

论著

转 Bt 基因大米暴露对雄性子代生殖系统影响的研究

冯永全,王二辉,支媛,于洲

(国家食品安全风险评估中心,卫生部风险评估重点实验室,北京 100022)

摘要:目的 研究转 Bt 基因大米(TT51)暴露对 Wistar 大鼠雄性子代生殖系统发育的影响。方法 亲代雌雄大鼠分别连续给予市售大米、亲本大米和 TT51 大米 70 d 后,交配并产生子代,孕期和哺乳期各组雌性大鼠继续给予相应受试大米;子代雄性大鼠断乳后各组均给予普通饲料至 70 日龄,其间每周称量体重并记录食物消耗量和动物生长发育状况。雄性仔鼠至 70 日龄处死,进行血常规、血生化、血清性激素水平、生殖器官重量以及精子参数等指标检测。结果 TT51 大米组与市售和亲本大米组比较,雄性子代体重、食物利用率、血常规、血生化、血清性激素水平以及精子各项指标差异无统计学意义。结论 转 Bt 基因大米暴露对雄性大鼠子代生殖系统发育未见不良影响。

关键词:转 Bt 基因大米;转基因食品;雄性仔鼠;生殖毒性

中图分类号:R155.52;Q492;TS201.6 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2013)02-0113-04

The effect of exposure to transgenic Bt rice on reproductive system of male offspring rats

Feng Yongquan, Wang Erhui, Zhi Yuan, Yu Zhou

(Key Laboratory of Food Safety Risk Assessment of Ministry of Health, China National Center For Food Safety Risk Assessment, Beijing 100022, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of transgenic Bt rice (TT51) exposure on reproductive system development of male filial generation of Wistar rats. **Methods** Market rice, TT51 and its parent were continuously administered to the female and male rats of parental generation for 70 days, and then produced the filial generation. The female parents were continued to feed with test samples during gestation and lactation. Filial generation male rats were administered with ordinary feed for 70 days after weaned, and body weight, food consumption and growth status were recorded every week. The young male rats were sacrificed on the 70th day for blood routine, blood biochemistry, serumal hormone level, reproductive organ weight, sperm parameter and other target examinations. **Results** No significant difference was observed between the TT51 rice, market rice and its parent rice groups on body weight, food consumption, blood routine, blood biochemistry, serumal hormone level, sperm parameter. **Conclusion** TT51 rice exposure had no observed adverse effect on the reproductive system development of male filial generation.

Key words: Transgenic Bt rice; transgenic food; male offspring; reproductive toxicity

水稻是世界三大主要粮食作物之一,全球约一半人口以大米为主食,在我国水稻作为第一大粮食作物,约占粮食总产量的 40%^[1-2]。与此同时,水稻也是受虫害侵袭最严重的粮食作物之一,虫害是导致水稻减产的重要原因之一,每年造成的产量损失大约占 10%^[3]。随着植物生物技术的迅速发展,目前人们利用基因工程技术将外源 Bt 抗虫基因导入水稻,从而大幅度提高水稻产量^[3-4],但由于转入的外源基因并非来自水稻自身基因库,转基因水稻是否会带来潜在

的对包括生殖发育影响在内的非预期效应,已经成为全社会普遍关注的热点问题^[5-7]。

转 Bt 基因水稻 TT51 是我国华中农业大学于近年新培养的具有自主知识产权的水稻新品种,田间试验表现出优异的抗虫特性,并于 2009 年获得农业部颁发的安全生产证书^[8]。本实验室在前期转 Bt 基因水稻(TT51)90 天喂养试验结果的基础上,对 TT51 大米生殖发育毒性开展研究,观察 TT51 大米 F0 代暴露对雄性子代 F1 代生长发育和生殖系统可能的影响,为 TT51 大米的安全性评价提供一些参考和科学数据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 受试物

TT51 大米及其亲本大米(明恢 63)均由华中农

收稿日期:2012-12-26

基金项目:转基因生物新品种培育重大专项(No.2012ZX08011001)

作者简介:冯永全 男 主管技师 研究方向为食品生殖、发育毒理学 E-mail: fengyongquan@cfsa.net.cn

通信作者:于洲 男 副研究员 研究方向为食品生殖、发育毒理学 E-mail: yz1244@yahoo.cn

业大学提供,两种大米种植条件完全相同,市售大米由试验者从超市购得。TT51 大米组、明恢 63 大米组及市售大米组饲料均由北京华阜康饲料公司参照 AIN-93G 标准制作^[9],各组饲料中大米掺入量均为 60%,并加入酪蛋白、蔗糖和玉米淀粉等以满足试验期间大鼠营养需求,各组饲料的主要营养成分见表 1。

表 1 对照、TT51 和明恢 63 大米组饲料配比 (%)

Table 1 Approximate nutrients formulation

成分	市售组	TT51 组	明恢 63 组
蛋白质	22	22	22
脂肪	5.5	4	4
碳水化合物	53.19	57.71	58.76
纤维素	3.174	3.1638	3.168

1.1.2 试验动物

SPF 级 Wistar 大鼠,雌性 36 只,体重 125 ~ 135 g,雄性 18 只,体重 130 ~ 140 g (购自北京维通利华实验动物科技有限公司,实验动物许可证号:京 2007-0001)。在中国医学科学院医学实验动物研究所动物房饲养[实验动物许可证号:SYXK(京) 2010-0029]。

1.1.3 主要试剂和仪器

大鼠促卵泡激素 (FSH) 放射免疫试剂盒、大鼠促黄体生成素 (LH) 放射免疫试剂盒、血清雌二醇 (E2) 放射免疫试剂盒、血清催乳素 (PRL) 放射免疫试剂盒、血清睾酮 (T) 放射免疫试剂盒 (购自北京北方生物工程研究所); DH-640 血细胞分析仪稀释液 (批号:120309)、血液生化分析用试剂 (均购自中生北控生物科技股份有限公司), MEK-6813K 型血细胞分析仪、日立 7080 型全自动生化分析仪、迈郎 ML-TMDI 810 型动物精子分析仪。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及处理

在动物房适应一周后,雌雄大鼠随机分配至市售大米、明恢 63 大米和 TT51 大米组,每组雄鼠 6 只,雌鼠 12 只。各组大鼠分别连续给予相应受试物大米饲料 10 周,每周称重并记录进食量。10 周后,将同组雌雄大鼠进行交配,每日 18 点按雌雄 1:1 合笼,次日晨进行阴道涂片或阴栓检查,以发现阴栓或镜下观察到精子确定为孕 0 d (gestation day 0, GD 0)。交配期间、孕期及哺乳期各组母鼠继续给予相应受试物大米,每天观察母鼠状况并每周称量母鼠体重。

仔鼠于出生后每天观察生长发育情况,并于出生后 4 d (postnatal day 4, PND 4) 进行窝标准化,每窝保留 8 只,雌雄各半,且 PND 0、4、7、14 及 21 称量仔鼠体重。仔鼠断乳后,各组每窝随机至多抽取

1 只雄鼠,每组共选 8 只进行进一步试验,各组所选雄性仔鼠均继续给予普通大鼠维持饲料至 70 日龄,用 1% 戊巴比妥钠麻醉,取血后处死并解剖,进行相关指标检测。其余雌雄仔鼠用于其他研究。

1.2.2 血常规和生化指标测定

70 日龄雄性大鼠处死后,取全血检测白细胞总数 (WBC)、红细胞计数 (RBC)、血红蛋白 (HGB)、红细胞压积 (HCT)、平均红细胞体积 (MCV)、平均红细胞血红蛋白含量 (MCH)、平均红细胞血红蛋白浓度 (MCHC)、红细胞分布宽度 (RDW)、血小板计数 (PLT); 取血清检测谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST)、碱性磷酸酶 (ALP)、总蛋白 (TP)、白蛋白 (ALB)、球蛋白 (GLOB)、白球比 (A/G)、尿素氮 (BUN)、肌酐 (CREA)、葡萄糖 (GLU)、甘油三酯 (TG)、总胆固醇 (CHOL)、和磷 (P)。

1.2.3 大体解剖及组织病理学检查

解剖时对脏器进行大体观察,并取脑、心、肝、脾、肺、肾、胃、胸腺、十二指肠和胰腺等脏器,称重后用 10% 甲醛溶液固定,梯度乙醇脱水,石蜡包埋后制片,苏木精-伊红 (HE) 染色,进行病理组织学检查。

1.2.4 血清性激素水平分析

动物麻醉后,腹主动脉采血 5 ml, 4 °C 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清, 检测前冻存于 -20 °C。参照试剂盒说明书检测 FSH、LH、E2、PRL 和 T。

1.2.5 精子分析

70 日龄雄性大鼠,取右侧附睾,放入盛有 3 ml 37 °C 预温的 M199 培养液中,沿附睾尾纵切 4 ~ 5 刀,放入 37 °C 培养箱扩散 5 min,让精子从附睾尾中游出,弃去附睾尾,获得精子悬液^[10]。用计算机辅助精子分析仪测定三组动物在精子密度、精子活力、精子活率、精子畸形率、平均路径速度 (VAP)、直线运动速度 (VSL)、曲线运动速度 (VCL)、鞭打频率 (BCF)、精子头侧摆幅度 (ALH)、直线性 (LIN)、摆动性 (WOB)、移动角度 (MAD)、前向性 (STR) 等反映运动能力及方式的参数,每份样品扫描 3 个视野进行统计。同时取精子悬液一滴置于载玻片,推片晾干,甲醇固定 5 min, 1% 伊红染色 1 h, 冲洗后镜下精子形态学观察,包括香蕉形、胖头、双头、无钩、尾折叠、双尾、无定形。每只雄鼠检查 1 000 个精子,计算畸形率^[11]。此外,取精子悬液,加入细胞计数板,倒置显微镜下计数精子数量。

1.3 统计学处理

各项指标均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。运用 SPSS 11.5 软件进行统计分析,进行单因素方差分析 (One-way ANOVA),组间比较采用 LSD 法,以 $P < 0.05$ 为差

异有统计学意义。

2 结果

2.1 子代雄性大鼠体重增长结果

三种大米受试物组子代雄鼠的体重均随着实验日期的延长而增加,其中 TT51 大米组和明恢 63 大米组子代雄性大鼠体重增长与市售大米组相比差异均无统计学意义($P > 0.05$),且 TT51 大米组和明恢 63 大米组之间相比,仔鼠体重增加差异无统计学意义($P > 0.05$)。表明 TT51 大米对大鼠雄性子代体重增长无明显影响。

2.2 子代雄性大鼠进食量结果

子代雄性大鼠断乳后至 PND 49,三种大米受试物组子代雄鼠的进食量均随着实验日期的延长而增加,PND 49~70 进食量则保持稳定且不再增加,其中 TT51 大米组和明恢 63 大米组子代雄性大鼠每周进食量与市售大米组相比差异均无统计学意义($P > 0.05$),且 TT51 大米组和明恢 63 大米组之间相比,每周进食量差异无统计学意义($P > 0.05$)。表明 TT51 大米对大鼠雄性子代进食量无明显影响。

2.3 子代雄性大鼠血常规结果

由表 2 可见,TT51 大米组、明恢 63 大米组和市售大米组间血常规指标均在本实验室历史对照范围内,且各组间差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

表 2 血常规测定结果($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 The result of routine blood test parameters

项目	市售组	TT51 组	明恢 63 组
WBC($10^9/L$)	10.93 ± 2.53	9.90 ± 1.55	10.25 ± 3.02
RBC($10^{12}/L$)	5.45 ± 0.72	4.90 ± 0.73	4.83 ± 0.52
HGB(g/L)	115.50 ± 15.82	107.63 ± 9.29	108.63 ± 9.41
HCT(%)	30.23 ± 4.49	27.34 ± 4.39	27.26 ± 2.75
MCV(fl)	55.43 ± 1.45	55.74 ± 1.65	56.48 ± 1.39
MCH(pg)	21.23 ± 1.29	22.20 ± 2.26	22.68 ± 2.83
MCHC(g/L)	383.13 ± 24.17	398.75 ± 42.43	401.88 ± 55.06
PLT($10^9/L$)	875.13 ± 127.09	1 030.00 ± 167.26	875.75 ± 187.33
RDW(%)	13.63 ± 0.86	13.85 ± 1.20	14.30 ± 0.93

2.4 子代雄性大鼠血生化结果

由表 3 可见,TT51 大米组、明恢 63 大米组和市售大米组间血液生化指标均在本实验室历史对照范围内,且各组间差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

2.5 子代雄性大鼠病理组织学检查

取雄性子鼠脑、心、肝、脾、肺、肾、胃、十二指肠、胰腺和胸腺,进行大体观察和病理组织学检查,各受试物大米组均未见有意义的病理改变。

2.6 生殖器官脏器系数

由表 4 可见,TT51 大米组和明恢 63 大米组子代雄性大鼠生殖器官脏器系数与市售大米组相比

表 3 血生化测定结果($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 3 The result of blood biochemical parameters

项目	市售组	TT51 组	明恢 63 组
ALT(U/L)	25.86 ± 2.97	22.71 ± 5.31	26.00 ± 5.29
AST(U/L)	157.43 ± 24.95	142.29 ± 20.64	136.25 ± 28.46
ALP(U/L)	40.50 ± 4.81	43.63 ± 6.44	41.50 ± 10.76
ALB(g/L)	38.56 ± 1.36	38.33 ± 1.73	37.79 ± 1.06
CHOL(mmol/L)	1.91 ± 0.27	2.39 ± 0.37	1.94 ± 0.22
CREA(mmol/L)	76.17 ± 4.35	74.01 ± 8.58	74.60 ± 6.14
GLUC(mmol/L)	4.27 ± 0.34	3.48 ± 0.97	4.92 ± 1.52
BUN(mmol/L)	5.01 ± 0.65	5.35 ± 0.62	5.60 ± 0.73
CA(mmol/L)	2.43 ± 0.05	2.50 ± 0.08	2.45 ± 0.09
PHOS(mmol/L)	3.52 ± 0.50	3.53 ± 0.44	3.56 ± 0.23
TP(g/L)	58.83 ± 3.19	58.39 ± 3.32	57.69 ± 1.77
TG(g/L)	1.42 ± 0.71	0.81 ± 0.20	1.32 ± 0.76

表 4 子代大鼠脏器系数测定结果($\bar{x} \pm s, n = 8, g$)

Table 4 The comparison of the weight of offspring male rats(g)

项目	市售组	TT51 组	明恢 63 组
附睾	0.29 ± 0.06	0.29 ± 0.05	0.25 ± 0.06
精囊腺	0.32 ± 0.06	0.28 ± 0.05	0.29 ± 0.07
睾丸	0.91 ± 0.12	1.00 ± 0.07	0.96 ± 0.10

差异均无统计学意义($P > 0.05$),且 TT51 大米组和明恢 63 大米组之间相比,生殖器官脏器系数差异无统计学意义($P > 0.05$)。表明 TT51 大米对大鼠雄性子代生殖器官脏器系数无明显影响。

2.7 血清性激素测定结果

由表 5 可见,雄性子鼠各项血清性激素水平,TT51 大米组和明恢 63 大米组子代雄性大鼠与市售大米组相比差异均无统计学意义($P > 0.05$),且 TT51 大米组和明恢 63 大米组之间相比,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 5 血清性激素测定结果($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 5 Offspring male serum hormone concentration

项目	市售组	TT51 组	明恢 63 组
FSH(mIU/ml)	0.89 ± 0.32	1.07 ± 0.45	0.85 ± 0.37
LH(mIU/ml)	1.17 ± 1.01	1.48 ± 1.10	0.82 ± 0.44
PRL(μ IU/ml)	115.25 ± 37.93	145.76 ± 50.87	131.69 ± 48.27
E ₂ (pg/ml)	58.94 ± 12.39	84.15 ± 30.24	56.37 ± 16.95
T(ng/ml)	2.20 ± 0.43	2.86 ± 0.93	2.63 ± 1.66

2.8 精子分析结果

由表 6 可见,雄性仔鼠在精子密度、精子活力、精子活率、精子畸形率等指标方面,TT51 大米组和明恢 63 大米组子代雄性大鼠与市售大米组相比差异均无统计学意义($P > 0.05$),且 TT51 大米组和明恢 63 大米组之间相比,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

3 讨论

虽然转基因水稻在前期的食品成分分析上与其相对应的传统食品几乎完全相似,但由于转入的外源基因并非来自水稻自身基因库,其是否会带来

表6 精子分析结果($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 6 The comparison of the testicular sperm production, epididymis sperm count of offspring male rats

项目	市售组	TT51组	明恢63组
精子数量($\times 10^6/g$)	157.45 \pm 24.51	160.59 \pm 34.91	164.17 \pm 19.33
精子活力(%)	86.37 \pm 8.57	82.94 \pm 10.28	85.56 \pm 8.23
精子畸形(%)	8.88 \pm 1.36	9.13 \pm 1.90	10.25 \pm 2.38
路径速度(VAP, $\mu m/s$)	142.32 \pm 31.25	154.52 \pm 19.54	147.40 \pm 27.18
直线速度(VSL, $\mu m/s$)	57.08 \pm 17.71	60.89 \pm 12.26	53.50 \pm 1.83
曲线速度(VCL, $\mu m/s$)	225.15 \pm 39.41	209.96 \pm 38.72	221.18 \pm 26.99
鞭打频率(BCF, Hz)	19.37 \pm 4.30	19.32 \pm 3.86	18.50 \pm 3.90
侧摆幅值(ALH, μm)	58.88 \pm 15.21	65.89 \pm 7.62	62.81 \pm 11.82
线性度(LIN, %)	0.59 \pm 0.22	0.56 \pm 0.21	0.59 \pm 0.22
摆动性(WOB, %)	0.70 \pm 0.00	0.70 \pm 0.00	0.70 \pm 0.00
移动角度(MAD, $^\circ$)	64.26 \pm 13.96	69.03 \pm 10.93	68.33 \pm 12.83
前向性(STR, %)	0.82 \pm 0.31	0.95 \pm 0.26	0.95 \pm 0.14

一定的毒副作用或潜在对包括生殖发育影响在内的非预期效应,则需要进一步通过大量的动物试验观察^[12]。

在转基因食品的安全性评价中,营养成分的改变是重要的考虑因素之一,尤其是开展动物饲喂试验时应特别注意,因此许多科学机构建议在进行转基因植物安全评价时,应充分考虑营养素不平衡带来的影响^[13]。在本研究中,我们对按60%比例掺入TT51大米、明恢63大米及市售大米的饲料主要营养成分,如氨基酸,脂肪酸,维生素和微量元素等进行分析和比较。为了消除营养素不平衡给实验结果带来的影响,依据食物成分分析的结果和AIN-93G饲料标准^[9],我们对各组饲料添加了部分营养素,使各组间大鼠所需营养素和能量相一致。

目前,我国转基因食品的安全性评价主要集中在亚慢性动物喂养试验为主,试验动物一般情况观察、血液生化和组织病理通常是主要考察指标,上述指标不足以反应转基因食品对子代生殖系统的影响,需进一步研究转基因食品对生殖在内的非预期效应,增加性激素、精子分析等生殖发育毒性指标^[14]。

本研究中设定了明恢63大米组和市售大米组,前者用来排除转基因亲本大米自身对试验动物可能造成的影响,后者排除普通大米的影响,使试验能够真实地反映转基因Bt蛋白对试验动物生殖毒性的作用。研究结果表明,子代大鼠试验期间各组动物生长状况良好,未出现不良症状,血液生化和病理组织学检查也未见有意义的变化,上述结果与Schroder等人^[15]的相关研究结果基本一致。此外,在相应的生殖发育毒性影响研究中,观察子鼠至PND 70,以涵盖精子成熟的整个过程,并同时观察相关生殖毒性参数,包括子鼠血清激素水平和精子活力等。检测结果表明,血清性激素(FSH、LH、E2

和T)和精子各项参数在各受试物大米组之间差异无统计学意义($P > 0.05$),未见TT51对子一代大鼠生殖系统发育具有毒性作用。

综上所述,转BT蛋白大米(TT51)以60%比例掺入饲料喂饲亲代大鼠至子一代断乳,未见其对子一代大鼠具有一般毒性和生殖毒性作用。但是,由于存在实验动物种系和试验时间等限制,对转Bt基因大米是否具有包括生殖发育毒性等非预期效应还需要进行更加深入和长期的试验研究。

参考文献

- [1] 胡柏椿,陈天金,朴建华,等. 转基因水稻及安全性的研究进展[J]. 中国食物与营养,2009(8):21-24.
- [2] 程式华,胡培松. 中国水稻科技发展战略[J]. 中国水稻科学,2008,22(3):223-225.
- [3] 刘丽,于志晶,张文娟,等. 转基因抗虫水稻研究进展[J]. 安徽农业科学,2011,3(9):5109-5110.
- [4] 王丽冰,刘立军,颜亨梅. 转Bt抗虫基因水稻的研究进展和生物安全性及其对策[J]. 生命科学研究,2009,13(2):182-184.
- [5] Han J H, Yang Y X, Chen S Y, et al. Comparison of nutrient composition of parental rice and rice genetically modified with cowpea trypsin inhibitor in China[J]. J Food Compos Anal, 2005,18(4):297-302.
- [6] 王忠华,周美园,夏英武. 转基因产品的食用安全性评价[J]. 生命科学,2002,14(5):305-307.
- [7] 吴振,顾宪红. 转基因食品及其食用安全性评价[J]. 家畜生态学报,2011,32(2):1-4.
- [8] Manimaran P, Ramkumar G, Mangrauthia SK, et al. Bt rice evaluation and deployment strategies[J]. GM crops, 2011, 2(3):135-137.
- [9] Reeves P G, Nielsen F H, Fahey G C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the american institute of nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the ain-76a rodent diet[J]. J Nutr,1993,123(11):1939-1951.
- [10] 韩彩艳,孙伟,王波,等. 生精散治疗大鼠弱精子症的实验研究[J]. 中国中医药信息杂志,2011,18(4):31-33.
- [11] 黄文涛,陈慧. 大鼠精子畸形形态学观察分析[J]. 重庆中草