

# 单核细胞炎性蛋白-1及巨噬细胞趋化蛋白-1 $\alpha$ 作为矽肺诊断生物标志物的可行性研究

李金木<sup>1,2</sup>, 王瑞<sup>3</sup>, 孙音音<sup>4</sup>, 刘秀玲<sup>4</sup>

(1. 济南大学 山东省医学科学院医学与生命学院, 山东 济南 250062; 2. 山钢股份莱芜分公司, 山东 莱芜 271104; 3. 山东省职业卫生与职业病防治研究院, 山东 济南 250062; 4. 莱钢集团有限公司医院, 山东 莱芜 271104)

**摘要:** **目的** 通过检测不同期别矽肺患者和接尘工人痰液单核细胞炎性蛋白-1 (MCP-1)、巨噬细胞趋化蛋白-1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ) 含量变化及与肺通气功能相关性, 探讨两种炎症趋化因子与矽肺发病的关系。**方法** 将不同期别矽肺患者及有无接尘工人分为5组; 用痰液诱导 (sputum-induction, SI) 的方法获取标本; 以酶联免疫吸附方法测定痰中MCP-1、MIP-1 $\alpha$ 的含量。**结果** MIP-1 $\alpha$ 及MCP-1组间差异均存在统计学意义 ( $F=3.111, P=0.016$ ;  $F=6.865, P=0.000$ )。MIP-1 $\alpha$ 与肺功能指标FEV<sub>1.0</sub>、FEV<sub>1.0</sub>/VCmax、MEF<sub>50</sub>、MEF<sub>25</sub>均呈明显正相关关系 ( $P<0.05$ )。**结论** MCP-1、MIP-1 $\alpha$ 可作为反映矽肺病程进展的敏感性生物指标, MIP-1 $\alpha$ 的表达水平更具有临床应用价值。

**关键词:** 矽肺; 痰液诱导; 趋化因子; 单核细胞炎性蛋白-1 (MCP-1); 巨噬细胞趋化蛋白-1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ )

中图分类号: R135.2 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2017)01-0018-03 DOI: 10.13631/j.cnki.zggyx.2017.01.004

## A feasibility study of MCP-1 and MIP-1 $\alpha$ as diagnostic biomarkers for silicosis

LI Jinmu\*, WANG Rui, SUN Yinyin, LIU Xiuling

(\* . University of Jinan; College of Medicine and Life Science, Shandong Provincial Academy of Medical Sciences, Jinan 250062, China)

**Abstract: Objective** Through detecting the contents of MCP-1, MIP-1 $\alpha$  in sputum of silicosis patients, silica-exposed workers and non silica-exposed workers, analyzing their correlations with pulmonary ventilation function, and to explore the relationship of these two inflammatory factors with the occurrence and development of silicosis. **Methods** The silicosis patients, silica-exposed and non silica exposed workers were divided into five groups, respectively, sputum-induction (SI) method was used to obtain sputum samples and enzyme linked immunosorbent assay to determine the contents of MCP-1, MIP-1 $\alpha$  in sputum. **Results** There were significant differences between groups both the contents of MCP-1 and MIP-1 $\alpha$  ( $F=3.111, P=0.016$  and  $F=6.865, P=0.000$ , respectively), and MIP-1 $\alpha$  and pulmonary function indexes such as FEV<sub>1.0</sub>, FEV<sub>1.0</sub>/VCmax, MEF<sub>50</sub>, MEF<sub>25</sub> all showed significant positive correlation ( $P<0.05$ ). **Conclusion** The results suggested that the MCP-1 and MIP-1 $\alpha$  could be used as a sensitive index to reflect the course of the silicosis, especially MIP-1 $\alpha$  which may have more clinical significance.

**Key words:** silicosis; sputum induction; chemokine; monocyte inflammatory protein-1 (MCP-1 $\alpha$ ); macrophage chemotaxis protein-1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ).

现阶段, 我国职业病发病以矽肺危害最为突出。矽肺发病机制尚不完全清楚, 无早期筛检的特异性指标。研究表明<sup>[1]</sup>, 矽肺纤维化进程与炎症因子的长期过度表达密切相关, 趋化因子的激活是矽肺早期炎症反应开始的标志<sup>[2]</sup>。大量动物实验也发现单核细胞炎性蛋白-1 (MCP-1)、巨噬细胞趋化蛋白-1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ) 对炎症反应细胞趋化作用明显, 能够诱导肺纤维化形成<sup>[3]</sup>, 但对人体 MCP-1、MIP-1 $\alpha$  变化规律与尘肺期别及肺功能改变的关系研究尚不多见。本研究通过痰液诱导的方法收集人体肺深部痰液, 检测分析 MCP-1、MIP-1 $\alpha$  在不同期别矽肺患者及接尘工人诱导痰中含量变化, 同时检测患者肺通气功能指

标, 探讨上述两种趋化因子与矽肺发生发展的关系, 为矽肺发生机制及早期预防提供依据。

## 1 对象与方法

### 1.1 对象

选择山东省某金矿井下作业 80 名接尘工人为接尘组, 40 例矽肺壹期患者为矽肺壹期组, 40 例贰期患者为矽肺贰期组, 40 例未诊断为矽肺壹期的观察对象作为观察对象组, 40 名无矽尘接触史的地面后勤人员作为对照组。以上研究对象均为男性, 无呼吸道、肝、肾疾病史, 参考美国胸科协会 (American Thoracic Society, ATS) 呼吸系统疾病设计的调查问卷, 并根据该矿每年的职业健康查体资料确定矽肺患者及接尘工人。

### 1.2 方法

**1.2.1 痰液的诱导** (1) 受试者静坐 5 min。(2) 诱导前 10 min 吸入沙丁胺醇 200  $\mu\text{g}$ , 雾化前清水漱口、

收稿日期: 2016-08-28; 修回日期: 2016-10-17

作者简介: 李金木 (1983—), 男, 主治医师, 从事职业卫生工作。

通信作者: 王瑞, 研究员。

擤鼻。(3)将3%的盐溶液装入超声雾化器,取消毒后的喷雾嘴安装于喷雾管口,准备诱导痰液。(4)打开雾化器,调节喷雾量及时间。受试者含住喷雾嘴,努力用口深吸气使喷雾尽可能被吸入肺深部。(5)吸入5 min后关闭雾化器,嘱受试者用力咳痰,用培养皿收集肺深部痰液。重复(3)操作,每5 min深咳一次,时间20~30 min,要求收集痰液体积至少2 ml。(6)若患者无痰或痰量不足则换用4%高渗盐水继续雾化7 min,若痰量仍不足,则再换用5%高渗盐水继续雾化,7 min后终止诱导程序。(7)痰液诱导完毕后填写记录表。

**1.2.2 痰液的处理** (1)用受试者的编号标记一15 ml的软管。(2)取1 ml或0.5 ml无唾液成分的痰液放入软管中,加入2倍体积0.1%二硫苏糖醇(DTT),并用一次性吸管吹打混匀。(3)盖上软管并将其放入37℃离心水浴锅中,水浴30~40 min使痰液溶解。(4)水浴结束后,加入与DTT相同体积的PBS稀释,用一次性吸管混匀,并摇荡5 min以上。(5)用PBS浸渍孔径为40 μm的尼龙过滤网,并用此网过滤上述摇荡混匀后的液体。(6)将以上混匀后的液体放入低速离心机中,以1 100 r/s离心10 min。(7)离心后将上清液吸尽,移入EP管中,-70℃下保

存待测。(8)于离心后所得的沉淀中加入一滴PBS混匀,用移液器吸取20 μl过滤后溶液加入一EP管中,用移液器吸取380 μl PBS加入上述EP管中,吹打、混匀。

**1.2.3 MCP-1、MIP-1α含量的测定** 采用酶联免疫法测定。试剂盒分别由荷兰Hycult公司和加拿大Blowen公司提供,具体步骤按试剂盒说明书进行。

**1.2.4 肺功能的测定** 采用6200Autobox型肺功能测试仪,由专人操作。检测指标包括FVC、FEV<sub>1.0</sub>、FEV<sub>1.0</sub>/VCmax、FEV、MEF<sub>75</sub>、MEF<sub>50</sub>、MEF<sub>25</sub>。

### 1.3 数据统计处理

采用SPSS 19.0对资料进行分析处理。资料符合正态分布的各组均数比较采用方差分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示;不符合正态分布的采用非参数秩和检验或转换成正态分布后进行方差分析,结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间两两比较采用LSD-*t*检验;MIP-1α、MCP-1水平与肺功能指标的分析采用Pearson相关分析;检验水准 $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 基本情况

5组间年龄存在显著性差异( $P<0.05$ ),在进行统计分析时将该指标予以考虑。身高、体重、吸烟时间、每日吸烟量及吸烟指数各组间差异均无统计学意义( $P>0.05$ ),见表1。

表1 各组研究对象基本情况

组别	例数	年龄(岁)	身高(cm)	体重(kg)	吸烟时间(年)	每日吸烟量(支)	吸烟指数(支·年)
对照组	40	43.43±6.40	172.00±5.15	74.05±11.85	13.33±11.60	15.40±13.68	315.85±344.48
接尘组	80	45.61±6.12	170.26±3.91	73.64±6.38	14.18±11.60	12.88±12.60	290.68±367.60
观察对象组	40	45.00±4.80	170.63±4.74	72.60±8.62	12.78±12.54	12.40±13.90	290.15±424.03
矽肺壹期组	40	53.58±12.66	170.08±6.41	72.80±8.88	17.05±13.66	16.33±16.74	424.13±491.79
矽肺贰期组	40	60.50±13.81	168.78±6.31	72.90±11.28	19.65±14.72	13.83±11.03	357.88±322.74
<i>F</i> 值		27.37	2.00	0.20	2.16	0.68	0.95
<i>P</i> 值		0.00	0.09	0.93	0.07	0.60	0.43

### 2.2 诱导痰中MIP-1α和MCP-1水平

以“年龄”为协变量对MIP-1α和MCP-1水平进行协方差分析,在剔除了“年龄”影响后,各组间MIP-1α和MCP-1水平差异有统计学意义( $F=3.111$ ,  $P=0.016$ ;  $F=6.865$ ,  $P=0.000$ ),与对照组相比,观察对象组、矽肺壹期组、矽肺贰期组的MIP-1α和MCP-1水平明显升高,差异具有统计学意义( $P=0.028$ ,  $P=0.004$ ,  $P=0.014$ ;  $P=0.013$ ,  $P=0.000$ ,  $P=0.000$ )。与接尘组相比,矽肺壹期组、矽肺贰期组MIP-1α水平明显升高,差异具有统计学意义( $P=0.014$ ,  $P=0.042$ );观察对象组、矽肺壹期组及矽肺贰期组MCP-1水平明显升高,差异具有统计学意义( $P=0.015$ ,  $P=0.000$ ,  $P=0.000$ );协变量年龄对MIP-1α和MCP-1水平的影响均不显著( $F=1.174$ ,  $P$

$=0.280$ ;  $F=0.374$ ,  $P=0.542$ )。见表2。

### 2.3 诱导痰中MIP-1α和MCP-1水平与肺功能相关性分析

各组诱导痰液中MIP-1α水平与肺功能相关性分析结果表明,MIP-1α与FEV<sub>1.0</sub>、FEV<sub>1.0</sub>/VCmax、MEF<sub>50</sub>、MEF<sub>25</sub>均呈明显的正相关关系( $P<0.05$ )。MCP-1水平与肺功能各指标均无明显的相关关系( $P>0.05$ ),见表3。

## 3 讨论

矽尘进入肺泡后,长期刺激激活肺泡巨噬细胞、淋巴细胞及成纤维细胞等炎性效应细胞,这些效应细胞合成并分泌大量具有多种生物活性的细胞因子,形成复杂的细胞因子网络,引起巨噬细胞性肺泡炎<sup>[4,5]</sup>。以肺泡巨噬细胞及中性粒细胞聚集为主的肺

表2 诱导痰中 MIP-1 $\alpha$  和 MCP-1 水平测定结果

ng/L

组别	例数	MIP-1 $\alpha$			MCP-1		
		$\bar{x}\pm s$	F 值	P 值	$\bar{x}\pm s$	F 值	P 值
对照组	40	19.27 $\pm$ 6.18			98.07 $\pm$ 20.75		
接尘组	80	20.21 $\pm$ 3.09			99.74 $\pm$ 16.71		
观察对象组	40	21.72 $\pm$ 5.22 <sup>ab</sup>	3.111	0.016	108.02 $\pm$ 17.62 <sup>ab</sup>	6.865	0.000
矽肺壹期组	40	22.95 $\pm$ 5.61 <sup>ab</sup>			114.64 $\pm$ 16.70 <sup>ab</sup>		
矽肺贰期组	40	23.12 $\pm$ 4.71 <sup>ab</sup>			115.73 $\pm$ 16.45 <sup>ab</sup>		

注: a, 与对照组比较  $P<0.05$ ; b, 与接尘组比较  $P<0.05$ 。

表3 MIP-1 $\alpha$  和 MCP-1 水平与肺功能相关分析

指标	参数	肺功能						
		FVC	FEV <sub>1.0</sub>	FEV <sub>1.0</sub> /VCmax	PEF	MEF <sub>75</sub>	MEF <sub>50</sub>	MEF <sub>25</sub>
MIP-1 $\alpha$	r 值	0.155	0.424	0.407	0.126	0.213	0.265	0.438
	P 值	0.308	0.004	0.006	0.409	0.160	0.079	0.003
MCP-1	r 值	0.089	-0.018	0.065	0.162	0.159	-0.014	0.005
	P 值	0.563	0.905	0.672	0.288	0.298	0.926	0.975

泡炎性反应中, 炎性细胞受到激活后作为趋化因子 C-C 家族的重要趋化蛋白 MCP-1、MIP-1 $\alpha$  得以释放, 显现出对免疫/炎症反应细胞显著的趋化活性。并调节效应细胞功能<sup>[3]</sup>, 调控肺损伤、肺的免疫功能和与之有关的细胞因子。MIP-1 $\alpha$  可以引起胶原基因表达伴肺内异常胶原沉积; MCP-1 升高可以引起成纤维细胞胶原合成增加, 并通过诱导外源性 TGF- $\beta$  基因表达间接刺激胶原合成, 然后通过自分泌/旁分泌途径刺激胶原基因表达<sup>[6]</sup>, MIP-1 $\alpha$ 、MCP-1 的表达在肺纤维化过程中至关重要。本次研究也表明接尘组、观察对象组、矽肺组人体诱导痰中 MIP-1 $\alpha$ 、MCP-1 水平显著高于对照组, 同时随矽肺病情进展 MIP-1 $\alpha$ 、MCP-1 水平持续升高, 提示两种因子可能参与了矽肺发生发展过程中肺组织的炎症反应和纤维化进程, 并且通过其对炎性细胞的趋化作用使得炎症反应随病情的进展而加剧。

此外, 纤维化动物模型肺内有大量的嗜酸性粒细胞存在, 提示它们与肺纤维化的愈后有关<sup>[7]</sup>, 嗜酸性粒细胞参与的肺疾病中 MIP-1 $\alpha$  作为关键介质, 能够促进嗜酸性粒细胞的迁移<sup>[8]</sup>, 而嗜酸性粒细胞又作为 MCP-1 的主要来源。本次研究中肺纤维化发生、发展乃至矽肺后期伴随的肺纤维化的愈后进程中, MIP-1 $\alpha$ 、MCP-1 水平的高表达持续于矽肺的临床进程。接尘组、观察对象组、矽肺组 MIP-1 $\alpha$ 、MCP-1 水平持续升高, 且出现在肺组织纤维化发生前, 我们推测两指标表达水平可较好地反映矽肺病程进展, 为敏感的生物指标。本次研究发现, 人体诱导痰液中 MIP-1 $\alpha$  水平与肺功能 FEV<sub>1.0</sub>、FEV<sub>1.0</sub>/VCmax、MEF<sub>50</sub>、MEF<sub>25</sub> 等指标呈明显的正相关关系 ( $P<0.05$ ), 与张

玮等研究结果<sup>[9]</sup>相符。提示痰液中 MIP-1 $\alpha$  水平能够较好地反映肺纤维化发展过程中人体肺功能的强度变化, 相比 MCP-1 的表达水平更具有临床指导意义。

#### 参考文献:

- [1] Virginie B, Aurelie N, Pierre M, *et al.* The role of pro-antiinflammatory responses in silica-induced lung fibrosis [J]. *Respir Res*, 2005, 6 (1): 112.
- [2] 李学军, 崔社怀, 韩根成. 肺纤维化大鼠血浆 MIP-1 $\alpha$ 、MCP-1 水平的动态变化及临床意义 [J]. *解放军医学杂志*, 2001, 26 (10): 745-748.
- [3] Smith R E, Strieter R M, Phan S H. Production and function of murine macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  in bleomycin-induced lung injury [J]. *J Immunol*, 1994, 153 (10): 4704-4712.
- [4] 张玮, 王瑞, 王欣, 等. 染矽尘大鼠支气管肺泡灌洗液中细胞因子的变化 [J]. *中华劳动卫生职业病杂志*, 2013, 31 (11): 801-805.
- [5] Krajnak K, Waugh S, Johnson C, *et al.* Vibration disrupts vascular function in a model of metabolic syndrome [J]. *Ind Health*, 2009, 47 (5): 533-542.
- [6] Gharaee K M, Phan S H. The role of eosinophils in pulmonary fibrosis [J]. *Int J Mol Med*, 1998, 1 (1): 43.
- [7] Hashimoto S, Nakayama T, Gon Y, *et al.* Correlation of plasmamono-cyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and monocyte inflammatory protein-1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ) levels with disease activity and clinical course of sarcoidosis [J]. *J Exp Med*, 1998, 188 (6): 157.
- [8] Manfred Z, Silke S, Gemot Z, *et al.* Increased expression of proinflammatory chemokines in bronchoalveolar lavage cells of patients with progressing idiopathic pulmonary fibrosis and sarcoidosis [J]. *J Investig Med*, 1998, 46 (5): 223-231.
- [9] 张玮, 王瑞, 张海东, 等. 尘肺患者诱导痰与肺灌洗液中炎性因子的差异和相关性研究 [J]. *中华劳动卫生职业病杂志*, 2015, 33 (3): 201-203.