

转*Bt*基因水稻的食用安全性评价研究进展

谭小燕^{1,2}, 陈高峰^{1,2}, 周晓冰¹, 汤 瑶¹, 黄芝瑛^{2,*}, 王 雪^{1,2,*}

(1. 中国食品药品检定研究院 国家药物安全评价监测中心, 药物非临床安全评价研究北京市重点实验室, 北京 100176;

2. 中山大学药学院药物安全评价中心, 广东 广州 510006)

摘 要: 水稻 (*Oryza sativa*) 是我国重要的经济作物, 其优化育种一直是研究的重点。苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, *Bt*) 抗虫基因的出现, 开辟了利用外源基因培育转基因抗虫作物的新领域。目前, 转基因抗虫水稻的培育技术已日趋成熟, 而其对人体的潜在安全性问题却备受争议。转*Bt*基因水稻能否实现商业化是人们关注的焦点。本文就转*Bt*基因水稻的食用安全性评价的研究进展进行综述, 以期为我国转*Bt*基因水稻的风险评估和推广提供一些参考。

关键词: 转*Bt*基因水稻; 安全性评价; 食用安全

Advances in Food Safety Evaluation of Transgenic *Bt* Rice

TAN Xiaoyan^{1,2}, CHEN Gaofeng^{1,2}, ZHOU Xiaobing¹, TANG Yao¹, HUANG Zhiying^{2,*}, WANG Xue^{1,2,*}

(1. Key Laboratory of Beijing for Safety Evaluation of Drugs, National Center for Safety Evaluation of Drugs, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100176, China; 2. Center of Safety Evaluation on New Drug, School of Pharmaceutical Science, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China)

Abstract: The development of optimal breeding strategies for rice (*Oryza sativa*), an important commercial crop in China, has always been the focus of research. The emergence of *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) insect-resistant genes opens up a new area of research on the breeding of transgenic insect-resistant crops with the exogenous genes. Until now, the breeding technology of transgenic *Bt* rice has become increasingly mature, while its potential danger to human health is still controversial. The commercialization of this transgenic rice has become the focus of public attention. In this paper, the recent progress in the food safety evaluation of transgenic *Bt* rice is reviewed, so as to provide references for the risk assessment and popularization of transgenic *Bt* rice in China.

Key words: transgenic *Bt* rice; safety evaluation; food safety

中图分类号: R994.5

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2015) 21-0297-06

doi:10.7506/spkx1002-6630-201521055

水稻 (*Oryza sativa*) 是人类主要粮食作物之一, 为人类提供20%以上的能量和15%以上的蛋白质。2013年, 水稻的种植面积超过1.64亿 hm^2 , 其中18%以上的水稻在中国种植^[1]。而螟虫和稻纵卷叶螟等鳞翅目害虫严重影响着水稻的产量, 每年由水稻螟虫造成的经济损失高达115亿元^[2]。

苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, *Bt*) 基因能表达对多种害虫具有特异杀伤作用的杀虫蛋白。利用基因工程将*Bt*抗虫基因导入水稻, 培育出具有抗虫作用的转基因水稻, 已成为防治害虫最经济、

有效的手段。目前国内外已经培育出多种具有抗虫作用的转*Bt*基因水稻。2009年, 中国华中农业大学研发的转*Bt*基因水稻“华恢1号”和“汕优63”获得了农业部的首个转基因水稻安全证书, 为转*Bt*基因水稻的商业化提供了可能。然而, 由于转入的基因来源于非传统基因库, 人们对其认识并不充分, 转*Bt*基因水稻可能会带来非预期的食品安全问题, 因此转*Bt*基因水稻的安全性研究已成为国内外专家关注的焦点。本文就国内外转*Bt*基因水稻的食用安全性评价情况进行综述。

收稿日期: 2014-12-31

基金项目: 农业部转基因生物新品种培育科技重大专项 (2012ZX08011001)

作者简介: 谭小燕 (1990—), 女, 硕士研究生, 研究方向为药物安全性评价。E-mail: feng678zheng@163.com

*通信作者: 黄芝瑛 (1965—), 男, 研究员, 主要从事药物安全性评价毒理学研究。E-mail: hzhiying@mail.sysu.edu.cn

王雪 (1961—), 男, 研究员, 博士, 主要从事药物安全性评价毒理学研究。E-mail: xue_wang@nifdc.org.cn

1 转Bt基因水稻简介

1.1 Bt杀虫晶体蛋白

苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 是一种在自然界中广泛分布的革兰氏阳性菌, 在其芽孢形成时期, 菌体内会产生一个或多个不同形状的伴孢晶体。伴孢晶体的主要成分是具有杀虫活性的蛋白质, 即杀虫晶体蛋白 (insecticidal crystal protein, ICPs), 对鳞翅目、双翅目和鞘翅目等多种昆虫, 以及线虫、蜡类和原生动物等具有特异的杀虫活性。ICPs常以原毒素的形式存在。典型的ICP分子大小为130 kD左右, 由两个部分构成, N端的活性片段和C端的结构片段。当ICPs被目标昆虫取食后, 在昆虫中肠的碱性环境下, ICPs被蛋白酶消化降解成有毒性的多肽, 活化的毒性多肽与昆虫中肠道上皮纹缘膜细胞上的特异受体相结合, 导致细胞膜穿孔, 细胞的渗透压平衡受到破坏, 引起细胞膨胀裂解, 使昆虫停止摄食, 最后死亡^[3]。Bt蛋白的杀虫作用具有高效广谱、特异性强、对非靶标生物安全的优点, 同时又不污染环境, 因此Bt基因已经成为植物转基因工程及作物育种领域应用最广泛、最具有应用前景的杀虫基因^[4]。

1981年, Schenpf等^[5]从Bt菌株HD-1中成功地克隆了第一个编码Bt杀虫晶体蛋白的基因, 揭开了利用基因工程培育抗虫植物的序幕。迄今为止, 已分离测定了100多个杀虫晶体蛋白基因序列。目前公认的Bt杀虫基因分类方法是Hofte和Whiteley提出的根据晶体蛋白的氨基酸序列、抗原性和杀虫谱的不同, 将编码它们的基因分为14个基因型。其中只有杀虫活性的13个基因型被命名为狭义的晶体蛋白基因, 即cry基因。cry基因划分为四群: cryI为鳞翅目特异性、cryII为鳞翅目和双翅目特异性、cryIII为鞘翅目特异性、cryIV为双翅目特异性^[6]。每个主要类型中根据序列的同源性, 又分为若干小组, 如cryI分为IAa、IAb、IAc、IB等10余种。目前应用于转基因水稻的主要是cryIA基因, 如cryIAb、cryIAc和cryIAb/Ac融合基因^[7]。

1.2 转Bt基因水稻

水稻作为最重要的经济作物之一, 其转Bt基因作物的培育受到越来越多研究者的关注。自1989年杨虹等^[2]首次报道了将Bt基因成功导入水稻以来, 人们已经培育出多个具有抗虫作用的转Bt基因水稻品种。目前报道的转Bt基因水稻主要有转单基因Bt水稻和转复合基因Bt水稻。

研究者通过原生质体融合法、农杆菌介导法、花粉管通道法和基因枪法等方法将cryIAb^[9-11]、cryIAc^[12-15]、cry2A^[16-17]、cry30Fa^[18]基因成功转入水稻中并表达。其中, 浙江大学与加拿大渥太华大学合作^[12-15], 采用农杆菌介导法将cryIAb和cryIAc基因分别导入多种水稻, 从粳稻“秀水12”中选育出高抗虫的“克螟稻”KMD1和

KMD2, 并确定了cryIAb基因能在有性世代交替中稳定表达。

为了进一步提高转基因作物的抗虫性, 扩大其抗虫谱, 研究者将多个抗虫基因同时导入农作物作为抗虫分子育种的新策略, 如转cryIAb/cryIAc双价转基因抗虫水稻^[19-20]、cryIAc和豇豆胰蛋白酶抑制剂基因CpTI^[21]、cryIAb/cry9Aa^[22]、cryIAb/Vip3DA^[23]。其中, 华中农业大学^[20]通过双质粒基因枪法将cryIAb/cryIAc融合基因成功转入籼稻“明恢63”, 获得高抗虫转基因水稻 (华恢1号) (TT51-1) 及其杂交种“Bt汕优63”, 这两个品系已在2009年获颁中国农业部转基因作物安全证书^[24]。与直接导入多个基因的方法不同, Yang Zhou等^[25]则是通过转cryIAb、转cryIAc或转cry2A的不同单价转基因水稻的常规杂交, 获得了抗虫性更强的双价转基因水稻。

2 转Bt基因水稻的食用安全性评价研究进展

由于转基因水稻未进行长时间的安全实验, 其安全性资料比较缺乏, 人们对其安全性还存在较大争议。目前认为转基因食品可能存在的安全隐患有: 潜在的致敏性; 可能导致已存在的受体基因失活或表达改变, 进而表达具有毒性的非预期成分; 减少食品的营养价值或降解食品中的重要成分; 食物中基因水平传递和重组DNA会对人体健康带来危害, 使肠道微生物产生抗药性^[26-27]。因此, 在转基因水稻商业化种植前, 对其进行全面的安全性评价是非常必要的。

目前国际上普遍采用的转基因食品安全性评价准则有: 实质等同性原则、个案评价原则、逐步评价原则、遗传特性分析原则和危险性评价原则等。根据我国农业部制定的《转基因植物安全评价指南》(试行), 转基因作物的食用安全性评价的研究内容主要包括新表达物质毒理学评价、致敏性评价、关键成分分析、营养学评价和全食品毒理学评价^[28]。其中致敏性评价的方法包括氨基酸序列相似性比较、特异性IgE抗体结合实验、定向筛选血清实验和模拟胃肠液消化实验; 毒理学评价主要包括急性毒理学评价、亚慢性毒理学评价、遗传毒性评价、致畸性评价、免疫毒理学评价和代谢评价等。美国国家环境保护局 (Environmental Protection Agency, EPA) 要求转Bt基因抗虫植物必须提供以下数据来证明其无害性: Bt蛋白与日常膳食蛋白质无差异, 结构上与现有的致敏原或毒蛋白无同源性, 高剂量进食的情况下无毒性^[29]。

2.1 营养学评价和关键成分分析

实质等同性原则要求转基因食品与传统食品具有无差异的营养物质。对营养学的评价内容主要包括蛋白质、淀粉、纤维素、脂肪、脂肪酸、氨基酸、矿物质、

维生素、灰分等与人类营养健康密切相关的物质,以及影响营养吸收的抗营养因子^[30]。

根据目前的文献报道,转基因水稻与非转基因对照水稻在主要成分、微量孢子营养成分以及抗营养因子等方面都没有生物学意义上的差异^[31-32],仅有个别文献报道有部分指标出现差异。Schröder等^[33]对比了KMD1和其亲本Xiushui 11的主要营养成分,发现两者在水分、淀粉、糖类、灰分、矿物质、主要维生素以及抗营养成分植酸等无显著差异;除了胱氨酸和脯氨酸,转*Bt*基因水稻的其他氨基酸成分均高于对照水稻,其中精氨酸和组氨酸显著高于对照组,组氨酸水平显著超出其他报道的范围;同时亚油酸高于对照组,油酸和硬脂酸低于对照组。由于该实验所用样本与Wang Zhonghua等^[31]的研究样本来源一致,仅研究时间和地点不一样,而Wang Zhonghua等并未发现KMD1与其亲本之间有以上差异,因此认为两个研究检测结果的不一致来源于生物体的个体差异,转基因水稻与其亲本间的差异并非来源于基因的转入。同时,根据目前的30 d或90 d喂养实验资料,分别食用转*Bt*基因水稻和非转基因水稻的动物的营养状态和生理指标均无差异,说明转*Bt*基因水稻与非转基因水稻具在营养学方面具有实质等同性。

2.2 致敏性评价

1996年,国际生物制品委员会和国际生命科学研究提出了转基因食品致敏性评价的三步法。该方法关注的是基因来源、新引入蛋白与已知蛋白的序列同源性以及新引进蛋白的理化特点。

Bt蛋白的致敏性可通过蛋白序列同源性查询和体外消化系统模拟实验进行。世界卫生组织^[34]通过查询蛋白质数据库,未发现Bt蛋白与已知过敏原存在同源性。欧洲食品安全局(European Food Safety Authority, EFSA)也没有发现Cry1Ab蛋白与目前存在的任何过敏原有相似氨基酸序列,并能在体外模拟胃环境下成功被降解^[36]。美国EPA等^[37]也证明了Cry1Ac、Cry2Aa和Cry3A等蛋白均在体外模拟胃肠道迅速降解。Bashir等^[38]将转*cry1Ac*和*cry2A*基因籼稻蒸煮后未检测到Bt蛋白,说明Bt蛋白具有热不稳定性。而张珍誉^[39]通过三维结构的比对,发现Bt蛋白与大肠杆菌素A和白喉毒素具有共同的三维构象特征,都含有多个由疏水的和亲水亲脂的 α -螺旋组成的 α -螺旋束,其长度足以跨过双层脂膜,具有相似的穿孔机制,据此预测转Bt蛋白具有致敏性可能。Bernstein等^[40]对农场工人进行了*Bt*作物的皮肤点刺测试,发现仅有水溶性部分和孢子出现了阳性反应。

由于*Bt*制剂作为生物杀虫剂的使用已有70余年的历史,而目前尚未有任何关于*Bt*制品的过敏报道,因此环境毒理学家Felsot认为,目前已有的过敏性研究可以部分消除人们对转基因食品可能存在健康隐患的担

忧,消费者不可能因为食用了含有Bt蛋白的食物而发生过敏反应。

2.3 毒理学评价

目前关于转*Bt*基因水稻的食用毒理学评价方法主要分为急性毒性实验、亚慢性毒性实验、生殖遗传毒性实验和其他毒性实验,转*Bt*基因水稻的毒理学评价情况汇总见表1。

2.3.1 急性毒性实验

Betz等^[56]对大鼠进行的*Bt*微生物制品急性毒性实验表明,即使在剂量大于5 000 mg/kg情况下,Bt蛋白对哺乳动物也没有影响。McClintock等^[55]通过*Bt*微生物制品的大鼠2 a长期喂养实验,得出*Bt*制品的无观察反应剂量(no obvious effect level, NOEL)大于8 400 mg/kg。王忠华等^[40]对转*cry1Ab*基因抗虫水稻KMD2进行的大鼠急性毒性实验表明,转*Bt*基因水稻对大鼠的半数致死量(LD₅₀)大于20 g/kg,属无毒物质。刘雨芳等^[41]对4个转*cry1Ab/sck*基因水稻进行小鼠急性毒性实验,结果表明,转*Bt*基因水稻剂量为2.15、4.64 g/kg和10 g/kg时对小鼠的肝脏、胃、肠系数以及血液学检查指标中的血小板压积(platelet hematocrit, PCT)、血小板平均体积(mean platelet volume, MPV)、红细胞(red blood cell, RBC)和红细胞压积(hematocrit, HCT)等指标有一定影响;但由于高剂量组21.5 g/kg除了白细胞(white blood cell, WBC)外,未出现任何其他异常,考虑到动物个体间可能存在应激反应的差异,因此认为转*Bt*基因水稻不会引起小鼠急性毒性,转*Bt*基因水稻对小鼠的LD₅₀大于21.5 g/kg。

2.3.2 亚慢性毒性实验

Wang Zhonghua等^[31,40]按照16、32、64 g/kg的剂量将转*cry1Ab*基因水稻KMD2拌入鼠饲料中,进行了大鼠的90 d喂养实验。该亚慢性毒性实验表明,转*Bt*基因水稻对大鼠的一般生命特征均无影响。同样地,Kroghsbo等^[42]将转*cry1Ab*基因抗虫水稻KMD1按照60%的比例加入鼠饲料中,并设置“60%转*Bt*基因水稻+0.1%纯Bt蛋白”组,进行了Wistar大鼠的28 d和90 d喂养实验,以研究转*Bt*基因水稻对大鼠的免疫毒性。实验结果表明,转*Bt*基因水稻对大鼠的血清总免疫球蛋白、抗SRBC-IgM抗体反应、脾细胞增殖率等免疫指标无影响,仅能见Bt蛋白特异性抗体的产生。

当然,也有部分研究发现转*Bt*基因水稻对动物有影响。刘雨芳等^[44,46]对转*Cry1Ab/sck*基因稻米的大鼠30 d喂养实验显示,4.64 g/kg和10 g/kg组出现胃脏系数、血液学和血生化等个别指标的差异,但这些有差异的指标都在正常值范围内,且主要出现在低剂量和中剂量组,不排除个体间存在应激反应差异,因此认为食用转基因稻米对大鼠是安全的。Schröder等^[33]将转*cry1Ab*基因稻米KMD1以60%的比例掺入饲料中,进行了Wistar大鼠90 d

表 1 转Bt基因水稻的毒理学评价情况
Fig.1 Food safety evaluation of transgenic Bt rice by toxicological methods

Bt基因	动物种属	实验内容或方法	实验结果或结论	参考文献
急性毒性和亚慢性一般毒性实验				
cry1Ab	SD大鼠	急性毒性实验 (20 g/kg, 以体质量计, 下同)	Bt水稻的LD ₅₀ >20 g/kg, 属无毒类	王忠华等 ^[40]
cry1Ac	河南小鼠	急性毒性实验 (2.15、4.64、10、21.5 g/kg)	2.15、4.64 g/kg和10 g/kg各组出现肝脏、胃和肠道等个别脏器系数的差异, 同时出现PCT、MPV、LYM、RBC、HCT等个别指标的差异, 以上指标均无剂量依赖性; Bt水稻的LD ₅₀ >21.5 g/kg	刘雨芳等 ^[41]
cry1Ab	SD大鼠	90 d喂养实验 (16、32、64 g/kg)	Bt水稻的安全剂量>64 g/kg	王忠华等 ^[40]
cry1Ab	SD大鼠	14 周喂养实验 (16、32、64 g/kg)	雌性大鼠的血清TG、CREA、ALB、GOT出现剂量依赖性降低	Wang Zhonghua等 ^[31]
cry1Ab	Wistar大鼠	90 d喂养实验 (60% Bt水稻; Bt蛋白每日剂量: 0.54 mg/kg)	雄性大鼠的血清URE和GLU升高, 而总蛋白、MCH和WBC降低; 雌性大鼠的血清Na ⁺ 升高; 以上指标均在正常值范围内; 雌性大鼠的肾上腺质量降低, 睾丸质量升高, 无相应病理改变。十二指肠的双歧杆菌减少, 回肠的大肠杆菌增多	Schröder等 ^[32]
cry1Ab	Wistar大鼠	28 d喂养实验 (60% Bt水稻+/-0.1% Bt纯蛋白; Bt蛋白每日剂量: 0.6 mg/kg+/-70 mg/kg)	60% Bt水稻+0.1% Bt纯蛋白引起Bt蛋白特异性抗体反应 (IgG1)	Kroghsbo等 ^[42]
cry1Ab	Wistar大鼠	90 d喂养实验 (60% Bt水稻)	60% Bt水稻引起Bt蛋白特异性抗体反应 (IgG2a)	Kroghsbo等 ^[42]
cry1Ab	SD大鼠	90 d喂养实验 (17.5%、35%、70%水稻)	17.5%组雌性大鼠的WBC下降, RDW和HCT升高; 35%组大鼠的RBC和HCT升高。高剂量组未出现异常, 无剂量依赖性	Song Huan等 ^[43]
cry1Ac	SD大鼠	30 d喂养实验 (4.64、10、21.5 g/kg)	Bt水稻的LD ₅₀ >21.5 g/kg, Bt水稻对大鼠血常规、血生化、脏器系数等指标均无影响	刘雨芳等 ^[44]
cry1Ac	昆明小鼠	90 d喂养实验 (73% Bt水稻)	小肠腺细胞发生病理性增生; 小肠线粒体mtDNA发生突变: 337G>C (His→Asp), 1771G>T (Asn→Lys)	张珍誉等 ^[45]
cry1Ac	SD大鼠	30 d喂养实验 (4.64、10、21.5 g/kg)	10 g/kg和21.5 g/kg组的胃系数降低4.64、10 g/kg和21.5 g/kg各组出现MON、MPV、NEU、LTY等个别指标的差异; 同时出现A/G、AST等个别指标的差异。以上有差异的指标主要表现在低剂量或中剂量	刘雨芳等 ^[46]
cry1C	SD大鼠	90 d喂养实验 (60% Bt水稻)	雌性大鼠的TP、CREA、CHOL升高, 但在正常范围内; 十二指肠的双歧杆菌数量降低	Tang Xueming等 ^[47]
cry2A	SD大鼠	90 d喂养实验 (70% Bt水稻), 胃肠道研究	雌性大鼠的MCH、MCHC降低; 胃肠道指标无异常 (盲肠内容的醋酸盐增加, pH值降低GM和NM组均有)	Yuan Yanfang等 ^[48]
生殖遗传毒性实验				
cry1Ab	ICR小鼠	微核实验、精子畸变实验 (2.5、5.8、10.0 g/kg); Ames实验 (5 000、1 000、200、40、8 μg)	Bt水稻无致突变作用	王忠华等 ^[49]
cry1Ac	河南小鼠	微核实验、精子畸变实验 (2.15、4.64、10.00、21.50 g/kg)	Bt水稻无致畸和致突变作用	刘雨芳等 ^[41]
cry1Ac	昆明小鼠	90 d喂养实验 (73% Bt水稻), 一代生殖实验	Bt水稻无生殖毒性	张珍誉等 ^[38]
cry1Ab/cry1Ac	Wistar大鼠	90 d喂养实验 (60% Bt水稻), 一代生殖实验	Bt水稻对雄性子代大鼠生殖系统无影响	冯永全等 ^[50]
cry1Ab/cry1Ac	Wistar大鼠	90 d喂养实验 (60% Bt水稻), 一代生殖实验	Bt水稻对雌性大鼠无一般毒性和生殖毒性	Wang Erhui等 ^[51]
cry1Ab/cry1Ac	Wistar大鼠	10 周喂养实验 (60% Bt水稻), 一代生殖实验	Bt水稻对亲代大鼠无一般毒性和生殖毒性, 对子代大鼠的生理发育和神经发育无影响	王二辉等 ^[52]
cry1Ab/cry1Ac	Wistar大鼠	10 周喂养实验 (60% Bt水稻), 一代生殖实验	亲代雌鼠脾脏中T细胞和Th细胞比例以及颈淋巴结中Th细胞比例升高, 但无相关免疫指标出现异常, Bt水稻对亲代雌鼠的免疫系统无影响	冯永全等 ^[53]
cry1Ab/cry1Ac	Wistar大鼠	两代生殖实验 (60% Bt水稻)	F2代大鼠的血清AST下降、TP和WBC上升, 但均在正常值范围内	Wang Erhui等 ^[54]
其他毒性实验				
cry1Ac	昆明小鼠	致敏性研究	Bt蛋白与大肠杆菌素A和白喉毒素具有共同的三维构象特征和相似的穿孔机制	张珍誉等 ^[38]
cry2A	SD大鼠	90 d喂养实验 (70% Bt水稻), 动物粪便的微生物群研究	Bt水稻对大鼠粪便中主要细菌种群无影响	Yuan Yanfang等 ^[48]
cry1C	SD大鼠	90 d喂养实验 (70% Bt水稻), 代谢组学和微生物群研究	Bt水稻对大鼠的代谢和微生物群无影响	Cao Sishuo等 ^[52]

注: A/G. 白/球比 (albumin/globulin); ALB. 血清白蛋白 (albumin); AST. 谷草转氨酶 (aspartate transaminase); GOT. 天冬氨酸氨基转移酶 (glutamic oxaloacetic transaminase); LYM. 淋巴细胞 (lymphocyte); MCH. 平均红细胞血红蛋白含量 (mean corpuscular hemoglobin); MCHC. 平均红细胞血红蛋白浓度 (mean corpuscular hemoglobin concentration); MON. 单核细胞 (monocyte); NEU. 中性粒细胞 (neutrophile granulocyte); RDW. 红细胞体积分布宽度 (red blood cell volume distribution width); TG. 甘油三酯 (triglyceride); UREA. 尿素 (urea)。

喂养实验。该研究发现, KMD1组雄性大鼠的白细胞和KMD1组大鼠的肾上腺质量明显低于阴性对照组。由于没有出现相应的病理学改变, 认为这些差异与转基因水稻无关, 因此得出转Bt基因水稻对大鼠无毒性的结论。Tang Xueming等^[47]同样对转cry1C基因水稻T1C1进行了SD大鼠的90 d喂养实验, 发现雌性大鼠血清中总蛋白 (total protein, TP)、肌酐 (creatinine, CREA) 和胆固醇 (cholesterol, CHOL) 出现明显的升高, 但由于均在正常值范围内, 且没有出现相应的肝肾损伤等病理变化, 因此认为该转Bt基因水稻对大鼠无毒性。Song Huan等^[43]按照17.5%、35%和70%的比例将转Cry1Ab基因抗虫水稻mfb-MH86掺入饲料中, 进行的SD大鼠90 d喂养实验发现, 转Bt基因水稻组的部分血液学血生化指标, 如平均红细胞体积 (mean corpuscular volume, MCV)、红细胞压积 (HCT)、白细胞 (WBC) 和葡萄糖

(glucose, GLU), 以及脾脏脏器系数与亲本组具有差异, 但这些差异无剂量依赖性, 因此无生物学意义。同时, 阴性对照组和转基因水稻组均出现少量肺间质出血, 该差异明显与转基因水稻无关, 因此得出该转Bt基因水稻与传统水稻无差异的结论。

值得注意的是, 张珍誉等^[45]发现, 昆明小鼠在喂食转cry1Ac基因稻米90 d后小肠腺细胞出现病理性增生, 认为转Bt基因水稻对小鼠的消化系统产生了不利影响。同时, Schröder^[33]和Tang Xueming^[47]等研究均发现喂食含60%转Bt基因稻米90 d后, 大鼠十二指肠的双歧杆菌数量均出现明显下降。由于Bt蛋白对昆虫杀伤作用的靶点位于中肠, 该研究结果提醒研究者在进行转Bt基因水稻的食用安全性评价时, 应重点关注对动物消化道的影响。

总的来说, 目前关于转Bt基因水稻的亚慢性毒性评价主要为啮齿类动物的30 d或90 d喂养实验, 已有的研究

未发现食用转*Bt*基因水稻对啮齿类动物的一般生理特征有明显影响。由于转基因食品的安全性对人类健康至关重要,应增加非啮齿类动物的亚慢性毒性研究,全面考察转*Bt*基因水稻对哺乳类动物的食用安全性。

2.3.3 生殖遗传毒性实验

王忠华等^[49]利用微核、精子畸变和Ames实验检测了转*Bt*基因稻米对小鼠骨髓嗜多染红细胞微核率和小鼠精子畸形发生率及组氨酸营养缺陷型鼠伤寒沙门氏菌株回变菌落数的影响。结果表明,转*Bt*基因水稻对小鼠体细胞和性细胞均无诱变活性,多个组氨酸营养缺陷型鼠伤寒沙门氏菌株的回变菌落数均处于正常水平,说明*Bt*水稻无致突变的作用。刘雨芳等^[41]对4种转*cry1Ab/sck*基因水稻进行了精子畸形实验和骨髓细胞微核实验,未发现转*Bt*基因水稻有致畸致突变作用。冯永全等^[50,53]对转*cry1Ab/Ac*基因水稻TT51-1的免疫毒性和生殖毒性研究表明,食用转*Bt*基因稻米对亲代雌鼠的免疫系统和雄性子代的生殖系统无影响;同样地,王二辉等^[51-52,54]对TT51-1的生殖毒性研究,研究表明,转*Bt*基因水稻对亲代雄鼠生殖系统无影响,对大鼠F1代的早期生理和神经发育以及F0、F1和F2代的一般生理指标均无影响。张珍誉^[38]的研究也未发现喂饲转*cry1Ac*基因水稻90 d对孕鼠和胎仔的生理指标有影响。以上研究均认为转*Bt*基因水稻无致畸性和生殖毒性。

2.3.4 其他毒性实验

Schröder^[33]和Tang Xueming^[47]等在进行转*Bt*基因水稻的大鼠90 d喂饲实验的一般毒性考察的同时,考察了转*Bt*基因水稻对大鼠肠道的影响,均发现大鼠十二指肠的双歧杆菌数量出现明显下降。Schröder等的研究结果表明,大鼠的粪便微生物群无明显变化,而十二指肠的双歧杆菌数量降低了13%,回肠的大肠杆菌数量升高了23%;Tang Xueming等标注文献的研究结果表明大鼠十二指肠的双歧杆菌数量降低了10%。这提示着转基因水稻对大鼠的肠道微生物活动可能有影响。然而,Yuan Yanfang等^[48]采用实时荧光定量聚合酶链式反应(real-time polymerase chain reaction, real-time PCR)对转*Cry2A*基因水稻T2A-1粪便各种细菌进行分析,未发现喂饲转*Bt*基因水稻90 d对大鼠粪便中微生物主要种群有影响;Cao Sishuo等^[32]也采用核磁共振氢谱(¹H nuclear magnetic resonance, ¹H NMR)和Real-time PCR对大鼠的尿液和粪便进行代谢分子的分析,同时进行细菌组成分析,从代谢组学的角度研究转*Bt*基因水稻对大鼠肠道微生物的影响,研究发现,转基因组和非转基因组的代谢组学分析结果以及细菌组成均无统计学差异,认为转基因水稻与非转基因一样安全。

综合以上毒性评价结果,目前国内外对转*Bt*水稻的食用安全性研究主要集中在啮齿类小动物,对于与人基

因同源性较高的灵长类动物的研究几乎空白;评价方法比较单一,大多停留在一般毒性评价层面上,生殖毒性、致畸性和免疫毒性研究较少。为更全面地反映转*Bt*基因水稻的食用安全性,应加强这两方面的研究,积极关注动物胃肠道变化,借助代谢组学和蛋白组学等工具开展代谢评价工作,并进行转*Bt*基因水稻的长期毒性实验。

3 结 语

转*Bt*基因水稻的研究已有近30 a的历史,其在提高水稻产量方面展现了巨大的前景,为解决人类粮食危机问题带来了希望。但人们对其食用安全性尚存担忧,而关于转*Bt*基因水稻的食用安全性评价研究资料相对缺乏。*Bt*蛋白作为一种在消化道发挥杀虫效应的外源蛋白,它对人体胃肠道的影响及其致敏性的资料还很匮乏,应考虑尽快建立*Bt*蛋白安全性数据库,对现有的*Bt*蛋白的致敏性进行逐一排查,为下一步的转*Bt*基因水稻的风险评估提供依据,以便有针对性地转*Bt*基因水稻进行更深入全面的研究。

另一方面,关于转*Bt*基因水稻的食用安全性报道多为大鼠短期喂饲实验,评价方法比较单一。转基因水稻掺到饲料中的最高比例为70%左右,动物喂养实验中*Bt*蛋白的实际剂量并不高。而水稻作为一种主粮,其预期的人体用量很大,因此,应开展转*Bt*基因水稻的灵长类动物长期毒性研究,并进行生殖遗传毒性的研究。同时,还应考虑结合体外细胞实验,进行*Bt*纯蛋白或转*Bt*基因水稻的分子水平毒性实验,进一步全面反映转*Bt*基因水稻的安全性。

总之,为了进一步推进转*Bt*基因水稻的发展,应该从多角度入手,开展转*Bt*基因水稻的长期安全性实验,建立完善的风险评估机制,加快转基因水稻的商业化进程,为人类健康提供保障。

参考文献:

- [1] Food and Agriculture Organization of the United Nations. Download Data[DB/OL]. New York: United Nations. (2014-10-23) [2015-01-01]. http://faostat3.fao.org/download/Q/*E.
- [2] 盛承发,王红托,高留德,等.我国水稻螟虫大发生现状、损失估计及防治对策[J].植物保护,2003,29(1): 37-39.
- [3] 夏立秋,孙运军,莫湘涛,等.苏云金芽孢杆菌杀虫晶体蛋白毒性片段的结构域在毒杀昆虫中的作用[J].生物工程进展,2002,22(1): 73-76.
- [4] BRAVO A, GILL S S, SOBERON M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cryt toxins and their potential for insect control[J]. Toxicon, 2007, 49(4): 423-424.
- [5] SCHENPF H E, WHITELEY H R. Cloning and expression of the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Escherichia coli*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1981, 78(5): 2893-2897.

- [6] HOFTE H, WHITELEY H R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*[J]. Microbiological Reviews, 1989, 53(2): 242-255.
- [7] 陈浩, 林拥军, 张启发. 转基因水稻研究的回顾与展望[J]. 科学通报, 2009, 54(18): 2699-2717.
- [8] 杨虹, 李家新, 郭三堆, 等. 苏云金芽孢杆菌 δ -内毒素基因导入水稻原生质体后获得转基因植株[J]. 中国农业科学, 1989, 22(6): 1-5.
- [9] WUNN J, KLOTT A, BURKHARDT P K, et al. Transgenic Indica rice breeding line IR58 expressing a synthetic *CryIA(b)* gene from *Bacillus thuringiensis* provides effective insect pest control[J]. Nature Biotechnology, 1996, 14(2): 171-176.
- [10] 朱常香, 胡全安, 温孚江, 等. 用两个抗虫基因分别转化水稻及抗虫株系的获得[J]. 农业生物技术学报, 1999, 17(3): 1-11.
- [11] GHAREYAZE B, ALINIA F, MENGUITO C A, et al. Enhanced resistance to two stem borers in an aromatic rice containing a synthetic *CryIA(b)* gene[J]. Molecular Breeding, 1997, 3(5): 401-414.
- [12] 项友斌, 竹青, 明尉, 等. 农杆菌介导的苏云金杆菌抗虫基因 *CryIA(b)* 和 *CryIA(c)* 在水稻中的遗传转化及蛋白表达[J]. 生物工程学报, 1999, 15(4): 494-500.
- [13] 舒庆尧, 叶恭银, 崔海瑞, 等. *Bt* 转基因水稻克螟稻选育[J]. 浙江农业大学学报, 1998, 24(6): 579-580.
- [14] SHU Qingyao, YE Gongyin, CUI Hairui, et al. Transgenic rice plants with a synthetic *CryIAb* gene from *Bacillus thuringiensis* were highly resistant to eight lepidopteran rice pest species[J]. Molecular Breeding, 2000, 6(4): 433-439.
- [15] 吴刚, 崔海瑞, 舒庆尧, 等. *cryIAb* 基因在转基因“克螟稻”后代中的遗传稳定性及表达[J]. 农业生物技术学报, 2000, 8(3): 253-256.
- [16] 唐微. *Bt* 抗虫水稻的培育[D]. 武汉: 华中农业大学, 2006.
- [17] 吴振映, 柳絮, 王文英, 等. 利用农杆菌介导法获得转 *cry2A* 抗虫基因水稻的研究[J]. 山东农业科学, 2011(5): 1-3; 7.
- [18] 黎月嫦. 转 *cry30Fa1* 基因抗虫水稻研究[D]. 成都: 四川农业大学, 2013.
- [19] CHENG Xiongying, SARDANA R, KAPLAN H, et al. *Agrobacterium*: transformed rice plants expressing synthetic *CryIA(b)* and *CryIA(c)* genes are highly toxic to striped stem borer and yellow stem borer[C]. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998, 95: 2767-2772.
- [20] 肖景华, 陈浩, 张启发. 转基因作物将为我国农业发展注入新动力[J]. 生命科学, 2011, 23(2): 151-156.
- [21] 李永春, 张宪银, 薛庆中. 农杆菌介导法获得大量转双价抗虫基因水稻植株[J]. 农业生物技术学报, 2002, 10(1): 60-63.
- [22] 陆苇. 一种基于 *Bt* 融合蛋白的转基因水稻研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2010.
- [23] 聂鹏. 转 *Bt* 融合基因 *cryIAb-vip3DA* 抗虫转基因水稻的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2010.
- [24] 农业部农业转基因生物安全管理办公室. 2009年农业转基因生物安全证书批准清单[EB/OL]. 北京: 中国农业部, 2012. http://www.moa.gov.cn/ztzl/zjyqwgz/spxx/201202/t20120203_2474158.htm.
- [25] YANG Zhou, CHEN Hao, TANG Wei, et al. Development and characterisation of transgenic rice expressing two *Bacillus thuringiensis* genes[J]. Pest Management Science, 2011, 67(4): 414-422.
- [26] 王桂才. 转基因食品的安全性评价及检测技术进展[J]. 食品研究与开发, 2012, 33(5): 220-221.
- [27] 李宇. 转基因食品的食用安全性评价[J]. 毒理学杂志, 2005, 19(2): 163-165.
- [28] 农业部农业转基因生物安全管理办公室. 转基因植物安全评价指南[EB/OL]. 北京: 中国农业部, 2012. http://www.moa.gov.cn/ztzl/zjyqwgz/sbzn/201202/t20120203_2474485.htm.
- [29] US EPA. Biopesticides plant-pesticides registration action document: preliminary risks and benefits sections-*Bacillus thuringiensis*[EB/OL]. Washington, DC: EPA, 2000. http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/pips/bt_brad.htm.
- [30] 赵兴绪. 转基因食品生物技术及其安全评价[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2009: 151.
- [31] WANG Zhonghua, WANG Yin, CUI Hairui, et al. Toxicological evaluation of transgenic rice flour with a synthetic *cryIAb* gene from *Bacillus thuringiensis*[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2002, 82: 738-744.
- [32] CAO Sishuo, HE Xiaoyun, XU Wentao, et al. Safety Assessment of transgenic *Bacillus thuringiensis* rice T1c-19 in Sprague-Dawley rats from metabolomics and bacterial profile perspectives[J]. IUBMB Life, 2012, 64(3): 242-250.
- [33] SCHRÖDER M, POULSEN M, WILCKS A, et al. A 90-day safety study of genetically modified rice expressing *CryIAb* protein (*Bacillus thuringiensis* toxin) in Wistar rats[J]. Food and Chemical Toxicology, 2007, 45: 339-349.
- [34] World Health Organization. Safety aspects of genetically modified foods of plant origin[R/OL]. Geneva: WHO, 2000. <http://www.fao.org/ag/agn/food/pdf/gmreport.pdf>.
- [35] ALINK G, BARLOW S, COCKBURN A, et al. Safety and nutritional assessment of GM plants and derived food and feed: the role of animal feeding trials[J]. Food and Chemical Toxicology, 2008, 46(Suppl 1): 2-70.
- [36] US EPA. EPA fact sheet for *Bacillus thuringiensis* subspecies tenebrionis *Cry3A* delta endotoxin and its controlling sequences in Potato[EB/OL]. Washington, DC: EPA, 1995. <http://www.epa.gov/>.
- [37] BASHIR K, HUSNAIN T, FATIMA T, et al. Field evaluation and risk assessment of transgenic indica basmati rice[J]. Molecular Breeding, 2004, 13: 301-312.
- [38] 张珍誉. 转 *Bt* 基因稻谷对小鼠健康的安全性评价[D]. 长沙: 湖南师范大学, 2010.
- [39] BERNSTEIN I L, BERNSTEIN J A, MILLER T S, et al. Immune responses in farm workers after exposure to *Bacillus thuringiensis* pesticides[J]. Environmental Health Perspectives, 1999, 107(7): 575-582.
- [40] 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[J]. 中国农业科学, 2002, 35(12): 1487-1492.
- [41] 刘雨芳, 刘文海, 贺玲, 等. 转基因工程稻大米对小鼠的急性毒性与致突变研究[J]. 湖南科技大学学报: 自然科学版, 2008, 23(4): 111-117.
- [42] KROGHSSBO S, MADSEN C, POULSEN M, et al. Immunotoxicological studies of genetically modified rice expressing PHA-E lectin or *Bt* toxin in Wistar rats[J]. Toxicology, 2008, 245: 24-34.
- [43] SONG Huan, HE Xiaoyun, ZOU Shiyang, et al. A 90-day subchronic feeding study of genetically modified rice expressing *CryIAb* protein in Sprague-Dawley rats[J]. Transgenic Research, 2014. doi: 10.1007/s11248-014-9844-6.
- [44] 刘雨芳, 刘文海, 李双, 等. 转基因抗虫水稻 *MSA4* 大米对大鼠脏器系数、血常规与血生化的影响[J]. 湘潭师范学院学报: 自然科学版, 2007, 29(4): 112-116.
- [45] 张珍誉, 刘立军, 张琳, 等. 转 *Bt* 基因稻谷对小鼠的亚慢性毒性实验[J]. 毒理学杂志, 2010, 24(2): 126-129.
- [46] 刘雨芳, 刘文海, 贺玲, 等. 转基因抗虫杂交稻大米对SD大鼠行为与生理的影响[J]. 生命科学研究, 2008, 12(3): 257-261.
- [47] TANG Xueming, HAN Fangting, ZHAO Kai, et al. A 90-day dietary toxicity study of genetically modified rice T1C1 expressing *CryIC* protein in Sprague-Dawley rats[J]. PLoS ONE, 2012, 7(12): e52507. doi: 10.1371/journal.pone.0052507.
- [48] YUAN Yanfang, XU Wentao, LUO Yunbo, et al. Effects of genetically modified T2A-1 rice on faecal microflora of rats during 90 day supplementation[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2011, 91: 2066-2072.
- [49] 王忠华, 王茵, 舒庆尧, 等. 转 *Bt* 基因水稻稻米的诱变活性研究[J]. 中国农业科学, 2004, 37(12): 2043-2046.
- [50] 冯永全, 王二辉, 支媛, 等. 转 *Bt* 基因大米暴露对雄性子代生殖系统影响的研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2013, 25(2): 113-117.
- [51] WANG Erhui, YU Zhou, HU Jing, et al. Effects of 90-day feeding of transgenic *Bt* rice TT51 on the reproductive system in male rats[J]. Food and Chemical Toxicology, 2013, 62: 390-396.
- [52] 王二辉, 于洲, 方海琴, 等. 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[J]. 中国食品卫生杂志, 2013, 25(6): 485-488.
- [53] 冯永全, 胡静, 支媛, 等. 转 *Bt* 基因大米暴露对亲代雌性大鼠免疫系统影响的研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2013, 25(4): 298-302.
- [54] WANG Erhui, YU Zhou, HU Jing, et al. A two-generation reproduction study with transgenic *Bt* rice TT51 in Wistar rats[J]. Food and Chemical Toxicology, 2014, 65: 312-320.
- [55] BETZ F S, HAMMOND B G, FUCHS R L. Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis* protected plants to control insect pests[J]. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2000, 32: 156-173.
- [56] MCCLINTOCK J T, SCHAFFER C R, SJOBLAD R D. A comparative review of the mammalian toxicity of *Bacillus thuringiensis*-based pesticides[J]. Pesticide Science, 2006, 45(2): 95-105.