

张曼, 王坤丽, 王艳慧, 等. 猪 β -防御素-2 在黄曲霉毒素 B1 致小鼠肠道炎症损伤中的作用 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (7): 36-43.

ZHANG M, WANG K L, WANG Y H, et al. Effect of porcine β -defensin-2 on intestinal inflammatory injury induced by aflatoxins B1 in mice [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (7): 36-43.

猪 β -防御素-2 在黄曲霉毒素 B1 致小鼠肠道炎症损伤中的作用

张曼¹, 王坤丽¹, 王艳慧¹, 李庆豪²,
李明², 边思琦¹, 皇甫和平^{1*}

(1. 河南牧业经济学院动物医药学院, 河南 郑州 450046;

2. 河南农业大学动物医学院, 河南 郑州 450046)

摘要: 旨在探究猪 β -防御素-2 (pBD-2) 在黄曲霉毒素 B1 (AFB1) 致鼠肠道损伤中的作用。本试验以 4 周龄 KM 小鼠为研究对象, 将体重相近的 30 只健康小鼠随机均分为 5 组, 分别为空白对照组 (不做任何处理)、DMSO 组 (1% DMSO 灌胃)、AFB1 组 (0.3 mg/kg AFB1 灌胃)、pBD-2 组 (0.03 mg/kg pBD-2 灌胃) 和 AFB1+pBD-2 组 (0.3 mg/kg AFB1 灌胃 28 d 后再用 0.03 mg/kg pBD-2 灌胃 28 d), 试验持续 56 d, 通过观察小鼠肠道结构的变化以及采用 qPCR 和免疫荧光的方法检测炎症相关因子的表达水平。结果: 与对照组相比, AFB1 组小鼠的平均日增重 (ADG) 和平均日采食量 (ADFI) 均呈现显著下降趋势 ($P < 0.05$), 料重比 (F/G) 降低, 但差异不显著 ($P > 0.05$), 而小鼠饲喂 pBD-2 以后 ADG 和 ADFI 均较 AFB1 组显著增加 ($P < 0.05$); HE 染色结果显示, AFB1 导致小鼠空肠黏膜显著损伤, 并伴有严重的肠壁变薄, 肠绒毛萎缩、稀疏, 肠绒毛高度与隐窝深度之比、相对肠绒毛数量及肠壁厚度均显著降低 ($P < 0.05$), 而使用 pBD-2 处理小鼠损伤模型, 肠道结构可见显著恢复 ($P < 0.05$); qPCR 和免疫荧光染色结果表明, AFB1 处理小鼠可显著上调白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6 (IL-6) 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 的 mRNA 和蛋白表达水平 ($P < 0.05$), 但对白细胞介素-8 (IL-8) 的表达水平出现了下调趋势, 而用 pBD-2 处理小鼠损伤模型后可显著下调炎症因子的表达水平, 说明 pBD-2 对 AFB1 造成的肠黏膜炎症具有缓解作用。本研究结果为 AFB1 中毒的防控及 pBD-2 在畜牧生产中的应用提供了科学依据。

关键词: 猪 β -防御素-2; 黄曲霉毒素 B1; 肠道炎症; 小鼠

中图分类号: S852 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-5130(2024)07-0036-08

Effect of porcine β -defensin-2 on intestinal inflammatory injury induced by aflatoxins B1 in mice

ZHANG Man¹, WANG Kunli¹, WANG Yanhui¹, LI Qinghao²,
LI Ming², BIAN Siqi¹, HUANGFU Heping^{1*}

(1. College of Veterinary Medicine, Henan University of Animal Husbandry and Economy, Zhengzhou 450046, China;

2. College of Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450046, China)

Abstract: The aim of this experiment was to investigate the effect of porcine β -defensin 2 (pBD-2) on intestinal injury induced by Aflatoxin B1 (AFB1) in mice. The experiment took 30 healthy 4-week-old KM mice with similar body weight as the subjects which were randomly divided into 5 groups, including the control group (no treatment), the DMSO group (treated with 1% DMSO), the AFB1 group (with 0.3 mg/kg AFB1), the pBD-2 group (the 0.03 mg/kg pBD-2) and the AFB1+pBD-2 group (with 0.3 mg/kg AFB1 for 28 days followed by 0.03 mg/kg pBD-2 for 28 days). The experiment lasted for 56 days, when the changes in the intestinal structure of the mice were observed and the expression of inflammation-related factors in them were detected by qPCR and immunofluorescence. The results showed that, compared with the control group, the average daily gain (ADG) and the average daily feed intake (ADFI) of the mice in the AFB1 group showed a significant downward trend ($P < 0.05$), and their ratio of feed to gain (F/G) was decreased, but not significantly different from that of the control group, while their ADG and ADFI were significantly increased after feeding with pBD-2, as compared with those of the AFB1 group ($P < 0.05$). The HE staining results showed that AFB1 caused significant injury of jejunum mucosa in the mice, accompanied by

收稿日期: 2024-01-29; 修回日期: 2024-05-10

基金项目: 河南省自然科学基金 (232300421271); 河南省科技攻关项目 (232102111037, 242102310457)

第一作者: 张曼, 女, 博士, 讲师

* 通信作者, 皇甫和平, 博士, 教授, 主要从事动物疾病防治方面的研究, E-mail: hepinghf@163.com。

severe intestinal wall thinning, intestinal villi atrophy and thinning. The ratio of villi height to crypt depth, the relative villi number and intestinal wall thickness in the rodents were significantly reduced by AFB1 ($P < 0.05$), and their intestinal structure was significantly recovered ($P < 0.05$). The results of the qPCR and immunofluorescence staining showed that the AFB1 treated mice significantly up-regulated their mRNA and protein expressions of interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) ($P < 0.05$), but down-regulated the expression of interleukin-8 (IL-8) in them; while the pBD-2 treated mice injured models significantly down-regulated the expression of inflammatory factors in them. The above results indicated that pBD-2 had an alleviating effect on intestinal mucosal inflammation caused by AFB1, which provided scientific basis for the prevention and control of AFB1 poisoning and the application of pBD-2 in livestock production.

Keywords: porcine β -defensin-2; aflatoxin B1; inflammation; mice

黄曲霉毒素 (aflatoxin, AF) 是一类在自然界里天然存在的真菌毒素,是具有双氢呋喃环化学稳定结构的次生代谢产物,由环境中广泛分布的真菌黄曲霉和寄生曲霉产生。在众多亚型衍生物中 AFB1 的毒性最强,其毒性和等量的氰化钾和砒霜相比能高约几十倍^[1],且无安全剂量。这些毒素通过动物饲料或食品进入动物和人体内,会引起动物和人的急性或慢性毒性作用,并且严重损害机体的各种组织^[2-3]。胃肠道作为食物转化和吸收的主要场所,是日粮中真菌侵入后接触到的首要器官,肠上皮细胞作为防御系统能够产生多种细胞因子和趋化因子,这对于肠道细胞免疫反应的募集和激活至关重要^[4]。当肠道接触到某些微生物或受到病原菌污染后,就会造成肠道内黏膜感染,引发肠道炎症因子浸润,导致肠道功能受损。目前,AFB1对肠道毒性的影响已引起人们广泛关注。猪长期摄入被 AFB1 污染的饲料后,毒素进入肠道后约有一半以上在空肠处被吸收,导致小肠绒毛上皮细胞坏死,绒毛形状不规则,肠黏膜出现炎症甚至细胞凋亡,进而破坏肠道屏障功能^[5]。Fouad 等^[6]研究发现,猪长期暴露于低水平的 AFB1 会抑制其生长,损害消化功能,并能通过降低超氧化物歧化酶活性和增加促炎细胞因子,如肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 (IL-1) 和转化生长因子- β (TGF- β) 的产生来破坏肠道屏障。另外,家禽摄入被 AFB1 污染的饲料后会降低繁殖力、孵化率、雏鸡体重、生长速度、产蛋率和肉蛋品质,增加疾病易感性和死亡率^[7]。

抗菌肽作为机体第一道防线的重要组成部分,可保护生物体免受感染并介导免疫反应。防御素是抗菌肽中的一个大家族,它在昆虫、植物、哺乳动物中都广泛表达,具有抵御细菌、真菌、病毒侵袭和免疫调节功能等生物活性,与多种肠道疾病关系密切。猪 β -防御素-2 (porcine beta-defensin-2, pBD-2) 作为猪体内的一种天然化合物,主要在肠道中表达,具有较强的杀菌、抗病毒作用。研究发现,在 Caco-2 细胞中,黏膜上皮细胞间的电阻值以及黏蛋白基因表达量在 pBD-2 的影响下有所增高,表明 pBD-2 可以

降低细胞通透性,对结肠上皮的炎性浸润起到抑制作用^[8]。此外,Han 等^[9]使用硫酸葡聚糖钠对小鼠结肠进行刺激,诱导小鼠结肠细胞产生炎症因子,如白细胞介素-8 (IL-8)、白细胞介素-6 (IL-6)、TNF- α ,然后再用 pBD-2 处理,结果发现能够降低这些炎症因子的基因表达水平和蛋白质翻译水平,表明 pBD-2 可降低 AFB1 引起的小肠上皮细胞 J2 内 IL-8 和 IL-6 等炎性细胞因子的表达水平。然而 pBD-2 是否能够在体内缓解 AFB1 造成的肠道炎症损伤,目前尚不清楚。因此,本试验以小鼠为研究对象,分析 AFB1 诱发肠黏膜损伤后 pBD-2 对小鼠肠道组织结构和炎症因子的影响,为更好地开发利用能够缓解 AFB1 诱发肠黏膜损伤的新型抗霉菌毒素饲料添加剂提供理论依据,同时也为 pBD-2 在畜牧业生产上的开发应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

30 只健康 4 周龄 KM 小鼠,体重 18~20 g。

1.2 主要试剂

二甲基亚砜 (DMSO)、AFB1 (纯度 $\geq 98\%$) 购自 SIGMA 公司; pBD-2 (纯度 $\geq 99\%$) 购自中国武汉百意欣生物技术有限公司; HifairTM II 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR 反转录试剂盒和 Hieff[®] qPCR SYBR Green Master Mix 试剂盒购自上海翌圣生物科技股份有限公司; 10% 的福尔马林缓冲液、苏木精、伊红、二甲苯、丙酮、梯度酒精、中性树胶、兔抗 TNF- α 、兔抗 IL-1 β 、兔抗 IL-6、兔抗 IL-8、兔抗 β -actin 及荧光二抗 CoraLite594-conjugated 山羊抗兔 IgG (H+L) 均购买自 Abcam 公司。

1.3 试验分组及处理

将体重相近的 30 只小鼠随机分为 5 组,每组 6 只,分别为空白对照组 (Control 组,不做任何处理),DMSO 组 (灌胃 1% DMSO),AFB1 组 (0.3 mg/kg AFB1 灌胃),pBD-2 组 (0.03 mg/kg pBD-2 灌胃) 和 AFB1+pBD-2 组 (0.3 mg/kg AFB1 灌胃

28 d 后再用 0.03 mg/kg pBD-2 灌胃 28 d)。在饲养和试验期间,所有小鼠均可自由进食和饮水。饲喂期结束,实施剖杀,立即取出小鼠的空肠组织并进行生理盐水冲洗,分别置于 4%多聚甲醛固定和-80 °C 冰箱冻存。

1.4 生长性能测定

每日清晨对小鼠进行空腹称重,并统计整个试验期间的采食量,计算平均日采食量 (ADFI)、平均日增重 (ADG) 和料重比 (F/G)。

1.5 组织切片制作

组织固定后,用梯度酒精进行脱水,并用透明剂进行透明;用石蜡包埋机进行常规的浸蜡、包埋及浸蜡 3 次;用切片机进行切片,厚度中等,切好之后在恒温箱展片。

1.6 苏木精-伊红 (HE) 染色

用二甲苯 I、二甲苯 II 脱蜡 3 次,各 5 min;梯度酒精 (75%、80%、90%、100%) 脱水 2 min;自来水冲洗 1 min;苏木精染色 10 min,自流水冲洗 10 min;1%盐酸酒精分化 3 s,自流水冲洗 5 min;伊红染色 3 s,自流水冲洗 1 min;脱水、透明、封固,95%、100%乙醇各 2 min;二甲苯 I、二甲苯各 5~10 min;中性树胶封固。

1.7 总 RNA 提取

将组织块放入 1.5 mL EP 管中,加入 0.5~1 mL TRIzol 裂解液 (对于一些较硬的组织建议用液氮磨碎),用研磨棒将组织杵碎至看不见组织块;往上述 EP 管中加入 1/5 TRIzol 的氯仿,剧烈震荡充分混合后,室温静置 10 min,使核酸蛋白复合物完全解离。将离心机提前预冷好,使其温度在 4 °C,然后将 EP

管放入离心机,设置转速 12 000 r/min,离心 15 min;取出 EP 管,用移液器吸取上清液,转移至新的 1.5 mL EP 管中,在每个管内再加入 600 μ L 异丙醇,用移液器进行吹打,使其混匀,然后放在冰上静置 5 min;设置保证离心机温度为 4 °C,转速仍为 12 000 r/min,离心 5 min 后取出,用移液器将上清液弃去,然后在每个 EP 管中加入 70%无 RNA 酶酒精,轻轻吹打清洗沉淀,用移液器重复 2 次;沉淀好后,将 EP 管放入离心机中,4 °C 12 000 r/min 离心 5 min,弃去上清液,然后放置在超净台设置中晾干;向每管中加入 50 μ L 的无酶水进行溶解,供 RNA 浓度测定用。

1.8 逆转录合成 cDNA

首先进行去除残留基因组 DNA 反应,按照如下配方配制反应液 (一):模板 RNA 5 μ L、gDNA digeste 1 μ L、5 \times gDNA digester Buffer 2 μ L、RNase Free ddH₂O 2 μ L,将上述反应液 (一) 用移液枪吹打混匀后,42 °C 孵育 2 min。然后配制反应液 (二):反应液 (一) 10 μ L、2 \times Hifair™ II SuperMix plus 10 μ L。配制好的反应液 (二) 用移液枪轻轻吹打几下,将所有样品放到 PCR 仪器中,PCR 反应程序如下:25 °C 5 min、42 °C 30 min、85 °C 5 min。最后取出 cDNA 进行稀释,得到稀释 5 倍的 cDNA。

1.9 荧光定量 PCR (qPCR) 检测炎症因子的表达

根据 NCBI 中提供的鼠源基因序列设计引物,并由上海生工生物技术有限公司合成,目的基因 IL-1 β 、IL-6、IL-8、TNF- α 和内参基因 β -actin 引物序列如表 1 所示。

表 1 qPCR 引物序列

基因	GenBank 登录号	引物序列 (5'→3')	片段长度/bp
IL-1 β	M86725.1	F: GCCAACGTGCAGTCTATGGAGTG R: GGTGGAGAGCCTTCAGCATGTG	383
IL-6	NM_001252429.1	F: AAATGTCGAGGCCGTGCAGATTAG R: GGGTGGTGGCTTTGTCTGGATTG	86
IL-8	X61151.1	F: ATGCCAGTGCATAAATACGC R: TTGGGAGCCACGGAGAAT	251
TNF- α	JF831365.1	F: GCCTCTTCTCCTCCTCCTGCT R: CGATCGGCTGATGCTGTA	375
β -actin	DQ845171.1	F: AATCCTGCGGCATCCACGAAAC R: CAGCACCGTGTGGCGTAGAG	89

qPCR 反应体系:上游引物 0.2 μ L、下游引物 0.2 μ L、Hieff® qPCR SYBR Green Master Mix (No Rox) 5 μ L、cDNA 2 μ L、RNase Free H₂O 补足至

10 μ L。qPCR 反应程序如下:95 °C 预变性 5 min;95 °C 变性 10 s,60 °C 退火 20 s,72 °C 延伸 20 s,40 个循环,溶解曲线阶段使用仪器默认设置。检测

PCR 反应液中的荧光信号强度, 并采用相对定量计算目的基因 IL-1 β 、IL-6、IL-8、TNF- α 与内参基因 β -actin 的相对表达量。

1.10 免疫荧光染色检测炎症因子的表达水平

将组织切片脱蜡入水后首先在 92~96 $^{\circ}\text{C}$ 温度下进行抗原微波修复 10~15 min, 自然冷却至室温后用正常羊血清 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 60 min; 倾去多余血清后分别滴加兔抗 TNF- α (1:200)、兔抗 IL-1 β (1:200)、兔抗 IL-6 (1:200)、兔抗 IL-8 (1:200) 和兔抗 β -actin (1:500), 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h 或者 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, PBS 冲洗 3 次, 5 min/次; 滴加荧光二抗 CoraLite 594-conjugated 山羊抗兔 IgG (H+L) (1:500), 避光, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 60 min, 0.01 mol/L PBS 冲洗 3 次, 5 min/次, 最后滴加防淬灭封片剂封片, 4 $^{\circ}\text{C}$, 避光保存。取出切片置于荧光显微镜观察拍照, 使用 Image J 软件对 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8 等炎症因子荧光强度进行分析。

1.11 数据统计和分析

光学显微镜下 4 倍、10 倍视野仔细观察各组小鼠的空肠组织形态学变化, 并用 Photoshop 软件测量不同组别空肠的隐窝深度、绒毛高度及肠壁厚度。试验数据处理采用 SPSS 软件 (22.0 版) 单因素方差分析统计模型, 试验数据以“平均值 \pm 标准差”表示, $P < 0.05$ 为差异显著。GraphPad Prism 8 软件绘图。

2 结果

2.1 pBD-2 对 AFB1 中毒小鼠生长性能的影响

由表 2 可知, 与对照组相比, AFB1 组小鼠的 ADG 和 ADFI 均呈现显著下降趋势 ($P < 0.05$), F/G 降低但与对照组差异不显著 ($P > 0.05$), 而小鼠饲喂 pBD-2 以后 ADG 和 ADFI 均较 AFB1 组显著增加 ($P < 0.05$), 说明 pBD-2 能够减轻 AFB1 对小鼠 ADG 和 ADFI 造成的不良影响。

表 2 pBD-2 对 AFB1 中毒小鼠生长性能的影响

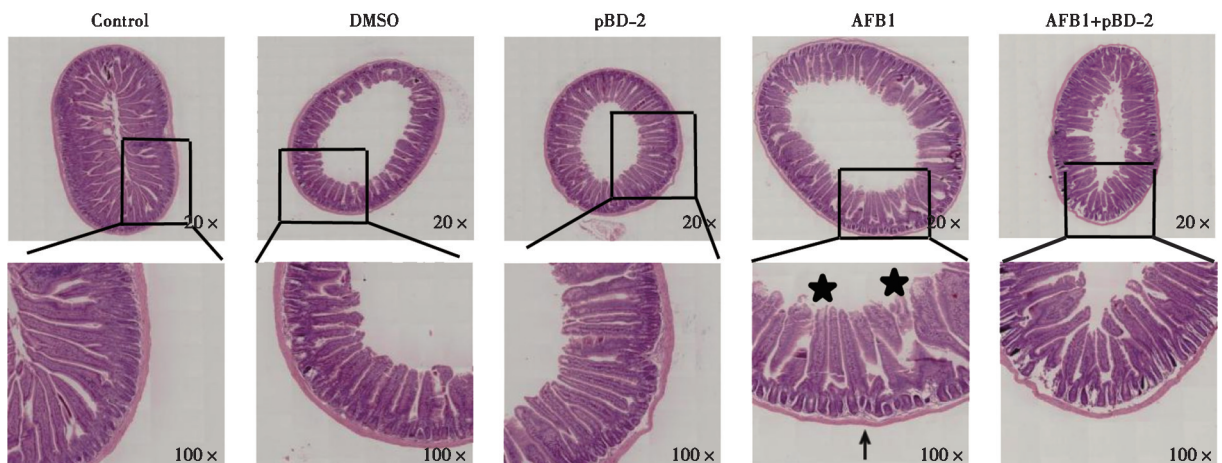
组别	初重/g	末重/g	ADG/g	ADFI/g	F/G
Control	18.90 \pm 0.64	32.40 \pm 4.24	0.96 \pm 0.30 ^{ab}	23.10 \pm 4.27 ^a	0.89 \pm 0.13
DMSO	18.70 \pm 0.52	32.00 \pm 3.12	0.94 \pm 0.20 ^{ab}	22.80 \pm 3.16 ^a	0.85 \pm 0.15
AFB1	17.90 \pm 0.99	28.00 \pm 2.51	0.72 \pm 0.21 ^b	19.70 \pm 2.83 ^b	0.86 \pm 0.16
pBD-2	19.00 \pm 1.41	36.80 \pm 1.50	1.27 \pm 0.15 ^a	25.90 \pm 4.99 ^a	0.91 \pm 0.16
AFB1+pBD-2	18.30 \pm 0.50	33.50 \pm 4.43	1.09 \pm 0.31 ^a	23.20 \pm 5.22 ^a	0.88 \pm 0.17

注: 同列数据肩标相同字母或无字母表示差异不显著 ($P > 0.05$), 不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

2.2 pBD-2 在 AFB1 致小鼠空肠损伤中的作用

HE 染色结果显示, AFB1 组小鼠空肠整体的肠壁变薄, 部分肠绒毛末端出现脱落现象, 且该组空肠

绒毛长度明显变短; pBD-2 处理小鼠损伤模型后肠绒毛得到修复, 染色与空白对照组相近 (图 1)。



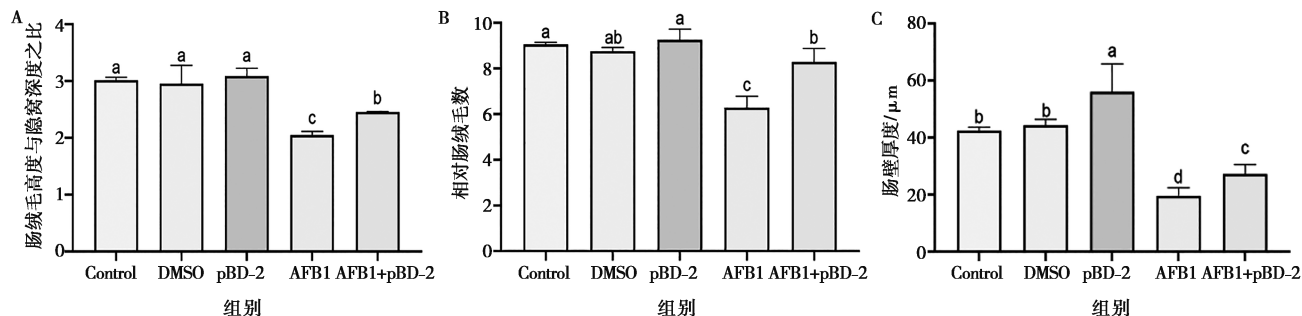
注: \rightarrow 表示肠壁变薄, \star 表示肠绒毛脱落。

图 1 空肠组织 HE 染色结果

2.3 空肠组织 HE 染色分析

统计分析表明, pBD-2 处理小鼠损伤模型后, 绒毛高度与隐窝深度之比 (图 2A) 和肠壁厚度 (图 2C) 相较 AFB1 组明显提升 ($P < 0.05$), 而相对肠绒

毛数 (图 2B) 显著恢复至 DMSO 组水平 ($P > 0.05$), 表明 0.03 mg/kg pBD-2 在很大程度上缓解 AFB1 对小肠黏膜造成的损伤, 恢复肠道结构与功能。



注: 字母相同表示差异不显著 ($P > 0.05$), 不同表示差异显著 ($P < 0.05$)。下同。

图 2 pBD-2 对 AFB1 致小鼠空肠损伤缓解作用

2.4 pBD-2 在 AFB1 致小鼠空肠黏膜炎症反应中的作用

2.4.1 qPCR 检测

为探究 AFB1 对肠黏膜上皮细胞炎症反应的影响及 pBD-2 在其中所发挥的作用, 取各组小鼠空肠组织提取 RNA 进行 qPCR 检测, 分析肠道组织内炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 及 IL-8 的表达水平。结果如图 3 所示, AFB1 组小鼠肠道内 TNF- α 、IL-1 β

和 IL-6 表达水平均有显著升高 ($P < 0.05$), IL-8 的表达水平呈现下调趋势 ($P < 0.05$); 使用 pBD-2 继续处理后, 与 AFB1 组相比, TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 表达水平显著下调 ($P < 0.05$), 而 IL-8 的表达水平显著上调 ($P < 0.05$)。该结果表明, AFB1 可促进肠黏膜上皮细胞炎症反应, pBD-2 可通过调控炎症因子的表达水平以缓解 AFB1 造成的炎症反应。

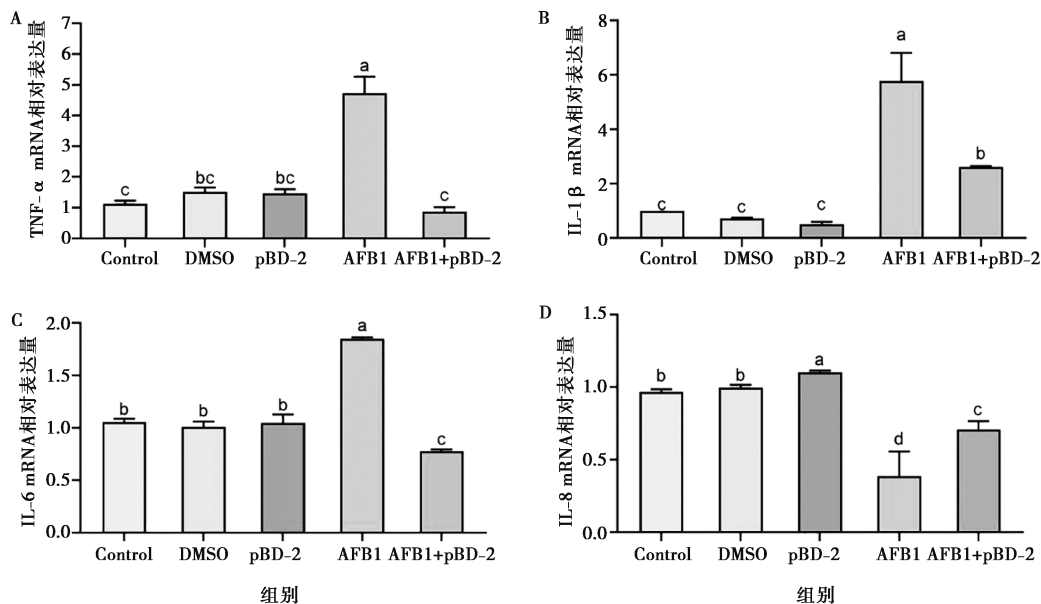


图 3 qPCR 检测 pBD-2 与 AFB1 对小鼠空肠组织中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 IL-8 mRNA 相对表达量的影响

2.4.2 免疫荧光染色

为探究 AFB1 对肠黏膜上皮细胞炎症反应的影响及 pBD-2 在其中所发挥的作用, 取各组小鼠空肠组织制作石蜡切片并进行免疫荧光染色, 分析空肠内炎

性因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 及 IL-8 蛋白表达水平。结果如图 4 所示, 受 AFB1 影响, 小鼠肠黏膜上皮细胞内红色的阳性信号增强, 表明 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6 表达水平均有显著升高 ($P < 0.05$), IL-8 的

表达水平显著降低 ($P < 0.05$)；使用 pBD-2 继续处理后，IL-1 β 表达水平显著降低 ($P < 0.05$)，而 IL-8 的表达水平呈现上升趋势，与空白组相比无显著差异 ($P > 0.05$)。表明 AFB1 可促进肠黏膜上皮细胞炎

症反应，pBD-2 可通过调控炎症因子的表达水平，缓解 AFB1 造成的炎症损伤，但对不同的炎症因子其恢复程度不一。

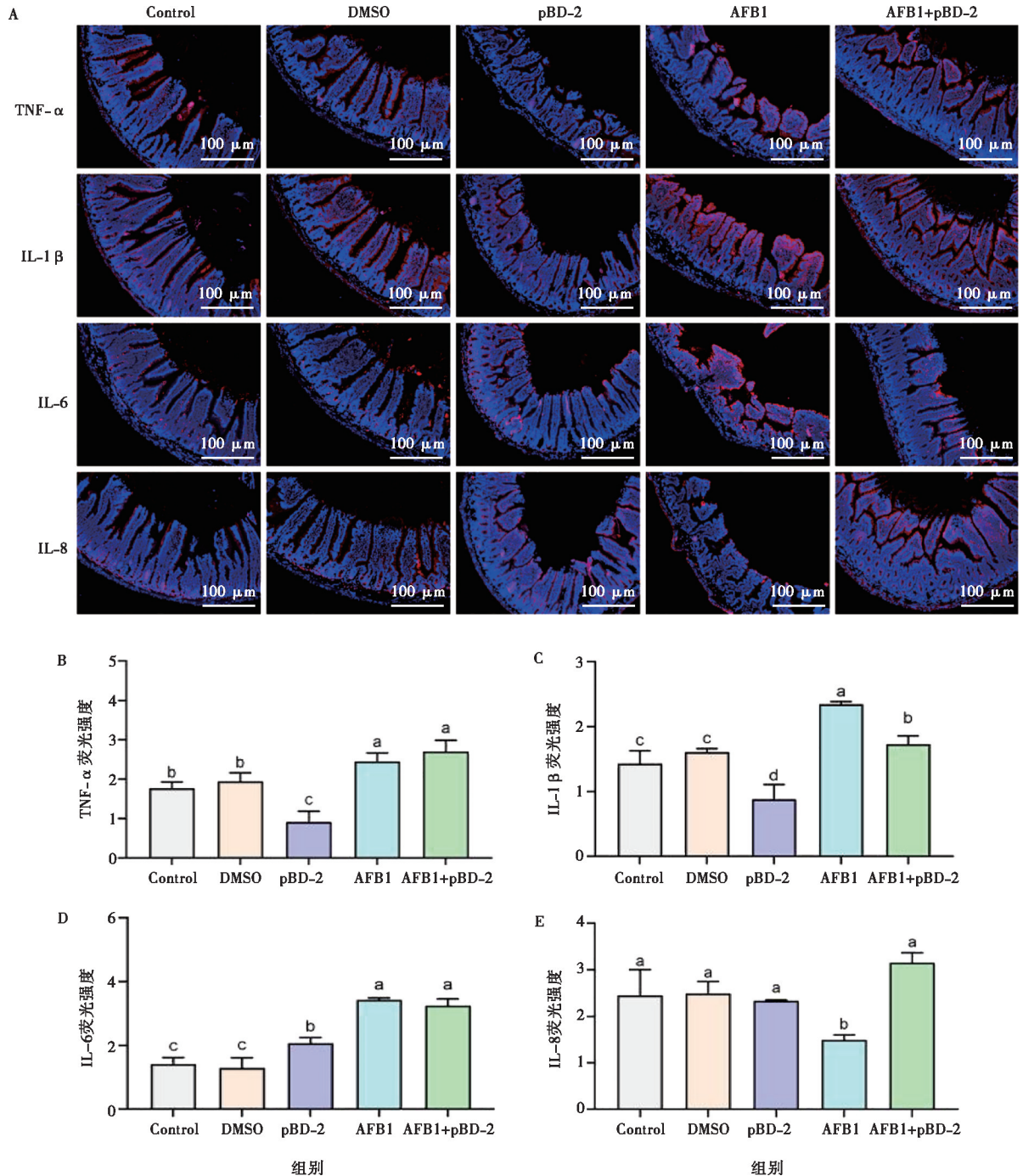


图 4 免疫荧光法检测 pBD-2 与 AFB1 对小鼠空肠组织中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 IL-8 蛋白表达水平的影响

3 讨论

长久以来，饲料中霉菌毒素污染屡见不鲜，且在自然界中分布广泛，尽管人们已经采取了防治措施，但仍无法杜绝此类事件的发生。而胃肠道作为最先接

触 AFB1 的部位，80% 的毒素会从小肠迅速吸收到血液中，然后在肝脏大量转化为代谢物。研究表明，AFB1 饲喂肉鸡后其空肠黏膜分泌型免疫球蛋白 A (SIgA) 含量显著减少，肠绒毛尖端上皮细胞脱落，空肠绒毛高度、绒毛高度/隐窝深度比值降低以及引

起空肠绒毛面积减小,进而影响雏鸡的消化和吸收功能^[10]。此外,有报道显示,肉鸭饲喂高毒素霉变稻米日粮也会导致其增重、料重比和采食量显著降低,这主要与消化道营养物质利用率下降密切相关^[11]。本研究中同样发现 AFB1 能够显著降低小鼠 ADG 和 ADFI,但对 F/G 的降低作用与对照组差异并不显著,这可能与本试验使用的 AFB1 为低剂量有关,长期接触低剂量 AFB1 会导致小鼠慢性中毒症状出现。抗菌肽作为机体第一道防线的重要组成部分,可保护生物体免受感染并介导免疫反应。由于 pBD-2 几乎无耐药性的特点,在日常生产生活中可作为食品保鲜剂和饲料添加剂,这种独特的抗菌机制给生活带来了许多便利^[12]。自从 pBD-2 被发现后,许多研究表明它具有十分重要的抗菌作用,能抵抗细菌、真菌、病毒等多种微生物^[13-14],但其在 AFB1 诱发的肠黏膜损伤中的作用还不明确。

肠黏膜形态可以反映肠道屏障的完整性,常通过绒毛高度和隐窝深度来评价其受损程度^[15]。肠道绒毛和肠道隐窝细胞具有相互促进的作用,有共同维持肠道的吸收功能,而肠道绒毛高度增高可以提高营养物质的消化^[16]。使用 AFB1 处理小鼠,小鼠空肠肠绒毛萎缩,绒毛高度与隐窝深度之比降低,肠绒毛数量显著减少,肠壁的厚度降低,表明 AFB1 严重影响肠黏膜屏障和吸收功能。肠绒毛变短且数量减少即代表肠黏膜上皮细胞与食糜的有效接触面积减少^[17-18],严重阻碍了食物的消化吸收,同时黏膜层变薄也加大了肠黏膜受损的可能。而使用 pBD-2 处理小鼠损伤模型后,肠绒毛高度与隐窝深度之比及肠绒毛数量均显著增高,肠壁厚度显著增加,表明饲料中添加 pBD-2 可显著缓解霉变饲料中的 AFB1 对空肠造成的影响,肠黏膜结构及功能显著恢复,肠道屏障物理结构更加坚固。使用 pBD-2 单独处理小鼠,肠壁厚度显著增加,表明日常饲喂 pBD-2 可增强肠道功能,对肠道健康起到保健作用。

近年来的研究发现,AFB1 暴露可导致炎症损伤,而保加利亚乳杆菌和鼠李糖乳杆菌均可通过调节 NF- κ B 信号通路的活性来拮抗 AFB1 诱导的肝损伤和炎症反应,减少炎症因子的分泌量,从而抑制炎症的发展^[19]。此外,研究者还发现姜黄素可以调节 NLRP3 炎症小体和 Nrf2 信号通路,以减弱 AFB1 诱导的肝脏焦亡损伤和氧化应激以及血清 IL-1 β 和 IL-18 的释放^[20]。本试验结果发现,使用 AFB1 灌胃处理小鼠,其空肠内 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的表达水平均显著升高,表明 AFB1 可对小鼠空肠造成炎症反应,但 IL-8 的表达水平出现了下调趋势。分析可能因为,IL-8 作为关键的促炎性细胞因子,其具有吸

引和激活中性粒细胞、发挥免疫细胞的抗菌作用^[21],而当使用纯度较高的 AFB1 作用时,将直接通过抑制 IL-8 的表达,降低免疫细胞的活性,阻止免疫系统对霉菌感染的干扰。使用 pBD-2 处理小鼠损伤模型,IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α mRNA 表达水平显著下调,而 IL-8 mRNA 及蛋白表达水平呈现了上调趋势,IL-1 β 蛋白表达水平显著恢复,IL-6 蛋白表达水平在 AFB1 影响的基础上继续升高,表明 pBD-2 可显著缓解 AFB1 造成的炎症反应。此外,单独使用 pBD-2 处理小鼠,可见空肠黏膜 TNF- α 和 IL-1 β 蛋白表达水平均显著降低,IL-6 表达水平显著升高,表明 pBD-2 可通过降低炎症因子的表达,同时通过上调在炎症因子家族中处于核心地位的 IL-6 的表达水平以调控 TNF- α 及 IL-1 β 等炎症因子的表达,预防炎症反应的发生。

综上,0.3 mg/kg AFB1 灌胃处理可对小鼠空肠造成显著损伤,诱发炎症反应,使肠绒毛严重萎缩,对肠道屏障及功能造成破坏。0.03 mg/kg pBD-2 的处理可使 AFB1 所致空肠损伤显著恢复,修复肠道功能,增强肠道免疫力,同时对肠道损伤具有一定程度的预防作用。因此,pBD-2 对 AFB1 致肠道损伤的修复效果显著,可显著缓解霉变饲料中 AFB1 对动物健康的影响。

参考文献:

- [1] 乔春雨,刘家和,张博熙,等. 黄曲霉毒素 B1 致病机制及防治研究进展 [J]. 中国畜牧兽医, 2022, 49 (2): 765-775.
- [2] FRANGIAMONE M, CIMBALO A, ALONSO-GARRIDO M, et al. *In vitro* and *in vivo* evaluation of AFB1 and OTA-toxicity through immunofluorescence and flow cytometry techniques: a systematic review [J]. Food Chem Toxicol, 2022, 160: 112798.
- [3] 马浩海,袁正宁,刘静,等. 黄曲霉毒素 B1 对动物危害作用研究 [J]. 中国畜禽种业, 2022, 18 (11): 3-8.
- [4] 郭佳怡,陈洁,何润霞,等. 呕吐毒素和其他 B 型单端孢霉烯族毒素对肠道影响研究进展 [J]. 畜牧与兽医, 2015, 47 (5): 147-150.
- [5] PU J, YUAN Q, YAN H, et al. Effects of chronic exposure to low levels of dietary aflatoxin B1 on growth performance, apparent total tract digestibility and intestinal health in pigs [J]. Animals, 2011, 11: 336.
- [6] FOUAD A M, RUAN D, EL-SENOUSEY H K, et al. Harmful effects and control strategies of aflatoxin B1 produced by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* strains on poultry: review [J]. Toxins (Basel), 2019, 11 (3): 176.
- [7] 胡贵丽. 吸附剂与黄曲霉毒素 B1 对白羽肉鸡生长性能、肠道和免疫功能的影响 [D]. 长沙: 湖南农业大学, 2018.
- [8] 薛现凤. 猪 β -防御素抗菌、抗氧化功能及其对肠上皮细胞黏膜屏障功能的影响 [D]. 杭州: 浙江大学, 2012.
- [9] HAN F F, ZHANG H W, XIA X, et al. Porcine beta-defensin-2

- attenuates inflammation and mucosal lesions in dextran sodium sulfate-induced colitis [J]. *Journal of Immunology*, 2015, 194 (4): 1882-1893.
- [10] 郑志翔. 硒拮抗黄曲霉毒素 B1 对鸡空肠细胞凋亡的死亡受体和内质网信号通路影响的研究 [D]. 成都: 四川农业大学, 2018.
- [11] 王晓琼. 黄曲霉毒素 B1 对番鸭生产性能、脏器病理变化及血清生化指标的影响 [D]. 广州: 华南农业大学, 2018.
- [12] 韩露. 猪 β -defensin-2 基因的定点突变及其初步抑菌活性分析 [D]. 郑州: 河南农业大学, 2011.
- [13] 王安田, 黄靖, 孙瑜凡, 等. 猪 β -防御素-2 对猪源肠外致病性大肠杆菌的体内外抑菌活性研究 [J]. *中国畜牧兽医*, 2021, 48 (2): 726-735.
- [14] 李庆豪, 张曼, 孙娟, 等. 猪 β -防御素-2 在黄曲霉毒素 B1 致仔猪空肠上皮细胞炎症反应中的作用 [J]. *中国兽医学报*, 2022, 42 (3): 558-565.
- [15] 张胜强. 黄曲霉毒素 B1 对雏鸡空肠黏膜细胞增殖与凋亡的影响及亚硒酸钠对其作用的研究 [D]. 成都: 四川农业大学, 2015.
- [16] 匡雁玲, 万志成, 李佩, 等. 葡聚糖硫酸钠诱导小鼠空肠损伤及肠上皮细胞组成变化的研究 [J]. *中国畜牧杂志*, 2022, 58 (6): 261-265.
- [17] LI H, CHENG J, YUAN Y, et al. Age-related intestinal monosaccharides transporters expression and villus surface area increase in broiler and layer chickens [J]. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 2020, 104 (1): 144-155.
- [18] WALTON K D, MISHKIND D, RIDDLE M R, et al. Blueprint for an intestinal villus: species-specific assembly required [J]. *Wiley Interdisciplinary Reviews Developmental Biology*, 2018, 7 (4): e317.
- [19] 李蕊蕊. 保加利亚乳杆菌/鼠李糖乳杆菌通过调控 NF- κ B 拮抗 AFB1 所致肝脏炎症性损伤 [D]. 哈尔滨: 黑龙江八一农垦大学, 2019.
- [20] WANG Y, LIU F, LIU M, et al. Curcumin mitigates aflatoxin B1-induced liver injury via regulating the NLRP3 inflammasome and Nrf2 signaling pathway [J]. *Food Chem Toxicol*, 2022, 161: 112823.
- [21] 郑秋菊. 隔药灸对慢性支气管炎模型大鼠血清相关免疫细胞因子 IL-4、IL-8 影响的研究 [D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2012.