

煤工尘肺支气管肺泡灌洗液 CC-10及 TNF- α 含量分析

Analysis of CC-10 and TNF- α content in bronchoalveolar lavage fluid from coal worker's pneumoconiosis patients

蔚岩¹, 马冬¹, 闫立成¹, 陈志远², 袁扬², 张志浩², 姚林¹

YU Yan¹, MA Dong¹, YAN Li cheng¹, CHEN Zhi yuan², YUAN Yang², ZHANG Zhi hao², YAO Lin¹

(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 中国煤矿工人北戴河疗养院, 河北 秦皇岛 066104)

摘要: 对符合 GBZ70-2002《尘肺病诊断标准》的 22例 0⁺、I、II 期尘肺住院患者进行肺灌洗, 所得肺灌洗液分瓶进行细胞计数, 再混合浓缩, ELISA检测 CC-10 及 TNF- α 的含量。3 个期别煤工尘肺灌洗液中第 2、3 瓶的细胞数最多。随着期别的增加, 煤工尘肺灌洗液中 CC-10、TNF- α 含量均明显降低, $P < 0.01$ 。检测结果表明, 煤尘对 Clara 细胞的损伤及肺泡内巨噬细胞的凋亡情况, 对临床治疗具有重要的指导意义。

关键词: 煤工尘肺; 尘肺灌洗液; 肿瘤坏死因子; 克拉拉细胞

中图分类号: R135.2 文献标识码: B

文章编号: 1002-221X(2011)01-0057-02

尘肺的发病机制仍不十分清楚, 因此, 进一步探讨尘肺的发病机制对尘肺的预防、诊断、治疗乃至最终消除具有十分重要的意义^[1]。本研究对肺灌洗液中细胞成分和可溶性成分, 包括 Clara 细胞分泌蛋白 (Clara cell secretion protein CCSP) 中的 CC-10 蛋白及肿瘤坏死因子 (TNF- α) 的含量进行测定分析, 探讨其在尘肺发病中的作用及意义。

1 对象和方法

1.1 对象

符合 GBZ70-2002《尘肺病诊断标准》的 0⁺、I、II 期尘肺住院病例 22 例, 且对大容量全肺灌洗术无禁忌证, 病例包括各种混合及单纯尘肺。禁忌证包括: 年龄 ≥ 65 岁、心肺功能低下、有活动性肺结核、凝血机能障碍、严重气管支气管畸形。22 例均为男性, 年龄 38~58 岁、平均 (52.1 $\pm$ 5.6) 岁, 接触粉尘类型为煤尘、岩尘、混合粉尘, 接尘年限 (26.8 $\pm$ 4.3) 年, 其中 0⁺ 期 7 例, I 期 11 例, II 期 4 例。

1.2 方法

1.2.1 支气管肺泡灌洗 尘肺患者进行支气管肺泡灌洗后回收灌洗液, 分别将其装入 24 瓶生理盐水空瓶中。所得支气管肺泡灌洗液 (BALF) 4 $^{\circ}\text{C}$ 1500 r/min 离心 30 min, 取上清液置于冷冻干燥浓缩仪 (LGJ-12 冷冻干燥机, 北京松源华云科技发展有限公司制造) 进行蛋白浓缩。

1.2.2 尘肺灌洗液中 CC-10 及 TNF- α 的含量测定 采用上海蓝基生物科技有限公司 ELISA 试剂盒对 CC-10 及 TNF- α 的含量进行测定。

1.2.3 细胞分析 对每位尘肺患者的 24 瓶 BALF 进行离心, 吸取少量灌洗液滴在细胞计数板上进行细胞计数, 分别得出 3 个期别尘肺患者 24 瓶尘肺灌洗液的细胞分布情况。

1.3 统计分析

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组样本均数之间比较用 t 检验, 多组间样本均数比较采用方差分析, 显著性水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 检测 BALF 中 CC-10 及 TNF- α 的含量

随着期别的增加煤工尘肺灌洗液中 CC-10 含量明显降低, $P < 0.01$ 。三组之间差异均有统计学意义, 但 I 期尘肺灌洗液的 CC-10 含量高于 0⁺、II 期。随着期别的增加 BALF 中 TNF- α 的含量降低, $P < 0.01$, 见表 1。

表 1 不同期别尘肺灌洗液中 CC-10 及 TNF- α 含量的变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	CC-10 (ng/ml)	TNF- α (U/L)
0 ⁺	8.23 $\pm$ 0.62	(13.50 $\pm$ 1.34) $\times 10^3$
I	9.53 $\pm$ 0.81 [*]	(9.36 $\pm$ 1.06) $\times 10^{3*}$
II	6.48 $\pm$ 0.45 ^{**}	(6.52 $\pm$ 0.92) $\times 10^{3**}$

注: 与 0⁺ 期比较, ^{*} $P < 0.01$, ^{**} $P < 0.01$ 。

2.2 不同期别 BALF 细胞计数

通过对 0⁺、I、II 期 3 个期别各 1 例尘肺患者灌洗液进行细胞计数, 24 瓶尘肺灌洗液的细胞分布呈现偏态分布, 高峰为第 2 瓶或第 3 瓶。其中 0⁺ 期尘肺患者灌洗液细胞数最多的为第 2 瓶, 大约是 $1.55 \times 10^{11}/\text{L}$, 细胞总数约 $10.0 \times 10^{11}/\text{L}$, 从第 2 瓶开始, 细胞数逐渐下降, 到第 24 瓶时细胞数接近 0 个。I 期尘肺患者灌洗液细胞数最多的为第 3 瓶, 大约是 $1.56 \times 10^{11}/\text{L}$, 细胞总数为 $11.6 \times 10^{11}/\text{L}$, 从第 3 瓶开始, 细胞数逐渐下降, 到第 24 瓶时细胞数接近 0 个。II 期尘肺患者灌洗液细胞数最多的为第 3 瓶, 约为 $1.65 \times 10^{11}/\text{L}$, 24 瓶细胞总数大约是 $11.8 \times 10^{11}/\text{L}$, 从第 3 瓶开始, 细胞数逐渐下降, 到第 24 瓶时细胞数接近 0 个。同时对 3 个期别尘肺灌洗液中所含的细胞总数进行比较可以看出, 0⁺ < I < II 期。

3 讨论

近年来对矿物粉尘引起的尘肺机制研究取得较大的进展,

收稿日期: 2010-04-26 修回日期: 2010-07-07

作者简介: 蔚岩 (1981-), 男, 硕士, 研究方向: 卫生毒理学。

通讯作者: 姚林, 教授, E-mail: yaojin766@sohu.com

其中肺灌洗技术是主要研究方法之一。肺灌洗是通过生理盐水的机械冲刷作用和肺泡内直接注药等手段,将沉积在肺泡内的粉尘排出体外,以减缓肺部纤维化进程的尘肺治疗措施。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^[2]。这种变化既有量的差异,也有质的不同。利用肺灌洗技术分析各种肺病时肺灌洗液成分的变化及其在疾病中的意义,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^[3]。

Clara细胞是指主要衬覆于远端细支气管的非纤毛上皮细胞,因其活跃的分泌、增殖分化和生物转化特性而受到关注。Clara细胞分泌蛋白是Clara细胞最主要的分泌物,占支气管肺泡灌洗液中可溶性蛋白总量的2%~3%。CCSP分子结构为2条相同肽链反向排列,分别通过3位和69位上的半胱氨酸形成的2个二硫键连接而成。CCSP每条肽链形成4个 α 螺旋,在CCSP二聚体,8个 α 螺旋之间构成一疏水性口袋,孕酮、PCB和视黄醇可以结合于其中。在近30年来的研究过程中,不同研究者根据CCSP的来源、分子量及其生物学特性曾将它称之为人类蛋白1、尿蛋白1、子宫球蛋白、Clara细胞蛋白10(CC10)、CC16、胚泡激肽、多氯化联苯(PCB)结合蛋白等。近年来随着CCSP基因敲除小鼠模型(CCSP^{-/-})的建立,对CCSP生理功能的研究取得许多新的进展,已经发现CCSP具有免疫抑制和内源性抗炎等多种生物学活性,表现为减少炎细胞定位、渗出和迁移^[4]。CCSP在肺部疾病发生发展中的作用也开始受到广泛重视。

CC-10蛋白是Clara细胞的分泌物之一,但从I⁺期至II期尘肺灌洗液中CC-10含量的变化特点,我们可以看出CC-10的含量总的趋势是在减少,但在I期的CC-10含量要比其他两个期的含量要大,其可能的原因有CC-10是Clara细胞表达分泌的一种内源性抗炎因子,在炎性气道疾病中有保护作用^[3],当粉尘颗粒进入机体时Clara细胞会代偿性的分泌CC-10蛋白,使CC-10蛋白含量增多以保护呼吸道。但粉尘颗粒大量进入机体后,可直接损伤Clara细胞导致CC-10分泌下降,肺泡巨噬细胞(AM)活化后释放的细胞毒素损伤Clara细胞,粉尘毒性和表面自由基对肺上皮细胞造成损伤,而Clara细胞又是细支气管上皮细胞更新的干细胞。因此长期接尘人群Clara细胞的数目将大量减少,所分泌的CC-10蛋白也

保持在较低水平,通过检测尘肺灌洗液中CC-10含量可反映粉尘对Clara细胞的损伤情况。

肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)主要由单核巨噬细胞在病毒、炎症介质等刺激下生成的一种多肽。它可分为两类,即TNF α 、TNF β 。研究发现,TNF α 是一种多功能的细胞因子,与许多疾病有关,其中它与肝病的发生、发展、结局密切相关^[5]。TNF α 在尘肺病中的主要作用是诱导炎症细胞的吸附,参与其他细胞因子的调节,促炎症反应、胶原蛋白沉积和促成纤维细胞增殖。分泌增强的TNF α 通过改变相关纤维形成因子(包括纤维结合素、胶原蛋白及其他细胞因子)的转录机制激活炎症级联反应,促进炎症的发展。TNF α 能诱导血小板和嗜酸性粒细胞在肺内聚集,激活的血小板可进一步释放促纤维化细胞因子,如血小板源性生长因子(PDGF)、TGF- β 等^[6]。TNF α 还能增强结节性纤维化病人肺成纤维细胞分泌II-6及其mRNA的表达。TNF α 是由肺泡巨噬细胞分泌的重要炎症介质,在尘肺等以肺纤维化为主要特征的疾病中具有关键性作用。本研究发现尘肺患者3个期别中TNF α 的含量趋于减少,提示粉尘长期刺激肺泡,引起肺泡内巨噬细胞的凋亡,TNF α 的分泌逐渐减少。

综上所述,各种粉尘粒子通过呼吸道进入肺部,必然要引起肺内成分的改变。这些变化彼此间及同肺纤维化之间势必具有某种联系。系统的研究并通过一些严谨细密的动态分析,可揭示肺纤维化的理论机制。

参考文献:

- [1] 刘秉慈,李玉端.我国尘肺发病机制研究的概况与展望[J].中国工业医学杂志,2007,20(1):3-5
- [2] 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
- [3] Heppleston A G. The role of surfactant in the pulmonary reaction to mineral particles [J]. Int J Exp Pathol 1991 72:599-616
- [4] Zouki C, Ouellet S, Fieff J G. The anti-inflammatory peptides and cytokines regulate the expression of adhesion molecules on human leukocytes and prevent neutrophil adhesion to endothelial cells [J]. FASEB J 2000 14:572-580
- [5] 李霖,李晨,齐放,等.肿瘤坏死因子- α 及其II型受体基因多态性与矽肺[J].中华劳动卫生职业病杂志,2004,22:323-326
- [6] 王德军,杨跃林,夏庆杰,等.肿瘤坏死因子- α 基因多态性与矽肺遗传易感性的研究[J].四川大学学报,2005,36(5):679-682

欢迎订阅《中国工业医学杂志》

主管单位:中华人民共和国卫生部 主办单位:中华预防医学会 沈阳市劳动卫生职业病研究所

本刊主要内容:职业病、工作相关疾病、劳动卫生基础研究和实验研究的科研论著、综述、讲座、调查报道、职业病及职业因素所致疾病、生活中毒、农药中毒、药物中毒的预防、急救、诊断、治疗、护理的临床病例报道、经验总结等。

本刊主要栏目:论著、专题交流、临床实践、调查报告、综述、讲座、专家论坛、病例报告、监测与检验、劳动卫生管理、卫生评价、尘毒防治等。

订阅方式:邮发代号8-215 全国各地邮局均可订阅。本刊为双月刊,每期定价6.00元,全年定价36.00元(含邮费)。2011年征订工作现已开始,订阅者可随时与本刊编辑部联系。款到即寄发票。本刊现存少量过刊期刊,需要者也可随时联系订阅。

邮局汇款

收款人:中国工业医学杂志编辑部

地址:沈阳市铁西区南十一西路18号(邮编:110024)

电话:024-25731414

银行汇款

账户:中国工业医学杂志编辑部

开户行:交通银行沈阳分行铁西办事处(邮编:110021)

账号:21111203012015204308