

我国主产地温石棉可吸入纤维致鼠肺损伤与抑癌基因 p53、p16 的表达

曾娅莉¹, 崔 琰², 邹文蓉¹, 马 骥¹, 董发勤³, 张青碧², 邓建军¹, 杨 洁¹,
高 磊¹

(1. 四川绵阳四〇四医院, 四川 绵阳 621000; 2. 西南医科大学, 四川 泸州 646000; 3. 西南科技大学,
四川 绵阳 621000)

摘 要: 选取我国四大矿区主产地的温石棉, 制备成粒径小于 10 μm 的可吸入纤维, 采用非暴露式气管滴注法染毒 Wistar 雄性大鼠, 分别于 1、3 及 6 个月时称重并处死, 迅速分离肺组织, 观察肺形态并称重, 计算肺脏器系数, 并采用 HE 染色法利用光学显微镜观察肺组织病理改变, RT-PCR 法测定 p53、p16 基因表达, 探讨我国温石棉可吸入纤维的生物安全性。结果表明, 四大主矿区的温石棉纤维粒度基本小于 10 μm , 符合可吸入纤维粉尘标准, 研磨前后纤维粉尘的结构和活性基团无破坏; 染毒组 Wistar 大鼠体重明显减轻, 肺重量显著增加, 肺脏器系数变大; 染毒组 Wistar 大鼠肺组织发生严重病理改变, 出现不同程度的充血、水肿、炎性细胞浸润和纤维增生; 染毒组 Wistar 大鼠肺 p53、p16 基因表达均降低。综合以上结果, 发现我国四大主矿区温石棉的可吸入纤维粉尘均对 Wistar 大鼠肺组织呈不同程度和方式损伤。随着染毒时间延长, Wistar 大鼠肺组织的抑癌基因 p53、p16 表达显著降低, 推测我国四大矿区温石棉的可吸入纤维粉尘具有致肺癌的风险。

关键词: 温石棉; 可吸入纤维粉尘; 肺损伤; 抑癌基因; 脏器系数

中图分类号: P619.27⁺1; R135.2

文献标识码: A

文章编号: 1000-6524(2019)06-0843-09

Lung injury and down regulation gene of p53 and p16 in rats induced by inhalable fibers from chrysotile asbestos in major mining areas of China

ZENG Ya-li¹, CUI Yan², ZOU Wen-rong¹, MA Ji¹, DONG Fa-qin³, ZHANG Qing-bi²,
DENG Jian-jun¹, YANG Jie¹ and GAO Zhan¹

(1. Department of Clinical Laboratory, 404 Hospital of Mianyang, Mianyang 621000, China; 2. School of Public Health, Southwest Medical University, Luzhou 646000, China; 3. Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621000, China)

Abstract: Chrysotile asbestos from four major mining areas in China was selected to prepare inhalable dust with particle size less than 10 μm . Male Wistar rats were exposed by non-exposure tracheal instillation and weighed and sacrificed at the time in 1, 3 and 6 months. The lung tissues were quickly separated, the lung morphology was observed and weighed, and the lung organ coefficient was calculated. The pathological changes of lung tissue were observed by light microscopy with HE staining, and the expression of p53 and p16 genes were determined by RT-PCR to investigate the biosafety of chrysotile fiber in China. The results show that the size of chrysotile fiber in the main

收稿日期: 2019-05-10; 接受日期: 2019-09-01; 编辑: 郝艳丽

基金项目: 国家自然科学基金项目(41472046, 41602033); 四川省科技厅重点项目(2016JY0045, 2019YFS0090)

作者简介: 曾娅莉(1972-), 女, 汉族, 硕士, 主任技师, 主要从事职业病防治研究, E-mail: 631734429@qq.com; 通讯作者: 董发勤(1963-), 男, 教授, 从事从事职业病防治研究30年, E-mail: 2431830569@qq.com; 邓建军(1972-), 女, 硕士, 主任技师, E-mail: jianjundeng0801@163.com。

mining areas was less than 10 μm , which could meet the standards of inhalable dust. The structure and active groups of the dust before and after grinding were not damaged. The body weight of the Wistar rats was significantly reduced, the lung weight was significantly increased, and the lung organ coefficient was increased. The lung tissues of Wistar rats in the exposed group showed severe pathological changes, and there were different degrees of congestion, edema, inflammatory cell infiltration and fibrosis. The expression of p53 and p16 genes in the lungs of Wistar rats exposed to 1 ~ 6 months was significantly decreased. Based on the above results, it was found that the inhalable fiber dust of chrysotile asbestos in four major mining areas in China damaged the lung tissue of Wistar rats in different degrees and ways. With the prolonged exposure time, the expression of p53 and p16 in the lung of Wistar rats was significantly decreased. It is inferred that the inhalable fiber dust of chrysotile asbestos in four major mining areas in China has the risk of lung cancer.

Key words: chrysotile asbestos; inhalable fiber dust; lung injury; tumor suppressor gene; viscera coefficient

Fund support: Project of National Natural Science Foundation of China (41472046, 41602033); Science and Technology Project of Sichuan Province, China (2016JY0045, 2019YFS0090)

吸入性粉尘可引起呼吸、心血管、血液系统甚至病毒传播等疾病(Guan *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016; Ye *et al.*, 2016; Gao *et al.*, 2017), 危害人体健康。我国是温石棉生产和使用大国, 人们在生产和使用过程中产生大量吸入性纤维粉尘, 污染环境。国际上对温石棉的安全性一直存在较大争议, 长期吸入这些粉尘是否致肺损伤或肺癌性未知。国外研究资料(Bernstein *et al.*, 2013; Gao *et al.*, 2015; Baur *et al.*, 2015; Gilham *et al.*, 2016)显示, 温石棉具有致间皮瘤或者肺癌的风险。国内关于可吸入性温石棉纤维粉尘的安全性研究较少, 杜利利等(2014)的流行病学调查显示长期接触温石棉的矿工, 其肺癌、石棉肺、肺心病、呼吸系统疾病的死亡率明显提高。近年来本课题组一直从事温石棉粉尘职业病和安全性的基础性研究。曾娅莉等(2013)通过细胞培养技术、体外分析比较了四川新康及陕西陕南温石棉的安全性, 结果显示两种温石棉对细胞生长具有较强抑制作用, 显著下调 p16 和 p53 蛋白, 有诱导癌症发展的风险。柏珺等(2017)采用多次非暴露式气管滴注的染毒法研究了四川新康温石棉纤维粉尘对雄性 Wistar 大鼠肺组织的危害, 检测了各项生化指标, 结果显示四川新康温石棉纤维粉尘可致大鼠肺损伤。王玉琳等(2018)研究发现温石棉可通过 ROS 途径激活线粒体凋亡通路, 诱导 A549 细胞发生凋亡。黄凤德等(2018)分析了四大矿区温石棉的物相成分、谱学特征等, 研究比较了四大矿区温石棉对 A549 细胞的生长抑制和细胞周期的影响, 实验结果显示四大矿区温石棉的主要物相是斜纤蛇纹石, 但不同产地的温石棉结构表面完善性、化学基团

存在差异, 4 种温石棉纤维粉尘均于 G_2/M 期阻滞 A549 细胞。由于青海茫崖、甘肃阿克塞、陕西陕南和四川新康矿区是我国温石棉主要产地, 目前尚缺乏对 4 种主产地的温石棉纤维粉尘在生物体内对呼吸系统损伤和致癌风险的比较和评估。课题组在前期研究的基础上, 选取由我国四大矿区温石棉制备成的可吸入纤维粉尘, 研究比较了可吸入温石棉粉尘对 Wistar 大鼠肺组织的有无损伤及损程度, 同时检测了大鼠的抑癌基因 p53、p16, 评估其有无致癌风险, 从体内和分子水平探讨了我国四大矿区可吸入性温石棉的生物安全性, 欲为环境检测和职业病防护提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验对象

实验对象为体重 180 ~ 200 g 的 Wistar 雄性大鼠, 购买自华西医科大学 SP 级实验动物中心。四大矿区温石棉分别采自青海省茫崖矿区、甘肃省阿克塞矿区、陕西省陕南矿区和四川省新康矿区。

1.1.2 试剂和仪器

试剂有 HE 试剂(武汉博士德生物工程有限公司)、Triol 试剂提取盒(北京 TIANGEN BIOTECH CO, LTD)、Prime Script TM RT reagent Kit with gDNA Eraser 和 PCR 试剂(大连 Takara 公司), 引物由 Takara 公司设计。

仪器有高速多功能粉碎机(RH-800, 浙江荣浩工贸有限公司)、卧式行星球磨机(QM-3SP4J, 南京大

学仪器厂)、激光粒度分析仪(90 plus, 美国 Brookhaven 公司)、红外光谱仪(Spectrum One, 美国 PE 公司)、RT-PCR 扩增仪(Mastecycler X50h, 德国 Eppendorf 公司)、DNA/RNA 测定仪(ND-1000, 美国 Nano Drop)、凝胶电泳成像系统(GelDocXR, 美国 BIO-RAD 公司)、凝胶电泳扫描仪(GE Image scanner III, 美国 GE Healthcare 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 可吸入温石棉纤维粉尘的制备

4 种产地的可吸入温石棉纤维由高速粉碎机初步粉碎至 60 目,按照粒料液(无水乙醇)比 1:1,用球磨机湿磨,检测纤维粒径。当纤维粒径约为 5 μm 时收集矿浆,120 $^{\circ}\text{C}$ 烘干,再次磨碎,400 目过筛,高压灭菌,加生理盐水配置成 8 mg/mL 储存液,备用。

1.2.2 粉尘染毒 Wistar 雄性大鼠造模

将 8~10 周龄健康未成年 Wistar 雄性大鼠 54 只,随机分为 3 组即 2 mg/mL 染毒组、阴性和阳性对照组,每组 18 只,分笼喂养,适应性喂养 1 周。将 4 种温石棉储备液分别稀释为 2.0 mg/mL 应用液,加入青霉素钠 8 000 U/mL,超声处理 30 min,采用非暴露式气管滴注法染毒 Wistar 雄性大鼠,每次滴注 0.5 mL,间隔 1 个月滴注 1 次。阳性对照组将苯并芘溶于玉米油配成 40 mg/mL 染毒液,阴性对照组使用生理盐水,每次滴注 0.1 mL。滴注后大鼠自由饮水、进食,观察其生长、发育及活动等一般情况。

1.2.3 纤维粒径、物相和化学成分特征

采用 90 plus 激光粒度分析仪检测各组温石棉纤维粒径,采用 Spectrum One 傅里叶变换红外光谱仪分析研磨后的粉尘结构和表面化学基团。

1.2.4 肺组织脏器系数和病理检测

分别于染毒 1、3 及 6 个月时称重后处死 Wistar 大鼠,迅速分离肺组织并称重,置 -80°C 冰箱保存备用。Wistar 大鼠的肺组织脏器系数 = 肺组织(g)/体重(g)。肉眼观察处死 Wistar 大鼠的肺组织外观,选取主支气管周围肺组织,生理盐水反复冲洗。置 10% 福尔马林溶液中固定,常规脱水,石蜡包埋,切片,HE 染色,光学显微镜下观察肺组织的病理变化。

1.2.5 染毒 Wistar 大鼠肺 p53 和 p16 基因检测

将处死 Wistar 大鼠的肺组织,按 Triol 试剂盒说明书提取总 RNA,DNA/RNA 测定仪检测 RNA 的浓度和纯度,调整 RNA 浓度一致,按照聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)试剂说明书进行 PCR 扩增。引物设计: p53 引物,104pb,正向 5'→3':

AGGAAATCCGTATGCTGAGTATCTG,反向 5'→3': GGATAGTGGTATAGTCGGAGCCG); p16 引物,97pb,正向 5'→3':CTAGAGCGGGGACATCACGA,反向 5'→3': AGCAGAAGTTATGCCTGTCGGT)。扩增条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 2 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s、63 $^{\circ}\text{C}$ 30 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 20 s,循环 35 次,72 $^{\circ}\text{C}$ 终末延伸 3 min。琼脂糖凝胶电泳 PCR 产物,凝胶电泳成像系统对电泳条带照相和灰度值的扫描,以 β -actin 为内参对照。

1.3 统计学处理

实验数据采用平均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,使用 EXCEL 和 SPSS 19.0 软件进行计算和统计分析,并采用单因素 ANOVA 分析进行显著性检验。

2 结果

2.1 纤维粉尘粒径分布

4 种温石棉纤维通过卧式行星球磨机湿磨 20 h,收集样本。采用 90 plus 激光粒度分析仪测定粒径,结果见表 1。从纤维粒度分布数据来看各纤维的平均粒径均小于或接近 5 μm ,符合可吸入粉尘粒径要求。

表 1 湿磨法 20 h 的四大矿区温石棉纤维粒度分布 μm
Table 1 Particle size distribution of chrysotile fibers in four main mining areas with 20 h wet grinding

	d_{10}	d_{25}	d_{50}	d_{75}	平均
甘肃阿克塞	0.68	1.03	2.36	6.34	4.26
青海茫崖	0.57	0.76	1.11	1.74	1.84
陕西陕南	0.62	0.86	1.41	3.63	2.83
四川新康	0.79	1.49	3.63	6.47	4.76

注: d_{10} 对应的粒径数据表示小于此粒径的颗粒体积分数占全部颗粒的 10%, d_{25} 、 d_{50} 、 d_{75} 以此类推。

2.2 研磨前后粉尘的结构和官能基团分析

Salamatipour 等(2016)研究显示,研磨石棉的方法不同可显著影响粉尘表面含铁量,铁可诱导细胞产生的活性氧,从而形成细胞毒性差异,并建议在研究石棉纤维的细胞毒性时应详细描述粉尘制备方式。本研究中采用湿磨法,为了使研磨后的各样品粒径小于 10 μm ,又防止过度研磨破坏纤维表面结构从而干扰实验结果,通过红外光谱分析了研磨后各纤维粉尘组化学基团,以分析研磨后的粉尘是否有理化性质改变。

Enrico 等(2009)研究发现,温石棉的结晶度和 OH^- 含量与其在动物体内的溶解性、降解及细胞毒

性相关。由图1可见,经过研磨后的4种温石棉样品的FT-IR图谱的吸收峰的峰位峰形基本不变。比较4种图谱,发现茫崖、陕南温石棉在($1\ 622$ 、 $1\ 618\ \text{cm}^{-1}$)附近的吸收谱带向高波数偏移,新康温石棉在($1\ 630$ 、 $1\ 455\ \text{cm}^{-1}$)附近的吸收谱带发生了偏移。这是由于红外光谱对阳离子质量和电价比较敏感, OH^- 伸缩振动频率受到与 OH^- 配位的八面体阳离子的影响产生分裂并向低波数方向位移。阿克塞和陕南温石棉在 $1\ 060\ \text{cm}^{-1}$ 附近的 $\text{Si}-\text{O}$ 伸缩振动峰吸收带分裂比茫崖和新康石棉明显,表明这两种温石棉的表面结构较茫崖和新康石棉的完善。通过上述分析,可初步确定4种温石棉样品为纤蛇纹石,研磨后的温石棉粉尘结晶度和化学基团未发生明显变化。

2.3 肺组织外观

4种温石棉纤维粉尘染毒Wistar大鼠1~6个

月,肺组织病变基本相似,肺损伤程度与染毒时间呈正比,4种产地的温石棉纤维粉尘染毒Wistar大鼠肺组织病变程度不同。与对照组相比,染毒1个月,Wistar大鼠肺组织体积变大,气管周围充血明显,表面可见少量白色瘤状突起,凹凸不平。染毒3个月,Wistar大鼠肺外观充血明显,体积比染毒1个月时缩小,肺组织塌陷,皱缩,肺表面的白色瘤状增多。染毒6个月,Wistar大鼠肺体积进一步缩小,组织实变,弹性变差,充血明显,肺组织表面凹凸不平加重,4种温石棉染毒后肺组织均未发现肉眼可见瘤变。图2显示的是茫崖温石棉染毒Wistar大鼠组肺外观,其余各染毒组肺组织外观相似。

2.4 肺组织脏器系数

与阴性对照组比较,染毒1个月,4组温石棉纤维

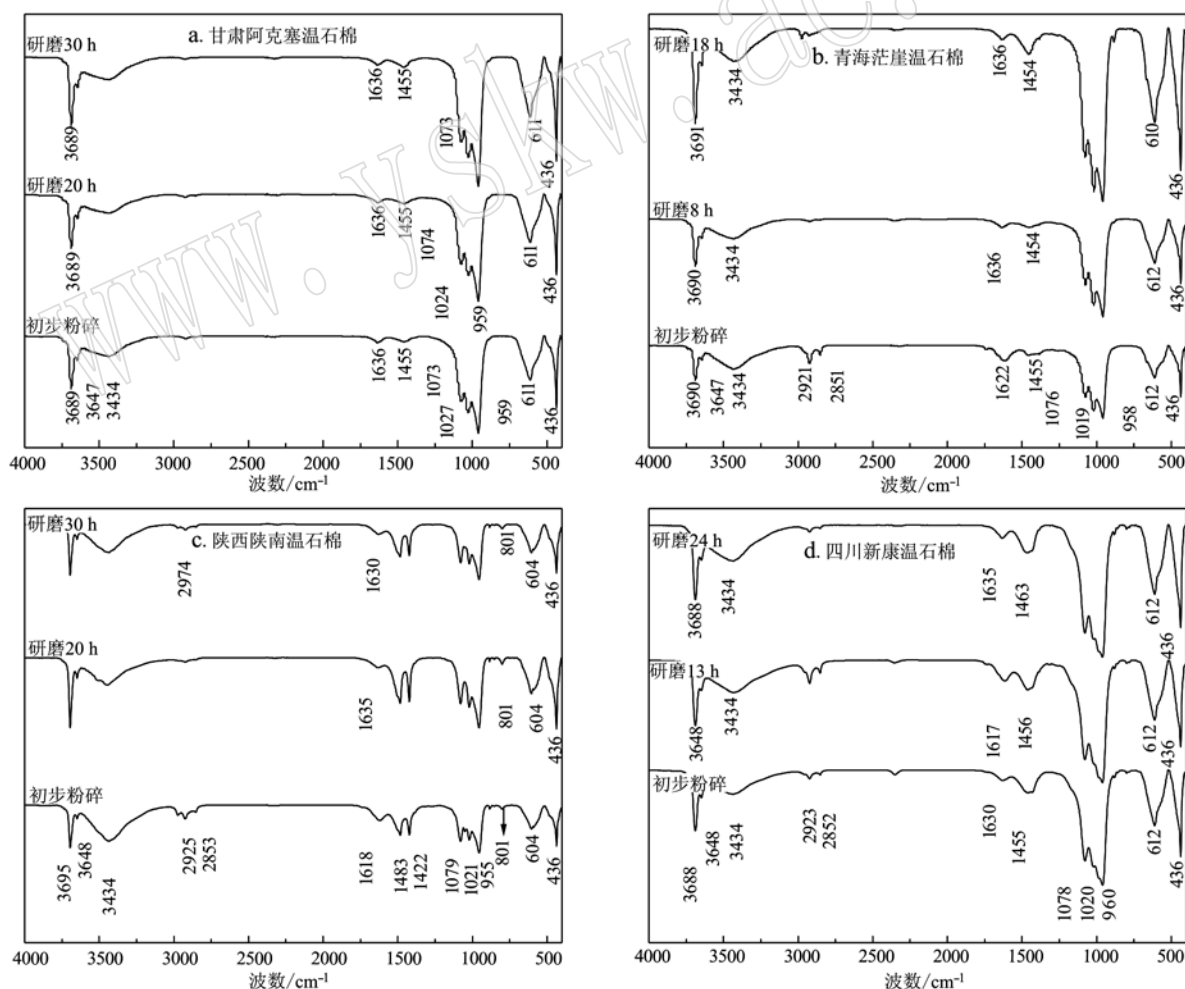


图1 我国四大矿区温石棉研磨后的FT-IR图

Fig. 1 FT-IR diagrams of chrysotile grinding 20 h in four main mining areas of China

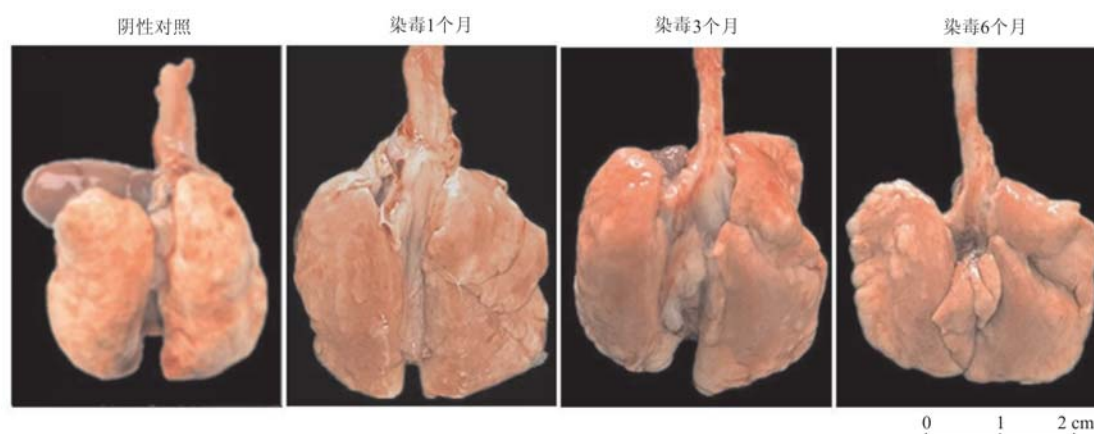


图2 茫崖温石棉染毒1、3、6个月Wistar大鼠肺组织外观图

Fig.2 1, 3 and 6 months lung histomorphology of Wistar rats exposed to 2.0 mg/mL chrysotile asbestos in Mangya

粉尘染毒 Wistar 大鼠肺系数变化无显著差异。染毒 3 个月,新康、茫崖和陕南温石棉纤维粉尘染毒的 Wistar 大鼠体重明显减轻,肺重量显著增加,肺系数变大,变化具有显著意义($P < 0.05$)。染毒 6 个月,4 组温石棉纤维粉尘染毒 Wistar 大鼠肺系数增大,变

化具有显著意义($P < 0.05$),如表 2 所示。染毒 6 个月,4 组可吸入温石棉纤维粉尘染毒 Wistar 大鼠肺组织脏器系数由大到小的顺序均为:新康 > 茫崖 > 阿克塞 > 陕南。

表2 我国四大矿区温石棉染毒1、3、6个月Wistar大鼠肺组织肺系数

Table 2 Lung organ visceral coefficient of Wistar rats exposed to chrysotile asbestos fiber dust at the time in 1, 3, 6 months in four major mining areas of China

组别	体重增长/g			肺重量/g			肺系数		
	1个月	3个月	6个月	1个月	3个月	6个月	1个月	3个月	6个月
阴性对照	433.70 ± 13.66	601.5 ± 14.72	732.50 ± 23.46	2.12 ± 0.28	2.05 ± 0.24	2.06 ± 0.16	0.47 ± 0.03	0.34 ± 0.03	0.28 ± 0.02
陕南	439.00 ± 19.39	570.00 ± 23.16	660.50 ± 21.15	2.12 ± 0.16	2.14 ± 0.19	2.17 ± 0.14	0.48 ± 0.01	0.38 ± 0.04 ^a	0.33 ± 0.04 ^a
茫崖	428.00 ± 32.17	533.00 ± 33.76	649.50 ± 43.25 ^a	1.91 ± 0.18	2.26 ± 0.07 ^a	2.81 ± 0.12 ^a	0.45 ± 0.02	0.42 ± 0.03 ^a	0.43 ± 0.03 ^a
新康	436.30 ± 27.55	513.00 ± 13.58	613.00 ± 27.35 ^a	1.84 ± 0.15	2.27 ± 0.14 ^a	3.36 ± 0.14 ^a	0.46 ± 0.05	0.44 ± 0.03 ^a	0.55 ± 0.02 ^a
阿克塞	465.00 ± 25.19	586.00 ± 24.63	676.00 ± 17.89	1.97 ± 0.14	2.13 ± 0.12	2.15 ± 0.13	0.46 ± 0.02	0.36 ± 0.04	0.34 ± 0.02 ^a

a 表示与对照组比较有显著差异($P < 0.05$)。

2.5 肺组织病理切片(HE 染色)

4 组温石棉染毒 Wistar 大鼠肺组织均发生显著的病理改变,出现不同程度的充血、水肿、炎性细胞和巨噬细胞浸润,肺间隔增宽,平滑肌破坏,肺泡大小不均和数量减少。随着粉尘作用时间延长,各染毒组 Wistar 大鼠肺病变逐渐加重,出现严重肺实变、纤维化,肺泡细胞大量破裂,肺组织塌陷。不同产地温石棉致病变的方式不同,阿克塞温石棉组的 Wistar 大鼠肺以出血和炎症细胞浸润为主,茫崖温石棉组的 Wistar 大鼠肺以炎症细胞浸润为主,肺泡轻度改变;陕南和新康温石棉组染毒的 Wistar 大鼠肺以肺间隔增宽、支气管周围炎性细胞浸润病变为主(图3)。

2.6 肺组织 p53、p16 基因检测

与阴性对照组相比,染毒 1 个月时各组 p53 基因表达无显著性降低;染毒 3 个月时,除四川新康外各染毒组 p53 基因均降低,与对照组相比差异具有统计学意义($P < 0.05$);染毒 6 个月时各组 p53 基因进一步降低表达降低,与对照组相比差异具有统计学意义($P < 0.05$)。p53 基因降低趋势由大到小为:阿克塞 > 陕南 > 茫崖 > 新康(图4)。

与阴性对照组相比,染毒 1 个月时除阿克塞温石棉组外,其余各组 p16 基因表达均显著性降低,染毒 3~6 个月各组 p16 基因表达进一步降低,与对照组相比差异具有统计学意义($P < 0.05$)。p16 基因表达降低趋势由大到小为:新康 > 茫崖 > 阿克塞 > 陕南(图5)。

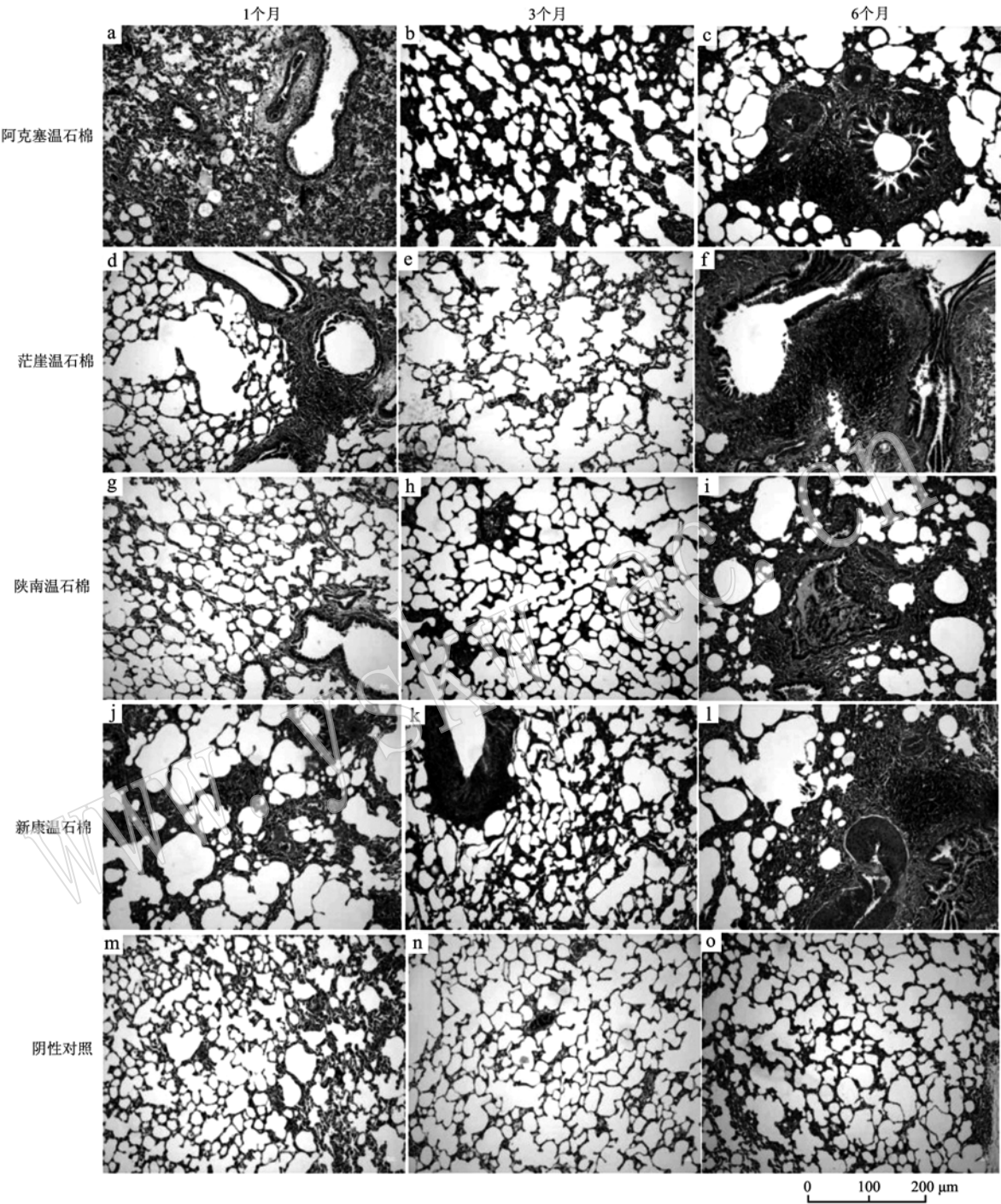


图 3 四大温石棉矿区可吸入纤维粉尘染毒 Wistar 大鼠的肺组织 HE 切片图

Fig. 3 HE section of lung tissue of Wistar rats exposed to inhalable fiber dust at the time in 1, 3, 6 months in four main chrysotile asbestos mining areas

3 讨论

3.1 温石棉可改变肺组织外观及肺脏系数

由不同染毒时间 Wistar 肺组织外观可见,我国四大产地可吸入温石棉纤维粉尘均不同程度损害肺

组织,使肺组织产生炎性或纤维化改变,但未见瘤样组织。脏器系数是毒理实验中常用指标,动物染毒后,受损脏器重量可发生改变,脏器系数也随之改变。脏器系数增大,表示脏器充血、水肿或增生肥大等病变;脏器系数减小,表示脏器萎缩及其他退行性改变。与对照组比较,温石棉纤维粉尘染毒 Wistar

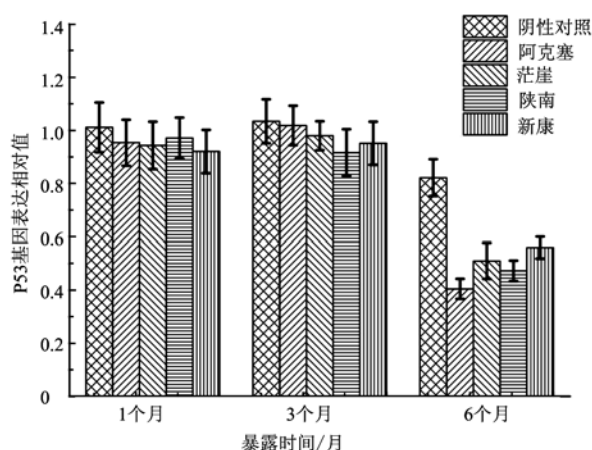


图4 我国四大矿区温石棉纤维粉尘染毒 Wistar 大鼠肺组织的 p53 基因表达

Fig. 4 p53 gene expression in lung tissue of Wistar rats exposed to chrysotile asbestos fiber dust at the time in 1, 3, 6 months in four major mining areas of China

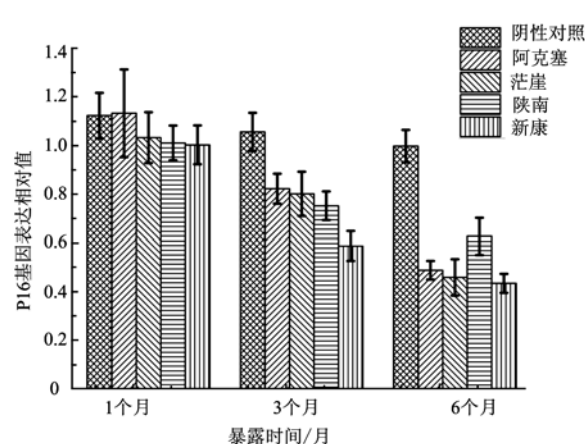


图5 我国四大矿区温石棉纤维粉尘染毒 Wistar 大鼠肺组织的 p16 基因表达

Fig. 5 p16 gene expression in lung tissue of Wistar rats exposed to chrysotile asbestos fiber dust at the time in 1, 3, 6 months in four major mining areas of China

大鼠 1 个月,肺脏系数无显著性变化,染毒 3~6 个月,Wistar 大鼠体重逐渐降低,肺组织重量逐渐增加,肺脏系数随之增大,与对照组相比差异具有统计学意义($P < 0.05$)。肺脏器系数和肺组织外观结果显示我国四大产地的温石棉可吸入纤维粉尘可损害肺组织,使肺组织充血、水肿或肥大增生,随之实变,损伤程度和病变方式随产地不同。Kim 等(2015)研究发现暴露于高浓度石棉环境中矿工体内的肺石棉斑和肺纤维化显著高于正常人,CT 结果显示胸膜石棉斑块数量和大小不同。Lemaire 等(1986)研究发现石棉肺病变特点是巨噬细胞积累,成纤维细胞增殖和胶原沉积。这些研究显示温石棉的可吸入纤维粉尘可致肺组织损伤,长期吸入可使肺组织纤维化,与本研究结果一致。

3.2 温石棉可致肺组织病理改变

HE 染色结果显示,4 种温石棉可吸入纤维粉尘可不同程度和方式损伤肺组织结构,长期染毒均可使肺组织纤维化(图2、图3)。FT-IR 分析结果显示,温石棉主要成分、化学基团与表面结构的完善性与产地之间存在差异(图1),这可能与 4 种产地温石棉对生物安全性不同相关。温石棉主要结构为由硅氧(SiO_2)四面体和 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 八面体组成的具双层型结构的三八面体硅酸盐矿物,不同产地温石棉的 SiO_2 和杂质含量不同。Piao 等(2001)研究显示暴露于 SiO_2 颗粒可致大鼠肺组织损伤,早期主要表现为炎症,后期为肺间质纤维化。4 种不同产地温石棉可吸入纤维粉尘对 Wistar 大鼠肺组织损伤程度与方式

可能与 SiO_2 和杂质含量相关。

关于温石棉的细胞毒性和机制国内有少量研究。查雨欣等(2017)研究发现,新康和茫崖温石棉可致大鼠体内产生过量 ROS,导致脂质过氧化作用,抗氧化酶 SOD 耗竭或失代偿,清除自由基的能力下降,造成大鼠肺氧化应激损伤,不同地域温石棉氧化损伤作用存在差异。黄凤德等(2018)研究显示我国 4 大主产地的温石棉均不同程度地抑制 A549 细胞增殖,诱导细胞凋亡和阻滞细胞周期,推测温石棉诱导细胞与凋亡大小与不同产地的化合物杂质含量不同相关。曾娅莉等(2012)研究显示温石棉纤维对 V79 细胞具有细胞毒性,其毒性大小与温石棉在有机酸中的溶蚀性相关。何静等(2014)研究发现不同矿床的温石棉,因生成条件不尽相同,表现活性基团不同,则对细胞的毒性不同,这些研究与本实验结果相似,具体原因还需进一步研究。

3.3 温石棉降低肺 p53、p16 基因表达

p53 基因具有抑制细胞分裂、修复损伤的 DNA 以及诱导细胞凋亡等功能。p53 基因时刻监控着细胞染色体 DNA 的完整性,参与 DNA 的复制与修复,如果修复失败,p53 蛋白即启动凋亡,诱导细胞自杀,从而防止细胞恶变。p16 基因是参与细胞周期调控的基本基因,可调节细胞的增殖及分裂。目前研究资料认为 p16 是比 p53 更为重要的一种新型抗癌基因,有人把它比作细胞周期中的刹车装置,一旦失灵则会导致细胞恶性增殖,导致恶性肿瘤发生。p53、p16 基因是细胞周期重要的调控因子和抑癌基因,它

可修复受损的 DNA, 避免细胞癌变, 与肺癌的发病密切相关 (Demirhan *et al.*, 2010; Stankovic *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2017)。它们的降低, 意味着个体容易发生癌变, 检测 p53 和 p16 基因对肿瘤的诊断具有十分重要的意义。

本实验检测到我国四大产地的温石棉可吸入纤维染毒 Wistar 大鼠后均降低抑癌基因 p16 和 p53 表达, 但不同产地的温石棉纤维粉尘对 p53 与 p16 降低的程度不同。Mishra 等 (1997) 研究显示老鼠暴露于温石棉纤维的气溶胶 24 h, 免疫组化法检测到 p53 蛋白升高, 8 d 开始下降, 14 d 后低于正常水平。曾娅莉等 (2013) 研究显示我国四大产地的温石棉均不同程度抑制 V79 细胞生长, 下调 p16 和 p53, 有诱导癌症发展的风险。叶微等 (2015) 研究显示 4 种温石棉的单细胞凝胶电泳实验和 V79 细胞微核实验可致细胞染色体和 DNA 的不稳定性, 这些研究与本实验结果类似。至于温石棉致肿瘤的风险评估, 还需进一步证实。

4 结论

(1) 我国四大温石棉矿区可吸入纤维粉尘不同程度损伤 Wistar 大鼠肺组织, 可致肺出血、水肿、炎症细胞浸润的急性损伤, 长期暴露可致肺组织纤维化。

(2) 我国四大温石棉矿区可吸入纤维粉尘可不同程度下调 Wistar 大鼠肺组织 p53、p16 抑癌基因, 具有致肺癌的风险。

References

- Baur X, Soskolne C L, Lemen R A, *et al.* 2015. How conflicted authors undermine the World Health Organization (WHO) campaign to stop all use of asbestos, spotlight on studies showing that chrysotile is carcinogenic and facilitates other non-cancer asbestos-related diseases [J]. *Int. J. Occup. Environ. Health*, 21: 176 ~ 179.
- Bai Jun, Cui Yan, Zhang Qingbi, *et al.* 2017. Study on the effect of chrysotile asbestos on lung injury in rats based on multiple non-exposed tracheal drips [J]. *Acta Petrologica et Mineralogica*, 36(6): 916 ~ 924 (in Chinese).
- Bernstein D, Dunnigan J, Hesterberg T, *et al.* 2013. Health risk of chrysotile revisited [J]. *Crit. Rev. Toxicol.*, 43: 154 ~ 183.
- Demirhan O, Tastemir D, Hastürk S, *et al.* 2010. Alterations in p16 and p53 genes and chromosomal findings in patients with lung cancer: Fluorescence in situ hybridization and cytogenetic studies [J]. *Cancer Epidemiol*, 34: 472 ~ 477.
- Du Lili, Lan Yajia and Wang Mianzhen. 2014. The causes of death of chrysotile asbestos miners [J]. *Journal of Preventive Medicine Information*, 30(6): 446 ~ 450 (in Chinese).
- Enrico Favero-Longo S, Turci F, Tomatis M, *et al.* 2009. The effect of weathering on ecopersistence, reactivity, and potential toxicity of naturally occurring asbestos and asbestiform minerals [J]. *J. Toxicol. Environ. Health A*, 72: 305 ~ 314.
- He Jing, Dong Faqin, Deng Jianjun, *et al.* 2014. The toxicity of chrysotile asbestos from different habitats to V79 cells [J]. *Environmental and Occupational Medicine*, 31(6): 476 ~ 478 (in Chinese).
- Huang Fengde, Wang Yuli, Feng Chenxu, *et al.* 2018. A comparative study on apoptosis and cycle arrest of A549 cells induced by chrysotile asbestos dust in four mining areas of China [J]. *Acta Petrologica et Mineralogica*, 37(6): 967 ~ 974 (in Chinese with English abstract).
- Gao J, Woodward A, Vardoulakis S, *et al.* 2017. Haze, public health and mitigation measures in China, A review of the current evidence for further policy response [J]. *Sci. Total Environ.*, 578: 148 ~ 157.
- Gao Z, Hiroshima K, Wu X, *et al.* 2015. Asbestos textile production linked to malignant peritoneal and pleural mesothelioma in women, Analysis of 28 cases in Southeast China [J]. *Am. J. Ind. Med.*, 58: 1 040 ~ 1 049.
- Gilham C, Rake C, Burdett G, *et al.* 2016. Pleural mesothelioma and lung cancer risks in relation to occupational history and asbestos lung burden [J]. *Occup. Environ. Med.*, 73: 290 ~ 299.
- Guan W J, Zheng X Y, Chung K F, *et al.* 2016. Impact of air pollution on the burden of chronic respiratory diseases in China, time for urgent action [J]. *Lancet*, 388: 1 939 ~ 1 951.
- Kim Y, Myong P, Lee J K, *et al.* 2015. Characteristics of pleural plaques related to occupational or environmental asbestos exposure from South Korean asbestos mines [J]. *Korean J. Radiol.*, 16: 1 142 ~ 1 152.
- Lemaire I, Beaudoin H, Massé S, *et al.* 1986. Alveolar macrophage stimulation of lung fibroblast growth in asbestos-induced pulmonary fibrosis [J]. *Am. J. Pathol.*, 122: 205 ~ 211.
- Mishra A, Liu J Y, Brody A R, *et al.* 1997. Inhaled asbestos fibers p53 induce expression in the rat lung [J]. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 16: 479 ~ 485.
- Piao C Q, Zhao Y L and Hei T K. 2001. Analysis of p16 and p21 (Cip1)

- expression in tumorigenic human bronchial epithelial cells induced by asbestos[J]. *Oncogene*, 20: 7 301 ~ 7 306.
- Salamatipour A, Mohanty S K, Pietrofesa A, *et al.* 2016. Asbestos fiber preparation methods affect fiber toxicity[J]. *Environ. Sci. Technol. Lett.*, 3: 270 ~ 274.
- Stankovic T, Milinkovic V, Bankovic J, *et al.* 2014. Comparative analyses of individual and multiple alterations of p53, PTEN and p16 in non-small cell lung carcinoma, glioma and breast carcinoma samples [J]. *Biomed Pharmacother*, 68: 521 ~ 526.
- Wang F, Ni S S and Liu H. 2016. Pollutational haze and COPD, etiology, epidemiology, pathogenesis, pathology, biological markers and therapy[J]. *J. Thorac. Dis.*, 8(1): E20 ~ 30.
- Wang Yulin, Huo Tingting, Dong Faqin, *et al.* 2018. Mechanisms of apoptosis of A549 cells induced by chrysotile asbestos via activated mitochondrial pathway[J]. *Acta Petrologica et Mineralogica*, 37(2): 318 ~ 324(in Chinese with English abstract).
- Ye Q, Fu J F, Mao J H, *et al.* 2016. Haze is an important medium for the spread of rotavirus[J]. *Environ. Pollut.*, 216: 324 ~ 331.
- Ye Wei, Huo Tingting, Deng Jianjun, *et al.* 2015. The mutagenicity of four chrysotile asbestos species[J]. *Journal of Toxicology*, 29(5): 369 ~ 372(in Chinese).
- Yang S, Dong S, Qu X, *et al.* 2017. Clinical significance of Wip1 over expression and its association with the p38MAPK/p53/p16 pathway in NSCLC[J]. *Mol. Med. Rep.*, 15: 719 ~ 723.
- Zeng Yali, Gan Siyang, Dong Faqin, *et al.* 2012. Dissolution characteristics of chrysotile asbestos and four main substituted fibers in organic acids and mechanism of cytotoxicity in vitro[J]. *Modern Preventive Medicine*, 39(12): 2 938 ~ 2 941(in Chinese).
- Zeng Yali, Wang Hongzhou, Dong Faqin, *et al.* 2013. Effect of chrysotile asbestos and its four substitutes on the expression of tumor protein profiles in V79 cells in China[J]. *Acta Petrologica et Mineralogica*, 32(6): 803 ~ 808(in Chinese with English abstract).
- Zha Yuxin, Cui Yan, Bai Jun, *et al.* 2017. The oxidative damage of typical chrysotile asbestos from different regions in Wistar rats[J]. *Journal of Toxicology*, 31(4): 227 ~ 282(in Chinese).

附中文参考文献

- 柏 珺, 崔 琰, 张青碧, 等. 2017. 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[J]. *岩石矿物学杂志*, 36(6): 916 ~ 924.
- 杜利利, 兰亚佳, 王绵珍. 2014. 温石棉矿工死因分析[J]. *预防医学情报杂志*, 30(6): 446 ~ 450.
- 何 静, 董发勤, 邓建军, 等. 2014. 不同产地的温石棉对 V79 细胞的毒性对比研究[J]. *环境与职业医学*, 31(6): 476 ~ 478.
- 黄凤德, 王玉琳, 冯晨旭, 等. 2018. 我国四大矿区温石棉粉尘诱导 A549 细胞凋亡和周期阻滞的对比研究[J]. *岩石矿物学杂志*, 37(6): 967 ~ 974.
- 王玉琳, 霍婷婷, 董发勤, 等. 2018. 温石棉通过活性氧激活线粒体通路诱导 A549 细胞凋亡的机制研究[J]. *岩石矿物学杂志*, 37(2): 318 ~ 324.
- 叶 薇, 霍婷婷, 邓建军, 等. 2015. 四种温石棉致突变性研究[J]. *毒理学杂志*, 29(5): 369 ~ 372.
- 曾娅莉, 甘四洋, 董发勤, 等. 2012. 温石棉与 4 种主要代用纤维在有机酸溶解特性与体外细胞毒性的机理研究[J]. *现代预防医学*, 39(12): 2 938 ~ 2 941.
- 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): 227 ~ 282.