

不同温度条件下盐酸吗啡对肥须亚麻蝇幼虫的影响及法医学意义

张楠¹, 李嘉², 梁婕¹, 牛晓莉¹, 冯慧敏¹, 李泽民^{2*}

1. 河北医科大学西山校区, 石家庄 050000

2. 河北医科大学病原生物学教研室, 石家庄 050000

[摘要] **目的** 研究不同浓度盐酸吗啡和不同温度对石家庄地区优势蝇种肥须亚麻蝇(*Parasarcophaga crassipalpis*)幼虫头咽骨的影响, 积累石家庄地区尸源性蝇类的法医昆虫毒理学资料, 从而为死后间隔时间(postmortem interval, PMI)的推断提供科学依据。**方法** 诱捕肥须亚麻蝇, 并在培养箱中连续培养。选用家兔4只, 其中1只经耳缘静脉注射生理盐水(对照), 另3只分别给予0.5、1、2倍致死剂量盐酸吗啡经耳缘静脉注射。分别在24℃、28℃、32℃恒温条件下用新鲜猪肝诱导成蝇产幼虫并移至家兔肌肉组织上饲养。每隔12 h 留取幼虫标本一次直至达到离食期。将幼虫烫死并保存。体视显微镜下分离出幼虫的头节, 然后将头咽骨进行对称分离, 光学显微镜下观察、拍照。利用计算机图像分析系统对头咽骨的口钩及咽骨面积、骨化面积和平均光密度等指标进行测定。**结果** (1)随着盐酸吗啡浓度和温度的增高, 肥须亚麻蝇幼虫的生长速度均在一定程度上加快。(2)随着时间的延长, 幼虫头咽骨的颜色从浅棕黄色逐渐加深直至变为黑褐色, 同时, 骨化程度逐渐加强, 骨化面积不断加大, 并在三龄期出现点状的附口骨。(3)幼虫口钩和咽骨面积均随时间的延长不断增加, 在叠龄期时变化较剧烈, 直至进入三龄期后很快达到最大值, 并进入平台期, 维持基本恒定。(4)幼虫口钩的骨化面积和平均光密度及咽骨的骨化面积和平均光密度在3个龄期中均随时间的延长而逐渐增高, 直至三龄期结束。口钩和咽骨的骨化面积和平均光密度达到最大值的时间明显滞后于二者面积达到最大值的时间。**结论** 肥须亚麻蝇幼虫的口钩骨化面积和平均光密度及咽骨的骨化面积和平均光密度均随时间的延长呈现持续性增加的趋势, 并一直维持到三龄期后, 此4项指标是推测PMI的理想指标。

[关键词] 法医毒理学; 肥须亚麻蝇; 盐酸吗啡; 温度; 死后间隔时间; 头咽骨

[中图分类号] R 384.2; R 894

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2012)11-1236-05

Effect of morphine hydrochloride on the larvae of *Parasarcophaga crassipalpis* under different temperatures and its forensic implication

ZHANG Nan¹, LI Jia², LIANG Jie¹, NIU Xiao-li¹, FENG Hui-min¹, LI Ze-min^{2*}

1. Xishan Campus, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei, China

2. Department of Pathogenic Biology, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei, China

[Abstract] **Objective** To study the effects of morphine hydrochloride and temperature on the cephalopharyngeal skeleton of the larvae of *Parasarcophaga crassipalpis* in Shijiazhuang, Hebei, so as to provide evidence for forensic toxicologic entomology of sarcosaphagous flies and inference of the postmortem interval (PMI) in Shijiazhuang. **Methods** Adult *Parasarcophaga crassipalpis* were collected. Four domestic rabbits were used in this experiment, with one receiving normal saline (control) and the others receiving morphine hydrochloride (0.5, 1.0 and 2.0 folds of lethal doses) via ear vein injection. Then the rabbits were hit on the head and the muscle was marked with M_0 , M_1 , M_2 and M_3 ; then the larvae were transferred to the muscle sites at 24℃, 28℃ and 32℃. When larvae were laid, 10 of them were randomly sampled from each group at 12 h intervals until the beginning of the prepupal stage. The larvae were collected every 12 h, fixed with boiling water, and stored as specimen. The scolex of the larvae was separated and then the cephalopharyngeal skeleton was separated symmetrically, observed and photographed. Finally the indices, including the areas of different parts of cephalopharyngeal skeleton, sclerotized area, and average optical density were determined using digital image processing equipment. **Results** (1) The larvae of *Parasarcophaga crassipalpis* grew faster with the increase of morphine hydrochloride concentration and the temperature. (2) The color of the cephalopharyngeal skeleton of the larvae changed from yellow to dark brown as time went by. Meanwhile, the degree and range of chitinization were increased, accompanied by increase of the sclerotized area. The attached larval mouth (shaped like a dot) could be observed during the third age. (3) The areas of the larval mouth hook and the larval pharyngeal sclerite increased with time. Especially, remarkable changes were observed during the fold period, and the changes reached

[收稿日期] 2012-06-14

[接受日期] 2012-10-08

[作者简介] 张楠, 硕士, 讲师. E-mail: cathy1021@126.com

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 0311-83938186, E-mail: lizemin1955@sohu.com.cn

their maximum in the third age, and then remained basically unchanged. (4) The sclerotized areas and the average optical densities of the cephalopharyngeal skeleton kept an increasing tendency till the end of the third age. The periods needed for reaching the maximal optical density and sclerotized area were greatly longer than that needed for reaching the maximal area of the cephalopharyngeal skeleton.

Conclusion The sclerotized area and the average optical density of the mouth hook and the pharyngeal sclerite of the larvae of *Parasarcophaga crassipalpis* keep increasing till the end of the third stage, and they are ideal indices for deducing PMI.

[Key words] forensic toxicology; *Parasarcophaga crassipalpis*; morphine; temperature; postmortem interval; cephalopharyngeal skeleton

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(11): 1236-1240]

法医昆虫毒理学的主要研究内容一是探讨尸源性昆虫及其幼虫生长历期及生长模式受毒物的影响,进而辅助推断尸体死后间隔时间(postmortem interval, PMI);二是通过检测尸源性昆虫幼虫体内的药物或毒物的含量,进而确定死者生前的染毒情况^[1-2]。

石家庄地区夏秋季优势蝇种肥须亚麻蝇(*Parasarcophaga crassipalpis*)是较早飞临腐败尸体的蝇类,对法医昆虫毒理学的研究有重要意义。本研究选取肥须亚麻蝇幼虫头咽骨作为研究对象,采用形态学和图像分析相结合的方法,测定口钩和咽骨的面积、骨化面积、平均光密度,从而明确在不同温度和不同盐酸吗啡浓度影响下的各项指标与幼虫发育历期的关系,为法医昆虫毒理学数据库的建立提供依据。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器 盐酸吗啡注射液(morphine hydrochloride),规格为 1 ml: 10 mg,由河北医科大学药理学教研室提供。2002-11 型恒温光照培养箱(常州国华电器有限公司),Motic Med 6.0 医学图像分析系统(北京麦克奥迪仪器仪表有限公司),Olympus SZX9 体视显微镜、Olympus BX-61 显微镜、Olympus DP-71 照相机[奥林巴斯(中国)投资有限公司]。

1.2 成蝇的采集和饲养 在河北医科大学校园内以大鼠内脏诱捕肥须亚麻蝇后带回实验室饲养,按照《中国常见蝇类检索表》^[3]进行蝇种分类鉴定。将肥须亚麻蝇置于养蝇笼内,饲以自来水、奶粉、糖(奶粉:糖=1:1)。养蝇笼置于生化培养箱内,温度分别设置为 24℃、28℃、32℃,相对湿度为 75%,光周期为 12:12 h。连续饲养,以第三代成蝇作为母代开始实验。

1.3 实验动物 实验动物为健康成年家兔 4 只,雌雄各 2 只,雌兔未孕,由河北省实验动物中心提供。4 只家兔体质量分别为:2.80、2.90、3.10、3.05 kg。

1.4 注射剂量 吗啡的最大注射剂量为 0.2 g/kg,根据“人和动物按体表面积折算的等效最大用量”^[4]计算出家兔的致死剂量为 5.33 mg/kg,根据此剂量分别设定家兔的注射剂量为 0.5 倍、1 倍、2 倍致死剂量。

1.5 供试材料的制备 第 1 只家兔(体质量 2.80 kg)经耳缘静脉注射生理盐水 2.8 ml,30 min 后重击其枕部致死,取其肌肉组织保存,标定为 M₀;其余 3 只家兔分别经耳缘静脉注射盐酸吗啡 7.7 ml(体质量 2.90 kg)、16.5 ml(体质量 3.10 kg)、32.5 ml(体质量 3.05 kg),30 min 后重击其枕部处死,取其肌肉组织分别保存,依照给药浓度从小到大依次标定为 M₁、M₂、M₃。

1.6 肥须亚麻蝇幼虫的饲养 分别在 24℃、28℃、32℃ 恒温条件下用新鲜猪肝诱导成蝇产幼虫。将时间上相差不超过 30 min 所产幼虫取出,分别移至装经不同浓度(M₀~M₃)吗啡处理的家兔肌肉的烧杯中饲养,并标明产幼虫时间以作为肥须亚麻蝇发育历期的零时。将烧杯分别置于 24℃、28℃、32℃ 恒温箱内。记录虫卵孵化时间、幼虫离食时间(判断标准:幼虫不再取食,四处爬动寻找化蛹场所)。

1.7 幼虫标本的留取和制作 自幼虫产出 12 h 开始,每 12 h 留取一次标本,每组每次 10 头幼虫。镊子夹起自然落入 80℃ 的热水中,烫死后将其取出并吸干多余水分,放入 70% 甘油乙醇溶液保存。至 50% 幼虫化蛹后不再留取标本。化蛹标准:刺激幼虫没有伸缩或移动反应。

取出幼虫标本,吸干表面液体,用大头针在幼虫腹部一侧扎几个小孔,放入 10% 的 KOH 溶液中消化内部组织,24 h 后将幼虫从 KOH 溶液中取出,用镊子轻轻按压幼虫,直至将体内已消化的组织排出。将幼虫用清水洗净后,在体视显微镜下分离出幼虫的头节,然后对头咽骨进行对称分离。标本依次用 30%、50%、70%、80%、90%、95%、100% 的乙醇,100% 乙醇与二甲苯的混合液(1:1)逐级脱水,最后用二甲苯透明,显微镜下整姿后滴加加拿大树胶封片,置于阴凉处风干。光学显微镜下观察、拍照。

1.8 标本形态特征的提取 利用 Motic Med 6.0 医学图像分析系统对不同日龄幼虫的图像进行处理和特征提取。首先利用图像分析系统对图像进行预处理,然后在显示器上交互式操作由该系统对头咽骨的多项指标进行定量测定。为使图像得以精

确的量化,需选择图像阈值范围,头咽骨面积及平均光密度阈值设定为 0~170,头咽骨骨化面积阈值设定为 0~130。

1.9 统计学处理 应用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析,用 Excel 软件绘图。各组头咽骨的各项形态学指标均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组最大值或最小值间比较应用单因素方差分析(one-way ANOVA)。检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 肥须亚麻蝇幼虫头咽骨的形态学变化 一龄幼虫:头咽骨面积较小,呈浅灰黄色,形似“H”;口钩颜色稍深于咽骨;口钩呈镰刀状,基部略方,窗明显,弯曲度较小;咽骨背角远长于腹角;下口骨与侧口骨融合在一起很难分开,似杆状(图 1A1、1A2)。

二龄幼虫:头咽骨明显增大,颜色亦显著加深至棕黄色;口钩钩部明显缩短的同时基部显著加长加宽;弯曲度和口钩窗较一龄幼虫减小;咽骨腹角仍小于背角;腹角窗和背角窗明显;下口骨显著,前部呈三角形,后部略呈长方形;侧口骨顶端较尖细;外形不规则的耻骨较明显(图 1B1、1B2、1C1、1C2)。

三龄幼虫:头咽骨颜色继续加深,呈黑褐色,几丁质化范围逐渐加大,在此期达到最大;头咽骨面积和长度增加,在此期达到最大值;口钩弯曲度继续减小,基部继续加宽使之略呈方形;口钩窗逐渐减小直至消失;咽骨的背角仍显著长于腹角;开始有隆突出现在腹角背缘;腹角窗仍非常显著;下口骨前部呈三角形,后部略呈长方形,其长约为口钩长度的 1/3;侧口骨加粗加长;耻骨达到最大,形状仍不规则;点状的附口骨在此期出现;咽膜宽(图 1D1、1D2、1E1、1E2)。

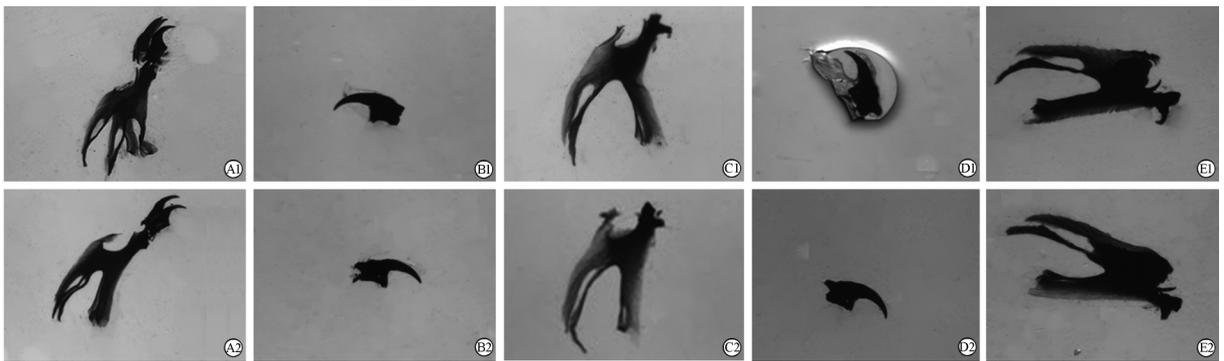


图 1 肥须亚麻蝇幼虫头咽骨的形态学变化

Fig 1 Morphological changes of cephalopharyngeal skeleton of the larva of *Parasarcophaga crassipalpis*

A: Cephalopharyngeal skeleton of the first-instar larva in M₂(A1) and M₃(A2) at 24°C; B: Mouth hook of the second-instar larva in M₀(B1) and M₁(B2) at 24°C; C: Pharyngeal sclerite of the second-instar larva in M₀(C1) and M₁(C2) at 24°C; D: Mouth hook of the third-instar larva in M₂(D1) and M₃(D2) at 24°C; E: Pharyngeal sclerite of the third-instar larva in M₀(E1) and M₁(E2) at 24°C. M₀: Blank control; M₁: 0.5 fold of lethal dose; M₂: 1.0 fold of lethal dose; M₃: 2.0 folds of lethal dose

2.2 肥须亚麻蝇幼虫口钩的形态指征变化

2.2.1 口钩面积的变化 在室内恒温(24°C、28°C、32°C)条件下,各供试组幼虫口钩面积呈阶段性增加,表现为在龄期内增加速度较平缓,在龄期更替时(叠龄期)显著加快,曲线变陡直。当面积达到最大值后,维持恒定,且各供试组最大值间差异无统计学意义($P>0.05$)。幼虫产出 12 h 时各组口钩面积均为最小,且最小值间差异有统计学意义($P<0.05$,图 2A)。

2.2.2 口钩骨化面积的变化 在室内恒温(24°C、28°C、32°C)条件下,各供试组幼虫口钩骨化面积均随时间的延长而增加,直至三龄期结束。各供试组的口钩骨化面积在幼虫产出后 12 h 时最小,且最小值间的差异有统计学意义($P<0.05$),各组最大值间差异无统计学意义($P>0.05$,图 2B)。

2.2.3 口钩平均光密度的变化 在室内恒温(24°C、

28°C、32°C)条件下,各供试组幼虫口钩平均光密度逐渐增加,直至三龄期末。各组幼虫口钩平均光密度在产出后 12 h 时最小,且最小值间的差异有统计学意义($P<0.05$),各组最大值间的差异无统计学意义($P>0.05$,图 2C)。平均光密度增长至最大值的时间和骨化面积达到最大值的时间基本一致。

2.3 肥须亚麻蝇幼虫咽骨的形态指征变化

2.3.1 咽骨面积变化 在室内恒温(24°C、28°C、32°C)条件下,各组幼虫咽骨面积均平缓增加,在叠龄期增长速度显著加快,幼虫进入快速生长期。当咽骨面积达到最大值后,基本维持恒定。幼虫产出 12 h 时咽骨面积最小,且各组最小值间差异有统计学意义($P<0.05$),而最大值间差异无统计学意义($P>0.05$,图 3A)。

2.3.2 咽骨骨化面积的变化 骨化面积在一龄初

期较小,随着时间的延长而不断加大,直至三龄期末。幼虫产出 12 h 时咽骨骨化面积均为最小。各组最小值间的差异具有统计学意义($P < 0.05$),各组最大值间差异无统计学意义($P > 0.05$,图 3B)

2.3.3 咽骨平均光密度的变化 在室内恒温(24℃、28℃、32℃)条件下,所有供试组幼虫咽骨平

均光密度的变化规律和咽骨骨化面积的变化规律一致。在各供试组内,平均光密度均随着时间的延长而逐渐增大,直至三龄期结束。各供试组在幼虫产出的 12 h 时,咽骨平均光密度均最小,各供试组的最小值间差异有统计学意义($P < 0.05$),各组最大值间差异无统计学意义($P > 0.05$,图 3C)。

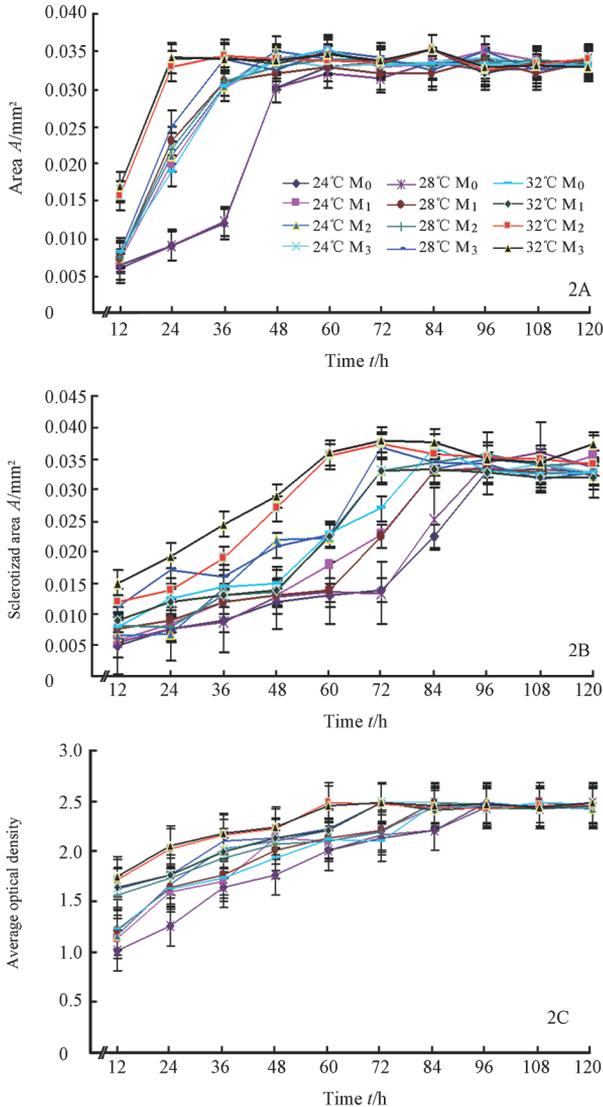


图 2 肥须亚麻蝇幼虫口钩面积(A)、骨化面积(B)和平均光密度(C)的变化

Fig 2 Changes of mouth hook area(A), sclerotized area(B) and average optical density(C) of *Parasarcophaga crassipalpis* larva

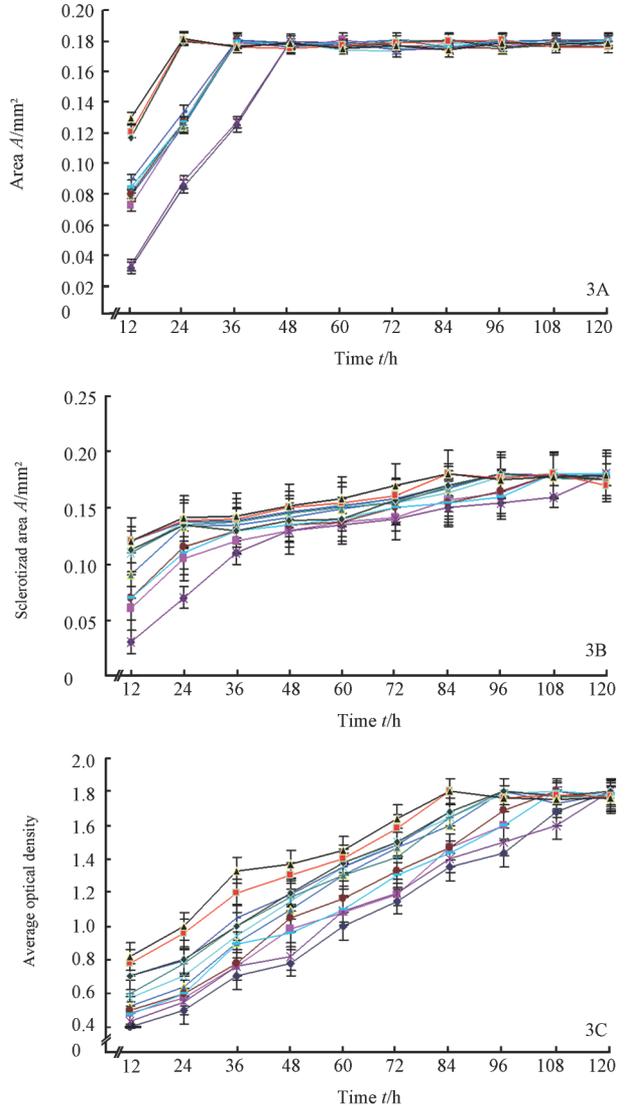


图 3 肥须亚麻蝇幼虫咽骨面积(A)、骨化面积(B)和平均光密度(C)的变化

Fig 3 Changes of pharyngeal sclerite area(A), sclerotized area(B), and average optical density(C) of *Parasarcophaga crassipalpis* larva

M₀: Blank control; M₁: 0.5 fold of lethal dose; M₂: 1.0 fold of lethal dose; M₃: 2.0 folds of lethal dose. Statistical analysis using one-way ANOVA indicated that there was significant difference in the minimum values between each group($P < 0.05$), but not in the maximum values ($P > 0.05$). $n = 10$, $\bar{x} \pm s$

3 讨论

近年来,因吸毒引发的各种恶性案件逐年增多^[5],这对我国法医昆虫毒理学工作者提出了新的挑战。传统的推测指标如蝇蛆的体长、体质量和历期法对于推断 PMI 都有一定的局限性^[6-12],因此,我们迫

切需要寻找更为稳定和准确的指标推断 PMI。本实验选用较早出现于腐败尸体的石家庄地区夏、秋季优势蝇种肥须亚麻蝇幼虫头咽骨的形态学作为研究对象,是由于头咽骨的形态学变化稳定性好,并且可以反映幼虫的生长变化,通过研究温度和盐酸吗啡对肥须亚麻蝇幼虫生长发育的影响,寻找更为准确的判断

PMI 的指标。

在幼虫的分类鉴定上具有决定性意义的头咽骨是由成对的口钩、下口骨、咽骨和若干小骨组成,小骨主要有附口骨、耻骨和侧口骨。其中,下口骨、侧口骨和咽骨结合紧密,难于分割,故将其整合在一起进行测量。而耻骨和附口骨面积积极小,对研究结果影响甚微,且在实际解剖中又极易丢失,故在实际操作中仅对其进行形态观察而不进行实际测量。

本实验结果显示,在所有供试组中,幼虫产出 12 h 时的口钩面积均为最小,且各组最小值间的差异有统计学意义($P < 0.05$)。各供试组中温度和盐酸吗啡均在一定程度上影响了幼虫的生长速度,在温度恒定时,随着盐酸吗啡浓度的增高,幼虫口钩面积的增加速度在一定程度上加快,如 24℃ 时, M_0 组达到最大值的时间为 48 h,而 M_1 组达到最大值的时间提前了 12 h。同时,在盐酸吗啡浓度恒定时,随着温度的增高,口钩面积增加速度加快,如 32℃ M_0 组达到最大值的时间较 24℃ M_0 组达到最大值的时间提前了 12 h。各供试组口钩面积在进入三龄期后,即刻达到最大值并基本维持不变。口钩骨化面积与平均光密度的变化趋势基本相似。在各供试组,两者达到最大值的时间基本一致,如在 24℃ 恒温条件下, M_0 、 M_1 、 M_2 、 M_3 各组口钩骨化面积和平均光密度达到最大值的时间均为 96、84、72 和 72 h。在温度恒定时,随着盐酸吗啡浓度的增高,幼虫口钩骨化面积和平均光密度的增加速度在一定程度上加快,如 24℃ 恒温条件下, M_1 组骨化面积和平均光密度达到最大值时间较 M_0 组提前 12 h。同时,在盐酸吗啡浓度恒定时,温度也在一定程度上影响了口钩骨化面积和平均光密度的增加,如 32℃ M_0 组口钩骨化面积和光密度达到最大值的时间较 24℃ M_0 组达到最大值的时间提前了 12 h。此外,我们还发现口钩骨化面积和光密度的变化趋势与口钩面积的变化趋势存在一定的差异,即口钩骨化面积和光密度达到最大值的时间要比口钩面积达到最大值的时间明显滞后,如 24℃ M_1 组口钩面积在 36 h 时达到最大值并进入平台期,而口钩骨化面积却始终在增长,由 12 h 的 $(0.0056 \pm 0.0007) \text{ mm}^2$ 增加到 120 h 的 $(0.0354 \pm 0.0023) \text{ mm}^2$,由此可见在三龄期内口钩面积没有增长的同时,其骨化面积和平均光密度却在逐渐增长,直至最大值。口钩骨化面积的最大值最终近似于其最大面积,如 24℃ M_1 组口钩面积最大值为 $(0.0359 \pm 0.0037) \text{ mm}^2$,口钩最大骨化面积为 $(0.0354 \pm 0.0023) \text{ mm}^2$ 。12 个供试组的口钩面积、骨化面积和平均光密度的最大值间差异均无统计学意义,说明温度和盐酸吗啡均未影响口钩面积、骨化面积和平均光密度的最大值。

咽骨面积的变化趋势和口钩面积的变化趋势基本一致。咽骨骨化面积和平均光密度的变化趋势相似,两者进入三龄期后,数值仍不断增加,故二者达到最大值的时间明显滞后于咽骨面积达到最大值的时间。咽骨的骨化面积及平均光密度的最大值间的差异无统计学意义。另外,通过本实验结果可以看出,温度和盐酸吗啡浓度对咽骨的影响类似于两者对口钩的影响。由此我们可以得出:(1)温度和盐酸吗啡在一定程度上改变了肥须亚麻蝇幼虫头咽骨的生长发育的速度,但未改变其最终发育结果,说明肥须亚麻蝇头咽骨的稳定性良好,可以为 PMI 的推断提供可靠的依据。(2)幼虫在进入三龄期后,头咽骨的面积很快达到最大值并维持不变,显然,头咽骨面积并非是推测 PMI 的理想指标。而相比之下,头咽骨的骨化面积和平均光密度在幼虫的整个生长过程中却在持续、稳定地增长,故头咽骨的骨化面积和平均光密度更适用于准确地推断 PMI。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 郭景元. 现代法医学[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 915.
- [2] 胡萃. 法医昆虫学[M]. 重庆: 重庆出版社, 2000: 167.
- [3] 范滋德. 中国常见蝇类检索表[M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 1992: 992.
- [4] 施新猷. 医学动物实验方法[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1983: 448.
- [5] 朱玉, 尹潞, 阮玉华, 郝春, 姚辉鸣, 边学贵, 等. 四川省西昌市静脉吸毒人群 3 年随访的死亡情况分析[J]. 中国自然医学杂志, 2006, 8: 170-174.
- [6] Goff M L, Omori A I, Goodbrod J R. Effect of cocaine in tissues on the development rate of *Boettcherisca peregrina* (Diptera: Sarcophagidae)[J]. J Med Entomol, 1989, 26: 91-93.
- [7] Pettit F L. Distinguishing larval instars of the vegetable leaf-miner *Liriomyza sativae* (Diptera: Agromyzidae) [J]. Fla Entomol, 1990, 73: 280-286.
- [8] Hutchinson G E, Tongqing N. The possible adaptive significance of the Brooks-Dyar rule[J]. J Theor Biol, 1984, 106: 437-439.
- [9] 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.
- [10] Ames C, Turner B. Low temperature episodes in development of blowflies: implications for postmortem interval estimation [J]. Med Vet Entomol, 2003, 17: 178-186.
- [11] Kharbouche H, Augsburger M, Cherix D, Sporkert F, Giroud C, Wyss C, et al. Codeine accumulation and elimination in larvae, pupae, and imago of the blowfly *Lucilia sericata* and effects on its development[J]. Int J Legal Med, 2008, 122: 205-211.
- [12] 赵文爱, 王伯霞, 胡圣爱, 冯小勇. 恒温条件下吗啡对丝光绿蝇发育规律的改变与死者死亡时间推断的相关研究[J]. 中国病原生物学杂志, 2008, 3: 612-615, 618.

[本文编辑] 商素芳