

性的本征型方程。这种方程可以存在着多于两个的本征解,即相应于多个分支解。估计这些分支的振幅可能比一次修正结果的振幅小很多。

本文是在上海生化所徐京华先生及其领导的小组的指导和帮助下完成的,顺致谢忱。

## 参 考 文 献

[1] J. M. 史密斯:《生态学模型》,科学出版社,1979年。

[2] Nicolis, G.: *Self-Organization in Nonequilibrium Systems*, 1977。

[3] M. J. 莱特希尔:《富里叶分析与广义函数引论》,科学出版社,1965年。

[4] B. N. 索伯列夫:《泛函数分析概要》,科学出版社,1955年。

[本文于1981年3月20日收到]

# 矽尘对肺细胞超微结构和功能影响的研究

殷 玲 豫

(山东省医学科学研究所)

有关矽肺的发病机制问题,国内外曾在矽肺的纤维化,矽肺病理和免疫学方面开展过一些工作。国内目前报道多为体内实验。1970年我们用人胚肺单层细胞培养进行了矽肺药物的筛选,本文在此基础上用体外细胞培养和细胞化学的方法,作了矽尘对肺细胞超微结构和功能影响的观察,以便探讨矽肺的发病问题。

## 一、实验材料与方法

**1. 细胞来源** 人胚肺原代细胞。

**2. 培养液** 小牛血清20%,0.5%水解乳蛋白79%及抗菌素1%(内含青霉素10,000单位/毫升,与链霉素10,000微克/毫升)组成,至于各种溶液的配方详见文献<sup>[1]</sup>。为了便于作细胞化学测定,培养液无酚红。

**3. 实验细胞的制备** 将离体6小时以内的人胚用1:1000新洁尔灭溶液浸泡洗涤,用2.5%碘酒消毒,在无菌室内解剖,取出肺脏置于无菌培养皿中,用Hank's液洗涤2—3次,剪碎放入无菌三角烧瓶,加0.25%胰酶调整pH为7.6—7.8并用37℃水浴消化20分钟,取出弃去胰酶,再用Hank's液洗去残留的胰酶,去上

清液,用滴管吹打使悬液均匀,之后加入适量培养液,接种于细胞培养皿中,静置在37℃温箱中培养3—4天,待长成单层后备用。

**4. 矽尘配制** 矽尘系化学纯,含SiO<sub>2</sub>98%以上,颗粒:1—2微米,配制于培养液中,每个培养瓶内粉尘浓度分别为50微克/毫升,100微克/毫升,150微克/毫升。

**5. 结果** 加入矽尘48小时后观察细胞病变及其程度,制备电镜标本并作细胞和培养液化学成分的测定。

**6. 肺细胞电镜标本制备** 本实验用体外培养单层肺细胞作原位固定包埋,用锇酸蒸气固定,考虑要求切割性能良好,用甲丁酯包埋,在解剖镜下选好标本用瑞典LKB4800型超薄切片机切片,所有超薄切片均用醋酸铀及柠檬酸铅染色,用Hu-LLA型电镜(日本日立公司产),作透射观察摄片。

**7. 肺细胞化学** 细胞总蛋白用Folin-Ciocalteu酚试剂测定<sup>[2]</sup>。用酪氨酸作标准,并折算出相当于清蛋白之量,糖类用蒽酮法<sup>[3]</sup>乳酸用Barker-Summerson法<sup>[4]</sup>测定。所有数值均以细胞蛋白质10毫克为基础。

## 二、实验结果

### 1. 不同矽尘剂量对肺细胞超微结构的分析

在已长成单层的肺细胞中,加入不同剂量的矽尘经 48 小时培养后,先用光学显微镜观察细胞病变,发现 50 微克/毫升的矽尘组细胞有轻微不太明显的病变产生,故选择 50 微克/毫升,100 微克/毫升,150 微克/毫升三个不同剂量作电镜标本制备。

(1) 正常肺细胞组 肺泡上皮细胞呈片状生长,细胞界限清楚、胞核,核仁清楚可见,核糖核蛋白体较多,有特殊的分泌颗粒和溶酶体细胞质内有线粒体(图 1)。

(2) 50 微克/毫升矽尘组 2a 肺上皮细胞,核膜及胞膜完整,胞浆内有张力纤维,分泌颗粒,可见到破坏的线粒体。2b 核膜胞膜完整胞浆内有空泡。2c 核膜胞膜完整胞浆内有分泌颗粒和溶酶体,细胞外有胶原纤维及积聚的矽尘颗粒。2d 核变形胞浆内有分泌颗粒和空泡,细胞外有胶原纤维及积聚的矽尘颗粒。2e 矽尘颗粒积聚在胞浆内呈接近圆形,内有大小不等的空泡,矽尘积聚处和胞浆间有空隙。2f 在矽尘积聚处有部分细胞坏死,另有部分细胞核膜胞膜完整。

(3) 100 微克/毫升矽尘组 图 3 可见细胞坏死比例大,成堆致密物周围出现成束的细丝状纤维。

(4) 150 微克/毫升矽尘组 从图 4 可见

成片细胞界限消失,细胞坏死,被成团成堆的致密物所代替。

综上所述矽尘对肺细胞有毒害作用,随剂量增大而加剧,50 微克/毫升矽尘组几乎只有少量细胞受损害,在细胞膜及核膜完整,细胞结构清楚的图片中见到有线粒体破坏,细胞内有核变形,胞浆内有空泡及分泌颗粒的图片中均无线粒体可见,大剂量组所有细胞均受损。

### 2. 矽尘对肺细胞化学功能的影响

通过电镜观察我们选择最低剂量组(50 微克/毫升)作细胞化学和大白鼠实验性矽肺组织化学测定指标对照,试图观察体外培养的肺细胞最小染尘剂量组对细胞化学测定的敏感性。

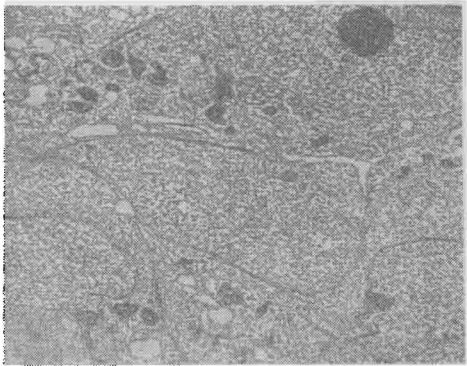
#### (1) 矽尘对肺细胞糖合成的影响

表 1 矽尘对肺细胞糖合成的影响

| 样 品                 | 实验次数 | 肺细胞糖含量(微克/10 毫克蛋白质) |
|---------------------|------|---------------------|
| 单层肺细胞组              | 3    | 163                 |
| 正常大白鼠肺组织            | 3    | 311                 |
| 体外肺细胞 +50 微克/毫升矽尘   | 3    | 144                 |
| 体内 50 毫克/毫升矽尘染尘四周鼠肺 | 3    | 142                 |

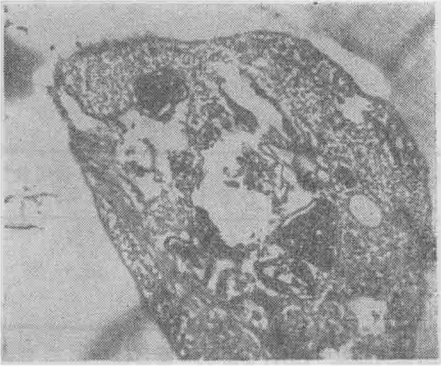
从正常单层肺细胞组、正常大鼠肺组织,50 微克/毫升矽尘作用于肺单层细胞 48 小时后及用 50 毫克/毫升矽尘给大白鼠一次染尘,四周肺组织糖含量的变化。可见,不论是体内体外试验均证实肺细胞糖合成量比正常降低(表 1)。

#### (2) 矽尘对肺细胞糖酵解作用的影响



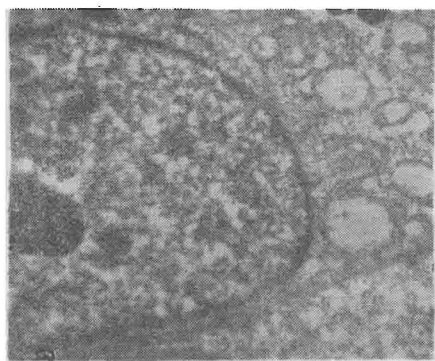
×1000

图 1 正常肺细胞组

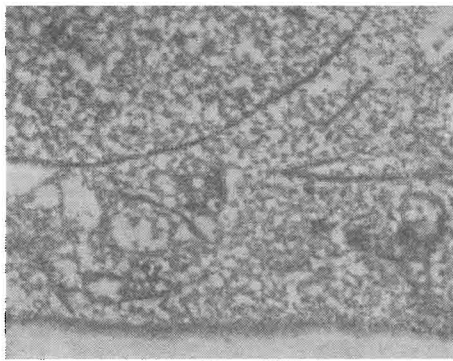


×5000

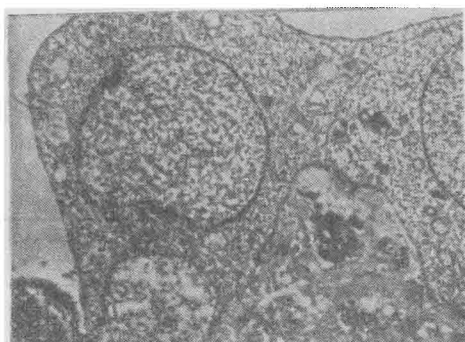
图 3 100 微克/毫升矽尘病变组



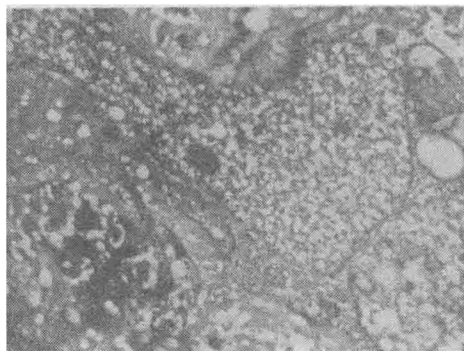
2a ×10,000



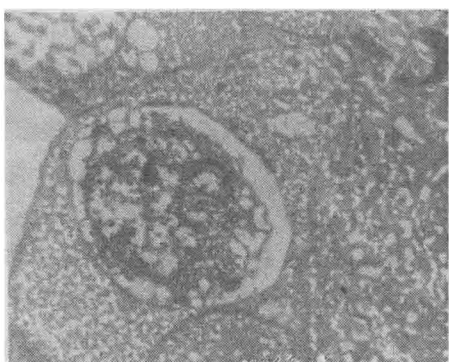
2b ×8000



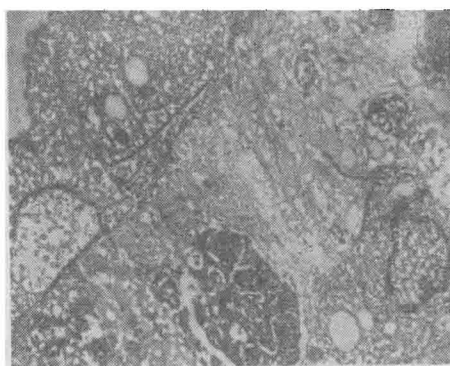
2c ×5000



2d ×6000



2e ×4500



2f ×5000

图 2a—2f 50 微克/毫升矽尘病变组

① 糖类的利用 正常肺细胞组和加 50 微克/毫升矽尘细胞的糖利用量见表 2。

表 2 矽尘对肺细胞糖利用的影响

| 样 品                | 实验次数 | 肺细胞糖利用量* (毫克) |
|--------------------|------|---------------|
| 单层肺细胞组             | 3    | 15.7          |
| 单层肺细胞 +50 微克/毫升矽尘组 | 3    | 16.9          |

\* 细胞糖利用量=[新鲜培养液中糖含量-所用培养液中糖含量]÷10 毫克蛋白质之细胞量。

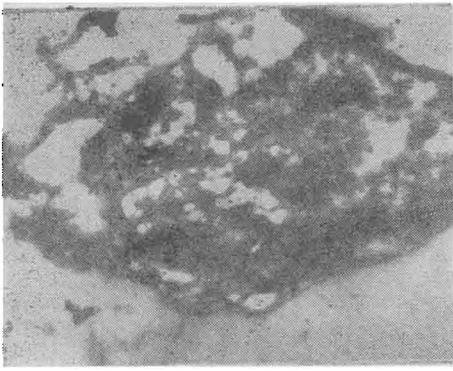
② 乳酸的生成 从表 3 可见体内体外试

验均证实矽尘对肺细胞乳酸生成量较正常为

表 3 矽尘对肺细胞乳酸生成的影响

| 样 品                 | 实验次数 | 肺细胞乳酸生成量* (毫克) | 肺组织乳酸含量 (微克) |
|---------------------|------|----------------|--------------|
| 单层肺细胞组              | 3    | 9.3            | 0            |
| 正常大白鼠肺              | 3    | 0              | 33.3         |
| 体外肺细胞 +50 微克/毫升矽尘   | 3    | 12.5           | 0            |
| 体内 50 毫克/毫升矽尘染尘四周鼠肺 | 3    | 0              | 53.2         |

\* 肺细胞乳酸生成量相当于 10 毫克蛋白质的肺细胞所用培养液中乳酸的含量。



×20,000

图4 150 微克/毫升矽尘病变组

高。

③ 酸碱度的改变 正常肺细胞培养液中 pH 为 7.0, 50 微克/毫升, 矽尘组培养液中 pH 为 6.5 较正常组为低。

### 三、讨 论

矽尘对体外培养的肺细胞有机械刺激和毒性两方面的作用, 因矽尘不溶于水故加入不同浓度矽尘均为矽尘之混悬液。在 50 微克/毫升低浓度矽尘组, 其结果引起少量肺上皮细胞超微结构有改变, 在细胞膜及核膜完整, 细胞结构清楚的图片中可见到有线粒体破坏和胞浆空泡形成, 如图 2a、2b。在细胞有核、变形、胞浆内有空泡及分泌颗粒和溶酶体的图片中均无线粒体可见, 如图 2c、2d。在矽尘积聚处有部分细胞坏死, 另有部分细胞核膜及胞膜完整的图片中亦无线粒体可见, 如图 2e、2f。根据上述情况, 可认为低浓度矽尘组对肺上皮细胞的致病作用首先表现为细胞线粒体最敏感。

在 100 微克/毫升矽尘组引起细胞病变较前一组为重, 细胞坏死比例大, 成堆致密物周围出现成束的细丝状纤维, 可能为胶原纤维。在 150 微克/毫升矽尘组可见成片的细胞界限消失, 细胞坏死被成团的致密物所代替。故认为

是由于随着矽尘浓度增大, 细胞病变加剧。值得引起重视的是, 在矽尘低浓度组细胞未发生明显病变之前, 即发生细胞线粒体之破坏。因此在 50 微克/毫升低浓度矽尘组作了矽尘对肺细胞化学功能的影响, 以便进一步验证其可靠性和大白鼠实验性矽肺, 肺组织化学测定相对照结果知体内体外试验肺细胞化学功能的改变一致。在肺细胞糖合成能力方面实验组均较正常组低, 乳酸生成均较正常组高, 从而进一步证实了体外矽尘低浓度实验组肺细胞化学功能测定的可靠性和敏感性。根据体外矽尘低浓度组证实, 由于矽尘对肺细胞的作用使肺细胞糖合成能力降低, 糖利用能力和乳酸的生成增高, 因而肺细胞糖酵解作用增强。Mevl-Ninio 等 (1975) 发现当大肠杆菌质膜的 ATP 酶被抑制剂作用后, DNA 复制也被抑制, 去掉 ATP 酶的抑制剂时, DNA 复制又重新恢复, 说明 DNA 复制受膜能量转换功能的控制, 看来膜 ATP 酶和 DNA 在结构和功能上的联系是紧密的<sup>[1]</sup>。矽尘作用于肺细胞首先是抑制肺细胞氧化作用呼吸链和整套酶体系, 使氧化磷酸化, 细胞能量偶联系统破坏, 使肺细胞能量供给减少或得不到能量供给, 从而影响基因调控和 DNA 的复制, 而导致肺细胞死亡和成纤维细胞增生, 故考虑矽肺发病机制问题与肺细胞的能量偶联有关。

### 参 考 文 献

- [1] 上海肿瘤研究所细胞生理组:《细胞营养与组织培养》, 上海科学出版社 1966。
- [2] 李健斋:《临床检验杂志》, 1959 年, 4 期 15 页。
- [3] Lowry, O.H.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265, 1951.
- [4] Barker, S.B. et al.: *J. Biol. Chem.*, **138**, 535, 1941.
- [5] Mevl-Ninio, M.T. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, **376**(3), 485, 1976.

[本文于 1981 年 3 月 30 日收到]