

## 硒酸酯多糖抗石英细胞毒性的研究

刘永民\* 王金晔 朱卫华 魏金华 陈荣三  
(南京大学配位化学研究所, 配位化学国家重点实验室, 南京 210093)

本文采用家兔肺泡巨噬细胞(AM)体外培养法, 以 AR-CM 阳离子测定系统和荧光试剂 Fura-2, 研究了石英细胞毒性与肺泡巨噬细胞胞浆游离  $Ca^{2+}$  浓度 ( $[Ca^{2+}]_i$ ) 的关系, 并以细胞存活率、乳酸脱氢酶 (LDH) 活性和脂质过氧化物 (LPO) 表征了由石英引起的 AM 毒性及硒酸酯多糖对其毒性的拮抗效应, 初步讨论了硒酸酯多糖拮抗石英细胞毒性的可能机理。

关键词: 硒酸酯多糖 石英 细胞毒性 胞浆游离  $Ca^{2+}$  浓度

### 前 言

微量元素与人类健康密切相关, 大量实验资料证实硒元素具有清除自由基、保护细胞、拮抗毒性和提高机体免疫功能等作用<sup>(1)</sup>, 而且一般认为有机硒化物具有较高的生理活性, 易被生物体所吸收<sup>(2)</sup>。硒酸酯多糖又称为硒化-卡拉胶 (简写 Kappa-Se), 系 C-4 酯化的硒酸酯半乳聚糖, 是一种含硒的有机化合物。本实验用 SPEX 阳离子测定系统, 以 Fura-2 荧光试剂测定了家兔肺泡巨噬细胞在不同培养条件下的  $[Ca^{2+}]_i$ , 同时又以脂质过氧化物、乳酸脱氢酶和细胞存活率为指标, 观察了硒酸酯多糖拮抗石英细胞毒性的效应, 并对其作用机理作了初步讨论。这将为危害严重的职业病矽肺 (矽肺) 的防治, 提供有用的参考资料。

### 实 验 部 分

#### 一、仪器和试剂

1、仪器: AR-CM 阳离子测定系统 (美国 SPEX 公司); 倒置荧光显微镜 (日本 Nikon 公司); RF-540 型荧光分光光度计和 UV-240 紫外分光光度计 (均为日本岛津公司);  $CO_2$  气流培养箱 (美国 Shelter 公司)。

2、试样及试剂: 标准  $\alpha$ -石英粉尘 (粒径小于  $5\mu m$ ; 含游离  $SiO_2$  97.7%), 中国预防医学科学院生产; Fura-2 试剂、RPMI-1640 干粉培养基及 Ionomycin 均为美国 Sigma 公司产品; 硫代巴比妥酸 (TBA) 及 1,1,3,3-四乙氧基丙烷 (TEP) 均为瑞士 Fluka 公司产品; 乙二醇双 ( $\alpha$ -氨基乙基) 醚-四乙酸 (EGTA)、还原辅酶 I 及 N-2-羟乙基哌嗪-N'-2'-乙烷磺酸 (HEPES) 为进口分装生化试剂; 硒酸酯多糖 (Kappa-Se), 张家港天赐福生物工程有限公司提供; 其他试剂, 均为国产分析纯试剂或生化试剂, 所有实验用水均为重蒸水。

#### 二、实验方法

1、巨噬细胞 (AM) 悬液的制备: 2.5kg 左右健康家兔 (江苏省动物中心提供) 股动脉放

本文于1994年1月25日收到。

国家自然科学基金资助课题。

\* 徐州医学院。

血处死后,置于超净工作台,在无菌条件下暴露气管,用D-Hank液反复灌洗,将收集的灌洗液离心分离(1500rpm, 10min),细胞经贴壁纯化后,用RPMI-1640培养液(内含100 $\mu$ g/ml青霉素、100 $\mu$ g/ml链霉素及10%小牛血清)配成 $1 \times 10^6$ AM/ml的细胞悬液。

2、细胞存活率测定:将 $\alpha$ -石英临用前紫外线照射30min,用生理盐水配成5mg/ml悬浊液;硒酸酯多糖用生理盐水配成2mg/ml溶液。分别取0.90ml  $1 \times 10^6$ AM/ml的细胞悬液置于各细胞培养瓶中,对照组加入100 $\mu$ l生理盐水;石英组分别加入石英悬液80 $\mu$ l和20 $\mu$ l;硒酸酯多糖组分别加入硒酸酯多糖溶液25 $\mu$ l和5 $\mu$ l;石英+硒酸酯多糖组分别按组合量加入石英悬液及硒酸酯多糖溶液。所有各组均在37 $^{\circ}$ C、CO<sub>2</sub>气含量5%的培养箱中温育,分别取4、8、20和32h温育的细胞培养液,用台盼蓝排斥法计数细胞存活率。

3、乳酸脱氢酶(LDH)活性测定:实验操作同2,但各组温育时间取4和20h,随即将细胞培养液离心分离(1500rpm, 10min),取上清液,按文献<sup>[3]</sup>测定LDH活性。活性单位皆折算成每 $1 \times 10^6$ AM释放出的酶每秒催化水解生成产物的nmol数来表示。

4、脂质过氧化物(LPO)的测定:实验操作同2,各组分别温育1和3h后,细胞悬液离心(3000rpm, 10min),细胞用生理盐水洗涤1~2次,按文献<sup>[4]</sup>进行LPO测定。测定时以TEP为标准,每份细胞数约为50万。

5、细胞[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>的测定<sup>[5]</sup>:在 $5 \times 10^5$ AM/ml的细胞悬液中,加入Fura-2/AM终浓度达2 $\mu$ mol/l和小牛血清终浓度为10%(V/V),放在5%CO<sub>2</sub>气流培养箱中,37 $^{\circ}$ C恒温负载30min后,离心分离(1500rpm, 10min),弃去上清液。细胞先用HEPES缓冲溶液洗涤两次,再用此溶液配成 $5 \times 10^5$ AM/ml悬液。实验操作同2,在5%CO<sub>2</sub>气流培养箱中37 $^{\circ}$ C分别温育1和3h,取出离心分离(1500rpm, 10min)后,细胞重悬于HEPES液中,37 $^{\circ}$ C分别测定其单细胞荧光强度( $\lambda_{ex}$  = 340nm和380nm,  $\lambda_{em}$ 为505nm),细胞[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>按下式计算:

$$[Ca^{2+}]_i = K_d \beta (R - R_{min}) / (R_{max} - R)$$

$K_d$ 是Fura-2-Ca的离解常数,在实验测定温度37 $^{\circ}$ C时,  $K_d = 2.24 \times 10^{-7}$ mol/l,  $R$ 为实测荧光强度减去细胞的自发荧光强度后的荧光比值 $F_{340} / F_{380}$ ,由实验测得常数 $R_{max}$ 、 $R_{min}$ 和 $\beta$ 依次为 $7.06 \pm 0.44$  ( $n=8$ )、 $0.62 \pm 0.06$  ( $n=10$ )和 $4.96 \pm 0.37$  ( $n=10$ )。

## 结果与讨论

一、细胞存活率:测定结果见表1。两组不同浓度的硒酸酯多糖(Kappa-Sc)与生理盐水对照组比较,均无显著差异( $p > 0.05$ ),说明在所示条件下它无细胞毒性。各组在4h内均无明显差异,但随着时间的延长,各组的细胞存活率皆有不同程度的降低,8h以上已有明显区别。两石英组存活率最低,且浓度越高对细胞毒性越大。石英加硒酸酯多糖后细胞存活率明显提高,且硒酸酯多糖高浓度组较较低浓度组更佳,提示它有保护AM的作用。

二、乳酸脱氢酶(LDH)活性:测定结果见表2。石英组与对照组比较在温育4h时,LDH活性即有显著差异( $p < 0.05$ )。石英加硒酸酯多糖后LDH释放速率减慢,且石英加硒酸酯多糖高浓度组更明显。说明硒酸酯多糖对石英引起的细胞毒性和LDH活性的升高均有拮抗作用,但硒酸酯多糖组本身无毒性(其与对照组相比 $p > 0.05$ )。本测定结果与细胞存活率相符合。

表 1 AM 在不同条件下的存活率(%)

Table 1 Survival Percents of AM in Various Conditions

groups	survival percents of AM(%)			
	4h	8h	20h	32h
control	92.1 ± 1.1	92.5 ± 1.0	84.5 ± 2.3	76.6 ± 0.9
quartz(100μg)	89.1 ± 0.9	75.3 ± 2.6*	62.0 ± 2.8**	38.1 ± 2.0**
quartz(400μg)	82.6 ± 1.6	71.3 ± 3.0*	52.9 ± 1.3**	27.7 ± 1.6**
Kappa-Sc(10μg)	92.4 ± 1.8	91.0 ± 1.4	81.7 ± 3.0	71.8 ± 2.4
Kappa-Sc(50μg)	92.1 ± 0.9	90.5 ± 1.4	83.5 ± 1.8	73.7 ± 2.7
quartz(100μg)+Kappa-Sc(10μg)	92.6 ± 0.6	90.9 ± 2.4*	81.8 ± 6.6**	69.7 ± 2.0**
quartz(400μg)+Kappa-Sc(10μg)	91.3 ± 1.3	87.0 ± 0.9*	74.3 ± 2.9**	63.8 ± 4.1**
quartz(100μg)+Kappa-Sc(50μg)	92.3 ± 1.5	89.2 ± 1.8*	78.2 ± 2.6**	65.5 ± 4.2**
quartz(400μg)+Kappa-Sc(50μg)	92.2 ± 0.8	88.0 ± 1.1*	77.9 ± 3.0**	61.1 ± 1.9**

Data given in table 1 are the means ± SD, n = 4.

\*  $p < 0.05$ , vs the control group

\*\*  $p < 0.01$ , vs the control group

+  $p < 0.05$ , vs the quartz group

++  $p < 0.01$ , vs the quartz group

表 2 AM 培养液 LDH 活性

Table 2 LDH Activities of AM in Culture Medium

groups	LDH activities (nmol · s <sup>-1</sup> · 10 <sup>-6</sup> AM)	
	4h	20h
control	405 ± 30	519 ± 22
quartz(100μg)	607 ± 17**	764 ± 21**
quartz(400μg)	821 ± 23**	1213 ± 59**
Kappa-Sc(10μg)	386 ± 13	512 ± 16
Kappa-Sc(50μg)	402 ± 24	549 ± 21
quartz(100μg)+Kappa-Sc(10μg)	472 ± 30*	596 ± 17**
quartz(400μg)+Kappa-Sc(10μg)	509 ± 24*	689 ± 34**
quartz(100μg)+Kappa-Sc(50μg)	440 ± 25**	566 ± 33
quartz(400μg)+Kappa-Sc(50μg)	479 ± 21**	600 ± 23**

Notes are the same as in table 1.

三、脂质过氧化物 (LPO) 的变化: 结果见表 3。各组随着培养时间增加, LPO 值增高。石英组与对照组有明显差异( $p < 0.05$ ), 石英加硒酸酯多糖组与石英组亦有明显差异( $p < 0.05$ )。提示硒酸酯多糖具有一定的抗脂质过氧化作用, 其结果与细胞存活率和 LDH 活性测定结果相平行。

表3 AM在不同条件下的LPO值

Table 3 LPO of AM in Various Conditions

groups	LPO (nmol · 10 <sup>-7</sup> AM)	
	1h	3h
control	0.63 ± 0.05	0.74 ± 0.08
quartz(100μg)	0.87 ± 0.11 <sup>*</sup>	1.08 ± 0.17 <sup>**</sup>
Kappa-Se(10μg)	0.67 ± 0.10	0.75 ± 0.05
quartz(100μg)+Kappa-Se(10μg)	0.75 ± 0.08 <sup>+</sup>	0.76 ± 0.09 <sup>++</sup>

Notes are the same as in table 1.

四、细胞[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>的变化: 结果见表4。培养1h后, 石英组与对照组比较有显著差异( $p < 0.05$ ), 表明石英明显提高了AM内游离钙浓度。石英加硒酸酯多糖后, 细胞[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>皆比石英组明显降低, 从而表明硒酸酯多糖具有明显的拮抗石英细胞毒性作用。

表4 AM在不同条件下的[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>Table 4 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> of AM in Various Conditions

groups	[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> (nmol · L <sup>-1</sup> )	
	1h	3h
control	127 ± 25(10)	131 ± 41(13)
quartz(100μg)	155 ± 31(12) <sup>*</sup>	193 ± 48(12) <sup>**</sup>
quartz(400μg)	339 ± 59(14) <sup>*</sup>	439 ± 65(8) <sup>**</sup>
Kappa-Se(10μg)	133 ± 26(12)	137 ± 29(11)
Kappa-Se(50μg)	134 ± 16(10)	135 ± 45(12)
quartz(100μg)+Kappa-Se(10μg)	145 ± 38(13) <sup>+</sup>	154 ± 49(8) <sup>++</sup>
quartz(400μg)+Kappa-Se(10μg)	185 ± 48(12) <sup>+</sup>	176 ± 37(9) <sup>++</sup>
quartz(100μg)+Kappa-Se(50μg)	132 ± 49(12) <sup>+</sup>	152 ± 41(10) <sup>++</sup>

Notes are the same as in table 1, the number in parenthesis represents the number of measured cells.

Kane认为石英的细胞毒性首先是石英破坏了细胞膜的结构和功能, 造成胞外Ca<sup>2+</sup>的大量内流, 使胞内Ca<sup>2+</sup>超载, 引起细胞内亚微结构损伤, 最后导致细胞死亡<sup>(6)</sup>。这种观点已被本实验室所证实<sup>(7)</sup>。本实验所用石英剂量与细胞毒性的正相关, 亦可说明这个问题。石英引起细胞毒性的另一个原因是其悬液中存在O<sub>2</sub><sup>-</sup>和·OH自由基<sup>(8)</sup>。这些自由基通过诱发脂质过氧化反应, 导致细胞膜的损伤, 而硒及硒化物具有清除自由基的作用<sup>(1)</sup>。说明硒酸酯多糖有效地维持了细胞膜的正常结构和功能, 起到拮抗石英毒性、保护细胞的作用。

## 参 考 文 献

- [1] Dalal, N.S. et al, *J. Toxi. Environ. Health*, **27**, 435(1989).  
[2] 陈震寰等, 无机化学新论选读, 陕西人民出版社, 西安(1988).  
[3] 蒋传葵等, 工具酶的活力测定, 上海科学技术出版社, 上海(1982).  
[4] 翁玉椿等, 细胞生物学杂志, **7**(3), 142(1985).  
[5] Mcdonough, P. M., Button, D. C., *Cell Calcium*, **10**, 171(1989).  
[6] Kanc, A. B. et al, *J. Cell Biol.*, **87**, 643(1980).  
[7] 温和瑞、陈荣三等, 无机化学学报, **9**(3), 266(1993).  
[8] Barry, H. et al, *Biochem. J.*, **219**, 1(1984).

## RESEARCH OF ANTAGONISM OF KAPPA- SELENOCARRAGEENAN TO CYTOTOXICITY OF QUARTZ

Liu Yongmin    Wang Jinxi    Zhu Weihua    Wei Jinhua    Chen Rongsan

(*Institute of Coordination Chemistry*,

*State Key Laboratory of Coordination Chemistry, Nanjing University, Nanjing 210093*)

In this article, the relation between the cytotoxicity of quartz and the change of cytoplasmic free  $\text{Ca}^{2+}$  of alveolar macrophage was studied by means of AR-CM cation measurement system and fluorescence solvent Fura-2. Both the cytotoxicity of quartz and the antagonized effects of Kappa-selenocarrageenan were characterized by the survival percent of cells, the activities of LDH and LPO as well. In addition, the mechanism of Kappa-selenocarrageenan's suppressing cytotoxicity of quartz was also discussed.

**Keywords:** Kappa-selenocarrageenan    quartz    cytotoxicity    cytoplasmic free  $\text{Ca}^{2+}$