黄曲霉毒素B1对断奶仔猪生长性能、肝脏组织及肠道健康的影响[1]

毕小娟　陈代文　余　冰　何　军　毛湘冰　郑　萍　黄志清　罗钧秋　罗玉衡　虞　洁*

（四川农业大学动物营养研究所，动物抗病营养教育部重点实验室，成都 611130）

摘　要：本试验旨在考察黄曲霉毒素B1（AFB1）对断奶仔猪生长性能、肝脏组织和肠道健康的影响。试验选用32头胎次相近、21日龄的“杜长大”断奶仔猪，根据体重相近原则随机分为2组（每组16个重复，每个重复1头猪），分别饲喂基础饲粮（对照组）和含有0.3 mg/kg AFB1的饲粮（AFB1组）。试验期间自由采食和饮水，常规饲养管理，试验预试期3 d，正试期21 d。试验结束时所有猪进行空腹称重后每组选取与平均体重相近的6头猪采集样品，考察生长性能、肝脏健康、肠道黏膜形态和肠道微生物数量等指标。结果表明：与对照组相比，饲粮AFB1显著降低断奶仔猪平均日增重（P<0.05），显著提高料重比（P<0.05），且有降低平均日采食量的趋势（P=0.09）；饲粮AFB1显著增加断奶仔猪肝脏指数（P<0.05），并导致肝小叶结构不清晰，肝细胞中度水肿变性，部分出现中、重局灶状坏死，肝纤维组织增生明显；饲粮AFB1对肝脏脂肪代谢相关基因乙酰辅酶A羧化酶–1、脂肪酸合成酶、肉毒碱棕榈酰转移酶–1、脂蛋白脂肪酶和过氧化物酶体增殖物激活受体α的mRNA表达量无显著影响（P>0.05）；饲粮AFB1显著增加十二指肠绒毛高度和隐窝深度以及空肠隐窝深度（P<0.05）；饲粮AFB1显著降低盲肠双歧杆菌数量（P<0.05），但对总菌、大肠杆菌、乳酸杆菌和芽孢杆菌的数量均无显著影响（P>0.05）。由此可见，饲喂含0.3 mg/kg AFB1的饲粮会导致断奶仔猪生长性能下降，肝脏组织和肠道健康轻微受损。

关键词：黄曲霉毒素B1；断奶仔猪；生长性能；肝脏损伤；肠道健康

中图分类号：S816　　文献标识码：A　　文章编号：

黄曲霉毒素B1（AFB1）是一类毒性极强的霉菌毒素[1]。AFB1污染造成的饲料原料浪费和动物生产性能下降给畜牧业带来了巨大的经济损失。动物采食AFB1污染的饲粮后，80%黄曲霉毒素在胃肠道前端快速通过被动运输被机体吸收，后转入肝脏进行代谢，从而出现肝脏损伤、食欲降低以及生长性能下降等中毒现象[2]。肠道作为AFB1吸收的主要部位，毒素

收稿日期：2018-01-29

基金项目：四川省科技支撑计划项目（2015NZ0095）；国家生猪产业技术体系（CARS-35）

作者简介：毕小娟（1992-），女，湖南新化人，硕士研究生，动物营养与饲料科学专业。E-mail: zsjg214@163.com

*通讯作者：虞　洁，副研究员，硕士生导师，E-mail: yujie@sicau.edu.cn

浓度远高于其他部位，但是关于 AFB1 对胃肠道的影响研究知之甚少。肠道健康是人和动物健康的关键因素，AFB1 降低动物生产力是否是通过损伤肠道健康来实现还有待研究。而目前关于 AFB1 研究所用材料多数采用自然霉变玉米，其中含有多种毒素可相互作用，不利于深入认识 AFB1 的毒性效应和机理。而对单一 AFB1 研究还较少，且所得结果差异较大。因此，本试验将培养黄曲霉菌制备的 AFB1 添加到断奶仔猪饲粮中，旨在考察饲粮添加 0.3 mg/kg AFB1 对断奶仔猪生长性能、肝脏组织及肠道健康的影响，以期为深入认识 AFB1 毒性机理研究提供参考资料。

1 材料与方法

1.1 黄曲霉毒素的培养和检测

黄曲霉毒素的培养包括菌种活化、接种、发酵和收毒 4 个过程。1）活化：采用购自中国工业微生物菌种保存中心的黄曲霉产毒菌株 ATCC28539 经过马铃薯葡萄糖琼脂（PDA）培养基于 28 ℃培养箱中培养 5～8 d 活化长出绿色孢子；2）接种：用 10 mL 0.05%灭菌的吐温 20 溶液冲洗 PDA 培养基中的黄曲霉孢子成孢子悬液，吸取 4 mL 孢子悬液接种于灭菌的大米培养基中；3）发酵：搅拌均匀后，25~28 ℃静置培养 8~12 d 至绿色孢子长出，培养前 3 d 需隔 8~12 h 搅拌 1 次。4）收毒：所得黄曲霉毒素培养完毕后，向锥形瓶内加入三氯甲烷淹没和打湿长满黄曲霉的培养基，4 ℃避光保存 24 h 或过夜后，于通风橱 65 ℃挥干氯仿，最后将培养基烘干、粉碎、装袋，避光保存（此过程需要佩戴口罩或防毒面具）。

1.2 黄曲霉毒素饲粮的制备和检测

参照国标法将培养的黄曲霉毒素进行检测，具体操作方法依照酶联免疫吸附试验（ELISA）试剂盒（购自江苏省苏微微生物研究有限公司）说明书进行，发酵所得 AFB1 的浓度为 400 mg/kg。

然后按比例将培养的 AFB1 添加至基础饲粮中，按照 0.3 mg/kg AFB1 计算，每吨饲粮中需加入 0.75 kg 发酵黄曲霉毒素替代部分玉米与之逐级混匀。饲粮中毒素含量则用高效液相色谱测得，其中黄曲霉毒素含量用 GB/T 30955—2014 免疫亲和柱净化-高效液相色谱法测定；呕吐毒素（脱氧雪腐镰刀菌烯醇）含量用 GB/T 30956—2014 免疫亲和层析净化-高效液相色谱法测定；玉米赤霉烯酮含量用 GB/T 28716—2012 免疫亲和层析净化-高效液相色谱法测定；赭曲霉素 A 含量用 GB/T 30957—2014 免疫亲和层析净化-高效液相色谱法测定；伏马毒素含量用 GB/T 25228—2010 免疫亲和层析净化-高效液相色谱法测定；T-2 毒素含量用 GB/T 23501—2009 免疫亲和层析净化-高效液相色谱法测定。经测定，饲粮中 AFB1 含量为 363.3 μg/kg，黄曲霉毒素 B2（AFB2）含量为 34.6 μg/kg，黄曲霉毒素 G1(AFG1)和黄曲霉毒

素 G2(AFG2)未检测到，而常见霉菌毒素都未超标，检测具体结果见表 1。

表 1　饲粮中常见霉菌毒素的含量(实测值)

Table 1　Common mycotoxin content in diets (measured values)　　μg/kg

项目 Items	对照组 Control group	AFB1 组 AFB1 group	标准（国标） Standard (national standard)
黄曲霉毒素 B1 AFB1	0.0	363.3	≤10
黄曲霉毒素 B2 AFB2	0.0	34.6	未规定
黄曲霉毒素 G1 AFG1	0.0	0.0	未规定
黄曲霉毒素 G2 AFG2	0.0	0.0	未规定
呕吐毒素 Vomitoxin	474.6	521.6	≤1 000
玉米赤霉烯酮 Zearalenone	71.6	107.2	≤500
赭曲霉素 A Ochratoxin A	1.0	3.2	≤100
伏马毒素 Fumonisin	12.8	179.2	未规定
T-2 毒素 T-2 toxin	0.0	0.0	≤1 000

1.2　试验动物与试验设计

试验选用 32 头胎次相近、21 日龄的“杜长大”断奶仔猪，根据体重相近原则随机分为 2 组（每组 16 个重复，每个重复 1 头猪），分别饲喂基础饲粮（对照组）和含有 0.3 mg/kg AFB1 的饲粮（AFB1 组）。预试期 3 d，正试期 21 d。

1.3　基础饲粮

基础饲粮参照 NRC(2012)仔猪营养需要标准并结合实际配制，其组成及营养水平见表 2。

表 2　基础饲粮组成及营养水平（风干基础）

Table 2　Composition and nutrient levels of the basal diet (air-dry basis)　　%

项目 Items	含量 Content
原料 Ingredients	
玉米 Corn （7.8% CP）	29.00
膨化玉米 Extruded corn （7.8% CP）	35.90
膨化豆粕 Extruded soybean meal （46.0% CP）	19.16

膨化大豆 Extruded soybean	6.33
进口鱼粉 Imported fish meal (62.5% CP)	2.80
乳清粉(低蛋白质) Whey powder (low protein)	3.00
豆油 Soybean oil	1.00
石粉 Limestone	0.78
磷酸氢钙 $CaHPO_4$	0.72
食盐 NaCl	0.30
L-赖氨酸盐酸盐 *L*-Lys·HCl (78%)	0.29
DL-蛋氨酸 *DL*-Met	0.14
L-色氨酸 *L*-Try (98.5%)	0.09
L-苏氨酸 *L*-Thr (98.5%)	0.03
氯化胆碱 Chloride choline	0.10
香味剂 Flavor	0.04
甜味剂 Sweetener	0.04
维生素预混料 Vitamin premix[1)]	0.08
矿物质预混料 Mineral premix[2)]	0.20
合计 Total	100.00
营养水平 Nutrient levels[3)]	
消化能 DE/(MJ/kg)	14.43
粗蛋白质 CP	18.30
钙 Ca	0.80
总磷 TP	0.59
有效磷 AP	0.39
赖氨酸 Lys	1.25
蛋氨酸 Met	0.45
蛋氨酸+半胱氨酸 Met+Cys	0.74
色氨酸 Trp	0.22
苏氨酸 Thr	0.75

1) 维生素预混料为每千克饲粮提供 Vitamin premix provided the following per kg of the

diet：VA 8 000 IU，VD_3 2 000 IU，VE 20 IU，VK_3 2 mg ，VB_1 1.5 mg，VB_2 5.6 mg，VB_{12} 0.02 mg，VB_6 1.5 mg，*D*-泛酸 *D*-pantothenic acid 10 mg，烟酸 nicotinic acid 15 mg，生物素 biotin 0.1 mg，叶酸 folic acid 0.6 mg。

2) 矿物质预混料为每千克饲粮提供 Mineral premix provided the following per kg of the diet：Fe ($FeSO_4•H_2O$) 100 mg，Cu ($CuSO_4•5H_2O$) 150 mg，Mn ($MnSO_4•H_2O$) 20 mg，Zn ($ZnSO_4•H_2O$) 100 mg，I (KI) 0.3 mg，Se (Na_2SeO_3) 0.3 mg。

3) 营养水平为计算值。Nutrient levels were calculated values.

1.4 饲养管理

试验在四川农业大学动物营养研究所科研基地仔猪舍进行。动物饲养管理按断奶仔猪饲养管理方式进行。预试期 3 d，正式试验每天饲喂 4 次（08:00、12:00、16:00 和 20:00），每次喂料量以吃饱后饲槽内略有余料为宜，采用自由饮水、自由采食和少喂勤添的原则。于正式试验当天早晨空腹称重分组，正式试验后在第22天早上进行一次称重。每组选取 6 头和全组平均体重相近的猪只进行采血屠宰取样。

1.5 样品采集

饲粮样品：通过四分法采集饲粮样品，每组取 300 g 左右，装入样品袋并标记，送给北京中检维康公司检测黄曲霉毒素、玉米赤霉烯酮和呕吐毒素等 6 中常见霉菌毒素的含量。

肝脏样品：全部试验仔猪屠宰后迅速将肝脏完整取出称重，同时对肝脏同一部位取基因样迅速置于液氮中，后转移至-80 ℃保存待测。对肝脏另一部位取切片样置于 4%多聚甲醛中保存待测。

肠道样品：将全部试验仔猪小肠的肠系膜解剖干净，并立即放在冰块上，从幽门到 Treitz 韧带的部分认为是十二指肠，小肠末端接近回盲连接部的 10 cm 为回肠，而小肠剩下的部分为空肠。取十二指肠、空肠、回肠和盲肠食糜，装于灭菌冻存管迅速置于液氮中，后转移至-80 ℃保存待测。取十二指肠、空肠、回肠中部部分（各 4 cm），放置在 4%多聚甲醛中保存检测。

1.6 检测指标及方法

1.6.2 生长性能

于试验的第 1 天和第 22 天 08:00 空腹称量全部试验猪只体重，准确记录好每天的给料量、剩余料和浪费料，计算仔猪的平均日增重（ADG）、平均日采食量（ADFI）和料重比（F/G）。

1.6.3　肝脏指数

肝脏指数（g/kg）=肝脏重量（g）/活体重（kg）。

1.6.4　组织形态学观察

将置于 4%多聚甲醛固定液中的肝脏、十二指肠、空肠和回肠组织经干燥脱水、浸蜡包埋及切片等处理，再经苏木精–伊红（HE）染色，采用 Leica DM1000 显微成像系统对结果进行拍照，观察组织病理学变化，用 ImageProPlus 6.0 选取 10 个最典型的视野测定肠道绒毛高度和隐窝深度进行测量在显微镜下进行观察，并计算绒毛高度/隐窝深度（V/C）值。样品在成都里来生物公司测定。

1.6.5　肝脏代谢相关基因 mRNA 表达量测定

提取肝脏总 RNA，具体参照 TaKaRaRNAiso Plus 说明书进行，然后进行反转录，具体参照 TaKaRaPrimeScript™ RT reagent Kit 说明书进行，实时荧光定量 PCR 则参照 SYBR Premix Ex Taq Ⅱ说明书、采用 10 µL 体系进行，包括 SYBR Premix Ex Taq Ⅱ(TliRNaseH Plus)(2×) 5.0 µL、ROX Reference Dye Ⅱ(50×) 0.2 µL、DNA 模板 1.0 µL、上下游引物各 0.4 µL 和 3.0 µL ddH_2O。实时荧光定量 PCR 的反应条件：95 ℃，30 s；95 ℃，5 s；60 ℃，30 s；40 个循环。溶解曲线反应程序为，95 ℃，15 s；60 ℃，1 min；95 ℃，15 s。β–肌动蛋白（β-actin）作内参基因，采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算各基因的相对表达量。

引物序列设计利用 NCBI 搜索目的基因片段，运用 Primer 3 进行引物设计，于生工生物工程（上海）股份有限公司合成。各基因具体引物序列见表 3。

表 3　基因引物序列

Table 3　Primers sequences of genes

项目 Items	引物序列 Primer sequences (5’—3’)	引物长度 Product length/bp
乙酰辅酶 A 羧化酶–1 *ACC*-1	上游:AGCAAGGTCGAGACCGAAAG	101
	下游:TAAGACCACCGGCGGATAGA	
脂肪酸合成酶 *FAS*	上游:CTACGAGGCCATTGTGGACG	148
	下游:AGCCTATCATGCTGTAGCCC	
肉毒碱棕榈酰转移酶–1 *CPT*-1	上游:CCACTATGACCCGGAAGACG	111
	下游:TTGAACGCGATGAGGGTGAA	
脂蛋白脂肪酶 *LPL*	上游：CACATTCACCAGAGGGTC	177

	下游：TCATGGGAGCACTTCACG	
过氧化物酶体增殖物激活受体α	上游：CGACCTGGAAAGCCCGTTAT	99
PPARα	下游：GAGGCTTTGTCCCCACAGAT	
β-肌动蛋白 β-actin	上游：TCTGGCACCACACCTTCT	114
	下游：TGATCTGGGTCATCTTCTCAC	

1.6.6 肠道食糜微生物菌群的数量

测定回肠、盲肠食糜微生物菌群数量采用反转录–PCR（RT-PCR）技术，以每克内容物为检测单位，通过 Ct 值与标准曲线计算得出每份样品所含拷贝数，结果用每克内容物中细菌拷贝数的常用对数[lg（CFU/g）]表示。食糜 DNA 提取采用 E.Z.N.A Stool DNA Kit 试剂盒(Omega,美国)进行。PCR 条件：95 ℃，10 s；95 ℃，5 s；最佳退火温度，25 s；40 个循环；95 ℃，10 s。熔解曲线：65~95 ℃，温度以 0.5 ℃/s 提升。检测乳酸杆菌、大肠杆菌和芽孢杆菌采用 20 μL 反应体系，包括 Probe Ehance Solution 1 μL、Real Mater Mix 8 μL、上下游引物各 1 μL、DNA 模板 1 μL、探针 0.3 μL 和 ddH_2O 7.7 μL；检测双歧杆菌采用 20 μL 反应体系，包括 Probe Ehance Solution 1 μL、Real Mater Mix 8 μL、DNA 模板 1 μL、上下游引物各 1 μL、探针 0.8 μL 和 7.2 μL ddH_2O；检测总菌采用 25 μL 反应体系：SYBR Premix Ex Taq（2×） 12.5 μL、上下游引物各 1 μL、DNA 模板 1 μL 和 9.5 μL ddH_2O。以上 Probe Ehance Solution 和 Real Mater Mix 是北京天根生化科技有限公司的探针 Mix 试剂盒里的 2 种试剂。

表 4 RT-PCR 引物序列及退火温度

Table 4 Primer sequences and annealed temperature for RT-PCR[3]

项目 Items	引物序列 Primer sequences (5'—3')	退火温度 Annealed temperature/℃
总菌 Total bacteria	上游:ACTCCTACGGGAGGCAGCAG	60
	下游:ATTACCGCGGCTGCTGG	
大肠杆菌	上游:CATGCCGCGTGTATGAAGAA	58
Escherichia coli	下游:CGGGTAACGTCAATGAGCAAA	
	探针:AGGTATTAACTTTACTCCCTTCCTC	
乳酸杆菌	上游:GAGGCAGCAGTAGGGAATCTTC	58
Lactobacillus	下游:CAACAGTTACTCTGACACCCGTTCTTC	
	探	

	针:AAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACTCTGTT	
双 歧 杆 菌	上游:CGCGTCCGGTGTGAAAG	56.8
Bifidobacterum	下游:CTTCCCGATATCTACACATTCCA	
	探针:ATTCCACCGTTACACCGGGAA	
芽孢杆菌 *Bacillus*	上游：GCAACGAGCGCAACCCTTGA	60
	下游：TCATCCCCACCTTCCTCCGGT	
	探针：CGGTTTGTCACCGGCAGTCACCT	

1.7 数据处理

试验数据采用 Excel 2007 进行整理，采用 SPSS 19.0 软件进行 *t* 检验，结果以平均值±标准误表示，$P<0.05$ 表示差异显著。

2 结 果

2.1 AFB1 对断奶仔猪生长性能的影响

由表 5 可知，与对照组相比，AFB1 组试验猪 ADG 降低了 23.81%，差异显著（$P<0.05$），ADFI 降低了 15.66%（$P=0.09$），F/G 显著提高（$P<0.05$）

表 5 AFB1 对断奶仔猪生长性能的影响

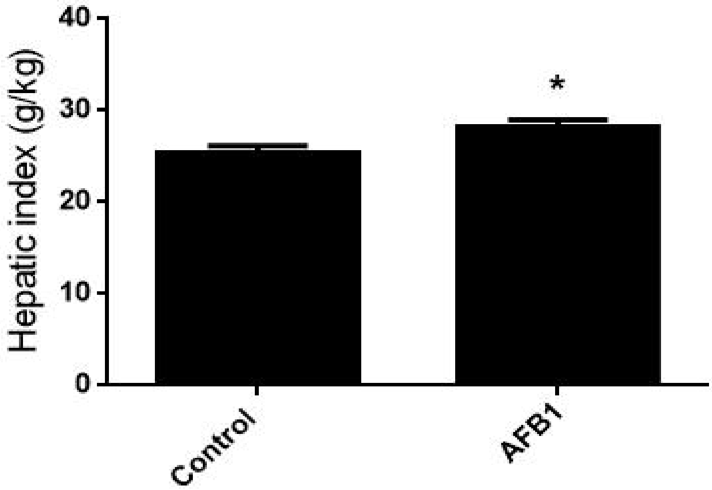
Table 5 Effects of AFB1 on growth performance of weaned piglets

项目 Items	对照组 Control group	AFB1 组 AFB1 group	*P* 值 *P*-value
平均日增重 ADG/kg	0.21±0.01	0.16±0.01	0.02
平均日采食量 ADFI/g	338.68±24.95	285.65±14.48	0.09
料重比 F/G	1.63±0.04	1.78±0.05	0.04

2.2 AFB1 对断奶仔猪肝脏的影响

2.2.1 AFB1 对断奶仔猪肝脏指数的影响

由图 1 可知，与对照组相比，AFB1 组断奶仔猪肝脏指数显著提高（$P<0.05$）。



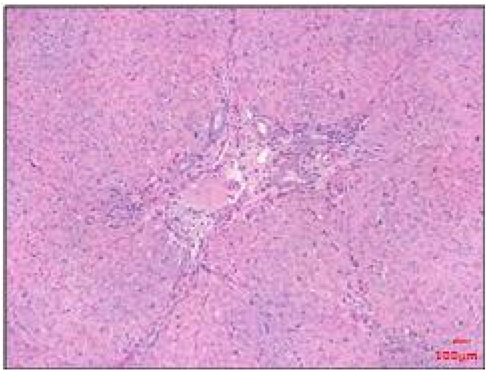
表示差异显著（P<0.05）。 mean significantly different （P<0.05）.

图 1 AFB1 对断奶仔猪肝脏指数的影响

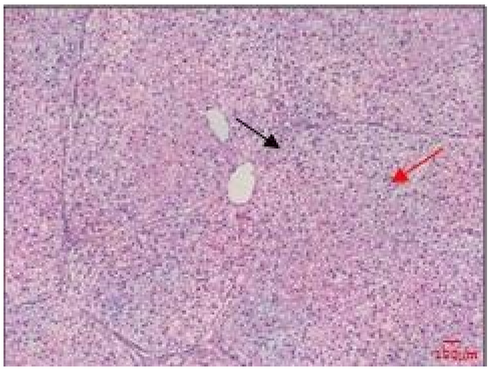
Fig.1 Effect of AFB1 on hepatic index of weaned piglets

2.2.2 AFB1 对断奶仔猪肝脏形态的影响

由图 2 可知，与对照组相比，AFB1 组仔猪肝小叶结构不清晰，肝细胞中度水肿变性，部分出现中、重局灶状坏死，肝纤维组织增生明显。



对照组 Control group



AFB1 组 AFB1 group

AFB1 组上方箭头表示肝小叶，下方箭头表示肝细胞。

Upper arrow of AFB1 group mean hepatic lobule, and lower arrow mean hepatocyte.

图 2 AFB1 对断奶仔猪肝脏组织结构的影响

Fig.2 Effect of AFB1 on organizational structure of liver of weaned piglets

2.2.3 AFB1 对断奶仔猪肝脏脂肪代谢相关基因 mRNA 表达量的影响

由表 6 可知，与对照组相比，AFB1 组乙酰辅酶 A 羧化酶–1（*ACC*-1）、脂肪酸合成酶（*FAS*）、肉毒碱棕榈酰转移酶–1（*CPT*-1）、脂蛋白脂肪酶（*LPL*）和过氧化物酶体增殖物激活受体α（*PPAR*α）的 mRNA 表达量无显著差异（P>0.05）。

表 6 AFB1 对断奶仔猪肝脏脂肪代谢相关基因 mRNA 表达量的影响

Table 6　Effects of AFB1 on lipometabolism-related gene mRNA expression in liver of weaned piglets

项目 Items	对照组 Control group	AFB1 组 AFB1 group	*P* 值 *P*-value
乙酰辅酶 A 羧化酶–1 *ACC*-1	1.00±0.13	0.65±0.08	0.06
脂肪酸合成酶 *FAS*	1.00±0.17	0.70±0.17	0.24
肉毒碱棕榈酰转移酶–1 *CPT*-1	1.00±0.17	1.31±0.18	0.25
脂蛋白脂肪酶 *LPL*	1.00±0.46	1.18±0.41	0.21
过氧化物酶体增殖物激活受体α *PPARα*	1.00±0.20	0.99±0.08	0.96

2.3　AFB1 对断奶仔猪肠道健康的影响

2.3.1　AFB1 对断奶仔猪肠道形态结构的影响

由表 7 可知，与对照组相比，AFB1 组十二指肠绒毛高度和隐窝深度显著增加（$P<0.05$），空肠隐窝深度显著降低（$P<0.05$），回肠的绒毛高度、隐窝深度和 V/C 值都无显著差异（$P>0.05$）。

表 7　AFB1 对断奶仔猪小肠形态结构的影响

Table 7　Effects of Aflatoxin B1 on intestinal morphology of weaned pigs

项目 Items	对照组 Control group	AFB1 组 AFB1 group	*P* 值 *P*-value
十二指肠 Duodenum			
绒毛高度 Villus height/μm	566.13±18.83	720.71±51.49	0.03
隐窝深度 Crypt depth/μm	171.91±4.99	199.56±10.34	0.04
绒毛高度/隐窝深度 V/C	3.30±0.10	3.60±0.11	0.07
空肠 Jejunum			
绒毛高度 Villus height/μm	487.71±31.08	414.04±32.79	0.13
隐窝深度 Crypt depth/μm	185.28±8.86	147.51±13.01	0.04
绒毛高度/隐窝深度 V/C	2.65±0.18	2.82±0.08	0.41
回肠 Ileum			
绒毛高度 Villus height/μm	342.25±12.05	354.36±18.17	0.59
隐窝深度 Crypt depth/μm	151.50±12.70	150.89±5.63	0.97
绒毛高度/隐窝深度 V/C	2.33±0.19	2.35±0.11	0.92

2.3.2 AFB1 对断奶仔猪肠道微生物数量的影响

由表 8 可知，与对照组相比，AFB1 组盲肠双歧杆菌数量显著降低（P<0.05），但盲肠总菌、大肠杆菌、乳酸杆菌和芽孢杆菌数量均无显著差异（P>0.05），且回肠微生物数量均无显著差异（P>0.05）。

表 8 AFB1 对断奶仔猪肠道微生物数量的影响

Table 8 Effects of AFB1 on intestinal microflora amounts of weaned piglets lg(CFU/g)

项目 Items	对照组 Control group	AFB1 组 AFB1 group	*P* 值 *P*-value
回肠 Ileum			
总菌 Total bacteria	9.49±0.34	10.31±0.30	0.12
大肠杆菌 *Escherichia coli*	8.37±0.99	8.64±0.45	0.82
乳酸杆菌 *Lactobacillus*	7.97±0.35	7.35±0.40	0.29
芽孢杆菌 *Bacillus*	9.54±0.29	10.05±0.17	0.17
双歧杆菌 *Bifidobacterium*	7.00±1.18	8.80±0.15	0.23
盲肠 Caecum			
总菌 Total bacteria	11.04±0.18	11.11±0.18	0.77
大肠杆菌 *Escherichia coli*	9.84±1.59	8.89±1.64	0.32
乳酸杆菌 *Lactobacillus*	8.74±0.04	7.34±0.84	0.19
芽孢杆菌 *Bacillus*	9.69±0.18	9.93±0.05	0.25
双歧杆菌 *Bifidobacterium*	8.30±0.57	6.06±0.29	0.02

3 讨 论

Grenier 等[4]用 Meta 分析所得现在研究 AFB1 时常用剂量为 0.3~2.0 mg/kg，其中 0.3 mg/kg 是介于正常情况和天气不佳时容易发生 AFB1 的临界值，故本试验选用的 AFB1 剂量为临界值 0.3 mg/kg。此外，本试验在 Shotwell 等[5]的发酵方法上进行条件改造所得 AFB1，其浓度用目前国际上普遍采用的定量检测黄曲霉毒素方法（免疫亲和柱净化–高效液相色谱法）测定[6]。结果表明试验所用毒素 91%黄曲霉毒素为 AFB1，饲粮中其他霉菌毒素都未见超标，说明此发酵培养方法获得的 AFB1 纯度很高且不适宜其他霉菌毒素生长，适合单一 AFB1 研究。

AFB1 作为一级致癌物质，其中毒主要症状是阻碍猪的生长发育和对营养物质的吸收，造成动物亚健康导致饲料的浪费和上市时间的延长，从而造成经济损失[7]。研究表明，AFB1

能不同程度降低猪 ADFI 和 ADG，提高饲料转化率，且年龄越小、剂量越高、时间越长，AFB1 对动物损伤就越大[2]。本试验结果表明 AFB1 显著降低仔猪 ADG，有降低 ADFI 的趋势，且显著提高 F/G，说明 0.3 mg/kg AFB1 会抑制仔猪的生长。但本试验结果与 Rustemeyer 等[8]用剂量 0.25 mg/kg 饲喂生长阉公猪的结果不一致，其在第 5 周开始出现 ADFI 显著下降，对 ADG 无显著影响，而本试验中，0.3 mg/kg AFB1 的毒性效应在前 2 周就体现，可能原因是动物日龄越大，对 AFB1 的耐受力越强。

肝脏是代谢的主要场所，也是 AFB1 的主要靶器官。有研究表明，AFB1 会通过增加肝脏的重量，影响肉鸡的生长性能[9]。本试验 AFB1 显著增加了肝脏指数，且病理切片结果发现，AFB1 造成肝小叶结构不清晰，肝细胞中度水肿变性，部分出现中、重局灶状坏死，肝纤维组织增生明显，说明 AFB1 对肝脏造成了病理损伤。此外，有研究表明，AFB1 降低脂肪代谢基因 *PPARα*的表达，可能导致脂肪代谢紊乱而增加肝脏脂肪的堆积[10]。所以本试验测定了肝脏代谢相关基因，但结果无显著差异。结合 HE 染色结果分析（图 2），AFB1 造成肝脏相对重量增加可能是线粒体氧化酶系统受损的组织学变化结果。当肝脏受损时，肝细胞的线粒体氧化酶系统被破坏，ATP 生成减少，细胞膜的钠泵障碍，导致细胞内钠离子增多，水分进入细胞增多，细胞肿大或形成水泡变性[11-12]。

小肠绒毛高度、隐窝深度、V/C 值是衡量小肠消化吸收能力的重要指标。隐窝深度可以反映隐窝细胞的增殖率和成熟度，而肠道绒毛高度则可以间接反映肠黏膜吸收细胞和分泌细胞比例及肠黏膜对营养物质的吸收能力[13]。本试验中，AFB1 能显著增加十二指肠绒毛高度和隐窝深度，对 V/C 值也有增加的趋势，显著降低空肠的隐窝深度，表明 AFB1 能改变肠道形态，影响肠道正常发育和功能，这与冯光德[13]结果一致。这可能是由于 80% AFB1 在胃肠道前端通过被动运输被机体吸收，其中 50%在十二指肠被吸收[4]。为降低细胞内外 AFB1 浓度差，十二指肠绒毛高度增加。但是 AFB1 会降低细胞的合成[13]，所以隐窝细胞生成率和分泌率下降，增加十二指肠隐窝深度。而本试验中 AFB1 能降低空肠隐窝深度，可能是 AFB1 造成机体代谢紊乱的一种补偿效应。

肠道微生物对动物健康有重要影响，破坏其生态平衡可能会损害宿主的健康。有研究表明，250 μg/kg BW 的 AFB1 能显著降低雄性昆明小鼠盲肠食糜乳酸菌、双歧杆菌和总厌氧菌等肠道有益菌的数目，从而造成肠道菌群失调[12]。本试验结果与 Ezz El-Arab 等[14]研究结果一致，其发现 AFB1 能显著降低后肠双歧杆菌的数目，说明 AFB1 对肠道微生物稳态的影响可能主要是降低有益菌的数目。另一方面，肝脏的功能状态与肠道微生态平衡息息相关[13]，它能够代谢转化来自肠道的有害物质以及分泌游离型胆汁酸调节后肠 pH，维持肠道菌

群平衡[15-16]，所以肠道微生物的变化也可能与 AFB1 损伤肝脏有关。

4 结 论

饲喂含有 0.3 mg/kg AFB1 的饲粮会导致断奶仔猪生长性能下降，肝脏组织和肠道健康轻微受损。

参考文献：

[1] 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,2011,3(6):566–590.

[2] ATHERSTONE C,GRACE D,LINDAHL J F,et al.Assessing the impact of aflatoxin consumption on animal health and productivity[J].African Journal of Food,Agriculture Nutrition and Development,2016,16(3):10949–10966.

[3] 刁慧.苯甲酸和百里香酚对断奶仔猪生长性能和肠道健康的影响[D].硕士学位论文.雅安:四川农业大学,2013.

[4] GRENIER B,APPLEGATE T J.Modulation of intestinal functions following mycotoxin ingestion:meta-analysis of published experiments in animals[J].Toxins,2013,5(2):396–430.

[5] SHOTWELL O L,HESSELTINE C W,STUBBLEFIELD R D,et al.Production of aflatoxin on rice[J].Applied and Environmental Microbiology,1966,14(3):425–428.

[6] 刘立芳.黄曲霉毒素的检测及其降解方法进展[J].中国酿造,2014,33(1):23–26.

[7] 易中华,吴兴利.饲料中常见霉菌毒素的中毒症及危害[J].湖南饲料,2008(4):14–17.

[8] RUSTEMEYER S M,LAMBERSON W R,LEDOUX D R,et al.Effects of dietary aflatoxin on the health and performance of growing barrows[J].Journal of Animal Science,2010,88(11):3624–3630.

[9] HERZALLAH S M,AL-AMEIRI N,AL DMOOR H,et al.Meat and organs quality of broiler chickens fed diet contaminated with B1 aflatoxin[J].Global Veterinaria,2014,12(3):376–380.

[10] ALLAMEH A,SAFAMEHR A,MIRHADI S A,et al.Evaluation of biochemical and production parameters of broiler chicks fed ammonia treated aflatoxin contaminated maize grains[J].Animal Feed Science and Technology,2005,122(3/4):289–301.

[11] 刘艳丽,汪铭书,程安春,等.人工感染黄曲霉毒素雏鸭的病理学动态变化[J].中国兽医科学,2006,36(5):396–400.

[12] 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.

[13] 冯光德.自然霉变玉米对肉鸭生产性能和消化生理的影响及机制研究[D].博士学位论文.雅安:四川农业大学,2011.

[14] EZZ EL-ARAB A M,GIRGIS S M,HEGAZY E M,et al.Effect of dietary honey on intestinal microflora and toxicity of mycotoxins in mice[J].BMC Complementary and Alternative Medicine,2006,6(1):6.

[15] 胡文豪,董礼阳,杨运俊,等.调整肠道菌群对肝癌介入治疗后肝功能及内毒素的影响作用研究[J].中国微生态学杂志,2008,20(3):251–252,354.

[16] 朱宁川,陈岩.肝病肠道菌群失调与肠源性内毒素血症[J].中国微生态学杂志,2004,16(1):61–62.

Effects of Aflatoxin B1 on Growth Performance, Liver Tissue and Intestine Health of Weaned Piglets

BI Xiaojuan CHEN Daiwen YU Bing HE Jun MAO Xiangbing ZHENG Ping HUANG Zhiqing LUO Junqiu LUO Yuheng YU Jie*

(*Key Laboratory for Animal Disease-resistance Nutrition of Ministry of Education*, *Institute of Animal Nutrition, Sichuan Agricultural University*, *Chengdu* 611130, *China*)

Abstract: This study was conducted to investigate the effects of aflatoxin B1 (AFB1) on growth performance, liver tissue and intestine health of weaned piglets. Thirty-two 21-day old Duroc×Large White×Landrace weaned piglets with similar parity and body weight were randomly divided into two groups with 16 replicates per group and 1 pig per replicate. Pigs in the two groups were fed the basic diet with or without 0.3 mg/kg AFB1 respectively for 21 days after 3 days adaption with free feeding and drinking. At the end of the experiment, all piglets were weighed on fasting condition and 6 pigs in each group with similar average body weight were selected to collect the samples for measuring the growth performance, liver healthy, intestinal mucosa morphology and intestinal microflora amounts. The results showed as follows: compared to control group, dietary AFB1 significantly decreased the average daily gain ($P<0.05$), while significantly increased the ratio of feed to gain ($P<0.05$) and tended to decrease the average daily feed intake ($P=0.09$) of weaned piglets. Dietary AFB1 significantly increased the liver index ($P<0.05$) and induced unsharp structure of liver lobule, moderate hydropic degeneration of hepatocytes and partly medium and heavy focal necrosis, meanwhile obvious hyperplasia of hepatic fibrosis of weaned piglets. Dietary AFB1 had no significant effect on the mRNA expression of lipometabolism-related genes including acetyl coenzyme A carboxylase-1, fatty acid synthase, carnitine palmityltransferase-1, lipoprotein lipase and peroxisome proliferators activate receptor-α in the liver (P>0.05). Dietary AFB1 significantly increased the villus height and crypt depth of duodenum, as well as the crypt depth of jejunum (P<0.05). Dietary AFB1 significantly reduced the *Bifidobacterium* amount in cecum (P<0.05), but had no significant effects on the amounts of total bacteria, *Escherichia coli*, *Lactobacillus* and *Bacillus.* In conclusion, it is suggested that dietary 0.3 mg/kg AFB1 can decrease the growth performance and cause slight impairment of liver histology and intestine health of weaned piglets, and the underlying mechanism remains to be further studied.

Key words: aflatoxin B1; weaned piglets; growth performance; liver damage; intestine health

i

---

*Corresponding author, associate professor, E-mail: yujie@sicau.edu.cn （责任编辑　田艳明）