

# 医用级硅橡胶遗传安全性的果蝇检测<sup>1)</sup>

李怀义 蔡功名 黄锦堂 杨龙春 王新民 庚镇城<sup>2)</sup> 张一新<sup>3)</sup>

(第二军医大学生物教研室,上海)

在致突物质和致癌物的测试中,果蝇检测系统越来越受到人们的重视。果蝇具有生活史短、容易饲养、耗资较少等优点,不仅可用于体内试验,测试从分子水平到染色体水平的各种遗传损害<sup>[1]</sup>,而且不需要外加代谢活化物质。果蝇的精细胞和精母细胞是代谢活化生殖细胞,前致癌剂可以被原位活化,特别是早期精细胞的代谢活性更高,现已在多种果蝇品系的整体匀浆中鉴定出几类细胞色素 P-450。并具有一个混合功能氧化酶系统<sup>[2]</sup>。果蝇的遗传背景清楚,七十多年来在果蝇的遗传学研究方面积累了大量的资料,建立了许多突变品系,可供应用。

医用级加成型硅橡胶是七十年代发展起来的新型硅橡胶,广泛用作器官代用品和其它永久性的植入件。1981年上海橡胶制品研究所开展了医用级加成型硅橡胶的合成研究。1982年由第二军医大学协作开展了生物学性能的测试研究。遗传毒理方面已作过测试的项目包括: Ames 试验、微核、姊妹染色单体互换(SCE)、非程序性 DNA 合成(UDS),染色体畸变分析、致畸试验等。本文报告两种果蝇检测方法的测试结果,一种是性连锁隐性致死试验(以下简称作 SLRL 法),另一种是并连 X 染色体法(以下简称作并连 X 法)。

## 材料和方法

本试验共测试了 A、B、C、D 4 种硅橡胶样品: A 是 ZG-D 医用级注射型硅橡胶, B 是 LS-4100 医用级加成型硅橡胶纯胶, C 是 LS-4100 医用级加成型硅橡胶混炼胶, D 是 MDX-

4-4210 医用级加成型硅橡胶混炼胶。硅橡胶是高分子化合物,经化学分析确定其浸出液中含有游离单体等物质。本试验通过给果蝇喂饲硅橡胶浸出液进行检测,该试液由上海橡胶制品研究所按照国际标准方法制备。

果蝇培养基组成如下:水、琼脂、白糖、玉米粉、干酵母粉、丙酸、对羟基苯甲酸丁酯。培养温度为  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 。

### 1. 可口性试验

用硅橡胶浸出液原液(含 2% 蔗糖和 0.2% 伊红)喂饲经过 6 小时饥饿的 Oregon K 品系雄蝇 50 只,观察摄食行为,12 小时后将雄蝇移至含新鲜培养基的培养管中,经数小时后解剖观察,若消化道及粪便中含有色素即可确证雄蝇进食了硅橡胶浸出液。

### 2. 毒性试验

用不同浓度的试液(硅橡胶原液、1/2 稀释液、1/10 稀释液)分别喂饲经过 5 小时饥饿的 Oregon K 雄蝇,3 天后将雄蝇移至含新鲜培养基的培养管中,计算存活的雄蝇数。

### 3. SLRL 试验的分离程序

SLRL 试验参照 Würzler 等<sup>[1]</sup>和 Brusick<sup>[2]</sup>介绍的方法进行。

*Li Huaiyi et al.: Detecting Hereditary Safety of the Medical Silicium Rubber in Drosophila Melanogaster*

- 1) 本研究得到复旦大学盛祖嘉、刘祖洞教授和上海铁道医学院叶恩赐副教授、艾裕和讲师的大力帮助;张麟、陈伟忠、陈晓东、张象温、邵兴国、鲁彤华、郭义柱、王其华参加部分工作,谨向他们表示衷心感谢。

- 2) 复旦大学遗传研究所。

- 3) 同济大学进修生。

本文于 1985 年 12 月 24 日收到。

(1) 用乙醚麻醉法收集若干只 Oregon K 雄蝇 (1—2 日龄), 并与 Basc 处女蝇 (2—4 日龄) 按 1 ♂:3 ♀ 的比例进行杂交 (图 1)。这是第 I 窝, 代表精子阶段, 即第 I 窝雄蝇的精子在接受被测试物处理时基本上处于精子阶段。

(2) 第 I 窝培养 2 天后, 将雄蝇移至另一新培养管并与另外 3 只处女蝇杂交, 这是第 II 窝, 代表精细胞阶段, 即第 II 窝雄蝇的精子在接受被测试物处理时基本上处于母细胞阶段。

(3) 第 II 窝培养 3 天后, 将雄蝇移至另一新培养管中并与另外 3 只处女蝇杂交, 这是第 III 窝, 代表精母细胞阶段, 即第 III 窝雄蝇的精子在接受被测试物处理时基本上处于精母细胞阶段<sup>[9]</sup>。如果第 I 窝雄蝇数为 50 只, 则每 1 窝有 50 只培养管, 3 窝合计有 150 只管。

(4) 经过 12 天左右的培养, F<sub>1</sub> 即可羽化, 在此之前将亲代弃去, 以避免亲、子代相混。从每只管中取 F<sub>1</sub> 肾形红色眼雌蝇 10 只以及 F<sub>1</sub> 棒状杏色眼雄蝇 30 只, 按 1 ♀:3 ♂ 的比例进行交配, 分装于 10 只培养管, 这样就有 1500 只培养管, 它们代表被测试的 1500 条 X 染色体。

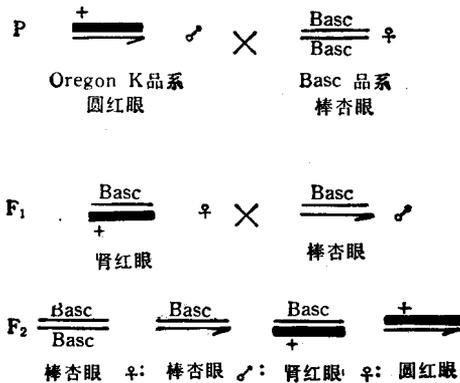


图 1 SLRL 试验示意图  
当亲代雄蝇中发生 X-连锁隐性致死突变时, F<sub>2</sub> 中就不会出现野生型圆红眼雌蝇

分窝技术有助于判定 X 染色体上隐性致死突变发生于精子形成的哪个阶段, 因为果蝇对某种待测物的敏感性可能具有阶段特异性<sup>[7,9]</sup>。另外分窝技术也有助于识别假阳性的产生。这里所说的假阳性是指在一个被处理的雄蝇所产

生的后代中发生的同一致死突变簇。由于分窝程序使不同雄蝇的后代处于分别培养的状态, 可以分别观察计数, 因此假阳性容易被识别和剔除<sup>[2]</sup>。

#### 4. SLRL 自然突变率的测定

Oregon K 雄蝇不经任何处理而直接喂饲新鲜培养基。试验按第 3 所述方法进行。到 F<sub>2</sub> 长成时观察计数。一只培养管中雌雄蝇合计在 20 只以上而未见有野生型雄蝇 (圆形红色眼) 者为阳性管, 即被测的这条 X 染色体上发生了隐性致死突变; 若发现有 2 只以上野生型雄蝇者为阴性管, 即未发生隐性致死突变。若只发现 1 只野生型雄蝇者则为可疑管, 若雌雄蝇合计在 20 只以下而未发现野生型雄蝇者亦为可疑管。对可疑管可以适当延长培养时间, 若仍不能确定时进行 F<sub>3</sub> 培养, 即取 F<sub>2</sub> 肾形红色眼雌蝇与 F<sub>2</sub> 状棒状杏色眼雄蝇交配, 观察计数 F<sub>3</sub>, 阳性与阴性所判定标准同上所述。将阳性管数积加得致死数, 将阴性管数积加得非致死数, SLRL 致死率可由下式求得。

$$\text{致死率} = \frac{\text{致死数}}{\text{非致死数} + \text{致死数}} \times 100\%$$

#### 5. 并连 X 染色体试验

并连 X 法中使用的野生型雄蝇是 Oregon K 品系, 雌蝇是含并连 X 染色体的 yf 品系。雌蝇是 X 染色体上黄体基因 (y) 和卷刚毛基因 (f) 的纯合子。处女蝇从 yf ♀ 和 FM 6 ♂ 杂交的后代中挑选。FM 6 是一个平衡品系, 其 X 染色体上有以下的标记基因: y sc dm B, 由于 dm 的存在, 纯合的雌蝇是不育的。FM 6 可用在实验室中维持 yf 品系。本试验中将 Oregon K 雄蝇与 yf 处女蝇进行群体杂交 (每只 3 × 10 厘米培养管中分装雄蝇 10 只和雌蝇 30 只), 然后观察 F<sub>1</sub> 的性比 (图 2)。

#### 6. 阳性对照组试验

给经过 4 小时饥饿的 Oregon K 雄蝇喂饲用 1% (SLRL 法中) 或 2% 蔗糖配制的 0.015 M 甲基磺酸乙酯 (EMS, 系上海试剂一厂产品), 24 小时后分别进行 SLRL 法和并连 X 法试验。

#### 7. 阴性对照组试验

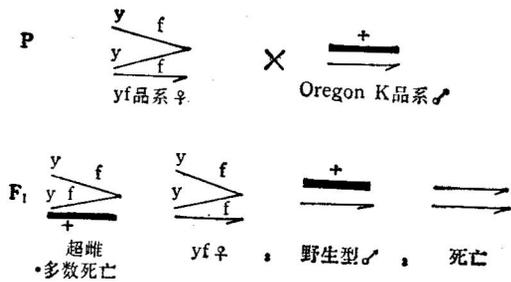


图2 并连X染色体试验示意图

当亲代雄蝇的X染色体上发生了致死突变时，  
F<sub>1</sub>中的野生型雌蝇减少而使F<sub>1</sub>性比下降

给经过4小时饥饿的 Oregon K 雄蝇喂饲 1% (SLRL 法中) 或 2% (并连X法中) 蔗糖, 24 小时后分别进行 SLRL 法和并连X法试验。

### 8. 硅橡胶各测试组试验

给经过4小时饥饿的 Oregon K 雄蝇分别喂饲不同类型和不同浓度的硅橡胶浸出液, 24 小时后分别进行 SLRL 法和并连X法试验。

## 结果和讨论

在可口性试验中, 野生型雄蝇的摄食行为积极活跃, 经过体视显微镜下的解剖观察, 看到消化道和粪便明显红染, 证明果蝇确实摄入了硅橡胶浸出液。毒性试验的结果证明硅橡胶浸出液对果蝇无毒性作用, 并不招致果蝇的死亡, 因此也不能计算 LD<sub>50</sub>。SLRL 试验结果见表 1。

为了比较不同试验组的数据, 根据 Würgler 等介绍的方法计算出各测试组的诱发突变率 (Pi)<sup>[1]</sup>。从表 1 可以看出硅橡胶各测试组的 Pi 值与阴性对照组的致死率都很接近, 其中 A 样品的 Pi 为负值, 这说明 A 样品没有诱发突变。当然由于统计学的原因, 差异显著性测定仍根据对照组的致死率和各样品测试组的致死率来进行。经计算上述各样品测试组的  $\chi^2$  值, 证明各测试组的 P 值均未达到具有显著差异的水平。因此可以说对 4 种硅橡胶样品的 SLRL 试验均得到了阴性结果。Kilbey 等提出在一般情况下, 实验室的 SLRL 自然突变率不会超过 0.2—0.4%, 可将此数据作为比较的基线<sup>[5]</sup>。

表1 硅橡胶诱变性的 SLRL 检测结果

试验分组	分离序号	F <sub>2</sub> 试验		
		测试配 子数	F <sub>2</sub> 中致死突变	
			致死数	%
自然突变率	1	650	1	0.15
	2	560	1	0.17
	3	630	0	0
	1—3	1840	2	0.109
阴性对照	1	540	0	0
	2	541	2	0.372
	3	507	1	0.198
	1—3	1602	3	0.187
阳性对照	1	271	53	19.56
	2	176	25	14.2
	3	231	31	13.42
	1—3	678	109	16.07
硅橡胶 A (原液)	1	753	1	0.13
	2	587	1	0.17
	3	339	1	0.29
	1—3	1661	3	0.18
硅橡胶 B (原液)	1	648	2	0.31
	2	614	2	0.32
	3	642	3	0.46
	1—3	1904	7	0.37
硅橡胶 B (1/2 稀释液)	1	703	2	0.28
	2	697	2	0.28
	3	654	2	0.30
	1—3	2054	6	0.292
硅橡胶 C (原液)	1	658	5	0.76
	2	584	1	0.17
	3	535	0	0
	1—3	1777	6	0.338
硅橡胶 D (原液)	1	538	1	0.186
	2	343	2	0.583
	3	356	1	0.281
	1—3	1237	4	0.32

Würgler 等提出, 当试验组突变率超过自然突变率的 2 倍并有剂量效应关系时可以认为是阳性结果<sup>[10]</sup>。根据上述标准来衡量我们的数据, 硅橡胶各测试组的诱发突变率并未超过本实验室自然突变率的 2 倍, 因此考虑为阴性结果是合理的。

Lee 等在美国环境保护局遗传毒理计划的报告中指出, 通过真核生物性细胞内可遗传突变来筛选化学物质并对其危险性作出评价方面, SLRL 试验的优点在于它的客观性。他们

表 2 硅橡胶诱变性的并连 X 染色体试验结果

试验组	浓度	F <sub>1</sub> 雌蝇数	F <sub>1</sub> 雄蝇数	F <sub>1</sub> 总蝇数	性比 $\left(\frac{\sigma^7}{\varphi + \sigma^7}\right) \pm S.E$
阳性对照	0.015M EMS	1178	1019	2197	0.4638 ± 0.0106
阴性对照	2%蔗糖溶液	1300	1991	3291	0.6050 ± 0.0085
A	原液	3596	5320	8916	0.5967 ± 0.0052
A	1/2 稀释液	1571	2414	3985	0.6058 ± 0.0077
A	1/10 稀释液	1468	2141	3609	0.5932 ± 0.0082
C	原液	1136	1962	3098	0.6333 ± 0.0086
C	1/2 稀释液	1963	2752	4715	0.5837 ± 0.0072
C	1/10 稀释液	1215	1911	3126	0.6113 ± 0.0087
D	原液	2070	3073	5143	0.5975 ± 0.0068
D	1/2 稀释液	2215	3290	5505	0.5976 ± 0.0066
D	1/10 稀释液	1942	3003	4945	0.6073 ± 0.0069

总结了文献报道的 421 种化合物, SLRL 试验为阳性的有 198 种, 阴性的有 46 种。有 62 种化合物可以明确地归类为致癌或致突变方面的阳性物或阴性物, 其中有 56 种 (50 种阳性物及 6 种阴性物) 在致癌与致突变方面是一致的, 一致率达到 90%<sup>[6]</sup>。由此可见, SLRL 试验对于致癌物的筛选具有重要的价值。

并连 X 染色体试验结果见表 2。阴性对照组的性比为 60.5%, 显然高于理论预期值 (50%)。这是由于 yf 雌蝇与野生型雄蝇比较起来对培养条件的要求更为苛刻, 在相同的培养条件下, 雌蝇的羽化率比雄蝇低, 雌蝇的抵抗力也比雄蝇差一些, 因此实际得到的性比高于理论值。阳性对照组的性比为 46.38%, 比阴性对照组的性比低 14.12%, 说明 EMS 诱发了 X 连锁的致死突变, 故性比下降的比较明显。硅橡胶 3 个样品共 9 个浓度组的性比与阴性对照组性比很接近, 均波动在 60% 左右。除了 C 样品原液组外, 其余各组的 P 值均未达到显著差异的水平。此外, 同一样品的不同浓度组间也没有剂量效应关系, 因此用并连 X 法对 A、C、D3 个样品的测试均得到阴性结果。表 2 中的标准误 (S.E) 系由下式求得<sup>[8]</sup>:

$$S.E. = \sqrt{\frac{P(1-P)}{n}}$$

上式中 n 为各试验组 F<sub>1</sub> 雌、雄蝇总数, P 为各组相应的性比值。如果结合各组的 S.E. 进行比较, 可以看出各组间的性比数值有部分

交叉, 这也反映出阴性结果的特征。

并连 X 法比 SLRL 法简便快速, 不需要分窝培养, 而且培养一代即可得结果。特别是有多种样品需要检测时, 可以将它作为粗筛性试验, 这样在短时间内就可以提供有关样品的致突变性方面的信息。当然由于并连 X 法比较粗放, 仍不能以它取代 SLRL 法。在现有的多种果蝇检测系统中, 还是应以 SLRL 试验为首选方法<sup>[4]</sup>。

### 参 考 文 献

- [1] Bears, A. J. et al.: 1977. *Mutation Res.*, 44: 257.
- [2] Brusick, D.: 1980. *Principles of Genetic Toxicology*, New York, Plenum Press, p. 254—266.
- [3] Brusick, D.: 1982. *in: Principles and Methods of Toxicology* (ed. by A. W. Hayes et al.), New York, Raven Press, p. 246—249.
- [4] ICPEMC.: 1982. *Mutation Res.*, 99: 13—91.
- [5] Kilbey, B. J. et al.: 1981. *ibid.*, 85: 141.
- [6] Lee, W. R. et al.: 1983. *ibid.*, 123: 183.
- [7] Sancararayanan, K. et al.: 1980. *in: Progress in Environmental Mutagenesis* (ed. by M. Alacevic), Amsterdam, Elsevier/north-holland Biomedical Press, p. 59—90.
- [8] Sheppard, P. M.: 1973. *Practical Genetics*, Oxford, Blackwell Scientific Publication, p. 17.
- [9] Vogel, E. et al.: 1976 *in: Chemical Mutagens: Principles and Methods for Their Derection* (ed by A. Hollaender), New York, Plenum Press, 4: 93—142.
- [10] Würgler, F. E. et al.: 1975. *Arch. Genet.*, 48: 158.
- [11] Würgler, F. E. et al.: 1977. *in. Handbook of Mutagenicity Test Procedures* (ed. by B. J. Kilbey et al.), Amsterdam, Elsevier/north-holland Biomedical Press, p. 335—373.