

表 2 两组 BALF中微量元素含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Cu ($\mu\text{g/ml}$)	Zn ($\mu\text{g/ml}$)	Mn ($\mu\text{g/ml}$)	Si ($\mu\text{g/ml}$)	Fe ($\mu\text{g/ml}$)	Cr ($\mu\text{g/ml}$)
对照组	10	0.18 ± 0.06	2.51 ± 1.77	0.09 ± 0.04	363.78 ± 179.45	4.76 ± 1.70	0.35 ± 0.10
染尘组	10	0.16 ± 0.06	6.03 ± 2.54	0.16 ± 0.05	304.50 ± 194.12	1.86 ± 1.10	0.14 ± 0.12
值		0.66	2.98	4.37	0.62	5.51	2.80
P值		0.51	0.01	0.02	0.54	< 0.001	0.01

表 3 BALF上清中铜/锌比值的比较 (n=10)

组别	Cu/Zn			H值	P值
	P ₂₅	P ₅₀	P ₇₅		
对照组	0.07	0.11	0.15	4.81	0.02
染尘组	0.01	0.02	0.04		

高可以反映粉尘对肺组织的损害程度。本次研究所得结果与此研究结果一致^[2,3]。

有学者对尘肺患者和染尘动物体内铜含量的变化进行研究^[4,5]，发现血清、头发、肺组织和 BALF 中铜含量升高。本次研究的结果没有显示染尘组与对照组 BALF 中铜含量的变化差异；锌具有抑制巨噬细胞的吞噬功能，阻止脂质过氧化，并与细胞膜上的酶相互作用，起稳定细胞膜的作用。关于接尘者体内锌含量的变化报道不一，朱玲勤^[5]等对煤工尘肺患者血清锌含量的测定结果为锌含量降低。本研究中锌、锰含量染尘组较对照组升高，可能是机体启动自我保护机制即代偿性的升高。

本实验对染尘大鼠模型的 BALF 中的硅、铁、铬元素含量进行了检测，发现 BALF 中染尘组与对照组比较，硅含量无明显变化，铁和铬含量降低。提示机体对进入体内外源性硅尘有一定的代谢和代偿能力。铁是机体内重要的抗氧化保护物质的组成成分，在尘肺病变时，其含量或活性可能受到影响。铬主要参与体内能量物质的代谢，在一定量 SO₂ 作用下，细

胞受到损伤，机体启动修复机制；铬还参与脂质的代谢，在体内具有抗氧化作用。但是细胞内的铬与大分子结合，形成的化合物分子量很大，进行离心时，易于沉降，因此染尘组 BALF 中铬含量降低。

机体内众多微量元素既有协同亦有拮抗，它们相对维持在某种水平上，参与机体的各种代谢，使机体保持平衡。由于粉尘的侵入，微量元素在机体总体调节下，参与对粉尘的清除，这一过程中可能存在着某些元素一定时期一定程度代偿性的改变，最终会出现机体微量元素的失调，导致体内某些酶含量减少或活力减弱，脂质过氧化进程加速，细胞膜受损，机体免疫功能下降。有关微量元素参与尘肺发生的具体机制，尚需我们更深入地进行研究探讨。

参考文献:

[1] 李庆 徐从景, 李倩 等. 煤工尘肺与 T 淋巴细胞及微量元素关系的临床研究 [J]. 中国工业医学杂志, 2005 18 (4): 208-210
 [2] 曹殿凤, 孙杰, 尚波. 染尘动物及尘肺支气管肺泡灌洗液的研究进展 [J]. 职业与健康, 2007 23 (12): 1039-1040
 [3] 张素华, 张兆志. 148例矽肺患者肺叶灌洗回收液检查结果分析 [J]. 中国工业医学杂志, 2005 8 (4): 241-242
 [4] 谷春 刘占红 赵宏伟, 等. 接尘对血清免疫球蛋白水平及血清超氧化物歧化酶活力的影响 [J]. 职业与健康 2003 19 (2): 48-49
 [5] 朱玲勤, 刘志宏. 煤工尘肺患者血清铜蓝蛋白活性与微量元素 Cu、Zn 相关性的探讨 [J]. 工业卫生与职业病, 2001 27 (3): 149

染尘巨噬细胞上清液对人胚肺成纤维细胞中 HSP27 表达的影响

Effect of silica exposed macrophage culture supernatant on HSP27 expression in human embryonic lung fibroblasts

张海英¹, 邹伟明², 金泰虞^{3*}, 杨莉¹, 陈世艺¹

ZHANG Haiying, ZOU Weiming, JIN Taiyu*, YANG Li, CHEN Shi-yi

(1 广西医科大学公共卫生学院, 广西南宁 530024; 2 广西职业病防治研究院, 广西南宁 530024; 3 复旦大学公共卫生学院, 上海 200032)

摘要: 采用大鼠巨噬细胞 (AMs) 和人胚肺成纤维细胞 (HELF) 组成体外模型, 以逆转录多聚酶链反应 (RT-PCR) 技术及免疫印迹 (western blot) 方法分别检测二氧化硅粉尘处理 AMs 24 h 的培养上清液刺激 HELF 细胞的 HSP27 mRNA 及蛋白表达。同时用二氧化钛作为阴性对照, 以不用粉尘处理的 AM 培养上清液作为正常对照。结果 HSP 27 能被染尘 AMs 诱导表达, 且 mRNA 表达水平和蛋白质表达水平变化趋势一致, 均呈良好的剂量效应关系。提示 HSP 27 可能参与了矽尘

致肺纤维化过程。

关键词: 矽尘; 人胚肺成纤维细胞; 热休克蛋白

中图分类号: R135.2 **文献标识码:** B

文章编号: 1002-221X(2009)02-0117-03

以往研究运用双向凝胶电泳/质谱 (2DE/MS) 检测到了染石英粉尘巨噬细胞上清液刺激的人胚肺成纤维细胞 HSP 27 表达的差异, 为了进一步对 2DE 筛出的差异结果进行验证, 且为进行下游差异蛋白质功能的分析打下基础, 我们采用 RT-PCR 及 western blot 技术分别对其 HSP 27 mRNA 及 HSP 27 蛋白质的表达进行了检测, 现报告如下。

1 材料与与方法

1.1 主要试剂

收稿日期: 2008-11-12

基金项目: 广西青年科学基金资助 (桂科青 0832047)

作者简介: 张海英 (1973-), 女, 博士, 主要从事职业流行病学与分子毒理学研究。

* 通讯作者, Email: vjia@smu.edu.cn

RPMI1640培养基, MEM (minimum essential medium) 培养基粉剂, 0.25%胰蛋白酶, 新生牛血清, 台盼蓝, Giemsa RNA抽提及扩增试剂盒 (上海晶美生物制品有限公司), 标准 SiO_2 粉尘 (上外广电公司惠赠), 标准二氧化钛尘 (TiO_2 , 中国预防医学科学院劳动卫生与职业病研究所提供), HELF株 (MRC-5) 购自中国科学院上海细胞生物学研究所细胞库。硝酸纤维素膜 (PDVF膜) 为美国 Millipore公司产品; 兔抗人蛋白质热休克蛋白 27 (heat shock protein 27, HSP 27) 单克隆抗体, 美国 Santa Cruz公司; 辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗, 英国 Abcam公司。

1.2 实验粉尘的制备

标准二氧化钛尘 (TiO_2), 其分散度粒径 $< 2 \mu\text{m}$ 的为 91.5%, $2 \sim 5 \mu\text{m}$ 的为 8.5%, 游离二氧化硅 (SiO_2) 为 0.8%, Al_2O_3 占 0.05%, Fe_2O_3 占 0.01%, TiO_2 , CaO , MgO 痕量经光衍射法检测粉尘粒径均 $< 5 \mu\text{m}$, 约为 $4 \mu\text{m}$, 占 100%。以上粉尘 (TiO_2 , SiO_2) 经 180°C 2 h 高温消毒后用无菌 RPMI1640 培养液配成 2 g/L 的粉尘悬液母液, 冷藏备用, 临用前将母液用无菌 RPMI1640 培养液稀释为所需浓度。

1.3 AM 的收集、纯化与培养及染尘肺泡 AMs 上清液制备

大鼠 AM 的收集、纯化与培养及染尘细胞 AMs 上清液制备采用本教研室方法^[1]。将接种好的培养板中分别加入一定量的粉尘溶液 (TiO_2 , SiO_2 粉尘悬液), 用无血清的 RPMI 1640 培养液调节为以下浓度: 0, 6.25, 12.5, 25.0, 50.0 mg/L (每组剂量 3 个复孔) 并补足体积至 2.5 ml/孔, 37°C 、5% CO_2 孵育 24 h 后终止培养, 上清液以 $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜的抽滤器抽滤后, 用 Parafilm 封口膜封口于 -70°C 储存备用。

1.4 HELF 株 (MRC-5) 的传代培养及染毒

用含 10% 新生小牛血清及青链霉素双抗的 MEM 培养液进行传代培养, 5% CO_2 、 37°C 恒温培养。MRC-5 细胞常规传代培养至对数生长期, 待细胞达到 70% ~ 80% 融合后去除上清液, 胰酶消化, 重悬细胞, 调节细胞浓度为 $1 \times 10^6/\text{L}$, 2 ml 接种于 6 孔板。实验组加入经不同浓度染尘 24 h AMs 上清液; 对照组加入无染尘 AMs 上清各 0.5 ml 及无血清 MEM 培养基各 2 ml; 空白组细胞仅加入 2.5 ml MEM 培养基 (每组设 3 孔平行样)。培养 24 h 后移除上清液, 贴壁细胞每孔加 0.5 ml 提取总 RNA 的试剂, 充分吹打混匀收集后保存于 -80°C , 提取 RNA 备用。

1.5 RNA 抽提及逆转录多聚酶链反应 (RT-PCR)

按说明书提取细胞总 RNA, 紫外分光法测定 RNA 纯度和含量, 将 RNA 模板逆转录成 cDNA。取 $1 \mu\text{l}$ 上述反应液用 PCR 试剂盒对 HSP 27 扩增, 引物序列为: 5' CTCAAACACCGCTGCTAAA 3'; 5' CTCACCACGCCATCCTT 3'; 预变性 5 min 后, 扩增反应条件为 94°C 变性 1 min, 57°C 退火 1 min, 72°C 延伸 1 min, 26 个循环, 循环结束后 72°C 终末延伸 10 min。于 2% 琼脂糖凝胶中电泳, 图像分析软件分析目的基因光密度值, 以甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 为内参照, 计算各基因相对表达丰度。

1.6 采用免疫印迹方法 (western blot) 检测 HSP 27 的表达

细胞总蛋白的提取: 1×10^7 细胞重悬于 $300 \mu\text{l}$ 蛋白裂解缓冲液中, 置冰浴中超声裂解 6 次, 每次超声 10 s, 静置 30 min, 4°C , 22 000 r/min 离心 30 min, 取上清, 测定蛋白浓度。采用 15 μg 总蛋白进行 12.5% SDS PAGE 分离, 蛋白转移至硝酸纤维素膜上, 印迹膜 5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h, 1:5 000 稀释的兔抗人 HSP 27-抗室温温育 1 h, TBST 缓冲液洗涤 3 次, 每次 5 min, 1:5 000 稀释的羊抗兔二抗室温温育 1 h, TBST 缓冲液洗 3 次, 每次 10 min, ECL 试剂发光及显影。以 β -actin 为内参照。

2 结果

2.1 HSP 27 mRNA 相对表达丰度

经比较 HSP 27 mRNA 与内参 GAPDH 表达的相对丰度发现, 随着染尘浓度增加其表达相对丰度逐渐升高 ($P < 0.05$), HSP 27 RT-PCR 产物凝胶电泳图如图 1 所示。图中 M, S₀, S₁, S₂, S₃, S₄, S₅ 分别表示 marker 和空白组 (仅有培养基), 对照组 (未经染尘的 AMs 上清), 6.25, 12.5, 25, 50 mg/L SiO_2 粉尘处理 AMs 上清。

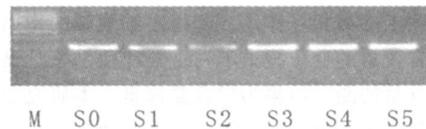


图 1 不同处理组 MRC-5 细胞 HSP 27 RT-PCR 产物凝胶图

2.2 不同浓度 SiO_2 粉尘刺激 AMs 上清诱导 MRC-5 HSP 27 的表达情况

如表 1 所示, HSP 27 蛋白表达随染尘剂量的增加而增加, 呈现良好的剂量-反应关系, 相关系数 $r = 0.751$, $P < 0.05$ 。图 2 为采用 western blot 方法进行的 HSP 27 表达鉴定。

表 1 染尘 AMs 上清诱导 MRC-5 HSP 27 的表达 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	HSP 27 蛋白 (积分光密度)
空白组	126.59 ± 7.28
AM 对照组	128.69 ± 5.46
6.25 mg/L 染尘组	226.14 ± 6.07*
12.5 mg/L 染尘组	266.19 ± 11.33*
25 mg/L 染尘组	274.51 ± 11.39*
50 mg/L 染尘组	310.87 ± 9.91*

与对照组比较 * $P < 0.05$

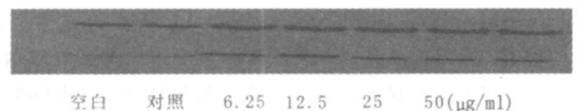


图 2 MRC-5 细胞经诱导后 HSP 27 蛋白的表达

3 讨论

利用蛋白质组学技术筛选差异蛋白再对差异蛋白进行验证, 不失为寻找和筛选新的疾病生物标志物的优良办法。之前的实验中, 我们采用 2DE/MS 筛选出数种差异蛋白质, 但是选择其中 HSP 27 进行验证主要是考虑到: (1) HSP 27 是 HSP 家族中的重要一员, 其重要的生物学功能是保护细胞免受各种应激因素的损伤^[2]; (2) HSP 27 也可参与细胞的增殖、分化及细胞凋亡的信号转导调节^[3-5]; (3) HSP 27 在砂

肺发生发展过程中的作用及其机制尚待研究。

本次实验采用 RT-PCR western blot 检测技术, 分别对经染尘的巨噬细胞上清液刺激的肺成纤维细胞株 (MRC-5) 中的 HSP 27 的 mRNA 及蛋白水平进行测定, 结果证实体外模型的 MRC-5 的 HSP 27 mRNA 及蛋白水平在经 SO_2 粉尘刺激后均可被诱导表达, 且随染尘剂量的增加而增加, 变化规律呈现一致。表明染尘 AMs 上清诱导其表达在转录水平调控, 在一定浓度范围内, 染尘 AMs 上清诱导 HSP 27 基因表达呈剂量效应关系, 提示 HSP 27 的表达与细胞的应激水平密切相关。因此, HSP 27 在矽肺形成及发病中的作用值得进一步探索。

参考文献:

[1] 张海英, 邹伟明, 李慧祺, 等. 染尘巨噬细胞上清液对人胚肺成纤维细胞应激蛋白诱导表达 [J]. 中国职业医学, 2008, 2(35): 105-107.

[2] Casado P, Zuazua-Villar P, Prado MA, et al. Characterization of HSP27 Phosphorylation induced by microtubule interfering agents. Implication on p38 signaling pathway [J]. Arch Biochem Biophys 2007; 461 (1): 123-129.

[3] Barral JM, Broadley SA, Schaffar G, et al. Roles of molecular chaperones in protein misfolding diseases [J]. Semin Cell Dev Biol 2004; 15 (1): 17-29.

[4] Christians E S, Zhou Q, Renard J, et al. Heat shock proteins in mammalian development [J]. Semin Cell Dev Biol 2003; 14 (5): 283-290.

[5] Williams K J, Cwikshank M K, Papper C G. Pulmonary heat shock protein expression after exposure to a metabolically activated Clara cell toxicant: relationship to protein adduct formation [J]. Toxicol Appl Pharmacol 2003; 192 (2): 107-118.

煤矿瓦斯爆炸致重度烧伤 28 例分析

Analysis on 28 cases of severe degree burn induced by gas explosion in a coal mine

杜松英, 陈凤凤

(阜新矿业集团公司总医院, 辽宁 阜新 123000)

近年来瓦斯爆炸时有发生, 爆炸时可致多人同时受伤, 且致病因素较多, 病情复杂, 救治任务繁重。现将我院 2005~2007 年收治的 3 批 28 例瓦斯爆炸致重度烧伤的病例资料分析如下。

1 对象

患者均为男性, 年龄 23~52 岁, 平均 38.5 岁, 平均烧伤面积 60%。其中三度烧伤 15 例, 烧伤面积达 30%~60% 者占 53.6%; 二度烧伤 13 例, 面积 46%~95% 者占 46.5%。合并吸入性烧伤 18 例, 合并中毒出现精神症状 11 例, 合并颅脑外伤、脑挫裂伤 5 例, 合并四肢骨折 6 例, 肺部损伤合并液气胸 3 例。入院时间为伤后 2~28 h。

2 救治措施与效果

入院后立即判定病情进行病员分诊, 医护人员分组, 同时采取相应的抢救治疗措施, ICU 医生负责保持呼吸道通畅及生命体征监测及处置, 专科医生负责创面及复合伤的处理。合并吸入性损伤、烧伤面积达 50% 以上者采取床边气管切开术, 必要时立即采取呼吸机辅助呼吸。在呼吸道保证通畅, 静脉复苏补液顺畅的情况下, 对烧伤创面进行流动水冲洗清创并涂磺胺嘧啶银, 红外线照射。全部病人均行深静脉穿刺补液及留置导尿, 适当加大胶体和水分补充量, 胶体尽量从外周静脉补给, 以保证监测中心静脉压的准确性。同时早期大量应用广谱抗生素, 采取气道及创面分泌物标本做细菌培养和药敏试验指导用药。加强创面处理, 尽早手术封闭创面, 及时消灭烧伤创面有助于控制和减轻感染, 避免并发症。

28 例患者住院 1~150 d, 平均 62 d, 抢救成功 22 例, 死亡 6 例, 1 例入院 2 h 后死于重度吸入性支气管损伤导致的呼吸衰竭, 1 例于入院第 7 天死于重度弥漫性颅脑损伤, 2 例于

第 18 天和第 31 天死于 ARDS, 2 例于切痂植皮术后第 7 天和第 16 天死于多脏器功能衰竭。于入院后第 5~7 天, 对病情平稳的三度及深二度的创面, 开始有计划的分期分批实施痂皮切开, 进行异体皮和微粒皮移植, 功能部位移植自体皮手术, 累计 18 例, 成功 12 例。在第三批病人的救治中, 我们根据药敏试验, 应用氟哌酸外敷浅二度创面 13 例, 获得了良好的效果, 创面均自行愈合。有 4 例病人出现轻度 CO 中毒的精神症状, 经早期高压氧治疗基本恢复。

3 讨论

3.1 瓦斯爆炸致烧伤的特点

(1) 烧伤程度: 瓦斯的主要成分是 CH_4 , 爆炸后产生的温度在流动空气中可达 1850°C , 在密闭空气中可达 2650°C , 因流动快 (2000 m/s), 与人体短暂接触就可以使暴露部位烧伤致二度以上, 加上大量煤尘, 创面多污染严重。(2) 呼吸系统损伤: 除余热直接引起呼吸道烧灼伤外, 爆炸后有害气体的吸入及冲击波致肺部暴震均可引起气管、支气管、肺泡不同程度的损伤, 导致呼吸系统功能障碍。本文有 18 例病人合并吸入性呼吸道损伤, 占 64%。(3) 有害气体中毒及脑缺氧损害: 瓦斯爆炸后可产生 CO , CO_2 , NO , NO_2 等有毒气体, 造成组织细胞缺氧, 极易诱发脑水肿及脑循环障碍, 引起一系列中枢神经症状。(4) 大面积烧伤、呼吸道灼伤、外伤、有害气体中毒均可以引发有效循环锐减、低氧血症发生, 从而导致多器官功能障碍。(5) 合并伤: 矿井内瓦斯爆炸时可产生 9.12 kPa 的压力, 冲击波可以引起颅脑、骨骼及内脏等复合损伤, 应及时判断, 有效处理。

3.2 救治体会

(1) 瓦斯爆炸因冲击波作用合并伤较多, 入院后立即分组诊治, 分工明确, 从伤情判断, 到迅速建立静脉通道及创面的处理, 医护人员紧密配合, 提高抢救实效。本组 28 例患者除 1 例入院时因重度吸入性损伤致呼吸功能衰竭死亡外, 其余均顺利通过休克急救期。(2) 早期人工气道开放, 加强气道管理, 减少肺不张和肺部感染, 在保持呼吸道通畅的同时给予雾化吸入。进行性呼吸困难的给予呼吸机辅助呼吸。28 例重度烧伤的病人仅 2 例死于 ARDS, 2 例死于 MOF。(3) 早期氧疗有助于防止低氧血症的发生, 且对 CO 中毒的救治也有较好的效果。