

真菌毒素(DON、AFB₁)对 HepG2/C3A 细胞联合毒性及机理研究

李文竹, 张根义*, 桑亚秋

(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)和黄曲霉毒素 B₁(AFB₁)是一类常见的毒素类污染物,常共存于小麦、玉米等食品及制品中。实验采用不同浓度的 DON(0.56、1.125、2.25、4.5、6.75 μmol/L)和 AFB₁(2.5、5、10、20、30 μmol/L)单独及联合作用于 HepG2/C3A 细胞 24 h 后,分别测定细胞增殖抑制率(SRB)、双链 DNA 含量变化以及低浓度条件下细胞凋亡率和细胞周期分布,采用 RTq-PCR 测定凋亡相关基因 *caspase-3*、*Bax* 以及 *Bcl-2* mRNA 的相对含量。最后通过 RNA-Seq 测序分析 2 种毒素作用的毒性机理。结果显示,2 种毒素单独及混合作用于 HepG2/C3A 细胞后使得细胞增殖抑制率增加,双链 DNA 含量下降,经分析后发现两者联合作用类型为加和作用。低浓度作用下均能引起细胞发生凋亡,使得细胞阻滞在 S 期或者 S 期和 G2/M 期,并且引起 *caspase-3* 和 *Bax* 表达量增加,*Bcl-2* 则下降,从而引发细胞凋亡。RNA-Seq 测序结果显示,经过差异基因的富集分析,AFB₁ 与 DON 的毒性作用机理并不相同,其中 AFB₁ 以及两者的混合作用主要是通过 P53 信号通路影响细胞凋亡,而 DON 并不是。AFB₁ 与 DON 可能是通过 2 种不同的途径一起共同导致细胞凋亡的发生。

关键词: 脱氧雪腐镰刀菌烯醇;黄曲霉毒素 B₁;联合毒性;RNA-Seq

中图分类号: R 155 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2017)11—1171—09

Co-Effect Cytotoxicity and Mechansim Research of Deoxynivalenol and Aflatoxin B₁ in HepG2/C3A Cells

LI Wenzhu, ZHANG Genyi*, SANG Yaqiu

(School of Food Science & Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Deoxynivalenol (DON) and Aflatoxin B₁ are the most prevalent mycotoxins in cereal-based ingredients or foods and they frequently coexist. HepG2/C3A cell treated with different concentrations of DON (0.56、1.125、2.25、4.5、6.75 μmol/L) and AFB₁ (2.5、5、10、20、30 μmol/L) for 24 h was used to analyze their toxic effects expressed by cell proliferation inhibition rate (SRB), total double-stranded DNA, apoptosis rate, cell cycle arrest and apoptosis-related gene, *caspase-3*, *Bax*, *Bcl-2* were analyzed by real-time quantitative PCR. The results showed that their co-effect was

收稿日期: 2015-09-08

基金项目: 国家农业部公益项目(201203069)。

* 通信作者: 张根义(1968—),男,山西晋城人,工学博士,教授,主要从事食品科学与营养学,细胞毒理学等研究。E-mail: genyiz@163.com

引用本文: 李文竹,张根义,桑亚秋. 真菌毒素(DON、AFB₁)对 HepG2/C3A 细胞联合毒性及机理研究[J]. 食品与生物技术学报,2017,36(11):1171-1179.

classified as being additive. Flow cytometry assay on the rate of apoptosis also shown an additive interaction which could indicated that these two toxins could induced apoptosis and they also induced cycle arrest in S-phase or S, G2/M- phase. The increase of expression of *caspase-3* and *Bax* as well as the decrease of *Bcl-2* further support their additive toxic effect. RNA-Seq analysis showed different cytotoxicity mechanism between AFB₁ and DON that AFB₁ and their combination effect induce cell apoptosis mainly through *P53* pathway while not for DON. We guess AFB₁ and DON may through different pathway to induce cell apoptosis together.

Keywords: deoxynivalenol, aflatoxin B₁, combined toxicity, RNA-Seq

脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (Deoxynivalenol, 简称 DON) 是一种单端孢霉烯族毒素, 主要是由生长在谷类物品如小麦、玉米等上的粉红镰刀菌和禾谷镰刀菌产生。因该毒素能够引发动物呕吐的特征, 故将其定名为呕吐毒素 (Vomitoxin)^[1-2]。黄曲霉毒素 (Aflatoxin, 简称 AFT) 是一类主要由黄曲霉和寄生曲霉在一定条件下产生的毒性代谢产物的总称^[3-4]。在大豆、玉米、牛奶等制品中经常会发现其存在, 黄曲霉毒素已经导致严重的食品安全问题。其中黄曲霉毒素 B₁ 的毒性最强, 具有很强的致癌性、致畸性和致突变性^[5-7]。AFB₁ 是一种肝毒素, 主要作用于肝脏细胞, 而 DON 虽无明确的靶器官, 但是主要作用于分裂较快的细胞^[8]。实验采用 HepG2/C3A 作为实验对象, 除能形成稳定的细胞系, 有利于实验的连续性, 一致性外, 还具有较高的 P450 酶系, 主要参与外源性药物的代谢, 对体内的物质转化也起到重要作用^[9-10]。近几年, 国内外研究者也对其联合作用有不同的研究, 国外对于坦桑尼亚北部人群食用比目鱼可能接触到多种真菌毒素进行研究, 发现 AFB₁ 与 DON 同时存在, 并且对于当地小孩造成严重毒害现象^[11]。有研究表明, 当 AFB₁ 与 DON 同时作用于猪的肝脏细胞后, 其细胞存活率明显下降, 可以观察到线粒体肿胀、内质网扩张以及许多脂肪粒等现象, 其联合作用效果表现出明显的加和效应^[12], 但是并没有涉及到基因表达层面的具体毒性机制。现如今人们面临真菌毒素的危害多是 2 种或者 2 种以上真菌毒素的同时存在, 这也大大增加了对人及动物的危害性。而当前国内外主要侧重于研究单一真菌毒素毒性情况, 对于 2 种或多种真菌毒素的联合作用研究尚且不多^[13-14]。DON 与 AFB₁ 常存在于同一谷物中, 因此本研究主要探讨 2 毒素对 HepG2/C3A 细胞的联合毒性作用, 及诱导 HepG2/C3A 细胞

发生凋亡的毒性机制探究, 为研究多种真菌毒素共存时的联合作用机制提供理论基础, 并结合低浓度下引起细胞凋亡程度对真菌毒素的早期检测提供依据, 在食品安全方面具有重大意义。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

人肝癌细胞株 HepG2/C3A, 美国模式培养物集存库提供; 脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (DON)、二甲亚砜 (DMSO)、SRB 染料、三氯乙酸 (TCA)、Tris base、Hoechst33258、小牛胸腺 DNA, 美国 Sigma 公司产品; 黄曲霉毒素 B₁ (AFB₁), 上海百灵威化学技术有限公司产品; DMEM 低糖培养基、MEM、HEPES、胎牛血清 (FBS)、含 2.5 g/L EDTA 的胰蛋白酶 (Trypsin)、无酚红 HBSS, Gibco 公司产品; 细胞凋亡检测试剂盒、细胞周期检测试剂盒, 碧云天公司产品; UNIQ-10 柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒, 上海生工生物工程技术服务有限公司产品; PrimeScriptTM RT 试剂盒、SYBR[®] Premix Ex TaqTM II 试剂盒, 常州博弘生物工程有限公司产品。

CO₂ 细胞培养箱、实时荧光定量 PCR 仪, 美国 Thermo 公司产品; 荧光酶标仪, 美国 Molecular Devices 公司产品; 流式细胞仪, 美国碧迪公司产品。

1.2 试验方法

1.2.1 细胞复苏与培养 从液氮罐中取出冻存管于 37 °C 恒温水浴锅中解冻 1 min 左右, 并轻轻摇动令其尽快融化, 用乙醇消毒后开启, 吸出细胞悬液于离心管中, 900 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 加入含有体积分数 20% 胎牛血清培养液, 并轻轻吹打, 接种到培养瓶中, 于 37 °C, 体积分数 5% CO₂ 培养箱中进行培养, 次日用含体积分数 10% 胎牛血清培养液更换进行常规培养。HepG2/C3A 细胞采用含有

体积分数 10%的胎牛血清、体积分数1%MEM 以及体积分数 1%的 HEPES 的 DMEM 低糖培养基于 37 ℃,体积分数 5%CO₂ 培养箱中进行培养。细胞生长恢复到正常状态并处于对数期即可进行后续试验。

1.2.2 DON、AFB₁ 对 HepG2/C3A 细胞单独及联合抑制率的测定 采用 SRB 染色法^[15]测定细胞增值抑制率。调整细胞密度为 1×10⁴ 个/孔,接种于 96 孔板,同时设定空白组,孵育 24 h 后,加入含毒素的培养液。设置 DON、AFB₁ 单独作用浓度分别为: DON 浓度为 0 (溶剂对照组)、0.56、1.125、2.25、4.5、6.75 μmol/L; AFB₁ 浓度为 0(溶剂对照组)、2.5、5、10、20、30 μmol/L。联合染毒浓度为 0(溶剂对照组), DON (0.56 μmol/L)+AFB₁ (2.5、5、10、20 μmol/L); DON (1.125 μmol/L)+AFB₁ (2.5、5、10、20 μmol/L); DON (2.25 μmol/L)+AFB₁ (2.5、5、10、20 μmol/L)。每组设定 5 个平行孔,继续孵育 24 h 后,加入 200 μL 4 ℃遇冷的三氯乙酸(TCA)溶液,4 ℃下固定 1 h 后,用去离子水洗 4 遍,室温晾干,加入 4 g/L SRB 染液,室温下避光染色 30 min, 体积分数 1%的乙酸溶液洗 4 遍,室温晾干。加入 10 mmol/L 的 Tris base 缓冲溶液 200 μL,于酶标仪上震荡 5 min 后测定 490 nm 下的吸光度 (A)。计算不同浓度的真菌毒素对 HepG2/C3A 细胞的增值抑制率。增值抑制率计算式:

$$\text{增值抑制率}=[1-(A_1-A_0)/(A_1-A_0)] \times 100\%^{[16]}$$

式中,A₁ 表示实验组吸光度值,A₀ 表示空白组吸光度值

1.2.3 细胞内总双链 DNA 含量测定 调整细胞密度为 2×10⁴ 个/孔,接种于 96 孔板,孵育 24 h 后,加入含毒素的培养液。DON、AFB₁ 单独及混合作用浓度同 1.2.2。每组设定 5 个平行孔,继续孵育 24 h 后,用 37 ℃预热的 HBSS 洗一遍,将 96 孔板置于-80 ℃冰箱中冷冻 1 h 后于 37 ℃水浴锅中加热 30 min,加入 100 μL 去离子水,再次冷冻 1 h,将其取出后于 37 ℃水浴锅中加热 30 min,向每个孔中

加入 100 μL 20 μg/mL 的 Hoechst 33258 染液,摇晃孔板使其混匀。同时配制小牛胸腺 DNA 标准曲线。室温下避光静置 30 min,采用荧光酶标仪测定各孔的荧光值。

1.2.4 HepG2/C3A 细胞凋亡率测定 调整细胞密度为 3×10⁵ 个/孔,接种于 12 孔板,孵育 24 h 后,分别对应加入 0.56 μmol/L DON 和 2.5 μmol/L AFB₁ 以及两者混合浓度,并设定对照组继续孵育 24 h 后,PBS 洗涤贴壁细胞并收集细胞,取 5 万~10 万重悬的细胞,1 200 r/min 离心 5 min,加入 195 μL AnnexinV-FITC 结合液轻轻重悬细胞。再加入 5 μL AnnexinV-FITC,轻轻混匀后,加入 10 μL 碘化丙啶染色液,室温避光孵育 15 min,随即进行流式细胞仪检测。

1.2.5 HepG2/C3A 细胞周期测定 调整细胞密度为 3×10⁵ 个/孔,接种于 12 孔板,孵育 24 h 后,分别对应加入 0.56 μmol/L DON 和 2.5 μmol/L AFB₁ 以及两者混合浓度,并设定对照组继续孵育 24 h 后,PBS 洗涤贴壁细胞并收集细胞,加入 1 mL 冰浴预冷的 PBS,重悬,1 200 r/min 离心 5 min,弃上清液,加入 1 mL 冰浴预冷的体积分数 70%乙醇,混匀,4 ℃固定 24 h。再次 1 200 r/min 离心 5 min,加入 1 mL 冰浴预冷的 PBS 继续 1 200 r/min 离心 5 min,最后弃上清液,加入 PI 染色工作液 500 μL,37 ℃孵育 30 min,随即进行流式细胞仪检测。

1.2.6 RNA 提取及实时荧光定量 PCR 调整细胞密度为 5×10⁶ 个/孔,接种于 6 孔板,孵育 24 h 后,分别对应加入 0.56 μmol/L DON 和 2.5 μmol/L AFB₁ 以及两者混合浓度,并设定对照组继续孵育 24 h 后。采用 UNIQ-10 柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒进行 RNA 提取,采用 PrimeScript™ RT 试剂盒进行 RNA 反转录,以及采用 SYBR® Premix Ex Taq™ II 试剂盒进行 QPCR 反应。按 2^{-ΔΔC_T} 方法计算。上下游引物以及内参引物序列见下表 1 所示。

表 1 凋亡相关基因引物序列

Table 1 Primer pairs for apoptosis-related gene in RTq-PCR analysis of gene expression

Gene	Gene sequence no.	Primer	5'-3' Sequence	Size/bp
Caspase-3	NM_004346.3	Forward	AGATGGTTTGAGCCTGAGCA	103
		Reverse	CAGTGCCTATGGAGAAATGG	
Bax	NM_004324.3	Forward	CCGATTCATCTACCCTGCTG	111
		Reverse	TGAGCAATTCAGAGGCACT	
Bcl-2	NM_000633.2	Forward	GAGGATTGTGGCCTTCTTTG	118
		Reverse	GTGCCGTTTCAGGTACTCA	
β-actin	NM_001101.3	Forward	CCTGGCACCCAGCACAAT	144
		Reverse	GGGCCGGACTCGTCATAC	

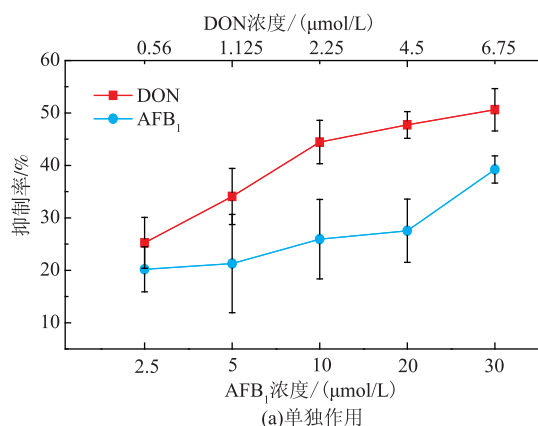
1.2.7 RNA-Seq 测序 调整细胞密度为 5×10^6 个/孔, 接种于 6 孔板, 孵育 24 h 后, 分别对应加入 $0.56 \mu\text{mol/L}$ DON 和 $2.5 \mu\text{mol/L}$ AFB₁ 以及两者混合浓度, 并设定对照组继续孵育 24 h 后, 收集细胞并速冻后利用干冰运送, 委托深圳华大基因进行 RNA-Seq 全基因测序。

1.2.8 统计学分析 所有试验重复 3 次, 每组浓度设定 5 个平行。采用 origin85 进行绘图, SPSS 19.0 软件进行单因素方差分析 (One-way ANOVA), 以 $p < 0.05$ 为显著性差异, $p < 0.01$ 代表具有高度显著差异。联合作用类型采用成对样本 T 检验分析。实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ (平均值 $\pm$ 标准差) 形式表示。

2 结语与讨论

2.1 DON、AFB₁ 对 HepG2/C3A 细胞增殖抑制率影响

真菌毒素 DON、AFB₁ 单独及联合作用于



注: * 表示各个 AFB₁ 浓度组下分别与该组中 AFB₁ 空白组相比 $p < 0.05$

图 1 真菌毒素 DON、AFB₁ 对 HepG2/C3A 细胞的增殖抑制率的影响 (24 h)

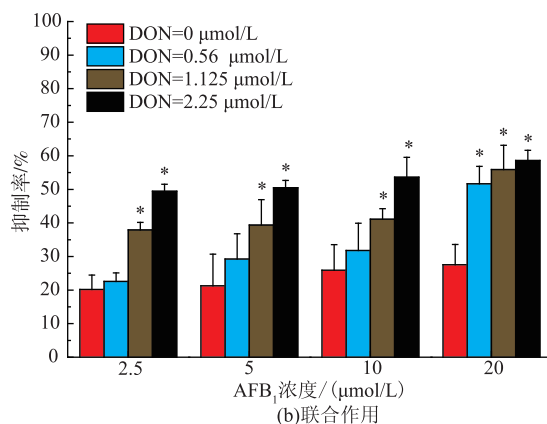
Fig. 1 Effect of DON and AFB₁ on proliferation inhibition rate on HepG2/C3A cells (24 h)

线粒体损伤, 造成细胞内 DNA 双链发生一系列变化, 从而引起 DNA 损伤。不同浓度 DON、AFB₁ 以及两者混合毒素分别处理 HepG2/C3A 细胞 24 h 后, 与对照组相比, 随着毒素处理剂量的增加, 单独作用时的毒素使得 HepG2/C3A 细胞内的双链 DNA 含量不断减少, 呈现出剂量相关性。如图 2(a)所示, 当 DON 浓度从 $0.56 \sim 6.75 \mu\text{mol/L}$ 时, 其相对含量从 75.28% 下降到 50.90%, 而 AFB₁ 单独作用浓度从 $2.5 \sim 30 \mu\text{mol/L}$ 时, 其双链 DNA 相对含量由 79.56% 下降到 58.87%。可以看出 DON 引起 DNA 相对含量变化程度高于 AFB₁。当两者以不同浓度混合作用于

HepG2/C3A 细胞后, 其结果表明, 不同浓度 DON、AFB₁ 以及两者混合毒素分别处理 HepG2/C3A 细胞 24 h 后, 与对照组相比, 随着毒素处理剂量的增加, 单独作用时的毒素对 HepG2/C3A 细胞的增殖抑制率不断增加, 呈现出剂量相关性。如图 1(a)所示, 当 DON 单独作用 24 h, 浓度从 $0.56 \sim 6.75 \mu\text{mol/L}$ 时, 其抑制率从 25.24% 增加到 50.62%, 而 AFB₁ 单独作用浓度从 $2.5 \sim 30 \mu\text{mol/L}$ 时, 其细胞增殖抑制率由 20.18% 增加到 39.22%。当两者以不同浓度混合作用于该细胞时如图 1(b)所示, 其细胞抑制率不断增加, 并且均高于单独作用时的抑制率, 呈现出剂量相关性。由图 1(a)可以看出 DON 的毒性较 AFB₁ 要高, 当毒素浓度逐渐升高, 对细胞的损伤作用越大, 造成细胞死亡越严重。

2.2 DON、AFB₁ 对细胞内总双链 DNA 相对含量的影响

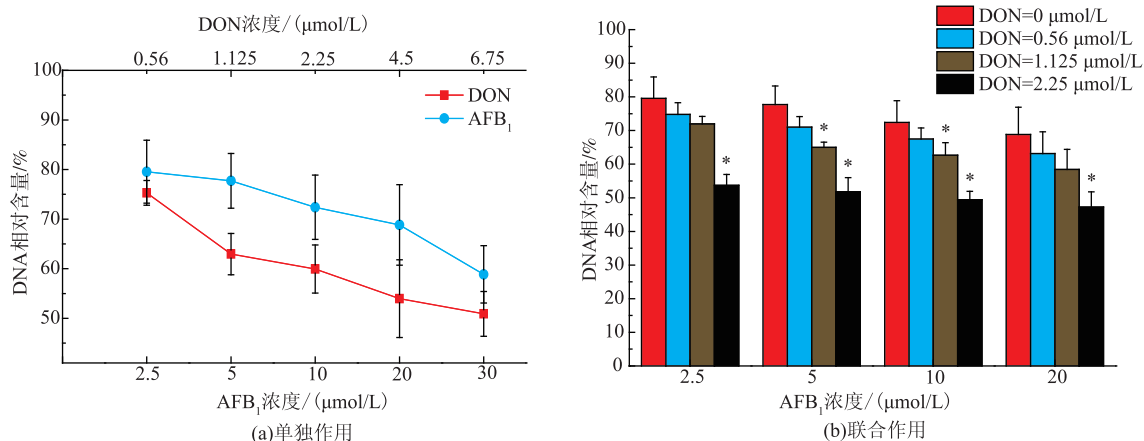
当细胞受到真菌毒素的作用时, 会引起细胞内



该细胞时, 结合图 2 (b) 所示, 可以看出其细胞内 DNA 相对含量呈现下降的趋势, 并且均低于单独作用时的 DNA 相对含量。

2.3 DON、AFB₁ 对细胞凋亡率的影响

正常细胞中磷脂酰丝氨酸 (PS) 位于细胞膜的内表面, 细胞受到外来刺激, 引起细胞发生早期凋亡时, PS 会从细胞膜内迁移到细胞膜外表面。Annexin 是一类广泛分布于真核细胞浆内钙离子依赖的磷脂结合蛋白, 参与细胞内的信号转导。AnnexinV 选择性的结合 PS 从而可以检测到细胞的早期凋亡。而碘化丙啶 (PI) 是一种核酸染料, 它并不



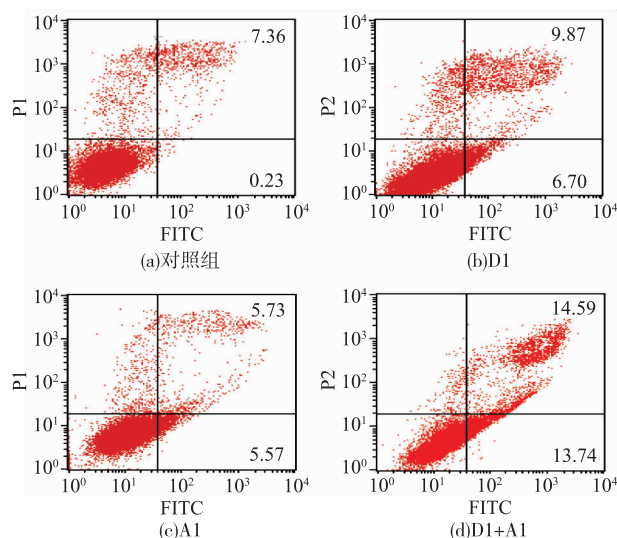
注: * 表示各个 AFB₁ 浓度组下分别与该组中 AFB₁ 空白组相比 $p < 0.05$

图 2 真菌毒素 DON、AFB₁ 对 HepG2/C3A 细胞内双链 DNA 的影响 (24 h)

Fig. 2 Effect of DON and AFB₁ on DNA content on HepG2/C3A cells (24 h)

能透过完整的细胞膜,但是在细胞发生晚期凋亡的时候,细胞膜通透性增加,此时 PI 可以透过细胞膜使得细胞核染成红色。采用 AnnexinV-FITC 双染试剂^[17],可以判断出细胞出现各个凋亡阶段的情况。从实验结果可以看出,低浓度的 0.56 μmol/L DON、

2.5 μmol/L AFB₁ 以及两者混合毒素分别处理 HepG2/C3A 细胞 24 h,与对照组相比,两者均能引起细胞产生显著的凋亡现象,并且联合作用条件下引起细胞发生凋亡的程度均高于单独作用时的情况。



注: 各毒素浓度组与对照组相比, * 表示 $p < 0.05$; ** 表示 $p < 0.01$

图 3 真菌毒素 DON、AFB₁ 对 HepG2/C3A 细胞凋亡率的影响 (24 h)

Fig. 3 Effect of DON and AFB₁ on apoptosis rate of HepG2/C3A cells (24 h)

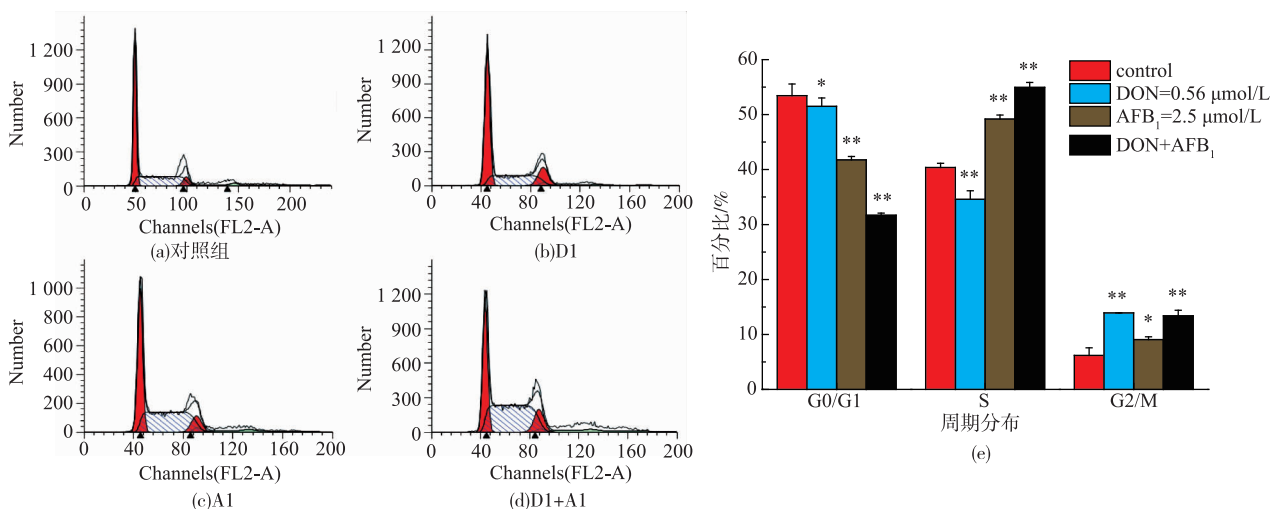
2.4 DON、AFB₁ 对细胞周期的影响

碘化丙啶(PI)是一种双链 DNA 荧光染料,与双链 DNA 结合后可以产生荧光,并且所产生的荧光强度与双链 DNA 相对含量成正比。因此,通过流式细胞仪测定细胞中 DNA 相对含量,使用 Modifit 软件分析细胞周期分布,得出各个时期细胞所占比例,从而判断出各毒素组对细胞生长阶段的阻滞情况^[18]。

从实验结果可以看出,0.56 μmol/L DON、2.5 μmol/L AFB₁ 以及两者混合毒素分别处理 HepG2/C3A 细胞 24 h,与对照组相比,0.56 μmol/L DON 能够引起 G2/M 期细胞增加,而 2.5 μmol/L AFB₁ 组能够引起 S 期和 G2/M 期细胞比例增加,当两者混合作用于 HepG2/C3A 细胞时,能同时引起 S 期和 G2/M 期细胞比例增加,说明 0.56 μmol/L DON 可以

引起细胞 G2/M 期发生阻滞, 2.5 $\mu\text{mol/L}$ AFB₁ 以及两者混合作用下可以诱导细胞发生 S 期和 G2/M 期阻滞现象。经过分析, 2 种真菌毒素单独作用引起 HepG2/C3A 细胞周期发生变化与联合作用时并不

具有显著差异 ($p < 0.05$), 这也再次说明了 2 种真菌毒素作用于 HepG2/C3A 细胞的联合作用类型为加和作用。



注: 各毒素浓度组与对照组相比, * 表示 $p < 0.05$; ** 表示 $p < 0.01$

图 4 真菌毒素 DON、AFB₁ 对 HepG2/C3A 细胞周期的影响 (24 h)

Fig. 4 Effect of DON and AFB₁ on cell cycle of HepG2/C3A cells (24 h)

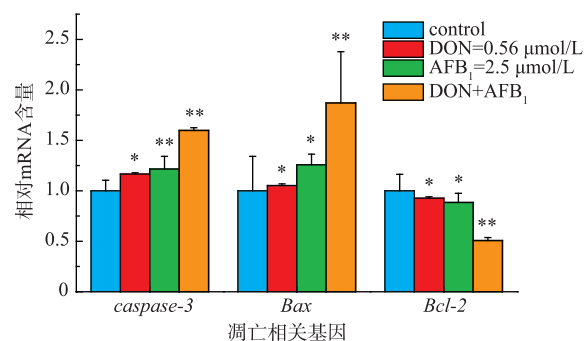
2.5 DON、AFB₁ 对细胞凋亡相关基因 mRNA 表达量影响

为了进一步研究 DON 和 AFB₁ 对细胞凋亡的影响, 又通过 RT-qPCR 对细胞凋亡相关基因 *Caspase-3*, *Bax* 和 *Bcl-2* mRNA 水平进行研究, 见图 5。实验结果表明, *caspase-3* 和 *Bax* 的 mRNA 相对表达量增加而 *Bcl-2* 表达量则下降且变化具有显著性差异。并且 2 种毒素的混合作用引起的相关基因 mRNA 表达程度均要高于单独作用情况, 后者 *Bcl-2* 混合作用时的表达量低于单独作用时的表达水平。这进一步证明二者作用于 HepG2/C3A 细胞的联合效应为加和效应。

2.6 DON、AFB₁ 对细胞联合毒性作

实验主要针对以上细胞毒性指标的测定来分析其可能的相互作用类型, 通过对上述毒性指标的实验值与理论值进行成对样本 *T* 检验分析其显著性来说明此 2 种真菌毒素作用于 HepG2/C3A 细胞的联合毒性类型。其分析结果见表 2 所示。

经过成对样本 *T* 检验分析后得出, 上述 2 个毒性指标的实验值与理论值之间并没有显著差异, 即 $p > 0.05$ 。表明这 2 种毒素作用于 HepG2/C3A 细胞的联合类型为加和作用。



注: 各毒素浓度组与对照组相比, * 表示 $p < 0.05$; ** 表示 $p < 0.01$

图 5 真菌毒素 DON、AFB₁ 对 HepG2/C3A 细胞凋亡相关基因 mRNA 表达的影响 (24 h)

Fig. 5 Effect of DON and AFB₁ on apoptosis-related genes mRNA level of HepG2/C3A cells (24 h)

表 2 成对样本 *T* 检验分析 HepG2/C3A 细胞内四个毒性指标实验值与理论值的差异

Table 2 Differences between EV and TV on HepG2/C3A cells by paired-samples *T*-tests

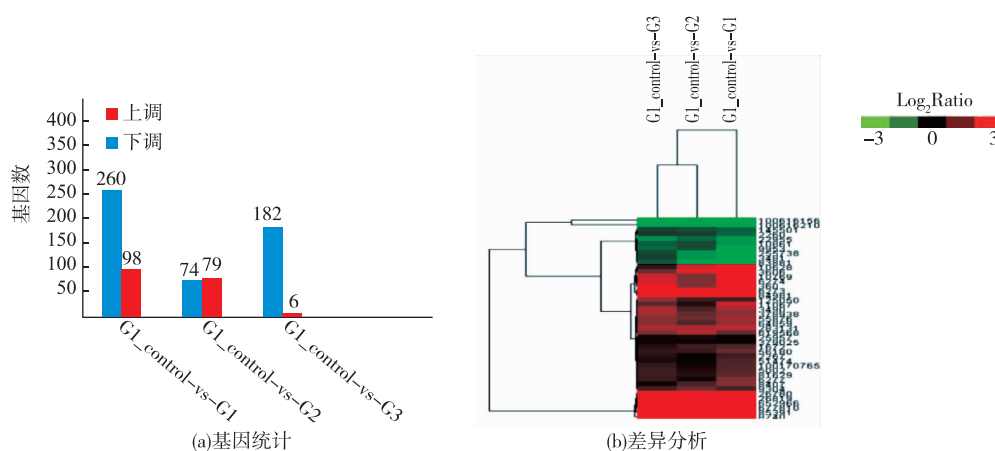
	样品数 (<i>N</i>)	相关系数 (<i>r</i>)	显著性 (<i>p</i>)
SRBEV&SRBTV	20	1.155	0.513
DNAEV&DNATV	20	-0.37	0.108

注: EV (Experimental Value) - 实验值, 即实际混合作用后测定的效应值; TV (Theoretical Value) - 理论值, 即 2 种毒素单独作用后的产生的效应值的加和值

2.7 RNA-Seq 测序及机理研究

2.7.1 差异基因表达筛选及聚类分析 经 RNA-Seq 测序,我们进行 3 组样品的对比分析,利用 RPKM(Reads Per Kb Million reads)算法^[19]计算出每组比对样品中基因的表达式,通过比较不同样本之间的数据从而筛选出差异表达的基因,其组间差异基因见图 6(a)所示。其中 AFB₁ 处理组中有 182 个基因表达上调,6 个基因表达下调;DON 处理组中

有 74 个表达基因上调,79 个基因表达下调;混合处理组中基因表达上调的有 260,基因表达下调的有 98 个。针对组间差异之间的交集聚类分析,取显著差异表达基因差异倍数的 log₂ 值利用 cluster 软件对其进行聚类分析,结果见图 6(b)所示,其中每一行代表一个基因,每一列代表一个实验条件,右边对应的是该基因的 ID 号。



注:G1-control 表示对照组 control;G1 表示混合处理组 (AFB₁+DON);G2 表示 DON 处理组;G3 表示 AFB₁ 处理组

图 6 3 组对比样本间差异基因统计和聚类分析

Fig. 6 Three groups of differentially expressed genes and cluster analysis

2.7.2 Pathway 分析 通过对富集出来的差异基因,进一步做 pathway 富集分析,主要是以 KEGG pathway^[20]为单位,应用超几何检验,找出与整个基因组比较后差异表达基因中显著性富集的 pathway。结果显示 AFB₁ 以及 AFB₁ 与 DON 混合处理组所富集出来的 pathway 主要是通过 P53 信号通路 ($p < 0.01$) 影响细胞凋亡和周期阻滞。而 DON 处理组中 P53 信号通路并不显著,而 DON 主要是影响核糖体循环这条通路 ($p < 0.01$),阻止蛋白质合成,对细胞造成一定程度的毒性作用。但是单独和混合作用组都会引起 JNK/c-JUN 通路和 P38 MAPK 通路的激活, pathway 分析结果与 Mishra^[21]和 Lu^[22]等研究结果一致,也有文献报道真菌毒素 ST 会通过这些通路进而影响细胞周期阻滞、细胞凋亡及 DNA 损伤等毒性作用^[23-24]。从实验测序中可以看出, DON 与 AFB₁ 作用于 HepG2/C3A 细胞的主要毒性机理并不相同,混合作用组中 AFB₁ 起主导作用。

3 结语

研究发现, DON 和 AFB₁ 均能引起细胞增殖抑制率增加以及细胞内总双链 DNA 的下降,并且其混合作用强度均大于单独作用效果,经成对样本 T 检验分析,两者联合作用为加和作用,这也与之前研究结果相同^[12]。Sun L.H.^[25]等研究多种真菌毒素对大鼠肝脏细胞的毒性作用,结果表明 AFB₁ 与 DON 的联合作用为协同作用。有人研究了由于实验对象的不同,从而导致联合效应的不同^[26]。本研究中当毒素作用浓度增加,引起的毒性变化不断增强,均表现出剂量相关性。且在低浓度下会引起相应毒性指标的变化,引起细胞凋亡和周期阻滞,可以反映出细胞早期染毒状态。凋亡相关基因 caspase-3 和 Bax mRNA 含量上升且 Bcl-2 mRNA 含量下降,进一步说明 2 毒素均能引起细胞发生凋亡并且两者的混合作用表现出加和效应。同时,通过 RNA-Seq 全基因测序分析,我们得到 AFB₁ 与 DON 作用于 HepG2/C3A 细胞的主要毒性机理并不相同。通过对差异基

因进行 pathway 的分析得出 AFB₁ 主要影响 P53 信号通路 ($p < 0.01$) 而 DON 主要影响核糖体循环这条通路 ($p < 0.01$), 阻止蛋白合成, 对细胞造成一定程度的毒性作用。但是他们同时都会引起 JNK/c-JUN 通路和 P38 MAPK 通路的激活。由此我们得出 AFB₁

与 DON 主要是通过 2 条不同的信号通路同时影响细胞凋亡和细胞周期阻滞。从基因分子层面, 研究其具体的主要凋亡途径。为食品安全防护提供有力的保护措施。

参考文献:

- [1] HUANG Kai, HUANG Mingting, ZHU Zuxian, et al. Research progress on toxicity of DON[J]. **Feed Review**, 2013, 12: 8-11. (in Chinese)
- [2] SCHOTHORST R, VAN E H. Collection of occurrence data of Fusarium toxins in food and assessment of dietary intake by the population of EU member states[J]. **Toxicol Letter**, 2004, 153: 133-143.
- [3] CHAN H T, CHAN C, HO JOHN W, et al. Inhibition of glycyrrhizic acid on aflatoxin B₁-induced cytotoxicity in hepatoma cells[J]. **Toxicology**, 2003, 188(2-3): 211-217.
- [4] JEANNOT E, BOORMAN G A, KOAYK O, et al. Increased incidence of aflatoxin B₁-induced liver tumors in hepatitis virus C transgenic mice[J]. **Cancer**, 2012, 130(6): 1347-1356.
- [5] WU Zhaofan. Research progress of AFB₁[J]. **Gansu Science and Technology**, 2010, 26(18): 89-93. (in Chinese)
- [6] KEW M C. Aflatoxins as a cause of hepatocellular carcinoma[J]. **Gastrointest Liver Dis**, 2013, 22(3): 305-310.
- [7] SUPRIYA C, GIRISH B P, REDDY P S. Aflatoxin B₁-induced reproductive toxicity in male rats: possible mechanism of action[J]. **Toxicol**, 2014, 33(3): 155-161.
- [8] DU R H, CUI J T, WANG T, et al. Trichothecin induces apoptosis of HepG2 cells via caspase-9 mediated activation of the mitochondrial death pathway[J]. **Toxicon**, 2012, 59(1): 143-150.
- [9] BANDELE O J, SANTILLO M F, FERGUSON M, et al. In vitro toxicity screening of chemical mixtures using HepG2/C3A cells[J]. **Food Chem Toxicol**, 2012, 50(5): 1653-1659.
- [10] MASSEY T E, SMITH G B, TAM A S. Mechanisms of aflatoxin B₁ lung tumorigenesis[J]. **Lung Res**, 2000, 26: 673-683.
- [11] MARTIN E K, CANDIDA P S, HAPPY M, et al. Co-exposures of aflatoxin with deoxynivalenol and fumonisin from maize based complementary foods in Rombo, Northern Tanzania[J]. **Food Control**, 2014, 41: 76-81.
- [12] 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]. **Int J Mol Sci**, 2010, 11(10): 3760-3768.
- [13] THESLA P, MICHAEL F, DUTTON A, et al. Cytotoxicity of aflatoxin B₁ and its chemically synthesized epoxide derivative on the A549 human epithelioid lung cell line[J]. **Mycopathologia**, 2000, 151: 155-159.
- [14] FATMA B, EMNA E G, SALWA A E, et al. Pathway of deoxynivalenol-induced apoptosis in human colon carcinoma cells[J]. **Toxicology**, 2009, 264: 104-109.
- [15] VICHAI V, KIRTIKARA K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening[J]. **Nature Protocols**, 2006, 1(3): 1112-1116.
- [16] LI A P. Metabolism comparative cytotoxicity assay (MCCA) and cytotoxic metabolic pathway identification assay (CMPIA) with cryopreserved human hepatocytes for the evaluation of metabolism-based cytotoxicity in vitro: Proof-of-concept study with aflatoxin B₁[J]. **Chem Biol Interact**, 2009, 179(1): 4-8.
- [17] WSBER F, FREUDINGER R, SCHOWERDT G, et al. A rapid screening method to test apoptotic synergisms of ochratoxin A with other nephrotoxic substances[J]. **Toxicology in Vitro**, 2005, 19(1): 135-143.
- [18] WU Jianyong, ZHAO Dezhang. Comparison among several methods for apoptosis examination by flow cytometry[J]. **Journal of Chongqing Medical University**, 2010, 35(9): 1386-1389. (in Chinese)
- [19] MORTAZAVI A, WILLIAMS B A. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq[J]. **Nature**, 2008, 5(7): 621-628.
- [20] KANEHISA M, ARAKI M, GOTO S, et al. KEGG for linking genomes to life and environment[J]. **Nucleic Acids Research**, 2008, 36: 480-484.

- [21] MISHRA S, TRIPATHI A, CHAUDHARI B P, et al. Deoxynivalenol induced mouse skin cell proliferation and inflammation via MAPK pathway[J]. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 2014, 279: 186-197.
- [22] LU X, HU B, SHAO L, et al. Integrated analysis of transcriptomics and metabonomics profiles in aflatoxin B₁-induced hepatotoxicity in rat[J]. **Food and Chemical Toxicology**, 2013, 55: 444-455.
- [23] XIN X, JUAN W, LING X X, et al. Involvement of MAPK and PI3K signaling pathway in sterigmatocystin-induced G2 phase arrest in human gastric epithelium cells[J]. **Mol Nutr Food Res**, 2011, 55: 749-760.
- [24] DONGHUI Z, YU C, HAITAO S, et al. sterigmatocystin-induced DNA damage triggers G2 arrest via ATM/P53-related pathway in human gastric epithelium GES-1 cells in vitro[J]. **PLoS One**, 2013, 8(5): e65044.
- [25] SUN L H, LEI M, ZHANG N Y, et al. Individual and combined cytotoxic effects of aflatoxin B₁, zearalenone, deoxynivalenol and fumonisin B₁ on BRL 3A rat liver cells[J]. **Toxicol**, 2015, 95: 6-12.
- [26] MCKEAN C, TANG L, TANG M, et al. Comparative acute and combinative toxicity of aflatoxin B₁ and fumonisin B₁ in animals and human cells[J]. **Food Chem Toxicol**, 2006, 44(6): 868-876.

会 议 消 息

会议名称(中文):全国第三届生物化学与分子生物技术学术研讨会

所属学科:生物物理学、生物化学及分子生物学

开始日期:2017-12-22 结束日期:2017-12-24

所在城市:黑龙江省 哈尔滨市

具体地点:黑龙江省哈尔滨市

主办单位:中国生物化学与分子生物学会生物化学与分子生物技术专业委员会

承办单位:杭州医学院、哈尔滨医科大学

议题:生命科学和生命组学中生物技术的应用及展望

联系人:王黎芳

联系电话:0571-87692713 13516802176

E-MAIL:2006031049@hmc.edu.cn

会议网站:<http://www.csmb.org.cn/newsmore.asp?id=1251>

会议背景介绍:为促进基因组学、蛋白质组学等组学的研究与发展,加强生物化学与分子生物学技术在生命组学中的应用与发展,中国生物化学与分子生物学会生物化学与分子生物学技术专业委员会将组织召开全国第三届生物化学与分子生物技术学术研讨会,同时进行专业委员会换届。本届会议设有大会报告和专题报告,旨在研讨各类组学的内涵与发展趋势,交流生物技术在其中的发展和应用。