

丁丽军, 陈林中日, 庞艳华, 等. 蛋白质修饰粪肠球菌的体内致突变作用[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(17): 192–193.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.17.050

蛋白质修饰粪肠球菌的体内致突变作用

丁丽军¹, 陈林中日², 庞艳华², 雷伟伟², 张雨梅²

(1. 江苏农牧科技职业技术学院, 江苏泰州 225300; 2. 扬州大学兽医学院, 江苏扬州 225009)

摘要:通过小鼠骨髓细胞微核试验和小鼠精子畸形试验,以评价蛋白质修饰粪肠球菌的潜在致突变性。受试小鼠分为 1、2、5 g/kg 剂量组(按体质量计),灌胃给予,环磷酰胺为阳性对照,生理盐水为阴性对照,检测小鼠骨髓细胞微核率与精子畸形率。结果表明,受试物不同剂量小鼠骨髓细胞微核率与精子畸形率与阴性对照组无显著差异($P > 0.05$),而阳性对照组极显著高于阴性对照组($P < 0.01$)。结论是蛋白质修饰粪肠球菌小鼠骨髓细胞微核试验和小鼠精子畸形试验均为阴性,无体内致突变性。

关键词:蛋白质修饰粪肠球菌;骨髓细胞微核试验;精子畸形试验;致突变效应

中图分类号: R378.1; S816.73 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)17-0192-02

粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)又称粪链球菌,是人和动物肠道内主要菌群之一^[1],在动物肠道内可形成生物薄膜附着于动物肠道黏膜上,并且生长、发育和繁殖。我国《饲料添加剂品种目录(2013)》将粪肠球菌规定为可以添加到饲料中的菌种。粪肠球菌能够将饲料中的纤维变软,提高饲料的转化率。研究发现在玉米秸秆青贮饲料中添加粪肠球菌和纤维素酶,能使青贮饲料的色泽、气味和质地等发生明显的改善,干物质消化率提高 8%,氨态氮与总氮质量比降低 33%,丁酸质量分数降低 82%,明显提高了饲料品质^[2]。饲料中添加粪肠球菌具有提高动物生产性能、改善营养物质代谢和提高免疫功能等作用^[3-5]。粪肠球菌能够产生多种抗菌物质,这些抗菌物质对沙门氏菌、大肠杆菌和金黄色葡萄球菌等致病菌具有良好的抑制作用^[6-8]。粪肠球菌作为益生菌在畜禽上的研究和应用也越来越多。本研究拟通过小鼠骨髓细胞微核试验、小鼠精子畸形试验,探讨蛋白质修饰粪肠球菌在体内的致突变作用,为该粪肠球菌的应用安全性评价提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

受试物蛋白质修饰粪肠球菌粉,由江苏省某生物技术公司研制, 5×10^9 CFU/g,批号 20141206。临用前配成所需浓度的水溶液。

ICR 小鼠,雌雄各半,体质量(22 ± 2) g,共 70 只;ICR 雄性小鼠,体质量(28 ± 2) g,共 50 只,购自扬州大学比较医学中心,动物生产许可证号:SCXK(苏)2012-0004,使用许可证号:SYXK(苏)2012-0029。饲喂经 ^{60}Co 照射饲料,自然光照,室温(24 ± 2) °C,湿度(60 ± 20)%,自由采食和饮水,饮

收稿日期:

基金项目:江苏省成人高等教育畜牧兽医重点专业建设支持项目(项目编号:11134415001)。

作者简介:丁丽军(1980—),男,江苏海安人,硕士,讲师,从事基础兽医学研究。E-mail:641042228@qq.com。

通信作者:张雨梅,博士,教授,研究方向为基础兽医学。E-mail:zym@yzu.edu.cn。

水为符合城市饮用水标准的自来水。

pH 值 6.47 磷酸缓冲液配制:称取 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 23.88 g,溶于 1 000 mL 蒸馏水,为甲液;称取 KH_2PO_4 9.08 g 溶于 1 000 mL 蒸馏水,为乙液。取甲液 30 mL 和乙液 70 mL 混合即为 pH 值 6.47 磷酸缓冲液。

姬姆萨(Giemsa)染液:取 1.5 g 姬姆萨原粉,加 50 mL 甘油,置于 60 °C 温箱,约 3 h 后溶解。取出后加入 50 mL 甲醇,即为母液。使用前将母液与 pH 值 6.47 磷酸缓冲液按 1:10 的比例混合成工作液。

1.2 方法

1.2.1 急性毒性试验 预试验中,小鼠剂量高达 10 g/kg(按体质量计,下同)时均无死亡,说明受试物毒性较小,根据急性毒性操作规程,进行最大给药量试验。小鼠 20 只,雌、雄各半,24 h 内灌胃 2 次,给予总剂量为 10 g/kg。小鼠灌胃前,禁食 12 h,自由饮水。灌胃后,继续停食 1 h,观察动物的反应情况 7~14 d,并记录中毒症状或死亡数。

1.2.2 小鼠骨髓细胞微核试验

1.2.2.1 染毒 受试物 3 个剂量组分别为 5、2、1 g/kg。另设阴性对照组和环磷酰胺阳性对照组,阴性对照组经口给予生理盐水,阳性对照组给予 80 mg/kg 环磷酰胺一次性腹腔注射。受试物采用不同浓度等体积灌胃,0.2 mL/10 g 体质量。染毒 2 次,时间间隔 24 h。每组 10 只小鼠,雌雄各半,在第二次灌胃后 6 h,脱颈椎处死小鼠。

1.2.2.2 制片染色 取小鼠两侧股骨,剪去股骨两端。用小牛血清 0.05 mL 冲洗骨髓腔,于载玻片上推匀,晾干。涂片经甲醇固定 5~10 min,晾干后,姬姆萨染液染色 20 min。蒸馏水冲洗,干燥,镜检。

1.2.2.3 镜检及微核细胞计数 油镜下可见嗜多染红细胞(PCE)呈灰蓝色,成熟的正染红细胞(NCE)呈粉红色。计数每只小鼠 1 000 个 PCE 中具有微核的细胞数,计算微核率。微核率 = 有微核的 PCE 总数/检查的 PCE 总数 $\times 1000\%$,微核率以‰表示。另外计数 200 个红细胞中的 PCE 和 NCE 数,求出 PCE/NCE 的值。

1.2.2.4 结果判定 若微核率统计结果差异显著($P <$

0.05) 并有剂量反应关系时判为阳性,反之则为阴性。PCE/NCE 的比值应在 0.6~1.2 的范围内。若比值小于 0.1,则表示 PCE 形成受到严重抑制;若比值小于 0.05,则表示受试物剂量过大,试验结果不可靠。

1.2.3 小鼠精子畸形试验

1.2.3.1 染毒剂量途经 ICR 雄性小鼠,每组 10 只,每天染毒 1 次,连续 5 d。受试物水溶液灌胃给予,灌胃体积为 0.2 mL/10 g 体质量,剂量分别为 5、2、1 g/kg;另以 40 mg/kg 环磷酸胺腹腔注射为阳性对照,生理盐水灌胃为阴性对照。

1.2.3.2 观察 于第一次给予受试物后 35 d 脱颈椎处死小鼠,取两侧附睾制成精子悬液,涂片、晾干后,2% 伊红染色、镜检。每只小鼠观察 1 000 个精子,计数畸形精子数,计算精子畸形率并分析畸形类别。

1.2.3.3 结果判定 出现可重复的剂量-反应关系时,可判定试验结果为阳性。即至少有 2 个相邻剂量组的精子畸形率比阴性对照组极显著增高($P<0.01$);或达到阴性对照组的 2 倍及以上,并且试验结果可重复,则可认为试验结果阳性;反之则为阴性。

1.3 数据统计

数据统计采用 SPSS 12.0,显著性比较采用 χ^2 分析。

2 结果与分析

2.1 小鼠急性毒性试验

试验中当剂量高达 10 g/kg 时小鼠均无死亡。因此,受试物小鼠经口 LD₅₀ > 10 g/kg。根据 WHO 关于外源化学物急性毒性分级标准,当 LD₅₀ > 5 000 mg/kg 时为实际无毒级别,故受试物蛋白质修饰粪肠球菌属于实际无毒物质。

2.2 小鼠骨髓细胞微核试验

微核率和 PCE/NCE 统计结果见表 1。各试验组 PCE/NCE 比值在正常范围内,说明本试验方法可行。阳性对照组与阴性对照组比较差异极显著($P<0.01$)。受试物各试验组微核率与阳性对照组比较差异极显著($P<0.01$);与阴性对照组比较差异不显著($P>0.05$),且各试验组微核率之间无剂量-反应关系。根据微核试验判定标准,受试小鼠骨髓细胞微核试验结果为阴性。

表 1 蛋白质修饰粪肠球菌微核率和 PCE/NCE 统计

剂量组	动物数	微核率(%)	PCE/NCE
阴性对照	10	2.30±0.96 [#]	1.05±0.10
1 g/kg	10	1.90±0.54 [#]	1.08±0.08
2 g/kg	10	2.30±0.76 [#]	1.08±0.05
5 g/kg	10	4.00±1.40 [#]	1.03±0.04
阳性对照	10	23.50±3.80 [*]	1.05±0.10

注: * 表示与阴性对照组比较差异极显著($P<0.01$); # 表示与阳性对照组比较差异极显著($P<0.01$)。表 2 同。

2.3 小鼠精子畸形试验

受试物小鼠精子畸形试验结果见表 2 和表 3。阳性对照组精子畸形率显著高于阴性对照组($P<0.01$)。受试物 3 个剂量组的精子畸形率与阴性对照组比较,无显著性差异($P>0.05$)。受试物精子畸形类别与阳性对照组相似,畸形主要以无钩、香蕉形、无定形及胖头 4 种为主,占 90% 以上,其他类别所占例较小。受试物小鼠精子畸形试验结果为阴性,表

表 2 蛋白质修饰粪肠球菌小鼠精子畸形试验率

剂量组	动物数	检查精子数	精子畸形率(%)
阴性对照	10	1 000×10	2.55±0.09 [#]
1 g/kg	10	1 000×10	3.17±0.14 [#]
2 g/kg	10	1 000×10	3.34±0.23 [#]
5 g/kg	10	1 000×10	3.38±0.38 [#]
阳性对照	10	1 000×10	11.01±0.24 [*]

表 3 蛋白质修饰粪肠球菌小鼠精子畸形类别统计

剂量组	各类畸形精子占比(%)						
	无钩	香蕉形	无定形	胖头	尾折叠	双头	双尾
阴性对照	35.29	15.29	34.90	10.20	3.92	0.00	0.39
1 g/kg	34.94	15.06	34.94	9.62	4.49	0.64	0.32
2 g/kg	36.75	14.46	34.04	10.24	4.22	0.0	0.30
5 g/kg	35.33	12.57	34.13	11.68	4.79	0.30	1.20
阳性对照	37.60	13.71	30.43	10.08	4.72	1.91	1.54

明蛋白球菌对小鼠的生殖细胞无明显的致突变性。

3 结论与讨论

受试物小鼠骨髓细胞微核试验阴性、小鼠精子畸形试验阴性,说明受试物在体内对体细胞和生殖细胞无明显的致突变作用。

本课题组进行的受试物对鼠伤寒沙门氏菌突变试验的结果也为阴性(此部分内容另文发表)。因此,受试物在体外 Ames 试验、体内小鼠骨髓细胞微核试验和小鼠精子畸形试验中均为阴性结果,说明蛋白质修饰粪肠球菌无致突变作用。

由于受试物 LD₅₀ 大于 10 g/kg,小鼠骨髓细胞微核试验和小鼠精子畸形试验中的剂量 5、2、1 g/kg,是按照 1/2 LD₅₀、1/5 LD₅₀ 和 1/10 LD₅₀ 设置的。虽然试验剂量相对较大,但小鼠骨髓细胞微核试验和小鼠精子畸形试验的结果仍然为阴性。

参考文献:

[1] Malik R K, Montecalvo M A, Reale M R, et al. Epidemiology and control of vancomycin-resistant enterococci in a regional neonatal intensive care unit[J]. Pediatr Infect Dis J, 1999, 18(4): 352.

[2] 郭刚, 霍文婕, 张拴林, 等. 添加肠球菌对收获籽实玉米秸秆青贮品质及体外发酵特性的影响[J]. 山西农业大学学报(自然科学版), 2016, 36(7): 461-467.

[3] 贡筱, 郭俊刚, 吴学壮, 等. 饲料中添加枯草芽孢杆菌和粪肠球菌对育成期蓝狐生长性能、营养物质消化率及氮代谢的影响[J]. 动物营养学报, 2014, 26(4): 1004-1010.

[4] 魏清甜, 李平华, 汪涵, 等. 粪肠球菌替代抗生素对保育仔猪生长性能、腹泻率、体液免疫指标和肠道微生物数量的影响[J]. 南京农业大学学报, 2014, 37(6): 143-148.

[5] 鲍延娥, 董晓芳, 佟建明, 等. 粪肠球菌益生特性的体外评价[J]. 西北农业学报, 2013, 22(11): 202-207.

[6] 刘松, 董晓芳, 佟建明, 等. 饲料添加粪肠球菌对蛋鸡生产性能、蛋品质、脂质代谢和肠道微生物数量的影响[J]. 动物营养学报, 2017, 29(1): 202-213.

[7] 李颖, 雷鸣, 潘春美. 益生肠球菌的应用开发进展[J]. 中国实用医药, 2014, 12(9): 252-253.

[8] 史自涛, 姚焰础, 江山, 等. 粪肠球菌替代抗生素对断奶仔猪生长性能、腹泻率、血液生化指标和免疫器官的影响[J]. 动物营养学报, 2015, 27(6): 1832-1840.