

史宗勇,路超,唐中伟,等. 转 *CP4-EPSPS* 基因大豆对大鼠的致突变研究[J]. 江苏农业科学,2016,44(10):286-288.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.10.080

# 转 *CP4-EPSPS* 基因大豆对大鼠的致突变研究

史宗勇<sup>1,2</sup>, 路超<sup>1</sup>, 唐中伟<sup>1,2</sup>, 赵成萍<sup>1,2</sup>, 陈卫国<sup>1</sup>, 马艳琴<sup>1</sup>, 袁建琴<sup>1,2</sup>

[1. 山西农业大学生命科学学院, 山西太谷 0308012; 2. 农业部转基因生物产品成分监督检验测试中心(太原), 山西太谷 0308012]

**摘要:**以 SD 大鼠为试验动物模型, 分别饲喂含转 *CP4-EPSPS* 基因大豆和常规大豆饲料, 以转基因大豆饲料饲喂大鼠为试验组, 常规大豆饲料饲喂大鼠为对照组, 择期进行精子畸变试验、显性致死试验和致畸试验。结果表明: 试验组和对照组相比精子畸变率无显著差异 ( $P > 0.05$ ), 二者与阳性对照组差异显著 ( $P < 0.05$ ); 显性致死试验中试验组与对照组胚胎死亡率无显著差异 ( $P > 0.05$ ); 致畸试验中 2 组活胎同性别间的体质量、体长、尾长、前肢长度均无显著差异, 经活胎外表检查、骨骼检查、内脏检查无畸形。结果说明, 喂食转 *CP4-EPSPS* 基因大豆饲料对大鼠精子畸变、胚胎致死、胎仔畸形无不良影响, 不存在生殖毒性。

**关键词:** 转 *CP4-EPSPS* 基因大豆; 精子畸变; 显性致死; 致畸试验

**中图分类号:** S565.101 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)10-0286-03

1988 年世界第一例转基因大豆诞生<sup>[1]</sup>, 自 1996 年美国首次批准 Monsanto(孟山都)公司抗草甘膦转基因大豆商业化种植 19 年以来, 其种植面积在全球范围内不断扩大, 2014 年全球转基因大豆种植面积达 0.90 亿  $\text{hm}^2$ , 占当年转基因作物总面积 1.815 亿  $\text{hm}^2$  的近 50%, 更是占全球大豆种植面积的 82%<sup>[2]</sup>。抗除草剂大豆 GTS-40-3-2 累计获得 26 个国家和欧盟 28 个成员国的 52 次批准, 是全球获得监管机构批准频次最多的作物, 也是应用最为广泛的转基因作物之一<sup>[3]</sup>。抗除草剂大豆 GTS-40-3-2 是在 Soy-bean A5403 大豆中导入从天然农杆菌菌系 CP4 中分离出的具有抗草甘膦功能的 EPSPS 酶, 使植株对草甘膦不敏感, 能够忍受正常剂量或更高剂量的草甘膦而不被杀死, 从而获得重大效益。

目前, 国内外对转基因大豆食用性安全的研究集中在其营养成分方面<sup>[4-5]</sup>, 而动物试验主要集中在日常行为、脏器系数、组织病理学、血液学和血清化学等分析, 大多数研究结果显示转基因大豆是安全的<sup>[6-7]</sup>。Qi 等以复合性状转基因大豆(3 $\phi$ 5 423 $\times$ 40-3-2)喂养 SD 大鼠 90 d 后, 发现大鼠的脏器系数、血常规和血生化等指标存在少数显著性差异, 但这些差异与转基因成分无关且变量数值在正常范围内<sup>[8]</sup>。由于近年来关于转基因作物安全性的深入研究, 转基因食品评价的实质等同性原则受到质疑, 从手性 D-氨基酸(DAA)角度考量, 转基因食品 and 传统食品的安全性不实质等同<sup>[9-10]</sup>, 转基因食品的食用安全性受到了社会和公众的广泛关注。

哺乳动物生殖过程中, 精子的形成和胚胎的发育对外界刺激极为敏感, 易受化学、环境因素的影响而发生畸变, 而且这些潜在的生殖毒性对生物个体和种群的影响是长期的。当前关于转 *CP4-EPSPS* 基因大豆致畸效应研究和报道较少。

本试验以 SD 大鼠为动物模型, 评估喂食转 *CP4-EPSPS* 基因大豆对大鼠生殖过程致畸性的影响, 进而探讨转 *CP4-EPSPS* 基因大豆的潜在生殖毒性作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物分组及处理

雄、雌各 60 只 30 d 龄 SD 大鼠购自山西医科大学实验动物中心, 按性别分类组群, 分笼饲喂。适应性喂食 7 d 后, 各群内随机取 30 只, 喂食含转基因大豆豆粕加工的饲料(GM 组), 其余 30 只喂食含常规大豆豆粕的饲料(CK 组), 按照国家实验动物饲养标准喂食, 根据试验进程随机挑选大鼠进行试验。

### 1.2 饲料

试验用转基因大豆豆粕为孟山都远东有限公司抗农达 GTS40-3-2 大豆加工品, 对照组常规大豆豆粕为其亲本 Soy-bean A5403 大豆加工品。转基因豆粕经农业部转基因生物产品成分监督检验测试中心(太原)检测确认含 *CP4-EPSPS* 外源基因。大鼠饲料委托山西医科大学实验动物中心加工, 2 种饲料组成成分配比相同, 其中豆粕成分占比 20%, 除豆粕外其余成分来源一致, 饲料经检测符合 GB 14924.3—2010《实验动物配合饲料营养成分》要求。

### 1.3 主要试剂与器材

磷酸盐缓冲液、生理盐水、甲醇、伊红、丝裂霉素 C(MMC)、乙醇、氢氧化钾、茜素红、冰醋酸、甘油、水合氯醛、氢氧化钾、鲍音(Bouin)氏液; 生物显微镜、解剖刀、剪刀、镊子、眼科剪、眼科镊、单面刀片、注射器等。

### 1.4 方法

1.4.1 精子畸变试验 取 70 d 龄体质量相近的雄性大鼠共 15 只, 其中 CK 组 10 只, 平均分为 2 组, 设为阳性对照组和正常对照组, GM 组 5 只设为试验组。阳性对照组大鼠腹腔注射丝裂霉素 C(MMC) 1.1  $\text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  连续处理 5 d, 给药剂量的参照傅剑云等小鼠精子致畸数据结合药理实验等效剂量系数折算法换算确定<sup>[11]</sup>。正常对照组和试验组不做任何处理。处理期间和处理后各组仍按试验设计分组进行饲喂。喂食

收稿日期: 2015-08-13

基金项目: 山西省自然科学基金(编号: 2013011028-2); 山西省科技攻关基金(编号: 20140311025-3)。

作者简介: 史宗勇(1970—), 男, 山西太谷人, 硕士, 副教授, 从事动物生理与转基因生物安全的研究。E-mail: zongyongtg@sohu.com。

42 d 后颈椎脱臼法处死大鼠,剪开腹腔,分离并摘取双侧附睾置于生理盐水中,用剪刀剪碎,用吸管轻轻吹打悬浮液 5 ~ 6 次后静置 3 ~ 5 min,用 4 层擦镜纸过滤组织碎片,取滤液滴于洁净载玻片上,均匀推片。晾干后用甲醇固定 5 min,伊红染色 1 h,用水轻轻冲洗,干燥后进行镜检。在高倍镜下观察 500 个精子的形态,计算精子畸变率。精子畸变率 = 畸变精子数/总检测精子数 × 100%。

1.4.2 显性致死试验 在 CK 组、GM 组内选取 70 d 龄体重相当的大鼠,每组选取雌性 15 只,雄性 5 只,组内按雌雄比 3 : 1 交配,下午 18:00 同笼,次日 08:00 雌雄分笼,随即冲洗雌鼠阴道制做涂片检查精子,以查到精子为受孕 0 d,受孕 21 d 剖腹取出即将分娩孕鼠的子宫,辨认子宫内的活胎、死胎、吸收胎数。

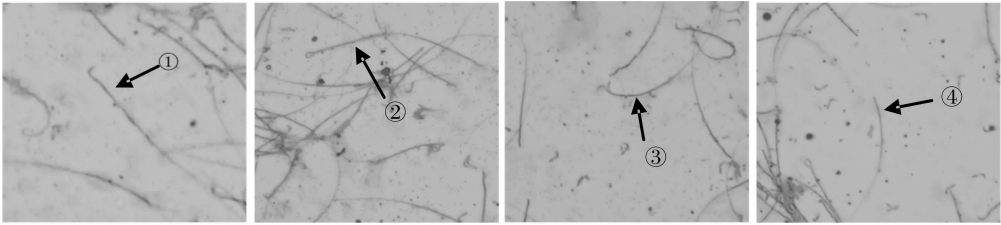
1.4.3 胚胎生长发育情况 每组随机选取显性致死试验雌性孕鼠 3 只,称量胎鼠体质量,测体长、尾长、前肢长。将胎仔按子宫内位置顺序编号。单数的胎仔放入 80% 的乙醇溶液中固定 5 d,用 1% 的氢氧化钾溶液浸泡 5 d,至肌肉透明可见

骨骼,然后用茜素红染色 3 d 至骨骼染成紫色,置于透明液中 2 d,做骨骼畸形检查。编号双数的胎仔放入鲍音 ( Bouin ) 氏液中固定 10 d 后,取出标本用自来水洗去固定液,用单面刀片沿口经耳做水平切面查口腔;将切下的颅顶部,沿眼球前缘垂直作额状切面查鼻道;然后沿着眼球正中垂直作第二额状切面,检查眼球、脑室;沿眼球后缘垂直作第三额状切面,检查脑、脑室。之后沿胸、腹壁中线和肋下缘水平线作“十”字切口,暴露胸腔、腹腔及盆腔内的器官,做内脏畸形检查。

2 结果与分析

试验期间,各组试验动物活动正常,生长发育良好,被毛浓密有光泽,未见外观体征、行为活动和饮食方面异常,也未发生死亡现象。

2.1 转 CP4 - EPSPS 基因大豆对大鼠精子畸变的影响 试验组、对照组和阳性对照组在喂食 42 d 后取附睾精子进行试验,发现 3 组均有畸变精子,由图 1 可知,异常精子表现为胖头、双头及无头等。



①表示为正常精子;②表示为胖头精子;③表示为双头精子;④表示为无头精子

图1 大鼠精子畸变涂片

将精子镜检结果进行统计分析后发现,试验组、正常对照组与阳性对照组精子畸变率具有极显著性差异 ( $P < 0.01$ ),说明阳性对照显著,结果成立。试验组和正常对照组相比,采用  $t$  检验  $P$  值为 0.147 ( $P > 0.05$ ),无统计学意义 (表 1)。

表 1 转基因大豆对大鼠精子畸形的影响

处理	动物数 (只)	受检精子总数 (个)	畸变精子总数 (个)	畸变率 (%)
正常对照	5	2 500	35	1.4 ± 0.31aA
试验组	5	2 500	50	2 ± 0.45aA
阳性对照	5	2 500	135	5.4 ± 0.5bB

注:同列数据后不同小写字母、大写字母分别表示处理间差异显著 ( $P < 0.05$ )、差异极显著 ( $P < 0.01$ )。

2.2 显性致死试验

剖腹取出即将分娩母鼠的子宫,辨认子宫内的活胎、死胎、吸收胎数。检查发现活胎胎仔完整成形,肉红色,能自然运动,对机械刺激有运动反应;胎盘较大呈红色,发育正常。晚死胎胎仔完整成形、灰红色、无自然运动,对机械刺激无反应;胎盘灰红色、较小。吸收胎呈暗紫或浅色点块,不能辨认胚胎和胎盘。对各受孕组统计分析表明:试验组和正常对照组平均着床数 ( $P = 0.688$ )、胚胎死亡率 ( $P = 0.994$ ) 差异不显著 (表 2)。

2.3 致畸试验

解剖母鼠子宫逐一详细察看,行胎仔外部检查,发现全部胎仔外观检查正常无畸形。测量活胎体质量、体长、尾长和前肢长度 (图 2),各组按胎仔性别归类,经统计学分析,2 组间

表 2 转基因大豆对大鼠显性致死试验的影响

处理	动物数 (只)	总着床数 (个)	平均着床数 (个)	胚胎死亡率 (%)
正常对照	15	191	12.73 ± 1.90a	6.93 ± 7.43a
试验组	15	195	13.00 ± 1.69a	6.91 ± 6.59a

雄性胎仔、雌性胎仔各指标  $t$  检验  $P$  值全部大于 0.05,表明两组间同性胎仔生长发育无显著差异。

用放大镜检查处理好的胎仔骨骼透明标本,可见试验组、对照组均有少数胸骨、颅骨发育不全,肋骨、椎骨、四肢骨数量正常,各骨形态、大小未见异常。

经内脏检查,发现活胎仔口腔无腭裂、舌缺或分叉;鼻道无扩大、单鼻道等畸形;眼球形态正常成双;无脑水肿积水,无脑室扩大;胸腔、腹腔内心脏和呼吸、消化、泌尿、生殖等主要器官数目、形态、位置无异常,大小匀称无异常。内脏检查无畸形。

3 讨论与结论

精子畸变试验通过观察精子形态的变化,检测受试物对实验动物精子形成过程的影响,在可引起生殖细胞遗传性损伤的因素作用下,动物睾丸产生的畸形精子数可大量增加,雄性动物接触受试物后精子畸变率的改变,可反映该受试物的生殖毒性和对生殖细胞的致突变性。试验结果发现,试验组精子畸变率 2%,处于大鼠的精子正常畸变范围 0.8% ~ 3.4%<sup>[12]</sup>,与对照组相比亦无明显差异,表明喂食含转 CP4 - EPSPS 基因大豆饲料不会影响实验大鼠的精子畸形率,与张奕等对转 GL 融合蛋白基因大米对 SD 大鼠的亚慢性毒性试

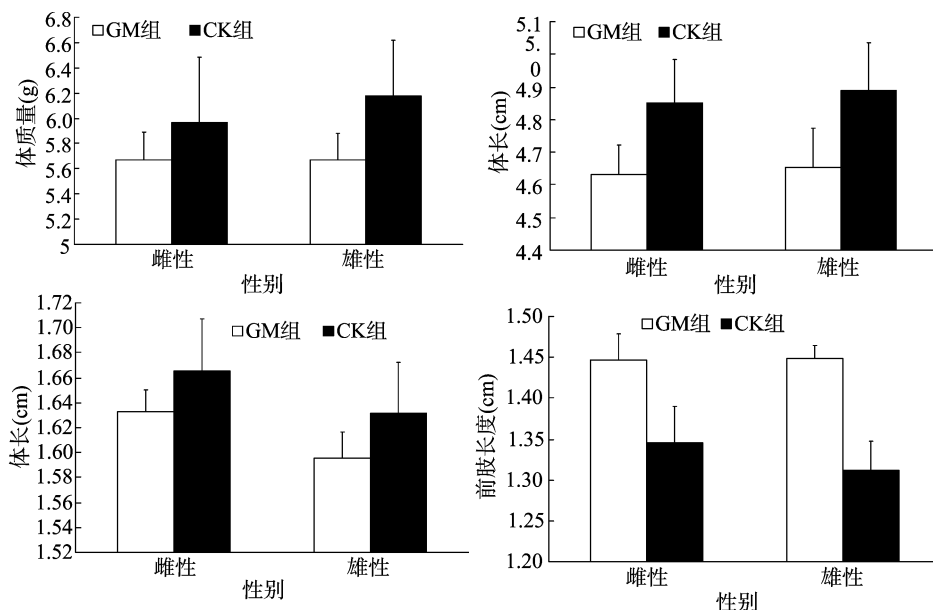


图2 喂食转基因大豆对孕鼠胎仔的影响

验研究的精子畸变结果<sup>[13]</sup>一致。本试验精子畸变结果也与芦春斌等喂食转基因大豆对小鼠精子存活率与畸形率影响的研究结果<sup>[14]</sup>相似。

显性致死试验通过观察大鼠胚胎死亡情况,检测受试物诱发哺乳动物生殖细胞的染色体畸变,反映受试物对哺乳动物生殖细胞的致突变性。试验结果显示,试验组与对照组的平均着床数和胚胎死亡率均无显著差异,表明 *CP4-EPSPS* 基因大豆未导致实验大鼠染色体结构异常或染色体数目变化。芦春斌等研究也表明,喂食转基因大豆对大鼠早期胚胎发育无不良影响<sup>[15]</sup>。

致畸试验是应用实验动物鉴定外来受试物致畸性的试验,母体在孕期如受到可通过胎盘屏障的有害物质作用,就会影响胚胎的正常发育与器官分化,导致胚胎结构和机能的缺陷,表现出畸胎,从而检测受试物导致胚胎结构畸形及生长迟缓等毒性作用。参考余梦瑶等对转基因棉籽壳栽培毛木耳安全性评价时采用在动物的器官敏感期进行染毒的检测方法对转基因大豆进行检测<sup>[16]</sup>。试验未发现转基因大豆对胎鼠的形成、发育、外观、骨骼及内脏等有致畸作用。本试验结果与张珍誉等对转 *Bt* 基因稻谷的研究结果<sup>[17]</sup>相同。

本试验研究结果表明,喂食转 *CP4-EPSPS* 基因大豆饲料对雄性大鼠精子畸变、孕鼠胚胎致死、胎仔畸变效应无明显影响,说明转 *CP4-EPSPS* 基因大豆对大鼠无明显生殖毒性。

#### 参考文献:

- [1] Hinchey M W, Connor - Ward D V, Newell C A, et al. Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium* - mediated DNA transfer[J]. *Biotechnology*, 1988(6): 915 - 922.
- [2] 刘定富. 图解全球转基因作物商业化[EB/OL]. (2015 - 03 - 17) [2015 - 08 - 6]. <http://www.agro-gene.cn/info-2321.shtml>.
- [3] James C. 2014 年全球生物技术/转基因作物商业化发展态势[J]. *中国生物工程杂志*, 2015, 35(1): 1 - 14.
- [4] Novak W K, Haslberger A G. Substantial equivalence of antinutrients

- and inherent plant toxins in genetically modified novel foods[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2000, 38(6): 473 - 483.
- [5] 朱元招, 王凤来, 尹靖东. 抗草甘膦大豆及豆粕营养成分和抗营养因子研究[J]. *营养学报*, 2010, 32(2): 178 - 182.
- [6] 张 力, 程 呈, 何 宁, 等. 转基因高油酸大豆对大鼠的亚慢性毒性研究[J]. *毒理学杂志*, 2011, 25(5): 391 - 394.
- [7] Dolaichuk O P, Fedoruk R S, Koval'chuk I I. The impact of components of conventional and genetically modified soybeans on parameters of the immune and reproductive systems in female rats[J]. *Fiziologichnyi Zhurnal*, 2013, 59(2): 65 - 70.
- [8] Qi X, He X, Luo Y, et al. Subchronic feeding study of stacked trait genetically - modified soybean (305423 × 40 - 3 - 2) in Sprague - Dawley rats[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2012, 50(9): 3256 - 3263.
- [9] Magaña - Gómez J A, de la Barca A M. Risk assessment of genetically modified crops for nutrition and health[J]. *Nutrition Reviews*, 2009, 67(1): 1 - 16.
- [10] 张志昆, 袁龙飞, 刘庆菊, 等. 基于手性 *D* - 氨基酸的毒理性对转基因食品安全性的研究[J]. *中国科学: 化学*, 2015, 45(1): 98 - 108.
- [11] 傅剑云, 赵 硕, 徐彩菊, 等. 甲基磺酸甲酯、环磷酰胺、丝裂霉素 C 对小鼠畸形影响的研究[J]. *癌变 · 畸变 · 突变*, 1998, 10(4): 223 - 226.
- [12] 王岳飞. 茶儿茶素制剂毒理学安全性评价与保健功效研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2004.
- [13] 张 奕, 董 英, 周兴华, 等. 转 GL 融合蛋白基因水稻的急性毒性与遗传毒性[J]. *江苏农业科学*, 2012, 40(3): 268 - 271.
- [14] 芦春斌, 周 文, 刘 标. 喂食转基因大豆对子代雄鼠生殖系统的影响[J]. *大豆科学*, 2013, 32(1): 119 - 123.
- [15] 芦春斌, 郑建新, 蔡 娟, 等. 转基因大豆对雌鼠胚胎发育及受精能力的影响[J]. *大豆科学*, 2014, 33(4): 578 - 582.
- [16] 余梦瑶, 郑林用, 许晓燕, 等. 转基因棉籽壳栽培毛木耳的安全性评价初报[J]. *西南农业学报*, 2010, 23(3): 644 - 649.
- [17] 张珍誉, 颜亨梅. 转 *Bt* 基因稻谷对小鼠生理与生殖的影响[J]. *激光生物学报*, 2011, 20(1): 50 - 53.