

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20171226001

周鸿媛, 唐莉莉, 路勇, 等. 脱氧雪腐镰刀菌烯醇、黄曲霉毒素 B₁ 和玉米赤霉烯酮对秀丽隐杆线虫的联合毒性研究[J]. 生态毒理学报, 2018, 13(3): 112-121

Zhou H Y, Tang L L, Lu Y, et al. Study on the combinatorial toxicity of deoxynivalenol, aflatoxin B₁ and zearalenone on *Caenorhabditis elegans* [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2018, 13(3): 112-121 (in Chinese)

脱氧雪腐镰刀菌烯醇、黄曲霉毒素 B₁ 和玉米赤霉烯酮对秀丽隐杆线虫的联合毒性研究

周鸿媛^{1,2,3}, 唐莉莉⁴, 路勇⁵, 杨惠成⁶, 孙秀兰^{1,2}, 王加生^{4,#}, 钱和^{1,2,*}

1. 江南大学 食品学院/食品科学与技术国家重点实验室, 无锡 214122

2. 江南大学 食品安全国际联合实验室, 无锡 214122

3. 西南大学 食品科学学院, 重庆 400716

4. 美国佐治亚大学 环境健康科学系, 美国 佐治亚 雅典 30602

5. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050

6. 广州广电计量检测股份有限公司, 广州 510630

收稿日期: 2017-12-26 录用日期: 2018-02-06

摘要: 脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)、黄曲霉毒素 B₁(AFB₁)和玉米赤霉烯酮(ZEN)是最为常见的粮食真菌毒素,易共存于谷物产品和动物饲料中,而目前对其联合毒性的研究较少,且研究结果并不完全一致。为探究 DON、AFB₁ 和 ZEN 的联合毒性作用,本论文以秀丽隐杆线虫(*C. elegans*)为模型,分别评估了毒素混合物 AFB₁+DON、AFB₁+ZEN、DON+ZEN 和 AFB₁+DON+ZEN 对 *C. elegans* 的生长发育(体长)和生殖能力(产卵量)的毒性作用,并用 Chou-Talalay 模型来判定毒素混合物的相互作用类型。研究表明, AFB₁、DON 和 ZEN 单独染毒 *C. elegans* 时,其毒作用强弱为 AFB₁>ZEN>DON。联合染毒时, AFB₁+DON 对 *C. elegans* 产生协同作用,而 DON+ZEN 则产生拮抗作用; AFB₁+ZEN 对体长(24 h)和产卵量的毒作用随着暴露浓度的增加,由弱拮抗变为协同作用,而在毒素暴露 48 h 后,对线虫的生长发育呈协同作用; AFB₁+DON+ZEN 除在 EC₅₀-24 h 和 EC₇₅-24 h 时对体长产生明显的毒性增强作用外,其他普遍表现出拮抗作用。由此表明, DON、AFB₁ 和 ZEN 对 *C. elegans* 的联合毒性作用与剂量和时间相关。

关键词: 脱氧雪腐镰刀菌烯醇; 黄曲霉毒素 B₁; 玉米赤霉烯酮; 秀丽隐杆线虫; 联合毒性

文章编号: 1673-5897(2018)3-112-10 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Study on the Combinatorial Toxicity of Deoxynivalenol, Aflatoxin B₁ and Zearalenone on *Caenorhabditis elegans*

Zhou Hongyuan^{1,2,3}, Tang Lili⁴, Lu Yong⁵, Yang Huicheng⁶, Sun Xiulan^{1,2}, Wang Jiasheng^{4,#}, Qian He^{1,2,*}

1. School of Food Science and Technology/State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

2. International Joint Laboratory on Food Safety, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

3. College of Food Science, Southwest University, Chongqing 400716, China

基金项目: 国家自然科学基金项目(31772069); 江苏省农业科技自主创新资金项目(CX(16)1028)

作者简介: 周鸿媛(1989-), 女, 博士, 研究方向为真菌毒素毒性评价, E-mail: zhouhy@swu.edu.cn;

* 通讯作者 (Corresponding author), E-mail: amtf168@126.com

共同通讯作者 (Co-corresponding author), E-mail: jswang@uga.edu

4. Department of Environmental Health Science, University of Georgia, Athens 30602, USA

5. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China

6. Guangzhou GRG Metrology & Test CO., LTD, Guangzhou 510630, China

Received 26 December 2017 accepted 6 February 2018

Abstract: Although deoxynivalenol (DON), aflatoxin B₁ (AFB₁) and zearalenone (ZEN) are the most prevalent mycotoxins co-existing in grain-based foodstuffs and feeds, little is known about their combined toxicities and the published results are inconsistent. To reveal the combined toxicities of DON, AFB₁ and ZEN, the toxic effects of AFB₁+DON, AFB₁+ZEN, DON+ZEN and AFB₁+DON+ZEN on the development (body length) and reproduction (brood size) of *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) were studied, respectively. And also, the types of interactions in mycotoxins combinations were determined by using Chou-Talalay model. Results showed that the toxicity of each mycotoxin alone in a decreasing order was AFB₁>ZEN>DON. For the combined toxicity, AFB₁+DON synergistically enhanced the toxic effects on *C. elegans* while DON+ZEN showed antagonism; AFB₁+ZEN displayed slight antagonism at lower concentrations, gradually turned to synergism at higher doses on body length (24 h) and brood size, and after 48 h exposure, an overall synergism was shown; AFB₁+DON+ZEN generally showed antagonistic effects except for the toxicity on the body length at EC₅₀-24 h and EC₇₅-24 h. Thus, our study indicates that the combined toxicity of DON, AFB₁ and ZEN on *C. elegans* is in a dose-time-response manner.

Keywords: deoxynivalenol; aflatoxin B₁; zearalenone; *C. elegans*; combined toxicity

粮食真菌毒素是一类存在于粮食中的真菌所产生的二级代谢产物。因其对生物体具有毒害作用且化学性质稳定、污染范围广泛,目前已成为威胁人类健康和环境安全的重要因素之一,受到广泛关注^[1]。总体来说,黄曲霉毒素(aflatoxins, Afla)、单端孢霉烯族毒素类、玉米赤霉烯酮(zearalenone, ZEN)、伏马菌素(fumonisin, FUM)、赭曲霉毒素 A(*Aspergillus Ochratoxin*, OTA)和麦角生物碱类被认为是主要的生物毒素^[2]。其中,黄曲霉毒素 B₁(aflatoxin B₁, AFB₁)、脱氧雪腐镰刀菌烯醇(deoxynivalenol, DON)和玉米赤霉烯酮(ZEN)影响范围最广^[3],而 DON 在我国已成为污染量最大、污染范围最广的真菌毒素^[4-5]。相关调查研究表明,全球范围内,越来越多的农产品被检出受到 AFB₁、DON 和 ZEN 的单独或共同污染^[3,6]。一份来自于 Biomin 公司的调查显示,在 2010 年中的 3 300 份送检样品(玉米、小麦、大麦、大米、大豆粉、玉米面筋粉、干酒糟和青贮饲料)中有 78% 样品呈阳性,即受到 Afla、DON、ZEN、FUM 和 OTA 不同程度的污染。在此批次样品中,同一样品中测出含有 2 种及以上毒素的送检样品的比率高达 42%^[3]。至 2013 年,毒素联合污染率仍居高不下(45%)^[7]。由此可见,现实生活中食物可被多种真菌毒素污染,人类长期同时接触多种真菌毒素,可对健康造成与单一毒素作用不同的危害。因此,开展对

食品中多种毒素联合毒性的评估,对指导食品安全、风险评估和公共健康等相关政策的制定以及未来研究发展方向具有极大的现实意义。

DON、AFB₁ 和 ZEN 均为谷物及其制品中的常见污染物。研究表明,DON、AFB₁ 和 ZEN 除对机体产生的各自最典型的毒作用(DON:拒食和细胞毒性;AFB₁:三致作用;ZEN:类雌激素毒性)外,还存在一些交叉,如引起氧化应激、蛋白合成受阻,导致免疫失调、生殖毒性等^[8-15]。由此可推测,3 种毒素共存时在一定程度上会产生相互作用,从而对其毒性产生影响(增强或减弱)。目前,基于这一猜想,“联合毒性”这一概念已被提出,越来越多的学者对此展开了研究,但不同实验模型、实验剂量间的研究结果存在差异,对多种毒素间的联合毒性类型的评价也不相一致。Zhou 等^[16-17] 研究表明,混合物 AFB₁+DON、DON+ZEN 和 AFB₁+DON+ZEN 均对 HepG2 人肝癌细胞(AFB₁:0~5 μg·mg⁻¹;DON:0~0.6 μg·mg⁻¹;ZEN:0~11 μg·mg⁻¹)和 RAW 264.7 鼠巨噬细胞(AFB₁:0~3 μg·mg⁻¹;DON:0~0.1 μg·mg⁻¹;ZEN:0~12 μg·mg⁻¹)产生协同/加和作用,混合物 AFB₁+ZEN 则产生拮抗作用。而对 BF-2 蓝鳃太阳鱼细胞(AFB₁:0~11.20 μmol·L⁻¹;DON:0~16.20 μmol·L⁻¹;ZEN:0~170.30 μmol·L⁻¹)和野生型斑马鱼(AFB₁:0~1.28 μmol·L⁻¹;DON:0~135.00 μmol·

L^{-1} ;ZEN:0~18.85 $\mu\text{mol}\cdot L^{-1}$)进行DON和ZEN联合暴露,则产生不同程度的拮抗作用,AFB₁+ZEN却产生协同作用,而AFB₁、DON和ZEN三者混合则随浓度的变化表现出不同的联合毒性类型。此外, Ji等^[18]发现,DON(2 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)和ZEN(20 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)联合暴露对小鼠的肝脏代谢具有明显的拮抗作用。而Smith等^[19]在研究DON(0.2 $\mu\text{mol}\cdot L^{-1}$)和ZEN(20 $\mu\text{mol}\cdot L^{-1}$)对人肝细胞HepaRG蛋白质组学时发现,在毒素暴露1 h后,蛋白质组分改变增多,而在暴露24 h后减少。由此可得,毒素的联合毒性类型及强弱与毒素组合、暴露时间、混合比例和实验模型密切相关。

秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*, *C. elegans*)(后文均简称为线虫)是一种可独立生活的非寄生虫类线虫,因其生命周期短、繁殖速度快、产卵量大、身体透明、培养方便且操作简单、成本低廉等优势,已被作为一种重要模式生物广泛应用于毒理学和生物学研究中^[20-23]。此外,通过全基因组测序方法、光消融技术和激光显微技术破译线虫的全基因组,并重建其神经系统,已得到了大量的有关线虫的生物学、遗传学和基因组学的数据^[24-26]。此外,线虫有40%的基因已被证明与人类基因具有同源性,推断以线虫为模型的毒理学研究可在很大程度上反映人类对同种毒物所产生的毒理反应^[27]。目前,已有学者将线虫作为人体健康与生态毒性的双重模式动物,研究环境中重金属或/和农药残留单一或联合暴露对机体的毒害作用,并逐步建立起了相对完整的研究体系^[27-28],但对粮食真菌毒素的毒性研究,鲜有报道。因此,本研究首次以线虫为模型,对DON、AFB₁和ZEN及其联合毒性进行评估,模拟毒素在现实生活中的存在模式,以国标限量标准为基础设定实验暴露剂量,旨在为今后相关标准的制定提供科学依据,进而指导人体健康效应判断与生态风险评估。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 试剂与线虫品系

DON、AFB₁和ZEN均购于Sigma-Aldrich公司(美国),纯度均 $\geq 98\%$ 。先将DON、AFB₁和ZEN粉末分别溶于超纯水、二甲基亚砜(DMSO,购于美国Sigma-Aldrich公司,纯度 $\geq 99.9\%$)和无水乙醇(购于美国Sigma-Aldrich公司,纯度 $\geq 99.9\%$),制备成浓度为10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的储备液并避光存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。实验时,用K-medium(2.36 g KCl, 3.00 g NaCl, 1 000 mL dH₂O)稀释成工作液,进行实验。

野生型Bristol品系线虫(N2)和大肠杆菌菌株(OP50)均购于国际线虫遗传中心(*Caenorhabditis Genetics Center/CGC*)。所有实验用线虫均为雌雄同体型。以线虫标准培养方法^[29]为依据,将线虫培养于以OP50作为食物源的固体线虫生长培养基(NGM)上,其配制方法参照Brenner法^[30]。选用L-broth^[23]液体培养基对OP50进行培养,作为线虫暴露实验的食物源。所有线虫培养均在 $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下进行。

1.2 实验方法

1.2.1 线虫准备

首先,向装有孕期成虫和及其虫卵的NGM中加入适量K-medium,用L型玻璃涂布棒将其从NGM上刮下并收集到15 mL离心管中,3 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心7 min,弃上清。然后,向沉淀中加入7 mL裂解液(8 $\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$ NaOH : NaClO = 5 : 1, V/V)^[31],静置7 min,再3 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心7 min,弃上清。随后,加入12 mL K-medium轻轻混匀后3 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心7 min,弃上清,重复此操作一次。最后,将沉淀接种到NGM上培养($20\text{ }^{\circ}\text{C}$)。实验所用线虫均为雌雄同体型。

1.2.2 线虫生长发育测定

通过测定线虫的身长(头部-尾末)来衡量线虫的生长发育情况。将同步化(L1/L2)的N2幼虫从培养板中转移到含有1 mL/孔特定毒素浓度和充足食物的12孔培养板中。每孔大约含有30~50条L1/L2期的线虫,并放在belly button[®]振动器上低速摇晃, $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。分别在24 h和48 h,用K-medium润洗线虫2次,再用10%福尔马林固定。5 min后,将线虫转移到玻璃皿上,在连有数码相机和Image-Pro[®] Express软件程序的显微镜(Olympus SZX9)下观察拍照。对照组和各剂量实验组均不少于20只线虫,3组平行试验。

1.2.3 线虫生殖能力测定

线虫生殖能力通过后代数日来评价。本实验参照Dhawan 72小时法^[31],改良后简述如下:将同步化(L1/L2)的N2幼虫转移到含有充足食物源的新NGM上, $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养直到L4末期。然后,挑出一只L4末期的线虫放入装有特定浓度毒素和充足食物(1 mL/孔)的12孔板中,放在振动器上低速摇晃, $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养72 h,各浓度3次平行试验。72 h后,在显微镜下记录每孔里所有阶段的线虫数(不含虫卵)。

1.2.4 毒素联合毒性的Chou-Talalay评价方法

本实验采用Chou-Talalay法评价多种毒素共同存在时的联合毒性类型^[32]。该方法是基于中效原理

和等效线原理,能可视化评估待测混合物中不同毒素间的相互作用。该计算模型要求混合物中各组分按固定比率混合,本实验混合比率为:AFB₁ : DON : ZEN = 1 : 40 : 5。在等辐射分析中,相互作用指数(CI)常在酶、细胞和动物体系中作为确定作用类型的指标^[32-33]。CI 值可通过下列公式计算:

$${}^n(CI)_x = \frac{\sum_{j=1}^n \frac{(D_j)}{(D_x)_j} = \sum_{j=1}^n \frac{(D_x)_{1-n} \{ [D]_j / \sum_1^n [D] \}}{(D_m)_j / \{ (f_{ax})_j / [1 - (f_{ax})_j] \}^{1/m_j}}$$

其中, ${}^n(CI)_x$ 是 n 种毒素在其各自抑制率为 $x\%$ 时的浓度时相互作用指数, $(D_x)_{1-n}$ 是 n 种毒素在同一混合物中共同产生 $x\%$ 抑制率的浓度之和, $[D]_j / \sum_1^n [D]$ 是 n 种毒素在混合物中各自产生 $x\%$ 抑制率时的比率, $(D_m)_j / \{ (f_{ax})_j [1 - (f_{ax})_j] \}^{1/m_j}$ 是每种毒素单独产生 $x\%$ 抑制率时的浓度。该分析由 CompuSyn (Chou and Martin, 2005, Compusyn Inc, USA) 软件运行完成。CI 指数与对应联合毒性类型及描述参见表 1^[32]。

表 1 联合毒性分类标准及其相应符号

Table 1 Descriptions and symbols of the degrees of combined toxicity grading

相互作用指数(CI) Combination index value	相互作用描述 Description	类别符号 Graded symbols
<0.10	极强协同作用 Very strong synergism	+++++
0.10~0.30	强协同作用 Strong synergism	++++
0.30~0.70	一般协同作用 Common synergism	+++
0.70~0.85	弱协同作用 Moderate synergism	++
0.85~0.90	极弱协同作用 Slight synergism	+
0.90~1.10	近似加和作用 Nearly additive	±
1.10~1.20	极弱拮抗作用 Slight antagonism	-
1.20~1.45	弱拮抗作用 Moderate antagonism	--
1.45~3.30	一般拮抗作用 Common antagonism	---
3.30~10.0	强拮抗作用 Strong antagonism	----
>10.0	极强拮抗作用 Very strong antagonism	-----

注:联合毒性的等级分类及其相应的符号均依据 Chou 所建立的理论^[32]。

Note: The degrees of combined toxicity and corresponding symbols were according to the theory build by Chou^[32].

1.2.5 统计学分析

原始数据有 Excel 进行分析处理,所有实验结果均用平均数±标准差表示,图表中的结果均以对照组的百分比(%)表示。EC₅₀ 由 SPSS 21 统计软件中 Probit 回归函数拟合得出,联合毒性类型由 Chou-Talalay 方法进行评价得出。采用 t-test 法评价实验组与对照组是否存在显著性差异,one-way ANOVA 法及 Bonferroni 检测(SPSS 21)对实验数据进行组间比较和差异显著性检验($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.001$)。

2 结果 (Results)

2.1 AFB₁、DON 和 ZEN 均对线虫的生长发育和生殖能力产生剂量-效应毒性

我国食品中真菌毒素限量标准 GB2761—2011 规定:谷物及其制品中,AFB₁、DON 和 ZEN 的限量需分别 ≤ 20、1 000、60 μg·kg⁻¹。鉴于物种差异和不同暴露类型等因素存在,为获得更能反映现实生活中的暴露水平,在实验设计时通常需考虑不确定/安全系数(100~1 000 倍)^[34]。因此,本实验选用:20 mg·L⁻¹ AFB₁、800 mg·L⁻¹ DON 和 100 mg·L⁻¹ ZEN (预实验时发现 ZEN 浓度为 60 mg·L⁻¹ 时对线虫体长作用效果不理想)作为高剂量组(不确定系数 = 1 000);10 mg·L⁻¹ AFB₁、400 mg·L⁻¹ DON 和 50 mg·L⁻¹ ZEN 作为中剂量组(1/2 高剂量组浓度);2 mg·L⁻¹ AFB₁、80 mg·L⁻¹ DON 和 10 mg·L⁻¹ ZEN 作为中剂量组(1/10 高剂量组浓度)。分别对线虫进行染毒,并在 24 h 和 48 h 测定线虫体长的变化量,72 h 测定线虫的产卵量。AFB₁、DON 和 ZEN 对线虫生长发育和生殖能力的半数效应浓度(EC₅₀)见表 2。结果显示,AFB₁ 随着暴露时间的增长,毒素对生长发育的抑制作用随之增强(EC₅₀-24 h = 9.49 mg·L⁻¹ > EC₅₀-48 h = 5.10 mg·L⁻¹),DON 则与之相反(EC₅₀-24 h = 476.42 mg·L⁻¹ < EC₅₀-48 h = 1 309.38 mg·L⁻¹),而 ZEN 并无明显变化(EC₅₀-24 h = 56.69 mg·L⁻¹ ≈ EC₅₀-48 h = 55.31 mg·L⁻¹)。此外,各暴露组均与其对应的对照组存在显著性差异,且随着 AFB₁、DON 和 ZEN 暴露剂量的增加,对线虫的生长发育和生殖能力的抑制作用呈显著的剂量-效应正相关性(图 1)。

2.2 AFB₁、DON 和 ZEN 对线虫的联合毒性类型由毒素的组合及暴露剂量共同决定

由图 1 可见,各模型组均随着暴露剂量的增加,毒作用也相应增强,存在显著的剂量-效应关系。其

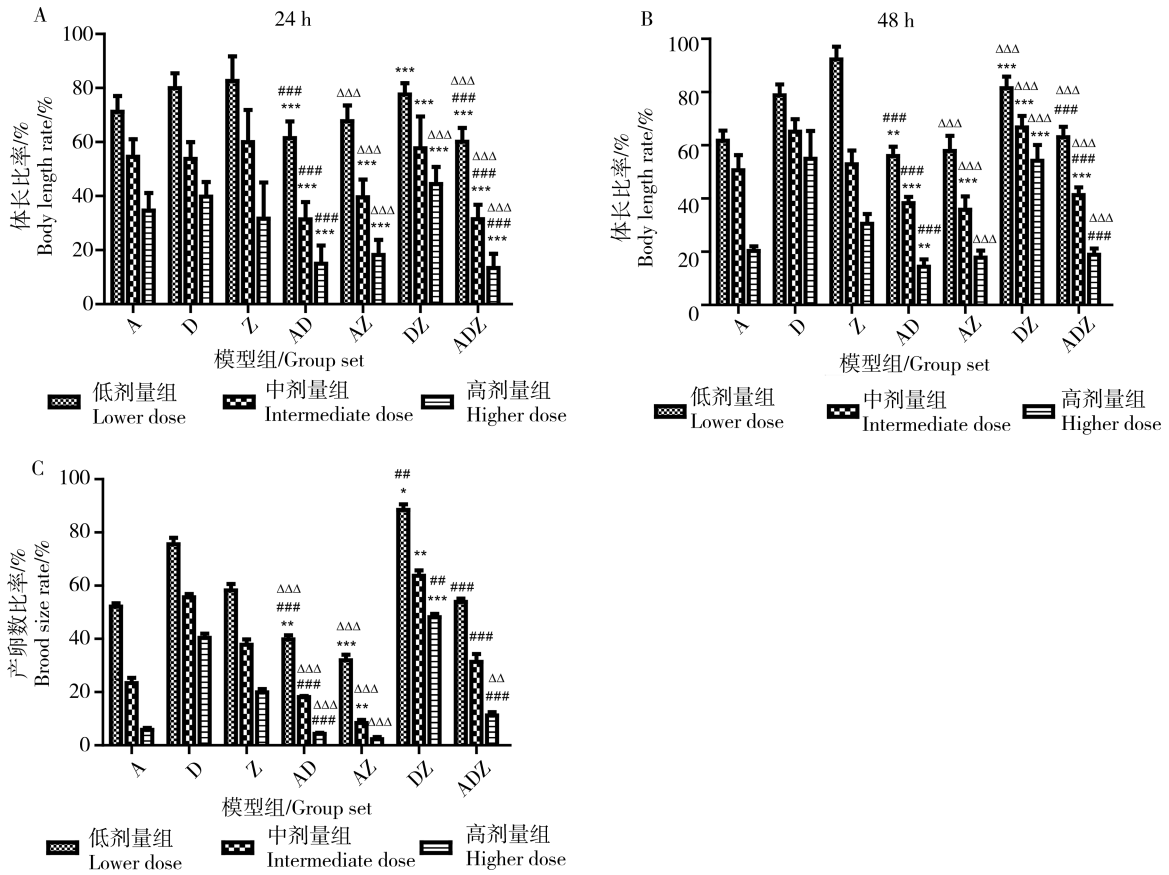


图1 AFB₁、DON 和 ZEN 单一及联合暴露下对线虫生长发育和生殖能力的毒性作用

注:体长比率由暴露组线虫产卵数与对照组线虫产卵数比较而得。横坐标中,A、D、Z、AD、AZ、DZ、ADZ 分别代表 AFB₁、DON、ZEN、AFB₁+DON、AFB₁+ZEN、DON+ZEN 和 AFB₁+DON+ZEN; AFB₁、DON 和 ZEN 在低/中/高剂量组中浓度分别为 2/10/20、80/400/800 和 10/50/100 mg·L⁻¹。所有暴露组与其对应的对照组相比,均有显著性差异,鉴于作图方便,未在图中标注,在此说明。** P < 0.01, *** P < 0.001(AFB₁单独暴露与其联合暴露组相比);## P < 0.01, ### P < 0.001(DON 单独暴露与其联合暴露组相比);ΔΔ P < 0.01, ΔΔΔ P < 0.001(ZEN 单独暴露与其联合暴露组相比)。

Fig. 1 Toxic effects of AFB₁, DON and ZEN alone and their binary or tertiary mixtures on development and reproduction of *C. elegans*

Note: The body length rate is obtained by the body length in treated group compared to control group. A, D, Z, AD, AZ, DZ, ADZ are the abbreviations of AFB₁, DON, ZEN, AFB₁+DON, AFB₁+ZEN, DON+ZEN and AFB₁+DON+ZEN, respectively. The lower/intermediate/higher doses of AFB₁, DON and ZEN are 2/10/20, 80/400/800 and 10/50/100 mg·L⁻¹. All mycotoxin-exposed groups are significantly different from its corresponding control groups, which are not shown in the figure due to the convenience of making clear and concise figures. ** P < 0.01, *** P < 0.001 (group of AFB₁ alone compared with its corresponding combined group); ## P < 0.01, ### P < 0.001 (group of DON alone compared with its corresponding combined group); ΔΔ P < 0.01, ΔΔΔ P < 0.001 (group of ZEN alone compared with its corresponding combined group).

表2 黄曲霉毒素 B₁(AFB₁)、脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)和玉米赤霉烯酮(ZEN)单一暴露下线虫生长发育和生殖能力的 EC₅₀ 及其置信区间(95%)

Table 2 EC₅₀ with 95% confidence interval (CI) of aflatoxin B₁ (AFB₁), deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZEN) alone on development and reproduction of *C. elegans*

	AFB ₁ /(mg·L ⁻¹)	DON/(mg·L ⁻¹)	ZEN/(mg·L ⁻¹)
体长-24 h/EC ₅₀ (95% CI) Body length-24 h/EC ₅₀ (95% CI)	9.49 (6.47~14.88)	476.42 (348.58~710.95)	56.69 (42.15~72.72)
体长-48 h/EC ₅₀ (95% CI) Body length-48 h/EC ₅₀ (95% CI)	5.10 (2.71~8.30)	1 309.38 (688.94~8 533.76) ^a	55.31 (45.70~67.40)
产卵数/EC ₅₀ (95% CI) Brood size/EC ₅₀ (95% CI)	2.32 (1.57~4.09)	486.98 (336.41~817.42)	17.69 (10.06~25.58)

注:由于最高剂量的 DON 仍不能引起超过 50% 的抑制作用, ^a 表示数字均由拟合曲线估算得出,故存在较大偏差。

Note: Because the inhibitory effects for *C. elegans* treated with the highest concentration of DON are still lower than 50%, ^a the numbers are obtained by the fitting curve, and hence there is a large deviation.

中, AFB₁+DON 和 AFB₁+ZEN 分别与 AFB₁、DON 和 ZEN 的单一暴露相比,对线虫生长及其产卵量的抑制作用明显增强,而 DON+ZEN 则出现毒性显著性减弱的趋势。AFB₁+DON+ZEN 则因暴露剂量的不同,仅在暴露 24 h 时对线虫体长存在显著性毒性

增强作用,而在 48 h 时低、高浓度时,与 AFB₁单一暴露结果相似;对线虫繁殖能力仅与 DON 和高浓度 ZEN 单一暴露时存在显著性毒性增强。对此,为了能客观定义混合物的联合毒性类别,本实验采用 Chou-Talalay 模型及其相应程序进行评价(表 3~5)。

表 3 AFB₁、DON 和 ZEN 对线虫生长 (24 h) 的联合毒性作用

Table 3 Combined toxic effect of AFB₁, DON and ZEN on the growth (24 h) of *C. elegans*

真菌毒素 Mycotoxin	剂量-效应指标/Dose-effect parameters				CI 值/CI values				
	D_m /(mg·L ⁻¹)	m	r	EC ₂₅	EC ₅₀	EC ₇₅			
AFB ₁	9.53	0.62	0.963						
DON	481.34	0.78	1.000						
ZEN	56.46	0.97	0.976						
AFB ₁ +DON	141.47	0.92	0.990	1.00	±	0.65	+++	0.43	+++
AFB ₁ +ZEN	29.20	0.94	0.977	1.36	- -	0.94	±	0.72	++
DON+ZEN	667.12	0.64	0.997	1.66	- - -	2.54	- - -	3.98	- - - -
AFB ₁ +DON+ZEN	152.38	0.96	0.980	1.30	- -	0.92	±	0.69	+++

注:联合毒性的分级参见前文。 D_m 和 m 值被用来计算 CI 值,其对应毒素混合物相互作用类型可参见表 1。 D_m 、 m 和 r 分别代表中效剂量、动力学顺序和拟合函数的回归系数;EC₂₅、EC₅₀ 和 EC₇₅ 值是指对体长产生 25%、50% 和 75% 抑制作用时的剂量。在本实验设计中,混合物中 AFB₁-DON-ZEN 的比率均为 1:40:5。本评估模型采用基于 Chou-Talalay 方法的 CalcuSyn 软件。

Note: The degrees of combined toxicity were graded as previously reported. D_m and m values are used for calculating the CI value which can be referred to Table 1 for the corresponding types of interactions. Here, D_m , m and r stand for median-effect dose, kinetic order and regression coefficient of the fitting function, and EC₂₅, EC₅₀ and EC₇₅ values are the doses required to inhibit body length by the rate of 25%, 50% and 75% of the whole system. The ratio of AFB₁-DON-ZEN is 1:40:5 used for the experimental design. CalcuSyn software based on the Chou-Talalay method was used for this assessment.

表 4 AFB₁、DON 和 ZEN 对线虫生长 (48 h) 的联合毒性作用

Table 4 Combined toxic effect of AFB₁, DON and ZEN on the growth (48 h) of *C. elegans*

真菌毒素 Mycotoxin	剂量-效应指标/Dose-effect parameters				CI 值/CI values				
	D_m /(mg·L ⁻¹)	m	r	EC ₂₅	EC ₅₀	EC ₇₅			
AFB ₁	6.38	0.93	0.938						
DON	1 308.83 ^a	0.48	0.997						
ZEN	55.81	1.41	1.000						
AFB ₁ +DON	129.99	0.82	0.924	0.67	+++	0.59	+++	0.63	+++
AFB ₁ +ZEN	20.27	0.76	0.972	0.56	+++	0.78	++	0.83	++
DON+ZEN	1 377.58 ^a	0.54	0.990	2.01	- - -	3.68 ^a	- - - -	10.27 ^a	- - - -
AFB ₁ +DON+ZEN	199.65	0.81	0.961	1.12	-	1.20	- -	1.57	- - -

注:联合毒性的分级参见前文。 D_m 和 m 值被用来计算 CI 值,其对应毒素混合物相互作用类型可参见表 1。 D_m 、 m 和 r 分别代表中效剂量、动力学顺序和拟合函数的回归系数;EC₂₅、EC₅₀ 和 EC₇₅ 值是指对体长产生 25%、50% 和 75% 抑制作用时的剂量。在本实验设计中,混合物中 AFB₁-DON-ZEN 的比率均为 1:40:5。本评估模型采用基于 Chou-Talalay 方法的 CalcuSyn 软件。由于最高剂量的 DON 仍不能引起超过 50% 的抑制作用,^a数字为拟合曲线估算得出,故存在较大偏差。

Note: The degrees of combined toxicity were graded as previously reported. D_m and m values are used for calculating the CI value which can be referred to Table 1 for the corresponding types of interactions. Here, D_m , m and r stand for median-effect dose, kinetic order and regression coefficient of the fitting function, and EC₂₅, EC₅₀ and EC₇₅ values are the doses required to inhibit body length by the rate of 25%, 50% and 75% of the whole system. The ratio of AFB₁-DON-ZEN is 1:40:5 used for the experimental design. CalcuSyn software based on the Chou-Talalay method was used for this assessment. Because the inhibitory effects for *C. elegans* treated with the highest concentration of DON are still lower than 50%, ^a the numbers are obtained by the fitting curve, and hence there is a large deviation.

从表3和表4可知,在低剂量(EC_{25})短时间(24 h)内,混合物 AFB_1+DON 对线虫的生长发育表现出加和作用,随着暴露浓度(EC_{50}/EC_{75})的增加和/或暴露时间(48 h)的延长, AFB_1+DON 则对线虫表现出协同作用。但在本实验中,混合物 $DON+ZEN$ 对线虫均表现出拮抗作用,且随着暴露浓度和暴露时间的增加,拮抗作用增强。另外,混合物 AFB_1+ZEN 在24 h时,对线虫的联合毒性类型在 EC_{25} 、 EC_{50} 和 EC_{75} 时分别为弱拮抗作用、近似加和作用 and 弱协同作用,但在48 h时,则由一般协同作用(EC_{25})变为弱协同作用(EC_{50} 、 EC_{75})。最后,混合物 $AFB_1+DON+ZEN$ 对线虫的生长发育除在 EC_{50} -24 h 和 EC_{75} -24 h 表现出毒性增强外,其他均为(极弱-弱-一般)拮抗作用。

表5列出了真菌毒素混合物对线虫繁殖能力的联合毒性类型。其中,混合物 AFB_1+DON 在 EC_{25} 暴露时表现为加和作用,随着浓度的增加,则变为弱协同作用。混合物 AFB_1+ZEN 则由弱拮抗作用(EC_{25})变为极弱协同作用(EC_{50})再到一般协同作用(EC_{75})。相反地,混合物 $DON+ZEN$ 和混合物 $AFB_1+DON+ZEN$ 则对线虫的繁殖能力分表表现强拮抗作用和一般拮抗作用。

3 讨论 (Discussion)

本实验旨在评价3种最为常见的真菌毒素(DON 、 AFB_1 和 ZEN)共同存在时的联合毒性及其毒作用类型。研究表明,单独作用时, AFB_1 对线虫的

毒性作用最强, DON 最弱。此外,采用 Chou-Talalay 模型分析毒素混合物对线虫的毒性作用情况,得到混合物中毒素间的相互作用类型。混合物 AFB_1+DON 和混合物 $DON+ZEN$ 较为一致地分别表现出加和/协同作用和拮抗作用。而混合物 AFB_1+ZEN 和混合物 $AFB_1+DON+ZEN$ 则会因暴露浓度、暴露时间和检测指标的不同,表现出不同的联合毒性类型。

由表2可知, AFB_1 分别在 $5.10(95\% CI = 2.17 \sim 8.30)$ 和 $2.32(1.57 \sim 4.09) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时对线虫的体长-48 h 和产卵数造成50%的抑制作用。现已有报道表明,在4218份农产品样本中, AFB_1 的检出最大值可高达 $1563 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ^[7],这表明真菌毒素在环境中的高暴露风险对人体健康安全存在着潜在威胁,同时为评价联合毒性强弱的剂量设定提供了理论依据,为加强开展联合毒性风险暴露评估提出了现实要求。此外,实验结果还表明,随着暴露时间的增加, AFB_1 对线虫的生长抑制作用增强,而 DON 呈减弱趋势, ZEN 则维持不变。这一现象可能与不同毒素在线虫体内的毒性动力学和生物转化关系密切。因此,暴露时间可作为另一显著影响因素,同暴露剂量一起影响目标毒素对线虫的毒性作用,即具有剂量-时间-效应关系。

联合毒性实验结果表明,混合物 AFB_1+DON 对线虫表现出毒性增强,即协同作用和加和作用(仅在 EC_{25} 时对24 h-体长和产卵数)。该结果与已有报道(细胞模型、斑马鱼和小鼠模型)基本一致^[16-17,35-36]。

表5 AFB_1 、 DON 和 ZEN 对线虫产卵数的联合毒性作用

Table 5 Combined toxic effect of AFB_1 , DON and ZEN on the brood size of *C. elegans*

真菌毒素 Mycotoxin	剂量-效应指标/Dose-effect parameters			CI 值/CI values					
	$D_m/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	m	r	EC_{25}		EC_{50}		EC_{75}	
AFB_1	2.40	1.15	0.961						
DON	486.53	0.66	0.992						
ZEN	17.59	0.70	0.968						
AFB_1+DON	65.64	1.11	0.943	0.90	±	0.80	++	0.76	++
AFB_1+ZEN	7.258	1.31	0.984	1.28	- -	0.85	+	0.62	+++
$DON+ZEN$	836.05	0.90	1.000	9.83	- - - -	6.81	- - - -	4.72	- - - -
$AFB_1+DON+ZEN$	124.74	0.91	0.952	2.34	- - -	2.12	- - -	2.13	- - -

注:联合毒性的分级参见前文。 D_m 和 m 值被用来计算 CI 值,其对应毒素混合物相互作用类型可参见表1。 D_m 、 m 和 r 分别代表中效剂量、动力学顺序和拟合函数的回归系数; EC_{25} 、 EC_{50} 和 EC_{75} 值是指对产卵数产生25%、50%和75%抑制作用时的剂量。在本实验设计中,混合物中 AFB_1 - DON - ZEN 的比率均为1:40:5。本评估模型采用基于 Chou-Talalay 方法的 CalcuSyn 软件。

Note: The degrees of combined toxicity were graded as previously reported. D_m and m values are used for calculating the CI value which can be referred to Table 1 for the corresponding types of interactions. Here, D_m , m and r stand for median-effect dose, kinetic order and regression coefficient of the fitting function, and EC_{25} , EC_{50} and EC_{75} values are the doses required to inhibit brood size by the rate of 25%, 50% and 75% of the whole system. The ratio of AFB_1 - DON - ZEN is 1:40:5 used for the experimental design. CalcuSyn software based on the Chou-Talalay method was used for this assessment.

这可能是由于 AFB₁ 的代谢产物与 DNA 结合,引起 p53 基因改变,对蛋白合成造成影响^[37-38]。同时, DON 作为 RNA、DNA 和蛋白合成的潜在抑制因子,可进入细胞与核糖体 60S 亚基结合,干扰肽基转移酶的活性,也抑制蛋白质的合成^[39]。因此, DON 和 AFB₁ 共同存在时,增加了各自原有的毒性,使联合毒性明显增强。由此表明,毒素混合物可通过共同和/或不同的通路进行相互作用,从而改变毒性强弱。然而,混合物 AFB₁+ZEN 则因暴露浓度和时间的不同,表现出不同的联合毒性类型。例如, AFB₁+ZEN 在 EC₂₅ 时,对体长(24 h)和产卵量均产生拮抗作用,而随着暴露剂量的增加(EC₅₀ 和 EC₇₅),则产生加和作用或协同作用。而在 48 h 时,则均产生协同作用。这可能源于共存的毒素改变了原有毒代动力学和/或生物转化。Gillesby 和 Zacharewski^[40] 曾报道, ZEN 可通过与之相结合的受体与 AFB₁ 功能团上的咪喃相互作用,暗示 ZEN 可阻碍 AFB₁ 与其靶位点结合,从而使毒性减弱。相反,混合物 DON+ZEN 则变现为拮抗作用,这一结果与成年猪模型结果相反^[41],但与斑马鱼模型中结论一致^[17]。此外,混合物 AFB₁+DON+ZEN 对线虫的生长发育在 24 h 暴露时,由弱拮抗作用(EC₂₅)变为加和作用(EC₅₀)再变为一般加和作用(EC₇₅),而在 48 h 暴露时,则由极弱拮抗作用逐步变为一般拮抗作用;对线虫的繁殖能力则毒性强弱较为稳定。这一现象可推测是因受到 3 种毒素在不同浓度和时间的共同作用和综合影响,以及检测指标的不同,导致其联合作用类型较为复杂。因此,对多种毒素间的相互作用及机理仍有待进一步深入研究,这不仅有助于丰富毒素领域的研究广度和深度,更对今后相关政策的制定以及有关公共卫生的决策具有科学的指导作用。

通讯作者简介:钱和(1962-),女,博士,教授,主要从事食品安全与质量控制研究。

共同通讯作者简介:王加生(1955-),男,分子流行病学博士,长江学者特聘教授,主要从事生物毒素分子生物标志物研究。

参考文献(References):

- [1] Wild C P, Miller J D, Groopman J D. Mycotoxin control in low- and middle- income countries [R]. Washington D C: International Agency for Research on Cancer, 2015
- [2] Richard J L. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses - An overview [J]. International Journal of Food Microbiology, 2007, 119: 3-10
- [3] Rodrigues I, Naehrer K. Biomin Survey 2010: Mycotoxins inseparable from animal commodities and feed [J]. All about Feed, 2011, 2: 17-20
- [4] 季海霞, 钱英, 黄翠茹, 等. 2015 年 1-6 月饲料霉菌毒素分析与探讨[J]. 养猪, 2015(4): 24-27
Ji H X, Qian Y, Huang C R, et al. Analysis and discussion of mycotoxins in feeds from January to June 2015 [J]. Swine Production, 2015(4): 24-27 (in Chinese)
- [5] 姚俊峰, 王晓亮, 吕文纬, 等. 上海地区鸡蛋养殖场夏秋季全价饲料黄曲霉毒素和呕吐毒素污染情况调查 [J]. 上海畜牧兽医通讯, 2015(1): 24-25
Yao J F, Wang X L, Lv W W, et al. Investigations on the contaminations of aflatoxins and vomitoxin in the summer and autumn of egg farms in Shanghai [J]. Shanghai Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2015 (1): 24-25 (in Chinese)
- [6] Rodriguez-Carrasco Y, Jose Ruiz M, Font G, et al. Exposure estimates to fusarium mycotoxins through cereals intake [J]. Chemosphere, 2013, 93: 2297-2303
- [7] Naehrer K, Kovalsky P. The Biomin Mycotoxin Survey: Identifying the threats in 2013 [J]. Mycotoxins Science and Solutions, 2014, 2014: 2-7
- [8] Casteel M, Nielsen C, Didier A, et al. Induction of MAPK dependent transcription factors by deoxynivalenol in human cell lines [J]. Mycotoxin Research, 2010, 26: 9-14
- [9] Pestka J J. Mechanisms of deoxynivalenol-induced gene expression and apoptosis [J]. Food Additives and Contaminants Part A-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment, 2008, 25: 1128-1140
- [10] Alberts J, Engelbrecht Y, Steyn P, et al. Biological degradation of aflatoxin B₁ by *Rhodococcus erythropolis* cultures [J]. International Journal of Food Microbiology, 2006, 109: 121-126
- [11] Roy A K. Effects of aflatoxin B₁ on polysomal profiles and RNA synthesis in rat liver [J]. Biochimica Biophysica Acta (BBA) - Nucleic Acids and Protein Synthesis, 1968, 169: 206-211
- [12] Sporn M B, Dingman C W, Phelps H L, et al. Aflatoxin B₁: Binding to DNA *in vitro* and alteration of RNA metabolism *in vivo* [J]. Science, 1966, 151: 1539-1541
- [13] Pfohl-Leskowicz A, Chekir-Ghedira L, Bacha H. Genotoxicity of zearalenone, an estrogenic mycotoxin: DNA adduct formation in female mouse tissues [J]. Carcinogenesis, 1995, 16: 2315-2320
- [14] Chatopadhyay P, Pandey A, Chaurasia A K, et al. Hepatic

- hyperplasia and damages induces by zearalenone *Fusarium* mycotoxins in BALB/c mice [J]. *Arquivos de Gastroenterologia*, 2012, 49: 77-81
- [15] Gazzah A C, Camoin L, Abid S, et al. iTRAQ: A method to elucidate cellular responses to mycotoxin zearalenone [J]. *Journal of Applied Toxicology*, 2013, 33: 566-575
- [16] Zhou H Y, George S, Hay C, et al. Individual and combined effects of aflatoxin B₁, deoxynivalenol and zearalenone on HepG2 and RAW 264.7 cell lines [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2017, 103: 18-27
- [17] Zhou H Y, George S, Li C X, et al. Combined toxicity of prevalent mycotoxins studied in fish cell line and zebrafish larvae revealed that type of interactions is dose-dependent [J]. *Aquatic Toxicology*, 2017, 193: 60-71
- [18] Ji J, Zhu P, Cui F C, et al. The antagonistic effect of mycotoxins deoxynivalenol and zearalenone on metabolic profiling in serum and liver of mice [J]. *Toxins*, 2017, 9 (1): 28
- [19] Smith M C, Emma T S, Monika C, et al. Differential impacts of individual and combined exposures of deoxynivalenol and zearalenone on the HepaRG human hepatic cell proteome [J]. *Journal of Proteomics*, 2018, 173: 89-98
- [20] Brenner S. The Genetics of *Caenorhabditis elegans* [J]. *Genetics*, 1974, 77: 71-94
- [21] Anderson G L, Boyd W A, Williams P. Assessment of sublethal endpoints for toxicity testing with the nematode *Caenorhabditis elegans* [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2001, 20: 833-838
- [22] Boyd W A, Smith M V, Kissling G E, et al. Medium- and high-throughput screening of neurotoxicants using *C. elegans* [J]. *Neurotoxicology and Teratology*, 2010, 32: 68-73
- [23] Ma H. Use of the nematode, *Caenorhabditis elegans*, to evaluate bioavailability and toxicity of transition metals and manufactured zinc oxide nanoparticles [D]. Athens, Georgia: University of Georgia, 2009: 1-27
- [24] García-Sancho M. From the genetic to the computer program: The historicity of 'data' and 'computation' in the investigations on the nematode worm *C. elegans* (1963 - 1998) [J]. *Studies in History and Philosophy of Science Part C: Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences*, 2012, 43: 16-28
- [25] Sulston J E, Schierenberg E, White J G, et al. The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans* [J]. *Developmental Biology*, 1983, 100: 64-119
- [26] White J, Southgate E, Thomson J, et al. The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*: The mind of a worm [J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B- Biological Sciences*, 1986, 314: 1-340
- [27] 王大勇. 模式生物毒理学: 基于秀丽线虫研究的总结与思考[M]. 南京: 东南大学出版社, 2013: 1-3
- Wang D Y. Model Organism Toxicology: Summary and Thinking Based on the Study of *Caenorhabditis elegans* [M]. Nanjing: Southeast University Press, 2013: 1-3 (in Chinese)
- [28] 王云彪, 李润琴, 邓茗岑, 等. 砷与农药草甘膦、敌敌畏对秀丽隐杆线虫的联合毒性[J]. *生态毒理学报*, 2013, 8(2): 262-267
- Wang Y B, Li R Q, Deng M C, et al. Joint toxicity of arsenic, glyphosate and dichlorvos to *C. elegans* [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2013, 8(2): 262-267 (in Chinese)
- [29] Stiernagle T. Maintenance of *C. elegans* [M]// WormBook: The Online Review of *C. elegans* Biology [Internet]. 2006 (doi/10.1895/wormbook.1.101.1)
- [30] Brenner S. The genetics of *Caenorhabditis elegans* [J]. *Genetics*, 1974, 77(1): 71-94
- [31] Dhawan R, Dusenber D B, Williams P L. Comparison of lethality, reproduction, and behavior as toxicological endpoints in the nematode *Caenorhabditis elegans* [J]. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*, 1999, 58: 451-462
- [32] Chou T C. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies [J]. *Pharmacological Reviews*, 2006, 58: 621-681
- [33] Chou T C, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: The combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors [J]. *Advances in Enzyme Regulation*, 1984, 22: 27-55
- [34] Dourson M L, Stara J F. Regulatory history and experimental support of uncertainty (safety) factor [J]. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 1983, 3: 224-238
- [35] He C H, Fan Y H, Wang Y, et al. The individual and combined effects of deoxynivalenol and aflatoxin B₁ on primary hepatocytes of *Cyprinus carpio* [J]. *International Journal of Molecular Science*, 2010, 11: 3760-3768
- [36] Sun L H, Lei M Y, Zhang N Y, et al. Hepatotoxic effects of mycotoxin combinations in mice [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2014, 74: 289-293
- [37] Eaton D L, Gallagher E P. Mechanisms of aflatoxin carcinogenesis [J]. *Annual Reviews of Pharmacology & Toxi-*

- cology, 1994, 34: 135-172
- [38] Kiessling K H. Biochemical mechanism of action of mycotoxins [J]. Pure and Applied Chemistry, 1986, 58: 327-338
- [39] Wan L Y, Turner P C, El-Nezami H. Individual and combined cytotoxic effects of *Fusarium* toxins (deoxynivalenol, nivalenol, zearalenone and fumonisins B₁) on swine jejunal epithelial cells [J]. Food and Chemical Toxicology, 2013, 57: 276-283
- [40] Gillesby B E, Zacharewski T R. Exoestrogens: Mechanisms of action and strategies for identification and assessment [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 1998, 17: 3-14
- [41] Rotter B, Thompson B, Lessard M, et al. Influence of low-level exposure to *Fusarium* mycotoxins on selected immunological and hematological parameters in young swine [J]. Toxicological Sciences, 1994, 23: 117-124 ◆