

圆弧青霉菌毒素-青霉酸对小鼠肾脏的损伤及机理

郭乐, 袁慧*

(湖南农业大学 动物医学院, 湖南 长沙 410128)

摘要: 采用25日龄健康的昆明种小鼠120只, 分为空白对照组和圆弧青霉菌毒素-青霉酸(以下简称青霉酸)低、中、高剂量组进行试验, 以探索青霉酸对小鼠肾脏的损伤及损伤机理。结果表明, 青霉酸对小鼠肾脏的损伤作用主要是在肾小管上皮细胞; 高剂量染毒能使小鼠肾小管上皮细胞空泡变性, 细胞核出现固缩、溶解, 相同剂量下雄性肾脏的损伤比雌性的严重; 脂质过氧化反应是青霉酸引起肾损伤的作用机理, 它能使小鼠肾组织中SOD活性降低及MDA含量上升, 呈现剂量相关性; 青霉酸通过促进 *Bax* 和 *P53* 基因的表达, 抑制 *Bcl-2* 的表达, 诱导肾小管上皮细胞发生凋亡。

关键词: 圆弧青霉菌毒素-青霉酸; 小鼠; 肾脏损伤

中图分类号: R334⁺2 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2010)03-0330-05

Renal injury and its mechanism on mice induced by penicillic acid from *Penicillium cyclopium*

GUO Le, YUAN Hui*

(College of Veterinary Medicine, HNAU, Changsha 410128, China)

Abstract: 120 Kunming mice (25 days old) were divided into 4 groups randomly, as control, low-dose group, middle-dose group and high-dose group, to find effects on kidney damage and its mechanism induced by a toxin of penicillic acid from *Penicillium cyclopium*. The results showed that renal tubular epithelial cells were severely damaged by penicillic acid. The epithelial cells showed vacuolar degeneration and nuclear condensation and dissolution. Under the same dose, the renal damage of male mouse was more serious than females. The main mechanism of kidney damage caused by penicillic acid was lipid peroxidation which could significantly enhance the content of MDA with corresponding decreases in the content of SOD, and the effect depends on the dose applied. Penicillic acid could markedly induce apoptosis in epithelia of renal tubule via promoting gene expression of *P53* and *Bax* and inhibiting gene expression of *Bcl-2*.

Key words: penicillic acid from *Penicillium cyclopium*; mice; renal injury

圆弧青霉菌毒素-青霉酸(penicillic acid from *Penicillium cyclopium*, PA, 以下简称青霉酸)是一种无色结晶状、多聚乙酰类毒素, 在饲料中的最高含量可达2%^[1]。青霉酸能促使人呼吸道上皮细胞死亡, 阻断细胞的能量传导, 降低细胞的呼吸作用^[2], 能诱导小鼠肺泡细胞发生炎症^[3], 具有抑制猪淋巴细胞的体外增殖作用^[4]。据文献[5]报道, 尼西鸡PA

中毒的主要病理变化是肝脏细胞脂肪变性、肾小管上皮细胞浊肿和心肌细胞颗粒变性; PA在各脏器中的含量从大到小依次为肝、肾、心, 表明PA的分布与各脏器的病变程度具有相关性。袁慧等^[6]认为, 家兔PA急性中毒的病理学主要是肾和心肌细胞变性。笔者研究青霉酸对动物肾脏的损伤作用, 从细胞和分子水平对其损伤机制进行深入研究, 以期查

收稿日期: 2010-02-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(30671548)

作者简介: 郭乐(1983—), 男, 湖南常德人, 硕士研究生, 主要从事毒素与动物中毒研究; *通讯作者, yuanhui7269@yahoo.com.cn

明青霉酸的肾毒作用机理。

1 材料和方法

1.1 材 料

供试动物为120只25日龄昆明种小鼠，体重20~22 g，雌雄各半。雌、雄分开饲养，每笼15只，自由摄食和饮水，预养1周。小鼠饲养笼自然采光，室温18~22℃，相对湿度45%~65%，清洁，安静。

主要试剂为青霉酸，尿酸测定试剂盒，尿素氮测定试剂盒，肌酐测定试剂盒，NAG、SOD、MDA试剂盒，总蛋白测定试剂盒(南京建成生物工程研究所)，Tunel 细胞凋亡检测试剂盒(武汉博士德公司)，其他试剂均为A.R.。

1.2 方 法

根据青霉酸在饲料中的实际含量，在试验前进行预试，得知2.0 mg/mL的青霉酸会对小鼠产生较严重的影响，最后确定灌胃质量浓度为5.000 0、1.250 0、0.312 5 mg/mL(采用蒸馏水稀释)。灌胃前加热至37℃。

将预饲1周后的120只健康小鼠分为雌、雄2组，每组分成4小组，每小组15只，分别为用蒸馏水灌胃的对照组(CK)、0.312 5 mg/mL 青霉酸低剂量组(L)、1.250 0 mg/mL 青霉酸中剂量组(M)、5.000 0 mg/mL 青霉酸高剂量组(H)，每天9:00对各组灌胃，每次每只小鼠灌胃0.5 mL，持续1个月。

试验期间，每天观察各组小鼠的情况，第30天灌胃后收集尿液(尿液收集采用每3只小鼠1个代谢笼，收集12 h尿液，-20℃放置备用)，然后用颈椎脱臼法将其处死。取每组试验鼠的部分肾脏组织进行肾功能和肾组织细胞脂质过氧化等相关指标测定；取部分肾脏(10%甲醛溶液固定)进行病理组织学检查及细胞凋亡检测；将部分肾脏样于-70℃冰冻保存，用于基因表达的检测及RT-PCR测定。小鼠处死前摘眼球取血，将血液3 500 r/min离心5 min，分离出血清，-20℃放置备用。

1.3 检测指标及方法

肾功能检测指标血尿酸(UA)、尿素氮(BUN)、血肌酐(Scr)、N-乙酰氨基葡萄糖苷酶(NAG)的测定

采用比色法，具体方法参考试剂盒说明书。

肾匀浆中蛋白质含量的测定采用考马斯亮兰比色法；丙二醛(MDA)含量的测定采用硫代巴比妥酸(TBA)法；超氧化物歧化酶(SOD)活性的测定采用改进的黄嘌呤氧化法-羟胺法，具体方法见试剂盒。

肾脏病理组织学检查采用常规切片处理，在显微镜下观察其病理变化。

用TUNEL法检测肾细胞凋亡，操作方法参照试剂盒说明。计算凋亡指数：每张切片取10个高倍镜视野(×400)，计数凋亡细胞占总数的百分比，细胞总数不少于1 000个。

RT-PCR 检测 *Bax*，*Bcl-2*，*P53*，*Fas* 基因的表达。引物(表1)由上海英骏生物技术有限公司合成。按照常规方法在肾脏中提取RNA。逆转录采用 RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit，按试剂盒说明书操作。PCR 按2×Taq PCR MasterMix 试剂盒说明书操作，具体条件：94℃预变性4 min，94℃变性30 s，退火温度60℃，循环30次，72℃延伸7 min，进行PCR产物的琼脂糖电泳。

表1 试验所用引物和内标的设计

Table 1 Primers and internal standard designed for experiment		
引物及内标	序列	扩增长度 / bp
<i>Bax</i> 上游	5'-CTGAGCTGACCTTGGAGC-3'	515
<i>Bax</i> 下游	5'-GACTCCAGCCACAAAGATG-3'	
<i>β-actin</i> 上游	5'- CCTCTATGCCAACACAGTGC-3'	211
<i>β-actin</i> 下游	5'- GTACTCCTGCTTGCTGATCC -3'	
<i>P53</i> 上游	5'- ATGGAGGAGTCACAGTCGGATA -3'	479
<i>P53</i> 下游	5'- GACTTCTTGTAGATGGCCATGG -3'	
<i>Bcl-2</i> 上游	5'-GACAGAAGATCATGCCGTCC-3'	426
<i>Bcl-2</i> 下游	5'-GGTACCAATGGCACTTCAAG-3'	
<i>Fas</i> 上游	5'-GACCCAGAATACCAAGTGCA-3'	436
<i>Fas</i> 下游	5'-TCT-GTTCTGCTGTGTCTTGG-3'	

1.4 数据处理

用 Spss13.0 软件对各剂量组、雌雄性之间进行方差分析及组间多重比较。

2 结果与分析

2.1 小鼠的临床症状

从染毒试验第4天开始，试验组部分小鼠开始

出现体重减轻、活动减少、精神萎靡、采食量下降、毛色干枯、耸毛、皮毛清洁度较差、少尿或无尿、尿液呈深黄色等现象。试验第 21 天，高剂量染毒雄性小鼠开始出现死亡。

2.2 小鼠的肾功能检测结果

由表 2 可知，染毒组的 UA、BUN 含量升高，

与对照组比较，M 组差异显著，H 组差异极显著；Scr 的变化不显著；染毒组 NAG 含量升高明显，与对照组比较，L、M、H 组差异都极显著 ($P<0.01$)。雌雄性之间比较，染毒 M、H 组 NAG 含量差异显著。

表 2 小鼠的肾功能检测结果
Table 2 The measurement results of renal function of mice

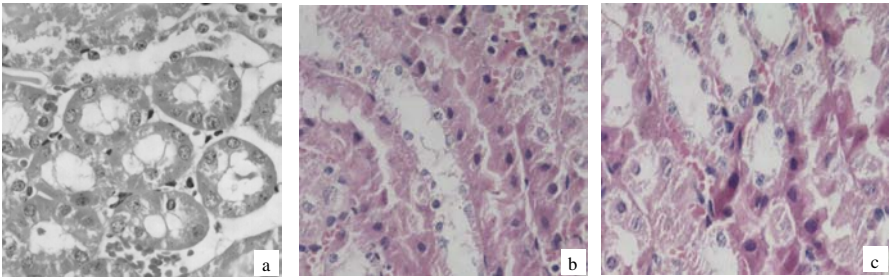
组别	NAG/U		BUN/(mg·L ⁻¹)		UA/(mmol·L ⁻¹)		Scr/(μmol·L ⁻¹)	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
CK	0.31±0.09	0.35±0.12	86.23±21.75	78.33±19.34	19.67±4.89	18.76±5.76	0.19±0.02	0.18±0.04
L	(1.19±0.28)**	(0.99±0.19)**	103.66±19.76	102.33±21.21	27.23±9.87	24.89±11.21	0.21±0.09	0.21±0.89
M	(2.43±0.67)**▲	(1.97±0.89)**	(194.43±18.21)*	(192.57±19.65)*	(37.49±13.98)*	(32.65±9.89)*	0.23±0.07	0.23±0.13
H	(5.71±1.32)**▲	(4.56±1.78)**	(234.59±28.89)**	(215.98±32.43)**	(51.67±17.86)**	(49.32±1.21)**	0.26±0.04	0.27±0.11

与CK组比较，**示差异极显著($P<0.01$)，*示差异显著($P<0.05$)；雌、雄之间比较，▲▲示差异极显著($P<0.01$)，▲示差异显著($P<0.05$)。下同。

2.3 小鼠肾组织切片结果

病理组织切片结果显示，青霉酸对肾脏的损害主要集中在肾小管。高剂量组小鼠肾小管上皮细胞空泡变性，大部分细胞出现核固缩，有的细胞核已经开始溶解；中剂量组细胞空泡变性明显，少量的

细胞出现核固缩；低剂量组主要病变是水泡变性。相同剂量的青霉酸对雄性的损伤比对雌性严重(图 1)，其中，雄性染毒组肾小管上皮细胞空泡变性，核浓缩、溶解(图 1-b)；雌性染毒组肾小管上皮细胞空泡变性，细胞核出现浓缩(图 1-c)。



a 对照组；b 雄性染毒组；c 雌性染毒组。

图 1 小鼠肾组织切片结果(×400)

Fig.1 Results of kidney biopsy treated with PA (×400)

2.4 小鼠肾脏细胞的 SOD 活性和 MDA 含量

表 3 结果表明，与对照组比较，H 组 SOD 含量差异极显著，M 组差异显著；H 组 MDA 含量升高，差异极显著；M 组雄性 MDA 含量差异显著。雌、雄性之间比较，H、M 组的 MDA 含量差异显著。

表 3 小鼠肾脏细胞的 SOD 活性及 MDA 含量
Table 3 The activity of SOD and MDA content in renal cell of mice

组别	SOD活性/(U·mg ⁻¹)		MDA含量/(nmol·mg ⁻¹)	
	雄性	雌性	雄性	雌性
CK	124.86±24.96	119.05±25.79	14.32±2.31	11.44±3.05
H	(65.52±19.69)**	(73.68±17.04)**	(29.24±3.24)**▲	(19.11±2.04)**
M	(95.52±15.84)*	(99.04±12.85)*	(20.69±3.47)*▲	15.49±3.57
L	105.28±18.34	106.20±13.94	16.95±1.39	12.92±2.46

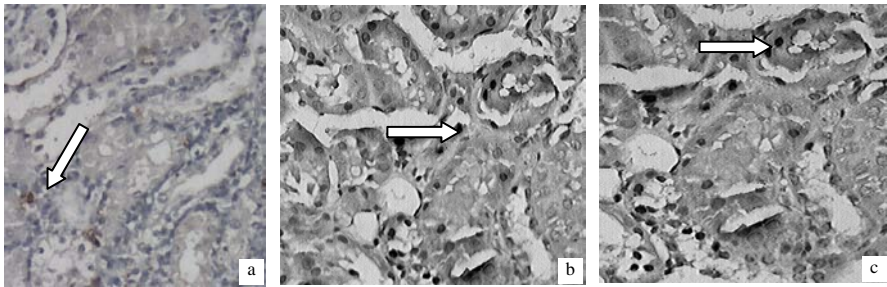
2.5 青霉酸对小鼠肾小管上皮细胞凋亡的影响

经 TUNEL 法检测，发现小鼠肾小管上皮细胞出现了凋亡(图 2)。典型的凋亡细胞表现为棕黄色，其染色质凝集、边集化，呈新月状聚集于核膜下方。对照组可见极个别凋亡细胞。与对照组比较，染毒组肾小管上皮细胞凋亡率增高。肾脏凋亡指数(表 4)表明，青霉酸剂量越高，小鼠肾小管上皮细胞凋亡越严重，雌、雄性之间差异显著。

表 4 各组小鼠肾脏细胞凋亡指数

Table 4 The apoptosis rate of mice kindey cell

组别	凋亡率/%	
	雄性	雌性
CK	3.13±1.36	3.19±1.10
H	(15.33±3.78)**▲	(12.67±2.99)**
M	(11.74±3.12)**▲	(9.03±3.13)**
L	(6.21±3.01)*▲	4.23±1.95



a 对照组；b 雄性染毒组；c 雌性染毒组。

图 2 肾小管上皮细胞凋亡水平(×400)

Fig. 2 Apoptosis of kidney epithelial cell

2.6 RT-PCR 法检测凋亡基因的表达

对凝胶电泳结果进行扫描，以 β -actin 基因作为内标，分别对不同试验组样品中 *Bcl-2*、*Bax*、*P53* 及 *Fas* 的表达水平进行分析，用 UVP Labworks

Analysis Software 图像分析软件分析目的片段条带的灰度值，计算 *Bcl-2*、*Bax* 及 *P53* 与内标 β -actin 的灰度比值见表 5。

表 5 各组基因表达灰度比值

Table 5 Expression of in kindey cells with different groups

组别	<i>Bcl-2</i>		<i>Bax</i>		<i>P53</i>		<i>Fas</i>	
	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄
CK	1.08±0.23	0.87±0.23	0.92±0.12	0.98±0.23	0.82±0.12	0.71±0.12	0.97±0.11	0.93±0.21
L	0.92±0.16	0.77±0.19	0.96±0.23	1.01±0.22	0.96±0.20	0.77±0.10	0.91±0.21	0.89±0.19
M	0.93±0.15	(0.694±0.23)*▲	1.02±0.22	1.16±0.25	1.023±0.22	0.88±0.21	(0.427±0.10)**▲▲	0.82±0.17
H	(0.70±0.11)**	(0.44±0.14)**▲	(1.10±0.29)*	(1.32±0.23)*	(1.04±0.20)*	(0.99±0.19)*	(0.37±0.09)**▲▲	0.76±0.17

各基因的组间差异和雌、雄间差异如下。

Bcl-2 基因：与对照组比较，H 组灰度比值下降，差异极显著；M 组雄性灰度比值下降，差异显著。雌、雄性之间比较，H、M 组差异显著。

Bax 基因：与对照组比较，H 组灰度值上升，差异明显。

P53 基因：与对照组比较，H 组灰度值上升，差异显著。

Fas 基因：与对照组比较，H、M 组雌性灰度值下降，差异极显著；雌、雄性比较，H、M 组差

异极显著。

3 结论与讨论

青霉酸存在于饲料中给畜禽养殖带来了严重的危害，其毒性主要为肝毒性、肾毒性^[5]。

肾脏是机体内尿素、Scr、UA 的主要代谢器官。当肾脏出现疾病时，体内尿素、Scr、UA 的清除速率下降，在血清中的含量改变，故可以将 BUN、Scr、UA 在血清中的含量作为检验肾脏功能的主要指标^[7]。同时测定血清尿素氮和肌酐的含量用于不

同肾功能疾病的诊断。血清尿酸(UA)是嘌呤类的代谢终末产物,经血液循环后主要从肾脏排出。当肾功能减退时,UA增高。试验中,染毒组BUN浓度显著升高,而肌酐浓度变化不明显,说明青霉酸主要损伤部位是肾小管。高剂量青霉酸染毒小鼠血液中的BUN,UA含量显著升高,但肌酐升高不明显,说明青霉酸对肾脏造成的损伤很严重,并且损伤部位主要集中在肾小管^[8]。正常情况下NAG不能通过肾小球过滤膜。当肾小管受损时,尿中NAG含量明显升高。试验结果表明,小鼠尿中NAG的含量随着青霉酸剂量的增加而逐渐升高,这也说明青霉酸对小鼠肾脏损伤的主要部位在肾小管,并且对高、中剂量组雄性小鼠肾小管的损伤大于雌性。

氧化损伤是青霉酸损伤肾脏的一种作用机制^[9]。青霉酸高、中剂量组,肾脏组织中SOD的活性明显较低,MDA含量较高,说明高剂量青霉酸使肾脏抗氧化能力下降。随着青霉酸浓度的升高,SOD活性下降,二者呈剂量效应关系。MDA含量与SOD活性的变化相反,随着青霉酸浓度的升高,MDA含量明显上升,说明脂质过氧化损伤加重。

青霉酸能加速肾小管上皮细胞的凋亡。随着青霉酸剂量的增大,促进凋亡基因*Bax*和*P53*的表达量明显升高;抑制凋亡基因*Bcl-2*的表达水平下降。其中,高剂量组的*Bcl-2*基因表达最弱,从而证实青霉酸通过促进凋亡基因*Bax*和*P53*的表达,抑制*Bcl-2*的表达来促进肾脏细胞发生凋亡^[10],也表明青霉酸引起肾脏组织细胞凋亡是导致肾脏损伤的作用机理。青霉酸引起的肾细胞凋亡不是简单的通过促进或抑制几个基因调控的,而是一个很复杂的过程。

不同性别小鼠的毒性试验结果表明,青霉酸对雄性的肾脏损伤大于雌性,这主要有两方面的原因:1)青霉酸通过调控*Bcl-2*和*Fas*的表达来调控凋亡,虽然染毒组小鼠的*Fas*表达都下降,但雌性的下降幅度远远大于雄性,这说明雌性可能通过另外的途径来抑制*Fas*的表达,从而减缓凋亡。2)从

雄、雌性氧化指标来看,SOD活性的变化不明显,但MDA含量的变化很明显,说明雌性可能通过其他的抗氧化物质来抵抗青霉酸的损伤。

参考文献:

- [1] Kurtzman C, Ciegler A. Mycotoxin from a blue-eye mold of corn[J]. *Applied Microbiology*, 1970, 20(2): 204-207.
- [2] Grabsch C, Wichmann G, Löffhagen N, et al. Cytotoxicity assessment of gliotoxin and penicillic acid in *Tetrahymena pyriformis*[J]. *Environ Toxicol*, 2006, 21(2): 111-117.
- [3] Thomas G, Rand G S, Flemming J, et al. Inflammatory and cytotoxic responses in mouse lungs exposed to purified toxins from building isolated *Penicillium brevicompactum* dierckx and *P. chrysogenum* thom[J]. *Vet Med*, 2005, 36(3): 175-181.
- [4] Keblyš, Modestas, Bernhoft, et al. The effects of the *Penicillium mycotoxins* citrinin, cyclopiazonic acid, ochratoxin A, patulin, penillic acid, and roquefortine C on *in vitro* proliferation of porcine lymphocytes[J]. *Mycopathologia*, 2005, 158(3): 317.
- [5] 何祖平,袁慧,丰美福. 青霉酸对尼西鸡的毒性作用[J]. *动物学研究*, 2002, 23(3): 261-265.
- [6] 袁慧,李文平,周可炎,等. 家兔圆弧青霉菌毒素中毒的临床与病理学观察[J]. *湖南农业大学学报:自然科学版*, 1999, 25(3): 233-235.
- [7] 李发生,徐霞,郭乐,等. 赭曲霉毒素A的毒性研究进展[J]. *山东畜牧兽医杂志*, 2009, 30(5): 58-60.
- [8] DeBelle F D, Nortier J L, De Prez E G, et al. Aristolochic acids induce chronic renal failure with interstitial fibrosis in salt-depleted rats[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2002, 13(2): 431-436.
- [9] 宋薇薇,韩玉昆,尚涛. 胎鼠宫内窘迫后脑组织SOD、MDA及NO的变化[J]. *中华围产医学杂志*, 2000, 3(1): 78-82.
- [10] J Olenius S. Mitochondrial regulation of apoptotic cell death[J]. *Toxicol Lett*, 2004, 149(1/3): 19-23.

责任编辑:王赛群

英文编辑:罗文翠