

矽肺大鼠血清硅元素水平及 Clara 细胞蛋白的表达和意义

王宏丽¹, 赵金垣³, 朱丽⁴, 白玉萍¹, 李清钊¹, 刘和亮^{1,2}

(1. 河北省煤矿卫生与安全重点实验室 河北 唐山 063000 2 河北联合大学医学实验研究中心 河北 唐山 063000 3 北京大学第三医院职业病研究中心 北京 100191 4 中国煤矿工人北戴河疗养院尘肺科, 河北 北戴河 066000)

摘要: 目的 探讨不同染尘剂量大鼠矽肺模型血清硅元素水平的变化情况, 并与反映肺内早期炎症变化的细胞因子血清克拉拉细胞蛋白 (Clara cell Protein, CC16) 进行比较, 以弄清它们在矽肺发病中的意义和价值。方法 雄性 Wistar 大鼠分为 28 组, 按不同染尘剂量 (10 mg/ml, 30 mg/ml, 50 mg/ml, 70 mg/ml) 染尘, 而在不同时间点 (染尘后 1 d, 3 d, 5 d, 7 d, 14 d, 21 d 和 28 d) 处死动物, 采取血液及肺组织, 用电感耦合等离子体质谱仪 (ICP-MS) 检测血清中硅元素含量, 酶联免疫吸附测定法 (ELISA 法) 测定大鼠血清中 CC16 含量。结果 随着染尘剂量增加和染尘时间延长, 大鼠血清硅元素的水平呈现逐渐增高的趋势; CC16 含量于染尘后即开始降低, 第 7 天开始与对照组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。并随着染尘时间延长和剂量增加, 其含量亦不断减少, 但血清硅元素的变化不论是从时间上还是从剂量上比较, 均早于 CC16。结论 矽肺模型大鼠血清硅元素水平在早期低剂量染尘时即明显升高, 且早于 CC16 的变化, 二者的变化具有剂量和时间依赖性, 提示血清硅元素、CC16 水平变化可能为矽肺的早期诊断提供生物学依据, 具有一定的临床价值。

关键词: 二氧化硅; 矽肺; 早期诊断; 电感耦合等离子体质谱仪 (ICP-MS); 血清硅元素; 血清克拉拉细胞蛋白 (CC16)

中图分类号: R135.2 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2011)03-0172-03

Study on levels of silicon and CC16 in serum of rats exposed to silica dust

WANG Hong-li, ZHAO Jin-yuan, ZHU Li, BAI Yu-ping, LI Qing-zhao, LIU He-liang

(*: Hebei Provincial Key Laboratory for Coal Mine Health and Safety Tangshan 063000 China)

Abstract: Objective To explore the change of serum silicon levels in rats with different exposure doses and compare to the changes of serum Clara cell Protein (CC16) which is an early biomarker of inflammation in lung and clarify their roles in pathogenesis of silicosis. Methods Male rats were randomly divided into 28 groups according to their exposure doses to silica (10, 30, 50 or 70 mg/ml) and their exposure time (1 d, 3 d, 5 d, 7 d, 14 d, 21 d and 28 d). The serum levels of silicon were determined by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), the serum levels of CC16 were examined by ELISA method. Meantime the pathological changes in lung were also observed using hematoxylin eosin staining. Results The silicon level in serum was gradually increased in a dose and time dependent manner, however the CC16 level in serum was dose dependently decreased but later than that of silicon level. Conclusions The results showed that the changes of serum levels of silicon and CC16 in rats appear quite early after exposure to silica dust, especially serum silicon level and the changes were dose and time dependent. It is suggested that these indices mentioned above might provide some earlier evidence of silicosis, therefore should have certain clinical significance.

Key words: silica; silicosis; early diagnosis; inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS); silicon in serum; serum Clara cell Protein (CC16)

矽肺 (silicosis) 是危害工人健康最为严重的职业病, 一旦发生, 即呈进行性发展, 不仅严重危害矽尘接触工人的健康, 降低其劳动能力和生活质量, 也

给国家造成巨大的经济损失^[1]。目前对矽肺的纤维化病变尚无特效药物治疗, 因此, 对矽肺易感人群早期筛选、早期诊断, 探索矽肺发病的早期效应生物标志物至关重要^[2,3]。本研究通过测定不同染尘剂量矽肺模型大鼠血清硅元素水平变化并与反映呼吸道损伤及肺屏障完整性早期改变的细胞因子 CC16^[4] 进行比较, 探讨二者在矽肺早期诊断及发病机制中的意义和价值。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组及模型的建立

收稿日期: 2010-11-10 修回日期: 2011-03-22

基金项目: 河北省人事厅留学回国人员择优资助项目 (冀人办 2008-199); 河北省科学技术研究与发展计划项目 (项目编号: 092761100D)

作者简介: 王宏丽 (1967-), 女, 硕士, 研究方向: 环境与呼吸系统疾病。

通讯作者: 刘和亮, 教授, 硕士生导师, E-mail: heliangliu

SPF级健康成年雄性 Wistar大鼠 145 只, 体重 180 ~ 220 g 购自中国医学科学院实验动物研究所 [许可证编号: SCXK(京) 2007-0001], 按体重随机分为 29 组, 每组 5 只, 第 1 组为对照组, 其余按不同染尘剂量及时间点分为不同染尘组。非暴露式气管内注入法建立染矽尘大鼠模型^[5], 对照组大鼠注入等量生理盐水。

1.2 主要试剂与仪器

矽尘由河北省煤矿卫生与安全重点实验室提供, 纯度 99%, 粒子直径在 0.5 ~ 10 μm 之间, 80% 粒子在 1 ~ 5 μm 之间, 用生理盐水配制成混悬液 (10 mg/ml, 30 mg/ml, 50 mg/ml, 70 mg/ml), 经高压蒸气灭菌后备用; 硝酸 (HNO₃)、高氯酸 (HClO₄) 优级纯, 购自北方化工原料试剂仪器有限公司; 大鼠克拉拉细胞蛋白 (CC16) 酶联免疫吸附测定试剂盒, 上海蓝基生物技术有限公司。电感耦合等离子体质谱 (ICP-MS7500a), 美国安捷伦科技有限公司。

1.3 观察指标及检测方法

1.3.1 血清样本的采集处理及硅元素水平测定 分别在 1 d, 3 d, 5 d, 7 d, 14 d, 21 d 和 28 d 时间点, 用 10% 水合氯醛 (0.35 ml/100 g 体重) 腹腔麻醉大鼠后, 暴露股静脉, 取血分离血清。将 0.5 ml 血清加入 5 ml 消解液 (HNO₃:HClO₄ = 10:1) 放置过夜后于电热板上进行消解至无色透明时取下冷却并用超纯水定容至 5 ml 后用 ICPMS7500 测定硅元素水平。

1.3.2 病理学观察 取每只大鼠右下肺最大横径处肺组织用于石蜡包埋切片, 常规行 HE 染色进行病理学观察。矽结节分级参照 King 五级分类法。

1.3.3 测定大鼠血清克拉拉细胞蛋白 (CC16) 的含量 采用酶联免疫吸附法, 严格按试剂盒说明书进行操作, 用酶标仪在 450 nm 波长测量光密度 (OD 值)。

1.4 统计分析

所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 13.0 for Windows 分析软件进行分析。

2 结果

2.1 染矽尘大鼠模型肺组织病理改变

光镜下可见对照组大鼠肺组织结构正常。大鼠染尘后随时间进展先后出现矽肺病理变化, 说明矽肺动物模型成功。

2.2 染矽尘大鼠模型血清硅元素水平测定

与对照组比较, 随染尘剂量及时间的增加, 大鼠血清硅元素水平呈逐渐增高趋势, 其中以染尘剂量 50 mg/ml, 70 mg/ml 组较为显著, 各时间点皆有统计

学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。详见表 1, 图 1。

表 1 矽肺模型大鼠血清硅元素水平测定结果 ($\bar{x} \pm s$)

分组	样本数	染尘剂量 (mg/ml)			
		10	30	50	70
对照组	5	0.055 ± 0.01			
染尘组					
1 d	5	0.069 ± 0.03	0.096 ± 0.04	0.167 ± 0.04 [#]	0.172 ± 0.04 [#]
3 d	5	0.084 ± 0.02	0.130 ± 0.03 [*]	0.147 ± 0.05 [#]	0.163 ± 0.04 [#]
5 d	5	0.124 ± 0.03 [*]	0.164 ± 0.04 [#]	0.187 ± 0.05 [#]	0.207 ± 0.04 [#]
7 d	5	0.160 ± 0.04 [*]	0.174 ± 0.03 [*]	0.237 ± 0.05 [#]	0.238 ± 0.03 [#]
14 d	5	0.181 ± 0.04 [*]	0.275 ± 0.08 [*]	0.353 ± 0.13 [*]	0.362 ± 0.11 [*]
21 d	5	0.189 ± 0.04 [*]	0.292 ± 0.11 [*]	0.562 ± 0.10 [#]	0.595 ± 0.17 [#]
28 d	5	0.373 ± 0.14 [*]	0.515 ± 0.19 [*]	0.647 ± 0.15 [#]	0.743 ± 0.33 [#]

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$ # $P < 0.01$ 。

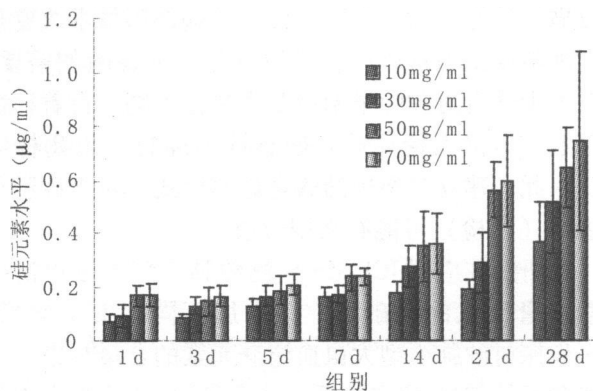


图 1 矽肺模型大鼠不同染尘剂量血清硅元素水平比较

2.3 矽肺模型大鼠血清 CC16 水平测定

随染尘剂量及时间的增加, 大鼠血清 CC16 水平呈逐渐降低趋势, 其中以染尘剂量 50 mg/ml, 70 mg/ml 组较为显著, 与对照组相比 7 d 后差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。详见表 2, 图 2。

表 2 矽肺模型大鼠血清 CC16 水平测定结果 ($\bar{x} \pm s$)

分组	样本数	染尘剂量 (mg/ml)			
		10	30	50	70
对照组	5	20.90 ± 2.26			
染尘组					
1 d	5	20.09 ± 3.29	20.27 ± 2.73	20.90 ± 3.40	19.84 ± 2.37
3 d	5	20.03 ± 3.18	19.87 ± 3.01	18.88 ± 2.91	18.43 ± 4.59
5 d	5	19.54 ± 2.58	18.86 ± 2.64	18.35 ± 2.83	18.12 ± 3.57
7 d	5	19.24 ± 3.10	18.37 ± 2.64	17.14 ± 2.75 [*]	16.99 ± 2.43 [*]
14 d	5	18.42 ± 2.32	17.21 ± 2.59 [*]	15.88 ± 2.33 [*]	15.42 ± 2.00 [*]
21 d	5	17.09 ± 2.81 [*]	16.69 ± 2.76 [*]	13.80 ± 2.08 [#]	13.03 ± 1.89 [#]
28 d	5	16.72 ± 2.08 [*]	15.83 ± 1.97 [#]	9.97 ± 0.77 [#]	8.24 ± 1.21 [#]

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$ # $P < 0.01$ 。

由以上结果可知, 大鼠染尘后血清硅元素水平即开始变化, 高剂量染尘更为显著, 呈现一个不断增高的趋势, 而大鼠血清 CC16 水平亦随染尘剂量及时间

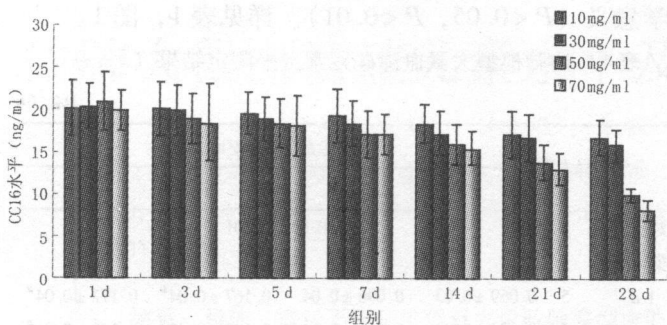


图 2 矽肺模型大鼠不同染尘剂量血清 CC16水平比较的增加呈逐渐降低趋势, 但其变化明显晚于血清硅元素水平的改变。

3 讨论

矽肺是危害工人健康最为严重的职业病, 目前仍无可靠的特异性诊断指标。传统的胸部影像学改变是以病理学变化为基础的, 难以满足早期诊断的需要。现有不少学者对矽肺早期诊断生物标志物进行着积极的探索, 但仍无特异性和敏感性均理想的生物标志物。因此, 建立多指标的联合诊断模式, 对于矽肺早期诊断(筛检)可能有实用价值。

本研究在应用 ICP-MS检测矽肺模型大鼠血清硅元素含量变化的基础上^[6], 增加不同的染尘剂量, 进一步探讨矽肺模型大鼠血清硅元素的含量与染尘剂量和时间的剂量效应关系, 结果显示, 1 d组染尘剂量为 50 mg/m³时, 大鼠血清硅元素含量即明显增高, 与对照组比较, 差异有统计学意义 (P<0.01); 而染尘剂量为 10 mg/m³时, 大鼠血清硅元素含量在第 5天开始显著增高, 与对照组比较, 差异有统计学意义 (P<0.05); 其后, 硅元素的含量随染尘剂量的增加和时间延长均呈不断增加的趋势, 28 d组染尘剂量为 70 mg/m³时达到最高点, 而各时间点与对照组比较, 差异皆有统计学意义 (P<0.05, P<0.01)。以上结果表明, 随着染尘剂量的增加, 大鼠血清硅元素含量亦相应增加; 而随着染尘时间的延长, 其硅元素含量也逐渐增加, 显示出一定的剂量-效应关系。

CC16是肺细支气管黏膜的非纤毛上皮细胞 Clara细胞所分泌, 具有抗炎、免疫抑制、抗纤维化、抗肿瘤、清除沉积在呼吸道中的有害物质及抑制肺表面活性物质降解的作用^[7], 主要存在于呼吸道的细胞上皮衬液中, 当支气管肺泡膜和毛细血管屏障的完整性被破坏时可进入外周血。在急性肺损伤时, 肺上皮屏障通透性增高, 完整性遭到破坏, 血清 CC16升高。在慢性肺损伤时, 由于气道 Clara细胞数目减少, 血清 CC16浓度降低^[8,9]。矽尘颗粒可直接损伤 Clara细

胞, 矽尘毒性和表面自由基可对肺上皮细胞造成损伤, 同时肺泡巨噬细胞 (AM) 活化后释放的细胞毒素又可损伤 Clara细胞, 因此长期接尘人群的 Clara细胞的数目将大量减少, 其所分泌的 CC16水平也相应降低, 通过检测血清中 CC16的含量可反映矽尘对 Clara细胞的损伤情况。本研究结果显示, 7 d组染尘剂量为 50 mg/m³时, 大鼠血清 CC16含量即明显降低, 与对照组比较, 差异有统计学意义 (P<0.05); 而染尘剂量为 10 mg/m³时, 大鼠血清硅元素含量在第 21天开始显著降低, 与对照组比较, 差异有统计学意义 (P<0.05); 其后, CC16的含量随染尘剂量的增加和时间延长均呈不断降低的趋势, 染尘剂量为 70 mg/m³时在 28 d达到最低点, 而各时点与对照组比较, 皆有统计学意义 (P<0.05, P<0.01)。以上结果表明, 随着染尘剂量的增加, 大鼠血清 CC16含量亦相应降低; 而随着染尘时间的延长, 其 CC16含量也逐渐降低, 显示出一定的剂量-效应关系。

综上, 不同染尘剂量大鼠矽肺模型血清硅元素与 CC16水平都显示出一定的剂量-效应关系, 其中血清硅元素水平从染尘后即开始变化, CC16改变明显晚于血清硅元素。血清硅元素和 CC16水平变化有望为矽肺的早期诊断提供新的生物学指标, 对筛选易感人群、早期诊断亚临床期矽肺病人, 都具有重要的现实意义。

参考文献:

- [1] 卫生部 2008年职业病防治工作新闻通报会新闻通报稿 [4].
- [2] Gulmjan M, Bom P, J Valiyathan V, et al. Mechanistically identified suitable biomarkers of exposure effect and susceptibility for silicosis and coalworker pneumoconiosis: a comprehensive review [J]. J Toxicol Environ Health B Crit Rev 2006 9(5): 357-385
- [3] 陈卫红. 矽肺防治的研究进展与展望 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2006 24 (9): 513.
- [4] Helleday R, Segerstedt B, Forsberg B, et al. Exploring the time dependence of serum Clara cell protein as a biomarker of pulmonary injury in humans [J]. Chest 2006 130 (3): 672-675
- [5] 朱建伟, 曹春玲, 孙德刚, 等. 尘肺清颗粒防治大鼠实验性矽肺的病理观察 [J]. 中国职业医学, 2006 12 (6): 437-440
- [6] 胡缘, 赵金垣, 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
- [7] Wong A P, Keating A, Waddell T K. Airway regeneration: the role of the Clara cell secretory protein and the cells that express it [J]. Cytotherapy 2009 11 (6): 676-687.
- [8] McAuley D F, Mathay M A. Clara cell protein CC16: A new lung epithelial biomarker for acute lung injury [J]. Chest 2009 135(6): 1408-1410
- [9] Lakind J S, Ho K, Ste S T, Ownby D R, et al. A critical review of the use of Clara cell secretory protein (CC16) as a biomarker of acute or chronic pulmonary effects [J]. Biomarkers 2007 12(5): 445-467.