

染矽尘大鼠血硅及尿硅含量与肺纤维化程度的关系

高宏生¹, 王艳平^{1,2,*}, 张鸽^{1,2}, 刘丽华², 李国良¹, 朱辉¹, 张国辉¹

(1. 天津职业与环境危害生物标志物重点实验室, 天津 300162 2. 华北煤炭医学院基础医学教研室, 河北 唐山 063000)

摘要: 目的 探讨染矽尘大鼠血、尿中硅含量与肺组织中羟脯氨酸、I型胶原、III型胶原含量的关系。方法 处理组采用气管灌注法注入矽尘混悬液建立大鼠矽肺模型, 对照组采用同样处理但用生理盐水代替矽尘混悬液。两组取第28天大鼠的血液、尿液, 经样品前处理后用原子吸收分光光度计检测; 大鼠肺组织制作石蜡切片, 采用天狼猩红染色法, 用偏振光显微镜和图像分析系统对肺组织I型胶原、III型胶原的表达进行分析; 试剂盒检测肺组织羟脯氨酸含量。结果 处理组大鼠血硅、尿硅、I型胶原及III型胶原明显高于对照组 ($P < 0.05$)。羟脯氨酸虽稍低于对照组, 但无统计学意义 ($P > 0.05$); 血硅、尿硅分别与I型胶原、III型胶原建立直线回归, 有统计学意义 ($P < 0.05$), 血硅、尿硅分别与羟脯氨酸建立直线回归, 无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 血硅、尿硅对早期矽肺纤维化程度可能有一定的指示意义。

关键词: 矽肺; 血硅; 尿硅; 羟脯氨酸; I型胶原; III型胶原

中图分类号: R135.2 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2010)06-0415-03

Relationship of blood and urine silicon contents to the degree of pulmonary fibrosis in rats exposed to silica dust

GAO Hong-sheng, WANG Yan-ping^{2,*}, ZHANG Ge², LIU Li-hua², LI Guo-liang, ZHU Hui, ZHANG Guo-hui

(1. Tianjin Key Laboratory of Biomarker for Occupational & Environmental Hazard, Tianjin 300162, China; 2. North China Coal Medical University, Tangshan 063000, China)

Abstract: Objective To explore the relationship of serum and urine silicon contents to the contents of hydroxyproline, collagen I and collagen III in lung tissues of rats exposed to silica dust. Methods By tracheal instillation of silica dust suspension, the silicosis rat model (treated group) was established. The rats in control group were only given the saline for tracheal instillation. 28 days after tracheal instillation, the blood and urine samples were taken in rats of both groups. The silica level in samples were detected by atomic absorption spectrophotometer after pre-treatment. Paraffin embedded lung sections were stained with Sirius red. The analysis of collagen I, III was by using polarization microscopy and Image-Pro Plus Version 4.5 for Windows TM. The detection of hydroxyproline content was by kit. Results The results showed that the serum and urine silicon levels and collagen I, III were all risen in treatment group compared with control group ($P < 0.05$), despite of that the hydroxyproline content in treatment group was slightly less than that of control group, but there was no statistical significance ($P > 0.05$). Serum and urine silicon levels may establish linear regression with collagen I and III respectively and have statistical significance ($P < 0.05$), while the linear regression established between serum or urine silicon levels and hydroxyproline content had no statistical significance ($P > 0.05$). Conclusion The results suggested that the serum and urine silicon contents may have some indication significance for the pulmonary fibrosis degree early.

Key words: silicosis; serum silicon; urine silicon; hydroxyproline; collagen I; collagen III

矽肺的发生发展是一个复杂的病理生理过程, 其中氧化应激所致的巨噬细胞的损伤和免疫系统活化所致的细胞因子及炎症介质的分泌, 是矽肺重要的病理生理基础^[1]。由于矽肺病的早期诊断很困难, 一经传统的胸片诊断, 肺部纤维化已经无药物可以逆

转, 所以矽肺诊断的早期生物标志物的研究成为了当前矽肺病研究中的重点和热点。血、尿中的硅元素属于接触生物标志物, 羟脯氨酸及I型、III型胶原属于效应生物标志物。本实验主要是研究血硅和尿硅是否与肺组织羟脯氨酸、I型胶原、III型胶原有关系。

1 材料与方法

1.1 仪器

微波消解仪、TAS990原子吸收分光光度计、空心阴极钨灯、电子天平、切片机、离心机、恒温干燥箱、Nikon Eclipse E800偏振光显微镜、WV-CP240/G Panasonic colour CCTV Camera

收稿日期: 2010-06-17 修回日期: 2010-09-01

基金项目: 国家自然科学基金项目 (3080902); 武警博士启动金 (WBS200907)

作者简介: 高宏生 (1973-), 男, 副教授, 博士, 研究方向: 职业病学。

*: 通讯作者, 硕士研究生, 研究方向: 职业病学, E-mail: wangkaiwangkai@163.com

1.2 试剂

硅标准储备液, 1 mol/L稀硝酸, 正戊醇 (分析纯), 钼酸铵四水化合物 (优级醇), 羟脯氨酸试剂盒, 二甲苯, 乙醇, 苏木精, 天狼猩红。

1.3 动物模型建立方法和标本处理

将 28只大鼠随机分为对照组和染矽尘组, 腹腔注射 0.14%戊巴比妥轻度麻醉后, 于无菌条件下在大鼠颈部皮肤正中作纵向切口, 暴露气管, 对照组大鼠气管内一次性注入灭菌生理盐水 1 ml, 染尘组注入 1 ml 配制好的矽尘混悬液。染矽尘 28 d处死大鼠, 取血液、尿液、肺组织。血液超速离心制备血清。

1.4 检测方法

1.4.1 血硅、尿硅分析

1.4.1.1 原子吸收仪工作条件 波长 379.8 nm 通带宽度 0.4 nm 灯电流 6.0 mA 燃烧器高度 6 mm 燃气流量 2 000 ml/min

1.4.1.2 样品处理 血清取 0.1 ml, 尿液取 0.02 ml, 放入消解罐中加 1 mol/L硝酸 6 ml 放入微波消解仪中进行消解后冷却待用, 样品空白也按同样的方法制备。

1.4.1.3 标准曲线的绘制 用移液管分别移取 0.05、1.2、4 ml 的 100 μg/ml 硅标准工作液放入 50 ml 容量瓶中, 再各滴入 6 ml 浓度为 1 mol/L 的稀硝酸, 用超纯水定容为 0.2、4、8、16 μg/ml 的标准溶液各 50 ml 将以上溶液混匀后倒入分液漏斗中, 各加入 5%钼酸铵溶液震荡后出现明显的显色反应生成黄色硅钼黄, 静置 10 min 再各加入正戊醇 8 ml 震荡后静置 5 min 后, 上层液收到比色管中, 完成一次萃取, 如此共萃取 3次, 然后将比色管中萃取液用正戊醇定容到 25 ml 所有样本及样本空白也加入钼

酸铵后按上述方法萃取定容后检测。

1.4.2 羟脯氨酸的测定 (碱水解法) 按羟脯氨酸试剂盒上的要求进行样本前处理。各取 1.0 ml 蒸馏水、5 μg/ml 标准应用液及检测液, 分别置于空白管、标准管、检测管, 依次加入试剂一 0.5 ml 混匀, 静置 10 min 加入试剂二 0.5 ml 混匀, 静置 5 min 试剂三 0.5 ml 混匀, 60℃水浴 15 min 冷却后, 3 500 r/min 离心 10 min 去上清在 550 nm 处, 1 cm 光径, 蒸馏水调零, 测各管吸光度, 然后根据公式计算出羟脯氨酸含量。

1.4.3 I、II型胶原的测定 取肺组织用 10%中性缓冲甲醛液固定 24 h 制作普通石蜡切片, 天狼猩红染色, 用 Nikon Eclipse E800 偏振光显微镜观察, 每只动物随机观察 1张切片, 每张切片随机选取上、中、下、左、右 5个视野, 用 WV-CP240/G Panasonic colour CCTV Camera 摄像并存入计算机, 然后用 Image Pro Plus Version 4.5 图像分析系统进行定量分析。在偏振光显微镜下, I 型胶原呈桔黄、橙红及亮红色, 其纤维较粗; II型胶原呈淡绿色, 其纤维较细。用阳性区域的面积百分比代表胶原含量。

1.5 数据的统计分析

建立 Excel 数据表, 利用 SPSS13.0 进行统计分析, 采用独立样本 t 检验和双变量直线回归对数据进行分析。

2 结果

对 40个样本进行测定, 检测 9个血清中的硅含量, 检测 12个尿液中的硅含量, 检测 21个肺组织中的羟脯氨酸含量及 28个肺组织中的 I 型胶原、II型胶原含量。对处理组与对照组进行分析, 除羟脯氨酸外, 血硅、尿硅、I 型胶原、II型胶原均有统计学意义 (表 1)。

表 1 血硅、尿硅、羟脯氨酸及 I、II型胶原的面积百分比含量

组别	血硅 (μg/ml)		尿硅 (μg/ml)		羟脯氨酸 (μg/g)		I 型胶原 (%)		II型胶原 (%)	
	n	$\bar{x} \pm s$	n	$\bar{x} \pm s$	n	$\bar{x} \pm s$	n	$\bar{x} \pm s$	n	$\bar{x} \pm s$
处理组	5	10.70 ± 5.33*	8	468.18 ± 117.15**	13	637.13 ± 180.25	14	0.47 ± 0.14**	14	1.29 ± 0.47**
对照组	4	2.05 ± 1.23	4	131.84 ± 38.04	8	710.55 ± 155.70	14	0.06 ± 0.03	14	0.13 ± 0.04

注: 与对照组比较, * P < 0.05 ** P < 0.01

血硅、尿硅分别与羟脯氨酸、I 型胶原、II型胶原进行双变量直线回归分析, 除羟脯氨酸与血硅、尿硅均无统计学意义外, I 型胶原、II型胶原与血硅、尿硅均有统计学意义 (表 2)。

3 讨论

硅在人体正常含量为 260 pmol, 是体内最多的微量元素。正常人每日从尿中排除硅可达 9 ~ 12 mg 本次实验中大鼠样本对照组血清、尿液中有一定硅含

量与以上相符。多种因素参与了矽肺的发病过程^[2], 其发病机制十分复杂, 至今尚未完全解释清楚。但二氧化硅 (SiO₂) 是其中关键的致病因子, 这是十分明确的。SiO₂ 进入肺内后, 能引起肺内巨噬细胞的趋化作用, 吞噬 SiO₂ 合成并释放大量的具有多种生物活性的细胞因子、前炎症因子、趋化因子和蛋白酶类等, 损伤肺组织; 被吞噬的 SiO₂ 则进而引起巨噬细胞发生功能改变、崩解、死亡, 并使肺泡结构和周围

表 2 血、尿硅分别与 I 型胶原、 III 型胶原、 羟脯氨酸直线回归相关参数

模型	未标化 β	标化 β	值	P 值
I 型胶原	常数	0.005	0.260	0.797
	血硅	0.039	0.959	17.202
III 型胶原	常数	-0.064	-1.479	0.151
	血硅	0.116	0.977	23.271
羟脯氨酸	常数	624.943	13.353	0.000
	血硅	6.834	0.241	1.265
I 型胶原	常数	-0.100	-8.881	0.000
	尿硅	0.001	0.991	38.057
III 型胶原	常数	-0.351	-8.461	0.000
	尿硅	0.003	0.986	29.997
羟脯氨酸	常数	638.760	10.909	0.000
	尿硅	0.103	0.123	0.633

细胞进一步受损，最终导致弥漫性肺间质纤维化和矽结节的形成^[3]。SiO₂ 化学性质稳定，难溶于水，也不与一般的酸起作用，故通常认为 SiO₂ 在肺内只是被巨噬细胞吞噬或在病灶内沉积下来。但实际上，SiO₂ 只是难溶，进入机体后，其表面和体液还是会产生产生反应生成硅酸，微量的硅元素仍可进入体内血液和组织进行代谢，并发挥作用，待累积到一定的“阈值”才能“触发”不断发展的纤维化过程^[4]。本实验血硅和尿硅处理组和对照组比较有统计学意义，说明 SiO₂ 颗粒进入机体后有一部分被代谢出去。但处理组尿液中的硅除了处理因素外还包括体内正常代谢的硅。

矽尘可以启动脂质过氧化反应，该反应的产物可以造成巨噬细胞损伤，释放一系列致纤维化细胞因子，同时也促使成纤维细胞合成过量胶原蛋白、弹性蛋白和蛋白多糖，是矽肺纤维化发病过程中的重要环节之一^[5]。矽肺纤维化时有多型胶原的分泌增多，如 I 型胶原、III 型胶原、透明质酸和层粘连蛋白等。有文献报道^[6]，染矽尘大鼠第 28 天肺组织 I 型胶原、III 型胶原含量明显升高，且显著高于对照组。本次实

验结果与文献报道相符。

张海英等^[7]的实验中，羟脯氨酸在矽肺 0⁺ 期、I 期含量明显高于对照组。但本次实验中对对照组与处理组的羟脯氨酸含量没有统计学意义，可能是染矽尘 28 d 时羟脯氨酸含量尚无改变，有待于进一步研究。

肺泡巨噬细胞吞噬进入肺部而不能被排除的大量游离 SiO₂，因呼吸爆发和坏死崩解产生大量的超氧阴离子和羟自由基等氧自由基，引起膜脂质过氧化增加。巨噬细胞膜的脂质过氧化损伤激活了巨噬细胞，触发其释放大量细胞因子，同时胶原的合成也会增加，促进肺纤维化发生^[8]。所以认为随着 SiO₂ 在肺组织内的增加，其进入血液、组织液代谢也会增加，同时导致胶原的合成增加。本实验血硅、尿硅分别与 I 型、III 型胶原有正相关关系，提示二者对早期矽肺纤维化程度有一定的指示意义。

参考文献:

[1] 胡永斌, 曾庆富. 矽肺纤维化细胞分子机制研究的进展 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2003, 21 (3): 219

[2] Zhai R, Ge X, Li H, et al. Differences in cellular and inflammatory cytokine profiles in the bronchoalveolar lavage fluid in bagassosis and silicosis [J]. Am J Ind Med 2004, 46 (4): 338-344.

[3] 胡缘, 赵金坦, 白玉萍, 等. 血清硅元素水平对矽肺早期诊断意义的探讨 [J]. 中国工业医学杂志, 2009, 22 (4): 250-252

[4] Porter DW, Hubbs AF, Mercer R, et al. Progression of lung inflammation and damage in rats after cessation of silica inhalation [J]. Toxicologica Science 2004, 79 (2): 370-380.

[5] Fenoglio J, Prandi L, Tomatis M, et al. Free radical generation in the toxicity of inhaled mineral particles: the role of iron speciation at the surface of asbestos and silica [J]. Redox Rep 2001, 6 (4): 235-241.

[6] 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

[7] 张海英, 杨莉, 袁秀玲, 等. 纤维蛋白降解产物、D-二聚体等生化指标用于矽肺早期诊断的探讨 [J]. 中国职业医学, 2000, 27 (5): 19-20

[8] 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

(上接第 414 页)

具有该类基因型的个体可以认为是苯乙烯毒性作用的易感人群，不适合在苯乙烯暴露岗位工作。因此，CYP2E1 5 端上游调节区 RsaI 位点基因多态性可考虑作为苯乙烯职业接触遗传易感性因素，用于评价苯乙烯接触工人职业健康损害的遗传易感性。

参考文献:

[1] P Corsi, A Aprile, B Nicot, et al. Synaptic contacts impaired by styrene-7, 8-oxide toxicity [J]. Toxicology and Applied Pharmacology

2007, 253 (17): 143-157.

[2] 崔蓉, 吕妹清, 杨林. GJ-1 型无泵型采样器用于苯乙烯的性能评价 [J]. 中国卫生检验杂志, 1997, 7 (5): 149-150

[3] 徐伯洪, 闫慧芳. 工作场所所有害物质检测方法 [M]. 北京: 中国人民公安大学出版社, 2003: 362-363, 386

[4] Ve Mina A, Galati R, Fafasca G, et al. Metabolic polymorphisms and urinary biomarkers in subjects with low benzene exposure [J]. Toxicol Environ Health 2001, 64: 607-618

[5] Kim H, Wang R, S Elvaara E, et al. CYP2E1 P450 isoenzymes responsible for the metabolism of toluene and styrene in human liver microsomes [J]. Xenobiotica 1997, 27: 657-665