

食品中 4 种交链孢毒素对肝脏细胞的联合毒性

于松, 邹连蓬, 赵佳伟, 朱怡平, 薛黎明, 卢大胜
(上海市预防医学研究院 上海 200336)

摘要 交链孢毒素是一类广泛存在的食品污染物,交链孢酚(AOH)、交链孢酚单甲醚(AME)、细交链孢菌酮酸(TeA)、腾毒素(TEN)经常同时出现,然而目前对其联合毒性的评估十分有限。目的:以 BRL-3A 细胞为研究模型,评估常见 4 种交链孢毒素对肝脏细胞的联合毒性。方法:应用 CCK-8 试剂盒检测 10~200 $\mu\text{mol/L}$ 交链孢毒素单独或联合处理 BRL-3A 细胞 24, 48, 72 h 细胞活性的变化。基于组合指数法,分析它们混合暴露后的联合毒性效应。结果:AOH、AME、TeA 和 TEN 单独处理 BRL-3A 细胞后,能够降低细胞存活率,并呈现剂量和时间依赖性,其 IC_{50} 分别为 38.11, 41.25, 49.05, 358.58 $\mu\text{mol/L}$ (48 h)。AOH-AME、AME-TEN 和 TeA-TEN 组合的毒性在 IC_{10} - IC_{90} 水平上都表现出累加或协同效应。AOH-AME-TeA、AME-TeA-TEN 和 AOH-AME-TeA-TEN 组合的毒性在低剂量时具有拮抗效应,在高剂量时具有协同效应,而其它组合与之相反。结论:食品中常见的 4 种交链孢毒素均能不同程度地抑制 BRL-3A 细胞的增殖,具有肝脏细胞毒性,其毒性强度顺序为 $\text{AOH} > \text{AME} > \text{TeA} \gg \text{TEN}$ 。当它们同时出现时,其毒性作用可能为协同效应,提示今后应重点关注毒素的联合毒性风险,以更精准地评估其安全风险。

关键词 交链孢毒素; 肝脏毒性; 联合毒性; 组合指数法; 风险评估

文章编号 1009-7848(2024)04-0099-09 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2024.04.010

交链孢毒素是由交链孢霉产生的一类次生代谢产物,主要污染谷物、坚果、水果、蔬菜及其制品和水。迄今为止,已经发现 70 余种交链孢毒素,它们具有急性毒性、遗传毒性、内分泌干扰和细胞毒性,对人类健康造成严重威胁^[1]。根据我国国家食品安全风险评估中心和欧洲食品安全局公布的污染监测和暴露评估数据,交链孢酚(AOH)、交链孢酚单甲醚(AME)、细交链孢菌酮酸(TeA)、腾毒素(TEN)是食品中 4 种常见的污染类型(图 1),其暴露风险较高。欧洲食品安全局基于遗传毒性,将 AOH 和 AME 的毒理学关注阈值(TTC)设定为 2.5 ng/kg bw , TeA 和 TEN 的 TTC 值设定为 1 500 ng/kg bw 。然而,目前相关的毒理学数据不足,国内外尚未制定食品中安全限量标准。迫切需要更多的毒理学数据来评估它们对人类的健康风险,以满足国家食品安全限量标准制定的需要^[2]。

迄今为止,大多数已报道的毒性研究都围绕

单一的交链孢毒素开展。然而,食品和环境往往存在着多种交链孢毒素共同污染的现象。在一项对我国安徽省采集的 370 个小麦样本的调查发现,TeA(污染率为 100%,污染浓度中位数为 150 $\mu\text{g/kg}$)是污染小麦的主要交链孢毒素,其次是 TEN(污染率为 77%,污染浓度中位数为 77 $\mu\text{g/kg}$)、AOH(污染率为 47%,污染浓度中位数为 7.9 $\mu\text{g/kg}$)和 AME(污染率为 15%,污染浓度中位数为 4.2 $\mu\text{g/kg}$)^[3]。欧洲市场上,在番茄酱、葵花籽油、面粉等食品中,78%的食品样本受到交链孢毒素的污染,其中番茄酱中的毒素污染水平最高,AOH、AEM、TeA 和 TEN 的污染水平平均值和最高值分别为 6.7, 1.4, 146, 0.6 ng/g 和 20.8, 4.7, 691, 1.2 ng/g ^[4]。我国一项电商销售食品中交链孢毒素污染状况调查报告表明,在采集的 486 份食品中,TeA 的污染率(51.0%)和污染水平(平均浓度为 40.6 $\mu\text{g/kg}$)均为最高,其次为 TEN、AOH 和 AME^[5]。与谷物和番茄相比,枸杞的污染水平更高。Xing 等^[6]发现我国西北地区枸杞中 AOH、AEM、TeA 和 TEN 的最高污染水平分别为 2 607, 1 825, 7 024, 1 964 $\mu\text{g/kg}$,远高于已报道的其它食品。此外,张耀庭等^[7]还发现北京市水源水中存在 TeA 和 TEN 共同污染的现象。

收稿日期: 2023-08-13

基金项目: 上海市卫生健康委员会“卫生健康青年人才计划”项目(2022YQ054);上海市科学技术委员会“扬帆计划”项目(23YF1441900)

第一作者: 于松,男,博士,主管技师

E-mail: yusong@sdc.sh.cn

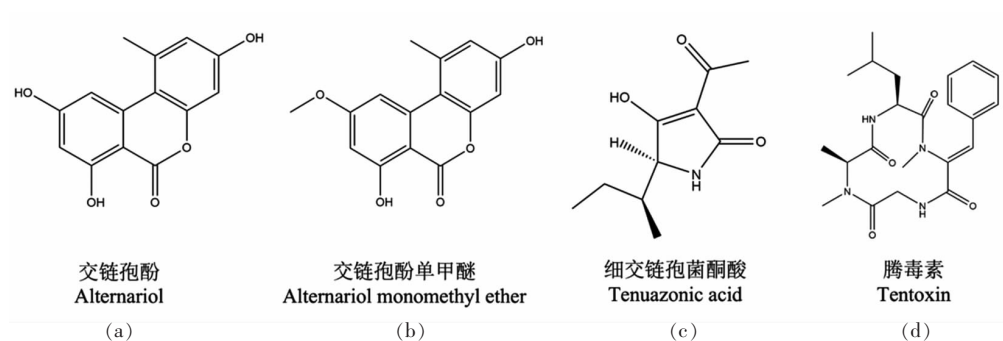


图 1 4种交链孢毒素的化学结构式

Fig.1 Chemical structural formulas of the four alternaria toxins

交链孢毒素不仅在体外有较高的暴露水平,在体内暴露水平也比较高。在一项北京市 2 212 份成人尿液样本中,交链孢毒素水平的调查中发现,超过 98%的样本中至少检测到 1 种交链孢毒素。其中,AME 的检出率最高(96.0%),其次为 TeA (70.5%),并且,AME 每日平均摄入量(12.5 ng/kg bw)是欧洲食品安全局设定的毒理学关注阈值 TTC(2.5 ng/kg bw)的 5 倍,提示与交链孢毒素相关的健康风险较高^[8]。

一些研究发现,当多种毒素同时暴露时,其毒性作用会出现累加、协同和拮抗效应^[9-11]。AOH 和 AME 同时暴露后,在结肠细胞中出现的协同毒性效应已被证实^[12]。因此,对单一毒素开展毒性评估,不能反映其在实际环境中的真实毒性,可能造成毒性被低估。然而,到目前为止,对常见的 4 种交链孢毒素混合物的体外或体内毒性知之甚少,需加强对这些交链孢毒素联合毒性的研究,以达到彻底评估其安全风险的目标,从而制定相关限量标准,保障食品安全和公众健康。

肝脏作为有毒物质蓄积、代谢的场所,容易受到毒素的危害^[13]。基于半数效应方程推导得出的组合指数模型(Combination index, CI),能够不依赖于作用模式定量表征混合物相互作用的大小,具有坚实的理论基础,在污染物联合毒性评估中被广泛应用^[10,14]。为了符合 3R 原则,本研究以大鼠肝脏细胞系(BRL-3A)为体外研究模型,基于污染水平和以往毒理学试验常用剂量,将交链孢毒素(AOH、AME、TeA 和 TEN)暴露剂量设置为 10~200 $\mu\text{mol/L}$ ^[15-16],应用 CCK-8 试剂盒检测不同剂量交链孢毒素单独或混合暴露不同时间(24, 48, 72

h)后的细胞毒性效应。同时,基于组合指数法分析其二元、三元和四元混合暴露后联合毒性类型。

1 材料与方法

1.1 材料及试剂

BRL-3A 肝细胞系,中国科学院细胞库。主要试剂:AOH、AME、TEN,青岛普瑞邦生物工程有限公司;TeA,英国 Abcam;DMEM(Dulbecco's modified Eagle medium)培养基、磷酸盐缓冲液、胰蛋白酶、胎牛血清(FBS)、青霉素-链霉素双抗,美国 Gibco;CCK-8 试剂盒,上海奥源生物科技有限公司。主要耗材:96 孔板、离心管(15 mL 和 50 mL)、25 cm^2 培养瓶,美国 Corning;细胞计数板,美国 Bio-rad。

1.2 主要仪器与设备

细胞计数仪,美国 Bio-rad 公司;酶标仪,瑞士 Tecan 公司; CO_2 培养箱,美国 Thermo Scientific 公司。

1.3 细胞培养

BRL-3A 细胞在含有 10%FBS 和 1%青霉素-链霉素双抗的 DMEM 培养基中,在 37 $^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中培养。当细胞密度达到 70%~80%时,使用 0.25%胰蛋白酶消化 2 min 后,在 1 000 r/min 条件下离心 5 min 后收获细胞,并按照 1:3 体积比例传代。

1.4 细胞活性检测

向 96 孔板的每孔中加入 1×10^4 个处于对数生长期的细胞,在 37 $^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱内培养 24 h 后,将原有培养基更换为 100 μL 含不同剂量(10~200 $\mu\text{mol/L}$)AOH、AME、TeA 和 TEN 的培养

基,继续培养 24,48,72 h 后,将培养基更换为含有 10% CCK-8 试剂的新鲜培养基,显色 2 h 后,用酶标仪检测波长 450 nm 处的吸光度。

1.5 交链孢毒素混合暴露的毒性相互作用效应评价

根据组合指数(CI)等线谱方程,采用常用的联合用药效应评价方法(Chou-Talalay 法)评价交链孢毒素毒性的相互作用类型^[15,17]。一般情况下,该方法能够根据质量作用定律的中效原理和方程,绘制单个和组合毒素的中效曲线,方程如下:

$$falfu = (D/Dm)^m \quad (1)$$

$$\text{或 } D = Dm[fa/(1-fa)]^{1/m} \quad (2)$$

式中, D ——被测毒素剂量值, $\mu\text{mol/L}$; fa —— D 剂量毒素诱导的细胞活性抑制率, $\%$; fu ——细胞活性率($fu = 1-fa$), $\%$; Dm ——中效剂量(如 IC_{50}), $\mu\text{mol/L}$; m ——中效曲线的斜率。由上述 Chou 方程,可以得到一个推导式(3):

$$\lg(falfu) = m\lg(D) - m\lg(Dm) \quad (3)$$

根据这个推导公式(3)绘制中效曲线。Chou 引入的组合指数(CI)值表示 2 种或 2 种以上被测毒素混合物的毒性相互作用类型。具体来说,组合

指数 $CI = 1$ 、 $CI < 1$ 和 $CI > 1$ 分别表现出累加、协同和拮抗作用。 CI 值使用 Compusyn 软件包(ComboSyn Inc., Paramus, NJ, USA)计算。

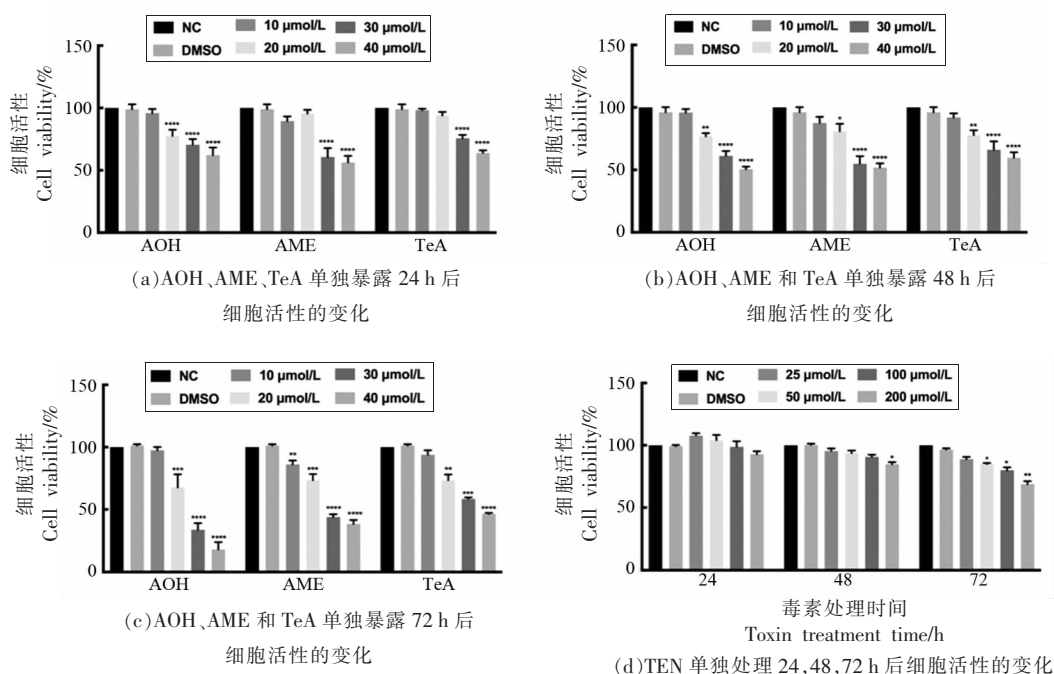
1.6 统计学分析

所有数据均代表 3 次独立试验的“平均值 \pm 标准偏差”。统计分析使用 GraphPad Prism 8 处理。采用 one-way 或 two-way ANOVA 分析组间的差异,当 $P < 0.05$ 时,被认为有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 交链孢毒素单独暴露对 BRL-3A 细胞活性的影响

细胞活性是评价细胞毒性的典型指标。如图 2 所示,BRL-3A 细胞被 AOH、AME、TeA 单独处理后,随着处理剂量(10~40 $\mu\text{mol/L}$)和处理时间(24,48,72 h)的增加,细胞存活率呈下降趋势。当处理剂量超过 20 $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞存活率显著下降,与对照组相比,具有显著差异($P < 0.05$)。然而,在 TEN 单独处理组,当处理 48 h 后,仅 200 $\mu\text{mol/L}$ 组的细胞存活率出现明显下降,与对照组相比,具有显著差异($P < 0.05$)。在处理时间为 48 h



注:*, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$, ***, $P < 0.001$, ****, $P < 0.0001$ 。

图 2 4 种交链孢毒素单独暴露对 BRL-3A 肝脏细胞活性的影响

Fig.2 Effect of individual exposure of the four alternaria toxins on cell viability in BRL-3A cell

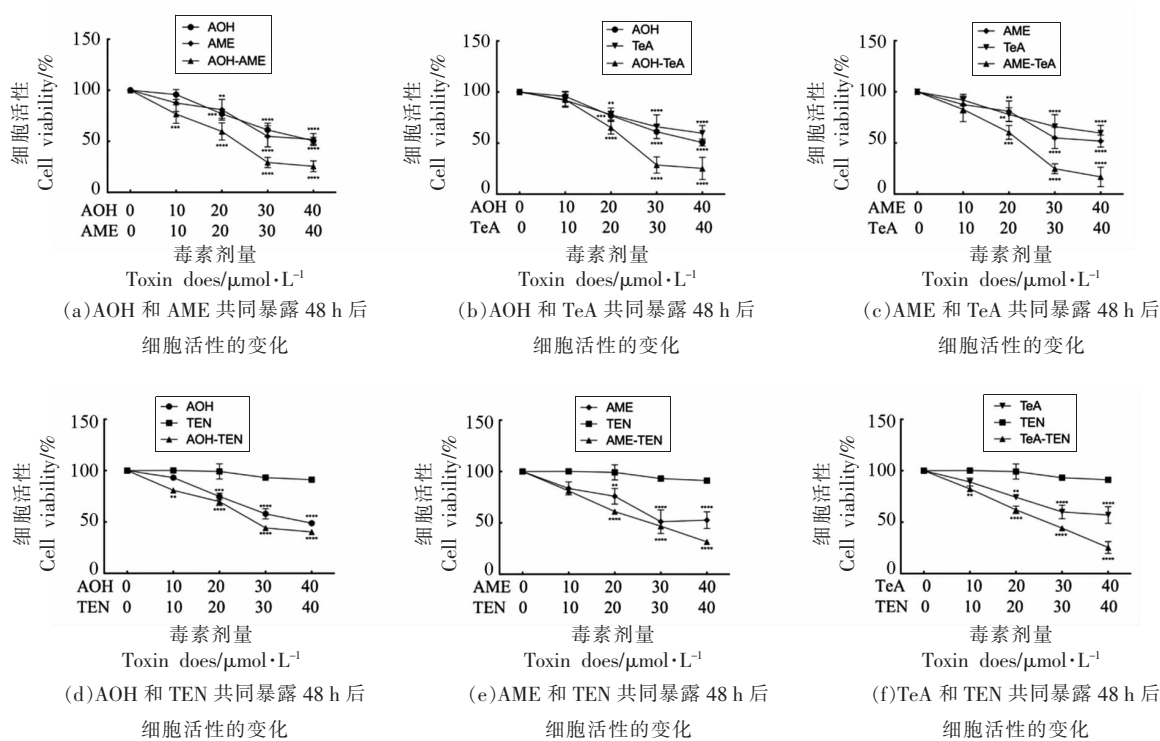
时,AOH、AME、TeA和TEN的 IC_{50} 分别为38.11, 41.25, 49.05, 358.58 $\mu\text{mol/L}$ (表1)。

2.2 交链孢毒素联合暴露对BRL-3A细胞活性的影响

当AOH、AME、TeA和TEN以相同剂量(10~40 $\mu\text{mol/L}$)二元混合暴露48 h后,BRL-3A细胞活性被检测。如图3所示,二元混合暴露后细胞存活率明显下降,并呈剂量依赖效应。并且,在各组中毒素二元混合暴露后的毒性(按 IC_{50} 比较)均大于毒素单独暴露组(表1)。高毒性组合为AME-TeA、AOH-TeA、TEN-TeA。同时,虽然TEN单独暴露时,毒性较低,然而当它以等剂量浓度与其它毒素混合暴露时,能够增强其它毒素的毒性作用,特别是与TeA同时暴露后,TeA的毒性强度被显著增强[49.05 $\mu\text{mol/L}$ (TeA IC_{50})VS 24.38 $\mu\text{mol/L}$ (TeA-TEN IC_{50}), $P < 0.05$]。并且,AOH-AME-TeA($IC_{50} = 17.16 \mu\text{mol/L}$)和AME-TeA-TEN($IC_{50} = 19.87 \mu\text{mol/L}$)等三元组合毒性大于AOH-AME-TeA-TEN($IC_{50} = 23.82 \mu\text{mol/L}$)四元组合毒性。当

40 $\mu\text{mol/L}$ AOH + 40 $\mu\text{mol/L}$ AME + 40 $\mu\text{mol/L}$ TeA同时处理细胞后,细胞活性抑制率达到最高水平,为87.64%(图4)。

毒素混合暴露的毒性相互作用效应主要包括3种不同的效果:协同作用、相加作用和拮抗作用^[15]。本研究应用组合指数法(CI)确定4种常见交链孢毒素联合暴露后的毒性相互作用效应。如表1所示,混合暴露组的 IC_{50} 在17.16~29.64 $\mu\text{mol/L}$ 之间。表2显示了不同细胞毒性水平(IC_{10} ~ IC_{90})的CI值。结果表明,AOH-AME组合在任何水平(IC_{10} ~ IC_{90})几乎都对BRL-3A细胞产生累加的细胞毒性。而AME-TEN组合和TeA-TEN组合在任何水平(IC_{10} ~ IC_{90})几乎都对BRL-3A细胞产生协同的细胞毒性。并且,随着剂量的增加,其协同作用不断增强。此外,AOH-AME-TeA、AME-TeA-TEN和AOH-AME-TeA-TEN组合表现为低浓度时,具有拮抗效应,而在高浓度时,出现协同效应。其它组合则与之相反。



注:**. $P < 0.01$, ***. $P < 0.001$, ****. $P < 0.0001$ 。

图3 4种交链孢毒素二元联合暴露对BRL-3A肝脏细胞活性的影响

Fig.3 Effects of binary combined exposure of four alternaria toxins on cell viability in BRL-3A cell

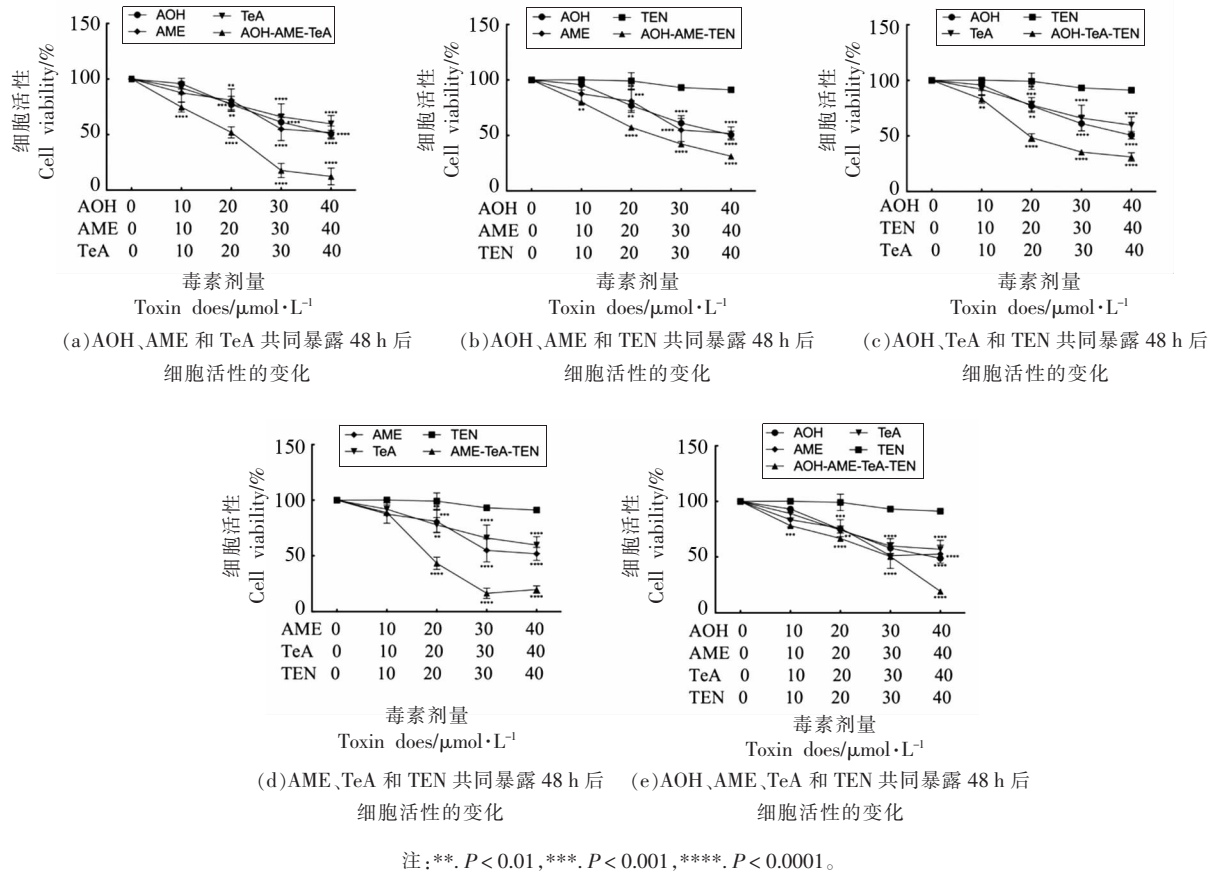


图 4 4 种交链孢毒素三元和四元联合暴露对 BRL-3A 肝脏细胞活性的影响

Fig.4 Effects of ternary and quaternary combined exposure of four alternaria toxins on cell viability in BRL-3A cell

表 1 交链孢毒素诱导 BRL-3A 细胞毒性的剂量-效应关系参数

Table 1 Dose-effect relationship parameters for cytotoxicity by alternaria toxins in BRL-3A cells

毒素名称及联合暴露比例	Dm	m	r
AOH	38.1096	-2.1292	0.9943
AME	41.2590	-1.4738	0.9529
TeA	49.0535	-1.4941	0.9952
TEN	358.5872	-0.6399	0.9941
AOH-AME = 1 : 1	21.0060	-1.7428	0.9746
AOH-TeA = 1 : 1	24.5628	-2.7627	0.9879
AME-TeA = 1 : 1	20.5322	-2.3777	0.9852
AOH-TEN = 1 : 1	29.6477	-1.4126	0.9694
AME-TEN = 1 : 1	26.0330	-1.5716	0.9959
TeA-TEN = 1 : 1	24.3875	-1.8322	0.9896
AOH-AME-TeA = 1 : 1 : 1	17.1631	-2.3008	0.9771
AOH-AME-TEN = 1 : 1 : 1	24.2984	-1.5567	0.9998
AOH-TeA-TEN = 1 : 1 : 1	21.4505	-1.6796	0.9822
AME-TeA-TEN = 1 : 1 : 1	19.8709	-2.5256	0.9764
AOH-AME-TeA-TEN = 1 : 1 : 1 : 1	23.8206	-1.7801	0.9659

注: Dm . 中位效应剂量; m . 中位效应曲线斜率; r . 相关系数。

表 2 交链孢毒素单独和联合暴露对 BRL-3A 细胞毒性的组合指数(CI)和剂量减少指数(DRI)
 Table 2 Combination index (CI) and dose reduction index (DRI) for cytotoxicity of individual alternaria toxins and their mixtures in BRL-3A cells

毒素名称	联合暴露比例	IC ₁₀			IC ₅₀			IC ₇₀			IC ₉₀		
		CI	DRI	DRI	CI	DRI	DRI	CI	DRI	DRI	CI	DRI	DRI
AOH	1:1	1.079	2.281	1.982	1.060	1.814	1.661	1.068	1.661	1.097	1.443		
AME			1.560	1.797		1.964	2.146		2.146		2.472		
AOH	1:1	1.800	1.225	1.416	1.145	1.552	1.700	0.974	1.700	0.764	1.966		
TeA			1.016	1.539		1.997	2.591		2.591		3.924		
AME	1:1	1.600	1.140	1.615	0.916	2.009	2.500	0.739	2.500	0.525	3.542		
TeA			1.383	1.935		2.389	2.950		2.950		4.127		
AOH	1:1	0.619	2.171	1.573	0.980	1.286	1.050	1.174	1.050	1.572	0.761		
TEN			6.316	5.434		4.944	4.499		4.499		3.870		
AME	1:1	0.855	1.444	1.529	0.809	1.585	1.643	0.792	1.643	0.769	1.739		
TEN			6.142	5.822		5.630	5.389		5.389		5.160		
TeA	1:1	0.838	1.533	1.812	0.664	2.011	2.233	0.607	2.233	0.528	2.639		
TEN			5.374	5.756		6.009	6.274		6.274		6.720		
AOH	1:1:1	1.783	2.056	2.156	1.216	2.220	2.287	1.062	2.287	0.869	2.398		
AME			1.407	1.955		2.404	2.956		2.956		4.108		
TeA			1.707	2.343		2.858	3.487		3.487		4.787		
AOH	1:1:1	1.224	2.292	1.816	1.392	1.568	1.355	1.482	1.355	1.659	1.073		
AME			1.568	1.647		1.698	1.751		1.751		1.838		
TEN			6.670	6.270		6.031	5.802		5.802		5.454		
AOH	1:1:1	1.088	2.342	1.976	1.147	1.777	1.597	1.183	1.597	1.260	1.348		
TeA			1.944	2.148		2.287	2.435		2.435		2.690		
TEN			6.814	6.825		6.832	6.839		6.839		6.851		
AME	1:1:1	1.845	1.116	1.634	1.022	2.076	2.638	0.815	2.638	0.568	3.863		
TeA			1.354	1.958		2.469	3.112		3.112		4.501		
TEN			4.746	6.222		7.375	8.742		8.742		11.462		
AOH	1:1:1:1	1.047	1.359	1.734	0.865	1.987	2.182	0.713	2.182	0.646	2.307		
AME			1.340	1.569		1.732	1.912		1.912		2.239		
TeA			1.626	1.88		2.059	2.256		2.256		2.608		
TEN			4.699	4.973		5.152	6.337		6.337		6.642		

剂量减少指数(DRI)是指在达到相同细胞活性抑制率时,所测试的毒素组合剂量与单独毒素剂量的比值,即剂量降低的倍数。如表 2 所示,当混合毒素毒性作用发生协同效应时,DRI 值均大于 1,甚至达到 11.462。随着 DRI 值的升高,协同毒性效应逐渐增强。

3 讨论

食品中真菌毒素的污染对人类健康造成严重威胁^[18],然而目前的毒性评估或风险评估主要围绕单一毒素开展,而忽略了自然界中多种毒素同时出现导致的毒性累加、协同或拮抗效应,这可能会导致毒素的健康风险被低估^[19]。交链孢毒素作为一类常见的真菌毒素,已广泛存在于小麦、坚果、果蔬及其制品中,AOH、AME、TeA 和 TEN 作为常见的污染类型^[20],往往同时出现在食品中,然而,目前对于它们对肝脏细胞联合毒性的研究较少。本研究以 BRL-3A 细胞为体外研究模型,评估 4 种交链孢毒素单独或混合暴露后对肝脏细胞的毒性。细胞活性经常作为评估污染物细胞毒性的关键指标,本研究结果表明,AOH、AME、TeA 和 TEN 单独暴露均能在不同程度降低 BRL-3A 细胞活性,在处理 48 h 后,AOH、AME 和 TeA 的 IC_{50} 分别为 38.11,41.25,49.05 $\mu\text{mol/L}$ 。韩小敏等^[16]发现,AOH、AME 和 TeA 处理人食管上皮细胞 Het-1 A 72 h 后,它们对细胞活性抑制效应的 IC_{50} 分别为 54.31,43.38,121.94 $\mu\text{mol/L}$,这说明它们可能更容易导致肝脏毒性。而 TEN 对细胞的毒性较低,暴露 48 h 后,仅当剂量达到 200 $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞活性抑制率才会出现显著差异,这也与之前的研究结果相似^[21],在处理 48 h 后,TEN 的 IC_{50} 为 358.58 $\mu\text{mol/L}$ 。

在毒素单独暴露毒性评估的基础上,本研究继续探究其联合毒性。虽然之前有部分研究开展了交链孢毒素的联合毒性评估^[22],但评估对象只包括 AOH、AME 和 TeA,由于 TEN 的动物毒性较低而被忽略。本研究结果表明,当 TEN 与 AOH、AME 和 TeA 同时出现时,它能够显著增强这三者的毒性强度。由于 TEN 经常与其它毒素同时出现,因此不能忽略 TEN 的危害,特别是对联合毒性的影响。同时,研究发现在二元混合暴露组中,

AME-TeA 组合的毒性最高,而之前的研究表明在 GES-1 细胞中,AOH-AME 组合的联合毒性最高^[5],这说明不同细胞类型中毒素联合毒性具有差异性。

本研究发现,在任何剂量下,AOH-AME、AME-TEN 和 TeA-TEN 组合的联合毒性均表现出累加或拮抗效应。AOH-TEN 组合在 IC_{10} ~ IC_{50} 水平上也具有协同效应,然而在高浓度时,具有拮抗效应。之前的研究也发现了类似的现象,当脱氧雪腐烯醇家族真菌毒素混合处理 GES-1 时,Yang 等^[14]发现在低浓度下存在协同效应,而在高浓度下存在拮抗效应。桔青霉素和赭曲霉毒素 A 混合处理 V79 细胞后,也观察到类似的结果。然而,AOH-AME-TeA、AME-TeA-TEN 等其它组合则表现出相反的趋势,在低剂量时,出现拮抗效应,随着剂量的升高,出现协同效应。这可能是由于多种毒素同时处理细胞时,单一毒素的吸收、降解、积累和代谢的过程会被改变。因此,不同毒素之间表现出不同的相关作用关系。若在制定管理法规或安全限制标准时,不考虑毒素之间的相互作用,其安全风险可能会被低估或夸大,这两者都可能导致重大的健康风险和大量的经济损失。本研究为今后开展交链孢毒素的健康风险评估提供了一个新视角。未来,将继续探究交链孢毒素联合暴露诱导肝脏毒素的分子机制及毒性干预方法。

参 考 文 献

- [1] 赵凯. 食品中交链孢毒素污染、生物利用及风险评估研究[D]. 北京: 中国疾病预防控制中心, 2015.
ZHAO K. Study on contamination, bioutilization and risk assessment of cyclosporin in food[D]. Beijing: Chinese Center for Disease Control and Prevention, 2015.
- [2] 程树品, 李晓蒙, 王小丹, 等. 交链孢霉毒素的危害评估[J]. 毒理学杂志, 2020, 34(3): 220-227.
CHENG S P, LI X M, WANG X D, et al. Current status of hazard assessment of *Alternaria* toxins[J]. Journal of Toxicology, 2020, 34(3): 220-227.
- [3] XU W J, HAN X M, LI F Q, et al. Natural occurrence of alternaria toxins in the 2015 wheat from Anhui Province, China[J]. Toxins, 2016, 8(11): 308.

- [4] PUNTSCHER H, COBANKOVIC I, MARKO D, et al. Quantitation of free and modified *Alternaria* mycotoxins in European food products by LC-MS/MS[J]. Food Control, 2019, 102: 157-165.
- [5] JI X F, XIAO Y P, JIN C H, et al. *Alternaria* mycotoxins in food commodities marketed through e-commerce stores in China: Occurrence and risk assessment[J]. Food Control, 2022, 140: 109125.
- [6] XING L J, ZOU L J, LUO R F, et al. Determination of five *Alternaria* toxins in wolfberry using modified QuEChERS and ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Food Chemistry, 2020, 311: 125975.
- [7] 张耀庭, 邵兵, 张晶. 饮用水中五种交链孢霉毒素的检测[C]. 厦门: 第三届全国质谱分析学术报告会, 2017.
- ZHANG Y T, SHAO B, ZHANG J. Identification and toxicity evaluation of chlorine disinfection by-products of *Alternaria* toxins in drinking water[C]. Xiamen: The Third National Mass Spectrometry Analysis Academic Report, 2017.
- [8] QIAO X T, LI G, ZHANG J, et al. Urinary analysis reveals high *Alternaria* mycotoxins exposure in the general population from Beijing, China[J]. Journal of Environmental Sciences, 2022, 118: 122-129.
- [9] 王智志. 砷、二氯乙酰胺及铁对 HepG2 细胞的联合毒性效应及其机制研究[D]. 南京: 南京大学, 2020.
- WANG Z Z. Study on the combined toxic effect of arsenic, dichloroacetamide and iron on HepG2 cells and its mechanism[D]. Nanjing: Nanjing University, 2020.
- [10] YU S, JIA B X, LIU N, et al. Evaluation of the individual and combined toxicity of fumonisin mycotoxins in human gastric epithelial cells[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(16): 1-13.
- [11] YANG Y X, YU S, JIA B X, et al. Metabolomic profiling reveals similar cytotoxic effects and protective functions of quercetin during deoxynivalenol- and 15-acetyl deoxynivalenol-induced cell apoptosis [J]. Toxicol In Vitro, 2020, 66: 104838.
- [12] BENSASSI F, GALLERNE C, SHARAF E D O, et al. Combined effects of alternariols mixture on human colon carcinoma cells[J]. Toxicol Mech Methods, 2015, 25(1): 56-62.
- [13] XIA D Y, YANG L, LI Y, et al. Melatonin alleviates ochratoxin A-induced liver inflammation involved intestinal microbiota homeostasis and microbiota-independent manner[J]. Journal of Hazardous Materials, 2021, 413: 125239.
- [14] YANG Y X, YU S, TAN Y L, et al. Individual and combined cytotoxic effects of co-occurring deoxynivalenol family mycotoxins on human gastric epithelial cells[J]. Toxins (Basel), 2017, 9(3): 1-10.
- [15] LIN H K, JIA B X, WU A B. Cytotoxicities of co-occurring alternariol, alternariol monomethyl ether and tenuazonic acid on human gastric epithelial cells [J]. Food Chem Toxicol, 2023, 171: 113524.
- [16] 韩小敏, 韩春卉, 李凤琴. 4种交链孢霉毒素对人食管上皮细胞 Het-1 A 的体外毒性研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2018, 30(1): 1-5.
- HAN X M, HAN C H, LI F Q. Study on the toxicity of four kinds of *Alternaria* toxins on human esophageal epithelial cell Het-1 A *in vitro*[J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2018, 30(1): 1-5.
- [17] YU S, ZOU L P, ZHAO J W, et al. Individual and combined cytotoxic effects of co-occurring fumonisin family mycotoxins on porcine intestinal epithelial cell[J]. Foods, 2023, 12(13): 1-10.
- [18] 施申伟, 李婷, 东为富. 食品抗菌包装研究进展[J]. 塑料包装, 2018, 28(4): 1-8, 41.
- SHI S W, LI T, DONG W F. Research progress of antibacterial packaging for food[J]. Plastic Packaging, 2018, 28(4): 1-8, 41.
- [19] 董燕婕, 范丽霞, 苑学霞, 等. 脱氧雪腐镰刀菌烯醇及其乙酰化衍生物对 Raw264.7 细胞的联合毒性效应研究[J]. 核农学报, 2022, 36(1): 136-142.
- DONG Y J, FAN L X, YUAN X X, et al. Study on the combined toxic effects of deoxynivalenol and its acetylated derivatives on Raw264.7 cells[J]. Journal of Nuclear Agronomy, 2022, 36(1): 136-142.
- [20] 薛华丽, 毕阳, 宗元元, 等. 果蔬及其制品中真菌毒素的污染与检测研究进展[J]. 食品科学, 2016, 37(23): 285-290.
- XUE H L, BING Y, ZONG Y Y, et al. Research progress on contamination and detection of mycotoxins in fruits, vegetables and their products[J]. Food Science, 2016, 37(23): 285-290.
- [21] 程树品, 曾珠, 梁江, 等. 交链孢霉毒素的遗传毒性及其机制研究进展[J]. 卫生研究, 2019, 48(6): 1020-1023.
- CHENG S P, ZENG Z, LIANG J, et al. Research

- progress of genotoxicity and mechanism of crosssporium toxin[J]. Health Research, 2019, 48(6): 1020–1023.
- [22] DEN HOLLANDER D, HOLVOET C, DEMEYERE K, et al. Cytotoxic effects of alternariol, alternariol monomethyl-ether, and tenuazonic acid and their relevant combined mixtures on human enterocytes and hepatocytes[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 1–12.

Combined Toxicity with Four Alternaria Toxins in Food of BRL-3A Cells

Yu Song, Zou Lianpeng, Zhao Jiawei, Zhu Yiping, Xue Liming, Lu Dasheng
(Shanghai Institutes of Preventive Medicine, Shanghai 200336)

Abstract Alternaria toxins are widespread food contaminants, accompanying with alternariol (AOH), alternariol monomethyl ether (AME), tenuazonic acid (TeA), and Tentoxin (TEN). Currently, there is limited assessment on their combined toxicity. Objective: To evaluate the combined toxicity of four common alternaria toxins on liver cells using BRL-3A cells as a research model. Methods: A CCK-8 kit was applied to detect changes in cell viability of BRL-3A cells treated with 10–200 $\mu\text{mol/L}$ alternaria toxin alone or in combination for 24, 48, 72 h. Based on the combination index method, the combined toxicity after their mixed exposure were analyzed. Results: When the BRL-3A cells were treated with AOH, AME, TeA and TEN alone, the cell survival rate was reduced in a dose- and time-dependent manner. Their IC_{50} were 38.11, 41.25, 49.05, 358.58 $\mu\text{mol/L}$ (48 h), respectively. Moreover, the toxicity of AOH-AME, AME-TEN and TeA-TEN combinations all showed additive or synergistic effects at IC_{10} - IC_{90} levels. The toxicity of the AOH-AME-TeA, AME-TeA-TEN and AOH-AME-TeA-TEN combination showed antagonistic effects at low doses and synergistic effects at high doses, while the other combinations showed the opposite results. Conclusion: All four alternaria toxins in food inhibit the proliferation of BRL-3A cells in varying degrees, with toxicity intensity being $\text{AOH} > \text{AME} > \text{TeA} \gg \text{TEN}$. When coexist, a synergistic effect occurs in their toxicity effect, suggests that we need to focus on the combined toxicity risk of toxins in order to assess their safety risk more accurately in the future.

Keywords alternaria toxin; hepatotoxicity; combined toxicity; combination index; risk assessment