

电气石处理水对 Caco-2 细胞生长和碱性磷酸酶活性的影响

夏枚生* 胡彩虹 张红梅 熊莉 许梓荣

(浙江大学动物科学学院; 动物分子营养学教育部重点实验室, 杭州 310029)

摘要 水是由若干水分子通过氢键结合形成的水分子团簇结构, 水分子团簇的改变能产生多种生物学效应。研究了电气石对液态水团簇的影响, 并以 Caco-2 细胞培养模型, 探讨了电气石处理 DMEM 培养液对细胞生长和碱性磷酸酶活性的影响。研究结果显示: 电气石使蒸馏水 ^{17}O 核磁共振(^{17}O nuclear magnetic resonance, ^{17}O NMR)半高幅宽变窄, 降低了水分子缔合度; 电气石处理的 DMEM 培养液培养 Caco-2 细胞促进了细胞生长, 提高了细胞碱性磷酸酶活性。结果表明电气石可降低水分子缔合度, 促进细胞生长和分化。

关键词 电气石; 水团簇; Caco-2; 细胞生长; 碱性磷酸酶

近年来, 水分子簇结构与功能研究已成为当今科研前沿的热点之一。水不是以 H_2O 单分子形式存在, 而是由若干水分子通过氢键结合形成的水分子团簇结构(water cluster), 这些团簇的形成对于水的性质及其生物学效应具有重要的影响^[1,2]。在各种生化反应中, 水以分子簇的形式存在并参与反应, 水的微观结构和运动状态影响了生物大分子的物化性质和生物活性, 水分子团簇的改变能产生多种生物学效应^[3,4]。

电气石是一种以含硼为特征的铝、钠、铁、钙、镁的环状硅酸盐晶体矿物, 19 世纪发现其具有压电和热释电效应。1989 年, Nakamura 等^[5]首次发现电气石存在永久性自发电极, 由此兴起了电气石在环境、健康、保健领域的研究热潮^[6]。Matsuoka^[7]报道, 电气石可提高水的界面活性功能, 使水的渗透和溶解能力增强。金惠铭等^[8]采用放置电气石微球的 Millicell 底膜培养皿与人血管内皮细胞 ECV304 联合培养的方法, 在电气石微球不与细胞直接接触的情况下, 发现电气石可加强 DNA 合成, 促进 ECV304 细胞增殖, 但是对其作用机制至今未见报道。

Caco-2 细胞(the human colon carcinoma cell line)是体外培养的肠上皮单层细胞株, 来源于人结肠腺癌细胞, 由于 Caco-2 细胞在特定培养条件下可自发进行上皮样分化并可形成紧密联结, 其形态学、标志酶的功能表达及渗透特征与小肠上皮细胞类似,

被广泛应用于细菌的肠道黏附、小肠上皮细胞药物转运和代谢等的研究^[9]。本研究采用 Caco-2 细胞培养模型, 探讨电气石处理水对细胞生长和碱性磷酸酶活性的影响, 为水分子团簇改变的生物学效应研究以及电气石在细胞生物学和健康领域的应用提供实验资料。

1 材料与方法

1.1 材料

电气石为内蒙古产的黑色铁镁电气石, 含量在 85% 以上。化学分析结果如下(%): SiO_2 46.03, Al_2O_3 16.71, B_2O_3 10.24, FeO 0.92, Fe_2O_3 18.24, TiO_2 0.45, Na_2O 1.12, K_2O 0.06, MgO 2.28, CaO 3.95。

Caco-2 细胞购自中国科学院生物化学与细胞生物学研究所。

DMEM 培养液(含 4500 mg/L 葡萄糖, 584 mg/L 谷氨酰胺, 110 mg/L 丙酮酸钠, 3.7 g/L 碳酸氢钠, 100 U/ml 青霉素、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 链霉素)、胎牛血清购自 Gibco BRL 公司, 二甲基亚砜(DMSO)、MTT 购自 Sigma 公司, 培养瓶、培养板购自 Corning 公司

1.2 ^{17}O 核磁共振(^{17}O nuclear magnetic resonance, ^{17}O NMR)研究电气石对液态水团簇的影响

1.2.1 电气石用量对蒸馏水 ^{17}O NMR 半高幅宽的影

收稿日期: 2004-10-19 接受日期: 2004-12-28

* 通讯作者。Tel: 0571-86985607, E-mail: msxia@zju.edu.cn

响 取 100 ml 蒸馏水，分别加入 0.5、1、2、5、10 g 电气石，10 min 后过滤，取上清液测定 ^{17}O NMR 半高幅宽。 ^{17}O NMR 半高幅宽于 Bruker DMX 500 型核磁共振波谱仪上测得， ^{17}O 核的共振频率为 67.786 MHz。

1.2.2 处理时间对蒸馏水 ^{17}O NMR 半高幅宽的影响 取 100 ml 蒸馏水，加入 2 g 电气石，于 5、10、20、60、120、720 min 取样过滤，取上清液测定 ^{17}O NMR 半高幅宽。

1.2.3 蒸馏水经电气石处理后放置不同时间 ^{17}O NMR 半高幅宽的改变 取 100 ml 蒸馏水，加入 2 g 电气石，10 min 后过滤，上清液放置不同时间后测定其 ^{17}O NMR 半高幅宽。

1.3 不同浓度电气石处理 DMEM 培养液对细胞生长的影响

取 DMEM 培养液，分别加入 0.5%、1%、2% 电气石，4 °C、30 min 钟后 Millipore 0.22 μm 滤膜无菌过滤，取上清液。

取对数生长期 Caco-2 细胞，消化后悬浮在一定量的 DMEM 培养液，计数后调整细胞浓度为 1×10^5 个/ml，接种到 96 孔细胞培养板中，每孔 200 μl 。24 h 后吸去培养液，换成不同浓度电气石处理的 DMEM 培养液和 10% 胎牛血清，37 °C、5% CO_2 培养箱继续培养 14 天，期间每 3 天更换 1 次电气石处理的 DMEM 培养液和 10% 胎牛血清。然后在不同的培养时期，采用 MTT 比色法测定细胞活力^[10]，用 MK3 型自动酶标仪(荷兰)在 $\lambda=570$ nm 处测定吸光度。

1.4 细胞碱性磷酸酶测定

细胞碱性磷酸酶活性的测定参照 He 等^[11]的方法。将培育在 96 孔培养板中的细胞置于冰中，细胞用冰的 HBSS 洗涤两次，然后用细胞刮刀轻轻刮取细胞于 0.5 mol/L Tris-HCl 缓冲液中(pH 7.0)。细胞经超声波粉碎(JY92-2D 超声波细胞粉碎机，宁波新芝生物科技股份有限公司生产)后，用于碱性磷酸酶活性的测定。以磷酸对硝基苯酯(Sigma 公司，N4645)为酶反应底物。酶活单位定义为每毫克细胞碎片蛋白质每分钟从磷酸对硝基苯酯中释放对硝基酚的微摩尔数。对硝基酚释放量的测定采用对硝基酚标准曲线对比法。细胞碎片中蛋白质含量的测定按 Lowry 等^[12]的方法进行。

1.5 统计学处理

各处理间平均值的比较采用方差分析中的最小

显著极差法(LSD)，结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。计算程序采用 SAS(6.12)中的一般线性模式(general linear models procedure)进行^[13]。

2 结果

2.1 电气石对蒸馏水 ^{17}O NMR 半高幅宽的影响

由图 1 和图 2 可见，不同浓度电气石处理蒸馏水均使 ^{17}O NMR 半高幅宽变窄。电气石浓度在 0%~2% 的范围内，随着电气石浓度的增加， ^{17}O NMR 半高幅宽急剧变窄；电气石浓度在 2%~10% 的范围内，随着电气石浓度的增加， ^{17}O NMR 半高幅宽不变。由图 3 可见，处理时间在 0~10 min 的范围内，随着时间的增加， ^{17}O NMR 半高幅宽急剧变窄；处理时间在 10~720 min 的范围内，随着时间的增加， ^{17}O NMR 半高幅宽不变，表明处理 10 min 反应已经达到平衡。

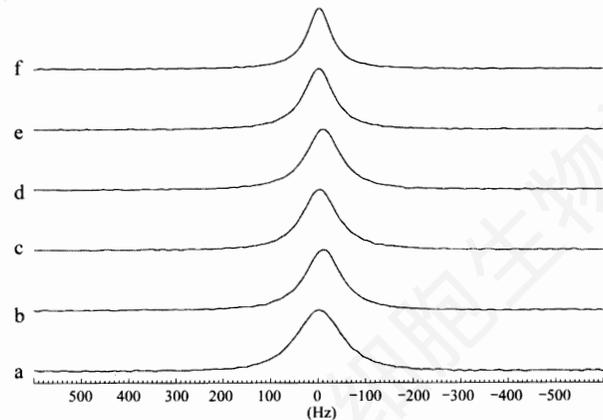


图 1 不同浓度电气石处理的蒸馏水 ^{17}O NMR 图谱

图中 a、b、c、d、e、f 为 100 ml 蒸馏水中分别加入 0、0.5、1、2、5、10 g 电气石，处理时间 10 min。

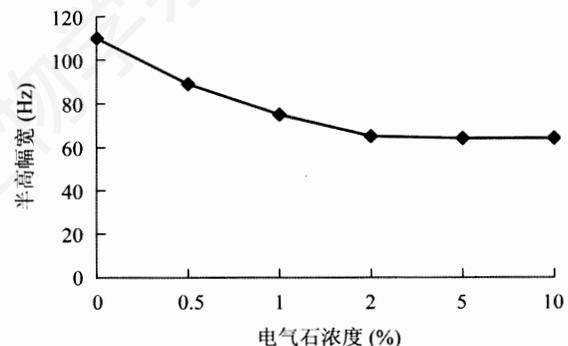


图 2 不同浓度电气石对蒸馏水 ^{17}O NMR 半高幅宽的影响
100 ml 蒸馏水中分别加入 0、0.5、1、2、5、10 g 电气石，处理时间 10 min。

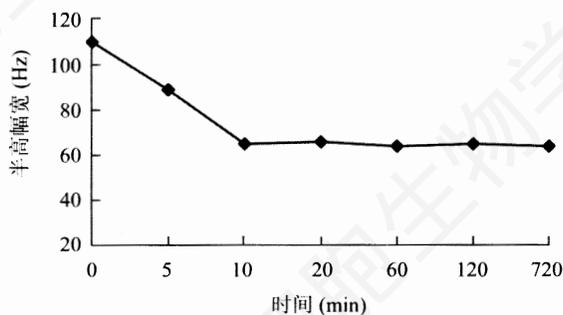


图3 处理时间对蒸馏水 ^{17}O NMR半高幅宽的影响

100 ml 蒸馏水中加入 2 g 电气石, 处理时间 0、5、10、20、60、120、720 min。

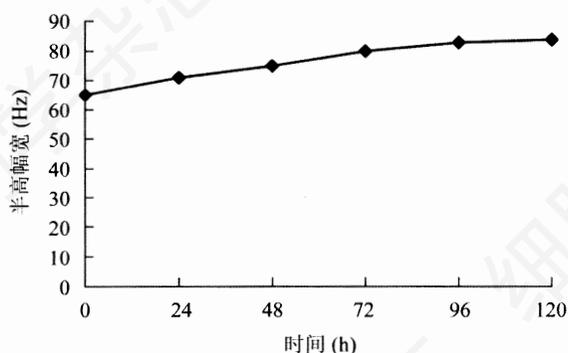


图4 蒸馏水经电气石处理后放置不同时间 ^{17}O NMR半高幅宽的改变

100 ml 蒸馏水中加入 2 g 电气石, 10 min 后过滤, 上清液放置 24、48、72、96、120 h。

为了了解电气石对水处理后引起 ^{17}O NMR半高幅宽变化的时效性, 我们测定了蒸馏水经电气石处理后放置不同时间 ^{17}O NMR半高幅宽的改变。结果发现(图4), 蒸馏水经电气石处理 10 min 后放置 120 h 内随着放置时间的延长 ^{17}O NMR半高幅宽略有增加, 但是都在 85 Hz 以下, 大大低于未用电气石处理的原水(110 Hz)。

2.2 不同浓度电气石处理 DMEM 培养液对细胞生长的影响

图5显示, Caco-2 细胞在 DMEM+10% 胎牛血清的培养液中培养 24 h 后, 换成不同浓度电气石处理的 DMEM +10% 胎牛血清的培养液, 对 Caco-2 细胞生长及增殖能力的影响有差异。与 DMEM 培养液未用电气石处理的培养孔细胞相比, 电气石处理浓度为 1.0% 和 2.0%, 在第 7、10、13 天均显著促进了细胞生长($P<0.05$); 电气石处理浓度为 0.5%, 在第 10、13 天均显著促进了细胞生长($P<0.05$)。

2.3 不同浓度电气石处理 DMEM 培养液对细胞

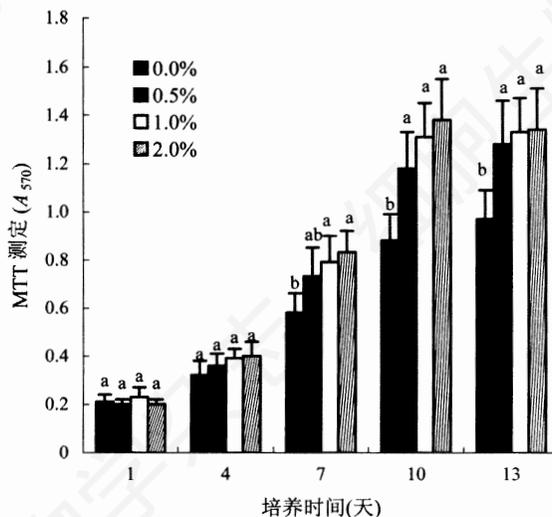


图5 不同浓度电气石处理 DMEM 培养液对细胞生长的影响

柱状图同一组中肩标小写字母不同者差异显著($P<0.05$)。

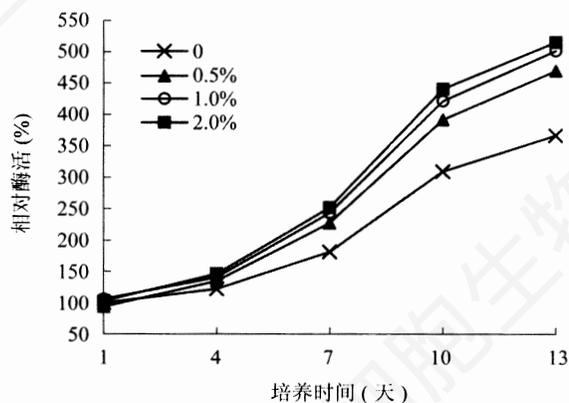


图6 不同浓度电气石处理 DMEM 培养液对细胞碱性磷酸酶的影响

碱性磷酸酶的影响

由图6可见, 不论 DMEM 培养液是否用电气石处理, 细胞碱性磷酸酶活性均随培养时间的增加而提高。电气石提高了碱性磷酸酶活性, 随着电气石作用时间的增长, 碱性磷酸酶活性增加, 有一定累积效应。与 DMEM 培养液未用电气石处理的培养孔细胞相比, 电气石处理浓度为 1.0% 和 2.0% 培养孔细胞的碱性磷酸酶活性在 7、10、13 天时提高显著($P<0.05$); 电气石处理浓度为 0.5%, 在第 10、13 天均显著提高了细胞碱性磷酸酶活性($P<0.05$)。

3 讨论

核磁共振是研究水缔合的有效手段, 利用 ^{17}O NMR半高幅宽可以反映出液态水团簇结构的平均相

对大小, 谱线越宽, 团簇越大; 谱线越窄, 团簇越小^[14]。本实验发现电气石使蒸馏水¹⁷O NMR 半高幅宽变窄, 说明电气石可对水团簇产生影响, 降低了水分子缔合度。冀志江等^[15]和金宗哲等^[16]利用扫描电镜、电子探针等手段直接观测到电气石电极性的存在, 其颗粒类似于自发极化的电偶极子。电气石电极产生的电场是其电极性的重要反映, 在电气石表面厚度十几微米范围内存在 $10^7 \sim 10^4$ V/m的高场强^[15,17]。电气石电场会对水的结构和活性产生影响。在电场作用下, 水分子发生电解, 形成 H^+ 和 OH^- , 最终形成活性分子 H_3O^+ 和 H_2O_2 , 使水分子具有极强的界面活性, 水的渗透和溶解能力增强^[7,8]。已有研究表明^[18], 电场对水的结构会产生一定的影响。因为水是一种极性分子, 分子间氢键形成的主要原因就是水分子间存在的电偶极相互作用^[2], 外加电场可以改变水分子簇的动态氢键网络体系, 破坏水分子间氢键, 从而达到使水分子簇变小的目的^[18]。另一方面, 电气石能发射波长 $4 \sim 14 \mu m$, 发射率在0.92以上的远红外线; 电气石发射的远红外线与水中氢键共振, 可将大分子团的氢键切断, 使水分子团变小^[19]。

研究表明, 改变水分子簇的大小可以使水在生物体中的作用发生改变, 减少水分子簇中的分子个数, 可增加水的生物膜透过率, 增强生物体的新陈代谢功能, 达到改善生物体机能的效果; 小分子团簇的水进入细胞内, 可促进细胞的新陈代谢, 增强细胞活力^[3,4]。梁金生等^[20]报道, 稀土复合磷酸盐无机抗菌材料制备的抗菌陶瓷制品可使自来水的¹⁷O NMR 半高幅宽由115.36 Hz降低到99.15 Hz。用试验陶瓷口杯和对照陶瓷口杯中自来水分别培育蚕豆、花生种子, 试验蚕豆和花生种子4天发芽率可分别提高12.5%和7.5%。Pouliquen等^[21]报道, 与蛋白质分子结合的水分子簇大小发生变化时, 血清白蛋白和丙种球蛋白的物化性质也随之发生变化。

碱性磷酸酶是小肠消化活动中所特有的酶, 该酶聚集于细胞表面, 主要集中在肠上皮细胞(IEC)的纹状缘部分, 参与细胞内消化及其上皮细胞脱落到

肠腔内的细胞外消化过程, IEC碱性磷酸酶含量与IEC的分化程度有关; 细胞分化程度越高, IEC的消化、吸收和防御能力越强^[11]。本实验表明, 电气石处理的DMEM培养液培养Caco-2细胞促进了细胞生长, 提高了细胞碱性磷酸酶活性, 肠上皮细胞分化能力增强, 从而可使机体消化、吸收和防御功能提高, 显示了电气石在肠道保健方面的应用前景。金惠铭等^[9]采用放置电气石微球的Millicell底膜培养皿与人血管内皮细胞ECV304联合培养的方法, 从血管内皮细胞形态、细胞覆盖率、细胞数目及核增殖抗原(PCNA)表达三方面表明电气石微球对血管内皮细胞具有一定的保护作用, 它能促进ECV304细胞增殖。由于金惠铭等的实验是电气石微球不与培养细胞直接接触, 因此电气石微球对细胞增殖的促进作用必然是通过微孔滤膜由培养基传递。本实验得出的电气石可对水分子团簇产生影响, 部分阐明了电气石对细胞作用的机理, 但是否还存在其他的作用机制值得进一步深入研究。

参考文献(References)

- [1] Liu K *et al. Science*, 1996, **271**: 929
- [2] Gregory JK *et al. Science*, 1997, **275**: 814
- [3] Lo SY *et al. Med Hypotheses*, 2000, **54**: 948
- [4] 张建平等. *化学通报*, 2004, **67**: 278
- [5] Nakamura T *et al. J Ferroelectrics*, 1994, **155**: 207
- [6] 张志湘等. *中国非金属矿工业导刊*, 2003, **31**: 47
- [7] Matsuoka T. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 1991, **38**: 422
- [8] 金惠铭等. *中国微循环*, 2003, **7**: 309
- [9] 杨海涛等. *药学学报*, 2000, **35**: 797
- [10] 郝新保等. *第四军医大学学报*, 1997, **18**: 390
- [11] He Y *et al. J Nutr*, 1993, **123**: 1017
- [12] Lowry OH *et al. J Biol Chem*, 1951, **193**: 265
- [13] SAS Institute Inc. SAS/STAT User's Guide, Version 6. SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, 1989
- [14] 李福志等. *环境科学学报*, 2004, **24**: 6
- [15] 冀志江等. *人工晶体学报*, 2002, **31**: 503
- [16] Jin ZZ *et al. Chinese Physics*, 2003, **12**: 222
- [17] Yamaguchi S. *Applied Physics A: Solids and Surfaces*, 1983, **A31**: 183
- [18] Shevkunov SV *et al. J Mol Stru (Theochem)*, 2002, **593**: 19
- [19] Torii K *et al. Far-infrared Radiation Material*, United States Patent, Patent number 6,004,588, December 21, 1999
- [20] 梁金生等. *中国稀土学报*, 2003, **21**: 214
- [21] Pouliquen D *et al. Biochimie*, 2001, **83**: 891

Effects of Tourmaline-treated-water on the Growth and the Activity of Alkaline Phosphatase of Caco-2 Cell

Mei-Sheng Xia*, Cai-Hong Hu, Hong-Mei Zhang, Li Xiong, Zi-Rong Xu

(College of Animal Science, Zhejiang University; The Key Laboratory of Molecular Animal Nutrition, Ministry of Education, Hangzhou 310029, China)

Abstract Water molecules form an infinite hydrogen-bonded network with localized and structured clustering. The structural change of water clusters may play an important role in physiological processes of life. In this study, structural change of water clusters of distilled water induced by polar crystal tourmaline was observed and caco-2 cells were used to investigate the effects of tourmaline-treated-Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) on the cell growth and the activity of alkaline phosphatase. The results showed that tourmaline reduced ^{17}O -nuclear magnetic resonance (^{17}O NMR) full width at halfmaximum intensity (FWHM) for distilled water and the volume of clusters of water molecules. The growth of cell was promoted and the activity of alkaline phosphatase was improved when tourmaline-treated-DMEM was used to incubate the cell. The results indicated the structural change of water clusters induced by tourmaline accounted much for promoted growth and differentiation of the cell observed in this study.

Key words tourmaline; water clusters; Caco-2 cell; cell growth; alkaline phosphatase

Received: October 19, 2004 Accepted: December 28, 2004

*Corresponding author. Tel: 86-571-86985607, E-mail: msxia@zju.edu.cn

细胞生物学杂志

双月刊 1979年创刊

第27卷 第3期 2005年6月

Chinese Journal of Cell Biology

Bimonthly Established in 1979

Vol. 27 No. 3 June 2005

主 办 中国科学院上海生命科学研究院
生物化学与细胞生物学研究所
中国细胞生物学学会

协 办 南方医科大学珠江医院肿瘤中心
赛达生物技术研究中心

编 辑 《细胞生物学杂志》编辑委员会
岳阳路319号31B楼405室, 上海200031
电 话: 021-54920950
传 真: 021-54922810
电子信箱: cjcb@sibs.ac.cn
网 址: //www.cjcb.org

主 编 郭礼和

出 版 上海科学技术出版社
上海瑞金二路450号 邮政编码: 200020

印 刷 上海图字印刷有限公司

发 行 上海市报刊发行局

订 阅 全国各地邮局

广告代理 上海高精广告有限公司
广告经营许可证: 沪工商广字3101031000061

Sponsored by Institute of Biochemistry and Cell Biology
Shanghai Institutes for Biological Sciences,
Chinese Academy of Sciences
Chinese Society for Cell Biology

Joint-sponsored by Oncology Center, Zhujiang Hospital,
The Southern Medical University
Celstar Center of Bio-Tech Research

Edited by Editorial Board of Chinese Journal of Cell Biology
Room 405, Building 31B, 319 Yue-Yang Road,
Shanghai 200031, China
Tel: 86-21-54920950 Fax: 86-21-54922810
E-mail: cjcb@sibs.ac.cn Http: //www.cjcb.org

Editor-in-Chief Li-He Guo

Published by Shanghai Scientific and Technical Publishers
450 Rui-Jin Er Road, Shanghai 200020, China

Distributed by Shanghai Bureau for Distribution of
Newspapers and Journals

Subscribed by Domestic Local Post Offices