

β -胡萝卜素对 $^{60}\text{Co-}\gamma$ 辐射诱发的大鼠 T-淋巴细胞 次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶位点突变影响

12818-74

R977-21

倪庆桂¹, 裴云 (海军神经生物学研究中心分子药理学室, 南京 210099, 中国)

Effect of β -carotene on $^{60}\text{Co-}\gamma$ -induced mutation at T-lymphocyte hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase locus in rats

NI Qing-Gui¹, PEI Yun

(Department of Molecular Pharmacology, Naval Neurobiology Research Centre, Nanjing 210099, China)

KEY WORDS carotene; experimental radiation injuries; hypoxanthine phosphoribosyltransferase; mutation; malondialdehyde; T-lymphocytes

AIM: To study the effect of β -carotene (β -Car) on radiation-induced mutation. **METHODS:** Mutant frequency at T-lymphocyte hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (HGPRT) locus in rats was measured using a T-lymphocyte cloning technique and malondialdehyde (MDA) was measured using a thiobarbituric acid (TBA). **RESULTS:** Mutant frequency at the HGPRT locus was elevated by $^{60}\text{Co-}\gamma$ 3.75 Gy, and was reduced by ig β -car 20 and 10 mg \cdot kg⁻¹ ($P < 0.05$), but not by β -Car 5 mg \cdot kg⁻¹. It showed a dose-dependent relationship. MDA was significantly reduced in plasma of rats given β -Car after $^{60}\text{Co-}\gamma$ radiation. There was positive coherence between MDA and mutant frequency at the HGPRT locus ($r = 0.9978$, $P < 0.05$). **CONCLUSIONS:** Radiation-induced mutation is inhibited by β -Car, associated with antioxidant action of β -Car.

关键词 胡萝卜素; 实验性辐射损伤; 次黄嘌呤, 磷酸核糖转移酶; 突变; 丙二醛; T-淋巴细胞

目的: 研究 β -胡萝卜素(β -Car)对电离辐射诱导的突变的影响。 **方法:** T-淋巴细胞克隆检测法测定大鼠 T-淋巴细胞次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HGPRT)位点的突变率和硫代巴比妥酸(TBA)法测定大鼠血丙二醛(MDA)。 **结果:** $^{60}\text{Co-}\gamma$ 3.75 Gy

照射大鼠显著提高 HGPRT 位点突变频率, ig β -Car 10 和 20 mg \cdot kg⁻¹, 突变频率明显降低($P < 0.05$), 应用 β -Car 5 mg \cdot kg⁻¹ 变化不甚显著, 表现一定的剂量依赖性, 同时 β -Car 也明显降低 $^{60}\text{Co-}\gamma$ 诱发的大鼠血中 MDA 水平($P < 0.05$)。 MDA 下降水平与 HGPRT 位点突变频率降低呈明显正相关性($r = 0.9978$, $P < 0.05$)。 **结论:** β -Car 具有抗电离辐射诱导的突变作用, 且这一作用与其抗氧化作用有关。

电离辐射介导的自由基学术揭示, 电离辐射产生自由基诱发生物细胞氧化过程引起 DNA 断裂, 碱基与核糖核酸基氧化, 碱基缺失及与蛋白交联等。 β -胡萝卜素(β -Car)有抗氧化作用, 可抑制脂质过氧化, 淬灭自由基, 抑制自由基的产生^[1]。 本实验检测大鼠 T-淋巴细胞 HGPRT 位点突变频率及其脂质过氧化物丙二醛(MDA)的含量, 观察不同剂量 β -Car 对大鼠 $^{60}\text{Co-}\gamma$ 辐射诱发的 HGPRT 位点突变的影响, 以探讨 β -Car 抗辐射诱导的突变作用。

MATERIALS

β -Car, 上海第六制药厂生产; $^{60}\text{Co-}\gamma$, 白细胞介素 2 (IL-2), 军事医学科学院提供; 淋巴细胞分离液, 植物血凝素(PHA), 硫代巴比妥酸(TBA), 上海试剂二厂生产; RPMI 1640 培养液, 日本制药株式会社生产; 6-硫代鸟嘌呤(6-TG), 1,1,3,3-四乙氧基丙烷(TEP), 美国 Sigma 公司生产; SD 大鼠, 体重 169 ± 5 16 g, 南京皮肤病研究所提供(一级, 苏动质 950032)。

METHODS

取正常大鼠无菌肝素抗凝血, 用淋巴细胞分离液分离淋巴细胞, 用含 20% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液配成 $1 \times 10^6 \cdot \text{L}^{-1}$ 悬液, 接种于培养瓶中, 加入 PHA(终浓度 100 mg \cdot L⁻¹), 培养 48-72 h, 洗涤 2 次, 制备淋巴细胞悬液。 以剂量率 6.67 Gy \cdot min⁻¹, 总剂量为 50 Gy $^{60}\text{Co-}\gamma$ 照射制备滋养细胞。

¹ Phn 86-25-443-1638, ext 42678 Fax 86-25-443-8475.

E-mail s5922599@public.ptt.js.cn

Received 1996-09-05

Accepted 1997-05-20

将大鼠分别 ig β -Car 5, 10, 20 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (玉米油溶液) 和玉米油, 5 wk 后以 $^{60}\text{Co}-\gamma$ 1.25 $\text{Gy}\cdot\text{min}^{-1}$, 距离 80 cm, 总剂量 3.75 Gy 照射, 非照射组 ig 玉米油不照射, 继续 ig 1 wk, 取血, 一份 10 mL 置入含肝素的无菌容器中混匀, 依上制备淋巴细胞悬液, 测 HGPRT 位点突变频率, 一份 2-3 mL 装入另一试管, 作 MDA 测定。

HGPRT 位点突变频率测定 用 T-淋巴细胞克隆法^[2], 并适当改变。将制备好的大鼠淋巴细胞悬液, 以 10 细胞/孔接种于含 1×10^4 滋养细胞的 96 孔培养板中, 加 IL-2 (终浓度 $2 \times 10^5 \text{ IU}\cdot\text{L}^{-1}$) 和不含 6-TG 的培养液, 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 , 8 d 后, 计阳性孔数, CE (克隆形成率) = $-\ln(\text{阴性孔数}/\text{接种总孔数})$ 。取 2×10^5 细胞/孔接种于含 1×10^4 滋养细胞的 96 孔培养板中, 加入 IL-2 (终浓度同上) 和含 6-TG (终浓度 $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 培养液, 同上条件培养, MF (突变频率) = $\frac{-\ln(\text{阴性孔数}/\text{接种总孔数})}{\text{每孔接种细胞数} \times \text{CE}}$ 。

脂质过氧化物 MDA 测定 用 TBA 法^[3]测定, 并适当改变。将血样分离出血清, 取 0.3 mL 血清, 加三氯醋酸 (浓度为 $200 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) 2.5 mL, 边加边摇, 加入 TBA (浓度为 $6.7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) 1.0 mL, 加盖, 沸水浴 30 min, 流水冷却至室温, 加入正丁醇 4 mL, 混匀, 抽取 TBA 色素, $1500 \times g$ 离心 10 min, 取上层液测定, 标准液 0.3 mL (含 TEP $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 作相同操作, 以正丁醇调零, 535 nm 测吸光度 (A) 值。MDA = $10 \times (\text{实验 A}/\text{标准 A})$ 。

RESULTS

$^{60}\text{Co}-\gamma$ 照射诱发的 HGPRT 位点突变频率显著提高, 应用 β -Car 10 和 20 mg 后, 突变频率明显降低, 应用 β -Car 5 mg 变化不甚显著, 表现一定的剂量依赖性。 β -Car 在 20 mg 时明显降低 $^{60}\text{Co}-\gamma$ 诱发的大鼠血中脂质过氧化物 MDA 水平, 经过相关性分析, 发现 MDA 下降水平与 HGPRT 位点突变频率降低呈明显正相关性 ($r = 0.9978$, $P < 0.05$) (Tab 1)。

DISCUSSION

一例病人受 5 Gy 急性电离照射, 明显升高 HGPRT 位点突变频率, 3 a 以后仍然很高^[4]。用 $^{60}\text{Co}-\gamma$ 0.5, 1, 2, 3, 4 Gy 体外照射人淋巴细胞, T-淋巴细胞 HGPRT 位点突变频率都有不同程度的提高, 并呈明显的剂量依赖性^[5]。本实验以 3.75 Gy 的剂量照射大鼠, T-淋巴细胞 HGPRT 位点突变频

Tab 1. Effect of β -carotene on $^{60}\text{Co}-\gamma$ -induced mutation at T-lymphocyte HGPRT locus in rats. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$, $^{*}P < 0.05$ vs corn oil group.

Groups/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	Mutant cells/ 10^5 T-lymphocytes	MDA/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
Corn oil	9.1 ± 3.1	11.9 ± 2.2
β -Carotene 5	6.2 ± 2.3	9.9 ± 2.1
10	4.9 ± 1.7^b	8.7 ± 1.8
20	3.8 ± 1.2^b	7.4 ± 1.5^b
Without $^{60}\text{Co}-\gamma$	3.2 ± 1.3^b	7.1 ± 2.1^b

率为 2-3 细胞/ 10^5 T-淋巴细胞 $\cdot\text{Gy}^{-1}$, 与上述结果相同, 较未照射组显著升高。

应用 β -Car 后, $^{60}\text{Co}-\gamma$ 诱导的 HGPRT 突变和脂质过氧化均受到抑制, 且抗 HGPRT 突变作用与脂质过氧化作用有关。电离辐射除可介导自由基间接引起突变外, 也可直接损伤 DNA 引起突变, 由上可知 β -Car 抗突变作用主要是影响了后者。但 β -Car 在 10 mg 时已可抗 HGPRT 位点突变, 而 MDA 在 β -car 为 20 mg 时才显著改变, 说明 β -Car 抗氧化作用不是其抗 HGPRT 位点突变的唯一因素, 此方面尚待进一步的研究。

β -Car 是维生素 A 的前体, 而其抗氧化性是维生素 A 所没有的, 因此, β -Car 的抗电离辐射诱发的 HGPRT 位点突变是其自身的活性所致。

β -Car 广泛地存在于自然界中, 无毒, β -Car 的抗辐射所致突变作用对于经常接触放射性物质的保护等具有一定的意义。

REFERENCES

- 1 Krinsky NI. Carotenoids as chemopreventive agents. *Prev Med* 1989; 18: 592-602.
- 2 Vijayalaxmi, Evans HJ. Measurement of spontaneous and X-irradiation-induced 6-thioguanine-resistant human blood lymphocytes using a T-cell cloning technique. *Mutat Res* 1984; 125: 87-94.
- 3 Zhong FS, Hu WY, Fong C. The determination of serum lipid peroxides by means of the colorimetric method with TBA reagent. *J Clin Lab Technology* 1986; 4: 129-30.
- 4 Albertini RJ, Gennett IN, Lambert B, Thilly WG, Vrieling H. Mutation at the HPRT locus. *Mutat Res* 1989; 216: 65-88.
- 5 Cao Y, Xu HL, Wu QQ, Duan ZK. Assay of mutant frequency induced by irradiation and chemical mutagens at the HGPRT locus of T-lymphocytes in human peripheral blood. *Chin J Radiol Med Prot* 1996; 16: 43-6.