

## 哺乳人溶菌酶转基因乳汁提高仔鼠肠道健康水平

杨雪珍<sup>1</sup> 鲁丹<sup>2</sup> 商圣哲<sup>2</sup> 王宇航<sup>2</sup> 王晔<sup>1</sup> 林树茂<sup>1</sup> 张辉华<sup>1</sup> 刘燊<sup>1\*</sup>

(1. 佛山科学技术学院 生命科学与工程学院, 广东 佛山 528000;

2. 中国农业大学 农业生物技术国家重点实验室, 北京 100193)

**摘要** 为探究富含人溶菌酶的转基因乳汁对仔鼠肠道健康影响,以转基因母鼠代养普通仔鼠(试验组)和普通母鼠代养普通仔鼠(对照组)为研究对象,进行仔鼠肠道菌群数量检测、肠道形态观测和大肠杆菌攻毒腹泻模型等试验,采样和检测时间为第3、11、21、30天(D3,D11,D21,D30)。结果表明:1)试验组的仔鼠肠道菌群总菌数在D11、D21显著性低于对照组( $P < 0.05$ );试验组乳酸菌在D21显著性高于对照组( $P < 0.05$ ),双歧杆菌在D11和D30均显著性高于对照组( $P < 0.05$ );试验组大肠杆菌在D21显著性低于对照组( $P < 0.05$ ),链球菌在D11极显著性低于对照组( $P < 0.01$ )且在D21显著性低于对照组( $P < 0.05$ ),肠球菌在D11极显著性低于对照组( $P < 0.01$ ),梭菌在D11显著性低于对照组( $P < 0.05$ );2)试验组仔鼠肠道内容物溶菌酶活性为 $1\ 803 \pm 93\ \text{U}/\mu\text{g}$ ,对照组仅为 $73 \pm 23\ \text{U}/\mu\text{g}$ ;试验组仔鼠半固体粪便在大肠近/中端形成(9/10),而对照组仔鼠半固体粪便在大肠中/末端形成(8/10);3)大肠杆菌攻毒腹泻模型中,试验组无仔鼠死亡,而对照组于攻毒144 h后死亡9只(死亡率60%)。因此,转基因鼠乳汁来源的高浓度重组人溶菌酶,能在仔鼠小肠中保持较高的活性,显著提高其内容物中的有益菌数量和降低有害菌数量,促进大肠半固体粪便形成,从而为攻毒后的小鼠腹泻模型提供保护作用。

**关键词** 重组人溶菌酶; 转基因小鼠; 哺乳仔鼠; 肠道菌群; 小鼠腹泻模型

中图分类号 Q331

文章编号 1007-4333(2018)05-0067-07

文献标志码 A

## Consumption of human lysozyme transgenic milk improved intestinal health of mouse pups

YANG Xuezheng<sup>1</sup>, LU Dan<sup>2</sup>, SHANG Shengzhe<sup>2</sup>, WANG Yuhang<sup>2</sup>,  
WANG Ye<sup>1</sup>, LIN Shumao<sup>1</sup>, ZHANG Huihua<sup>1</sup>, LIU Shen<sup>1\*</sup>

(1. School of Life Science and Engineering, Foshan University, Foshan 528000, China;

2. State Key Laboratory of Agrobiotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

**Abstract** The aim of this study was to investigate the effect of human lysozyme transgenic milk on intestinal health. The mouse pups were nursed randomly by transgenic mother mice (PC group) and non-transgenic mother mice (NC group), and the experiments as follows were performed on day 3, 11, 21, 30 (D3, D11, D21 and D30): the number of intestinal bacterial flora was counted, the fecal morphology of mouse pups in different groups was observed, and the mice were induced to diarrhea models by injection of *Escherichia coli*. The results showed that: 1) The total bacteria in PC group was significantly lower than that in NC group at D11 and D21 ( $P < 0.05$ ); The quantity of beneficial bacteria *Lactobacillus* spp. in PC group was significantly higher than that in NC group at D21 ( $P < 0.05$ ), and the *Bifidobacterium* spp. was also significantly higher than that in NC group at D11 and D30 ( $P < 0.05$ ); The quantity of harmful bacteria *E. coli* in PC group was significantly lower than that in NC group at D21 ( $P < 0.05$ ), the *Streptococcus* was very significantly lower than that in NC group at D11 ( $P < 0.01$ ) and significantly lower than that in NC group at D21 ( $P < 0.05$ ), the *Enterococcus* was very significantly lower than that in NC group at D11 ( $P < 0.01$ ), and the

收稿日期: 2017-09-15

基金项目: 广东省科技计划公益研究与能力建设专项(2015A020209195); 佛山市科技创新专项市院合作项目(2014HK100314)

第一作者: 杨雪珍, 硕士研究生, E-mail: xuezhencau@163.com

通讯作者: 刘燊, 副教授, 主要从事动物生物技术研究, E-mail: shencn@aliyun.com

*Clostridium* was significantly lower than that in NC group at D11 ( $P < 0.05$ ). 2) The lysozyme activities of small intestine contents were  $1803 \pm 93$  U/ $\mu\text{g}$  in PC group, while was only  $73 \pm 23$  U/ $\mu\text{g}$  in NC group; the semisolid stools were formed in the proximal/middle of colon in PC group (9/10), whereas in the middle/end of large intestine in NC group (8/10). 3) The mortality rate of diarrhea mice model in NC group was 60%, while in PC group was 0. In conclusion, recombinant human lysozyme of the transgenic mice kept high activity in the small intestine of mouse pups, which significantly increased the number of beneficial bacteria, reduced the number of harmful bacteria in the intestine, promoted semisolid stool formation and provided protection for the mouse diarrhea model.

**Keywords** recombinant human lysozyme; transgenic mice; mouse pups, intestinal flora, mouse diarrhea model

溶菌酶(Lysozyme)是一种具有强力杀菌作用的天然、非特异性免疫物质,其主要溶菌机制是切断肽聚糖中 N-乙酰葡萄糖胺和 N-乙酰胞壁酸之间的  $\beta$ -1,4 糖苷键,破坏肽聚糖支架,从而引起细菌裂解<sup>[1]</sup>。溶菌酶广泛存在于禽类的蛋清和哺乳动物的泪液、唾液、血浆、尿、乳汁、白细胞及其他体液和组织细胞内,也存在于某些植物和微生物中<sup>[2]</sup>。与其它来源的溶菌酶相比,人溶菌酶(Human lysozyme, hLZ)具有独特的优越性和多种药理作用,具有更广泛的应用价值。人溶菌酶的活性最高,是蛋清溶菌酶的 3 倍<sup>[3]</sup>;无过敏原,过敏性风险很低,可以安全应用于药品/食品行业<sup>[4]</sup>;热稳定性高,在 100 °C 加热 60 min 不会降解<sup>[5]</sup>。人溶菌酶还具有抗病毒<sup>[6]</sup>,增强机体免疫力,激活血小板分解脓液等消炎止痛作用<sup>[7]</sup>。

人溶菌酶工业化生产十分困难。虽然人类母乳中溶菌酶含量可达到 400 mg/L,远高于牛(*Bostaurus*) (0.13 mg/L)、山羊(*Capra hircus*) (0.25 mg/L)、绵羊(*Ovisarie*) (0.1 mg/L)、猪(*Susscrofa*) (0.065 mg/L)等物种<sup>[8-9]</sup>,但也无法支持工业化生产。随着 DNA 重组技术,特别是动/植物生物反应器的发明,为重组人溶菌酶(Recombinant human lysozyme, rhLZ)的大规模生产创造了机会。已有研究试图通过细菌、酵母、霉菌等多种系统来表达和生产重组人溶菌酶<sup>[10]</sup>,但均存在表达量低、活性弱等问题。本研究团队早期研究利用细菌人工染色体(Bacterial artificial chromosome, BAC)上的人乳铁蛋白(Human lactoferrin, hLF)调控序列作为人溶菌酶的调控元件,可高效表达重组人溶菌酶,小鼠乳汁中的表达量在 1.20~1.76 g/L<sup>[11]</sup>,之后又陆续获得重组人溶菌酶高效表达的转基因克隆牛(3.1 g/L)<sup>[12]</sup>和猪(2.76 g/L)<sup>[13]</sup>,为重组人溶菌酶的规模化生产奠定了基础。本研究中,拟通过转基因母鼠哺乳普通仔鼠的饲喂试验,研究富含重组人溶菌酶的转基因母

鼠乳汁对仔鼠肠道健康的影响,以期为“人乳化”牛奶研制、转基因动物抗病育种,以及重组人溶菌酶作为食品添加剂改善仔畜肠道健康等方面奠定一定的基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

乳腺高效表达重组人溶菌酶(1.20~1.74 g/L)的转基因小鼠<sup>[11]</sup>,由中国农业大学农业生物技术国家重点实验室制备获得;普通清洁级昆明白小鼠,由中国农业大学农业生物技术国家重点实验室自繁自养。试验动物饲养环境与管理:排气扇通风,空调调节温度,饲养温度为(24±1)°C,光照周期 12 h 明 12 h 暗,每天打扫鼠舍,保持清洁,小鼠自由饮食与饮水,每隔 1~2 d 换水 1 次,2~3 d 更换 1 次垫料。

选择性培养基,购自北京宝杰罗生物科技有限公司。细菌种类和培养基对应如下:总好氧菌:脑心浸液琼脂(BHIA);总厌氧菌:WILKINS-CHALGREN 琼脂;乳酸杆菌:乳酸杆菌选择性琼脂;双歧杆菌:MRS 琼脂;大肠杆菌:大肠杆菌显色培养基;链球菌:KF 链球菌琼脂;肠球菌:肠球菌显色培养基;沙门氏菌:沙门氏菌显色培养基;梭菌:亚硫酸盐-多粘菌素-磺胺嘧啶琼脂。

溶壁微球菌(中国科学院微生物研究所);致病性大肠杆菌(*Enteropathogenic Escherichia coli*, EPEC)O<sub>101</sub>菌株(中国药品生物制品鉴定所)。

### 1.2 试验设计

试验一,选用 60 只刚出生的清洁级普通昆明白仔鼠,随机分配给 2 个处理组进行代养:试验组(PC 组,5 只生理周期同步的转基因泌乳母鼠)和空白对照组(NC 组,5 只生理周期同步的普通泌乳母鼠),于第 3、11、21、30 天(D3、D11、D21、D30)收集仔鼠肠道内容物,并进行菌落计数。

试验二,试验设计同试验一,仔鼠数量为 80 只,于 D11 检测仔鼠肠道内容物的溶菌酶活性(各

3只),于D11、D21观察仔鼠肠道形态(各20只),于D21攻毒大肠杆菌建立腹泻模型并观察仔鼠存活情况(各15只)。

### 1.3 比浊法测定溶菌酶活性

将溶壁微球菌在液体培养基中培养24h,然后以5000rpm离心菌液,收集菌体。用66mmol/L磷酸钾缓冲液冲洗菌液2次,5000rpm离心,在用此溶解菌体至OD<sub>450</sub>为0.8左右。将紫外可见分光光度计打开预热,调至OD<sub>450</sub>。利用蛋清溶菌酶制作标准曲线,各浓度为1000、2000、3000、4000、5000、6000、8000U/ $\mu$ L。取1 $\mu$ L样品,加99 $\mu$ L缓冲液稀释。在光程为1cm的石英比色杯中加入2.5mL混好的菌悬液,迅速加入100 $\mu$ L配置好的样品。每次试验重复3次。计算抑菌活性均值和均值标准。

### 1.4 小鼠腹泻模型建立

采取小鼠细菌性腹泻模型的诱导方法<sup>[14]</sup>,腹腔注射EPEC<sub>101</sub>菌株,注射剂量约为0.26亿/只(10<sup>7</sup>CFU)。

### 1.5 统计分析

试验数据采用SAS 8.0统计软件进行统计分析,以 $P < 0.05$ 为显著水平,以 $P < 0.01$ 为极显著水平,试验结果以平均值 $\pm$ 标准差表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 哺乳转人溶菌基因乳汁对仔鼠肠道菌群的影响

给予仔鼠哺乳人溶菌转基因乳汁和普通乳汁,并于D3、D11、D21和D30进行肠道菌群数量检测,试验结果见图1。

#### 2.1.1 对总菌数影响

总菌数为总好氧菌和总厌氧菌之和。相比NC组,PC组总菌数在D11、D21有显著性下降( $P < 0.05$ ),但在D3、D30于NC组无显著性差异(图1(a))。

#### 2.1.2 对有益菌影响

对于乳酸菌,PC组的数量在D21显著性高于NC组( $P < 0.05$ ),但在D3、D11、D30与NC组无显著性差异(图1(b))。对于双歧杆菌,PC组的数量在D11、D30显著性高于NC组( $P < 0.05$ ),但在D3、D30与NC组无显著性差异(图1(c))。

#### 2.1.3 对有害菌影响

对于大肠杆菌,PC组的数量在D21显著性低于NC组( $P < 0.05$ ),但在D3、D11、D30与NC组无显著性差异(图1(d));对于链球菌,PC组的数量在

D11极显著性低于NC组( $P < 0.01$ ),且在D21显著性低于NC组( $P < 0.05$ ),但在D3、D30与NC组无显著性差异(图1(e));对于肠球菌,PC组的数量在D11极显著性低于NC组( $P < 0.01$ ),但在D3、D21、D30与NC组无显著性差异(图1(f));对于沙门氏菌,PC组的数量在D3、D11、D21、D30和NC组均无显著性差异(图1(g))。对于梭菌,PC组的数量在D11显著性低于NC组( $P < 0.05$ ),但在D3、D21、D30与NC组无显著性差异(图1(h))。

### 2.2 rhLZ在胃肠道内容物中的生物活性

胃内容物中PC组rhLZ活性为2023 $\pm$ 199U/ $\mu$ g,NC组为33 $\pm$ 15U/ $\mu$ g,两者有极显著的差异( $P < 0.01$ );小肠内容物PC组为1803 $\pm$ 93U/ $\mu$ g,NC组为73 $\pm$ 23U/ $\mu$ g,两者差异极显著( $P < 0.01$ );大肠内容物PC组为23 $\pm$ 12U/ $\mu$ g,NC组为20 $\pm$ 20U/ $\mu$ g,两者无显著性差异。PC组中胃和小肠内容物rhLZ活性无显著性差异( $P > 0.05$ ),二者均和大肠有极显著性差异( $P < 0.01$ )(图2)。

### 2.3 哺乳转人溶菌基因乳汁对仔鼠大肠粪便形成的影响

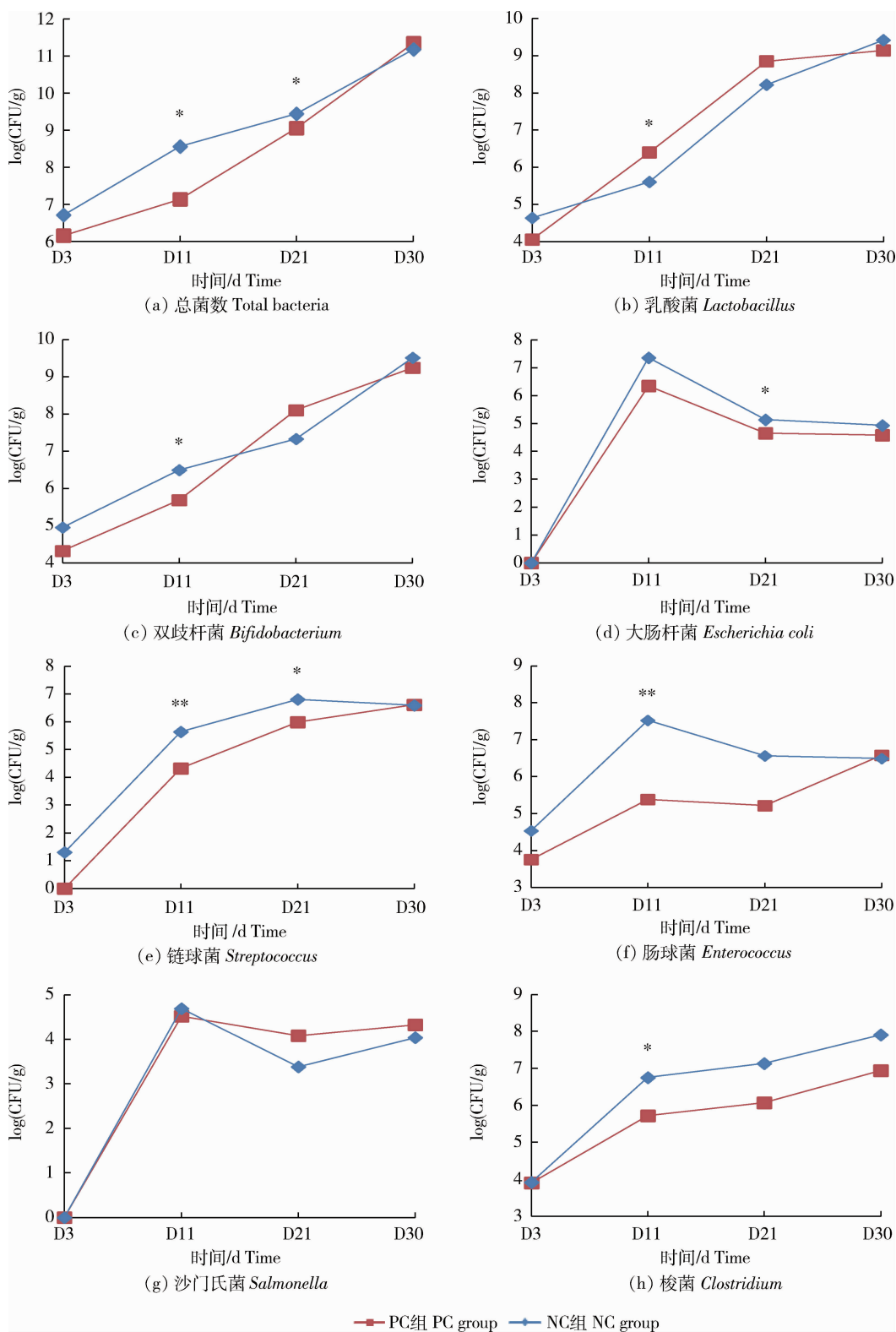
D11,PC组仔鼠半固体粪便形成块数分别为大肠近和中端分别为9和10块(图3(a)),而NC组仔鼠半固体粪便形成块数在大肠中和末端中分别为8和10块(图3(b));D21,PC组和NC组仔鼠的固体粪便形成位置均位于盲肠近侧,两组间没有明显区别(图3(c)和3(d))。

### 2.4 哺乳转人溶菌基因乳汁对攻毒后腹泻模型仔鼠的影响

大肠杆菌EPEC<sub>101</sub>菌株攻毒后结果见图4。PC组和NC组的仔鼠均表现出精神沉郁,排黄色稀便。NC组仔鼠于96h死亡2只,于108h死亡2只,于120h死亡3只,于132h死亡1只,于144h死亡1只,最终死亡9只,死亡率60%。而PC组在试验前期可观察到有浅黄色、水样粪便的排出,但无仔鼠死亡现象发生。

## 3 讨论与结论

人溶菌酶可以增加动物肠道中有益菌数量和降低有害菌数量,增加肠绒毛高度与隐窝深度的比值,以及增加抗炎细胞因子的表达<sup>[15-20]</sup>。本研究设计新出生仔鼠的“全母乳代养”试验,更好地模拟了仔猪或婴幼儿的自然哺乳过程,为人溶菌酶转基因抗病育种猪的培育和“人乳化”牛奶的研制提供理论依据。

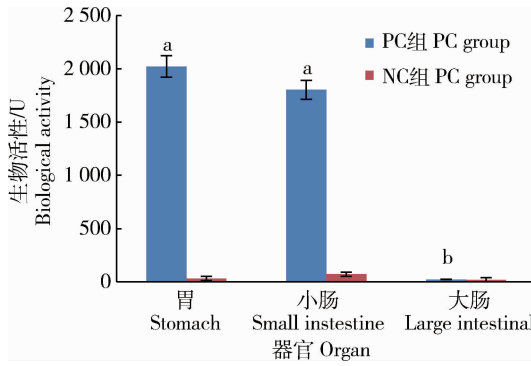


\* 表示两组间存在显著性差异 ( $P < 0.05$ ); \*\* 表示两组间存在极显著性差异 ( $P < 0.01$ )。

\* indicates significant difference between PC and NC group ( $P < 0.05$ ); \*\* indicates very significant difference between PC and NC group ( $P < 0.01$ ).

图1 哺乳转人溶菌基因乳汁对仔鼠肠道菌群数量的影响

Fig. 1 Effect of rhLZ-milk on microflora numbers in intestinal tract of pups



不同字母表示 PC 组不同器官间的溶菌酶活性存在显著性差异 ( $P < 0.05$ )。  
 Different letters on organs indicate significant difference among PC groups ( $P < 0.05$ ).

图 2 重组人溶菌酶在仔鼠胃肠道中的生物活性

Fig. 2 Lytic activity of rhLZ in gastrointestinal tract



(a) NC 组 D11 半固体粪便形成于大肠中/末端; (b) PC 组 D11 半固体粪便形成于大肠近/中端; (c) NC 组 D21 固体粪便形成于大肠近端; (d) PC 组 D21 固体粪便形成于大肠近端

(a) The semi-solid stool is formed at the proximal/middle of large intestine in NC group at D11; (b) The semisolid stool is formed at the middle/distal of large intestine in PC group at D11; (c) The solid stool is formed at the proximal of large intestine in NC group at D21; (d) The solid stool is formed at the proximal of large intestine in PC group at D21

图 3 哺乳转人溶菌基因乳汁对仔鼠肠道粪便形成的影响

Fig. 3 Effect of rhLZ-milk on fecal morphology in intestine of mouse pups

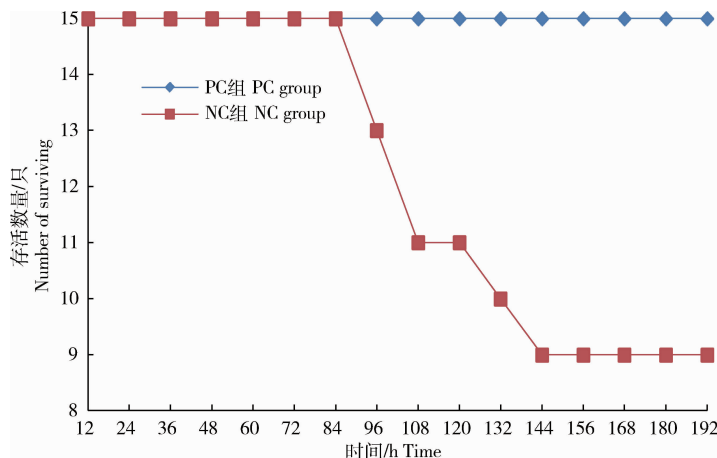


图 4 哺乳转人溶菌基因乳汁对 EPEC 攻毒后仔鼠存活的影响

Fig. 4 Effect of rhLZ-milk on the death of mouse pups after EPEC challenge

本研究结果表明,哺乳了转基因母鼠乳汁后,仔鼠肠道内容物的溶菌酶活性可达到  $1\ 803 \pm 93\ \text{U}/\mu\text{g}$ , 约为原转基因鼠乳汁的 50% ( $3\ 137 \sim 3\ 498\ \text{U}/\mu\text{g}$ )<sup>[11]</sup>,但其到达大肠后则完全失活 ( $23 \pm 12\ \text{U}/\mu\text{g}$ )。这说明重组人溶菌酶能耐受胃酸,并主要在小肠中发挥菌群结构调节作用。

在哺乳期间,小鼠肠道菌群的总菌数和有益菌数量均呈现逐渐升高的变化趋势。而有害菌群的变化则存在差异:如链球菌、肠球菌、梭菌等数量逐渐升高,大肠杆菌、沙门氏菌等则呈现先升高后降低的趋势。本研究发现,重组人溶菌酶促进了有益菌的增长,同时抑制有害菌(如链球菌、肠球菌和梭菌)的增长,且调节作用的时间阶段主要为 D11 和 D21。在 D30,各菌群结构已趋于稳定,调节作用效果不显著。上述结果说明,重组人溶菌酶在仔鼠肠道菌群构建的过程中发挥着正向调节作用,加快了最终平衡菌群的建立进程。该推论也与 D11 时间阶段的 PC 组仔鼠大肠半固体粪便的形态结果吻合。

大肠杆菌攻毒腹泻模型试验表明,重组人溶菌酶有效地提高了 D21 仔鼠的恢复能力,从而保护了仔鼠,该保护能力的获得,很大一部分来自于 PC 组相对完善的肠道菌群结构,另一部分来自于抗炎细胞因子表达等免疫相关指标的提高<sup>[21]</sup>。

与已有研究相比<sup>[19-20]</sup>,本研究的显著特色是喂养的重组人溶菌酶浓度更高,发生变化的菌群种类更多,得到的调节效果更加显著。

转基因鼠乳汁来源的高浓度重组人溶菌酶,能在仔鼠小肠中保持着较高的活性,显著提高其内容物中的有益菌数量和降低有害菌的数量,促进大肠半固体粪便形成,从而为攻毒后的小鼠腹泻模型提供保护。

## 参考文献 References

- [1] Salton M R. The properties of lysozyme and its action on microorganisms[J]. *Bacteriological Reviews*, 1957, 21(2): 82-100
- [2] Mason D Y, Taylor C R. The distribution of muramidase (lysozyme) in human tissues[J]. *Journal of Clinical Pathology*, 1975, 28(2): 124-132
- [3] 王佃亮. 重组人溶菌酶研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2003(9): 59-63  
Wang D L. Research progress in recombinant human lysozyme [J]. *China Biotechnology*, 2003(9): 59-63 (in Chinese)
- [4] 吕超,包琪,邹世颖,陈思媛,贺晓云,黄昆仑. 转基因羊奶表达重组人溶菌酶的急性毒性及过敏性研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2014(9): 2831-2836  
Lv C, Bao Q, Zou S Y, Chen S Y, He X Y, Huang K L. Study on toxicity and allergy of lysozyme expressed in milk from transgenic goats[J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2014(9): 2831-2836 (in Chinese)
- [5] 叶军,钱世钧. 工程菌人溶菌酶的纯化和性质[J]. 微生物学报, 1999(1): 57-61  
Ye J, Qian S J. Purification and properties of human lysozyme in engineered bacterium *E coli* [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 1999(1): 57-61 (in Chinese)
- [6] Lee-Huang S, Huang P L, Sun Y, Huang P L, Kung H F, Bliithe D L, Chen H C. Lysozyme and RNases as anti-HIV components in beta-core preparations of human chorionic gonadotropin[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96(6): 2678-2681
- [7] Kurasawa T, Takada K, Ohno N, Yadomae T. Effects of murine lysozyme on lipopolysaccharide-induced biological activities[J]. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 1996, 13(4): 293-301
- [8] 吴芳芳,鲁丹,李秋艳,李宁. 转基因动物生产重组人溶菌酶的研究进展[J]. 中国畜牧杂志, 2014(23): 88-92  
Wu F F, Lu D, Li Q Y, Li N. Research progress on the production of recombinant human lysozyme in transgenic animal[J]. *Chinese Journal of Animal Science*, 2014(23): 88-92 (in Chinese)
- [9] Maga E A, Anderson G B, Murray J D. The effect of mammary gland expression of human lysozyme on the properties of milk from transgenic mice[J]. *Journal of Dairy Science*, 1995, 78(12): 2645-2652
- [10] Jigami Y, Muraki M, Harada N, Tanaka H. Expression of synthetic human-lysozyme gene in *Saccharomyces cerevisiae*: use of a synthetic chicken-lysozyme signal sequence for secretion and processing[J]. *Gene*, 1986, 43(3): 273-279
- [11] Liu S, Li X, Lu D, Shang S, Wang M, Zheng M, Zhang R, Tang B, Li Q, Dai Y, Li N. High-level expression of bioactive recombinant human lysozyme in the milk of transgenic mice using a modified human lactoferrin in BAC [J]. *Transgenic Research*, 2012, 21(2): 407-414
- [12] Lu D, Liu S, Ding F, Wang H, Li J, Li L, Dai Y, Li N. Large-scale production of functional human lysozyme from marker-free transgenic cloned cows[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 22947
- [13] Lu D, Liu S, Shang S, Wu F, Wen X, Li Z, Li Y, Hu X, Zhao Y, Li Q, Li N. Production of transgenic-cloned pigs expressing

- large quantities of recombinant human lysozyme in milk[J]. *PLoS One*, 2015, 10(5):e123551
- [14] 赵荣山, 杨会锁, 郝京生, 刘卫, 陈晓青. 小鼠细菌性腹泻模型的诱导方法[J]. 现代中西医结合杂志, 2000(13):1210  
Zhao R S, Yang H S, Hao J S, Liu W, Chen X Q. A method for inducing bacterial diarrhea in mice[J]. *Modern Journal of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine*, 2000 (13):1210 (in Chinese)
- [15] Maga E A, Desai P T, Weimer B C, Dao N, Kultz D, Murray JD. Consumption of lysozyme-rich milk can alter microbial fecal populations[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(17):6153-6160
- [16] Brundige D R, Maga E A, Klasing K C, Murray J D. Lysozyme transgenic goats' milk influences gastrointestinal morphology in young pigs[J]. *The Journal of Nutrition*, 2008, 138(5): 921-926
- [17] Brundige D R, Maga E A, Klasing K C, Murray J D. Consumption of pasteurized human lysozyme transgenic goats' milk alters serum metabolite profile in young pigs [J]. *Transgenic Research*, 2010, 19(4):563-574
- [18] Cooper C A, Brundige D R, Reh W A, Maga, E A, Murray J D. Lysozyme transgenic goats' milk positively impacts intestinal cytokine expression and morphology[J]. *Transgenic Research*, 2011, 20(6):1235-1243
- [19] Maga E A, Walker R L, Anderson G B, Murray J D. Consumption of milk from transgenic goats expressing human lysozyme in the mammary gland results in the modulation of intestinal microflora[J]. *Transgenic Research*, 2006, 15(4): 515-519
- [20] Lu D, Li Q, Wu Z, Shang S, Liu S, Wen X, Li Z, Wu F, Li N. High-level recombinant human lysozyme expressed in milk of transgenic pigs can inhibit the growth of *Escherichia coli* in the duodenum and influence intestinal morphology of sucking pigs [J]. *PLoS One*, 2014, 9(2):e89130
- [21] Cooper C A, Garas K L, Maga E A, Murray J D. Consuming transgenic goats' milk containing the antimicrobial protein lysozyme helps resolve diarrhea in young pigs[J]. *PLoS One*, 2013, 8(3):e58409

责任编辑: 杨爱东