

铀矿尘对支气管上皮细胞遗传毒性及茶多酚的防护作用

黄波^{1,2} 贺性鹏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 长沙 410078)

² (南华大学公共卫生学院 衡阳 421001)

摘要 研究铀矿尘所致人支气管上皮细胞遗传毒性以及茶多酚对细胞的防护作用,为铀矿尘的防护提供理论依据。将细胞分为3组:对照组、铀矿尘组(高中低剂量组)、茶多酚保护组,采用微核多核实验、彗星实验、HPRT基因突变检测及染色体分析研究铀矿尘对支气管上皮细胞的遗传毒性作用及茶多酚防护作用。BEAS-2B细胞经铀矿尘染毒后,与对照组相比,彗星细胞数(高剂量组 156.75 ± 8.26)、彗星尾长(高剂量组 $164.48 \pm 12.11 \mu\text{m}$)、尾距(高剂量组 109.92 ± 10.53)均显著意义的增加($p < 0.05$),并有剂量—效应关系;茶多酚对此有明显的抑制作用。铀矿尘能诱发微核细胞(高剂量组 120.25%)、多核细胞增多(高剂量组 74.50%),茶多酚对微核多核细胞增多有抑制作用($p < 0.05$)。铀矿尘作用于BEAS-2B细胞后引起HPRT基因突变率增加(高剂量组 1.092%),茶多酚能有效地降低HPRT基因突变率。染色体分析结果表明,经染毒后转化细胞可出现染色体非稳定性畸变,茶多酚对染色体畸变具有抑制作用。铀矿尘具有较强的遗传毒性,茶多酚对铀矿尘的遗传毒性具有防护作用。

关键词 铀矿尘, BEAS-2B细胞, 遗传毒性, 茶多酚, HPRT基因

中图分类号 R135, R142.3, R131

流行病学调查显示:接触铀矿尘职业人群主要见于铀矿的开采、选矿、精铀提取等有关核燃料的生产过程。铀矿尘是铀矿勘探和开采的主要职业性有害因素,铀矿尘的组成除了非放射性的二氧化硅粉尘外,还包括放射性粉尘和凝聚核。铀矿粉尘可通过呼吸道进入人体后形成内辐射,引发损伤。通过对铀作业人员的健康随访研究表明,长期接触铀矿尘与矽肺、肺癌等多种疾病的发生率增高有关。Gulson等^[1]对德国铀矿1957—1989间工作的铀矿工人调查发现肺癌发生率显著增高。温晋爱等^[2]对湖南A铀矿矿工死亡原因采用历史前瞻性方法调查结果显示:在死因分组死亡率中,第一位死因是恶性肿瘤(26.57%)。恶性肿瘤的第一位死因为肺癌(31%),铀矿工人肺癌发生率高,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,铀矿尘对机体毒性的研究及相关医学防护剂的研制是亟待解决的问题。本研究拟通过铀矿尘对人支气管细胞的遗传毒性以及茶多酚的保护作用的探讨,为铀矿尘毒性研究和防治措施提供科学依据。

1 实验材料和方法

1.1 细胞分组及其染毒

人支气管上皮细胞系(BEAS-2B),购自美国ATCC(American Type Culture Collection)。铀矿尘(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‰)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 mg/mL混悬液。将指数生长期细胞分为空白对照组、铀矿尘染毒组和茶多酚保护组。铀矿尘染毒组按铀矿尘终浓度1.0、1.5、2.0 mg/mL加入细胞中;茶多酚保护组在铀矿尘染毒前2 h加入终浓度为250 mg/L的茶多酚(无锡太阳绿宝科技有限公司)。

1.2 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 1%正常熔点琼脂糖滴至磨砂玻片上,4℃冷却10 min;取10 μL $5 \times 10^5/\text{mL}$ 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

国家自然科学基金(81072331)、湖南省教育厅科研基金(07C619)资助

第一作者:黄波,男,1974年9月出生,2005年毕业(硕士)于南华大学,中南大学在读博士生,南华大学放射医学系副教授,研究方向为放射医学防护

通讯作者:胡建安, Email: jiananhu@xysm.net

收稿日期:初稿 2011-12-27, 修回 2012-02-13

熔点的琼脂糖, 放于 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 (pH8.2—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. EXE 软件分析彗星细胞, 分析尾长、尾部 DNA 百分含量、尾距。每组分析 200 个细胞, 重复 4 次。

1.3 微核细胞多核细胞的检测

细胞分组及染毒同上, 染毒 24 h 后, 倾去培养液, PBS 清洗, 用甲醇/冰醋酸 (3:1) 固定 15 min, Gimsa 染色后, 在油镜下观察细胞, 计数每 1000 个细胞中微核和多核细胞数, 每组重复 4 次。

1.4 HPRT 基因突变检测^[3]

细胞分组及染毒同上, 铀矿尘染毒 24 h 后, 用预温的 D-Hank's 液洗涤 3 次, 立即换新鲜的培养液继续培养。上述染毒后的细胞培养至第 5 代时, 每组细胞分为两组, 一组加入含终浓度为 0.1 mmol/L 6-巯基鸟嘌呤 (6-TG, Sigma) 的 LHC-8 培养液, 37℃ 培养 30 h; 同时向两组加入 6 μg/mL 的细胞松弛素 B (Cytochalasin B, Calbiochem), 继续培养 42 h; 胰蛋白酶消化, 制备细胞悬液, 甲醇/冰醋酸 (3:1); 细胞悬液滴片, Giemsa 染色, 干燥后, 在光镜下计数 5 000 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 (‰), 每组重

复 4 次。

1.5 细胞染色体分析

细胞分为 3 组: 对照细胞、铀矿尘组细胞 (以浓度为 1.5 mg/mL 铀矿尘 24 h 染毒, 染毒后, 去除铀矿尘, 更换培养液传代至第 6 代)、茶多酚组 (以浓度为 1.5 mg/mL 铀矿尘 24 h 染毒, 染毒前 2 h 加入终浓度为 250 mg/L 的茶多酚保护, 染毒完毕后, 去除铀矿尘及茶多酚, 更换培养液, 传代至第 6 代)。当对数生长期的三组细胞达到 60%—70% 融合时, 加入秋水仙素 (终浓度为 0.03 μg/mL), 继续培养 3 h。0.075 mol/L KCl 低渗, 甲醇/冰醋酸 (3:1) 固定, 制备细胞悬液, 细胞悬液滴于冰冷的载波片上, 烘干制备染色体标本; Giemsa 染色, 镜检。油镜下每组细胞观察 100 个中期分裂相细胞, 计数染色体数目, 并进行结构分析。

1.6 统计分析

采用 SPSS 10.0 软件进行统计学分析。

2 结果

2.1 铀矿尘诱发 BEAS-2B 细胞 DNA 损伤及茶多酚的抑制作用

经不同剂量的铀矿尘染毒的 BEAS-2B 细胞彗星测定结果如表 1 所示。可以看出, 各铀矿尘组拖尾细胞数量、尾部 DNA 百分比、尾长、尾距都较对照组明显增加, 并随着铀矿尘浓度的增高, 这些指标不断增高, 表明铀矿尘可造成细胞的 DNA 损伤。而茶多酚对各剂量铀矿尘诱发的 BEAS-2B 细胞 DNA 损伤都有明显抑制作用 ($p<0.05$)。

Table 1 DNA damage induced by uranium dust in BEAS-2B and the protective effect of tea polyphenols ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

Group	Number of tail cell	Tail Rate / %	Tail DNA / %	Tail Length / μm	Tail Moment
Control group	9.75±0.95	4.875	11.58±6.37	34.80±14.20	4.48±1.12
Uranium dust group					
1.0 mg / mL	108.75±3.59*	54.375	27.79±4.29*	72.23±21.19*	20.21±0.75*
1.5 mg / mL	131.00±9.67*	65.5	43.23±5.12*	131.28±5.71*	57.94±3.27*
2.0 mg / mL	156.75±8.26*	78.35	65.65±6.21*	164.48±12.11*	109.92±10.53*
TPs protection group					
1.0 mg / mL	71.25±0.95**	35.63	19.53±6.17**	48.09±12.65**	9.24±0.95**
1.5 mg / mL	109.50±0.87**	54.75	31.2±2.18**	117.03±5.73**	37.32±2.00**
2.0 mg / mL	126.75±10.91**	63.38	41.32±6.25**	139.73±6.09**	57.45±4.44**

Note: * Compared with the control group, $p<0.05$. ** with the same dose of uranium dust group, $p<0.05$.

2.2 BEAS-2B 细胞产生的微核多核细胞

从表 2 中可以看出，随着铀矿尘剂量浓度的增高，BEAS-2B 细胞中的微核细胞、多核细胞增多，

表明铀矿尘对细胞染色质损伤加重，茶多酚对铀矿尘所诱发的微核及多核细胞增多有较好的抑制作用。

Table 2 Multi-nucleated and micro-nucleated cells induced by uranium dust in BEAS-2B and the protective effect of tea polyphenols ($\bar{x} \pm s, n=4$)

Group	Counting cells	Number of Micronuclei	Rate of Micronuclei / %	Number of Multinucleated cells	Rate of Multinucleated cells / %
Control group	1 000	8.25±0.50	8.25	5.50±2.08	5.50
Uranium dust group					
1.0 mg / mL	1 000	68.75±1.70*	68.75	62.25±4.11*	62.25
1.5 mg / mL	1 000	86.25±3.95*	86.25	81.00±2.16*	81.00
2.0 mg / mL	1 000	120.25±9.17*	120.25	114.75±7.93*	114.75
TPs protection group					
1.0 mg / mL	1 000	42.25±1.70**	42.25	47.50±1.29**	47.50
1.5 mg / mL	1 000	65.00±5.47**	65.00	7.00±3.65**	67.00
2.0 mg / mL	1 000	74.50±3.87**	74.50	81.50±2.88**	81.50

Note: * Compared with the control group, $p<0.05$. ** with the same dose of uranium dust exposure group, $p<0.05$.

2.3 HPRT 突变率改变（见表 3）

由表 3 可见，铀矿尘作用 24 h 后，随着染毒浓度的增加，HPRT 基因突变率显著增加，与对照组比较差异有统计学意义 ($p<0.05$)，而茶多酚保护组能有效地抑制 HPRT 基因突变率增加，与同剂量的铀矿尘染毒组比较差异有统计学意义 ($p<0.05$)。说明 TP_S 对铀矿尘所诱发的遗传毒性具有较好的保护作用。

2.4 染色体分析

比较三组细胞染色体的非稳定性畸变，对照组细胞和茶多酚保护组细胞少见有双或三着丝粒，碎片等非稳定性畸变。而铀矿尘染毒组可见较多的多倍体畸变、着丝粒改变、染色体易位改变（见表 4）。

Table 3 HPRT mutation frequency in BEAS-2B cells ($\bar{x} \pm s, n=4$)

Group	HPRT mutation frequency / %
Control group	0.307±0.015
Uranium dust group	
1.0 mg / mL	0.655±0.012*
1.5 mg / mL	0.823±0.033*
2.0 mg / mL	1.092±0.45*
TPs protection group	
1.0 mg / mL	0.56±0.013**
1.5mg / mL	0.725±0.33**
2.0 mg / mL	0.925±0.06**

Note: * Compared with the control group, $p<0.05$. ** with the same dose of uranium dust exposure group, $p<0.05$.

Table 4 Non-stability of chromosomal aberrations in Three cell lines

Group	Counting cells	Number of chromosomal aberrations	Type of aberration		
			Dicentric chromosome	Fragment	Translocation
Control group	100	1	1	0	0
Uranium dust group					
1.5 mg / mL	100	15*	13	2	0
TPs protection group					
1.5 mg / mL	100	4**	3	0	1

Note: * Compared with the control group, $p<0.05$. ** with the uranium dust group, $p<0.05$.

3 讨论

铀矿尘通过呼吸道进入人体,它对人体造成的危害主要是由于粉尘在肺泡、支气管等表面的沉积以及所含放射性物质的辐射所引起。放射性粉尘长时间滞留于肺气管、支气管和淋巴结内,可构成潜在的内照射危害。在对湖南某铀矿矿工 655 例死亡原因的调查中,肺癌的标化死亡比为 2.29,且死亡数大于矽肺死亡例数^[2]。铀矿尘中 α 、 β 射线具有直接损伤 DNA 的能力,也可通过产生包括活性氧 (ROS) 在内的多种自由基的间接作用造成 DNA 氧化损伤^[4]。

Krunic 等^[5]发现前南地区暴露贫铀人群的外周血淋巴细胞微核频率和 HPRT 基因突变频率都增加,在黄波等^[3]的研究中也发现贫铀对支气管上皮细胞具有遗传毒性。我们前期的研究中发现,铀矿尘可以诱发支气管上皮细胞内外的活性氧增高,导致细胞氧化防御体系崩溃,细胞的抗氧化物质减少,氧化应激反应加重,造成氧化损伤,细胞膜破裂^[6,7]。本研究中观察到铀矿尘作用 BEAS-2B 细胞后出现彗星细胞增加,表明细胞 DNA 双链断裂增加。微核试验检测的是染色体完整性改变,多核细胞的产生则是由于细胞质不能随细胞核的分裂而分裂或不正常的核分裂所致。生活在铀矿地区的工人的体细胞血细胞中微核有增加的现象^[8]。

从本研究实验结果来看,随着铀矿尘浓度增加,BEAS-2B 细胞产生的微核增多。毒物作用于机体后,机体细胞可出现遗传物质的改变,可导致机体许多疾病发生,HPRT 基因突变检测就是一种目前常用的分析和定量检测细胞基因突变的方法。有研究表明,HPRT 基因突变与肿瘤的发生有关^[9]。

本研究可观察到染色体不稳定畸变增加,证实铀矿尘能诱发 DNA 损伤,引起染色体受损,导致基因突变率增高,自由基通过改变细胞膜通透性或导致离子通道受体、磷酸化反应等细胞内可逆性变化。自由基作用于 DNA 链时,可致 DNA 链切断,引起遗传物质损伤。对 DNA 的不可逆性变化和对细胞应答的可逆性变化,将细胞推向癌变^[10]。从本研究实验结果来看,随着铀矿尘浓度增加,引发 BEAS-2B 细胞遗传损伤加剧。结合前期研究,铀矿尘导致铀矿工癌症的机制,可能是铀矿尘诱发自由基的大量产生,对遗传物质造成损伤,最终导致肺癌。茶多酚作为一种自由基清除剂,对铀矿尘所致的损伤增多有较好的抑制作用,也表明了铀矿尘诱发遗传毒性是由自由基所造成的。

国内外学者一直在寻找高效、稳定、低毒、实

用的辐射防护剂。茶多酚 (Tea polyphenols, TPs) 是从绿茶中提取的多酚类化合物,具有极小的毒性,因而得到广泛的应用。流行病学等调查和一系列研究表明:茶叶及其提取物不仅具有明显的抗氧化、消除自由基、抗肿瘤、抗突变、抗病毒等多种生理活性,而且具有对辐射的防护效应、升白细胞和增强非特异性免疫功能的作用。因此,茶多酚被认为是一种很有潜力的抗辐射损伤和治疗双重功能的药物^[11,12]。本研究以茶多酚作为对铀矿尘毒性的抑制剂,结果表明,茶多酚对铀矿尘诱发的细胞遗传毒性有明显抑制作用,为铀矿尘的损伤防护药物的研制提供了有益的线索。

参考文献

- 1 Gulson B L, Mizon K J, Dickson B L. 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**(13): 267-272
- 2 温晋爱, 姜如意, 常学奇. 1958-1997 年湖南 A 铀矿矿工死亡原因的流行病学调查[J]. *辐射防护*, 2002, **22**(1): 44-50
WEN Jinai, JIANG Ruyi, CHANG Xueqi. 1958 to 1997 uranium miners Hunan A cause of death in epidemiological investigation [J]. *Radiation Protection*, 2002, **22**(1): 44-50
- 3 黄波, 龙颖, 朱茂祥. 贫铀对支气管上皮细胞遗传毒性及 DMSO 的保护作用的方法[J]. *实用预防医学*, 2009, **16**(3): 639-642
HUANG Bo, LONG Ying, ZHU Maoxiang. DNA Damage of Depleted Uranium Induced BEAS-2B cells and Its Protection by DMSO [J]. *Practical Preventive Medicine*, 2009, **16**(3): 639-642
- 4 Taeger D, Fritsch A, Wiethege T. Role of exposure to radon and silicosis on the cell type of lung carcinoma in German uranium miners [J]. *Cancer*, 2006, **106**(4): 881-889
- 5 Krunic A, Haveric S, Ibrulj S. Micronuclei frequencies in peripheral blood lymphocytes of individuals exposed to depleted uranium [J]. *Arh Hig Rada Toksikol*, 2005, **56**(3): 227-232
- 6 黄波, 龙颖, 罗振华, 等. 茶多酚对铀矿尘致支气管上皮细胞损伤保护作用[J]. *中国公共卫生*, 2011, **27**(3): 284-286
HUANG Bo, LONG Ying, LUO Zhenhua, et al. Protective effects on oxidative damage induced by uranium mineral dust in BEAS-2B cells by tea polyphenols [J]. *Chi-*

- nese Journal of Public Health, 2011, **27**(3): 284-286
- 7 李世珍, 黄波, 黄锐, 等. 铀矿粉对支气管上皮细胞的毒性作用分析[J]. 中国现代医学杂志, 2008, **18**(9): 1167-1173
 - LI Shizhen, HUANG Bo, HUANG Rui, *et al.* Malignant transformation of human bronchial epi BEAS-2B induced by uranium [J]. Modern Chinese Medicine, 2008, **18**(9): 1167-1173
 - 8 Popp W, Plappert U, Müller W U, *et al.* Biomarkers of genetic damage and inflammation in blood and bronchoalveolar lavage fluid among former German uranium miners: a pilot study [J]. Radiat Environ Biophys, 2000, **39**(4): 275-82
 - 9 Diane M Stearns, Monica Yazzie, Andrew S Bradley, *et al.* Uranyl acetate induces hprt mutations and uranium-DNA adducts in Chinese hamster ovary EM9 cells [J]. Mutagenesis, 2005, **20**(6): 417-423
 - 10 Periyakaruppan A, Kumar F, Sarkar S, *et al.* Uranium induces oxidative stress in lung epithelial cells [J]. Arch Toxicol, 2007, **81**(6): 389-395
 - 11 郭绍来, 胡园, 刘屏, 等. 茶多酚及其主要成分 EGCG 在辐射损伤小鼠模型中的保护作用[J]. 中国中药杂志, 2010, **35**(10): 1328-1331
 - GUO Shaolai, HU Yuan, LIU Ping, *et al.* The main component of tea polyphenols and EGCG in the mouse model of radiation damage in the protective effect [J]. Traditional Chinese Medicine, 2010, **35**(10): 1328-1331
 - 12 Beltz L A, Bayer D K, Moss A L, *et al.* Mechanisms of cancer prevention by green and black tea polyphenols [J]. Anticancer Agent Med Chem, 2006, **6**(5): 389-406

Genotoxicity of uranium dust in the bronchial epithelial cell and the protective effect of polyphenols

HUANG Bo^{1,2} HE Xingpeng² LONG Ying² QIU Jingsong² HUANG Yun² HU Jiangan¹

¹(School of Public Health, Central South University, Changsha 410078, China)

²(School of Public Health, University of South China, Hengyang 421001, China)

ABSTRACT To observe the genotoxicity induced by uranium dust in BEAS-2B cells and the protective effect of tea polyphenol, the cells were divided into three groups as control group, uranium dust group (high, medium and low dose group), tea polyphenols protection group, using the micronucleus multicore experiments, comet assay, the HPRT gene mutation detection and analysis of chromosome studies of uranium dust bronchial epithelial cells with the genotoxic effects of tea polyphenols protective effect. BEAS-2B cells exposed to uranium ore dust, compared with the control group, the number of comet cells (high dose group 156.75 ± 8.26), tail length (high dose group $164.48 \pm 12.11 \mu\text{m}$), tail length (high dose group, 109.92 ± 10.53) are significant increased ($p < 0.05$), and the dose-effect relationship; tea polyphenols have a significant inhibitory effect. Uranium dust-induced micro-nucleated cells (high dose group and 120.25 ‰), the increase in multinucleated cells (high dose group and 74.50 ‰), tea polyphenols inhibit multinucleated cells increased micronucleus ($p < 0.05$). The role of uranium dust in the BEAS-2B cells caused the increase in the HPRT gene mutation rate (high dose group and 1.092 ‰), tea polyphenols can effectively reduce the HPRT gene mutation rate. Chromosome analysis showed that by the transformed cells, there may be instability of chromosome aberrations after exposure, and tea polyphenols can inhibit chromosomal aberrations. The uranium dust has a strong genetic toxicity, and has a protective effect of tea polyphenols on the genetic toxicity of the uranium ore dust.

KEYWORDS Uranium dust, BEAS-2 B cells, Genotoxicity, Tea polyphenols, HPRT gene

CLC R135, R142.3, R131