

## 研究通讯

# 水中有有机物致大骨节病的实验研究

王维哲 乔有江 陈炳南

(辽宁省基础医学研究所)

大骨节病是一种发展缓慢和地理分布有密切关系的危害严重的地方性疾病。病变以侵犯软骨为主,常发生变性、坏死,致骨骼发生软骨内化骨障碍。由于病因不明,防治该病缺少得力措施。为此,我们从1981年开始用软骨细胞培养技术对它的有机物中毒病因说做了系统分析,结果报告如下:

### 实 验 部 分

#### 一、酚酸对软骨细胞的生物效应<sup>[1,2]</sup>

日本学者瀧澤等曾提出阿魏酸 (Ferulic acid) 和对香豆酸 (P-cumaric acid) 是大骨节病的病因<sup>[3]</sup>。为此,我们选用这两种酚酸试剂,观察它们各自对软骨细胞的生物效应。同时从同一个体分离出皮肤纤维细胞培养做对比观察。用 Olympus 倒置显微镜位相差观察细胞形态学变化,以组织化学方法确定合成硫酸葡糖胺聚糖 (SGAG) 能力和碱性磷酸酶 (ALP-ase) 活性水平。

实验结果表明,阿魏酸或对香豆酸对培养的鸡胚软骨细胞都有明显的毒性作用。在

50 ppm 浓度时,软骨细胞损伤明显,细胞数量减少,胞体瘦小,胞浆中脂滴增多。相应地,软骨细胞合成 SGAG 量减少和细胞膜上 ALP-ase 活性下降。这种损伤效应,与所用酚酸的浓度和作用时间成并行关系(表1)。但同是 5 ppm,由于对香豆酸的浓度大于阿魏酸(3.0:2.6),前者对软骨细胞呈现“抑制效应”,后者常表现“促进效应”。而 50 ppm 阿魏酸作用于成纤维细胞(它和软骨细胞都来源于中胚层的间充质细胞),则不表现出任何损伤作用。

阿魏酸作用于人胚软骨细胞,以草酸做比较,后者在  $2.6 \times 10^{-4}$  mol/L 未见致细胞损伤。

#### 二、水中各种酸组分对软骨细胞的生物效应比较<sup>[4]</sup>

1982年8月从陕西省永寿县病区分别采取患地和非患地饮水,以聚酰胺吸附,加入 10% 碳酸钠溶液分出溶解部分(“强酸组分”)和不溶解部分(“弱酸组分”),分别观察和比

表 1 酚酸对软骨细胞合成 SGAG 量和 ALP-ase 活性的影响

组 别	SGAG 量			ALP-ase 活性		
	3d	7d	14d	3d	7d	14d
对照组	+	++	+++	+	++	+++
加阿魏酸组						
5ppm( $2.6 \times 10^{-5}$ mol/L)	+	++	+++	+	++	+++
50ppm( $2.6 \times 10^{-4}$ mol/L)	+	+	++	+	+	++
加对香豆酸组						
5ppm( $3.0 \times 10^{-5}$ mol/L)	+	+	++	+	++	++
50ppm( $3.0 \times 10^{-4}$ mol/L)	+	+	±	+	+	±



伤都明显增强,也是 FA (6.25 ppm 作用 3 天) 大于 HA (12.5 ppm 作用 3 天, 或 6.25 ppm 作用 9 天)。

但是,令人惊异的是,与酚酸试剂或聚酰胺吸附物的“酸性组分”作用不同,FA 或 HA 在 6.25—12.5 ppm 不但能致一部分软骨细胞损伤,还常伴有促进另一部分软骨细胞生长和增殖,且合成 SGAG 能力不象酚酸时减

弱而是增强。这一现象是在我们研究的物质中腐殖酸络合物所独有的(参见表 4)。但当腐殖酸组分的浓度加大到 50.0 ppm 时,则刺激细胞生长和促进 SGAG 合成能力减弱,以至消失。

对病区非患点和非病区的 FA 和其脱脂部分进行了同样观察,所见与上述病区患点相比作用略轻,但差别不十分明显。

表 4 大骨节病区饮水和土壤中有有机酸组分和酚酸对软骨细胞结构和功能作用的比较

检品	浓度(ppm)	细胞来源	细胞形态改变	合成 SGAG 能力	文献
酚酸		鸡胚肢软骨细胞			
对香豆酸	5		轻度抑制生长	正常	[1]
	50		损伤,有死亡	减弱	
阿魏酸	5		轻度促进生长	正常	
	50		损伤	减弱	
阿魏酸	5	人胚肢软骨细胞	正常	正常	[2]
	50		损伤,有死亡	减弱	
阿魏酸	50	人胚成纤维细胞	正常	—	
	500		轻度损伤	—	
水中聚酰胺吸附物		人胚肢软骨细胞			
强酸组分	6.25		中度损伤	明显减弱	[4]
	12.5		重度损伤	明显减弱	
	25.0		极重度损伤	近于消失	
弱酸组分	6.25		轻度损伤	正常	
	12.5		轻度损伤	减弱	
	25.0		中度损伤	减弱	
土壤中腐殖酸组分		人胚肢软骨细胞			
富里酸	6.25		细胞增殖,微损伤	增强	[5]
	12.5		细胞增殖,轻度损伤	轻度增强	
	25.0		中度损伤	减弱	
胡敏酸	6.25		细胞增殖	增强	
	12.5		细胞增殖,微损伤	增强	
	25.0		细胞增殖,轻度损伤	轻度增强	

## 结果与讨论

HA 和 FA 是腐殖物中的主要组分,而酚酸类是它的基本构成成分。它多产于植物分解和煤炭、油气的燃烧<sup>[6]</sup>,因而在自然界如土壤、水和空气等环境中几乎到处都有它们。现已知它和激素合成<sup>[7]</sup>、酶的作用<sup>[8]</sup>有关,也被用于废水处理<sup>[6]</sup>和药物作用<sup>[9]</sup>的探索。尽管人们对腐殖物和其组分的生成、理化特性

已有较多的了解,但是对它和生物特别是人组织的功能、各种代谢间的关系所知尚少,尤其是对它们是否有致病性问题研究得更少。

腐殖物的分子量大小不定,是以和各种金属形成稳定络合物(腐殖酸络合物)形式存在的,在聚集和迁移金属元素上起到重要作用<sup>[10]</sup>。所以,当把腐殖物作为大骨节病病因的一种假设提出时,应当把它和它所络合的或吸附的各种成分联在一起做为一个整体加

以讨论。据此，我们对实验结果作出如下推论：

1. 阿魏酸或对香豆酸，浓度为  $10^{-6}$  mol/L 能引起软骨细胞严重损伤。而同样浓度草酸对软骨细胞，或阿魏酸对同体成纤维细胞仍无损伤效应，说明软骨细胞对酚酸致损伤作用的反应是较为敏感的。因此在大骨节病的病因学研究中，对酚酸类物质的作用不应忽略。

2. 病区居民饮水中聚酰胺吸附物的“强酸组分”损伤人胚软骨细胞强于“弱酸组分”，“弱酸组分”的八种组分中只有 6 号和 14 号对软骨细胞伤害明显。由于酚酸主要存在于“强酸组分”及“弱酸组分”14 号原点物质里，因此有理由说：在损伤人胚软骨细胞的作用上，腐殖物中酚酸类物质可能起到较重要的作用。但必须提出，水中“酸性组分”这样复杂的物质，它损伤软骨细胞的效应并不明显低于酚酸试剂。因此，在肯定瀧澤等工作的同时，也应指出他们用一、二种酚酸说明大骨节病发生的原因是不够的。

3. 在对人胚软骨细胞的损伤效应上，FA 强于 HA。脱脂后，损伤细胞效应增强，也是 FA 强于 HA。两种酸比较，化学结构相似，都带有含氧官能团（如 -OH、-COOH、-OCH 等）；但由于 FA 是亲水性的，分子量低，单位重量中含氧官能团多等特性，这或许就是它损伤软骨细胞强于 HA 的原因。如果这种推想成立，软骨细胞损伤程度与其说是和腐殖物量的多少有关，不如说是与它们结构中含

氧官能团多少有关更为恰当。

4. 在腐殖物组分对人胚软骨细胞作用的研究中，出现一种在酚酸研究中从未见到而在聚酰胺吸附物研究中也不多见的现象——在致一部分软骨细胞损伤的同时，常伴以另一部分软骨细胞生长和增殖旺盛表现。这说明腐殖物本身，不仅含有能致软骨细胞结构和功能损伤的因子，同时还含有其它因素（尤其是络合和吸附的金属离子、无机元素），从不同侧面影响着软骨细胞损伤因子的效能，甚至起到相反的作用。

5. 据此，我们认为应对腐殖物的研究，从目前通行的三种大骨节病病因学说（饮水中有机物中毒说、粮食镰刀菌中毒说和生物地球化学说）中分出来，作为一种独立的观点（腐殖物病因），开展系统的研究。

#### 参 考 文 献

- [1] 王维哲等，地方病通讯 (3), 29(1984).
- [2] 乔有江等，地方病通讯, (4), 90(1981).
- [3] 瀧澤延次郎，日本にすけるカシンベック病の研究，56—84，绪方书店，东京，1970年。
- [4] 王维哲等，永寿大骨节病科学考察文集，108—114页，人民卫生出版社，北京，1984年。
- [5] 王维哲等，中国地方病学杂志，4(4), 349(1985).
- [6] Green, J. B. and S. F. Manahan, In: A. J., Rubin *Chemistry of Wastewater Technology*, pp. 373—399, Ohio, 1978.
- [7] Ramwell, P. W. et al., In: J. B. Harborne, *Biochemistry of Phenolic Compounds*, pp. 457—472, Academic Press, London, 1964.
- [8] Wardle, E. N., *J. Mol. Med.*, 3(4), 319(1978).
- [9] 方 增，山西腐植酸(医药专辑)，4588(1982).
- [10] Schnitzer, M. and S. U. Khan (吴奇虎等译)，环境中的腐殖物质，153—191页，化学工业出版社，北京，1982年。

(上接第 91 页)

不断地得到改善。香港政府已认识到在经济发展规划中水质管理的重要性，这一点是值得称道的。

#### 参 考 文 献

- [1] Hong Kong EPA, *Environmetn Hong Kong*, 1985.
- [2] Hong Kong Government, *Environmental Guidelines for Planning in Hong Kong*, 1985.