

大鼠矽肺BALF中DPPC与Ⅱ型 细胞改变关系的研究

华西医科大学公共卫生学院 (610041) 杨 青

提 要 本文采用非暴露式气管注入法对大鼠一次染尘50mg,染尘后 15、45、90、180和270天分批剖检,测定支气管肺泡灌洗液(简称BALF)中二棕榈酰卵磷脂(简称DPPC)含量,同时对肺组织标本进行扫描电镜观察。结果表明在实验早期DPPC含量就达高峰,随染尘时间延长,DPPC含量逐渐下降。DPPC含量变化与扫描电镜下Ⅰ型上皮细胞的数量和功能改变相关。

关键词 石英 二棕榈酰卵磷脂 扫描电镜

矽肺是严重危害接尘作业工人健康的职业病之一^{〔1〕}。由于长期吸入含有大量游离二氧化硅粉尘所致,病因很清楚,但其纤维化过程等方面尚存在很多问题。本文旨在观察实验性大鼠矽肺BALF中DPPC的变化规律和肺组织扫描电镜改变的关系,探讨矽肺纤维化过程中表面活性物质的变化与Ⅰ型上皮细胞功能改变的关系。

1 材料和方法

1.1 实验用粉尘

由中国预防医学科学院劳动卫生与职业病研究所提供,直径小于5 μ m的粒子占99%以上,游离二氧化硅含量在98%以上,用生理盐水配成50g/L的混悬液,高压灭菌,染尘前加青霉素和链霉素各 5×10^6 U/L。

1.2 实验动物的分组与处置

取Wistar种雄性健康大鼠,体重180~280g,按体重随机分成正常对照组和石英组。大鼠在乙醚轻度麻醉下,非暴露式气管内注入染尘,石英组注入石英粉尘混悬液1ml,正常对照组注入生理盐水1ml,均分左、右两侧各0.5ml。

1.3 BALF中DPPC的测定

在染尘后15、45、90、180和270天分批剖检大鼠,剥离出气管和肺脏,按Myrick法对右肺进行支气管肺泡灌洗^{〔2〕},每次注入预热至37℃的生理盐水5ml,共灌洗5次,回收率约为80%,将灌洗液离心,测定无细胞上清液中DPPC的含量。采用钨酸氧化薄层层析法,DPPC标准品为美国Sigma公司生产,染色斑

点在日本岛津CS-930薄层色谱扫描仪上定量,测定波长为630nm。

1.4 扫描电镜标本制备

取新鲜肺组织用2.5%戊二醛固定,2h后,切成 $2 \times 2 \times 4$ mm³的小块,放入1%二甲砷酸钠溶液中,4℃冰箱保存。制片时再用锇酸固定,丙酮梯度脱水,JCDP-3型临界点干燥仪干燥,JFC-110型离子溅射仪镀金,JSM-35c扫描电镜观察。

1.5 大鼠全肺胶原蛋白含量测定

采用氯胺T法^{〔3〕}。

2 结果

2.1 大鼠BALF中DPPC含量测定结果

见表1。

表1 大鼠BALF中DPPC含量测定结果
($\bar{X} \pm S$) mg/L

时间(天)	对照组	石英组
15	12.20 $\pm$ 10.62(6)	50.71 $\pm$ 29.01*(7)
45	12.79 $\pm$ 3.07(6)	21.26 $\pm$ 3.69*(6)
90	10.29 $\pm$ 1.48(7)	20.36 $\pm$ 8.24*(6)
180	14.86 $\pm$ 4.45(6)	17.67 $\pm$ 9.97(7)
270	12.78 $\pm$ 5.47(7)	12.39 $\pm$ 5.12(6)

注:()内为动物只数,*与正常对照组相比 $P < 0.05$

2.2 大鼠全肺胶原蛋白含量

见表2。

2.3 病理学结果

2.3.1 正常对照组 整个实验期间,肉眼观察肺表面光滑,呈粉红色,质地柔软,富有弹性,未见淋巴结肿大。扫描电镜下肺泡结构正常,泡腔直径40~50 μ m,肺泡壁厚度正常,肺

表2 大鼠全肺胶原蛋白含量测定结果
($\bar{X} \pm S$) mg

时间(天)	对照组	石英组
15	22.60 ± 7.06(6)	68.29 ± 10.28*(7)
45	27.45 ± 12.51(6)	197.65 ± 71.05*(6)
90	28.76 ± 7.51(7)	202.41 ± 24.19*(6)
180	48.52 ± 11.35(6)	342.94 ± 186.37*(7)
270	76.33 ± 23.37(7)	548.24 ± 409.60*(6)

注: () 内为动物只数, *与同期正常对照组相比
 $P < 0.05$

泡角处偶见Ⅰ型上皮细胞, 表面微绒毛长短粗细较一致, 分布均匀, 泡腔内偶见巨噬细胞, 见封三图1。

2.3.2 石英组 染尘后15天, 肉眼观察两肺体积增大, 表面有许多灰白色斑点, 质地较硬。淋巴结肿大, 直径0.5cm左右, 质地较硬。扫描电镜下肺泡结构紊乱、破坏; 肺泡腔内巨噬细胞聚集、成簇, 表面皱折、突起增多; Ⅰ型细胞增生, 直径6~7 μm , 微绒毛稀疏、局部脱落, 细胞变扁平, 向Ⅰ型细胞移行, 在肺泡间隔和肺泡壁上可见成纤维细胞, 呈梭状, 直径5~15 μm , 分泌的纤维可逐渐将其包绕, 纤维呈网状, 网孔径3 μm 左右, 纤维直径0.03 μm 左右, 增生的纤维间常夹杂有棱角明显的石英颗粒。见封三图2, 3。

染尘后45天, SEM观察大部肺泡结构破坏, Ⅰ型上皮细胞剥脱, 肺毛细血管受损, 肺间质裸露, 部分成纤维细胞游出到肺泡腔, 残存的肺泡壁肿胀变厚。局部泡腔Ⅰ型上皮细胞增生, 微绒毛稀疏, 长短不齐, 部分细胞变扁平, 向Ⅰ型上皮细胞移行。偶见部分肺泡腔内巨噬细胞聚集、成簇, 直径6~7 μm , 皱折变浅, 见封三图4。

染尘后90天, 大部肺泡结构破坏, 个别部分肺泡结构消失, 在破坏的肺泡结构上可见大量细胞碎片。纤维呈网状, 纤维直径约0.03 μm , 部分纤维融合成索条状, 直径约4 μm 。部分残存的肺泡结构上Ⅰ型上皮细胞增生, 细胞大小不等, 直径5~10 μm , 表面微绒毛呈片状。几乎看不到巨噬细胞, 见封三图5。

染尘后180和270天, 大部肺泡结构消失, 但细胞轮廓尚存, 可见大量细胞碎片, 纤维交织、融合成索条状, 直径2~5 μm 。肺间质和实质弥漫性纤维化, 见封三图6。

3 讨论

正常肺泡腔的表面, 被覆两种上皮细胞, 一种为Ⅰ型上皮细胞, 该细胞很薄, 是被覆肺泡腔的主要细胞, 约占肺泡表面的95%; 而另一种称为Ⅱ型上皮细胞, 间夹于Ⅰ型上皮细胞之间, 它具有分泌表面活性物质的功能。正常情况下, 肺表面活性物质中卵磷脂(PC) 占总磷脂的80%左右, 而二棕榈酰卵磷脂(DPPC) 又占PC的70~80%, 是表面活性物质的重要组份之一。Ⅱ型上皮细胞还是Ⅰ型上皮细胞的后备细胞^[4], 当Ⅰ型上皮细胞受损时, Ⅰ型上皮细胞增殖增生, 移行成为Ⅰ型上皮细胞, 以保持呼吸膜的完整性。本实验经气管一次注入大量石英粉尘的研究结果显示, 在15天时可使肺泡结构受损, 主要是导致Ⅰ型上皮细胞受损, 这时Ⅱ型上皮细胞大量增生, 并移行成为Ⅰ型上皮细胞, 修复呼吸膜。由于Ⅰ型上皮细胞的功能和数量的改变, 肺泡腔内积聚大量肺表面活性物质, 引起BALF中DPPC含量明显增高, 这种作用在早期可能是有益的, 可刺激骨髓造血干细胞分化为单核细胞, 补充巨噬细胞并增强肺泡巨噬细胞的流动性, 有助于将粉尘清除于体外^[5]。随着染尘时间延长, 到90天时, Ⅰ型上皮细胞只是局部增生, DPPC含量也较15天时明显降低, 提示BALF中DPPC的含量可反映Ⅰ型上皮细胞的数量和功能。石英粉尘在肺内持续发挥作用, 产生大量自由基, 使表面活性物质和生物膜上的多不饱和脂肪酸过氧化, 形成脂质过氧化物, 引起肺表面活性物质和生物膜上脂质的成份和比例改变, 一方面造成表面活性物质的功能障碍, 另一方面导致生物膜的结构与功能受损, 膜的通透性和流动性改变, 造成肺组织损伤。

在实验15天时肺内出现纤维状物质, 相互交织呈网状和束状, 全肺胶原蛋白明显高于正

(下转第350页)

表2 H_3P 接触年限与肺功能异常率的关系

接触年限 (年)	A组			B组			合 计		
	受检数	异常数	异常率(%)	受检数	异常数	异常率(%)	受检数	异常数	异常率(%)
0 ~	11	0		6	0		17	0	
5 ~	19	2	10.53	16	3	18.75	35	5	14.29
10 ~	17	4	23.53	22	9	40.91	39	13	33.33
15 ~	5	3	60.00	9	5	55.56	14	8	57.14
20 ~	3	3	100.00				3	3	100.00
合计	55	12	21.82	53	17	32.08	108	29	26.85
$\chi^2(P)$	19.54(<0.01)			22.83(<0.01)			24.60(<0.01)		

3 讨论

磷化氢经呼吸道进入人体,刺激呼吸道粘膜,可致充血、水肿。本次结果表明:(1)常规通气功能除MVV均值观察组低于对照组,农村组低于粮库组外,其余肺量值(VC,FVC,FEV₁)基本无改变;MMEF仅农村女性观察组降低,但二者的异常检出率三组无统计学差异,尚有待于今后的进一步观察。(2)小气道功能农村组显著低于粮库组及对照组($P<0.01$),且农村组 $\dot{V}_{25}$, $\dot{V}_{50}$,粮库组 $\dot{V}_{25}$ 异常检出率显著高于对照组(P 值依次为 <0.01 , <0.05 , <0.05),示磷化氢慢性作用对小气道功能有明显影响。此与临床上无症状、体征,常规肺功能检查不易发现的损伤可首先表现为小气道功能的异常相符。(3)肺功能受损以农村组为著,调查中发现:粮仓在熏蒸期磷化氢浓度虽高(可达200mg/m³),但工人在仓内时间短暂,且佩带防毒面具,个人防护较好。而仓外环境浓度较低,经监测在熏蒸第8天开仓放气时其下风侧5米处仅为0.26mg/m³,低于国家规定的车间内最高容许浓度0.3mg/m³。而农户则是人、粮同室,磷化氢浓

度虽较低(熏蒸24h达3.86mg/m³),但实际接触时间要长得多。农村组女性肺功能降低明显更说明了这一点。调查中还发现,粮仓每年仅需熏蒸一次,而农户则需熏蒸两次。更有甚者,有的农户不按磷化铝的使用说明,有长期或超量使用磷化铝的现象。(4)接触组肺功能异常以阻塞性为主,符合刺激性气体所致的呼吸道损害特点。随着接触磷化氢年限的增加肺功能异常率明显增加,说明肺功能损害与接触工龄有密切关系。

调查结果表明,磷化氢慢性接触肺功能改变以MVV,MMEF, $\dot{V}_{50}$, $\dot{V}_{25}$ 等指标较敏感。肺功能改变以阻塞性为主。肺功能异常率依次为农村组>粮库组>对照组,但无统计学意义。肺功能异常率随接触年限增加呈明显增加。各指标异常检出率以 $\dot{V}_{25}$, $\dot{V}_{50}$ 为高,且农村组>粮库组>对照组,说明磷化氢慢性作用对小气道功能有显著影响。建议今后在磷化氢、磷化铝等杀虫剂的使用、管理及安全防护方面加强宣传,使用户充分认识其危害性,增强个体防护意识,以降低其危害,保护广大用户的身体健康。

(上接第325页)

常对照组,提示在染石英尘早期大鼠肺实质可出现纤维化性质的改变。随染尘时间延长,这种纤维状物质相互交织、融合成束状和索条状,直径约2~5 μ m,推测这种纤维状物质可能是胶原纤维的前身,但有待进一步证实。

4 参考文献

- 王移兰,主编.劳动卫生学(第三版).北京:人民卫生出版社,1993;79-92
- Myrick QN. Studies on pulmonary alveolar macrophages from the thenormal rabbit. J Immun. 1961;86:128
- Stogenman H. Dedetermination of hydroxyproline. Clinical chemical Acta. 1967;16:267
- 孟昭阔,张国忱,邢国长,主编.矿山矽肺与结核防治.北京:能源出版社,1985;132~142
- Richards R. Pulmonary surfactant system. The Netherlands Elsevier Science Publishers. 1983;287

Abstracts of Original Articles

Investigation on the Cytogenetic Effects in Tunnel Bus Drivers and Conductors**Peng Baocheng, et al**

The cytogenetic effects of tunnel bus drivers and conductors were studied in the paper, workers in Shanghai botanical garden were selected as control group. The result showed that the 6-TG-resisting lymphocyte mutation rate, frequency of sister chromatid exchange and the micronucleus of peripheral blood lymphocyte in exposed group were markedly higher than those in control group. The result suggested that high concentration automotive exhaust could induce genetic damages on occupational exposed people.

Key words, automobile exhaust, lymphocytes, 6-TG-resisting mutation, sister chromatid exchange, lymphocyte micronucleus

Studies on DPPC in the BALF of Experimental Silicotic Rats**Yang Qing**

Rat were injected with 50mg of silica intratracheally. The contents of dipalmitoylphosphatidylcholine(DPPC) of the broncho alveolar lavage fluid(BALF) were detected on 15, 45, 90, 180 and 270 days after dosing. The lung tissues of silicotic rats were examined under scanning electromicroscopy. The results show that the DPPC peaks at early stage and declines along with the experimental duration. There is a condation between the DPPC levels and the changes of amount and function of the type 2 areolar epithelium under scamming electromicroscopy.

key words, silica, dipalmitoylphosphatidylcholine(DPPC), scanning, electromicroscopy

Combined Effects of High Temperature and Carbon Monoxide on Rat Liver HSP70mRNA and its Synthesis**Wu Tangchun, et al**

The HSPs(heat stress proteins) could be induced by heat or other stimuli, the normal proteins was inhibited. Present study aimed at the effects of high temperature, carbon monoxide and their combined effects on the major heat stress protein-HSP70 and its mRNA. 8 male rats were randomly divided into four groups, control group($25.0 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$), high temperature group($40.0 \pm 2.0^{\circ}\text{C}$), carbon monoxide group (600 + 50ppm, $25.0 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$) and the combine effects group(600 + 50ppm, $40 \pm 2.0^{\circ}\text{C}$). After experiment, the rats recovered in room temperature for 60 min. Then determined the rectal temperature and HbCO in the blood, the liver were taken for HSP70 and its mRNA for analysis. The results were as follows, (1) the rectal temperature in high temperature group and combined effect group, showed a 3.0°C , HbCO level in CO group and combined effect group increased above 30%, respectively compared with control group. (2) only little HSP70 mRNA was transcribed in control group, showed little increase HSP70 mRNA was obviously increased in high temperature group, and the increase of HSP70 mRNA in combined effect group was most obvious, suggesting a synergistic action between high temperature and CO. The synthesis of HSP70 showed a consistent changes with that of its mRNA in all groups.

Key words, high temperature, carbon monoxide, combined effects, heat stress proteins, HSP70mRNA

The Study of Byssinosis in Guangzhou**Jiang Chaoqiang, et al**

1320 workers of two factories processing pure cotton were studied. 1306 subjects without occupational dust exposure were served