

## 口服避孕药诱发果蝇非整倍体的研究·

李怀义\*\* 王新民\*\* 蒋左庶\*\*\* 王肖鹏\*\*\*

第二军医大学 \*\*特殊毒理学教研室 \*\*\*生物学教研室, 上海

**摘要** 对6种国产口服避孕药和一种美国制造的口服避孕药在黑腹果蝇野生型Oregon K品系中诱发非整倍体的效应进行了实验观察。结果表明, 在高剂量(炔诺酮、甲地孕酮和炔雌醇的剂量分别为1500、2500、175ppm, 它们分别相当于人每日口服剂量的1.5、2.5、5.0倍)染毒的试验组中, 非整倍体的频率与溶剂对照组比较有高度显著的差异。从实验结果来看, 口服避孕药主要是引起染色体不分离, 并不是使染色体发生断裂而导致染色体丢失, 所以很可能主要是损害了细胞分裂机构(纺锤丝、中心粒、着丝粒)而导致染色体在子细胞中的非均等分配。

**关键词** 口服避孕药; 黑腹果蝇; 染色体不分离; 非整倍体

口服避孕药具有使用方便, 避孕效果良好的特点, 因此目前有大量的育龄妇女使用它们以达到节育的目的。但是已有证据说明作为多种口服避孕药重要成分的炔雌醇和炔诺酮对动物具有致癌性<sup>(1)</sup>。还有人认为口服避孕药是诱发人类非整倍体的化学物<sup>(2)</sup>, 并且每1000名活产儿中, 7种非整倍体疾病的总发生率高达5%<sup>(3)</sup>。为了进一步探讨避孕药是否具有遗传毒性, 对几种女用口服避孕药进行了诱发果蝇非整倍体的实验研究。

### 材料和方法

1. 果蝇测试品系: 黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*; 雄性亲本为 yB/Yy<sup>+</sup>, 雄性亲本为 yw/yw。以上测试品系均为本课题组培养而成<sup>(4)</sup>。
2. 受试物: 口服避孕药膜0号, 口服避孕药膜1号, 口服避孕药片0号, 口服避孕药片1号(以上均为上海信谊药厂产品), 口服避孕药片2号(上海第七制药厂产品), 18甲速效口服避孕药片(北京制药厂产品), NeIova(USA产品)。
3. 受试剂量: 在预实验中, 当按人每日

口服剂量(炔诺酮、甲地孕酮和炔雌醇的剂量分别为1000、1000、35ppm)处理幼虫时, 约有半数幼虫在染毒过程中死亡, 存活幼虫发育为成虫后有相当一部分是不育的。据此确定以下各受试剂量炔: 诺酮为600、1000、1500、2000ppm; 甲地孕酮为1000、2500ppm; 炔雌醇为35、58、70、117、175ppm。阴性对照物为5%蔗糖水溶液。阳性对照物为100ppm放线菌素D。

4. 方法: 将受试药品按所需剂量溶解于5%蔗糖水溶液中。用此溶液饲喂yw/yw品系幼虫24h。然后将染毒过的幼虫转移到新鲜培养基上。待发育到羽化后从中挑选处女雌蝇与yB/Yy<sup>+</sup>雄蝇进行杂交, ♀:♂=1:3。各试验组均按4-3-3天间隔分窝程序进行杂交培养。培养温度25±1℃, 相对湿度60%。

5. 观察计数标准: 本测试系统包含2个测试终点, 即性染色体不分离和性染色体丢失。F<sub>1</sub>中正常雌蝇的表现型为黄体肾形眼, 正常雄蝇为灰体白眼, 非整倍体雌蝇为灰体白眼(XXY型, 可育), 非整倍体雄蝇为黄体棒眼(XO型, 不育)。对全部检出的非整倍

\* 本研究得到国家自然科学基金的资助

体蝇均进行可育性试验，以进一步验证其基因型。上述XXY型是亲本雌蝇X染色体不分离的产物，XO型既可由亲本雌蝇X染色体不分离产生，也可由丢失产生。

6. 实验数据的统计学处理：对所有各组数据用卡方和Kastenbaum-Bowman两种检验方法进行统计学分析<sup>(5)</sup>。

**结果**

试验结果见表1。经上述两种统计学检验方法分析数据，得到相同的结果。阳性对

照组与阴性对照组之间有显著差异( $P < 0.05$ )。口服避孕药0号组与阴性对照组之间有高度显著的差异( $P < 0.01$ )。观察到了剂量效应关系。18甲速效口服避孕药片的测试结果与口服避孕药1号组基本一致。Nelova的成分与国产口服避孕药1号的组成相同，前者的炔雌醇含量比后者低23ppm，但是Nelova组的测试结果与阴性对照组比较有显著差异( $P < 0.05$ )，该组的XXY型和XO型的出现率约为口服避孕药1号组的10倍(表1)，这可能是由于Nelova的原料药的纯

**表 1 口服避孕药的果蝇非整倍体检测试验结果**

试验分组	剂 量(ppm)			分窝 序号	总数	F <sub>1</sub> 蝇数(只)	
	炔诺酮	甲地孕酮	炔雌醇			XXY型(%)	XO型(%)
口服避孕药0号	1500	2500	175	I	4396	11(0.25)	8(0.18)
				II	2974	1(0.03)	2(0.07)
				III	1288	2(0.16)	1(0.08)
				I-III	8658	14(0.16)**	11(0.13)**
口服避孕药1号	2000		117	I	768	1	2
				II	1044	1	0
				III	432	0	0
				I-III	2244	2(0.09)	2(0.09)
口服避孕药0号	600	1000	70	I	6650	3	2
				II	6306	2	5
				III	7492	4	2
				I-III	20488	9(0.04)	9(0.04)
口服避孕药1号	1000		53	I	5080	0	2
				II	6730	1	0
				III	7114	1	0
				I-III	18924	0(0.001)	2(0.01)
口服避孕药2号		1000	35	I	554	1	0
				II	7304	0	1
				III	6191	1	0
				I-III	20549	2(0.01)	1(0.01)
18甲速效口服避孕药 (甲基炔诺酮)	1000			I	4724	1	0
				II	4674	0	3
				III	6007	0	1
				I-III	15405	1(0.01)	4(0.03)
Nelova	1000		35	I	4436	4	8
				II	3768	5	1
				III	2344	1	1

续表

阴性对照 (5%蔗糖)	I - II	10548	10(0.1)*	10(0.1)*
	I	6329	1	1
	II	5819	2	2
	III	4476	0	0
阳性对照 (100ppm 放线菌素D)	I - II	16624	3(0.02)	3(0.02)
	I	6942	5	6
	II	5966	5	5
	III	7017	5	4
	I - II	19925	15(0.08)*	15(0.08)*

\* P&lt;0.05 \*\* P&lt;0.01

度高所致。

### 讨论

本研究采用活体动物体内实验方法测试口服避孕药诱发生殖细胞的非整倍体效应，遇到的一个重要问题是药物的致不育性。如果剂量过高以致大多数染毒果蝇不育，则因F<sub>1</sub>蝇数很少而得不出结果。如果剂量过低，可育性与阴性对照组无明显差异，则所得数据难以说明问题。因为在避孕药的剂量没有达到产生一定药效(本研究主要涉及的是产生一定程度的不育性)的情况下，诱发的非整倍体频率与阴性对照组比较没有显著差异(表1)，只有当剂量达到产生明显的不育效应时，才能观察到显著提高非整倍体频率的效应。表1中避孕膜0号组炔雌醇、甲地孕酮、炔诺酮的剂量分别为其最低剂量的5、2.5、1.5倍。如果口服避孕药2号组的可育性以1计，避孕膜0号组的可育性为0.42。而显著提高非整倍体频率的是避孕膜0号组。考虑到受试物为女用口服避孕药，我们采用了对雌性亲本yw/yw进行染毒的方法。如果在成蝇阶段染毒，由于卵子发生过程已到卵母细胞阶段，而且卵母细胞外有厚实的卵壳包围，药物难以透过卵壳作用于细胞<sup>(6)</sup>。因此我们选择了在幼虫阶段进行染毒。这样就可以防止由于实验方法的原因使药物作用达不到靶细胞而得出假阴性结果。幼虫期染

毒时靶细胞是卵原细胞，避孕膜0号组中第I窝的非整倍体频率明显高于第II、III窝，因此处于较晚发育时期的卵原细胞对药物更为敏感一些(表1)。

在避孕膜0号组中XXY型蝇数和XO型蝇数分别为14和11(表1)从理论上来说，由X染色体不分离所产生的XXY蝇与XO蝇数应该相等，即各12.5只。对以上实验观察值和理论预期值进行卡方检验， $X^2 = 0.36$ ， $0.50 < P < 0.70$ ，无显著差异。由X染色体丢失所产生的XO蝇数应该等于XO总蝇数减去XXY蝇数，即 $11 - 14 = -3$ ，这表明在该组试验中没有出现由X染色体丢失所产生的XO型蝇，这同时也提示受试物基本上是引起X染色体不分离而不是使染色体发生断裂导致染色体丢失。

对于避孕药的遗传毒性，国外已有关于果蝇性连锁隐性致死(SLRL)的测试报告，得阴性结果的有炔雌醇，尚未定论的有甲基炔诺酮<sup>(7)</sup>。国内有关避孕药的SLRL测试结果与上述的基本一致<sup>(8)</sup>。SLRL试验主要检测点突变和小缺失，亦即检测诱变剂直接对染色体DNA的损害。而非整倍体畸变的产生只有一部分是直接损害染色体DNA的结果(引起染色体断裂而导致染色体丢失)，相当一部分则是由于染色体不分离的结果，即毒物损害了细胞分裂机构(纺锤丝、中心粒、着丝粒)使染色体的正常分离发生紊

乱<sup>(6)</sup>。所以SLRL试验结果为阴性不等于在非整倍体试验中也是阴性，因为两者测试的遗传终点不同，至少是不完全相同。因此避孕药诱发果蝇非整倍体的研究仍然是一个值得探讨的重要课题。

### 参考文献

1. IARC Monographs. 1987; Suppl. 7, 286-287, 294
2. Hoffmann GR et al. 人类染色体非整倍性的病因学及发生机理。国外医学卫生学分册, 1987; 14 (6); 341
3. Emery AEH. Elements of Medical Genetics.

- 6th, 1983; 84
4. 李怀义, 等, 15种化合物在果蝇非整倍体检测系统中的诱变效应。癌变畸变突变, 1989; 1(1); 38
5. Kastenbaum MA and Bowman KO. Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. Mutat Res 1970; 9; 527
6. Valencia R' et al. Chromosome mutation tests for mutagenesis in *Drosophila melanogaster*. Mutat Res 1984; 134; 61
7. IARC Monographs. 1987; Suppl. 6, 293-295, 432-433
8. 吴亦帆, 等, 八种避孕药对果蝇X染色体上隐性致死突变的研究。中国药理通讯 1990; 7(1); 41

(上接第14页)

起源于胃粘膜上皮细胞，因此由胃上皮细胞显示的结果避免了动物细胞或人或纤维细胞所致的种属差异和组织差异，不仅证明了MNNG可以造成人胃上皮的遗传学改变，也为我们进一步深入研究亚硝酰胺的癌变机制打下了基础。

我们近年来曾致力于原代人胃上皮细胞培养的建立，经大量实践摸索到了人胃上皮原代培养的可行办法，并对体外培养的胃粘膜上皮作了一系列生物学鉴定，证明我们培养的细胞确系胃上皮而非成纤维细胞在培养中的污染(如鉴定上皮细胞的角蛋白及PAS染色)。

从我们的结果可以看出，不同个体的细胞对MNNG的一般毒性作用或诱变作用的反应存在差异，这可能与个体的遗传背景和取材前的暴露环境有关。另外在未经MNNG处理的对照组每一个体虽然均未发现微核却都有少量的畸形核，范围在0.33-8%。畸形核形成的机制目前并不明确，但一般认为这一现象同样是核内遗传物质的改变，可能是个体的某些病毒感染及接触了其它有害物

质。MNNG可使其明显增加，其意义有待长期培养甚至转化的指标证实。从图1可见MNNG对每一个体的细胞均有一使DNA合成增强的浓度剂量。这一现象可能是1，由于MNNG造成了程序外DNA修复合成，使总<sup>3</sup>H-TdR掺入量大为提高，此时镜下没有明显的细胞形态学改变。2. MNNG造成的细胞S期阻滞，这是MNNG所致毒性作用的特点之一<sup>(5)</sup>。结论有待深入研究的证实。

### 参考文献

1. 张汝麒等。我国胃癌病因综合考察报告。中华医学杂志。1982; 62; 203
2. 鄂征, 等。组织培养技术。第2版。人民卫生出版社, 1988; 249-260
3. Sugimura T, et al. Tumor production in glandular stomach of rats by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. Nature. 1967; 216; 943
4. 陈泉光等。亚硝酸钠在MNNG和MNU诱导离体V79细胞染色体畸变中的作用。中华肿瘤杂志。1987; 9(1); 33
5. 潘世斌, 等。肿瘤 第1版。人民卫生出版社, 1984; 119-132

ethyl methanesulfonate (EMS). Later returned the treated plasmid to *E. coli* strain MC1061F'150kan and plate the transformants on the special medium containing X-gal for rapid detection and analysis of lacI mutation.

The spontaneous mutant frequency of this system is less than  $1.21 \times 10^{-4}$ \*. After treated by 300ug/ml EMS, induced mutant frequency increased  $3.8 \times 10^{-3}$ . Neither has gross alteration been discovered for 7 lacI mutants at DNA level, nor has point mutation of EcoRI site been found yet by analysis with restriction enzyme EcoRI.

## ANEUPLOIDY INDUCED BY CONTRACEPTIVES IN *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Li Huaiyi, Wang Xinmin, Jiang Zuoshu\*, Wang Xiaopeng\*

Department of Special Toxicology & \*Department of Biology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

Tests for induction of aneuploid with suspected carcinogenic oral contraceptive preparations in *Drosophila melanogaster* were conducted. The yw/yw larvae were fed with testing formulations of oral contraceptive dissolved in 5% sucrose solution respectively. Treated yw/yw virgin females were mated to yB/Yy<sup>+</sup> males. The schedule of 4-3-3 day broods were adopted in all tests. The testing subjects were oral contraceptive tablet No.0, No.1, No.2, No.18(methyl norethindronum); film No. 0, No.1 and Nelova with dosage range from 35 ppm to 2500 ppm variously. Actinomycin D was used as positive control. Kastenbaum-Bowman test was used to check the statistical significance of the results.

Positive results were obtained from the groups of flies received film preparation No. 0 & Nelova. Linear dose-response correlation was revealed in 5 groups given maximum dose of ethinyloestradiol. Both of the frequencies of chromosome loss and nondisjunction in flies received 175ppm ethinyloestradiol were significantly exceeded.