DOI:10.16016/j.1000-5404.1995.05.012

环境致癌物阻断NIH3T3*细胞间隙连接通讯与细胞内游离钙离子关系初探

张晓丽 高 宁 卓鉴波 邱志群 曹 波 陈东升 (第三军医大学预防医学系环境卫生学教研室)重庆,630038

提 要 选用环境致癌物芥子气(MG)、苯并(a)芘(B(a)p)、4-硝基喹啉-1-氧化物(4NQO)、二甲基亚硝胺(DEN)、环磷酰胺(CP)、雌二醇(Est)、四氯化碳(CCl_4),作用于该细胞12 h后,用划痕标记染料示踪技术(SLDT)检测其对该细胞间隙连接通讯(GJIC)功能的阻断作用,同时测定该细胞内$[Ca^{2+}]i$的变化,结果表明,环境致癌物阻断细胞GJIC与$[Ca^{2+}]i$变化密切相关。

关键词 划痕标记染料示踪技术;细胞间隙连接通讯;细胞内游离钙离子$[Ca^{2+}]i$;环境致癌物

中图法分类号 R730.2

近年来的资料表明多数肿瘤细胞无细胞间隙连接通讯(GJIC)功能[1],少数肿瘤细胞有该功能,但易受破坏,比正常细胞少而弱[2],GJIC功能与细胞生长调控及促癌变有关[3],细胞外游离Ca^{2+}浓度降低或细胞内游离Ca^{2+}浓度升高均可抑制GJIC[4]。我们通过检测这些环境致癌物对NIH3T3细胞GJIC功能的影响及细胞内$[Ca^{2+}]i$的变化,以了解环境致癌物能否阻断GJIC及其程度和对细胞内$[Ca^{2+}]i$的影响,为环境致癌物对GJIC的抑制与Ca^{2+}变化关系提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试剂

1.1.1 4NQO、B(a)P、DEN、TPA、LY为Sigma产品;MG为本校毒理室提供;CP为医用品;Est为Merck产品;CCl_4为天津市化学试剂一厂出品。

1.1.2 Quin-2/Am 美国分子生物探针公司产品

1.1.3 HBS NaCl 145,KCl 5,Na_2HPO_4 1,$CaCl_2$ 1,$MgSO_4$ 0.5,glucose 5,HEPES 10 mmol。

1.2 环境致癌物的给药条件[5,6,7](表1)

表1 某些环境致癌物的给药条件

Tab 1 Administration condition of some environmental carcinogens

Carcinogens	Dose μmol/L			Solvent
	Lower	Medium	Higher	
Bcasp	0.396	3.96	39.6	acetone
4NQO	2.62	26.2	262	DMSO
Est	3.67	36.7	367	DMSO
CCl4	6.5	65	650	DMSO
DEN	4.05	40.5	405	H_2O
CP	14.3	143.3	1433	H_2O
MG	0.053	0.53	5.3	ethanol
TPA	0.0049	0.049	0.49	ethanol
$BaCl_2$*	7.2	72	720	H_2O

*: Noncarcinogen $BaCl_2$ is as a negative control

* NIH3T3细胞来源于Swiss小鼠胚胎,美国国立卫生研究所建

1.3 细胞培养

本试验细胞由重庆医科大学病理生理学教研室提供,培养基为RPMI 1640,含15%小牛血清,青霉素100u/ml,链霉素100ug/ml,37℃CO_2恒温箱孵育,每周传代2~3次,成纤维型。

1.4 NIH3T3细胞GJIC功能检测—SLDT法[8]

将新鲜细胞接种在直径35mm的塑料小平皿内,生长48h后,加药作用12h达密度饱和为宜。倒出培养基,用PBS洗细胞2~3次,然后将细胞浸在含0.05% LY的PBS液约2ml内,用手术刀在细胞表面轻轻划痕5~6条,记时,染料标记3min,吸除荧光染液,用PBS洗3~4次以洗净游离的剩余染料,细胞浸在PBS液内,olympus落射荧光显微镜下观察、照相。

1.5 NIH3T3细胞游离Ca^{2+}的测定[9]

1.5.1 细胞准备 在含3ml培养液的25ml培养瓶内接种7.5×10^5个细胞,生长48h后,加各药(低、中、高)剂量,继续培养12h,收集细胞。

1.5.2 细胞标记 将收集的细胞用2 ml HBS制成细胞悬液,加400 μmol的Quin-2/Am贮备液50 μl,使成终浓度为10 μmol,37℃水浴振荡温孵90 min、离心、弃上清,用HBS洗去残存于细胞外的Quin-2/Am,重新悬浮在2ml HBS中,待测。

1.5.3 测定参数 仪器为MPF-4型荧光分光光度计,发射波长为500 nm,发射光栅10 nm,激发波长340 nm,激发光栅4 nm,电压20 mV,灵敏度3,走低速度16 mm/min

1.5.4 测定步骤 扫描最大激发波长为340 nm,发射波长为500 nm,确认标记成功,然后测定静息时的荧光强度F,尔后向细胞悬液中加入0.1% Triton X-100,1 mmol $CaCl_2$,使细胞内的Quin-2释放,并测定其与Ca^{2+}结合达饱和量时的荧光强度Fmax,随后加入0.5 mmol $MnCl_2$以淬灭样品荧光得到Fmin,则$[Ca^{2+}]i=115\ \text{nmol}\ \frac{(F-Fmin)}{(Fmax-F)}$。

1.6 数据处理

试验结果采用第三军医大学数学教研室编制的统计程序,其名为BASE,哈佛Hg绘图软件,AST-386微机上做单因素方差分析,秩和检验。($P<0.05$为有统计学意义,相差显著,$P<0.01$为相差非常显著)。

2 结果

2.1 所选环境致癌物对NIH3T3细胞GJIC功能的影响(表2)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 2 某些环境致癌物对 NIH3T3 细胞 GJIC 功能的影响

Tab 2 Effect of some carcinogens on GJIC in NIH3T3 cells

Carcinogens	Dose μmol/L			Control
	Lower	Medium	Higher	
B(a)P	+	−	−	++++
4NQO	−	−	−	++++
Est	+	−	−	++++
CCl_4	+	−	−	++++
DEN	−	−	−	++++
CP	++	+	−	++++
MG	++	++	−	+++
TPA	+	−	−	+++
$BaCl_2$	++++	++++	++++	++++

"−"The LY Fluorescence was limited to the primary loaded cells

"+——+++++"Transfer of LY fluorescence reached some rows of cells from the scraped line

"+"2 rows of cells, "++"3 rows of cells, "+++"4 rows of cells, "++++"5 rows of cells

2.1.1 二次重复试验，每次每组两个平皿，细胞划痕 10 次，结果一致。

2.1.2 NIH3T3 细胞有一定的 GJIC，LY 荧光染料传输范围达标记细胞附近 4～5 列细胞，从标记细胞到染料传输前沿，荧光程度逐渐减弱，表明荧光染料浓度由近一远逐渐稀释，未划痕区细胞无荧光标记或传输。

2.1.3 TPA 作为阳性对照，溶剂作为空白对照，与各药物组作平行观察，TPA 组、细胞 GJIC 传递阴性，空白组，该功能基本接近该细胞正常时的 GJIC 功能，非细胞毒剂量的所选致癌物对 GJIC 的阻断在各药均可观察到，只是程度不同。

2.1.4 已知不致癌化合物 $BaCl_2$ 对 NIH3T3 细胞 GJIC 无任何阻断作用。

2.2 所选环境致癌物对 NIH3T3 细胞内[Ca^{2+}]i 的影响(表 3)

表 3 某些环境致癌物对 NIH3T3 细胞内[Ca^{2+}]i 的影响

Tab 3 Effect of some carcinogens on[Ca^{2+}]i in NIH3T3 cells (nmol)

Carcinogens	Dose μmol/L			Control
	Lower	Medium	Higher	
B(a)P	143.59±32.55	309.28±35.33*	1348.15±421.31**	140.13±14.51
4NQO	340.81±140.33*	386.00±80.50*	1021.61±476.61**	176.20±29.72
Est	265.25±146.41	335.05±69.75*	450.29±141.70**	176.08±29.57
CCl_4	178.39±65.24	264.62±42.55*	423.73±63.61**	176.08±29.57
DEN	117.12±28.99*	199.51±39.38*	419.41±90.56**	96.84±46.47
CP	130.16±96.16	172.58±53.07	251.76±171.34	96.84±46.47
MG	211.03±46.52	265.31±75.21*	350.62±85.78**	164.51±42.88

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs control*; $n=5$, $\bar{x}\pm s$, *after administration 12h in NIH3T3 cells in vitro by these carcinogens, B(a)P, 4NQO, DEN, Est, CCl_4 caused significant enhancement in the different dose, respectively. The increase of* [Ca^{2+}]*i was significant, Est* ($P<0.05$) *and other* ($P<0.01$). *They have as a significant dose−effect relationship, but CP didn't cause the significant change on* [Ca^{2+}]*i in NIH3T3 cells*, ($P>0.05$).

3 讨论

GJ 是由嵌入细胞膜内的大分子蛋白构成，它由6个蛋白亚单位构成15～20Å的微孔，而相邻的细胞膜的此种蛋白对接便构成了可以沟通该细胞内质的通道，能通过 *cAMP*、Ca^{2-}、1.4.5—三磷酸肌醇以及其他参与细胞生长分化的调节性物质[10]，并允许通过 *Mr* 为1000～1600*u* 的小分子、离子等，使得细胞之间产生代谢协作，传递细胞生长发育信号。*GJIC* 受许多因素的影响如 H^-、[Ca^{2-}]*i*、*cAMP*、*CaM*、激素、毒素等多种因素的综合影响，在本文中着重讨论[Ca^{2-}]*i* 与 *GJIC* 的关系。

细胞外游离 Ca^{2-} 浓度很低或胞内 Ca^{2-} 浓度升高均可抑制 *GJIC*，细胞内 Ca^{2+} 增加，可能通过对连接电导的控制或者改变连接蛋白构象而产生门控效应从而抑制 *GJIC*。*DPT*[11] 抑制 *GJIC* 是通过对膜的组成及性质发挥作用而调节细胞内[Ca^{2+}]*i* 水平而抑制 *GJIC*。*Heptanol* 抑制胰腺腺泡细胞 *GJIC* 时并未改变细胞内[Ca^{2+}]*i* 水平。

本试验中 *B(a)P*、*DEN*、*4NQO*、*Est*、*MG*、CCl_4 在几乎完全阻断细胞 *GJIC* 的同时，使细胞内[Ca^{2+}]*i* 浓度显著增高，上述六种致癌物有可能通过改变细胞内[Ca^{2+}]*i* 水平而直接或间接地抑制细胞 *GJIC*，有些学者[12]认为 *MG* 引起细胞膜上 Ca^{2-}—*ATPase* 的烃化，阻碍了 Ca^{2-} 排入介质中，从而增加了细胞内[Ca^{2-}]*i* 而改变 *GJ* 蛋白的通透性也支持了上述假说。*CP* 阻断

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

GJIC 而细胞内$[Ca^{2+}]i$ 却无明显改变，可能有其它机理。

综上所述，环境致癌物影响细胞 *GJIC* 与细胞内$[Ca^{2+}]i$ 的关系不完全清楚，其机理有待进一步探讨。本试验为研究其机理提供了重要的理论依据，环境致癌物阻断细胞 *GJIC* 与细胞内$[Ca^{2+}]i$ 有着非常紧密的关系，其可能的机理：(1)通过改变细胞内$[Ca^{2+}]i$ 而抑制 *GJIC*；(2)也可能存在其它机理如自由基的产生、酸度改变、*cAMP*、*CaM* 调控等。

参考文献

1 Swift JG, Mukherjee TM, Rowl R. Intercellular junctions in hepatocellular carcinoma. J Submicrosc Cytol, 1983; 15: 799

2 林仲翔. 间隙连接通讯—生长调控—癌变三者之间的关系. 细胞生物学杂志, 1988; 10: 111

3 Yotti LP, Chang CC, Trosko JE. Elimination of a metabolic cooperation in chinese hamster cells by a tumor promotor. Science, 1979; 208: 1089

4 Spray DC, Bennett MVL. Physiolgy and pharmacology of gap junctions. Annu Rev Physiol, 1985; 47: 281

5 唐伟峰，陶炼晖，王翔朴. 四氯化碳对肝细胞内钙、钙调蛋白、钙泵的影响. 湖南医科大学学报, 1992; 17: 37

6 林仲翔，吕桂芝，江世文. 黄芪花提取物对 V_{79}细胞和 WB 肝细胞的生物学效应：1. 细胞连接通讯与增殖活性的相关性变化. 实验生物学报, 1991; 24: 307

7 Kihara K, Fukui I, Higashi Y. Inhibitory effect of testosterone on gap junctional intercellular communication of human transitional cell carcinoma cell lines. Cancer Res, 1990; 50: 1848

8 EL—Fouly MH, Trosko JE, Chang CC. Scrape—Loading and dye transfer: rapid and simple technique to study gap junctional intercellular communication. Exp Cell Res, 1987; 168: 422

9 Veronica P, Weiel JE, Somers SD. Effects of bacterial lipopolysaccharide on the hydrolysis of phosphatidylinositol—4, 5— bisphosphate in murine peritoneal macrophages. The Journal of Immunology, 1987; 139: 526

10 Lawrence TS, Beers WH, Gilula NB. Transmission of hormonal stimulation by cell to cell communication. Nature, 1978; 272: 501

11 Davidson JS, Baumgarten I, Harley EH. Use of a new citrulline incorporation assay to investigate inhibition of intercellular communication by 1,1,1—trichloro—2, 2—bis—(P—chlorophenyl)ethane in human fibroblasts. Cancer Res, 1985; 45: 515

12 魏相德. 芥子气中毒机制研究进展. 国外医学：军事医学分册, 1992; 9: 7

(收稿：1995-02-22；修回：1995-10-10)

Prelminary study of the relationship of the blockade on gap junctional interceular communication by environmenta carcinogens with cytosollic ree calcium ion ocncentration in NIH3T3 cells in vitro

Zhang Xiaoli, Gao Ning, Zhuo Jianbo, Qiu Zhiqun, Chao Bo, Cheng Dongsheng (Department of Environmental Hygiene, Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

Abstract Seven environmental carcinogens including mustard gas, benzo(a)oyyrene, 4-nitroquinoline-1-oxide, nitrosodimethylamine, cyclophosphamide, carbon tetrachloride and estradiol were sected for the study. 12 hours after the administration of the carcinogens, to NIH3T3 cells in vitro, scrape-loading and dye transfer was used to observe the gap junctional intercellular communication and cytosoic free calcium ion concentration (Ca^{2+}) in NIH3T3 cells was determined. It was found that all the 7 environmental carcinogens blocked the gap junctional intercelluar communication which was closely related to the Ca^{2+} level of NIH3T3 cells.

Key words scrape-loading and dye transfer (SLDT); gap junction; intercellular communication; cytosolic calcium ion; carcinogen/environmental

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net