DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.12.020

论著

文章编号:1000-5404(2000)12-1170-03

纤状蛇纹石石棉对兔肺泡巨噬细胞影响的体外研究

邓建军[1],董发勤[2],蒲晓允[3],方育琼[1],蒋惠芝[1],董跃君[1],李德知[1] ([1]四川省绵阳市第四人民医院检验科,绵阳 621000;[2]西南工学院资源工程系,绵阳 621003;[3]第三军医大学医学检验系临床血液学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 探讨纤状蛇纹石石棉致肺泡巨噬细胞受损的机制。方法 采用体外细胞培养技术,以兔肺泡巨噬细胞死亡率、乳酸脱氢酶(LDH)、超氧化物歧化酶(SOD)活力及丙二醛(MDA)含量变化来表示不同剂量、不同培养时间的纤状蛇纹石石棉对巨噬细胞的毒性。结果 纤状蛇纹石石棉对肺泡巨噬细胞的毒性存在着剂量-效应关系、时间-效应关系;125μg/ml培养18 h后,细胞死亡率及LDH增加,500μg/ml培养5 h后,细胞死亡率、LDH、MDA均明显增加,而SOD活力明显降低。随粉尘剂量的增加及培养时间的延长,细胞毒性也增加。结论 纤状蛇纹石石棉对肺泡巨噬细胞的毒性可能与其表面活性基团有关。

关键词:纤状蛇纹石石棉;细胞毒性;肺泡巨噬细胞;表面活性基团
中图法分类号:R322.35 文献标识码:A

Study on the effect of chrysotile asbestos on rabbit pulmonary alveolar macrophages injury *in vitro*

DENG Jian-jun, DONG Fa-qing, PU Xiao-yun, FANG Yu-qiong, JIANG Hui-zhi, DONG Yue-jun, LI De-zhi (Department of Laboratory Medicine, 4th Hospital of Mianyang City, Mianyang 621000, China)

Abstract: Objective To study the mechanism of damages of pulmonary alveolar macrophages caused by chrysotile asbestos. Methods Rabbit pulmonary alveolar macrophages were cultured *in vitro*. The cell death rate, the malandialdehyde (MDA), lactate dehydrogenate (LDH) and superoxide dismitase (SOD) contents in the cultured cells were determined at different incubation time and different dose of chrysotile asbestos for the cytotoxicity of the material. Results The cytotoxicity of chrysotile asbestos was in a dose and incubation time dependent manner. After 18 h incubation and at the dose of 250 μg/ml, the cell death rate and LDH content were increased significantly. In 5 h incubation and 500 μg/ml dose, the cell death rate, LDH and MDA all had a significant increase. Conclusion The cytotoxicity of chrysotile asdestos on pulmonary alveolar macrophages maybe related to the surface free radicals of chrysotile asbedtos.

Key words: chrysotile asdestos; cytotoxicity; pulmonary alveolar macrophages; surface free radicals

石棉纤维能引起肺部的严重疾病[1],几十年来,国内外学者进行了长期而深入的研究,至今其致病机制仍不清楚。我们的前期研究结果认为:矿物的生物活性是由表面的活性基团决定的,国内尚无此报道。本研究采用体外细胞培养技术,观察不同剂量、不同培养时间的纤状蛇纹石石棉对兔肺泡巨噬细胞损伤中所起的作用,为寻找纤状蛇纹石石棉表面的安全改造剂,减少及预防该类粉尘造成的肺部疾病提供理论依据。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(49502025)
作者简介:邓建军(1972—),女,四川省绵阳市人,主管技师,主要从事环境医学方面的研究,发表论文10篇。电话:(0816)2333342-232
收稿日期:1999-12-30;修回日期:2000-09-10

1 材料与方法

1.1 粉尘制备

纤状蛇纹石石棉采自四川石棉县,由超声粉碎制成超细粉

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

尘(由西南工学院资源系提供)用 RPMI1640 培养液制成悬液, 直接于玻片上在光镜下计算分散度, 其中直径< 15 μm 的纤维占90%以上。用电子天平准确称取 25 mg 超细粉尘于青霉素小瓶内, 高压蒸汽灭菌。用前加 1640 培养液 5 ml, 磁场力搅拌器上充分分散 4 h 备用。

1.2　细胞培养

选用 2 kg 左右的健康雄兔, 耳缘静脉注入空气处死, 腹主动脉放血, 立即超净工作台上进行支气管, 肺灌洗[2]。灌洗液 1 500 r/min 离心 10 min, 细胞用培养体系(20%小牛血清+80% 1640 培养液+100 U/ml 青霉素+100 μg/ml 链霉素)调整浓度至 3×10^6/ml, 分装于直径 35 mm 的无菌培养皿, 37℃, 5% CO_2 培养 3 h 后取出, 洗去未贴壁的细胞, 贴壁的几乎都是巨噬细胞。

1.2.1　培养时间与细胞毒性的关系　　实验组 0.1 ml 粉尘悬液与 0.9 ml 的培养体系加入到上述培养皿中(使粉尘悬液的终浓度为 500 μg/ml), 对照组加 0.1 ml 1640 培养夜代替粉尘悬液, 放 37℃、5% CO_2 分别培养 1.5、3、5、7、15、18 h 后取出, 收集上清液, 细胞用 pH 7.3 PBS 配成 1×10^6/ml 悬液。

1.2.2　粉尘剂量与细胞毒性的关系　　实验组分别加入粉尘悬液与培养体系, 使粉尘悬液的最终浓度分别为 125、250、500、1 000、1 500 μg/ml、放 37℃、5% CO_2 培养箱 18 h 后取出, 收集上清液, 细胞用 pH 7.3 的 PBS 配成 1×10^6/ml 的悬液。上述实验每次做平行实验, 重复 4 次。

1.3　观察指标

1.3.1　细胞膜通透性变化指标　　0.4%台盼蓝染色, 计算细胞死亡率; 培养上清液测乳酸脱氢酶(Lactate dehydrogonate, LDH)活力, 试剂由英国 Randox 公司提供, 按说明书操作, 仪器为日本 7060 型全自动生化分析仪。

1.3.2　脂质过氧化损伤的指标　　细胞悬液做丙二醛(Malandialdehyde, MDA)含量及超氧化物歧化酶(Superoxide dismitase, SOD)活力分析, 试剂由南京建成生物研究所提供, 操作按说明书, 仪器为美国贝克曼 DU-65 型紫外分光光度计。

1.3.3　细胞形态观察　　细胞悬液滴于玻片上, 瑞氏-姬姆萨染色, 光学显微镜下观察细胞形态变化。

1.4　统计学处理

数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 t 检验。

2　结果

纤状蛇纹石石棉对肺泡巨噬细胞的毒性存在着时间-效应关系, 随培养时间的延长, 毒性增大。从表 1 可看出, 粉尘悬液与巨噬细胞共同培养 5 h 后, 即出现了明显的细胞毒性: 细胞死亡率增加, 细胞膜通透性增高(LDH 漏出细胞外, 培养液 LDH 增高), 同时 MDA 增加, SOD 降低, 与对照组相比差异显著, 粉尘悬液与巨噬细胞共同培养 7、15、18 h 细胞毒性有明显增加的趋势。

表 1　不同培养时间对肺泡巨噬细胞毒性的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Effects of incubation time on cytotoxicity of pulmonary alveolar macrophages($\bar{x}\pm s$)

Incubation time(t/h)	n	Death rate(%)	LDH(IU/L)	SOD(U/L)	MDA(C_B/nmol·L^{-1})
Control	4	12.4±1.6	36.5±3.5	12.5±3.0	3.02±0.2
1.5	4	13.6±2.0	38.0±4.0	13.7±2.3	3.10±0.26
3	4	15.0±3.7	40.1±2.9	11.7±2.7	3.17±0.28
5	4	30.5±5.0**	60.8±5.7**	8.08±0.64*	3.89±0.22*
7	4	35.5±2.6**	76.0±4.1**	6.44±1.03**	4.52±0.11**
15	4	43.2±3.3**	114.0±8.5**	4.6±0.89**	4.58±0.06**
18	4	60.8±5.7**	120.0±3.9**	3.07±0.76**	5.04±0.49**

*: $P<0.05$,　**: $P<0.01$ *vs* control

纤状蛇纹石石棉对肺泡巨噬细胞的毒性存在着剂量-效应关系, 随剂量的增加, 毒性增大。从表 2 可看出, 当剂量为 125 μg/ml 的粉尘悬液与巨噬细胞共同培养 18 h 后, 就出现了细胞毒性, 细胞死亡率及 LDH 增加, 与对照组相比差异显著, 当粉尘剂量增加至 250 μg/mL, 细胞毒性非常明显, 不仅死亡率 LDH 明显增加, SOD 与 MDA 均出现了明显变化, 与对照组相比差异非常显著, 随着剂量的增加毒性增加。

表 2　不同粉尘剂量对肺泡巨噬细胞毒性的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Effects of dust dose on cytotoxicity of pulmonary alveolar macrophages($\bar{x}\pm s$)

Dust dose(ρ_B/μg·ml^{-1})	n	Death rate(%)	LDH(IU/L)	SOD(U/L)	MDA(C_B/nmol·L^{-1})
Control	4	12.4±1.6	36.5±3.5	12.5±3.0	3.02±0.2
125	4	30.05±3.7**	48.0±5.1*	13.4±2.2	3.22±0.16
250	4	41.24±5.5**	65.6±3.9**	6.85±1.0**	3.75±0.20*
500	4	48.9±5.0**	100.8±13.0**	3.07±0.76**	5.04±0.49**
1 000	4	56.3±4.17**	143.4±20.5**	3.43±0.81**	5.38±0.11**
1 500	4	70.7±8.7**	156.8±18.6**	3.01±20.80**	5.29±0.17**

*: $P<0.05$,　**: $P<0.01$ *vs* control

瑞氏-姬姆萨染色观察细胞形态的变化, 对照组巨噬细胞多为圆形, 表面光滑, 膜完整, 细胞核与浆边界清楚, 核染成紫色, 胞浆均匀染成紫红色。与粉尘悬液共同培养后巨噬细胞形态发生不同程度的毒性变化: 细胞体积增大, 聚集成团, 形态不规则, 出现梭形细胞, 巨大巨噬细胞, 粉尘悬液与细胞共同培养 5 h 后, 细胞核出现疏松, 固缩基至溶解, 只剩网状结构, 细胞浆变浅, 胞浆内出现吞噬颗粒, 细胞膜不完整, 随培养时间的延长以及粉尘剂量的增加毒性变化更明显。

3　讨论

纤状蛇纹石石棉是一类以硅酸盐为支架, 表面覆

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

盖有 Mg-OH 层的纤维状硅酸盐矿物，分子式为 $Mg_3[Si_5O_2](OH)_4$，其细胞毒性国内外的研究很多，与纤维的大小、形态、化学组成、结构、耐久性、有无污染等有关。而我们的前期研究结果认为：具有重要意义的矿物生物活性与矿物表面的活性基团有关，活性基团决定了它在生物体内的持久性、溶解性，活性基团也决定了矿物生物活性及其大小[2,3]。

根据我们前期的研究结果：作为一种碱性纤维，来源于四川石棉县的纤状蛇纹石石棉经超声粉碎制成超细粉尘后，在中性液体环境中（如体液、培养液）有一定的溶解能力，能电离出 OH^-、O_2^-、$Si\text{-}O^-$ 等活性基团，我们认为 OH^-、O_2^- 及 $Si\text{-}O^-$ 是 $OH^{\cdot}$、$O_2^{\cdot-}$、及 $SiO^{\cdot}$（硅载自由基）在溶液中存在的形式即流体自由基，这些活性基团攻击细胞聚不饱和脂肪酸（Polyunsturated fazty acid，PUFA）发生一系列氧化连锁反应即脂质过氧化。从实验结果可以看出，当纤维与巨噬细胞相互作用 5 h 后，细胞死亡率、LDH 及脂质过氧化的主要产物 MDA 明显增高，自由基清除剂 SOD 被消耗，随培养时间的延长及粉尘剂量的增加，细胞毒性越明显：细胞死亡率增高、细胞膜破坏、核疏松、固缩甚至破裂、溶解。可见纤状蛇纹石石棉的细胞毒性存在着时间依赖关系、剂量依赖关系[4~6]。

我们采用低浓度的弱酸（醋酸、柠檬酸、酒石酸等）处理纤维水镁石，中和其表面的部分 OH^-，已显著地降低了纤维水镁石的细胞毒性[7]，这也充分证明了石棉纤维矿物的细胞毒性与表面活性基团有关，若改变纤状蛇纹石石棉的表面离子基团种类，能否降低其细胞毒性，将有待与进一步研究。

参考文献：

[1] 樊晶光，王起恩，吴卫东，等. 几种化合物对石棉诱发肺泡巨噬细胞产生一氧化氮的抑制作用[J]. 中华预防医学杂志，1997，31(1)：31—34.

[2] 邓建军，董发勤，蒲小允，等. 纤维状矿物粉尘对肺泡巨噬细胞膜的损伤机制研究[J]. 川北医学院学报，1999，14(1)：3—5.

[3] 邓建军，董发勤，蒲小允，等. 工业矿物粉尘对肺泡巨噬细胞影响的体外研究[J]. 中国环境科学，1999，19(5)：466—468.

[4] 李国武，董发勤，庄 稼，等. 纤维矿物生物活性研究的新进展[J]. 四川地质学报，1998，18(1)：48—52.

[5] 董发勤，万 朴，宋功宝，等. 矿物纤维粉尘的表面特性及对生物活性的影响[J]. 地质科技情报，1997，16(3)：77—81.

[6] 董发勤，万 朴，周开灿，等. 陕南水镁石的环境安全性评估[J]. 中国环境科学，1998，18(1)：29—33.

[7] 邓建军，董发勤，吴逢春，等. 酸处理纤维水镁石对红细胞溶血能力的影响[J]. 工业卫生与职业病，2000，26(2)：76—78.

（编辑 汪勤俭）

（上接 1169 页）

孔 1 例；卵巢囊肿破裂 1 例；出血性黄体破裂 1 例。住院期间死亡 15 例。

讨论

非癌性肝硬化血性腹水发生率较低（小于 1%），临床上诊断较困难，救治难度大。肝硬化门脉高压时广泛门体侧支循环、腹内异位的曲张静脉或淋巴管破裂，是非癌性肝硬化患者血性腹水的主要原因；出血部位大多位于破裂的脐或脐旁静脉，特别在大量腹水出现脐疝时易发，也是严重的门脉高压并发症之一。肝硬化时，病理常表现为弥漫性肝纤维化及结节增生，在大结节肝硬化患者中，再生结节的缺血坏死所致的再生结节自发破裂也是血性腹水常发生原因之一，病死率极高[1]。

肝硬化患者由于免疫功能底下，感染结核杆菌机会极大，结核性腹膜炎若为干酪型与渗出混合型时多出现血性腹水；肝硬化患者合并急性重型胰腺炎时，胰源性腹水也可能是血性腹水，血性腹水也可继发于腹膜后胰假性囊肿破裂出血；在肝硬化患者中，胆石症的发生率极高，急性胆石性胆囊穿孔时，也可出现血性腹水；肝硬化患者常伴有脾大及脾功能亢进，腹部的钝性打击，对脾增大时损伤的危险性更大，也极易造成脾破裂而发生血性腹水；对于女性肝硬化患者，出现血性腹水时还应考虑到卵巢囊肿破裂、出血性黄体囊肿破裂及子宫内膜异位等因素，相对而言，此部分患者血性腹水的原因临床上诊治较容易，若能及时救治，病死率可大大降低。

关键词：肝硬化；腹水

中图法分类号：R575.2 文献标识码：B

参考文献：

[1] Sherlok S，Dooley J. Diseases of the bilary system[M]. London：Blaclcwell Scientific Publication，1993. 132.

（编辑 谢义霞）

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