

沥青烟致肺损伤细胞凋亡及突变的实验研究

郭湘云, 王金穗, 卢启明, 刘晓霞

(甘肃省人民医院, 甘肃 兰州 730000)

摘要: 目的 探讨沥青烟对肺组织的损伤机制, 早期发现沥青烟致肺癌的预警指标。方法 建立染毒小鼠模型, 进行不同剂量 (55、165 mg/m³) 和不同时间 (30 d、60 d) 染毒, 光镜下观察肺组织形态改变; 采用免疫组化 S-P 法, 进行 p53、p21、cyclin D1 染色, 观察 p53、p21^{WAF/CIP1} 和 cyclin D1 基因蛋白表达; 采用流式细胞仪进行小鼠肺组织细胞 DNA 含量的检测和细胞周期分析。结果 随着沥青烟染毒时间和剂量增加, 小鼠肺组织表现为不同程度的不典型增生; 小鼠肺组织 p53 基因蛋白在低剂量染毒 30 d 组未见阳性表达, 高剂量 60 d 组呈强阳性表达 ($P < 0.01$)。p21^{WAF/CIP1} 基因蛋白表达在低剂量染毒 30 d 组呈阳性表达, 高剂量染毒 60 d 组表达明显下调 ($P < 0.01$)。cyclin D1 基因蛋白表达同 p53 基因蛋白表达; 小鼠肺组织细胞各周期指数均发生变化, G₁ 期细胞数下降, S 期阻滞, 进入 G₂/M 期的细胞减少, 细胞增殖指数 (PI) 增加 ($P < 0.05$), 异倍体指数 (DI) 升高 ($P < 0.05$), 与对照组比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。相同染毒时间 55 mg/m³ 剂量组和 165 mg/m³ 剂量组的 PI 均高于对照组, 相同染毒剂量下 60 d 组 DI 随时间的增加而升高 ($P < 0.05$)。结论 沥青烟损伤肺组织影响细胞周期, S 期 DNA 含量增加, 细胞增殖能力增强, 突变几率提高, 可能与 p53 和 cyclin D1 基因蛋白表达增高及 p21^{WAF/CIP1} 基因蛋白的转录抑制相关。

关键词: 沥青烟; 肺损伤; 细胞周期; p53; p21^{WAF/CIP1}; cyclin D1

中图分类号: R994.3 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2007)01-0009-04

Experimental study on apoptosis and mutagenicity of lung lesion caused by bitumen fumes

GUO Xiang-yun, WANG Jin-sui, LU Qi-ming, LIU Xiao-xia

(Department of Occupational Medicine, People's Hospital of Gansu Province, Lanzhou 730000, China)

Abstract Objective To explore the mechanism of pulmonary lesion and early warning index of cancer caused by bitumen fumes. **Method** In this subacute toxicity study, the experimental mice were forced to inhale the bitumen fumes at different exposure levels (55 mg/m³, 165 mg/m³) and different time periods (30 d, 60 d). H. E staining was used to study the pathological changes. The expressions of p53, p21^{WAF/CIP1} and cyclin D1 gene were observed by immunohistochemical method. The cell circles were analyzed by flow cytometry. **Result** The experimental results showed that the main pathological changes of pulmonary tissues in bitumen fume groups were atypical hyperplasia at different levels. The protein expression of p53 and cyclin D1 increased significantly but the protein expression of p21 decreased significantly ($P < 0.01$). Bitumen fumes could result in the decrease of the cell number of G₁ phase, the block of S phase, the delay of G₂/M phase, the increase of cell proliferation index (PI) and the increase of DNA aneuploid index (DI). All the changes were correlated with the exposure level and time of action. **Conclusion** It indicated that the precancerous changes caused by bitumen fumes could be relative to the changes of cell cycles of lung tissue.

Key words: Bitumen fume; Lung lesion; Cell cycle; p53; p21^{WAF/CIP1}; cyclin D1

自 1987 年国际癌症研究机构把沥青烟列为人类可疑致癌物以后, 其可能存在的职业危害和环境污染日益受到重视。本文建立沥青烟染毒模型, 探讨其对肺组织损伤的机制, 以提出肺癌发生的预警指标。

1 材料与方法

1.1 材料

实验动物由兰州大学医学部动物中心提供, 昆明种健康小鼠 60 只, 4 周龄, 体重 (18±2) g, 雌雄各半; 染毒用石油沥青由兰州石化公司炼油厂提供。

p53 (1:100)、p21 (即用型)、cyclin D1 (1:50) 单克隆抗体由美国 Neomarkers 公司生产 (批号: 031202D.F.E)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组 正常对照组: 小鼠 20 只, 雌雄各半; 沥青烟染毒低剂量组: 小鼠 20 只, 雌雄各半, 染毒平均浓度 55 mg/m³; 沥青烟染毒高剂量组: 小鼠 20 只, 雌雄各半, 染毒平均浓度 165 mg/m³。

1.2.2 染毒模型建立 将染毒组动物置入 1 m³ 密闭静式染毒柜中自然吸入不同浓度沥青烟气体, 每天 2 h, 每周 6 d; 对照组同等条件下吸入常温下空气, 各组动物在同等条件下饲养并自由饮食, 分别于染毒后 30 d 及 60 d 处死。

1.2.3 肺组织病理形态学检查 取肺脏, 经生理盐

收稿日期: 2006-06-06; 修回日期: 2006-08-29

基金项目: 甘肃省科学技术厅科学事业费资助项目 (Q5041-C33-27)

作者简介: 郭湘云 (1946-), 女, 主任医师, 主要从事职业病防治工作。

水反复冲洗后,将右肺用10%甲醛固定,取每个动物右肺尖叶和膈叶依次脱水、透明、浸蜡、包埋、切片、贴片;HE染色后光镜下观察组织病理形态(参照《世界卫生组织肺癌分类》标准41)。

1.2.4 肺组织 p53、p21^{WAF/CIP1}、cyclin D1 基因检测

采用免疫组化法(S-P)法,用0.1 mol/L PBS代替一抗作阴性对照,以已知阳性片作阳性对照,各组石蜡肺切片脱蜡至水处理后,细胞染色依次加 p53、p21、cyclin D1 抗体、生物素化二抗及链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶等,经DAB显色后再经苏木精轻度复染,阳性细胞核染成棕黄色,根据染色强度打分与阳性细胞百分比分值乘积(大于3为阳性)判断结果。

1.2.5 细胞周期检测 将左肺置于含有BPS液的试管中,剪碎匀浆制成细胞悬液,用体积分数为75%的乙醇固定,离心洗涤后后调节细胞密度至 1×10^6 /ml加入RNA酶(50 μ g/ml) 100 μ l, 37 $^{\circ}$ C恒温水浴消化30 min后,加1 ml 碘化丙啶液(50 μ g/ml)终止RNA酶的作用,4 $^{\circ}$ C避光30 min后,应用流式细胞仪测定,用multi-cycle软件计算细胞周期和DNA指数,以DI值表示DNA含量,依据DI值制定DNA倍体,0.9 \leq DI \leq 1.1为DNA二倍体;DI $<$ 0.9或DI $>$ 1.1为异倍体。

$$DI = \frac{\text{异常细胞 } G_0/G_1 \text{ 峰道数}}{\text{正常二倍体细胞 } G_0/G_1 \text{ 期峰道数}}$$

DNA倍体克隆的判断标准,参照上海第二军医大学出版社《实用流式细胞术彩色图谱》应用标准。

1.3 统计学处理

应用SPSS12.0统计学分析软件进行统计学处理,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用LSD检验,阳性率用R \times C列联表的卡方分析。

2 结果

2.1 肺组织形态改变

染毒30 d和60 d对照组(图1)肺组织基本正常,支气管及肺泡结构清晰,细胞形态一致,排列整齐,核浆比例正常,无异型性。低剂量染毒组30 d小鼠肺组织可见有管周炎和间质性肺炎,肺泡间隔增宽,肺泡壁毛细血管扩张充血,肺泡腔大小不等,部分萎陷,大量淋巴细胞围管样浸润,支气管上皮和肺泡上皮均轻度增生,局部支气管上皮乳头状增生,胞浆带消失;60 d小鼠较30 d小鼠支气管上皮和肺泡上皮增生明显,胞浆带消失,核质比例增加,可见核分裂像。高剂量染毒组30 d小鼠较低剂量组肺泡间隔增宽明显,肺泡萎陷部分呈实变,核深染,支气管黏膜上皮细胞、胞浆带消失局部区域极性紊乱核分

裂像可见,呈中度不典型增生;60 d小鼠肺组织结构破坏,支气管上皮排列紊乱形状、大小不一,核大小不等畸形,分裂像可见,呈重度不典型增生(图2)。

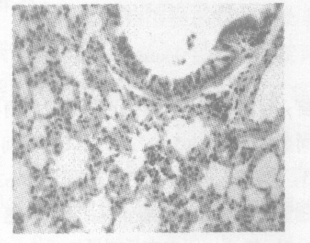


图1 60 d 阴性对照组肺组织 $\times 200$

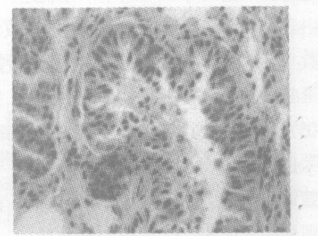


图2 高剂量染毒60 d肺组织 $\times 400$

2.2 肺组织 p53 基因蛋白表达

随着染毒剂量的增加呈上升趋势,差异有统计学意义, $P < 0.01$;在同一染毒剂量下随染毒时间的延长略有增加,差异无统计学意义, $P > 0.05$ 。对照组小鼠肺组织 p53 染色未见阳性细胞;低剂量染毒30 d组 p53 染色未见阳性表达;60 d组可见阳性表达。高剂量染毒30 d组可见阳性表达;60 d组 p53 染色呈强阳性表达(图3)。

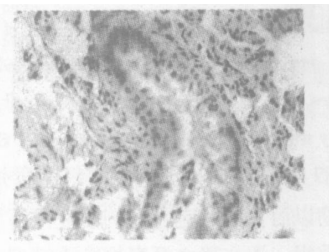


图3 高剂量染毒60 d p53 染色 $\times 200$

2.3 肺组织 p21^{WAF/CIP1} 基因蛋白表达

随着染毒剂量的增加呈递减趋势,差异有统计学意义, $P < 0.01$;在同一染毒剂量下,随着染毒时间的延长略有降低,差异无统计学意义, $P > 0.05$ 。对照组小鼠肺组织 p21 染色阳性细胞多见;低剂量染毒30 d组 p21 染色可见阳性细胞,60 d组阳性细胞较30 d组少;高剂量染毒30 d组阳性细胞少见,60 d组 p21 染色偶见阳性细胞(图4)。

2.4 肺组织 cyclin D1 基因蛋白表达

随着染毒剂量的增加呈增高趋势,差异有统计

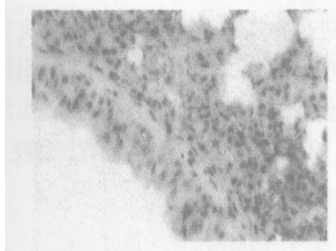


图 4 高剂量染毒 60 d p21 染色 × 200

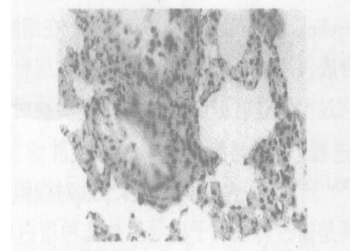


图 5 高剂量染毒 60 d 肺组织 cyclin 染色 × 200

学意义, $P < 0.01$; 同一染毒剂量下随着染毒时间的延长有增高, 但差异无统计学意义, $P > 0.05$ 。对照组小鼠肺组织 cyclin D1 染色未见阳性细胞; 低剂量染毒 30 d 组 cyclin D1 染色可见阳性细胞, 60 d 组较 30 d 阳性细胞增加; 高剂量染毒 30 d 组阳性细胞数与低剂量 60 d 组近似, 60 d 组 cyclin D1 染色阳性细胞较多见 (图 5)。

2.5 对肺组织细胞周期的影响

表 1 不同剂量沥青烟染毒 30 d、60 d 对小鼠肺组织细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s$)

染毒剂量 (mg/m^3)	染毒时间 (d)	各时相细胞数构成比 (%)			PI	DI ($\times 10^{-2}$)
		G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M		
对照组	30	85.4 ± 0.8	5.0 ± 0.66	9.6 ± 1.01	14.6 ± 0.8	
55		84.0 ± 0.7*	6.7 ± 0.83	9.3 ± 0.66	16.0 ± 0.7*	1.14 ± 0.88
165		84.3 ± 1.4*	11.7 ± 1.36**△	3.9 ± 1.68**	15.6 ± 1.4*	1.16 ± 1.47
对照组	60	87.7 ± 1.1	4.7 ± 0.91	7.5 ± 0.81	12.3 ± 1.1	
55		84.3 ± 2.0**	8.3 ± 1.68**	7.4 ± 0.78▲▲	15.7 ± 2.0**	1.16 ± 1.51▲
165		80.9 ± 0.8**▲	12.0 ± 2.54**△	7.2 ± 0.68*△▲	19.2 ± 0.8***▲▲	1.20 ± 2.30△

染毒时间相同时, 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 染毒时间相同时, 与低剂量组比较, △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$; 染毒剂量相同时, 与短时间组比较, ▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$

2.6 对肺组织细胞 DNA 倍体的影响

各染毒组均出现 DNA 倍体细胞, 可见二倍体 G₀/G₁ 期异倍体细胞峰 (四倍体峰)。时间分层分析可见, 在染毒时间相同情况下, 随着染毒剂量增加, 各组的二倍体细胞百分比均有比较明显的下降, 异倍体细胞百分比均有比较明显的上升, 以染毒 60 d 后最为显著。在染毒剂量相同情况下, 随着时间的延长, 各组的二倍体细胞百分比均有所下降, 异倍体细胞百分比有所上升, 低剂量染毒变化差异无统计学意义, 高剂量染毒随着时间的延长其变化差异有统计学意义。

3 讨论

近年来在研究疾病的职业环境因素、筛查高危人群及早期发现亚临床病人及制定职业环境卫生标准等方面, 广泛应用细胞生物学和分子生物学的原理和方法, 从分子水平探讨环境因子相关肿瘤的病因发展机制已成为人们的研究方向^[1]。本文通过沥青烟暴露小鼠肺组织病理形态观察发现, 随着染毒剂量增加染毒时间延长, 病理损伤加重, 较长时间吸入沥青烟可致不典型组织增生; 经免疫组化法 p53、p21^{WAF/CIP1} 和 cyclin D1 染色, 结果显示随沥青烟暴露剂量增加和时

间分层分析 (表 1) 可见染毒组细胞周期各时期细胞数均发生改变, G₀/G₁ 期细胞呈逐渐减少趋势, S 期细胞比率增加, PI 和 DI 均增加, 细胞呈异倍体化趋势, 差异有统计学意义, 高剂量染毒组更为显著, 处于 G₂/M 期细胞数减少, 但差异无统计学意义。剂量分层分析 (表 1) 提示在相同剂量下染毒不同时间、细胞周期各时期的细胞数变化大致相同, S 期阻滞差异无统计学意义。DI、PI 略有增高。

间延长, p53 和 cyclin D1 阳性表达增加, 而 p21^{WAF/CIP1} 反之; 应用流式细胞仪检测细胞周期, 表现染毒小鼠细胞周期各时相细胞数均发生改变, 细胞呈异倍体化趋势, 并且均出现 DNA 倍体细胞。

随着对癌症发生机制认识的不断深入, 阐明细胞增殖是细胞生命活动的重要特征之一, 细胞增殖是通过细胞周期实现的, 而细胞周期是在细胞内外各种因素的精确调控下实现^[2]。细胞周期失控是细胞增殖导致癌变的重要原因, 接触致癌物质可诱发细胞异常增殖导致细胞周期紊乱^[3]。目前对细胞周期的调控认为细胞周期 (cyclin)、细胞周期蛋白依赖激酶 (CDK) 和细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子 (CKI) 以及肿瘤抑制基因 p53 在细胞周期调控中有重要作用^[4]。在正常的细胞周期中 G₁/S 期、G₂/M 期是两个关键调控点, 当 DNA 受损可决定细胞进入分裂程序是处于静止的 G₀ 期或者诱发细胞凋亡。PI 是反映细胞增殖活性的常用指标^[5]。DI 出现提示 DNA 含量异常, 反映细胞染色体发生了不稳定性改变 (突变), 出现 DNA 异倍体几率越大, 不典型增生癌变发生率越高^[6]。而与 CDK 结合决定 CDK 活性和细胞周期运转方式的蛋

白即为 cyclin, cyclin D1 属 G₁-cyclin 类, 在细胞 G₁ 期最先被合成, 认为是作用于 G₁ 期的重要细胞周期蛋白, 当它过度表达时可以促进 G₁/S 期转换而加速细胞周期进程, 造成细胞增殖失控导致肿瘤发生^[7]。p53、p21^{WAF/CIP1} 均为肿瘤抑制基因, p53 对细胞周期的调控主要是通过转录因子诱导另外几种蛋白 (p21 蛋白、cyclin 蛋白等) 产生作用, DNA 损伤使突变型 p53 表达增加, 突变型 p53 对肿瘤无抑制作用却具有促进恶性转化功能^[1]。p21^{WAF/CIP1} 是 p21 蛋白的亚型之一, 在细胞 G₁ 期 DNA 受到损伤后可以阻断 G₁ 期向 S 期的转换, 抑制细胞增殖使细胞凋亡, 当表达下调或缺失可导致细胞增殖过度, 甚至发生癌变^[8]。本实验结果显示, 沥青烟染毒后 G₁ 期细胞数下降, G₁/S 期调控消失, S 期细胞增多, 进入 G₂/M 期细胞减少, 各染毒组均出现 DNA 倍体细胞, G₀/G₁ 期出现四倍体峰 (少量处于 G₂/M 及 S 期的细胞)。随着染毒剂量和时间的增加, PI 增加, DI 升高; 细胞周期调控因子 p53、cyclin 蛋白表达增加, p21^{WAF/CIP1} 蛋白表达下调, 这些因素可能是沥青烟诱发细胞突变率提高致异常增生, 抑制细胞凋亡, 使细胞周期紊乱, 导致肺损伤发生癌变的主要机制。

环境中存在多种化学、物理、生物性致癌因素, 可以通过不同途径进入人体诱导恶性肿瘤, 在职业医学领域研究分析阐明致癌物质的致癌性和致癌机制,

对高危人群进行暴露评价和早期诊断具有重要意义, 但职业环境中致癌物的作用有一定的时间性和剂量效应, 可能将会陆续发现更多的具有致癌作用的物质, 迫切需要为积极有效的预防和治疗手段开辟新领域。

参考文献:

- [1] 许真, 金银龙. 环境致癌剂与 p53 基因突变 [J]. 卫生研究, 2004, 33 (2): 239-242.
- [2] 戴玉锦. 癌症发生机理的研究进展 [J]. 生物学杂志, 2004, 21 (6): 4-7.
- [3] Skora ER, Stone S, Tomblyn S, et al. Asphalt exposure enhances neuropeptide levels in sensory neurons projecting to the rat nasal epithelium [J]. J Toxicol Environ Health, Part A, 2003, 66 (11): 1015-1027.
- [4] 李志琴, 章静波. 细胞周期调控与肿瘤 [J]. 癌症进展杂志, 2004, 2 (1): 70-76.
- [5] 王福生, 荆梦杰. 周期素 D1 与肿瘤研究进展 [J]. 国外医学临床生物化学与检验, 2000, 21 (3): 140-142.
- [6] Funya T, Uchiyama T, Murakami T. Relationship between chromosomal instability and intratumoral regional DNA ploidy heterogeneity in primary gastric cancer [J]. Clin Cancer Res, 2000, 6: 2815-2820.
- [7] Nikaido T, Li S F, Shiozawa T, et al. Coabnormal expression of cyclin D1 and p53 protein in human uterine endometrial carcinoma [J]. Cancer, 1996, 78: 1248-1253.
- [8] Noda A, Jares P, Cazzol M, et al. p21^{WAF/CIP1} expression is associated with cell differentiation but not with p53 mutations in squamous cell carcinoma of Larynx [J]. Pathology, 1997, 183 (2): 156-163.

· 病例报道 ·

铅绞痛误诊为急腹症 2 例报告

Lead colic misdiagnosed as surgical acute abdomen

杨俊奎

(沈阳市第九人民医院, 辽宁 沈阳 110024)

1 病例介绍

【病例 1】男, 39 岁, 就诊前 1 天无诱因出现腹部绞痛, 可忍受, 无腹胀。后感腹痛明显加重, 伴恶心和呕吐, 不排气和排便。来诊时查体: 痛苦面容, 面色苍白, 蜷曲体位, T 37.8℃, P 100 次/min, R 19 次/min, BP 110/70 mm Hg。腹部平坦, 未见肠型, 腹壁稍紧张, 上腹部有压痛, 肠鸣音减弱。腹部摄片示中上腹肠管积气。超声检查提示胆囊内 1.0 cm×1.0 cm 强光团, 后有声影, 内回声粗糙, 囊壁厚 0.60 cm, 肝内外胆管无扩张。以急性胆囊炎、胆石症收入院。入院后予以禁食、抗感染、解痉等保守治疗。2 d 后患者疼痛无明显缓解, 决定行手术治疗。取右上腹经腹直肌切口, 探查腹腔见, 胆囊稍增大, 无明显急性炎症表现, 无异常, 行胆囊切除术。术后仍有绞痛, 程度稍有减轻。追问病史, 曾在某蓄电池厂

工作, 1 周前刚刚解除劳动合同。遂请中毒科会诊。实验室检查: 血 Pb 3.3 μmol/L, 尿 Pb 1.1 μmol/L, 尿粪卟啉阳性。诊断铅中毒。予以依地酸二钠驱铅治疗, 疼痛明显缓解, 2 周后病愈出院。

【病例 2】男, 42 岁, 外地某矿厂冶炼工, 职业史 5 年, 2 周前来沈务工。突发腹部阵发性绞痛, 不放射, 伴恶心、呕吐, 不排气和排便。腹部摄片示肠管胀气, 散在细小液平, 以良性肠梗阻收入院。查体: 腹稍膨隆, 无固定压痛点, 以脐周为重, 考虑到有职业性铅接触史, 在禁食、补液等治疗的同时, 请中毒科会诊。实验室检查: 血 Pb 3.0 μmol/L, 尿 Pb 1.0 μmol/L。经驱铅治疗, 腹痛明显缓解, 1 周后出院。

2 讨论

铅中毒多发生于油漆、铅矿开采、蓄电池、冶炼、化工等工种, 偶有误服。可以在接触数天、数月、数年内发生。主要表现为突发腹部绞痛, 剧烈难忍, 疼痛部位多在脐周, 亦可在上、下腹部; 发作时面色苍白、焦虑、急躁不安, 出冷汗, 按压稍缓解, 腹壁可稍紧张, 无固定压痛点, 无明显反跳痛, 伴恶心、呕吐, 肠鸣音减弱, 正常或阵发性增强; 易误诊为急性胃肠炎、胆囊炎、胰腺炎、溃疡穿孔、肠梗阻等, 化验血铅、尿铅指标升高, 尿粪卟啉阳性。本组病例提示, 不明原因的急性腹痛, 必要时一定要询问职业史, 避免误诊。