

Ames 法和 SCE 法检测正定霉素和甲氨基 喋呤钠盐的诱变性研究

赵寿元 邱信芳 李昌本 秦世真 伏晓敏¹⁾

(复旦大学遗传学研究所, 上海)

据估计, 目前全世界人工合成的化合物其总数已超过七千万种。每年还有近千种新的化合物进入人类环境。这些化合物包括农药、药物、食品添加剂、化工产品、工业三废等。其中有些能改变人体细胞里 DNA 的结构, 从而诱发肿瘤或导致畸胎和提高遗传病的发病率。因此, 检测化合物的诱变性和潜在致癌性是关系到人类健康的大事。当前, 我国化学品的生产和使用正日益扩大, 随着四个现代化的进展, 检测工作的重要性将更加突出。

鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*) 加大鼠肝脏微粒体酶系——Ames 法和哺乳动

物姐妹染色单体互换 SCE 法是常用的快速检测诱变剂和潜在致癌物方法中较为灵敏而可靠的两个系统^[3]。我们已用这两种方法检测同一种化学物质诱变活性, 取得一致的结果^[1,2]为进一步验证两种方法可相互印证, 以治癌药物为检测对象进行了比较研究。

材料和方法

(一) 检测样品 国产抗癌药物正定霉素 (daunomycin) 和甲氨基喋呤钠盐 (methotrexatum natricum) 分别用生理盐水稀释到各种浓度供检测用。

表 1 化学药物诱变效应检测结果 (Ames 法)

药 品	剂量 (微克/ 皿)	TA98				TA100			
		不加 S9		加 S9		不加 S9		加 S9	
		回变菌落数/皿	诱变性	回变菌落数/皿	诱变性	回变菌落数/皿	诱变性	回变菌落数/皿	诱变性
正定霉素	0	27.3 ± 5.4	—	27.0 ± 4.0	—	138.0 ± 20.1	—	135.3 ± 20.3	—
	0.02	37.3 ± 4.4	—	31.3 ± 4.2	—	151.3 ± 10.2	—	235.0 ± 85.2	—
	0.2	78.7 ± 9.8	+	68.0 ± 8.7	+	175.7 ± 11.1	—	189.3 ± 6.2	—
	2	940.0 ± 69.1	+	454.0 ± 130.8	+	408.3 ± 29.1	+	525.7 ± 21.5	+
	20	243.3 ± 36.2	+	236.0 ± 23.1	+	220.3 ± 16.5	—	194.0 ± 18.9	—
甲氨基喋呤 钠 盐	0	23.0 ± 1.7	—	25.7 ± 1.5	—	112.3 ± 4.4	—	136.3 ± 9.3	—
	0.02	17.0 ± 2.4	—	23.0 ± 1.0	—	133.5 ± 14.5	—	134.3 ± 4.5	—
	0.2	19.0 ± 1.0	—	30.7 ± 3.0	—	94.3 ± 1.7	—	120.0 ± 18.0	—
	2	21.0 ± 0.6	—	23.7 ± 0.7	—	106.0 ± 7.5	—	136.3 ± 4.4	—
	20	4.5 ± 1.5	—	24.3 ± 0.3	—	59.7 ± 4.4	—	121.3 ± 8.3	—

Zhao Shouyun et al.: Detection of Mutagenicity of Daunomycin and Methotrexatum Natricum by Ames Test and Sister Chromatid Exchanges

1) 浙江人民卫生实验院工作, 在复旦进修期间参加部分实验。

讨 论

1. Ames 法是用原核细胞在基因突变水平上检出化学物质的诱变活性, SCE 则反映了真核细胞染色体水平上的诱变作用。这两种方法同时确定某种物质是否具有诱变性并获得一致的结果, 将比任何一种单一的快速检测法所得结论更为可靠。本实验表明, 正定霉素对细菌和人体染色体均有诱变作用; 甲氨基喋呤钠盐则都表现为阴性; 这两种方法确可相互印证, 因而检测结论是正确可信的。

2. 从表 1 数据看, 当正定霉素的浓度增加到每皿 20 微克时, 所诱发的细菌回复突变数都低于每皿 2 微克所诱发的回复突变菌落数, 这可能是高浓度的正定霉素抑制了一部份细菌生长的缘故。

当甲氨基喋呤钠盐浓度为每毫升 0.1 微克时, 抑制体外培养的人体细胞的生长, 观察不到分裂相。在 Ames 法检测时, 浓度为每皿(每皿共 18 毫升培养基) 20 微克——约每毫升培养基 1 微克时, 细菌生长只是略受抑制; 浓度为每皿 2 微克——约每毫升培养基 0.1 微克时, 细菌生长正常。另外, 正定霉素浓度为每皿 0.2 微克(约每毫升培养基 2×10^{-2} 微克)时, 对细菌有诱变作用, 浓度再低时不出现阳性结果。可是, 用 SCE 作为检测指标时, 浓度 (下转第 19 页)



图 1 正定霉素(10^{-5} 微克/毫升)诱发人体白细胞的 SCE

(二) Ames 法 以带有 pKM101 质粒的鼠伤寒沙门氏菌 (*S. typhimurium*) 组氨酸缺陷型突变株 TA98 和 TA100 为测试菌株。所用培养基的配方, S9 的制备和酶活力测定, 测试操作步骤等均见另文报道^[1]。

(三) SCE 法 抽取正常人体静脉血, 按常规方法离体培养 22—24 小时加 5-溴脱氧尿嘧啶核苷 (BrdUrd), 最终浓度为每毫升培养液 8 微克, 避光培养 48 小时。制片, 分化染色以及 SCE 计数标准等, 与我们以前的报道相同^[2]。

实 验 结 果

(一) 细菌检测结果 TA98 和 TA100 是鼠伤寒沙门氏菌组氨酸缺陷型中最敏感的两个测试菌株, TA98 可检测诱发移码突变的诱变剂, TA100 可同时检测诱发碱基置换和移码突变两种突变类型的诱变剂^[4]。甲氨基喋呤钠盐不管是否经大鼠肝脏微粒体酶系 (S9) 活化, 都没有诱变活力; 相反, 正定霉素则不管是否在体外活化, 对两个菌株都表现出诱变效应, 而且对 TA98 的作用尤为明显 (表 1)。

(二) SCE 镜检时选取细胞轮廓完整, 染色体数目 $2n = 46$ 的分裂相计算 SCE 数目。其结果整理为表 2。从表 2 所列数据可见, 甲氨基喋呤钠盐诱发的 SCE 数目同对照组的自发频率相比无显著差异, 是诱变阴性; 与之成对比的是正定霉素的浓度为每毫升培养液 10^{-4} 微克和 10^{-5} 微克时, 诱发的 SCE 数为每一分裂相 12 个左右, 明显高于对照水平, 表明对染色体有诱变效应。

表 2 化学药品诱发的 SCE 数

药 品	剂 量 (微克/毫升)	观 察 分裂相数	SCE/分裂相	P 值
甲氨基喋呤 钠盐	0	20	5.35 ± 0.42	> 0.05
	10^{-4}	1)	1)	
	10^{-5}	20	5.75 ± 0.52	
	10^{-6}	20	4.05 ± 0.56	
正定霉素	0	20	4.25 ± 0.27	< 0.001
	10^{-4}	20	12.45 ± 1.08	
	10^{-5}	20	12.00 ± 0.66	

1) 抑制细胞生长, 观察不到分裂相。

中着丝点。

第3对为最大的近端着丝点染色体,很易辨认。

第4对染色体具亚端着丝点,能看到明显的短臂。Shoffner等^[5]指出,它具有亚中着丝点。根据我们的测量结果和标准,以定为亚端着丝点较合适。

第5对为性染色体,Z和W均为中着丝点,易于辨认。有人把W染色体定为亚中着丝点^[6,7],根据我们观察,以定为中着丝点较适宜。

第6对与第3对染色体同样具近端着丝点,但其大小只相当于第3对的一半略多。

第7对染色体具亚端着丝点,能看出短臂。Shoffner^[5]等把第8对具近端着丝点的染色体作为第7对,与第6对一起列为E组;并把第8对、第9对列为F组,认为均具中着丝点。但按相对长度,第7对要比第8对约长 $\frac{1}{3}$ 。

第8对染色体具近端着丝点,其大小约为第7对的 $\frac{2}{3}$ 。

第9对染色体比第8对略小,能清楚看到中着丝点,易于区别。

第10对及其后面的29对微小染色体都被认为具近端着丝点。

由以上叙述及表1看出,不同作者指出的染色体大小顺序和着丝点位置基本一致,但第1、2对着丝点位置有的认为是亚中,有的认为是中间;W染色体有的认为是具中着丝点,有的认为具亚中着丝点;Shoffner等考虑到分组,把第7对和第8对染色体的顺序颠倒过来了,并把第8、9对染色体列为F组,认为均具中间着丝点。我们指出的染色体大小顺序和着丝点位置是根据测量结果判断的,与前人报道的略有不同。

参 考 文 献

- [1] Shaklee, W. E.: 1972. 日本家禽学会志, 9(6): 291—292.
- [2] Tjio, J. H. et al.: 1962. *Stain Techn.*, 37(1): 17—20.
- [3] Newcomer, E. H. et al.: 1963. *ibid.*, 38(1): 54—56.
- [4] Owen, J. J. T.: 1965. *Chromosoma (Berl.)*, 16(5): 601—608.
- [5] Shoffner, R. N. et al.: 1967. *Poultry Sci.*, 46(2): 334—334.
- [6] Becak, M. L. et al.: 1971. *Chromosomes Atlas: Fish, Amphibians, Reptiles and Birds*, Berlin, Heidelberg, New York, Vol. 1, p. 6.
- [7] King, R. C.: 1975. *Handbook of Genetics*, New York, Vol. 4, 154—161.
- [8] Nancy Wang et al.: 1974. *Chromosoma (Berl.)*, 47(1): 61—69.
- [9] Feehheimer, N. S. et al.: 1978. *Journal of Reproduction and Fertility*, 52(1): 141—146.

(上接第13页) 可低到每毫升培养液 10^{-5} 微克,仍表现出明显的诱变效应(图1)。

这些数据表明,以对于药物毒性的敏感性来说,人体细胞比细菌更为敏感;以检测化学物质的诱变性来说,SCE看来也比Ames法更为敏感。根据本次实验结果分析,SCE检测的诱变剂浓度可比Ames法灵敏1,500倍左右。

3. 根据一些实验室报道的数据,每个个体外周血白细胞中的SCE自发频率有相当大的差别^[5]。因此,实验最好用“自身对照”,即同一个体的静脉血一部分作对照,另一部份用药物处理,这样可以排除因个体差异而产生的实验误差,又可适当减少供实验用的个体数目,收到事半功倍之效。

4. 正定霉素能同时诱发碱基置换和移码突

变,又能提高SCE频率;由于SCE生成的机制目前还不清楚,比较研究Ames法同SCE法对同一种诱变剂的检测结果,也许有助于对DNA碱基水平上的突变与SCE生成之间的关系探讨。

参 考 文 献

- [1] 赵寿元、李昌本、薛京伦: 1979. 鼠伤寒沙门氏菌/微粒体系统检测三十六种化学物质的诱变性试验。实验生物学报, 12:41—49。
- [2] 李昌本、赵寿元、邱信芳、薛京伦: 1979. 哺乳动物姐妹染色单体互换检测化学物质诱变性及同Ames氏法相比较。实验生物学报, 12:131—137。
- [3] Hollstein, M. & J. McCann: 1979. *Mutation Res.*, 65: 133—226.
- [4] McMahon, R. E., J. C. Cline & C. Z. Thompson: 1979. *Cancer Res.*, 39: 682—693.
- [5] Lambert, B., A. Lindblad, M. Nordenskyjöld & B. Werelius: 1978. *Hereditas*, 88: 147—149.