

蜂毒素—死亡素重组抗菌肽的小鼠毒性试验

刘小元¹, 孟春颜², 姬生跃², 刘勇^{3,*}

(1. 修武县农业综合行政执法大队, 河南 修武 454351; 2. 中基高科(北京)生物技术有限公司;
3. 西北农林科技大学)

摘要: 本试验旨在探索蜂毒素—死亡素重组抗菌肽(MT-W)对昆明小鼠的毒性影响。试验通过小鼠口服急性毒性试验和口服生物利用度试验,研究了 MT-W 对小鼠主要脏器的影响,并检测了血液中碱性磷酸酶、丙氨酸氨基转移酶、天冬氨酸氨基转移酶等生化指标,并对 MT-W 的体内吸收情况进行了检测。结果显示,MT-W 在试验设定浓度下,对试验小鼠的体重、器官/体重比率没有显著影响,血液生化指标与对照组也无统计学差异;在按照 50 mg/kg 体重给实验小鼠灌服 MT-W 溶液后,在血浆中未检测到 MT-W。研究表明,MT-W 对小鼠没有明显毒副作用,MT-W 在口服后未被有效吸收。

关键词: 蜂毒素;死亡素;重组抗菌肽;小鼠;毒性试验

[中图分类号] S896.5 [文献标识码] A [文章编号] 1004-6704(2023)05-0025-04

Toxicity Test of Melittin—Thanatin Recombinant Antimicrobial Peptide in Mice

LIU Xiaoyuan¹, MENG Chunyan², JI Shengyue², LIU Yong^{3,*}

(1. Xiuwu County Agricultural Comprehensive Administrative Law Enforcement Brigade, Xiuwu Henan 454351, China;

2. Zhongji Hi-Tech (Beijing) Biotechnology Co., Ltd.; 3. College of Veterinary Medicine, Northwest Agriculture and Forestry University)

Abstract: The aim of this experiment was to investigate the toxicity effects of melittin—thanatin recombinant antimicrobial peptide (MT-W) on Kunming mice. The effects of MT-W on major organs of mice were studied by oral acute toxicity test and oral bioavailability test, and biochemical indexes such as alkaline phosphatase, alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase in blood were detected, as well as the absorption of MT-W in vivo. The results showed that MT-W had no significant effects on the body weight and organ/body weight ratio of experimental mice, and there was no statistical difference in blood biochemical indexes between the control group and the control group. No MT-W was detected in plasma of mice given MT-W solution at 50mg/kg body weight. Studies have shown that MT-W has no obvious toxic and side effects on mice, and MT-W is not effectively absorbed after oral administration.

Key words: melittin; thanatin; recombinant antimicrobial peptides; mice; toxicity test

当前,细菌对抗生素耐药性问题日益严重,寻找新型替代抗菌剂是解决耐药性的重要途径,抗菌肽以其特有的优势被看作一种新型抗菌剂而备受关注。抗菌肽与抗生素比较具有耐环境因素影响,不易诱发耐药性的优点,当前在畜牧业生产中通过添加抗菌肽作为抑菌、促生长制剂显示出良好前景。

研究表明,通过在饲料中添加抗菌肽,可以明显提高动物的生长性能,并具有改善免疫力,减少动物发病,提高生长速度和效益的优势。但与抗生素相比,抗菌肽存在细胞毒性强、抑杀活性不稳定、生物学活性稳定性差的问题,需要通过对现有抗菌肽进行结构改造或设计新型抗菌肽,以满足新型抗菌剂研发的需要。

为了提高天然抗菌肽的抗菌活性、生物学稳定性并降低细胞毒性,我们应用抗菌肽分子设计技术方案,将蜂毒素和死亡素两种抗菌肽进行了重组,并用 3 个色氨酸残基对特定位点的氨基酸残基进行了替代,获得了蜂毒素—死亡素重组抗菌肽(MT-W)

[收稿日期] 2023-06-19

[基金项目] 陕西省动物防疫专项资金项目(2021-XN18、XNDY2201);宁夏回族自治区重点研发计划(2021BEF03005)

[作者简介] 刘小元(1986-),男,河南修武人,本科,畜牧师,主要从事畜牧技术推广和服务工作。E-mail: 329778382@qq.com

*[通信作者] 刘勇(1980-),男,甘肃兰州人,博士,研究方向为新兽药的创制。E-mail:liuyonglh@126.com

W)。初步研究发现 MT-W 相较于蜂毒素和死亡素对蛋白酶的稳定性显著增强、抗菌活性也明显提高而细胞毒性显著下降。

本试验目的在于将 MT-W 饲喂实验小鼠,通过检测实验鼠的生理生化指标,血液中 MT-W 的含量等,综合评估其对动物的潜在毒性,为进一步在养殖动物中实验提供参考和依据。

1 材料与方法

1.1 蜂毒素—死亡素毒素重组抗菌肽

抗菌肽 MT-W 通过构建的重组芽孢杆菌表达、提取纯化获得,并经冷冻干燥。用生理盐水配制 100 g/L 的母液备用,4℃ 保存。

1.2 试验动物小鼠

昆明系成年小鼠 200 只,公母各半,平均体重 18.5 ± 1.5 g(北京斯贝福生物科技有限公司)。实验环境达到 SPF 水平,恒温恒湿($23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、相对湿度 $60 \pm 5\%$),每日照明 12 h,自由采食。

1.3 给小鼠口服急性毒性试验

将 50 只小鼠随机分为 5 个组,每组 10 只,公母各 5 只。试验组编号为 I、II、III 和 IV,第 V 组为对照组。试验组小鼠按照 600、1 200、2 500 和 5 000 mg/kg 体重,分别口服 MT-W 稀释液,每日 1 次,连续使用 15 d。对照组灌服 0.5 mL 灭菌生理盐水。第一次给药后 15 d,禁食 1 d 后对所有小鼠进行称重,采集血液并分离血清;然后人道处死全部试验鼠,分别对其脏器进行采集后称重,主要包括心、肝、肺、胃、脾和淋巴结;观察所采脏器的变化;计算器官与体重的比值;检测碱性磷酸酶、丙氨酸氨基转移酶、天冬氨酸氨基转移酶、白蛋白、球蛋白、总蛋白、肌酸酐、血尿素氮、甘油三酯和总胆固醇等生化指标。

1.4 小鼠口服生物利用度

将 MT-W 溶液,按照 50 mg/kg 体重的剂量

给 60 只小鼠(公母各半)进行试验处理,同时将生理盐水灌服 60 只对照组小鼠(公母各半)。从小鼠接受口服灌注开始计时,在第 0.5 h,1 h,2 h,3 h,4 h,6 h,8 h,12 h,16 h 和 20 h,每组随机取出公母各半的 6 只小鼠用乙醚麻醉,从眼眶静脉丛采集血样,并将其放置在肝素管中,2000 r/min 离心 10 min,将分离的血于一 20℃ 保存备用。

按照 Hematyar 等的方法进行血样中 MT-W 的检测。基本步骤如下:将采集的血样经 $0.22 \mu\text{m}$ 孔径滤器(Nucleopore, Costar)过滤。用反相高效液相色谱系统(Agilent Technologies),反相高效液相色谱分析柱 Zorbax300SB-C8(250 mm × 4.6 mm, $5 \mu\text{m}$, 300 Å)(Agilent Technologies)对血样进行处理。用 0.1% (v/v) 三氟乙酸和 10% 乙腈平衡色谱柱,然后以 0%~60% 的乙腈梯度线性展开,流速为 1.0 mL/min。监测 214 nm 和 280 nm 处的吸光度。

1.5 统计分析方法

通过 t-检验进行统计学分析, $P < 0.05$ 为差异显著。

2 试验结果

2.1 小鼠口服急性毒性试验结果

试验组和对照组小鼠灌服不同浓度的 MT-W 后未出现异常和死亡。且各试验组与对照组相比体重无差异;小鼠的器官/体重比率也无显著差异,表明 MT-W 溶液对小鼠没有明显毒副作用。结果见表 1。

生化指标的检测结果表明,灌服 MT-W 的各组小鼠的主要生化指标与对照组相比无统计学差异(表 2)。另外,在内脏器官中肉眼未观察到可见变化。

表 1 实验鼠急性毒性试验检测指标汇总表

指标	对照组	试验组			
		I	II	III	IV
剂量 Dose (mg/kg)	0	600	1200	2500	5000
雄性小鼠(只)	5	5	5	5	5
初始体重 Initial BW (g)	18.69 ± 1.49	18.41 ± 1.40	19.16 ± 1.77	18.41 ± 1.58	18.88 ± 1.58
终止体重 Ending BW (g)	23.53 ± 1.77	23.44 ± 1.86	23.72 ± 1.77	23.90 ± 1.95	23.62 ± 1.49
死亡率 Death rate (%)	0	0	0	0	0
心脏 Heart (mg/g)	5.23 ± 0.47	5.41 ± 0.41	5.50 ± 0.31	5.18 ± 0.43	5.20 ± 0.33
肾脏(L)Kidney (L; mg/g)	6.77 ± 0.58	7.00 ± 0.45	7.12 ± 0.60	7.06 ± 0.75	6.87 ± 0.73

肾脏 (R)Kidney (R; mg/g)	7.22±0.70	7.61±0.82	7.74±0.62	7.50±0.86	7.43±0.65
肝脏 Liver (mg/g)	39.34±2.98	41.02±3.83	40.41±4.03	40.77±4.54	41.25±3.81
肺脏 (L)Lung (L; mg/g)	1.95±0.20	2.18±0.17	2.04±0.21	2.30±0.33	2.13±0.23
肺脏 (R)Lung (R; mg/g)	3.16±0.35	3.53±0.25	3.37±0.28	3.73±0.39	3.61±0.37
脾脏 Spleen (mg/g)	2.54±0.16	2.56±0.20	2.55±0.19	2.55±0.23	2.62±0.19
胃 Stomach (mg/g)	7.74±0.76	7.96±0.85	7.86±0.84	7.55±0.66	7.68±0.78
雌性小鼠(只)	5	5	5	5	5
初始体重 Initial BW (g)	18.88±1.40	18.14±1.77	18.79±1.58	18.51±1.95	19.25±1.86
终止体重 Ending BW (g)	23.25±1.67	23.62±2.05	24.18±1.77	23.99±1.86	23.44±1.67
死亡率 Death rete (%)	0	0	0	0	0
心脏 Heart (mg/g)	5.05±0.50	5.17±0.47	4.92±0.38	4.97±0.48	5.31±0.59
肾脏 (L)Kidney (L; mg/g)	5.71±0.60	5.97±0.54	6.06±0.56	6.04±0.70	5.85±0.74
肾脏 (R)Kidney (R; mg/g)	6.26±0.56	5.60±0.51	5.53±0.53	5.57±0.59	6.39±0.57
肝脏 Liver (mg/g)	40.13±3.62	41.65±4.02	40.88±3.75	40.95±4.36	41.39±3.97
肺脏 (L)Lung (L; mg/g)	2.38±0.26	2.46±0.21	2.26±0.28	2.50±0.30	2.31±0.28
肺脏 (R)Lung (R; mg/g)	3.41±0.37	3.67±0.34	3.46±0.33	3.82±0.42	3.53±0.36
脾脏 Spleen (mg/g)	3.27±0.20	3.16±0.26	3.21±0.28	3.35±0.37	3.43±0.34
胃 Stomach (mg/g)	8.21±0.73	8.28±0.86	7.65±0.82	7.81±0.73	8.24±0.74

注:脏器系数(mg/g)=器官重量(mg)/体重(g)。L:左边;R:右边。数值用平均值±标准差进行表示。*表示差异显著($P<0.05$)。

表 2 实验鼠生化指标统计表

指标	对照组	试验组			
		I	II	III	IV
剂量 Dose (mg/kg)	0	600	1200	2500	5000
AST (U/L)	60.43±3.30	63.83±5.43	58.59±4.75	63.05±5.14	66.64±5.82
GB (g/L)	18.72±2.23	17.65±1.46	18.82±1.94	19.40±1.84	18.92±2.23
TP (g/L)	49.66±4.66	49.37±5.04	51.70±5.63	48.50±4.75	50.63±5.24
Cre (μ mol/L)	28.44±2.28	28.56±2.45	29.22±2.82	28.67±2.61	28.94±2.72
ALT (U/L)	29.20±2.23	28.52±1.94	28.91±1.84	29.59±3.01	28.03±2.81
TC (mmol/L)	3.62±0.28	3.82±0.42	3.71±0.32	3.77±0.41	3.65±0.30
ALP (U/L)	134.25±9.80	135.32±9.51	136.67±11.16	137.74±11.83	137.35±12.03
TG (mmol/L)	2.07±0.04	2.18±0.05	1.98±0.03	2.05±0.04	2.17±0.03
BUN (mmol/L)	4.75±1.94	4.95±2.13	5.14±2.91	6.31±2.72	7.54±2.43
Alb (g/L)	30.56±2.04	31.23±2.23	31.82±1.94	32.11±2.04	31.43±2.33
AST (U/L)	133.67±28.62	125.03±24.06	121.25±34.05	118.92±33.76	126.49±23.38
GB (g/L)	14.55±2.23	14.84±1.84	15.33±1.94	15.71±1.65	16.01±2.33
TP (g/L)	48.79±3.40	49.28±3.01	49.66±3.98	50.34±5.14	51.41±4.75
Cre (μ mol/L)	40.42±0.50	39.14±0.47	40.28±0.41	40.43±0.49	40.45±0.51
ALT (U/L)	61.50±24.83	46.85±17.46	51.22±21.53	54.61±25.90	49.47±18.92
TC (mmol/L)	2.32±0.11	2.11±0.15	2.19±0.17	2.24±0.19	2.36±0.22
ALP (U/L)	119.31±14.84	123.00±14.07	124.16±12.51	126.39±11.64	129.30±13.00
TG (mmol/L)	2.11±0.14	1.92±0.10	1.97±0.12	2.04±0.16	1.93±0.13
BUN (mmol/L)	4.89±0.81	6.09±0.07	6.19±0.07	7.27±0.06	7.60±0.08
Alb (g/L)	34.24±2.43	33.17±2.72	34.92±3.10	36.18±3.40	35.31±3.20

注:AST:天冬氨酸氨基转移酶;GB:球蛋白;TP:总蛋白;Cre:肌酐酞;ALT:丙氨酸氨基转移酶;TC:总胆固醇;ALP:碱性磷酸酶;TG:甘油三酯;BUN:血尿素氮;Alb:白蛋白。数值用平均值±标准差进行表示。*表示差异显著($P<0.05$)。

2.2 小鼠口服生物利用度试验结果

在按照 50 mg/kg 体重给实验小鼠灌服 MT-W 溶液后,10 个检测时间点上在血浆中均未检测到 MT-W,提示 MT-W 未在小鼠血液中残留。表明 MT-W 在口服后未被有效吸收,未在血液中累积到可检测的水平。

3 蜂毒素—死亡素重组抗菌肽(MT-W)试验讨论

利用动物模型来进行毒性分析研究,以评估某种物质对人类或生物体健康的潜在风险。为了评估 MT-W 的急性毒性,本研究用了小鼠作为动物模型,并在 15 d 的试验中对试验小鼠分别灌注了不同剂量的 MT-W。结果显示,MT-W 在 500、1 000、2 000 和 5 000 mg/kg 体重的剂量下,对小鼠无毒性作用,尽管 5 000 mg/kg 体重剂量的 MT-W 灌注的雄性小鼠的天冬氨酸氨基转移酶和血尿素氮水平有所升高,雌性小鼠的血尿素氮水平有所升高,但这些变化都在正常的生理指标波动范围内。这表明,MT-W 口服后,代谢终产物在小鼠体内有所增加,但不会对其肾脏造成实质性损害。因此,口服 MT-W 的半致死剂量(LD₅₀)大于 5 000 mg/kg/d。总的来说,在不超过 5 000 mg/kg 体重剂量的情况下,MT-W 对昆明小鼠的急性毒性是可控的,不会对其造成伤害。

在经 MT-W 单剂量灌注的昆明小鼠进行 15 d 试验后,通过血液样品分析发现无法检测到 MT-W,这表明 MT-W 的生物利用度非常低。口服急性毒性试验和口服生物利用度试验的结果都表明,MT-W 难以以完整的形式进入小鼠的血液循环系统。本研究结果表明,MT-W 的生物利用度较低,其完整形式没有在血液循环系统中检出。

参考文献:

- [1] MCEWEN S A, COLLIGNON P J. Antimicrobial Resistance: One Health Perspective[J]. *Microbiol Spectrum*, 2018, 6(2): ARBA-0009-2017.
- [2] MIYOSHI N, ISOGAI E, HIRAMATSU K, *et al.* Activity of tick antimicrobial peptide from *Ixodes persulcatus* (persulcatusin) against cell membranes of drug-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. *The Journal of Antibiotics (Tokyo)*, 2017, 70(2):142-146.
- [3] SHANG L, ZHOU J, TU J, *et al.* Evaluation of Effectiveness and Safety of Microcin C7 in Weaned Pigs[J]. *Animals (Basel)*, 2022, 12(3267).
- [4] TANG Q, XU E, WANG Z, *et al.* Dietary *Hermetia illucens* Larvae Meal Improves Growth Performance

and Intestinal Barrier Function of Weaned Pigs Under the Environment of Enterotoxigenic *Escherichia coli* K88[J]. *Frontiers in Nutrition*, 2021, 8,812011.

- [5] 乔恒鑫, 轩松. 抗菌肽粗提物对肉鸡生长性能、粪便微生物菌群结构及经济效益的影响[J]. *中国饲料*, 2021, 7,68-71.
- [6] 蒋翔, 李锦强. 抗菌肽对断奶仔猪生长性能、腹泻率、抗氧化性及免疫功能的影响. *饲料研究*[J]. 2021, 14,42-45.
- [7] LEI J, SUN L, HUANG S, *et al.* The antimicrobial peptides and their potential clinical applications[J]. *American Journal of Translational Research*, 2019, 11(7):3919-3931.
- [8] ONG Z Y, WIRADHARMA N, YANG Y Y. Strategies employed in the design and optimization of synthetic antimicrobial peptide amphiphiles with enhanced therapeutic potentials[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2014, 78,28-45.
- [9] LIU Y, ZHANG X P, MENG C Y, *et al.* Antimicrobial Activity of the Recombinant Peptide Melittin-Thanatins with three Glycine to Tryptophan Mutations[J]. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*. 2022.
- [10] HEMATYAR M, ES-HAGHI A, SOLEIMANI M. Quantification of Melittin in Iranian Honey Bee (*Apis mellifera meda*) Venom by Liquid Chromatography-electrospray Ionization-ion Trap Tandem Mass Spectrometry (LC-ESI-IT-MS/MS) [J]. *Archives of Razi Institute*, 2019, 74(4):435-439.
- [11] ASARE G A, ADDO P, BUGYEI K, *et al.* Acute toxicity studies of aqueous leaf extract of *Phyllanthus niruri*[J]. *Interdisciplinary Toxicology*, 2011, 4(4): 206-210.
- [12] 田雨佳, 孙跃, 赵瑞利, 等. 面向“新农科”的动物生产类和动物医学类专业“五链三位”实践创新体系与平台构建[J]. *畜牧兽医杂志*, 2022, 41(5):78-81.
- [13] 王欣荣. SPOC 混合式教学在《动物繁殖学》课程中的应用效果[J]. *畜牧兽医杂志*, 2022, 41(5):206-209.
- [14] 左宗辉, 李留安, 赵瑞利, 等. 《兽医流行病学》课程思政元素有机融入改革与实践[J]. *畜牧兽医杂志*, 2022, 41(5):210-212, 219.
- [15] 王新霞, 路则庆. 《饲料卫生学》课程多维过程性评价体系构建[J]. *畜牧兽医杂志*, 2022, 41(5): 213-219.
- [16] 朱晓萍, 尚秀国, 王瑞晓, 等. 新农科下强化畜牧专业实践与突出创新能力的教学改革初探[J]. *畜牧兽医杂志*, 2022, 41(5):224-226, 230.
- [17] 信吉阁, 毛晓月, 王丽屏, 等. 翻转课堂在《兽医公共卫生学》教学中的应用[J]. *畜牧兽医杂志*, 2022, 41(5): 264-267.