

## 黄曲霉毒素B1(AFB1)的短期投喂对凡纳滨对虾 肠道黏膜屏障的影响

齐灿灿<sup>1,2,3</sup>, 王宝杰<sup>1,3</sup>, 刘梅<sup>1,3</sup>, 蒋克勇<sup>1,3</sup>, 赵伟<sup>1,3</sup>,  
任春华<sup>4</sup>, 胡超群<sup>4</sup>, 王雷<sup>1,3\*</sup>

(1. 中国科学院海洋研究所,  
中国科学院实验海洋生物学重点实验室, 山东 青岛 266071;  
2. 中国科学院大学, 北京 100049;  
3. 青岛海洋科学与技术国家实验室,  
海洋生物学与生物技术功能实验室, 山东 青岛 266071;  
4. 中国科学院南海海洋研究所,  
热带海洋生物资源与生态重点实验室, 广东 广州 510301)

**摘要:** 为探究黄曲霉毒素B1(AFB1)对凡纳滨对虾肠道黏膜屏障的影响, 以投喂含有15 mg/kg AFB1饲料的凡纳滨对虾作为实验组, 不含AFB1饲料投喂的凡纳滨对虾作为对照组, 分别于第2、4、8、12天取肠道组织, 采用实时荧光定量PCR检测mTOR信号通路中的真核细胞启动因子4E结合蛋白(*eif4ebp*), 真核翻译起始因子1a(*eif4e1a*), 真核翻译起始因子2(*eif4e2*)和核糖体s6蛋白激酶(*p70s6k*)基因, 与免疫相关的转录因子*Dorsal*和*Relish*基因, 酚氧化酶原(*proPO*)基因以及黏蛋白样围食膜因子(*mucin-like PM*)基因表达水平的变化, 利用组织切片技术研究AFB1对肠道组织形态的影响。结果发现, AFB1的添加会对mTOR通路相关基因的表达产生影响, 实验组对虾*eif4ebp*基因自第2天起发生显著上调, 此后呈现先升高后降低的趋势; *eif4e2*和*eif4e1a*基因皆在第8和第12天被显著抑制; *p70s6k*基因在第2和第4天呈现下调趋势, 并于第12天回升至初始水平。AFB1同时也刺激了免疫系统的响应, 实验组*Dorsal*基因和*Relish*基因均被显著诱导, 并呈现先增高后降低的趋势; *proPO*基因于第4和第8天显著上调并于第12天回落至初始水平; *mucin-like PM*基因在第2、4、8天均显著上调。AFB1的添加也破坏了凡纳滨对虾肠道正常的组织形态, 出现上皮细胞核肥大、边缘模糊、上皮细胞层部分脱落等现象。研究表明, AFB1严重影响凡纳滨对虾肠道黏膜的屏障功能, 不仅对肠道黏膜造成机械损伤, 同时对肠道化学屏障和免疫屏障产生影响。

**关键词:** 凡纳滨对虾; 黄曲霉毒素B1; 肠道; 基因表达

**中图分类号:** S 941.43

**文献标志码:** A

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)是我国目前对虾养殖的最主要品种, 饲料营养与品质是制约对虾养殖业发展的因素之一。黄曲霉毒素是由黄曲霉(*Aspergillus flavus*)和寄生曲霉(*A.*

*parasiticus*)在一定条件下的次级代谢产物, 其中黄曲霉毒素B1(AFB1)毒性最强, 且广泛存在于发生霉变的动物饲料及原料中<sup>[1]</sup>。饲料中的AFB1污染会导致动物生长性能降低、生理机能失衡

收稿日期: 2016-10-25 修回日期: 2016-12-20

资助项目: 国家科技支撑计划(2015BAD17B03); 山东省科技重大专项(2015ZDZX05002)

通信作者: 王雷, E-mail: wanglei@qdio.ac.cn

及组织学变化, 同时抑制免疫机能, 使机体对传染性疾病的易感性增强, 从而引发次级感染, 严重时导致死亡, 最终降低养殖动物的产量, 影响经济效益<sup>[2-3]</sup>。

肠道是AFB<sub>1</sub>的主要吸收场所, 动物的十二指肠能吸收食物中50%的AFB<sub>1</sub>, 少量水溶性AFB<sub>1</sub>的代谢产物及游离的AFB<sub>1</sub>也会在肠系膜处积累<sup>[4]</sup>。李赵嘉等<sup>[5]</sup>对凡纳滨对虾幼体的研究表明, 除胰腺外, AFB<sub>1</sub>在幼虾肠道中也有部分残留。肠道既是营养物质消化和吸收的场所, 也是抵御毒素入侵的第一道屏障<sup>[6]</sup>。肠道黏膜屏障由物理屏障、化学屏障、免疫屏障及微生物屏障组成, 以防御异物的侵袭。有研究表明, AFB<sub>1</sub>会损伤动物肠道结构, 使肠道物理屏障遭到破坏<sup>[7]</sup>。宋洪国<sup>[4]</sup>研究表明, 在肉鸭饲料中添加100 μg/mL的AFB<sub>1</sub>会显著降低十二指肠黏膜厚度和肠绒毛高度。Awad等<sup>[8]</sup>针对肉仔鸡的研究发现, 霉菌毒素会影响肠道形态, 使肠绒毛变得短而细。此外, AFB<sub>1</sub>会破坏肠道正常的微生物区系, 从而影响肠道微生物的屏障功能。Larsen等<sup>[9]</sup>研究表明, AFB<sub>1</sub>会影响仓鼠(*Cricetidae*)生长, 减少肠道细菌数量。雷晓娅等<sup>[6]</sup>研究发现, 霉菌毒素会使仔猪盲肠内大肠杆菌数量增加。

目前, 有关AFB<sub>1</sub>对肠道黏膜影响的研究多集中于哺乳动物及畜禽动物上, 而对于水产动物尤其是对虾的研究较少, 涉及到肠道化学及免疫屏障的研究并不多见。本研究在AFB<sub>1</sub>对水产动物影响已有研究的基础上, 通过观察对虾肠道组织形态变化及部分免疫和相关基因的表达情况, 从组织及基因表达层面探究AFB<sub>1</sub>对凡纳滨对虾肠道黏膜屏障的影响, 为对虾的健康养殖和疾病防治提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验用虾及培养条件

实验用凡纳滨对虾由青岛瑞滋海珍品发展有限公司提供, 随机挑取健康的对虾300尾[体质量(2.4±0.13) g/尾], 平均分配于6个水族箱(80 cm×60 cm×50 cm)暂养1周, 暂养期间以无AFB<sub>1</sub>添加的饲料饱食投喂。所有对虾均饲养于天然海水中(盐度30), 水温为(28±1.0) °C, 持续通气, 每天换水量50%。每日按照体质量的7%分3次投喂饲料。

### 1.2 实验饲料配制

以基础配合饲料制成不含AFB<sub>1</sub>的对照组投喂饲料和AFB<sub>1</sub>含量为15 mg/kg的实验组投喂饲料。实验组饲料先将AFB<sub>1</sub>溶解于氯仿中, 加入鱼油混匀, 后置于37 °C水浴中加热2 h以蒸发多余的氯仿<sup>[10]</sup>, 再将含有AFB<sub>1</sub>的鱼油添加到饲料中。对照组投喂的饲料在基础饲料的基础上添加同实验组等量的无添加AFB<sub>1</sub>的鱼油。两组饲料于4 °C冰箱贮存。

基础饲料为烟台大乐饲料有限公司生产的凡纳滨对虾饲料1#料, 粗蛋白42.3%, 粗脂肪7.2%, 灰分15.5%, 水分11.6%。

### 1.3 攻毒实验及取样

暂养期结束后, 将6个水族箱随机分为两组, 分别标记为对照组和实验组, 每组3个平行, 每个平行箱中50尾虾。分别投喂无添加AFB<sub>1</sub>(对照组)和添加AFB<sub>1</sub>(实验组)的饲料, 实验持续12 d。分别于第0、2、4、8、12天, 从每个水族箱随机选取3尾对虾, 取其肠道保存于RNA保护液用于后续RNA提取实验, 于4 °C放置过夜后, 冻存于-80 °C冰箱待用。实验过程中记录每个时间点对虾的死亡数。

### 1.4 RNA提取及基因表达测定

**RNA的提取** 按照TaKaRa MiniBEST Universal RNA Extraction Kit(大连宝生物工程有限公司)说明书提取肠道组织总RNA, 用NanoDrop 2000(Thermo)对所提RNA进行定量检测, 用1%琼脂糖凝胶电泳检测条带完整性。

**RNA的反转录** 利用TransScript® One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis Kit(北京全式金生物科技有限公司), 按其说明书对RNA进行反转录。

**实时荧光定量PCR(qRT-PCR)** 根据说明书利用TransStar Top Green qRT-PCR Supermix(北京全式金生物科技有限公司)进行相关基因表达的测定。本实验对凡纳滨对虾肠道基因*mucin-like PM*、*proPO*、*EIF4ebp*、*EIF4e1a*、*EIF4e2*、*p70s6k*、*Dorsal*、*Relish*基因进行基因表达测定, 以 $\beta$ -actin作为内参基因。实验中所用引物由南京金斯瑞生物科技有限公司合成(表1)。用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 的方法计算基因相对表达量的变化。

表 1 实验所用引物及序列

Tab. 1 The primer sequences used in this study

基因 gene	引物5'-3' primers(5'-3')	来源 sources
<i>β-actin</i>	F: GCCCATCTACGAGGGATA R: GGTGGTCGTGAAGGTGATA	[11]
<i>mucin-like PM</i>	F: ACTGGAAACCGAAGGATGTTCCCT R: TTGTTGACGTCCTTGTTGGCTTG	[12]
<i>proPO</i>	F: CGGTGACAAAGTTCCTCTTC R: GCAGGTCGCCGTAGTAAG	[11]
<i>ef4ebp</i>	F: ATGTCTGCTTCGCCGTCGCTCGCC R: GGTTCCTGGGTGGGCTCTT	[13]
<i>ef4e1a</i>	F: TCCCTTCCCTAACCCCTCA R: GTTTTGCTGCTCGCTTCC	[13]
<i>ef4e2</i>	F: TGGAATCAAACCTATGTGGG R: GTCTCCTGGAAGCGTA	[13]
<i>p70s6k</i>	F: GCAAGAGGAAGACGCCATA R: CCGCCCTTGCCCAAACT	本研究
<i>Dorsal</i>	F: GATGGAATGATAGAATGGGAAGC R: CACTGGTACTCTTGTCTGGTGGTC	[14]
<i>Relish</i>	F: CTACATTCTGCCCTTGACTCTGG R: GGCTGGCAAGTCGTCTCG	[14]

1.5 组织切片制作及观察

将中肠组织置于10%的中性甲醛中固定，于不同浓度梯度的酒精中进行梯度脱水后用石蜡包埋；修整凝固蜡块，10 μm切片，60 °C 烘片；脱蜡后使用苏木精—伊红(H.E)染色法对组织染色；最后利用显微镜观察并进行显微摄影(Nikon-Eclipse 50i POL)。

1.6 统计分析

数据均用(平均值±标准差)进行表示。用SPSS 19.0中的单因素方差分析(One-Way ANOVA)方法对数据进行统计学分析，用Duncan法进行多重比较。显著水平为P<0.05。数据图均由Origin 8.6生成。

2 结果

2.1 AFB1对凡纳滨对虾存活率的影响

饲料中AFB1对凡纳滨对虾存活率的影响结果显示，在12 d的饲喂实验结束时，对照组存活率为97.33%±0.02%，显著高于实验组的65.50%±

0.03%(P<0.05)(表2)。

2.2 AFB1对凡纳滨对虾营养和免疫相关基因表达的影响

凡纳滨对虾肠道营养相关基因的表达同对照组相比，自第2天起*ef4ebp*基因发生显著上调，并呈现先升高后降低的趋势，并在第8天出现最大幅度上调(P<0.05)(图1-a)。*ef4e1a*基因在第2天没有出现显著变化，在第4天略有上升，而在第8和第12天被显著抑制(P<0.05)(图1-b)。*ef4e2*基因变化趋势与*ef4e1a*基因相似，在第2和第4天出现下调，但是同对照组相比无显著性差异，而在第8和第12天显著下调(P<0.05)(图1-c)。*p70s6k*基因在第2和第4天受到显著的抑制，此后呈现回升趋势并在第12天升至初始水平(P<0.05)(图1-d)。

凡纳滨对虾肠道免疫相关基因的表达*Dorsal*及*Relish*两种免疫相关基因在投喂AFB1后的对虾肠道中均呈现显著的上调。*Dorsal*基因从第2天起呈现上调趋势，并于第4天相对表达量达到最高，第12天降至初始水平(P<0.05)(图2-a)。

表 2 不同时间点凡纳滨对虾的存活率

Tab. 2 The survival rate of *L. vannamei* at different time points

组别 groups	存活率/% survival rate			
	第2天	第4天	第8天	第12天
实验组 test group	95.00±0.01 <sup>a</sup>	83.00±0.01 <sup>a</sup>	72.00±0.02 <sup>a</sup>	65.50±0.03 <sup>a</sup>
对照组 control group	100±0.00 <sup>b</sup>	98.67±0.01 <sup>b</sup>	97.33±0.02 <sup>b</sup>	97.33±0.02 <sup>b</sup>

注：同列数据上标不同表示有显著性差异(P<0.05)

Notes: different letters in the same row mean significantly different at P<0.05

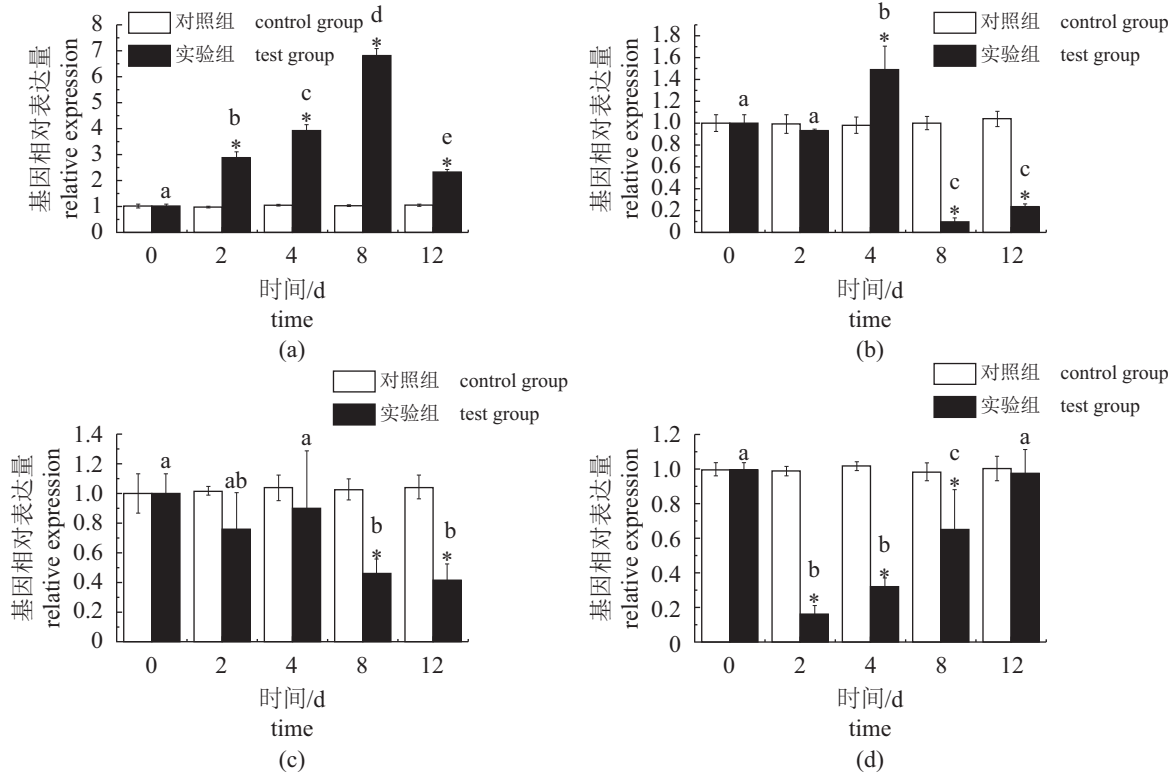


图 1 饲料中添加AFB1对凡纳滨对虾肠道4种营养相关基因表达的影响

不同时间点的不同字母代表存在显著性差异; “\*”代表同一时间点实验组与对照组存在显著性差异(P<0.05); 下同

Fig. 1 The effects of AFB1 on the transcription level of 4 genes related to nutrition in the midguts of *L. vannamei*

(a) *eif4ebp*, (b) *eif4e1a*, (c) *eif4e2*, (d) *p70s6k*; bars with different letters above them are significantly different at P<0.05; “\*” indicate significant differences between the control group and the experimental group at each time point (P<0.05); the same below

Relish基因自第2天起被显著诱导并达到最高, 此后上调程度逐渐降低, 有回落的趋势, 于第12天降至最低(P<0.05)(图2-b)。proPO基因在第2天无显著变化, 在第4和第8天均被显著诱导, 在第8天上调幅度最大, 并于第12天回落至初始水平(P<0.05)(图2-c)。mucin-like PM基因在投喂AFB1后的第2、4、8天均被显著诱导, 并于第2天升至最高, 而在第12天回落至初始水平(P<0.05)(图2-d)。

2.3 凡纳滨对虾肠道组织形态学分析

对照组肠道上皮细胞排列紧密, 与基膜紧密相连, 细胞核边缘清晰, 内壁向肠腔内凸起形成褶皱(图版-1, 2)。实验组第2天肠道组织形态并未发生明显变化, 上皮细胞层完整, 并未与基膜分离, 细胞间隙较为清晰(图版-3)。第4天肠道上皮细胞与基膜间出现间隙, 部分细胞核边缘开始模糊不清(图版-4)。第8和第12天肠道上皮细胞出现细胞核肥大、细胞间隙模糊、上皮细胞层与基膜分离等现象(图版-5, 6)。

3 讨论

目前针对AFB1对水产动物影响的研究多集中在对肝胰腺及血淋巴的影响。肠道是水产动物重要的消化及免疫器官, 毒素主要由肠道吸收进入循环系统并到达其他组织[15]。然而, 针对饲料中AFB1对肠道的影响及分子机理的研究较为缺乏。对虾肠道疾病严重制约着对虾养殖业的发展, 而饲料质量是影响对虾肠道健康的重要因素之一, 因此研究AFB1对凡纳滨对虾肠道黏膜屏障的影响有着重要的意义。

Ostrowski-Meissner等[16]研究发现, 饲料中AFB1浓度为15 mg/kg时, 对虾经14 d饲养后全部死亡。本实验中饲养12 d对虾存活率显著低于对照组, 说明AFB1已经对对虾正常的生存产生影响, 与上述结果的不同可能与实验动物的生长阶段不同有关。

肠道的组织学与其功能相适应[17]。正常的肠道上皮细胞层排列紧密、细胞间隙清晰, 内



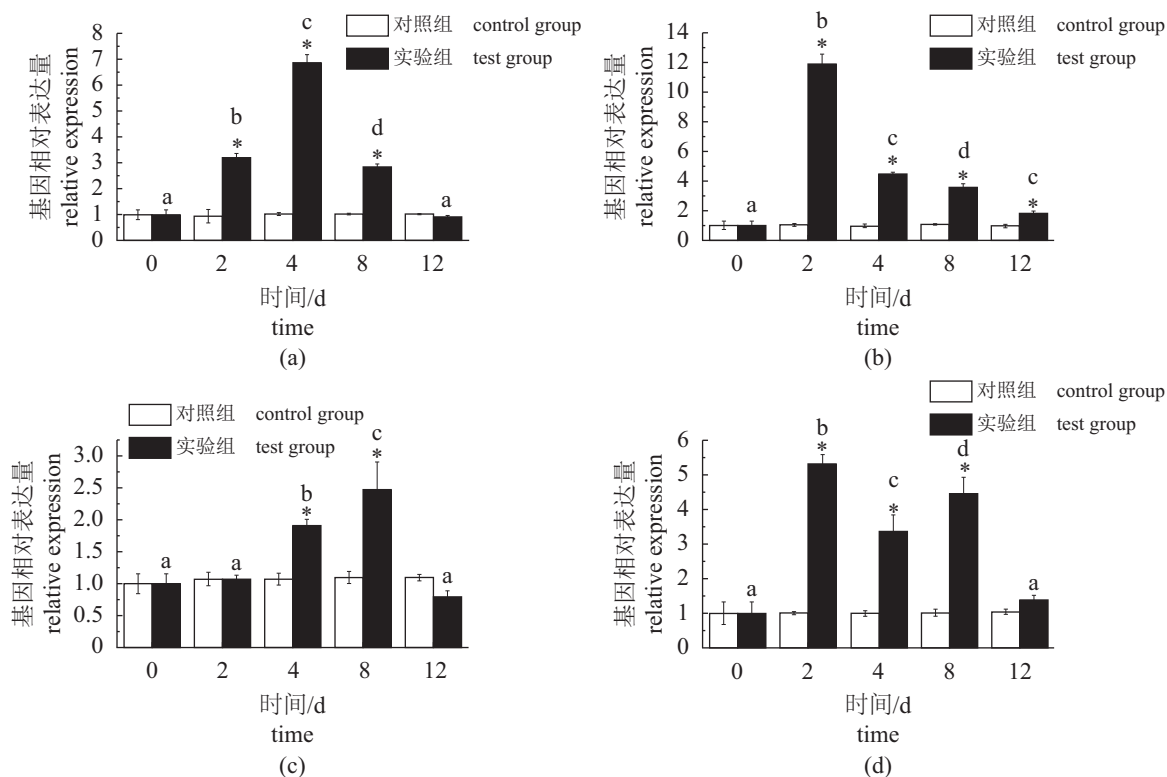


图 2 饲料中添加AFB1对凡纳滨对虾肠道4种免疫相关基因表达的影响

Fig. 2 The effects of AFB1 on the transcription level of 4 genes related to immunology in the midguts of *L. vannamei*

(a) Dorsal, (b) Relish, (c) proPO, (d) mucin-like PM

壁向肠腔内突起褶皱<sup>[18]</sup>。宋洪国<sup>[4]</sup>研究表明, AFB1的添加对肉鸭肠绒毛及黏膜造成了损伤, 肠绒毛顶端出现脱落及断裂现象。Karunasagar等<sup>[19]</sup>发现, 感染白斑综合征的对虾肠道会出现上皮细胞质变薄, 细胞核边缘模糊最终降解形成空洞等现象。本研究发现, 投喂含AFB1饲料后对虾肠道形态开始发生变化, 并随着投喂时间的延长, 肠道损伤情况逐渐加重, 出现上皮细胞与基膜分离、细胞核肥大、边缘模糊等现象, 与上述文献所描述的现象不同, 可能是由于实验对象和攻毒方式的不同, 说明AFB1对凡纳滨对虾肠道黏膜造成了机械损伤, 即在一定程度上破坏了其肠道的物理屏障, 进而可能影响肠道其他功能。

黏蛋白(mucin)在肠道黏液层中发挥重要作用, 是组成肠道化学屏障的主要成分之一。有研究认为, 微生物产物及毒素的刺激有可能造成muc2黏蛋白的大量分泌<sup>[20]</sup>。Mucin-like PM是一种类似于黏蛋白的围食膜因子, Soonthornchai等<sup>[12]</sup>针对斑节对虾(*Penaeus monodon*)的研究表明, 弧菌侵染对虾后, mucin-like PM基因在中肠

的表达显著高于后肠, 说明其可能为抵御微生物或其分泌毒素的侵害提供了有效的屏障。本研究中, mucin-like PM基因在第2、4、8天均显著上调, 说明AFB1刺激了肠道围食膜因子的分泌, 以保护肠道试图阻止毒素的进一步入侵; 后期表达量降低则可能是毒素的持续侵害使肠道受到损伤, 上皮细胞的分泌能力下降。本实验结果说明, AFB1对凡纳滨对虾肠道的化学屏障产生了一定的影响。

雷帕霉素受体信号通路(mTOR信号通路)是广泛存在于后生动物中并与营养密切相关的信号通路, 主要通过调控下游的4E-结合蛋白(4E-BP)和s6激酶(s6K)来调控蛋白的合成<sup>[21-22]</sup>。Chen等<sup>[23]</sup>发现, 投喂含AFB1饲料20 d会使肉仔鸡肠道4E-BP1基因表达显著上调。Rubiolo等<sup>[24]</sup>发现扇贝毒素处理人胶质瘤细胞24 h使细胞中s6K的磷酸化受到了抑制, 影响了蛋白的合成。与上述结果相似, 本实验结果表明, 投喂AFB1后, 凡纳滨对虾肠道eif4ebp基因显著上调, 而其下游的eif4e1a和eif4e2基因则在第8和第12天皆被显著抑制; p70s6k基因也于第2、4、8天显著下调, 说

明AFB<sub>1</sub>的添加对mTOR通路产生了一定程度的抑制, 影响了对虾肠道中蛋白的合成, 而其表达在时间上与上述研究存在差异, 可能是由于实验物种的不同造成的。有研究表明, AFB<sub>1</sub>会降低机体抗氧化能力而产生大量活性氧(ROS)<sup>[25]</sup>, 而ROS会对mTOR通路产生抑制, 破坏肠道的免疫屏障并导致肠道损伤<sup>[26-27]</sup>。由此可以推测, AFB<sub>1</sub>对对虾肠道mTOR通路的抑制可能受到ROS等因素的影响, 并且与肠道的免疫功能相关。而AFB<sub>1</sub>对凡纳滨对虾肠道mTOR通路影响的具体机理尚不清晰, 还需进一步的研究。

Toll通路和IMD通路是无脊椎动物抵御细菌和病毒感染的重要免疫通路<sup>[28]</sup>。Dorsal和Relish分别是Toll通路和IMD通路下游的核转录因子, 同属于Rel/NF- $\kappa$ B家族, 在一定外界条件刺激下能够启动抗菌肽基因的转录<sup>[29-30]</sup>。AFB<sub>1</sub>对动物的免疫系统具有一定的抑制作用<sup>[31]</sup>, 而目前尚无明确证据显示AFB<sub>1</sub>是否会对上述2种免疫通路产生影响。李智<sup>[32]</sup>发现, 注射溶藻毒素后, 凡纳滨对虾抗菌肽基因Penaeidin 3和ALF基因均出现不同程度的上调, 推测其原因为弥补氧化应激损伤造成的免疫力下降。与上述研究结果相似, 本研究发现, 投喂AFB<sub>1</sub>后肠道中与抗菌肽转录相关的Dorsal及Relish基因皆被显著诱导, 分别在第4和第2天达到最高, 并在此后有回落的趋势。此外, 在针对高等动物的研究中发现, AFB<sub>1</sub>的投喂会在一定程度上改变动物肠道正常的微生物区系<sup>[8, 33]</sup>。Ul-Hassan等<sup>[34]</sup>研究表明, AFB<sub>1</sub>可降低机体自身免疫力, 增加机体对病毒或病原菌的易感性。由此推测, AFB<sub>1</sub>的投喂可能会改变凡纳滨对虾肠道微生物群落结构, 进而造成微生态失衡, 使一些病原菌大量繁殖, 从而诱导Dorsal与Relish基因的表达。本实验结果或许可以说明, AFB<sub>1</sub>在一定程度上影响了对虾肠道免疫屏障的功能, 增加了凡纳滨对虾感染微生物源疾病的风险。而AFB<sub>1</sub>对这两种免疫通路具体的影响机制有待进一步的研究。

酚氧化酶原(proPO)系统在甲壳动物免疫防御中发挥着重要的作用, 类似于脊椎动物的补体系统<sup>[35]</sup>。李赵嘉等<sup>[5]</sup>研究发现, 投喂含有AFB<sub>1</sub>(1600  $\mu$ g/kg)的饲料会使凡纳滨对虾酚氧化酶活性升高。与上述结果相似, 本实验中检测出肠道proPO基因在第4和第8天显著上调, 说明AFB<sub>1</sub>的添加刺激了酚氧化酶原系统的免疫响应。Soon-

thornchai等<sup>[12]</sup>研究表明, 哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)感染后斑节对虾proPO基因在血细胞中显著上调, 由此推测本实验中在肠道中检测出该基因表达上调则可能与血细胞渗透入肠道组织有关。

本实验结果表明, 饲料中添加15 mg/kg的AFB<sub>1</sub>对凡纳滨对虾肠道黏膜屏障造成了损伤, 影响了对虾肠道物理、化学和免疫屏障的功能, 进而可能引发对虾死亡。本研究旨在为对虾的健康养殖和疾病防治, 及降低饲料及原料中AFB<sub>1</sub>对对虾的危害提供理论依据。

#### 参考文献:

- [1] Akinrinmade F J, Akinrinde A S, Amid A. Changes in serum cytokine levels, hepatic and intestinal morphology in aflatoxin B<sub>1</sub>-induced injury: modulatory roles of melatonin and flavonoid-rich fractions from *Chromolaena odorata*[J]. Mycotoxin Research, 2016, 32(2): 53-60.
- [2] Gopinath R, Raj R P, George K C, et al. Ultrastructural changes in the hepatopancreas of *Penaeus monodon* Fabricius 1798 given aflatoxin B<sub>1</sub> diets[J]. Aquaculture Research, 2012, 43(1): 32-43.
- [3] Liu Y, Wang W J. Aflatoxin B<sub>1</sub> impairs mitochondrial functions, activates ROS generation, induces apoptosis and involves Nrf2 signal pathway in primary broiler hepatocytes[J]. Animal Science Journal, 2016, 87(12): 1490-1500.
- [4] 宋洪国. 黄曲霉毒素B<sub>1</sub>对肉鸭消化道结构和功能、血液生化指标及生产性能的影响研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2012.  
Song H G. Effects of Aflatoxin B<sub>1</sub> on the digestive tract structure and function, blood biochemical parameters and production performance of Meat Duck[D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2012 (in Chinese).
- [5] 李赵嘉, 郭冉, 曹英昆, 等. 饲料中高浓度黄曲霉毒素B<sub>1</sub>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 B<sub>1</sub> in juvenile Pacific white leg shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2015, 30(3): 298-304(in Chinese).
- [6] 雷晓娅, 陈代文, 毛湘冰, 等. 自然霉变玉米对仔猪肠

- 道微生态的影响[J]. 动物营养学报, 2011, 23(10): 1790-1799.
- Lei X Y, Chen D W, Mao X B, *et al.* Effects of maize contaminated with naturally-occurring mycotoxins on intestinal microecology in piglets[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2011, 23(10): 1790-1799(in Chinese).
- [7] Aboutaleb N. Toxic effects of aflatoxin B<sub>1</sub> on duodenum tissue[J]. Journal of American Science, 2013, 9(3s): 115-117.
- [8] Awad W A, Böhm J, Razzazi-Fazeli E, *et al.* Effects of deoxynivalenol on general performance and electrophysiological properties of intestinal mucosa of broiler chickens[J]. Poultry Science, 2004, 83(12): 1964-1972.
- [9] Larsen A B, Cysewski S J, Miller J M. Effect of aflatoxin on susceptibility of hamsters to *Mycobacterium paratuberculosis*[J]. American Journal of Veterinary Research, 1975, 36(10): 1545-1547.
- [10] Sahoo P K, Mukherjee S C. Immunomodulation by dietary vitamin C in healthy and aflatoxin B<sub>1</sub>-induced immunocompromised rohu (*Labeo rohita*)[J]. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, 2003, 26(1): 65-76.
- [11] 沙玉杰. 乳酸菌对凡纳滨对虾益生机理的研究[D]. 青岛: 中国科学院研究生院(海洋研究所), 2016.
- Sha Y J. Studies on probiotic mechanism of lactic acid bacteria in *Litopenaeus vannamei*[D]. Qingdao: Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2016 (in Chinese).
- [12] Soonthornchai W, Rungrasamee W, Karoonuthaisiri N, *et al.* Expression of immune-related genes in the digestive organ of shrimp, *Penaeus monodon*, after an oral infection by *Vibrio harveyi*[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2010, 34(1): 19-28.
- [13] 辛芳. 凡纳滨对虾mTOR信号通路中重要基因的克隆和功能的初步研究[D]. 北京: 中国科学院研究生院(海洋研究所), 2016.
- Xin F. Gene cloning and functional study on the important genes of mTOR signaling in *Litopenaeus vannamei*[D]. Beijing: Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2016 (in Chinese).
- [14] Hou F J, He S L, Liu Y J, *et al.* RNAi knock-down of shrimp *Litopenaeus vannamei* Toll gene and immune deficiency gene reveals their difference in regulating antimicrobial peptides transcription[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2014, 44(2): 255-260.
- [15] Kumagai S. Intestinal absorption and excretion of aflatoxin in rats[J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 1989, 97(1): 88-97.
- [16] Ostrowski-Meissner H T, LeaMaster B R, Duerr E O, *et al.* Sensitivity of the Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*, to aflatoxin B<sub>1</sub>[J]. Aquaculture, 1995, 131(3-4): 155-164.
- [17] 涂永锋, 宋代军. 鱼类肠道组织结构及其功能适应性[J]. 江西饲料, 2004(4): 16-19.
- Tu Y F, Song D J. The intestinal tissue and the functional adaption of fish[J]. Jiangxi Feed, 2004(4): 16-19(in Chinese).
- [18] 周凯, 来琦芳. 中国明对虾弧菌病的组织病理学研究[J]. 海洋渔业, 2005, 27(1): 49-54.
- Zhou K, Lai Q F. Histopathological research of *Fenneropenaeus chinensis* infected by bacteria *Vibrio alginolyticus*[J]. Marine Fisheries, 2005, 27(1): 49-54(in Chinese).
- [19] Karunasagar I, Otta S K, Karunasagar I. Histopathological and bacteriological study of white spot syndrome of *Penaeus monodon* along the west coast of India[J]. Aquaculture, 1997, 153(1-2): 9-13.
- [20] Kim Y S, Ho S B. Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress[J]. Current Gastroenterology Reports, 2010, 12(5): 319-330.
- [21] 辛芳, 王雷, 刘梅, 等. 水产动物雷帕霉素受体信号通路的研究进展[J]. 海洋科学, 2016, 40(1): 147-154.
- Xin F, Wang L, Liu M, *et al.* Mechanistic target of rapamycin signaling in aquatic animals[J]. Marine Science, 2016, 40(1): 147-154(in Chinese).
- [22] Ma X M, Blenis J. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2009, 10(5): 307-318.
- [23] Chen X, Naehrer K, Applegate T J. Interactive effects of dietary protein concentration and aflatoxin B<sub>1</sub> on performance, nutrient digestibility, and gut health in broiler chicks[J]. Poultry Science, 2016, 95(6): 1312-1325.
- [24] Rubiolo J A, López-Alonso H, Martínez P, *et al.* Yessotoxin induces ER-stress followed by autophagic cell death in glioma cells mediated by mTOR and BNIP3[J]. Cellular Signalling, 2014, 26(2): 419-432.
- [25] Shen H M, Shi C Y, Shen Y, *et al.* Detection of elevated

- reactive oxygen species level in cultured rat hepatocytes treated with aflatoxin B<sub>1</sub>[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 1996, 21(2): 139-146.
- [26] Chen L, Xu B S, Liu L, *et al.* Hydrogen peroxide inhibits mTOR signaling by activation of AMPK $\alpha$  leading to apoptosis of neuronal cells[J]. *Laboratory Investigation*, 2010, 90(5): 762-773.
- [27] Ayyaz A, Jasper H. Intestinal inflammation and stem cell homeostasis in aging *Drosophila melanogaster*[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2013, 3: 98.
- [28] Li F H, Xiang J H. Signaling pathways regulating innate immune responses in shrimp[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 34(4): 973-980.
- [29] 刘甜, 罗开珺. 果蝇Toll和IMD信号通路中的功能结构域[J]. *环境昆虫学报*, 2011, 33(3): 388-395.
- Liu T, Luo K J. Immunity-related domains of Toll and IMD signaling pathways in *Drosophila*[J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2011, 33(3): 388-395(in Chinese).
- [30] Tanji T, Yun E Y, Ip Y T. Heterodimers of NF- $\kappa$ B transcription factors DIF and Relish regulate antimicrobial peptide genes in *Drosophila*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(33): 14715-14720.
- [31] 李赵嘉, 申亮, 魏旭光, 等. 配合饲料中的黄曲霉毒素对对虾影响的研究进展[J]. *中国渔业质量与标准*, 2014, 4(3): 6-11.
- Li Z J, Shen L, Wei X G, *et al.* Research progress for the effects of aflatoxin in the formula feed on shrimp[J]. *Chinese Fishery Quality and Standards*, 2014, 4(3): 6-11(in Chinese).
- [32] 李智. 微囊藻毒素对凡纳滨对虾体液免疫相关基因表达的影响[D]. 上海: 上海海洋大学, 2014.
- Li Z. The effect of Microcystin-LR on *Litopenaeus vannamei* humoral immune-related genes[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2014 (in Chinese).
- [33] 曾东, 唐雨蕊, 倪学勤, 等. 植物乳杆菌F22对肝脏和肠道微生物菌群的影响研究[J]. *营养学报*, 2010, 32(4): 370-374.
- Zeng D, Tang Y R, Ni X Q, *et al.* Study on the effects of *Lactobacillus plantarum* F22 on liver and intestinal microflora[J]. *Acta Nutrimenta Sinica*, 2010, 32(4): 370-374(in Chinese).
- [34] Ul-Hassan Z, Khan M Z, Khan A, *et al.* Immunological status of the progeny of breeder hens kept on ochratoxin A (OTA)- and aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>)-contaminated feeds[J]. *Journal of Immunotoxicology*, 2012, 9(4): 381-391.
- [35] Ashida M, Söderhäll K. The prophenoloxidase activating system in crayfish[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 1984, 77(1): 21-26.



## Effects of short term addition of aflatoxin B1(AFB1) on the intestinal mucosal barrier of *Litopenaeus vannamei*

QI Cancan<sup>1,2,3</sup>, WANG Baojie<sup>1,3</sup>, LIU Mei<sup>1,3</sup>, JIANG Keyong<sup>1,3</sup>, ZHAO Wei<sup>1,3</sup>,  
REN Chunhua<sup>4</sup>, HU Chaoqun<sup>4</sup>, WANG Lei<sup>1,3\*</sup>

(1. Key Laboratory of Experimental Marine Biology, Institute of Oceanology,  
Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China;

2. University of Chinese Academy of Science, Beijing 100049, China;

3. Laboratory of Marine Biology and Biotechnology,  
Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071, China;

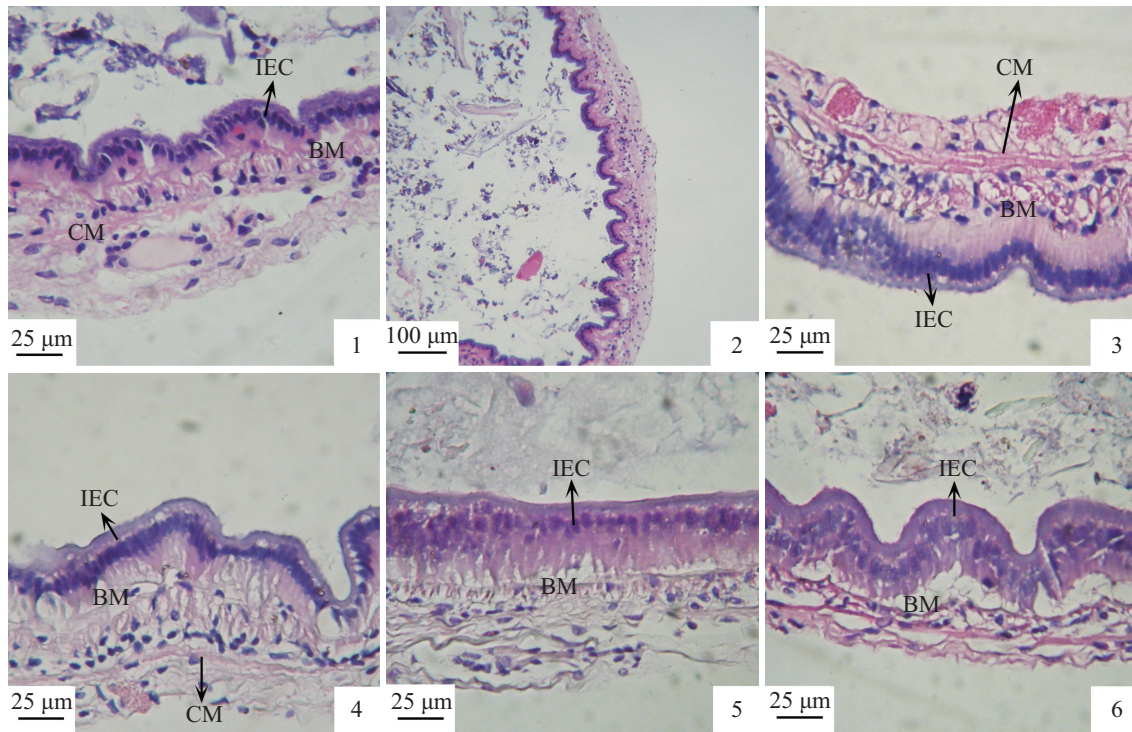
4. Key Laboratory of Tropical Marine Bio-resources and Ecology, South China Sea Institute of Oceanology,  
Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China)

**Abstract:** In order to determine the impact of aflatoxin B1(AFB1) on the intestinal mucosa of *Litopenaeus vannamei*, shrimps were fed with normal diet and diet containing 15 mg/kg of AFB1 for 12 days, and the tissues of intestine were collected on the day 2, 4, 8 and day 12 of the experiment. The relative expression of genes in mTOR signal pathway including *eif4ebp*, *eif4e1a*, *eif4e2* and *p70s6k*, the immune-related genes including *Dorsal*, *Relish* and *proPO* and *mucin-like PM* gene were quantified with RT-qPCR. The changes of intestinal morphology were explored under microscope. The results showed that, the expression of genes in mTOR signal pathway was affected by AFB1, *eif4ebp* gene was up-regulated from the 2nd day, and decreased after reaching its peak on the 8th day; *eif4e2* and *eif4e1a* genes were both inhibited on the 8th and 12th day; *p70s6k* gene was down-regulated from the 2nd to 8th day, and climbed to the initial level on the day 12. The immune response of the intestine was also stimulated by AFB1, *Dorsal* and *Relish* genes were induced significantly after fed with AFB1; *proPO* gene was up-regulated on the day 4 and day 8, followed by a fall to the initial level on the day 12; and the *mucin-like PM* gene was also significantly induced on the day 2, 4 and day 8. The morphology of shrimp gut was changed by AFB1, the nucleus of epithelial cells swelled, the clear margin of chromatin was no longer present, and the ecclasis of epithelial cell layer occurred. In conclusion, the function of intestinal mucosal barrier was affected by AFB1, not only the mechanical barrier was damaged, but also the chemical and immunologic barriers were impaired.

**Key words:** *Litopenaeus vannamei*; aflatoxin B1; intestine; gene expression

**Corresponding author:** WANG Lei. E-mail: wanglei@qdio.ac.cn

**Funding projects:** National Key Technology Support Program (2015BAD17B03); Science and Technology Major Project of Shandong Province (2015ZDZX05002)



图版 凡纳滨对虾肠道组织切片观察

1、2代表对照组肠道组织样品；3~6分别代表第2，4，8，12天肠道组织样品；其中IEC代表肠道上皮细胞层，BM代表基膜，CM代表环肌层

**Plate Histological examination of *L. vannamei* midguts**

Histological examination of 1, 2 indicates the midgut of shrimp in control group; 3-6 indicates the damage in midgut of shrimps fed with AFB1 containing diet at 2, 4, 8, 12 d respectively; letters indicate different structures: IEC represents intestinal epithelial cells, BM represents basement membrane, CM represents circular muscle