

模拟大气混合污染物对大鼠肺表面蛋白 A 影响*

肖纯凌 李舒音 尚德志 赵肃 赵辉 王任群

摘要:目的 筛选敏感的生物标志物,探讨大气混合污染物对肺泡 II 型上皮细胞(AT-II)的损伤及其机制,为控制大气污染的危害提供理论依据。方法 使用便携式 PM_{2.5} 采样器和 47mm 玻璃纤维滤膜采集大气粉尘样品,制成生理盐水混悬液,实验大鼠气管注入混悬液及动态吸入 SO₂、NO₂、CO 混合气,制备大气混合污染物吸入动物模型,测定染毒不同时间血清及支气管肺泡灌洗液(BALF)中肺表面活性蛋白(SP-A)水平,肺组织中 SP-A 的 mRNA 及蛋白表达。结果 染毒 7 d 组大鼠肺组织中 SP-A mRNA 表达为 1.816 ± 1.299,明显高于染毒 1、30 d 组(0.930 ± 0.587; 0.902 ± 0.378)及对照组;染毒 30 d 组大鼠肺组织中 SP-A 表达吸光度值为 0.385 ± 0.068,明显低于染毒 7 d 组(0.438 ± 0.069)及对照组;染毒 30 d 组大鼠 BALF 中 SP-A 水平为 47.09 ± 5.78,明显低于染毒 1、7 d 组(54.72 ± 6.15; 58.82 ± 9.76)及对照组;染毒 30 d 组大鼠血清中 SP-A 水平明显高于染毒 1、7 d 组及对照组。结论 SP-A 是反映 AT-II 功能受损严重程度的肺特异性指标。

关键词: 大气污染物;肺表面活性蛋白(SP-A);肺泡 II 型上皮细胞(AT-II)

中图分类号: R 114

文献标志码: A

文章编号: 1001-0580(2012)01-0046-03

Effects of air pollutants on SP-A mRNA expression in pulmonary tissue of rats XIAO Chun-ling, LI Shu-yin, SHANG De-zhi et al. Department of Pathogenic Microorganism, Shenyang Medical College(Shenyang 110034, China)

Abstract: Objective To screen sensitive biologic markers and to explore the mechanism of the damage in pulmonary alveolus type II epithelial cell(AT-II) exposed to atmospheric mix pollutants. **Methods** The air particulate samples were collected with portable sampler for particulate matter of 2.5 μm in diameter and glass fiber filter(47 mm). The particulates collected were mixed with normal saline and gavaged into trachea of the rats inhaling mixed air of sulfur dioxide, nitrogen dioxide and carbon monoxide. The effects of air pollutants on pulmonary surfactant-associated protein A(SP-A) expression in pulmonary tissue, blood, bronchoalveolar lavage fluid(BALF) of the rats were determined. **Results** The SP-A mRNA expression level in pulmonary tissue 7 days after the exposure(1.86 ± 1.299) was significantly decreased compared to that of rats with 1 or 30 days exposure(0.930 ± 0.587, 0.902 ± 0.378) and that of the control group. The SP-A expression level in pulmonary tissue in 30 days exposure group was significantly decreased compared to 7 days exposure and the control group. The SP-A expression level in BALF of the rats with 30 days exposure was significantly decreased compared to that of with 1 or 7 days exposure and the control group. The SP-A expression level in blood in 30 days exposure group was significantly decreased compared to 1 day, 7 days exposure and the control group. **Conclusion** SP-A reflects the function of lung alveolus type II cells and SP-A could be used as a specific indicator of lung function.

Key words: air pollutant; SP-A; AT-II

大气污染对健康的影响是近年来研究的热点。流行病学研究表明,空气中的细颗粒物(粒径 ≤ 2.5 μm, PM_{2.5})、SO₂ 等与慢性阻塞性肺部疾病、心脏病及肺癌的死亡率相关;肺功能的显著降低与暴露于酸性气体、NO₂ 和 PM_{2.5} 有关;城市大气污染与炎症、氧化应激、血凝及心率紊乱均有关,而且这些效应主要是由交通污染中的硫酸盐和臭氧引起,可见大气污染所致的负健康效应是多种污染物共同作用的结果^[1-4]。肺表面活性物质相关蛋白 A(pulmonary surfactant-associated protein A, SP-A)主要由肺泡 II 型上皮细胞(alveolar type II cell, AT-II)和远端细支气管的非纤毛上皮细胞(Clara 细胞)合成和分泌,是肺部表面活性物质的重要组成部分之一,功能较为复杂,可在肺部特异性高表达。肺泡 II 型上皮细胞损伤后,一方面可诱导上皮通透性增加,降低表面活性物质的合成,导致肺气肿以及肺泡结构的破坏,另一方面,可诱发细胞因子和生长因子不适当地产生,导致肺泡结构的重建^[5-7]。为了探讨大气污染物对肺泡 II 型上皮细胞(AT-II)的损伤及其损伤

机制,筛选敏感的生物标志物,控制大气污染对人类健康损害提供理论依据,本研究选择 Wistar 大鼠,采用模拟大气污染现状的混合污染物进行染尘染毒,观察大鼠肺表面活性物质相关蛋白 A 的变化。结果报告如下。

1 材料与方

1.1 材料 (1) 仪器与试剂:细颗粒物(PM_{2.5})便携式采样器、47mm 玻璃纤维滤膜(美国 Air Metrics 公司);HOPE-MED 8050E 液气类动式染毒控制装置、体积 30 cm × 30 cm × 30 cm 有机玻璃染毒柜(天津合普公司);SO₂、NO₂、CO 的氮气标准混合气(大连特种气体产业公司-国家标准物质资质认证);RNA 保存液(天泽基因工程有限公司);总 RNA 提取试剂盒(美国 QIAGEN 公司);逆转录试剂盒(大连宝生物工程有限公司);荧光染料 SYBR Green(美国 TIANGEN 公司);一抗(兔抗大鼠,美国 USCN LIFE SCIENCE & TECHNOLOGY COMPANY);二抗(山羊抗兔)、免疫组化染色剂及二氨基联苯胺显色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司);ELISA 试剂盒(美国 RD 公司,上海活乐生物科技有限公司);PLUS384 型全自动酶标仪(美国 MD 公司)。(2) 实验动物:SPF 级 Wistar 大鼠(合格证号 SCXK(京)200220001;北京维通利华实验动物技术有限公司)78 只,雌雄各半,体重 190 ~ 210 g。

1.2 方法

1.2.1 大气样品采集 2008 年 12 月 - 2009 年 3 月,选择辽

* 基金项目:国家自然科学基金(30872083);辽宁省教育厅重点实验室项目(2009S102);辽宁省科技厅重点实验室项目(2009403023);沈阳市科技局重点实验室项目(1081108-1-00)

作者单位:沈阳医学院病原生物学教研室 辽宁 沈阳 110034

作者简介:肖纯凌(1964-),女,沈阳人,教授,博士生导师,博士,主要从事大气污染对呼吸道的影响机制及微生物生态研究。

宁省沈阳市交通繁华地段作为采样点,使用便携式 PM_{2.5} 采样器和 47 mm 玻璃纤维滤膜采集大气样品,采样流量 6~8 L/min,每天连续采样 24 h,连续采集 4 个月。滤膜干燥后称重,计算采尘量,于 -20 °C 冰箱保存。

1.2.2 大气污染物混悬液及 SO₂、NO₂、CO 混合气体制备
将采样后滤膜用一定量生理盐水超声震荡洗脱 20 min,吸去滤膜水分,干燥后称重,计算生理盐水中粉尘量。根据粉尘量,加入适量生理盐水,制备粉尘浓度为 10 mg/mL 的生理盐水混悬液,用于实验动物染尘模型。同时使用动式染毒控制装置设备,连接标准混合气钢瓶,依据国家(GB3095-1996)《环境空气质量标准》^[8] 调试 SO₂、NO₂ 及 CO 浓度均等于二级日标准的 100 倍,标准混合气进气流量为 0.6 L/min,用于实验动物染毒。

1.2.3 染尘及染毒 大鼠随机分为 6 组,每组 13 只。3 个染尘实验组分别一次性染尘,染尘后观察 1、7、30 d,每组各设 1 个同期对照组。采用乙醚麻醉下气管非暴露式注入染尘方法,各实验组大鼠用 1 mL 气管染尘注射器分别注入 1 mL 粉尘生理盐水混悬液,对照组大鼠分别注入 1 mL 生理盐水。于染尘次日用染毒控制装置设备进行动式吸入染毒,体积 30 cm × 30 cm × 30 cm 有机玻璃染毒柜 3 个,分别放入各实验组大鼠,用减压器和流量计使得进入染毒罐的浓缩气体的量是染毒罐体积的 1%,即稀释 100 倍;其余 99% 为流动的正常空气,使大鼠吸入稀释后的 SO₂-NO₂-CO 混合气体。3 组大鼠吸入浓度分别为 15、12、400 mg/m³,每天吸入 4 h,对应各组染尘后观察时间,分别吸入 1、7、30 d;对照组吸入正常空气。

1.2.4 染尘毒动物标本采集 分别于染毒 1、7、30 d 的次日,乙醚麻醉处死大鼠,腹主动脉取血 8~10 mL,分离血清备用酶联免疫吸附试验(ELISA);用 37 °C 生理盐水进行支气管肺泡灌洗,每次 3 mL,洗 3 次,合并灌洗液并离心收集上清液;血清及支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)均置于 -80 °C 冰箱保存;剪取肺组织 80 mg,放入装有保存液的无 RNA 酶的微量离心管中,用于提取总 RNA;剪取两小叶肺组织用 10% 甲醛固定,用于免疫组化试验。

1.2.5 肺组织 SP-A mRNA 表达检测 总 RNA 提取及 mRNA 反转录均按试剂盒操作步骤完成;引物设计依据美国国立生物技术信息中心(NCBI)基因库,输入目标基因及其参数,从给出的 10 对引物中选择最符合 realtime 引物设计要求的 2~3 对引物,经预试验后确定所用引物;引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。引物序列如下:SP-A:上游 5'-CCC AAG CCT CCG GCC TCT AC -3',下游 5'-TGC AGG TCT GAG GCA GGG TTG -3';GAPDH:上游 5'-TGA TGA CAT CAA GAA GGT GGT GAA G -3',下游 5'-TCC TTG GAG GCC ATG TAG GCC AT -3'。PCR 反应体系:2.5 × RealMasterMix/20 × SYBR 染料 9 μL,正向、反向引物各 0.5 μL, DNA 模板 1 μL,超纯水 9 μL,总体积 20 μL。PCR 反应程序:95 °C 1 min 95 °C 10 s 60 °C 30 s,共 40 个循环。

1.2.6 肺组织 SP-A 表达检测 常规病理切片经脱蜡至水、抗原修复后按免疫组化试剂盒步骤操作,苏木素染色后,在光镜下应用 Motic Images Advanced 3.2 软件系统进行图像分析;每组随机选取 3 只鼠的 3 张切片,每张图片随机选择 10 个 AT-II,测定胞质中棕黄色颗粒的平均吸光度(A)值。(被测结构截面内各像素吸光度值的算术平均值,可反映组织细胞被染色的深浅。)

1.2.7 BALF 及血清中 SP-A 水平检测 使用全自动酶标仪读取 A₄₅₀。

1.3 统计分析 实验数据采用 SPSS 10.0 软件进行统计分析,拟合最佳曲线回归方程,求出 BALF 和血清样品中 SP-A 浓度,进行 t 检验及单因素方差分析,多重比较采用 LSD 或 Tamhane 检验,检验水准 α = 0.05。

2 结果

2.1 大鼠肺组织 SP-A mRNA 表达(表 1) 染毒 1 d 及 30 d 大鼠肺组织中 SP-A mRNA 表达与对照组比较,差异无统计学意义;染毒 7 d 大鼠肺组织中 SP-A mRNA 表达明显高于染毒 1、30 d 及对照组。

表 1 不同染毒时间大鼠肺组织 SP-A mRNA 表达

染毒时间(d)	对照组		实验组		t 值	P 值
	只数	$\bar{x} \pm s$	只数	$\bar{x} \pm s$		
1	13	1.066 ± 0.272	12	0.930 ± 0.587 ^a	0.753	>0.05
7	13	0.892 ± 0.370	12	1.816 ± 1.299	-2.377	<0.05
30	13	0.974 ± 0.276	13	0.902 ± 0.378 ^a	0.559	>0.05

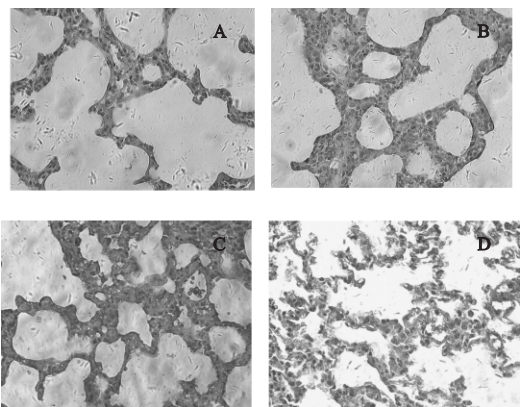
注:与 7d 比较 a P < 0.05。

2.2 大鼠肺组织中 SP-A 的表达(表 2) 染毒 1 d 及 7 d 大鼠肺组织中 SP-A 表达与对照组比较差异无统计学意义;染毒 30 d 大鼠肺组织中 SP-A 表达明显低于染毒 1、7 d 及对照组。图 1 可见染毒 30 d 大鼠肺组织中 SP-A 表达棕色颗粒明显低于染毒 1 d、7 d 及对照组。

表 2 不同染毒时间大鼠肺组织 SP-A 表达平均吸光度值比较

时间(d)	对照组		染毒组		t 值	P 值
	只数	$\bar{x} \pm s$	只数	$\bar{x} \pm s$		
1	10	0.406 ± 0.023	10	0.401 ± 0.043 ^a	0.741	>0.05
7	10	0.443 ± 0.023	10	0.438 ± 0.069 ^a	0.537	>0.05
30	10	0.412 ± 0.040	10	0.385 ± 0.068	3.229	<0.01

注:与 30d 比较 a P < 0.01。



注:A:对照组;B:1 d 组;C:7 d 组;D:30 d 组。

图 1 SP-A 在肺泡 II 型上皮细胞内的表达(苏木素染色 × 400)

2.3 大鼠 BALF 中 SP-A 水平(表 3) 染毒 1 d 及 7 d 大鼠 BALF 中 SP-A 含量与对照组比较,差异无统计学意义;染毒 30 d 大鼠 BALF 中 SP-A 含量明显低于染毒 1、7 d 及对照组。

表 3 不同染毒时间大鼠 BALF 中 SP-A 含量(ng/L)

时间(d)	对照组		染毒组		t 值	P 值
	只数	$\bar{x} \pm s$	只数	$\bar{x} \pm s$		
1	10	58.54 ± 7.07	9	54.72 ± 6.15 ^a	1.25	>0.05
7	10	57.97 ± 5.60	9	58.82 ± 9.76 ^a	0.59	>0.05
30	10	58.64 ± 7.06	11	47.09 ± 5.78	4.12	<0.01

注:与 30 d 比较 a P < 0.01。

BALF 中 SP-A 水平与对照组比较差异无统计学意义; 染毒 30 d 大鼠 BALF 中 SP-A 水平明显低于染毒 1 d、7 d 及对照组。

2.4 大鼠血清中 SP-A 的水平(表 4) 染毒 1 d 及 7 d 大鼠血清中 SP-A 水平与对照组比较差异无统计学意义; 染毒 30 d 大鼠血清中 SP-A 水平明显高于染毒 1 d、7 d 及对照组。

表 4 不同染毒时间大鼠血清中 SP-A 含量(ng/L)

时间(d)	对照组		染毒组		t 值	P 值
	只数	$\bar{x} \pm s$	只数	$\bar{x} \pm s$		
1	13	31.26 ± 11.67	12	36.17 ± 8.48 ^a	1.19	>0.05
7	13	43.44 ± 10.37	12	41.24 ± 8.32 ^a	0.58	>0.05
30	13	43.15 ± 16.27	13	63.08 ± 10.44	-3.82	<0.01

注: 与 30 d 比较, 与 30 d 比较 ^a $P < 0.01$ 。

3 讨论

研究表明, SP-A 功能较为复杂, 其最重要的是免疫学功能, 通过其免疫调节作用, 参与机体的防御和肺的炎症过程⁽⁶⁻⁷⁾。本研究结果显示, 染毒 7 d 大鼠肺组织中 SP-A mRNA 的表达明显升高, 提示大气混合污染物作用于大鼠呼吸系统后, 在肺损伤早期即对 SP-A 转录水平产生了影响, 使 SP-A mRNA 的表达代偿性增高, 同时也证实了 SP-A 对肺具有保护作用。而染毒 30 d, SP-A 在大鼠肺组织和 BALF 中的表达明显降低, 提示大气污染物对大鼠肺组织产生了持续的细胞毒作用, 造成肺泡 II 型上皮细胞不可逆的损伤。

另外, 染毒 30 d 大鼠血清中 SP-A 水平明显升高, 提示大气污染物引起肺泡毛细血管内皮细胞损伤, 肺上皮的屏障作用受到损害、通透性增强, 使肺内的 SP-A 漏入到血液循环。正常情况下肺泡-毛细血管屏障完好无损, 可以阻止 SP-A 进入血液循环, 血清中只能检测到很少量的 SP-A。因此, 血清中 SP-A 水平和肺损伤程度密切相关, 肺部损伤越重, 血清中 SP-A 浓度亦越高。提示当大气污染导致肺部损伤后, 肺内 SP-A

可通过损伤的肺泡-毛细血管屏障进入血液循环而成为肺损伤的血清标志物。

大气混合污染物导致的急性肺损伤早期, SP-A mRNA 表达代偿性增高, 肺组织、BALF 及血清中 SP-A 水平均无明显变化, 证实 SP-A 在肺损伤早期具有天然免疫功能, 对肺组织具有保护作用。随着染毒时间的延长, 由于肺泡 II 型上皮细胞受损, 其分泌特异性保护蛋白 SP-A 的能力下降, 肺组织及 BALF 中 SP-A 表达降低; 由于急性肺损伤导致的肺泡壁通透性增强, 进而血清中 SP-A 水平升高, 因此血清 SP-A 是反映血气屏障损伤敏感的外周血指标。

参考文献

- (1) Laumbach RJ. Outdoor air pollutants and patient health [J]. Am Fam Physician 2010 81(2): 175-180.
- (2) Harrod KS, Jaramillo RJ, Berger JA, et al. Inhaled diesel engine emissions reduce bacterial clearance and exacerbate lung disease to *Pseudomonas aeruginosa* infection in vivo [J]. Toxicol Sci 2005 83(1): 155-165.
- (3) 洪传洁, 阚海东, 陈丙衡. 城市大气污染健康危险度评价的方法—第五讲 大气污染对城市居民健康危害的定量评估(续五) [J]. 环境与健康杂志 2005 22(1): 62-64.
- (4) 肖纯凌, 王任群, 赵肃, 等. 大气污染物对大鼠肺炎性细胞因子影响 [J]. 中国公共卫生 2007 23(1): 83-84.
- (5) Ahmad IM, Britigan BE, Abdalla MY. Oxidation of thiols and modification of redox-sensitive signaling in human lung epithelial cells exposed to *Pseudomonas pyocyanin* [J]. J Toxicol Environ Health A 2011 74(1): 43-51.
- (6) Hecht E, Usmani SM, Albrecht S, et al. Atomic force microscopy of microvillous cell surface dynamics at fixed and living alveolar type II cells [J/OL]. Anal Bioanal Chem 2010 30. <http://www.springerlink.com/content/4w024q7634615671/>.
- (7) 田丹. GSK3 在吸烟致气道上皮和肺泡 II 型上皮细胞损伤修复中的作用研究 [D]. 武汉: 华中科技大学, 博士论文, 2006.
- (8) 国家环境保护局科技标准司. GB3095-1996 环境空气质量标准 [S]. 北京: 中国标准出版社, 1996.

收稿日期: 2010-11-02

(孔繁学编辑 韩仰欢校对)