

卵磷脂抗石英毒作用的研究

胡继岳 谢吉民 朱卫华 辛淮生

(镇江医学院, 镇江 212001)

(南京大学配位化学国家重点实验室, 南京 210008)

本文采用家兔肺泡巨噬细胞(AM)体外培养法, 以细胞内游离钙浓度($[Ca^{2+}]_i$)、细胞存活率、乳酸脱氢酶(LDH)和酸性磷酸酶(ACP)活性为指标, 观察了卵磷脂、脑磷脂及现用防治硅肺药物克矽平(PVPNO)、柠檬酸铝等抗石英毒效果。结果表明: 卵磷脂在所试各药物中效果最佳。初步探讨了卵磷脂拮抗石英细胞毒性的机理。卵磷脂有成为防治硅肺药物的可能性。

关键词: 卵磷脂 石英 硅肺 细胞毒性 胞浆游离 Ca^{2+} 浓度

引言

石英粉尘是引起硅肺(矽肺)的主要化学物质。目前, 石英致硅肺的机理尚未研究清楚, 现有防治硅肺的药物尚不理想, 积极探索硅肺的发病机理和找出更理想的防治药物是国内外普遍关注的课题。近年研究报道: 染石英尘后的鼠肺磷脂含量增加^[1,2]。本文用 Fura-2 荧光探针测定了家兔肺泡巨噬细胞在不同培养环境下的 $[Ca^{2+}]_i$; 同时以细胞存活率、乳酸脱氢酶和酸性磷酸酶活性变化为指标, 观察了卵磷脂、脑磷脂抗石英细胞毒的效果, 并与现用的几种抗硅肺药物进行比较。

实验部分

一. 仪器和试剂

1. 仪器: AR-CM 阳离子测定系统(美国 SPEX 公司); 倒置荧光显微镜(日本 Nikon 公司); CO_2 气流培养箱(美国 Sheltex 公司); 721 型分光光度计(上海第三分析仪器厂)。

2. 试样及试剂: 标准 α -石英粉尘(粒径小于 $5\mu m$, 含游离 SiO_2 97.7%), 中国预防医学科学院; Fura-2 / AM, RPMI-1640 干粉培养基及 Ionomycin 均为美国 Sigma 公司产品; 台盼蓝, 辅酶 I 及 N-2'-羟乙基哌嗪-N'-2'-乙烷磺酸(HEPES)为进口分装生化试剂。小牛血清, 杭州血清厂; 卵磷脂, 生化试剂, 上海禽蛋二厂; 脑磷脂, 生化试剂, 新疆化学研究所生化试剂厂; 克矽平(PVPNO), 上海劳动卫生职业病防治所; 汉防己甲素, 中国药科大学植物化学教研室提供; 柠檬酸铝, 自制; 对硝基苯磷酸二钠, 生化试剂, 德国 Merck 公司。其他试剂, 均为国产分析纯或生化试剂; 所有实验用水均为重蒸水。

二. 实验方法

1. 试样和试剂的预处理: α -石英临用前经紫外光照射 30min, 用生理盐水配成 $5mg/ml$ 悬浊液; 卵磷脂、脑磷脂和汉防己甲素均采用超声分散法溶解在生理盐水中备用。D-Hank's

液和生理盐水用高压灭菌消毒; HEPES 缓冲液、RPMI-1640 培养液及卵磷脂等药物溶液均经微孔滤膜抽滤除菌。

2. 巨噬细胞 (AM) 悬液的制取: 健康家兔 (本院动物室提供) 股动脉放血处死, 在无菌下, 暴露出气管, 插入导管, 用 D-Hank's 液反复灌洗, 收集灌洗液离心分离 (2000rpm, 10min), 细胞经贴壁纯化后, 用 RPMI-1640 培养液 (含 10% 小牛血清、100u/ml 青霉素及 100μg/ml 链霉素) 配成 1×10^6 AM/ml 的细胞悬液。

3. 细胞存活率测定: 取 1×10^6 AM/ml 的细胞悬液 1.00ml, 分别置于各细胞瓶中。对照组加 40μl 生理盐水; 石英组加石英悬液 (含量 5mg/ml) 20μl, 生理盐水 20μl; 药物组分别加卵磷脂、脑磷脂、克砂平、汉防己甲素、柠檬酸铝溶液 (含量都是 5mg/ml) 20μl, 生理盐水各 20μl; 石英加药物组在石英悬液 20μl 中, 分别加各药物溶液 20μl。所有各组都在隔水式培养箱中温育 (37℃)。分别取经 4, 12, 24 和 36h 温育的细胞培养液, 用台盼蓝排斥法计数细胞存活率。

4. LDH 及 ACP 活性测定: 根据细胞存活率实验结果, 选取抗石英毒效果较好的卵磷脂、克砂平和柠檬酸铝三种药物, 进行酶活性测定。分别取经温育 4、12 和 24h 的细胞培养液, 离心分离 (2000rpm, 10min), 取上清液, 用 2, 4-二硝基苯肼-丙酮酸法测定 LDH 活性^[3], 用对硝基苯磷酸二钠法测定 ACP 活性^[4]。活性单位都折算成每 1×10^6 AM 释放出的酶每秒催化水解生成产物的 nmol 数表示。

5. 细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的测定^[5]: 在 5×10^5 AM/ml 的细胞悬液中, 加入 Fura-2/AM 达终浓度 $1 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$, 于 5% CO_2 气流培养箱中 37℃ 恒温 25min, 1000rpm 离心 5min, 弃去上清。细胞用等渗 HEPES 缓冲液洗涤两次, 再用 HEPES 液配成 5×10^5 AM/ml 悬液。按方法 3 染尘。分别于 37℃ 培养 1h 和 3h, 取出离心 (1000rpm, 5min), 细胞重悬于 HEPES 液中, 37℃ 分别测定其单细胞荧光强度 (λ_{ex} 为 340nm 和 380nm, λ_{em} 为 505nm), 细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 按下式计算:

$$[Ca^{2+}]_i = K_d \beta (R - R_{min}) / (R_{max} - R)$$

式中 Fura-2-Ca 的离解常数 $K_d = 2.24 \times 10^{-7} \text{mol}/\text{dm}^3$, 实验测得常数 R_{max} 、 R_{min} 和 β 依次为 15.8 ± 0.05 ($n=10$), 0.46 ± 0.04 ($n=12$) 和 5.90 ± 0.42 ($n=10$)。R 为实测荧光强度减去细胞自发荧光强度后的荧光比值 (F_{340}/F_{380})。

结果和讨论

一. 细胞存活率测定结果: 见表 1。数据表明: 4h 内各组间无明显差别, 随温育时间的延长, 各组的细胞存活率都有不同程度的降低, 12h 有明显区别; 石英组的存活率最低, 与对照组比较有显著差异 ($p < 0.01$), 这提示石英有明显的细胞毒性; 石英加药物后存活率降低减慢, 提示各药物对 AM 都有保护作用, 其中以石英加卵磷脂组存活率最高, 表明在所试的五种药物中, 卵磷脂对 AM 的保护作用最好, 拮抗石英细胞毒作用最强。各药物组与生理盐水对照组比较无显著差异 ($p > 0.05$), 表明各药物本身在所试浓度下, 没有细胞毒性。

二. LDH 和 ACP 活性测定结果: 见表 2。数据表明: 随温育时间的延长, 细胞培养液中两种酶的活性都增加; LDH 活性增加较早, 在 4h 时即有显著差异 (石英组与对照组比较 $p < 0.05$), 而 ACP 活性至 12h 才出现显著差异。这提示石英可能先与 AM 表面膜作用, 细胞膜受损, 释放胞浆标志酶 LDH, 继之是 AM 吞噬石英尘, 石英进一步与细胞器作用, 溶酶体

膜受损, 释放标志酶 ACP。石英加药物后, 两种酶的释放都减慢, 提示各种药物对石英毒都有拮抗作用, 且以卵磷脂的效果最好; 各药物组本身与对照组无显著差异 ($p > 0.05$), 酶活性测定结果与细胞存活率测定结果呈平行关系, 结论一致。

表 1 AM 与不同受试物作用后的存活率(%)

Table 1 Survival Percents of AM after Reacting with Various Substances

groups	incubation time			
	4h	12h	24h	36h
control	96.5 ± 1.2	91.5 ± 2.6	88.3 ± 2.6	83.4 ± 3.5
quartz	92.4 ± 3.5	81.5 ± 6.8*	65.6 ± 5.5**	31.5 ± 5.4**
quartz+lecithin	96.0 ± 1.8	91.5 ± 2.5 ⁺	86.2 ± 3.4 ⁺⁺	81.4 ± 5.6 ⁺⁺
quartz+cephalin	91.2 ± 3.5	85.2 ± 4.7	73.1 ± 6.3 ⁺	52.9 ± 4.9 ⁺
quartz+PVPNO	95.4 ± 2.0	88.4 ± 5.6 ⁺	83.6 ± 5.5 ⁺⁺	77.3 ± 6.5 ⁺⁺
quartz+tetrandrine	94.4 ± 2.6	84.3 ± 6.5	77.2 ± 3.6 ⁺	64.4 ± 6.5 ⁺⁺
quartz+alu. citrate	94.6 ± 2.4	85.8 ± 5.2	78.4 ± 4.1 ⁺	74.1 ± 5.8 ⁺⁺
lecithin	96.2 ± 1.5	92.5 ± 2.2	90.2 ± 2.6	85.6 ± 2.6
cephalin	95.4 ± 1.2	92.8 ± 2.5	90.1 ± 2.3	84.1 ± 2.5
PVPNO	96.3 ± 1.8	91.2 ± 1.6	89.8 ± 3.2	85.2 ± 3.0
tetrandrine	94.8 ± 1.6	90.8 ± 2.5	88.6 ± 3.4	82.3 ± 3.2
alu. citrate	96.0 ± 2.1	91.8 ± 1.8	90.2 ± 2.8	82.5 ± 3.6

Results are the mean ± SD, n = 8.

* significantly different from control ($p < 0.05$)

** significantly different from control ($p < 0.01$)

+ significantly different from quartz ($p < 0.05$)

++ significantly different from quartz ($p < 0.01$)

表 2 AM 培养液酶活性($\text{nmol} \cdot \text{s}^{-1} / 10^6 \text{AM}$)

Table 2 Enzymatic Activities of AM in Culture Medium

type	groups	incubation time		
		4h	12h	24h
LDH	control	421 ± 41	443 ± 32	529 ± 50
	quartz	583 ± 33**	889 ± 49**	1240 ± 110**
	quartz+lecithin	442 ± 30 ⁺	478 ± 47 ⁺⁺	622 ± 121 ⁺⁺
	quartz+PVPNO	454 ± 27 ⁺	583 ± 72 ⁺⁺	776 ± 89 ⁺⁺
	quartz+alu. citrate	473 ± 42 ⁺	639 ± 52 ⁺⁺	856 ± 120 ⁺⁺
	lecithin	408 ± 52	417 ± 39	475 ± 75
	PVPNO	416 ± 57	435 ± 49	494 ± 108
	alu. citrate	396 ± 65	440 ± 67	526 ± 79
ACP	control	1.08 ± 0.15	1.29 ± 0.19	1.76 ± 0.16
	quartz	1.32 ± 0.27	2.44 ± 0.29*	6.55 ± 0.48**
	quartz+lecithin	1.17 ± 0.11	1.98 ± 0.32 ⁺	4.10 ± 0.67 ⁺⁺
	quartz+PVPNO	1.22 ± 0.21	2.15 ± 0.53 ⁺	4.56 ± 0.77 ⁺⁺
	quartz+alu. citrate	1.27 ± 0.18	2.26 ± 0.32 ⁺	4.82 ± 0.69 ⁺⁺
	lecithin	1.07 ± 0.12	1.36 ± 0.33	1.65 ± 0.42
	PVPNO	1.09 ± 0.27	1.46 ± 0.72	1.78 ± 0.30
	alu. citrate	1.16 ± 0.17	1.33 ± 0.44	2.06 ± 0.64

note: same as in table 1

三.细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的测定结果:见表3。一般认为细胞损伤常伴有胞内钙水平的增高⁽⁶⁾,毛延等发现硅肺发生时肺组织匀浆中 $[Ca^{2+}]$ 升高⁽⁷⁾。我们的实验结果得到石英能明显增高肺泡巨噬细胞内游离钙浓度。石英组细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 在培养至1h时即明显大于对照组($p < 0.05$),且随培养时间延长,细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 升高。各药物组细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 与对照组无显著差异,表明所试药物无明显细胞毒性。药物加石英后,其细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 均比纯石英组明显降低,提示所试药物都有明显拮抗石英毒性的作用。以上结果与细胞存活率、LDH及ACP活性测定结果一致。

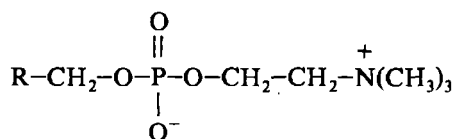
表3 AM与不同受试物作用后的 $[Ca^{2+}]_i$ (nmol·dm⁻³)

Table 1 $[Ca^{2+}]_i$ of AM after Reacting with Various Substances

groups	incubation time	
	1h	3h
control	125 ± 26(10)	131 ± 39(12)
quartz	192 ± 36(10)*	269 ± 59(8)* *
lecithin	120 ± 15(8)	128 ± 23(10)
alu. citrate	123 ± 16(8)	130 ± 40(6)
PVPNO	115 ± 15(10)	112 ± 22(8)
quartz+lecithin	138 ± 22(8) ⁺	152 ± 24(10) ⁺⁺
quartz+alu. citrate	156 ± 29(8) ⁺	178 ± 27(9) ⁺⁺
quartz+PVPNO	149 ± 38(8) ⁺	159 ± 20(10) ⁺⁺

note: Same as in table 1, number in parenthesis represents the number of measured cells.

四.卵磷脂拮抗石英细胞毒机理的初步探讨:已知在中性或微碱性溶液中,石英表面有两种具有细胞毒性的基团⁽⁸⁾,即硅氧基 $\equiv Si-O^-$ 和硅羟基 $\equiv Si-OH$ 。卵磷脂分子的部分结构如下:



卵磷脂分子中的带正电基团 $-N^+(CH_3)_3$ 最可能与石英表面的带负电基团 $\equiv Si-O^-$ 以静电方式结合,而其 $\equiv P-O^-$ 可与石英表面的 $\equiv Si-OH$ 形成氢键。杨震、陈荣三等⁽⁹⁾用卵磷脂人工膜与石英作用,发现石英表面 ζ 电位降低,这证实了卵磷脂与石英表面发生了电性作用。卵磷脂是肺表面活性物质,是构成细胞膜表层的主要成分,石英的细胞毒性可能首先是其与细胞膜上的卵磷脂双基团牢固结合,进而引起细胞膜组成、结构发生改变而导致细胞膜受损。Dethloff等发现染石英尘后的鼠肺细胞内外磷脂含量大量增加⁽²⁾,这可能是动物自身防御机制对细胞膜的一种保护。作为药物,外加的卵磷脂能很好地与细胞膜亲合覆盖,从而保护了细胞膜,卵磷脂也能很好地包裹在石英尘表面并与之毒性基团结合而降低了石英的细胞毒性。

结 语

综上所述,卵磷脂拮抗石英细胞毒的效果优于现用的防治硅肺药物。卵磷脂是生物体内固有的物质,无毒、且易得,其多方面的拮抗石英细胞毒的作用与其他各药物所不能同时具备的。因此,我们有理由期望:卵磷脂有成为防治硅肺的一种有效药物的可能性。

致谢:本文承南京大学配位化学研究所陈荣三教授指导,并得到王金晞副教授、温和瑞和凌静同志的具体帮助,在此表示感谢。

参 考 文 献

- [1] Gabor, S. et al., *Environ. Res.*, **16**, 443–448(1978).
[2] Dethloff, L.A. et al., *Biochem. J.*, **223**, 111–118(1986).
[3] 上海市立化验所, 临床生化检验, 上海科技出版社, 315–325 页 (1979).
[4] 蒋传葵等, 工具酶的活力测定, 上海科技出版社, 62–64 页 (1982).
[5] McDonough, P.M., Button, D.C., *Cell Calcium*, **10**, 171–180(1989).
[6] 关超然, 基础医学与临床, **10**(1), 54(1990).
[7] 毛 延、陈荣三等, 无机化学, **3**(4), 12–18(1987).
[8] Jacques, D. et al., *J. Colloid and Interface Sci.*, **50**(3), 619–621(1976).
[9] 杨 震、陈荣三等, 南京大学学报 (自然科学版), **25**(1), 48–55(1989).

RESEARCH OF RESISTANCE OF LECITHIN TO TOXICITY OF QUARTZ

Hu Jiyue Xie Jimin Zhu Weihua Xin Huaishen

(Zhenjiang Medical College, Zhenjiang 212001)

(State Key Laboratory of Coordination Chemistry, Nanjing University, Nanjing 210008)

Authors studied about the resistance effects of lecithin and some anti-silicosis drugs, such as PVPNO and aluminium citrate, to the toxicity of quartz by means of external culture of alveolar macrophage of rabbit with the indexes of the cells' survival percent, cytoplasmic free Ca^{2+} concentration, the activities of LDH and ACP. The results indicate that lecithin is the most effective and it will become probably an ideal drug which prevents and cures silicosis. Besides, the mechanism of lecithin's reducing the toxicity of quartz is discussed.

Keywords: lecithin quartz silicosis cytotoxicity cytoplasmic free Ca^{2+}