

## 喂食转基因大豆对子代雄鼠生殖系统的影响

芦春斌<sup>1</sup>, 周文<sup>1</sup>, 刘标<sup>2</sup>

(1. 暨南大学 生命科学技术学院 发育与再生生物学系, 广东 广州 510632; 2. 环境保护部南京环境科学研究所, 江苏 南京 210042)

**摘要:** 亲代小鼠分别喂食转基因和非转基因大豆饲料, 120 d 后组内交配获得子一代小鼠。以转基因饲料喂食的亲代所繁殖的子代小鼠作为实验组, 断乳后子鼠继续喂食转基因大豆饲料; 对照组子鼠为亲代非转基因喂食组所繁殖, 断乳后继续喂食非转基因大豆饲料。分别于喂食 30、60、90、120 d 取子代小鼠的睾丸称重并计算脏器系数, 伊红法染色检测精子存活率与畸形率; 制作石蜡切片 HE 染色后观察睾丸病理学变化。结果表明: 与对照组相比, 实验组小鼠睾丸系数、精子存活率与畸形率均无显著性差异; 组织切片镜检未发现两组小鼠的睾丸出现明显病理损伤。实验结果说明转基因大豆饲料喂食 120 d 未对子代雄鼠精子质量和睾丸组织病理造成影响, 表明亲代长期喂食转基因大豆饲料后无潜在遗传毒性及积累效应。

**关键词:** 转基因大豆; 小鼠; 睾丸系数; 精子质量; 病理

**中图分类号:** S865.1

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1000-9841(2013)01-0119-05

## Effects of Transgenic Soybean on Reproductive System in Male Mice

LU Chun-bin<sup>1</sup>, ZHOU Wen<sup>1</sup>, LIU Biao<sup>2</sup>

(1. Department of Development and Regenerative Biology, College of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, Guangdong;  
2. Nanjing Institute of Environmental Sciences, Ministry of Environmental Protection, Nanjing 210042, Jiangsu, China)

**Abstract:** The parental mice were fed transgenic soybean or control diets for 120 days respectively. After mating of intramural group, the offsprings were divided into transgenic group (GM) and control group (CK) corresponding to their parents. The GM group was fed with transgenic diets while the CK group was fed conventional diets for 120 days after weaning. At 30, 60, 90 and 120 days of feeding, the coefficient of testis were weighed, the sperm viability and abnormality were analyzed, and the pathology of testis was examined after HE staining. There were no significant differences in testis coefficient and sperm quality between two groups. Additionally, no significant pathology damages were observed in testis and epididymis. Results suggest transgenic soybean have no potential reproductive toxicity and genetic additive effects on mice.

**Key words:** Transgenic soybean; Mice; Coefficient of testis; Sperm quality; Pathology

近年来,随着转基因技术的发展,转基因作物已成为农业及食品中的重要组成部分,同时,其安全性问题已受到人们的关注<sup>[1]</sup>。世界卫生组织宣布已进入商业市场的转基因作物均经过了官方的安全评估,但是目前还没有系统性的科学文献证实其安全性。目前转基因大豆食用安全性评估主要是通过动物体内实验进行,研究内容包括血液生理生化、组织病理学、分子生物学、形态学变化等,大部分研究报道均表明转基因作物是安全的<sup>[2]</sup>。De-laney 等<sup>[3]</sup>以转高油酸大豆 305423 为材料对大鼠进行亚慢性喂食,研究证明该转基因大豆对大鼠体重增长、食物利用率、死亡率、毒理学临床指标、眼科学、神经行为学、脏器系数、组织病理学等均无显著性影响。Appenzeller 等<sup>[4]</sup>以抗草甘膦大豆 356043 为材料对大鼠进行亚慢性喂食,研究表明转基因大

豆对体重增长、进食量、死亡率、神经行为学、病理学等也无显著性影响。然而,有研究发现喂食转基因饲料使动物不同脏器和组织的超微结构等发生了变化<sup>[5-7]</sup>。

目前转基因植物安全性研究主要集中于营养性能评估以及常规的毒理学变化监测,而对转基因植物对哺乳动物生殖毒性研究还较少。本课题组已对转基因大豆喂食后的亲代雄鼠生殖系统部分功能进行了初步安全性评估<sup>[8-9]</sup>,研究结果未显示转基因作物对实验动物雄性生殖功能有不良影响。本实验以长期喂食转基因饲料的亲代小鼠繁殖获得子一代小鼠,子代雄鼠喂食转基因饲料 120 d,对喂食过程中雄鼠生殖系统发育和功能变化进行评估,研究以转基因大豆饲料喂食小鼠是否具有潜在遗传积累效应及生殖毒性。

收稿日期: 2012-09-19

基金项目: 转基因生物新品种培育专项(2011ZX08012-005); 广东省科技计划项目(2010B031600108)。

第一作者简介: 芦春斌(1964-),男,副研究员,硕士生导师,研究方向为转基因与生物安全。E-mail: tcbu@jnu.edu.cn。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂与仪器

1.1.1 试剂 Bouins 固定液,中性树胶,苏木精染液,0.5% 伊红;0.9% 生理盐水,1% 伊红,0.15% 伊红。

1.1.2 仪器 全自动脱水机 (TP1020),包埋机 (KD-BM II),切片机 (Leica RM2245),展片机 (Leica HI1210),烘片机 (Leica HI1220),冷冻台 (KD-BL),光学显微镜 (Nikon, ECLIPSE TE200)。

### 1.2 实验动物分组及处理

亲代小鼠均为健康正常的昆明小白鼠(购自广东省医学动物中心),亲代动物分为转基因大豆饲料喂食组和非转基因大豆饲料喂食组,喂养 120 d 后分别组内交配,产生的子一代小鼠用于实验;子代小鼠母乳喂养 21 d 后,分为实验组 (GM) 与对照组 (CK),实验组小鼠均为亲代转基因饲料喂食组繁殖,断乳后继续喂食转基因大豆饲料;对照组小鼠均为亲代非转基因饲料喂食组繁殖,断乳后继续喂食非转基因大豆饲料。实验组与对照组雄鼠数量各 40 只;分别于喂食 30、60、90、120 d 后,各组随机处死 5 只小鼠进行实验。动物实验饲养条件为:室内温度 22 ~ 24℃,湿度 40% ~ 70%,12 h 光照,12 h 黑暗,动物自由取食饮水。

### 1.3 饲料

转基因豆粕为孟山都公司的抗除草剂大豆 GTS40-3-2,非转基因豆粕为其亲本 A5403,且转基因与非转基因豆粕均经过本实验室 PCR 检测验证,饲料委托暨南大学医学动物中心加工,各营养成分比例按照国家实验动物饲料标准 (GB 14924. 1-2001) 配置。

### 1.4 实验方法

1.4.1 睾丸系数 喂食 30、60、90、120 d 处死小鼠后取其睾丸称重 (g) 并计算其脏器系数 (睾丸系数 = 睾丸重量/小鼠体重)。

1.4.2 精子存活率与畸形率 参照朱伟杰等<sup>[10]</sup>的方法,小鼠脱臼处死后,双侧附睾尾取精子,制备精子悬液。0.15% 伊红染色后涂片,400 倍光镜下观察并计数 200 个精子,活精子头部无色,死精子头部呈红色。1% 伊红染色 15 min,涂片 2 张,自然晾干,中性树脂封片。400 倍光学显微镜下计数 500 个精子 (每张 250 个)。

1.4.3 睾丸病理切片 在不同喂食时期,处死小鼠并分别取睾丸,Bouins 固定液固定 24 h 后,经梯度酒精脱水,二甲苯透明,浸蜡包埋。切片厚度 5  $\mu\text{m}$ ,HE 染色并中性树胶封片。光学显微镜观察并拍片。

### 1.5 统计学分析

应用 SPSS 17.0 录入数据,结果以  $\bar{x} \pm s$  表示。组间差异进行方差分析后,再进行 T 检验,以  $p < 0.05$  为有显著性差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 喂食转基因大豆饲料对小鼠睾丸系数的影响

如图 1 所示,在 120 d 的喂食周期中各喂食时期实验组小鼠睾丸系数与对照组相比均无显著性差异 ( $p > 0.05$ )。说明在饲养周期内,喂食转基因大豆饲料均未对睾丸生长发育造成不良影响。

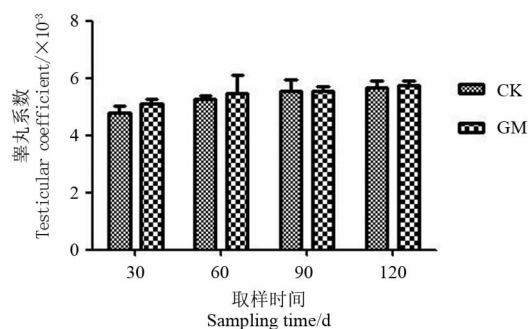


图 1 喂食转基因大豆饲料对小鼠睾丸系数的影响

Fig. 1 Effects of GM soybean on the testicular coefficient of male mice

### 2.2 喂食转基因大豆饲料对小鼠精子存活率与畸形率的影响

如图 2 所示,喂养 30、60、90、120 d 实验组小鼠精子存活率分别为 (77.473 ± 1.089)%、(78.89 ± 3.14)%、(76.17 ± 1.72)%、(73.65 ± 2.379)%,实验组和对照组存活率均较高,二者无显著性差异 ( $p > 0.05$ )。如图 3 所示,喂食 30、60、90、120 d 后实验组小鼠精子畸形率分别为 (5.707 ± 0.536)%、(6.51 ± 1.75)%、(8.99 ± 1.68)%、(6.645 ± 0.897)%,与对照组相比无显著性差异 ( $p > 0.05$ );各类型畸形精子比例不均,无定形精子数量最多,其次为小头精子、香蕉型与无勾精子,双头、双尾精子数量极少。图 4-A 和图 4-B 分别示精子存活率染色与畸形率染色,图 4-C 和图 4-D 为观察到的主要畸形精子形态。实验结果表明在 30、60、90、120 d 喂食实验中,喂食转基因大豆饲料未对小鼠附睾尾精子存活率与畸形率造成影响。

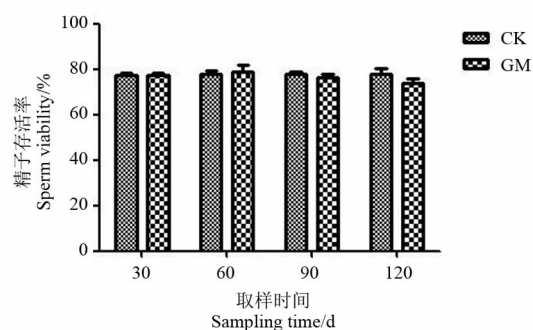


图2 转基因大豆对小鼠精子存活率的影响

Fig.2 Effects of GM soybean on sperm viability of male mice

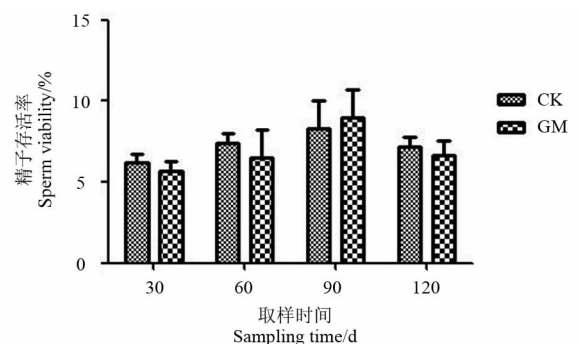
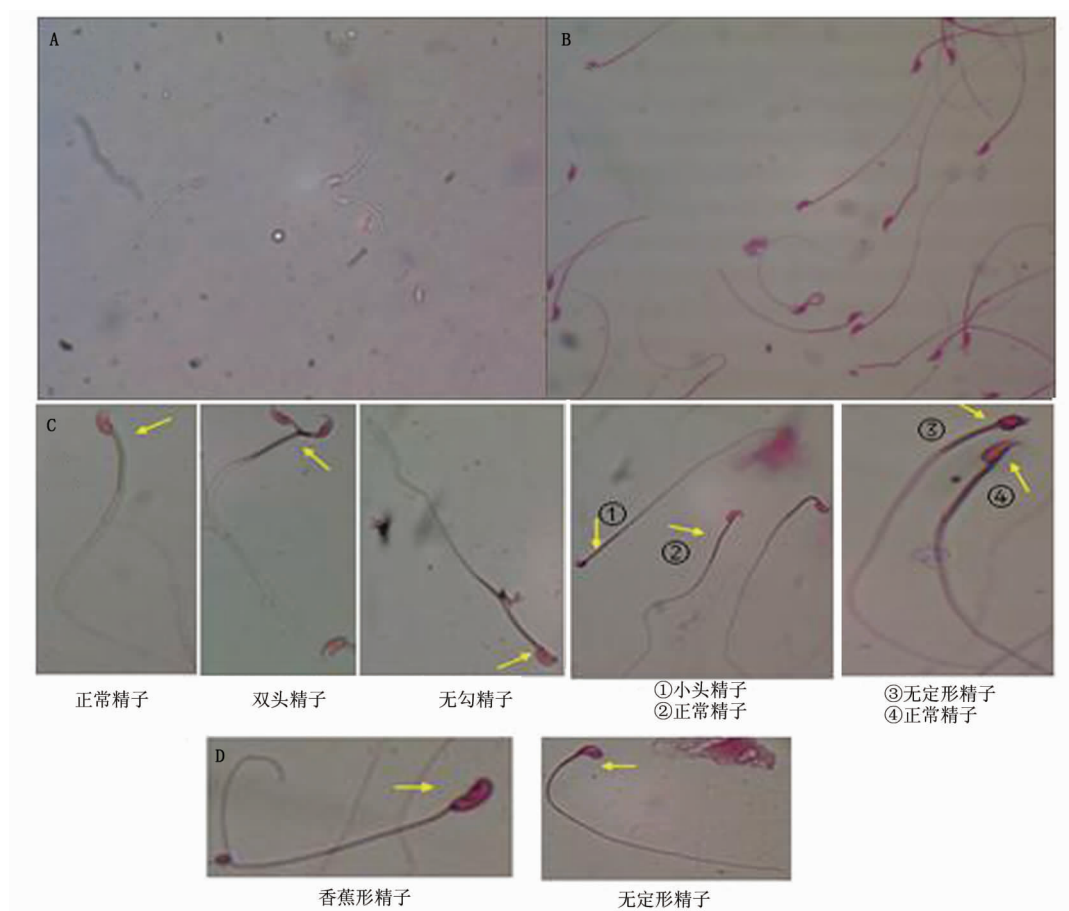


图3 转基因大豆对小鼠精子畸形率的影响

Fig.3 Effects of GM soybean on sperm abnormality of male mice



A. ( $\times 400$ , Nikon)精子存活率染色,头部无色或淡红色精子为活精子,头部暗红色精子为死精子。B. ( $\times 400$ , Nikon)精子畸形率染色实验,精子头部均呈均匀红色。C, D 主要观察到的畸形精子类型,包括双头、无钩、小头、香蕉形、无定形精子等。

A ( $\times 400$ , Nikon) showed the viability stain, the dead sperm was stained red in head while the live one was non-staining or lightly stained. B ( $\times 400$ , Nikon) showed the abnormality stain, all sperms were stained deep red. C and D showed various sperms observed in the abnormality assay, such as double-head, no-hook, capitulum, banana-shap and amorphous sperm.

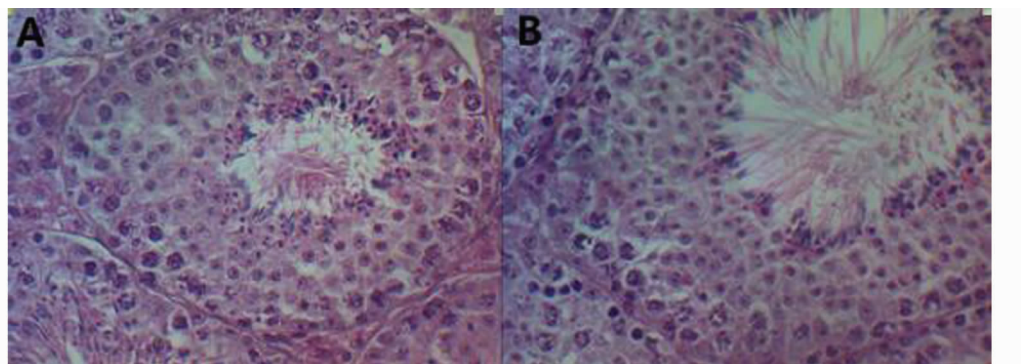
图4 精子染色图片

Fig.4 Pictures of dyeing sperm

### 2.3 喂食转基因大豆饲料对小鼠睾丸组织结构的影响

喂食 120 d 的 HE 染色结果表明,实验组与对照组小鼠睾丸结构均正常;可见睾丸曲细精管之间连接紧密,无管腔收缩现象;精管内生精细胞层次宽,

细胞排列规则,从基底膜至管腔可见精原细胞、精母细胞、精细胞、精子及镶嵌其中的支持细胞,管外间质均匀可见正常间质细胞;管腔中心未见明显的脱落细胞,腔面形状大小正常(图 5A、B),120 d 喂食后小鼠睾丸结构无明显病理变化。



A. 对照组小鼠睾丸(×400, Nikon); B. 实验组小鼠睾丸(×400, Nikon)。

A and B respectively showed the HE-stain results of testis of control and GM groups(×400, Nikon).

图5 喂食转基因大豆饲料对小鼠睾丸组织结构的影响

Fig. 5 Effects of GM soybean on testis structure of mice

### 3 讨论

精子的存活率与畸形率直接反映精子质量,是精子质量评价的重要指标;附睾尾精子与射精所得精子成熟度类似,因此实验选用附睾尾取精。实验结果表明,伊红浓度高低直接影响精子着色程度,多次预实验确定以 0.15% 伊红染色检测精子存活率,实验组与对照组小鼠精子存活率均为 71.27%~82.03%,但考虑到附睾组织中精子的生理生化环境与实验环境的差异,对精子的实际存活率会产生影响,附睾组织中精子存活率应高于实验中的 82%。

精子畸形是实验室评价环境理化因素对雄性哺乳动物生殖细胞遗传损伤的一种常见方法,精子形态学相关的异常和畸形反映了其生殖能力的变化及毒物的生殖毒性和对生殖细胞潜在的致突变性。实验结果发现精子存活率与畸形率均处于正常范畴,与对照组比较亦无显著性差异,表明 30、60、90、120 d 喂食转基因大豆不会影响小鼠精子存活率与畸形率。Xing 等<sup>[12]</sup>研究发现多代喂食小鼠转基因大米未对精子各项参数造成影响;张琳晗等<sup>[13]</sup>研究报道短期喂食小鼠转 Bt 玉米未对小鼠精子畸形率、早晚期胚胎畸形率造成影响。

精子生成过程涉及 DNA 合成、细胞分化和一些复杂的分子功能,检测动物睾丸发育情况常用于毒理学研究<sup>[11]</sup>。长期喂食转基因大豆饲料是否会对睾丸组织的发育和功能造成病理性伤害是转基因作物安全评价的重要内容。迄今为止,相关研究<sup>[16-17]</sup>表明长期持续喂食转基因大豆并不会引起动物组织器官病理学变化。Zhou 等<sup>[12]</sup>连续喂食三代小鼠 L-赖氨酸水稻,未发现附睾与睾丸出现病理

损伤。唐茂芝等<sup>[18]</sup>评估了转基因棉籽的食用安全性,未发现大鼠睾丸、卵巢等组织出现病理损伤。本实验中,连续喂食子代小鼠抗草甘膦大豆 4 个月,制作睾丸组织切片后 HE 染色,镜检结果显示,实验组与对照组睾丸组织均未出现明显病理损伤。表明喂食转基因大豆饲 120 d 的长期喂食不会对雄鼠生殖器官造成明显病理损伤。

多代喂食实验主要目的在于研究转基因作物喂食亲代后是否会对下一代造成影响。Aysun 等<sup>[19]</sup>连续喂食三代小鼠 Bt 玉米后发现,脏器相对重量无显著变化,而在肝、肾组织发现轻微病理损伤;Brake 等<sup>[20]</sup>连续喂食大鼠亲代抗草甘膦大豆,检测子一代胎鼠、出生后、青春期及成年各阶段睾丸发育情况,结果未发现显著影响;Haryu 等<sup>[21]</sup>多代喂食小鼠 Bt11 玉米并检测小鼠生长曲线、断乳周期和繁殖能力,结果未发现显著性影响。本课题组前期对亲代小鼠进行了 90 d 喂食实验,结果表明未对亲代雄鼠脾脏细胞体外增殖、睾丸发育及组织结构造成影响<sup>[8-9]</sup>;而本实验研究喂食转基因大豆后子一代小鼠发育情况,小鼠离乳后按亲代喂食方式喂食,在多个喂食时期进行安全评估,试图探讨长期喂食转基因大豆饲料后是否会通过亲代母乳、遗传细胞而积累形成遗传毒性,研究结果显示子一代雄鼠睾丸系数、睾丸发育及精子质量、生殖器官组织结构等均未发现影响。初步表明喂食转基因大豆饲料应不具备遗传积累效应,同时也说明喂食 120 d 转基因大豆对于雄鼠生殖器官组织结构及雄性生殖细胞发生等无影响、对于成熟精子也无致突变性。

### 参考文献

- [1] Domingo J L. Health risks of GM foods: many opinions but few data

- [J]. Science, 2000, 288 (5472): 1748-1749.
- [2] Domingo J L, Bordonaba J G. A literature review on the safety assessment of genetically modified plants [J]. Environment International, 2011, 11: 317-324.
- [3] Delaney B, Appenzeller L M, Munley S M, et al. Subchronic feeding study of high oleic acid soybeans (event DP-305423-1) in Sprague-Dawley rats [J]. Food and Chemical Toxicology, 2008, 46: 3808-3817.
- [4] Appenzeller L M, Munley S M, Hoban D, et al. Subchronic feeding study of herbicide-tolerant soybean DP-356043-5 in Sprague-Dawley rats [J]. Food and Chemical Toxicology, 2008, 46: 2201-2213.
- [5] Magaña-Gómez J A, López Cervantes G, Yepiz-Plascencia G, et al. Pancreatic response of rats fed genetically modified soybean [J]. Journal of Applied Toxicology, 2008, 28: 217-226.
- [6] Malatesta M, Boraldi F, Annovi G, et al. A long-term study on female mice fed on a genetically modified soybean: effects on liver ageing [J]. Histochemistry and Cell Biology, 2008, 130: 967-977.
- [7] Vecchio L, Cisterna B, Malatesta M, et al. Ultrastructural analysis of testes from mice fed on genetically modified soybean [J]. European Journal of Histochemistry, 2004, 48: 448-454.
- [8] 芦春斌, 杨冬宇, 刘标. 转基因大豆对雄性鼠生殖系统的安全性评估 [J]. 扬州大学学报, 2012, 33 (1): 24-27. (Lu C B, Yang D Y, Liu B, et al. Safety assessment of reproductive system in male mice fed with genetically modified soybeans [J]. Journal of Yangzhou University, 2012, 33 (1): 24-27. )
- [9] 芦春斌, 张伟, 刘标. 抗草甘膦转基因大豆饲料对雄性小鼠脾淋巴细胞体外增殖的影响 [J]. 大豆科学, 2012, 31 (2): 292-294. (Lu C B, Zhang W, Liu B, et al. Effects of transgenic soybean feed on proliferation spleen lymphocyte in male mice [J]. Soybean Science, 2012, 31 (2): 292-294. )
- [10] 朱伟杰, 陈秋菊, 李菁. 小鼠精子 3 种活体染色法的比较分析 [J]. 中国优生与遗传杂志, 2003, 11 (3): 108-109. (Zhu W J, Chen Q J, Li J. Comparison of three supravital stains for mouse sperm [J]. Chinese Journal of Birth Health & Heredity, 2003, 11 (3): 108-109. )
- [11] Janca F C, Jost L K, Evenson D P. Mouse testicular and sperm cell development characterized from birth to adulthood by dual parameter flow cytometry [J]. Biology of Reproduction, 1986, 34: 613-623.
- [12] Zhou X H, Dong Y, Wang Y, et al. A three generation study with high-lysine transgenic rice in Sprague-Dawley rats [J]. Food and Chemical Toxicology, 2012, 50: 1902-1910.
- [13] 张琳哈, 李赞, 许超, 等. 转 *Bt* 基因玉米的生殖毒性评价 [J]. 玉米科学, 2010, 18 (2): 27-29. (Zhang L H, Li Z, Xu C, et al. Effects of genetically modified *Bt* corn on inherited toxicity in mice [J]. Journal of Maize Sciences, 2010, 18 (2): 27-29. )
- [14] 朱虎. 流式细胞仪在睾丸生精过程研究中的应用 [J]. 国外医学计划生育分册, 2001, 20 (1): 23-27. (Zhu H. The application of FCM in the development of testis spermatogenesis [J]. Foreign Medical Sciences (Family Planning Fascicle), 2001, 20 (1): 23-27. )
- [15] Denise G B, Robert T, Donald P E, et al. Evaluation of *Bt* corn on mouse testicular development by dual parameter flow cytometry [J]. Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52: 2097-2102.
- [16] Malatesta M. Animal feeding trials for assessing GMO safety: answers and questions [J]. CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources, 2009, 4 (68): 1-13.
- [17] Chelsea S, Aude B, Berge J P, et al. Assessment of the health impact of GM plant diets in long-term and multigenerational animal feeding trials: A literature review [J]. Food and Chemical Toxicology, 2012, 50: 1134-1148.
- [18] 唐茂芝, 黄昆仑, 周可, 等. 转基因棉籽的食用安全性及对大鼠抗氧化系统影响的研究 [J]. 食品科学, 2006, 27 (6): 216-219. (Tang M Z, Huang K L, Zhou K, et al. Study on food safety of transgenic cotton seed and effects on antioxidant activity of rats [J]. Food Science, 2006, 27 (6): 216-219. )
- [19] Kilic A, Akay M T. A three generation study with genetically modified *Bt* corn in rats: Biochemical and histopathological investigation [J]. Food and Chemical Toxicology, 2008, 46: 1164-1170.
- [20] Denise G B, Donald P E. A generational study of glyphosate-tolerant soybeans on mouse fetal, postnatal, pubertal and adult testicular development [J]. Food and Chemical Toxicology, 2004, 42: 29-36.
- [21] Haryu Y, Taguchi Y, Itakura E, et al. Longterm biosafety assessment of genetically modified plant: the genetically modified insect-resistant Bt11 corn does not affect the performance of multi-generations or life span of mice [J]. Open Plant Science, 2009, 3: 49-53.