

论著

重组人乳铁蛋白对子代大鼠免疫功能影响的一代繁殖毒性扩展试验

徐一凡^{1,2}, 支媛², 汪会玲², 冯晓莲², 王二辉³, 胡静², 杨建军¹, 贾旭东², 于洲², 徐海滨²

(1. 宁夏医科大学公共卫生与管理学院, 宁夏 银川 750004; 2. 国家食品安全风险评估中心 卫生部食品安全风险评估重点实验室, 北京 100021; 3. 新乡医学院公共卫生学院, 河南 新乡 453003)

摘要:目的 研究转基因牛乳腺生物反应器表达的重组人乳铁蛋白(rhLF)对子代大鼠免疫功能的影响。方法 参照一代繁殖毒性扩展试验指南设计试验,将 Wister 大鼠分为对照组(酪蛋白)、重组人乳铁蛋白组,每组 30 只雌鼠、15 只雄鼠;按照蛋白占比为 20% 的比重掺入饲料进行全食物喂养。雌/雄大鼠喂养相应饲料两周后进行交配,各组雌鼠在交配期、妊娠期和哺乳期继续给予相应饲料,子代大鼠从断乳到处死继续给予相应饲料。子代大鼠分别在 PND0(出生后 0 天)、PND21(出生后 21 天)和 PND56(出生后 56 天)进行免疫功能评价。结果 重组人乳铁蛋白组与对照组比较,重组人乳铁蛋白组子代大鼠血常规、血生化和淋巴细胞分型结果未见明显改变;溶血空斑试验(PFC)、淋巴细胞增殖试验及自然杀伤细胞(NK 细胞)活性试验指标结果均差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 在本研究的试验条件下,重组人乳铁蛋白对子代大鼠免疫功能未见不良影响。

关键词:重组人乳铁蛋白;转基因食品;子代大鼠;免疫功能;一代繁殖毒性;毒理学试验;不良反应

中图分类号:R155 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2016)02-0155-05

DOI:10.13590/j.cjfh.2016.02.004

Effects of recombinant human lactoferrin on immune function of offspring rats in an extended one-generation study

XU Yi-fan, ZHI Yuan, WANG Hui-ling, FENG Xiao-lian, WANG Er-hui, HU Jing, YANG Jian-jun, JIA Xu-dong, YU Zhou, XU Hai-bin

(School of Public Health and Management, Ningxia Medical University, Ningxia Yinchuan 750004, China)

Abstract: Objective To assess the influence of rhLF expressed by mammary gland bioreactor of transgenic cows on immune function of rat offsprings. **Methods** According to the extended one-generation reproductive toxicity study protocol (OECD443), the experiment was divided into two groups, including control group and rhLF group. Diets containing 20% casein or recombinant human lactoferrin (rhLF) were fed to parental rats for 14 days prior mating and throughout pregnancy and lactation. Offsprings were randomly selected from each group and fed with corresponding diets from weaning to execution. Immune function of offsprings was assessed on PND0, PND21 and PND56. **Results** No significant differences were observed on hematology and percentage of lymphocyte subsets between various groups. PFC, the lymphocyte proliferative response and NK cell activity had no statistical difference ($P > 0.05$). **Conclusion** The results suggested that recombinant human lactoferrin exerts no adverse effect on the immune system of rat offsprings.

Key words: Recombinant human lactoferrin; transgenic food; offspring rats; immune function; one-generation reproductive toxicity; toxicology experiments; adverse effect

乳铁蛋白(lactoferrin)属于转铁蛋白家族,由乳腺上皮细胞表达和分泌,在中性粒细胞中也有分布,有重要的生物学作用^[1]。有研究表明,人乳铁蛋白有改善铁营养状况^[2]和调节肠道菌群的作用^[3]。由于

免疫系统的敏感性,在器官出现病理改变之前,免疫毒性即可显现,外来化学物质对免疫系统的影响在危害识别中受到广泛关注。转基因食品的免疫学评价是其食品安全性评价的重要内容,目前仅有少量资料涉及重组人乳铁蛋白(rhLF)的免疫毒性研究,ZHOU等^[4]发现重组人乳铁蛋白与致敏蛋白的同源性较高,但没有发现与鸡蛋、牛奶过敏患者的血清免疫球蛋白E(IgE)特异性结合,推测 rhLF 可能不存在潜在的致敏性。相较于成人,婴幼儿免疫器官尚未发育成熟,对外界免疫刺激更为敏感,目前鲜见亲代动物重组人

收稿日期:2016-01-28

基金项目:高品质转基因奶牛新品种培育(2014ZX08007001)

作者简介:徐一凡 男 硕士生 研究方向为营养与食品卫生

E-mail: xuonefan@163.com

通信作者:徐海滨 男 研究员 研究方向为食品安全风险评估

E-mail: hbxu1231602@vip.sina.com

乳铁蛋白暴露对子代大鼠免疫功能影响的相关研究报道,为进一步丰富对重组人乳铁蛋白免疫毒性的认知,本研究通过观察 rhLF 暴露对子代大鼠免疫功能的影响,丰富重组人乳铁蛋白的安全性评价资料,为相关食品安全风险管理和风险交流提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及样品

实验动物选择 SPF 级 11 周龄 Wistar 大鼠,雌鼠 60 只,体质量 200 ~ 250 g,雄鼠 30 只,体质量 330 ~ 400 g,实验动物由北京维通利华实验动物科技有限公司提供[许可证号:京 SCXK(京)2012-0009]。试验在中国疾病预防控制中心动物实验室进行[许可证号 SYXK(京)2009-0032],温度 21 ~ 24 °C,湿度 40% ~ 70%,明暗周期 12/12 h。

重组人乳铁蛋白冻干粉由无锡科捷诺生物科技有限责任公司提供,经过反相高效液相色谱测定分析纯度为 95% 以上。

1.1.2 主要仪器与试剂

xt2000i 全自动血球计数仪(日本 Sysmex)、AU680 全自动生化分析仪(美国 Beckman),70 mm 细胞筛、FACS Calibur 流式细胞仪均购自美国 BD,酶标仪(美国 BioTek),二氧化碳培养箱。

1640 培养液、胎牛血清、青链霉素均购自美国 Gibco,Hank's 液(北京索莱宝科技有限公司),磷酸盐缓冲液(PBS,北京索莱宝科技有限公司),红细胞裂解液、CD3/CD45RA/CD161a 大鼠流式检测抗体、CD3/CD4/CD8 大鼠流式检测抗体均购自美国 BD,非放射性细胞增殖检测试剂盒(MTS,美国 Promega),刀豆蛋白 A(ConA,美国 Sigma),无菌脱纤维绵羊血(北京陆桥技术股份有限公司),YAC-1 细胞(本实验室储备)。

1.2 方法

1.2.1 试验设计

本研究参照一代繁殖毒性扩展试验指南(OECD443)^[5],重点研究亲代大鼠在孕期和哺乳期暴露 rhLF 对子代大鼠免疫功能的影响,以及子代大鼠在断乳后持续暴露 rhLF 对其免疫功能的影响。为了更好的说明 rhLF 对子代大鼠免疫功能的影响,本试验在保证营养平衡的基础上,以最大掺入量为设计剂量,以酪蛋白为对照组。关于免疫指标的选择,本研究参考人用药物免疫毒性试验指导原则(ICH S8)^[6],选取了血常规,血生化,外周血、脾、胸腺及潘氏结淋巴细胞表型分析(CD3/CD4/CD8、CD3/CD45RA/CD161a);进行溶血空斑试验(PFC)、淋巴

细胞增殖试验、自然杀伤细胞(NK 细胞)活性试验。指标涵盖了体液免疫、细胞免疫和非特异性免疫。

1.2.2 动物分组及处理

雌/雄大鼠适应环境 7 d 后,按体重随机分为 2 个组:对照组、rhLF 组,每组 30 只雌鼠、15 只雄鼠。分别给予酪蛋白(CS)饲料和蛋白全替换的 rhLF 饲料 2 周后,将同组雌/雄大鼠进行交配。交配时,每只雌鼠与从同一组随机选择的单个雄鼠合笼,直至检测到阴栓或阴道涂片观察到精子,每组保证至少 20 只孕鼠。各组雌鼠在交配期、妊娠期和哺乳期继续给予相应蛋白饲料,直至子鼠断乳。雌鼠在子鼠断乳后处死。子代大鼠从断乳到 PND91(PND91 指出生第 91 天,以此类推)进一步给予相应饲料。PND0 的子鼠进行脾、胸腺淋巴细胞分型,PND21 的子鼠进行外周血、脾淋巴细胞分型,PND56 的子代大鼠进行外周血、脾、潘氏结淋巴细胞分型和免疫功能试验。

1.2.3 饲料配制

CS 和 rhLF 分别作为对照组和 rhLF 组饲料的唯一蛋白源,掺入比为 20%。由北京华阜康饲料公司参照 AIN-93G 标准制作^[7],饲料配方见表 1。

表 1 饲料配方(%)

Table 1 Feed components of each group

成分	对照组	rhLF 组
CS	20.0	0.0
rhLF	0.0	20.0
玉米淀粉	39.7	39.7
麦芽糖糊精	13.2	13.2
蔗糖	10.0	10.0
纤维素	5.0	5.0
豆油	7.0	7.0
矿物质混合物	3.5	3.5
维生素混合物	1.0	1.0

1.2.4 观察指标

1.2.4.1 血常规指标

利用全自动血球计数仪测定白细胞(WBC)、红细胞(RBC)、血红蛋白(HGB)、红细胞压积(HCT)、平均红细胞压积(MCV)、淋巴细胞(LY)、单核细胞(MO)、血小板(PLT)、红细胞宽度(RDW)。

1.2.4.2 血生化学指标

利用全自动生化分析仪测定白蛋白/球蛋白(A/G)、白蛋白(ALB)、谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、胆固醇(CHO)、肌酐(CRE)、球蛋白(GLB)、血糖(GLU)、甘油三酯(TG)、总蛋白(TP)、尿素(UREA)。

1.2.4.3 外周血淋巴细胞分型

腹主动脉采血,分别在流式管中加入 100 ml 抗凝血,再分别加入大鼠流式检测抗体(CD3/CD4/

CD8、CD3/CD45RA/CD161a),振荡混匀,避光孵育 20 min;每管加入 2 ml 红细胞裂解液,振荡混匀,避光孵育 10 min,300 × g 离心 5 min,弃上清;每管加入 2 ml PBS,300 × g 离心 5 min,弃上清;加入 500 ml PBS 用流式细胞仪收集数据。

1.2.4.4 胸腺、脾和潘氏结淋巴细胞分型

新鲜摘取大鼠胸腺、脾和小肠潘氏结,置于无菌 Hank's 液中,研磨过筛,300 × g 离心 5 min,弃上清;加入 PBS 调节细胞浓度至 10⁷ 个/ml 后备用;取流式管,分别加入 100 ml 细胞悬液,再分别加入大鼠流式检测抗体 (CD3/CD4/CD8、CD3/CD45RA/CD161a),振荡混匀,避光 20 min;每管再加入 2 ml PBS,混匀后 300 × g 离心 5 min,弃上清,加入 500 ml PBS 用流式细胞仪收集数据。

1.2.4.5 溶血空斑试验

无菌脱纤维绵羊血 550 × g 离心 10 min,PBS 洗 3 遍;用 PBS 调整细胞浓度为 5 × 10⁹ 个/ml,腹腔注射 0.4 ml。将免疫 5 d 后的大鼠按照 1.2.4.4 方法获得无菌脾细胞悬液,调整脾细胞浓度为 5 × 10⁶ 个/ml。每只大鼠做 2 个平行样;取两个小试管放入 47 °C 水浴中,加入 0.5% 琼脂糖 0.35 ml 和 2 × 10⁹ 个/ml 绵羊血红细胞 (SRBC) 25 ml,然后从水浴中取出试管,并加入 100 ml 脾细胞 (5 × 10⁶ 个/ml) 和 25 ml 豚鼠补体,混匀后迅速倒在载玻片上,加盖玻片,琼脂凝固后,37 °C 潮湿环境孵育 3 h,计数玻片上的空斑数^[8]。

1.2.4.6 ConA 诱导淋巴细胞增殖试验

按照 1.2.2.4 方法获得无菌脾细胞悬液,调整脾细胞浓度为 1 × 10⁶ 个/ml,分两孔加入到 96 孔培养板中,每孔 90 ml,一孔加 10 ml 50 mg/ml ConA,另一孔加 10 ml 1640 完全培养基作对照;置于 5% CO₂ 细胞培养箱,37 °C 培养 72 h,培养结束前 4 h,每孔加 20 ml MTS,继续培养 4 h,培养结束后,酶标仪在 490 nm 处检测吸光度值 (OD 值)。用加 ConA 孔的 OD 值减去不加 ConA 孔的 OD 值代表淋巴细胞的增殖能力。

1.2.4.7 NK 细胞活性试验

调整脾细胞悬液浓度为 5 × 10⁶ 个/ml,试验前一天将靶细胞 (YAC-1) 进行传代培养,应用前调整

细胞浓度为 1 × 10⁵ 个/ml。试验孔加靶细胞和脾细胞各 50 ml,自然释放孔加靶细胞和培养液各 50 ml,最大释放孔加靶细胞和培养液各 50 ml,培养结束前 45 min 加入 10 ml 裂解液。将 96 孔板置于 5% CO₂ 孵箱,37 °C 培养 4 h,培养结束后,250 × g 离心 4 min,每孔吸取 50 ml 上清,加 50 ml 基质液,室温避光反应 30 min,最后加入 50 ml 终止液,酶标仪在 490 nm 处测定吸光度。

1.3 统计学分析

各项指标均采用平均值 ± 标准差 $\bar{x} \pm s$ 表示。运用 SPSS 11.5 软件进行独立样本 *t* 检验,检验水准 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 rhLF 对子代大鼠免疫脏器相对重量的影响

rhLF 组 PND56 雌鼠胸腺相对重量及 PND91 雄鼠脾相对重量与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$),但由于病理学检测没有发现有意义的变化,且不存在性别一致性,相对重量数据的变化范围在文献报道范围内^[9],所以不认为差别有生理意义,见表 2。

2.2 rhLF 对子代大鼠血常规和血生化影响

PND56 各组血常规指标如表 3 所示,与对照组相比,雌鼠红细胞平均体积 (MCV)、雄鼠血红蛋白 (HGB),差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。PND56 大鼠血生化指标如表 4 所示,rhLF 组雄鼠尿素含量低于对照组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。部分指标虽然差异有统计学意义,但不存在性别一致性,不认为有实际生理意义。

2.3 rhLF 对子代大鼠淋巴细胞分型影响

PND0 大鼠淋巴细胞分型结果如表 5 所示,各组间均差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。由 PND21 大鼠淋巴细胞分型结果可知,rhLF 组雌鼠脾 T 淋巴细胞比例高于对照组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见表 6。PND56 大鼠淋巴细胞分型结果显示,rhLF 组雌鼠脾 B 淋巴细胞比例低于对照组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见表 7。

2.4 免疫功能试验结果

PND56 大鼠的溶血空斑试验 (PFC)、ConA 诱导淋巴细胞增殖试验及 NK 细胞活性试验结果见表 8。

表 2 不同性别试验组与对照组大鼠脏器相对重量的测量结果 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$, g)

Table 2 Effect of rhLF on relative organ weight of offspring rats

性别	组别	PND0		PND21		PND56		PND91	
		胸腺	脾	胸腺	脾	胸腺	脾	胸腺	脾
雌鼠	对照组	0.22 ± 0.08	0.38 ± 0.12	0.33 ± 0.06	0.48 ± 0.04	0.23 ± 0.04	0.35 ± 0.08	0.19 ± 0.04	0.25 ± 0.03
	rhLF 组	0.21 ± 0.04	0.34 ± 0.09	0.35 ± 0.06	0.46 ± 0.08	0.26 ± 0.02 [#]	0.37 ± 0.04	0.19 ± 0.06	0.27 ± 0.02
雄鼠	对照组	0.22 ± 0.05	0.34 ± 0.11	0.32 ± 0.05	0.51 ± 0.05	0.23 ± 0.04	0.33 ± 0.03	0.16 ± 0.04	0.22 ± 0.02
	rhLF 组	0.22 ± 0.04	0.38 ± 0.11	0.35 ± 0.05	0.49 ± 0.13	0.26 ± 0.05	0.35 ± 0.03	0.15 ± 0.01	0.25 ± 0.02 [#]

注: #表示该组数据与对照组相比,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)

表3 不同性别试验组与对照组 PND56 子代大鼠血常规指标检测结果 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of rhLF on haematology parameters of rats on PND56

性别	分组	WBC	RBC	HGB	HCT	MCV	LY	MO	PLT	RDW
		($\times 10^9/L$)	($\times 10^{12}/L$)	/(g/L)	/%	/fl	/%	/%	/($\times 10^9/L$)	/%
雌鼠	对照组	4.45 ± 2.31	6.97 ± 0.17	135.70 ± 5.83	39.37 ± 1.31	56.49 ± 1.36	81.27 ± 7.59	3.92 ± 1.60	1 168.56 ± 214.81	16.83 ± 2.01
	rhLF 组	3.61 ± 0.84	6.75 ± 0.58	134.50 ± 6.48	40.26 ± 1.71	60.00 ± 4.41 [#]	80.96 ± 4.96	2.58 ± 1.53	1 006.33 ± 109.52	17.78 ± 1.89
雄鼠	对照组	3.74 ± 1.52	6.83 ± 0.33	135.80 ± 5.07	40.16 ± 1.62	58.80 ± 1.79	77.33 ± 5.93	2.74 ± 0.95	1 139.20 ± 96.68	16.85 ± 1.95
	rhLF 组	3.49 ± 3.02	6.45 ± 0.51	128.86 ± 6.64 [#]	38.50 ± 2.78	59.75 ± 2.13	72.33 ± 5.82	3.89 ± 1.29	808.30 ± 514.06	17.86 ± 1.76

注:#表示该组数据与对照组相比,差异有统计学意义($P < 0.05$)表4 不同性别试验组与对照组 PND56 子代大鼠血生化指标检测结果 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Effect of rhLF on clinical chemistry parameters of rats on PND56

性别	分组	A/G	ALB	ALT	AST	CHO	CRE
			/(g/L)	/(U/L)	/(U/L)	/(mmol/L)	/(mmol/L)
雌鼠	对照组	1.24 ± 0.01	29.76 ± 1.53	30.13 ± 20.37	159.91 ± 43.64	2.34 ± 0.57	31.52 ± 9.57
	rhLF 组	1.28 ± 0.07	29.98 ± 1.96	27.69 ± 16.76	147.14 ± 18.43	2.07 ± 0.42	24.13 ± 8.16
雄鼠	对照组	1.20 ± 0.10	29.02 ± 1.53	28.27 ± 20.05	158.76 ± 43.83	2.16 ± 0.53	32.71 ± 9.15
	rhLF 组	1.26 ± 0.07	29.32 ± 2.12	26.79 ± 16.67	151.31 ± 26.80	2.01 ± 0.42	25.03 ± 8.14

性别	分组	GLB	GLU	TG	TP	UREA
		/(g/L)	/(mmol/L)	/(g/L)	/(g/L)	/(mmol/L)
雌鼠	对照组	24.19 ± 1.79	4.66 ± 1.29	0.60 ± 0.23	53.95 ± 2.61	6.99 ± 2.39
	rhLF 组	23.44 ± 2.17	5.25 ± 2.12	0.71 ± 0.31	53.42 ± 3.96	5.59 ± 1.16
雄鼠	对照组	24.30 ± 1.73	4.76 ± 1.07	0.53 ± 0.19	53.32 ± 2.46	8.72 ± 3.76
	rhLF 组	23.38 ± 2.04	5.18 ± 2.11	0.69 ± 0.30	52.70 ± 3.90	5.64 ± 1.20 [#]

注:#表示该组数据与对照组相比,差异有统计学意义($P < 0.05$)表5 不同性别试验组与对照组 PND0 子代大鼠淋巴细胞分型结果 ($\bar{x} \pm s, n = 10, %$)

Table 5 Effect of rhLF on percentage of lymphocyte subsets of rats on PND0

性别	组别	脾				胸腺			
		CD4/CD8	B 细胞	T 细胞	NK 细胞	CD4/CD8	B 细胞	T 细胞	NK 细胞
		雌鼠	对照组	1.23 ± 0.35	2.19 ± 1.09	1.76 ± 0.70	2.83 ± 2.28	1.22 ± 0.17	0.22 ± 0.07
	rhLF 组	1.09 ± 0.23	1.22 ± 0.85	1.06 ± 0.81	1.79 ± 2.37	1.05 ± 0.25	0.44 ± 0.58	28.88 ± 8.47	1.19 ± 1.37
雄鼠	对照组	1.35 ± 0.77	2.77 ± 1.44	1.84 ± 1.96	2.94 ± 2.59	1.16 ± 0.13	0.46 ± 0.76	22.67 ± 3.01	0.88 ± 0.54
	rhLF 组	1.18 ± 0.75	1.88 ± 1.09	1.66 ± 1.14	3.86 ± 3.34	1.23 ± 0.11	0.19 ± 0.14	24.13 ± 6.25	0.57 ± 0.29

表6 不同性别试验组与对照组 PND21 子代大鼠淋巴细胞分型结果 ($\bar{x} \pm s, n = 10, %$)

Table 6 Effect of rhLF on percentage of lymphocyte subsets of rats on PND21

性别	组别	外周血				脾			
		CD4/CD8	B 细胞	T 细胞	NK 细胞	CD4/CD8	B 细胞	T 细胞	NK 细胞
		雌鼠	对照组	3.71 ± 0.87	21.14 ± 3.61	44.84 ± 10.17	17.19 ± 7.56	3.06 ± 0.88	35.18 ± 11.37
	rhLF 组	4.10 ± 0.90	25.58 ± 8.59	48.23 ± 8.79	14.66 ± 3.58	3.59 ± 1.06	34.53 ± 3.53	27.51 ± 5.24 [#]	14.28 ± 4.23
雄鼠	对照组	3.84 ± 0.94	24.09 ± 6.05	39.50 ± 7.71	21.22 ± 6.43	3.44 ± 1.07	35.79 ± 7.96	17.71 ± 5.69	10.02 ± 3.33
	rhLF 组	3.96 ± 0.80	24.18 ± 5.05	39.87 ± 6.85	18.81 ± 6.06	3.21 ± 1.07	34.12 ± 7.94	19.20 ± 5.82	10.91 ± 3.61

注:#表示该组数据与对照组相比,差异有统计学意义($P < 0.05$)表7 不同性别试验组与对照组 PND56 子代大鼠淋巴细胞分型结果 ($\bar{x} \pm s, n = 10, %$)

Table 7 Effect of rhLF on percentage of lymphocyte subsets of rats on PND56

性别	组别	外周血				脾			
		CD4/CD8	B 细胞	T 细胞	NK 细胞	CD4/CD8	B 细胞	T 细胞	NK 细胞
		雌鼠	对照组	6.79 ± 3.10	33.15 ± 13.12	46.91 ± 12.45	8.96 ± 5.44	9.24 ± 3.57	46.35 ± 9.06
	rhLF 组	4.30 ± 1.03	27.51 ± 13.83	56.34 ± 12.48	9.18 ± 4.07	6.82 ± 1.20	36.95 ± 4.49 [#]	36.25 ± 5.42	13.35 ± 2.10
雄鼠	对照组	5.98 ± 1.48	28.42 ± 8.82	52.40 ± 7.99	14.16 ± 10.19	9.33 ± 2.00	43.28 ± 14.99	27.22 ± 8.17	9.51 ± 3.74
	rhLF 组	6.34 ± 2.52	30.43 ± 8.36	56.30 ± 9.45	8.89 ± 2.43	8.67 ± 3.26	32.98 ± 4.55	28.66 ± 4.40	10.97 ± 3.28

性别	组别	潘氏结			
		CD4/CD8	B 细胞	T 细胞	NK 细胞
		雌鼠	对照组	2.71 ± 1.74	52.42 ± 9.35
	rhLF 组	3.89 ± 1.82	46.87 ± 11.60	24.51 ± 8.44	3.13 ± 1.43
雄鼠	对照组	13.74 ± 10.60	50.83 ± 8.33	31.95 ± 5.59	2.40 ± 2.12
	rhLF 组	12.41 ± 6.79	47.33 ± 6.26	34.44 ± 14.26	1.34 ± 0.42

注:#表示该组数据与对照组相比,差异有统计学意义($P < 0.05$)

rhLF 组和对对照组之间比较,均差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 8 不同性别试验组与对照组 PND56 子代大鼠的 PFC、淋巴细胞增殖及 NK 细胞活性检测结果 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 8 Effect of splenic PFC, the lymphocyte proliferative response and NK cell activity of rats on PND56

性别	组别	PFC	淋巴细胞	NK 细胞
		/(/10 ⁶ 脾细胞)	增殖 ¹	活性/%
雌鼠	对照组	161.40 ± 47.59	0.29 ± 0.15	34.97 ± 18.27
	rhLF 组	156.00 ± 53.81	0.33 ± 0.14	39.33 ± 23.29
雄鼠	对照组	164.20 ± 59.38	0.19 ± 0.11	37.19 ± 16.97
	rhLF 组	168.40 ± 63.02	0.20 ± 0.04	36.28 ± 17.12

注:1 表示试验结果以加 ConA 孔的 OD 值与不加 ConA 孔的 OD 值差值表示

3 讨论

重组人乳铁蛋白毒性评价可以分两种情形开展,一种情形是从牛奶中分离重组人乳铁蛋白做受试物,进行毒性评价;另一种情形是以牛奶或奶粉为受试物,开展全食品的毒性评价,现有以这两种情形开展的重组人乳铁蛋白毒性试验均未发现毒性作用^[10-13]。

T 淋巴细胞是参与细胞免疫的主要免疫细胞,CD3⁺ 是 T 淋巴细胞表面的特征性标记分子,CD3⁺ T 淋巴细胞的比例能反应机体免疫功能的整体情况。在正常情况下,CD4⁺ T 淋巴细胞(Th 细胞)和 CD8⁺ T 淋巴细胞(Tc 细胞)之间相互平衡、相互制约。CD4/CD8(Th/Tc, Th、Tc 为两种 T 淋巴细胞)合适的比值是维持机体健康的重要因素,可直接反映出机体免疫状况^[14]。通过分析子代大鼠淋巴细胞分型结果,B/T/NK 淋巴细胞百分比未见明显改变,rhLF 对子代大鼠 T 淋巴亚群的稳定性没有明显影响。

溶血空斑试验是国际上一致认可的检测体液免疫较为敏感有效的指标,该方法检出免疫毒性的可靠性较高^[15];ConA 诱导淋巴细胞增殖试验能反应细胞免疫状况,淋巴细胞的增殖和分化是机体免疫应答过程中的重要阶段;NK 细胞在抗感染、抗肿瘤和抑制自身免疫性疾病过程中起到非常重要的作用^[16]。通过分析溶血空斑试验、ConA 诱导淋巴细胞增殖试验及 NK 细胞活性试验结果,发现 rhLF 对子代大鼠体液免疫、细胞免疫和非特异性免疫未见不良影响。因为针对大鼠的体外免疫试验方法并不完善,部分试验并没有进行,包括血清溶血素试验、碳廓清试验和鸡红细胞吞噬试验等,这是本研究的不足之处。

本研究旨在通过一代繁殖毒性扩展试验研究 rhLF 对子代大鼠免疫功能指标的影响,丰富 rhLF 的安全性数据。本研究未发现重组人乳铁蛋白对

子代大鼠免疫功能产生不良影响。

参考文献

- [1] Ward P P, Paz E, Conneely O M. Multifunctional roles of lactoferrin: a critical overview[J]. CMLS,2005,62(22):2540.
- [2] Bethell D R, HUANG J. Recombinant human lactoferrin treatment for global health issues: iron deficiency and acute diarrhea[J]. Biometals,2004,17(3):337-342.
- [3] HU W, ZHAO J, WANG J, et al. Transgenic milk containing recombinant human lactoferrin modulates the intestinal flora in piglets[J]. Biochemistry and Cell Biology,2012,90(3):485.
- [4] ZHOU C, SUN N, WANG J, et al. Allergenicity assessment of a genetically modified protein-recombinant human lactoferrin[J]. J Aller Ther S,2013(S3):2.
- [5] Organization for Economic Co-operation and Development. OECD test guideline 441 for the testing of chemicals; extended one-generation reproductive toxicity study[EB/OL]. (2012-10-02) [2015-11-12]. http://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-testing-of-chemicals-section-2-effects-on-biotic-systems_20745761.
- [6] Spanhaak S. The ICH S8 immunotoxicity guidance, immune function assessment and toxicological pathology: autonomous or synergistic methods to predict immunotoxicity[J]. Experimental and Toxicologic Pathology,2006,57(5):373-376.
- [7] Reeves P G, Nielsen F H, Fahey J G. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet[J]. J Nutr,1993,123(11):1939-1951.
- [8] Blakley B R, Yole M J, Brousseau P, et al. Effect of pentachlorophenol on immune function[J]. Toxicology,1998,125(2):141-148.
- [9] 王燕, 厉彦翔. Wistar 大鼠血液生化指标、体重及主要脏器系数参考值的研究[J]. 中国民族民间医药杂志,2011,20(23):9-10.
- [10] Appel M J, Van V H, Vietsch H, et al. Sub-chronic(13-week) oral toxicity study in rats with recombinant human lactoferrin produced in the milk of transgenic cows[J]. Food and Chemical Toxicology,2006,44(7):964-973.
- [11] ZHOU C, WANG J W, HUANG K L, et al. A 90 day safety study in Sprague-Dawley rats fed milk powder containing recombinant human lactoferrin (rhLF) derived from transgenic cloned cattle[J]. Drug and Chemical Toxicology,2011,34(4):359-368.
- [12] 王小丹, 刘珊, 严卫星, 等. 重组人乳铁蛋白对大鼠生长发育作用的研究[J]. 中国食品卫生杂志,2011,23(2):105-108.
- [13] 刘珊, 王小丹, 冯晓莲, 等. 重组人乳铁蛋白小鼠喂养毒理学评价[J]. 中国公共卫生,2013,29(2):230-232.
- [14] 张振斌, 蒋宗勇. 超早期断奶应激对子猪 T 淋巴细胞亚群的影响[J]. 中国畜牧杂志,1999,35(3):16-18.
- [15] The ICICs Group Investigators. Report of validation study of assessment of direct immunotoxicity in the rat[J]. Toxicology, 1998,125(2):183-201.
- [16] Sawaki J, Tsutsumi H, Hayashi N, et al. Type 1 cytokine/chemokine production by mouse NK cells following activation of their TLR/MyD88-mediated pathways[J]. International Immunology,2007,19(3):311-320.