

• 基础实验研究论著 •

黄曲霉毒素 B1 诱发昆明鼠高血氨的实验研究

林雅宁, 徐忠玉[△]

(中国人民解放军第一七五医院/厦门大学附属东南医院检验科, 福建漳州 363000)

摘要:目的 探讨黄曲霉毒素 B1 对昆明鼠血氨浓度的影响。方法 用黄曲霉毒素 B1 注射昆明鼠 10 周, 每 2 周测定 1 次昆明鼠血氨浓度。结果 毒素组昆明鼠血氨浓度从 40 $\mu\text{mol/L}$ 上升到 170 $\mu\text{mol/L}$, 同时毒素组的血氨浓度相对于对照组呈上升趋势。结论 黄曲霉毒素 B1 可诱发昆明鼠高血氨, 推测黄曲霉毒素 B1 会干扰尿素循环。

关键词:黄曲霉毒素 B1; 氨; 小鼠, 近交系

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.02.002

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)02-0132-02

Laboratory study on hyperammonemia of KM mouse induced by aflatoxin B1

Lin Yaning, Xu Zhongyu[△]

(Department of Clinical Laboratory, the 175th Hospital of PLA/Affiliated Dongnan Hospital of Xiamen University, Zhangzhou, Fujian 363000, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of aflatoxin B1 on blood ammonia in KM mouse. **Methods** KM mouse were injected with aflatoxin B1, and the blood ammonia was measured every two week, lasting 10 weeks. **Results** Aflatoxin B1 induced blood ammonia significantly higher than control group, and the blood ammonia rised from 40 $\mu\text{mol/L}$ to 170 $\mu\text{mol/L}$. **Conclusion** Hyperammonemia of KM mouse induced by aflatoxin B1 indicates that aflatoxin B1 can interrupt the urea cycle.

Key words: aflatoxin B1; ammonia; mice, inbred strains

黄曲霉毒素是由黄曲霉菌和寄生曲霉菌产生的一种对禽禽和人类危害大且最常见的真菌毒素, 通常所说的黄曲霉毒素主要是指黄曲霉毒素 B1^[1-3]。肝脏是消除体内氨的主要器官, 当肝脏病变时会导致肝功能不全。机体正常来源的血氨在肝内经尿素循环合成尿素的能力也大为降低, 从而导致血氨浓度增高。临床数据显示, 血氨升高的程度与肝病病情严重程度有密切的关系。黄曲霉毒素 B1 的靶器官是肝脏, 庄振宏等^[4]利用黄曲霉毒素 B1 注射小鼠, 通过差异蛋白组学方法, 发现尿素合成酶系中的关键酶氨甲酰磷酸合成酶 1 是一个显著下调的蛋白, 初步推测黄曲霉毒素 B1 会影响小鼠的尿素循环。本实验在前人的研究基础上通过黄曲霉毒素 B1 注射小鼠, 测定小鼠血氨浓度的动态变化, 为下一步研究黄曲霉毒素 B1 与尿素循环障碍的关系奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材料 黄曲霉标准菌株 133(*Aspergillus flavus* 133), 购自中科院菌种保藏中心, 雄性昆明种小白鼠购自福建医科大学实验动物中心, 鼠龄 5 周, 体质量 20 g。

1.2 仪器与试剂 电子天平 COBS 购自 COBS 公司, 旋转蒸发仪 RE-5258A 购自上海亚荣生化仪器厂; 紫外分光光度计 Cary50 购自英国瓦里安全有限公司。ELISA 试剂盒购自江苏微生物研究所、硫酸铵、苯酚购自重庆北碚化学试剂厂; 钨酸钠购自天津市大茂化学试剂厂; 亚硝基铁氰化钠购自上海三爱思试剂公司。所用试剂均为分析纯, 水为无氨蒸馏水。

1.3 方 法

1.3.1 黄曲霉毒素 B1 标准菌株的培养和提取 按参考文献^[5]的方法, 以大米作为培养基培养黄曲霉, 培养温度 30 $^{\circ}\text{C}$, 培

养 2 个月。利用 1:1 甲醇水萃取黄曲霉毒素, 50 $^{\circ}\text{C}$ 旋转蒸发浓缩, 最后用 ELISA 试剂盒测定黄曲霉毒素 B1 浓度。

1.3.2 黄曲霉毒素 B1 注射小鼠 将刚买来的昆明鼠分成 6 组, 饲养 1 周后开始注射剂毒素, 注射剂量参考文献^[4-6]。第 1~5 组为毒素组, 每组各 5 只, 每天腹腔注射 800 μL 黄曲霉毒素 B1, 第 6 组 15 只, 每天腹腔注射 800 μL 生理盐水。实验进行到第 10 周结束。

1.3.3 血氨浓度测定 参考文献^[7-8], 待注射黄曲霉毒素 B1 一定时间后采血, 肝素抗凝, 立即低温离心分离血浆, 建立紫外分光光度法检测血液中的氨浓度。首先精确配置 10、20、50、100、150、200、400 $\mu\text{mol/L}$ 的硫酸铵系列标准溶液建立标准曲线, 以空白管校正后于 630 nm 处测定光密度(OD)值, 将所测得的 OD 值对浓度进行线性回归。小鼠血氨测定步骤为: 离体血液肝素抗凝, 立即低温离心取血浆, 加入过量的 10% 的钨酸钠溶液和 0.5 mol/L 硫酸溶液使蛋白沉淀。血浆中的氨与硫酸形成硫酸铵而存留于血滤液中, 用酚次氯酸钠显色剂显色后于波长 630 nm 处测定 OD 值, 即可定量测定血氨。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件数据分析, 均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 统计检验采用 *t* 检验。

2 结 果

2.1 黄曲霉毒素 B1 的获得和浓度测定 成功提取到黄曲霉毒素, 按照试剂盒说明建立黄曲霉毒素 B1 标准曲线, 测定其浓度为 65.83 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.2 血氨浓度测定 建立紫外分光光度法检测血液中的氨浓度, 将所测得的 OD 值对浓度进行线性回归处理得回归方程: $Y = 157.24X - 3.7833$, 相关系数 $r^2 = 0.9964$, 根据硫酸铵与游

离氨的定量关系,即得游离氨浓度在 10~200 μmol/L 的定量线性范围(图 1)。注射黄曲霉毒素 B1 一定时间后(2、4、6、8、10 周)采血,测定 OD₆₃₀,计算血氨浓度(表 1),随着时间的推移毒素组的血氨浓度呈上升趋势。用生理盐水对照组的小鼠血氨浓度作分母,毒素组的血氨浓度作分子柱状图分析(图 2)。结果也显示随着时间的推移毒素组的血氨浓度相对于对照组呈上升趋势。

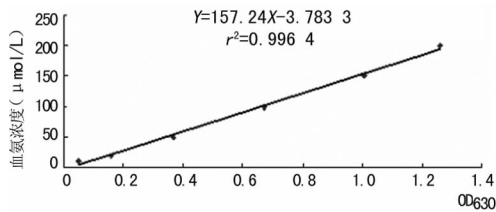


图 1 血氨标准曲线

表 1 黄曲霉毒素组血氨浓度的变化

注射时间(周)	血氨浓度(μmol/L)
0	40.76±6.54
2	68.55±9.56
4	75.36±5.05
6	98.95±11.04
8	119.91±14.09
10	172.33±13.98

3 讨论

黄曲霉毒素又称肝脏毒素,其毒害作用主要是损害肝脏。秦雪等^[9]通过差异蛋白组学推测黄曲霉毒素 B1 会损害肝脏,一定程度干扰尿素循环。尿素循环的功能是将有毒的氨合成无毒的尿素,从而避免高氨血症的发生。本研究通过黄曲霉毒素 B1 注射昆明鼠,注射量约 50 μg/次,建立紫外分光光度法检测血液中的氨浓度,测定血氨浓度的动态变化。实验显示,毒素组小鼠血氨浓度从 40 μmol/L 上升到 170 μmol/L,同时,随着时间的推移毒素组小鼠的血氨浓度相对对照组呈上升趋势,结果与其他相关推测一致,表明黄曲霉毒素 B1 干扰了尿素循环。

血氨浓度测定是本研究的一个关键技术。标本放置时间

越长,其血氨浓度越高,主要原因可能是血液细胞自身代谢或部分微生物代谢后产生氨致使其血氨浓度升高^[10-12]。本实验研究中,每次采血后用肝素抗凝,立即低温分离血浆进行血氨浓度测定,避免了血氨假阳性升高。

总之,本实验通过黄曲霉毒素 B1 注射小鼠,发现小鼠血氨浓度持续上升,推测黄曲霉毒素 B1 干扰了尿素循环,为下一步研究黄曲霉毒素 B1 与尿素循环障碍关系的研究奠定了基础。

参考文献

- [1] 白路. 黄曲霉毒素的危害[J]. 吉林农业, 2012, 263(1): 178-178.
- [2] 魏丽莉. 黄曲霉毒素对食品的污染及防治措施[J]. 粮油加工, 2008, 9(1): 86-89.
- [3] 安虹, 邹广迅. 黄曲霉毒素毒性效应机制的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(24): 15007-15012.
- [4] 庄振宏, 黄缘缘, 张峰, 等. 黄曲霉毒素 B1 对小鼠肝脏蛋白质组影响的初步研究[J]. 热带作物学报, 2010, 31(11): 2072-2079.
- [5] 庄振宏, 郑传琦, 汪世华. 黄曲霉培养条件的优化及黄曲霉毒素 B1 的提取[J]. 应用于环境生物学报, 2010, 16(5): 724-729.
- [6] 申海涛, 张祥宏, 黄向华, 等. 黄曲霉毒素 G1 长期灌胃对 NIH 小鼠肺泡上皮细胞 SP2C 和 PCNA 表达的影响[J]. 肿瘤防治研究, 2007, 3(3): 325-327.
- [7] 刘福, 曾芝兰. 血氨浓度测定方法学研究[J]. 儿科药学杂志, 2007, 13(1): 22-25.
- [8] 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典: 二部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2005: 134.
- [9] 秦雪, 代智, 崔杰峰, 等. 黄曲霉毒素 B1 诱发树鼯肝癌过程中的差异表达蛋白质分析及意义[J]. 中华检验医学杂志, 2006, 29(6): 538-542.
- [10] 盛太平, 徐元宏, 李涛, 等. 血氨检测的临床适应证及其价值探讨[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(6): 565-567.
- [11] 李晓光, 于永光, 王丽艳, 等. 血氨检测在临床肝脏疾病中的应用价值[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(11): 1340-1342.
- [12] 陆铭, 刘国珍. 重型肝炎、肝硬化血氨的检测及其临床意义[J]. 肝脏, 2007, 12(5): 427-428.

(收稿日期: 2013-08-13)

(上接第 131 页)

- [4] Zhou Z, Hu X, Huang Y, et al. Molecular cloning and identification of a novel Clonorchis sinensis gene encoding a tegumental protein[J]. Parasitol Res, 2007, 101(6): 737-742.
- [5] Zhou Z, Xia H, Hu X, et al. Oral administration of a Bacillus subtilis Spore-based vaccine expressing Clonorchis sinensis tegumental protein 22. 3kDa confers protection against Clonorchis sinensis [J]. Vaccine, 2008, 26(15): 1817-1825.
- [6] 徐劲, 胡旭初, 应康, 等. 华支睾吸虫成虫全长基因表达文库的构建和基因表达谱的建立[J]. 中国人兽共患病杂志, 2004, 20(5): 383-386.
- [7] Arantxa D, Ruiz DE, Angeles M, et al. Cloning and expression in

Escherichia coli of a Fasciola hepatica gene encoding a calcium-binding protein [J]. Mol Biochem Parasitol, 2007, 101(1/2): 13-21.

- [8] Hoffmann KF, Strand M. Molecular characterization of a 20. 8 kDa Schistosoma mansoni antigen; Sequence similarity to tegumental associated antigens and dynein light chains [J]. J Biol Chem, 2007, 272(23): 14509-14515.
- [9] Fitzsimmons CM, Stewart TJ, Hoffmann KF, et al. Human IgE response to the Schistosoma haematobium 22. 6 kDa antigen [J]. Parasite Immunol, 2008, 26(2): 371-376.

(收稿日期: 2013-08-11)