

研究报告

亚硒酸钠对巨噬细胞内游离
 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的影响*温和瑞¹⁾ 王金晔²⁾ 朱卫华 李瑞延³⁾ 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)

摘要 用单细胞阳离子测定系统研究了 SeO_3^{2-} 对巨噬细胞内游离 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的影响. 实验结果表明: SeO_3^{2-} 高于 10^{-4} mol/L 时, 有显著的细胞毒性. SeO_3^{2-} 对细胞的毒性作用使细胞内游离 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的浓度升高但 Ca^{2+} 浓度的升高速率比 Mg^{2+} 快. 还有, 高于 10^{-4} mol/L 的 SeO_3^{2-} 对红细胞膜上的 Ca^{2+} -ATP 酶活性有明显抑制作用.

关键词 亚硒酸钠, 细胞毒性, 细胞内游离 Ca^{2+} , 细胞内游离 Mg^{2+} , Ca^{2+} -ATP 酶

硒是生物体必需的微量元素, 它与人类的健康和疾病有很大的相关性^[1]. 硒对肿瘤有抑制作用. 克山病和大骨节病均与缺硒有关. 研究表明, 亚硒酸钠有保护巨噬细胞免受石英粉尘毒性损伤的作用^[2]. 因此, 硒化合物可能成为用来防治硅肺病的药物. 亚硒酸钠虽然有保护细胞的作用, 但当硒的浓度超过一定值时对细胞却有很大的毒性作用^[3]. 亚硒酸钠对巨噬细胞的毒性虽已有研究, 但对其作用机理还待进一步阐明, 这对于研究用硒化合物来防治硅肺病是很有意义的. 近年来我们的研究发现毒物对细胞的毒性作用与生物体内 Ca^{2+} 浓度的变化密切相关^[4]. 本文应用荧光试剂和单细胞阳离子测定系统研究了 SeO_3^{2-} 与离体肺泡巨噬细胞的作用过程中, SeO_3^{2-} 毒性作用与细胞内游离 Ca^{2+} 浓度和游离 Mg^{2+} 浓度的关系, 得到若干有意义的结果.

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

AR-CM-MIC 型单细胞离子测定系统 (美国, SPEX 公司). AFX-DX 型倒置荧光显微镜

(日本, Nikon 公司). 1815 TC 型 CO_2 培养箱 (美国, Shelter 公司). Fura-2/AM, Mag-Fura-2/AM, Ionomycin, RPMI 1640 干粉剂均购自美国 Sigma 公司. Na_2SeO_3 (A. R.). N-2-羟乙基哌嗪-N'-2'-乙烷磺酸 (HEPES, 生化试剂). 其他的试剂为 A. R., 所有溶液均用重蒸水配制.

1.2 细胞悬液的制备

家兔 (2~3 kg, 性别不拘) 股动脉放血处死, 用 0.9% 的灭菌生理盐水经肺灌洗获得肺泡巨噬细胞. 用 RPMI 1640 培养液或 HEPES 缓冲液配成 $4 \times 10^8 \sim 5 \times 10^8$ 个/L 的细胞悬液备用. HEPES 缓冲液的组成为: NaCl 140 mmol/L, KCl 4.7 mmol/L, CaCl_2 1.2 mmol/L, MgCl_2 1.2 mmol/L, 葡萄糖 10 mmol/L, HEPES 10 mmol/L, 内含 0.2% 的灭活小牛血清, pH=7.4.

* 国家自然科学基金资助课题.

¹⁾ 赣南师范学院化学系.

²⁾ 通讯联系人.

³⁾ 内蒙古民族师范学院化学系.

收稿日期: 1994-11-29, 修回日期: 1995-07-05

1.3 红细胞膜的制备

家兔股动脉放血,用肝素钠抗凝收集血液, 3000 r/min 离心 30 min (0~4℃) 使红细胞沉淀. 用 0.9% 的生理盐水洗涤细胞两次. 在洗净的红细胞中, 按 1:40 (体积比) 比例加入 0℃ 的 10 mmol/L Tris-HCl (pH=7.4) 的低渗缓冲液. 在 0℃ 下放置 2 h, 使红细胞完全溶血, 然后 10 000 r/min (0~4℃) 离心机离心, 使红细胞沉淀. 重复洗涤 3 次, 所得红细胞膜样品悬浮于 10 mmol/L Tris-HCl 缓冲液中, -18℃ 下保存备用.

1.4 细胞存活率的测定

所有试剂在配制前均用紫外线照射灭菌消毒. 实验操作均在超净室内进行. 在 RPMI 1640 培养液的细胞悬液中加入不同浓度的 Na_2SeO_3 , 在 CO_2 培养箱中 (37℃, 5% CO_2) 孵育不同时间, 用台盼蓝拆分法计数细胞存活率.

1.5 Ca^{2+} -ATP 酶活性测定

红细胞膜悬液中加入不同浓度的 Na_2SeO_3 (蛋白含量 0.8~1 mg/L), 在 4℃ 下放置 2 h 后, 离心弃上清液. 所得的细胞膜按文献 [5] 的方法测定 Ca^{2+} -ATP 酶的活性.

1.6 细胞内游离 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 浓度的测定

细胞用 1 $\mu\text{mol/L}$ 的 Fura-2/AM 负载 20 min (37℃, 5% CO_2). 1000 r/min 离心, 弃上清液, 细胞用 HEPES 缓冲液洗涤两次, 洗去细胞外所附的荧光试剂. 细胞用 HEPES 缓冲液配成 $4 \times 10^8 \sim 5 \times 10^8$ 个/L 细胞悬液, 在悬液中加入不同浓度的 Na_2SeO_3 . CO_2 培养箱中孵育不同时间后, 洗涤一次, 然后在单细胞阳离子测定系统上测定单个细胞的荧光强度, 激发波长分别为 340 nm 和 380 nm, 发射波长为 505 nm. 根据公式^[6]:

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

计算 $c(\text{Ca}^{2+})_i$. 式中 $k_d = 2.24 \times 10^{-7}$ mol/L. 按文献 [7] 的方法测得 $R_{\max}$ 、 $R_{\min}$ 和 β 依次为 14.7 ± 0.84 ($n=10$)、 0.62 ± 0.04 ($n=12$)、 5.40 ± 0.46 ($n=10$). R 为实测荧光比值 F_{340}/F_{380} .

$c(\text{Mg}^{2+})_i$ 的测定: 细胞用 4 $\mu\text{mol/L}$ Mag-

Fura-2/AM 负载 30 min (37℃, 5% CO_2) 后, 25℃ 下放置 4 h, 其他实验过程与 $c(\text{Ca}^{2+})_i$ 的测定相同^[8].

$$c(\text{Mg}^{2+})_i = k_d \beta (R - R_{\min}) / (R_{\max} - R)$$

式中 $k_d = 1.5$ mmol/L. 按文献 [9] 的方法测得 $R_{\max}$ 、 $R_{\min}$ 和 β 依次为 4.8 ± 0.52 ($n=12$)、 0.68 ± 0.08 ($n=12$)、 3.5 ± 0.44 ($n=12$).

2 实验结果

2.1 细胞存活率

实验结果表明 (见表 1), 当介质中 SeO_3^{2-} 浓度为 10^{-3} mol/L 时, 有很大的细胞毒性, 孵育 4 h, 细胞死亡 60% 以上. 10^{-5} mol/L 的 SeO_3^{2-} 在短时间内对细胞无毒, 当孵育时间增至 8 h 时表现出低毒. 在实验时间内, 10^{-6} mol/L 的 SeO_3^{2-} 无细胞毒性.

表 1 不同亚硒酸钠浓度中的巨噬细胞存活率

$c(\text{Na}_2\text{SeO}_3) / \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	细胞存活率	
	4 h	8 h
0	91.3 ± 1.9	90.1 ± 2.3
10^{-3}	$38.7 \pm 5.9^{1)}$	$20.5 \pm 6.7^{1)}$
10^{-4}	$72.8 \pm 4.5^{1)}$	$59.1 \pm 4.8^{1)}$
10^{-5}	$87.3 \pm 3.8^{3)}$	$83.6 \pm 5.4^{2)}$
10^{-6}	$92.8 \pm 3.4^{3)}$	$89.1 \pm 3.1^{3)}$

注: $\bar{x} \pm s$, $n=4$. 1) 与对照组比较, $P < 0.001$; 2) 与对照组比较, $P < 0.05$; 3) 与对照组比较, 无显著性差异.

2.2 亚硒酸钠对 $c(\text{Ca}^{2+})_i$ 的影响

细胞悬液中加入不同浓度的 SeO_3^{2-} , 37℃ 孵育不同时间后, 测得 $c(\text{Ca}^{2+})_i$ (见图 1). SeO_3^{2-} 的毒性作用, 使 $c(\text{Ca}^{2+})_i$ 升高. SeO_3^{2-} 浓度越大, 毒性越大, $c(\text{Ca}^{2+})_i$ 升高也越大. 10^{-3} mol/L 的 SeO_3^{2-} , 孵育 10 min 时, $c(\text{Ca}^{2+})_i$ 显著升高 ($P < 0.01$). 随着孵育时间的增长, $c(\text{Ca}^{2+})_i$ 升高越大. 10^{-5} mol/L 和 10^{-6} mol/L 的 SeO_3^{2-} , 在实验时间内未观察到 $c(\text{Ca}^{2+})_i$ 有显著性变化.

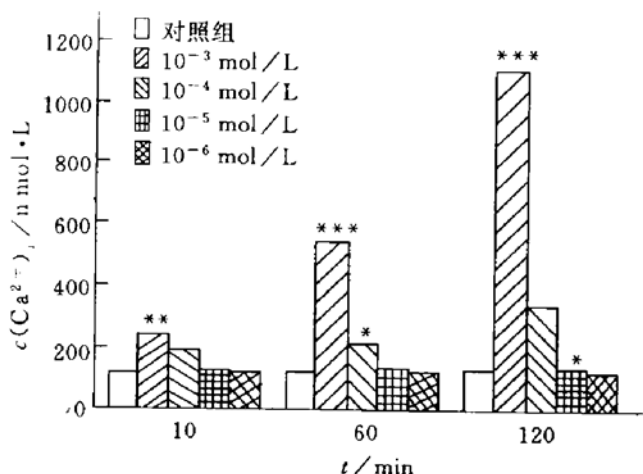


图1 Na_2SeO_3 对巨噬细胞 $c(\text{Ca}^{2+})_i$ 的影响

* 与对照组比较, $P < 0.05$; ** 与对照组比较, $P < 0.01$; *** 与对照组比较, $P < 0.001$.

2.3 亚硒酸钠对 $c(\text{Mg}^{2+})_i$ 的影响

图2所示是不同浓度的亚硒酸钠对 $c(\text{Mg}^{2+})_i$ 的影响. 结果表明, SeO_3^{2-} 的毒性作用也使 $c(\text{Mg}^{2+})_i$ 升高, 但 $c(\text{Mg}^{2+})_i$ 的变化要比 $c(\text{Ca}^{2+})_i$ 的迟缓. 孵育1 h, 各组的 $c(\text{Mg}^{2+})_i$ 未出现显著性变化, 孵育时间增至2 h, 10^{-3} mol/L 的 SeO_3^{2-} 组的 $c(\text{Mg}^{2+})_i$ 才出现显著性上升. SeO_3^{2-} 增大和作用时间增长, $c(\text{Mg}^{2+})_i$ 升高越大.

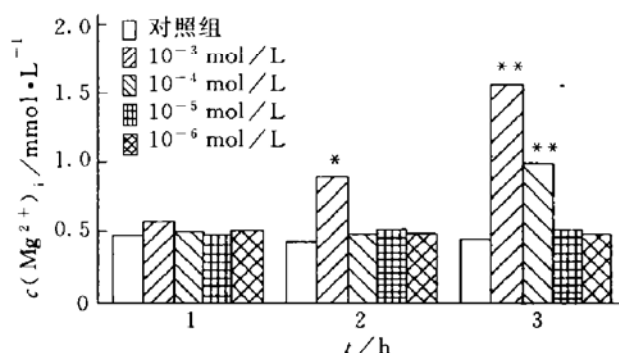


图2 Na_2SeO_3 对巨噬细胞 $c(\text{Mg}^{2+})_i$ 的影响

* 与对照组比较, $P < 0.01$; ** 与对照组比较, $P < 0.001$.

2.4 亚硒酸钠对膜 Ca^{2+} -ATP 酶活性的影响

经不同浓度的 SeO_3^{2-} 处理过的红细胞膜的 Ca^{2+} -ATP 酶活性变化见图3. 10^{-7} mol/L 和 10^{-6} mol/L 的 SeO_3^{2-} 对膜 Ca^{2+} -ATP 酶活

性无显著性的影响. 10^{-5} mol/L SeO_3^{2-} 对 Ca^{2+} -ATP 酶活性有轻微的抑制作用. 当 SeO_3^{2-} 浓度增至 10^{-3} mol/L 时, Ca^{2+} -ATP 酶的活性被抑制70%以上. 这表明 SeO_3^{2-} 对 Ca^{2+} -ATP 酶活性有抑制作用.

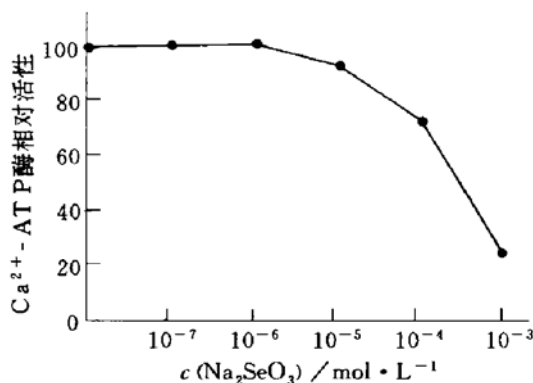


图3 Na_2SeO_3 对 Ca^{2+} -ATP 酶活性的影响

3 讨 论

硒虽是生物体内必需的微量元素, 但当硒的摄入量超过一定限值时, 则有毒害作用. 实验的结果表明, 当 SeO_3^{2-} 高于 10^{-4} mol/L 时, 有显著性毒性 (见表1); SeO_3^{2-} 的细胞毒性作用使细胞内游离 Ca^{2+} 浓度显著升高 (见图1); SeO_3^{2-} 对膜上 Ca^{2+} -ATP 酶活性产生抑制作用 (见图3). Se 能取代细胞膜上—SH 和—S—S—等基团中的 S^[10,11], 当 SeO_3^{2-} 浓度增大时, 使细胞膜上的 S 大量被 Se 取代, 从而导致细胞膜的结构和功能受到破坏. 这种破坏作用可能造成细胞外 Ca^{2+} 内流^[12]. 同时, SeO_3^{2-} 对膜 Ca^{2+} -ATP 酶活性的抑制, 降低了细胞主动运输 Ca^{2+} 的能力, 使胞内多余的 Ca^{2+} 不能得到有效的清除, 细胞内 Ca^{2+} 聚集越来越多, 造成胞内游离 Ca^{2+} 超载. 当胞内 Ca^{2+} 持续处于超载状态下时, 会对细胞产生损伤作用^[13]. SeO_3^{2-} 对细胞的毒性作用, 使 $c(\text{Mg}^{2+})_i$ 升高 (图2), 这可能与胞内 Ca^{2+} 代谢受阻有关. $c(\text{Ca}^{2+})_i$ 的骤增可能刺激胞内结合 Mg^{2+} 的释放或是引起线粒体的破裂, 使线粒体内的 Mg^{2+} 释放到胞浆中^[14]. 因此, SeO_3^{2-}

对细胞的毒性作用可能是由于 SeO_3^{2-} 与细胞膜的作用破坏了细胞膜的结构和 Ca^{2+} 的调控机制, 最后导致细胞崩解死亡。

参 考 文 献

- 1 Shamberger R J. In: Friden E ed. Biochemistry of selenium. New York and London: Plenum Press, 1983: 31
- 2 Gabor S, Ciugudeanu M, Surcel D. Environ Res, 1985; 37: 293
- 3 Fisher G L, McNeill K L, Democko C J. Environ Res, 1986; 39: 164
- 4 Ling J, Wen H R, Chen R S *et al.* In: Anastassopoulou J eds. Metal ions in biology and medicine. Paris: John Libbey Eurotext, 1992; 2: 295
- 5 Colvin R A, Ashavaia T F, Herbert L G. Biochem Biophys Acta, 1985; 821: 601
- 6 Gryniewicz G, Poenie M, Tsien R Y. J Biol Chem, 1985; 260: 3440
- 7 McDonough P M, Button D C. Cell Calcium, 1989; 10: 171
- 8 Murphy E, Freudenrich C C, Levy L A *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1989; 86: 2981
- 9 Raju B, Murphy E, Levy L A *et al.* Am J Physiol, 1989; 256: C540
- 10 Holker K J, Speakman J B. J Appl Chem, 1958; 8: 1
- 11 Jenkins K J, Hidioglou M. Can J Biochem, 1971; 49: 468
- 12 温和瑞, 王金唏, 陈荣三等. 无机化学学报, 1993; 9 (3): 266

13 Nayler W G. European Heart J, 1983; 4 (suppl. c): 33

14 张祖喧, 陈荣三. 科学通报, 1979; 24: 471

Effects of Sodium Selenite on Cytoplasmic Free Ca^{2+} and Mg^{2+} of Alveolar Macrophages.

Wen Herui, Wang Jinxi, Zhu Weihua, Li Ruiyan, Chen Rongsan (Coordination Chemistry Institute, State Key Laboratory of Coordination Chemistry, Nanjing University, Nanjing 210093, China).

Abstract Cytoplasmic free Ca^{2+} and Mg^{2+} concentration ($c(\text{Ca}^{2+})_i$ and $c(\text{Mg}^{2+})_i$) of alveolar macrophages in rabbit lung after incubation with sodium selenite were determined by SPEX AR-CM-MIC system. The results showed that high concentration sodium selenite ($\geq 10^{-4}$ mol/L) had the cytotoxicity. The poisonous effect of selenite on macrophage led to the increase of $c(\text{Ca}^{2+})_i$ and $c(\text{Mg}^{2+})_i$. High concentration selenite had some suppressive effect on the Ca^{2+} -ATPase activity of erythrocyte membrane.

Key words sodium selenite, cytotoxicity, cytoplasmic free Ca^{2+} , cytoplasmic free Mg^{2+} , Ca^{2+} -ATPase

反义 c-fos 和 c-jun 抑制 IL-1 诱导阿片肽分泌*

王朝晖 单巍松 吴希如

(北京医科大学第一临床医学院, 北京 100034)

摘要 白细胞介素-1 (IL-1) 及阿片肽作为神经调质参与了神经细胞兴奋性毒性作用. 以大鼠大脑皮层神经细胞为研究对象, 探讨了 IL-1、阿片肽和 c-fos、c-jun 表达产物之间的关系. 结果表明, IL-1 β 能诱导大脑皮层神经细胞 c-fos、c-jun mRNA 瞬时短暂表达, 15 min 增高, 30 min 达高峰, c-fos mRNA 2 h 回至基线水平, c-jun mRNA 8 h 回至基线水平; 联合应用 c-fos、c-jun 反义寡核苷酸能部分抑制 IL-1 诱导的大脑皮层神经细胞脑啡肽及 β -内啡肽分泌增加, 呈一定量效关系, 相应意义寡核苷酸无抑制作用. 提示 IL-1 促进大脑皮层神经细胞脑啡肽及 β -内啡肽分泌作用部分受 Fos 和 Jun 蛋白调控.

关键词 大脑皮层神经细胞, 白细胞介素-1, 阿片肽, c-fos, c-jun, 反义寡核苷酸