

文章编号: 1674-5566(2023)06-1135-09

DOI: 10.12024/jsou.20230304112

壳寡糖对黄曲霉毒素 B₁ 致大鼠肝损的干预效果

陈琳¹, 严佳惠¹, 张昭寰^{1,2,3}, 赵勇^{1,2,3}, 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: 黄曲霉毒素 B₁ (Aflatoxin B₁, AFB₁) 分布广、肝毒性强, 能够导致肝脏氧化性损伤。本研究通过注射 AFB₁ 建立大鼠急性肝损伤模型, 探究具有抗氧化活性的壳寡糖 (Chitosan oligosaccharide, COS) 对肝损伤的干预效果及方式。实验设置空白组、COS 对照组、模型组、COS 干预组、阳性对照组, 连续灌胃 8 d, 模型组、COS 干预和阳性对照组仅在第 6 天注射 1 mg/kg AFB₁。以大鼠血清肝功能指标、脂质过氧化物含量、抗氧化酶活性以及肝脏组织切片, 评价 COS 对肝损伤的干预效果, 并利用 RNA 测序 (RNA-Seq) 技术获得差异表达基因 (Differentially expressed genes, DEGs) 以分析 COS 干预方式。结果表明: 与模型组相比, COS 干预组显著降低了血清肝功能指标和脂质过氧化物含量, 提高了抗氧化酶活性; 肝脏切片观察显示 COS 有利于改善大鼠肝脏形态; RNA-Seq 数据表明, COS 干预组和模型组比较共有 968 个 DEGs, 富集的基因本体 (Gene ontology, GO) 条目主要与肝脏代谢功能、氧化应激反应和蛋白质合成相关。综上, COS 对 AFB₁ 引起的急性肝损伤具有一定的干预作用, 为 COS 用于预防 AFB₁ 诱导的肝损伤提供理论参考依据。

关键词: 壳寡糖; 黄曲霉毒素 B₁; 肝损伤; 抗氧化; RNA 测序

中图分类号: R 575 **文献标志码:** A

黄曲霉毒素 B₁ (Aflatoxin B₁, AFB₁) 由黄曲霉和寄生曲霉产生, 广泛存在于谷物和粮油制品中^[1]。AFB₁ 在 P450 酶系统的活化下, 形成具有致癌性的 AFB₁-8,9-环氧化物 (AFBO)^[2], 并产生大量活性氧 (Reactive oxygen species, ROS), 导致机体肝脏氧化损伤、DNA 损伤和蛋白质羧基化^[3-4]。目前去除 AFB₁ 的方法多从原料中进行, 常用方式包括物理法、化学法与生物法等, 但存在食物营养价值降低、易残留和效率低等缺点^[5-7]。而营养干预法是近年来从体内降低 AFB₁ 毒性的新策略, 主要途径是促进机体解毒与抑制 AFB₁ 代谢^[8-9]。干预物质多为合成化合物或天然化合物, 后者具有安全无毒的优势, 且有良好的生物相容性^[8], 因此, 利用天然化合物干预由 AFB₁ 导致的肝损伤已成为研究热点。

壳寡糖 (Chitosan oligosaccharide, COS) 是天然多糖甲壳素的低聚物, 水溶性强、黏度低并易于被胃肠道吸收。更重要的是, COS 具有抗氧化、抗肿

瘤和降“三高”等生物特性。在高脂饮食小鼠模型中 COS 被证实可提高机体的抗氧化酶活性^[10], 也有从体外探究 COS 对 AFB₁ 损伤肝细胞的干预效果^[11], 发现 COS 通过提高细胞的抗氧化能力降低 AFB₁ 的毒性作用, 但在动物体内利用 COS 干预 AFB₁ 诱导肝损伤的研究及干预方式鲜有报道。

RNA 测序 (RNA-Seq) 是目前研究基因表达情况的较好方法, 它能在短时间内获得极多的样本基因且灵敏度较高^[12-14]。该方法既能显示单个基因表达量差异, 还可与数据库联合分析基因功能^[12]。本研究通过建立 AFB₁ 诱导大鼠急性肝损伤模型, 评估 COS 的干预效果并基于 RNA-Seq 技术探索其干预方式。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

SPF 级雄性 Wistar 大鼠 40 只, 180~200 g, 购

收稿日期: 2023-03-07 修回日期: 2023-08-07

基金项目: 国家自然科学基金 (31972188); 上海市优秀学术带头人计划 (21XD1401200)

作者简介: 陈琳 (1998—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品安全的风险评估。E-mail: ccenln@163.com

通信作者: 欧杰, E-mail: jou@shou.edu.cn

版权所有 ©《上海海洋大学学报》编辑部 (CC BY-NC-ND 4.0)

Copyright © Editorial Office of Journal of Shanghai Ocean University (CC BY-NC-ND 4.0)

<http://www.shhydx.com>

自上海斯莱克实验动物有限责任公司,饲养温度22~24℃,湿度50%~55%,昼夜交替。所有大鼠均饲养于上海中医药大学动物实验中心,严格按照大鼠饲养标准管理。动物实验伦理编号为PZSHUTCW210115014。

AFB₁(纯度≥99.9%),购自上海吉至科技;COS(MW≤1.5 ku),购自山东卫康生物;水飞蓟素(Silymarin, SIL),购自天士力制药;2,2-二苯基-1-苦基肼基(DPPH)检测试剂盒、谷丙转氨酶(Glutamic pyruvic transaminase, ALT)检测试剂盒、谷草转氨酶(Glutamic oxaloacetic transaminase, AST)检测试剂盒、碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase, ALP)检测试剂盒、丙二醛(Malondialdehyde, MDA)检测试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶(Glutathione peroxidase, GSH-Px)检测试剂盒、超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)检测试剂盒,购自北京索莱宝;MagZol Reagent 试剂盒, VAHTS® Universal V8 RNA-seq Library Prep Kit,购自南京诺唯赞生物。

1.2 仪器与设备

ADVIA 2120i 自动生化分析仪,日立(中国)有限公司;Tissuelyser-192 全自动样品快速研磨仪,上海净信科技有限公司;UV1102 紫外可见分光光度计,上海天美生化仪器设备工程有限公司;CT14RD 低温高速离心机,上海天美生化仪器设备工程有限公司;SYNERGY2 多功能酶标仪,美国伯腾仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 动物分组及处理

大鼠适应性饲养7 d后随机分成5组(每组8只)。空白对照组(CK组)正常饲养;壳寡糖对照组(COS组)、壳寡糖干预组(ICOS组),COS 600 mg/kg 灌胃;模型组(AFB₁组)生理盐水灌胃;阳性药物对照组(ISIL组)SIL 100 mg/kg 灌胃。实验周期8 d,其中AFB₁、ICOS和ISIL组在第6天腹腔注射1 mg/kg AFB₁。AFB₁的剂量选择基于YAN等^[15]的研究,根据预实验结果选用COS的剂量为600 mg/kg进行干预,阳性药物选择及使用剂量参考崔燕^[9]的研究。

造模48 h后注射10%的水合氯醛(3.5 mL/kg)麻醉大鼠,腹腔主动脉取血,离心(4 000 r/min, 4℃)15 min制备血清。取大鼠肝脏组织,生理盐水清洗后吸干称重。取肝小叶于4%多聚甲

醛中固定后进行组织病理学检测,余下肝组织-80℃保存。

1.3.2 COS抗氧化活性检测(DPPH法)

参考LIU等^[16]的方法检测COS的DPPH自由基清除力。将COS配制成不同质量浓度的溶液,再按照DPPH试剂盒说明书进行操作。维生素C(Vitamin C, Vc)为阳性对照,在515 nm处测定吸光度,将提取液作为空白对照。DPPH自由基清除率计算公式:

$$w_{\text{DPPH}} = (1 - A_{\text{测定}}/A_{\text{空白}}) \times 100\% \quad (1)$$

式中: w_{DPPH} 为自由基清除率,%; $A_{\text{测定}}$ 为样品组的吸光度; $A_{\text{空白}}$ 为空白组的吸光度。

1.3.3 肝组织病理学检测(H. E染色)

肝脏组织在多聚甲醛中充分固定后,通过浸蜡、包埋、切片和染色等一系列步骤后,用光学显微镜采集图像,分析肝脏病理变化。

1.3.4 血清肝功能指标测定

取适量离心后收集的血清,利用ADVIA 2120i 自动生化分析仪检测ALT、AST和ALP活性。

1.3.5 肝组织脂质过氧化产物含量和抗氧化酶活性的测定

称取一定量的肝脏组织,用无菌生理盐水制备10%肝组织匀浆液,5 000 r/min离心5 min后,取上清液按照试剂盒说明书检测各组大鼠肝脏中MDA含量,SOD和GSH-Px活性。

1.3.6 RNA-Seq

利用RNA提取试剂盒提取肝脏总RNA,测序过程由金唯智公司完成。获得测序数据后,用基因本体(Gene ontology, GO)数据库分析基因功能。

1.4 数据处理与分析

所有实验数据采用GraphPad Prism 8软件进行绘图,应用Excel和SPSS 25.0软件进行ANOVA分析和Duncan's检验,结果采用平均值±标准差(Mean±SD)表示。 $P < 0.05$ 被认为具有显著性差异统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 体外检测COS的抗氧化活性

DPPH法是体外判断抗氧化性的常用方法之一^[17]。如图1所示,以Vc作为对照,随着COS浓度升高清除能力增强,当质量浓度为1.2 mg/mL时,清除率达到96%,表明COS具有较好的抗氧化能力。

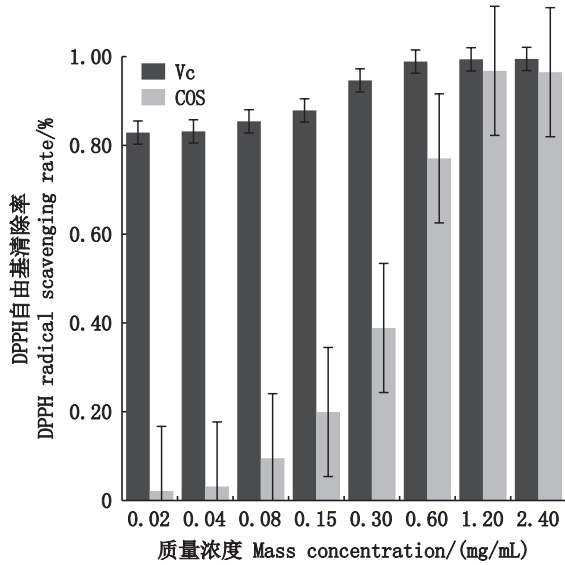


图1 COS和Vc对DPPH自由基的清除能力(n=3)
Fig. 1 Scavenging abilities of COS and Vc on DPPH free radical (n=3)

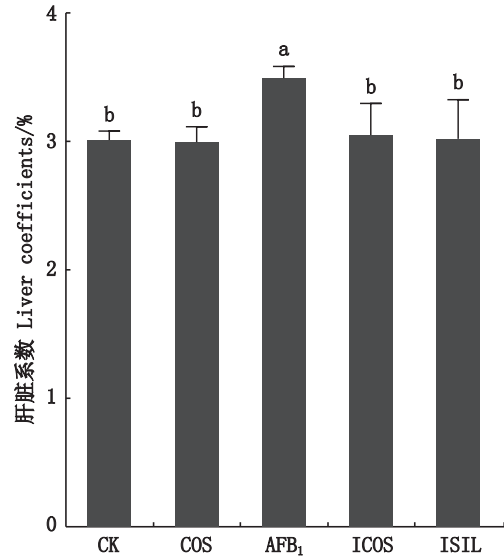
2.2 大鼠体质量和肝脏系数的变化

如表1所示,实验过程中,CK和COS组大鼠体质量正常增长,其余3组体质量均降低,与前期研究^[18-19]结果相似。与AFB₁组比较,ICOS和ISIL组大鼠体质量降低量减少,故干预组在一定程度上缓解了AFB₁对大鼠代谢能力的影响。由表1可知:AFB₁会导致大鼠摄食量减少,代谢能力下降,不能充分吸收营养物质,但经COS的干预能有效改善AFB₁引起的大鼠食欲减退。

表1 COS对大鼠体重的影响
Tab. 1 Effect of COS on body weight in rats

组别 Groups	剂量 Dose/ (mg/kg)	体质量平均增长量 Average body mass gain/(g/d)	
		造模前 Before modeling (6 d)	
		造模前 Before modeling (6 d)	造模后 After modeling (2 d)
CK	0	3.81 ± 0.33	4.22 ± 1.67
COS	600	3.42 ± 0.24	4.08 ± 1.16
AFB ₁	1	5.29 ± 0.36	-4.75 ± 0.90
ICOS	600	4.74 ± 0.12	-1.48 ± 0.29
ISIL	100	5.83 ± 1.09	-1.23 ± 0.51

脏器系数是反映动物生物学特性的主要指标之一^[20-21]。如图2所示,与CK组比较,COS组肝脏系数无显著性差异(P>0.05);AFB₁组肝脏系数显著升高(P<0.05)。与AFB₁组相比,ICOS和ISIL组肝脏系数显著降低(P<0.05),并恢复到正常水平。该结果表明COS在一定程度上能够缓解AFB₁引起的肝脏系数异常变化。



同一指标字母不同为存在显著性差异,P<0.05。
Different letters in each testing parameter represent statistical significance among groups, P<0.05.
图2 COS对AFB₁诱导大鼠肝脏系数异常变化的影响
Fig. 2 Effects of COS on abnormal changes of rat liver coefficients induced by AFB₁

2.3 大鼠肝脏组织病理学变化

为了直观了解COS对AFB₁急性暴露的干预作用,本文采用苏木素-伊红(Hematoxylin-eosin, H.E)染色法检测大鼠肝脏组织病理学变化。具有代表性的病理切片结果显示(图3),CK和COS组大鼠的肝组织结构完整,肝小叶清晰且大小均匀;AFB₁组肝组织结构不完整,细胞有条索状坏死,并伴有炎细胞浸润现象,导致肝细胞肿胀;对比AFB₁组,ICOS和ISIL组可见肝细胞点状坏死现象有不同程度的减少,同时仅出现较轻炎细胞浸润现象。该结果与肝脏系数变化相似,说明了ICOS组能够减轻大鼠经AFB₁诱导而引起的肝脏细胞肿大,降低肝脏的脏器指数,并且COS在一定程度上改善了AFB₁诱导大鼠肝脏损伤的影响。

2.4 大鼠肝功能指标的检测

通常通过指标转氨酶ALT和AST活性来判断肝细胞是否受到损伤^[22]。血清中ALT和AST升高分别反映肝细胞膜和细胞器受损^[23],而ALP值则与肝脏胆道功能是否异常相关^[24-25]。图4显示,与CK组相比,COS组ALT、AST和ALP无显著性变化(P>0.05),而AFB₁组的相关指标均极显著升高(P<0.01),分别升高了17.43,3.09和0.98倍。与AFB₁组相比,ICOS和ISIL组肝功能指标显著降低(P<0.01),但除ISIL组ALP值与CK组相比

无显著性差异外,其余仍显著高于CK组($P < 0.05$)。并且与AFB₁组相比,ICOS和ISIL组ALT降低了67%和73%倍,AST降低了57%和62%,

ALP降低了23%和46%倍。综上所述,COS干预可有效抑制AFB₁引起的肝功能指标急剧上升,在一定程度上可以与护肝药SIL相媲美。

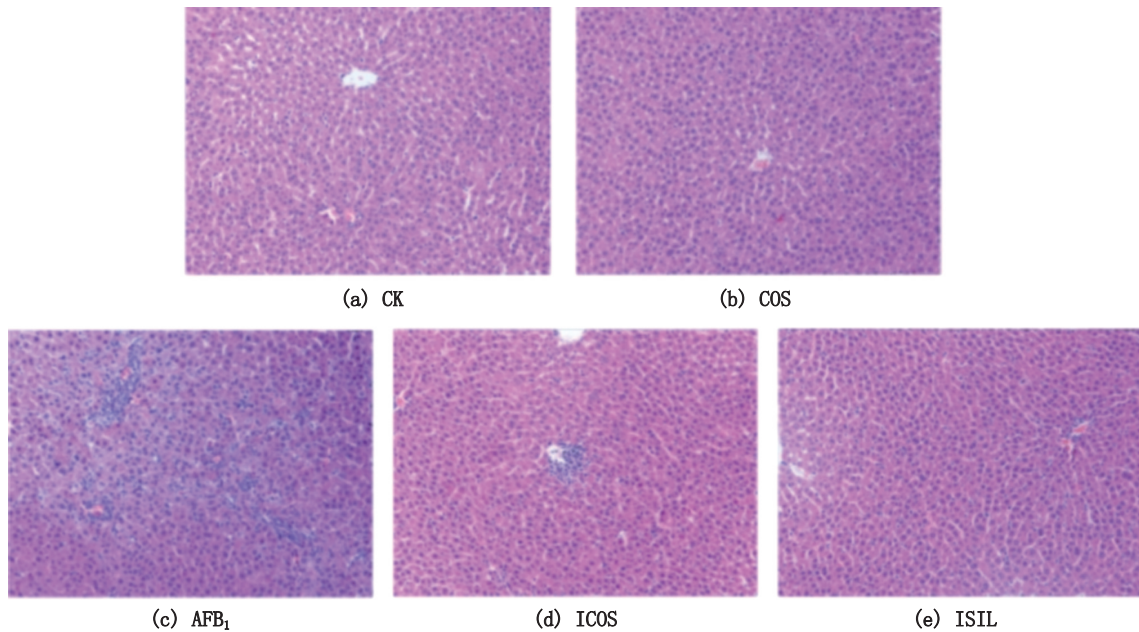
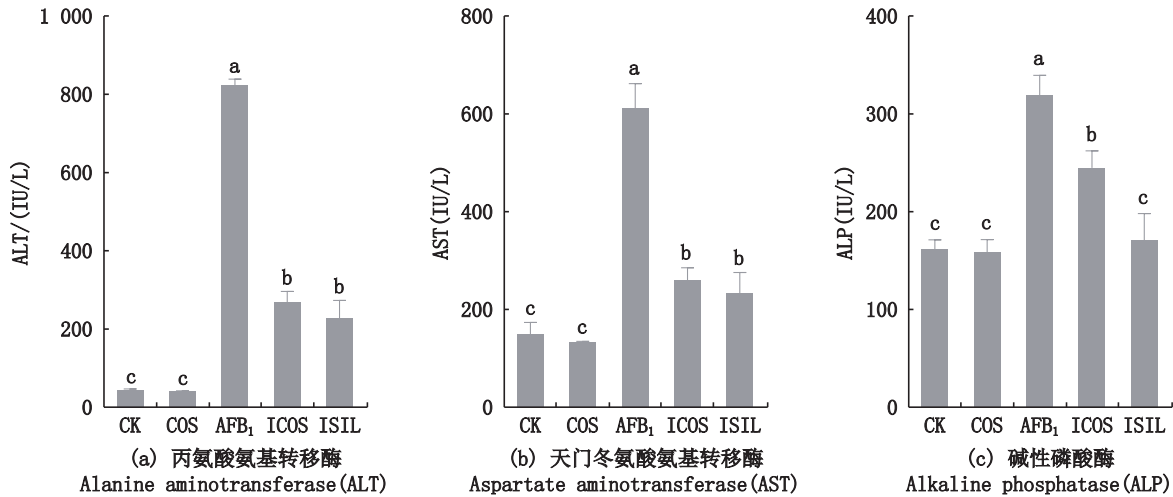


图3 大鼠肝组织病理切片(H. E染色,×200)

Fig. 3 Pathological sections of rat liver tissue (H. E, ×200)



同一指标字母不同为存在显著性差异, $P < 0.05$ 。

Different letters in each testing parameter represent statistical significance among groups, $P < 0.05$.

图4 COS对AFB₁诱导大鼠肝功能指标变化的影响

Fig. 4 Effects of COS on changes of liver function indexes in rats induced by AFB₁

2.5 脂质过氧化物含量和抗氧化酶活性的检测

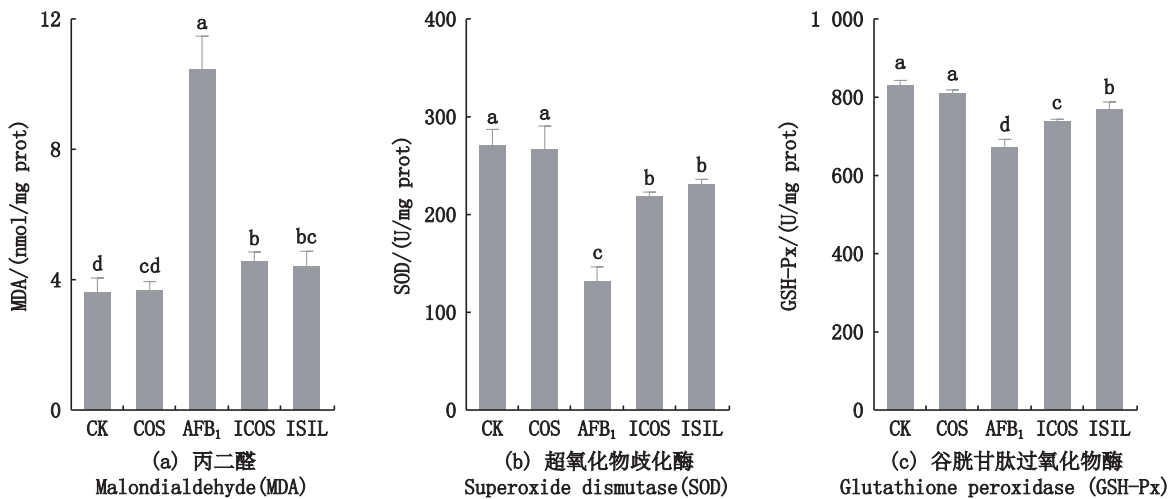
AFB₁可诱导机体产生过量自由基,攻击细胞膜导致脂质过氧化^[26],并能引起氧化应激反应^[24]。通过测定大鼠肝脏的MDA含量可间接反映机体细胞脂质过氧化的受损程度。如图5所示,相比CK组,COS组的MDA含量无显著性差异($P > 0.05$),经AFB₁诱导的大鼠肝脏MDA含量急

剧上升,且上升了1.90倍($P < 0.05$),而COS的干预则有效降低了MDA的含量。结果表明,AFB₁可引起大鼠肝脏的脂质过氧化,造成大鼠肝损,而COS的干预可以缓解AFB₁对大鼠肝细胞脂质过氧化的影响。

大鼠肝组织中SOD和GSH-Px的活性可以直接反映机体抗氧化的能力。图5显示,CK组和

COS组的SOD和GSH-Px活性均无显著性差异($P>0.05$),而AFB₁组的SOD和GSH-Px活性显著性降低($P<0.05$)。与AFB₁组相比,ICOS组中SOD活性升高了0.66倍且与ISIL组相当,GSH-Px

活性也显著恢复到正常水平。但相比CK组,ICOS和ISIL组的SOD和GSH-Px活性仍具有显著性差异($P<0.05$)。综上所述,COS能够显著改善AFB₁导致的肝脏氧化性损伤。



同一指标字母不同为存在显著性差异, $P<0.05$ 。

Different letters in each testing parameter represent statistical significance among groups, $P<0.05$.

图5 COS对AFB₁诱导大鼠肝中MDA含量,和SOD、GSH-Px活性变化的影响

Fig. 5 Effects of COS on MDA content, and SOD, GSH-Px activity changes in AFB₁-induced rat liver

2.6 差异基因表达分析

本研究选用R语言中的DESeq2软件包分析CK和AFB₁组、AFB₁和ICOS组间的差异表达基因(Differentially expressed genes, DEGs)。按照 $FDR\leq 0.05$ 和 $|\log_2FC|\geq 2$ 的标准进行筛选,将筛选出的DEGs绘制成火山图(图6)。AFB₁组与CK组比较共有1 059个基因表达存在显著差异,其中有612个基因上调,447个基因下调;ICOS组与AFB₁组比较共有968个基因表达存在显著差异,其中有413个基因上调,555个基因下调。结合COS对AFB₁引起肝脏表型指标的改善情况,这些显著变化的DEGs表明了,在一定程度上COS对AFB₁引起的大鼠肝脏基因表达具有显著调控作用。

为了进一步了解COS的干预方式,对AFB₁和ICOS组间的DEGs进行GO富集分析。GO条目的功能被分为3大类:分子功能(Molecular function, MF)、细胞组分(Cellular component, CC)和生物学进程(Biological process, BP)。AFB₁-vs-ICOS DEGs显著富集了622条GO条目(BP: 380, MF: 170, CC: 72, $P<0.05$)。分别从MF、CC和BP中选取差异表达基因最显著的前10条GO条目,绘制了GO富集柱状图(图7)。

根据图7可知,在BP分类中,有38个基因显著富集在翻译功能,8个基因富集在葡萄糖代谢过程的积极调控功能,24个基因富集在翻译起始功能和18个基因富集在葡萄糖稳态功能等。说明了COS的干预主要影响了糖类和脂质代谢调节过程,以及RNA翻译的起始过程。肝脏是机体的主要代谢器官,AFB₁的毒性作用对其产生极大影响^[27]。这也与表型指标中COS干预降低AFB₁对大鼠体质量影响有联系。在MF分类中,有48个基因显著富集在核糖体结构成分功能,21个基因富集在血红素结合功能,7个基因富集在胰岛素激活受体活性功能和20个基因富集在铁离子结合功能等。COS的干预主要影响了AFB₁急性毒性对血红素、氧气和铁离子结合反应以及氧气运输活动。DEGs富集在这些条目说明COS可以缓解AFB₁毒性作用使肝脏处于缺氧状态的现象。机体缺氧与AFB₁诱导机体产生大量ROS有关,机体为了适应缺氧环境,会启动无氧酵解途径提供能量,促进红细胞增殖、血管扩张和生成分支血管,这些机体应激反应有可能会引发一系列疾病^[28-29]。在CC分类中,有29个基因显著富集在胞质大核糖体亚基功能,5个基因富集在高铁血红蛋白复合体功能,5个基因富集在血红蛋白复合

体功能和17个基因富集在胞质小核糖体亚基功能等。COS降低了AFB₁对在核糖体、内质网和细胞核上执行功能基因的影响。核糖体、内质网和细胞核是蛋白质合成分泌以及DNA形成的场所。

GO条目的3个分类中,影响最显著的GO条目是翻译(Translation)、核糖体的结构成分(Structural constituent of ribosome)和胞质核糖体(Cytosolic

large ribosomal subunit),表明大鼠肝脏蛋白质翻译、合成分泌以及转运过程都严重受到AFB₁的影响。这与前期研究中AFB₁诱导产生的ROS可导致蛋白质结构功能发生变化的结果相一致^[30-31]。综上所述,ICOS与AFB₁组比较的差异基因GO富集结果说明,COS主要改善了由AFB₁引起的肝脏代谢功能异常,氧化应激反应和蛋白质合成受阻。

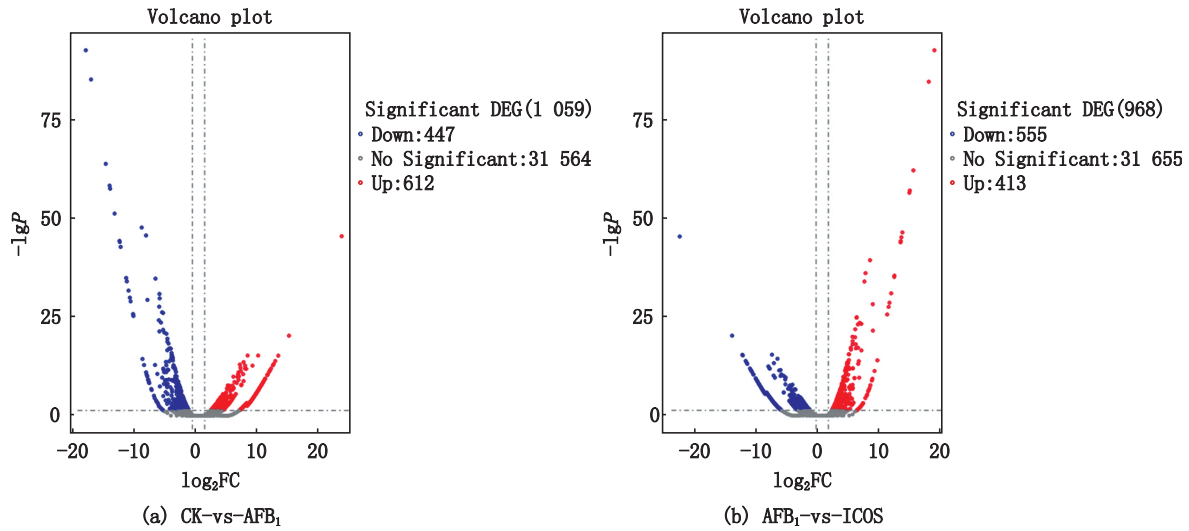


图6 差异表达基因火山图
Fig. 6 Differential expressed gene volcano map

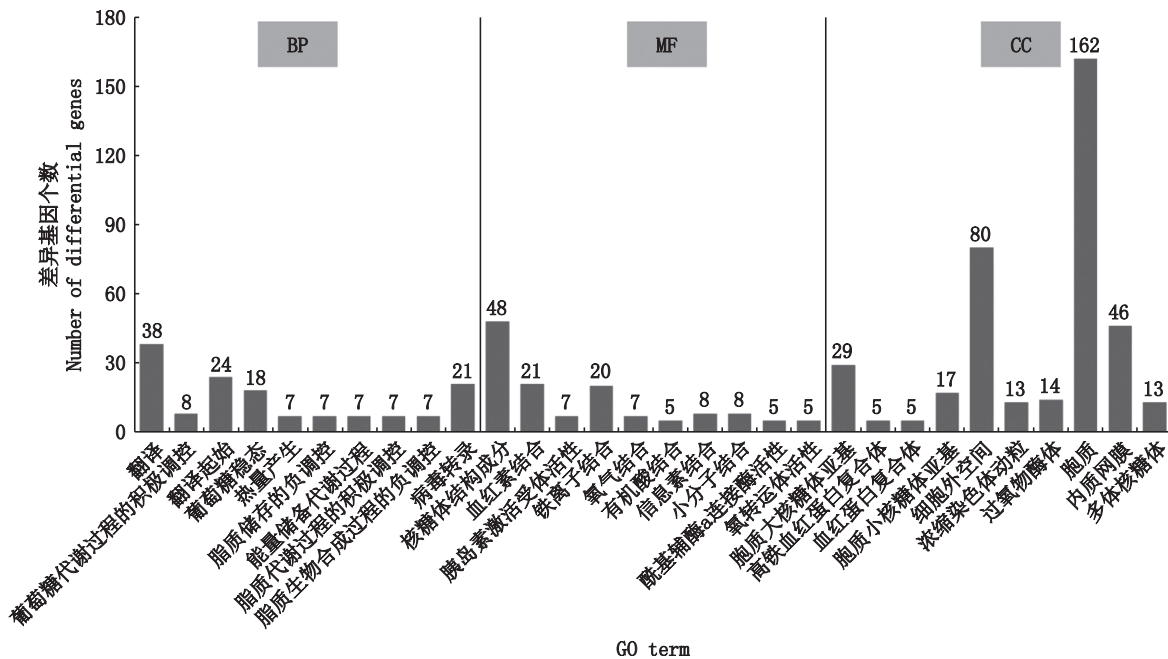


图7 AFB₁-vs-ICOS组GO富集柱状图
Fig. 7 AFB₁-vs-ICOS group GO enrichment histogram

3 结论

本研究在给大鼠腹腔注射1 mg/kg AFB₁后,

发现肝功能指标ALT、AST和ALP活性和脂质过氧化物MDA含量急剧升高;肝脏出现肝细胞大量坏死和炎细胞浸润等现象;抗氧化酶SOD和

GSH-Px 活性降低,该结果表明 1 mg/kg AFB₁ 可导致大鼠肝细胞损伤、胆道堵塞和氧化损伤,与前期研究^[32-33]结果一致。基于该模型本文探究了 COS 对肝损伤的干预效果及干预方式。发现 COS 干预显著改善了 AFB₁ 引起各指标的异常变化,而且 ICOS 组肝脏切片显示仅有少量肝细胞坏死,炎细胞浸润现象也较轻。说明 COS 不仅可以提高机体抗氧化能力,还能降低 AFB₁ 对肝脏形态的影响。进一步的 RNA-Seq 结果显示,ICOS 组和 AFB₁ 组比较的 DEGs 共有 968 个,COS 的干预可显著调控差异表达基因。差异基因富集的 GO 条目主要与糖类和脂质代谢、机体抗氧化应激能力以及蛋白质合成相关,表明 COS 可以降低 AFB₁ 对这些功能相关基因的影响,具体基因功能机制有待进一步研究。另外,本文中设置了 COS 实验组,从各指标和肝脏切片结果可知,COS 对正常大鼠健康无影响。综上所述,COS 可以降低 AFB₁ 急性暴露对肝脏代谢功能、氧化系统防御能力和蛋白质合成的影响,即 COS 能够减轻 AFB₁ 诱导大鼠产生的肝毒性。

参考文献:

- [1] CONTE G, FONTANELLI M, GALLI F, et al. Mycotoxins in feed and food and the role of ozone in their detoxification and degradation: an update [J]. *Toxins*, 2020, 12(8): 486.
- [2] WANG X H, HE Y, TIAN J L, et al. Ferulic acid prevents aflatoxin B₁-induced liver injury in rats via inhibiting cytochrome P450 enzyme, activating Nrf2/GST pathway and regulating mitochondrial pathway [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2021, 224: 112624.
- [3] WOO L L, EGNER P A, BELANGER C L, et al. Aflatoxin B₁-DNA adduct formation and mutagenicity in livers of neonatal male and female B6C3F1 mice [J]. *Toxicological Sciences*, 2011, 122(1): 38-44.
- [4] TESSARI E N C, KOBASHIGAWA E, CARDOSO A L S P, et al. Effects of aflatoxin B₁ and fumonisin B₁ on blood biochemical parameters in broilers [J]. *Toxins*, 2010, 2(4): 453-460.
- [5] RUSTOM I Y S. Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods [J]. *Food Chemistry*, 1997, 59(1): 57-67.
- [6] MARCHESI S, POLO A, ARIANO A, et al. Aflatoxin B₁ and M1: biological properties and their involvement in cancer development [J]. *Toxins*, 2018, 10(6): 214.
- [7] HERZALLAH S, ALSHAWABKEH K, FATAFTAH A A. Aflatoxin decontamination of artificially contaminated feeds by sunlight, γ -radiation, and microwave heating [J]. *Journal of Applied Poultry Research*, 2008, 17(4): 515-521.
- [8] FAN T T, XIE Y L, MA W B. Research progress on the protection and detoxification of phytochemicals against aflatoxin B₁-induced liver toxicity [J]. *Toxicon*, 2021, 195: 58-68.
- [9] 崔燕. 芦荟对黄曲霉毒素 B₁ 致大鼠肝损伤的干预及其作用机制研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2015.
CUI Y. Hepatoprotective activity and mechanism of *Aloe vera* on aflatoxin B₁-induced liver injury in rats [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2015.
- [10] QU D F, HAN J Z. Investigation of the antioxidant activity of chitooligosaccharides on mice with high-fat diet [J]. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 2016, 45(11): 661-666.
- [11] 谢佳雨, 张雯, 杨靖亚, 等. 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 [J]. *上海海洋大学学报*, 2021, 30(6): 1164-1176.
XIE J Y, ZHANG W, YANG J Y, et al. Intervention effect of chitooligosaccharides on aflatoxin B₁-induced toxic damage of rat liver cells [J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2021, 30(6): 1164-1176.
- [12] WANG Z, GERSTEIN M, SNYDER M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics [J]. *Nature Reviews Genetics*, 2009, 10(1): 57-63.
- [13] OZSOLAK F, MILOS P M. RNA sequencing: advances, challenges and opportunities [J]. *Nature Reviews Genetics*, 2011, 12(2): 87-98.
- [14] XUAN J K, YU Y, QING T, et al. Next-generation sequencing in the clinic: promises and challenges [J]. *Cancer Letters*, 2013, 340(2): 284-295.
- [15] YAN J H, CHEN L, ZHANG L, et al. New insights into the persistent effects of acute exposure to AFB₁ on rat liver [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 911757.
- [16] LIU C, CUI Y, PI F W, et al. Torularhodin ameliorates oxidative activity in vitro and D-Galactose-induced liver injury via the Nrf2/HO-1 signaling pathway in vivo [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(36): 10059-10068.
- [17] 陈孝云. 佛手多糖的提取纯化及其对酒精性肝细胞损伤保护作用研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2018.
CHEN X Y. Extraction and purification of polysaccharides from finger citron and their hepatoprotective effect on alcohol induced hepatocyte injury [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2018.
- [18] RASTOGI R, SRIVASTAVA A K, RASTOGI A K. Biochemical changes induced in liver and serum of aflatoxin B₁-treated male wistar rats: preventive effect of picroliv [J]. *Pharmacology & Toxicology*, 2001, 88(2): 53-58.

- [19] KNIPSTEIN B, HUANG J S, BARR E, et al. Dietary aflatoxin-induced stunting in a novel rat model: evidence for toxin-induced liver injury and hepatic growth hormone resistance [J]. *Pediatric Research*, 2015, 78(2): 120-127.
- [20] 赵静芳. EGCG对AFB₁致大鼠急性肝损伤的干预作用及其机制研究[D]. 南宁: 广西医科大学, 2018.
ZHAO J F. The effects of EGCG on AFB₁ induced liver acute injury in rats [D]. Nanning: Guangxi Medical University, 2018.
- [21] RAWAL S, KIM J E, COULOMBE R JR. Aflatoxin B₁ in poultry: toxicology, metabolism and prevention [J]. *Research in Veterinary Science*, 2010, 89(3): 325-331.
- [22] 王晶. 血清ALT、AST和GGT水平检测在肝脏疾病诊断中的应用分析[J]. *医药论坛杂志*, 2018, 39(10): 176-177.
WANG J. Application analysis of serum ALT, AST and GGT levels in the diagnosis of liver diseases [J]. *Journal of Medical Forum*, 2018, 39(10): 176-177.
- [23] LALA V, GOYAL A, BANSAL P, et al. Liver function tests [M]. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2022.
- [24] 郑海平. 银杏叶提取物对AFB₁致大鼠肝癌抑制作用的研究[D]. 南宁: 广西医科大学, 2012.
ZHENG H P. The inhibition effects of ginkgo biloba extract on aflatoxin B₁-induced hepatocarcinogenesis in wistar rats [D]. Nanning: Guangxi Medical University, 2012.
- [25] 杨晓明, 张琳, 赵家仪, 等. 肝炎肝硬化患者的肝功能指标与相关生化指标的检测意义[J]. *现代医学与健康研究电子杂志*, 2022, 6(1): 109-111.
YANG X M, ZHANG L, ZHAO J Y, et al. Significance of detection of liver function indexes and related biochemical indexes in patients with hepatitis and cirrhosis [J]. *Modern Medicine and Health Research Electronic Journal*, 2022, 6(1): 109-111.
- [26] NAAZ F, ABDIN M Z, JAVED S. Protective effect of esculin against prooxidant aflatoxin B₁-induced nephrotoxicity in mice [J]. *Mycotoxin Research*, 2014, 30(1): 25-32.
- [27] LU X Y, HU B, SHAO L, et al. Integrated analysis of transcriptomics and metabolomics profiles in aflatoxin B₁-induced hepatotoxicity in rat [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2013, 55: 444-455.
- [28] 荣黎, 曾维政, 吴晓玲. 高原缺氧与肝脏损伤[J]. *世界华人消化杂志*, 2009, 17(21): 2171-2178.
RONG N, ZENG W Z, WU X L. High-altitude hypoxia and liver injury [J]. *World Chinese Journal of Digestology*, 2009, 17(21): 2171-2178.
- [29] 陈理达. 非酒精性脂肪性肝病患者中夜间缺氧与肝损伤的相关性[D]. 福州: 福建医科大学, 2014.
CHEN L D. Association between nocturnal hypoxia and liver injury in the setting of nonalcoholic fatty liver disease [D]. Fuzhou: Fujian Medical University, 2014.
- [30] LI Q, QIU J N, YANG H, et al. Kinesin family member 15 promotes cancer stem cell phenotype and malignancy via reactive oxygen species imbalance in hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Letters*, 2020, 482: 112-125.
- [31] MARQUARDT J U, THORGEIRSSON S S. Stem cells in hepatocarcinogenesis: evidence from genomic data [J]. *Seminars in Liver Disease*, 2010, 30(1): 26-34.
- [32] DENG Z J, ZHAO J F, HUANG F, et al. Protective effect of procyanidin B₂ on acute liver injury induced by aflatoxin B₁ in rats [J]. *Biomedical and Environmental Sciences*, 2020, 33(4): 238-247.
- [33] MONMEESIL P, FUNGFUANG W, TULAYAKUL P, et al. The effects of astaxanthin on liver histopathology and expression of superoxide dismutase in rat aflatoxicosis [J]. *Journal of Veterinary Medical Science*, 2019, 81(8): 1162-1172.

Intervention effect of chitosan oligosaccharide on aflatoxin B₁-induced liver injury in rats

CHEN Lin¹, YAN Jiahui¹, ZHANG Zhaohuan^{1,2,3}, ZHAO Yong^{1,2,3}, 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: Aflatoxin B₁ (AFB₁) is widely distributed and highly hepatotoxic, which can cause oxidative damage to human liver. In this study, a rat model of acute liver injury was established by injecting AFB₁ to explore the intervention effect and method of chitosan oligosaccharide (COS) with antioxidant activity on liver injury. The experiment was designed with blank group, COS control group, model group, COS intervention group, and positive control group. Consecutive gavage for 8 days, the model group, COS intervention and positive control group were injected with 1 mg/kg AFB₁ only on the 6th day. The intervention effect of COS on liver injury was evaluated by serum liver function indexes, lipid peroxide content, antioxidant enzyme activity and liver tissue sections in rats, and differentially expressed genes (DEGs) were obtained by RNA sequencing (RNA-Seq) technology to analyse the intervention mode of COS. The results showed that compared with the model group, the COS intervention group significantly decreased the serum liver function indexes and lipid peroxide content, and increased the activity of antioxidant enzymes; the observation of liver slices showed that COS was beneficial to improve the liver morphology of rats. RNA-Seq data showed a total of 968 DEGs in the COS intervention group compared with the model group, and the enriched gene ontology (GO) entries were mainly related to liver metabolic function, oxidative stress response and protein synthesis. In conclusion, COS has a certain intervention effect on AFB₁-induced acute liver injury, which provides a theoretical basis for COS to prevent AFB₁-induced liver injury.

Key words: chitosan oligosaccharide; aflatoxin B₁; liver injury; anti-oxidation; RNA-Seq