

基础研究 DOI:10.13406/j.cnki.cyxh.000195

铜绿蝇幼虫在不同脏器组织源食物上生长发育变化

王 尧¹,杜琳敏²,袁增琼²,李学博²,万立华²

(1. 贵阳医学院法医学系, 贵阳 550004; 2. 重庆医科大学基础医学院法医学教研室, 重庆 400016)

【摘要】目的:研究铜绿蝇幼虫在不同组织源的食物上生长发育变化。**方法:**在 26℃ 恒温、相对湿度 70% 条件下, 用猪的肌肉组织、肝脏组织、脑组织、肌肉与脂肪的混合物(6:4)分别饲养铜绿蝇幼虫。每隔 12 h 测体长和体质量, 化蛹后测蛹的体长和体质量。统计幼虫及蛹的死亡率。推算各组幼虫发育总历期和成虫的性别比。**结果:**40% 脂肪混合组与其他 3 组相比生长缓慢, 达到最大个体的时间延迟 24 h 以上。肝脏组幼虫体长(15.02 ± 1.39) mm 和 40% 脂肪混合组体长(14.85 ± 1.43) mm 明显小于脑组织组(17.53 ± 2.08) mm、肌肉组(16.82 ± 2.15) mm ($F=5.440, P=0.003$); 肝脏组幼虫体质量(72.8 ± 14.2) mg 和 40% 脂肪混合组体质量(70.4 ± 15.4) mg 均明显小于脑组织组(89.6 ± 19.2) mg 和肌肉组(85.9 ± 16.7) mg ($F=3.320, P=0.030$)。40% 脂肪混合组蛹体长及体重均明显小于脑组织组和肌肉组 ($F=7.890, P=0.001$; $F=9.280, P=0.001$)。40% 脂肪混合组幼虫和蛹的死亡率均明显高于脑组织组、肌肉组、肝脏组 ($F=3.470, P=0.040$; $F=4.720, P=0.035$)。**结论:**铜绿蝇幼虫在 40% 脂肪混合食物上生长发育历期较长, 肝脏组和 40% 脂肪混合组幼虫及蛹的体长和体质量较小。

【关键词】死后间隔时间; 铜绿蝇幼虫; 法医昆虫学**【中图分类号】**R384.2**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2012-11-19

作者介绍: 王 尧, Email: wangyao123abcd@163.com,

研究方向: 法医现场学。

通信作者: 万立华, Email: 441567490@qq.com。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20150209.1123.028.html>
(2014-04-04)

综上所述, 本研究结果表明腺病毒载体介导 Apoptin 可以明显降低人大细胞肺癌 NCI-H460 细胞的增殖活性, 并有效地诱导肺癌细胞发生凋亡; 因此, Apoptin 是一种潜在的抗肿瘤生物制剂, 为 NSCLC 的基因治疗提供了新的方向。

参 考 文 献

- [1] Moldvay J. Personalized therapy in non-small cell lung cancer: from diagnosis to therapy[J]. *Orv Hetil*, 2012, 153(23): 909-916.
- [2] Los M, Panigrahi S, Rashedi I, et al. Apoptin, a tumor-selective killer[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1793(8): 1335-1342.
- [3] Argiris K, Panethymitaki C, Tavassoli M. Naturally occurring, tumor-specific, therapeutic proteins[J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2011, 236(5): 524-536.
- [4] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics[J]. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61(2): 69-90.
- [5] Ferlay J, Shin HR, Bray F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008; GLOBOCAN 2008[J]. *Int J Cancer*, 2010, 127(12): 2893-2917.
- [6] 孔灵芝, 赵平. 中国肿瘤死亡报告: 全国第三次死因回顾抽样调查[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010, 11-19.
- [7] Zhu CQ, Pintilie M, John T, et al. Understanding prognostic gene expression signatures in lung cancer[J]. *Clin Lung Cancer*, 2009, 10(5):

331-340.

- [8] Backendorf C, Visser AE, de Boer AG, et al. Apoptin: therapeutic potential of an early sensor of carcinogenic transformation[J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2008, 48(2): 143-169.
- [9] Bullenkamp J, Cole D, Malik F, et al. Human Gyrovirus Apoptin shows a similar subcellular distribution pattern and apoptosis induction as the chicken anaemia virus derived VP3/Apoptin[J]. *Cell Death Dis*, 2012, 3(e296): 1-7.
- [10] Noteborn MH. Proteins selectively killing tumor cells[J]. *Eur J Pharmacol*, 2009, 625(1-3): 165-173.
- [11] Grimm S, Noteborn M. Anticancer genes: inducers of tumour-specific cell death signaling[J]. *Trends Mol Med*, 2010, 16(2): 88-96.
- [12] 王春晖, 王建松, 詹 辉, 等. 改良型 TAT-凋亡素体外抗人膀胱肿瘤活性的研究[J]. *中国肿瘤临床*, 2011, 38(5): 246-254.
- [13] Bernt KM, Ni S, Tieu AT, et al. Assessment of a combined adenovirus-mediated oncolytic and immunostimulatory tumor therapy[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(10): 4343-4352.
- [14] Teodoro JG, Heilman DW, Parker AE, et al. The viral protein Apoptin associates with the anaphase-promoting complex to induce G2/M arrest and apoptosis in the absence of p53[J]. *Genes Dev*, 2004, 18(16): 1952-1957.
- [15] Wang QM, Fan GC, Chen JZ, et al. A putative NES mediates cytoplasmic localization of apoptin in normal cells[J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2004, 36(12): 817-823.

(责任编辑: 冉明会)

Growth and development of *lucilia cuprina* larvae fed by different organ tissues

Wang Yao¹, Du Linmin², Yuan Zengqiong², Li Xuebo², Wan Lihua²

(1. Department of Forensic Science, Guiyang Medical College; 2. Teaching and Research Section of Forensic Medicine, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University)

[Abstract] **Objective:** To research the growth and development of *lucilia cuprina* larvae fed by different organization sources. **Methods:** Under the condition of constant temperature (26 °C) and relative humidity (70%), muscle tissue, hepatic tissue, brain tissue, muscle and fat mixture (6:4) were used to feed *lucilia cuprina* larvae. Length and weight of larvae and were measured at an interval of 12 h while length and weight of pupa were measured after eclosion. Development stages of larvae, mortality of larvae and pupa as well as sex ratio of adults were recorded. **Results:** Growth was retarded in 40% fat mixed group than in the other three groups, achieving maximum individual delay time of 24 h. Larvae body length of hepatic tissue group (15.02 ± 1.39) mm and 40% fat mixed group (14.85 ± 1.43) mm were statistically shorter than those of brain tissue group (17.53 ± 2.08) mm and muscle tissue group (16.82 ± 2.15) mm ($F=5.440, P=0.003$). Larvae body weight of hepatic tissue group (72.8 ± 14.2) mg and 40% fat mixed group (70.4 ± 15.4) mg were statistically lighter than those of brain tissue group (89.6 ± 19.2) mg and muscle tissue group (85.9 ± 16.7) mg ($F=3.320, P=0.030$). Pupa body weight and body length of 40% fat mixed group were statistically lighter and shorter than those of brain tissue group and muscle tissue group ($F=7.890, P=0.001; F=9.280, P=0.001$). Larvae and pupa mortality of 40% fat mixed group were statistically higher than that in the other three groups ($F=3.470, P=0.040; F=4.720, P=0.035$). **Conclusion:** *Lucilia cuprina* larvae fed by 40% fat mixed food have longer growth and development period. Body weight and body length of larvae and pupa are lighter and shorter in hepatic tissue group and 40% fat mixed group than in the other groups.

[Key words] postmortem interval; *lucilia cuprina* larvae; forensic entomology

铜绿蝇在南方较普遍,全国大多数省份均有分布。铜绿蝇是较早出现在尸体上的昆虫之一,夏秋季节人、畜尸体上占绝对优势,生活习性与丝光绿蝇相似。在法医学案件中,经常遇到开放性颅脑损伤等,由于人体重要脏器都是较大的组织,所以可以引来大量的蝇类前来取食、产卵^[1-2]。此外尸体上的肌肉组织及脂肪组织也是其重要的食物。

嗜尸性蝇类具有以动物尸体为食物来源的特殊生活习性,利用嗜尸性蝇类推断死后间隔时间 (postmortem interval, PMI) 应该建立在大量的经验和实验研究的基础上。现在的主要研究数据是通过观察前来取食的各种嗜尸性昆虫,特别是在哺乳动物的尸体或者某部分组织中获取的^[2-5]。但是,不同脏器组织的营养成分具有差异,这也许会影响嗜尸性蝇类幼虫的生长发育。因此,不能忽视不同脏器组织对幼虫生长发育的影响,以免推断出与实际情况不符的 PMI^[3]。同时,通过观察取食不同组织来源的食物对嗜尸性幼虫的生长发育变化,对法医昆虫实验研究中的不同食物饲养的选择及生长发育变化评价也具有一定的意义。实验采用最常见的铜绿蝇做为研究对象,观察其幼虫在不同组织来源食物上生长发育情况,并探讨在法医学应用中的意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 铜绿蝇的来源 在重庆医科大学校园(北纬 29°53' 东经 106°50') 内用猪肉诱捕铜绿蝇,经过种属鉴定后,按照雌雄比例 1:1 (200 只) 放在 100 cm × 100 cm × 100 cm 的养蝇笼内,喂以奶粉+红糖+水,并在食物中适量添加少许鸡血。连代饲养 3 代后开始实验。

1.1.2 铜绿蝇幼虫培养基的制作 从白市驿屠宰场订购同一批次的 2 头猪的猪脑和肝脏组织、肌肉组织和皮下脂肪组织。分别将脑组织、肝脏组织、肌肉组织、肌肉与脂肪的混合物 (6:4) 各 750 g, 搅碎拌匀后放于冰箱 (-20 °C) 中备用。

1.1.3 主要器材 多功能环境控制培养箱 (MLR-351 H 型) 为日本三洋公司产品, 数字分析天平 (AUW-22D 型) 日本岛津公司生产, 数字螺旋测微仪 (293-821 型) 日本三丰公司产品, 体视显微镜 (CH-9436 型) 瑞士莱卡公司产品, 载玻片、烧杯等。

1.2 方法

1.2.1 幼虫的饲养 待铜绿蝇进入产卵高峰期, 把猪肉片放于养蝇笼内诱导其产卵, 约 90 min 后取出, 筛选蝇卵 (每组约 200 粒) 并分别移植到各组烧杯中的食物表面上^[4-5], 然后把烧杯放于培养盒内, 培养盒大小为 30 cm × 40 cm × 30 cm, 其上口用细孔纱网覆盖, 盒底铺 1 层消毒细沙子。最后将培养盒放于多功能环境控制培养箱 (温度 26 °C、相对湿度

70%,光照条件 12 h/d)内饲养,每组重复 3 次。

1.2.2 相关指标测量

1.2.2.1 取样 从卵孵化后 16 h 开始取样,间隔 12 h 观察 1 次,并在幼虫聚集较多的位置随机取样 10 只检测,取样时间应尽量缩短。幼虫离食后,每组分别取蛹 5 个检测。

1.2.2.2 指标的测量 将取样幼虫立即放入热水中烫死,然后用消毒过滤纸吸干幼虫表面的水分,数字分析天平测量幼虫和蛹体重,数字螺旋测微器测量幼虫和蛹体长。待蛹羽化完成后,计算培养盒内死亡的幼虫、蛹和成虫数据,得到幼虫和蛹死亡率。根据成虫复眼间距判断成虫性别并计算性别比,性别比=雌虫/(雌虫+雄虫)。

1.3 统计学分析

3 次重复实验结果显示相同食物材料组内各项数据无差异,将数据合并后应用 SPSS 16.0 软件进行统计处理,计量资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。对各组幼虫体长与体质量的数据进行重复测量方差分析比较,其余指标采用 LSD-*t* 检验进行比较。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 铜绿蝇幼虫生长指标的变化

2.1.1 幼虫体长的变化 脑组织组和肌肉组在 88 h 达到最大体长。40%脂肪混合组幼虫的体长增长变化较其他 3 组慢,但是 24 h 后也达到最长水平,取食 4 种不同脏器组织食物的幼虫最大体长存在明显差异($F=5.440, P=0.003$)。肝脏组体长(15.02 ± 1.39) mm 和 40%脂肪混合组的体长(14.85 ± 1.43) mm 明显小于脑组织组(17.53 ± 2.08) mm,差异有统计学意义($P=0.004, P=0.002$);肌肉组(16.82 ± 2.15) mm,与肝脏组和 40%脂肪混合组的体长相比,差异有统计学意义($P=0.031, P=0.019$)。见图 1。

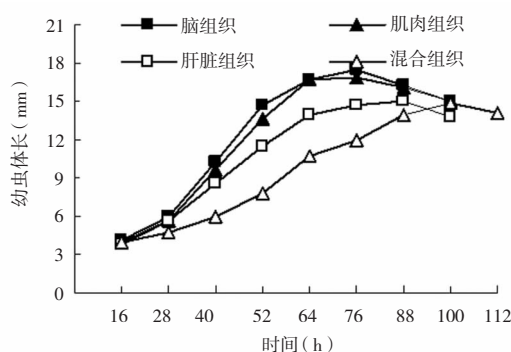


图 1 铜绿蝇幼虫体长增长变化曲线

Fig.1 Curve of body length growth change of lucilia cuprina larvae

2.1.2 幼虫体质量的变化 脑组织组和肌肉组的最大体质量出现在 88 h,分别为(89.6 ± 19.2) mg,(脑组织组与肝脏组、混合组进行比较,差异有统计学意义, $P=0.028, P=0.013$)和(85.9 ± 16.7) mg,(肌肉组与肝脏组混合组比较,差异有统计学意义, $P=0.084, P=0.043$);肝脏组体质量(72.8 ± 14.2) mg 和 40%脂肪混合组体质量(70.4 ± 15.4) mg 在 24 h 后也达到

最大。取食 4 种不同脏器来源食物的幼虫最大体质量呈现明显的差异($F=3.320, P=0.030$)。见图 2。

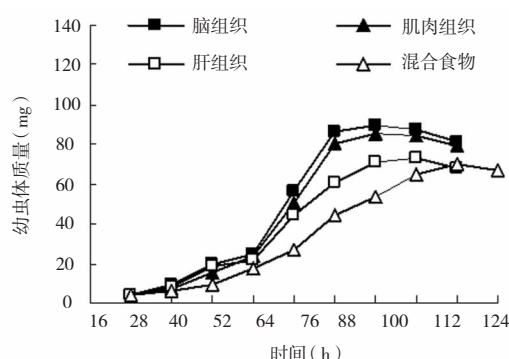


图 2 铜绿蝇幼虫体质量增长变化曲线

Fig.2 Curve of body weight growth change of lucilia cuprina larvae

2.2 铜绿蝇蛹的指标测量

取食 4 种不同脏器组织食物的幼虫化蛹后,其蛹长和蛹体质量也出现明显的差异($F=7.890, P=0.001; F=9.280, P=0.001$)。40%脂肪混合组蛹长为(7.41 ± 0.83) mm,与其他 3 组相比,差异有统计学意义($P=0.006, P=0.022, P=0.014$),明显小于脑组织组(9.12 ± 0.52) mm、肌肉组(8.78 ± 0.51) mm、肝脏组(8.86 ± 0.53) mm;脑组织组蛹最重(62.9 ± 10.2) mg,肌肉组蛹体质量(63.3 ± 9.1) mg;肝脏组蛹体质量(55.8 ± 8.5) mg 小于脑组织组和肌肉组,40%脂肪混合组蛹体质量最小(37.1 ± 7.9) mg,与其他 3 组相比,差异有统计学意义($P=0.014, P=0.008, P=0.043$)。见表 1。

表 1 铜绿蝇蛹体长、体质量统计

Tab.1 Body length and body weight of lucilia cuprina pupa

分组	蛹体长(mm)	蛹体质量(mg)
脑组织组	9.12 ± 0.52	62.9 ± 10.2
肌肉组	8.78 ± 0.51	63.3 ± 9.1
肝脏组	8.86 ± 0.53	55.8 ± 8.5
40%脂肪混合组	7.41 ± 0.83^a	37.1 ± 7.9^a

注:与其他 3 组相比, $a, F=7.890, P=0.001, F=9.280, P=0.001$

2.3 铜绿蝇幼虫不同发育时期死亡率

不同脏器组织食物对铜绿蝇幼虫和蛹的死亡率产生了影响($F=3.470, P=0.040; F=4.720, P=0.035$),其中 40%脂肪混合组的死亡率最高,幼虫与蛹的死亡率分别为(9.8 ± 2.2)%,与其他 3 组相比,差异有统计学意义($P=0.020, P=0.044, P=0.037$)、(10.3 ± 1.9)%,与其他 3 组相比,差异有统计学意义($P=0.012, P=0.014, P=0.022$),其他 3 组依次为肌肉组: (5.4 ± 1.4)%、(5.3 ± 0.9)%,肝脏组: (5.2 ± 1.4)%、(5.7 ± 1.2)%,脑组织组: (4.5 ± 1.3)%、(4.1 ± 1.0)%。见图 3。

2.4 铜绿蝇幼虫发育历期与成虫性别比

不同脏器组织食物的营养成分对铜绿蝇的生长发育历期也产生了明显的影响,取食 40%脂肪混合食物幼虫发育总历期为(296.3 ± 10.6) h,脑组织组(242.0 ± 11.7) h、肌肉组(257.0 ± 9.2) h 和肝脏组(261.0 ± 9.8) h。各组蛹羽化后成虫性别比为 47.96%~51.80%,各组之间差异无统计学意义($P>0.05$)。

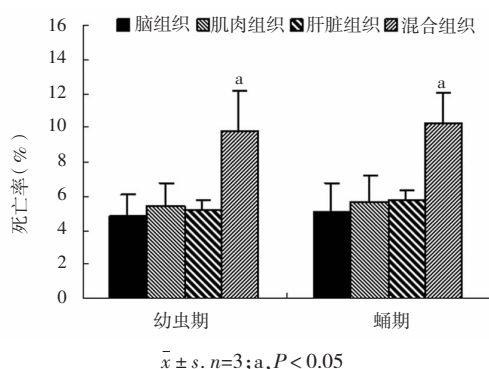


图3 铜绿蝇幼虫不同发育时期死亡率

Fig.3 Mortality of lucilia cuprina larvae at different development stages

3 讨论

嗜尸性蝇类生长发育常受到不同环境条件、食物材料的影响。其幼虫在同一种动物的不同脏器组织上的生长发育存有营养需求方面的差异,这会影响到嗜尸性昆虫幼虫的生长发育变化。以往研究发现,幼虫的个体生长受多方面环境因素变化的影响,尤其关注点多集中在湿度、温度及药(毒)物等方面^[6-9]。本实验发现,食物营养成分的差异对其个体大小也存在明显的影响,在法医刑事案件中应引起重视。

通过实验观察到,铜绿蝇幼虫在肝脏组织上生长发育较缓慢,所有观测指标都低于脑组织组、肌肉组。曾有研究发现肝脏组织对大头金蝇、红头丽蝇、螳丽蝇、丝光绿绿蝇等幼虫的生长发育,具有延缓作用。肝脏组织中有大量的有害外源物质和结缔组织,使得肝脏组织在幼虫体内难以有效的消化和吸收,从而延缓了其个体的生长发育^[3-6]。铜绿蝇幼虫在含 40%脂肪混合食物上生长发育缓慢,发育历期较其他组延长 24 h,而且蛹的个体也较小,幼虫和蛹的死亡率较高。分析原因为脂肪组织不含足量的营养成分,导致其生长发育受限,早期脂肪组织为幼虫活动和生长提供了能量,还具有保持幼虫体表的湿润和生物体内信号传导通路的作用,蛹和早期成虫的能量供应也需要储存适量的脂肪组织^[10],但是,过量脂肪组织对蝇类有不利的影响,而适量则可以促进各发育期成长。

铜绿蝇幼虫在不同脏器组织上的生长发育具有一定的差异,通过比较可以观察到幼虫体长和体重的变化规律基本相同,这 2 项指标可以反映幼虫的生长变化情况,为推断死亡时间提供参考指标。

蝇类幼虫的发育时间在 PMI 推断方面有着重要的意义,而发育阶段的主要确定特征为龄期及体长和体质量^[11-12]。在遇到碎尸等案件时,幼虫不一定有充足的食物来源,其发育历期和生长都会受到影响。那么在类似案件现场提取检材时,就要标记提取的部位。在进行 PMI 推断时查找不同尸体部位的组织对幼虫生长发育的数据资料。为此,研究铜绿蝇幼虫在不同脏器组织上的生长发育变化,旨在描绘出可用于判断幼虫生长时间的形态数据资料,以满足实际工作中较精确地推断 PMI。

参 考 文 献

- [1] Kaneshrajah G, Turner B. Calliphora vicina larvae grow at different rates on different body tissues[J]. Int J Legal Med, 2004, 118(4): 242-244.
- [2] Clark K, Evans L, Wall R. Growth rates of the blowfly, Lucilia sericata, on different body tissues[J]. Forensic Sci Int, 2006, 156(2-3): 145-149.
- [3] Day DM, Wallman JF. Influence of substrate tissue type on larval growth in Calliphora augur and lucilia cuprina[J]. J Forensic Sci, 2006, 51(3): 657-663.
- [4] Ireland S, Turner B. The effects of larval crowding and food type on the size and development of the blowfly, Calliphora vomitoria[J]. Forensic Sci Int, 2006, 159(2-3): 175-181.
- [5] Danies S, Simkiss K, Sminth R. A simple larval diet for population studies on the blowfly lucilia sericata[J]. Med Vet Entomol, 1991, 5(3): 283-292.
- [6] Arong GA, Imandeh GN, Utsu AA, et al. The influence of food type on larval growth in Musca domestica and lucilia sericata (Diptera) in Calabar, Nigeria[J]. World J Sci Technol, 2011, 1(4): 73-77.
- [7] Byrd JH. Laboratory rearing of forensic insects[M]. CRC Press: Boca Raton, 2001: 121-142.
- [8] Grassberger M, Reiter C. Effect of temperature on development of the forensically important holarctic blow fly Protophormia terraenovae (Robineau-Desvoidy) (Diptera: Calliphoridae)[J]. Forensic Sci Int, 2002, 128(3): 177-182.
- [9] Niederegger S, Pastuschek J, Mall G. Preliminary studies of the influence of fluctuating temperatures on the development of various forensically relevant flies[J]. Forensic Sci Int, 2010, 199(1-3): 72-78.
- [10] Aguila JR, Suszko J, Gibbs AG, et al. The role of larval fat cells in adult Drosophila melanogaster[J]. J Exp Biol, 2007, 210(6): 956-963.
- [11] Arecher M, Elgar M. Examination of forensic entomology evidence using computed tomography scanning: case studies and refinement of techniques for estimating maggot mass volumes in bodies[J]. Aust J Zool, 2003, 51(2): 165-174.
- [12] 李学博, 吕 宙, 万立华, 等. 不同组织源食物对大头金蝇生长发育的影响[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2012, 30(3): 191-195.

(责任编辑: 冉明会)