维普资讯 http://www.cqvip.com

Ames试验检测硫芥的致突变作用

李奇慧，董兆君
（第三军医大学预防医学系军事毒理学教研室，重庆 400038）

［摘 要］ **目的** 应用Ames试验检测系统观察硫芥的诱变活性。**方法** 选用TA97，TA98，TA100，TA102标准测试菌株，采用标准平板掺入法检测硫芥的诱变活性。加S9混合液作为体外代谢活化系统。**结果** 硫芥在S9活化和非活化两种测试条件下，8～500 μg/皿浓度范围内，诱发TA98、TA100两种测试菌株回变菌落数与阴性对照组相比无明显增加，在8～32 μg/皿浓度范围内，诱发TA97和TA102产生的回变菌落数与阴性对照相比无明显增加，在125～500 μg/皿测试浓度范围内，对TA97和TA102产生的回变菌落数与阴性对照相比均达到阴性对照两倍以上。**结论** 硫芥具有碱基置换及移码型的直接诱变特性和间接诱变特性，间接诱变活性较直接诱变活性减弱。

［关键词］硫芥；Ames试验；突变
［中图分类号］R394.8；Q754 ［文献标识码］A ［文章编号］1672－5042(2004)04－0235－02

Study on mutagenicity of sulfur mustard by Ames test

LI Qi-hui, DONG Zhao-jun
(Department of Military Toxicology, Third Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective The mutagenicity of sulfur mustard was observed by Ames test detection system. **Methods** The TA97, TA98, TA100 and TA102 standard tester strains were used to detect the mutagenicity of sulfur mustard by using standard plate incorporation version. Adding S9 mixture to the plate for the use of metabolic activation system in vitro. **Results** With and without S9 activation, there is no obvious increase of the reverse strain clones in both TA98 and TA100 strains from 8～500 μg/plate concentration, compared with negative group. The TA97 and the TA102 strains had the same reaction at concentrations of 8～32 μg /plate. The reverse strain clones induced by sulfur mustard in TA97 and TA102 strain were twice as much as negative control group at concentrations of 125～500 μg /plate. **Conclusion** Sulfur mustard was characterized by the direct and indirect mutagenicity with substitution mutant and frameshift mutant. Indirect mutagenicity is weaker than direct ones.

Keywords: sulfur mustard; Ames test; mutation

由于硫芥在生产、使用、储存等过程中处理不当致中毒事件屡有发生。硫芥中毒可对DNA产生强烈损伤[1]。除了细胞毒作用外，硫芥可能尚具有遗传毒作用[2]。Ames试验是遗传毒理学中应用最广泛的检测基因突变的方法之一。它是利用鼠伤寒沙门氏菌(Salmonella typhymurium)的组氨酸缺陷型突变株(his－)发生回复突变的性能，对化学物质致突变性进行初步筛选的短期实验方法。其实验结果与啮齿类致癌试验有很高的符合率。本文应用Ames试验评价硫芥的致突变性，以期阐明硫芥的遗传毒理学基本特征，为探讨硫芥的遗传毒性以及可能的致肿瘤作用机理提供一定的实验依据。

［基金项目］全军"十五"重点课题资助项目(01L054)
［作者简介］李奇慧(1976－)，女，黑龙江省肇东市人，主治医师，硕士研究生，主要从事遗传毒理学方面的研究。电话(023)68752356
［收稿日期］2004－01－21 ［修回日期］2004－03－12

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验毒剂 实验用毒剂硫芥由军事医学科学院六所提供，纯度为97.5%，用1,3－丙二醇溶解。

1.1.2 试验菌株 采用标准测试菌株TA97，TA98，TA100，TA102四株菌。菌株由Ames实验室提供，液氮保存。经组氨酸营养缺陷鉴定，深粗糙型(rfa)鉴定，uvrB缺失鉴定，R因子和pAQ1质粒的鉴定及自发回变数测定，菌株均合格。

1.1.3 培养基 ①营养肉汤培养基：用于增菌和鉴定菌种；②营养肉汤琼脂培养基：用于鉴定和分离菌种；③底层培养基：含V-B盐贮备液，20%葡萄糖琼脂水溶液；④上层培养基：每1 000 ml含D-生物素12.4 mg，L-盐酸组氨酸9.5 mg，氯化钠5 g，琼脂6～7.5 g。

1.1.4 肝微粒体酶活化系统(S9)制备[3] 采用苯巴比妥钠和β-奈黄酮联合诱导方法制备。操作过程需注意无菌和局部冷环境。

1.2 方法

采用黄幸纾等[3]描述的方法。选用TA97，TA98，TA100，TA102标准测试菌株，采用标准平板掺入法检测硫芥的诱变性。

维普资讯 http://www.cqvip.com

向2 ml融化并保温在45 ℃的上层培养基中依次加入细菌培养液0.1 ml,受试物溶液0.1 ml,S9混合液或磷酸缓冲液(无需活化时)0.5 ml,即刻在震荡器上混合均匀,迅速倒在底层培养基表面,使之均匀分布于底层之上。水平放置凝固后置于37 ℃恒温培养48 h。在确认细菌背景菌苔生长良好,与溶剂对照相比无明显稀疏的条件下计数回变菌落数,取两次6皿平均值,如超过对照一倍以上并有剂量反应关系时判为阳性结果。

2 结果

硫芥在S9活化和非活化两种测试条件下,8～500 μg/皿浓度范围内,诱发TA98、TA100产生的回变菌落数与阴性对照相比均无明显增加;在8～32 μg/皿浓度范围内,诱发TA97和TA102产生的回变菌落数与阴性对照相比无明显增加;在125～500 μg/皿浓度范围内,诱发TA97和TA102产生的回变菌落数与阴性对照相比均达到阴性对照两倍以上。上述结果表明在125～500 μg/皿测试浓度范围内,硫芥对TA97和TA102两种测试菌株有致基因突变作用。(见表1,2)

表1 硫芥的Ames试验结果(-S9)(个/皿,$\bar{x} \pm s$, $n=6$)

剂量(μg/皿)	TA97	TA98	TA100	TA102
500	1172.83±103.22**	14.00±1.67	94.83±5.12	977.00±11.58**
125	304.00±13.42**	16.00±1.90	71.33±4.32	562.33±12.58**
32	260.50±6.57	17.00±2.10	50.00±7.82	324.33±10.05
8	152.80±34.40	23.00±3.52	44.50±4.93	316.83±8.91
空白对照	143.00±15.70	22.33±1.75	72.17±4.92	260.00±8.85
溶媒对照	134.67±12.14	21.83±2.32	71.17±2.64	270.33±6.77
	4-NQO	正定霉素	4-NQO	MMC
阳性对照	(0.5 μg/皿)	(40 μg/皿)	(0.5μg/皿)	(0.5μg/皿)
	452.67±21.32**	527.67±14.64**	634.67±19.51**	667.67±13.28**

注:与空白对照组比较,** $P<0.01$

表1 硫芥的Ames试验结果(+S9)(个/皿,$\bar{x} \pm s$, $n=6$)

剂量(μg/皿)	TA97	TA98	TA100	TA102
500	950.83±34.40**	28.33±1.97	96.00±5.90	809.00±10.83**
125	308.50±19.55**	28.83±2.40	93.50±3.94	531.17±8.21**
32	244.67±13.82	28.33±2.94	97.00±7.87	422.17±9.99
8	197.83±11.43	30.67±2.58	87.67±4.46	368.83±9.06
空白对照	142.17±5.04	23.00±2.19	80.67±4.93	259.33±5.89
溶媒对照	135.00±4.56	20.00±1.79	82.83±3.54	263.67±14.53
S9对照	138.17±3.82	28.67±2.58	80.17±2.71	270.17±7.88
阳性对照 2-AF(60 μg/皿)	581.17±16.23**	510.67±6.59**	494.67±20.48**	876.17±12.64**

注:与空白对照组比较,** $P<0.01$

3 讨论

硫芥因其理化性质稳定,毒性大,穿透性强,作用隐蔽,持久性大等特点,而成为医学防护研究的对象[4]。硫芥是一种烷化作用很强的化合物,曾经作为候选抗癌药物进行动物实验[5]。但长期接触硫芥的生产工人上呼吸道癌症发生率增加[6],接触硫芥的渔民外周血淋巴细胞姐妹染色单体交换率升高[7]。这些资料提示,硫芥很可能具有遗传毒性的远期危害。

Ames试验是检测化学诱变剂的常规方法之一。它是一种快速获得化学物质致突变性以及潜在致癌性资料的有效手段,对于进一步探讨化学物质导致遗传物质突变的分子基础有重要的价值。其原理是鼠伤寒沙门菌突变株(组氨酸缺陷型)在缺乏组氨酸的培养基上不能生长,当受试物使之能生长时,说明其所携带的突变已被纠正或补偿,即发生了回复为野生型的突变。故可根据在无组氨酸的培养基上菌落生成数量来检测受试物是否为致突变物。本文应用经典的Ames试验方法研究硫芥的遗传毒性。结果显示硫芥在125～500 μg/皿浓度范围内诱发TA97和TA102产生的回变菌落数与阴性对照相比均达到后者的两倍以上,并有剂量效应趋势,说明硫芥具有碱基置换及移码型的直接诱变特性,在微粒体酶参与下,硫芥兼有碱基置换和移码型的间接诱变特性,证明本方法是评价硫芥遗传毒性的良好方法。硫芥间接诱变活性较直接诱变活性有所减弱,其原因可能是在微粒体酶系统作用下,硫芥代谢转化为芥子砜、芥子亚砜、二羟二乙硫醚等无毒或低毒性产物,而后者的诱变活性较弱所致。

有关硫芥导致遗传物质突变的分子基础以及对其进行远期危害评价的进一步研究尚在进行中。

[参考文献]

[1] Lakshmana Rao PV, Vijayaraghavan R, Bhaskar AS. Sulfur mustard induced DNA damage in mice after dermal and inhalation exposure[J]. Toxicology, 1999,139(1-2):39-51.

[2] Dacre JC, Goldman M. Toxicology and pharmacology of the chemical warfare agent sulfur mustard[J]. Pharmacol Rev, 1996,48(2): 289-326.

[3] 黄幸纾,陈星若. 环境化学物致突变、致畸、致癌试验方法[M]. 杭州:浙江科学技术出版社, 1985.219-234.

[4] 罗成基, 欧阳子倩. 核、化学武器损伤防治学[M]. 北京:人民军医出版社,1994.138-140.

[5] 袁素波, 王治乔. 肿瘤化疗药物的致癌性及致癌机制[J]. 癌变·畸变·突变,1998,10(6):386-391.

[6] Goldman M, Dacre JC. Lewisite: its chemistry, toxicology, and biological effects[J]. Rev Environ Contam Toxicol,1989,110: 75-115.

[7] Wulf HC, Aasted A, Darre E, et al. Sister chromatid exchanges in fishermen exposed to leaking mustard gas shells[J]. Lancet, 1985,1(8430) : 690-691.

(编辑:兰阳军)