

粉防己碱拮抗 α -石英细胞毒性的机理朱卫华 陈瑶^{*} 孟翠利 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)

借助于单细胞阳离子测定系统研究了 α -石英诱发细胞毒性过程中, 不同外钙浓度时粉防己碱作用后, 细胞存活率与胞浆游离钙浓度的变化关系。研究发现粉防己碱可以通过阻断细胞离子通道, 拮抗 α -石英的细胞毒性。

关键词:

粉防己碱

 α -石英

细胞毒性

硅肺

钙离子

分类号:

O613.72

拮抗

粉防己碱在医学上主要用于心血管方面的治疗, 是一种非选择性钙通道阻断剂^[1]。现在国内外医学界也正在进行粉防己碱防治硅肺的研究, 以往的一些研究表明, 粉防己碱能减少硅肺的病变组织中胶原蛋白含量, 从而抑制硅肺纤维化进展^[2]。粉防己碱作用于实验性硅肺大鼠后, 可以减轻硅肺症状, 改善硅肺大鼠的肺功能^[3]。但由于客观条件的限制, 还没有人将其拮抗 α -石英细胞毒性的作用与细胞内钙浓度联系起来。过去我们的研究发现钙离子在硅肺发生过程中起着重要的作用^[4-6]。我们在此基础上研究了 α -石英诱发细胞毒性过程中, 不同外钙浓度时, 粉防己碱作用后, 细胞存活率与胞浆游离钙浓度的变化关系, 对粉防己碱拮抗 α -石英细胞毒性的机理进行了初步探讨。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

AR-CM-MIC 阳离子测定系统(美国 SPEX 公司); AFX-DX 型倒置荧光显微镜(日本 Nikon 公司); 1815TC 型 CO₂ 气流培养箱(美国 Shelter 公司)。标准 α -石英粉尘(粒径小于 5 μ m, 含游离 SiO₂ 97.7%), 中国预防医学科学院; Fura-2/AM、RPMI-1640 干粉培养基, 台盼蓝、N-2-羟乙基哌嗪-N'-2'-乙烷磺酸(HEPES)为进口分装生化试剂。粉防己碱由中国药科大学药化室提供。其它试剂, 均为分析纯或生化试剂。所有实验用水均为重蒸水。

1.2 肺泡巨噬细胞

提取家兔巨噬细胞, 用 RPMI-1640 培养液或 HEPES 缓冲液配成浓度为 1×10^6 个/mL 的细胞悬液。无钙培养液和缓冲液的组在中除不含 CaCl₂ 外, 还需另外加 0.1 mmol · L⁻¹ 的 EGTA, 其它组成相同。高钙培养液和缓冲液 [Ca²⁺] 分别为正常值 ([Ca²⁺] = 1.26 mmol · L⁻¹) 的 2 倍和 4 倍。

收稿日期: 1998-03-02。 收修改稿日期: 1998-06-16。

国家自然科学基金资助项目(No. 29271022)。

* 通讯联系人。

第一作者: 朱卫华, 男, 29 岁, 现为镇江医学院讲师; 研究方向: 生物无机化学。

1.3 试样和试剂的预处理

α -石英临用前用紫外线照射 30 min, 用生理盐水配成 $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 悬浊液; 粉防己碱用生理盐水配成 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 溶液; 所有使用的溶液均需经过 5 # 砂芯漏斗抽滤除菌。

1.4 细胞存活率测定

分别取 0.9 mL 细胞悬液于细胞培养瓶中, 对照组加 $100 \mu\text{L}$ 生理盐水; α -石英组分别加入 α -石英悬液 $80 \mu\text{L}$ 、 $40 \mu\text{L}$ 和 $20 \mu\text{L}$; α -石英加药组还需加粉防己碱溶液。各组均用生理盐水调终体积为 1.0 mL , 均在 37°C 、 $\text{CO}_2 5\%$ 的培养箱温育, 分别取温育 4、12、24 h 细胞培养液, 用台盼蓝染色法计数细胞存活率。

1.5 细胞浆游离 Ca^{2+} 浓度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) 的测定

在 5×10^5 个/mL 的细胞悬液中, 加入 Fura-2 和小牛血清使终浓度分别达 $2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 10% (V/V), 置于含 $\text{CO}_2 5\%$ 气流培养箱中, 37°C 下恒温负载 30 min 后, 离心分离 (1500 rpm , 10 min), 弃上清液。细胞先用 HEPES 缓冲溶液洗涤两次, 再用此溶液配成 5×10^5 个/mL 细胞悬液, 再加入一定量的 α -石英悬浊液或粉防己碱溶液。在 $5\% \text{ CO}_2$ 气流培养箱中 37°C 分别温育 1 h 和 3 h, 取出离心分离 (1500 rpm , 10 min) 后, 细胞重悬于 HEPES 液中, 37°C 分别测定其单细胞荧光强度 ($\lambda_{\text{ex}} = 340 \text{ nm}$ 和 380 nm , $\lambda_{\text{em}} = 505 \text{ nm}$), 细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 按下式计算:

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

K_d 是 Fura-2-Ca 的离解常数, 在实验测定温度 37°C 时, $K_d = 2.24 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, R 为实测荧光强度减去细胞自发荧光强度后的荧光比值 (F_{340}/F_{380}), 常数 $R_{\min}$ 、 $R_{\max}$ 和 β 依次为 11.2 ± 0.84 ($n=10$), 0.62 ± 0.04 ($n=12$), 5.26 ± 0.46 ($n=10$), n 为测定细胞数。

1.6 统计学方法

采用 t 检验方法。

2 结果与讨论

2.1 正常外钙浓度时粉防己碱对 α -石英细胞毒性的研究

2.1.1 细胞存活率

结果 (见表 1) 表明, 随着温育时间的延长, 各组的细胞存活率均有不同程度的下降, 各组间的差异也愈加明显。 α -石英组的存活率最低, 它们与生理盐水对照组相比存在显著性差异, α -石英加粉防己碱后细胞存活率明显提高, 提示粉防己碱对巨噬细胞具有保护作用, 能拮抗 α -石英细胞毒性。

2.1.1 细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的变化

结果 (见表 2) 表明, 在培养 1 h 后, α -石英组 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 明显提高, α -石英大剂量组比小剂量组升高更大, 且此时粉防己碱抑制 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高的作用明显。温育 3 h 后, α -石英组 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高更为明显, 不仅高于对照组, 而且高于 1 h 的 α -石英组, 但粉防己碱同样能部分地抑制 α -石英引起的细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高。

2.2 在无外钙和高外钙情况下, 粉防己碱对 α -石英细胞毒性的研究

2.2.1 细胞存活率

在无外钙介质中的细胞存活率: 结果 (见表 3) 表明, 随着温育时间的延长, 各组细胞存活率均有所降低, 但是各组间均无显著性差异。

表1 在正常外钙介质中 α -石英对细胞存活率的影响Table 1 Effect of α -quartz to the Cell's Survival Rates in Normal $[Ca^{2+}]$ Medium ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

groups	cell's survival rate		
	4 h	12 h	24 h
control	96.31 $\pm$ 2.46	87.01 $\pm$ 3.27	81.30 $\pm$ 3.80
α -quartz(100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	87.40 $\pm$ 3.45 ^a	72.15 $\pm$ 3.85 ^a	55.69 $\pm$ 2.03 ^a
α -quartz(200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	80.04 $\pm$ 2.74 ^a	67.06 $\pm$ 3.90 ^a	41.11 $\pm$ 2.32 ^a
α -quartz(100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)+tetradrine	93.51 $\pm$ 5.77 ^a	84.78 $\pm$ 4.14 ^a	74.46 $\pm$ 4.51 ^{b,c}
α -quartz(200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)+tetradrine	87.27 $\pm$ 3.10 ^{b,d}	79.74 $\pm$ 4.83 ^{b,d}	72.53 $\pm$ 4.90 ^{b,d}

a. $P<0.01$, b. $P<0.05$, compared with control groupc. $P<0.01$, compared with α -quartz group (100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)d. $P<0.01$, compared with α -quartz group (200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)表2 在正常外钙介质中 α -石英组对 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响Table 2 Effect of α -quartz to $[Ca^{2+}]_i$ in Normal $[Ca^{2+}]$ Medium ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

groups	$[Ca^{2+}]_i / (\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1})$	
	1 h	3 h
control	106 $\pm$ 6	115 $\pm$ 11
α -quartz(100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	154 $\pm$ 14 ^a	179 $\pm$ 15 ^a
α -quartz(200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	194 $\pm$ 22 ^a	242 $\pm$ 32 ^a
α -quartz(400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	242 $\pm$ 39 ^{a,c}	319 $\pm$ 41 ^{a,c}
α -quartz(100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)+tetradrine	117 $\pm$ 43 ^b	133 $\pm$ 43 ^b
α -quartz(200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)+tetradrine	136 $\pm$ 47 ^b	163 $\pm$ 49 ^b
α -quartz(400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)+tetradrine	178 $\pm$ 51 ^{a,d}	196 $\pm$ 53 ^{a,d}

a: $P<0.01$; $P<0.05$ compared with control groupc: $P<0.01$, compared with α -quartz group (100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)d: $P<0.01$, compared with α -quartz group (400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)表3 在无外钙介质中 α -石英对细胞存活率的影响Table 3 Effect of α -quartz to Cell's Survival Rates in Medium without Ca^{2+} ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

groups	cell's survival rate		
	4 h	12 h	24 h
control	97.95 $\pm$ 2.36	91.18 $\pm$ 1.06	87.36 $\pm$ 2.05
α -quartz(100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	96.14 $\pm$ 3.52	88.61 $\pm$ 2.64	85.68 $\pm$ 2.18
α -quartz(200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	91.42 $\pm$ 2.85	87.79 $\pm$ 2.09	86.71 $\pm$ 2.23
α -quartz(100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)+tetradrine	96.11 $\pm$ 2.41	93.06 $\pm$ 3.25	87.15 $\pm$ 2.46
α -quartz(200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)+tetradrine	92.69 $\pm$ 1.20	88.20 $\pm$ 2.91	86.87 $\pm$ 3.98

no significant difference among each group

在高外钙介质中的细胞存活率;结果(见表4)表明,随着时间的延长,各组细胞存活率均有所下降,但 α -石英组与正常外钙情况下存活率相比之下降得更多。粉防己碱能部分抑制这种趋势。

表4 在高外钙介质中 α -石英组对细胞存活率的影响Table 2 Effect of α -quartz to Cell's Survival Rates in High $[Ca^{2+}]$ Medium ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

groups	cell's survival rate		
	4 h	12 h	24 h
control *	94.46 $\pm$ 3.06	84.86 $\pm$ 2.13	80.19 $\pm$ 1.06
α -quartz(400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) *	70.63 $\pm$ 2.39 ^a	59.18 $\pm$ 1.06 ^a	37.90 $\pm$ 2.43 ^a
α -quartz(400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) * + tetradrine	89.18 $\pm$ 2.70 ^{a,b}	74.95 $\pm$ 1.37 ^{a,b}	58.36 $\pm$ 3.37 ^{a,b}
control **	92.31 $\pm$ 2.03	89.26 $\pm$ 2.16	81.75 $\pm$ 2.18
α -quartz(400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) **	68.05 $\pm$ 2.05 ^a	45.88 $\pm$ 2.58 ^a	28.42 $\pm$ 2.64 ^a
α -quartz(400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) ** + tetradrine	87.01 $\pm$ 2.24 ^{a,b}	72.92 $\pm$ 2.75 ^{a,b}	51.12 $\pm$ 2.53 ^{a,b}

* : $[Ca^{2+}] = 2.52 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ in medium; * * : $[Ca^{2+}] = 5.04 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ in mediuma: $P < 0.01$; compared with control groupb: $P < 0.01$, compared with α -quartz group (400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)2.2.2 细胞的 $[Ca^{2+}]_i$ 变化

在无外钙介质中, $[Ca^{2+}]_i$ 的变化与表3中细胞存活率结果一致,在各组间均无显著性差异。在高外钙介质中 $[Ca^{2+}]_i$ 的变化:结果(见表5)表明,石英组与对照组相比 $[Ca^{2+}]_i$ 增加很多,粉防己碱能部分抑制 $[Ca^{2+}]_i$ 的升高。

表5 在高外钙介质中 α -石英对 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响Table 5 Effect of α -quartz to $[Ca^{2+}]_i$ in High $[Ca^{2+}]$ Medium ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

groups	$[Ca^{2+}]_i / (\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1})$	
	1 h	3 h
control *	126 $\pm$ 16	138 $\pm$ 18
α -quartz(400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) *	271 $\pm$ 89 ^a	319 $\pm$ 80 ^a
α -quartz(400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) * + tetradrine	195 $\pm$ 13 ^{a,b}	267 $\pm$ 22 ^{a,b}
control **	130 $\pm$ 17	141 $\pm$ 19
α -quartz(400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) **	342 $\pm$ 98 ^a	428 $\pm$ 76 ^a
α -quartz(400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) ** + tetradrine	231 $\pm$ 75 ^{a,b}	350 $\pm$ 21 ^{a,b}

* : $[Ca^{2+}] = 2.52 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ in medium; * * : $[Ca^{2+}] = 5.04 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ in mediuma: $P < 0.01$; compared with control groupb: $P < 0.01$, compared with α -quartz group (400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)

综上所述,在含外钙介质中, α -石英对巨噬细胞毒性作用使细胞的存活率降低, $[Ca^{2+}]_i$ 升高,介质中钙浓度越高细胞存活率越低, $[Ca^{2+}]_i$ 升高越多。且这种效应随 α -石英剂量增加和时间延长越明显。但这种效应可部分地被粉防己碱所抑制。而在无外钙介质中,各组间细胞存活率和 $[Ca^{2+}]_i$ 均无显著变化。这表明由 α -石英引起的 $[Ca^{2+}]_i$ 升高是由于细胞外钙内流所致, $[Ca^{2+}]_i$ 的升高直接导致了细胞的死亡,使得细胞存活率下降。而细胞外 Ca^{2+} 通过细胞膜进入细胞内,一般需要借助于离子的跨膜运送,由钙离子通道进入。而粉防己碱是一种非选择性钙离子通道阻断剂,它可以阻断各种类型的钙离子通道。由此我们不难看出,粉防己碱拮抗 α -石英细胞毒性的作用正在于它可以阻断钙离子通道,减少了细胞外 Ca^{2+} 进入细胞内,其作用机理与我们研究过的异博定相似^[7]。此外,我们也可以发现粉防己碱只能部分地抑制由 α -石英引起的 $[Ca^{2+}]_i$ 升高。这也提示 α -石英作用后,细胞外钙不仅通过钙离子通道进入细胞内,还有其它途径进入细胞内。由此也进一步说明在受 α -石英作用后,可能是细胞膜受到了损伤,膜

的通透性增加,外钙大量内流,细胞内钙超载,导致细胞死亡。我们也可看出仅仅使用粉防己碱一种药物进行硅肺防治有一定的局限性。

参 考 文 献

- [1] Kwan C. Y., Deng H. W., Guan Y. Y., *Acta Pharmacologica Sinica*, **1992**, *13*(5), 395.
- [2] HE Yu-Xian(何玉先), LIU Bing-Ci(刘秉慈), MIAN Qing(缪庆) et al *Zhonghua Yufang Yixue Zazhi (Chinese J. Preventive Medicine)*, **1995**, *29*(1), 18.
- [3] Sun Shunxian, Kang Aili, Liu Zhengliang *Biomedical and Environmental Sciences*, **1992**, (5), 362.
- [4] MAO Yan(毛延), CHEN Rong-San(陈荣三), HUANG Meng-Jian(黄孟健) et al *Wu Ji Hua Xue Xue Bao (Chinese J. Inorg. Chem.)*, **1987**, *3*(4), 12.
- [5] MAO Yan(毛延), CHEN Rong-San(陈荣三), HUANG Meng-Jian(黄孟健) et al *Wu Ji Hua Xue (Chinese J. Inorg. Chem.)*, **1989**, *5*(2), 16.
- [6] Ling J., Wen H. R., Chen R. S. et al *Metal Ions in Biology and Medicine*, Vol. 2, John Libbey Eurotext, Paris, **1992**, p295-298.
- [7] ZHU Wei-Hua(朱卫华), WANG Jin-Xi(王金晞), LI Hai-Shai(李海山) et al *Shengwu Huaxue Yu Shengwu Wuli Juchan (Progress in Biochem and Biophys)*, **1998**, *25*(5), 439.

MECHANISM OF ANTAGONISM OF TETRANDRINE TO CYTOTOXICITY OF α -QUARTZ

ZHU Wei-Hua CHEN Yao MENG Cui-Li WANG Jin-Xi

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

By use of the AR-CM-MIC system, the relationship between cell's survival rate of alveolar macrophages and the change of plasmic free Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) after the action of α -quartz and tetrandrine was investigated under different extracellular Ca^{2+} concentration. The results showed that tetrandrine could antagonize the cytotoxicity of α -quartz by blocking the calcium channels of alveolar macrophages.

Keywords: tetrandrine α -quartz cytotoxicity silicosis calcium ion