[文章编号] 1004- 0609(2002)01- 0014- 06

# 金属毒性研究(Ⅱ)①

阮建明[1, 2], M.H. Grant[2], 黄伯云[1]
(1. 中南大学 粉末冶金国家重点实验室, 长沙 410083; 2. Bioengineering Unit, Strathclyde University, Glasgow G4 ONW, UK)

[摘 要] 利用细胞生物学技术从定量和定性两个方面探讨了 Cr(Ⅲ), Cr(Ⅵ), Ni, Al, Ag 和 V 金属离子对生命组织的毒性作用。研究中发现, Cr(Ⅵ)对细胞 DNA, RNA 合成限制最为显著, Ni 和 V 金属离子在同等水平上妨碍 RNA 合成, 随着离子浓度增加, Cr(Ⅲ)离子对细胞 DNA 及 RNA 限制增大。Al 离子对 RNA 合成限制大于对 DNA 合成。Ag 离子对细胞 DNA, RNA 合成限制作用相同。细胞谷胱甘肽(GSH)还原能力强, 是细胞最重要的解毒物质, 也是细胞中防御毒性物质最关键的物质。细胞 GSH 还原能力定量分析表明: 微量的 Cr(Ⅵ) 即可导致细胞 GSH 下降。金属 Ni 离子破坏细胞骨架, 使细胞内信息传递受阻, 亦表现较强毒性。

[关键词] 金属毒性; DNA 和 GSH; 细胞
[中图分类号] R 995 [文献标识码] A

人们在日常生活和工作中常接触许多金属元素, 但往往只重视几种毒性很强的金属, 如镉, 汞, 铅[1~3], 等。实际上, 许多普通金属对生命肌体都有一定毒性。铝是我们接触最多的普通金属, 从事铝加工的人群中患老年痴呆症的人数是其他人群的 29 倍[4, 5]。通过食物进入人体的金属被人体吸收后, 除极少量留下以维持生物体功能的正常代谢外, 其它大多数经酶解或络合后排泄掉。然而, 作为生物材料, 植入人体后直接接触体内组织, 可以离子、原子、分子、甚至颗粒的形态通透细胞膜, 进入细胞, 产生毒性反应[1, 6]。最显著的反映是限制和破坏 DNA, RNA 合成[6~8], 表现为细胞增殖能力和蛋白质合成能力降低。谷胱甘肽(GSH)是细胞最重要的防御和解毒物质, GSH 将有毒物质降解成无毒性物质, 由细胞蛋白质递解出细胞[9~11]。随着有毒物质进入细胞的数量增加, 细胞中 GSH 被消耗, 含量逐步减少。因此测定细胞 GSH 含量能够定量反映细胞毒性程度。作者在考察了金属离子对细胞酶活性和细胞代谢能力影响的基础上[12], 进一步研究了 Ag, Ni, Cr, V 和 Al 金属离子对细胞抗毒机构的破坏和金属离子对细胞 DNA, RNA 合成功能的限制。

## 1 实验

### 1.1 金属离子溶液制备

不同浓度的金属离子溶液分别从各自的金属盐溶液制得, 金属盐包括 $NiCl_2$, $AlCl_3$, AgCl, $VOCl_3$, $CrCl_3$(3 价铬), $CrCl_2O_4$(6 价铬)。这些金属离子溶液与细胞培养基混合。对于动物细胞使用复合培养基(DMEM), 对于人骨细胞使用哈姆斯 F-10 培养基(Hams F-10)。培养基中的离子浓度范围在 0.1~ 1 250 μmol/L。

### 1.2 细胞 DNA, RNA 合成能力分析

细胞种类和细胞准备方法如文献[1]所描述。本项研究继续采用经病毒转染的人类成骨细胞(第 8 次至第 12 次传代)及动物成骨细胞(第 24 次至第 32 次传代)(Osteoblasts)。细胞 DNA, RNA 合成能力测定在 24 孔板上进行。对于人骨细胞, 每井下种密度为 $5\times10^4$, 对于动物细胞, 每井下种密度为 $2.5\times10^4$。下种后 24 h, 正常的培养基为金属离子的培养基替代, 接着再培养 24 h。分别在同时含有金属离子和放射性同位素标定的胸腺嘧啶($H^+$-Thymidine; Td)和同时含有金属离子和放射性同位素标定的尿嘧啶($H^+$-Uridine)的培养基中培养 48 h。经 PBS 溶液充分洗涤后, 细胞在含有 1 mmol/L 胸腺嘧啶脱氧核苷或尿嘧啶核苷的 PBS 溶液中处理 30 min, 以清除细胞内非特性结合的 $H^+$-Thymidine 或非特性结合的 $H^+$-Uridine。接下来, 每井细胞经 2 mL 浓度为 0.5 mol/L 的乙酸消化溶解 24 h 后用 0.5 mL 浓度为 0.5 mol/L 的氢氧化钠溶液中和。取 0.5 mL 上述消化液与 4 mL 闪烁剂混合, 在闪烁记数器上定量测取细胞 DNA 中 $H^+$-Thymidine

① [收稿日期] 2000- 12- 27; [修订日期] 2001- 04- 16 [作者简介] 阮建明(1956- ), 男, 教授, 博士.

和 RNA 中 $H^+$-Uridine。闪烁记数器上定量测定参数用(每分钟放射性点数) d/m 表示。

### 1.3　细胞 GSH 解毒能力测定

细胞 GSH 解毒能力测定同样在 24 孔板上进行。细胞种植密度与前相同。细胞先由正常培养基培养, 每隔 48 h 更新培养液。对于人骨细胞, 1 周后, 在细胞出现凋零(Apoptosis)之前, 正常培养基由含金属离子的培养基替代, 接着培养 24 h。对于鼠骨细胞 96 h 后, 在细胞出现凋零之前, 正常培养基由含金属离子的培养基替代, 接着培养 24 h。每井细胞的 GSH 经 200 μL 10% 三氯已酸(Trichloroacetic acid: TCA) 在室温条件下萃取 10 min, 萃取液中的细胞碎片由离心沉淀法去除。取 25 μL 上层清液与 2.3 mL PBS(pH8), 100 μL 磺基水杨酸溶液混合并将此混合液在暗室和室温条件下陈化 30 min。GSH 含量荧光分析采用 Hissin/Hilf 方法在 RF-5001PC 荧光质谱仪上测得[10]。标准曲线取值范围在 0~ 50 μmol/L GSH, 零值用水标定。在 350 nm 波长激发光和 420 nm 波长发射光下记录读数。

### 1.4　实验数据统计

所有数据收集下来, 在图上表示成平均值 ±标准误差。应用单因素方差分析评估所有实验数据统计显著性。实验时, 以不含金属离子的培养基作为对照组。细胞在 37 ℃恒温箱中培养, 培养气氛是含 5% $CO_2$ 的空气。

## 2　实验结果

### 2.1　细胞形貌观察

图 1 所示为第 10 次传代培养的人类成骨细胞相差显微镜形貌。在对照组中(图 1(a)), 细胞生长状态呈现为正常, 细胞直径约在 10~ 20 μm, 图中用星号标示的圆形细胞(实际为球形) 正处于细胞核 DNA 合成状态, 即细胞生命周期中有丝分裂前期。细胞密集贴附在培养皿底盘上, 表现经 SV40 病毒 DNA 转染, 人类成骨细胞经 10 次传代有很强的增殖能力。图 1(b) ~ (g) 依次是培养在含 Al, Ag, Cr(Ⅲ), V, Ni, Cr(Ⅵ) 离子培养基中的人类成骨细胞相差显微镜形貌, 其时, 金属离子浓度为 500 μmol/L。很明显, 细胞数量也按上述顺序依次减少。结果表现不同金属离子对细胞增殖的影响。作者曾用红血球计数器(Heamocytometer) 测定细胞数, 依照上述顺序, 每井细胞数分别为 $6.5\times10^5$, $6.6\times10^5$, $1.3\times10^4$, $1.1\times10^4$, $3.1\times10^3$ 和 $3.3\times10^3$。

### 2.2　金属离子溶液中细胞 DNA, RNA 合成能力

图 2 所示为不同金属离子及不同金属离子浓度对人类成骨细胞(a) 和动物成骨细胞(b) DNA 合成能力的影响的定量分析结果。依照上述 Al, Ag, Cr(Ⅲ), V, Ni, Cr(Ⅵ) 的顺序, 当离子浓度超过 1 mmol/L(85 ±14)%, 500 μmol/L(87 ±9)%, 250 μmol/L(79 ±17)%, 50 μmol/L (84 ±12)%, 10 μmol/L(77 ±15)%, 5 μmol/L(77 ±19)% 时, 人骨细胞 DNA 合成能力受到抑制。金属离子浓度对动物成骨细胞 DNA 合成能力的影响大于对人类成骨细胞 DNA 合成能力影响。依照 Al, Ag, Cr(Ⅲ), V, Ni, Cr(Ⅵ) 的顺序, 与对照组之间存在显著统计性差异的离子浓度分别降低到 1 mmol/L (78 ±12)%, 500 μmol/L(81 ±1)% 1 μmol/L(72 ±

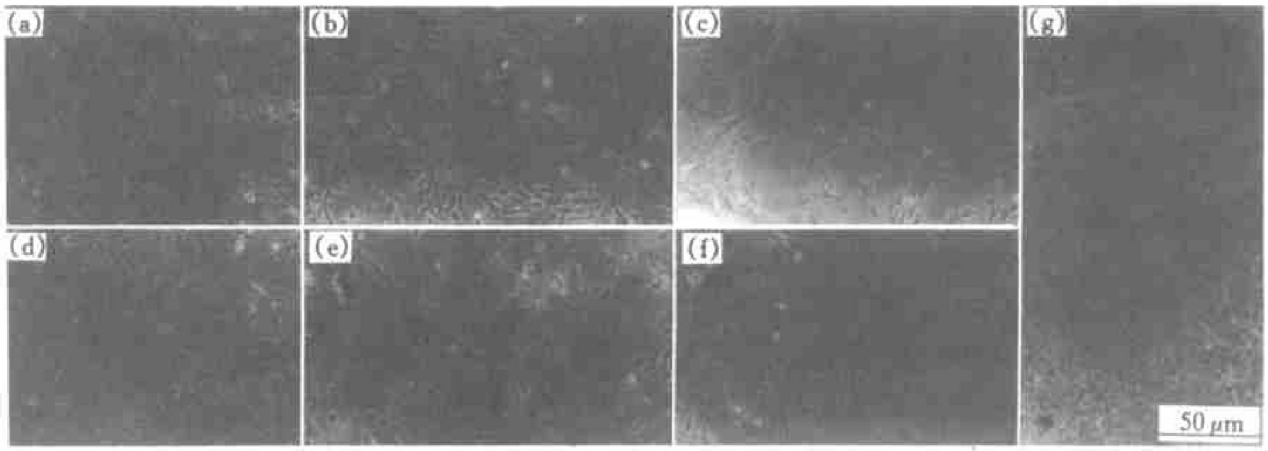


**图 1**　不同金属离子培养基中人类成骨细胞相差显微镜形貌

**Fig. 1**　Morphologic observation of human osteoblasts in metal ion culture media

(a) —Comparison group; (b) —Al; (c) —Ag; (d) —Cr(Ⅲ); (e) —V; (f) —Ni; (g) —Cr(Ⅵ)

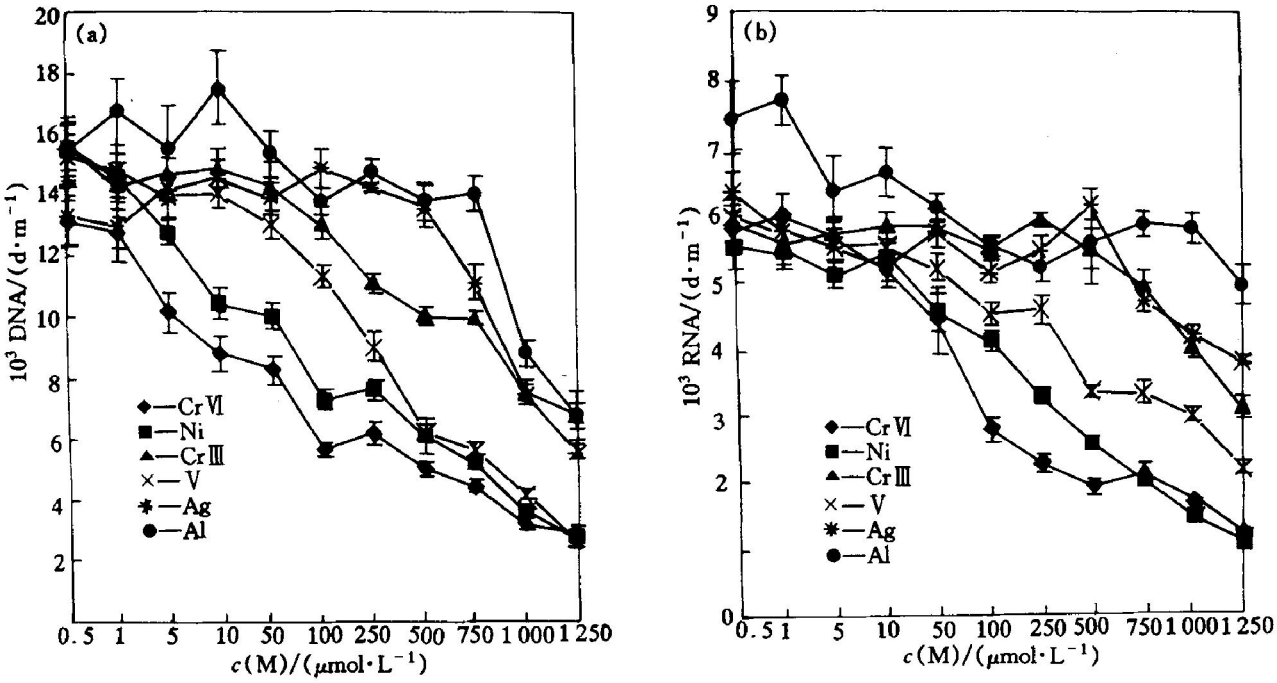


**图 2** 细胞 DNA 合成定量分析

**Fig. 2** Quantitive determination of cellular DNA

(a) —TRO cells; (b) —THO cells

18) % 。

图 3 所示为不同金属离子及不同金属离子浓度对鼠类成骨细胞 RNA 合成能力的影响的定量分析结果。随着培养基中金属离子浓度增加，细胞 RNA 合成能力受到限制，但是限制的程度小于 DNA，除铝离子之外，使得与对照组产生统计性显著差异的金属离子浓度提高。仍然依照 Al，Ag，Cr(Ⅲ)，V，Ni，Cr(Ⅵ) 的顺序，与对照组之间存在显著统计性差异的离子浓度分别 750 μmol/L(77 ±16) %，750 μmol/L(79 ±12) %，500 μmol/L(71 ±15) %，100 μmol/L(87 ±9) %，100 μmol/L(82 ±13) % 和 10 μmol/L(90 ±7) % 。类似的结果表现在人类成骨细胞 RNA 合成能力上。

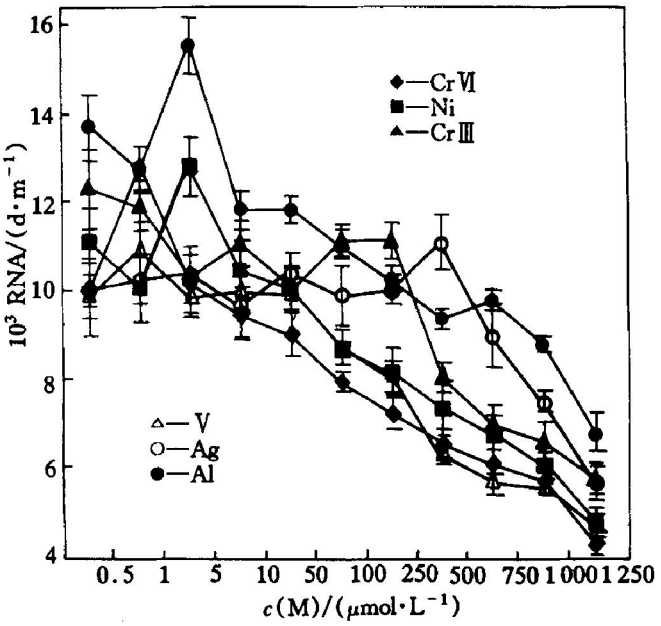


**图 3** 动物细胞细胞 RNA 合成定量分析

**Fig. 3** Quantitive determination of TRO cellular RNA

## 2.3 细胞 GSH 测量

细胞对金属离子的反应的 GSH 定量分析结果如图 4 所示。每种金属离子都给出了 4 组数据，表示与对照组比较产生显著差异前后的离子浓度。仍然以 6 价铬对细胞 GSH 含量的影响最为显著，其离子浓度为 10 μmol/L(89 ±7) % 。接下来是镍和钒，分别是 50 μmol/L(77 ±17) % 和 100 μmol/L(84 ±7) % 。产生显著毒性的 3 价铬离子浓度是 500 μmol/L(79 ±11) % 。导致细胞 GSH 含量下降的银离子，Al 离子浓度则在 1 mmol/L 附近，分别是 1 mmol/L(74 ±11) % 和 1 mmol/L (87 ±8) % 。与图 4(a) 中的数据比较，注意到图 4(b) 中的数据，显示金属离子对人骨细胞 GSH 含量的影响要小于作用于鼠骨细胞，在与上述相同的金属离子浓度条件时，除了钒与对照组之间仍有显著性差异，其余均无显著差异。这种结果说明鼠骨细胞 GSH 对金属离子的敏感性高于人骨细胞 GSH 对金属离子的敏感性。

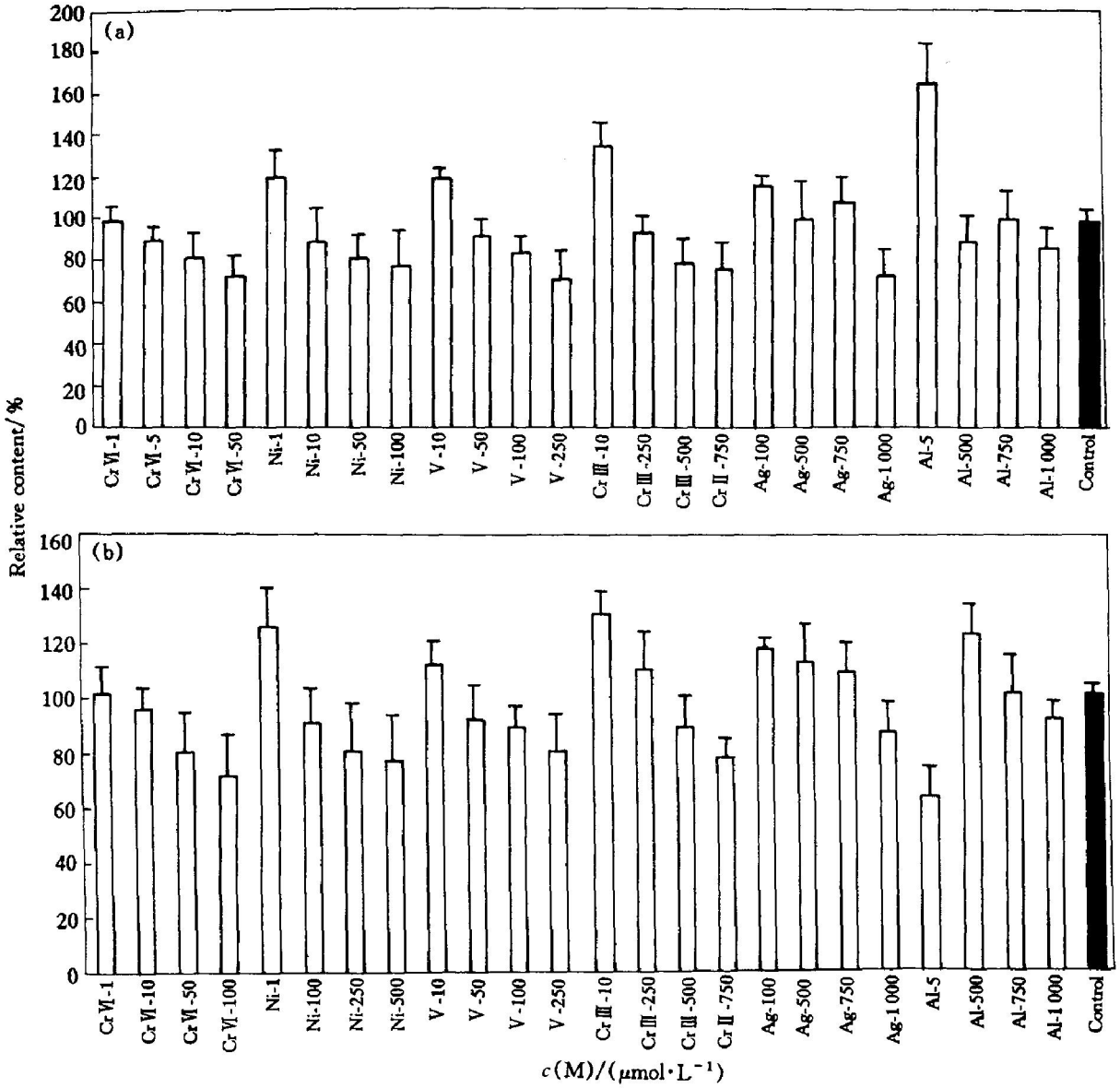


图 4　细胞 GSH 相对百分含量分析

**Fig. 4**　Relative percents of cellular GSH

(a) —TRO cells; (b) —THO cells

## 3　讨论

核酸是携带生命遗传基因的基础物质, 由核苷酸组成, 根据其在细胞中的作用, 分为 DNA 和 RNA, 生命的具体运行由蛋白质体现。为满足各种需要, 细胞脱氧核糖核酸 DNA 提供复制各种蛋白质的基因链拷贝, 由细胞信使核糖核酸 RNA 携带进入细胞质, 并在那里经细胞质和高尔基器官等其它器官完成蛋白质的复制合成[13, 14]。因此, DNA, RNA, 细胞质, 高尔基器官, 蛋白质构成一个极其精确的生命体系环节。环节中任何一个因素的缺陷都会导致细胞功能障碍。如果有毒金属离子穿膜进入 RNA 高分子并且与 RNA 表面识别位点结合, RNA 携带基因链拷贝和自身复制的功能受损, 将导致细胞合成蛋白质的能力下降。另一方面, 如果有毒金属离子进入细胞 DNA, 这里会有两种结果: 影响 DNA 提供复制各种蛋白质的基因链拷贝和影响 DNA 本身的合成。后一个因素直接妨碍细胞自己本身的增殖。因此, 细胞 DNA, RNA 的定量分析都能够表达金属离子对细胞的毒性作用。简单说来, DNA 链由腺嘌呤(A), 鸟嘌呤(G), 胞嘧啶(C), 和胸腺嘧啶(T) 4 个硷基空间排列组合而成。RNA 链由腺嘌呤(A), 鸟嘌呤(G), 胞嘧啶(C), 和尿嘧啶(U) 4 个硷基空间排列组合而成。它们就像砖头一样, 严密而又准确地构成 DNA, RNA 移传基因大厦。利用高分子细胞生物学技术, 只要测定细胞中某种碱基对的含量, 就能够得到 DNA 或 RNA 确定值。本研究将已经放射性同位素标定的胸腺嘧啶或尿嘧啶引入细胞培养系统, 利用细胞

DNA 或 RNA 合成时将其组合进 DNA 或 RNA，然后用闪烁记数器定量测定样品，反映 DNA 或 RNA 合成能力。如果因为金属离子的毒性存在，妨碍放射性标定的胸腺嘧啶或尿嘧啶组合，结果是样品中 DNA 或 RNA 合成数量减少。图 2 中的实验结果曲线和数据表明培养基中金属离子，对细胞 DNA 合成具有限制作用，特别是 Cr(Ⅵ)和镍离子。一个解释是镍离子在细胞生理周期的 DNA 合成阶段阻碍 DNA 合成[16]。另一个解释是 Cr(Ⅵ)离子进入细胞后，破坏细胞骨架，使得细胞中的信息传递受阻，导致 DNA 合成障碍[17]。上述两个因素均使细胞增殖下降，如图 1 所示。贵金属银表现出相对惰性，直到溶液离子浓度高于 500 μmol/L，DNA 合成才受到影响，在溶液离子浓度低于 1 mmol/L，RNA 合成不受影响。低浓度 Cr(Ⅲ)离子对 RNA 合成影响很小，这可能与 Cr(Ⅲ)离子与培养基中的物质形成络合物，不能进入细胞膜相关[17]。高浓度 Cr(Ⅲ)离子对 DNA 合成限制可能与 Cr(Ⅲ)离子形成络合物后，为细胞表面蛋白质受体识别和结合，堵塞了膜表面通道相关。同时，随着离子浓度增加，渗透压亦增加[14, 16]，进入细胞的离子数量增加，产生较大细胞毒性。研究数据还表明，微量的铝对细胞 DNA 有促成作用，但是，高浓度 Al 离子对 RNA 合成限制大于对 DNA 合成限制。一种分析是微量的铝离子介入细胞内信息传递系统，加快了信息传递，刺激 DNA 合成[18~20]。然而过度的铝离子介入细胞内信息传递系统后妨碍 RNA 合成，破坏了细胞内信息传递系统，最终限制 DNA 合成。与上述细胞内毒性机制不同的是，V 离子的毒性表现在妨碍细胞间的信息传递，使得受细胞间信息调控的细胞克隆受阻导致细胞凋零。同时，随着离子浓度增加，渗透压亦增加，部分 V 离子进入细胞，产生毒性，结果是分析样品的 DNA，RNA 同时减少。因此，钒离子浓度-DNA 合成关系曲线与钒离子浓度-RNA 合成关系曲线非常相似。

谷胱甘肽 GSH 广泛地分布于活细胞，且与许多生物功能相关。它的氧化形式是 GSSG，它的还原形式是 GSH。GSSG 由谷胱甘肽还原酶还原成 GSH。当 GSH 与从材料析出的亲电子物质反应后失去电子，成为 GSSG，部分被分泌出细胞。这种氧化-还原的过程就是最重要的细胞解毒机理之一[10, 11]。进入细胞的毒性物质愈多，细胞中残留的 GSH 就愈少。研究结果表明，Cr(Ⅵ)和镍离子都具有很强的毒性，GSH 含量急骤降低。细胞与对照组产生显著差异的离子浓度分别在 10 μmol/L，50 μmol/L。接下来是 V 和 Cr(Ⅲ)。银，铝直到很高离子浓度时 GSH 才降低。值得注意的是，除了 Cr(Ⅵ)，其余 5 种金属离子在它们各自的低浓度时，GSH 都高于对照组。这种现象很可能是受刺激的细胞加强了消除致亚死毒物剂量的防卫活性和对毒物的酶解，增加了膜通道蛋白的合成，促进毒物酶解后的分泌[21, 22]。Cr(Ⅵ)离子和镍离子的毒性值得进一步研究，很可能除了消耗细胞 GSH，还破坏细胞骨架，作者曾用微管抗体标定细胞微管蛋白，发现经含 Cr(Ⅵ)离子培养液培养的细胞，与对照组比较，无论是微管取向，还是微管密度与对照组比较，都存在差异[23]。

另一个值得注意的问题是上述研究数据显示，作为异类同种骨，鼠骨细胞较人骨细胞对金属离子的毒性敏感。特别是对表现细胞增殖的 DNA 合成能力影响显著。如对图 2 中的实验曲线 50% DNA 处引垂线交于浓度坐标，即产生 50% 死亡率的药剂量($D_{50}$)。仍以 Cr(Ⅵ)，Ni，V，Cr(Ⅲ)，Ag，Al 为序，对于鼠骨细胞，$D_{50}$值分别是 65 μmol/L，250 μmol/L，750 μmol/L，1 mmol/L，1 mmol/L 和 1.2 mmol/L；对于人骨细胞，$D_{50}$值则分别是 100 μmol/L，375 μmol/L，1 mmol/L，1 mmol/L，> 1.25 mmol/L 和> 1.25 mmol/L。二者间存在差别。其原因可能是在细胞增殖时期，金属离子破坏细胞分蘖出来的两个球形姐妹细胞在培养盘底板上贴附[11, 22]。因为鼠骨细胞增殖能力高于人骨细胞，受影响的程度大于人骨细胞。

## [REFERENCES]


[1] Angerer J, Schaller K. Analysis of Hazardous Substances in Biological Materials [M]. Germany: Wilay-VCH, 1999. 1- 62.

[2] Bier O G, Gotze D, Mota I. Fundamentals of Immunology [M]. New York: Springer-Verlag, 1981. 1- 73.

[3] Bruner L H, Kain D J, Roberts D A, et al. Evaluation of seven in vitro alternatives for ocular safety testing [J]. Fund Appl Toxicol, 1991, 17: 136- 149.

[4] Jeffery E H. Biochemical mechanisms of aluminium toxicity [A]. Goyer R A, Cherian M G. Toxicology of Metals [C]. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 1995. 138 - 161.

[5] Letzel S, Schaller K H, Angerer J, et al. Biological monitoring of occupational aluminium powder exposure [J]. Occup, 1996, 3: 271- 280.

[6] Bisset C. Cytotoxicity studies in cultured mammalian cell

[D]. Strathclyde University, UK, 1995.

[7] Burton S A, Petersen R V, Dickman S N, et al. Comparison of in vitro bacterial bioluminescense and tissue culture bioassays and in vivo test for evaluating acute toxicity of biomaterials [J]. J Biomed Mater Res, 1986, 20: 287 – 838.

[8] Palissot V, Liautaud R F, Carpentier Y, et al. Analysis of DNA content in multidrug resistant cells by image and floe cytometry [J]. Cell Prolif, 1996, 29: 549– 559.

[9] Pelletier L, Druet P. Immunotoxicology of metals [A]. Goyer R A and Cherian M G. Toxicology of Metals [C]. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 1995. 77– 92.

[10] Hissin P J, Hilf R. A fluorimetric method for determination of oxidised and reduced glutathione in tissue [J]. Anal Biochem, 1976, 74: 214– 226.

[11] Macnair R A, Rodgers E H, Macdonald C, et al. The response of primary rat and human osteoblasts and immortalized rat osteoblast cell to orthopedic materials — comparative sensitivity and several toxicity indices [J]. J Mater Sci Mater Med, 1997, 8: 105– 111.

[12] 阮建明, Grant M H, 黄伯云. 金属毒性研究(Ⅰ) [J]. 中国有色金属学报, 2001, 11(6): 960– 965. RUAN Jian-ming, Grant M H, HUANG Bai-yun. Approach of metal cytotoxicity (Ⅰ) [J]. The Chinese Journal of Nonferrous Metals, 2001, 11(6): 960– 965

[13] Peterson W J, Yamaguchi D J. Cell density down regulates DNA synthesis and proliferation during osteogenesis in vitro [J]. Cell Prolif, 1996, 26: 665– 677.

[14] Seeley R G, Stephen T D, Tate P. Anatomy & Physiology [M]. Missouri, USA: Mosby-Year Book, 1995. 134– 158.

[15] Rodan G A. Introduction to Bone Biology [M], Bone, 1992, 13: 5– 47.

[16] Smith D, Owen T A, Martin T J. Toxicology [M]. New York: Von Hoffmann Press, 1992. 15– 302.

[17] Ning J, Ruan J, Rodgers E H, et al. The effects of Cr Ⅲ and Cr Ⅳ ions on cellular phenotypic and functional expression [J]. J Mater Sci Mater Med, 1999, 3: 437 – 444.

[18] Lau K H W, Utrapiromsuk S, Yoo A, et al. Mechanism of mitogenic action of aluminum ion on human bone cells [J]. Arch Biochem Biophys, 1993, 303: 267 – 273.

[19] Lau K H W, Yoo A, Wang S P. Aluminum stimulates the proliferation and differentiation of osteoblasts in vitro by a mechanism that is different from fluoride [J]. Mol Cell Biochem, 1991, 105: 93– 105.

[20] Quarles L D, Wenstrup R J, Drezner M K. Aluminum-induced neo-osteogenesis: attenuation by PTH deficiency [J]. J Clin Invest, 1989, 83: 1644– 1650.

[21] Shi Q, Gaylor J D S, Cousins R, et al. The effects of serum from patients with acute liver failure on the growth and metabolism of Hep G2 cells [J]. J. Artifi Org, 1998, 22: 1023– 1030.

[22] Walum E, Stenberg K, Jensson D. Understanding Cell Toxicity: Principle and Practice [M]. Chichester: Ellis Horwood Ltd, 1990. 64– 128.

[23] Ruan J. Characterization and biocompatibility evaluation of calcium phosphate biomaterials in vitro [D]. Glasgow Strathclyde University, UK, 1998.

# Approach of metal cytotoxicity(Ⅱ)

RUAN Jian-ming[1, 2], M.H. Grant[2], HUANG Bai-yun[1]

(1. State Key Laboratory for Powder Metallurgy, Central South University, Changsha 410083, China;

2. Bioengineering Unit, Strathclyde University, Glasgow G4 ONW, UK)

**[Abstract]** By use of cellular biological techniques, the poison mechanism of metal ions (Cr(Ⅵ), Ni, V, Cr(Ⅲ), Ag, and Al) on living tissue was both quantitatively and qualitatively approached. The results show that Cr(Ⅵ) has a notable action on cellular both DNA and RNA synthetic functions. With increasing concentration, the limit action of Cr(Ⅲ), on DNA, RNA synthetic abilities increases. Different to other five metal ions, the limit of Al ion on RNA is greater than that of Al ion on DNA. The limitation of V, Ag ions on DNA is same to that of V, Ag ions on RNA. Glutathione is most important of detoxification in living cells. It is also the most important defensive. Trace Cr(Ⅵ), in culture medium results in the decreasing of GSH in living tissue. Similar to that, a little higher Ni ion concentration seriously reduces the GSH content in living tissue. It is suggested that Cr(Ⅵ), Ni should destroy and/or disturb the orientation of the microtubulin in cell skeleton. For other four metal ions, together with increasing the concentration in culture medium, the osmotic pressure increases. Consequently, more metal ions entered cell membrane, more GSH were lost in cell.

**[Key words]** metal cytotoxicity; DNA and GSH; cell　　(编辑　黄劲松)