

二甲基呋喃酮诱发黑腹果蝇生殖细胞非整倍体效应的研究

郭宝生
李袭丽指导

天津医科大学卫生毒理室 (300070)

摘要 应用黑腹果蝇 (yB/Yy^+ ♂) × (yw/yw ♀) 测试系统就 HDMF 诱发生殖细胞非整倍体效应进行了研究。结果表明, HDMF 能够诱发 yB/Yy^+ (♂) 与 yw/yw (♀) 3 龄幼虫性染色体之非整倍体突变, 主要机制以直接损害 DNA 导致染色体断裂继而丢失为主; 而对 yw/yw (♀) 成蝇, HDMF 仅在高剂量时有诱变活性, 其原因可能与 HDMF 难以穿透靶细胞 (卵母细胞) 外的坚厚卵壳有关。

二甲基呋喃酮 (4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone, HDMF) 是一种人工合成的食用菠萝香精, 国内外一直将其作为“公认安全” (GRAS) 的添加剂广泛应用于食品、饮料、化妆品、医药工业等领域 (安全号 FEMA: 3174; CoE: 536)。^{〔1〕}自邢邦华等 1988 年首次发现 HDMF 具有较强的诱变活性后,^{〔2〕}李袭丽等国内学者又以多种遗传毒理学方法对其进行了检测, 均获阳性结果。^{〔3~7〕}鉴于非整倍体突变可显示对人类的危害严重性, 本文应用黑腹果蝇快速筛检系统就 HDMF 潜在的非整倍体诱变活性进行了研究。

1 材料与方 法

1.1 果蝇品系 黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*) yB/Yy^+ 雄性亲本及 yw/yw 雌性亲本均由第二军医大学提供。

1.2 试剂 HDMF (瑞士 Firmenich 公司); 放线菌素 D (瑞士 Fluka Chemic AG 公司); 1,2-丙二醇 (美国 Dow 公司、食品级); 蔗糖 (天津市试剂一

厂)。

1.3 受试剂量 经测试, yB/Yy^+ (♂)、 yw/yw (♀) 及其 3 龄幼虫的 HDMF 半数致死浓度 (LC_{50}) 分别为 4.01、9.60 和 7.95 mg/mL。生育力试验表明, HDMF 之 1/2、1/4 LC_{50} 2 剂量对 yw/yw 处女雌蝇生育力有明显的抑制作用。据此设定的 yw/yw (♀) 受试剂量为 1/8、1/16 和 1/32 LC_{50} , 而 yB/Yy^+ (♂) 和 yw/yw (♀) 3 龄幼虫的剂量均为 1/2、1/4、与 1/8 LC_{50} 。阴性对照物和溶剂对照物分别为 5% 蔗糖水溶液和 10% 1,2-丙二醇溶液。阳性对照物为 100 μ g/mL 放线菌素 D。

1.4 方法 将受试样品按所需剂量要求溶于 5% 蔗糖水溶液或新配制的培养基中, 混匀。用此溶液分别喂饲已饥饿 4~5h 的 yB/Yy^+ (♂) 及 yw/yw 处女雌蝇 24h, 然后分别与未染毒的 yw/yw 处女雌蝇及 yB/Yy^+ (♂) 进行交配。而 yw/yw (♀) 3 龄幼虫染毒则采用培养基喂饲法, 24h 后将染毒幼虫移至新鲜培养基上, 羽化后从中挑选处女雌蝇并与

yB/Yy+(♂)进行杂交 各试验组均按2-3-3分窝程序杂交培养。待F₁代羽化时开始分类计数,直至全部羽化止。培养温度25℃±1℃、相对湿度60%。

1.5 观察计数标准^{〔8〕} 本系统检测的遗传学终点为染色体不分离和丢失。F₁正常蝇为灰体白眼(♂)和黄体肾红眼(♀);非整倍体例外,雄蝇为黄体白眼和黄体棒眼(XO型、不育)、例外雌蝇为灰体肾红眼和灰体白眼(XXY型、可育)。对检出的全部例外蝇均进行可育性试验,进一步验证其基因型。

1.6 数据处理 统计学分析采用Kastenbaum-Bowman^{〔9〕}和 χ^2 2种检验方法。

2 结果

2.1 经测试,阳性对照物放线菌素D诱发的yB/Yy+(♂)、yw/yw(♀)及其3龄幼虫非整倍体突变率分别为0.19%、0.28%和0.15%,与阴性对照比较差异极其显著(P<0.01)且无阶段特异性,与文献报告一致,说明本研究方法是客观可靠的。

2.2 溶剂对照物1,2-丙二醇在各试验中诱发的非整倍体突变率与阴性对照比较差异均无显著性(P>0.05)。

2.3 HDMF诱发yB/Yy+(♂)非整倍体突变试验结果(见表1)表明,高、中、低3个剂量组的诱发突变率与阴性对照组比较差异均极其显著(P<0.01),且呈明显的剂量反应关系,但未观察到阶段特异性。终点分析表明,各测试组诱发的性染色体遗失率及高剂量组的染色体获得率均明显高于对照组(P<0.05)。

2.4 HDMF仅在高剂量(1.2mg/mL)时诱发的yw/yw(♀)非整倍体突变率及染

色体遗失率与阴性对照组比较,差异有显著性(P<0.05),其它2个剂量则无明显诱变活性(P>0.05)(见表2)。

2.5 HDMF诱发yw/yw(♀)3龄幼虫非整倍体突变实验结果(表3)表明,各测试组诱发的3窝总突变率明显高于阴性对照组(P<0.05),而且有明显的剂量反应关系。终点分析显示,仅在高剂量时诱发的染色体遗失率与阴性对照组比较差异有显著性(P<0.05)。

3 讨论

本研究采用真核生物活体体内测试系统,就HDMF潜在的非整倍体诱变活性进行了检测。由试验结果可见,HDMF诱发的非整倍体例外蝇包括XXY与XO2种类型,其中XXY型例外蝇是染色体不分离的结果,而XO型例外蝇则是不分离和/或丢失造成的,目前尚无法将2种不同来源的XO型例外蝇加以区分。但理论上,由不分离造成的XXY型例外蝇数与XO型数相等,故因丢失而产生的XO型数应等于F₁XO型总数减去相应的XXY型数。^{〔8〕}表1、2与3中的丢失数就是按上述理论求出的。

通过对结果分析,作者发现HDMF诱发yB/Yy+(♂)生殖细胞的非整倍体突变率是正常对照的4~11倍,而且各试验组的染色体丢失率及高剂量组的获得率亦都显著高于对照组,据此推断HDMF的非整倍体诱发机制可能以该品直接损害染色体DNA,造成染色体断裂继而丢失为主。而HDMF对yw/yw(♀)成蝇仅在高剂量时存在明显的诱变活性,其原因可能与HDMF难以穿透卵母细胞外的坚厚卵壳有关。^{〔10〕}有必要对其3龄幼虫阶段作进一步研究。yw/yw(♀)3龄幼虫期的

靶细胞处于卵原细胞阶段、基本可排除卵 的非整倍体突变率都显著高于对照组但无 的干扰作用。经检测，HDMF3 个剂量组 阶段特异性，可以看出该品对雌性生殖

表 1 HDMF 诱发 yB/Yy+ 雄性非整倍体突变的测试结果

试验分组	分离序号	F ₁ 蝇数 (只)										测试终点: 染色体	
		规则蝇		例 外 蝇								获得	遗失
				xXy	xXY	xO	x0	xY ⁻	Total	%	χ^2_c		
HDMF (mg/mL)													
0.50	I	9921	1	0	1	0	1	3	0.0302				
	II	8422	1	0	6	2	1	10	0.1186				
	III	8385	2	1	4	1	0	8	0.0931				
	I—III	26728	4	1	11	3	2	21	0.0785 ⁽⁶⁾	9.31	<0.01	5(0.0187)	9(0.0336) ⁽⁶⁾
1.00	I	10092	1	1	8	3	1	14	0.1385				
	II	9706	2	2	3	1	0	8	0.0824				
	III	9206	0	1	6	1	1	9	0.0977				
	I—III	29004	3	4	17	5	2	31	0.1068 ⁽⁶⁾	16.40	<0.01	7(0.0241)	15(0.0517) ⁽⁶⁾
2.01	I	12499	0	5	8	3	0	16	0.1278				
	II	13008	3	2	7	2	1	15	0.1152				
	III	9122	0	1	10	4	0	15	0.1642				
	I—III	34629	3	8	25	9	1	46	0.1327 ⁽⁶⁾	23.62	<0.01	11(0.0317) ⁽⁵⁾	23(0.0663) ⁽⁶⁾
阳性对照 ⁽²⁾	I	9815	2	2	8	5	0	17	0.1729				
	II	10215	1	6	6	3	0	16	0.1564				
	III	9412	4	1	15	2	2	24	0.2543				
	I—III	29442	7	9	29	10	2	57	0.1932 ⁽⁶⁾	39.25	<0.01	16(0.0542)	23(0.0779)
溶剂对照 ⁽³⁾	I	8725	0	1	2	1	0	4	0.0458				
	II	9417	1	1	2	0	1	5	0.0531				
	III	10211	0	1	0	0	0	1	0.0098				
	I—III	28353	1	3	4	1	1	10	0.0353	1.00	>0.05	4(0.0141)	1(0.0035)
阴性对照 ⁽⁴⁾	I	9069	0	0	1	1	0	2	0.0220				
	II	9863	0	1	0	1	0	2	0.0202				
	III	8974	1	0	0	0	0	1	0.0111				
	I—III	27906	1	1	1	2	0	5	0.0179			2(0.0072)	1(0.0036)

x=yw, X=yB, Y=Yy⁺, 0= 性染色体遗失. Y⁻=Y 染色体的 y⁺标记遗失.

- (1) Yates 校正法.
- (2) (3) (4) 分别为 100 μg/mL 放线菌素 D、10% 1,2- 丙二醇和 5% 蔗糖水溶液.
- (5) P<0.05, (6) P<0.01 (Kastenbaum and Bowman, 1970)

表 2 HDMF 诱发 yw/yw 处女雌蝇非整倍体突变的测试结果

		F ₁ 蝇数 (只)										测试终点: 染色体	
试验分组	分窝序号	规则蝇	例 外 蝇							获得	遗传		
			xxY	.xXY	x0	x0	xY ⁻	Total	%			χ^2_c	p ⁽¹⁾
HDMF (mg/mL)													
0.30	I	2250	0	0	0	1	1	2					
	II	3129	0	0	1	3	0	4					
	III	1930	1	0	0	0	0	1					
	I—III	7558	1	0	1	4	1	7	0.0925	1.18	>0.05	1(0.0132)	4(0.0529)
0.60	I	1984	0	1	1	1	0	3					
	II	1871	0	0	0	1	0	1					
	III	1797	1	0	0	1	0	2					
	I—III	5652	1	1	1	3	0	6	0.1060	1.56	>0.05	2(0.0353)	2(0.0353)
1.20	I	1876	0	1	0	2	1	4					
	II	1899	0	0	2	1	1	4					
	III	1771	0	0	1	1	0	2					
	I—III	5552	0	1	3	4	2	10	0.1797 ⁽⁵⁾	5.81	<0.05	1(0.0180)	6(0.1079) ⁽⁵⁾
阳性对照 ⁽²⁾	I	1084	1	0	0	1	0	2					
	II	1026	1	0	2	0	2	5					
	III	1045	0	1	0	1	0	2					
	I—III	3155	2	1	2	2	2	9	0.2846 ⁽⁶⁾	11.13	<0.01	3(0.0949)	1(0.0316)
溶剂对照 ⁽³⁾	I	2003	0	0	1	0	0	1					
	II	1985	2	0	0	1	0	3					
	III	2410	0	0	0	0	0	0					
	I—III	6398	2	0	1	1	0	4	0.0625	0.11	>0.05	2(0.0312)	0(-)
阴性对照 ⁽⁴⁾	I	2370	0	0	0	0	0	0					
	II	3035	1	0	0	1	0	2					
	III	2812	0	0	0	1	0	1					
	I—III	8237	1	0	0	2	0	3	0.0364			1(0.0121)	1(0.0121)

注释见表 1。

细胞确有较强的非整倍体诱变活性。值得注意的是, HDMF 在 yw/yw(♀) 成蝇期和 3 龄幼虫期存在的诱变效应之差异是否还与某些药物代谢酶

活性在幼虫期可被强烈地表达有关呢? 亦或还有其它影响因素? 尚待进一步研究。此外, 作者还利用 CPBS 法 (carcinogenicity prediction

and battery selection)^{〔11〕} 对该香料的潜在致癌性作了预测，发现 HDMF 为可能致癌物的概率高达 97% 以上。因此，

作者建议应对 HDMF 的遗传毒性与潜在致癌性及其作用机制作进一步深入的研究，以确保广大消费者的健康。

表 3 HDMF 诱发 yw/yw 雌蝇 3 龄幼虫非整倍体突变的测试结果

		规则蝇		例				外		蝇		获得		遗传	
		xxY	xXY	x0	x0	xy ⁻	Total	%	X _c ²	P ¹	(%)	(%)			
HDMF (mg/mL)															
3.97	I	5542	1	0	4	2	0	7							
	II	6207	1	2	3	0	0	6							
	III	6861	0	2	6	1	1	10							
	I—III	18610	2	4	13	3	1	23	0.1234 ⁽⁶⁾	9.67	<0.01	6(0.0322)	10(0.0537) ⁽⁵⁾		
1.99	I	5122	1	1	3	0	0	5							
	II	4932	1	0	1	0	2	4							
	III	5039	0	1	2	3	0	6							
	I—III	15093	2	2	6	3	2	15	0.0993 ⁽⁸⁾	5.99	<0.05	4(0.0265)	5(0.0331)		
0.99	I	5546	0	1	2	0	1	4							
	II	5123	1	0	2	0	1	4							
	III	4934	1	0	1	1	1	4							
	I—III	15603	2	1	5	1	3	12	0.0768 ⁽⁵⁾	4.30	<0.05	3(0.0192)	3(0.0192)		
阳性对照 ²	I	4517	3	0	6	1	0	10							
	II	4464	0	3	0	0	1	4							
	III	4923	1	1	4	0	1	7							
	I—III	13904	4	4	10	1	2	21	0.1508 ⁽⁶⁾	12.88	<0.01	8(0.0575) ⁽²⁾	3(0.0215)		
溶剂对照 ³	I	4783	1	0	0	1	0	2							
	II	5123	0	0	0	0	0	0							
	III	4958	1	1	2	0	0	4							
	I—III	14864	2	1	2	1	0	6	0.0403	0.20	>0.05	3(0.0202)	0		
阴性对照 ⁽⁴⁾	I	4924	1	0	1	0	1	2							
	II	5876	0	0	1	0	0	1							
	III	5390	0	0	0	1	0	1							
	I—III	16190	1	0	2	1	0	4	0.0247			1(0.0062)	2(0.0124)		

注释见表 1。

(下接第 16 页)

范”的要求相距甚远,突出表现在卫生设施、工厂卫生管理、原料选购、工厂设计与设施等方面。评价结果还表明,企业的“规范”符合情况与企业有无自身卫生管理体制密切相关,有则佳,无则差;也与企业生产规模、企业性质相关。研究发现,食品的微生物学卫生质量随企业的“规范”符合率增加而提高。

针对我国食品企业的基本现状及其与“规范”要求相距甚远的严重问题,建议:(1)我国的最高卫生行政管理机构应尽快作好实施“规范”的统一布署和全面规划;(2)进一步明确“规范”的法规意义,完善有关实施“规范”的各项配套法规,形成实施“规范”的法律制约机

制;(3)加强对食监机构和食品企业的“规范”宣传教育,提高对“规范”的认识,进一步推广和普及实施“规范”的有关技术;(4)地方卫生行政部门应以“规范”的各项要求作为本地区预防性卫生监督的基本依据,充分作好企业建厂前的卫生审查工作;(5)帮助和促进食品企业建立健全自身卫生管理体系,发挥其对实施“规范”的自身指导和监督作用;(6)衔接食品卫生质量监测与实施“规范”的联系,实行对“规范”达标企业的产品标志化管理。同时,对消费者进行实施“规范”与保证食品卫生质量方面的宣传。由此增加达标企业的产品竞争优势,引发企业实施“规范”的市场动力。

4 参考文献

- 1 中华人民共和国卫生部. 饮料厂卫生规范 1991—03—18
- 2 中华人民共和国卫生部. 肉类加工厂卫生规范

1991—03—18

- 3 中华人民共和国卫生部. 乳品厂卫生规范 1991—03—18
- 4 杨树勤. 卫生统计学. 北京: 人民卫生出版社. 1986

(上接第11页)

4 参考文献

- 1 Bruce KB. Flavor and Fragrance Materials. USA: Allured Publishing Corporation. 1993;146
- 2 邢邦华,等. 二甲基呋喃酮(HDMF)致突变实验研究. 中华预防医学杂志 1988;22(2):85
- 3 姚小曼,等. 孕鼠骨髓和胚鼠肝血嗜多染红细胞中微核检出率的比较. 癌变·畸变·突变 1990;2(1):33.
- 4 李袭丽,等. 二甲基呋喃酮是否“公认安全”. 天津医学院学报 1992;16(2):14
- 5 田庆伟,等. 二甲基呋喃酮的雄性小鼠生殖细胞中的遗传毒性效应. 癌变·畸变·突变 1991;3(3):32
- 6 商瑞明,等. 体外培养大鼠胚胎中脑神经细胞检测HDMF的致畸作用. 卫生毒理学杂志 1992;6(2):125
- 7 邢邦华. 二甲基呋喃酮致畸性实验研究. 癌变·

畸变·突变 1992;4(3):15

- 8 李怀义,等. 十五种化合物在一个新建立的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
- 9 Kastenbaum MA Bowman KO. Tables for Detecting the Statistitcal Significance of Mutation Frequencies. Mutation Res. 1970, 9:527~549
- 10 Valencia R, et al. Cheomosome Mutation Tests for Mutagensis in Drosophila Melanogaster, A Report of U. S. Enviromental Protection Agency Gene-Tox Program. Mutation Res.1984;134:61~88
- 11 Pet-Edwards J, et al. Application of the Carcinogenicity Prediction and Battery Selection (CPBS) method to the Gene-Tox Data Base. Mutation Res. 1985;153:187~200

ABSTRACTS

A feeding trial of Ginseng Syrup in human volunteers/ Yang Ying Guo ShipingYe Yuqin et al.// Chinese Journal of Food Hygiene. –1995,7(1):1–4

A Feeding trial with Ginseng Syrup in 25 subjects was carried out for 6 weeks. The ginsenoside intake was 30 mg/day. The result showed that the syrup was well accepted by the subjects and no abnormal symptoms and signs were found. There were no adverse effects of the Ginseng Syrup on hemopoiesis blood system, the biochemical indexes in blood and the levels of sex hormone except the increasing of urea nitrogen content in woman subjects. According to the result of our study, the recommendable limit of ginsenoside intake will be below 20mg/day.

Author's address Yang Ying, Institute of Food Safety Control and Inspection, Ministry of Public Health, Beijing 100021, PRC

Study of growth and decline of bacteria in roast chicken irradiated for preserve/ Zhang Ming Wang Hong Cheng Xiaoxia et al.// Chinese Journal of Food Hygiene. –1995,7(1): 5–6

In order to draft the national hygienic standard of irradiated food and verify the bactericidal effectiveness of 8 kGy⁶⁰Co dosage to irradiate roast chicken, we tested the irradiated roast chicken using the methods of national hygienic standards 4789.2, 3, 4, 5, 10, 11–84. The result indicated that after the roast chicken irradiated by 8 kGy⁶⁰Co and keeping in room temperature for 21 d, the compliance rate was over 90% which significantly better than non-irradiated samples.

Author's address Zhang Ming, Institute of Food Safety Control and Inspection of Shandong Province, Jinan 250014, PRC

Induction of aneuploidy mutation in the germ cells of drosophila melanogaster by 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone(HDMF)/ Guo Baosheng Li Xili// Chinese Journal of Food Hygiene. –1995, 7(1):7–11,16

HDMF(4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone) is a synthetic flavor that has distinct mutagenicity. In present paper, HDMF was tested for further investigating the aneugenic hazard to the eukaryotic germ

observed. HDMF also significantly induced chromosome loss (CL) in all groups and chromosome gain (CG) only at 2.01mg/mL level. (2) After permitting adults to feed on HDMF, significantly increases were found in yw/yw (♀) for aneuploidy and CL only at 1.20mg/mL level. The reason is probable that HDMF may have difficulty in penetrating the chorionated oocytes. But when its 3-instar larvae were exposed to HDMF at 0.99, 1.99 and 3.97mg/mL, the frequencies of aneuploidy had significant increases in the control, while both rates of CL and CG were similar but the increases did not attain statistical significance. In general, the above results indicated that HDMF has a distinct aneuploidy activity on the eukaryotic germ cells.

Author's address Guo Baosheng, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, PRC

Estimation of implementing GMP in 3 kinds of enterprises in 7 provinces and municipal cities in China/ Zhang Zhiqiang Wang Maoqi Bao Dayue et al.// Chinese Journal of Food Hygiene.—1995, 7(1): 12—16

The Institute of Food Safety Control and Inspection, Ministry of Public Health, investigated and estimated the implementation of hygienic standards of food factory (GMP) in 135 mills of 3 kind enterprises which are beverage mills, dairy mills and meat mills in Shanghai city and other 6 provinces and municipal cities. The rate up to standards of 3 kind of enterprise in average is 71.09%. The compliance rate separately is: beverage mills: 78.00%, dairy mills: 70.00%, meat and meat product mills: 64.50%. To the separate subject of the standards, the best of implemented subject is "facilities and equipment" and the worst is "hygienic facilities" and "raw material test". The estimation result indicated that the main factors affecting the implementation of GMP are: whether there is a perfect self-management system; the production capacity and the characteristic of the enterprise. The research also found that the higher the compliance rate of GMP, the better the food quality in microbial.

Author's address Zhang Zhiqiang, Institute of Food Safety Control and Inspection, Ministry of Public Health, Beijing 100021, PRC

Requirements on evaluation and assessment of qualification of food toxicological inspection unite/ Feng Hongyou Cui Shengyao Xing Banghua et al //Chinese Journal of Food Hygiene.—1995, 7(1): 17—23

Based on the nation's related regulation and rules, we set up a set of requirements which has 60 specific items for evaluating qualification of

(下转封二)