

孙雨航, 赵文硕, 李卓儒, 等. 不同时间和剂量 AFB1 暴露对小鼠的双向免疫毒性作用[J]. 沈阳农业大学学报, 2024, 55(6): 727-735.

SUN Yuhang, ZHAO Wenshuo, LI Zhuoru, et al. Bidirectional immunotoxic effects of different time points and dose afb1 exposure of mice[J]. Journal of Shenyang Agricultural University, 2024, 55(6): 727-735.

## 不同时间和剂量 AFB1 暴露对小鼠的双向免疫毒性作用

孙雨航, 赵文硕, 李卓儒, 龙 淼

(沈阳农业大学 动物科学与医学学院, 沈阳 110161)

**摘要:** 为了探究黄曲霉毒素 B1 (AFB1) 呈现双向免疫毒性作用的时间和剂量, 通过剂量梯度试验和时间梯度试验, 考察不同剂量、时间的 AFB1 暴露对小鼠体重、各脏器指数、剖检变化和病理特征的影响, 明确 AFB1 暴露对小鼠的双向免疫毒性作用。剂量梯度试验选取雄性昆明鼠 30 只, 随机分为 6 组 (每组 5 只), 每天灌服 0, 10, 20, 40, 80, 160  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  AFB1 (按体重计), 试验持续 21 d; 时间梯度试验采用固定剂量的 AFB1 每日对小鼠进行腹腔注射, 分别持续 0, 7, 14, 21, 28, 35 d。试验结果表明: 与对照组 (0  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) 相比, 在较高浓度 (80, 160  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) 和较长时间 (21 d) 的 AFB1 作用下, 小鼠的体重显著降低 ( $p<0.01$ ), 脾脏指数、胸腺指数和血清中 TNF- $\alpha$  表达水平呈现先升高而后降低的趋势; 相反, IL-10 在较高浓度 (80, 160  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) 和较长时间 (21 d) AFB1 作用下则表现显著升高趋势, 脾脏和胸腺的损伤程度也表现相似的结果。综上所述, 低浓度或短时间 AFB1 暴露可能诱发炎症, 而高浓度或长时间 AFB1 暴露可能导致免疫抑制, 证实了不同时间和剂量 AFB1 暴露可以诱导双向免疫毒性作用, 研究结果将为 AFB1 污染的防控和致病机理的深入研究提供科学依据。

**关键词:** 黄曲霉毒素 B1; 免疫刺激; 免疫抑制; 小鼠; 双向免疫毒性作用

中图分类号: S856

文章编号: 1000-1700(2024)06-0727-09

文献标识码: A

开放科学 (资源服务) 标识码 (OSID):



## Bidirectional Immunotoxic Effects of Different Time Points and Dose AFB1 Exposure of Mice

SUN Yuhang, ZHAO Wenshuo, LI Zhuoru, LONG Miao

(College of Animal Science and Medicine, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China)

**Abstract:** In order to study the time points and dose of aflatoxin B1 (AFB1) showing "bidirectional immunotoxicity", the effects of AFB1 exposure at different doses and times on body weight, organ index, autopsy changes and pathological characteristics of mice were investigated by dose gradient test and time gradient test, and the bidirectional immunotoxicity effect of AFB1 exposure on mice was clarified. In the dose gradient test, 30 male Kunming mice were randomly divided into 6 groups (5 mice in each group), and daily given 0, 10, 20, 40, 80, 160  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  of AFB1 (by weight), the test lasted for 21 days. In the time gradient test, mice were intraperitoneally injected daily with a fixed dose of AFB1 for 0, 7, 14, 21, 28, 35 days, respectively. The results showed that mice exposed to higher concentrations (80, 160  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) and a longer period (21 days) of AFB1 had significantly lower weight gain ( $p<0.01$ ), and the expression levels of TNF- $\alpha$ , spleen index and thymus index increased first and decreased then than those exposed to the control group (0  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), while IL-10 showed a significant increase in higher concentrations (80, 160  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) and longer period (21 days) of AFB1 exposure, and

收稿日期: 2024-05-22

基金项目: 中国博士后科学基金面上项目 (2023M741095, 2021M692231)

第一作者: 孙雨航 (1989-), 女, 博士, 讲师, 从事畜禽霉菌毒素免疫毒性研究, E-mail: syh2019@syau.edu.cn

通信作者: 龙 淼 (1978-), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 从事畜禽霉菌毒素中毒机制以及防控措施研究, E-mail: longmiao@syau.edu.cn

the degree of damage to the spleen and thymus also showed similar results. In conclusion, low concentrations or short periods of AFB1 exposure may induce inflammation, while high concentrations or prolonged AFB1 exposure may lead to immunosuppression, which confirms that different times and doses of AFB1 exposure can induce bidirectional immunotoxic effects, and the results of this study will provide a scientific basis for the prevention and control of AFB1 pollution and the in-depth study of the pathogenic mechanism.

**Key words:** Aflatoxin B1; immunostimulation; immunosuppression; mice; bidirectional immunotoxic effects

黄曲霉毒素(AFs)是由真菌寄生曲霉菌(*Aspergillus parasiticus*)等产毒菌株产生的次生代谢产物,由于其具有很大的毒性和致癌性,一直被认为是一种重要的霉菌毒素<sup>[1-2]</sup>。其中,黄曲霉毒素B1(AFB1)污染最为普遍,尤其是在高温高湿地区。一份来自塞尔维亚的玉米样本检测报告显示,气候条件对玉米AFs污染影响很大,AFB1和总AFs超标比例分别为72.5%和51.5%<sup>[3]</sup>。AFB1也是目前我国最常规检测的霉菌毒素之一,广泛存在于发霉的饲料和原料(如玉米、花生粕等)中<sup>[4-5]</sup>。2021-2022年国内8个玉米主产区中苏皖地区新玉米AFB1检出率分别为91%和88%,猪全价饲料中AFB1检出率分别为21%和14%,而花生粕中AFB1检出率最高,达100%<sup>[6-7]</sup>,严重威胁着人类和动物健康。

1993年,世界卫生组织将AFB1列为I类致癌物<sup>[8]</sup>。据联合国粮食及农业组织估计,全球粮食及其衍生食品中约有25%存在不同程度的AFB1污染<sup>[9]</sup>。人和动物误食被AFB1污染的食品后,毒素会逐渐积于肝脏,产生慢性或急性中毒症状。不同动物因品种、年龄及营养情况不同导致其对AFB1的耐受程度各不相同。索江华等<sup>[10]</sup>研究发现肝脏是AFB1的主要靶器官,畜禽食入AFB1污染的饲料会导致肝脏功能损伤、炎症、脂肪浸润甚至出血和纤维样变性。猪对AFB1耐受性最差,摄食AFB1污染的饲料会表现出采食量下降、肝脏受损肿大、生长发育停滞、产死胎,严重的还会造成肾脏和肠道出血等<sup>[11]</sup>。AFB1对家禽的危害也很大,主要表现为生长迟缓、体重增加减少、产蛋量下降、肝损伤和肠道出血等<sup>[11-12]</sup>。AFB1对反刍动物也有很大的影响,可造成犊牛采食量降低、抵抗力差,严重时还会造成犊牛的直肠痉挛和脱肛等现象;若奶牛食用黄曲霉毒素会导致产奶量下降,在牛奶中检出AFB1的代谢产物黄曲霉毒素M1(AFM1),严重时会引起成年牛肝脏损伤以及免疫抑制<sup>[13]</sup>。

目前,全世界已有37个国家针对食品或谷物中的AFB1规定了限量标准。根据我国农业部最新限量标准规定,猪全价饲料中AFB1最多不应超过 $20 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。众所周知,AFB1不仅具有肝毒性、肾毒性,还具有较强的免疫毒性<sup>[14-16]</sup>。传统观念认为AFB1暴露可引起免疫抑制,但越来越多证据表明AFB1可能还兼具刺激免疫、诱发炎症的作用<sup>[17-18]</sup>。有研究表明,AFB1主要影响机体的细胞免疫系统,通过调节细胞因子表达来促进炎症反应<sup>[17]</sup>。另一项研究显示,AFB1暴露可以显著降低 $\text{CD4}^+$ T细胞抗炎细胞因子IL-4表达,而提高促炎细胞因子IFN- $\gamma$ 和TNF- $\alpha$ 的表达水平<sup>[19]</sup>。此外,有研究表明 $0.01 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的AFB1暴露可促进促炎性通路因子TLR4和细胞色素P450 1A1的表达<sup>[20]</sup>。另有研究表明, $4\sim 8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  AFB1暴露可显著降低IL-2的表达<sup>[21]</sup>。这说明不同浓度AFB1暴露可能影响AFB1的免疫毒性。与此类似,有研究显示,短期(24 h)暴露于一定剂量赭曲霉毒素(OTA,也是一种霉菌毒素)会增加促炎细胞因子的表达,但长期暴露于OTA(48, 72 h)可增强抗炎细胞因子水平<sup>[22]</sup>。这说明不同时间霉菌毒素暴露可能影响其免疫毒性。但目前尚未见具体何时间和何剂量AFB1暴露会导致机体出现双向免疫毒性作用的报道。

值得注意的是,即使低浓度的AFB1暴露也并非绝对安全的,它们刺激免疫和诱发炎症的同时也会增加某些病原入侵的机会。研究发现,低水平的AFB1也可降低仔猪的增重和平均日采食量,降低表观肠道消化率,破坏肠道屏障完整性<sup>[23]</sup>。本课题组前期试验也证实 $10\sim 40 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  AFB1暴露可以显著促进猪流感病毒在小鼠体内复制、降低小鼠增重、加剧病毒感染所致肺损伤<sup>[24-25]</sup>。因此,明确AFB1的双向免疫毒性作用至关重要,研究成果将为建立AFB1限量新标准奠定基础,为进一步建立AFB1染毒的预防新措施提供科学依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

供试AFB1(Sigma,美国)溶于二甲基亚砜(DMSO)中,并保存在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中。DMSO、生理盐水、

磷酸盐缓冲液(PBS)、酒精和4%多聚甲醛组织固定液购自碧云天生物技术有限公司。ELISA试剂盒购自沈阳诺唯赞生物技术有限公司,小鼠营养维持饲料(基础日粮)购自辽宁长生生物有限公司。供试小鼠选用清洁级(ICR),年龄(5周龄)和体重[(20±1)g]相近的雄性昆明鼠,购自辽宁长生生物有限公司。所有小鼠均在标准实验室条件下饲养,光照12 h/黑暗12 h循环,自由采食、饮水。

## 1.2 方法

1.2.1 剂量梯度试验 30只小鼠随机分为6组,每组5只,分笼饲养,适应性饲养7 d后进行试验。试验期间自由采食基础日粮、饮水。为防止拒食,每组小鼠分别采取灌服0, 10, 20, 40, 80, 160  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  AFB1(按体重计)稀释液方式进行染毒。每天灌服1次,试验持续14 d。试验过程中每天观察小鼠的饮食、饮水及精神状态,并进行称重。计算并比较处理间增重和器官指数。器官指数=(器官重量/小鼠体重)×100。

1.2.2 时间梯度试验 30只小鼠随机分为6组,每组5只,分笼饲养,适应性饲养7 d后进行试验。按20  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  AFB1(按体重计)的注射剂量每日对小鼠进行腹腔注射,试验分别持续0, 7, 14, 21, 28, 35 d<sup>[17, 26-30]</sup>。试验过程中每天观察小鼠的饮食、饮水及精神状态,并进行称重。计算并比较处理间增重和器官指数。器官指数=(器官重量/小鼠体重)×100。

1.2.3 H&E染色 试验结束后,收集各组小鼠部分脾脏和胸腺,将新鲜的组织进行生理盐水冲洗后,放入4%的多聚甲醛固定液中,然后进行酒精梯度脱水、二甲苯呈透明和石蜡包埋,待石蜡组织块冷却后将其切成厚度约5  $\mu\text{m}$ 的薄片,然后根据操作流程进行H&E染色和封片。

1.2.4 TNF- $\alpha$ 和IL-10含量的测定 试验结束后对小鼠进行眼球动脉采血,以3 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min分离血清,然后按照ELISA试剂盒步骤测定TNF- $\alpha$ 和IL-10的含量。

## 1.3 数据统计与分析方法

使用GraphPad Prism(v8.0)软件进行数据统计分析,结果以平均值±标准差(Mean±SD)表示。\*,  $p<0.05$ 表示差异显著;\*\* $p<0.01$ 表示差异极显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同剂量AFB1暴露对小鼠体重增长和剖检变化的影响

为了评估不同剂量AFB1暴露对小鼠生长性能和剖检变化的影响,连续14 d给小鼠灌服0, 10, 20, 40, 80, 160  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  AFB1。结果显示,与对照组相比,除20  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  AFB1暴露组以外,10, 40, 80, 160  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  AFB1组小鼠增重都极显著降低(图1A),说明AFB1暴露可能降低小鼠的增重率。其中20  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  AFB1暴露组小鼠体重增长较快,可能是因此剂量处理小鼠使其体内炎症加剧致使体重升高。

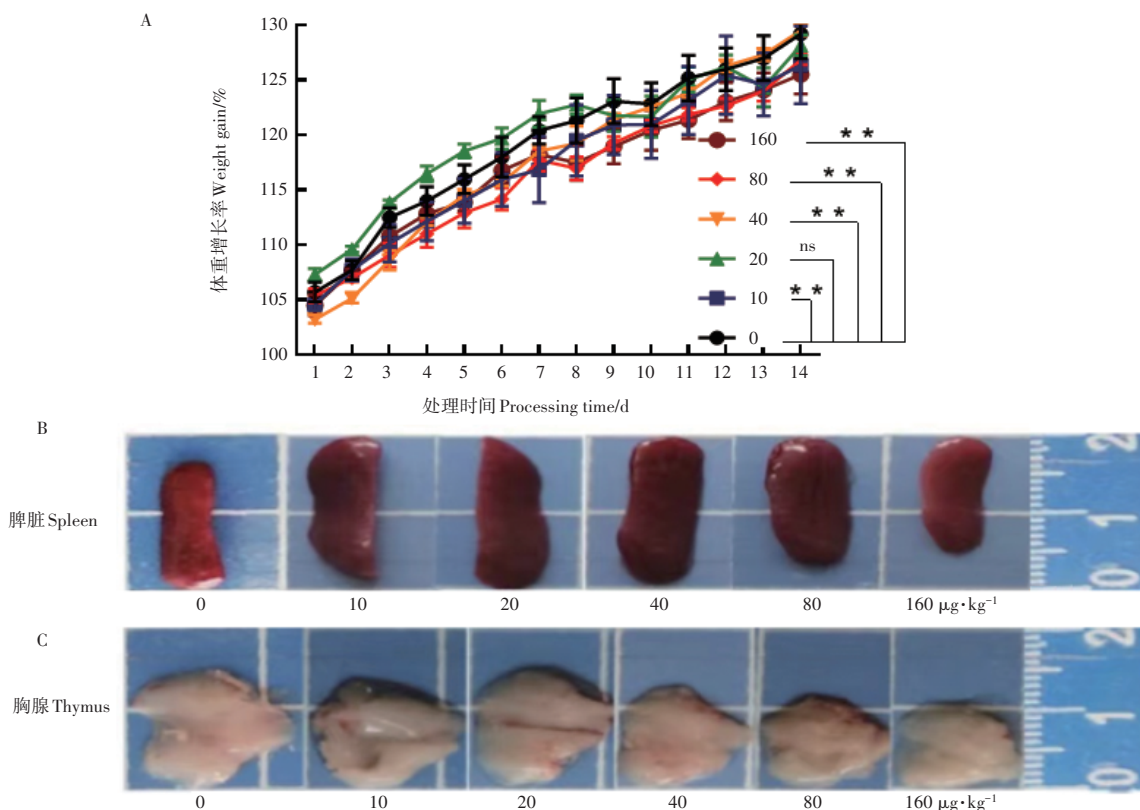
剖检结果显示,与对照组相比,小鼠的脾脏在10~80  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  AFB1暴露下表现肿胀、出血和炎性浸润,而在160  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  AFB1暴露下则表现为萎缩和体积减小(图1B);胸腺也表现相似的结果(图1C)。

### 2.2 不同剂量AFB1暴露对小鼠的免疫功能和炎症状态的影响

为进一步探讨不同剂量AFB1暴露对小鼠免疫应答和炎症状态的影响,试验结束后,收集小鼠的脾脏和胸腺,进行称重并计算器官指数。与对照组相比,暴露于20  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  AFB1的脾脏指数显著降低,而其余各组脾脏指数各组间差异均不显著(图2A),这可能与此组小鼠体重增长过快有关。与此类似,10~80  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  AFB1暴露组小鼠胸腺指数差异不显著,160  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 暴露组小鼠胸腺指数显著低于对照组(图2B),说明高浓度AFB1暴露可能导致胸腺发生免疫抑制。

血清促炎性和抑炎性细胞因子检测结果显示,与对照组相比小鼠血清TNF- $\alpha$ 呈现较低浓度AFB1(10~40  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )暴露下显著升高,而较高浓度AFB1(80, 160  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )暴露下降低的趋势(图2C);相反,IL-10在较高浓度AFB1(80, 160  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )作用下表现显著升高(图2D)。这些结果说明低浓度AFB1暴露可能诱发炎症,而高浓度AFB1暴露可能导致免疫抑制。

H&E染色结果显示,对照组(0  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )小鼠脾脏淋巴细胞排列整齐,红白髓界限清晰,而20  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和40  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  AFB1暴露组小鼠出现脾脏淤血(黄色箭头),红白髓界限不清(绿色圆圈),白髓逐渐减少的现象,相反80  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和160  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  AFB1暴露组小鼠白髓再次出现,但是白髓排列松散,淋巴细胞



A. 体重增长率; B. 脾脏的剖检变化; C. 胸腺的剖检变化. \*\* $p < 0.01$  表示差异极显著; ns $p > 0.05$ , 表示差异不显著  
 A. Weight gain; B. Autopsy changes in the spleen; C. Autopsy changes in the thymus. \*\* $p < 0.01$  was considered extremely significant; ns $p > 0.05$ , not significant

图1 不同剂量AFB1暴露对小鼠体重增长和剖检变化的影响

Figure 1 Effects of different doses of AFB1 exposures on weight gain and autopsy pictures of mice

减少(图2E)。另外,对照组( $0 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )小鼠胸腺皮质区的网状细胞形态清晰,周围少见有细胞核碎块,而AFB1( $80, 160 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )处理组小鼠胸腺有不同程度淤血(红色箭头),细胞核碎块增多(蓝色圆圈),网状细胞核形态不清现象(图2F)。可见,低剂量的AFB1暴露可能会诱发炎症反应和免疫器官损伤,而高剂量的AFB1暴露会导致免疫抑制

2.3 AFB1暴露不同时间对小鼠体重增长和剖检变化的影响

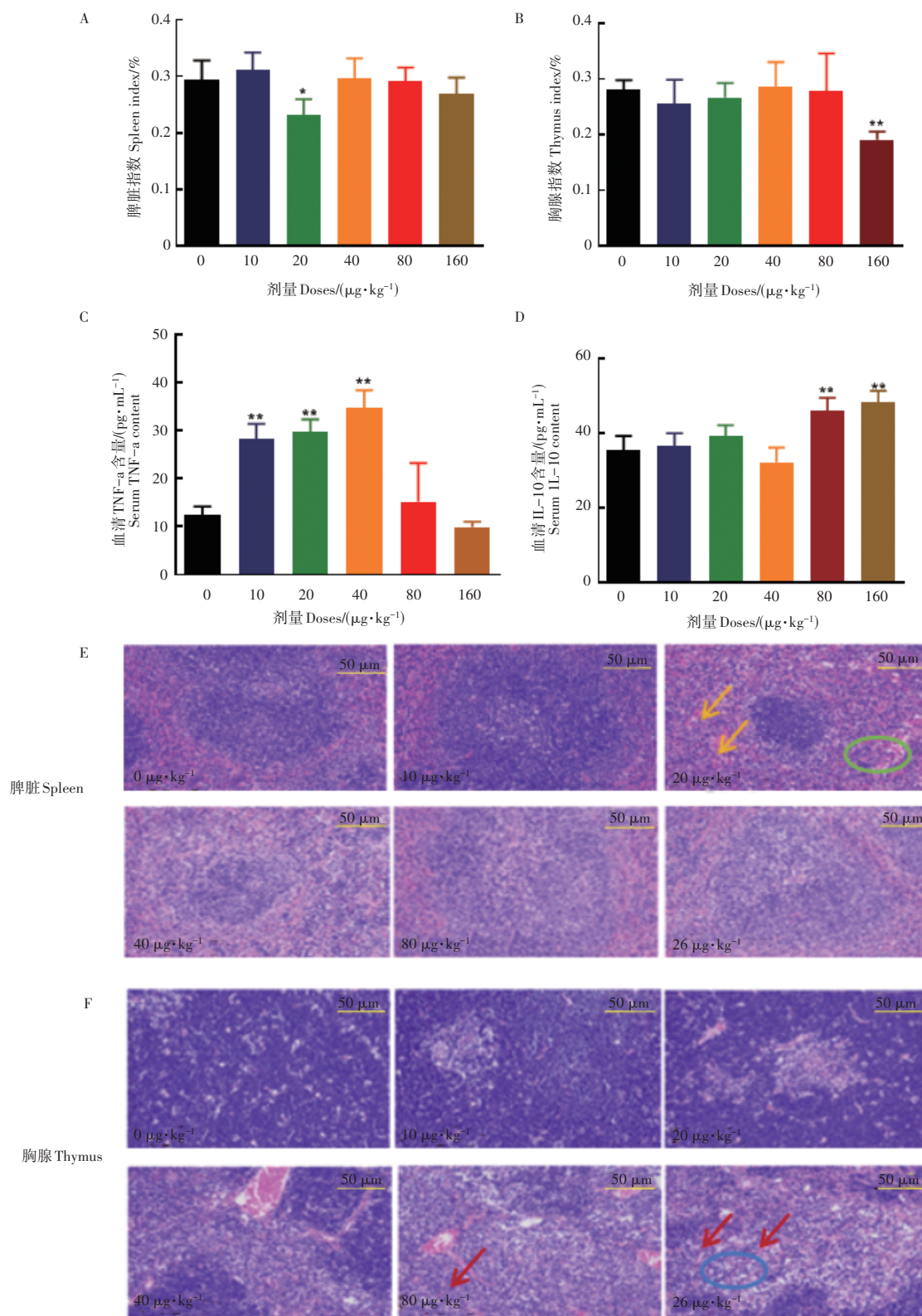
为了探讨AFB1暴露不同时间对小鼠生长性能和剖检变化的影响,选择 $20 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  AFB1连续注射0~35 d。由图3A可知,随着时间的增加小鼠的体重也增加。但是,根据体重增长速率(增长率的斜率K)可以看出,注射AFB1 35 d内小鼠的体重虽然一直在增长,但是每7 d的增长速率有所不同,呈下降趋势(图3B)。

剖检结果显示,与对照组相比小鼠的脾脏和胸腺在7~21 d内表现出肿胀,14 d和21 d最为严重,而28~35 d则表现萎缩(图3C和图3D)。

2.4 AFB1暴露不同时间对小鼠的免疫功能和炎症状态的影响

为进一步探讨AFB1暴露不同时间对小鼠免疫应答和炎症状态的影响,首先测算免疫器官指数。结果显示,与对照组相比,7 d的脾脏指数显著降低,而14, 21, 28, 35 d的脾脏指数极显著下降(图4A);与对照组相比,14, 21, 28, 35 d的胸腺指数也极显著降低(图4B),说明随着AFB1暴露时间延长免疫器官受到抑制。

血清促炎性和抑炎性细胞因子检测结果显示,血清TNF- $\alpha$ 呈现先升高(7~21 d)而后降低(28~35 d)的趋势(图4C);相反,IL-10在21 d呈现显著升高趋势(图4D);这说明随着AFB1暴露时间延长,小鼠体内先产生炎症,然后转向免疫抑制,并且较低剂量AFB1( $20 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )暴露也会因为时间累积导致炎症加剧最终产生免疫抑制。

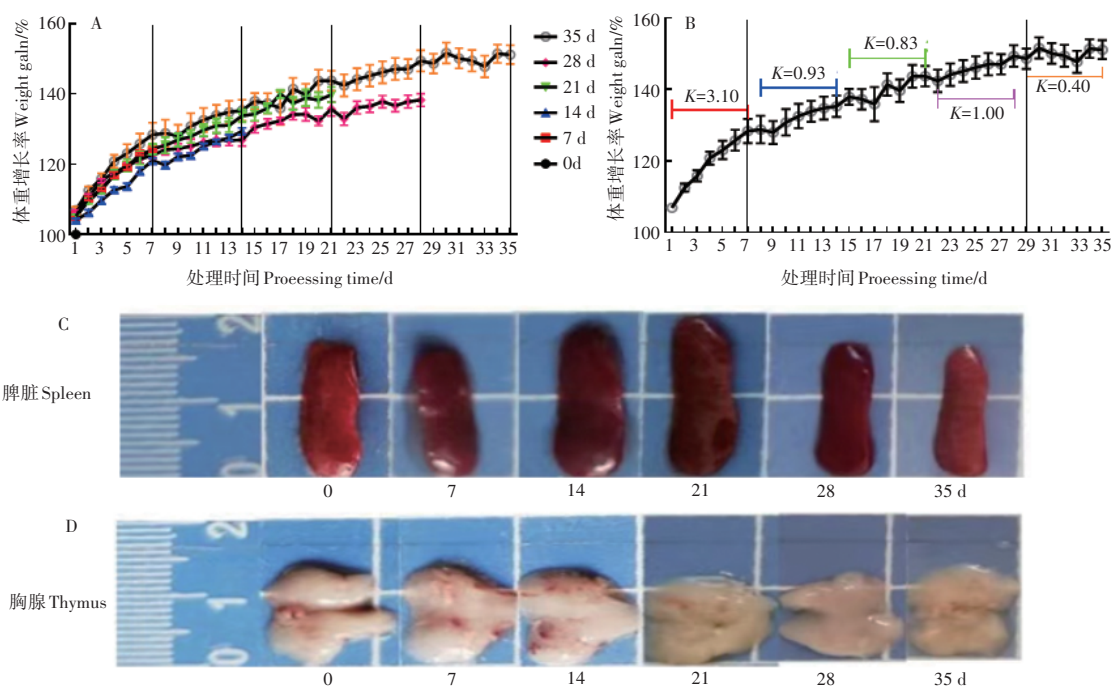


A. 脾脏指数; B. 胸腺指数; C. TNF- $\alpha$  血清含量; D. IL-10 血清含量; E. 脾脏 H&E 染色图片; F. 胸腺 H&E 染色图片, 在 200 $\times$  放大倍率下获得每组小鼠的代表性图像。\*  $p < 0.05$  表示差异显著; \*\*  $p < 0.01$  表示差异极显著。图中黄色箭头代表脾脏淤血, 绿色圆圈代表红白髓界限不清, 红色箭头代表胸腺出血, 蓝色圆圈代表细胞核碎片增多

A. Spleen index; B. Thymus index; C. TNF- $\alpha$  serum contents; D. IL-10 serum contents; E. H&E-stained images of the spleens; F. H&E-stained images of the thymus, representative images from mice in each group were obtained at 200 $\times$  magnification. \*  $p < 0.05$  was considered significant; \*\*  $p < 0.01$  was considered extremely significant

图 2 不同剂量 AFB1 暴露对小鼠的免疫功能和炎症状态的影响

Figure 2 Effects of different doses of AFB1 exposures on immune function and inflammatory status of mice



A. 体重增长; B. 增长速率; C. 脾脏的剖检变化; D. 胸腺的剖检变化  
 A. Weight gain; B. Weight gain rate; C. Autopsy changes in the spleens; D. Autopsy changes in the thymus

图3 AFB1暴露不同时间对小鼠体重增长和剖检变化的影响

Figure 3 Effects of different time points of AFB1 exposures on weight gain and autopsy pictures of mice

H&E 染色结果显示, 0 d 的脾脏组织可以清楚地看见红髓和白髓结构, 14, 21, 28, 35 d 组小鼠脾脏结构界限不清楚 (绿色圆圈), 在 21 d 中可以看出有少量红细胞浸润 (图 4E; 黄色箭头), 这说明 AFB1 作用时间越长, 髓质组织细胞间距越大; 与此类似, 对照组胸腺组织结构紧密, 14~35 d 组胸腺组织结构疏松, 部分区域着色浅, 皮髓质界限不清 (蓝色圆圈)。21 d 组中胸腺组织被破坏, 结构缝隙中有少量红细胞浸润 (红色箭头), 出现淤血现象 (图 4F)。

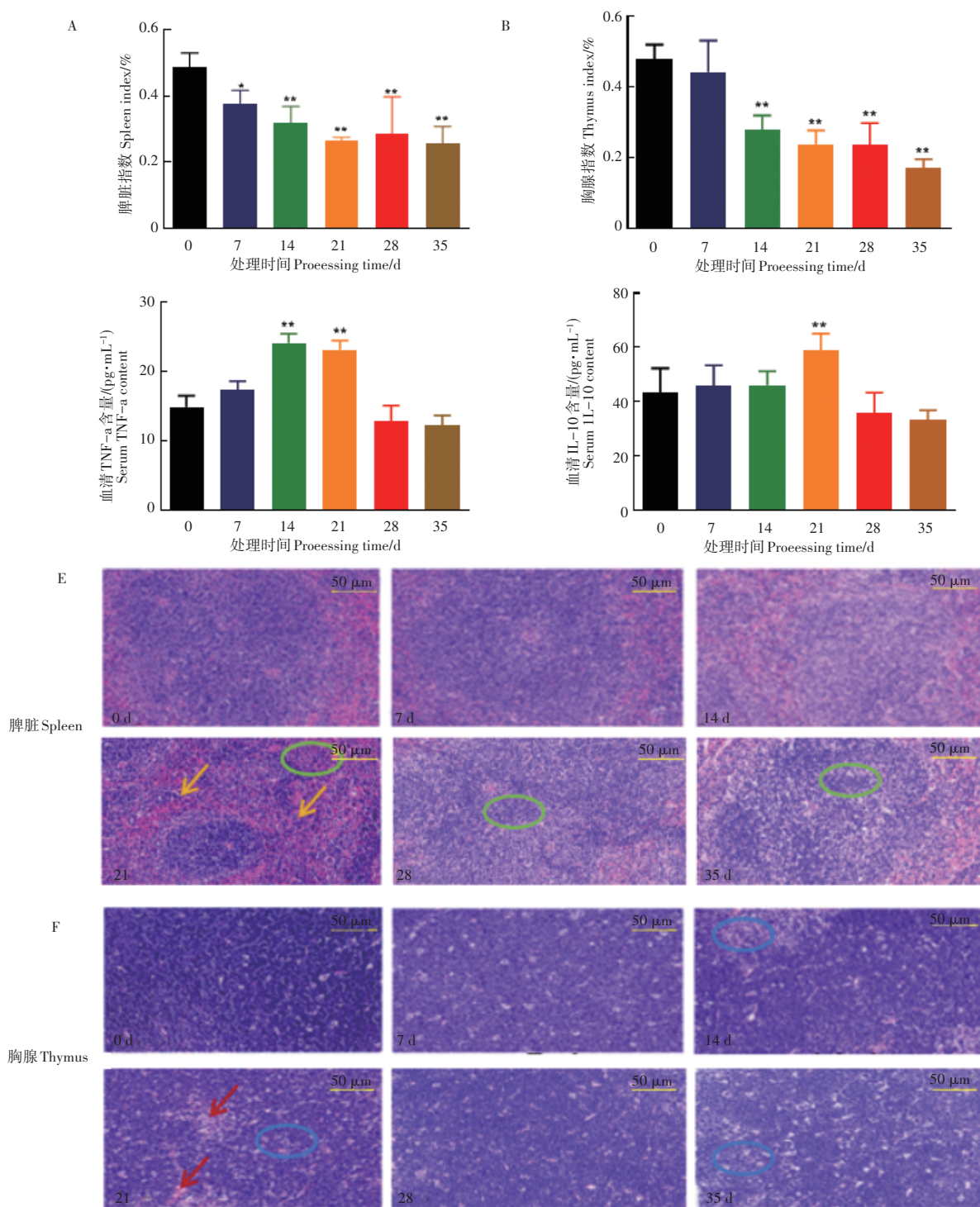
### 3 讨论与结论

#### 3.1 不同时间和剂量 AFB1 暴露对小鼠体重增长的影响

AFB1 通常存在于发霉的食品及饲料中, 对机体各器官危害很大<sup>[31]</sup>。据报道, 畜禽长期暴露在 AFB1 的环境下会导致畜禽的采食量下降, 体重减轻<sup>[32]</sup>。本试验结果显示, AFB1 处理组小鼠增重极显著降低 (除 20  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  AFB1), 说明 AFB1 暴露对小鼠的体重增长具有一定抑制作用。研究还发现, 小鼠灌服 AFB1 可导致体重下降, 肝脏肿大, 影响小鼠生长发育<sup>[33]</sup>; 另有试验证据表明, 给育肥猪饲喂高剂量 (100  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) 的 AFB1 可使猪的日增重和平均采食量明显降低, 损害肝脏功能<sup>[34]</sup>。这些研究表明, AFB1 暴露不仅可以抑制生长, 损害器官, 可能还会引发器官炎症、肿大进而影响增重。在本试验中, 20  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  AFB1 暴露组小鼠体重增长较快, 可能是因为此剂量处理小鼠使其体内炎症加剧致使体重升高, 与前人的研究结果相一致。

#### 3.2 不同时间和剂量 AFB1 暴露对小鼠免疫功能的影响

脾脏和胸腺是机体重要的免疫器官, 一般来说, 免疫器官指数和组织学检测共同反映机体免疫器官的功能和结构变化。于正强等研究发现, 喂食艾维茵健康公雏含 0.15~0.60  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  AFB1 的基础日粮, 其中 0.30  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , 0.60  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  AFB1 暴露导致雏鸡胸腺和脾脏脏器指数显著降低, 这表明 AFB1 一定程度上抑制了雏鸡免疫器官的生长发育<sup>[35]</sup>; 本试验结果与此相一致, 表现为长时间 (35 d) 和高剂量 (160  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  体重) 注射 AFB1 使小鼠脾脏指数和胸腺指数显著降低, 说明长时间和高剂量 AFB1 暴露对免疫器官的发育有明显的抑制作用。



A.脾脏指数;B.胸腺指数;C.TNF-α血清含量;D.IL-10血清含量;E.脾脏H&E染色图片;F.胸腺H&E染色图片,在200×放大倍率下获得每组小鼠的代表性图像。\* $p < 0.05$ 表示差异显著;\*\* $p < 0.01$ 表示差异极显著。图中黄色箭头代表红细胞浸润,绿色圆圈代表脾脏红白髓界限不清,红色箭头代表胸腺出血,蓝色圆圈代表结构疏松及皮髓质界限不清

A.Spleen index; B.Thymus index; C.TNF-α serum contents; D.IL-10 serum contents; E.H&E-stained images of the spleens; F.H&E-stained images of the thymus, representative images from mice in each group were obtained at 200× magnification. \* $p < 0.05$  was considered significant; \*\* $p < 0.01$  was considered extremely significant

图4 AFB1暴露不同时间对小鼠的免疫功能和炎症状态的影响

Figure 4 Effects of different time points of AFB1 exposures on immune function and inflammatory status of mice

骨髓与红髓是脾脏免疫应答反应发生的主要部位,正常情况下H&E染色后红髓因含有大量红细胞呈红色,与白髓区别明显,脾脏中含有大量的T淋巴细胞和B淋巴细胞,能产生大量抗体来保护机体。胸腺组织学结构可以分为皮质和髓质,在H&E染色后深的为皮质,是T淋巴细胞成熟分化的场

所。从H&E染色的结果来看,长时间和高剂量AFB1暴露导致脾脏和胸腺的基本结构遭到破坏,脾脏和胸腺有不同程度淤血、细胞核碎块增多、染色变浅,结构疏松和萎缩等现象,说明AFB1会导致小鼠免疫器官受损。以往一项研究表明AFB1随着作用浓度增加,会导致肉鸡脾脏中淋巴细胞的凋亡,大量淋巴细胞崩解,细胞核碎片增加<sup>[36]</sup>;另外,也有研究表明,AFB1在长时间作用下导致雏鸡胸腺皮质区内网状细胞形态较模糊,细胞核碎片明显增多<sup>[37]</sup>。本试验结果与前人的研究结果相符合,表明低剂量的AFB1会促进炎症反应和免疫器官损伤,而高剂量的AFB1暴露可能会产生免疫抑制。

### 3.3 不同时间和剂量AFB1暴露对小鼠炎症状态的影响

霉菌毒素暴露后机体的免疫状态与细胞因子水平是密切相关的,许多炎性细胞因子共同作用会导致产生炎症或者免疫抑制。研究表明,低剂量AFB1(0.01, 0.1 ng·mL<sup>-1</sup>)暴露可降低IL-10表达水平<sup>[38]</sup>;另一项研究表明,短时间暴露于OTA会促进巨噬细胞分泌促炎性细胞因子(如IL-6),促使机体产生炎症,相反,长时间暴露于OTA会促进巨噬细胞分泌抑炎性细胞因子(如IL-10),导致免疫抑制<sup>[22]</sup>。本试验结果显示,在AFB1暴露不同时间后,血清TNF- $\alpha$ 呈现短时间(14~21 d)AFB1暴露后升高而后降低的趋势,而IL-10在AFB1暴露21 d后也显著升高趋势。在不同剂量的AFB1分别作用下,血清TNF- $\alpha$ 呈现低剂量AFB1(10~40  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )暴露后升高而高剂量AFB1(80, 160  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )暴露后降低的趋势,而IL-10在高剂量AFB1(80, 160  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )作用下表现显著升高趋势。这与前人研究结果一致,进一步证实了AFB1具有双向免疫毒性作用,即低剂量或短时间AFB1暴露可刺激免疫、诱发炎症,而高剂量或长时间AFB1暴露导致免疫抑制。

总之,本研究证实AFB1具有双向免疫毒性作用,即低剂量或短时间AFB1暴露可刺激免疫、诱发炎症,而高剂量或长时间AFB1暴露会导致免疫抑制。

### 参考文献:

- [1] CAO W Y, YU P, YANG K P, et al. Aflatoxin B1: Metabolism, toxicology, and its involvement in oxidative stress and cancer development[J]. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 2022, 32(6): 395-419.
- [2] ALSHANNAQ A, YU J H. Occurrence, toxicity, and analysis of major mycotoxins in food[J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2017, 14(6): 632.
- [3] JANIĆ HAJNAL E, KOS J, KRULJ J, et al. Aflatoxins contamination of maize in Serbia: The impact of weather conditions in 2015[J]. *Food Additives & Contaminants Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*, 2017, 34(11): 1999-2010.
- [4] ESKOLA M, KOS G, ELLIOTT C T, et al. Worldwide contamination of food-crops with mycotoxins: Validity of the widely cited 'FAO estimate' of 25[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2020, 60(16): 2773-2789.
- [5] CIMBALO A, ALONSO-GARRIDO M, FONT G, et al. Toxicity of mycotoxins in vivo on vertebrate organisms: A review[J]. *Food and Chemical Toxicology: an International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 2020, 137: 111161.
- [6] 2021年帝斯曼动物营养与保健原料与饲料霉菌毒素普查报告[R]. 帝斯曼动物营养与保健, 2022-01-26.
- [7] 2022年帝斯曼动物营养与保健原料与饲料霉菌毒素普查报告[R]. 帝斯曼动物营养与保健, 2023-02-07.
- [8] RAYSAN A, EREMIN S A, BELOGLAZOVA N V, et al. Immunochemical approaches for detection of aflatoxin B1 in herbal medicines[J]. *Phytochemical Analysis: PCA*, 2020, 31(5): 662-669.
- [9] 张牧臣, 郑楠, 王加启. 食品中黄曲霉毒素B1污染研究进展[J]. *食品科学*, 2018, 39(7): 312-320.
- [10] 索江华, 张宸, 连艳鲜, 等. 黄曲霉毒素对畜禽危害和脱毒方法的研究进展[J]. *中国饲料*, 2024(15): 143-149.
- [11] 冯涛琦. 霉菌毒素的危害与防控措施[J]. *北方牧业*, 2024(15): 14.
- [12] 杨胜兰, 王慧娴, 刘金松, 等. 黄曲霉毒素B1对家禽的危害及解毒策略研究进展[J]. *中国畜牧杂志*, 2024, 60(5): 62-67.
- [13] 陈媛媛, 李蕊蕊, 董志昊, 等. 黄曲霉毒素B1研究进展[J]. *黑龙江八一农垦大学学报*, 2019, 31(1): 28-32.
- [14] 王晓敏, 常娟, 王平, 等. 黄曲霉毒素B1、玉米赤霉烯酮和呕吐毒素的累加细胞毒性研究[J]. *中国饲料*, 2021(9): 98-101.
- [15] 刘锦芳. DON与AFB1单一及联合染毒对小鼠肠道损伤的研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2018.
- [16] 刘秦. DON与AFB1单一及联合染毒对小鼠神经毒性的研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2018.
- [17] LIU D D, WANG Q, HE W M, et al. Two-way immune effects of deoxynivalenol in weaned piglets and porcine alveolar mac-

- rophages:Due mainly to its exposure dosage[J].Chemosphere,2020,249:126464.
- [18] SUN Y H,HUANG K H, LONG M, et al. An update on immunotoxicity and mechanisms of action of six environmental mycotoxins[J]. Food and Chemical Toxicology: an International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association, 2022, 163: 112895.
- [19] QIAN G Q, TANG L L, GUO X, et al. Aflatoxin B1 modulates the expression of phenotypic markers and cytokines by splenic lymphocytes of male F344 rats[J]. Journal of Applied Toxicology: JAT, 2014, 34(3): 241-249.
- [20] BAHARI A, MEHRZAD J, MAHMOUDI M, et al. Cytochrome P450 isoforms are differently up-regulated in aflatoxin B<sub>1</sub>-exposed human lymphocytes and monocytes[J]. Immunopharmacology and Immunotoxicology, 2014, 36(1): 1-10.
- [21] HAO S, PAN S C, HU J F, et al. Aflatoxin B1 suppressed T-cell response to anti-pig-CD3 monoclonal antibody stimulation in primary porcine splenocytes: A role for the extracellular regulated protein kinase (ERK1/2) MAPK signaling pathway[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2015, 63(26): 6094-6101.
- [22] PU J N, YUAN Q H, 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: an Open Access Journal from MDPI, 2021, 11(2): 336.
- [23] SUN Y H, SU J R, LIU Z X, et al. Aflatoxin B1 promotes influenza replication and increases virus related lung damage via activation of TLR4 signaling[J]. Frontiers in Immunology, 2018, 9: 2297.
- [24] SUN Y H, LIU Z X, LIU D D, et al. Low-level aflatoxin B1 promotes influenza infection and modulates a switch in macrophage polarization from M1 to M2[J]. Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology, 2018, 49(3): 1110-1126.
- [25] FAISAL K, FARIDHA A, AKBARSHA M A. Induction of meiotic micronuclei in spermatocytes in vivo by aflatoxin B1: Light and transmission electron microscopic study in Swiss mouse[J]. Reproductive Toxicology, 2008, 26(3/4): 303-309.
- [26] WANG F Y, ZUO Z C, CHEN K J, et al. Histopathological injuries, ultrastructural changes, and depressed TLR expression in the small intestine of broiler chickens with aflatoxin B<sub>1</sub>[J]. Toxins, 2018, 10(4): 131.
- [27] CHEN Y Y, LI R R, CHANG Q C, et al. Lactobacillus bulgaricus or Lactobacillus rhamnosus suppresses NF- $\kappa$ B signaling pathway and protects against AFB<sub>1</sub>-induced hepatitis: A novel potential preventive strategy for aflatoxicosis? [J]. Toxins, 2019, 11(1): 17.
- [28] 孙真真. 四种霉菌毒素对蛋鸡毒性效应及其在蛋鸡体内代谢的动力学研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2016.
- [29] 殷芬, 俞顺章, 张社, 等. 黄曲霉毒素在大鼠体内的毒物代谢动力学研究[J]. 卫生毒理学杂志, 1996(1): 19-22.
- [30] GERDEMANN A, CRAMER B, DEGEN G H, et al. Comparative metabolism of aflatoxin B1 in mouse, rat and human primary hepatocytes using HPLC - MS/MS[J]. Archives of Toxicology, 2023, 97(12): 3179-3196.
- [31] 劳文艳, 林素珍. 黄曲霉毒素对食品的污染及危害[J]. 北京联合大学学报(自然科学版), 2011, 25(1): 64-69.
- [32] 王晓晓, 王宝维, 王鑫, 等. 黄曲霉毒素对畜禽的危害、检测及去毒方法[J]. 中国饲料, 2011(13): 33-36.
- [33] 李蕊蕊, 陈媛媛, 董志昊, 等. 黄曲霉毒素 B1 干预对小鼠生长状况及肝脏变化的影响[J]. 黑龙江畜牧兽医(下半月), 2018(11): 108-109, 113.
- [34] 周芬, 吴东, 陈胜, 等. 黄曲霉毒素 B1 对肥育猪生长性能及血液、肝脏功能的影响[J]. 中国饲料, 2019(13): 114-117.
- [35] 于正强, 陈瑾, 彭西, 等. 黄曲霉毒素 B1 对雏鸡免疫器官影响的病理学观察[J]. 畜牧兽医学报, 2015, 46(8): 1447-1454.
- [36] CHEN J, CHEN K, YUAN S B, et al. Effects of aflatoxin B1 on oxidative stress markers and apoptosis of spleens in broilers [J]. Toxicology and Industrial Health, 2016, 32(2): 278-284.
- [37] 梁娜, 彭西, 吴邦元, 等. 亚硒酸钠对黄曲霉毒素 B1 致雏鸡胸腺细胞死亡受体通路活化的缓解作用研究[J]. 四川农业大学学报, 2018, 36(4): 527-534.
- [38] BRUNEAU J C, STACK E, O'KENNEDY R, et al. Aflatoxins B(1), B(2) and G(1) modulate cytokine secretion and cell surface marker expression in J774A.1 murine macrophages[J]. Toxicology in Vitro: an International Journal Published in Association with BIBRA, 2012, 26(5): 686-693.
- [39] SU J R, LIU D D, WANG Q, et al. Long-time instead of short-time exposure in vitro and administration in vivo of ochratoxin A is consistent in immunosuppression[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(26): 7485-7495.