

硒在¹⁴⁷Pm 内污染条件下对体细胞和生殖细胞 UDS 的刺激效应

朱寿彭 杨占山 赖冠华

(苏州医学院, 215007)

摘 要 本文研究了机体处在荧光涂料激发能源¹⁴⁷Pm 内污染条件下, 不同剂量水平的微量元素硒对体细胞中的脾脏淋巴细胞和生殖细胞中精子非程序 DNA 合成(UDS)的刺激效应。观察发现, 当加入 0.18—0.72 mg/mL 范围不同剂量水平的亚硒酸钠培养时, 观察到能使脾淋巴细胞紫外线(UV)诱导的 UDS 值明显增长, 表明了硒能增强对 DNA 损伤的切除修复能力, 使脾淋巴细胞的 DNA 修复能力得到加强, 出明显的刺激效应。至于机体在内污染荧光涂料激发能源¹⁴⁷Pm 条件下, 加入剂量水平为 0.18 mg/mL 的亚硒酸钠培养时, 观察到可使精子 UV 诱导的 UDS 值明显增加, 表明精子中的 DNA 修复能力增强。但随着加入硒剂量增至 0.36—0.72 mg/mL 水平时, 观察到机体雄性生殖细胞精子 UV 诱导的 UDS 值明显下降, 呈现出精子 DNA 的修复能力受到了损伤。

关键词 硒 ¹⁴⁷Pm 内污染 非程序 DNA 合成

硒作为一种人体必需的微量元素, 是机体的必需营养素, 其生理功能及其与人体健康的关系愈来愈受到人们的关注和重视^[1]。我们以前的工作^[2, 3]研究了硒在全身水平、脏器水平以及细胞水平的行径滞留动态, 因为这关系到硒对机体作用的发生和预后, 并与其作用机理紧密关联, 其在体内作用的表现和延续, 取决于其在机体中的生物转运和转化代谢因素的动态过程。本文探讨了当机体处在荧光涂料激发能源¹⁴⁷Pm 内污染条件下, 微量元素硒对脾淋巴细胞和精子非程序 DNA 合成(UDS)的刺激效应。

1 实验方法和结果

1.1 硒在¹⁴⁷Pm 内污染条件下对脾淋巴细胞 UV 诱导 UDS 的刺激效应

实验观察选用纯品系 BALB/c 的雄性小白鼠进行。使用的荧光涂料激发能源、裂变产物¹⁴⁷Pm 原液的放射性浓度为 17.5 GBq/mL, ³H-TdR 的放射性浓度为 37 MBq/mL。将实验小白鼠随机分成 4 个组, 每组含 5 只动物, 均由尾静脉注入¹⁴⁷Pm 37 kBq/g, 而对照组注入等容量的生理盐水。12 d 后小白鼠由颈动脉放血处死, 立即无菌操作取脾, 置于 RPM I 1640 基础培养液中, 用眼科弯镊刮脾脏制成单细胞悬液, 离心去上清, 随即用含 10⁻² mol 羟基脲的 RPM I 1640 全培养液(含 10% FCS, 20 mmol Hepes, 5 × 10⁻⁵ mol 2-ME, 2 mmol L-*glutamine*, 3.6 g Glucose, 2 g NaHCO₃, 100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素), 调整细胞液浓度为 1 × 10⁷ mL。取 24 孔平底培养板, 每孔加入已调整好的细胞悬液, 每一样品设 3 只

重复孔,一式共 2 块培养板,将培养板放入 37 ℃、5% CO₂ 细胞培养器中预培养 30 min 后,取出,将其中一块培养板置于无菌超净工作台中央,用 15 W 紫外线(UV)光源,距离 40 cm 处照射 5 s,其 UV 剂量为 20 J/m²。随后在两块平底培养板的对照 3 只重复孔中各加入全培养液,而在实验各组的每 3 只重复孔中各分别加入 0.18、0.36 和 0.72 mg/mL 的亚硒酸钠,最后在培养板的全部孔中各加入 37 kBq ³H-TdR,再放入 37 ℃、5% CO₂ 细胞培养器中培养 2 h。培养结束后,立即用多头细胞样品收集器收获细胞于 49 型醋酸纤维滤膜上,依次用生理盐水冲洗,10% 三氯醋酸固定,无水乙醇脱水后,取出滤膜样品,在红外灯下烘干后,即可置于含 5 mL 的 0.6% PPO 和 0.06% POPOP 二甲苯闪烁液的液闪测量杯中,使滤膜片的细胞面向上,放置于紧贴测量杯底部。经暗适应后,用 Beckman 液体闪烁计数装置测量各样本的计数率(cpm)。随后将 UV 诱导的 UDS 结果按经 UV 照射的淋巴细胞³H-TdR 掺入 cpm 减去未经 UV 照射的淋巴细胞³H-TdR 掺入 cpm 的差值表示。

实验结果列于表 1。由表 1 可见,当机体处在内污染¹⁴⁷Pm 时,其使脾淋巴细胞 UV 诱导的 UDS 值为 797.4;而当加入 0.18—0.72 mg/mL 不同剂量的亚硒酸钠培养时,均可见到能使脾淋巴细胞 UV 诱导的 UDS 值明显增升,其增值处在 1434.9—2755.3 之间。说明了在上述剂量范围的硒作用下,能增强对 DNA 损伤的切除修复能力,使脾淋巴细胞的 DNA 修复功能得到加强,呈现出明显的刺激效应。

表 1 不同剂量硒在¹⁴⁷Pm 内污染条件下对脾淋巴细胞 UDS 的影响

硒加入培养液浓度 (mg/mL)	实验 动物数	UDS 值 [(UV 组计数率- 对照组计数率)/10 ⁷ 细胞]	相对值
0	5	797.4 ± 135.5	1.00
0.18	5	2755.3 ± 298.4 [*]	3.45
0.36	5	1569.1 ± 215.9 [*]	1.97
0.72	5	1434.9 ± 231.7 [*]	1.78

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。

1.2 硒在¹⁴⁷Pm 内污染条件下对精子 UV 诱导 UDS 的效应

实验动物与¹⁴⁷Pm 和³H-TdR 的放射性浓度都与第一部分实验相同。观察共设 4 个组,每组 5 只动物。将各实验组的小白鼠于内污染¹⁴⁷Pm 12 d 后由颈动脉放血处死,迅速无菌剖取分离出双侧的输精管,剪断成数截,然后将每只动物的输精管分别放入盛有 5 mL pH 为 7.2 的 PBS 液的小烧杯中,并注意用黑纸包裹置于黑暗处以防可见光对精子的损伤^[4, 6]。放置 20 min 后,输精管中的大部分精子均可游入 PBS 中,然后离心,弃上清,随即用含有 10⁻² mol 羟基脲的 RPM I 1640 全培养液调整精子浓度为 1 × 10⁶ mL 的悬液。显微镜观察时,可见这样采集到的精子活力良好。

取 24 孔平底培养板,加入精子悬液,每一样品设 3 只重复孔,一式共 2 块培养板。先将培养板放入 37 ℃、5% CO₂ 细胞培养器中预培养 30 min 后,取出,将其中的一块培养板同第一部分实验条件用剂量为 20 J/m² 的 UV 照射。随后在两块平板培养板的 3 只对照重复孔中各加入全培养液,而在实验各组的 3 只重复孔中同第一部分实验各分别加入 0.18、0.36 和 0.72 mg/mL 的亚硒酸钠,最后在全部分板孔中各加入 37 kBq 的³H-TdR,再放入

37、5% CO₂ 细胞培养器中培养 2 h, 培养结束后的 49 型醋酸纤维素膜标本制备及纸片法液体闪烁测量计数的条件及数据处理, 都与第一部分实验相同。

观察结果列于表 2。由表 2 可见当机体在内污染荧光涂料激发能源¹⁴⁷Pm 条件下, 其致使精子 UV 诱导的 UDS 值为 292.9。而在加入剂量水平为 0.18 mg/mL 的亚硒酸钠培养时, 观察到可使精子 UV 诱导的 UDS 值明显增升, 表明在此硒剂量作用条件下, 可使精子中的 DNA 修复能力增强。但随着加入硒剂量水平增升至 0.36-0.72 mg/mL 时, 观察到精子 UV 诱导的 UDS 值呈现明显下降, 说明了在此硒剂量条件下, 表现出精子 DNA 的修复能力受到了损伤。

表 2 不同剂量硒在¹⁴⁷Pm 内污染条件下对精子 UDS 的影响

硒加入培养液浓度 (mg/mL)	实验 动物数	UDS 值 [(UV 组计数率- 对照组计数率)/10 ⁶ 细胞]	相对值
0	5	292.9 ± 55.7	1.00
0.18	5	508.7 ± 98.3 ^{**}	1.73
0.36	5	197.5 ± 67.9 [*]	0.67
0.72	5	194.8 ± 48.8 [*]	0.66

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

2 讨论

生物细胞具有高效切除修复 DNA 损伤的能力, 这些细胞包括已增殖的哺乳动物细胞^[7]和各种淋巴细胞等^[8]。DNA 切除修复与细胞周期无关^[9], 称非程序 DNA 合成(DNS), 这种切除修复不受 DNA 半保留复制合成抑制剂羟基脲的影响^[10]。

由于机体中免疫系统的状况与肿瘤、免疫缺陷病和辐射远后效应的发生密切相关, 因此我们特别关注机体外周免疫器脾脏淋巴细胞在荧光涂料激发能源¹⁴⁷Pm 内污染条件下的 UV 诱导 UDS, 以及在不同剂量水平硒作用下的改变。本研究表明, 当硒的剂量水平处在 0.18—0.72 mg/mL 水平时, 可使体细胞中的脾脏淋巴细胞对 UV 诱导的 UDS 具有明显的刺激作用, 即可增强对 DNA 损伤的切除修复能力。表明微量元素硒可诱发机体脾淋巴细胞的 DNA 损伤修复功能增强。实验还发现, 机体中雄性生殖细胞精子, 在硒的剂量水平为 0.18mg/mL 作用下, 观察到亦可使精子 UV 诱导的 UDS 值明显增升, 呈现出刺激效应, 使精子中的 DNA 修复能力增强。

UDS 的功能变化与一系列的酶活性增强有关^[11], 它是维持 DNA 遗传完整性的基础^[12]。而本实验中观察到硒具有在¹⁴⁷Pm 内污染条件下对体细胞和生殖细胞 UDS 的刺激效应。应该考虑到硒作为活性氧自由基的消除剂, 它在细胞中具有抗氧化的功能, 能阻止自由基的产生, 从而可以保护细胞免受氧化损伤。

(下转第 47 页)

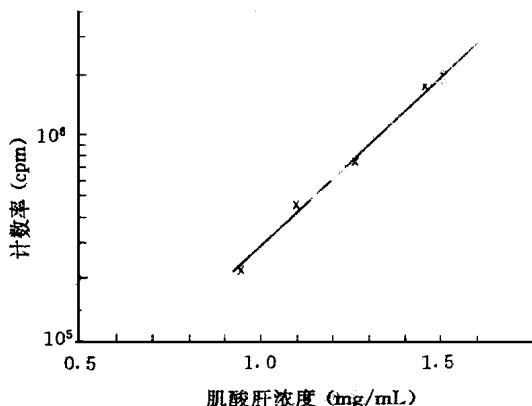


图 8 肌酐酞溶液闪样计数与肌酐酞浓度的关系

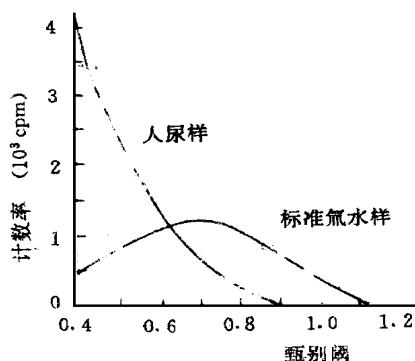


图 9 人尿样和氚水样的计数谱

参 考 文 献

- 1 A. 费利等. 尿液分析, 吴山等译. 广东科技出版社, 1980: 8—11.
- 2 D.L. 霍罗光斯. 液体闪烁计数技术的应用. 黄显太译. 原子能出版社, 1981: 294—312.
- 3 梁联中. 核技术, 1986: (2).

(上接第 32 页)

参 考 文 献

- 1 Bachrach W H, Birsner J W. Gastroenterology, 1972. 65(5): 890.
- 2 朱寿彭等. 中国核科技报告, CN IC-00816, SMC-0102, 北京: 原子能出版社, 1994. 1—9.
- 3 朱寿彭等. 中国药理学报, 1987. 8(1): 93.
- 4 Kohn K W et al. Biochemistry, 1976. 15: 4629.
- 5 Share J A, Schrotel K R. Mutat. Res., 1984. 130: 283.
- 6 Woods W G et al. Biochem. Biophys. Acta, 1982. 698: 40.
- 7 Rasmussen R E, Painter R B. J. Cell Biol., 1966. 29(1): 11.
- 8 Lewensohn R et al. J. Cell Sci., 1982. 54(1): 69.
- 9 Sawada S, Okada S. Radiat Res., 1970. 41(1): 140.
- 10 Young G W et al. Cancer Res., 1967. 27: 526.
- 11 Hill M. Int. J. Radiat. Biol., 1967. 13: 109.
- 12 Shoshana S et al. Mutat. Res., 1982. 95: 389.