第 23 卷第 6 期
2003 年 11 月

环 境 科 学 学 报
ACTA SCIENTIAE CIRCUMSTANTIAE

Vol. 23, No. 6
Nov., 2003

文章编号: 0253-2468(2003)06-0828-03　　中图分类号: X18, Q99　　文献标识码: A

二氧化硫对大鼠肺泡细胞和肺泡灌洗液的生化效应

杜青平, 孟紫强*　(山西大学环境医学和毒理学研究所, 太原　030006)

摘要: 研究了二氧化硫(SO_2)对大鼠支气管肺泡灌洗细胞和肺泡灌洗液(BALF)的生化指标的影响. 结果表明, 吸入 SO_2 后大鼠 BALF 中肺泡巨噬细胞数量增加、但比例减少, 中性粒细胞和淋巴细胞数量和比例均增加, 并存在剂量-效应关系; 熏气后 BALF 的 pH 下降、蛋白质含量和肺通透指数升高, BALF 中酸性磷酸酶、碱性磷酸酶和乳酸脱氢酶活性升高, 脂质过氧化水平提高; 这些细胞和生物化学指标的改变从不同的方面反映了 SO_2 可引起大鼠肺组织和肺泡细胞的结构和功能的损伤.

关键词: 肺泡灌洗液; 酸性磷酸酶; 碱性磷酸酶; 乳酸脱氢酶; 膜通透性; 肺泡巨噬细胞

Cellular and biochemical response in BALF of rats exposed to different concentrations of SO_2

DU Qingping　MENG Ziqiang　(Institute of Environmental Medicine and Toxicology, Shanxi University, Taiyuan　030006)

Abstract: The Bronchoalveolar lavage cells(BALF) and the biochemical indexes in BALF were studied in the rats exposed to different concentrations of sulfur dioxide(SO_2). The results showed the numbers of alveolar macrophage were increased but its percentage decreased; Both the numbers and percentages of the neutrophils and lymphocytes increased in BALF, and they showed dose-response relationship. The pH values decreased significantly; the protein contents in BALF, the pulmonary vascular permeability index, the activities of acid phosphatase, alkaline phosphatase and Lactic dehydrogenase in BALF increased as well as the malondialdehyde contents. These cellular and biochemical indexes suggested different ways of damage of the structure and function of lung tissues and the cells.

Keywords: bronchoalveolar lavage fluid; acid phosphatase; alkaline phosphatase; lactic dehydrogenase; membrane permeability; alveolar macrophages

二氧化硫(SO_2)是一种中等毒性的常见大气污染物, 主要通过呼吸进入机体. 在 SO_2 污染地区, 哺乳动物的气管、肺、肺门淋巴结和食道中 SO_2 的含量相对比较高. 近年来的研究发现, 在 SO_2 浓度较高的地区, 一些呼吸系统疾病发病率升高[1], 同时加重哮喘患者呼吸道的阻塞. 所以肺和呼吸道是 SO_2 等气体污染物作用的主要靶器官, SO_2 污染使肺功能受到抑制[2]. 为了探讨 SO_2 对肺脏的毒性机理, 本文用大鼠肺灌洗的方式, 对 SO_2 熏气后大鼠肺脏灌洗液(BALF)中细胞生物学和生物化学两个方面指标的改变进行了研究.

1　材料和方法

1.1　试验材料

由山西医科大学动物中心提供的健康雄性 Wistar 大鼠, 体重 180—200 g, 随机分为 4 组, 每组 10 只. 1 组为对照组, 3 组为 SO_2 熏气组. SO_2 标准气体纯度为 99.99%, 由北京氦谱北分气体工业有限公司提供.

1.2　染毒方法

试验组在玻璃熏气缸中进行动式染毒, 即从缸底部不断输入 SO_2 与新鲜空气的一定比例混合物, 并进行电动搅拌与定量排气, 保持熏气过程中玻璃箱中进气量与排气量相等, 并使 SO_2 浓度维持在 28±2、56±3、112±2 mg/m^3. 对照组在同样大小的玻璃箱中接受过滤的新鲜空气. 熏气时间 6 h/d, 共 10 d. 箱内 SO_2 浓度采用盐

收稿日期: 2002-11-01; 修订日期: 2002-12-10
基金项目: 国家自然科学基金(编号: 30070647); 山西省自然科学基金资助项目
作者简介: 杜青平(1973—), 女, 讲师(在职博士生)　E-mail: zqmeng@sxu.edu.cn　*　通讯联系人

酸副玫瑰苯胺分光光度法测定. 动物染毒期间不进食和饮水, 其余时间动物自由摄食.

1.3　肺灌洗和 BALF 中细胞记数

染毒结束后 24 h, 动物腹腔注射 1.5% 戊巴比妥钠麻醉, 打开腹腔, 切断腹主动脉, 放血处死. 暴露气管, 剪一斜口, 插入灌流针头, 结扎固定. 缓慢注入 3 mL 生理盐水, 同时轻轻按摩胸部, 然后缓慢抽出灌洗液, 每只大鼠灌洗 10 次. 第 1、2 次洗出液分置两试管中, 冰浴保存. 第 3—10 次每 2 次合并于 1 管, 记录每管体积.

将每管灌洗液混匀后, 用血球记数板光镜下记数肺泡巨噬细胞(AM) 和细胞总数. 记数后将 1、2 管灌洗液混合, 3000 r/min 离心 10 min 后, 管底细胞涂片, Giemsa 染色, 作细胞分类记数.

1.4　肺泡 BALF 的部分生化成分的测定

Lowry 法测定 BALF 中蛋白质含量[3], 计算肺通透指数(肺泡灌洗液蛋白/血浆蛋白, LPI); 用 pHS-3C 型酸度计测定 BALF 的 pH 值; 灌洗液离心后测定无细胞的 BALF 中乳酸脱氢酶(LDH) 活性(用乳酸为基质, 2,4-二硝基苯肼法测定)[4]; 酸性磷酸酶(ACP) 和碱性磷酸酶(AKP) 活性(用磷酸苯二钠为基质, 4-氨基安替比林法[5]); BALF 的丙二醛(MDA) 含量用硫代巴比妥酸(TBA) 法[6].

1.5　数据处理与统计分析

试验数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$) 表示, Winspss 9.0 统计软件包进行 t 检验.

2　结果

2.1　BALF 中细胞数量、巨噬细胞数量及细胞组成变化

如表 1 所示, SO_2 吸入肺后, 在 28、56 mg/m^3 组, 细胞总数和肺泡巨噬细胞数目与对照组相比没有显著性差异, 112 mg/m^3 组大鼠 BALF 中细胞总数和肺泡巨噬细胞数目明显增加, 总细胞数量是正常对照组的 1.3 倍左右. 细胞分类结果显示, 3 种细胞中, 以淋巴细胞的增加尤为明显, 56 mg/m^3 和 112 mg/m^3 组与对照组相比, 均有显著性差异($P < 0.01$), 其在数值上比对照组增加了 10 倍. 而巨噬细胞总数目增加但在细胞总数中的相对值减少, 中性粒细胞比例增加, 112 mg/m^3 组巨噬细胞和中性粒细胞在相对数目上的变化与对照组相比均有极显著性差异($P < 0.01$).

表 1　SO_2 对大鼠 BALF 中细胞总数和细胞组成的影响

Table 1　Effects of SO_2 on the cellular numbers and the percentages of different cells in BALF

组别	例数	总细胞数, × 10^6 个/mL	肺巨噬细胞, × 10^6 个/mL	灌洗液细胞中细胞组成, %		
				巨噬细胞	中性粒细胞	淋巴细胞
对照组	10	2.14±0.57	1.32±0.10	89.11±3.31	6.31±0.92	4.53±0.88
28±2 mg/m^3 组	10	2.16±0.69	1.39±0.52	88.17±4.54	6.29±1.01	5.12±1.09
56±3 mg/m^3 组	10	2.30±0.54	1.47±0.39	73.63±1.72**	6.96±2.61	19.01±9.32**
112±2 mg/m^3 组	10	2.81±0.64*	1.61±0.38*	54.68±2.54**	8.33±0.91**	37.92±7.22**

与对照组相比, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

2.2　大鼠 BALF 中 pH 和蛋白质含量测定

从表 2 可见, SO_2 吸入导致了 BALF 中的 pH 降低, 肺通透指数和肺泡灌洗液的蛋白质含量升高, 且有一定的浓度-效应关系. 这表明 SO_2 吸入使大鼠肺泡细胞膜受到损伤, 通过细胞膜渗入间质的蛋白质量增加, 肺泡的通透性升高. 肺通透指数在 56 mg/m^3 组与对照组有显著性差异($P < 0.05$), 在 112 mg/m^3 时, 与

表 2　SO_2 对大鼠肺泡 BALF 的 pH 值和肺泡细胞通透性的影响

Table 2　Effects of SO_2 on the pH values in the BALF and the pulmonary vascular permeability

组别	例数	肺灌洗液 pH 值	肺灌洗液的蛋白质含量, mg/L	肺通透指数 (LPI)
0	10	6.23±0.23	88.64±10.11	1.81±0.23
28±2 mg/m^3 组	10	6.15±0.44	90.02±12.15	1.82±0.39
56±3 mg/m^3 组	10	5.87±0.65*	105.24±9.33**	2.66±0.34*
112±2 mg/m^3 组	10	5.35±0.42**	143.33±15.49**	4.58±0.86**

与对照组相比, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

对照组有极显著性差异($P < 0.01$). BALF 中蛋白质含量在两个剂量组与对照组相比均有极显著性差异($P < 0.01$).

2.3 SO_2 对大鼠 BALF 部分生化指标的影响

表 3 结果显示, SO_2 熏气后, 大鼠 BALF 中 LDH、ACP、AKP 以及 MDA 含量不同程度地发生改变, 随着 SO_2 浓度的增加, ACP、AKP、LDH 活性升高, MDA 含量增加(BALF 中 LDH 活性在 28 mg/m^3 时稍有降低, 但和对照组没有统计学差异.) ; ACP 和 AKP 在 28 mg/m^3 时就与正常对照组有显著性差异($P < 0.05$) ; 在 56 mg/m^3 时, ACP、AKP 活性和 MDA 含量, 与对照组相比, 有极显著性差异($P < 0.01$) , LDH 活性与对照组相比, 有显著性差异($P < 0.05$) ; 在 112 mg/m^3 时, LDH、ACP、AKP 活性以及 MDA 含量均与对照组有极显著性差异($P < 0.01$) .

表 3 SO_2 对大鼠肺泡 BALF 中酶活性和 MDA 含量的影响

Table 3 Effects of SO_2 on the enzymatic activities and the MDA contents in BALF

组别	ACP, U/L	AKP, U/L	LDH, U/L	MDA 含量, nmol/L
0	1.25±0.17	4.89±0.66	175.30±39.21	34.83±1.11
28±2 mg/m^3 组	1.49±0.26*	5.31±0.38*	169.55±35.92	35.62±4.23
56±3 mg/m^3 组	4.76±0.79**	7.49±0.52**	214.58±34.54*	52.66±3.98**
112±2 mg/m^3 组	5.66±0.64**	8.15±0.83**	254.67±45.23**	68.15±4.71**

与正常对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3 讨论

肺泡分类记数结果显示, 随着 SO_2 熏气浓度升高, 肺泡腔内的细胞总数和巨噬细胞总数增加, 但是肺泡巨噬细胞在 3 种炎性细胞中所占的比例相对降低, 而淋巴细胞和中性粒细胞的绝对数量和相对值均比对照组有显著性增加, 呈现一定的剂量-效应关系. 这表明 SO_2 熏气导致肺泡炎症反应, 炎性细胞从组织中渗出, 但炎性细胞比例发生了改变. 巨噬细胞数量相对减少, 可能是由于巨噬细胞在 SO_2 熏气浓度升高时变性坏死, 细胞膜渗透性改变, 会引起 BALF 中生化指标的改变.

生化指标的测定结果显示: SO_2 熏气后 BALF 中的 pH 降低, 肺通透指数和肺泡灌洗液的蛋白质含量显著升高, 且呈现一定的浓度-效应关系, 表明 SO_2 确实引起肺泡细胞通透性增加. 而肺泡组织结构的损伤与 BALF 中各生化组分密切相关. 本实验中, SO_2 熏气使大鼠 BALF 中 LDH、ACP、AKP 等酶活性升高, 并具有一定剂量-反应关系. LDH 和 ACP 分别为细胞胞浆酶和溶酶体酶, 是反映肺细胞生物膜损伤的早期灵敏指标. 它们的增高提示有肺泡细胞膜损伤或细胞发生死亡和溶解; AKP 主要由肺泡Ⅱ型细胞产生, 部分由中性粒细胞产生, AKP 的增加, 表明肺泡上皮细胞受损, 白细胞活动增加[7], 细胞的炎症反应加剧; MDA 含量增加, 表明肺泡膜发生脂质过氧化损伤, 细胞液中脂质过氧化的水平升高.

BALF 的这些细胞生物学和生化指标的改变从不同的方面反映了 SO_2 对肺组织和肺泡细胞的损伤, 这种损伤主要表现为肺组织发生炎性渗出, 肺泡细胞膜的通透性升高, 而这些改变可能与生物膜脂质过氧化改变有关.

参考文献:

[1] Herbarth O. Risk asessment of environmentally influenced airway disease based on timer series analysis[J]. Environ Health Perspect, 1995, 103(9): 852—856

[2] Marianne Reist, Peter Jenner, Barry Halliwell. Sulphite enhances peroxynitrite-dependent α_1-antiproteinase inactivation. A mechanism of lung injury by sulphur dioxide[J]. FEBS Letters, 1998, 423: 231—234

[3] Lowry O H, Rosenbrough N J, Far A L, *et al*. Protein measurement with folin-phenol reagent[J]. J Biol Chem, 1951, 193: 265—275

[4] 朱忠勇, 陈之航. 临床医学检验[M]. 上海: 上海科技出版社(第一版), 1981. 340—341

[5] 金丽琴, 吕建新, 胡云良, 等. 细拟脚青霉对大鼠血清及组织中脂质过氧化物和还原型谷胱甘肽水平的影响[J]. 中国病理生理杂志, 1997, 13(4): 379—382

[6] Wasowicz W, Neve J, Pevetz A. Optimized steps in fluorometric determination of thiobarbituric acid-reactive substance in serum: importance of extraction pH and influence of sample preservation and storage[J]. Clin Chem, 1993, 39(12): 2522—2526

[7] 阚海东, 宋伟民, 蒋蓉芳. 室内常见气传真菌对动物肺损伤的实验研究[J]. 中国公共卫生, 2002, 18(2): 135—136