

文章编号: 1673-3851 (2014) 06-0728-06

家蚕表达人促红细胞生成素口服急性毒性和初步药效学研究

李杰^{1a,b}, 谭淑敏^{1a,b}, 王小飞^{1a,b}, 舒特俊^{1a,b}, 于威^{1a,b}, 张耀洲^{2,3}, 陈剑清^{1a,b}

(1. 浙江理工大学, a. 生物化学研究所; b. 浙江省家蚕生物反应器和生物医药重点实验室, 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 300457)

摘要: 为了研究家蚕表达的重组人促红细胞生成素(BmrhEPO)口服治疗肾性贫血的疗效并评价安全性,进行了小鼠口服BmrhEPO急性毒性实验,结果显示其对小鼠基本无毒或毒性极低,小鼠口服BmrhEPO最大耐受剂量大于147 882 IU/kg。肾性贫血小鼠以剂量为62 865 IU/kg和20 955 IU/kg的两个剂量组连续口服BmrhEPO一周,以小鼠血液网织红细胞数及百分率为药效指标,结果显示口服有药效,并且药效与剂量呈正相关。本实验为开发重组人促红细胞生成素口服药物提供了理论指导和实验基础。

关键词: 家蚕; EPO; 口服; 急性毒性; 肾性贫血

中图分类号: Q816 **文献标志码:** A

0 引言

人促红细胞生成素(human erythropoietin, hEPO)是一个分子量约为36 kDa的糖蛋白分子,糖基化程度大约能达其分子量的40%左右^[1-2]。胎儿发育阶段,hEPO主要是由肝脏产生的,随着发育的进行,hEPO主要由肾脏产生,其主要的生理学作用是促进红系祖细胞向红细胞的生长与分化^[3-4]。1985年,hEPO基因第一次被克隆^[5],从而开启了EPO的分子生物学研究的新篇章,而且重组人促红细胞生成素(rhEPO)作为治疗药剂开始服务于患各种贫血病的病人。由于基因重组技术的飞速发展,重组人促红细胞生成素(rhEPO)已经可以通过各种表达系统表达了^[6-8]。目前市售rhEPO主要由CHO细胞表达,临床上主要用于治疗肾性贫血症,近期也发现了rhEPO具有一些非造血功能,比如保护神经、大脑和心脏,修复创伤等^[9]。全世界越来越多的患者使用rhEPO或Aranesp有效地治疗了肾性贫

血。EPO也被用于治疗癌症患者化疗引起的贫血和艾滋病患者抗病毒治疗引起的严重贫血症。一些患骨质增生症引起的贫血症患者使用rhEPO也有疗效。一些医疗机构还使用rhEPO治疗因早产或外科手术引起的贫血症^[10]。rhEPO全球市场已达到约100亿欧元,在生物制药的全球市场中处于领导地位^[11]。与其它蛋白类药物一样,rhEPO在临床上主要是通过注射用药。然而,注射用药会引起患者的不适,并且也不方便,特别是慢性患者。因此一种替代的用药途径是患者迫切需要的,而口服给药由于安全方便而深受患者欢迎。

家蚕蛹生物反应器是一种高效、经济的昆虫表达系统,其表达的蛋白通过口服给药已经证明有药效,比如本实验室表达的人粒细胞巨噬细胞刺激因子(hGM-CSF)^[12]、人胰岛素(insulin)^[13]、人生长激素(hGH)^[14]等。本研究进行了小鼠口服家蚕蛹表达的rhEPO(BmrhEPO)急性毒性的实验和肾性贫血小鼠口服BmrhEPO的初步药效学实验。

收稿日期: 2014-01-14

基金项目: 国家高技术研究发展计划“863”项目(2011AA100603)

作者简介: 李杰(1988-),男,湖北谷城人,硕士研究生,研究方向为生物反应器与蛋白质组学。

通信作者: 陈剑清, E-mail: cjqqj@126.com

1 材料与方法

1.1 材料

BmrhEPO 蚕蛹粉为本实验室制备,主要是通过构建含有 *hEPO* 基因序列的重组家蚕杆状病毒,然后接种家蚕蛹(浙江中奇生物药业股份有限公司提供),蚕蛹发病后,匀浆 30 min, 4℃, 8 000 r/min 离心 30 min,放入冻干机中冻干 48 h,制成 BmrhEPO 蚕蛹粉;感染野生病毒 BmNPV 蚕蛹粉也为本实验室制备,对家蚕蛹接种野生病毒 BmNPV,蚕蛹发病后,按照相同的方法制成阴性对照蚕蛹粉。

rhEPO 注射液购于 Roche 公司;anti-*hEPO* 兔多克隆抗体和 anti-*hEPO* ELISA 试剂盒购于 R&D 公司;蛋白预染 Marker 购于 Thermo 公司;HRP 标记的羊抗兔 IgG 抗体购于康为世纪生物科技有限公司;过硫酸铵(AP)、SDS、Tris、Tween-20 和甘氨酸购于上海生工生物有限公司;丙烯酰胺、TEMED 和 N,N'-甲叉双丙烯酰胺均购于 Fisher Scientific 公司;DAB 购于 Bio Basic 公司;腺嘌呤购于 solarbio 公司;其他化学试剂均为国产分析纯。

昆明小鼠和 Balb/c 小鼠(编号为 SCXK-(军)2012-0004)及小鼠饲料均购于中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心。

蛋白质电泳和 Western Blotting 实验所用相关试剂的配制参照《蛋白质电泳实验技术》中相应的配方。

1.2 实验方法

1.2.1 BmrhEPO 蚕蛹粉蛋白样品的制备

分别称取质量为 1 g 的 BmrhEPO 蚕蛹粉和野生病毒感染的蚕蛹粉,分别溶于 5 mL ddH₂O 中,充分混匀,放入-80℃冰箱冷冻 15 min,37℃水浴 5 min,如此反复冻融 3 次,4℃,12 000 r/min,离心 10 min,吸取上清,分装成小管,保存于-80℃冰箱备用。

1.2.2 BmrhEPO 蚕蛹粉中 BmrhEPO 的 SDS-PAGE 和 Western Blotting 检测

分别取 100 μL 的上述 BmrhEPO 蚕蛹粉蛋白样品溶液和感染野生病毒的蚕蛹粉蛋白样品溶液(用作阴性对照)置于两个 EP 管中,再取相同体积的 rhEPO 注射液于另一个 EP 管中,分别向 3 个 EP 管中加入 25 μL 5×Loading Buffer,100℃,煮沸 10 min 制样,然后 4℃,12 000 r/min,离心 10 min。取上清点样,进行 12% SDS-PAGE 凝胶电泳,并用考马斯亮蓝溶液染色。

另一块电泳完的 SDS-PAGE 凝胶用于 Western Blotting 检测。将凝胶上分离过的蛋白质电转

移至 PVDF 膜上(80 V 恒压,120 min),取出 PVDF 膜浸入含有 5%脱脂奶粉的 TBS 溶液(pH 7.4)中 4℃封闭过夜,然后向封闭液中加入 anti-*hEPO* 兔多抗(稀释倍数为 1:5 000),放在摇床上 37℃孵育 2 h,取出 PVDF 膜,TBST 溶液清洗 3 次,每次 10 min,取出 PVDF 膜浸入含有 HRP 标记的羊抗兔 IgG 溶液(抗体稀释倍数为 1:10 000)中,放在摇床上 37℃孵育 1 h,取出 PVDF 膜,TBST 溶液清洗 2 次,TBS 溶液再清洗 1 次,最后使用 DAB 显色液显色,待出现明显条带后迅速用 ddH₂O 终止。

1.2.3 BmrhEPO 蚕蛹粉中 BmrhEPO 的含量的检测

分别将 100 μL 的上述制备的 BmrhEPO 蚕蛹粉蛋白样品溶液和感染野生病毒的蚕蛹粉蛋白样品溶液(用作阴性对照)置于两个 EP 管中,使用 ddH₂O 稀释 1 000 倍,使用 anti-*hEPO* ELISA 试剂盒进行 ELISA 检测。具体操作方法参考说明书。绘制标准曲线,根据全波长酶标仪读出的 OD₄₅₀ 值和标准曲线,计算出 BmrhEPO 蚕蛹粉中 BmrhEPO 蛋白的含量。

1.2.4 小鼠口服 BmrhEPO 蚕蛹粉急性毒性实验

经试验,1 mL ddH₂O 中最多能溶解 BmrhEPO 蚕蛹粉 0.3 g,其中 BmrhEPO 的含量为 2 514.6 IU/mL。配制 0.3 g/mL 的 BmrhEPO 蚕蛹粉水溶液进行小鼠口服急性毒性实验。

选择昆明小鼠 40 只,周龄为 5 周,体重 17±1 g,雌雄各半,随机分成阴性对照组、高剂量组、中剂量组和低剂量组,每组 10 只,雌雄各半。在实验开始前,小鼠禁食 12 h。阴性对照组口服 ddH₂O,1 mL/只;高、中、低剂量组分别口服浓度为 0.3、0.15、0.08 g/mL 的 BmrhEPO 蚕蛹粉水溶液,1 mL/只,以小鼠平均体重为 17 g 计算,BmrhEPO 有效剂量分别为 147 917.6、73 958.8、36 979.4 IU/kg。每只小鼠分别灌胃 1 次。给药后观察小鼠的活动,连续 14 d,其中给药后第 1 d 需要对小鼠频繁观察,以后每天可以减少观察次数。每天称取小鼠体重,并计算饮食量。查看小鼠外形、毛色、粪便。14 d 后,解剖小鼠,对比实验组小鼠与阴性对照组小鼠,观察内脏是否缺失,有无异常。

1.2.5 小鼠肾性贫血模型的构建及鉴定

选择 Balb/c 小鼠 60 只,周龄为 5 周,体重 20±1 g,雌雄各半,随机分成 6 组(A~F 组),每组 10 只,雌雄各半,其中 A 组作为空白对照组,正常饲养,其它 5 组利用腺嘌呤^[15]灌胃造肾性贫血模型,腺嘌呤剂量为 250 mg/kg,每天灌胃 1 次,连续 3 周,对 A、B 两组小鼠进行眼内眦取血,并进行血液常规分析和肾

功能检测,以血液网织红细胞数及百分率、血肌酐和血液尿素氮为指标鉴定小鼠肾性贫血模型是否构建成功,本研究中小鼠血液常规分析和肾功能检测均在天津国际生物医药联合研究院新药毒理平台进行。

1.2.6 肾性贫血小鼠口服 BmrhEPO 蚕蛹粉初步药效学研究

小鼠肾性贫血模型构建成功后,对上述 C~F 组 4 组小鼠进行药效学实验,分别是高剂量组,每只小鼠灌胃浓度为 0.3 g/mL 的 BmrhEPO 蚕蛹粉水溶液 0.5 mL,其中 BmrhEPO 蛋白的含量为 1 257.3 IU,按照小鼠的平均体重 20 g 计算,BmrhEPO 蛋白口服给药剂量为 62 865 IU/kg;低剂量组,每只小鼠灌胃浓度为 0.1 g/mL 的 BmrhEPO 蚕蛹粉的水溶液 0.5 mL,其中 BmrhEPO 蛋白的含量为 419.1 IU,口服给药剂量为 20 955 IU/kg;阳性对照组,皮下注射 rhEPO 注射液,给药剂量为 200 IU/kg,此剂量为 rhEPO 注射液说明书上人体推荐剂量的 10 倍;阴性对照组,灌胃等体积溶剂(0.5 mL ddH₂O)。连续给药 7 d 后,对 4 组小鼠眼内眦微量取血,每只小鼠取 40 μ L,对血样进行血液常规分析,以血液网织红细胞数及百分率为药效指标^[16]。

2 结果与讨论

2.1 结果

2.1.1 BmrhEPO 蚕蛹粉中 BmrhEPO 的 SDS-PAGE 和 Western Blotting 检查及含量测定

对 BmrhEPO 蚕蛹粉和感染野生 BmNPV 病毒后发病的蚕蛹粉进行 SDS-PAGE 和 Western Blotting 检测,如图 1 所示,泳道 3 在 25 kDa 附近出现了一条特异性条带,这验证了 BmrhEPO 蚕蛹粉中含有 BmrhEPO 蛋白。

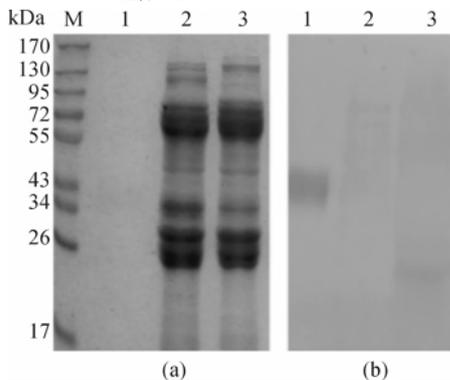


图 1 BmrhEPO 蚕蛹粉中 BmrhEPO 蛋白的 SDS-PAGE(a)和 Western Blotting(b)检测

注:M:蛋白预染 Marker;1:rhEPO 注射液;2:感染野生病毒 BmNPV 的蚕蛹粉上清;3:BmrhEPO 蚕蛹粉上清。

对 BmrhEPO 蚕蛹粉上清进行 ELISA 检测,计算得到 BmrhEPO 蚕蛹粉中 BmrhEPO 蛋白的含量为 8 382 IU/g 蚕蛹粉。

2.1.2 小鼠口服 BmrhEPO 蚕蛹粉急性毒性实验

给药后观察小鼠,第一天,小鼠进食量和活动量均减少,第二天后基本上恢复正常。连续观察 14 d,小鼠无一死亡,小鼠的平均体重和饮食量变化如图 2 和图 3 所示,与阴性对照组小鼠相比无异常,外形正常完好,毛色光泽,粪便呈棕色,活动灵活,进食量正常,也未出现中毒症状,与阴性对照组小鼠相比无明显差异。

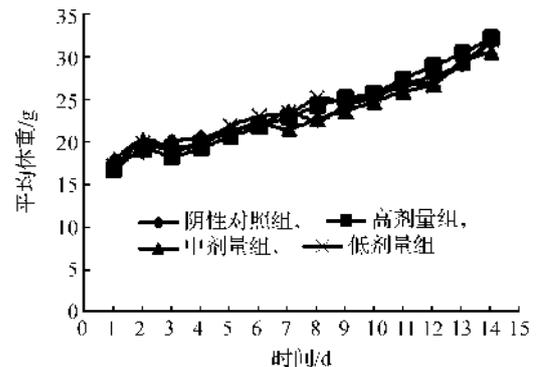


图 2 小鼠平均体重的变化

注:阴性对照组:口服 ddH₂O,每只 1 mL;高剂量组:口服 BmrhEPO 蚕蛹粉水溶液(浓度 0.3 g · mL⁻¹),每只 1 mL,BmrhEPO 有效剂量为 147 917.6 IU · kg⁻¹;中剂量组:口服 BmrhEPO 蚕蛹粉水溶液(浓度 0.15 g · mL⁻¹),每只 1 mL,BmrhEPO 有效剂量为 73 958.8 IU · kg⁻¹;低剂量组:口服 BmrhEPO 蚕蛹粉水溶液(浓度 0.08 g · mL⁻¹),每只 1 mL,BmrhEPO 有效剂量为 36 979.4 IU · kg⁻¹。

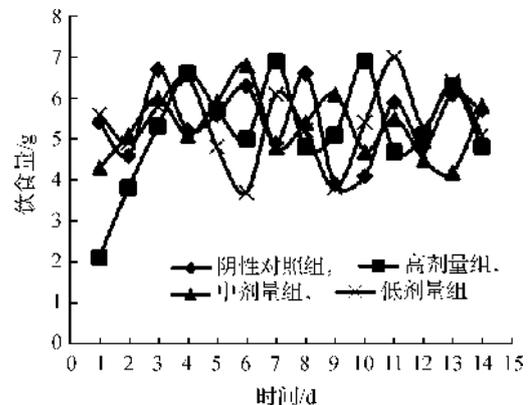


图 3 小鼠饮食量的变化

注:阴性对照组:口服 ddH₂O,每只 1 mL;高剂量组:口服 BmrhEPO 蚕蛹粉水溶液(浓度 0.3 g · mL⁻¹),每只 1 mL,BmrhEPO 有效剂量为 147 917.6 IU · kg⁻¹;中剂量组:口服 BmrhEPO 蚕蛹粉水溶液(浓度 0.15 g · mL⁻¹),每只 1 mL,BmrhEPO 有效剂量为 73 958.8 IU · kg⁻¹;低剂量组:口服 BmrhEPO 蚕蛹粉水溶液(浓度 0.08 g · mL⁻¹),每只 1 mL,BmrhEPO 有效剂量为 36 979.4 IU · kg⁻¹。

14 d 后,解剖小鼠,高、中、低剂量组小鼠内脏完整无缺失,未见损失,与阴性对照组小鼠相比,无明显差异。因此,BmrhEPO 蚕蛹粉对于小鼠,基本无毒或毒性极低。小鼠口服 BmrhEPO 最大耐受剂量大于 147 882 IU/kg。

2.1.3 肾性贫血小鼠模型的鉴定

对构建的小鼠肾性贫血模型进行验证的结果显示,如图 4(a)、5(b)所示,模型组小鼠的网织红

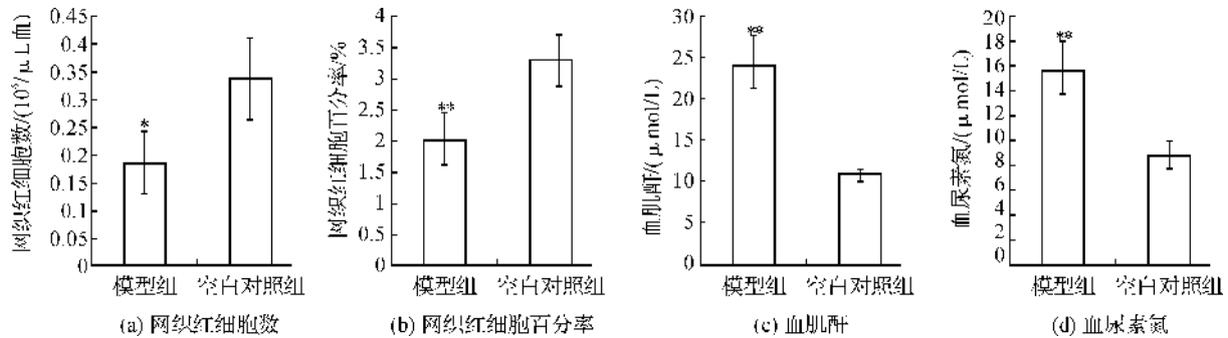


图 4 肾性贫血模型小鼠的鉴定

注:空白对照组,正常饲养;模型组,灌胃腺嘌呤造肾性贫血模型,腺嘌呤剂量为 $250 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,每天灌胃 1 次,连续 3 周。* $P < 0.05$,与空白对照组相比差异显著;** $P < 0.01$,与空白对照组相比差异极显著。

2.1.4 肾性贫血小鼠口服 BmrhEPO 蚕蛹粉初步药效学研究

肾性贫血小鼠连续口服不同剂量的 BmrhEPO 后药效学检测结果显示,如图 5 所示,阳性对照组(皮下注射 rhEPO 注射液,剂量为 200 IU/kg)、高剂量组(口服 BmrhEPO 蚕蛹粉,BmrhEPO 有剂量为 $62 865 \text{ IU/kg}$)、低剂量组(口服 BmrhEPO 蚕蛹粉,BmrhEPO 有剂量为 $20 955 \text{ IU/kg}$)与阴性对照

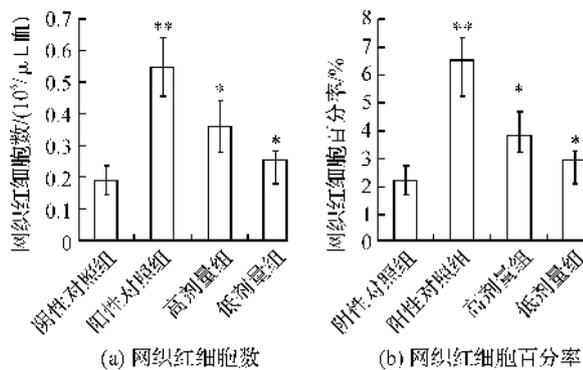


图 5 肾性贫血小鼠口服 BmrhEPO 蚕蛹粉药效测定
注:高剂量组:口服 BmrhEPO 蚕蛹粉水溶液(浓度 $0.3 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$),每只 0.5 mL ,BmrhEPO 有效剂量为 $62 865 \text{ IU} \cdot \text{kg}^{-1}$;低剂量组:口服 BmrhEPO 蚕蛹粉水溶液(浓度 $0.1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$),每只 0.5 mL ,BmrhEPO 有效剂量为 $20 955 \text{ IU} \cdot \text{kg}^{-1}$;阳性对照组:皮下注射 rhEPO 注射液,给药剂量为 $200 \text{ IU} \cdot \text{kg}^{-1}$;阴性对照组:口服 ddH_2O ,每只 0.5 mL ;连续给药 7 d。* $P < 0.05$,与阴性对照组相比差异显著;** $P < 0.01$,与阴性对照组相比差异极显著。

细胞数(* $P < 0.05$,差异显著)及百分率(** $P < 0.01$,差异极显著)的数值都比正常生长的空白对照组小鼠的小,说明模型组小鼠出现了贫血;如图 4(c)、5(d)所示,模型组小鼠的血肌酐(** $P < 0.01$,差异极显著)和血尿素氮(** $P < 0.01$,差异极显著)的数值都比空白对照组小鼠的大,说明模型组小鼠的肾脏功能受损,因此,小鼠肾性贫血模型构建成功。

组(口服 ddH_2O)相比,网织细胞数和百分率都有明显升高,其中阳性对照组差异极显著,高、低剂量组差异显著,三个给药组药效依次递减,两个口服实验组的药效存在剂量依赖,口服药效与剂量正相关。

2.2 讨论

关于使用 EPO 口服给药的研究已有报道。日本学者 Maitani 等^[16]利用脂质体包裹 EPO 口服灌胃大鼠,结果有明显药效;将维生素 B12 连接到 EPO 分子上提高 EPO 口服吸收也有报道^[17];Miller-Gilbert 等^[18]使用乳汁与 EPO 混合灌胃大鼠,促进了 EPO 的口服吸收;Venkatesan 等^[19]使用了甘油酯和聚氧乙烯氢化蓖麻子油等吸收促进剂促进了 EPO 口服吸收。

目前促红细胞生成素的药物研发主要有几个方面,通过寻找能发挥 EPO 功能的类似 EPO 的天然药物或类似物^[20];通过结构修饰,提高 rhEPO 在体内的半衰期,从而形成更持久的疗效^[21];通过生产缺氧诱导因子亚基(HIF- α)羟甲基化酶的抑制剂,HIF- α 的羟甲基化会引起泛素化降解,从而抑制 EPO 的生成^[22]。

本研究进行了小鼠口服 BmrhEPO 蚕蛹粉急性毒性实验,以最大溶解度配制 BmrhEPO 蚕蛹粉水溶液,其浓度为 0.3 g/mL ,其中 BmrhEPO 蛋白的含量为 $2 514.6 \text{ IU/mL}$,高剂量小鼠口服 BmrhEPO 蛋白的剂量达到 $147 882 \text{ IU/kg}$,中剂量和低剂量小

鼠口服 BmrhEPO 蛋白的剂量分别为高剂量的 1/2 和 1/4。结果显示, BmrhEPO 蚕蛹粉对于小鼠, 基本无毒或毒性极低。小鼠口服 BmrhEPO 最大耐受剂量大于 147 882 IU/kg。本实验只用了小鼠这一种动物做了急性毒性实验, 为了更加准确地评价 BmrhEPO 的安全性, 下一步将在大鼠、狗和猕猴等动物身上做 BmrhEPO 蚕蛹粉的包括急性毒性、长期毒性和生殖毒性等毒性实验。

通过给 Balb/c 小鼠灌胃腺嘌呤^[15] (剂量为 250 mg/kg) 构造肾性贫血模型, 每天灌胃 1 次, 连续 3 周。一周后, 小鼠就现毛色不光泽、脱毛、尿多症状。2 周后, 小鼠变得消瘦。3 周后, 血常规检测结果显示, 模型组小鼠的网织红细胞数用百分率明显低于正确饲养的空白对照组 (如图 4), 这说明模型组小鼠的肾脏可能受损, 产生的 EPO 减少了。肾功能检测结果显示, 模型组小鼠的血肌酐和血尿素氮大约是空白对照组的 2 倍 (如图 4), 这说明模型组小鼠的肾功能确实受损, 所以小鼠肾性贫血模型构建成功了。但是此构建方法, 耗时时间长, 造模过程中有小鼠死亡的情况, 不方便实验, 因此构建的方法需要改进。

家蚕蛹在中国已有很长时间的食用史, 李时珍在《本草纲目》中记载蚕蛹可以作药。而在家蚕蛹中表达 BmrhEPO, 用于口服治疗肾性贫血, 具有成本低, 可操作性。本实验通过给肾性贫血小鼠口服两个不同剂量的 BmrhEPO 蚕蛹粉, 结果证明口服有效, 并且药效与剂量正相关 (如图 5 所示)。接下来, 我们将优化 BmrhEPO 剂型和剂量。其它动物口服 BmrhEPO 药效学实验正在筹备中, 关于 BmrhEPO 口服药代动力学和生物利用度都不清楚, 所以, 需要做的工作还有很多。

3 结 论

在 BmrhEPO 蚕蛹粉中成功地检测到 BmrhEPO 蛋白, 大小约 25 KDa, 含量为 8 382 IU/g; 小鼠口服急性毒性实验显示, BmrhEPO 蚕蛹粉对于小鼠基本无毒或毒性极低; 小鼠口服 BmrhEPO 最大耐受剂量大于 147 882 IU/kg; 肾性贫血小鼠以 62 865 IU/kg, 20 955 IU/kg 两个不同剂量连续口服 BmrhEPO, 血液网织红细胞数及百分率与阴性对照组相比均有明显升高, 并且与口服剂量呈正相关。因此, 小鼠口服 BmrhEPO 治疗肾性贫血有疗效。

参考文献:

- [1] Miyake T, Kung C K, Goldwasser E. Purification of human erythropoietin[J]. Journal of Biological Chemistry, 1977, 252(15): 5558-5564.
- [2] Imai N, Kawamura A, Higuchi M, et al. Physicochemical and biological comparison of recombinant human erythropoietin with human urinary erythropoietin[J]. Journal of Biochemistry, 1990, 107(3): 352-359.
- [3] Jacobson L O, Goldwasser E, Fried W, et al. Role of the kidney in erythropoiesis[J]. Nature, 1957, 179(4560): 633-634.
- [4] Goldwasser E, Kung C K H. Progress in the purification of erythropoietin[J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 1968, 149(1): 49-53.
- [5] Jacobs K, Shoemaker C, Rudersdorf R, et al. Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin[J]. Nature, 1985, 313(6005): 806-810.
- [6] Bill R M, Flitsch S L, Bicknell R. COS-1 cell expression and one-step affinity protein purification and activity of epitope-tagged human erythropoietin and of site-directed mutants [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology, 1997, 1340(1): 13-20.
- [7] Quelle D E, Lynch K J, Burkert-Smith R E, et al. Phosphorylatable and epitope-tagged human erythropoietins: utility and purification of native baculovirus-derived forms[J]. Protein Expr Purif, 1992, 3(6): 461-469.
- [8] MacLeod J N, Tetreault J W, Lorsch K A, et al. Expression and bioactivity of recombinant canine erythropoietin[J]. Am J Vet Res, 1998, 59(9): 1144-1148.
- [9] Noguchi C T, Wang L, Rogers H M, et al. Survival and proliferative roles of erythropoietin beyond the erythroid lineage[J]. Expert Rev Mol Med, 2008, 10: e36.
- [10] Jelkmann W. Developments in the therapeutic use of erythropoiesis stimulating agents[J]. British Journal of Haematology, 2008, 141(3): 287-297.
- [11] Jelkmann W. Recombinant EPO production: points the nephrologist should know[J]. Nephrol Dial Transplant, 2007, 22(10): 2749-2753.
- [12] Gong Z, Jin Y, Zhang Y. Oral administration of a cholera toxin B subunit-insulin fusion protein produced in silkworm protects against autoimmune diabetes[J]. J Biotechnol, 2005, 119(1): 93-105.
- [13] Zhang Y, Chen J, Lv Z, et al. Can 29kDa rhGM-CSF expressed by silkworm pupae bioreactor bring into

- effect as active cytokine through orally administration? [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2006, 28(3): 212-223.
- [14] Lan H, Nie Z, Liu Y, et al. In vivo bioassay of recombinant human growth hormone synthesized in *B. mori* pupae[J]. *J Biomed Biotechnol*, 2010, 2010: 306462.
- [15] Yokozawa T, Zheng P D, Oura H, et al. Animal model of adenine-induced chronic renal failure in rats[J]. *Nephron*, 1986, 44(3): 230-234.
- [16] Maitani Y, Hazama M, Tojo Y, et al. Oral administration of recombinant human erythropoietin in liposomes in rats; influence of lipid composition and size of liposomes on bioavailability[J]. *J Pharm Sci*, 1996, 85(4): 440-445.
- [17] Venkatesan N, Uchino K, Amagase K, et al. Gastrointestinal patch system for the delivery of erythropoietin[J]. *J Control Release*, 2006, 111(1-2): 19-26.
- [18] Miller-Gilbert A L, Dubuque S H, Dvorak B, et al. Enteral absorption of erythropoietin in the suckling rat [J]. *Pediatr Res*, 2001, 50(2): 261-267.
- [19] Venkatesan N, Yoshimitsu J, Ito Y, et al. Liquid filled nanoparticles as a drug delivery tool for protein therapeutics[J]. *Biomaterials*, 2005, 26(34): 7154-7163.
- [20] Wenger R H, Kurtz A. Erythropoietin [J]. *Compr Physiol*, 2011, 1(4): 1759-1794.
- [21] Bunn H F. Erythropoietin [J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2013, 3(3): a011619.
- [22] Yan L, Colandrea V J, Hale J J. Prolyl hydroxylase domain-containing protein inhibitors as stabilizers of hypoxia-inducible factor: small molecule-based therapeutics for anemia [J]. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 2010, 20(9): 1219-1245.

Research on Acute Oral Toxicity and Preliminary Pharmacodynamics of Human Erythropoietin Expressed in *Bombyx Mori*

LI Jie^{1a,b}, TAN Shu-min^{1a,b}, WANG Xiao-fei^{1a,b}, SHU Te-jun^{1a,b}, YU Wei^{1a,b},
ZHANG Yao-zhou^{2,3}, CHEN Jian-qing^{1a,b}

- (1a. Institute of Biochemistry; 1b. Zhejiang Provincial Key Laboratory of Silkworm Bioreactor and Biomedicine, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China;
2. Tianjin International Joint Academy of Biomedicine, Tianjin 300457, China;
3. School of Pharmaceutical Science and Technology, Tianjin University, Tianjin 300192, China)

Abstract: To study the therapeutic effect of oral administration of recombinant human erythropoietin (BmrhEPO) expressed in *bombyx mori* on the treatment of renal anemia and evaluate its security, this paper conducts an experiment on acute toxicity after oral administration of BmrhEPO of a mouse. The result shows that it is basically non-toxic for a mouse or its toxicity is extremely low. The maximum tolerance dose of a mouse for oral administration of BmrhEPO is more than 147 882 IU/kg. Mice with renal anemia took BmrhEPO orally for one consecutive week with the dose of 62 865 IU/kg and 20 955 IU/kg. The number and percentage of blood reticulocyte of mice are used as indexes of pharmacodynamics. The result shows that oral administration has pharmacological function and pharmacological function has positive correlation with dose. This experiment provides theoretical guidance and experimental foundation for the development of recombinant human erythropoietin oral drugs.

Key words: *bombyx mori*; rhEPO; oral administration; acute toxicity; renal anemia

(责任编辑: 许惠儿)