

纤粒矿物粉尘体外细胞毒性研究^{*}

邓建军¹⁾ 董发勤²⁾ 吴逢春¹⁾ 蒲小允³⁾ John Huang⁴⁾ 赵世泉¹⁾

(1—四川省绵阳第四人民医院, 绵阳 621000; 2—西南工学院, 绵阳 621000;

3—第三军医大学, 重庆 400038; 4—Laurentian Univ., Canada P3E 2C6)

主题词 粒状矿物 纤维状矿物 粉尘 肺泡巨噬细胞 细胞毒性

提 要 采用体外细胞培养技术, 观察兔肺泡巨噬细胞死亡率, 用丙二醛(MDA)的含量变化、乳酸脱氢酶(LDH)及超氧化物歧化酶(SOD)的活性变化来评价来自 12 个矿床的 6 种矿物的 12 种结晶习性的矿物粉尘的细胞毒性, 探讨其使巨噬细胞受损的机制。结果显示: 沸石、硅灰石无细胞毒性, 而其他的纤维状及片粒状矿物粉尘则表现出不同程度的细胞毒性, 说明矿物粉尘的细胞毒性与矿物粉尘的形态有一定关系, 但主要由矿物粉尘的特性所决定。

许多片粒状或纤维状矿物粉尘都能显示广义上的生物化学特性, 在生物体内表现出生物活性。而生物活性与细胞毒性有关^[1]。本文采用体外细胞培养技术, 观察来自 12 个矿区的 6 种矿物的 12 件粉尘样品对兔肺泡巨噬细胞产生的不同毒性, 探讨巨噬细胞受损的机制。

1 样 品

1.1 粉尘样品

1.1.1 粉尘样品特征

12 件粉尘分别采自全国 12 个矿区, 制成超细粉尘后, 用 X 射线荧光光谱分析其化学组成(表 1); 同时分析了其在悬液中的表面基团、pH 值及溶度积等特性(见表 2)。

1.1.2 体外粉尘样品制备

用电子天平称取 25 mg 超细粉尘, 并置于青霉素小瓶内, 高压蒸汽灭菌。用前加 PRMI 1640 培养液至悬液体积为 5 ml, 在磁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, 立即腹主动脉放血。按 Myrvik^[2]的方法在超净工作台上进行支气管、肺灌洗, 灌洗液以 1 500 r/min 的转速离心 10 min, 细胞用培养体系[ϕ (小牛血清) = 20%, ϕ (1640 培养液) = 80%, 另按 100 u/ml 加入青霉素, 按 100 mg/L 加入链霉素]调整细胞浓度为 3.0×10^9 个/L, 然后分装于直径为 35 mm 的培养皿中, 在 37 °C 的温度条件下, 置于含有 5% CO₂ 的培养箱中培养 3h 后取出, 洗去未贴壁的细胞(贴壁的 98% 以上都是巨噬细胞)。

* 本文得到国家自然科学基金项目(编号: 49502025)资助

第一作者简介 邓建军, 女, 1973 生, 检验师, 主要从事医学检验和研究工作。

收稿日期 2000-01-26, 改回日期 2000-06-13

表 1 粉尘主要化学成分

Table 1 Major chemical composition of mineral dusts

粉尘名称	w _B /%											总和
	SiO ₂	TiO ₂	Al ₂ O ₃	Fe ₂ O ₃	MnO	CaO	MgO	Na ₂ O	K ₂ O	P ₂ O ₅	LOI	
斜发沸石*	71.79	0.14	12.34	0.84	0.05	2.36	0.20	2.19	2.78	0.05	7.17	99.91
斜发沸石	70.54	0.26	13.30	1.32	0.02	1.85	1.32	0.50	3.19	0.07	7.46	99.83
硅灰石	50.83	0.05	0.40	0.23	0.03	44.27	0.46	0.05	0.08	0.07	3.49	99.96
纤状硅灰石	49.48	0.02	0.49	0.27	0.06	45.01	0.08	0.78	0.00	0.04	4.06	100.29
土状坡缕石	62.04	0.58	7.96	4.35	0.05	0.26	12.49	0.08	0.86	0.09	11.27	100.03
纤状坡缕石**	46.21	0.01	15.16	0.69	0.00	11.73	6.47	0.23	0.07	0.03	19.74	100.34
土状海泡石	70.15	0.25	4.82	1.91	0.17	1.00	13.45	0.41	0.51	0.13	7.37	100.17
纤状海泡石	62.73	0.04	1.72	0.01	0.01	0.64	23.02	0.42	0.00	0.01	11.44	100.04
块水镁石	1.08	0.01	0.04	7.40	0.33	0.38	59.81	0.24	0.01	0.03	30.09	99.42
纤状水镁石***	21.53	0.00	1.16	4.96	0.21	1.60	48.46	0.01	0.00	0.00	22.83	100.76
蛇纹石	40.33	0.09	2.21	7.82	0.12	1.26	36.91	0.10	0.06	0.06	11.26	100.22
纤状蛇纹石	39.67	0.11	3.34	4.91	0.10	3.27	31.69	0.28	0.61	0.61	16.18	100.77

注: LOI 为烧失量; * 含丝光沸石; ** 含方解石; *** 含纤蛇纹石。测试单位及测试者: 加拿大劳伦丁大学(Laurentian Univ.) 分析测试中心, John Huang。测试仪器: XRF Philips PW1404。

表 2 矿物粉尘在悬液中的性质

Table 2 Properties of mineral dusts in suspended solution

矿物粉尘	表面官能团	pH 值	溶度积	可释放的主要离子
沸石	Ca-O ⁻ ; -Si-O ⁻ ; -Ca-OH ₂	8.0	7.1×10^{-17}	K ⁺ , Na ⁺ , Ca ²⁺
硅灰石	Si-O ⁻ ; Ca-O ⁻ ; Si-O-Si; -Si-O	8.8	2.7×10^{-17}	Ca ²⁺
坡缕石	OH ⁻ ; -Si-O ⁻ ; -Mg-OH ₂ ; -Al(Si)-OH	8.3	5.3×10^{-18}	Mg ²⁺ , Ca ²⁺ , Al ³⁺ , OH ⁻
海泡石	OH ⁻ ; -Al-OH; -Si-O ⁻ ; -Mg-OH ₂	8.0	6.4×10^{-19}	Mg ²⁺ , Ca ²⁺ , OH ⁻
水镁石	OH ⁻ ; Mg(OH) ⁺ ;	9.0	3.8×10^{-13}	Mg ²⁺ , Fe ²⁺ , OH ⁻
蛇纹石	OH ⁻ ; (O ₂) Mg(OH) ⁺ , Si-O-Si	8.9	8.8×10^{-16}	Mg ²⁺ , Fe ³⁺ , Fe ²⁺ , OH ⁻

2 实验

2.1 实验方法

向上述培养皿内加 0.9 ml 培养体系, 0.1 ml 的上述各粉尘悬液(粉尘悬液的最终浓度为 500 mg/L), 对照组加 0.1 ml 1640 培养液代替粉尘悬液; 37 °C, 5% CO₂ 培养 18 h 后取出, 收集培养上清液, 用 pH 值为 7.3 的 PBS(磷酸盐缓冲液) 配制 1.0×10^9 个/L 的细胞悬液, 每份标本做平行样品, 重复操作 4 次。

2.2 观察指标

- (1) 细胞悬液用 0.4% 台盼兰染色。活细胞不着色, 死亡细胞被染成蓝色, 计算死亡率。
- (2) 用培养上清液测定乳酸脱氢酶(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。
- (3) 细胞悬液做超氧化物歧化酶(SOD) 活力及丙二醛(MDA) 含量分析, 试剂由南京建成生物研究所提供, 仪器为美国贝克曼 DU-65 紫外分光光度计, 按说明书操作。
- (4) 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 t 检验处理各实验组与对照组数据。

3 结果

上述四项观察指标的实验结果列于表3中。

由表3可见,与对照组相比,沸石、斜发沸石、硅灰石、纤状硅灰石各项指标差异无显著性,蛇纹石、纤状海泡石细胞死亡率有明显增大($P < 0.05$);纤状坡缕石、土状海泡石的细胞死亡率及LDH与对照组相比有显著升高($P < 0.01$);而土状坡缕石、块状水镁石、纤状水镁石、纤状蛇纹石,无论是细胞死亡率,还是LDH、SOD、MDA,与对照组相比,差异均有显著性。结果提示,这几种矿物粉尘表现出不同程度的细胞毒性。

表3 矿物粉尘对肺泡巨噬细胞的毒性($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

Table 3 Cytotoxicity of mineral dusts on pulmonary alveolar macrophages ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

粉尘名称	死亡率/%	LDH/(IU·L ⁻¹)	SOD/(U·L ⁻¹)	MDA/(nmol·L ⁻¹)
对照组	10.49 ± 6.29	23.57 ± 13.34	17.93 ± 4.94	2.65 ± 0.15
沸石	20.41 ± 4.56	23.50 ± 6.56	11.05 ± 2.36	2.76 ± 0.16
斜发沸石	17.20 ± 10.17	24.30 ± 2.08	13.69 ± 2.49	2.46 ± 0.26
硅灰石	25.86 ± 10.80	27.00 ± 10.73	9.16 ± 5.57	3.03 ± 0.37
纤状硅灰石	25.04 ± 4.16	20.00 ± 4.31	13.24 ± 3.43	2.46 ± 0.26
土状坡缕石	47.09 ± 7.93**	80.50 ± 13.23*	6.67 ± 2.09**	3.77 ± 0.18**
纤状坡缕石	44.73 ± 4.39**	87.70 ± 21.23**	14.75 ± 3.76	2.90 ± 0.30
土状海泡石	42.55 ± 5.14**	76.80 ± 10.50**	18.22 ± 3.68	2.77 ± 0.12
纤状海泡石	37.28 ± 3.73**	23.25 ± 4.03	14.75 ± 3.76	2.54 ± 0.23
块状水镁石	52.93 ± 10.52**	80.50 ± 15.29**	4.58 ± 1.89**	3.90 ± 0.34**
纤状水镁石	47.43 ± 4.83**	97.50 ± 22.89**	7.39 ± 2.49**	3.23 ± 0.17*
蛇纹石	30.50 ± 6.82*	12.00 ± 2.27	13.46 ± 2.37	2.66 ± 0.20
纤状蛇纹石	49.00 ± 4.83**	92.70 ± 9.00**	5.26 ± 2.06**	4.33 ± 1.05**

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

4 结论与讨论

(1) 纤维状矿物粉尘的细胞毒性大于颗粒状矿物粉尘。矿物粉尘与细胞的相互作用是一个非常复杂的过程,矿物粉尘所表现出来的细胞毒性是多种因素共同作用的结果。实验表明,不同种类的矿物对肺泡巨噬细胞产生的毒性不同,而不同形态的同种矿物产生的细胞毒性也不完全相同。总的来说,纤维状矿物的细胞毒性大于颗粒状矿物,可以说形态是影响矿物与细胞相互作用的因素之一,这可能主要是因为纤维状粉尘结晶度高,而通常纤维的结晶度及其保留的持久性是机械破坏细胞组织的主要因素。但细胞毒性主要是由矿物本身的特性决定的。

(2) 粉尘中的活性OH⁻含量与细胞毒性成正相关。6种矿物粉尘在悬液中电离出不同的活性基团。沸石不能电离出OH⁻,硅灰石可在电离后水解生成部分OH⁻;海泡石、坡缕石能电离出OH⁻,但电离度较低,细胞毒性较小;水镁石、蛇纹石能电离出OH⁻,而且可发生多级电离,电离度高,表现出较强的细胞毒性,可见矿物的OH⁻及其活性数量与细胞毒性有关。OH⁻近年来被认为是OH(羟基自由基)在溶液中存在的形式,它能引起细胞膜脂质

过氧化, 导致细胞膜破裂, LDH 漏出到细胞外^[3,4]。表 3 结果显示, 存在电离 OH^- 的样本, 其脂质过氧化的主要产物 MDA 增高, 自由基清除剂 SOD 活性降低。

(3) 粉尘所形成的高 pH 值环境不利于细胞的生存。粉尘的 pH 值影响粉尘自身环境的稳定性和对细胞的破坏力, 高 pH 值对细胞的生存是不利的; 水镁石、硅灰石、蛇纹石的 pH 值较高, 稳定的平衡 pH 值可达 10 左右。因此, 对不含硅的水镁石粉尘, 巨噬细胞的死亡率与其自身的电离、水解引起培养环境 pH 值变化而不利于细胞存活有关。

(4) 粉尘的细胞毒性并非一定与 SiO_2 含量正相关。有人认为细胞毒性与粉尘所含游离 SiO_2 的含量有关^[5]。表 1 所列为矿物粉尘中的结构化合 SiO_2 , 结合表 3 中的生化检测数据可以看出, 含硅最高的斜发沸石其细胞毒性并不是很高, 基本不含硅的水镁石粉尘却具有一定的化学活性和细胞毒性。因此, 细胞毒性并非一定与 SiO_2 含量相关, 粉尘中的主要元素在生化过程中的作用也不容忽视。

(5) 粉尘的变价元素含量可影响细胞毒性。从表 3 所列的生化指标可以看出, 水镁石与其他样品不同, 其细胞死亡率、LDH、SOD、MDA 与对照组相比均有明显差异。水镁石的 pH 值与蛇纹石、硅灰石相近, 化学稳定性亦与之相当, 而且不含人们通常认为有细胞毒性的 SiO_2 , 它在试验中表现出活跃的生物活性主要与其活跃的化学活性有关, 即其自身在电离溶解过程中有变价元素 Fe^{2+} 的放出(见表 2)。放出的 Fe^{2+} 在溶液中会快速发生氧化反应而破坏生化平衡。

(6) 低生物持久性的粉尘对细胞是安全的。6 种矿物在悬液中的溶度积不同(见表 2), 其中水镁石、蛇纹石溶度积大, 在中性水体环境中(如培养液)有较强的自溶能力。粉尘的 pH 值、化学组成及溶度积基本反映了其生物持久性趋势。生物持久性与细胞毒性相关^[6], 低生物持久性对细胞是安全的。

参 考 文 献

- 1 Jolicoeur C, Poisson D. Surface Physico-Chemical studies of chrysotile asbestos and related mineral. *Toxicol Appl. Pharmacol.* 1987, 142(10): 1~ 47.
- 2 Myrvik Q N. Studies on pulmonary alveolar macrophages from normal rabbit: a technique to produce them a high state of purity. *J. Immunol.* 1961, 61: 128~ 131.
- 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. *中国环境科学*, 1999, 19(5): 466~ 468.
- 4 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损伤的机制研究. *川北医学院学报*, 1999, 14(1): 2~ 4.
- 5 Gormley I P, Collings P, Davis J M G, et al. An investigation into the cytotoxicity of respirable dusts from British collieries. *British J. Experimental Pathology*, 1979, 60: 525~ 535.
- 6 董发勤, 万朴, 宋功保, 等. 矿物纤维粉尘的表面特性及对生物活性的影响. *地质科技情报*, 1997, 16(3): 77~ 81.

VITRO Cytotoxicity Investigation of Fibrous and Grainy Mineral Dusts

Deng Jianjun¹, Dong Faqin², Wu Fengchun¹, Pu Xiaoyun³,
John Huang⁴, Zhao Shiquan¹

(1 The Fourth People's Hospital of Mianyang City, Mianyang 621000; 2 Southwest Institute of Technology, Mianyang 621000; 3 The Third Military Medical University, Chongqing 400038; 4 Laurentian Univ., Canada P3E 2C6)

Key words: fibrous mineral; grainy mineral; dust; pulmonary alveolar macrophage; cytotoxicity

Abstract

In order to study the damaging mechanism of pulmonary alveolar macrophages, the changes of their death ratio, malondialdehyde (MDA) content and activities of dehydrogenase (LDH) and superoxide dismutase (SOD) were determined, and the technique of VITRO cell culture was used to investigate the cytotoxicity of dusts of six minerals (twelve crystal habits) from twelve mineral deposits. The results show that wollastonite and zeolite have no cytotoxicity while dusts of other fibrous and grainy minerals may damage pulmonary alveolar macrophages in various degrees. The cytotoxicity of fibrous mineral dust exceeds that of the grainy one; the cytotoxicity of dust is positively correlated with the active OH^- content in dust, but not necessarily so with its SiO_2 content; the high pH values produced by dust is unfavorable for the survival of cells; the dust with a low bio-resistance is safe for cells; the content of variable valency elements may influence cytotoxicity. It is suggested that the shape of mineral dusts is one of the factors affecting cytotoxicity, and that the cytotoxicity of mineral dusts mainly depends on its properties.