

双歧杆菌及其表面分子对 MNNG 诱导 SOS 反应的抑制作用

蓝景刚 胡 宏 康格非

重庆医科大学检验系 重庆 400046

摘要 化学物质对细菌的基因毒作用与其对哺乳动物的致突变性和致癌性密切相关。为探讨双歧杆菌抗致癌作用的机理,本文研究了双歧杆菌及其表面分子——酯磷壁酸、细胞壁肽聚糖和双歧杆菌培养乏液对已知致癌剂 N - 甲基 - N - 硝基 - N - 亚硝基胍(MNNG)诱导 E. coli PQ37 菌株 SOS 反应的抑制作用。结果表明,双歧杆菌全菌、脂磷壁酸、细胞壁肽聚糖、培养乏液均能不同程度地抑制 MNNG 的诱变性,其中以脂磷壁酸作用最强,细胞壁肽聚糖与全菌相当,培养乏液也有一定的抗诱变作用,未培养过双歧杆菌的原培养液无抗诱变性。双歧杆菌及其表面分子的这种体外抗诱变作用机理,可能是通过与诱变剂发生结合作用掩盖了诱变剂的活性基团或使诱变剂降解,使之丧失活性。

关键词 双歧杆菌;脂磷壁酸;肽聚糖;抗突变性;亚硝基胍

INHIBITORY EFFECT OF BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM AND ITS SURFACE MOLECULES ON THE SOS REACTION INDUCED BY MNNG

Lan Jinggang, Hu Hong, Kang Gefei

Faculty of Laboratory Medicine, Chongqing University of Medical Sciences Chongqing, Sichuan 400046

Abstract It has been known that there is a close correlation between the genotoxic effect of chemicals on the bacteria and their mutagenesis or carcinogenesis on mammals. In order to investigate the mechanisms of the anticarcinogenicity effect of Bifidobacteria, the inhibitor effect of Bi-

15. Koo M, Rao AN. Long-term effect of bifidobacteria and neosugar on precursor lesions of colonic cancer in CFI mice. *Nutr Cancer*, 1991;16:249
16. Baricault L, Denariatz G, Darmoul D, et al. Use of HT-29, a cultured human colon cancer cellline, to study the role of fermented milks on cancer cell growth and differentiation. *Carcinogenesis* 1995;16:245
17. Abdelali H, Cassand P, Saussotte V, et al. Effect of dairy products on initiation of precursor lesions of colon cancer in rats. *Nutr Cancer*, 1995;24:121
18. Heine W, Braun OH, Mohr C, et al. Enhancement of lysozyme trypsin-mediated decay of intestinal bifidobacteria and lactobacilli. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 1995;21(1):54
19. Pochart P, Marteau P, Biuhnik Y, et al. Survival of bifidobacteria ingested via fermented milk during their passage through the human small intestine: an in vivo study using intestinal perfusion. *Am J Clin Nutr*, 1992;55:78
20. Raffer JJ. The Role of lactic acid bacteria in colon cancer prevention. *Scand J Gastroenterol*, 1995;30:497

本课题得到国家自然科学基金部分资助。(批准号 39570010)

现在地址:北京昌平流 5 号,中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所微生物室 102206

fidobacterium bifidum(Bif1101) and its surface molecules - Lipoteichoic acid(LTA), whole cell peptidoglycan(WPG) and Spent Culture(SC) on the SOS reaction of E.coli PQ37 induced by N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG) was studied. The results indicate that all of the tested Bif1101 related materials appeared significant inhibition on the SOS response induced by MNNG, but the most effective components was LTA, the following WPG, Bif1101, SC. The uninoculated BL medium had not appeared effect of antimutagenicity. This kind of in vitro antimutagenicity of Bifidobacteria and its surface is probably occurred by binding or cleaving the active center of mutagens.

Key words Bifidobacterium bifidum; lipoteichoic acid; Whole Cell peptidoglycan; Antimutagenicity; MNNG

近年,人们设计了一系列以细菌为工具检测化学物质基因毒性的短期试验,其中以利用沙门氏菌回复突变的 Ames 试验应用最广。1982年 Quillardet 等创立了 SOS 显色法,并作了一系列的评价分析。发现其敏感性与经典 Ames 法相当而在某些方面优于 Ames 法,如操作简便、快速、终点测试不依赖菌株存活;不需无组氨酸的特殊培养基;试验中后期杂菌污染对整个试验结果影响较小;假阳性率低;检测结果与药物致癌性更为相符等。SOS 显色法已广泛地用于研究抗氧化剂、食品、金属化合物、维生素 C、多种氨基酸、中药成分、叶绿素铜钠、有机稀土化合物等抗突变性。我们研究了双歧杆菌及其表面分子——脂磷壁酸(Lipoteichoic Acid, LTA)、细胞壁肽聚糖(Whole Cell Peptidoglycan, WPG)和双歧杆菌培养乏液(Spent Culture, SC)对已知致癌物 N-甲基-N-硝基-N-亚硝基胍(N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine, MNNG)诱导 SOS 反应的影响,以探讨双歧杆菌抗致癌作用的机理。

材料和方法

1 主要仪器设备:不锈钢厌氧罐由大连金中微生物器材开发公司生产、培养箱为日本三洋产品、美国 Thermolyne 恒温空气振荡培养箱、华东电子管厂 DG-3022A 酶标仪、日本久保田高速低温离心机。

2 实验菌株

Escherchia coli PQ37 (PQ37 菌株):由法国巴斯德研究所 Hofnung 教授惠赠,其主要遗传特性经鉴定合格。

分叉双歧杆菌 Bifidobacterium bifidum (Bif1101)由本室分离经中国科学院微生物研究所鉴定。

3 培养基

La 培养基:用于培养 PQ37 菌株。每升含酵母粉 5g、胰蛋白胨 10g、氯化钠 5g, PH7.0,用前加氨苄青霉素使成 25 μ g/ml。

BL 培养基:用于培养 Bif1101。每升以牛肉汤为基础的液体中含多肽 10g、植肽 38、胰蛋白胨 3g、酵母粉 5g、葡萄糖 10g、硫酸亚铁 100mg、可溶性淀粉 0.5g、硫酸锰 6.74mg、吐温-80 1g、氯化血红素 5mg、半胱氨酸 0.5g、维生素 K10mg、磷酸二氢钾 1g、磷酸氢二钾 1g、硫酸镁 200mg、氯化 10mg、PH7.2

4 主要试剂:如无特指均为国产分析纯试剂。

MNNG:购自 Fluka 公司。

LTA:按 Sutcliffe 等方法自制,利用非离子去垢剂 Triton X-114(Sigma)自 Bif1101 分离经 DEAE-Sephacel(Sigma)纯化,紫外光谱及血清学鉴定与日本 Masata Nagaok 博士惠赠标准品相符。

WPG:按 Sekine 等方法自制,主要将 Bif1101 经甲醇、丙酮脱脂、胰酶、糜蛋白酶、胃蛋白酶(华美公司)、蛋白酶 E(E-Merk)处理去蛋白,DNA 酶、RNA 酶(华美公司)处理去核酸,再经甲醇、氯仿脱脂、硫酸处理后用

蒸馏水反复透析,所得产物经分析鉴定与 Sekine 等报道相符。

B 缓冲液、P 缓冲液、- 半乳糖苷酶测定用试剂及碱性磷酸测定用试剂均按 Quillardet 等文献配制。

5 方法

Bif1101 用 BL 培养液经厌氧、37 培养 48h,4000rpm ×30min 离心收获菌液,上清为备用 SC。沉淀用生理盐水洗涤 3 次后,干燥定量备用。

SOS 微量显色法基本按 Singh 等及杨玫等的方法略加改进:即将 PQ37 菌株接种于 La 培养液,37 振荡通气培养过夜,用培养基将培养物稀释 50 倍,37 150rpm 继续振荡培养 2h 左右,使 A590 为 0.1 左右(约 10⁸ 细菌/ml)。将 MNNG 先配成 200μg/ml 原液,再倍比稀释成 200,100,50,25,12.5μg/ml,分别加到 4 块 55 孔聚苯乙烯酶标板的前 10 列 5 行内,每孔 10μl。将双歧杆菌全菌、LTA、WPG 先分别配成 5120μg/ml 原液,然后作倍比稀释至 10 个稀释度,分别加到标有全菌、LTA、WPG 的已加 MNNG 的酶标板前 10 列上,每孔 10μl。在剩下的一块加有 MNNG 酶标板前 9 列分别加倍比稀释 9 个稀释度的 SC,第 10 列加 BL 原液作对照每孔 10μl。在各板第 11 列设 MNNG 对照、PQ37 对照、Bif1101、LTA、WPG、SC 原液对照。然后加已调试浓度的 PQ37 菌液每孔 0.2ml,37、70rpm 振荡培养 2h。从各板每孔中吸出 0.1ml 转移至另一酶标板对应孔中,用于平行测定碱性磷酸酶。前者每孔加 0.1ml - 半乳糖苷酶裂解显色液;后者每孔加 0.1ml 碱性磷酸酶裂解显色

液,37、70rpm 振荡培养。显色时间 20 ~ 120min,待出现满意的颜色反应时,在 - 半乳糖苷酶测定板每孔加 45μl 2MN₂CO₃ 终止反应;在碱性磷酸酶测定板先加 6MHCl10μl/孔,5min 后加 2MTris35μl/孔。- 半乳糖苷酶测定板上底物显蓝色,在 620nm 比色;碱性磷酸酶反应显黄色,420nm 处比色。

6 结果计算:酶单位 = $\frac{A_{420}/620 \times 1000}{t}$ t 为显色时间

$$\text{比率}(R) = \frac{A_{620}}{A_{420}}$$

$$\text{诱导系数 } I_c = \frac{R_c}{R_0} \quad I_c : C \text{ 浓度}$$

下其化学物质诱导系数;

R_c:C 浓度下的比率值;R₀:O 浓度下(无 MNNG 的阴性对照)的比率值。

根据 Mersch-Sundermann 及杨玫等判断标准 I_c > 2 为阳性反应。

结 果

1 双歧杆菌全菌对 MNNG 诱导 SOS 反应的影响

由表 1 可见在 MNNG 0.125μg/孔的条件下所有孔 I_c < 2 均为阴性反应,说明该浓度 MNNG 不足以诱导 SOS 反应。MNNG 对照孔在 0.25μg/孔及以上 I_c > 2 均为阳性反应。在 MNNG 0.25μg/孔,能使 MNNG 诱导 SOS 反应呈阴性的 Bif1101 最低浓度为 3.2μg/孔, MNNG 为 0.5μg/孔时,能抑制 SOS 反应至阴性的 Bif1101 最低浓度为 12.8μg/孔。当 MNNG 浓度在 1μg/孔及以上时,所试各浓度的 Bif1101 均不再能抑制 MNNG 诱导 SOS 反应呈现阴性。

Table 1 Effect of Bif1101 Whole Cell on the Induction factor of SOS Response by MNNG

MNNG μg/ assay	Bif1101 μg/ assay										
	51.2	25.6	12.8	6.4	3.2	1.6	0.8	0.4	0.2	0.1	0.0
2.000	3.59	5.00	5.86	6.23	6.55	6.91	7.30	7.41	7.62	7.84	7.88
1.000	2.57	3.21	4.12	4.71	5.12	5.58	5.71	5.91	6.01	6.05	6.10
0.500	1.80	1.88	1.96	2.42	3.11	3.78	4.12	4.53	4.61	4.60	4.70
0.250	1.30	1.41	1.61	1.80	1.88	2.12	2.31	2.55	2.58	2.67	2.80
0.125	1.03	1.06	0.82	1.06	1.21	1.20	1.41	0.94	1.16	0.71	1.40

2 LTA 对 MNNG 诱导 SOS 反应的影响

由表 2 可见 PQ37 本身在无 MNNG 的情况下不会发生 SOS 反应。当 MNNG 浓度 0.25μg/孔时 LTA 能抑制 MNNG 诱导 SOS

反应呈阴性的最低浓度为 0.8μg/孔。且在 MNNG 达 2μg/孔时,LTA 仍有抑制作用,最小抑制浓度为 12.8μg/孔。

Table 2 Effect of LTA from Bif1101 on the Induction Factor of SOS Response by MNNG

MNNG μg/ assay	LTA μg/ assay										PQ37
	51.2	25.6	12.8	6.40	3.20	1.60	0.80	0.40	0.20	0.10	control
2.000	1.74	1.88	1.82	2.56	3.75	4.91	5.83	6.70	7.61	7.65	0.87
1.000	1.65	1.74	1.61	1.96	2.71	3.85	4.95	5.52	5.89	6.02	0.91
0.500	1.28	1.41	1.65	1.82	1.74	3.43	4.13	4.45	4.56	4.66	0.96
0.250	0.77	0.94	0.87	1.41	1.65	1.54	1.74	2.39	2.54	2.70	0.91
0.125	0.47	0.87	1.18	1.28	1.06	1.20	1.21	1.31	1.25	1.29	1.01

3 WPG 对 MNNG 诱导 SOS 反应的影响。

由表 3 可见,在阴性对照孔,Bif1101、WPG 原液 SOS 反应均为阴性,说明 Bif1101、WPG 本身无诱导 SOS 反应的作用。在 MN-

NG 0.25μg/孔,WPG 能抑制 MNNG 的最小浓度为 3.2μg/孔,在 MNNG 0.5,1μg/孔,WPG 抑制 MNNG 的最小浓度分别为 25.6,51.2μg/孔。

Table 3 Effect of WPG Bif1101 on the Induction Factor of SOS Response by MNNG

MNNG μg/ assay	WPG μg/ assay										Negative
	51.2	25.6	12.8	6.4	3.2	1.6	0.8	0.4	0.2	0.1	control
2.000	2.78	3.25	3.87	4.23	5.01	5.75	6.80	7.25	7.70	7.92	0.90 *
1.000	1.80	2.82	3.42	4.05	4.82	5.25	5.78	6.01	6.10	6.08	0.98
0.500	1.88	1.74	2.44	3.03	3.83	4.01	4.13	4.48	4.69	4.72	0.98
0.250	1.41	1.65	1.61	1.82	1.74	2.06	2.32	2.56	2.74	2.82	0.98 **
0.125	1.18	0.87	1.41	1.30	1.06	1.18	1.21	1.09	1.45	1.18	0.87

*Bif1101 control, **WPG Control

4 SC 对 MNNG 诱导 SOS 反应的影响。

由表 4 可见,LTA 及 SC 对照均为 SOS 阴性反应,说明 LTA 及 SC 本身无诱导 SOS 反应的作用。能抑制 0.25μg/孔 MNNG 的

SC 最高稀释度为 1:8,能抑制 0.5μg/孔 MNNG 的 SC 最高稀释度为 1:2。未培养过 Bif1101 的 BL 原液则无抑制性。

Table 4 Effect of Spent Culture by Bif1101 on the Induction Factor of SOS by MNNG

MNNG μg/ assay	SCI/ X										MNNG Negative
	1	2	4	8	16	32	64	128	256	BL	control
2.000	2.57	3.16	4.28	5.17	6.95	7.16	7.28	7.35	7.38	7.40	0.99 *
1.000	2.59	3.05	4.22	4.41	4.80	5.40	5.95	6.05	6.10	6.08	0.88
0.500	1.81	1.89	2.82	3.70	3.89	4.11	4.50	4.66	4.70	4.65	1.07
0.250	1.64	1.75	1.89	1.95	2.03	2.15	2.35	2.54	2.61	2.63	1.10 **
0.125	1.02	0.71	1.88	1.19	1.21	1.41	1.18	1.35	1.25	1.41	0.96

*LTA control, **SC Control

讨 论

化学物质对细菌的基因毒作用与其对哺乳动物的致突变性和致癌性密切相关。由于细菌在简单的培养基中就能迅速生长,细菌的短期试验简便、快速、价廉,因此在基因毒性物质的筛选、检测中被广泛采用。SOS 试验是这些细菌短期试验中较新近发展起来的一种,其基本原理是:SOS 反应在大肠杆菌对众多的基因毒性物质引起的反应中起中心作用,该系统的启动可被认为是 DNA 损害的一个通用的早期信号。该系统包括 15 个以上基因,其中有两个基因起关键作用:LexA 编码该系统所有基因的阻遏蛋白,recA 在 SOS 诱导信号下被激活编码一种蛋白能裂解(或增强裂解) LexA 阻遏蛋白。当 DNA 损伤扰乱或阻止 DNA 复制的时候,就会产生这种 SOS 诱导信号。SOS 显色法利用一种 *sfia:lacZ* 操纵子融合,其中 *sfia* 是 SOS 基因之一。大肠杆菌 *E. coli* PQ37 菌株携带这种 *sfia:lacZ* 融合基因,并去掉了正常的 *lac* 区基因,使 β -半乳糖苷酶活性完全依赖于 *sfia* 的表达。此外还进行了一些使该菌对基因毒性物质易感的处理:去掉切除修复功能,通过 *rfa* 突变造成脂多糖缺陷,使许多化学物质能更好地透过细胞壁进入细胞。为确保受测试化合物不因对细菌生长直接抑制作用而造成假阴性反应,在检测 β -半乳糖苷酶活性的同时,检测与 SOS 系统无关的碱性磷酸酶活性以指示细菌的蛋白质合成未受影响。我们采用的 MNNG 在所用浓度范围内对碱性磷酸酶活性未表现抑制作用。

近年国外掀起了一个对含乳酸性细菌乳制品抗诱变活性的研究热潮。Bodana 等用 Ames 试验研究了含嗜热链球菌、保加利亚乳杆菌的发酵乳拮抗 4-硝基喹啉氧化物和 2-氨基苄的诱变作用,发现该两种乳酸菌共同发酵牛乳的产物具有明显的抗诱变性。Hosoda 等用同样方法研究了分别用 71 株含乳杆菌、链球菌、乳球菌和双歧杆菌的乳酸菌培养物均有抗诱变性。Renner 等用体内外试验研究了作为益生菌的双歧杆菌、乳杆菌的抗诱变活

性,用 Ames 试验证明乳酪乳杆菌对亚硝酸盐处理的牛肉有很强的抗诱变活性,以含双歧杆菌活菌的乳酪和诱变剂一起经口给药中国仓鼠和小鼠,检测骨髓细胞染色体畸变和微核也证明益生菌具有很强的抗诱变作用。Pool-Zobel 发现双歧杆菌、乳杆菌、链球菌活菌的发酵乳酪抗诱变程度随菌株不同、诱变原不同而有差异。Nadathur 等将乳杆菌、链球菌发酵乳的丙酮提取物溶于二甲亚砜,再经 Ames 试验发现该提取物能抑制 MNNG、3,2-二甲基-4-氨基二酚的诱变性。进一步研究发现该提取物对 4-硝基喹啉氧化物、黄曲霉素 B₁ 等也有显著抗诱变活性。Cassand 等研究接种双歧杆菌或乳杆菌的牛乳和未种菌牛乳的抗诱变性,发现种菌牛乳对直接诱变剂 4-硝基喹啉、2-硝基苄有明显的抗诱变性,而对食物中间接的诱变剂如黄曲霉素 B₁、苯并芘等的抗诱变性反而不及未种菌牛乳。Abdelali 等也发现双歧杆菌对苯并芘的抗诱变作用比预料的要低,提示双歧杆菌等乳酸性细菌的抗诱变作用可能有一定的诱变原特异性。我们用双歧杆菌及其菌体提取物 LTA、WPG 和双歧杆菌培养液作拮抗 MNNG 诱导 SOS 反应的试验,结果表明 Bif1101 菌体、LTA、WPG、SC 均能不同程度地抑制 MNNG 的诱导性,其中以 LTA 作用最强,WPG 与 Bif1101 菌体相当,SC 也有一定的抗诱变作用。未培养过 Bif1101 的 BL 原液无抗诱变性。双歧杆菌及其表面分子的这种体外抗诱变作用机理,可能是通过与诱变剂发生结合作用掩盖了诱变剂的活性基因或使诱变剂降解,使之丧失活性。目前已有不少证据表明双歧杆菌及其菌体成分有结合诱变剂的作用:Zhang 及 Orrhage 等都先后证明双歧杆菌、乳杆菌等可结合具有诱变性的杂环胺类化合物,被胃液杀死的菌体也有这种作用。Grill 等发现双歧杆菌可清除或分解培养系统中的亚硝胺和亚硝酸盐。Zhang 等还发现双歧杆菌、乳杆菌、链球菌的细胞壁骨架可结合杂环胺类化合物。动物实验结果表明,大鼠胃肠道细菌可阻止 3-氨基-1,4

- 二甲基 - 5H - 吡啶并(4,3-6)吲哚的吸收。进一步研究双歧杆菌及其菌体成分对他诱变剂,致癌剂的直接结合并抑制其诱变

性、致癌性的作用,必将为人类更好地开发利用双歧杆菌作为益生菌防癌抗癌提供理论依据。

参考文献

1. Quillardet P, Huisman O, Dari R, et al. The SOS chromotest, a direct assay of the expression of gene SfiA as a measure of chemicals. *Biochimie*, 1982;64:797
2. Quillardet P, de Bellecobe C, Hofnung M. The SOS chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins validation study with 83 compounds. *Mutat Res*, 1985;147:79
3. 肖白,崔明珍,杨华等. 有机稀土化合物对 SOS 反应的抑制作用. *癌变·畸变·突变*,1995;7(1):42
4. Sutcliffe IC, Hogg SD. Extraction of lipoteichoic acid from *Streptococcus mutans* with the non-ionic detergent tritonx-114. *J Microbiol Meth*, 1993;17(3):215
5. Sekine K, Toida T, Saito M, et al. A new morphologically characterized cell wall preparation (whole peptidoglycan) from *mifidobacterium infantis* with a higher efficacy on the regression of established tumor in mice. *Cancer Res*, 1985;45:1300
6. Quillardet P, Hofnung M. The SOS chromotest, colorimetric bacterial assay for genotoxins:procedures. *Mutat Res*, 1985;147:65
7. 杨玫,胡燕平,黄念君. 一种改良的 DNA 损伤检测技术—SOS 微量显色法. *癌变·畸变·突变*,1992;46(6):51
8. Mersch-Sundermann V, Mochayedi S, Kevekordes S. Genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons in *Escherichia coli* PQ37. *Mutat Res*, 1992;278:1
9. Quillardet P, Hofnung M. The SOS chromotest:a review. *Mutat Res*, 1993;297:235
10. Bodana AR, Rao DR. Antimutagenic activity of milk fermented by *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. *J Dairy Sci*, 1990;73:3379
11. Hosoda M, Hashimoto H, Morita H, et al. Antimutagenicity of milk cultured with lactic acid bacteria against N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine. *J Dairy Sci*, 1992;75:976
12. Renner HN, Munzner R. The possible role of probiotics as diary antimuagens. *Mutat Res*, 1991;262:239
13. Pool-Zobel BL, Munzner R, Holzapfel WH. Antigenotoxic properties of lactic acid bacteria in the *S. typhimurium* mutagenicity assay. *Nutr Cancer*, 1993;20:261
14. Nadathur SR, Gould SJ, Bakalinsky AT. Antimutagenicity of fermented milk. *J Dairy Sci*, 1994;77:3287
15. Nadathur SR, Could SJ, Bakalinsky AT. Antimutagenicity of an acetone extract of yogurt. *Mutat Res*, 1995;334:213
16. Cassand P, Abdelali H, Bouley C, et al. Inhibitory effect of dairy puoducts on the mutagenicities of chemicals and dietary Mutagens. *J Dairy Res*, 1994;61:545
17. Abdelali H, Cassand P, Soussotte V, et al. Antimutagenicity of components of dairy products. *Mutat Res*, 1995;331:133
18. Zhang X B, Ohta Y. In vitro binding of mutagenic pyrolyzates to lactic acid bacterial cells in human gastric juice. *J Dairy Sci*, 1991;74:752
19. Orrhage K, Sillerstrom E, Gustaisson JA. Binding of mutagenic heterocyclic heterocyclic amines by intestinal and lactic acid bacteria. *Mutat Res*, 1994;311:239
20. Grill, J P, Crociani J, Ballongue J. Effect of bifidobacteria on nitrites and nitrosamines. *Lett Appl Microbiol*, 1995;20:328
21. Zhang XB, Ohta Y. Binding of mutagens by fractions of the cell wall skeleton of lactic acid bacteria on mutagens. *J Dairy Sci*, 1991;74:1477
22. Zhang XB, Ohta Y. Microorganisms in the gastrointestinal tract of the rat prevent absorption of the mutagen-carcinogen 3-amino-1,4 dimethyl-5H-pyrido(4,3-6) indole. *Can J Microbiol*, 1993;39:841