

转 SCK 基因大米对小型猪生长发育的影响

韩军花 杨月欣 陈淑蓉 杨晶明 边立华 门建华 杨晓光
(中国疾控中心营养与食品安全所,北京 100050)

摘要:为观察和比较转 SCK 基因大米和亲本大米对机体生长发育的影响,从而评价转 SCK 基因大米的营养价值,选用 15 头雄性断乳中国实验用小型猪为试验对象,随机分成 3 组,分别是正常对照组(NG)、亲本大米对照组(CG)、转基因大米组(GG),饲料根据实验目的配制,共饲养 62 d。观察 3 组动物体格发育(体重、体长、体高、胸围)和脏器发育(脏器重、大体病理和组织病理)等方面的差异。结果表明,亲本大米对照组和转基因大米组动物的体格发育均优于正常对照组;3 组动物脏器发育差异不明显,大体病理和组织病理均未观察到转 SCK 基因大米具有明显的非期望效应。说明外源性基因的插入未改变大米的营养价值或产生对动物的不良影响,转 SCK 基因大米和亲本大米在动物饲养方面基本满足“实质等同性”的要求。

关键词:转基因;植物;转基因;稻(米);猪;胰蛋白酶抑制剂

The effect of rice genetically modified with cowpea trypsin inhibitor gene on the growth and development of minipigs

Han Junhua, Yang Yuexin, Chen Shurong, Yang Jingming, Bian Lihua, Men Jianhua, Yang Xiaoguang
(National Institute for Nutrition and food safety, Chinese CDC, Beijing 100050, China)

Abstract: In order to assess and compare the nutritional value of rice genetically modified with cowpea trypsin inhibitor gene (GM rice) and to see the effect of this rice on the growth and development of animals, 15 weaning male minipigs weighed 6.22 ± 0.42 kg were divided into three groups and 5 for each group, : (1) Normal group (NG), fed a commercial pig diet, (2) Control or parental rice group (CG), fed a diet contain 70% parental rice, (3) GM rice group (GG), fed a diet contain 70% GM rice. All minipigs were housed individually in the pen, and had ad libitum access to feed and water. The feeding period was 62 days, the growth (weight, height, body length, breast circumference, ect.) and food intake were determined at regular intervals. All the animals were sacrificed at the end of the experiment and the parameters of growth and development were examined, and compared among the three groups. The results showed that there were no significant difference in the growth and development of body, organ weight and histopathologic examination of tissues in CG and GG group, the body weight gain of minipigs in CG and GG group was higher than that in NG group ($P < 0.05$). The results suggest that the feeding value of GM rice and parental rice were similar in this study, and no detrimental unexpected effects were observed in minipigs fed rice genetically modified with cowpea trypsin inhibitor gene.

Key Words: Transgenes; Plants; Transgenic; Rice; Swine; Trypsin Inhibitors

转基因作物及食品的研制工作在我国正飞速发展,抗虫害是转基因农作物的一个重要目标。我国

科学工作者将来源于豇豆的广谱抗虫基因——豇豆胰蛋白酶抑制剂(*cpiti*)基因进行体外修饰,即在该基因的 5 端和 3 端分别与来源于大豆胰蛋白酶抑制剂

基金项目:国家科技部转基因植物研究与产业化专项(J00-003),
法国达能膳食营养与宣教基金(DIC2002-02)。

作者简介:韩军花 女 博士生
通讯作者:杨月欣 女 研究员

This work was supported by the National Research on Genetically Modified Plant from Ministry of Science and Technology (J00-003), Nutritional Research and Education Fund of DANONE Group (DIC 2002-02).

的信号肽 (SKT) 和内质网定位信号 (KDEL) 的编码序列融合, 以增加其在受体植物中的积累水平和稳定性,^[1] 修饰后的豇豆胰蛋白酶抑制剂基因 (简称 SCK 基因) 现已成功转入水稻中, 田间种植实验证实转 SCK 基因水稻能很好地抵抗绝大部分的田间害虫。

对转 SCK 基因大米进行了初步的安全评价, 未发现其与亲本大米间存在明显差异。^[2,3] 由于营养学评价也是安全性评价的重要组成部分, 本实验选用具有优良生产性状的转 SCK 基因抗虫水稻科丰 2 号作为实验材料, 在全面营养素分析的基础上, 选用与人体消化系统非常相似的中国实验用断乳小型猪作实验动物, 在小型猪生长发育高峰期进行了 62 d 喂养研究, 对受试动物的体格发育和脏器发育等方面进行观察和评价, 并与亲本大米进行比较, 观察验证 2 种大米对动物生长发育的影响, 从而初步评价其营养学价值并为今后的研究提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料 转 SCK 基因抗虫恢复系杂交稻 86 (商品名: 科丰 2 号) 和对照原型水稻 - 恢复系杂交稻明恢 86 均来自福建省福州市南郊盖山镇吴凤福建省农业科学院综合实验基地。转基因水稻与亲本水稻生长在相邻的田地里, 气候条件一致, 除转基因水稻未喷施化学杀虫剂外, 2 种水稻均采用正常杂交水稻种植管理方法。2 种水稻脱粒后抛光 3 次, 与普通食用大米加工程序相同。

1.2 动物分组和喂养 选用中国农业大学实验动物研究所培育的中国实验用小型猪作为实验动物 (基因型系), 取 56~57 d 日龄的雄性断乳小型猪 15 只, 初始体重 6.22 ± 0.42 kg。按窝别、初始体重分成 3 组, 每组 5 只, 分别是正常对照组 (normal group, NG), 喂饲市售猪饲料; 亲本大米对照组 (control rice group, CG) 和转基因大米组 (genetically modified rice group, GG), 分别喂饲亲本大米饲料和转基因大米饲料, 饲料配方如表 1 所示。动物均单笼饲养, 自然光照, 正常自由饮水。动物适应性喂养 12 d 后, 开始分组并正式喂养。

正式饲养时间共 62 d。每天观察动物的行为、进食等情况, 每 5 天称量 1 次进食量, 每 2 周称量 1 次体重、胸围、体高和体长等体格发育指标。喂养结束后, 用盐酸氯胺酮 (0.2 g) 麻醉动物, 切开小型猪股静脉放血至死, 做系统的尸体剖检和大体病理检查, 称量脑、心脏、肺、肝脏、胃、胰腺、肾脏、膀胱和睾丸等组织器官的去脂重量。采集心脏、肝脏、脾脏、肺、肾脏、肾上腺、肠道等组织样本浸入福尔马林溶

液 (4% 甲醛溶液) 进行组织切片检查。

1.3 饲料配制 饲料的配制参照猪的营养需要和本次实验的目的进行设计, 在满足小型猪营养需要的基础上, 尽可能多地添加大米含量。^[4,5] 将受试的生大米磨碎后过 20 目筛, 按表 1 比例配制饲料, 正常对照组动物则喂饲市售普通猪饲料。3 组动物饲料的具体配方如表 1。

表 1 3 组动物饲料配方组成

普通饲料	%	亲本大米饲料	%	转基因大米饲料	%
玉米	58	亲本大米	70	转基因大米	70
小麦麸	22	酪蛋白	6	酪蛋白	6
豆粕	4	小麦麸	12	小麦麸	12
棉籽饼	8	豆粕	8	豆粕	8
鱼粉	4	维生素矿物盐预混料	4	维生素矿物盐预混料	4
维生素矿物盐预混料	4				

每公斤维生素矿物盐预混料中含: 维生素 A 30 万 IU, 维生素 D₃ 3.75 万 IU, 维生素 E 225 IU, 维生素 K 72 mg, 维生素 B₁ 44 mg, 维生素 B₂ 150 mg, 维生素 B₆ 120 mg, 维生素 B₁₂ 0.6 mg, 叶酸 18 mg, 生物素 1.5 mg, 烟酸 600 mg, 泛酸 225 mg, 氯化胆碱 12 g, 铜 5 g, 铁 2.5 g, 锰 0.2 g, 锌 2.5 g, 硒 7.5 g, 碘 3.5 g, 磷 62 g, 赖氨酸 33 g, 剩余部分以食盐、石粉、麦饭石等补充至 1 kg。

1.4 指标的测定和分析

1.4.1 营养成分的测定方法 转 SCK 基因大米和亲本大米中各种营养素的含量测定采用国标方法或 AOAC 方法进行。受试大米共 2 批, 每批取双样进行分析测定。

1.4.2 体格发育的测量方法 体重用 TGT-100 型地磅秤, 体高、体长、胸围等用无伸缩性软尺测量, 其中体高为鬃腭最高点到地面的垂直距离, 体长为从两耳根联线的中点, 沿背线至尾根的长度, 胸围为绕肩胛骨后角的体躯周径。^[5]

1.4.3 脏器发育的试验方法 动物处死后先进行头部、五官及体表检查, 脏器的检查按照大动物的尸体解剖方法进行。脏器称重 剥除脂肪后除肝脏用 ES-10 电子天平称量, 其余脏器用千分之一电子天平称量; 组织病理学检查 将组织用福尔马林固定 (胰腺用多聚甲醛固定), 经组织选块、常规脱水、石蜡包埋, 切 5 μ m 薄片, HE 染色, 光镜检查; 各脏器的大体病变和组织病理变化均采用半定量标准: 无病理变化 (-) 为 0 分, 可疑或偶见 (\pm) 为 0.5 分, 轻度 (+) 为 1 分, 中度 (++) 为 2 分, 重度 (+++) 为 3 分, 将每只动物各脏器的评分相加作为动物的总评分, 并进行组间统计学分析。

1.5 统计分析 用 SPSS 软件进行统计分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表达,并以 $P < 0.05$ 为显著性检验水平。

2 结果

2.1 转 SCK 基因大米与亲本大米主要营养成分的比较 2 个批次的转 SCK 基因大米和亲本大米的形状细长,亲本大米的均匀度较好,转基因大米相对较碎,两者均无异常气味。

食物营养成分含量测定是评价食物营养价值的重要方面,对转基因食品而言,成分分析则是对其进行安全性和营养学评价的第一步。对转基因大米和亲本大米的主要营养成分含量进行了分析,结果表明转基因大米和亲本大米中各种营养成分的含量基本接近,能量值相似,如表 2 所示。

2.2 3 组动物体格发育和食物利用率的比较 对 3 种饲料的主要成分如蛋白质、脂肪、糖类含量等进行测定和比较,结果发现,对照饲料的脂肪含量高于 2 个大米组,而糖类含量稍低,但 3 种饲料的能量值和蛋白质含量接近,饲料的营养成分具有可比性,如表 3 所示。

所选用的动物为断乳期小型猪(出生约 2 个月),选择其生长发育高峰期进行喂养实验,喂养时间共 62 d,在小型猪自由活动状态下进行观察。整个实验期的观察结果说明,各组小型猪进食正常,姿势、体形、全身皮肤颜色、行为等未见异常,未观察到任何动物有眼、口、鼻异常分泌物及其他疾病症状,所有实验用小型猪符合实验动物标准。

表 2 转 SCK 基因大米和亲本大米中主要营养成分含量的比较 mg/100 g

		亲本大米	转基因大米
能量(由平均值计算得)	kcal/100 g	331.76	325.78
水分	%	11.0 ± 0.2	11.5 ± 0.7
蛋白质	%	8.2 ± 0.6	8.5 ± 1.0
灰分	%	0.8 ± 0.2	0.8 ± 0.2
脂肪	%	1.04 ± 0.04	0.82 ± 0.04
可利用糖类	%	72.4 ± 0.7	71.6 ± 1.5
总膳食纤维	%	6.6 ± 0.0	6.8 ± 0.0
维生素 B ₁		0.15 ± 0.01	0.16 ± 0.01
维生素 B ₂		0.045 ± 0.007	0.039 ± 0.001
维生素 E		0.12 ± 0.00	0.21 ± 0.00
铁		0.8 ± 0.2	0.6 ± 0.1
锌		1.96 ± 0.47	1.61 ± 0.11
铜		0.25 ± 0.07	0.26 ± 0.02
镁		40 ± 25	32 ± 6
锰		1.02 ± 0.16	0.95 ± 0.13
钾		85 ± 28	78 ± 11
钠		3.3 ± 1.0	4.9 ± 2.6
钙		3.2 ± 2.1	3.5 ± 2.5
磷		138 ± 4	194 ± 66

表 3 3 组饲料大致成分的比较 %

	NG	CG	GG
能量 kcal/100 g	328.0	320.6	318.9
蛋白质	17.9	17.4	17.8
脂肪	3.6	1.4	1.3
总糖类	56.0	59.6	59.0

评价动物生长发育状况的指标有体重、体长、体高、胸围等指标,体重和胸围是评价动物近期营养状况的较好指标,体高和体长则可反映动物较长时间的营养状况。在实验饲养期间,定期对 3 组实验用小型猪的体重、体长、体高、胸围等生长发育指标进行测量,并称量进食量以计算食物利用率,结果如表 4。

表 4 3 组动物体格发育的比较⁽²⁾

指标	NG	CG	GG
初始体重 kg	6.22 ± 0.42	6.21 ± 0.50	6.23 ± 0.45
末期体重 kg	15.91 ± 1.56	17.20 ± 0.81	17.48 ± 0.74
体重增长值 kg	9.69 ± 1.28	10.99 ± 0.56 ⁽¹⁾	11.25 ± 0.42 ⁽¹⁾
末期体长 cm	56.8 ± 2.6	57.9 ± 0.7	59.6 ± 1.4
体长增长值 cm	9.3 ± 1.7	11.5 ± 1.3	11.4 ± 1.9
末期体高 cm	41.5 ± 0.7	42.3 ± 0.7	42.6 ± 1.9
体高增长值 cm	5.4 ± 0.4	5.8 ± 0.4	5.6 ± 2.2
末期胸围 cm	54.9 ± 2.6	56.9 ± 2.0	57.4 ± 1.6
总进食量 kg	26.14 ± 0.12	26.39 ± 0.26	26.30 ± 0.11
食物利用率(总增重/总进食量 %)	37.1 ± 4.9	41.6 ± 1.8 ⁽¹⁾	42.8 ± 1.5 ⁽¹⁾

注:(1)与正常对照组(NG)比较, $P < 0.05$ 。(2)每组实验动物数为 5。

由表 4 结果可见,转基因大米组和亲本大米对照组的小型猪末期体重和体重增长值之间差异无显著性($P > 0.05$),但两个大米组动物的体重总增长值(11.25 kg 和 10.99 kg)均显著高于正常对照组(9.69 kg),两组的食物利用率也显著高于正常对照组。体长、体高、胸围等指标在 3 组动物之间差异不明显。说明大米在经过基因修饰后,其喂养价值和动物生长发育的影响与亲本大米基本一致。

2.3 动物脏器发育的比较 脏器的重量变化可直接反映动物的脏器发育情况和及早发现包括食物在内的外环境的不良影响。表 5 显示了 3 组动物主要脏器重量的比较结果,转基因大米组动物脏器重量(包括性器官)与正常对照组、亲本大米对照组相比差别不明显,见表 5。

2.4 病理观察结果 试验观察了 3 组动物脏器的大体病理变化和组织病理变化。从大体外观结果来看,15 例动物头部各器官、会阴部及体表均未见到异常,大体病变结果发现个别动物出现了实验动物常见的胃粘膜糜烂、颌下淋巴结肿大和肝表面散在斑点状暗红色病变等大体病变,普通饲料组中有 1 只实验猪出现右侧睾丸萎缩,经切片检查后属先天性发育畸形。其它动物的睾丸、附睾、前列腺等器官

未见异常。总的大体病变评分未发现转基因大米组的动物有明显升高。

表5 3组动物脏器重量的比较

脏器重量	NG	CG	GG
脑	59.9 ±2.6	62.9 ±3.5	61.5 ±3.0
甲状腺	1.4 ±0.3	1.5 ±0.4	1.5 ±0.1
颌下腺	31.5 ±2.6	35.1 ±7.9	33.4 ±10.4
胸腺	7.8 ±3.9	12.7 ±3.4	12.1 ±3.3
肺	106.9 ±11.3	102.0 ±11.1	114.1 ±10.4
心脏	68.7 ±6.8	69.9 ±3.8	67.9 ±9.1
肝	361 ±46	339 ±45	352 ±21
胰腺	31.8 ±6.0	32.1 ±4.2	29.8 ±1.5
脾	36.0 ±4.0	34.6 ±2.3	35.0 ±3.4
肾	78.7 ±11.1	92.1 ±11.3	90.0 ±16.2
肾上腺	1.5 ±0.2	1.5 ±0.2	1.5 ±0.2
膀胱	13.3 ±4.1	11.8 ±3.7	11.3 ±1.9
睾丸	47.3 ±7.7	51.9 ±5.8	43.7 ±4.5
附睾	23.3 ±4.0	25.4 ±2.4	21.0 ±2.1
前列腺	80.6 ±17.9	111.9 ±16.7	89.1 ±38.1

注:每组实验动物数为5。

组织病理学检查结果(表7)显示,3组动物均出现了实验用小型猪常见的微小病变(如散在肝灶性坏死和淋巴结轻度增生等),总的组织学评分3组动物间无差别,病变名称及每组病变动物数如表6所示。

表7 3组动物组织病理学检查结果

组织名称	病变名称	NG	CG	GG
肝	肝细胞散在灶性坏死	+ (1)	±(1)	±(2) + (2)
脾	脾淋巴细胞增生	+ (1)	-	-
肾	肾蛋白管型	-	-	+ (1)
	局灶型慢性间质炎症	-	+ (1)	-
	间质局灶性出血	-	+ (1)	-
淋巴结	增生	+ (3)	+ (2)	+ (3)
	含铁血黄素沉着	+ + + (1)	+ (1) + + + (1)	-
胰腺	外分泌腺点状细胞固缩	+ (1)	±(3)	+ (1)
胆囊	慢性胆囊炎	-	+ (1)	-
胃	充血	+ (1) + + (1)	+ (1) + + (1)	+ (2) + + (2)
	局灶性糜烂	±(1) + (1)	±(1) + (1)	+ (3) + + (1)
	粘膜增厚	-	±(1)	±(2)
睾丸萎缩	+ (1)	-	-	
组织学评分		2.9 ±3.3	3.2 ±1.3	4.0 ±0.9

注:括号内是发生病变的动物个数,括号外“-”无异常;“±”偶见病变;“+”轻度病变;“++”中度病变;“+++”重度病变。

本实验选用中国实验用小型猪为研究对象,选择其生长发育高峰期进行喂养研究,从体格发育、脏器发育等方面观察转基因大米对小型猪的影响,综合地评价了转SCK基因大米的营养学价值、非期望效应等。由实验结果可以看出,所有体格发育的指标在转基因大米组和亲本大米组小型猪之间差异均无显著性,说明大米经基因修饰后对动物生长发育无明显不良影响,转基因大米与亲本大米的营养价值类似。整个喂养期间各组小型猪外观、生长和活

表6 3组动物的大体病变结果

病变	NG	CG	GG
胃粘膜糜烂	+ + (1)	+ (1)	+ (3)
颌下淋巴结肿大	+ (1)	-	-
肠系膜淋巴结肿大	+ (1)	-	-
一侧睾丸萎缩	+ + (1)	-	-
肝表面散在斑点状暗红色病变	+ (1)	-	-
平均大体病变积分	1.4 ±1.3	0.2 ±0.4	0.6 ±0.5

注:括号内是发生病变的动物个数,括号外“-”表示无异常;“+”轻度病变;“++”中度病变

3 讨论

与成分分析相比较,长期或短期的整体动物喂养实验对综合考虑转基因食品的营养价值、非期望效应等更具有说服力。在动物喂养实验中最常用的实验用动物为小鼠,^[6,7]具有实验费用较低、生理性状已经被大家熟悉、操作方便等优点,但缺点是其与人的亲缘性远,食性和人类差别显著,外推于人时需要更多的实验数据来支持,因而实用性较差。而比较医学的结果表明,猪在心血管系统、消化系统、皮肤、营养需要、骨骼发育及矿物质代谢等方面与人类有极大的相似,在食性和食物摄入种类、生长发育特点等方面也接近于人,猪现在已经越来越多地被应用于实验研究。^[8]但用猪做实验材料实验费用高、操作困难,因而使用受到一定的限制。

动正常,无可观察到的异常表现。脏器发育在3组动物之间未观察到明显差异,病理检查发现各组动物都出现了实验猪常见的普通病变,经与有关专家咨询讨论后认为这是实验用大动物的常见现象,可能因为为大动物的饲料精细度、饲养环境等条件与小鼠相比要差,不认为与基因修饰有关。

综合本小型猪喂养实验的结果,初步可以说明表达豇豆胰蛋白酶抑制剂基因大米与亲本大米在动物喂养价值方面基本等同,且未发现转基因大米对

动物有明显的毒副作用。但要得出转 SCK 基因大米与亲本大米的实质等同性的结论,尚需其他大量的研究证实,如通过蛋白质的体内、体外消化实验来评价新表达蛋白在动物体内的实际消化情况和生物利用率等,需要在今后的研究中进一步探讨。

参考文献:

- [1] 邓朝阳,宋贵生,徐军望,等. 通过细胞内的靶向定位大幅度提高外源蛋白在转基因植株的转录水平[J]. 植物学报,2003,45(9):1084—1089.
- [2] 卓勤,陈小萍,朴建华,等. 转豇豆胰蛋白酶抑制剂大米的致畸作用研究[J]. 卫生研究,2004,33:74—77.
- [3] 陈小萍,卓勤,朴建华,等. 转基因大米的免疫毒理学评价[J]. 卫生研究,2004,33:77—81.
- [4] 裴德智. 小型猪养殖利用技术[M]. 北京:中国盲文出版社,1999,29—39.

- [5] 陈清明,王连纯. 现代养猪生产[M]. 北京:中国农业大学出版社,1997,139—181.
- [6] Momma K, Hashimoto W, Yoon, et al. Safety assessment of rice genetically modified with soybean glycinin by feeding studies on rats [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2000, 64(9):1881—1886.
- [7] Hashimoto W, Momma K, Yoon H J, et al. Safety assessment of transgenic potatoes with soybean glycinin by feeding studies in rats [J]. J Sci Food Agric, 1999, 79:1607—1612.
- [8] Spencer J D, Allee GL, Sauber T E. Growing-finishing performance and carcass characteristics of pigs fed normal and genetically modified low - phytate corn [J]. J Anim Sci, 2000, 78: 1529—1536.

[收稿日期:2004 - 07 - 23]

中图分类号:R15;Q78;TS213.3 文献标识码:A 文章编号:1004 - 8456(2004)03 - 0489 - 05

《中国食品卫生杂志》2005 年征订启事

《中国食品卫生杂志》(ISSN 1004 - 8456/CN 11 - 3156/R)系中华预防医学系列杂志,公开发行,双月刊,96 页。所设栏目论文部分有:论著、实验技术与方法、监督管理、调查研究、综述、食物中毒、CAC 专栏、网络信息等;法规文件部分刊登有关食品卫生的国家法律、法规、标准、行政答复、通告等。读者可以通过本刊及时掌握国家新颁布的食品卫生法律、法规,了解最新食品卫生科研成果,解决工作中遇到的问题,提高论文水平。

本刊可通过邮局订阅,邮发代号:82 - 450;亦自办发行并常年办理订阅。

自办发行办法如下,2005 年《中国食品卫生杂志》全年售价 78 元(含邮费)。从邮局汇款时请注明订阅册数、详细的收件人地址、单位、邮编、姓名;通过银行汇款的单位,请在汇款的同时寄函或电传我以下内容:订阅册数、详细收件人地址、邮编、单位、姓名,以便准确邮寄。

希望挂号投寄期刊的用户,每期杂志需加挂号费 3 元,全年合计挂号费 18 元,并请寄款时同时说明要求挂号。

汇款地址:北京市宣武区南纬路 29 号 《中国食品卫生杂志》编辑部

邮 编:100050

联系人:姜人怡

电 话:(010)83132658

电 传:(010)83132658

银行汇款:工商银行华威路分理处

账 号:0200022709008904285

户 名:中国疾控中心营养与食品安全所 请注明“《中国食品卫生杂志》订阅款”

《中国食品卫生杂志》编辑部

2004 年 9 月