

论著

大鼠繁殖试验评价牛初乳对生殖发育的影响

王洋¹, 薛勇¹, 刘钊燕¹, 吕艳丽¹, 贾梦¹, 徐丽², 康小红³, 生庆海³, 张玉梅¹, 王培玉¹(1. 北京大学公共卫生学院, 北京 100191; 2. 哈尔滨工业大学, 黑龙江 哈尔滨 150001;
3. 蒙牛乳业, 内蒙古 呼和浩特 011500)

摘要:目的 通过繁殖试验观察牛初乳对亲代大鼠生殖及F1代仔鼠发育状况的影响,评价牛初乳的生殖发育安全性。方法 选用4周龄SD大鼠,牛初乳组在交配前期、宫内暴露期、哺乳期和仔鼠性成熟期(受孕前11周至仔鼠性成熟),用含10%牛初乳的饲料喂饲亲代和子代大鼠,对照组饲喂普通饲料,检测亲代体重、摄食量、动情周期、繁殖力指数、怀孕指数、孕周、每窝活产数、激素水平、生殖器官及精子质量;子代出生体重及身长、性别比、4日生存率、阴道开口时间、包皮分离时间等。采用两独立样本 t 检验的统计方法对均数进行比较,使用SPSS 13.0统计分析软件处理数据。结果 与对照组相比,牛初乳对亲代的动情周期、繁殖力指数、怀孕指数、孕周、每窝活产数、子代性别比、出生身长、4日生存率均无显著影响,但亲代雄鼠左侧储精囊脏体比降低,精子总数提高($P < 0.05$),且牛初乳组亲代雌、雄大鼠血液中的促黄体生成素(LH)显著降低($P < 0.05$),雌鼠血液中催乳素(PRL)和孕酮(P)均显著低于对照组($P < 0.05$)。结论 一代繁殖试验未发现牛初乳对生殖发育能力有显著影响,仅见亲代储精囊、精子总数和激素水平改变,其长远影响需二代繁殖试验进一步验证。

关键词:牛初乳;繁殖试验;雌二醇;促黄体生成素;催乳素;精子总数;肛门生殖孔间距;生长发育

中图分类号:R151.3 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2012)03-0000-00

Safety assessment of bovine colostrums on reproductive development by reproduction study

Wang Yang, Xue Yong, Liu Zhaoyan, Lü Yanli, Jia Meng, Xu Li, Kang Xiaohong,

Sheng Qinghai, Zhang Yumei, Wang Peiyu

(School of Public Health, Peking University, Beijing 100191, China)

Abstract: **Objective** To assess bovine colostrums (BC) safety by reproduction study by observe the influence of BC on reproductive development. **Methods** Forty four-week-old Sprague-Dawley rats (20 male and 20 female) were randomly divided into BC group and control group according to their body mass and were fed with the diet with 10% BC and normal diet, respectively. These indexes of parental generation were examined, such as body weight, daily food intakes, estrous cycle, fertility index, pregnant index, gestation length, number of pups, blood hormone level, reproduction organ and sperm parameters. Sex ratio, anogenital distance, vaginal opening (VO), preputial separation (PPS) were also reported. **Results** The weight of left seminal vesicle was slightly lower in bovine colostrums group than that in control group ($P < 0.05$), while BC significantly increased the total number of sperms ($P < 0.05$). BC diet vs control diet significantly decreased the level of luteinizing hormone (LH), prolactin (PRL) and progesterone (P) in female rats of the P generation ($P < 0.05$). And the level of LH in male rats of the P generation was Lower than that of control group ($P < 0.05$). There was no significant differences on the other indices such as estrous cycle, mating index, fertility index, pregnant index, gestation length, Number of pups, sex ratio, anogenital distance, vaginal opening (VO), preputial separation (PPS) between Bovine colostrums group and control group. **Conclusion** Bovine colostrums did not show significant influence on the reproductive development ability in the one-generation reproduction study. But there are changes in seminal vesicle, the total number of sperms and the level of hormones of parental rats. Further study is required to determine whether Bovine colostrums have adverse effects on reproductive health for F2-generation.

Key words: Bovine colostrums; reproduction study; estradiol; estrogens luteinizing hormone; prolactin; total number of sperm; anogenital distance; growth and development

收稿日期:2011-11-09

作者简介:王洋 女 硕士 研究方向为营养与食品卫生 E-mail: zhong555guo@163.com

通信作者:张玉梅 女 教授 研究方向为植物雌激素和乳品 E-mail: zhangyumei@hsc.pku.edu.cn

牛初乳除了含有常乳所具有的蛋白质、碳水化合物、脂肪等营养成分外,还含有生长因子(如胰岛素样生长因子 IGF 等^[1])、乳铁蛋白和免疫调控物质(如 IgG、IgA 等)^[2],这些成分能改善胃肠道功能、调节免疫及机体生理状态平衡。

目前我国婴儿产后 1 个月纯母乳喂养率仅为 47%~62%^[3],缺乏初乳的婴儿 6 个月内过敏、腹泻等疾病发生率较高。曾有人建议采用牛初乳作为非母乳喂养婴儿的膳食补充剂(dietary supplement),但牛初乳中的激素安全问题一直备受关注。有报道称牛初乳中雌激素含量是常乳的 5~10 倍,主要存于乳脂肪中,虽然脱脂工艺可去除大部分雌激素^[4-5],但婴幼儿早期摄入牛初乳粉,其中的激素是否引起性早熟、是否引起成年后生殖功能改变等尚无相关试验证据。国内外对于牛初乳的安全性评价仅仅局限于急性毒性试验、致突变试验和 30d 喂养试验^[6-8],目前尚无用繁殖试验对牛初乳的安全性进行研究。本试验将通过繁殖试验评价牛初乳对于亲代生殖和子代发育的影响。

1 材料和方法

1.1 试剂和仪器

牛初乳由某公司提供,动物饲料购于北京华阜康生物科技股份有限公司。仪器:WLZY-9000 型彩色精子质量检测系统(伟力);DFM-96 型放射免疫 γ 计数器;CKX-41 型光学显微镜。

1.2 试验方法

1.2.1 试验动物

SPF 级 4 周龄 SD 大鼠 40 只,体重 60~80 g,雌雄各半,购于北京大学医学部试验动物科学部(动物合格证号:SCXK(京)2006-008),饲养于北京大学医学部 SPF 级动物房(合格证号:SYXK(京)2007-0008),动物室温度为 $(23 \pm 2)^\circ\text{C}$,相对湿度 $50\% \pm 5\%$,通风良好。本试验获得北京大学生物医学伦理委员会批准。

1.2.2 受试动物分组与喂养

本研究旨在考查牛初乳对生殖安全的影响,仅根据实际使用剂量设定一个受试组,并与对照组比较。SD 大鼠适应 1 周后,按体重随机分为两组:牛初乳组和饲料对照组(简称对照组),每组 20 只,雌雄各半。牛初乳组饲料是在普通饲料基础上加入 10% 的牛初乳配制而成^[9]。调整饲料成分,使对照组和牛初乳组饲料中蛋白质、碳水化合物和总能量相近,具体如下:

牛初乳组饲料组成含玉米 54%、豆粕 29%、麸皮 6%、鱼粉 4%、油脂 1.5%、预混剂 5.5%,总能量

为 278.1 kcal/100 g,蛋白质含量为 17.4 g/100 g。

对照组饲料组成含玉米 58.5%、豆粕 21%、酪蛋白 3.5%、麸皮 6%、鱼粉 4%、油脂 1.5%、预混剂 5.5%;总能量 275.4 kcal/100 g,蛋白质含量为 17.5 g/100 g 饲料。

试验开始,牛初乳组、对照组大鼠分别饲喂不同饲料,11 周后,同组雌雄鼠进行交配,交配期间按组别继续饲喂饲料,亲代雄鼠饲喂至确认同组母鼠受孕全部完成为止;亲代母鼠饲喂至子一代出生后 3 周断乳为止;子一代断乳后持续饲喂,到子代性成熟为止。

1.2.3 观察及检测指标

1.2.3.1 交配前及交配期动物喂养及观察指标

大鼠自由进食、饮水,每周称体重及饲料用量。从试验第 8 周起连续查亲代雌鼠阴道涂片 3 周,评价其动情周期。第 12 周起以雌雄 2:1 的方式同组内合笼,次日早查阴道涂片,查到精子的当天记为受孕 0d(GD 0)示受孕成功,未受孕成功的雌鼠次日再次合笼。3 周交配结束后,放弃未怀孕雌鼠。

1.2.3.2 宫内暴露至仔鼠性成熟期观察指标

记录亲代受孕雌鼠 GD 0、7、14、21 天体重,评估亲代雌鼠是否受孕成功及孕期母鼠和仔鼠发育是否正常。仔鼠出生当日,记录每窝活产数、出生体重、出生身长;出生第 4 天,记录 4 日生存率、仔鼠体重和性别比,并按照 GB 15193.15—2003 繁殖试验要求,调整每窝仔鼠至 8 只(雌、雄各 4 只),不足 8 只的窝被剔除;记录仔鼠出生 7、14、28、35 日体重,母鼠哺乳期 0、7、14、21 日体重;从子代出生第 25 日开始记录各组子代雌鼠阴道开口时间和雄鼠包皮分离时间,并于子代出生第 35 日测仔鼠肛门生殖孔间距。

1.2.3.3 亲代雄鼠生殖相关指标

亲代母鼠受孕完成后,处死同组雄鼠,取血液、肝脏、胸腺、睾丸、附睾、储精囊等脏器,称重后冻存于 -80°C 。采用放射性免疫吸附法,用 DFM-96 型放射免疫 γ 计数器测定血清中睾酮(T)、促黄体生成素(LH)、促卵泡激素(FSH)的含量。分离左侧附睾,称重后立即置于 1 ml 含有 1% 小牛血清的 f12 培养液(37°C 预热)中,剪碎后吹打 30 次,静置吸上清 10 μl ,用 WLZY-9000 彩色精子质量检测系统检测精子总数、密度及精子活性率。

1.2.3.4 亲代雌鼠生殖相关指标:

子代 3 周断乳后,处死亲代母鼠,取血液、肝脏、胸腺、子宫、卵巢,称重后冻存于 -80°C 。放射性免疫吸附法测定血清中睾酮(T)、促黄体生成素(LH)、促卵泡激素(FSH)、催乳素(PRL)、孕酮(P)、雌二醇(E_2)的含量。

1.3 统计学检验

各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,均数比较采用两独立样本 t 检验的统计方法,应用 SPSS 13.0 软件对结果进行分析,设定检验的显著性水平为 0.05(双侧)。

2 结果

2.1 亲代大鼠行为学观察

牛初乳组和对照组亲代雌、雄鼠在生长阶段和

雌鼠怀孕、分娩、哺乳阶段均未发现外观和行为异常。

2.2 牛初乳对亲代生殖能力的影响

2.2.1 对亲代体重的影响

牛初乳组亲代雄鼠从干预第 7 周开始体重增重大于对照组($P < 0.05$);在雌鼠发育期、孕期、哺乳期两组体重差异均无统计学意义,见表 1。

表 1 牛初乳对亲代大鼠体重的影响

Table 1 The influence to weight of parental generation by bovine colostrums ($\bar{x} \pm s$, g)

饲养时间 (周)	对照组体重		牛初乳组体重	
	雄	雌	雄	雌
1	157.64 ± 3.12	147.24 ± 2.56	158.74 ± 2.89	144.51 ± 2.35
2	215.69 ± 3.36	185.40 ± 2.89	219.61 ± 4.25	184.14 ± 3.37
3	269.81 ± 3.46	211.09 ± 3.78	281.70 ± 4.25 ^a	207.16 ± 4.70
4	349.72 ± 4.45	234.47 ± 3.89	356.11 ± 5.75	234.24 ± 5.04
5	401.72 ± 4.97	251.51 ± 5.02	418.28 ± 7.99	250.45 ± 5.51
6	435.90 ± 5.83	266.09 ± 6.15	455.20 ± 9.99	261.33 ± 6.46
7	468.36 ± 7.04	277.62 ± 6.19	499.50 ± 10.48 ^a	277.56 ± 8.08
8	515.00 ± 11.89	288.31 ± 6.66	530.08 ± 11.04 ^a	283.25 ± 7.22
9	524.27 ± 6.96	293.05 ± 7.02	558.66 ± 12.09 ^a	292.76 ± 7.09
10	540.47 ± 6.95	302.43 ± 6.95	583.88 ± 13.46 ^a	300.25 ± 7.90
11	543.76 ± 7.68	321.64 ± 6.69	597.80 ± 14.90 ^a	313.86 ± 7.91

注:a 与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2.2 对体重增加和食物利用率的影响

与对照组比较,牛初乳组雄鼠的摄食量降低、体重增加值升高,食物利用率提高,差异有统计学

意义($P < 0.05$);牛初乳组雌鼠进食量降低($P < 0.05$),体重差异未见统计学意义,食物利用率升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

表 2 牛初乳对亲代食物利用率的影响

Table 2 The influence to food utilization of parental generation by bovine colostrums ($\bar{x} \pm s$)

组别		体重增重(g)	进食量(g)	食物利用(%)
对照组	雄($n=10$)	386.12 ± 6.86	1854.76 ± 19.99	20.82 ± 0.32
	雌($n=10$)	174.40 ± 5.82	1605.68 ± 19.56	10.87 ± 0.38
牛初乳组	雄($n=9^b$)	439.06 ± 14.22 ^a	1743.81 ± 34.50 ^a	25.23 ± 0.90 ^a
	雌($n=10$)	169.35 ± 7.48	1271.11 ± 24.11 ^a	13.38 ± 0.66 ^a

注:a 与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);b 牛初乳组亲代雄鼠试验第 3 周死亡 1 只,为同组动物咬伤死亡,解剖后未发现脏器异常。

2.2.3 对亲代生殖指标及生殖器官的影响

与对照组比较,牛初乳组亲代的动情周期、繁殖力指数、怀孕指数、孕周、每窝活产数、子代性别比、出生体重、出生身长、4 日成活率差异均无统计

学意义。但牛初乳组有 1 只雌鼠仅生了 2 只仔鼠,且出生后 1 只仔鼠死亡,可能系母鼠意外伤害致死,对该死亡仔鼠进行解剖未发现脏器异常,见表 3。

表 3 亲代生殖指标

Table 3 The reproductive index of parental generation ($\bar{x} \pm s$)

组别	动情周期 (d)	繁殖指数 (%) ^a	怀孕指数 (%) ^b	活产率 (%) ^c	孕期 (d)	每窝活产数 (只)	子代性别比 ^d	出生体重 (g)	出生身长 (cm)	4 日生存率 (%) ^e
对照组 ($n=10$)	4.28 ± 0.18	100%	90%	99.3	21.60 ± 0.16	14.10 ± 0.86	1.00 ± 0.31	6.53 ± 0.06	4.73 ± 0.03	95.71
牛初乳组 ($n=10$)	4.46 ± 0.20	100%	100%	98.1	21.40 ± 0.16	12.90 ± 1.32	1.19 ± 0.20	6.69 ± 0.07	4.80 ± 0.03	99.23

注:a 繁殖指数 = 怀孕的雌鼠数目/合笼的雌鼠数目 × 100; b 怀孕指数 = 正常分娩的雌鼠数目/怀孕的雌鼠数目 × 100; c 活产率 = 每窝活产数/该窝产仔数 × 100; d 子代性别比 = 子代雄性只数/子代雌性只数; e 4 日生存率 = 每窝 4 日仔鼠存活数/该窝活产数 × 100; n 各组母鼠只数。

亲代雄鼠肝脏和胸腺的脏体比高于对照组 ($P < 0.05$),左侧储精囊脏体比小于对照组 ($P < 0.05$),见表4。亲代雌鼠各脏器的脏体比与对照组比较差异均无统计学意义,见表5。

表4 亲代雄鼠脏器体重比值结果
Table 4 The ratio between organ and weight of male from parental generation(g/1 000 g, $\bar{x} \pm s$)

组别	肝脏/体	胸腺/体	左侧睾丸/体	右侧睾丸/体	左侧附睾/体	右侧附睾/体	左侧储精囊/体	右侧储精囊/体
对照组($n=10$)	27.22±0.84	0.13±0.02	2.93±0.01	2.89±0.09	0.61±0.04	0.58±0.03	0.55±0.03	0.50±0.03
牛初乳组($n=9^a$)	27.89±0.46 ^b	0.25±0.03 ^b	2.91±0.11	2.78±0.17	0.56±0.03	0.54±0.02	0.45±0.03 ^b	0.45±0.02

注:a 牛初乳组亲代1只雄鼠试验第3周死亡,解剖后未发现异常;b 与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表5 亲代雌鼠脏器体重比值结果
Table 5 The ratio between organ and weight of female from parental generation

组别	肝脏/体	胸腺/体	左侧卵巢/体	右侧卵巢/体	子宫/体
对照组($n=10$)	28.80±1.10	0.74±0.10	0.31±0.02	0.31±0.03	1.87±0.14
牛初乳组($n=10$)	27.61±1.10	0.81±0.02	0.27±0.02	0.29±0.02	1.93±0.19

2.2.4 对亲代雄鼠精子的影响 较,差异有统计学意义($P < 0.05$),但精子密度和活性率两组之间差异没有统计学意义,见表6。

牛初乳组雄鼠精子总数显著增加,与对照组比

表6 亲代雄鼠精子数量和质量结果
Table 6 The quality and quantity of sperm of parental generation($\bar{x} \pm s$)

指标	精子总数	精子密度(百万/ml)	精子活性率
对照组($n=10$)	105.00±10.68	8.96±0.93	15.78±2.62
牛初乳组($n=9^a$)	141.44±11.18 ^b	9.94±0.85	16.14±1.49

注:a 试验组有1只雄鼠在第3周死亡,解剖后未发现异常;b 与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2.5 对亲代激素水平的影响 代雌鼠血液中HL、PRL、P显著低于对照组($P < 0.05$),见表7、8。

牛初乳组雄鼠血液中HL显著低于对照组;亲

表7 亲代雄鼠血液中激素水平结果
Table 7 The level of hormone of male from parental generation

组别	LH(mIU/ml)	FSH(mIU/ml)	T(ng/ml)
对照组($n=10$)	0.72±0.08	0.26±0.05	0.14±0.06
牛初乳组($n=9^a$)	0.46±0.10 ^b	0.18±0.07	0.26±0.09

注:a 牛初乳组有1只雄鼠在第3周死亡,解剖后未发现异常;b 两组之间比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表8 亲代雌鼠血液中激素水平结果
Table 8 The level of hormone of female from parental generation($\bar{x} \pm s$)

	LH(mIU/ml)	FSH(mIU/ml)	PRL(ng/ml)	P(ng/ml)	E2(pg/ml)
对照组($n=10$)	0.29±0.05	0.22±0.03	0.77±0.14	112.70±20.29	7.38±2.07
牛初乳组($n=10$)	0.13±0.03 ^a	0.21±0.04	0.27±0.10 ^a	41.92±7.95 ^a	11.37±2.33

注:a 两组之间比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 对仔鼠发育能力的影响 分开时间、阴道开口时间差异均无统计学意义,见表9。

两组仔鼠的肛门生殖孔间距与体重的比、包皮

表9 子代体重及发育指标
Table 9 The weight of F1 and The Index of development($\bar{x} \pm s$)

组别	雄AGD/体(mm/kg) ^a	雌AGD/体(mm/kg) ^b	包皮分开时间(d)	阴道开口时间(d)
对照组($n=80$)	19.99±1.95	10.63±0.60	34.50±1.07	32.90±0.94
牛初乳组($n=80$)	20.52±1.31	10.19±0.36	33.89±1.16	31.56±0.44

注:a 雄AGD/体=雄性仔鼠出生第35天测得的肛门生殖孔间距/当日该鼠体重;b 雌AGD/体=雌性仔鼠出生第35天测得的肛门生殖孔间距/当日该体重。

3 讨论

本研究并未发现牛初乳对亲代的生殖和子代的发育能力有显著影响。但发现牛初乳组雌、雄鼠促黄体生成素降低现象。促黄体生成素由垂体产生,能刺激男性睾丸间质细胞分泌雄性激素,刺激女性卵巢分泌雌性激素,还对这些性激素有负反馈作用。本研究虽然没有发现雌二醇和睾酮在两组间存在差异,但牛初乳组均值略高于对照组。怀疑亲代雌雄鼠血液中 LH 降低可能是血液中性激素负反馈调节所致。

催乳素能促进乳汁分泌,也可刺激黄体分泌孕酮,而孕酮对维持妊娠非常必要。乳汁中催乳素可进入子代循环系统,调节免疫功能发育,对子代的免疫系统至关重要^[10]。Huang 等^[11]报道,孕酮与受体结合后可直接刺激 PRL mRNA 的表达。刘疆等^[12]发现,生理剂量的雌二醇对 PRL 的分泌无明显影响,但高浓度的雌二醇有抑制孕酮的促蜕膜化效应。本试验中,牛初乳组雌鼠催乳素和孕酮降低,可能与该机制有关。

本研究中牛初乳组有一只雌鼠仅生产了 2 只仔鼠,且有 1 只出生后即死亡,这一现象的发生是由于偶然因素造成还是与长期大量食用牛初乳有关尚不能明确。这可能与试验设计时孕鼠的数量不足或无不同剂量组有关,导致结果观察不够充分,因此会在接下来的试验中增加 1 000 mg/kg BW 剂量组,以判断是否采用限量试验,并将各组孕鼠数增至 20 只,以便说明。但从子代发育指标阴道开口时间、包皮分离时间和肛门生殖孔间距结果来看,可以认为牛初乳对于子代发育没有显著影响,并没有表现出性早熟或推迟的现象。

本研究未发现牛初乳对亲代的繁殖能力和子代的发育状况有显著影响,但是亲代血液中激素水

平的变化提示,有必要进一步试验去观察子一代的繁殖能力和子二代的发育是否会受到影响,以便进一步评价牛初乳的生殖发育安全性。

志谢:蒙牛集团提供研究经费,研发负责人生庆海博士参与课题设计。哈尔滨康普公司提供试验用牛初乳,在此一并感谢!

参考文献

- [1] 王洋,生庆海,张玉梅,等. 比较中国北方人初乳、牛初乳、牛常乳、牛血液中胰岛素样生长因子-1 和神经因子的含量[J]. 中国食品卫生杂志,2011, 23(4):82-85.
- [2] 崔立雪,韩秀娥,刘宁. 牛初乳的生物活性物质及其应用[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2010, 22:17-18.
- [3] 罗元绮. 产后缺乳的发病机理与证治规律研究[D]. 南京:南京中医药大学,2008.
- [4] 荆文清,陆东林. 关于牛初乳中的激素问题[J]. 新疆畜牧业, 2010,(2): 7-9.
- [5] 徐丽,张玉梅,张英华,等. 牛初乳中可的松和氢化可的松质量分数变化[J]. 中国乳品工业,2009,11:18-20.
- [6] 亢建志,迪丽努尔·沙来,穆冰. 牛初乳粉的毒性研究[J]. 地方病通报, 2007,22(6):41-42.
- [7] 林健,黄宗锈,陈润,等. 牛初乳粉大鼠长期毒性研究[J]. 实用预防医学,2005,12(6):1451-1453.
- [8] DAVIS P F, GREENHILL N S, ROWAN A M, et al. The Safety of New Zealand Bovine Colostrum: Nutritional and Physiological Evaluation in Rats [J]. Food Chem Toxicol,2007,45:229-236.
- [9] GANMAA D, Qin Liqiang, Wang Peiyu, et al. A two-generation reproduction study to assess the effects of cows' milk on reproductive development in male and female rats [J]. Fertil Steril, 2004, 3(82): 1106-1114.
- [10] 汪玉松,邹思湘. 乳生物化学[M]. 长春:吉林大学出版社,1995.
- [11] HUANG J R, TSENG L, BISCHOF P, et al. Regulation of prolactin production by progesterin, estrogen and relaxin in human endometrial cells [J]. Endocrinology, 1987, 121:2011-2017.
- [12] 刘疆,刘瑞华,焦丽红,等. 人早孕子宫蜕膜催乳素分泌的调节[J]. 生理学报,2000,52(4):329-332.