

## 论著

## 转人乳铁蛋白基因大米的慢性毒性研究

张敏,卓勤,田园,李卫东,毛德倩,朴建华,杨晓光

(中国疾病预防控制中心营养与食品安全所 卫生部微量元素营养重点实验室,北京 100050)

**摘要:**目的 观察转人乳铁蛋白(hLF)基因大米是否具有慢性毒性作用。方法 初断乳的180只SD大鼠按性别、体重随机分为3组:转基因hLF基因大米组、亲本大米对照组和AIN-93对照组,分别饲喂相应饲料12个月。观察大鼠的体重、进食量、血常规、血生化情况,实验末期处死动物,称量脏器重量并对脏器进行病理学检查。结果 转hLF基因大米组血常规(LYM%、GRN%)、血生化(ALT、AST、GLU)在个别时间点上与亲本对照组或AIN-93对照组存在显著差异( $P < 0.05$ );其他观察指标与两个对照组均无显著差异。结论 现有实验结果不能证实转hLF基因大米对大鼠有慢性毒性作用。

**关键词:**转基因大米;人乳铁蛋白;慢性毒性;毒理学试验;食品安全

中图分类号:TS201.6;R155.52 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2012)06-0517-06

## Study on chronic toxicity of genetically modified rice expressing human lactoferrin

Zhang Min, Zhuo Qin, Tian Yuan, Li Weidong, Mao Deqian, Piao Jianhua, Yang Xiaoguang

(Key Laboratory of Trace Element Nutrition MOH, Institute for Nutrition and Food Safety, China CDC, Beijing 100050, China)

**Abstract: Objective** To observe the chronic toxic effect of the genetically modified rice which harboring human lactoferrin (hLF) gene on rats. **Methods** Based on gender and weight, 180 weanling SD rats were randomly divided into three groups: transgenic rice group, parental rice group and AIN-93 normal control group. They were fed for 12 months. Body weight, food consumption, hematology and clinical biochemistry were observed during the experiment period. The rats were sacrificed at the end point for organ weight measurement and pathological examination. **Results** The differences of some indices of hematology (LYM%, GRN%) and clinical biochemistry (ALT, AST, GLU) between hLF rice group, parental rice group and AIN-93 group were significant ( $P < 0.05$ ) while no other significant difference was observed. **Conclusion** There was inadequate evidence to indicate the hLF rice had adverse effects on rats.

**Key words:** Genetically modified rice; human lactoferrin; chronic toxicity; toxicology tests; food safety

人乳铁蛋白(human lactoferrin, hLF)是一种能与铁可逆性结合的糖基化蛋白,广泛分布于乳汁、泪液、唾液、胆汁、精液等分泌液及血浆、中性粒细胞中,在人初乳中其含量最高,可达6 mg/ml;人乳铁蛋白具有多种生理功能:促进铁吸收,广谱抗微生物(细菌、病毒、真菌、寄生虫),消炎、抗感染,促进细胞生长、DNA合成及抗癌作用<sup>[1]</sup>。人乳铁蛋白广泛的生理功能,使其在疾病防治、营养补充、食品、药品、化妆品等领域具有广阔的应用前景<sup>[2]</sup>。基于对人乳铁蛋白基因的研究及转基因技术的发展,促使人们致力于通过转基因技术生产大量在性

质、功能上与人乳铁蛋白相同的重组人乳铁蛋白(recombinant human lactoferrin, rLF),以期发挥健康效应。水稻作为转基因受体,具有食用安全性高、表达系统表达量高、贮藏过程中外源蛋白保持稳定等优点<sup>[3]</sup>。研究表明,水稻中表达的rLF具有和人体内源hLF一样的活性,表达量占种子干重的0.5%,表达水平稳定<sup>[4-5]</sup>。将人乳铁蛋白基因转入水稻,对提高水稻的营养价值、促进人体健康具有重大的经济意义和社会意义。

目前,世界各国普遍把大鼠90天喂养实验作为评价转基因全食品毒性的主要内容。90天喂养实验主要观察动物生长过程中的毒性表现,而长期喂养实验则能观察到转基因食品对动物的长期(生长全程)影响。一些研究者也提出,90天喂养实验不能充分评价转基因食品的非期望效应(如:致癌、致突变的能力),而长期喂养实验虽然实验周期长、耗费财力物力、操作繁琐复杂,但能够观察到食用转

收稿日期:2012-06-28

基金项目:转基因生物新品种培育重大专项(2008ZX0811-005, 2011ZX08011-005)

作者简介:张敏 女 硕士生 研究方向为转基因食品安全评价  
E-mail: sitong1998@126.com

通信作者:卓勤 女 研究员 研究方向为转基因食品安全评价

基因食品的长期效果<sup>[6-7]</sup>。由于考虑到转基因食品商品化后可被不同年龄、健康状况的人群长期甚至终生食用,所以为了解除消费者对转基因食品的担心和疑虑,进行长期喂养实验是有必要的,其得到的结论更为科学、准确、有说服力。本研究开展为期 12 个月的喂养实验,观察大鼠长期食用以最大量掺入转基因大米的饲料能否出现毒副作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验大米及饲料配制

该转人乳铁蛋白基因大米是通过农杆菌介导法将人乳铁蛋白基因导入梗稻秀水 110 号(未进行任何转基因操作)获得的,其乳铁蛋白含量占种子干重的 0.5%。转基因大米及亲本大米均为梗稻品种,由浙江大学转基因研究中心提供,种植于浙江大学长兴转基因基地,种植条件相同。

3 组饲料分别为转 hLF 基因大米饲料(A 组)、亲本大米饲料(B 组)、AIN-93 常规基础饲料(C 组)。实验开始的前 13 周以满足大鼠生长发育所需的 AIN-93G 配方为参照配制饲料,13 周以后改用 AIN-93M 配方进行饲料配制<sup>[8]</sup>。根据大米营养成分分析结果,以转基因大米、亲本大米中蛋白质的最大量掺入饲料为原则,从添加 90% 的大米为起点,依次降低 0.1% 往下推算,分别计算其他成分的可加量 A1(1000 - 1000 × 大米百分含量),及与 AIN93 比各成分(蛋白、大豆油、纤维、淀粉、矿物质、维生素等)的需要量之和 A2,两者相等时即为大米的添加量。蛋白不足的部分由酪蛋白补齐,其他营养成分扣除大米中的添加量后按配方补齐。经计算生长期 A 组饲料中转基因大米的添加量为 73%,B 组饲料中亲本大米的添加量为 72.4%;维持期 A 组饲料中转基因大米的添加量为 85%,B 组饲料中亲本大米的添加量为 83.1%。生长期及维持期三组饲料的主要成分见表 1。饲料由中国医学科学院实验动物研究所配制,饲料形式为颗粒状 φ12 mm,并经<sup>60</sup>Co 辐照灭菌,采用真空小包装(2.5 kg/袋)。成品饲料的营养成分由北京市营养源研究所营养分析检测中心测定,主要成分的检测结果见表 1。结果表明,生长期及维持期三组成品饲料的主要营养成分含量均衡,均符合 AIN-93 配方要求。

### 1.2 实验动物分组与喂养

SPF 级健康初断乳(5 周龄)SD 大鼠 180 只,雌雄比例 1:1,体重 60 ~ 80 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,生产许可证号:SCXK(京)2006-0009。饲养于中国疾病预防控制中心动物实验室,许可证号:SYXK(京)2009-0032。室温 20 ℃ ~ 23 ℃,

表 1 生长期及维持期三组饲料的配方及成品饲料  
主要成分检测结果

Table 1 Composition of diets for growth and adult maintenance  
and analysis results of the three finished feeds(g/kg)

| 成分        | 生长期   |       |       | 维持期   |       |       |
|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|           | A     | B     | C     | A     | B     | C     |
| 转 hLF 大米  | 730.0 | 0     | 0     | 850.0 | 0     | 0     |
| 亲本大米      | 0     | 724.0 | 0     | 0     | 831.0 | 0     |
| 酪蛋白(≥85%) | 127.9 | 133.0 | 200.0 | 57.9  | 64.4  | 140.0 |
| 大豆油       | 48.9  | 49.8  | 70.0  | 24.4  | 25.0  | 40.0  |
| 乙酸纤维      | 43.8  | 44.0  | 50.0  | 20.0  | 31.8  | 50.0  |
| 玉米淀粉      | 0     | 0     | 398.6 | 0     | 0     | 466.8 |
| 糊精淀粉      | 0     | 0     | 132.0 | 0     | 0     | 155.0 |
| 蔗糖        | 0     | 0     | 100.0 | 0     | 0     | 100.0 |
| L-胱氨酸     | 3.000 | 3.000 | 3.000 | 1.800 | 1.800 | 1.800 |
| 氯化胆碱      | 1.370 | 1.370 | 1.370 | 1.370 | 1.370 | 1.370 |
| 矿物质预混料    | 35.0  | 35.0  | 35.0  | 35.0  | 35.0  | 35.0  |
| 维生素预混料    | 10.0  | 10.0  | 10.0  | 10.0  | 10.0  | 10.0  |
| 饲料主要成分检测  |       |       |       |       |       |       |
| 粗蛋白       | 171.0 | 175.0 | 166.0 | 124.0 | 123.0 | 121.0 |
| 粗脂肪       | 67.8  | 66.4  | 70.4  | 39.0  | 39.0  | 43.0  |
| 水分        | 57.0  | 61.0  | 53.0  | 78.0  | 81.0  | 70.0  |
| 粗灰分       | 26.0  | 27.0  | 25.0  | 29.0  | 27.0  | 24.0  |
| 总碳水化合物    | 678.2 | 670.6 | 685.6 | 730.0 | 730.0 | 742.0 |

相对湿度为 40% ~ 60%,昼夜明暗交替时间 10/14(h)。动物自购入给予常规基础饲料适应 1 周后,按性别、体重随机分为三组:转 hLF 基因大米组(A 组)、亲本大米对照组(B 组)和 AIN-93 对照组(C 组),每组 60 只,雌雄各半,6 只一笼,动物体重达到 300 ~ 400 g 时,改为 3 只一笼。饲相应的饲料,自由进食饮水。

### 1.3 观察指标与方法

#### 1.3.1 一般情况观察

每天观察动物的一般健康状况,详细记录动物的发病及死亡情况。每周称进食量 2 次,前 13 周每周称体重 1 次,以后每月称量 1 次。

#### 1.3.2 血常规

在实验的第 3、6、12 个月,大鼠禁食(不禁水)16h 后尾部采血各测 1 次,每组每一性别检查 10 只。采用全自动血球计数仪(ACT-5diff,美国 Beckman 公司)测定。测定指标包括:白细胞计数(WBC),红细胞计数(RBC),血红蛋白浓度(HGB),血小板计数(PLT),淋巴细胞计数(LYM%),中间细胞百分数(MID%),中性细胞百分数(GRN%)。

#### 1.3.3 血生化

时间及采血方法同 1.3.2。采用全自动血生化分析仪(7080 型,日立 HITACHI 公司)测定,试剂盒购自北京中山北控生物公司。测定指标包括:谷丙转氨酶(ALT),谷草转氨酶(AST),总蛋白(TP),血清白蛋白(ALB),碱性磷酸酶(ALP),血糖(GLU),

血尿素氮(BUN),血肌酐(CRE),胆固醇(CHO),甘油三酯(TG)。

1.3.4 脏器系数

在实验的第12个月,所有大鼠禁食16 h后称量空腹体重,10%水合氯醛麻醉(0.4 ml/100g)并放血处死,取脑、心、肝、脾、肾、肾上腺、睾丸、附睾用千分之一天平(GX-200,日本A&D公司)称重,按以下公式计算脏器系数:

脏器系数 = 脏器湿重(mg) / 大鼠空腹体重(g)

1.3.5 病理学检查

上述脏器及垂体、甲状腺、胰腺、胃、十二指肠、空肠、回肠、盲肠、结肠、直肠、肠系膜淋巴结、膀胱、前列腺、子宫、卵巢及可疑组织用10%福尔马林溶液固定,委托中国疾病预防控制中心辐射防护与核安全医学所进行常规病理学检查。

1.4 统计处理

计量资料数据以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,各组间差异的检验先进行方差齐性检验,各组数据如符合方差齐性,用单因素方差分析的方法进行分析;若方差不齐需进行相应的数据转换后再进行统计分析。计数资料(如:死亡率)用 $\chi^2$ 检验。所有统计分析采用SPSS 20.0分析软件。

2 结果

2.1 大鼠一般情况及死亡情况

实验期间大鼠体重增长及进食情况见图1~2,雄性和雌性大鼠A、B、C组之间体重及平均每日进食量的变化趋势基本一致。由表2可知,实验期间,雄性和雌性大鼠各组间死亡率差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

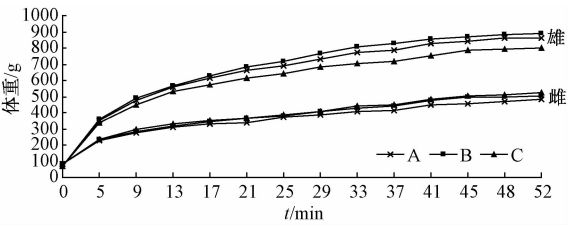


图1 雌雄SD大鼠体重增长曲线

Figure 1 Body weight curves of male and female SD rats

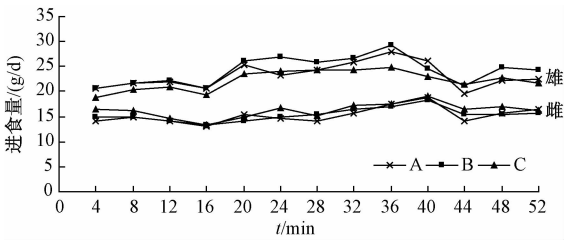


图2 雌雄SD大鼠进食曲线

Figure 2 Food consumption curve of male and female SD rats

表2 各组大鼠死亡情况

Table 2 Mortality rate of rats in each group

| 性别 | 组别 | 动物总数<br>(只) | 死亡动物数<br>(只) | 死亡率<br>(%) |
|----|----|-------------|--------------|------------|
| 雄性 | A  | 30          | 2            | 6.7        |
|    | B  | 30          | 2            | 6.7        |
|    | C  | 30          | 2            | 6.7        |
| 雌性 | A  | 30          | 1            | 3.3        |
|    | B  | 30          | 1            | 3.3        |
|    | C  | 30          | 0            | 0          |

2.2 血常规情况

由表3可见,实验第3个月的血常规结果显示,A组雄性大鼠GRN%低于C组,差异有统计学意义( $0.01<P<0.05$ ),但与B组比较差异无统计学意义( $P>0.05$ );其他指标各组间差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

表3 实验第3个月血常规情况

Table 3 Hematological data of rats in each group for 3 months

| 性别 | 组别 | WBC<br>( $\times 10^9/L$ ) | RBC<br>( $\times 10^{12}/L$ ) | HGB<br>(g/L) | PLT<br>( $\times 10^9/g/L$ ) | LYM%<br>(%) | MID%<br>(%) | GRN%<br>(%)            |
|----|----|----------------------------|-------------------------------|--------------|------------------------------|-------------|-------------|------------------------|
| 雄性 | A  | 14.7±3.7                   | 7.57±0.20                     | 154±4        | 381±68                       | 83.3±3.6    | 11.0±2.6    | 5.6±1.4 <sup>(1)</sup> |
|    | B  | 15.6±2.4                   | 7.49±0.34                     | 153±7        | 376±46                       | 85.6±2.4    | 10.5±1.5    | 6.9±1.0                |
|    | C  | 13.9±1.7                   | 7.51±0.36                     | 153±8        | 401±91                       | 80.3±6.7    | 11.7±2.9    | 8.0±3.9                |
| 雌性 | A  | 9.8±2.4                    | 7.16±0.38                     | 149±6        | 252±66                       | 89.2±3.1    | 6.5±1.8     | 4.3±1.6                |
|    | B  | 9.0±2.2                    | 7.15±0.33                     | 147±6        | 267±53                       | 89.4±2.7    | 6.7±1.9     | 3.9±1.2                |
|    | C  | 8.6±2.1                    | 7.31±0.29                     | 151±5        | 274±48                       | 89.6±3.8    | 6.1±2.9     | 5.3±2.0                |

注:(1)与C组相比 $0.01<P<0.05$ 。

由表4可见,实验第6个月的大鼠血常规指标中,A组雌性大鼠GRN%低于B、C组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。雄性大鼠各组血常规指标差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

由表5可见,实验末期的大鼠血常规指标中,A

组雄性大鼠LYM%高于B、C组,而GRN%低于B、C组,差异有统计学意义( $P<0.01$ );雌性大鼠各组血常规指标差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

血小板计数(PLT)因当时全自动血球计数仪数据输出系统故障,结果未导出,故实验末期未给出

此指标结果。( $P>0.05$ )。

2.3 血生化情况

表 6 显示,实验第 3 个月 A 组雄性大鼠 ALT、AST 高于 B、C 组,差异有统计学意义 ( $P<0.05$ );雌性大鼠各组指标差异无统计学意义

表 7 显示,实验第 6 个月的大鼠血生化指标中,雄性组,A 组 GLU 低于 B、C 组,AST 高于 B、C 组,差异有统计学意义 ( $P<0.05$ );雌性大鼠各组指标差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。

表 4 实验第六个月血常规情况

| Table 4 Hematological data of rats in each group for 6 months |    |                            |                               |                         |                              |                |                |                                |
|---------------------------------------------------------------|----|----------------------------|-------------------------------|-------------------------|------------------------------|----------------|----------------|--------------------------------|
| 性别                                                            | 组别 | WBC<br>( $\times 10^9/L$ ) | RBC<br>( $\times 10^{12}/L$ ) | HGB<br>( $\times g/L$ ) | PLT<br>( $\times 10^9/g/L$ ) | LYM%<br>(%)    | MID%<br>(%)    | GRN%<br>(%)                    |
| 雄性                                                            | A  | 14.9 $\pm$ 4.8             | 7.48 $\pm$ 0.27               | 154 $\pm$ 4             | 670 $\pm$ 106                | 77.8 $\pm$ 2.9 | 9.7 $\pm$ 2.3  | 12.4 $\pm$ 1.9                 |
|                                                               | B  | 15.4 $\pm$ 5.2             | 7.36 $\pm$ 0.22               | 148 $\pm$ 5             | 669 $\pm$ 132                | 74.8 $\pm$ 4.8 | 8.7 $\pm$ 1.6  | 16.4 $\pm$ 5.6                 |
|                                                               | C  | 13.0 $\pm$ 3.4             | 7.50 $\pm$ 0.30               | 153 $\pm$ 6             | 738 $\pm$ 126                | 75.4 $\pm$ 4.9 | 9.7 $\pm$ 1.8  | 14.9 $\pm$ 4.3                 |
| 雌性                                                            | A  | 8.2 $\pm$ 2.0              | 6.97 $\pm$ 0.39               | 146 $\pm$ 7             | 421 $\pm$ 92                 | 81.5 $\pm$ 3.8 | 10.0 $\pm$ 2.4 | 8.4 $\pm$ 2.9 <sup>(1,2)</sup> |
|                                                               | B  | 9.2 $\pm$ 2.2              | 6.95 $\pm$ 0.35               | 150 $\pm$ 6             | 525 $\pm$ 116                | 79.1 $\pm$ 4.9 | 10.0 $\pm$ 1.9 | 11.0 $\pm$ 3.5                 |
|                                                               | C  | 8.4 $\pm$ 2.0              | 6.94 $\pm$ 0.25               | 150 $\pm$ 2             | 461 $\pm$ 69                 | 77.5 $\pm$ 4.4 | 10.3 $\pm$ 2.5 | 12.2 $\pm$ 3.7                 |

注:(1)与 C 组相比  $P<0.01$ ;(2)与 B 组相比  $0.01<P<0.05$ 。

表 5 实验末期血常规情况

| Table 5 Hematological data of rats in each group at the end of the experiment |    |                            |                               |                         |                                 |                |                                |  |
|-------------------------------------------------------------------------------|----|----------------------------|-------------------------------|-------------------------|---------------------------------|----------------|--------------------------------|--|
| 性别                                                                            | 组别 | WBC<br>( $\times 10^9/L$ ) | RBC<br>( $\times 10^{12}/L$ ) | HGB<br>( $\times g/L$ ) | LYM%<br>(%)                     | MID%<br>(%)    | GRN%<br>(%)                    |  |
| 雄性                                                                            | A  | 12.9 $\pm$ 2.6             | 7.32 $\pm$ 0.58               | 142 $\pm$ 10            | 80.2 $\pm$ 5.9 <sup>(1,2)</sup> | 14.8 $\pm$ 2.8 | 8.1 $\pm$ 3.5 <sup>(1,2)</sup> |  |
|                                                                               | B  | 16.0 $\pm$ 7.2             | 6.63 $\pm$ 0.84               | 143 $\pm$ 13            | 69.1 $\pm$ 4.7                  | 14.7 $\pm$ 3.0 | 16.2 $\pm$ 4.6                 |  |
|                                                                               | C  | 13.0 $\pm$ 4.1             | 6.88 $\pm$ 1.20               | 143 $\pm$ 11            | 67.2 $\pm$ 7.2                  | 15.1 $\pm$ 2.7 | 17.8 $\pm$ 6.4                 |  |
| 雌性                                                                            | A  | 9.8 $\pm$ 2.2              | 6.52 $\pm$ 0.77               | 142 $\pm$ 11            | 72.3 $\pm$ 6.8                  | 15.0 $\pm$ 2.6 | 12.7 $\pm$ 5.4                 |  |
|                                                                               | B  | 9.9 $\pm$ 2.8              | 6.72 $\pm$ 0.39               | 141 $\pm$ 9             | 75.6 $\pm$ 5.3                  | 14.1 $\pm$ 3.1 | 10.3 $\pm$ 3.0                 |  |
|                                                                               | C  | 9.0 $\pm$ 1.3              | 6.04 $\pm$ 0.78               | 144 $\pm$ 13            | 74.4 $\pm$ 6.2                  | 14.8 $\pm$ 2.6 | 10.8 $\pm$ 3.8                 |  |

注:(1)与 B 组相比  $P<0.01$ ;(2)与 C 组相比  $P<0.01$ 。

表 6 实验第 3 个月血生化情况

| Table 6 Blood biochemistry data of rats in each group for 3 months |    |                              |                               |                |                |              |                 |                 |                       |                 |                 |
|--------------------------------------------------------------------|----|------------------------------|-------------------------------|----------------|----------------|--------------|-----------------|-----------------|-----------------------|-----------------|-----------------|
| 性别                                                                 | 组别 | ALT<br>(U/L)                 | AST<br>(U/L)                  | TP<br>(g/L)    | ALB<br>(g/L)   | ALP<br>(U/L) | GLU<br>(mmol/L) | BUN<br>(mmol/L) | CRE<br>( $\mu$ mol/L) | CHO<br>(mmol/L) | TG<br>(mmol/L)  |
| 雄性                                                                 | A  | 38 $\pm$ 12 <sup>(1,2)</sup> | 204 $\pm$ 42 <sup>(3,4)</sup> | 78.2 $\pm$ 5.5 | 42.5 $\pm$ 1.8 | 83 $\pm$ 22  | 3.86 $\pm$ 0.41 | 5.21 $\pm$ 0.98 | 72.0 $\pm$ 7.2        | 1.66 $\pm$ 0.26 | 1.56 $\pm$ 0.90 |
|                                                                    | B  | 29 $\pm$ 3                   | 176 $\pm$ 26                  | 77.4 $\pm$ 5.3 | 42.3 $\pm$ 1.8 | 74 $\pm$ 15  | 4.23 $\pm$ 0.51 | 4.95 $\pm$ 0.69 | 69.2 $\pm$ 7.9        | 1.86 $\pm$ 0.22 | 1.63 $\pm$ 0.71 |
|                                                                    | C  | 29 $\pm$ 6                   | 177 $\pm$ 24                  | 77.7 $\pm$ 5.3 | 42.8 $\pm$ 1.4 | 81 $\pm$ 14  | 3.95 $\pm$ 0.52 | 5.46 $\pm$ 0.86 | 69.0 $\pm$ 8.1        | 1.67 $\pm$ 0.44 | 1.19 $\pm$ 0.42 |
| 雌性                                                                 | A  | 28 $\pm$ 7                   | 204 $\pm$ 50                  | 87.3 $\pm$ 6.3 | 49.7 $\pm$ 2.3 | 43 $\pm$ 10  | 3.61 $\pm$ 0.80 | 6.16 $\pm$ 1.27 | 81.6 $\pm$ 7.0        | 1.96 $\pm$ 0.36 | 0.81 $\pm$ 0.33 |
|                                                                    | B  | 26 $\pm$ 8                   | 181 $\pm$ 39                  | 87.6 $\pm$ 4.6 | 49.9 $\pm$ 1.8 | 41 $\pm$ 9   | 4.08 $\pm$ 0.74 | 5.98 $\pm$ 1.00 | 86.3 $\pm$ 12.81      | 1.86 $\pm$ 0.31 | 0.80 $\pm$ 0.97 |
|                                                                    | C  | 25 $\pm$ 5                   | 178 $\pm$ 36                  | 86.8 $\pm$ 6.2 | 49.3 $\pm$ 1.6 | 41 $\pm$ 12  | 3.55 $\pm$ 0.53 | 5.84 $\pm$ 0.88 | 82.6 $\pm$ 4.7        | 1.74 $\pm$ 0.34 | 0.78 $\pm$ 0.30 |

注:(1)与 B 组相比  $P<0.01$ ;(2)与 C 组相比  $P<0.01$ ;(3)与 B 组相比  $0.01<P<0.05$ ;(4)与 C 组相比  $0.01<P<0.05$ 。

表 7 实验第 6 个月血生化情况

| Table 7 Blood biochemistry data of rats in each group for 6 months |    |              |                               |                |                |              |                                  |                 |                       |                 |                 |
|--------------------------------------------------------------------|----|--------------|-------------------------------|----------------|----------------|--------------|----------------------------------|-----------------|-----------------------|-----------------|-----------------|
| 性别                                                                 | 组别 | ALT<br>(U/L) | AST<br>(U/L)                  | TP<br>(g/L)    | ALB<br>(g/L)   | ALP<br>(U/L) | GLU<br>(mmol/L)                  | BUN<br>(mmol/L) | CRE<br>( $\mu$ mol/L) | CHO<br>(mmol/L) | TG<br>(mmol/L)  |
| 雄性                                                                 | A  | 32 $\pm$ 8   | 202 $\pm$ 34 <sup>(1,3)</sup> | 82.9 $\pm$ 7.6 | 46.8 $\pm$ 2.1 | 49 $\pm$ 13  | 5.86 $\pm$ 0.60 <sup>(1,2)</sup> | 5.65 $\pm$ 0.80 | 75.8 $\pm$ 5.5        | 1.58 $\pm$ 0.31 | 1.38 $\pm$ 0.38 |
|                                                                    | B  | 32 $\pm$ 10  | 159 $\pm$ 22                  | 81.9 $\pm$ 5.6 | 47.4 $\pm$ 2.2 | 56 $\pm$ 15  | 8.81 $\pm$ 0.80                  | 5.71 $\pm$ 0.77 | 76.9 $\pm$ 10.1       | 1.83 $\pm$ 0.27 | 1.44 $\pm$ 0.76 |
|                                                                    | C  | 33 $\pm$ 19  | 174 $\pm$ 45                  | 79.5 $\pm$ 3.4 | 46.5 $\pm$ 1.3 | 57 $\pm$ 15  | 6.86 $\pm$ 0.65                  | 5.98 $\pm$ 0.68 | 75.2 $\pm$ 9.3        | 1.65 $\pm$ 0.37 | 1.37 $\pm$ 0.45 |
| 雌性                                                                 | A  | 25 $\pm$ 5   | 159 $\pm$ 27                  | 88.2 $\pm$ 6.1 | 53.0 $\pm$ 3.2 | 23 $\pm$ 6   | 4.72 $\pm$ 0.74                  | 7.70 $\pm$ 1.69 | 93.6 $\pm$ 24.0       | 1.93 $\pm$ 0.54 | 1.57 $\pm$ 0.95 |
|                                                                    | B  | 26 $\pm$ 7   | 151 $\pm$ 42                  | 89.4 $\pm$ 5.4 | 54.1 $\pm$ 2.9 | 23 $\pm$ 7   | 6.38 $\pm$ 0.93                  | 6.39 $\pm$ 1.30 | 87.4 $\pm$ 11.2       | 1.87 $\pm$ 0.50 | 1.42 $\pm$ 0.80 |
|                                                                    | C  | 27 $\pm$ 9   | 134 $\pm$ 27                  | 89.8 $\pm$ 6.0 | 54.4 $\pm$ 3.2 | 24 $\pm$ 8   | 4.77 $\pm$ 0.83                  | 5.73 $\pm$ 0.90 | 85.0 $\pm$ 10.3       | 1.83 $\pm$ 0.39 | 1.51 $\pm$ 1.17 |

注:(1)与 B 组相比  $P<0.01$ ;(2)与 C 组相比  $P<0.01$ ;(3)与 C 组相比  $0.01<P<0.05$ 。

表 8 显示,实验末期 A 组雄性大鼠 AST 高于 B 组,ALT 低于 C 组,差异有统计学意义 ( $P<0.05$ );雌性组 A 组 ALT、AST 高于 B、C 组,差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ),雌雄各组其他指标差

异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。

2.4 大鼠脏器系数

由表 9 可见,实验末期大鼠的脏器系数各组之间差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。

表 8 实验末期血生化情况

| Table 8 Blood biochemistry data of rats in each group at the end of the experiment |    |                       |                         |             |              |              |                 |                 |                 |                 |                |
|------------------------------------------------------------------------------------|----|-----------------------|-------------------------|-------------|--------------|--------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|----------------|
| 性别                                                                                 | 组别 | ALT<br>(U/L)          | AST<br>(U/L)            | TP<br>(g/L) | ALB<br>(g/L) | ALP<br>(U/L) | GLU<br>(mmol/L) | BUN<br>(mmol/L) | CRE<br>(μmol/L) | CHO<br>(mmol/L) | TG<br>(mmol/L) |
| 雄性                                                                                 | A  | 30 ± 7 <sup>(2)</sup> | 219 ± 49 <sup>(1)</sup> | 86.0 ± 5.2  | 42.7 ± 1.4   | 56 ± 14      | 4.43 ± 0.50     | 5.24 ± 0.49     | 52.1 ± 6.6      | 2.16 ± 0.38     | 2.20 ± 0.89    |
|                                                                                    | B  | 34 ± 11               | 156 ± 27                | 84.1 ± 4.0  | 41.7 ± 1.9   | 59 ± 16      | 6.09 ± 0.67     | 5.27 ± 0.50     | 49.7 ± 3.7      | 2.41 ± 0.35     | 2.50 ± 0.97    |
|                                                                                    | C  | 63 ± 6.5<br>36        | 209 ± 57<br>205         | 86.7 ± 2.8  | 43.0 ± 1.4   | 65 ± 13      | 5.37 ± 0.71     | 5.54 ± 0.73     | 53.9 ± 4.2      | 2.52 ± 0.57     | 2.19 ± 0.84    |
| 雌性                                                                                 | A  | ± 10 <sup>(1,2)</sup> | ± 49 <sup>(1,2)</sup>   | 90.6 ± 8.4  | 46.7 ± 3.8   | 28 ± 11      | 3.81 ± 0.57     | 6.36 ± 0.73     | 55.3 ± 5.8      | 2.13 ± 0.46     | 2.33 ± 1.18    |
|                                                                                    | B  | 26 ± 5                | 153 ± 39                | 84.9 ± 4.7  | 44.6 ± 2.3   | 23 ± 6       | 4.61 ± 0.73     | 5.93 ± 0.56     | 51.5 ± 6.0      | 2.10 ± 0.46     | 2.93 ± 2.27    |
|                                                                                    | C  | 28 ± 12               | 166 ± 48                | 87.7 ± 5.4  | 46.7 ± 3.2   | 24 ± 8       | 4.16 ± 0.57     | 5.70 ± 0.98     | 53.0 ± 6.4      | 2.28 ± 0.42     | 2.79 ± 1.19    |

注：(1)与B组相比  $P < 0.01$ ；(2)与C组相比  $0.01 < P < 0.05$ 。

表 9 大鼠脏器系数比较

| Table 9 Comparison of organ coefficient of rats in each group(mg/g) |    |               |               |                |               |               |               |               |               |
|---------------------------------------------------------------------|----|---------------|---------------|----------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| 性别                                                                  | 组别 | 脑             | 心脏            | 肝              | 脾             | 双肾            | 双肾上腺          | 睾丸            | 附睾            |
| 雄性                                                                  | A  | 2.697 ± 0.349 | 2.316 ± 0.234 | 21.746 ± 1.978 | 1.353 ± 0.269 | 4.109 ± 0.452 | 0.070 ± 0.024 | 4.048 ± 1.142 | 2.090 ± 0.465 |
|                                                                     | B  | 2.567 ± 0.436 | 2.330 ± 0.241 | 21.517 ± 2.362 | 1.509 ± 0.269 | 4.289 ± 0.323 | 0.060 ± 0.016 | 4.152 ± 0.686 | 1.985 ± 0.393 |
|                                                                     | C  | 2.930 ± 0.323 | 2.572 ± 0.307 | 22.513 ± 2.016 | 1.542 ± 0.347 | 4.484 ± 0.654 | 0.070 ± 0.024 | 4.547 ± 0.324 | 2.385 ± 0.442 |
| 雌性                                                                  | A  | 4.361 ± 1.027 | 2.651 ± 0.386 | 22.330 ± 2.296 | 1.543 ± 0.294 | 4.865 ± 0.705 | 0.124 ± 0.077 | -             | -             |
|                                                                     | B  | 4.251 ± 0.798 | 2.815 ± 0.392 | 23.445 ± 4.632 | 1.833 ± 0.487 | 4.710 ± 0.524 | 0.139 ± 0.042 | -             | -             |
|                                                                     | C  | 4.134 ± 0.946 | 2.503 ± 0.431 | 21.417 ± 2.494 | 1.629 ± 0.323 | 4.586 ± 0.703 | 0.124 ± 0.056 | -             | -             |

注：- 为未检测。

2.5 病理学检查结果

病理学检测结果显示,脏器病理改变发生率各组之间差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),心脏、肝脏、肾脏、大脑、小脑的病理改变多为解剖损伤引起的灶性或散在出血。

3 讨论

目前,国内外关于转基因食品 90 天喂养实验的报道比较多,长期喂养实验的报道较少。Sakamoto 等<sup>[9-10]</sup>开展了转基因大豆的 52 周喂养试验,未发现该转基因大豆对大鼠有毒副作用;之后又延长喂养时间为 104 周,结果同上。Zhu 等<sup>[11]</sup>用转 CP4 EPSPS 大豆喂养大鼠 90 天,未发现该转基因大豆对大鼠有任何毒性作用;Malatesta 等<sup>[12]</sup>用该转 CP4 EPSPS 大豆喂养小鼠 104 周,发现长期摄入含有该转基因大豆的饲料能影响老龄鼠的肝脏功能,原因尚不清楚,但这表明了长期喂养实验的重要性与必要性。

本研究参照 AIN-93 配方,以大米中蛋白质的最大掺入饲料为原则配制实验饲料。这可保证动物在全面营养的基础上最大程度地暴露于转基因大米。实验中转基因大米组大鼠的平均每日进食量为 20 g,若以成年大鼠体重 300 g 计算,平均每只大鼠每日的进食量约为 67 g/kg 体重,其中转基因大米的摄入量约为 50 g/kg 体重,为我国居民大米及其制品平均摄入量的 12.5 倍(平均摄入量为 3.97 g/kg 体重,以成人体重 60 kg 计算<sup>[13]</sup>)。所以这种饲料配制方法能最大程度地评估转 hLF 基因大米的潜在风险。本实验设置了两个对照组,亲本大米组和 AIN93 对照组,前者用来发现转入的外源

基因可能带来的影响,后者用来排除大米自身成分对实验可能造成的影响。

实验从大鼠断乳后即开始饲喂转基因饲料,实验期限长达 12 个月,全面观察了与其生长发育、营养及健康密切相关的各项指标。结果显示:转基因大米组、亲本大米组和 AIN93 对照组体重增长、进食量的变化趋势基本一致,说明本实验选用的饲料配制方法合理,大米添加组未出现营养缺乏的状况,饲料适口性良好;此外各组的死亡率、脏器系数没有显著差异。血常规(LYM%、GRN%)、血生化(ALT、AST、GLU)的指标在个别时间点上检测时与对照组之间存在差异,但大部分有差异的指标没有同时与两个对照组都存在差异或没有同时在雌雄大鼠中存在差异。在每个检测时间点上存在差异的指标不同,例如 GRN% 在雌、雄大鼠间没有同时与对照组存在差异,雌性大鼠 GRN% 第 6 个月检测时显著低于对照组,而实验结束时差异消失。而且大部分有差异的指标在数值上与对照组差异不大,仅存在统计学差异,基本上都在文献报道的正常范围之内<sup>[14-15]</sup>。此外,动物实验中存在一些转基因食品特性外的不确定因素<sup>[16]</sup>,可能对实验结果造成一定影响,所以不应认为差异是因饲喂转基因饲料造成的。值得注意的是,三次血生化结果显示 A 组 ALT、AST 普遍稍高于对照组。ALT、AST 是反映肝脏功能的灵敏指标,肝脏受损时可出现血清 ALT、AST 明显升高。血生化变化的生物学意义需要结合动物的病理表现及相关器官的病理学检测结果进行综合判断;虽然本研究转基因组的部分 ALT、AST 结果偏高,但是仍在正常范围之内,且转基因组动

物的健康状况、肝脏重量及病理学检测未发现异常,所以不应认为指标升高是因饲喂转基因饲料造成的。

综上所述,本实验结果不能证实该转人乳铁蛋白基因大米对大鼠有慢性毒性作用;本实验结果结合三代繁殖实验(正在进行中)的结果能更好地评价该转基因大米的非期望效应。在今后的研究中,本课题还将继续对该转基因水稻表达的人乳铁蛋白进行急性毒性、营养功效等方面的研究,以最大限度地评价其食用安全性。

## 参考文献

- [1] GARIA-MONTOYA I A, CENDON T S, AREVALO-GALLEGOS S, et al. Lactoferrin a multiple bioactive protein: An overview[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1820(3): 226-236.
- [2] 刘红云, 童富淡. 乳铁蛋白生理功能研究现状[J]. *上海畜牧兽医通讯*, 2003, (3): 2-4.
- [3] LIN Chaoyang, NIE Peng, LU Wei, et al. A selectively terminable transgenic rice line expressing human lactoferrin[J]. *Protein Expr Purif*, 2010, 74(1): 60-64.
- [4] NANDI S, SUZUKI YA, HUANG J, et al. Expression of human lactoferrin in transgenic rice grains for the application in infant formula[J]. *Plant Sci*, 2002, 163(4): 713-722.
- [5] HUMPHREY B D, HUANG N, KLASING K C. Rice expressing lactoferrin and lysozyme has antibiotic-like properties when fed to chicks[J]. *J Nutr*, 2002, 132(6): 1214-1218.
- [6] de VENDOMOIS J S, ROULLIER F, CELLIER D, et al. A comparison of the effects of three GM corn varieties on mammalian health[J]. *Int J Biol Sci*, 2009, 5(7): 706-726.
- [7] SERALINI G E, MESNAGE R, CLAIRE E, et al. Genetically modified crops safety assessments: present limits and possible improvements[J]. *Environ Sci Europe*, 2011, 23(1): 10-20.
- [8] REEVES P G, NIELSEN F H, FAHEY G C. AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet[J]. *J Nutr*, 1993, 123(11): 1939-1951.
- [9] SAKAMOTO Y, TADA Y, FUKUMORI N, et al. A 52-week feeding study of genetically modified soybeans in F344 rats[J]. *Food Hyg Soc*, 2007, 48(3): 41-50.
- [10] SAKAMOTO Y, TADA Y, FUKUMORI N, et al. A 104-week feeding study of genetically modified soybeans in F344 rats[J]. *Food Hyg Soc*, 2008, 49(4): 272-282.
- [11] ZHU Yuanzhao, LI Defa, WANG Fenglai, et al. Nutritional assessment and fate of DNA of soybean meal from roundup ready or conventional soybeans using rats[J]. *Arch Anim Nutr*, 2004, 58(4): 295-310.
- [12] MALATESTA M, BORALDI F, ANNOVI G, et al. A long-term study on female mice fed on genetically modified soybean: effects on liver ageing[J]. *Histochem Cell Biol*, 2008, 130(5): 967-977.
- [13] 翟凤英, 杨晓光. 2002年中国居民营养与健康状况调查报告之二——膳食与营养素摄入状况[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 21-22.
- [14] 齐云, 蔡润兰, 刘彬, 等. 新药长毒试验动物血液生化测定规范化研究系列之五[J]. *中国比较医学杂志*, 2006, 16(4): 193-196.
- [15] 朱华, 高虹, 黄澜, 等. 清洁级SD大鼠标准生物学指标的建立[J]. *医学动物防制*, 2005, 21(9): 629-633.
- [16] MOMMA K, HASHIMOTO W, YOON H J, et al. Safety assessment of rice genetically modified with soybean glycinin by feeding studies on rats[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2000, 64(9): 1881-1886.

## 《中国食品卫生杂志》2013年征稿征订启事

《中国食品卫生杂志》创刊于1989年,由卫生部主管,中华预防医学会、中国疾病预防控制中心营养与食品安全所主办,国内公开发行人。为中文核心期刊、中国科技核心期刊。被中国知网(CNKI)中国期刊全文数据库收录。2011年版影响因子1.031,在预防医学学科排名第3(共50种杂志);在预防医学领域影响因子连续8年排前7名。是中国食品卫生专业唯一的核心期刊。

该杂志于2003~2004、2005~2006和2007~2008年度连续获得中华预防医学会优秀期刊一等奖;获得卫生部首届医药卫生优秀期刊三等奖。

所设栏目有:专家述评、论著、研究报告、实验技术与方法、监督管理、调查研究、食品安全标准、风险评估、风险交流、食物中毒、综述等,及时报道食品卫生领域的最新科研动向、食品安全监管、事件处理以及国内、国际有关食品卫生的政策、法律法规和标准等最新信息。

在线投稿: <http://www.zgspws.com>。欢迎投稿、欢迎订阅。

订阅:由北京报刊发行局发行,邮发代号为82-450。双月刊,每期定价18元,全年108元。可汇款到编辑部订阅过刊(免费邮寄、挂号加收3元)。

地址:北京市朝阳区潘家园南里7号 办公楼208室《中国食品卫生杂志》编辑部

E-mail: SPWS462@163.com

电话和传真: 010-67791542

邮政编码: 100021