

二氧化硅及柠檬酸铝对巨噬细胞膜 K^+ 通透性影响的研究

曹 承 敬

(北京医学院卫生系劳动卫生教研室)

通常认为矽肺发病的重要环节之一是肺泡巨噬细胞吞噬二氧化硅(SiO_2)粉尘颗粒后的崩解死亡^[1]。因此,凡能保护巨噬细胞的药物就可能具有防治矽肺的作用。柠檬酸铝(柠铝)对实验性动物矽肺以及临床矽肺病人的疗效可能正是与其体外保护巨噬细胞的作用有关^[2,3]。最近体外研究证明, SiO_2 粉尘与豚鼠肺泡巨噬细胞温育时,最初是细胞 K^+ 含量减少,随着温育时间延长,减少更为明显,并逐渐伴有乳酸脱氢酶和酸性磷酸酶漏出细胞外,最终导致细胞死亡^[3]。可见,细胞膜 K^+ 通透性的改变是 SiO_2 致细胞毒性的一种早期表现。为探讨上述机理,本文着重研究了细胞膜流动性和 Na^+-K^+-ATP 酶活性与 K^+ 通透性的关系。

一、材料和方法

1. 动物:豚鼠,雄性,体重 600—800g。

2. 主要试剂:

(1) 培养液 1640 干粉培养基(中国科学院生物物理所生化厂生产)。称 10.5g,溶于 1000 ml 去离子水,灭菌分装,冰箱保存。用时加 10% 小牛血清,1% 双抗(即 100u. 青霉素, 100 μ g 链霉素)。

(2) 荧光探针 1,6-二苯基-1,3,5-己三烯(1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene, DpH; Sigma, USA 产品)。用四氢呋喃配成 $2 \times 10^{-3}M$ 的储备液,低温避光保存,应用时用磷酸缓冲液(PBS)稀释成 $2 \times 10^{-6}M$ 的应用液。

(3) 二氧化硅粉尘 中国医学科学院卫生研究所提供。含游离 SiO_2 99%,颗粒直径全部 $<5\mu m$,其中 $<2\mu m$ 者占 89.3%。用生理盐水配成 10mg/ml 和 3mg/ml 的浓度。

(4) 柠檬酸铝(柠铝)(北京医学院药厂

生产):含铝量 9.26%。用生理盐水配成 5mg 铝/ml 和 1.25mg 铝/ml 的浓度。

(5) 柠铝预处理 SiO_2 粉尘 将柠铝与 SiO_2 按一定比例充分混悬,然后用去离子水反复洗涤,离心,去除游离的柠铝。最后将沉淀粉尘置于 100℃ 烤箱烘干,用石墨炉原子吸收分光光度计测其含铝量明显增加^[3]。用生理盐水配成 10mg SiO_2 /ml 的浓度。

(6) 腺嘌呤核苷三磷酸二钠盐(ATP)(中国科学院上海生物化学研究所生产)用去离子水配成 18 mg/ml (30 μM /ml) 的浓度。

(7) 毒毛旋花子苷(G-strophanthin Krist reinst, Ouabain; Merck Germany 产品)。用无水乙醇配成 116.7mg/ml (20 μM /ml) 的浓度。

3. 巨噬细胞的制备:

(1) 悬浮细胞的制备 用戊巴比妥钠麻醉动物,行气管插管术。用注射器通过塑料导管缓慢注入生理盐水,每次约 20ml,如此反复数次。收集灌洗液离心,用 1640 培养液将沉淀细胞稀释成大约 4×10^6 细胞/ml,分装于方形培养瓶中,37℃ 温箱孵育 2 小时,使巨噬细胞贴壁生长。然后倾去原培养液,用无 Ca^{++} 、 Mg^{++} -PBS 液洗瓶三次。再倾去末次冲洗液,换 0.02% EDTA-PBS 液,放回温箱继续孵育 30 分钟,尔后用滴管轻轻冲洗瓶壁,尽可能使贴壁细胞脱落,离心后弃去上清液,用有 Ca^{++} 、 Mg^{++} -PBS 液将沉淀细胞稀释成 2×10^6 细胞/ml,低温保存。

(2) 贴壁细胞的制备 将肺灌洗液经离心沉淀的细胞用 1640 培养液稀释成 2×10^6 细胞/ml,分装于青霉素小瓶中(1 ml/瓶),37℃ 温箱孵育 2 小时。然后倾去原培养液,用无 Ca^{++} 、 Mg^{++} -PBS 液洗瓶三次,即可用于测定 Na^+-K^+

ATP 酶活性。

(3) 细胞匀浆的制备 用 Tris 缓冲液制备 8×10^6 细胞/ml 的悬浮细胞液, 冰浴中匀浆化。再将匀浆稀释 1 倍, 取 0.5ml, 即相当 2×10^6 细胞, 测 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性。

4. 测定方法:

(1) 细胞膜流动性和细胞 K^+ 含量的测定 按配对实验设计。关于巨噬细胞膜流动性的测定方法见另文^[4]; 细胞 K^+ 含量的测定用文献^[3]的方法。

(2) 钼酸铵比色法测 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性。

(3) 福林酚法测蛋白含量。

5. 主要仪器及测试条件:

(1) 日立 MPF-4 型荧光分光光度仪。激发光源为 150W 汞灯; λ_{ex} 362 nm; λ_{em} 432 nm; 缝宽均为 12nm。

(2) 国产 Y-3 型火焰原子吸收分光光度仪。 λ 765.9 nm; 灯电流 5mA; 缝宽 0.2nm; 压力 2.2; 火焰头高 10×4 cm。

6. 统计学方法:

将测定结果做相关分析和 F 检验。

二、结果与讨论

1. 细胞 K^+ 含量与细胞膜流动性的相关分析。

由表 1 可见, SiO_2 组细胞膜 DpH 荧光偏振度 P 和膜脂微粘度 η 不仅明显低于对照组 ($P < 0.01$), 而且明显低于两个给柠檬组 ($\text{SiO}_2 +$ 柠檬组和柠檬预处理 SiO_2 组) ($P < 0.01$)。表明 SiO_2 可以增加巨噬细胞膜流动性, 干扰膜脂双分子层的有序排列, 且随孵育时间延长, 其作用更加明显。作者在有关 SiO_2 对人工膜脂流动性影响的研究中也获得了与此一致的结果^[5]。 SiO_2 之所以能够破坏膜的脂质双分子层构型, Allison 认为, 因 SiO_2 颗粒表面富有严格排列的羟基, 它们能够与磷脂形成氢键^[6]; 另有人认为, 在一定的 pH 条件下, SiO_2 表面部分电离形成离子化的 SiO^- , SiO^- 可与磷脂分子中带正电荷的季胺离子形成离子键^[7]。

当 SiO_2 悬液中加入一定量的柠檬以及 SiO_2 经一定量的柠檬预处理后, 其 P 值和 η 值均较单纯 SiO_2 组明显升高 ($P < 0.01$), 但两组之间无明显差异 ($P > 0.05$), 表明这两种给柠檬的方式均有拮抗 SiO_2 的作用, 使细胞膜流动性降低。单纯用柠檬预处理的细胞, 其 P 值和 η 值与对照组细胞无差异 ($P > 0.05$), 说明柠檬本身并不影响细胞膜流动性。而经柠檬预处理的细胞再与 SiO_2 孵育, 其 P 值和 η 值的变化与单纯 SiO_2 组基本一致 ($P > 0.05$), 表明这种给柠檬的方式对 SiO_2 的作用无明显影响。Stalder 等指出, 如果硅颗粒表面包上氢氧化铝、磷脂酰胆碱等, 其溶血活性明显受到抑制^[8]。我们的研究结果也提示, 柠檬拮抗 SiO_2 的作用方式主要是通过 SiO_2 颗粒表面的结合, 因而可以阻断 SiO_2 表面活性基团与膜的相互作用, 在一定程度上维持了膜的稳定性, 保护了巨噬细胞, 这可能是柠檬治疗动物和人矽肺获得可喜疗效的重要原因。对此问题做进一步研究, 无疑将有助于探索新的防治矽肺措施。

细胞膜流动性不仅与细胞的多种功能有关, 而且在许多疾病和一些毒物中毒的发生发展过程中, 膜流动性的改变也具有重要意义^[9,10]。至于 SiO_2 引起巨噬细胞膜流动性的改变在其致细胞毒性中所起的作用, 通过细胞 K^+ 含量的测定得到了进一步的证实。 SiO_2 及三种方式给予柠檬对细胞膜 K^+ 通透性的影响与其对细胞膜流动性的影响规律是一致的 (表 1、图 1), 即当 P 值和 η 值下降, 膜流动性升高时, 该

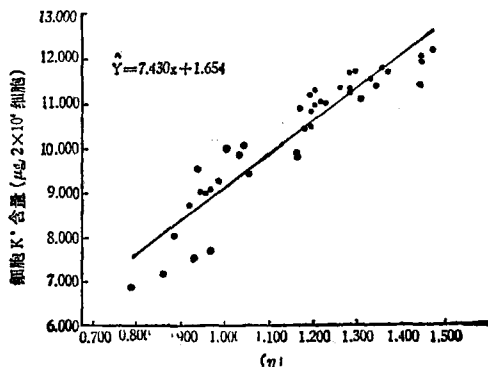


图 1 各组巨噬细胞膜微粘度(η)与细胞 K^+ 含量的散点图

组细胞 K^+ 含量则减少, 反之亦然。结果表明, SiO_2 使巨噬细胞膜对 K^+ 的通透性增加, 柠铝恰可抑制 SiO_2 的这一作用。相关分析证明, SiO_2

及不同方式给柠铝后对巨噬细胞膜流动性的作用, 与其影响细胞膜 K^+ 通透性的作用之间有极为密切的相关性 (图 1), 其相关性表示如下:

x	y	r	P	回 归 方 程
荧光偏振度 P	细胞 K^+ 含量	+0.949	<0.001	$y = 80.016x - 3.161$
脂区微粘度 $\bar{\eta}$	细胞 K^+ 含量	+0.939	<0.001	$y = 7.430x + 1.654$

表 1 细胞膜 DPH 荧光偏振度 P 和膜脂区微粘度 $\bar{\eta}$ 及其细胞内 K^+ 含量 ($\bar{x} \pm SE$)

组 别	测定时间 (min)	P	$\bar{\eta}$ (泊)	$K^+(\mu g/2 \times 10^6 \text{ 细胞})$
正常细胞对照组	20	0.185 ± 0.0034	1.352 ± 0.0419	11.557 ± 0.149
	60	0.184 ± 0.0015	1.329 ± 0.0180	11.533 ± 0.099
SiO_2 组	20	0.152 ± 0.0020	0.984 ± 0.0192	9.239 ± 0.192
	60	0.141 ± 0.0034	0.885 ± 0.0309	7.431 ± 0.205
SiO_2 + 柠铝组	20	0.171 ± 0.0006	1.183 ± 0.0068	10.612 ± 0.227
柠铝预处理 SiO_2 组	20	0.172 ± 0.0009	1.195 ± 0.0099	10.694 ± 0.254
柠铝预处理细胞组	20	0.185 ± 0.0035	1.350 ± 0.0427	11.608 ± 0.181
柠铝预处理细胞 + SiO_2 组	20	0.154 ± 0.0025	1.000 ± 0.0287	9.498 ± 0.205

注: SiO_2 剂量均为 $1mg$; 柠铝剂量均为 $500\mu g$ 铝。

表 2 三种方法制备的细胞样品中 Na^+-K^+-ATP 酶活性 ($\mu MPi/mg$ 蛋白)

组 别	贴壁细胞/ ($\bar{x} \pm SE$)	悬浮细胞/ ($\bar{x} \pm SE$)	细胞匀浆/ ($\bar{x} \pm SE$)
正常细胞对照组	0.672 ± 0.099	0.806 ± 0.144	1.156 ± 0.190
SiO_2 组	0.646 ± 0.113	0.794 ± 0.142	1.099 ± 0.232
SiO_2 + 柠铝组	0.666 ± 0.119	0.794 ± 0.128	1.162 ± 0.168
柠铝对照组	0.616 ± 0.099	0.799 ± 0.137	1.136 ± 0.057

注: SiO_2 剂量均为 $300\mu g$; 柠铝剂量均为 $125\mu g$ 铝; 测定时间均为 $1hr$ 。

至于膜脂双层构型的改变是否影响镶嵌在膜上的 Na^+-K^+-ATP 酶的活性, 从而引起 K^+ 通透性的改变, 我们对此做了以下初步探讨。

2. Na^+-K^+-ATP 酶活性的测定:

为进一步了解巨噬细胞吞噬 SiO_2 粉尘后早期 K^+ 通透性的改变机理, 分别测定了完整细胞 (包括贴壁细胞和悬浮细胞) 以及细胞匀浆中的 Na^+-K^+-ATP 酶活性。结果表明: (1) 正常巨噬细胞膜的 Na^+-K^+-ATP 酶活性较低, 而细胞匀浆中的酶活性较高, 这可能是因为匀浆中包括了线粒体和微粒体中的部分酶活性; (2) SiO_2 和柠铝各组细胞及其各组细胞匀浆中的 Na^+-K^+-ATP 酶活性与对照组比较, 均无明显

差异 ($P > 0.05$) (表 2), 表明 SiO_2 对该酶无影响, 其引起巨噬细胞膜 K^+ 通透性的改变与 Na^+-K^+-ATP 酶无关, 推测可能涉及另外一些与细胞膜 K^+ 通透性有关的机理, 如生物膜上的离子通道等^[1]。

本研究在刘世杰教授、林克椿教授的指导下完成, 并蒙邹世渠副教授和张铨副教授审阅, 一并致谢。

参 考 文 献

- [1] Allison, AC. et al.: J. Exp. Med., 124, 141, 1966.
- [2] 北京医学院卫生系劳动卫生教研室等: 《北京医学院学报》, (3), 185, 1974.
- [3] 邹彤彤: 《冶金劳动卫生》, 8(6): 326, 1982.
- [4] 曹承敬: 《中华劳动卫生职业病杂志》(特发表), 1984.
- [5] 曹承敬: 《中华劳动卫生职业病杂志》, 1(3), 140,

- 1983。
[6] Allison, A.C. et al.: *Nature*, **210**: 259, 1966.
[7] 顾荣生等:《劳动卫生与环境医学》, **6**, 354, 1981。
[8] Stalder, K. et al.: *Nature*, **207**: 874, 1965.
[9] Inbar, M. et al.: *Europ. J. Cancer*, **13**, 1231, 1977.

- [10] 曹承敬:《国外医学卫生学分册》, **3**: 734, 1983。
[11] 程极济、林克椿主编:《生物物理学》, 320 页, 1981。人民教育出版社, 北京。

[本文于 1983 年 11 月 1 日收到]

羟磷灰石离心法及其在细胞 DNA 辐射损伤和修复研究中的应用

刘楠 郑秀龙

(第二军医大学, 上海)

Ahnström 等^[1]在 1973 年首先用羟磷灰石(以下简称 HA)层析法检测 DNA 单链断裂。该法较经典的硷性蔗糖梯度离心法操作简便, 灵敏度高。我们根据本室条件, 按照 Kanter 等^[2]的方法稍加改进, 用国产 HA 建立了 HA 离心分离检测 DNA 单链断裂及其重接的技术, 并用该法观察了小鼠白血病 L_{712} 细胞 DNA 单链断裂及其重接。

材料与方 法

(一) 细胞 取郑升等建立的小鼠腹水型淋巴性白血病细胞 (L_{712})^[3], 由 615 纯种小鼠 (18—22g) 腹腔接种传代。接种后 4—5 天将小鼠行颈椎脱臼处死, 抽取腹水。镜检 L_{712} 细胞占有核细胞的 99% 以上。

(二) ^3H -TdR 标记及细胞活力检测 将 L_{712} 细胞悬浮于 RPMI 1640 培养液(含 20% 未灭活马血清)中稀释成 $1.5\text{--}2.5 \times 10^6$ 细胞/ml, 加入 ^3H -TdR(比活 $13\text{--}14\text{Ci}/\text{mmol}$, $0.5\mu\text{Ci}/\text{ml}$), 37°C 孵育 2—4 小时。离心后倾去放射性培养液, 用冰冷生理盐水洗涤离心后, 将细胞重新悬浮于新鲜非放射性培养液中, 于 37°C 继续孵育 1—2 小时。在培养过程中取样用 0.2% 台酚蓝染色法检测, 5 分钟内未染色细胞为活细胞。

(三) 照射条件 细胞悬液置于 $\phi 1.5\text{cm}$ 玻璃试管内, 于冰水浴中距 ^{60}Co 源 40cm 处照射 5—40Gy, 剂量率 400 伦/分。

(四) 羟磷灰石离心法

1. 样品制备 照射后将细胞悬于冰冷生理盐水中, 取 0.2ml 细胞悬液(约 $4\text{--}8 \times 10^5$ 个细胞)放入平底塑料管内, 速加入 1ml 硷性溶胞液 (0.03N NaOH , $0.01\text{M Na}_2\text{HPO}_4$, 0.15M NaCl , $\text{pH} > 12$) 于暗处 20°C 静置 30 分钟, 使细胞溶破, DNA 解旋, 然后快速加入 0.034N HCl (含酚红作指示剂) 1 ml 进行中和。立即将样品浸于冰水浴中, 用 CSF-1A 型超声波发生器 (300 mA) 超声处理 1 分钟, 使 DNA 被剪切成分子量为 4×10^5 dalton 以下的小片段^[4], 再加入 0.5% SDS 2ml, 使 DNA 和蛋白质解离, 混匀后冰箱内贮存备用。

2. DNA 单、双链分离 将上述制备好的样品加入装有 0.4—0.5g HA 的试管内。HA 预先用 0.01M 磷酸钾缓冲液(简称 KPB, $\text{pH} 6.9$)平衡 1 小时。用玻棒轻轻搅匀, 置 60°C 水浴中保温 10 分钟, 间或搅拌二次, 使 DNA 吸附于 HA 上。室温下离心 ($3000\text{rpm} \times 1\text{min}$) 后倾出上清液。

用 0.01M KPB 3ml (60°C) 洗涤 HA 沉淀, 除去游离 ^3H -TdR、酚红等杂质。再用 0.125M KPB 3ml (60°C) 从 HA 上洗脱单链 DNA, 并离心收集上清液; 重复二次, 洗脱液合并收集。然后在 80°C 用 0.25M KPB 3ml 洗脱双链 DNA, 离心收集上清液。重复二次, 洗脱液合并收集。

(五) 样品测量 标记细胞样品分离后的洗脱液各取 0.2ml, 加入 1N HCl 0.1ml 及水溶性