

棒曲霉素对 KM 小鼠肾脏的毒性效应

张百刚*, 徐冬梅, 邵琳, 鹿琪坤, 梁海荣, 李金亮, 黄橙辉

(兰州理工大学生命科学与工程学院, 甘肃兰州 730050)

摘要: 该研究以 KM 小鼠作为实验动物, 研究 2.5、5.0、7.5、10、15 $\mu\text{mol/L}$ 五个浓度梯度下棒曲霉素对小鼠体重、肾脏系数等的影响, 并通过各项肾脏切片染色试验验证 PAT 对肾脏的毒性损伤。其中 PAT 浓度对体重增长率基本无影响, 两者之间几乎无相关关系; 而随着 PAT 浓度增大, 肾脏系数有逐渐增大的趋势, 其中 7.5 $\mu\text{mol/L}$ 和 10 $\mu\text{mol/L}$ PAT 处理的差异显著 ($p < 0.05$); 随着 PAT 浓度增加, 苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色后可观察到大片细胞基质和胞外基质, 蓝紫色细胞核逐渐减少且细胞核密度逐渐降低, 此外 PAT 浓度较高时出现了长条状空白; Masson 染色后肾小球发生明显的纤维硬化情况, 且胞间充血; 过碘酸雪夫 (Periodic Acid-Schiff, PAS) 染色后出现了少量糖原, 可知糖原没有被正常降解。因此, PAT 浓度的增加会导致核密度降低、肾脏细胞皱缩、胶原纤维增加、糖原分解被抑制等问题, 从而对 KM 小鼠肾脏造成严重损伤。研究结果将为进一步研究棒曲霉素对肾脏的损伤提供理论支持。

关键词: 棒曲霉素; 毒性机制; 肾脏; 苏木素-伊红染色; 过碘酸雪夫染色

文章编号: 1673-9078(2022)06-275-279

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.6.0849

Toxic Effects of Patulin on the Kidneys of KM Mice

ZHANG Baigang*, XU Dongmei, SHAO Lin, LU Qikun, LIANG Hairong, LI Jinliang, HUANG Chenghui

(School of Life Sciences and Engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, China)

Abstract: In this study, KM mice were used as experimental animals. The effects of patulin (PAT) at concentration gradients of 2.5, 5.0, 7.5, 10 and 15 $\mu\text{mol/L}$ on the body weight and renal coefficients in mice were investigated. The toxicity and damage of PAT to the kidneys were examined through section staining experiments. The PAT concentration had little effect on the increasing rate of body weight, and there was almost no correlation between them. However, as the concentration of PAT increased, the kidney coefficients tended to increase gradually, with the difference between the 7.5 $\mu\text{mol/L}$ PAT treatment and 10 $\mu\text{mol/L}$ PAT treatment being significant ($p < 0.05$). As the concentration of PAT increased, large areas of cell stroma and extracellular matrix were observed after HE staining (hematoxylin-eosin staining), with the number of bluish purple nuclei and the nucleus density gradually decreasing. In addition, there were long blank strips at higher PAT concentrations. After Masson staining, glomeruli showed significant fibrosclerosis, along with intercellular congestion. A small amount of glycogen appeared after periodic acid-schiff (PAS) staining, indicating that glycogen was not normally degraded. Therefore, the increase in PAT concentration led to problems such as decreased nucleus density, shrinkage of kidney cells, increased collagen fibers and inhibition of glycogenolysis, causing severe kidney damage in KM mice. This result will provide theoretical support for further studies on the damage of PAT to the kidney.

Key words: patulin; toxicological; kidney; hematoxylin-eosin staining; periodic acid-schiff staining

引文格式:

张百刚,徐冬梅,邵琳,等.棒曲霉素对 KM 小鼠肾脏的毒性效应[J].现代食品科技,2022,38(6):275-279

ZHANG Baigang, XU Dongmei, SHAO Lin, et al. Toxic effects of patulin on the kidneys of KM mice [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(6): 275-279

棒曲霉素 (Patulin, PAT) 是青霉属菌和曲霉属菌等产生的一种有毒次级代谢产物。目前, 对于 PAT 的毒理学研究主要集中于其对肝肠胃的毒性及皮肤毒性, 对肾脏的毒理作用研究较少。在各种食品中均可

收稿日期: 2021-08-04

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31760495); 甘肃省自然科学基金项目 (18JR3RA136)

作者简介: 张百刚 (1981-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品生物技术,

E-mail: zhangbaigang@163.com

发生棒曲霉素污染, 其中苹果是最为常见的被污染水果。因此, 将苹果、苹果汁和其相关食品中棒曲霉素的浓度用作质量指标^[1], 我国国家标准也对食品中棒曲霉素含量作了详细的规定^[2]。人们接触棒曲霉素主要是通过食用被污染的食品, 而食品在不同的阶段如种植过程、收获期间、收获后、运输期间、储存期间、陈列期间和整个加工阶段都有可能被污染^[3,4]。在食品加工过程中卫生条件较差的地区, 由棒曲霉素产生的风险会更大^[5]。高浓度的棒曲霉素对不同种族、性别

和年龄的人群都会产生影响,其中婴幼儿、孕妇及胎儿等都是敏感人群^[6]。

有研究表明, PAT 可引起急性和慢性中毒, PAT 给药的实验动物外部表现为焦虑、抽搐和呼吸短促等,内部表现为肺部充血、溃烂、水肿、血液外渗和胃肠道疾病等,并且 PAT 还具有细胞毒性和遗传毒性^[7,8],这可能与半缩醛和内酯环的毒性有关^[9]。虽然目前国内外对棒曲霉素的研究较为广泛,但对于肾脏的研究仍然不够充分,而肾脏作为人体重要的解毒器官,对 PAT 的代谢起着至关重要的作用。因此,本研究以 KM 小鼠作为实验动物,取小鼠肾脏最大横截面做石蜡切片,然后制作 HE 染色, Masson 染色和过碘酸雪夫染色(Periodic Acid-Schiff stain, PAS)切片,结合体重增长率及脏器系数等,从外观形态,生理生化方面评估 PAT 对小鼠的毒性效应,尤其是对肾脏的毒性,探讨可能的毒性机制,为进一步探究其毒性效应提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

棒曲霉素标准品(纯度≥98%),上海哈灵生物科技有限公司; HE 染液、Masson 染液套装、PAS 染液套装、苏木素染液、分化液、返蓝液, Servicebio; 中性树胶, 国药集团化学试剂有限公司。

江南永新 MR2100 倒置显微镜,上海向帆仪器有限公司; WHB-7105-1 普通载玻片 25×75 mm, 祺翔生物科技有限公司; 美国 RAININ Pipet -Lite PL+单道可调移液器, Mettler Toledo 国际贸易有限公司; ES-J 分析天平, 德安特传感技术有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 实验动物饲养和 PAT 预处理

KM 小鼠购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,均为6周龄左右。饲养环境整洁安静,通风良好,温度、湿度适宜。72只KM小鼠雌雄各半并且被随机分为6组,其中一组为空白组,空白组以无菌水灌胃,其余五组分别以2.5、5、7.5、10和15 μmol/L PAT 灌胃,灌胃标准为0.1 mL/10 g。每天灌胃前禁食6h左右并称取体重,连续灌胃28d后处死取双肾,称量肾脏重量,然后进行后续试验。

$$\text{体重增长率}/\% = \frac{\text{当次体重(g)} - \text{初始体重(g)}}{\text{初始体重(g)}} \times 100\%$$

$$\text{肾脏系数}/\% = \frac{\text{双肾重量(g)}}{\text{体重(g)}} \times 100\%$$

式中:

初始体重——灌胃前禁食6h后体重, g;

当次体重——不同浓度 PAT 灌胃一定时间后体重, g;

双肾重量——不同浓度 PAT 灌胃28d后双肾湿重, g;

体重——不同浓度 PAT 灌胃28d后小鼠体重, g。

1.2.2 石蜡切片制作

新鲜组织用固定液固定24h以上。固定后的组织水洗后依次用50%、70%、85%、95%及无水乙醇进行脱水,脱水后从无水乙醇中取出组织块先放入二甲苯和无水酒精等量混合的溶液中1h左右,然后取出放入纯二甲苯中20min即可。然后进行浸蜡、包埋、塑形。之后的工作由武汉塞维尔生物有限公司完成。

1.2.3 HE 染色

染色前依次将切片放入二甲苯 I 和二甲苯 II 中各20min脱去切片中的石蜡,再依次放入无水乙醇 I、无水乙醇 II、75%酒精中各5min,最后入蒸馏水后即可染色。水洗后切片入苏木素染液染5min后,蒸馏水洗去多余染液。显微镜控制下用分化液分化,镜下观察细胞核蓝色、组织背景几乎无色时,自来水洗终止分化。水洗蓝化15min后,依次放入85%、95%的梯度酒精脱水各5min。浸入伊红染液中染色5min后,依次放入无水乙醇 I、无水乙醇 II、无水乙醇 III 中各5min进行脱水,再依次放入二甲苯 I 和二甲苯 II 中各5min使切片透明。将已透明的切片用中性树胶封片。显微镜镜检,图像采集分析。

1.2.4 Masson 染色

石蜡切片脱蜡至水,如1.2.3所示。切片入重铬酸钾浸泡过夜后,依次自来水和蒸馏水洗。切片入 Weigert 氏铁苏木素染液3min后,自来水充分水洗,1%盐酸酒精分化液分化数秒,自来水冲洗,流水冲洗数分钟后返蓝液返蓝。用丽春红酸性品红染10min后,蒸馏水快速漂洗。1%磷钼酸水溶液浸染1~3min后,不经水洗,直接用苯胺蓝染液复染5min。1%冰醋酸处理1min。将切片依次放入95%酒精 I、95%酒精 II 各5min,无水乙醇 I、无水乙醇 II 各5min进行脱水。再依次放入二甲苯 I 和二甲苯 II 中各5min使切片透明,中性树胶封片。显微镜镜检,图像采集分析。

1.2.5 PAS 染色

石蜡切片脱蜡至水,如1.2.3所示。切片入1%高碘酸染液中染色15min(溶液温度以17~20℃为宜),流水冲洗5min,再用蒸馏水浸洗两遍。Schiff 氏液(Schiff 氏液从冰箱取出升至室温使用)避光染色30min,流水冲洗5min。Harris 苏木精染5min,自来水洗;1%盐酸酒精分化液分化,再用自来水充分冲洗。

返蓝液返蓝，流水冲洗。脱水封片方法同 HE 染色。显微镜镜检，图像采集分析。

1.2.6 数据分析

记录灌胃前小鼠体重，连续灌胃 28 d 后处死取双肾，记录肾脏重量。计算体重增长率与肾脏系数，取平均值，结果以“平均值±标准差”来表示。采用 SPSS 26.0 对实验数据进行统计学分析，6 组数据间采用“One-way ANOVA”的 Duncan’s 法进行比较分析， $p < 0.05$ 为差异显著，标记为“*”。

2 结果与讨论

2.1 PAT 浓度对 KM 小鼠的体重增长的影响

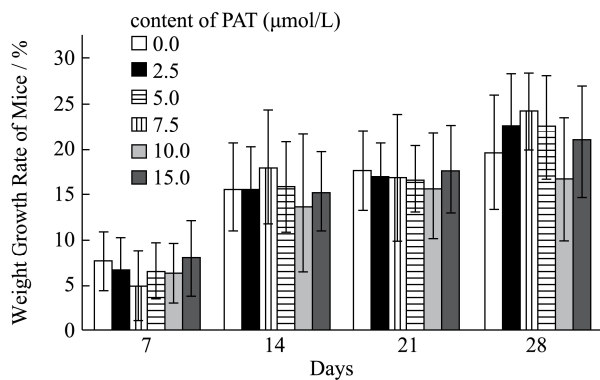


图 1 Weekly weight growth rate of KM mice

连续 28 d 对 KM 小鼠灌胃给予不同浓度 PAT，每天禁食 6 h 后称取体重，每 7 d 对体重取一次平均值，体重增长与 PAT 浓度之间的关系如图 1 所示。不同浓度的 PAT 对体重增长率的影响有高有低，与无菌水灌胃对照组相比，各 PAT 剂量组受试小鼠体重增长率与对照组无显著差异 ($p > 0.05$)，不同 PAT 剂量组之间的大鼠体重增长率也无显著性差异。除在 14~28 d 之间 5 $\mu\text{mol/L}$ PAT 影响稍大外几乎无规律。由此可判断连续 28 d 给予 KM 小鼠 15 $\mu\text{mol/L}$ 及以下剂量的 PAT 对体重增长率基本无显著性影响，两者之间几乎无相关关系。

2.2 PAT 浓度对 KM 小鼠肾脏系数的影响

连续 28 d 对 KM 小鼠灌胃给予不同浓度 PAT，试验结束处死动物，记录双肾湿重，计算肾脏系数，各组动物肾脏系数统计结果见图 2。随着 PAT 浓度增大，肾脏系数亦有逐渐增大的趋势，与对照组相比，PAT 组中 7.5 $\mu\text{mol/L}$ 和 10 $\mu\text{mol/L}$ PAT 处理的差异显著 ($p < 0.05$)。虽然 PAT 组之间差距并不大，但相较于空白组，PAT 组整体都大于空白组。肾脏系数增大即说明在体重无明显变化的情况下出现的双肾增大现象，

而双肾增大常见于肾积水或者肾脏部位炎症，如急性肾衰竭、急性肾炎、双侧急性肾盂肾炎、双侧肾盂积水等多种肾脏疾病。因此，可推断 PAT 为 7.5 $\mu\text{mol/L}$ 和 10 $\mu\text{mol/L}$ 时即对肾脏造成严重损伤；而当 PAT 为 15 $\mu\text{mol/L}$ 时，肾脏细胞开始皱缩凋亡，因此，肾脏系数下降。

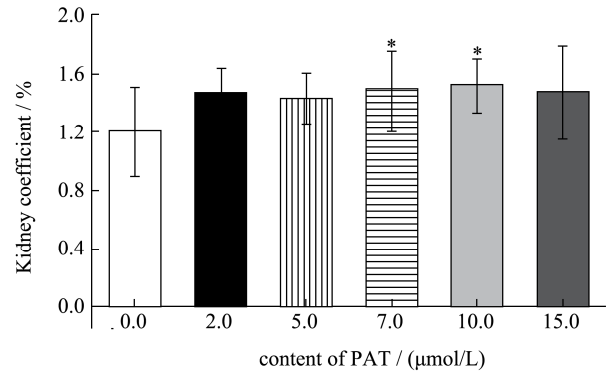


图 2 PAT 浓度对肾脏系数的影响

Fig.2 Effect of PAT concentration on kidney coefficient

2.3 肾脏切片 HE 染色

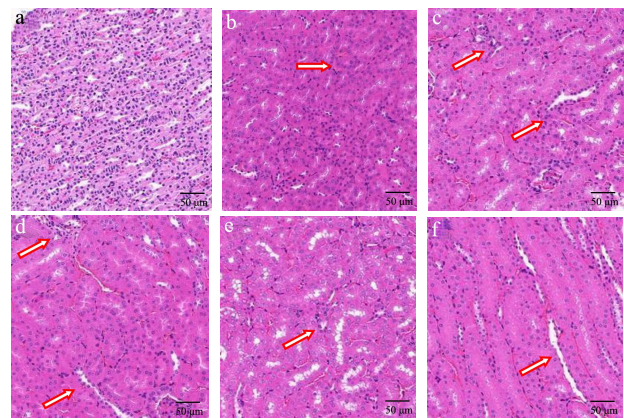


图 3 肾脏最大横截面切片 HE 染色 (200 \times)

Fig.3 HE staining of the largest cross section of kidney (200 \times)

注：a: 0 $\mu\text{mol/L}$; b: 2.5 $\mu\text{mol/L}$; c: 5 $\mu\text{mol/L}$; d: 7.5 $\mu\text{mol/L}$; e: 10 $\mu\text{mol/L}$; f: 15 $\mu\text{mol/L}$ 。下图同。

取肾脏最大横截面制作 HE 染色切片，观察肾脏细胞的基本外观。对照组细胞核核膜界限清晰，染色无异常情况。当 PAT 浓度为 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 时，细胞核略微减少；PAT 浓度增为 5.0 $\mu\text{mol/L}$ 和 7.5 $\mu\text{mol/L}$ 时，可观察到大片细胞基质和胞外基质，蓝紫色细胞核逐渐减少且细胞核密度逐渐降低；PAT 浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 时，视野内可见大量条状空白，细胞核明显减少，颜色模糊不可分辨；PAT 浓度为 15 $\mu\text{mol/L}$ 时，条状空白增长变为长条状，细胞核颜色减淡并多聚集于长条状空白两侧^[10,11]。染色结果说明随着 PAT 浓度升高，肾脏细胞逐渐皱缩凋亡。研究表明，肾脏有核细胞数与凋亡指数之间存在负相关，而凋亡细胞数又与肾功

能恶化成密切正相关。

2.4 肾脏切片 Masson 染色

取肾脏最大横截面制作 Masson 染色切片, 观察肾脏细胞的基本外观。Masson 染色结果为胶原纤维呈蓝色, 肌纤维、纤维素和红细胞呈红色。如图 4 所示, 对照组细胞间界限清晰, 肾小球无明显硬化。PAT 浓度逐渐增加时, 可观察到蓝色胶原纤维逐渐增加, 细胞间界限逐渐模糊。结果显示 PAT 使肾小球发生明显的纤维硬化情况, 且胞间充血, 说明有炎症出现, 初步考虑为肾脏纤维化的炎症反应期, 如果延长 PAT 给药时间很有可能形成瘢痕, 对肾脏造成不可逆的损伤。

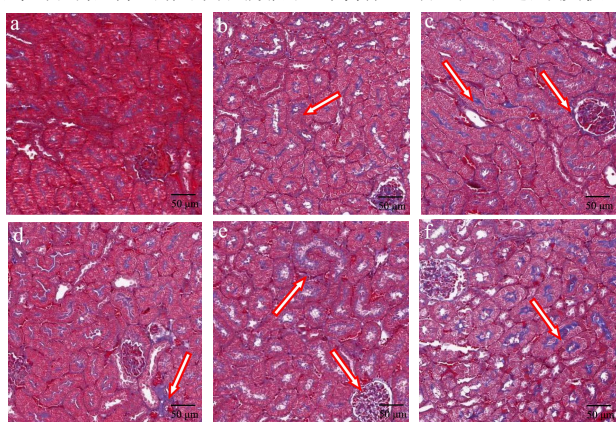


图 4 肾脏最大横截面切片 Masson 染色 (200×)

Fig.4 Masson staining of the largest cross section of kidney (200×)

2.5 肾脏切片 PAS 染色

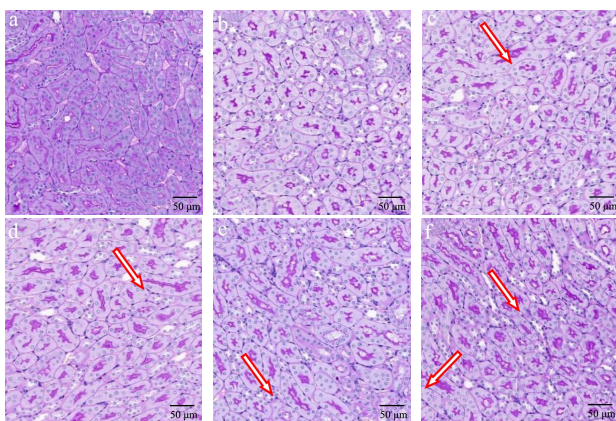


图 5 肾脏最大横截面切片 PAS 染色 (200×)

Fig.5 PAS staining of the largest cross section of kidney (200×)

PAS 染色的目的是为了观察细胞的糖原降解情况, 糖原在体内酶促作用下的合成和分解可维持血糖正常水平。在动物体内糖原大部分存在于骨骼肌中, 肾脏中液存在少量糖原, 由图 5 观察得知, 对照组几乎无大面积糖原, 说明糖原被大量降解来维持体内的基本活动, 当 PAT 浓度为 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 时, 糖原增加,

染色明显变浅; PAT 浓度增为 5.0 $\mu\text{mol/L}$ 和 7.5 $\mu\text{mol/L}$ 时, 可观察到细胞中出现大量糖原, 细胞皱缩, 细胞间隙增加; 并且随 PAT 浓度增加, 糖原累积逐渐增多, 细胞间隙增大。肾脏作为糖类储藏和释放的场所, 人体内多余的糖分在这里形成肾糖原加以储藏, 需要的时候又能转变为葡萄糖来补充血糖, 血糖升高时只要肾脏功能正常, 就可以通过排尿将多余的糖分排出, 使血糖不至于太高。而当 PAT 浓度升高使肾小球受到损害时, 肾小球滤过率降低, 这不仅会对细胞和机体的 ATP 生成产生影响, 糖原的累积势必会影响肾脏结构和功能, 引起各种并发症。

3 结论

本试验设计不同浓度梯度 PAT, 28 d 连续灌胃 KM 小鼠, 并按照正常条件饲养, 以此评估试验动物在不同浓度 PAT 下造成的肾损伤作用。经过不同浓度处理 KM 小鼠后的灌胃实验结果表明体重变化与 PAT 浓度几乎无关联。随 PAT 浓度增加, HE 染色后可观察到大片细胞基质和胞外基质, 肾脏切片中细胞核明显减少, 核膜界限模糊; Masson 染色后肾小球切片可观察到蓝色胶原纤维增多, 且胞间充血; 当 PAT 为 7.5 $\mu\text{mol/L}$ 和 10 $\mu\text{mol/L}$ 时, PAT 组肾脏系数皆高于对照组, 差异显著 ($p < 0.05$); 而当 PAT 为 15 $\mu\text{mol/L}$ 时, 肾脏系数相较于 PAT 为 10 $\mu\text{mol/L}$ 时发生了下降, 由此可推测 PAT 浓度在 10 $\mu\text{mol/L}$ 及以下时, 肾脏虽然有自修复能力, 但仍然有肾积水或炎症存在, 随着 PAT 浓度增加, 肾脏细胞皱缩、凋亡指数增加, 肾功能损伤, 逐渐有肾脏纤维化的倾向。因此导致肾小球滤过率下降, 故 PAS 染色观察到大量糖原沉积, 可知糖原没有被正常代谢, 这不仅会对细胞和机体的 ATP 生成产生影响, 还会使肾脏进一步损伤。

参考文献

- [1] GB/T 23585-2009, 预防和降低苹果汁及其他饮料的苹果汁配料中展青霉素污染的操作规范[S]
GB/T 23585-2009, Code of Practice for the Prevention and Reduction of Patulin Contamination in Apple Juice and Apple Juice Ingredients in Other Beverages [S]
- [2] GB 5009.185-2016, 食品安全国家标准食品中展青霉素的测定[S]
GB 5009.185-2016, National Food Safety Standard - Determination of Patulin in Food [S]
- [3] Tournas V H. Spoilage of vegetable crops by bacteria and fungi and related health hazards [J]. Critical Reviews in Microbiology, 2005, 31(1): 33-44

- [4] Al Riachy R, Strub C, Durand N, et al. Microbiome status of cider-apples, from orchard to processing, with a special focus on *Penicillium expansum* occurrence and patulin contamination [J]. Journal of Fungi (Basel, Switzerland), 2021, 7(4): 244
- [5] Saleh I, Goktepe I. Health risk assessment of patulin intake through apples and apple-based foods sold in Qatar [J]. Heliyon, 2019, 5(11): e02754
- [6] Chan-Hon-Tong A, Charles M A, Forhan A, et al. Exposure to food contaminants during pregnancy [J]. The Science of the Total Environment, 2013, 458-460: 27-35
- [7] Sohrabi H, Arbabzadeh O, Khaaki P, et al. Patulin and trichothecene: characteristics, occurrence, toxic effects and detection capabilities via clinical, analytical and nanostructured electrochemical sensing/biosensing assays in food stuffs [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2021: 21-29
- [8] Yang G, Bai Y, Wu X, et al. Patulin induced ROS-dependent autophagic cell death in human hepatoma G2 cells [J]. Chemico-biological Interactions, 2018, 288: 24-31
- [9] Monika C, Thibaud B, Elisabeth P, et al. Production and migration of patulin in *Penicillium expansum* molded apples during cold and ambient storage [J]. International Journal of Food Microbiology, 2020, 313: 108377
- [10] 张亮,马晓燕,王佳虹. 肾衰饮调控慢性肾功能衰竭大鼠肾脏细胞凋亡的机制[J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(23): 3672-3677
- ZHANG Liang, MA Xiaoyan, WANG Jiahong. Regulatory mechanism of Shenshuai Yin on cell apoptosis in the kidney of chronic renal failure rats [J]. Chinese Journal of Tissue Engineering Research, 2021, 25(23): 3672-3677
- [11] 张元元,王驰,黄华,等. 黄芩苷基于矽肺模型大鼠的肝肾毒性作用研究[J]. 职业与健康, 2021, 37(12): 1619-1621, 1626
- ZHANG Yuanyuan, WANG Chi, HUANG Hua, et al. Study on liver and kidney toxicity of baicalin in silicosis model rats [J]. Occupation and Health, 2021, 37(12): 1619-1621, 1626

(上接第 168 页)

- [46] 翟莹莹,黄晶晶,张慧敏,等. 酵母抽提物主要滋味成分分析及其对鱼糜制品风味的影响[J]. 华中农业大学学报, 2019, 38(5): 105-113
- ZHAI Yingying, HUANG Jingjing, ZHANG Huimin, et al. Analysis of main taste components of yeast extract and its effect on flavor of surimi products [J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2019, 38(5): 105-113
- [47] 杨峰,巫朝华,范大明,等. 四川泡椒对鲢鱼鱼糜凝胶风味特性的影响[J]. 食品科学, 2017, 38(16): 152-157
- YANG Feng, WU Chaohua, FAN Daming, et al. Effect of Sichuan pickled peppers on flavor characteristics of silver carp surimi gel [J]. Food Science, 2017, 38(16): 152-157

(上接第 197 页)

- [33] Jiwei Li, Jianwei Ma, Shaojuan Chen, et al. Characterization of calcium alginate/deacetylated konjac glucomannan blend films prepared by Ca²⁺ crosslinking and deacetylation [J]. Food Hydrocolloids, 2018, 82: 363-369
- LI Bo, XIE Bijun. Research on edible membrane material of Konjac Glucomannan (II) [J]. Food Science, 2000, 2: 24-26
- [34] 漆雪莲,张倩倩,盛德尊,等. 魔芋葡甘聚糖溶液水基的润滑特性[J]. 材料研究学报, 2018, 32(1): 25-32
- QI Xuelian, ZHANG Qianqian, SHENG Dezun, et al. Water-based lubricating properties of konjac glucomannan solution [J]. Chinese Journal of Materials Research, 2018, 32(1): 25-32
- [35] Li Zhenyu, Zhang Ling, Mao Chunling, et al. Preparation and characterization of konjac glucomannan and gum arabic composite gel [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 183: 2121-2130
- [36] 李波,谢笔钧. 魔芋葡甘聚糖可食性膜材料研究(II)[J]. 食品科学, 2000, 2: 24-26
- [37] Qing Huang, Zhongsi Liu, Yaqiong Pei, et al. Gelation behaviors of the konjac gum from different origins: *A. guripingensis* and *A. rivirei* [J]. Food Hydrocolloids, 2020, 111
- [38] 朱坤,刘缘勤,范盛玉,等. 魔芋葡甘聚糖-大豆分离蛋白-辣椒红色素复合有色凝胶的制备及其性能研究[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(15): 213-219
- ZHU Kun, LIU Yuanqin, FAN Shengyu, et al. Konjac glucomannan soy protein isolate paprika red composite colored gel preparation and properties [J]. Food and Fermentation Industry, 2021, 47(15): 213-219