论文

基于手性 *D*-氨基酸的毒理性对转基因食品安全性的研究

张志昆^①, 袁龙飞^①, 刘庆菊^①, 蔡波太^①, 李向军^①, 赵红^①, 董亚蕾^①, 杨镜奎^{①*}, 何裕建^{①②*}, 赵亮^③, 董树清^③

① 中国科学院大学化学与化工学院, 北京 100049

② 北京大学天然药物及仿生药物国家重点实验室, 北京 100191

③ 中国科学院兰州化学物理研究所, 兰州 730000

*通讯作者, E-mail: jkyang@ucas.ac.cn; heyujian@ucas.ac.cn

收稿日期: 2014-05-31; 接受日期: 2014-06-30; 网络版发表日期: 2014-11-26

doi: 10.1360/N032014-00048

摘要 转基因食品安全性是国内外广泛关注与争议的问题之一. 根据“实质等同性”原则, 本文基于手性 *D*-氨基酸(DAA)形成机制对抗除草剂草甘膦和抗虫 Bt 蛋白转基因的食品安全性进行了风险评估. 与传统非转基因作物相比, 除草剂草甘膦或 Bt 蛋白由于具有较强的金属络合能力, 因此在本质上促使土壤中金属离子较多地进入转基因作物体内, 然后诱导 *D*-海因酶的活性增加从而产生更多的 DAA. 体外研究发现, DAA、*D*-氨基酸氧化酶(DAAO)和亚铁离子(Fe^{2+})同时存在时, 将损伤 DNA、*L*-抗坏血酸(V_C)和生育酚(V_E)等. 而 DAA 在 DAAO 存在下产生的 H_2O_2 也可诱导损伤 V_C . 在有机相与水相界面, V_E 能够将 Fe^{3+} 还原为 Fe^{2+} , Fe^{2+} 与 DAA、DAAO 一起产生的 $\cdot\text{OH}$ 也可损伤 DNA. 细胞实验表明, 相比于 *L*-氨基酸(LAA), DAA 能够明显抑制细胞生长. 因此, 即使不考虑转基因食品中相对高含量的草甘膦或 Bt 蛋白、重金属离子的生物安全性, 仅从 DAA 在转基因食品中的客观相对高的含量及其诱导损伤 DNA、 V_C 和 V_E 的毒理性效应考虑, 转基因食品 and 传统食品的成分不实质等同, 自然其安全性也不实质等同.

关键词

转基因食品

D-氨基酸

DNA 损伤

 V_C V_E

1 引言

转基因技术是人类认识与改造自然的重要成果, 其技术本身无可争议. 然而, 当转基因技术用于食品方面时, 其安全性问题须谨慎对待^[1,2]. 自 1997 年至今, 我国进口转基因食品中, 转基因大豆已占我国大豆市场的 80% 以上, 而其中 90% 以上用于制取食用大豆油^[3]. 目前, 市场上转基因食品(如大豆、玉米、大米等)主要分为三类: 抗除草剂(主要为草甘膦)转

基因食品、抗虫(主要含 Bt 蛋白)转基因食品、其他类型(如维生素补充、抗除草剂与抗虫结合、抗旱与抗病毒等)转基因食品.

本文根据“实质等同性”原则^[4,5], 主要针对目前中国市场上消费最多的抗除草剂转基因大豆及其大豆油, 进行化学成分分析以及毒理与安全性评估.

国际上, 对转基因食品的安全评价方法主要有 3 种: 结果评价法、过程评价法、结果与过程相结合评价法. 其核心均是“实质等同性”原则(substantial

equivalence), 即如果某个新食品的成分与传统非转基因食品的成分等同, 那么它们同等安全. 反之, 为实质不等同, 安全性不同^[4, 5].

对于转基因食品的安全性, 国内外一直存在两极的激烈争议^[2, 6, 7]. 转基因公司在小白鼠身上进行的实验一般只持续 90 天. 2012 年, Seralini 等^[6, 7]报道, 用孟山都公司的抗草甘膦“NK603”转基因玉米喂养 200 只小白鼠进行了长达两年的实验. 结果表明, 实验小白鼠普遍患上乳腺癌, 并出现肝脏衰竭现象, 50% 的雄鼠和 70% 的雌鼠提前死亡. 但支持转基因食品者却认为, 这个比孟山都公司更严谨细致的研究是有漏洞的^[7].

我们认为, 与传统非转基因作物相比, 转基因作物体内残留的除草剂(草甘膦、草铵膦等)和含有丰富酸性氨基酸的 Bt 蛋白具有较强的金属络合能力, 种植过程中在本质上会促使土壤中金属离子较多地进入作物体内, 然后诱导 D-海因酶的活性增加从而产生较多的 D-氨基酸(DAA)^[8]. 考虑到除草剂和 Bt 蛋白的残留、重金属离子和手性 DAA 等有害物质分别在转基因食品中的毒理性, 转基因食品的安全性值得重新认真评估. 除草剂(草甘膦、草铵膦等)和 Bt 蛋白残留的毒理性在国内外已有许多报道^[6, 9~12]. 本课题组最近的工作表明, 重金属与草甘膦在抗除草剂转基因食品中含量相对较高, 并且草甘膦能分别与组蛋白、精蛋白和胰岛素作用, 破坏其相关功能, 存在潜在的致癌、致不孕不育、致糖尿病等风险. 迄今, 关于普通食品中 DAA 的起源与毒理性的研究较多^[2, 7], 但从 DAA 角度研究评估转基因食品成分及安全性的工作很少.

本文首先测定了市场上消费最多的转基因大豆油中的 DAA 含量, 然后模拟生理环境研究了 DAA 如何通过人体内普遍存在的、以 DAA 为专一性底物的 D-氨基酸氧化酶(DAAO)催化氧化作用引起 DNA、L-抗坏血酸(V_C)和生育酚(V_E)的损伤, 同时考察了其对细胞生长的影响, 从 DAA 的毒理性角度重点关注和评估了抗草甘膦转基因大豆和大豆油的潜在危害.

2 实验部分

2.1 试剂与仪器

D-和 L-丙氨酸(Ala, > 98.0%)购自 TCI (中国). D-, L-精氨酸(Arg, > 99.0%)、D-和 L-组氨酸(Ser, >

99.0%)、4-氨基安替比林(4-AAP, 98.0%)和 3,5-二氯-2-羟基苯磺酸钠(DHBS, 99.0%)购自百灵威科技有限公司(中国); 猪肾 D-氨基酸氧化酶(pkDAAO)、小牛胸腺 DNA 和过氧化物酶(POD)均购自 Sigma Aldrich (美国); V_C、V_E 和无氨基酵母氮源培养基(YNB)购自 Solarbio (中国); 甲醇(一级色谱纯)购自天津四友公司(中国). 实验用水均为二次蒸馏水(电导率 ≥ 18 MΩ cm).

UV-2550 型紫外-分光光度计(Shimadzu, 日本), 数显型磁力搅拌器(Dragon Lab, 中国), 凝胶电泳仪(Junyi, 中国), GIAS-4400 凝胶成像系统(北京炳洋科技有限公司, 中国), Gi54DWS 高压灭菌器(Zealway, 美国), LC-20AT 高压液相色谱仪(Shimadzu, 日本).

2.2 食品中 DAA 含量的酶偶联法检测

酶偶联显色剂用 0.1 mol/L pH 7.7 PBS 配制, 其中含 4-AAP、DHBS、pkDAAO 和 POD. 显色剂与样品混合后, 上述各物质浓度依次为: 4-AAP 0.4 mmol/L, DHBS 2.0 mmol/L, DAAO 228 U/L, POD 1500 U/L. 酶偶联法原理为以下两反应耦合:

分别配制 L-Ala 和 D-Ala 标准水溶液, 浓度均依次为 10 mmol/L、1 mmol/L、100 μmol/L、10 μmol/L、1 μmol/L. 显色剂与 1 mL 标准样溶液混合均匀, 37℃ 水浴 30 min, 对样品进行 UV 测定.

用乙醇、水分别与食用油等比例混合均匀, 静置分层. 乙醇提取法取上层乙醇相, 80℃ 敞口水浴将乙醇蒸干, 产物溶解于 700 μL 超纯水中. 水提取法取下层水相. 显色剂分别与食用油、食用油乙醇提取物水溶液、食用油水提取物混合均匀, 37℃ 水浴 30 min, 对样品进行 UV 测定.

2.3 DAA 在 DAAO 催化下对 DNA 的损伤

已有工作表明, H₂O₂ 与 Fe²⁺ 作用产生具有高氧化活性的羟基自由基(·OH), 它可氧化损伤 DNA^[13, 14]. 本文模拟体内环境, 探讨 Fe²⁺ 存在下, DAA 和 pkDAAO 反应产生的·OH 对小牛胸腺 DNA 的损伤.

用 0.01 mol/L pH 7.4 PBS 缓冲溶液配制 Fe²⁺、H₂O₂ 和小牛胸腺 DNA 混合溶液, 溶液最终含有 50 μg/mL DNA 和不同浓度的 Fe²⁺ 和 H₂O₂ (1:1, 摩尔比), 溶液置于 37℃ 水浴中恒温保持 20 min. 琼脂糖凝胶

电泳对 DNA 片段分离, 以溴化乙锭(0.5 $\mu\text{g/mL}$)对其染色并用凝胶电泳成像系统测定(激发光为 312 nm). 所用凝胶质量浓度为 1%, 电泳时间 40 min, 电泳缓冲液为(1 $\times$ TAE). 探讨了 $\cdot\text{OH}$ 对小牛胸腺 DNA 的损伤.

中性 *D*-Ala、碱性 *D*-Arg 分别与 Fe^{2+} 、pkDAAO 加入到小牛胸腺 DNA 溶液中, 混合溶液最终含 50 $\mu\text{g/mL}$ DNA, 0.2 mmol/L Fe^{2+} 和一定浓度的 DAA、pkDAAO 混合溶液, 溶液置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中恒温保持 40 min, 测定 DNA 损伤程度. 探讨 0.01 mol/L pH 7.4 PBS 溶液中 DAA、DAAO 和 Fe^{2+} 共存下反应产生的 $\cdot\text{OH}$ 对小牛胸腺 DNA 的影响.

2.4 DAA 在 DAAO 催化下对 V_C 的损伤

用 0.01 mol/L pH 7.4 PBS 缓冲溶液配制 H_2O_2 与不同浓度 V_C 的 4 组混合溶液, 各溶液中 H_2O_2 浓度均为 0.2 mmol/L, V_C 浓度依次为 0、0.1、0.2 和 0.4 mmol/L. 混合溶液静置 10 min, 依据上述酶偶联法中的第二步反应测定 H_2O_2 浓度.

取不同量 *D*-Ala、pkDAAO、 Fe^{2+} 和 V_C 加入到小牛胸腺 DNA 溶液中, 溶液最终含 50 $\mu\text{g/mL}$ DNA、0.2 mmol/L Fe^{2+} 、0.2 mmol/L V_C 和不同浓度的 *D*-Ala、pkDAAO, 以 V_C 浓度为 0 的溶液为对照. 将上述溶液置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中恒温保持 40 min, 测定 DNA 损伤程度. 探讨 *D*-Ala、DAAO、 Fe^{2+} 存在时, V_C 对 DNA 的影响.

人体血浆中 V_C 浓度约 50 $\mu\text{mol/L}$ ^[15], 取不同量 V_C 、*D*-Ala 和 pkDAAO 加入到 0.01 mol/L pH 7.4 PBS 缓冲溶液中, 溶液最终含 0.051 mmol/L V_C 和不同浓度 *D*-Ala、pkDAAO, 将混合溶液置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中保持 30 min, UV 测定 V_C 含量. 探讨 DAA 代谢产生的 H_2O_2 对 V_C 的定量影响.

2.5 DAA 在 DAAO 催化下对 V_E 的损伤

V_E 是一种脂溶性的抗氧化剂^[16,17], 本实验用乙

醇将 V_E 均匀分散到 PBS 缓冲溶液中. 取不同量的 V_E 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 H_2O_2 加入到 0.01 mol/L pH 7.4 PBS 溶液中, 样品中各物质浓度如表 1 所示. 考察 0.01 mol/L pH 7.4 PBS 溶液中 H_2O_2 及 $\cdot\text{OH}$ 对 V_E 的影响和水相及有机相中 V_E 对 Fe^{3+} 的影响.

取不同量 Fe^{2+} 、*D*-Ala、pkDAAO、 V_E 加入到小牛胸腺 DNA 溶液中, 其最终浓度分别为 50 $\mu\text{g/mL}$ DNA、0.2 mmol/L Fe^{2+} 、0.8 mmol/L *D*-Ala、0.08 U/mL pkDAAO 和 0 mmol/L V_E , 以 0.2 mmol/L V_E 溶液为对照. 探讨 Fe^{2+} 、DAA 和 DAAO 存在时, V_E 对 DNA 的影响. 取不同量的 Fe^{3+} 、*D*-Ala、pkDAAO、 V_E 加入到小牛胸腺 DNA 溶液中, 溶液最终含 50 $\mu\text{g/mL}$ DNA、0.2 mmol/L Fe^{3+} 、0.8 mmol/L *D*-Ala、0.08 U/mL pkDAAO 和 0.2 mmol/L V_E , 以 0 mmol/L V_E 溶液为对照. 探讨 Fe^{3+} 、*D*-Ala、pkDAAO 存在时, V_E 对 DNA 的影响. 上述各样品溶液均被置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴 40 min 后, 测定 DNA 损伤程度.

取一定量 V_E 溶液和 Fe^{2+} 、 H_2O_2 , 配制成 0.86 mmol/L V_E 和不同浓度的 Fe^{2+} - H_2O_2 水溶液(摩尔比为 1:1), 探讨 $\cdot\text{OH}$ 对 V_E 的定量影响. 采用 HPLC 对样品中 V_E 进行测定, 分析条件: 色谱柱 C18, 流动相为甲醇 100%, 流速为 1.0 mL/min, 进样量为 10 μL .

2.6 *D*和 *L*-氨基酸对细胞生长的影响

分别取等量同源酵母菌加入到 25 mL YNB 液体培养基中, 然后向其中加入不同浓度的 *L*、*D*-Arg 和 *L*、*D*-His, 以无氨基酸 YNB 液体培养基培养的酵母菌为对照样品(Control), YNB 培养基组成为: 0.67 g YNB/100 mL 水溶液, 2.00 g 葡萄糖/100 mL 水溶液. 30 $^{\circ}\text{C}$ 恒温摇床培养箱中培养酵母菌 36 h, 将其稀释 1000 倍后, 用涂布珠将 50 μL 上述菌液均匀涂布在固体培养基上, 恒温培养箱(30 $^{\circ}\text{C}$)中培养 36 h, 拍照查看酵母生长情况. 实验重复 3 次, 并对结果进行显著性分析.

考察 *D*-Arg、*L*-Arg、*D*-His 及 *L*-His 在 70 $\mu\text{mol/L}$

表 1 $\cdot\text{OH}$ 和 Fe^{3+} 与 V_E 作用的实验条件

样品序号	1	2	3	4	5	6	7
溶液	PBS	PBS	PBS	PBS	EtOH	PBS	EtOH
V_E (mmol/L)	0.6	0.6	0.6	0.2	0.2	0.2	0.2
H_2O_2 (mmol/L)	0	0.6	0.6	0	0	0	0
Fe^{2+} (mmol/L)	0	0	0.6	0	0	0	0
Fe^{3+} (mmol/L)	0	0	0	0	0	0.2	0.2

浓度下的 YNB 培养基中, DAA 与 LAA 相比对 HeLa 宫颈癌细胞生长的抑制作用(2 天). 实验重复 3 次, 对结果进行显著性分析.

3 结果与讨论

3.1 食品中 DAA 的含量测定

本实验采用酶偶联法测定食品中的 DAA. DAAO 是一种以黄素腺嘌呤(FAD)为辅基的典型黄素蛋白酶类, 其最适活性 pH 为 6.5~8.5, 30℃能够保持活力至少 2 h. 它对 LAA 不识别, 但能够特异地催化 *D*- α -氨基酸氧化为 α -酮酸并产生 H_2O_2 ^[18]. H_2O_2 在 4-AAP 和 DHBS 存在下被 POD 催化产生红色亚醌类物质和水. 基于 DAAO 的催化特性, 酶偶联法测定 DAA 具有较高的专一性.

L-Ala、*D*-Ala 标准水溶液测定结果如图 1 所示. 图 1(a)中 *L*-Ala 标准溶液(1、2、3、4、5 号)的 A_{512} 与 11 号水溶液的 A_{512} 相同, 而 *D*-Ala 标准溶液(6、7、8、9、10、11 号) A_{512} 随其浓度的降低而减小, 且酶偶联法检测下限可达到 1×10^{-6} mol/L. 图 1(b)中 1~5 号 *L*-Ala 水溶液加入显色剂后始终保持无色; 6~10 号溶液中有红色物质生成, 且红色随 *D*-Ala 的浓度降低

图 1 酶偶联法测定 LAA、DAA 标准溶液. 1, 10 mmol/L *L*-Ala; 2, 1 mmol/L *L*-Ala; 3, 0.1 mmol/L *L*-Ala; 4, 0.01 mmol/L *L*-Ala; 5, 0.001 mmol/L *L*-Ala; 6, 10 mmol/L *D*-Ala; 7, 1 mmol/L *D*-Ala; 8, 0.1 mmol/L *D*-Ala; 9, 0.01 mmol/L *D*-Ala; 10, 0.001 mmol/L *D*-Ala; 11, 水和酶; 12, 水对照样品

逐渐变浅. 可见酶偶联法测定 DAA 具有较高的专一性.

采用酶偶联法测定目前市场上转基因与非转基因大豆油中 DAA 的含量, 结果表明, 转基因大豆油的(第 4、6、7、9、10、12 管)提取产物水溶液比非转基因大豆油/花生油(第 5、8、11 管)的提取产物水溶液有更明显的颜色反应(图 2), 其 DAA 总浓度为 10^{-6} ~ 10^{-5} mol/L.

3.2 DAA 在 DAAO 催化下对 DNA 的损伤效应

本实验利用 Fenton 反应产生 $\cdot OH$, 探讨了溶液中 $\cdot OH$ 对小牛胸腺 DNA 的影响, 凝胶电泳结果如图 3 所示. 结果表明, 随着 Fe^{2+} - H_2O_2 的浓度增大, DNA 片段减少, DNA 的氧化损伤程度增加. 当 Fe^{2+} - H_2O_2 浓度为 3.5 mmol/L 时, DNA 出现严重损伤. Fe^{2+} 与 H_2O_2 反应速率较快($k = 76$ L/(mol s)), 产生高活性 $\cdot OH$, 其存在时间较短(半衰期 10^{-9} s)^[19]. 由此可知, 溶液中 Fe^{2+} 与 H_2O_2 反应产生高活性 $\cdot OH$, 且在短时间内可损伤小牛胸腺 DNA.

普通 DAAO (包括 pkDAAO) 对不同 DAA 的代谢活

图 2 市售食用油样品中 DAA 的含量测定. 1, 1 mmol/L *D*-Ala; 2, 100 μ mol/L *D*-Ala; 3, 10 μ mol/L *D*-Ala; 4, 直接混合油 a; 5, 直接混合油 b; 6, 直接混合油 c; 7, 水萃取油 a; 8, 水萃取油 b; 9, 水萃取油 c; 10, 乙醇萃取油 a; 11, 乙醇萃取油 b; 12, 乙醇萃取油 c. a 为转基因大豆油品牌 1; b 为非转基因大豆油/花生油; c 为转基因大豆油品牌 2

图 3 $\cdot OH$ 对 DNA 损伤效应凝胶电泳图. M 为 Marker; 1~7, 溶液中 Fe^{2+} - H_2O_2 浓度依次为 0、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5 mmol/L

性不同, 酸性 DAA 主要由天门冬氨酸氧化酶氧化^[20]. 本文探讨了中性 *D*-Ala、碱性 *D*-Arg 分别与 pkDAAO、 Fe^{2+} 作用产生 $\cdot\text{OH}$ 对小牛胸腺 DNA 的损伤效应.

D-Ala、pkDAAO 和 Fe^{2+} 对小牛胸腺 DNA 的损伤效应如图 4(a) 所示. 结果表明, 随 *D*-Ala 浓度的增加, DNA 片段减少, DNA 的氧化损伤程度不断增加. 其原因在于溶液中 *D*-Ala 被 pkDAAO 催化氧化, 产物 H_2O_2 与 Fe^{2+} 不断反应产生 $\cdot\text{OH}$, 从而损伤 DNA. 本文使用的 pkDAAO 为中性 DAAO, 实验通过酶偶联法验证了 pkDAAO 也可催化氧化碱性 *D*-Arg. *D*-Arg 的存在对小牛胸腺 DNA 的损伤结果如图 4(b) 所示, 与 *D*-Ala 相近, DNA 损伤程度随 *D*-Arg 浓度增加而增大. 由此可知溶液中 Fe^{2+} 、中性(碱性)DAA 和 pkDAAO 可产生 $\cdot\text{OH}$ 并损伤 DNA, 损伤程度随 DAA 浓度增加而增大.

根据图 4 中 DNA 条带的光密度值可计算得 DNA 的损伤程度(图 5). *D*-Ala 和 *D*-Arg 浓度为 0.05 mmol/L 时, DNA 损伤程度分别为 8.49% 和 2.11%. 实验用 DAAO 为中性 pkDAAO, 相同浓度 *D*-Ala 和 *D*-Arg 时, *D*-Ala 对 DNA 损伤较严重.

正常人体血清所含 DAA 的 $R_{\text{D/L}}$ ($R_{\text{D/L}}$ 为 DAA 与相对应 LAA 浓度比值) 低于 1.77%^[21]. 年轻人(42 ± 4

岁) 血浆中的 DAA 浓度为 $2.5 \pm 1.8 \mu\text{mol/L}$, 老年人(76 ± 6 岁) 血浆中所含 DAA 浓度为 $6.9 \pm 4.8 \mu\text{mol/L}$. 老年人血浆中 DAA 含量明显高于年轻人, 即 DAA 血浆浓度与机体衰老正相关. 而患有肾病的病人体内血浆 DAA 浓度可高达 $52.6 \mu\text{mol/L}$, DAA 血浆浓度与肾病明显相关^[22, 23]. 转基因大豆油中 DAA 为 $1 \sim 10 \mu\text{mol/L}$, 按每人每天摄入量 25 g 计算, 如果其中 DAA 代谢产物转化成 $\cdot\text{OH}$ 并对 DNA 进行损伤, 则可损伤 $1 \times 10^{15} \sim 2 \times 10^{15}$ 个核苷酸. 另考虑到 DAA 对 DNA 的损伤有积累效应, 并且一个核苷酸的损伤即可能使整条 DNA 链功能失常, 因此, 转基因食用油中 DAA 对 DNA 的损伤度令人担忧.

3.3 DAA 在 DAAO 催化下对 V_C 的损伤效应

V_C 具有较强的抗氧化能力, 在体内能够保护 DNA、蛋白质等物质不被氧化损伤^[24, 25]. 用 0.01 mol/L pH7.4 PBS 缓冲溶液配制标准 H_2O_2 溶液, 浓度依次为 0.1、0.2、0.4、0.6 mmol/L. 采用酶-UV 法测定溶液中 H_2O_2 含量, 其 A_{512} 与 H_2O_2 浓度呈正比关系, 此方法的可靠性和准确性均较好.

用 0.01 mol/L, pH 7.4 PBS 缓冲溶液配制 H_2O_2 和不同浓度的 V_C 混合溶液, 初步探讨了缓冲液中 H_2O_2 对 V_C 的损伤效应, 结果见表 2. H_2O_2 紫外吸收值随

图 4 *D*-Ala (a) 和 *D*-Arg (b) 分别与 pkDAAO、 Fe^{2+} 共存时对 DNA 损伤效应的凝胶电泳图. M 为 Marker; 1~7, *D*-Ala 和 *D*-Arg 浓度均依次为 0、0.05、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8 mmol/L

图 5 DNA 损伤程度随中性 *D*-Ala 和碱性 *D*-Arg 的浓度变化曲线

V_C 加入量的增加而减小, 表明 0.01 mol/L pH 7.4 PBS 缓冲液中低氧化活性的 H_2O_2 能够与 V_C 反应. 即可知 DAAO 催化 DAA 代谢产生 H_2O_2 时, 将直接损伤 V_C .

Fe^{2+} 、 $D-Ala$ 和 $pkDAAO$ 存在时, 溶液中 V_C 对 DNA 的影响如图 6 所示. 与图 6(a)相比, 图 6(b)中条带亮度更明显, 可知图 6(b)样品溶液中 V_C 的存在减小了 DNA 的氧化损伤, 此过程使 V_C 被损伤. DAAO 催化氧化 DAA 产生低活性的 H_2O_2 能够直接损伤 V_C , 另外 DAA、DAAO 和 Fe^{2+} 共同作用也可损伤 V_C , 可见 DAAO 催化 DAA 代谢对 V_C 有较强的损伤效应.

$D-Ala$ 被 $pkDAAO$ 催化氧化产生的 H_2O_2 对 V_C 的定量影响如图 7 和 8 所示. 由图 7 可知, 低浓度下 H_2O_2 紫外谱图对 V_C 定量分析无干扰. 溶液中 V_C 在 λ_{max} 位置吸收值随 $D-Ala$ 浓度增加而减小, 其损伤程度随 $D-Ala$ 浓度增加而增大(图 8). 按每人每天食入转基因食用油量 25 g (含 DAA $10^{-6} \sim 10^{-5}$ mol/L)计算, 每天 DAA 代谢产物 H_2O_2 对 V_C 损伤程度为 0.3%~3%, 对 V_C 损伤总量为 1~10 μ mol.

3.4 DAA 对生育酚(V_E)的损伤效应

V_E 俗称生育酚, 能促进性激素分泌, 使男子精子活力和数量增加; 使女子雌性激素浓度增高, 提高生育能力, 预防流产. 缺乏 V_E 会引起流产或不孕不育. Yamashita 等^[26]研究发现, V_E 、 Cu^{2+} 和 H_2O_2 共同存在时能够损伤 DNA, 这是因为 V_E 能够将 Cu^{2+} 还原为 Cu^+ , Cu^+ 与 H_2O_2 发生 Fenton 反应产生 $\cdot OH$, 从而

表 2 V_C 损伤效应

样品序号	H_2O_2 (mmol/L)	V_C (mmol/L)	反应后 A_{512}
1	0.2	0	0.39
2	0.2	0.1	0.25
3	0.2	0.2	0.07
4	0.2	0.4	0.03

图 6 $D-Ala$ 、 $pkDAAO$ 和 Fe^{2+} 反应产物对 V_C 的损伤效应. (a) 各样品不含 V_C ; (b) 样品溶液各含 0.2 mmol/L V_C . M 为 Marker; 1~4, $D-Ala$ 浓度依次为 2.0、1.6、0.8、0 mmol/L

图 7 V_C 的损伤程度随 $D-Ala$ 浓度的变化图. 1, 51 μ mol/L V_C PBS 溶液; 2, 0 μ mol/L $D-Ala$; 3, 1 μ mol/L $D-Ala$; 4, 5 μ mol/L $D-Ala$; 5, 25 μ mol/L $D-Ala$; 6, 50 μ mol/L $D-Ala$ (样品 2~6 中 V_C 浓度均为 51 μ mol/L, DAAO 浓度均为 20 U/L); 7, 100 μ mol/L H_2O_2 PBS 溶液; 8, 50 μ mol/L H_2O_2 PBS 溶液

图 8 V_C 损伤程度随 $D-Ala$ 浓度的变化

损伤 DNA. DAA、DAAO 可诱导 Fe^{2+} 转化为 Fe^{3+} , Fe^{3+} 较 Cu^{2+} 氧化性高, 因此, 本实验考察了 H_2O_2 、 $\cdot OH$ 对 V_E 的影响和 V_E 对 Fe^{3+} 的影响(图 9). 图 9 中曲线 1, 2 表明, 低活性的 H_2O_2 不能损伤 V_E . 实验同时配制了 0.2 mmol/L 的 H_2O_2 和不同浓度的 V_E 混合溶液, 酶法测定结果再次验证, V_E 与 H_2O_2 不发生反应. 曲线 4, 5 分别与曲线 6, 7 对比可知, 在水相和有机相乙醇中 V_E 的紫外吸收图谱随 Fe^{3+} 的加入而改变, 即 Fe^{3+} 可被 V_E 还原为 Fe^{2+} .

Fe^{2+} 、 $D-Ala$ 和 $pkDAAO$ 共同存在时, 或 Fe^{3+} 、 $D-Ala$ 、 $pkDAAO$ 共同存在时, V_E 对 DNA 的影响结果如图 10 所示. 图 10(a)中条带 1 较条带 2 中 DNA 片段明显减少, 可见样品溶液 2 中 V_E 的存在保护了 DNA, 此过程使 V_E 被损伤. 图 10(b)中条带 1 较条带 2 中 DNA 损伤明显, 表明 V_E 能够将 Fe^{3+} 还原为 Fe^{2+} , Fe^{2+} 与 DAA、 $pkDAAO$ 产生 $\cdot OH$, 从而损伤 DNA.

$\cdot OH$ 对 V_E 的定量影响结果如图 11 和 12 所示. 图 11 中以保留时间 t_R 6.7 min 为参比峰, t_R 7.2 min

图9 不同条件下 V_E 紫外吸收谱. 1, V_E 的 PBS 溶液; 2, H_2O_2 和 V_E 的混合 PBS 溶液; 3, Fe^{2+} 、 H_2O_2 和 V_E 的混合 PBS 溶液; 4, 水相中 V_E ; 5, 有机相乙醇中 V_E ; 6, 水相中 Fe^{3+} 和 V_E ; 7, 有机相乙醇中 Fe^{3+} 和 V_E

图10 不同条件下 V_E 对 DNA 影响凝胶电泳图. (a) 1, 0.2 mmol/L Fe^{2+} 、0.8 mmol/L *D*-Ala、0.08 U/mL pKDAAO; 2, V_E 浓度为 0.2 mmol/L 的对照样; 3, 空白样. (b) 1, 0.2 mmol/L Fe^{3+} 、0.8 mmol/L *D*-Ala、0.08 U/mL pKDAAO 和 0.2 mmol/L V_E ; 2, V_E 浓度为 0 mmol/L 的对照样; 3, 空白样

图11 $\cdot OH$ 对 V_E 的损伤测定结果图. (a~e) Fe^{2+} - H_2O_2 浓度依次为 0.05、0.025、0.0125、0.00125、0 mmol/L. V_E 浓度均为 0.86 mmol/L

图12 V_E 损伤程度随 $\cdot OH$ 浓度的变化图

为 V_E 特征峰. 由参比峰与特征峰峰面积对照可知, V_E 损伤程度随 $\cdot OH$ 浓度发生变化(图 12), V_E 损伤程度随 $\cdot OH$ 浓度增加而增大. 按每人每天摄入转基因油 25 g 计算, 每天食用的油中 DAA 代谢产物损伤 V_E 约 0.01 μmol .

3.5 DAA 对细胞生长的影响

酵母菌所含的 DAAO 对碱性 DAA 具有较高的活性^[20], 实验考察了碱性 *L*、*D*-Arg 和 *L*、*D*-His 对酵母

细胞生长的影响. 在含有不同浓度 *L*、*D*-Arg 和 *L*、*D*-His 的 YNB 培养基中, 酵母菌生长情况如图 13 所示. *L*-Arg 和 *L*-His 培养的酵母细胞菌落数明显多于其对应的 DAA 培养的酵母细胞菌落数. *D*-Arg 和 *D*-His 浓度低至 35 $\mu mol/L$ 时, 即可对细胞生长产生抑制作用, 酵母菌落数随 *D*-Arg 和 *D*-His 浓度的增加而不断减少. LAA、DAA 对酵母细胞生长抑制率如图 14 所示, *D*-Arg、*D*-His 相对于 *L*-Arg、*L*-His 明显损伤和抑制了酵母细胞的生长. 酵母细胞生长抑制率随 *D*-Arg 和 *D*-His 浓度的增加而增大. 上述细胞实验可知, YNB 培养基中 70 $\mu mol/L$ DAA 可明显抑制酵母细胞生长, 因此分别选取 70 $\mu mol/L$ 的 *L*、*D*-Arg 和 *L*、*D*-His YNB 培养基培养人源细胞(HeLa), 考察 DAA 对人源细胞 HeLa 宫颈癌细胞生长的影响(图 15). 结果表明, 在低摩尔浓度下, *D*-Arg 和 *D*-His 相比于 *L*-Arg 和 *L*-His 对 HeLa 宫颈癌细胞有更强的抑制作用, 与对酵母菌生长的影响一致. 我们还考察了 DAA 对其他人源细胞(如 A375 肾癌细胞、U87 人脑胶质瘤

图 13 LAA、DAA 对酵母菌生长的影响. 培养基中 LAA、DAA 浓度分别为: L-1, 35 $\mu\text{mol/L}$; L-2, 70 $\mu\text{mol/L}$; L-3, 100 $\mu\text{mol/L}$; L-4, 140 $\mu\text{mol/L}$; D-1, 35 $\mu\text{mol/L}$; D-2, 70 $\mu\text{mol/L}$; D-3, 100 $\mu\text{mol/L}$; D-4, 140 $\mu\text{mol/L}$ (L 代表 L 型氨基酸, D 代表 D 型氨基酸)

图 14 不同浓度的 LAA、DAA 对酵母细胞生长的影响

图 15 70 $\mu\text{mol/L}$ LAA、DAA 对 HeLa 宫颈癌细胞生长的影响

细胞、MCF7 乳腺癌细胞、A549 人肺腺癌细胞等)的生长抑制作用,结果均与 HeLa 细胞相似,在此不详述。

上述实验结果的主要原因之一是,培养基中 DAA 进入酵母细胞后与酵母细胞本身所含的 DAAO 反应,产生 H_2O_2 或高氧化活性的 $\cdot\text{OH}$, 损伤 DNA 和还原性维生素分子等并导致细胞更快衰老死亡。

3.6 转基因食品安全性讨论

目前,支持转基因食品者的普遍观点认为,从生物化学角度来看,转基因食品引入的外源基因和表达出的新蛋白进入人体肠胃后都会被分别水解消化成核苷酸和氨基酸等分子,所有这些物质与非转基因食品的消化产物无异,并且,中国进口的转基因大豆主要是用来制取食用油,新基因和新蛋白及其水解产物等即使有害也基本上不存在于油脂中,因此,转基因大豆油是安全的。

但上述观点至少忽略了氨基酸和核苷酸等分子的手性,即光学异构体。以氨基酸为例,其存在 DAA 和 LAA 形式。D-或 L-型非极性和弱极性氨基酸的游离态或肽链形式均容易存在于油脂中。LAA 对细胞生长相对有益,而 DAA 则被 DAAO 催化产生 H_2O_2 , 进而可损伤 DNA 和抑制细胞生长等。这犹如当年英国的“反应停”事件,即以为两种相反手性的药物是一样的功能,但最后发现,其 R-(+)构型能有效地阻止女性怀孕早期的呕吐,而 S-(-)构型则导致大量海

豹畸形婴儿出生, 毒性很大。

另外, 抗草甘膦转基因大豆与大豆油中残留了除草剂草甘膦, 具有一定的安全隐患, 其与糖尿病、不孕不育、癌症等疾病相关^[2, 9-12]。我国国家标准《食品中农药最大残留限量》(GB2763-2005), 包括 2014 年修订版, 对大豆中草甘膦残留量未作限制。其直接后果是, 全世界草甘膦残留量较高的转基因大豆均可能流向中国^[1]。草甘膦分子结构中含有磷酸基、胺基和羧基, 是一种对金属离子有较强络合能力的有机化合物。它可将土壤金属离子带至作物中, 通过代谢(半衰期约 30 天)将金属离子释放出来^[9-11, 27, 28]。因此, 抗草甘膦的转基因食品, 其重金属离子含量相对传统食品高, 如抗草甘膦转基因大豆或玉米相比于非转中的重金属离子(V、Cr、Mn、Fe、Co、Cu、Zn、Cd、Pb 等)明显较高, 可达两倍以上^[27]。而重金属离子在人体内具有一定的蓄积效应并可引发癌症等疾病。

生物体内主要以 LAA 合成蛋白质行使生命活动, 仅少而适量的 DAA 是生命必需的。生命体内的 DAA 可由 D-海因酶催化产生。与 L-海因酶不同, D-海因酶活性强烈正向依赖于碱土或过渡金属离子(如 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 等)的浓度, 且上述金属离子浓度达到 0.5 mmol/L 时, D-海因酶的活性可增大 10 倍。同时, D-海因酶活性与温度、pH 等条件有关, D-海因酶活性在 pH 8.0~9.5 范围内有较高活性, 当 pH 9.0 时其活性最高^[8, 29-31]。考虑到转基因食品中

的草甘膦/Bt 蛋白对金属离子的强络合性会导致转基因食品中的金属离子含量高于非转基因食品, D-海因酶的活性增加并诱导产生较多 DAA, 本课题组提出了草甘膦/Bt 蛋白转基因食品中 DAA 含量较高的可能机制(图 16)。由此可合理解释 2007 年文献报道的 Bt 转基因玉米(Aristis、Tietar、PR33P66)中 DAA 的总含量高于其亲本非转基因玉米的实验结果^[32], 也可解释本文图 2 的结果。

众所周知, DNA 的损伤会引发癌症, V_C 、 V_E 的损伤与缺失会引起对应的代谢疾病。人体中 DAAO 主要存在于肝与肾器官。根据本文实验结果可知, 当人体食用 DAA 含量相对高的转基因食品时, DAAO 催化代谢 DAA 产生 H_2O_2 , 它通过与 Fe^{2+} 的作用转化为强氧化活性的 $\cdot\text{OH}$, 进而损伤肝肾内脏细胞 DNA、 V_C 、 V_E , 阻碍细胞生长, 最终导致癌症或不孕不育等疾病。这从 DAA 的角度进一步支持了食品中 DAA 具有一定毒性以及转基因食品存在安全隐患的观点和实验结果^[2, 6, 7, 9-12, 33]。

综上所述, 转基因食品中的手性 DAA 明显较高的含量及其毒性, 应是评估转基因食品安全性的一个不可忽略的新切入点。此外, 转基因食品还可能存在其他未知的化学物质、因素或过程的潜在危害, 如基因漂移、外源 RNA 干扰、碱基错配和密码子移位等, 这些安全性因素无疑也是必须予以考虑评估的。

图 16 除草剂草甘膦和 Bt 蛋白诱导转基因食品中 DAA 含量较高的可能分子机制

4 结论

综上所述, 体内 DAA 代谢产物能够直接损伤 V_C ; Fe^{2+} 存在时, DAA 代谢产生的 $\cdot OH$ 将损伤 DNA、 V_C 和 V_E ; 同时 $\cdot OH$ 氧化 Fe^{2+} 转化为 Fe^{3+} , 而 V_E 可将 Fe^{3+} 还原为 Fe^{2+} , 即 V_E 的存在可使 DAA 代谢产物连续损伤 DNA. 转基因大豆油中含 $10^{-6} \sim 10^{-5} \text{ mol/L DAA}$, 其含量高于传统的非转基因大豆油. DAA 随转基因食用油或日常转基因豆制品进入体内, 可导致 DNA 损

伤, 或直接损伤 V_C 或 V_E . 这些效应可导致细胞生长受阻, V_C 和 V_E 缺乏, 导致癌症或不孕不育等相关疾病. 酵母与 HeLa 宫颈癌细胞实验进一步表明, 相比于 LAA, DAA 能够明显抑制细胞生长.

尽管仍需更多的实验研究, 但仅从 DAA 分子毒理性角度考虑, 现有证据已足以表明, 占国内较大市场份额的转基因大豆油与传统非转基因大豆油的成分明显不同, 其安全性自然也不简单等同.

致谢 本工作得到国家自然科学基金(21272263, 21405161, 30970693)、北京大学天然药物及仿生药物国家重点实验室开放基金(K20130206, K20140204)、中国科学院大学课题基金(O8JT011J01)资助, 特此一并致谢. 此外, 感谢北京大学医学部张亮仁教授课题组对癌细胞培养实验的大力支持.

参考文献

- 1 柴卫东. 含有草甘膦的转基因大豆严重危害人类健康. <http://www.hsa.org.cn/news/?id=9307>. 2013-08-07
- 2 王月丹. 转 Bt 基因大米对人类健康可能存在安全隐患. 科学对社会的影响, 2010: 53–57
- 3 王小语. 去年我国大豆进口 6340 万吨创纪录-外依存度超 80%. <http://www.hsa.org.cn/news/?id=9732>. 2014-01-07
- 4 杨昌举, 黄灿, 高原. 实质等同性: 转基因食品安全性评估的基本原则. 食品科学, 2001, 22: 95–98
- 5 毛新志. “实质等同性”原则“转基因食品”的安全性. 科学学研究, 2004, 22: 578–582
- 6 Séralini G-E, Clair E, Mesnage R, Gress S, Defarge N, Malatesta M, Hennequin D, de Vendôme JS. Long term toxicity of a roundup herbicide and a roundup-tolerant genetically modified maize. *Food Chem Toxicol*, 2012, 50: 4221–4231
- 7 Séralini G-E, Clair E, Mesnage R, Gress S, Defarge N, Malatesta M, Hennequin D, De Vendôme JS. Answers to critics: why there is a long term toxicity due to a Roundup-tolerant genetically modified maize and to a Roundup herbicide. *Food Chem Toxicol*, 2013, 53: 476–483
- 8 许伟, 严明, 许琳. L-海因酶与 D-海因酶的序列及结构比较研究. 生物加工过程, 2004, 2: 17–21
- 9 邓晓, 李雅琦. 草甘膦对土壤微生物的影响的研究. 农药, 2005, 44: 59–62
- 10 Thongprakaisang S, Thiantanawat A, Rangkadilok N, Suriyo T, Satayavivad J. Glyphosate induces human breast cancer cells growth via estrogen receptors. *Food Chem Toxicol*, 2013, 59: 129–136
- 11 Samsel A, Seneff S. Glyphosate's suppression of cytochrome P450 enzymes and amino acid biosynthesis by the gut microbiome: pathways to modern diseases. *Entropy*, 2013, 15: 1416–1463
- 12 竺利红, 李翀, 吴吉安, 梁建根, 施跃峰. 苏云金芽孢杆菌 Bt9875 晶体蛋白诱导 HL-60 细胞凋亡. 微生物学报, 2008, 48: 690–694
- 13 De Bont R, Van Larebeke N. Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. *Mutagenesis*, 2004, 19: 169–185
- 14 Aruoma OI, Halliwell B, Gajewski E, Dizdaroglu M. Damage to the bases in DNA induced by hydrogen peroxide and ferric ion chelates. *J Biol Chem*, 1989, 264: 20509–20512
- 15 Naidu KA. Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An overview. *Nutr J*, 2003, 2: 1–10
- 16 Brigelius-Flohe R, Traber MG. Vitamin E: function and metabolism. *FASEB J*, 1999, 13: 1145–1155
- 17 Wolf G. The discovery of the antioxidant function of vitamin E: the contribution of Henry A. Mattill. *J Nutr*, 2005, 135: 363–366
- 18 Pollegioni L, Piubelli L, Sacchi S, Pilone MS, Molla G. Physiological functions of D-amino acid oxidases: from yeast to humans. *Cell Mol Life Sci*, 2007, 64: 1373–1394
- 19 Aruoma OI. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *J Am Oil Chem Soc*, 1998, 75: 199–212
- 20 郭姣洁, 薛永常, 徐书景等. D-氨基酸氧化酶研究进展. 中国生物工程杂志, 2010, 30: 106–111
- 21 Nagata Y, Masui R, Akino T. The presence of free D-serine, D-alanine and D-proline in human plasma. *Experientia*, 1992, 48: 986–988
- 22 Fujii N, Kaji Y, Fujii N. D-amino acids in aged proteins: analysis and biological relevance. *J Chromatogr B*, 2011, 879: 3141–3147
- 23 Nagata Y, Akino T, Ohno K, Ueda T, Sakurai T, Shiroshita KI, Yasuda T. Free D-amino acids in human plasma in relation to senescence and renal diseases. *Clin Sci*, 1987, 73: 105–108

- 24 Brand-Williams W, Cuvelier M, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci Tech*, 1995, 28: 25–30
- 25 Henle ES, Linn S. Formation, prevention, and repair of DNA damage by iron/hydrogen peroxide. *J Biol Chem*, 1997, 272: 19095–19098
- 26 Yamashita N, Murata M, Inoue S, Burkitt MJ, Milne L, Kawanishi S. α -Tocopherol induces oxidative damage to DNA in the presence of copper(II) ions. *Chem Res Toxicol*, 1998, 11: 855–862
- 27 Li SX, Chen LH, Zheng FY, Li YC. Effect of the cp4-epsps gene on metal bioavailability in maize and soybean using bionic gastrointestinal tracts and ICP-MS determination. *J Agr Food Chem*, 2013, 61: 1579–1584
- 28 崔玉侠, 王玉军, 周东美, 王慎强, 肖安云, 陈玉成. 草甘膦对重金属污染土壤中铜、锌淋溶的研究. *土壤*, 2009, 41: 840–843
- 29 董妍玲, 郑月, 潘学武. 豆类来源 D-海因酶的提取及特性研究. *化学与生物工程*, 2010, 27: 59–61
- 30 Pozo C, Rodelas B, De La Escalera S, Gonzalez-Lopez J. D, L-hydantoinase activity of an ochrobactrum anthropi strain. *J Appl Microbiol*, 2002, 92: 1028–1034
- 31 杨柳, 孙万儒. 海因酶的研究进展. *生物工程进展*, 2001, 21: 11–14
- 32 Herrero M, Ibáñez E, Martín-Álvarez PJ, Cifuentes A. Analysis of chiral amino acids in conventional and transgenic maize. *Anal Chem*, 2007, 79: 5071–5077
- 33 Friedman M. Origin, microbiology, nutrition, and pharmacology of D-amino acids. *Chem Biodivers*, 2010, 7: 1491–1530

Biosafety assessment of genetically modified foods based on the toxicology of the chiral D-amino acid

Zhikun Zhang¹, Longfei Yuan¹, Qingju Liu¹, Botai Cai¹, Xiangjun Li¹, Hong Zhao¹,
Yalei Dong¹, Jing-Kui Yang^{1*}, Yujian He^{1,2*}, Liang Zhao³, Shuqing Dong³

¹ School of Chemistry and Chemical Engineering, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

² State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs, Peking University, Beijing 100191, China

³ Lanzhou Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Science, Lanzhou 730000, China

*Corresponding authors (email: jkyang@ucas.ac.cn; heyujian@ucas.ac.cn)

Abstract: Biosafety of genetically modified foods (GM foods) have been the subject of much controversy. Based on the Principle of Substantial Equivalence and the mechanism of formation of the chiral D-amino acids (DAA), this paper evaluated the biosafety of glyphosate-tolerant GM foods and insect-resistant transgenic Bt foods. Because of the stronger complexibility of the glyphosate and protein Bt, compared with the traditional foods, there were more metal ions in GM foods that were transferred from soil into GM crop. This would result in the increase of activity of D-hydantoinase, the more DAAs would be synthesized. The results showed DAA can act as a potent damaging agent for DNA, V_C and V_E in the present of D-amino acids oxidases (DAAO) and Fe^{2+} . The DAA and DAAO are able to directly induce V_C damage. The interface of the organic phase and aqueous phase, the V_E is able to reduce Fe^{3+} to Fe^{2+} , and Fe^{2+} assisted DAA and DAAO induced DNA damage again. The cell experiments indicated, DAA obviously inhibited cell growth. Therefore, although ignored of the toxic effects of glyphosate, Bt and heavy metal, only from the higher content of DAA in GM foods and its toxicological influence, there were big differences in both the ingredients and biosafety between the GM foods and the traditional non GM foods according to the Principle of Substantial Equivalence.

Keywords: GM foods, D-amino acid, DNA damage, V_C , V_E