文章编号: 1001-0580(2009)02-0217-02 中图分类号: R 15 文献标志码: A 【实验研究】

牛磺酸对苯并(a)芘致 *L*-02细胞损伤保护作用*

吴姗芸[1], 鲁力[1], 林辉[2], 鲁文清[2], 肖德强[1], 李习艺[1], 曾高峰[1]

摘 要: 目的 研究牛磺酸对苯并(a)芘(B(a)P)致人胚肝细胞(L-02细胞)染色体损伤的保护作用。方法 以 L-02细胞为靶细胞, 按完全随机设计分成 5组: (1)空白对照组; (2)溶剂对照组; (3) B(a)P染毒组: 设 12.5, 25, 50μmol/L3个剂量染毒细胞; (4)牛磺酸组: 设 1.0, 2.0, 4.0mmol/L3个浓度, 加入培养体系后继续培养 24h; (5)牛磺酸预防组: L-02细胞先以 3个不同浓度的牛磺酸预处理 24h, 再加入 25μmol/L的 B(a)P培养 24h。各组均设 3个平行样。收获细胞后用微核实验检测染色体损伤, 计算微核率和核分裂指数。结果 牛磺酸单独作用于 L-02细胞时, 与空白对照组比较, 中、高浓度牛磺酸诱导的微核率降低, 核分裂指数增高, 差异有统计学意义。从低到高 3个剂量 B(a)P单独染毒 L-02细胞诱导的微核率为(34.67±2.52), (45.33±4.16), (60.00±7.21)%。核分裂指数分别为 1.326±0.034, 1.228±0.006, 1.148±0.012, 与溶剂对照组比较微核率升高, 核分裂指数降低, 差异有统计学意义, 且两者均呈明显的剂量-反应关系。低、中、高浓度牛磺酸预防组诱导的微核率对应为(30.33±3.51), (25.67±1.53)和(23.00±1.00)%。均比单纯 25μmol/L B(a)P染毒组诱导的微核率降低, 差异有统计学意义。低、中、高浓度牛磺酸预防组对应的核分裂指数为 1.455±0.011, 1.474±0.015和 1.1492±0.013, 比单纯 25μmol/L B(a)P染毒诱导的核分裂指数高, 差异有统计学意义, 且两者均呈剂量-反应关系。结论 B(a)P能诱导肝细胞染色体损伤, 且存在明显的剂量-反应关系; 牛磺酸预处理对 B(a)P引起的肝细胞毒性具有明显保护作用。

关键词: 牛磺酸; 苯并(a)芘; 人胚肝细胞; 微核实验

Effect of taurine on micronuclei formation of L-02 cells exposed to benzo(a) pyrene *WU Shan-yun, LU Li, LIN Hui, et al. Nutritional Scientific Research Center, School of Public Health, Guangxi Medical University (Nanning 530021, China)*

Abstract Objective To investigate the protective effect of taurine on chromosome damage of human derived fetal hepatocytes (L-02 cells) induced by benzo(a) pyrene (B(a)P). **Methods** L-02 cells were randomized divided into 5 groups: blank control group (Ⅰ); solvent control group (Ⅱ); B(a)P group (Ⅲ): exposed to B(a)P at concentration of 12.5, 25, 50μmol/L, in culture medium for 24 hours; taurine group (Ⅳ): exposed to taurine at the concentration of 1.0, 2.0, 4.0mmol/L in culture medium for 24 hours; taurine preventive group (Ⅴ): exposed to taurine at three different concentration in culture medium for 24 hours and treated further for 24 hours by adding 25μmol/L B(a)P into the culture media. Chromosome damage was detected by cytokinesis-block micronucleus assay (CBMNT). The frequencies of MN (‰) and nuclei division index (NDI) were calculated. **Results** Compared with the blank control, taurine at concentrations of 2.0 and 4.0mmol/L induced a significant decrease in MN frequencies and an increase in NDI in L-02 cells. Compared with the solvent control, B(a)P at concentrations of 12.5, 25 and 50μmol/L induced a significant enhancement of MN frequencies and a reduce in NDI. Compared with the 25μmol/L B(a)P group, pretreatment with taurine could induce a significant decrease in MN frequencies and an increase in NDI in L-02 cells. The reductions of MN frequency and NDI showed a dose-effect manner. **Conclusion** B(a)P could induced chromosome damage in dose-effect manner. Taurine could play a protective role in hepatic cytotoxicity induced by B(a)P.

Key words taurine; B(a)P; L-02 cells; micronuclei test

苯并(a)芘[Benzo(a) Pyrene, B(a)P]在体内主要由肝脏代谢, 经酶代谢活化可生成终致癌物, 引起 DNA损伤, 启动致突变、致癌过程[1]。牛磺酸(taurine)是体内含量最丰富的氨基酸, 研究发现牛磺酸可通过减轻脂质过氧化, 而拮抗某些毒物、药物的肝毒性, 并有拮抗人胚肝细胞(L-02细胞)DNA损伤的作用[2,3]。鉴于人胚肝细胞有较完整的代谢酶系, 本课题通过微核实验观察 B(a)P致人胚肝细胞的微核率和核分裂指数, 研究染色体的损伤及牛磺酸对其的保护作用。

1 材料与方法

1.1 材料 人胚肝细胞(武汉大学中国典型培养物保藏中心); B(a)P, 二甲基亚砜(DMSO)、牛磺酸、细胞松弛素 B(美国 Sigma公司); DMEM培养基和新生小牛血清(美国 Gibco公司); 胰蛋白酶(美国 Amresco公司); 其他试剂皆为国产分析纯。

1.2 细胞培养 L-02细胞在含 10%新生小牛血清的 DMEM培养基中, 于 37℃、5% CO_2的培养箱中培养。L-02细胞生长状态良好, 处于对数生长期时可用于实验。

1.3 胞质分裂阻滞法微核实验(CBMNT) 将 L-02细胞按 5×10^5接种于 100ml细胞培养瓶中, 加 10%新生小牛血清, 再加 DMEM培养基至 5ml, 于 37℃、5% CO_2的培养箱中培养 24h后, 当细胞密度为 50%~60%时开始实验。牛磺酸设 1.0, 2.0, 4.0mmol/L 3个浓度, B(a)P设 12.5, 25, 50μmol/L 3个剂量。实验按完全随机设计分成 5组: (1)空白对照组; (2)溶剂对照组: 加入 DMSO; (3) B(a)P染毒组; (4)牛磺酸组: 各个浓度加入培养体系后继续培养 24h; (5)牛磺酸预防组: L-02细胞先以 3个不同浓度的牛磺酸预处理 24h, 再加入 25μmol/L的 B(a)P培养 24h。5个组每种物质、每种浓度均设 3个平行样。染毒结束后更换培养基, 加入 10μl细胞松弛素 B(3μg/ml), 培养 24h。收获细胞时, 通过

* 基金项目: 广西自然科学基金(桂科自 0640115)
作者单位: 1. 广西医科大学公共卫生学院营养科学研究中心, 南宁 530021; 2. 华中科技大学同济医学院公共卫生学院职业与环境卫生学教研室
作者简介: 吴姗芸(1983-), 女, 广西人, 硕士在读, 研究方向: 营养与健康。
通讯作者: 鲁力

胰蛋白酶消化细胞,收集细胞离心后用 KCl低渗处理细胞,再次同样条件和时间离心后加入固定液(乙酸和甲醇按 3∶1比例配制),离心,重复固定 2次后滴片,以 10%的 Giemsa染色 13 min,用清水冲洗风干后用树胶封片保存。每个样本在光学显微镜 400×10倍镜下记数单核、双核、三核及四核细胞,总数记达 500个以上。计算核分裂指数(NDI) = (MI+ 2MII + 3MIII+ 4MIV)/总细胞数,其中 MI至 MIV分别代表单核细胞到四核细胞的细胞数。同时计数 1000个双核细胞中的微核(MN)数[4]。

1.4 统计分析 所有数据采用 SPSS 10.0统计软件进行统计处理,计量资料进行单因素方差分析,各实验组与对照组间比较用 Dunnett-*t*检验。

2 结 果

2.1 牛磺酸对 L-02细胞单独作用时微核的影响(表 1) 表 1可见,与空白对照组比较,2.0和 4.0 mmol/L牛磺酸作用于 L-02细胞诱导的微核率明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。而 1.0 mmol/L牛磺酸作用于 L-02与空白对照组微核率比较,差异无统计学意义,核分裂指数与其相一致。

表 1 牛磺酸对 L-02细胞单独作用的微核率和核分裂指数($\bar{x} \pm s$)

组别(mmol/L)	微核率(‰)	NDI
空白对照	14.33±2.08	1.510±0.012
牛磺酸 1.0	13.33±1.15	1.517±0.003
2.0	10.33±1.15[a]	1.529±0.007[a]
4.0	10.00±1.00[a]	1.533±0.011[a]

注:与空白对照组相比,a$P < 0.05$。

2.2 B(a)P对 L-02细胞单独染毒时微核的影响(表 2) 用 B(a)P对 L-02细胞单独染毒时,可见随着 B(a)P浓度的升高,其诱导的微核率与溶剂对照组(DMSO)相比,呈剂量依赖性显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$或 $P < 0.01$)。B(a)P所有染毒浓度所产生的 NDI与 DMSO对照组相比均有显著下降,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

表 2 B(a)P单独染毒及牛磺酸预处理再染毒 B(a)P致 L-02细胞的微核率和核分裂指数($\bar{x} \pm s$)

组别	微核率(‰)	NDI
DMSO对照	22.33±4.16	1.489±0.014
B(a)P 12.5 μmol/L	34.67±2.52[a]	1.326±0.034[b]
25.0 μmol/L	45.33±4.16[b]	1.228±0.006[b]
50.0 μmol/L	60.00±7.21[b]	1.148±0.012[b]
1.0 mmol/L牛磺酸+ 25 μmol/L B(a)P	30.33±3.51[c]	1.455±0.011[c]
2.0 mmol/L牛磺酸+ 25 μmol/L B(a)P	25.67±1.53[c]	1.474±0.015[c]
4.0 mmol/L牛磺酸+ 25 μmol/L B(a)P	23.00±1.00[c]	1.492±0.013[c]

注:与 DMSO比较,a$P < 0.05$,b$P < 0.01$;与单纯 25 μmol/L B(a)P染毒组比较,c$P < 0.01$。

2.3 牛磺酸预处理对 B(a)P致 L-02细胞毒性的保护作用(表 2) 牛磺酸预处理 L-02细胞后再加 B(a)P染毒,可观察到与单纯 25 μmol/L B(a)P相比,其诱导的微核率有随牛磺酸浓度增加而减少的趋势,差异有统计学意义($P < 0.01$)。1.0 mmol/L牛磺酸预处理组所诱导的微核比 DMSO对照组高,差异有统计学意义($P < 0.05$);而 2.0和 4.0 mmol/L牛磺酸预处理组 g与 DMSO对照组比较差异无统计学意义。与单纯 25 μmol/L B(a)P染毒比较,牛磺酸预处理组使 NDI明显升高,呈剂量依赖性地显著升高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

3 讨 论

实验结果显示,B(a)P在 12.5,25,50 μmol/L的剂量条件下,诱导的微核率明显增多,核分裂指数明显降低,且存在明显的剂量-反应关系。而 1.0,2.0,4.0 mmol/L的牛磺酸预处理对 25 μmol/LB(a)P引起的染色体损伤则具有明显的拮抗作用。

B(a)P在体内肝细胞线粒体 P-450酶系的催化下,可生成环氧化物并与 DNA结合,形成环氧化加合物引起 DNA损伤,从而启动致突变、致癌过程[5]。Garry S等发现,B(a)P 0.75 mg单独给予大鼠后,用彗星实验检测其可引起肝细胞的 DNA损伤[6]。本研究结果也表明,B(a)P对人胚肝细胞有染色体损伤的毒性作用,随着 B(a)P剂量的升高,其毒性也增大。

牛磺酸为机体条件必需氨基酸,可由食物供给或肝脏合成,在人类一次性最高给予剂量达 5 g时仍未观察到任何毒副作用。本研究显示,不同浓度牛磺酸单独作用于 L-02细胞时,均未引起染色体损伤,且中高剂量的牛磺酸诱导的微核率比空白对照组还低。Eman F等发现,牛磺酸可以预防用乙醇与 CCl_4诱导的大鼠肝纤维化及脂质过氧化损伤[7]。宋樱[8]等研究发现,牛磺酸对 CCl_4诱导的大鼠肝细胞损伤有保护作用。本实验结果显示,经牛磺酸预处理的 L-02细胞再染毒 B(a)P,所诱导的微核率与核分裂指数与单纯 B(a)P染毒组相比,染色体损伤随牛磺酸浓度增加逐渐减轻,差异有统计学意义。表明牛磺酸对 B(a)P致 L-02细胞的染色体损伤具有保护作用,且牛磺酸浓度越高,保护作用越强。

综上所述,牛磺酸对 B(a)P诱导的肝细胞染色体具有良好的保护作用,且牛磺酸可通过食物摄取,无毒副作用,表明牛磺酸可用于肝损伤及肝癌预防和治疗。

参考文献

〔1〕 Nesnow S, Davis C, Nelson GB, et al. Comparison of the genotoxic activities of the K-region dihydrodiol of benzo[a]pyrene with benzo[a]pyrene in mammalian cells: morphological cell transformation, DNA damage, and stable covalent DNA adducts[J]. Mutat Res, 2002, 521: 91-102.

〔2〕 Miyazaki T, Karube M, Matsuzaki Y, et al. Taurine inhibits oxidative damage and prevents fibrosis in carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis[J]. J Hepatol, 2005, 43(1): 117-125.

〔3〕 鲁力,秦秋兰,肖德强,等.牛磺酸对苯并(a)芘致人胚肝细胞损伤拮抗作用[J].中国公共卫生,2007,23(9):1131-1133.

〔4〕 Fenech M. The *in vitro* micronucleus technique[J]. Mutation Research, 2000, 455(1-2): 81-95.

〔5〕 张桥.毒理学基础[M].4版.北京:人民卫生出版社,2003:8-47.

〔6〕 Garry S, Nesslany F, Aliouat E, et al. Hematite(Fe_2O_3) enhances benzo[a]pyrene genotoxicity in endotracheally treated rat, as determined by Comet Assay[J]. Mutat Res, 2003, 538(1-2): 19-29.

〔7〕 Eman F, Balkan J, Cevikbas U, et al. Betaine or taurine administration prevents fibrosis and lipid peroxidation induced by rat liver by ethanol plus carbon tetrachloride intoxication[J]. Amino acids, 2004, 27(2): 193-204.

〔8〕 宋樱,张敏,王冬.牛磺酸和支链氨基酸对大鼠肝细胞氧化损伤的保护作用[J].青岛大学医学院学报,2004,40(1):20-24.

收稿日期:2008-07-05 (孔繁学编辑 李贵福校对)

中国公共卫生 CPH