

洋茉莉醛遗传毒性的实验研究

庄宇¹, 屈卫东², 帅怡¹

摘要: [目的] 评价洋茉莉醛的遗传毒性。[方法] 应用果蝇伴性隐性致死试验(sex-linked recessive lethal, SLRL)及小鼠骨髓微核试验对洋茉莉醛进行遗传毒性评价。[结果] 与对照组相比,不同剂量染毒组对果蝇的诱发突变率差异均无统计学意义($P>0.05$);与对照组相比,不同剂量染毒组小鼠骨髓嗜多染红细胞微核率差异均无统计学意义($P>0.05$)。[结论] 本实验结果提示洋茉莉醛无致突变作用。

关键词: 洋茉莉醛; 伴性隐性致死试验; 微核试验

An Experimental Study on Genotoxicity of Heliotropin ZHUANG Yu¹, QU Wei-dong², SHUAI Yi¹
(1.Shanghai Municipal Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 200336, China; 2.School of Public Health, Fudan University, Shanghai 200032, China). Address correspondence to QU Wei-dong, E-mail: wdqu@shmu.edu.cn • The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract: [Objective] To evaluate the genotoxicity of heliotropin. [Methods] Genotoxicity of heliotropin was evaluated by the sex-linked recessive lethal (SLRL) test in *Drosophila melanogaster* and the bone marrow cell micronucleus (MN) test in mice. [Results] Compared with the control group, neither the mutation rate nor the micronucleus rate induced by different doses of heliotropin showed significant difference (both $P>0.05$). [Conclusion] This experiment suggests that mutagenesis effect of heliotropin is not supported by the current experimental settings.

Key Words: heliotropin; sex-linked recessive lethal test; bone marrow cell micronucleus test

洋茉莉醛,又名胡椒醛,化学名称为3,4-亚甲二氧基苯甲醛,外观为白色或黄白色闪光结晶,其天然品少量存在于洋茉莉花、刺槐花等花油和香荚豆等植物中。具有茴香豆香气,主要用于葵花、甜豆花、紫罗兰、香石竹、金合欢等日用香精的调香,是一种用途极广的名贵香料,世界年消费量约1 100 t。果蝇伴性隐性致死试验(sex-linked recessive lethal, SLRL)是根据交叉遗传原理,即父系x染色体传到雌性子代,而雌性子代从母系接受x染色体。正常野生型雄蝇(红色圆眼)和具有特殊遗传标志的Base雌蝇(淡杏色棒眼)交配,子一代出现肾型红眼雌蝇和棒眼雄蝇。将子一代相互交配至子二代应出现圆红眼雄蝇、棒眼雄蝇、肾型红眼雌蝇和棒眼雌蝇共4种不同表现型。以某种毒物处理雄蝇,如其x染色体已诱发致死突变,则子一代雌蝇应是带有致死突变的杂合型,本身虽不致死,但子二代雄蝇将有一半死亡。以子二代中出现圆红眼雄蝇与否来判断是否具有隐性致死突变性。为检测洋茉莉醛是否具有致突变性,本研究拟采用果蝇SLRL试验和小鼠骨髓细胞微核试验对其遗传毒性进行评价。

[作者简介] 庄宇(1971—),女,本科,主管技师;研究方向:卫生毒理学;E-mail: yzhuang@scdc.sh.cn

[通信作者] 屈卫东教授, E-mail: wdqu@shmu.edu.cn

[作者单位] 1.上海市疾病预防控制中心,上海 200336; 2.复旦大学公共卫生学院,上海 200032

1 材料与方法

1.1 SLRL 试验

1.1.1 材料

1.1.1.1 黑腹果蝇:野生型黑腹果蝇Oregon K品系、Base(Miller-5)品系,由同济大学医学院果蝇研究室提供。

1.1.1.2 普通果蝇培养基:参照国家标准《果蝇伴性隐性致死试验》(GB 15193.11—2003)^[1]的方法。蔗糖26 g、酵母粉4 g,加水150 mL,煮沸溶解;加入玉米粉34 g、酵母粉4 g,加水150 mL,混匀、煮沸;搅拌分装于试管内,备用。

1.1.2 方法

1.1.2.1 受试物配制:先用酒精将洋茉莉醛溶解后,再用2%糖水配成不同浓度的溶液。先用等差系列浓度法测定果蝇对洋茉莉醛最高诱变浓度的半数致死浓度(median lethal concentration, LC₅₀)值,所得LC₅₀值为1.6 g/L。根据预试验结果,以LC₅₀及1/2 LC₅₀、1/4 LC₅₀、1/8 LC₅₀设4个剂量组和4个不同酒精浓度的溶媒对照组,阳性对照组给予1%乌拉坦。

1.1.2.2 处女蝇的收集:开始羽化后,清除试管内所有成蝇,然后在6~12 h内收集的雌蝇即为处女蝇。将处女蝇放入新试管,一管不超过20只,备用。

1.1.2.3 接触受试物(染毒):用2~3 d龄的野生型黑腹果蝇Oregon K雄蝇染毒,采用3 d喂饲法。采用溶液饲养,受试物溶解后用2%蔗糖水稀释成不同浓度,倒入玻璃染毒装置,放入经饥饿4 h的雄蝇进行喂饲,接触受试物时间为3 d。

1.1.2.4 亲代交配：为检测受试物对哪一期生殖细胞最敏感，将染毒后 Oregon K 雄蝇按 2、3、3 d 间隔（分别表示成熟精子、精细胞和精母细胞的效应），即每一试管以一只经染毒处理的雄蝇按上述程序顺次与 3 只处女蝇交配，产生 F₁ 代。

1.1.2.5 子代交配：以 F₁ 代按雌与雄 1：3 进行 F₁~F₂ 交配。12~14 d 后观察 F₂ 代，孵育温度为（25±1）℃。

1.1.3 统计分析 根据 Piosson 分布进行统计分析，判断各剂量组的洋茉莉醛和相应的溶媒对照对果蝇的生殖细胞有无致死突变作用。

1.1.4 结果判定 每一试管在多于 20 个子代（雌及雄）中没有红色圆眼的野生型雄蝇为阳性，属致死突变。如有 2 只以上红色圆眼的野生型雄蝇为阴性。当受试物的突变率大于自发突变率 2 倍，并结合有剂量反应者可认为受试物存在致死突变。

1.2 微核试验

1.2.1 实验动物 清洁级昆明种小鼠，体重为 25~30 g，由上海斯莱克实验动物有限公司提供。

1.2.2 方法 选用昆明种小白鼠，雌雄各半，动物随机分组，每组 10 只。根据预试验测得的半数致死浓度（LD₅₀）值（>10 g/kg），设 10、5、2.5 g/kg（按小鼠体重）3 个剂量组，同时设溶剂对照组（2% 淀粉，20 g/kg）和阳性对照组（环磷酰胺，40 mg/kg）。采用间隔 24 h 二次经口灌胃法，第二次灌胃后 6 h 处死动物，取股骨骨髓制片，每只动物计数 1 000 个嗜多染红细胞（PCE）的微核数，微核率以千分率表示，同时计数成熟红细胞（NCE）数，结果经 χ^2 检验进行统计。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 不同剂量的洋茉莉醛酒精溶液对黑腹果蝇的致死性影响

本实验 4 个剂量组共培养 F₂ 代果蝇 4 800 管，结果获得 4 298 管；4 个对照组共培养 F₂ 代果蝇 4 800 管，结果获得 4 003 管。

不同剂量的洋茉莉醛酒精溶液对黑腹果蝇的致死性影响试验结果（表 1）显示，各剂量组的洋茉莉醛酒精溶液与相应的溶媒对照对果蝇的诱发突变率均未超过所允许的 SLRL 自发突变率 0.4% 的范围，各剂量组与溶媒对照组差异无统计学意义（ $P>0.05$ ），故可认为洋茉莉醛对果蝇的生殖细胞无致死性突变作用。

表 1 不同剂量洋茉莉醛酒精溶液对黑腹果蝇的致死性影响试验结果

级别	剂量	I P/N	II P/N	III P/N	合计 P/N	突变率 P/N（%）	P
洋茉莉醛（g/L）	0.2	0/373	0/333	1/281	1/987	0.10	>0.05
	0.4	1/349	0/396	1/323	2/1 066	0.19	>0.05
	0.8	0/389	0/392	0/357	0/1 138	0.00	>0.05
	1.6	0/363	3/334	0/394	3/1 101	0.07	>0.05
溶媒对照（%）	0.75	1/376	0/272	0/186	1/834	0.12	>0.05
	1.5	1/382	1/368	0/273	2/1 023	0.20	>0.05
	3.0	0/314	1/381	0/291	1/986	0.10	>0.05
	6.0	0/379	0/391	1/386	1/1 156	0.09	>0.05
乌拉坦（%）	1.0	11/330	18/430	15/319	44/1 079	4.08	<0.01

[注] P：致死阳性管数；N：受试染色体数。

2.2 不同剂量的洋茉莉醛酒精溶液微核试验结果

根据预试验结果，以 10、5、2.5 g/kg 3 个剂量组染毒昆明种

小白鼠均未见子鼠骨髓嗜多染红细胞微核的明显增多，经 χ^2 检验，差异无统计学意义（ $P>0.05$ ），阳性对照组微核率与溶剂对照组比较，差异有统计学意义（ $P<0.01$ ）。提示洋茉莉醛对小鼠骨髓多染红细胞无致突变作用（表 2）。

表 2 洋茉莉醛小鼠骨髓微核试验结果

性别	剂量（mg/kg）	动物数 （只）	受检 PCE 数（个）	含微核 PCE 数	PCE/NCE （ $\bar{x}\pm s$ ）	微核率（‰） （ $\bar{x}\pm s$ ）
雄	2 500	5	5 000	6	1.09±0.05	1.2±0.45
	5 000	5	5 000	6	1.09±0.06	1.2±0.45
	10 000	5	5 000	4	1.09±0.05	0.8±0.45
	2% 淀粉（20 g/kg）	5	5 000	6	1.09±0.03	1.2±0.45
	环磷酰胺（40 mg/kg）	5	5 000	131	0.99±0.06	26.2±3.03*
雌	2 500	5	5 000	5	1.09±0.03	1.0±0.71
	5 000	5	5 000	4	1.08±0.04	0.8±0.45
	10 000	5	5 000	5	1.08±0.04	1.0±0.71
	2% 淀粉（20 g/kg）	5	5 000	4	1.09±0.04	0.8±0.45
	环磷酰胺（40 mg/kg）	5	5 000	132	0.99±0.04	26.4±2.70*

[注]*：与溶剂对照组（2% 淀粉，20 g/kg）比较， $P<0.01$ 。

3 讨论

果蝇是一种真核生物，由于其 x 染色体占全部染色体的 20%，而其中的 1 000 个基因中有 700~800 个对各类物理、化学因素具有特殊的敏感性，极易被诱发产生 SLRL 突变，而果蝇体内的酶系统具有代谢的多能性，类似动物的肝脏，可代谢、活化多种化合物，与在小白鼠体内观察到的微粒体代谢和解毒作用十分相近^[2]。有资料表明，果蝇 SLRL 试验阳性结果与哺乳动物致癌试验阳性结果的符合率可达 80%^[3]。国际环境诱变剂和致癌剂防护委员会（ICPFC）认为，果蝇 SLRL 试验能检出的几种遗传损伤与人的遗传负荷有关^[4]，故将果蝇 SLRL 试验系统列为研究性细胞突变的标准试验，并定为遗传效应的危险估计标准之一。

果蝇自发突变率较低，过去三十多年 20 多个果蝇试验室所得到的果蝇 SLRL 自发突变率平均为 0.2%~0.4%，比较稳定^[5-7]。果蝇试验结果需依靠其他实验结果支持方能确定其致突变性，呈阴性者，在无其他真核系统试验结果的支持前，不能认为无诱变性^[8-9]。

小鼠骨髓微核试验作为一种监测染色体损伤的哺乳动物真核细胞体内试验，可以较准确地反映受试物的遗传毒理学体内致突变作用，是目前国际上公认的筛选致突变物的一种主要方法。大量的毒理学研究结果表明，大多数化学物对生殖系统比其他系统更敏感，在其他系统尚未出现毒性反应之前，生殖系统可能已出现了损害作用^[10]。本研究同时用哺乳动物昆明种小白鼠以 10、5、2.5 g/kg 3 个剂量进行实验，3 个剂量组均未见子鼠骨髓嗜多染红细胞微核的明显增多，洋茉莉醛果蝇 SLRL 试验阴性得到小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验的支持，说明洋茉莉醛在本实验条件下未见遗传毒性。

·作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

参考文献：

[1] 中华人民共和国卫生部. GB 15193.11—2003 果蝇伴性隐性致死（下转第 182 页）

(4)纤维分析的作用 作为石棉肺评定中的附加技术,纤维分析不能取代石棉肺的组织病理学诊断。当有弥漫性肺纤维化及石棉暴露史,但还未达到组织病理学诊断标准时,则可以采用纤维分析方法排除石棉肺疾病。但是假如当肺内被包裹的石棉纤维很少而未形成真正的石棉小体时,此时光学显微镜对于纤维的计数作用就很受限了。

对于未达到石棉肺病理诊断标准的病变,最好让经验丰富的实验室采用电镜技术对肺样本进行纤维分析。如果出现弥漫性间质纤维化、石棉纤维负荷量达到石棉肺的参考范围时,那么有可能诊断为石棉肺。其参考范围是依据石棉肺病人肺(形态学符合上述诊断标准)的角闪石纤维计数结果来确定的,不计数温石棉,因为其在肺内残留时间较短。参考范围通常包括样本中95%的观察值,其下限为第五个百分位点(即5%)的最小值,而其余95%值都高于它。

(5)分级方案 曾经有报道,石棉肺病变范围及严重程度的几条分级标准。虽然它们在流行病学上可能有特殊意义,但是也只能对于能够达到组织学标准的案例才能做出诊断。于是美国病理学家学院和NIOSH组成的石棉委员会,提出一个12级的分级方案(标准)。其简化版本分为4级,已由Sporn和Roggli进行描述。这种基于组织学诊断方案改进的分级标准如表2所示。

作为国内外广发的严重职业病,石棉肺对人类健康的巨大威胁不容忽视;由于涉及到劳动保障等直接利益问题,其诊断及病理分期变得尤为重要。本摘译的原文为国际石棉委员会提出的石棉肺病理学诊断新标准,它定义了石棉肺不同阶段的形态特征,将石棉暴露水平与相应的组织病变联系起来,对石棉

肺的病理诊断进行深刻描述,也阐述了石棉肺在临床学、影像学及流行病学等方面的表现,此外还对肺内石棉纤维的测定技术作出评价。本文意在为我国专家学者们对石棉肺的诊断和研究提供线索及参考。

表2 石棉肺的组织学分级方案(标准)^a

级别	描述
0级	没有明显的细支气管周纤维化,或纤维化仅限于细支气管壁
1级 ^b	纤维化局限于呼吸性细支气管壁和邻近肺泡壁的第一层
2级 ^b	纤维化累及到肺泡管和(或)呼吸性细支气管壁相邻的≥2层肺泡,但至少相邻细支气管之间的一些肺泡尚未受累
3级	≥2个相邻呼吸性细支气管之间的所有肺泡壁都伴有纤维性增厚
4级	出现蜂窝状病变

[注]来源:来自Craighead等提供的分级方案(标准)加以修改。^a:级别平均级数为把每个病例每块组织切片的级别数(0~4)相加,除以所观察的切片数;^b:少数情况下,1级和2级要与吸烟或混合型尘肺导致的细支气管周纤维化相鉴别。

译自 ROGGLI VL, GIBBS AR, ATTANOOS R, et al. Pathology of Asbestosis—An Update of the Diagnostic Criteria: Report of the asbestosis committee of the college of american pathologists and pulmonary pathology society. Arch Pathol Lab Med, 2010, 134(3): 462-480.

·作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

(收稿日期: 2011-06-07)

(英文编审: 黄建权、金克峙; 编辑: 徐新春; 校对: 张晶)

(上接第174页)

试验[S]. 北京: 中国标准出版社, 2003.

[2] International Commission for Protection against Environmental Mutagens and Carcinogens. Committee 2 Final Report. Mutagenesis testing as an approach to carcinogenesis[J]. Mutat Res, 1982, 99(1): 73-91.

[3] WILLIAMS GM. The predictive value of short-term screening test in carcinogenicity evaluation[M]. New york: Elsevier North Holland Biochemical Press, 1990: 125-147.

[4] MURPHY JC, KADEN DA, WARREN J, et al. International Commission for Protection against Environmental Mutagens and Carcinogens. Power frequency electric and magnetic fields: a review of genetic toxicology[J]. Mutat Res, 1993, 296(3): 221-240.

[5] 黄国城, 谢春玲, 韩景田, 等. 果蝇伴性隐性致死试验检测头孢唑啉的致突变作用[J]. 实用预防医学, 2001, 8(5): 386-387.

[6] LEE WR, ABRAHAMSON S, VALENCIA R, et al. The sex-linked recessive lethal test for mutagenesis in Drosophila melanogaster. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program[J]. Mutat Res, 1983, 123(2): 183-279.

[7] 叶其泉, 冯继泽, 刘进, 等. 不同龄龄下3品系果蝇的七氟醚ED50和生存力[J]. 大连医科大学学报, 2006, 28(1): 13-16.

[8] 厉曙光, 杨科峰, 蔡智鸣, 等. DBP、DOP对黑腹果蝇生存天数的影响及遗传毒性[J]. 环境与职业医学, 2002, 19(3): 197.

[9] 蔡智鸣, 杨科峰, 厉曙光, 等. DBP、DOP对小鼠的联合遗传毒性[J]. 环境与职业医学, 2002, 19(3): 197-198.

[10] 卿佰春, 崔亚飞, 李晓林, 等. 抗真菌药安特芬的小鼠微核试验与精子畸形试验研究[J]. 中国畜牧兽医, 2011, 38(7): 141-143.

(收稿日期: 2011-02-28)

(英文编审: 金克峙; 编辑: 郭薇薇; 校对: 张晶)