

昆明山海棠诱发果蝇生殖细胞非整倍体的研究^①

汪 旭 合正基 刘素清

(云南师范大学生命科学系, 昆明 650092)

摘 要 以黑腹果蝇的非整倍体测试品系评价了云南地方中草药昆明山海棠水抽提物 (THH) 在动物生殖细胞中的非整倍体诱发效应, 秋水仙素 (COL) 为本试验的阳性对照物。结果发现, 在所有雌雄成虫口饲染毒组中, THH (10—80mg/ml) 及 COL (2.5—20 μ g/ml) 均显著诱发生殖细胞非整倍体, 从而导致 X0 及 XXY 例外子代频率显著升高 ($P < 0.001—0.05$)。试验表明: THH 及 COL 均能够在果蝇生殖细胞形成过程中导致染色体的丢失或不分离; 在本研究的受试剂量范围内, 雄性果蝇对受试物诱发生殖细胞 X 染色体遗失效应较为敏感, 而雌性果蝇则易检出诱发生殖细胞性染色体不分离的化合物。

关键词 昆明山海棠, 黑腹果蝇, 染色体不分离, 染色体丢失, 非整倍体

Aneuploidy Induction by Water-extract of *Tripterygium hypoglaucum* (Leve) Hutch in Germ Cells of *Drosophila melanogaster*

Wang Xu He Zhengji Liu Suqing

(Department of Life Sciences, Yunnan Normal University, Kunming 650092)

由染色体异常分离造成细胞中整条染色体获得与丢失 (gain and loss) 是非整倍体形成的根本原因。非整倍体 (Aneuploidy) 是生物学研究中的重要遗传学终端指标, 也是人类群体中一类常见的遗传异常。据报道: 50% 的人类自发流产是由于非整倍体而引起⁽⁶⁾; 异常新生儿中, 非整倍体 (三体) 的频率也较高⁽⁴⁾。鉴于各类非整倍体诱发剂在细胞中的作用靶标不同⁽³⁾, 建立各类具不同终端指标的非整倍体诱发剂检测系统是毒理遗传学中的重要课题。

昆明山海棠 (*Tripterygium hypoglaucum* (Leve) Hutch, THH) 为云南地方中草药, 其主要化学成份为生物碱、萜类、内酯及皂甙, 已广泛用于治疗多种免疫性疾病, 该药物在小鼠体细胞中表现非整倍体诱发效应⁽⁷⁾; 秋水仙素 (Colchicine, COL) 为典型的纺锤体毒剂, 通过抑制微管蛋白的聚合而诱发非整倍体, 为本试验的阳性对照物。

本试验采用了果蝇非整倍体测试品系检测 THH 及 COL 在生殖细胞中的非整倍体诱发效应, 同时探讨细胞非整倍体诱发剂对生殖细胞染色体分离的影响以及体细胞与生殖细胞非整倍体诱发剂检测系统的吻合度。

1 材 料 和 方 法

1.1 材 料

1.1.1 黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 杂交用雄性亲本为 yB / Yy⁺, 雌性亲本为 yw / yw。均购自上海第

①国家自然科学基金及云南省国际合作基金资助。

二军医大学特殊毒理教研室⁽¹⁾, 该系统检测染色体丢失与不分离的原理见表 1。

1.1.2 受试物 昆明山海棠根部水抽提物制备: 取昆明山海棠根部粉碎物 100g, 以 1 000ml 双蒸水浸泡 1h, 煮沸 3 次, 每次 30min, 滤渣, 浓缩为 50ml, -20℃ 保存。抽提液以 2g/ml 计, 实际抽干得率为 2.8%, 使用前以 5% 的无菌蔗糖溶液稀释。受试剂量为 10—80mg/ml。秋水仙素为阳性对照物, 使用前以 5% 无菌蔗糖溶液稀释, 受试剂量为 2.5—20 μ g/ml。5% 蔗糖液为阴性对照物。

1.2 方法

1.2.1 染毒与杂交 每测试组选 20 只羽化后 1—2 天的 yB/Yy⁺ 雄性果蝇 (或 yw/yw 雌性处女蝇), 于空瓶中饥饿 4h 后, 按要求饲喂受试物 24h, 将上述处理后果蝇与未经处理的 yw/yw 处女蝇 (或 yB/Yy⁺ 雄蝇) 按 ♀: ♂ = 2:1 的比例在普通培养基中杂交, 杂交间隔为 2—3—3 天⁽⁸⁾。25℃ 培养至 F₁ 代全部羽化。分类计数 F₁ 代各种表型分布及例外子代发生率。F₁ 代中正常 ♂ 为灰体, 例外子代为黄体 (X0); 正常 ♀ 为黄体, 例外子代为灰体 (XXY)。

1.2.2 统计学分析 以卡方校正检作显著性分析。

表 1 检测果蝇生殖细胞染色体不分离图解

		亲 代: ♂ yB/Yy ⁺ × ♀ yw/yw			
		正常 ♂ 配子		不分离 ♂ 配子	
♀	♂	yB	Yy ⁺	yB/Yy ⁺	0
	y w 正常配子		yw/yB XX	yw/Yy ⁺ XY	yw/yB/Yy ⁺ XXY
yw/yw 0 不分离♀配子		yw/yw/yB XXX yB X0	yw/yw/Yy ⁺ XXY Yy ⁺ 0Y	yw/yw/yB/Yy ⁺ XXXY yB/Yy ⁺ XY	yw/yw XX 00

w/w: 白眼; B/B: 棒眼; B 对 W 不完全显性, B/W 为肾眼; y/y: 黄体; y/y⁺: 灰体。

2 结 果

试验结果见表 2。当以 THH 处理雄性亲本后, 所有受试组的例外子代频率显著升高 ($P < 0.001—0.05$), 在 10—40mg/ml 剂量组, 例外子代 (X0) 均由于其雄性亲本配子丢失一条 X 染色体所致。最高剂量组中则同时出现 XXY 及 X0 例外子代, 且 X0 子代是 XXY 子代的三倍 (44/14), 暗示雄性亲本经 THH 处理后, 配子染色体在减数分裂过程中出现染色体丢失及染色体不分离二类事件, 但以前者居多。以 THH 处理雌性亲本果蝇, 在各剂量受试组中, 例外子代的发生率均显著升高 ($P < 0.001$), 然而, 相较于雄性果蝇处理组, 雌性受试组例外子代频率偏低, 且各剂量组均出现 XYY 及 X0 子代, XYY 个体数较 X0 个体数为多。

在阳性对照物处理组, COL 处理雌、雄性亲本后, 例外子代频率较溶剂对照均显著增加 ($P < 0.001—0.05$), 所有例外子代均由于受处理的亲本配子形成过程中 X 染色体丢失所致 (即均为 X0 型), 当受处理亲本为雌性时, 例外子代频率显著低于雄性亲本处理组。

3 讨 论

作为诱发非整倍体的阳性对照物, COL 在果蝇生殖细胞发育过程中显著诱发雌雄配子 X 染色体丢失从而导致 X0 子代产生, 但雌性亲本受处理后, 例外子代的频率偏低, 表现了其对诱发 X 染色体丢失的化学物质敏感度不及雄性亲本的特点; 在高剂量时 (20 μ g/ml), F₁ 子代数明显减少, 提示 COL 可诱发不育。

以往的研究已证明, THH 具有诱发小鼠体细胞 C-有丝分裂、滞后染色体 (lagging chromosome) 及微核产

生等一系列遗传损伤效应^(2,7)。在本研究工作中, THH 在雌、雄果蝇的生殖细胞形成过程中均表现了显著的非整倍体诱发效应, 导致高频率的例外子代产生, 证明 THH 在动物体细胞/生殖细胞中都系非整倍体诱变剂。

表 2 受试物诱发果蝇生殖细胞非整倍体频率

化合物	剂量	受处理果蝇性别	F ₁ 个体数			
			总数	例外子代数		
				No.(%)	XXY	X0
对照	—		1640	0	0	0
昆明山海棠	10	雄性	1998	4(0.2)*	0	4
THH	20		1780	2(0.1)*	0	2
(mg/ml)	40		1698	38(2.2)***	0	38
	80		1676	58(8.5)***	14	44
秋水仙素	2.5		雄性	1440	2(0.1)*	0
COL	5	1202		12(1.0)***	0	12
(μg/ml)	20	1436		88(6.0)***	8	80
对照	10	雌性	2342	1(0.04)	0	1
昆明山海棠	60		1653	9(0.5)***	6	3
THH	80		1048	8(0.8)***	7	1
(mg/ml)	80		1328	12(0.9)***	6	6
秋水仙素	2.5	雌性	1440	3(0.2)*	0	3
COL	5		1002	2(0.2)*	0	2
(μg/ml)	20		842	6(0.7)***	0	6

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ (Ycaset χ^2 校正测验)。

值得注意的是: THH 处理 yB/Yy^+ 雄性亲本和 yw/yw 雌性亲后, 所诱发的例外子代频率相差较大, 前者明显高于后者。当雄性亲本受处理, 其例外子代除最高剂量组外均为 X0 型, 暗示这些子代源于 X 染色体丢失的父本生殖细胞。在最高剂量组, 出现了 XXY 型例外子代, 表明 THH 在高剂量时能诱发雄性生殖细胞发育过程中 XY 染色体不分离。此外, 该剂量组中 X0 及 XXY 子代的比例悬殊, 为 3:1, 提示 X0 子代来源于二类配子: (1) 单纯的 X 染色体丢失所形成的性染色体缺如的配子, (2): XY 不分离所产生的相应无性染色体配子。THH 处理 yw/yw 雌性亲本后, 例外子代数也显著高于溶剂对照组, 各组均出现由 X 染色体丢失和 XX 染色体不分离所产生的异常雌配子形成的 X0 及 XXY 子代。其中 X0 频率略高于 XXY 个体, 推测 X0 个体也存在上述配子来源。

该果蝇测试系统的 yB/Yy^+ 品系对化合物的非整倍体诱发尤其 X 染色体丢失效应有较高的灵敏度; yw/yw 雌性果蝇虽对化学物质在生殖细胞形成时诱发染色体丢失的敏感度不足, 但却易检出在减数分裂过程中诱发性染色体不分离的化学物质。用该系统检测化学物质在生殖细胞中的非整倍体诱发效应, 应兼顾这一特点。

参 考 文 献

- (1) 李怀义等, 1989. 癌变畸变突变, 1 (1): 38—41.
- (2) 合正基等, 1992. 云南师范大学学报, 12 (3): 89—92.
- (3) Bond D J, 1987. Mutat. Res., 181: 257—266.
- (4) Hernandez A, et al, 1990. Mutat. Res., 232: 23—29.
- (5) Oogood C, et al, 1991. Mutat. Res., 259: 147—163.
- (6) Sankaranarayanan K, 1979. Mutat. Res., 61: 1—28.
- (7) Wang X, et al, 1993. Mutagenesis, 8(5): 395—398.

本文于 1994 年 2 月 16 日收到。