

壳寡糖对黄曲霉毒素B₁诱导大鼠肝细胞毒性损伤的干预作用

谢佳雨, 张雯, 杨靖亚, 严佳惠, 欧杰

Intervention effect of chitooligosaccharides on aflatoxin B₁-induced toxic damage of rat liver cells

XIE Jiayu, ZHANG Wen, YANG Jingya, YAN Jiahui, OU Jie

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.12024/jsou.20201103229>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

黄曲霉毒素B₁对黄颡鱼幼鱼生长及肝脏功能的影响

Effects of aflatoxin B₁ on growth performance and liver function of juvenile *Pelteobagrus fulvidraco*

水产学报. 2021, 45(10): 1775 <https://doi.org/10.11964/jfc.20201212564>

黄曲霉毒素B₁对凡纳滨对虾幼虾肝胰腺抗氧化酶的损伤机制

Damage mechanism of aflatoxin B₁ on antioxidant enzyme in hepatopancreas of juvenile *Litopenaeus vannamei*

水产学报. 2017, 41(3): 448 <https://doi.org/10.11964/jfc.20160610438>

鱼干中黄曲霉毒素B₁的紫外辐照消减技术参数

Parameters of Ultraviolet Irradiation Degradation Technology of AFB₁ Toxin in Dried *Trachinotus ovatus* and *Lutjanus erythropterus*

广东海洋大学学报. 2020, 40(1): 69 <https://doi.org/10.3969/j.issn.1673-9159.2020.01.010>

饲料中高浓度黄曲霉毒素B₁在凡纳滨对虾幼虾体内的残留及其影响

Residues and toxic effects of high dietary concentration of aflatoxin B₁ in juvenile Pacific white leg shrimp *Litopenaeus vannamei*

大连海洋大学学报. 2015, 30(3): 298 <https://doi.org/10.16535/j.cnki.dlhyxb.2015.03.012>

黄曲霉毒素B₁(AFB₁)的短期投喂对凡纳滨对虾肠道黏膜屏障的影响

Effects of short term addition of aflatoxin B₁(AFB₁) on the intestinal mucosal barrier of *Litopenaeus vannamei*

水产学报. 2017, 41(12): 1936 <https://doi.org/10.11964/jfc.20161010594>

饲喂不同浓度黄曲霉毒素B₁饲料对花鳗幼鱼生长、抗氧化能力和毒素积累的影响

EFFECTS OF DIETARY AFLATOXIN B₁ ON GROWTH, ANTIOXIDANT CAPACITY AND TISSUE ACCUMULATION OF JUVENILE MARBLED EEL (*ANGUILLA MARMORATA*)

水生生物学报. 2021, 45(3): 566 <https://doi.org/10.7541/2021.2020.136>

文章编号: 1674-5566(2021)06-1164-13

DOI:10.12024/jsou.20201103229

壳寡糖对黄曲霉毒素 B₁ 诱导大鼠肝细胞毒性损伤的干预作用

谢佳雨¹, 张 雯¹, 杨靖亚^{1,2,3}, 严佳惠¹, 欧 杰^{1,2,3}

(1. 上海海洋大学 食品学院, 上海 201306; 2. 上海水产品加工及贮藏工程技术研究中心, 上海 201306; 3. 农业农村部水产品贮藏保鲜质量安全风险评估实验室, 上海 201306)

摘 要: 为了研究壳寡糖(COS)对黄曲霉毒素 B₁(AFB₁)诱导大鼠肝细胞(BRL 3A 细胞)毒性损伤的干预作用,采用 CCK-8 法分别测定 AFB₁ 对细胞的半数抑制浓度(IC₅₀)和 COS 对细胞的无损害作用浓度;用试剂盒检测 COS 预处理细胞 6 h 后再加入 AFB₁ 继续培养 24 h 的细胞存活率、活性氧(ROS)水平、丙二醛(MDA)含量、超氧化物歧化酶(SOD)活性、谷胱甘肽 S-转移酶(GST)活性和细胞凋亡率;通过 Real-time quantitative PCR(RT-qPCR)测定 *Nrf2*、*Keap1*、*Ho-1*、*Nqo1*、*Bax* 和 *Bcl-2* 基因的 mRNA 相对表达量;最后通过 RNA-seq 研究分析差异表达基因的层次聚类和富集途径。结果: AFB₁ 对 BRL 3A 细胞的 IC₅₀ 为 15.86 μmol/L, COS 浓度小于 125 μmol/L 时不会对细胞造成毒性损伤;COS 可以缓解 AFB₁ 引起的细胞内 ROS 水平和 MDA 含量升高,增强 SOD 和 GST 酶活性,进而提高细胞自身的抗氧化能力,降低细胞凋亡率;AFB₁ 可引起促凋亡基因 *Bax* 的显著表达($P < 0.05$),并显著降低 *Nrf2*、*Keap1*、*Ho-1*、*Nqo1* 的转录水平($P < 0.05$),而 COS 预处理则能显著提高 *Nrf2*、*Keap1*、*Ho-1*、*Nqo1* 基因的表达($P < 0.05$),显著降低 *Bax* 的表达水平($P < 0.05$);在 RNA-seq 的富集途径结果中, COS 还可能通过细胞色素 P450 对外源物质的代谢作用、药物代谢-细胞色素 P450 和 p53 信号通路途径来缓解 AFB₁ 诱导的细胞毒性损伤($P < 0.05$)。结果表明: COS 预处理对 AFB₁ 诱导大鼠肝细胞的毒性损伤具有干预作用,其机制可能与 Nrf2 信号通路、细胞色素 P450 对外源物质的代谢作用、药物代谢-细胞色素 P450 和 p53 信号通路有关。

关键词: 黄曲霉毒素 B₁; 壳寡糖; 细胞毒性; 抗氧化
中图分类号: TS 201.3 **文献标志码:** A

黄曲霉毒素(aflatoxin, AF)是一类主要由黄曲霉(*Aspergillus flavus*)和寄生曲霉(*A. parasiticus*)产生的具有二氢咪唑环结构的次级代谢物,其中,黄曲霉毒素 B₁(aflatoxin B₁, AFB₁)的毒性最强。已经证实 AFB₁ 是诱导肝细胞性肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)的诱发因子, AFB₁ 的摄入与乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)和丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)具有协同作用,可通过遗传和表观遗传修饰促进 HCC 的发展^[1]。AFB₁ 除了具有致癌、致畸、致突变的特性外,还会导致营养不良、生长迟缓和免疫抑制^[2-4],已被国际癌症研究机构(International Agency for Research on Cancer, IARC)列为 I 类致癌物^[5]。尽管 AFB₁ 主要毒性作用器官是肝

脏,但摄入 AFB₁ 对其他器官如肾脏^[6]、心脏^[7]、睾丸^[8]、附睾^[9]、卵巢^[10]和大脑^[11]等也有不良反应。ZHENG 等^[12]研究发现,4 μg/mL AFB₁ 分别作用于 Caco-2、HEK、Hep-G2 和 SK-N-SH 细胞,均可显著抑制细胞生长、提高乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)水平、降低细胞抗氧化水平和诱导遗传损伤。AFB₁ 的摄入总是伴随着肝损伤和氧化应激,LI 等^[13]研究发现 AFB₁ 会导致肉鸡的肝脏损伤,包括肝组织学病变、血清酶活性增加、肝脏内抗氧化酶活性下降以及活性氧(reactive oxygen species, ROS)和 8-羟基脱氧鸟苷(8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, 8-OHdG)水平的升高。

壳寡糖(chitooligosaccharides, COS)是甲壳

收稿日期: 2020-11-24 修回日期: 2021-01-04

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFC1602205)

作者简介: 谢佳雨(1993—),女,硕士研究生,研究方向为食品生物技术。E-mail:violina15@163.com

通信作者: 欧 杰, E-mail:jou@shou.edu.cn

素通过酶或化学脱乙酰作用生成的衍生物壳聚糖进一步水解得来的,其聚合度小于 20,平均分子量小于 3.2 ku,商业生产 COS 的原料丰富,主要是海洋甲壳类动物废弃物,如虾壳、蟹壳等。COS 具有抗氧化、抗炎、调节免疫、抗肿瘤、抗菌、抗凝血、保护神经等多种生物活性^[14-18]。QU 等^[19]研究了在高脂饮食小鼠模型中体内和体外 COS 的自由基清除能力,在高脂肪饮食小鼠的饲料中加入 COS 会导致小鼠的胃、肝和血清中的超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)和谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)活性显着增加,显示出 COS 具有一定的抗氧化活性,并且可以恢复受高脂饮食影响的小鼠体内的抗氧化酶的活性。HUANG 等^[20]研究发现, COS 预处理可以降低 Cu²⁺ 诱导的 SH-SY5Y 细胞活力的降低和 LDH 释放水平的增加,同时 COS 下调了 Cu²⁺ 诱导的细胞氧化应激和 *Caspase-3* 基因活化水平,并通过激活核因子红系-2-相关因子-2(nuclear factor erythroid-2-related factor-2, Nrf2)信号通路来缓解 Cu²⁺ 诱导的细胞氧化损伤。

因此,基于以上研究基础,本文以大鼠肝细胞(BRA 3A 细胞)为研究对象,通过设计体外实验来研究 COS 对 AFB₁ 诱导大鼠肝细胞毒性损伤的干预作用,以期利用具有生物活性的天然产物降低真菌毒素对肝脏的毒性损伤作用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料与仪器

大鼠肝细胞(BRL 3A 细胞),中国科学院上海生命科学研究院细胞库;COS(分子量为1 220 u),山东卫康生物医药技术有限公司;DMEM 高糖培养基,HyClone 公司;胎牛血清(FBS),BI 公司(以色列);二甲基亚砜(DMSO)、磷酸缓冲溶液(PBS),生工生物(上海)股份有限公司;青链霉素混合液(100×)、胰蛋白酶、BCA 蛋白浓度测定试剂盒,北京索莱宝科技有限公司;CCK-8 试剂盒,DOJINDO 公司(日本);Western 及 IP 裂解液、ROS 检测试剂盒、脂质氧化(MDA)检测试剂盒、超氧化物歧化酶(SOD)活性检测试剂盒,碧云天生物技术公司;谷胱甘肽-S 转移酶(GST)测定试剂盒,南京建成生物工程研究所;TRIzol 试

剂,赛默飞世尔科技(中国)有限公司;HiScript III RT SuperMix for qPCR、AceQ qPCR SYBR Green Master Mix,南京诺唯赞生物有限公司;96 微孔板、6 孔板、细胞培养皿、细胞培养瓶,Corning 公司(美国);0.22 μm 针头式滤器,PALL 公司(美国)。

主要仪器:BB150 二氧化碳恒温培养箱和 NANODROP 2000 分光光度计,购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司;OptiMair™ 垂直流超净工作台,购自新加坡艺思高科技有限公司;AE2000T 倒置生物显微镜,购自麦克奥迪实业集团有限公司;TD3 低速离心机,购自湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;SYNERGY2 多功能酶标仪,购自伯腾仪器有限公司(美国);CT14RD 高速冷冻离心机,购自上海天美生化仪器设备工程有限公司;BD FACSVerse 流式细胞仪,购自 Becton Dickison(美国);QL-902 涡旋振荡仪,购自海门市其林贝尔仪器制造有限公司;ABI7900 荧光定量 PCR 仪,购自 Applied Biosystems;G2965A Agilent 2200 生物分析仪,购自安捷伦生物科技有限公司。

1.2 细胞培养

大鼠肝细胞(BRL 3A 细胞)在加有体积分数为 10% 的胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 U/mL 链霉素的 DMEM 培养基中,置于恒湿的 37 °C 和 5% 二氧化碳的培养箱中培养。AFB₁ 和 COS 分别溶解在 DMSO 和超纯水中制备 AFB₁ 和 COS 工作液(1 000×),工作液使用前均需用 0.22 μm 针头式滤器过滤。细胞接种在细胞培养皿或培养瓶中培养,在用 AFB₁ 和 COS 处理前,取对数期的细胞计数后制备一定浓度的细胞悬液接种在 96 孔板、6 孔板或培养皿中,将种板细胞培养 24 h,其中 DMSO 的终体积分数为 0.1%。

1.3 细胞活力的测定

AFB₁ 对细胞的半数抑制浓度(half inhibitory concentration, IC₅₀)是指 AFB₁ 能将细胞生长抑制 50% 所需的作用浓度。用 CCK-8 法分别测定 AFB₁ 对细胞的 IC₅₀ 和 COS 对细胞的无损害作用浓度,取对数期细胞接种于 96 孔板中(5×10³ 个/孔),置于培养箱中培养 24 h 后吸出培养基,分别更换不同浓度的 AFB₁ 工作液(0.4、2、10、50、250 μmol/L)和 COS 工作液(7.81、31.25、125、500、2 000 μmol/L)继续培养 24 h。培养结

束后按照 CCK-8 试剂盒说明书向每孔加入 10 μL CCK-8 溶液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h 后立即用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度值, 按照公式(1)分别计算各浓度组的 AFB₁ 和 COS 对细胞的增殖抑制率, 然后再根据公式(2)计算的到 AFB₁ 对细胞的 IC₅₀。

$$Y = \left(1 - \frac{A_c - A_b}{A_c - A_a}\right) \times 100 \quad (1)$$

式中: Y 为增殖抑制率, %; A_b 为空白组(只含细胞工作液, 无细胞)的吸光度值; A_c 为试验组的吸光度值; A_a 为对照组(无药物处理, 有细胞)的吸光度值。

$$\lg \text{IC}_{50} = X_m - I \times \left[P - \frac{3 - P_m - P_n}{4}\right] \quad (2)$$

式中: X_m 为 \lg (最大剂量); I 为 \lg (最大剂量/相邻剂量); P 为增殖抑制率之和; P_m 为最大增殖抑制率; P_n 为最小增殖抑制率。

1.4 COS 和 AFB₁ 作用于细胞存活率的测定

根据 1.3 节的结果得到 AFB₁ 的 IC₅₀ 和 COS 对细胞的无损害作用浓度, 重新设置 AFB₁ 和 COS 作用浓度, 测定它们对细胞存活率的影响。取对数期的细胞制备密度为 5×10^3 个/mL 的细胞悬液, 接种于 96 孔板中(100 μL /孔), 培养 24 h 后加入重新设定的各浓度组的 COS 工作液(0、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$) 预处理细胞 6 h 后, 去除原培养液, 加入 AFB₁ 工作液(0、2.5、5、10 $\mu\text{mol/L}$) 继续培养 24 h。培养结束后每孔加入 10 μL CCK-8 溶液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h 后立即用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度值, 各实验组的细胞存活率按照公式(3)进行计算。

$$W = \frac{A_c - A_b}{A_c - A_a} \times 100 \quad (3)$$

式中: W 为细胞存活率, %; A_b 为空白组(只含细胞工作液, 无细胞)的吸光度; A_c 为实验组的吸光度; A_a 为对照组(无药物处理, 有细胞)的吸光度。

1.5 细胞内 ROS 的测定

试验组的设置: 对照组、COS 单独处理组(10、20、40 $\mu\text{mol/L}$), AFB₁ 单独处理组(0、2.5、5、10 $\mu\text{mol/L}$)、COS 预处理 + AFB₁ 处理组。将对数期的细胞密度调整为 2.5×10^5 个/mL, 接种于 96 孔板中, 200 μL /孔, 培养 24 h, 然后加入各试验组后继续培养。培养结束后按照试剂盒说明书操作, PBS 清洗 1 次细胞, 每孔加入 200 μL

预热的 DCFH-DA 探针, 培养箱中避光孵育 30 min, 用不含血清的 DMEM 培养基清洗 3 次去掉未结合的探针后, 立即用酶标仪检测激发波长和发射波长分别为 488 nm 和 525 nm 处的 DCF 荧光强度值, 结果用相对 DCF 荧光强度表示, 即试验组/对照组。

1.6 细胞内氧化还原水平的测定

试验组的设置: 对照组、COS 单独处理组(10、20、40 $\mu\text{mol/L}$), AFB₁ 单独处理组(0、2.5、5、10 $\mu\text{mol/L}$)、COS 预处理 + AFB₁ 处理组。取对数期的细胞计数后配制成密度为 5×10^5 个/mL 的细胞悬液, 以 2 mL/孔接种于 6 孔板中, 培养 24 h 后按照试验组设置加药继续培养。培养结束后在冰上进行裂解细胞的操作: 用预冷的 PBS 清洗 1 次后每孔加入 300 μL 细胞裂解液, 静置 30 s, 细胞刮刮下细胞, 将细胞裂解悬液移至离心管中, 然后 4 $^{\circ}\text{C}$, 8 000 r/min 离心 5 min, 取上清液分装在新离心管中, 置于冰槽中备用或者 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。在进行氧化还原指标测定前, 需要测定样品的蛋白浓度。根据 BCA 蛋白浓度试剂盒说明书进行操作: 配制标准品溶液并将样品适当稀释后, 分别取 20 μL 置于 96 孔板中, 每孔加入 200 μL 配置好的 BCA 工作液, 混匀后置于培养箱中孵育 30 min, 酶标仪测定 562 nm 处的吸光度值, 根据标准曲线, 计算样品的蛋白浓度。

1.6.1 细胞内 MDA 含量的测定

按照丙二醛(Malondialdehyde, MDA)检测试剂盒说明书进行操作, 样品处理后取 200 μL 上清液至 96 孔板中, 随即用酶标仪测定 532 nm 处的吸光度值, 绘制 MDA 标准曲线, 根据标准曲线可以计算样品 MDA 的含量, 结果用相对 MDA 含量表示, 即试验组/对照组。

1.6.2 细胞内 SOD、GST 活性的测定

分别按照 SOD、GST 检测试剂盒说明书步骤进行操作, 结果用相对 SOD、GST 活性表示, 即试验组/对照组。

1.7 细胞凋亡率的检测

试验组的设置: 对照组、20 $\mu\text{mol/L}$ COS 单独处理组、AFB₁ 单独处理组(5、10 $\mu\text{mol/L}$)、COS 预处理 + AFB₁ 处理组。流式检测还需要设置用于调电压的阴性对照(无药物处理)、单阳 1(FITC Annexin V 染色)、单阳 2(PI 染色), 收集细胞后先分别对单阳 1 和单阳 2 进行诱导凋亡处

理后再进行染色。取对数期的细胞,计数后配制成密度为 5×10^4 个/mL 的细胞悬液,接种于 6 孔板中,2 mL/孔,培养 24 h 后按照试验组设置加药继续培养。培养结束后按照 FITC Annexin V 试剂盒说明书步骤进行操作,分别收集清洗细胞后进行染色,避光分别加入 5 μ L FITC Annexin V 和 5 μ L PI,室温避光孵育 15 min,孵育结束后,立即用流式细胞仪检测,每个样品收集 10 000 个细胞进行检测分析。

1.8 RNA 的提取与实时荧光定量 Real-time quantitative PCR (RT-qPCR)

根据 1.4 ~ 1.7 节的试验结果,最终选择 20 μ mol/L COS 和 10 μ mol/L AFB₁ 处理细胞,试验组分为对照组、AFB₁ 单独处理组、COS 预处理 + AFB₁ 处理组。取对数期的细胞,计数后配制成密度为 2.5×10^4 个/mL 的细胞悬液,接种于细胞培养皿中,10 mL/皿,培养 24 h 后按照试验组设置加药继续培养。培养结束后按照说明书步骤,全程在冰上操作,采用 TRIzol 法提取样本总 RNA, NanoDrop[®] Nanodrop-2000 (thermal) 系统测定 RNA 浓度和纯度,每个 RNA 样品的 A_{260}/A_{280} 大于 1.8, A_{260}/A_{230} 大于 2.2,再通过 Bioanalyzer

2200 对 RNA 进行质量检测,用过 RNA 的完整值 (RIN) 来判断 RNA 完整性。质检和完整性均合格之后,开始逆转录合成 cDNA:取 1 ~ 2 μ g Total RNA 加入离心管中,然后加 4 \times gDNA wiper Mix (4 μ L),再加 RNase-free ddH₂O 补充至 16 μ L 混匀后置于 42 $^{\circ}$ C 孵育 2 min,随后再加 5 \times HiScript III qRT SuperMix (4 μ L),混匀后 37 $^{\circ}$ C 下孵育 15 min,85 $^{\circ}$ C 孵育 5 s 终止反应。再根据 cDNA 样品分别配置 qPCR 反应体系:取 PCR 管,依次加入 2 \times Master Mix (5 μ L)、Forward Primer (0.2 μ L)、Reverse Primer (0.2 μ L)、ROX (0.2 μ L),再加水至总体积为 9 μ L,混匀后将该混合液加到 384-PCR 板对应的每个孔中,接着加入对应的 cDNA (1 μ L),置于 PCR 仪上进行 qPCR 反应。采用以下热循环程序进行 PCR 扩增:在 50 $^{\circ}$ C 下孵育 2 min,94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,95 $^{\circ}$ C 解链 15 s,60 $^{\circ}$ C 退火 1 min,40 个循环,60 $^{\circ}$ C 1 min,95 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 15 s,95 $^{\circ}$ C 15 s,并从 60 $^{\circ}$ C 缓慢加热到 99 $^{\circ}$ C。引物由苏州金唯智公司完成序列的合成,引物序列如表 1 所示,采用 RT-qPCR 检测表 1 中的基因表达量,按 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算结果。

表 1 引物序列

Tab. 1 The primer sequences

基因名 Gene name	基因编号 Gene ID	正向引物(5'至3') Forward primer (5'to 3')	反向引物(5'至3') Reverse primer (5'to 3')
<i>Nrf2</i>	83619	TGCCCACATTCCTCCAAACAAG	GCTATCGAGTGACTGAGCCT
<i>Keap1</i>	117519	GGTGTCCATTGAAGGCATCC	ACCACGCTGTCAATCTGGTA
<i>Ho-1</i>	24451	GCATGTCCCAGGATTTGTCC	CCTCTTCCAGGGCCGTATAG
<i>Nqo1</i>	24314	TGGGAGGAGTCCACTCTA	CCCACAGAAAGGCCAAACTT
<i>Bax</i>	24887	AGCTGCAGAGGATGATTGCT	GATCAGCTCGGGCACTTTAG
<i>Bcl-2</i>	24224	GCATGCCGACCTCTGTTGAT	CAGGTATGCACCCAGAGTGA
<i>GAPDH</i>	24383	ACAGCAACAGGCTGCTGGAC	TTTGAGGCTGCAGCGAACTT

1.9 转录组测序(RNA-Seq)

试验组的设置:对照组、10 μ mol/L AFB₁ 单独处理组、COS 预处理 + AFB₁ 处理组。取对数期的细胞,计数后配制成密度为 2.5×10^4 个/mL 的细胞悬液,接种于细胞培养皿中,10 mL/皿,培养 24 h 后按照试验组设置加药继续培养。培养结束后快速用 TRIzol 试剂裂解并收集细胞, -80 $^{\circ}$ C 速冻后利用干冰运送,委托苏州金唯智生物科技有限公司进行 RNA - Seq 全基因组测序。

1.10 数据处理

用 IBM SPSS Statistic 25 软件进行分析,所有数据以平均值 \pm 标准差 (Mean \pm SD) 表示,试验数据分析采用单因素 ANOVA 检验和 Duncan 氏检验进行多重比较和差异显著性检验。试验设定 3 ~ 5 个平行组,每个试验重复不少于 3 次,以 $P < 0.05$ 表示存在显著性差异且具有统计学意义。

2 结果

2.1 AFB₁ 对 BRL 3A 细胞的 IC₅₀

由图 1 可知:在浓度为 0.4 ~ 250 $\mu\text{mol/L}$ 时, AFB₁ 对细胞的增殖抑制呈现剂量-效应关系趋势。根据公式 2 计算得到 AFB₁ 对 BRL 3A 细胞的 IC₅₀ 为 15.86 $\mu\text{mol/L}$ 。

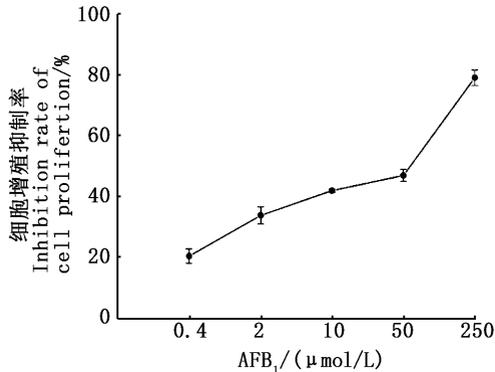


图 1 AFB₁ 处理 24 h 对 BRL 3A 细胞增殖的影响

Fig. 1 Effect of AFB₁ treatment for 24 h on proliferation of BRL 3A cells

2.2 COS 对 BRL 3A 细胞的无损害作用浓度

由图 2 可知, COS 浓度 $\leq 125 \mu\text{mol/L}$ 时对细胞没有明显损伤, 而 COS 浓度 $> 125 \mu\text{mol/L}$ 才对细胞的增殖有抑制作用。

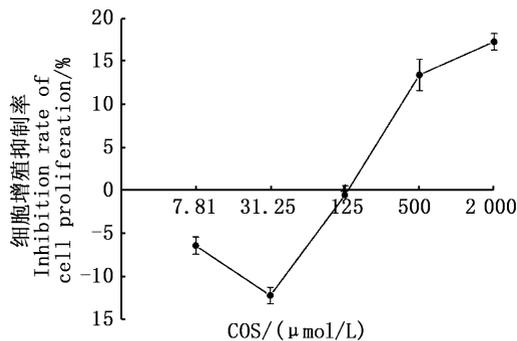


图 2 COS 处理 24 h 对 BRL 3A 细胞增殖的影响

Fig. 2 Effect of COS treatment for 24 h on proliferation of BRL 3A cells

2.3 COS 预处理对 BRL 3A 细胞存活率的影响

如图 3 所示:与无处理的对照组相比, AFB₁ 单独处理组 (2.5、5、10 $\mu\text{mol/L}$) 的细胞存活率显著降低; 而 COS 单独处理组 (10、20、40 $\mu\text{mol/L}$) 中除了 20 $\mu\text{mol/L}$ COS 显著提高细胞的存活率以外 ($P < 0.05$), 其余浓度组对细胞的存活率均无

显著改变。而在 COS 预处理 + AFB₁ 处理中, 与对照组相比, COS 预处理后的 AFB₁ 各浓度组的细胞存活率均显著提高 ($P < 0.05$), 且在 COS 预处理浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$ 时, 产生的干预效果最好, 可将被 2.5、5、10 $\mu\text{mol/L}$ AFB₁ 处理的细胞存活率分别从 83.89% \pm 3.60%、79.05% \pm 2.34%、67.96% \pm 3.53% 显著提高到 102.56% \pm 2.77%、102.24% \pm 4.67%、95.04% \pm 2.92% ($P < 0.05$); 且在 COS 预处理浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$ 时, 各 AFB₁ 浓度处理与无 AFB₁ 处理的细胞存活率相比没有显著性变化。因此, 初步判断可以得出 COS 预处理对 AFB₁ 诱导的 BRL 3A 细胞毒性损伤有一定的缓解作用。

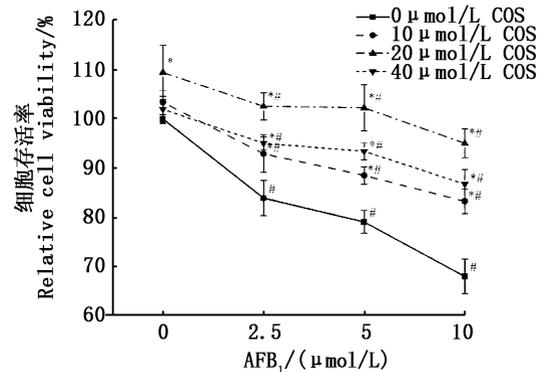


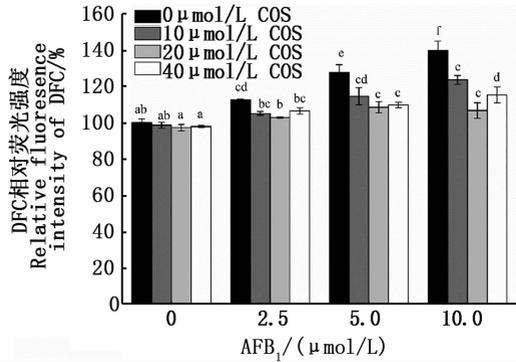
图 3 COS 预处理对 AFB₁ 诱导 BRL 3A 细胞存活率的影响

Fig. 3 Effect of COS pretreatment on the survival rate of BRL 3A cells induced by AFB₁

2.4 COS 预处理对 AFB₁ 诱导 BRL 3A 细胞 ROS 含量的影响

如图 4 所示, 与无药物处理对照组相比, 细胞内 ROS 水平随 AFB₁ 浓度的增加而显著升高 ($P < 0.05$), 可分别升高到 113.03% \pm 0.28%、128.02% \pm 4.19%、140.01% \pm 5.20%, 且 COS 单独处理组的 ROS 相对水平无显著变化。在 COS 预处理 + AFB₁ 处理组中, AFB₁ 浓度为 5、10

μmol/L 时,10、20、40 μmol/L COS 均可显著降低细胞内 ROS 水平 ($P < 0.05$),其中,20 μmol/L COS 预处理可将各 AFB₁ 浓度组诱导引起的 ROS 水平升高降至 $102.98\% \pm 0.25\%$ 、 $108.67\% \pm 3.08\%$ 、 $106.92\% \pm 4.33\%$,且 20 μmol/L COS 预处理可将 2.5 μmol/L AFB₁ 组诱导引起的 BRL 3A 细胞内升高的 ROS 水平恢复到正常水平。



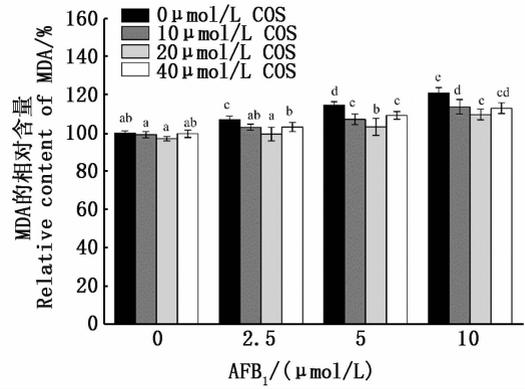
小写字母不同,表示具有显著差异 ($P < 0.05$)。
Different lowercase letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

图 4 COS 预处理对 AFB₁ 诱导 BRL-3A 细胞 ROS 含量的影响

Fig. 4 Effect of COS pretreatment on AFB₁-induced intracellular ROS production in BRL 3A cells

2.5 COS 预处理对 AFB₁ 诱导 BRL 3A 细胞 MDA 的影响

如图 5 所示,与对照组相比,AFB₁ 单独处理组可以使 MDA 的相对含量显著升高 ($P < 0.05$),而 COS 单独处理组中 MDA 的相对含量与无药物处理对照组相比差异不显著。在 COS 预处理 + AFB₁ 处理组中,与无 COS 处理的对照组相比,各 COS 预处理组均可显著降低各 AFB₁ 诱导后细胞内的 MDA 含量 ($P < 0.05$),其中 20 μmol/L COS 预处理效果最好,可将 2.5、5、10 μmol/L AFB₁ 处理的 MDA 的相对含量由 $107.09\% \pm 1.80\%$ 、 $114.62\% \pm 1.86\%$ 、 $121.11\% \pm 2.68\%$ 分别显著降低到 $99.53\% \pm 3.61\%$ 、 $103.30\% \pm 4.39\%$ 、 $109.73\% \pm 2.78\%$ ($P < 0.05$),并且在 AFB₁ 处理的浓度为 2.5、5 μmol/L 时,20 μmol/L COS 预处理与无药物处理的对照组相比无显著差异。

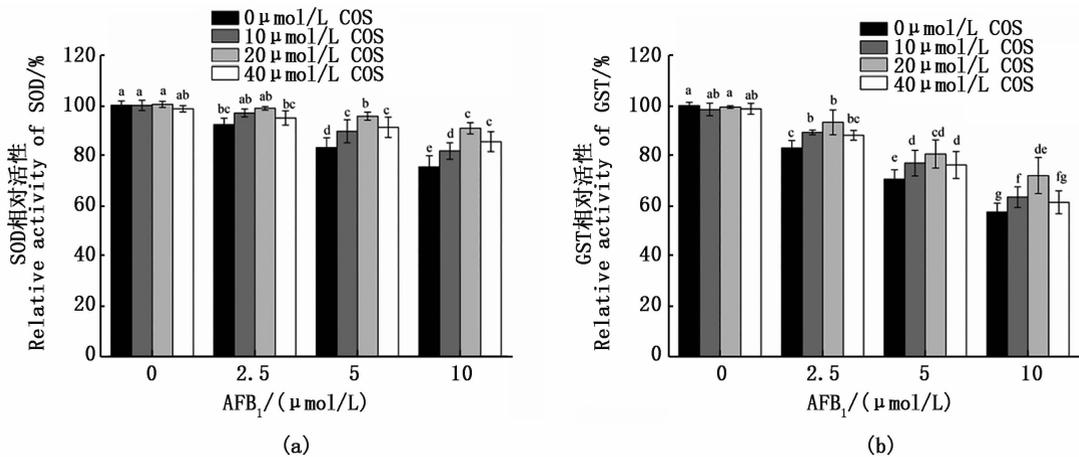


小写字母不同,表示具有显著差异 ($P < 0.05$)。
Different lowercase letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

图 5 COS 预处理对 AFB₁ 诱导 BRL 3A 细胞脂质过氧化的影响
Fig. 5 Effect of COS pretreatment on AFB₁-induced lipid peroxidation in BRL 3A cells

2.6 COS 预处理对 AFB₁ 诱导 BRL 3A 细胞 SOD、GST 活性的影响

如图 6a 所示,与对照组相比,随着 AFB₁ 单独处理的浓度升高,SOD 的活性显著降低 ($P < 0.05$),COS 单独处理组对 SOD 的活力无显著改变。而在 COS 预处理 + AFB₁ 处理组中,当 AFB₁ 浓度为 5、10 μmol/L 时,各浓度 COS 预处理均可显著提高 SOD 的活性 ($P < 0.05$),20 μmol/L COS 预处理组的效果最好,可将 SOD 的相对活性分别由 $83.20\% \pm 3.87\%$ 、 $75.47\% \pm 4.46\%$ 显著提高到 $95.69\% \pm 1.60\%$ 、 $90.88\% \pm 2.27\%$ ($P < 0.05$)。由图 6b 可知:与对照组相比,AFB₁ 单独处理组可显著降低 GST 的活力 ($P < 0.05$),COS 单独处理组对 GST 的相对活力无显著改变。在 COS 预处理 + AFB₁ 处理组中,当 AFB₁ 处理浓度为 5 μmol/L 时,各浓度的 COS 预处理均能显著提高 GST 活性 ($P < 0.05$);与无 COS 对照组相比,20 μmol/L COS 预处理组可显著提高各浓度 AFB₁ 处理细胞后的 GST 相对活性,可分别由 $83.14\% \pm 2.99\%$ 、 $70.71\% \pm 3.75\%$ 、 $57.72\% \pm 3.52\%$ 显著提高到 $93.40\% \pm 4.94\%$ 、 $80.75\% \pm 5.56\%$ 、 $72.18\% \pm 7.14\%$ ($P < 0.05$)。



小写字母不同,表示具有显著差异($P < 0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

图6 COS预处理对 AFB₁ 诱导 BRL 3A 细胞 SOD 和 GST 活性的影响

Fig. 6 Effect of COS pretreatment on the activities of SOD and GST in BRL 3A cells induced by AFB₁

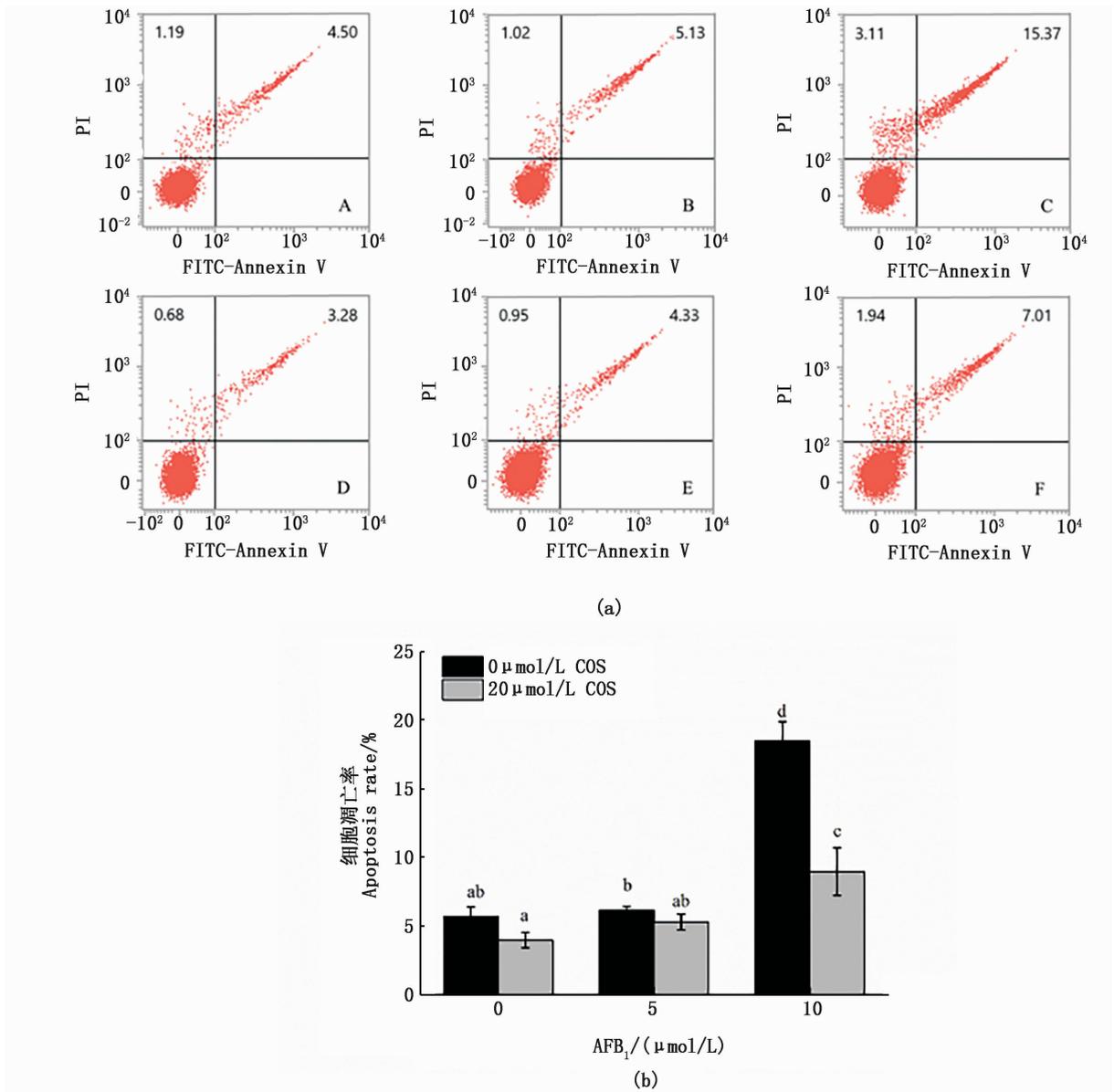
2.7 COS 预处理对 AFB₁ 诱导的大鼠肝细胞凋亡率的影响

如图 7 所示,从结果可以看出,20 μmol/L COS 单独处理的细胞凋亡率与无处理对照组相比无显著变化,10 μmol/L AFB₁ 单独处理组的细胞凋亡率相比于无处理对照组显著升高,而经过 20 μmol/L COS 预处理后显著降低了细胞的凋亡率,可以将 10 μmol/L AFB₁ 诱导 BRL 3A 细胞的凋亡率从 $18.48\% \pm 1.40\%$ 显著降低到 $8.95\% \pm 1.75\%$ 。

2.8 COS 预处理对 AFB₁ 诱导氧化应激和细胞凋亡相关基因表达的影响

基于以上研究结果,为了研究 COS 预处理干预 AFB₁ 诱导细胞凋亡和氧化应激的可能机制,通过 RT-qPCR 检测了氧化应激和细胞凋亡相关基因 mRNA 的表达情况。Keap1-Nrf2 通路是细胞最重要的内源性抗氧化通路,Nrf2 作为细胞对抗氧化应激的关键转录因子,其作用机制是在胞质中与 Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) 蛋白解离,转移到细胞核与抗氧化应答元件 ARE (Antioxidant Response Element) 结合,然后启

动下游 II 相代谢酶的高效表达,如 NAD(P)H: (醌受体) 氧化还原酶 1 (NAD(P)H: quinone acceptor oxidoreductase 1, NQO1)、酶血红素加氧酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1)、SOD、CAT 等。Keap1 和 Nrf2 是 Nrf2 信号通路的核心基因,Nrf2 转录调节 Nqo1 和 Ho-1 基因;Bax 和 Bcl-2 基因分别参与促进细胞凋亡和抑制细胞凋亡。如图 8a 所示,结果表明 AFB₁ 显著降低了 Nrf2 信号通路和细胞凋亡相关基因 mRNA 的表达 ($P < 0.05$),而 COS 预处理能够将基因 Keap1 和 Nrf2 的 mRNA 相对表达水平恢复至正常水平,并显著促进下游基因 Nqo1 和 Ho-1 的 mRNA 表达;此外,如图 8b, COS 预处理还可以显著降低 AFB₁ 诱导引起的促凋亡基因 Bax 的 mRNA 相对表达量的升高。基于以上试验结果,推测 COS 可能通过激活 Nrf2 信号通路来启动通路下游的 II 相代谢酶的表达,从而提高细胞自身的抗氧化能力来缓解 AFB₁ 诱导引起的细胞氧化损伤,同时可能调节 Bax 基因的表达来缓解 AFB₁ 诱导引起的细胞凋亡。

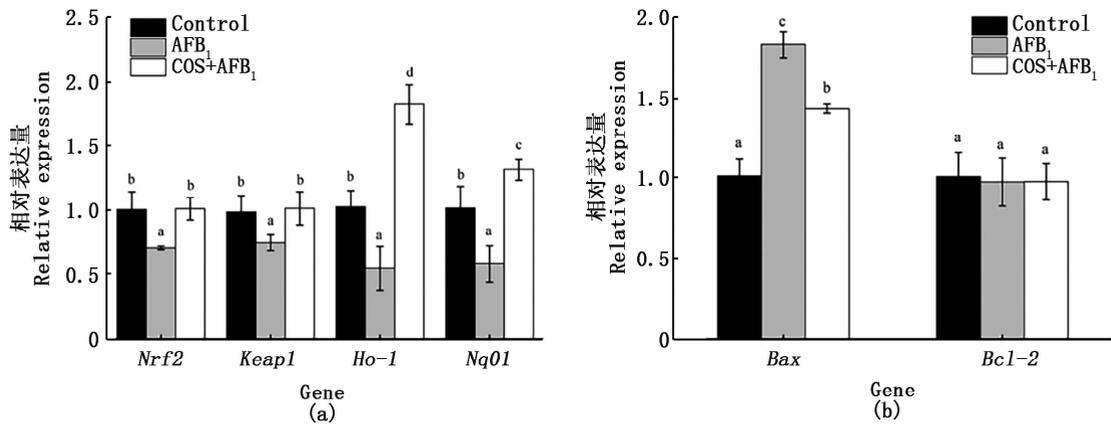


A. 对照组; B. 5 μmol/L AFB₁ 单独处理组; C. 10 μmol/L AFB₁ 单独处理组; D. 20 μmol/L COS 单独处理组; E. 20 μmol/L COS 预处理 + 5 μmol/L AFB₁ 处理组; F. 20 μmol/L COS 预处理 + 5 μmol/L AFB₁ 处理组。

A. control group; B. 5 μmol/L AFB₁ single treatment group; C. 10 μmol/L AFB₁ single treatment group; D. 20 μmol/L COS single treatment group; E. 20 μmol/L COS Pretreatment + 5 μmol/L AFB₁ treatment group; F. 20 μmol/L COS pretreatment + 5 μmol/L AFB₁ treatment group.

图 7 COS 预处理对 AFB₁ 诱导 BRL 3A 细胞凋亡的影响

Fig.7 Effect of COS pretreatment on apoptosis of BRL 3A cells induced by AFB₁



小写字母不同,表示具有显著差异($P < 0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

图8 COS 预处理对 AFB₁ 诱导 BRL 3A 细胞氧化应激和凋亡相关基因表达的影响

Fig. 8 Effects of COS pretreatment on gene expression of oxidative stress and apoptosis in BRL 3A cells induced by AFB₁

2.9 RNA-seq 测序研究参与 COS 干预作用的其他途径

细胞内维持正常生理功能和稳态通常与多种代谢途径、信号通路和基因表达有关,为进一步研究 COS 预处理对 AFB₁ 诱导细胞毒性损伤干预作用的可能机制,通过 RNA-seq 测序来研究 COS 和 AFB₁ 处理细胞后基因的差异表达情况和富集情况,研究可能参与了 COS 干预作用的信号通路。

2.9.1 差异基因表达的筛选及其聚类分析

通过 RNA-seq 测序,进行了 3 组样品的对比分析,使用 FPKM (Fragments Per Kilo bases per

Million reads) 方法计算每组对比样品中的基因表达量,通过比较每组样本之间的基因表达量从而筛选出差异表达的基因,其中组间差异基因表达如图 9 所示。与对照组 (Control 组) 相比, AFB₁ 单独处理组 (AFB₁ 组) 中有 690 个基因表达上调, 593 个基因表达下调; COS 预处理 + AFB₁ 处理组 (CA 组) 中有 116 个基因表达上调, 42 个基因表达下调; 与 AFB₁ 组处理组相比, CA 组有 174 个基因表达上调, 125 个基因表达下调。差异基因表达聚类图如图 10, 颜色从蓝到红, 表示基因表达量越高, 从整体图可以看出, COS 可以缓解由 AFB₁ 诱导引起的基因表达差异性的上下调。

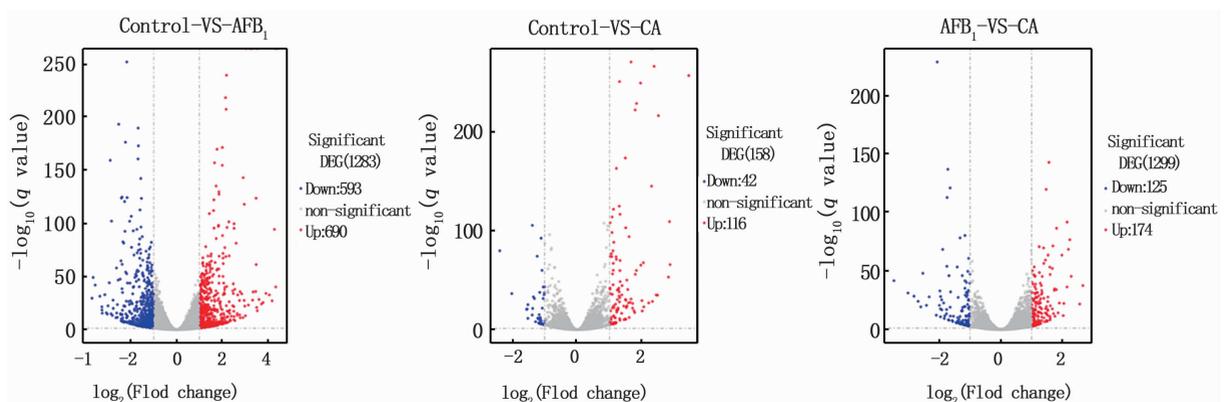


图9 3组比较样本差异基因表达统计分析

Fig. 9 Statistical analysis of differential gene expression among 3 groups of comparative samples

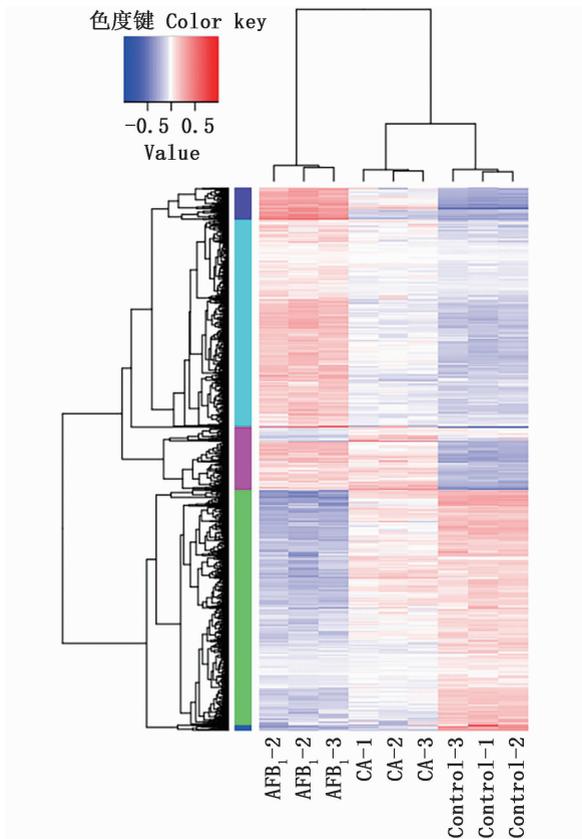


图 10 3 组样本的差异基因表达层次聚类分析

Fig. 10 Hierarchical cluster analysis of differential gene expression in 3 groups of samples

2.9.2 Pathway 富集分析

通过 Pathway 显著性富集能确定差异表达基因参与的最主要生化代谢途径和信号转导途径,使用 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 公共数据库对富集出的差异表达基因做 Pathway 富集分析,以 KEGG Pathway 为单位,应用超几何检验,找出与整个基因组背景相比,在差异表达基因中显著性富集的 Pathway。结果显示,AFB₁ 诱导细胞可以引起细胞多个通路途径的基因差异表达,特别是代谢作用的相关通路,为了有针对性地研究 COS 发挥干预作用的可能途径,主要分析差异表达基因富集到代谢作用、细胞过程和环境信息传递通路的具体情况,结果如图 11 所示。发现 AFB₁ 刺激细胞后,差异表达基因较多的富集到代谢途径 (Metabolic pathways),其中差异极显著的有细胞色素 P450 对外源物质的代谢作用 (Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450)、药物代谢-细胞色素 P450 (Drug metabolism - cytochrome P450) 和谷胱甘肽

代谢 (Glutathione metabolism) ($P < 0.01$), 其次是 p53、MAPK 和 Hippo 信号通路 ($P < 0.05$), 这些通路的差异表达基因可能参与了 AFB₁ 诱导的细胞生长抑制和凋亡。图 12b 中, CA 组相比于 AFB₁ 组的差异表达基因显著富集到细胞色素 P450 对外源物质的代谢作用 ($P < 0.01$)、药物代谢-细胞色素 P450 ($P < 0.01$)、和 p53 信号通路 ($P < 0.05$), 这些 Pathway 可能与 COS 预处理对细胞的保护作用有关。

3 讨论

曲霉菌属可以在适当的自然条件下生长并产毒,增加了控制 AFB₁ 污染食品和粮食的难度,人和动物也不可避免的通过饮食摄入 AFB₁ 进而造成肝脏损伤。AFB₁ 在没有经过代谢活化之前无致癌毒性,其主要是通过肝脏中细胞色素 P450 酶系统 (CYP450) 生物转化形成致癌的活性中间体 AFB₁-8, 9-环氧化物 (AFB₁-8, 9-epoxide, AFBO) 来发挥毒性作用^[21]。

AFB₁ 诱导的大鼠肝细胞毒性损伤可能与其刺激细胞生化代谢和氧化应激有关,AFB₁ 通过细胞的 CYP450 生物转化为毒性中间体 AFBO,再进一步刺激细胞内各种代谢途径和信号通路,同时抑制细胞自身的抗氧化防御系统来诱导大鼠肝细胞的氧化应激,进而诱导细胞凋亡。COS 预处理能在一定程度上缓解 AFB₁ 对细胞的毒性损伤,其可能激活了 Nrf2 信号通路来提升内源性抗氧化剂的生成能力,进而缓解 AFB₁ 诱导细胞引起的氧化应激。Nrf2 信号通路是最重要的内源性抗氧化应激通路之一,对调节机体氧化应激方面有着重要作用,早期的研究中,LUO 等^[22]通过敲除 Nrf2 基因发现 COS 的抗氧化能力与 Nrf2 的转录激活诱导的 *Ho-1*、*Nqo1* 和 *Sod* 等抗氧化基因有关,同时 COS 还抑制了 p38mapk、JNK 和 ERK 的磷酸化,其研究表明 COS 通过 Nrf2 活化和 MAPK 磷酸化的降低来保护乙醇诱导 L02 细胞的氧化应激。试验进一步的 RNA-seq 研究结果显示:AFB₁ 可能激活 p53、MAPK 和 Hippo 信号通路来帮助其抑制细胞的生长和促进细胞凋亡;而 COS 也可能通过细胞色素 P450 对外源物质的代谢作用途径、药物代谢-细胞色素 P450 途径和 p53 信号通路来帮助其干预 AFB₁ 的毒性损伤。以上结果表明 COS 预处理可以缓解 AFB₁ 诱导大

鼠肝细胞的毒性损伤,然而,该研究尚处于初始阶段,需要更进一步研究 COS 发挥干预作用的作用靶点和具体机制;此外,体外试验的结果还需

要设计相关体内试验进行验证,并研究 COS 在动物模型中干预作用的具体情况及相关机制。

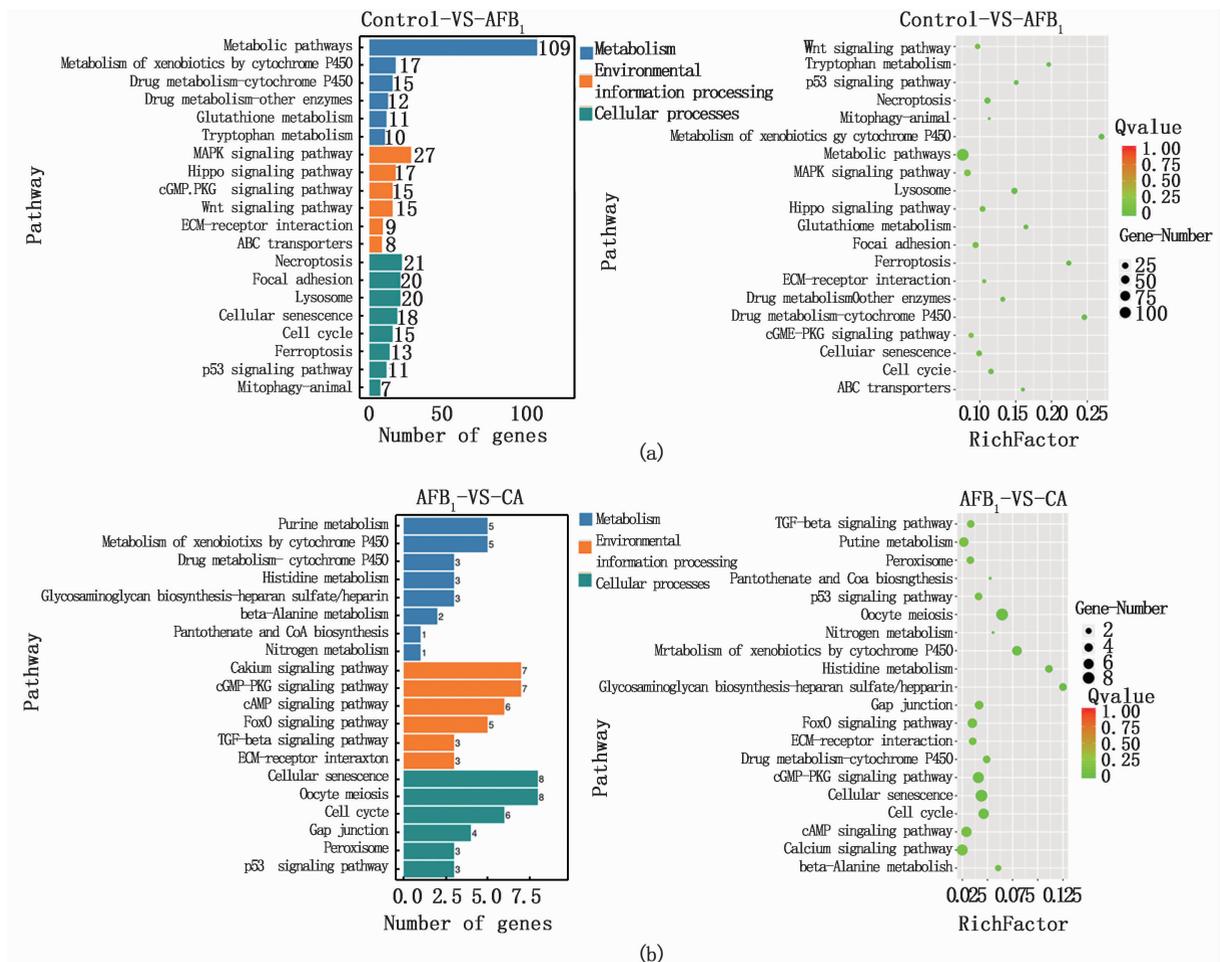


图 11 差异表达基因的 KEGG 富集分析

Fig. 11 KEGG enrichment analysis of differentially expressed genes

参考文献:

- [1] JEANNOT E, BOORMAN G A, KOSYK O, et al. Increased incidence of aflatoxin B₁-induced liver tumors in hepatitis virus C transgenic mice[J]. International Journal of Cancer, 2012, 130(6): 1347-1356.
- [2] RODA E, COCCINI T, ACERB D, et al. Comparative in vitro and ex-vivo myelotoxicity of aflatoxins B₁ and M₁ on haematopoietic progenitors (BFU-E, CFU-E, and CFU-GM): species-related susceptibility[J]. Toxicology in Vitro, 2010, 24(1): 217-223.
- [3] GOLLI-BENNOUR E E, KOUIDHI B, BOUSLIMI A, et al. Cytotoxicity and genotoxicity induced by aflatoxin B₁, ochratoxin A, and their combination in cultured Vero cells [J]. Journal of Biochemical and Molecular Toxicology, 2010, 24(1): 42-50.
- [4] CORCUERA L A, ARBILLAGA L, VETTORAZZI A, et al. Ochratoxin A reduces aflatoxin B₁ induced DNA damage detected by the comet assay in Hep G2 cells[J]. Food and Chemical Toxicology, 2011, 49(11): 2883-2889.
- [5] NONE. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans, Vol. 56, some naturally occurring substances; Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins; IARC, Lyon, 1993 (ISBN 92-832-1256-8). 599 pp. Price SF 95.00 [J]. Analytica Chimica Acta, 1994, 294(3): 341.
- [6] ABDEL-HAMID A A M, FIRGANY A E D L. Vitamin E supplementation ameliorates aflatoxin B₁-induced nephrotoxicity in rats [J]. Acta Histochemica, 2015, 117(8): 767-779.
- [7] MANNAA F A, ABDEL-WAHHAB K G, ABDEL-WAHHAB M A. Prevention of cardiotoxicity of aflatoxin B₁ via dietary

- supplementation of papaya fruit extracts in rats [J]. *Cytotechnology*, 2014, 66(2) : 327-334.
- [8] SUPRIYA C, REDDY P S. Prenatal exposure to aflatoxin B₁ : developmental, behavioral, and reproductive alterations in male rats[J]. *The Science of Nature*, 2015, 102(5/6) : 26.
- [9] MURAD A F, AHMED S, ABEAD S. Toxicity effect of aflatoxin B₁ on reproductive system of albino male rats[J]. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 2015, 18(3) : 107-114
- [10] CHENG L H, QIN Y S, HU X, et al. Melatonin protects in vitro matured porcine oocytes from toxicity of aflatoxin B₁ [J]. *Journal of Pineal Research*, 2019, 66(4) : e12543.
- [11] BAHEY N G, ABD ELAZIZ H O, GADALLA K K S. Toxic effect of aflatoxin B₁ and the role of recovery on the rat cerebral cortex and hippocampus [J]. *Tissue and Cell*, 2015, 47(6) : 559-566.
- [12] ZHENG N, ZHANG H, LI S L, et al. Lactoferrin inhibits aflatoxin B₁-and aflatoxin M₁-induced cytotoxicity and DNA damage in Caco-2, HEK, Hep-G2, and SK-N-SH cells[J]. *Toxicol*, 2018, 150: 77-85.
- [13] LI S H, MUHAMMAD I, YU H X, et al. Detection of aflatoxin adducts as potential markers and the role of curcumin in alleviating AFB₁-induced liver damage in chickens [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2019, 176: 137-145.
- [14] NGO D H, VO T S, NGO D N, et al. Biological effects of chitosan and its derivatives[J]. *Food Hydrocolloids*, 2015, 51: 200-216.
- [15] ISMAIL S A. Microbial valorization of shrimp byproducts via the production of thermostable chitosanase and antioxidant chitoooligosaccharides [J]. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2019, 20: 101269.
- [16] XIE C Y, WU X, LONG C M, et al. Chitosan oligosaccharide affects antioxidant defense capacity and placental amino acids transport of sows[J]. *BMC Veterinary Research*, 2016, 12: 243.
- [17] JIANG Z W, HAN B Q, LI H, et al. Preparation and anti-tumor metastasis of carboxymethyl chitosan[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2015, 125: 53-60.
- [18] JU Y Y, HUANG Y Y, XIAO M T, et al. Hypolipidaemic and antioxidant activities of chito-oligosaccharides in hyperlipidaemic rats induced by high-fat diet [J]. *Maejo International Journal of Science and Technology*, 2019, 13 (1) : 72-81.
- [19] QU D F, HAN J Z. Investigation of the antioxidant activity of chitoooligosaccharides on mice with high-fat diet[J]. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 2016, 45(11) : 661-666.
- [20] HUANG H C, HONG L, CHANG P, et al. Chitoooligosaccharides attenuate Cu²⁺-induced cellular oxidative damage and cell apoptosis involving Nrf2 activation [J]. *Neurotoxicity Research*, 2015, 27(4) : 411-420.
- [21] RUSHING B R, SELIM M I. Aflatoxin B₁ : a review on metabolism, toxicity, occurrence in food, occupational exposure, and detoxification methods [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2019, 124: 81-100.
- [22] LUO Z G, DONG X X, KE Q, et al. Chitoooligosaccharides inhibit ethanol-induced oxidative stress via activation of Nrf2 and reduction of MAPK phosphorylation [J]. *Oncology Reports*, 2014, 32(5) : 2215-2222.

Intervention effect of chitooligosaccharides on aflatoxin B₁-induced toxic damage of rat liver cells

XIE Jiayu¹, ZHANG Wen¹, YANG Jingya^{1,2,3}, YAN Jiahui¹, OU Jie^{1,2,3}

(1. College of Food Sciences and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Shanghai Engineering Research Center of Aquatic-Product Processing & Preservation, Shanghai 201306, China; 3. Laboratory of Quality & Safety Risk Assessment for Aquatic Product on Storage and Preservation, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai 201306, China)

Abstract: To study the effect of chitooligosaccharides (COS) on aflatoxin B₁ (AFB₁)-induced toxic injury of rat liver cells (BRL 3A cells), the CCK-8 method was used to determine the IC₅₀ value of AFB₁ on cells and the non-damage concentration of COS on cells. After COS pretreated the cells for 6 hours and then adding AFB₁ to continue culturing for 24 hours, the kit was used to determine the cell viability, reactive oxygen species (ROS) levels, malondialdehyde (MDA) content, superoxide dismutase (SOD) activity, glutathione S-transferase (GST) activity and apoptosis rate. The mRNA relative expression levels of *Nrf2*, *Keap1*, *Ho-1*, *Nqo1*, *Bax* and *Bcl-2* genes were determined by real-time quantitative PCR (RT-qPCR), and the hierarchical clustering and enrichment pathways of differentially expressed genes were analyzed by RNA-seq. Results: The IC₅₀ of AFB₁ to BRL 3A cells was 15.86 μmol/L, and the COS concentration less than 125 μmol/L would not cause toxic damage to the BRL 3A cells. COS can reduce the increase of ROS level and MDA content in cells induced by AFB₁, enhance the activity of SOD and GST, thereby improve the cell's own antioxidant capacity and reduce the rate of apoptosis. AFB₁ can cause the significant expression of the pro-apoptotic gene *Bax* ($P < 0.05$), and significantly reduce the transcription levels of *Nrf2*, *Keap1*, *Ho-1*, and *Nqo1* ($P < 0.05$), while COS pretreatment can significantly increase the expression of *Nrf2*, *Keap1*, *Ho-1*, *Nqo1* ($P < 0.05$), and significantly reduce the expression level of *Bax* ($P < 0.05$). In the results of RNA-seq enrichment pathways, COS may also alleviate the cytotoxic damage induced by AFB₁ through the metabolism of xenobiotics by cytochrome P450, drug metabolism-cytochrome P450 and p53 signaling pathway ($P < 0.05$). In summary, COS pretreatment can intervene the toxic injury of BRL 3A cells induced by AFB₁, which may be mediated by Nrf2 signaling pathway, metabolism of xenobiotics by cytochrome P450, drug metabolism-cytochrome P450 and p53 signaling pathway.

Key words: aflatoxin B₁; chitooligosaccharide; cytotoxicity; antioxidant