

- controversy beneath the surface[J]. *Oncogene*, 2004, 23: 2875-2580.
- [13] 刘志,郑军. Bcl-2 家族蛋白及其在细胞凋亡中的作用[J]. *生命的化学*, 2007, 27(1): 22-25.
- [14] KAGAN V E, BAYIR H A, BELIKOVA N A, et al. Cytochrome c/cardiolipin relations in mitochondria: a kiss of death[J]. *Free Radical Biology Medicine*, 2009, 46(11): 1439-1453.
- [15] 乔玲,徐治立,谭旭,等. 间充质干细胞释放 Dkk-1 抑制乳腺癌细胞 Wnt/ β -catenin 途径的实验研究[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2007, 34(7): 702-708.
- [16] 赵保路. 茶多酚保护神经防止帕金森病损伤作用及其分子机理[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2008, 35(7): 735-743.
- [17] 谢朝阳,祝其锋,吴斌华. 姜黄素对 β -淀粉样肽(25-35)诱导去血清培养 PCI2 细胞周期异常与细胞凋亡的影响[J]. *中国新医药杂志*, 2007, 16(1): 36-40.

论著

重组人乳铁蛋白对大鼠生长发育作用的研究

王小丹,刘珊,严卫星,徐海滨

(中国疾病预防控制中心营养与食品安全所,北京 100021)

摘要:目的 研究从转基因牛乳中分离纯化的重组人乳铁蛋白是否具有促进动物生长发育的作用。方法 给大鼠灌胃重组人乳铁蛋白共 8 周,设低、中、高 3 个剂量组(0.375、0.75 和 2.25 g/kg BW·d),以水为对照组。检测指标包括动物体重、身长、摄食量和食物利用率。结果 高剂量组体重、身长和食物利用率指标均显著优于对照组,低、中剂量组的体格发育指标较对照组有轻度改善。结论 在本研究条件下,重组人乳铁蛋白具有促进大鼠生长发育的作用。

关键词:转基因;重组;乳铁蛋白;促进生长发育

中图分类号:R285.5 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2011)02-0105-04

Effect of recombinant human lactoferrin on improving the growth of rats

Wang Xiaodan, Liu Shan, Yan Weixing, Xu Haibin

(National Institute for Nutrition and Food Safety, China CDC, Beijing 100021, China)

Abstract: Objective To study whether the growth of rats will be improved by recombinant human lactoferrin (rhLF) separated and purified from transgenic cow milk. **Methods** rhLF was administered by gavage to 4 groups of 14 male weaned Wistar rats at doses of 0.375, 0.75 or 2.25 g/(kg BW·d) for 56 days. Body weight, body length and food consumption were recorded at regular intervals. **Results** Compared with the control group, the physical parameters including body weight, body length and food utilization were improved obviously in the high dose group. There is a slight improvement on physical parameters in the low and medium dose groups. **Conclusion** Recombinant human lactoferrin might show a function of improving the growth of rats in this study.

Key words: Transgene; recombinant; human lactoferrin; growth improvement

乳铁蛋白(lactoferrin, LF)是由哺乳动物腺上皮细胞表达和分泌的一种 80 kDa 左右的铁结合性糖蛋白,属于转铁蛋白家族成员。越来越多的研究表明,乳铁蛋白具有多种生物学作用,包括调节体内

铁稳态、广谱抗微生物作用、抗炎作用、调节细胞生长和分化以及抑制癌症发生和转移等^[1]。最近的研究还发现,乳铁蛋白具有很强的成骨作用,从而促进骨骼生长^[2,3]。由于天然乳铁蛋白主要从乳清中分离得到,昂贵的价格限制了其大规模应用。转基因技术为生产成本较低的重组乳铁蛋白提供了新的技术手段。重组蛋白研究的一个重要方面就是对重组蛋白进行生理功能的分析鉴定,只有确定了重组蛋白和天然同种蛋白具有相同的生物活性,才能实现前者对后者的成功替代。本实验以大鼠

收稿日期:2010-08-04

基金项目:国家高技术研究发展计划(863 计划项目)
(2007AA100506)

作者简介:王小丹 女 硕士生 研究方向为食品卫生学 E-mail:
suzhou1985@sina.com

通信作者:徐海滨 男 研究员

为模式动物,采用从转人乳铁蛋白基因牛的乳汁中分离纯化所得的重组人乳铁蛋白(recombinant human lactoferrin, rhLF)为受试物,研究其对大鼠生长发育的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 受试物

重组人乳铁蛋白冻干粉,纯度为95%以上,来源于北京济普霖生物技术有限公司培育的转人乳铁蛋白基因牛的乳汁,由中国科学院过程工程研究所通过膜纯化工工艺分离纯化。

1.1.2 实验动物

清洁级健康 Wistar 雄性断乳大鼠,体重 69 ~ 84 g,由中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心提供,动物合格证号[SCXK(军)2007-004]。饲养地点为中国医学科学院实验动物研究所清洁级动物房,许可证号[SYXK(京)2006-0010]。颗粒饲料购自北京科澳协力饲料有限公司,许可证号[SCXK(京)2005-0007]。

1.1.3 实验器材

电子天平(型号:YB1201DW,可读性:0.1 g)、测量尺(精度:1 mm)。

1.2 方法

参照卫生部发布的《保健食品检验与评价技术规范》(2003年版)^[4]中改善生长发育功能检验方法设计并实施本实验。

1.2.1 动物分组与饲养条件

56只雄性断乳大鼠于实验环境中适应3 d后,按体重随机分为4组,每组14只,每笼2只进行饲养。保证动物自由饮水和进食,动物房内保持安静、清洁、通风和自然光照状态,温度20~26℃,相对湿度50%~65%。

1.2.2 剂量设计

以人体可能摄入量(0.075g/kg BW·d,计算方法:目前培育的转人乳铁蛋白基因牛乳汁中 rhLF 表

达量为 3.4 ~ 4.5 g/L,假设体重为 60 kg 的成年人每人每天摄入 1 L 牛奶,则 rhLF 最大可能摄入量为 0.075 g/kg BW·d)的 5 倍、10 倍和 30 倍设立低、中、高 3 个剂量组,分别为 0.375、0.75 和 2.25 g/kg BW·d。将受试物 rhLF 用蒸馏水配制成浓度分别为 37.5、75 和 225 g/L 的溶液,以灌胃方式给予 3 个处理组动物,对照组同样以灌胃方式给予溶剂蒸馏水。按 10 ml/kg BW 灌胃量每天灌胃 1 次,实验周期为 56 d。

1.2.3 观察指标

实验期间观察动物的一般状况,包括精神状态、行为表现、活动能力、被毛及粪便情况。记录动物的初始体重和初始身长,实验开始后每周称 2 次体重,每两周测量 1 次身长(头部到尾尖部长度),记录每周摄食量,计算每周食物利用率和实验期间(8周)总食物利用率,计算公式为:第 n 周食物利用率 = [第 n 周末体重 - 第 $(n-1)$ 周末体重] / 第 n 周摄食量 $\times 100\%$ 。

1.2.4 统计分析

采用 SPSS 统计软件进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 一般状况的观察结果

除实验第 23 天高剂量组 1 只动物由于意外死亡外,无其他动物死亡。整个实验过程中,动物精神状态良好,行为表现正常,反应灵敏,活泼好动;被毛整齐有光泽,粪便形态和颜色均未见异常。

2.2 rhLF 对大鼠体重的影响

实验第 2 周时,各组动物体重显著增长($P < 0.05$),3 个 rhLF 处理组体重均高于对照组,且各组平均体重与剂量之间呈正相关($r_s = 0.355, P < 0.01$);中、高剂量组与对照组相比差异有显著性($P < 0.05$)。第 3 周时,3 个 rhLF 处理组体重仍高于对照组,其中高剂量组与对照组之间差异有显著性($P < 0.05$)。从第 4 周至实验结束(第 8 周),各组动物体重差异均无显著性。见表 1。

表 1 rhLF 对大鼠体重的影响

Table 1 Effect of rhLF on body weight of rats($\bar{x} \pm s, g$)

组别	n	体重								
		0 周	1 周	2 周	3 周	4 周	5 周	6 周	7 周	8 周
水对照组	14	76.1 ± 3.7	126.7 ± 5.8	180.8 ± 11.0	241.0 ± 12.2	295.5 ± 17.9	340.2 ± 22.4	375.5 ± 25.3	387.7 ± 26.5	392.1 ± 26.7
低剂量组	14	76.2 ± 3.5	128.2 ± 6.0	187.8 ± 6.3	246.8 ± 8.1	300.3 ± 9.8	342.2 ± 11.6	378.1 ± 12.8	387.2 ± 14.3	395.3 ± 13.3
中剂量组	14	76.5 ± 3.3	129.8 ± 6.5	188.4 ± 8.6 ^a	245.6 ± 12.9	300.1 ± 14.3	339.5 ± 18.6	371.4 ± 21.5	382.2 ± 20.9	387.7 ± 23.3
高剂量组	13	76.3 ± 2.9	130.8 ± 5.8	193.0 ± 11.5 ^a	254.8 ± 14.9 ^a	309.2 ± 19.2	352.1 ± 21.8	383.8 ± 26.8	396.1 ± 30.4	403.5 ± 29.6

注:^a与对照组比较, $P < 0.05$ 。

2.3 rhLF 对大鼠身长的影响

实验第 2 周时,各组动物身长显著增长($P <$

0.05),中、高剂量组身长大于对照组和低剂量组,且差异有显著性($P < 0.05$)。第 4 周时 3 个 rhLF

处理组身长均大于对照组,其中低、高剂量组与对照组相比差异有显著性($P < 0.05$)。第6周和第8周时各组动物身长差异无显著性。见表2。

2.4 rhLF 对大鼠摄食量的影响

整个实验过程中3个rhLF处理组和对照组摄食量差异无显著性,见表3。

表2 rhLF 对大鼠身长的影响

Table 2 Effect of rhLF on body length of rats($\bar{x} \pm s$, cm)

组别	n	身长				
		0周	2周	4周	6周	8周
水对照组	14	22.6 ± 0.8	31.3 ± 0.7	36.1 ± 0.9	38.9 ± 0.8	40.8 ± 0.9
低剂量组	14	22.7 ± 0.7	31.3 ± 0.7	36.9 ± 0.7 ^a	39.5 ± 0.6	41.6 ± 0.8
中剂量组	14	22.7 ± 0.6	31.9 ± 0.6 ^a	36.5 ± 0.9	39.5 ± 0.7	41.0 ± 0.9
高剂量组	13	22.8 ± 0.5	32.0 ± 0.8 ^a	37.4 ± 1.0 ^a	39.8 ± 1.2	41.3 ± 1.1

注:^a与对照组比较, $P < 0.05$ 。

表3 rhLF 对大鼠摄食量的影响

Table 3 Effect of rhLF on food intake of rats($\bar{x} \pm s$, g)

组别	n	摄食量							
		第1周	第2周	第3周	第4周	第5周	第6周	第7周	第8周
水对照组	14	101.6 ± 7.9	152.6 ± 21.0	179.8 ± 17.8	205.4 ± 24.5	211.8 ± 13.0	218.6 ± 14.5	199.0 ± 14.0	139.8 ± 9.3
低剂量组	14	99.2 ± 10.7	152.9 ± 6.4	180.3 ± 12.5	204.8 ± 18.0	212.4 ± 7.0	213.6 ± 6.2	198.1 ± 10.6	142.1 ± 6.1
中剂量组	14	103.6 ± 9.8	153.4 ± 8.1	179.7 ± 16.2	201.6 ± 15.3	211.0 ± 14.2	210.0 ± 12.7	194.3 ± 11.6	134.8 ± 11.2
高剂量组	13	101.9 ± 7.7	152.9 ± 17.7	183.6 ± 12.1	201.8 ± 19.4	211.6 ± 14.3	208.3 ± 15.5	193.3 ± 15.5	134.7 ± 8.6

2.5 rhLF 对大鼠每周食物利用率和总食物利用率的影响

实验前2周时,3个rhLF处理组动物的食物利用率均高于对照组,第1周低、高剂量组与对照组相比差异有显著性($P < 0.05$),第2周低、中、高剂量组与对照组相比均有显著性差异($P < 0.05$)。从第

2周到第3周,对照组动物的食物利用率仅轻度降低,而3个rhLF处理组降幅较大,因此第3周时,高剂量组食物利用率降至与对照组基本相同,低、中剂量组低于对照组,且中剂量组与对照组之间的差异有显著性($P < 0.05$)。从第4周开始至实验结束(第8周)各组食物利用率差异无显著性。见表4。

表4 rhLF 对大鼠每周食物利用率的影响

Table 4 Effect of rhLF on food utilization each week in rats($\bar{x} \pm s$, %)

组别	n	食物利用率							
		第1周	第2周	第3周	第4周	第5周	第6周	第7周	第8周
水对照组	14	49.9 ± 1.8	35.4 ± 3.3	33.5 ± 2.2	26.5 ± 2.2	21.0 ± 2.1	16.1 ± 1.7	6.1 ± 2.3	3.0 ± 3.9
低剂量组	14	52.8 ± 5.7 ^a	39.0 ± 1.9 ^a	32.7 ± 0.5	26.2 ± 1.5	19.7 ± 3.2	16.8 ± 2.3	4.5 ± 3.1	5.6 ± 4.7
中剂量组	14	51.5 ± 2.1	38.2 ± 1.8 ^a	31.8 ± 1.6 ^a	27.0 ± 1.4	18.6 ± 2.4	15.2 ± 1.8	5.5 ± 3.5	3.8 ± 4.2
高剂量组	13	53.5 ± 2.0 ^a	40.7 ± 1.1 ^a	33.6 ± 1.4	27.1 ± 0.9	20.3 ± 1.1	15.1 ± 3.0	6.2 ± 3.7	5.4 ± 5.8

注:^a与对照组比较, $P < 0.05$ 。

各组动物8周总增重量和总摄食量均无显著性差异。总食物利用率方面,高剂量组较对照组显著增高($P < 0.05$),低、中剂量组与对照组相比差异无显著性。见表5。

表5 rhLF 对大鼠8周总食物利用率的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Effect of rhLF on food utilization in rats

组别	n	总体重增长(g)	总摄食量(g)	总食物利用率(%)
水对照组	14	316.1 ± 27.7	1408.5 ± 87.7	22.4 ± 0.7
低剂量组	14	319.0 ± 14.9	1403.4 ± 35.8	22.7 ± 0.9
中剂量组	14	311.2 ± 20.9	1388.4 ± 69.5	22.4 ± 0.7
高剂量组	13	327.2 ± 28.7	1382.1 ± 92.4	23.5 ± 0.9 ^a

注:^a与对照组比较, $P < 0.05$ 。

显示出明显的促进大鼠生长发育的作用,体重、身长和食物利用率指标较对照组有较大改善;低剂量(0.375 g/kg BW)和中剂量(0.75 g/kg BW)rhLF对大鼠的作用效果相近,各项指标较对照组有轻度改善。

本实验周期共8周,通过各项结果可以看出,rhLF主要在前3~4周表现出了促进大鼠生长发育的作用。实验初期rhLF处理组和对照组在体重、身长和食物利用率方面差异均有显著性,而实验中后期则差异无显著性。依据该品系大鼠的生长曲线^[5]推论产生该现象的原因可能是:实验初期正值动物生长发育最快的阶段,对各种调节因素最为敏感,同时该期动物自身的调节机制还未形成,对外界干预较为依赖,处理因素在此时最易发挥作用;而实验中后期动物生长发育速度减慢,且动物在成

3 讨论

在本研究条件下,高剂量(2.25 g/kg BW)rhLF

熟过程中逐渐增强了自身调节的能力,对外界调节因素的依赖性减弱,因此处理因素表现出来的作用便不再明显。由于体重、摄食量和食物利用率均可反映受试物对动物生长发育的作用,同时3个指标之间相互关联,将三者进行综合分析发现,整个实验过程中各组动物摄食量差异均无显著性,而rhLF处理组的体重和食物利用率在实验初期显著高于对照组,表明处理组动物体重增加并非由于摄食量增加导致,而是归因于rhLF使动物对食物的利用率提高,这是rhLF营养价值的重要体现。在各指标反映受试物对动物生长发育作用的敏感性方面,食物利用率出现差异的时间最早(第1周),且低、中、高3个剂量组与对照组相比差异均可见显著性。体重从第2周开始显示出差异,其中低剂量组与对照组之间的差异无统计学意义。这一结果表明,与体重相比,食物利用率是反映受试物对动物生长发育作用较为敏感的指标。

有文献从多方面对转人乳铁蛋白基因牛乳汁中分离纯化的重组人乳铁蛋白进行了理化性质和生理作用的鉴定^[6],分析了其与天然人乳铁蛋白的等同性:二者分子量相近,N端氨基酸序列相同,热稳定性和消化稳定性一致,都具有结合和释放铁离子的能力,重组人乳铁蛋白在体外实验时同样表现出抑菌作用,鉴定结果表明重组人乳铁蛋白和天然人乳铁蛋白在上述方面均具有等同性。天然乳铁蛋白对动物生长发育的促进作用已被多项研究证明^[7-9],机制可能与其能够调节体内铁稳态、广谱抗微生物和抗炎、调节细胞生长和分化以及促进骨骼生长等作用有关,鉴于重组人乳铁蛋白与天然人乳铁蛋白在结构和性质方面的等同性,认为重组人乳铁蛋白通过与天然人乳铁蛋白相同的机制发挥促进动物生长发育的作用。

乳铁蛋白作为初乳中的重要营养成分,其对婴幼儿生长发育的作用早已引起广泛关注,发达国家在多年前即有添加乳铁蛋白的婴幼儿奶粉面市,而我国在该方面的开发和应用几乎空白^[10]。本研究

以大鼠为实验对象,在人群乳铁蛋白可能摄入量的基础上,研究了通过膜纯化分离工艺获得的重组人乳铁蛋白促进动物生长发育的作用剂量谱,证实重组人乳铁蛋白具有促进动物生长发育的作用,肯定了其添加于婴幼儿配方奶粉中的意义和价值,为我国自主知识产权的重组人乳铁蛋白替代天然人乳铁蛋白开发利用提供了科学依据。

除了体格发育方面的指标外,本研究今后将进一步探索rhLF对动物神经系统及其他系统的发育是否同样具有促进作用。

参考文献

- [1] WARD P P, PAZ E, CONNEELY O M. Multifunctional roles of lactoferrin: a critical overview [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2005, 62 (22):2540-2548.
- [2] WLODARSKI K. Lactoferrin: a promising bone-growth promoting milk-derived glycoprotein [J]. *Chir Narzadow Ruchu Ortop Pol*, 2009, 74(5):257-259.
- [3] 曹阳阳, 张楠楠, 李丹丹, 等. 铁饱和乳铁蛋白对大鼠成骨细胞增殖与分化的影响 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2009, 15 (10):752-755.
- [4] 中华人民共和国卫生部. 保健食品检验与评价技术规范 [S]. 2003:108-110.
- [5] 李善如, 王冬平. Wistar大鼠生长性能测定 [J]. *上海实验动物科学*, 1994, 14(2):93-94.
- [6] YANG P, WANG J, GONG G, et al. Cattle mammary bioreactor generated by a novel procedure of transgenic cloning for large-scale production of functional human lactoferrin [J]. *PLoS One*, 2008, 3(10):e3453.
- [7] PRENNER M L, PRGOMET C, SAUERWEIN H, et al. Effects of lactoferrin feeding on growth, feed intake and health of calves [J]. *Arch Anim Nutr*, 2007, 61(1):20-30.
- [8] WANG Y, SHAN T, XU Z, et al. Effect of lactoferrin on the growth performance, intestinal morphology, and expression of PR-39 and protegrin-1 genes in weaned piglets [J]. *J Anim Sci*, 2006, 84(10):2636-2641.
- [9] 张祥. 不同乳铁蛋白含量的代乳粉对犊牛生长发育的影响 [D]. 江苏:扬州大学动物营养与饲料科学, 2007.
- [10] 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.