

研究报告

动物双歧杆菌 V9 亚慢性毒性研究

李永宁, 梁春来, 张馨, 贾旭东

(国家食品安全风险评估中心, 北京 100021)

摘要:目的 研究动物双歧杆菌 V9 的亚慢性毒性, 提出其无可见有害作用水平 (NOAEL)。方法 80 只断乳 SD 大鼠按体重随机分成 4 组, 即对照组和 3 个受试物组, 每组 20 只, 雌雄各半。低、中、高剂量分别为 1.25、2.50、5.00 g/kg BW。各剂量组灌胃给予受试物, 对照组灌同体积的蒸馏水。动物单笼喂养, 自由饮食, 每周记录大鼠进食量, 每周称 2 次体重以调整灌胃量, 连续观察 90 d, 于实验中期 (46 d) 和实验结束采血测各项血液学和临床生化指标, 并进行病理组织学检查。结果 各受试物剂量组动物体重、进食量、食物利用率、临床生化指标、各脏器脏体比与对照组比较均无显著性差异; 病理指标也未见由受试物引起的异常改变。血常规指标中有显著性差异的检测值均在本室历史正常对照检测范围内, 无生物学意义。结论 根据本次实验结果确定动物双歧杆菌 V9 NOAEL 在雌雄大鼠均为 5.00 g/kg BW, 即本实验的高剂量, 相当于人体推荐量的 300 倍。

关键词: 动物双歧杆菌 V9; 亚慢性毒性; 未观察到有害作用水平; 毒理学试验

中图分类号: R117; R392.12 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2012)03-0000-00

Subchronic toxicity of *Bifidobacterium animalis* V9 in rats

Li Yongning, Liang Chunlai, Zhang Xin, Jia Xudong

(China National Center For Food Safety Risk Assessment, Beijing 100021, China)

Abstract: **Objective** To study the subchronic toxicity of *Bifidobacterium animalis* V9, and to determine its no-observable-adverse-effect-level (NOAEL). **Methods** Eighty Sprague-Dawley rats were randomly divided into four groups, twenty rats (10 males and 10 females) per group. Animals in the three treatment groups were given 1.25, 2.50, and 5.00 g/kg BW of test material by gavage for 90 days respectively, and rats in the control group were treated with the same volume of water by gavage for 90 days. Clinical observations were conducted daily. Body weights and food consumption were recorded weekly. Blood samples were collected from all rats on the Day 46 and at the termination of the study, and gross examinations were performed on all animals euthanized for necropsy. Organ weights were recorded and selected tissues were examined microscopically. **Results** All parameters including body weight, food consumption, clinical biochemistry, absolute and relative organ weights and histopathology in treatment groups had comparable values to animals in the control group. Differences on hematology between treated and control groups were not treatment-related. **Conclusion** The NOAEL of *B. animalis* V9 were 5.00 g/kg BW in male and female rats, which was the highest dosage tested in this study, was equivalent to 300 times of the dosage recommended for human use.

Key words: *Bifidobacterium animalis* V9; subchronic toxicity; no observable adverse effect level; toxicology experiment

双歧杆菌 (*Bifidobacterium*) 是法国学者 Tissier 用厌氧培养法从健康母乳喂养婴幼儿的粪便中分离出来的一种专性厌氧菌, 研究表明双歧杆菌属具有免疫调节、抗肿瘤、抗菌消炎、降血脂等多种生物活性功能^[1-4]。动物双歧杆菌 V9 (*B. animalis* V9) 是一种分离于健康蒙古儿童的动物双歧杆菌乳酸

亚种 (*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactic* V9) 菌株, 具有良好的耐酸、耐胆盐益生特性及较强的人工胃液耐受性^[5], 有研究显示动物双歧杆菌 V9 对腹泻动物具有保护作用, 在体外对志贺痢疾杆菌、沙门菌、铜绿假单胞菌和大肠埃希菌有不同程度的拮抗作用, 并可对肠道菌群起到调节作用^[6-7]。由此可见, 动物双歧杆菌 V9 作为益生菌具有良好的应用前景, 但是, 任何新的菌株在上市以前都必须进行充分的安全性评价, 因此本试验依据 GB 15193.13—2003《食品安全性毒理学评价程序和方法 30 天和 90 天喂养试验》^[8] 对其进行了大鼠亚慢性毒性研究。

收稿日期: 2012-02-13

作者简介: 李永宁 男 实习研究员 研究方向为营养与食品卫生

E-mail: 13466796251@163.com

通信作者: 贾旭东 男 研究员 研究方向为食品毒理 E-mail:

jiaxudong@yahoo.com

1 材料和方法

1.1 受试物

动物双歧杆菌 V9,由内蒙古某生物制品有限责任公司提供,为淡黄色粉末,活菌数 $\geq 5.0 \times 10^{10}$ (CFU/g),人体推荐量为每天 0.0167 g/kg BW。

1.2 主要仪器与试剂

BECKMAN GS15R 离心机;日立 7080 型自动生化仪;BECKMAN COULTER A^c. T diff2TM 血液分析仪。血生化检测试剂盒购自中生北控生物科技股份有限公司。

1.3 实验动物及处理

1.3.1 实验动物及饲养

SD 大鼠(SPF 级)购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号为[SCXK(京)2006-0009];饲养于首都医科大学附属北京口腔医院实验动物中心,动物房温度为 20~25℃,湿度为 40%~70%,12 h 明暗交替,换气次数为 10~20 次/小时。本实验符合《实验动物管理条例》,并经中国疾病预防控制中心营养与食品安全所动物伦理委员会认可。

1.3.2 动物分组和处理

选用健康断乳大鼠 80 只,随机分为 4 组,即对照组和 3 个受试物组,每组 20 只,雌雄各半。设低、中、高剂量分别为 1.25、2.50、5.00 g/kg BW,分别相当于人体推荐量的 75、150 和 300 倍。各剂量组灌胃给予受试物,灌胃量均为 10 ml/kg BW。每天配制,对照组灌同体积的蒸馏水。动物单笼喂养,自由饮食,每周记录大鼠进食量,每周称 2 次体重以调整灌胃量,连续观察 90 d,于实验中期(46 d)和实验结束采血测各项血液学和临床生化指标,并进行病

理组织学检查。

1.4 观察指标

1.4.1 体重、进食量和日常观察

每周记录大鼠体重、进食量 2 次;每日观察大鼠的活动、进食及饮水情况。

1.4.2 血液学及临床生化指标

分别于试验中期和末期进行白细胞计数及其分类、红细胞计数、血红蛋白、血小板计数、谷草转氨酶、谷丙转氨酶、碱性磷酸酶、尿素氮、肌酐、胆固醇、甘油三酯、血糖、总蛋白、白蛋白测定。

1.4.3 脏器比

实验结束处死动物取肝、肾、脾、心脏、胸腺、睾丸称重,计算相应的脏器比(以百克体重计算)。

1.4.4 病理组织学

解剖进行大体观察及病理组织学检查。在对各剂量组动物做大体检查未发现明显病变和生化指标未见异常改变时,仅先对高剂量组和对照组动物进行心、肝、脾、肾、肾上腺、胸腺、胃、十二指肠、睾丸、卵巢组织等脏器进行病理观察。

1.5 统计分析

数据经 EXCEL 计算均数和标准差,经 PEMS 统计软件包进行方差分析,方差不齐者采用非参数分析。

2 结果

2.1 体重、进食量和食物利用率

各组动物活动正常,被毛浓密有光泽。以 1.25、2.50、5.00 g/kg BW 剂量的动物双歧杆菌 V9 灌胃给予大鼠 90 d,各受试物剂量组动物体重、进食量和食物利用率与对照组比较均无显著性差异($P>0.05$)。

表 1 动物双歧杆菌 V9 对大鼠总食物利用率的影响

Table 1 Effect of *B. animalis* V9 on food efficiency in rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

性别	动物双歧杆菌 V9(g/kg BW)	动物数(只)	体重增量(g)	总进食量(g)	总食物利用率(%)
雌	0.00	10	246.8 ± 34.0	1909.2 ± 83.5	12.9 ± 1.4
	1.25	10	236.9 ± 18.2	1916.3 ± 27.4	12.4 ± 0.8
	2.50	10	229.8 ± 26.4	1903.2 ± 56.9	12.1 ± 1.2
	5.00	10	249.5 ± 18.5	1934.7 ± 60.1	12.9 ± 0.6
雄	0.00	10	432.3 ± 56.8	2332.9 ± 88.5	18.5 ± 2.0
	1.25	10	435.3 ± 33.3	2361.1 ± 69.1	18.4 ± 1.4
	2.50	10	439.9 ± 42.6	2338.5 ± 74.5	18.8 ± 1.4
	5.00	10	430.6 ± 35.1	2343.1 ± 52.6	18.4 ± 1.5

2.2 血液学和临床生化指标

雌雄各受试物剂量组除实验中期血常规 2.50 g/kg BW 剂量组雌性大鼠红细胞计数显著高于对照组($P<0.05$,见表 2)外,各项血液学指标(白细胞计数及其分类、血红蛋白、血小板计数)和临床生化指标(谷草转氨酶、谷丙转氨酶、碱性磷酸酶、尿素

氮、肌酐、胆固醇、甘油三酯、血糖、总蛋白、白蛋白)与对照组比较在试验中期和末期均无显著性差异($P>0.05$)。

2.3 大体病理及组织学检查

各受试物剂量组宰杀体重、肝脏、肾脏、脾脏、心脏、胸腺、肾上腺、胃、睾丸的重量及各脏器脏体

表 2 动物双歧杆菌 V9 90 天喂养试验对大鼠中期血常规的影响
Table 2 Effect of *B. animalis* V9 on medium-term hematology in rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

性别	剂量 (g/kg BW)	动物数 (只)	白细胞计数 ($\times 10^9$ /L)	红细胞计数 ($\times 10^{12}$ /L)	血红蛋白 (g/L)	血小板计数 ($\times 10^{12}$ /L)
雌	0.00	10	9.1 $\pm$ 2.4	6.0 $\pm$ 0.5	146.3 $\pm$ 8.7	865.1 $\pm$ 169.8
	1.25	10	9.0 $\pm$ 3.0	6.2 $\pm$ 0.2	150.2 $\pm$ 4.6	930.6 $\pm$ 142.8
	2.50	10	11.2 $\pm$ 1.8	6.5 $\pm$ 0.3 ^a	150.0 $\pm$ 5.7	842.3 $\pm$ 96.2
	5.00	10	10.7 $\pm$ 3.1	6.3 $\pm$ 0.5	148.6 $\pm$ 10.9	877.2 $\pm$ 193.2
雄	0.00	10	11.6 $\pm$ 4.2	6.6 $\pm$ 0.4	152.7 $\pm$ 5.9	849.3 $\pm$ 138.4
	1.25	10	11.2 $\pm$ 2.0	6.9 $\pm$ 0.5	158.1 $\pm$ 8.7	762.7 $\pm$ 132.8
	2.50	10	12.6 $\pm$ 1.7	6.4 $\pm$ 0.5	148.3 $\pm$ 11.9	804.1 $\pm$ 63.5
	5.00	10	12.0 $\pm$ 2.7	7.0 $\pm$ 0.3	152.8 $\pm$ 9.7	827.5 $\pm$ 104.3

注:a 和阴性对照组比较, $P < 0.05$ 。

表 3 动物双歧杆菌 V9 90 天喂养试验对大鼠肝脏、肾脏脏器体重比的影响
Table 3 Effect of *B. animalis* V9 on absolute and relative organ weights of liver and kidney in rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

性别	剂量 (g/kg BW)	动物数 (只)	宰杀体重 (g)	肝脏		肾脏	
				重量 (g)	脏体比 (%)	重量 (g)	脏体比 (%)
雌	0.00	10	296.5 $\pm$ 32.4	7.79 $\pm$ 1.34	2.62 $\pm$ 0.29	2.12 $\pm$ 0.32	0.72 $\pm$ 0.07
	1.25	10	279.3 $\pm$ 23.8	7.09 $\pm$ 0.73	2.56 $\pm$ 0.38	1.99 $\pm$ 0.24	0.72 $\pm$ 0.10
	2.50	10	277.6 $\pm$ 26.8	7.31 $\pm$ 1.03	2.64 $\pm$ 0.36	2.05 $\pm$ 0.18	0.74 $\pm$ 0.09
	5.00	10	289.7 $\pm$ 17.9	7.62 $\pm$ 0.63	2.63 $\pm$ 0.13	2.20 $\pm$ 0.14	0.76 $\pm$ 0.06
雄	0.00	10	468.6 $\pm$ 56.5	11.18 $\pm$ 1.45	2.39 $\pm$ 0.12	3.38 $\pm$ 0.55	0.72 $\pm$ 0.06
	1.25	10	479.9 $\pm$ 30.8	12.54 $\pm$ 1.42	2.63 $\pm$ 0.39	3.51 $\pm$ 0.29	0.73 $\pm$ 0.08
	2.50	10	485.7 $\pm$ 45.1	11.91 $\pm$ 1.04	2.47 $\pm$ 0.33	3.49 $\pm$ 0.29	0.72 $\pm$ 0.04
	5.00	10	468.8 $\pm$ 33.9	11.54 $\pm$ 0.82	2.47 $\pm$ 0.15	3.39 $\pm$ 0.26	0.73 $\pm$ 0.06

表 4 动物双歧杆菌 V9 90 天喂养试验对大鼠脾脏、胸腺脏器体重比的影响
Table 4 Effect of *B. animalis* V9 on absolute and relative organ weights of spleen and thymus in rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

性别	剂量 (g/kg BW)	动物数 (只)	脾脏		胸腺	
			重量 (g)	脏体比 (%)	重量 (g)	脏体比 (%)
雌	0.00	10	0.50 $\pm$ 0.13	0.17 $\pm$ 0.04	0.36 $\pm$ 0.08	0.12 $\pm$ 0.03
	1.25	10	0.51 $\pm$ 0.08	0.18 $\pm$ 0.03	0.40 $\pm$ 0.10	0.15 $\pm$ 0.04
	2.50	10	0.55 $\pm$ 0.14	0.20 $\pm$ 0.06	0.40 $\pm$ 0.14	0.15 $\pm$ 0.05
	5.00	10	0.57 $\pm$ 0.09	0.20 $\pm$ 0.03	0.38 $\pm$ 0.09	0.13 $\pm$ 0.03
雄	0.00	10	0.84 $\pm$ 0.24	0.18 $\pm$ 0.05	0.44 $\pm$ 0.12	0.09 $\pm$ 0.02
	1.25	10	0.81 $\pm$ 0.12	0.17 $\pm$ 0.03	0.47 $\pm$ 0.11	0.10 $\pm$ 0.02
	2.50	10	0.82 $\pm$ 0.14	0.17 $\pm$ 0.02	0.55 $\pm$ 0.20	0.11 $\pm$ 0.04
	5.00	10	0.78 $\pm$ 0.09	0.17 $\pm$ 0.01	0.52 $\pm$ 0.20	0.11 $\pm$ 0.04

表 5 动物双歧杆菌 V9 90 天喂养试验对大鼠心脏、睾丸脏器体重比的影响
Table 5 Effect of *B. animalis* V9 on absolute and relative organ weights of heart and testis in rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

性别	剂量 (g/kg BW)	动物数 (只)	心脏		睾丸	
			重量 (g)	脏体比 (%)	重量 (g)	脏体比 (%)
雌	0.00	10	0.98 $\pm$ 0.24	0.33 $\pm$ 0.06		
	1.25	10	0.94 $\pm$ 0.13	0.34 $\pm$ 0.05		
	2.50	10	0.95 $\pm$ 0.14	0.35 $\pm$ 0.05		
	5.00	10	0.97 $\pm$ 0.11	0.33 $\pm$ 0.03		
雄	0.00	10	1.49 $\pm$ 0.17	0.32 $\pm$ 0.03	3.10 $\pm$ 0.35	0.66 $\pm$ 0.05
	1.25	10	1.59 $\pm$ 0.14	0.33 $\pm$ 0.02	3.05 $\pm$ 0.20	0.64 $\pm$ 0.07
	2.50	10	1.46 $\pm$ 0.20	0.30 $\pm$ 0.05	3.29 $\pm$ 0.32	0.68 $\pm$ 0.06

比与对照组比较均无显著性差异 ($P > 0.05$)。解剖后肉眼大体观察均未发现各脏器异常。病理组织学检查发现对照组和 5.00 g/kg BW 剂量组均有 1 只动物出现肝细胞点状坏死,其他脏器均未见异常。

3 讨论

针对动物双歧杆菌 V9 进行的毒理学安全性评价研究较少,梁春梅等^[9]利用小鼠进行的一项动物双歧杆菌 V9 冻干粉急性毒性试验结果显示其无毒

副作用。

在本实验中,以 1.25、2.50、5.00 g/kg BW 剂量的动物双歧杆菌 V9 灌胃给予大鼠 90 d,各受试物剂量组动物大部分观察指标与对照组比较均无显著性差异;虽然 2.50 g/kg BW 剂量组雌性大鼠红细胞计数显著高于对照组,但该检测值在本室历史正常对照检测范围内,而且没有剂量反应关系,因此认为与受试物无关。在组织病理学检测中发现的少数动物肝细胞点状坏死也是实验动物常见病变,且受试物组与对照组比较无显著性差异,故认为与受试物无关。因此,根据本次亚慢性毒性研究结果,将本次实验的最高剂量,即 5.00 g/kg BW 确定为本研究的未观察到有害作用水平,相当于人体推荐量的 300 倍。

参考文献

- [1] MARTINS A K, MARTINS F S, GOMES D A, et al. Evaluation of in vitro antagonism and of in vivo immune modulation and protection against pathogenic experimental challenge of two probiotic strains of *Bifidobacterium animalis* var. *lactis* [J]. Arch Microbiol, 2010, 192: 995-1003.
- [2] MEDINA M, IZQUIERDO E, ENNAHAR S, et al. Differential immunomodulatory properties of *Bifidobacterium longum* strains: relevance to probiotic selection and clinical applications [J]. Clin Exp Immunol, 2007, 150: 531-538.
- [3] AN H M, PARK S Y, LEE D O K, et al. Antiobesity and lipid-lowering effects of *Bifidobacterium* spp. in high fat diet-induced obese rats [J]. Lipids Health Dis, 2011, 10: 116.
- [4] SASAKI T, FUJIMORI M, HAMAJI Y, et al. Genetically engineered *Bifidobacterium longum* for tumor-targeting enzyme-prodrug therapy of autochthonous mammary tumors in rats [J]. Cancer Sci, 2006, 7: 649-657.
- [5] 高鹏飞,孙志宏,麻士卫,等.蒙古族儿童源益生特性双歧杆菌的筛选及鉴定[J].微生物学报,2009,49(2):210-219.
- [6] 高鹏飞,孙志宏,麻士卫,等. *B. animalis* V9 对腹泻动物的保护性作用及其机制研究[J].中国微生态学杂志,2009,21(5):385-387.
- [7] 王记成,高鹏飞,周琦,等.双歧杆菌 V9 对便秘和腹泻患者的临床研究[J].营养学报,2011,33(1):70-74.
- [8] 中华人民共和国卫生部,中国国家标准化管理委员会. GB 15193.13—2003 食品安全性毒理学评价程序和方法 30 天和 90 天喂养试验[S].北京:中国标准出版社,2003.
- [9] 梁春梅,高鹏飞,陈震,等.益生菌 *B. animalis* V9 冻干粉安全性毒理学研究[J].中国微生态学杂志,2010,22(6):481-488.

消息

我国 21 个省份出台食品安全有奖举报制度

福建规定食品安全举报受理工作实行首接负责制,相关部门接到举报后要立即受理,并在案件查处结束后负责向举报人反馈结果。吉林设立专门的食品安全投诉举报机构。

河北要求各市县人民政府设立本级食品安全举报中心,并公布 24 小时举报电话。

上海、浙江统一了本行政区域的食品安全投诉举报电话号码。

陕西、湖南分别设立 500 万元和 300 万元专项奖励资金。

广州市、石家庄市明确市财政分别安排举报奖励资金 600 万元和 300 万元。

在奖励标准方面,北京、浙江将最高奖励金额提高至 30 万元,江苏、广西、海南等地还规定,举报人有特别重大贡献的,奖励额度上不封顶。