

• 研究论文 •

纳米 Eu_2O_3 和 Eu^{3+} 抑制人肝癌细胞 HepG2 增殖的作用

刘洁 魏春英* 杨频*

(山西大学化学生物学与分子工程教育部重点实验室 分子科学研究所 太原 030006)

摘要 稀土纳米氧化物和稀土化合物的生物效应已引起人们的广泛关注. 利用 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT), 流式细胞术法和激光共聚焦显微镜初步探讨了纳米 Eu_2O_3 和 Eu^{3+} 对体外培养的人肝癌细胞 HepG2 生长的影响. 结果发现, 较低浓度的纳米 Eu_2O_3 对细胞生长没有明显影响, 浓度达到 $600 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 作用癌细胞仅 24 h, 细胞就停止分裂, 表现为细胞被阻滞在 S 期, 大量细胞坏死. 利用激光共聚焦显微镜观察到纳米 Eu_2O_3 能进入活的 HepG2 细胞中. 而 Eu^{3+} 则在较低含量, 即 $\leq 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时能较弱地抑制癌细胞的生长, 细胞被阻滞在 G_0/G_1 期, 并诱导细胞发生凋亡.

关键词 纳米 Eu_2O_3 ; Eu^{3+} ; HepG2 细胞; 凋亡; 稀土

Inhibitory Effect of Both Nano Eu_2O_3 and Eu^{3+} on Proliferation of HepG2 Cells

Liu, Jie Wei, Chunying* Yang, Pin*

(Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering of Ministry of Education, Institute of Molecular Science, Shanxi University, Taiyuan 030006)

Abstract The biological effects of rare earth elements and rare earth nanoparticles have aroused an extensive interest during the past few years. *In vitro* culture conditions, we reported the impact of nano Eu_2O_3 and Eu^{3+} on the HepG2 cells using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), flow cytometry and laser scanning confocal microscopy. The results suggested that the nano Eu_2O_3 at low concentrations does not make an obvious impact on cell growth whereas it can suspend cell division, and the percentage of cells in G_2/M phase increase gradually and lead to necrosis at higher concentrations ($\geq 600 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). In addition, nano Eu_2O_3 can be internalized by live HepG2 cells. Eu^{3+} at low concentrations ($\leq 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) can slightly inhibit the growth of HepG2 cells by arresting the ratio of G_0/G_1 phase cells and triggering apoptosis.

Keywords nano Eu_2O_3 ; Eu^{3+} ; HepG2 cells; apoptosis; rare earth

我国是举世公认的稀土资源大国, 其储量和产量均居世界首位. 除了在传统农业、工业、国防、高技术领域有广泛的应用, 稀土元素在生物医学领域的应用也一直是研究的热点^[1,2]. 例如将碳酸镧用于肾功能衰竭病人, 发现可有效降低患者血中磷酸盐水平, 而且没有明显的毒副作用^[3]; Yb 可广泛用于肝、肺、心和骨等组织

的癌诊断和治疗^[4]. 尽管稀土具有潜在的生物医学应用价值, 但其毒理和生物安全性仍需要被认真的探讨.

独特的微结构和奇异性能, 使得纳米材料引起了科学界的极大关注, 其研究领域涉及物理、化学、生物、医学等诸多学科^[5,6]. 稀土纳米氧化物作为纳米粒子的一种, 也广泛应用于生活、生产的各个领域^[7]; 但纳米粉

* E-mail: weichunying@sxu.edu.cn; yangpin@sxu.edu.cn

Received March 2, 2011; revised September 27, 2011; accepted November 1, 2011.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 21041008, 21171108), Shanxi Provincial Fund for Natural Sciences (No. 2009011012-2) and the Research Project Supported by Shanxi Scholarship Council of China (No. 2011-016).

国家自然科学基金(Nos. 21041008, 21171108)、山西省自然科学基金(No. 2009011012-2)和山西省回国留学人员基金(2011-016)资助项目.

体在生产和制造过程中潜在的职业暴露、医学应用和周围大气污染造成的直接暴露对人类健康安全的影响不容忽视。国内陈勇等^[8]研究了纳米 Nd_2O_3 可引起 NCI-H460 肺癌细胞大量空泡化并诱导细胞死亡; Park 等^[9]发现纳米 Ce_2O_3 则可以诱导 BEAS-2B 人肺上皮细胞发生凋亡。因此, 我们非常有必要在关注纳米材料广泛应用前景的同时, 考虑其负面的生物效应, 以期对纳米技术的发展和运用起到很好的指导作用。有关纳米 Eu_2O_3 材料的研究已有报道, 纳米 Eu_2O_3 是一种可发红色荧光的材料^[10]。我们前期的工作研究了纳米 Eu_2O_3 , Eu^{3+} 对 HL-7702 和纳米 Eu_2O_3 对 HEK-293T 细胞产生的生物效应^[11,12]。那么纳米 Eu_2O_3 和 Eu^{3+} 对肿瘤细胞的影响又如何? 因此本工作选取 HepG2 肝癌细胞为模型, 初步研究了纳米 Eu_2O_3 和 Eu^{3+} 对人肝癌细胞生长的影响, 探讨它们对正常细胞和肿瘤细胞影响的差异。

1 实验部分

1.1 实验仪器和材料及主要试剂

水套式二氧化碳细胞培养箱(上海力申科学仪器有限公司); FQ-100DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); 全自动酶标仪(Bio-Rad Model 550); 流式细胞仪(BeckMan Coulter CYTOMICS FC-500); 激光共聚焦显微镜(Olympus luoview FV1000)。HepG2 肝癌细胞(北京大学医学部药学院提供); 粒度为 60 nm 的纳米 Eu_2O_3 (纯度 99.91%, 北京纳辰科技发展有限公司); 纯度为 99.9% 的 Eu_2O_3 (国药集团化学试剂)。DMEM 细胞培养基(赛默飞世尔生物化学制品北京有限公司); 胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司); 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT) (Sigma); DMSO (Amresco); Trypsin (华美生物工程公司); EDTA (Solarbio); 碘化丙啶(PI) (Sigma); RNase A (Sigma); 4%多聚甲醛(Solarbio); Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(凯基生物)。

EuCl_3 溶液的制备: 将纯度为 99.9% 的 Eu_2O_3 加入浓盐酸加热溶解后, 使盐酸挥发近干, 再加入超纯水溶解定容, 配成 $70 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 储备液, 在超净台中过滤后 4°C 保存备用。

纳米 Eu_2O_3 溶液的制备: 称取一定量粒度为 60 nm 的 Eu_2O_3 , 高温灭菌后于超净台中加入 DMEM 细胞培养基, 配成终浓度为 $3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的纳米 Eu_2O_3 溶液, 4°C 保存备用。使用前需超声处理 1 h, 获得稳定分散悬浮的纳米 Eu_2O_3 水溶液。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基培养细胞, 并

置于 37°C , 5% CO_2 饱和湿度培养箱中, 细胞呈单层贴壁生长。用倒置显微镜观察细胞生长情况和贴壁形态, 并取指数生长期细胞用于实验。

1.2.2 细胞活力测试

将细胞接种于 96 孔培养板(3×10^3 个/孔)中, 待贴壁后分别加入不同剂量的纳米 Eu_2O_3 颗粒溶液或 EuCl_3 溶液 $200 \mu\text{L}$, 对照组加等体积的 DMEM 培养基, 每组 6 复孔。培养一定时间后, 每孔加 MTT 溶液($5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) $20 \mu\text{L}$, 培养箱中孵育 4 h 后终止培养, 吸去上清, 每孔加入 $150 \mu\text{L}$ 的 DMSO, 振荡 10 min 后用酶标仪(波长 490 nm)测定吸光度值, 计算细胞的生长存活率。细胞存活率按下列公式计算: 细胞存活率% = 实验组 A_{490} /对照组 $A_{490} \times 100\%$ 。用只加培养液而不加细胞的孔调零。

1.2.3 细胞周期的测定

将 2.5×10^5 个细胞接种于 60 mm 培养盘中, 贴壁后分别加入配制好的纳米 Eu_2O_3 颗粒溶液或 EuCl_3 溶液, 对照组加含 10%血清的 DMEM 培养基, 设 3 复孔。培养一定时间后, 消化收集细胞, 用 4°C 的 PBS 洗两次, 再加入 -20°C , 75%的乙醇固定细胞并置于 -20°C 保存。测试前用 PBS 洗细胞两次后加入 $500 \mu\text{L}$ 含 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ PI, $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ RNase A 的 PBS, 室温避光孵育 30 min。以标准程序用流式细胞仪检测。

1.2.4 细胞凋亡的检测

将 2.5×10^5 个细胞接种于 60 mm 培养盘中, 贴壁后加入配制好的纳米 Eu_2O_3 颗粒溶液或 EuCl_3 溶液, 对照组加含 10%血清的 DMEM 培养基, 设 3 复孔。培养一定时间后, 消化并收集细胞, 用 4°C 的 PBS 洗两次, 再加入 Binding Buffer $500 \mu\text{L}$ 悬浮细胞后用 Annexin V/PI 凋亡试剂进行双染; 室温、避光反应 5~15 min 后, 立即用流式细胞仪检测。

1.2.5 纳米 Eu_2O_3 跨细胞膜研究

将 1.5×10^5 个细胞接种于放有盖玻片(已灭菌)的 35 mm 培养盘中, 待细胞贴壁后加入 $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的纳米 Eu_2O_3 培养 7 h 后, 将培养盘移至超净台弃去培养液。用 PBS 洗一次后加入 4%多聚甲醛固定细胞 8 min, 弃去固定液再用 PBS 洗三次, 待盖玻片晾干后用镊子将其置于滴有甘油的载玻片上, 用激光共聚焦显微镜观察。

2 结果与讨论

2.1 纳米 Eu_2O_3 与 Eu^{3+} 对 HepG2 细胞活力的影响

将浓度为 10, 50, 200, 400, 600 和 $800 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的纳米 Eu_2O_3 与 HepG2 细胞孵育 72 h 后, 用 MTT 法测试细胞活力, 结果表明纳米 Eu_2O_3 对细胞生长呈现出抑制作用(图 1A)。当药物浓度为 $400 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 细胞存活率

为 86.9%, 抑制作用不明显; 而增至 600 和 800 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 存活率明显下降, 分别为 35.6% 和 10.1%。以 600 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的纳米 Eu_2O_3 进行时间依赖实验, 结果表明随着孵育时间的延长纳米 Eu_2O_3 显著抑制肝癌细胞的生长 (图 1B)。

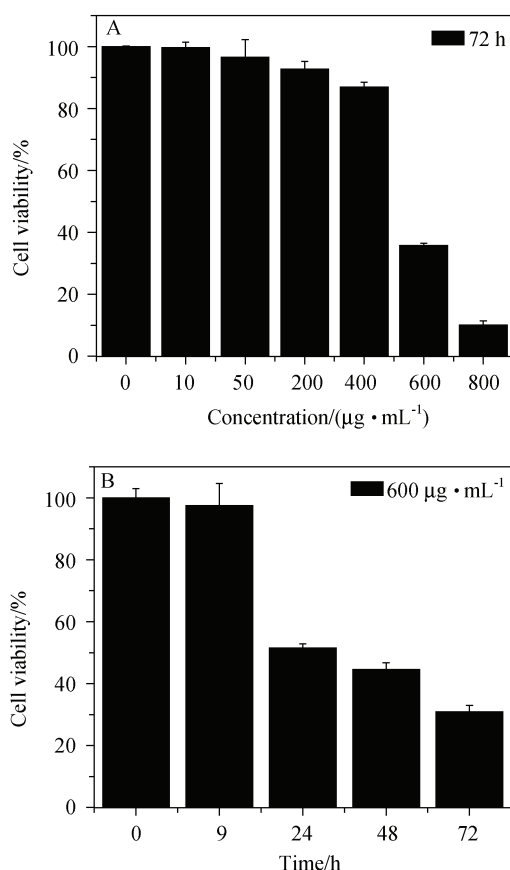


图 1 纳米 Eu_2O_3 对肝癌细胞活力的影响

Figure 1 The effect of nano Eu_2O_3 on the HepG2 cells viability (A) Cells treated with various concentrations of Eu_2O_3 for 72 h; (B) Cells treated for various times with 600 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Eu_2O_3

HepG2 细胞与不同剂量的 EuCl_3 溶液(1, 10, 50 和 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)共同孵育 72 h 后, 细胞存活率降低了 6%~23% (图 2A)。为了进一步证明 EuCl_3 对细胞增殖的抑制作用, 用 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 EuCl_3 孵育细胞不同时间, 发现细胞存活率随作用时间的延长逐渐降低, 在作用 96 h 后细胞存活率被抑制了 33.1%, 如图 2B 所示。结果表明 Eu^{3+} 能较弱的抑制肝癌细胞的生长。

2.2 纳米 Eu_2O_3 与 Eu^{3+} 对 HepG2 细胞周期的影响

为了搞清纳米 Eu_2O_3 颗粒抑制 HepG2 细胞生长的机制, 我们进行了细胞周期分析。如图 3 所示, 同对照组相比(图 3A), 400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 纳米 Eu_2O_3 作用细胞 72 h 后, 细胞各期比率变化不大(图 3B); 而 600 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的纳米 Eu_2O_3 作用肝细胞仅 24 h 后, G_0/G_1 期下降为 42.9%, S 期比率明显升高, 由正常细胞的 25.1% 上升到 57.1%,

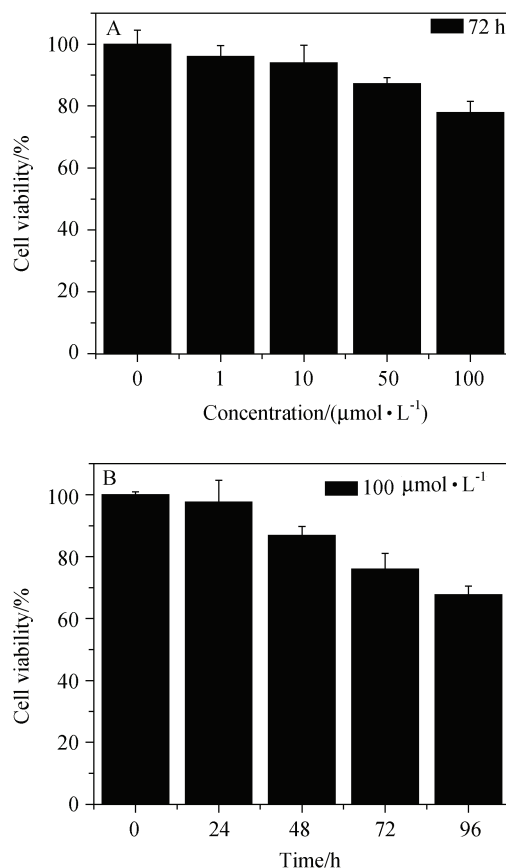


图 2 Eu^{3+} 对肝癌细胞活力的影响

Figure 2 The effect of Eu^{3+} on the HepG2 cells viability (A) Cells treated with various concentrations Eu^{3+} for 72 h; (B) Cells treated for various times with 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Eu^{3+}

处于 G_2/M 期的细胞数为 0。此结果与 MTT 法测试细胞活力的结果一致。

根据图 3 的实验结果可以得出: 600 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的纳米 Eu_2O_3 颗粒作用肝癌细胞 24 h 后, 细胞被完全阻滞在 S 期, 使肝癌细胞不能进行正常的细胞分裂, 生长受到了抑制。但是 subG_0/G_1 期变化不大, 可初步判断纳米 Eu_2O_3 作用 HepG2 细胞, 虽抑制了细胞的生长, 但未引起细胞发生明显凋亡。

细胞活力测试得到 EuCl_3 对 HepG2 细胞的生长有抑制作用, 为搞清其机理, 利用流式细胞仪测试了 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ EuCl_3 对肝癌细胞周期的影响, 结果如图 4 所示。

与对照组相比, Eu^{3+} 的加入增加了细胞 G_0/G_1 期的细胞比率。100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 EuCl_3 作用细胞 24 和 72 h 后, G_0/G_1 期细胞比率分别提高了 4.3% 和 4.4%; 且 DNA 直方图中出现的亚二倍体峰所表示的细胞比率, 由对照组的 10.9% 分别增加到 21.2% 和 27.4%, 说明 Eu^{3+} 的加入引起细胞发生凋亡, 而且细胞的周期被阻滞于 G_0/G_1 期, 而相应进入 S 期及 G_2/M 期的细胞数量有所减少, 抑制了细胞的增殖; 另外, 不能继续分裂的细胞还可能通

过某些调控机制进入凋亡程序而死亡, 使细胞数目减少, 进一步导致了细胞存活率的下降^[13].

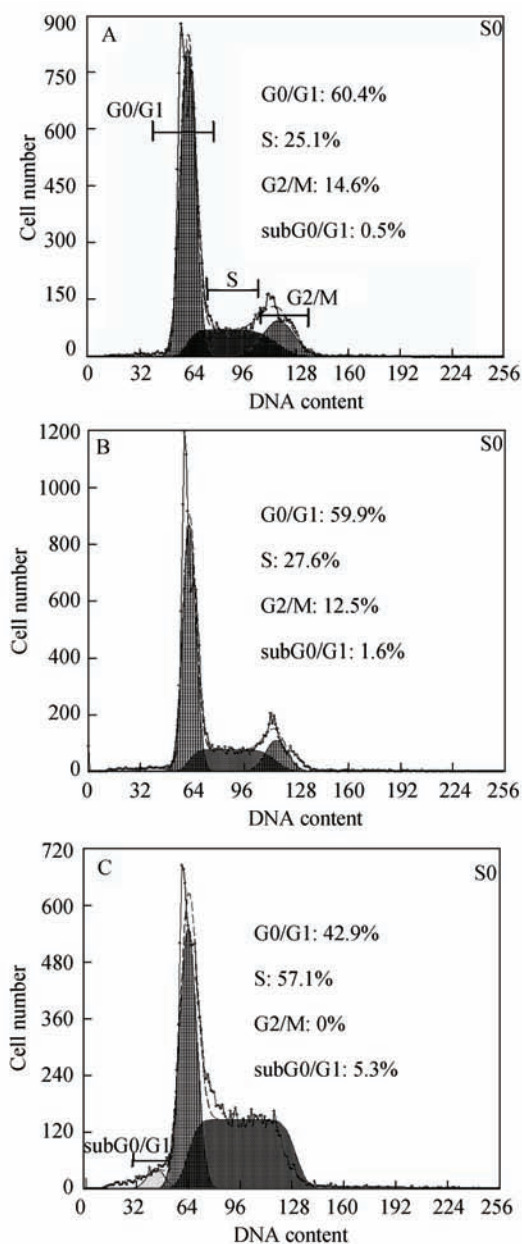


图3 不同浓度纳米 Eu_2O_3 作用细胞不同时间后的细胞周期分布

Figure 3 The distribution of cell cycle after treated with various concentrations of nano Eu_2O_3 on HepG2 cells for different time (A) Cells in the control group; (B) Cells treated with $400 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Eu_2O_3 for 72 h; (C) Cells treated with $600 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Eu_2O_3 for 24 h

2.3 纳米 Eu_2O_3 与 Eu^{3+} 对 HepG2 细胞凋亡的影响

细胞周期实验中观察到了 subG_0/G_1 凋亡峰的变化, 尤其是 EuCl_3 作用细胞后其值明显增大. 为了进一步测试稀土是否引起细胞凋亡我们用 FITC-AnnexinV/PI 双荧光标记进行了研究, 结果如图 5、6 所示. 图 5 中不

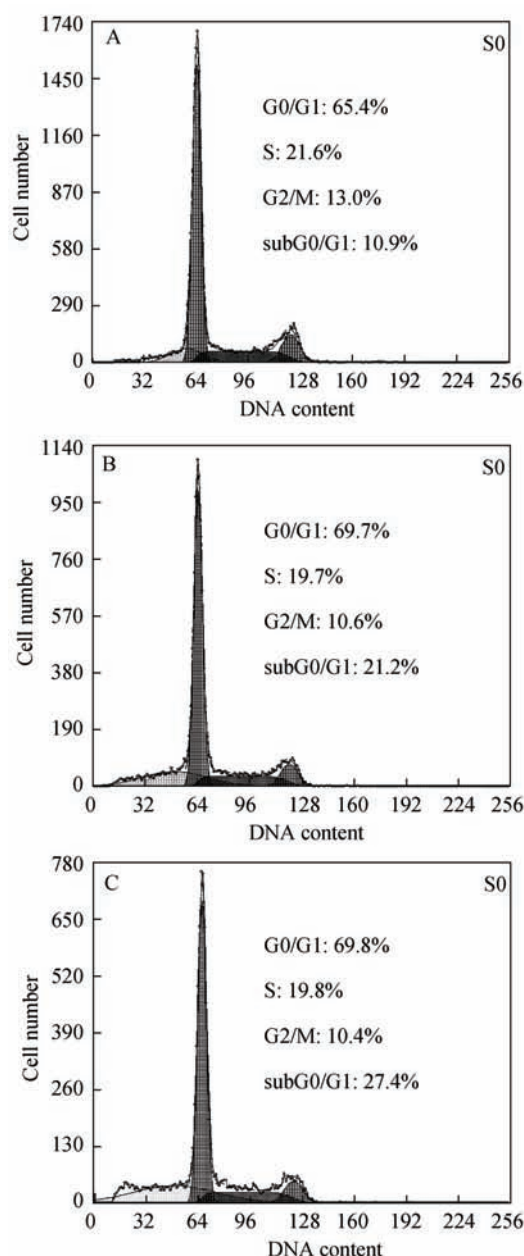


图4 Eu^{3+} 对肝癌细胞细胞周期的影响

Figure 4 The effect of Eu^{3+} on cell cycle of HepG2 cells (A) Cells in the control group; (B) Cells treated with $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Eu^{3+} for 24 h; (C) Cells treated with $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Eu^{3+} for 72 h

同浓度纳米 Eu_2O_3 颗粒作用于 HepG2 细胞不同时间后, 均观察不到明显的凋亡, 与细胞周期测试所得结果一致. 与对照组相比, $400 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 纳米 Eu_2O_3 作用细胞 72 h 后, 早期和晚期凋亡细胞增加了约 0.1%; 而 $600 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 纳米 Eu_2O_3 作用细胞 24 h, 凋亡细胞也只增加了 0.4%. 表明纳米 Eu_2O_3 作用细胞后几乎不引起细胞发生凋亡.

从图 6 可以看出, $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 EuCl_3 作用细胞 24 和 72 h 后, 均观察到不同程度的细胞凋亡. 同对照组相比, 早期和晚期凋亡率随作用时间的增加呈缓慢的上

升, 由对照组的 0.5% 分别上升到 5.8% 和 7.5%, 此结果与细胞周期所得结果较一致。

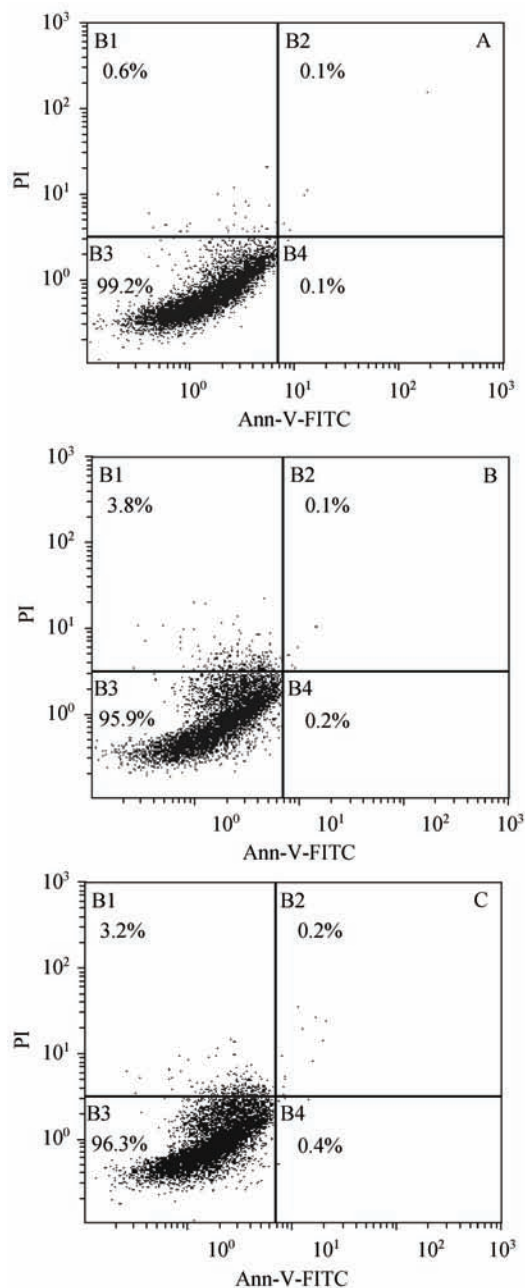


图 5 纳米 Eu_2O_3 诱导肝癌细胞凋亡图

Figure 5 Apoptosis of HepG2 cells induced by nano Eu_2O_3
(A) Cells in the control group; (B) Cells treated with $400 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Eu_2O_3 for 72 h; (C) Cells treated with $600 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Eu_2O_3 for 24 h

2.4 共聚焦显微镜观察纳米 Eu_2O_3 颗粒跨细胞膜

进一步我们利用激光共聚焦显微镜观察了纳米 Eu_2O_3 颗粒作用 HepG2 细胞后沿 Z 轴的扫描图像。图 7 为扫描到的处于细胞中心位置、视野清楚的图像。其中图 7A 为正常细胞明场条件图像; 图 7B 和 7C 分别为 $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 纳米 Eu_2O_3 与细胞孵育 7 h 后的明、暗场图像,

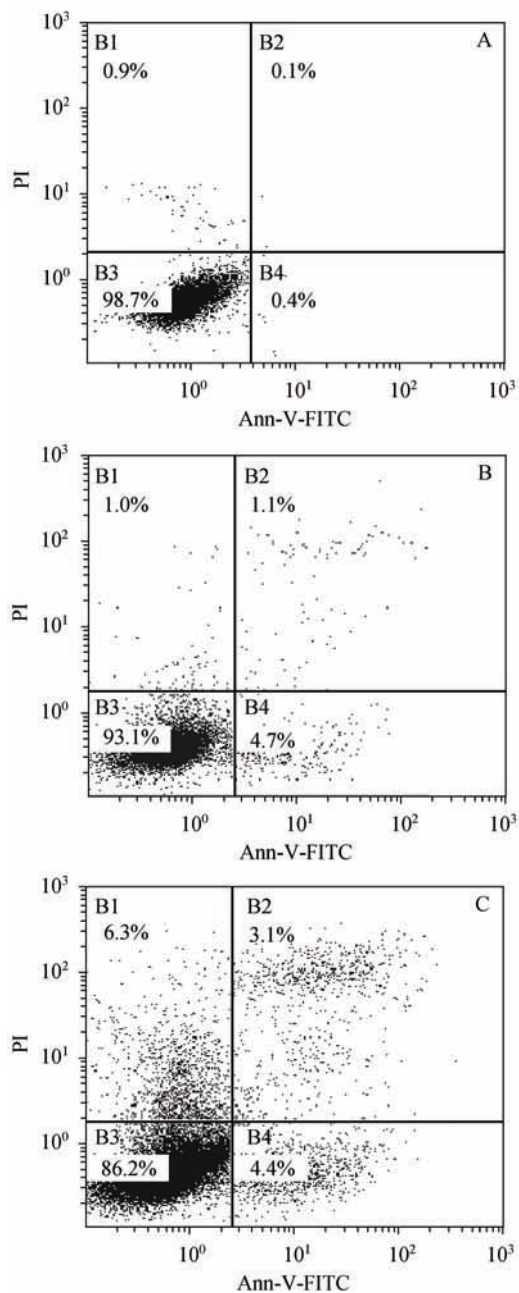


图 6 Eu^{3+} 诱导肝癌细胞凋亡图

Figure 6 Apoptosis of HepG2 cells induced by Eu^{3+}
(A) Cells in the control group; (B) Cells treated with $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Eu^{3+} for 24 h; (C) Cells treated with $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Eu^{3+} for 72 h

因为纳米 Eu_2O_3 是一种可发红色荧光材料, 则暗场中可观察到纳米 Eu_2O_3 的红色荧光; 图 7D 为图 7B 和 7C 的叠加图, 可看出红色荧光与明场细胞中的颗粒完全重合, 说明发红光的 Eu_2O_3 纳米粒子能进入 HepG2 细胞。即使我们所用的稀土氧化物纳米颗粒在使用前均经过超声分散处理, 但由于纳米粒子具有较高的表面活性, 粒子本身很容易团聚, 对于较大的粒子团聚体, 可以认为是通过吞噬作用进入细胞^[14]。

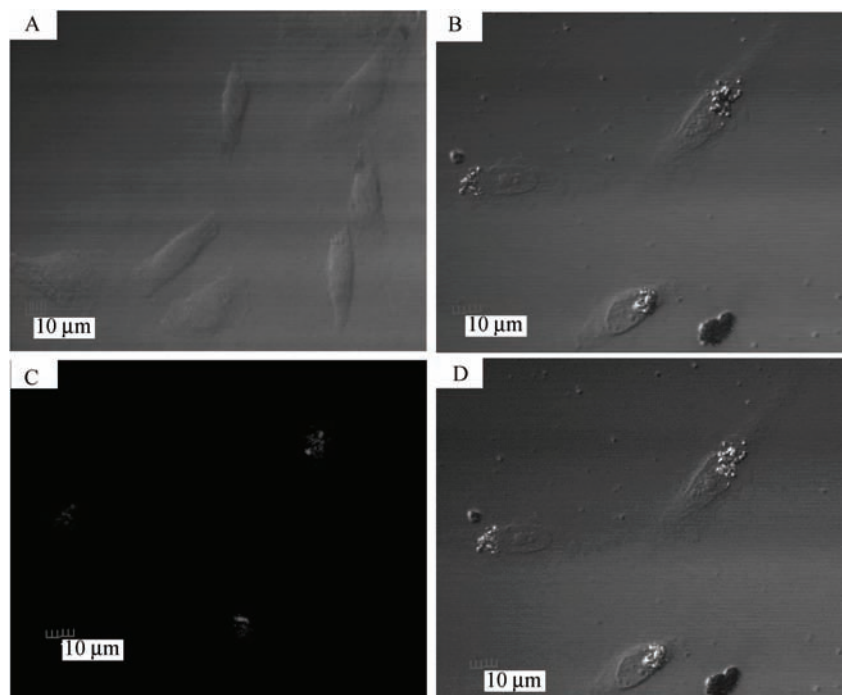


图 7 $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 纳米 Eu_2O_3 作用 HepG2 细胞的激光共聚焦图像

Figure 7 Confocal laser scanning images of HepG2 cells incubated with $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ nano Eu_2O_3

Bright field light scattering images of cells without nano Eu_2O_3 (A) or with nano Eu_2O_3 (B); dark field light scattering images of cells with nano Eu_2O_3 with red fluorescence (C); The merge of B and C (D). The scale bars are $10 \mu\text{m}$

3 结论

我们应用 MTT 法和流式细胞仪定量分析表明较低浓度的纳米 Eu_2O_3 颗粒对细胞生长无明显影响; 浓度达到 $600 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 作用仅 24 h, 癌细胞就停止分裂, 表现为细胞被阻滞在 S 期, 处在 G_2/M 期的细胞数为 0, 但没有引起细胞发生凋亡. 而对正常肝细胞, 当浓度为 $800 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时使细胞在 G_0/G_1 期发生阻滞, 并诱导肝细胞发生了凋亡^[11]. 通过激光共聚焦显微镜首次观察到纳米 Eu_2O_3 颗粒能进入 HepG2 肝癌细胞, 可能是通过吞噬作用进入. 进入癌细胞后并没有诱导其发生凋亡, 因此该纳米粒子是通过其他细胞死亡方式抑制细胞生长的. 有文献报道, 纳米 Nd_2O_3 可诱导 NCI-H460 人肺癌细胞自体吞噬的程序性细胞死亡^[8]; Park 等^[9]发现纳米 Ce_2O_3 可以诱导 BEAS-2B 人肺上皮细胞发生凋亡; 而 HeLa 细胞暴露于纳米 Eu_2O_3 48 h 后的生长状态仍然正常, 细胞活力没有发生变化^[14]等等. 可见, 不同稀土纳米氧化物对各类细胞的作用是不尽相同的, 这可能由于纳米粒子的表面活性部位直接或间接对 DNA 产生损伤, 或者聚结的纳米颗粒沉降在细胞周围和细胞表面, 阻碍了细胞间的胞间通信^[17]而造成细胞死亡. 纳米 Eu_2O_3 颗粒抑制肝癌细胞死亡的具体机制, 则需要在今后的研究中做进一步探讨.

根据已往的结论可知较高浓度的稀土元素即达到

毫摩尔时均有明显的抑制细胞生长的效应^[16,17], 增殖作用常发生在稀土浓度至少为微摩尔水平, 甚至更低^[2,18]. 然而稀土元素的生物效应不仅依赖于稀土元素的作用剂量, 也随着元素和作用对象的不同而表现不同. 而在本文中, 主要关注低浓度 Eu^{3+} 的作用, 因此选取的最大浓度为 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. 我们发现在此浓度范围内 Eu^{3+} 能较弱的抑制癌细胞的生长并诱导细胞发生凋亡. 而先前的研究发现, Eu^{3+} 在同浓度范围内则促进了肝细胞 HL-7702 生长^[11], 即相同浓度的同种稀土, 作用正常细胞和肿瘤细胞却呈现出截然相反的作用. 可能相比正常细胞, 高度增殖是癌细胞生长的特点, 需摄入大量的铁以满足生长需要. 据报道 Eu^{3+} 可与铁离子竞争占据脱铁转铁蛋白的 2 个金属离子结合部位, 影响了癌细胞对铁的摄入, 以致细胞生长受阻^[19].

总之, 目前的结果显示出稀土元素对正常细胞和肿瘤细胞的作用明显不同. 因此, 对稀土纳米氧化物和稀土化合物生物效应的研究需要从多方面下手, 才能得到更全面、更准确的结果.

References

- 1 Chen, L.-J. *Sci. Technol. Inf.* **2006**, 32, 29 (in Chinese). (陈丽娟, 科技资讯, **2006**, 32, 29.)
- 2 Fu, L.-J.; Li, J.-X.; Yang, X.-G.; Wang, K. *J. Biol. Inorg.*

- Chem.* **2009**, *14*, 219.
- 3 Shigematsu, T. *Ther. Apheresis Dial.* **2008**, *12*, 55.
- 4 Jiang, W.-H.; Chen, D.; Meng, X.-T. *J. Chin. Rare Earth Soc.* **2004**, *22*, 292 (in Chinese).
(姜文华, 陈东, 孟晓婷, 中国稀土学报, **2004**, *22*, 292.)
- 5 Sahoo, S. K.; Labhasetwar, V. *Drug Disc. Today* **2003**, *8*, 1112.
- 6 Zhu, R.-R.; Wang, S.-L.; Chen, X.-P.; Sun, X.-H.; Zhang, R.; Yao, S.-D. *Acta Chim. Sinica* **2006**, *64*, 2161 (in Chinese).
(朱融融, 汪世龙, 陈小平, 孙晓宇, 张蕤, 姚思德, 化学学报, **2006**, *64*, 2161.)
- 7 Guan, H.-F.; Liao, L.-W. *Guizhou Chem. Ind.* **2004**, *29*, 30 (in Chinese).
(管海凤, 廖列文, 贵州化工, **2004**, *29*, 30.)
- 8 Chen, Y.; Yang, L.-S.; Feng, C.; Wen, L.-P. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *337*, 52.
- 9 Park, E. J.; Choi, J.; Park, Y. K.; Park, K. *Toxicology* **2008**, *245*, 90.
- 10 Chen, G. *Rare Earth Inf.* **2002**, *12*, 12 (in Chinese).
(陈刚, 稀土信息, **2002**, *12*, 12.)
- 11 Liu, J.; Wei, C.-Y.; Yang, P. *J. Chin. Rare Earth Soc.* **2011**, *29*, 112 (in Chinese).
(刘洁, 魏春英, 杨频, 中国稀土学报, **2011**, *29*, 112.)
- 12 Zhou, X.-P.; Hou, H.-Z.; Li, Y.-Q.; Yang, P. *Acta Chim. Sinica* **2011**, *69*, 106 (in Chinese).
(周雪萍, 侯惠智, 李英奇, 杨频, 化学学报, **2011**, *69*, 106.)
- 13 Li, Y. *M.S. Thesis*, Jilin University, Changchun, **2010** (in Chinese).
(李阳, 硕士论文, 吉林大学, 长春, **2010**.)
- 14 Yu, L. *M.S. Thesis*, University of Science and Technology of China, Hefei, **2009** (in Chinese).
(于乐, 硕士论文, 中国科学技术大学, 合肥, **2009**.)
- 15 Jin, H.-F.; Yuan, L.; Qiu, L.; Wu, K. *Orthopaedic Biomechanics Materials and Clinical Study*, **2009**, *6*, 33 (in Chinese).
(金华芳, 袁琳, 邱乐, 武奎, 生物骨科材料与临床研究, **2009**, *6*, 33.)
- 16 Dai, Y.-C.; Li, J.; Yu, L.; Dai, G.; Hu, A.-G.; Yuan, L.-Y.; Wen, Z. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **2002**, *38*, 373.
- 17 Shi, P.; Huang, Z.-W. *Biometals* **2005**, *18*, 89.
- 18 Zhang, Y.; Fu, L.-J.; Li, J.-X.; Yang, X.-G.; Yang, X.-D.; Wang, K. *Biometals* **2009**, *22*, 511.
- 19 Yang, B.-S.; Harris, W.-R. *Acta Chim. Sinica* **1999**, *57*, 503 (in Chinese).
(杨斌盛, Harris, W. R. 化学学报, **1999**, *57*, 503.)

(A1103022 Cheng, F.)