

染矽尘大鼠支气管肺泡灌洗液某些成分分析

黄何¹, 姚林^{1*}, 李卫红², 袁扬³, 陈志远³, 张志浩³, 闫立成¹, 徐厚君¹

(1 华北煤炭医学院预防医学系, 河北省煤矿卫生与安全实验室, 河北 唐山 063000 2 华北煤炭医学院实验动物中心, 河北 唐山 063000 3 中国煤矿工人北戴河疗养院, 河北 秦皇岛 066104)

摘要: 目的 研究染矽尘大鼠支气管肺泡灌洗液 (BALF) 中炎症细胞成分、超氧化物歧化酶 (SOD) 活力及可溶性蛋白成分、微量元素成分。方法 采用气管非暴露法建立大鼠矽肺模型, 在体全肺肺灌洗法收集支气管肺泡灌洗液。对 BALF 中的细胞进行总数计数及分类计数; 分别采用黄嘌呤氧化酶法、Bradford 法、电感耦合等离子体原子发射光谱法 (ICP-AES) 对 BALF 中的 SOD 活力、总蛋白含量、微量元素进行测定; 采用聚丙烯酰胺凝胶电泳法分离 BALF 可溶性蛋白; 同时对肺组织进行 HE 染色, 普通光镜下观察肺组织的病理学改变。结果 实验组较对照组 BALF 中细胞总数及各类炎性细胞数均明显升高 ($P < 0.05$); SOD 活力及蛋白总量和条带均见增多 ($P < 0.05$); 几种微量元素含量差异也有统计学意义, 如铁含量降低, 锌、锰含量升高。肺组织病理学观察发现染矽尘大鼠肺组织出现严重的病理学改变。结论 本实验发现大鼠染矽尘后 BALF 中有形成分 (细胞) 与某些无形成分出现明显改变 ($P < 0.05$), 均不同程度地影响了尘肺的发生及发展变化过程。

关键词: 矽尘; 支气管肺泡灌洗液; 炎症细胞; 蛋白质; 微量元素

中图分类号: R135.2 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2009)03-0175-04

Analysis of some components in bronchoalveolar lavage fluid of rats exposed to silica dust

HUANG He, YAO Lin*, LI Wei-hong, YUAN Yang, CHEN Zhi-yuan, ZHANG Zhi-hao, YAN Li-cheng, XU Hou-jun

(1. Department of Preventive Medicine, Northern China Coal Medical College, Tangshan 063000, China; 2. Laboratory of Animal Center, Northern China Coal Medical College, Tangshan 063000, China; 3. Chinese Coal Workers' Beidaihe Nursing Home, Qinhuangdao 066104, China)

Abstract: Objective To explore the changes of inflammatory cells, SOD activity, dissolubility protein and microelements in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of rats exposed to silica dust. Methods BALF was collected by bronchoalveolar lavaging from rats exposed to silica dust. The total count and classification in BALF were counted. SOD activity, total protein level and microelement in BALF were measured by xanthinoxidase method, Bradford method and ICP-AES technique respectively. The dissolubility proteins in BALF were isolated by polyacrylamide gel electrophoresis. The pathobiological changes of lung tissue were also observed under light microscope. Results The total count and classification of inflammatory cells in BALF of rats were risen in exposed group compared with that of the control group. The SOD activity and total protein level and the separating strips were also increased ($P < 0.05$). Meanwhile, the composition of microelements in BALF of dust-exposed rats were quite different from that of the control rats. For example, the Fe content in BALF of dust-exposed rats was decreased, while the Zn and Mn contents were increased. Some obvious pathological changes could be seen in the lung in dust-exposed rats. Conclusions The results showed that the formed elements (cells) and invisible elements in BALF (proteins and enzymes) of rats changed obviously after dust exposure, which might be the important impact factors on the occurrence and the development processes of silicosis.

Key words: Silica dust; Bronchoalveolar lavage fluid (BALF); Inflammatory cells; Proteins; Microelements

尘肺是我国目前最常见的危害较为严重的一种职业性肺部疾病, 虽经国内外学者多年研究与探讨, 目前尘肺的发病机制仍不明确, 对尘肺的诊断和治疗仍处在摸索阶段, 因此阐明尘肺的发病机制成为预防与治疗尘肺病的首要任务。本研究通过建立大鼠染矽尘模型, 采用支气管肺泡灌洗技术对 BALF 中某些成分

进行分析, 探索哪些物质的改变在尘肺早期病变中起到了关键性作用, 为进一步揭示尘肺的发病机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选用本校实验动物中心提供的清洁级健康成年雄性 SD 大鼠 20 只, 体重 (200 ± 16) g。本校实验动物中心饲养。

1.2 支气管肺泡灌洗

收稿日期: 2008-12-29 修回日期: 2009-03-10

作者简介: 黄何 (1981-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 卫生毒理。

* 通讯作者, 教授, Email: yaolin766@sohu.com

大鼠经股动脉放血处死，暴露气管，插入气管插管，用灭菌生理盐水在无菌条件下进行支气管肺泡灌洗，收集所有的灌洗液，4℃，1 500 r/min离心 15 min 吸取上清液，用 15 ml 的试管分装，标记后置-70℃冰箱冻存储备用。经离心沉淀的细胞成分用 Hank 液在同样条件下离心 2次，每次 5 min 弃去上清后加 Hank 液 3~5 ml 制成细胞悬液。

1.3 BALF中各项指标测定

1.3.1 细胞成分分析 在细胞计数板上计数 BALF 中细胞总数，采用细胞离心图片装置，加入备用细胞悬液 100 μl 在 4℃下以 1 200 r/min离心 10 min 取下载玻片后立即冷风吹干，至无水乙醇中固定 30 min 后，进行 HE染色。40倍光学显微镜下计数 200个细胞，进行细胞分类计数。

1.3.2 SOD活力测定 采用黄嘌呤氧化酶法，BALF中 SOD活力计算公式为：

$$\text{SOD活力 (U/ml)} = (\text{对照管吸光度} - \text{测定管吸光度}) / \text{对照管吸光度} \times 50\% \times \text{反应液总体积} / \text{取样量 (ml)} \times \text{组织中蛋白含量 (mg protein)}$$

表 1 BALF中细胞总数及分类计数比较 ($\bar{x} \pm s$, n=10)

组别	细胞总数 ($\times 10^6$ /L)	白细胞总数 ($\times 10^6$ /L)	中性粒细胞总数 ($\times 10^6$ /L)	巨噬细胞总数 ($\times 10^6$ /L)	淋巴细胞总数 ($\times 10^6$ /L)
对照组	6.30±2.19	9.42±4.37	1.28±1.48	4.78±4.50	7.36±6.61
实验组	12.10±4.44	18.76±7.15	1.91±1.02	5.00±2.14	11.85±4.47

实验组与对照组相比，P<0.05

2.2 BALF中 SOD及蛋白质成分分析

2.2.1 实验组和对照组大鼠 BALF中总蛋白含量及 SOD活力的比较 (表 2)

表 2 BALF中蛋白含量、SOD活力及细胞中 SOD活力比较 ($\bar{x} \pm s$, n=10)

组别	蛋白含量 (g/L)	上清中 SOD活力 (U/ml)	细胞中 SOD活力 (U/mg protein)
对照组	0.32±0.27	13.61±8.61	14.01±13.38
实验组	1.13±0.56	14.24±8.01	22.01±6.46*

实验组与对照组相比，* P<0.05

2.2.2 聚丙烯酰胺凝胶电泳图 本实验通过聚丙烯酰胺凝胶电泳技术，获得了较为清晰的对照和染尘大鼠 BALF的蛋白质分离条带，见图 1。

2.3 BALF上清中铁、锌、锰元素的含量测定 (表 3)

表 3 BALF上清液中铁、锌、锰的比较 ($\bar{x} \pm s$, n=10)

组别	Fe (μ g/ml)	Zn (μ g/ml)	Mn (μ g/ml)
对照组	4.76±1.70	2.51±1.77	0.09±0.04
实验组	1.84±1.10	6.03±2.54	0.16±0.05

实验组与对照组相比，P<0.05

即每毫克蛋白在 1 ml 反应液中 SOD抑制率达 50%时所对应的 SOD量为一个 SOD活力单位 (U)。

1.3.3 蛋白质含量分析 采用北京百泰克生物技术有限公司生产的 Bradford法蛋白浓度定量试剂盒测定大鼠 BALF中总蛋白含量。采用聚丙烯酰胺凝胶电泳方法分离标本中可溶性蛋白成分。

1.3.4 微量元素测定 采用美国生产的 IR-1000型电感耦合等离子体原子发射光谱 (ICP-AES) 仪测定 BALF上清中铁、锌、锰元素的含量。

1.4 肺组织的病理学观察

肺泡灌洗完毕后，将肺组织用 10%中性缓冲福尔马林液固定，石蜡包埋，切片厚度 5 μm HE染色，普通光镜下观察肺组织的病理学变化。

1.5 统计方法

实验数据结果以均数 ±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，均采用 SPSS1.5版统计学软件处理。P<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BALF中细胞成分分析 (表 1)

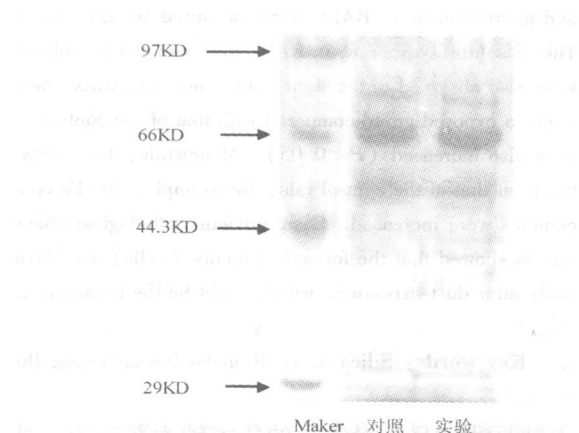


图 1 BALF中蛋白凝胶电泳图 (鼠)

2.4 肺组织的病理学观察

染矽尘组，肺泡壁和肺泡隔毛细血管旁中性粒细胞轻度浸润，靠近终末气道的肺泡壁和肺泡隔有少量巨噬细胞浸润。巨噬细胞在肺泡腔内聚集，正常肺组织结构大部遭到破坏。对照组肺组织结构基本正常，巨噬细胞形状规则；染尘组肺泡壁显著增厚，肺泡结构部分遭到破坏，部分肺泡腔消失，由胶原纤维和成

纤维细胞占据,肺组织广泛纤维化,巨噬细胞内有吞噬的粉尘颗粒,细胞形状不规则。见图 2

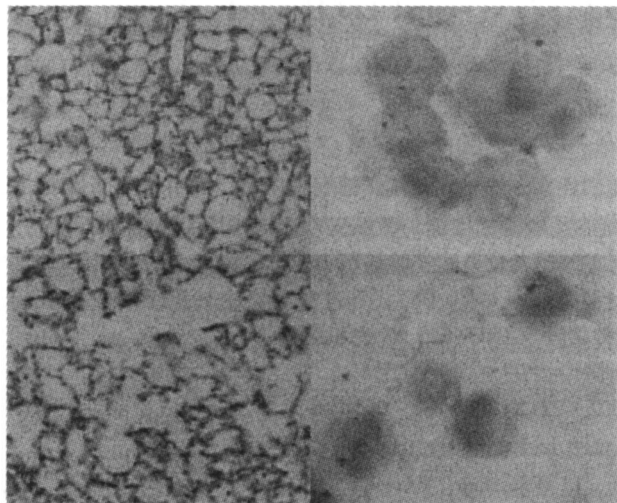


图 2 两组肺组织 HE染色图片 (10×20 左上为正常组,左下为染尘组)及巨噬细胞形态比较 (10×100 右上为正常组,右下为染尘组)

3 讨论

支气管肺泡灌洗术 (BAL)用于肺部疾病的研究已有近百年的历史。近 30年来,由于纤维支气管镜的发明与引入,使 BAL作为一种相对安全的技术手段,更被广泛用于科研和临床^[1]。

BALF可获得肺内活的细胞,便于在体外观察各种细胞的形态和功能,为人们从细胞和分子生物学水平研究肺部疾病提供了一种简便、安全、相对无创伤性的主要途径。近年来,随着蛋白质组学的兴起,使 BALF中的可溶性蛋白成分受到广泛的研究,对这些 BALF蛋白成分的分析,对于肺部疾病的机制研究及其诊断、治疗和预后的判断有着重要的意义^[2,3]。

有实验发现大鼠染尘早期肺组织的病理改变与 BALF的细胞总数的变化基本一致^[4]。染矽尘后 1、7、14、21和 28 d时, BALF白细胞总数及其分类中性粒细胞、巨噬细胞和淋巴细胞均有不同程度的升高,炎症早期以中性粒细胞和巨噬细胞为主,晚期则以淋巴细胞为主^[5]。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^[6],还没有发现随矽肺期别增高,巨噬细胞浓度增加的现象^[7]。BALF中白细胞数目的变化基本上可以反映肺组织炎症的病理学改变^[8]。矽肺早期炎症损伤过程中白细胞数目的增加,既是矽尘与肺组织中炎症细胞相互作用的级联效应所致,同时也是矽尘损伤肺实质后机体局部反应的必然结果^[9,10]。

SOD是机体内惟一以超氧化物阴离子为底物的

酶,也是体内清除氧自由基的酶。它可使氧自由基产生歧化反应,维持细胞内氧自由基处于无害低水平状态^[11]。在尘肺发生发展的过程中,伴随着大量自由基的产生, SOD的活力也发生着变化。

微量元素是机体不可缺少的组成部分,对于维持人体正常生理功能和诱发某些疾病起着重要作用。微量元素在体内具有保护细胞生物膜、清除自由基、阻断脂质过氧化、增强机体免疫功能、阻止细胞凋亡等作用,这些作用对抑制尘肺的发生发展十分有利^[12]。铁是多种酶的活性部分,在体内参与许多生物化学反应,其中与尘肺发病关系密切的是参与组成过氧化氢酶和铁蛋白。这两种物质是机体内重要的抗氧化保护性物质,在尘肺病变时,其含量或活性可能受到影响。锌具有抑制巨噬细胞吞噬的功能,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。锌升高后,其保护细胞膜的功能增强,并有利于抵抗生物膜的脂质过氧化反应,抑制巨噬细胞的激活与损害,增强机体免疫力。锰是 Mn-SOD的重要组成部分,而 SOD具有清除自由基、抗氧化的作用,同时,锰还参与机体的细胞免疫过程。

从本实验收集的 BALF的蛋白总量及电泳分离结果来看,与对照组比较,实验组 BALF蛋白总量出现增加现象。这些蛋白的增加,有可能是由于在一些外源性毒物的刺激下,肺内出现了某些细胞分泌蛋白的增加,或是产生了一些原来没有的新的蛋白质,或是原有的一些蛋白质的增加。当然,也有可能是由于肺泡细胞受损后,使得对一些蛋白的灭活能力减弱所致;或者是炎症损伤了肺内的毛细血管壁,而导致一些血浆蛋白渗出到肺泡腔中所致^[13]。

本实验通过对 BALF中细胞以及可溶性蛋白质的某些成分分析为进一步探讨尘肺发病机制以及对尘肺病人进行早期诊断提供了依据。

参考文献:

- [1] Mason G R Treatment of mixed dust pneumoconiosis with whole lung lavage [J]. Am Rev Respir Dis 1982 126 (6): 1102-1107
- [2] Turner Warwick M The value of serial bronchoalveolar in assessing the clinical progress of patients with cryptogenic fibrosing alveolitis [J]. Am Rev Respir Dis 1987 136 (1): 26-34
- [3] 孙健,曾昭玉.支气管肺泡灌洗液的蛋白质组研究 [J].国外医学卫生学分册, 2004 31 (1): 51-55
- [4] 刘彦,杜海科,高默杰,等.染矽尘大鼠早期肺组织的病理学与支气管肺泡灌洗液炎症细胞的关系 [J].武警医学院学报, 2003 12 (5): 332-335
- [5] 洪长福.矽肺患者肺泡灌洗液的肿瘤坏死因子检测和促成纤维细胞生长能力的研究 [J].劳动医学, 1996 13 (2): 77-79

(下转第 180页)

对细胞产生遗传毒性的机制^[2,3]。

常规二氧化钛已经证明是无毒的,应用于日常生活的许多方面,但具有以上性质的纳米二氧化钛是否仍然无毒,许多科学家对此进行了研究讨论,却没有得出权威统一的结果,还需进一步探讨。10~50 nm大小颗粒现已证实可以通过呼吸道进入机体其他器官,包括人体最重要器官中枢神经系统和心脏。1 μm大小颗粒就可以通过皮肤角质层,颗粒越小越容易通过,因此人体任何部位暴露面(包括皮肤体表面)都可以不同程度地吸收纳米颗粒。纳米 TiO₂颗粒越小,侵入越多,150~500 nm TiO₂颗粒就可以通过完整表皮和消化道,进入血液和肝脏等器官^[4]。

对于纳米 TiO₂颗粒的毒性,测定大都来自体外和动物体内试验,主要指标仍停留在对试验动物支气管肺泡灌洗液和肺组织进行的一些常规毒理学检查。Renwick等用 125或 500 μg等重量 29 nm TiO₂颗粒和 250 nm TiO₂颗粒分别气管内滴注 24 h后对支气管肺泡灌洗液中细胞总数、巨噬细胞吞噬和趋化功能、反映上皮细胞损伤的 γ-2谷氨酰转肽酶活力、反映细胞毒性的乳酸脱氢酶活力和总蛋白含量进行测定分析,结果除肺泡巨噬细胞吞噬百分率两者相同外,其余各项毒性指标高剂量组纳米 TiO₂颗粒均有显著改变,而细 TiO₂颗粒与对照差异不明显^[5]。因 TiO₂广泛应用于各类防晒产品,其是否可以经皮渗透进入人体引起了人们的普遍关注。关于纳米级 TiO₂粒子的皮肤渗透可能性已经进行了若干研究,但结果不一。Tan等将含有 8%超细微 TiO₂ (10~50 nm)的防晒产品在 16名志愿者的皮肤上应用 2至 6周,以研究其是否渗入皮肤。结果表明,皮肤的 TiO₂粒子有明显升高的现象,首次提供了关于纳米级 TiO₂皮肤渗透的证据,但因 T₀的样本量还不够大,因此需要加大样本量来观察。而 Schu^l等和 P^lck^e等应用光电子显微镜后,认为 TiO₂ (20~200 nm)仅沉积在角质层的最外边,角质层的深面和真皮层并没有检测到它的

存在,纳米粒子不能渗入志愿者的皮肤。Lademann等报道在毛囊角质层和毛乳头处发现了防晒霜中的超细 TiO₂颗粒的沉积,但是这并不能认为颗粒能穿透活皮肤组织。Bennat等将水状和油状的 TiO₂用于评价其皮肤渗透性,结果表明,油状的 TiO₂较水状的 TiO₂的皮肤渗透现象明显^[6]。

本实验对人离体淋巴细胞进行纳米二氧化钛染毒,在已经显示的研究结果上进行进一步探讨,研究 TiO₂通过完整表皮和消化道进入血液和肝脏等器官后是否对人淋巴细胞产生毒性作用。结果显示,淋巴细胞转化率常规、1D 3D TiO₂各个剂量组与阴性对照之间差异无统计学意义;单细胞凝胶电泳实验常规、1D TiO₂各个剂量组与阴性对照之间差异无统计学意义,3D TiO₂与阴性对照、常规 TiO₂、1D TiO₂之间的差异有统计学意义;微核实验 TiO₂染毒各个剂量组与阴性对照差异无统计学意义。即常规、1D TiO₂无明显毒性,3D TiO₂具有一定的毒性。

由于本实验中存在许多局限条件,对 TiO₂进入机体后的转运机制,是否在血液中首先作用于淋巴细胞还未见有研究资料,所以本结果仅仅对 TiO₂的遗传毒性提供参考,为 TiO₂安全性和毒性的研究提供依据。

参考文献:

- [1] 唐萌,王晓娜,李倩. 纳米氧化铁、纳米 TiO₂、碳纳米管的毒理学研究进展 [J]. 国际生物医学工程杂志, 2006 29 (6): 340-345.
- [2] 周晓谦,周文淮. 纳米二氧化钛的光催化特性及应用进展 [J]. 辽宁化工, 2002 31 (10): 448-451.
- [3] 刘清,治洪,郭宝岗. 纳米 TiO₂毒性的试验研究 [J]. 现代预防医学, 2006 33 (7): 1211-1212.
- [4] 何继亮. 纳米材料的毒理学研究进展 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2006 24 (8): 502-505.
- [5] 应贤平,仲伟鉴. 纳米二氧化钛颗粒毒理学进展 [J]. 毒理学杂志, 2006 20 (5): 334-336.
- [6] 冯晶,肖冰,陈敬超. 纳米材料对生物体及环境的影响 [J]. 材料科学与工程学报, 2006 24 (3): 462-465.
- [7] 曹殿凤,孙杰,尚波. 染尘动物及肺支气管肺泡灌洗液的研究进展 [J]. 职业与健康, 2007 23 (12): 1039-1041.
- [8] 张素华,张兆志. 148例矽肺患者肺叶灌洗回收液检验结果分析 [J]. 中国工业医学杂志, 2005 18 (4): 241-242.
- [9] Tesohler H, Friedrichs K S, Hohelsel G B et al. Asbestos fibers in bronchoalveolar lavage and lung tissue of former asbestos workers [J]. Am J Respir Crit Care Med, 1994 29 (16): 12-14.
- [10] 姜蕙馨,胡一本,马国云,等. 尘肺患者支气管肺泡灌洗液分析 [J]. 中国工业医学杂志, 1992 4 (5): 24-27.
- [11] Keller G A, Wames T G, Steiner K S et al. Cu²⁺ Zn superoxide dismutase is a peroxidomal enzyme on human fibroblasts and hepatoma cell [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991 88: 7381.
- [12] 孙太东,陈朝万,王波. 隧道工及矽肺患者发中微量元素 Cu²⁺ Zn²⁺ Fe²⁺ Mn含量测定 [J]. 铁道劳动安全卫生与环保, 1998 25 (3): 186-187.
- [13] Noel-Georis J, Bernard A, Fajmagne P et al. Database of bronchoalveolar lavage fluid proteins [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2002 77 (27): 221-236.

(上接第 177页)