

文章编号: 1000-0615(2017)03-0448-08

DOI: 10.11964/jfc.20160610438

黄曲霉毒素B₁对凡纳滨对虾幼虾肝胰腺抗氧化酶的损伤机制

解伟, 郭冉*, 夏辉, 王小瑞, 李赵嘉,
李垚垚, 王美雪, 沈庆洲

(河北农业大学海洋学院, 河北秦皇岛 066003)

摘要: 为考察黄曲霉毒素B₁对凡纳滨对虾幼虾抗氧化酶的损伤机制, 选取体质量为(0.3±0.02) g的凡纳滨对虾进行实验, 实验组饲喂含2000 μg/kg AFB₁的饲料, 对照组饲喂无AFB₁饲料, 每组设3个平行, 共养殖4周, 每隔4天进行1次取样, 测定肝胰腺抗氧化酶指标。结果显示, 幼虾在摄入高浓度AFB₁后, 第8天实验组体内SOD显著低于对照组, 连续饲喂2周后机体内的SOD活性显著下降, 实验组酶活性极显著低于对照组; 同时CAT活性随着时间的推移呈现下降的趋势, 且每个阶段之间差异显著, 20 d后虽有上升趋势, 但与初始相比显著降低, 第8天之后, 实验组CAT活性均低于对照组, 在第8、16和24天酶活性极显著低于对照组。GSH-Px活性整体均低于对照组, 且机体自我修复能力下降。同时脂质过氧化物MDA的含量在16 d后出现显著增加, 同时实验组MDA含量极显著高于对照组, 且继续呈现增加趋势。研究表明高浓度AFB₁对凡纳滨对虾抗氧化酶的影响因酶种类而异, 同时对肝胰腺的损伤持续增加, 在4周内便会造成肝胰腺的严重损伤。

关键词: 凡纳滨对虾; 黄曲霉毒素B₁; 抗氧化酶

中图分类号: S 948

文献标志码: A

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)作为优良的虾类养殖品种, 于1988年引入我国, 因营养要求低、生长速率快等优点已在我国沿海地区进行了大规模的人工养殖。然而目前制约养殖生产的问题日渐突出, 其中最重要的是虾肝病的发生, 除肝胰腺坏死性细菌(NHPB)和一些支原体等会导致肝胰腺病变^[1], 配合饲料的营养不均衡和饲料中霉菌毒素作用也是肝病产生的主要因素。对虾配合饲料中, 利用植物蛋白代替鱼粉等动物蛋白已经成为趋势, 大量的豆粕、花生粕等在高温高湿的条件下储藏易引起黄曲霉菌(*Aspergillus flavus*)和寄生曲霉菌(*A. parasiticus*)的生长, 产生黄曲霉毒素。黄曲霉毒素是一类毒性极强的物质, 具有致癌和致突变的作用, 根据其化学结构分为4种: B₁、B₂、G₁和G₂。AFB₁(黄曲霉毒素B₁, aflatoxin)是最常见也是其

中毒性最强的毒素^[2], 其毒效相当于氰化钾的10倍, 三氧化二砷的60倍。我国水产品饲料受AFB₁污染程度广泛, 这种现状对水产动物养殖造成极大威胁。更严重的是在水产动物组织中已检测出AFB₁的残留, 这对消费者的公共卫生健康产生潜在危害。El-Sayed等^[3]发现, AFB₁以180 μg/kg的浓度投喂舌齿鲈(*Dicentrarchus labrax*)6周后, 其肌肉中的AFB₁浓度可达到5 μg/kg。黄莹等^[4]研究AFB₁对异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)成鱼的毒性作用时发现, 投喂含500 μg/kg的AFB₁饲料56 d后, AFB₁会在其肝脏内积累, 且与毒素剂量呈正相关, 同时在成鱼肌肉和性腺中的积累分别达到0.46和2.29 μg/kg。世界各国均对食品中AFB₁的限量值做出相关规定, 日本检验检疫措施规定进口食品中不得检出AFB₁, 欧盟食品中AFB₁的限量范围为0~12 μg/kg, 我国

收稿日期: 2016-06-07 修回日期: 2016-09-12

资助项目: 国家自然科学基金(31202010); 河北省科技支撑项目(14967117D)

通信作者: 郭冉, E-mail: toguoran@163.com

的食品标准规定AFB₁的限量范围为5~20 μg/kg, 这些限量值的规定只涉及玉米(*Zea mays*)、花生(*Arachis hypogaea*)、豆类及其相关制品, 但在水产品中AFB₁的限量值并未引起国内研究人员的足够重视。

目前在水产动物中对AFB₁的研究主要集中在鱼类。不同鱼类对AFB₁的敏感程度不同, 冷水鱼类要比温水性鱼类对AFB₁更敏感^[4], 对黄曲霉毒素最敏感的是虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)^[5]。这种不同的敏感程度受生物转化过程中来源于不同基因的酶的作用^[6]。相对于其他甲壳动物和硬骨鱼类, 凡纳滨对虾受AFB₁毒性影响较小^[7]。肝脏是黄曲霉毒素的靶器官, 研究表明, AFB₁进入机体后会增加体内活性氧(ROS)的形成^[8], 同时由于生物膜磷脂中的多聚不饱和脂肪酸较易受到ROS自由基的攻击, 产生脂质过氧化反应, 造成过氧化脂质的含量升高, 主要产物是脂质过氧化物丙二醛(MDA), 因此自由基对机体细胞损伤的严重程度可以通过MDA含量的高低体现。这种脂质过氧化反应遇到超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽(GSH)等抗氧化物质或产生损伤效应后终止。机体抗氧化酶组成抵抗自由基损伤的第一道防线, 主要有SOD、谷胱甘肽过氧化氢酶(GSH-Px)和过氧化氢酶(CAT)等, SOD可通过歧化反应消除超氧阴离子, 其活力间接反映了机体清除氧自由基的能力^[9], 过氧化氢(H₂O₂)可以在CAT和GSH-Px的共同作用下转化为水和分子氧, 降低自由基对于细胞的氧化损伤。本实验参考王静等^[10]的研究, 选取致死率最高的AFB₁(浓度2000 μg/kg)饲料进行实验, 研究高浓度黄曲霉毒素对虾的抗氧化系统造成损伤的动态过程, 为黄曲霉毒素中毒机理的研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验对象

凡纳滨对虾虾苗由河北沧州黄骅鑫海生物技术公司提供, 在实验室水族箱“标粗”, 实验开始前用随机抽样方法选出长势良好且健壮无病的虾苗, 平均体长1.5 cm, 体质量为(0.3±0.02) g, 放入水族箱内以配合饲料作为饵料暂养10 d后进行实验。

1.2 实验方法

以酪蛋白和明胶为蛋白源, 鱼油、玉米油和卵磷脂为脂肪源, 配制基础饲料(表1)。并在

基础饲料中添加AFB₁, 浓度为2000 μg/kg。测得饲料中AFB₁实际浓度为1922.8 μg/kg。实验中AFB₁标准品购买于Sigma。各种原料经过粉碎、过80目筛后按比例混合(微量成分采取逐级扩大法混合均匀), 加入鱼油与玉米油后进行搅拌, 边搅拌边加入30%水, 于双螺杆压条机〔华中理工大学监制, F-26(II)〕中制成1.5 mm直径的

表1 基础饲料的配方及营养组成

Tab. 1 Formulation and composition of experimental diets

项目 items	含量 content	%
原料 ingredient		
酪蛋白 casein		44.00
明胶 gelatin		10.00
纤维素 cellulose		12.90
玉米淀粉 corn starch		20.00
鱼油 fish oil		3.50
玉米油 corn oil		3.50
卵磷脂 lecithin		0.50
维生素预混料 vitamin mixture ¹⁾		2.00
矿物盐预混料 mineral mixture ²⁾		0.50
氯化胆碱 choline		0.50
VC磷酸酯 ascorbic phosphate ester		0.50
诱食剂 attractant		0.10
羧甲基纤维素钠 sodium carboxymethylcellulose		2.00
合计 total		100.00
饲料成分组成 proximate analysis		
粗蛋白 crude protein		45.63
粗脂肪 crude lipid		6.33
灰分 ash		3.21

注: 1)每kg维生素预混料含有氯化胆碱55.5 g, 肌醇 22.2 g, 泛酸钙 8.3 g, V C 11.1 g, VB₁ 2.2 g, VB₂ 5.6 g, VB₆ 0.6 g, VK 0.6 g, 叶酸 0.2 g, VB₁₂ 0.12 g, 生物素 0.06 g, 醋酸-α-生育酚4.4 g, 纤维素 888.7 g

2)每kg矿物盐预混料含有Ca (H₂PO₄)₂·2H₂O 122.9 g, 乳酸钙 474.2 g, NaH₂PO₄·2H₂O 42.0 g, NaCl 32.2 g, K₂SO₄ 163.8 g, KCl 65.8 g, FeSO₄·7H₂O 10.7 g, 柠檬酸铁 38.3 g, MgSO₄·7H₂O 44.2 g, ZnSO₄ 4.7 g, MnSO₄·H₂O 0.33 g, CuSO₄·5H₂O 0.22 g, CoCl₂·6H₂O 0.43 g, KIO₄ 0.22 g

Notes: 1) one kg of vitamin premix contained the following: choline chloride 55.5 g, inositol 22.2 g, Ca-pantothenate 8.3 g, VC 11.1 g, VB₁ 2.2 g, VB₂ 5.6 g, VB₆ 0.6 g, VK 0.6 g, folic acid 0.2 g, VB₁₂ 0.12 g, biotin 0.06 g, tocopherol acetate 4.4 g, cellulose 888.7 g

2) one kg of mineral premix contained the following: Ca (H₂PO₄)₂·2H₂O 122.9 g, calcium lactate 474.2 g, NaH₂PO₄·2H₂O 42.0 g, NaCl 32.2 g, K₂SO₄ 163.8 g, KCl 65.8 g, FeSO₄·7H₂O 10.7 g, ferric citrate 38.3 g, MgSO₄·7H₂O 44.2 g, ZnSO₄ 4.7 g, MnSO₄·H₂O 0.33 g, CuSO₄·5H₂O 0.22 g, CoCl₂·6H₂O 0.43 g, KIO₄ 0.22 g

颗粒饲料, 60 °C烘箱中熟化4 h后晾干, 置于-20 °C冰箱中保存备用。室内实验中玻璃水箱的规格为长×宽×高=60 cm×40 cm×50 cm, 每箱投放70尾幼虾, 养殖密度约为583尾/m³。实验组投喂含有AFB₁(2000 µg/kg)的饲料, 对照组投喂无AFB₁的基础饲料, 每组设3个平行, 共计6箱。投喂量为虾总重量的6%~7%, 每天7:00、12:00和19:00投喂, 用虹吸法清除粪便后更换1/3海水, 及时巡查各箱, 拣出死虾。养殖用水为经过滤、消毒的天然海水, 盐度为30, 连续充气, 养殖期间水温控制在(28±0.1) °C, 总氨氮为(1.0±0.1) mg/L。

1.3 样品采集和指标测定

实验期间, 每隔4天进行1次取样, 从每箱随机取5尾虾, 取其肝胰腺, 加入缓冲液置于冰水环境中, 充分匀浆后冷冻离心得上清液进行测定。采用考马斯亮蓝染色法测定肝胰腺总蛋白含量; 采用黄嘌呤氧化酶法测定SOD活性; 采用硫代巴比妥酸法测定MDA含量; 采用钼酸铵比色法测定CAT; GSH-Px采用二硫代二硝基甲酸方法测定。测定上述指标均采用购买于南京建成生物工程研究所的试剂盒。使用酶联免疫吸附法(ELISA)测定饲料中的AFB₁含量, 试剂盒购于上海佑隆生物科技公司。

1.4 实验结果分析

实验结果数据统计使用SPSS 17.0分析软件,

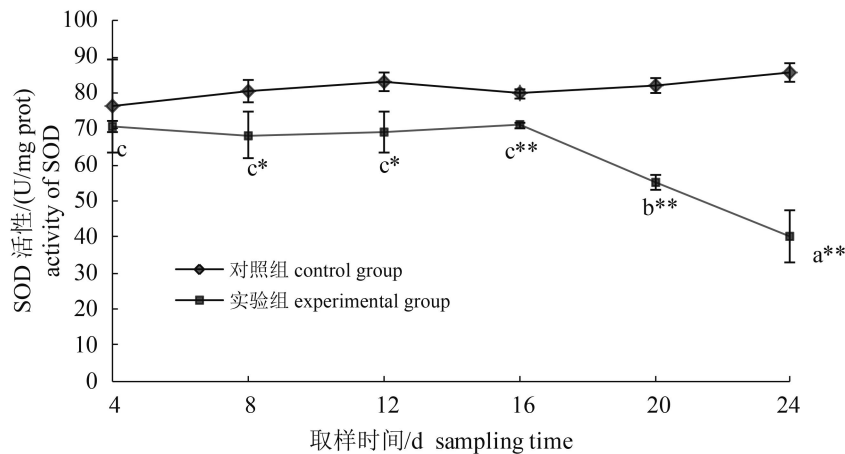


图1 AFB₁对凡纳滨对虾肝胰腺SOD活性的影响

数据点标注不同字母表示差异显著($P < 0.05$)。*同一时间点两组之间差异显著($P < 0.05$), **差异极显著($P < 0.01$)。下同

Fig. 1 The SOD activity of *L. vannamei* hepatopancreas fed with AFB₁

Value points with different letters mean significant difference ($P < 0.05$). The two sets of figures at the same time with asterisk mean significant difference ($P < 0.05$), binary star means extremely difference ($P < 0.01$). The same below

先进行单因子方差分析(One-Way ANOVA), 若数据间差异显著($P < 0.05$), 再采用Duncan氏多重比较法进行多重比较。同时采用 t 检验的方法对同一时间点的不同组之间进行差异显著性分析。

2 结果

2.1 AFB₁对肝胰腺SOD活性的影响

与对照组相比, 在第8天实验组的SOD活性显著($P < 0.05$)低于对照组, 16 d后出现极显著差异($P < 0.01$), 整个阶段实验组酶活性均低于对照组。对照组SOD活性随时间推移无差异显著性($P > 0.05$), 实验组的SOD活性在前2周并未出现显著性变化, 2周后出现显著下降($P < 0.05$), 同时实验组酶活性极显著低于对照组($P < 0.01$)(图1)。

2.2 AFB₁对肝胰腺内MDA含量的影响

实验组MDA含量在投喂1周后便高于对照组, 但二者并不存在显著性差异($P > 0.05$)。实验期间前8 d, 实验组MDA含量无显著性差异, 投喂16 d后显著增加($P < 0.05$), 同时实验组的MDA含量极显著高于对照组($P < 0.01$), 且实验组MDA含量整体呈现上升趋势(图2)。

2.3 AFB₁对肝胰腺CAT活性的影响

对照组CAT活性在养殖期间呈现先上升后下降再上升的趋势, 但第24天与第4天的酶活性没有显著性差异。实验组CAT活性随着时间推移呈现下降趋势, 且每个阶段之间差异显著($P < 0.05$),

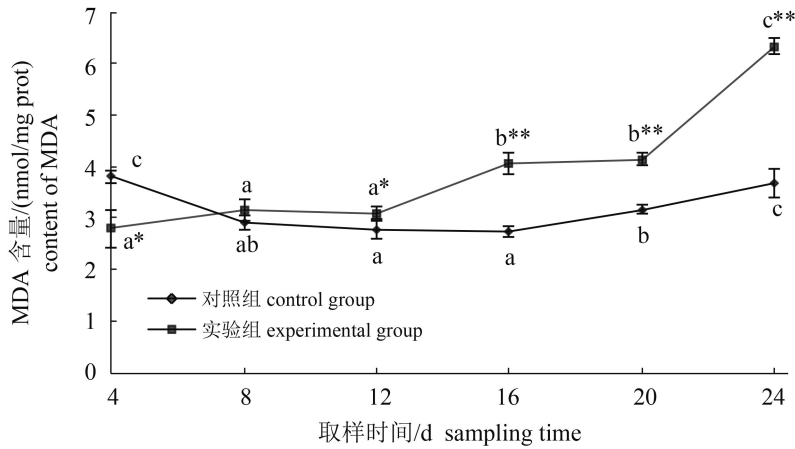


图 2 AFB₁对凡纳滨对虾肝胰腺MDA含量的影响

Fig. 2 The MDA content of *L.vannamei* hepatopancreas fed with AFB₁

20天后虽有上升趋势,但仍显著低于初始水平($P<0.05$)。第8天之后,实验组CAT活性均低于对照组,在第8、16和24天酶活性极显著低于对照组($P<0.01$)(图3)。

2.4 AFB₁对肝胰腺GSH-Px活性的影响

实验组和对照组GSH-Px有相同的变化趋势,实验组GSH-Px活性整体低于对照组,但仅有第12天时出现极显著降低($P<0.01$),第24天显著性降低($P<0.05$)。随着时间的延长,实验组酶活性较初始状态显著降低($P<0.05$),且后4天实验组酶活性的恢复速率低于对照组(图4)。

其本身不具有致癌能力,在体内被活化物质激活后才具致癌性。AFB₁进入机体后主要在肝微粒体内进行代谢^[11],被细胞色素P450酶激活,部分会转化为毒性较小的AFM₁和AFQ₁,另一部分进行环氧化作用代谢后转变成AFB₁-8,9-环氧化物(AFB-8,9-epoxide, AFBO),AFBO具有亲电性,极易攻击酶蛋白等大分子中亲核的氮、氧和硫等,使酶失活的同时产生大量的自由基,进而攻击周围蛋白质和核酸,造成酶蛋白失活、DNA损伤等。机体内自由基若不及时清除,会造成机体免疫力下降和细胞凋亡^[12]。研究报道将AFB₁与大鼠肝细胞孵育后,肝细胞代谢AFB₁过程中会产生大量的ROS,对细胞造成氧化损伤和细胞毒性^[13]。AFB₁作用细胞后,会使得细胞内的ROS增加,线粒体膜通透性增加^[14]。由于线粒体是

3 讨论

黄曲霉毒素是前致癌物,其靶器官是肝脏,

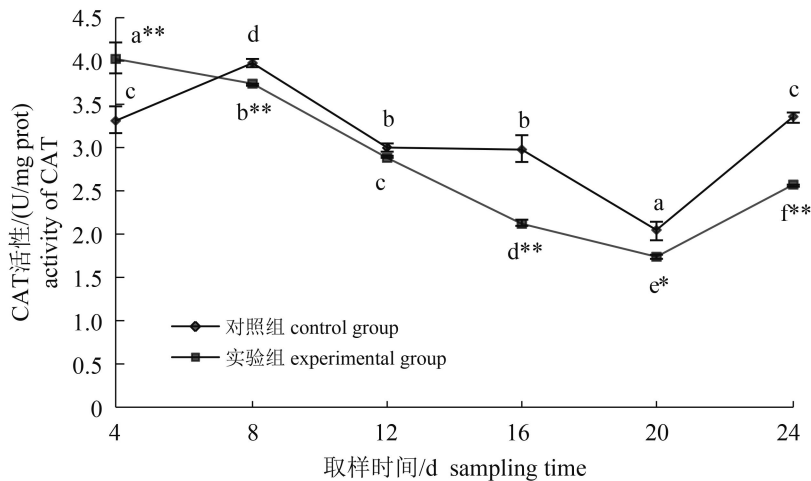


图 3 AFB₁对凡纳滨对虾肝胰腺CAT活性的影响

Fig. 3 The CAT activity of *L. vannamei* hepatopancreas fed with AFB₁

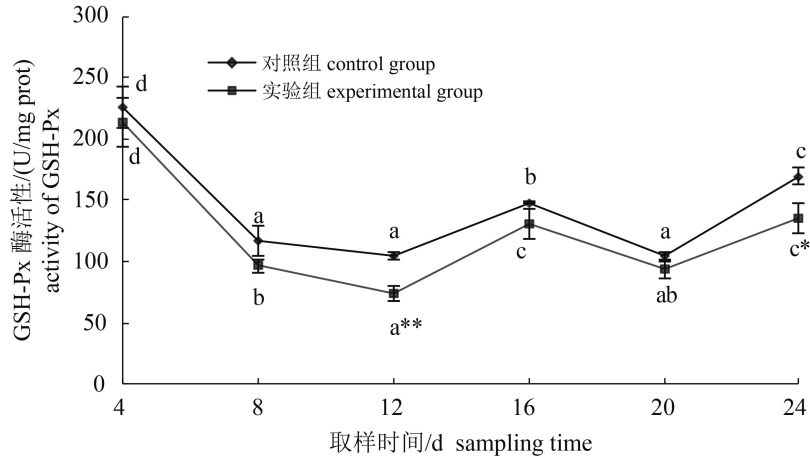


图4 AFB₁对凡纳滨对虾肝胰腺GSH-Px活性的影响

Fig. 4 The GSH-Px activity of *L. vannamei* hepatopancreas fed with AFB₁

ROS的主要产生部位,同时也是对ROS极其敏感的部位,ROS的增加会对线粒体造成氧化损伤,进而易造成细胞凋亡^[15]。生理条件下ROS在不断产生的同时也被机体抗氧化系统不断地清除,一旦ROS产生过多,打破机体抗氧化机能的平衡,便会对机体细胞造成损伤。SOD作为机体清除氧自由基的重要酶类,能维持细胞内的氧自由基维持低量无害的状态,对机体的氧化与抗氧化平衡起着至关重要的作用,其活性的高低间接反映了机体清除氧自由基的能力。本研究中,SOD活性先小幅增加,然后显著下降。当机体处于O₂⁻的动态平衡中,O₂⁻的增加会诱导SOD活性的增强,而一旦O₂⁻超过动态平衡,引起线粒体的溶解,就会造成SOD活性下降^[16]。第8天实验组中SOD活性显著低于对照组可能与CAT活性的显著下降有关,SOD将O₂⁻转化为H₂O₂后,H₂O₂会被CAT清除,但由于CAT活性的降低使SOD受到H₂O₂的攻击,导致酶活性下降。因为H₂O₂/羟基自由基系统可以造成SOD蛋白氨基酸残基的氧化,变成羰基从而降低SOD活性^[17]。未被清除的ROS会攻击细胞膜脂质,发生脂质过氧化,造成膜通透性和流动性的改变,导致机体的氧化应激损伤^[18]。水产动物机体内高不饱和脂肪酸的含量高于其他动物,其细胞膜更易受到自由基的攻击^[19],MDA作为多不饱和脂质氧化损伤的产物,其含量的增加说明对虾体内的抗氧化系统一直受到AFB₁的损伤,本实验中MDA的含量在投喂第16天后出现显著增加(P<0.05),且持续上升,同时SOD活性出现显著降低的趋势,说明随着AFB₁的持续摄入,凡纳滨对虾机

体清除自由基体系的动态平衡遭到破坏,自由基攻击多不饱和脂肪酸的双键造成脂质过氧化,进而使MDA含量上升。李赵嘉等^[20]将高浓度AFB₁饲喂凡纳滨对虾8周后也发现SOD活性与MDA含量呈负相关。对虾摄入AFB₁后其肝胰腺内CAT活性在第8天即出现显著下降(P<0.05),且前20天一直呈下降趋势,原因可能与AFB₁造成细胞内ROS含量增加有关,当细胞内H₂O₂浓度超出CAT清除能力时,CAT的构象将以恒定的速率变为无活性的稳定状态,酶的活性逐渐降低^[21]。另一个原因可能与细胞膜受到损伤有关,CAT作为与膜相关的酶^[22],受到AFB₁的影响,主要因为AFB₁产生的自由基及其代谢产物攻击生物大分子导致病变,造成大分子之间发生非正常的交联、聚合,进而造成膜系统的损伤^[23]。CAT在高浓度的H₂O₂作用下会发生可逆的抑制作用,主要是与酶催化机制中形成的Compound III有关^[24],这有可能是后期CAT活性能暂时恢复的原因之一。实验组第8天SOD和CAT活性的显著降低表明SOD和CAT可能共同组成凡纳滨对虾抗氧化系统在抵抗AFB₁破坏时的首要防线。实验组GSH-Px活性与对照组保持相同的趋势,但在第12天实验组的GSH-Px极显著低于对照组,表明AFB₁对凡纳滨对虾抗氧化酶的损伤与酶的种类有关。GSH-Px在机体内以GSH为底物,将有害的H₂O₂及有机氢过氧化物(ROOH)还原为无害物质,保护细胞膜的完整性,而AFB₁会造成肝脏内GSH的含量下降^[25],酶底物浓度的下降可能是造成实验组GSH-Px活性普遍低于对照组的原因之一。由于CAT主要存在于微粒体中,GSH-Px

能协助CAT清除胞浆和线粒体中的H₂O₂^[26],本实验中后期GSH-Px与CAT活性均呈现上升趋势,可能与CAT和GSH-Px相互协作有关。但是由于受AFB₁的影响,实验组酶活性的恢复速率较低,表明机体的自主修复能力已经受到损伤。

综上所述,饲料中2000 μg/kg的AFB₁会对凡纳滨对虾幼虾肝胰腺造成连续性损伤。并且AFB₁对凡纳滨对虾抗氧化酶的影响因酶种类的不同存在差异,2000 μg/kg的AFB₁饲料在4周内便会对凡纳滨对虾肝胰腺造成严重破坏。

参考文献:

- [1] 王大鹏,赵永贞,杨彦豪,等.对虾肝胰腺坏死性细菌的研究进展[J].海洋湖沼通报,2009(3):39-45.
Wang D P, Zhao Y Z, Yang Y H, *et al.* Advances in research of necrotizing hepatopancreatitis bacterium of penaeid shrimp[J]. Transactions of Oceanology and Limnology, 2009(3): 39-45(in Chinese).
- [2] Ellis W O, Smith J P, Simpson B K, *et al.* Aflatoxins in food: occurrence, biosynthesis, effects on organisms, detection, and methods of control[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 1991, 30(4): 403-439.
- [3] El-Sayed Y S, Khalil R H. Toxicity, biochemical effects and residue of aflatoxin B(1) in marine water-reared sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.)[J]. Food & Chemical Toxicology, 2009, 47(7): 1606-1609.
- [4] 黄莹,朱晓鸣,韩冬,等.饲喂不同浓度黄曲霉毒素B₁饲料对异育银鲫成鱼的生长和毒素积累的影响[J].水生生物学报,2012,36(5):817-825.
Huang Y, Zhu X M, Han D, *et al.* Growth and aflatoxin B₁ accumulation of gibel carp adult fed with diets of different levels of aflatoxin B₁[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2012, 36(5): 817-825(in Chinese).
- [5] Dichter C R. Risk estimates of liver cancer due to aflatoxin exposure from peanuts and peanut products[J]. Food and Chemical Toxicology, 1984, 22(6): 431-437.
- [6] Eaton D L, Gallagher E P. Mechanisms of aflatoxin carcinogenesis[J]. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 1994, 34(1): 135-172.
- [7] Santacroce M P, Conversano M C, Casalino E, *et al.* Aflatoxins in aquatic species: metabolism, toxicity and perspectives[J]. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 2008, 18(1): 99-130.
- [8] Yang C F, Liu J, Shen H M, *et al.* Protective effect of ebselen on aflatoxin B₁-induced cytotoxicity in primary rat hepatocytes[J]. Pharmacology & Toxicology, 2000, 86(4): 156-161.
- [9] Moñoz M, Cedeñor R, Rodríguez J, *et al.* Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*[J]. Aquaculture, 2000, 191(1-3): 89-107.
- [10] 王静,郭冉,苏利,等.饲料中黄曲霉毒素B₁对凡纳滨对虾生长、肝胰腺和血淋巴生化指标及肝胰腺显微结构的影响[J].水产学报,2012,36(6):952-957.
Wang J, Guo R, Su L, *et al.* Toxic effects of aflatoxin B₁ on growth performance, biochemical and hepatopancreas microstructure of *Litopenaeus vannamei*[J]. Journal of Fisheries of China, 2012, 36(6): 952-957(in Chinese).
- [11] Riffel A K, Schuenemann E, Vyhldal C A, *et al.* Regulation of the CYP3A4 and CYP3A7 promoters by members of the nuclear factor I transcription factor family[J]. Molecular Pharmacology, 2009, 76(5): 1104-1114.
- [12] 朱其建,邹卫丽,戴习林,等.溶藻弧菌对罗氏沼虾血清中一氧化氮及氧自由基的影响[J].广东农业科学,2012,39(15):140-143.
Zhu Q J, Zou W L, Dai X L, *et al.* Effect of *Vibrio alginolyticus* on nitric oxide and oxygen free radical in serum of *Macrobrachium rosenbergii*[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2012, 39(15): 140-143(in Chinese).
- [13] Shen H M, Shi C Y, Shen Y, *et al.* Detection of elevated reactive oxygen species level in cultured rat hepatocytes treated with aflatoxin B₁[J]. Free Radical Biology and Medicine, 1996, 21(2): 139-146.
- [14] 刘洋,杜明,张根义.黄曲霉毒素B₁与杂色曲霉毒素对HepG2细胞的联合毒性[J].食品与生物技术学报,2014,33(12):1300-1306.
Liu Y, Du M, Zhang G Y. Multi-index detection of toxicological interaction between the aflatoxin B₁ and sterigmatocystin in HepG2 cells[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2014, 33(12): 1300-1306(in Chinese).
- [15] Costa S, Utan A, Speroni E, *et al.* Carnosic acid from rosemary extracts: a potential chemoprotective agent against aflatoxin B₁. An *in vitro* study[J]. Journal of Applied Toxicology, 2007, 27(2): 152-159.
- [16] 许燕,杨洁,孙静秋,等.凡纳滨对虾不同组织内

- SOD、POD酶的细胞化学定位[J]. 水生生物学报, 2010, 34(2): 402-409.
- Xu Y, Yang J, Sun J Q, *et al.* Cytochemical location of superoxide dismutase and peroxidase in different tissues of *Litopenaeus vannamei*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2010, 34(2): 402-409(in Chinese).
- [17] 姜招峰, 杨翰仪. 氧自由基对CAT、SOD和GPX的氧化修饰研究[J]. 北京联合大学学报(自然科学版), 2003, 17(3): 12-17.
- Jiang Z F, Yang H Y. Effects of oxygen free radicals on functions and structures of CAT, SOD and GPX *in vitro* [J]. Journal of Beijing Union University (Natural Sciences), 2003, 17(3): 12-17(in Chinese).
- [18] Choi K C, Lee B S, Chung W T, *et al.* Protective effects of apigenin and quercetin on aflatoxin B₁-induced immunotoxicity in mice[J]. Food Science and Biotechnology, 2010, 19(4): 987-992.
- [19] Ritola O, Lyytikäinen T, Pylkkö P, *et al.* Glutathione-dependent defence system and monooxygenase enzyme activities in Arctic charr *Salvelinus alpinus*(L.) exposed to ozone[J]. Aquaculture, 2000, 185(3-4): 219-233.
- [20] 李赵嘉, 郭冉, 曹英昆, 等. 饲料中高浓度黄曲霉毒素B₁在凡纳滨对虾幼虾体内的残留及其影响[J]. 大连海洋大学学报, 2015, 30(3): 298-304.
- Li Z J, Guo R, Cao Y K, *et al.* Residues and toxic effects of high dietary concentration of aflatoxin B₁ in juvenile pacific white leg shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2015, 30(3): 298-304(in Chinese).
- [21] Pasquali M A B, Gelain D P, Oliveira M R, *et al.* Vitamin a supplementation induces oxidative stress and decreases the immunocontent of catalase and superoxide dismutase in rat lungs[J]. Experimental Lung Research, 2009, 35(5): 427-438.
- [22] Bauer G. Tumor cell-protective catalase as a novel target for rational the rapeutic approaches based on specific intercellular ROS signaling[J]. Anticancer Research, 2012, 32(7): 2599-2624.
- [23] 王荣梅, 苏荣胜, 潘家强, 等. 黄曲霉毒素对动物免疫及抗氧化能力的影响[J]. 饲料研究, 2010(2): 54-56.
- Wang R M, Su R S, Pan J Q, *et al.* Effect of aflatoxin on immune and antioxidative of animals[J]. Feed Research, 2010(2): 54-56(in Chinese).
- [24] Lardinois O M, Mestdagh M M, Rouxhet P G. Reversible inhibition and irreversible inactivation of catalase in presence of hydrogen peroxide[J]. Biochimica et Biophysica Acta(BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology, 1996, 1295(2): 222-238.
- [25] Atroshi F, Biese I, Saloniemi H, *et al.* Significance of apoptosis and its relationship to antioxidants after ochratoxin A administration in mice[J]. Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences, 2000, 3(3): 281-291.
- [26] 马森. 谷胱甘肽过氧化物酶和谷胱甘肽转硫酶研究进展[J]. 动物医学进展, 2008, 29(10): 53-56.
- Ma S. Progress on GSH-Px and GST[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2008, 29(10): 53-56(in Chinese).

Damage mechanism of aflatoxin B₁ on antioxidant enzyme in hepatopancreas of juvenile *Litopenaeus vannamei*

XIE Wei, GUO Ran*, XIA Hui, WANG Xiaorui, LI Zhaojia,
LI Yaoyao, WANG Meixue, SHEN Qingzhou

(Ocean College, Agriculture University of Hebei, Qinhuangdao 066003, China)

Abstract: Some antioxidant enzymes in hepatopancreas were examined to evaluate the damage of the dietary AFB₁ on antioxidant enzyme in hepatopancreas of juvenile *Litopenaeus vannamei*. Two kinds of diets (control diet and test diet containing 2000 µg/kg of aflatoxin B₁) were fed to the shrimp [with body weight (0.3±0.02) g] for 4 weeks. 420 shrimps were selected randomly to 6 aquariums (40 cm ×50 cm ×60 cm). The activity of some antioxidant enzymes in hepatopancreas were determined every four days. The results showed that the activity of SOD of test group was significantly lower than that in control group on the 8th day. In two weeks the activity of SOD decreased significantly, and the activity of test group was significantly lower than that in control group. The activity of CAT significantly decreased in each stage. After 8 days, the activity of CAT in test group was lower than control group, especially, the activity of test group was significantly lower than control group on the 8th, 16th and 24th days. Although there was a rising trend after 20 days, the CAT activity showed significant decline from the original value. The activity of GSH-Px was lower than that in the control group, with the ability of repairing themselves decreasing. The content of MDA increased significantly after 16 days and there was a rising trend. Meanwhile, the content of MDA in test group was significantly higher than that in control group. These results indicate that the damage of high concentrations of AFB₁ on antioxidant enzyme in *L. vannamei* varies with different enzymes, and the damage on hepatopancreas continues to increase, causing severe hepatopancreas damage only in 4 weeks.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; aflatoxin B₁; antioxidant enzyme

Corresponding author: GUO Ran. E-mail: toguoran@163.com

Funding projects: National Nature Science Foundation of China(31202010); National Key Technology R&D Program of Hebei Province(14967117D)