【论著】

碳纳米管的 Ames 试验研究

马茂才，黄萍，陶云，邓雅斌，袁凌堃，李东辉

【摘要】 目的 应用 Ames 试验系统观察多壁碳纳米管的诱变活性。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多壁碳纳米管的诱变活性。加 S9 混合液作为体外代谢活化系统。结果 多壁碳纳米管在 S9 活化和非活化两种测试条件下，1~ 500 μg/ 皿浓度范围，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 1~ 10 μg/ 皿浓度范围，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 10~ 500 μg/ 皿测试浓度范围，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 多壁碳纳米管具有碱基置换及移码型的直接诱变特性和间接诱变特性。

【关键词】 多壁碳纳米管；Ames 试验；致突变性

中图分类号：R114 文献标识码：A 文章编号：1009-6639（2010）07-0686-03

Salmonella/ mammalian microsome mutagenicity test of carbon nanotube

MA Mao-cai, HUANG Ping, TAO Yun, DENG Ya-bin, YUAN Ling-kun, LI Dong-hui. Cancer Research Center, Xiamen University College of Medicine, Xiamen, Fujian 361005, *China*

Corresponding author: LI Dong-hui, E-mail: Lidh@xmu.edu.cn

【**Abstract**】 **Objective** To evaluate the mutagenicity of multi-wall carbon nanotube (MWNTs) with the salmonella/ mammalian microsome mutagenicity test. **Methods** The standard tester strains of TA97, TA98, TA100 and TA102 were used to detect the mutagenicity of multi-wall carbon nanotube with standard plate incur poration version S9 mixture was added to the plate as the activation system of *in vitro* test. **Results** There was no significant increase of the reverse clones for TA98 and TA100 strains compared with that of controls at the MWNT concentration of 1~ 500 μg/plate. Similar results were observed for TA97 and TA102 strains at MWNTs concentrations of 1~ 10 μg/ plate. The multi-wall carbon nanotube induced as two times of the reverse clones of TA97 and TA102 strains as that of controls at MWNTs concentration of 10~ 500 μg/ plate. **Conclusion** The multi-wall carbon nanotube could induce the direct and indirect mutagenicity of gene substitution and frame shift.

【**Key words**】 Multi-wall carbon nanotube; Ames test; Mutagenicity

纳米碳管（carbon nanotubes，CNTs）是最常见的纳米材料之一，自问世以来一直以其独特的结构和优异的性能吸引着人们的注意，在物理、化学、信息技术、环境科学、材料科学、能源技术、生命及医药科学等领域均具有广阔的应用前景，被认为是一种性能优异的新型功能材料和结构材料。随着 CNTs 生产和应用的快速增加，人们在工作场所甚至普通环境中接触 CNTs 的机会也将相应增加，因此其安全性问题逐渐引起人们的关注。Lam 等[1] 通过支气管注入法对单壁碳纳米管（SWNTs）的毒性进行了研究，结果表明，一定量的单壁碳纳米管可以导致老鼠的肺部肉芽肿或死亡。Warheit 等[2] 通过支气管注入法以大鼠为实验动物研究了多壁碳纳米管（MWNTs）的急性毒性，发现一定量的多壁碳纳米管可以导致大鼠的窒息死亡。Muller 等[3] 研究了碾磨前后 MWNTs 对呼吸系统造成的影响，实验表明 MWNTs 对肺部组织的影响包括炎症反应、肉芽肿的形成以及肿瘤坏死因子的产生。Jia 等[4] 研究了不同的碳纳米材料对肺泡巨噬细胞毒性的影响。可见 CNTs 不仅容易进入体内，而且在体内的生物学效应不同于常规物质，但目前人们对 CNTs 的潜在致突变性仍了解甚少。

因此，本研究选用遗传毒理学中使用最广泛的鼠伤寒沙门菌回复突变试验（Ames 试验）对碳纳米管是否具有潜在的诱变作用进行评价。

1 材料与方法

1.1 实验材料

多壁碳纳米管（厦门大学化学系陈小兰副教授惠

基金项目：厦门大学新世纪优秀人才支持计划资助项目

作者单位：厦门大学医学院抗癌研究中心，福建厦门 361005

作者简介：马茂才，硕士，主要从事分子肿瘤学研究

通讯作者：李东辉，E-mail：Lidh@xmu.edu.cn

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

赠，经扫描电镜、透射电镜显示管径在 40~ 60 nm)、阳性对照 2-氨基芴（2-AF，分析纯)、叠氮钠 (NaN_3，分析纯)。

1.2 实验菌株

采用标准测试菌株 TA97、TA98、TA100、TA102 四株菌。菌株储存于加有二甲基亚砜的新鲜培养液中，其体积比为 1∶ 9。混合后分装于 1 ml冻存管内，－ 80 ℃冰箱贮存。

各菌株按照 YY/T 0127. 10－ 2001 的方法进行如下鉴定：（1）组氨酸需求（his-）试验；（2）脂多糖屏障缺陷鉴定（rfa 突变)；（3）对紫外线敏感性鉴定 (uvrB 修复缺陷型的鉴定)；（4）抗氨苄青霉素 (PKM 101）试验（菌株 R 因子丢失鉴定)；（5）四环素（PAQI）抗性的鉴定；（6）自发回变数（his+）的测定；（7）对阳性突变剂的敏感性鉴定。

1.3 肝微粒体酶活化系统 **(S9)** 制备[5]

采用苯巴比妥和 5，6-苯黄酮联合诱导方法制备。操作过程需注意无菌和局部低温环境。

1.4 剂量设计

由于碳纳米管不溶于水和 DMSO 等有机溶剂，故将其配成悬浊液的形式进行试验。多壁碳纳米管悬浊液初次分别设 100，50，25，10，5 μg/皿 5 个剂量组。为了便于操作，上述剂量组分别配成 1 000，500，250，100，50 mg/L，即在实验时，在每平皿中加 0. 1 ml上述溶液。

两次重复试验后，发现碳纳米管对 TA97、TA102 具有致突变。继续扩大剂量组，进一步设计了 500，250，150，2. 5，1 μg/皿 5 个剂量组进行重复试验。另设自然回变对照组、溶剂对照组（水）和阳性对照组。

1.5 试验方法

用 Ames 试验标准菌株 TA97、TA98、TA100、TA102，在加与不加 S9 混合液的条件下，多壁碳纳米管以平板掺入法进行 Ames 试验；各菌株每剂量做 2 个平行皿，整个试验重复 3 次。

1.6 统计学处理

记录受试物各剂量组、空白对照（自发回变)组、溶剂对照组以及阳性诱变剂对照组的每皿回变菌落数，以均数±标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示。

如果受试物的回变菌落数是溶剂对照组回变菌落数的两倍或两倍以上，并呈剂量－效应关系，则该受试物判定为致突变阳性。

受试物经上述四个试验菌株测定后，只要有一个试验菌株，无论在加 S9 或未加S9 条件下为阳性，均可报告该受试物对鼠伤寒沙门菌为致突变阳性。如果受试物经四个试验菌株检测后，无论加 S9 和未加 S9 均为阴性，则可报告该受试物为致突变阴性。

2 结 果

2.1 多壁碳纳米管 **Ames** 试验结果

结果见表 1。

2.2 多壁碳纳米管 **Ames** 试验放大剂量结果

结果见表 2。

表 **1** 多壁碳纳米管回变菌落数试验结果（个/皿，$\bar{x}\pm s$)

菌群	组别	自然对照组	多壁纳米管悬浊液					溶剂对照组	阳性对照组
			100 μg/皿	50 μg/皿	25 μg/皿	10 μg/皿	5 μg/皿		
TA97	S9(－)	118±14	293±32	271±24	265±16	248±9	189±14	123±11	
	S9(+)	120±16	286±35	301±24	268±16	256±21	204±13	119±16	1 132±331(2-AF 10. 0 μg/皿)
TA98	S9(－)	38±11	34±9	33±9	32±6	33±12	38±7	34±4	
	S9(+)	35±6	33±8	35±9	33±5	39±4	37±5	34±8	2 741±242(2-AF 10. 0 μg/皿)
TA100	S9(－)	148±16	156±19	154±23	147±12	146±15	151±8	149±12	3 568±324(NaN_3 1. 5 μg/皿)
	S9(+)	147±15	153±14	148±16	149±20	144±12	150±17	142±19	1 683±169(2-AF 10. 0 μg/皿)
TA102	S9(－)	243±14	544±23	543±26	484±23	370±21	326±11	239±21	
	S9(+)	248±19	526±36	485±23	465±36	426±9	341±14	263±12	254±36(2-AF 10. 0 μg/皿)

表 **2** 多壁碳纳米管回变菌落数试验结果（个/皿，$\bar{x}\pm s$)

菌群	组别	自然对照组	多壁纳米管悬浊液					溶剂对照组	阳性对照组
			500 μg/皿	250 μg/皿	150 μg/皿	2. 5 μg/皿	1 μg/皿		
TA97	S9(－)	128±12	347±24	334±9	325±6	208±7	175±16	126±14	
	S9(+)	131±19	352±12	325±20	323±6	191±7	170±3	125±8	1 249±186(2-AF 10. 0 μg/皿)
TA98	S9(－)	35±9	38±9	32±4	33±6	33±6	34±9	36±11	
	S9(+)	41±4	36±8	32±9	31±5	33±4	34±5	35±10	2 583±198(2-AF 10. 0 μg/皿)
TA100	S9(－)	148±16	157±21	154±23	147±18	151±12	138±8	144±12	4 204±451(NaN_3 1. 5 μg/皿)
	S9(+)	149±15	151±14	146±16	149±11	142±12	150±17	145±21	1 536±324(2-AF 10. 0 μg/皿)
TA102	S9(－)	238±22	560±7	504±45	545±5	350±12	320±18	256±19	
	S9(+)	249±19	608±59	520±73	538±6	350±6	310±29	248±16	242±23(2-AF 10. 0 μg/皿)

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.3 多壁碳纳米管的剂量效应关系

表 1、表 2 结果显示，多壁碳纳米管在实验剂量范围内对 TA97、TA102 具有潜在的致突变性。为进一步说明多壁碳纳米管对 TA97、TA102 的潜在致突变性的剂量效应关系，将表 1、表 2 的相关数据导入到散点图中，结果见图 1、图 2。

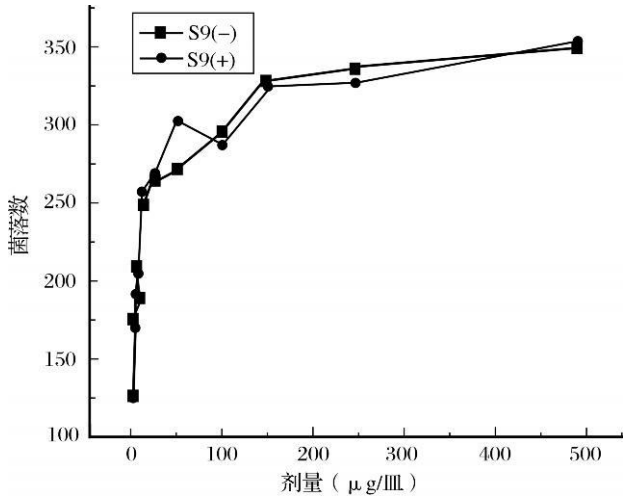

图 1 在不同浓度的多壁碳纳米管作用下 TA97 回变菌落数的散点图

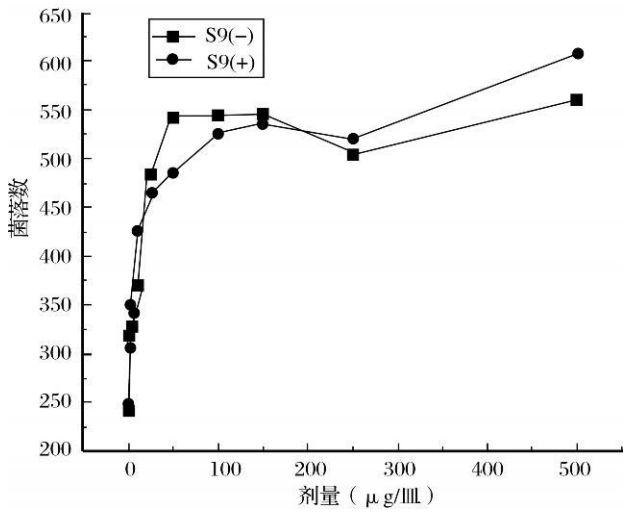

图 2 在不同浓度的多壁碳纳米管作用下 TA102 回变菌落数的散点图

3 讨 论

遗传毒性试验目前已有 200 多种试验方法，但常规使用的仅约 20 种。由美国加州大学 Ames[6] 于 1975 年建立的 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[7]。该法利用鼠伤寒沙门菌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。

本研究的受试物——多壁碳纳米管不溶于水及 DMSO，故采用悬浊液的形式，为保证每平皿的设计浓度，在每次加受试物时，均先将悬浊液摇匀，后立即吸取加入到装有顶层培养基和菌液的 5 ml 离心管中，轻摇并使受试物与菌液、顶层培养基充分混合，然后倾入底层培养基平板上。

本次研究采用 TA97、TA98、TA100 和 TA102 这一套标准菌株，对多壁碳纳米管进行了 Ames 实验，开展生物安全性的研究。实验选用平板掺入法，参照鼠伤寒沙门菌回复突变试验（Ames 试验）。结果显示多壁碳纳米管在 S9 活化和非活化两种测试条件下，1~ 500 μg/皿，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 1~ 10μg/皿，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 10~ 500μg/皿，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，并有剂量效应趋势。说明多壁碳纳米管在试验剂量内具有碱基置换及移码型的直接诱变特性；并且，在微粒体酶参与下，多壁碳纳米管兼有碱基置换和移码型的间接诱变特性。此外，实验设阴性对照组、阳性对照组以说明菌株的标准性，保证结果的可靠性；肝 S9 活化系统旨在模拟体内代谢系统，并进一步证明受试物在体内代谢后其产物的致突变性。

对于多壁碳纳米管的“三致”效应的综合评价还需结合骨髓细胞微核试验、小鼠精子实验等其他体内、外实验结果进行。

参考文献

[1] Lam CW, James JT, McCluskey R, *et al*. Pulmonary toxicity of single-wall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation [J]. Toxicol Sci, 2004, 77(1): 126-134.

[2] Warheit DB, Laurence BR, Reed KL, *et al*. Comparative pulmonary toxicity assessment of single-wall carbon nanotubes in rats [J]. Txoicol Sci, 2004, 77(1): 117-125.

[3] Muller J, Huaux F, Moreau N, *et al*. Respiratory toxicity of multi-wall carbon nanotubes [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2005, 207(3): 221-231.

[4] Jia G, Wang HF, Lei Y, *et al*. Cytotoxicity of carbon nanomaterials: single-wall nanotube, multi-wall nanotube, and fullerene [J]. Environ Sci Technol, 2005, 39(5): 1378-1383.

[5] 王亚其，李宏霞，肖凯，等. 两种诱导方法制备大鼠肝 S9 在两种遗传毒性试验中活性比较 [J]. 现代防医学，2006，33(4): 457-463.

[6] Ames BN, Mccann J, Yamasaki E, *et al*. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test [J]. Mutat Res, 1975, 31(6): 347-364.

[7] 郝和平. 医疗器械生物学评价实施指南 [M]. 北京：中国标准出版社，2000: 16.

（收稿日期：2010-03-22）
（李川 编辑）

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net