



论文

华恢 1 号稻谷的大鼠慢性毒性试验研究

樊柏林, 唐晓莽, 田辉, 孙凡中, 杨文祥, 谢勇军, 李新兰, 宋毅, 许四元, 刘家发*

湖北省预防医学科学院, 湖北省疾病预防控制中心, 应用毒理学湖北省重点实验室, 武汉 430079

* 联系人, E-mail: jflionm@sohu.com

收稿日期: 2014-05-10; 接受日期: 2014-06-15

国家高技术研究发展计划(批准号: 101-06-01-05)、国家转基因植物研究与产业化专项(批准号: ZJB-B-02-02)和湖北省医学领军人才培养工程资助项目

doi: 10.1360/052014-107

摘要 为了解长期喂养接触华恢 1 号稻谷是否会导致慢性毒性作用, 尤其是进行性或不可逆的毒性作用以及致癌作用, 本研究以 SD 大鼠为实验动物, 进行了为期 106 周的慢性毒性试验. 与普通稻谷对照组和基础饲料对照组比较, 喂饲华恢 1 号稻谷 106 周的低、中、高剂量组 SD 大鼠, 在一般临床症状、体重和食物利用率、血液学和血液生物化学指标、脏器重量和脏器系数、大体解剖学和病理组织学检查等各项观察指标上, 均未见统计学意义和毒理学意义的差异. 各组间, 老年大鼠的肿瘤发生率为 8.3%~10%, 没有剂量反应关系, 其发生部位主要在皮下, 符合美国 NIH Rodent 1980 catalogur SD 大鼠乳腺肿瘤自然发病的正常范围. 故认为华恢 1 号稻谷对 SD 大鼠没有明显的慢性毒性和致癌性.

关键词
水稻
Bt 基因
大鼠
慢性毒性

随着世界经济的迅速发展、人口的日益膨胀和食品结构的改变, 全球对农产品的需求不断增长. 然而, 耕地面积增长缓慢, 人均可耕种面积持续下降, 导致了农产品供求矛盾激烈. 为提高农作物单产, 农药和化肥的使用量与日俱增, 中国以不到世界 1/10 的耕地, 使用了全球化肥和农药总量的 1/3. 长期的高农药、高化肥、高残留、高污染的农业生产, 对环境造成不利影响, 对人、畜的健康产生严重威胁^[1,2]. 转基因作物通过重组 DNA 技术实现对植物的定向遗传改造, 可以改良作物的品质, 提高产量, 但其食用安全和环境安全一直为人们所质疑.

水稻是世界上最主要的粮食作物之一, 也是受虫害危害最为严重的作物之一. 从 20 世纪 80 年代后期开始, 全球科学家开始了植物抗虫基因工程的研究.

已经有大量文献报道的转 Bt 基因抗虫水稻植株的培育, 将有望成为水稻虫害治理上的新方法和新途径^[3,4]. 本文所研究的转 Bt 基因明恢 63(商品名华恢 1 号)的一个显著特点就是由转基因赋予的高抗螟虫特性^[5]. 为了解长期喂养接触该产品后是否会导致慢性毒性作用, 尤其是进行性或不可逆的毒性作用以及致癌作用, 为该产品能否作为安全食品的评价提供依据, 本研究以大鼠(*Rattus norvegicus*)为实验动物, 进行了为期 106 周的慢性毒性合并致癌试验.

1 材料与方法

1.1 实验用稻谷

带壳的普通明恢 63 和华恢 1 号稻谷由华中农业

引用格式: 樊柏林, 唐晓莽, 田辉, 等. 华恢 1 号稻谷的大鼠慢性毒性试验研究. 中国科学: 生命科学, 2014, 44: 911-919

Fan B L, Tang X Q, Tian H, et al. Chronic toxicity of Huahui No. 1 rice toward rats. SCIENTIA SINICA Vitae, 2014, 44: 911-919, doi: 10.1360/052014-107

大学提供。明恢 63 和华恢 1 号稻谷按照实验设计方案以不同比例掺入到基础饲料中,制成块状饲料供动物食用。

1.2 实验动物及环境条件

体重 75~85 g 的 Sprague-Dawley(SD)大鼠,共 200 只,雌雄各 1/2, 来源于湖北省医学实验动物研究中心。大鼠适应性喂养观察 1 周后获得健康大鼠 185 只,被随机分成 5 组,分别是华恢 1 号稻谷高剂量组(A 组)、中剂量组(B 组)、低剂量组(C 组)、基础饲料对照组(D 组)和普通稻谷对照组(E 组)。

动物实验室温度保持在 22~26℃,湿度保持在 55%~70%, 各组动物分笼饲养, 每笼 2~3 只。

1.3 饲料配方和饲料成分检测

高、中、低剂量组饲料中华恢 1 号稻谷的比例分别为 67.4%、34.5%和 16.9%, 基础饲料对照组中不掺入稻谷, 普通稻谷对照组的明恢 63 稻谷掺入比例同中剂量组的稻谷掺入比例。各实验组的饲料配方见表 1。各组饲料的原料按配比混合均匀后制成块状,干燥保存供动物食用。

营养成分检测: 配制成的各组动物饲料, 抽样进行营养成分的检测, 检测指标包括粗蛋白、粗脂肪、无氮浸出液、VitA、VitB2 和氨基酸总和。

1.4 转基因成分的检测

于加工饲料前, 对转基因水稻和非转基因对照水稻的植株进行转基因成分的检测。取适量水稻植株的幼嫩叶片, 用 CTAB 法抽提少量叶片总 DNA。

检测引物为 TT51-F: TCGAGACGTTAGCGTGTTTG 和 TT51-R: GAGGAAAGGTGAATTCGGGC。PCR 反应体系: 2.0 μL 10×缓冲液, 1.5 μL 2 mmol/L dNTP, 0.2 μL 10 μmol/L 左右引物, 1 U *Taq* DNA 聚合酶和 30 ng DNA 模板, 补加双蒸水至 20 μL。PCR 反应程序为 94℃预变性 5 min; 94℃变性 30 s, 57℃退火 30 s, 72℃延伸 30 s, 30 个循环; 72℃延伸 5 min。扩增产物在 1%的琼脂糖凝胶中电泳分离。

1.5 实验方法

(1) 观察指标。经检疫和适应性喂养后, 各组动物定量给予含不同比例受试稻谷的饲料 106 周, 期间观察并记录有关的指标, 包括: (i) 动物的一般临床表现。如行为、临床症状、大小便情况和动物死亡情况; (ii) 动物的体重和进食量。记录 12 周之前每周的体重和进食量以及试验结束时的体重; (iii) 血液学检查。分别于试验第 12 周和结束时进行, 测定指标包括血红蛋白(hemoglobin, Hb)、红细胞计数(red blood cell count, RBC)、白细胞(white blood corpuscle, WBC)计数及分类和血小板计数(platelet count, PLT)(SYSMEXTMF820 型自动血球计数仪, 日本东亚公司); (iv) 血液生物化学指标检测。分别于试验第 12 周和结束时进行, 测定指标包括血清谷丙转氨酶(alanine aminotrans-ferase, ALT)、谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)、血清尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)、总胆固醇(cholesterol, CHO)、甘油三酯(triglycerides, TRI)、肌酐(creatine, CRE)、血糖(glucose, GLU)、血清白蛋白(albumin, ALB)和总蛋白(total protein, TP)(SABA18 型全自动生化分析仪, 意

表 1 各组动物的饲料配方

饲料成分	A 组	B 组	C 组	E 组	D 组
华恢 1 号	75 kg	37.5 kg	17.5 kg	0 kg	0 kg
明恢 63 稻谷	0 kg	0 kg	0 kg	37.5 kg	0 kg
玉米	0 kg	20 kg	28.5 kg	20 kg	40 kg
麸皮	0 kg	20 kg	28.5 kg	20 kg	33.8 kg
黄豆	25 kg	20 kg	17.5 kg	20 kg	15 kg
鱼粉	6.5 kg	6.5 kg	6.5 kg	6.5 kg	6.3 kg
食盐	0.5 kg	0.5 kg	0.5 kg	0.5 kg	0.5 kg
贝壳粉	1 kg	1 kg	1 kg	1 kg	1 kg
Ca(H ₂ PO ₄) ₂	1.25 kg	1.25 kg	1.25 kg	1.25 kg	1.5 kg
奶粉	1.5 kg	1.5 kg	1.5 kg	1.5 kg	1.5 kg
蛋黄粉	0.5 kg	0.5 kg	0.5 kg	0.5 kg	0.5 kg
复合维生素	20 g	20 g	20 g	20 g	20 g
微量元素	150 g	150 g	150 g	150 g	150 g

大利 ams 公司和上海复星长征医学科学有限公司生产的相应试剂盒), 计算白蛋白与球蛋白(globulin, GLO)的比值; (v) 脏器重量和脏器系数. 试验结束时, 处死动物, 称量脏器重量, 计算脏器系数; (vi) 病理组织学检查. 试验结束时, 禁食 16 h 后处死动物, 对心、肝、脾、肺、肾、胃肠及胸腔内等器官的颜色、渗出液、水肿、增生、萎缩、肿瘤发生部位及性质等进行大体解剖观察. 根据肉眼观察的组织形态变化, 选取对照组和稻谷各剂量组各 20 只动物(雌雄各半)部分脏器(心、肝、脾、肾、胃肠、子宫、睾丸、肿瘤), 常规固定、取材、脱水、浸蜡、制片、苏木精-伊红染色法(hematoxylin-eosin staining, HE 染色)染色, 在光学显微镜下由低倍至高倍观察各组织的形态学变化(如细胞变性、浊肿、脂肪变、细胞核是否淡染、破碎、大小以及炎性细胞浸润等病变), 并详细记录描述所观察到的形态学变化, 并根据病理改变程度, 分为“-”, “+”, “++”, “+++”进行量化, 分级标准见表 2.

表 2 病理组织学量化分级及评分标准

分级	分级标准	评分
-	切片中镜下观察每 10 个基本单位组织结果中不多于 1 个细胞坏死灶而坏死灶范围不超过 5 个基本细胞的大小(例如, 每 10 个肝小叶或肾小管内点状细胞坏死不超过 5 个细胞的大小)	0
+	散在的单个细胞浊肿、脂滴及胞浆状物和不同程度的灶状炎性细胞浸润(包括肾小球大小不一、胃肠黏膜上皮变性), 其变性、散在细胞点状坏死的范围一般不超过观察视野的 10 个细胞的大小	1
++	切片中观察到各种结构的浊肿、炎性细胞浸润及坏死区直径不超过 1/4(例如, 每个肝小叶、肾曲管直径的 1/4, 肾小球大小不一超过 3~5 个)	2
+++	切片中细胞浊肿、炎性细胞浸润或坏死区超过基本细胞结构的 1/4(例如, 1 个肝小叶结构), 但极少同其他细胞结构的坏死区相连	3
++++	切片中在显微镜低倍视野下观察, 无论是浊肿、炎性细胞浸润或坏死区融合成网或成片, 而且变性坏死范围超过基本细胞结构的 1/4(例如, 肾小球囊内可见明显炎性细胞浸润或肾小球大小不一, 胃肠黏膜各层可见多个炎性细胞浸润灶)	4

表 3 各组饲料的营养成分测定结果

检测指标	A 组	B 组	C 组	E 组	D 组
粗蛋白质(%)	15.89	17.08	18.61	17.36	19.47
粗脂肪(%)	6.08	6.30	6.73	6.91	6.48
无氮浸出液(%)	52.46	54.14	53.88	53.11	54.32
VitA(IU)	313	270	399	399.6	866
VitB ₂ (mg)	1.34	1.38	1.39	1.39	1.40
氨基酸总和(%)	13.1	14.6	16.7	14.8	16.7

表 4 各组饲料中氨基酸的构成比值

氨基酸组成	标准	A 组	B 组	C 组	E 组	D 组
异亮氨酸	4.0	4.7	3.3	3.6	3.4	3.7
亮氨酸	7.0	7.8	6.0	6.5	6.2	7.1
赖氨酸	5.5	5.6	4.0	4.4	4.0	4.2
蛋氨酸	3.5	1.7	1.2	1.5	1.3	1.4
苯丙氨酸	6.0	6.9	5.4	6.4	5.5	6.0
苏氨酸	4.5	3.1	2.3	2.6	2.3	2.5
缬氨酸	5.0	3.9	2.7	3.0	3.0	3.0
色氨酸	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

(2) 数据统计分析方法. 采用 SPSS8.0 for Windows 统计软件包, 计量资料采用单因素方差分析(one way ANOVA), 计数资料采用非参数统计分析(norparametric tests).

2 结果

2.1 饲料检测结果

(1) 饲料中营养成分检测结果. 饲料主要营养成分检测结果表明, 高剂量组蛋白质和氨基酸含量稍低于普通稻谷对照组, 而低剂量组蛋白质和氨基酸含量高于普通稻谷对照组, 中剂量组的蛋白质和氨基酸含量与普通稻谷对照组相当. 基础饲料对照组的蛋白质和氨基酸含量均高于其他组别(表 3). 氨基酸比例中蛋氨酸含量偏低, 但饲料中未测定半胱氨酸含量(表 4).

(2) 转基因成分检测结果. TT51-F 和 TT51-R 为根据华恢 1 号转基因植株的转基因插入序列设计的 1 对特异性引物. 如图 1 所示, 华恢 1 号水稻植株 DNA 扩增出预期的 494 bp 特异条带, 与含 *cry1Ab/cry1Ac* 的阳性质粒 pFHBT1 扩增得到的条带大小相同, 而非转基因对照植株 MH63 中未扩增出相应条带. 表明所用的华恢 1 号为转 *cry1Ab/cry1Ac* 的转基因材料.

2.2 实验动物的一般表现

试验期间, 动物毛色、精神状态、行为、进食及大小便等方面, 转基因各剂量组未观察到与对照组

有不同的异常表现. 试验期间, 各组合计有 70 只动物死亡, 其中 12 周前死亡 11 只, 主要原因为动物试图逃逸或相互咬伤致死等, 占动物总数 5.9%; 12 周至 106 周内死亡 59 只, 占动物总数 33.1%, 主要死亡原因为肺部感染 56 例, 皮下脓肿 3 例(其中 2 例为尾背部形成脓肿, 尾巴溃烂, 1 例为右眼部形成脓肿, 眼睛视力受损, 均为老年动物). 试验结束时, 各组动物存活率均在 50% 以上, 结果见表 5.

2.3 对体重及食物利用率的影响

取食转基因稻谷各剂量组的大鼠体重变化与普通稻谷对照组结果比较无明显差异($P>0.05$). 取食转基因稻谷各剂量组动物的食物利用率等指标, 与普通稻谷对照组比较亦无显著差异($P>0.05$, 表 6 和图 2, 3).

2.4 对血液常规检查结果的影响

取食转基因稻谷各剂量组、普通稻谷对照组和基础饲料对照组的实验动物的 Hb、RBC 计数、WBC 计数及分类和 PLT 计数均在本实验室的历史正常值范围内(表 7 和 8).

2.5 对血液生物化学指标的影响

取食转基因稻谷各剂量组、普通稻谷对照组和基础饲料对照组实验动物的血清 ALT, AST, BUN, CHO, TRI, CRE, GLU, ALB 和 TP 均在本实验室历史正常值范围内(表 9 和 10).

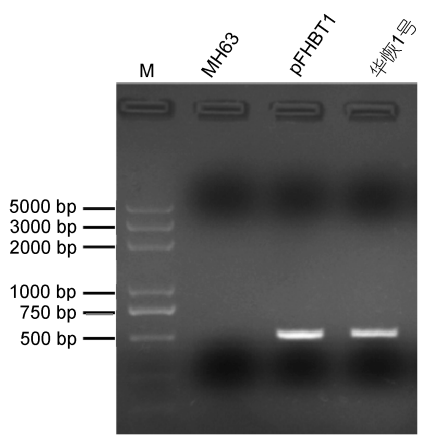


图 1 华恢 1 号中 *cry1Ab/cry1Ac* 的 PCR 检测结果

M: 全式金 2K Plus DNA 分子量标准; MH63: 非转基因阴性对照明恢 63; pFHBT1: 含 *cry1Ab/cry1Ac* 的阳性质粒; 华恢 1 号: 检测材料

表 5 大鼠慢性毒性试验中动物死亡情况列表

组别	动物数	12 周前			12~106 周		
		死亡数	存活数	存活率(%)	死亡数	存活数	存活率(%)
A	♀17	0	17	100.0	6	11	64.7
	♂20	1	19	95.0	8	11	57.9
B	♀17	0	17	100.0	6	11	64.7
	♂20	0	20	100.0	8	12	60.0
C	♀17	0	17	100.0	5	12	70.6
	♂20	3	17	85.0	4	13	76.5
D	♀17	0	17	100.0	7	10	58.8
	♂20	3	17	85.0	5	12	70.6
E	♀17	1	16	94.1	5	11	68.8
	♂20	1	19	95.0	7	12	63.2
合计	185	11	174	94.1	59	115	66.1

表 6 华恢 1 号慢性毒性试验对大鼠 12 周食物利用率的影响($\bar{x} \pm SD$)

性别	组别	动物数	总增重(g)	总进食量(g)	平均食物利用率(%)
♀	A	17	149.2±21.5	1329.8±23.6	10.9±1.9
	B	17	158.7±17.4	1442.2±32.9	10.2±1.7
	C	17	153.9±25.1	1402.4±19.2	10.4±1.9
	D	17	154.8±28.9	1361.1±22.7	10.0±2.7
	E	16	163.6±21.3	1358.6±33.1	11.2±2.0
♂	A	17	250.2±41.5	1918.7±44.6	13.0±2.8
	B	20	274.6±30.9	1948.2±51.3	14.1±1.6
	C	17	278.2±33.6	1916.2±33.3	14.3±1.9
	D	17	255.8±36.9	1859.8±20.9	13.2±2.1
	E	17	269.6±36.1	1892.4±24.7	14.8±2.1

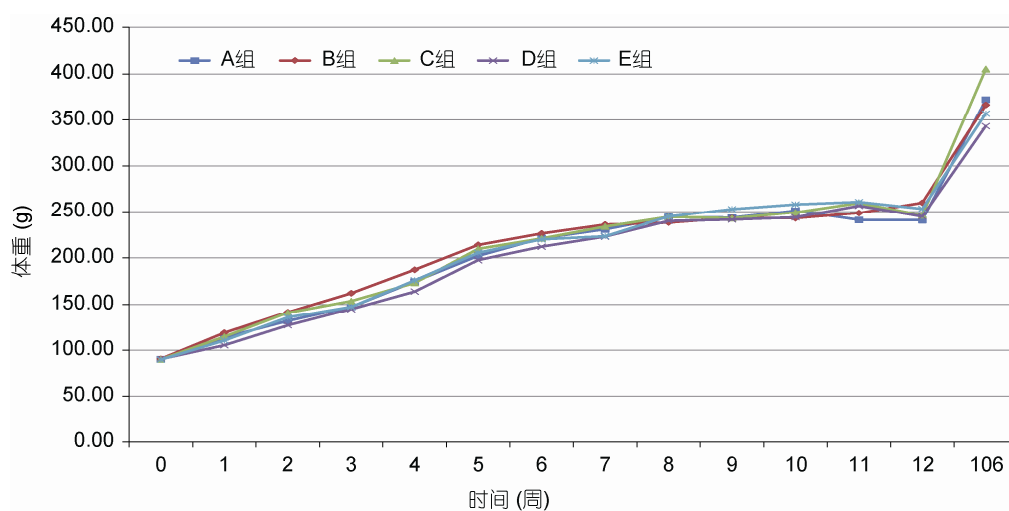


图 2 华恢 1 号慢性毒性试验雌性大鼠体重变化曲线

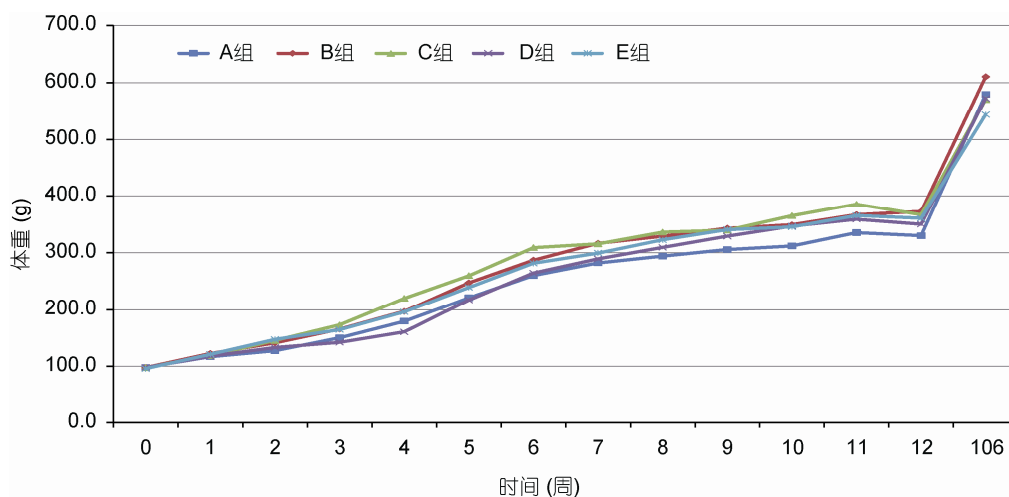


图 3 华恢 1 号慢性毒性试验雄性大鼠体重变化曲线

表 7 华恢 1 号慢性毒性试验对大鼠第 12 周血常规检查结果的影响($\bar{x} \pm SD$)

性别	组别	动物数(只)	Hb (g/L)	RBC ($\times 10^{12}/L$)	PLT ($\times 10^9/L$)	WBC ($\times 10^9/L$)	WBC 分类(%)	
							淋巴及单核	粒细胞
♀	A	17	129.6 $\pm$ 7.90	6.64 $\pm$ 0.39	942.7 $\pm$ 74.39	12.7 $\pm$ 0.92	65.7 $\pm$ 3.10	34.3 $\pm$ 3.10
	B	17	127.6 $\pm$ 8.77	6.67 $\pm$ 0.40	911.7 $\pm$ 59.45	12.6 $\pm$ 1.24	62.5 $\pm$ 3.25	37.5 $\pm$ 3.25
	C	17	133.9 $\pm$ 14.76	7.10 $\pm$ 0.35	979.1 $\pm$ 23.97	14.1 $\pm$ 0.65	66.4 $\pm$ 2.88	33.6 $\pm$ 2.88
	D	17	134.6 $\pm$ 6.75	6.85 $\pm$ 0.16	886.6 $\pm$ 35.23	14.3 $\pm$ 0.33	62.8 $\pm$ 1.39	37.2 $\pm$ 1.39
	E	16	134.8 $\pm$ 6.44	6.84 $\pm$ 0.16	884.9 $\pm$ 34.34	14.2 $\pm$ 0.32	63.0 $\pm$ 1.65	37.1 $\pm$ 1.65
♂	A	17	142.7 $\pm$ 7.96	6.94 $\pm$ 0.23	936.9 $\pm$ 41.42	14.8 $\pm$ 1.08	65.5 $\pm$ 1.25	34.5 $\pm$ 1.25
	B	20	130.6 $\pm$ 8.19	6.81 $\pm$ 0.29	948.8 $\pm$ 51.88	14.3 $\pm$ 0.85	68.0 $\pm$ 3.02	32.0 $\pm$ 3.02
	C	17	133.4 $\pm$ 6.87	6.75 $\pm$ 0.36	982.2 $\pm$ 22.03	15.0 $\pm$ 1.43	64.2 $\pm$ 3.20	35.8 $\pm$ 3.20
	D	17	128.3 $\pm$ 4.95	6.77 $\pm$ 0.28	930.3 $\pm$ 64.29	14.4 $\pm$ 0.77	68.1 $\pm$ 2.68	31.9 $\pm$ 2.68
	E	19	130.5 $\pm$ 6.13	6.82 $\pm$ 0.41	954.0 $\pm$ 46.95	14.5 $\pm$ 0.95	68.0 $\pm$ 3.25	32.0 $\pm$ 3.25

表 8 华恢 1 号慢性毒性试验对大鼠第 106 周血常规检查结果的影响($\bar{x} \pm SD$)

性别	组别	动物数(只)	Hb (g/L)	RBC ($\times 10^{12}/L$)	PLT ($\times 10^9/L$)	WBC ($\times 10^9/L$)	WBC 分类(%)	
							淋巴及单核	粒细胞
♀	A	10	134.0 $\pm$ 4.57	6.62 $\pm$ 0.28	934.6 $\pm$ 29.71	12.9 $\pm$ 0.66	67.3 $\pm$ 1.33	32.7 $\pm$ 1.33
	B	10	134.1 $\pm$ 3.25	6.98 $\pm$ 0.15	952.3 $\pm$ 27.33	12.8 $\pm$ 0.84	66.8 $\pm$ 1.02	33.2 $\pm$ 1.02
	C	10	135.1 $\pm$ 4.36	6.80 $\pm$ 0.20	924.1 $\pm$ 45.90	12.5 $\pm$ 0.42	66.3 $\pm$ 1.42	33.7 $\pm$ 1.42
	D	10	134.3 $\pm$ 4.22	6.89 $\pm$ 0.10	938.1 $\pm$ 24.03	12.5 $\pm$ 0.42	67.1 $\pm$ 0.74	32.9 $\pm$ 0.74
	E	10	135.4 $\pm$ 2.59	6.55 $\pm$ 0.18	943.9 $\pm$ 38.46	14.5 $\pm$ 0.74	65.6 $\pm$ 1.23	34.4 $\pm$ 1.23
♂	A	10	139.8 $\pm$ 2.62	6.90 $\pm$ 0.14	973.2 $\pm$ 32.58	14.0 $\pm$ 0.62	65.5 $\pm$ 1.22	34.5 $\pm$ 1.22
	B	10	140.1 $\pm$ 2.28	6.69 $\pm$ 0.19	940.5 $\pm$ 50.94	14.4 $\pm$ 0.58	65.3 $\pm$ 1.09	34.7 $\pm$ 1.09
	C	10	139.6 $\pm$ 2.55	6.97 $\pm$ 0.08	960.4 $\pm$ 30.51	14.6 $\pm$ 0.73	65.7 $\pm$ 0.95	34.4 $\pm$ 0.95
	D	10	139.5 $\pm$ 3.41	6.86 $\pm$ 0.20	960.7 $\pm$ 32.17	14.2 $\pm$ 0.56	65.0 $\pm$ 1.50	35.0 $\pm$ 1.50
	E	10	140.5 $\pm$ 2.68	6.92 $\pm$ 0.14	961.5 $\pm$ 29.60	13.9 $\pm$ 0.39	65.2 $\pm$ 0.93	34.8 $\pm$ 0.93

表 9 华恢 1 号慢性毒性试验对大鼠第 12 周血生物化学指标的影响($\bar{x} \pm SD$)

性别	组别	动物数 (只)	ALT (U/L)	AST (U/L)	CRE ($\mu\text{mol}/L$)	TRI (mmol/L)	BUN (mmol/L)	CHO (mmol/L)	GLU (mmol/L)	ALB (g/L)	TP (g/L)	ALB/GLO
♀	A	17	46.4 $\pm$ 2.74	228.3 $\pm$ 8.62	60.9 $\pm$ 1.73	1.82 $\pm$ 0.12	6.47 $\pm$ 0.51	2.09 $\pm$ 0.09	6.20 $\pm$ 0.42	32.0 $\pm$ 1.58	62.3 $\pm$ 3.16	1.08 $\pm$ 0.21
	B	17	46.6 $\pm$ 1.63	238.1 $\pm$ 10.85	55.9 $\pm$ 2.07	1.81 $\pm$ 0.19	6.41 $\pm$ 0.51	2.13 $\pm$ 0.05	6.20 $\pm$ 0.42	33.3 $\pm$ 0.97	61.4 $\pm$ 2.58	1.19 $\pm$ 0.05
	C	17	52.8 $\pm$ 3.32	232.4 $\pm$ 15.07	58.7 $\pm$ 0.59	1.71 $\pm$ 0.15	6.20 $\pm$ 0.21	2.23 $\pm$ 0.10	6.20 $\pm$ 0.42	33.1 $\pm$ 1.44	65.6 $\pm$ 1.98	1.04 $\pm$ 0.15
	D	17	54.0 $\pm$ 3.79	220.9 $\pm$ 10.79	63.5 $\pm$ 3.71	1.76 $\pm$ 0.07	6.43 $\pm$ 0.06	2.18 $\pm$ 0.06	6.20 $\pm$ 0.42	32.9 $\pm$ 0.46	62.3 $\pm$ 1.16	1.12 $\pm$ 0.05
	E	16	53.9 $\pm$ 2.56	222.2 $\pm$ 13.21	63.6 $\pm$ 3.17	1.74 $\pm$ 0.05	6.44 $\pm$ 0.05	21.6 $\pm$ 0.08	6.20 $\pm$ 0.42	33.2 $\pm$ 0.99	61.9 $\pm$ 1.62	1.16 $\pm$ 0.09
♂	A	17	59.7 $\pm$ 8.37	185.1 $\pm$ 15.63	56.9 $\pm$ 3.15	0.89 $\pm$ 0.08	5.67 $\pm$ 0.34	1.88 $\pm$ 0.10	5.90 $\pm$ 0.32	29.1 $\pm$ 1.10	58.3 $\pm$ 1.54	1.00 $\pm$ 0.08
	B	20	58.0 $\pm$ 3.21	202.8 $\pm$ 16.01	57.3 $\pm$ 4.91	1.05 $\pm$ 0.09	5.50 $\pm$ 0.31	2.03 $\pm$ 0.08	6.20 $\pm$ 0.42	28.5 $\pm$ 1.18	59.6 $\pm$ 4.19	0.94 $\pm$ 0.20
	C	17	55.6 $\pm$ 3.34	191.5 $\pm$ 23.14	55.8 $\pm$ 2.03	1.03 $\pm$ 0.06	6.18 $\pm$ 0.41	1.98 $\pm$ 0.12	6.30 $\pm$ 0.48	29.0 $\pm$ 0.94	56.1 $\pm$ 3.91	1.10 $\pm$ 0.22
	D	17	54.9 $\pm$ 2.35	202.5 $\pm$ 11.09	56.3 $\pm$ 1.56	1.46 $\pm$ 0.23	6.07 $\pm$ 0.15	2.08 $\pm$ 0.14	6.30 $\pm$ 0.48	28.4 $\pm$ 0.79	54.4 $\pm$ 1.65	1.10 $\pm$ 0.12
	E	19	55.3 $\pm$ 3.57	197.3 $\pm$ 11.61	54.7 $\pm$ 2.06	1.47 $\pm$ 0.20	6.03 $\pm$ 0.17	2.07 $\pm$ 0.20	6.20 $\pm$ 0.42	28.3 $\pm$ 0.80	53.5 $\pm$ 1.26	1.13 $\pm$ 0.09

2.6 对脏器重量及系数的影响

取食转基因稻谷各剂量组、普通稻谷对照组和基础饲料对照组的实验动物心、肝、脾、肾的绝对重量和脏器系数均在本实验室历史正常值范围内(表 11).

2.7 对病理组织学的影响

对不同时期死亡部分大鼠进行大体解剖后观察,肺部感染的动物主要表现为肺脓肿,伴有脓性渗出液和萎缩黏连肺以及肺组织陈旧性淤血灶多见,属

表 10 华恢 1 号慢性毒性试验对大鼠第 106 周血生物化学指标的影响($\bar{x} \pm SD$)

性别	组别	动物数 (只)	ALT (U/L)	AST (U/L)	CRE (μ mol/L)	TRI (mmol/L)	BUN (mmol/L)	CHO (mmol/L)	GLU (mmol/L)	ALB (g/L)	TP (g/L)	ALB/GLO
♀	A	10	45.1 $\pm$ 5.92	187.6 $\pm$ 17.17	54.8 $\pm$ 4.38	1.46 $\pm$ 0.09	5.99 $\pm$ 0.28	1.99 $\pm$ 0.11	5.90 $\pm$ 0.14	31.5 $\pm$ 1.06	63.7 $\pm$ 1.95	0.98 $\pm$ 0.02
	B	10	41.0 $\pm$ 2.17	186.5 $\pm$ 13.83	52.9 $\pm$ 1.85	1.35 $\pm$ 0.11	6.05 $\pm$ 0.17	1.97 $\pm$ 0.10	6.03 $\pm$ 0.37	31.9 $\pm$ 1.10	64.3 $\pm$ 2.07	0.98 $\pm$ 0.02
	C	10	52.3 $\pm$ 3.80	190.4 $\pm$ 12.33	53.5 $\pm$ 3.43	1.46 $\pm$ 0.10	5.69 $\pm$ 0.31	1.99 $\pm$ 0.13	5.53 $\pm$ 0.28	32.5 $\pm$ 1.34	65.5 $\pm$ 1.70	0.98 $\pm$ 0.04
	D	10	44.8 $\pm$ 2.84	194.2 $\pm$ 18.13	53.8 $\pm$ 1.67	1.45 $\pm$ 0.08	5.64 $\pm$ 0.32	2.01 $\pm$ 0.10	5.63 $\pm$ 0.24	33.0 $\pm$ 1.07	66.2 $\pm$ 1.72	0.99 $\pm$ 0.02
	E	10	48.3 $\pm$ 5.35	189.1 $\pm$ 16.74	58.8 $\pm$ 4.13	1.45 $\pm$ 0.10	5.66 $\pm$ 0.20	1.79 $\pm$ 0.18	5.67 $\pm$ 0.19	33.8 $\pm$ 1.54	67.2 $\pm$ 2.38	1.03 $\pm$ 0.03
♂	A	10	47.2 $\pm$ 7.17	195.2 $\pm$ 16.15	59.4 $\pm$ 3.63	1.04 $\pm$ 0.13	5.40 $\pm$ 0.24	1.90 $\pm$ 0.08	5.76 $\pm$ 0.26	33.4 $\pm$ 2.22	66.7 $\pm$ 3.73	1.00 $\pm$ 0.02
	B	10	48.2 $\pm$ 5.83	187.2 $\pm$ 13.83	56.2 $\pm$ 2.36	1.00 $\pm$ 0.14	5.72 $\pm$ 0.17	1.93 $\pm$ 0.07	5.62 $\pm$ 0.21	32.8 $\pm$ 0.80	65.8 $\pm$ 1.51	1.00 $\pm$ 0.01
	C	10	48.1 $\pm$ 5.44	188.9 $\pm$ 12.64	54.9 $\pm$ 1.76	1.00 $\pm$ 0.09	5.58 $\pm$ 0.25	1.95 $\pm$ 0.10	5.59 $\pm$ 0.25	32.5 $\pm$ 0.54	65.4 $\pm$ 1.37	0.99 $\pm$ 0.02
	D	10	51.2 $\pm$ 4.72	196.3 $\pm$ 10.99	53.5 $\pm$ 4.28	1.36 $\pm$ 0.07	5.48 $\pm$ 0.25	2.04 $\pm$ 0.14	5.48 $\pm$ 0.13	33.1 $\pm$ 1.13	65.9 $\pm$ 1.70	1.01 $\pm$ 0.03
	E	10	50.7 $\pm$ 5.53	197.8 $\pm$ 10.76	51.3 $\pm$ 6.24	1.21 $\pm$ 0.15	5.56 $\pm$ 0.20	1.92 $\pm$ 0.10	5.44 $\pm$ 0.07	33.1 $\pm$ 0.83	66.0 $\pm$ 1.59	1.00 $\pm$ 0.01

表 11 华恢 1 号慢性毒性试验对大鼠脏器重量和脏器系数的影响($\bar{x} \pm SD$)

性别	组别	动物数 (只)	心脏		肝脏		脾脏		肾脏	
			重量(g)	系数(%)	重量(g)	系数(%)	重量(g)	系数(%)	重量(g)	系数(%)
♀	A	10	1.23 $\pm$ 0.21	0.33 $\pm$ 0.05	11.77 $\pm$ 1.37	3.16 $\pm$ 0.28	1.15 $\pm$ 0.13	0.31 $\pm$ 0.04	2.57 $\pm$ 0.51	0.69 $\pm$ 0.12
	B	10	1.24 $\pm$ 0.07	0.34 $\pm$ 0.03	11.92 $\pm$ 1.14	3.29 $\pm$ 0.08	1.11 $\pm$ 0.05	0.31 $\pm$ 0.04	2.72 $\pm$ 0.45	0.74 $\pm$ 0.07
	C	10	1.32 $\pm$ 0.26	0.33 $\pm$ 0.07	12.28 $\pm$ 2.26	3.04 $\pm$ 0.66	1.04 $\pm$ 0.11	0.26 $\pm$ 0.04	2.81 $\pm$ 0.71	0.70 $\pm$ 0.20
	D	10	1.23 $\pm$ 0.07	0.36 $\pm$ 0.03	10.90 $\pm$ 0.97	3.23 $\pm$ 0.57	1.10 $\pm$ 0.07	0.33 $\pm$ 0.06	2.53 $\pm$ 0.18	0.75 $\pm$ 0.10
	E	10	1.19 $\pm$ 0.17	0.33 $\pm$ 0.04	11.50 $\pm$ 1.59	3.23 $\pm$ 0.52	1.12 $\pm$ 0.11	0.32 $\pm$ 0.03	2.61 $\pm$ 0.14	0.73 $\pm$ 0.06
♂	A	10	1.60 $\pm$ 0.12	0.28 $\pm$ 0.04	14.85 $\pm$ 1.86	2.58 $\pm$ 0.47	1.01 $\pm$ 0.06	0.18 $\pm$ 0.03	3.63 $\pm$ 0.62	0.64 $\pm$ 0.16
	B	10	1.72 $\pm$ 0.17	0.28 $\pm$ 0.02	17.70 $\pm$ 1.98	2.92 $\pm$ 0.32	1.00 $\pm$ 0.13	0.17 $\pm$ 0.03	3.80 $\pm$ 0.39	0.63 $\pm$ 0.06
	C	10	1.59 $\pm$ 0.17	0.28 $\pm$ 0.02	14.34 $\pm$ 0.91	2.51 $\pm$ 0.14	1.13 $\pm$ 0.12	0.20 $\pm$ 0.03	3.29 $\pm$ 0.24	0.58 $\pm$ 0.06
	D	10	1.50 $\pm$ 0.15	0.26 $\pm$ 0.03	15.24 $\pm$ 1.40	2.69 $\pm$ 0.39	1.06 $\pm$ 0.09	0.19 $\pm$ 0.03	3.53 $\pm$ 0.36	0.63 $\pm$ 0.10
	E	10	1.43 $\pm$ 0.24	0.26 $\pm$ 0.05	13.15 $\pm$ 2.34	2.43 $\pm$ 0.57	1.17 $\pm$ 0.25	0.22 $\pm$ 0.06	3.07 $\pm$ 0.67	0.57 $\pm$ 0.14

大鼠常见的肺炎特征, 其他脏器如心、肝、脾、肾、胃未见明显因受试物中毒造成的病理改变. 试验结束时, 雌雄大鼠各 10 只的心、肝、脾、肾、胃肠、睾丸、子宫等脏器(除肺组织外)与基础饲料组比较, 其外观颜色和脏器大小正常(华恢 1 号低剂量组雌性动物 1 例巨脾, 大于正常脾 3 倍重量)均未见明显渗出、增生、水肿、萎缩等病变.

光学显微镜下所见病理组织学变化: 对各剂量组死亡的约 50 只动物, 进行切片观察(除肺组织外). 其中, 肝细胞主要表现为浊肿、汇管区炎性细胞浸润及小灶状坏死, 肾小管上皮细胞浊肿, 胃肠未见明显病理改变, 不同时期死亡动物各脏器病变积分表病理变化见表 12 所示. 106 周试验结束时, 各剂量组动物主要表现是肝、肾细胞的浊肿, 间质炎性细胞浸润和细胞点状、灶状坏死、脾红髓中含铁血黄素多见, 脾小梁增宽, 胃肠黏膜、黏膜下、肌层、浆膜层均未见炎性细胞浸润, 子宫、睾丸等脏器未见病理改变, 不同时期死亡动物各脏器病变积分表病理变化见表 13 所示.

本次试验中共观察到 5 例自然发生的肿瘤(9.1%), 且各剂量组均有发生、发生部位主要在皮下. 经病理组织学诊断, 其中华恢 1 号稻谷高剂量组和普通稻谷对照组为恶性肿瘤(乳腺癌), 其他剂量组为良性肿瘤(乳腺瘤和乳腺汗腺瘤), 各组间肿瘤在老年雌性大鼠中的发生率为 8.3%~10%, 且没有剂量反应关系, 符合美国 NIH Rodent 1980 catalogur SD 大鼠乳腺肿瘤自然发病的正常范围.

3 讨论

华恢 1 号所用的目的基因为 *cryIAb* 和 *cryIAc* 融合型杀虫基因, 其产物为专一高效杀虫的 Bt 蛋白. 目前, 这种 Bt 蛋白结合位点只在二化螟、三化螟和稻纵卷叶螟等鳞翅目害虫的肠壁细胞上被发现, 因而, 该蛋白能选择性地有效杀死该类害虫; 而人类肠道上没有该蛋白的结合位点, 故不会对人类健康造成危害^[6].

表 12 华恢 1 号慢性毒性试验中不同时期死亡动物各脏器病变积分表

病变类型	病变程度	A 组	B 组	C 组	D 组	E 组
肝脏	+例数	30	31	32	32	31
	积分	30	31	32	32	31
	++例数	6	5	7	8	9
	积分	24	20	28	32	36
	+++例数	0	0	0	0	0
	积分	0	0	0	0	0
	总积分	54	51	60	64	67
肾脏	+例数	15	10	15	14	15
	积分	15	10	15	14	15
	++例数	0	0	0	0	0
	积分	0	0	0	0	0
	+++例数	0	0	0	0	0
	积分	0	0	0	0	0
	总积分	15	10	15	14	15
胃肠	+例数	0	0	0	0	0
	积分	0	0	0	0	0
	++例数	0	0	0	0	0
	积分	0	0	0	0	0
	+++例数	0	0	0	0	0
	积分	0	0	0	0	0
	总积分	0	0	0	0	0
合计		69	61	75	78	82

表 13 106 周 Bt 稻谷慢性毒性试验各组大鼠各脏器病变积分表

病变类型	病变程度	A 组	B 组	C 组	D 组	E 组
肝脏	+例数	39	45	43	39	46
	积分	39	45	43	39	46
	++例数	8	8	7	6	6
	积分	32	32	28	24	24
	+++例数	0	0	0	0	0
	积分	0	0	0	0	0
	总积分	71	77	71	63	70
肾脏	+例数	28	30	29	28	31
	积分	28	30	29	28	31
	++例数	0	0	0	0	0
	积分	0	0	0	0	0
	+++例数	0	0	0	0	0
	积分	0	0	0	0	0
	总积分	28	30	29	28	31
胃肠	+例数	0	0	0	0	0
	积分	0	0	0	0	0
	++例数	0	0	0	0	0
	积分	0	0	0	0	0
	+++例数	0	0	0	0	0
	积分	0	0	0	0	0
	总积分	0	0	0	0	0
合计		99	107	100	91	101

对转基因水稻品种与非转基因对照品种进行营养成分分析显示, 两者在主要成分、微量元素等营养学方

面, 未见生物学意义上的差异. 虽然拌入饲料后, 由于掺入比的不同, 基础饲料组的蛋白质和氨基酸含量略

高于其他组别, 但对动物体重的生长未见明显影响。

2002 年, 王忠华等人^[7]的研究显示, 转 Bt 基因抗虫水稻稻米属无毒级; 大鼠 90 天喂养实验中各实验组与对照组无明显差异。在 106 周的慢性毒性试验中, 对实验动物的一般临床症状、体重和食物利用率、血液学检查、血液生物化学检查、脏器重量和脏器系数以及病理组织学检查(包括大体解剖和病理切

片检查等方面)进行了详细的观察和记录, 试验结果表明, 各剂量组与普通稻谷对照组和基础饲料对照组的受试动物相比较, 上述所有指标的观察或检测数值均在正常值范围内。故认为, 华恢 1 号稻谷对受试动物没有进行性、不可逆性慢性毒性, 也未发现有致癌性的证据。因此, 进一步证实该转 Bt 基因稻谷对哺乳类动物是安全的。

致谢 感谢中国疾病预防控制中心营养与食品安全所(原卫生部食品卫生监督检验研究所)戴寅研究员和华中科技大学同济医学院公共卫生学院营养与食品卫生系朱清华教授在研究中给予的指导。

参考文献

- 1 刘爱红, 张琳. 农药残留与食品安全. 安徽农业科学, 2007, 35: 4017-4018
- 2 袁仲, 杨继远. 农药化肥污染与食品安全. 农产品加工·学刊, 2009, 7: 67-69
- 3 Cheng X, Sardana R, Kaplan H, et al. *Agrobacterium*-transformed rice plants expressing synthetic *cryA(b)* and *cryIA(c)* genes are highly toxic to striped borer and yellow stem borer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 195-203
- 4 Chen H, Tang W, Xu C, et al. Transgenic indica rice plants harboring a synthetic *cry2A** gene of *Bacillus thuringiensis* exhibit enhanced resistance against lepidopteran rice pests. *Theor Appl Genet*, 2005, 111: 1330-1337
- 5 杨妮娜. 转 Bt 基因水稻对仓储害虫的影响及其毒理分析. 硕士学位论文. 武汉: 华中农业大学, 2009
- 6 赵玉艳, 蔡磊明. 转苏云金芽孢杆菌基因作物安全性研究. 卫生毒理学杂志, 2004, 18: 57-58
- 7 王忠华, 王茵, 崔海瑞, 等. Bt 水稻“克螟稻”稻米毒理性评价研究初报. 中国农业科学, 2002, 35: 1487-1492

Chronic Toxicity of Huahui No. 1 Rice Toward Rats

FAN BoLin, TANG XiaoQiao, TIAN Hui, SUN FanZhong, YANG WenXiang, XIE YongJun,
LI XinLan, SONG Yi, XU SiYuan & LIU JiaFa

Hubei Provincial Key Laboratory for Applied Toxicology, Hubei Provincial Center for Disease Control and Prevention, Hubei Provincial Academy for Preventive Medicine, Wuhan 430079, China

This paper aims to understand the chronic toxicity and carcinogenicity of Huahui No. 1 rice, especially the progressive or unreversal toxicity and carcinogenicity. Sprague-Dawley (SD) rats were selected in the 106-week chronic toxicity test. Compared with rats of non-gene modified rice group and basic feed group, no statistical difference and toxicological changes in clinical symptoms, body weight, food utilization efficiency, hematological and biochemical index, organ weight and index, gross anatomy and histopathological observation were found in rats fed low, medium and high dosages of Huahui No. 1 rice. Tumor incidences of old rats in different groups were between 8.3% and 10% and mostly observed in subcutaneous site, and no dose-response relationship was observed. The results were in accordance with the spontaneous tumor incidence by NIH Rodent 1980 catalogur SD rats. In conclusion, no chronic toxicity and carcinogenicity were found in SD rats after they were fed with Huahui No. 1 rice for 106 weeks in the experiment.

rice, Bt gene, rat, chronic toxicity

doi: 10.1360/052014-107