

## 4种天然温石棉致大鼠肺损伤及对HO-1和HSP-70的影响

陈建国<sup>1,2</sup>, 黄柳雯<sup>3</sup>, 李杰<sup>4</sup>, 崔琰<sup>1</sup>, 霍婷婷<sup>5</sup>, 邓建军<sup>6</sup>, 孙耀川<sup>7</sup>, 张青碧<sup>1</sup>

(1. 西南医科大学公共卫生学院, 四川泸州 646000; 2. 泸州市疾病预防控制中心, 四川泸州 646000; 3. 西南医科大学药学院, 四川泸州 646000; 4. 泸州市卫生健康委员会, 四川泸州 646000; 5. 西南科技大学, 四川绵阳 621010; 6. 四川绵阳四〇四医院, 四川绵阳 621000; 7. 西南交通大学地球科学环境工程学院, 四川成都 611756)

**摘要:** 探讨了我国四大矿区天然温石棉致大鼠肺部损伤作用及肺组织中HO-1和HSP-70的表达差异。从我国四大天然矿区采集4种天然温石棉,用扫描电镜、红外光谱和X射线荧光光谱分析其粉尘形貌、表面活性基团和化学组分。将90只初断乳SPF级Wistar大鼠,随机分为5组(甘肃阿克塞、青海茫崖、四川新康、陕西陕南温石棉组和生理氯化钠溶液阴性对照组),用2.0 mg/mL温石棉粉尘悬液0.5 mL(1次/月)对大鼠非暴露式气管内滴注染毒。于1、6、12个月分批处死大鼠6只,测定支气管肺泡灌洗液(BALF)中的乳酸脱氢酶(LDH)、碱性磷酸酶(AKP)和总蛋白(TP)含量,采用qRT-PCR检测肺组织中血红素氧化合酶1(HO-1)和热休克蛋白70(HSP-70)mRNA表达水平,采用western blot检测肺组织中HO-1和HSP-70蛋白表达水平。结果显示,阿克塞、茫崖和新康温石棉组LDH及各温石棉组AKP和TP在各时间点均比阴性对照组高( $P < 0.05$ ),且随染毒时间延长呈上升趋势( $P < 0.05$ )。染毒1月时,各染毒组HO-1、HSP-70 mRNA和HO-1、HSP-70蛋白表达量比阴性对照组高( $P < 0.05$ );染毒6月时,各染毒组比阴性对照组高,阿克塞和陕南温石棉组低于茫崖和新康温石棉组( $P < 0.05$ );染毒12月时,阿克塞和陕南温石棉组高于茫崖和新康温石棉组( $P < 0.05$ ),茫崖和新康温石棉组低于阴性对照组。

**关键词:** 温石棉; 肺损伤; HO-1; HSP-70

中图分类号: P579; P578.94

文献标识码: A

文章编号: 1000-6524(2020)03-0305-09

## The effects of four natural chrysotile asbestos on lung injury as well as on HO-1 and HSP-70 of rats

CHEN Jian-guo<sup>1,2</sup>, HUANG Liu-wen<sup>3</sup>, LI Jie<sup>4</sup>, CUI Yan<sup>1</sup>, HUO Ting-ting<sup>5</sup>, DENG Jian-jun<sup>6</sup>,  
SUN Yao-chuan<sup>7</sup> and ZHANG Qing-bi<sup>1</sup>

(1. School of Public Health, Southwest Medical University, Luzhou 646000, China; 2. Luzhou City Center for Disease Control and Prevention, Luzhou 646000, China; 3. School of Pharmacy, Southwest Medical University, Luzhou 646000, China; 4. Luzhou City Health and Wellness Committee, Luzhou 646000, China; 5. Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621010, China; 6. Mianyang No. 404 Hospital, Mianyang 621000, China; 7. School of Earth Science and Environmental Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu 611756, China)

**Abstract:** To investigate the effects of four natural chrysotile asbestos in major mining areas of China on lung injury

收稿日期: 2019-07-29; 接受日期: 2019-12-04; 编辑: 尹淑苹

基金项目: 国家自然科学基金(41472046); 四川省教育厅科研项目(17ZA0431); 泸州市-西南医大联合项目(2017LZXNYD-J24); 西南医科大学项目(2017-ZRQN-002, 2016-YDQN-41); 四川医事卫生法治研究中心项目(YF17-Y12)

作者简介: 陈建国(1983-), 男, 汉族, 主管医师, 研究方向: 职业健康, E-mail: 252707985@qq.com; 通讯作者: 张青碧, E-mail: qingbizhang@126.com。

and the expression of HO-1 and HSP-70 in lung tissues of Wistar rats, the authors collected samples of four natural chrysotile asbestos from the four mining areas of China. The fiber morphology, surface active group and chemical composition were analyzed by scanning electron microscopy, Fourier transform infrared spectroscopy and X-ray fluorescence diffraction. Wistar rats were randomly divided into 5 groups (Akesai of Gansu, Mangnai of Qinghai, Xinkang of Sichuan, chrysotile groups and physiological sodium chloride solution negative control group of southern Shaanxi), with the chrysotile groups treated with intratracheal instillation. Six rats were put to death in batches 1 month, 6 months and 12 months later respectively, and lactate dehydrogenase (LDH), alkaline phosphatase (AKP), and total protein (TP) in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were measured. The expression levels of heme oxygenase 1 (HO-1) and heat shock protein 70 (HSP-70) mRNA in lung tissues were detected by qRT-PCR, and the expression levels of HO-1 and HSP-70 protein were detected by western blot. The results showed that the LDH of Gansu Akesai, Qinghai Mangnai and Sichuan Xinkang chrysotile groups and the AKP and TP in each chrysotile group were higher than those in the negative control group at each time point ( $P < 0.05$ ), and increased with the prolonged exposure time ( $P < 0.05$ ). As for HO-1, HSP-70 mRNA and HO-1, HSP-70 protein expression levels, it is shown that, 1 month later, the values of each exposure group was higher than those in the negative control group ( $P < 0.05$ ); 6 months later, values of each exposure group was higher than those in the negative control group, and values of Gansu Akesai and southern Shaanxi chrysotile groups were lower than those in the Qinghai Mangnai and Sichuan Xinkang chrysotile groups ( $P < 0.05$ ); 12 months later, values of Gansu Akesai and Southern Shaanxi chrysotile groups were higher than those in the Qinghai Mangnai and Sichuan Xinkang chrysotile groups, whereas values of Qinghai Mangnai and Sichuan Xinkang chrysotile groups were lower than those in the negative control group ( $P < 0.05$ ).

**Key words:** chrysotile asbestos; lung injury; HO-1; HSP-70

**Fund 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, 2016-YDQN-41); Sichuan Medical and Health Law Research Center Project (YF17-Y12)

石棉是性能优异的纤维状硅酸盐矿物质,可分为温石棉和角闪石石棉。随着应用的深入,人类渐渐意识到石棉纤维对人体健康有不良影响,可致肺纤维化、肺癌、胸膜间皮瘤、胸膜斑等(施海燕等, 2009)。国际癌症研究组织(IARC)已宣布石棉是一类致癌物质(Andersen *et al.*, 2002),但温石棉的使用安全性仍然存在较大争议(杨方明, 2002)。中国虽已在2002年淘汰了角闪石石棉,却仍是全球温石棉最大消费国和第二大生产商(Courtice *et al.*, 2012; Wang X *et al.*, 2013),其中甘肃阿克塞、青海茫崖、四川新康、陕西陕南是我国温石棉的主要产地,有超过一百万人职业暴露于温石棉环境下。目前,温石棉导致肺部损伤的机制涉及炎症反应、氧化应激、细胞凋亡及基因突变等方面。血红素氧化合酶1(HO-1)具有抗炎、抗氧化应激、抗气道平滑肌细胞增殖等重要功能(Wagener *et al.*, 2001; Song *et al.*,

2002),细胞内热休克蛋白70(HSP-70)具有抗凋亡、抗炎作用(Song *et al.*, 2008)。有研究表明颗粒物或较短纤维对肺部的损伤与HO-1和HSP-70有关(Farina *et al.*, 2011; Obata *et al.*, 2011; Sancini *et al.*, 2014; Yoshiura *et al.*, 2015)。本研究以我国甘肃阿克塞、青海茫崖、四川新康、陕西陕南四大矿区的天然温石棉为研究对象,用扫描电子显微镜、红外光谱和X射线荧光光谱分析粉尘形貌、表面活性基团和化学组分,并对Wistar大鼠进行多次非暴露式气管滴注染毒,观察各时间点大鼠支气管肺泡灌洗液(BALF)中乳酸脱氢酶(LDH)、碱性磷酸酶(AKP)和总蛋白(TP)含量的变化,以及肺组织中HO-1、HSP-70 mRNA和HO-1、HSP-70蛋白表达量的变化,为探讨温石棉致大鼠肺部损伤及其可能的机制提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂与仪器

主要仪器有 7200 型分光光度计(优尼柯上海仪器公司, FJ7200)、酶标仪(thermo Multiskan Spectrum)、卧式行星磨( QM-3SP4J, 南京大学仪器厂)、冷冻离心机(eppendorf, 5810R)、扫描电子显微镜(Libra 200FE, 德国蔡司公司)、红外光谱仪(Spectrum One, 美国 PE 仪器公司)、X 射线荧光光谱仪(PW1404, Philips)、DNA/RNA 测定仪(Nano-Drop 1000, 日本 Olympus 公司)和 96 孔 PCR 仪(ABI7900HT, Life technologies 公司)。

主要试剂有乳酸脱氢酶(LDH)、碱性磷酸酶(AKP)、总蛋白(TP)检测试剂盒(南京建成生物制品研究所), Trizol 试剂提取盒(北京天根生化科技有限公司), PrimeScript™ RT-PCR Kit 试剂(Takara 公司), BCA 蛋白定量试剂盒(巴傲得生物科技有限公司), 兔抗大鼠 HO-1 多克隆抗体(英国 Abcam 公司), 兔抗大鼠 HSP-70 多克隆抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司),  $\beta$ -actin 小鼠单克隆抗体(北京柏奥易杰科技有限公司), 辣根酶标记山羊抗兔 IgG(H+L)(北京柏奥易杰科技有限公司), 辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG(H+L)(北京柏奥易杰科技有限公司)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 样品制备及特性分析

受试物为我国甘肃阿克塞、青海茫崖、四川新康、陕西陕南四大矿区的天然温石棉。将 4 种矿石用高速粉碎机初步粉碎 2~3 min, 然后用行星磨机湿磨阿克塞温石棉 30 h、茫崖温石棉 18 h、新康温石棉 24 h、陕南温石棉 30 h, 收集矿浆, 置于 150℃ 烘箱内烘烤 2 h, 磨碎备用。采用扫描电子显微镜观察矿物粉尘形貌; 红外光谱仪分析研磨后的矿物粉尘表面活性基团, 扫描范围 4 000~400  $\text{cm}^{-1}$ ; X 射线荧光光谱仪分析矿物粉尘的主要化学组分和微量元素。

#### 1.2.2 实验动物与分组

选用的初断乳、4~6 周龄、体重 180~220 g 的 SPF 级 Wistar 大鼠雄鼠共 90 只, 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 5 组即阿克塞、茫崖、新康、陕南温石棉组和阴性对照组(生理

盐水), 每组 18 只, 分笼喂养, 适应性喂养 1 周。

#### 1.2.3 实验动物染毒与取材

称取 0.02 g 消毒温石棉粉体, 加入生理盐水和青霉素钠(8 000 U/mL), 制备成浓度 2.0 mg/mL 的温石棉悬液, 用前超声处理 30 min。采用非暴露式气管滴注法染毒大鼠, 每次 0.5 mL, 每月 1 次。阴性对照用生理盐水。滴注后自由饮水、进食。分别在滴注 1、6、12 个月时各取材 6 只, 迅速取出肺组织称量, 用 EP 管分装置 -80℃ 冰箱保存备用。生理盐水反复灌洗右肺 3 次后收集灌洗液(回收率 80% 以上)于离心管中即为支气管肺泡灌洗液(BALF)。

#### 1.2.4 大鼠 BALF 中 LDH、AKP 和 TP 的测定

BALF 中 LDH、AKP 和 TP 的含量分别采用 2,4-二硝基苯肼比色法、分光光度法、考马斯亮蓝法测定, 实验步骤按照试剂盒说明书严格操作, 观察我国四大矿区天然温石棉对大鼠肺损伤作用。

#### 1.2.5 大鼠肺组织 HO-1、HSP-70 mRNA 的表达

取肺组织, TRIzol 法抽提总 RNA, 逆转录反应, PCR 扩增。实验步骤按照试剂盒说明书严格操作。HO-1、HSP-70 和  $\beta$ -actin mRNA 引物序列见表 1。

表 1 HO-1、HSP-70 及  $\beta$ -actin mRNA 引物序列  
Table 1 Gene primer sequences of HO-1, HSP-70 and  $\beta$ -actin

	正向 5'→3'	反向 5'→3'	片段(bp)
HO-1	ACCTTCCCGAG CATCGACAA	TCTTAGCCTCTTCTG TCACCCCTGT	112
HSP-70	CCTTCGACG TGTCATCCTG	TGTCCTCTTGTGC TTCTCTTTC	147
$\beta$ -actin	ACGGTCAGG TCATCACTATCG	GGCATAGAGGCTC TTTACGGATG	155

注: HO-1 表示血红素氧化合酶 1 的基因, HSP-70 表示热休克蛋白 70 的基因。A 代表腺嘌呤, T 代表胸腺嘧啶, G 代表鸟嘌呤, C 代表胞嘧啶, 碱基按照一定的顺序排列, 序列中储存着遗传信息。

#### 1.2.6 大鼠肺组织 HO-1、HSP-70 蛋白的表达

将肺组织放入研钵中研磨, 加入蛋白抽提试剂和蛋白酶抑制剂, 提取蛋白样品, BCA 法测定蛋白浓度, 于 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳进行蛋白分离后转移至 PVDF 膜, 本实验采用湿转的转膜方式, 电流 130 mA, 电压 60 V 左右, 时间为 60 min。小心取出转移膜置于封闭液中, 室温、摇床上缓慢摇动状态下封闭 1 h, 将 HO-1 一抗(1:1 000)、HSP-70 一抗(1:1 000)、 $\beta$ -actin 一抗(1:5 000)用封闭液稀释, 将封闭后的膜直接放入一抗工作液中, 4℃ 孵育过夜, 次日用 TBST 洗膜 3 次, 后加入二抗, 室温反应 1 h, 再用

TBST 洗膜 3 次。将上述 PVDF 膜置于 ECL 显影液中,采集图像,ImageJ 软件扫描读取蛋白条带的灰度值并分析,以  $\beta$ -actin 为内参计算蛋白相对表达量。

### 1.2.7 数据分析

采用 SPSS19.0 软件进行统计分析。定量资料若服从正态分布,用  $\bar{x} \pm s$  描述;若方差齐采用单因素方差分析(ANOVA)进行统计推断,两两比较用 SNK-q

法检验,否则采用 Kruskal-Wallis 检验。检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

## 2 测试与结果

### 2.1 样品形貌

图 1 分别为阿克塞温石棉原样(A)与湿磨 30 h

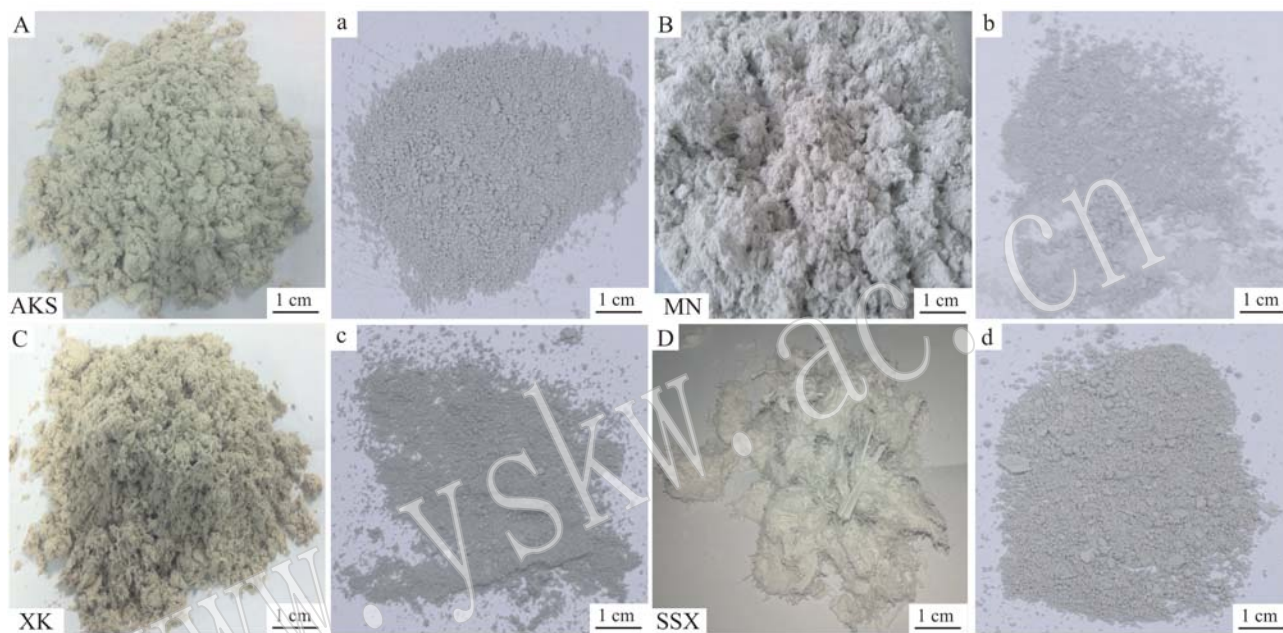


图 1 我国四大矿区天然温石棉样品形貌

Fig. 1 A photo of four natural chrysotile asbestos samples from major mining areas in China

A,a—AKS, 甘肃阿克塞温石棉组; B,b—MN, 青海茫崖温石棉组; C,c—XK, 四川新康温石棉组; D,d—SSX, 陕西陕南温石棉组; 下同  
A, a—AKS, Gansu Akesai chrysotile group; B, b—MN, Qinghai Mangnai chrysotile group; C, c—XK, Sichuan Xinkang chrysotile group;  
D, d—SSX, Southern Shaanxi chrysotile group; the same below

后制备的矿物粉体(a)、茫崖温石棉原样(B)与湿磨 18 h 后制备的矿物粉体(b)、新康温石棉原样(C)与湿磨 24 h 后制备的矿物粉体(c)、陕南温石棉原样(D)与湿磨 30 h 后制备的矿物粉体(d)的自然光下照片。湿磨后的矿物粉体保存备用用于后续体内滴注。

### 2.2 粉体显微形貌分析

扫描电镜图像显示,4 种温石棉粉尘的显微形态类似,均为纤维状,并掺杂有少量其他块状矿物。阿克塞温石棉为长纤维,形态较一致;茫崖温石棉为更细长的纤维,并与小而薄的块状结构混合;新康温石棉有团聚现象;陕南温石棉相对较短并且混合了薄块状结构(图 2)。

### 2.3 粉体红外光谱分析

如图 3 所示,我国四大矿区天然温石棉样品在各自 3 个研磨时间段后的红外光谱图吸收峰的峰位峰形基本相同。4 种温石棉 FTIR 图谱共同显示,1 622 和 1 618  $\text{cm}^{-1}$ 附近的吸收带转移到了更高的波数。3 695 ~ 3 650  $\text{cm}^{-1}$ 附近的吸收谱带是—OH 的吸收峰,主要由内外—OH 伸缩振动引起;1 050 ~ 950  $\text{cm}^{-1}$ 附近的吸收谱带主要由 Si—O 伸缩振动引起;650 ~ 600  $\text{cm}^{-1}$ 附近的吸收谱带主要由 Mg—O 伸缩振动引起。新康温石棉 1 630 和 1 455  $\text{cm}^{-1}$ 附近的吸收带发生了偏移。因为红外光谱对阳离子的质量和电价敏感,—OH 伸缩振动频率受到具有—OH配位的八面体阳离子的影响,导致了在低波数



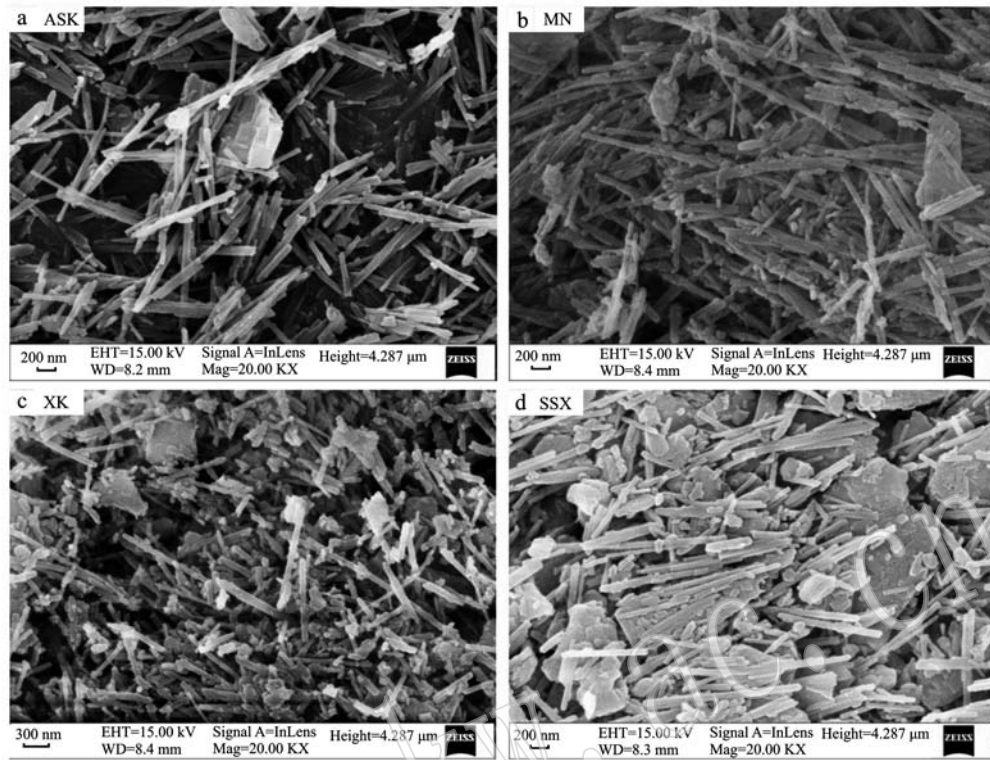


图 2 我国四大矿区天然温石棉矿物粉体的电镜扫描图片

Fig. 2 Scanning electron microscope images of four natural chrysotile asbestos in major mining areas of China

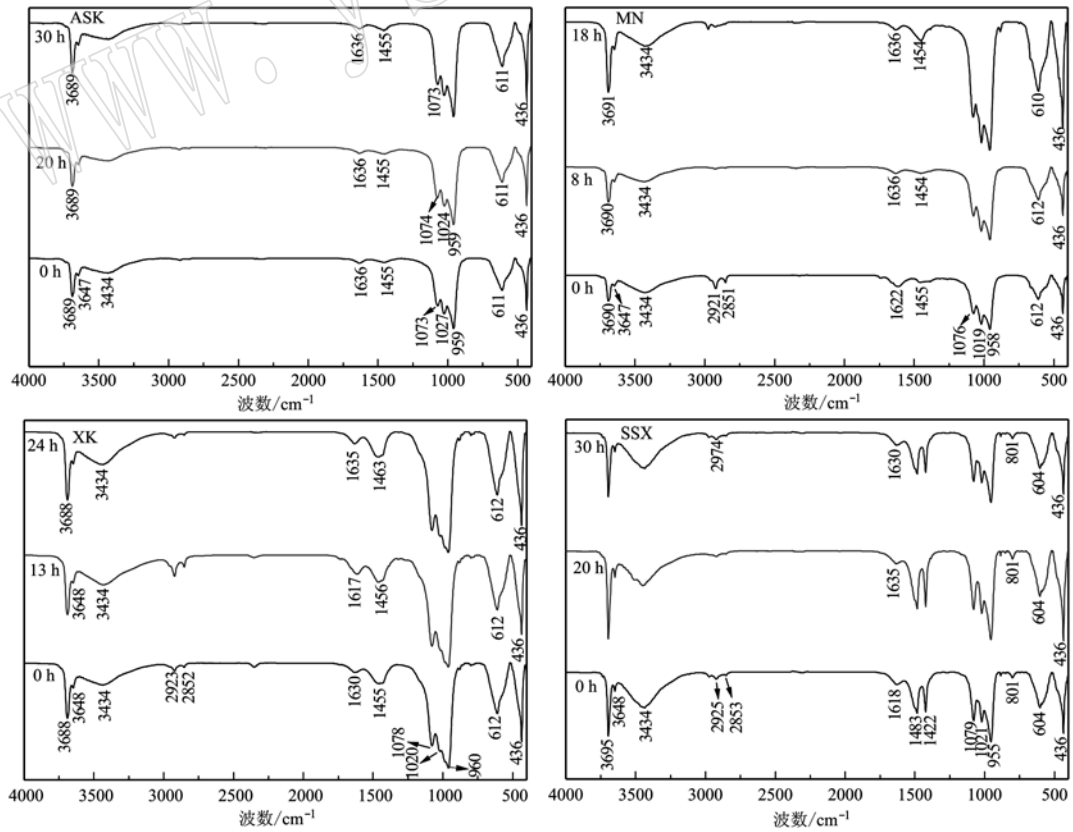


图 3 我国四大矿区天然温石棉不同研磨时间后矿物粉体的 FTIR 分析

Fig. 3 The FTIR analyses of four natural chrysotile asbestos in major mining areas of China at different grinding time spans

方向上的分裂和移动。阿克塞和陕南温石棉 1 060  $\text{cm}^{-1}$ 附近的 Si—O 伸缩振动带吸收分裂与新康温石棉相比有差异,表明这两种温石棉的晶体结构比茫崖和新康更完整。通过上述分析,初步确定 4 种石棉样品是温石棉,且经不同时间研磨后,其结晶度和化学活性基团未明显改变。

## 2.4 常量化学成分检测

我国四大矿区天然温石棉常量化学成分相似(表 2),主要由  $\text{SiO}_2$  和  $\text{MgO}$  组成,还含有少量的  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ 、 $\text{Al}_2\text{O}_3$ 。茫崖和新康温石棉  $\text{SiO}_2$  含量高于阿克塞和陕南温石棉,并且含较多  $\text{Al}_2\text{O}_3$  和  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ 。陕南温石棉中  $\text{SiO}_2$  含量最低, $\text{MgO}$  含量最高。

## 2.5 微量元素检测

表 2 显示,我国四大矿区天然温石棉矿物粉体的微量元素相似,主要含有 Cr、Ni、Mn、Ti 和 P 等元素。阿克塞和茫崖温石棉含有较多的 Cr 和 Ni,陕南温石棉含有较多的 Mn,新康温石棉含有较多的 P、Ti 和 Zr。

表 2 我国四大矿区天然温石棉矿物粉体的主量( $w_B/\%$ )和微量( $w_B/10^{-6}$ )元素含量

Table 2 Main chemical composition analysis ( $w_B/\%$ ) and trace chemical element content ( $w_B/10^{-6}$ ) of four natural chrysotile asbestos in major mining areas in China

样品	AKS	MN	XK	SSX
$\text{SiO}_2$	37.97	40.82	39.07	19.33
$\text{Al}_2\text{O}_3$	0.78	2.12	3.41	0.29
$\text{Fe}_2\text{O}_3$	3.65	4.97	4.80	3.58
$\text{MgO}$	34.57	39.20	39.59	49.14
CaO	0.45	0.34	1.96	0.17
$\text{Na}_2\text{O}$	0.05	0.15	0.11	0.04
$\text{K}_2\text{O}$	0.06	0.04	0.28	0.03
LOI	14.72	11.43	11.15	26.02
总量	92.25	99.07	100.37	98.60
Ba	0.00	12.95	4.72	45.29
Cr	1 159.03	1 102.91	423.76	501.03
Cu	32.87	17.76	31.65	0.00
Mn	526.80	509.13	835.81	1 596.08
Ni	1 883.75	2 088.64	1 662.07	1 401.89
P	63.18	44.43	129.83	47.01
Sr	20.61	23.99	48.19	19.34
Ti	753.27	318.77	935.35	289.96
Zr	0.00	1.93	22.12	0.00

## 2.6 温石棉染毒大鼠 BALF 中 LDH、AKP 和 TP 含量的变化

表 3 显示,染毒 1 个月时,与阴性对照组比较,阿克塞、茫崖和新康温石棉组 BALF 中 LDH 增高( $P < 0.05$ ),各温石棉组 AKP 和 TP 含量增高( $P < 0.05$ ),且茫崖温石棉组 LDH 高于其余温石棉

组( $P < 0.05$ ),新康温石棉组 LDH 高于陕南温石棉组( $P < 0.05$ ),茫崖温石棉组 AKP 高于其余温石棉组( $P < 0.05$ ),阿克塞、茫崖和新康温石棉组 TP 高于陕南温石棉组( $P < 0.05$ );染毒 6 个月和 12 个月时,与阴性对照组比较,各温石棉组 LDH、AKP 和 TP 含量均增高,且温石棉组两两之间比较均有差异( $P < 0.05$ ),茫崖和新康温石棉组高于阿克塞和陕南温石棉组( $P < 0.05$ )。阿克塞、茫崖和新康温石棉组的 LDH 以及各温石棉组 AKP、TP 含量都随着染毒时间延长呈上升趋势( $P < 0.05$ )。

## 2.7 HO-1、HSP-70 的 mRNA 和蛋白表达水平

染毒 1 个月时,与阴性对照组比较,各温石棉组大鼠肺组织中 HO-1、HSP-70 mRNA 以及 HO-1、HSP-70 蛋白表达水平均增高( $P < 0.05$ ),且温石棉组两

表 3 我国四大矿区天然温石棉对大鼠 BALF 中 LDH、AKP 和 TP 含量的影响( $n=6, \bar{x} \pm s$ )

Table 3 Effects of four natural chrysotile asbestos in major mining areas of China on the content of lactate dehydrogenase, alkaline phosphatase and total protein in alveolar lavage fluid of rats ( $n=6, \bar{x} \pm s$ )

组别	LDH(IU/L)		
	1 个月	6 个月	12 个月
NC	2.64 ± 0.25	5.23 ± 1.06 <sup>#</sup>	6.03 ± 0.46
AKS	4.47 ± 0.28 <sup>*</sup>	35.84 ± 1.16 <sup>*#</sup>	46.20 ± 1.06 <sup>*#</sup>
MN	12.91 ± 1.60 <sup>*a</sup>	107.33 ± 4.71 <sup>*#a</sup>	131.56 ± 1.39 <sup>*#a</sup>
XK	5.78 ± 0.26 <sup>*b</sup>	88.79 ± 9.63 <sup>*#ab</sup>	112.63 ± 0.70 <sup>*#ab</sup>
SSX	3.84 ± 0.33 <sup>bc</sup>	16.33 ± 4.30 <sup>*#abc</sup>	16.92 ± 0.58 <sup>*#abc</sup>
组别	AKP(U/100 mL)		
	1 个月	6 个月	12 个月
NC	0.25 ± 0.05	0.30 ± 0.01	0.32 ± 0.01
AKS	0.38 ± 0.01 <sup>*</sup>	3.05 ± 0.05 <sup>*#</sup>	4.12 ± 0.31 <sup>*#</sup>
MN	0.65 ± 0.07 <sup>*a</sup>	5.88 ± 0.18 <sup>*#a</sup>	6.92 ± 0.10 <sup>*#a</sup>
XK	0.42 ± 0.03 <sup>*b</sup>	4.18 ± 0.23 <sup>*#ab</sup>	5.74 ± 0.14 <sup>*#ab</sup>
SSX	0.37 ± 0.04 <sup>*b</sup>	1.42 ± 0.02 <sup>*#abc</sup>	1.91 ± 0.07 <sup>*#abc</sup>
组别	TP(mg/mL)		
	1 个月	6 个月	12 个月
NC	0.25 ± 0.01	0.26 ± 0.01	0.29 ± 0.01
AKS	0.34 ± 0.02 <sup>*</sup>	0.52 ± 0.01 <sup>*#</sup>	0.67 ± 0.01 <sup>*#</sup>
MN	0.35 ± 0.01 <sup>*</sup>	1.43 ± 0.01 <sup>*#a</sup>	1.79 ± 0.04 <sup>*#a</sup>
XK	0.35 ± 0.03 <sup>*</sup>	0.90 ± 0.06 <sup>*#ab</sup>	1.41 ± 0.03 <sup>*#ab</sup>
SSX	0.30 ± 0.01 <sup>*abc</sup>	0.45 ± 0.01 <sup>*#abc</sup>	0.58 ± 0.02 <sup>*#abc</sup>

注: NC 为阴性对照组;与相同染毒时间的阴性对照组比较,<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ;与同组前一染毒时间比较,<sup>#</sup> $P < 0.05$ ;与相同染毒时间的阿克塞温石棉组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与相同染毒时间的茫崖温石棉组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与相同染毒时间的新康温石棉组比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$ 。

两之间比较无差异( $P > 0.05$ );染毒6个月时,与阴性对照组比较,各温石棉组增高,且阿克塞和陕南温石棉组低于茫崖和新康温石棉组( $P < 0.05$ )。染毒

12个月时,与阴性对照组比较,茫崖和新康温石棉组降低,且阿克塞和陕南温石棉组高于茫崖和新康温石棉组( $P < 0.05$ )(图4)。

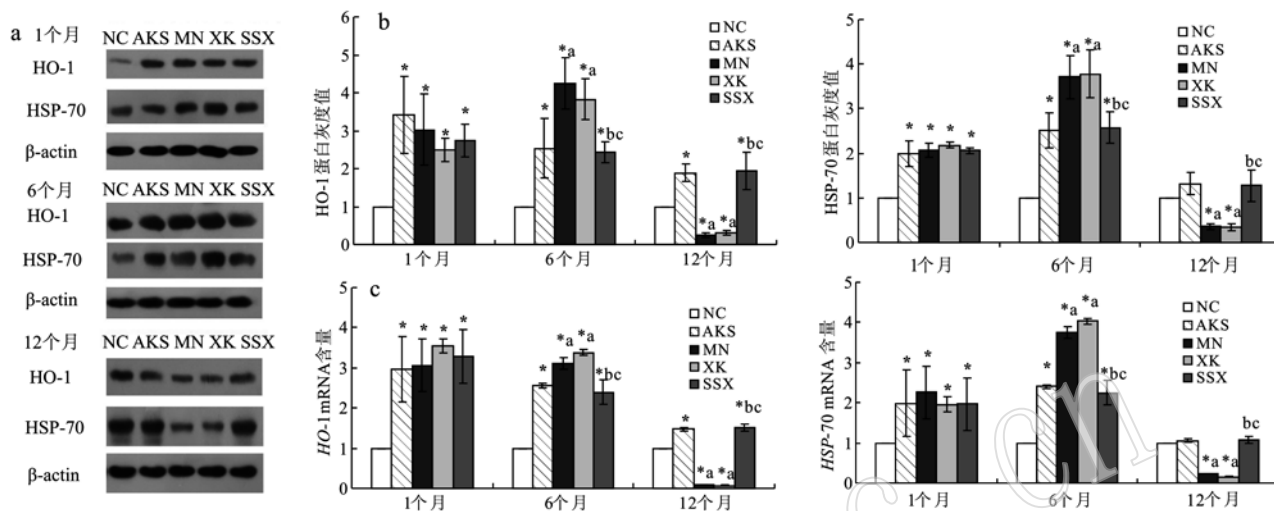


图4 我国四大矿区天然温石棉对大鼠肺组织HO-1、HSP-70的蛋白和mRNA表达的影响( $n=6, \bar{x} \pm s$ )

Fig. 4 Effects of four natural chrysotile asbestos in major mining areas in China on the expression of HO-1 and HSP-70 protein and mRNA in rat lung tissue ( $n=6, \bar{x} \pm s$ )

a—各温石棉组大鼠肺组织中HO-1和HSP-70蛋白凝胶电泳图;b—HO-1和HSP-70蛋白表达量;c—HO-1和HSP-70 mRNA表达量;NC为阴性对照组;与相同染毒时间的阴性对照组比较,\* $P < 0.05$ ;与相同染毒时间的阿克塞温石棉组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与相同染毒时间的茫崖温石棉组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与相同染毒时间的新康温石棉组比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$

a—HO-1 and HSP-70 protein gel electrophoresis; b—HO-1 and HSP-70 protein expression; c—HO-1 and HSP-70 mRNA expression in lung tissue of rats of each chrysotile group; NC, negative control group; \* $P < 0.05$ , different from the negative control group; <sup>a</sup> $P < 0.05$ , different from Gansu Akesai chrysotile group; <sup>b</sup> $P < 0.05$ , different from Qinghai Mangnai chrysotile group; <sup>c</sup> $P < 0.05$ , different from Sichuan Xinkang chrysotile group

### 3 讨论

BALF成分的变化可以较为敏感地反映肺对吸入毒物的反应和肺受损程度。LDH属胞浆酶,当肺部组织受到损伤时,血液或组织液渗漏到肺泡可导致LDH漏出量增多,从而作为反映毒物毒性的早期灵敏指标。AKP是一种常见的免疫标志酶,中性粒细胞浸润程度和肺泡Ⅱ型细胞受损程度与AKP含量的改变呈正比关系;血浆渗出的蛋白质是BALF中TP的主要来源,它能够作为肺部血管通透性的指标,肺泡上皮-毛细血管屏障损伤的程度可通过TP含量的变换来反映。本实验结果显示,阿克塞、茫崖和新康温石棉组LDH以及各温石棉组AKP和TP含量在各时间点高于阴性对照组且都随着染毒时间延长呈上升趋势。徐斌(2016)在探讨细颗粒物PM<sub>2.5</sub>对人肺泡上皮细胞A549损伤的研究中发现,随着染毒浓度和时间的增加,LDH含量增加,说明细颗粒物

PM<sub>2.5</sub>对人肺泡上皮细胞A549的损伤可以引起LDH增加。Wang G等(2013)在探讨臭氧和细颗粒物暴露对大鼠肺部影响的实验中发现,染毒3周后大鼠BALF中AKP和TP的含量与阴性对照组相比增加明显,提示臭氧和细颗粒物联合暴露会造成大鼠肺部损伤。在实验中也发现随着染毒时间的延长,我国不同矿区的4种温石棉染毒组BALF中AKP和TP的含量增多。综上,大鼠暴露于温石棉后,BALF中LDH、AKP和TP含量发生了变化,这说明我国四大矿区天然温石棉可导致大鼠肺部生化功能障碍,温石棉进入肺部后可通过改变中性粒细胞和肺泡Ⅱ型细胞的细胞膜通透性或使细胞受损,使各种细胞酶渗出增加,对肺组织具有毒性损伤作用,在一定程度上可导致大鼠肺泡上皮-毛细血管屏障损伤及肺部炎症。

HO-1对多种呼吸系统疾病有保护作用,HSP-70作为分子伴侣参与细胞调控和维持细胞内多种蛋白的正确构象及功能,具有减轻肺损伤的生物学功能。

我国四大矿区天然温石棉可造成大鼠肺部损伤,那么对肺组织中 HO-1 和 HSP-70 表达有何影响? 本实验结果显示,各温石棉组在染毒 1 和 6 个月时大鼠肺组织 HO-1、HSP-70 mRNA 和 HO-1、HSP-70 蛋白表达量与阴性对照组比显著增高。有研究观察到小鼠急性暴露于细颗粒物 PM<sub>2.5</sub> 后,肺组织中 HO-1、HSP-70 蛋白的表达量高于阴性对照组 (Farina *et al.*, 2011; Sancini *et al.*, 2014),大鼠气管内滴注 TiO<sub>2</sub> 纳米粒子或石棉纤维后,大鼠肺部 HO-1 mRNA 和 HO-1 蛋白含量均增加 (Obata *et al.*, 2011; Yoshiura *et al.*, 2015),以上都提示颗粒物和纤维物质造成肺部损伤可能与 HO-1 和 HSP-70 有关。而有研究报道肺组织中 HO-1 和 HSP-70 表达的减少意味着肺部生物转化或解毒作用变缓慢 (Beere *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2005),本研究结果显示,青海茫崖和四川新康温石棉组 HO-1、HSP-70 mRNA 和 HO-1、HSP-70 蛋白表达量在染毒 12 个月时比阴性对照和阿克塞和陕南温石棉组低。这可能是其对肺组织损伤作用较强引起解毒和修复作用缓慢导致的。由此推测,当机体受到温石棉纤维短时间刺激时,产生应激反应使 HO-1、HSP-70 保护性机制启动,通过表达量增加来减轻细胞的损伤,但是长时间毒性较强的温石棉刺激可能削弱了机体免疫监视及清除功能,导致 HO-1、HSP-70 mRNA 和 HO-1、HSP-70 蛋白表达量下降。

Sporn (2011) 和 Hamra 等 (2017) 发现肺组织的损伤与温石棉纤维的结构、尺寸大小和生物持久性有关。本研究结果显示,我国四大矿区天然温石棉矿物粉体大多排列成细长纤维束状。Li 和 Fukagawa (2010) 认为温石棉纤维可通过呼吸进入肺内,如不能排出,可被肺泡巨噬细胞吞噬或穿透上皮细胞而进入肺间质,从而在体内持续停留很长时间造成肺部损伤,提示温石棉纤维可能对大鼠肺部造成不同程度的机械损伤。本研究采用的是未提纯的 4 种天然温石棉,X 射线荧光光谱分析显示阿克塞、茫崖、新康温石棉主要含有 SiO<sub>2</sub> 和 MgO,陕南温石棉中的 SiO<sub>2</sub> 含量较低,MgO 含量较高,杂质含量不同可能是各温石棉样品成分不同的原因之一。Darne 等 (2016) 通过微核实验和彗星实验证实了 SiO<sub>2</sub> 的遗传毒性,提示温石棉毒性强弱可能和 SiO<sub>2</sub> 含量有关。4 种温石棉成分对比显示,陕西陕南温石棉中 MgO 含量较高,SiO<sub>2</sub> 含量较低,前期课题组 XRD 结果 (Zeng *et al.*, 2018) 显示陕南温石棉中含水镁石,

这可能是其 MgO 含量较高的原因之一。孟丽娟等 (2005) 发现 Mg 可维护膜结构的完整性,对大鼠肺损伤有保护作用,提示 Mg 含量较高可能是陕西陕南温石棉毒性较弱的原因。本研究中茫崖、新康温石棉主要含有较多的 Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 和 Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>。Huo 等 (2018) 推测 Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 可增强纤维的毒性,Toyokuni (2014) 发现涂铁石棉纤维能像锋利的刀一样使间皮细胞内的 DNA 双键断裂,巨噬细胞和间皮细胞里 Fe<sup>2+</sup> 的长期沉积能够诱发氧化应激,从而促进致癌作用,它们均提示 Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 和 Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 含量较高可能是茫崖、新康温石棉毒性较高的原因。本研究微量元素检测结果显示,茫崖温石棉含有最多的 Cr、Ni,其次是阿克塞、新康和陕南温石棉,四川新康温石棉含有较多 Ti。温石棉中的微量元素可进入肺部的弱酸环境并溶解,因此微量元素的局部浓度增加了生物毒性 (Zeng *et al.*, 2018)。有研究表明 Cr、Ni 等元素可能与肿瘤发生有关 (Scimeca *et al.*, 2014; Cao *et al.*, 2016; Halasova *et al.*, 2016; Tomioka *et al.*, 2016),Sun 等 (2012) 发现小鼠暴露于 TiO<sub>2</sub> 纳米粒子 90 天后发生了炎症反应和氧化应激肺毒性反应它们均提示较多的 Cr、Ni 和 Ti 微量元素可能是茫崖和新康温石棉毒性较高的原因。

## 4 结论

(1) 我国四大矿区天然温石棉可引起 BALF 中 3 种肺损伤指标增加,对大鼠肺组织有毒性作用,可导致大鼠肺泡上皮-毛细血管屏障损伤以及肺部炎症。

(2) 长期染毒后,茫崖和新康温石棉可引起大鼠体内 HO-1、HSP-70 mRNA 和 HO-1、HSP-70 蛋白表达量下降,导致大鼠肺部损伤。

(3) 茫崖和新康温石棉致大鼠肺损伤作用强于阿克塞和陕南温石棉,作用强度差异的原因可能与其形态与杂质含量有关。

## 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]. Lyon: International Agency for Research on Cancer (IARC), 1~418.
- Beere H M, Wolf B B, Cain K, *et al.* 2000. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome [J]. *Nature Cell Biology*, 2(8): 469~475.
- Cao H, Gao F, Xia B, *et al.* 2016. The co-induced effects of molybde-

- num and cadmium on the mRNA expression of inflammatory cytokines and trace element contents in duck kidneys[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 133: 157 ~ 163.
- Courtice M N, Lin S and Wang X. 2012. An updated review on asbestos and related diseases in China[J]. *International Journal of Occupational and Environmental Health*, 18(3): 247 ~ 253.
- Darne C, Coulais C, Terzetti F, *et al.* 2016. In vitro comet and micronucleus assays do not predict morphological transforming effects of silica particles in Syrian Hamster Embryo cells[J]. *Mutation Research Genetic Toxicology & Environmental Mutagenesis*, 796: 23 ~ 33.
- Farina F, Sancini G, Mantecca P, *et al.* 2011. The acute toxic effects of particulate matter in mouse lung are related to size and season of collection[J]. *Toxicology Letters*, 202(3): 209 ~ 217.
- Halasova E, Matakova T, Skerenova M, *et al.* 2016. Polymorphisms of selected DNA repair genes and lung cancer in chromium exposure[J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 911: 17 ~ 22.
- Hamra G B, Richardson D B, Dement J, *et al.* 2017. Lung cancer risk associated with regulated and unregulated chrysotile asbestos fibers[J]. *Epidemiology*, 28(2): 275 ~ 280.
- 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.
- Li H M, Niki T, Taira T, *et al.* 2005. Association of DJ-1 with chaperones and enhanced association and colocalization with mitochondrial Hsp70 by oxidative stress[J]. *Free Radical Research*, 39(10): 1 091 ~ 1 099.
- 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.
- Meng Lijuan, Wang Xueting, Li Zhengbin, *et al.* 2005. Experimental study on the effect of magnesium on acute lung injury[J]. *Chinese Journal of Critical Care Medicine*, 25(6): 441 ~ 443 (in Chinese).
- Obata Y, Morimoto Y, Hirohashi M, *et al.* 2011. Expression of heme oxygenase-1 in lung of rat exposed to potassium octatitanate whiskers[J]. *Journal of Occupational Health*, 53(4): 267 ~ 273.
- Sancini G, Farina F, Battaglia C, *et al.* 2014. Health risk assessment for air pollutants: Alterations in lung and cardiac gene expression in mice exposed to Milano Winter fine particulate matter (PM<sub>2.5</sub>) [J]. *PLOS One*, 9(10): e109685.
- Scimeca M, Orlandi A, Terrenato I, *et al.* 2014. Assessment of metal contaminants in non-small cell lung cancer by EDX microanalysis [J]. *European Journal of Histochemistry Ejh*, 58(3): 2 403.
- Shi Haiyan and Mao Ling. 2009. Research progress on health hazards and safe use of asbestos[J]. *Shanghai Journal of Preventive Medicine*, 21(3): 125 ~ 127, 134 (in Chinese).
- Song J M, Liu H X, Li Y, *et al.* 2008. Extracellular heat-shock protein 70 aggravates cerulein-induced pancreatitis through toll-like receptor-4 in mice[J]. *Chinese Medical Journal*, 121(15): 1 420 ~ 1 425.
- Song R, Mahidhara R S, Liu F, *et al.* 2002. Carbon monoxide inhibits human airway smooth muscle cell proliferation via mitogen-activated protein kinase pathway[J]. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 27(5): 603 ~ 610.
- Sporn T A. 2011. Mineralogy of asbestos[J]. *Recent Results Cancer Research*, 189: 1 ~ 11.
- 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.
- Tomioka K, Saeki K, Obayashi K, *et al.* 2016. Risk of lung cancer in workers exposed to benzidine and/or beta-naphthylamine: A systematic review and meta-analysis[J]. *Journal of Epidemiology*, 26(9): 447 ~ 458.
- Toyokuni S. 2014. Iron overload as a major targetable pathogenesis of asbestos-induced mesothelial carcinogenesis[J]. *Redox Report Communications in Free Radical Research*, 19(1): 1 ~ 7.
- Wagener F A, Eggert A, Boerman O C, *et al.* 2001. Heme is a potent inducer of inflammation in mice and is counteracted by heme oxygenase [J]. *Blood*, 98(6): 1 802 ~ 1 811.
- Wang G, Jiang R, Zhao Z, *et al.* 2013. Effects of ozone and fine particulate matter (PM<sub>2.5</sub>) on rat system inflammation and cardiac function [J]. *Toxicology Letters*, 217(1): 23 ~ 33.
- Wang X, Courtice M N and Lin S. 2013. Mortality in chrysotile asbestos workers in China[J]. *Current Opinion Pulmonary Medicine*, 19(2): 169 ~ 173.
- Xu Bin. 2016. Study on Oxidative Damage of Human alveolar Epithelial Cells A549 by Air PM<sub>2.5</sub> in Shijiazhuang City[D]. Shijiazhuang: Hebei Medical University (in Chinese).
- Yang Fangming. 2002. State economic and trade commission announces the elimination of backward production capacity, processes and products[J]. *China Plant Engineering*, 1(7): 56 ~ 57 (in Chinese).
- Yoshiura Y, Izumi H, Oyabu T, *et al.* 2015. Pulmonary toxicity of well-dispersed titanium dioxide nanoparticles following intratracheal instillation[J]. *Journal of Nanoparticle Research*, 17(6): 241.
- Zeng Y, Cui Y, Ma J, *et al.* 2018. Lung injury and expression of p53 and p16 in Wistar rats induced by respirable chrysotile fiber dust from four primary areas of China[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(23): 22 389 ~ 22 399.

## 附中文参考文献

- 孟丽娟, 王学廷, 李正斌, 等. 2005. 镁对急性肺损伤作用的实验研究[J]. *中国急救医学*, 25(6): 441 ~ 443.
- 施海燕, 毛翎. 2009. 石棉的健康危害及安全使用研究进展[J]. *上海预防医学杂志*, 21(3): 125 ~ 127, 134.
- 徐斌. 2016. 石家庄市空气 PM<sub>2.5</sub> 对人肺泡上皮细胞 A549 的氧化损伤研究[D]. 石家庄: 河北医科大学.
- 杨方明. 2002. 国家经贸委公布淘汰落后生产能力、工艺和产品的目录[J]. *中国设备工程*, 1(7): 56 ~ 57.