

单端孢菌素类毒素对机体免疫机能的影响

张祥宏 孙旭明 曹文军

(河北医科大学基础所病理室 石家庄市 050017)

单端孢菌素类毒素(Trichothecene)是 T-2 毒素(T-2 toxin)、雪腐链刀菌烯醇(Nivalenol, NIV)、脱氧雪腐链刀菌烯醇(Deoxynivalenol, DON; 又名呕吐毒素, Votoxin, VT)、Verrucaric A (ver A)、Scirpentriol(STO)等一类毒素的总称,是粮食中最常见的一类污染性霉菌毒素,多为镰刀菌产生。国内学者研究表明^[1~4],镰刀菌及单端孢菌素类毒素在我国食管癌高发区居民饮食中的检出率和含量均明显高于低发区,是食管癌高发区居民饮食中的优势污染霉菌和霉菌毒素,引起了国内肿瘤工作者的高度重视。但实验室研究表明^[5~7],在该类霉菌毒素中,除 T-2 毒素和 NIV 对实验动物具有致突变作用外,其它则尚未证明有明显致突变作用。因此,该类毒素在肿瘤高发区恶性肿瘤发生发展中的作用尚不甚明了。一般认为,肿瘤的发生是一包括内因外因多因素和多阶段的复杂过程,其中机体的免疫状态在肿瘤的发生发展过程中发挥重要作用。近年来国外学者初步探讨了单端孢菌素类毒素对动物机体免疫机能的影响,综述如下。

1 单端孢菌素类毒素对细胞因子分泌和其基因表达的影响

以细胞原代培养体系分析多种单端孢菌素类毒素: DON, NIV T-2 毒素及 15-乙酰 DON(15-ADON), 3-乙酰 DON(3-ADON) 和 Verrucaric A (ver A) 对体外培养的小鼠脾脏 CD4 + T 细胞因子分泌及其基因表达的影响。培养上清经 ELISA 分析结果发现, CD4 + T 细胞在 Con A 刺激下,不同浓度的单端孢菌素类毒素处理第 2d, 所有上述受试毒素均可抑制 IL-2, IL-4 和 IL-5 的产生,但在处理第 7d, 除 T-2 和 Ver A 外的其它毒素均可导致培养上清中的 IL-2 明显增高; 另外, 上述所有受试毒素可使 IL-4 和 IL-5 明显增高。使用逆转录酶多聚酶链反应(RT-PCR)结合 Southern 分析方法对毒素处理第二天总 RNA 分析结果表明, VT(50 和 100ng / ml), NIV(50, 100,

250ng / ml), 3-ADON (1500ng / ml), 15-ADON (100ng / ml), T-2(0.5ng / ml) 和 Ver A (25, 50, 100pg / ml) 可诱导 IL-2 mRNA 高表达; VT(50ng / ml), NIV(50ng / ml) 和 Ver A(25, 50, 100pg / ml) 可诱导 IL-4 mRNA 高表达; VT(50ng / ml) 可诱导 IL-5 mRNA 高表达; 而 15-ADON(100ng / ml) 和 Ver A(50pg / ml) 则诱导 IL-6 mRNA 高表达。若受试单端孢菌素类毒素浓度超过上述水平, 则 IL mRNA 在转录水平上受到抑制。可见, 单端孢菌素类毒素根据毒素种类、浓度和处理时间不同, 对 CD4 + T 细胞 IL 分泌和 mRNA 的表达可表现为抑制作用又可表现为诱导作用^[8]。

2 单端孢菌素类毒素对免疫细胞增殖的影响

Azcona-Olivera 等^[8]观察了连续 DON 处理对体外培养的 CD4 + 脾细胞 IL 分泌和 mRNA 水平的影响。结果发现在浓度为 250ng / ml 和 100ng / ml 的 DON 作用下, 经 Con A 刺激的 CD4 + 细胞在培养第 7d 时, 其上清 IL-2, IL-4 和 IL-5 明显增加。与此同时, 对细胞增殖情况的分析表明, 尽管在上述浓度的 DON 处理 3d 之内, 培养的 CD4 + 细胞总细胞数与对照无明显区别, 但 VT 处理第 5d 始, 细胞数明显减少, 活细胞数亦明显降低。提示 VT 在引起 CD4 + 脾细胞 IL 分泌和其 mRNA 的表达式的同时, 可引起细胞增殖的抑制。对体外培养的 CH12LX B 细胞的研究结果也表明^[12], 在较高剂量 DON 作用(100ng / ml)下, CH12LX 细胞活性与功能均受抑制; 当 DON 浓度达到 200ng / ml 时培养细胞的数目亦明显下降。可见 DON 对体外培养的 T 和 B 细胞的增殖均有抑制作用。

3 单端孢菌素类毒素对免疫细胞蛋白质合成的影响

以逆转录酶多聚酶链反应(RT-PCR)结合 Southern

分析方法研究口服不同剂量的 DON 2h 和 4h 后 B6C3F1 小鼠脾、肝、肾、小肠等组织内细胞因子 mRNA 水平和蛋白质合成的变化,发现给予 DON 处理后,数种细胞因子的 mRNA 均增高,其中 25mg/kg 剂量组最为明显。从不同组织器官分析,IL-1 β , IL-6 mRNA 水平在脾脏增加最为明显; TNF- α mRNA 的增高亦以脾脏最著; TNF- β mRNA 在肾脏增加最明显,而在肝脏和小肠增加较少; TNF- γ 的增高则以脾脏最高,其次依次为小肠、肝、肾; IL-2 mRNA 的增加主要在脾脏。DON 对 TH2 细胞因子、IL-4 和 IL-5 或看家基因的 mRNA 无明显影响。以 ¹⁴C-Leucine 摄入法分析经口给予 DON 3h 后 DON 对体内蛋白合成的影响,发现 DON 5mg/kg 和 25mg/kg 两组动物蛋白质合成的抑制率分别 $\geq 20\%$ 和 $\geq 50\%$ 。给药 6h 后,5mg/kg 组蛋白质合成恢复正常,而 25mg/kg 组在给药后 9h 蛋白质合成抑制率仍大于 70%。因此,可见经口给予 DON 后,动物体内 proinflammatory 和 TH1 类细胞因子 mRNA 暂时升高,同时伴有蛋白质合成的抑制^[10]。

另有研究表明,以 25×10^{-4} 的 DON 饲喂小鼠,可使其血清总 IgA 升高而 IgM 和 IgG 明显降低^[11]。而以较低浓度的 DON, 15ADON 和 Zearalethone 饲喂小猪,也可造成实验组小猪 α 球蛋白水平降低,抗 SRBC 的抗体滴度下降^[12]。体外培养的 CH12LX B 细胞在高剂量 DON 作用 ($>100\text{ng/ml}$) 下, IgA 和 IgM 的产生均受抑制;但在 5~50ng/ml 的浓度范围内,却可轻度刺激 IgA 的分泌。DON 浓度 $>100\text{ng/ml}$ 时,CH12LX 细胞的活性与功能、DNA 和蛋白质的合成均受抑制^[13]。

4 单端孢菌素类毒素对单核吞噬细胞系统的影响

在一次腹腔注射 Sephadex 悬液后分离 21d 龄火鸡腹腔巨噬细胞,观察 DON, 3-ADON, Scirpentriol (STO), 15-acetylscirpentriol (15-MAS) 体外直接作用对吞噬细胞的影响,不同浓度的毒素处理 1h 后,所有 4 种毒素对吞噬细胞均具有剂量相关的抑制效应。当浓度为 $50\mu\text{g/ml}$ 时, DON 可明显降低吞噬细胞的贴附、抑制对调理素化的 SRBC 的吞噬作用并降低每个吞噬细胞吞噬 SRBC 的数目。浓度为 $200\mu\text{g/ml}$ 时,对未调理素化的 SRBC 的吞噬作用亦降低。形态学观察发现,随 DON 剂量的增加,受损伤吞噬细胞比例增加。3-ADON 和 STO 处理后吞噬细胞活性降低。此外, STO

和 15-MAS 可降低吞噬细胞贴附,而 3-ADON, STO 和 15-MAS 可诱导吞噬细胞发生形态学变化。可见单端孢菌素类毒素通过影响细胞活性和贴附能力以及单核吞噬细胞的吞噬能力而发挥其免疫抑制作用^[14]。Ayril 等^[15]研究 DAS 和 DON 对体外培养的鼠腹腔巨噬细胞功能的影响,以浓度为 $0.1\text{ng/ml} \sim 1\mu\text{g/ml}$ 的毒素预培养 42h,在不影响巨噬细胞活性的浓度范围内(以特异性乳酸脱氢酶试验证实), DAS 和 DON 均可抑制巨噬细胞的杀菌活性。DAS 降低巨噬细胞吞噬作用、杀菌活性、过氧化物阴离子产生和吞噬体-溶酶体融合,其浓度分别为 2ng/ml , 1ng/ml , 1ng/ml 和 0.1ng/ml ,表明 DAS 对巨噬细胞杀伤能力的抑制既可通过氧化途径又可通过非氧化途径。与 DAS 不同, DON 虽然在 1ng/ml 的浓度下即可降低巨噬细胞吞噬作用、杀菌活性和过氧化物阴离子产生,但只有其浓度超过 100ng/ml 后,才出现对吞噬体-溶酶体融合的抑制作用。可见 DON 对巨噬细胞杀菌活性的抑制并非通过非氧化途径(吞噬体-溶酶体融合)的损伤作用。

5 单端孢菌素类毒素对造血系统的影响^[16,17]

由单端孢菌素类毒素引起的镰刀菌中毒症 (Fusarial Toxicosis) 的特征性的症征是呕吐、炎症、出血、腹泻和造血系统的变化。摄入单端孢菌素类毒素可引起动物循环白细胞降低,这种变化与人消化道中毒性白细胞减少症的特征性变化极为相似。Parent-Massin 等为探讨单端孢菌素类毒素导致对造血系统变化的机理,以四种单端孢菌素类毒素: T-2, HT-2, DAS 和 DON 处理体外培养的大鼠和人造血祖细胞-CFU-GM,发现四种毒素对造血祖细胞均有细胞毒性,因此可见单端孢菌素类毒素中毒过程中所出现的造血系统紊乱是由于单端孢菌素类毒素对造血祖细胞如 CFU-GM 的破坏引起的。

6 单端孢菌素类毒素对淋巴造血细胞凋亡的影响^[18,19]

VT 和其他单端孢菌素类毒素的免疫毒性可由其与淋巴细胞的直接相互作用而引起。Ueno 等以 DNA 片段凝胶电泳和电镜形态学方法分析了包括单端孢菌素类毒素在内的 31 种化学物质对人原粒细胞白血病细胞系 HL60 细胞凋亡的影响,发现 T-2, NIV, DON 均可诱导 HL60 细胞出现凋亡性变化。动物实验

结果亦表明,VT可明显抑制从胸腺、脾和Peyer斑分离出经Dexamethasone诱导的T细胞的凋亡,但对经Dexamethasone诱导的B细胞和IgA⁺细胞的凋亡无明显影响。对未经Dexamethasone处理的B、T和IgA⁺VT均可诱导细胞出现凋亡。

7 小结

单端孢菌素类毒素是粮食中最常见的一类污染性霉菌毒素。在我国肿瘤高发区居民饮食中的检出率和含量均很高。该类毒素对免疫机能的影响可表现为如下几方面:(1)对细胞因子的分泌具有抑制作用,但据毒素种类、浓度和处理时间不同,对细胞因子分泌和mRNA的表达又可表现为一定的诱导作用。(2)对免疫细胞的增殖具有抑制作用。(3)对免疫细胞蛋白质的合成有抑制作用,可抑制IgG的分泌。(4)影响单核吞噬细胞活性、黏附能力及杀菌活性。(5)对造血干细胞有明显损伤作用。(6)可诱导免疫细胞出现凋亡。

可见,单端孢菌素类毒素对免疫系统的影响主要表现为抑制作用。但目前的研究工作主要限于实验动物。有关单端孢菌素类毒素对人免疫系统的影响及该类毒素在我国肿瘤高发区恶性肿瘤发生发展中的作用有待进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] 张振东,王凤荣,焦炳忠,等. 中华病理学杂志,1981, 12:226~228.
- [2] 甄应中,杨文献,杨胜利,等. 中华肿瘤杂志,1984,6: 27~29.
- [3] Zhang X H, Xie T X, Yan X *et al.* Chin J Cancer Res, 1995, 7(3): 172~176.
- [4] 高进. 中华病理学杂志, 1995, 24(4): 205~206.
- [5] 夏求洁,李云仙,吴建丽. 中华肿瘤杂志, 1988, 10(5): 381.
- [6] 李铭新,主歌凤,程书均,等. 中华肿瘤杂志, 1988, 10(5): 326~329.
- [7] Lambert L A, Hines F A, Eppley R M. Food Chem Toxicol, 1995, 33(3): 217~222.
- [8] Ouyang Y L, Azcona-Olivera J I, Pestka J J. Toxicology, 1995, 104(1-3): 187~202.
- [9] Azcona-Olivera J I, Ouyang Y L, Warner R L, *et al.* Food Chem Toxicol, 1995, 33(6): 433~441.
- [10] Azcona-Olivera J I, Ouyang Y L, Murtha J, *et al.* Toxicol Appl Pharmacol, 1995, 133(1): 109~120.
- [11] Rasooly Land Pestka J J. Food Chem Toxicol, 1992, 30(6): 499~504.
- [12] Rotter B A, Thompson B K, Lessard M *et al.* Fundam Appl Toxicol, 1994, 23(1): 117~124.
- [13] Minervini F, Dong W, Pestka J. Mycopathologia, 1993, 121(1): 33~40.
- [14] Kidd M T, Hagler W M Jr, Qureshi M A. Immunopharmacol Immunotoxicol, 1995, 17(2): 385~398.
- [15] Ayral A M, Dubech N, Le Bars J *et al.* Mycopathologia, 1992, 120(2): 121~127.
- [16] Parent-Massin D, Thouvenot D. Food Addit Contam, 1995, 12(1): 41~49.
- [17] Parent-Massin D, Fuselier R, Thouvenot D. Food Addit Contam, 1994, 11(4): 441~447.
- [18] Pestka J J, Yan D, King L E. Food Chem Toxicol, 1994, 32(12): 1125~1136.
- [19] Ueno Y, Umemori K, Niimi E *et al.* Nat Toxins, 1995, 3(3): 129~137.