

茶多酚二甲亚砷合剂对铀矿尘人支气管细胞毒性的防护作用

黄波^{1,2}, 龙颖², 邱劲松², 黄云², 胡建安¹

(1. 中南大学公共卫生学院, 湖南长沙 410078; 2. 南华大学公共卫生学院, 湖南衡阳 421001)

摘要:目的 探讨铀矿尘所致人支气管细胞 BEAS-2B 细胞 DNA 损伤以及茶多酚二甲亚砷合剂对细胞的防护作用。方法 BEAS-2B 细胞中加入铀矿尘、铀矿尘+茶多酚、铀矿尘+二甲亚砷、铀矿尘+茶多酚二甲亚砷合剂染毒 24 h 后,通过检测微核和多核细胞观察染色体损伤,彗星实验及 H2AX 蛋白磷酸化检测 DNA 的损伤,多核细胞法检测细胞次黄嘌呤磷酸核糖转移酶(HPRT)突变。结果 与正常对照组相比, BEAS-2B 细胞经铀矿尘染毒后,细胞的微核率、多核率和拖尾率明显升高, H2AX 蛋白磷酸化表达增高, HPRT 突变率明显增高($P < 0.05$),铀矿尘+茶多酚、铀矿尘+二甲亚砷和铀矿尘+茶多酚二甲亚砷合剂保护能有效降低上述变化($P < 0.05$),其中茶多酚二甲亚砷合剂的保护效果最好。结论 铀矿尘对 BEAS-2B 细胞 DNA 具有损伤作用,茶多酚二甲亚砷合剂有较强防护作用。

关键词: 铀; 茶多酚; 二甲亚砷; DNA 损伤

中图分类号: R965.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-3002(2012)04-0546-04

DOI: 10.3867/j.issn.1000-3002.2012.04.014

铀(uranium)矿粉尘及其氧化物可通过呼吸道及消化道进入人体形成内辐射,从而发生辐射效应。前期研究发现,铀矿尘能诱发人支气管细胞 BEAS-2B 氧化损伤,二甲亚砷(dimethylsulfoxide, DMSO)和茶多酚(tea polyphenol, TP)一定程度上均能降低这种损伤^[1-2]。本研究通过制备 TP 和 DMSO 合剂,采用 BEAS-2B 细胞作为靶细胞,研究 TP 和 DMSO 合剂对铀矿尘染毒 BEAS-2B 细胞的防护作用,为铀矿尘损伤的医学防护新药开发提供有益的理论和实践依据。

1 材料与方法

1.1 细胞和试剂

BEAS-2B 细胞,本实验室保存。铀矿尘从南华大学核工业铀矿溶浸采矿重点实验室(铀的含量为 4.52%)获得, DMSO 和 6-巯基鸟嘌呤(6-TG)购自 Sigma 公司,茶多酚从无锡太阳绿保科技有限公司获得。铀矿尘用玛瑙研钵研磨后,经 500 目筛过筛,高温高压消毒后用无血清培养液 LHC-8 配成

5 g·L⁻¹混悬液。

1.2 细胞分组和染毒

将指数生长期的 BEAS-2B 细胞分为 5 组:正常对照组、铀矿尘组、TP 保护组、DMSO 保护组、TP+DMSO 合剂保护组。铀矿尘组细胞加入铀矿尘 1.0 g·L⁻¹染毒; TP 保护组、DMSO 保护组和 TP+DMSO 合剂保护组先分别加入 TP 250 mg·L⁻¹, 0.5% DMSO 和 0.5% DMSO+TP 250 mg·L⁻¹, 在 37℃ 下孵育 2 h 后,再分别加入铀矿尘 1.0 g·L⁻¹, 染毒 24 h。

1.3 微核多核细胞检测

细胞染毒后,用冰冷的 PBS 洗净,固定液(甲醇:乙酸=3:1)固定 15 min, Giemsa 染色后,在油镜下观察细胞,计数每 1000 个细胞中微核细胞数和多核细胞数。

1.4 中性单细胞凝胶电泳实验

实验分组与染毒同上,染毒 24 h 后,收集细胞制成悬液;取 100 μl 密度为 1% 正常熔点琼脂糖滴至磨砂玻片上, 4℃ 冷却 10 min;取 10 μl 密度为 5×10⁸ L⁻¹ 上述细胞悬液与 60 μl 低熔点的琼脂糖混匀滴在第一层琼脂糖上, 4℃ 冷却 10 min;在第二层上再滴上 60 μl 低熔点的琼脂糖,盖上盖玻片置于 4℃ 冷却 10 min;将玻片放入 4℃ 细胞裂解液中裂解 2 h;用 0.5% TBE (pH 8.2~8.5)漂洗 3 次,每次 1 h;玻片置于中性缓冲液中, 4℃ 电泳 30 min (25 V, 5 mA); PI 染色 15 min, Olympus 荧光显微镜绿色激发光下观察并拍照;用 CASP 软件分析彗星

基金项目: 国家自然科学基金(81072331), 湖南省教育厅科研基金(07C619)

作者简介: 黄波(1974-), 博士研究生, 副教授, 主要从事环境化学致癌及其医学防护研究; 胡建安(1955-), 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事环境化学物毒性作用研究。

通讯作者: 胡建安, E-mail: jiananhu@xysm.net, Tel: (0731)84805460

细胞数目。

1.5 Western 印迹法检测磷酸化 H2AX (Ser139) 蛋白表达

细胞染毒后,消化离心,收集细胞,加入蛋白裂解液,室温裂解后,离心,收集蛋白。常规 Western 印迹检测磷酸化 H2AX (Ser139) 蛋白表达水平 (15% 聚丙烯酰胺凝胶电泳,0.22 μm NC 膜),用 β 肌动蛋白作为内参。

1.6 次黄嘌呤磷酸核糖转移酶 (hypoxanthine phosphoribosyltransferase, *HPRT*) 基因突变检测

细胞染毒后,用 PBS 洗净,换新鲜的培养液,培养至第 5 代时,分为两部分,一部分加入终浓度为 6-TG 0.1 mmol·L⁻¹ 的 LHC-8 培养液,37℃ 培养 30 h;同时向两部分加入细胞松弛素 B (cytochalasin B) 6 mg·L⁻¹,继续培养 42 h;胰蛋白酶消化,制备细胞悬液,固定液 (甲醇:乙酸 = 3:1) 固定;细胞悬液滴片,Giemsa 染色,干燥后,光镜下计数 5000 个细胞,记录在同一胞浆内具有完整核膜的双核或多核细胞 (包括相压、相切和分离的双核或多核细胞数)。含有 6-TG 培养细胞中的 1000 个细胞中双核或多核细胞数除以不含 6-TG 培养的 1000 个细胞中双核或多核细胞数,所得结果为 *HPRT* 基因位点突变频率 (%)。

1.7 统计学分析

实验结果数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析,组间两两比较采用 χ^2 检验进行分析。

2 结果

2.1 茶多酚二甲亚砷合剂对铀矿尘致细胞微核多核发生的影响

由表 1 可见,与正常对照组比较,铀矿尘 1.0 g·L⁻¹ 能诱发 BEAS-2B 细胞微核细胞数及多核细胞数增加 ($P < 0.05$)。与铀矿尘组相比,TP,

DMSO 和 TP + DMSO 合剂保护组对铀矿尘诱发 BEAS-2B 细胞微核细胞数及多核细胞数增加有明显的抑制作用 ($P < 0.05$)。其中,TP + DMSO 合剂保护组的抑制作用较 TP 保护组和 DMSO 保护组更为明显 ($P < 0.05$)。

Tab.1 Effect of tea polyphenol (TP) and dimethylsulfoxide (DMSO) mixture on micronuclei increase induced by uranium dust

Group	Micronuclei rate/%	Multi-nuclear rate/%
Normal control	8.2 ± 0.5	5.5 ± 2.1
Uranium	68.8 ± 1.7*	62.2 ± 4.1*
Uranium + TP	42.2 ± 1.7 ^{#Δ}	47.5 ± 1.3 ^{#Δ}
Uranium + DMSO	51.5 ± 1.3 ^{#Δ}	49.8 ± 5.3 ^{#Δ}
Uranium + TP + DMSO	39.8 ± 1.0*	30.2 ± 2.1*

$\bar{x} \pm s, n = 4$. * $P < 0.05$, compared with normal control group; # $P < 0.05$, compared with uranium group; Δ $P < 0.05$, compared with uranium + TP + DMSO group.

2.2 茶多酚二甲亚砷合剂对铀矿尘致细胞拖尾数增多的抑制作用

由表 2 可见,与正常对照组相比,在彗星实验中,可见铀矿尘诱发 BEAS-2B 细胞拖尾数和尾部 DNA 含量明显增加,彗星尾长明显延长 ($P < 0.05$),表明铀矿尘对 BEAS-2B 细胞 DNA 具有明显的损伤作用。与铀矿尘组相比较,TP, DMSO 和 TP + DMSO 合剂保护组对铀矿尘诱发的细胞 DNA 的损伤具有明显的抑制作用 ($P < 0.05$)。TP + DMSO 合剂保护组的抑制作用较 TP 保护组和 DMSO 保护组更为明显 ($P < 0.05$)。

2.3 茶多酚二甲亚砷合剂对磷酸化 H2AX 蛋白表达的影响

由图 1 可见,而 H2AX (Ser139) 蛋白表达条带中,铀矿尘组灰度最高;TP, DMSO 和 TP + DMSO 合剂保护组条带灰度均低于铀矿尘组,其中以 TP + DMSO 合剂保护组灰度最低。表明铀矿尘能

Tab.2 Effect of TP and DMSO mixture on increased number of tailing cells induced by uranium dust

Group	Tailing cell number	Tailing rate/%	Tailing DNA/%	Tailing length/μm
Normal control	10 ± 1	4.9	12 ± 6	35 ± 14
Uranium	109 ± 4*	54.4	28 ± 4*	72 ± 21*
Uranium + TP	71 ± 1 ^{#Δ}	35.6	20 ± 6 ^{#Δ}	48 ± 13 ^{#Δ}
Uranium + DMSO	78 ± 4 ^{#Δ}	38.9	21 ± 6 ^{#Δ}	59 ± 16 ^{#Δ}
Uranium + TP + DMSO	56 ± 5 [#]	28.1	14 ± 8 [#]	42 ± 18 [#]

$\bar{x} \pm s, n = 4$. * $P < 0.05$, compared with normal control group; # $P < 0.05$, compared with uranium group; Δ $P < 0.05$, compared with uranium + TP + DMSO group.

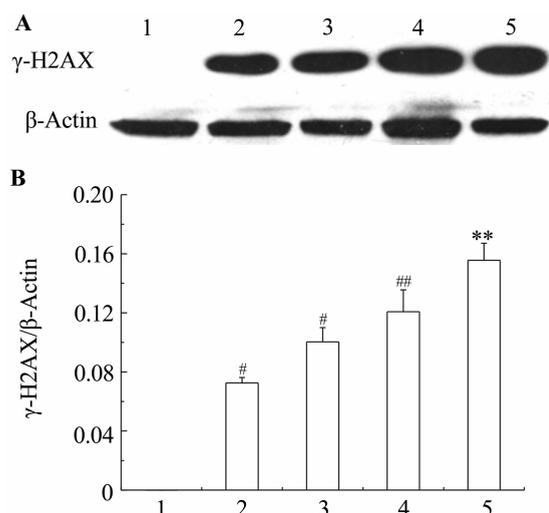


Fig. 1 Effect of TP and DMSO mixture on phospho-histone H2AX increased expression induced by uranium dust by Western blotting. Lane 1: normal control; lane 2: uranium + TP + DMSO; lane 3: uranium + DMSO; lane 4: uranium + TP; lane 5: uranium. B was the semi-quantitative result of A. $\bar{x} \pm s$, $n = 4$. ** $P < 0.01$, compared with normal control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, compared with uranium group.

诱发 BEAS-2B 细胞 H2AX (Ser139) 磷酸化增加, 具有较强的损伤 DNA 能力; 而 TP, DMSO 和 TP + DMSO 合剂保护组能有效减少 H2AX (Ser139) 磷酸化, 具有抑制 DNA 损伤的能力, 其中 TP + DMSO 合剂保护组的保护作用最强。

2.4 茶多酚二甲亚砷合剂对 HPRT 基因突变的影响

表 3 结果表明, 与正常对照组相比, 铀矿尘组可引起细胞 HPRT 基因突变率显著增高 ($P < 0.05$); 与铀矿尘组相比, TP, DMSO, TP + DMSO 合剂保护组可抑制铀矿尘引起的突变率增高 ($P < 0.05$)。

Tab. 3 Effect of TP and DMSO mixture on uranium dust-induced hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT) gene mutation rate

Group	Mutant rate/%
Normal control	0.307 ± 0.015
Uranium	1.255 ± 0.012 *
Uranium + TP	0.725 ± 0.330 ^{#Δ}
Uranium + DMSO	0.925 ± 0.060 ^{#Δ}
Uranium + TP + DMSO	0.560 ± 0.013 *

$\bar{x} \pm s$, $n = 4$. * $P < 0.05$, compared with normal control group; # $P < 0.05$, compared with uranium group; $\Delta P < 0.05$, compared with uranium + TP + DMSO group.

3 讨论

铀矿粉尘可使铀矿工肺癌高发^[3-4], 但其致癌机制尚未明了。由于铀矿尘的接触人群多, 影响长

远, 因此铀矿尘的毒性机制研究及相关医学防护制剂的研制是亟待解决的问题。

本研究发现, BEAS-2B 细胞经铀矿尘染毒后与正常对照组比较细胞的微核率、多核率和拖尾率升高, H2AX 蛋白磷酸化表达增高, HPRT 突变率增高, 3 个保护组能有效降低上述变化, 其中 TP + DMSO 合剂保护组的保护效果最好。说明 TP + DMSO 合剂对铀矿尘引起的 DNA 和染色体损伤具有较强的保护作用。

众多研究表明, HPRT 基因突变与肿瘤的发生有关, HPRT 基因的突变广泛存在于环境中, 基因重组是引起肿瘤发生的重要机制。细胞 DNA 错配修复 (mismatch repair) 系统功能缺陷的人类肿瘤细胞自发 HPRT 突变频率比功能正常的肿瘤细胞高 50 ~ 750 倍^[5-6]。

γ -H2AX 的形成是一个快速敏感的细胞反应, 当环境和代谢等因素使细胞和动物体内的染色质 DNA 发生双链断裂时, SQ 基序的 139 位丝氨酸残基快速发生磷酸化形成 γ -H2AX。因此, 可以根据 γ -H2AX 的表达高低来判断细胞 DNA 受损的情况^[7-8]。

TP 是从绿茶中提取的多酚类化合物, 具有强大的清除自由基和抗氧化性能, 生物学作用广泛^[9-10]。加入 TP 后对铀矿尘诱发 BEAS-2B 细胞内外活性氧的增高具有明显抑制作用, 乳酸脱氢酶的外溢也大大减少, 从而有效地抑制了遗传毒性。

DMSO 是优良的双亲性强的极性有机溶剂, 作为自由基清除剂和辐射损伤保护剂的应用研究颇受关注。Huang 等^[11]发现, 其对铀矿尘诱发 BEAS-2B 细胞内外活性氧增高、DNA 损伤和体外转化有明显抑制作用。DMSO 对铀矿尘作用于 BEAS-2B 细胞后, 可引起细胞 DNA 的断裂, 造成细胞拖尾率、彗星尾部 DNA 含量、尾长、尾部面积和尾距增加具有较好的抑制作用^[1]。

由于体内的自由基反应是链式反应, 利用复合式抗氧化剂抑制自由基对生物体的损伤已成为国内外新的研究热点。具有不同的活性、存在形式、作用位点、相对分子质量大小和脂水溶解性质的抗氧化剂或自由基清除剂之间有相互替代补充和协同增强作用。在本研究中也发现 TP + DMSO 合剂的防护效果最好。

参考文献:

[1] Li SZ, Huang B, Huang R, He XP. The protection of DMSO to cytotoxic of human bronchial epithelial cell

- caused by uranium mine dust[J]. *China Med Eng*(中国医学工程), 2008, **16**(1):26-28,31.
- [2] Huang B, Long Y, Luo ZH, Huang R, He XP. Protective effects of tea polyphenols on oxidative damage induced by uranium-mineral dust in BEAS-2B cells[J]. *Chin J Public Health*(中国公共卫生), 2011, **27**(3):284-286.
- [3] Gulson BL, Mizon KJ, Dickson BL, Korsch MJ. The effect of exposure to employees from mining and milling operations in a uranium mine on lead isotopes – a pilot study [J]. *Sci Total Environ*, 2005, **339**(1-3):267-272.
- [4] Wen JA, Jiang RY, Chang XQ, Zhong R, Gu JJ, Wang WA, et al. Study on mortality of a cohort of miners in a Chinese uranium mine during 1958 – 1997[J]. *Radiat Protection*(辐射防护), 2002, **22**(1):44-50.
- [5] Ao L, Liu SX, Yang MS, Fong CC, An H, Cao J. Acrylamide-induced molecular mutation spectra at *HPRT* locus in human promyelocytic leukaemia HL-60 and NB4 cell lines[J]. *Mutagenesis*, 2008, **23**(4):309-315.
- [6] Havla JB, Hill CE, Abdel-Rahman SZ, Richter E. Evaluation of the mutagenic effects of myosmine in human lymphocytes using the *HPRT* gene mutation assay [J]. *Food Chem Toxicol*, 2009, **47**(1):237-241.
- [7] Kuo LJ, Yang LX. Gamma-H2AX-a novel biomarker for DNA double-strand breaks[J]. *In Vivo*, 2008, **22**(3):305-309.
- [8] Ewald B, Sampath D, Plunkett W. H2AX phosphorylation marks gemcitabine-induced stalled replication forks and their collapse upon S-phase checkpoint abrogation [J]. *Mol Cancer Ther*, 2007, **6**(4):1239-1248.
- [9] Thangapazham RL, Singh AK, Sharma A, Warren J, Gaddipati JP, Maheshwari RK. Green tea polyphenols and its constituent epigallocatechin gallate inhibits proliferation of human breast cancer cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *Cancer Lett*, 2007, **245**(1-2):232-241.
- [10] Yamada H, Watanabe H. Tea polyphenols in preventing cardiovascular diseases [J]. *Cardiovasc Res*, 2007, **73**(2):439-440.
- [11] Huang B, Chen F, Yang ZH, Pan XJ, Cao ZS, Zhu MX. Oxidative damage of BEAS-2B cells induced by depleted uranium and protection by DMSO [J]. *Chin J Radiol Med Prot*(中华放射医学与防护杂志), 2009, **29**(2):143-146.

Protection of tea polyphenol and DMSO mixture against uranium dust-induced cytotoxicity in human bronchial epithelial cells

HUANG Bo^{1,2}, LONG Ying², QU Jin-song², HUANG Yun², HU Jian-an¹

(1. College of Public Health, Central South University, Changsha 410078, China;

2. College of Public Health, University of South China, Hengyang, 421001, China)

Abstract: **OBJECTIVE** To observe the uranium dust-induced DNA damage in BEAS-2B cells and the protective effect of tea polyphenol (TP) and DMSO mixture. **METHODS** Uranium dust, uranium + TP, uranium + DMSO, uranium + TP + DMSO were added into BEAS-2B cells for 24 h. Chromosomal damage was observed by micronucleus and multinuclear cells, DNA damage by comets assay, and expression of H2AX phosphorylated proteins and hypoxanthine phosphoribosyl-transferase (*HPRT*) gene mutations were assayed by multinucleated cell method. **RESULTS** Compared with normal control group, the micronucleus rate, multinuclear rate, tailing rate, expression of H2AX protein phosphorylation and *HPRT* gene mutation rate in BEAS-2B cells were significantly increased ($P < 0.05$) after BEAS-2B cells were exposed to uranium dust. Uranium + TP, uranium + DMSO and uranium + TP + DMSO effectively reduced the changes ($P < 0.05$). Uranium + TP + DMSO mixture had the best protective effect. **CONCLUSION** Uranium dust can cause DNA damage in BEAS-2B cells. TP and DMSO mixture has a stronger protective effect.

Key words: uranium; tea polyphenol; dimethyl sulfoxide; DNA damage

Foundation item: The project supported by National Natural Science Foundation of China (81072331); and Hunan Provincial Department of Education Research Fund (07C619)

Corresponding author: HU Jian-an, E-mail: jiananhu@xysm.net, Tel: (0731)84805460

(收稿日期: 2011-11-29 接受日期: 2012-03-21)

(本文编辑: 付良青)