

染石英及石棉尘大鼠肺灌洗液 SDS-PAGE测定

陈 莉 王迎春 富 博 杨鸿武 汤天昀

摘 要 目的 探讨尘肺发病机理。方法 采用 SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 技术对染石英 (25mg/只) 或石棉尘 (5mg/只) 大鼠支气管肺泡灌洗液 (BALF) 进行了测定, 并在光镜下观察天狼星红染色肺组织 I、III 型胶原分布情况。结果 染石英不同时间大鼠 BALF 中存在 5 条分子量分别为 90, 66, 60, 25, 14 KD 的蛋白质条带。染石棉大鼠 BALF 仅有一条带, 分子量为 66KD。染石英两周时, 大鼠肺组织细胞纤维性结节中即有少量 I 型胶原沉积, 2 个月时 I 型胶原明显增加。粗大。石棉组 3 个月时肺间质中有 I 型胶原存在。两组均未见明显 III 型胶原。结论 染石英大鼠 BALF 中不同分子量蛋白质的出现可能对矽肺的发生有一定的促进作用。

关键词 石英 石棉 BALF SDS-PAGE

Analysis of SDS-PAGE on BALF in Rats Exposed to Quartz or Chrysotile Chen Li, Wang Yingchun, Fu Bo et al. Shenyang Institute of Occupational Health and Medicine, Shenyang, 110024

Abstract In order to explore the pathogenesis of pneumoconiosis, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was used to analyse the changes of bronchoalveolar lavage fluid (BALF) in male rats, at 0.5, 1, 2, 3, 5 months after intratracheal injection of quartz (25mg/rat) or Canada UICC chrysotile (5mg/rat), and the lung histopathology with picrosirius stain were examined. The results showed that there were five protein bands in BALF of quartz exposed rats and their molecular weights were 90, 66, 60, 25, 14 KD, respectively; only one-band with 66KD molecular weight were found in BALF of chrysotile exposed rats. The collagens I deposited in pulmonary fibrotic nodes in quartz exposed rats could be seen in two week exposure, then gradually increased. Collagens I were only found in thickened lung interstitial tissues of chrysotile exposed rats after 3 month exposure, no collagens III were found in two groups. The conclusion seems that the existing of proteins with different molecular weight in BALF of quartz exposed rats might play a promoting role in the development of silicosis.

Key words Quartz, Chrysotile, Bronchoalveolar lavage fluid (BALF), SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

石英、石棉等各种矿物性粉尘经呼吸道进入肺部之后可引起肺内一系列的生理、病理改变, 最终导致肺纤维化。许多研究认为肺泡巨噬细胞在这一系列的变化中起关键作用。巨噬细胞受到粉尘刺激之后释放多种蛋白质因子作用于成纤维细胞, 并影响胶原的合成。但

这些研究多限于体外, 结果也不尽一致。本研究采用 SDS-PAGE 技术对染石英、石棉尘大鼠支气管肺泡灌洗液 (BALF) 进行了分离测定, 并采用天狼星红染色方法对大鼠肺组织中 I、III 型胶原分布情况进行了观察, 以期探讨肺纤维化发病机理提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 粉尘

石英粉尘 (中国预防医科院劳卫所提供)

作者单位: 110024 沈阳市劳动卫生职业病研究所 (陈莉、王迎春、富博、杨鸿武), 中国医科大学科技开发公司 (汤天昀)

游离 SiO_2 含量 $> 97\%$, 分散度 99% 以上的粉尘粒径 $< 5 \mu\text{m}$, 加生理盐水配成浓度为 $25\text{mg}/\text{ml}$ 的粉尘悬液

Canada UICC 温石棉 (德国杜塞尔多夫大学环境卫生研究所提供) 用生理盐水配成浓度为 $5\text{mg}/\text{ml}$ 的粉尘悬液

1. 2 动物染尘及 BAL

雄性 Wistar 大鼠 10 只, 体重 $160 \sim 200\text{g}$, 随机分为石英组、石棉组及生理盐水对照组。实验组每只经气管注入 1ml 相应粉尘悬液, 对照组注入 1ml 生理盐水。分别于染尘后 0.5, 1, 2, 3, 5 个月经股动脉放血处死动物, 按常规方法行支气管肺泡灌洗 (BAL)。取少量 BALF 计数细胞总数。余 BALF 于 4°C $1200\text{r}/\text{min}$ 离心 10min , 上清液分装, 冻存待测。

1. 3 病理学检查

每组随机留取一只大鼠, 取肺进行病理学检查。HE 天狼星红染色, 光镜或偏光镜下观

察。偏光镜下, I 型胶原红色, III 型胶原绿色。

1. 4 十二烷基磺酸钠 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)

电泳仪: Bio-Red 公司产 Bio-Red's mini-electrophoresis system 凝胶与电极液配制: 按仪器说明书配制 $12\% \sim 14\%$ SDS 聚丙烯酰胺凝胶和电极液, 全部试剂均为 Bio-Red 产品。样品缓冲液配制: 参照仪器说明书。样品液制备: 取 BALF 和样品缓冲液按 $1:1$ 配制 (血清按 $1:16$ 配制), 煮沸 5min 。分子量标准蛋白 (Marker): Bio-Red 产品。电泳条件: 调电压 150V , 其他参数自动控制。考马斯亮兰染色。

2 结果

2. 1 细胞总数变化

给大鼠气管注入石英尘 25mg , 2 周时, 其 BALF 中细胞总数即明显增加, 此后一直维持较高水平 (表 1)。石棉组各时间 BALF 细胞总数与对照组相比无明显差异。

表 1 染尘不同时间实验组和对照组大鼠 BALF 中细胞总数 ($\times 10^6$) ($\bar{x} \pm s$)

	0.5月	1月	2月	3月	5月
对照	(5) 3.62 ± 2.27	(5) 2.30 ± 1.63	(6) 2.97 ± 0.94	(5) 1.20 ± 0.21	(5) 2.12 ± 0.75
石英	(6) $16.36 \pm 2.80^*$	(5) $15.99 \pm 0.63^*$	(4) $16.37 \pm 1.51^*$	(4) $15.72 \pm 3.84^*$	(5) $14.80 \pm 4.47^*$
石棉	(4) 1.52 ± 1.22	(5) 1.87 ± 0.73	(4) 1.43 ± 0.79	(4) 2.57 ± 1.37	(5) 1.44 ± 0.34

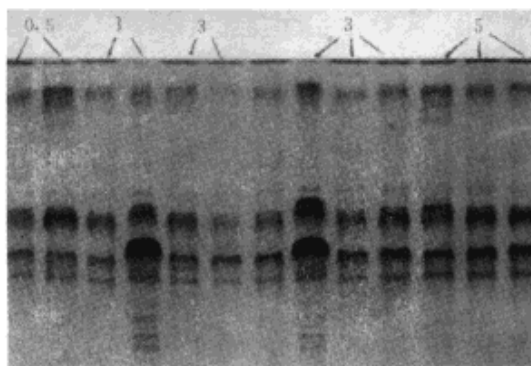
** $P < 0.01$ 注: 括号内为大鼠数。

2. 2 病理学改变

染尘后半个月, 石英组大鼠肺内即有 I 型胶原明显增生呈结节状。2 个月时, I 型胶原明显增多、粗大。各时间均未见明显 III 型胶原。石棉组可见间质明显增厚。3 个月时, 经天狼星红染色可见少量 I 型胶原。

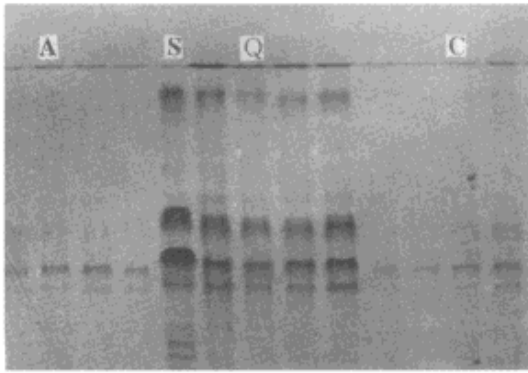
2. 3 SDS-PAGE 分析

石英组大鼠 BALF 经 SDS-PAGE 之后可见 5 条清晰区带, 分子量约为 90, 66, 60, 25, 14 KD, 随染尘时间延长无明显变化 (图 1)。石棉组大鼠 BALF 仅有一条区带, 分子量约为 66KD (图 2)。各组大鼠血清 SDS-PAGE 区带无明显差别。将石英组大鼠 BALF 与血清同时电泳可见 BALF 区带与血清中某些成分一致 (图 3)。



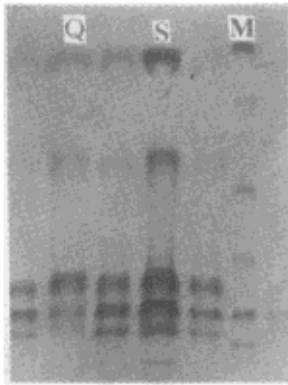
M: 分子量 Marker; 0.5, 1, 2, 3, 5 染尘时间 (月)

图 1 石英组大鼠染尘后不同时间 BALF SDS-PAGE 图谱



A 石棉组, Q 石英组, C 对照组, S 对照血清

图2 染尘不同时间各组大鼠 BALF SDS-PAGE结果



Q 石英 BALF, S 血清, M: 蛋白标准

图3 石英组大鼠 BALF和血清 SDS-PAGE比较

3 讨论

粉尘引起的肺纤维化是一个非常复杂的生物学过程。许多研究表明,当各种矿物性粉尘通过呼吸道抵达肺泡之后,首先引起肺内巨噬细胞的吞噬反应,巨噬细胞数量增加,并释放多种细胞因子,这些细胞因子彼此联系,交互作用影响成纤维细胞增殖和胶原合成与沉积。60年代末,Heppleston^[1]等首先报告巨噬细胞在体外经石英处理后产生一种蛋白质因子,能促进成纤维细胞的增殖和胶原的合成。此后,许多学者做了大量研究工作。陈元秀^[2]等用体内染尘方法使石英与巨噬细胞相互作用,从这种在体内受石英刺激的肺巨噬细胞体外短期无血清培养上清液中分离纯化出一种具有促进成纤维细胞增殖和胶原合成的蛋白

质,分子量为 66 KD

本实验采用 SDS-PAGE 对染石英、石棉尘不同时间大鼠支气管肺泡灌洗液进行了测定,结果表明矽肺大鼠 BALF 中展现 5 条区带,这些区带都是生理情况下不该出现或微量存在的蛋白质,其中 66 KD 者与陈元秀等 199 年报道的一致,是一条具有致纤维化作用的蛋白质因子。其他 4 条带中有 2 条 (14~20 KD) 也曾体外实验出现过,均有致纤维化作用。这 5 条区带为何种蛋白质,具有哪些理化特性,尚需做进一步分析。

石棉组大鼠 BALF 仅出现一条 66 KD 蛋白带可能与染尘剂量小及作用时间较短有关。其 BALF 中细胞总数未见明显变化,病理改变较轻与电泳结果颇为一致。但有实验证明 66 KD 蛋白质可促进石棉肺的胶原 mRNA 表达^[3]。

石英组大鼠肺病理学检查发现 2 周时肺组织即有较多纤维细胞结节,天狼星红染色其间有少量 I 型胶原沉积。染尘 2 个月时肺组织中可见大量 I 型胶原。一般认为病变早期 I、III 型胶原同时增加^[4],本文未见到明显 III 型胶原沉积,可能与染色条件控制不当,切片过厚有关。天狼星红染色条件要求严格,切片要薄且均匀。石棉组肺组织病理学变化以间质增厚为主。3 个月时肺间质中仅见少量 I 型胶原,系因石棉尘致纤维化能力本身较石英尘为弱,染尘剂量较小之故。此结果支持 BALF 变化。

4 参考文献

- 1 Heppleston AG, Syles JA. Activity of a macrophage factor in collagen formation by silica. *Nature*, 1967, 214: 521
- 2 陈元秀,李玉瑞.矽肺成纤维细胞增生因子的纯化及分析. *生物化学杂志*, 1991, 7 (4): 447
- 3 陈亚萍,李玉瑞.实验性石棉肺病变中 I 型及 III 型胶原基因表达的研究. *生物化学杂志*, 1993, 9 (1): 65
- 4 Bateman EO, Turner-Warwick M, Adelman-Grill BC. Immunohistochemical study of collagen types in human foetal lung and fibrotic lung disease. *Thorax*, 1981, 36: 645

(收稿: 1997-02-27 修回: 1997-06-19)