

# 稀土化合物对离体巨噬细胞的影响

温和瑞\* 郭国瑞

(赣南师范学院化学系, 赣州 341000)

朱卫华 王金晔

(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)

本文应用细胞培养法和单细胞阳离子测定系统研究了稀土化合物对巨噬细胞的影响。结果表明, 在培养介质中  $\text{SmCl}_3$  和  $\text{YCl}_3$  的浓度大于  $1\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$  时, 有明显的细胞毒性,  $\text{YCl}_3$  的细胞毒性大于  $\text{SmCl}_3$ ,  $\text{SmCl}_3$  和  $\text{YCl}_3$  的细胞毒性明显大于  $\text{Sm}(\text{Ala})_3\text{Cl}_3$  和  $\text{Y}(\text{Ala})_2\text{Cl}_3$ , 稀土化合物的作用使细胞  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  升高; 毒性越大,  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  升高越甚。低浓度  $\text{Sm}^{3+}$  和  $\text{Y}^{3+}$  对细胞膜  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶有激活作用。

关键词: 稀土化合物 细胞毒性 胞浆游离  $\text{Ca}^{2+}$   $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶

稀土元素虽不是生命必需元素, 但对它的生物效应研究表明, 稀土元素对机体细胞的一些物质代谢过程和酶的活性具有促进或抑制作用<sup>[1]</sup>。特别是有些稀土化合物对动植物生长具有促进作用以及抗血凝、抗炎症和抗肿瘤等药理作用<sup>[2]</sup>, 稀土生物无机化学的研究引起了人们的广泛重视。目前, 对稀土化合物在整体水平的生物效应的研究较多, 但在细胞和亚细胞的水平研究稀土元素生物效应则较少<sup>[3,4]</sup>。本文应用细胞培养法和单细胞阳离子测定系统研究了稀土钆和铈的化合物对离体巨噬细胞的影响, 获得了若干有意义的结果。

## 实验方法

### 一、仪器与主要试剂

1815TC 型  $\text{CO}_2$  培养箱(美国, Shelter 公司)。AR-CM-MIC 型单细胞阳离子测定系统(美国, SPEX 公司)。AFX-DX 倒置荧光显微镜(日本 Nikon 公司)。岛津 UV-240 型紫外可见分光光度计(日本)。

· 荧光试剂 Fura-2/AM, RPMI 1640 培养剂(美国, Sigma 公司)。N-2-羟乙基哌嗪-N'-2'-乙烷磺酸(HEPES, 生化试剂)。三羟基甲基氨基甲烷(Tris, 生化试剂)。99.99%的  $\text{Y}_2\text{O}_3$ , 99.6%的  $\text{Sm}_2\text{O}_3$  (赣加稀土公司提供)。其他试剂均为国产 A.R 级。

### 二、 $\text{SmCl}_3$ 、 $\text{YCl}_3$ 、 $\text{Sm}(\text{Ala})_2\text{Cl}_3$ 和 $\text{Y}(\text{Ala})_2\text{Cl}_3$ 的合成

1.74 克  $\text{Sm}_2\text{O}_3$ 、1.13 克  $\text{Y}_2\text{O}_3$  分别溶于  $6\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  的  $\text{HCl}$  中, 缓慢加热至干后, 用二次蒸馏水配成  $0.1\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  的  $\text{SmCl}_3$  和  $0.1\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  的  $\text{YCl}_3$  溶液备用。

$\text{Sm}$ -丙氨酸配合物( $\text{Sm}(\text{Ala})_3\text{Cl}_3$ ),  $\text{Y}$ -丙氨酸配合物( $\text{Y}(\text{Ala})_2\text{Cl}_3$ )参照文献<sup>[5]</sup>的方法合成。

收稿日期: 1994-12-21.

江西省青年科学基金资助课题。

\* 通讯联系人。

第一作者: 温和瑞, 男 30 岁, 讲师。主要研究方向是环境生物无机化学。

### 三、细胞悬液的制备

家兔(2-3kg,性别不拘)股动脉放血处死,用0.9%的生理盐水经脑灌注获得巨噬细胞,用RPMI 1640细胞培养液或HEPES细胞缓冲液配成 $5\sim 6 \times 10^5$  cells/ml的细胞悬液备用。

### 四、红细胞膜的制备

用肝素钠抗凝收集家兔血液,参照文献<sup>[6]</sup>方法制备红细胞膜。红细胞膜悬浮于 $10\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 的Tris-HCl(pH=7.2)缓冲液中,冰冻(-18℃)保存备用。

### 五、细胞存活率的测定

在RPMI 1640培养液的细胞悬液中分别加入不同浓度的 $\text{SmCl}_3$ 、 $\text{YCl}_3$ 、 $\text{Sm}(\text{Ala})_3\text{Cl}_3$ 和 $\text{Y}(\text{Ala})_2\text{Cl}_3$ ,于 $\text{CO}_2$ 培养箱中(37℃,5% $\text{CO}_2$ 气流)培养不同时间后,用台盼蓝拆分法计数细胞存活率。

### 六、细胞内游离 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ )的测定

参照文献<sup>[7]</sup>的实验方法。

### 七、 $\text{Ca}^{2+}$ -ATP酶活性测定

0.5ml红细胞膜悬液(含膜蛋白0.25mg)加入2ml $\text{Ca}^{2+}$ -ATP酶反应液中。稀土离子组分别加入不同浓度的 $\text{SmCl}_3$ 或 $\text{YCl}_3$ , $\text{Ca}^{2+}$ 组加入不同浓度的 $\text{CaCl}_2$ 。参照文献<sup>[8]</sup>的实验方法测定 $\text{Ca}^{2+}$ -ATP酶的活性。本文用吸光值( $\pi$ )的大小表示酶的相对活性。 $\text{Ca}^{2+}$ -ATP酶反应液的组成为: $25\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ Tris,  $100\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ KCl,  $2\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$  $\text{MgCl}_2$ ,  $1\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ATP钠盐。用1:1的HCl调pH=6.8,以防止稀土离子生成氢氧化物沉淀。

## 实验结果

### 一、稀土化合物的细胞毒性

表1实验结果表明, $\text{YCl}_3$ 的细胞毒性大于 $\text{SmCl}_3$ ,培养2小时后, $1\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$  $\text{YCl}_3$ 组细胞存活率显著低于 $1\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$  $\text{SmCl}_3$ 组( $p < 0.01$ )。 $5\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 的 $\text{SmCl}_3$ 和 $\text{YCl}_3$ 有明显的细胞毒性,培养8小时后,细胞死近50%。 $\text{Sm}(\text{Ala})_3\text{Cl}_3$ 和 $\text{Y}(\text{Ala})_2\text{Cl}_3$ 的细胞毒性明显小于 $\text{SmCl}_3$ 和 $\text{YCl}_3$ 。在实验时间内, $0.1\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 的 $\text{Sm}(\text{Ala})_3\text{Cl}_3$ 和 $\text{Y}(\text{Ala})_2\text{Cl}_3$ 无明显的细胞毒性。这表明 $\text{Sm}^{3+}$ 和 $\text{Y}^{3+}$ 与丙氨酸形成配合物后,细胞毒性明显减小。

### 二、稀土化合物对细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的影响

稀土化合物与细胞作用后,细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高(见表2),且随稀土化合物在培养介质中浓度的增高或培养时间的延长, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高越大。 $\text{YCl}_3$ 组的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 比相同浓度 $\text{SmCl}_3$ 组的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高大。 $\text{YCl}_3$ 或 $\text{SmCl}_3$ 组的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 比相同浓度的 $\text{Y}(\text{Ala})_2\text{Cl}_3$ 和 $\text{Sm}(\text{Ala})_3\text{Cl}_3$ 组的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高大。这表明细胞毒性越大,细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高也越大。

表1 稀土化合物的细胞毒性

Table 1 Cytotoxicity of Rare Earth Compound

group	survial percentage of alveolar macrophage		
	2h	4h	8h
control	94.3 ± 2.3	92.5 ± 2.4	90.5 ± 1.8
5mmol · dm <sup>-3</sup> SmCl <sub>3</sub>	82.9 ± 6.9 <sup>a,b,c</sup>	70.4 ± 5.7 <sup>a,b,c</sup>	53.7 ± 11.5 <sup>a,b,c</sup>
1mmol · dm <sup>-3</sup> SmCl <sub>3</sub>	88.7 ± 2.5	83.6 ± 6.6 <sup>a</sup>	80.0 ± 3.3 <sup>a</sup>
0.1mmol · dm <sup>-3</sup> SmCl <sub>3</sub>	90.4 ± 2.8	87.2 ± 2.5	84.1 ± 5.7
5mmol · dm <sup>-3</sup> Sm(Ala) <sub>3</sub> Cl <sub>3</sub>	90.7 ± 2.1	83.4 ± 2.7 <sup>a</sup>	76.4 ± 4.2 <sup>a</sup>
1mmol · dm <sup>-3</sup> Sm(Ala) <sub>3</sub> Cl <sub>3</sub>	92.4 ± 1.3	89.1 ± 2.6	84.3 ± 3.4
0.1mmol · dm <sup>-3</sup> Sm(Ala) <sub>3</sub> Cl <sub>3</sub>	95.1 ± 3.6	92.3 ± 3.0	89.6 ± 2.7
1mmol · dm <sup>-3</sup> YCl <sub>3</sub>	80.3 ± 3.4 <sup>a,d</sup>	72.0 ± 4.7 <sup>a,d</sup>	61.5 ± 4.5 <sup>a,d</sup>
0.1mmol · dm <sup>-3</sup> YCl <sub>3</sub>	86.2 ± 2.7	80.4 ± 3.4 <sup>a</sup>	70.8 ± 5.1 <sup>a</sup>
1mmol · dm <sup>-3</sup> Y(Ala) <sub>2</sub> Cl <sub>3</sub>	86.6 ± 3.1	81.5 ± 3.7 <sup>a</sup>	73.1 ± 4.3 <sup>a</sup>
0.1mmol · dm <sup>-3</sup> Y(Ala) <sub>2</sub> Cl <sub>3</sub>	92.3 ± 2.0	86.4 ± 5.4	84.5 ± 4.2

Note: Each value represents X ± SD, n = 4.

a p < 0.01, vs control;

b p < 0.01, vs 0.1mmol · dm<sup>-3</sup>SmCl<sub>3</sub>;

c p < 0.01, vs 5mmol · dm<sup>-3</sup>SmCl<sub>3</sub>;

d p < 0.01, vs 1mmol · dm<sup>-3</sup>SmCl<sub>3</sub>.

表2 稀土化合物对巨噬细胞[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>的影响Table 2 Effect of Rare Compound on [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> of Alveolar Macrophage

group	[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> (nmol · dm <sup>-3</sup> )	
	30min	60min
control	122 ± 17(12)	119 ± 21(12)
1mmol · dm <sup>-3</sup> SmCl <sub>3</sub>	188 ± 27(10) <sup>a,d</sup>	249 ± 35 <sup>a,c,d</sup>
0.1mmol · dm <sup>-3</sup> SmCl <sub>3</sub>	147 ± 23(12)	184 ± 23(10) <sup>a</sup>
1mmol · dm <sup>-3</sup> Sm(Ala) <sub>3</sub> Cl <sub>3</sub>	152 ± 21(12) <sup>b</sup>	176 ± 26(10) <sup>b</sup>
0.1mmol · dm <sup>-3</sup> Sm(Ala) <sub>3</sub> Cl <sub>3</sub>	132 ± 16(12)	150 ± 23(12) <sup>b</sup>
1mmol · dm <sup>-3</sup> YCl <sub>3</sub>	216 ± 32(10) <sup>a,d</sup>	308 ± 42(10) <sup>a,d</sup>
1mmol · dm <sup>-3</sup> (Ala) <sub>2</sub> Cl <sub>3</sub>	174 ± 20(10) <sup>a</sup>	216 ± 34(10) <sup>a</sup>

Note: Each value represents X ± SD,

Number in parenthesis represents the number of measured cells.

a p < 0.01, vs control; b p < 0.05, vs control; c p < 0.01, vs 0.1mmol · dm<sup>-3</sup>SmCl<sub>3</sub>;

d p < 0.01, vs 1mmol · dm<sup>-3</sup>Sm(Ala)<sub>3</sub>Cl<sub>3</sub>; e p < 0.01, vs 1mmol · dm<sup>-3</sup>SmCl<sub>3</sub>.

### 三、Sm<sup>3+</sup>和Y<sup>3+</sup>对红细胞膜Ca<sup>2+</sup>-ATP酶活性的影响

在Ca<sup>2+</sup>-ATP酶反应液中,不加入Ca<sup>2+</sup>,而是加入不同浓度的Sm<sup>3+</sup>或Y<sup>3+</sup>,红细胞膜Ca<sup>2+</sup>-ATP酶能被Sm<sup>3+</sup>和Y<sup>3+</sup>激活(见表3)。但1mmol·dm<sup>-3</sup>和0.1mmol·dm<sup>-3</sup>的Sm<sup>3+</sup>对Ca<sup>2+</sup>-ATP酶的激活作用反而小于0.01mmol·dm<sup>-3</sup>的Sm<sup>3+</sup>。Y<sup>3+</sup>对Ca<sup>2+</sup>-ATP酶活性的影响小于Sm<sup>3+</sup>。在实验浓度范围内,不同浓度的Y<sup>3+</sup>对Ca<sup>2+</sup>-ATP酶活性的影响无显著性差异。这表明Sm<sup>3+</sup>和Y<sup>3+</sup>对Ca<sup>2+</sup>-ATP酶活性的影响存在差异。

表3 Sm<sup>3+</sup>和Y<sup>3+</sup>对红细胞膜Ca<sup>2+</sup>-ATP酶活性影响

Table 3 Effect of Sm<sup>3+</sup> and Y<sup>3+</sup> on Ca<sup>2+</sup>-ATPase Activity of Crythrocytic Membrane

group	Ca <sup>2+</sup> -ATPase activity(A)
control	0.38 ± 0.05
1mmol·dm <sup>-3</sup> Sm <sup>3+</sup>	0.44 ± 0.03 <sup>a,b,c</sup>
0.1mmol·dm <sup>-3</sup> Sm <sup>3+</sup>	0.54 ± 0.03 <sup>a</sup>
0.01mmol·dm <sup>-3</sup> Sm <sup>3+</sup>	0.97 ± 0.14 <sup>a</sup>
1mmol·dm <sup>-3</sup> Y <sup>3+</sup>	0.45 ± 0.06 <sup>a,c</sup>
0.1mmol·dm <sup>-3</sup> Y <sup>3+</sup>	0.47 ± 0.03 <sup>a</sup>
0.01mmol·dm <sup>-3</sup> Y <sup>3+</sup>	0.51 ± 0.02 <sup>a</sup>
1mmol·dm <sup>-3</sup> Ca <sup>2+</sup>	0.58 ± 0.04 <sup>a</sup>
0.1mmol·dm <sup>-3</sup> Ca <sup>2+</sup>	0.60 ± 0.03 <sup>a</sup>
0.01mmol·dm <sup>-3</sup> Ca <sup>2+</sup>	0.56 ± 0.02 <sup>a</sup>

Note: Each value represents X ± SD, n = 4.

a p < 0.01, vs control; b p < 0.01, vs 0.01mmol·dm<sup>-3</sup>Ca<sup>2+</sup>;

c p < 0.05, vs 1mmol·dm<sup>-3</sup>Ca<sup>2+</sup>

## 结果与讨论

实验结果表明,当培养介质中SmCl<sub>3</sub>和YCl<sub>3</sub>的浓度大于1mmol·dm<sup>-3</sup>时,表现出明显的细胞毒性,YCl<sub>3</sub>的细胞毒性大于SmCl<sub>3</sub>;Sm(Ala)<sub>3</sub>Cl<sub>3</sub>和Y(Ala)<sub>2</sub>Cl<sub>3</sub>的细胞毒性明显小于相同浓度的SmCl<sub>3</sub>和YCl<sub>3</sub>。希土离子与Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>的离子半径相近,希土离子可竞争细胞膜上Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>的结合位点。而且希土离子是正三价,它与细胞膜的结合更稳定。大量的希土离子与细胞膜的作用使细胞膜的结构和功能受到破坏,从而造成细胞损伤。希土离子与氨基酸形成配合物后,减弱了希土离子与细胞膜的作用,所以希土氨基酸配合物的细胞毒性较希土氯化物小。对去的研究表明,希土离子对通过细胞膜的Ca<sup>2+</sup>流和线粒体摄取Ca<sup>2+</sup>的能力均产生抑制作用<sup>[1,9]</sup>。这种作用使细胞内游离Ca<sup>2+</sup>的调节受到破坏,结果造成细胞[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>升高。细胞内游离Ca<sup>2+</sup>的超载,会对细胞产生损伤作用<sup>[10]</sup>。在0.01mmol·dm<sup>-3</sup>浓度范围内的希土离子对Ca<sup>2+</sup>-ATP酶有激活作用,但随希土离子浓度的增大,对Ca<sup>2+</sup>-ATP酶的激活作用反而减弱,甚至产生抑制作用。Ca<sup>2+</sup>ATP酶是一种依靠Ca<sup>2+</sup>激活的酶,希土元素的离子半径和性质与Ca<sup>2+</sup>相近,这可能是希土离子对Ca<sup>2+</sup>-ATP酶有激活作用的部分原因。但细胞膜的结构和功能十分复杂,希土离子与细胞膜的作用亦较复杂,因此希土离子对细胞膜Ca<sup>2+</sup>-ATP酶活性的影响有

待进一步的研究。

### 参 考 文 献

- [1] 杨 频, 化学通报, 7, 31(1985).
- [2] 石 凤、倪嘉缙等, 稀土, 4, 44(1986).
- [3] 聂毓秀、倪嘉缙等, 中国稀土学报, 6(4), 49(1988).
- [4] 周 莉、聂毓秀等, 中国稀土学报, 12 (2), 167(1994).
- [5] 高胜利、薛鸿福等, 化学学报, 52, 639(1994).
- [6] 中国科学院北京动物研究所细胞室生物膜组, 生物化学与生物物理, 1, 22(1979).
- [7] 温和瑞、陈荣三等, 无机化学学报, 9(3), 266(1993).
- [8] Colvin, R. A. et al, *Biochim. Biophys. Acta*, 68, 1354(1985).
- [9] Reed, K. C., *Biochem. J.*, 239, 138(1974).
- [10] Ling, J., Wen, H. R. et al, *Metal Ions in Biology and Medicine*, Vol. 2, Eds. J Anastassopoulou, et al, John Libbey Eurotext, Paris pp295-298(1992).

## EFFECT OF RARE EARTH COMPOUNDS TO ALVEOLAR MACROPHAGE IN VITRO

Wen Herui Guo Guorui

(Department of Chemistry, Gannan Teachers College, Ganzhou 341000)

Zhu Weihua Wang Jinxi

(Coordination Chemistry Institute, Coordination Chemistry State Key Laboratory,

Nanjing University, Nanjing 210093)

Using cell incubation and AR-CM-MIC Cation Measurement System, the effect of rare earth compounds to alveolar macrophage was studied in vitro. The results are mainly as follows:  $1\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}\text{SmCl}_3$  or  $\text{YCl}_3$  in incubation medium has obvious cytotoxicity. The cytotoxicity of  $\text{YCl}_3$  is greater than that of  $\text{SmCl}_3$ . The cytotoxicity of  $\text{SmCl}_3$  or  $\text{YCl}_3$  is greater than that of  $\text{Sm}(\text{Ala})_3\text{Cl}_3$  or  $\text{Y}(\text{Ala})_2\text{Cl}_3$ . The poisonous action of rare earth compounds to alveolar macrophage leads to the increase of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . The greater the cytotoxicity, the greater the increase of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ .  $\text{Sm}^{3+}$  and  $\text{Y}^{3+}$  can activate the  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase of erythrocytic membrane.

**Keywords:** rare earth compound cytotoxicity cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$   $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase