

肝癌高发区霉变粮食致突变性的研究——SCE 实验

千佰仙 阮萃才 黄少珍

(广西壮族自治区肿瘤研究所, 南宁)

刘宗河 涂文升 刘锦玲

(广西医学院, 南宁)

摘要 从肝癌高发的扶绥县主粮中分离的常见污染真菌 25 株, 分别接种于玉米-大米培养基培养, 其培养物的甲醇-氯仿提取液经 SCE 试验, 结果有 10 株为阳性。提示霉变粮食中存在着使人的体细胞突变的物质, 这对肝癌的发生可能起重要作用。防止粮食霉变, 不吃发霉的粮食可能会降低肝癌发病率。

关键词 姐妹染色单体互换; 霉菌毒素

扶绥县是我国肝癌的高发区之一, 据流行病学研究发现, 该县粮食被真菌污染严重。肝癌的发生可能与人接受一些真菌代谢产物有关。1980 年我们对扶绥县的主粮被真菌污染情况进行了调查, 了解该县粮食主要的污染菌是曲霉属, 其次是青霉属和镰刀菌属。为进一步了解这些常见真菌的代谢产物是否具有致突变性, 我们首批随机选取了六个菌群属的 25 个菌株作扩大培养, 用化学方法提取浓缩, 然后用姐妹染色单体互换试验 (SCE) 对其提取物进行检测。现将检测结果报道如下。

材料与方 法

(一) 受试物的来源

1. 真菌代谢物的制备^[1,2]: 从扶绥县主粮分离的污染菌中随机抽取 25 株, 在适当的条件下进行扩大培养, 获得各种真菌代谢物。

① 杂色曲霉(5 株)、构巢曲霉(5 株)、灰绿曲霉 2 株: 培养基用玉米粉加 2% 黄豆粉, 每株用 160g, 高压灭菌, 接种时加入 40% 的无菌水。

② 棕曲霉(6 株): 4% 蔗糖察氏培养基加 2% 酵母膏等混合配成 400ml 的液体培养基。接种后振荡培养。

③ 镰刀菌(2 株): 每株用玉米粉作培养基 250g, 高压灭菌, 接种时加入 40% 无菌水。

(4) 冰岛青霉(5 株): 大米粉和玉米粉各 50% 混合, 每株用培养基 250g, 高压灭菌, 接种时加入 40% 的无菌水。

将以上接种好的培养物置 25—30℃, 相对湿度 85—90% 的培养箱中培养, 每日翻动 1—2 次, 培养 1—3 周, 从而获得各种菌株的代谢物。

2. 真菌代谢物的提取^[1,2]: 在获得的各种真菌代谢物中加入甲醇水(甲醇:水=5:3), 转置于烧瓶回流 4 小时, 过滤(反复 4 次), 合并滤液, 减压浓缩至一定体积, 用草酸调整 pH 至一定值, 经石油醚处理后, 加入氯仿萃取, 蒸干获得样品的粗提物。然后用二甲基亚砜(DMSO)溶解, 配成含原培养物 10、1.0 和 0.1g/ml 的浓度供 SCE 实验。

(二) SCE 实验

1. 淋巴细胞的培养: RPMI1640 和 20% 的小牛血清, 含 30mM/ml 的 5'-BrdU, 真菌代谢提取物与全血同时加入培养基中, 根据对照及三个不同浓度的真菌代谢提取物划分为对照组及实验组, 对照组每瓶仅加 20μl 的二甲基亚砜, 实验组加 20μl 的真菌代谢物, 使其最终浓度分别为 0.4、4、40 mg/ml。接种后避光培养 72 小时, 终止培养前 4 小时加入秋水仙素。

2. 染色体片的制备: 按常规的空气干燥法。

3. 分化、染色: 采用贺维顺等人的 UPG

法^[3]。

4. 镜检: SCE 的计数按照李昌本^[4]等人的计算方法,即选择染色体分散良好,差别染色清楚的细胞计数,末端交换计数为一次,中间交换计数为 2 次,着丝点交换计数为一次,但需与着

丝点上的染色体扭曲相区别。每个样品计数 25—30 个细胞。重复 2 次以上。

实验结果

受试的 25 株真菌代谢提取物结果见表

表 1 曲霉属的真菌代谢提取物对人的淋巴细胞的 SCE 效应

菌群	菌株	浓度 mg/ml	SCE	P 值	诱变性	菌群	菌株	浓度 mg/ml	SCE	P 值	诱变性
			$\bar{x} \pm S$						$\bar{x} \pm S$		
杂色曲霉群	杂色 ⁰ 曲霉	0	9.2±3.40	>0.05 <0.001	+	群	构巢 ⁴⁷ 曲霉	0	9.35±3.20	>0.05 >0.05	-
		0.4	11.2±4.10					0.4	10.20±5.35		
		4.0	31.95±12.85					4.0	10.25±3.93		
		40	—					40	—		
	杂色 ¹² 曲霉	0	10.45±3.59	<0.001	+	群	棕 ³ 曲霉	0	6.1±2.57	>0.05 >0.05 <0.05	+
		0.4	17.0±6.08					0.4	7.65±2.99		
		4.0	—					4.0	7.90±3.40		
		40	—					40	9.40±3.03		
	杂色 ³³ 曲霉	0	7.1±3.60	<0.05 <0.01	+	棕	棕 ⁶ 曲霉	0	11.05±3.57	>0.05 >0.05 >0.05	-
		0.4	9.75±4.03					0.4	12.05±4.20		
		4.0	10.68±4.63					4.0	11.40±3.60		
		40	—					40	—		
	杂色 ⁴⁴ 曲霉	0	12.50±3.06	>0.05 <0.01	+	曲	棕 ⁷ 曲霉	0	6.1±2.57	>0.05 <0.05 <0.001	+
		0.4	12.25±6.38					0.4	7.8±3.30		
		4.0	32.05±11.69					4.0	8.85±3.20		
		40	—					40	11.50±3.03		
	杂色 ⁴⁶ 曲霉	0	12.50±3.06	<0.05 <0.001	+	霉	棕 ¹⁴ 曲霉	0	9.75±3.49	>0.05 >0.05 <0.01	+
		0.4	17.95±5.57					0.4	9.75±3.01		
		4.0	42.2±12.49					4.0	10.25±3.06		
		40	—					40	13.05±3.39		
构巢曲霉群	构巢 ⁸ 曲霉	0	6.65±2.51	<0.05	+	群	棕 ¹⁸ 曲霉	0	7.50±3.70	>0.05 >0.05 >0.05	-
		0.4	9.10±2.26					0.4	9.13±4.0		
		4.0	—					4.0	7.0±2.8		
		40	—					40	—		
	构巢 ¹² 曲霉	0	7.45±3.65	>0.05 >0.05 >0.05	-	群	棕 ⁶⁵ 曲霉	0	9.75±3.21	>0.05 >0.05 >0.05	-
		0.4	7.35±2.10					0.4	11.65±3.46		
		4.0	7.80±2.95					4.0	10.35±3.26		
		40	8.20±3.19					40	10.60±3.68		
	构巢 ¹⁹ 曲霉	0	9.35±3.20	>0.05 <0.05	+	灰绿曲霉群	安姆斯特丹	0	9.75±3.49	>0.05 >0.05 >0.05	-
		0.4	11.55±4.19					0.4	11.65±3.56		
		4.0	—					4.0	11.65±3.21		
		40	—					40	10.75±3.29		
	构巢 ³⁰ 曲霉	0	7.15±3.32	>0.05 <0.05	+		赤曲霉	0	7.10±3.60	>0.05 >0.05	-
		0.4	9.25±3.40					0.4	8.20±2.11		
		4.0	10.30±3.80					4.0	8.90±3.30		
		40	—					40	—		

注: “—”表示无分裂相。“+”表示有诱变性,“-”表示无诱变性。下同。

表2 青霉属的真菌代谢提取物对人淋巴细胞的 SCE 效应

菌株	浓度 mg/ml	SCE	P 值	诱变性	菌株	浓度 mg/ml	SCE	P 值	诱变性
		$\bar{x} \pm s$					$\bar{x} \pm s$		
冰岛青霉 ¹	0	11.45±4.51	>0.05	—	冰岛青霉 ⁷⁵	0	14.85±5.02	>0.05	—
	0.4	11.40±4.54				0.4	13.15±6.01		
	4.0	—				4.0	—		
	40	—				40	—		
冰岛青霉 ³⁴	0	7.75±3.01	>0.05	—	冰岛青霉 ³⁶	0	7.75±3.33	>0.05	—
	0.4	7.25±3.38				0.4	9.05±4.71		
	4.0	—				4.0	—		
	40	—				40	—		
冰岛青霉 ⁴¹	0	10±4.38	>0.05	—					
	0.4	10.20±4.02							
	4.0	10.50±4.24							
	40	—							

表3 镰刀菌属的真菌代谢提取物对人淋巴细胞的 SCE 效应

菌株	浓度 mg/ml	SCE	P 值	诱变性	菌株	浓度 mg/ml	SCE	P 值	诱变性
		$\bar{x} \pm s$					$\bar{x} \pm s$		
木色镰刀菌	0	8.4±2.72	>0.05	—	木贼镰刀菌	0	9.75±3.21	>0.05	—
	0.4	9.10±3.11				0.4	11.30±3.97		
	4.0	8.10±2.46				4.0	11.35±4.68		
	40	8.10±3.55				40	—		

1—3。被检测的6个菌群属25个菌株的真菌代谢提取物,在其0.4、4以及40 mg/ml 的浓度范围内:

1. 曲霉属的5株杂色曲霉全部为阳性结果。2株构巢曲霉、3株棕曲霉也是阳性结果,2株灰绿曲霉为阴性结果。

2. 青霉属和镰刀菌属的菌株都是阴性结果。

由此可见,在呈阳性结果的同一曲霉属的不同菌群中,其致突变性的差异很大,其中以杂色曲霉群菌株的致突变性为最强,其次是棕曲霉,最弱的是构巢曲霉。在同一菌群的不同菌株中,致突变性的差异也很大。在杂色曲霉群中以杂色曲霉46的致突变性最强,杂色曲霉38为最弱。在构巢曲霉群中以构巢曲霉8致突变性为最强,构巢曲霉20为最弱。在棕曲霉群中以棕曲霉7致突变性为较强,棕曲霉5次之,棕曲霉14为最弱。

以上这些菌株的代谢提取物与致突变性间

呈明显的剂量效应关系。与杨骏昌^[5]等人报道的四川食管癌流行地区酸菜中杂色曲霉代谢产物的致突、致癌作用是一致的。此外,大多数菌株的代谢提取物在40 mg/ml 浓度时培养细胞严重受抑制,因此无分裂相出现。由此说明,这些真菌代谢提取物中存在着抑制人体细胞有丝分裂的物质。

讨 论

我们应用 SCE 试验^[6]来筛选,检测扶绥县粮食中常见污染真菌代谢提取物的致突变性。探讨这些真菌代谢提取物在肝癌发病因素中的地位 and 可能的作用。从实验结果看,所有的杂色曲霉(5/5)及部分棕曲霉(3/6)、构巢曲霉(2/5)的代谢提取物均存在着能使人体细胞突变的物质。在前两年的菌相调查中还发现扶绥县主粮中同时存在着几种污染菌^[7]。由于多种真菌毒素的协同致癌作用要比单一的真菌毒素致癌作用强得多,因此,扶绥县肝癌高发区除了

与 AFB₁ 和乙型肝炎病毒感染及饮用水污染因素相关外,可能与主粮中常见污染菌代谢产物的致突变或致癌因子协同作用有密切关系。SCE 实验结果还表明食用霉变食物在扶绥县肝癌病因学上占有重要的地位。因此,在肝癌的预防研究中,除了要预防黄曲霉菌污染食物还应防止其他霉菌的污染。并告诫人们切记不吃霉变食物,以保障人体健康。

本实验另有 15 株(曲霉属里有 8 株,岛青霉属里有 5 株,镰刀菌属里有 2 株)经多次重复测试,其代谢提取物仍呈阴性。其原因可能是(1)受试菌株为无毒株。(2)受试菌株为有毒

株,因培养条件或提取方法不当致使突变物提不出来。(3)受试菌株为弱毒株,产生的有毒物质甚少,测试浓度不能达到诱变时的有效剂量,因此这些问题还有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 胡文娟: 卫生研究, 9(3): 30, 1980。
- [2] 魏润蕴等: 卫生研究, 10(2): 16, 1981。
- [3] 贺维顺等: 自然杂志, 3(8): 638, 1980。
- [4] 李昌木等: 实验生物学报, 12(2): 6, 1979。
- [5] 杨骏昌等: 四川医学, 1979。
- [6] Latt, S. A. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 72: 4066—4070, 1975。