

黄曲霉毒素 B1 致肝脏损伤的机制

庞惠萍, 丁 泽, 苏 娜, 苏冠宁, 王佳楠, 杨茂洪, 吴高峰*

(沈阳农业大学畜牧兽医学院, 辽宁沈阳 110866)

摘要:黄曲霉毒素(AF)是一种霉菌毒素,是全世界饲料污染危害最严重的污染源之一,给动物和人类健康造成了巨大的危害。目前已经发现的黄曲霉毒素有 20 多种,其中,黄曲霉毒素 B1(AFB1)是毒性最强的一种,其在畜禽的代谢过程中可通过引起肝脏氧化损伤,诱导肝细胞凋亡和自噬,从而导致畜禽肝脏损伤,严重的还会造成死亡。论文针对 AFB1 的危害及其引发畜禽肝损伤的机制进行综述,旨在为预防和治疗 AFB1 中毒提供一定的参考。

关键词:黄曲霉毒素 B1; 肝脏; 氧化损伤; 细胞凋亡; 自噬

DOI:10.16437/j.cnki.1007-5038.2019.12.023

中图分类号: S852.6

文献标识码: A

文章编号: 1007-5038(2019)12-0110-04

黄曲霉毒素 B1(aflatoxin B1, AFB1)是一种具有剧毒,强致癌性的饲料污染物,能够引起肝炎、肝硬化、肝癌以及肝脏的免疫损伤,严重降低畜禽的生产力,给动物和人类健康造成巨大的危害。本文就 AFB1 引起肝损伤机制相关研究概况进行综述,以期期为 AFB1 中毒的预防及治疗提供一定的参考。

1 黄曲霉毒素

黄曲霉毒素(aflatoxin, AF)是一类真菌毒素,其作为花生、玉米、小麦等饲料谷物的主要污染物之一,对动物和人类的健康都有着非常大的威胁,同时也给世界各国造成了巨大的经济损失。世界卫生组织(WHO)已经将 AF 列为 I 类致癌物。AF 是一类化学结构相近的化合物的总称,基本结构单位是一个双氢呋喃环和一个氧杂萘邻酮,分子质量为 312 u ~ 346 u,由于其在紫外光下产生蓝光和绿光,故分为 B 和 G 两大类;而 M 类是人们后来在牛奶中发现的,是黄曲霉毒素 B1(AFB1)羟基化的代谢产物,也是牛奶的主要污染物之一。AFM1 被认为具有致癌性,对人体有很大危害^[1]。目前分离出来的 AF 有 20 多种,其中 AFB1 是毒性最强的一种^[2],也是最有效的致癌物。AFM1 和 AFB1 的代谢都主要在肝脏中进行^[3]。AFB1 的半数致死量为大鼠 5.5 mg/kg~17.9 mg/kg,家兔 0.3 mg/kg~0.5 mg/kg,犬 1 mg/kg,鸡 6.5 mg/kg,其毒性是砒霜的 68 倍,氰化钾的 10 倍。所有的 AF 均具有耐高温、难溶于水的特点,仅溶于一些有机溶剂,如甲醇、氯仿

等,280℃才会发生裂解,在酸性条件下仍然性质稳定,在碱性或者紫外光照射的条件下毒性才会大大降解。在污染的食物和饲料中性质也十分稳定,存放 20 年仍可检出。因此,1960 年震惊世界的大量火鸡中毒事件之后,AFB1 的污染问题就一直备受世界各国的关注。AFB1 中毒会使畜牧业产量下降,造成严重的经济损失,目前还没有安全有效的药物来缓解 AFB1 引发的肝癌。

2 AFB1 在肝脏中的代谢

肝脏是动物体内主要的解毒器官,也是物质代谢转化的主要场所,所以肝脏极易受到有毒物质的损害。AFB1 引起的肝脏损伤主要由 CYP450 酶系、线粒体、免疫系统和自由基 4 种机制介导的。AFB1 并不能直接致癌,而是通过在体内经过一系列转化,形成间接致癌。AFB1 进入体内后,由消化道的十二指肠吸收,经过门静脉进入肝脏,由肝细胞 I 相代谢酶细胞色素 P450 酶系(CYP450)中的 CYP1A2 和 CYP3A4 转化为 AFB1-8,9-环氧化物(AFBO),这一过程是其造成机体紊乱,产生毒性和致癌作用最显著的原因^[4-5]。AFB1 的暴露浓度不同,参与代谢的酶也不同,当 AFB1 的暴露浓度小于等于 1 mol/L 时,由 CYP1A2 将 AFB1 转化为 AFBO,而正常 AFB1 在体内的暴露量一般都小于 1 mol/L,所以 CYP1A2 一般被认为是肝脏内将 AFB1 转化为 AFBO 最主要的酶之一。

收稿日期: 2018-12-13

基金项目: 国家自然科学基金项目(31772694, 31872441)

作者简介: 庞惠萍(1995-),女,辽宁人,硕士研究生,主要从事基础兽医学研究。* 通讯作者

3 AFB1 引起肝损伤的机理

3.1 AFB1 引起氧化应激损伤

AFB1 在体内的代谢过程会引起肝细胞的脂质过氧化反应。CYP450 酶系的激活会产生大量的活性氧(ROS),从而造成肝细胞的氧化应激损伤,引起细胞功能受损甚至凋亡^[6]。据报道,氧化应激和细胞凋亡可能在 AFB1 诱导的免疫毒性中发挥关键作用^[7]。AFB1 的代谢物 AFBO 有 2 个异构体,分别为 exo 和 endo 环氧化物,其中毒性较强的是 exo 环氧化物,exo-AFB1 能与 DNA 形成一种加和物为 AFB1-N7-鸟嘌呤,大多数的加和物都会经过脱嘌呤后,随尿液排出体外,但也有一些开环之后形成了稳定的结构,进而引起 G-T 转化突变和原发性肝癌细胞的生成^[8]。AFBO 还能与抑癌基因 p53 作用,引起 p53 基因的第 249 号密码子的 G-T 突变,诱发肝癌。p53 基因的突变频率与 AFB1 的暴露程度呈正相关。AFBO 也会与肝细胞的一些蛋白质结合,影响多种酶的功能,造成肝细胞功能紊乱,引发炎症,继而诱导肝细胞凋亡。AFBO 与 DNA 结合的同时形成稳定的化合物,会造成遗传物质损伤也会引起肝癌。因此,AFB1 可以使小鼠肝脏谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)、过氧化氢酶(CAT)、总抗氧化能力(T-AOC)、总超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽还原酶(GR)活性下降。同时,AFB1 在对蛋鸡作用 12h 后,肝脏的丙二醛(MDA)含量显著升高;24 h 后,谷胱甘肽过氧化物酶 4 基因(GPX4)和谷胱甘肽还原酶基因(GSR)表达明显降低。研究结果表明黄曲霉毒素诱导了氧自由基的形成,造成抗氧化损伤^[9]。也有研究显示,给肉鸡饲喂 AFB1 后,肝脏中的 Nrf2 的下游基因如 GSTA3、GSTM2 的 mRNA 和蛋白表达水平降低^[10]。氧化应激在 AFB1 的毒性机制中起关键作用,因此,可以在动物饲料中添加抗氧化剂,通过增强抗氧化能力和免疫功能,从而对畜禽的 AFB1 中毒起到保护和预防作用^[11]。因此,对于缓解 AFB1 中毒的抗氧化剂的研究日益渐增,比如熟知的抗氧化剂葡萄籽原花青素提取物就可以改善 AFB1 对小鼠的氧化损伤和免疫损伤^[12]。

3.2 AFB1 诱导细胞凋亡

凋亡是细胞的一种程序性死亡的过程,是一种精确控制细胞数量的机制^[14]。细胞凋亡形态上表现为细胞收缩,染色质致密化和片段化。细胞凋亡是由启动子和 caspases 家族激活介导的,caspases 通过裂解蛋白质激活核酸酶,将 DNA 裂解成短的、规律性大小的片段,从而杀死细胞。凋亡是维持机体环境稳定的多基因调控的过程,如果抑制这一重

要过程,就很有可能导致癌症的发生。正常的细胞凋亡具有很重要的生理学意义,能够维持机体稳态,提高免疫力,更好地适应不良环境等。正常的细胞凋亡一般不会引起炎症,但是如果凋亡的细胞数量高到机体自身无法清理时,就会引起炎症反应。AFB1 引起的细胞凋亡主要由线粒体通路、内质网通路和死亡受体通路三条途径介导。

3.2.1 AFB1 通过线粒体通路诱导细胞凋亡 线粒体凋亡有 2 种途径,分别是内源性和外源性。这 2 种途径均由 Bcl-2 家族介导,Bcl-2 蛋白的激活使线粒体膜通透性增加,MPTP 通道打开,从而在细胞质中释放细胞色素 C(cytochrome C,Cyt C),产生大量活性氧(ROS),激活下游 caspase 家族级联反应,引起细胞凋亡。Bcl-2 家族既包含促凋亡亚族也包含抗凋亡亚族,其中促凋亡亚族主要包括 Bak、Bax、Bid 等,抗凋亡家族包含 Bcl-xL 和 Bcl-2 等。在凋亡初期,会出现线粒体内膜和嵴明显的重叠,内膜不断增大由凸向基质变为凸向外膜,随着凋亡的加剧,最终会导致外膜破裂,线粒体出现严重的肿胀现象^[15]。有研究显示,由 AFB1 诱导的细胞凋亡与 Bcl-2、Bax 和 caspase-3 的 mRNA 和蛋白表达量上调有关^[16]。AFB1 可以使肝脏线粒体功能受损,造成氧化应激,生成大量 ROS,并通过调控线粒体通路中的 Bax、caspase-3 和 caspase-9 过表达引起细胞凋亡^[17]。在姜黄素干预 AFB1 诱导肝细胞线粒体凋亡的试验中,AFB1 模型组的促凋亡因子 Bax、caspase-3 的 mRNA 和蛋白水平均显著上调,而凋亡抑制因子 Bcl-2 的 mRNA 和蛋白水平显著下降^[18]。

3.2.2 AFB1 通过内质网通路诱导细胞凋亡 内质网(ER)受到外界刺激时产生严重的内质网应激(endoplasmic reticulum stress,ERS)也会引起细胞凋亡。内质网应激主要是由于一些蛋白在内质网错误折叠,积累到一定程度后诱导葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78,又名 Bip)释放而产生的,同时还会引起未折叠蛋白反应(protein response,UPR),激活转录因子 6(transcription factor 6,ATF-6)和蛋白激酶 R(PKR)-如内质网激酶(PERK)和肌醇依赖酶 1 α (inositolrequiring enzyme 1 α ,IRE-1 α),PERK 的激活会造成自身磷酸化和同源二聚化,同时诱导真核翻译起始因子-2 的磷酸化,阻碍 mRNA 的翻译^[19]。这一过程也会促进 CHOP 和 ATF-4 的合成。CHOP 可进一步激活促凋亡蛋白 Bim 和 Bax 或抑制抗凋亡 Bcl-2 的表达,从而促进细胞凋亡。有研究发现,AFB1 作用于肉鸡法氏囊时,通过调节 Ca²⁺ 浓

度、线粒体损伤和氧化应激导致 ATP 缺乏,并同时引起未折叠蛋白反应(UPR),UPR 可引起未折叠蛋白和伴蛋白的不平衡,最终导致内质网应激,表现为 Grp78/Bip、Grp94 和 CaM 的 mRNA 表达水平升高^[20]。因此,我们说,内质网凋亡通路可以由线粒体损伤而间接引起。

3.2.3 AFB1 通过死亡受体通路诱导细胞凋亡

死亡受体通路(DR)是一种外源性的细胞凋亡,死亡受体介导的细胞凋亡有多种信号通路,主要是由死亡受体(Fas、DR3、4、5 和 TNFR1 等)与配体结合后,激活与之对应的效应器,引发细胞凋亡。这一过程会激活 caspase 级联反应。与此同时,FASL 与配体的结合还会诱导 Fas 的三聚反应,Fas 与 FADD (Fas-associated death domain-containing protein)结合使 caspase-8 通过自身催化作用被激活,被活化的 caspase-8 通过两个平行的级联刺激细胞凋亡:它既可以直接裂解活化 caspase-3,也可以激活 Bcl-2 家族的促凋亡蛋白 Bid,Bid 通过释放作用进入线粒体,诱导细胞色素 C(Cyt-C)的释放,激活下游信号因子 caspase-3 和 caspase-9 的释放,进一步加强细胞凋亡。有文献报道,FADD 也可以与 procaspase-10 的死亡结构域结合,激活下游 caspase-10 蛋白^[21]。TNFaR 也可以激活 NF-kB 通路诱导细胞凋亡,NF-kB 还能够激活 Bcl-2 和 XIAP 的表达,促进凋亡。用 AFB1 作用于人类 HepaRG 肝细胞时发现,0.05 μ mol/L 的 AFB1 培养基中,肝细胞死亡受体通路 Fas 的 mRNA 表达水平显著升高^[22]。AFB1 还会导致胸腺中 Fas、FasL、FADD、caspase-8、caspase-10、Bid 的 mRNA 和蛋白表达量增加,也就是说,AFB1 可以通过死亡受体通路诱导胸腺细胞凋亡,并且,caspase-8 不仅能够激活下游的 caspase-3 和 caspase-7,还能够激活 Bcl-2 同源基因 Bid,进而激活线粒体凋亡通路,加强细胞的凋亡反应。

4 AFB1 与肝细胞自噬

自噬对于正常的细胞维持细胞稳态起着至关重要的作用,在细胞存活和细胞死亡中也有至关重要的作用。自噬还会参与内质网应激、微生物感染、发育、消除错误折叠蛋白聚集物和损伤细胞器等。在自噬的过程中,自噬体和溶酶体发生降解。早期报道指出,自噬是由于饥饿或活性氧(ROS)大量释放引起的^[23]。但当 ROS 含量过高时,会越过自噬直接引起细胞死亡。AFB1 作用 12 h 后,巨噬细胞的未折叠蛋白反应(UPR)活跃,引发自噬^[24]。AFB1

是通过诱导生成 ROS 引起巨噬细胞自噬的^[25]。AFB1 作用于肉鸡肝脏后,会引起肝脏自噬体消失,mTOR 升高,同时,自噬相关基因的 mRNA 和蛋白表达水平表明 AFB1 能够明显抑制自噬并且诱导炎症。目前,关于 AFB1 引起肝细胞自噬的机制尚不明确,因此,研究 AFB1 诱导肝脏自噬的潜在机制,预防 AFB1 的毒性有着广阔的空间。

5 展望

我国饲料中 AFB1 的污染十分严重,这种污染带来了严重的经济损失和安全隐患,但目前还没有安全有效且绿色的药物能够解决这一问题。因此,研究 AFB1 诱导肝损伤的具体机制有着极其重要的意义。迄今为止,已经有大量的基础试验报道,AFB1 能够引起肝脏脂质过氧化,并通过死亡受体通路、线粒体通路和内质网通路引起细胞凋亡。未来,可以通过抑制肝脏脂质过氧化及细胞凋亡和自噬来探索绿色有效的药物,并应用到畜禽 AFB1 中毒的临床防治中,以保证畜禽及人类的健康。

参考文献:

- [1] Dai Y, Huang K, Zhang B L, et al. Aflatoxin B1-induced epigenetic alterations: An overview[J]. *Food Chem Toxicol*, 2017, 109:683-689.
- [2] Yubus A W, Razzazi-fazeli E, Bohm J. Aflatoxin B1 in affecting broiler's performance, immunity, and gastrointestinal tract: a review of history and contemporary issues[J]. *Toxins*, 2011, 3(6):566-590.
- [3] Cui X, Muhammad I, Li R, et al. Development of a UPLC/FLD method for detection of aflatoxin B1 and M1 in animal tissue to study the effect of curcumin on mycotoxin clearance rates[J]. *Front Pharmacol*, 2017, 8:650.
- [4] Giri I, Stone M, Wobble C. dA pairing 50 to the cationic guanine N7 8, 9-dihydro-8-(N7-guanyl)-9-hydroxyaflatoxin B1 adduct: Implications for nontargeted AFB1 mutagenesis[J]. *Biochemistry*, 2003, 42(23):7023-7034.
- [5] Yang X, Zhang Z, Wang X, et al. Cytochrome P450 2A13 enhances the sensitivity of human bronchial epithelial cells to aflatoxin B1-induced DNA damage[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2013, 270(2):114-121.
- [6] Yuan S, Wu B, Yu Z, et al. The mitochondrial and endoplasmic reticulum pathways involved in the apoptosis of bursa of Fabricius cells in broilers exposed to dietary aflatoxin B1[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(40):65295-65306.
- [7] Chen J, Chen K, Yuan S, et al. Effects of aflatoxin B1 on oxidative stress markers and apoptosis of spleens in broilers[J]. *Toxicol Ind Health*, 2016, 32:278-284.
- [8] Jeannot E, Boorman G, Kosyk O, et al. Increased incidence of aflatoxin B1-induced liver tumors in hepatitis virus C transgenic mice[J]. *Int J Cancer*, 2012, 130(6):1347-1356.
- [9] Erdélyi M, Balogh K, Pelyhe C, et al. Changes in the regulation

- and activity of glutathione redox system, and lipid peroxidation processes in short-term aflatoxin B1 exposure in liver of laying hens[J]. *J An Physiol An Nutrition*, 2018, 102(4): 947-952.
- [10] Muhammad I, Wang H, Sun X, et al. Dual role of dietary curcumin through attenuating AFB1-induced oxidative stress and liver injury via modulating liver phase-I and phase-II enzymes involved in AFB1 bioactivation and detoxification[J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 554.
- [11] Zhang N Y, Qi M, Zhao L, et al. Curcumin prevents a toxin B1 hepatotoxicity by inhibition of cytochrome p450 isozymes in chick liver[J]. *Toxins (Basel)*, 2016, 8: 327.
- [12] Long M, Zhang Y, Li P, et al. Intervention of grape seed proanthocyanidin extract on the subchronic immune injury in mice induced by aflatoxin B1[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17: 516.
- [13] Liu T, Ma Q, Zhao L, et al. Protective effects of sporoderm-broken spores of *Ganoderma lucidum* on growth performance, antioxidant capacity and immune function of broiler chickens exposed to low level of aflatoxin B1[J]. *Toxins (Basel)*, 2016, 8: 278.
- [14] Hirsova P, Gores G. Death receptor-mediated cell death and proinflammatory signaling in nonalcoholic steatohepatitis[J]. *CMGH Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2015, 1: 17-27.
- [15] Li H, Xing L, Zhang M, et al. The toxic effects of aflatoxin B1 and aflatoxin M1 on kidney through regulating L-proline and downstream apoptosis[J]. *Biomed Res Int*, 2018, 7(11): 861-870.
- [16] Yasin M, Mazdak R, Mino I. Aflatoxin B1 impairs spermatogenesis: An experimental study for crosslink between oxidative stress and mitochondria-dependent apoptosis[J]. *Environ Toxicol*, 2018, 33(11): 1204-1213.
- [17] Liu Y, Wang W. Aflatoxin B1 impairs mitochondrial functions, activates ROS generation, induces apoptosis and involves Nrf2 signal pathway in primary broiler hepatocytes[J]. *Anim Sci J*, 2016 (12): 1490-1500.
- [18] Hetz C, Papa F R. The unfolded protein response and cell fate control[J]. *Mol Cell*, 2018, 69: 169-181.
- [19] Kook S, Zhan X, Cleghorn W M, et al. Caspase-cleaved arrestin-2 and BID cooperatively facilitate cytochrome C release and cell death[J]. *Cell Death Differentiation*, 2014, 21(1): 172-184.
- [20] Peng X, Yu Z, Liang N, et al. The mitochondrial and death receptor pathways involved in the thymocytes apoptosis induced by aflatoxin B1[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(11): 12222-12234.
- [21] Mughal M J, Peng X, Zhou Y, et al. Aflatoxin B1 invokes apoptosis via death receptor pathway in hepatocytes[J]. *Oncotarget*, 2017 (5): 8239-8249.
- [22] Josse R, Dumont J, Fautrel A, et al. Identification of early target genes of aflatoxin B1 in human hepatocytes, inter-individual variability and comparison with other genotoxic compounds[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2012, 258: 176-187.
- [23] Christian P, Sacco J, Adeli K. Autophagy: Emerging roles in lipid homeostasis and metabolic control[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1831(4): 819-24.
- [24] Paul S, Jakhar R, Bhardwaj M, et al. Glutathione-transferase omega 1 (GSTO1-1) acts as mediator of signaling pathways involved in aflatoxin B1-induced apoptosis-autophagy crosstalk in macrophages[J]. *Free Radic Biol Med*, 2015, 89: 1218-1230.
- [25] An Y, Shi X, Tang X, et al. Aflatoxin B1 induces reactive oxygen species-mediated autophagy and extracellular trap formation in macrophages[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2017, 7: 53.

Mechanism of Liver Injury Caused by Aflatoxin B1

PANG Hui-ping, DING Ze, SU Na, SU Guan-ning, WANG Jia-nan, YANG Mao-hong, WU Gao-feng

(College of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning, 110866, China)

Abstract: Aflatoxin (AF) is a kind of mycotoxin, which is one of the most serious pollution sources of feed pollution in the world. At present, there are more than 20 kinds of aflatoxins, among which aflatoxin B1 (AFB1) is the most toxic one. It can induce apoptosis and autophagy of liver cells by causing oxidative damage of liver during the metabolism of livestock and poultry, thus leading to liver damage of livestock and poultry and even death. In this paper, the harm of AFB1 and the specific mechanism of causing livestock and poultry liver injury were summarized in order to provide some references for the prevention and treatment of AFB1 poisoning.

Key words: aflatoxin B1; liver; oxidative damage; cell; apoptosis; autophagy