

避孕药醋酸诺酮肟对果蝇的致畸性和致突变性的研究

王 瑶¹ 计雪文² 纪贤文²

¹ 福州总医院全军医学检验中心 福州 350001 ² 第三军医大学遗传学教研室 重庆 630038

摘要 采用果蝇致畸试验,果蝇伴性隐性致死试验和果蝇非整倍体试验对避孕药醋酸诺酮肟进行致畸和致突变性研究。结果表明当醋酸诺酮肟在浓度分别为 5mg/ml 和 50mg/ml 时,不引起果蝇致畸率和伴性隐性致死率升高。但在 50mg/ml 浓度时可引起果蝇非整倍体频率上升,并具有统计学意义。

关键词 醋酸诺酮肟;果蝇致畸试验;果蝇伴性隐性致死试验;果蝇非整倍体试验。

TERATOGENICITY AND MUTAGENICITY OF CONTRACEPTIVE DRUG NORETHISTERONE ACETATE-3-OXIME IN DROSOPHILA MELANOGASTER

Wang Yao¹, Ji Xuewen², Ji Xianwen²

The laboratory center of Fuzhou general hospital, Fuzhou, Fujian, 350001

Abstract Norethisterone acetate-3-oxime is a new contraceptive drug whose teratogenicity and mutagenicity is unclear. In this Paper, in order to investigate safety of norethisterone acetate-3-oxime, we studied the teratogenicity and mutagenicity of norethisterone acetate-3-oxime using *Drosophila melanogaster* teratogenicity test, sex-linked recessive lethal test and aneuploid test. The results showed that norethisterone acetate-3-oxime didn't induce to increase of teratogenic rate and lethal rate in *Drosophila melanogaster* at concentration 5mg/ml

标评价胚胎的生长发育,结果表明 ALT、AST 这两项指标小鼠胚胎不敏感,这可能是由于胚胎太小,某些脏器发育不完全有关。而 ALP、LDH 和 TP 均有明显的改变,是否与影响胚胎的正常生长发育有关,还有待于进一步的研究。

参考文献

1. shuichi KAI, Hisashi KOHMURA, Eiko HIRAIWA, et al, Reproductive and developmental toxicity studies of paclitaxel

- (11): Intravenous administration to rats during the total organogenesis. *J Toxicol Sci*, 1994;19(Suppl. 1):69.
2. Scialli AR, Desesso JM, Goeringer GC. Taxol (paclitaxel) toxicity in the developing chick. *Teratology society abstracts*, 1994;49(5):404.
3. Brown NA, Fabro S. Quantitation of rat embryonic development in vitro: a morphological scoring system. *Teratology*, 1981, 24:65.
4. Van Maele - Fabry G, Delhaise F, Picard J. Morphogenesis and quantification of the development of post-implantation mouse embryos. *Toxic in vitro*, 1990;4(2):149.

and 50mg/ml. But aneuploid frequency which norethisterone acetate-3-oxime induced in *Drosophila melanogaster* at concentration 50mg/ml was 0.105% and had significant difference ($P < 0.01$) compared with positive control. The reason was unclear.

Key words Norethisterone acetate-3-oxime; *Drosophila melanogaster* teratogenicity test; Sexed-linked recessive lethal test; Aneuploid test

在致突变物和致癌物测试中,果蝇检测系统越来越受到人们的重视。果蝇具有生活史短,易饲养、经济、灵敏等优点;且能像哺乳动物那样可经口摄入,呼吸道吸入,皮肤接触各种受试物;并具有消化、吸收、代谢、排泄各过程。果蝇具有体内代谢的多能性,可代谢活化各种化合物。鉴于上述特点,果蝇检测系统可测试从分子水平到染色体水平的各种遗传损害⁽¹⁾,它在环境化学物致突变致畸试验的方法中发挥了越来越大的作用⁽²⁾。醋炔诺酮肟(norethisterone acetate-3-oxime NA)是美国科学家于1973年将炔诺酮经17-OH酰化,第三位酮基转化为肟基后制成17 α -乙炔基-17 β -乙酰基-19-去甲基-4-雄甾烯-3-酮肟-醋炔诺酮肟的孕激素化合物。本品是一种极有希望的新型避孕药,具有避孕率高,副反应小,服用简便等优点⁽³⁾。但是对其长期使用的安全性如何,尚待作出评价。本文采用果蝇检测系统的三种试验方法:果蝇伴性隐致死试验(sex-linked recessive lethal testing),果蝇非整倍体试验(aneuploid testing),果蝇致畸试验(teratogenicity testing)对醋炔诺酮肟进行致畸和致突变性的研究,其目的为了解醋炔诺酮肟对生物细胞的遗传物质是否有致突变作用,进而有助于对长期使用醋炔诺酮肟的安全毒性问题作出评价。

材料和方法

1 材料 雄蝇为3-4天的Oregon-K野生型品系, YB/Yy⁺, 处女蝇为3-5天的Muller-5品系和YW品系。以上品系均以标准培养基孵育于温度25 \pm 1 $^{\circ}$ C,相对湿度为60 \pm 5%的生化培养箱。醋炔诺酮肟为浙江

医学研究院计划生育研究所生产的粉剂。甲基磺酸乙酯(ethylmethanesulfonate, EMS)系上海化学试剂厂产品。丝裂霉素C(mitomycin C, MC)系中国科学院上海药物研究所实验药厂产品。氨甲喋呤(methotrexate, MTX)系上海第十二制药厂产品。

2 方法 果蝇LC₅₀试验:醋炔诺酮肟的临床剂量为1mg/50kg/d,将醋炔诺酮肟粉剂溶于2%乙醇,用5%蔗糖溶液中稀释成5mg/ml, 10mg/ml, 20mg/ml, 30mg/ml, 40mg/ml, 50mg/ml不同浓度,各取上述溶液2ml分别滴入折成16层厚的卫生皱纸上,使纸湿润,放入3 \times 8cm的测试指管内,每指管内放入经饥饿6小时的Oregon-K野生型品系雄蝇20只,72小时后移入新鲜制备不含受试物的培养管内,24小时后观察结果,连续观察1周,从观察中可看到经各种不同浓度喂养的雄蝇未出现一只死亡,无法计算LC₅₀。

3 果蝇致畸试验 按浙江医科大学徐惟安⁽⁴⁾的方法进行,在标准培养基刚刚制备完时按5mg/ml和50mg/ml的剂量分别加入受试物,充分混匀,分装于2.5 \times 8cm的培养管内,待培养基完全冷却后,每一指管加入2对Oregon-K野生型品系雄蝇和处女蝇,在25 \pm 1 $^{\circ}$ C,相对湿度为60 \pm 5%的培养箱内孵育,让其交配产卵,6天后倒去亲本,待孵出仔蝇后,每天在20X显微镜下检查仔蝇外观形态,大小。连续观察记录10天,求出致畸率。用 χ^2 检验进行统计学处理。

$$\text{致畸率} = \frac{\text{致畸蝇数}}{\text{非致畸蝇数} + \text{致畸蝇数}} \times 100\%$$

4 果蝇伴性隐性致死试验 按Wurgler⁽⁵⁾和Brusik⁽²⁾方法进行,设两个剂量组(5mg/ml,

50mg/ml),每一试验剂量组经6小时饥饿的野生品系雄蝇50只,喂药48小时后,每只经过处理的雄蝇,每隔2,3,3天分别与3只Muller-5品系处女蝇交配(分别代表, , 窝)。再以所产F₁代的雌蝇与雄蝇按1:3进行交配,在25±1,相对湿度60±5%的培养箱内孵育14天后,观察F₂代中的致死数,求出致死率。用²检验进行统计学处理。

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

5果蝇非整倍体试验 按第二军医大学李怀义的方法进行,5mg/ml和50mg/ml两个剂量组分别喂饲经6小时饥饿的YW处女蝇50只,喂药48小时后,每只经过处理的处女蝇,每隔2,3,3天分别与3只YB//YY⁺品系雄蝇交配,在25±1,相对湿度60±5%的培养箱中孵育至F₁羽化为止开始计数,直至F₁全部羽化为止。

结果和讨论

Table 1 Teratogenic effect of Norethisterone Acetate-3-oxime in *Drosophila melanogaster*

Drug	Conc	Teratogenicity Number	Abnormal place				Number	%
			Wing	Humeral	Band	Bristles		
EA	2 %	803	5	3	7	4	19	2.36
NA	5mg/ml	791	2	7	2	6	17	2.15
NA	50mg/ml	561	3	11	5	-	19	3.38
MTX	0.5mg/ml	276	3	3	2	74	82	29.71

:Number of tested *Drosophila melanogaster*, $P < 0.001$

EA: Ethyl Alcohol, MTX: methotrexate

1 醋炔诺酮脂在果蝇中的致畸性 从表1中可见,给药组所产仔蝇数比对照组减少,提示醋炔诺酮脂对果蝇的产仔率有一定影响。醋炔诺酮脂在剂量为5mg/ml,50mg/ml时对果蝇的致畸率分别为2.15%,3.38%。与阴性对照组相近似,提示醋炔诺酮脂对果蝇无致畸性。醋炔诺酮脂在果蝇中的致畸表现主要为肱羽的增多或减少。而阳性对照物MTX对果蝇的致畸效应80%以上都表现为背中鬃及小盾鬃增多,少数表现为色素带紊乱及翅切迹等。从实验中观察到乙醇,醋炔诺酮脂,氨甲喋呤引起的果蝇致畸表现也截然不同。基于人和动物模型之间存在许多重要差别,所以不可能期望一种完全相同的反

应。除物种间有不同外,同种不同品系间的反应也不一定相同。故Schuler⁽⁶⁾认为,为了筛选目的,畸形表现和传统哺乳动物终点之间有多少有关是不重要的而在果蝇形态发育时经过化学处理后,果蝇反应的明显性和重现性是重要的。

醋炔诺酮脂在哺乳动物中的致畸现象还未见报道。孕妇服用甾体激素类避孕药是否发生畸胎,不同学者持不同的看法。有人认为妇女妊娠16周之前长时间服用甾体激素可致畸胎,而有些前瞻性研究认为甾体避孕药对胚胎发育无致畸性。为了安全,在大量前瞻性研究未澄清之前,若要妊娠最好在停药一段时间为宜。

Table 2 Effect of norethisterone acetate-3-oxime inducer SLRL in *Drosophila melanogaster*

Group	Conc	Number of lethals/ Number of chromosomes tested(%)			
		Brood	Brood	Brood	Total
SS	2 %	2/ 1056(0. 18)	1/ 876(0. 11)	0/ 916(0)	3/ 2848(0. 11)
NA	5mg/ ml	2/ 1362(0. 15)	0/ 840(0)	1/ 1308(0. 07)	3/ 3510(0. 085)
NA	50mg/ ml	2/ 1495(0. 13)	1/ 1070(0. 09)	1/ 1194(0. 08)	4/ 3759(0. 11)
EMS	0. 015mol/l	17/ 86(19. 77)	14/ 74(18. 91)	15/ 87(17. 24)	46/ 274(16. 79)
EA	2 %	2/ 860(0. 23)	1/ 976(0. 10)	0/ 1040(0)	3/ 2876(0. 10)

SS :Sucrose solution , $P < 0. 001$ 与阴性对照相比

2 醋炔诺酮肟在果蝇中诱导 SLRL 的效应

从表 2 可见,在醋炔诺酮肟的浓度为 5mg/ml,50mg/ml 时,三窝总的致死突变率分别为 0. 085 %,0. 106 %,与本实验室 SLRL 自然突变率 0. 103 %相比,在正常诱变范围内。按成熟精子、精细胞和精母细胞三窝各阶段试验的结果,与阴性对照三窝的 SLRL 突变相近似,在正常诱变范围内,提示醋炔诺酮肟对三个阶段的生殖细胞均无致突变作用。

果蝇伴性隐性致死试验主要是检测基因突变,小缺失及某些类型的染色体畸变,它是整体测试系统中能检出基因突变和小缺失的最简便、快速、经济而有效的诱变剂筛选方法。在现有的果蝇试验中伴性隐性致死试验的敏感性是最高的。这是因为本试验能检出所有点突变以及与染色体断裂有关的遗传变化。由于某些诱变剂其浓度还不足以诱发显性致死突变或染色体畸变时就可在本试验中得到阳性结果。在近十年来,尽管已用不同手段进行了大量的研究,如 DNA 修复,染色体畸变,细胞分裂等方法,但甾体激素避孕药的细胞遗传学效应仍然是不清楚的。甾体激素避孕药会不会引起致突变的危险,看法并不一致。Badr 提出服用大剂量的口服避孕药(间称 OC),雌性小鼠显性致死突变的发病率较高。相反,Wallace 等却报道 OC 不存

在这一毒副作用。他们详细研究了两种 OC 对小鼠的致突变作用,一种是 Gynanovlar,内含醋炔诺酮肟和炔雌醇。另一种是 Lynodiol,内含 Lynstrana 和炔雌醇三甲醚。RU₄₈₆ 是一种抗孕激素的甾体类药物,Deraedt⁽⁷⁾ 对其进行 Ames 试验证明它无致突变效应。近几年来研究细胞遗传学的技术不断发展,其中之一就是能够灵敏地检测 DNA 原发损伤的姐妹染色单体交换 SCE 方法的改进应用,使得评价口服避孕药对遗传的影响增加了一个新的手段。Murthy 首次利用 SCE 对 15 名口服避孕药妇女进行了观察,发现用 OC 的 SCE 频率明显高于正常妇女及孕妇。Murthy 根据他的实验认为导致服药妇女的 SCE 频率增加的原因是该药和它的代谢产物增加引起致细胞突变的条件。与上述结果相反,1982 年 Husum 等报道应用 OC 妇女淋巴细胞 SCE 频率正常。作者最后的结论是服用 OC 对人类染色体不会产生潜在性诱发突变的危险。甾体激素对昆虫的效应一直研究的比较少。直到 1981 年,Paradi⁽⁸⁾ 利用果蝇对三种孕激素和两种雌激素进行了伴性隐性致死试验。研究了它们在果蝇中的致突变作用。结果表明上述五种甾体激素未诱发潜在的突变作用。

Table 3 Effects of Norethisterone-3-oxime induced aneuploid in *Drosophila melanogaster*

group	Conc	total	F ₁ XO	Number of chromosome aneuploid	
				XXY	XO
EA	2 %	8162	4 (0.049)	-	-
NA	5mg/ ml	9981	4 (0.040)	1 (0.010)	3 (0.030)
NA	50mg/ ml	8588	9 (0.105)	4 (0.047)	5 (0.058)
MC	0.014 %	12070	33 (0.273)	9 (0.075)	24 (0.198)

: Total number of F₁ generation flies, $P < 0.01$, $P < 0.001$

3 醋炔诺酮肟对果蝇非正倍体频率的诱变效应 从表 3 可见 5mg/mlNA 诱发性染色体丢失率为 0.040%,性染色体不分离率 0.010%。与阴性对照相近似。在正常的诱变范围内,50mg/mlNA 诱发性染色体丢失率为 0.105%,不分离率为 0.047%,与对照组相比经 χ^2 检验具有显著差异 ($P < 0.01$)。甾体激素可诱发染色体非正倍体频率增加近几年来一直未见报道。1963 年, Goh 首先观察到服避孕药妇女的染色体断裂率明显高于对照组。以后 Meqarrie 和 littlefield 等也观察到了同一现象。但国外大量的研究表明 OC 不引起染色体断裂增加。最近张忠恕⁽⁹⁾ 等研究表明,长期服用“复方炔雌醚”妇女的染色体断裂率虽高于正常,但无统计学意义。丁延淑等的研究表明服“复方 18 甲基炔诺酮”全量片 3—10 年的妇女的染色体断裂率为 1.55%,服减量片妇女的断裂率为 2.523%均高于对照组。但亦无统计学意义。本试验结果提示大剂量 NA 可引起性染色体丢失及不分离率升高,并具有统计学意义,其原因有待于进一步的研究。

有关 NA 的遗传毒性研究较少。1987 年伏晓敏⁽¹⁰⁾ 用微核试验对醋炔诺酮肟进行致突变性的研究,结果表明 NA 不引起微核率升高,亦证明并未发现本品对骨髓及纺锤体的损害。本文采用果蝇检测系统的三种试验方法对 NA 进行了致畸性和致突变性研究,这对进一步了解 NA 的遗传毒性有一定的帮助。但果蝇试验仅仅是遗传毒理动物试

验的一部分,如要对 NA 的遗传毒性作全面的评价,还须进行哺乳动物和其它原核生物检测系统的试验。

参考文献

1. Brusik DJ. Principles of genetic toxicology. New York: Plenum press,1980.
2. Bears AJ, Zijlstra JA, Vogel E, et al. The occurrence of cytochrome p-450 and aryl hydrocarbon hydroxylase activity *Drosophila melanogaster* microsomes and the importance of this metabolizing capacity for the screening of carcinogenic and mutagenic properties of foreign compounds. *Mutat Res*, 1977;44:257.
3. 张寅恭,卢风英,沈元康,等. 醋炔诺酮肟的抗着床作用及其毒性研究. 生殖与避孕,1981;1(4):31.
4. 徐惟安,祝慧娟,黄幸纾. 简易快速的致畸初筛方法——果蝇致畸实验. 浙江医科大学学报,1988;17(4):176.
5. Wurgler FE, Sobels FH, Vogel E. *Drosophila* as an assay system for detecting genetic change. In: Kilbey BJ eds. Handbook of mutagenicity test procedures. 2nd eds Elsevier press,1984:555.
6. Schuler RL. Investigation of *Drosophila* for teratogenic screening. In: Safety evaluation and regulation of chemicals. New York: Karger press,1983:270.
7. Deraedt R, et al. Toxicological study on RU₄₈₆. In: The anti-progestin steroid RU₄₈₆ and human fertility control, Baulion EE, Segal SJ eds, New York and London: Plinun Press. 1985;123.
8. Pradi E. Mutation effects of contraceptive drugs in *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res*, 1981;88:175.
9. 张忠恕,谈涌布,吕群,等. 长效口服避孕药“复方炔雌醚”的遗传学效应. 遗传学报,1979;6(1):137.
10. 伏晓敏. 醋炔诺酮肟致突变性研究——微核实验. 现代应用药学,1987;43:13.