

豆类丝核菌次级代谢产物对动植物细胞损害作用的对比

杨鸣琦, 张黎

(西北农林科技大学动物科技学院, 杨凌 712100)

摘要: 【目的】探索豆类丝核菌或其次级代谢产物的动植物损害在细胞生物学上的作用, 为苦马豆素 (swainsonine, SW) 的毒理学研究提供新的思路。【方法】通过制作豆类丝核菌次级代谢产物污染的饲料和人工污染豆类丝核菌饲料, 饲喂家兔 17d, 剖检家兔并取其脑、肝脏、肾脏等组织分别进行病理组织学和电镜观察; 并将不同浓度的次级代谢产物和不同株的豆类丝核菌分别污染回接的绿豆, 待 84h 培养后, 进行组织学和电镜观察。【结果】在对动植物细胞损害作用中, 豆类丝核菌次级代谢产物使家兔脑组织和淋巴细胞呈现空泡变性, 神经细胞核糖体脱颗粒, 粗面内质网扩张等变化; 同时还能使植物根部组织结构受损, 细胞呈现空泡变性, 内膜破裂等变化。【结论】豆类丝核菌引起的动物中毒作用主要是其次级代谢产物中 SW 发挥毒性, 且同疯草中毒引起的病理变化基本一致; 菌株对植物根部的致病性与其次级代谢产物中 SW 含量呈正相关。即推测, SW 很有可能不仅是动物豆类丝核菌中毒的主要毒素, 而且是豆科植物丝核菌病中细胞损害的主要化学物质。

关键词: 豆类丝核菌; 次级代谢产物; 苦马豆素; 毒性

The Contrast of The Damage to Animal and Plant Cell by Secondary Metabolites of *Rhizoctonia leguminicola*

YANG Ming-qi, ZHANG Li

(College of Animal Science and Technology, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry University, Yangling 712100)

Abstract: 【Objective】The damage effect and cellular biological relationship of animal and plant cell by *Rhizoctonia leguminicola* and its secondary metabolites was studied. All these can provide new thoughtfulness for the study on toxicology. 【Method】The *Rhizoctonia leguminicola* and the secondary metabolites of *Rhizoctonia leguminicola* were interfused into feedingstuff of the rabbit, and these rabbits were fed for 17 days, then the rabbits were killed and pathological obserbvation of brain, liver, kidney was carried out under optical microscope and TEM. 【Result】In the experiment of the damage effects of cells from animal and plant body by the secondary metabolites of *Rhizoctonia leguminicola*, the rabbit brain and lymphocyte showed vacuolar degeneration, and the granule of ribosome was broken off in neurocyte, and also expressed dilatation of RER. And the plant root tissue expressed the structural damage, and the cell showed vacuolar degeneration and breach of the inner membrane. 【Conclusion】These results show that the reason of poisoning of *Rhizoctonia leguminicola* to animal is that SW in the secondary metabolites bring into important play, and this effect is identical with locoweed toxicosis basically. The damage of the plant cell had positive correlation with the content of SW in the the secondary metabolites of *Rhizoctonia leguminicola*. It is suspected that SW is not only a kind of important toxin in the toxicosis of animal, but also a sort of chemical substance in the cell damage of legume plant.

Key words: *Rhizoctonia leguminicola*; Secondary metabolites; Swainsonine; Toxicity

0 引言

【本研究的重要意义】本研究将为豆类丝核菌引起动植物的毒害作用机理提供重要依据, 同时为解决

因为苦马豆素引起的动植物细胞中毒提供理论基础。

【前人研究进展】疯草 (黄芪属和棘豆属部分植物) 能引起牛、羊、猪、兔等动物出现不同程度的慢性中毒, 一般认为疯草中毒的主要毒物是苦马豆素

收稿日期: 2005-01-17; 接受日期: 2005-12-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30270979); 陕西省自然科学基金资助项目 (2003C119)

作者简介: 杨鸣琦 (1963-), 男, 陕西扶风人, 教授, 硕士, 研究方向为动物病理学。Tel: 13572177081; Fax: 029-87092164; E-mail: xbdymq@163.com

(swainsonine, SW)^[1~6]。SW 同时也被认为是豆类丝核菌污染饲料引起流涎征的主要成分之一,并能引起类似于疯草中毒的病理变化^[7]。杨鸣琦等首次在国内分离出的豆类丝核菌,与国外报道的该菌生理、形态特性相一致,同时发现了该菌的植物致病性和所提取的 SW 抗肿瘤作用^[8,9]。进一步研究发现该菌的次级代谢产物中含有大量的 SW^[10]。此外,豆类丝核菌又是豆科植物幼芽发生烂根、枯萎的重要致病菌。【本研究切入点】运用国内分离的豆类丝核菌污染饲料是否同样可引起动物中毒;中毒是菌体本身作用还是该菌的次级代谢产物作用;该菌的植物致病作用是否也同次级代谢产物 SW 相关;动物中毒与植物致病在细胞生物学角度上是否存在一定的关系,这些疑问目前仍未解决。【拟解决的关键问题】本试验旨在运用病理学方法分析豆类丝核菌次级代谢产物对动植物细胞的损害作用,并将动物中毒与植物致病作用进行比较,找到其与次级代谢产物 SW 的关系。

1 材料与方法

1.1 主要仪器

AO 组织切片机: WARNER-LAMBERT TECH. INC, 美国。JEM-100SX 透射电子显微镜: 日本 JEOL 公司。XSZ-4G 型光学显微镜, 重庆光学仪器厂。Coolpix995 型数码相机, 日本 NIKON 公司。ZPQ-280B 智能气候培养箱: 哈尔滨东拓科技发展有限公司。SW-CJ-IF 型医用洁净工作台: 苏州安泰空气技术有限公司。1602MP8-1 型电子天平(万分之一): 德国 SARTORIUS COTTINGEN 公司。

1.2 主要试剂及其配制

豆类丝核菌: 菌株 02-6B 和 94-2B, 由西北农林科技大学动物病理学实验室提供。次级代谢产物液 I: 将豆类丝核菌 14d 发酵液稀释为内含 SW $0.54\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, 煮沸灭菌, 待用。次级代谢产物液 II: 将豆类丝核菌 14d 发酵液稀释为内含 SW $0.14\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, 煮沸灭菌, 待用。

1.3 试验动物与植物

家兔: 中国本兔, 购于陕西杨凌周边农村, 体重 500g 左右, 共 9 只, 雄性。绿豆: 秦豆 2 号, 购于陕西杨凌市场。

1.4 动物分组

A 组: 饲喂次级代谢产物组, 家兔 3 只, 每天每只定时饲喂含有豆类丝核菌次级代谢产物饲料 7 g 及胡萝卜、白菜等(每天摄入 SW 约为 $14.5\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\text{bw}$),

饲喂 17 d。B 组: 丝核菌污染饲料组, 家兔 3 只, 每天每只定时饲喂人工污染豆类丝核菌饲料 II 7 g 及胡萝卜、白菜等, 饲喂 17 d。C 组: 空白组, 家兔 3 只, 每天每只饲喂普通饲料 7 g 及胡萝卜、白菜等, 饲喂 17 d。

1.5 试验用绿豆及其分组

I 组: 空白对照组, 将绿豆回接于少氮半固体培养基中培养^[10], 共 4 管。II 组: 将绿豆回接于培养基的同时, 在培养基中接种菌株 02-6B, 共 4 管。III 组: 将绿豆回接于培养基的同时, 在培养基中接种菌株 94-2B, 共 4 管。IV 组: 将绿豆回接于含有高浓度次级代谢产物的培养基中(含 SW $270\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), 进行培养, 共 4 管。V 组: 将绿豆回接于含有低浓度培养基中(含 SW $70\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), 进行培养, 共 4 管。VI 组: 将绿豆回接于培养基中培养 24 h 后, 滴加次级代谢产物液高浓度 0.4 ml(含 SW $72\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 后继续培养。VII 组: 将绿豆回接于培养基中培养 24 h 后, 滴加低浓度次级代谢产物液 0.4 ml(含 SW $18.67\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 后继续培养。

1.6 中毒家兔的组织学与电镜观察

将各组家兔于试验的第 17 天后处死, 取血液并涂片, 瑞氏染色, 于 1 000 倍油镜下观察淋巴细胞。将小脑、大脑、心脏、脾脏、肾脏用 10% 中性福尔马林固定, 石蜡包埋, 连续切片, 片厚 4 μm , 光镜观察。取大脑、小脑及肝组织用 2.5% 戊二醛固定, 制作超薄切片, 片厚 300 \AA , 透射电镜观察。

1.7 回接绿豆试验及其组织学与电镜观察

在无菌条件下, 将绿豆用 0.1% HgCl_2 浸泡 5 min, 无菌水冲洗 6 次, 再将绿豆置于含有无菌水的灭菌平皿中, 25 $^{\circ}\text{C}$ 温箱培养, 每隔 24 h 换无菌水 1 次。培养 72 h 时将已发芽的绿豆分别接种于各组试管中, 在光照气候箱内培养, 培养条件: 白天 5: 00~19: 00 (14 h), 25 $^{\circ}\text{C}$, 4 级光照度; 夜间 19: 00~5: 00 (10 h), 20 $^{\circ}\text{C}$, 无光照, 连续培养 48 h。48 h 后按照白天 5: 00~19: 00 (14 h), 22 $^{\circ}\text{C}$, 4 级光照度; 夜间 19: 00~5: 00 (10 h), 15 $^{\circ}\text{C}$, 无光照, 再培养 36 h。将回接培养共 84 h 的各组豆苗进行大体观察、拍照; 并将各组豆苗中病变部位取样用 FAA 固定液抽气固定, 石蜡包埋, 连续切片, 片厚 10 μm , 番红-固绿染色, 光镜观察。另取培养后豆苗病变组织用 4% 戊二醛抽气固定, 制作超薄切片, 片厚 600 \AA , 透射电镜观察。

2 结果与分析

2.1 家兔中毒试验结果

兔病变组织光镜观察, A、B 两组家兔, 经 17 d 培养后, 血涂片中淋巴细胞均出现轻度空泡变性, C 组血液涂片未见异常。A、B 两组小脑浦肯野氏细胞空泡变性, 并出现卫星化及噬神经现象; 大脑中有个别神经细胞出现核浓缩与卫星化现象, 并有小胶质细胞及神经细胞的空泡变性(图 1), 毛细血管周围水肿; 肾间质淤血, 肾小管上皮细胞颗粒变性; 肝脏淤血, 肝细胞颗粒变性, 个别动物肝细胞呈脂肪变性; 心肌颗粒变性及肝脏胆管增生以 A 组更为明显。

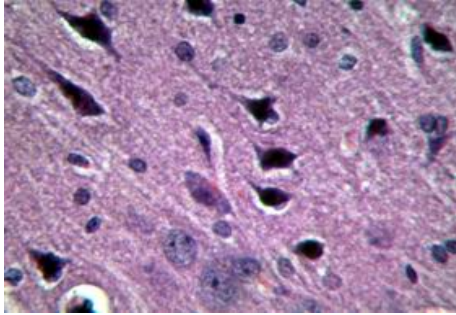


图 1 17d 时 II 组大脑神经细胞空泡变性 (H.E., $\times 400$)

Fig.1 Vacuolar degeneration of cerebra neurone in group II, in day 17 (H.E., $\times 400$)

家兔病变细胞电镜观察, A 组脑组织中神经细胞皱缩, 密度增大, 个别神经细胞肿胀, 内质网扩张, 核糖体脱颗粒(图 2), 脑组织血管内皮水肿; B 组中脑组织除以上情况外, 还可见吞噬细胞溶酶体增多, 出现噬神经现象。A、B 两组肝组织窦内出现嗜中性

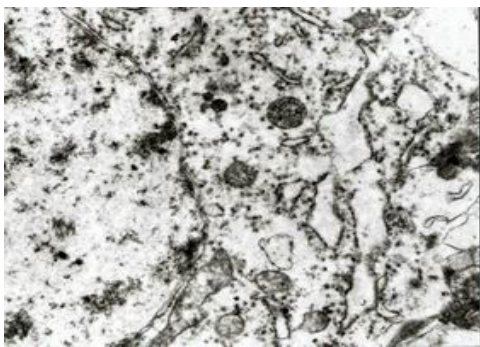


图 2 17d 时 I 组神经细胞粗面内质网扩张, 核糖体脱颗粒 (TEM 观察, $\times 11\ 600$)

Fig.2 Expansion of rough endoplasmic reticulum of neurone, and the granule dropped from ribosome in group I, in day 17 (TEM, $\times 11\ 600$)

粒细胞, 毛细胆管扩张, 肝细胞线粒体分散存在, 且糖原增多, 枯否氏细胞溶酶体增多。

2.2 回接绿豆试验结果

大体观察, II~VII 组豆苗根部均出现不同程度的褐斑、豆苗萎缩, 其中 IV 组豆苗生长完全受到抑制, 根部只有主根无须根, 且主根萎缩, 溃烂, 颜色变褐。除 IV 组外, II、VI 组褐斑等病变较 III 组和 V 组严重; VII 组病变最轻, 与 I 组(对照组)情况接近。

光镜观察, II~VII 组豆苗根部横断切片的疏导组织、导管或筛管中均有侵填体产生, 部分细胞结构破损或坏死。II、IV、VI 3 组侵填体产生较多, 维管束病变严重, 细胞坏死数量多, 而 III、V 组病变相对较轻; VII 组病变最轻。这与大体观察结果相一致。

透射电镜观察, II~VII 组根部细胞多表现为空泡变性或细胞坏死或细胞结构消失, 有时细胞壁破裂或线粒体游走并进入液泡中(图 3)。IV 组则表现为广泛的细胞坏死(图 4)。VI 组还表现有细胞内膜破裂, 叶绿体固缩、颜色加深及叶绿体空泡变性等变化。

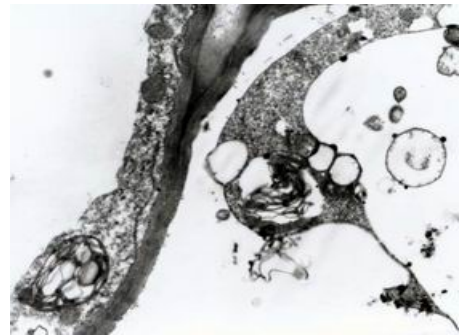


图 3 III 组豆苗根部细胞胞器广泛空泡化 (TEM 观察, $\times 7\ 250$)

Fig.3 Vacuolar degeneration of root cell of mung in group III (TEM, $\times 7\ 250$)

3 讨论

3.1 豆类丝核菌次级代谢产物对家兔的毒性作用

本试验中, 经饲喂含有豆类丝核菌(A 组)或其次级代谢产物(B 组)的饲料 17 d, 均未出现临床症状, 但经病理组织学及电镜观察, 家兔的脑、肝、肾、心都有不同程度的细胞病变。淋巴细胞、小脑浦肯野氏细胞及大脑的小胶质细胞与神经细胞的空泡变性, 则与家畜疯草中毒的病理变化相同, 这表明该次级代谢产物或豆类丝核菌的中毒主要是由 SW 引起的, 再

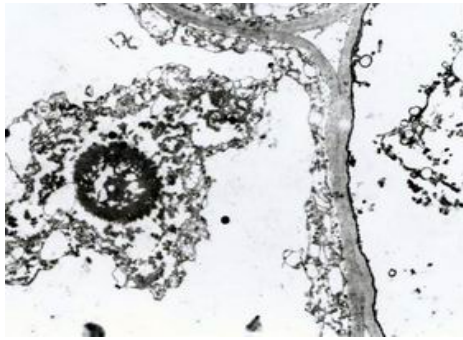


图 4 IV组豆苗根部细胞坏死 (TEM 观察, $\times 7250$)

Fig. 4 Necrosis of of root cell of mung in group IV (TEM, $\times 7250$)

次表明 SW 引起的动物中毒具有一定的贮积作用, 属于慢性中毒, 并与国外研究的疯草中毒表现相一致^[1~3]。A、B 两组家兔中毒的病理变化基本一致, 这不但表明该菌污染的饲料与国外报道的^[11~13]豆类丝核菌引起的动物中毒相似, 而且还表明豆类丝核菌污染所引起的动物中毒主要是由其产生的次级代谢产物 SW 所致。此外, 在病理组织学变化中脑组织毛细血管水肿, 肾小管上皮细胞颗粒变性, 心肌细胞颗粒变性及肝脏淤血、肝细胞颗粒变性等则与文献^[5, 6, 14]中家兔、羊、小鼠的疯草中毒病变相似, 表明 SW 除了对以脑组织为主的神经系统进行损害外, 还能损害心、肝、肾等重要器官的组织细胞。

结合电镜观察结果, 神经细胞的皱缩、细胞密度增大及光镜和电镜中均观察到的噬神经现象表明, 该次级代谢产物的神经毒害作用, 可导致神经细胞的坏死。神经细胞内质网扩张与核糖体脱颗粒, 表明这些神经细胞的损伤、坏死与其蛋白质合成代谢障碍有关, 特别是膜表面的蛋白质合成受到影响。膜表面蛋白既是膜结构蛋白, 还是多种离子与营养物质运输的通道, 因此推测含有 SW 的次级代谢产物可使整个神经细胞的营养代谢发生紊乱。此外, 在电镜观察中还观察到吞噬细胞内溶酶体增多, 这可能与 SW 对 α -甘露糖苷酶的抑制作用有关, 从而导致部分合成的低聚糖及糖蛋白在溶酶体内的聚积, 出现溶酶体贮积症。

由此可见, 豆类丝核菌引起动物中毒主要是其次级代谢产物发挥作用, 其中以 SW 为主, 且同疯草中毒引起的病理变化基本一致。

3.2 豆类丝核菌次级代谢产物对绿豆苗的致病作用

从大体观察看, 不论是接种豆类丝核菌还是应用其次级代谢产物, 豆苗根部均能出现褐斑或溃烂, 且

高浓度次级代谢产物组 (含 SW $270 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 的豆苗生长完全受到抑制。由此可以看出, 该菌对植物致病作用与动物中毒相似, 都是次级代谢产物 SW 发挥主导作用。在组织学观察中, II~VII 组均有不同程度的维管束病变, 植物的疏导组织、导管或筛管均有侵填体产生, 并伴有部分细胞的破损、坏死, 从而表明, 该代谢产物可导致植物水分和营养物质的运输受阻。在 IV~VII 组中, 随着该次级代谢产物 SW 浓度的增加, 病变程度越重, 侵填体越多; 即表明 SW 在培养基中的浓度与病变程度呈正相关。此外, II 组豆苗根部的病变明显比 III 组严重, 即表明 02-6B 菌株致病性比 94-2B 菌株致病性强。

3.3 豆类丝核菌次级代谢产物对动植物细胞损害的对 比

从动植物细胞的超微结构上来看, 豆苗根部细胞病变与动物中毒后神经细胞病变一致, 均出现空泡变性, 此即 SW 细胞损害作用的特征病变; 结合 SW 含量与植物致病性的正相关作用, 推测该次级代谢产物对植物的致病作用仍以 SW 为主。植物细胞的细胞壁与内膜的破裂与动物中毒时细胞膜表面蛋白结构的损害作用^[15]有一定的相似性, 故很可能在植物中仍是因 SW 的作用导致甘露糖苷酶 II 抑制, 使膜表面蛋白与细胞骨架合成障碍。植物中侵填体增加与动物细胞中糖元蓄积、粗面内质网扩张、脱颗粒等均是营养物质运输受阻所致。豆苗的叶绿体在次级代谢产物的作用下出现了固缩, 颜色加深及空泡变性, 这些病变在动物细胞中是无法见到的; 而动物吞噬细胞溶酶体增多也是在植物中无法发现的。但有一点可以肯定, 即 SW 对动植物细胞的总体作用均是阻断或抑制了细胞正常的物质运输与能量代谢。动物的 SW 中毒机理已基本确定: SW 为 α -甘露糖苷酶的抑制剂, 从而引起细胞代谢紊乱^[16], 从豆类丝核菌次级代谢产物作用于豆苗后细胞超微结构病变与动物细胞病变的相似性上推测, SW 很有可能不仅是动物豆类丝核菌中毒的主要毒素, 而且是豆科植物丝核菌病中引起细胞损害的主要化学物质。而要真正确定这一推论, 并深入研究 SW 在动植物细胞中对具体代谢途径的影响, 以及该次级代谢产物中 SW 以外的生物碱在动物中毒与植物致病中发挥的作用等一系列问题仍有待进一步研究。

4 结 论

豆类丝核菌次级代谢产物对动植物细胞的毒性作用在超微结构的损伤上相似, 表明该类物质对动植物

细胞的毒害作用机理有相似之处。而豆类丝核菌引起的动物中毒作用主要是其次级代谢产物中 SW 发挥毒性, 且同疯草中毒引起的病理变化基本一致; 菌株对植物根部的致病性与其次级代谢产物中 SW 含量呈正相关。因此推测, SW 很有可能不仅是动物豆类丝核菌中毒的主要毒素, 而且是豆科植物丝核菌病中细胞损害的主要化学物质。

References

- [1] Pfister J A, Stegelmeier B L, Cheney C D, James L F, Molyneux R J. Operant analysis of chronic locoweed intoxication in sheep. *Journal of Animal Science*, 1996, 74: 2622-2632.
- [2] Elbein A D, Solf R, Dorling P R, Vosbeck K. Swainsonine: an inhibitor of glycoprotein processing. *The Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 1981, 78: 7393-7397.
- [3] Dugarte-Stavanja M, Smith G S, Edrington T S, Hallford D M. Failure of diefary bentonite clay, Silent Herder mineral supplement, or parenteral Banamine to alleviate locoweed toxicosis in rats. *Journal of Animal Science*, 1997, 75: 1867-1875.
- [4] Dawn D, Patricia S, Tony H, Mike M, Barton W, Elbein A D. Isolation and characterization of swainsonine from Texas locoweed (*Astragalus emoryanus*). *Plant Physiology*, 1984, 76: 972-975.
- [5] Croom W J, Hagler W M, Frotschel M A, Johnson A D. The involvement of slaframine and swainsonine in slobbers syndrome: a review. *Journal of Animal Science*, 1995, 73: 1499-1508.
- [6] 杨鸣琦, 曹光荣, 李绍君. 豆类丝核菌中苦马豆素的提取. 西北农业大学学报, 1998, 4(26): 87-90.
- Yang M Q, Cao G R, Li S J. Abstraction of swainsonine from *Rhizoctonia leguminicola*. *Acta University Agriculture Boreali-occidentalis*, 1998, 4(26): 87-90. (in Chinese)
- [7] 杨鸣琦, 曹光荣, 李绍君, 高峰, 王安福. 苦马豆素对小白鼠移植性肿瘤 S₁₈₀、ARS 的抑制试验. 动物医学进展, 1998, 19(2): 26-29.
- Yang M Q, Cao G R, Li S J, Gao F, Wang A F. A Study on inhibition of mice with tumor S₁₈₀ and ARS by swainsonine. *Progress of Veterinary Medicine*, 1998, 19(2): 26-29. (in Chinese)
- [8] 张黎, 杨鸣琦, 周宏超, 蒲鹏, 曹光荣. 豆类丝核菌发酵代谢产物中苦马豆素的测定. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2003, 31(6): 124-126.
- Zhang L, Yang M Q, Zhou H C, Pu P, Cao G R. The study of SW in the metabolism product of *Rhizoctonia leguminicola*. *Journal of Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry (Natural Science Edit)*, 2003, 31 (6): 124-126. (in Chinese)
- [9] Hibbard B, Moseley W M, Robinsons J A, Bouchers J F. The effect of daily slaframine injection of salivary score, feed intake, ruminal pH, and circulating concentrations of somatotropin and insulin-like growth factor I. *Journal of Animal Science*, 1995, 73: 526-533.
- [10] Broquist H P, Mason P S, Hagler W M, Harris T M. Identification of swainsonine as a probable contributory mycotoxin in moldy forage mycotoxicoses. *Applied and Environment Microbiology*, 1984, 48: 386-388.
- [11] Kang M S, Elbein A D. Mechanism of inhibition of jack bean α -mannosidase by swainsonine. *Plant Physiology*, 1983, 71: 551-554.
- [12] 王凯, 何宝祥, 羊秀措. 家兔实验性黄花棘豆中毒的临床症状及病理学观察. 中国兽医科技, 1995, 25(2): 26-27.
- Wang K, He B X, Yang X C. Clinical symptom and pathology observation of poisoned rabbits by *O. ochirocephala* in lab conditions. *Chinese Journal of Veterinary Science and Technology*, 1995, 25(2): 26-27. (in Chinese)
- [13] 王生奎, 安清聪, 李志祥, 王旭东. 家兔及绵羊变异黄芪中毒的病理形态学观察. 甘肃畜牧兽医, 1998, 28(4): 14-15.
- Wang S K, An Q C, Li Z X, Wang X D. Pathology observation of poisoned rabbits and sheep by *A. variabilis*. *Gansu Animal and Veterinary Sciences*, 1998, 28(4): 14-15. (in Chinese)
- [14] 丁伯良, 王建辰, 薛登民, 王淑娥. 甘肃棘豆及中毒奶山羊尿液、胎水、胎儿胎盘中苦马豆素的检验. 草地学报, 1994, 2(2): 66-73.
- Ding B L, Wang J C, Xue D M, Wang S E. The detection of swainsonine from *Oxytropis kansuensis* and urine, placental fluid and fetoplacenta of poisoned dairy goats. *Acta Agrestia Sinca*, 1994, 2(2): 66-73. (in Chinese)
- [15] 陶厚权. 抗癌药 Swainsonine 的基础与临床研究进展. 国外医药—合成药、生化药、制剂分册, 1997, 18(1): 34-36.
- Tao H Q. The basic and clinical progress on swainsonine as a antitumour drug. *World Pharmacy*, 1997, 18(1): 34-36. (in Chinese)
- [16] Tulsiani D R P, Harris T M, Touster O. Swainsonine inhibits the biosynthesis of complex glycoproteins by inhibition of Golgi mannosidase II. *Journal of Biological Chemistry*, 1982, 257: 7936-7939.

(责任编辑 林鉴非)