染尘大鼠Ⅰ和Ⅲ型胶原与相关细胞因子含量的变化关系

陈南芳[1,2]，何文彤[1]，高宏生[1*]，薛荣[1,2]，马庆波[1]，刘丽华[2]，任贵兵[1]，冀润利[1]，孟斌[1]，赵国平[1]

（1 天津职业与环境危害生物标志物重点实验室，天津 300162；2 华北煤炭医学院基础医学教研室，河北唐山 063000）

摘要：目的 探讨 IL-1β、TNF-α及 TGF-β_1在染尘矽肺大鼠肺组织内的变化和对Ⅰ、Ⅲ型胶原含量的影响。方法 将 50只大鼠随机分为对照组、染尘组，各组于 1、7、14、21、28 d 5个时间点分别取 5只大鼠，采用气管暴露法建立大鼠矽肺模型；分别进行 HE常规染色、天狼猩红染色并用 Image-pro Plus Version 4.5 for Windows TM图像分析系统进行Ⅰ、Ⅲ型胶原定量分析；肺组织内 IL-1β、TNF-α、TGF-β_1测定采用悬浮芯片蛋白测定法。结果 Ⅰ、Ⅲ型胶原分别在第 14天和第 7天开始急剧增高；染尘组肺组织 IL-1β的浓度在第 1天达到高峰；TNF-α的表达量持续增加，在第 14天出现峰值；TGF-β_1第 14天表达量增加并达峰值；回归分析结果显示 IL-1β表达水平下降和 TNF-α表达水平升高可能直接或间接导致Ⅰ型胶原的增加；IL-1β表达水平下降、TGF-β_1表达水平升高可能直接或间接导致Ⅲ型胶原的增加。结论 矽尘可以诱导肺组织过度表达Ⅰ、Ⅲ型胶原，并且 IL-1β、TNF-α及 TGF-β_1可以直接或间接地增加胶原含量。

关键词：矽肺；大鼠；Ⅰ型胶原；Ⅲ型胶原；IL-1β；TNF-α；TGF-β_1

中图分类号：R135.2 文献标识码：A 文章编号：1002－221X(2010)02－0089－04

Relationship between contents of collagens Ⅰ or Ⅲ and levels of cytokines in silica exposed rats

CHEN Nan-fang[1,2], HE Wen-tong[1], GAO Hong-sheng[1*], XUE Rong[1,2], MA Qing-bo[1], LIU Li-hua[2], REN Gui-bing[1], JI Run-li[1], MENG Bin[1], ZHAO Guo-ping[1]

(1. Tianjin Key Laboratory of Biomarker for Occupational & Environmental Hazard, Tianjin 300162, China; 2. North China Coal Medical University, Tangshan 063000, China)

Abstract: Objectives To explore the relationship between contents of collagen Ⅰ or Ⅲ and levels of IL-1β, TNF-α or TGF-β_1 in rats exposed to silica. Methods Rats were exposed to 50 mg silica suspended in 0.9% saline solution through intratracheal instillation, then were sacrificed at 1, 7, 14, 21 and 28 d after a single instillation, respectively. Lungs were removed and stained with hematoxylin and eosin (HE) for pathological examination or with Sirius red stains for determination of collagen Ⅰ and Ⅲ contents. Levels of IL-1β, TNF-α and TGF-β_1 in lung were determined by suspension array technique. Results Compared with those in control group, the contents of collagen Ⅰ were increased on the 14th day after exposure, and the contents of collagen Ⅲ were on the 7th day. The levels of IL-1β were increased significantly on the 1st day, levels of TNF-α were increased on the 14th day, then decreased on the 28th day. The levels of TGF-β_1 were increased significantly between the 14th day and 28th day. Correlation analysis showed that the levels of IL-1β and TNF-α were correlated with the content of collagen Ⅰ, and the levels of IL-1β and TGF-β_1 were also correlated significantly with content of collagen Ⅲ. Conclusions The results showed that the silica dust might induce the overexpression of collagen Ⅰ or Ⅲ, IL-1β, TNF-α and TGF-β_1, and the latter three indices might play the important role in the formation of collagen in the lung.

Key words: silicosis; rat; collagen Ⅰ; collagen Ⅲ; interleukin-1β (IL-1β); tumor necrosis factor-α (TNF-α); transforming growth factor-β_1 (TGF-β_1)

矽肺是由于长期吸入超过一定浓度的 SiO_2粉尘所致的以肺间质纤维化为主的全身性疾病，其病理特征是肺部炎症导致肺泡持续性损伤及细胞外基质（ECM）的反复破坏、修复、重建和过度沉积[1]。目前认为，SiO_2粉尘刺激后引发肺泡炎并使肺巨噬细胞等分泌多种活性介质，作用于肺间质细胞和成纤维细胞，促进成纤维细胞增殖和胶原形成，但其发病机制尚未完全阐明，并且存在诊断滞后、尚无有效的早期诊断（筛检）方法、缺乏有效治疗等问题。IL-1β、TNF-α、TGF-β_1是在矽肺早期变化明显的 3种细胞因子，已有实验证明，IL-1β、TNF-α作为炎症因子在加重肺损伤的同时，调节刺激其他细胞因子共同介导

收稿日期：2010－01－05

基金项目：国家自然基金资助项目（30800902）；武警部队博士启动金（WBS200907）

作者简介：陈南芳（1983－），女，硕士研究生，研究方向：职业病学。

*：通讯作者，男，副教授，博士，研究方向：职业病学，E-mail：gaohs_ll@yahoo.com.cn

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

肺纤维化进程[2]，TGFβ1在肺纤维化过程中，对促进胶原的产生和肺间质的沉积具有重要的作用[3]。本实验通过动态观察Ⅰ、Ⅲ型胶原含量及 IL-1β、TNF-α、TGFβ1表达的变化，寻找早期诊断（筛检）特异性的生物介质组合，为诊断、预防乃至治疗矽肺提供必要的理论支持。

1 材料与方法

1.1 试验分组及动物模型的建立

按照中华人民共和国技术监督局《实验动物微生物和寄生虫监测等级》（GB14922—94）的标准，选用清洁级成年 Wistar大鼠 50只，雄性，180～220 g。采用随机数字表将大鼠分为对照组、染尘组，各组于 1 d、7 d、14 d、21 d、28 d5个时间点分别取 5只大鼠。

将染尘组灌肺所用矽尘用生理盐水配成 50 mg/ml矽尘悬浊液，高压灭菌后按 8 000 U/ml加入青霉素。利用气管暴露法建立大鼠矽肺模型，即手术暴露气管后，将 1 ml矽尘混悬液缓慢注入气管。同样方法在对照组大鼠气管内注入 1 ml灭菌生理盐水。

1.2 标本采集处理方法

在各个时间点取大鼠放血处死，将肺左叶进行肺组织固定、脱水后常规石蜡包埋，其余组织 －80 ℃冻存。连续切片后分别进行常规 HE染色和天狼猩红染色，并在光学显微镜下观察组织病理变化及偏振光显微镜下观察Ⅰ、Ⅲ型胶原的变化，利用 Image-pro Plus Version4.5 for Windows TM图像分析系统进行Ⅰ、Ⅲ型胶原含量定量分析。

1.3 细胞因子的测定

采用 Bio-Plex悬浮芯片系统（Bio-Rad laboratories, Inc）测定肺组织内 IL-1β、TNF-α及 TGFβ1的蛋白含量，测定过程严格按照试剂盒（panomics, Inc）说明书方法和悬浮芯片操作方法进行。

1.4 数据处理方法

结果采用 SPSS11.0统计分析软件处理，组间比较用 t检验，采用多元线性回归进行统计分析，并以 α＝0.05为检验水准。

2 结果

2.1 肺组织 HE染色（见封三图 1）

对照组各个时间点肺组织结构基本正常（图 1 A）。染尘组第 1天无明显改变；第 7天（图 1 B），肺泡隔水肿增厚，内有淋巴细胞、单核巨噬细胞浸润，肺泡腔内小肉芽肿弥漫，局部融合成较大的肉芽肿，并中心发生坏死，肉芽肿内伴有成纤维细胞增生、胶原纤维形成和玻璃样变，出现胶原性结节和纤维化改变，病灶内肺泡腔变小；第 14天（图 1 C），肺泡壁增厚，肺泡隔内仍有较多淋巴细胞、巨噬细胞及少量中性粒细胞侵润，伴有较多的成纤维细胞和平滑肌细胞增生并呈平行排列，肺泡结构破坏，可见胶原纤维积聚，出现斑片状纤维化，细胞性结节数量增多；第 21天（图 1 D），肺泡间隔断裂现象严重，肉芽肿大面积纤维化，结节间有肺气肿形成；第 28 d（图 1 E），肺泡壁明显增厚，肺泡结构破坏严重，部分肺泡腔消失，被胶原纤维和成纤维细胞占据，肺组织广泛纤维化，可见纤维性结节。

2.2 肺组织天狼猩红染色（见封三图 2）

在偏振光显微镜下，Ⅰ型胶原较粗，成橘黄色、深红色；Ⅲ型胶原较细，呈淡绿色。各时间点对照组，肺泡隔正常。染尘组，第 1天无明显改变（图 2 A）；第 7天（图 2 B），肺泡正常结构被破坏，取而代之的是交织存在的Ⅰ、Ⅲ型胶原；第 14天（图 2 C），可见弥漫性、淡绿色弯曲的胶原呈网状存在，其间夹杂少量粗大的橘黄色纤维及矽尘颗粒；第 21天（图 2 D），淡绿色胶原明显增多，与之相比橘黄色胶原只有少量增多；第 28天（图 2 E），粗大的橘红色胶原明显增多，与纤细的淡绿色胶原呈网状交织存在，布满整个视野，其间夹杂矽尘颗粒。

2.3 肺组织活性介质的变化趋势

Ⅰ、Ⅲ型胶原时间变化趋势如图 3。Ⅰ型胶原在第 14天、第 21天、第 28天含量（1.169 3 ±0.080 0，5 230 ±0.045 50，3 752 ±0.045 8）pg/ml均高于对照组，差异有统计学意义（P＜0.05），且第 14天急剧增高，后趋于平稳。Ⅲ型胶原在第 7天（0.428 1 ±0.048 6）pg/ml开始增加（P＜0.05），在第 28天达到高峰（1.135 2 ±0.165 2）pg/ml。

IL-1β、TNF-α、TGFβ1随时间的变化趋势如图 4。染尘组肺组织内 IL-1β的浓度在各时间点均高于对照组，在第 1、7、14天时差异有统计学意义（P＜0.05），于第 1天达到高峰（6.707 5 ±1.142 1）pg/ml。肺组织内 TNF-α的表达量持续增加且在各时间内均有统计学意义（P＜0.05），并于第 14天达到峰值（22.923 3 ±1.817 1）pg/ml。但各时间点上的趋势变化无统计学意义；肺组织内 TGFβ1于第 14天表达量增加并达峰值（122.386 7 ±10.880 2）pg/ml（P＜0.01）。

2.4 肺组织Ⅰ、Ⅲ型胶原同相关细胞因子的关系

分别以Ⅰ型、Ⅲ型胶原为应变量，以 IL-1β、TNF-α、TGFβ1为因变量进行回归分析，由表 1、表 2可见，IL-1β表达水平下降、TNF-α表达水平升高

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

可能直接或间接导致Ⅰ型胶原的增加（$P<0.05$）；IL-1β表达水平下降、TGF-β_1表达水平升高可能直接或间接影响Ⅲ型胶原的增加（$P<0.05$）。

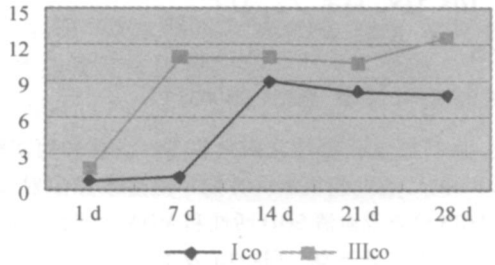


图3 Ⅰ、Ⅲ型胶原变化趋势

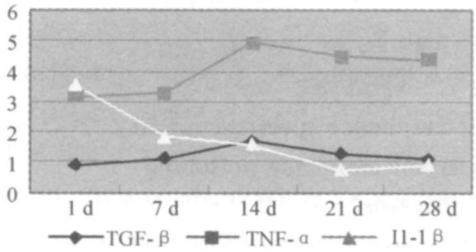


图4 IL-1β、TNF-α、TGF-β_1变化趋势

表1 肺组织Ⅰ型胶原多元线性回归分析

因变量	非标准回归系数 β	非标准回归系数 $S_{\bar{x}}$	标准回归系数（Beta）	P值
IL-1β	−1.4996	0.6217	−0.3714	0.0345
TNF-α	2.6124	0.9676	0.5183	0.0207
TGF-β_1	2.0508	2.1525	0.1616	0.3612

表2 肺组织Ⅲ型胶原多元线性回归分析

因变量	非标准回归系数 β	非标准回归系数 $S_{\bar{x}}$	标准回归系数（Beta）	P值
IL-1β	−2.8075	0.7347	−0.7367	0.0028
TNF-α	−2.1408	1.4334	−0.4500	0.0880
TGF-β_1	7.4382	2.5435	0.6212	0.0138

3 讨论

胶原蛋白是构成ECM的成分之一，是稳定内环境、维持组织结构的重要因子。矽肺的发生是矽尘刺激后多种因子通过促进胶原蛋白合成或中断细胞内胶原蛋白降解途径，最终导致胶原合成降解动态平衡失衡，从而引发组织增生及纤维化[4]。本实验通过天狼猩红染色并结合图像分析结果表明，Ⅲ型胶原较Ⅰ型胶原出现早、增长快。虽然两型胶原含量动态变化不同，但均有增多趋势。Ⅰ型胶原在第21天出现下降趋势，但这种差异无统计学意义，可能与在图像定量分析过程中由主观肉眼判断颜色有关。

本实验采取气管暴露法建立大鼠矽肺模型，手术创伤可以引起应激反应，作为急性炎症细胞因子的IL-1β[5]，在第1天呈现IL-1β高峰，而在第7天和第14天时手术创伤愈合，IL-1β表达量增高即是矽肺作用的结果。IL-1β作为炎症因子可在矽肺早期介导细胞损伤和修复乃至过度修复，而IL-1β的变化与胶原变化正好相反，推测IL-1β通过间接作用导致肺纤维化[6]。由于在矽尘刺激后IL-1β表达量在早期急剧增高，利用IL-1β预测胶原含量及肺纤维化程度具有较高的预防意义。

在肺组织内TNF-α主要由肺巨噬细胞（AM）分泌。TNF-α作为炎症细胞因子在多条与纤维化相关的通路中处于关键地位，可与IL-1β协同增强中性粒细胞和嗜酸性粒细胞的功能，还可介导其它细胞因子表达，刺激成纤维细胞的增殖。TNF-α可以通过细胞外信号调节激酶（ERK）通路诱导TGF-β_1，与位于其细胞表面的受体结合引起细胞代谢改变和细胞凋亡[7]。TNF-α可与肿瘤坏死因子受体1（TNFR1）结合，引起TNFR1三聚体化，通过激活细胞膜上的脂质神经酰胺（CM），以此作为第二信使，以Ra途径部分激活促分裂原活化蛋白激酶（MAPK），再通过转录因子NF-κB发挥作用[8]。本实验结果显示，在各个时间点内，染尘组TNF-α含量均比对照组高，呈现波浪性升高趋势，且具有统计学意义。TNF-α表达水平升高与Ⅰ型胶原的关系更为密切。

转化生长因子TGF-β_1被认为是与肺纤维化的发生和形成关系最为密切的介导因子[9]，TGF-β_1可以趋化并促进成纤维细胞增生和分化，刺激成纤维细胞合成胶原蛋白，TGF-β_1还可以通过多种途径减少ECM的降解，Sybille等[10]发现TGF-β_1可以控制组织蛋白酶-κ（Catκ）的过度表达，而Catκ与肺纤维化高度相关，Catκ可以降低胶原蛋白含量和细胞外基质（ECM）的聚积，TGF-β_1也能促进成纤维细胞自身合成TGF-β_1，成纤维细胞的这种自分泌作用也是导致肺纤维化进展的重要原因之一。本研究表明，染尘组TGF-β_1水平在第14天显著高于对照组，推测在早期TGF-β_1表达水平升高应与Ⅲ型胶原表达有关。

参考文献：

[1] Brown J M, Swindle E J, Kushnir-Sukhov N M, et al. Silica-directed mast cell activation is enhanced by scavenger receptors[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2007, 36: 43-52.

[2] Virginie B, Aurelie N, Pierre M, et al. The role of pro- and anti-inflammatory responses in silica-induced lung fibrosis[J]. Respiratory Research, 2005, 6: 112.

[3] Jasimuddin A, Nathalie B, Keiji Y, et al. In vitro and in vivo evidence for shear-induced activation of latent transforming growth factor-β1[J]. Blood, 2008, 112(9): 3650-3660.

（下转第98页）

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.4.5 神经行为功能项目 测试分析情感状态 6个项目指标，行为功能 6个项目 10个指标。情感状态，暴露组男性消极情感得分均高于对照组，积极情感得分低于对照组，差异有统计学意义（$P<0.05$）。女性消极情感得分高于对照组，但差异没有统计学意义（$P>0.05$），积极情感得分低于对照组，差异有统计学意义（$P<0.05$）。行为功能，男性和女性在简单反应时和数字广度方面没有表现出差异；圣地安娜提转敏捷度和目标追踪方面，男性暴露组与对照组比较，除总打点数外，差异有统计学意义（$P<0.05$），而女性暴露组与对照组比较，差异没有统计学意义。

3 讨论

与既往钒职业危害研究比较，本文具有暴露物性质、种类和作业场所稳定，职业人群数量大，暴露时间长的特点。研究从调查人群重慢病史，收集职业健康监护资料，现患检诊三个层面展开，结果相互印证或支持，可以比较系统全面揭示钒职业危害效应及其特征。

学界普遍认为职业条件下，钒主要通过呼吸道吸收，但吸收少，排出快，蓄积不多，主要引起呼吸系统刺激反应。急性中毒表现集中为呼吸道刺激症状和炎性征象；慢性损害表现与急性损害颇为相似，或伴有心、肺、肝、肾结构和功能异常及糖、脂肪代谢过程的变化[2,3]，本文发现与此相符。

钒对人体致癌作用争论较多，其关键问题是已有的研究均以动物为对象，且结果不一致，缺少人群流行病学资料支持。本文发现钒职业暴露人群恶性肿瘤发病率低于所在公司总体人群，该总体人群恶性肿瘤年均发病率 70.63/10万，与同期四川省城市居民恶性肿瘤年平均总体粗死亡率 142.6/10万比较[4]，差异明显，即使考虑健康工人效应影响，也应无超额发病。本文结果不支持钒为人体可疑致癌物结论，与多数研究结果一致[5~7]。

本项研究中的职业健康监护资料和现患检诊结果，均表明暴露对象胸部 X线阳性检出率极低，提示钒对呼吸道刺激性损害具有可逆性。肺通气功能结果显示，暴露组各参数均值与对照组无差异，但检出异常率较高，其总体印象是通气功能呈阻塞性为主的混合性通气功能下降，这与周清的调查结果相似[8]。

本项研究发现职业暴露对工人的情感影响表现为增加紧张、抑郁、愤怒、疲劳、困惑等消极情绪，降低有力积极情绪；神经行为的损害表现为降低协调能力、运动速度和稳定性，损害短期视觉记忆力；损害作用因性别和接触时间而有所不同。支持长期职业暴露 V_2O_5 对神经行为功能有损害作用的研究结果[9]。

参考文献：

[1] 梁友信. 介绍 WHO推荐的神经行为核心测验组合 [J]. 工业卫生与职业病, 1987, 13 (5): 331-339.

[2] 何凤生. 职业医学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1999: 276-280.

[3] 何凤生, 黄金祥. 职业病医师培训教材 (第二篇: 职业中毒) [M]. 北京: 人民日报出版社, 2004: 224-228.

[4] 张宁梅, 李德云. 全国第三次死因流调四川省恶性肿瘤死亡分析 [J]. 预防医学情报杂志, 2007, 23 (5): 522-524.

[5] Thompson H J, Chasteen N D, Meeker L D, Dietary vanadyl (IV) sulfate inhibits chemically-induced mammary carcinogenesis [J]. Carcinogenicity, 1984, 5: 849-851.

[6] Schroeder H A, Mitchener M, Life-term effects of mercury, methylmercury and nine other trace metals on mice [J]. J Nutr, 1975, 105 (4): 452-458.

[7] Köpf-Maier P, Hesse B, Köpf H, Tumour inhibition by metallocenes: effect of titanocene and hafnocene dichlorides on ehrlich ascites tumour in mice [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 1980, 96 (1): 43-51.

[8] 周清. 钒化合物对工人肺功能影响的研究 [J]. 职业医学, 1990, 17 (2): 79-81.

[9] 袁中文, 林杰. 五氧化二钒作业工人的健康调查 [J]. 职业卫生与救援, 1998, 16 (1): 11-12.

(上转第 91页)

[4] Meshel A, Wei Q, Adelstein R, et al. Basic mechanism of three-dimensional collagen fibre transport by fibroblasts [J]. Nat Cell Biol, 2005, 7: 157-164.

[5] Catherine M, Jack T, Interleukin (IL) 1β induction of IL-6 is mediated by a novel phosphatidylinositol 3-kinase-dependent AKT/IκB kinase α pathway targeting activator protein-1 [J]. J Biol Chem, 2008, 283 (38): 25900-25912.

[6] Jan J, Vivi V, Per E, et al. IL-1 beta differently involved in IL-8 and FGF-2 release in crystalline silica-treated lung cell co-cultures [J]. Part Fibre Toxicol, 2008, 5: 16.

[7] Mei Z, Donald F, Aled P, ERK, P38 and smad signaling pathways differentially regulate transforming growth factor-β1 autoinduction in proximal tubular epithelial cells [J]. Am J Pathol, 2006, 169 (4): 1282-1293.

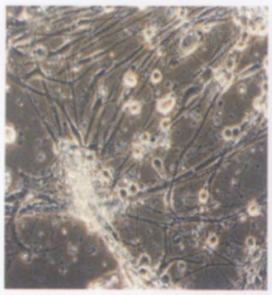
[8] Haining Y, Maurizio B, Barbara K, et al. TNF-α inhibits asbestos-induced cytotoxicity via a NF-κB-dependent pathway, a possible mechanism for asbestos-induced oncogenesis [J]. Proc Natl Acad Sci, 2006, 103 (27): 10397-10402.

[9] Cutroneo K R, White S L, Phan S H, et al. Therapies for bleomycin induced lung fibrosis through regulation of TGF-beta1 induced collagen gene expression [J]. J Cell Physiol, 2007, 211: 585-589.

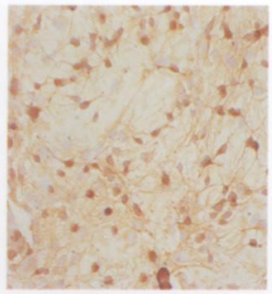
[10] Sybille B, Pierre M, Frank B, et al. Overexpression of cathepsin K during silica-induced lung fibrosis and control by TGF-β [J]. Respir Res, 2005, 6 (1): 84.

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

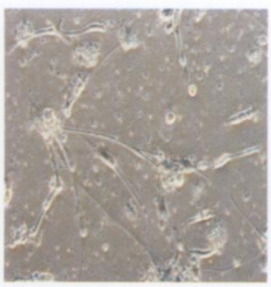
锰对神经元细胞内钙稳态影响的研究（正文见83～85页）



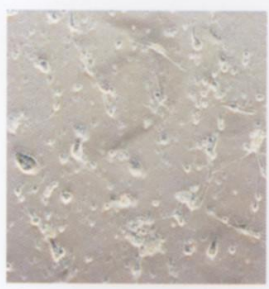
正常神经元 （400 ×）



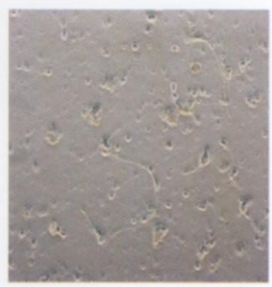
抗NSE染色 （400 ×）



染Mn 25 μmol/L组（200 ×）



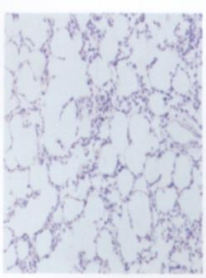
染Mn 100 μmol/L组（200 ×）



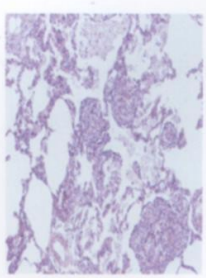
染Mn 400 μmol/L组（200 ×）

图1 锰对神经元形态的影响

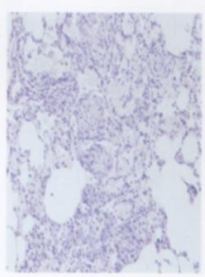
染尘大鼠Ⅰ和Ⅲ型胶原与相关细胞因子含量的变化关系（正文见89～91页）



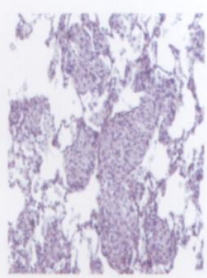
A．7 d对照组



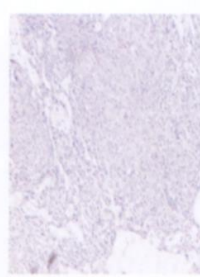
B．7 d染尘组



C．14 d染尘组



D．21 d染尘组



E．28 d染尘组

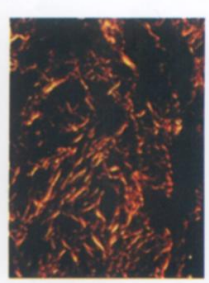
图1 不同时间点肺组织HE染色观察结果（HE，100 ×）

A．1 d染尘组

B．7 d染尘组

C．14 d染尘组

D．21 d染尘组



E．28 d染尘组

图2 肺组织天狼猩红染色结果（天狼猩红，200 ×）

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net