

几种化合物改变纤维海泡石 对红细胞毒性初探*

邓建军¹⁾ 董发勤²⁾ 吴逢春¹⁾ 李国武²⁾ 赵世泉¹⁾ 庄稼²⁾

(1—四川省绵阳市第四人民医院, 绵阳 621000; 2—西南工学院, 绵阳 621002)

主题词 纤维海泡石 阳离子交换 Gamble 溶液 有机酸 尼古丁 溶血 脂质过氧化

提要 纤维海泡石对红细胞有毒性。本文采用阳离子交换、Gamble 溶液、有机酸及尼古丁处理纤维海泡石, 观察处理前后红细胞的溶血率及脂质氧化的主要产物丙二醛(MDA)的变化。结果显示: 经过阳离子交换及 Gamble 溶液处理, 纤维海泡石对红细胞的毒性显著降低, 其机制可能是延长了界膜形成时间, 降低了脂质氧化的强度; 有毒物质, 如尼古丁的参与则增强了海泡石对红细胞的毒性; 有机酸处理对红细胞的毒性影响不明显。

海泡石作为一种原料, 在工业上得到广泛的应用。纤维海泡石的产出不如土状海泡石那样广泛, 两者经加工生产成粉体(或其他方式形成粉尘)后均呈微纤维形态。西班牙有世界上最大的沉积海泡石矿, 欧洲学者曾对其粉尘的安全性作过流行性病学调查和动物实验^[1]。日本的 K. Kobayama 博士断言, 中国的纤维海泡石毒性大于其他国家的沉积型海泡石^[1], 这对我国的纤维海泡石矿利用及其制品的出口是极为不利的。用人工方法改变矿物的成分或结构特征是优化矿物性能的重要方法之一, 它可以进一步满足生产对矿物材料质量和功能的要求, 扩大其使用领域, 并大大增加其经济价值^[2], 另外可以提供改变矿物材料细胞毒性和生物活性的改性处理方法。本文采用阳离子交换、Gamble 溶液、有机酸及尼古丁处理纤维海泡石, 观察其处理前后对人的红细胞(RBC)的毒性变化, 探讨 RBC 受损的机制, 并评价纤维海泡石的安全性。

1 实验样品

1.1 粉尘制备与处理

1.1.1 超细粉尘制备

研究所用纤维海泡石采自湖北广济, 由超声分散制成超细粉尘(西南工学院提供)。经光学显微镜观察, 直径 $< 3 \mu\text{m}$ 、长径 $< 15 \mu\text{m}$ 的纤维占90%以上。

1.1.2 阳离子交换

用 $w = 20\%$ 的 HCl、 NH_4Cl 、 NaCl 、 KCl 、 CaCl_2 各 100 ml, 分别加入上述超细粉尘样 1 g, 98 °C 煮沸, 每 1 h 振荡一次, 沙浴保温恒定 8 h, 并保持作用前后溶液体积恒定。

* 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 1999-12-21, 改回日期 2000-06-26

1.1.3 Gamble 溶液处理

粉尘 1 g 置于管内容积为 50 ml 的自制密封聚丙烯塑料管内, 将 Gamble 缓冲溶液(pH 值分别为 3, 5, 7) 以 5 ml/h 的流速连续动态作用 96 天, 保持温度为 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 。

1.1.4 有机酸处理

2% 柠檬酸、4% 酒石酸、2% 乙酸、4% 草酸(上述浓度化学吸附活性最大) 各 50 ml, 加粉尘 1 g, 静置 24 h, 温度为 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 。

将上述 4 种超细粉尘及其处理样品洗涤、过滤、烘干, 紫外灯下照射 4 h, 用无菌生理盐水配成 20 g/L 的粉尘悬液^[3]。

1.2 RBC 悬液制备

将健康成人“O”型新鲜全血(由绵阳市中心血站提供)离心 10 min(1500 r/min), 弃上清液, 用无菌生理盐水洗涤三次, 配成 20% 的 RBC 悬液。

2 实验方法

取上述 RBC 悬液 2 ml 入试管, 分别加入上述各粉尘悬液 0.5 ml; 尼古丁管加美国进口纯尼古丁, 并使其最终浓度为 0.3% (尼古丁能使 RBC 溶血的最低浓度为 0.6%)。摇匀, 置于 37°C 水浴中孵育 3 h。作用期间每 15 min 反复振荡 5 次。作用完毕取出, 以 1500 r/min 的转速离心 15 min, 收集上清液备用。用日本产溶血剂作全溶对照, 生理盐水作自溶对照。

取上清液 0.2 ml, 加生理盐水 1.0 ml, 混匀。用 ISP- II 型半自动生化分析仪测吸光度, 波长 546 nm。按公式:

$$\text{溶血率} = \frac{\text{粉尘管吸光度} - \text{自溶管吸光度}}{\text{全溶管吸光度} - \text{自溶管吸光度}} \times 100\% \quad \text{计算溶血率。}$$

另取上述上清液作 MDA 分析, 试剂由南京建成生物研究所提供, 按说明书操作。每次实验重复 3 次, 实验结果以 \bar{x} (测试数据平均值) $\pm s$ (数据误差) 方式表示, 测定数据以 t 检验处理表示各组间差异显著性。

3 实验结果

(1) 如表 1 所示, 纤维海泡石对 RBC 存在毒性, 其溶血率为 10.61%, 对 RBC 膜有脂质过氧化损伤, 脂质过氧化的产物 MDA 高达 10.85 nmol/L, 而经 H^+ , NH_4^+ , K^+ , Na^+ , Ca^{2+} 五种阳离子交换后的纤维海泡石对 RBC 的毒性显著降低, 与未经处理的纤维海泡石相比, 差异具极显著性 ($P < 0.05$, 见表 1)。

表 1 阳离子交换对纤维海泡石溶血能力的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 1 The effect of cation exchange on the hemolytic capacity of fibrous sepiolite ($\bar{x} \pm s$)

样品	溶血率/%	MDA/(nmol·L ⁻¹)
纤维海泡石原样	10.61 ± 2.56	10.85 ± 2.06
H ⁺ 型纤维海泡石	3.51 ± 1.07**	4.81 ± 1.36*
NH ₄ ⁺ 型纤维海泡石	2.75 ± 1.05**	4.69 ± 1.26*
K ⁺ 型纤维海泡石	3.20 ± 0.95**	4.59 ± 1.05*
Na ⁺ 型纤维海泡石	1.18 ± 0.63**	1.56 ± 0.75**
Ca ²⁺ 型纤维海泡石	1.79 ± 0.90**	1.75 ± 0.34**

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

(2) 经 pH = 3 和 pH = 5 的 Gamble 溶液处理后, 纤维海泡石降低了对 RBC 的溶血率及 MDA 值, 与处理前比较差异有显著性 ($P < 0.05$)。而用 pH = 7 的 Gamble 溶液处理纤维海泡石则无显著性(见表 2)

(3) 经 2% 柠檬酸、4% 酒石酸、2% 乙酸、4% 草酸处理的纤维海泡石与处理前比较差异无显著性; 而加 0.3% 的尼古丁处理后, RBC 的溶血率及 MDA 值均增加, 与处理前比较, 差异有显著性(见表 3)。

4 讨论

海泡石是一种富镁的含水层链状结构硅酸盐矿物, 其硅氧四面体二维连续, 活性氧指向沿 b 轴方向, 并周期性地反转, 与 OH^- 呈紧密堆积, 阳离子 (Mg^{2+} , Ca^{2+} 等) 填充于空隙中。来源于湖北广济的纤维海泡石经超细加工后, 在中性水体环境中含有 OH^- , $-\text{Si}-\text{O}^-$ 等活性基团, 而 OH^- , $-\text{Si}-\text{O}^-$ 近年来被称为流体自由基, 一方面它们攻击 RBC 上的多聚不饱和脂肪酸, 发生一系列氧化连锁反应, 引起细胞膜脂质过氧化损伤^[4,5]; 另一方面, $-\text{Si}-\text{O}^-$ 极易与 RBC 膜上的正电性基团, 如卵磷脂分子中的 $-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ 结合形成共价键, 使细胞膜破坏, 导致 RBC 溶解^[6], 使纤维海泡石表现出对 RBC 的毒性。

由于湖北广济的超细纤维海泡石带有 -60.6 mV 的表面电动电位及 $327 \text{ m}^2/\text{g}$ 的大比表面积, 因此, 具有良好的吸附性能和一定的离子交换容量, H^+ , NH_4^+ , K^+ , Na^+ , Ca^{2+} 都能与海泡石中的 Mg^{2+} (少量 Ca^{2+}) 进行交换, 如 $\text{H}^+ = \text{Mg}^{2+} + \text{e}$, $\text{K}^+ = \text{Mg}^{2+} + \text{e}$, $\text{Ca}^{2+} = \text{Mg}^{2+}$ 。随着交换的进行, 表面电荷与表面空位减少, 电动电位降低, 交换量下降, 直至达到交换平衡。发生阳离子交换后, 纤维海泡石表面的吸附力及化合键作用力减弱, 与 RBC 的相互作用减弱, 延长了界/膜形成时间, 同时降低了脂质过氧化, 故对 RBC 的毒性显著降低了。

在 pH 值分别为 3, 5, 7 的三种缓冲对控制下的 Gamble 溶液中, 纤维海泡石内的 Ca^{2+} , Mg^{2+} 能缓慢地溶出, 溶出作用既有阳离子交换, 也有在酸性条件下的中和反应溶解, 因此, 作用 96 天后, 纤维海泡石的形态、成分、细度、表面官能团、表面电性等均发生变化, 表现为吸附能力下降, 可产生脂质过氧化的核素如 OH^- , $\text{Si}-\text{O}$ 减少, 故对 RBC 的毒性降低了。在 pH 值为 3 或 5 的缓冲体系中的溶出能力远大于在 pH 值为 7 的缓冲体系中的溶出能力, 实

表 2 Gamble 溶液处理前后海泡石对 RBC 的毒性 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of the RBC toxic effects of sepiolite before and after its treatment by Gamble solution ($\bar{x} \pm s$)

样 品	溶血率/%	MDA/($\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)
处理前	10.61 \pm 2.56	10.85 \pm 2.06
处理后		
pH _{Gamble} = 3	5.71 \pm 1.85*	5.07 \pm 0.83*
pH _{Gamble} = 5	5.19 \pm 1.31*	5.89 \pm 1.35*
pH _{Gamble} = 7	9.27 \pm 2.15	8.51 \pm 1.71

* $P < 0.05$ 。

表 3 有机酸处理影响海泡石对红细胞毒性的实验结果 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 The effects of several organic acids on RBC toxicity of sepiolite ($\bar{x} \pm s$)

样 品	溶血率/%	MDA/($\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)
处理前	10.61 \pm 2.65	10.85 \pm 2.06
处理后		
2% 柠檬酸	9.21 \pm 1.75	8.35 \pm 1.63
4% 酒石酸	10.56 \pm 2.03	8.46 \pm 2.10
2% 乙酸	10.62 \pm 1.78	7.62 \pm 1.85
4% 草酸	8.21 \pm 2.30	8.44 \pm 1.71
0.3% 尼古丁	14.57 \pm 1.88*	15.00 \pm 2.16*

* $P < 0.05$ 。

验表明, 溶出能力与细胞毒性有一定的负相关关系。

纤维海泡石在有机酸溶液中阳离子溶出不明显, 原因是有机酸均为弱酸, 存在多级电离; 含羟羧酸, 如柠檬酸、酒石酸又可电离出 OH^- 和 H^+ 等多种离子, 溶解和阳离子交换作用受到限制, 作用速度不如无机酸中那样迅速, 再加上纤维海泡石的结晶度较高, 作用时间较短(相对 96 天), 其结果是对纤维海泡石的表面特征破坏不明显, 故对 RBC 的影响也不明显。

有毒物质(如尼古丁)的参与, 则增强了纤维海泡石对 RBC 的毒性, 其机制可能是增强了脂质过氧化反应。表明尼古丁对纤维海泡石具有毒性协同作用, 这与流行病学调查所得出的吸烟对矿物粉尘有毒性协同作用的结论是一致的^[1]。

参 考 文 献

- 1 Santaren J, Alvaraz A. Assessment of the Health Effects of Mineral Dusts. *Industrial Minerals*, 1994, 319: 101~109.
- 2 董发勤. 矿物的表面性质. 应用矿物学. 武汉: 武汉工业大学出版社, 1993, 21~30.
- 3 吴卫东, 刘树春. 沸石尘体外细胞毒性研究. *职业医学*, 1992, 19: 76~77.
- 4 邓建军, 董发勤, 蒲晓允, 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): 486~488.
- 5 杜泽吉. 自由基介导的组织损伤机制. *国外医学卫生学分册*, 1992, 2: 79~83.
- 6 胡继岳, 谢吉民, 陈荣三. 石英对细胞内游离钙、镁的影响. *中华劳动卫生职业病杂志*, 1993, 11(6): 347~350.

Modification of RBC Toxicity of Fibrous Sepiolite by Several Substances

Deng Jianjun¹, Dong Faqin², Wu Fengchun¹, Li Guowu², Zhao Shiquan¹, Zhuang Jia²

(1. The Fourth Hospital of Mianyang City, Mianyang 621000;

2. Southwest Institute of Technology, Mianyang 621002)

Key words: fibrous sepiolite; cation exchange; Gamble solution; organic acid; nicotine; hemolysis; superoxide dismutase

Abstract

Fibrous sepiolite has cytotoxicity to human erythrocyte. In order to evaluate the hemolysis of fibrous sepiolite from Guangji of Hubei Province, the fibrous sepiolite was treated by cation exchange, Gamble solution, organic acid and nicotine, and then the changes of the percentage of hemolysis and malandialdehyde (MDA) —the main product of superoxidation of lipids— before and after the treatment were observed. The results indicate the following: the RBC toxicity of fibrous sepiolite treated by cation exchange and Gamble solution decreases significantly and its possible mechanism is to decrease the intensity of lipid superoxidation and prolong the time of surface/membrane formation; the RBC toxicity of fibrous sepiolite increases significantly in the presence of nicotine; while fibrous sepiolite treated by organic acid has insignificant effect on human erythrocyte.