矽肺发病机理研究

中国预防医学科学院劳动卫生与职业病研究所 李玉瑞

一、石英对肺泡巨噬细胞(AM)的影响

石英(SiO_2)进入肺中首先被AM吞噬。石英损伤巨噬细胞,导致细胞的氧化代谢下降,并导致释放一些生物活性物质,对细胞有毒性作用,或能促进成纤维细胞增生与胶原合成,有的还可抑制胶原合成。通过获取支气管肺泡冲洗液(BALF),可以得到肺泡巨噬细胞及其分泌物。本课题中进行了以下的几项检查。

1. 溶菌酶: 石英致使细胞释放很多种溶酶体酶,溶菌酶可以做为代表。在大鼠染石英尘后10~30天逐渐增多(含在肺泡冲洗液中)。其对细胞和肺组织可进一步破坏。

2. 总蛋白: 总蛋白中包括各种酶类,抗体(Ig)及补体(C_3 、 C_5 等)其含量增多,表示细胞毒性加强。

3. 铜蓝蛋白(Cp): Cp具有清除自由基的作用,它在染尘后7~10天时就开始增多,以后随病变严重程度加强,其含量也增多。它也有促进胶原合成的作用。用放射免疫法证明它在肺泡巨噬细胞中存在。加尘后,含量倍增。在肺内,通常只分布于间质或肺泡壁上,矽肺时,与胶原纤维共存于结节中。

4. 白细胞介素-1(IL-1): 它是AM分泌的一种生物活性物质,可介导T淋巴细胞产生IL-2,继而诱导产生抗体。它有促进成纤维细胞增生及胶原合成的作用,但它又能促进胶原酶及前列腺素E(PGE)的分泌。这两种物质都对胶原合成有抑制作用。

5. 纤维粘连蛋白(Fn): Fn是联结细胞与细胞,细胞与胶原纤维的生物粘合剂。已证明它能促进成纤维细胞增殖,与胶原合成。

6. 脂类: 脂类包括甘油三脂、胆固醇及磷脂。在染尘后脂类的变化很大,肺表面活性物是肺中特有的含大量脂类的物质,主要由II型上皮细胞分泌。其所含脂类中以饱和卵磷脂尤为特异。矽肺时,其分泌量明显增高。但各种磷脂的组成百分比,无明显改变。

7. 细胞代谢活性: 在染尘以后,肺泡巨噬细胞的细胞代谢活性逐渐下降,最后死亡。

在BALF中,所测上述各项指标的变化,均与

肺纤维化的程度呈良好的相关关系,致纤维化能力弱的粉尘所引起的上述指标变化不甚明显,其对肺重与肺胶原含量方面的增高也不明显,表明BALF的检查做为矽肺病情变化的观察指标是有意义的。

二、石英对矽肺中组织成分的影响

矽肺组织中的主要成分有胶原、蛋白多糖、脂类及粘连糖蛋白等(如Fn)。胶原纤维增多,也伴随着上述各成分增多并改变其组成,形成矽结节,以致丧失肺的正常功能。

1. 胶原: 在矽肺发展过程中,I、III型胶原都迅速增长。首先是纤细的III型胶原快速增长。在染石英尘10天时大鼠肺内I/III型胶原含量之比为0.89,比正常比值(1.38)要低。至20天时,粗大的I型胶原开始迅速增长,I/III型胶原之比达2.5,以后一直维持在比值为2左右。至矽结节成熟时,以粗大的I型胶原为主。不同的粉尘致纤维化能力不同,其I型与III型胶原的增长的情况也不同。染电焊烟尘的鼠肺直至90天时才见III型胶原增长稍多于I型胶原(I/III为1.14,低于正常比值)。至180天时,I型胶原的增长才超过III型胶原(I/III为1.41)。可见这种粉尘所引起的尘肺是以III型胶原纤维增生为主(镜下观察也证实)。其它粉尘如钨(WO_3)则不引起纤维化。当 WO_3 与 SiO_2 混合后,则产生以III型为主的肺纤维化,其过程较矽肺缓慢且程度较轻。又如锡与石英混合后,则能降低石英的毒性及纤维化程度。

对人矽肺组织的研究表明0~I期及I期矽肺组织中以III型胶原纤维为主。II~III期矽肺病人的矽结节中以I型胶原为主。

在以往的研究中应用传统的测羟脯氨酸法测定胶原含量存在许多问题,而且不能分辨不同类型胶原,在本研究中建立ELISA(酶联免疫法)可测I及III型胶原,既可定量又可观察其分布。对肺内纤维化程度可提供更直接的科学的依据。

2. 蛋白多糖(PG): 蛋白多糖中除含少量蛋白质外还含有糖胺多糖(GAG)。正常肺组织中,蛋白多糖与胶原纤维在一起是肺间质中一种主要成分。

在矽肺组织中,蛋白多糖也随着胶原增多而大量增生。其GAG的组成也发生改变,以透明质酸及硫酸皮肤素明显增多,肝素明显下降。进一步研究矽肺病人尿中GAG含量,表明尿中GAG有增多趋势。

3. 脂类: 矽肺时总脂、磷脂、胆固醇及甘油三酯均有明显增多。磷脂中以饱和卵磷脂增多最明显。

4. 纤维粘连蛋白: 与胶原纤维分布相同, 矽肺时明显增多。

5. 铜蓝蛋白: 以荧光免疫法显示, 矽肺时铜蓝蛋白与胶原纤维共存, 分布在矽结中, 其含量异常增多。

6. 脂质过氧化物: 染石英尘大鼠血清、肺冲洗物及肺中脂质过氧化物均明显增多, 表明石英导致自由基释放, 使细胞膜或组织中脂质氧化产生过氧化物。石英在肺内产生大量自由基已为国内外学者所证实。自由基破坏了膜上的脂类, 产生脂质过氧化物, 是一个导致矽肺发生的重要反应。

7. 肺中前列腺素E (PGE): 在大鼠染石英尘10天与20天时, 肺中前列腺素E₁及E₂均明显增高。无致纤维化作用的钨(WO₃)则不引起PGE升高。前列腺素E有抑制胶原合成的作用, 与其它致纤维化因子有相反的作用。

三、致纤维化因子的研究

从染石英尘三周后的大鼠肺泡巨噬细胞培养液中分离得到一种蛋白质, 其分子量为67KD, 等电点(PI)为4.72, 还测定其氨基酸组成。此种纯化的蛋白质对2BS成纤维细胞及鼠胚肺成纤维细胞均有促进细胞增生及胶原合成量增加的作用, 其促进作用为无刺激因子时4倍以上, 这种蛋白质及其作用在文献上未见报道。在国外文献中所报道的致纤维化因子如IL-1、Fn、AMDEF等, Fn的分子量为440KD, IL-1为18~70KD, AMDEF等为18KD。多数学者证明所获因子约为14~18KD, 有的学者报道获得一个56KD(Edtos, 1984)因子, 但也未证实其化学本质。这项工作仍在继续探讨其作用及化学本质。还证明有血管内皮生长因子存在的可能。

四、正常与矽肺I型胶原的性质与结构差别

1. 结构变化: 利用红外光谱法, 激光拉曼光谱法, 荧光光谱, 紫外吸收光谱, 圆二色谱和电泳法比较了正常与矽肺胶原结构的差别。从电泳中所见横纹的间距, 发现矽肺的胶原分子较正常胶原分子缩短, 其暗纹处缩短比明纹处更多。从圆二色谱的结果表明矽肺胶原分子中螺旋减少。荧光光谱显示荧光偏振度明显减少, 说明矽肺胶原分子内有序结构发生变化。

激光拉曼光谱的结构表明矽肺胶原链上的疏水侧键(-C-H)活动加强, 脯氨酸吡咯环的伸缩谱线加强, 分子内的有序运动减弱。红外光谱的结果表明矽肺胶原分子中-Si-O-R、-SiOH、-OH键增强, -C-C键有明显变化。通过大鼠、狗及矽肺病人的肺组织检查, 得到相似的结果。人矽肺组织中-Si-O-R的谱线有随矽肺期别增高而增强的趋势。此结果表明在矽肺组织中SiC₂不以结晶形式存在, 而是与胶原羟基结合形成硅氧桥键, 推测此键能增强胶原的交联与硬度, 促进矽结节不断扩大。

2. 性能变化

(1) 通过温度电流变化曲线表明矽肺原固有极化潜力明显地低于正常胶原, 矽肺胶原纤维的空间电荷受到分子内或分子间更多的束缚, 移动能力减弱;
(2) 稳定的自由基减少, 不出现ESR信号, 表示其中的硅已由-Si-O状态转变为-Si-OH, 更进一步证实红外所得结果;
(3) 矽肺胶原静电荷的产生较正常胶原快, 但衰退也快。

以上结果较为一致地证明矽肺胶原与正常胶原不同, 有序性减弱, α 螺旋减少, -C-C键缩短, -Si-O-R键有可能参与矽肺的交联, 国外文献中未报道矽肺胶原中有有机硅存在。

五、病理形态学研究结果

利用偏光显微镜, 以苦味酸天狼星红溶液使胶原染色, 可见到I型胶原呈红色, II型胶原呈绿色, 能分辨I型与II型胶原纤维, 方法简便, 效果好。

利用扫描电镜和透射电镜观察染石英尘大鼠肺组织结构所发生的变化。包括各种细胞的损伤及增生, 胶原纤维的增生与变化, 对I型上皮细胞更作了系统的和细致的观察并指出其与矽肺发病的关系。

六、免疫与矽肺发病的关系

利用先天性T淋巴细胞免疫缺欠(细胞免疫缺欠)的裸小鼠作为实验组, 以相应品系免疫力正常的小鼠作为对照组。两组以同样的实验条件, 等量的SiO₂作腹腔注射染尘, 经3个月的实验过程, 结果表明, 形态学上, 除坏死程度为实验组大于对照组外, 其它的病变大小、巨噬细胞反应、网织纤维的形式、纤维化程度及浆细胞出现的程度, 均是实验组较对照组轻而缓。体液免疫在两组间均有增强。

七、矽宁(盐酸替络欧)治疗矽肺研究总结*

为了寻找高效、低毒的抗矽肺新药, 我们合成了一系列梯络龙衍生物, 探讨化学结构与其疗效之间的关系。在这十几种衍生物中, 经动物实验结果表明, 矽宁(盐酸替络欧)不仅疗效好, 而且毒性较低, 是一个有

开发前途的新药。

(一) 矽宁的理化性质

矽宁化学名称为2,7-双-[2-(二乙氨基)-乙氧基]-酮脲-3-盐酸盐(2,7-Di-[2-(Die thiamini)-etho]-Fuorenon um O ximi-9-Dihydro chloridum)。黄色结晶粉末,有吸湿性,无臭,味苦。易溶于水、乙醇,几乎不溶于苯或乙醚。样品在105~110°C干燥后,其熔点为204~206°C。

(二) 实验性矽肺疗效研究

1. 预防性治疗实验:大鼠染尘后第三天开始灌胃给药,每次剂量40mg/kg,每周给药3次,疗程为一个月。实验结果表明:肺湿重的T/C值为0.55,病理形态检查显示以泡沫样细胞构成的矽结节,坏死细胞甚少。大鼠染尘一个月后,在已形成典型的矽肺病变的基础上开始灌胃给药,分为两个剂量组,40mg/kg及80mg/kg,每周给药3次,连续治疗6个月。结果表明:肺湿重T/C值分别为0.65及0.63。肺胶原蛋白含量T/C值为0.43及0.34。病理形态检查显示治疗组病变明显减轻,主要由泡沫样细胞、尘细胞等构成的矽结节,坏死细胞较少。

狗染尘一个月后,在已形成典型的矽肺病变的基础上,开始灌胃给药,分为两个剂量组,15mg/kg及30mg/kg,每周灌胃给药3次,连续给药6个月。实验结果表明:治疗组的全肺干重明显低于矽肺对照组。全肺胶原蛋白含量,高剂量组T/C值为0.40,低剂量为0.42。病理形态检查表明:治疗组病变主要以尘细胞、泡沫样细胞及成纤维细胞构成的矽结节,坏死细胞少见。矽肺对照组的病变严重,主要由胶原纤维构成的融合性矽结节,大部分细胞已坏死。

(三) 药理和毒理研究

1. 急性毒性实验:小鼠灌胃给药的LD₅₀为1170mg/kg(1085~1262mg/kg)。大鼠静脉给药的LD₅₀为46.24mg/kg(39.64~53.94mg/kg)。静脉麻醉后静注矽宁5mg/kg、10mg/kg后,血压、ECG无显著变化。灌胃40mg/kg、80mg/kg后60分钟观察神经系统,鼠尾动脉血压及心率无明显改变。

2. 长期毒性实验:大鼠灌胃给于盐酸替络欧,分为两个剂量组40mg/kg及80mg/kg,每周给药3次,连续给药6个月,实验结果表明:各治疗组的体重稍有增长,一般体征、外观进食量、行为等均未见异常。血、尿常规以及肝(SGPT)、肾(尿素氮)功能检查均在正常范围。病理形态检查表明:高剂量组的肝脏,位于中央静脉周围的肝细胞,呈轻度空泡性

变。睾丸曲精管上皮细胞轻度萎缩。在停药3个月后,肝及睾丸的退行性变,有不同程度的恢复。

狗灌胃15mg/kg或30mg/kg,每周给药3次,连续给药6个月后解剖,实验结果表明:各治疗组动物的一般体征、进食量、行为活动均正常,体重增长。血常规、尿常规、肝(SGPT)、肾(BUN)功能检查、心电图检查均属正常。病理形态检查示高剂量组(30mg/kg)肝小叶中央部呈不同程度的空泡性变,汇管区可见少量淋巴细胞浸润。停药3个月后渐恢复。余无明显改变。

3. 药代动力学及特殊毒理实验结果(略)。

小 结

1. 检查了支气管肺泡冲洗液中一些成分的改变。证明这些指标的变化程度与肺纤维化程度有相关性。

2. 矽肺组织中胶原蛋白多糖及脂类不但在含量上明显增加,其组成都发生明显改变。在国内首先建立了检查上述物质组成的方法,现已为有关单位采用推广。其它成分如纤维粘连蛋白、铜蓝蛋白、前列腺素E及脂类过氧化物等也都显著增高。这些成分都与矽结节的形成有关。

3. 病理形态学观察中也建立了分辨I、II型胶原的方法,利用偏光显微镜及特异的染料,两种胶原在镜下着色不同,方法简便易行效果好。通过扫描电镜与透射电镜系统地观察了矽肺发生过程中细胞与胶原生成的关系。重点观察了I型上皮细胞的变化与纤维化的关系。

4. 自肺泡巨噬细胞培养液中分离纯化一种蛋白质(67KD),有较强的促进成纤维细胞合成胶原的能力(约4倍)。与国外文献中报道的致纤维化因子不同(14~20KD)。

5. 从结构与性质两方面比较了正常与矽肺胶原的差别,证明矽肺胶原的分子有序程度减弱,碳链缩短,螺旋减少,羟基增多,有Si-O-R键可能是一种交联键导致胶原纤维聚合。胶原纤维之间的电荷在分子内与分子间的运动受束缚,静电荷衰退较快。

6. 以T淋巴细胞缺陷的裸小鼠制作矽肺模型与相应品系的正常小鼠模型比较。前者体内矽肺的发生程度轻而且缓慢。表明矽肺的发生与细胞免疫及体液免疫都有关系。

* 本研究专题中一分题,起草者程玉海。

Study on the Mechanism of Silicosis and a New Drug for Silicosis

Li Yurui

In this study, the biological changes in silicosis were studied systematically.

First the changes in bronchoalveolar fluid were observed including the determination of lysozyme, total proteins, interleukin-1, fibronectin, ceruloplasmin, lipids and the metabolic activity of cells. It was proved that the changes of the above mentioned substances were obviously correlated with the development of silicotic lesion in the lung.

Second, contents of main components in silicotic nodules including collagen, proteoglycan and lipids were found not only increased abnormally in quantities, but also changed in composition, for example, ratio of collagen type I/III was higher than normal lung collagen. Levels of other components, such as ceruloplasmin, fibronectin, prostaglandin E and lipid peroxides were also increased which de-

noted that they were all closely related with the formation of silicotic fibrosis. Infrared spectrophotographic analysis proved that SiO_2 presented in the silicotic nodules in the form of $-\text{Si}-\text{O}-\text{R}-$, may be reacted as a cross linking bridge, between collagen fibers.

Third, a protein was isolated from medium of silicaingested macrophages. Its biochemical properties were characterized. Results of Western Blot methods proved that it combined with antibody of ceruloplasmin. It also showed strong activity in stimulating the synthesis of collagen.

A new drug called Xinin was discovered. It showed good effect and low toxicity to experimental silicotic animals, such as rats and dogs. The pharmacological studies were performed and the drug was ready for clinical trials.

二氧化硫脲皮炎2例报告

山东省烟台市职业病防治院 盖修海

二氧化硫脲引起的皮肤损害报道较少, 我院收治2例, 现报告如下。

男、女各1例, 均从事本品烘干作业。工作7~11天后, 感觉面部、手背、前臂、小腿皮肤痒, 继之出现红色小丘疹, 伴面部、眼睑水肿, 逐渐加重收入院, 同工种10人中, 曾类似发病5人。

检查: 面部、手背、前臂、小腿皮肤粗糙充血, 可见不同程度的红色斑丘疹, 有的融合成片, 界限清楚, 并可见抓痕。1例手小指伸侧有皲裂、渗出、脱屑。面部、眼睑水肿, 球结膜充血。咽部充血, 扁桃体不大。心、肺、肝、脾未见异常。手、足无紫绀, 手掌、足底无汗。血象、尿、肝功能检查无明显异常。

入院后给10%GS 500ml+氟美松5mg、Vit C1g静脉滴注, 同时口服扑尔敏、VitC、抗生素预防感染等治疗, 住院10~17天痊愈。1例出院后仍从事烘干作业4小时后上症又发, 休息治疗而愈, 经脱离接触后再未发生。

二氧化硫脲由硫脲加双氧水制得。为白色晶体, 在水中溶解度为2.94%(20°C)。其毒作用与硫脲相似, 但较硫脲为强。有人观察, 在生产本品的124名工人中, 有96人患有不同程度的皮肤病, 表现在手和前臂瘙痒, 间或面部和下肢瘙痒, 手掌出汗, 指甲疼痛。典型的症状还有手足发绀, 手掌和足底出汗, 皮肤出现粉红色丘疹皲裂等。