

# 伏马毒素 B1 的毒性和检测方法

黎晓雯, 罗俊崇, 张梦丹, 王 凯\*, 曹嫦妤\*

(佛山科学技术学院, 广东佛山 528231)

**摘 要:**伏马毒素是镰刀属真菌产生的毒素,可污染世界各地的农作物。目前已发现的伏马毒素有 28 种,分为 FA、FB、FC、FP 四大类。而 B1 型伏马毒素是所有类型中污染最广泛、毒性最强的一种。FB1 通过抑制神经酰胺合成酶的活性,发挥其毒性作用,并可经食物链传播,严重危害畜禽和人类的健康。论文主要对 FB1 的毒性作用及检测方法进行简要综述,为进一步研究 FB1 提供新视角。

**关键词:**伏马毒素;理化代谢;毒性作用;检测方法

DOI:10.16437/j.cnki.1007-5038.2019.06.021

中图分类号:S859.7

文献标识码:A

文章编号:1007-5038(2019)06-0112-04

伏马毒素(fumonisin)是由串珠镰刀菌(*Fusarium moniliforme*)、轮状镰刀菌(*Fusarium verticillioides*)等在合适的环境下生成的次级代谢产物。因镰刀属真菌是污染玉米、高粱、小麦等农作物的优势菌种,故伏马毒素可通过食物链传播影响人和动物的健康。1998 年, Gelderblom 首次从串珠镰刀菌培养液里分离获得伏马毒素,时至今日,已鉴定出 28 种不同的异构体。伏马毒素均为结构类似的双酯化合物,直链骨架含有 19 或 20 个碳原子,各种羧、羟基、酯键分布在骨架两侧。不同类型的伏马毒素因碳骨架上取代基的不同分为 FA、FB、FC、FP 四大类,每一类又含有各种不同的分型,其中, B1 型伏马毒素污染最广泛,约占粮食污染中伏马毒素 60% 以上,毒性作用也最强<sup>[1]</sup>。

## 1 代谢途径

伏马毒素 B1(fumonisin B1, FB1)为白色吸湿性粉末,易溶于乙腈、甲醇、水等极性溶剂,无紫外吸收和荧光特性,热稳定性极高,普通热加工对其无影响,故 FB1 在农产品中均可保持稳定的结构和性质。动物对 FB1 的生物利用率很低,代谢排出速度较快。给猪静脉注射 FB1,血清中 FB1 的 T<sub>1/2α</sub>、T<sub>1/2β</sub> 为 6 min 和 36 min,口服 FB1 时,在尿液、粪便中回收到大量的 FB1,仅 3.1% 经肠肝循环后又随粪便排出,说明粪便排泄是 FB1 最主要的代谢途径<sup>[2]</sup>。FB1 在其他组织器官中无法被降解,仅有胃肠道可水解少量 FB1,将猪盲肠内容物与 FB1 共同培养,FB1 可被肠道菌群降解为无毒水解 FB1

(hydrolysed FB1, HFB1)<sup>[3]</sup>。给肉鸡饲喂 10 mg/kg FB1 饲料,在砂囊、小肠和粪便中发现大量 FB1 和极少量 HFB1<sup>[4]</sup>。相对于 FB1, HFB1 对机体几乎无害,故水解饲料中 FB1 或许是一个较好的减轻 FB1 毒性的方法。

## 2 毒性作用

### 2.1 作用机理

鞘氨醇(sphingosine, So)、二氢鞘氨醇(sphinganine, Sa)在神经酰胺合成酶(ceramide synthase, CerS)的催化下合成神经酰胺(Cer),神经酰胺是复合鞘脂代谢的中间产物,复合鞘脂是真核生物细胞膜或细胞器膜的重要组成部分,在细胞生长分化、信号转导等方面发挥重要作用。FB1 与 So、Sa 结构类似,可竞争性结合 CerS,抑制其催化 So、Sa 的活性,使 Sa、So 大量蓄积,复合鞘脂合成减少,因 So 是由 Cer 分解产生,故相比 Sa、So 蓄积较少。临床上常将血液、尿液或组织器官中 Sa/Sa 比值升高作为 FB1 中毒的生物标记<sup>[5]</sup>。

### 2.2 神经毒性

若饲料中含 FB1,马会患上脑白质软化症(Equine leukoencephalomalacia, ELEM),脑白质稀薄坏死,并出现头颈伸直、共济失调等突然的神经症状。小鼠注射 8 mg/kg FB1,30 min 后注射 30 mg/kg 戊四氮,发现 FB1 可增加大脑皮层 Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup> ATP 酶活性及线粒体膜电位,缩短戊四氮促发肌阵挛的时间并增加痉挛次数<sup>[6]</sup>。给成年鲤鱼饲喂 10 mg/kg 和 100 mg/kg FB1 饲料 42 d,脑组织毛细血

收稿日期:2018-05-28

作者简介:黎晓雯(1995—),女,广东惠州人,硕士研究生,主要从事中毒病与小动物疾病研究。\* 通讯作者

管受损,出现空泡、坏死的神经细胞,且浓度越高损伤越严重<sup>[7]</sup>。给大鼠灌胃 FB1(6.2 mg/kg)14 d,发现胫骨和坐骨神经传导速度下降、屈肌反射和伸肌反射的 H 波(感觉和运动纤维往返传导的速度)减少,可能是 FB1 干扰细胞膜鞘脂的形成导致膜信号传导发生改变所致。以上研究表明,FB1 可跨过血脑屏障引起大脑过度兴奋,破坏神经细胞和神经反射信号传导,对中枢神经系统和外周神经系统均损害作用<sup>[8]</sup>。

### 2.3 免疫毒性

据文献报道,FB1 可阻滞 G0/G1 细胞周期,使细胞增殖减少,用 150、500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  FB1 处理人淋巴细胞,细胞活性呈剂量依赖性下降,单细胞电泳发现 DNA 损伤严重<sup>[9]</sup>。FB1 影响仔猪肠道连接蛋白 e-cadherin、occludin 表达,使肠细胞水肿坏死,还可降低肉鸡肠道黏膜蛋白 Muc2、锌转运体 ZnT-1 表达,使肠黏液层屏障作用和抗氧化能力下降<sup>[10]</sup>。发现 FB1 可抑制脂多糖(LPS)诱导小鼠树突细胞刺激 T 细胞的能力,导致淋巴细胞刺激因子 CD80 和 CD86、主要组织相容性复合体(MHC II)表达均显著下降,阻碍抗原呈递过程<sup>[11]</sup>。因此,FB1 的免疫毒性包括抑制免疫细胞增殖、影响免疫蛋白和细胞因子表达、降低屏障功能、干扰免疫应答等。

### 2.4 生殖毒性

给雄兔饲喂 FB1(0.13、5、7.5、10 mg/kg)饲料 28 周,发现睾丸和附睾中日产精量、精子储备量均呈剂量依赖性下降,同时,FB1 也可降低公猪附睾重量和精子储备量<sup>[12]</sup>。颗粒细胞对卵泡的形成和卵母细胞的发育具有重要意义,FB1 可干扰颗粒细胞生长和雌激素的分泌,用不同浓度 FB1 处理牛颗粒细胞,孕酮和细胞增殖无差异,雌二醇轻微上升,而对于猪来说,颗粒细胞增殖减少,孕酮增加且 CYP11A1(刺激类固醇合成的基因)表达下降,说明 FB1 对颗粒细胞和雌激素的影响存在物种差异性<sup>[13]</sup>。FB1 处理小鼠早期胚胎 96 h,最终发育成晚期囊胚的胚胎比例下降,胚胎死亡率显著增加<sup>[14]</sup>。表明 FB1 可干扰精子、卵泡、生殖激素的形成、影响胚胎的生长发育,从而降低家畜的生产性能。

### 2.5 器官毒性

以前研究认为 FB1 毒性具有物种特异性,引起猪肺水肿、马脑白质软化和啮齿类动物肝肾损伤。给小鼠注射 FB1(2.5 mg/kg)4 d,血清 ALT、AST、ALP 呈时间依赖性下降,1 d~3 d 内肝细胞病变(空泡、毛细血管沉积、中央和门静脉紊乱、肝窦扩张)增多,造成肝细胞损伤,而第 4 天时病变减少,ROS、内

质网跨膜蛋白 IRE1- $\alpha$ 、PERK、ATF6 和自噬标记物 ATG5、ATG7、LC3 I/II 表达增加,说明机体内质网、氧化应激介导的细胞自噬被激活从而降低肝细胞损伤<sup>[15]</sup>。给大鼠灌胃 FB1(100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ )12 周,肾脂质过氧化物、DNA 片段化增加,GSH、Gpx、SOD 和 CAT 表达下降<sup>[16]</sup>。肉鸡饲喂 200 mg/kg FB1 饲料,肝肾出现实质性损害,细胞凋亡坏死并伴有炎性细胞浸润<sup>[17]</sup>。当饲料中 FB1 $\geq 16$  mg/kg 时,猪可患上致命性肺水肿,并伴有心收缩力和心输出量降低,FB1 除了引起马脑白质软化外,也可降低其心率和心收缩力,此外,暴露于 FB1 的小鼠也出现肺水肿和心功能障碍<sup>[18]</sup>,故有学者认为 FB1 引起的肺水肿为心源性肺水肿。说明 FB1 严重影响肝、肾、肺和心血管系统,且毒性作用更倾向于具有明显的组织器官特异性,而非物种特异性。

### 2.6 致癌性

F344 大鼠饲喂 250 mg/kg FB1 饲料 21 d,肝癌前谷胱甘肽 S 转移酶阳性病灶(GST-P<sup>+</sup>)轻微增加,与黄曲霉毒素 B1(AFB1)可协同诱导肝癌的产生<sup>[19]</sup>,或许 FB1 和 AFB1 共同暴露是建立肝癌模型的可靠方法。据报道,长期暴露于高浓度 FB1 下,小鼠和大鼠可患上肝癌和肾癌。给雄性 P53 杂合、纯合小鼠饲喂 150 mg/kg FB1 饲料 26 周,均发现患有肝细胞腺瘤和胆管瘤,证明 FB1 的致癌性为非遗传毒性<sup>[20]</sup>。基于 FB1 对啮齿动物的致癌性,国际癌症研究署将 FB1 归为 2B 类致癌物,但其对人类的致癌作用尚不清楚,仅发现某些食管癌高发区食品中 FB1 含量远高于低发区,且多以玉米为主食。因此,FB1 的致癌性属于慢性积累的过程,且对于其他动物是否具有致癌作用还需进一步的探究。

## 3 检测方法

### 3.1 薄层色谱

薄层色谱(TLC)是我国最早用来检测真菌毒素的标准方法。展开剂带动样品在薄层板上移动,根据样品中各组分移动距离的不同进行分离。若样品有颜色,可直接观察,否则需喷显色剂或在紫外灯下观察,与标准品比较可对样品进行定性和半定量。薄层色谱检测 FB1 时,展开剂一般为不同比例的可溶解 FB1 的极性溶液混合物,如氯仿、甲醇、乙腈等,也可用荧光素或香草醛为显色剂。用反相薄层色谱检测玉米粉中 FB1,展开剂为甲醇:4%氯化钾(70:30),荧光素显色,估算 FB1 浓度为 0.5 mg/kg。TLC 操作简便,大多数技术人员均能轻松掌握,但不可精确定量和大批量检测,因而已逐渐被其他检测方法替代。

### 3.2 高效液相色谱

高效液相色谱(HPLC)是目前应用最广泛的分离检测技术。高压系统将流动相泵入固定相(色谱柱),在柱内分离样品,再进入检测器,实现对样品定性定量分析。FB1是一种水溶性的物质,适用于反相液相色谱测定,因其无紫外吸收基团及荧光特性,故检测前需对FB1进行荧光衍生,一般常用的色谱柱和衍生剂为C18和邻苯二甲醛(OPA),而采用FMO-Cl(9-芴甲氧羰酰氯)进行荧光衍生,激发、发射波长为263 nm和313 nm,以甲醇:乙腈:去离子水(1:1:2)萃取FB1,固定相C18柱温为35℃,80%流动相A(pH 4.7 柠檬酸盐缓冲液/乙腈,70:30)和20%流动相B(pH 4.7 柠檬酸盐缓冲液/乙腈,30:70)以1 mL/min进样,流动相B在进样后的第一个20 min内从20%增至95%,保持5 min,后回到在20%保持4 min,最终在0.04 μg/mL~2.5 μg/mL取得良好线性关系, $R^2 \geq 0.999$ 。HPLC准确度高重复性好,可同时检测多种真菌毒素,但操作时间长不可快速检测大批量样品,适用于实验室检测<sup>[21]</sup>。

### 3.3 高效液相色谱质谱联用

高效液相色谱质谱联用(HPLC-MS)将HPLC和质谱联用,高度结合HPLC分离能力和质谱鉴定能力,可对复杂有机混合物进行有效分析。在HPLC将混合物分离成单一组分后,依次进入质谱仪由电喷雾按顺序逐个分析,根据质荷比(m/z,离子的质量与他们所带的电荷的比值)不同形成质谱图,实现定性、定量分析。FB1经萃取和HPLC后,进入质谱仪,采用正电子喷雾模式(ESI+),5 500 V离子化电压、50psi雾化器压力、55psi辅助气压力、500℃离子源温度为质谱条件,测定玉米粉FB1含量,最终在0.05 ng/mL~50 ng/mL之间取得良好的线性关系, $R^2 > 0.999$ 。HPLC-MS/MS与HPLC一样精确度和灵敏度较好,但仪器成本较高,不适合大规模生产应用<sup>[22]</sup>。

### 3.4 酶联免疫吸附试验

酶联免疫吸附试验(ELISA)属于免疫学检测方法,包被抗原或抗体后,加入底物、样品和酶标抗原或抗体,用酶标仪检测吸光度,进行定量检测。根据反应方式不同可分为间接、夹心、竞争3种类型。以硝酸纤维素膜为基板,包被FB1单抗,制备生物素标记的偶联FB1抗原及链霉亲和素标记的辣根过氧化物酶,建立竞争型生物素-链霉亲和素系统,检测区间为0.56 ng/mL~92.57 ng/mL, $R^2 = 0.981$ <sup>[23]</sup>。利用FB1-OVA、FB1单抗和山羊抗小鼠

IgG建立竞争性间接ELISA,也得到较好的检测结果。近十几年来ELISA发展迅猛,市面上ELISA试剂盒,操作简便省时,适用大规模检测样品,但重复性较低,容易产生假阳性。在免疫学检测FB1的方法中,胶体金检测法比ELISA用时更短,可现场大量检测,但目前还未开发出标准化产品,还需进一步研究。

### 3.5 核酸适配体

核酸适配体是一种单链寡核苷酸,可与样品特异性结合。将核酸适配体识别样品后空间结构的改变,转变为定量的荧光或电化学信号,实现高效的特异性检测。FB1的核酸适配体可用配体指数富集系统筛选得到。利用荧光染料Pico Green仅识别双链核酸的特性,建立核酸适配体检测FB1的方法:一定浓度的适配体与FB1结合,剩余适配体与体系中互补链杂交成双链DNA,再检测Pico Green识别双链DNA产生的荧光信号,最终线性关系为0.1 μg/L~1 μg/L,最低检测限为0.1 μg/L<sup>[24]</sup>。将金纳米粒子(AuNPs)固定于多孔聚二甲基硅氧烷(PDMS),用PDMS覆盖碳电极(SPCE)构建一次性微电池,AuNPs可固定FB1适配体,当FB1与适配体结合,构象改变阻碍电信号传递,最终在10 pg/mL~50 ng/mL范围内有良好的线性,最低检测限为3.4 pg/mL,进一步升级检测灵敏度。核酸适配体建立的FB1检测避免了其他毒素干扰,特异性极高,根据转变信号不同,灵敏度也不同,目前看来电信号比荧光信号更加灵敏,但成本较高,也无标准化商品,适用于实验室检测<sup>[25]</sup>。

## 4 小结

综上所述,FB1对人和动物的健康存在巨大的威胁,深入了解FB1的作用机理和毒性情况有助于防治FB1给人和动物所带的疾病。农作物中FB1的及时检测,可防止FB1在食物链中传播从而降低危害。然而,FB1的检测并不能从根本上解决问题,我们更应该思考如何才能最大的程度上降解或清除FB1,而这就需要进一步深入研究。

### 参考文献:

- [1] Ramesh C G. Reproductive and developmental toxicology[M]. New York: Academic Press, 2017: 925-943.
- [2] Schertz H, Kluess J, Frahm J, et al. Oral and intravenous fumonisin exposure in pigs a single-dose treatment experiment evaluating toxicokinetics and detoxification [DB/OL]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5923316/>, 2018-04-05.
- [3] Dang H A, Zsolnai A, Kovacs M, et al. *In vitro* interaction between fumonisin B1 and the intestinal microflora of pigs[J].

- Polish J Microbiol, 2017, 66(2): 245-250.
- [4] Grenier B, Schwartz-Zimmermann H E, Gruber-Dorninger C, et al. Enzymatic hydrolysis of fumonisins in the gastrointestinal tract of broiler chickens[J]. Poultry Sci, 2017, 96(12): 4342-4351.
- [5] Yamazoe Y, Koyama N, Kumagai S, et al. Possible role of phosphatidylcholine and sphingomyelin on fumonisin B1-mediated toxicity[J]. Food Safety, 2017, 5(3): 75-97.
- [6] Poersch A B, Trombetta F, Souto N S, et al. Fumonisin B1 facilitates seizures induced by pentylentetrazol in mice[J]. Neurotoxicol Teratol, 2015, 51: 61-67.
- [7] Kovaci S, Pepeljnjak S, Petrincec Z, et al. Fumonisin B1 neurotoxicity in young carp (*Cyprinus carpio* cL.)[J]. Arch Industrial Hygiene Toxicol, 2009, 60(4): 419-426.
- [8] Banczerowski-Pelyhe I, D  t  ri L, Vil  gi I, et al. Nerve conduction velocity and spinal reflexes may change in rats after fumonisin B1 exposure[J]. Acta Biologica Hungarica, 2002, 53(4): 413-422.
- [9] Sinai W M. Cytotoxicity and genotoxicity of fumonisin B1 on cultured human lymphocytes [DB/OL]. <https://www.researchgate.net/publication/324006481>, 2018-01-13.
- [10] Antonissen G, Van I F, Pasmans F, et al. Mycotoxins deoxynivalenol and fumonisins alter the extrinsic component of intestinal barrier in broiler chickens[J]. J Agr Food Chem, 2015, 63(50): 10846-10855.
- [11] Li Y, Fan Y, Xia B, et al. The immunosuppressive characteristics of FB1 by inhibition of maturation and function of BMDCs [J]. Int Immunopharmacol, 2017, 47: 206-211.
- [12] Ewuola E O, Egbunike G N. Gonadal and extra-gonadal sperm reserves and sperm production of pubertal rabbits fed dietary fumonisin B1 [J]. Animal Reprod Sci, 2010, 119(3): 282-286.
- [13] Albonico M, Schutz L F, Caloni F, et al. Toxicological effects of fumonisin B1 alone and in combination with other fusarioxins on bovine granulosa cells[J]. Toxicol Official J Int Soci Toxinol, 2016, 118: 47-53.
- [14] Somosk I B, Kov c M, Cseh S. Effects of T-2 and fumonisin B1 combined treatment on in vitro mouse embryo development and blastocyst quality[J]. Toxicol Industrial Health, 2018, 34(5): 353-360.
- [15] Singh M P, Kang S C. Endoplasmic reticulum stress-mediated autophagy activation attenuates fumonisin B1 induced hepatotoxicity *in vitro* and *in vivo* [J]. Food Chem Toxicol, 2017, 110: 371-382.
- [16] Hassan A M, Abdel-Aziem S H, El-Nekeety A A, et al. Panax ginseng extract modulates oxidative stress, DNA fragmentation and up-regulate gene expression in rats sub chronically treated with aflatoxin B1 and fumonisin B1 [J]. Cytotechnology, 2015, 67(5): 861-871.
- [17] Deepthi B V, Somashekaraiah R, Rao K P, et al. Lactobacillus plantarum MYS6 ameliorates fumonisin B1-induced Hepatorenal damage in broilers [J]. Front Microbiol, 2017, 22, (8): 2317.
- [18] Loiseau N, Polizzi A, Dupuy A, et al. New insights into the organ-specific adverse effects of fumonisin B1: comparison between lung and liver. [J]. Arch Toxicol, 2015, 89(9): 1619-1629.
- [19] Qian G, Tang L, Lin S, et al. Sequential dietary exposure to aflatoxin B1 and fumonisin B1 in F344 rats increases liver preneoplastic changes indicative of a synergistic interaction [J]. Food Chem Toxicol, 2016, 95: 188-195.
- [20] Genevieve Bondy, Rekha Mehta, Don Caldwell, et al. Effects of long term exposure to the mycotoxin fumonisin B1 in p53 heterozygous and p53 homozygous transgenic mice [J]. Food Chem Toxicol, 2012, 50(10): 3604-3613.
- [21] Smith L L, Francis K A, Johnson J T, et al. Quantitation of fumonisin B 1, and B 2, in feed using FMOC pre-column derivatization with HPLC and fluorescence detection [J]. Food Chem, 2017, 234: 174-179.
- [22] 马俊美, 刘 东, 张雷雷, 等. 在线固相萃取-液相色谱-串联质谱法快速测定玉米粉和面粉中伏马毒素 [J]. 食品科学, 2017, 38(20): 300-305.
- [23] 章 先. 农产品中四种常见真菌毒素免疫检测技术研究 [D]. 浙江杭州: 浙江大学, 2016.
- [24] 桂海雯. 基于核酸适配体的赭曲霉毒素 A 和伏马毒素 B1 检测方法研究 [D]. 浙江杭州: 浙江农林大学, 2015.
- [25] Ren C, Li H, Lu X, et al. A disposable aptasensing device for label-free detection of fumonisin B1 by integrating PDMS film-based micro-cell and screen-printed carbon electrode [J]. Sensors Actuators B Chem, 2017, 251: 192-199.

## Toxicity and Detection Methods of Fumonisin B1

LI Xiao-wen, LUO Jun-chong, ZHANG Meng-dan, WANG Kai, CAO Chang-yu

(Foshan University, Foshan, Guangdong, 528231, China)

**Abstract:** Fumonisins are mycotoxins mainly produced by *Fusarium* spp., and may pollute crops around the world widely. 28 kinds of fumarins have been found now and are divided into four categories: FA, FB, FC, FP. Fumonisin B1 is one of the most widely polluted and most toxic in all types, it exerts toxic effect by inhibiting the activity of ceramide synthase and spreads through the food chain, which seriously endangers human and animal health. To offer a new perspective for next studies of FB1, this paper principally narrate the physicochemical metabolism, toxicological effect and detection methods of FB1.

**Key words:** fumonisins; physicochemical metabolism; toxicological effect; detection method