

阿维菌素对小鼠雌性生殖细胞的致突变性研究

杨桂香* 朱蓓蕾

(北京农业大学, 100094)

摘要 阿维菌素是我国生产的一种高效广谱抗寄生虫抗生素,对动物的消化道线虫和外寄生虫有很强的驱杀作用。本文选择了第二次减数分裂中期相(MII)卵母细胞和第一次分裂中期相合子染色体畸变分析方法,研究其对哺乳动物雌性生殖细胞的遗传毒性。1. MII 卵母细胞染色体畸变分析:根据阿维菌素的小鼠急性毒性试验结果(小鼠经口 $LD_{50}=19.19\text{mg/kg}$),设以下剂量组:1.92、3.84 和 9.60mg/kg (约相当于 $\frac{1}{10}$ 、 $\frac{1}{5}$ 和 $\frac{1}{2}LD_{50}$),经口一次染毒,同时设溶剂和阳性对照组。试验结果为阴性;2. 第一次分裂中期相合子染色体畸变分析:根据阿维菌素的小鼠急性毒性试验结果,设以下剂量组:1.92、3.84 和 9.60mg/kg ,给雌性小鼠一次经口染毒。染毒后立即与未染毒的雄性小鼠交配,同时设溶剂和阳性对照组。试验结果为阴性。结果表明,阿维菌素对雌性生殖细胞不具致突变作用。

关键词 雌性生殖细胞,致突变性,阿维菌素

近年来,兽药及药物添加剂的应用日益广泛,一方面促进了畜牧业的迅速发展,但是另一方面又导致这些药物在食品动物组织及其产品中残留。人类长期食用含有药物残留的动物性食品,经常会引起一些不良反应:如过畸、致畸、致突变等^[1]。因此对兽药的安全性毒理学评价越来越受到人们的关注。

阿维菌素(Avermectins)是我国近年来开发的一种新型的广谱抗寄生虫药,与美国生产的广谱抗寄生虫药伊维菌素(Ivermectin)具有相同的驱虫效果。鉴于国产阿维菌素的毒理学资料不全(仅有急性毒性资料),本文选择了 MII 卵母细胞及第一次分裂合子染色体畸变分析来研究国产阿维菌素对小鼠雌性生殖细胞的致突变性,为其安全性毒理学评价提供资料,同时为兽药和药物添加剂的安全性毒理学评价提供新的致突变试验方法。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 受试物:阿维菌素(Avermectins),由北京农业大学微生物工程工业试验基地提供,纯度:含 B₁94%,A₂2.2%,灌胃液用 1,2-丙二醇配制。

1.1.2 试验动物:昆明系小鼠,由国家计划生育委员会科学研究所提供。

* 现在地址为广州华南农业大学。

** 收稿日期 1995-12-11。

1.1.3 阳性对照物:环磷酰胺,由上海第十二制药厂生产。

1.2 方法

1.2.1 急性毒性试验:取体重20~24g的健康小鼠60只,观察一周后,随机分成6个剂量组(每组10只,雌雄各半),即50.00、37.00、27.43、20.30、15.05和11.15mg/kg,药液用1,2-丙二醇按1:k系列稀释法配制。试验前禁食6h,按等容量法(0.1ml/10gb.w.)灌胃给药。每日观察中毒症状,并记下两周内动物的死亡情况。按简化寇氏法计算LD₅₀及其95%可信限。

1.2.2 小鼠MⅡ卵母细胞染色体畸变分析^[3-5]。

1.2.2.1 动物分组与处理:选择8~10周龄,体重25~30g的健康雌性处女小鼠100只,随机分成5组,每组20只,其中3组为受试物剂量组,即9.60(1/2LD₅₀)、3.84(1/5LD₅₀)和1.92(1/10LD₅₀)mg/kg。另2组为溶剂(1,2-丙二醇)和阳性对照(环磷酰胺100mg/kg)组。为了使排卵同步化及获得较多的卵母细胞,在染毒前宜用激素进行人工超排:下午4:00腹腔注射10IU孕马血清促性腺激素(PMSG),48h后,再腹腔注射10IU绒毛膜促性腺激素(HCG)(将激素溶于生理盐水中,配成100IU/ml,每只小鼠注射0.1ml)。注射HCG后立即染毒,剂量组和溶剂组按等容量法空腹灌胃染毒,环磷酰胺采用腹腔注射。每组小鼠在注射HCG后16h时采样。

1.2.2.2 标本制备:在预定时间内处死小鼠,剖开腹腔,细心分离输卵管,在输卵管子宫端将输卵管剪断,置于含生理盐水的表玻璃皿中。在解剖镜下用注射针头刺破输卵管壶腹部,释出含卵母细胞和大量颗粒细胞的卵团块,用自制的小吸管(尖端内径约0.5mm,以下同)将卵团块转至含1ml透明质酸酶(400IU/ml林格氏液)在表玻璃皿中,室温处理2min,使颗粒细胞全部从卵母细胞表面脱落下来。然后将卵母细胞转至含0.7%柠檬酸钠的表玻璃皿中,室温低渗30~40min。用自制的小吸管吸取含10~20个卵母细胞的微量低渗液,置于干净载玻片中央(液滴直径≤2mm)。用自制的小吸管吸取新配制的3:1甲醇冰酸固定液,滴于含卵子的微滴上,待固定液接近挥发完时,再滴2滴固定液。制片干燥后,用10%Giemsa染液(pH=6.8)染色10~20min。

1.2.2.3 镜检与统计:每个实验组至少观察100个可分析的MⅡ卵母细胞,记录正常MⅡ卵母细胞(n=20)、超倍体(n=21)、亚倍体(n=19)及二倍体(2n=40)卵母细胞以及延期分裂的MI卵母细胞,并计算每组动物卵母细胞的非整倍体率。由于亚倍体难以排除人为因素造成的假象,故计算非整倍体率时应将超倍体卵母细胞数加倍后统计。最后用 χ^2 检验检测各剂量组与空白对照组的差异显著性。

1.2.3 第一次分裂中期相合子染色体畸变分析^[3,4,6]。

1.2.3.1 动物分组与处理:动物分组、人工促排卵方法、染毒时间与剂量均同MⅡ卵母细胞染色体畸变分析,其不同之处是:小鼠染毒后,立即与同系雄性小鼠(1:1)同笼过夜,次晨8:00检查阴道栓,查到阴道栓的小鼠于注射HCG后28.5~29h时,腹腔注射秋水仙素(6mg/kg),在注射HCG后31.5~32h时采样。

1.2.3.2 标本制备:在预定时间处死小鼠,取出输卵管,在解剖镜下找到输卵管壶腹部有卵团的部位,用注射针头刺破输卵管,释出受精卵团,若受精卵已转移至输卵管后段,则可在解剖镜下,用尖端磨钝的4#针头(接1ml注射器,抽取0.2ml生理盐水)从输卵管伞端腹腔开口处插

入输卵管中,然后将受精卵冲出。若受精卵表面仍然附有颗粒细胞,则可用透明质酸酶处理 5min,其余过程同 M II 卵母细胞畸变分析。

1.2.3.3 镜检与统计:对每个实验组至少分析 100 个雌、雄染色体组分离明显的第一次分裂中期相合子,记录非整倍体合子数、有结构畸变的合子数及各种畸变类型,计算每组动物的非整倍体率、结构畸变率及总畸变率,用 χ^2 检验检测各剂量组与空白对照组的差异显著性。

2 结 果

2.1 急性毒性试验 中毒症状:高剂量组的小鼠约在给药后 30min 开始出现中毒症状,其它各剂量组在接毒后 50min~2h 出现中毒症状,表现行动缓慢,行走不稳和转圈等运动失调症状,然后小鼠转入抑制状态,表现为反应迟钝、不食、麻痹,最后昏迷、死亡,高剂量组在给药后 50~60min 出现动物死亡,大部分小鼠的死亡发生在染毒后 24h 之内,有些处于抑制状态的小鼠在持续 1~3d 后死亡,存活小鼠约在一周后开始恢复正常。剖检未见典型病理变化。

LD₅₀ 计算:根据各剂量组动物的死亡情况,经简化寇氏(kärber)法计算阿维菌素的小鼠经口 LD₅₀ 值为 19.19mg/kg,其 95% 可信限为 16.14~22.81mg/kg。

2.2 M II 卵母细胞染色体畸变分析 阿维菌素的小鼠 M II 卵母细胞染色体畸变分析见表 1。由表 1 可见,阳性对照组非整倍体率为 4.4%,当阴性组(非整倍体率为 0)比较,差异显著($P < 0.05$),而各剂量组的非整倍体率均为 0,与阴性对照组比较,差异均不显著($P > 0.05$),阿维菌素的小鼠 M II 卵母细胞染色体畸变分析结果为阴性。

2.3 第一次分裂中期相合子雌性染色体组畸变分析 阿维菌素的小鼠第一次分裂中期相合子染色体畸变分析结果见表 2。由表 2 可见,环磷酰胺明显地引起了小鼠第一次分裂中期相合子中雌性染色体组的非整倍体率及结构畸变率增加,与阴性对照组比较,其差异均极显著($P < 0.01$)。各剂量组的非整倍体率均为 0,与阴性对照组比较差异均不显著($P > 0.05$),各剂量组的结构畸变率虽有不同程度的升高,但与阴性对照组比较,差异均不显著($P > 0.05$)。结构畸变类型包含染色体型和染色单体型两种,但以染色单体型为主,其畸变种类有断裂、裂隙、交换及复合畸变,其中以断裂最多见。阿维菌素的第一次分裂中期相合子雌性染色体组畸变分析结果为阴性。

表 1 阿维菌素小鼠 M II 卵母细胞染色体畸变分析结果
Table 1 Results of cytogenetic analysis of metaphase II oocytes in mice for Avermectins

组 别 Group	剂 量 Dose (mg/kg)	分析卵母细胞数(个) Number of analyzed oocytes	非整倍体卵母细胞数(个) Number of aneuploid oocytes		非整倍体率 (2×超倍体%) Frequency of aneuploid (2× hyperhaploid %)
			亚倍体(n=19) Hypohaploid	超倍体(n=21) Hyperhaploid	
			溶剂对照组 Solvent	—	127
阿维菌素 Avermectins	1.92	90	1	0	0
	3.84	107	0	0	0
	9.6	96	1	0	0
环磷酰胺组 Cyclophosphamide	100	135	13	3	4.4*

* $p < 0.05$

表2 阿维菌素小鼠第一次分裂合子染色体畸变分析结果

Table 2 Results of cytogenetic analysis of first cleavage zygotes in mice for Avermectins

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg)	分析合子 数(个) Number of zygotes analyzed	非整倍体合子数(个) Aneuploid zygotes			结构畸变合子数(个) Structural aberrant zygotes			总畸变合子 Total aberrant zygotes	
			亚倍体 (♀:♂=19:20)		超倍体 Hyperplod	总畸变 Total	畸变类型 Aberration types	交换 Exchanges		
			♀:♂=19:20	♂:♀=21:20						非整倍体率 (2×超倍体%) Frequency of aneuploid (2×hyperplod%)
溶剂对照组 Solvent	—	101	1	0	0	0	0	0	0	0
阿维菌素 Avermectins	1.92	98	0	0	0	1	1.02	0	1	1.02
	3.84	105	0	0	0	1	0.95	0	1	0.95
环磷酰胺组 Cyclophosphamide	9.6	101	0	0	0	2	1.98	2	0	1.98
	100	103	3	4	7.76**	30	29.13**	4	21	5

** p<0.01

3 讨 论

M II 卵母细胞及第一次分裂中期相合子染色体畸变分析是检测在排卵前化学物对卵母细胞染色体的损伤。本试验中,在 M II 卵母细胞染色体畸变分析时,在环磷酰胺及各剂量组中均未见染色体结构畸变,而在第一次分裂中期相合子染色体畸变分析时,环磷酰胺组结构畸变率显著上升,各剂量组的结构畸变率也有不同程度的升高。这是由于有些致突变剂引起的 DNA 损伤,必须经过一个周期的 DNA 复制才能转化为染色体结构畸变^[7]。从染毒到 M II 卵母细胞过程,卵母细胞并未进行 DNA 合成,而第一次分裂中期相合子在原核时期进行了 DNA 合成,因此排卵前受试物对卵母细胞 DNA 的损伤能在第一次分裂中期相合子中表现出来。本实验表明,小鼠体内 M II 卵母细胞和第一次分裂合子染色体畸变分析是一种灵敏可靠及相对快速的检测雌性生殖细胞染色体畸变的方法,在检测兽药及药物添加剂对生殖细胞的遗传损伤中值得推广。

在小鼠 M II 卵母细胞染色体畸变分析和第一次分裂中期相合子染色体畸变分析两种试验的各剂量组中均未见非整倍体率和结构畸变率显著增加。试验结果表明阿维菌素对小鼠雌性生殖细胞不具致突变作用,因而可认为阿维菌素对哺乳动物雌性生殖细胞不具致突变作用。

参 考 文 献

- [1] 朱蓓蕾. 动物性食品药物残留. 上海科学出版社,1994,1~2.
- [2] Mailhes J B and Francesco Marcheffi. Chemically-induced aneuploidy in mammalian oocytes. *Mut. Res.*, 1994,320:87~111.
- [3] Tarkowski A K. An air-drying method for chromosome preparations on mouse oocytes. *Cyogenetics*, 1996,5:394~400.
- [4] 王仁礼,张忠恕. 小鼠体内卵母细胞及第一次分裂合子染色体分析方法及其应用. *卫生毒理学杂志*, 1990,4(3):153~156.
- [5] 郑青 等. 化学物质对小鼠卵母细胞染色体影响的研究. *卫生毒理学杂志(增刊)*,1993,107~108.
- [6] Albanese R. The use of fertilized mouse eggs in detecting potential clastogens. *Mut. Res.*,1982,97:315~326.
- [7] Obe G and beek. Trenimon;biochemical physiological and genetic effects on cells and organisms. *Mut. Res.*,1979,65:21~70.

STUDIES ON MUTAGENICITY OF AVERMECTINS IN THE FEMALE MOUSE GERM CELLS

Yang Guixiang, Zhu Beilei

(Beijing Agricultural University, Beijing 100094)

Abstract

Avermectins is a high-efficacy and broad-spectrum antiparasitic antibiotic developed in China. Cytogenetic analysis of mouse oocytes and one-cell zygotes had been selected for the

study of mutagenicity of Avermectins in the germ cells, the purpose of the present experiments is to develop some new direct methods of medicated additives, and also to provide some scientific data for safety evaluation of Avermectins.

1. M II oocytes cytogenetics in mice. According to per os LD_{50} of Avermectins in mice, dose levels of the test were given as follows: 1.92, 3.84 and 9.6mg/kg (equals 1/10, 1/5, 1/2 LD_{50}). Avermectins were given to the mice by oral route. Positive and negative controls were run concurrently with the dosing groups, the results of experiment were negative.

2. The cytogenetics of first-cleavage metaphase zygotes in mice. According to per os LD_{50} of Avermectins on mice, dose levels of the test were given as follows: 1.92, 3.84 and 9.6mg/kg. Avermectins were given to the female mice by oral route, then the female mice were mated with untreated fertile males, positive and negative controls were run concurrently with the dosing groups, the results of experiment were negative.

The experimental results suggest that Avermectins is non-mutagenic in female mouse germ cells.

Key words Female germ cell, Mutagenicity, Avermectins

书 讯

《最新养禽实用技术大全》工具书

本书由国家星火计划实施单位——中国农科院时成星火科技中心和中国家禽业协会高级专家咨询中心联合编写发行。再版的《最新养禽实用技术大全》一书将以全新的面貌与您见面。

本书十六开精装,是国内养禽业至今第一本最全面、系统、适用的工具书。开篇有一目了然的、三十七种禽病的230幅病理彩色图谱。内容全面系统,介绍了国内外最新研究成果,包括八大篇三十八章十个附录。内容有育种与孵化篇、饲养管理篇、疫病防治篇、家禽常用药物篇、饲料配方篇、饲料添加剂篇、禽蛋品加工篇、现代管理篇、各种禽病免疫程序表以及一些知名兽药、添加剂、养殖器械厂家的介绍。该书适用于养禽户(场),广大兽医工作者,并可作为大专院校的教学参考用书,及科研单位禽业工作者的参考资料。

本书定价126元,欢迎广大畜牧兽医工作者、养禽场及服务机构代理销售。

《最新养禽实用技术大全》一书中的病理图谱部分(37种禽病,230幅病理彩图)已单独装订成《禽病诊断图谱》,定价68元。并推荐中国农业大学范国雄教授主讲的《禽病剖检诊断》录像带。定价298元。对照病理图谱,此录像能让您更直观地掌握禽病解剖诊断的方法。以上工具书及录像带一律款到即免费挂号邮寄。

单位:北京时成星火科技文化发展中心 地址:北京白石桥路30号农科院87号信箱

邮编:100083 联系人:周旭东