

用微生物学方法检测化学致癌物

吴 明

(中国科学院微生物研究所, 北京)

全世界每年出现的新合成化合物不下数千万种。现已查明,有数百种结构不同的化学物质对动物有致癌作用。而人类患的癌症目前已公认有 80% 是由于接触某些化学物质引致的,这些化学物质有化工产品、化妆品、药物、染料、沥青、某些食品、城市污染物、微生物毒素等。由于这些产品遍及我们生活的每一方面,生物学家多年来就想寻找一种快速、简便的方法,来测定化学物质中潜在的致癌活性。因为“传统的”致癌物测定法皆以实验动物作材料,这类试验时间过长,有的需时数月或数年。需要动物也较多。采用微生物学方法,迅速、简便、精确度高、且可同时测定多种化学物质。

目前对人体组织的癌变机理虽然还不完全清楚,但化学物质所引起的癌症,不外乎是这些物质使细胞发生突变和由此而引起的后生效应(epigenetic effect),包括潜在病毒的活化等。引起细菌细胞 DNA 结构变化因子的作用和动物或培养细胞形成癌肿之间,存在着密切的相关性。因而细菌系统对潜在的有害因子可能起到某种有效的指示作用。利用细菌检查化学诱变剂(和致癌物)的方法最早是 1958 年 Iyer 和 Szybalski^[1] 提出来的,但由于当时对化学物质致癌作用的了解还不充分,故未被重视和采用。

用微生物学方法检测化学物质的致癌作用,大体上是根据下列三种原理: 1. 化学物质对细菌的毒性^[2]; 2. 化学物质的诱变作用^[3]; 3. 化学物质对溶源性细菌的诱导作用(简称“溶源诱导”)^[4]。日前根据第二种原理设计的方法应用最广。

利用化学物质对细菌的毒性进行检测

正常细胞经有毒因子作用后,细胞 DNA 会发生改变。但由于细胞本身含有一种 DNA 多聚酶 I,通过这种酶的作用,即能切割去该部分改变了的 DNA,这样便能再合成正常的 DNA 序列,从而克服这些有毒因子的影响。我们可以设想,缺失这种多聚酶 I 的细胞对损伤 DNA 的有毒因子(包括已知的一些诱变剂和致癌物)将会是非常敏感的。近来利用缺失这种酶的大肠杆菌(*Escherichia coli*)突变株(Pol A⁻)证实了这种推测,它们的敏感性比正常大肠杆菌(Pol A⁺)要高。

Slater 等根据这些观察设计了一种利用细菌进行有毒因子检测的简易方法。这种方法是:将细菌 PolA⁺ 和 PolA⁻ 分别涂在琼脂平板上,再放上含有待测化学物质的圆纸片,培育 7—16 小时后,如果该化学因子有毒性,PolA⁻ 平板上所产生的抑菌圈比相应的 PolA⁺ 平板上的要大;不改变细胞 DNA 的一些因子,则在这两个平板上的抑菌圈一样^[5]。有人曾用这种方法检查烟草的烟的冷凝液中的活性物质。

还获得了一株缺失 DNA 多聚酶 I 的枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。这种细菌对甲基磺酸盐和紫外光敏感^[6]。这就提供了一种与大肠杆菌 PolA⁻ 一样的检测系统。由于枯草芽孢杆菌细胞对放线菌素 D、各种染料以及一些络合分子的通透能力比大肠杆菌高,所以与大肠杆菌结合使用,可扩大此法的应用范围。

鉴于此法未经进一步的研究,且无法用于

检测一些不能抑菌的化学物质,所以应用范围受到限制。尚待进一步改进。

利用化学物质的诱变作用进行检测

不久前,Ames 研究小组介绍了一种用于检定化学诱变剂和致癌物的鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)系统。这种菌经诱变后,只在补加组氨酸的条件下才能生长。在这个组氨酸缺陷型(his^-)的培养物中加入某种待测的化学物质后,若在此种化学物质的四周长出菌落时,这些菌落就是由 $his^- \rightarrow his^+$ 的回复突变菌落,则该化学物质即为诱变剂。Ames 等从大量突变株中挑选出自发回复突变率低的,并对各种有害因子高度敏感的三个菌系,这三个菌系可分别用于检测造成碱基置换,移码突变和造成缺失的诱变剂。

de Serres 等也曾用链孢霉(*Neurospora*)及其它菌系观察了一些化学物质的诱变作用和致癌作用,证明所试过的化学物质的诱变和致癌作用是一改的。Slater 用缺失 DNA 多聚酶的大肠杆菌 W3110、P3478 作指示菌证明,青霉素、红霉素、环丝氨酸和放线菌素 D 等七种药物,既无致癌作用,也无诱变作用;反之,甲基亚硝基脒烷、羟基氨基苄等十种化学物质既是诱变剂,又是致癌物。这个结论和 de Serres 的观察是一致的,但有些致癌物如二甲基亚硝胺、二乙基亚硝胺以及氨基甲酸乙酯则不能引起细菌突变。当用大鼠肝脏抽提液与上列三种化学物质分别和大肠杆菌一起培养时,它们就有了明显的诱变作用。据认为,其原因可能是它们需要通过哺乳动物的酶系作用,在机体中经过代谢以后,才能起诱变作用^[7]。由于大多数微生物不含有使化学致癌物激活和分解的多功能氧化酶和其它有关的酶系^[8],因此在推广应用 Ames 等的试验法时,须加一些能在离体条件下激活待测药物的哺乳动物组织如肝脏、肾、肺、皮肤中的酶系。

这种方法也可以用来检查受试对象排泄物(例如尿)中的诱变产物^[9]。也适用于那些与有毒物质接触的人,和新药强力疗法的患者。Ames 等用大鼠或人体肝脏匀浆活化致癌物,然后用

鼠伤寒沙门氏菌 TA1538、LT-2 等菌系,测定了十八种化学致癌物的诱变活性。结果证明,黄曲霉素 B₁、 α -乙酰氨基苄、苯并芘等均为强力诱变剂,它们都有一亲电子基团能与 DNA 起反应。国际肿瘤研究中心用鼠伤寒沙门氏菌 TA100、TA98 作指示菌,亦证明 α -乙酰氨基苄的代谢产物能与 DNA 结合,使细菌发生突变。

用大肠杆菌和鼠伤寒沙门氏菌作诱变指示菌测定化学致癌物,尚有一定局限性。根据 Ames 等的试验法,几乎一切致癌物都是诱变剂,特别是对人体的一切致癌物都起诱变作用。但是反过来,一切诱变剂并不都是致癌物。据报道,诱变剂中有 85—90% 是致癌物。因而切不可将诱变过程和致癌过程等同起来。细菌诱变试验法仅仅利用了与此两种过程一致的单一或多种特性而已。根据 Ames 的最近看法,在检定环境化学物质潜在的致癌活性时,细菌诱变试验法只能作为初筛的手段,它需要有其它方法的配合,如动物试验。业经证明,2,4-二氨基甲苯、氯乙烯、二氯乙烯既是诱变剂,又是致癌物;而 2,4-二氨基苯甲醚、 α -氯丁二烯具有诱变作用,对人体也可能是一种潜在性致癌物。还曾证明,治疗疟疾用的吡喹啉衍生物是细菌的诱变剂,但对人体似乎不是致癌物。

利用溶源诱导作用进行检测

某些致癌物对溶源性细菌里处于休止状态的前噬菌体有诱导作用。Lwoff^[10]曾经指出,对噬菌体的诱导作用对检定诱变剂和致癌物是一种有效的手段。许多实验室都证实了 Lwoff 的这个论断。Heinemann^[11] 近期的一篇评论中列举了 89 种能诱导前噬菌体的诱变剂和致癌物,包括环境因子、药物因子等^[12]。其中有些是强力致癌物。但这些物质要起致癌作用,其中大部分必须透过细菌细胞壁这道屏障,并借助哺乳动物组织使这些致癌物代谢成为活性产物。这两大困难均已由 Moreau 研究小组^[13]一一克服了。

他们使用了一些新的大肠杆菌 K12 菌株,如致癌物可透过该菌株细胞膜的菌株(*envA*)和

缺失 DNA 修复能力的菌株(*uvrB*)^[14]。待测化学物质须预先溶于二甲基砒中。如系必须先激活的化学物质,则须加入一分体积的离心除去线粒体后的上清液和六分体积的提供 NADP 系统的代谢混合物。

现将溶源诱导试验分述如下:

1. 点样定性试验: 直接在平板上或滤纸上点上待测化学物质。软琼脂中含有 *envA uvrB* (λ) 溶源性试验细菌、 λ 噬菌体的指示菌和代谢混合物。一俟化学物质发生代谢, 代谢物即扩散, 掺入 λ 溶源性细胞内, 后者即被诱导。经 37℃ 培养过夜后, 药物从点样处向外以不同浓度同心圆的形式扩散, 如出现噬菌斑, 则说明此化学物质可能为致癌物。

此法简便易行, 可检验大量的化学物质。也可用来判断某一化学物质是否必须激活才能有诱变或致癌作用, 例如, 黄曲毒素 B₁ 和 7,12-二甲基苯[α]蒽只有经过代谢变化后才有活性, 而苯[α]并芘 4,5 氧化物和丝裂霉素则无须经过代谢, 本身即有活性。

2. 平板定量试验: 把 500—1000 个溶源性细胞与一定量的待测化学物质、有代谢活性的混合物和 λ 噬菌体指示菌一起混合, 倒入平板。在加入最适量的药物条件下, 若所有处理的细胞均被诱导, 则此化学物质可能为致癌物。

3. 液体培养基定量试验: 一定量的溶源性细胞 (500—1000) 与定量的待测化学物质以及有代谢活性的混合物一起混合后, 在 37℃ 培养。然后利用软琼脂进行稀释, 以中断化学物质的代谢和代谢物掺入细胞里, 并作平板培养。倘若该化学物质发生了诱变作用, 则此化学物质可能为致癌物。

液体法的灵敏度一般高于平板法。若待测化学物质是不溶于水的, 则经处理的溶源性细菌在液体中只有 50% 被诱导, 而在软琼脂中则为 100%。水不溶性化学物质扩散和掺入至溶源性细胞里较缓慢。上述这两种方法均可定量测定某一化学物质对 λ 噬菌体的诱导活性。但液体法还有三个独特的优点: 1) 用 λ CI857 溶源性细菌代替 λ 溶源性细菌更易于试验致癌物对细

胞的毒性效应; 2) 可任意通过稀释法或平板培养法使化学物质的代谢以及代谢物掺入细胞的过程中断, 这就可以测定活性代谢物出现和消失的动力学; 3) 只需要少量的代谢混合物和待测的化学物质(主要指水不溶性的化学物质)。

有证据表明, 诸如苯[α]并芘和 7,12-二甲基苯[α]蒽这样的多环烃致癌物能诱导 λ 前噬菌体。这两类化学物质对啮齿类动物的致癌活性和在细菌里的诱导作用有极大的相关性。黄曲毒素 B₁ 是一种潜在的致癌物, 也是 λ 前噬菌体的潜在的诱导物, 而黄曲毒素 G₁ 的致癌和诱导活性则微弱。苯蒽是一种可疑的致癌物, 即便是潜在的诱变剂, 但不诱导 λ 前噬菌体, 它的衍生物 7,12-二甲基苯[α]蒽却能致癌, 是 λ 前噬菌体的诱导物, 也是细菌的诱变剂。

利用溶源诱导试验研究致癌物对细菌的作用, 其优点首先在于诱导溶源性细菌的化学物质可能为致癌物, 比起 Ames 研究小组认为致癌物即为诱变剂的方法更为精确。其二, 有的化学物质, 如溴代脱氧核苷酸, 本身虽不是致癌物, 却能诱导 λ 噬菌体和潜伏的致癌病毒, 也能抑制表型的表达; N-甲基-亚硝基氧基甲酸甲酯是一种对动物和培养细胞作用强烈的致癌物, 而且也是溶源性菌株的诱导物。说明它们具备诱导细胞突变的特性。这两种化学物质都能诱导溶源性菌株, 因而可检测的致癌物范围最广, 是其它微生物系统所不及的。最后, 由于大部分细胞群体均可被诱导, 这就有可能在生物化学水平上通过测量对 λ 阻抑物的钝化作用来测定致癌物的诱导活性。它的局限性主要在于细胞对许多化学物质是不可透过的^[15], 即便是可透过的, 亦须经过代谢作用后^[16], 方能被激活。利用化学物质可透过细胞的突变株、溶源性细菌和鼠肝匀浆, 可扩大被检定为 λ 前噬菌体诱导物的致癌物范围。菌株 *env A* 细胞壁层表面的脂多糖碳水化合物虽未改变, 但对诸如龙胆紫这样的化学物质的透过性, 则较 *Lps* 突变株为高。它吸收龙胆紫的速率几乎和用溶菌酶—EDTA 处理的原生质球相同。菌株 *env A* 在突变后造成的细胞透性改变的程度, 似乎和

细菌细胞被膜所能耐受的透过速率相当。

几点设想和建议

诱变作用和溶源诱导试验表明,同一化学物质既然能在原核细胞里诱导前噬菌体或造成突变,就可能在真核细胞里有致癌作用。由此推测,致癌物在体内的激活形式与哺乳动物酶系在离体条件下使其激活的形式相同;而且,致癌物引致原核细胞里的DNA损伤,类似于真核细胞里的DNA损伤。最近证明,用紫外线^[17]或黄曲霉素B₁代谢物^[18]处理过的细菌,经切割胸腺嘧啶二聚体修复后仍然存在着的DNA损伤,会有一种新的代谢途径被诱导,从而导至突变发生,溶源性菌株的被诱导和细菌细胞不发生分裂变成丝状。可以设想,在真核细胞里也存在一种类似的途径,从而导致癌变。由此推断,对诱变试验和溶源诱导试验反应阳性的化学物质,可能有致癌作用。

1977年7月在英国爱丁堡举行的第二届环境突变因子国际讨论会上,决定成立国际消除环境突变因子和致癌因子委员会(ICPEMC)^[19]。估计目前全世界有60家以上的制药厂和化工厂已经使用了所提出的方法^[20]。日本原先用作食品防腐剂的一种化学物质(AF-2),经用该方法试验,证明具有诱变作用,因而已停止出售^[21]。我国也在开展这方面的研究。根本的问题是要从分子水平上把化学物质的致癌机理搞清楚,力求微生物学方法检定化学致癌物简便有效。例如本文提到的第二种方法,能否采用基因工程的手段使动物组织的酶系——多功能氧化酶系组入到微生物体内去呢?那样将能免去用动物组织匀浆激活化学物质。又例如溶源诱导试验法虽比突变法为优,但也存在细胞透性问题。能否采用其它方法改变细菌细胞壁,提高渗透性呢?另一方面,我们也要承认微生物学方法不是万能的,对一些已知的诱变和致癌

因子,诸如杀虫剂、电离辐射、偶氮染料及金属致癌物等,微生物学方法就无能为力了。所以说微生物学方法检定化学致癌物还不能完全代替动物试验^[19]。以上三方面的问题都是值得我们今后考虑的。

参考文献

- [1] Iyer, V. N., & Szybalski, W.: *Appl. Microbiol.*, 6: 23, 1958.
- [2] Slater, E. E., Anderson, M. D., & Rosenkranz, H. S.: *Cancer Res.*, 31: 970, 1971.
- [3] Ames, B. N., McCann, J., & Yamasaki, E.: *Mutat. Res.*, 31: 347—364, 1975.
- [4] Lwoff, A.: *Bacteriol. Rev.*, 17: 269—337, 1953.
- [5] Rosenkranz, H. S.: *Bull. Environ. Toxicol.*, 8: 242, 1972.
- [6] Gass, K. B., et al.: *J. Bacteriol.*, 108: 364, 1971.
- [7] Magee, P. N., & Farber, E.: *Biochem. J.*, 83: 114, 1962.
- [8] Geissler, E.: *Die Naturwissenschaften*, 49: 320, 1962.
- [9] Sarasin, A.: *La Recherche*, No. 61, 1975.
- [10] Lwoff, A., et al.: *Ann. Inst. Pasteur*, 79: 815—859, 1950.
- [11] Heieman, B.: *Prophage Induction in Lysogenic Bacteria as a Method of Detecting Potential Mutagenic, Carcinogenic, Carcinostatic, & Teratogenic Agents, Chemical Mutagens*, (ed. by A. Hollanender), Plenum Press, N. Y. London, P. 235, 1971.
- [12] Heinemann, B.: *Appl. Microbiol.*, 21: 726, 1971.
- [13] Moreau, P., Bailone, A., & Devoret, R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 73: 3700—3704, 1976.
- [14] Normark, S., et al.: *J. Bacteriol.*, 97: 1334—1342, 1969.
- [15] Gustafsson, P., Nordström, K., & Mormark, S.: *J. Bacteriol.*, 116: 893—900, 1973.
- [16] Magee, P. N.: *Essay Biochem.*, 10: 105—137, 1974.
- [17] Witkin, E. M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 71: 1930—1934, 1974.
- [18] Goze, A., Sarasin, A., Moulé, Y., & Devoret, R.: *Mutat. Res.*, 28: 1—7, 1975.
- [19] Fox, M.: *Nature*, 268 (5620): 488, 1977.
- [20] Ames, B. N.: *Chem. Engin. News*, 54 (38): 19, 1976.
- [21] Tazima, Y., et al.: *Mutat. Res.*, 32: 55, 1975.