

## · 综 述 ·

## 矽肺发生中的自由基

何永华 (综述) 王广增 (审核)

近20多年来,尘肺发病机理的研究多集中于肺泡巨噬细胞(AM)。目前公认吸入肺内的石英尘粒引起AM死亡是矽肺发生的始动环节。被吞噬的矽尘颗粒作用于AM溶酶体膜,使之破裂并释放内容物,引发一系列反应,导致矽肺发生。这就是由来已久的矽肺溶酶体学说。然而近年来矽肺的溶酶体学说受到了挑战。首先发现即使低剂量的石英对无吞噬功能的红细胞也有毒作用。进一步实验发现,在含 $\text{Ca}^{2+}$ 与不含 $\text{Ca}^{2+}$ 的AM培养液中分别加入石英,两组细胞存活率明显不同,而细胞内溶酶体破损率却无明显差别;加入溶酶体膜稳定剂,80%左右的溶酶体稳定无破裂时,仍不能有效防止石英诱发的细胞死亡,其存活率与只加石英不加稳定剂者相似。随后还发现,加入较高剂量的石英后,溶酶体酶在细胞内的扩散,多见于细胞形态改变以后<sup>[1]</sup>。故而认为石英引起的AM死亡与溶酶体破裂无因果关系,而是由于石英对细胞膜的直接损害,改变了膜的通透性、细胞外 $\text{Ca}^{2+}$ 内流、细胞功能紊乱所致。

70年代以来迅速发展起来的自由基与脂质过氧化(LPO)学说及膜毒理学为深入研究疾病的发生发展,尤其是细胞损伤机制开辟了新途径。自由基是指具有一个或多个不成对电子的原子或分子,由分子内共价键均裂而产生。人体内的众多生理现象均有自由基的参与。由于自由基一般都具有高度的化学活性,可激发一系列化学反应,所以当自由基的量超过人体正常代谢能力时即可造成组织损伤。矽肺的自由基理论认为石英经自由基致AM过氧化,损伤AM,导致矽肺发生。

## 1 矽肺发生中自由基及脂质过氧化的确认

1975年Cabor等<sup>[2]</sup>报道豚鼠AM与石英体外培养致LPO产物丙二醛(MDA)增加一倍以上,而无毒的金刚砂则无此作用,提出石英通过自由基作用于细胞膜致LPO的假设。矽尘接触者血清超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化酶、MDA均高于对照组,说明过氧化物增加不是由于其清除系统功能降低,而是由于

过氧化水平实质性增高<sup>[3]</sup>。

电子自旋共振波谱(ESR)技术的研究结果为矽肺发生中的自由基的存在提供了最直接的证据。新鲜石英ESR分别为 $g=2.0017$ 及 $g=2.0007$ ,这是硅载自由基 $\text{Si}^\cdot$ 、 $\text{SiO}^\cdot$ 的共振磁场位置。在捕捉剂二甲基氧化吡咯啉(DMPO)溶液中研磨石英,则形成 $\text{DMPO}^\cdot\text{OH}$ 加合物,超精细分裂常数 $a=14.9\text{g}$ ,为典型的 $\cdot\text{OH}$ 波谱,它随研磨时间延长而增强。在反应液中加入超氧化物歧化酶,结果信号降低65%;当加入过氧化氢酶时,信号消失<sup>[4]</sup>。说明溶液中存在超氧阴离子自由基( $\text{O}_2^\cdot$ )及 $\text{H}_2\text{O}_2$ ,并均参与 $\cdot\text{OH}$ 的形成。

## 2 矽肺发生中自由基的来源

关于矽肺发生中自由基的来源虽未最后确定,但概括起来主要有以下几个方面。

(1) AM吞噬尘粒后,发生呼吸爆发,激活电子传递系统,催化细胞内氧,产生 $\text{O}_2^\cdot$ 。 $\text{O}_2^\cdot$ 由超氧化物歧化酶催化发生质子化反应,歧化生成 $\text{H}_2\text{O}_2$ 。细胞内含有还原性金属离子, $\text{O}_2^\cdot$ 以此为催化剂产生 $\cdot\text{OH}$ 。脂质被初始氧化后的中间产物如有机自由基、烷氧自由基、有机过氧化自由基与 $\text{O}_2^\cdot$ 反应,持续产生大量 $\cdot\text{OH}$ <sup>[5]</sup>。

(2) Vallythan等<sup>[6]</sup>认为石英可不依赖AM而产生氧自由基。通过对新研磨的石英尘采用ESR技术,检测到 $\text{Si}^\cdot$ 、 $\text{SiO}^\cdot$ 特征波谱。与二苯代苦味酰肼基(DPPH)标准ESR峰比较,推算出每克石英粉尘在空气中研磨30分钟后,即可产生 $10^8$ 个硅载自由基。硅载自由基与水或 $\text{H}_2\text{O}_2$ 反应,直接生成 $\cdot\text{OH}$ 。另外,硅酸水化也能产生 $\text{H}_2\text{O}_2$ 。

(3) 已知各期矽肺患者体液免疫水平升高,血清免疫球蛋白如IgG、IgE、IgA促进AM产生 $\text{O}_2^\cdot$ 及过氧化产物。吸附有IgG的某些纤维能显著增加AM的 $\text{O}_2^\cdot$ 释放<sup>[7]</sup>。

(4) 石英刺激髓单核细胞一氧化氮合成酶的mRNA表达<sup>[8]</sup>。一氧化氮合成酶催化精氨酸与分子氧生成一氧化氮( $\text{NO}$ )<sup>[9]</sup>。 $\text{NO}$ 接受还原型辅酶II传来的电子生成氮氧自由基( $\text{NO}^\cdot$ )。 $\text{NO}^\cdot$ 与 $\text{O}_2^\cdot$ 迅速生成氮过氧化物阴离子( $\text{ONOO}^\cdot$ )。 $\text{ONOO}^\cdot$ 一旦质子化,即迅

速分解,产生活性更强的氧化物<sup>[10]</sup>。

### 3 自由基致矽肺机理

大多数自由基都不带电荷,对反应物选择性低。自由基的不成对电子异常活跃,能通过多种方式参与机体生化反应,产生复杂影响。

自由基形成后,首先作用于生物膜上多不饱和脂肪酸(PUFA)。PUFA被抽取氢,产生脂质自由基并自氧化,形成过氧化产物。生物膜被过氧化后,疏水部分极性增强,膜通透性及脆性增加,结构改变,功能受损。亚细胞结构的生物膜被自由基损伤后,释放大量的活性物质,进一步放大了自由基的损伤,这是自由基作用的关键。 $\cdot\text{OH}$ 不易扩散转移,可直接攻击膜上的多种离子通道如 $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ -ATP酶,膜内外离子交换紊乱,细胞溶解。在含 $\text{Ca}^{2+}$ 的AM培养液中加入 $400\mu\text{g/ml}$ 的石英,发现胞浆游离 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度比对照组高出3倍。通过时效关系的研究还发现AM对 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 的通透性改变早于乳酸脱氢酶的释放,表明石英致AM损伤与细胞内外 $\text{Ca}^{2+}$ 稳态失调有关,且提示钙稳态紊乱是细胞膜损伤的结果<sup>[15]</sup>。由此可见,石英损伤膜结构导致AM死亡,LPO是其中最有力因素。其主要机理是自由基与膜上酶、受体或其他成分共价结合,改变膜结构和活性,细胞功能紊乱而死亡。

组成蛋白质的所有氨基酸对氧自由基及脂质过氧化物的修饰作用都很敏感,使蛋白质分子间及分子内成键,以致交联、断裂。自由基打击酶活性基因,酶变性失活。但受损的机体会保护性地增加清除自由基的酶的合成,抗氧化水平升高<sup>[12]</sup>。活性氧能直接影响核酸,如 $\cdot\text{OH}$ 使脱氧核苷酸脱嘌呤, $\text{O}_2\cdot$ 使DNA链断裂。矽尘的 $\text{SiO}_2$ 与DNA通过氢键形成DNA矽尘加合物,干预DNA表达、修复及染色体的有丝分裂。活性氧自由基通过改变巨噬细胞核蛋白的氧化还原状态,引发转录或稳定特定的mRNA而影响基因谱,改变调节蛋白的结构<sup>[13]</sup>。近年来发现内源性或外源性氧自由基均可诱导吞噬作用产生热应激蛋白(HSP<sub>70</sub>),增强抗氧化损伤能力<sup>[14]</sup>。染石英尘大鼠AM的HSP<sub>70</sub>mRNA表达水平明显升高,HSP<sub>70</sub>合成增加<sup>[15]</sup>。

氮氧自由基及氮过氧化物比 $\text{O}_2\cdot$ 的活动范围更宽,能穿透数个细胞,具有高度的细胞活性,不仅能分解核苷酸,而且能引导脂肪酸的过氧化和芳香氨基酸的亚硝酰基化<sup>[16]</sup>。

许多学者从多方面研究矽肺发生过程中自由基的作用。仓鼠气管内注入黄嘌呤氧化酶系,分期处死动物,发现仓鼠肺组织内羟脯氨酸及MDA增加,

肺泡间隔增厚,纤维结节形成<sup>[17]</sup>。大鼠气管内同时注入葡萄糖、葡萄糖氧化酶及髓过氧化物酶,4小时后即可在光镜下见到肺泡壁变得模糊不清,肺泡内纤维蛋白沉着。1天后可见到切片上肺泡轮廓消失,AM破碎,肺泡间质广泛纤维化<sup>[18]</sup>。Vallythan等<sup>[6]</sup>取大鼠AM于浓度分别为1.25、2.50、5.00mg/ml的石英尘培养液中,5分钟后各溶液的MDA含量分别为5.75、6.48、7.50mmol,两者呈剂量-效应关系,石英致LPO作用非常明显。

各类自由基的半减期极短,扩散半径也很小,毒作用多局限于产生自由基的膜或胞浆内,矽肺过程中自由基的损伤对象主要是AM。AM受损后,释放大量的活性物质,如肿瘤坏死因子、纤维粘连蛋白、AM源生长因子、转化生长因子、胰岛素样生长因子、白细胞介素、单核细胞趋化因子、溶酶体酶等,促进成纤维细胞增生及胶原合成<sup>[19]</sup>。矽结节中含有大量硅-氧桥键,纤维内多聚分子结合紧密,胶原高度交联,矽结节不断发育增大,矽肺逐渐形成。

目前,矽肺的自由基学说与矽肺的其他学说一样,不能详细说明矽肺发病机理;也有人认为矽肺与自由基的联系是不明确的。尹宏等<sup>[20]</sup>用ESR研究 $\cdot\text{OH}$ 与石英引起的豚鼠AM损伤,发现石英在溶液中确实能产生 $\cdot\text{OH}$ ,其多少随石英的量而增加。但在磷酸缓冲液中衰减较快,90分钟内已检测不到其信号。因此怀疑在呼吸道的湿润环境中能否维持足够长的时间来发挥其生物反应性作用。实验还发现,酵母多聚糖能发出比石英更强的 $\cdot\text{OH}$ 信号,但其培养液中AM存活率比石英组高得多(分别为99.3%和7.60%),故而认为 $\cdot\text{OH}$ 的多少与AM死亡无必然联系。

### 4 抗氧化作用与矽肺治疗

自由基学说虽有待完善,但作为一个已确立的学说对矽肺防治具有重要意义。研究能清除自由基、防止脂质过氧化、保护AM的药物,将是防治矽肺的有效途径。近年来发现能有效防治矽肺的药物一般都具有抗氧化作用,汉防己甲素是其中研究得较为成功的一例。它能促使胶原在细胞内积聚,降低胶原基因转录水平,阻止成纤维细胞合成胶原,对大鼠实验性尘肺有明显的防治作用,使其全肺干重及胶原含量显著低于对照组,而且胶原排列松散,结节退变<sup>[21,22]</sup>。实验发现汉甲是高效的抗氧化剂。在含有酵母多聚糖的AM培养液中加入终浓度为 $40\mu\text{mol/L}$ 的汉甲,能降低AM 70%以上的耗氧量, $\text{O}_2\cdot$ 、 $\text{H}_2\text{O}_2$ 产量分别减少43%、68%;使染尘AM的化学发光量降低63%<sup>[23]</sup>。梯络龙类药物

如矽宁亦可清除自由基,降 AM耗氧及化学发光,抑制矽肺进展,使大鼠实验性矽肺的胶原蛋白含量降低,矽结节中出现大量泡沫样细胞。

总之,随着自由基医学在矽肺领域的应用,矽肺的自由基理论将日趋成熟完善。今后,如能筛选出更具抗氧化性能的药物,必将使矽肺的防治呈现出新的面貌。

## 5 参考文献

- 1 Agnes B Kane, et al. J Cell Biol, 1980, 87 643
- 2 Silsive Gabor, et al. Arch Environ Health, 1975, 30 499
- 3 马勇,等. 卫生研究, 1995, 24 (2): 193
- 4 郭维新. 国外医学卫生学分册, 1996, 23 (4): 208
- 5 Joseph C Fantone, et al. AM J Path, 1982, 107 (3): 397
- 6 Val Vallythan, et al. Am Rev Respir Dis, 1988, 138 1213
- 7 I M Hill, et al. Exp Lung Res, 1996, 22 133
- 8 Fei Cheng, et al. PMIS, 1996, 104 176
- 9 Harald Schmidt, et al. NO at work. cell, 1994, 78 919
- 10 Joseph S, et al. Pro Natl Acad Sci USA, 1990, 87 1620

- 11 尹宏,等. 中华劳动卫生职业病杂志, 1991, 9 (6): 324
- 12 Yvorne MW, et al. J Biol Chem, 1996, 267 (15): 10625
- 13 Michael Ming shi, et al. J Biol Chem, 1996, 267 (10): 5878
- 14 Polla BS, et al. Inflammation, 1993, 19 363
- 15 龚鹏飞,等. 中华劳动卫生职业病杂志, 1996, 14 (6): 344
- 16 Willian A Pryor, et al. Science, 1981, 214 (23): 435
- 17 Shri N Giri, et al. Exp Mol Pathol, 1988, 49 395
- 18 Kent J Johnson, et al. J Clin Invest, 1981, 26 449
- 19 David A, et al. Am Rev Respir Dis, 1993, 148 68
- 20 尹宏,等. 中华劳动卫生职业病杂志, 1992, 10 (2): 101
- 21 尤宝荣,等. 卫生研究, 1996, 25 (4): 201
- 22 韩素丽,等. 卫生研究, 1996, 25 (1): 6
- 23 程玉海,等. 卫生研究, 1994, 23 (4): 197

(收稿: 1997-07-03 修回: 1997-10-14)

# 尘肺支气管肺泡灌洗液的变化及意义

李 激 陈 莉

当环境中各种有害物质如粉尘粒子、有毒气体等通过呼吸道进入肺部时,必然要引起肺内局部的一系列生理、病理反应如细胞群、生化成分及免疫功能的改变。这种变化既有量的差异,也有质的差别。利用支气管肺泡灌洗技术分析各种肺病时支气管肺泡灌洗液(BALF)成分的变化及其在疾病中的意义,无疑对研究各种环境因素所致肺病特别是尘肺的发生、发展及早期诊断具有重要的理论价值和实际意义。本文仅就尘肺时的BALF变化特点予以概述。

## 1 细胞群的变化

正常肺内存在一组以肺巨噬细胞为主的游离细胞群,可以通过支气管肺泡灌洗(BAL)技术获取,收获的总细胞数可随灌洗量和回收率变动,而细胞浓度相对稳定。健康不吸烟成年人BALF中细胞浓度约为 $100 \sim 150 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ [1],分数巨噬细胞占 $(93 \pm 5)\%$ ,淋巴细胞 $(7 \pm 1)\%$ ,中性粒细胞 $< 1\%$ 。吸烟者BALF中细胞浓度增加[2]。吸烟可使肺巨噬细胞释放对中性粒细胞有趋化活性的物质。长期接触粉尘作业的工人特别是发生尘肺之后,其BALF中细胞总数或细胞浓度

明显增多,可达对照组2~4倍[3~5]。尘肺时BALF中细胞总数增加的程度可因吸入粉尘的种类而异。矽肺时BALF中细胞总数增加最明显,石棉肺逊之[3,4]。纤支镜下所见气道病变程度及X线下尘肺进展情况也影响细胞总数的变化,气道病变重或肺纤维化的X线表现明显者其BALF中细胞总数增加幅度也大[4]。

肺巨噬细胞是肺内炎症反应的主要细胞,通过分泌和释放对中性粒细胞有趋化作用的物质和其他细胞因子,在肺的损伤和修复中起着关键作用。尘肺时BALF中巨噬细胞比例不变或减少,但绝对数因细胞总数的显著增加而增加[5]。

尘肺时BALF中淋巴细胞数百分比增加[6~8],但未见因吸入粉尘种类不同而淋巴细胞比例变化有明显差别。淋巴细胞通过细胞免疫和产生特异性抗体在肺炎症反应和纤维化过程中起活化作用。

中性粒细胞在尘肺患者BALF中增加比例较大[9,10],实验性矽肺BALF中中性粒细胞百分比显著增加。石棉肺早期BALF中以巨噬细胞为主,石棉肺明显时表现为中性粒细胞性肺炎[10]或淋巴细胞性肺炎[8]。

Studdy[11]认为肺有弥漫性阴影的患者BALF细胞分类主要有两种形式:淋巴细胞百分比增加通常为

作者单位: 11002沈阳市第九人民医院(李激),沈阳市劳动卫生职业病研究所。(陈莉)