

文章编号:1004 - 616X(2001)01 - 0032 - 04

论著 ·

茶蛋白液预防辐射引起的突变效应

李 燕¹,蔡东联¹,夏雪君¹,陈小莉¹,胡同杰¹,袁静珏¹,肖作平²

(1. 第二军医大学长海医院营养科、中国人民解放军临床营养中心,上海 200433;2. 第二军医大学长海医院放射治疗中心,上海 200433)

摘要:目的:研究茶叶中的茶蛋白抵抗电离辐射所引起的突变效应。方法:Ames 试验、V79 细胞染色体畸变试验、小鼠嗜多染红细胞(PCE)微核试验和显性致死试验。结果:茶蛋白可抵抗⁶⁰Co 辐射对沙门氏菌的诱变作用,降低中国仓鼠肺 V79 细胞的染色体畸变数,使小鼠 PCE 微核数明显减少,对⁶⁰Co 辐射引起小鼠的显性致死损害有保护作用。结论:茶蛋白液可防护⁶⁰Co 辐射所致突变效应,可以认为茶蛋白对预防放射治疗时引起的致突变效应有保护作用,对茶蛋白用于临床治疗有参考意义。

关键词:茶蛋白;抗辐射效应;Ames 试验;染色体畸变试验;PCE 微核试验;显性致死试验

中图分类号:R459.3

文献标识码:A

有关资料表明细胞发生突变后,有可能转变为癌变或是畸变¹。在可以引起体细胞突变的众多环境因素中:电离辐射可以引起 DNA 的损伤,进而使细

胞发生突变;体内物质代谢时所产生的过氧化物,也可以引起细胞遗传物质的突变²⁻⁶。因此,如果能消除辐射的不良影响,就可以防止细胞发生突变,进

收稿日期:2000 - 02 - 29;修回日期:2000 - 04 - 04

作者简介:李 燕(1976 -),女,江苏盐城人,医师,医学硕士,从事临床营养和食品毒理研究。

2.2 同工酶异常改变 本组癌症患者血清 LDH 同工酶的改变,大部分呈 LDH₁、LDH₂,减低和 LDH₄、LDH₅ 增高趋势,并表现为 LDH₃ 明显增高(15.88% ~ 54.51%)和高阳性率(71.43% ~ 93.75%)的特征。详见表 1,2。

3 讨论

肿瘤组织中糖酵解速度明显高于正常组织,故恶性肿瘤组织的血清 LDH 总酶活力明显升高,最高可达正常的 6 倍⁴。本组观察例数较多者,其 LDH 总活力升高的阳性率为 14.29% ~ 76.92%,升高均值为正常值的 3.91% ~ 58.26%,其中一例腮腺混合瘤升高值为正常均值的 153.86%,与文献报道相符。提示各种组织细胞癌变时,其糖酵解作用增强。

文献报道⁴,人类成年正常组织具有各自特异的 LDH 同工酶谱,当发生癌变时,其同工酶的特异图谱消失,与恶性肿瘤在形态上的反分化趋同胚胎组织的改变一样,它们的 LDH 同工酶也“反分化”而趋向胚胎型酶谱,即细胞一旦癌变,则又重新变为 M 亚基增加,H 亚基减少为特点。(人体组织在胚胎时期 M

亚基占优势,随着胚龄的增加,H 亚基随之增加,而 M 亚基减少或消失)。不同组织来源的各种肿瘤之间酶谱却较接近,多以 LDH₁、LDH₂ 减少及 LDH₄、LDH₅ 增加为特点。本组观察完全符合这一特点,说明在恶性组织中胚胎型同工酶呈现增加趋势。

本组观察发现,不论正常人或癌症病人血清的 LDH 同工酶谱,均表现为 LDH₂ > LDH₁ > LDH₃ > LDH₄ > LDH₅,其原因系 M 亚基在血浆中的半衰期比 H 亚基短的缘故⁴。癌症患者 LDH₃ 均值与正常均值相比,均明显增高,其原因系细胞癌变后,同工酶谱向胚胎型酶谱转化之故。

参考文献:

- 1 王顺祥,魏经建,段志友,等. 血清乳酸脱氢酶及其同工酶对肝癌诊断价值的探讨 J. 癌症,1987,3: 205 ~ 208.
- 2 王顺祥,魏经建,段志友,等. 血清 LDH 同工酶检测在食管癌和贲门癌诊断上的应用 J. 肿瘤防治研究,1988,1: 11 ~ 13.
- 3 崔福生. 医学生化检验手册 M. 天津:天津科学技术出版社,1982. 297 ~ 300.
- 4 王顺祥. 肿瘤酶学研究 M. 北京:中国科学技术出版社,1996. 302 ~ 310.

而可以预防肿瘤的发生⁷。以往的研究证实茶叶含有多种抗突变的成分,有抗突变的作用^{8~13}。本文主要是研究茶蛋白抗辐射引起的致突变效应,为开展茶叶或是茶蛋白防癌和抗癌研究提供试验依据。

1 材料与方法

按照文献 14 的方法进行试验。

1.1 沙门氏菌回变试验(Ames 试验)

1.1.1 试验菌株选择 用组氨酸缺陷型鼠伤寒沙门氏菌 TA100 为测试菌株,诱变菌落数为 3 000 个/皿左右,自发回变数为 120~200 个/皿。

1.1.2 受试物和剂量设计 茶蛋白制作是将浙江杭州绿茶用水浸泡后得茶渣,将其烘干后粉碎,再用酶水解成蛋白液,蛋白质含量为 4.5 mg/ml。试验剂量为 50 μ l/皿、25 μ l/皿及 12.5 μ l/皿,每个剂量做 3 个平行样品。阳性对照用 2-氨基苄(2-AF),剂量为 10 μ g/皿。

1.1.3 试验步骤 预试验确定⁶⁰Co 照射总剂量为 0.75 Gy,剂量率为 0.89 Gy/min。试验用标准平板掺入法,在 2.5 ml 上层培养基中加菌液 0.1 ml,不同浓度茶蛋白液 0.1 ml,需代谢活化加 S9 0.5 ml,充分混匀后倒在底层培养基上。除阴性对照外,其余的平板均在密闭无菌操作箱中操作,先用⁶⁰Co 照射后于 37 培养 48 h,用自动菌落计数器进行计数。

1.2 中国仓鼠肺 V79 细胞染色体畸变(CA)试验

1.2.1 材料 试验用中国仓鼠肺 V79 细胞株,所用试剂有 1640 液、0.25%胰酶液、3:1 甲醇冰醋酸液、Gimesa 染色液、丝裂霉素 C、0.1%秋水仙素液及 0.45%茶水解蛋白液。

1.2.2 半数抑制浓度(IC₅₀)确定 培养的单层细胞经酶消化制成细胞悬液,接种于培养瓶中,细胞数为 5 $\times 10^6$ 个/瓶。分为 6 组的细胞分别加入茶蛋白,浓度为 0 μ l/ml、12.5 μ l/ml、25 μ l/ml、50 μ l/ml、100 μ l/ml 和 200 μ l/ml,4 h 后换液继续培养。第 2 d 观察细胞生存情况,经试验确定半数抑制浓度为 25 μ l/ml。

1.2.3 辐照剂量确定 将 5 $\times 10^6$ 个/30 ml 细胞分为 7 组,用 25 μ l/ml 的茶蛋白接触 4 h 后换液,继续培养 3 h 后,进行⁶⁰Co 照射,照射剂量率为 0.89 Gy/min。其中阳性对照组只加丝裂霉素 C 0.5 μ g/ml,不照射。阴性对照组不加茶蛋白只加培养液。另 5 组

辐照剂量分别为 0.25 Gy、0.5 Gy、0.75 Gy、1.0 Gy 和 1.25 Gy。辐照后继续培养 24 h,收获细胞前 3 h 时,用秋水仙素阻断,制片,每张片观察 100 个中期相细胞的突变数,计算畸变率。辐照剂量为 0.75 Gy 时可引起细胞突变。

1.2.4 试验方法 将生长期细胞分为 6 组,分别为阴性和阳性对照组;1640 + ⁶⁰Co 照射组;另 3 组分别加茶蛋白 12.5 μ l/ml、25 μ l/ml、和 50 μ l/ml。用茶蛋白干预 4 h 后再继续培养 3 h,用⁶⁰Co 照射按 0.75 Gy,照射后继续培养 24 h,此后步骤同 1.2.3。

1.3 小鼠微核(MN)试验 昆明种小鼠作为试验动物,雄雌各半,体质量为(32.7 \pm 3.5)g,按体质量随机分为茶蛋白高、中、低剂量组,分别按 1:2、1:4、1:8 稀释茶蛋白,设阴性和阳性对照组,每组 10 只,阴性对照组不接受辐照,阳性对照组接受⁶⁰Co 辐照,阴性组和阳性组均给予生理盐水。对各组小鼠进行灌胃,预试验确定⁶⁰Co 剂量为 6 Gy,除阴性对照组不辐照外,其余各组小鼠都按 6 Gy 进行照射。照射后 24 h 处死,取股骨骨髓涂片。每张玻片观察 1 000 个嗜多染红细胞(PCE),计数含微核 PCE 数,计算微核率。

1.4 小鼠显性致死试验

1.4.1 试验动物 用性成熟的雄性昆明种小鼠 50 只,体质量为(32.7 \pm 3.5)g,按体质量随机分为茶蛋白高、中、低试验剂量组,分别按 1:2、1:4 和 1:8 稀释,阴性和阳性对照组,共 5 组,每组 10 只。阴性对照组不接受⁶⁰Co 辐照,阳性对照组接受⁶⁰Co 辐照,2 组均给予生理盐水。预试验确定⁶⁰Co 照射剂量为 6 Gy。雌性小鼠共 700 只,体质量为(24.4 \pm 2.5)g。

1.4.2 交配 于⁶⁰Co 照射第 2 d 开始交配,第 1 wk 每只雄鼠与 2 只雌鼠合笼,以后每 1 wk 另换 2 只未交配过的雌鼠,每 1 wk 合笼时间为 5 d,如此共连续 7 wk。

1.4.3 观察指标 于妊娠第 14 d 处死雌鼠,剖腹取出子宫,观察着床数、晚死胎数及活胎数,在解剖显微镜下观察黄体数。

1.4.4 结果分析和评价 将各组雌鼠全部数据按合笼周次分别计算各项相关指标。

2 结果与讨论

2.1 沙门氏菌回变试验(Ames 试验)的结果见表 1。

表 1. 茶蛋白抗⁶⁰Co 辐射对 TA100 的影响

组别	试验材料和剂量 (/皿)	诱变菌落数 ($\bar{x} \pm s$, /皿)	抑制率 (%)
正常对照组	生理盐水 100 μ l	126.8 \pm 9.6	-
试验对照组	⁶⁰ Co 0.75 Gy	279.3 \pm 11.3	-
阳性对照组	2-氨基苄 2 μ g	296.2 \pm 14.2	-
茶蛋白低剂量组	12.5 μ l/ml	221.5 \pm 21.8 **	20.69
茶蛋白中剂量组	25 μ l/ml	196.3 \pm 12.6 **	29.72
茶蛋白高剂量组	50 μ l/ml	145.1 \pm 19.3 **	48.05

** P<0.01 与试验对照组相比

Ames 试验是目前检测基因突变常用检测系统之一,所用菌株为组氨酸缺陷型鼠伤寒沙门氏菌。由于这些菌株不能合成组氨酸,故在缺乏组氨酸的培养基上,除自发回变的少数细菌外,不能生长,而能诱发回变的诱变物能使生长的细菌大为增多。本试验是在基因水平上用原核生物进行抗辐射危害的研究¹⁴。结果表明正常对照组 TA100 自发回变数在 120 ~ 200 个/皿的范围内,阳性对照组诱变菌落数均大于正常对照的 2 倍,表明试验菌株和试验条件均符合规定要求。茶蛋白对沙门氏菌在辐射条件下,可降低诱变率,减少诱变菌落数 (P<0.01),在一定剂量范围内呈剂量-效应关系,可以认为茶蛋白有抗辐射对沙门氏菌的诱变作用。

2.2 茶蛋白抗辐射对仓鼠肺 V79 细胞染色体畸变作用结果见表 2。

表 2. 茶蛋白抗辐射对仓鼠肺 V79 细胞染色体畸变作用

组别	试验用药及剂量	断裂	环状体	畸变率 (%)
正常对照组	1640 培养液	5	1	6
试验对照组	0.75 Gy ⁶⁰ Co + 1640	67	14	83 **
阳性对照组	丝裂霉素 0.5 μ g/ml	69	9	78 **
茶蛋白低剂量组	12.5 μ l/ml	47	5	52 *
茶蛋白中剂量组	25 μ l/ml	41	1	41 *
茶蛋白高剂量组	50 μ l/ml	39	6	45 *

** P<0.01 与正常对照组相比, * P<0.05 与阳性和试验对照组相比

生物细胞染色体有一定数目和特定的结构,而这些特征相对稳定,如果机体受到致突变作用的影响,染色体固有的数目、形态都可能发生改变,即染色体畸变。通过观察染色体的形态、数目、结构的变化,可检测茶蛋白对细胞抗辐射引起的突变作用,试验属于

体外、真核体细胞在染色体水平上的观察¹⁴。在接受⁶⁰Co 辐照后,中国仓鼠肺 V79 细胞染色体畸变率明显升高 (P<0.01)。在使用茶蛋白后,辐射对中国仓鼠肺 V79 细胞染色体畸变影响降低 (P<0.05)。表明茶蛋白可以对抗⁶⁰Co 辐射对 V79 细胞的影响,降低染色体畸变的发生。

2.3 茶蛋白液抗辐射小鼠 PCE 微核试验 结果见表 3。

表 3. 茶蛋白液抗辐射小鼠 PCE 微核试验

组别	动物数(只)	检查 PCE 数(个)	含微核 PCE 数(个)
正常对照组	10	20 000	6.0 \pm 1
阳性对照组	10	20 000	20.0 \pm 3
茶蛋白低剂量组	10	20 000	6.0 \pm 2 **
茶蛋白中剂量组	10	20 000	4.0 \pm 1 **
茶蛋白高剂量组	10	20 000	2.0 \pm 1 **

** P<0.01 与正常对照组相比

红细胞发育,在 PCE 阶段前有细胞核,进入 PCE 阶段将细胞核排出,因此,成熟红细胞不含细胞核。在某些因素作用下,特别是环境致突变物可以使细胞核断裂,使 PCE 中含有残留的细胞核,通常称为微核。接受放射线照射后,动物体内含微核的 PCE 数明显升高,在一定范围内有剂量-效应关系。茶蛋白可降低受辐照小鼠含微核的 PCE 数,提示对小鼠有抗辐射作用¹¹。结果表明各种浓度的茶蛋白液,均有显著的抗⁶⁰Co 辐射作用,可使小鼠 PCE 微核数明显降低 (P<0.01) 可有效地减少辐射对机体的损害。

2.4 茶蛋白液抗辐射对小鼠的显性致死作用

2.4.1 生殖能力 雄鼠在受⁶⁰Co 辐照第 2 d 开始,与 2 只雌鼠同笼,5 d 后取出雌鼠。根据雌鼠受孕情况,计算生育率和受孕率,结果见表 4。

表 4. 茶蛋白液抗辐射对小鼠生育率和受孕率的影响

组别	生育率 (%)							受孕率 (%)						
	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7
正常对照组	100	100	100	100	100	100	100	85	90	95	90	85	90	95
试验对照组	20	20	10	30	30	20	30	15	20	20	10	15	20	25
茶蛋白低剂量组	30	40	30	50	50	40	60*	45*	40*	55*	50*	65**	60*	75**
茶蛋白中剂量组	30	50*	40*	50	60*	60**	70**	50*	50*	65**	80**	75**	75**	85**
茶蛋白高剂量组	40	50*	50*	60*	60*	60**	70**	45*	55*	65**	80**	75**	90**	90**

** P<0.01, * P<0.05 与试验对照组相比

结果表明各剂量组的茶蛋白均有抗⁶⁰Co 辐射对雄性小鼠生殖细胞的损害作用,并有剂量-效应关系。接受辐照后,雄性小鼠的生育率明显降低,母鼠的受孕率也相应的减少,试验对照组生育率和受孕率均与各试验组有显著性差异(P<0.01, P<0.05)。试验

组生育率与受孕率低于对照组,说明雄鼠受辐照后生殖能力降低,并影响精子发育各阶段。

2.4.2 着床数 根据各组孕鼠着床数、晚死胎数、活胎数计算着床数和平均着床数,结果见表 5。

表 5. 茶蛋白抗⁶⁰Co 辐射对孕鼠着床数和平均着床数的影响

组别	着床数(只) (%)							平均着床率 (%)						
	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7
正常对照组	243	218	229	248	251	296	288	12.3	11.5	14.6	16.7	13.6	15.5	17.2
试验对照组	34	39	21	37	44	45	56	4.3	5.4	4.9	5.6	7.9	7.2	6.8
茶蛋白低剂量组	57	98	69	132*	167**	132**	214**	10.0*	12.4*	12.1*	12.4*	13.1*	12.7*	13.4*
茶蛋白中剂量组	62	110*	142**	143**	211**	226**	254**	13.1*	12.5*	13.2*	14.3*	13.8*	14.4*	15.3*
茶蛋白高剂量组	104*	156**	184**	178**	250**	260**	279**	12.2*	14.2*	17.4*	15.1*	12.9*	13.8*	14.0*

** P<0.01, * P<0.05 与试验对照组相比

小鼠的生殖能力很强,最高的着床点可达 18 个之多¹⁴。试验对照组着床数和平均着床数均显著低于茶蛋白各剂量组(P<0.01, P<0.05)。

2.4.3 着床后死亡数 根据死胎数、着床数、孕鼠数,计算平均活胎数和死胎率。结果见表 6。

表 6. 茶蛋白抗⁶⁰Co 辐射对平均活胎数和死胎率的影响

组别	平均活胎数(只)							死胎率 (%)						
	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7
正常对照组	12.3	11.5	14.6	16.7	13.6	15.5	16.8	0.2	0.0	0.0	0.0	0.3	0.4	0.4
试验对照组	4.3	5.4	4.9	5.6	7.9	7.2	6.8	34.6	42.0	51.2	47.9	42.4	35.2	21.4
茶蛋白低剂量组	9.0*	10.4*	11.3*	11.6*	13.1*	12.7*	13.4*	4.5**	4.0**	2.4**	3.8**	3.2**	2.1**	1.4**
茶蛋白中剂量组	11.1*	10.6*	12.7*	12.8*	13.8*	13.4*	15.3*	3.0**	2.0**	3.7**	3.3**	1.5**	2.1**	1.2**
茶蛋白高剂量组	10.8*	12.2*	13.4*	13.7*	12.9*	14.2*	15.1*	1.4**	2.5**	2.1**	1.5**	1.2**	0.9**	0.04**

** P<0.01, * P<0.05 与试验对照组相比

按受放射线照射后,试验对照组小鼠死胎率明显升高,使用茶蛋白后死胎率显著降低(P<0.01, P<0.05),各剂量组之间有剂量-效应关系。试验对照组死胎率升高,主要是由辐射引起的,而茶蛋白各剂量组死胎率显著降低是茶蛋白的保护作用所致。显

性致死试验(DLA)是体内诱变试验,其观察为显性致死突变。所谓显性致死突变是指发生于配子(精子或卵子)的遗传结构改变,这种改变将导致由配子所产生的合子,或由合子发育而成的胚胎或幼仔的死亡¹⁴。本试验主要研究茶蛋白液抗⁶⁰Co 辐射对雄性

文章编号:1004 - 616X(2001)01 - 0036 - 03

· 论著 ·

偏二氯乙烯/ 氯乙烯共聚物成型品迁移物及其致突变性研究

袁振华, 丁友昌, 查捷

(杭州市卫生防疫站, 浙江 杭州 310006)

摘要:目的:研究偏二氯乙烯/氯乙烯(VDC/VC)共聚物成型品-火腿肠肠衣膜中化学物在常温下向模拟食品溶剂(蒸馏水、4%乙酸和正己烷)中迁移的情况,及迁移物的致突变性。方法:样品前处理方法采用了冻干法和常规法,并进行了比较研究;迁移物的致突变性应用了Ames试验。结果:冻干法所获得的迁移物量要比常规法大6~27倍。对此迁移物经诱变性测试(Ames试验)结果为阴性。结论:这种共聚物在本试验条件下未发现诱变性。

关键词:VDC/VC共聚物;迁移物;致突变性

中图分类号:R114

文献标识码:A

STUDY ON THE MIGRATION AND MUTAGENICITY OF VDC/VC COPOLYMER PRODUCTS

YUAN Zhen - hua , DING You - chang , CHA Jie

(Hangzhou Sanitation and Anti - epidemic Station , Hongzhou 310006 , China)

收稿日期:2000 - 03 - 13;修订日期:2000 - 06 - 27

作者简介:袁振华(1942 -),浙江湖州人,男,主任技师,研究方向:卫生毒理学。

小鼠生殖细胞的影响。综上所述,可以认为茶蛋白对辐射引起小鼠的显性致死损害有保护作用,表现在与试验对照组相比,茶蛋白各组生育率、受孕率、每孕鼠平均着床数、活胎数均与正常对照组相近;每孕鼠平均死胎率均显著低于试验对照组。

本试验结果表明,用茶蛋白对预防接受放射治疗引起的致突变效应有保护作用¹⁵,对茶蛋白用于临床治疗有参考意义。

参考文献:

- 1 Yang CS and Wang ZY. Tea and cancer J. *JNCI*, 1993, 85: 1 038 ~ 1 051.
- 2 Rogers AE, Zeisel SH, Groopman J. Diet and carcinogenesis J. *Carcinogenesis*, 1993, 14(11): 2 205 ~ 2 235.
- 3 蔡东联,赵继军,胡同杰,等. 茶叶防病作用初步总结 J. *中国公共卫生*, 1997, 13(3): 155 ~ 156.
- 4 Han C. Screening of anticarcinogenic ingredients in tea polyphenols J. *Cancer Lett*, 1997, 114(1 - 2): 153 ~ 158.
- 5 Kuroda Y. Bio - antimutagenic activity of green tea catechins in cultured Chinese hamster V79 cells J. *Mutat Res*, 1996, 361(2 - 3): 179 ~ 186.
- 6 Constable A, Varga N, Richoz J, et al. Antimutagenicity and cat-
- echin content of soluble instant teas J. *Mutagenesis*, 1996, 11(2): 189 ~ 194.
- 7 Stavric B, Matula TI, Klassen R, et al. The effect of teas on the in vitro mutagenic potential of heterocyclic aromatic amines J. *Food Chem Toxicol*, 1996, 34(6): 515 ~ 523.
- 8 Stoner GD, Mukhtar H. Polyphenols as cancer chemopreventive agents J. *J Cell Biochem Suppl*, 1995, 22: 169 ~ 180.
- 9 蔡东联,印木泉,陈耀富,等. 40种酱油的致突变性和不同浓度的亚硝酸盐对突变性的影响 J. *第二军医大学学报*, 1990, 11(5): 424 ~ 427.
- 10 蔡东联,印木泉,贺清玉,等. 茶叶对亚硝化处理酱油的致突变性影响 J. *中华预防医学杂志*, 1991, 25(4): 249 ~ 250.
- 11 Yin MQ, Cai DL, Chen YF, et al. Studies on the antimutagens in human environment J. *Carcinog Terat Mutag*, 1993, 5(3): 92 ~ 103.
- 12 蔡东联,梁华,苏峰,等. 茶中微量元素和蛋白质含量与茶叶质量的关系 J. *中国公共卫生*, 1994, 10(11): 516 ~ 518.
- 13 胡同杰,蔡东联,王建军,等. 绿茶预防大鼠脂肪肝的效果 J. *第二军医大学学报*, 1995, 16(3): 261 ~ 264.
- 14 李寿祺. *卫生毒理学基本原理和方法* M. 成都:四川科学技术出版社, 1987. 416 ~ 459.
- 15 Bu - Abbas A, Clifford MN, Walker R, et al. Selective induction of at hepatic CYP1 and CYP4 proteins and of peroxisomal proliferation by green tea J. *Carcinogenesis*, 1994, 15(11): 2 575 ~ 2 579.