

# 温石棉和陶瓷纤维致大鼠炎症及氧化应激的 毒性效应

黄柳雯<sup>1</sup>, 崔 琰<sup>2</sup>, 查雨欣<sup>3</sup>, 柏 珺<sup>2</sup>, 董发勤<sup>4</sup>, 邓建军<sup>5</sup>, 张青碧<sup>2</sup>, 王国俊<sup>6</sup>

(1. 西南医科大学 药学院, 四川 泸州 646000; 2. 西南医科大学 公共卫生学院, 四川 泸州 646000; 3. 四川省疾病预防控制中心, 四川 成都 610041; 4. 西南科技大学, 四川 绵阳 621010; 5. 绵阳四〇四医院, 四川 绵阳 621000; 6. 西南医科大学附属医院药学部, 四川 泸州 646000)

**摘 要:** 探讨了温石棉和陶瓷纤维致 Wistar 大鼠肺部炎症反应和氧化应激的毒性效应。将 54 只初断乳 Wistar 大鼠随机分为 3 组, 即温石棉染毒组、陶瓷纤维染毒组和阴性对照组。采用非暴露式气管内滴注进行染毒(2.0 mg/mL, 1 次/月), 并于 1、6、12 个月分批处死 6 只, 观察肺组织病理学改变以及支气管肺泡灌洗液(BALF)和肺组织相关指标。结果显示, 染毒组均出现不同程度的病理改变, 其 BALF 中白细胞总数在染毒各时间点均高于阴性对照组( $p < 0.05$ ); 染毒组白细胞总数、中性粒细胞和淋巴细胞的百分比随染毒时间延长而升高( $p < 0.05$ ), 巨噬细胞百分比则下降( $p < 0.05$ ); 染毒组肺组织中 IL-6、TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B 含量在染毒各时间点均高于阴性对照组并随染毒时间延长而升高( $p < 0.05$ ), 且温石棉组高于陶瓷纤维组( $p < 0.05$ ); 染毒组肺组织中 ROS、MDA 浓度在染毒各时间点均高于阴性对照组并随染毒时间延长而升高( $p < 0.05$ ), 且温石棉组高于陶瓷纤维组( $p < 0.05$ ); 染毒组 SOD 活力均随染毒时间延长而下降( $p < 0.05$ ), 染毒一个月时与阴性对照组比较无差异( $p > 0.05$ ), 染毒 6 个月和 12 个月时温石棉组低于陶瓷纤维组且均低于阴性对照组( $p < 0.05$ )。综上, 温石棉和陶瓷纤维均能对大鼠肺组织造成毒性作用, 可引起炎症反应和氧化应激; 温石棉致大鼠肺毒性的能力较陶瓷纤维强。

**关键词:** 温石棉; 陶瓷纤维; 炎症; 氧化应激

中图分类号: P619.27<sup>+</sup>1; P579

文献标识码: A

文章编号: 1000-6524(2019)06-0834-09

## Toxic effects of chrysotile asbestos and ceramic fibers on inflammation and oxidative stress in rats

HUANG Liu-wen<sup>1</sup>, CUI Yan<sup>2</sup>, ZHA Yu-xin<sup>3</sup>, BAI Jun<sup>2</sup>, DONG Fa-qin<sup>4</sup>, DENG Jian-jun<sup>5</sup>,  
ZHANG Qing-bi<sup>2</sup> and WANG Guo-jun<sup>6</sup>

(1. School of Pharmacy, Southwest Medical University, Luzhou 646000, China; 2. School of Public Health, Southwest Medical University, Luzhou 646000, China; 3. Sichuan Center for Disease Control and Prevention, Chengdu 610041, China; 4. Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621010, China; 5. Mianyang No. 404 Hospital, Mianyang 621000, China; 6. Department of Pharmacy, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China)

**Abstract:** To explore the toxic effects of chrysotile asbestos and ceramic fibers on pulmonary inflammation and oxidative stress in Wistar rats, the authors randomly divided early weaning clean level of Wistar rats into 3 groups,

收稿日期: 2019-04-15; 接受日期: 2019-09-26; 编辑: 尹淑苹

基金项目: 国家自然科学基金项目(41472046); 四川省教育厅科研项目(17ZA0431); 泸州市科技计划项目(2017LZXNYD-J24); 西南医科大学项目(2017-ZRQN-002)

作者简介: 黄柳雯(1995-), 女, 汉族, 硕士研究生, 研究方向: 临床药学, E-mail: huangliuwenn@163.com; 通讯作者: 王国俊, E-mail: renren333@126.com。

namely, chrysotile asbestos exposure group, ceramic fibers exposure group and negative control group. The Wistar rats were administered by intratracheal instillation of chrysotile asbestos and ceramic fibers at the concentration of 2.0 mg/mL once a month. And 6 rats were sacrificed at 1, 6, and 12 months to observe pathological changes of lung tissues, bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and lung tissues related indicators. The results showed that there were different degrees of pathological changes in the exposed groups, and the total number of white blood cells in BALF of exposed groups was higher than that in the negative control group at each time point ( $p < 0.05$ ). The percentage of white blood cells, neutrophils and lymphocytes in the exposed group increased with the prolonged exposure time ( $p < 0.05$ ), and the percentage of macrophages decreased ( $p < 0.05$ ). The content of interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) in lung tissues of the exposed groups was higher than that in the negative control group at each time point and increased with the prolonged exposure time ( $p < 0.05$ ), and the content in the chrysotile asbestos exposure group was higher than that of the ceramic fiber exposure group ( $p < 0.05$ ). The concentrations of reactive oxygen species (ROS), malondialdehyde (MDA) in lung tissues of the exposed groups were higher than those in the negative control group at each time point and increased with the prolonged exposure time ( $p < 0.05$ ), and those in the chrysotile asbestos exposure group were higher than the ceramic fiber exposure group ( $p < 0.05$ ). The superoxide dismutase (SOD) activity of the exposed groups decreased with the prolonged exposure time ( $p < 0.05$ ); there was no difference between exposed groups and the negative control group at 1 month ( $p > 0.05$ ); those in the chrysotile asbestos exposure group were lower than those in the ceramic fibers exposure group and lower than those in the negative control group at 6 and 12 months ( $p < 0.05$ ). All these results prove that chrysotile asbestos and ceramic fibers could cause toxic effects of inflammation and oxidative stress in lung tissues of rat, and chrysotile asbestos induced toxicity was stronger than ceramic fibers.

**Key words:** chrysotile asbestos; ceramic fibers; inflammation; oxidative stress

**Found support:** National Natural Science Foundation of China (41472046); Sichuan Provincial Department of Education Research Project (17ZA0431); Science and Technology Project of Luzhou (2017LZXNYD-J24); Southwest Medical University Project (2017-ZRQN-002)

温石棉是性能优异、储量丰富、价格低廉的矿物纤维材料,由于具有耐腐蚀、耐高温、绝缘性好、抗张力强等优良性能,被广泛应用于防火、隔热、防腐、隔音和绝缘等方面(樊晶光等, 2016)。中国石棉资源绝大部分为温石棉矿,占石棉总产量的 95% 以上。温石棉能以纤维的形式在环境中扩散沉积,造成污染。石棉纤维的环境暴露会导致多种人类疾病,包括石棉沉滞症、胸膜斑、肺癌、间皮瘤和非呼吸系统疾病(Huang *et al.*, 2011)。国际上对温石棉的安全性存在争议(Yarborough, 2007; Vanchugova *et al.*, 2008),一些非石棉生产国,特别是西方发达国家提倡使用温石棉的人工代用纤维,如陶瓷纤维、玻璃纤维和岩棉纤维等。人们往往认为只要无石棉化了,其代用纤维及其制品就是安全的。然而在 2002 年,国际癌症研究机构(IARC)将陶瓷纤维归类为人类可疑致癌物的 2B 组,将玻璃纤维和岩棉纤维归类为现有证据不能对人类致癌性进行分类的第 3 组(Andersen *et al.*, 2002)。有研究发现,陶瓷纤维可

诱导工人产生胸膜斑(Lockey *et al.*, 2012),表明其可能仍具有生物活性和致病性,因此,开展温石棉人工代用纤维的安全性研究同等重要。目前对温石棉和陶瓷纤维致机体炎症及氧化应激的毒性机制研究尚不清楚,有学者提出细胞内 ROS(活性氧簇)可以引起细胞凋亡和炎症反应(Funahashi *et al.*, 2015),而温石棉能够诱导细胞产生大量活性氧而致氧化损伤和细胞凋亡(Nagai *et al.*, 2011),陶瓷纤维可通过潜在产生的自由基活性表现出细胞毒性(Elias *et al.*, 2002)。

目前有较多温石棉和陶瓷纤维的体外毒性研究,而体内动物研究较少。因此本研究拟采用陶瓷纤维和我国青海茫崖矿区的天然温石棉对 Wistar 大鼠进行多次非暴露式气管滴注染毒,分别于染毒 1、6 和 12 个月时,观察大鼠肺部的病理变化,支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)中白细胞总数及类型的变化,肺组织中相关炎性细胞因子白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因

子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 和核因子- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) 含量的变化, 以及活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)、脂质过氧化产物丙二醛(malondialdehyde, MDA) 浓度和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD) 活力的变化, 为探讨和比较温石棉和陶瓷纤维毒性提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂与仪器

实验主要仪器包括: 7200 型分光光度计(优尼柯上海仪器公司), Multiskan Spectrum 酶标仪(美国 Thermo 公司), 5810R 冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司), HS-800D 恒温水浴箱(华利达实验设备公司), Ultra55 场发射扫描电子显微镜(德国蔡司仪器公司), Mastersizer2000 马尔文激光粒度分析仪(英国马尔文仪器公司), X'Pert PRO 荧光衍射分析仪(荷兰帕纳科公司); 主要试剂包括: IL-6、TNF- $\alpha$  酶联免疫检测试剂盒(美国 R&D 公司), NF- $\kappa$ B 酶联免疫检测试剂盒(武汉华美生物工程有限公司), ROS、MDA 和 SOD 检测试剂盒(南京建成生物制品研究所)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 样品的制备

采自我国青海茫崖矿区的天然温石棉(西南科技大学惠赠)和购买的陶瓷纤维(购于淄博民烨耐火纤维有限公司)作为受试物。用高速粉碎机初步粉碎 2~3 min, 然后用星球磨机分别湿磨 18 h 和 5 h, 收集矿浆, 置于 150 °C 烘箱内烘烤 2 h, 磨碎备用。

#### 1.2.2 理化特性分析

采用扫描电镜分析温石棉和陶瓷纤维粉体形貌结构, 激光粒度分析仪测定粒径, X 射线荧光光谱仪分析主要化学组分。

#### 1.2.3 实验动物与分组

选择健康初断乳 SPF 级(specific pathogen free 动物, 即无特定病原体动物, 是指除清洁动物应排除的病原外, 不携带主要潜在感染或条件致病和对科学实验干扰大的病原的实验动物)Wistar 雄性大鼠 54 只, 4~6 周龄, 体重为 180~220 g, 由西南医科大学实验动物中心提供(经西南医科大学动物伦理审查委员会同意, 合格证号: 201601011), 随机分为 3 组, 即温石棉染毒组、陶瓷纤维染毒组和阴性对照组(生理盐水), 每组 18 只, 分笼喂养。

#### 1.2.4 实验动物染毒及样品采集

称取质量为 0.02 g 充分消毒杀菌的粉体, 加入生理盐水, 制备成浓度为 2.0 mg/mL 的粉尘悬液, 每次临用前超声震荡 30 min。采用非暴露式气管滴注法染毒质量浓度为 2.0 mg/mL 粉尘悬液 0.5 mL, 染毒频率 1 次/月。阴性对照组使用生理盐水, 滴注后自由饮水、进食。分别在滴注 1、6 和 12 个月时各取材 6 只。将大鼠麻醉后仰卧固定, 迅速取出右肺组织并称量, 分装于 EP 管, 置 80 °C 冰箱保存备用。用 37 °C 生理盐水灌洗大鼠左肺 3~5 次收集 BALF, 每次回收率需达到 80%。回收的灌洗液以 2 000 r/min 离心 15 min, 弃上清液, 细胞沉淀制成细胞悬液涂于细胞计数板, Giemsa 染色, 光镜下进行白细胞总数统计及其细胞分类计数。

#### 1.2.5 大鼠肺组织病理学检测

选取主支气管周围肺组织, 经生理盐水反复冲洗后, 置 10% 甲醛水溶液中固定, 常规脱水, 石蜡包埋, 切片, 经苏木素-伊红(HE)染色后光学显微镜下观察肺组织的病理变化。

#### 1.2.6 大鼠肺组织中 IL-6、TNF- $\alpha$ 和 NF- $\kappa$ B 的含量测定

白介素-6(IL-6)是由活化的 T 细胞和成纤维细胞产生的淋巴因子, 其失调的持续产生会导致各种自身免疫性和慢性炎症性疾病的发生和发展; 肿瘤坏死因子  $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) 是主要由单核细胞和巨噬细胞产生的一种单核因子, 具有强大的促炎和免疫调节作用; 核因子  $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B) 蛋白选择性的结合在 B 细胞  $\kappa$ -轻链增强子上调控许多基因的表达, 参与细胞对外界刺激的响应, 如细胞因子、重金属、病毒等, 在细胞的炎症反应、免疫应答等过程中起到关键性作用。IL-6、TNF- $\alpha$  和 NF- $\kappa$ B 的含量测定采用酶联免疫吸附试验(ELISA), 具体操作步骤严格按照试剂盒说明书进行。

#### 1.2.7 大鼠肺组织中 ROS、MDA 浓度及 SOD 活力的测定

ROS、MDA 浓度及 SOD 活力的测定分别采用 ELISA 双抗体夹心法、硫代巴比妥酸(TBA)比色法和黄嘌呤氧化酶法测定, 具体操作步骤严格按照试剂盒说明书进行。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS21.0 统计软件进行数据的统计分析。定量资料若服从正态分布、方差齐, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 SNK-q 法检验, 若方差

不齐则采用 Kruskal-Wallis 检验, 检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 温石棉和陶瓷纤维的形貌分析

由图1可见, 温石棉纤维呈较硬直的纤维状或针状, 排列成平行或倾斜的束状结构; 陶瓷纤维多呈柱状或块状, 纤维状颗粒的长径比更小, 纤维直径分布较广。

### 2.2 温石棉和陶瓷纤维的粒径分布

由图2( $\bar{x}$  指平均粒径, 是根据粒径分布曲线算出的一种几何平均值;  $d_{50}$  表示一种粉体样品的累计粒度分布百分数达到 50% 时所对应的粒径;  $d_{90}$  表示一种粉体样品的累计粒度分布百分数达到 90%

时所对应的粒径。三者均指纤维长度, 单位为  $\mu\text{m}$ ) 可见, 温石棉粉体样品粒径主要集中在  $2 \sim 10 \mu\text{m}$ , 陶瓷纤维粉体样品粒径主要集中在  $2 \sim 12 \mu\text{m}$ 。

### 2.3 温石棉和陶瓷纤维的主要化学组分

由表1可见, 温石棉的主要化学成分为  $\text{SiO}_2$  (40.82%) 和  $\text{MgO}$  (39.20%), 还含少量的  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  (4.97%) 和  $\text{Al}_2\text{O}_3$  (2.12%); 陶瓷纤维的主要化学成分为  $\text{SiO}_2$  (54.44%) 和  $\text{Al}_2\text{O}_3$  (43.63%)。

### 2.4 大鼠肺组织的病理变化

阴性对照组在染毒12个月时才出现少量炎性细胞浸润。温石棉和陶瓷纤维染毒组在染毒1个月时, 炎性细胞增多、肺间隔轻微增宽、少许淋巴细胞聚集、肺泡结构遭到破坏(如图3b、3f箭头所示); 染

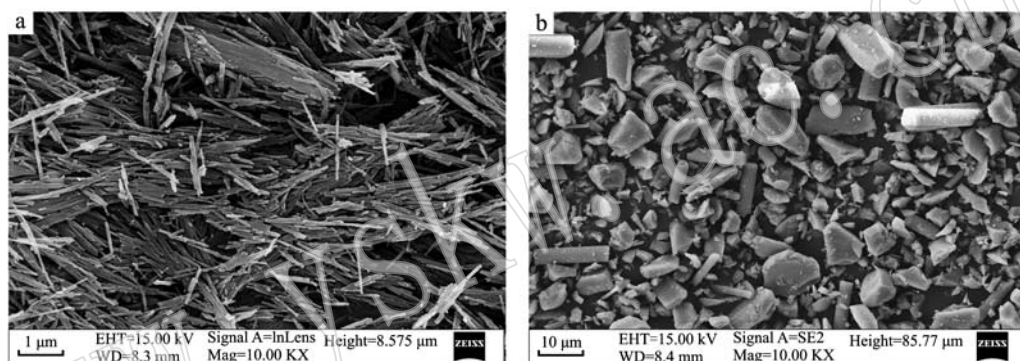


图1 温石棉(a)和陶瓷纤维(b)的扫描电镜图像

Fig. 1 Scanning electron microscopy image of chrysotile asbestos (a) and ceramic fibers (b)

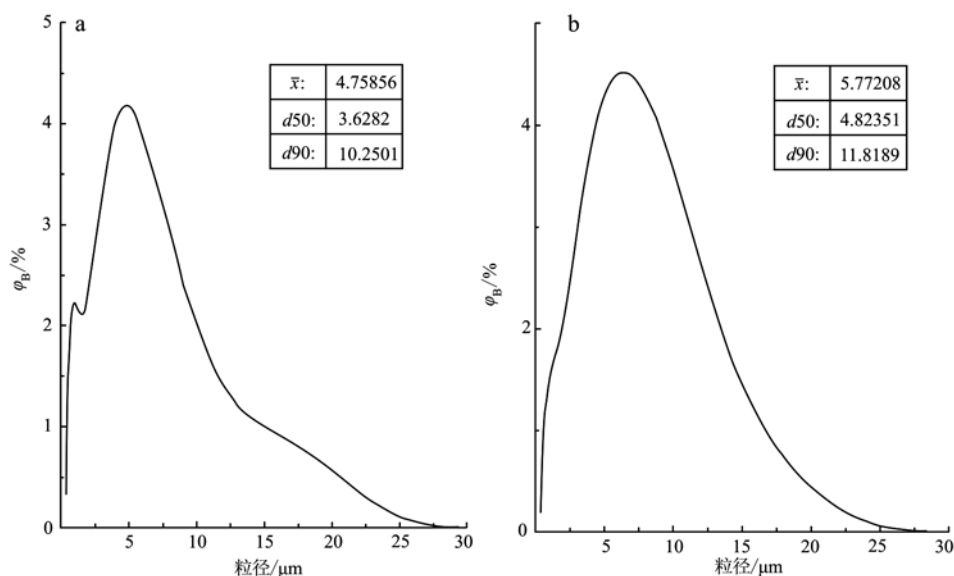


图2 温石棉(a)和陶瓷纤维(b)的粒径分布图

Fig. 2 Particle size distribution of chrysotile asbestos (a) and ceramic fibers (b)



表 1 温石棉和陶瓷纤维的主要化学组分分析  $w_B/\%$

Table 1 Analyses of main chemical composition of chrysotile asbestos and ceramic fibers

样品	SiO <sub>2</sub>	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	MgO	CaO	Na <sub>2</sub> O	K <sub>2</sub> O	LOI
温石棉	40.82	2.12	4.97	39.20	0.34	0.15	0.04	11.43
陶瓷纤维	54.44	43.63	0.92	0.09	0.21	0.05	0.20	0.44

毒 6 个月时,上述现象进一步加重并出现少许纤维化、肺间隔断裂、肺泡融合(如图 3c、3g 箭头所示);染毒 12 个月时,陶瓷纤维染毒组病理特征与染毒 6 个月时比较无明显变化(如图 3h、3g 箭头所示),而温石棉染毒组与染毒 6 个月时比较病理损害加重,肺泡结构破坏严重、出现较多肺大泡和面积的纤

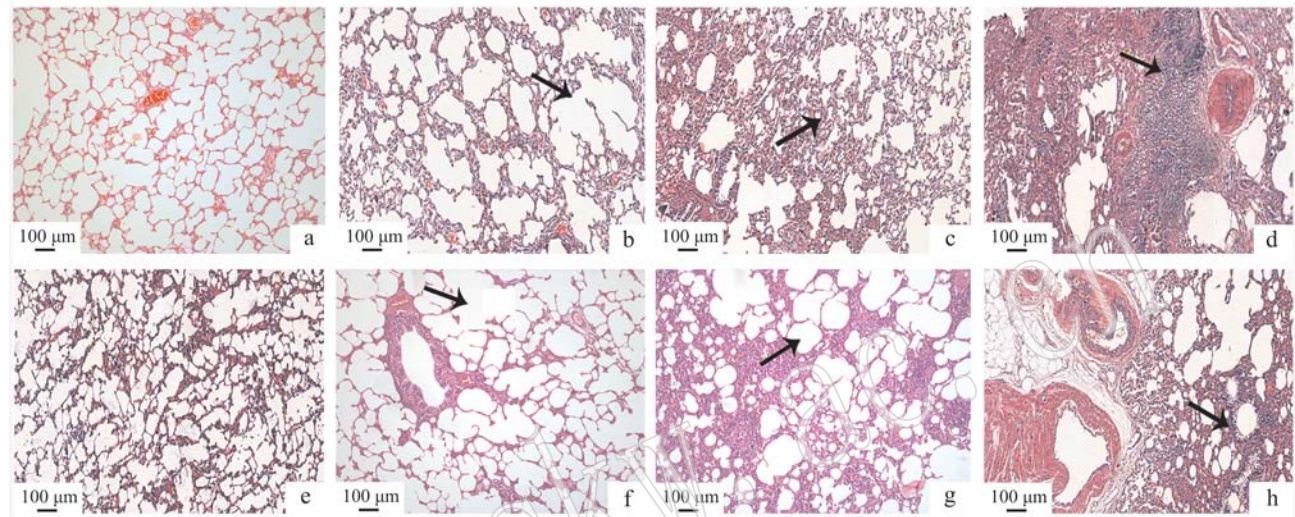


图 3 温石棉和陶瓷纤维染毒大鼠肺组织的病理学改变

Fig. 3 Pathological changes in lung tissues of rats exposed to chrysotile asbestos and ceramic fibers

a, e—1 个月和 12 个月阴性对照组; b~d—1、6 和 12 个月温石棉染毒组; f~h—1、6 和 12 个月陶瓷纤维染毒组  
a, e—1 month and 12 months control groups; b~d—1, 6 and 12 months chrysotile asbestos exposure groups; f~h—1, 6 and 12 months ceramic fibers exposure groups

维化(如图 3d、3c 箭头所示)。

2.5 大鼠 BALF 中白细胞总数及分类

本文用 SPSS 统计软件进行假设检验得到  $p$  值,为原假设为真时所得到的样本观察结果或更极端结果出现的概率。如  $p$  值很小,说明原假设情况发生的概率很小,根据小概率原理,则拒绝原假设。统计学根据显著性检验方法所得到的  $p$  值一般以  $<0.05$  为有统计学差异。表 2 显示,在染毒的各个时间点,两个染毒组 BALF 中白细胞总数均高于阴性对照组( $p < 0.05$ );两个染毒组 BALF 中,白细胞总数、中性粒细胞和淋巴细胞的百分比均随染毒时间延长而升高( $p < 0.05$ ),巨噬细胞百分比均随染毒时间延长而下降( $p < 0.05$ ),均呈现时间-效应关系( $p < 0.05$ )。

2.6 大鼠肺组织中细胞因子 IL-6、TNF- $\alpha$  和 NF- $\kappa$ B 含量的变化

表 3 显示,在染毒的各个时间点,两个染毒组肺组织中 IL-6、TNF- $\alpha$  和 NF- $\kappa$ B 的含量均高于阴性对照组( $p < 0.05$ );两个染毒组肺组织中 IL-6、TNF- $\alpha$

和 NF- $\kappa$ B 的含量随染毒时间延长而升高( $p < 0.05$ ),均呈现时间-效应关系( $p < 0.05$ );在染毒的各个时间点,温石棉染毒组肺组织中 IL-6、TNF- $\alpha$  和 NF- $\kappa$ B 的含量均高于陶瓷纤维染毒组( $p < 0.05$ )。

2.7 大鼠肺组织中 ROS、MDA 浓度及 SOD 活力的变化

表 4 显示,在染毒的各个时间点,两个染毒组肺组织中 ROS 和 MDA 浓度均高于阴性对照组( $p < 0.05$ );两个染毒组肺组织中 SOD 活力在染毒一个月时与阴性对照组比较无差异( $p > 0.05$ ),在染毒 6 个月和 12 个月时均低于阴性对照组( $p < 0.05$ );两个染毒组肺组织中 ROS 和 MDA 浓度随染毒时间延长而升高( $p < 0.05$ ),SOD 活力随染毒时间延长而下降( $p < 0.05$ ),均呈现时间-效应关系( $p < 0.05$ );温石棉染毒组肺组织中 ROS 和 MDA 浓度在染毒的各个时间点均高于陶瓷纤维染毒组( $p < 0.05$ ),SOD 活力在染毒一个月时与陶瓷纤维染毒组

表 2 温石棉和陶瓷纤维对大鼠 BALF 中白细胞总数和巨噬细胞、中性粒细胞和淋巴细胞百分含量的影响 ( $n=6, \bar{x} \pm s$ )

Table 2 Effects of chrysotile asbestos and ceramic fibers on total leukocyte count and percentage of macrophages, neutrophils and lymphocytes in BALF of rats ( $n=6, \bar{x} \pm s$ )

组别	1 个月					6 个月					12 个月				
	总细胞数/ $10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$	巨噬细 胞/%	中性粒细 胞/%	淋巴细 胞/%	总细胞数/ $10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$	巨噬细 胞/%	中性粒细 胞/%	淋巴细 胞/%	总细胞数/ $10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$	巨噬细 胞/%	中性粒细 胞/%	淋巴细 胞/%	总细胞数/ $10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$	巨噬细 胞/%	中性粒细 胞/%
阴性对照组	4.08 ± 0.32	71.36 ± 1.07	12.54 ± 0.85	9.72 ± 0.88	4.24 ± 0.13	70.83 ± 0.99	14.36 ± 1.76	10.77 ± 0.78	4.68 ± 0.42	69.33 ± 0.65	15.04 ± 0.74	11.43 ± 0.46			
陶瓷纤维	8.57 ± 0.45 <sup>a</sup>	93.05 ± 3.10	24.32 ± 2.33	15.01 ± 0.56	16.31 ± 0.19 <sup>ab</sup>	42.91 ± 0.68 <sup>b</sup>	51.26 ± 1.85 <sup>b</sup>	25.03 ± 0.80 <sup>b</sup>	25.54 ± 1.53 <sup>ab</sup>	33.24 ± 0.56 <sup>b</sup>	65.51 ± 0.23 <sup>b</sup>	38.67 ± 2.71 <sup>b</sup>			
温石棉	7.67 ± 0.54 <sup>a</sup>	83.61 ± 2.34	26.53 ± 0.16	14.45 ± 0.55	15.74 ± 0.38 <sup>ab</sup>	37.23 ± 0.66 <sup>b</sup>	56.52 ± 2.16 <sup>b</sup>	23.12 ± 0.79 <sup>b</sup>	20.52 ± 0.79 <sup>ab</sup>	30.01 ± 1.24 <sup>b</sup>	69.02 ± 0.21 <sup>b</sup>	31.21 ± 1.87 <sup>b</sup>			

注: a 表示与相同染毒时间的阴性对照组比较,  $p < 0.05$ ; b 表示与前一染毒时间组比较,  $p < 0.05$ 。

表 3 温石棉和陶瓷纤维对大鼠肺组织内 IL-6、TNF- $\alpha$  和 NF- $\kappa$ B 含量的影响 ( $n=6, \bar{x} \pm s$ )

Table 3 Effects of chrysotile asbestos and ceramic fibers on the content of IL-6, TNF- $\alpha$  and NF- $\kappa$ B in rat lung tissues ( $n=6, \bar{x} \pm s$ )

组别	IL-6				TNF- $\alpha$				NF- $\kappa$ B			
	1 个月	6 个月	12 个月	1 个月	6 个月	12 个月	1 个月	6 个月	1 个月	6 个月	12 个月	12 个月
阴性对照组	80.92 ± 3.21	82.07 ± 3.61	87.19 ± 4.12	272.18 ± 10.24	280.18 ± 21.55	290.40 ± 8.47	846.21 ± 21.25	858.43 ± 10.24	864.54 ± 8.77			
陶瓷纤维	92.08 ± 1.14 <sup>a</sup>	103.76 ± 4.25 <sup>ab</sup>	118.92 ± 4.11 <sup>ab</sup>	317.91 ± 7.98 <sup>a</sup>	338.95 ± 9.57 <sup>ab</sup>	366.59 ± 6.01 <sup>ab</sup>	899.32 ± 14.25 <sup>a</sup>	950.28 ± 11.25 <sup>ab</sup>	990.74 ± 20.89 <sup>ab</sup>			
温石棉	122.81 ± 2.89 <sup>ac</sup>	135.19 ± 3.14 <sup>abc</sup>	150.14 ± 7.41 <sup>abc</sup>	372.97 ± 34.78 <sup>ac</sup>	432.65 ± 10.25 <sup>abc</sup>	486.30 ± 23.89 <sup>abc</sup>	942.43 ± 21.58 <sup>ac</sup>	1 126.47 ± 75.89 <sup>abc</sup>	1 356.84 ± 101.21 <sup>abc</sup>			

注: a 表示与相同染毒时间的阴性对照组比较,  $p < 0.05$ ; b 表示与前一染毒时间组比较,  $p < 0.05$ ; c 表示与相同染毒时间的陶瓷纤维染毒组比较,  $p < 0.05$ 。

表 4 温石棉和陶瓷纤维对大鼠肺组织内 ROS、MDA 浓度及 SOD 活力的影响 ( $n=6, \bar{x} \pm s$ )

Table 4 Effects of chrysotile asbestos and ceramic fibers on ROS, MDA concentration and SOD activity in rat lung tissues ( $n=6, \bar{x} \pm s$ )

组别	ROS (U/mL)			MDA (mol/mg)			SOD (U/mg)		
	1 个月	6 个月	12 个月	1 个月	6 个月	12 个月	1 个月	6 个月	12 个月
阴性对照组	283.71 ± 21.76	315.39 ± 2.72	336.04 ± 16.82	1.67 ± 0.29	1.57 ± 0.49	1.73 ± 0.04	23.63 ± 2.02	24.63 ± 1.76	23.17 ± 0.81
陶瓷纤维	326.92 ± 16.21 <sup>a</sup>	391.02 ± 30.42 <sup>ab</sup>	465.70 ± 32.72 <sup>ab</sup>	3.45 ± 0.01 <sup>a</sup>	4.66 ± 0.38 <sup>ab</sup>	8.78 ± 0.07 <sup>ab</sup>	27.81 ± 1.02	21.15 ± 0.46 <sup>ab</sup>	14.17 ± 0.07 <sup>ab</sup>
温石棉	387.18 ± 12.63 <sup>ac</sup>	460.00 ± 48.36 <sup>abc</sup>	559.32 ± 13.75 <sup>abc</sup>	4.47 ± 0.22 <sup>ac</sup>	8.84 ± 1.19 <sup>abc</sup>	13.01 ± 0.36 <sup>abc</sup>	25.65 ± 2.61	10.03 ± 1.77 <sup>abc</sup>	4.12 ± 0.12 <sup>abc</sup>

注: a 表示与相同染毒时间的阴性对照组比较,  $p < 0.05$ ; b 表示与前一染毒时间组比较,  $p < 0.05$ ; c 表示与相同染毒时间的陶瓷纤维染毒组比较,  $p < 0.05$ 。

比较无差异( $p > 0.05$ ),在染毒6个月和12个月时均低于陶瓷纤维染毒组( $p < 0.05$ )。

### 3 讨论

温石棉是一种用途极广的纤维状硅酸盐矿物质,陶瓷纤维为温石棉的常用代用纤维,也得到了广泛应用。

本研究病理结果显示,温石棉和陶瓷纤维染毒组都有不同程度的炎性细胞聚集、肺泡结构破坏和纤维化,温石棉染毒组损伤随染毒时间延长加重。Kamp(2009)指出颗粒物可刺激ROS在肺部生成,引起肺部损伤和纤维化。Maxim等(2018)研究发现吸入陶瓷纤维引起肺组织纤维化。本实验结果与以上研究结果基本一致,由此可见,温石棉和陶瓷纤维可以引起大鼠肺部不同程度的病理损伤。

与其他类型石棉类似,温石棉纤维进入肺部后也会被巨噬细胞吞噬或破坏上皮细胞滞留在肺间质,引发炎症反应和氧化应激,巨噬细胞的进一步崩解可导致肺部纤维化和炎症反应的加重,这被认为是温石棉致肺部损伤非常重要的机制(Li and Fukagawa, 2010)。Kim等(2001)研究表明,陶瓷纤维被肺泡巨噬细胞吞噬后,导致细胞活力下降,细胞生长受阻,表现出一定程度的细胞毒性作用。本研究结果显示,两个染毒组BALF中白细胞总数与阴性对照组比较在染毒各时间点均升高;随着时间延长,两个染毒组BALF中白细胞总数、中性粒细胞和淋巴细胞的百分比升高,巨噬细胞的百分比呈现下降趋势,可能是温石棉和陶瓷纤维在进入大鼠肺部后,引发巨噬细胞对异物清除和吞噬的防御反应,破坏巨噬细胞并导致其大量崩解,进一步加重肺部炎症损伤,并随着染毒时间的延长而加重。

炎性细胞因子在维持慢性炎症、促进肿瘤细胞的进展、抑制免疫系统对肿瘤的监视等方面具有重要作用(宾流等,2014)。本研究结果显示,在染毒的各个时间点,两个染毒组肺组织中IL-6、TNF- $\alpha$ 和NF- $\kappa$ B含量均高于阴性对照组,且随染毒时间延长均呈逐渐升高的趋势。NF- $\kappa$ B可参与石棉介导的慢性炎症反应(Liu *et al.*, 2013),细胞暴露于不同类型的石棉后,NF- $\kappa$ B含量随染毒时间延长和染毒剂量的增加而升高,呈现明显的时间-效应关系和剂量-效应关系(Manning *et al.*, 2002)。此外,NF- $\kappa$ B活化也是细胞暴露于石棉纤维后各种促炎细胞因子和

趋化因子表达的核心,其中包括IL-6和TNF- $\alpha$ (Chew and Toyokuni, 2015)。Kumagai-Takei等(2018)在石棉致T细胞长期炎症研究中发现,胸膜斑块和恶性胸膜间皮瘤患者组培养上清液中的IL-6水平较高。Sun等(2012)在纳米颗粒引起小鼠肺毒性的研究中发现,纳米颗粒升高了活性氧的积累和脂质过氧化水平,并降低抗氧化能力;同时激活NF- $\kappa$ B,升高TNF- $\alpha$ 和IL-6的表达水平。本实验结果与以上有关文献报道一致,提示IL-6、TNF- $\alpha$ 和NF- $\kappa$ B三种炎症因子在温石棉和陶瓷纤维致大鼠肺组织损伤中起重要作用,使组织出现延续炎症反应。

炎症反应伴随着活性氧的生成(Valavanidis *et al.*, 2013)。ROS可通过细胞氧化应激反应导致细胞凋亡和坏死;氧自由基作用于脂质发生过氧化反应生成MDA,其含量可以代表机体细胞受自由基攻击的程度。本研究显示,两个染毒组肺组织中ROS和MDA的浓度与阴性对照组比较在染毒各时间点均升高,且随染毒时间的延长均呈上升趋势。有研究报道温石棉和陶瓷纤维作用于仓鼠肺细胞(V79)可观察到细胞内ROS的水平升高(Huo *et al.*, 2018)。邓建军等(2009)发现温石棉使受损后的巨噬细胞脂质过氧化的主要产物MDA增高,自由基清除剂SOD被消耗。本实验结果与以上有关文献报道一致,提示温石棉和陶瓷纤维进入大鼠肺部后,机体氧化应激程度随时间延长持续加深,ROS积累并产生脂质过氧化物,使MDA水平增高,导致组织氧化损伤。SOD是生物体内重要的抗氧化酶,可清除氧自由基从而降低脂质过氧化作用。本研究发现,与阴性对照组比较,两个染毒组肺组织中SOD活力在染毒中晚期降低,且随时间延长呈下降的趋势。有研究表明A549细胞暴露于石英粉体后,细胞内SOD酶活力被激活,酶活力随染毒时间延长而降低(霍婷婷,2013)。本实验结果与以上有关文献报道一致,提示过量的ROS使体内抗氧化酶SOD耗竭或失代偿,清除自由基的能力降低,导致机体氧化平衡体系被打破,造成组织氧化损伤。

造成温石棉和陶瓷纤维毒性差异的原因,可能与形态、粒径大小和化学组成相关。本研究中,温石棉纤维多为尖锐的纤维状,陶瓷纤维粒径变化范围更广,块状较多;温石棉染毒组肺组织中三种炎症因子的含量在染毒的各个时间点均高于陶瓷纤维染毒组。有学者推测长纤维更容易引起纤维化或癌症,但长的人造矿物纤维并不然,它们会横向断裂,从而

降低了残留纤维的毒性(Eastes *et al.*, 2007), 这可能是进入肺组织的陶瓷纤维引起较弱炎症反应的原因之一。本研究中, 温石棉和陶瓷纤维化学构成均以  $\text{SiO}_2$  为主, 温石棉含较多 Fe 和 Mg 元素, 而陶瓷纤维含较多的 Al 元素; 温石棉染毒组肺组织中 ROS 和 MDA 浓度在染毒的各个时间点均高于陶瓷纤维染毒组, SOD 活力在染毒中晚期均低于陶瓷纤维染毒组。Park 和 Park(2009)研究发现纳米  $\text{SiO}_2$  能够导致鼠源性巨噬细胞系发生氧化应激反应和促炎症反应。Huo 等(2018)推测 Mg 元素可降低温石棉对 V79 细胞的死亡率,  $\text{Al}_2\text{O}_3$  可增强陶瓷纤维的毒性。颗粒物的铁元素可通过芬顿反应诱导羟自由基生成, 并影响 A549 细胞内的氧化还原平衡(Deng *et al.*, 2013)。以上相关文献提示这些元素含量不同可能导致两者毒性存在差异, 含有较多活性强的 Fe 元素可能对诱导 ROS 的生成起关键作用, 这可能是在不同染毒时间点, 温石棉氧化损伤作用较陶瓷纤维强的原因之一。

目前关于温石棉和陶瓷纤维炎症和氧化应激损伤作用的研究主要采用体外实验, 而长期染毒实验较少, 本研究探讨温石棉和陶瓷纤维毒性差异的因素是否与纤维形态、粒径大小、化学组成有关, 提示陶瓷纤维可能会导致与温石棉类似的健康影响。但非暴露式气管滴注法可能与现有关于石棉生物持久性及毒性的结果缺少可比性。在以后的研究中, 本课题组考虑加入吸入染毒方式, 并进行方法上的比较, 着重探讨氧化应激产生的通路及氧化应激效应是否最终会致肺部肿瘤的发生, 为继续深入开展温石棉及人造矿物纤维毒性及其作用机制的研究提供实验数据。

## 4 结论

(1) 温石棉和陶瓷纤维可导致大鼠病理表现为肺泡结构破坏、肺间隔增宽、纤维化等。

(2) 温石棉和陶瓷纤维使大鼠肺组织中相关炎症因子 IL-6、TNF- $\alpha$  和 NF- $\kappa$ B 的含量升高; 诱导细胞产生过量 ROS、MDA, 同时体内 SOD 活力降低, 使机体处于氧化应激状态, 氧化和抗氧化平衡被打破, 最终造成大鼠的肺部氧化损伤。

(3) 青海茫崖矿区天然温石棉致大鼠肺部炎症和氧化损伤的能力较陶瓷纤维强, 这可能与纤维形态、粒径大小和化学组成有关。

## References

- Andersen A, Axten C, Bernstein D M, *et al.* 2002. Man-made Vitreous Fibres. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans[M]. No. 81. Lyon: International Agency for Research on Cancer (IARC), 1~418.
- Bin Liu, Lin Ziying and Liu Gang. 2014. Advance research of Asbestos-induced pulmonary tumor[J]. Journal of Modern Oncology, 22(7): 1 694 ~ 1 697(in Chinese with English abstract).
- Chew S H and Toyokuni S. 2015. Malignant mesothelioma as an oxidative stress-induced cancer: An update[J]. Free Radical Biology & Medicine, 86: 166 ~ 178.
- Deng Jianjun, Dong Faqin, Wang Limin, *et al.* 2009. Comparative study of the cytotoxicities between chrysotile and three substituent mineral fiber dusts in vitro[J]. Industrial Health and Occupational Diseases, 35(6): 321 ~ 323.
- Deng X, Zhang F, Rui W, *et al.* 2013. PM 2.5-induced oxidative stress triggers autophagy in human lung epithelial A549 cells[J]. Toxicology In Vitro, 27(6): 1 762 ~ 1 770.
- Eastes W, Baron P A, Baier R E, *et al.* 2007. Do vitreous fibers break in the lung? [J]. Inhalation Toxicology, 19(4): 311 ~ 315.
- Elias Z, Poirot O, Daniere M C, *et al.* 2002. Surface reactivity, cytotoxicity, and transforming potency of iron-covered compared to untreated refractory ceramic fibers[J]. Journal of Toxicology & Environmental Health Part A, 65(23): 2 007 ~ 2 027.
- Fan Jingguang, Wang Haijiao and Feng Lingyun. 2016. Deadly asbestos fiber[J]. Labour Protection, 67(2): 12 ~ 14(in Chinese with English abstract).
- Funahashi S, Okazaki Y, Ito D, *et al.* 2015. Asbestos and multi-walled carbon nanotubes generate distinct oxidative responses in inflammatory cells[J]. Journal of Clinical Biochemistry & Nutrition, 56(2): 111 ~ 117.
- Huang S X, Jaurand M C, Kamp D W, *et al.* 2011. Role of mutagenicity in asbestos fiber-induced carcinogenicity and other diseases[J]. Journal of Toxicology & Environmental Health Part B, 14(1~4): 179 ~ 245.
- Huo T, Dong F, Deng J, *et al.* 2018. In vitro genotoxicity of asbestos substitutes induced by coupled stimulation of dissolved high-valence ions and oxide radicals[J]. Environmental Science & Pollution Research, 25(23): 22 356 ~ 22 367.
- Huo Tingting. 2013. In Vitro Cytotoxicity of Several Typical Mineral parti-



- cles on Human Lung Epithelial Cell[D]. Sichuan: Southwest University of Science and Technology (in Chinese with English abstract).
- Kamp D W. 2009. Asbestos-induced lung diseases: an update[J]. *Translational Research*, 153(4): 143 ~ 152.
- Kim K A, Lee W K, Kim J K, *et al.* 2001. Mechanism of refractory ceramic fiber-and rock wool-induced cytotoxicity in alveolar macrophages[J]. *International Archives of Occupational & Environmental Health*, 74(1): 9 ~ 15.
- Kumagai-Takei N, Yamamoto S, Lee S, *et al.* 2018. Inflammatory alteration of human T cells exposed continuously to asbestos[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2): 504.
- Li M Y and Fukagawa N K. 2010. THP-1 cells exposed to chrysotile asbestos (CHRY) and libby amphiboles (LIB) induce inflammation in bronchial epithelial cells (BEAS-2B) via IL1- $\beta$  and oxidative stress[J]. *Free Radical Biology & Medicine*, 49(s): S133.
- Liu G, Cheres P and Kamp D W. 2013. Molecular basis of asbestos-induced lung disease[J]. *Annual Review of Pathology*, 8(1): 161 ~ 187.
- Lockey J E, Roggli V L, Hilbert T J, *et al.* 2012. Biopersistence of refractory ceramic fiber in human lung tissue and a 20-year follow-up of radiographic pleural changes in workers[J]. *Journal of Occupational & Environmental Medicine*, 54(7): 781 ~ 788.
- Manning C B, Vallyathan V and Mossman B T. 2002. Diseases caused by asbestos: Mechanisms of injury and disease development[J]. *International Immunopharmacology*, 2(2 ~ 3): 191 ~ 200.
- Maxim L D and Utell M J. 2018. Review of refractory ceramic fiber (RCF) toxicity, epidemiology and occupational exposure[J]. *Inhalation Toxicology*, 30(2): 49 ~ 71.
- Nagai H, Ishihara T, Lee W H, *et al.* 2011. Asbestos surface provides a niche for oxidative modification[J]. *Cancer Science*, 102(12): 2118 ~ 2125.
- Park E J and Park K. 2009. Oxidative stress and pro-inflammatory responses induced by silica nanoparticles in vivo and in vitro[J]. *Toxicology Letters*, 184(1): 18 ~ 25.
- Sun Q, Tan D, Ze Y, *et al.* 2012. Pulmotoxicological effects caused by long-term titanium dioxide nanoparticles exposure in mice[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 235 ~ 236: 47 ~ 53.
- Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis K, *et al.* 2013. Pulmonary oxidative stress, inflammation and cancer: respirable particulate matter, fibrous dusts and ozone as major causes of lung carcinogenesis through reactive oxygen species mechanisms[J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10(9): 3886 ~ 3907.
- Vanchugova N N, Kashanski S V, Tregubov E S, *et al.* 2008. Experimental basis for possible tumors induction in descendants after placental transmission of chrysotile asbestos fibers[J]. *Meditsina Truda I Promyshlennaia Ekologiya*, (3): 33 ~ 37.
- Yarborough C M. 2007. The risk of mesothelioma from exposure to chrysotile asbestos[J]. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, 13(4): 334 ~ 338.

## 附中文参考文献

- 宾 流, 林子英, 刘 刚. 2014. 石棉相关的肺肿瘤发病机制研究进展[J]. *现代肿瘤医学*, 22(7): 1694 ~ 1697.
- 邓建军, 董发勤, 王利民, 等. 2009. 温石棉与其3种天然代用纤维矿物粉尘体外细胞毒性的对比研究[J]. *工业卫生与职业病*, 35(6): 321 ~ 323.
- 樊晶光, 王海椒, 冯灵云. 2016. 致命的石棉纤维[J]. *劳动保护*, 67(2): 12 ~ 14.
- 霍婷婷. 2013. 典型超细矿物粉体的 A549 细胞毒性作用研究[D]. 四川: 西南科技大学.