

# 螺旋藻抗石英尘对肺泡巨噬细胞影响的实验研究

徐永芳 吴开国 杨莉 吴超伟 袁秀玲

**摘要** 目的 观察不同时点螺旋藻对染尘肺泡巨噬细胞的保护功能。方法 采用肺泡巨噬细胞体外培养方法。结果 随培养时间延长, 各组 LDH、MDA 含量均明显升高, SOD 含量均明显下降, 尤其在 12 小时前变化较明显, 但经 SP 处理的两组则有明显的拮抗作用; 表现在: 各孵育时点 SiO<sub>2</sub> 组 LDH、MDA 含量最高, SOD 最低, 其次分别为 SiO<sub>2</sub>+SP、生理盐水组、SP 组, 各组 LDH、MDA、SOD 含量经统计学处理均有显著性差异 (P<0.01)。结论 (1) SP 具有提高染尘 PAM 体外抗氧化水平和保护 PAM、增强 PAM 吞噬功能作用。(2) SP 提高 PAM 体外抗氧化水平作用可能与其含有丰富营养成分有关。

**关键词** 螺旋藻 肺泡巨噬细胞 脂质过氧化 石英尘

**Experimental Studies on Effects of Spirulina on Anti-damage to Pulmonary Alveolar Macrophage Caused by Quartz Dust** Xu Yongfang\*, Wu Kaiguo, Yang Li, et al. \*Nanning City Health and Anti-epidemic Station. Guangxi 530011

**Abstract Objective** To study the protective effects of spirulina on pulmonary alveolar macrophage exposed to quartz dust at different time. **Methods** Alveolar macrophage was cultured in vitro and its levels of LDH MDA and SOD were determined. **Results** Levels of LDH and MDA in the alveolar macrophage elevated and level of SOD reduced significantly with the duration of culture especially before 12 hours for culture. But treatment with spirulina had obviously antagonist effects on it. Content of LDH and MDA reached the highest and that of SOD the lowest in those treated with silica dust, as compared with those treated with silica and spirulina, and with normal saline or with spirulina. There was significant difference in levels of LDH, MDA and SOD between different treatments (P<0.01). **Conclusion** It suggested that spirulina could increase anti-oxidation in vitro of alveolar macrophage exposed to silica protect it and improve its phagocytosis which could be attributed to its rich nutritional components.

**Key words** Spirulina, Pulmonary alveolar macrophage, Silica, LDH, MDA, SOD

РУЯВСН<sup>[1]</sup> 等提出, SiO<sub>2</sub> 可启动肺泡巨噬细胞膜表面的脂质过氧化 (LPO) 自由基链锁反应, 从而使巨噬细胞受损, 释放许多活性因子引起肺部进行性纤维化, 这是矽肺发病的重要环节之一。因此, 阻断或抑制 SiO<sub>2</sub> 引起的脂质过氧化反应, 对矽肺的治疗或保健具有重要意义。螺旋藻 (SP) 含有丰富的优质植物蛋白、不饱和脂肪酸、多糖和具有清除自由基作用的维生素 E、β-胡萝卜素、Vit C 及人体必需的微量元素 Se、Zn、Mn、Cu、Fe 等<sup>[2]</sup>, 具有抗氧化<sup>[3,4]</sup> 作用。体内实验已证明螺旋藻具有提高实验性矽肺大鼠体内抗氧化水平和保护细胞膜性结构的作用<sup>[5]</sup>。螺旋藻是否同样具有提高染尘肺泡巨噬细胞 (PAM) 体外抗氧化水平及膜性结构, 国内迄今未见报道。本文采用体外培养方法观察螺旋藻对染尘肺泡巨噬细胞膜脂质过氧化影响, 同时观察对抗氧化的损伤作用, 进一步研究螺旋藻拮抗粉尘毒作用的机理, 为螺旋藻应用于矽肺

的营养保健和辅助治疗提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂及配方

1.1.1 石英粉尘悬液 采用标准石英粉尘, 由中国预防医学科学院劳卫所提供, 含游离 SiO<sub>2</sub>98% 以上, 99% 粒径小于 5μm, 用去离子生理盐水配成 3mg/ml 的石英尘悬液。

1.1.2 螺旋藻液 螺旋藻干粉由广西北海市绿海生物保健食品有限公司提供, 研磨成单个螺旋后, 配成 4mg/ml 溶液, 过滤除残渣, 巴氏消毒 62~65℃, 30 分钟。

1.1.3 RPMI-1640 培养液 采用美国生产 RPMI-1640 培养基干粉, 溶于三蒸水中, G6 玻璃滤器灭菌分装, 用时加 10% 灭活小牛血清 (含 1% 单抗 100U/ml 庆大霉素)。

1.1.4 氧化型辅酶 I 由中科院上海生化所提供, 超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA) 试剂盒由南京聚力生物医学工程研究所提供。

### 1.2 动物及其处理

作者单位: 530011 南宁市卫生防疫站 (徐永芳), 广西医科大学 (吴开国、杨莉、吴超伟、袁秀玲)

1. 2. 1 实验动物 由广西医科大学动物实验中心提供的健康雄性 Wistar 大鼠, 体重 250g 左右, 鼠龄 3 个月。

1. 2. 2 肺泡巨噬细胞收集、纯化 基本上按 Myrvik 的方法收集肺泡巨噬细胞。用含 10% 小牛血清 RPMI-1640 培养液 (加 1% 单抗) 将沉淀细胞稀释为  $1 \times 10^6$  /ml, 分装到内含有小玻片的青霉素小瓶中, 每瓶 3ml 置 37℃ 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中进行贴壁培养 1 小时。

1. 2. 3 实验分组 待细胞贴壁后, 倾去原培养液, 分组见表 1。

表 1 实验分组

组别	RPMI-1640	成 分
生理盐水组	2. 7ml	0. 3ml(N. S)
石英组	2. 7ml	0. 3ml SiO <sub>2</sub> 液(内含 SiO <sub>2</sub> 300 <sup>μ</sup> g/ml)
SP	2. 7ml	0. 3ml SP 液(内含 SP 400 <sup>μ</sup> g/ml)
SP+SiO <sub>2</sub>	2. 4ml	0. 3ml SiO <sub>2</sub> + 0. 3ml SP 液(内含 SiO <sub>2</sub> 300 <sup>μ</sup> g/ml, SP 400 <sup>μ</sup> g/ml)

每组 5 个样本, 于 37℃ 5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养 4、8、12、18、24 小时后取出, 取出小玻片固定、染色, 将培养液离心取上清液作指标测定。

1. 3 检测指标及实验方法

1. 3. 1 培养液中乳酸脱氢酶 (LDH) 活性测定 用 2, 4-二硝基苯法。

1. 3. 2 培养液中 SOD 活性测定 化学比色法。酶定义: 每毫升反应液中 SOD 抑制率达 50% 时所对应的一个 SOD 量为一个亚硝酸盐单位 (nU/ml)。

1. 3. 3 培养液中 MDA 含量测定 化学比色法。单位 nm/ml。

1. 3. 4 细胞形态变化观察 取出小玻片用 camoy 液固定 30 分钟, 用姬姆萨染色 15 分钟, 冲洗干净, 晾干在油镜下观察拍片。

1. 4 实验数据处理 采用华西医科大学研制统计软件包进行方差分析及 Q 检验。

2 结果

2. 1 培养液中 LDH 的活性

见表 2。各组培养液中随时间延长 LDH 活性不断升高, 各组培养液中 LDH 的活性 (除 4、8 小时生理盐水组和 SP 组无统计学差异外,  $P > 0.05$ ) 经统计检验差异均有显著意义 ( $P < 0.01$ ), SiO<sub>2</sub> 组 LDH 的活性是最高的, 其次 SiO<sub>2</sub>+SP、生理盐水组, SP 组最低。

表 2 不同孵育时间 (小时) LDH 活性比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

活力单位/100ml

组 别	孵 育 时 间				
	4	8	12	18	24
(1)生理盐水组	140. 36±19. 81	180. 00±25. 89	247. 00±30. 13	291. 11±31. 30	320. 50±36. 43
(2) SiO <sub>2</sub>	230. 98±20. 01	300. 80±29. 11	377. 50±35. 03	436. 19±31. 69	485. 19±31. 91
(3) SP	123. 45±14. 56	150. 20±27. 27	170. 91±29. 47	200. 11±27. 14	230. 10±28. 98
(4) SP+SiO <sub>2</sub>	178. 49±19. 23	228. 00±20. 86	306. 50±33. 56	369. 20±30. 71	380. 00±31. 00
F 值	0. 0000	0. 0000	0. 0000	< 0. 01	< 0. 01
q 检验	1:2 * 2:3 ** 1:3 2:4 ** 1:4 * 3:4 **	1:2 * 2:3 ** 1:3 2:4 ** 1:4 * 3:4 **	1:2 * 2:3 ** 1:3 * 2:4 ** 1:4 * 3:4 **	1:2 * 2:3 ** 1:3 * 2:4 ** 1:4 * 3:4 **	1:2 * 2:3 ** 1:3 * 2:4 ** 1:4 * 3:4 **

注: n=5. \*\* P<0.01.

2. 2 培养液中 SOD 含量

见表 3。各实验组随着培养时间的延长 SOD 活性下降, 尤其 SiO<sub>2</sub> 组下降明显, 由 4h 的 7. 50 下降到 24h 的 3. 30, 下降了两倍多, 同一时间, SiO<sub>2</sub> 组

与各组比较差异均有显著意义 ( $P < 0.01$ ) (除 4h 点 SiO<sub>2</sub> 与 SP+SiO<sub>2</sub>,  $P > 0.05$ )。SOD 下降最快的为 SiO<sub>2</sub> 组, 其次为 SP+SiO<sub>2</sub> 组, 生理盐水、SP 组在实验过程中下降较平缓。

表 3 不同孵育时间 (小时) 培养液中 SOD 活性比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

nU/ml

组 别	孵 育 时 间				
	4	8	12	18	24
(1)生理盐水组	9. 00±0. 85	8. 58±0. 94	7. 80±0. 83	7. 48±1. 02	7. 28±0. 90
(2) SiO <sub>2</sub>	7. 50±0. 64	5. 09±0. 96	4. 16±0. 79	3. 64±0. 54	3. 30±0. 41
(3) SP	12. 08±1. 00	11. 28±1. 01	10. 40±1. 41	9. 44±1. 25	9. 00±0. 96
(4) SP+SiO <sub>2</sub>	8. 51±0. 95	7. 00±0. 71	6. 28±0. 73	6. 07±0. 80	5. 72±0. 89
F 值	< 0. 01	< 0. 01	< 0. 01	< 0. 01	< 0. 01
q 检验	1:2 * 2:3 ** 1:3 * 2:4 ** 1:4 3:4 **	1:2 * 2:3 ** 1:3 * 2:4 ** 1:4 * 3:4 **	1:2 * 2:3 ** 1:3 * 2:4 ** 1:4 * 3:4 **	1:2 * 2:3 ** 1:3 * 2:4 ** 1:4 * 3:4 **	1:2 * 2:3 ** 1:3 * 2:4 ** 1:4 * 3:4 **

注: n=5. \* P<0.05, \*\* P<0.01.

### 2. 3 培养液中MDA含量

见表4。MDA变化与SOD变化方向刚好相反。各组培养液中MDA的含量随培养时间的延长而升

高，SiO<sub>2</sub>组MDA与各组MDA含量在统计学上差异均有显著意义(P<0.01)，MDA含量最多的是SiO<sub>2</sub>组，其次是SP+SiO<sub>2</sub>，SP组含量最低。

表4 不同孵育时间(小时)培养液中MDA含量( $\bar{x} \pm s$ )

nm/ml

组别	孵 育 时 间				
	4	8	12	18	24
(1)生理盐水组	1.25±0.074	1.45±0.053	1.70±0.034	1.91±0.100	2.00±0.134
(2)SiO <sub>2</sub>	1.57±0.089	1.88±0.086	2.35±0.098	2.50±0.140	2.60±0.156
(3)SP	1.20±0.068	1.35±0.064	1.40±0.030	1.63±0.086	1.90±0.120
(4)SP+SiO <sub>2</sub>	1.35±0.083	1.67±0.076	1.93±0.041	2.11±0.098	2.23±0.150
F值	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
q检验	1:2**2:3** 1:3 2:4** 1:4 3:4*	1:2**2:3** 1:3**2:4** 1:4**3:4**	1:2**2:3** 1:3**2:4** 1:4**3:4**	1:2**2:3** 1:3**2:4** 1:4**3:4**	1:2**2:3** 1:3 2:4** 1:4* 3:4**

注: n=5。\*P<0.05, \*\*P<0.01。

### 2. 4 PAM形态油镜下观察

2.4.1 生理盐水组 PAM大小较一致，细胞呈圆形或椭圆形，胞膜完整，胞质均匀，胞核小，圆形或椭圆形着色较深，多偏于细胞一侧。

2.4.2 石英尘组 可见较多PAM破裂。有的细胞膜不完整，胞质呈空泡状，结构紊乱，核浓缩；有的呈圆形，较小，细胞表面网眼性结构较多，完好PAM形态不规则。

2.4.3 SP组 PAM形态完好，胞膜完整，可见较多指状伪足突起，胞质丰富、均匀，核大。

2.4.4 SP+SiO<sub>2</sub> 较多细胞完整，有的胞内可见较多SiO<sub>2</sub>尘粒，胞膜仍完整。

### 3 讨论

脂质过氧化是指发生在不饱和脂肪酸侧链的链锁反应，由自由基启动，它和许多病理生理过程有关，其中间产物自由基和最终分解产物——丙二醛蓄积可造成机体细胞损伤和功能异常，较重要的自由基有：超氧阴离子(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)、过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)、羟自由基(°OH)、单线态氧(<sup>1</sup>O<sub>2</sub>)。Shi等<sup>[6]</sup>证明SiO<sub>2</sub>是通过°OH、O<sub>2</sub><sup>-</sup>等中介作用引起LPO。PAM膜发生脂质过氧化，引起细胞结构和功能一系列改变，细胞膜通透性增强，甚至细胞崩解死亡，导致细胞内容物渗漏到细胞外。本实验中各时点的SiO<sub>2</sub>组，LDH的含量显著高于其他3组(P<0.01)，尤其12小时前LDH升高较明显，说明早期细胞受损破坏较严重，而加有SP的SiO<sub>2</sub>组LDH的含量明显低于单纯的SiO<sub>2</sub>组(P<0.01)，提示SP具有拮抗SiO<sub>2</sub>脂质过氧化引起的细胞损伤作用。保护细胞结构的完整性，使PAM免受损伤，提高机体免疫力。

SOD是一种抗氧化酶，对O<sub>2</sub><sup>-</sup>的灭活是通过歧化反应进行的，SOD还能调节H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的浓度，达到防御

自由基损伤的目的。SOD、CAT、GSH-Px一起通过清除自由基O<sub>2</sub><sup>-</sup>、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>可减轻或阻止脂质过氧化一级触发反应。本实验中，SiO<sub>2</sub>引起膜脂质过氧化作用增强，消耗大量SOD，而使石英组SOD活性明显下降，MDA含量明显升高，这与刘保连报道较一致<sup>[7]</sup>。而加有SP的SiO<sub>2</sub>组，SOD下降较轻，MDA升高也低于SiO<sub>2</sub>组，两者经统计学处理(P<0.01)。有意义的是螺旋藻在体外也可以提高正常细胞抗氧化水平，SP组在整个实验期间MDA都是最低，SOD最高，这与杨莉等<sup>[8,9]</sup>报道螺旋藻具有提高正常大鼠SOD活性，降低MDA含量的抗氧化作用的结果相一致。国外也有报道<sup>[10,11]</sup>螺旋藻能稳定细胞膜、增强巨噬细胞吞噬功能，提高巨噬细胞抗氧化能力。

螺旋藻具有拮抗膜的脂质过氧化作用，可能与螺旋藻的营养成分密切相关。SP富含蛋白质、不饱和脂肪酸、活性多糖和具有清除自由基作用的VitC、VitE、β-胡萝卜素与多种微量元素Zn、Se等有关。β-胡萝卜素通过猝灭单线态氧(<sup>1</sup>O<sub>2</sub>)、三线态光化学敏感物和自由基而抑制脂质过氧化反应<sup>[12,13]</sup>。VitE本身是细胞膜组成部分，可与不饱和脂肪酸竞争性地与脂质自由基(LOO°)结合，终止链式反应，既是脂质过氧化反应的阻断剂，又是自由基的清除剂<sup>[14]</sup>。VitC也是自由基清除剂，它可使VitE再生，增加和维持VitE水平<sup>[15]</sup>。多糖具有清除自由基°OH、O<sub>2</sub><sup>-</sup>的能力，减少自由基与核酸、脂类、氨基酸作用机会，具有抗氧化作用<sup>[4,16]</sup>。锌作为构成生物膜的成分，对维持和稳定膜结构和功能起着非常重要作用，外加Zn可以渗入细胞结构。Se通过提高GSH-Px活性具有抗脂质过氧化作用。

以上结果和螺旋藻的成分中可以看出，螺旋藻具

有拮抗SiO<sub>2</sub>引起脂质过氧化作用,在一定程度上减轻了SiO<sub>2</sub>对巨噬细胞损害,保护巨噬细胞膜性结构,对矽肺高危人群营养保健或辅助治疗有一定实用价值。

#### 4 参考文献

- 1 Архипова О Г. 实验性矽肺脂质自由基化反应的改变和寻求病因治疗的基本方向. 国外医学. 卫生学分册, 1985, 2: 76
- 2 左绍远. 螺旋藻的营养价值及其综合利用. 生命化学, 1994, 14 (6): 46
- 3 张惠贞, 梁宏立, 刘金星, 等. 盐藻提取物对尘肺病人抗氧化及细胞免疫功能影响研究. 中国工业医学杂志, 1995, 8 (5): 260
- 4 周志刚, 刘志礼, 刘雪娟等. 极大螺旋藻多糖的分离、纯化及其抗氧化特性研究. 植物学报, 1997, 39 (1): 80
- 5 张中兴, 杨莉, 吴开国. 螺旋藻对实验性矽肺大鼠体内抗氧化水平的作用. 中国工业医学杂志, 1999, 12 (1): 8
- 6 Shi X and Dahl Nc. Abstract of Communications; Viith International Pneumoconiosis Conference 1988; p23; pittsburgh.
- 7 刘保连, 张国高, 等. 氧化性损伤在矽肺发病过程中的作用探讨. 中华预防医学杂志, 1993, 27 (1): 10

- 8 左绍远, 钱金祺 等. 螺旋藻营养片抗衰老抗疲劳的实验研究. 中成药, 1996, 18 (6): 3
- 9 杨莉, 袁秀玲, 吴开国. 螺旋藻抗衰老动物实验研究. 广西医科大学学报, 1993, 增刊: 123
- 10 Qureshi-MA, et al. Dietary Spirulina platensis enhance humoral and cell-mediated immune functions in chickens. Immunopharmacol-Immunotoxicol. 1996, 18 (3): 465
- 11 Wang-ZG, et al. Effects of dietary supplementation on the function of alveolar macrophages of silicosis rats on the blastogenic response of lymphocytes and on the peroxidase activity in blood of silicosis patients. J-Environ-Pathol-Toxicol-Oncol. 1994, 13 (3): 209~212
- 12 Burton GW, Zngold Kr. Beta-carotene: an unusual type of lipid antioxidant. Science. 1984, 224: 569
- 13 Burton GW. Antioxidant action of carotenoids. J Nutr. 1989, 119: 109
- 14 徐承水. 维生素E的抗衰老机理. 生命化学, 1989, 6: 17
- 15 方允中, 等. 主编. 自由基与酶. 第一版. 科学出版社, 1989.
- 16 田晓华, 等. 褐藻硫酸多糖清除活性氧自由基作用及动力学ESR研究. 营养学报, 1997, 19 (1): 32

(收稿: 1999-02-14 修回: 1999-04-09)

## 短期苯接触后发生慢性粒细胞性白血病 1 例报告

于维松 薛加玲 陈艳霞 杨素峰

### 1 临床资料

1.1 病情介绍 常某, 女, 21岁, 外资企业印刷工, 因头晕、乏力3个月于1997年8月19日入院。1996年7月1日至1996年11月26日从事印刷工作近5个月, 接触苯、二甲苯等, 每日工作10小时, 车间通风不良, 防护条件差, 曾2次测定工作环境空气中苯浓度分别为10mg/m<sup>3</sup>及40mg/m<sup>3</sup>, 二甲苯浓度为20mg/m<sup>3</sup>及100mg/m<sup>3</sup>。1996年12月以后从事修理工作, 脱离苯作业。3个月前开始出现头晕、乏力、食欲减退, 有时有左上腹痛, 未予诊治。1周前作职业性体检时见白细胞明显增高167.3×10<sup>9</sup>/L, 1996年6月进厂时检查白细胞8.3×10<sup>9</sup>/L, 遂来我院诊治。

既往健康, 无放射性物质及化学药物接触史, 亦无家族性白血病史。

查体: T36.6℃, P80次/分, R18次/分, BP16/9kPa。轻度贫血貌, 全身皮肤无出血点, 巩膜无黄染; 浅表淋巴结未触及; 胸骨下端压痛。双肺呼吸音清; 心律齐, 未闻及杂音; 腹软, 无压痛, 肝未触及, 脾肋下1.5cm; 生理反射存在, 病理反射未引出。

实验室检查: Hb108g/L, RBC3.47×10<sup>12</sup>/L, WBC159.9×10<sup>9</sup>/L, BPC530×10<sup>9</sup>/L; 末梢血白细胞分类见原粒+早幼粒7%, 中、晚幼粒及杆状核亦有不同程度增高, 淋巴、单核比值低; 中性粒细胞碱性磷酸酶积分1.0, 阳性率1%。骨髓检

查示增生极度活跃; 粒系异常增生, 原粒0.025, 早幼粒0.055, 中幼粒0.11, 晚幼粒0.105, 杆状核0.305, 分叶核0.25, 各阶段细胞比值均高, 以中、晚幼粒及杆状核为主, 且可见白血病细胞分裂相; 红系、单核系、淋巴系增生受抑; 巨核系增生旺盛, 巨核细胞数目增多, 血小板呈大堆分布, 数目增多; 同时可见嗜酸及嗜碱性粒细胞增多。诊断为慢性粒细胞性白血病(慢性期)。

1.2 治疗经过 入院后给予高三尖杉酯碱2mg/d静滴(10天)及羟基脲20g/d口服化疗, 同时给予罗钙全、干扰素等诱导分化及调节机体免疫功能药物。2周后检查白细胞8.9×10<sup>9</sup>/L, 继续服用羟基脲0.5g/d维持治疗。1997年10月起病情加重, 1997年10月15日检查白细胞191.3×10<sup>9</sup>/L; 骨髓象示有核细胞增生极度活跃, 粒系呈恶性增生, 以原始细胞为主, 原粒0.785, 早幼粒0.025, 中幼粒0.035, 晚幼粒0.015, 杆状核0.05, 分叶核0.055; 红系及其余各系增生明显受抑; 组化POX示阳性率6%。符合慢性粒细胞性白血病急粒样变。给予DA(柔红霉素、阿糖胞苷)方案化疗2个疗程及HOAP(高三尖杉酯碱、长春新碱、阿糖胞苷、强的松)方案化疗1个疗程, 病情未缓解, 于1997年12月14日死亡。

### 2 讨论

据文献报道, 苯性白血病的发生多与长时间接触高浓度苯有关, 从接触苯至发生白血病的专业工龄平均11.4(0.8~49.5)年, 且以急性型多见。但本例与文献报道不同, 具有下述特点: (1)苯职业接触史仅半年累计加班 (下转223页)