

论著

转生长激素基因鲤鱼的雌激素样作用研究

刘玉梅^{1,2} 张文众¹ 雍 凌¹ 贾旭东¹ 齐丽娟¹ 赵晓红² 李 宁¹

(1. 中国疾病预防控制中心营养与食品安全所, 北京 100050;

2. 北京联合大学应用文理学院, 北京 100191)

摘要:目的 研究转生长激素基因鲤鱼是否具有类雌激素样作用。方法 用啮齿动物子宫试验方法, 选用 19 日龄未成年雌性 SD 大鼠, 分为 6 个组: 溶剂对照组玉米油 5 ml/(kg BW·d), 亲本鲤鱼对照组 3 g/(kg BW·d), 转生长激素基因鲤鱼组 3 g/(kg BW·d), E₂ (17β-雌二醇) 经口低剂量组 1 μg/(kg BW·d), E₂ 经口高剂量组 3 μg/(kg BW·d), E₂ 经皮组 3 μg/(kg BW·d)。所有剂量组连续给予受试物 3 d (从 19 日龄到 21 日龄)。实验结束称量子宫湿重和干重, 对子宫、卵巢和阴道做组织病理学检查, 并测量子宫内膜上皮细胞高度。结果 与溶剂对照组比较, E₂ 经口低剂量组和转生长激素基因鲤鱼组及亲本鲤鱼对照组的子宫重量差异无统计学意义, E₂ 经口高剂量组和 E₂ 经皮组与溶剂对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 转生长激素基因鲤鱼经口摄入未见雌激素样作用。

关键词:啮齿动物子宫试验; 转生长激素基因鲤鱼; 雌激素

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2010)05-0385-05

Estrogenic Effect of Growth Hormone Gene Transgenic Carp on Immature RatsLIU Yu-mei, ZHANG Wen-zhong, YONG Ling, JIA Xu-dong, QI Li-juan, ZHAO Xiao-hong, LI Ning
(National Institute of Nutrition and Food Safety, China CDC, Beijing 100050, China)

Abstract: Objective To explore the potential estrogen-like activity of growth hormone (GH) gene in transgenic carp.

Method Uterotropic assay was used. Nineteen-day-old immature female rats were randomly divided into 6 groups: using corn oil 5 ml/(kg BW·d) in vehicle control group, parental carp meal 3 g/(kg BW·d) in counterpart control group, GH gene transgenic carp meal 3 g/(kg BW·d) in transgenic carp group, oral administration with 1 μg/(kg BW·d) in oral low E₂ group, oral administration with E₂ 3 μg/(kg BW·d) in oral high E₂ group, and hypodermic injection with E₂ 3 μg/(kg BW·d) in hypoderm high E₂ group. All animal groups were given related test substances for 3 days (from the postnatal day 19 to day 21). The wet and dry weights of uterus were measured and the histopathological changes of uterus, ovary and vagina were examined by the end of the test. In addition, morphometric measurement of endometrial epithelium was conducted for quantitative comparison. **Results** Comparing with the vehicle control group, significant differences for wet and dry weights of uterus were observed in oral high E₂ group and hypoderm high E₂ group ($P < 0.05$), and no significant difference was observed in other groups. **Conclusion** No estrogenic effect of GH gene transgenic carp was shown in uterotrophic assay.

Key words: Uterotropic Assay; GH Gene Transgenic Carp; Estrogen

我国是世界上最早开始转生长激素基因鲤鱼研究的国家之一,早在 1984 年由朱作言院士率领的研究小组就成功地将人类生长激素基因导入鱼类受精卵,生产出世界上第一批转生长激素基因鲤鱼。此后转基因鱼的研究得到迅速发展。为了消除鱼体含

有超远重组基因对消费者造成的心理影响,朱作言等又生产出第一批全部由我国家养鲤科鱼类基因元件组成的转“全鱼”生长激素基因鲤鱼^[1],以下简称转生长激素基因鲤鱼。而转生长激素基因鲤鱼由于转入外源基因其食用安全性遭到人们的质疑。

据报道许多化学物质对人类和动物都有内分泌干扰作用^[2-4],经济合作和发展组织(Organization for Economic Cooperation and Development, OECD)推荐子宫试验作为体内筛选雌激素的方法^[5]。孙孝文^[6]、张甫英^[7]等都做过转基因鱼的食用安全性研究,但食用转生长激素基因鲤鱼是否具有内分泌干

收稿日期:2010-05-04

基金项目:国家重点基础研究发展计划 973 计划课题 (2007CB109207)

作者简介:刘玉梅 女 硕士生 研究方向为食品毒理

E-mail: Haifengdjt@163.com

通信作者:李 宁 女 研究员

扰作用,目前尚未见报道。本研究采用啮齿动物子宫试验,研究转生长激素基因鲤鱼是否会产生雌激素样效应。

1 材料和方法

1.1 受试物和转生长激素基因鲤鱼

转生长激素基因鲤鱼和亲本鲤鱼由中科院水生生物研究所提供。 E_2 (17β -雌二醇)购自Sigma公司(批号D0005215),玉米油(食用)由中粮食品营销有限公司生产。

1.2 实验动物及处理

1.2.1 实验动物和饲养 未成年的SD雌性大鼠,16日龄,购自维通利华实验动物技术有限公司,清洁级,合格证号[SCXK(京)2006-0009]。饲养于首都医科大学附属北京口腔医院动物中心,许可证号[SYXK(京)2005-0031],室温(22 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,湿度40%~70%。饲料为不含大豆和苜蓿成分的配制饲料,由中国医学科学院实验动物研究所提供,许可证号[SCXK(京)2009-0008]。

1.2.2 动物分组和处理 36只16日龄动物适应环境3d,于19日龄按体重随机分组,共分为6个组别,剂量分别为:溶剂对照组玉米油5 ml/(kg BW·d),亲本鲤鱼对照组3 g/(kg BW·d),转生长激素基因鲤鱼组3 g/(kg BW·d), E_2 经口低剂量组1 $\mu\text{g}/(\text{kg BW}\cdot\text{d})$, E_2 经口高剂量组3 $\mu\text{g}/(\text{kg BW}\cdot\text{d})$, E_2 经皮组3 $\mu\text{g}/(\text{kg BW}\cdot\text{d})$ 。以玉米油为溶剂,将各组受试物配制相应的浓度(转生长激素基因鲤鱼和亲本鲤鱼冷冻干燥后磨成粉,制成悬浊液)分别给予各组动物,连续3d(第19日龄至21日龄)。

1.3 测定指标及方法

1.3.1 子宫称重 末次给予受试物24h,即22日龄时,颈椎脱臼处死动物,解剖分离子宫、卵巢和阴道。子宫分离后直接称重为子宫湿重,用滤纸吸取子宫内液再次称重为子宫干重。

1.3.2 组织病理学检查 子宫、卵巢和阴道放入4%多聚甲醛溶液中固定做病理学检查。相同脏器均在同一部位选取组织做组织病理学检查,若有肉眼病变再取病变部位组织,组织常规脱钙、石蜡包埋,切片5 μm 薄片,HE染色,显微镜观察。

1.3.3 测量子宫内膜上皮细胞高度 用图像分析系统进行子宫内膜上皮细胞高度的测量和图像采集,每只动物标本选择3个不同视野子宫内膜上皮做上皮细胞高度的测定。

1.4 数据统计和分析

数据录入Excel,并计算子宫的湿重系数(子宫湿重/动物体重)和干重系数(子宫干重/动物体重),最后数据用统计软件SPSS 17.0计算均数和标准差。做方差齐性检验,方差齐时用Dunnett法统计分析,方差不齐时用Games-Howell法统计分析。

2 结果

2.1 子宫增重情况

和溶剂对照组相比, E_2 经口高剂量组(3 $\mu\text{g}/\text{kg BW}$)、 E_2 经皮组(3 $\mu\text{g}/\text{kg BW}$)子宫干重、湿重及其系数显著增加,而转生长激素基因鲤鱼组、亲本鲤鱼对照组、 E_2 经口低剂量组(1 $\mu\text{g}/\text{kg BW}$)子宫干重和湿重及其脏器系数无明显变化,见表1。

表1 转生长激素基因鲤鱼对子宫重量和子宫系数的影响($n=6$)

组别	剂量	给药前体重(g)	宰杀时体重(g)	子宫湿重(mg)	湿重系数(%)	子宫干重(mg)	干重系数(%)
溶剂对照组	5 ml/kg	30.08 \pm 2.78	48.18 \pm 4.70	27.66 \pm 14.36	0.56 \pm 0.25	18.55 \pm 9.07	0.37 \pm 0.15
转生长激素基因鲤鱼组	3 g/kg	30.00 \pm 2.74	49.81 \pm 8.21	23.00 \pm 5.36	0.46 \pm 0.10	14.66 \pm 5.53	0.29 \pm 0.10
亲本鲤鱼对照组	3 g/kg	30.13 \pm 2.98	51.26 \pm 8.04	27.00 \pm 12.21	0.50 \pm 0.18	15.00 \pm 5.86	0.28 \pm 0.07
E_2 经口低剂量组	1 $\mu\text{g}/\text{kg}$	30.53 \pm 2.84	46.91 \pm 6.58	24.00 \pm 5.09	0.52 \pm 0.13	18.33 \pm 3.98	0.39 \pm 0.10
E_2 经口高剂量组	3 $\mu\text{g}/\text{kg}$	30.28 \pm 3.47	47.01 \pm 8.42	56.00 \pm 4.85 ^{ab}	1.21 \pm 0.18 ^{ab}	47.16 \pm 6.67 ^{ab}	1.01 \pm 0.09 ^{ab}
E_2 经皮组	3 $\mu\text{g}/\text{kg}$	30.02 \pm 2.77	49.08 \pm 6.22	99.00 \pm 27.90 ^{ab}	2.01 \pm 0.54 ^{ab}	85.55 \pm 23.74 ^{ab}	1.73 \pm 0.41 ^{ab}

注:^a与溶剂对照组相比, $P < 0.05$;^b与亲本鲤鱼对照组相比, $P < 0.05$ 。

2.2 病理学检查

2.2.1 子宫病理学检查 和溶剂对照组相比, E_2 经皮组大体可见子宫明显肥大,有大量液体,病理学显示为子宫内膜上皮细胞呈高柱状,胞浆多透明,粘膜轻度增生,子宫腺体稍增多,上皮细胞高度明显增加; E_2 经口高剂量组大体解剖可见子宫肥大,有少量液体,病理学显示子宫内膜上皮细胞呈立方状或

柱状,可见轻度增厚,子宫腺体未见明显异常,上皮细胞高度也明显增加; E_2 经口低剂量组、亲本鲤鱼对照组、转生长激素基因鲤鱼组大体解剖有少量液体,病理学显示子宫腺体、粘膜未见异常改变,其子宫上皮细胞高度和对照组比较差异无统计学意义,见图1和表2。

2.2.2 阴道病理学检查 和溶剂对照组相比, E_2

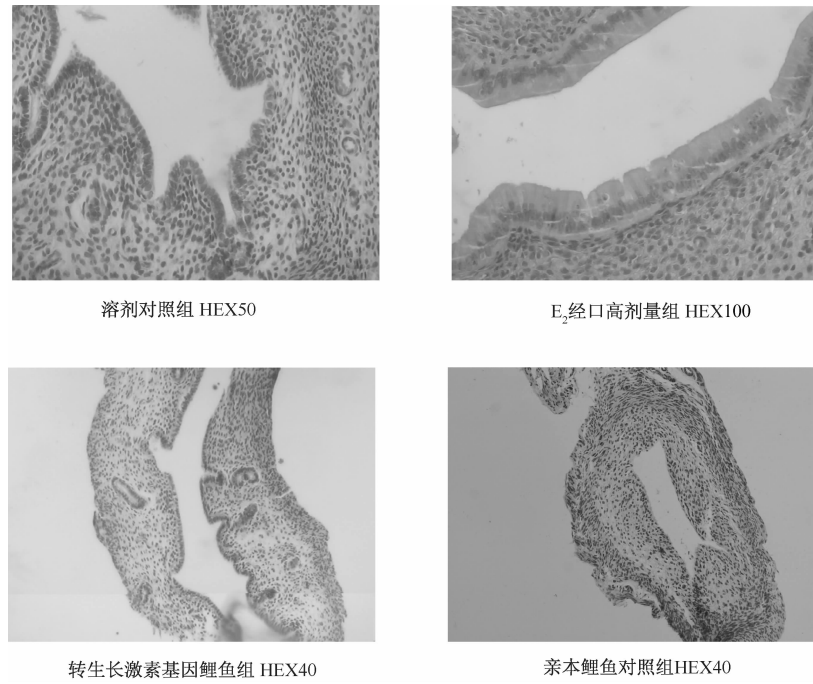


图1 子宫的病理学图片

表2 转生长激素基因鲤鱼对子宫内膜上皮细胞的影响 (n = 6)

组别	剂量	上皮细胞高度 (μm)
溶剂对照组	5 ml/kg	7.79 ± 0.31
转生长激素基因鲤鱼组	3 g/kg	7.84 ± 2.76
亲本鲤鱼对照组	3 g/kg	7.29 ± 0.61
E ₂ 经口低剂量组	1 μg/kg	7.61 ± 0.98
E ₂ 经口高剂量组	3 μg/kg	13.78 ± 1.20 ^{ab}
E ₂ 经皮组	3 μg/kg	16.37 ± 1.24 ^{ab}

注：^a与溶剂对照组相比， $P < 0.05$ ；^b与亲本鱼对照组相比， $P < 0.05$ 。

组病理学检查显示阴道上皮细胞增厚，并呈剂量-反应关系，其中 E₂ 经皮组可见明显的角化；亲本鲤鱼对照组、转生长激素基因鲤鱼组的阴道粘膜和上皮细胞未见明显变化，见图 2。

2.2.3 卵巢病理学检查 卵泡组织结构清楚，多数原始卵泡和各阶段发育卵泡并存，未见黄体。和溶剂对照组相比，转生长激素基因鲤鱼组卵泡液稍增多、E₂ 组卵泡液增多并呈剂量-反应关系，亲本鲤鱼对照组无差异，见图 3。

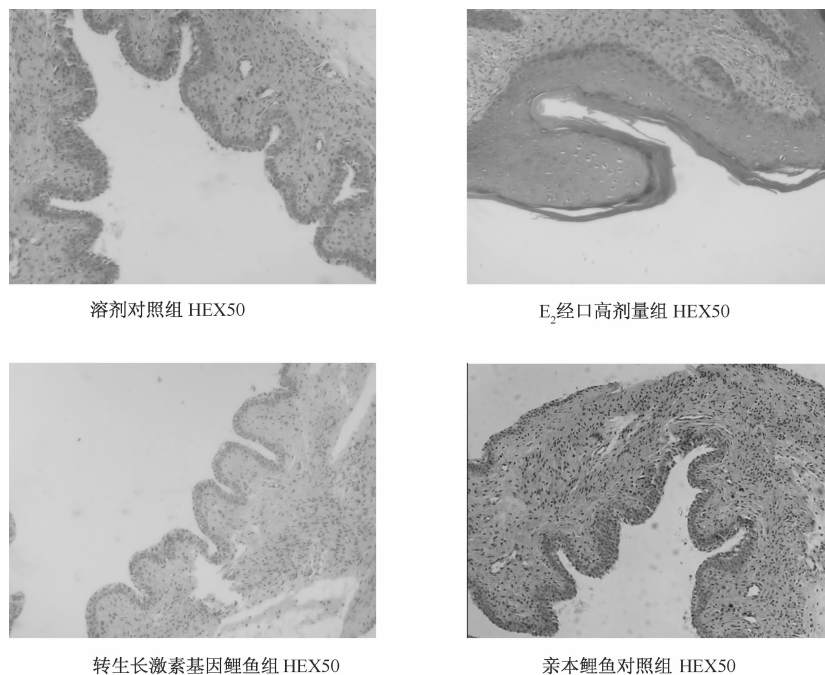


图2 阴道病理学图片

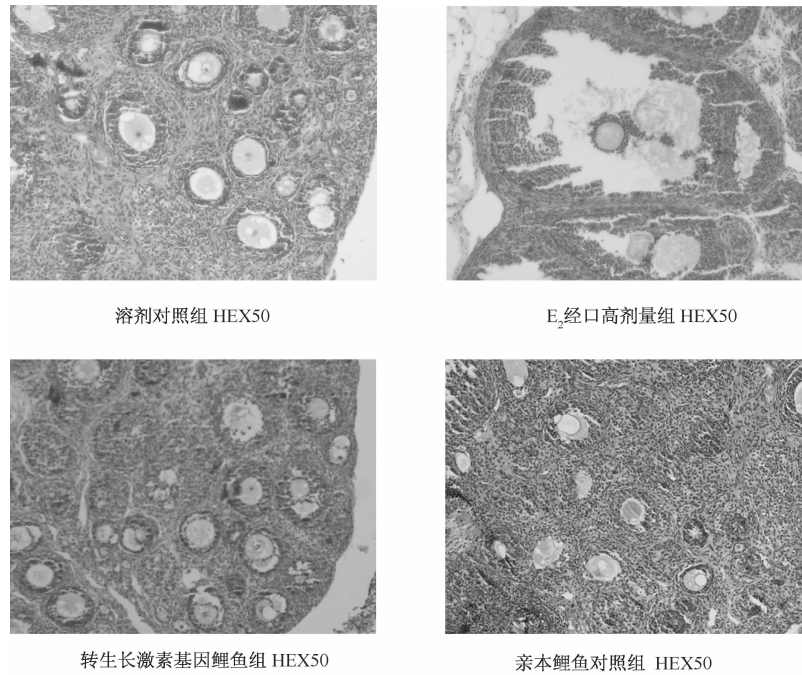


图3 卵巢病理学图片

3 讨论

对转基因鱼的食用安全性研究已有报道,如孙孝文等^[6]用转大马哈鱼生长激素基因鲤鱼喂养猫,病理解剖和血细胞化学检测等都表明实验组与对照组之间差异无统计学意义。张甫英等^[7]对小鼠饲养转“全鱼”基因鱼,结果显示对小鼠的生长、血液常规、组织病理等均无影响。以上都是用常规毒理学方法对转基因鱼的食用安全性进行研究,而本研究用筛选环境内分泌干扰物的方法对食用转生长激素基因鲤鱼进行了内分泌干扰作用研究。内分泌干扰研究具有特定的观察终点,有助于提高筛选的灵敏性和特异性。

本文采用的子宫增重试验是最常用的检测环境雌激素的方法之一,其原理是子宫含有丰富的雌激素受体(ER),当外来化合物与ER结合后,可使子宫的雌激素诱导蛋白含量增加,刺激子宫生长,通过测定动物子宫重量或计算其脏器系数,可筛选受试物的雌激素活力^[8]。本实验结果表明转生长激素基因鲤鱼并没有引起子宫重量增加,无论是子宫干重、湿重还是脏器系数和溶剂对照组比较差异均无统计学意义,和亲本鲤鱼对照组比较差异也无统计学意义。进一步的病理学分析表明转生长激素基因鲤鱼组的子宫内膜上皮细胞高度、子宫和阴道的上皮增生、卵巢和溶剂对照组和亲本鲤鱼对照组比较差异都无统计学意义。从而提示本实验剂量的转生长激素基因鲤鱼没有雌激素效应。 E_2 经口高剂量组和 E_2 经皮组子宫内膜上皮细胞高度、子宫湿重、干重、脏器系数以及病理学分析和溶剂对照组比较

都有统计学意义,说明 E_2 能显著诱导大鼠子宫增重,与国外的研究一致^[9,10]。

本研究从整体动物的角度对转生长激素基因鲤鱼是否具有雌激素样作用进行了初步探讨,结果表明转生长激素基因鲤鱼没有产生雌激素样作用。

参考文献

- [1] 朱作言,曾志强.转基因鱼离市场还有多远[J].生物技术通报,2000(1):1.
- [2] JIAO Baowei, CHENG Christopher H K. Disrupting actions of bisphenol A and malachite green on growth hormone receptor gene expression and signal transduction in seabream[J]. Fish Physiol Biochem, 2010,36(2):251-261.
- [3] BELLINGHAM M, FOWLER P A, AMEZAGA M R, et al. Exposure to a complex cocktail of environmental endocrine-disrupting compounds disturbs the kisspeptin/GPR54 system in ovine hypothalamus and pituitary gland[J]. Environ Health Perspect, 2009,117(10):1556-1562.
- [4] BRAR N K, WAGGONER C, REYES J A, et al. Evidence for thyroid endocrine disruption in wild fish in San Francisco Bay, California, USA. Relationships to contaminant exposures[J]. Aquat Toxicol, 2010, 96(3):203-215.
- [5] OECD. Second meeting of the Validation Management Group on screening and testing for endocrine disruptors for Mammalian effects, 20-21 January 2000, Paris[R]. Document ENV/JM/TG/EDTA/M(2000)1/REV1. Paris: Organization for Economic Cooperation and Development, 2000.
- [6] 孙孝文,梁利群,闫学春,等.转基因鲤鱼作为食物的研究[J].高技术通讯,1998(3):45-49.
- [7] 张甫英,汪亚平,胡炜,等.摄食转“全鱼”基因黄河鲤小鼠的生理和病理分析[J].高技术通讯,2000(7):17-19.

- [8] SHELBY M D. Assessing environmental chemicals for estrogenicity using a combination of *in vitro* and *in vivo* assays [J]. *Environ Health Perspect*, 1996, 104:1296-1300.
- [9] WINUTHAYANON W, PIYACHATURAWAT P, SUKSAMRAM A, et al. Diarylheptanoid phytoestrogens isolated from the medicinal plant *Curcuma comosa*: biologic actions *in vitro* and *in vivo* indicate estrogen receptor-dependent mechanisms [J]. *Environ Health Perspect*, 2009, 117(7):1151-1161.
- [10] LIU Jin, HUANG Huiling, ZHANG Wenchang, et al. Cadmium-induced increase in uterine wet weight and its mechanism [J]. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*, 2010, 89(1):43-49.

论著

聚合酶链式反应-变性高效液相色谱法检测 5 种食源性致病菌

杨福江¹ 王玉平¹ 吴永宁² 沈建忠³

(1. 邢台医学高等专科学校, 河北 邢台 054000; 2. 中国疾病预防控制中心营养与食品安全所, 北京 100021; 3. 中国农业大学, 北京 100193)

摘要:目的 建立聚合酶链式反应与变性高效液相色谱 (polymerase chain reaction-denaturing high-performance liquid chromatography, PCR-DHPLC) 相结合的方法, 快速检测 5 种食源性致病菌 (沙门菌、副溶血性弧菌、福氏志贺菌、大肠埃希菌 O157:H7 和单核细胞增生李斯特菌)。方法 针对 16S rRNA 基因保守区设计引物, PCR 扩增产物用变性高效液相色谱仪检测, 并进行敏感性、特异性、检出率等指标测定。结果 柱温 61.4 °C 时, 5 种致病菌 PCR 产物分别呈现特异 DHPLC 色谱图, 保留时间均为 7 min 左右。对沙门菌、副溶血性弧菌和单核细胞增生李斯特菌检出限均为 5~10 CFU/ml, 福氏志贺菌和大肠埃希菌 O157:H7 均为 1~5 CFU/ml。对 83 株目的分离株的检出符合率为 100%, 38 株非目的分离株检测均为阴性; 对人工污染食品中的 5 种致病菌均可正确检出。结论 该 PCR-DHPLC 方法具有较高的敏感性和特异性, 可用于食品中 5 种食源性致病菌的高通量快速检测。

关键词: 变性高效液相色谱; 聚合酶链式反应; 食源性致病菌; 16S rRNA 基因

中图分类号: R155.5; TS207.4 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2010)05-0389-04

Detection of Five Foodborne Bacterial Pathogens by Using PCR-DHPLC

YANG Fu-jiang, WANG Yu-ping, WU Yong-ning, SHEN Jian-zhong
(Xingtai Medical College, Hebei Xingtai 054000, China)

Abstract: Objective To establish a PCR-DHPLC (polymerase chain reaction-denaturing high-performance liquid chromatography) method for the detection of five foodborne bacterial pathogens (*Salmonella* spp., *Vibrio parahaemolyticus*, *Shigella flexneri*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Listeria monocytogenes*). **Method** The primer sets for the conserved region of 16S rRNA gene were designed and used for PCR amplification. PCR products were detected by DHPLC, and the sensitivity and specificity of this method were tested as well. **Results** The five PCR products were shown as specific peak profiles with the retention time of 7 min at an oven temperature of 61.4 °C. The detection limits of *Salmonella* spp., *Vibrio parahaemolyticus*, and *Listeria monocytogenes* were 5-10 CFU/ml, while that of *Shigella flexneri* and *Escherichia coli* O157:H7 were 1-5 CFU/ml. All 83 target bacteria isolates tested were correctly identified and all 38 non-target strains tested were negative. The five pathogens in artificially contaminated food samples were also correctly identified by this method. **Conclusion** The PCR-DHPLC method was specific and sensitive for the detection of these five bacterial pathogens and could be used for quickly detecting a large number of samples.

Key words: Denaturing High-Performance Liquid Chromatography; Polymerase Chain Reaction; Foodborne Bacterial Pathogen; 16S rRNA Gene

收稿日期: 2010-01-29

基金项目: “十一五”国家科技支撑计划课题 (2006BAK02A03)

作者简介: 杨福江 男 副教授 研究方向为预防医学 E-mail: yangxuanguod@126.com

通信作者: 王玉平 女 博士 研究方向为营养与食品卫生学