

## 论著

亲代大鼠转 Bt 基因水稻暴露对其子代部分  
早期生理和神经发育指标的影响

王二辉,于洲,方海琴,汪会玲,刘海波,徐海滨

(国家食品安全风险评估中心,北京 100021)

**摘要:**目的 研究亲代大鼠转 Bt 基因水稻(TT51 大米)暴露对其子代部分早期生理和神经发育指标的影响。方法 亲代大鼠随机分为 3 组,每组雄性 15 只,雌性 30 只,分别给予按 60% 比例掺入市售大米、明恢 63 大米和 TT51 大米的饲料,连续喂养 70 d 后同组雄雌大鼠交配并产生子代,孕期和哺乳期各组母鼠继续给予相应受试大米的饲料。亲代大鼠每周称量和记录体重及食物消耗量,同时观察动物生长发育状况,观察和记录亲代雌鼠生殖指标。仔鼠出生后记录 0、4、7、14 及 21 d 体重,并观察仔鼠部分生理指标发育情况,同时进行听觉惊愕等神经发育指标的测定。断乳后,对各试验组部分仔鼠取脑等主要脏器进行病理检查。结果 TT51 大米组与明恢 63 大米组和市售大米组比较,亲代大鼠一般毒性及生殖指标间差异均无统计学意义;子代部分生理发育指标和神经发育指标差异均无统计学意义;各试验组仔鼠脏器病理检查均未见有意义的变化。结论 未见亲代大鼠转 Bt 基因水稻暴露对其子代早期部分生理和神经发育指标有不良影响。

**关键词:**转 Bt 基因水稻;生理发育;神经行为发育;转基因食品;食品安全;组织病理;毒理实验

中图分类号:R155.52;Q78;Q334 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2013)06-0485-04

**Effect of transgenic Bt rice TT51 on early physiological and neurological development of rats offspring**

WANG Er-hui, YU Zhou, FANG Hai-qin, WANG Hui-ling, LIU Hai-bo, XU Hai-bin  
(China National Center for Food Safety Risk Assessment, Beijing 100021, China)

**Abstract: Objective** To investigate the effects of parental expose to transgenic Bt rice TT51 on early physical and neurological development parameters of rats offspring. **Methods** Parental Wistar rats were fed with rice-based diets containing TT51, MingHui63 or grocery rice for 70 days prior mating, and females throughout pregnancy and lactation. Body weights of parental rats were measured weekly. Body weights of the pups on 0, 4, 7, 14 and 21d were measured and recorded. In each dietary group, pups were assessed for physical, neuromotor, reflexologic development postnatal. **Results** Compared with MingHui63 group and grocery rice group on physical, neuromotor and neurological reflex parameters in the offspring, no significant differences were observed in the TT51 rice group. Furthermore, no diet-related histopathological changes were observed. **Conclusion** The results of this study suggested that compared with parental rice exposure to transgenic Bt rice did not exert any effects on physical and neurological development indexes of rats offspring.

**Key words:** Transgenic Bt rice; physical development; neurological development; transgenic food; food safety; histopathology; toxicological experiments

水稻是世界三大主要粮食作物之一,全球约一半人以大米为主食<sup>[1]</sup>,同时水稻也是受虫害侵袭最严重的粮食作物之一,每年因虫害导致水稻减产大约 10%<sup>[2]</sup>。为了解决上述问题,科学家将具有抗虫特性的 Bt 蛋白基因转入水稻中,并经过筛选培育形

成了具有显著抗害虫性能的转 Bt 基因水稻,从而使水稻产量大幅提高成为可能。随着越来越多的转基因食品走向人类的餐桌,转基因食品的食用安全性日益引起人们的关注,并成为当下的热点问题。

转 Bt 基因水稻 TT51 是华中农业大学于近年培育的具有自主知识产权的转 Bt 基因(CryAb/CryAc)水稻,在前期田间试验中表现出优异的抗虫特性,并于 2009 年底获得农业部颁发的安全生产证书。为了进一步丰富 TT51 的食用安全性资料,完善其包括生殖发育毒性在内的特殊毒性等非预期效应的研究方法和技术手段,本课题观察 TT51 大

收稿日期:2013-08-30

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

作者简介:王二辉 男 博士生 研究方向为食品毒理学

E-mail: weh1985@126.com

通讯作者:徐海滨 男 研究员 研究方向为食品毒理学

E-mail: hbxu1231602@vip.sina.com

米亲代(F0)暴露对子代(F1)部分早期生理和神经发育指标的影响,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

转 Bt 基因大米 TT51 及其亲本大米明恢 63 均由华中农业大学提供,两种大米种植条件完全相同,从超市购得的市售普通稻花香大米作为对照。市售大米组、明恢 63 大米组、TT51 大米组饲料均由北京华阜康饲料公司参照 AIN93G 标准制作,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的营养需求。

SPF 级 Wistar 大鼠,雌性 90 只,体重 125 ~ 135 g; 雄性 45 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。动物饲养条件:SPF 级动物室,温度范围(22 ± 2) °C,相对湿度 50% ~ 60%,昼:夜为 12 h: 12 h,期间动物自由摄食饮水。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 动物分组、交配

Wistar 大鼠给予基础饲料喂养适应 1 周后,按体重随机分为市售大米组、明恢 63 大米组和 TT51 大米组,每组 30 只雌鼠和 15 只雄鼠,饲喂含有相应受试物的饲料 70 d 后,各组雌性 Wistar 大鼠与同组健康性成熟雄性 Wistar 大鼠于每晚 18:00 按雌雄比 1:1 合笼交配,次日晨 7:00 观察阴栓或者做阴道涂片,发现阴栓或者在光学显微镜下观察到精子认为受孕,当天记为孕 0 d。受孕雌鼠单笼饲养。至子代断乳应保证每组窝数不少于 20 窝。

#### 1.2.2 亲代一般状况观察

试验开始后,每周称量亲代动物体重并观察记录动物进食状况。交配开始后,记录各组动物交配率、怀孕率。母鼠从妊娠第 0 天开始,每 7 d 称 1 次体重,直到妊娠第 21 天;观察孕鼠有无外观变化、阴道出血、流产以及死亡等情况。记录母鼠自然分娩死产和活产数,以及仔鼠的出生存活率、4 d 存活率以及 21 d 存活率等情况。试验期间观察并记录动物精神状态、活动情况以及毛色等一般体征。

#### 1.2.3 仔鼠检查

仔鼠出生后第 4 天,将每窝仔鼠调整至相同数量,每窝 8 只,雌雄各半。仔鼠出生的第 0、4、7 天分别称量体重 1 次,此后每周称量仔鼠体重。仔鼠出生后以窝为单位,进行生理发育指标(耳廓分离、出毛时间、门齿萌出、睁眼、阴道开放、睾丸下降)和神经发育指标(平面翻正、悬崖回避、空中翻正、前肢

悬挂)检查。各发育指标的达标标准定为:同窝所有仔鼠该项指标均达到标准,记录达标天数。每组观察 20 窝以上。

#### 1.2.4 子代大体解剖及组织病理学检查

子代大鼠断乳后,每组随机挑选 20 只大鼠(雌、雄各 10 只)以 50 mg/kg 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,解剖并对各主要脏器进行大体观察,取脑、心、肝、脾、肺、肾、胸腺、胃、十二指肠、睾丸、附睾、子宫和卵巢等脏器并用 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。

### 1.3 统计学分析

试验结果以  $\bar{x} \pm s$  表示。计量资料采用 SPSS 11.5 软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA)。方差分析的结果显示方差齐时用 LSD 法进行组间数据比较,方差不齐时用 Dunnett's 法进行组间数据比较。计数资料采用  $\chi^2$  检验。

## 2 结果与分析

### 2.1 亲代一般状况

亲代雄鼠和雌鼠体重变化见图 1。各组亲雄代鼠和雌鼠整个生长发育期体重增长情况基本一致,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。各组雌鼠孕期及哺乳期的体重差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。亲代雄鼠以及雌鼠食物消耗量变化见图 2,各组亲代雄鼠和雌鼠整个生长发育期食物消耗量基本一致,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),雌鼠孕期及哺乳期的食物消耗量差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),孕期食物消耗量基本稳定,哺乳期食物消耗量快速增长。孕鼠外观均无明显异常,未见有阴道出血、早期或晚期流产及死亡等毒性反应,孕期时间正常。各组动物交配率、怀孕率、孕期、母鼠活产仔率、仔鼠数(窝大小)、出生性别比、出生存活率、仔鼠出生 4 d 存活率及 21 d 存活率差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),结果见表 1。

### 2.2 亲代转 Bt 基因水稻长期暴露对仔鼠体重变化的影响

TT51 大米组仔鼠出生平均体重与明恢 63 大米组和市售大米组相近,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),结果见表 2。整个哺乳期,各组动物体重随时间延长逐渐增长,在此期间各组动物体重增长速率相近,各组差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),结果见表 2。

### 2.3 亲代长期转 Bt 基因水稻暴露对仔鼠早期生理发育的影响

仔鼠生理指标发育情况见表 3。各组动物耳廓分离、门齿萌出、睁眼、阴道开放、睾丸下降等时间差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

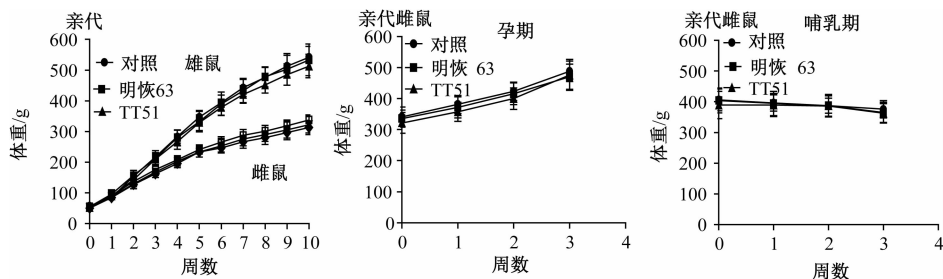


图1 亲代雄鼠以及雌鼠、孕期以及哺乳期体重

Figure 1 Body weights change of F0 male and female rats (pre-mating, gestation and lactation)

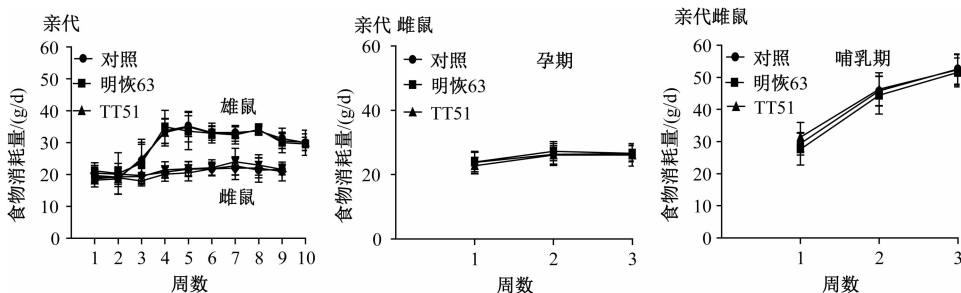


图2 亲代雄鼠以及雌鼠、孕期以及哺乳期食物消耗量

Figure 2 Feed consumption of F0 male and female rats (pre-mating, gestation and lactation)

表1 亲代雌鼠生殖指标

Table 1 Reproduction index of the F0 female rats

组别	交配率/%	怀孕率/%	孕期/d	母鼠活产率/%	仔鼠出生数目/只
市售大米组	93.33	96.43	22.76 ± 0.86	100	13.28 ± 2.65
明恢 63 大米组	96.67	93.10	22.48 ± 0.88	100	13.48 ± 2.55
TT51 大米组	93.33	92.86	22.38 ± 0.75	100	13.71 ± 2.47
组别	仔鼠雌雄比	仔鼠出生存活率/%	鼠 4 d 存活率/%	仔鼠 21 d 存活率/%	
市售大米组	0.51	94.70 ± 7.05	94.97 ± 16.98	100	
明恢 63 大米组	0.51	98.16 ± 3.86	96.59 ± 9.97	100	
TT51 大米组	0.52	94.98 ± 13.36	97.10 ± 9.71	100	

表2 子代仔鼠哺乳期体重

Table 2 Body weights change of the F1 offspring rats during lactation

组别	窝数	哺乳期体重/g				
		0 d	4 d	7 d	14 d	21 d
市售大米组	27	6.44 ± 0.43	9.08 ± 1.39	14.57 ± 2.50	32.15 ± 4.70	50.91 ± 7.31
明恢 63 大米组	27	6.33 ± 0.49	9.44 ± 1.25	13.33 ± 2.88	30.36 ± 4.62	48.60 ± 5.98
TT51 大米组	26	6.52 ± 0.41	9.29 ± 1.90	14.67 ± 3.43	32.46 ± 3.29	52.28 ± 8.63

表3 子代仔鼠生理发育指标

Table 3 Physiological development indexes of the F1 offspring rats

组别	窝数	耳廓分离/d	出毛时间/d	门齿萌出/d
市售大米组	27	3.12 ± 0.33	6.91 ± 0.38	7.03 ± 0.30
明恢 63 大米组	27	3.03 ± 0.31	6.94 ± 0.35	7.00 ± 0.36
TT51 大米组	26	2.97 ± 0.30	6.91 ± 0.38	7.06 ± 0.35
组别	睁眼时间/d	睾丸下降/d	阴道放开/d	
市售大米组	14.03 ± 0.47	21.30 ± 0.92	28.45 ± 1.22	
明恢 63 大米组	13.94 ± 0.35	21.50 ± 1.24	28.69 ± 1.45	
TT51 大米组	14.03 ± 0.39	21.48 ± 1.28	28.52 ± 1.73	

表4 子代大鼠神经发育指标

Table 4 Neurological development indexes of the F1 offspring rats

组别	窝数	翻正反射/d	悬崖回避/d
市售大米组	27	3.73 ± 0.63	6.76 ± 0.56
明恢 63 大米组	27	3.78 ± 0.55	6.84 ± 0.45
TT51 大米组	26	3.85 ± 0.44	6.88 ± 0.42
组别	空中翻正反射/d	听觉惊愕/d	前肢悬挂/s
市售大米组	13.27 ± 0.72	13.73 ± 0.80	16.24 ± 2.29
明恢 63 大米组	12.91 ± 0.47	13.75 ± 0.72	16.88 ± 1.66
TT51 大米组	13.00 ± 0.61	13.85 ± 0.71	15.96 ± 1.26

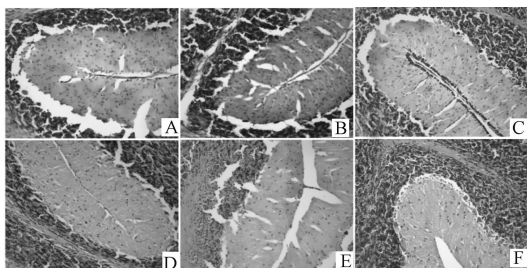
## 2.4 亲代长期转 Bt 基因水稻暴露对子代仔鼠神经行为发育的影响

子代仔鼠神经行为发育指标见表4。各组动物的平面翻正、悬崖回避、空中翻正、听觉惊愕达标时间和前肢悬挂时间差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。

## 2.5 子代大鼠组织病理学检查

各组子代雌雄大鼠取主要脏器后进行大体观察和组织病理学检查,并用 10% 甲醛固定、HE 各试验组均未见有意义的病理改变。各组子代雌雄大鼠脑组织经石蜡切片 HE 染色后,光镜下正常的大

鼠脑组织结构清晰完整,神经细胞密集,排列整齐,神经元胞浆丰富,淡染,胞核居中,神经胶质细胞结构完整排列紧密,核仁清晰,细胞周围间隙致密无水肿(见图3)。



注:从左至右 A~C 和 D~F 依次为:市售大米组、明恢 63 大米组和 TT51 大米组;A~C:雄性子代脑;D~F:雌性子代脑

图3 子代大鼠脑组织病理图片(HE200×)

Figure 3 Photomicrographs of the brain of F1 male and female offspring rats stained with (HE200×)

### 3 讨论

随着转基因技术的迅猛发展,人类培育了越来越多的具有各种优良性状的转基因作物新品种,转基因作物的食用安全性日益引起人们的关注。由于生殖发育毒性涉及雌雄配子生成、胚胎发育、分娩、哺乳、新生儿发育一系列复杂的过程,所以理论上生殖发育的任何过程受到有害物质的影响,都有可能干扰子代正常发育。转基因作物中外源基因的转入有可能会产生改变受体植物原有的代谢通路、产生新的有毒有害物质或者提高原有有害物质的含量,因此,生殖发育毒性评价是转基因作物食用安全性评价的一个重要方面<sup>[3-4]</sup>。目前少数文献报道了转基因作物可能存在生殖发育毒性,虽然这些报道先后因为试验设计缺陷等原因不被科学界所认可,但也促使研究人员更加认识到开展对转基因作物生殖发育毒性评价,积累转基因作物生殖发育毒性的科学资料是非常必要的。

毒物对妊娠前期的影响可引发不育,对胚胎期的毒效应,可在出生后观察到发育、行为、代谢功能障碍,此时母体接触毒物可造成胚胎形态畸形、死亡、生长发育迟缓等毒性效应<sup>[5]</sup>。此外,带有致畸因子的雄性也会使胎仔发生畸形。大鼠精子发育成熟的完整周期大约需要 70 d,卵子发育成熟的最后一个阶段大约需要 15 d,本试验在交配前让动物暴露于受试物 70 d,同时孕期和哺乳期持续暴露,覆盖了雌雄配子生成、胚胎发育、分娩、哺乳、新生儿发育等涉及生殖发育的几乎全部过程。大鼠出生后哺乳期体重增长的变化、出毛、门齿萌出、睾丸下降和阴道开放时间等指标被认为是较为敏感的反

映生理发育的指标<sup>[6-7]</sup>。本试验结果表明,与市售大米组和亲本明恢 63 大米组相比暴露于 TT51 大米对亲代的生殖指标和子代部分早期生理指标的影响差异无统计学意义。

在胚胎发育过程中,神经系统的发育是一个精密的时程化改变过程,任何一个环节发生障碍都将导致神经功能改变,所以神经系统对受试物的毒性作用较其他组织系统更为敏感,因此在组织结构产生不可逆的损害之前,神经行为具有很好的预警作用。神经行为毒理学研究方法由于它的敏感性、可定量及可测定外来化合物导致的亚临床表现,其中如平面翻正、悬崖回避、空中翻正、前肢悬挂等经典的试验指标,由于具有高度的发育规律性和重复性,可较全面地反映中枢神经系统的发育情况,目前已成为毒理学安全性评价的重要方法。本试验对 3 个试验组仔鼠进行神经发育指标的检测,暴露于转基因 Bt 水稻 TT51 对子代部分早期神经发育指标与市售和亲本明恢 63 大米组比较,差异无统计学意义。

本试验采用上述观察指标对亲代转 Bt 基因水稻暴露对子代 Wistar 大鼠早期生理和神经发育的影响进行了较为全面的评价,初步研究发现以 60% 转基因水稻 TT51 掺入饲料喂饲亲代大鼠和断乳后子代未见其与亲本明恢 63 和市售组相比对子代部分早期生理和神经发育指标的影响差异有统计学意义。由于试验动物的种类、数量、试验考察指标和试验暴露时间的局限,该转基因水稻 TT51 是否对人和动物的健康有不良影响尚需进一步研究。

### 参考文献

- [1] ZHOU X H, DONG Y, XIAO X, et al. A 90-day toxicology study of high-amylose transgenic rice grain in Sprague-Dawley rats[J]. *Food Chem Toxicol*, 2011, 49: 3112-3118.
- [2] RAO Y H, DONG G J, ZENG D L, et al. Genetic analysis of leafroller resistance in rice[J]. *Genet Genomics*, 2010, 37: 325-331.
- [3] Dona A, Arvanitoyannis I S. Health risks of genetically modified foods[J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2009, 49(2): 164-175.
- [4] ZANG W, SHI F. Do genetically modified crops affect animal reproduction? A review of the ongoing debate[J]. *Animal*, 2011, 5(7): 1048-1059.
- [5] Heuland E, Germaux M A, Galineau L, et al. Prenatal MDMA exposure delays postnatal development in the rat: a preliminary study [J]. *Neurotoxic Teratol*, 2010, 32(4): 425-431.
- [6] Gerenutti M, Prestes A F, Silva M G, et al. The effect of *Cecropia glaziovii* Snethlage on the physical and neurobehavioral development of rats[J]. *Pharmazie*, 2008, 63(5): 398-404.
- [7] Johnson F O, Chambers J E, Nail C A, et al. Developmental chlorpyrifos and methyl parathion exposure alters radial-arm maze performance in juvenile and adult rats[J]. *Toxicol Sci*, 2009, 109(1): 132-142.