

## 重组人乳铁蛋白小鼠喂养毒理学评价\*

刘珊, 王小丹, 冯晓莲, 李晨汐, 汪会玲, 徐海滨

**摘要:**目的 探讨牛乳腺生物反应器表达的人乳铁蛋白对小鼠亚急性毒性。方法 断乳昆明小鼠 48 只, 雌雄各半, 随机分为 2 组, 对照组给予 AIN-93 啮齿类实验动物纯合饲料, 人乳铁蛋白组饲料用重组人乳铁蛋白替代 AIN-93 中的酪蛋白制成, 进行小鼠 28 d 喂养试验, 每周记录体重和进食量, 实验结束时分析血液、取脏器称重并进行病理组织学检查。结果 人乳铁蛋白组雄性小鼠终体重为  $(38.3 \pm 3.1) \text{g}$ , 高于对照组的  $(34.9 \pm 4.3) \text{g}$ ; 人乳铁蛋白组雌性小鼠终体重为  $(31.2 \pm 2.4) \text{g}$ , 对照组终体重为  $(31.2 \pm 1.9) \text{g}$ , 2 组差异无统计学意义; 与对照组比较, 人乳铁蛋白组小鼠食物利用率、血常规、血生化、脏器重量、脏器比和病理组织学检查结果未见明显改变。结论 牛乳腺生物反应器表达的重组人乳铁蛋白对小鼠未见亚急性毒性作用。

**关键词:** 人乳铁蛋白; 转基因; 牛乳腺生物反应器; 28 d 喂养试验

中图分类号: R 15

文献标志码: A

文章编号: 1001-0580(2013)02-0230-03

## Twenty-eight days feeding study on human lactoferrin expressed by cattle mammary bioreactor in mice

LIU Shan, WANG Xiao-dan, FENG Xiao-lian, et al (Institute for Nutrition and Food Safety, China Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100021, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate sub-acute toxicity of recombinant human lactoferrin (rhLf) from cattle mammary bioreactor in mice. **Methods** Groups of 12 male and 12 female weaning Kunming mice were fed with AIN-93 purified diets for laboratory rodents (control group) or rhLf modified diets (treated group), in which 20 g casein/100 g AIN-93 diet was substituted for 20 g rhLf/100 g diet, for a consecutive 28-day period. Body weight and food intake were recorded weekly. At the end of the study, blood was collected for routine and biochemical blood examination and organs were dissected and weighted; histopathological examination was accomplished simultaneously. **Results** The final mean body weight of rhLf-treated male mice was  $38.3 \text{ g} \pm 3.1 \text{ g}$ , higher than that of the control ( $34.9 \text{ g} \pm 4.3 \text{ g}$ ) significantly, but there was no significant difference between two female groups ( $31.2 \text{ g} \pm 2.4 \text{ g}$  in the treated and  $31.2 \text{ g} \pm 1.9 \text{ g}$  in the control). Food utilization rate, routine blood examination and biochemistry, absolute and relative weight of organs, and histopathology of organs of treated male and female mice were similar to those of the controls. **Conclusion** No evidence of sub toxicity was observed in the mice administered with recombinant human lactoferrin for 28 days.

**Key words:** human lactoferrin; transgene; cattle mammary bioreactor; 28-days feeding study

1996 年克隆羊多利和 1998 年第一头体细胞核转移牛的诞生宣告转基因克隆动物的研究进入了一个新时代。许多研究表明转基因动物及其后代的血液学、临床生化学、生长发育情况与传统动物无明显差别<sup>[1]</sup>。2008 年美国食品药品监督管理局在克隆动物的风险评估报告中提出转基因牛肉和牛奶的成分分析和动物喂养试验与传统对照动物比较均未见明显差别<sup>[2]</sup>。2010 年欧洲食品安全局克隆动物的进展情况报告中也提出用转基因牛肉或对照牛肉喂养动物未见有明显差别<sup>[3]</sup>。本研究以中国农业大学自主研发的牛乳腺生物反应器表达的人乳铁蛋白为原料, 将其掺入饲料进行小鼠 28 d 喂养试验, 观察其亚急性毒性, 结果报告如下。

### 1 材料与与方法

1.1 实验动物 健康清洁级昆明种小鼠(中国药品生物制品检定所实验动物中心)48 只, 雌雄各半, 体重 16 ~ 19 g, 许可证号: SCXK(京)2005-0004。使用中国医学科学院药物研究所动物实验中心清洁级动物房, 许可证号: SYXK(京)2004-0001。鼠料(中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心), 许可证号: SCXK-(军)2007-005。

1.2 主要试剂与仪器 重组人乳铁蛋白(中国农业大学研发的转人乳铁蛋白基因牛表达), 牛乳中的人乳铁蛋白表达量为 3.5 g/L, 通过膜纯化技术从该牛奶中分离提纯重组人乳铁蛋白(中国科学院过程工程研究所), 制成纯度 > 99% 重组人乳铁蛋白冻干粉供试验用。7080 型全自动生化分析仪(日本日立公司), 生化试剂(中生北控生物科技股份有限公司), MEK-6318K 全自动血球计数仪(日本光电公司), 血球稀释液及溶血液(上海东湖仪器试剂科技有限责任公司)。

\* 基金项目: 国家 863 计划项目(2007AA100506); 转基因生物新品种培育科技重大专项(2008ZX08011-005)

作者单位: 中国疾病预防控制中心营养与食品安全所, 北京 100021

作者简介: 刘珊(1978-), 女, 江苏人, 副研究员, 博士, 研究方向: 食品安全与毒理, 转基因生物及其产品的食用安全。

通讯作者: 徐海滨, E-mail: hbxu1231602@vip.sina.com

1.3 分组与处理 动物适应 3 d, 随机分为对照组和人乳铁蛋白组, 每组 24 只, 雌雄各半。分别用 2 种饲料连续喂饲小鼠 28 d。对照组给予 AIN-93 啮齿类实验动物纯合饲料(100 g 含酪蛋白 20 g), 人乳铁蛋白组饲料参照 AIN-93 饲料配方, 用重组人乳铁蛋白替代酪蛋白(100 g 含重组人乳铁蛋白 20 g)。每笼 2 只小鼠, 自由饮食, 每周记录小鼠体重及进食量。试验结束, 动物空腹过夜, 摘眼球取血测血常规和各项生化指标, 主要脏器进行称重并进行组织病理学检查。

1.4 观察指标

1.4.1 一般状况观察 每天观察并记录动物的一般表现、行为、中毒表现和死亡情况。记录每周体重及进食量, 计算每周及总食物利用率。

1.4.2 血液学指标检测 采用全自动血球计数仪测定血红蛋白、红细胞计数、血小板、白细胞计数及分类。

1.4.3 血液生化学指标检测 采用全自动生化分析仪测定血中谷丙转氨酶、谷草转氨酶、尿素氮、肌酐、血糖、血清白蛋白、总蛋白、总胆固醇、甘油三酯、

碱性磷酸酶含量。

1.4.4 病理检查 试验结束时对所有动物大体检查心、胸腺、肝、脾、肾、胃及十二指肠、睾丸或卵巢等脏器, 组织固定保存进行组织病理学检查。心、肝、肾、脾和睾丸称重, 计算相应的脏体比(以百克体重计算)。

1.5 统计分析 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 Excel 2003 软件建立数据库, 采用 SPSS 13.0 软件进行 *t* 检验, 检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 重组人乳铁蛋白对小鼠一般状况影响(表 1) 重组人乳铁蛋白组小鼠生长发育正常, 被毛浓密有光泽。从第 1 周开始, 重组人乳铁蛋白组雄性小鼠体重较对照组增高, 第 4 周时差异有统计学意义 ( $t = 2.259, P < 0.05$ ); 雌性小鼠体重 2 组差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。重组人乳铁蛋白组雄性小鼠摄食量和食物利用率稍高于对照组, 但差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

表 1 重组人乳铁蛋白对小鼠体重影响( $\bar{g}, \bar{x} \pm s, n = 12$ )

性别	组别	初始体重	第 1 周	第 2 周	第 3 周	第 4 周
雄	对照组	25.2 ± 1.6	29.5 ± 2.0	31.8 ± 2.3	33.5 ± 3.1	34.9 ± 4.3
	人乳铁蛋白组	25.1 ± 1.6	31.1 ± 2.5	33.3 ± 3.0	35.8 ± 3.3	38.3 ± 3.1 <sup>a</sup>
雌	对照组	24.6 ± 1.0	26.7 ± 1.4	28.6 ± 1.6	30.6 ± 1.8	31.2 ± 1.9
	人乳铁蛋白组	24.4 ± 1.1	26.9 ± 1.7	28.8 ± 2.3	30.7 ± 2.5	31.2 ± 2.4

注: 与对照组比较, a  $P < 0.05$ 。

2.2 重组人乳铁蛋白对小鼠血常规和生化影响(表 2、3) 重组人乳铁蛋白组雄性小鼠血小板计数高于对照组 ( $t = 2.282, P < 0.05$ ), 与对照组比较, 雌性小鼠血小板计数、血红蛋白、红细胞数和白细胞数无明显变化 ( $P > 0.05$ )。重组人乳铁蛋白组雄性小鼠总蛋白和白蛋白均高于对照组 ( $t = 2.957$ 、

3.241,  $P < 0.05$ ), 雌性小鼠血清中丙氨酸转氨酶和甘油三酯水平均高于对照组 ( $t = 2.787, 2.285, P < 0.05$ ), 总蛋白和肌酐水平均低于对照组 ( $t = 4.201, 3.747, P < 0.05$ )。天冬氨酸转氨酶和尿素、胆固醇、血糖、碱性磷酸酶在 2 组间差异均无统计学意义。

表 2 重组人乳铁蛋白对小鼠血常规影响( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

性别	组别	白细胞 ( $\times 10^9/L$ )	红细胞 ( $\times 10^{12}/L$ )	血红蛋白 (g/L)	血小板 ( $\times 10^9/L$ )
雄	对照组	4.23 ± 1.96	10.05 ± 1.52	175.82 ± 24.62	693.64 ± 189.47
	人乳铁蛋白组	3.78 ± 1.28	9.83 ± 0.82	178.00 ± 13.88	892.92 ± 225.69 <sup>a</sup>
雌	对照组	4.15 ± 1.01	10.49 ± 1.36	191.55 ± 26.31	814.09 ± 149.60
	人乳铁蛋白组	4.47 ± 1.82	10.20 ± 0.96	186.33 ± 10.59	863.17 ± 228.48

注: 与对照组比较, a  $P < 0.05$ 。

表 3 重组人乳铁蛋白对小鼠血生化指标影响( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

性别	组别	谷草转氨酶 (U/L)	谷丙转氨酶 (U/L)	总蛋白 (g/L)	白蛋白 (g/L)	尿素氮 (mmol/L)	肌酐 ( $\mu\text{mol/L}$ )	甘油三酯 (mmol/L)
雄	对照组	274 ± 94	58 ± 31	58.1 ± 7.2	32.0 ± 3.2	11.02 ± 1.81	88.3 ± 7.9	4.58 ± 1.68
	人乳铁蛋白组	215 ± 60	41 ± 15	66.3 ± 6.2 <sup>a</sup>	36.6 ± 3.5 <sup>a</sup>	9.29 ± 2.29	90.4 ± 9.9	6.36 ± 2.79
雌	对照组	153 ± 54	23 ± 7	65.6 ± 4.7	39.0 ± 4.0	8.67 ± 1.53	90.0 ± 6.7	2.32 ± 0.50
	人乳铁蛋白组	131 ± 23	34 ± 11 <sup>a</sup>	59.1 ± 2.4 <sup>a</sup>	36.6 ± 1.8	7.52 ± 1.58	79.3 ± 7.0 <sup>a</sup>	2.94 ± 0.77 <sup>a</sup>

注: 与对照组比较, a  $P < 0.05$ 。

2.3 重组人乳铁蛋白对小鼠脏器绝对重量和相对重量影响(表 4) 雌雄小鼠主要脏器绝对重量在 2 组间差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。由表 4 可见, 人乳铁蛋白组雌性小鼠肾脏相对重量高于对照组,

雄性小鼠睾丸相对重量低于对照组, 差异有统计学意义( $t = 2.426, P < 0.05$ ), 其他脏器相对重量差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。

表 4 重组人乳铁蛋白对小鼠脏器相对重量的影响( $\%, \bar{x} \pm s, n = 12$ )

性别	组别	肝脏	脾脏	肾脏	心脏	睾丸
雄	对照组	4.56 ± 0.598	0.334 ± 0.052	2.685 ± 0.510	0.553 ± 0.097	0.937 ± 0.201
	人乳铁蛋白组	4.66 ± 0.536	0.333 ± 0.056	2.870 ± 0.703	0.537 ± 0.073	0.784 ± 0.060 <sup>a</sup>
雌	对照组	4.56 ± 0.495	0.413 ± 0.079	1.854 ± 0.194	0.574 ± 0.098	
	人乳铁蛋白组	4.43 ± 0.673	0.452 ± 0.092	2.043 ± 0.170 <sup>a</sup>	0.546 ± 0.059	

注:与对照组比较, a  $P < 0.05$ 。

2.4 器官及组织学病理检查 解剖肉眼观察各动物心、肝、肾、脾、胸腺、胃、十二指肠、睾丸、卵巢组织未见明显异常, 未发现膀胱、肝总管结石。组织病理学检查发现部分动物可见轻度肝细胞水样变性; 部分动物肾脏肾小管上皮细胞有不同程度空泡化和肾小管再生; 脾窦轻度扩张瘀血; 可见灶状或片状分布心肌细胞萎缩或消失, 萎缩心肌细胞变小而散在, 并有结缔组织增生和少量淋巴细胞浸润, 部分区域心肌纤维内可见轻度空泡状结构, 2 组间病理改变差异不明显。

### 3 讨论

乳腺生物反应器是指利用乳腺特异表达的乳蛋白基因调控序列构建表达载体, 制作转基因动物, 指导特定外源基因在动物乳腺中特异性、高效率表达, 并能从乳汁中获取重组蛋白的一种生物反应器, 可以生产出完全活性的药用蛋白, 且产量高、活性稳定, 不污染环境<sup>[4]</sup>。人乳铁蛋白作为母乳的重要成分, 对婴儿的正常生长发育具有不可或缺作用<sup>[5]</sup>。此外, 在泪液、唾液、精液等分泌液中也广泛存在<sup>[6]</sup>。研究发现乳铁蛋白或其肽段是人类免疫系统的重要组成部分, 具有抗微生物和预防肿瘤作用<sup>[7-8]</sup>, 能预防极低体重新生儿败血症的发生<sup>[9]</sup>, 还能促进人表皮成纤维细胞透明质酸合成从而加快伤口愈合<sup>[10]</sup>。

转基因生物安全性是公众关注热点<sup>[11]</sup>, 重组人乳铁蛋白是否能够得到广泛应用首先取决于其安全性。研究表明, 生物信息学分析未见其与毒蛋白具有同源性, 遗传毒性研究也未发现阳性结果<sup>[12]</sup>。由于实验室制备的纯蛋白数量有限, 选择进食量较少的小鼠进行 28 d 喂养试验, 并且仅设置一个最高剂量组。人乳铁蛋白组雄性小鼠体重高于对照组, 睾丸绝对重量差别不大, 导致睾丸相对重量低于对照组, 似乎是性发育和体格发育不完全同步, 乳铁蛋白

主要促进体格发育, 而且雄性表现更为敏感。虽然有些生化指标存在组间统计学差异, 但均在正常范围内, 且在不同性别表现不一致, 因此没有明确的生物学意义。2 组动物各脏器相对重量均在正常值范围内, 各组织器官组织病理检查均未见有意义病理变化。重组人乳铁蛋白对小鼠未表现出亚急性毒性。

### 参考文献

- [1] Makiko Y, Masaya I, Yoshihiko I, et al. A 12-month feeding study of reproduction/development in rats fed meat/milk powder supplemented diets derived from the progeny of cloned cattle produced by somatic cell nuclear transfer [J]. J Reprod Dev, 2008, 54(5):321-334.
- [2] Center for Veterinary Medicine, US Food and Drug Administration. Animal cloning: a risk assessment [EB/OL]. (2008-01-14). [2011-07-21]. <http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/SafetyHealth/AnimalCloning/ucm055489.htm>.
- [3] European Food Safety Authority. Update on the state of play of animal cloning [J]. EFSA Journal, 2010, 8(9):1784.
- [4] 朱小甫, 渠敬峰, 吴旭锦, 等. 转基因动物乳腺生物反应器研究进展 [J]. 畜牧兽医杂志, 2007, 26(3):50-52.
- [5] 张艳杰. 乳铁蛋白的功能特性及其在婴儿配方奶粉中的应用 [J]. 中国乳品工业, 2005, 33(2):33-36.
- [6] Atsushi I, Syoko U, Hirohisa S, et al. Human trial of liposomal lactoferrin supplementation for periodontal disease [J]. Biol Pharm Bull, 2010, 33(10):1758-1762.
- [7] Jochen W, Andreas V. Antimicrobial peptides: the ancient aim of the human immune system [J]. Virulence, 2010, 1(5):440-464.
- [8] Haversen L, Kondori N, Baltzer L, et al. Structure-microbicidal activity relationship of synthetic fragments derived from the antibacterial  $\alpha$ -helix of human lactoferrin [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2010, 54(1):418-425.
- [9] Paolo M, Matteo R, Silvia C, et al. Bovine lactoferrin supplementation for prevention of late-onset sepsis in very low-birth-weight neonates [J]. JAMA, 2009, 302(13):1421-1428.
- [10] Shinichi S, Yoshiharu T, Koko M, et al. Lactoferrin promotes hyaluronan synthesis in human dermal fibroblasts [J]. Biotechnol Lett, 2011, 33:33-39.
- [11] 施向东, 卢洁. 转基因食品安全与发展 [J]. 中国公共卫生, 2007, 23(8):1014-1016.
- [12] 刘珊, 冯晓莲, 李晨汐, 等. 重组人乳铁蛋白的遗传毒性研究 [J]. 癌变 畸变 突变, 2011, 23(5):384-387.

收稿日期: 2012-01-21

(解学魁编辑 周欣琳校对)