

基于多次非暴露式气管滴注的染毒法研究温石棉致大鼠肺损伤的作用

柏 珺¹, 崔 琰¹, 张青碧¹, 霍婷婷², 查雨欣¹, 邓建军³

(1. 西南医科大学 公共卫生学院, 四川 泸州 646000; 2. 西南科技大学, 四川 绵阳 621000;

3. 四川绵阳四〇四医院 检验科, 四川 绵阳 621000)

摘 要: 温石棉是一种安全性存在争议的石棉, 合理可行并且能够真实反映其暴露致病过程的染毒方法对深入研究其致病机理有着重要意义。本文采用多次非暴露式气管滴注的染毒方法对雄性 Wistar 大鼠分别进行不同浓度温石棉悬液的染毒, 在染毒 1、3 和 6 个月记录体重和肺脏系数, 观察肺组织大体及苏木素-伊红(HE)染色的病理形态, 对支气管肺泡灌洗液(BALF)中白细胞总数进行分类计数, 并测定总蛋白(TP)、乳酸脱氢酶(LDH)、酸性磷酸酶(ACP)和碱性磷酸酶(AKP)的含量。结果表明, 多次滴注的方式大鼠死亡率较低, 并且每次滴注后能够苏醒的大鼠没有死亡发生; 随着四川新康温石棉染毒时间的延长和染毒剂量增加, 大鼠体重增长缓慢, 肺脏系数升高, 肺大体出现水肿、肉芽肿、萎缩实质化, HE 染色观察则表现为炎性细胞增多、肺泡结构遭到破坏以及出现纤维化; 随着染毒时间的延长, 支气管肺泡灌洗液(BALF)中的白细胞总数、中性粒细胞和淋巴细胞百分比呈上升趋势, 巨噬细胞百分比呈下降趋势, TP、LDH、ACP 和 AKP 均表现为上升的趋势, 并呈现一定的剂量-效应关系。综上所述, 多次非暴露式气管滴注方法可用于模拟温石棉慢性暴露的致病过程, 四川新康温石棉可以通过破坏巨噬细胞、肺泡上皮细胞及肺泡上皮-毛细血管屏障造成大鼠的肺损伤。

关键词: 多次非暴露式气管滴注; 温石棉; Wistar 大鼠; 肺损伤

中图分类号: P619.27⁺1; R322.3⁺5

文献标识码: A

文章编号: 1000-6524(2017)06-0916-09

The lung injury induced by chrysotile asbestos in rats based on the multiple non-exposed intratracheal instillation

BAI Jun¹, CUI Yan¹, ZHANG Qing-bi¹, HUO Ting-ting², ZHA Yu-xin¹ and DENG Jian-jun³

(1. School of Public Health, Southwest Medical University, Luzhou 646000, China; 2. Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621000, China; 3. Mianyang No. 404 Hospital, Mianyang 621000, China)

Abstract: Chrysotile asbestos is a kind of asbestos that is controversial in safety, and it is of great significance to study its pathogenesis in a reasonable and feasible way to reflect its exposure process. A multiple non-exposed intratracheal instillation method was used to expose male Wistar rats under the condition of different concentrations of chrysotile asbestos. After exposure for 1, 3 and 6 months, the rats' body weight and lung coefficient were recorded, and pulmonary tissue and HE Staining slices were observed. The bronchoalveolar lavage fluid (BALF) was collected to measure the change of different kinds of white cells, total protein (TP), lactate dehydrogenase (LDH), acid phosphatase (ACP) and alkaline phosphatase (AKP). The results showed that a low mortality was

收稿日期: 2017-08-31; 接受日期: 2017-10-10

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(41472046); 四川省科技厅自然科学基金(14JC0126); 西南医科大学基金资助计划(2015-YJ124)

作者简介: 柏 珺(1987-), 女, 汉族, 博士, 讲师, 研究方向: 环境污染健康效应, E-mail: baijunjill@gmail.com; 通讯作者: 邓建军, 女, 主任技师, 主要从事职业病防治研究, E-mail: jianjundeng0801@163.com。

presented by using the multiple intratracheal instillation method. The body weight increased slowly and lung coefficient increased with the time and dosage. The edema, granuloma and atrophy appeared in pulmonary tissue. The increased inflammatory cells, destroyed alveolar and fibrosis were observed by HE staining. Chrysotile asbestos induced the increase of total white cells, the neutrophils and lymphocytes percentages, but the reduction of the macrophages percentage in BALF. The values of TP, LDH, ACP and AKP in exposure groups were higher than those in control group with a significant dose-response correlation. All these results prove that the multiple intratracheal instillation method could be used to simulate the chronic exposure of chrysotile asbestos. The Xinkang chrysotile asbestos could induce lung injury through destroying the lymphocytes, alveolar epithelial cells and alveolar epithelial-capillary barrier.

Key words: multiple non-exposed intratracheal instillation; chrysotile asbestos; Wistar rats; lung injury

Fund support: National Natural Science Foundation of China (41472046); Natural Science Foundation of Sichuan Science and Technology Department (14JC0126); Fund Project of Southwest Medical University (2015-YJ124)

石棉因为容易导致肺部纤维化和恶性肿瘤(肺癌、间皮瘤等)等肺部疾病(Shukla *et al.*, 2003),已被许多国家完全禁用(WHO, 2014)。我国在2002年也宣布禁止使用危害严重的角闪石类石棉,但温石棉仍然有着较大的生产和消费量,超过100万人直接从事着与温石棉相关的行业(Courtice *et al.*, 2012)。温石棉的生物安全性在国际上依然存在争议(Yarborough, 2007; Vanchugova *et al.*, 2008; Ferro *et al.*, 2014)。流行病学调查显示,温石棉也会导致肺部纤维化、恶性肿瘤等(Wang *et al.*, 2014; Hamra *et al.*, 2017),不少体外实验也表明温石棉具有细胞毒性(邓建军等, 2009; 曾娅莉等, 2013; Qi *et al.*, 2013),但基于动物的体内实验研究较少,致病机制尚不明确。

非暴露式气管滴注是实验动物经呼吸道染毒的常见方法之一,目前温石棉动物实验研究大多基于此方法的一次性染毒的方式进行(Nagatomo *et al.*, 2008; Takata *et al.*, 2009; Cyphert *et al.*, 2012),虽然都能观察到肺部病变过程,但温石棉在实际环境中是持续慢性暴露并致病的,一次大剂量染毒法可能并不能准确地反映其致病过程。因此本研究拟基于非暴露式气管滴注法,采用慢性暴露的方式,即用不同浓度的四川新康温石棉对Wistar大鼠进行多次染毒,从而更好地模拟温石棉实际的暴露过程所致大鼠的肺部损伤,观察不同染毒时间大鼠肺部的病理变化,并通过支气管肺泡灌洗液(BALF)中白细胞计数、总蛋白(TP)、乳酸脱氢酶(LDH)、酸性磷酸酶(ACP)和碱性磷酸酶(AKP)等指标的变化进一步观察大鼠肺部损伤情况,从而综合评估该染毒方法

的可行性,为更深入开展温石棉致癌等作用机制研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

初断乳SPF级雄性Wistar大鼠84只,体重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),饲养于西南医科大学实验动物中心SPF级动物实验室,自由饮食饮水,室温 23 ± 2 °C,相对湿度50%~70%,光照每12 h明暗交替,适应性喂养1周以上。

1.1.2 主要试剂与仪器

受试物为四川新康温石棉(由西南科技大学提供,95%以上粒径为 $0.5 \sim 2.0$ μm)(查雨欣等, 2017);总蛋白(TP)、乳酸脱氢酶(LDH)、酸性磷酸酶(ACP)、碱性磷酸酶(AKP)检测试剂盒(南京建成生物制品研究所);酶标仪(Thermo Multiskan Spectrum);7200型分光光度计(优尼柯上海仪器公司, FJ7200);冷冻离心机(Eppendorf, 5810R);普通光学显微镜(Leica020-518.500)。

1.2 方法

1.2.1 温石棉悬液配制及实验分组

称取经消毒灭菌后的四川新康温石棉粉尘,加入生理盐水,分别配制为低、中、高浓度,即0.5、2.0、8.0 mg/mL的悬浮液,每次使用前超声振荡30 min使其分散均匀。84只大鼠随机分配为4组,即低、

中、高浓度温石棉染毒组和阴性对照组(生理盐水), 每组 21 只, 分笼饲养。

1.2.2 实验动物模型的建立

非暴露式气管滴注 (intratracheal instillation, IT): 用浓度为 2% 的戊巴比妥钠以 0.35 mL/100 g 体重进行腹腔内注射麻醉。麻醉大鼠仰卧放置于 15°~20° 倾斜的平台上, 并将上切牙固定在鼠板边缘, 采用透射光插管法 (Cambron *et al.*, 1995) 进行套管的气管插管, 插管成功之后, 取出管芯, 竖起大鼠手术台, 将吸有染毒液的注射器连接套管接口, 轻推注射器将吸取的 0.5 mL 液体完全滴注入大鼠肺组织, 快速沿导管注入 1~2 mL 空气, 以便于滴注受试物向大鼠肺组织深处扩散, 滴注完毕后, 用口镜再次观察随着大鼠呼吸是否有水雾出现, 以确认导管是否仍在大鼠气管之中。保持大鼠手术台继续竖立 1~2 min, 待呼吸平稳后方可将其平卧。大鼠苏醒前, 为防止唾液进入气管造成堵塞, 导管需继续置于气管中, 随着大鼠意识恢复, 可缓慢自行咳出导管, 待其四肢能自由活动后放回饲养笼中。

采用上述方法滴注 3 种不同浓度的温石棉悬液, 滴注频率 1 次/月, 持续时间为 6 个月, 阴性对照组使用生理盐水以相同的方式进行滴注, 滴注后自由饮水、进食。

1.2.3 取材及标本处理

分别在染毒 1、3 和 6 个月后各组麻醉处死 6 只大鼠, 完整取出大鼠的肺脏及气管, 用生理盐水洗净并用滤纸将表面的水吸干后称重。随后用止血钳将左侧肺叶结扎, 将外径为 1.8 mm 的静脉导管插入气管并用橡皮筋绑紧, 用注射器向导管内缓慢注入 3 mL 预冷的生理盐水, 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)。将 BALF 离心 (4℃、1 000 r/min、10 min), 上清液 -80℃ 保存待测, 底部沉淀的细胞加入 30 μ L PBS 重新悬浮, 取 10 μ L 细胞悬液涂于细胞计数板上, 在光镜下计数细胞总数, 余下细胞悬液涂片

经 Giemsa 染色后至少计数 200 个细胞, 分别统计中性粒细胞、巨噬细胞和淋巴细胞的数量。

选取左侧肺叶主支气管周围肺组织, 经生理盐水反复冲洗后, 置于 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。

1.2.4 BALF 中 TP、LDH、ACP 和 AKP 的测定

BALF 中 TP、LDH、ACP 和 AKP 的含量分别采用考马斯亮蓝法、2, 4-二硝基苯肼比色法和分光光度法测定, 测试均按试剂盒说明书进行操作 (南京建成试剂盒)。

1.3 统计方法

所有实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据的统计分析, 组间均数比较采用单因素方差分析 (ANOVA), 两两比较采用 SNK-*q* 法检验, 若方差不齐则采用 Kruskal-Wallis 检验 $P < 0.05$ 具有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠一般情况

为保证每组 6 只的取材数, 进行实验的大鼠共 84 只, 染毒过程中死亡 6 只, 其中阴性对照组和中剂量组在第一次染毒时各死亡 1 只, 染毒 5 个月以后低中高剂量组分别死亡 1、1 和 2 只。阴性对照组大鼠毛发浓密、光亮、顺滑, 活动灵活, 饮水饮食正常; 各染毒组 1 个月和 3 个月时, 和阴性对照组比在一般状态上没有明显改变; 6 个月时, 染毒组大鼠饮水饮食有所减少、不喜运动, 毛发蓬松, 精神不振, 蜷缩成团, 个别表现焦躁, 随着剂量增加症状越明显。

染毒 3 个月时, 中、高浓度组大鼠体重低于阴性对照组, 高浓度组大鼠肺脏器系数高于阴性对照组 ($P < 0.05$); 而染毒 6 个月后低、中、高浓度组大鼠体重均低于阴性对照组, 肺脏器系数均高于阴性对照组 ($P < 0.05$), 数据见表 1。

表 1 不同时间、不同剂量染毒大鼠体重及肺脏器系数变化 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 The change of body and lung viscera coefficient for exposure to chrysotile in different time spans and does ($\bar{x} \pm s$)

组别	体重/g				肺脏器系数/%		
	初重	1 个月	3 个月	6 个月	1 个月	3 个月	6 个月
阴性对照	268.00 $\pm$ 8.32	433.70 $\pm$ 13.66	601.50 $\pm$ 14.72	732.50 $\pm$ 23.46	0.45 $\pm$ 0.03	0.33 $\pm$ 0.02	0.26 $\pm$ 0.01
0.5 mg/mL	273.00 $\pm$ 8.54	438.00 $\pm$ 28.12	579.00 $\pm$ 23.56	629.50 $\pm$ 23.16*	0.43 $\pm$ 0.02	0.35 $\pm$ 0.04	0.37 $\pm$ 0.02*
2.0 mg/mL	280.00 $\pm$ 7.65	436.30 $\pm$ 27.55	553.00 $\pm$ 18.51*	613.00 $\pm$ 27.35*	0.42 $\pm$ 0.01	0.37 $\pm$ 0.03	0.40 $\pm$ 0.01*
8.0 mg/mL	274.00 $\pm$ 9.29	425.00 $\pm$ 35.21	546.00 $\pm$ 21.13*	616.00 $\pm$ 20.54*	0.46 $\pm$ 0.01	0.40 $\pm$ 0.05*	0.46 $\pm$ 0.08*

注: * 与相同染毒时间的阴性对照组比较, $P < 0.05$, $n = 6$ 。

2.2 肺组织病理观察

2.2.1 肺组织大体观察

阴性对照组肺组织大体呈粉红色，表面光滑，质地柔软，轮廓清晰(图 1a)；染毒 1 个月各组肺轻微肿胀，海绵样病变(图 1b)；染毒 3 个月各组双肺颜色加深，低中剂量染毒组出现肿胀(图 1c)，高剂量染毒组

肺组织萎缩(图 1e)，肺组织表面粗糙，有不均匀分布的灰白色肉芽肿(图 1c、1e 箭头所示)，肺下叶质地变硬，随染毒剂量增加症状加剧；染毒 6 个月各组双肺呈灰白色，肺组织严重萎缩，实质化，并出现大片石棉斑(图 1e、1f 箭头所示)。

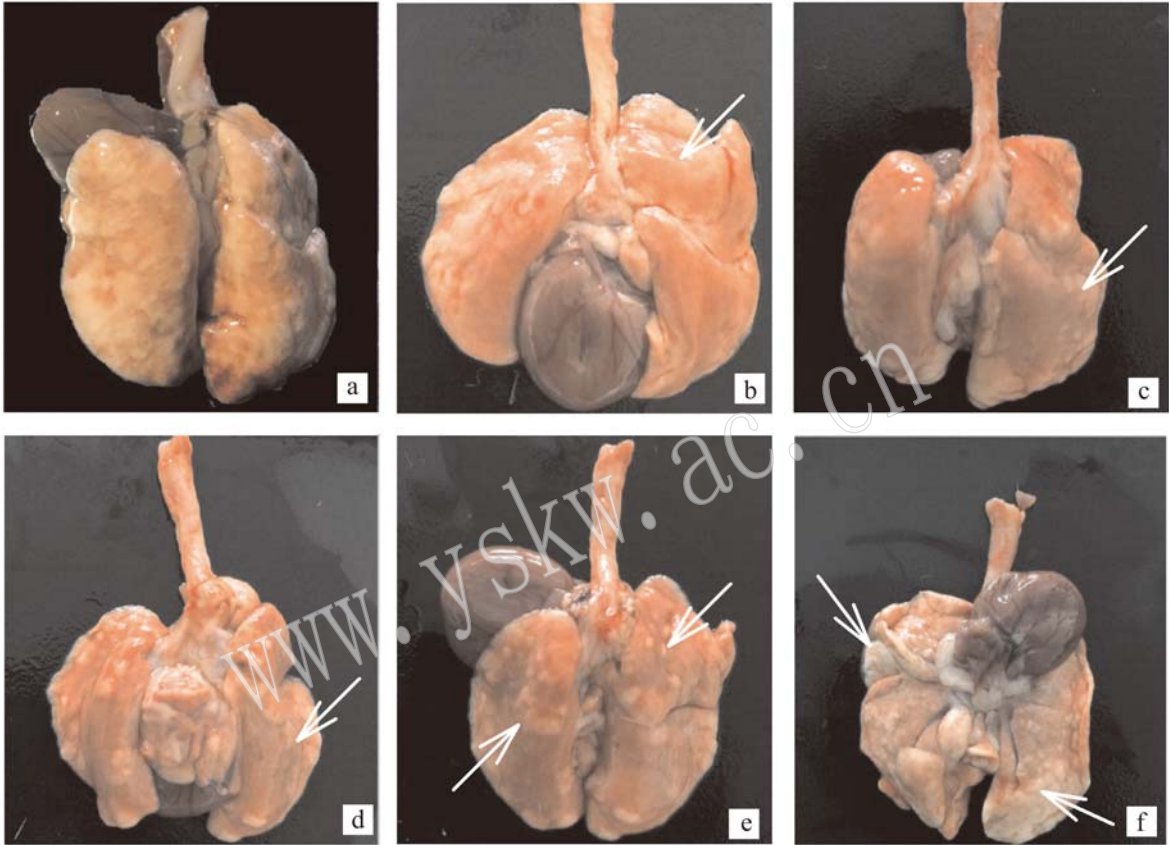


图 1 实验大鼠肺组织标本

Fig. 1 The gross morphology of rats' lung tissues

a—阴性对照组 1 个月；b—0.5 mg/mL 染毒 1 个月；c、d—2.0 mg/mL 染毒 3、6 个月；e、f—8.0 mg/mL 染毒 3、6 个月
a—control treatment for 1 month; b—0.5 mg/mL exposure for 1 month; c, d—2.0 mg/mL exposure for 3 and 6 months;
e, f—8.0 mg/mL exposure for 3 and 6 months

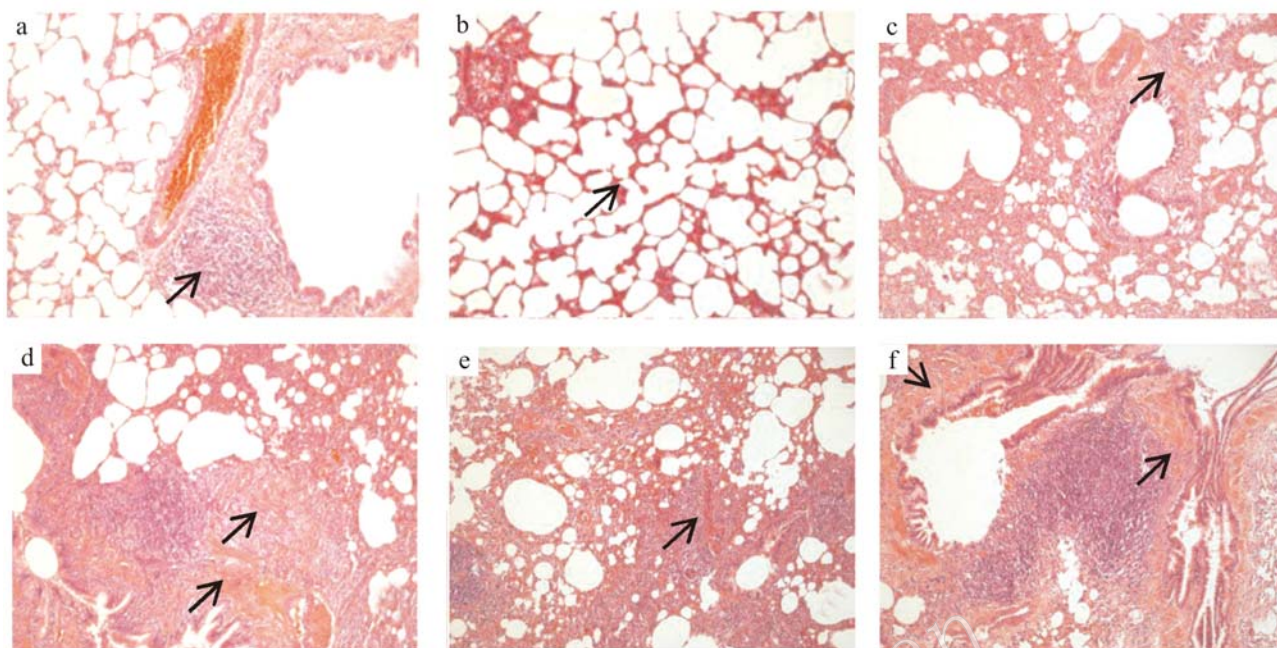
2.2.2 肺组织 HE 染色观察

大鼠肺组织 HE 染色结果如图 2 所示，阴性对照组肺组织结构清晰，形态正常，只有在染毒 6 个月时在支气管周围有少量炎性细胞浸润(图 2a 箭头所示)；染毒 1 个月各染毒组炎性细胞增多，轻微的肺间隔增宽，肺泡结构遭到破坏(图 2b 箭头所示)；染毒 3 个月上述现象进一步加重，并出现肺间隔断裂，部分肺泡塌陷，肺泡融合，支气管周围及肺间质少量纤维组织增生(图 2c、2e 箭头所示)；染毒 6 个月肺间隔大范围断裂塌陷，肺泡结构破坏严重，支气管周围

及肺间质可见大面积纤维化(图 2e、2f)；上述现象随着剂量增加而加重。

2.3 BALF 中白细胞总数及其分类计数

各组 BALF 中白细胞总数及巨噬细胞、中性粒细胞和淋巴细胞的分类计数结果如图 3 所示。阴性对照组在第 6 个月时，较前两个时间点其白细胞总数和中性粒细胞、淋巴细胞百分比升高，巨噬细胞百分比下降($P<0.05$)；各剂量染毒组 BALF 中，除低剂量染毒 1 个月时的淋巴细胞和巨噬细胞百分比与对照组没有显著差异，白细胞总数、中性粒细胞和淋

图2 大鼠肺组织的病理变化($\times 200$)Fig. 2 The histopathologic change of rats' lung tissues ($\times 200$)

a—阴性对照组 6 个月; b—0.5 mg/mL 染毒 1 个月; c、d—2.0 mg/mL 染毒 3、6 个月; e、f—8.0 mg/mL 染毒 3、6 个月

a—control treatment for six months; b—0.5 mg/mL exposure for 1 month; c, d—2.0 mg/mL exposure for 3 and 6 months; e, f—8.0 mg/mL exposure for 3 and 6 months

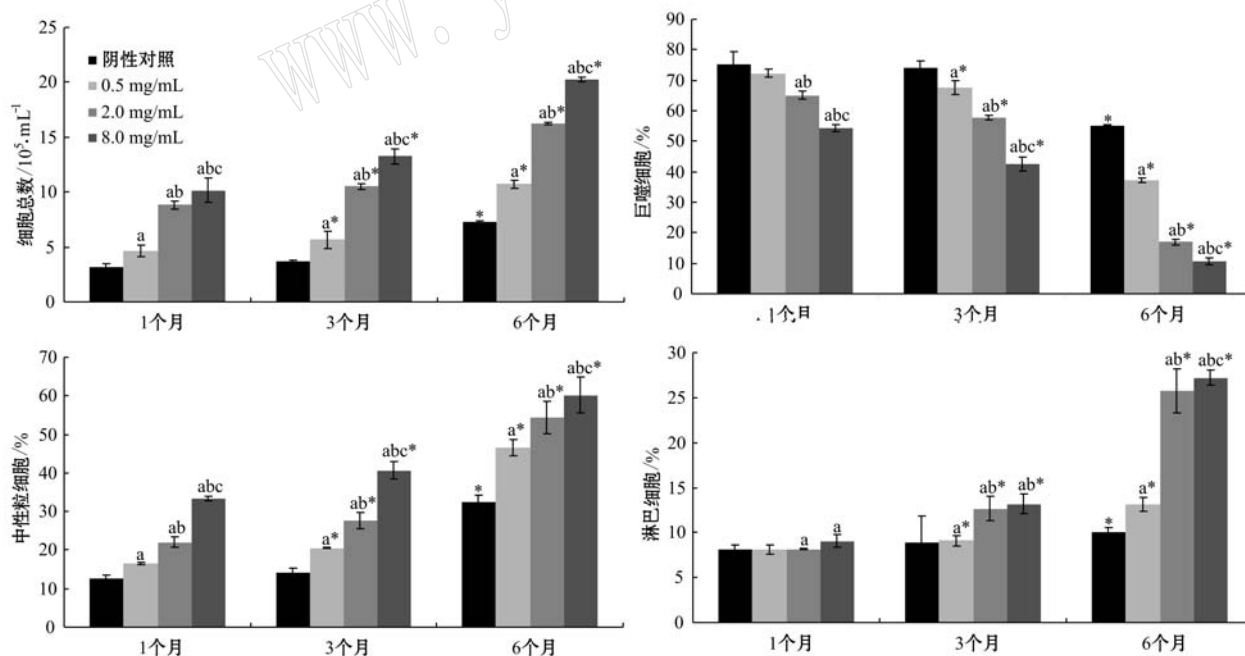


图3 BALF 中白细胞总数和巨噬细胞、中性粒细胞、淋巴细胞的百分含量

Fig. 3 The total cell numbers and percentage of macrophages, neutrophils and lymphocytes in BALF

a—与相同染毒时间的阴性对照组比较; b—与相同染毒时间的 0.5 mg/mL 剂量组比较; c—与相同染毒时间的 2.0 mg/mL 剂量组比较,

 $P < 0.05$, $n = 6$; *—与同组前一染毒时间比较, $P < 0.05$, $n = 6$

a—comparison with the control group at the same exposure time; b—comparison with the 0.5 mg/mL group at the same exposure time;

c—comparison with the 2.0 mg/mL group at the same exposure time, $P < 0.05$, $n = 6$;*—comparison with the data previously sampled in the same group, $P < 0.05$, $n = 6$

巴细胞的百分比均高于对照组,并随着浓度和时间的增加而升高($P<0.05$),巨噬细胞百分比均低于对照组,并随着浓度和时间的增加而降低($P<0.05$)。

2.4 BALF 中 TP、LDH、ACP 和 AKP 含量的改变

各组 BALF 中 TP 和 LDH 的含量如图 4 所示,阴性对照组各指标均未发生变化,TP 和 LDH 的含

量,除染毒 1 个月时低中浓度组没有差异外,3 个月和 6 个月均随着浓度和染毒时间的增加而升高($P<0.05$);各组 BALF 中 ACP 和 AKP 的含量如图 4 所示,除染毒 1 个月时低中浓度组没有差异和 3 个月时中高浓度组没有差异外,其染毒时段均随着浓度和染毒时间的增加而升高($P<0.05$)。

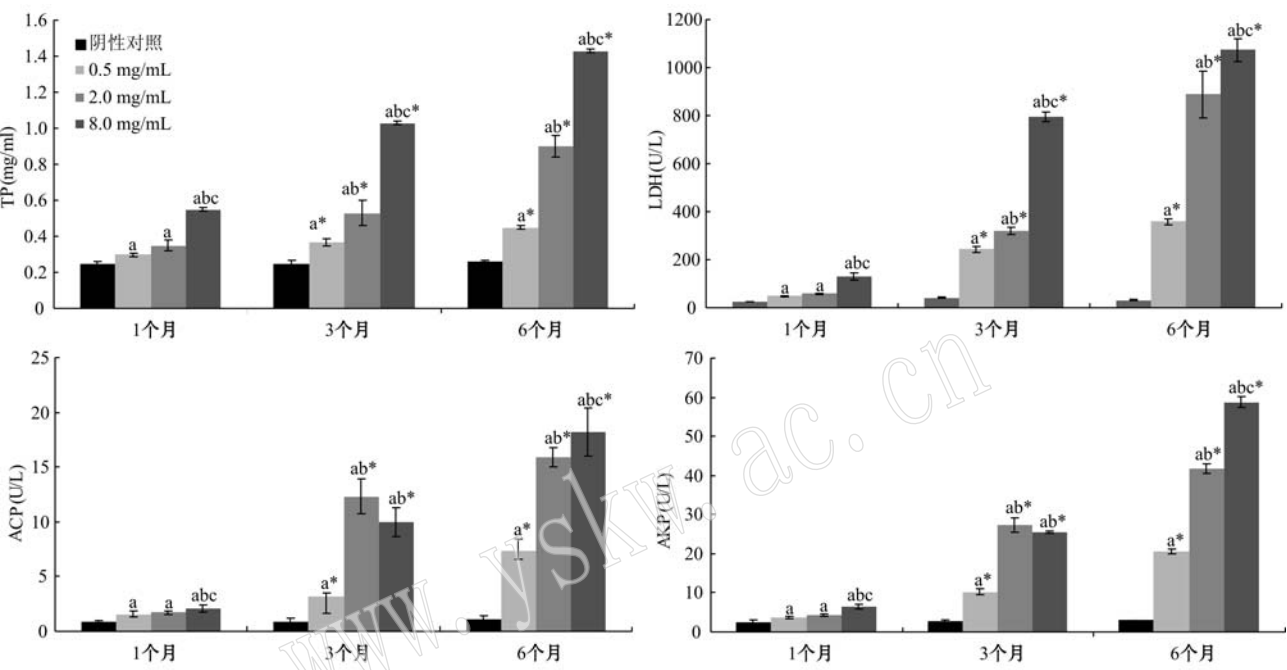


图 4 BALF 中 TP、LDH、ACP 和 AKP 的含量

Fig. 4 The content of TP, LDH, ACP and AKP in BALF

a—与相同染毒时间的阴性对照组比较; b—与相同染毒时间的 0.5 mg/mL 剂量组比较; c—与相同染毒时间的 2.0 mg/mL 剂量组比较, $P<0.05$, $n=6$; *—与同组前一染毒时间比较, $P<0.05$, $n=6$

a—comparison with the control group at the same exposure time; b—comparison with the 0.5 mg/mL group at the same exposure time; c—comparison with the 2.0 mg/mL group at the same exposure time, $P<0.05$, $n=6$; *—comparison with the data previously sampled in the same group, $P<0.05$, $n=6$

3 讨论

温石棉同其他类型的石棉相似,主要是加工过程中产生的粉尘纤维(Li and Fukagawa, 2010)可经呼吸作用进入体内,自然呼吸染尘法虽然更接近于其吸入方式但往往很难保证实验动物吸入量的一致性,而非暴露气管滴注染毒安全性高、动物死亡率低(Driscoll *et al.*, 2000),适用于温石棉致慢性肺部疾病的动物模型制作。本研究基于非暴露气管滴注的方法,以 1 次/月的频率对 Wistar 大鼠进行持续 6 个月的不同浓度温石棉的慢性染毒,染毒过程中死亡 6

只大鼠,其中阴性对照组和中剂量组各 1 只因麻醉过深自主呼吸停止而死亡,低剂量组 1 只、中剂量组 1 只和高剂量组 2 只在实验后期可能因滴注后悬液堵塞窒息死亡,尤其是高浓度组更容易导致窒息死亡,其余染毒后能够正常苏醒的大鼠均未出现死亡。这说明用非暴露式气管滴注方式进行多次染毒的方法在技术操作上是可行的,在实际实验过程中首先应注意观察麻醉后大鼠的反应,其次在滴注后及时给予肺部适量通气以保证温石棉充分的扩散,再次应注意发生窒息时及时采取急救措施,从而更有效地降低动物的死亡率。

大鼠经温石棉染毒后,其体重较阴性对照组增

长缓慢,染毒时间越长影响越明显,对大鼠生活情况的观察也发现,随着染毒时间延长,其饮食饮水量降低,说明温石棉对大鼠的一些生理活动有一定影响。阴性对照组肺脏器系数呈现降低的趋势,而染毒3~6个月的大鼠肺脏器系数逐渐升高,并且高于阴性对照组,染毒浓度越高时间越长越显著,可能是温石棉进入肺部后,引起肺组织的炎性病变、细胞浸润、肺部水肿,逐渐形成肉芽肿,致使肺部纤维组织增生,肺组织质量增加(周效宝, 2011),而大鼠的体重较阴性对照增长缓慢,因此导致肺脏器系数的升高。从肺组织大体的观察也可发现,染毒后肺组织均有不同程度水肿出现,并且逐渐由不均匀的灰白色病灶到大片病灶形成,染毒后期肺组织萎缩并实质化。而大鼠肺组织 HE 染色进一步显示各染毒组肺组织变化为:炎性细胞增多、肺间隔增宽、淋巴细胞聚集、肺泡结构遭到破坏以及出现纤维化,并随着染毒时间的延长和染毒剂量增加上述现象逐渐加重,尤其是在染毒进行6个月后,肺泡结构严重破坏,出现大面积的纤维化,肺部损伤严重,通过本研究的染毒方法成功观察到温石棉所致大鼠的肺损伤。早在 Drew 等(1987)的研究中就比较过一次和多次气管滴注的方法研究玻璃纤维对大鼠的慢性作用,结果表明多次气管滴注的方法使得玻璃纤维在大鼠肺部的分布规律与自然吸入方法的更接近。郑志仁等(1991)的研究采用一次滴注的方式对大鼠染毒 25 mg 新康温石棉,结果染毒后 3 d 就能出现严重的炎性反应,7 d 后就有肉芽肿形成,14 d 就能导致严重的纤维化,本文研究的高剂量组累积染毒量为 24 mg,但染毒第3个月才开始观察到少量纤维化发生,第6个月才导致严重纤维化,染毒后大鼠肺部病变进程与超声雾化新康石棉吸入染毒大鼠得到的结果(刘慧等, 2014)更为接近,说明本研究所采用的染毒方法或许更能准确反映机体慢性暴露于温石棉并致病的过程。

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性反应的加重,这被认为是温石棉致肺部损伤非常重要的机制(Li and Fukagawa, 2010)。BALF 中白细胞总数是炎症损伤程度总的标志物(Muller *et al.*, 2005),巨噬细胞具有很强的吞噬功能,但一旦崩解会释放大量的炎性因子,并渗出大量中性粒细胞参与炎性反应,而淋巴细胞

参与的免疫应答也进一步激活巨噬细胞和中性粒细胞参与炎性过程(Brown *et al.*, 2000; Gerlofs-Nijland *et al.*, 2005)。本研究对 BALF 中白细胞总数及分类计数结果表明,随着温石棉染毒剂量和时间增加,白细胞总数、中性粒细胞和淋巴细胞的百分比增加,说明温石棉引起了肺组织的炎性反应,而巨噬细胞的百分比呈现下降趋势,说明温石棉造成了巨噬细胞的崩解,进一步加重肺部炎性反应,也为肺部纤维化提供了基础。

BALF 中 TP 主要来自于血浆渗出,TP 水平可反映肺泡上皮-毛细血管屏障损伤程度(钱春燕等, 2011);LDH 属于胞浆酶,来源于血液或肺损伤后组织渗漏,是反映细胞膜损伤的早期敏感指标,是细胞毒性标志物(Shvedova *et al.*, 2008),I 型上皮细胞损坏及吞噬细胞的破裂均可引起 LDH 增加(刘平安等, 2015);ACP 为溶酶体酶,在巨噬细胞中含量较多,当肺巨噬细胞发挥吞噬作用而崩解死亡后,大量 ACP 进入肺灌洗液中(钱春燕等, 2011);AKP 主要由肺泡 II 型细胞产生,部分由中性粒细胞产生,其含量提示了肺泡 II 型细胞受损程度和中性粒细胞浸润程度(Punithavathi *et al.*, 2000)。本研究结果显示,染毒组的 TP 含量、LDH、ACP 和 AKP 的活性较阴性对照组显著升高,并有随着染毒剂量和时间的增加而增加的趋势。这说明温石棉进入肺部后可通过改变巨噬细胞、I 型上皮细胞、肺泡 II 型细胞的细胞膜通透性或使细胞死亡,使各种细胞酶渗出增加,并且还能破坏肺泡上皮-毛细血管屏障。在病理观察中,发现温石棉导致了肺部纤维化的发生,进一步对 BALF 中巨噬细胞计数及 LDH、ACP 的含量分析也发现,温石棉会导致巨噬细胞的凋亡崩解,从而促使纤维化的发生。肺泡上皮-毛细血管屏障被认为是防止肺损伤后肺水肿形成的重要屏障(Matthay *et al.*, 2002),温石棉能够破坏此屏障导致肺水肿形成,而肺泡上皮细胞的通透性改变会导致液体漏入肺泡腔(Matthay *et al.*, 2002),同时受损的肺泡上皮细胞也不能发挥其液体转运功能,导致进入肺泡的液体不能及时清除,会造成肺泡性肺水肿(Matthay *et al.*, 2002),甚至造成肺泡结构的破坏。

4 结论

(1) 基于非暴露式气管滴注的多次染毒方式,无论温石棉浓度大小,均能观察到温石棉所致大鼠

不同程度的肺损伤,并且相对于一次性染毒法更适用于反映机体慢性暴露于温石棉并致病的过程。

(2) 温石棉进入大鼠肺部后诱导炎症反应发生,破坏巨噬细胞,导致肺组织纤维化损伤;对肺泡上皮-毛细血管屏障和肺泡上皮细胞的破坏,导致肺部水肿加重、肺泡结构破坏等损伤作用发生。

References

- Brown D M, Stone V, Findlay P, *et al.* 2000. Increased inflammation and intracellular calcium caused by ultrafine carbon black is independent of transition metals or other soluble components[J]. *Occupational & Environmental Medicine*, 57(10): 685~691.
- Cambron H, Latulippe J F, Nguyen T, *et al.* 1995. Orotracheal intubation of rats by transillumination[J]. *Laboratory Animal Science*, 45(3): 303~304.
- Courtice M N, Lin S and Wang X. 2012. An updated review on asbestos and related diseases in China[J]. *International Journal of Occupational & Environmental Health*, 18(3): 247~253.
- Cyphert J M, Nyska A, Mahoney R K, *et al.* 2012. Sumas mountain chrysotile induces greater lung fibrosis in Fischer344 rats than Libby amphibole, El Dorado tremolite, and Ontario ferroactinolite[J]. *Toxicological Sciences An Official Journal of the Society of Toxicology*, 130(2): 405~415.
- 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(in Chinese with English abstract).
- Drew R T, Kuschner M and Bernstein D M. 1987. The chronic effects of exposure of rats to sized glass fibres[J]. *Annals of Occupational Hygiene*, 31(4B): 711~729.
- Driscoll K E, Costa D L, Hatch G, *et al.* 2000. Intratracheal instillation as an exposure technique for the evaluation of respiratory tract toxicity: Uses and limitations[J]. *Toxicological Sciences An Official Journal of the Society of Toxicology*, 55(1): 24~35.
- Ferro A, Zebedeo C N, Davis C, *et al.* 2014. Amphibole, but not chrysotile, asbestos induces anti-nuclear autoantibodies and IL-17 in C57BL/6 mice[J]. *Journal of Immunotoxicology*, 11(3): 283~290.
- Gerlofs-Nijland M E, Boere A J F, Leseman D L, *et al.* 2005. Effects of particulate matter on the pulmonary and vascular system: Time course in spontaneously hypertensive rats[J]. *Particle & Fibre Toxicology*, 2(1): 1~14.
- 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.
- 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 IL-1 β and oxidative stress [J]. *Free Radical Biology & Medicine*, 49(supplement): S133.
- Liu Hui, Yang Chenlu, Cheng Weibo, *et al.* 2014. Observation on lung injury of rats caused by ultrasonic atomizing asbestos fiber suspension[J]. *Occupation and Health*, 30(18): 2 574~2 577(in Chinese with English abstract).
- Liu Ping'an, Mo Yang, Zhang Guomin, *et al.* 2015. Study of effects of rhodiola rosea on rats of acute lung injury induced by fine particles PM_{2.5}[J]. *Journal of Traditional Chinese Medicine University of Hunan*, 35(7): 5~7 (in Chinese with English abstract).
- Matthay M A, Folkesson H G and Clerici C. 2002. Lung epithelial fluid transport and the resolution of pulmonary edema[J]. *Physiological Reviews*, 82(3): 569~600.
- Muller J, Huanx F, Moreau N, *et al.* 2005. Moreau N. Respiratory toxicity of multi-wall carbon nanotubes[J]. *Toxicology & Applied Pharmacology*, 207(3): 221~231.
- Nagatomo H, Morimoto Y, Ogami A, *et al.* 2007. Change of heme oxygenase-1 expression in lung injury induced by chrysotile asbestos in vivo and in vitro[J]. *Inhalation Toxicology*, 19(4): 317~323.
- Punithavathi D, Venkatesan N and Babu M. 2000. Curcumin inhibition of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats[J]. *British Journal of Pharmacology*, 131(2): 169~172.
- Qi F, Okimoto G, Jube S, *et al.* 2013. Continuous exposure to chrysotile asbestos can cause transformation of human mesothelial cells via HMGB1 and TNF- α signaling[J]. *American Journal of Pathology*, 183(5): 1 654~1 666.
- Qian Chunyan, Li Li, Gao Zhiyi, *et al.* 2011. Pneumotoxicity and hematoxicity of airborne fine particles and lead compounds on rats [J]. *J. Environ. Occup. Med.*, 28(1): 20~24(in Chinese).
- Shukla A, Gulumian M, Hei T K, *et al.* 2003. Multiple roles of oxidants in the pathogenesis of asbestos-induced diseases[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 34(9): 1 117~1 129.
- Shvedova A A, Kisin E, Murray A R, *et al.* 2008. Inhalation vs. aspiration of single-walled carbon nanotubes in C57BL/6 mice: Inflammation, fibrosis, oxidative stress, and mutagenesis[J]. *American Journal of Physiology Lung Cell Molec Physiology*, 295(4): L552~L565.

- Takata A, Yamauchi H, Toya T, *et al.* 2009. Forsterite exposure causes less oxidative DNA damage and lung injury than chrysotile exposure in rats[J]. *Inhalation Toxicology*, 21(9): 739~746.
- Vanchugova N N, Kashanskii S V, Tregubov E S, *et al.* 2008. Experimental basis for possible tumors induction in descendants after placental transmission of chrysotile asbestos fibers[J]. *Meditina Truda I Promyshlennaia Ekologiya*, (3): 33~37.
- Wang X R, Lin S H, Yano E, *et al.* 2014. Exposure-specific lung cancer risks in Chinese chrysotile textile workers and mining workers[J]. *Lung Cancer*, 85(2): 119~124.
- WHO. 2014. Chrysotile asbestos[J]. Geneva World Health Organization.
- Yarborough C M. 2007. The risk of mesothelioma from exposure to chrysotile asbestos[J]. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, 13(4): 334~338.
- Zeng Yali, Wang Hongzhou, Dong Faqin, *et al.* 2013. The effects of chrysotile and its four substitutes from two major production areas of China on the expression of oncoprotein in V79 cells[J]. *Acta Petrologica et Mineralogica*, 32(6): 803~808(in Chinese with English abstract).
- Zha Yuxin, Cui Yan, Bai Jun, *et al.* 2017. Representative chrysotile asbestos in different regions-induced oxidative damage in wistar rats[J]. *Journal of Toxicology*, 31(4): 50~55(in Chinese with English abstract).
- Zheng Zhiren and Zeng Lin. 1991. Different dust induced alveolar inflammation in rats[J]. *Chinese Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 7(1): 45~48(in Chinese).
- Zhou Xiaobao. 2011. Study on the Variation of Inflammatory Factors in BALF of Rats Exposed to Silicious Dust Early[D]. Jinan: Jinan University (in Chinese with English abstract).

附中文参考文献

- 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.
- 刘慧, 杨晨璐, 程薇波, 等. 2014. 超声雾化石棉纤维悬液致大鼠肺损伤的观察[J]. *职业与健康*, 30(18): 2574~2577.
- 刘平安, 莫阳, 张国民, 等. 2015. 红景天对细颗粒物PM_{2.5}所致急性肺损伤大鼠干预作用的研究[J]. *湖南中医药大学学报*, 35(7): 5~7.
- 钱春燕, 李丽, 高知义, 等. 2011. 大气细颗粒物及铅化合物对大鼠肺及血液的毒性[J]. *环境与职业医学*, 28(1): 20~24.
- 曾娅莉, 王洪州, 董发勤, 等. 2013. 我国温石棉与其4种代用品致V79细胞肿瘤蛋白谱表达的影响[J]. *岩石矿物学杂志*, 32(6): 803~808.
- 查雨欣, 崔琰, 柏珺, 等. 2017. 不同地域的典型温石棉对wistar大鼠的氧化损伤作用[J]. *毒理学杂志*, 31(4): 50~55.
- 郑志仁, 曾林. 1991. 不同粉尘诱发大鼠肺泡炎的病理研究[J]. *临床与实验病理学杂志*, 7(1): 45~48.
- 周效宝. 2011. 矽肺早期BALF中炎症因子变化规律的实验研究[D]. 济南: 济南大学.