

热应激蛋白保护肺泡巨噬细胞 抵抗石英尘毒作用的研究

同济医科大学 (430030) 龚鹏飞 张国高 贺涵贞 张敏轩 吴植恩 熊世洲

提 要 采用体外热应激的方法观察了 HSPs 对培养大鼠 AM 的保护作用。结果 HSPs 水平增加可保护 AM 抵抗石英尘毒作用, 表现在 AM 细胞存活率明显提高, 而 MDA 含量及培养上清液 LDH 活性明显下降。提高 AM HSPs 水平, 可能为保护和促进肺清除功能, 预防矽肺等肺部疾病的发生发展提供一条新的途径。

关键词 热应激蛋白 肺泡巨噬细胞 石英

热应激蛋白(Heat stress proteins, HSPs)的重要生物学功能之一就是保护组织细胞抵抗热及其他有害因素的损伤作用, 维护细胞的生存与功能^[1,2]。在单核巨噬细胞中, HSPs 很可能作为一种抗氧化损伤机制而存在。在肺清除机制以及矽肺等肺部疾病的发病机制中, 肺部巨噬细胞起着十分重要的作用^[3,4]。提高巨噬细胞 HSPs 水平以抵抗石英尘之毒作用, 可能为保护和促进肺清除功能, 预防矽肺等肺部疾病的发生发展提供一条新的途径。

1 材料与方 法

健康雄性 Wistar 大鼠, 体重 180~200g, 由本校实验动物中心提供。大鼠用 2% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后, 腹主动脉放血处死。取全肺及支气管, 按本室方法灌洗回收肺泡巨噬细胞(AM)。用含 10% 小牛血清的 1640 培养液调节细胞浓度为 10^6 cell/ml, 接种于 25ml 培养瓶。37℃ 贴壁纯化培养 2h, 去上清。用 D-Hanks 液清洗 3 次, 换上新鲜的含 10% 小牛血清的 1640 培养液。

将培养瓶随机分为两组: 未应激组及热应激组。将热应激组培养瓶置 42℃ 水浴 15min 后再放回 37℃ 培养箱, 继续培养 4h 后, 未应激组及热应激组同时换上含一定浓度的石英尘(直径 $\leq 5\mu\text{m}$, 中国预防医学科学院劳动卫生研究所提供)的 1640 培养液, 37℃ 继续培养 24h。

用 Dot Blot 法测定 AM HSP70 含量^[5,6]: 将回收的 AM 在匀浆缓冲液 (50mmol/L Tris

• Cl, 0.1% SDS, 0.2mmol/L PMSF, 10mmol/L DTT, 4% 巯基乙醇, 10% 甘油, pH7.4) 中裂解, 15000r/min 离心 15min, 取上清用 Lowry 微量法测定蛋白质含量。取等蛋白量的各样品用抽滤杂交点样器点样到硝酸纤维素薄膜上。然后用兔抗人 HSP70 单克隆抗体(本室与加拿大拉瓦尔大学细胞分子遗传室合制)及碱性磷酸酶 SABC 试剂盒(武汉博士德生物工程公司)进行免疫检测^[7]。检测结果用图象分析仪进行定量分析。

AM 细胞存活率测定采用台盼蓝法。乳酸脱氢酶活性测定采用试剂盒法(北京化工厂)。丙二醛(MDA)含量测定采用 TBA 法^[8]。统计方法采用 *t* 检验。

2 结 果

2.1 体外受热应激大鼠 AM 在石英尘作用下 HSP70 含量的变化

在没有石英尘的情况下, 受热应激后的 AM HSP70 含量明显高于未应激的 AM。在同样剂量石英尘作用下, 热应激组 AM HSP70 含量均较未应激组显著升高。在较高剂量 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 石英尘作用下, 未应激组 AM HSP70 的增加有所下降, 而热应激组 AM HSP70 含量继续升高(表 1)。

2.2 体外受热应激大鼠 AM 在石英尘作用下细胞存活率、LDH 活性及 MDA 含量变化

受热应激后大鼠 AM 在同样剂量的石英尘作用下, 其细胞存活率都明显高于未应激

表1 体外受热应激大鼠 AM 在石英尘作用下 HSP70 蛋白含量变化 (积分光密度)

组 别	观察数	石英尘剂量 ($\mu\text{g/ml}$)			
		0	10	20	50
未应激组	3	48.50 $\pm$ 3.93	84.22 $\pm$ 3.24	121.58 $\pm$ 2.86	74.37 $\pm$ 4.36
热应激组	3	66.27 $\pm$ 1.92*	103.22 $\pm$ 3.29*	150.75 $\pm$ 3.24*	165.50 $\pm$ 2.30*

*与对照组比较, $P<0.01$

表2 体外受热应激大鼠 AM 在石英尘作用下细胞存活率、MDA 含量及培养上清液 LDH 活性变化

石英尘剂量 ($\mu\text{g/ml}$)	细胞存活率 (%)		LDH (U/ml)		MDA ($\mu\text{g/ml}$)	
	未应激组	热应激组	未应激组	热应激组	未应激组	热应激组
0	91 $\pm$ 3	94 $\pm$ 3	115.55 $\pm$ 5.06	113.50 $\pm$ 3.80	9.41 $\pm$ 0.32	8.62 $\pm$ 0.51
10	76 $\pm$ 2	84 $\pm$ 3*	152.71 $\pm$ 17.82	128.60 $\pm$ 5.18*	13.28 $\pm$ 0.25	11.37 $\pm$ 0.42*
20	60 $\pm$ 3	78 $\pm$ 4*	191.88 $\pm$ 6.86	149.70 $\pm$ 10.56*	16.08 $\pm$ 0.42	13.63 $\pm$ 0.47*
50	22 $\pm$ 2	69 $\pm$ 2*	240.09 $\pm$ 6.86	180.83 $\pm$ 5.19*	20.65 $\pm$ 1.08	16.85 $\pm$ 0.38*

注: 每组样本数 4; *与未应激组比较 $P<0.01$

组; LDH 活性均明显低于未应激组; 脂质过氧化产物 MDA 含量亦都明显低于未应激组 (表 2)。

3 讨论

实验结果表明, 体外培养的正常大鼠 AM 受热应激后 HSP70 的表达增加, 与有关报道的结果一致^[9]。

本实验中, 我们先让大鼠 AM 受热应激诱导 HSPs 合成, 继而观察到 AM HSPs 增加后对石英毒作用的抵抗力明显增加, 表现在同样剂量的石英尘作用下 AM 细胞存活率明显提高, 培养上清液 LDH 活性明显下降。表明 HSPs 水平增加能保护 AM 抵抗石英毒作用。

HSPs 保护 AM 的机制可能与其抑制石英尘诱发的活性氧产生有关。NADPH 氧化酶参与氧自由基产生的关键性反应, HSPs 可抑制 NADPH 氧化酶。此外, HSPs 还可激活过氧化物歧化酶 (SOD) 等, 从而使细胞能抵抗反应性过氧化物的伤害^[9]。; 本实验中亦观察到受热应激组的大鼠 AM 在石英尘作用下脂质过氧化产物 MDA 含量明显低于未应激组。

HSPs 作为 AM 的一种抗氧化损伤机制而存在。培养 AM 在石英尘作用下, 受到活性氧产物的氧化损伤而使 HSP70 含量适应性地增加, 且在一定范围内呈剂量-反应关系。但当石英尘的毒作用过强时 (本实验 50 $\mu\text{g/ml}$ 石英尘

24h), 这种自我防御机制本身受到损害, 致使 HSP70 含量并不继续增加, 而是有所下降。说明 AM 的这种自我保护作用是有一定限度的。受热应激后的 AM HSPs 含量增加, 对石英毒作用的抵抗力增强, 在同样剂量石英尘作用下, AM HSP70 含量较未应激组增加更为明显。尤其在较高剂量石英尘作用下, AM HSPs 含量并未下降而是进一步增加, 进一步说明了 HSPs 对 AM 的保护作用。

受热应激大鼠 AM 在石英尘作用下, HSP70 含量增加较 AM 单受石英尘或热应激作用下更为明显, 说明两者在增加 AM HSP70 水平上有协同作用。60 年代苏联学者曾在动物实验中发现高温与石英尘存在拮抗作用^[10], 但对其机制一直少有研究。由于 HSPs 的保护意义, 本实验结果可为其提供一些线索。

AM 在肺部清除机制及矽肺等肺部疾病的发病机制中起着关键作用^[3,4]。HSPs 水平增加可提高 AM 抵抗石英毒作用的能力。因此, 提高 AM HSPs 水平可为保护和促进肺清除功能, 预防矽肺等肺部疾病的发生、发展提供一条新的途径。

4 参考文献

- 1 Lindquist S. The heat shock response. Annu Rev Biochem. 1986; 55: 1151
- 2 Lindquist S, Craig EA. The heat shock proteins. Annu Rev

- Genet 1988; 22: 631
- 3 Lehnert BE. Pulmonary and thoracic macrophage subpopulations and clearance of particles from the lung. Environ Health Perspect 1992; 97: 17
- 4 Heppleston AG. Minerals, fibrosis and the lung. Environ Health Perspect 1991; 94: 149
- 5 Teyton L, et al. A quantitative dot immunobinding assay for human HLA class I antigens using nitrocellulose membrane filters. J Immunol Methods 1986; 89: 73
- 6 龚鹏飞, 等. 染矽尘大鼠肺泡巨噬细胞及肺组织热应激蛋白 HSP70 的表达. 中华劳动卫生与职业病杂志 1995; 13 (3): 166
- 7 金冬雁, 黎孟枫, 等. 译. 分子克隆实验指南. 第二版. 北京: 科学出版社, 1993; 894~898
- 8 陈顺志, 等. 过氧化脂质 TBA 显色的三种方法学比较. 临床检验杂志 1984, (4): 18
- 9 Donati YRA, et al. Oxidative injury and the heat shock response. Biochem pharmacol 1990, 40: 2571
- 10 Polla BS, et al. Differential induction of heat stress proteins and functional effects of heat shock in human phagocytes. Inflammation 1995, 19 (3): 363
- 11 Zaidi SH. Experimental Pneumoconiosis, Baltimore, John Hopkins Press, 1969; 64~93
- (收稿: 1995—07—10 修回: 1996—04—30)

清洗汽油储罐致急性四乙基铅中毒 1 例报告

南充市卫生防疫站 (637000) 兰小雪 杨忠荣 刘 慧 白体君 罗克智

张某, 男, 38 岁, 某炼油厂临时工, 1995 年 5 月 6 日 8 时许, 穿塑料凉鞋, 戴布手套, 进入汽油储罐内, 双腿浸在淤水中, 用铁铲铲除罐内淤渣。工作约 2 小时, 出现头昏、头痛、恶心、呕吐、心悸、腹胀等症状, 即回家休息。下午 3 时许又进入罐内工作约 2 小时, 上述症状加重, 到医院就诊, 给予吗叮啉、安定等治疗。第二天上午再入罐内工作约 2 小时, 感头昏、头痛、腹胀加剧, 并出现步态不稳, 神志恍惚, 再次到医院就诊, 仍以吗叮啉、多酶片、安定等治疗, 但无好转。一周后病情逐渐加重, 兴奋、多语、健忘, 双下肢不自主抽搐, 下肢乏力, 肌肉跳动, 严重失眠, 恶梦, 易惊醒, 每晚仅睡 1 小时左右, 于 1995 年 5 月 30 日转我站就诊。

既往体健, 无接触其他毒物史。

查体: 体温 35.8℃, 脉搏 53 次/分, 血压 11/7.5kPa; 神清, 兴奋, 步态蹒跚; 双肺正常, 心率 53 次/分, 律不齐; 肝脾未及; 皮肤划痕(++); 眼心反射 +6 (53), 眼睑、舌震颤, 手有细小的意向性震颤, 四肢肌束颤动, 昂白氏征(+), 膝腱反射活跃。

实验室检查: 血常规、肝功、X 线胸片、B 超均正常。尿铅 1.8μmol/L, 尿 δ-ALA 45.8μmol/L, 尿 CP (+), 心电图示窦性心律不齐。脑血流图示波幅低且双侧不对称。肌电图示神经传导速度正常, H 反射潜伏期延长, 波幅减小。左、右腓肠肌针电极肌电图: 左侧伴自发肌电出现痉挛性放电, 右侧松弛时为电静息, 随意

运动时运动单位电位幅度较低, 波宽增大。诱发肌电波幅较低, 波宽增大。脑电图示 θ 波增多, 对光反射减弱。

现场调查: 汽油储罐系金属结构, 圆锥形, 高 7.8m, 直径 8m, 通常储存汽油约 320 吨, 置于露天, 仅侧面距地面 45cm 处及顶部各有一直径为 50cm 的圆形通气口, 内储 70 号汽油 (其含四乙基铅小于 1.00g/kg), 油罐 8 年未清洗, 此次因漏需补, 将油抽干后, 加气压蒸气煮开 4 小时, 反复 4 次。3 天后患者清罐, 局部无通风设备, 入罐操作仅患者 1 人, 共铲除淤渣 3 吨多。周围无其他有害物质。

事故发生后, 在同类空油罐内不同位置及不同时间模拟测定了四乙基铅及汽油浓度, 各采 8 份样, 空气中四乙基铅、汽油平均浓度分别为 0.75mg/m³, 12681.20mg/m³, 淤渣内含四乙基铅 16%。

诊断: 急性轻度四乙基铅中毒。

治疗: 入院后给予能量合剂, 补充液体, 谷维素、镇静剂及大量维生素等对症、支持治疗, 住院 5 个月后恢复正常。

本病例提示, 清洗汽油储罐时, 必须先冲洗并充入大量压缩空气, 工人戴送风或防毒面具、胶皮手套, 穿防护服装、长筒胶鞋, 限制每次进入工作时间, 罐外专人监护, 工作后淋浴清洗。残渣要妥善处理, 才能有效地防止中毒事故的发生。

(收稿: 1995—11—30 修回: 1996—2—15)

to each rat, respectively. After forty days, the blood GSH-Px activity decreased obviously. Sixty days later, the blood GSH-Px activity declined very significantly, and the GSH-Px activity of kidney decreased obviously ($P < 0.05$), but the GSH-Px activity of liver made no change. The GSH-Px activity of kidney after sixty days in 40mg dose group decreased more significantly than that in 20mg dose group ($P < 0.05$). The blood GSH-Px activity in coking workers was significantly lower than that in controls ($P < 0.01$). The results showed that CTP could decreased blood GSH-Px activity and enhanced 63 the level of lipid peroxidation.

Key words: coal tar pitch, lipid peroxidation, glutathione peroxidase

Study on the protective effects of heat stress protein against quartz in cultural alveolar macrophage

Gong Pengfei, et al

Previous studies both in vitro and in vivo demonstrated that quartz could increases the expression of HSP-70 in pulmonary macrophage and the increased level of HSPs may serve as an autoprotective mechanism. In this research, the protective effect of HSPs induced by heat stress (42°C, 15 min) on the cultural AM of rats against quartz were studied. The results showed that the increased level of HSPs in AM could obviously increase the survival rate of AM and remarkably decrease the content of MDA of AM and the LDH activity of the culture medium. It was suggested that raising the level of HSPs in AM may provide a new route for protecting and improving lung clearance mechanism, preventing the development and progression of silicosis and other lung diseases.

Key words: heat stress protein, alveolar macrophage, quartz

Correlation between erythrocyte pyrimidine 5'-nucleotidase (P5N) and other biological monitoring indices in lead-exposed workers

Wang Yuzi, et al

In the paper the erythrocyte pyrimidine 5'-nucleotidase (P5N) activity, blood lead (BPb) and urinary δ -aminolevalinic acid (δ -ALA) levels in 20 lead-exposed workers and 20 control workers were studied, and correlative analysis among them were performed too. The results showed that the P5N activity was significantly lower in lead-exposed workers than that of the control group, and was negatively correlated with blood lead ($r = -0.51$) and urinary δ -ALA ($r = -0.31$). It was suggested that the P5N activity might be one of the most reliable indicators for lead exposure.

Key words: lead, erythrocyte pyrimidine 5-nucleotidase, blood lead, urinary δ -ALA

Psychological stress in seamen

Wang Haiming, et al

The score of the self-rating anxiety scale, 24 hour urinary excretion values of 17-hydroxycorticosteroid, keto steroid, catecholamine, epinephrine and norepinephrine, and the attention were measured in 36 seamen in different periods of a 61-day ocean travelling and in 8 of them in overstaying 60 days after the voyage. The results showed that the seamen were under psychological stress on the voyage. The stress tended to be more intensive with the travelling going on and was relieved through a period of mainland living. Suggestions were made for the seamen to relieve psychological stress.

key words: psychological stress, seamen, urine hormone