

## 抗草甘膦转基因大豆饲料对雄性小鼠脾淋巴细胞体外增殖的影响

芦春斌<sup>1</sup>, 张伟<sup>1</sup>, 刘标<sup>2</sup>

(1. 暨南大学 生殖免疫研究所, 广东 广州 510632; 2. 环境保护部 南京环境科学研究所, 江苏 南京 210042)

**摘要:**以雄性昆明鼠为动物模型,对亲本( $F_0$ )和子一代( $F_1$ )短期(30 d)及长期(90 d)喂食抗草甘膦转基因大豆饲料后,取其脾脏,MTT法检测脾淋巴细胞增殖情况。结果表明:短期喂食实验过程中,在0、2、7、14和30 d取样时,转基因大豆饲料对亲本( $F_0$ )实验的雄性小鼠脾脏淋巴细胞体外增殖均无显著性影响( $P>0.05$ ),在长期(90 d)喂食实验过程中,抗草甘膦转基因大豆饲料对亲本( $F_0$ )小鼠脾脏淋巴细胞体外增殖也无显著影响( $P>0.05$ )。同样,在30 d的短期和90 d的长期喂食实验过程中,抗草甘膦转基因大豆饲料对子一代( $F_1$ )雄性小鼠脾脏淋巴细胞体外增殖也均无显著抑制作用( $P>0.05$ )。表明短期(30 d)及长期(90 d)喂食含抗草甘膦转基因大豆饲料对亲本及子一代雄性小鼠脾脏淋巴细胞体外增殖均无显著性影响,且无遗传积累效应。

**关键词:**抗草甘膦转基因大豆;饲料;雄性小鼠;MTT;脾细胞增殖

**中图分类号:**S816.7 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-9841(2012)02-0291-04

## Effects of Transgenic Soybean Feed on Proliferation of Spleen Lymphocyte in Male Mice

LU Chun-bin<sup>1</sup>, ZHANG Wei<sup>1</sup>, LIU Biao<sup>2</sup>

(1. Institute of Reproductive Immunology, Jinan University, Guangzhou 510632, Guangdong; 2. Nanjing Institute of Environmental Science, Ministry of Environmental Protection, Nanjing 210042, Jiangsu, China)

**Abstract:** In recent years, there have been a notable concerns on the safety of genetically modified (GM) foods, especially transgenic soybean. To evaluate effects of soybean on immunological function and possible genetic effects for progeny in male mice, male Kunming mice were fed with glyphosate feed for short-term of 30 and long-term of 90 days. Cell proliferation of spleen lymphocyte was analyzed with MTT assay. The sampling time was 0, 2, 7, 14 and 30 day. For progeny test, male mice and female fed with transgenic soybean feed were mated and produced progeny  $F_1$ . There were no significant adverse effects on cell proliferation of spleen for parent mice at different time during 30 day feeding trial ( $P>0.05$ ). It was also showed that cell proliferation of spleen was not affected for long-term of 90 days. For progeny, no adverse effect on cell proliferation of spleen was found both for 30 and 90 days. It was showed that there was no significant adverse effect on cell proliferation of spleen for parent and progeny male mice during 30 and 90 day feeding trial of transgenic soybean. There was no possible potential of genetic toxicology in male mice fed with transgenic soybean.

**Key words:** Transgenic glyphosate-resistant soybean; Feed; Male mice; MTT; Lymphocytes proliferation

随着转基因技术的迅猛发展,转基因作物及其产品的食用安全性受到社会和公众的广泛关注<sup>[1]</sup>。转基因大豆占大豆种植总面积的81%,是世界最主要的转基因作物<sup>[2]</sup>。转基因大豆在食品和饲料业的应用日益增多,已经直接或间接地进入到人们的日常生活中,国内外通过对模式动物喂食小麦、玉米、大豆等转基因作物来研究体重、饮食量、脏器系数、血液生化及组织病理变化,多数实验中未发现其对喂食动物的损伤<sup>[3-4]</sup>,但是转基因植物及其加工的食品等是否具有长期、潜在的副作用值得深入研究。目前对转基因大豆安全性评价主要集中在对动物的生长性能,血液生化,繁殖能力,外源基因

在动物体内残留的分析,而对免疫功能的影响研究报道较少<sup>[5]</sup>。脾脏是哺乳动物重要的免疫器官,脾淋巴细胞增殖活性在评价细胞免疫功能中具有重要意义,因此该试验通过脾淋巴细胞体外增殖反应来评价抗草甘膦转基因大豆对雄性小鼠免疫功能的免疫毒理学,进而可以评估转基因食品的安全性。

### 1 材料与方法

#### 1.1 主要试剂和仪器

1.1.1 试剂 噻唑蓝(MTT, Sigma), RPMI-1640培养基(GIBCO),胎牛血清(杭州四季青生物工程有

收稿日期:2011-12-17

基金项目:农业部转基因生物新品种培育重大科技项目(2011ZX08012-005);广东省科技计划项目(2010B031600108)。

第一作者简介:芦春斌(1964-),男,副研究员,博士,从事植物分子生物学研究。E-mail:tcblu@jnu.edu.cn。

限公司),刀豆球蛋白 A(ConA,Solarbio),SDS(北京鼎国生物),红细胞裂解液(北京康维世纪)。

1.1.2 仪器 光学显微镜(Nikon,TE200),CO<sub>2</sub>培养箱(日本三洋公司),低速离心机(Sigma 2-5),酶标仪(ELX800)。

## 1.2 饲料

实验用转基因豆粕为孟山都公司的抗除草剂大豆 GTS40-3-2,非转基因豆粕为其亲本 A5403。动物饲料委托广东省实验动物中心进行加工,饲料中的各种成分比例按照啮齿类动物食物配方进行配置。饲料加工前在实验室对转基因和非转基因大豆豆粕进行 PCR 检测,确定是否含有外源基因后再按饲料标准加工,进行动物实验。

## 1.3 实验动物分组及处理

4 周龄健康昆明鼠 120 只,其中雄鼠 80 只,雌鼠 40 只,体重 22~25 g,购自广东省实验动物中心,动物试验期间饲养条件为:室内温度 22~24℃,湿度 40%~70%,光照时间为 12 h 光照/12 h 黑暗,动物自由取食饮水。实验开始前均以非转基因大豆饲料适应喂养,7 d 后随机分成 2 组,即实验组(GM 组:40 只雄鼠,20 只雌鼠)和对照组(CK 组:40 只雄鼠,20 只雌鼠),实验组喂食含抗草甘膦大豆的饲料,对照组喂食含非转基因大豆饲料,GM 组及 CK 组中的 30 只雄鼠用于检测亲本(F<sub>0</sub>)雄鼠的脾细胞增殖变化。分别在 0、2、7、14、30 和 90 d 处死雄性小鼠取其脾脏,MTT 法检测脾淋巴细胞增殖。剩余 GM 组雄鼠与雌鼠按 1:2 喂食到 90 d 时进行合笼(CK 组相同处理),以得到子一代(F<sub>1</sub>)小鼠。F<sub>1</sub>代小鼠断乳后喂食非转基因大豆饲料至第 5 周龄,GM 组开始喂食转基因大豆饲料,CK 组继续喂食非转基因大豆饲料。分别在 0、2、7、14、30 和 90 d 处死雄性小鼠取其脾脏,MTT 法检测脾脏淋巴细胞增殖情况。每次取样 GM 组与 CK 组均取 5 只雄性小鼠。

## 1.4 小鼠脾淋巴细胞的分离和增殖反应

小鼠脾淋巴细胞的分离和增殖实验参照文献[6-8]进行并加以改进。小鼠处死后,无菌条件下解剖、取脾脏;无菌 PBS(pH 7.4)缓冲液中洗涤 3 次,将脾组织用注射器针芯挤压制备成脾细胞悬液过 200 目细胞筛,经 1 500 r·min<sup>-1</sup>离心 10 min,无菌 PBS(pH 7.4)洗 2 次,1 500 r·min<sup>-1</sup>离心 10 min;细胞沉淀中加入 6 mL 红细胞裂解液,冰浴 15 min 裂

解红细胞,1 500 r·min<sup>-1</sup>离心 10 min;加入 6 mL PBS 洗涤后 1 500 r·min<sup>-1</sup>离心 10 min;加入 5 mL RPMI-1640 培养液悬浮细胞,转入细胞培养皿,5% CO<sub>2</sub>,37℃ 静止培养 24 h,0.4% 台盼蓝染色计数,并调节细胞浓度至 1.5 × 10<sup>6</sup>个·mL<sup>-1</sup>。取小鼠脾细胞 100 μL 接种于 96 孔培养板中,每孔分别加入终浓度为 5 μg·mL<sup>-1</sup>的 ConA 20 μL、RPMI-1640 培养基 80 μL,以 RPMI-1640 培养液为空白对照,每孔 3 次重复。37℃ 培养 72 h 后,每孔加 20 μL 终浓度为 6.05 mg·mL<sup>-1</sup>的 MTT,培养 4 h。每孔加入 10 mmol·L<sup>-1</sup>HCl 酸化的 10% SDS 80 μL,振荡混匀,37℃ 培养箱中孵育过夜,用酶标仪于 570 nm 波长读取各孔光密度值。

## 1.5 数据分析

所有数据均采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析,统计分析采用方差分析,结果采用  $\bar{x} \pm s$  表示。组间分析进行方差分析后,再进行 *t* 检验, $P < 0.05$  为有统计学差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 喂食抗草甘膦转基因大豆饲料对亲本(F<sub>0</sub>)雄性小鼠脾细胞体外增殖的影响

30 d 短期喂食实验结果经方差分析,组间采用 *t* 检验,GM 组与对应的 CK 组之间 OD 值均没有显著性差异( $P > 0.05$ ),即 30 d 短期喂食过程中,喂食不同时间对雄鼠脾淋巴细胞功能无明显影响(表 1)。亲本(F<sub>0</sub>)小鼠继续喂食转基因大豆饲料至 90 d 分析脾细胞增殖变化,结果显示,长期喂食 GM 组与 CK 组之间也无显著性差异( $P > 0.05$ )。

长期(90 d)喂食实验 GM 组与 CK 组的脾细胞增殖变化与短期(30 d)喂食实验结果相比没有显著变化,脾细胞增殖保持相对稳定,说明在 30 d 的短期和 90 d 的长期喂食抗草甘膦转基因大豆饲料对雌性小鼠脾脏细胞免疫功能无明显影响。

### 2.2 喂食抗草甘膦转基因大豆饲料对子一代(F<sub>1</sub>)雄鼠脾淋巴细胞体外增殖的影响

子一代(F<sub>1</sub>)雄鼠 30 d 短期喂食实验中各不同时间的脾细胞增殖结果经方差分析,组间采用 *t* 检验,结果显示:GM 组与 CK 组的脾细胞增殖没有显著差异( $P > 0.05$ )(表 2)。同样子一代(F<sub>1</sub>)90 d 喂食实验中,脾细胞增殖的分析结果显示,GM 组与

CK 组之间无显著性差异( $P > 0.05$ )。

表 1 短期及长期喂食含抗草甘膦转基因大豆饲料对亲本( $F_0$ )雄性小鼠脾细胞体外增殖的影响

Table 1 The influence of transgenic soybean feed on cell proliferation for short-term and long-term feeding in parent male mice( $F_0$ )

处理时间 Processing time/d	组别 Group	OD 值( $\bar{x} \pm s$ ) n = 3 OD value( $\bar{x} \pm s$ ) n = 3	P 值 P value
0	GM	0.347 ± 0.009	0.692
	CK	0.349 ± 0.004	
2	GM	0.358 ± 0.020	0.380
	CK	0.368 ± 0.014	
7	GM	0.337 ± 0.005	0.285
	CK	0.345 ± 0.013	
14	GM	0.389 ± 0.009	0.523
	CK	0.396 ± 0.021	
30	GM	0.341 ± 0.003	0.238
	CK	0.336 ± 0.007	
90	GM	0.353 ± 0.006	0.112
	CK	0.347 ± 0.003	

表 2 短期及长期喂食抗草甘膦转基因大豆饲料对子一代雄性小鼠脾淋巴细胞体外增殖的影响

Table 2 The influence of transgenic soybean feed on cell proliferation for short-term and long-term feeding in progeny male mice( $F_1$ )

处理时间 Processing time/d	组别 Group	OD 值( $\bar{x} \pm s$ ) n = 3 OD value( $\bar{x} \pm s$ ) n = 3	P 值 P value
0	GM	0.340 ± 0.006	0.712
	CK	0.339 ± 0.004	
2	GM	0.337 ± 0.013	0.239
	CK	0.348 ± 0.012	
7	GM	0.353 ± 0.008	0.707
	CK	0.350 ± 0.015	
14	GM	0.361 ± 0.009	0.218
	CK	0.352 ± 0.011	
30	GM	0.410 ± 0.012	0.944
	CK	0.409 ± 0.019	
90	GM	0.362 ± 0.011	0.736
	CK	0.360 ± 0.006	

在子一代 30 和 90 d 的喂食实验中,不同时间 GM 组小鼠的脾细胞增殖实验结果与 CK 组相比,没有显著性差异;而且在各不同实验时间点,子一代 GM 组脾细胞增殖变化结果,与亲本 GM 组及 CK 组相比,脾细胞增殖也都不存在明显变化。长期

(90 d)喂食抗草甘膦转基因大豆饲料对子代小鼠脾淋巴细胞体外增殖无明显影响,表明转基因饲料不仅对亲本的脾细胞免疫功能无影响,其对后代的免疫功能也无损伤,即没有潜在的长期遗传损伤。

### 3 讨论

转基因植物技术通过生物遗传信息的人为操作,使动植物和微生物的生物特性可以打破种属间的自然隔离屏障进行快速转移,赋予受体植物以抗病、抗虫、改善植物品质等优良性状,从而带来显著的经济效益<sup>[9]</sup>。转基因技术自问世以来已经历了近 20 a 的发展,其产品及加工产品已进入我们的食物链中。但是转基因植物技术应用中的潜在安全隐患,如是否存在食品毒性、过敏性、导致抗生素抗性等方面需要进行全面长期的评估和研究。我国每年进口大量的转基因大豆用于食品和饲料工业,对其进行食用安全性评估有重要意义。

脾脏是最重要的免疫器官之一,包含 B、T 淋巴细胞,巨噬细胞等重要免疫细胞,脾淋巴细胞在某些活性物质,如美洲商陆丝裂原(PWM)<sup>[10]</sup>、刀豆蛋白 A(ConA)、脂多糖(PAS)等有丝分裂原刺激下发生增殖,其转化增殖程度与细胞免疫功能密切相关<sup>[11]</sup>。因此,对雄性小鼠喂食抗草甘膦转基因大豆饲料,检测其脾淋巴细胞体外增殖情况,可以发现转基因饲料是否对雄性小鼠免疫功能造成不利影响,评价其安全性。研究显示,亲本雄性小鼠短期(30 d)喂食抗草甘膦大豆饲料,在 0、2、7、14 和 30 d 取样,GM 组与 CK 组脾脏淋巴细胞体外增殖无显著性差异( $P > 0.05$ )。外源毒物对生物机体的毒害作用除可能发生短期急性效应外,其潜在的毒性作用可能表现为长期效应和积累性毒理作用,因此短期实验不一定能准确反映其潜在的长期毒害作用,因此在该实验中进行了长期喂食实验。长期(90 d)喂食抗草甘膦大豆饲料后,结果显示,与对照组相比,喂食转基因大豆饲料对亲本雄性小鼠脾淋巴细胞体外增殖无显著性差异,说明长期喂食抗草甘膦转基因大豆饲料对雄性小鼠脾淋巴细胞增殖无显著性影响。同样,毒物对机体的影响也可能通过遗传,在其后代表现出毒害作用,因此该研究对实验小鼠交配产生的子一代进行了脾细胞增殖分析,在 30 d 的短期实验过程中,喂食 0、2、7、14 和 30 d 时

GM组与CK组之间的脾淋巴细胞增殖没有显著性差异( $P > 0.05$ )。对子一代雄鼠长期(90 d)喂食抗草甘膦大豆饲料后,未发现GM组与CK组脾细胞增殖有显著性差异,说明短期和长期喂食抗草甘膦大豆饲料都不影响子一代雄鼠的脾淋巴细胞免疫功能,而且对雄鼠脾淋巴细胞的影响无明显遗传积累效应。

前期实验对抗草甘膦转基因大豆的安全性进行了部分评估工作,主要集中在评价其对小鼠各种器官是否造成病理损伤、对精子质量、精子细胞周期等是否有影响,结果上述指标未发现显著变化。该研究结果显示,在亲代及子一代的短期及长期喂食实验中,喂食转基因大豆饲料对脾淋巴细胞增殖无明显抑制作用,而且对其子一代的脾淋巴细胞增殖无不利影响,初步结果表明转基因大豆喂食不会对其后代产生遗传毒理作用。脾淋巴细胞体外转化只是评价免疫功能是否造成影响的一个方面,课题组正在对转基因大豆喂食后免疫反应类型变化、淋巴细胞亚群变化等方面作进一步的综合评估,评价其转基因饲料的潜在毒理作用。

## 参考文献

- [1] 林清,彭于发,吴红,等. 转基因作物及产品检测技术研究进展[J]. 西南农业学报,2009,22(2):513-518. (Lin Q, Peng Y F, Wu H, et al. Research progress of detection techniques for genetically modified crops and products[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2009, 22(2): 513-518. )
- [2] Richard E G, Afua O T. Suggested improvements for the allergenicity assessment of genetically modified plants used in foods[J]. Current Allergy and Asthma Reports, 2011, 11(4): 317-324.
- [3] Hammond B G, Dudek R, Lemen J K, et al. Results of a 90-day safety assurance study with rats fed grain from corn borer-protected corn [J]. Food and Chemical Toxicology, 2006, 44(7): 1092-1099.
- [4] Susan A M, Ian L, Jean S, et al. Thirteen week feeding study with transgenic maize grain containing event DAS-01507-1 in Sprague-Dawley rats[J]. Food and Chemical Toxicology, 2007, 45(4): 551-562.
- [5] 谭建专,刘莎莎,孙哲,等. 抗草甘膦转基因豆粕对肉仔鸡肠粘膜免疫的影响[J]. 动物营养学报,2011,23(5):836-841. (Tan J Z, Liu S S, Sun Z, et al. Effects of Glyphosate-tolerant soybean meal on intestinal mucosal immunity in broilers[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2011, 23(5): 836-841. )
- [6] 李玮,蒋莹,楚建平,等. 地黄酒提液对BALB/c雄性小鼠脾细胞体外增殖作用的研究[J]. 中国煤炭工业医学杂志,2010,13(7):1409-1451. (Li W, Jiang Y, Chu J P, et al. Study on proliferation of spleen cells in BALB/C mice stimulated by *Rehmannia glutinosa*[J]. Chinese Journal of Coal Industry Medicine, 2010, 13(7): 1409-1451. )
- [7] 胡庭俊,康乐,帅学宏,等. 山豆根多糖对雄性小鼠脾脏淋巴细胞体外增殖及分泌一氧化氮的影响[J]. 中药药理与临床,2009,25(5):70-72. (Hu T J, Kang L, Shuai X H, et al. The effect of *Sophora subprosrate* polysaccharide on proliferation and nitric oxide release of splenic lymphocytes from mice[J]. Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica, 2009, 25(5): 70-72. )
- [8] 刘民,马华,李柏青. MTT法检测雄性小鼠淋巴细胞增殖性反应探讨[J]. 中国实验动物学杂志,1999,9(3):146-149. (Liu M, Ma H, Li B Q. Investigation of detecting murine lymphocyte proliferate response by MTT assay[J]. Chinese Journal of Laboratory Animal Science, 1999, 9(3): 146-149. )
- [9] José L D, Jordi G B. A literature review on the safety assessment of genetically modified plants[J]. Environment International, 2011, 37(4): 734-742.
- [10] Liu S, Mizu H, Yamauchi H. Molecular response to phototoxic stress of UVB-irradiated ketoprofen through arresting cell cycle in G2/M phase and inducing apoptosis[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2007, 364(3): 650-655.
- [11] Megumi K, Hiroaki S, Yuko K, et al. CR/periphilin is a transcriptional co-repressor involved in cell cycle progression[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2007, 364(4): 930-936.

## 国际学术前沿摘编

### 美国威斯康星州大豆对土著根瘤菌及根瘤菌促生剂的反应

Branden J. Furseth\*, Shawn P. Conley, Jean-Michel Ané

**摘要:**根瘤菌拌种剂可以促进大豆的生物固氮,但是在效率上存在较大差异。该研究旨在通过研究不同环境条件下根瘤菌促生剂拌种的作用效果及大豆对土著根瘤菌的反应来更加准确的预测根瘤菌促生剂对大豆产量和品质的影响。试验于2009和2010年在威斯康星州的9个地点进行,考察了2种根瘤菌促生剂及1个未接种对照对3个大豆品种的影响。2年9个地点共18个环境的大豆籽粒产量、蛋白质和油分含量均与根瘤菌接种不相关( $P = 0.15, 0.38$ 和 $0.30$ )。除3个环境的产量与根瘤菌接种呈显著正相关外其余环境均不相关( $P < 0.05$ )。对照的产量与土著根瘤菌量呈极显著正相关( $P = 0.005$ ),但与根瘤菌接种处理不相关。结果表明,在土著根瘤菌数量较少时使用根瘤菌促生剂有利于大豆高产,由于使用根瘤菌促生剂处理的18个数据中,只有3个与产量呈正相关,因此,大豆根瘤菌促生剂用量的阈值需进一步确定。

孙明明 摘译自 *Crop Science*, 2012, 52: 339-344