

硅氧聚合度对细胞毒性的影响

谢吉民* 焦新辉 汪志银**
朱建国 杨震 陈荣三

(南京大学配位化学研究所, 南京 210008)

本文采用家兔肺泡巨噬细胞(AM)存活率和细胞过氧化脂质(LPO)值为测定指标, 研究了硅氧的聚合度对其细胞毒性的影响。结果表明: 各种聚合度的硅氧都有一定的细胞毒性, 聚合度愈大, 细胞毒性也愈大。胶体 SiO_2 的粒径增大, 其细胞毒性降低。十硅酸盐及粒径小于 5nm 的硅溶胶的细胞毒性大于 α -石英。聚合度小于 6 的低聚硅酸及其盐、粒径 18nm 以上的硅溶胶以及硅胶 H 的毒性皆小于 α -石英。本实验细胞存活率降低和过氧化脂质值升高的趋势基本一致, 这表明硅氧可能主要与细胞表面膜作用, 膜上磷脂等表面活性物质被氧化和变性, 从而导致细胞损伤。

关键词: 硅氧 聚合度 硅溶胶 细胞毒性 肺泡巨噬细胞

引言

硅氧(silica)是二氧化硅的简称, 包括晶态、无定形和水合或羟合态⁽¹⁾, 一般认为晶态二氧化硅能致硅肺而无定形二氧化硅则不能, 为何两者有此差异, 这是长期以来不解的问题。弄清两者致硅肺能力差异的化学本质是研究硅肺发生及发展机理的重要课题。通常认为直径为 0.05~5 μm 的石英粉尘易导致纤维化并有致硅肺作用, 然而对更小粒子的硅氧如多硅酸、无定形 SiO_2 和胶体 SiO_2 的细胞毒性以及对硅肺发生和发展的影响却很少研究。本实验试图通过测定各种类型 SiO_2 与细胞作用后其细胞存活率和脂质过氧化物(LPO)量的差异, 说明晶态和无定形 SiO_2 的聚合度对细胞毒性的影响, 从而为进一步探讨硅肺的发生及发展机理提供依据。

实验部分

一. 仪器

日本岛津 RF-540 型荧光分光光度计, 日本岛津 XD-3A 型 X-射线粉末衍射仪, 日本 Olympusco 11 型显微镜, 日本 RKI10-2 型培养箱。

二. 试样及试剂

标准 α -石英粉尘($\bar{D}_s < 5\mu\text{m}$, 含游离 SiO_2 97.7%), 中国预防医学科学院; 硅溶胶($\bar{D}_s = 2.3\text{nm}$), 自制; 硅溶胶($\bar{D}_s = 4.5\text{nm}$ 、8.8nm、12nm、18nm 和 27nm), 江苏武进硅溶胶厂提供; 硅胶 H (色谱纯), 青岛海洋化工厂; 1, 1, 3, 3-四乙氧基丙烷 (TEP), E. Merck 公司。

本文于1990年12月1日收到。

国家自然科学基金资助课题。

* 镇江医学院, ** 浙江林学院。

其他试剂均为国产 A.R. 级, 所有溶液均用重蒸水配制。

三. 实验方法

1. 晶态硅酸盐的制备: $K_8Si_4O_{19}$ 、 $K_2Ca_3Si_6O_{16}$ 和 $K_8CaSi_{10}O_{25}$ 制备参照文献[3], $Na_6Si_8O_{19}$ 和 $K_2Si_2O_5$ 制备参照文献[4]。产品均经 X-射线粉末衍射并查 A.S.T.M. 卡片验证。

2. 不同聚合度硅酸盐溶液的制备: 在沸腾的一定体积 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ NaOH}$ 溶液中逐渐加入不同量的硅胶 H, 待完全溶解后即得。用中和滴定法测定 $Na_2O\%$, 重量法测定 $SiO_2\%$, 由此算出 SiO_2/Na_2O (摩尔比)。各试样的聚合度参照文献[5]查得。

3. 硅溶胶理化指标的测定: $Na_2O\%$ 及 $SiO_2\%$ 测定同方法 2, 胶粒直径测定见文献[6]。

4. 细胞悬液的制备: 提取家兔肺泡巨噬细胞⁽²⁾, 贴壁培养纯化后, 用 RPMI1640 培养液 (含小牛血清 10%, 青霉素和链霉素各 100u/100ml, 微孔滤膜抽滤除菌) 配成 $1 \times 10^6 \text{ AM/ml}$ 的细胞悬液。

5. 细胞存活率测定: 固体试样先在玛瑙研钵中研细 (<200 目), 紫外线消毒。硅溶胶及硅酸盐溶液采用高压灭菌消毒。临用前用 D-Hank's 液配成含 SiO_2 5mg/ml 试液, 调 pH 至 7.2~7.4 后, 立即取含有 SiO_2 100 μg 的试液加到含有 1ml 细胞悬液的培养瓶中, 于 CO_2 气流培养箱 (5% CO_2 , 37 $^\circ\text{C}$) 中培养, 分批用台盼蓝染色计数细胞存活率。各实验组均设 α -石英组和对照组。

6. 细胞 LPO 测定: 按文献[7]方法, 测定时每份细胞数为 50 万左右, 以 TEP 为标准。

结 果

一. 不同聚合度的硅酸对 AM 的毒性

不同 SiO_2/Na_2O 摩尔比的硅酸盐溶液酸化后与细胞悬液混合培养, 其细胞存活率 (SP) 和 LPO 值见表 1。在 4h 内各组间 SP 结果无显著性差异; 8h 时除单硅酸外, 均显示明显的细胞毒性 (与对照组相比, 存活率降低, LPO 值增加); 在 32h 时单硅酸也表现明显的细胞毒性。结果表明: 各组培养时间越长, 细胞存活率越低, LPO 值越高; 无论是单硅酸还是多硅酸都有一定的细胞毒性, 且随着聚合度增大, 细胞毒性增加, 但以上各低聚硅酸的细胞毒性均明显低于 α -石英。

表 1 不同聚合度低聚硅酸作用后的 AM 存活率及 LPO 值

Table 1 Survival Percents and LPO of AM after Reacting with Oligosilicic Acids

SiO_2/Na_2O SP or LPO t/h		0.96 (1.0)	1.99 (2.5)	3.01 (4.0)	3.50 (5.8)	3.70 (6.5)	α -quartz	control
SP of AM	4	96.2 $\pm$ 0.9	95.7 $\pm$ 2.1	95.6 $\pm$ 1.5	94.5 $\pm$ 1.2	94.2 $\pm$ 1.2	87.4 $\pm$ 2.0*	98.6 $\pm$ 1.2
	16	90.6 $\pm$ 1.6++	85.2 $\pm$ 2.1*	83.9 $\pm$ 2.0*	82.4 $\pm$ 2.2*	80.2 $\pm$ 2.1*	66.0 $\pm$ 3.9**	96.5 $\pm$ 1.6
	32	84.2 $\pm$ 2.6*	75.1 $\pm$ 2.9++	70.3 $\pm$ 2.4**	64.6 $\pm$ 2.9**	61.5 $\pm$ 3.6**	22.2 $\pm$ 5.3**	94.6 $\pm$ 2.5
	48	79.1 $\pm$ 2.9*	68.2 $\pm$ 4.2**	63.0 $\pm$ 3.5**	59.3 $\pm$ 4.8**	55.2 $\pm$ 3.2**	9.2 $\pm$ 4.6**	91.7 $\pm$ 2.1
LPO ^A	8	0.80 $\pm$ 0.17	0.89 $\pm$ 0.21*	0.94 $\pm$ 0.20*	0.99 $\pm$ 0.23**	0.98 $\pm$ 0.15**	1.30 $\pm$ 0.30**	0.75 $\pm$ 0.15
	16	0.93 $\pm$ 0.16	0.94 $\pm$ 0.19*	1.06 $\pm$ 0.22**	1.10 $\pm$ 0.17**	1.13 $\pm$ 0.18**	1.47 $\pm$ 0.21**	0.84 $\pm$ 0.19

The values are means $\pm$ SD, n=8. Data in parentheses are degrees of polymerization.

^A The values of LPO are expressed by nmol per 10^7 AM.

* significantly different from control ($p < 0.05$), ** significantly different from control ($p < 0.01$), + significantly different from α -quartz ($p < 0.05$), ++ significantly different from α -quartz ($p < 0.01$)

二. 不同粒径硅溶胶对 AM 的毒性

不同粒径的钠稳硅溶胶与细胞悬液混合培养, 细胞的存活率和 LPO 值见表 2。在 4h 时, 粒径小于和等于 8nm 的硅溶胶即有细胞毒性; 到 10h 时, 全部硅溶胶都有细胞毒性。在 16h 时, 2.3 和 4.5nm 的小粒径硅溶胶的毒性已超过 α -石英, 8.8 和 12nm 的硅溶胶的毒性与 α -石英相当。结果表明: 随着硅溶胶的粒径增大, 细胞存活率增大、LPO 值减小, 细胞毒性减小。硅胶 H 的毒性小于硅溶胶。

表 2 不同粒径硅溶胶作用后的 AM 存活率及 LPO 值

Table 2 Survival Percents and LPO of AM after Reacting with Silica Sols

D_p / nm SP or LPO t / h		2.3	4.5	8.8	12	18	27	silica gel H	α -quartz	control
SP of AM	4	82.5 $\pm$ 2.5*	84.1 $\pm$ 2.9*	86.6 $\pm$ 2.6*	88.2 $\pm$ 3.1	89.4 $\pm$ 2.8	90.3 $\pm$ 3.2	92.1 $\pm$ 2.7	86.9 $\pm$ 2.7*	98.0 $\pm$ 0.3
	10	60.6 $\pm$ 1.6**	66.3 $\pm$ 4.2**	72.4 $\pm$ 1.9*	80.4 $\pm$ 2.7*	82.3 $\pm$ 3.5*	83.4 $\pm$ 2.7*	86.3 $\pm$ 5.0*	77.5 $\pm$ 2.9**	97.5 $\pm$ 1.4
	16	42.3 $\pm$ 3.2**	45.4 $\pm$ 3.8**	61.5 $\pm$ 4.4**	62.6 $\pm$ 3.1**	68.4 $\pm$ 2.9**	70.6 $\pm$ 3.3**	74.4 $\pm$ 4.6**	65.4 $\pm$ 2.1**	97.6 $\pm$ 2.1
	32	8.3 $\pm$ 4.5**	12.3 $\pm$ 6.2**	23.4 $\pm$ 3.6**	34.3 $\pm$ 2.5**	44.6 $\pm$ 5.1**	47.3 $\pm$ 3.6**	55.2 $\pm$ 2.7**	20.1 $\pm$ 3.5**	94.0 $\pm$ 2.0
LPO	16	1.56 $\pm$ 0.24*	1.49 $\pm$ 0.25*	1.39 $\pm$ 0.19*	1.31 $\pm$ 0.23*	1.17 $\pm$ 0.17*	1.15 $\pm$ 0.21*	0.91 $\pm$ 0.10	1.40 $\pm$ 0.20*	0.86 $\pm$ 0.27

Notes are the same as in table 1, n = 6.

三. 晶态多硅酸盐对 AM 的毒性

用自制的结晶多硅酸盐与细胞悬液混合培养, 细胞存活率及 LPO 值见表 3。由表可见, 在培养 4h 时, 八硅及十硅酸盐出现明显的细胞毒性; 在培养 16h 时, 除单硅酸外, 各硅酸盐组都表现明显的细胞毒性。六硅以下硅酸盐的细胞毒性明显低于 α -石英, 八硅酸盐与 α -石英相当, 十硅酸盐明显高于 α -石英。结果表明, 随着聚合度的增大, 晶态多硅酸盐的毒性增加, 表现为细胞存活率降低和 LPO 值增加。由表 3 和表 1 对比可见, 晶态多硅酸盐的毒性高于相应聚合度的无定形聚硅酸。

表 3 多硅酸盐作用后的 AM 存活率及 LPO 值

Table 3 Survival Percents and LPO of AM after Reacting with Polysilicates

	t / h	Na ₂ SiO ₃	Na ₂ Si ₂ O ₅	K ₂ Si ₄ O ₉	K ₂ Ca ₃ Si ₆ O ₁₆	Na ₆ Si ₈ O ₁₉	K ₄ CaSi ₁₀ O ₂₅	α -quartz	control
SP of AM	4	94.4 $\pm$ 3.4 ₊	92.4 $\pm$ 1.9	92.6 $\pm$ 3.5	90.2 $\pm$ 0.9	89.4 $\pm$ 2.8*	80.4 $\pm$ 3.1*	85.4 $\pm$ 2.5*	98.4 $\pm$ 0.6
	10	91.1 $\pm$ 3.1 ₊	85.4 $\pm$ 2.2 ₊	84.5 $\pm$ 2.4 ₊	82.5 $\pm$ 5.2 ₊	76.6 $\pm$ 3.5**	56.2 $\pm$ 2.7 ₊ **	76.9 $\pm$ 2.6**	97.6 $\pm$ 2.1
	16	87.4 $\pm$ 2.6 ₊	79.6 $\pm$ 3.2 ₊	78.1 $\pm$ 1.5 ₊	74.1 $\pm$ 3.5 ₊ *	65.3 $\pm$ 1.2**	38.4 $\pm$ 5.3 ₊ **	65.0 $\pm$ 1.9**	97.0 $\pm$ 1.5
	32	76.4 $\pm$ 5.6 ₊	64.2 $\pm$ 1.2 ₊ *	62.0 $\pm$ 1.9 ₊ **	58.2 $\pm$ 1.7 ₊ *	37.4 $\pm$ 3.2 ₊ **	5.2 $\pm$ 2.5 ₊ **	20.6 $\pm$ 2.9**	92.6 $\pm$ 1.9
LPO	16	0.97 $\pm$ 0.20*	1.14 $\pm$ 0.19*	1.20 $\pm$ 0.16**	1.32 $\pm$ 0.23*	1.39 $\pm$ 0.14**	1.67 $\pm$ 0.21 ₊ **	1.44 $\pm$ 0.27**	0.86 $\pm$ 0.20

Notes are the same as in table 1, n = 6.

四. 测定了不同浓度的 α -石英、硅溶胶($D_p = 4.5$ nm)和 $K_4CaSi_{10}O_{25}$ 分别与 AM 作用后的 SP 和 LPO 值, 均有明显的剂量效应关系。此外还测定了 AM 浓度与 LPO 值的关系, 细胞量在 10~70 万范围内, LPO 值与 AM 量有较好的线性关系。因限于篇幅, 实验结果未列入。

讨 论

本实验结果表明各种聚合度的硅氧都有不同程度的细胞毒性, 表现为细胞存活率降低和细胞 LPO 值升高。这表明, 低分子量或小粒子硅氧可能主要与细胞表面膜作用, 膜表面活性

物质如磷脂等被氧化和变性, 导致细胞损伤, 产生细胞毒性。

在中性及微碱性溶液中, 硅氧表面主要有两种基团, 即硅氧基 ($\equiv\text{Si}-\text{O}^-$) 和硅羟基 ($\equiv\text{Si}-\text{OH}$)。两者均有毒性^[8], 前者可与细胞膜上生物分子带正电性基团如磷脂上的 $\text{RN}^+(\text{CH}_3)_3$ 、蛋白质上的 R^+NH_3 等结合; 后者可与生物大分子上的某些给电子原子或基团形成氢键。胶体 SiO_2 胶粒增大, 其比表面积减小, 表面硅氧基和硅羟基总数减少, 与细胞膜作用力减弱, 因此毒性下降。这与单细胞的藻类在硅溶胶中的生长情况相一致, 即在小粒径硅溶胶中生长慢, 在大粒径硅溶胶中生长快^[9]。反映胶粒越小, 毒性越大。

多硅酸在溶液中有聚合或解聚两种行为。一般认为只有当溶解的 SiO_2 浓度大于无定形 SiO_2 的溶解度 (100ppm) 时, 才会有聚合作用。但是在生物体系中存在大量的表面活性物质如细胞表面的磷脂和蛋白质等, 都能吸附和浓缩低浓度的硅酸并进行聚合^[1], 从而造成蛋白质变性, 使细胞膜损伤直至崩解死亡。聚合度越大, 硅酸表面硅羟基解离度越大 (pK_a 越小), 表面硅羟基增多。由于静电力与氢键同时作用, 可能与细胞结合更牢固, 因而对细胞毒性也愈大。

十硅酸盐的细胞毒性在所试硅氧化合物中为最大。十硅酸是七环对称型结构化合物, 其直径 1.13nm, 已属胶体范围, 比所试硅溶胶的粒径 (2.3nm) 更小, 因此毒性应更大。同时还由于其特定的空间结构, 使表面硅羟基规则排列, 可能更有利于与细胞膜结合。Weiss^[10] 在硅肺组织中发现了一种自然界中不存在的硅肺特征化合物, 其化学组成式为 $\text{M}_{1.15}^+(\text{H}_2\text{O})_x[\text{Fe}_{0.9}^{3+}\text{Fe}_{1.1}^{2+}\text{Si}_{3.36}\text{P}_{0.64}\text{O}_{11}]$, 其中 M^+ 为可交换的阳离子。若将此盐各组分整数化, 可得十聚硅的磷硅铁酸盐的化学式 $\text{M}_2^{(\text{II})}[\text{Fe}_3^{(\text{III})}\text{Fe}_3^{(\text{II})}(\text{OH})_3\text{Si}_{10}\text{P}_2\text{O}_{33}](\text{H}_2\text{O})_x$ 。可以设想, 在硅肺的发生过程中, 结晶硅氧可能部分溶解成为十硅酸, 并与细胞中的磷酸盐等结合, 形成了此种硅肺特征化合物。

参 考 文 献

- [1] Iler, R.K., *The Chemistry of Silica*, John Wiley & Sons, p.2, p.137, p.776(1979).
- [2] 梅懋华、孙云寿主编, 生理学方法与技术, 人民卫生出版社, 387 (1987) .
- [3] Morey, G.W. et al., *J. Soc. Glass Tech.*, **14**, 149(1930).
- [4] Gunawardane, R.P., *J. Am. Ceram. Soc.*, **57**(5), 201(1974).
- [5] Nauman, R.V. et al., *J. Phys. Chem.*, **55**, 1(1951).
- [6] Sears, G.W., *J. Anal. Chem.*, **28**(12), 1981(1956).
- [7] 翁玉椿等, 细胞生物学杂志, **7**(3), 142(1985).
- [8] Shi, X.L. et al., *J. Toxicol. Environ. Health*, **27**, 435(1989).
- [9] 杨宇翔、吴庆余、陈荣三, 南京大学学报 (自然科学版), **25**(3), 92(1989).
- [10] Weiss, A., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1**, 165(1962).

EFFECT OF DEGREE OF POLYMERIZATION OF SILICA ON ITS CYTOTOXICITY

Xie Jimin

Jiao Xinhui

Wang Zhiying

Zhu Jianguo

Yang Zhen

Chen Rongsan

(Coordination Chemistry Institute, Nanjing University, Nanjing 210008)

In this paper, the survival percents and lipid peroxide(LPO) values of alveolar macrophage(AM) in rabbit lung after incubation with some sorts of silica(polysilicic acids, synthesized polysilicates, silica gel and α -quartz) are determined. The relationship between degree of polymerization(D.P.) of silica and its toxic effect on AM has been studied. The results show that every kind of silica with different D.P. is toxic on AM. The higher the D.P., the stronger the toxicity; and the larger the particle size of silica sol, the weaker the toxic effect. Decasilicate and silica sols with particle size less than 5 nm are more toxic than α -quartz. Oligosilicates(D.P. < 6), silica sols(particle size > 18nm) and silica gel are all less toxic than α -quartz. The reduction of survival percents of AM is corresponding to the increase of its LPO value. It is showed that silica mainly reacts with the surface of cell membrane, and the surfactant of membrane such as phospholipid will be oxidized and denatured, resulting in cell damaging.

Keywords: silica degree of polymerization cytotoxicity alveolar macrophage silica sol