

血清硅元素水平对矽肺早期诊断意义的探讨

胡缘¹, 赵金垣³, 白玉萍¹, 李清钊¹, 朱丽¹, 王宏丽¹, 刘和亮^{1,2*}

(1. 华北煤炭医学院 河北省煤矿卫生与安全重点实验室, 河北 唐山 063000 2 华北煤炭医学院实验中心, 河北唐山 063000 3 北京大学第三医院职业病研究中心, 北京 100083)

摘要: 目的 探讨血清硅元素水平对矽肺早期诊断的意义。方法 采用电感耦合等离子体质谱仪 (ICP-MS) 检测矽肺模型大鼠血清中硅元素含量。同时采用免疫组织化学-链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连接法观察转化生长因子- β_1 、肿瘤坏死因子- α 在大鼠矽肺模型肺组织的表达。结果 与对照组比较, 大鼠染尘后血清硅元素水平在染尘第一天即见增高, 峰值在 16 h, 其后的 7 d、14 d、21 d 和 28 d 其含量水平亦显著高于对照组, 差异有统计学意义。大鼠染尘后肺组织 TGF- β_1 表达与对照组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 表达高峰是染尘后的第 7 天; TNF- α 表达也显著高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 矽肺模型大鼠血清硅元素水平在染尘早期即见明显升高, 且早于 TGF- β_1 、TNF- α 的表达, 提示此一指标在矽肺的早期诊断中具有一定的价值和意义。

关键词: 二氧化硅; 矽肺; 早期诊断; 电感耦合等离子体质谱 (ICP-MS); 肿瘤坏死因子 (TNF- α); 转化生长因子 (TGF- β_1); 免疫组织化学-链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连接法

中图分类号: R135.2 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2009)04-0250-03

Significance of blood levels of silicon in early diagnosis of silicosis

HU Yuan¹, ZHAO Jin-yuan³, BAI Yu-ping¹, LI Qing-zhao¹, WANG Hong-li¹, ZHU Li¹, LIU He-liang^{2*}

(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. The Occupational Medicine Research Center, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China)

Abstract: Objective To explore the significance of blood silicon levels in early diagnosis of silicosis. Methods Silicon exposed rats were randomly divided into eleven groups according to the body weight, detecting the serum silicon regularly by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) after exposure; the expression of transforming growth factor- β_1 and tumor necrosis factor- α in lung tissue were also observed by immunohistochemistry-SP (streptavidin-peroxidase) method. Results Comparing the controls, the serum silicon levels were raised at the first day after exposure (the peak value was at the 16th hour), the subsequent 7 d, 14 d, 21 d and 28 d were also significantly higher than that of control group ($P < 0.05$), meanwhile the expressions of TGF- β_1 and TNF- α in the lung tissue of exposed rats were all obviously increased at 7 d, 14 d, 21 d and 28 d after exposure compared with control group ($P < 0.05$). Conclusions The results showed that the rise of serum silicon level was even earlier than the expression of TGF- β_1 and TNF- α in lung tissues, suggesting that this index may have some useful value in the early diagnosis of silicosis.

Key words: Silicon dioxide; Silicosis; Early diagnosis; ICP-MS; TNF- α ; TGF- β_1 ; Immunohistochemistry-SP (streptavidin-peroxidase) method

矽肺是由于在生产过程中长期吸入游离二氧化硅含量较高的粉尘而引起的以肺组织纤维化为主的疾病, 是危害工人健康最为严重的职业病。2007年全国报告各类职业病 14 296 例, 其中, 尘肺病 10 963 例, 占新发职业病病例总数的 76.69%, 在报告的尘肺新病例中, 矽肺约占尘肺病例的半数^[1]。临床对矽肺和煤工矽肺 (coal workers pneumoconiosis, CWP) 的检测目前主要依赖放射学和肺功能检查,

很难作到早期诊断。一旦确诊, 肺内纤维化病变已经形成, 而目前对矽肺的纤维化病变尚无特效治疗药物, 因此, 探索矽肺发病的早期效应生物标志物, 对矽肺易感人群的早期筛选、早期诊断至关重要^[2]。本研究通过测定矽肺模型大鼠血清硅元素水平变化, 并与肿瘤坏死因子- α 、转化生长因子- β_1 在矽肺模型大鼠肺组织的表达情况进行比较, 探讨血清硅元素水平在矽肺早期诊断中的意义和价值。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组及模型的建立

清洁级健康成年雄性 Wistar 大鼠 88 只, 体重 180~220 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 按体重随机分为 11 组, 每组 8 只, 第 1 组为对

收稿日期: 2009-04-06

基金资助: 河北省人事厅留学回国人员择优资助项目 (冀人办 2008-199)

作者简介: 胡缘 (1982-), 女, 硕士, 研究方向: 环境与呼吸系统疾病。

*: 通讯作者, 教授, 硕士生导师。

对照组, 其余为染尘组 (4 h 8 h 12 h 16 h 24 h 3 d 7 d 14 d 21 d 28 d)。非暴露式气管内注入法建立染矽尘大鼠模型^[3]。模型组大鼠气管内注入浓度为 50 mg/m³的矽尘混悬液, 对照组大鼠注入等量生理盐水。

1.2 主要试剂与仪器

矽尘由河北省煤矿卫生与安全重点实验室提供, 纯度 99%, 粒子直径 0.5 ~ 10 μm, 80% 粒子在 1 ~ 5 μm 之间, 用生理盐水配制成 50 mg/m³混悬液, 经高压蒸汽灭菌后备用; 硝酸 (HNO₃)、高氯酸 (HClO₄) 优级纯, 购自北方化工原料试剂仪器有限公司; 山羊抗大鼠 TNF-α 及兔抗大鼠 TGF-β₁, 购自 Santa Cruz 生物技术有限公司; 链霉菌抗生物素蛋白 过氧化物酶 (SP) 试剂盒, 购自北京市中山生物技术有限公司。仪器设备: 电感耦合等离子体质谱 (ICPMS 7 500 a), 美国安捷伦科技有限公司; MotiMed 6.0 数码医学图像分析系统, 北京航空航天大学。

1.3 观察指标及检测方法

1.3.1 血清样本的采集处理及硅元素水平测定 分别在 4 h 8 h 12 h 16 h 24 h 3 d 7 d 14 d 21 d 和 28 d 等时间点, 用 10% 水合氯醛 (0.35 ml/100 g) 腹腔麻醉大鼠后, 暴露股静脉, 取血分离血清。将 0.5 ml 血清加入 5 ml 消解液 (HNO₃ : HClO₄ = 10 : 1) 放置过夜后于电热板上进行消解至无色透明时取下冷却并用超纯水定容至 5 ml 后用 ICPMS 7 500 测定硅元素水平。

1.3.2 病理学观察 取每只大鼠右下肺最大横径处肺组织用于石蜡包埋切片, 常规行 HE 染色进行病理学观察。矽结节分级参照 King 五级分类法。

1.3.3 肺组织 TNF-α、TGF-β₁ 的免疫组化染色 采用链霉菌亲生物素蛋白 过氧化物酶复合技术进行 TNF-α、TGF-β₁ 免疫组化染色, 严格按试剂盒进行操作。每只大鼠的免疫组化标本随机选取 5 个视野 200 倍光镜下进行观察。应用 MotiMed 6.0 数码医学图像分析系统对 TNF-α、TGF-β₁ 的蛋白表达进行分析。阳性反应为胞浆呈棕褐色, 用阳性细胞积分光密度来表示表达强度。

1.4 统计分析

所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 13.0 for windows 软件进行分析。

2 结果

2.1 染矽尘大鼠模型不同时间点肺组织病理改变

光镜下可见对照组大鼠肺组织结构正常。大鼠染尘后 1 d 肺泡壁水肿, 中性粒细胞、巨噬细胞浸润;

3 d 时巨噬细胞在肺泡腔内聚集, 肉芽肿结节开始在肺泡腔内形成, 胶原纤维出现; 7 d 时小肉芽肿弥漫存在, 并融合成较大的肉芽肿, 肉芽肿内上皮样细胞数量增加, 伴成纤维细胞增生、胶原纤维形成和玻璃样变, 为胶原性结节; 14 d 时肉芽肿进行性纤维化, 成纤维细胞增生并平行排列; 21 d 时肉芽肿大面积纤维化, 肺泡间隔断裂现象较严重, 结节间有灶性肺气肿形成; 28 d 时可见巨大纤维性结节, 纤维化损害进一步扩大, 甚至占满整个肺叶。

2.2 染矽尘大鼠模型血清硅元素水平测定结果

2.2.1 矽尘大鼠模型染尘 24 h 血清硅元素水平测定结果 由表 1 可见, 大鼠染尘后 24 h 内血清硅元素水平即有显著的增高, 16 h 达到高峰, 然后下降。

表 1 矽尘大鼠模型染尘急性期血清硅元素

水平测定结果 ($\bar{x} \pm s$)		μg/ml
组别	样本数	硅元素水平
对照组	8	0.0548 ± 0.04
染尘组		
4 h	6	0.515 ± 0.081**
8 h	5	0.542 ± 0.133**
12 h	5	0.611 ± 0.097**
16 h	7	0.666 ± 0.167**
24 h	6	0.160 ± 0.058*

与对照组比较, * P < 0.05 ** P < 0.01; 下表同。

2.2.2 矽尘大鼠模型染尘后不同时间血清硅元素水平和肺组织 TNF-α、TGF-β₁ 阳性细胞积分光密度测定结果 由表 2 可见, 大鼠染尘后从第一天开始血清硅元素水平即有显著的增高, 28 d 达到高峰。肺组织 TNF-α 阳性表达细胞积分光密度均有不同程度的增加, 但在第 3 天后与对照组相比差异才有统计学意义 (P < 0.05 P < 0.01)。与对照组相比, 染矽尘大鼠肺组织 TGF-β₁ 阳性细胞积分光密度均有不同程度的增加, 但在第 7 天开始差异才有统计学意义 (P < 0.05 P < 0.01)。

表 2 大鼠染尘后不同时间血清硅元素水平和肺组织 TNF-α、TGF-β₁ 阳性细胞积分光密度变化情况 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	硅元素水平 (μg/ml)	TNF-α 积分光密度 (×10 ³)	TGF-β ₁ 积分光密度 (×10 ³)
对照组	8	0.0548 ± 0.04	25.44 ± 5.49	4.75 ± 1.34
染尘组				
1 d	6	0.164 ± 0.0542*	36.26 ± 5.19	5.90 ± 1.99
3 d	7	0.145 ± 0.0392**	44.56 ± 12.23*	5.45 ± 1.12
7 d	6	0.236 ± 0.0909*	48.76 ± 20.03*	59.13 ± 20.77*
14 d	6	0.349 ± 0.125*	37.69 ± 7.07*	27.61 ± 16.97*
21 d	6	0.562 ± 0.090**	63.79 ± 21.31**	32.53 ± 19.53*
28 d	5	0.654 ± 0.220*	48.63 ± 10.40**	22.63 ± 12.22*

由以上结果可知, 大鼠染尘后硅元素水平即开始变化, 呈现一个不断增高的趋势, 其变化明显早于 TNF-α、TGF-β₁ 的表达。

3 讨论

矽肺发病机制十分复杂, 至今尚未完全阐明, 但已

经明确的是二氧化硅 (SiO_2) 是其中关键的致病因子。目前认为, SiO_2 进入肺内后, 可诱发肺泡巨噬细胞 (alveolar macrophage AM) 聚集, 吞噬 SiO_2 合成并释放大量具有多种生物活性的细胞因子、前炎症因子、趋化因子和蛋白酶类等, 损伤肺内组织; 被吞噬的 SiO_2 则进而引起 AM 发生功能改变、崩解、死亡, 并使肺泡结构和周围细胞进一步受损, 最终导致弥漫性肺间质纤维化和矽结节的形成。但人们对矽肺病程启动、推进的关键环节和调控机制仍知之甚少^[4]。

SiO_2 化学性质稳定, 难溶于水, 也不与一般的酸起作用, 故通常认为 SiO_2 在肺内只是被巨噬细胞吞噬或在病灶内沉积下来, 并不象其他大多数物质一样被人体代谢, 其不被代谢的主要原因, 就是基于对上述理化性质的考虑。但实际上, SiO_2 只是难溶而已, 进入机体后, 其表面和体液还是会产生反应生成硅酸, 这样微量的硅元素是可以进入体内血液和组织中去进行代谢, 并发挥作用^[5], 待累积到一定的“阈值”才能“触发”不断发展的纤维化过程^[6]。以往研究由于技术条件的限制不能检测血液样品中的痕量硅元素, 随着现代技术的发展, 其检测已成为可能, 因此, 检测生物样品中硅离子的含量可能成为反映矽肺早期病理变化的一个有效手段。

自从 1983 年第一台电感耦合等离子体质谱仪问世以来, 电感耦合等离子体质谱 (ICP-MS) 技术得到迅速发展, 由于其优异的分析性能, 在地质、环境、生物、医学、冶金和化工等领域得到广泛的应用。应用 ICP-MS 测定生物样品中的 Pb Cd Hg As Se B 稀土、Au Pt Bi 和 离子都有报道^[7]。本研究在国内外首次应用 ICP-MS 检测矽肺模型大鼠血清硅元素的含量变化, 结果显示, 在染尘后的 24 h 内, 染矽尘大鼠模型组血清的硅元素含量即呈现一个逐渐升高的趋势, 在 16 h 达到最高, 至 24 h 开始下降, 与对照组比较, 差异皆有统计学意义 ($P < 0.01$); 其后, 硅元素的含量随时间延长而呈不断增加的趋势, 各时间点与对照组比较, 差异皆有统计学意义 ($P < 0.01$)。

在矽肺发生的病理过程中也涉及到许多细胞因子, 其中 $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{TGF-}\beta_1$ 是研究较多的细胞因子, 也是公认的能反映矽肺早期病理改变的细胞因子之一。 $\text{TNF-}\alpha$ 主要由激活的单核巨噬细胞产生, 对免疫反应、机体代谢、炎症反应均有重要的调节和介导作用, 是肺纤维化细胞因子网络中重要的因子之一, 可能介导早期肺炎症反应和纤维化^[8,9]。本研究结果显示, 染矽尘组大鼠于染尘后第 1 天 $\text{TNF-}\alpha$ 的表达即开始增加, 一直持续至第 14 天, 第 21 天回落至正常水

平, 其中 $\text{TNF-}\alpha$ 的表达高峰在第 7 天, 与文献报道相同。大量的研究资料表明, 在多种因素导致的肺纤维化中均有 $\text{TGF-}\beta_1$ 含量增高, 因而有学者推测 $\text{TGF-}\beta_1$ 可能是矽肺发病过程中的关键分子之一^[10]。本实验结果显示, 矽肺模型组的 $\text{TGF-}\beta_1$ 表达与对照组相比, 差异有统计学意义, 这表明矽肺组肺组织中 $\text{TGF-}\beta_1$ 的表达范围广, 表达的强度高, 提示实验大鼠接触 SiO_2 后, 肺组织受到损伤, 可能促使 $\text{TGF-}\beta_1$ 蛋白的表达上调, 从而促进成纤维细胞增殖并使其大量分泌纤粘素和胶原等细胞外基质, 导致肺组织纤维化, 最终形成矽肺。因此, $\text{TGF-}\beta_1$ 蛋白的异常高表达可能参与了矽肺纤维化的发生和发展。

本研究结果表明, 硅离子含量变化在 SiO_2 进入体内后即可出现, 其升高改变早于 $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{TGF-}\beta_1$ 这两个细胞因子的变化, 说明硅离子的检测对矽肺的早期诊断具有重要意义。这将对筛选易感人群、早期诊断亚临床期矽肺病人有重要帮助, 亦有助于及时采取有效措施, 早期防范矽肺的发生。

参考文献:

- [1] 卫生部 2008 年职业病防治工作新闻通报会新闻通报稿 [4].
- [2] Gulimjan M, Bom P J, Valjathan V et al. Mechanistically identified suitable biomarkers of exposure effect and susceptibility for silicosis and coal worker's pneumoconiosis: a comprehensive review [J]. J Toxicol Environ Health B Crit Rev 2006 9 (5): 357.
- [3] 朱建伟, 曹春玲, 孙德刚, 等. 尘肺清颗粒防治大鼠实验性矽肺的病理观察 [J]. 中国职业医学, 2006 12 (6): 437-440
- [4] Rimal B, Graenbers A K, Rom W N. Basic pathogenetic mechanisms in silicosis: current understanding [J]. Current Opinion in Pulmonary Medicine 2005 11 (2): 169-173.
- [5] 王夔. 生命科学中的微量元素 [M]. 2 版. 北京: 中国计量出版社, 1996 143-150
- [6] Porter D W, Hubbs A F, Mercer R et al. Progression of lung inflammation and damage in rats after cessation of silica inhalation [J]. Toxicologica Science 2004 79 370-380
- [7] Reid B, Nuccitelli R, Zhao M. Non-invasive measurement of bioelectric currents with a vibrating probe [J]. Nat Protoc 2007 2 (3): 661-669.
- [8] Pantelidis P, McGrath D S, Southcott A M et al. Tumour necrosis factor α production in fibrosing alveolitis is macrophage subset specific [J]. Respir Res 2001 2 65
- [9] Gozal E, Ortiz L A, Zou X et al. Silica induced apoptosis in murine macrophages: involvement of tumor necrosis factor α and nuclear factor κ B activation [J]. Am J Respir Cell Mol Biol 2002 27 91-98
- [10] Chen C M, Chou H C, Hsu H H et al. Transforming growth factor β up regulation is independent of angiotensin in paraquat induced lung fibrosis [J]. Toxicology 2005 216 (2-3): 181-187