

串珠镰刀菌素及其毒理

章 红 李季伦

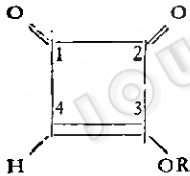
(北京农业大学生物学院, 北京)

以自陕西省黄龙县分离到的串珠镰刀菌胶孢变种 (*Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*) 作为产毒菌株进行培养, 用离子交换法从其培养物中提取到毒素纯结晶。经紫外、红外及核磁共振等波谱分析, 证明此毒素为串珠镰刀菌素 (moniliformin)。它可使雏鸭心电图发生异常变化。

北京鸭心肌组织培养表明, 先加适量硒可在一定程度上抑制串珠镰刀菌素毒性, 后补加适量硒对毒素毒性无影响。此外, 该毒素可使北京鸭和大白鼠心肌细胞膜通透性加强。实验结果支持了克山病的真菌毒素中毒学说, 提出串珠镰刀菌素可能是克山病的直接致病因子。

关键词 串珠镰刀菌素; 毒性

串珠镰刀菌素是某些镰刀菌的代谢产物, 因最初是由 Cole 等人^[1]于 1973 年自串珠镰刀菌 (*Fusarium moniliforme*) 的培养物中提取出来的, 而被命名为串珠镰刀菌素 (moniliformin)。其化学结构式为:



式中 R 为 H、Na 或 K。其自由酸 (R=H) 的化学名称为 3-羟基环丁-3 烯-1,2 二酮。串珠镰刀菌素通常以 Na 盐或 K 盐形式存在于自然界中^[2]。

除串珠镰刀菌外, 已报道的还有: *F. moniliforme* var. *subglutinans*, *F. acuminatum*, *F. concolor*, *F. fusarioides*, *F. avenaceum* 和 *F. graminearum* 等 13 种菌株可产生串珠镰刀菌素^[3-5]。这些菌广泛分布于自然界, 有些菌株产毒能力很强, 如一种串珠镰刀菌胶孢变种 (*F. moniliforme* var. *subglutinans*), 在每公斤培养物中, 可以产生高达 30 多克的串珠镰刀菌素^[4]。

据报道, 串珠镰刀菌素对动物有强烈的毒害作用^[3,6]。对 7d 龄北京鸭的 LD₅₀ 为 3.65mg/kg, 对雌性和雄性大白鼠的 LD₅₀ 分别为 41.57mg/kg 和 50.0mg/kg。主要症状是危害心脏。

鉴于国外的工作已证明串珠镰刀菌素是水溶性的且对动物心血管系统有强烈损害作用的毒素, 结合对我国一种地方性心脏病——克山病的临床和病理特征以及流行规律的认识, 我们怀疑串珠镰刀菌素或许是诱发克山病的真实病因。因此, 我们从 1983 年起开始了对此毒素的研究。

材 料 和 方 法

(一) 纯毒素的制备

1. 产毒菌株: 自陕西省黄龙县克山病采集的霉玉米中, 分离出串珠镰刀菌胶孢变种 (*F. moniliforme* var. *subglutinans*), 作为产毒试验菌株。

2. 产毒培养: 以灭菌玉米粒为培养基。500

本文于 1988 年 3 月 3 日收到。

本校中心实验室沈其丰和颜衍禄等先生帮助进行核磁共振和光谱分析; 本校医学院邓泽沛、卢胜明同志协助进行细胞膜透性试验及照相; 乔惠理、游九芬同志协助测量心电图及心电图分析, 在此一并致谢。

ml 三角瓶中装干燥玉米粒 90g, 加水 85ml, 经 1 kg/cm^2 灭菌 1h。冷却后, 接种该菌株, 25°C 培养 10d 后, 转至 $0-5^\circ\text{C}$ 培养 7d (低温促进毒素生成), 再转至 25°C 培养 10d。用薄层层析法检测毒素(方法见后)。

3. 毒素的提取和纯化: 我们改进并简化了 Steyn 等人的方法^[7,11]。直接加约 2 倍重量的蒸馏水用组织捣碎机将玉米培养物 (2kg) 粉碎, 经抽滤后含毒素的水提液用 1/4 体积三氯甲烷除去一些色素及脂溶性物质后, 将水溶液上 201×7 型阴离子交换柱 (Cl^- 型, 60—70 目, $3 \times 40\text{cm}$), 流速 8ml/min 。先用约 4L 无离子水洗脱去杂, 再以 6L 0.2mol/L NaCl 水溶液洗脱, 大约 2L 后有大量毒素被洗脱下来(用薄层层析法检测)。收集富含毒素部分, 浓缩至干。用无水甲醇溶解毒素, 过滤去除不溶于甲醇的 NaCl, 将滤液浓缩至干, 加入少量水及甲醇, 最后在甲醇-水中得到浅棕色针状毒素结晶, 并在此基础上又进行重结晶, 以便获得纯毒素结晶。此法与 Steyn 等人的方法相比, 具有经济、快速的特点。

4. 毒素鉴定:

(1) 薄层层析法: 采用 $200\mu\text{m}$ 厚硅胶 G 薄板 ($2.5 \times 7.5\text{cm}$), 展开剂为氯仿+甲醇(体积比为 3:2), 以 1% 2,4-二硝基苯酚的 3mol/L H_2SO_4 液为显色剂。

(2) 高压液相色谱: 采用美国 Varian 公司的 LD5000 高压液相色谱仪, C_{18} 反向柱, 流速 1.0ml/min , 毒素配成甲醇溶液。

(3) 紫外吸收光谱: 采用美国 Beckman 公司的 Du-8B 紫外扫描仪, 毒素配成甲醇溶液。

(4) 红外吸收光谱: 采用日本岛津 IR-435 型红外光谱仪, KBr 压片, $400-4000\text{cm}^{-1}$ 区段进行扫描。

(5) 核磁共振波谱: 采用日本 Jeol 电子公司的 Fx-90Q 核磁共振分析仪, 用无离子水将毒素溶解后, 以二氧六环(位移 67.4ppm) 作内标, 进行碳谱分析。

(6) 离子含量分析: 采用上海分析仪器厂生产的 6400 型火焰光度计。

(二) 毒素对雏鸭心电图的影响

取 3—4d 龄北京雏鸭(体重 50—60g), 采用日本三荣公司产品 362 型多导仪进行心电监测描

记。将雏鸭背位固定在实验台上, 左翼基部和左下肢皮下同时插入针状电极, 待动物安静后, 描记 II 导程正常状态下的心电图作为自体对照, 描记一段时间后, 经灌胃法给毒 12mg, 给毒后记录时间并开始心电监测。

(三) 串珠镰刀菌素对人工培养的北京鸭心肌组织的影响

目前还未见有关北京鸭心肌组织培养的报道。我们主要参照北京大学生物系及北京中医研究院^[12]的大鼠心肌组织培养方法进行鸭心肌组织培养的。

1. 北京鸭心肌组织培养方法: 取 19d 龄鸭胚无菌操作取出鸭胚, 去心包膜, 切取心室, 在无 Ca^{++} 、 Mg^{++} 磷酸缓冲液 ($\text{pH}7.4-7.6$) 中洗去心内残留血块, 置组织于 Hank's 液冲洗二次, 将组织剪成约 0.5mm^3 或更小的碎块, 使组织块呈匀浆状。用 199* 营养液(内含 20% 小牛血清)分装于 $6 \times 3 \times 2\text{cm}$ 的组织培养瓶内。每瓶 3ml 组织悬液, 并使组织悬液浓度调整到每瓶 15—25 个细胞团。加塞后 37°C 孵育, 每 2—3d 更换一次营养液。

孵育 24h 后可见细胞贴壁生长, 3d 后可见有速率不同的自发性搏动。

2. 毒性试验: 将培养 5—7d 已有节律规则搏动的心肌组织在倒置显微镜下, 于 $36 \pm 1^\circ\text{C}$ 恒温条件下进行实验观察, 记录给药前后搏动速率并观察节律、范围和强度。试验过程中瓶口密闭, 严格控制环境温度, 避免震动, 将药物缓慢加入瓶内, 避免冲击细胞。试验进行以下处理:

(1) 加入不同浓度的毒素, 15min 后观察记录, 随后更换新鲜营养液, 再观察细胞团收缩恢复情况。

(2) 先加适量的 H_2ScO_4 溶液 ($3.18 \times 10^{-10}\text{mol/L}$), 15min 后加入不同浓度的毒素。

(3) 先加入不同浓度的毒素, 15min 后加适量 H_2ScO_4 ($3.18 \times 10^{-10}\text{mol/L}$)。

(4) 加入不同浓度的毒素, 再加入适量 ATP ($0.60 \times 10^{-3}\text{mol/L}$)。

(四) 串珠镰刀菌素对大白鼠及北京鸭心肌

* 199 培养基为中国科学院生物物理研究所生化试剂厂产品。

细胞膜通透性的影响

辣根过氧化物酶 (HRP) 示踪法是以形态学手段研究细胞膜通透性的一种常用方法。它不会被研究的组织发生病变, 不能穿透完整肌膜, 当肌膜通透性增大时, 则可进入心肌细胞内。给动物注射 HRP 并在体内循环一段时间后, 将心肌冰冻切片放入含有二氨基联苯胺 (DAB) 和过氧化氢 (H_2O_2) 的孵育液中, 在 HRP 的作用下含有 HRP 的部位释放出原子氧, 后者使 DAB 氧化成褐色的 HRP 反应物沉淀, 含这种反应物的肌细胞数量多少和颜色深浅, 可反映肌膜通透性变化的程度。

实验动物采用三只雌性离乳大白鼠, 体重分别为 360g, 330g 和 370g。

HRP: 中国科学院上海生物化学研究所产品 RZ2.5—3.0, 批号 800639。

动物处理方法及组织化学操作主要参照 Boutet^[10] 及白求恩医科大学^[11] 介绍的方法。我们又根据具体情况作了一些改进。主要步骤如下: 分别将三只大白鼠麻醉, 其中二只经颈静脉注射 1ml 毒素的生理盐水溶液, 毒素用量为 21 mg/kg, 分别于给毒后 30min 及 60min 经颈静脉留置导管注射 HRP (用量 7mg/kg, 溶于 0.5 ml 生理盐水)。另一只大白鼠只经颈静脉注射 HRP 作对照。注射肝素抗凝。6min 后由左心室心尖处用生理盐水灌注冲洗出血液, 再用固定液^[9]灌流固定。将心脏取下纵切成 0.3—0.4cm 厚的组织块, 浸泡在醛固定液^[9]中 4—6h, 冰冻切片厚 6—8 μ m, 经二甲胂酸钠缓冲液冲洗后, 置于 G-K 孵育液^[9]中孵育 15—30min, 光学显微镜下观察。

另外, 我们又用 6 只 7d 龄北京鸭进行试验, 试验前将 2 只雏鸭不供毒作对照, 4 只雏鸭毒素用量各为 11.25mg/kg·d, 每天分 5 次灌胃法给毒素水溶液, 自由采食法饲喂 7d, 饲喂过程中未见实验动物有任何异常。试验时, 由隐静脉注射 HRP (用量为 10mg/kg), 6min 后, 开胸由左心室心尖处用生理盐水冲洗, 灌注固定以后步骤如上述。

结果和分析

(一) 纯毒素的制备和鉴定

我们用改进后的方法, 自 2kg 干培养物中提出约 2g 串珠镰刀菌素纯结晶, 结晶呈棕黄色长针状, 见图 1。

薄层层析结果表明, 该毒素在以氯仿+甲醇作展开剂时, R_f 值为 0.4—0.5。喷以显色剂后呈桔红色; 高压液相色谱分析, 在 230nm、260nm 处分别得到单一峰的毒素, 表明提取的毒素纯度较高, 紫外光谱分析, 该毒素分别在 227.5nm 及 259.2nm 处

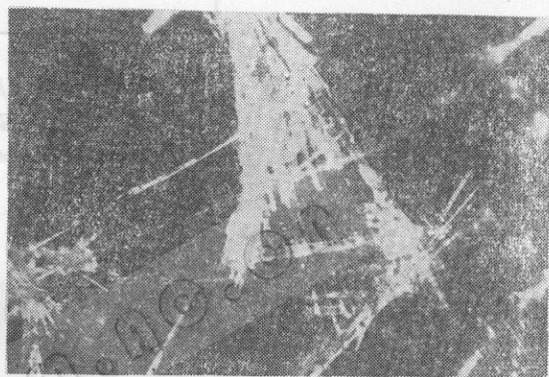


图 1 纯毒素针状结晶

Fig 1 The needle-like crystals of moniliformin

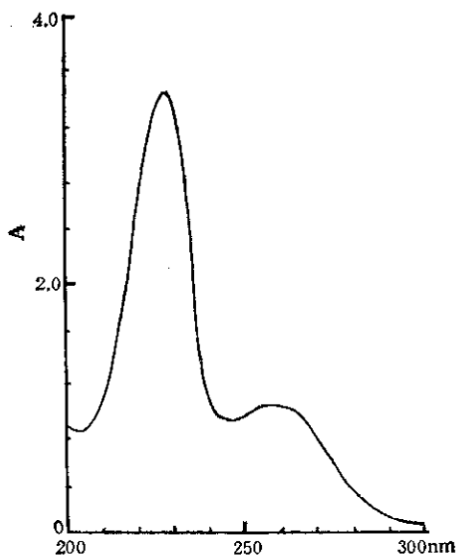


图 2 结晶样品紫外吸收图谱

Fig. 2 Ultraviolet absorption spectrum of moniliformin with maxima at 227.5 and 259.2nm

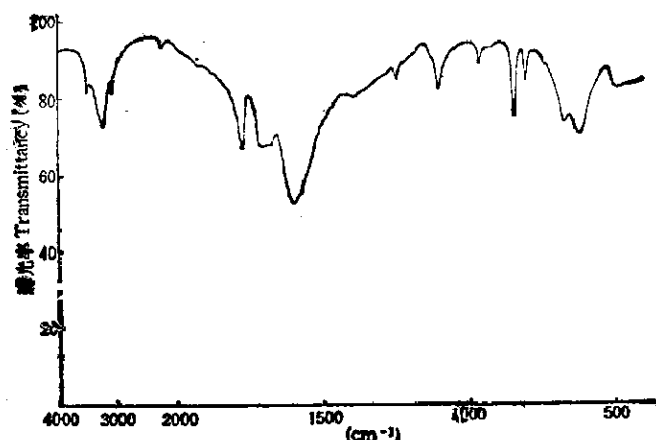


图3 结晶样品红外吸收图谱

Fig. 3 Infrared absorption spectrum of moniliformin

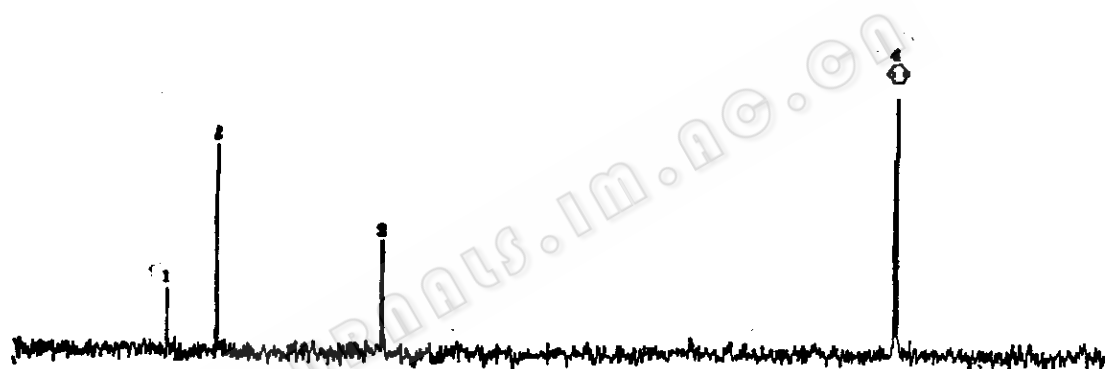


图4 结晶样品核磁共振图谱

Fig. 4 Nuclear magnetic resonance spectrum of moniliformin

No.	Freq(Hz)	ppm	INT%
1	4815.91	213.720	277
2	4596.18	203.969	730
3	3849.11	170.815	437
4	1518.79	67.400	5531

有吸收峰(见图2);红外光谱分析表明,毒素在1780、1709、1682、1605、1107和846 cm^{-1} 均有吸收(见图3);该毒素的核磁共振图谱见图4。这些图谱均同国外报道的串珠镰刀菌素的一致^[12]。毒素中离子含量分析表明,我们提取的毒素是以钠盐形式存在的。

(二) 毒素对雏鸭心电图的影响

在以同体作为对照,对比同一只雏鸭

给毒前后正常与异常心电图的试验中,受试的三只雏鸭在14—54min内先后死亡。给毒后4min左右,心率由给毒前的240—300次/min变为360—480次/min,后来心率又逐渐变慢,出现心律不齐,最后停止收缩。从死亡时间看,似乎雏鸭对毒素的敏感性有较大差别,但三只受试雏鸭的心电图变化趋势基本相似:供毒时血钾升高,引起高血钾症,由于心肌缺血,心房开

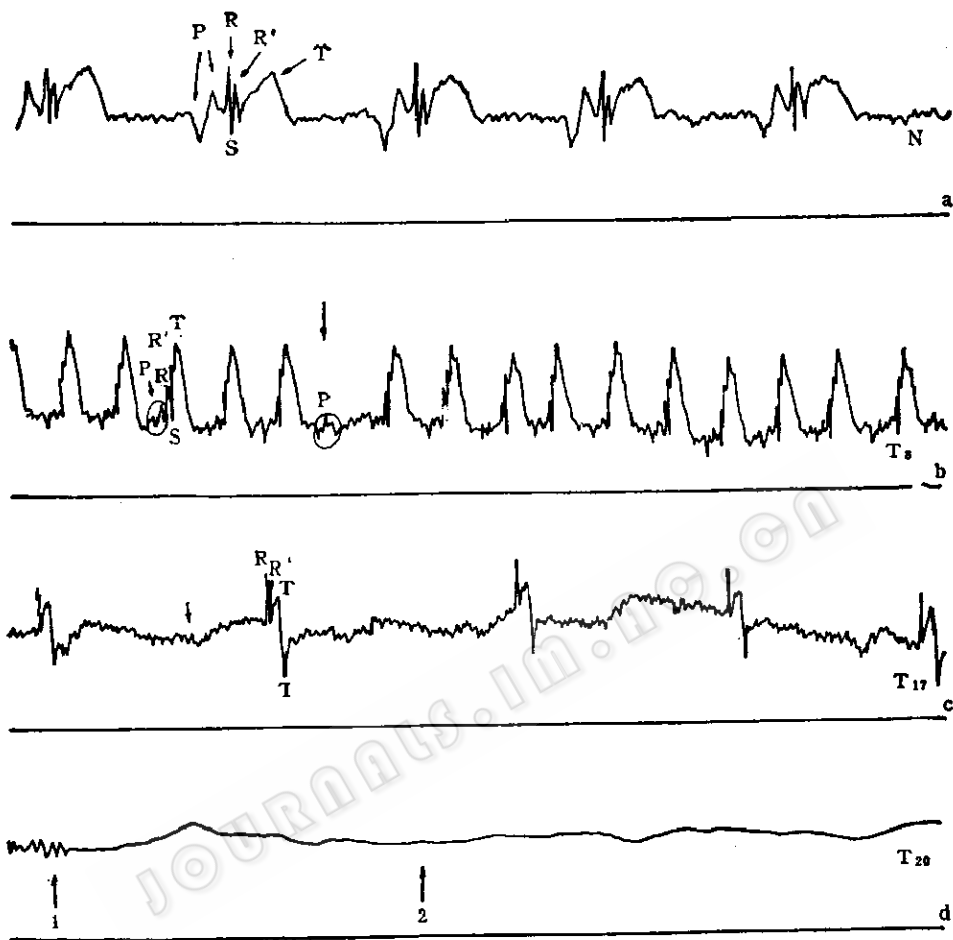


图5 2号鸭给毒前后心电图对比图

a. 正常情况下的心电图; b—d. 给毒后 8min、17min 和 20min 时的心电图
(详细说明见本页注释)。

Fig. 5 Comparison of Electrocardiogram (ECG) of No. 2 Beijing duckling before and after administration of moniliformin

a. the ECG under normal condition; b—d. the ECG at 8, 17 and 20 minutes after administration of moniliformin separately.

a. 2号鸭给毒前II导联心电图,示各波形状(走纸速度=100mm/s)。双相P波,RSR'型心室去极波,正向T波,S-T段在基线上约3mm,心率240次/min,窦性心律。

b. 给毒后8min心电图(走纸速度=50mm/s)。双相P波,电压变低,RSR'电压变低,S-T段上移约9mm(提示心肌损伤),出现二度房室传导阻滞(2nd-degree atrioventricular block)(箭头所指),心律不整,心率稍增快(360次/min)(提示心肌早期缺血生理性代偿作用;RSR'电压变低意同),T波高耸(提示高血钾症)。

c. 给毒后17min心电图(走纸速度=25mm/s)。无P波,只有心房波棘(即心房颤动)(箭头所指),心悸过缓,心率30次/min,心律不整,RR'-M型心室去极波,双相T波(提示心肌缺血)。

d. 给毒后20min心电图(走纸速度=25mm/s)。心室颤动(箭头1所指),随即发展为心脏停搏(箭头2所指)。

表 1 不同浓度串珠镰刀菌素对心肌组织的影响

Table 1 Effect of moniliformin of different concentration on cardiac muscle tissue culture of Beijing ducklings

毒素浓度(mol/L) Concentration of moniliformin	心肌组织搏动速率(次/min) Pulse rate (beats per min)		P
	给毒前 Moniliformin treatment before	给毒后 Moniliformin treatment after	
2.75×10^{-8}	37.60 ± 26.01	38.10 ± 29.33	>0.05
2.75×10^{-4}	50.84 ± 28.89	29.24 ± 27.49	<0.01
2.75×10^{-3}	54.59 ± 24.09	0	

始扩张。S-T 段上升示心肌劳损,进而发生不仅心房扩张,且左右心室扩张。同时保持血钾过高,很快心室颤动,导致心脏停搏,造成死亡(见图 5)。

(三) 串珠镰刀菌素对人工培养的北京鸭心肌组织的影响

当心肌细胞团出现正常搏动时,在倒置显微镜下观察并记录心肌组织在加毒前后的收缩情况,当加入不同浓度的毒素,心肌组织收缩情况见表 1。已中毒的心肌组织虽然经置换新鲜培养液以除去毒素,仍不能恢复正常收缩,说明串珠镰刀菌素对心肌细胞已造成严重伤害。给毒前 15min 加入一定量的硒 (3.18×10^{-10} mol/L H_2SeO_4),再加入 2.75×10^{-4} mol/L 毒素时,可以减轻毒素对心肌细胞的毒性,心搏次数由 57.08 ± 40.76 次/min 仅降至 44.74 ± 41.39 次/min ($p < 0.05$);但先加毒素,15min 后再加硒时,心搏次数由 31.03 ± 29.01 次/min 降至 24.93 ± 32.43 次/min ($p > 0.05$),这说明硒只在一定范围内有一定的防护作用,而没有治疗作用。给毒后再给以一定量的 ATP (0.60×10^{-3} mol/L) 时,可见心肌细胞虽然未能达到正常水平收缩,但收缩速率和节律异常有所改善。这些试验结果与硒对预防克山病起一定作用,ATP 可以缓解克山病病情发展的现象是一致的。

(四) 串珠镰刀菌素对大白鼠及北京鸭心肌细胞通透性影响的初步试验

我们用辣根过氧化物酶 (HRP) 示踪法,观察了串珠镰刀菌素对活体大白鼠和北京鸭心肌细胞膜透性的影响。发现只注射 HRP 的对照组大白鼠心肌细胞膜间隙中含有反应产物,呈褐色。心肌细胞内不含反应产物,呈浅黄色,细胞间界限清晰(见图版 I-1)。给毒后 30min 和 60min 后注射 HRP 的大白鼠,每张心肌切片中可见一些含反应产物的肌细胞多为散在分布,在一定区域内相对集中。含反应产物的心肌细胞主要位于左心室内层、室间隔和乳头肌。在同一心肌切片上常见含反应产物的肌细胞颜色深浅不一致,有的浓重,有的较浅,表明细胞膜受损的程度不等(见图版 I-2)。有些心肌细胞中可见含反应产物的肌细胞围绕毛细血管分布。

用北京鸭作实验动物的结果与大白鼠的相似,都可见心肌细胞膜在毒素作用下有不同程度的损伤。含反应产物的心肌细胞主要位于左心室内层、室间隔和乳头肌。

讨 论

北京鸭受串珠镰刀菌素的毒害所表现出的以心血管系统遭受毒害的主要特征,与人类克山病的症状有相似之处。白求恩医科大学根据用克山病病区粮饲喂大白鼠

所进行的大量研究,明确提出克山病病因不是由于缺硒,而是来源于病区粮食中的一种“致病因子”^[10],但未明确此“致病因子”究竟是何物。我们认为这个“致病因子”很可能就是病区粮食中所污染的串珠镰刀菌素。我们用串珠镰刀菌素做 HRP 示踪实验所得的结果,与白求恩医科大学用克山病病区粮得到的结果一致。由于串珠镰刀菌素本身具有离子载体的化学结构,很可能与细胞膜上的 K^+ 或 Na^+ 发生交换,干扰膜上 K^+ 、 Na^+ 平衡,从而破坏心肌细胞膜的正常透性。串珠镰刀菌素首先损害心肌细胞膜透性,继而作用于产能细胞器——线粒体,选择性地抑制丙酮酸脱氢酶系活性^[13-14],减少 ATP 合成。使心肌细胞因得不到能量供应而导致心肌劳损,严重者因心力衰竭而死亡。我们在心肌组织培养试验中还发现,加毒前补加适量硒,在一定程度上有抑制毒素毒性的作用,而加毒后补硒对毒素毒性无影响。这个结果说明硒对细胞膜有一定的保护作用,并且与硒可以预防克山病,而用硒不能治疗克山病的现象是一致的。我们认为克山病的直接病因不是缺硒,而很可能是串珠镰刀菌素。虽然有多数病区确实缺硒,但以缺硒作为克山病直接病因的学说难以解释为什么江浙一带缺硒的平原地区并不发生克山病。克山病多发生在山区农村或森林沼泽地带,病区生态条件有利于产毒真菌的大量滋生和产生毒素。串珠镰刀菌素作为水溶性毒素被雨水冲洗而污染水

源。加上收获粮食时,如遇阴雨,场院中的谷物易遭真菌侵染致使粮食发生霉变并产生毒素。人们经常食用含有毒素的粮食和水,而导致克山病的发生。近年来,由于农村实行改革,生产增收,农民生活水平提高,不少病区改饮自来水,不再吃霉变粮食,克山病的发病率已大大下降。

为了确证串珠镰刀菌素是克山病的直接病因,还需要以大动物进行慢性中毒试验。同时,也应研究快速检测毒素和消除毒性的简便方法,以便有效地防治克山病。

参 考 文 献

- [1] Cole, R. J. et al.: *Science*, **197**: 1324—1326, 1973.
- [2] Springer, J. P. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **96**: 2267—2268, 1974.
- [3] Kriek, N. P. J. et al.: *Food Cosmet. Toxicol.*, **15**: 579—587, 1977.
- [4] Rabie, C. J. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **43**: 517—521, 1982.
- [5] Scott, P. M. et al.: *ibid.*, **53**(1): 196—197, 1987.
- [6] Burmeister, H. R. et al.: *ibid.*, **40**(6): 1142—1144, 1980.
- [7] Steyn, M. et al.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **61**(3): 578—580, 1978.
- [8] Rable, C. J. et al.: *J. Agric. Food Chem.*, **26**(2): 375—379, 1978.
- [9] 李连达等: *中医杂志*, **6**: 68—70, 1980.
- [10] Bouter, M. et al.: *Lab. Invest.*, **34**(5): 482—488, 1976.
- [11] 白求恩医科大学: *白求恩医科大学学报副刊,心脏生化研究进展*, 1984.
- [12] Cole, R. J. et al.: *Handbook of toxic fungal metabolites*, Academic Press, New York, pp. 893—897, 1981.
- [13] Thiel, P. G.: *Biochem. Pharmacol.*, **27**: 483—486, 1978.
- [14] Burka, L. T. et al.: *ibid.*, **31**(1): 79—84, 1982.

STUDY ON TOXICOLOGICAL MECHANISM OF MONILIFORMIN

Zhang Hong Li Jilun

(College of Biological Sciences, Beijing Agricultural University, Beijing)

A mycotoxin was extracted and purified from a strain of *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* isolated from mouldy corn seeds harvested in a serious Keshan disease region in Shaanxi Province. The purification procedure involves water extraction, ion exchange chromatography, desalination and crystallization. Its UV spectrum, IR spectrum and NMR are identical with that of the moniliformin. The toxin is highly toxic to young Beijing ducklings. The electrocardiogram (ECG) of the duckling was changed immediately after feeding with moniliformin.

The cardiac muscle cells of Beijing ducklings were injured by the toxin. Toxicity may be alleviated to certain extent by applying ad-

equate dosage of Selenium (3.18×10^{-10} mol/L of H_2SeO_4) prior to moniliformin treatment. The permeability of the cardiac muscle cells of the rats and young ducklings was damaged posterior to the injection of the toxin as tested by extracellular macromolecular tracer (HRP) method.

The relationship between moniliformin and Keshan disease was discussed. We consider that the moniliformin may be the causal agent of the disease.

Key words

Moniliformin; Toxicity

图 版 说 明

Explanation of plate

1. 只注射 HRP 的对照组大白鼠心肌的横切面 ($\times 132$)。示细胞膜间隙中含有 HRP 反应物呈褐色, 心肌细胞内不含反应物。黑色小点示红细胞。
2. 给毒后注射 HRP 的大白鼠乳头肌纵切面 ($\times 100$)。示含反应产物的肌细胞呈褐色。黑色小点示红细胞。
1. Cross section of the rat heart muscle treated with horseradish peroxidase (HRP) only, showing the brown color product of HRP distributed in myocardial interstitium. The dark spots are red blood cells.
2. Longitudinal section of the rat heart muscle treated with moniliformin and followed by HRP, showing the brown color product of HRP within the muscular cells. The dark spots are red blood cells.