

家蚕表达重组人乳铁蛋白及产物对 溃疡性结肠炎的治疗作用

赵红玉¹, 张耀洲^{1,2,3}, 于威¹, 舒特俊¹, 陈剑清¹

(1. 浙江理工大学生命科学学院, 杭州 310018; 2. 天津国际生物医药联合研究院, 天津 300457;
3. 天津大学药物科学与技术学院, 天津 300072)

摘要: 乳铁蛋白(LF)在抗炎和参与机体免疫调节方面具有重要作用。利用家蚕杆状病毒表达系统构建含人乳铁蛋白(*hLF*)基因的重组病毒 Bm-hLF, 接种蚕蛹表达重组人乳铁蛋白(rhLF), ELISA 法检测 rhLF 的表达量, 体外抑菌试验检测其抑菌活性, 并建立小鼠溃疡性结肠炎(UC)模型, 探究口服 rhLF 蚕蛹粉对 UC 的治疗效果。结果表明: rhLF 在蚕蛹感染重组病毒 120 h 后表达量最高达 0.38 mg/mL 蚕蛹匀浆上清液; rhLF 蚕蛹粉能抑制 *E. coli* TG1 的生长; 口服 rhLF 蚕蛹粉可明显降低 UC 小鼠的疾病活动指数(DAI)、髓过氧化物酶(MPO)含量, 减轻结肠组织炎症损伤, 为今后开发一种新型、廉价的 UC 口服药物提供药理学实验参考。

关键词: 重组人乳铁蛋白; 蚕蛹; 抑菌活性; 口服; 溃疡性结肠炎

中图分类号: R574.62 **文献标志码:** A

0 引言

乳铁蛋白(lactoferrin, LF)主要存在于哺乳动物乳汁中, 是转铁蛋白家族中的一种分泌型铁结合糖蛋白^[1]。LF 由一条多肽链组成, 其中人乳铁蛋白(*hLF*)基因的 cDNA 为 2 136 bp, 成熟蛋白质分子量约 80 kD^[2]。LF 除具有超强的铁结合能力外, 还具有抑菌、抗病毒、抗肿瘤、抗炎和参与机体免疫调节等多种生物学功能^[3], 因而成为在许多疾病治疗方面备受瞩目的潜在药物开发对象。研究发现, 在正常生理状态下血液中 LF 水平很低, 而当机体受到感染时, 血液中 LF 显著增加^[4], 表明 LF 在机体免疫反应中起重要作用。Togawa 等^[5]报道, 口服牛乳铁蛋白可以通过调节免疫系统和细胞因子的平衡来治疗由 2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS)诱导的大鼠结肠炎。在葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导的大鼠结肠炎模型中也证实了这一点, 给予牛乳铁蛋白后, 大鼠

的活动情况和结肠炎症损伤得到明显改善, 且通过对结肠细菌总数的检测发现, 口服牛乳铁蛋白后结肠细菌总数没有明显变化, 说明 LF 的抑菌活性并不是其发挥抗炎作用的主要原因^[6]。由此认为, LF 有可能作为一种天然免疫调节剂用于炎症性肠病的治疗。

天然的 LF 含量低, 提取、纯化工艺复杂, 成本高, 为解决这些问题, 许多学者利用基因重组技术在牛^[7]、曲霉^[8]、sf-9 昆虫细胞^[9]、烟草^[10]和家蚕 BmN 细胞^[11]、幼虫^[12]等多种表达系统中成功表达了重组乳铁蛋白, 但表达量仍然较低, 且纯化过程繁琐。基于蚕蛹来源广, 无需喂养且安全、可食的优势, 利用蚕蛹作为生物反应器表达重组人乳铁蛋白(rhLF), 表达产物不经纯化, 蚕蛹匀浆简单分离后可直接以冻干粉口服给药, 节省时间, 降低成本。此外, 利用蚕蛹表达的重组蛋白可以进行较完善的翻译后修饰, 具有与天然蛋白相似的生物学活性^[13]。已有报道利用蚕蛹表达合成的人表皮生长因子具有修复胃粘膜

收稿日期: 2014-01-03

基金项目: 国家高技术发展计划“863”项目(2011AA100603), 浙江省自然科学基金面上项目(207217)

作者简介: 赵红玉(1988—), 女, 河北新乐人, 硕士研究生, 研究方向为生物工程制药。

通信作者: 陈剑清, E-mail: cjqqj@126.com

损伤的作用^[14],口服含人生长激素的蚕蛹冻干粉能促进大鼠的体重增长^[15],推测蚕蛹中表达的重组蛋白口服后可以部分进入血液并仍具有一定的生物学活性,为利用蚕蛹表达功能蛋白进行药物的开发提供了可能性。有鉴于此,本试验在蚕蛹中表达 rhLF,蚕蛹经匀浆后冻干制备 rhLF 蚕蛹粉,通过体外抑菌试验进行生物学活性检测,并首次探究 rhLF 蚕蛹粉对 DSS 诱导的小鼠急性溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)的口服治疗效果,为今后开发一种新型、廉价的治疗 UC 的口服药物提供药效学实验参考。

1 试验

1.1 实验材料

重组质粒 pBacPAK₈-hLF、转移载体 pFastBac 1、家蚕 BmN 细胞、*E. coli* TG1 菌株、*E. coli* DH10Bac 菌株、家蚕野生杆状病毒由本实验室保存。*Xho* I、*Kpn* I、连接酶购自 Fermentas 公司,DNA 回收试剂盒购自 TransGen Biotech 公司,脂质体转染试剂 CellfectinII Reagent、胎牛血清、sf-900II SFM(1×)无血清培养基购自 Invitrogen 公司,病毒基因组抽提试剂盒购自上海生工生物公司,hLF 标准品、兔抗 hLF 抗体购自 SIGMA 公司,酶标羊抗兔 IgG(HRP)购自天津三箭生物技术有限公司。春蕾×锡方蚕品种购自浙江中奇生物药业股份有限公司。

BALB/c 小鼠购自天津市奥易得实验用品有限公司;葡聚糖硫酸钠(DSS)购自东京化成工业株式会社,相对分子质量约为 25 000;柳氮磺胺吡啶片(SASP)购自上海中西三维药业有限公司;髓过氧化物酶(MPO)ELISA 检测试剂盒购自 USCN 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 hLF 基因的获取

根据 NCBI 上提供的 hLF (基因登录号:AY875691.1)的基因序列设计一对引物:

hLF F: 5'-GCGCTCGAGATGAACTTGTC TTCC-3';

hLF R: 5'-CGCGGTACCTTACTTCCTGAG GAATTC-3'。

引物 hLF F 和 hLF R 的 5'端分别引入 *Xho* I、*Kpn* I 酶切位点,以重组质粒 pBacPAK₈-hLF DNA 为模版,进行 PCR 扩增目的基因。引物由北京六合华大基因科技股份有限公司合成。

1.2.2 重组病毒 Bm-hLF 的获得与鉴定

将 pFastBac 1 载体用 *Xho* I 和 *Kpn* I 进行双酶切,与 hLF 目的基因连接,构建重组转移质粒 pFastBac1-

hLF。pFastBac1-hLF 转化 *E. coli* DH10Bac 感受态细胞,蓝白斑筛选挑取白色菌落,抽提重组质粒 Bacmid-hLF,脂质体介导其转染家蚕 BmN 细胞,收集发病细胞,抽提重组病毒基因组,PCR 鉴定。将鉴定成功的重组病毒命名为 Bm-hLF,经 BmN 细胞扩增后备用。

1.2.3 ELISA 法检测不同时间 rhLF 在家蚕蛹中的相对表达量

以 10^6 PFU 重组病毒 Bm-hLF 穿刺接种家蚕蛹,26~28℃培养,分别在接种后第 72、96、120、144 h 随机抽取 20 头蚕蛹,液氮研磨,4℃,15 000 r/min 离心 30 min,去除油脂层,重复离心 2 次,收集上清,简称为蚕蛹匀浆上清液。采用间接 ELISA 法检测 rhLF 蚕蛹匀浆上清液中 rhLF 的相对表达量,以接种野生病毒的蚕蛹匀浆上清为阴性对照,PBS 为空白对照。

1.2.4 蚕蛹粉的制备及表达产物 rhLF 的检测

收集感染野生病毒和重组病毒 Bm-hLF 120 h 后的蚕蛹,低温匀浆后冻干成蚕蛹粉,感染重组病毒 Bm-hLF 的蚕蛹粉简称为 rhLF 蚕蛹粉。称取蚕蛹粉 5 g,溶于 20 mL PBS 中,4℃,15 000 r/min 离心 30 min,去油脂层,重复离心 2 次,收集上清于 -20℃ 保存。取上清进行 10% SDS-PAGE 和 Western blotting 检测,以兔抗 hLF 抗体为一抗,酶标羊抗兔 IgG(HRP)为二抗。

1.2.5 体外抑菌活性检测

将 *E. coli* TG1 接种于 LB 培养基中,37℃摇瓶培养 4~8 h,至菌液浓度为 $10^5 \sim 10^6$ CFU/mL。取灭菌 EP 管加入 200 μ L 新鲜 LB 培养基,2 μ L 菌液和 20 μ L rhLF 蚕蛹粉上清液(过 0.22 μ m 滤膜除菌),37℃摇床培养,每隔 2 h(至第 10 h)取出相应的菌液,12 000 r/min 离心 10 min,沉淀用 PBS 洗涤以消除蚕蛹粉的颜色干扰,最后以 220 μ L PBS 重悬,测 OD_{600} ,每组 3 个重复,绘制生长曲线。以接种野生病毒蚕蛹粉和正常蚕蛹粉的上清为阴性对照,PBS 为空白对照。

1.2.6 动物实验

选取 BALB/c 小鼠(5 周龄,(20±2) g),雌雄各半,于动物房饲养 1 周。随机分为柳氮磺胺吡啶(SASP)组、rhLF 蚕蛹粉组、正常蚕蛹粉阴性组、模型组和正常组,每组 10 只。除正常组外,其余各组小鼠自由饮用 5% DSS 溶液 1 周,建立急性 UC 模型^[16]。1 周后灌胃给药,SASP 组参考相关文献^[17]给予 SASP 520 mg·kg⁻¹·d⁻¹,rhLF 蚕蛹粉组和阴性组分别给予 5 g·kg⁻¹·d⁻¹的 rhLF 蚕蛹粉和

正常蚕蛹粉,0.2 mL/10 g,以蒸馏水溶解。每日称量小鼠体重,观察大便性状、隐血和便血情况,参照 Cooper HS 评分系统^[18],按表 1 对小鼠进行疾病活动指数(disease activity index, DAI)评分,以评估结肠组织的炎症程度。其中,DAI 的计算公式为:DAI=(体重下降分数+大便性状分数+便血分数)/3。

表 1 DAI 评分标准

记分	体重下降%	大便性状	隐血/肉眼血便
0	无	正常	阴性
1	1~5	—	—
2	6~10	半稀便	隐血
3	11~15	—	—
4	>15	稀便	肉眼血便

大便性状:正常即成形大便;半稀便即不粘附于肛门的糊状、半成形大便;稀便即可粘附于肛门的稀水样便。

髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)主要存在于中性粒细胞中,是被公认的评价炎症程度的一项重要指标^[19]。2 周后处死小鼠,取各组小鼠结肠组织,一部分液氮冻存,用于检测 MPO 的含量;另一部分固定于 10%中性福尔马林中,用于制作病理组织切片。

2 结果与讨论

2.1 *hLF* 基因的 PCR 鉴定

以重组质粒 pBacPAK8-*hLF* DNA 为模板,*hLF* F 和 *hLF* R 为引物进行 PCR。电泳检测 PCR 产物,在 2 000 bp 上方可见一条明显条带,与 *hLF* 基因大小一致(图 1),表明经 PCR 成功获取了 *hLF* 基因。

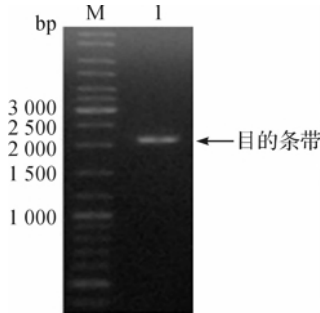


图 1 重组质粒 pBacPAK8-*hLF* 的 PCR 产物凝胶电泳
M:DNA Marker;1:PCR 产物

2.2 重组病毒 Bm-*hLF* 的鉴定

以重组病毒基因组为模板,分别以 M13 F 和 *hLF* R、M13 R 和 *hLF* F 为上下游引物进行 PCR 鉴定,结果显示两条特异性条带,与预期大小一致(图 2),说明重组病毒 Bm-*hLF* 构建成功。

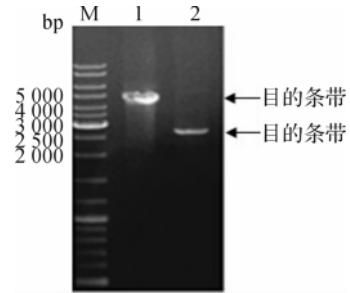


图 2 重组病毒 Bm-*hLF* 的 PCR 鉴定
M:DNA Marker;1:Bm-*hLF*/M13 F+*hLF* R;2:Bm-*hLF*/M13 R+*hLF* F

2.3 ELISA 检测 rhLF 在蚕蛹中的相对表达量

将蚕蛹研磨离心后的上清进行 ELISA 检测,结果表明蚕蛹在感染重组病毒 120 h 后 rhLF 的相对表达量达到最高,约为 0.38 mg/mL 蚕蛹匀浆上清液(图 3)。本实验利用感染重组病毒 120 h 后的蚕蛹经匀浆后冻干制成蚕蛹粉,进行后续试验。

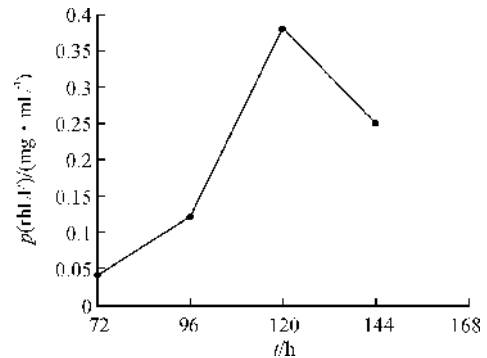


图 3 ELISA 法检测蚕蛹中 rhLF 的相对表达量
2.4 蚕蛹粉中 rhLF 的 SDS-PAGE 和 Western blotting 检测

感染重组病毒的蚕蛹粉进行 SDS-PAGE 和 Western blotting 检测,以 *hLF* 标准品为阳性对照,在 PVDF 膜上显示出一条与 *hLF* 标准品大小相近(约 80 kDa)的特异性条带,而感染野生病毒的蚕蛹粉中没有该条带(图 4b),表明在家蚕蛹中成功表达了 rhLF。

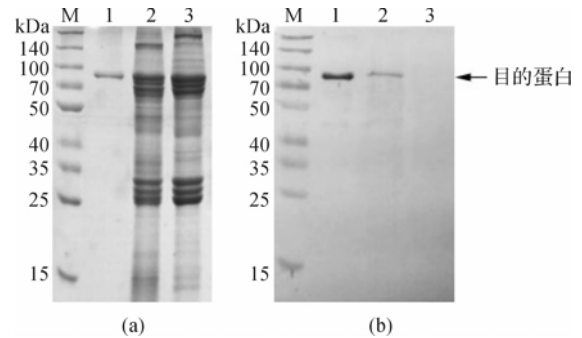


图 4 蚕蛹中 rhLF 的 SDS-PAGE(a)和 Western blotting(b)鉴定

M:蛋白 Marker;1:*hLF* 标准品;2:rhLF 蚕蛹粉上清;
3:感染野生病毒的蚕蛹粉上清

2.5 rhLF 蚕蛹粉体外活性检测

以 *E. coli* TG1 为对象,绘制生长曲线,图 5 显示 rhLF 蚕蛹粉组 *E. coli* TG1 的生长在前 6 h 急剧下降,感染野生病毒的蚕蛹粉和正常蚕蛹粉对 *E. coli* TG1 的生长没有影响,说明蚕蛹中表达的 rhLF 具有抑菌活性;但在 6 h 后生长曲线又开始上升,说明 rhLF 没有将 *E. coli* TG1 完全杀死,可能随着时间的延长 rhLF 的抑菌活性降低,导致未被杀死的 *E. coli* TG1 大量繁殖生长。

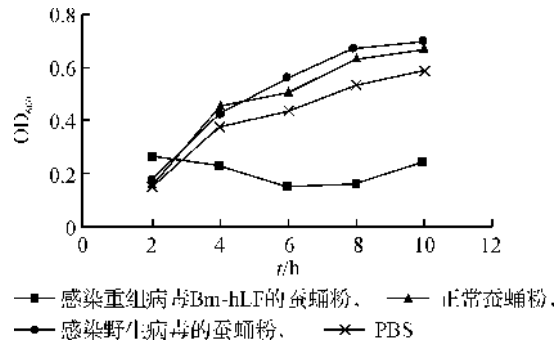


图 5 对 *E. coli* TG1 的抑菌作用比较

2.6 rhLF 蚕蛹粉对小鼠 UC 的治疗作用

5% DSS 造模 1 周后,小鼠体重明显下降,活动减少,出现稀便和肉眼血便,说明成功建立急性 UC 模型,然后灌胃小鼠不同药物治疗 1 周。表 2 为各组小鼠 DAI 分析结果,与正常组相比模型组和阴性组分数显著升高($P<0.01$),SASP 组和 rhLF 蚕蛹粉组较模型组都显著下降($P<0.01$),但二者之间没有显著差异($P>0.05$),说明 rhLF 蚕蛹粉能够改善小鼠 UC 症状。

表 2 DAI 分析结果($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	正常组	模型组	阴性组	SASP 组	rhLF 蚕蛹粉组
DAI	0	3.37±0.16▲▲	3.10±0.15▲▲	0.90±0.15**	1.15±0.16**

注:▲▲:与正常组比较 $P<0.01$; **:与模型组比较 $P<0.01$

ELISA 检测小鼠结肠组织中 MPO 的含量,结果见图 6,模型组和阴性组的 MPO 含量较正常组明显升高($P<0.01$),治疗后 SASP 组和 rhLF 蚕蛹粉组较模型组显著下降($P<0.01$),二者差异不显著($P>0.05$),说明 rhLF 蚕蛹粉能降低 UC 小鼠结肠组织中 MPO 含量。

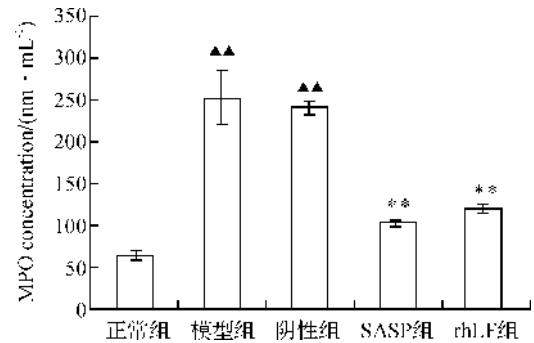


图 6 结肠组织中 MPO 的含量($n=10$)

正常组:未经 5% DSS 诱导;模型组:5% DSS 诱导 1 周,饮用蒸馏水 1 周;阴性组:5% DSS 诱导 1 周,灌胃正常蚕蛹粉溶液治疗 1 周;SASP 组:5% DSS 诱导 1 周,灌胃 SASP 溶液治疗 1 周;rhLF 组:5% DSS 诱导 1 周,灌胃 rhLF 蚕蛹粉溶液治疗 1 周

图 7 为小鼠的结肠病理组织切片,结果显示:正常小鼠的结肠腺体排列整齐,黏膜连续、完整,隐窝正常,无炎性细胞浸润(见图 7A);模型组小鼠的结肠黏膜上皮严重破坏,隐窝和杯状细胞基本消失,黏膜下层严重水肿,全层炎性细胞浸润(见图 7B);阴性组腺体破坏,结构紊乱,肠腔内可见大量炎性细胞渗出物(见图 7C);SASP 组和 rhLF 蚕蛹粉组腺体有不程度的恢复,上皮较完整,与模型组相比未见明显的炎性细胞浸润(见图 7D 和 7E)。总体来看,结肠病理组织切片结果与 DAI 和 MPO 检测结果相符。

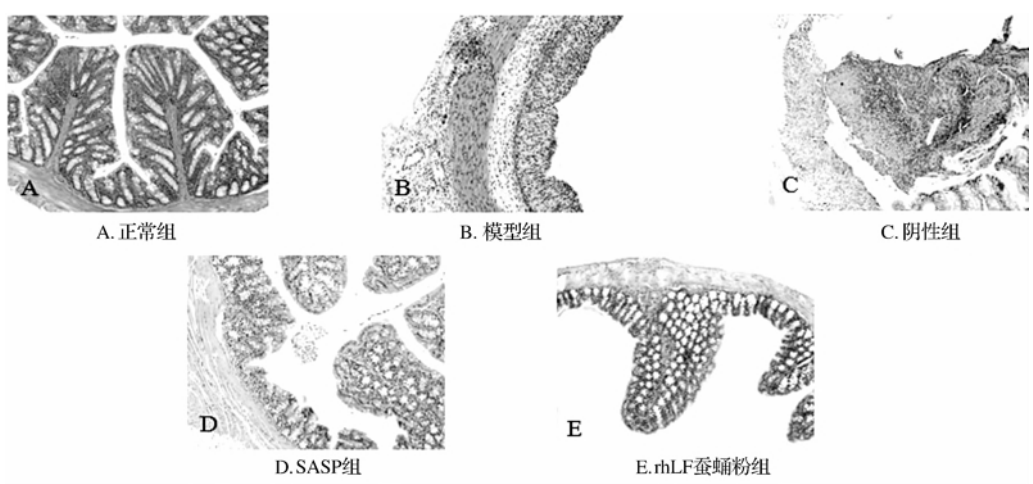


图 7 小鼠结肠病理组织切片(HE×10)

3 结 论

利用家蚕杆状病毒表达系统构建重组病毒 Bm-hLF,以蚕蛹作为生物反应器表达 rhLF,并在蚕蛹感染重组病毒 120 h 后达到最大表达量,约为 0.38 mg/mL 蚕蛹匀浆上清液。将感染重组病毒 120 h 后的蚕蛹经匀浆后冻干成蚕蛹粉,体外抑菌试验表明 rhLF 蚕蛹粉对 *E. coli* TG1 具有抑制作用。采用 DSS 诱导法建立小鼠急性 UC 模型,口服 rhLF 蚕蛹粉给予治疗发现,小鼠 UC 症状得到明显改善,结肠组织中 MPO 含量显著下降,结肠炎症损伤减轻,说明 rhLF 蚕蛹粉对 DSS 诱导的小鼠溃疡性结肠炎有一定的治疗作用。

参考文献:

- [1] González-Chávez S A, Arévalo-Gallegos S, Rascón-Cruz Q. Lactoferrin: structure, function and applications[J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2009, 33(4): 301-308.
- [2] Liu T, ZHANG Y Z, WU X F. Recombinant functional human lactoferrin expressed in baculovirus system[J]. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 2006, 38(3): 201-206.
- [3] García-Montoya I, Salazar-Martínez J, Arévalo-Gallegos S, et al. Expression and characterization of recombinant bovine lactoferrin in *E. coli*[J]. Bio Metals, 2013, 26(1): 113-122.
- [4] Lönnnerdal B, Iyer S. Lactoferrin: molecular structure and biological function[J]. Annual Review of Nutrition, 1995, 15(1): 93-110.
- [5] Togawa J I, Nagase H, Tanaka K, et al. Lactoferrin reduces colitis in rats via modulation of the immune system and correction of cytokine imbalance[J]. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology, 2002, 283(1): 187-195.
- [6] Togawa J U N I, Nagase H, Tanaka K, et al. Oral administration of lactoferrin reduces colitis in rats via modulation of the immune system and correction of cytokine imbalance[J]. Journal of Gastroenterology and Hepatology, 2002, 17(12): 1291-1298.
- [7] Krimpenfort P. The production of human lactoferrin in the milk of transgenic animals[J]. Cancer Detection and Prevention, 1993, 17(2): 301.
- [8] Ward P P, Piddington C S, Cunningham G A, et al. A system for production of commercial quantities of human lactoferrin: a broad spectrum natural antibiotic[J]. Nature Biotechnology, 1995, 13(5): 498-503.
- [9] Salmon V, Legrand D, Georges B, et al. Characterization of human lactoferrin produced in the baculovirus expression system[J]. Protein Expression and Purification, 1997, 9(2): 203-210.
- [10] Salmon V, Legrand D, Slomianny M C, et al. Production of human lactoferrin in transgenic tobacco plants[J]. Protein Expression and Purification, 1998, 13(1): 127-135.
- [11] 刘 涛, 张耀洲, 吴祥甫. 人乳铁蛋白 cDNA 的克隆及在家蚕细胞中的表达[J]. 蚕业科学, 2005, 31(3): 280-285.
- [12] Liu T, Zhang Y Z, Wu X F. High level expression of functionally active human lactoferrin in silkworm larvae[J]. Journal of Biotechnology, 2005, 118(3): 246-256.
- [13] Miller L K. Baculoviruses as gene expression vectors[J]. Annual Reviews in Microbiology, 1988, 42(1): 177-199.
- [14] 薛仁宇, 曹广力, 陈 森, 等. 利用家蚕表达合成表皮生长因子(EGF)及产物对胃粘膜损伤的修复作用[J]. 蚕业科学, 2007, 33(1): 67-73.
- [15] Lan H, Nie Z, Liu Y, et al. In Vivo Bioassay of recombinant human growth hormone synthesized in *B. mori* pupae[J/OL]. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2010, 2010. <http://wenku.baidu.com/link?url>.
- [16] Yoon S W, Lee C H, Kim J Y, et al. Lactobacillus casei secreting alpha-MSH induces the therapeutic effect on DSS-induced acute colitis in Balb/c Mice[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008, 18(12): 1975-1983.
- [17] 王晓娟. 苦豆子总碱治疗葡聚糖硫酸钠致急性期溃疡性结肠炎小鼠作用机制研究[D]. 南京: 南方医科大学, 2010.
- [18] Cooper H S, Murthy S N, Shah R S, et al. Clinico-pathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis[J]. Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology, 1993, 69(2): 238-249.
- [19] Schicho R, Storr M. Topical and systemic cannabidiol improves trinitrobenzene sulfonic acid colitis in mice[J]. Pharmacology, 2012, 89(3-4): 149-155.

(下转第 727 页)

Expression Features and Molecular Properties of Diapause-associated Protein Gene *dap2* of *Antheraea Pernyi*

YANG Xiao-li^{1,2}, BI Zhen-le^{1,2}, SHU Te-jun^{1,2}, CHEN Jian-qing^{1,2}, ZHANG Yao-zhou^{1,2}, CHEN Jian¹

- (1. Institute of Biochemistry, College of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China;
2. Tianjin International Joint Academy of Biotechnology & Medicine, Tianjin 300457, China)

Abstract: Diapause-associated protein (DAP) might play an important role in the diapause process of insects. The sequence of *Antheraea pernyi* diapause-associated protein 2, *dap2* is obtained from NCBI. Sequence analysis shows that the overall length of cDNA of this gene is 1187bp and that of ORF is 874bp and 278 amino acids are encoded. According to NCBI database amino acid sequence alignment, the homology of DAP2 with ommin-binding protein (OBP) of tobacco hornworm and silkworm respectively reaches 57% and 58%. The transcriptional expression level of *dap2* mRNA in different development stages of *antheraea pernyi* and different tissues of five-instar larvae is respectively tested with fluorescent quantitation PCR and western blotting method. The result shows that *dap2* has the highest transcriptional and expression level in diapause pupae. The analysis in different tissues of five-instar larvae shows that its transcriptional level is highest in fat body and hemolymph and its translational level is highest in hemolymph. Preliminary study is conducted on molecular characteristics of natural ApDAP2 protein after separation and purification. Absorption spectrum analysis cannot show that it carries pigment. Deglycosylation modification analysis shows that it is glycoprotein and dimensional electrophoresis shows that there might be posttranslational modification at three different degrees. It might be an ommin-binding protein (OBP) of *antheraea pernyi*.

Key words: *antheraea pernyi*; diapause-associated protein 2; ommin-binding protein; fluorescent quantitation PCR; western blotting method

(责任编辑: 许惠儿)

(上接第 720 页)

Therapeutic Effect of Recombinant Human Lactoferrin Expressed in Silkworm and Its Product on Ulcerative Colitis

ZHAO Hong-yu¹, ZHANG Yao-zhou^{1,2,3}, YU Wei¹, SHU Te-jun^{1*}, CHEN Jian-qing¹

- (1. School of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China;
2. Tianjin International Joint Academy of Biotechnology and Medicine, Tianjin 300457, China;
3. School of Pharmaceutical Science and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract: Lactoferrin (LF) plays an important role in anti-inflammation and participation in body immunity moderation. This paper constructs recombinant virus Bm-hLF containing human lactoferrin (hLF) through silkworm baculovirus expression system, inoculates silkworm chrysalis expression recombinant human lactoferrin (rhLF), tests the expression quantity of rhLF with ELISA method, detects its bacteriostatic activity through antibacterial experiment in vitro, establishes mouse ulcerative colitis (UC) model and explores the therapeutic effect of oral administration of rhLF silkworm chrysalis meal on UC. The result shows that the maximum expression quantity of rhLF can be 0.38 mg/mL silkworm chrysalis homogenate supernatant 120 h after silkworm chrysalis is infected with recombinant virus. rhLF silkworm chrysalis meal can inhibit the growth of *E. coli* TG1. Oral administration of rhLF silkworm chrysalis meal can greatly reduce the disease activity index (DAI) and myeloperoxidase (MPO) content of UC mice and reduce the damage of colon tissue inflammation. This study provides pharmacodynamic experimental reference for further development of a new and cheap UC oral drug.

Key words: recombinant human lactoferrin; silkworm pupa; antibacterial activity; oral administration; ulcerative colitis

(责任编辑: 许惠儿)