

抗虫转基因欧洲黑杨鲜叶对小鼠的急性毒性

刘海涛^{1,2}, 汪承润¹, 刘玲¹, 郑勇奇², 张川红² (1. 淮南师范学院生物工程学院, 安徽淮南 232038; 2. 中国林业科学研究院林业研究所, 北京 100091)

摘要 [目的]为了研究抗虫转基因欧洲黑杨对小鼠的急性毒性,为其生物安全性评估提供依据。[方法]以转基因欧洲黑杨鲜叶和非转基因欧洲黑杨鲜叶作为受试物,采用限量法测定小鼠的急性经口毒性反应。[结果]灌胃后7 d时间内所有处理组无小鼠死亡,一般状况观察和大体解剖也未见明显异常和毒性反应,小鼠LD₅₀ > 10.0 g/kg 体重,表明其属于“实际无毒”级别。组织病理学切片检查发现转基因灌胃组中有一雌性小鼠肺部出现间质性炎症及一雄性小鼠肝部出现局部胞浆淡染、细胞轮廓不清及空泡样变的现象,具体原因需进一步深入研究。[结论]转基因欧洲黑杨和非转基因欧洲黑杨鲜叶对小鼠均无明显急性毒性作用。

关键词 抗虫转基因欧洲黑杨;急性毒性;小鼠;动物试验

中图分类号 S859.82 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)01-0094-02

Acute Toxicity of Fresh Leaves of Insect Resistant Transgenic *Populus nigra*. to Mice

LIU Hai-tao^{1,2}, WANG Cheng-run¹, LIU Ling¹ et al (1. Bioengineering Institute, Huainan Normal University, Huainan, Anhui 232038; 2. Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091)

Abstract [Objective] Acute toxicity of fresh leaves of *Populus nigra* to mice were studied to evaluate the biological safety. [Method] Taking transgenic *Populus nigra* and non-transgenic *Populus nigra* as test substance, unintended effects of insect-resistant transgenic *Populus nigra* was studied. [Result] There was not any death of mice after treating for 7 days, and no obvious acute effect in general condition and general dissecting. The half lethal dose (LD₅₀) was greater than 10.0 g/kg · bw, result showed that it was classified as no toxicity. Interstitial inflammation of lung in a female mice and local pale cytoplasm, indistinct cytoplasmic borders and vacuolation of liver in a male mice have been found in the transgenic *Populus nigra* group by using histopathology histopathologic biopsy examine. Specific reasons still need further study. [Conclusion] It suggested that there was no obvious acute toxicity effect of transgenic *Populus nigra* and non-transgenic *Populus nigra* to the test mice.

Key words Insect resistant transgenic *Populus nigra*; Acute toxicity; Mice; Animal experiment

自1986年Parsons等^[1]证实杨树(*Populus* spp.)可以进行遗传转化和外源基因在木本植物细胞中表达以来,木本植物遗传转化工作已经取得了巨大的进展^[2,3]。我国是较早从事转基因林木研究的国家之一,目前转抗虫基因欧洲黑杨(*Populus nigra*)和741杨[*P. alba* × (*P. davidiana* + *P. simonii*) × *P. tomentosa*]已经进入商业化阶段,其中抗食叶害虫转基因欧洲黑杨是世界上释放面积最大的转基因林木,栽培面积已超过8.99万hm²^[4]。在转基因林木对人类做出巨大贡献的同时,其向环境释放后的生态安全性问题也越来越受到人们的关注^[4-6]。其中,转基因植物或其产品的毒理学方面检测是其安全性评估非常重要的一个方面,目前的研究基本集中在转基因农作物的毒理学评价^[7-9]。而杨树一个非常重要的特征是其可作为农业动物饲料而被广泛应用^[10-11],动物如果取食含有转基因成分的杨树叶片后,是否产生毒性效应的相关研究鲜有报道。因此,参照食品安全性毒理学评价方法^[12-13],对转基因杨树欧洲黑杨的急性毒理试验进行初步研究,以期为其安全性评估提供科学依据。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 受试样品。抗虫转基因欧洲黑杨鲜叶及非转基因欧

洲黑杨鲜叶,均采自中国林科院北京玉泉山下转基因欧洲黑杨实验苗圃地。

1.1.2 试验动物。清洁级ICR小鼠,雌雄兼用,由首都医科大学基础医学院实验动物学系提供,许可证SCXK(京)2005-0006。每只小鼠的初始体重不超过或低于所有小鼠平均体重的20%。饲养环境为IVC屏蔽系统,温度(20 ± 3)℃,相对湿度为30%~70%,人工照明12h,注意通风。在实验室内适应性饲养5d后进行试验处理。

1.1.3 试验仪器。电子秤、小鼠笼、1 mL灌胃器、莱卡LeicaDME型光学显微镜、Motic 5000照相系统。

1.2 方法

1.2.1 样品配置及灌胃。将样品鲜叶称量加液氮彻底研磨粉碎后加蒸馏水配制为0.68 g/mL(最大使用浓度)的液糊状物质。所有供试小鼠随机分成3组:转基因叶片灌胃组、非转基因叶片灌胃组和空白对照组(蒸馏水),每组12只,雌雄各半。灌胃前禁食16h,不禁水,在预试验的基础上,根据食品安全国家标准^[12-13],以限量法(limit test)设计研究的灌胃急性毒性试验,灌胃剂量为10.0 g/kg体重进行单次灌胃。

1.2.2 观察时间及指标。灌胃后,观察小鼠出现的反应,连续观察7d。观察的间隔和频率应适当,以便能观察到毒性反应出现的时间及其恢复时间、动物死亡时间等。观察的指标包括一般体征指标(如动物外观、行为、对刺激的反应、分泌物、排泄物等)、动物体重变化(给药前、试验结束处死动物前各称重一次,观察期间可多次称重)、动物死亡情况(死亡时间、濒死前反应)等。记录所有小鼠的死亡情况、出现的症状以及症状起始的时间、严重程度、持续时间等。试验期间试验小鼠喂饲基础饲料,自由饮水。

基金项目 安徽省自然科学基金项目(1608085QC50);安徽省2016年高校优秀中青年骨干人才国内外访学研修重点项目(gxfxZD2016202);淮南师范学院2015年度科学研究重点项目(2015xj06zd)。

作者简介 刘海涛(1983—),男,安徽淮南人,讲师,博士,从事生物安全评估及植物生理生态学研究。

鸣谢 首都医科大学基础医学院试验动物学系的杜小燕副教授在试验过程中给予了大力支持!

收稿日期 2017-10-11

1.2.3 组织病理学检查。试验结束后将所有供试小鼠处死并进行大体解剖检查,肉眼观察所有脏器,记录每只小鼠大体病理学变化。取心、肺、脑、脾、肝、肾放入波恩氏液(Bouin)中固定,石蜡切片,H. E 染色,在光学显微镜下进行组织学观察。

1.3 统计学处理 试验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,小鼠体重组间比较用 t 检验,采用 SPSS16.0 统计分析软件进行数据处理与分析。

2 结果与分析

2.1 小鼠一般体征指标 灌胃后 7 d 内,所有试验处理组小鼠未出现任何临床症状。小鼠活动正常,摄食、精神状态良好,并且毛皮光滑,粪便、尿液正常,鼻、眼和口腔无异常分泌物,未见明显中毒症状及死亡发生,抗虫转基因组、非转基因组和对照组相比无任何差异。

2.2 小鼠体重情况 灌胃后 7 d 内,对试验前后转基因供试组、非转基因供试组与对照组之间的小鼠体重进行称重,并进行 t 检验。结果表明(表 1),各试验处理组小鼠体重在灌胃处理后均呈增长趋势,且至试验结束时,小鼠体重无明显差异($P > 0.05$),说明无论是抗虫转基因欧洲黑杨鲜叶,或是非转基因欧洲黑杨鲜叶对雌、雄小鼠体重影响不显著。该研究中,受试小鼠一次灌胃量高达 10.0 g/kg 体重,表明抗虫转基因欧洲黑杨及非转基因欧洲黑杨鲜叶片研磨物对小鼠的 $LD_{50} > 10.0$ g/kg 体重。按急性毒性(LD_{50})剂量分级标准判定,该受试物属于实际无毒级别。

表 1 经口灌胃急性毒理试验对小鼠体重的影响

Table 1 Effect of single oral injection acute toxicity on body weight of mice (mean \pm SD)

组别 Group	一次灌胃剂量 Single oral injection 10.0 g/kg · bw		
	动物数 Number of animals	初始体重 Initial body weight//g	7 d 体重 7 d body weight//g
对照组 Control group	6 ♂	20.90 \pm 0.71	24.99 \pm 0.78
	6 ♀	20.12 \pm 0.39	25.85 \pm 0.97
转基因组 Transgenic group	6 ♂	20.36 \pm 0.63	24.87 \pm 0.87
	6 ♀	20.85 \pm 0.52	25.33 \pm 0.92
非转基因组 Non-transgenic group	6 ♂	20.61 \pm 0.59	24.67 \pm 0.69
	6 ♀	19.88 \pm 0.47	23.93 \pm 0.93

2.3 小鼠脏器组织病理学检查 在试验结束时,将所有供试小鼠处死并进行大体解剖,所有处理组小鼠脏器未见肉眼可见的明显异常。组织病理学检查小鼠心、肺、脑、脾、肝、肾等脏器,发现转基因组中有一雌性小鼠的肺部出现间质性炎症(图 1、2);另一雄性小鼠的肝部出现局部胞浆淡染、细胞轮廓不清空泡样变的现象(图 3、4);其他小鼠的各脏器结构清楚,未见病理性改变。

3 结论

根据食品安全国家标准^[12-13],采用限量法(limit test)进行了抗虫转基因欧洲黑杨鲜叶对小鼠的急性毒性试验,灌胃后 7 d 时间内各处理组无小鼠死亡,一般状况观察均未出现急性中毒症状和表现,大体解剖检查亦未发现肉眼明显可见

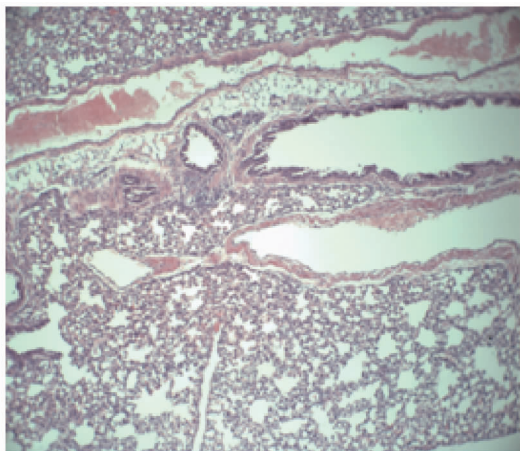


图 1 雌肺间质性炎症(10 × 10)

Fig. 1 Female interstitial inflammation of lungmice(10 × 10)

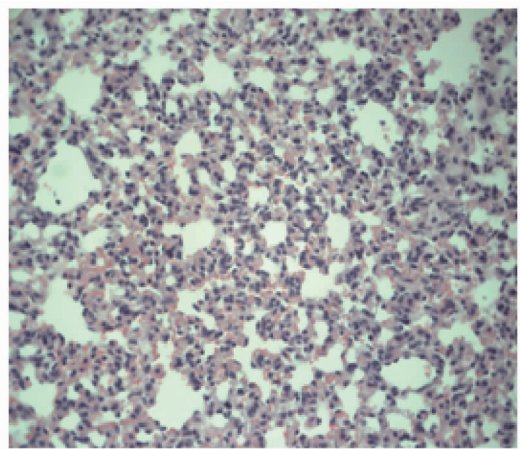


图 2 雌肺间质性炎症(10 × 40)

Fig. 2 Female interstitial inflammation of lungmice(10 × 40)

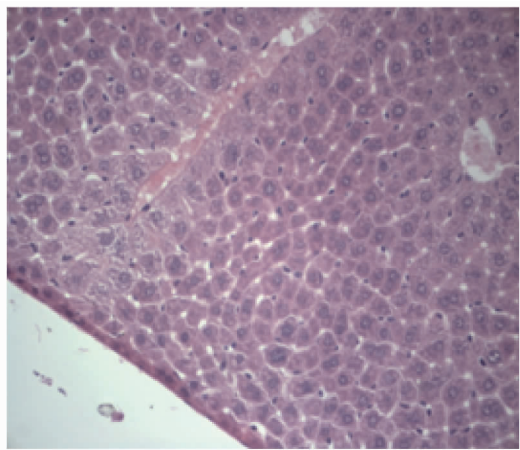


图 3 雄肝边缘局部胞浆淡染、细胞轮廓不清(10 × 40)

Fig. 3 Male local pale cytoplasm and indistinct cytoplasmic borders of liver(10 × 40)

的所检器官的肿胀、萎缩、出血、颜色异常、粘连、硬化等异常改变。这与杨利艳^[14]以食草动物兔子为受试动物,将转双价抗虫基因(*chitinase - BmkIT*)杨鲜叶做为饲料的安全性评估的结果是相似的。

(下转第 136 页)

3 结论

(1) 在水稻生育进程上,缓释肥施肥与常规施肥相仿,不施氮肥水稻生长发育明显滞后。

(2) 总体上看,土壤全氮和速效钾在不同施肥处理之后表现出较为一致的下降趋势,土壤有机质则在不同施肥处理之后表现出一定的上升趋势,其他土壤理化性质在不同施肥处理间变化趋势不明显。

(3) 较常规施肥处理,缓释肥施肥对水稻有明显的增产效果,增产幅度在 1.8% ~ 11.2%。从穗粒结构来看,缓释肥施肥处理增产与水稻有效穗数、每穗实粒数和千粒重均高于常规施肥有关。

(4) 缓释肥施肥(12N)较常规施肥处理减少氮肥施用量

36.8% (平均)的情况下,产量增加 162 ~ 990 kg/hm² (平均增产 6.6%),具有明显的减肥增产效益。缓释肥施肥(12N)较常规施肥处理增加经济效益 486 ~ 3 195 元/hm²,平均节本增效 1 857.0 元/hm²,具有明显的经济效益。

参考文献

- [1] 罗弼樱. 浅谈林地科学合理施肥[J]. 中国科技博览, 2012(33):33.
- [2] 马立珩,张莹,隋标,等. 江苏省水稻过量施肥的影响因素分析[J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 2011,32(2):48-52.
- [3] 游奕来,周柏权,李伯欣,等. 水稻控释肥一次性施肥技术示范应用效果[J]. 广东农业科学,2008(6):13-15.
- [4] 黄香贵,廖品莹. 水稻一次性施肥试验研究[J]. 广西农学报, 2011, 26(5):12-14.
- [5] 杨树森. 长效氮肥——草酰胺[J]. 江苏化工, 1989(1):53.
- [6] 胡玉容,王科,李扬,等. 新型缓释氮肥草酰胺[J]. 化工技术与开发, 2012, 41(10):31-33.

(上接第 95 页)

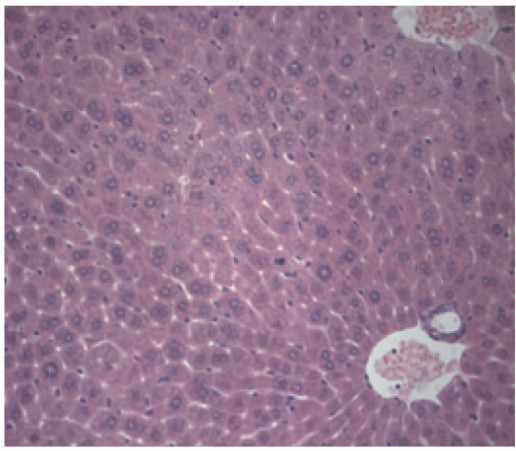


图 4 雄肝局部胞浆淡染、细胞轮廓不清、空泡样变(10 × 40)

Fig. 4 Male local pale cytoplasm and indistinct cytoplasmic borders and vacuolation of liver(10 × 40)

依据 2014 年修订的《急性经口毒性试验》中对受试物急性毒性的剂量分级标准为:经口一次性或 24 h 内多次给予受试物剂量大于 5 000 mg/kg 体重时,受试物实际无毒^[12]。结合该试验中小鼠的 LD₅₀ > 10.0 g/kg 体重的结果,我们认定,转基因欧洲黑杨鲜叶对小鼠的急性毒性并未因 *Bt* 基因的转入而发生明显的改变,其应属于“实际无毒”物质,故认为无论是转基因欧洲黑杨鲜叶,还是非转基因欧洲黑杨鲜叶均对小鼠无急性毒性。但是,组织病理学切片检查中发现,转基因灌胃组中有一雌性小鼠肺部出现间质性炎症及一雄性小鼠的肝部出现局部胞浆淡染、细胞轮廓不清及空泡样变的现

象,推测这可能与外源 *Bt* 基因的转入有关,具体原因尚需进一步的深入研究。

该试验研究结果为进一步开展转基因欧洲黑杨的毒性评价和生态安全性研究提供了有关的毒理学资料。

参考文献

- [1] PARSON T J, SINKAR V P, STETTLER R F, et al. Transformation of poplar by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Nature biotechnology, 1986, 4(6): 533-536.
- [2] 刘海涛,张川红,马森,等. 中国树木转基因研究进展及其生物安全管理现状[J]. 中国农学通报, 2009, 25(5): 80-89.
- [3] MARINA N, CRISTINA V, FABIO B, et al. Genetically modified trees - state and perspectives [J]. Genetika, 2012, 44(2): 429-440.
- [4] 刘海涛,张川红,郑勇奇,等. 抗虫转基因欧洲黑杨叶片水浸提液的生物效应[J]. 东北林业大学学报, 2010, 38(12): 27-30.
- [5] 杨利艳,孙毅,谢莉琴. 转基因杨树的研究及其生物安全评价[J]. 分子植物育种, 2008, 6(1): 123-127.
- [6] HELY H, ALAN R, ALUIZIO B, et al. Genetically engineered trees for plantation forests: Key considerations for environmental risk assessment [J]. Plant biotechnology journal, 2013, 11(7): 785-798.
- [7] 周兴华. 两种转基因大米食用安全性的毒理学研究 [D]. 镇江: 江苏大学, 2012.
- [8] LIU B, SHU C, XUE K, et al. The oral toxicity of the transgenic *Bt* + CpTI cotton pollen to honeybees (*Apis mellifera*) [J]. Ecotoxicology & environmental safety, 2009, 72(4): 1163-1169.
- [9] 严红实. 四种转基因大豆的毒理学评价 [D]. 延吉: 延边大学, 2015.
- [10] 孙海霞,周道玮. 杨树落叶对绵羊的饲喂价值[J]. 东北林业大学学报, 2009, 37(3): 64-66.
- [11] 刘应竹,王桂华,李海军,等. 杨树叶颗粒饲料替代羊草饲喂公梅花鹿效果的研究[J]. 国土与自然资源研究, 2009, 31(4): 89-90.
- [12] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 急性经口毒性试验: GB 15193.1-2014 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2014.
- [13] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全性毒理学评价程序: GB 15193.1-2014 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2014.
- [14] 杨利艳. 双价抗虫基因杨的获得、抗虫鉴定及安全性评价 [D]. 太原: 山西大学, 2009.

名词解释

扩展被引半衰期:指该期刊在统计当年被引用的全部次数中,较新一半是在多长一段时间内发表的。被引半衰期是测度期刊老化速度的一种指标,通常不是针对个别文献或某一组文献,而是对某一学科或专业领域的文献的总和而言的。

扩展 H 指数:指该期刊在统计当年被引的论文中,至少有 h 篇论文的被引频次不低于 h 次。

来源文献量:指来源期刊在统计当年发表的全部论文数,它们是统计期刊引用数据的来源。

文献选出率:按统计源的选取原则选出的文献数与期刊的发表文献数之比。

参考文献量:指来源期刊论文所引用的全部参考文献数,是衡量该期刊科学交流程度和吸收外部信息能力的一个指标。