

# 基于胚胎干细胞模型的 Cry1Ab 蛋白发育毒性

简远志<sup>1</sup>, 王 菲<sup>1</sup>, 尹 宁<sup>1</sup>, 周若宇<sup>1</sup>, 王军波<sup>1, 2Δ</sup>

(1. 北京大学公共卫生学院营养与食品卫生学系, 北京 100191; 2. 食品安全毒理学研究与评价北京市重点实验室, 北京 100191)

**[摘 要]** **目的:**通过胚胎干细胞发育毒性评价模型研究 Cry1Ab 蛋白对于细胞增殖和分化能力的影响,以评估其发育毒性。**方法:**设置 Cry1Ab 蛋白 7 个剂量组 (31.25、62.50、125.00、250.00、320.00、1 000.00、2 000.00 μg/L),以 5-氟尿嘧啶 (5-fluorouracil, 5-FU) 为阳性对照,以磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffer saline, PBS) 为溶剂对照,分别处理小鼠胚胎干细胞 D3 (embryonic stem cell line D3, ES-D3) 和小鼠成纤维细胞 3T3。通过 CCK-8 法检测细胞活性,计算受试物对于不同细胞的增殖半抑制浓度 (50% inhibition concentration of growth and viability, IC<sub>50</sub>)。设置 Cry1Ab 蛋白 5 个剂量组 (125.00、250.00、320.00、1 000.00、2 000.00 μg/L),设置溶剂对照 (PBS),同时以 5-FU 为受试物进行模型验证,分别处理细胞后,通过拟胚胎体 (embryonic bodies, EBs) 培养法诱导 ES-D3 分化出心肌细胞;镜下观察 EBs 生长情况并测量其第 3 天和第 5 天的直径,观察并记录同批次 EBs 分化出搏动心肌细胞的比例,计算受试物的心肌分化半抑制浓度 (50% inhibition concentration of differentiation, ID<sub>50</sub>),根据发育毒性判别函数对受试物的胚胎发育毒性进行分类;收集培养终点的 EBs 样本,进行实时定量聚合酶链式反应 (real-time quantitative polymerase chain reaction, qPCR),检测心肌分化相关标志物 (Oct3/4、GATA-4、Nkx2.5 和 β-MHC) 的 mRNA 表达情况。**结果:**5-FU 的 IC<sub>50,3T3</sub> 为 46.37 μg/L, IC<sub>50,ES</sub> 为 32.67 μg/L, ID<sub>50,ES</sub> 为 21.28 μg/L,根据判别函数结果将 5-FU 分类为强胚胎毒性物质。不同浓度的 Cry1Ab 蛋白处理组的 3T3 细胞和 ES-D3 细胞活性与对照组相比差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。与对照组相比, Cry1Ab 蛋白处理组分化第 3 天和第 5 天的 EBs 直径差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), EBs 形态也未见明显差异;不同浓度 Cry1Ab 蛋白处理组的心肌分化率与对照组相比差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。5-FU 使 β-MHC、Nkx2.5 和 GATA-4 的 mRNA 表达水平降低 ( $P < 0.05$ ),且具有剂量依赖趋势 ( $P < 0.05$ ),而与细胞多能性相关的标志物 Oct3/4 mRNA 表达水平则呈升高趋势 ( $P < 0.05$ ); Cry1Ab 蛋白处理组的成熟心肌标志物 β-MHC、心肌早期分化标志物 Nkx2.5 和 GATA-4、多能性相关标志物 Oct3/4 的 mRNA 表达水平与对照组相比差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。**结论:**本实验模型中未观察到 31.25 ~ 2 000.00 μg/L 的 Cry1Ab 蛋白具有发育毒性。

**[关键词]** Cry1Ab 蛋白;发育毒性;心肌细胞;细胞分化;胚胎干细胞

**[中图分类号]** R155.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1671-167X(2024)02-0213-10

**doi:**10.19723/j.issn.1671-167X.2024.02.003

## Developmental toxicity of Cry1Ab protein in the embryonic stem-cell model

JIAN Yuanzhi<sup>1</sup>, WANG Fei<sup>1</sup>, YIN Ning<sup>1</sup>, ZHOU Ruoyu<sup>1</sup>, WANG Junbo<sup>1, 2Δ</sup>

(1. Department of Nutrition and Food Hygiene, School of Public Health, Peking University, Beijing 100191, China; 2. Beijing Key Laboratory of Toxicological Research and Risk Assessment for Food Safety, Beijing 100191, China)

**ABSTRACT Objective:** To evaluate the developmental toxicity of Cry1Ab protein by studying its effects on cell proliferation and differentiation ability using a developmental toxicity assessment model based on embryonic stem-cell. **Methods:** Cry1Ab protein was tested in seven dose groups (31.25, 62.50, 125.00, 250.00, 320.00, 1 000.00, and 2 000.00 μg/L) on mouse embryonic stem cells D3 (ES-D3) and 3T3 mouse fibroblast cells, with 5-fluorouracil (5-FU) used as the positive control and phosphate buffer saline (PBS) as the solvent control. Cell viability was detected by CCK-8 assay to calculate the 50% inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) of the test substance for different cells. Additionally, Cry1Ab protein was tested in five dose groups (125.00, 250.00, 320.00, 1 000.00, and 2 000.00 μg/L) on ES-D3 cells, with PBS as the solvent control and 5-FU used for model validation. After cell treatment, cardiac differentiation was induced using the embryonic bodies (EBs) culture method. The growth of EBs was observed under a microscope, and their diameters on the third and fifth days were measured. The proportion of EBs differentiating into beating cardiomyocytes was recorded, and the 50% inhibition concentration of differentiation (ID<sub>50</sub>) was calculated. Based on a developmental toxicity discrimination func-

**基金项目:** 科技创新 2030—重大项目 (2023ZD0406305-04) Supported by Science and Technology Innovation 2030—Major Project (2023ZD0406305-04)

ΔCorresponding author's e-mail, bmuwjbx@bjmu.edu.cn

网络出版时间:2024-03-11 11:34:16 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4691.R.20240307.2332.002.html>

tion, the developmental toxicity of the test substances was classified. Furthermore, at the end of the culture period, mRNA expression levels of cardiac differentiation-related markers (Oct3/4, GATA-4, Nkx2.5, and  $\beta$ -MHC) were quantitatively detected using real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) in the collected EBs samples. **Results:** The  $IC_{50}$  of 5-FU was determined as 46.37  $\mu\text{g}/\text{L}$  in 3T3 cells and 32.67  $\mu\text{g}/\text{L}$  in ES-D3 cells, while the  $ID_{50}$  in ES-D3 cells was 21.28  $\mu\text{g}/\text{L}$ . According to the discrimination function results, 5-FU was classified as a strong embryotoxic substance. There were no statistically significant differences in cell viability between different concentrations of Cry1Ab protein treatment groups and the control group in both 3T3 cells and ES-D3 cells ( $P > 0.05$ ). Moreover, there were no statistically significant differences in the diameter of EBs on the third and fifth days, as well as their morphology, between the Cry1Ab protein treatment groups and the control group ( $P > 0.05$ ). The cardiac differentiation rate showed no statistically significant differences between different concentrations of Cry1Ab protein treatment groups and the control group ( $P > 0.05$ ). 5-FU significantly reduced the mRNA expression levels of  $\beta$ -MHC, Nkx2.5, and GATA-4 ( $P < 0.05$ ), showing a dose-dependent trend ( $P < 0.05$ ), while the mRNA expression levels of the pluripotency-associated marker Oct3/4 exhibited an increasing trend ( $P < 0.05$ ). However, there were no statistically significant differences in the mRNA expression levels of mature cardiac marker  $\beta$ -MHC, early cardiac differentiation marker Nkx2.5 and GATA-4, and pluripotency-associated marker Oct3/4 between the Cry1Ab protein treatment groups and the control group ( $P > 0.05$ ). **Conclusion:** No developmental toxicity of Cry1Ab protein at concentrations ranging from 31.25 to 2 000.00  $\mu\text{g}/\text{L}$  was observed in this experimental model.

**KEY WORDS** Cry1Ab protein; Developmental toxicity; Cardiac myocytes; Cell differentiation; Embryonic stem cells

Cry1Ab 蛋白是由苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, Bt) 在孢子形成阶段所产生的具有特殊功能的蛋白质,由 Bt 质粒中的 Cry 基因编码,属于 Bt 所分泌的各类蛋白中的 Cry 蛋白家族。Cry 晶体蛋白具有 3 个结构域,结构稳定,以毒素源的形式在 Bt 中合成,被昆虫摄食后能在碱性的昆虫肠道中被溶解,激活其杀虫毒性,对于多种昆虫目(如鞘翅目、鳞翅目和双翅目)以及一些线虫、原生动物和螨虫有效<sup>[1]</sup>。独特的杀虫机制使得 Cry 蛋白杀虫效率和特异性较高,目前已被广泛应用于农林业中的生物防治领域。在已开发的 Cry 蛋白中,Cry1Ab 蛋白是转基因植物和生物杀虫剂中最常用的杀虫物质之一<sup>[2]</sup>。近年来,各类 Cry1Ab 产品在全球范围内长期、大范围的使用,使得社会各界更加关注相关转基因产品的安全性问题。

Cry1Ab 蛋白作为 Bt 转基因植物的新表达蛋白质,是相关转基因植物与非转基因植物的主要差异成分,对该蛋白食用安全性的评价是相关转基因植物安全性评价的重要组成部分。基于已有的毒理学数据和环境暴露评估,有研究认为 Cry1Ab 产品对于脊椎动物是安全的<sup>[2-4]</sup>,但不能说明其对于人类完全无害。目前,关于该蛋白安全性评价的研究以大鼠 90 d 喂养试验为主,对于其慢性毒性、生殖发育毒性等安全性的评价研究较少。虽然一些中长期动物喂养试验未发现 Cry 蛋白对于非目标生物的毒性,但也有部分研究报道了不一样的结果。

Vieira 等<sup>[5]</sup>通过斑马鱼胚胎实验发现 Cry1Ab 蛋白(1.1 mg/mL)可能干扰斑马鱼胚胎发育过程中磷酸肌酸的形 成, Bøhn 等<sup>[6]</sup>发现 4.5 mg/L 的

Cry1Ab 蛋白能增加水蚤死亡率和降低幼崽产量。Alves 等<sup>[7]</sup>使用以 Cry1Ab 蛋白为主要成分的生物杀虫剂灌胃妊娠大鼠后,发现 2 mg/kg 的 Bt 杀虫剂导致孕鼠及其后代丙氨酸转氨酶、天冬氨酸转氨酶、尿素和肌酐等生物标记物水平降低,肝和肾的部分血管出现充血。在一些体外试验中还报道了 Cry1Ab 蛋白对部分人类细胞系的毒性,如人胚胎肾细胞系<sup>[8]</sup>、人宫颈癌细胞系<sup>[9]</sup>等。目前尚未明确这些可能的毒性作用,特别是对于动物胚胎发育的毒性是否会同样作用于人体。胚胎发育时期对于外源物质所产生的生物学效应较为敏感,当外源物质出现潜在的发育毒性时,需要慎重的去考虑和评估。

在进行新物质毒性评估时,体外试验常是学者们优先考虑的试验方法之一。相比于传统的发育毒性动物试验,体外试验方法符合“3R”原则[替代(replacement)、减少(reduction)、优化(refinement)],极大地减少了实验动物的使用,具有花费少、周期短、准确性高等优点,能够进行高通量的毒性测试<sup>[10]</sup>。胚胎干细胞试验(embryonic stem cell test, EST)是常用的评价物质发育毒性的替代方法,该方法经过欧洲替代方法验证中心(European Centre for the Validation of Alternative Methods, ECVAM)的验证,多项研究证实了其评价物质发育毒性的准确性,特别是对于强胚胎毒性物质的预测准确率可达 100%<sup>[11-12]</sup>。EST 利用胚胎干细胞 D3 (embryonic stem cell line D3, ES-D3) 的多能性,使用悬滴培养法形成拟胚胎体(embryonic bodies, EBs),在不添加诱导物质的情况下使其自发分化为搏动的心肌细胞,综合受试物对于细胞生长和心肌分化的影响情

况来评价受试物的发育毒性。

本研究以 Cry1Ab 蛋白为受试物,通过以 EST 为基础的实验,结合分化第 3 天和第 5 天的形态学指标及培养终点心肌分化标志物的基因表达情况检测,评估其发育毒性,为相关转基因产品的安全性提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞株

小鼠 Balb/c 3T3 成纤维细胞系购自北京鼎国昌盛科技有限公司,小鼠胚胎成纤维细胞系(mouse embryo fibroblast,MEF)和小鼠 ES-D3 购自中国科学院分子细胞科学卓越创新中心。

### 1.2 主要试剂

Cry1Ab 重组蛋白(纯度大于 90%)购自美国 SAB 公司,5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil,5-FU,分析纯)、青-链霉素(100×)、β-巯基乙醇(分析纯)、澳洲血源胎牛血清、小鼠来源白血病抑制因子、100 倍浓缩非必须氨基酸均购自美国 Sigma 公司,0.25% 胰蛋白酶-EDTA 溶液、高糖 DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司,细胞增殖毒性检测试剂盒 CCK-8 购自北京兰博利得科技有限公司,TRIZol 总 RNA 提取试剂购自北京索莱宝科技有限公司,AceQ<sup>®</sup> qPCR SYBR<sup>®</sup> Green Master Mix 购自南京诺唯赞生物科技有限公司,MLLV 逆转录酶、Taq 酶、引物购自日本 TaKaRa 公司。

### 1.3 实验方法

**1.3.1 实验分组** 细胞增殖毒性实验:Cry1Ab 纯品蛋白浓度依次为 31.25、62.50、125.00、250.00、500.00、1 000.00、2 000.00 μg/L,5-FU 浓度依次为 15.63、31.25、62.50、125.00、250.00、500.00、1 000.00 μg/L。心肌分化抑制实验:Cry1Ab 纯品蛋白浓度依次为 125.00、250.00、500.00、1 000.00、2 000.00 μg/L,5-FU 浓度依次为 19.88、14.81、22.22、33.33、50.00 μg/L。各实验均以磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline,PBS)为溶剂对照。

**1.3.2 细胞增殖毒性实验** 检测受试物对于 ES-D3 和 3T3 细胞的细胞增殖与毒性。在各个细胞系的基础培养基中制备浓度为  $1 \times 10^7$ /L 的细胞悬液(细胞活力  $\geq 90\%$ )。每孔 50 μL 培养基加入到 96 孔板的外围孔中,将制备好的细胞悬液每孔 50 μL 加入到 96 孔板的其余孔中,将细胞置于 37 °C、5% (体积分数) CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养 2 h。待细胞贴壁后,每孔补充 150 μL 含有相应受试物的培养基(浓度为终浓度的 1.33 倍),每个浓度设置 6 个复

孔。在第 3 天和第 5 天吸出孔内培养基并加 200 μL 含有相应受试物的培养基。每天在显微镜下观察细胞的形态变化,培养到第 7 天时,在细胞培养板的每个孔中加 10% (体积分数) CCK-8 试剂,轻敲孔板使液体混匀,并在 37 °C 下孵育 1 h,孵育结束后在 450 nm 下测量每孔的光密度值。根据光密度值检测结果绘制剂量-反应曲线,计算出抑制 50% 细胞活性的受试物浓度(50% inhibition concentration of growth and viability,即 IC<sub>50</sub>,分别用 IC<sub>50,3T3</sub> 和 IC<sub>50,ES</sub> 表示),以表示受试物对于不同细胞的增殖毒性。

**1.3.3 小鼠胚胎干细胞心肌分化抑制实验** 第 0 天,准备含有相应受试物的 ES-D3 悬液( $3.75 \times 10^7$  细胞/L,细胞活力  $\geq 90\%$ ),用连续移液器将细胞悬液滴加在 60 mm 细菌培养皿盖上(每滴 20 μL,每皿 40~50 滴),并轻放在装有 5 mL PBS 的培养皿上;将培养皿置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养 3 d,悬滴培养形成 EBs。第 3 天,准备与第 0 天相同浓度的受试物,对每种浓度的受试物及对照物使用一个 60 mm 培养皿,以大约 45° 的角度倾斜培养皿盖,用 5 mL 含有适当浓度受试物或对照物的培养基小心地将 EBs 冲洗并转移至新的 60 mm 培养皿中,轻轻吹散 EBs 防止其相互粘连;将培养皿置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养 2 d。第 5 天,准备与第 0 天相同浓度的受试物,对每种浓度的受试物或对照物使用一个铺备好明胶的 24 孔板,用移液器将含有相应浓度受试物的培养基添加到 24 孔培养板的各个孔中(每孔 1 mL);将 EBs 按照分组转移到 24 孔板中,每孔一个 EBs;将培养皿置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养 16 d,每 5 天更换一次培养基。培养过程中检测指标及方法如下:(1)EBs 生长情况:在培养的第 3 天和第 5 天,分别在倒置显微镜下观察 EBs 形态大小并拍照,镜下测量 EBs 直径。(2)心肌分化情况:培养结束后,在光学显微镜下观察每孔 EBs 的生长状况,检查其是否出现自主搏动区域,并记录包含自发收缩心肌细胞的孔数,心肌分化率 = 出现心肌搏动区域的孔数/含有 EBs 的总孔数;与对照组相比,得出化学物各剂量的相对抑制分化率(相对抑制分化率 = 实验组心肌分化率/对照组心肌分化率  $\times 100\%$ );作出剂量-反应曲线,计算相对抑制 50% 细胞分化的化学物浓度(50% inhibition concentration of differentiation, ID<sub>50</sub>),以表示受试物的心肌分化毒性。

**1.3.4 检测心肌分化标志物表达情况** ES-D3 心肌分化抑制实验中观察并记录每孔 EBs 分化情况后,吸除孔内培养基,每孔用 1 mL PBS 清洗一遍,加入 150 μL TransZol 试剂,用移液器反复吹打消化至

无细胞团块,将样本收集到 2 mL 离心管中,转移到液氮速冻后置于 -80 °C 保存。电泳检测 RNA 质量,经检测合格并定量的总 RNA 样本进行 qPCR 检测,引物序列如表 1 所示,以 GAPDH 为内参基因。PCR 反应程序为 95 °C 5 min、95 °C 15 s、60 °C 30 s,进行 40 次循环。

表 1 心肌分化标志物引物序列

Table 1 Primer sequence of myocardial differentiation marker

Primer	Sequences (5' to 3')
β-MHC	Forward: CCTGCCGAAGTCTGAGAAGG
	Reverse: CTCGGGACACGATCTTGGC
GATA-4	Forward: CACCCCAATCTCGATATGTTTGA
	Reverse: GCACAGGTAGTGTCCCGTC
Nkx2.5	Forward: GACAAAGCCGAGACGGATGG
	Reverse: CTGTGCGTTGCACTTGTAGC
Oct3/4	Forward: CGGAAGAGAAAGCGAACTAGC
	Reverse: ATTGCGCATGTGACTGATCTC
GAPDH	Forward: CGTCCCGTAGACAAAATGGT
	Reverse: TTGATGGCAACAATCTCCAC

### 1.4 统计分析方法

各实验均独立重复 3 次。计量资料用均数 ± 标准差表示,采用 SPSS 24.0 软件进行单因素方差分析 (one-way ANOVA),采用 Dunnett-*t* 法进行两两比较,所有检验均为双侧检验。各细胞培养模型中的 IC<sub>50</sub> 及 ID<sub>50</sub> 使用 GraphPad Prism 9.31 软件通过 Bliss 法进行拟合计算,qPCR 结果采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 方法进行分析。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

物质发育毒性的判别函数如下:  $I = 5.916 \times \lg IC_{50,3T3} + 3.500 \times \lg IC_{50,ES} - 5.307 [(IC_{50,3T3} - ID_{50}) / IC_{50,3T3} - 15.27]$ ,  $II = 3.651 \times \lg IC_{50,3T3} + 2.394 \times \lg IC_{50,ES} - 2.033 [(IC_{50,3T3} - ID_{50}) / IC_{50,3T3} - 6.85]$ ,  $III = -0.125 \times \lg IC_{50,3T3} - 1.917 \times \lg IC_{50,ES} + 1.500 [(IC_{50,3T3} - ID_{50}) / IC_{50,3T3} - 2.67]$ 。当  $I > II$  且  $I > III$  时,分类为强胚胎毒性;当  $II > I$  且  $II > III$  时,分类为弱胚胎毒性;当  $III > I$  且  $III > II$  时,分类为无胚胎毒性。

## 2 结果

### 2.1 细胞培养

ES-D3 在饲养层细胞上培养时,细胞呈集落式生长,以圆形、椭圆形为主,细胞集落边界清晰,与饲养层细胞界限清楚,内部细胞的形态一致 (图 1),细胞保持未分化状态。每 2 天传代以防止细胞过度生长,选取复苏后 3~6 代生长状况良好且保持全能性的细胞进行实验。

ES-D3 的心肌分化过程如图 2 所示,细胞先在细菌培养皿盖上进行悬滴培养,悬滴的形态饱满,大小均一。在培养第 3 天时,EBs 形态肉眼可见,呈米白色圆形斑点,镜下观察为圆形细胞团块,边界清楚,可见细胞隆起。培养第 5 天时,EBs 体积明显增大,四周呈毛绒状,可见颜色加深的中心细胞团。将 EBs 转移到 24 孔板后,EBs 开始贴壁,细胞团块逐渐呈同心圆状铺开,细胞呈多层结构。培养到第 16 天时,细胞团展开面积明显增大,中央为黑色密集细胞团,周边细胞排列紧密、有序,出现网格状结构,可见心肌跳动区域,ES-D3 心肌分化体系建立成功。

### 2.2 受试物对 3T3 细胞和 ES-D3 增殖的影响

经过 7 d 的暴露期后,用 CCK-8 试剂盒检测各 96 孔培养板中的细胞活性。以对照孔的细胞生长活性为 100%,结果显示,5-FU 浓度为 31.25 μg/L 时开始对 3T3 和 ES-D3 的增殖显示出明显抑制作用 (*P* < 0.05),且抑制效果随着浓度增加而增强 (图 3)。经线性拟合计算,5-FU 的 IC<sub>50,3T3</sub> 为 46.37 μg/L,IC<sub>50,ES</sub> 为 32.67 μg/L。不同浓度的 Cry1Ab 蛋白处理组的 3T3 细胞和 ES-D3 的细胞活性与对照组相比差异无统计学意义 (*P* > 0.05,图 4),无法计算相应的 IC<sub>50</sub>,提示 Cry1Ab 蛋白未对 3T3 细胞和 ES-D3 的增殖能力产生影响。

### 2.3 受试物对 ES-D3 心肌分化的影响

为了更全面地观察受试物对于 ES-D3 心肌分化过程的影响,本研究对 EBs 进行了形态学相关指标的检测。在分化第 3 天和第 5 天,镜下拍照记录 EBs 形态并测量其直径,结果如图 5 和图 6 所示。与对照组相比,大于 9.88 μg/L 的 5-FU 能使 EBs 第 3 天和第 5 天的直径显著减少 (*P* < 0.05),该效应具有剂量相关趋势。而不同浓度的 Cry1Ab 蛋白处理组第 3 天和第 5 天的 EBs 直径与对照组相比差异均无统计学意义 (*P* > 0.05),提示 Cry1Ab 蛋白对 EBs 生长无不良影响。

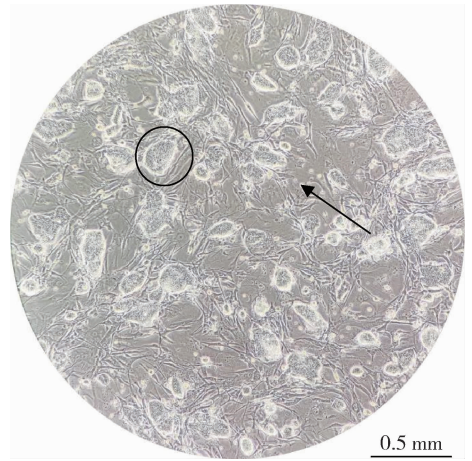
从第 13 天开始可观察到部分有 EBs 的孔中出现心肌搏动区域。到第 16 天时,对照组的心肌分化率接近 100%,此时记录各实验组中出现跳动的心肌细胞的比例,结果如图 7 和图 8 所示。与对照组相比,22.22 μg/L 的 5-FU 即能显著降低 ES-D3 的心肌分化率,当 5-FU 浓度为 50 μg/L 时,心肌分化率接近为 0。随着 5-FU 浓度的增加,可观察到 EBs 贴壁生长形成的细胞团面积逐渐减小,生长连续性变差。经线性拟合计算,ID<sub>50,ES</sub> 为 21.28 μg/L。而 Cry1Ab 蛋白各浓度组与对照组相比形成的 EBs 细胞团形态、规模接近,各组观察到的心肌搏动区域均

范围大,跳动有力且频率均匀;不同浓度 Cry1Ab 蛋白处理组的心肌分化成功率与对照组相比差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ),相应的  $ID_{50}$  无法计算,提示 Cry1Ab 蛋白对 EBs 的心肌分化无不良影响。

#### 2.4 受试物对 ES-D3 心肌分化标志物基因表达情况的影响

为了进一步研究受试物对于 ES-D3 心肌分化的影响,本研究检测了 4 个心肌分化相关基因标志物(全能性相关标志物 Oct3/4、成熟心肌标志物  $\beta$ -MHC、心肌早期分化标志物 Nkx2.5 和 GATA-4)的基因表达情况,结果如图 9 和图 10 所示。与对照组相比,5-FU 使  $\beta$ -MHC、Nkx2.5 和 GATA-4 的表达水平降低 ( $P < 0.05$ ),且具有剂量依赖趋势,说明 5-FU 能够抑制 EBs 的心肌分化与成熟;5-FU 使 Oct3/4 表达水平升高 ( $P < 0.05$ ),22.22  $\mu\text{g/L}$  的 5-FU 使 ES-D3 的 Oct3/4 平均表达水平升高为对照组的 2.89 倍,说明培养终点的 ES-D3 中多能性干细胞的占比增多。而 Cry1Ab 蛋白各浓度处理组的  $\beta$ -MHC、Nkx2.5 和 GATA-4、Oct3/4 的表达水平与对照组相比差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ ),提示该

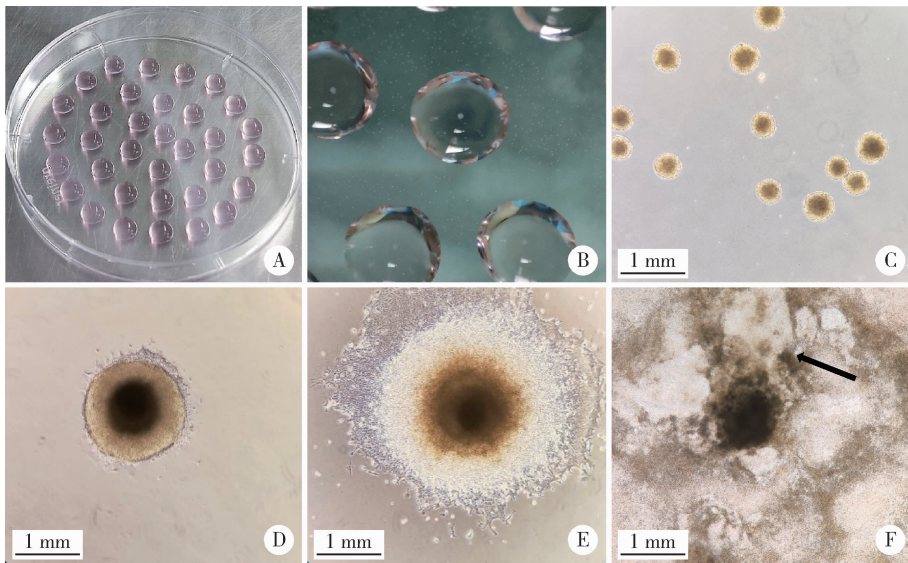
蛋白对于胚胎干细胞的多能性、早期心肌分化与成熟心肌细胞的产生无不良影响。



The figure shows the co-culture morphology of MEF cells and ES-D3 cells, with ES-D3 cells on the upper layer and MEF cells on the lower layer. The elliptical cell colonies indicated by the black circles in the image represent ES-D3 cells, while the region indicated by the black arrows represents the underlying MEF cells. The observation was made using a 100 $\times$  optical microscope. MEF, mouse embryo fibroblast; ES-D3, embryonic stem cell line D3.

图 1 ES-D3 和 MEF 细胞形态学观察

Figure 1 Morphological observation of ES-D3 and MEF cells



A, cell suspension droplets prepared from ES-D3 cells; B, cell suspension droplets cultured for 3 days; C, embryoid embryos cultured for 3 days under a microscope; D, embryoid embryos cultured for 5-6 days; E, embryoid embryos adherent cultured for 5-6 days; F, embryoid embryos cultured for 16 days, and the arrow shows the myocardial beating area. ES-D3, embryonic stem cell line D3.

图 2 ES-D3 心肌分化过程

Figure 2 The myocardial differentiation process of ES-D3

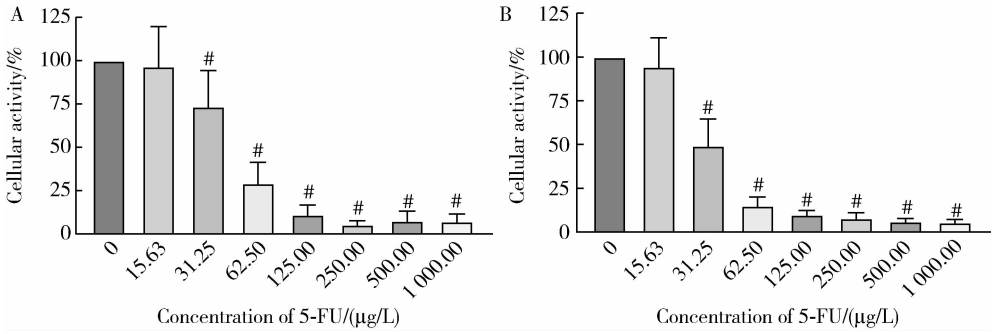
### 3 讨论

胚胎干细胞具有分化为多种细胞的潜能,在适当的体外培养条件下,可自发分化为跳动的心肌细胞<sup>[13]</sup>。利用胚胎干细胞的这种特性,学者们开发出了以胚胎干细胞为基础的一系列实验<sup>[14]</sup>,通过受试物对于胚胎干细胞增殖和心肌分化过程的影响来

评价物质的发育毒性。其提出的试验体系经过不断改良和完善,后来发展为经 ECVAM 验证的 EST。EST 主要通过三个关键指标来综合评价物质的发育毒性,一是受试物对于 3T3 细胞的生长半抑制浓度 ( $IC_{50,3T3}$ ),二是受试物对于 ES-D3 的生长半抑制浓度 ( $IC_{50,ES}$ ),三是受试物对于 ES-D3 的心肌分化半抑制浓度 ( $ID_{50,ES}$ ),将它们带入判别函数,即可

将物质的发育毒性分为无胚胎毒性、弱胚胎毒性和强胚胎毒性三类。经 ECVAM 验证<sup>[15]</sup>, EST 所

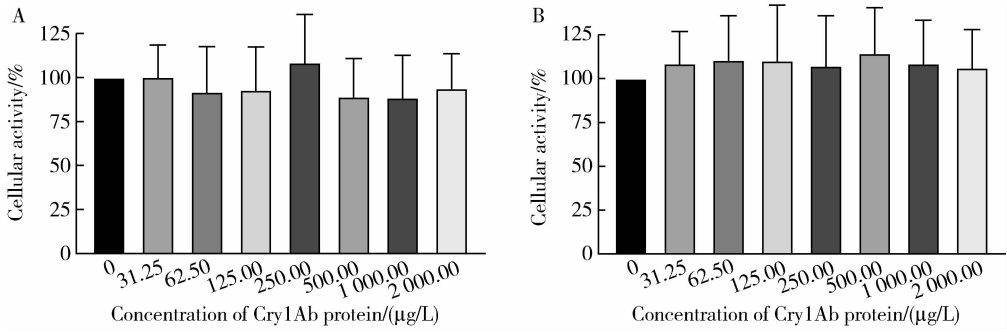
得体外数据与体内数据的相关性良好,其准确度可达 78%。



5-FU, 5-fluorouracil; ES-D3, embryonic stem cell line D3. #  $P < 0.01$ , vs. control (0 µg/L).

图 3 5-FU 对 3T3 细胞 (A) 和 ES-D3 (B) 增殖的影响 (n = 18)

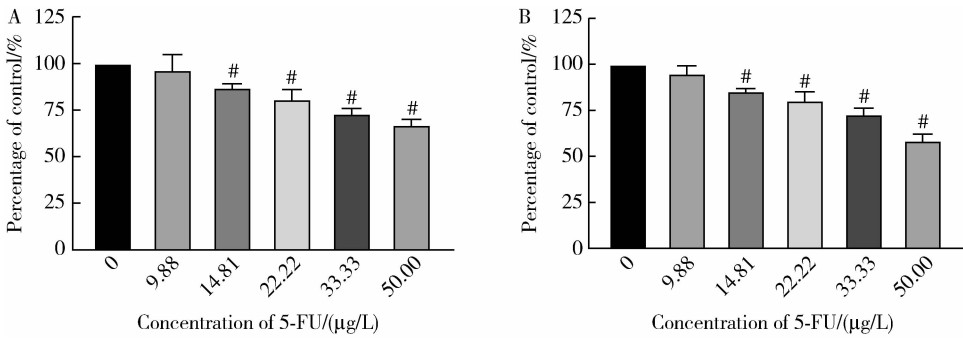
Figure 3 Effect of 5-FU on 3T3 cells (A) and ES-D3 (B) proliferation (n = 18)



ES-D3, embryonic stem cell line D3.

图 4 Cry1Ab 蛋白对 3T3 细胞 (A) 和 ES-D3 (B) 增殖的影响 (n = 18)

Figure 4 Effect of Cry1Ab protein on 3T3 cells (A) and ES-D3 (B) proliferation (n = 18)



#  $P < 0.01$  vs. control (0 µg/L). 5-FU, 5-fluorouracil; EBs, embryonic bodies.

图 5 5-FU 对培养第 3 天 (A) 和第 5 天 (B) EBs 直径的影响 (n = 24)

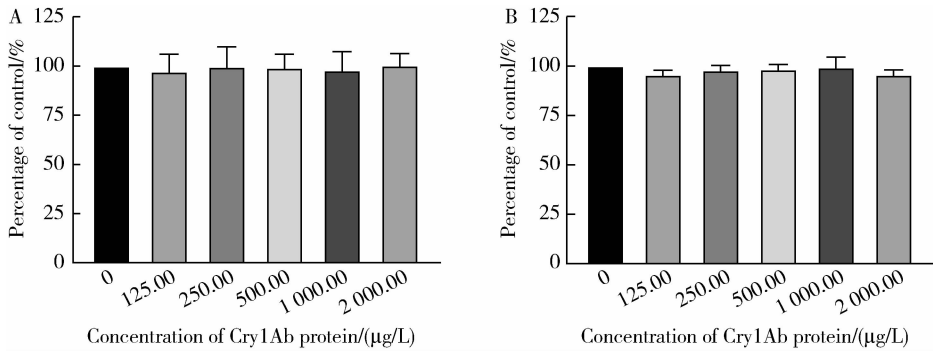
Figure 5 Effect of 5-FU protein on the diameter of EBs on the 3rd (A) and 5th (B) day (n = 24)

本研究在 EST 基础上,采用 qPCR 方法检测 4 种心肌分化标志物 (Oct3/4、GATA-4、Nkx2.5 和 β-MHC) 的基因表达情况,从基因表达水平上探究 Cry1Ab 蛋白对于 ES-D3 心肌分化的影响。Oct3/4 是 POU 转录因子家族中的一员,其主要作用是调控胚胎干细胞的生长和分化,它也是代表胚胎干细胞多能性的重要指标,对于胚胎早期发育过程的调控起着关键作用<sup>[16]</sup>。GATA-4 是一种转录因子,其结

构中具有以锌指结构为主的 DNA 结合区域,参与生物体生长发育的多个过程,如胚胎体的存活、细胞组织的分化和心肌细胞前体的迁移等<sup>[17]</sup>。Nkx2.5 是属于 NK 型同源核基因家族的一种转录因子,参与心肌细胞分化、心血管形成等过程,在整个胚胎发育时期持续表达<sup>[18]</sup>。Schluterman 等<sup>[19]</sup>的研究指出,GATA-4 和 Nkx2.5 互相依赖共同在心脏早期分化中发挥作用,二者及其下游的多个心脏特异基因的

互相调控调节着心脏的发育过程。 $\beta$ -MHC 是心肌肌球蛋白重链中的一条,主要在成熟的心肌细胞中表达,对于心肌的收缩功能至关重要; $\beta$ -MHC 的表达与心肌收缩区域的发生相关性良好,是 EST 中常

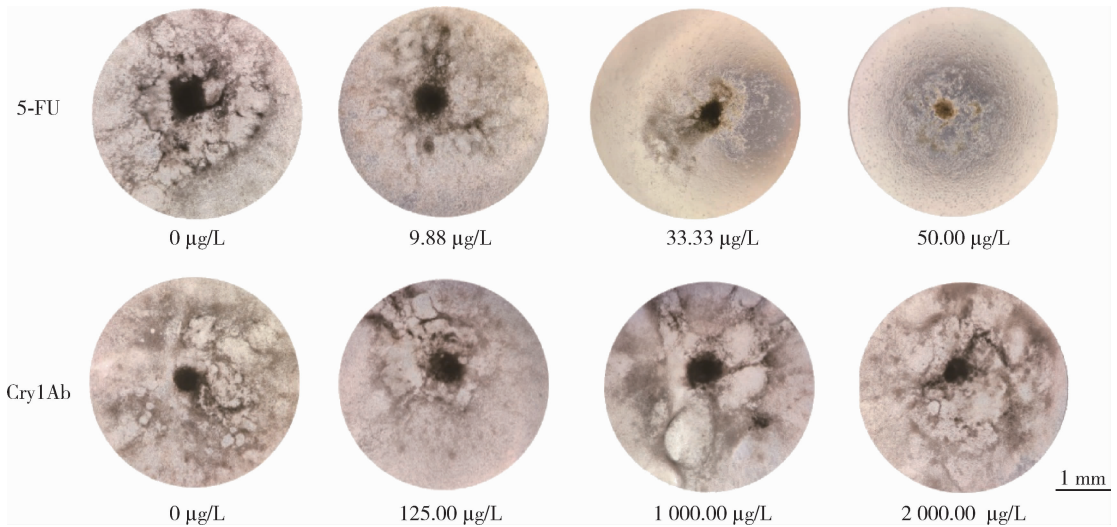
用且灵敏的分子检测指标之一<sup>[20]</sup>。因此,综合 4 种心肌分化标志物的表达结果,有利于进一步研究受试物对 ES-D3 不同分化阶段的影响,提高试验的准确性。



EBs, embryonic bodies.

图 6 Cry1Ab 蛋白对培养第 3 天(A)和第 5 天(B) EBs 直径的影响 ( $n=24$ )

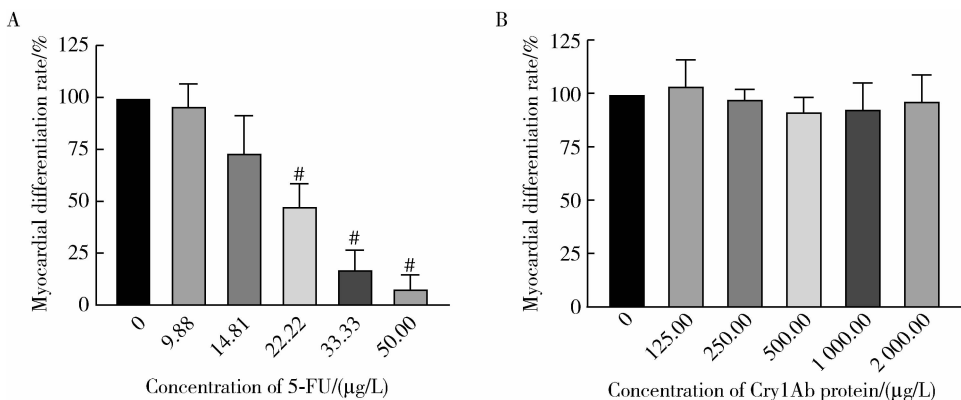
Figure 6 Effect of Cry1Ab protein on the diameter of EBs on the 3rd (A) and 5th (B) day ( $n=24$ )



The figure shows the growth status of EBs in each group on the 16th day of culture, where the central black cell cluster represents the high-density aggregation area of ES-D3, and the outer layer consists of ES-D3 cells forming a multi-layered structure. 5-FU, 5-fluorouracil; EBs, embryonic bodies; ES-D3, embryonic stem cell line D3.

图 7 各浓度 5-FU 和 Cry1Ab 蛋白对 EBs 贴壁生长情况的影响

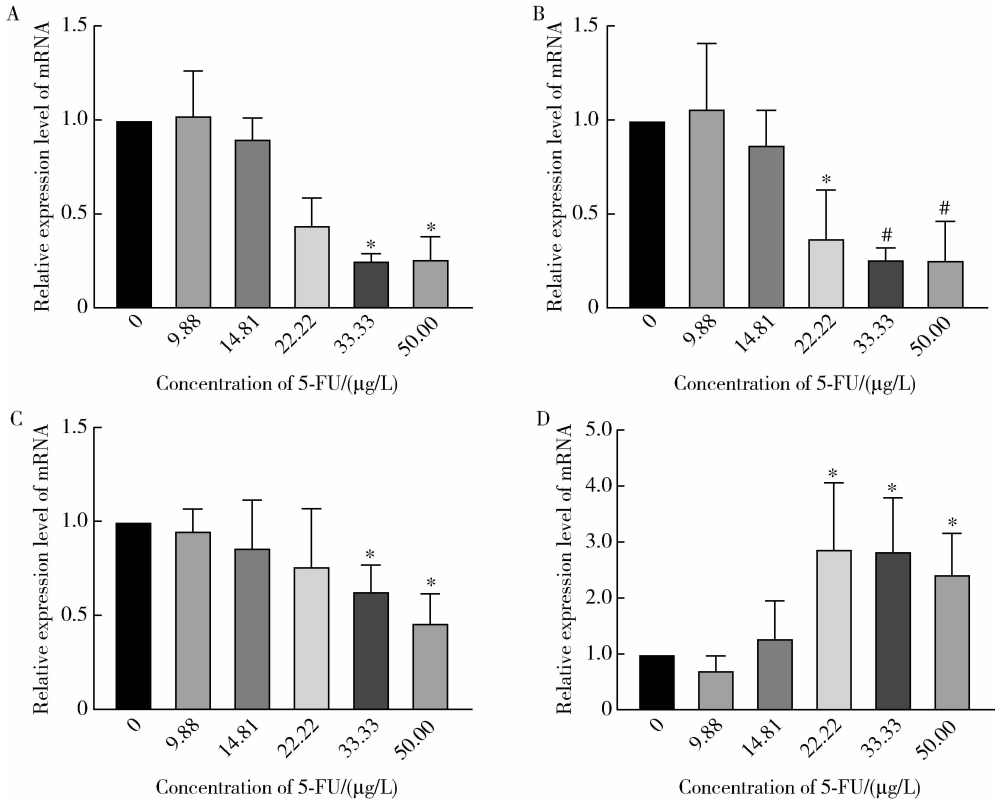
Figure 7 Effects of 5-FU and Cry1Ab protein at various concentrations on the adhering growth of EBs



#  $P < 0.01$  vs. control (0 µg/L). 5-FU, 5-fluorouracil; ES-D3, embryonic stem cell line D3.

图 8 5-FU(A)和 Cry1Ab 蛋白(B)对 ES-D3 心肌分化率的影响 ( $n=3$ )

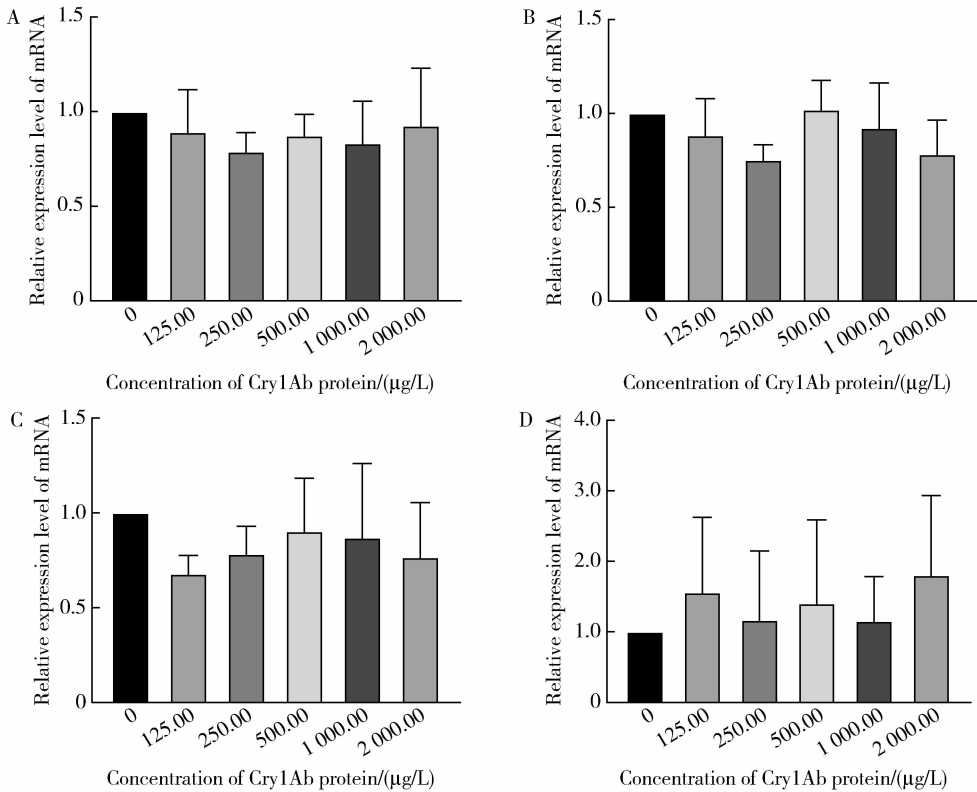
Figure 8 Effect of 5-FU (A) and Cry1Ab protein (B) on ES-D3 myocardial differentiation ( $n=3$ )



A, β-MHC; B, Nkx2.5; C, GATA-4; D, Oct3/4. \*  $P < 0.05$ , #  $P < 0.01$  vs. control (0 μg/L). 5-FU, 5-fluorouracil; ES-D3, embryonic stem cell line D3.

图 9 5-FU 对 ES-D3 心肌分化标志物表达的影响 (n = 3)

Figure 9 Effect of 5-FU on the expression of ES-D3 myocardial differentiation markers (n = 3)



A, β-MHC; B, Nkx2.5; C, GATA-4; D, Oct3/4. ES-D3, embryonic stem cell line D3.

图 10 Cry1Ab 蛋白对 ES-D3 心肌分化标志物表达的影响 (n = 3)

Figure 10 Effect of Cry1Ab protein on the expression of ES-D3 myocardial differentiation markers (n = 3)



在 EST 中,ES-D3 从单细胞悬液聚集形成具有立体三维结构的 EBs,再由 EBs 贴壁生长分化为搏动的心肌细胞,尽可能地在体外条件下模拟了胚胎发育的早期阶段<sup>[21]</sup>。EBs 是 ES-D3 细胞在重力的作用下自发聚集形成的三维细胞团,具有和早期胚胎类似的结构,能分化出外、中、内三种胚层结构<sup>[22]</sup>,且能在无诱导物质的情况下分化出搏动的心肌细胞。对 EBs 形态结构指标的检测可较好地预测化学品发育毒性<sup>[23]</sup>,所得结果与 EST 传统试验结果相关性高<sup>[24-25]</sup>。将受试物暴露于试验的全过程,可在不同时期观察物质对于心肌分化过程的影响。EST 在不同实验室之间具有高可重复性和可靠性,每次试验开展前,都需要以 5-FU 为受试物验证实验体系的有效性。本研究中,5-FU 的 IC<sub>50,3T3</sub> 为 46.37 μg/L,IC<sub>50,ES</sub> 为 32.67 μg/L,ID<sub>50,ES</sub> 为 21.28 μg/L,在镜下观察到一致的细胞活性和分化抑制情况,所得结果与 ECVAM 提供的历史对照数据相近,也与近年来开展的其他 EST 研究<sup>[12, 26-27]</sup> 结果一致,证明此次实验模型建立成功。

本研究所测试的 Cry1Ab 最大剂量为 2 000.00 μg/L,远高于实际可能的暴露量。有研究在孕妇和胎儿血液中检测出的 Cry1Ab 蛋白浓度为 (0.19 ± 0.30) μg/L 和 (0.04 ± 0.04) μg/L<sup>[28]</sup>。Walsh 等<sup>[29]</sup> 从喂食 Bt 玉米的猪胃肠样本中检测到了浓度最高为 2.74 μg/L 的 Cry1Ab 蛋白。Vieira 等<sup>[5]</sup> 在水生环境中检测到的最大 Cry1Ab 蛋白浓度也仅为 0.13 μg/L。一项体外毒性试验结果显示,Cry1Ab 蛋白对于 HeLa (HPV18 +) 宫颈癌细胞系的细胞半致死剂量为 2 500 μg/L<sup>[9]</sup>。综合历史 Cry1Ab 蛋白暴露和毒性数据,本研究设置的受试物剂量范围足够包含 Cry1Ab 蛋白的真实暴露水平,能够发现可能存在的生物学效应。经过 ES-D3 心肌分化实验测试,未发现 31.25 ~ 2 000.00 μg/L 的 Cry1Ab 蛋白具有发育毒性,这与既往 Cry1Ab 蛋白毒性研究结果一致。Shimada 等<sup>[30]</sup> 通过牛肝细胞培养模型检测了 Cry1Ab 蛋白(0 ~ 2 000 μg/L)的体外毒性,未发现其对实验细胞产生急性毒性作用。Bondzio 等<sup>[31]</sup> 用绵羊瘤胃上皮细胞模型评价了 Cry1Ab 蛋白(0.1 ~ 1 000 μg/L)的毒性,在短期和长期实验中均未发现其毒性,该研究小组在进一步的猪肠细胞培养毒性评价实验中,也未发现 Cry1Ab 蛋白对猪肠细胞增殖和细胞膜功能的不良影响<sup>[32]</sup>。一些在斑马鱼<sup>[5]</sup>、大鼠<sup>[33]</sup>、鸡<sup>[34]</sup>、猪<sup>[35]</sup> 等实验动物上开展的体内实验研究也认为 Cry1Ab 蛋白不具有发育毒性,但也有报道指出了 Cry1Ab 蛋白的潜在毒性。值得注意的是,这

些明确发现 Cry1Ab 蛋白毒性的体外实验都是在人类细胞系中进行的,比如人胚胎肾细胞和人宫颈癌细胞,而本研究使用的细胞系(ES-D3 和 3T3 细胞)都是来源于小鼠细胞,提示 Cry1Ab 蛋白对于细胞的毒性可能存在一定种属差异。已知对人类胚胎产生强致畸作用的沙利度胺,在最初的研究中也未在小鼠和大鼠胚胎上观察到致畸作用<sup>[36]</sup>。因此,在后续的研究中,还需在人类胚胎细胞和成体细胞模型中进一步测试 Cry1Ab 蛋白的毒性。此外,虽然这些研究中测试的毒性剂量都比较高,如 Cry1Ab 蛋白对人类胚胎肾细胞系产生毒性的剂量为 100 mg/L,远高于实际可能的暴露剂量水平,但考虑到转基因食品在一些国家和地区的日常生活中占比较大<sup>[37]</sup>,Cry1Ab 蛋白的摄入是一个微量长期的过程,且孕妇和幼儿是可能的敏感人群,Cry1Ab 蛋白长期食用的安全性仍需进一步评估。

本研究通过小鼠 EST 评估了 Cry1Ab 蛋白的发育毒性,存在一定的局限性。首先,本研究的受试物为重组的 Cry1Ab 蛋白,是具有活性作用的蛋白片段,与原毒素经蛋白酶活化后的毒性片段相似,纯度较高。但受试蛋白的结构与实际暴露于体内的 Cry1Ab 片段有一定差距,所得实验结果的外推受到一定限制,且目前关于 Cry1Ab 蛋白在人体内的暴露相关资料较少,还需更多的研究去确定该蛋白在生物体内的实际消化和吸收情况。其次,EBs 在整个生长阶段可同时具有三个胚层的细胞,由于本研究主要关注心肌细胞分化,未对 EBs 的细胞构成情况及细胞凋亡情况进行检测。后续研究可以对不同天数的 EBs 样本进行各个胚层细胞构成与分化情况的检测,以补充受试物对于不同胚层细胞的发育毒性数据。最后,本研究受到体外实验类型的限制,无法完全代替体内实验结果,但可以通过多类型细胞与多分化终点的试验组合来提高试验体系对受试物发育毒性的预测准确度。

综上,本研究未发现 Cry1Ab 蛋白对于小鼠 ES-D3 及 3T3 增殖能力的影响,也未发现其对 ES-D3 心肌分化不同阶段存在影响。经 EST 测试,31.25 ~ 2 000.00 μg/L 的 Cry1Ab 蛋白不具有发育毒性,尚需进一步评估其对于人体的安全性。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突。

**作者贡献声明** 简远志:提出研究设计,实施实验方案,撰写论文;王菲:修改及实施实验方案;尹宁:收集、分析、整理数据;周若宇:实施实验方案;王军波:指导研究设计,总体把关和审定论文。

#### 参考文献

[1] Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, et al. *Bacillus thuringiensis*

- and its pesticidal crystal proteins [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998, 62(3): 775–806.
- [ 2 ] Rubio-Infante N, Moreno-Fierros L. An overview of the safety and biological effects of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins in mammals [J]. *J Appl Toxicol*, 2016, 36(5): 630–648.
- [ 3 ] Álvarez F, Messéan A, Streissl F. Assessment of the 2019 post-market environmental monitoring report on the cultivation of genetically modified maize MON810 in the EU [J]. *EFSA J*, 2021, 19(7): e06683.
- [ 4 ] Koch MS, Ward JM, Levine SL, et al. The food and environmental safety of Bt crops [J]. *Front Plant Sci*, 2015, 6: 283.
- [ 5 ] Vieira L, Hissa DC, Souza T, et al. Assessing the effects of an acute exposure to worst-case concentration of Cry proteins on zebrafish using the embryotoxicity test and proteomics analysis [J]. *Chemosphere*, 2021, 264(Pt 2): 128538.
- [ 6 ] Bøhn T, Rover CM, Semenchuk PR. *Daphnia magna* negatively affected by chronic exposure to purified Cry-toxins [J]. *Food Chem Toxicol*, 2016, 91: 130–140.
- [ 7 ] Alves RDC, Ferreira CGM, Ferreira de Melo IM, et al. Renal and hepatic changes in the offspring of rats that received biological insecticides during pregnancy and lactation [J]. *Acta Histochem*, 2021, 123(8): 151799.
- [ 8 ] Mesnage R, Clair E, Gress S, et al. Cytotoxicity on human cells of Cry1Ab and Cry1Ac Bt insecticidal toxins alone or with a glyphosate-based herbicide [J]. *J Appl Toxicol*, 2013, 33(7): 695–699.
- [ 9 ] Mendoza-Almanza G, Rocha-Zavaleta L, Aguilar-Zacarías C, et al. Cry1A Proteins are cytotoxic to HeLa but not to SiHa cervical cancer cells [J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2019, 20(12): 1018–1027.
- [ 10 ] Soberón M, Portugal L, García-Gómez BI, et al. Cell lines as models for the study of Cry toxins from *Bacillus thuringiensis* [J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 2018, 93: 66–78.
- [ 11 ] Genschow E, Spielmann H, Scholz G, et al. Validation of the embryonic stem cell test in the international ECVAM validation study on three *in vitro* embryotoxicity tests [J]. *Altern Lab Anim*, 2004, 32(3): 209–244.
- [ 12 ] Liu H, Ren C, Liu W, et al. Embryotoxicity estimation of commonly used compounds with embryonic stem cell test [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(1): 263–271.
- [ 13 ] zur Nieden N I, Ruf L J, Kempka G, et al. Molecular markers in embryonic stem cells [J]. *Toxicol In Vitro*, 2001, 15(4/5): 455–461.
- [ 14 ] Spielmann H, Pohl I, Döring B, et al. The embryonic stem cell test, an *in vitro* embryotoxicity test using two permanent mouse cell lines; 3T3 fibroblasts and embryonic stem cells [J]. *In Vitro Mol Toxicol*, 1997, 10(1): 119–127.
- [ 15 ] ECVAM. DB-ALM protocol n° 113: Embryonic stem cell test (EST) [G]. EURL ECVAM, 2010. [https://jeodpp.jrc.ec.europa.eu/ftp/jrc-opendata/EURL-ECVAM/datasets/DBALM/LATEST/online/DBALM\\_docs/113\\_P\\_Embryonic%20Stem%20Cell%20Test.pdf](https://jeodpp.jrc.ec.europa.eu/ftp/jrc-opendata/EURL-ECVAM/datasets/DBALM/LATEST/online/DBALM_docs/113_P_Embryonic%20Stem%20Cell%20Test.pdf).
- [ 16 ] Pesce M, Scholer HR. Oct-4; Gatekeeper in the beginnings of mammalian development [J]. *Stem Cells*, 2001, 19(4): 271–278.
- [ 17 ] Charron F, Paradis P, Bronchain O, et al. Cooperative interaction between GATA-4 and GATA-6 regulates myocardial gene expression [J]. *Mol Cell Biol*, 1999, 19(6): 4355–4365.
- [ 18 ] 卜萌萌. 中胚层细胞分化新功能基因的鉴定及功能研究[D]. 北京: 北京协和医学院, 2020.
- [ 19 ] Schluterman MK, Krysiak AE, Kathiriya IS, et al. Screening and biochemical analysis of GATA4 sequence variations identified in patients with congenital heart disease [J]. *Am J Med Genet A*, 2007, 143A(8): 817–823.
- [ 20 ] zur Nieden NI, Kempka G, Ahr HJ. Molecular multiple endpoint embryonic stem cell test: A possible approach to test for the teratogenic potential of compounds [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2004, 194(3): 257–269.
- [ 21 ] Gordeeva O, Gordeev A. Comparative assessment of toxic responses in 3D embryoid body differentiation model and mouse early embryos treated with 5-hydroxytryptophan [J]. *Arch Toxicol*, 2021, 95(1): 253–269.
- [ 22 ] Liang S, Zhou H, Yin N, et al. Embryoid body-based RNA-seq analyses reveal a potential TBBPA multifaceted developmental toxicity [J]. *J Hazard Mater*, 2019, 376: 223–232.
- [ 23 ] Kim I Q, Marikawa Y. Embryoid body test with morphological and molecular endpoints implicates potential developmental toxicity of trans-resveratrol [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2018, 355: 211–225.
- [ 24 ] Lee JH, Park SY, Ahn C, et al. Pre-validation study of alternative developmental toxicity test using mouse embryonic stem cell-derived embryoid bodies [J]. *Food Chem Toxicol*, 2019, 123: 50–56.
- [ 25 ] Lee JH, Park SY, Ahn C, et al. Second-phase validation study of an alternative developmental toxicity test using mouse embryonic stem cell-derived embryoid bodies [J]. *J Physiol Pharmacol*, 2020, 71(2): 223–233.
- [ 26 ] 夏荃, 鲍倩, 蒋德菊, 等. 基于小鼠胚胎干细胞实验模型评价川芎水煎液的胚胎毒性[J]. *中成药*, 2018, 40(9): 1910–1915.
- [ 27 ] van Oostrom CT, Slob W, van der Ven LT. Defining embryonic developmental effects of chemical mixtures using the embryonic stem cell test [J]. *Food Chem Toxicol*, 2020, 140: 111284.
- [ 28 ] Aris A, Leblanc S. Maternal and fetal exposure to pesticides associated to genetically modified foods in Eastern Townships of Quebec, Canada [J]. *Reprod Toxicol*, 2011, 31(4): 528–533.
- [ 29 ] Walsh MC, Buzoianu SG, Rea MC, et al. Effects of feeding Bt MON810 maize to pigs for 110 days on peripheral immune response and digestive fate of the cry1Ab gene and truncated Bt toxin [J]. *PLoS One*, 2012, 7(5): e36141.
- [ 30 ] Shimada N, Kim YS, Miyamoto K, et al. Effects of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin on mammalian cells [J]. *J Vet Med Sci*, 2003, 65(2): 187–191.
- [ 31 ] Bondzio A, Stumpff F, Schö n J, et al. Impact of *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ab on rumen epithelial cells (REC): A new *in vitro* model for safety assessment of recombinant food compounds [J]. *Food Chem Toxicol*, 2008, 46(6): 1976–1984.
- [ 32 ] Bondzio A, Lodemann U, Weise C, et al. Cry1Ab treatment has no effects on viability of cultured porcine intestinal cells, but triggers Hsp70 expression [J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e67079.
- [ 33 ] 郭梦凡, 韩超, 李岩, 等. 转 Cry1Ab 和 epsps 基因抗虫耐除草剂玉米对三代繁殖大鼠子代的神经行为与认知能力的影响 [J]. *卫生研究*, 2018, 47(3): 419–424.
- [ 34 ] Li Z, Gao Y, Zhang M, et al. Effects of a diet containing genetically modified rice expressing the Cry1Ab/1Ac protein (*Bacillus thuringiensis* toxin) on broiler chickens [J]. *Arch Anim Nutr*, 2015, 69(6): 487–498.
- [ 35 ] Buzoianu SG, Walsh MC, Rea MC, et al. Transgenerational effects of feeding genetically modified maize to nulliparous sows and offspring on offspring growth and health [J]. *J Anim Sci*, 2013, 91(1): 318–330.
- [ 36 ] Ridings JE. The thalidomide disaster, lessons from the past [J]. *Methods Mol Biol*, 2013, 947: 575–586.
- [ 37 ] Niraula PM, Fondong VN. Development and adoption of genetically engineered plants for virus resistance: Advances, opportunities and challenges [J]. *Plants*, 2021, 10(11): 2339.

(2023-04-06 收稿)

( 本 文 编 辑 : 赵 波 )