

油桐尺蠖核型多角体病毒对小鼠的安全性试验 ——微核测定

祝庆荃 刘军

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉)

油桐尺蠖是茶树的主要害虫之一, 长期使用化学农药, 不仅使其产生抗药性, 而且使环境污染日趋严重。五年来我室在油桐尺蠖核型多角体病毒 (*Buzura suppressaria* Nuclear Polyhedrosis Virus, 简称 BSNPV) 及其应用方面的研究工作表明, BSNPV 确有防除油桐尺蠖的效果。作为茶叶害虫的综合防治手段之一, BSNPV 是一种有前途的生物杀虫剂。

昆虫病毒杀虫剂是否具有诱发哺乳动物染色体畸变而使机体造成危害的潜在诱变活力的问题, 目前尚缺乏可参考的资料, 是急待解决的课题。

微核测定是反映一些诱变因子在活体内诱发染色体损伤的快速检测方法, 是以观察细胞中染色体碎片出现的频率为依据的突变试验。而且是农牧渔业部规定农药新产品在投产前必须做的安全试验项目之一。本文报道用此方法测定 BSNPV 对小白鼠骨髓细胞中微核的出现来作为评价杀虫剂——油桐尺蠖 NPV 对哺乳动物安全性的一项指标。

材料与 方法

(一) 多角体的纯化

油桐尺蠖 NPV 多角体来自自然罹病的油桐尺蠖幼虫, 加水研磨, 纱布过滤, 滤液经低速离心弃沉渣, 上清液 3000rpm 离心 30 分钟, 沉淀用蒸馏水、生理盐水及 PBS 反复交替洗涤数次, 然后加入 SDS 使最终浓度为 0.6%, 在 30℃ 下处理 30 分钟, 再用蒸馏水以 3000 rpm 离心 30 分钟, 反复洗涤数次, 直至多角体呈白色。用血球计数器在显微镜下计数为 $51.5 \times$

10^8 个/ml。

活性测定: 用 200 万个/ml 多角体添食感染油桐尺蠖 3—4 龄幼虫, 7 天后全部幼虫都因病毒感染而死亡, 而未用病毒感染的对照幼虫无一典型病毒感染致死的。此结果表明用以上方法处理后多角体对油桐尺蠖幼虫仍具有感染活性。

(二) 多角体降解物的制备

取纯净多角体 0.1ml (51.5×10^8 个/ml) 加 1.9ml 蒸馏水, 再加等量的 0.05M Na_2CO_3 (内含 0.16M NaCl) 在 30℃ 下降解 30 分钟后, 立即用 0.2M NaH_2PO_4 调 pH 至 7.4, 再加入蒸馏水使总量为 5.15ml, 即含 1×10^8 个/ml 多角体。此液通过微量除菌滤器后, 无菌分装备用。

电镜检查: 此滤过液中观察到许多完整的病毒粒子。

诱变剂: 环磷酰胺 (Cyclophosphamidum), 上海第十二制药厂出品, 批号 820703, 用生理盐水稀释成 200mg/ml 备用。

(三) 实验动物分组及投药方式

供试验用的小白鼠由湖北医学院动物房饲养繁殖, 7—8 周龄雄性健康成鼠。第一组采用一次腹腔注射; 第二组为间隔 24 小时两次灌胃口服多角体。各组都采用 120×10^6 个/kg、 120×10^7 个/kg、 120×10^8 个/kg 等三种浓度处理。第三组为一次腹腔注射原液、1/10、1/100 多角体降解物。并用 100mg/kg、500mg/kg 环磷酰胺作为阳性对照; 相同容积的生理盐水作阴性对照。在开始给药后 30 小时将小白鼠脱

本文照片由本所电镜室邓红同志拍摄, 特此致谢。

延髓处死。

(四) 制片、染色及观察

取出小白鼠两根股骨，剔净肌肉，剪掉股骨头，用注射器在 30℃ 吸取 1% 柠檬酸三钠或小牛血清约 0.5ml，反复抽洗骨髓腔，并抽吸打碎骨髓团块，使成混悬液，1,000rpm 离心 5 分钟，上清液弃去，留下少许液体将沉淀混匀，吸取混悬液一小滴滴于载玻片之一端，推成 2—3cm 长度的血片，在空气中干燥后，放入甲醇液中固定 5—10 分钟。经甲醇固定后的血片在 0.5% May-Grunwald's 染液中染色 3 分钟，再在 1:1 May-Grunwald's 磷酸盐缓冲稀释液中染色 2 分钟，最后在 Giemsa 应用液中染色 5 分钟。在显微镜下每只动物计数嗜多染红细胞 1,000 个，观察含有微核的嗜多染红细胞数，以千分率表示之。

结果与讨论

BSNPV 多角体对小白鼠骨髓细胞微核率的影响见表 1。腹腔注射 BSNPV 多角体降解物后对小白鼠骨髓细胞微核率的影响见表 2。

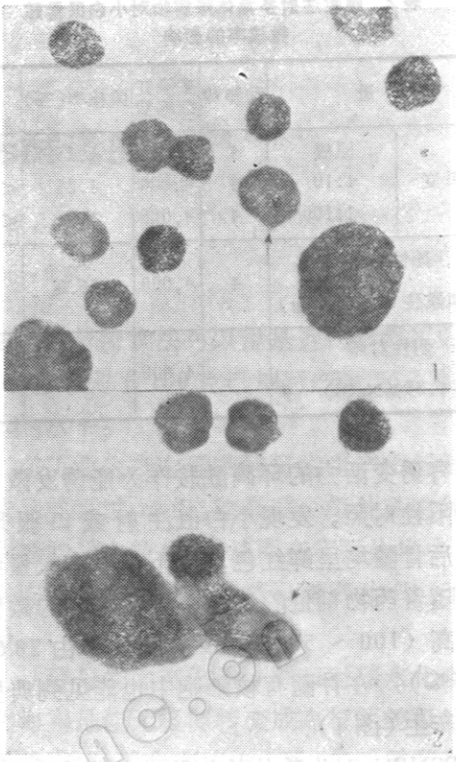


图 1 骨髓细胞中的微核形态
1: 多染红细胞的微核 2: 有核细胞的微核

表 1 油桐尺蠖 NPV 多角体对小白鼠骨髓细胞微核率的影响

给药途径	剂 量	动物数	多染红细胞数	微 核 率 (%)	P
腹腔注射	120×10 ⁸ 个 PIB*/kg	4	4,000	1.5	<0.005
	120×10 ⁷ 个 PIB/kg	4	4,000	1.0	<0.005
	120×10 ⁶ 个 PIB/kg	5	5,000	2.0	<0.005
	阳性对照 (环磷酸胺 100mg/kg)	4	4,000	45.5	
	阴性对照 (0.85%NaCl)	4	4,000	2.0	
口服感染	120×10 ⁸ 个 PIB/kg	4	4,000	1.5	<0.005
	120×10 ⁷ 个 PIB/kg	5	5,000	1.0	<0.005
	120×10 ⁶ 个 PIB/kg	5	5,000	1.0	<0.005
	阳性对照 (环磷酸胺 100 mg/kg)	4	4,000	54.25	
	阴性对照 (0.85%NaCl)	4	4,000	0.75	

* PIB 为 Polyhedral Inclusion Body 的简写,即多角体。

表2 腹腔注射多角体降解物对小白鼠骨髓微核率的影响

剂 量		动物数	多染红细胞数	微核率(%)	P
稀释度	原液	4	4,000	1.25	<0.005
	1:10	4	4,000	1.25	<0.005
	1:100	4	4,000	1.0	<0.005
阳性对照 (环磷酰胺 500 mg/kg)		4	4,000	36.0	
阴性对照 (0.85%NaCl)		4	4,000	1.5	

用具有诱变活力的环磷酰胺作为能诱发微核效应的阳性对照,发现小白鼠注射或口服环磷酰胺后骨髓均呈鲜红色,镜下观察有大量红细胞,随着药物剂量的增加多染红细胞的微核率亦增高(100~500mg/kg其微核率由28.67—54.25%)。在骨髓有核细胞中也能见到典型的微核产生(图1)。

BSNPV对生物体的细胞遗传学作用,没有表现阳性反应。无论采用腹腔注射和口服多角体及降解物去感染小白鼠对其骨髓中多染红细胞微核的形成,都没有发现各剂量组之间存在剂量-效应关系。经与阴性对照作统计学处理,证明二者的微核率没有显著性差别($P>0.05$),而和能诱发微核效应的环磷酰胺所诱发的微核率相比较则有极为显著的差异($P<0.005$)。

当致突变原作用于骨髓细胞时,不仅引起幼稚红细胞染色体的断裂,也能使骨髓的幼稚白细胞、淋巴细胞染色体断裂,故微核在各种骨髓细胞中均可存在,并呈现出不同的核异常类型。目前作为分析鉴定,最常用的是检查嗜多染红细胞的微核和淋巴细胞的微核两种。我们选择多染红细胞的微核计数是因为骨髓中红细胞的数量较血液中淋巴细胞的数量为多,容易观察,且操作简便。

在昆虫病毒中杆状病毒一般被认为对脊椎动物是安全的。国内外资料表明无论用整体动物^[1,2],还是用离体细胞进行感染试验,均不能

引起动物的组织损伤及细胞病变^[3,4]。本试验用细胞遗传学方法观察诱发染色体受损伤时所出现的无着丝点断片进入间期细胞形成微核的结果,证明BSNPV对小白鼠的染色体没有表现致突变反应,与整体动物和细胞感染试验的结果一致。

在进行骨髓多染红细胞微核测定的过程中,先用May-Grunwald's染色,再用Giemsa染色的标本比单用Giemsa染色的标本清晰,色差分辨良好,嗜多染红细胞呈灰蓝色,成熟红细胞呈粉红色,微核的嗜色性与核质一致。

用柠檬酸三钠代替小牛血清冲洗骨髓腔,制成混悬液涂片,不仅分散均匀,细胞无损,而且还可避免血清偶尔受细菌污染造成的与微核难以区分的颗粒出现,以致影响结果的正确判断。

骨髓多染红细胞微核试验作为化学物质诱变性的筛选方法,国内外报道甚多。昆明动物研究所较系统地报道了用微核试验测定辐射对哺乳动物染色体损伤的研究^[5,6]。Heddle^[7]的工作证明了可以利用小鼠骨髓微核的出现率作为快速初筛抗放药物的方法,适用于评定染色体损伤的程度。从我们实验观察中也证实检查骨髓微核率的方法测定生物诱变因子同样具有方法简便,易于掌握,有较高的可靠性等优点,因此在研究各种诱变因子的细胞遗传学效应,包括生物学因子在内的测定中,微核试验可做为染色体损伤的评定指标。

参 考 文 献

- [1] 袁观修等:微生物学通报,9(3):101—105,1982.
- [2] 祝庆奎等:中国茶叶,4:30—32,1982.
- [3] Ignoff, C. M. et al.: J. Invertebr. Pathol., 20:321—325, 1972.
- [4] 谢天恩等:微生物学通报,11(1):2—3,1984.
- [5] 云南动物研究所辐射细胞组:遗传学报,3:164—168,1976.
- [6] 施立明等:生物化学与生物物理进展,3:33—35,1975.
- [7] Heddle, J. A. et al.: Radiat. Res., 61:350—353, 1975.