

• 论 著 •

# 黄曲霉毒素 B1 对非洲绿猴肾细胞的毒性效应及作用机制研究\*

刘 珊<sup>1</sup>, 罗仲秋<sup>2</sup>, 范小明<sup>1</sup>, 吴 昊<sup>1</sup>, 李明勇<sup>1</sup>, 谭 洪<sup>3△</sup>

(1. 电子科技大学附属医院/四川省医学科学院·四川省人民医院检验科, 成都 610072; 2. 成都中医药大学医学技术学院, 成都 610031; 3. 成都市第一人民医院/成都市中西医结合医院普外科 610041)

**摘 要:**目的 探讨黄曲霉毒素 B1 (AFB1) 对非洲绿猴肾细胞 (Vero E6) 的毒性效应及其作用机制。方法 体外培养 Vero E6 细胞, 不同浓度 AFB1 处理细胞后, 采用 CCK-8 法检测细胞存活率; 检测乳酸盐脱氢酶 (LDH) 释放率; 利用 Annexin V/PI 双染、DAPI 染色研究细胞死亡机制。结果 AFB1 对 Vero E6 细胞有显著毒性损伤效应, 200  $\mu\text{mol/L}$  AFB1 处理 Vero E6 细胞 48 h 后, 细胞存活率不到 10%。细胞 LDH 释放率随着 AFB1 浓度增加而显著升高。Annexin V/PI 染色检测到细胞膜磷脂酰丝氨酸外翻。DAPI 染色检测到细胞核碎裂。结论 AFB1 对 Vero E6 细胞具有明显的毒性损伤作用, 其可能通过凋亡的机制引起细胞死亡。

**关键词:**黄曲霉毒素 B1; 非洲绿猴肾细胞; 细胞凋亡; 细胞毒性

**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2017.08.001

**文献标识码:**A

**文章编号:**1673-4130(2017)08-1009-03

## Cytotoxic effect and mechanism of Aflatoxins B1 on Vero E6 cells\*

LIU Shan<sup>1</sup>, LUO Zhongqiu<sup>2</sup>, FAN Xiaoming<sup>1</sup>, WU Hao<sup>1</sup>, LI Mingyong<sup>1</sup>, TAN Hong<sup>3△</sup>

(1. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital of University of Electronic Science and Technology/Sichuan Academy of Medical Sciences and Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu, Sichuan 610072, China; 2. Chengdu University of TCM, Chengdu, Sichuan 610031, China; 3. Department of General Surgery, Chengdu First People's Hospital/Chengdu Integrated TCM & Western Medicine Hospital, Chengdu, Sichuan 610041, China)

**Abstract:** Objective To explore the cytotoxic effects and mechanisms of Aflatoxins B1 (AFB1) on the African green monkey kidney cells (Vero E6). **Methods** After incubation of Vero E6 cells with AFB1, cellular toxicity was assessed by CCK-8 assay and LDH release rate. Annexin V/PI double staining and DAPI staining was used to detected cell apoptosis. **Results** AFB1 has significant toxic effects on Vero E6 cells. Cell viability was less than 10% when treated by 200  $\mu\text{mol/L}$  AFB1 for 48 h. LDH release rate was increased significantly with the increase of AFB1 concentration. Externalization of cell membrane phosphatidylserine was observed by Annexin V/PI double staining. Nucleus fragmentation was detected by DAPI staining. **Conclusion** AFB1 exhibits significantly cytotoxic effects on Vero E6 cells by inducing cell apoptosis.

**Key words:** aflatoxins B1; african green monkey kidney cells; cell apoptosis; cytotoxicity

黄曲霉毒素主要是在粮食霉变过程中, 由黄曲霉菌和寄生曲霉菌产生的毒性代谢产物<sup>[1]</sup>。其中以黄曲霉毒素 B1 (AFB1) 最为常见、毒性最强, 具有致癌、致畸、致突变等生物学效应, 能够引起肝脏、肾脏、肺等器官不同程度的细胞损伤<sup>[2-3]</sup>。近年来, AFB1 对人类健康的强烈危害性已引起广泛关注。研究发现, AFB1 对肝细胞具有显著的毒性损伤作用, AFB1 的暴露可引起肝细胞损伤, 使肝细胞 DNA 含量及 ATP 水平明显降低, 从而导致细胞活性氧含量的增加以及线粒体膜损伤, 引起细胞凋亡<sup>[4-5]</sup>。尽管肝脏是 AFB1 作用的主要靶器官, 但 AFB1 对肾脏的毒性作用也不容忽视。目前已有多项研究报道了 AFB1 对体外培养肝细胞的毒性作用, 然而关于 AFB1 对肾细胞的毒性作用却鲜有报道。因此, 本实验以非洲绿猴肾细胞 (Vero E6) 为实验细胞株, 采用 CCK-8 法以及乳酸盐脱氢酶 (LDH) 释放率测试 AFB1 对细胞存活率的影响, 并采用 Annexin V/PI 双染和 DAPI 染细胞核方法研究细胞死亡机制。研究 AFB1 对肾细胞的毒性作用及其可能的作用机制, 可为 AFB1 的毒性损伤研究提供相关基础研究数据, 并为进一步研

究 AFB1 对人体毒性效应提供一定的参考。

## 1 材料与方法

**1.1 细胞株及主要试剂仪器** Vero E6 购自美国 ATCC 公司。AFB1 (纯度  $\geq 99\%$ ) 购自美国 Sigma 公司、DMEM 培养液购自美国 HyClone 公司、二甲基亚砷 (DMSO) 购自美国 Sigma 公司、小牛血清购自美国 HyClone 公司、0.25% 胰蛋白酶溶液购自美国 Thermo Fisher 公司、CCK-8 试剂盒购自日本 Dojin 公司、LDH 试剂盒购自碧云天生物技术有限公司、Annexin V/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒购自凯基生物技术股份有限公司、DAPI 染色液购自美国 Sigma 公司。Model 680 型酶标仪购自美国 Bio-Rad 公司、倒置相差显微镜购自日本 Olympus 公司、CO<sub>2</sub> 培养箱购自日本 SANYO 公司、96 孔细胞培养板购自美国 Corning 公司、流式细胞仪购自美国 Beckman Coulter 公司、荧光显微镜购自日本 Olympus 公司。

**1.2 细胞培养与分组** 细胞于含有 10% 小牛血清、100 U/mL 青霉素、100  $\mu\text{g/mL}$  链霉素和 2 mmol/L L-谷氨酰胺的高糖 DMEM 培养基, 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养。按照  $5 \times 10^3$

\* 基金项目: 国家自然科学基金青年项目 (81603018)。

作者简介: 刘珊, 女, 主管技师, 主要从事临床检验方向的研究。

△ 通信作者, E-mail: tanhongcd@126.com。

个/孔(100  $\mu$ L)接种于 96 孔板,再放于培养箱中培养 18~24 h,使细胞贴壁生长。取对数生长期细胞进行实验,将实验分为空白对照组、溶剂对照组和 AFB1 处理组。溶剂对照组加入相应浓度的 DMSO,AFB1 处理组加入 25、50、75、100、150、200  $\mu$ mol/L AFB1。各组均设 3 个复孔。AFB1 处理细胞 24 或 48 h 后,使用倒置相差显微镜观察并记录细胞形态变化。

**1.3 CCK-8 法检测细胞毒性** 采用 CCK-8 法检测 AFB1 对细胞存活率的影响。按 1.2 所述分组,AFB1 作用于 Vero E6 细胞 24 或 48 h 后,每孔加入 10  $\mu$ L CCK-8 试剂,37  $^{\circ}$ C、5%  $\text{CO}_2$  条件下孵育 4 h。使用酶标仪在 450 nm 检测波长、630 nm 参比波长处,测定每孔的吸光度(A),并计算细胞存活率。细胞存活率(%)=(样品  $A_{630\text{ nm}}$  - 样品  $A_{450\text{ nm}}$ )/(对照  $A_{630\text{ nm}}$  - 对照  $A_{450\text{ nm}}$ ) $\times$ 100。

**1.4 LDH 释放率的检测** 按 1.2 所述分组,将 AFB1 与 Vero E6 细胞共孵育 24 或 48 h 后,采用 LDH 试剂盒说明书检测 AFB1 作用于细胞后 LDH 释放率,反映 AFB1 对 Vero E6 细胞的毒性强弱。

**1.5 Annexin V/PI 双染色检测细胞凋亡** 正常细胞中,磷脂酰丝氨酸(PS)位于细胞膜内侧,凋亡早期时,细胞膜完整,但 PS 已从细胞膜内侧翻至外侧,Annexin V 可与外翻的 PS 结合,使细胞膜显示绿色荧光。碘化丙啶(PI)是一种核酸染料,不能通过完整的细胞膜,只能进入细胞膜受损的细胞,将细胞核染成红色。因此,Annexin V-/PI-是活细胞,Annexin V+/PI-是早期凋亡细胞,Annexin V+/PI+是晚期凋亡或坏死细胞。AFB1 与 Vero E6 细胞共孵育,Annexin V 和 PI 双染后,荧光显微镜观察,并采用流式细胞术进行分析。

**1.6 DAPI 染色观察细胞核** 细胞核的形态改变是鉴别细胞凋亡和坏死的重要依据。细胞凋亡时,细胞核会发生断裂,而细胞坏死时不会有此变化。200  $\mu$ mol/L AFB1 处理 Vero E6 细胞 48 h,DAPI 染色后,荧光显微镜下观察并照相。

**1.7 统计学处理** 采用 SPSS22.0 统计软件进行分析,符合正态分布的数据以  $\bar{x}\pm s$  表示,方差齐性时采用独立样本  $t$  检验,方差不齐时采用非参数检验。 $P<0.05$  表示差异具有统计学意义。

2 结 果

**2.1 形态学观察细胞损伤** AFB1 处理 Vero E6 细胞后,倒置相差显微镜观察细胞形态,对照组中细胞呈贴壁生长,排列

紧密。100 和 200  $\mu$ mol/L AFB1 处理 Vero E6 细胞 48 h 后,贴壁细胞逐渐皱缩变圆,由贴壁变为不贴壁,培养液中出现大量漂浮细胞和细胞碎片。随着 AFB1 浓度增加,细胞存活率明显降低。见图 1。

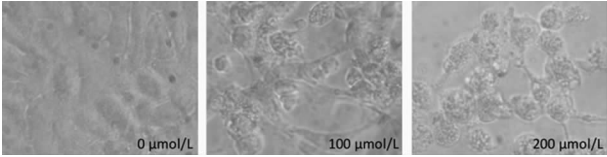


图 1 形态学观察 AFB1 对 Vero E6 细胞的毒性效应( $\times$ 320)

**2.2 CCK-8 法检测细胞存活率** AFB1 与 Vero E6 细胞共孵育后,采用 CCK-8 法检测细胞存活率。DMSO 溶剂对照组与空白对照组细胞存活率差异无统计学意义( $P>0.05$ )。AFB1 处理组与空白对照组相比较,细胞存活率明显降低,呈时间和剂量依赖关系。随 AFB1 浓度、时间的增加,细胞存活率显著降低。200  $\mu$ mol/L AFB1 处理细胞 48 h 后,细胞存活率不到 10%。见图 2。

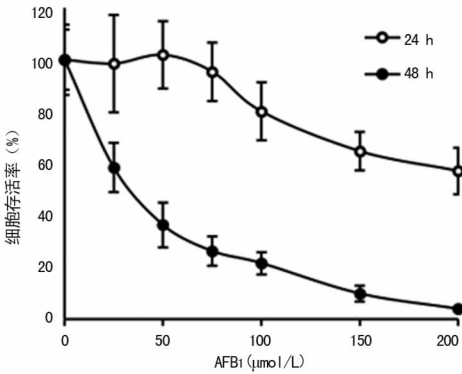


图 2 CCK-8 定量分析 AFB1 对 Vero E6 的毒性效应

**2.3 不同浓度 AFB1 对细胞 LDH 释放率的影响** LDH 释放量可反映 AFB1 对细胞的毒性损伤程度。随着 AFB1 作用时间、浓度的增加,LDH 释放率逐渐增高,呈浓度时间依赖性。200  $\mu$ mol/L AFB1 处理细胞 48 h 后,LDH 释放率比空白对照组增加 74.24%,差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。见表 1。

表 1 不同浓度 AFB1 对细胞 LDH 释放率的影响( $\bar{x}\pm s$ ,%)

染毒时间	0 $\mu$ mol/L	25 $\mu$ mol/L	50 $\mu$ mol/L	75 $\mu$ mol/L	100 $\mu$ mol/L	150 $\mu$ mol/L	200 $\mu$ mol/L
24 h	10.36 $\pm$ 0.75	9.85 $\pm$ 1.2	10.94 $\pm$ 1.49	13.17 $\pm$ 2.46	29.41 $\pm$ 3.53*	53.62 $\pm$ 4.67*	69.03 $\pm$ 8.41*
48 h	12.98 $\pm$ 1.26	48.39 $\pm$ 3.57*	67.53 $\pm$ 6.32*	75.83 $\pm$ 6.79*	78.40 $\pm$ 8.31*	82.41 $\pm$ 8.48*	87.22 $\pm$ 10.34*

注:与空白对照组(0  $\mu$ mol/L 组)比较,\* $P<0.05$ 。

**2.4 Annexin V /PI 双染和 DAPI 染色检测细胞凋亡** 200  $\mu$ mol/L AFB1 作用 Vero E6 细胞 48 h,Annexin V/PI 双染后,荧光显微镜观察到 Annexin V+/PI-早期凋亡细胞和 Annexin V+/PI+晚期凋亡/坏死细胞,见图 3(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。流式细胞仪进一步分析发现,随着 AFB1 浓度增加,早期凋亡细胞先增加后减少,晚期凋亡/坏死细胞逐渐增加。见表 2。200  $\mu$ mol/L AFB1 处理 Vero E6 细胞 48 h 后,采用 DAPI 染细胞核,荧光显微镜观察到细胞核碎裂。见图 4(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

表 2 AFB1 作用 Vero E6 细胞 48 h 后 凋亡情况( $\bar{x}\pm s$ ,%)

AFB1 浓度	活细胞	早期凋亡细胞	晚期凋亡/ 坏死细胞
0 $\mu$ mol/L	95.24 $\pm$ 12.64	1.65 $\pm$ 1.23	2.31 $\pm$ 1.82
100 $\mu$ mol/L	73.28 $\pm$ 10.75*	10.84 $\pm$ 4.37*	10.42 $\pm$ 5.31*
200 $\mu$ mol/L	32.83 $\pm$ 6.37*	4.07 $\pm$ 3.58*	58.79 $\pm$ 8.36*

注:与空白对照组(0  $\mu$ mol/L 组)比较,\* $P<0.05$ 。

### 3 讨 论

黄曲霉毒素对人体具有很强的毒性,广泛存在于各种粮食食品和饲料中,是天然存在的最危险食品污染源之一,被世界卫生组织癌症机构(IARC)列为 I 类致癌物<sup>[6-7]</sup>。目前已分离鉴定出 AFB1、AFB2、AFG1、AFG2、AFH1、AFM1、AFM2、AFP1 和 AFQ1 等 10 多种该类毒素<sup>[8]</sup>。其中 AFB1 毒性最强,约为砒霜的 68 倍,摄入 AFB1 污染的食物对人类健康具有强烈的潜在威胁。有研究表明,AFB1 急性中毒可引起肝功能异常、发热呕吐、心脏扩大、肺水肿,甚至昏迷和死亡等症状<sup>[9]</sup>。AFB1 慢性暴露可引起人体肝脏、消化系统、免疫系统、血液系统、生殖系统等多器官系统的毒性损伤效应<sup>[10-12]</sup>。尽管肝脏是 AFB1 作用的主要靶器官,然而 AFB1 对肾脏的毒性作用也不容忽视。已有多项研究报道了 AFB1 可能与肾脏疾病有关,但作用机制尚不明确,基于细胞水平的研究亦较少。本实验从细胞水平研究 AFB1 对肾细胞株 Vero E6 的作用,希望为 AFB1 在肾脏疾病发生发展中的作用及其机制研究提供基础。

本研究结果发现,AFB1 对 Vero E6 细胞具有明显的细胞毒性作用,能够显著降低细胞的存活率,AFB1 对 Vero E6 细胞的毒性作用呈时间和剂量依赖性。已有研究报道了 AFB1 对其他体外培养细胞的毒性损伤作用<sup>[13-14]</sup>。刘洋等<sup>[15]</sup>发现 AFB1 对体外培养的肝癌细胞 Hep G2 具有毒性损伤作用,引起肝癌细胞凋亡,染毒剂量增加后,细胞大量死亡。Golli-Bennour 等<sup>[2]</sup>发现 AFB1 使 P53 表达上调、Bcl-2 表达下调,从而引起猴胚肾细胞核断裂、细胞死亡。在本研究中也发现 AFB1 可引起肾细胞核断裂,诱导细胞凋亡。本研究从细胞水平在一定程度上阐述了 AFB1 对肾细胞的毒性作用及可能的作用机制,可为 AFB1 的毒性损伤研究提供相关研究数据,并为进一步了解 AFB1 对人体损伤效应奠定基础。

### 参考文献

- [1] Bianco G, Russo R, Marzocco S, et al. Modulation of macrophage activity by aflatoxins B1 and B2 and their metabolites aflatoxins M1 and M2 [J]. *Toxicon*, 2012, 59(6): 644-650.
- [2] Golli-Bennour EE, Kouidhi B, Bouslimi A, et al. Cytotoxicity and genotoxicity induced by aflatoxin B1, ochratoxin A, and their combination in cultured Vero cells[J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2010, 24(1): 42-50.
- [3] Mughal MJ, Peng X, Kamboh AA, et al. Aflatoxin B1 Induced Systemic Toxicity in Poultry and Rescue Effects of Selenium and Zinc[J/OL]. *Biol Trace Elem Res*, 2017, <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs12011-016-0923-9>.
- [4] Sun LH, Lei MY, Zhang NY, et al. Individual and combined cytotoxic effects of aflatoxin B1, zearalenone, deoxynivalenol and fumonisin B1 on BRL 3A rat liver cells [J]. *Toxicon*, 2015, 95: 6-12.
- [5] Singh KB, Maurya BK, Trigun SK. Activation of oxidative stress and inflammatory factors could account for histopathological progression of aflatoxin-B1 induced hepato-

- carcinogenesis in rat[J]. *Mol Cell Biochem*, 2015, 401(1/2): 185-196.
- [6] Sun XD, Su P, Shan H. Mycotoxin Contamination of Rice in China[J/OL]. *J Food Sci*, 2017, <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1750-3841.13631/abstract;jsessionid=E61FCB91D28EB47B0DDA583110BF662C.f02t04>.
- [7] Torovic L, Trajkovic Pavlovic L, Popovic M. Ochratoxin A and aflatoxin B1 in breakfast cereals marketed in Serbia - occurrence and health risk characterization [J/OL]. *Food Addit Contam Part B Surveill*, 2017, <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/19393210.2017.1285358>.
- [8] Karaaslan M, Arslanoglu Y. Aflatoxins B1, B2, G1, and G2 contamination in ground red peppers commercialized in Sanliurfa, Turkey [J]. *Environ Monit Assess*, 2015, 187(4): 184.
- [9] Massey TE. The 1995 Pharmacological Society of Canada Merck Frosst Award. Cellular and molecular targets in pulmonary chemical carcinogenesis: studies with aflatoxin B1 [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 1996, 74(6): 621-628.
- [10] Supriya C, Akhila B, Pratap Reddy K, et al. Effects of maternal exposure to aflatoxin B1 during pregnancy on fertility output of dams and developmental, behavioral and reproductive consequences in female offspring using a rat model [J]. *Toxicol Mech Methods*, 2016, 26(3): 202-210.
- [11] Qureshi H, Hamid SS, Ali SS, et al. Cytotoxic effects of aflatoxin B1 on human brain microvascular endothelial cells of the blood-brain barrier [J]. *Med Mycol*, 2015, 53(4): 409-416.
- [12] Bernabucci U, Colavecchia L, Danieli PP, et al. Aflatoxin B1 and fumonisin B1 affect the oxidative status of bovine peripheral blood mononuclear cells [J]. *Toxicol In Vitro*, 2011, 25(3): 684-691.
- [13] Lei M, Zhang N, Qi D. In vitro investigation of individual and combined cytotoxic effects of aflatoxin B1 and other selected mycotoxins on the cell line porcine kidney 15 [J]. *Exp Toxicol Pathol*, 2013, 65(7/8): 1149-1157.
- [14] Yang XJ, Lu HY, Li ZY, et al. Cytochrome P450 2A13 mediates aflatoxin B1-induced cytotoxicity and apoptosis in human bronchial epithelial cells [J]. *Toxicology*, 2012, 300(3): 138-148.
- [15] 刘洋, 杜明, 张根义. 黄曲霉毒素 B1 与杂色曲霉毒素对 HepG2 细胞的联合毒性[J]. *食品与生物技术学报*, 2014, 33(12): 1300-1306.

(收稿日期: 2016-12-12 修回日期: 2017-02-13)

