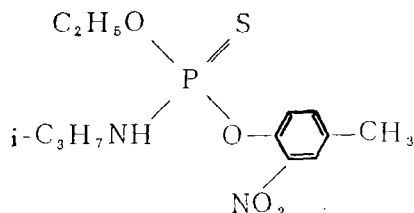


除草剂胺草灵毒性试验

V. 果蝇伴性隐性致死试验

农药毒理研究室 徐惟安 杨丽英 滕素珍 黄幸纾

有机磷除草剂胺草灵(Amiprophos), 化学名O—(2—硝基—4—甲基)—O—乙基—N异丙基硫磷酰胺酯, 化学结构式为:



大鼠经口急性毒性 LD_{50} 为 794mg/kg (584~1080), 小鼠 LD_{50} 为 2000 mg/kg (1430~3780), 属低毒类。我们在进行该药迟发性神经毒性时, 发现该药对公鸡有性腺毒作用, 表现在公鸡不再啼叫, 鸡冠萎缩下垂, 睾丸明显萎缩, 睾丸脏器系数比对照组小 4~5 倍⁽¹⁾。为此, 我们曾对该药进行一系列生殖细胞效应的观察, 证明该药在 60 mg/kg 时对小鼠睾丸精母细胞有致突变作用⁽²⁾, 100mg/kg 时对精母细胞有显性致死突变⁽³⁾, 并可诱发小鼠精子畸形⁽⁴⁾。这些均表明胺草灵是一种遗传毒性剂。为进一步证实该农药对生殖细胞的遗传学效应是否包括基因突变, 进行了果蝇伴性隐性致死试验。

果蝇具有对外来物质的代谢(酶)系统, 它们的作用谱及程度类似哺乳动物内的系统, 故能代谢、活化各种化合物, 因此能检测许多种前致癌物和短寿命的中间代谢产物的诱变剂。果蝇伴性隐性致死试验方法灵敏, 在果蝇的 X 染色体中有 700~800 个座位, 能突变成隐性致死, 同时判断是否引起突变的

终点很客观、明确、容易掌握, 故该试验是目前整体测试系统中能检出基因突变、小缺失的最简便、快速、经济的方法。

材料和方法

实验用的雄蝇为 3 天龄的 Caston-S 野生型品系(杭州大学生物系提供), 处女蝇为 2~6 天龄的 Muller-5 品系(北京大学生物系提供)。胺草灵(南开大学元素所提供)纯度为 100%, MMS 系市售(德国 Merck 公司产品)。

实验前先进行预试, MMS 先溶于二甲亚砜中, 然后拌入培养基, 加入培养基后的 MMS 最终浓度为 50 μ m, 二甲亚砜为 2%, 放入野生型雄蝇, 接触 24 小时后移入标准培养基, 24 小时后观察果蝇存活情况。胺草灵研细后, 按 500mM 浓度, 与少量食用红色素拌入冷却到 55℃ 的新鲜培养基中, 迅速搅拌约 2 分钟使充分混匀⁽⁵⁾, 放入雄蝇接触 48 小时, 观察果蝇存活及粪便色泽。根据初试结果认为拌饲可行, 然后按上法但不加食用色素给药 4 天, 按实验设计程序 3 : 2 : 2 交配, 观察不育情况。

根据预试结果, 决定正式实验以胺草灵 0、100、300、500mM 和 50 μ M 的 MMS 给药, 给药前先饥饿 4 小时。胺草灵给药 96 小时, MMS 给药 48 小时, 给药后雄蝇按 3 : 2 : 2 程序与 Muller-5 处女蝇以 1 : 3 交配, 即每一管有一只经处理过的雄蝇每隔 3、2、2 天分别与一批新处女蝇交配。孵出的 F_1 代再以每一管(即交配数)按雌与雄 1 : 1 进行 F_1 — P_2 交配, 按 Wurgler 等⁽⁶⁾所述的标

准于14天后观察F₂代,记录致死数、不育数,对可疑的则继续进行F₃代培养和观察。果蝇均在25℃室温下繁育。根据受试染色体数(即F₁代交配的雌蝇数减去不育数)与致死阳性管数求出致死率。按Kastenbaum—Bowman方法进行统计和评价⁽⁷⁾。

结 果 与 讨 论

一、实验结果表明(表1),空白对照

的自发突变率为0.28%。据美国环境保护局的报告⁽⁸⁾标准品系的自发突变率为0.1~0.3%。Kilbey等⁽⁹⁾认为20多年来几个实验室的结果基本相近,自发突变率为0~0.33%。据此,可认为我室果蝇的自发致死率在一般正常范围内。阳性对照物MMS的致死率为3.54%,与空白对照组有非常显著意义($P<0.01$),说明所用的果蝇品系和试验方法是可信的。

表1 胺草灵的果蝇伴性隐性致死试验结果

受试物 剂 量 (mM)	I			I			II			总 计		
	受色 试体 染数	致死 数	致死 率 (%)	受色 试体 染数	致死 数	致死 率 (%)	受色 试体 染数	致死 数	致死 率 (%)	受色 试体 染数	致死 数	致死 率 (%)
空白对照 —	600	2	0.33	621	2	0.32	589	1	0.17	1810	5	0.28
MMS 50μM	789	28	3.55*	700	24	3.43*	585	18	3.08*	2074	70	3.38*
胺草灵500	1064	13	1.22	1054	12	1.14	940	9	0.96	3058	34	1.11*
胺草灵300	564	5	0.89	572	3	0.52	593	2	0.34	1729	10	0.58
胺草灵100	652	1	0.15	682	2	0.29	646	2	0.31	1980	5	0.25

* $P<0.01$

表2 500mM组胺草灵二次实验结果

实验 次数	I			I			II			总 计		
	受色 试体 染数	致死 数	致死 率 (%)	受色 试体 染数	致死 数	致死 率 (%)	受色 试体 染数	致死 数	致死 率 (%)	受色 试体 染数	致死 数	致死 率 (%)
1	461	5	1.08	408	6	1.47	424	4	0.94	1293	15	1.16
2	603	8	1.33	646	6	0.93	518	5	0.97	1765	19	1.08
总计	1064	13	1.22	1054	12	1.14	940	9	0.96	3058	34	1.11

二、为获得实验的重现性,对500mM胺草灵进行了一次重复,根据实验结果(表2)两次数据基本接近,故将二次实验结果相加列入表1。从表1可见500mM胺草灵的致死率为1.11%,有非常显著意义($P<0.01$)。至于各期特异性分析及300mM剂量组因样本数较少按Kastenbaum—Bowman法未见有显著意义,但500mM的各窝及300mM的第1、3窝和总数均为对照组的倍量。各剂量组的致死率,500、300和100mM分别为1.11%、0.58%和0.25%,有一定的剂量效应关系。根据试验组的突变率大于自发突变

率的两倍,并有剂量效应者为阳性反应⁽¹⁰⁾的标准,可认为胺草灵在高剂量时对果蝇伴性隐性致死试验阳性。

三、果蝇伴性致死试验对人的意义,国际环境致变物和致癌物防护委员会⁽¹¹⁾认为,果蝇伴性隐性致死试验所能检出遗传学改变的几种类型(点突变、小缺失、重排),特别是小缺失,相信亦与人的遗传负荷有关。点突变对杂合的携带者的有害效应是明显地增加。Kilby⁽⁸⁾认为果蝇试验阴性结果在没有其他真核系统试验支持前不能完全宣称为无诱变性,但如果(下转第176页)

迄今国内外文献记载的Hb New York十多个家系中,除了2个是古巴人⁽³⁾,1个是泰国人⁽¹²⁾外,其余均为中国血统。这种异常血红蛋白在我国分布较广,以南方发生率比较高。根据血红蛋白普查结果,Hb New York的发生率在广东省为5/8,621,湖南省为2/2,268,江西省为1/9,041,湖北省为0/1,139。Hb New York在我国上述4省的发生率为0.38%⁽¹³⁾。Hb New York在浙江省的发生率还有待于进一步开展血红蛋白病的普查工作。一般异常血红蛋白都有家族遗传史,弄清这种血红蛋白在浙江的发生情况对研究我国Hb New York在不同民族间的分布是很有必要的。

参 考 文 献

1. Ranney H M, et al. Nature 1967; 213: 876.

2. Blackwell R Q, et al. Am J Phys Anthropol 1971; 34: 329.
3. Saenz G F, et al. Hemoglobin 1980; 4(1): 101.
4. Zeng Yi-tao, et al. Hemoglobin 1982; 6(1): 61.
5. 黄淑娟, 等. 上海医学 1979; 2(2): 60.
6. Clegg J B, et al. J Mol Biol 1966; 19: 91.
7. 曾溢滔, 等. 上海医学 1980; 3(9): 40.
8. 黄淑娟, 等. 上海医学 1981; 4(8): 37.
9. Chang J y, et al. FEBS Lett 1978; 93(2): 205.
10. Sack J S, et al. Hemoglobin 1978; 2(2): 153.
11. Perutz M F. Proc Roy Soc London 1969; 173: 113.
12. Pootrakul S, et al. J Med Ass Thailand 1971; 54: 688.
13. 曾溢滔, 等. 遗传学报 1982; 9(2): 125.



(紧接第168页)是阳性效应,必须认为有高的实际价值。从本实验及以前实验的结果表明,胺草灵不仅能诱发生殖细胞的染色体畸变,且也是基因突变的诱发剂。基因突变可以遗传给后代,故该农药对人的生殖细胞可能有潜在性损伤。

(承北京大学生物系及杭州大学生物系提供果蝇原种特此致谢)

参 考 文 献

1. 黄幸纾, 等. 浙江医科大学学报 1979; 8(2): 63.
2. 徐惟安, 等. 浙江医科大学学报 1979; 8(3): 125.

3. 王敏, 等. 浙江医科大学学报 1981; 10(5): 211.
4. 徐惟安, 等. 浙江医科大学学报 1982; 11(4): 169.
5. Nguyen T D, et al. Mutat Res 1979; 63(1): 67.
6. Wurgler F E, et al. Drosophila as assay system for detecting genetic changes, in: Kilbey B et al. Handbook of mutagenicity test procedures Amsterdam: Elsevier, 1977; 335~375.
7. Kastenbaum M A Bowman K D Mutat. Res 1970; 9: 529.
8. Lee W R, et al. Mutat Res 1981; 123: 193.
9. Kilbey B J, et al. Mutat Res 1981; 85(3): 141.
10. David Brusick. Genetic Toxicology, in: Hayes A W et al. Principles and Method of Toxicology, New York: Raven Press, 1982; 249.
11. ICPMC Mutat Res 1983; 114(2): 117.

腺 草 灵

徐维安, 等. 除草剂腺草灵毒性试验 V. 果蝇伴性隐性致死试验. 浙江医科大学学报 1984; 13(4): 167.

以前研究表明腺草灵在一定剂量时能引起小鼠精子畸形, 小鼠显性致死试验阳性, 尚能诱发小鼠精子畸形。

作者以雄性Caston-S野生型与雌性Muller-5果蝇进行腺草灵伴性隐性致死试验。腺草灵剂量为0、100、300、500mM和阳性对照组MMS 50 μ M。试验结果: 致死率分别为0.28、0.25、0.58、1.11和3.54%。高剂量组及MMS与空白对照组比较, 有非常显著意义($P<0.01$), 且有剂量效应关系。这表明腺草灵对生殖细胞能引起可遗传的基因突变。

异常血红蛋白

周振群, 等. 浙江发现的一例Hb New York 及其结构分析. 浙江医科大学学报 1984; 13(4): 173.

本文报道1982年在浙江丽水县发现的一例快速血红蛋白变种, 其醋酸纤维薄膜电泳泳及淀粉胶电泳迁移率相当于血红蛋白K组。先证者体质康健, 无临床症状。家系调查发现除先证者外, 其他5个成员均无异常血红蛋白。异常血红蛋白成分的相对含量为45.3%。异丙醇试验阴性。此血红蛋白的肽链通过8M尿素的CM-22纤维素层析柱进行分离, 发现一种异常的 β 链, 经氨乙基化及胰蛋白酶水解, 作指纹分析, 分离出异常肽段, 将异常肽段经氨基酸组或和顺序测定, 证实其 β 链N端第113位的缬氨酸被谷氨酸所替代, 即血红蛋白New York (β 113 (G15) Val $\rightarrow$ Glu)。

N-甲基-N'-(4-氯-邻甲苯基)脲

N-亚硝化

徐宗藩, 等. 杀虫剂代谢物N-甲基-N'-(4-氯-邻甲苯基)脲的N-亚硝化. 浙江医科大学学报 1984; 13(4): 169.

本文研究了N-甲基-N'-(4-氯-邻甲苯基)脲在体外和体内的N-亚硝化, 用化学方法合成了N-甲基-N-亚硝基-N'-(4-氯-邻甲苯基)脲, 并用IR, NMR, MS和TLC技术进行了结构测定。大白鼠灌胃试验表明, 将N-甲基-N'-(4-氯-邻甲苯基)脲和亚硝酸钠同时喂食, 半小时后即可在胃内检出N-甲基-N-亚硝基-N'-(4-氯-邻甲苯基)脲。

软组织肿瘤

纤维瘤

夏贤良 苏咏元. 肌-腱膜纤维瘤病. 浙江医科大学学报 1984; 13(4): 192.

肌-腱膜纤维瘤病相当少见, 其病因仍未明。本文报告组织学证实的20例, 女14例, 男6例。半数以上病例出现肿块时年龄不足24岁。肿瘤常起于肩胛带或臀部肌肉。所有病例均诉深部坚硬而固定的肿块。大体上肿瘤轮廓不规则, 质地似橡皮样, 切面灰白色, 广泛浸润肌组织而无明确界限, 极少包膜形成。主要组织学改变为细长而均匀的细胞, 为丰富胶原纤维包围分隔, 核椭圆或长形, 无异型的核, 核分裂少见。大部病例容易与纤维肉瘤鉴别。一般宜局部广泛切除, 8例术后1次或多次复发。复发病例组织学上仍保持高度良性, 可作同样处理, 预后良好, 不必截肢。

N-METHYL-N'-N-NITROSATION (4-CHOLORO-O-TOLYL)UREA

Xu Zhongfan, et al. N-Nitrosation of N-Methyl-N'-(4-Chloro-o-Tolyl) Urea, a Metabolite of Chlordimeform. J Zhejiang Med Univ 1984; 13(4):169.

The N-nitrosation of N-methyl-N'-(4-chloro-o-tolyl)urea has been studied in vitro and in vivo respectively. N-methyl-N'-nitroso-N'-(4-chloro-o-tolyl)urea was chemically synthesized and its chemical structure was determined by IR, NMR, MS and TLC techniques. Experiments in rats have proved that N-methyl-N'-nitroso-N'-(4-chloro-o-tolyl)urea might be detected in the stomach 30 min after oral administration of a mixed solution of N-methyl-N'-(4-chloro-o-tolyl)urea and sodium nitrite.

AMIPROPHOS

Xu Weian, et al. Study on Toxicity of Amiprophos V. Sex-linked Recessive Lethal Test in *Drosophila Melanogaster*. J Zhejiang Med Univ 1984; 13(4):167.

Previous studies reported that amiprophos gave rise to chromosomal aberration of spermatocyte, positive result in the dominant lethal test and increase of sperm with abnormal morphological changes. We carried out a recessive lethal test on amiprophos with wild type Canton-S male *drosophila* and Muller-5 female *drosophila*. The dosages were 0, 100, 300, 500µM of amiprophos and 50 µM of MMS for positive control. Experimental results revealed lethality rates were 0.28, 0.25, 0.58, 1.11 and 3.54% respectively. Comparison of the results of the high dosage groups of amiprophos and of MMS with that of the negative control ($P < 0.01$) showed marked significance as well as dose response. The study indicates that amiprophos might cause transmissible gene mutation in germ cells.

SOFT TISSUE TUMOR FIBROMATOSIS

Xia Xianliang and Su Yongyuan Musculo-aponeurotic Fibromatosis. J Zhejiang Med Univ 1984; 13(4):192.

Musculo-aponeurotic fibromatosis is fairly rare. Its exact pathogenesis remains obscure. This paper reports 20 cases confirmed histologically. Fourteen of them are females and 6 males with over half of them younger than 24 years old at the time the tumors appeared. The tumor originated most often from the muscles of the shoulder girdle and the gluteal region. All the patients complained of the presence of firm or hard masses usually fixed to the underlying structures. Grossly the tumor is irregular in outline and rubbery in consistency with a grayish white surface. It infiltrates extensively into the muscle tissue without a clear demarcation line and encapsulation is rarely seen. The main histological findings consist of uniform-sized slender cells with either ovoid or elongated nuclei, surrounded or separated from one another by abundant collagen. No atypical nuclei are found in the cells. Mitotic figures are scarcely detected. Its differentiation from the fibrosarcoma is evident in the majority of cases. The usual accepted treatment is extensive local excision. In 8 cases the tumor recurred once or more. Recurrent tumors which display a similar high degree of histological benignancy could be treated in the same way. In view of the excellent prognosis, amputation is not suggested.

ABNORMAL HEMOGLOBIN

Zhou Zhenqun, et al. Structural Analysis of a Case of Hb New York Discovered in Zhejiang Province. J Zhejiang Med Univ 1984; 13(4):173.

A fast moving hemoglobin (Hb) variant with its cellulose acetate membrane electrophoretic mobility and starch-gel electrophoretic mobility similar to those of the Hb K group was found in a case in Lishui, Zhejiang province in 1982. The carrier was healthy without any clinical symptom. Family study showed that 5 of the 6 family members did not carry the abnormal hemoglobin except the carrier. The relative amount of abnormal hemoglobin of this carrier was 45.3%. Isoelectric point precipitation test of this carrier showed positive. The globin chains of the variant were isolated by 8 M urea CM-cellulose chromatography. The abnormal β chains were aminocetylated(AE) with ethylenimine. Tryptic digestion as well as amino acid composition and sequence analysis of the abnormal peptide indicated that the valine at position 113 in the β chain N-terminal had been replaced by glutamic acid, or Hb New York (β 113 (G15) Val $\rightarrow$ Glu).