

Cr(VI)对细胞增殖周期和细胞内蛋白质及DNA含量的影响

贾光, 刘世杰

(北京医科大学公共卫生学院劳动卫生教研室, 北京 100083)

摘要: 目的 研究六价铬 [Cr(VI)] 对细胞增殖周期和细胞内蛋白质及DNA含量的影响。方法 应用流式细胞技术研究K₂Cr₂O₇ [Cr(VI)] 对人胚肺细胞增殖周期和细胞内蛋白质及DNA含量的影响。结果 低剂量K₂Cr₂O₇ (0~1.250 μ mol/L) 可刺激细胞增殖, 2.500 μ mol/L及以上剂量K₂Cr₂O₇ 可以抑制细胞增殖, 细胞多数被阻断在S期 ($P<0.01$)。细胞内蛋白质及DNA含量也随K₂Cr₂O₇ 浓度增加而有降低趋势, 在5.000 μ mol/L组, 即有差异显著性 ($P<0.05$)。结论 低剂量K₂Cr₂O₇ (0~1.250 μ mol/L) 对细胞增殖的刺激作用, 可能与六价铬多阶段致癌作用有关。

关键词: K₂Cr₂O₇ [Cr(VI)]; 流式细胞技术; 细胞增殖周期; 蛋白质含量; DNA含量

中图分类号: O614.61⁺1; Q253 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(1999)06-0341-03

Effects of six-valent chromium on cell proliferation cycle and cellular contents of protein and DNA

JIA Guang, LIU Shi-jie

(Department of Occupational Health, Beijing Medical University, Beijing 100083, China)

Abstract: **Objective** To study the effects of six-valent chromium [Cr(VI)] on cell proliferation cycle and cellular contents of protein and DNA. **Methods** Effects of potassium dichromate [Cr(VI)] on cell proliferation cycle and cellular contents of protein and DNA in human embryo lung (HEL) cells were detected by flow cytometry. **Results** Low dose potassium dichromate (0~1.250 μ mol/L) could stimulate cell proliferation, and a dose of 2.500 μ mol/L or more could inhibit it and most of cell cycles were delayed at S phase ($P<0.01$). Cellular contents of protein and DNA showed a reducing trend with increasing doses of potassium dichromate, and there was significant difference in them with treatment of 5.000 μ mol/L potassium dichromate ($P<0.05$). **Conclusion** Stimulation of cell proliferation cycle by low dose of potassium dichromate could correlate to the multistage carcinogenicity of Cr(VI).

Key words: Potassium dichromate; Flow cytometry; Cell proliferation cycle; Cellular protein; Cellular DNA

流式细胞技术 (Flow cytometry, FCM) 在细胞生物学领域有着广泛的应用。其中应用最频繁也最普遍的是细胞周期分析。随着荧光探针的不断开发和利用, 应用 FITC (异硫氰基荧光素) 及 PI (碘化丙啉) 双标记法即可同时检测细胞内蛋白质及DNA的含量。六价铬有着广泛的工业用途, 同时也是一种明确的工业致癌物。为了研究六价铬的体外致癌机制, 我们应用流式细胞技术观察了K₂Cr₂O₇ 对人胚肺细胞 (Human embryo lung cell, HEL cell) 的增殖周期和蛋白质、DNA含量的影响。期望从细胞增殖角度, 为六价铬致癌机制研究提供一定线索。

1 材料和方法

1.1 细胞株

人胚肺细胞 (HEL cell) 由军事医学科学院毒物

药物研究所赵修南同志建株并惠赠。常规培养。

1.2 细胞增殖周期^[1]分析

取指数生长期的HEL细胞, 加入含实验所需不同浓度K₂Cr₂O₇的最低限度MEM型培养液, 继续培养24小时, 染毒结束时, 用胰酶消化, PBS清洗, 收集细胞, 调整细胞浓度为 1×10^6 个细胞/ml, 加入终浓度50 μ g/ml的RNase, 室温放置30分钟, 然后离心, 将RNase洗去, 再加入含0.1% Triton X-100及终浓度为50 μ g/ml PI的PBS, 混匀, 室温放置20~30分钟, 上机检测, 激发波长为488nm。

1.3 用PI、FITC双标记分析细胞蛋白质、DNA含量^[1]

培养及染毒方法同细胞增殖周期分析。收集细胞, 经台盼兰拒染实验, 细胞存活率在95%以上。取 1×10^6 个细胞/ml, 以pH为7.2的0.1mol/L PBS洗2遍, 70%乙醇固定过夜, 上机前洗去乙醇, 用pH为5.0的磷酸盐-柠檬酸缓冲液处理细胞30分钟, 再以PBS洗一遍。悬浮细胞于1ml PBS, 加入终浓度

收稿日期: 1999-06-29

基金项目: 卫生部科研基金资助 (96-1-291)

作者简介: 贾光 (1968-), 女, 山东人, 博士, 副教授, 研究方向: 职业肿瘤。

为 50 μ g/ml 的 RNase, 室温放置 30 分钟, 再加入 FITC 0.05 μ g/ml, 置室温 30 分钟, 最后加入 PI, 终浓度 50 μ g/ml, 20 分钟后上机检查。FL1 为 FITC 参数, 反映蛋白质含量, 激发波长 495nm; FL2 为 PI 参数, 反映 DNA 含量, 激发波长为 488nm。

表 1 K₂Cr₂O₇ 染毒 24 小时对 HEL 细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

剂量 (μ mol/L)	细胞周期 (%)		
	G ₁ /G ₀	S	G ₂ +M
0.000	72.93 $\pm$ 2.10	14.77 $\pm$ 1.36	12.30 $\pm$ 3.36
0.625	47.40 $\pm$ 1.37**	26.63 $\pm$ 0.47**	25.97 $\pm$ 0.91**
1.250	30.87 $\pm$ 0.21**	41.30 $\pm$ 0.53**	27.83 $\pm$ 0.67**
2.500	47.73 $\pm$ 1.72**	36.93 $\pm$ 0.42**	15.33 $\pm$ 1.36**
5.000	55.20 $\pm$ 1.45**	44.40 $\pm$ 1.25**	0.40 $\pm$ 0.26**

** 与对照组相比 $P<0.01$ (χ^2 检验)。

S 期细胞占 14.77%, G₂+M 期细胞占 12.30%。染毒结束后, G₁/G₀ 期细胞明显减少, 多数细胞进入 S 期和 G₂+M 期。S 期细胞所占比例随 K₂Cr₂O₇ 剂量增加而升高 ($P<0.01$)。0.625 μ mol/L 及 1.250 μ mol/L K₂Cr₂O₇ 组的 G₂+M 期细胞所占比例明显高于对照组, 且都有统计学意义 ($P<0.01$), 但 5.000 μ mol/L K₂Cr₂O₇ 组, G₂+M 期细胞所占比例明显降低, 几乎

表 2 K₂Cr₂O₇ 染毒 24 小时对 HEL 细胞蛋白质及 DNA 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

剂量 (μ mol/L)	FL1 (Protein)		FL2 (DNA)	
	左峰	右峰	左峰	右峰
0.000	3.37 $\pm$ 0.83	96.63 $\pm$ 0.77	3.30 $\pm$ 0.19	96.70 $\pm$ 0.19
0.625	5.97 $\pm$ 0.24	94.03 $\pm$ 0.29	5.08 $\pm$ 0.53	94.92 $\pm$ 0.53
1.250	7.31 $\pm$ 0.78	92.69 $\pm$ 0.70	7.05 $\pm$ 0.98	92.95 $\pm$ 0.97
2.500	8.30 $\pm$ 0.73	91.70 $\pm$ 0.81	8.41 $\pm$ 0.34	91.59 $\pm$ 0.31
5.000	13.58 $\pm$ 3.29*	86.42 $\pm$ 3.19*	12.90 $\pm$ 4.09*	87.10 $\pm$ 4.05*

* 与对照组相比 $P<0.05$ (χ^2 检验)。

表 2 中, FL1 反映细胞内蛋白质含量的情况, FL1 左峰表示低蛋白质含量的细胞所占比例, FL1 右峰反映正常蛋白质含量的细胞所占比例; FL2 反映的是细胞内 DNA 含量的情况, FL2 左峰表示低 DNA 含量的细胞所占的比例, FL2 右峰表示正常 DNA 含量的细胞所占的比例。随着 K₂Cr₂O₇ 染毒剂量的加大, 低蛋白质及 DNA 含量的细胞所占的比例明显增加, 这可能是 K₂Cr₂O₇ 抑制了细胞内蛋白质及 DNA 的合成, 也可能是 K₂Cr₂O₇ 引起蛋白质及 DNA 的损伤, 蛋白质分解的亚基或残体及小分子量的 DNA 片断从细胞漏出所致 (并可能因细胞经乙醇固定, 膜通透性增加)。

1. 4 采用 Primer 软件中的 χ^2 检验程序对数据进行统计分析。

2 结果与分析

2. 1 K₂Cr₂O₇ 对 HEL 细胞周期的影响

表 1 显示, 正常细胞组 G₁/G₀ 期细胞占 72.93%,

近于零, 表明细胞基本被阻断在 S 期。

以上结果说明 K₂Cr₂O₇ 在 0.625 ~ 1.250 μ mol/L 组, 可刺激细胞进入 S 期及 G₂+M 期, 表现为促进细胞增殖; 当 K₂Cr₂O₇ 等于或大于 2.500 μ mol/L 时, 细胞则被阻断在 S 期, 因而 G₂+M 期细胞所占比例明显递减。

2. 2 K₂Cr₂O₇ 对 HEL 细胞蛋白质及 DNA 含量的影响

3 讨论

铬是动物和人体内必需的微量元素, 参与糖、蛋白质、核酸、脂肪等的代谢, 促进机体生长发育, 也促进细胞的增殖和分裂。但同时铬又是一种确定的工业致癌物, 所有的铬化合物在较高浓度都有毒性, 铬的不同生物学作用取决于它的浓度。本研究的结果提示, 从细胞周期分析来看, K₂Cr₂O₇ 浓度在 0 ~ 1.250 μ mol/L 范围内, 随剂量增加可明显地促进 HEL 细胞由 G₁ 期进入 S 期及 G₂+M 期, 即主要表现为促进增殖作用; 当 K₂Cr₂O₇ 在 2.500 μ mol/L 及以上时, 则可使多数细胞阻断于 S 期, 分裂相明显减少, 而呈现抑制细胞的增殖。同时, 随 K₂Cr₂O₇ (下转 365 页)

故对神经细胞已发生变性坏死的锰中毒患者应用 PAS—Na 治疗是否确实有效尚无定论。但 PAS—Na 至少可作为治疗慢性锰中毒的一种过渡性药物。

目前有关应用必需微量元素、酶学制剂、高压氧、光子血疗、能量合剂等辅助治疗慢性锰中毒的报道也日见增多,但临床应用前景还有待进一步探讨和验证。

参考文献

- [1] 陈骥光, 姜欣明, 林彬, 等. 锰接触—行为功能关系的研究 [J]. 工业卫生与职业病, 1995, 21 (4): 200~202.
- [2] Mergler D, Huel G, Bowler R, et al. Nervous system dysfunction among workers with long-term exposure to manganese [J]. Environ Res, 1994, 64 (2): 151~160.
- [3] Lucchini R, Selis L, Folli D, et al. Neurobehavioral effects of manganese in workers from a ferroalloy plant after temporary cessation of exposure [J]. Scand J work Environ Health, 1995, 21 (2): 143~149.
- [4] Siqueira M E, Moraes E C. Homovanillic acid (HVA) and manganese in urine of workers exposed in a ferromanganese alloy plant [J]. Med Lav, 1989, 80 (3): 224~228.
- [5] Buchet J P, Mesos C, Roels H, et al. Urinary excretion of homovanillic acid in workers exposed to manganese [J]. Int Arch Occup Environ Health, 1993, 65 (2): 131~133.
- [6] Smargiassi A, Mergler D, Bergamaschi E, et al. Peripheral markers of catecholamine metabolism among workers occupationally exposed to manganese [J]. Toxicol lett, 1995, 77 (1~3): 329~333.
- [7] Szeliga Cetnarska M. Electroneurographic and electro-myographic examinations of workers chronically exposed to manganese dioxide [J]. Med Pr, 1987, 38 (3): 214~219.
- [8] Petkova V, Karadzov K. The clinical picture and diagnosis of manganese-induced Parkinsonism [J]. Gig Tr Prof Zabol, 1991, 4: 16~18.
- [9] Sjogren B, Iregren A, Frech W, et al. Effects on the nervous system among welders to aluminum and manganese [J]. Occup Environ Med, 1996, 53 (1): 32~40.
- [10] 吴骏, 任建梅, 王素华, 等. 免疫功能检查在锰中毒普查中的作用初探 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 1996, 14 (1): 34~35.
- [11] Mutti A, Bergamaschi E, Alinovi R, et al. Serum prolactin in subjects

occupational exposed to manganese [J]. Ann Clin lab Sci, 1996, 26 (1): 10~17.

- [12] Alessio L, Apostoli P, Ferioli A, et al. Interference of manganese on neuroendocrinal system in exposed workers. Preliminary report [J]. Biol Trace Elem Res, 1989, 21: 249~253.
- [13] Misiewicz A, Radwan K, Januszewska B, et al. Urinary excretion of 3-methoxy-4-hydroxy-mandelic acid, 17-hydroxycorticosteroids and 17-ketosteroids in workers producing iron-manganese alloys [J]. Med Pr, 1991, 42 (3): 169~172.
- [14] Saitoh Y, Kimura S, Nezu A, et al. Hyperintense brain lesions on T₂-weighted MRI after parenteral nutrition [J]. No To Hattatsu, 1996, 28 (1): 39~43.
- [15] Katsuragi T, Takahashi T, Shibuya K, et al. A patient with Parkinsonism presenting hyperintensity in the globus on T₂-weighted MR images the correlation with manganese poisoning [J]. Rinsho Shinkeigaku, 1996, 36 (6): 780~782.
- [16] Spahr L, Butterworth RF, Fontaine S, et al. Increased blood manganese in cirrhotic patients: relationship to pallidal magnetic resonance signal hyperintensity and neurological symptoms [J]. Hepatology, 1996, 24 (5): 1116~1120.
- [17] Newland MC. Persistent effects of manganese on effortful responding and their relationship to manganese accumulation in the primate gland pallidus [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 1992, 113: 87~97.
- [18] 姜锋杰, 任永清, 侯光萍. 慢性锰中毒颅脑 CT 改变 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 1997, 15 (2): 112~113.
- [19] Lili DW, Mountz JM, Darji JT. Technetium-99m-HMPAO-brain-SPECT evaluation of neurotoxicity due to manganese toxicity [J]. J Nucl Med, 1994, 35 (5): 863~866.
- [20] Calne D B, Chu N S, Huang C C, et al. Manganism and idiopathic Parkinsonism: similarities and difference [J]. Neurology, 1994, 44 (9): 1583~1586.
- [21] Chu N S, in: Chang LW ed. Hand book of Neurotoxicology [M]. New York: Mekker Inc, 1995. 91~104.
- [22] 纪淑琴. 对氨基水杨酸钠治疗慢性锰中毒的临床评价及其作用的初步探讨 [J]. 广西职防, 1989, (1): 57.

(上接 342 页) 剂量增加, 细胞内蛋白质及 DNA 含量也逐渐减少。蛋白质及 DNA 是细胞结构的重要成分, 它们的降解及结构的变化, 势必会影响细胞的增殖及周期的变化。

低浓度 K₂Cr₂O₇ 对细胞增殖的刺激作用, 可能与 K₂Cr₂O₇ 抑制生长负调控因子 p53 的表达有关^[2]。另外, 低浓度的 K₂Cr₂O₇ 也可能以细胞必需微量元素的身份部分地刺激细胞生长、增殖。而高浓度 K₂Cr₂O₇ 则主要表现为细胞毒性。

众所周知, 增殖与分化异常是肿瘤细胞的重要生物学特征, 低剂量 K₂Cr₂O₇ 对细胞增殖的刺激作用, 有可能与六价铬多阶段致癌作用有关, 但尚需与其他指标的变化相联系, 全面进行分析考虑。

参考文献:

- [1] 杨景山, 医学细胞化学与细胞生物学技术 [M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1990. 381~410.
- [2] 贾光, 刘世杰, 吕有勇, 等. Cr (VI) 对人胚肺细胞 p53 及抑癌基因 p21 (WAF1) 表达的影响 [J]. 中华劳动卫生与职业病杂志, 1998, 16 (4): 201.