

文章编号: 0529-6579 (1999) 03-0109-04

钕对培养肝细胞的影响^{*}

申治国¹, 雷衡毅¹, 杜柳涛², 杨杏芬², 杨燕生¹

(1. 中山大学化学与化学工程学院, 广东 广州 510275;

2. 中山医科大学公共卫生学院, 广东 广州 510089)

摘 要: 应用流式细胞术研究了稀土离子对大白鼠原代肝细胞和肝癌细胞的影响。结果表明, 稀土离子可以增加原代肝细胞内 DNA 含量, 促进细胞增殖, 改变肝细胞周期时相, 减少正常肝细胞凋亡, 诱导肝癌细胞凋亡; 钙调素也能促进细胞内 DNA 含量的增加, 改变细胞周期时相。

关键词: 稀土元素; 大白鼠; 肝细胞; 流式细胞术; 细胞周期; 细胞凋亡; 钙调素

中图分类号: O 614 332; Q 28 **文献标识码:** A

稀土元素作为微肥和饲料添加剂的应用日益广泛, 人们对稀土元素的生物效应也进行了广泛的研究, 但其生物效应机理尚不十分清楚^[1]。钙调素 (CaM) 是细胞内 Ca^{2+} 的重要受体蛋白, 参与介导调节体内众多的生理生化过程, 在细胞增殖、运动、转化、程序性死亡中都起着重要的作用。稀土离子 (Ln^{3+}) 能与 CaM 作用。低浓度的 Ln^{3+} 可刺激 CaM 的活性, 而高浓度的 Ln^{3+} 则抑制 CaM 的活性^[2]。研究表明稀土离子不能进入正常细胞内, 稀土对细胞的大部分生理效应是基于 Ln^{3+} 与细胞膜外表面的相互作用^[3]。实验表明, 在花椰菜胞外 CaM 的中介下, 细胞外的低浓度稀土离子促进花粉萌发及花粉管伸长, 高浓度的稀土离子则明显抑制花粉萌发及花粉管伸长^[4]。这就说明稀土离子也许是同细胞膜外侧的受体结合, 然后通过信号转导的途径, 对动植物的生长作出调控。肝是稀土元素最重要的靶器官, 在各器官中, 以肝、脾中的稀土元素含量为最高。但前人^[1]主要研究了稀土元素对癌细胞株和正常细胞株的作用。癌细胞株已变异分化, 丧失了细胞原有的许多功能。而原代肝细胞则较好地保持了原有细胞的基本功能, 这样就能比较如实地反映稀土元素对细胞的作用。本工作研究了 CeCl_3 对大白鼠原代肝细胞的 DNA 含量、细胞周期、细胞凋亡的影响, 以及对肝癌细胞凋亡的诱导作用, 并探讨了 CaM 的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料 170~200 g SD 大白鼠 (购自广东省实验动物场)、肝癌细胞 (中山医科大学公共卫生学院陈雯博士惠赠)。

1.2 主要仪器 CO_2 细胞培养箱, 倒置显微镜, 超净工作台, 无菌室, 细胞流式仪。

* 基金项目: 国家自然科学基金 (29671034); 广东省自然科学基金 (960048) 资助项目

收稿日期: 1998-11-12 作者简介: 申治国, 男, 1965 年生, 博士研究生。

1.3 主要试剂 CeCl_3 (AR), EGTA (Sigma), 牛脑 CaM (河北师范大学生物系白娟老师惠赠), 胶原酶 II (Sigma), DMEM 培养液 (Gibco), 胰蛋白酶 (Gibco), 胰岛素 (Gibco), 地塞米松.

1.4 原代肝细胞培养 取 170~200 g SD 大白鼠, 按文献 [5] 方法采用两步法进行循环灌流, 胶原酶的浓度为 0.05% . 肝细胞分散、离心、纯化后, 接种于 60 mm 塑料培养皿中. 每 mL 培养液中含 0.5×10^6 个肝细胞, 置于 CO_2 培养箱中 37°C 培养. DMEM 培养液中含 10% 胎牛血清、青霉素 (100 kU/L)、链霉素 (120 kU/L)、胰岛素 (10^{-7} mol/L) 和地塞米松 (10^{-6} mol/L) 等. 8 h 后第一次换液, 24 h 后加入不同浓度的 Ce^{3+} 进行培养. 培养 24 h 后用 0.25% 胰蛋白酶消化, 70% 乙醇固定后, 以碘化吡啶为染料, 用细胞流式仪分析 DNA 含量和细胞凋亡情况.

1.5 肝癌细胞培养 取肝癌细胞按接种密度为每 mL 培养基含 1×10^5 个细胞接种培养. 培养基为 DMEM, 于对数期加入含不同浓度 Ce^{3+} 的培养基进行培养. 48 h 后用 0.25% 胰蛋白酶消化, 70% 乙醇固定, 以碘化吡啶为染料, 用细胞流式仪分析细胞凋亡情况.

2 实验结果与讨论

2.1 Ce^{3+} 对原代肝细胞内 DNA 含量的影响 低浓度的镧、钆、铈、铈对体外培养人二倍体细胞有促进作用^[9]. 不同浓度的 Ce^{3+} 对大白鼠原代肝细胞内 DNA 相对含量的影响见图 1 (以对照组的 DNA 含量为 100). 结果表明 0.05, 0.1, 0.2 mmol/L 的 Ce^{3+} 均能促进细胞内 DNA 的合成, 说明低浓度的 Ce^{3+} 能促进肝细胞增殖.

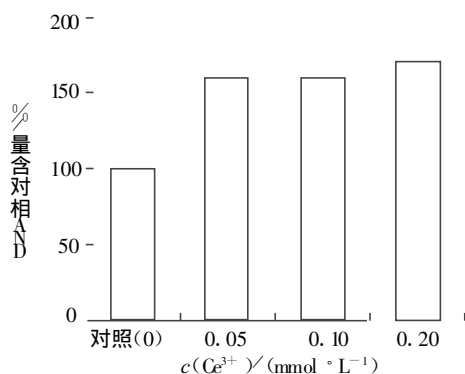


图 1 Ce^{3+} 对肝细胞内 DNA 含量的影响

Fig. 1 The effect of cerium(III) on DNA content of hepatocyte

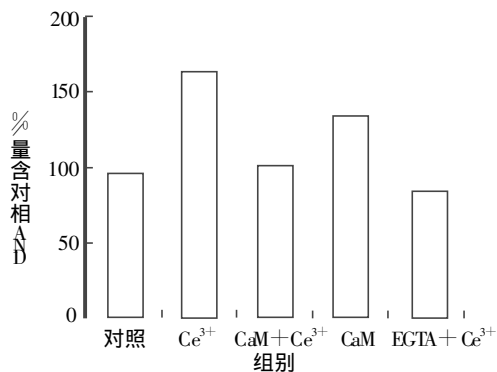


图 2 CaM 和 EGTA 对肝细胞周期的影响

Fig. 2 The effect of CaM and EGTA on cell cycle of hepatocyte
 $c(\text{EGTA}), c(\text{Ce}^{3+}) = 0.1 \text{ mmol/L}, c(\text{CaM}) = 0.5 \mu\text{mol/L}$

2.2 CaM 和 EGTA 对肝细胞 DNA 含量的影响 在细胞培养液中分别加入 Ce^{3+} , CaM 和 EGTA 进行细胞培养, 以对照组的 DNA 含量为 100, 计算各组细胞的 DNA 相对含量, 结果见图 2. 结果表明, Ce^{3+} 和外源 CaM 均可增加细胞内 DNA 含量, 促进细胞增殖; 而 EGTA 由于可以络合 Ce^{3+} , 从而使 Ce^{3+} 对细胞增殖的促进作用消失, 且细胞内 DNA 的合成也受到抑制. 由于 EGTA 不能穿透细胞膜, 而且 EGTA 对 Ce^{3+} 的络合稳定性远远超过 Ca^{2+} , 因此可以推断, EGTA 对细胞内 DNA 合成的抑制是由于细胞外的 Ce^{3+} 被络合, 而不是由于细胞外 Ca^{2+} 被络合. 表明 Ce^{3+} 的作用点是在细胞外, 而不是细胞内. CaM 也能促进细胞内 DNA 的合成; 但在含 Ce^{3+} 的培养基中加入 CaM 后可能由于 Ce^{3+} 与 CaM 之间的相互作用, 致使 CaM 对 DNA 合成的促进作用不显著.

2.3 Ce^{3+} 和钙调素对原代肝细胞周期的影响 含 0.1 mmol/L Ce^{3+} 溶液中, 分别加入 0.05 μ mol/L CaM 和 0.1 mol/L EGTA, 结果见表 1. 结果表明, Ce^{3+} 和 CaM 的加入将改变细胞周期时相, 使得肝细胞的 S 期和 G_2-M 期细胞数增加, 而减少 G_0-G_1 期细胞数. EGTA 的存在使 S 期细胞数减少, 这与 EGTA 使细胞内 DNA 含量减少是一致的. 这再次表明, Ce^{3+} 的作用点可能是在细胞外.

表 1 铈对肝细胞周期的影响

Tah 1 The effect of cerium (III) on cell cycle

组 别	各期细胞数占全周期的细胞数的百分率/%		
	G_0-G_1	G_2-M	S
对照组	95.98 $\pm$ 0.96	1.12 $\pm$ 0.61	2.9 $\pm$ 0.35
Ce^{3+}	90.32 $\pm$ 4.37*	5.91 $\pm$ 3.82	4.43 $\pm$ 2.74
CaM+ Ce^{3+}	92.03 $\pm$ 0.91**	4.37 $\pm$ 1.08	3.6 $\pm$ 0.39
EGTA+ Ce^{3+}	92.97 $\pm$ 1.97*	6.32 $\pm$ 2.00*	1.67 $\pm$ 1.54
CaM	92.69 $\pm$ 1.24*	3.76 $\pm$ 0.62**	3.54 $\pm$ 0.66

$n=4\sim 5, \bar{x}\pm SD;$
* $P<0.05$ ** $P<0.01$, 与对照组比较

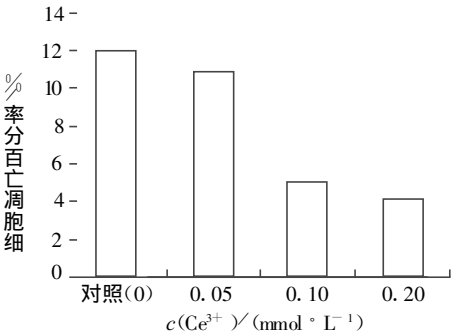


图 3 Ce^{3+} 对细胞凋亡的作用

Fig.3 The effect of cerium on apoptosis

2.4 Ce^{3+} 对肝细胞凋亡的影响 细胞凋亡又称细胞程序性死亡. 细胞凋亡与细胞的生长、分化一样属于各具特征的细胞学事件或过程, 它们决定着细胞和组织的基本特征和命运. 这些过程都受到了来自细胞内和细胞外的诸多信号的调控. 不同浓度 Ce^{3+} 对细胞凋亡的影响见图 3. 结果表明, 0.05, 0.1, 0.2 mmol/L 的 Ce^{3+} 能抑制细胞的凋亡, 说明细胞外的 Ce^{3+} 对肝细胞的凋亡有一定的调控作用.

2.5 Ce^{3+} 对肝癌细胞凋亡的诱导作用 稀土元素的抑癌作用已得到了广泛的研究, 但其机理尚不十分清楚. 稀土元素可改变癌细胞微管结构, 使抑癌基因 p53、p16 和 p21 表达上升^[7]. 不同浓度的 Ce^{3+} 以及 CaM 对肝癌细胞凋亡有诱导作用见图 4. 结果表明, 0.01mmol/L 的 Ce^{3+} 对肝癌细胞的凋亡无明显作用, 而 0.1, 0.5 mmol/L 的 Ce^{3+} 对肝癌细胞的凋亡有明显诱导作用. 实验结果表明稀土元素的抑癌机理与稀土元素诱导癌细胞凋亡有关. 但加入 CaM 后, Ce^{3+} 的诱导凋亡作用明显减弱, 提示 CaM 能缓解稀土离子对癌细胞的诱导作用. 同前述发现的 Ce^{3+} 与 CaM 加在一起时, 对细胞内 DNA 含量的影响不显著一样, 由于 Ce^{3+} 与 CaM 之间的相互作用而影响了 Ce^{3+} 的生物效应. 稀土元素可以取代 Ca^{2+} 而与 CaM 结合, 并在浓度较大时, 能抑制 CaM 的作用, 而 CaM 同稀土结合时可多达 10 个阳离子结合位点^[8].

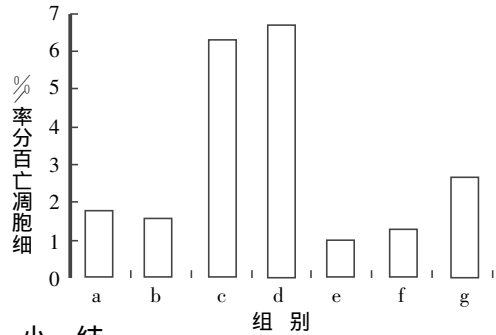


图 4 Ce^{3+} 对肝癌细胞凋亡的诱导作用

Fig.4 The effect of cerium(III) on induction of apoptosis of hepatocarcinogen

a control; b 0.01 mmol/L Ce^{3+} ;
c 0.1 mmol/L Ce^{3+} ; d 0.5 mmol/L Ce^{3+} ;
e 0.01 mmol/L Ce^{3+} +CaM;
f 0.1 mmol/L Ce^{3+} +CaM; g CaM

3 小 结

成年大白鼠由于分泌一种抑制素而使肝细胞很少增殖, 一般只有新生肝细胞和再生肝

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

细胞才增殖. 因而肝细胞绝大多数处于 G_0-G_1 期, 而处于 S 期的细胞比较少. 低浓度的稀土元素在较长时间的培养中, 一般不进入细胞内^[1]. 本实验使用的 Ce^{3+} 浓度均较低, 低于稀土离子对细胞的抑制浓度, 而处于稀土离子对细胞的影响范围内, 且 Ce^{3+} 对细胞的作用时间较短. 因而可推测 Ce^{3+} 不会进入细胞内. EGTA 对 Ce^{3+} 的抑制作用也表明 Ce^{3+} 不能进入细胞内. 本实验的结果也表明, Ce^{3+} 能在细胞外使肝细胞由 G_0-G_1 期向 S 期转化, 并促进肝细胞的增殖, 这也说明 Ce^{3+} 的作用点可能是在细胞外. 最近文献报道提及高浓度的稀土离子 (1 mmol/L) 将阻止细胞周期时相从 G_0-G_1 期向 S 期转化^[9]. Ce^{3+} 减少肝细胞凋亡, 并诱导肝癌细胞凋亡的这种特殊生物效应, 提示稀土元素的适当化合物有可能作为未来抗衰老或抗肿瘤的药物. 本研究通过 Ce^{3+} 对肝细胞的作用研究表明细胞外的 Ce^{3+} 能对细胞增殖、细胞周期、细胞凋亡等进行调控. 为了进一步深入探讨稀土元素的上述生物效应与钙的内流或胞内钙池的释放以及细胞内 $[Ca^{2+}]_i$, cAMP, cGMP 等第二信使的关系. 我们已测试了 Ce^{3+} 对细胞内的 cAMP, cGMP 浓度的影响(另文发表), 并将进一步测定细胞内 $[Ca^{2+}]_i$, 以期较全面了解稀土元素对细胞内第二信使系统的作用.

参考文献:

- [1] 倪嘉缙. 稀土元素生物无机化学[M]. 北京: 科学出版社, 1995.
- [2] BUCCIGROSS J M, MCDONALD K E. Lanthanide inhibition of 5'-nucleotidase in the phosphodiesterase assay of calmodulin[J]. J Alloys and Compounds, 1992, 180: 357~362.
- [3] 杨频, 魏春英. 稀土与细胞、器官、组织的作用及其生理效应[J]. 化学通报, 1996(7): 14~17.
- [4] 刘德龙, 杨燕生, 孙大业, 等. 花椰菜胞外钙调素的性质及促进植物生长作用[J]. 中山大学学报(自然科学版), 1997, 36(3): 216~217.
- [5] ERIN G S, LI Donna, OMICINSKI, et al. Regulation of gene expression in adult rat hepatocytes cultured on a basement membrane matrix[J]. J Cellular Physio, 1988, 134: 309~323.
- [6] 聂毓秀, 陈玉兰, 赵培林, 等. 镧钕及镱对体外培养人二倍体细胞的作用[J]. 中国稀土学报, 1990, 8(4): 350~353.
- [7] 纪云晶, 肖白, 王宗惠, 等. 轻稀土元素抑癌作用机理研究[J]. 卫生毒理学杂志, 1996, 10(4): 223~227.
- [8] LAFITTE D. Electrospray ionization mass spectrometric study of calcium in the presence of magnesium and terbium[J]. J Mass Spectrum, 1995: 5192~5196.
- [9] SATO T, HASHIZUME M, HOTTA Y, et al. Morphology and proliferation of B16 melanoma cells in the presence of lanthanoid and Al^{3+} ions[J]. Biomaterials, 1998, 11(2): 107~112.

The Effect of Cerium(III) on Hepatocytes

SHEN Zhi-guo^{}, LEI Heng-yi, DU Liu-dao, YANG Xin-fen, YANG Yan-sheng*

Abstract: The effect of cerium(III) on primary hepatocyte was studied by flow cytometry. The result showed that cerium(III) and calmodulin could promote the proliferation, change the cell cycle and reduce the percent of apoptosis of primary hepatocyte, and also showed that cerium(III) could induce the apoptosis of hepatocarcinogen cell.

Keywords: rare earth element; cerium(III); rat; hepatocyte; flow cytometry; cell cycle; apoptosis; calmodulin

^{*} School of Chemical and Chemical Engineering, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China