

矽尘颗粒大小对复制大鼠矽肺模型的影响

桑银洲, 郑素琴, 刘佳麒, 孙影, 伊雪, 胡亚平

(河北联合大学基础医学院, 河北 唐山 063000)

摘要: 目的 比较 SiO_2 粉尘粒径大小对非暴露气管灌注一次性染尘法复制大鼠矽肺模型的影响。方法 将购买的 SiO_2 粉尘分为用玛瑙研钵研磨与不做处理两部分, 分别将不同粒径的两种粉尘配制成悬液; 将大鼠随机分为对照组、研磨实验组和未研磨实验组, 实验组均采用非暴露气管灌注 SiO_2 粉尘悬液一次性染尘, 对照组以等量灭菌生理盐水代替; 三组大鼠分别于 1 周、2 周、3 周、4 周、6 周、8 周六个时间点取肺组织, 做石蜡切片, 行 HE、I 型和 III 型胶原免疫组化染色, 镜下观察肺组织形态变化。结果 SiO_2 粉尘研磨后, 粒径小于 $5\ \mu\text{m}$ 的达 90% 以上, 未研磨的 SiO_2 粉尘粒径小于 $5\ \mu\text{m}$ 的仅占 20%; 研磨组染尘 3 周时 HE 染色可见细胞性结节, 8 周时纤维组织增生明显, 结节增大, 肺组织明显破坏, I 型及 III 型胶原在肺间质广泛阳性表达, 大鼠矽肺模型复制成功, 未研磨组未能成功复制大鼠矽肺模型。结论 研磨可使粒径小于 $5\ \mu\text{m}$ 的 SiO_2 粉尘大于 90%, 采用非暴露气管灌注 SiO_2 粉尘悬液一次性染尘法可以成功复制大鼠矽肺模型, 而未研磨粉尘未能引起明显的矽肺形态学变化。

关键词: 大鼠; 矽肺; 动物模型; 矽尘粒径

中图分类号: R135.2 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2013)03-0171-04

Effect of silica dust particle size on duplicate of rat silicosis model

SANG Yin-zhou, ZHENG Su-qin, LIU Jia-qi, SUN Ying, YI Xue, HU Ya-ping

(Hebei United University, Tangshan 063000, China)

Abstract: **Objective** Compare the effect of silica dust particle size on duplicate of rat silicosis model. **Methods** Purchased SiO_2 was divided into two parts, part one was grinded with agate mortar and the other was not, they were prepared to suspension respectively. 90 Wistar rats were randomly divided into three groups: control group, the grinded group and without grinding group. The rats of dust exposed groups were given silica suspension by trachea perfusion, and controls were only given physiological saline. 1, 2, 3, 4, 6 and 8 week later silica exposure, the rats were killed respectively, took the lung tissues for pathological examination (paraffin section, HE and immunohistochemical staining). **Results** After grinding, the respirable SiO_2 dust (size less than $5\ \mu\text{m}$) might reach to 90% or more, while the without grinding SiO_2 dust the respirable dust was only 20%. The rats of grinded-dust group could successfully silicosis model, the cellular silicotic nodules could be clearly seen 3 weeks later after silicon exposure; 8 weeks later, fibrous tissue and silicotic nodules were obviously proliferation, collagen I and collagen III were widely expressed. But in the rats of dust without grinding group the duplicate of silicosis model was unsuccessful. **Conclusion** The results suggested that grinding could make more respirable SiO_2 dust particle (size less than $5\ \mu\text{m}$), which is a important ensurance for successfully silicosis rat model by trachea perfusion method.

Key words: rat; silicosis; animal model; silicon dust particles size

对矽肺的发生发展及早期诊断和防治进行动态、系统的研究需借助于成功的复制矽肺动物模型^[1]。在以往的实验中, 将购买的商品矽尘(标明粒径小于 $5\ \mu\text{m}$) 直接用于建立动物模型成功率很低。为此, 本研究拟采取非暴露气管灌注一次性染尘法, 比较不同粒径 SiO_2 粉尘悬液灌注大鼠后矽肺模型复制情况, 为矽肺发病机制与防治的研究提供实验平台。

1 材料与方法

收稿日期: 2013-01-05; 修回日期: 2013-03-22

基金项目: 河北省科技支撑计划项目(编号: 10276114D)

作者简介: 桑银洲(1986—), 男, 在读研究生, 研究方向: 矽肺纤维化分子病理学。

通讯作者: 郑素琴, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向: 器官纤维化分子病理学及肿瘤分子病理学, E-mail: 13931588618@163.com。

1.1 材料

健康 Wistar 雄性大鼠 90 只, 体重 $190 \sim 210\ \text{g}$, 由河北联合大学实验动物中心提供, 实验动物许可证号: SYXK(冀) 2010-0038。主要试剂有 SiO_2 粉尘(Sigma 公司), I 型和 III 型胶原抗体(博士德生物技术有限公司), 免疫组化 SP 法试剂盒(四正柏生物技术有限公司)。主要仪器为玛瑙研钵、灌注器械、石蜡切片机、显微镜等。

1.2 复制矽肺模型

1.2.1 粉尘悬液制备 将购买的 SiO_2 商品粉尘(标明粒径小于 $5\ \mu\text{m}$) 分为两部分, 一部分用玛瑙研钵充分研磨 SiO_2 粉尘 2 h 以上, 在显微镜下结合目镜测微尺随机依次测定粉尘颗粒大小, 遇长径量长

径,遇短径量短径。至少测量 200 个尘粒,计算百分数,粒径小于 $5\ \mu\text{m}$ 的 SiO_2 尘粒达 90% 以上^[2]。另一部分不进行研磨处理,直接测量使用。两种 SiO_2 粉尘均在 180°C 烘干至恒重,然后用生理盐水配制成 $50\ \text{mg/ml}$ 的 SiO_2 粉尘悬液,高压灭菌备用,使用前超声震荡混匀 30 min 以上^[3~5]。

1.2.2 模型复制 将大鼠随机分为矽尘研磨后染尘实验组、矽尘未研磨染尘实验组(后简称研磨组和未研磨组)和对照组各 30 只。研磨组每只大鼠给予研磨 SiO_2 粉尘悬液,左右肺各 0.5 ml;未研磨组每只大鼠给予未研磨 SiO_2 粉尘悬液 1 ml;对照组给予等剂量灭菌生理盐水。各组均在灌注后注射庆大霉素每只 0.5 ml 预防感染,分别标记后在 SPF 环境下普饲养。

1.3 肺组织标本制作

染尘后 1 周、2 周、3 周、4 周、6 周和 8 周分别对研磨组、未研磨组和对照组各 30 只大鼠称重并麻醉处死取材。从胸腔取出整个肺脏,剔除残留的气管及血管等,称重并用 PBS 漂洗,肉眼观察病理变化。取左肺下叶固定于福尔马林中,常规石蜡包埋, $4\ \mu\text{m}$ 连续切片,行 HE 及免疫组化染色。

2 结果

2.1 SiO_2 研磨前后粒径比较(表 1)

表 1 SiO_2 研磨前后各粒径所占比例

	$<5\ \mu\text{m}$	$5\sim10\ \mu\text{m}$	$10\sim15\ \mu\text{m}$	$>15\ \mu\text{m}$
未研磨粉尘	20%	46%	31%	3%
研磨后粉尘	98.5%	1%	0.5%	0

2.2 大鼠一般体征

与对照组相比,自染尘 4 周始,研磨组大鼠呼吸次数明显增多,呼吸音明显,未研磨组无明显变化;至第 8 周,研磨组大鼠运动迟缓、精神欠佳,未研磨组依然无明显改变。

2.3 大鼠肺组织

2.3.1 肉眼观察 (1) 对照组:各时间点大鼠双肺粉红色,质软,表面光滑,无明显异常,灌注时回缩良好。(2) 研磨组:1 周时双肺被膜紧张,体积增大,局部充血、肿胀;2 周时双肺体积增大、海绵样改变;3 周时双肺体积明显增大,表面均匀分布直径 1 mm 左右的灰白色小结节;4 周时双肺可见较多大小不等且形状不规则的结节,肺组织硬度略增加;6 周时双肺结节继续增大,出现较大的结节,触之沙砾感,灌注时肺弹性减弱;8 周时,肺体积变小,灰白色结节突出于表面,并见融合病灶,肺组织硬度进一步增加。(3) 未研磨组:1 周时双肺被膜略紧张,质

软;第 2 周至第 8 周肺组织质软,弹性良好,与正常对照组相似,未出现结节。

2.3.2 HE 染色镜下观察 (1) 对照组:各时间点大鼠肺组织结构正常,肺泡结构清晰,个别区域少数中性粒细胞和淋巴细胞浸润。(2) 研磨组:1 周时肺泡间隔水肿增厚,巨噬细胞等炎细胞浸润,肺泡腔内较多巨噬细胞、矽尘颗粒等,散在分布,未聚集成团;2 周时肺内出现较小的结节,主要由吞噬矽尘的巨噬细胞组成;3 周时肺泡间隔仍有炎细胞浸润,细胞性矽结节数量增多且体积增大,组织结构有破坏;4 周时部分细胞性矽结节内出现胶原纤维;6 周时肺组织结构进一步被破坏,细胞性矽结节向由胶原纤维和成纤维细胞构成的矽结节转变,结节间出现肺气肿;8 周时,纤维组织增生明显,结节清晰,细胞-纤维性结节形成,肺组织破坏明显(图 1,见封三)。(3) 未研磨组:仅肺泡间隔增宽,肺泡腔内炎细胞渗出。未见矽结节。

2.3.3 I 型胶原及 III 型胶原免疫组化染色镜下观察

I 型胶原及 III 型胶原阳性表达均主要定位于肺泡间隔、小血管和细支气管周围间质中,呈棕黄色细颗粒。(1) 对照组:肺间质有弱表达,呈浅棕色。(2) 研磨组:肺泡间隔及肺间质有广泛明显的阳性表达,并随时间的延长,表达逐渐增多增强,尤其在矽结节内。8 周时在矽结节内表达量多且强度明显增强(图 2、3,见封三)。(3) 研磨组:肺间质有弱表达,呈浅棕色。

3 结论

实验证实,研磨能使购买的 SiO_2 商品粉尘粒径变小。本实验通过非暴露气管一次性灌注研磨后 SiO_2 粉尘悬液成功建立大鼠矽肺模型,HE 染色证实研磨后的 SiO_2 粉尘能到达肺泡并刺激机体病变,8 周时形成明显的矽结节。免疫组化示结节内有大量 I 型和 III 型胶原,为纤维化典型表现。未研磨的 SiO_2 粉尘粒径小于 $5\ \mu\text{m}$ 者约 20%,染尘后大鼠无明显矽肺病变。

4 讨论

从矽尘进入肺组织到矽肺的发生是一个复杂的病理生理过程。目前比较公认的矽肺发病机制有机械刺激学说、表面活性学说、自由基学说、细胞因子学说等。游离 SiO_2 粉尘经呼吸道进入肺部后,被巨噬细胞吞噬,造成巨噬细胞损伤并分泌细胞因子,引起肺脏炎症和致纤维化因子生成,形成小肉芽肿。 SiO_2 粉尘被吞噬后又因巨噬细胞崩解而释放,又会再次被巨噬细胞吞噬,该刺激持续反复呈循环状态,在此过

程中多种细胞因子或致纤维化因子不断产生释放,作用于成纤维细胞,促其大量增殖、聚集和胶原合成,产生大量的细胞外基质,主要是 I 型和 III 型胶原,形成肺纤维化^[5~10]。

SiO₂ 致肺纤维化作用不仅与游离 SiO₂ 的含量高低有关,也与 SiO₂ 的晶体结构有关。通过研磨使 SiO₂ 尘粒碎裂成更小的颗粒并产生许多新鲜破碎面,这些新鲜破碎面有许多活性自由基,在体内更容易发生生物化学反应^[9,11]。

呼吸道自身防御机制能够清除吸入空气中固体颗粒,直径小于 10 μm 的颗粒才可进入下呼吸道。一般直径大于 5 μm 的尘粒被吸入后,通常被呼吸道黏膜阻挡或通过粘液纤毛排送系统咳出,不进入肺内;而小于 5 μm 的粉尘能够进入肺泡并由于气流逐步减慢及重力作用,在终末呼吸性细支气管和肺泡壁上沉积,更小的颗粒通过弥散作用在肺内沉积。SiO₂ 作为一种生产性粉尘,其致病性取决于粉尘粒径大小,粒径小于 5 μm 时为呼吸性粉尘,多可到达呼吸道深部和肺泡,易被巨噬细胞吞噬引起生物学作用,导致尘肺病的发生,其中以 1~2 μm 的颗粒致病力最强^[11]。购置的 SiO₂ 粉尘在存放状态下,粒径不能完全满足小于 5 μm,经充分研磨后,可使 SiO₂ 的粒径小于 5 μm。

本实验结果表明 SiO₂ 粉尘经过充分研磨,可以使 98.5% 粉尘粒径小于 5 μm,提高分散度。用研磨

后的 SiO₂ 粉尘配制悬液,经非暴露气管一次性染尘 8 周后可以复制成稳定的大鼠矽肺模型,极大地提高了大鼠矽肺模型的成功率。

参考文献:

- [1] 金泰虞. 职业卫生与职业医学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 249.
- [2] GBZ/T192. 3—2007, 工作场所空气中粉尘测定 [S].
- [3] 王莹, 邓国祥. 实验动物矽肺不同时段 CT 与病理学表现对比 [J]. 山西医科大学学报, 2008, 39 (9): 787-790.
- [4] 金玉兰, 张文丽, 姚三巧, 等. 染矽尘大鼠血清白介素-1 和白介素-8 含量及肺泡巨噬细胞凋亡情况 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2011, 29 (8): 562-566.
- [5] 蒲新明, 温浩, 窦红, 等. 矽肺动物模型的病理观察 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2011, 29 (10): 761-765.
- [6] 高衍新, 王瑞. 矽尘致肺纤维化机制及细胞因子在矽肺纤维化中的作用 [J]. 中国工业医学杂志, 2008, 21 (1): 31-35.
- [7] 王丹, 毕长龙. 矽肺发病机制研究进展 [J]. 中国疗养医学, 2006, 15 (3): 161-162.
- [8] 李宏伟, 高秀霞, 杜海科, 等. 染矽尘大鼠肺组织 I、III 型胶原表达的变化 [J]. 武警医学院学报, 2005, 14 (6): 457-460.
- [9] 史延明, Bice Fubini, 翁少凡, 等. 游离二氧化硅粉尘致病性研究进展 [J]. 中华劳动卫生与职业病杂志, 2008, 26 (7): 439-442.
- [10] Arcangeli G, Cupelli V, Giuliano G. Effects of silica on human lung fibroblast in culture [J]. Sci Total Environ, 2001, 270: 135-139.
- [11] 鲍含诚, 范雪云. 尘肺病 [M]. 北京: 煤炭工业出版社, 2010: 41-42.

(上接第 170 页)

- [13] Ceccatellis S, Dare E, Moors M. Methylmercury—induced neurotoxicity and apoptosis [J]. Chem Biol Interact, 2010, 188 (2): 301-308.
- [14] Sarafian T, Verty M A. Oxidative mechanisms underlying methylmercury neurotoxicity [J]. Int J Dev Neurosci, 1991, 9 (2): 147-153.
- [15] 郑徽. 汞的毒性效应及作用机制研究进展 [J]. 卫生研究, 2006, 35 (5): 663-666.
- [16] Ziech D, Franco R, Georgakilas A G, et al. The role of reactive oxygen species and oxidative stress in environmental carcinogenesis and biomarker development [J]. Chem Biol Interact, 2010, 188: 334-339.
- [17] Tasaki M, Umemura T, Suzuki Y, et al. Oxidative DNA damage and reporter gene mutation in the livers of gpt delta rats given non-genotoxic hepatocarcinogens with cytochrome P450-inducible potency [J]. Cancer Sci, 2012, 101: 2525-2530.
- [18] 潘洪志, 李蓉. DNA 氧化损伤标志物 8-羟基脱氧鸟苷及其检测 [J]. 中国卫生检验杂志, 2003, 13 (4): 404-405.
- [19] Trujillo M, Radi R. Peroxynitrite reaction with the reduced and the oxidized forms of lipoic acid: New insight into the reaction of peroxynitrite with thiols [J]. Arch Biochem Biophys, 2002, 397 (1): 91-98.
- [20] Navari Izzo F, Quartacci M F, Sgherri C. Lipoic acid: a unique antioxidant in the detoxification of activated oxygen species [J]. Plant Physiol Biochem, 2002, 40: 463-470.
- [21] 田芳, 仲伟鉴, 应贤平. α-硫辛酸对 H₂O₂ 诱导的细胞活性氧水平及 DNA 氧化损伤的影响 [J]. 环境与职业医学, 2007, 24 (2): 180-189.
- [22] Packer L, Witt E H, Tritschler H J. Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant [J]. Free Radic Biol Med, 1995, 19 (2): 227-250.