



饲料中添加柠檬黄对鲫肝、肠组织结构、抗氧化指标及肠道菌群的影响

辛晴晴, 吕茜茜, 吴利敏, 田雪, 马文阁, 李学军*

(河南师范大学水产学院, 河南新乡 453007)

摘要: 为研究合成食用色素柠檬黄对水生生物的影响, 实验以初始体质量为 (35.0 ± 1.5) g 的鲫为研究对象, 探究了不同剂量 (0、1.4、5.5 和 10.0 mg/kg) 柠檬黄摄入对鲫肝、肠组织结构, 抗氧化性能以及肠道菌群的影响。结果显示, 与对照组相比, 1.4 mg/kg 处理组柠檬黄摄入即可导致肠上皮细胞空泡化, 肠绒毛变短; 5.5 mg/kg 处理组的摄入量引起肠绒毛断裂, 而 10.0 mg/kg 处理组病理现象更严重; 肝脏组织学显示, 1.4 mg/kg 处理组柠檬黄摄入导致肝细胞发生损伤, 细胞核萎缩、变形; 5.5 mg/kg 处理组摄入量引起肝细胞核溶解, 细胞空泡化增多; 10 mg/kg 处理组导致细胞界限模糊不清, 细胞变形, 空泡化加剧, 肝血窦不可见, 肝小叶结构模糊; 1.4 mg/kg 处理组柠檬黄摄入即可引起血清中超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT) 以及谷胱甘肽 (GSH-Px) 活性均下降, 丙二醛 (MDA) 含量升高。肠道内容物测序结果显示, 柠檬黄的摄入引起鲫肠道微生物 Chao1、Shannon 和 Simpson 等指数变化, 一些有益菌 (芽孢杆菌和梭状芽胞杆菌) 数量明显减少, 而一些致病微生物 (如蛭弧菌和希瓦氏菌) 的数量明显增加。研究表明, 柠檬黄的摄入会导致鲫肝、肠组织结构造成损伤, 并对其抗氧化指标及肠道菌群造成不同程度的影响。

关键词: 鲫; 柠檬黄; 氧化应激; 肠道菌群

中图分类号: S 963.7

文献标志码: A

近年来, 随着工业发展, 食用色素被广泛应用于各种产品中^[1-2]。合成食用色素因其成本低、易获得、稳定性好等优点, 在食品、药品、纺织品、皮革和化妆品等行业中被大量使用。合成食用色素分为偶氮色素和非偶氮色素, 其中偶氮色素使用较为广泛^[2]。随着生产量和消费量的不断增长, 环境中被检出偶氮色素的报道越来越多^[3]。在水生生态系统中, 偶氮色素及其代谢物随着食物链富集, 最终对水生动物产生毒性影响^[4-5]。因此, 偶氮色素的污染对水生生物造成的威胁不可忽视。

柠檬黄是使用最广泛的偶氮色素之一, 它被用作食品 (冰激凌、软饮料、果冻、果酱和口香糖等)、药品和化妆品中的着色剂^[6]。粮农组织/世界卫生组织食品添加剂联合专家委员会规定, 对人体来说, 柠檬黄的每日允许摄入量 (acceptable daily intake, ADI) 为 7.5 mg/kg^[7]。猫、狗为 8.66 mg/kg; 观赏鸟类为 8.57 mg/kg; 观赏鱼为 8.81 mg/kg^[8]。如果每天摄入的柠檬黄超过 ADI 水平将导致机体产生各种病理反应^[9-12]。在实验啮齿动物中, 长期过量食用含有柠檬黄的食物会对神经行为造成一定的不良影响, 高浓度下长期暴露在柠

收稿日期: 2022-03-26 修回日期: 2022-08-17

资助项目: 河南师范大学青年科学基金 (2021QK09)。

第一作者: 辛晴晴 (照片), 从事鱼类遗传育种研究, E-mail: 919229817@qq.com

通信作者: 李学军, 从事水产动物遗传育种和水生生物资源保护与开发研究, E-mail: xjli670405@163.com



柠檬黄中会对机体产生血液毒性和免疫毒性作用, 导致淋巴细胞的数量大大增加^[13-14]。也有研究表明, 无论剂量是否高于 ADI 水平, 柠檬黄摄入均会导致大鼠肝脏和肾脏病变^[15]。目前, 关于柠檬黄对生物影响的研究主要集中在哺乳动物^[16-17], 对硬骨鱼类的影响则较少研究。

肠道是行使消化和营养物质吸收的主要器官, 其内定植着数量庞大的微生物菌群, 稳定的肠道微生物菌群对宿主的生长与健康至关重要^[18]。据报道, 许多疾病与肠道微生物区系的变化有关^[19]。肠道菌群对药物、饮食甚至环境污染物都非常敏感。近年来, 已有学者报道, 动物暴露在重金属、持久性有机污染物、农药、纳米材料等环境污染物中会改变肠道微生物的组成, 导致机体能量代谢、养分吸收和免疫系统功能紊乱或产生其他中毒症状^[19-21]。然而, 目前关于色素摄入对水生动物肠道微生物影响的报道较少, 因此, 需要进一步研究。

鲫 (*Carassius auratus*) 隶属鲤形目 (Cyprinid) 鲤科 (Cyprinidae) 鲫属 (*Carassius*), 生长速度快, 在中国各地的淡水中被广泛养殖。除此之外, 鲫的生存能力和适应性强, 科研价值和营养价值高。鲫也可以作为评估环境污染状况的生物指标, 是毒理学研究的良好模型^[22-23], 因此, 利用鲫研究水环境毒理学具有较高的实用价值。本实验以鲫为研究对象, 从肝、肠组织形态、抗氧化能力、肠道微生物结构这 3 个方面综合研究饲料中添加不同浓度柠檬黄对鲫的影响, 以期丰富偶氮类色素对鱼类生态毒理方面的研究, 为水生态环境污染及水质检测提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验饲料

基础饲料购自河南通威饲料有限公司, 其配方及营养组成见表 1。将柠檬黄溶解于蒸馏水中配置成浓度为 0.1 g/mL 的母液, 随后稀释成不同浓度, 拌于基础饲料中, 以 0 (对照组)、1.4、5.5 和 10 mg/kg (处理组) 的量饲喂鲫鱼 30 d。

1.2 实验鱼及饲养管理

实验用鲫取自河南师范大学水产养殖基地。挑选同一批次、生长健康状况良好的鲫 [(35.0±1.5) g], 采用循环曝气淡水系统 (组内循环, 组间不循环), 在 1.2 m³ 的养殖桶中进行为期 30 d 的喂

表 1 基础饲料配方及营养组成

Tab. 1 Composition and nutrient levels of basal diet

项目 items	含量/% content
原料 ingredients	
鱼粉 fish meal	20
面粉 flour	20
豆粕 soybean meal	20
棉籽粕 cottonseed meal	5
酪蛋白 casein	19
羧甲基纤维素钠 CMC-Na	10
豆油 soybean oil	3
磷酸二氢钙 CaH ₂ PO ₄	1.5
矿物质预混料 mineral premix ¹	1
维生素预混料 vitamin premix ¹	0.1
盐 salt	0.2
甲基纤维素 methyl cellulose	0.2
合计 total	100
营养成分 nutrient level	
粗蛋白 crude protein	33.16
粗脂肪 crude lipid	6.52
粗灰分 crude ash	4.93

注: 1. 维生素预混料和矿物质预混料, 河南通威饲料有限公司

Notes: 1. vitamin premix and mineral premix, Henan Tongwei Feed Group

养实验。在正式实验前, 将鲫暂养 2 周进行驯化, 环境温度保持在 24 °C 左右, 水中溶解氧浓度为 7.5 mg/L 左右, pH 7.1~7.4, 氨氮含量<0.01 mg/L, 每日换水一次, 换水量为总水量的 1/3, 光照周期为 14 h 光照/10 h 黑暗。暂养期间, 投喂商业基础饲料, 每天 3 次, 投喂时间分别为 8:30、12:30 和 17:30, 并记录饲料用量。

将鲫随机分成 4 组, 分别为对照组 (0 mg/kg)、T1 组 (1.4 mg/kg)、T2 组 (5.5 mg/kg) 及 T3 组 (10.0 mg/kg), 每组 3 个平行, 每个平行 30 尾鱼。对照组饲喂基础饲料, 处理组分别投喂含有不同含量柠檬黄的饲料进行正式实验, 连续投喂 30 d 后取样。

1.3 样品采集与分析

样品收集 30 d 养殖实验结束后, 停食 24 h, 从各组中随机抽取 6 尾鱼, 采用尾静脉取血, 放置于 1.5 mL 离心管中, 4 °C 静置 2 h, 5000 r/min 离心 10 min, 吸取上层血清分装, 并置于 -80 °C 冰箱中备用。同时取少许肝组织放入冻存管中经液氮速冻, 储存于 -80 °C 冰箱, 用于

生化分析。随后,取肝、肠组织固定在波恩氏液中用于制备组织学切片。除此之外,对照组、T2和T3组再各选取15尾鱼,在无菌操作条件下取出肠道内容物,每3条鱼的肠道内容物混合为一个样本,总共取5个平行样本,用于肠道内容物测序。

石蜡切片的制备与观察 肝和肠组织在波恩氏液中固定过夜,经1×PBS漂洗,之后用梯度酒精(70%、80%、90%、95%、100%)逐级脱水,1/2二甲苯、二甲苯I、二甲苯II透明后,石蜡包埋、切片、HE染色,显微观察并拍照(Zeiss Axio Scope A1)。

血清和肝组织抗氧化指标检测 超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽(GSH-Px)和丙二醛(MDA)含量的测定使用南京建成生物工程研究所生产的试剂盒进行检测,检测方法依照试剂盒说明书进行操作。

肠道菌群结构测序分析 肠道微生物DNA按照QIAamp® DNA Stool Mini Kit(Qiagen)试剂盒说明书提取。以提取的基因组DNA作为模板进行16S rRNA V3-V4区特异区域的扩增。所用引物为338F(5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3')和806R(5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')。PCR体系和反应程序参照Chang等^[21]。PCR产物用AxyPrep DNA凝胶提取试剂盒进行纯化,之后在上海元莘生物医药科技有限公司的Illumina PE250平台上测序。测序结果分析前根据序列质量对原始数据进行初步筛查,得到优化序列。然后进行有效操作分类单元(operational taxonomic units, OTUs)聚类分析,基于OTU在不同样本中的分布,评估每个样本的 α 多样性水平。 β 多样性指数分析通过计算Weighted UniFrac距离进行主成分分析(principal co-ordinates analysis, PCoA);根据以上分类学信息,在门和属分类水平上进行群落结构组成的统计分析。本研究通过对肠道OTU统计、物种多样性分析及肠道菌群结构3个方面来分析饲料中添加不同浓度柠檬黄对鲫肠道菌群的影响。

1.4 数据统计

实验数据用平均值±标准差(mean±SD)表示。采用SPSS软件对数据进行统计分析,先对数据进行单因素方差分析(One-Way ANOVA),若组间有显著差异,再用Duncan氏法进行多重比较。

2 结果

2.1 柠檬黄摄入对鲫肠道组织形态的影响

HE染色结果显示,对照组鲫肠道组织结构完整清晰,纹状边缘和上皮细胞排列整齐,细胞边界明显,肠绒毛完整、致密。肌层厚度均匀,浆膜完整(图版I-1、2)。T1处理组出现肠上皮细胞空泡化,肠绒毛断裂现象(图版I-3、4)。T2处理组肠道损伤严重,肠绒毛断裂加剧,纹状缘排列不规则(图版I-5、6)。T3处理组肠组织形态进一步被破坏,肠绒毛断裂情况更严重,纹状缘和上皮细胞排列紊乱,并出现纹状边缘融合现象(图版I-7、8)。肠绒毛长度是反映鱼类肠道健康的重要指标之一,本实验中,处理组较对照组肠绒毛长度缩短($P<0.05$)(图1)。

2.2 柠檬黄对鲫肝组织形态的影响

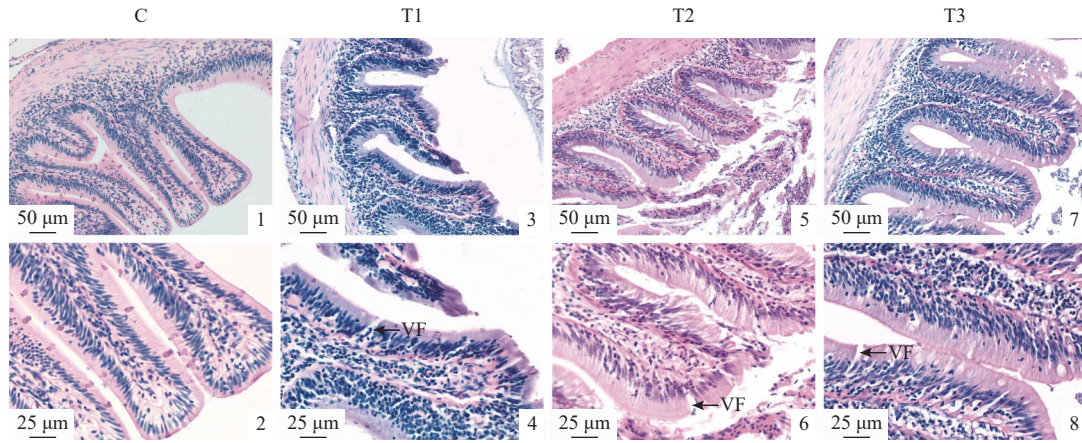
HE染色结果显示,对照组中,除血窦及胆小管横切的空洞外,肝组织中央静脉周围的肝细胞分布均匀,整齐紧密相连,形成肝板,肝小叶之间轮廓也清晰可见(图版II-1、2)。在T1处理组中,部分肝细胞发生损伤,细胞核萎缩变形,出现肝细胞空泡化(图版II-3、4)。T2和T3处理组空泡化现象加重,肝小叶轮廓模糊,且出现细胞核溶解和肝小叶轮廓模糊不清的现象,尤其是T3处理组较为严重,细胞界限模糊不清,细胞的形状变得不规则,细胞空泡化现象加剧,肝血窦不可见,肝小叶结构模糊,肝组织结构损伤严重(图版II-5~8)。

2.3 柠檬黄对鲫血清、肝组织抗氧化能力的影响

处理组血清中MDA随柠檬黄含量的增加呈上升趋势,T2和T3处理组MDA明显高于对照组($P<0.05$),但T1处理组与对照组相比无差异($P>0.05$)。柠檬黄处理后,SOD活性和GSH活性明显下降。同样,过氧化氢酶活性也显著下降($P<0.05$),并且随着柠檬黄浓度的增加,过氧化氢酶活性下降趋势愈加明显(图2)。在肝组织中,柠檬黄摄入导致MDA含量呈上升趋势;与对照组相比,处理组肝组织的SOD、CAT和GSH-Px活性下降($P<0.05$)。

2.4 柠檬黄摄入对鲫肠道微生物菌群的影响

柠檬黄摄入对鲫肠道微生物多样性的影响



图版 I 柠檬黄处理对肠结构的影响

C: 对照组; T1、T2、T3 分别为 1.4、5.5、10.0 mg/kg 柠檬黄处理组; 1、3、5、7 为各对应组肠组织 H.E 染色 (20×); 2、4、6、8 为 1、3、5、7 的局部放大 (40×), VF: 肠绒毛断裂

Plate I Effects of tartrazine consumption on intestinal structure

C, Control; T1, T2, and T3 are the groups treated by 1.4, 5.5, and 10 mg/kg bwt/day tartrazine, respectively; 1, 3, 5, 7 are HE staining of intestinal tissue in each corresponding groups (20×), and 2,4,6,8 are local zoom of 1,3,5,7 (40×). VF: intestinal villi rupture

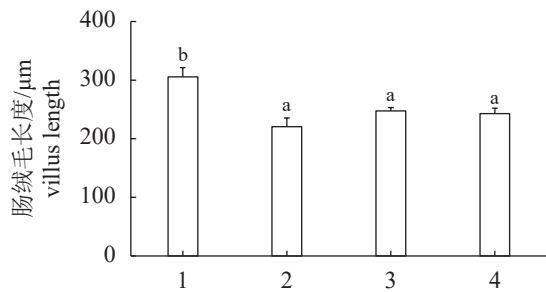


图 1 柠檬黄处理对肠绒毛长度的影响

不同字母表示显著性差异 ($P<0.05$), 下同。1、2、3、4 分别表示 C、T1、T2、T3 组。C: 对照组; T1、T2、T3 分别为 1.4、5.5、10.0 mg/kg 柠檬黄处理组

Fig. 1 Effects of tartrazine consumption on intestinal villus length

Different lowercase letters indicate significant difference ($P<0.05$), the same below. 1, 2, 3 and 4 are groups C, T1, T2 and T3, respectively. C. Control; T1, T2, and T3 are the groups treated by 1.4, 5.5, and 10.0 mg/kg tartrazine, respectively

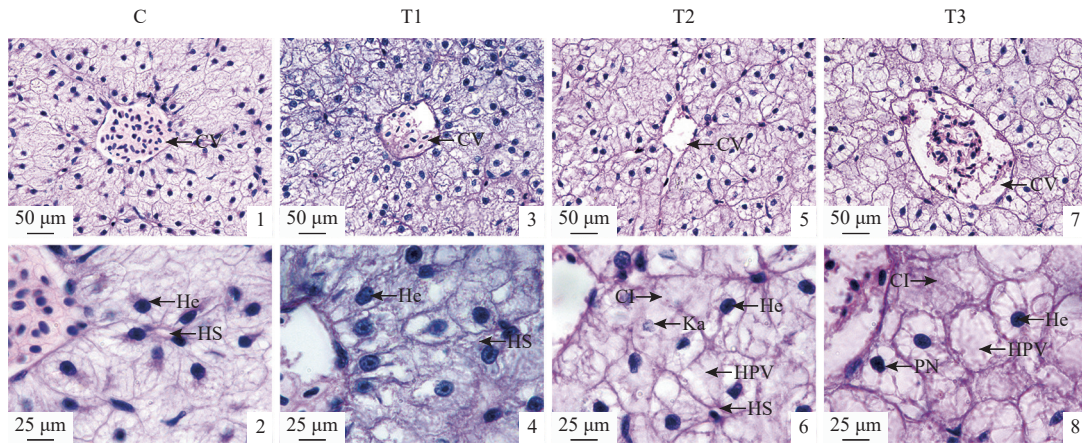
肠道微生物 α 多样性指数反映肠道微生物群落的丰富度和多样性。肠道菌群测序结果显示, 各组的覆盖率指数 (coverage) 均大于 0.99, 表明测序数据已经覆盖了大部分微生物, 各组样品均达到测序要求。Chao1 指数、香农指数 (Shannon) 和辛普森指数 (Simpson) 呈增加的趋势 ($P<0.05$)。结果显示, 柠檬黄摄入可能导致鲫鱼肠道微生物群落多样性与均匀度改变 (表 2)。

为进一步了解对照组和处理组间肠道菌群的多样性, 对每个样本的 OTU 进行了主成分分析

(PCoA) 分析。结果显示, 肠道样本中的微生物群落分区明显, 被分为 3 个明确的组 (图 3)。

柠檬黄处理对鲫鱼肠道微生物中 OTU 分布的影响 15 个样品共产生 2613 个 OTU, 在不考虑不同处理组间重叠 OTU 的情况下, C 组有 784 个 OTU; T2 组有 1321 个 OTU; T3 组有 1641 个。其中 C 和 T2 组共有的 OTU 数为 305, C 和 T3 组共有的 OTU 数为 393, T2 和 T3 组共有的 OTU 数为 691, 3 组共享的 OTU 个数为 256, 占总数的 9.8%。结果显示, 随着饲料中柠檬黄浓度的增加, 鲫鱼肠道中 OTU 数目呈现上升的趋势, C 组 OTU 数目最低。相同养殖环境下, 对照组和处理组肠道菌群中共有的核心菌群占比较小, 表明柠檬黄处理对鲫鱼肠道微生物的组成具有一定的影响。

柠檬黄摄入对鲫鱼肠道微生物组成结构的影响 本实验从不同水平上对 3 个实验组的样本进行了丰度分析, 在门水平上, 鲫鱼肠道菌群主要由变形杆菌门、放线杆菌门、氯杆菌门、纤毛菌门、梭杆菌门等组成 (图 4-a)。对照组和处理组菌群组成门类相似, 但在各组中所占比例有一定的差异。与对照组相比, 柠檬黄的摄入导致类杆菌门和变形杆菌门相对含量增加, 氯杆菌门和纤毛菌门的相对丰度明显降低。从属水平上看, 鲫鱼肠道样品中的优势属为红杆菌属、梭状芽胞杆菌属、盲肠杆菌属 (图 4-b), 柠檬黄摄入后, 一些菌在属水平发生较大变化 (表 3)。此外, 在柠檬黄处理的鲫鱼肠道中, 一些影响食物代谢、与短链脂肪酸生



图版 II 柠檬黄处理对肝组织的影响

CV. 中央静脉; He. 肝细胞; HS. 肝血窦; CI. 细胞轮廓模糊不清; Ka. 细胞核溶解; HPV. 肝细胞空泡化; PN. 细胞核偏移; C. 对照组; T1、T2、T3 分别为 1.4、5.5、10.0 mg/kg 柠檬黄处理组; 1、3、5、7 为各对应组肝组织 H.E 染色 (20×); 2、4、6、8 为 1、3、5、7 的局部放大 (40×)

Plate II Effects of tartrazine consumption on liver structure

CV. central veins; He. hepatocyte; HS. hepatic sinusoid; CI. cellular outline indistinguishable; Ka. karyolysis; HPV. hepato cellular vacuolation; PN. cellular peripheral nucleus; C. Control; T1, T2, and T3 are the groups treated by 1.4, 5.5, and 10.0 mg/kg tartrazine, respectively; 1, 3, 5, 7 are H.E staining of liver tissue in each corresponding group (20×), and 2, 4, 6, 8 are local zoom of 1, 3, 5, 7 (40×)

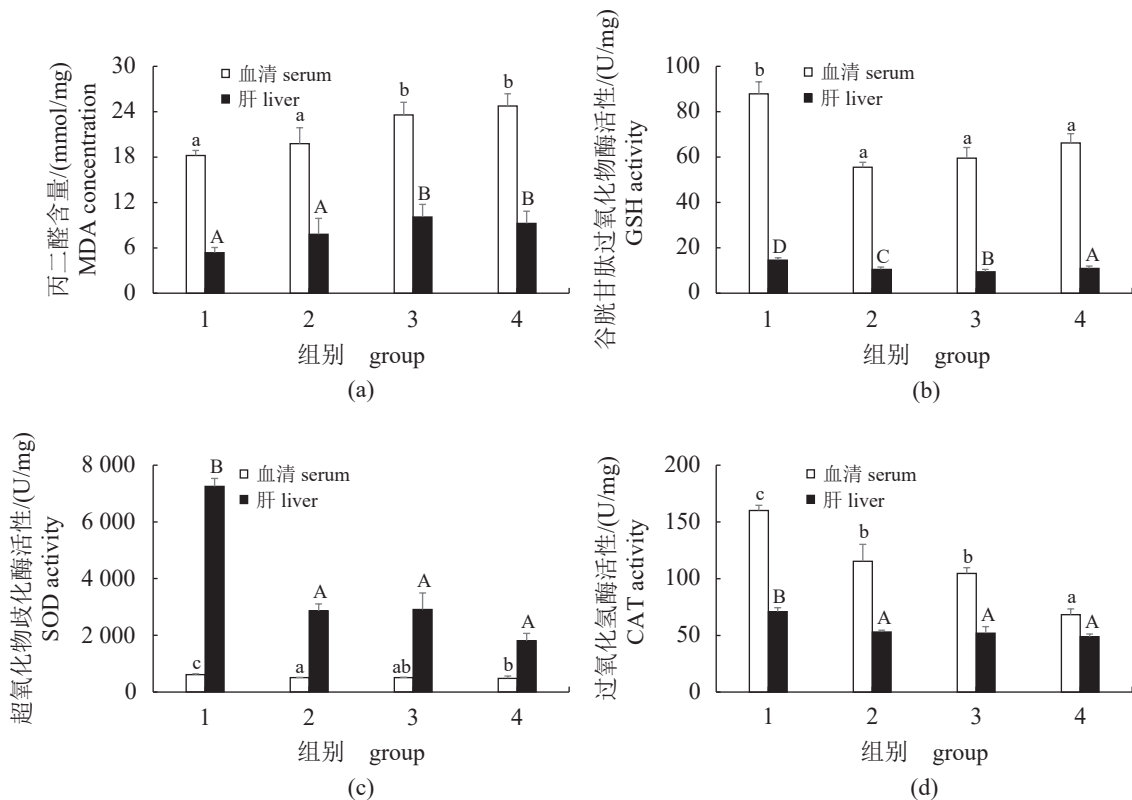


图 2 柠檬黄摄入对血清和肝脏抗氧化酶活性的影响

1、2、3、4 分别表示 C、T1、T2、T3 组。C. 对照组; T1、T2、T3 分别为 1.4、5.5、10.0 mg/kg 柠檬黄处理组

Fig. 2 Effects of tartrazine consumption on the serum and liver antioxidant enzyme activity of crucian carp

1, 2, 3 and 4 are groups C, T1, T2 and T3, respectively. C. Control; T1, T2, and T3 are the groups treated by 1.4, 5.5, and 10.00 mg/kg tartrazine, respectively

表 2 柠檬黄摄入对鲫鱼肠道物种多样性的影响

Tab. 2 Effects of tartrazine consumption on gut species diversity of crucian carp

柠檬黄 (mg/kg) tartrazine	Chao1 指数 Chao1 index	香农指数 Shannon index	辛普森指数 Simpson index	覆盖率指数 Coverage
0	365.3162±56.91 ^a	5.3636±0.25 ^a	0.9428±0.01 ^a	0.999487
5.5	664.3844±54.91 ^b	5.9434±0.16 ^b	0.9451±0.01 ^b	0.998957
10.0	810.6094±91.61 ^c	6.9219±0.14 ^c	0.9709±0.01 ^c	0.998981

注: 同一列数据不同上标表示组间存在显著差异 ($P < 0.05$)

Notes: Values in each column with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$)

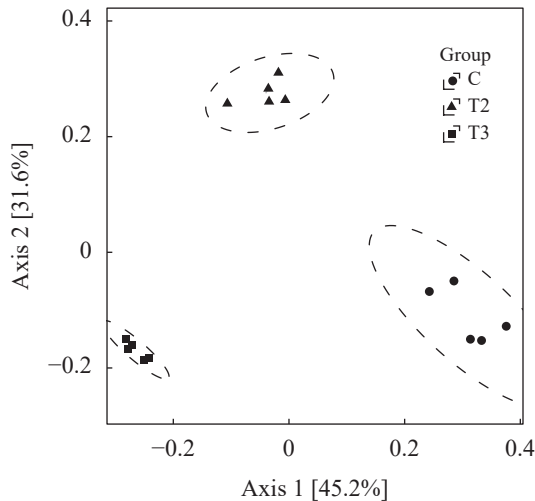


图 3 对照组和处理组肠道微生物群落组成的主成分分析 (PCoA)

主成分 1 和主成分 2 分别解释了 45.2% 和 31.6% 的方差。C. 对照组; T2、T3 分别为 5.5、10.0 mg/kg 柠檬黄处理组

Fig. 3 Principal component analysis (PCoA) of gut bacterial community compositions in the control and treated groups

Principal components (PCs) 1 and 2 explain 45.2% and 31.6% of the variance, respectively. C. Control; T2, and T3 are the groups treated by 5.5, and 10.0 mg/kg tartrazine, respectively

成有关的细菌 (芽孢杆菌和梭状芽孢杆菌) 丰度水平降低 ($P < 0.05$), 而一些致病微生物 (如蛭弧菌和希瓦氏菌) 的数量增加 ($P < 0.05$) (表 4)。结果表明, 柠檬黄处理导致鲫肠道中菌群的组成结构发生变化。

3 讨论

合成食用色素由于其成本低、易获得、稳定性好等优点, 在食品、纺织、印刷等工业中被广泛使用, 由此产生的色素废水的排放, 对水生生物有一定的威胁^[3]。目前关于柠檬黄对水生生物的影响还鲜有报道, 本研究以终生生活在水中的鲫为模型, 旨在探讨柠檬黄的摄入对水生动物组

织结构、抗氧化指标与肠道微生物结构的影响, 以期为柠檬黄毒性机制研究奠定基础。肝脏是生物体重要的代谢器官, 具有一定的解毒功能, 摄入有毒性的化合物会对肝脏造成损伤, 使肝细胞出现异常^[23]。本实验中我们观察到鲫摄入不同剂量柠檬黄 30 d 后, 部分肝细胞发生损伤, 细胞核萎缩、变形甚至溶解; 在鱼类中, 肠道是机体消化和吸收功能的主要场所, 是鱼类从外界获取物质和能量的媒介^[24-25]。鱼类肠道对于外部环境的变化比较敏感, 易受饲料成分、外界水质变化等因素的影响, 易造成生理性损伤。本研究结果中柠檬黄摄入导致肠上皮细胞空泡化、肠绒毛断裂、变短等现象, 说明柠檬黄的摄入可能有改变肠道生理结构的趋势。

Wu 等^[26]报道显示, 摄入相同剂量柠檬黄 60 d, 与 30 d 相比, 肠的组织形态进一步被破坏, 出现严重的肠道损伤, 肠绒毛断裂情况明显加剧, 上皮细胞排列愈加不整齐, 纹状缘融合现象明显; 肝组织中, 细胞核溶解增多, 细胞空泡化现象加剧, 细胞界限模糊不清, 肝血窦不可见, 肝小叶结构模糊, 肝组织结构损伤更加严重。因此, 同等剂量下, 随着柠檬黄摄入时间的延长, 组织损伤程度增加, 对机体的伤害可能更大。这可能是由于柠檬黄的摄入导致肝、肠等组织细胞代谢的异常, 进而造成相应的组织损伤。

抗氧化指标能够反映机体的健康状态, SOD、CAT 作为机体抗氧化酶, 具有清除和平衡细胞内活性氧自由基的作用。GSH-Px 可以保护细胞免受自由基引起的氧化损伤。MDA 是脂质过氧化的衍生物, 其浓度反映了脂质过氧化物的水平^[21,27]。因此, SOD、CAT、GSH-Px 以及 MDA 的动态平衡对机体的健康非常重要^[28]。本研究发现, 饲料中添加不同浓度柠檬黄后, 鲫血清、肝脏中的 SOD、CAT 和 GSH-Px 活性下降, MDA 呈升高趋势, 这与其他毒性物质研究中观察到的血清相关酶活性变化趋势相似^[21], 表明柠檬黄摄入后机体发生了

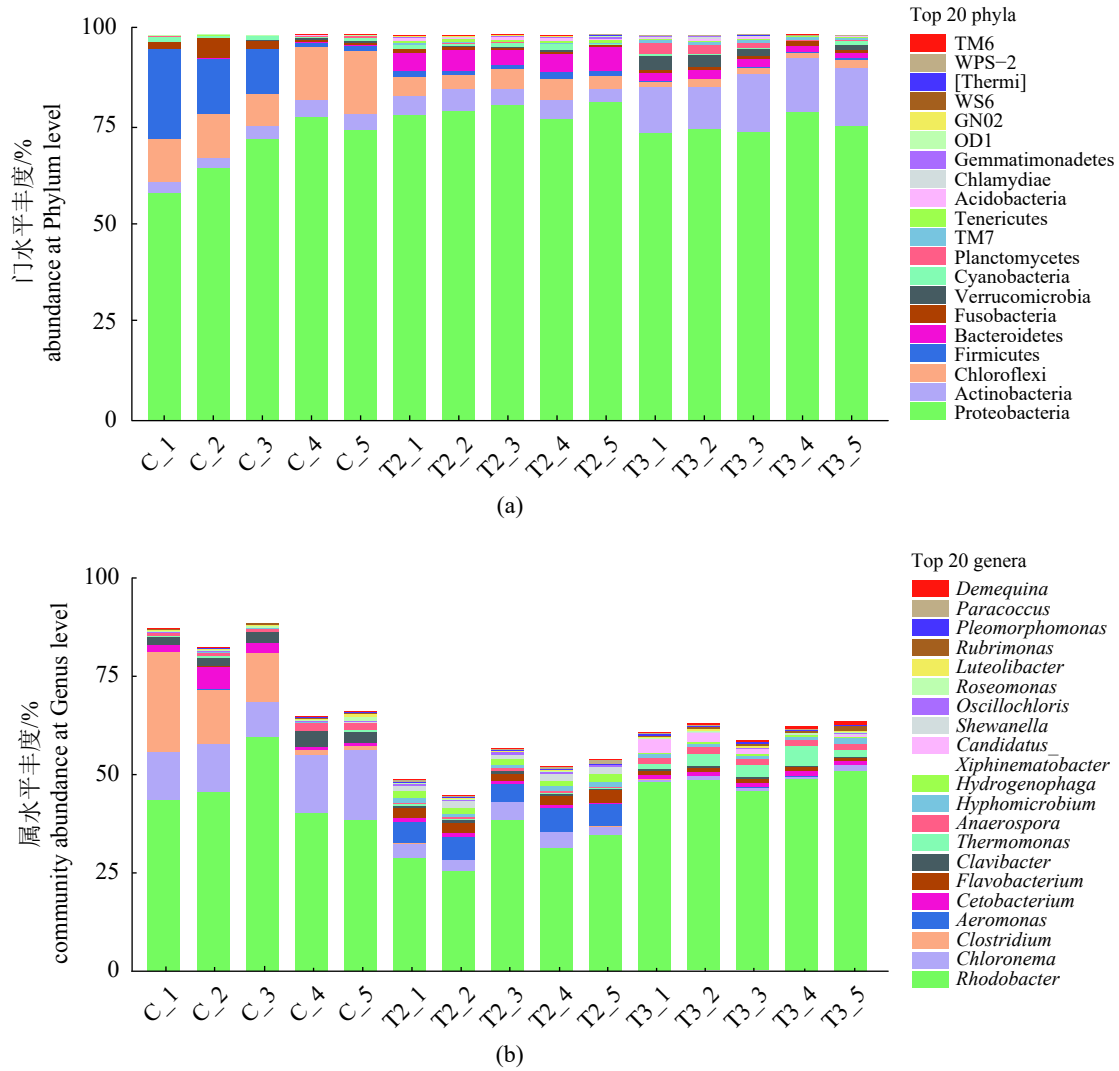


图 4 对照组和处理组中优势门(A)和属(B)水平的相对丰度

Fig. 4 Relative abundance at phylum level (A) and genus level (B) in the control and treated groups

表 3 柠檬黄摄入对鲫肠道菌群属水平的影响

Tab. 3 Changes in the intestinal microbiota at the genus level after tartrazine consumption

属 Genus name	丰度/% abundance		
	对照组 control	T2	T3
unidentified_Actinomycetales	0.006±0.018 ^a	0.026±0.025 ^b	0.109±0.072 ^c
unclassified_Rhizobiaceae	0.036±0.033 ^a	0.006±0.002 ^b	0.003±0.004 ^c
Thermomonas	0.026±0.007 ^a	0.001±0.002 ^b	0.002±0.056 ^c
Microbacteriaceae	0.003±0.001 ^a	0.005±0.001 ^b	0.020±0.006 ^c
Clavibacter	0.002±0.031 ^a	0.025±0.009 ^c	0.005±0.001 ^b
Hyphomicrobium	0.007±0.001 ^a	0.044±0.011 ^b	0.041±0.013 ^b
Flavobacterium	0.001±0.001 ^a	0.101±0.021 ^c	0.044±0.005 ^b
unclassified_Sphingomonadales	0.001±0.001 ^a	0.005±0.002 ^b	0.009±0.070 ^b
unidentified_TM7-1	0.001±0.001 ^a	0.002±0.003 ^b	0.008±0.009 ^c
unidentified_Xanthobacteraceae	0.024±0.007 ^a	0.105±0.021 ^c	0.058±0.009 ^b

注：同一列数据不同上标表示组间存在显著差异(P<0.05)
Notes: Values in each column with different superscripts are significantly different(P<0.05)

表 4 柠檬黄摄入对鲫鱼肠道菌群的影响

Tab. 4 Effects of tartrazine consumption on intestinal microflora of crucian carp

种类 name	丰度/% abundance		
	对照组 control	T2	T3
<i>Shewanella</i>	0	0.03±0.000 ^a	1.30±0.110 ^b
<i>Bdellovibrio</i>	0.06±0.028 ^a	0.19±0.036 ^b	0.22±0.044 ^b
<i>Roseomonas</i>	0.41±0.291 ^a	0.18±0.06 ^a	0.15±0.022 ^a
<i>Bacillus</i>	0.23±0.124 ^a	0.04±0.038 ^b	0
<i>Clostridium</i>	0.95±0.090 ^a	0.02±0.000 ^b	0

注: 同一列数据不同上标表示组间存在显著差异 ($P < 0.05$)

Notes: Values in each column with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$)

氧化应激反应。鲫摄入同等剂量柠檬黄 60 d 相应的抗氧化指标变化程度更加明显^[26], 柠檬黄摄入导致机体产生严重的氧化应激反应, 并且摄取时间越久, 反应越剧烈。这与早期在大鼠和小鼠中研究结果一致^[29], 即服用柠檬黄, 可显著增加 MDA 含量, 显著降低 SOD、CAT 和 GSH-Px 的活性, 导致机体抗氧化系统被破坏。

有研究表明, 肠道微生物影响宿主的新陈代谢、能量平衡和炎症反应, 被认为是宿主健康的重要决定因素。因此, 肠道微生物在健康中起着至关重要的作用^[30]。在本研究中, 由于柠檬黄的摄入导致肠道菌群有效 OTU 数目、Chao1、Shannon 和 Simpson 等多样性指数变化, 推测柠檬黄摄入改变了肠道微生物的多样性。其中 Chao1 与 Shannon 升高可能意味着物种多样性升高, Simpson 的升高暗示物种丰度更均匀, 这可能是由于柠檬黄摄入导致鲫肠道内有害菌增加, 有益菌减少导致。从门水平和属水平方面来看, 对照组和不同处理组间鲫肠道微生物结构组成存在差异, 一些有益菌和有害菌的相对丰度发生改变。与对照组相比, 一些有益菌的数量相对减少, 有害菌的数量相对增加。以上结果表明, 柠檬黄摄入导致鲫肠道菌群结构改变。柠檬黄的摄入对鲫肠道菌群的影响与环境污染造成的影响是相似的, 该结果再次证明了柠檬黄对宿主肠道微生物具有一定的危害。考虑到柠檬黄摄入后鲫肝、肠的病理变化, 实验推测柠檬黄诱导的组织损伤可能改变了肠道微环境, 进而影响肠道微生物区系, 导致微生物区系失调最终威胁宿主的健康。

综上所述, 无论柠檬黄摄入剂量是否超过 ADI 水平, 柠檬黄的摄入均会对鲫产生毒性作用,

导致鲫的肝、肠组织结构发生损伤, 抗氧化系统遭到破坏, 并且机体损伤程度随着柠檬黄摄入剂量的增加而增加。此外, 柠檬黄的摄入还影响鲫肠道微生物区系结构, 造成肠道微生物稳态失调。该结果有助于为进一步了解柠檬黄在水生动物体内的毒性作用及相关机制奠定基础。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] El-Desoky G E, Abdel-Ghaffar A, Al-Othman Z A, *et al.* Curcumin protects against tartrazine-mediated oxidative stress and hepatotoxicity in male rats[J]. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 2017, 21(3): 635-645.
- [2] Abd-Elhakim Y M, Moustafa G G, Hashem M M, *et al.* Influence of the long-term exposure to tartrazine and chlorophyll on the fibrogenic signalling pathway in liver and kidney of rats: the expression patterns of collagen 1- α , TGF β -1, fibronectin, and caspase-3 genes[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2019, 26(12): 12368-12378.
- [3] Motta C M, Simoniello P, Arena C, *et al.* Effects of four food dyes on development of three model species, *Cucumis sativus*, *Artemia salina* and *Danio rerio*: assessment of potential risk for the environment[J]. *Environmental Pollution*, 2019, 253: 1126-1135.
- [4] Saratale R G, Saratale G D, Chang J S, *et al.* Bacterial decolorization and degradation of azo dyes: a review[J]. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 2011, 42(1): 138-157.
- [5] Edison T N J I, Atchudan R, Sethuraman M G, *et al.* Reductive-degradation of carcinogenic azo dyes using *Anacardium occidentale* testa derived silver nanoparticles[J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2016, 162: 604-610.
- [6] Amin K A, Hameid II H A, Abd Elsttar A H. Effect of food azo dyes tartrazine and carmoisine on biochemical parameters related to renal, hepatic function and oxidative stress biomarkers in young male rats[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2010, 48(10): 2994-2999.
- [7] WHO. Specifications for the identity and purity of food additives and their toxicological evaluation: food colours and some antimicrobials and antioxidants. Eighth

- report of the joint FAO/WHO expert committee on food additives[R]. Geneva: World Health Organization, 1965, 309: 1-25.
- [8] Rycken G, Azimonti G, Bampidis V, *et al.* Safety and efficacy of tartrazine (E 102) for cats and dogs, ornamental fish, grain-eating ornamental birds and small rodents[J]. *European Food Safety Authority*, 2016, 14(11): e04613.
- [9] Dixit S, Purshottam S K, Gupta S K, *et al.* Usage pattern and exposure assessment of food colours in different age groups of consumers in the State of Uttar Pradesh, India[J]. *Food Additives & Contaminants:Part A*, 2010, 27(2): 181-189.
- [10] Dixit S, Purshottam S K, Khanna S K, *et al.* Usage pattern of synthetic food colours in different states of India and exposure assessment through commodities preferentially consumed by children[J]. *Food Additives & Contaminants:Part A*, 2011, 28(8): 996-1005.
- [11] Elhkim M O, Héraud F, Bemrah N, *et al.* New considerations regarding the risk assessment on Tartrazine: an update toxicological assessment, intolerance reactions and maximum theoretical daily intake in France[J]. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2007, 47(3): 308-316.
- [12] Ha M S, Ha S D, Choi S H, *et al.* Exposure assessment of synthetic colours approved in Korea[J]. *Food Additives & Contaminants:Part A*, 2013, 30(4): 643-653.
- [13] Tanaka T. Reproductive and neurobehavioural toxicity study of tartrazine administered to mice in the diet[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2006, 44(2): 179-187.
- [14] Abd-Elhakim Y M, Hashem M M, El-Metwally A E, *et al.* Comparative haemato-immunotoxic impacts of long-term exposure to tartrazine and chlorophyll in rats[J]. *International Immunopharmacology*, 2018, 63: 145-154.
- [15] Khayyat L, Essawy A, Sorour J, *et al.* Tartrazine induces structural and functional aberrations and genotoxic effects *in vivo*[J]. *PeerJ*, 2017, 5: e3041.
- [16] Abe F R, Soares A M V M, De Oliveira D P, *et al.* Toxicity of dyes to zebrafish at the biochemical level: cellular energy allocation and neurotoxicity[J]. *Environmental Pollution*, 2018, 235: 255-262.
- [17] Mehedi N, Mokrane N, Alami O, *et al.* A thirteen week ad libitum administration toxicity study of Tartrazine in Swiss mice[J]. *African Journal of Biotechnology*, 2013, 12(28): 4519-4529.
- [18] Cerezuola R, Fumanal M, Tapia-Paniagua S T, *et al.* Histological alterations and microbial ecology of the intestine in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) fed dietary probiotics and microalgae[J]. *Cell and Tissue Research*, 2012, 350(3): 477-489.
- [19] Jin Y X, Wu S S, Zeng Z Y, *et al.* Effects of environmental pollutants on gut microbiota[J]. *Environmental Pollution*, 2017, 222: 1-9.
- [20] Chen J J, Sun D D, Cui H, *et al.* Toxic effects of carbon quantum dots on the gut-liver axis and gut microbiota in the common carp *Cyprinus carpio*[J]. *Environmental Science:Nano*, 2022, 9(1): 173-188.
- [21] Chang X L, Wang X F, Feng J C, *et al.* Impact of chronic exposure to trichlorfon on intestinal barrier, oxidative stress, inflammatory response and intestinal microbiome in common carp (*Cyprinus carpio* L.)[J]. *Environmental Pollution*, 2020, 259: 113846.
- [22] Sula E, Aliko V, Barceló D, *et al.* Combined effects of moderate hypoxia, pesticides and PCBs upon crucian carp fish, *Carassius carassius*, from a freshwater lake-*in situ* ecophysiological approach[J]. *Aquatic Toxicology*, 2020, 228: 105644.
- [23] 吴利敏, 徐瑜凤, 李永婧, 等. 急性氨氮胁迫对淇河鲫幼鱼脑、鳃、肝、肾组织结构的影响[J]. *中国水产科学*, 2020, 27(7): 789-800.
- Wu L M, Xu Y F, Li Y J, *et al.* Effects of acute ammonia nitrogen exposure on brain, gill, liver and kidney histology of Qi river crucian carp (*Carassius auratus*)[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2020, 27(7): 789-800 (in Chinese).
- [24] Zhang S B, Jin Y X, Zeng Z Y, *et al.* Subchronic exposure of mice to cadmium perturbs their hepatic energy metabolism and gut microbiome[J]. *Chemical Research in Toxicology*, 2015, 28(10): 2000-2009.
- [25] 郑晓婷, 段亚飞, 董宏标, 等. 甲壳动物肠道免疫系统研究进展[J]. *海洋湖沼通报*, 2016(3): 83-90.
- Zheng X T, Duan Y F, Dong H B, *et al.* Progress on gut mucosal immunization of crustacean[J]. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2016(3): 83-90 (in Chinese).
- [26] Wu L M, Xu Y F, Lv X X, *et al.* Impacts of an azo food dye tartrazine uptake on intestinal barrier, oxidative stress, inflammatory response and intestinal microbiome

- in crucian carp (*Carassius auratus*)[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2021, 223: 112551.
- [27] Jin M, Pan T T, Cheng X, *et al.* Effects of supplemental dietary L-carnitine and bile acids on growth performance, antioxidant and immune ability, histopathological changes and inflammatory response in juvenile black seabream (*Acanthopagrus schlegelii*) fed high-fat diet[J]. *Aquaculture*, 2019, 504: 199-209.
- [28] Nepal S, Kumar V, Makkar H P S, *et al.* Comparative nutritional value of *Jatropha curcas* protein isolate and soy protein isolate in common carp[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2018, 44(1): 143-162.
- [29] Gao Y L, Li C M, Shen J Y, *et al.* Effect of food azo dye Tartrazine on learning and memory functions in mice and rats, and the possible mechanisms involved[J]. *Journal of Food Science*, 2011, 76(6): T125-T129.
- [30] Yang S, Du J, Luo J, *et al.* Effects of different diets on the intestinal microbiota and immunity of common carp (*Cyprinus carpio*)[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2019, 127(5): 1327-1338.

Effects of tartrazine consumption on liver and intestine structure, antioxidant indices and intestinal microbiota in crucian carp (*Carassius auratus*)

XIN Qingqing, LÜ Xixi, WU Limin, TIAN Xue, MA Wenge, LI Xuejun*

(College of Fisheries, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

Abstract: Tartrazine (TZ), a synthetic food dye, is widely used in food, cosmetics and textiles to improve the sensory properties of final products. In recent years, there are reports on detecting azo dyes in the aquatic environment, so the impact of these compounds on aquatic organisms could not be ignored. In the present study, we aimed to evaluate the effects of different doses (0, 1.4, 5.5 and 10 mg/kg) of TZ consumption on health by using a teleost, crucian carp (*Carassius auratus*) as the experimental fish. The effects of TZ on liver and intestinal tissue structure, antioxidant properties and intestinal microbiota of crucian carp were analyzed. The results showed that the intake of 1.4 mg/kg of TZ led to the vacuolization of intestinal epithelial cells and decreased the height of intestinal villi. The intake of 5.5 mg/kg caused the rupture of intestinal villi, while the pathological phenomenon was more serious in the 10 mg/kg treatment group; It also showed that TZ consumption, even at 1.4 mg/kg resulted in hepatocyte injury, nuclear atrophy, deformation and even dissolution, and with the increase of TZ, the vacuolization of hepatocytes increased. Moreover, with the increase of TZ concentrations, the activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione (GSH-Px) in serum and liver were downregulated, while the contents of MDA elevated. In addition, the intestinal contents sequencing results showed that TZ consumption also affected the community of the intestine microbiota structure of crucian carp. Compared with the control group, the number of effective OTUs, Chao1, Shannon and Simpson diversity indexes increased significantly in the treated groups. The number of some beneficial bacteria (*Bacillus* and *Clostridium*) decreased significantly, while the number of some pathogenic microorganisms (such as *Bdellovibrio* and *Shewanella*) increased markedly. The above results indicate that the addition of TZ in diet could damage the liver and intestinal tissue structure of crucian carp.

Key words: *Carassius auratus*; tartrazine; oxidative stress; intestinal microbiota

Corresponding author: LI Xuejun. E-mail: xjli670405@163.com

Funding projects: Natural Science Foundation of Henan Normal University (2021QK09)