发生出血、感染、新生儿窒息、影响母乳喂养等不足,很少顾虑以后的生育问题,过分关注阴道分娩潜在胎儿不安全因素,干脆逃避阴道试产,临产前后稍有异常就要求剖宫产。另外,分娩产程中有许多不可预知的危险因素,产科医生缺乏对孕妇的安慰鼓励和积极支持阴道分娩,产前紧张焦虑的孕妇多数选择剖宫产。

目前,亟需加强产前宣传,正确认识剖宫产的利与弊,重点是受教育程度、职业和收入层次较高的人群。针对孕妇对产痛的恐惧,一方面应提供高质量心理护理,给孕妇精神上支持和安慰,同时采用孕妇易接受的无痛分娩技术,保证母儿安全,以降低剖宫产率。

参考文献

[1] 吴庆庆,赖爱鸾,孟戈,等. 剖宫产率增高原因的探讨[J]. 中国妇产科临床,2001,2(3):134 - 135.
[2] 朱丽萍,周冰华,秦敏,等. 上海市 20 年剖宫产产妇死亡原因分析[J]. 中华妇产科杂志,2000,35:153 - 156.
[3] 熊巨洋,杜玉开,陈汉平. 武汉市剖宫产流行特征及其影响因素分析[J]. 中国妇幼保健,2005,20:298 - 300.
[4] 曹泽毅. 中华妇产科学[M]. 北京:人民卫生出版社,1999:926 - 934.

收稿日期: 2007-03-13　(郑新编辑　刘铁校对)

文章编号: 1001-0580(2007)09-1131-03　**中图分类号**: R 15　**文献标志码**: A　【论　著】

牛磺酸对苯并(a)芘致人胚肝细胞损伤拮抗作用*

鲁力[1],秦秋兰[2],肖德强[1],王志清[1],邹亚玲[3],鲁文清[3]

摘　要: **目的**　探讨牛磺酸对苯并(a)芘致肝细胞 DNA 损伤的作用和机制。**方法**　以人胚肝细胞为靶细胞体外培养,按完全随机实验设计分成 5 个组:(1)空白对照组;(2)溶剂对照组;(3)苯并(a)芘组:25 μmol/L 苯并(a)芘加入细胞培养体系后培养 2 h;(4)牛磺酸组:设 0.5,1.0,2.0,4.0 μmol/L 4 个浓度,加入培养体系后培养 24 h;(5)牛磺酸预防组:先以 4 个不同浓度的牛磺酸预处理 24 h,再加入 25 μmol/L 的苯并(a)芘,培养 2 h。各组培养结束后用单细胞凝胶电泳技术(SCGE)检测细胞 DNA 损伤,用分光光度法测定细胞培养液中丙二醛(MDA)、还原型谷胱甘肽(GSH)、天门冬酸氨基转移酶(AST)和丙氨酸氨基转移酶(ALT)含量。**结果**　(1)微量苯并(a)芘可致人胚肝细胞 NDA 明显损伤,同时使 MDA、ALT、AST 水平升高、GSH 含量降低,牛磺酸的作用则相反;(2)牛磺酸预处理可明显减轻苯并(a)芘引起的人胚肝细胞 DNA 损伤,抑制 MDA、AST、ALT 含量升高和 GSH 含量下降,其作用呈剂量 - 效应关系;(3)人胚肝细胞 DNA 损伤的 Oliver 尾矩值与细胞培养液中 MDA、AST、ALT 含量呈明显正相关,与 GSH 含量呈明显负相关。**结论**　苯并(a)芘致人胚肝细胞 DNA 损伤可能与氧化损伤有关,而牛磺酸具有拮抗苯并(a)芘致人胚肝细胞 DNA 损伤的良好作用。

关键词: 牛磺酸;苯并(a)芘;人胚肝细胞;DNA 损伤;单细胞凝胶电泳(SCGE)

Protective effect of taurine against DNA damage of human derived fetal hepatocytes induced by Benzo(a) Pyrene

LU Li, QIN Qiu-lan, XIAO De-qiang, 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 DNA damages of human derived fetal hepatocytes induced by B(a) P. **Methods**　Human derived fetal hepatocytes (L - 02 cells) were randomized into 5 groups: (Ⅰ) blank control group; (Ⅱ) solvent control group; (Ⅲ) B(a) P group explored to B(a) P at the concentration of 25 μmol/L, in culture medium for 2 hours: (Ⅳ) Taurine group explored to taurine at the concentration of 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mmol/L in culture medium for 24 hours: (Ⅴ) Taurine preventive group explored to taurine at 4 different concentration in culture medium for 24 hours and treated further for 2 hours by adding 25 μmol/L B(a) P into the culture media. Single cell gel etectrophoresis (SCGE) were used to detect DNA damage. The concentration of MDA, GSH, AST, ALT in the supernatants of culture media were tested by spectrophotometric method to reflect the oxidative damage level of cell. **Results**　(1) Only a low concentration of B(a) P could induce DNA damage of L - 02 cells and cause the concentration of MDA, AST, ALT in the supernatant increased and GSH decreased. (2) Pretreatment with taurine could antagonize significantly the toxicity of L - 02 cells induced by B(a) P. It could reduce the MDA, AST, ALT level and increase GSH content in cells in dose - effect manner. (3) The DNA damage was positive correlation with MDA, AST and ALT levels. However, it was negative correlation with GSH level. **Conclusion**　Oxidative damage might be a important mechanism with regard to DNA damage of human derived fetal hepatocytes induced by B(a) P; Taurine could play a protective role in hepatic cell damage by means of ant - oxidation effect.

Key words: taurine; Benzo(a) Pyrene [B(a) P]; human derived fetal hepatocytes (L - 02 cells); DNA damage; single cell electrophoresis (SCGE)

牛磺酸(taurine)是一种具有多种生物学功能的氨基酸,如调节细胞钙稳态、稳定细胞膜、抗氧化、抑制肿瘤细胞增殖及胶原形成、对外源化合物的解毒作用等。研究表明,牛磺酸通过抗氧化作用可拮抗许多毒物对肝细胞的损害[1,2]。苯并(a)芘[B(a) P]是一种公认的环境和食品污染物,世界卫生组

*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. 广西疾病预防控制中心; 3. 华中科技大学同济医学院公共卫生学院
作者简介: 鲁力(1960 -),男,江苏南京人,副教授,硕士,研究方向:营养与健康。

织确定其为食物中强致癌物质之一,对人胚肝细胞 DNA 有明显的损伤作用[3]。本研究采用单细胞凝胶电泳技术(SCGE)检测牛磺酸对苯并(a)芘致人胚肝细胞 DNA 损伤的保护作用,同时测定氧化损伤相关指标及肝细胞损伤漏出酶含量的变化,分析牛磺酸对苯并(a)芘肝细胞毒性的保护作用机制,为寻找有效的抗毒保肝营养因子提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 主要仪器 CO_2 培养箱,电泳仪、电泳槽,冷冻离心机,紫外可见分光光度计检测仪(日本 SHIMADZU 公司);荧光显微镜和荧光数码显微成像系统(日本 OLYMPUS 公司)。

1.2 主要试剂 胎牛血清培养基(DMEM,美国 Gibco 公司);小牛血清(新西兰 PerBio Science company 公司);胰蛋白酶(武汉中键科技开发公司);正常熔点琼脂糖(德国 Merck Darmstadt 公司);低熔点琼脂糖(上海 YITO BIO - INSTRUMENT 公司);TritonX - 100(美国 Sino - American Biotec 公司);二甲基亚砜(DMSO)、牛磺酸和苯并(a)芘(美国 Sigma 公司)。丙二醛(MDA)、还原型谷胱甘肽(GSH)、天门冬酸氨基转移酶(AST)、谷氨酸氨基转移酶(ALT)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所)。

1.3 细胞株 选用人胚肝细胞(L - 02 细胞)(武汉大学中国典型培养物保藏中心提供),华中科技大学环境与职业卫生学教研室传代保存。取生长状况良好并达一定密度的人胚肝细胞 40 μl,与 0.4 %台盼蓝按 1∶1 混合,镜下观察细胞存活率应不低于 95 %。按每孔细胞数约 1×10^5 个,将其接种到 6 和 24 孔培养板,置 CO_2 培养箱培养 12 h 使细胞贴壁,12 h 后更换新鲜培养基用于以下试验。

1.4 分组处理 将人胚肝细胞随机分为 5 个组:(1)空白对照组:不加任何试剂;(2)溶剂对照组:加入浓度为 10 ml/L 的 DMSO;(3)苯并(a)芘组:25 μmol/L 苯并(a)芘,加入细胞培养体系后培养 2 h;(4)牛磺酸组:设 0.5,1.0,2.0 和 4.0 mmol/L 4 个浓度,加入培养体系后培养 24 h;(5)牛磺酸预防组:细胞先以不同浓度的牛磺酸预处理 24 h,再加入 25 μmol/L 苯并(a)芘培养 2 h。试验中每种物质、每种浓度设 3 个复孔,培养体系中小牛血清浓度均为 10 %。

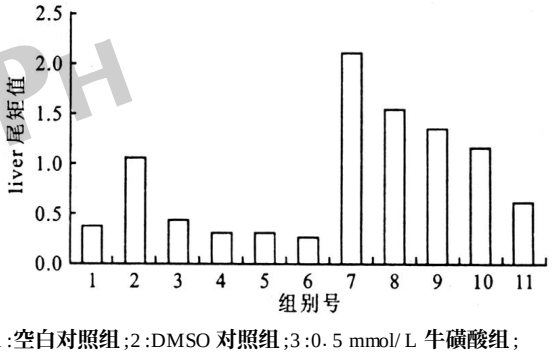
1.5 肝细胞 DNA 损伤测定 培养结束后参照 Singh 方法对细胞进行单细胞凝胶电泳技术(SCGE)分析[4],操作步骤包括制片、裂解、解旋、电泳、中和和染色,然后每片在荧光显微镜下随机观察计数 100 个细胞核并拍照,用 IMI 彗星分析软件计算细胞平均 Oliver 尾矩值(彗星尾长与彗尾 DNA 含量之积,能灵敏反映细胞 DNA 断裂损伤)及标准差,根据彗星尾中 DNA 含量占彗星 DNA 总量的百分比将细胞损伤进行分级与计数[5](0 级:< 5 %,表示无损伤;I 级:5 %～20 %,表示轻度损伤;II 级:20 %～40 %,表示中度损伤;III 级:40 %～95 %,表示重度损伤;Ⅳ级:≥95 %,表示完全损伤)。

1.6 氧化损伤及肝功能酶学指标测定 培养结束后用分光光度法对上清液进行 MDA、GSH、AST 和 ALT 含量测定。

1.7 统计分析 所有指标重复测 3 次取均值,采用 SPSS11.0 统计软件处理。计量资料各组间的显著性检验用方差分析,各实验组与对照组间比较用 Games - Howell 检验;计数资料用秩和检验;采用一元线性相关分析各指标间的相关性。

2 结 果

2.1 牛磺酸和苯并(a)芘对肝细胞 DNA 损伤的作用(图 1,2,表 1) 由图 1 可见,25 μmol/L 的苯并(a)芘能引起人胚肝细胞明显的 DNA 损伤其 Oliver 尾矩值与溶剂对照组相比差异有统计学意义($P<0.01$),牛磺酸组对细胞 DNA 未见有损伤作用,若预先用牛磺酸处理,可明显减轻苯并(a)芘对细胞 DNA 的损伤,其 Oliver 尾矩值与苯并(a)芘组比较,呈剂量 - 效应关系,差异有统计学意义($P<0.01$)。



注:1:空白对照组;2:DMSO 对照组;3:0.5 mmol/L 牛磺酸组;
4:1.0 mmol/L 牛磺酸组;5:2.0 mmol/L 牛磺酸组;
6:4.0 mmol/L 牛磺酸组;7:25 μmollLB(a)P 组;
8:0.5 mm01/L 牛磺酸 + 25 μmol/LB(a)P 组;
9:1.0 mmol/L 牛磺酸 + 25 μmol/LB(a)P 组;
10:2.0 mmol/L 牛磺酸 + 25 μmol/LB(a)P 组;
11:4.0 mmol/L 牛磺酸 + 25 μmol/LB(a)P 组

图 1 牛磺酸和苯并(a)芘对肝细胞 DNA 损伤作用的 Oliver 尾矩值图

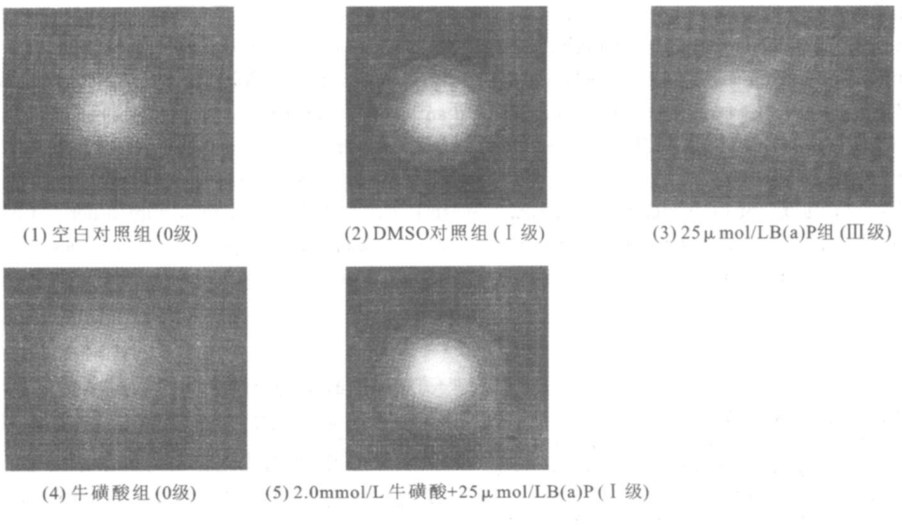


图 2 牛磺酸和苯并(a)芘对肝细胞 DNA 损伤作用的彗星图像(×400)

表 1　牛磺酸和苯并(a)芘对肝细胞 DNA 损伤作用的分级

组　别	0 级	I 级	II 级	III 级
空白对照	46	50	4	0
DMSO 对照	28	67	5	0
0.5mmol/L 牛磺酸	47	37	16	0
1.0mmol/L 牛磺酸	56	40	4	0
2.0mmol/L 牛磺酸[a]	57	41	2	0
4.0mmol/L 牛磺酸[a]	65	34	1	0
25μmol/LB(a)P	0	67	28	5
0.5mmol/L 牛磺酸 + 25μmol/L B(a)P[b]	12	50	38	0
1.0mmol/L 牛磺酸 + 25μmol/L B(a)P[b]	14	50	36	0
2.0mmol/L 牛磺酸 + 25μmol/L B(a)P[b]	16	64	20	0
4.0mmol/L 牛磺酸 + 25μmol/L B(a)P[b]	16	78	6	0

注:与空白对照组或 DMSO 对照组比较,a　$P < 0.01$;与 25 μmol/L B(a)P 组比较,b　$P < 0.01$。

从表 1 可见,苯并(a)芘肝细胞 DNA 损伤严重程度影响较大。2.0～4.0 mmol/L 牛磺酸有显著减轻细胞 DNA 损伤作用,若先用牛磺酸处理肝细胞,则可明显减轻苯并(a)芘所致细胞 DNA 损伤等级,并呈剂量 - 效应关系。

2.2　牛磺酸和苯并(a)芘对肝细胞氧化损伤的影响(表 2)　苯并(a)芘能引起人胚肝细胞培养液中 MDA 含量增加和 GSH 含量降低,牛磺酸组的结果则正好相反;牛磺酸预防组中 MDA 含量变化不大,但 GSH 含量明显上升,与苯并(a)芘组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

表 2　牛磺酸和苯并(a)芘对肝细胞氧化损伤的影响($\bar{x} \pm s$)

组　别	MDA	GSH
空白对照	5.817 ±0.282	214.65 ±7.74
DMSO 对照	5.817 ±0.675	128.36 ±2.14
0.5mmol/L 牛磺酸	5.993 ±0.664	215.36 ±12.40
1.0mmol/L 牛磺酸	4.743 ±0.766	218.22 ±10.20
2.0mmol/L 牛磺酸[a]	4.563 ±0.820	233.19 ±21.48
4.0mmol/L 牛磺酸[a]	4.253 ±0.472	252.09 ±21.03
25μmol/LB(a)P	7.650 ±0.817	109.47 ±5.39[a]
0.5mmol/L 牛磺酸 + 25μmol/L B(a)P[b]	6.577 ±0.135	144.77 ±7.28[b]
1.0mmol/L 牛磺酸 + 25μmol/L B(a)P[b]	6.397 ±0.509	160.45 ±8.49[b]
2.0mmol/L 牛磺酸 + 25μmol/L B(a)P[b]	6.400 ±1.347	171.51 ±4.05[b]
4.0mmol/L 牛磺酸 + 25μmol/L B(a)P[b]	6.307 ±1.075	5197.89 ±11.27[b]

注:与空白对照组或 DMSO 对照组比较,a　$P < 0.05$;与 25 μmol/LB(a)P 组比较,b　$P < 0.01$。

2.3　牛磺酸和苯并(a)芘对肝细胞转氨酶的影响(表 3)　苯并(a)芘可致人胚肝细胞培养液中 AST 和 ALT 含量升高,牛磺酸组与空白组比较,差异无统计学意义,而牛磺酸预防组却可使培养液中 AST 和 ALT 含量显著降低,与苯并(a)芘组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

表 3　牛磺酸和苯并(a)芘对肝细胞转氨酶的影响($\bar{x} \pm S$)

组　别	AST	ALT
空白对照	21.06 ±0.43	23.99 ±3.51
DMSO 对照	21.24 ±1.39	27.84 ±0.88
0.5mmol/L 牛磺酸	20.68 ±1.29	24.37 ±3.37
1.0mmol/L 牛磺酸	20.68 ±1.27	21.77 ±7.52
2.0mmol/L 牛磺酸[a]	19.36 ±1.07	19.56 ±1.37
4.0mmol/L 牛磺酸[a]	20.31 ±0.75	18.40 ±1.59
25μmol/LB(a)P	30.93 ±0.43[b]	39.01 ±5.69
0.5mmol/L 牛磺酸 + 25μmol/L B(a)P	29.61 ±2.46	0.73 ±3.76
1.0mmol/L 牛磺酸 + 25μmol/L B(a)P	25.75 ±1.42[c]	27.07 ±1.48[c]
2.0mmol/L 牛磺酸 + 25μmol/L B(a)P	23.88 ±2.68[d]	25.24 ±10.02[c]
4.0mmol/L 牛磺酸 + 25μmol/L B(a)P	23.31 ±3.29[d]	24.85 ±2.52[c]

注:与 DMSO 对照组比较,a　$P < 0.05$;b　$P < 0.01$;与 25 μmol/L B(a)P组比较,c　$P < 0.05$,d　$P < 0.01$。

2.4　肝细胞 DNA 损伤与其他指标相关性分析　将苯并(a)芘组和牛磺酸预防组对人胚肝细胞 DNA 损伤的 Oliver 尾矩值与培养液中氧化损伤及肝功能酶学指标做直线相关分析发现,Olive 尾矩值与 MDA 含量呈明显正相关($r = 0.852$, $P < 0.01$),与 GSH 含量呈明显负相关($r = -0.929$, $P < 0.01$),与 AST、ALT 含量呈明显正相关($r = 0.930$ 和 0.927, $P < 0.01$)。

3　讨　论

本研究结果显示,不同浓度纯牛磺酸对人胚肝细胞能反映 DNA 损伤的 Oliver 尾矩值无影响,而牛磺酸预处理后能明显减轻苯并(a)芘引起的肝细胞 DNA 损伤,并呈一定的剂量 - 效应关系,表明牛磺酸有良好的拮抗苯并(a)芘致人胚肝细胞 DNA 损伤效果。本研究对细胞培养液中 MDA 及 GSH 含量测定结果表明,MDA 含量随着牛磺酸浓度增加而降低,牛磺酸预防组 MDA 含量虽然与苯并(a)芘组比较,差异无统计学意义,但加入牛磺酸可使 MDA 含量降低。牛磺酸组 GSH 含量变化不大,但有随牛磺酸浓度增高而增加的趋势;牛磺酸预防组 GSH 含量与苯并(a)芘比较显著增高,呈剂量 - 效应关系。提示牛磺酸具有拮抗苯并(a)芘引起的人胚肝细胞 MDA 含量升高及 GSH 下降作用。相关性分析表明,肝细胞 DNA 损伤的 Olive 尾矩值与 MDA 含量呈明显正相关,与 GSH 含量呈明显负相关,显示氧化损伤在苯并(a)芘致人胚肝细胞损伤机制中起重要作用,MDA 升高和 GSH 降低可在一定程度上反映肝细胞 DNA 损伤情况。对细胞培养液中 AST、ALT 测定结果显示,牛磺酸组与空白对照组比较差异无统计学意义,牛磺酸预防组可显著抑制苯并(a)芘引起的转氨酶升高,表明牛磺酸具有拮抗苯并(a)芘引起人胚肝细胞 AST、ALT 含量升高,表明牛磺酸具有拮抗苯并(a)芘引人胚肝细胞 AST、ALT 含量升高的作用。从相关性上看,肝细胞 DNA 损伤的 Olive 尾矩值与 AST、ALT 含量呈明显正相关,表明转氨酶含量升高也可在一定程度上反映肝细胞 DNA 损伤情况。

综上所述,牛磺酸对人胚肝细胞无毒副作用,并可拮抗苯并(a)芘引起的肝细胞 DNA 损伤和毒性,抗细胞氧化损伤是其主要作用机制之一,表明牛磺酸为一种良好的具有抗化学性肝损伤的营养因子。

参考文献

[1] Waters Eoin, Jiang Huai Wang, Redmond H Paul, et al. Role of taurine in preventing acetaminophen - induced hepatic injury in the rat [J]. American Journal of Physiology, 2001, 280(6): 1274 - 1279.

[2] Hagar, Hanan H. The protective effect of taurine against cyclosporine A - induced oxidative stress and hepatotoxicity in rats [J]. Toxicology Letters, 2004, 151 (2): 335 - 343.

[3] 秦秋兰,鲁力,肖德强,等. 苯并(a) 芘对健康人肝细胞 DNA 损伤作用的研究[J]. 广西医学, 2005, 28(4): 489 - 492.

[4] Singh NP, Mccopy MT, Tice RR, et al. A single technique for quantification of low levels of DNA damage in indivedual cells[J]. Exp Cell Res, 1988, 175(1): 184 - 191.

[5] Anderon, D, Yu TW, Phillips BJ, et al. The effect of various antoxidants and other modifying agents on oxygen - radical - gegerated DNA damage in human lymphocytes in the comet assay[J]. Mul Res, 1994, 307: 261 - 271.

收稿日期:2007-01-05　(文涛编辑　张亚莲校对)