

的关系。

紫露草微核测定法最初是在研究 1, 2-二溴乙烷 (1, 2-dibromoethane) 这种诱变剂对染色体的破坏作用以及剂量与反应间的关系时建立起来的^[11]。以后在用各种物理的因素, 如 X-射线、 γ -射线等, 和化学的因素, 如诱变剂甲基磺酸乙酯 (EMS)、叠氮化钠 (NaN_3)、叠氮酸 (hydrazoic acid)、环己胺 (cyclohexylamine) 及马来肼胍 (maleic hydrazide) 等等的实验中进一步确证了这一方法的有效性^[11, 12]。随后这一方法广泛地被世界上许多实验室 (包括我国某些实验室) 所采用, 现在这一方法已被我国环保部门采用为标准方法之一。

现在这一方法不仅被用于现场测试存在于空气中的环境污染物或射线, 而且还被用于测定食品添加剂和日用化妆品中是否含有诱变剂或毒性物质^[13]。从应用的角度看来, 这一测定方法已被证实为监测环境诱变剂最有效的一种方法。其理由有三: 一是方法本身灵敏度高, 因为应用真核生物紫露草生殖细胞减数分裂系统; 二是培养材料容易, 耗资少, 方法操作简便, 不需特殊仪器设备, 观察统计微核不受人力和时间限制, 试验周期短, 可在 48h 内得到结果; 三是方法适用范围广, 不仅可用于监测存在于空气中的诱变剂或放射性, 而且也可用于测试存在于液体中的诱变剂 (如河水、湖水、污水、井水、

自来水、咸淡水等等), 也还可以用以测试液态的或固态的 (水溶性的和非水溶性的, 对于非水溶性的要先溶于有机溶剂中)、食品、药物和日用化妆品。

这个测定方法常用的紫露草是 *T. paludosa* No. 02、*T. paludosa* No. 03 和 *Tradescantia* 4430 (杂种), 但是最常用的还是 *T. paludosa* No. 03, 这个品种于 1980 年引入我国, 现在中国科学院海洋研究所所有大量种植。

参 考 文 献

- [1] 林光恒, 海洋环境科学, 6(1), 49(1987).
- [2] Cohn, N. S., *Elements of Cytology*, pp. 243—271 2nd Ed., Harcourt, Brace and World, New York, 1969.
- [3] Kabarity, A. et al., *Acta Biol. Acad. Sci., Hung.*, 25, 9(1974).
- [4] Ma, T. H., *Mutation Research*, 99, 257(1982).
- [5] Ma, T. H. et al., *Mutation Research*, 104, 101 (1982).
- [6] Ma, T. H., *Mutation Research*, 99, 293(1982).
- [7] Sparrow, A. H., *Radiation Research*, 5, 596(1956).
- [8] Cuany, R. L. et al., *Abstamm Vererbungsl.*, 89, 7 (1958).
- [9] Sparrow, A. H. et al., *Bio-Science*, 18, 582(1968).
- [10] Thompson-Emmerling, M. et al., *J. Hered.*, 71, 261(1980).
- [11] Ma, T. H. et al., *Environ. Mut.*, 1, 123(1978).
- [12] Ma, T. H. et al., *Environ. Exper. Bor.*, 20, 169 (1980).
- [13] Ma, T. H. *Mutation Research*, 138, 157(1984).

关于检测环境致变物的 Ames 试验的几个问题

高 培 基

(山东大学微生物研究所)

1975 年 Ames 等建立了鼠伤寒沙门氏菌-微粒体系统, 用对诱发回复突变率的估计来检测环境致变物^[1], 由于表现为对动物致癌的 179 种化合物在 Ames 试验中有 87.9% 表现致突变作用, 而在确定为非致癌的 117 种化合物中有 86.3% 不具致突变作用, 都达到了近 90% 的正确度, 而且方法简便, Ames 试验已成为检测环境致变物的生物学短期试验中的首选方法。近年来我国已在环境保护、医药卫生和工农业生产等多方面应用了 Ames 试验, 做为环境质量安全评价, 产品检定和癌症病因分析等的依据^[2, 4]。随着人们对环境致癌因素的日益关切

和环境保护工作的开展, 食品卫生等法令的实施, Ames 试验的应用将更加广泛。但是, 研究者们陆续发现 Ames 试验方法中尚存在一些影响试验结果的不确定性因素^[3, 4, 6, 9, 10], Ames 等^[2]近年来也对其原试验方法做了修改, 本文仅就试验结果的判断和代谢活化系统的应用做一简略讨论。

一、关于确定被检物具致突变性的标准

Ames 试验是由对微生物诱发突变率和自发突变率的比较来推断被检物 (诱变剂) 是否具致突变作用。对微生物诱发突变率的估计, 涉及到对两个正

态分布的混合分布的估计,它需要大量的样本^[5].但 Ames 试验中的样本数(测定回复突变的培养皿数)均很小,无法用条件矩估计等方法测定混合分布的参数.在这类情况下,通常可借用“平均数相差的显著性测验”进行统计推断. Runung^[6]为了简化统计计算,根据实际经验提出了试验结果为阳性(即被检物具致突变性)的临界差数为“二倍于对照值”,即加有被检物培养皿中出现的回变菌落数为对照皿的二倍时,即可做出被检物具致突变性的判断.这一看法,已被广泛接收.笔者认为由于引用者对提出这一经验性判断方法的条件了解不够,在某些情况下则易于导致做出错误的判断.

实践经验和统计理论的分析都表明,一个容量有限的样本是不能确切给出真值的.由于试验误差的存在,由不同容量的样本得到的均值并不是唯一的确定值而是一随机变量.因此,Ames 试验中处理组各皿回变菌落数的均值 $\bar{X}_T$ 和对照组均值 $\bar{X}_C$ 的差数或其比值 $\frac{\bar{X}_T}{\bar{X}_C}$ 也具有不确定性.为消除这类不确定性的干扰,生物统计学上,常用可信限 CL 来估计由试验变差造成的平均值的界限:

$$CL = \bar{x} \pm a$$

$$\bar{x} (\text{均值}) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

a 为常数,它取决于试验数据的标准差(S),样本数(n)和实验者所期望的可信度(α). 即该可信限包含真正均值的概率.具体可写为下式:

$$CL = \bar{x} \cdot tS / \sqrt{n}$$

t 为在一定自由度下,概率为(α)时的 t 值(可查表).在一定的概率下,如两个样品的可信限(CL)不互容,即上、下限的差均为正值,即表明它们来自不同的群体,均值相差显著. Ames 试验中,则表示由于被检物的致突变作用,使处理组形成的回变菌落数(诱发突变和自发突变的总效应)与对照组的回变菌落数(自发突变效应)相差显著,因此,可在一定概率水平下,判断被检物具致突变作用.

由上式可见,如供试皿数相同,当标准差也相同时,只需 $\bar{X}_T > \bar{X}_C$, CL_T 即可恒大于 CL_C .但实际上由于 S_T 与 S_C 总有相差.为简化试验结果的计算,Runung 提出了以 $\frac{\bar{X}_T}{\bar{X}_C} > 2$ 做为被检物具致突变作用的“临界差数”,但这只是一个经验性的标准.由上述分析可看出,只在 $\left| \frac{S_T}{S_C} \right| < \frac{\bar{X}_T}{\bar{X}_C}$ 时,才能使 CL_T 与 CL_C 不互容.所以,如不同时给出试验的标

准差,从而计算出在一定概率水平下的可信限,仅由 $\bar{X}_T$ 和 $\bar{X}_C$ 的差数是难以做出确切判断的,当供试皿数较少时,更是这样.

现以 Ehrenberg^[6] 检测二氯乙烯焦油 (EDC-tar) 的试验结果为例(见表 1),做出分析如下:

表 1 二氯乙烯焦油 (EDC-tar) 的致突变作用

	回变菌落数/皿	
	对照组	处理组
	15	24
	23	25
	13	31
	17	57
	18	41
$\bar{X}$	17.2	31.6
S	3.767	7.402
$S\bar{X}$	1.685	3.310

由于 $\frac{\bar{X}_T}{\bar{X}_C} = 1.83 < 2$, 如不考虑试验变差时,依“二倍于对照值”的标准,应判断为无致突变作用.用可信限方法,在 95% 显著性水平下 ($\alpha = 0.05$) 计算可信限:

$$CL_T = 31.6 \pm 2.776 \times 3.31 = 22.41 - 40.78,$$

$$CL_C = 17.2 \pm 2.776 \times 1.685 = 12.52 - 21.80.$$

两者不互容, CL_T 恒大于 CL_C , 应做出有致突变作用的判断.把检测的显著水平提高到 99% ($\alpha = 0.01$) 时, $CL_T = 16.39 - 46.83$, $CL_C = 9.41 - 24.95$. 亦不互容. 这表明,根据试验结果做出的 EDC-tar 具致突变作用的推断,可能出现的(以假为真)错误的机会将不会大于 1%. 也同时表明,如不考虑试验变差,仅由 $\bar{x}$ 的差值做出判断时的不可靠性.

考虑到 Ames 试验主要是做为检测环境致癌因素的初筛方法,如做出“无致突变作用”的判断后,被检物即失去了被进一步检测的机会,因此,在 $\bar{X}_T$ 与 $\bar{X}_C$ 的差值不大,供试皿数又较少时,不考虑试验变差而径用“二倍于对照值”为标准做出判断时,是易于造成“以真为假”的错误,从客观效果上来看,在本试验中这较犯“以假为真”的错误判断则要严重的多.这在致突变作用的检测上不能不给予重视.

目前在实验室中函数型电子计算器已普及,方差分析等统计计算都可方便进行.这样,对 Ames 试验的结果做上述的可信限分析或者做“成组数据平均数比较的 t 测验”^[7] 都已很方便.由此做出的统

计推断的可靠性远较用“二倍于对照值”方法为优。建议对此做出相应的规定。

当初步判断被检物进具致突变性时,可进一步用不同浓度的被检物行试验。一些研究者习惯用一元线性回归方法计算剂量反应曲线,由曲线斜率得“比致变潜力”(回变菌落数/nmol)和相关系数 r 做为判断致突变性的进一步证据。应该注意的是,由于研究者们往往仅选用3—5种浓度梯度进行试验,在此条件下只有 $r > 0.9$ 时才可做出相关显著的判断^[8]。如不做预备试验直接进行浓度试验,由于浓度的选择难免带有盲目性,而高浓度的被检物如对微生物的生长有抑制作用时,就难以用回归分析方法对结果进行分析。这都是试验设计中需注意的。

二、关于代谢活化系统的应用

由一个细菌繁殖成为能为肉眼所见的菌落,往往需经20—30次分裂,每次分裂形成的细菌都会发生突变,因此一次微生物培养过程中形成的回变菌落数,很大程度上要取决于经分裂形成的细菌数,任何影响细菌生长繁殖的因素,如接种量、培养基组成和培养时间等都会影响回变菌落数,而难以标准化的是代谢活化系统S-9、S-10和S-14(由抽提时的离心速度而得名)的用量。

由于已知相当多的致变物需加入代谢活化系统进行“激活”之后始可显示致变性,因此Ames试验中通常加入大鼠肝匀浆S-9,由于尚缺少简便的测定匀浆中过氧化物酶等微粒体酶活力的方法,S-9的加入都是以匀浆量而计的。已知鼠肝匀浆微粒体酶活性会因动物品种、性别、年龄和制备方法而异。另一方面S-9制剂中还含有微量组氨酸,采用过量加入时会造成自发回变菌落数过多而降低了试验的灵敏性。在得不到标准S-9制剂时,则需用已知需代谢激活的致变物如黄曲霉毒素B₁和不需代谢激活的致变物如N-亚硝基胍,做为阳性指示物,进行预备试验以检验试验条件。被检物使用不同浓度时,各种浓度下亦需试用不同浓度的S-9。考虑到某些被检物中还可能含有活性因子,因此,在S-9的用量

试验中应包括不含S-9的一组为对照,以检测被检物本身是否含有活性因子。

McCann等^[10]还发现,一些植物来源的致瘤物质如苏铁素(Cycasin),是在由肠道微生物的 β -葡萄糖苷酶酶解后才转化为活性致变物——甲基偶氮甲醇的。芸香苷和黄芪素等亦属此类。因此,当检测这类植物来源的配糖物时,就需先用 β -葡萄糖苷酶进行酶解。

随着更多的新菌株被用于进行短期试验,活化系统的选择将更加复杂,为排除可能存在的干扰因素,试验步骤也会更趋复杂,因而减低了做为初筛方法的实用价值。这就需要研究者应根据被检物的性质和实际重要性等因素做出妥善的选择。根据我国情况,除少数单位已试用Ames 1983年的改进方法以外,多数单位还是依其1975年方法,但具体操作方法又往往有所不同,这给对试验结果的评价也带来困难。笔者认为,拟订一个统一的操做规程,同时由指定单位供应菌株和S-9制剂,这对简化试验操做,取得可靠的结果,是很必要的。

参 考 文 献

- [1] Ames, B. N., et al., *Mutation Research*, **31**, 347(1975).
- [2] Maron, D. M., and Ames, B. N., *Mutation Research*, **113**, 173(1983).
- [3] 张进等, *中国环境科学*, **6**(1), 40(1986).
- [4] 王家玲等, *环境科学*, **6**(1), 2(1985).
- [5] 刘垂珏, *中国科学(B辑)*, (7), 625(1983).
- [6] Ehrenberg, L. 著. (张湘桥译), In *Handbook of Mutagenicity Test Procedure*, p. 419, 1977. 译文载“生物学短期试验”521—559页, 人民卫生出版社, 北京, 1982年.
- [7] 杨纪柯, *数理统计方法在医学科学中的应用*, 87—104页, 上海科技出版社, 上海, 1964年.
- [8] 冯士雍, *回归分析*, 22页, 科学出版社, 北京, 1985年.
- [9] Mitchell, I. G., *Mutation Research*, **54**(1), 1(1978).
- [10] McCann, J. and Ames, B. N., (陈祖经译) *Advances in Modern Toxicology*, 译文载“生物学短期试验”28—41页, 人民卫生出版社, 北京, 1982年.