

诱导痰中巨噬细胞碳含量的定量方法

刘元升, 李建宇, 管鸽, 曹雪, 蒋梦会, 祝肖肖, 魏禄堂, 冷曙光, 郑玉新

青岛大学公共卫生学院, 山东 青岛 266000

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2020.20045

摘要:

[背景] 巨噬细胞碳含量作为颗粒物内暴露的新型生物标志物可通过诱导痰获得。当前分子流行病学研究中诱导痰保存尚无有效方法, 并且诱导痰中巨噬细胞碳含量的定量方法国内尚无报道。将此标志物应用于含碳颗粒物暴露需要进行方法的标准化研究和验证。

[目的] 探究并建立新鲜诱导痰液新型保存方法和诱导痰中巨噬细胞碳含量定量方法。

[方法] 选择无特殊职业有害因素暴露的自来水厂工人作为一般人群 ($n=169$) 进行诱导痰中碳含量方法学验证和影响因素研究。受试者吸入超声雾化的4.5%高渗盐水并咳出痰液, 向痰液中加入约20~30 mL的Sacomanno固定液倒转摇匀, 置于阴凉避光处保存。待返回实验室用痰消化液消化痰液, 杜氏磷酸缓冲液清洗, 离心获得纯细胞悬液。血涂片法涂片, Diff-quick快速染液固定染色。使用光学显微镜在物镜100倍放大并加香柏油对每份样本随机选取的50个形态完好的巨噬细胞拍照, 并通过Image J软件处理照片进行巨噬细胞碳含量定量: 在挖去细胞核之后, 转换灰度使照片呈黑白色, 并根据每个细胞染色情况特异性调整灰度值, 以保证能计算出细胞中所有的碳颗粒。

[结果] 用Sacomanno固定液保存的新鲜诱导痰液, 经处理后, 镜下观察视野杂质少, 细胞形态学完整, 核质清晰, 细胞核呈蓝紫色, 胞浆呈淡粉红色或浅蓝色, 细胞核偏于一侧呈圆形或肾形, 胞浆内黑色碳颗粒清晰可见, 大多呈小团块聚集分布, 可进行巨噬细胞碳含量定量。诱导痰成功率在无职业颗粒物暴露的一般人群中为63.3%, 性别不会影响痰液诱导成功率。采用巨噬细胞碳面积与巨噬细胞胞浆面积比 (the proportion of cytoplasm area occupied by carbon particles, PCOC) 的中位数作为个体巨噬细胞碳含量的读数, 一般人群巨噬细胞碳含量的 $M(P_{25}, P_{75})$ 为0.83% (0.63%, 1.34%), 男性为0.79% (0.59%~1.27%), 女性为0.95% (0.75%~1.34%)。

[结论] 本研究方法方便、可靠、高效, 可用于诱导痰标本保存并开展大规模的基于诱导痰的巨噬细胞碳含量测定工作。

关键词: Saccomanno固定液; 诱导痰; 保存方法; 气道巨噬细胞碳含量; 暴露水平

Quantitative method of macrophage carbon content in induced sputum LIU Yuan-sheng, LI Jian-yu, GUAN Ge, CAO Xue, JIANG Meng-hui, ZHU Xiao-xiao, WEI Lu-tang, LENG Shu-guang, ZHENG Yu-xin (School of Public Health, Qingdao University, Qingdao, Shandong 266000, China)

Abstract:

[Background] Macrophage carbon content, as a biomarker of novel particulate matter exposure, can be obtained by inducing sputum. At present, there is no effective method for induced sputum preservation in molecular epidemiological investigations, and there is no domestic report on a quantitative method for evaluating the macrophage carbon content in induced sputum. The application of this marker to the exposure assessment of carbon-containing particles requires standardized research and verification.

[Objective] This study aims to explore and establish a new preservation method for freshly induced sputum and a quantitative method for the carbon content of airway macrophages in induced sputum.

[Methods] In this study, workers without occupational exposure to particulate matters from waterworks were selected as a general population ($n=169$) for method validation and influencing factor study. The participants inhaled 4.5% hypertonic saline water and coughed up sputum, and 20-30 mL Saccomanno's fixative was added in the sputum specimens, shaken well, and stored in a cool place shielded from light. Transferred to the lab, the sputum specimens were digested by the addition of sputasol, washed with Dulbecco's phosphate-buffered saline, and centrifuged to

基金项目

国家自然科学基金项目 (91643203)

作者简介

刘元升 (1993—), 男, 硕士生;
E-mail: liuyuanseng@outlook.com

通信作者

冷曙光, E-mail: sleng@qdu.edu.cn
郑玉新, E-mail: yxzheng@qdu.edu.cn

伦理审批 已获取

利益冲突 无申报

收稿日期 2020-02-06

录用日期 2020-05-10

文章编号 2095-9982(2020)06-0566-07

中图分类号 R114

文献标志码 A

►引用

刘元升, 李建宇, 管鸽, 等. 诱导痰中巨噬细胞碳含量的定量方法 [J]. 环境与职业医学, 2020, 37 (6): 566-572.

►本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2020.20045

Funding

This study was funded.

Correspondence to

LENG Shu-guang, E-mail: sleng@qdu.edu.cn
ZHENG Yu-xin, E-mail: yxzheng@qdu.edu.cn

Ethics approval Obtained

Competing interests None declared

Received 2020-02-06

Accepted 2020-05-10

►To cite

LIU Yuan-sheng, LI Jian-yu, GUAN Ge, et al. title[J]. Quantitative method of macrophage carbon content in induced sputum[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2020, 37(6): 566-572.

►Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2020.20045

obtain pure cell suspension. The concentrated cell suspension was deposited on a slide by blood smear method, followed by Diff-quick staining. Finally, 50 macrophages with an intact morphology were randomly selected from each sample and were photographed with an optical microscope at 100× with oil-immersed, and carbon content was quantified by Image J software: after the nuclei were removed, color pictures were converted to gray images, and gray values were calibrated specifically for each cell stain to ensure that all carbon particles in the cell could be calculated.

[Results] The freshly induced sputum preserved with Saccomanno's fixative had fewer impurities under optical microscope, and the cells had an intact cell morphology, clearly round or kidney-shaped bluish-purple nuclei on the one side, light pink or light blue cytoplasm, and black carbon particles in the cytoplasm, most of which were clustered and distributed in small clumps, suggesting that the prepared induced sputum could be used to quantify the carbon content of airway macrophages. The success rate of induced sputum was 63.3% in the selected general population without occupational particulate matter exposure, and sex did not affect the success rate of sputum induction. Using the median of the proportion of cytoplasm area occupied by carbon particles as individual's carbon content of airway macrophage, the median (P_{25} , P_{75}) carbon content of airway macrophages in the general population was 0.83% (0.63%, 1.34%), that for males was 0.79% (0.59%-1.27%), and that for females was 0.95% (0.75%-1.34%).

[Conclusion] This convenient, reliable, and efficient method can well preserve induced sputum samples, and can be used to the large-scale quantification of carbon content of airway macrophages based on induced sputum.

Keywords: Saccomanno's fixative; induced sputum; preservation method; carbon content of airway macrophages; exposure level

细颗粒物暴露可增加人群心肺疾病的发生风险^[1-4]。目前基于人群的大范围外暴露测量不能准确反映个体暴露水平,已有的内暴露生物标志物如尿中多环芳烃和苯并[a]芘并不能反映颗粒物暴露与健康效应之间的关联^[5],导致无法建立精确的颗粒物暴露与健康效应之间的关系^[6]。因此,需要一个能准确测量并反映个体颗粒物暴露与健康效应关系的生物标志物。作为机体主动防御之一的气道巨噬细胞能吞噬颗粒物等外来异物,而且该吞噬是以剂量依赖性的方式进行^[7]。研究表明,正常人体不产生单质的元素碳,体内的单质碳均为外来污染物^[8],并且气道巨噬细胞碳含量(carbon content of airway macrophage, CCAM)可通过光学显微镜检出并定量,所以其作为内暴露生物标志物能有效表征个体颗粒物内暴露情况,在很多研究中也得到了证实^[9-11]。在职业人群研究中,通过CCAM分析可以得到职业人群颗粒物暴露情况及其与健康效应间的联系^[9, 12-13]。

对于一个评估颗粒物暴露的生物标志物,需要有效、标准化的测定方法。因此,建立一种方便、可靠、高效的诱导痰保存方法及CCAM定量方法显得非常重要。痰是经口咳出的下呼吸道分泌物,其成分包括上皮细胞和炎性细胞在内的细胞成分和液体成分。但是普通人痰液较少,留取自然痰标本困难,这限制了通过痰液研究探讨CCAM定量。诱导痰是通过吸入超声雾化器产生的高渗氯化钠盐水后产生的痰液,通过此方法可以获取满足要求的样本。Saccomanno固定液(含有50%乙醇和2%聚乙二醇)可用于支气管肺泡灌洗液等生物样本的保存^[14-16],具有方便、可靠等优点,易于推广。本研究通过向痰液中加入适量

Saccomanno固定液进行保存处理,探究新鲜诱导痰液保存方法,建立诱导痰中CCAM定量方法,并通过分子流行病学研究中收集的痰液生物样本进行保存处理以验证方法,并探讨影响这一指标的因素,以及非职业暴露成年人群的诱导痰中CCAM。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

医用4.5%氯化钠溶液,4℃保存。滤膜(70 μm, Falcon, 中国)。Diff-quick快速染液(Yeasen Biotech, 中国),其中包含一瓶固定液(主要成分为甲醇),一瓶红色酸性染液A液,一瓶蓝色碱性染液B液。载玻片(病理级,世泰,中国),用无水乙醇浸泡30 min以上,然后用吸水纸擦拭干净保存于玻片盒。

Saccomanno固定液^[17][2%聚乙二醇(PEG1500, 分析纯,国药试剂有限公司,中国)与50%乙醇混合液(分析纯,国药试剂有限公司,中国)]:微波炉融化聚乙二醇后,取20 mL于广口瓶中然后加入20 mL 50%乙醇摇匀配置成母液,然后将40 mL母液缓缓倒入960 mL的50%乙醇中摇匀配置成Saccomanno固定液,阴凉避光保存。

痰消化液(Thermo Fisher Scientific, 美国):取7.5 mL痰消化液放入广口瓶中,然后加入92.5 mL无菌蒸馏水混匀,置于4℃备用。

杜氏磷酸缓冲液(Thermo Fisher Scientific, 美国)。超声雾化器(402AI, 鱼跃, 中国),离心机(SL40R, Thermo Fisher Scientific, 美国),光学显微镜(BX60, Olympus, 日本),相机(DP72, Olympus, 日本),图像分析:Image J (<https://imagej.nih.gov/ij/>)。

1.2 研究人群的选择

本研究选择无明显职业暴露的自来水厂水泵工种工人作为一般人群 ($n=169$) 进行方法学验证和影响因素研究。包括纳入和排除标准在内的研究设计等详细信息已经发表^[1, 18], 纳入标准包括: 纳入人群负责操作和控制水泵, 不接触其他职业性有害因素和颗粒物; 排除标准包括: 有肺部手术、肺结核、癌症、先天性心脏病和/或病毒性心肌炎的病史。开展研究的时间为2018年10月份, 同时当地同时间的 $PM_{2.5}$ 数据主要来自于《2018年10月全国城市空气质量报告》^[19]。在研究和生物样本采集之前已经获得所有受试者的书面知情同意。本研究得到了中国疾病预防控制中心职业卫生与中毒控制所医学伦理委员会的批准(NIOHP201604)。

1.3 诱导痰的获取

受试者通过超声雾化器(流量: $8L \cdot min^{-1}$)经口吸入4.5%氯化钠雾气并经鼻呼出, 缓慢呼吸(正常潮气量, 呼吸之间可暂停1~2s), 间隔定时作深吸气到肺总量; 每位受试者每次雾化持续5~7min, 间隔3min再次雾化, 共计3次。雾化间隔期间轻拍受试者背部, 以促进痰液排出。雾化结束, 嘱受试者将痰液吐于贴有其个人信息标签的50mL无菌离心管中。诱导出不含唾液的纯痰液>2mL为诱导成功。在诱导过程中, 考虑到现场调查取样的方便性和可操作性, 故本研究优化之后采用恒定浓度4.5%盐溶液。

1.4 痰液的保存

取20~30mL Saccomanno固定液加入装有痰液的离心管中并充分混匀, 注意不要使总体积超过40mL, 然后用封口膜封口后置于阴凉避光处保存, 待转运到实验室进行后续处理。

1.5 痰液中细胞悬液的制备

以往类似研究中, 处理痰液均按照1:4的比例加入二硫苏糖醇消化痰液, 然后再用滤膜进行过滤。考虑到二硫苏糖醇使用量大而且配置复杂, 给流行病学现场采集以及现场实验带来不便, 故本研究进行优化。采用商品化的痰消化液以消化痰液, 按照与痰液1:1比例加入将痰液消化。检查痰液消化处理效果是否合格: 在细胞涂片前进行细胞计数(大于 1.0×10^5)并查看视野中细胞状况无破损或细胞结团。

将装有痰液的离心管放入离心机中以 $4^\circ C$ 2100 $\times g$ 离心30min, 弃上清后, 向沉淀中加入等体积的痰消化液并涡旋摇匀, 置 $37^\circ C$ 水浴至完全液化(10~15min)。

使用滤膜过滤, 在 $4^\circ C$ 550 $\times g$ 条件下离心7min, 留取细胞沉淀, 并使用2000 μL 杜氏磷酸缓冲液清洗两遍, 以获得纯净的细胞沉淀。

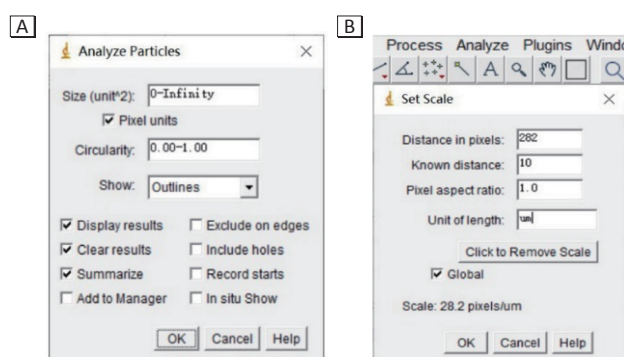
1.6 细胞涂片的制备

向细胞沉淀中加入200~600 μL 杜氏磷酸缓冲液混匀, 杜氏磷酸缓冲液加入量取决于细胞计数的结果(细胞数量应大于 1.0×10^5), 之后取40 μL 细胞悬液使用血细胞涂片法获得细胞涂片。待涂片自然晾干后(不要超过48h), 用Diff-quick快速染液中的固定液固定10min, 在A液中固定5~10s, 再于B液中固定5~10s, 染色好的玻片置于蒸馏水中上下提动去除多余染液, 然后再将玻片置于无水乙醇中2~3s以除去多余水分, 最后滴加适量中性树胶并用盖玻片封片。

1.7 CCAM 分析定量

采用光学显微镜在物镜放大100倍、油浸条件下, 对随机选取、染色良好、形态完整的巨噬细胞拍照成像, 拍照时聚焦于细胞核二维平面且无虚影。每份样本随机选取50个巨噬细胞图片。以下测量CCAM步骤均在Image J软件中进行。

(1) 测量标尺, 确定实际长度和像素间的转换关系($282 \text{ pixel}=10 \mu m$) (Analysis>>Set scale, 选项Distance in pixels填入像素长度, 在Known distance中填入标尺实际长度, Unit of length填 μm , 并勾选Global) (图1)。



[注] A图显示计算碳颗粒时需要勾选的选项; B图显示设置标尺长度和像素之间的对应关系。

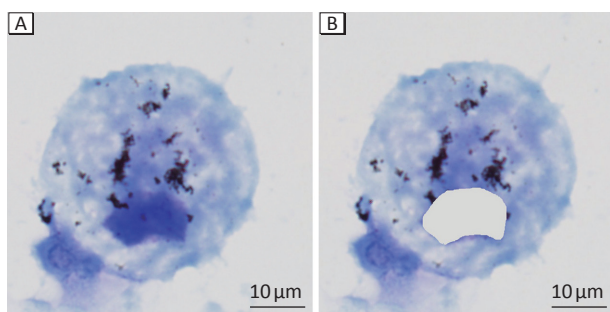
[Note] Figure A shows the options that need to be checked when calculating carbon particles; Figure B shows the relationship between the length of set scale and the pixels.

图1 测量过程中参数设置

Figure 1 Parameter setting for measurement

(2) 用Freehand selection功能测量细胞和细胞核的面积 (Analysis>>Analyze particles, show下拉菜单选择Outlines, 并勾选Display results、Clear results和Summarize)。

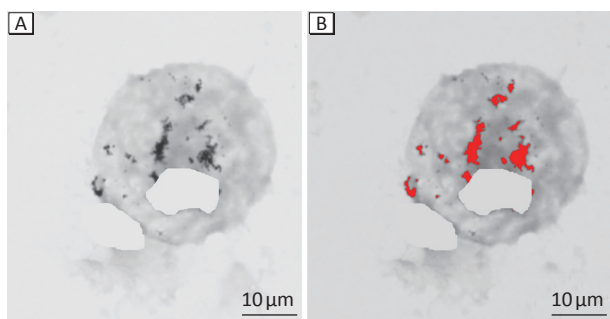
(3) 切除核 (Edit>>Cut) (图2), 转换灰度使照片呈黑白色 (Image>>Type>>8 bit, Image>>Type>>RGB stack), 根据每个细胞染色情况对每个要测量的细胞照片特异性调整灰度值, 以保证能计算出所有细胞中的碳颗粒 (Image>>Adjust>>Threshold>>Apply)。如果存在非碳颗粒会影响后续碳定量, 可以圈中那些非碳颗粒区域并切除 (图3)。



[注] 胞浆中黑色为碳颗粒。

[Note] The black color in the cytoplasm indicates carbon particles.

图2 Image J软件进行气道巨噬细胞去核前 (A)、后 (B) 对比
Figure 2 Comparison of before (A) and after (B) enucleation of airway macrophages with Image J software



[注] A图显示转换灰度后的细胞图片; B图显示调整灰度值后选中碳颗粒的图片。

[Note] Figure A shows a cell after gray conversion; Figure B shows selected carbon particles after grey conversion.

图3 Image J软件进行巨噬细胞碳定量

Figure 3 Carbon quantification of macrophages with Image J software

(4) 最后, 计算每个样本 CCAM, 以中位数、第25百分位数 (P_{25})、第75百分位数 (P_{75}) 描述。

(5) 抽取过高以及过低的样本进行二次重测, 共16个样本。对二次重测数据和首次测量数据进行一致性检验 (intra-class correlation coefficients, ICC), $ICC=0.95$, 可认为一次重测数据可信。

1.8 统计学方法

本研究使用 SAS 9.4 进行统计分析。男性和女性人群诱导痰成功率、吸烟、饮酒差异采用卡方检验, 年龄和体重指数差异采用独立样本 t 检验。使用 Spearman 秩相关检验分析巨噬细胞的碳含量指标之

间的相关性。本研究后续分析均使用巨噬细胞碳面积与巨噬细胞胞浆面积比 (the proportion of cytoplasm area occupied by carbon particles, PCOC) 的中位数 (M) 作为 CCAM 指标。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 一般人群痰液诱导结果及影响因素

研究人群的基本信息如表1所示。实际样本结果表明, 一般人群诱导痰的成功率为63.3%, 其中男性和女性的诱导痰成功率分别为65.8%和57.1%, 差异没有统计学意义 ($P=0.2875$); 诱导失败人群和诱导成功人群之间基本信息差异没有统计学意义。男性平均年龄 (36.4岁) 小于女性 (50.5岁), 吸烟率高于女性 (女性无吸烟), 并且体重指数高于女性 ($25.3 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-2}$ vs $23.1 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-2}$)。此外, 生物采样时当月大气环境 $\text{PM}_{2.5}$ 水平为 $51 \mu\text{g} \cdot \text{m}^{-3}$ 。

表1 研究对象的一般情况

Table 1 General information of the participants

特征 Characteristics	合计 ($n=169$) Total	男性 ($n=120$) Male	女性 ($n=49$) Female	P
年龄 / 岁 ($\bar{x} \pm s$) Age / years ($\bar{x} \pm s$)	40.5 $\pm$ 11.9	36.4 $\pm$ 11.8	50.5 $\pm$ 2.4	<0.0001 ^a
体重指数 / $\text{kg} \cdot \text{m}^{-2}$ ($\bar{x} \pm s$) Body mass index / $\text{kg} \cdot \text{m}^{-2}$ ($\bar{x} \pm s$)	24.6 $\pm$ 4.2	25.3 $\pm$ 4.3	23.1 $\pm$ 3.4	0.0027 ^a
吸烟 [n (%)] Smokers [n (%)]	66 (39.1)	66 (55.0)	0 (0)	<0.0001 ^b
饮酒 * [n (%)] Alcohol drinkers * [n (%)]	131 (78.0)	99 (83.2)	32 (65.3)	0.0110 ^b
诱导痰 [n (%)] Induced sputum [n (%)]	107 (63.3)	79 (65.8)	28 (57.1)	0.2875 ^b

[注] a: 两组独立样本 t 检验; b: 卡方检验; *: 饮酒缺失1例。

[Note] a: Independent samples t -test; b: Chi-square test; *: There is one case missing in the number of alcohol drinkers.

2.2 痰液保存处理方法结果

经 Saccomanno 固定液保存处理的痰液, 形态学检查结果显示, 巨噬细胞形态完整, 核质清晰, 细胞核偏于一侧呈圆形或肾形, 易于染色, 染色后细胞核呈蓝紫色, 胞浆呈浅粉色或浅蓝色; 镜下观察视野中杂质少, 细胞易于辨认, 胞内黑色碳颗粒清晰可见, 呈小团块聚集状, 可用于碳定量分析。图4为代表性痰巨噬细胞图片, 细胞内的碳颗粒数量不等。

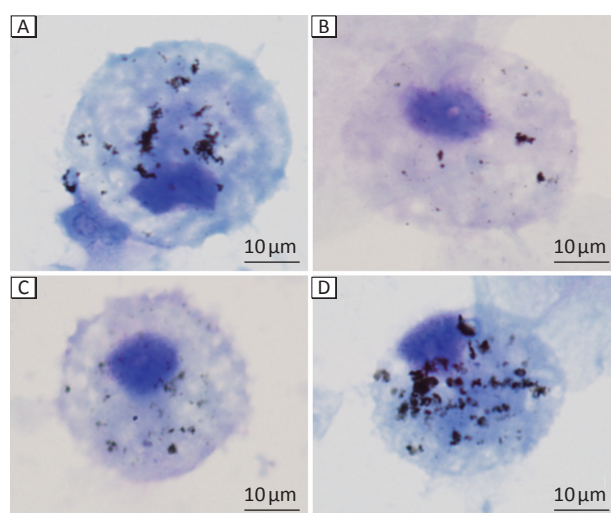
2.3 CCAM 的分析参数

在确定 CCAM 参数过程中, 通过计算 PCOC 来定量每个巨噬细胞的碳含量, 可以避免不同大小的巨噬细胞和碳颗粒与细胞核重叠所产生的偏差。每个研究

对象均计算分析 50 个巨噬细胞中的 PCOC, 由于数据呈偏态分布, 所以使用均数、中位数、 P_{25} 、 P_{75} 描述个体 CCAM 水平。经 Spearman 相关分析结果表明, 这几个指标高度相关 ($r=0.95\sim 0.98$)。所以, 选择 PCOC 的中位数作为反映个体 CCAM 水平的参数。

2.4 一般人群的 CCAM 范围

经 Saccomanno 固定液保存并标准化方法处理的痰液中 CCAM 定量工作可以顺利进行 (图 5)。按照此方法本研究对样本进行处理分析, 结果显示, 一般非职业颗粒物暴露人群 CCAM 的 PCOC 的中位数 (P_{25} , P_{75}) 为 0.83% (0.63%, 1.34%), 男性为 0.79% (0.59%~1.27%), 女性为 0.95% (0.75%~1.34%)。



[注] 不同巨噬细胞吞噬碳颗粒具有异质性。胞浆中黑色为碳颗粒。图 A、B、C、D 为气道巨噬细胞代表性图片。图 D 中的 CCAM 水平最高。

[Note] Different macrophages have heterogeneity in phagocytosis of carbon particles. The black color in the cytoplasm indicates carbon particles. A, B, C, D: Four representative pictures of airway macrophages. The CCAM level in figure D is the highest.

图 4 气道巨噬细胞碳颗粒光学显微镜图

Figure 4 Carbon particles in airway macrophages under light microscope

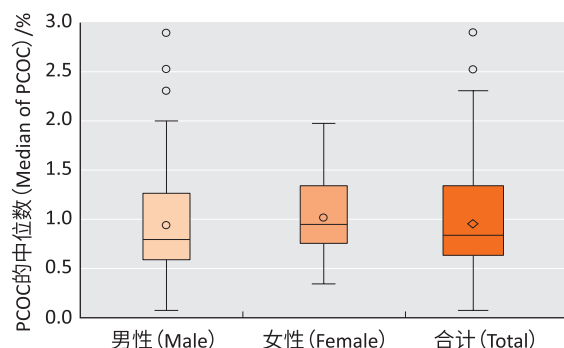


图 5 一般人群的 CCAM 定量水平

Figure 5 Quantitative level of CCAM in a selected general population

3 讨论

通过诱导痰获得的 CCAM 作为大气颗粒物内暴露生物标志物可通过光学显微镜检出并定量。然而, 诱导痰尚无有效的保存方法, 必须在诱导之后 2 h 内处理^[20-22], 并且当前国内诱导痰的处理方法尚无统一标准, 所以需要建立一种方便、可靠、高效的诱导痰保存方法及 CCAM 定量方法。

Saccomanno 固定液 (含有 50% 乙醇和 2% 聚乙二醇) 作为一种固定剂, 可用于支气管肺泡灌洗液等生物样本的保存。基于此, 本研究首次使用 Saccomanno 固定液保存流行病学现场调查获取的痰液, 结果完全满足后续 CCAM 定量工作, 这与李龙芸等^[23] 保存处理肺癌患者晨痰中的痰液细胞以获得清晰癌细胞涂片结果相似。此外, 本研究的诱导痰保存方法优点在于: ①所需固定液配置简易; ②操作简单; ③保存不需要冰箱, 方便在流行病学调查研究中保存样本; ④经 Saccomanno 固定液保存后处理的痰液, 涂片染色后显微镜下观察视野清晰、核质清晰、杂质少、细胞形态完整易于辨别, 完全满足后续 CCAM 定量工作; ⑤经 Saccomanno 固定液保存并处理的痰液涂片结果, 在形态学方面优于 Eells 等^[24] 研究中直接处理痰液并涂片的方法。需要注意的是, 加入 Saccomanno 固定液需要足量, 至少保证每份痰液中加入 20 mL, 并且要充分混匀, 置于阴凉避光处保存。

影响 CCAM 定量的因素有受试者的身体特征、实验因素等。不同人群特征会影响诱导痰的成功率, 而诱导痰成功率可能会影响碳含量的测定。本研究中, 一般人群诱导痰成功率为 63.3%。其他研究中针对不同人群的诱导痰成功率不等: Kalappanavar 等^[25] 针对工业区儿童和 Kulkarni 等^[26] 针对哮喘儿童痰液诱导成功率均为 100%; Kulkarni 等^[26] 对健康儿童诱导成功率仅为 56%, 这与 Brugha 等^[27] 关于健康儿童的诱导痰成功率一致; Jacobs 等^[28-29] 针对糖尿病成人的诱导痰成功率为 87%。上述研究也表明, 在相同人群中痰液诱导成功者与痰液未成功诱导者的基本资料差异没有统计学意义^[25, 27]。有研究表明, 因患有呼吸系统疾病如慢性阻塞性肺部、哮喘、咳嗽等导致身体状况欠佳的时候, 人体会产生更大量的诱导痰样本^[30]。所以, 不同来源人群因其机体特异性差异和暴露环境不同, 即使采用相同的痰液诱导方法 (采用 4.5% 高渗氯化钠溶液), 也会产生不同的诱导成功率。此外, 使用浓度梯度的盐水会增加诱导成功率^[31]。诱导时间

是否足够,诱导是否分多次进行也是影响诱导成功率的重要因素^[27-28, 32]。本研究经验显示,使用的流量大小,诱导时间是否足够,在两次诱导间歇期是否轻拍后背等因素也会影响诱导成功率,在诱导间期轻拍受试者后背有助于其顺利将痰液排出。

实验方法方面,需要注意以下几个影响因素和环节:①在处理过程中,首先要将痰液涡旋使其充分混匀,这有助于离心时痰液细胞与杂质分析。②在消化过程中,本研究使用成品痰消化液,而不是以往使用4倍痰液体积的0.1%二硫苏糖醇^[9, 12, 22],使研究方法更方便、简洁、高效。③在痰液消化过程中,需充分涡旋并且在37℃水浴,以使痰液充分消化。④在拍照过程中,应随机选取形态完整、染色良好的巨噬细胞进行拍照,这也是影响CCAM定量的要素^[10],同时,在拍照之前需要对相机和镜头清理干净^[33]。⑤在定量过程中,定量分析的软件有Image SXM和Image J,前者自动化程度更高,但是只能定量提前处理好的照片,并且只能处理单一一种类细胞,而本研究使用的Image J软件可以更好地特异性处理图片。当前其他学科有研究使用高内涵筛选显微镜方法针对荧光标记的细胞进行筛选并进行下一步分析处理,以达到自动化高通量操作^[34]。发展自动化标记痰液中巨噬细胞并筛选处理也是今后方法学研究的方向。在使用Image J处理过程中,测量者对样本信息是否知晓以及灰度值阈值的确定也是影响CCAM的因素。因此,采用盲法可以减少测量者的观察偏倚,并且需要对部分样本进行重复测量,评判重复性。

综上,本研究使用Saccomanno固定液可以有效保存痰液,本研究方法可有效进行碳CCAM定量,具有快速简便、准确、可靠的优点,为进一步开展暴露于含碳颗粒物特定人群诱导痰的CCAM测定工作奠定了方法学的基础。基于此方法,可深入研究这一内暴露标志物应用于评价不同环境条件下暴露于碳颗粒人群的生物效应以及其适用范围。

参考文献

- [1] YANG M, LI Y, MENG T, et al. Ultrafine CB-induced small airway obstruction in CB-exposed workers and mice [J]. Sci Total Environ, 2019, 671: 866-873.
- [2] PRUNICKI M, STELL L, DINAKARPANDIAN D, et al. Exposure to NO₂, CO, and PM_{2.5} is linked to regional DNA methylation differences in asthma [J]. Clin Epigenetics, 2018, 10: 2.
- [3] WANG H, DUAN H, MENG T, et al. Local and systemic inflammation may mediate diesel engine exhaust-induced lung function impairment in a Chinese occupational cohort [J]. Toxicol Sci, 2018, 162 (2): 372-382.
- [4] XING YF, XU YH, SHI MH, et al. The impact of PM_{2.5} on the human respiratory system [J]. J Thorac Dis, 2016, 8 (1): E69-E74.
- [5] HAJAT A, DIEZ ROUX A V, CASTRO-DIEHL C, et al. The association between long-term air pollution and urinary catecholamines: evidence from the multi-ethnic study of atherosclerosis [J]. Environ Health Perspect, 2019, 127 (5): 057007.
- [6] Health Effects Institute. Traffic-related air pollution: a critical review of the literature on emissions, exposure, and health effects [M]. Boston: Health Effects Institute, 2010.
- [7] BOYLEN CE, SLY PD, ZOSKY GR, et al. Physiological and inflammatory responses in an anthropomorphically relevant model of acute diesel exhaust particle exposure are sex and dose-dependent [J]. Inhal Toxicol, 2011, 23 (14): 906-917.
- [8] KUPIAINEN K, KLIMONT Z. Primary emissions of fine carbonaceous particles in Europe [J]. Atmos Environ, 2007, 41 (10): 2156-2170.
- [9] NWOKORO C, EWIN C, HARRISON C, et al. Cycling to work in London and inhaled dose of black carbon [J]. Eur Respir J, 2012, 40 (5): 1091-1097.
- [10] BAI Y, CASAS L, SCHEERS H, et al. Mitochondrial DNA content in blood and carbon load in airway macrophages. A panel study in elderly subjects [J]. Environ Int, 2018, 119: 47-53.
- [11] ACKERMANN-LIEBRICH U. Alveolar macrophages carbon load: a marker of exposure? [J]. Eur Respir J, 2012, 40 (5): 1065-1066.
- [12] BAI Y, BOVÉ H, NAWROT TS, et al. Carbon load in airway macrophages as a biomarker of exposure to particulate air pollution; a longitudinal study of an international Panel [J]. Part Fibre Toxicol, 2018, 15: 14.
- [13] STEINER S, BISIG C, PETRI-FINK A, et al. Diesel exhaust: current knowledge of adverse effects and underlying cellular mechanisms [J]. Arch Toxicol, 2016, 90 (7): 1541-1553.
- [14] MAREK W, KRAMPE S, DICKGREBER NJ, et al. Automated quantitative image cytometry of bronchial washings in suspected lung cancer: comparison with cytology,

- histology and clinical diagnosis [J]. *Pneumologie*, 1999, 53 (12) : 583-595.
- [15] GARBAR C, MASCAUX C, WESPES E. Is urinary tract cytology still useful for diagnosis of bladder carcinomas? A large series of 592 bladder washings using a five-category classification of different cytological diagnoses [J]. *Cytopathology*, 2007, 18 (2) : 79-83.
- [16] DJURICIC S, PLAMENAC P. The effect of sex factors on cytologic changes in the sputum of young adults exposed to urban air pollution [J]. *Srp Arh Celok Lek*, 1999, 127 (1-2) : 16-20.
- [17] SACCOMANNO G, SAUNDERS RP, ELLIS H, et al. Concentration of carcinoma or atypical cells in sputum [J]. *Acta Cytol*, 1963, 7 : 305-310.
- [18] ZHANG R, DAI Y, ZHANG X, et al. Reduced pulmonary function and increased pro-inflammatory cytokines in nanoscale carbon black-exposed workers [J]. *Part Fibre Toxicol*, 2014, 11 : 73.
- [19] 中国环境监测总站. 2018年10月全国城市空气质量报告[R]. 北京: 中国环境监测总站, 2018.
- [20] PAGGIARO PL, CHANEZ P, HOLZ O, et al. Sputum induction [J]. *Eur Respir J Suppl*, 2002, 37 : 3s-8s.
- [21] NIU Y, ZHANG X, MENG T, et al. Exposure characterization and estimation of benchmark dose for cancer biomarkers in an occupational cohort of diesel engine testers [J]. *J Expo Sci Environ Epidemiol*, 2018, 28 (6) : 579-588.
- [22] PIZZICHINI E, PIZZICHINI MM, EFTHIMIADIS A, et al. Measurement of inflammatory indices in induced sputum : effects of selection of sputum to minimize salivary contamination [J]. *Eur Respir J*, 1996, 9 (6) : 1174-1180.
- [23] 李龙芸, 汪斌超, 陈勇, 等. 改良Saccomanno法用于肺癌患者痰标本处理的应用体会 [J]. *中国肺癌杂志*, 2000, 3 (4) : 280-283.
- [24] EELLS TP, PRATT DS, COPPOLO DP, et al. An improved method of cell recovery following bronchial brushing [J]. *Chest*, 1988, 93 (4) : 727-729.
- [25] KALAPPANAVAR NK, VINODKUMAR CS, GOULI C, et al. Carbon particles in airway macrophage as a surrogate marker in the early detection of lung diseases [J]. *Int J Occup Environ Med*, 2012, 3 (2) : 68-75.
- [26] KULKARNI NS, PRUDON B, PANDITI SL, et al. Carbon loading of alveolar macrophages in adults and children exposed to biomass smoke particles [J]. *Sci Total Environ*, 2005, 345 (1/2/3) : 23-30.
- [27] BRUGHA RE, MUSHTAQ N, ROUND T, et al. Carbon in airway macrophages from children with asthma [J]. *Thorax*, 2014, 69 (7) : 654-659.
- [28] JACOBS L, EMMERECHECHTS J, HOYLAERTS MF, et al. Traffic air pollution and oxidized LDL [J]. *PLoS One*, 2011, 6 (1) : e16200.
- [29] JACOBS L, EMMERECHECHTS J, MATHIEU C, et al. Air pollution-related prothrombotic changes in persons with diabetes [J]. *Environ Health Perspect*, 2010, 118 (2) : 191-196.
- [30] SUMNER H, WOODCOCK A, KOLSUM U, et al. Predictors of objective cough frequency in chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2013, 187 (9) : 943-949.
- [31] POPOV TA, PIZZICHINI MM, PIZZICHINI E, et al. Some technical factors influencing the induction of sputum for cell analysis [J]. *Eur Respir J*, 1995, 8 (4) : 559-565.
- [32] KULKARNI N, PIERSE N, RUSHTON L, et al. Carbon in airway macrophages and lung function in children [J]. *N Engl J Med*, 2006, 355 (1) : 21-30.
- [33] REZAEI HACHESU V, NADERYAN FE'LI S, KARGAR SHOUROKI F, et al. Carbon load in airway macrophages, DNA damage and lung function in taxi drivers exposed to traffic-related air pollution [J]. *Environ Sci Pollut Res*, 2019, 26 (7) : 6868-6876.
- [34] 刘佳, 李钢, 周婷婷, 等. 利用高内涵筛选显微镜技术评估培养的间充质干细胞衰老程度 [J]. *中国老年学杂志*, 2019, 39 (8) : 1939-1942.

(英文编辑: 汪源; 责任编辑: 汪源)