

## 肺 $\text{Ca}^{2+}$ 含量与硅肺的关系\*

毛 延 陈荣三 黄孟健 戴安邦

(南京大学配位化学研究所)

施善苓 张祖暄

(南京大学生物系)

本文用离子选择电极测定了实验性诱发硅肺大鼠的肺、脑、肾、肝和血清中的 $[\text{Ca}^{2+}]$ 、 $[\text{K}^+]$ 和 $[\text{Na}^+]$ ，还以荧光探针 $\text{Tb}^{3+}$ 探讨了 $\text{Ca}^{2+}$ 的作用。在硅肺形成后，大鼠的肺、脑、肾、肝和血清等组织中的游离 $[\text{Ca}^{2+}]$ 均发生变化。荧光探针表明：硅肺大鼠肺 $\text{Ca}^{2+}$ 增加部分来自线粒体 $\text{Ca}^{2+}$ 的释放。硅肺大鼠肺中游离 $\text{Ca}^{2+}$ 和线粒体 $\text{Ca}^{2+}$ 的变化可能与巨噬细胞的损伤有关。

**关键词：** $\text{Ca}^{2+}$ 含量 硅肺  $\text{SiO}_2$ 晶状粉末

### 引 言

硅肺\*\*是以肺组织纤维化为主要症状的全身性疾病，是一种严重的职业病。然而由于对其发病机理不甚明瞭，缺乏比较理想的预防和治疗措施，以致至今仍然没有得到很好的控制。因此，弄清硅肺的成因，以进一步探索防治的有效措施，仍是亟待研究的重要课题。

关于硅肺的发病机理，各国学者已作了大量的研究<sup>[1-4]</sup>，由于学科的局限性，多集中在以 $\text{SiO}_2$ 进入动物体内所引起的组织病变和细胞损伤作为观察指标来推断硅肺发病机理。本组多年来一直从事二氧化硅化学和针刺镇痛过程中 $\text{Ca}^{2+}$ 作用机理的研究<sup>[5]</sup>，对二氧化硅化学和生物 $\text{Ca}^{2+}$ 的基础理论及研究手段有较多了解。在此基础上我们开始研究硅肺，探索硅肺形成过程中 $\text{SiO}_2$ 与哪些物质发生作用及其作用机制。首先我们应用离子选择电极测定了实验性硅肺大鼠肺匀浆中游离的 $[\text{Ca}^{2+}]$ 、 $[\text{K}^+]$ 和 $[\text{Na}^+]$ ，进而用荧光探针 $\text{Tb}^{3+}$ 观察了线粒体 $\text{Ca}^{2+}$ 的变化。本文报道其结果。

\* 本文于1987年4月27日收到。

\*\* 本文在第25届国际配位化学会议 (XXV ICC, 1987.7, 南京) 上演讲。国家自然科学基金资助的课题。

\*\* 硅肺 (Silicosis)，医学习惯称为矽肺，根据化学命名标准，本文一律称为硅肺。

## 实 验

### 一、仪器

荧光分光光度仪, 日本MPF—4型;

721型分光光度仪, 上海第二分析仪器厂;

美国 Orion 901 型微电脑离子计; Ca<sup>2+</sup> 电极, Orion Model 93—20; K<sup>+</sup> 电极, Orion Model 93—19; Na<sup>+</sup> 电极, Orion Model 97—11; Ca<sup>2+</sup>、Na<sup>+</sup> 参比电极, Orion Model 90—07; K<sup>+</sup> 参比电极, Orion Model 90—55;

Teflon 匀浆器, 南京大学仪器厂加工。

### 二、试剂

α—石英粉, 动物试验用标准石英粉, 中国预防医学中心卫生研究所研制;

Tb<sub>4</sub>O<sub>7</sub>, 光谱纯; NaCl、KCl、CaCl<sub>2</sub> 均为优级纯;

本实验所用溶液均用二次重蒸水配制。

### 三、方法

#### 1. 动物模型

实验动物为体重 200—250g 健康雄性大鼠, 随机分成实验组和对照组。配制浓度为 50mg/ml 的石英生理盐水混合液待用。实验组动物用乙醚麻醉, 由口腔插管入右肺, 每只注入 1ml 粉尘液。染尘后连续三天记录大鼠体重变化, 染尘后的大鼠作为动物模型, 分三批处死。

#### 2. [Ca<sup>2+</sup>]、[K<sup>+</sup>]和[Na<sup>+</sup>]的测定

用 NaCl 生理盐水配制 Ca<sup>2+</sup> 和 K<sup>+</sup> 的标准溶液, 用 KCl 生理盐水配制 Na<sup>+</sup> 标准溶液。从大鼠股动脉放血, 离心管收集血液, 离心 (2000 转/分, 10 分钟), 吸取上层血清, 测定 [Ca<sup>2+</sup>]、[K<sup>+</sup>] 和 [Na<sup>+</sup>]。依照前文<sup>(9)</sup>的方法, 制备肺、前段脑 (包括下丘脑)、肾、肝、肺门淋巴结等组织的匀浆, 测定其中的 [Ca<sup>2+</sup>]、[K<sup>+</sup>] 和 [Na<sup>+</sup>]。

#### 3. 用荧光探针 Tb<sup>3+</sup>(<sup>7</sup>) 检测肺和前段脑细胞器线粒体 Ca<sup>2+</sup> 的变化。

## 结 果

### 一、染尘后大鼠体重和肺组织重量的变化

如表 1 所示, 在本实验中, 大鼠在染尘后 2—5 个月内的体重增加量, 较对照组明显减慢; 正常大鼠的肺门淋巴结很小, 肉眼几乎观察不到, 而染尘后明显增大; 染尘大鼠的肺重量显著增加, 还可观察到肺部硅结节。结果表明, 在本实验条件下, 染尘后 2 个月大鼠的实验性诱发硅肺已经形成。

### 二、硅肺大鼠肺中 [Ca<sup>2+</sup>] 的变化

实验结果表明: 硅肺大鼠膈肺和右肺的游离 [Ca<sup>2+</sup>] 比对照组显著增加, 但在染尘后 2—5 个月区间内游离 [Ca<sup>2+</sup>] 的增加不存在时间依赖关系 (见表 2)。在染尘后 2 个和 3 个月时, 左肺中游离 [Ca<sup>2+</sup>] 没有明显变化。直至 5 个月, 由于硅肺的发展, 左肺中游离 [Ca<sup>2+</sup>] 显著升高, 但仍比膈肺和右肺为低, 在左肺未能观察到硅结节。

表1 染尘后大鼠体重和肺等组织重量的变化

Table 1 Change of Weight of Body and Lung etc. of Rats after Injection of  $\text{SiO}_2$  Crystalline Dusts

tissue	difference of weight from controls (g)		
	second month after injection of $\text{SiO}_2$	third month after injection of $\text{SiO}_2$	fifth month after injection of $\text{SiO}_2$
lung	$+5.66 \pm 0.25^{**}(7)$	$+4.83 \pm 0.23^{**}(5)$	$+4.09 \pm 0.35^{**}(6)$
bronchopulmonary lymph node	$+0.55 \pm 0.06^{**}(8)$	$+0.74 \pm 0.12^{**}(5)$	$+0.75 \pm 0.13^{**}(6)$
body	$-58 \pm 8^*(7)$	$-64 \pm 9^*(5)$	$-73 \pm 12^{**}(6)$

note: each value represents the mean  $\pm$  S.D.

number in parenthesis representst the number of animal

\* significantly different from control,  $P < 0.05$

\*\* significantly different from control,  $P < 0.01$

表2 硅肺形成对大鼠肺 $[\text{Ca}^{2+}]$ 的影响Table 2 Effect of Silicosis on  $[\text{Ca}^{2+}]$  in Lung

tissue	difference of $[\text{Ca}^{2+}]$ in lung from controls ( $\mu\text{g/g}$ tissue)		
	second month after injection of $\text{SiO}_2$	third month after injection of $\text{SiO}_2$	fifth month after injection of $\text{SiO}_2$
diaphragmatic lung	$+14.1 \pm 3.2^{**}(5)$	$+13.1 \pm 2.6^{**}(5)$	$+15.9 \pm 3.2^{**}(5)$
right lung	$+16.1 \pm 3.1^{**}(5)$	$+21.3 \pm 5.0^*(5)$	$+20.9 \pm 7.5^*(6)$
left lung	$+2.0 \pm 7.4 (6)$	$+3.7 \pm 3.5(5)$	$+11.5 \pm 1.7^{**}(6)$

note: each value represents the mean  $\pm$  S.D.

number in parenthesis represents the number of animal

\* significantly different from control,  $P < 0.05$

\*\* significantly different from control,  $P < 0.01$

### 三、硅肺大鼠其他组织的 $[\text{Ca}^{2+}]$ 变化

为了弄清硅肺大鼠肺中 $[\text{Ca}^{2+}]$ 增高的来龙去脉, 本文测定了硅肺大鼠的前段脑(包括下丘脑)、肾、肝匀浆及血清中游离 $[\text{Ca}^{2+}]$ 。从表3可见: 大鼠形成硅肺后, 前段脑的游离 $[\text{Ca}^{2+}]$ 显著升高, 在染尘后2—3个月, 肝和肾中游离 $[\text{Ca}^{2+}]$ 明显升高, 而血清游离 $[\text{Ca}^{2+}]$ 则显著降低。到5个月, 肝、肾和血清中的游离 $[\text{Ca}^{2+}]$ 均无显著变化。

### 四、硅肺大鼠不同组织中 $[\text{K}^+]$ 和 $[\text{Na}^+]$ 的变化

本文还测定了部分组织 $[\text{K}^+]$ 和 $[\text{Na}^{2+}]$ 的变化。结果见表4。在形成硅肺后, 大鼠肺、脑、肾、肝和血清的游离 $[\text{K}^+]$ 和 $[\text{Na}^+]$ 均未发生显著改变。

表3 硅肺大鼠其他组织中[Ca<sup>2+</sup>]的变化Table 3 Change of [Ca<sup>2+</sup>] in other Tissues of Silicotic Rats

tissue	difference of [Ca <sup>2+</sup> ] in tissues from control ( $\mu\text{g/g tissue}$ ) <sup>A</sup>		
	second month after injection of SiO <sub>2</sub>	third month after injection of SiO <sub>2</sub>	fifth month after injection of SiO <sub>2</sub>
brain	+6.10 $\pm$ 1.50*(5)	+4.44 $\pm$ 1.10*(5)	+8.12 $\pm$ 1.60*(6)
kidney	+3.04 $\pm$ 1.30*(6)	+4.26 $\pm$ 0.78*(5)	+1.58 $\pm$ 1.49(6)
liver	+7.40 $\pm$ 1.71*(6)	+17.3 $\pm$ 5.9*(5)	+3.09 $\pm$ 2.44(6)
serum	-2.70 $\pm$ 0.78*(5)	-7.10 $\pm$ 0.5*(5)	+0.22 $\pm$ 1.21(5)

note: Each value represents the mean $\pm$ S.D.

number in parenthesis represents the number of animal

\* significantly different from control, P<0.05

$\Delta$ [Ca<sup>2+</sup>] in serum:  $\mu\text{g/ml}$

### 五、硅肺大鼠肺门淋巴结[Ca<sup>2+</sup>]和[K<sup>+</sup>]的变化

肺门淋巴结增大是硅肺形成的主要标志之一。由于正常大鼠很难找到肺门淋巴结，故本实验只测定了硅肺大鼠中肺门淋巴结[Ca<sup>2+</sup>]和[K<sup>+</sup>]的变化(表5)。结果发现在染尘后2—5个月，硅肺大鼠中肺门淋巴结的[Ca<sup>2+</sup>]随时间显著下降，而[K<sup>+</sup>]没有明显改变。

表4 硅肺大鼠不同组织中[K<sup>+</sup>]和[Na<sup>+</sup>]变化Table 4 Changes of [K<sup>+</sup>] and [Na<sup>+</sup>] in Tissues of Silicotic Rats

tissue	difference of [K <sup>+</sup> ] and [Na <sup>+</sup> ] in tissues from controls			
	second month after injection of SiO <sub>2</sub>	third month after injection of SiO <sub>2</sub>	fifth month after injection of SiO <sub>2</sub>	
[K <sup>+</sup> ]	lung (mg/g)	-0.472 $\pm$ 0.350(6)	-0.308 $\pm$ 0.124(5)	+0.185 $\pm$ 0.566(6)
	brain (mg/g)	+0.025 $\pm$ 0.176(6)	+0.176 $\pm$ 0.073(5)	-0.048 $\pm$ 0.071(6)
	kidney (mg/g)	+0.075 $\pm$ 0.156(6)	-0.036 $\pm$ 0.074(5)	+0.438 $\pm$ 0.190(6)
	liver (mg/g)	+0.102 $\pm$ 0.200(6)	-0.002 $\pm$ 0.193(5)	+0.223 $\pm$ 0.099(6)
	serum(mg/10ml)	+0.75 $\pm$ 0.20(6)	+0.10 $\pm$ 0.01(5)	+0.49 $\pm$ 0.35(6)
[Na <sup>+</sup> ]	lung (mg/10g)	-0.467 $\pm$ 0.429(6)	-1.08 $\pm$ 0.66(5)	+0.36 $\pm$ 1.36(6)
	serum (mg/ml)	+0.078 $\pm$ 0.247(6)	+0.076 $\pm$ 0.404(5)	+0.652 $\pm$ 0.786(6)

note: each value represents the mean $\pm$ S.D.

number in parenthesis represents the number of animal

表5 硅肺大鼠肺门淋巴结中 $[Ca^{2+}]$ 和 $[K^+]$ 变化Table 5 Changes of  $[Ca^{2+}]$  and  $[K^+]$  in Bronchopulmonary Lymph Node of Silicotic Rats

ion	months after injection of $SiO_2$ and the concentration of ions		
	2	3	5
$[Ca^{2+}]$ ( $\mu g/g$ )	$55.3 \pm 11.6$ (7)	$24.7 \pm 5.4^{**}$ (5)	$14.2 \pm 2.5^*$ (6)
$[K^+]$ (mg/g)	$3.17 \pm 0.25$ (8)	$2.43 \pm 0.21$ (5)	$3.28 \pm 0.55$ (6)

note: each value represents the mean  $\pm$  S.D.

number in parenthesis represents the number of animal

\* significantly different from third month,  $P < 0.05$

\*\* significantly different from second month,  $P < 0.05$

## 六、硅肺大鼠中肺和前段脑线粒体 $Ca^{2+}$ 的变化

把 $Tb^{3+}$ 作为 $Ca^{2+}$ 的置换物用作生物大分子结构的探针已有报导<sup>[8,9]</sup>, 本文以荧光探针 $Tb^{3+}$ 研究硅肺大鼠中肺和前段脑细胞器线粒体 $Ca^{2+}$ 的变化, 以图了解硅肺大鼠中肺、前段脑游离 $[Ca^{2+}]$ 增高的原因。

实验方法及条件大致与文献<sup>[9]</sup>相同, 如图1所示, 在480—630nm范围内出现了492、545、593、623nm四个 $Tb^{3+}$ 特征发射峰, 虚线部分为水合自由 $Tb^{3+}$ 的发射光谱, 实线部分为对照组大鼠的肺线粒体- $Tb^{3+}$ 的发射光谱, 本文选择545nm处的发射峰作为发射波长, 测定硅肺大鼠肺、前段脑和肺门淋巴结中线粒体与 $Tb^{3+}$ 溶液混合后荧光强

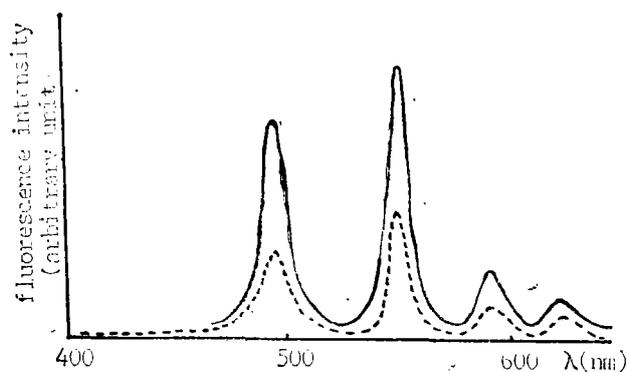


图1  $Tb^{3+}$ 、 $Tb^{3+}$ -大鼠肺线粒体配合物的荧光发射光谱

Fig. 1 Fluorescence emission spectra of  $Tb^{3+}$  and  $Tb^{3+}$ -mitochondria complex in lung of rat

$\lambda_{exc} = 296$  nm, pH = 6.2

—  $Tb^{3+}$ -mitochondria in lung    .....  $Tb^{3+}$

度的变化,结果如表6所示。硅肺大鼠肺和前段脑中线粒体-Tb<sup>3+</sup>的荧光强度均比对照组的高,而肺门淋巴结的线粒体-Tb<sup>3+</sup>的荧光强度,染尘后5个月的比染尘后3个月的为低。

表6 线粒体-Tb<sup>3+</sup>荧光强度的变化Table 6 Changes of Fluorescence Intensity of Tb<sup>3+</sup>-Mitochondria Complex

tissue	difference of fluorescence intensity from control	
	third month after injection of SiO <sub>2</sub>	fifth month after injection of SiO <sub>2</sub>
right lung	+17.5±1.5** (5)	+16.3±2.0** (6)
front segment brain	+3.8±0.8* (5)	+2.9±0.5* (6)
bronchopulmonary lymph node	42.3±3.0***Δ (5)	35.3±3.0Δ (6)

note: each value represents the mean±S.D.

number in parenthesis represents the number of animal

\* significantly different from control, P<0.05

\*\* significantly different from control, P<0.01

\*\*\* significantly different from fifth month, P<0.01

Δ not found in control

## 讨 论

无机离子在硅肺形成中的作用至今尚未见报导,本文选择体内宏量元素钙、钠和钾作为指标,测定了它们在血清、肺、脑、肾和肝等组织中的游离量。结果表明:在硅肺形成以后,上述各组织中的〔Ca<sup>2+</sup>〕均发生了变化。钙的生理作用广泛而复杂,许多重要的生理过程都与钙离子浓度(或活度)相关。早在50年前,就有人明确指出,离子化钙是生理活性物质<sup>[10,11]</sup>。本文的结果亦说明钙在硅肺发病机制中作用的研究是一个值得重视的课题。

荧光强度测定结果表明,硅肺大鼠的肺和前段脑中线粒体Ca<sup>2+</sup>均降低,肺门淋巴结内线粒体Ca<sup>2+</sup>随染尘时间而升高。线粒体是细胞内的重要钙库<sup>[12]</sup>,因此肺和前段脑中游离Ca<sup>2+</sup>的增加,部分可能来自细胞内线粒体Ca<sup>2+</sup>的释放。当线粒体Ca<sup>2+</sup>减少时,蛋白质基团与Tb<sup>3+</sup>结合,形成蛋白质-Tb<sup>3+</sup>配合物使荧光强度增加。从离子选择电极的结果可见(表2,表3),肺、脑、肝和肾中游离Ca<sup>2+</sup>的增高,部分来自血清中游离Ca<sup>2+</sup>的减少,但当染尘后5个月时,肝、肾和血清中游离Ca<sup>2+</sup>都接近于正常水平。这说明硅肺是一种以肺组织病变为主的全身性疾病,表明在硅肺形成后,体内钙的调节作用明显发生了变化。在中枢神经系统中Ca<sup>2+</sup>水平与兴奋和抑制有关<sup>[13]</sup>,本实验中脑游离Ca<sup>2+</sup>含量的增高,线粒体钙的释放都可能是硅肺病变引起的。已有实验证明<sup>[9]</sup>,SiO<sub>2</sub>对巨噬细胞有毒害作用,故可推论硅肺大鼠肺中游离Ca<sup>2+</sup>含量的增高,线粒体Ca<sup>2+</sup>的释放也都可能与巨噬细胞的破坏有一定的相关性。据报导<sup>[14]</sup>,Rosenfeld等给硅肺大鼠注射葡萄糖钙可缓解肺部病变,这是一个饶有兴趣的结果。因此,深

入地研究  $\text{Ca}^{2+}$  在硅肺发病机制中的作用, 无疑具有重要的理论意义和临床价值。对于  $\text{SiO}_2$  的形态和硅肺形成的关系, 以及硅肺的发生、发展和  $\text{Ca}^{2+}$  的关系, 我们正在进一步研究中。

**致谢:** 本文承北京医科大学公共卫生院刘世杰教授、曲青山、周世渠副教授、张宝旭、陈进、尹宏、曹承敬等同志的大力支持和帮助, 特表诚挚的谢意。

### 参 考 文 献

- [1] Marks, J., et al, *Brit.J.Industr.Med.*, 13, 187(1956).
- [2] Heppleston, A.G., et al, *Nature*, 214, 512(1967).
- [3] Allison, A.C., et al, *J.Exp.Med.*, 124, 141(1966).
- [4] 黄建权, 国外医学卫生学分册, 1, 64(1982).
- [5] (a). Dai An-Bang, Chen Rong-San, "30 Years Review of China's Science and Technology" Chapter 10, World's Science Press, Sigapore(1981).  
;(b)张祖暄、陈荣三等, 中国科学, B辑(12), 1299(1986).
- [6] 任镇章, 陈荣三, 张祖暄, 南京大学学报(自然科学版), (1), 91—98(1984).
- [7] Luk, C.K., *Biochemistry*, 10, 2838(1971).
- [8] Brittain, H.G., et al, *J.A.C.S.*, 98, 8255(1976).
- [9] Epstein, M., Reuben, J., *Biochemistry*, 16, 2449(1977).
- [10] Mclean, F.C., Hastings, A.B., *J.Biochem.*, 107, 337(1934).
- [11] Mclean, F.C., Hastings, A.B., *J.Biochem.*, 108, 285(1935).
- [12] 张祖暄, 生理科学进展, 13(1), 51(1982).
- [13] Graziani, L.J., et al, *Am.J.Physiol.*, 213, 629(1967).
- [14] Rosenfeld, R., et al, *Prac.Lek.*, 31(3), 86(1979).

## CALCIUM CONTENT OF LUNG AND SILICOSIS

Mao Yan Chen Rongsan Huang Mengjian Dai Anbang

(*Coordination Chemistry Institute of Nanjing University*)

Shi Shanling and Zhang Zuxuan

(*Biology Department of Nanjing University*)

The variation of inorganic ions in silicosis has not been studied. As an extension of our previous studies, the concentrations of Ca<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> in lung, brain, kidney, liver and serum of rats with experimentally silica-induced silicosis were measured by ion selective electrodes and the effect of Ca<sup>2+</sup> was studied by fluorescent probe Tb<sup>3+</sup>. The following findings are obtained:

1. The rats with experimental silicosis induced by intratracheal injection of SiO<sub>2</sub> crystalline dusts grew up much more slowly and their bronchopulmonary lymph node gave rise to granulomas and weight of the lung increased.

2. The concentration of free calcium ion in lung of silicotic rats was higher than that of the control group. The increase seemed to have reached its maximum within the first two months after injection of SiO<sub>2</sub> crystalline dusts into the right lung. From second to fifth month afterwards, the increased concentration of Ca<sup>2+</sup> did not change noticeably with time. This is true for the infected right lung and diaphragmatic lung. But for the left lung, the increase was noticed only at the fifth month.

3. For the silicotic rats, concentration of Ca<sup>2+</sup> ion in the front segment brain, liver and kidney were considerably increased but that of the serum was greatly decreased. However, at the fifth month these differences disappeared with the exception of the case of the brain wherein increase of Ca<sup>2+</sup> concentration became more marked.

4. By use of fluorescent probe Tb<sup>3+</sup>, it was found that the content of Ca<sup>2+</sup> of mitochondria in the right lung and front segment brain of silicotic rats was higher than that of the control group. But the content of Ca<sup>2+</sup> of mitochondria in the bronchopulmonary lymph node decreased with the time after the injection of SiO<sub>2</sub> crystalline dusts.

5. Concentration of the free K<sup>+</sup> ion and Na<sup>+</sup> ion in lung, brain, liver and serum of silicotic rats had no marked difference as compared with those of the control group.

All above findings had been initially explained.

**Keywords** calcium content silicosis SiO<sub>2</sub> crystalline dust