

构树多糖对黄曲霉毒素 B₁ 致雏鸡肝损伤的缓解作用

林森柱, 史心茹, 孙筱梦, 胡嘉敏, 农科伟, 周庆兰, 蒋凯屹, 司红彬
(广西大学 动物科学技术学院, 广西 南宁 530004)

摘要: 探讨构树多糖对黄曲霉毒素 B₁ (AFB₁) 诱导的雏鸡肝损伤的保护效应。选取 30 只 7 日龄健康雏鸡, 随机分配为对照组、AFB₁ 模型组及构树多糖组。除对照组外, 其它组均在饲料中添加 2.8 mg/kg AFB₁, 建立雏鸡肝损伤模型。在雏鸡 14 日龄时, 分别检测各组雏鸡的肝功能指标及细胞因子含量, 并对肝组织进行病理形态学检查及抗氧化酶活性评估。结果显示, 与对照组比较, 模型组雏鸡的肝功能指标中谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST)、碱性磷酸酶 (ALP)、 γ -谷氨酰转肽酶 (GGT) 显著升高, 白蛋白 (ALB) 显著降低 ($P < 0.05$)。经过构树多糖治疗后, AST、ALB 指标显著改善 ($P < 0.05$)。模型组雏鸡血清中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、干扰素- γ (INF- γ)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6 (IL-6) 水平显著升高 ($P < 0.05$), 而构树多糖组相应指标下降, 其中 INF- γ 差异显著 ($P < 0.05$)。模型组雏鸡肝脏抗氧化酶活性降低, 丙二醛 (MDA) 水平显著升高 ($P < 0.05$), 而构树多糖组抗氧化指标转向改善, 特别是过氧化氢酶 (CAT) 活性明显恢复 ($P < 0.05$)。肝脏形态学检查结果显示, 模型组肝脏出现显著的黄染、出血, 肝细胞出现核碎裂和坏死。相较之下, 构树多糖组的肝组织损伤程度减轻。综上所述, 构树多糖对 AFB₁ 诱导的雏鸡肝损伤具有显著的缓解作用。

关键词: 构树多糖; 黄曲霉毒素 B₁; 肝损伤; 氧化应激

中图分类号: S831.5

文献标识码: A

文章编号: 2096-2975(2023)04-0026-06

The mitigating effect of *Broussonetia papyrifera* polysaccharide on aflatoxin B₁-induced hepatic injury in chicken

LIN Senzhu, SHI Xinru, SUN Xiaomeng, HU Jiamin, NONG Kewei,
ZHOU Qinglan, JIANG Kaiyi, SI Hongbin
(College of Animal Science and Technology, Guangxi University, Nanning Guangxi, 530004)

Abstract: This study aims to investigate the protective effects of *Broussonetia papyrifera* polysaccharide on aflatoxin B₁ (AFB₁)-induced hepatic injury in chicken. Thirty 7-day-old healthy chickens were randomly assigned to the control group, AFB₁ model group, and *Broussonetia papyrifera* polysaccharide group. Except for the control group, all other groups were administered with 2.8 mg/kg AFB₁ through feed to establish the chicken hepatic injury model. At the age of 14 days, hepatic function indicators, cytokine levels, pathological morphology of liver tissues, and antioxidant enzyme activities were assessed. The results showed that compared with the control group, the levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP), and gamma-glutamyl transferase (GGT) of chicken in the model group were significantly increased, while albumin (ALB) was significantly decreased ($P < 0.05$). The AST and ALB indexes were significantly improved after treatment with *Broussonetia papyrifera* polysaccharide ($P < 0.05$). Serum levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interferon- γ (INF- γ), interleukin-1 β (IL-1 β) and interleukin-6 (IL-6) were significantly increased in model group ($P < 0.05$), while the corresponding indexes of the *Broussonetia papyrifera* polysaccharide group were decreased, and the INF- γ difference was significant ($P < 0.05$). The activity of hepatic

收稿日期: 2023-07-24

基金项目: 广西重点研发计划项目(桂科 AB19245037)。

作者简介: 林森柱(1995—), 男, 广西北海人, 硕士生。

通信作者: 司红彬(1977—), 男, 河南商丘人, 教授, 博士。

antioxidant enzymes in model group decreased and the level of malondialdehyde(MDA) increased significantly ($P<0.05$). Conversely, the antioxidant indexes in the polysaccharide group turned to be improved, especially the catalase (CAT) activity was significantly recovered ($P<0.05$). Morphological examination of the liver revealed significant jaundice and hemorrhage in the model group, along with nuclear fragmentation and necrosis of hepatic cells. In contrast, the degree of liver tissue damage was reduced in the *Broussonetia papyrifera* polysaccharide group. In conclusion, *Broussonetia papyrifera* polysaccharide had a significant alleviating effect on AFB₁-induced hepatic injury in chicken.

Key words: *Broussonetia papyrifera* polysaccharide; aflatoxin B₁; hepatic injury; oxidative stress

黄曲霉毒素是由黄曲霉和寄生曲霉产生的一种次级真菌代谢物,具有致癌性、免疫毒性、诱变性、肝脏毒性和致畸作用,对人类和动物健康构成了严重威胁^[1]。1993年,国际癌症研究机构(IARC)将黄曲霉毒素划定为一类致癌物,表明其为剧毒和极其危险的物质^[2]。黄曲霉毒素的污染不仅对人类健康构成威胁,也对家禽的生产性能造成影响,导致经济损失,严重威胁着养禽业的发展。该毒素可污染多种农作物,通过直接或间接途径进入人类和家禽的食物链,从而引发严重的健康问题^[3]。

构树叶是桑科构树属植物的叶,早在《本草纲目》和《太平圣惠方》等医药经典中就已记录了构树叶的药用价值,如止血、利尿、解毒等^[4]。植物多糖是一种自然存在、具有生物活性的物质,能够增强机体的免疫力,具有抗氧化性能,提供潜在的治疗效益^[5]。已有研究表明构树多糖具有良好的保肝、抗氧化等作用^[6]。为了进一步阐明构树多糖的保肝功效,试验采用黄曲霉毒素 B₁ 构建雏鸡肝损伤模型,通过在日粮中添加构树多糖,研究构树多糖对黄曲霉毒素 B₁ 致雏鸡肝损伤的调节作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药材与试剂

构树叶采于南宁市构树种植园;黄曲霉毒素 B₁ 购自成都化夏化学试剂有限公司,纯度>98%;甲醛购自成都市科隆化学有限公司;无水乙醇、二甲苯购自四川西陇科学有限公司;硫酸购自广东光华科技股份有限公司;苏木素染液购自武汉塞维尔生物科技有限公司;伊红染液购自合肥博美生物科技有限公司;ELISA试剂盒购自南京博研生物科技有限

公司。

1.1.2 试验动物

1日龄三黄鸡,雄性,购自中国广西南宁市林信哲禽苗经营部。

1.2 试验方法

1.2.1 构树多糖的提取及多糖含量的测定

构树叶经过阴干、粉碎,置于 50℃ 烘箱烘干。按照料液比值 1:5、提取温度 95℃、提取时间 4 h 和提取 2 次进行热水浸提。将滤液过滤、离心和浓缩处理。加入 4 倍浓缩液体积的无水乙醇进行醇沉,离心后收集沉淀,冷冻干燥得到构树多糖。利用苯酚硫酸法测定多糖含量。

1.2.2 动物试验设计

所有雏鸡进行一周的适应性饲养,7日龄时将其随机分配为 3 组:对照组、模型组、构树多糖组。每组 10 个重复,每个重复 1 只雏鸡。饲养至 14 日龄,试验周期为 7 d。具体给药方式以及剂量如表 1 所示。

表 1 试验设计及分组

组别	处理
对照组	基础日粮
模型组	基础日粮+2.8 mg/kg AFB ₁
构树多糖组	基础日粮+2.8 mg/kg AFB ₁ + 1000 mg/kg 构树多糖

1.2.3 试验指标测定

1.2.3.1 肝功能指标分析

雏鸡颈静脉采血并分离血清(3000 rpm, 4℃, 20 min),参照 ELISA 试剂盒的操作说明,测定血清中 ALT、AST、ALP、GGT 和 ALB 的活性。

1.2.3.2 肝组织病理形态学检查

采集雏鸡肝脏样本,10%的甲醛溶液固定 72 h,

清洗组织样本,经 12 h 脱水与透明化处理后,将样本包埋在石蜡中。石蜡固化冷却后进行切片处理(厚度为 5 μm),使用苏木精-伊红(H&E)染色,观察肝脏的组织形态学变化。

1.2.3.3 细胞因子含量测定

雏鸡颈静脉采血并分离血清(3000 rpm, 4 °C, 20 min),参照 ELISA 试剂盒的操作说明,测定血清中 TNF-α、INF-γ、IL-1β、IL-6 的含量。

1.2.3.4 肝组织抗氧化指标测定

采集雏鸡肝脏样本,参照 ELISA 试剂盒说明书的方法,测定肝脏中超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)及丙二醛(MDA)的含量。

1.3 数据统计分析

所有试验数据均以平均值±标准差的方式呈现,使用 SPSS 22.0 统计软件进行计算和分析。 $P < 0.05$ 表示差异显著,并以不同字母进行标注。

2 结果

2.1 构树多糖含量测定

通过苯酚硫酸法测构树多糖含量,所建立的葡

萄糖标准曲线如图 1 所示。根据标准葡萄糖浓度对应的吸光值,得到回归方程: $y = 5.9027x - 0.0041$, $R^2 = 0.9958$ 。计算可得样品中构树多糖含量为 47.13%。

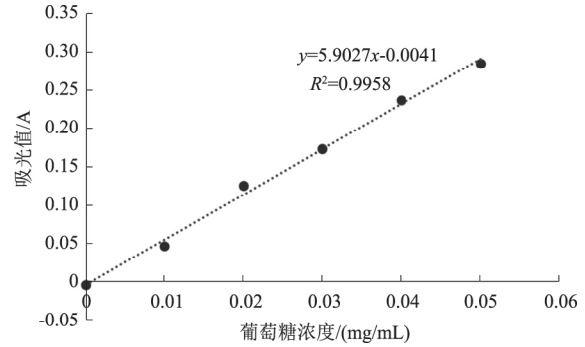


图 1 葡萄糖标准曲线

2.2 构树多糖对雏鸡肝功能指标的影响

如表 2 所示,与对照组相比,模型组 ALT、AST、GGT 以及 ALP 显著升高($P < 0.05$),ALB 显著降低($P < 0.05$)。与模型组相比,构树多糖组 AST 显著降低,ALB 指标则显著升高($P < 0.05$),ALT、GGT 和 ALP 有所降低($P > 0.05$)。

表 2 构树多糖对雏鸡肝功能指标的影响

项目	对照组	模型组	构树多糖组
ALT/(U/L)	5.13±1.69 ^b	13.53±2.01 ^a	12.62±1.61 ^a
AST/(U/L)	5.62±2.95 ^c	15.27±1.74 ^a	11.43±2.26 ^b
GGT/(U/L)	3.74±0.14 ^c	5.17±0.37 ^a	4.68±0.29 ^a
ALP/(U/L)	66.11±1.11 ^b	94.68±2.20 ^a	89.63±4.69 ^a
ALB/(g/L)	27.31±1.86 ^a	20.20±1.96 ^c	23.92±1.87 ^b

注:同行数据肩标相同字母或不标示字母表示差异不显著($P > 0.05$),肩标不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$),下表同。

2.3 构树多糖对雏鸡肝脏病理损伤的影响

如图 2A 所示,对照组中肝脏呈正常的红褐色,质地柔软且平滑。切片检查显示图 2B,肝细胞形态正常,且围绕中央静脉呈现整齐的放射状排列,细胞质丰富,细胞核大且圆,位置居中。

模型组的肝脏外观呈现严重的黄染,肝脏质地变脆、肿大,表面出现多个出血点。切片结果显示图 2B,肝细胞排列紊乱,广泛性水肿,细胞质疏松透亮。同时,细胞出现空泡、气球样变性、细胞核被挤向一侧(绿色箭头指示),肝血窦模糊不可见。大量

水肿细胞的细胞核碎裂,甚至溶解消失,同时出现点灶状坏死(黑色箭头指示)。

与模型组相比,构树多糖组的肝脏质地依然脆弱,但表面坏死点减少。切片检查显示图 2B,肝细胞排列虽然仍然紊乱(蓝色箭头指示),但点灶状坏死的情况有所改善(黄色箭头指示)。

2.4 构树多糖对雏鸡细胞因子的影响

如表 3 所示,与对照组相比,模型组的雏鸡血清中 TNF-α、INF-γ、IL-1β 和 IL-6 水平显著增加($P < 0.05$)。与模型组相比,构树多糖组的血清中 TNF-

α 、IFN- γ 、IL-1 β 和 IL-6 水平下降,其中 IFN- γ 的差异显著($P<0.05$)。

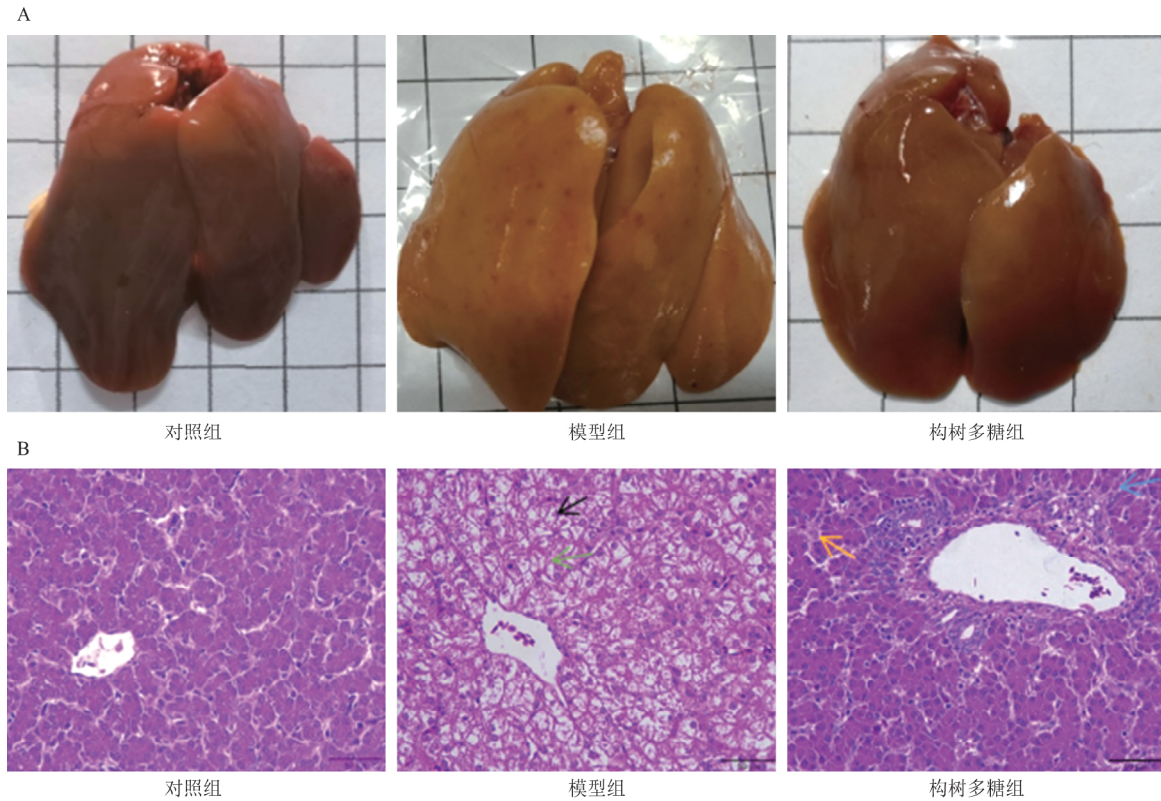


图 2 肝脏外观与病理切片比较

表 3 构树多糖对雏鸡细胞因子的影响

项目	对照组	模型组	构树多糖组
IFN- γ	22.65 \pm 1.52 ^c	34.32 \pm 1.93 ^a	28.39 \pm 3.41 ^b
IL-1 β	215.29 \pm 20.75 ^a	301.84 \pm 25.66 ^b	279.79 \pm 22.87 ^b
IL-6	9.28 \pm 0.86 ^b	13.56 \pm 1.26 ^a	12.93 \pm 1.19 ^a
TNF- α	28.71 \pm 1.67 ^b	37.44 \pm 2.89 ^a	34.51 \pm 2.22 ^a

2.5 构树多糖对雏鸡肝脏抗氧化指标的影响

如表 4 所示,相比于对照组,模型组雏鸡的肝脏组织中 SOD、GSH-Px 以及 CAT 活性明显降低,同时

MDA 水平显著升高($P<0.05$)。与模型组相比,构树多糖组的 SOD、GSH-Px 活性升高,CAT 的活性显著升高($P<0.05$)。

表 4 构树多糖对雏鸡肝脏抗氧化指标的影响

项目	对照组	模型组	构树多糖组
SOD/(ng/g)	835.89 \pm 89.08 ^a	580.33 \pm 54.44 ^b	638.04 \pm 99.72 ^b
CAT/(pg/g)	2051.58 \pm 119.57 ^a	1353.33 \pm 120.92 ^c	1625.40 \pm 205.73 ^b
GSH-Px/(ng/g)	548.94 \pm 41.48 ^a	385.43 \pm 46.63 ^b	430.56 \pm 56.59 ^b
MDA/(nmol/g)	70.16 \pm 7.59 ^b	98.31 \pm 6.98 ^a	93.66 \pm 5.56 ^a

3 讨论

黄曲霉毒素 B₁ 可以破坏肝脏细胞的结构和功

能,从而引发氧化应激和炎症反应,影响蛋白质和脂肪的代谢^[7]。肝脏功能生化指标是用来评估肝脏健康状况和功能的关键参数^[8],当肝脏受到损伤

或疾病的影响时,该指标水平会发生改变,如 ALT 和 AST 的升高通常表示肝细胞的破坏,ALP 和 GGT 的升高可能提示胆汁淤积,ALB 下降则提示蛋白质合成的受阻^[9]。研究表明,黄曲霉毒素 B₁ 中毒可使多项肝功能指标显著升高^[10]。李瑞娟^[11]在饮水中添加 1 g/L 的黄芪多糖,能降低黄曲霉毒素中毒雏鸡血清中的 ALT、AST、ALP 活性,恢复血清中蛋白质水平。Gan^[12]研究发现,灌木苦参根多糖能显著逆转 AFB₁ 对鸡肝细胞的毒性效应,调节 ALT 和 AST 水平。试验结果表明,模型组的 ALT、AST、ALP 和 GGT 显著升高,ALB 则显著降低,而构树多糖干预下肝功能指标显著改善,与上述结果一致。因此,构树多糖可能通过保护肝细胞、改善细胞功能和调节胆汁分泌等多种机制,有效对抗黄曲霉毒素 B₁ 引发的肝功能损伤。

肝脏的病理学分析是评价肝损伤的重要指标^[13]。Poloni^[14]研究表明,摄入黄曲霉毒素 B₁ 饲料的肉鸡肝脏组织病理学结果显示,肝细胞出现弥漫性的气泡样脂肪变性。研究发现,模型组雏鸡肝细胞出现显著的形态结构改变,如肝细胞排列紊乱、广泛水肿、空泡变性、气球样变性以及细胞核的碎裂甚至溶解、消失。这种情况可能源于细胞功能受损,无法正常执行代谢活动,导致细胞结构及功能逐渐退化。同时,模型组雏鸡肝血窦明显扩张。肝血窦作为肝细胞与血液进行物质交换的主要通道,其扩张可能暗示了血液动态改变,以及肝脏生理功能可能受到严重影响。王春霞^[15]研究发现,白术多糖可以明显减轻环磷酰胺造成的药物性肝脏损伤,显著减少肝细胞的点状坏死灶和大泡性脂滴。郭艳^[16]发现,纳米硒-浒苔多糖能够有效减轻黄曲霉毒素 B₁ 引起的体内和体外肝细胞模型的肝细胞损伤。综上所述,通过与已有研究的对比,作者的观察结果不仅进一步验证了黄曲霉毒素引起的肝脏损伤的病理学特征,而且发现在构树多糖的干预下,受损肝细胞和血窦扩张情况明显改善。

多糖具有调节免疫细胞功能和免疫应答的作用^[17]。细胞因子是由炎性细胞产生的一类生物活性物质,TNF- α 表示机体的炎症反应程度;IFN- γ 反映机体细胞免疫反应的活性;IL-1 β 参与炎症调节

和信号传递;IL-6 与代谢、免疫和炎症过程相关。检测相关细胞因子水平可以了解机体免疫系统的激活程度、炎症反应强度和细胞免疫能力的变化^[18]。研究结果显示,模型组雏鸡的细胞因子(TNF- α 、INF- γ 、IL-1 β 、IL-6)水平显著升高,暗示黄曲霉毒素对肝脏的损伤导致炎症反应加重,导致更大范围肝细胞的凋亡^[19]。研究发现,白及多糖可显著降低烟曲霉菌刺激所引起的巨噬细胞模式识别受体 LOX-1 和下游炎症因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的 mRNA 表达和蛋白表达^[20]。试验结果与上述研究一致,构树多糖可改善黄曲霉毒素导致的细胞因子水平升高,具有抗炎功能。

氧化应激是一种广泛的生物现象,当生物体面临外部和内部的有害刺激时,其自身的抗氧化系统与氧化损伤之间的平衡可能会被打破。当氧化损伤超过抗氧化能力时,可能会引发细胞结构和功能的异常,从而导致各种疾病^[21]。研究数据中,模型组雏鸡的 SOD、GSH-Px 和 CAT 的活性明显降低,而 MDA 含量显著增加;表明在黄曲霉毒素 B₁ 的毒性作用下,自由基的大量生成和细胞膜脂质过氧化物的加剧,肝脏细胞受到损伤;而构树多糖组雏鸡的抗氧化指标明显改善。Liu 等^[22]研究表明,浒苔多糖通过抑制一期解毒酶和上调 p38MAPK/Nrf2 介导的二期解毒酶通路,缓解黄曲霉毒素 B₁ 对肉鸡肝脏的损伤。Zhang 等^[23]研究发现,对天然混合霉菌毒素污染的饲料添加酵母多糖,能显著增加 CAT、SOD 和 GSH-Px 活性,降低 MDA 含量,表明酵母多糖通过调节抗氧化指标改善肉鸡的氧化应激状态。这与作者试验结果一致,MDA 含量的降低意味着脂质过氧化损伤的减轻,而抗氧化酶活性的提升,则表明构树多糖可能增强了抗氧化能力,在细胞水平上缓解了黄曲霉毒素 B₁ 的毒性效应。

4 结论

研究表明,构树多糖有效缓解了黄曲霉毒素 B₁ 引起的肝脏损伤,通过调节肝功能、恢复肝细胞形态、调节免疫功能、减轻炎症反应以及增强抗氧化防御能力等途径实现其保护作用。

参考文献:

- [1] 罗自生,秦雨,徐艳群,等.黄曲霉毒素的生物合成、代谢和毒性研究进展[J].食品科学,2015,36(03):250-257.
- [2] Li C,Liu X,Wu J,et al.Research progress in toxicological effects and mechanism of aflatoxin B₁ toxin [J].PeerJ,2022,10:e13850.
- [3] 张牧臣,郑楠,王加启,等.食品中黄曲霉毒素 B₁ 污染研究进展[J].食品科学,2018,39(07):312-320.
- [4] 黄咏明,田瑞,卢素芳,等.构树化学成分及饲用价值研究进展[J].湖北林业科技,2019,48(02):36-40.
- [5] Zhang C,Li C,Shao Q,et al.Effects of dietary Glycyrrhiza polysaccharide on growth,serum biochemistry,immunity,and egg laying in quail [J].Animal biotechnology,2023,34(03):520-528.
- [6] Xu B,Hao K,Chen X,et al.Broussonetia papyrifera Polysaccharide Alleviated Acetaminophen-Induced Liver Injury by Regulating the Intestinal Flora [J].Nutrients,2022,14(13):2636.
- [7] Yunus A W,Razzazi-Fazeli E,Bohm J.Aflatoxin B₁ in affecting broiler's performance,immunity and gastrointestinal tract:a review of history and contemporary issues [J].Toxins (Basel),2011,3(06):566-590.
- [8] Xu L,Yu Y,Sang R,et al.Protective Effects of Taraxasterol against Ethanol-Induced Liver Injury by Regulating CYP2E1/Nrf2/HO-1 and NF-κB Signaling Pathways in Mice [J].Oxidative medicine and cellular longevity,2018,2018:8284107.
- [9] 严文瑞,王玲芝,候玲玲,等.复方黄芪益气口服液对 AFB₁ 所致大鼠急性肝损伤的保护作用[J].山西医科大学学报,2019,50(10):1435-1439.
- [10] El-Bahr S M.Effect of curcumin on hepatic antioxidant enzymes activities and gene expressions in rats intoxicated with aflatoxin B₁ [J].Phytotherapy research,2015,29(01):134-140.
- [11] 李瑞娟.黄芪多糖对 AFB₁ 所致雏鸡肝及免疫功能损伤的缓解作用研究[D].保定:河北农业大学,2015.
- [12] Gan F,Yang Y,Chen Y,et al.Bush sophora root polysaccharide could help prevent aflatoxin B₁-induced hepatotoxicity in the primary chicken hepatocytes [J].Toxicology,2018,150:180-187.
- [13] Trefts E,Gannon M,Wasserman D H.The liver [J].Current biology,2017,27(21):R1147-R1151.
- [14] Poloni V,Magnoli A,Fochesato A,et al.A Saccharomyces cerevisiae RC016-based feed additive reduces liver toxicity,residual aflatoxin B₁ levels and positively influences intestinal morphology in broiler chickens fed chronic aflatoxin B₁-contaminated diets [J].Animal nutrition,2020,6(01):31-38.
- [15] 王春霞.白术多糖对环磷酰胺诱导的岭南黄鸡肝损伤的调节作用[J].山东畜牧兽医,2023,44(07):1-4+7.
- [16] 郭艳.纳米硒-浒苔多糖制备及对 AFB₁ 诱导肉仔鸡肝脏损伤的保护作用研究[D].湛江:广东海洋大学,2022.
- [17] 王迪,李钧,侯兵乔,等.中药多糖对肿瘤微环境中免疫细胞调节作用研究进展[J].中草药,2023,54(13):4346-4358.
- [18] 赵静芳.EGCG 对 AFB₁ 致大鼠急性肝损伤的干预作用及其机制研究[D].南宁:广西医科大学,2018.
- [19] Wang X H,Li W,Wang X H,et al.Water-soluble substances of wheat:a potential preventer of aflatoxin B₁-induced liver damage in broilers [J].Poultry science,2019,98(01):136-149.
- [20] 纪晓月,彭旭东,战璐,等.白及多糖对烟曲霉菌诱导巨噬细胞炎症的调节作用[J].青岛大学学报(医学版),2022,58(05):662-666.
- [21] 吴映欣.两种霉菌毒素 AFB₁ 与 T-2 对 PK15 细胞和小鼠肝肾毒性及氧化应激的研究[D].长沙:湖南农业大学,2021.
- [22] Liu W C,Yang Y Y,Pushparaj K,et al.Evaluation of Hepatic Detoxification Effects of Enteromorpha prolifera Polysaccharides against Aflatoxin B₁ in Broiler Chickens [J].Antioxidants (Basel),2022,11(09):1757.
- [23] Zhang J,Fang Y,Fu Y,et al.Yeast polysaccharide mitigated oxidative injury in broilers induced by mixed mycotoxins via regulating intestinal mucosal oxidative stress and hepatic metabolic enzymes [J].Poultry science,2023,102(09):102862.

(责任编辑:孙彦婷)