

温石棉与纤维水镁石矿物粉尘体外细胞毒性对比

吴思源¹, 董发勤², 邓建军^{1*}, 刘俭¹, 何静¹, 刘绪军¹

(1. 绵阳四〇四医院检验科, 四川 绵阳 621000; 2. 西南科技大学, 四川 绵阳 621000)

摘要: 目的 比较温石棉与纤维水镁石矿物粉尘对肺泡巨噬细胞体外细胞毒性来评价纤维水镁石的安全性。方法 采用体外细胞培养技术, 测定细胞死亡率、乳酸脱氢酶及超氧化物歧化酶活力、细胞膜流动性、丙二醛含量, 采用光学显微镜以及扫描电镜观察肺泡巨噬细胞形态变化。结果 温石棉及纤维水镁石均产生了肺泡巨噬细胞毒性。结论 作为温石棉代用品的纤维水镁石对肺泡巨噬细胞的作用也并不是绝对安全的。

关键词: 温石棉; 纤维水镁石; 肺泡巨噬细胞; 细胞毒性

中图分类号: R99 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2007)05-0310-02

Comparative study of the cytotoxicities between chrysotile and fibrous brucite on pulmonary alveolar macrophages in vitro

WU Si-yuan¹, DONG Fa-qin², DENG Jian-jun^{1*}, LIU Jian¹, HE Jing¹, LIU Xu-jun¹

(1. Department of the Clinic Laboratory, The No. 404 People's Hospital of Mianyang City, Mianyang 621000, China;

2. Southwest University for Science and Technology, Mianyang 621000, China)

Abstract Objective To study the cytotoxicities of chrysotile and fibrous brucite on pulmonary alveolar macrophages, and to evaluate and compare the security between the two minerals. **Method** Rabbit pulmonary alveolar macrophages were cultured in vitro, the cell death rate, malandialdehyde (MDA), lactate dehydrogenate (LDH), membrous fluidity and superoxide dismutase (SOD) activity in the cultured cells of different groups were detemined, and the cell shape changes were observed by scanning electron microscopy and light microscopy. **Result** Chrysotile and fibrous brucite had similar degrees of cytotoxicity on pulmonary alveolar macrophages. **Conclusion** Fibrous brucite as a substitute for chrysotile, might not be absolutely safe according to the result of this experiment.

Key words: Chrysotile; Fibrous brucite; Pulmonary alveolar macrophages; Cytotoxicity

中国是世界产量第三的石棉产业国,但由于石棉可引起“石棉肺”从而引发了禁止使用温石棉的社会舆论和行为,使温石棉工业的发展陷入困境。世界各国特别是西方发达国家对温石棉的开采与使用采取严厉的限制措施,鼓励开发温石棉代用品。但安全“石棉代用纤维”是否安全值得研究。纤维水镁石在纤维性、耐热性、绝缘性、耐碱性、抗拉强度等方面具有与温石棉相似的性能,在很多领域可以代替温石棉^[1,2],是当今最廉价的温石棉代用品。本实验对温石棉及纤维水镁石进行了体外兔肺泡巨噬细胞毒性对比,对温石棉代用纤维之一的纤维水镁石的安全性进行初步评价。

1 材料与方

1.1 粉尘的制备

温石棉采自四川石棉矿,纤维水镁石采自陕西宁强水镁石矿,均采用超声分散制成超细矿物粉尘,98%以上的粉尘 $< 10 \mu\text{m}$,85%以上的粉尘 $< 5 \mu\text{m}$,50%以上的粉尘 $< 2.5 \mu\text{m}$ 。用电子天平准确称取 25 mg 超细粉尘于青霉素小瓶内,高压蒸气灭菌,用前加 RPMI 培养液(日本产)5 ml,磁力搅拌器上充分分散 4 h 备用。

1.2 细胞培养

选用 1.8~2.2 kg 来自第三军医大学动物房的日本系大耳雄性白兔,耳缘静脉注入空气处死,立即腹主动脉放血,以生理盐水加 0.2% 枸橼酸钠为灌洗液,按 Myrvik^[3] 方法在超净工作台上进行支气管肺灌洗。灌洗液 1500 r/min 离心 15 min,用培养体系(20% 小牛血清+80% 1640 培养液+100 U/ml 青霉素+100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 链霉素),调整细胞浓度为 $3 \times 10^6/\text{ml}$,分装于 35 mm 的无菌培养皿中,于 37℃、5% CO_2 培养箱培养 3 h 后取出,洗去贴壁的细胞,贴壁的 98% 以上是巨噬细胞。向该培养皿内加 0.9 ml 的培养体系,0.1 ml 粉尘悬液(使粉尘浓度为 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$),对照组加 0.1 ml 1640 培养液代替,37℃、5% CO_2 培养 18 h 后取出,收集培养上清液,用 pH7.3 磷酸盐缓冲液(PBS)配成 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 的细胞悬液,每次做平行样本,重复 6 次操作。

1.3 观察指标

1.3.1 细胞受损的程度及方式 细胞悬液 0.4% 台盼蓝染色,死亡细胞被染成蓝色,计算死亡率,培养上清液测乳酸脱氢酶活力,试剂为英国 Randox 公司提供,仪器为日立 7060 型全自动生化分析仪。

1.3.2 脂质过氧化的测定 细胞悬液用于脂质的主要产物丙二醛(MDA)含量及自由基清除剂超氧化物歧化酶活力的分析,试剂由南京建成生物研究所提供,仪器为美国贝克曼 DU-65 紫外分光光度仪,按说明书操作。

收稿日期: 2007-03-16; 修回日期: 2007-06-11

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 40072020)

作者简介: 吴思源 (1969-), 男, 主管技师, 主要从事环境医学研究。

* 通讯作者。

1.3.3 膜流动性分析 采用 20 mmol/L 的 DPH (1, 6-二苯基-1, 3, 5-己三烯, 瑞士生产) 标记的荧光探针, 激发光波长 361 nm, 发射光波长 463 nm, 仪器为 MPF-4 型荧光分光光度计, 测不同方向的荧光强度, 计算膜流动度即荧光偏振度 P 值, 膜脂微黏度 η 。

1.3.4 细胞形态观察 细胞悬液滴于盖玻片上, 0.4% 戊二醛预固定过夜, 送第三军医大学电镜室制作扫描电镜标本, 观察细胞形态变化。

1.4 统计学处理

表 1 温石棉及纤维水镁石对肺泡巨噬细胞毒性测定结果 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	死亡率 (%)	IDH (IU/L)	SOD (U/L)	MDA (nmol/L)	荧光偏振度 (P)	膜脂微黏度 (η)
对照组	10.49	23.6 $\pm$ 3.0	17.3 $\pm$ 1.9	2.7 $\pm$ 0.2	0.15 $\pm$ 0.006	1.00 $\pm$ 0.057
温石棉组	49.0 ^{**}	92.0 $\pm$ 9.3 ^{**}	5.9 $\pm$ 2.6 ^{**}	4.3 $\pm$ 0.1 ^{**}	0.14 $\pm$ 0.007	0.89 $\pm$ 0.005
纤维水镁石组	47.7 ^{**}	97.0 $\pm$ 8.5 ^{**}	7.0 $\pm$ 2.9 ^{**}	3.3 $\pm$ 0.2 ^{##}	0.18 $\pm$ 0.055 [*]	1.39 $\pm$ 0.061 ^{**##}

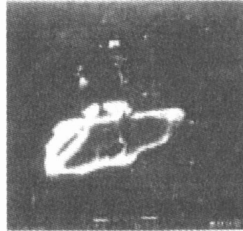
与对照组比较, ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$; 与温石棉组比较, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$

2.2 两种矿物粉尘对细胞形态的影响

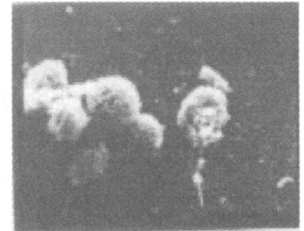
培养 18 h 后, 光学显微镜观察到对照组细胞呈圆形, 细胞膜完整, 细胞染成红色, 细胞核染色较深偏于一侧; 温石棉组细胞体积增大, 细胞浆染色较浅, 细胞核染色较浅; 纤维水镁石组细胞体积明显增大, 出现巨大巨噬细胞。扫描电镜观察到对照组细胞大小较一致, 呈球形 (见图 1-1); 温石棉组细胞变大变长, 出现了洞眼样的膜缺陷 (见图 1-2); 纤维水镁石组细胞吞入多根纤维, 细胞膜已破裂 (见图 1-3)。



1-1 对照组



1-2 温石棉组



1-3 纤维水镁石组

图 1 扫描电镜观察下各组的巨噬细胞形态 ($\times 2000$)

3 讨论

温石棉是一类以硅酸盐为支架, 表面覆盖有 $Mg-OH$ 层的纤维状硅酸盐矿物, 结构式为 $Mg_3Si_2O_5(OH)_4$, 是一种富含镁的矿物^[4]。陕西宁强县黑木林纤维水镁石矿是迄今为止世界上最大的唯一有工业价值的水镁石矿, 其结构式为 $(Mg, Fe)(OH)_2$, 也是一种富含镁的矿物。我们的前期研究发现, 两者在水溶液中均能释放出 OH^- 、 $Mg(OH)^+$ 等碱性活性基团^[5,6]。温石棉与纤维水镁石无论是矿物形态、化学组成以及释放出的活性基团都极为相似, 水镁石作为一种“低毒”的天然矿物在许多领域都有取代温石棉的趋势。

本研究结果发现, 纤维水镁石对兔肺泡巨噬细胞死亡率、LDH、SOD、MDA 以及细胞膜流动性的影响与温石棉接近, 且也引起了肺泡巨噬细胞体积增大, 胞浆内出现空泡, 出现巨大巨噬细胞, 细胞表面出现洞眼样的膜缺陷等, 这些都是细胞毒性的表现。可能与两者都能在水溶液中释放出碱性活性基团有关, 这些基团可引起细胞膜发生一系列氧化连锁反应即脂质过氧化, 从而改变了细胞膜通透性及流动性, 导致了细胞形态的变化^[7,8]。在前期的研究中曾采用低浓度的有机弱酸如 2% 的柠檬酸、酒石酸、草酸等处理纤维水镁石及温石棉, 发现可以显著降低对细胞的毒性^[9]。

本研究显示, 所谓“低毒”的纤维水镁石毒性并不低。

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 死亡率用 χ^2 检验测试差异统计学意义, 其它各指标均以 Dunnett t 检验测试差异统计学意义。

2 结果

2.1 两种矿物粉尘对肺泡巨噬细胞的毒性

两种矿物粉尘与肺泡巨噬细胞共同培养 18 h 后, 与对照组相比, 温石棉及纤维水镁石组细胞死亡率、LDH、SOD、MDA 差异均有统计学意义, 纤维水镁石的荧光偏振度及膜脂微黏度差异有统计学意义; 温石棉与纤维水镁石两两比较, MDA 及膜脂微黏度差异有统计学意义。结果见表 1。

纤维水镁石组细胞体积明显增大, 出现巨大巨噬细胞。扫描电镜观察到对照组细胞大小较一致, 呈球形 (见图 1-1); 温石棉组细胞变大变长, 出现了洞眼样的膜缺陷 (见图 1-2); 纤维水镁石组细胞吞入多根纤维, 细胞膜已破裂 (见图 1-3)。

对于其它的代用纤维是否也有细胞毒性, 值得进一步研究。

参考文献:

- [1] Cacciotti P, Barbone D, Porta C, et al. SV40-dependent AKT activity drives mesothelial cell transformation after asbestos exposure [J]. Cancer Research, 2005, 65 (12): 5256-5262.
- [2] Odile Poinot, Francine Terzetti. Surface reactivity, cytotoxicity, and transforming potency of iron-covered compared to untreated refractory ceramic fibers [J]. Inhalation Toxicology, 2002, 65 (23): 2007-2027.
- [3] Myrvik Q N. Studies on pulmonary alveolar macrophages from normal rabbit: a technical to produce them in a high state of purity [J]. J Immunol, 1961, 61: 128-129.
- [4] 董发勤, 万朴, 彭同江, 等. 纤维矿物粉尘环境矿物学与环境医学研究的新进展 [J]. 中华医学遗传学杂志, 2000, 19 (3): 193-198.
- [5] 吴逢春, 董发勤, 邓建军, 等. 矿物尘粒对大肠埃希菌作用的体外研究 [J]. 工业卫生与职业病, 2005, 31 (5): 279-281.
- [6] 邓建军, 董发勤, 蒲晓允, 等. 纤维矿物粉尘对肺泡巨噬细胞作用的体外研究 [J]. 中国病理生理杂志, 2000, 19 (3): 249-253.
- [7] 杜泽吉. 自由基介导的组织损伤机制 [J]. 国外医学卫生学分册, 1992, (2): 79-83.
- [8] 邓建军, 董发勤, 王利民, 等. 纤维矿物粉尘体外细胞毒性研究 [J]. 中华预防医学杂志, 2002, 36 (3): 212-213.
- [9] 邓建军, 董发勤, 吴逢春, 等. 酸处理水镁石对红细胞溶血能力的影响 [J]. 工业卫生与职业病, 2000, 26 (2): 76-77.