

矽肺患者和接尘工人诱导痰中炎性细胞和一氧化氮衍生物测定

Detection of NO derivatives and inflammatory cells in induced sputum of silicosis patients and dust-exposed workers

吴捷¹, 王瑞^{1*}, 万恩广², 周效宝¹, 张玮¹

WU Jie¹, WANG Rui^{1*}, WAN En-guang², ZHOU Xiao-bao¹, ZHANG Wei¹

(1. 山东省职业卫生与职业病防治研究院, 山东 济南 250062 2. 兖州矿务局职业病防治所, 山东 济宁 272000)

摘要: 为探讨矽肺患者和接尘工人肺功能、诱导痰中白细胞和痰液处理后的上清液中 NO 衍生物含量变化及意义, 选择 80 名矽尘接触工人为接尘组, 84 名矽肺患者为病例组, 30 名无矽尘接触史的后勤人员为对照组, 进行肺功能测定和痰液诱导, 测定诱导痰中一氧化氮代谢产物硝酸盐/亚硝酸盐 ($\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$)、硝化酪氨酸的含量, 并进行炎性细胞分类计数。结果 (1) 接尘组和病例组白细胞总数显著高于对照组 ($P < 0.05$), 中性粒细胞数低于对照组 ($P < 0.05$), 而淋巴细胞数显著高于对照组 ($P < 0.05$); 对照组、接尘组、病例组的尘细胞数逐步增多, 经检验各组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。 (2) 接尘组 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 水平明显高于对照组 ($P < 0.05$), 病例组 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 水平明显高于接尘组和对照组 ($P < 0.05$); 接尘组和病例组硝化酪氨酸水平明显高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。 (3) FVC、FEV₁ 等肺功能测定结果显示矽肺组 < 接尘组 < 对照组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。提示矽尘暴露人群肺功能随着矽肺病变的进展呈逐渐下降趋势, NO 在这一过程中起到了重要作用; 诱导痰中尘细胞数量反映了肺组织内的粉尘吸入量, 尘细胞在矽肺发生发展中发挥作用。

关键词: 矽肺; 诱导痰; $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$; 硝化酪氨酸

中图分类号: R135.2 **文献标识码:** B

文章编号: 1002-221X(2010)06-0442-03

矽肺是一种长期的持续性、进行性炎症最终导致纤维化的疾病, 纤维化病变一旦形成很难逆转, 已证实一氧化氮参与了肺部炎症和纤维化过程, 了解矽肺发生发展过程呼吸道分泌物中一氧化氮及其衍生物及炎性细胞的变化情况, 可为寻找矽肺的早期监测指标提供依据。NO 作为一种新型信息分子, 近年来受到广大学者的关注。国内外大量报道显示, NO 在多种呼吸道疾病中发挥了作用, 并且与气道炎症反应有密

切关系^[1]。但是目前关于 NO 在矽肺中的研究较少。炎性细胞可以很好地反映矽肺病变, 本研究通过测定矽肺患者和接尘工人肺功能及诱导痰液中的 NO 代谢产物的含量, 分析其变化规律及其意义。

1 对象与方法

1.1 研究对象与内容

选择山东省某煤矿矽肺患者 84 名为矽肺组 (均为 I 期), 接尘工人 (掘进工) 80 名为接尘组 (无矽肺), 另外选取无矽尘接触史的地面后勤人员 30 名为对照组, 以上研究对象均为男性, 无呼吸道、肝、肾疾病史, 各组之间身高、体重、吸烟状况等差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 所有研究对象均来自同一煤矿, 作业环境相似, 作业场所矽尘浓度基本稳定。矽肺患者的诊断根据当地政府提供的职业史证明, 通过流行病学分析, 依据高千伏 X 线前后位胸片, 按照 GBZ70-2002《尘肺病诊断标准》进行诊断。

1.2 实验方法

1.2.1 痰液诱导 受试者静坐 5 min 诱导前 10 min 吸入沙丁胺醇 200 μg 雾化前清水漱口、擤鼻; 将 3% 的盐溶液装入超声雾化器, 调节喷雾量, 让受试者用口含住喷雾嘴, 努力用口深吸气使喷雾尽可能被吸入肺深部, 5 min 后用力咳痰, 收集肺深部痰液; 重复该操作 20~30 min 收集至少 2 ml 痰液。

1.2.2 痰液处理 取 1 ml 或 0.5 ml 无唾液成分的痰液放入软管中, 加入 4 倍体积 0.1% 二硫苏糖醇 (DTT), 放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中 30~40 min 加入与 DTT 相同体积的磷酸缓冲液 (PBS) 稀释, 并振荡 5 min 以上, 过滤, 滤液以 1 100 r/min 离心半径 200 mm 离心 10 min 后将上清液移入 EP 管中, -80 $^{\circ}\text{C}$ 下保存待测。

1.2.3 诱导痰中 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 、硝化酪氨酸的含量测定 应用 ELISA 法测定硝化酪氨酸, 硝酸酶还原法测定 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 。ELISA 试剂盒由 BLOWEN 公司提供。

1.2.4 诱导痰中炎细胞计数及观察 将离心所得沉淀加入一滴 PBS 混匀, 用移液器吸取 20 μl 过滤后加入 EP 管中, 同时加入 380 μl PBS 吹打混匀。用吸管轻轻吸取 1 滴加至细胞计数板上, 光学显微镜下计数总细胞数。同时吸取一滴于载玻片上, 涂片, 晾干, 滴 2~3 滴无水乙醇, 固定 1 min 后进行瑞-姬氏染色, 光学显微镜下观察各种炎性细胞。

收稿日期: 2010-07-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30872094); 山东省科技攻关项目 (2008GG30002036)

作者简介: 吴捷 (1962-) 男, 助理研究员, 主要从事职业卫生学研究。

*: 通讯作者, 研究员, 硕士研究生导师, 主要从事职业卫生学研究及建设项目评价工作。

1.2.5 肺功能测定 用 6200 Autobox型肺功能测试仪(美国森迪公司)按常规操作方法进行肺功能测定。主要检测指标:肺活量(VC)、用力肺活量(FVC)、第一秒用力肺活量(FEV₁)、第一秒用力肺活量占用力肺活量百分比(FEV₁/FVC)、25%最大呼气流速(MEF₂₅)、50%最大呼气流速(MEF₅₀)、75%最大呼气流速(MEF₇₅)、峰流速(PEF),各指标以实测值与预计值的百分比表示。

1.2.6 数据的统计处理 采用 SPSS 13.0 统计软件对资料进行统计处理。资料符合正态分布的各组均数采用方差分析,结果以均数±标准差表示;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,结果用中位数表示,组间两两比较采用 LSD 检验;计数资料采用卡方检验。

2 结果

2.1 基本情况比较

3组间除年龄外其他因素比较差异无统计学意义(P>0.05),病例组年龄明显高于对照和接尘组,差异有统计学意义(P<0.05),接尘组与对照组之间无差异(P=0.341),见表 1。

表 1 各组研究对象基本情况比较

组别	例数	年龄(岁)	身高(cm)	体重(kg)	吸烟率(%)	吸烟时间(年)	每日吸烟量(支)
对照组	30	42.07±11.93	172.00±3.21	71.48±7.10	58.00	19.70±10.30	10.68±10.32
接尘组	80	46.58±15.16	171.33±5.04	73.21±9.16	60.00	24.30±12.92	9.98±10.40
病例组	84	67.30±5.33 ^a	169.21±5.44	71.48±8.73	66.00	27.97±14.16	10.54±9.65
F或χ ² 值		F=72.59	F=2.32	F=0.90	χ ² =0.74	F=2.71	F=0.53
P值		<0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05

注:与接尘组比较, ^aP<0.05

2.2 诱导痰中白细胞总数及分类计数

结果显示接尘组和病例组白细胞总数显著高于对照组(P<0.05),接尘组与病例组之间白细胞总数无明显差异(P>0.05);诱导痰中白细胞计数分类结果显示:接尘组和病例组中性粒细胞数低于对照组(P<0.05),接尘组与病例组之间中性粒细胞数无明显差异(P>0.05);接尘组和病例组淋巴

细胞数显著高于对照组(P<0.05),接尘组与病例组之间淋巴细胞数无明显差异(P>0.05);三组间单核细胞数无明显差异(P>0.05);对照组、接尘组、病例组的尘细胞数逐步增多,经检验各组间差异有显著性意义(P<0.05)。见表 2。

表 2 诱导痰中白细胞总数与分类计数结果(¯x±s)

组别	例数	白细胞总数(×10 ⁶ /m ³)	中性粒细胞(%)	淋巴细胞(%)	单核细胞(%)	尘细胞(%)
对照组	32	16.92±6.39	45.89±4.50	37.78±4.62	1.70±0.39	0.80±0.21
接尘组	110	37.07±12.24 ^a	33.58±6.38 ^a	55.52±6.81 ^a	1.50±0.31	11.50±2.62 ^a
病例组	54	49.06±15.99 ^a	36.90±7.27 ^a	56.42±7.09 ^a	1.80±0.41	19.50±5.64 ^{ab}
F值		6.003	4.468	9.462	0.467	12.753
P值		0.003	0.013	0.000	0.188	0.000

注:与对照组相比, ^aP<0.05;与接尘组相比, ^bP<0.05

2.3 诱导痰中 NO₂⁻/NO₃⁻ 和硝化酪氨酸测定结果

经正态性检验,两指标数据均为非正态分布,分别采用对数转换和平方转换后接近正态分布,结果用中位数表示。以年龄为协变量对诱导痰中 NO₂⁻/NO₃⁻ 和硝化酪氨酸测定值进行单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 检验,结果显示:(1)接尘组 NO₂⁻/NO₃⁻ 水平明显高于对照组,病例组 NO₂⁻/NO₃⁻ 水平明显高于接尘组和对照组,差异均有统计学意义(P<0.05);(2)接尘组和病例组硝化酪氨酸水平明显高于对照组,差异有统计学意义(P<0.05),病例组与接尘组水平比较,差异无统计学意义(P>0.05),见表 3。

2.4 肺功能测定结果

各组研究对象肺功能测定结果表明,除 VC 外各项指标平均值循此规律下降:矽肺组<接尘组<对照组,差异均有统

计学意义(P<0.05或 P<0.01),见表 4。

表 3 诱导痰中 NO₂⁻/NO₃⁻ 和硝化酪氨酸含量测定结果

组别	例数	NO ₂ ⁻ /NO ₃ ⁻ (μmol/L)		硝化酪氨酸 (μmol/L)	
		中位数(Q ₂₅₋₇₅)	95%可信区间	中位数(Q ₂₅₋₇₅)	95%可信区间
对照组	30	36.90(22.28)	27.90~46.80	2.91(0.89)	2.75~3.21
接尘组	80	60.30(46.58) ^a	52.20~66.60	3.51(0.46) ^a	3.48~3.65
病例组	84	79.65(89.10) ^{ab}	72.9~90.94	3.48(0.49) ^a	3.42~3.61
F值			32.06		13.53
P值			0.0000		0.0000

注:与对照组比较, ^aP<0.05;与接尘组比较, ^bP<0.05

表 4 肺功能测定结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	VC	FVC	FEV ₁	FEV ₁ /FVC	MEF ₂₅	MEF ₅₀	MEF ₇₅	PEF
对照组	24	75.41±12.22	85.80±12.20	85.29±11.74	87.25±8.53	86.71±38.92	72.23±26.64	59.25±23.01	58.81±22.04
接尘组	65	69.51±20.00	70.47±19.40 ^a	70.44±22.43 ^a	80.53±13.56 ^a	82.18±37.04 ^a	63.58±25.45 ^a	50.25±24.41 ^a	49.54±22.45 ^a
病例组	71	62.42±19.81	61.64±18.97 ^{ab}	58.17±20.90 ^{ab}	74.20±17.96 ^{ab}	64.63±31.40 ^{ab}	45.49±24.81 ^{ab}	37.22±19.46 ^{ab}	38.87±20.34 ^{ab}
F值		0.625	7.419	11.214	5.571	13.554	18.085	12.108	8.648
P值		0.431	0.007	0.001	0.020	0.000	0.000	0.001	0.004

注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与接尘组比较, ^b $P < 0.05$ 各指标均以实测值与预计值的百分比表示。

3 讨论

矽尘进入肺内后引起的病变十分复杂, 涉及多种细胞和生物活性物质, 表现为炎症反应、免疫反应、纤维化形成等, 反应多呈进行性^[2], 最终导致结节性纤维化。由于纤维化病变一经诊断即无药物可逆转, 因此对于矽尘进入肺内引起的初期炎症反应的研究已成为目前国内外研究的热点。

NO是 20世纪 80年代发现的一种新型生物信息分子, 参与机体多种生理和病理过程, 与多种急慢性呼吸道疾病有密切的关系。国外动物实验发现, 矽尘引起的肉芽肿区域附近的肺组织和支气管淋巴组织中诱导型一氧化氮合酶活性表达增强, 且与肺组织损伤、炎症、纤维化等变化密切相关, 指出 NO在矽肺发病的启动过程中发挥重要作用, 参与了矽肺早期的炎症反应过程, 并与肺纤维化的形成密切相关^[3]。呼吸道内产生的 NO部分以气体的形式随呼出气体排出, 部分与氧结合形成硝酸盐/亚硝酸盐 ($\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$) 或者形成其他代谢产物, 如 3-硝基酪氨酸等, 因此呼吸道分泌物 (诱导痰) 中硝酸盐/亚硝酸盐和硝基酪氨酸浓度可以间接反映呼吸道内 NO的浓度。本文研究结果显示, 接尘工人和矽肺患者诱导痰中 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 含量高于对照组, 病例组又高于接尘组, $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 含量与矽肺发病过程有很好的同步性, 提示 NO参与矽肺形成发展。诱导痰液中硝基酪氨酸水平测定结果显示, 接尘组和病例组明显高于对照组, 而病例组和接尘组之间无差异, 推测矽尘暴露导致接触人群及患者体内硝基酪氨酸的水平发生变化, 但与病变严重程度无相关性。综合分析上述结果, 认为 NO可能参与了矽尘所导致的肺组织炎症/纤维化反应, 这与文献报告一致^[4]。

诱导痰检测方法是一种安全、可靠、可行的检测气道炎症的方法^[5], 诱导痰中细胞学研究发现^[6], 接尘组及病例组白细胞总数显著高于对照组, 分类计数结果显示 3组研究对象诱导痰液中中性粒细胞比例呈逐渐减少趋势, 而淋巴细胞比例呈逐渐增多的趋势。淋巴细胞是参与炎症反应的一种重要的细胞, 在慢性炎症反应中发挥重要作用。本研究结果说明了矽肺发生发展为逐渐增强的慢性炎症反应过程。尘细胞是吞噬了矽尘颗粒后的巨噬细胞, 它是接尘工人及矽肺患者痰中的特征性细胞, 也是判断诱导痰是否来自于肺泡病变区域, 是否具有较好代表性的重要标志。矽肺的发病与尘细胞崩解, 释放各种炎症因子, 引起炎症/纤维化反应有很大关系。本研究中发现, 病例组尘细胞比例显著高于接尘组和对照组, 接尘组明显高于对照组, 由此, 我们推测诱导痰中尘细胞数量水平反映了肺组织内的粉尘吸入量, 同时也证明了

尘细胞在矽肺发生发展中的作用。

目前, 肺功能测定是临床早期诊断及劳动力损伤评定的主要依据, 进行肺功能指标测定与上述 NO代谢产物的相关分析有助于矽肺早期标志物的确定^[7]。肺功能受年龄、身高、体重的影响, 本研究各项肺功能指标测定结果均采用实测值占预测值百分比表示。从本次测定结果来看, 各项肺功能指标 (VC除外) 循此规律下降: 对照组 > 接尘组 > 矽肺组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。提示矽尘暴露人群肺功能状况与矽尘暴露程度有关, 这与有关文献报道一致^[8]。矽肺患者及接尘工人肺功能下降与诱导痰液中一氧化氮升高有同步性, 推测可能是由于长期接触粉尘致内源性 NO浓度升高有关。已证实局部大量 NO产生引起气道充血、血浆渗漏, 造成肺上皮细胞及组织损伤而诱发气道高反应性, NO扩张支气管黏膜血管, 导致黏膜水肿, 通过非肌性机制加重气道阻塞。上述可见, 矽尘暴露人群肺功能随着接尘量的增加及矽肺病变的进展呈逐渐下降趋势, 且 NO在这一过程中起到了重要作用, 测定矽尘接触工人诱导痰液中 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 水平能够反映接尘工人和尘肺患者的肺功能状况, 有助于矽肺病人早期诊断。

参考文献:

- [1] 王强, 廖情奎. 一氧化氮在炎症反应中的作用 [J]. 医学综述, 2002, 8(16): 161-162.
- [2] 沈国安, 刘瑾. 尘肺发病机制研究进展 [J]. 职业卫生与病伤, 2002, 17(1): 32-40.
- [3] Bodo M, Bellocchio S, Bellucci C et al. Silica, hyaluronate and alveolar macrophage functional differentiation [J]. J Invest Med, 2003, 51(2): 95-103.
- [4] Kenazawa H, Shoji S, Yamada M et al. Increased level of nitric oxide derivatives in induced sputum in patients with asthma [J]. J Allergy Clin Immunol, 1997, 99: 624-629.
- [5] 赵莹, 刘刚, 孔灵菲. 诱导痰在支气管哮喘气道炎症评价中的应用 [J]. 中国医科大学学报, 2007, 36(1): 78-79.
- [6] Pih J, Gibson P G, Kowalowicz R et al. Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma [J]. Thorax, 1992, 47(1): 25-29.
- [7] Ojo J C, Mulrennan S A, Kaselik J A et al. Exhaled breath condensate pH and exhaled nitric oxide in allergic asthma and in cystic fibrosis [J]. Thorax, 2005, 60(1): 22-26.
- [8] Piiari R, Piiari A P, Keskinen H et al. Exhaled nitric oxide in specific challenge tests to assess occupational asthma [J]. Eur Respir J, 2002, 20(6): 1532-1537.