

三氯化磷对肺细胞毒作用的研究

何玉莺 周建平 钟小明
杨杏芬 张越华 梁彝庆

(卫生系劳动卫生与职业病学教研室)

肺巨噬细胞(PM ϕ)是游离于肺和呼吸道表面的大单核细胞,通过其吞噬和分泌活动在维持机体肺表面无菌方面起着重要作用,是呼吸道非纤毛部份的重要防御屏障,但PM ϕ 在执行其防御功能时也可能受到外源性物质的损害,因此,测定肺巨噬细胞的数量、存活、分泌功能,可以反映毒物对呼吸道和肺部的毒性。目前国内外利用测定肺巨噬细胞毒性作为大气污染的监测和尘肺、金属毒性的研究^[1-5]。PCl₃是一种挥发性液体,已知其高浓度对上呼吸道和肺部有强烈刺激作用,但在低浓度下对肺部有否影响,尚缺报道。本实验试图用肺巨噬细胞系统对PCl₃的毒作用进行评价,为制订PCl₃车间最高容许浓度提供科学依据。

材料和方法

一、急性毒性

本实验采用广州农药厂生产的纯度为98%(g/g)的三氯化磷染毒,动物为本室繁殖的健康雄性Wistar大鼠60只,体重180—210克,分两批进行。第一批动物30只,用以观察剂量—反应关系,动物随机分六组,其中五组分别静式一次吸入PCl₃急性阈浓度(1105.3 mg/M³)以下的剂量,其浓度为890.59、686.72、525.77、407.74、311.17 mg/M³(实测浓度),连续吸入2小时,24小时后处死作肺灌洗。第二批动物用以观察时间—反应关系,动物分六组,其中五组吸入同一剂量(407.74 mg/M³),连续吸入2小时,以后分别于30分钟,6小时,24小时,3天和7天处死作肺灌洗。

肺灌洗方法 动物于1.5%戊巴比妥(按0.15ml/100g体重)腹腔注射麻醉下,股动脉

放血后,剪去胸骨,暴露气管及两肺,于气管中段剪一小口,插入套有小段塑料管的针头,用棉线固定,用注射器吸取3ml不含Ca⁺⁺、Mg⁺⁺的生理盐水灌洗,如此反复六次,将灌洗液收集于试管内,记录每鼠灌洗液回收总量。

肺灌洗液检测指标及方法

1.肺巨噬细胞(PM ϕ)总数^[1]:用血球计数器计算。

2. PM ϕ 死亡率^[1],灌洗液经离心后取沉渣用台酚兰染料作排斥试验,计算100个PM ϕ 中死活细胞数。

3. 乳酸脱氢酶(LDH)活力:取离心后非细胞部分用2,4-二硝基苯胍法测定。

4. 酸性磷酸酶(ACP)和碱性磷酸酶(ALP)活力:取离心后非细胞部分用磷酸二钠法测定。

5. 溶菌酶含量:取非细胞成分用琼脂扩散法测定。

6. 病理学检查:每剂量组取一动物作肺组织学检查。

二、亚急性毒性

实验选用本室动物房繁殖的SD纯种雄性大鼠48只,体重180~154克,随机分为四组,用圆柱形有机玻璃柜作动式染毒,每日4小时共60天,每天用钼酸铵法测定PCl₃浓度,染毒剂量参考小鼠LC₅₀,实测浓度为高毒组1/14LC₅₀(97.75 mg/M³),中毒组1/39LC₅₀(33.5 mg/M³),低毒组1/659LC₅₀(2 mg/M³),另设对照组。

灌洗技术如前,但只是灌洗右肺,左肺作病理学检查,灌洗液每次用1.5ml,检测指标如前。

所有数据用方差分析法统计处理。

实验结果

一、 PCl_3 对肺巨噬细胞(PM ϕ)的剂量—反应关系

从表1可见一次吸入 PCl_3 后肺巨噬细胞总数(PM ϕ)的变化无直线相关关系($r=0.769P>0.05$),其中最高剂量组(890.7mg/ M^3)和第4剂量组(407.8mg/ M^3)略高于对照组,但无显著性($P>0.05$)。在巨噬细胞死亡率方面除最低剂量组外显示一定剂量反应关系($r=0.911 P<0.05$),特别第一、二剂量组差异有显著性($P>0.01$),提示 PCl_3 对细胞有毒作用。LDH在最高剂量组(890.7mg/ M^3)明显升高($P>0.01$),除最低剂量组外(311.2mg/ M^3),其余各组均高于对照组,但不呈比例。酸性磷酸酶和碱性磷酸酶与对照组之间差异无显著性。溶菌酶均高于对照组,且高剂量组明显升高($P>0.01$)。从本实验可见PM ϕ 死亡率和溶菌酶的阈剂量为186.8mg/ M^3 ,LDH的阈剂量为890.7mg/ M^3 。

二、 PCl_3 对肺巨噬细胞(PM ϕ)的时间—反应关系

从表2可见吸入 PCl_3 30'后PM ϕ 总数减少,6小时才明显增加,24小时又有所减少,第3~7天又增加,反映PM ϕ 在整个防御反应中的变化过程。在PM ϕ 死亡率方面,染毒30'PM ϕ 死亡明显增加($P<0.01$),但6小时即恢复在正常范围,而乳酸脱氢酶于吸入30'后少量渗出,第6~36小时维持在正常范围,到第7天才明显渗出;酸性磷酸酶及碱性磷酸酶,溶菌酶各时期均无明显渗出。总的来看出现反应时间一般在30',达峰值时间各指标不同,峰值与对照组相差倍数PM ϕ 总数为1.8,PM ϕ 死亡率为3.3,LDH为1.5,ALP为3.2。

三、长期吸入低浓度 PCl_3 对肺巨噬细胞的影响

从表3可见吸入 PCl_3 45天后,97mg/ M^3 组PM ϕ 总数,死亡率均有比对照组高的倾向,但差异无显著性($P>0.05$),LDH、ACP、ALP、溶菌酶无大改变,吸入 PCl_3 60

天的33.5mg/ M^3 组动物肺巨噬细胞死亡率明显增加($P<0.01$),其余LDH、ACP、ALP、溶菌酶无明显变化。

四、急性、亚急性染毒情况下,肺组织学变化

急性一次吸入后24小时各剂量组肺组织未见明显改变,支气管,细支气管粘膜正常,个别动物部分肺泡淤滞和肺泡上皮细胞增多,完全无渗出表现。连续60天吸入低浓度的 PCl_3 33.5mg/ M^3 组部分动物可见细支气管粘膜部分上皮脱落,肺泡毛细血管淤滞和增厚,其余各组肺组织无明显异常。

讨论

动物吸入 PCl_3 后,用肺灌洗方法得到的巨噬细胞(PM ϕ)均有不同程度的数量,死亡率,分泌产物的变化,这些变化提示了 PCl_3 影响着肺巨噬细胞的代谢和功能。

学者们认为,PM ϕ 的计数是反映有毒物质对机体影响的指标,可作为肺损害过程的动态记录,并认为吸入有毒物质后可诱导巨噬细胞从血管向肺泡渗出^[1],本实验虽然无论急性、亚急性染毒后高毒组PM ϕ 数目比对照组只稍增,但表现是先抑制后增加的波动过程,反映新的巨噬细胞的补充,可以认为是 PCl_3 对巨噬细胞毒作用的过程。然而PM ϕ 总数的变化与毒物的种类和染毒方式不同而有不同。Bingham^[8]报导,于小鼠长期(3~12月)经呼吸道吸入三氧化二铅颗粒或经高温气化的三氧化二铅后肺灌洗液得到的PM ϕ 数量明显减少,即使吸入铅尘浓度低至10 μ g/ M^3 ,细胞的数量也比对照组减少50%,而大量(0.5~1mg/鼠)的氧化铅一次气管内注入都可引起PM ϕ 数量的明显增加。从本实验PM ϕ 的数量看,急性实验高毒组轻度升高,但不成直线关系,原因是:我们的采样是在吸入后24小时,恰巧是在巨噬细胞分泌抑制期,PM ϕ 分泌高峰期在6小时,因此结果增加不明显;其次由于生物的个体差异数值波动较大,因此经统计学处理显示不出PM ϕ 的数量明显增加,

而 PM ϕ 的数量与肺液中酶的关系是反映 PM ϕ 数量和功能两个方面,从表 1 可见 LDH、溶菌酶在 PCl_3 浓度 $890.7\text{mg}/\text{M}^3$ 时明显增加 ($P < 0.01$),反映 PCl_3 对细胞的损害。LDH 是一种胞浆酶,细胞受损,胞膜渗透性增加或细胞死亡时均可自细胞释出。

PM ϕ 的死活是反映毒物的细胞毒性的最终指标。 PCl_3 导致的 PM ϕ 存活率下降,寿命缩短,可能是通过破坏细胞膜或引起膜的通透性增加所致^[6,7],因为代表细胞受损胞膜通透性增加或细胞死亡时释出的胞浆酶——乳酸脱氢酶和溶菌酶都有明显的升高,另一方面代表溶酶体酶的酸性磷酸酶和代表微粒体酶的碱性磷酸酶始终无大改变,说明 PM ϕ 的死亡并不是由于 PCl_3 激活溶酶体酶及微粒体酶后使细胞自溶而引起。

关于本测试方法的科学性和可靠性问题,目前国内外学者大多采用体外短期实验方法或整体气管注入法^[2-5],较少用整体吸入法。根据陈秉衡的意见^[1]认为此系统适于颗粒和液体毒物的测试,对气体污染物的测试尚需进一步探讨。Bingham^[3,9]曾认为气管内一次大量地导入铅颗粒,不能真实地反映在自然条件下铅对 PM ϕ 的数量影响,认为引起细胞数量增加,可能是一种物理刺激引起的反应,不足以说明铅对巨噬细胞数量的影响,我们此次采用整体吸入染毒的目的是企图能够反映机体呼吸道肺部巨噬细胞防御系统对 PCl_3 的防御反应,而事实上,由于气态 PCl_3 刺激性极强,它在潮湿空气中易水解为亚磷酸和盐酸,因此当机体吸入时, PCl_3 在上呼吸道表面已经被水解,能进入肺部的浓度已经较小,因此低浓度 PCl_3 对气管和支气管、肺泡的刺激作用较小,病理组织的结果亦显示无大异常,但仍出现肺巨噬细胞数量的轻度改变和死亡率的上升、LDH 的渗出,故未能排除这类指标反映着 PCl_3 对肺细胞损伤的程度,因此认为此测试方法更正确地代表机体对毒物的反应,但这测试系统的应用还为时较短,实验数据波动较大,今后

应继续探讨和改进。

小 结

本文试图用整体吸入染毒法分析肺灌洗液中肺巨噬细胞 (PM ϕ) 的数量,死亡率和非细胞成分的变化,以评价 PCl_3 对肺细胞的毒作用,并对此法的科学性进行议论。实验表明 PCl_3 经急性、亚急性吸入后,高毒组 PM ϕ 数量和死亡率、乳酸脱氢酶有较明显改变,反映 PCl_3 对肺细胞有轻度毒作用,并认为此法较正确地反映毒物对机体的作用。

参 考 文 献

- [1] 陈秉衡. 肺巨噬细胞系统对大气颗粒污染的测定. 卫生毒理学进展. 第一版北京: 人民卫生出版社, 1984年2月; 223页。
- [2] 陈秉衡, 等. 汞对巨噬细胞的毒性研究. 中华预防医学杂志 1984; 18: 1。
- [3] 陈秉衡. 上海市不同地区大气飘尘对肺细胞毒性的研究. 公共卫生与疾病控制杂志 1984; 3: 2。
- [4] 陆培康. 肺巨噬细胞与尘肺研究. 国外医学卫生学分册 1980; 2: 88。
- [5] 周健. 铅对巨噬细胞的毒性作用. 国外医学卫生学分册 1986; 1: 4。
- [6] Roth RA. Effect of pneumotoxicants on lactate dehydrogenase activity in airway of rat. Toxicology & Appl. Pharmacology 1981; 57: 69。
- [7] Rogene FH. Early damage indicators in the lung I lactate dehydrogenase activity in the airway. Toxicology & Appl. Pharmacology 1978; 44: 291。
- [8] Bingham E, et al. Alveolar macrophages reduced number in rats after prolonged inhalation of lead sesquioxide. Science 1968; 162: 1292。
- [9] Bingham E, et al. Responses of alveolar macrophages to metals I inhalation of lead and nickel. Arch Environ Health 1972; 25: 406。

表 1 Pcl_3 不同剂量大鼠肺巨噬细胞各项指标变化

指 标	染 毒 剂 量 mg/M^3				对 照 组	r	
	890.7	686.8	525.8	407.8			311.2
PM ϕ	4.460 \pm 2.338	2.374 \pm 1.102	2.574 \pm 2.204	3.283 \pm 2.715	1.190 \pm 1.273	2.915 \pm 1.79	0.763
($\times 16^{\circ}$ /总灌洗量)	153.0	81.4	88.3	112.1	40.8	100	
PM ϕ 死亡率%	57.71 \pm 15.53**	56.76 \pm 35.31*	45.06 \pm 13.31	24.63 \pm 10.50	7.20 \pm 6.10	12.66 \pm 8.23	0.911*
%	302.1	447.9	355.9	194.5	86.9	100	
LDH(活力单位)	681 \pm 125**	357 \pm 122	331 \pm 167	511 \pm 113	304 \pm 29	344 \pm 69	0.975
%	198.0	102.8	110.3	148.5	86.4	100	
ALP(活力单位)	1.36 \pm 1.07	1.20 \pm 0.66	0.96 \pm 0.27	0.55 \pm 0.19	2.34 \pm 2.08	2.36 \pm 0.97	0.295
%	57.6	50.8	40.7	23.3	99.2	100	
ACP(活力单位)	0.63 \pm 0.19	0.72 \pm 0.37	0.89 \pm 0.49	1.05 \pm 0.30	1.01 \pm 0.26	0.78 \pm 0.18	-0.334**
%	80.8	92.3	114.1	134.6	129.5	100	
溶菌酶($\mu\text{g/ml}$)	199.2 \pm 64.5**	180.8 \pm 24.8*	106.8 \pm 65.4	154.0 \pm 30.5	59.8 \pm 36.5	64.2 \pm 29.5	0.337*
%	310.3	281.6	166.4	239.9	93.1	100	
回收率%	95.00 \pm 3.90	96.53 \pm 4.06	99.93 \pm 0.00	97.09 \pm 2.55	98.10 \pm 1.59	98.23 \pm 1.86	

注 * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

表 2 Pcl_3 (407.8mg/M³) 染毒后不同时间各指标变化

染毒时间	PM ϕ × 10 ⁶ /总灌洗量	%	PM ϕ 死亡率%	%	LDH (活力单位)	%	ALP (活力单位)	%	ACP (活动单位)	%	溶菌酶 (μ g/ml)	%
30'	0.1003 ± 0.0208	21.2	22.13 ± 7.83**	325.4	390.63 ± 49.34	131.3	0.738 ± 0.118*	34.0	0.263 ± 0.075	58.2	352.25 ± 137.83	88.0
6h	0.8347 ± 0.5778	17.63	7.00 ± 2.65	102.9	300.00 ± 77.06	100.8	2.125 ± 0.263	97.9	0.208 ± 0.115	46.0	438.25 ± 128.19	109.5
1天	0.2442 ± 0.2354	51.6	5.50 ± 4.06	80.9	350.00 ± 64.55	117.6	1.748 ± 0.414	80.6	0.135 ± 0.270	29.9	202.25 ± 13.89	50.0
3天	0.6751 ± 0.5140	142.6	1.50 ± 0.41	22.1	234.38 ± 50.39	78.8	0.675 ± 0.263**	31.1	0.380 ± 0.180	84.1	293.25 ± 143.44	73.3
7天	0.7970 ± 0.7700	168.3	2.60 ± 0.74	38.3	443.75 ± 76.72	149.2	1.775 ± 0.492	81.8	0.600 ± 0.000	132.7	202.4 ± 35.35	50.5
对照	0.4735 ± 0.1291	100	6.80 ± 6.47	100	297.50 ± 122.60	100	2.170 ± 0.829	100	0.452 ± 0.188	100	400.4 ± 122.52	100

注 *P > 0.05 **P < 0.01

表 3 Pcl_3 亚急性染毒肺巨噬细胞毒性指标

染毒时间(天)	组别	动物数	PM ϕ × 10 ⁶ /总量	PM ϕ 死亡率	LDH(活力单位)	ACP(活力单位)	ALP(活力单位)	溶菌酶(μ g/ml)
45	97mg/M ³	6	1.293 ± 0.882	34.97 ± 8.77	261.7 ± 91.7	1.25 ± 0.14	8.0 ± 1.3	79.3 ± 36.6
	2mg/M ³	5	0.466 ± 0.183	34.84 ± 14.56	368.0 ± 143.8	1.36 ± 0.22	3.4 ± 1.4	126.8 ± 63.9
	对照	5	0.483 ± 0.259	15.56 ± 14.50	389.0 ± 205.0	1.56 ± 0.30	7.3 ± 6.6	89.4 ± 29.6
60	33.5mg/M ³	10	0.503 ± 0.301	48.67 ± 19.83**	116.0 ± 102.4	2.28 ± 0.20	4.0 ± 2.1	175.3 ± 71.6
	2mg/M ³	7	0.305 ± 0.211	18.8 ± 12.64	135.0 ± 125.5	2.29 ± 0.18	2.5 ± 1.8	146.3 ± 99.4
	对照	5	0.309 ± 0.118	8.39 ± 9.03	90.0 ± 33.9	2.48 ± 0.25	5.1 ± 2.8	263.6 ± 127.2

注 **P < 0.01

A Study of Phosphorus Trichloride on the Toxic Effect of Pulmonary cells

He Yuying Zhou Jianping Zhong Xiaomin
Yang Xinfeng Zhang Yuehua Liang Yiqing

(Department of Industrial Hygiene & Occupational Medicine
Faculty of Public Health)

Abstract

The study represented an attempt to analyse the changes of number, mortality and the non-cellular constituents of alveolar macrophages (PM ϕ) in bronchopulmonary lavage fluid of rat inhaled by phosphorus trichloride of in vivo testing procedure, to evaluate the toxic effect of low-concentration phosphorus trichloride on the pulmonary cells. we also made a discussion on accuracy of this method.

The results showed that the increase of the number and mortality rate of alveolar macrophages and the activity of Lactate dehydrogenase and Lysozyme were more significant than those of the control group ($P < 0.01$) before pathological changes in lung were showed, at the single dose of inhalation ($890.59\text{mg}/\text{M}^3$), that is lower than acute threshold concentration. It showed that low-concentration of phosphorus trichloride is of toxic effect on pulmonary cells.

In addition, it showed that other parameters observed had no difference between treated group and control group except for the mortality rate of PM ϕ at long-term inhalation of low-concentration phosphorus trichloride.

The writer considered that this method indicating the toxic effects of this toxicant on the body is more accurately than short-term tests in vitro.