DOI:10.16016/j.1000-5404.1995.01.027

几种代谢和抗代谢药物对λDNA的遗传毒性分析*

经验交流

Analysis of genetic toxicity of several metabolic and anti-metabolic chemicals to λDNA

曹 佳 杨录军 (第三军医大学预防医学系分子毒理室) 630038
曹 阳 胡维民 (华南农业大学蚕学系) 510642
许丽萍 (中山大学生物工程中心) 510275

随着医学的迅速发展,许多临床药物的毒副作用日益受到人们的重视。但是,临床的观察多是诸如恶心呕吐、白细胞减少、骨髓抑制等短期的毒副作用,而对其是否有致癌、致畸、致突变(简称"三致")的远期潜在遗传毒性研究较少。

目前检测化合物致突变性的试验方法很多,并在方法学上各有优劣。近年来,我们首次报道用λDNA体外重包装技术构建了一种致突变物检测新方法[1,2]。该方法具有简便、快速、敏感的优点。由于直接用诱变物处理λDNA并辅以酶切-电泳技术等,还可以初步确定诱变物对DNA的损伤机理。

本研究用此方法研究了5种临床上使用的代谢和抗代谢药物对λDNA的遗传毒性。现报道如下:

1 材料和方法

1.1 菌株与试剂

制备λ噬菌体包装壳蛋白的溶原菌BHB2688和2690以及LE392宿主大肠杆菌,由中山大学生物工程中心刘良式教授惠赠。λDNA、Pst I、EcoR I为华美公司产品,氨甲基喋呤(Methotrexate,简称MTX),6-巯基嘌呤(6-Mercaptopurine,简称6-MP)购自Fluka公司,5-溴脱氧尿苷(5-bromodoxy-uridine,简称BrdU),叶酸(Folacin,简称FA),烟酸(Nicotinic Acid,简称NA)均为国产分析纯或粉剂药品。

1.2 药物剂量分组及对λDNA的处理

药物使用蒸馏水或75%二甲基亚砜(DMSO)配制。在10.0~0.05 μg药物/0.5 μg λDNA之间设置4个剂量组。

预先将λDNA配成0.1 μg/μl的λDNA包装缓冲液,然后用5 μl λDNA包装缓冲液与5 μl受试药物混匀,37℃温育30 min,置冰上10 min终止反应。

1.3 λ噬菌体壳蛋白制备及λDNA离体包装方法

按《分子克隆操作指南》"方法Ⅰ,用两个溶原菌制备包装提取物,用两种提取物进行体外包装"的方法进行[3]。

1.4 噬菌体感染宿主菌

包装后的噬菌体原液用SM液作10^{-4}稀释,然后取10 μl包装稀释液100 μl与LE392宿主菌悬浮液混合、吸附。每剂量铺3个重复皿,37℃过夜(8~12 h)培养,次日计数各平板上的噬菌斑数目。

1.5 酶切和电泳

受试药物以在λDNA重包装法检出的毒性剂量(或最高剂量),按前述方法处理λDNA,再分别用Pst I和EcoR I限制性内切酶消化,进行0.8%琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色,260 mm紫外灯下观察和照相。

1.6 实验重复

每个药物均重复做3次"λDNA重包装法"检测和2次"酶切-电泳"。结果相同或类似才视为正常。

2 实验结果

5种DNA代谢药物处理λDNA后,离体包装形成的噬菌发生率见附表。从表中可以看出,仅MTX和6-MP所设置的较大剂量诱导的噬菌斑发生率与对照组相比有显著下降。按我们先前设置的阳性判定标准[1]:即在两次实验结果有平行重现的前提下,噬菌斑发生率比空白对照至少降低一半;同时随剂量增高而降低,剂量反应关系或是线性或是陡坎效应。其余情况视为阴性。据此MTX和6-MP对λDNA的毒性判定为阳性结果,而5-BrdU、NA和FA为阴性结果。

* 国家自然科学基金资助项目,No.3880680
华南农业大学校长基金资助项目

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

是其产生的点突变发生率较低或突变终点不在与λ噬菌体生命周期有关的基因上的缘故。

FA是嘌呤合成代谢的重要底物之一，而NA则是辅酶Ⅰ(DNA)和辅酶Ⅱ(NADP)的底物，直接参与传递氢的作用[11]。这两种受试药物对λDNA无直接损伤或诱变性的报道，在λDNA重包装法中也检测为阴性结果。

总之，我们的实验结果证实了目前临床常用的抗肿瘤药物MTX和6-MP具有潜在的遗传毒性，在尚无更安全的替代药物情况下，应引起临床医生的高度重视。在选配联合化疗方案时，应既考虑到这些药物的短期毒副作用，也应考虑到这些药物的远期遗传毒性效应。

关键词 λDNA；致变物/分析；遗传毒性

中图法分类号 R730.231

参考文献

1 曹 佳，曹 阳，许丽萍，等. λDNA体外重包装法进行化学诱变的初步研究. 癌变·畸变·突变，1991，3(4)：40～45

2 曹 阳，曹 佳，许丽萍，等. 一种致突变物检测新方法——λDNA体外重包装法的构建. Ⅰ：新方法检测10种化学受试物致突变的分子机理初探. 癌变·畸变·突变，1991，3(2)：29～30

3 J. 萨姆布克，E. F. 弗里奇，T. 曼尼阿蒂斯，著. 金冬雁，黎孟枫，译. 分子克隆实验指南. 第二版，北京：科学出版社，1992：75～153

4 Kier LE. The salmonella typhimurium/mammalian microsomal assay, A Report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. Mutat Res, 1986, 168(2): 60～240

5 Nesnow S. Chemical carcinogens. A review and analysis of the literature of selected chemicals and the establishment of the Gene-Tox Carcinogen Data Base. A Report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. Mutat Res, 1987, 185(1/2): 1～195

6 Mavaurnin KH, Blakey OH, Cimino MC, et al. The in vivo micronucleus assay in mammlian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. Mutat Res, 1990, 239(1): 29～80

7 曹 阳，曹 佳，许丽萍. 硫酸铜和亚硫酸氢钠对λDNA的遗传毒性研究. 中国环境科学，1993，13(5)：386～389

8 曹 阳，张 林，刘雁雨，等. 22种化学物和紫外线对λDNA的遗传毒性分析. 中国环境科学，1994，14(2)：139～142

9 李正化，主编. 药物化学. 北京：人民卫生出版社，1990：274～311

10 Weller EM, Dietrich I, Viaggis S, et al. Flow cytometric analysis of bromodeoxyuridine induced micronuclei. Mutagensis, 1993, 8(5): 437～441

11 J. 玛克斯，著. 郑昌学，陈濂生，曾耀辉，译. 维生素手册. 北京：科学普及出版社，1981：97～111

(收稿：1994-06-01；修回：1994-11-30)

细菌拉丝试验的应用探讨

A study of adaption of the "String" test for bacteria

解晓珍 田洪明 舒亦平 (第三军医大学新桥医院检验科) 630037

潘绍武 (第三军医大学检验系临床微生物学教研室) 630038

1970年Smith[1]首先报道拉丝试验用于霍乱弧菌，1981年Shushan等[2]和1983年Agbonlahor等[3]相继将拉丝试验应用于革兰氏阳性菌和阴性菌的鉴别。近年来国内也有一些初步应用的报道[4～6]，但尚未普及。我们用1267株菌进行拉丝试验，以求进一步了解此项试验的准确性、可靠性，同时对其影响因素进行探讨。现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试剂：在比较试验的基础上选用25 g/L (CP)KOH水溶液，作为本试验的基本试剂。菌株：革兰氏阴性菌32种664株，革兰氏阳性菌16种603株，共1267株，其中82株系实验室保存菌株(含成都生物制品所提供的质控标准菌株)，其余均为本实验室自临床标本中分得。

1.2 实验方法

用接种环取25 g/L KOH水溶液两环于洁净玻片上，从培养基中刮取菌落1至数个，与试剂充分混合，并不断地将环从悬液中轻轻提起，在黑色背景下观察。60 s内出现细丝者为阳性，60 s内不出现细丝者为阴性。以革兰氏染色结果与其对比。

1.3 影响因素的观察

取部分革兰氏阴性菌株观察比较不同试剂，不同菌量和不同类型菌落(S型、R型)的细菌对拉丝试验结果的影响。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net