

黄曲霉毒素 B₁ 致雏鸭肝脏细胞 DNA 的损伤效应

王瑞国¹, 侯水生², 苏晓鸥¹

(¹中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所, 北京 100081; ²中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100193)

摘要: 【目的】(1) 研究黄曲霉毒素 B₁ (AFB₁) 不同染毒水平 (3, 30, 300 μg·kg⁻¹ BW) 染毒后, 在不同时间点导致雏鸭肝细胞 DNA 损伤情况; (2) 探明 AFB₁ 染毒剂量及染毒时间与雏鸭肝细胞 DNA 损伤之间的关系, 为 AFB₁ 遗传毒性提供研究模型。【方法】96 只雄性北京鸭雏鸭, 随机分为 16 组, 每组 6 只。第 1 组为对照组, 第 2 至 6 组为低剂量 (染毒) 组、第 7 至 11 组为中剂量 (染毒) 组、第 12 至 16 组为高剂量 (染毒) 组。对照组、低剂量组、中剂量组、高剂量组雏鸭分别灌胃 25% DMSO 水溶液, 0.25, 2.5, 25 μg·mL⁻¹ 溶液各 1 mL, 对照组于灌胃 1 h 后, 各剂量染毒组分别于灌胃染毒 1、2、8、24、48 h 用彗星试验检测肝细胞 DNA 损伤。【结果】试验表明, 雏鸭对于 AFB₁ 导致的肝细胞 DNA 损伤非常敏感, 肝细胞 DNA 损伤程度与 AFB₁ 摄入量以及摄入时间有关。经口染毒 2 h 左右 DNA 损伤达到高峰, 所有染毒组在尾长、尾部 DNA 百分含量、尾矩、Olive 尾矩等指标上均显著高于对照组 ($P < 0.05$); 随着 AFB₁ 染毒剂量增加, DNA 损伤程度加深、持续时间延长。【结论】(1) AFB₁ 致雏鸭肝细胞 DNA 损伤的效应非常强, 低剂量 (3 μg·kg⁻¹ BW) AFB₁ 暴露就能够引起雏鸭肝细胞 DNA 发生显著损伤。(2) 经口染毒 AFB₁ 2 h 后雏鸭肝细胞 DNA 损伤达到高峰, 此时 DNA 损伤程度与 AFB₁ 暴露之间的量效关系最为明显。(3) 雏鸭是研究 AFB₁ 遗传毒性的一个良好动物模型, 彗星试验能够反映 AFB₁ 致雏鸭肝细胞 DNA 损伤的量效关系。

关键词: 黄曲霉毒素 B₁; DNA 损伤; 彗星试验; 雏鸭

Study on the Induction of DNA Damage in Hepatic Cells by Aflatoxin B₁ in Ducklings

WANG Rui-guo¹, HOU Shui-sheng², SU Xiao-ou¹

(¹Institute of Quality Standards and Testing Technology for Agro-Products, Chinese Academy of Agricultural Science, Beijing 100081; ²Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193)

Abstract: 【Objective】Aflatoxin B₁ (AFB₁) is one of the most potent naturally occurring carcinogens and classified as a group I carcinogen. This study has two objectives: (1) To evaluate the effect of 3, 30, 300 μg·kg⁻¹ BW on DNA damage in hepatic cells in Beijing ducklings at different times after administrated by oral feeding. (2) To study the relationship between the level of DNA damage and concentration of AFB₁, time after exposed to AFB₁, to provide research model for genotoxicity of AFB₁. 【Method】Ninety-six male Beijing ducklings were randomly divided into 16 groups with 6 ducklings in each one. Each duckling in group 1 was administered orally with 1 mL 25% DMSO solution as control, and low (group 2 to 6), moderate (group 7 to 11), high (group 12 to 16) AFB₁ exposure groups were given 1 mL with 0.25, 2.5, 25 μg·mL⁻¹ 25% DMSO solution by gavage, respectively. The modified comet assay was performed at 1 h in control group, and at 1, 2, 8, 24, 48 h in AFB₁ exposure groups on hepatic cells after AFB₁ administration. 【Result】The results showed that ducklings were sensitive to hepatic DNA damage induced by AFB₁, and the level of DNA damage was associated with concentration and time after AFB₁ intake. DNA strand breaks reached peak value at 2 h of exposure, and all different doses of AFB₁ could induce significantly higher tail length, tail DNA%, tail moment, Olive tail moment than in control group ($P < 0.05$). With AFB₁ concentration increasing, the duration of DNA damage prolonged, and under the

收稿日期: 2009-06-30; 接受日期: 2009-11-05

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划重点项目 (2006BAD12B03)

作者简介: 王瑞国, 硕士研究生。Tel: 010-82106576; 13811751877; E-mail: wangruiquoofficial@yahoo.com.cn. 通信作者苏晓鸥, 研究员, 博士。Tel: 010-82106307; E-mail: suxiaou@caas.net.cn

condition of the same treatment time, the DNA damage was more serious. 【Conclusion】 From the results, three conclusions were drawn as follows: (1) Ducklings are sensitive to DNA damage in live cells induced by AFB₁, and low level (3 μg·kg⁻¹ BW) exposure of AFB₁ can induce significantly hepatic DNA damage in ducklings. (2) The level of DNA damage reached the peak at 2 h after a single oral administration of AFB₁, and at this time the dose-effect relationship was obvious in this experiment. (3) Duckling is an ideal animal model for study of AFB₁ genotoxicity, and comet assay is a useful tool for monitoring the hepatic DNA damage induced by AFB₁ in ducklings.

Key words: aflatoxin B₁; DNA damage; comet assay; duckling

0 引言

【研究意义】黄曲霉毒素 (aflatoxin, AF) 易发生于热带和亚热带地区, 主要污染谷物及其它食品, 其中黄曲霉毒素 B₁ (AFB₁) 是迄今所知最强的致肝癌物质之一^[1], 被世界卫生组织 (WHO) 癌症研究机构 (International Agency for Research on Cancer, IARC) 划定为 I 类致癌物^[2]。AF 是饲料中存在最普遍、危害最严重的一种霉菌毒素, 据统计, 目前世界上至少 25% 的谷物被霉菌毒素污染, 其中最为严重的就是 AF 污染^[3], 其主要危害表现在对动物多系统的直接破坏, 高强度地抑制动物的免疫系统, 与动物疫情流行有着密切关系^[4]。【前人研究进展】AFB₁ 在肝细胞内代谢活化成具有高致癌活性的 8, 9-环氧 AFB₁ (AFB₁-8, 9-epoxide, AFBO), AFBO 能够与 DNA 分子共价结合形成 AFB₁-DNA 加合物^[1]; 继而造成碱基损伤、碱基缺失、DNA 单链或双链断裂、DNA 氧化损伤、姐妹染色体交换频率增加、碱基错配等一系列遗传损伤^[5]; 同时, 还会阻碍核酸和蛋白质等大分子物质的合成, 对机体能量和物质代谢、免疫系统产生不利影响^[6]。单细胞凝胶电泳试验 (single cell gel electrophoresis, SCGE), 又称彗星试验 (comet assay), 是一种评价遗传性损伤非常灵敏的方法, 可以在单细胞水平上检测 DNA 单链和双链损伤, 不完全修复位点, 碱性不稳定位点和交联, 已被用于检测受试物对哺乳类细胞 DNA 损伤和修复的各种体内外试验^[7]。

【本研究切入点】雏鸭是对 AFB₁ 中毒最为敏感的动物之一, AFB₁ 对雏鸭主要危害表现为肝脏毒性, 可引起肝脏肿大、细胞变性、脂肪浸润、胆管增生、肝硬化、肝癌甚至死亡^[8]。目前, 尚未见关于 AFB₁ 致雏鸭肝细胞 DNA 断裂以及 DNA 损伤随染毒时间变化的报道。【拟解决的关键问题】本试验旨在研究不同染毒水平下 AFB₁ 对雏鸭肝细胞 DNA 损伤的影响, 以及 DNA 损伤随染毒时间变化的动态过程, 探讨将 DNA 损伤作为评价 AFB₁ 遗传毒性敏感指标的可行性。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

低熔点琼脂糖 (LMA), 正常熔点琼脂糖 (NMA), 曲拉通 X-100 (TritonX-100), 上述试剂购自 Amresco 公司; N-十二烷基肌氨酸钠, 购自 NERCK 公司; 二甲基亚砜 (DMSO), Tris-Base, 台酚蓝, 上述试剂购自 Sigma 公司; Gelred 荧光核酸染料购自 Biotium 公司; HCl、NaCl、NaOH、Na₂EDTA、KCl、Na₂HPO₄、KH₂PO₄、无水乙醇, 上述试剂均为分析纯 (AR), 购自北京北化精细化学品有限责任公司; 黄曲霉毒素 B₁ 购自 ALEXIS 公司, 纯度大于 98%, 使用时用 25% DMSO 水溶液稀释到相应浓度。北京六一仪器厂 DYY-6C 电泳仪、DYCP-38B 电泳槽; 德国 Zeiss 公司 Axio imager AI 荧光显微镜、AxioCam MRm 照相机。

1.2 实验动物与饲养

选用 4 日龄健康雄性 Zr 型北京鸭 96 只, 平均体重 80.81 g, 变异系数 6.50%, 由中国农业科学院北京畜牧兽医研究所水禽研究室提供。试验开始前, 雏鸭预饲 4 d, 根据本品种推荐的饲养标准进行温度、相对湿度、光照管理。雏鸭饲喂基础日粮, 不添加药物、霉菌毒素吸附剂等物质, 经酶联免疫试剂盒检测 AFB₁ 阴性, 自由饮水。

1.3 雏鸭 AFB₁ 染毒与样品采集

雏鸭随机分为 16 组, 每组 6 只, 第 1 组为对照组, 第 2 至 6 组为低剂量 (染毒) 组、第 7 至 11 组为中剂量 (染毒) 组、第 12 至 16 组为高剂量 (染毒) 组。根据 AFB₁ 致雏鸭半数致死量 (LD₅₀) 350—364 μg·kg⁻¹ BW^[9], 基本按照 LD₅₀ 的 1/100, 1/10, 1/1 设定雏鸭染毒剂量。对照组、低剂量组、中剂量组、高剂量组雏鸭分别灌胃 25% DMSO 水溶液, 0.25, 2.5, 25 μg·mL⁻¹ 溶液各 1 mL, 分别相当于 0, 3, 30, 300 μg·kg⁻¹ BW 的染毒水平。对照组于灌胃 1 h 后, 各剂量染毒组分别于灌胃染毒 1、2、8、24、48 h 后将雏鸭处死, 立即取其肝脏左叶下缘约 1 cm² 大小的组织, 置于 2

mL 冰冷的含 20 mmol·L⁻¹ EDTA 的 PBS (不含 Ca²⁺和 Mg²⁺) 缓冲液中待用。DMSO 作为稀释剂已被证实不会对动物产生有害或遗传影响^[10]。灌胃采取合适的塑料管直接将溶液灌注到雏鸭的肌胃中, 灌胃前 12 h 停料, 2 h 停水。

1.4 改良单细胞凝胶电泳

参考 Hartmann 等^[11]推荐的方法, 并加以改进, 下述步骤均在避光条件下进行。首先制备肝脏单细胞悬液, 调整细胞浓度至 2×10^5 — 10^6 个/mL, 台盼蓝拒染细胞 >90%。采用两层胶法铺胶, 10 μ L 单细胞悬液与 100 μ L LMA (1% 浓度) 混匀, 滴到已铺好第一层 NMA (1% 浓度) 的磨砂载玻片上, 盖上盖玻片, 4 $^{\circ}$ C 固化 10 min, 然后揭去盖玻片; 浸入 4 $^{\circ}$ C 新鲜配制的细胞裂解液 (2.5 mol·L⁻¹ NaCl, 8 g·L⁻¹ NaOH, 100 mmol·L⁻¹ Na₂EDTA, 10 mmol·L⁻¹ Tris-Base, 1% 十二烷基肌氨酸钠, 调节 pH >10, 用前加入 1% Triton X-100 和 10% DMSO) 中裂解 1.5 h; 冰冷的双蒸水漂洗 2 次, 于新鲜配制的电泳缓冲液 (1 mmol·L⁻¹ Na₂EDTA, 300 mmol·L⁻¹ NaOH) 中解旋 30 min; 在 25 V, 300 mA 条件下电泳 20 min; 0.4 mol·L⁻¹ Tris-HCl (pH=7.5) 中和 2 次, 冰冷的无水乙醇脱水固化 10 min, Gelred 核酸染料染色, 阅片。每个胶板随机选取 50 个细胞图像, 每个动物随机选取 100 个细胞图像, 使用彗星图像分析软件 CASP (comet assay software project) 对随机选取的每个细胞图像进行分析。采用尾部 DNA 百分含量 (tail DNA%)、尾长 (tail length)、尾矩 (tail moment)、Olive 尾矩 (olive tail moment) 作为衡量 DNA 损伤程度的指标。

1.5 统计方法

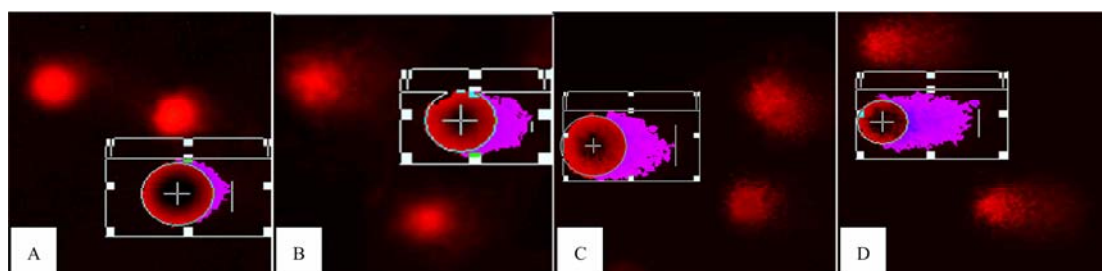
分别计算出每只动物肝细胞 DNA 损伤各项指标

的均值, 再利用 SPSS13.0 软件 (SPSS Inc., Chicago) 方差分析进行统计, 数据结果以平均数 \pm SE 表示。

2 结果

2.1 染毒时间对 DNA 损伤的影响

通过碱性单细胞凝胶电泳检测各试验组肝脏细胞 DNA 损伤, 获得了典型、清晰的显微图像 (图 1)。由表可见, 雏鸭染毒 AFB₁ 后, 在很短的时间内肝细胞 DNA 就出现明显损伤, 3 个剂量组都经历了 DNA 损伤迅速达到顶峰, 随后逐渐恢复的过程。染毒剂量越高, 导致 DNA 发生显著损伤的时间越早, 持续的时间越长, 损伤严重程度越深。高剂量组在 AFB₁ 染毒 1 h 时 DNA 损伤与对照组相比差异极显著 ($P < 0.01$), 并一直持续到 24 h 才降至差异显著水平 ($P < 0.05$), 48 h 基本恢复正常, 与对照组相比无显著差异 ($P > 0.05$); 中剂量组在 AFB₁ 染毒 2 h 后 DNA 损伤与对照组相比差异显著 ($P < 0.05$), 并持续到 8 h, 24 h 基本恢复正常, 与对照组相比无显著差异 ($P > 0.05$); 低剂量组在 AFB₁ 染毒 2 h 后 DNA 损伤与对照组相比差异显著 ($P < 0.05$), 但很快恢复正常, 至 8 h 已经与对照组相比无显著差异 ($P > 0.05$)。以尾长指标为例 (图 2), AFB₁ 染毒后肝细胞在 1—2 h 左右就出现了明显的 DNA 损伤, AFB₁ 染毒 1 h 时高剂量组尾长即为对照组的 172%, 达到差异极显著的水平 ($P < 0.01$); 中、低剂量组尾长分别为对照组的 123% 和 112%, 均有上升趋势, 但尚未达到差异显著的水平 ($P > 0.05$)。2 h 时高剂量组尾长为对照组的 179% ($P < 0.01$); 中、低剂量组尾长分别为对照组的 134% 和 129%, 达到差异显著的水平 ($P < 0.05$)。8 h 时高剂量组尾长为对照组的 184% ($P < 0.01$); 中

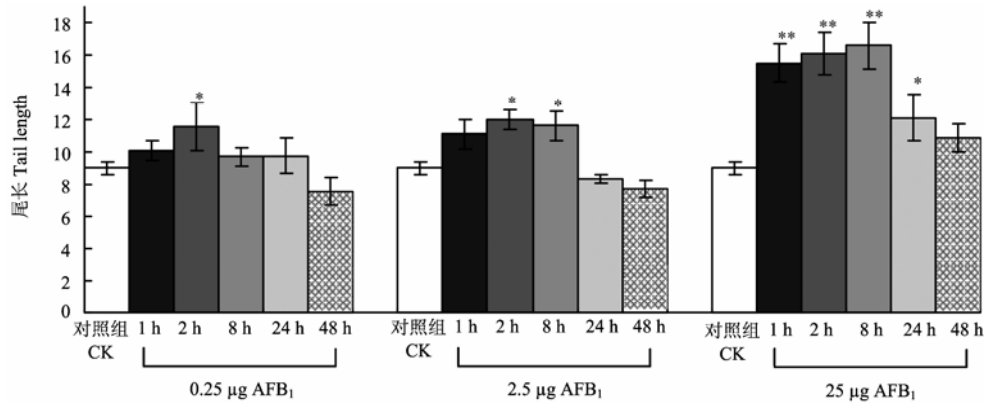


矩形框内为 CASP 软件分析彗星图片示意图, 可见清晰的彗星头部和尾部, A: 对照组; B: 0.25 μ g·mL⁻¹ 2 h 染毒组; C: 2.5 μ g·mL⁻¹ 2 h 染毒组; D: 25 μ g·mL⁻¹ 2 h 染毒组

The comet head and tail can be clearly distinguished from the images in the measurement frames of comet assay software project. A: Hepatic cells untreated; B: Treated with 0.25 μ g·mL⁻¹ for 2 h; C: 2.5 μ g·mL⁻¹ for 2 h; D: 25 μ g·mL⁻¹ for 2h

图 1 典型单细胞凝胶电泳图像 (2 h, 200 \times)

Fig. 1 Representative microgel electrophoresis image of genomic DNA of duckling (2 h, 200 \times)



横坐标表示染毒剂量和时间, 柱形表示尾长, 竖线表示 SE; 与对照组相比, * 表示差异显著 ($P < 0.05$), ** 表示差异极显著 ($P < 0.01$)

The damage is presented by tail length of comet. Columns mean tail length; and bars mean SE. * means remarkable difference ($P < 0.05$), ** means very remarkable difference ($P < 0.01$)

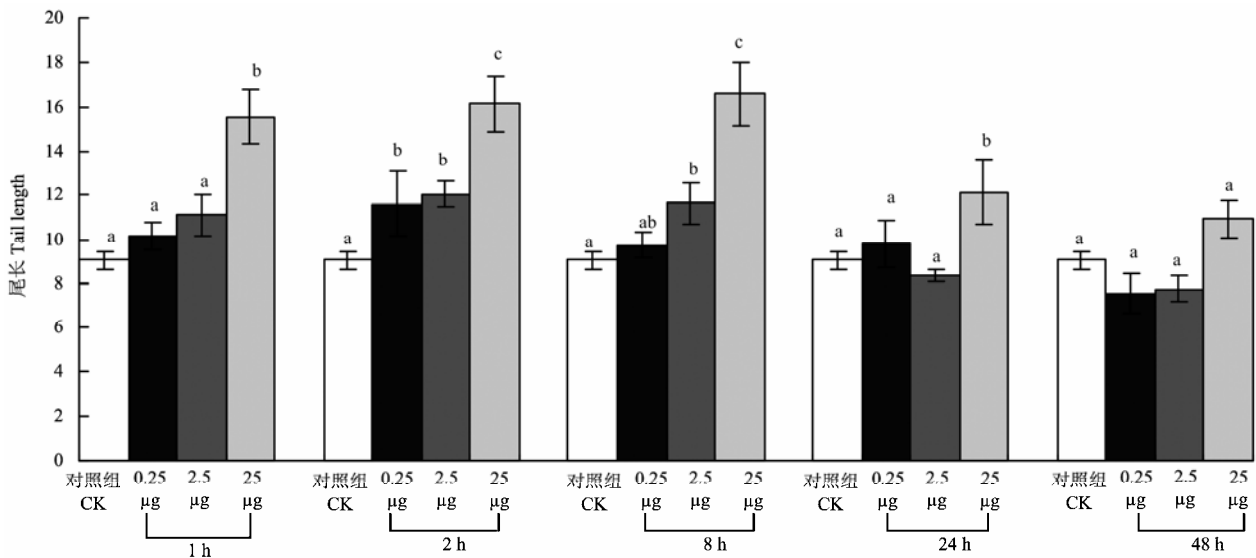
图 2 AFB₁ 不同染毒剂量在不同处理时间对雏鸭肝脏细胞 DNA 彗星试验尾长的影响

Fig. 2 Level of DNA damage in duckling hepatic cells untreated and treated with a certain given concentration of AFB₁ at different times

剂量组尾长为对照组的 129% ($P < 0.05$); 低剂量组尾长为对照组 108%, 已无显著差异 ($P > 0.05$)。24 h 时高剂量组尾长为对照组的 135%, 差异显著 ($P < 0.05$); 中、低剂量组尾长分别为对照组的 93% 和 109%, 均无显著差异 ($P > 0.05$)。48 h 时高、中、低剂量组尾长分别为对照组的 121%、86% 和 84%, 均无显著差异 ($P > 0.05$)。

2.2 染毒剂量对 DNA 损伤的影响

由表可见, 不同染毒剂量在某些时间下肝细胞 DNA 损伤表现出明显的差异, 基本趋势是在某一时刻, 随着染毒剂量水平的增加, DNA 损伤程度加剧或 DNA 修复迟缓; 其中, 在 2 h 时表现出最为明显的量效关系。以尾长指标为例 (图 3), 1 h 时, 高剂量染毒组肝细胞 DNA 损伤与对照组和中、低剂量染毒组



横坐标表示染毒剂量和时间, 柱形表示尾长, 竖线表示 SE; 与对照组相比, 肩标字母有相同者, 为差异不显著 ($P > 0.05$)

The damage is presented by tail length of comet. Columns mean tail length; bars mean \pm SE. Values on the bars within groups with no common superscripts are significantly different ($P > 0.05$)

图 3 AFB₁ 不同染毒剂量在某一处理时间对雏鸭肝脏细胞 DNA 彗星试验尾长的影响

Fig. 3 Level of DNA damage in duckling hepatic cells untreated and treated with a certain given time of AFB₁ at different concentrations (0.25, 2.5, 25 µg)

表 各处理组肝脏细胞 DNA 损伤

Table Hepatic DNA damage after treatment with AFB₁

染毒剂量 Expoure doses	时间 Time (h)	DNA 损伤指标 Parameters of DNA damage			
		尾部 DNA 百分含量 Tail DNA%	尾长 Tail length	尾矩 Tail moment	Olive 尾矩 Olive tail moment
对照组 Control	1	7.40±0.53	9.03±0.43	0.94±0.09	1.00±0.06
0.25 µg AFB ₁	1	8.80±0.86	10.12±0.63	1.37±0.23	1.29±0.15
	2	10.59±1.69*	11.61±1.48*	1.94±0.47*	1.73±0.33*
	8	8.80±0.78	9.73±0.58	1.33±0.20	1.25±0.13
	24	8.15±1.00	9.80±1.06	1.22±0.27	1.20±0.17
	48	6.61±0.65	7.55±0.87	0.62±0.12	0.79±0.09
2.5 µg AFB ₁	1	9.37±1.09	11.11±0.94	1.67±0.38	1.48±0.24
	2	10.62±0.92*	12.06±0.62*	1.94±0.24*	1.80±0.18**
	8	10.56±1.09*	11.64±0.93*	1.80±0.31	1.56±0.19
	24	7.09±0.45	8.36±0.28	0.86±0.08	0.98±0.07
	48	5.90±0.54	7.75±0.55	0.67±0.03	0.76±0.05
25 µg AFB ₁	1	14.11±1.34**	15.55±1.19**	3.21±0.46**	2.58±0.31**
	2	15.03±1.52**	16.14±1.28**	3.32±0.56**	2.72±0.35**
	8	15.93±1.76**	16.62±1.44**	3.35±0.57**	2.60±0.35**
	24	10.71±1.36*	12.14±1.46*	1.87±0.28	1.71±0.26*
	48	10.79±1.29	10.91±0.87	1.38±0.23	1.48±0.23

数据用平均数±SE 表示, 同列数据与对照组相比, * 表示差异显著 ($P<0.05$), ** 表示差异极显著 ($P<0.01$)

Data are shown as mean±SE (n=6), values in the same column with * are significant vs. untreated control cells ($P<0.05$), ** are significant vs. untreated control cells ($P<0.01$)

相比已有显著差异 ($P<0.05$), 中、低剂量染毒组与对照组相比 DNA 损伤程度有加重趋势, 但未达到差异显著的水平 ($P>0.05$); 2 h 时, 高、中、低剂量染毒组与对照组相比肝细胞 DNA 损伤均差异显著 ($P<0.05$), 其中, 高剂量染毒组与中、低剂量染毒组相比也有显著差异 ($P<0.05$), 而中、低剂量染毒组之间无显著差异 ($P>0.05$); 8 h 时, 中剂量染毒组肝细胞 DNA 损伤程度与对照组相比有显著差异 ($P<0.05$), 但中、低剂量染毒组之间无显著差异 ($P>0.05$); 高剂量染毒组与其它 3 组相比均有显著差异 ($P<0.05$); 24 h 时, 对照组、中、低剂量组之间已无显著差异 ($P>0.05$), 但高剂量染毒组与其它 3 组相比仍有显著差异 ($P<0.05$); 48 h 时, 高、中、低剂量组均恢复到正常水平, 与对照组相比均无显著差异 ($P>0.05$)。

3 讨论

彗星试验可以作为遗传毒性生物标记物用于霉菌毒素的研究中, 其基本原理是将单个细胞包埋于琼脂

糖凝胶中进行裂解、电泳、荧光染色和显微镜观察, 细胞 DNA 损伤产生的断链或碎片在电泳中迁移形成典型的“彗星”图像, 根据迁移长度和荧光强度即可定量分析 DNA 损伤的程度^[10]。该方法具有其它方法不可比拟的优点, 如需要样品细胞少、方法简单、检测时间短、花费甚少, 而且是在单个细胞水平上检测 DNA 损伤水平, 能够检测出不同组织细胞之间遗传毒性的差异, 还能够观察到 DNA 损伤与修复的动态过程。一些研究也把彗星试验用于 AFB₁ 遗传毒性检测、靶器官和解毒物质效果评价中^[12-15]。肝脏是 AFB₁ 主要靶器官, 并且 AFB₁ 主要蓄积在被感染细胞的细胞核中^[16], 从而造成肝细胞 DNA 损伤。AFB₁ 在肝脏中代谢活化后, 与 DNA 中鸟嘌呤残基形成加合物 AFB₁-N⁷-G, 进而能够转化为开环甲酰胺基嘧啶, 或者导致 DNA 链去嘌呤化^[17]而产生无碱基位点, 在碱性条件下使 DNA 单链断裂, 从而可以通过碱性彗星试验将这种损伤表现出来。本试验表明, 雏鸭对于 AFB₁ 造成的肝脏细胞 DNA 断裂极为敏感, 仅仅一次低剂量 (3 µg·kg⁻¹ BW) 染毒都能够通过彗星试验检测

到显著的 DNA 损伤 ($P < 0.05$)。Bedar 等^[17]报道, AFB₁ 造成 DNA 损伤主要修复方式都是核苷酸切除修复 (nucleotide excision repair, NER), 试验已经证明 DNA 修复是导致不同种群和组织对 AFB₁ 致癌敏感程度差异的其中一个主要原因^[18]。在动物体内, AFB₁ 的活化与清除是同步进行的, AFB₁ 造成 DNA 损伤与细胞内 DNA 的修复也是同时进行的, 本试验所检测到的 DNA 断裂是 DNA 损伤与修复共同作用的结果, 能够反映出动物 AFB₁ 染毒后细胞内 DNA 所经历的损伤与修复的整个过程。试验结果显示, 随着 AFB₁ 染毒剂量的增加, 雏鸭肝细胞 DNA 损伤程度加深, 损伤修复的时间延长。通过对 AFB₁ 染毒 LD₅₀ 的比较已知雏鸭是对 AFB₁ 毒性最为敏感的动物之一^[19], 本试验可以看出雏鸭对 AFB₁ 导致的肝细胞 DNA 损伤同样非常敏感, 低剂量 ($3 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ BW) 染毒水平大约相当于雏鸭 AFB₁ LD₅₀ 的 1/100, 即可在 2 h 左右显示出显著的 DNA 损伤 ($P < 0.05$), 而在高剂量 ($300 \mu\text{g}$ AFB₁/kg BW) 水平下, 这种 DNA 损伤能够长时间持续表现。由此可以表明, 彗星试验检测 DNA 损伤能够作为雏鸭 AFB₁ 中毒的一个敏感指标。由于 DNA 损伤是致癌作用的关键一步, 本试验提示雏鸭还可以作为 AFB₁ 致癌研究的一个很好的动物模型。

AFB₁ 在雏鸭体内吸收代谢活化的速度很快, Reobuck 等^[20]采用 [¹⁴C] 标记体外试验显示, AFB₁ 在鸭肝细胞 30 min 后, 超过 90% 已经被代谢, 而小鼠肝细胞只代谢了 15% 左右。本试验结果也提示 AFB₁ 在雏鸭体内能够迅速得以吸收代谢, 各个剂量组 DNA 损伤水平均在染毒 1—2 h 左右达到高峰, 并且在 2 h 时的 DNA 损伤程度与 AFB₁ 染毒水平之间的剂量-效应关系最为明显。动物对 AFB₁ 敏感度差异很大, 其原因之一是具有清除体内 AFB₁ 活性的谷胱甘肽-S-转移酶 (GST) 编码基因能否持续表达^[21], 例如大鼠对 AFB₁ 致癌作用的敏感性比小鼠要大的多, 其原因之一就是小鼠体内 GST 活性比大鼠高 3—5 倍。本试验显示, 随着染毒剂量的增加, 雏鸭肝细胞 DNA 损伤程度加深、持续时间延长, 反映了当 AFB₁ 浓度增加到一定程度后便无法将其迅速清除, 从而对 DNA 造成较为持久的损伤。另一方面也提示, 由于染毒剂量的增加导致 DNA 损伤范围扩大、程度加深, DNA 无法将其迅速修复。

4 结 论

4.1 雏鸭对于 AFB₁ 导致的肝细胞 DNA 损伤非常敏

感, 低剂量 ($3 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ BW) AFB₁ 暴露就能够引起雏鸭肝细胞 DNA 发生显著损伤, 并且随着 AFB₁ 染毒剂量增加, 雏鸭肝细胞 DNA 损伤达到高峰的时间越早、损伤程度越深、持续时间越长;

4.2 雏鸭 AFB₁ 暴露后, 在很短时间内即可造成肝细胞 DNA 损伤, 并于染毒 1—2 h 左右 DNA 损伤达到高峰, 一次染毒 2 h 时 DNA 损伤与染毒剂量之间的量效关系最为明显;

4.3 雏鸭是一个研究 AFB₁ 遗传毒性的良好模型, 彗星试验是用于检测 AFB₁ 致雏鸭肝细胞 DNA 损伤的有力工具。

References

- [1] Miller E C, Miller J A. Searches for ultimate chemical carcinogens and their reactions with cellular macromolecules. *Cancer*, 1981, 47: 2327-2345.
- [2] Gratz S, Wu Q K, El-Nezami H, Juvonen R O, Mykkanen H, Turner P C. Lactobacillus rhamnosus strain GG reduces aflatoxin B₁ transport, metabolism, and toxicity in Caco-2 cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(12): 3958-3964.
- [3] Moss M O. Risk assessment for aflatoxins in foodstuffs. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 2002, (50): 137-142.
- [4] Tom B, Sun A Q, Karo M. 霉菌毒素研究新进展. 饲料与畜牧, 2006, (8): 43-45.
Tom B, Sun A Q, Karo M. The new progress on the mildew toxin studies. *Feed and Husbandry*, 2006, (8): 43-45. (in Chinese)
- [5] Denissenko MF, Cahill J, Koudriakova TB, Gerber N, Pfeifer GP. Quantitation and mapping of aflatoxin B₁-induced DNA damage in genomic DNA using aflatoxin B₁-8, 9-epoxide and microsomal activation systems. *Mutation Research*, 1999, 425(2): 205-211.
- [6] 冯建蕾. AAN 对肉鸡日粮中黄曲霉毒素吸附、解毒效果的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2004: 15-20.
Feng J L. Effect of AAN on adsorbing dietary aflatoxins and detoxification in broiler chicken[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2004: 15-20. (in Chinese)
- [7] Wu M, Bauch T, Streffer C, Niedereichholz F, Bocker W. Comet assay studies of radiation-induced DNA damage and repair in various tumor cell lines. *Radiation Biology*, 1994, 65(3): 315-319.
- [8] 刘艳丽. 实验感染黄曲霉毒素雏鸭的病理学及免疫组化检测石蜡切片中黄曲霉毒素的研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2006: 1-3.
Liu Y L. Study on the rule of pathological development of duckling be infected experimental by aflatoxin and research on the immunohistochemistry to detect aflatoxin in paraffine-embedded

- sequential tissue[D]. Yaan: Sichuan Agricultural University, 2006: 1-3. (in Chinese)
- [9] Newberne P M, Butler W H. Acute and chronic effects of aflatoxin on the liver of domestic and laboratory animals: a review. *Cancer Research*, 1969, 29: 236-250.
- [10] Sokolovic M, Garaj-Vrhovac V, Ramic S, Simpraga B. Chicken nucleated blood cells as a cellular model for genotoxicity testing using the comet assay. *Food and Chemical Toxicology*, 2007, 45: 2165-2170.
- [11] Hartmann A, Agurell E, Beevers C, Brendler-Schwaab S, Burlinson B, Clay P, Collins A, Smith A, Speit G, Thybaud V, Tice RR. Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline comet assay. *Mutagenesis*, 2003, 18(1): 45-51.
- [12] Abd-Allah G A, el-Fayoumi R I, Smith M J, Smith M J, Heckmann R A, O'Neill K L. A comparative evaluation of aflatoxin B₁ genotoxicity in fish models using the comet assay. *Mutation Research*, 1999, 446(2): 181-188.
- [13] Miranda D D C, Arcari D P, Ladeira M S P, Calori-Domingues M A, Romero A C, Salvadori D M F, Gloria E M, Pedrazzoli J J, Ribeiro M L. Analysis of DNA damage induced by aflatoxin B₁ in dunkin-hartley guinea pigs. *Mycopathologia*, 2007, 163: 275-280.
- [14] Watzl B, Neudecker C, Hansch G M, Rechkemmer G, Pool-Zobel B L. Short-term moderate aflatoxin B₁ exposure has only minor effects on the gut-associated lymphoid tissue of Brown Norway rats. *Toxicology*, 1999, 138(2): 93-102.
- [15] Madhusudhanan N, Kavithalakshmi S N, Shanmugasundaram E R B, Shanmugasundaram K R. Aflatoxin B₁-induced DNA damage in *Labeo rohita*: protective effect of an antioxidant supplement, Amrita Bindu. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 2006, 98(5): 473-479.
- [16] 程安春, 刘艳丽, 朱德康, 汪铭书, 胡 骑, 陈孝跃. 用黄曲霉毒素 B₁ 单抗介导免疫组化法检测雏鸭感染黄曲霉毒素的分布规律研究. *中国农业科学*, 2008, 41(8): 2460-2466.
- Cheng A C, Liu Y L, Zhu D K, Wang M S, Hu J, Chen X Y. Research on the invading process and distribution of aflatoxin B₁ in artificially infected ducklings by development and application of monoclonal-antibody mediated immunohistochemistry. *Scientia Agricultura Sinica*, 2008, 41(8): 2460-2466. (in Chinese)
- [17] Bedar L L, Massay T E. Aflatoxin B₁-induced DNA damage and its repair. *Cancer Letters*, 2006, 241: 174-183.
- [18] Bedard L L, Alessi M, Scott D, Thomas M E. Susceptibility to aflatoxin B₁-induced carcinogenesis correlates with tissue-specific differences in DNA repair activity in mouse and in rat. *Cancer Research*, 2005, 65: 1265-1270.
- [19] 于炎湖. 饲料毒物学附毒物分析. 北京: 农业出版社, 1992: 122-134.
- Yu Y H. *Feed Toxicology and Toxicological Analysis*. Beijing: Agricultural Press, 1992: 122-134. (in Chinese)
- [20] Roebuck B D, Wogan G N. Species comparison of *in vitro* metabolism of aflatoxin B₁. *Cancer Research*, 1977, 37: 1649-1656.
- [21] Bammler T K, Slone D H, Eaton D L. Effects of dietary oltipraz and ethoxyquin on aflatoxin B₁ biotransformation in non-human primates. *Toxicological Sciences*, 1999, 54: 30-41.

(责任编辑 林鉴非)