文章编号:1009-038X(2004)03-0036-05

活性蛋黄抗体的毒性试验

杨严俊[1], 周建新[2]
(1. 江南大学 食品学院,江苏 无锡 214036; 2. 艾格生物制品有限公司,浙江 长兴 313100)

摘 要: 通过小鼠急性毒性试验、大鼠急性毒性试验、小鼠嗜多染红细胞微核试验、小鼠精子畸形试验、Ames 试验及大鼠 30 d 毒试验来评估蛋黄抗体的安全性. 试验结果表明,7 d 内小鼠和大鼠均未出现明显中毒症状和死亡,3 项致突变试验结果也均为阴性. 大鼠 30 d 长毒试验中临床检查、血像、生化、脏器组织病理学等项目测定均无异常. 结论为 IgY 无急性毒性和致突变性,属安全制剂.

关键词: 蛋黄抗体; 急性毒性; 安全性
中图分类号:R 446.62 **文献标识码**: A

Test of Acute and Chronic Toxicity of Egg-Yolk Antibody IgY

YANG Yan-jun[1], ZHOU Jian-xing[2]
(1. School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China; 2. AGS Biological Product LTD. Zhejiang Changxin 313100, China)

Abstract: The security of egg-yolk antibody IgY was evaluated by acute toxicity test of mice and rat, micronucleus test of bone marrow cell, sperm shape abnormality test in mice, Ames test and thirty days feeding test. No death and toxicity were observed in acute test. All the results in these three tests (mouse micronucleus test, mouse sperm abnormality assay and Ames test) were negative. So egg-yolk antibody IgY has no toxicity and mutation to human body.

Key words: egg-yolk antibody IgY; acute toxicity; security

抗体能通过被动免疫保护作用,增强机体防病抗病能力、促进机体生长发育. 蛋黄因含有丰富的蛋黄抗体(Immunoglobulin Yolk,IgY)而成为近年的研究重点[1]. 研究显示,母鸡经免疫注射后,抗体活性较其他动物要高,每只母鸡一年可以获得 30 g 以上的 IgY,故认为母鸡是高产、优质、经济的活性抗体"加工厂"[2,3]. 江南大学在承担国家八五重点科技(攻关)项目《蛋黄免疫球蛋白分离提取》的基础上与浙江艾格生物制品有限公司合作,建立了一条具有国际领先水平的蛋黄免疫球蛋白生产线[4]. 本试验依据《食品安全性毒理学评价程序和方法》(GB15193-94)对生产的活性蛋黄抗体系统进行了安全性评价.

1 材料与方法

1.1 材 料

IgY 由浙江长兴艾格生物制品有限公司提供; ICR 清洁级小鼠和 SD 大鼠由浙江省实验动物中心繁殖、提供.

1.2 IgY 的制备

以大肠杆菌、沙门氏菌为混合抗原免疫母鸡,采用一步超滤法从其所产的鸡蛋中制取 IgY 产

收稿日期:2003-09-26; 修回日期:2003-11-13.
基金项目: 中小企业创新基金项目(00C26233300242)资助课题.
作者简介: 杨严俊(1965-),男,江苏武进人,副教授,博士.

万方数据

品[1],成品封装于胶囊中待用.

1.3 小鼠急性毒性试验

ICR 小鼠 40 只,体重 18～22 g,雌雄各半. 小鼠随机分为实验组(剂量为千克体重 20 g)和阴性对照组(1 g/dL 羧甲基纤维素),每组 20 只,雌雄各半. 小鼠 2 次灌胃,间隔 2 h,观察 7 d,记录动物中毒症状及死亡情况.

1.4 大鼠急性毒性试验

SD 大鼠 40 只,体重 180～220 g,雌雄各半. 随机分为实验组剂量为每千克体重 20 g 和阴性对照组(1 g/dL 羧甲基纤维素),每组 20 只,雌雄各半. 大鼠分 4 次灌胃,间隔 2～3 h,观察 7 d,记录动物中毒症状及死亡情况.

1.5 小鼠微核试验

ICR 小鼠 50 只,体重 25～28 g,雌雄各半. 随机分为每公斤体重含 IgY 2.5,5.0,10.0 g 组,阴性对照组(1 g/dL 羧甲基纤维素),阳性对照组(每千克体重含环磷酰胺 80 mg). 每组 10 只,雌雄各半. IgY 用 1 g/dL 羧甲基纤维素制成相应剂量. 小鼠间隔 24 h 连续灌胃 2 次,于第二次灌胃后 6 h 处死. 取胸骨骨髓制成骨髓片,Giemsa 染色,每只小鼠计数嗜多染红细胞 1 000 只,计算千分率.

1.6 小鼠精子畸形试验

雄性 ICR 小鼠 50 只,体重 22～25 g. 随机分为每千克体重含 IgY2.5,5.0,10.0 g 组及阴性对照组(1 g/dL 羧甲基纤维素)和阳性对照组(每公斤体重含丝裂霉素 C 2.0 mg),每组 10 只. IgY 用 1 g/dL 羧甲基纤维素制成相应剂量. 小鼠连续经口灌胃 5 d,于首次灌胃后第 35 天处死. 每组随机选 5 只小鼠分别取两侧附睾,制成吸滤液直接涂片,伊红染色,高倍镜下观察精子形态并计数,每只小鼠计数完整精子1 000条,计算精子畸形发生率.

1.7 Ames 试验

所用菌株为组氨酸营养缺陷型鼠伤寒沙门氏菌,共 4 株,即 TA_{97a},TA_{98},TA_{100} 和 TA_{102}. IgY 用蒸馏水配制备用. 以 TA_{100} 菌株的非代谢活化系统进行预试验,结果在每个培养皿含剂量为 5 000 μg 时未出现明显的增菌和抑菌现象,故正式试验时选择试验剂量为 5 000,1 000,200,40,8 μg 5 个剂量组及阴性对照组(蒸馏水)和阳性对照组(具体数据见表 3). 采用标准平板掺入法,需要代谢活化时加入多氯联苯(PCB)诱导的大鼠肝匀浆作为体外代谢活化系统,37 ℃培养箱孵育 48 h,计数回变菌落数. 试验在同一条件下重复一次.

1.8 大鼠 30 d 长毒试验

SD 大鼠 80 只,体重 70～100 g,雌雄各半. 随机分成每千克体重含 IgY 1.25,2.5 和 5.0 g 3 个体重剂量组(约相当于人体推荐量的 187,375 和 750 倍)及对照组,每组 20 只,雌雄各半. 大鼠单笼饲养、自由进食和饮水,连续观察 30 d,每周记录体重和进食量并计算食物利用率,试验期末摘眼球取血,断头处死. 肉眼观察大鼠脏器,并取肝、肾、脾、胃和小肠进行病理组织学观察.

血像按临床常规检验方法,血生化检查取血清用 OLYMPUS S1000 型生化全自动分析仪进行测定,脏器石蜡切片,HE 染色.

2 结果与讨论

2.1 小鼠急性毒性试验

试验期间,两组小鼠均未出现明显症状,也无死亡. IgY 对雌雄小鼠经口 LD_{50} 每千克体重均大于 20 g,按急性毒性分级,该受试物属无毒类物质.

2.2 大鼠急性毒性试验

大鼠试验结果与小鼠完全相同. 试验期间,两组大鼠均未出现明显症状,也无死亡. IgY 对雌雄大鼠经口 LD_{50} 均大于 20 g,按急性毒性分级,该受试物属无毒类物质.

2.3 小鼠微核试验

IgY 对小鼠微核率的影响见表 1,各剂量组与阴性对照组相比,微核千分率均无显著性差异. 阳性对照组微核率显著高于阴性对照组,其差异有显著性意义($P<0.01$).

表 1 IgY 对小鼠微核率的影响

Tab. 1 Mouse micronucleus test of IgY

性别	组别	每千克体重剂量/g	鼠数目	嗜多染红细胞数/个	微核细胞数/个	微核率/%
雌	阴性对照	0	5	5000	11	2.2
	IgY	2.5	5	5000	10	2.0
		5.0	5	5000	9	1.8
		10.0	5	5000	11	2.2
	环磷酰胺	0.08	5	5000	160	32.0*
雄	阴性对照	0	5	5000	10	2.0
	IgY	2.5	5	5000	10	2.0
		5.0	5	5000	11	2.2
		10.0	5	5000	9	1.8
	环磷酰胺	0.08	5	5000	159	31.8*

注:* $P<0.01$(与阴性对照组相比).

2.4 小鼠精子畸形试验

IgY 对小鼠精子畸形发生率的影响见表 2. 各

万方数据

剂量组与阴性对照组相比，小鼠精子畸形率均无显著性差异；而阳性对照组小鼠精子畸形率则显著高于阴性对照组，其差异有显著性意义（$P<0.01$）.

2.5 Ames 试验

从试验结果可见，不同浓度受试物在加和不加 S_9 条件下的回变菌落与阴性对照组相近似，而阳性对照组回变菌落均高于阴性对照组回变菌落 2 倍以上（见表 3）.

2.6 大鼠 30 d 长毒试验

2.6.1 一般观察 试验期间对照组与各剂量组大鼠均未出现异常症状和体征，也无死亡.

2.6.2 IgY 对大鼠体重的影响 各剂量组雌、雄大鼠的体重增长情况良好，与对照组均无显著性差异，说明 IgY 对大鼠体重增长无明显影响（见表 4）.

2.6.3 IgY 对大鼠增重、进食量及食物利用率的影响 各剂量组雌、雄大鼠的增重、进食量及食物利用率与对照组比较均无显著性差异，因此 IgY 对大鼠的生长发育未见明显影响（见表 5）.

表 2 IgY 对小鼠精子畸形发生率的影响

Tab. 2 Mouse spermab normality assay of IgY

组别	每千克体重剂量/g	鼠数	观察精子数/条	畸形精子数							小计	畸变率/%
				无定形	无钩	折叠	胖头	香蕉	双头	双尾		
IgY	0	5	5 000	71	4	—	5	3	1	0	84	1.68
	2.5	5	5 000	85	5	—	0	1	0	1	92	1.84
	5.0	5	5 000	83	4	—	1	5	0	1	94	1.88
	10.0	5	5 000	70	3	—	0	0	0	1	74	1.48
MMC	0.00 2	5	5 000	237	35	—	22	16	18	1	329	6.58*

注：MMC 丝裂霉素； * $P<0.01$（与阴性对照组相比）.

表 3 IgY Ames 平板掺入试验结果

Tab. 3 Anes test of IgY

受试物	剂量（μg/皿）	回变菌落数（X±SD）							
		TA_{97a}		TA_{98}		TA_{100}		TA_{102}	
		$-S_9$	$+S_9$	$-S_9$	$+S_9$	$-S_9$	$+S_9$	$-S_9$	$+S_9$
IgY	0	111.0 ±8.72	162.7 ±19.29	34.0 ±2.00	40.7 ±8.74	154.7 ±10.79	143.3 ±20.21	240.7 ±7.57	306.0 ±29.46
	8	114.3 ±7.09	164.7 ±14.29	31.0 ±2.00	45.7 ±2.52	165.3 ±10.69	154.0 ±10.15	250.3 ±12.01	314.7 ±7.64
	40	111.3 ±8.50	172.0 ±16.00	30.7 ±2.31	45.7 ±2.31	143.3 ±13.32	154.3 ±17.62	258.0 ±20.66	312.0 ±16.00
	200	107.0 ±14.73	166.7 ±27.15	31.7 ±4.51	49.3 ±6.11	150.3 ±7.51	133.3 ±17.21	256.3 ±36.50	273.0 ±20.52
	1 000	113.7 ±16.29	153.3 ±21.83	30.0 ±5.57	48.3 ±8.02	146.0 ±12.17	209.0 ±8.89	258.7 ±30.09	281.3 ±20.13
	5 000	123.3 ±7.51	159.0 ±1.73	32.7 ±3.21	46.7 ±3.06	166.3 ±3.06	188.3 ±33.08	279.3 ±8.33	277.3 ±5.03
9AA	25	>1 000							
2.7AF	20			340					
NaN3	15					>1 000			
2AAF	10		>1 000		>1 000		>1 000		
MMC	5							>1 000	
1.8HAQ	2.5								>1 000

注：9AA：9-氨基吖啶；2.7AF：2.7-二氨基芴；NaN3：叠氮钠；2AAF：2-乙酰氨基芴；MMC：丝裂霉素 C；1.8HAQ：1.8-二羟基蒽醌.

万方数据

表 4　IgY 对大鼠体重增长的影响(x±s)

Tab. 4　Influence of body weight in rat by IgY

性别	剂量/(g/kg)	鼠数/只	始重	第 1 周	第 2 周	第 3 周	第 4 周
雌性	0.00	10	88.0±7.3	106.1±10.0	130.9±11.7	164.8±16.3	189.0±15.9
	1.25	10	87.8±8.7	106.0±9.3	127.7±13.3	163.1±17.3	180.1±16.0
	2.50	10	87.8±9.4	107.0±10.3	127.2±15.5	159.6±14.4	180.6±10.4
	5.00	10	87.9±7.3	105.3±6.5	125.0±12.2	154.0±11.4	176.8±13.6
雄性	0.00	10	87.4±8.5	105.4±10.8	129.9±12.1	183.1±21.6	224.1±32.6
	1.25	10	87.6±9.9	110.5±13.1	135.5±16.3	188.0±19.1	229.0±18.7
	2.50	10	87.2±9.3	110.0±11.0	136.5±11.6	183.1±15.4	225.4±14.5
	5.00	10	87.4±9.5	107.4±10.2	135.8±16.7	1755±14.7	208.4±17.4

表 5 IgY 对大鼠增重、进食量及食物利用率的影响(x±s)

Tab. 5　Influence of rat body weight, feed intake and fed utility by IgY

性别	每千克体重添加剂量/g	鼠数/只	增重/g	进食量/g	食物利用率/%
雌性	0.00(阴性对照)	10	108±15.3	400.6±27.1	25.2±2.6
	1.25	10	92.3±10.3	389.1±16.2	23.9±1.9
	2.50	10	92.8±7.9	385.1±39.4	23.6±2.5
	5.00	10	88.7±15.6	372.7±22.8	23.7±3.5
雄性	0.00(阴性对照)	10	136.7±33.3	446.2±27.0	30.3±6.4
	1.25	10	141.4±14.9	456.5±30.4	30.3±2.2
	2.50	10	138.2±16.3	450.1±21.3	30.6±2.4
	5.00	10	121.0±17.0	432.5±18.3	28.5±3.4

2.6.4　IgY 对大鼠血像的影响　雌、雄大鼠对照组与各剂量组的红细胞、白细胞计数及分类均在正常参考值范围，IgY 对大鼠红细胞、白细胞计数及分类未见明显影响(见表 6)。

2.6.5　IgY 对大鼠血液生化指标的影响　对照组与各剂量组的血液生化指标均在正常参考值范围，IgY 对大鼠血生化各项目指标未见明显影响(见表 7)。

2.6.6　IgY 对大鼠脏体比的影响　各剂量组的雌、雄大鼠与对照组比较均无显著性差异，IgY 对大鼠脏体比未见明显影响(见表 8)。

表 6　IgY 对大鼠血像的影响($\bar{x}$±s)

Tab. 6　Influence of Hemogram in rat by IgY

性别	每千克体重添加剂量/g	鼠数/只	血红蛋白/(g/dL)	白细胞/($\times10^9$L)	白细胞分类/%		
					淋巴	中性	其它
雌性	0.00(阴性对照)	10	12.6±0.7	14.94±2.41	80.2	19.1	0.7
	1.25	10	12.6±0.7	13.98±2.70	81.4	17.8	0.8
	2.50	10	12.7±0.4	14.05±3.22	82.0	17.8	0.2
	5.00	10	12.9±0.7	11.87±2.67	84.5	14.9	0.6
雄性	0.00(阴性对照)	10	12.8±0.7	11.05±3.01	84.6	14.9	0.5
	1.25	10	13.4±0.4	13.60±4.30	88.2	11.3	0.5
	2.50	10	13.8±1.0	13.01±4.40	87.4	12.2	0.4
	5.00	10	14.6±0.9	11.26±2.12	87.3	12.4	0.3

万方数据

表7 IgY对大鼠血生化的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab.7 Influence of blood biochemistry value in rat by IgY

性别	每千克体重添加剂量/g	鼠数/只	ALT/(U/L)	TP/(g/L)	ALB/(g/L)	Chol/(mmol/L)	TG/(mmol/L)	Urea/(mmol/L)	CR/(μmol/L)	Glu/(mmol/L)
雌性	0.00	10	50.7±4.7	77.0±4.5	34.9±1.9	1.95±0.32	0.95±0.26	6.9±0.7	25.6±3.0	1.8±1.3
	1.25	10	84.6±10.2	78.6±2.2	35.8±1.2	2.18±0.28	1.10±0.20	8.3±1.0	29.8±3.0	1.8±0.9
	2.50	10	76.2±15.8	79.0±3.0	35.4±1.0	2.15±0.27	1.00±0.25	7.8±1.2	28.7±2.1	1.5±0.6
	5.00	10	66.5±9.3	78.6±4.1	36.3±1.3	2.08±0.34	0.98±0.22	9.0±1.4	30.3±2.6	1.2±1.0
雄性	0.00	10	42.2±4.2	80.1±3.4	36.8±1.0	2.18±0.32	0.83±0.14	8.1±0.7	28.9±2.3	1.8±0.2
	1.25	10	70.8±11.6	80.3±3.2	35.9±1.0	2.33±0.22	0.96±0.43	7.8±1.2	30.7±2.8	2.5±0.4
	2.50	10	75.1±25.7	81.1±3.2	36.3±1.8	2.10±0.24	0.87±0.17	7.9±0.6	29.8±2.4	2.2±0.8
	5.00	10	64.7±8.6	79.8±3.8	35.6±1.2	2.34±0.29	0.79±0.19	8.4±1.0	29.0±2.4	2.6±0.4

表8 IgY对大鼠脏体比的影响(%,$\bar{x}\pm s$)

Tab.8 Influence of the viscera/body weight ratio of rat by IgY

性别	每千克体重添加剂量/g	鼠数/只	肝体比	肾体比	脾体比
雌性	0.00	10	4.14±0.38	0.86±0.04	0.32±0.04
	1.25	10	4.38±0.22	0.84±0.04	0.33±0.03
	2.50	10	4.19±0.22	0.84±0.05	0.29±0.03
	5.00	10	4.25±0.37	0.83±0.03	0.32±0.03
雄性	0.00	10	3.98±0.54	0.85±0.06	0.33±0.04
	1.25	10	4.22±0.78	0.87±0.31	0.32±0.03
	2.50	10	4.02±0.24	0.85±0.04	0.33±0.06
	5.00	10	4.10±0.41	0.88±0.11	0.34±0.04

2.6.7 病理学观察结果 肉眼观察均未发现异常改变.镜检发现对照组与高剂量组均有1只大鼠肝脏有散在肝细胞轻度脂肪变性;对照组与各剂量组各有2～3只脏肝血窦轻度充血,各有2只大鼠肾脏局部肾间质毛细血管和/或肾小球毛细血管襻轻度充血;对照组有1只雄性大鼠脾脏脾中央动脉周围淋巴鞘轻度增厚;胃、小肠均未见异常改变.因此IgY对大鼠大体解剖、组织学结构未见明显影响.

3 结 论

免疫球蛋白能通过被动免疫保护作用,增强机体防病抗病能力、促进机体生长发育.蛋黄因含有丰富的蛋黄免疫球蛋白而成为近年的研究重点,作为免疫球蛋白的新资源,需要对其进行安全性评价,通过以上各项急、慢性毒性试验表明:IgY对小鼠骨髓嗜多染红细胞微核率、小鼠精子畸形率、Ames试验检测结果均为阴性;对大鼠30 d长毒试验也无明显毒性反应;对大鼠的生长发育、血像、血生化及脏体比等指标均未见明显影响;大体解剖、组织学观察也未见异常病理改变.因此可得出IgY的无作用剂量为5.0 g.

此结果与国内其他单位的试验结果相同[5].因此IgY完全可作为一种新型的具有生物活性的功能因子,广泛地应用于各类需要的人群,其应用前景十分广阔.

(下转第60页)

万方数据

[2] 马美湖，林亲录，张凤凯.冷却肉生产中保鲜技术的初步研究[J].食品科学,2002,23(8):235－241.
[3] 南庆贤，李国钰. 肉类保鲜技术的研究[J].肉类工业,1996,(12):10－16
[4] 赵建生，谢华.高新技术在肉类工业中的应用[J]. 肉类研究,2002,(4):7－10.
[5] Djenane D. The shelf-life of beef steaks treated with dl-lactic acid and antioxidants and stored under modified atmospheres [J]. **Food Microbiology**, 2003,20(1) :1－7.
[6] 章建浩，胡飞杰,杨霞,等. 生鲜冷却猪肉MAP包装保鲜研究[J].食品科学,2002,23(2):114－117.
[7] 张学坚. 鲜肉充气保鲜包装技术初探[J]. 中国食品工业,1999,(6)24－25.
[8] 陈永红. 气调包装在肉类保鲜中的应用[J]. 肉类工业,1997,(10):33－35.
[9] 段静芸，徐幸莲，周光宏. 气调包装在鲜肉保鲜中的应用[J]. 食品科技,2002,(1):62－63,72.
[10] Buys E M, Kruger J, Nortje G J. Centralised bulk pre－packaging of fresh pork retail cuts in various gas atmospheres [J]. **Meat Science**,1994, (36):293－308.

（责任编辑：杨 勇）

（上接第40页）

参考文献：

[1] Shimizu M, Fitzsimmons R C, Nakai S. Anti-*E. coli* immunogobulin Y isolated from egg yolk of immunized chickens as a potential food ingredient[J]. **J Food Sci**,1988, 53(5): 1360－1366.
[2] Carral S B, Stollar B D. Antibodies of calf thymus RNA polymerase Ⅱ from egg yolks of immunized hes[J]. **J Biol chem**, 1983,258(1): 24－26.
[3] Otake S, Nishihara Y, Makimura M,*et al*. Protection of rats against dental carries by passive immunization with hen-egg-yolk antibody(IgY)[J]. **J Dent Res**,1991,70, 162－166.
[4] 杨严俊,周建新. 免疫活性蛋白的开发及其在乳制品中的应用[J]. 中国食品添加剂,2000,(1):49.
[5] 江千舟. 鸡蛋黄抗体IgY的急、慢性毒性实验[J]. 牙体牙髓牙周病杂志,2001,11(6):389.

（责任编辑：杨 萌）

万方数据