

矽肺患者肺泡巨噬细胞中胆固醇及 ox-LDL 水平分析

张秀峰¹, 朱丽², 刘舒鹏³, 侯晓敏¹, 陈紫莺¹, 刘微¹, 郝小惠³, 王宏丽³, 刘和亮^{1,3}

摘要: [目的] 分析不同期别矽肺患者肺泡灌洗液(BALF)及肺泡巨噬细胞中胆固醇及氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)水平的变化,探讨脂质代谢在矽肺纤维化进展过程中的作用。[方法] 选取59例男性矽肺患者,其中壹期18例,贰期17例,叁期24例,对照组8例,另选取12名健康成年人作为血清对照组。应用HE染色和油红O染色观察肺泡巨噬细胞形态和脂质蓄积情况;应用ELISA法检测BALF和肺泡巨噬细胞中胆固醇、ox-LDL和血清中人结缔组织生长因子(CTGF)水平。[结果] 肺泡巨噬细胞中有脂质存在,随着矽肺分期增高,肺泡巨噬细胞和肺泡灌洗液中胆固醇含量均呈上升趋势,矽肺叁期组均明显高于对照组、矽肺壹期组、矽肺贰期组,差异具有统计学意义($P<0.05$);肺泡巨噬细胞中ox-LDL水平随矽肺分期呈上升趋势,而BALF中ox-LDL水平呈下降趋势,组间两两比较差异具有统计学意义($P<0.05$)。与血清对照组相比,矽肺患者血清中CTGF含量随矽肺进展不断升高($P<0.05$);肺泡巨噬细胞中胆固醇、ox-LDL及BALF中胆固醇与CTGF呈正相关($P<0.05$),BALF中ox-LDL与CTGF呈负相关($P<0.05$)。[结论] 在矽肺纤维化发展进程中,矽肺患者肺泡巨噬细胞中胆固醇代谢失衡,可能与ox-LDL水平增高导致巨噬细胞泡沫化有关。

关键词: 矽肺; 肺泡巨噬细胞; 胆固醇; 氧化低密度脂蛋白; 结缔组织生长因子

Analysis of Cholesterol and Ox-LDL Levels in Alveolar Macrophages from Patients with Silicosis
ZHANG Xiu-feng¹, ZHU Li², LIU Shu-peng³, HOU Xiao-min¹, CHEN Zi-ying¹, LIU Wei¹, HAO Xiao-hui³, WANG Hong-li³, LIU He-liang^{1,3} (1.School of Public Health, North China University of Science and Technology, Tangshan, Hebei 063000, China; 2.Chinese Coal Miners' Beidaihe Sanatorium, Qinhuangdao, Hebei 066104, China; 3.Medical Research Center, North China University of Science and Technology, Tangshan, Hebei 063000, China). Address correspondence to LIU He-liang, E-mail: tsruoshui@163.com; WANG Hong-li, E-mail: whllhl@163.com • The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract: [Objective] To investigate the role of lipid metabolism in the fibrosis progression of silicosis through detecting cholesterol and oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) levels in alveolar macrophages and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) from patients in different silicosis stages. [Methods] Fifty-nine male patients with silicosis were selected, among whom 18 cases were graded as stage I, 17 cases as stage II, and 24 cases as stage III; 8 controls were recruited; another 12 healthy adults were selected as serum control group. HE staining and oil red O staining were used to observe macrophage morphology and lipid accumulation, and ELISA was used to detect cholesterol, ox-LDL, and connective tissue growth factor (CTGF) levels in alveolar macrophages and BALF. [Results] Lipids existed in alveolar macrophages. Cholesterol levels increased in alveolar macrophages and BALF with higher silicosis stages, and the cholesterol level of stage III group was significantly higher than that of the control, stage I, and stage II groups ($P<0.05$). The ox-LDL level in alveolar macrophages increased with higher silicosis stages, whereas in the BALF it showed a declining trend ($P<0.05$). Compared with the serum control group, the CTGF level in serum was increasing with the advance of silicosis ($P<0.05$). Cholesterol in alveolar macrophages and BALF and ox-LDL in alveolar macrophages were positively correlated with CTGF ($P<0.05$), but ox-LDL in BALF was negatively correlated with CTGF ($P<0.05$). [Conclusion] In the advance of silicosis fibrosis, cholesterol metabolism disorder in alveolar macrophages are identified in silicosis patients, which might be related to the macrophage foam cells caused by elevated ox-LDL level.

Key Words: silicosis; alveolar macrophage; cholesterol; oxidized low density lipoprotein; connective tissue growth factor

DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2016.16523

[基金项目] 河北省科技计划项目(编号: 153977150); 唐山市国际科技合作项目(编号: 14160201B); 华北理工大学大学生创新创业实践项目(编号: X2014130)

[作者简介] 张秀峰(1990—), 女, 硕士生; 研究方向: 环境与劳动卫生学; E-mail: 724700122@qq.com

[通信作者] 刘和亮, E-mail: tsruoshui@163.com; 王宏丽, E-mail: whllhl@163.com

[作者单位] 1. 华北理工大学公共卫生学院, 河北 唐山 063000; 2. 中国煤矿工人北戴河疗养院, 河北 秦皇岛 066104; 3. 华北理工大学医学实验研究中心, 河北 唐山 063000

矽肺是在工作环境中长期吸入大量游离二氧化硅(SiO_2)粉尘引起的以弥漫性肺纤维化为主的全身性疾病,是目前危害我国工人健康最为严重的职业病。矽肺的发病机制非常复杂,各国学者虽提出多种学说,但其具体发生机制至今仍未阐明。

近年来,脂质在矽肺发病过程中的作用越来越受到学者的重视,脂质不仅是细胞重要的信号分子,还参与调节诸多关键的生命活动,研究表明肺脏对脂类可进行氧化、酯化、贮存,并能合成磷脂、甘油三酯、游离脂肪酸等^[1-3]。同时,富含脂质的巨噬细胞即泡沫细胞是动物肺纤维化模型和各种肺纤维化病人组织样本中常见的病理学特征^[4-6]。此外,多种呼吸系统疾病亦与各种脂质成分相关。但目前对矽肺患者肺内脂质代谢的研究尚不多见。本研究拟分析矽肺患者肺泡灌洗液及肺泡巨噬细胞脂质代谢情况,结合反映矽肺纤维化进程变化的指标——人结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF),探讨不同期别矽肺患者肺内脂质代谢水平的差异。

1 对象与方法

1.1 主要试剂

油红O(Sigma,美国),RPMI-1640培养基(赛默飞世尔生物化学制品北京有限公司,中国),NP-40裂解液、甘油明胶封片液(碧云天生物科技有限公司,中国),胆固醇测定试剂盒(Biovision,美国),人氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)试剂盒(南京信帆生物科技有限公司,中国),CTGF试剂盒(上海岚派生物科技有限公司,中国),其余实验试剂均为分析纯产品。

1.2 研究对象

研究对象为中国煤矿工人北戴河疗养院内首次进行肺灌洗手术的矽肺患者,主要从事开拓、掘进、粉碎、风钻、石材加工等工作,矽肺期别由尘肺诊断专家组依据GBZ 70—2009《尘肺病诊断标准》进行集体诊断。其中,矽肺壹期18例,矽肺贰期17例,矽肺叁期24例,均为男性;对照组8例,包括3例误吸(2例误吸入辣椒碎片,1例误吸入瓜子,在误吸当天进行纤维支气管镜灌洗)和5例矽肺观察对象。此外,选取12名健康成年男性作为血清对照组。选取研究对象时排除患有活动性肺结核、肺炎、肺心病等肺部疾病,传染性疾病及患有其他部位纤维化的矽肺患者,同时排除肝功能异常和高脂血症患者。对照组、血清

对照组、矽肺壹期、矽肺贰期、矽肺叁期患者的年龄、体质指数差异均无统计学意义。

1.3 生物样品采集

1.3.1 细胞收集、分离、培养 研究对象在全身麻醉状态下行大容量双肺同期灌洗手术,收集适量肺泡灌洗回收液,用4层经过高压灭菌无菌纱布过滤肺泡灌洗回收液至离心瓶内,1500 r/min(离心半径15 cm,下同)离心15 min,弃去上清液,可见离心瓶底有大量的肺泡巨噬细胞。磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗肺泡巨噬细胞3次,每次1500 r/min离心10 min,使细胞沉淀,弃去上清液,加入5 mL PBS吹打肺泡巨噬细胞沉淀,使细胞成悬浮液。取1 mL细胞悬液(剩余细胞转移至EP管中,离心弃上清后-80℃保存备用)进行常规细胞计数后,用含体积分数10%胎牛血清的1640培养基将细胞稀释成 5×10^5 个/mL的细胞悬液,按每孔1 mL接种到24孔板,置于 CO_2 体积分数为5%的37℃恒温培养箱中进行培养。

1.3.2 血清采集 采集研究对象外周静脉血2 mL,1500 r/min常温离心10 min后,收集上清液于EP管中,-80℃保存备用。

1.4 细胞形态和细胞内脂滴的观察

肺泡巨噬细胞贴壁后,将24孔板中的细胞爬片用PBS洗涤3次,95%酒精固定10 min后进行HE染色,胞质呈红色,细胞核成蓝色;另用1%多聚甲醛固定15 min,油红O染色液染色15 min,苏木精复染。Olympus BX51显微镜观察。

1.5 肺泡巨噬细胞和BALF中胆固醇、ox-LDL含量及血清中CTGF水平测定

均严格按照厂家测定试剂盒说明书测定上述指标水平。

1.6 统计学分析

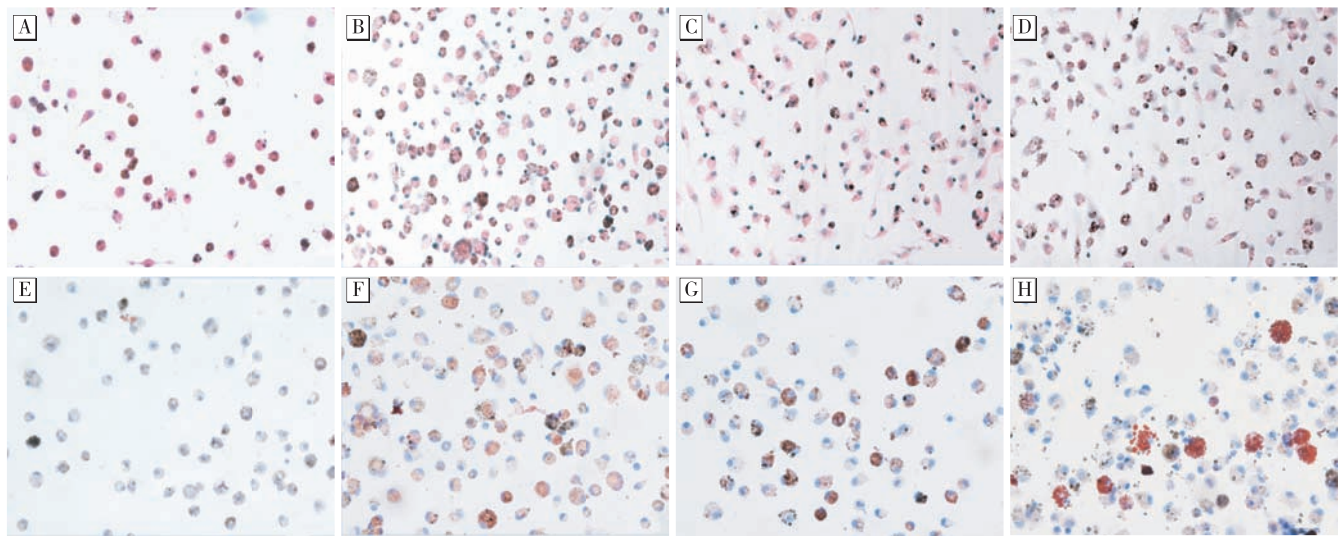
采用SPSS 20.0软件分析,多组间比较应用单因素方差分析,组间两两比较应用 q 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 病理改变

肺泡巨噬细胞培养贴壁后,将细胞爬片进行HE染色和油红O染色观察。由图1可见,HE染色时,肺泡巨噬细胞体积较大,形状不规则,胞核位于胞浆一侧,呈嗜碱性着色,胞浆呈嗜酸性着色,胞浆内含有大量的吞噬颗粒;随着期别增高,可观察到胞质中存

在空泡。油红O染色时,可见细胞体积较大,形状不规则,细胞核位于胞浆一侧,呈蓝紫色,细胞质无色,胞浆内可见大量的吞噬颗粒,同时可观察到橘红色脂滴存在,以叁期矽肺最为明显。



[注]A~D: HE染色(A: 对照组; B: 矽肺壹期组; C: 矽肺贰期组; D: 矽肺叁期组); E~H: 油红O染色(E: 对照组; F: 矽肺壹期组; G: 矽肺贰期组; H: 矽肺叁期组)。

图1 肺泡巨噬细胞HE和油红O染色结果(×200)

2.2 胆固醇和ox-LDL水平

随着矽肺分期增高,肺泡巨噬细胞和BALF中胆固醇含量均明显增高,矽肺叁期组均明显高于对照组、矽肺壹期组、矽肺贰期组,差异具有显著性($P<0.05$),但对照组、矽肺壹期组、矽肺贰期组组间差异无统计学意义($P>0.05$)。肺泡巨噬细胞中ox-LDL水平呈上升趋势,各期矽肺组均明显高于对照组($P<0.05$),而矽肺壹期组、矽肺贰期组、矽肺叁期组的组间差异无统计学意义($P>0.05$)。BALF中ox-LDL水平呈下降趋势,对照组、矽肺壹期组、矽肺贰期组、矽肺叁期组间两两比较,差异具有统计学意义($P<0.05$)。见表1。

表1 肺泡巨噬细胞、BALF中胆固醇、ox-LDL水平变化($\bar{x}\pm s$)

组别	n	胆固醇(mg/dl)		ox-LDL(μg/L)	
		肺泡巨噬细胞	BALF	肺泡巨噬细胞	BALF
对照	8	18.88±2.73	1.07±0.26	6.87±2.37	36.31±1.44
矽肺壹期	18	19.39±4.85 [△]	1.25±0.26 [△]	16.72±5.36 [*]	21.93±1.16 [*]
矽肺贰期	17	20.60±6.57 [△]	1.29±0.29 [△]	18.17±5.05 [*]	18.72±0.98 ^{**△}
矽肺叁期	24	24.68±4.65 [*]	2.18±0.34 [*]	19.88±5.28 [*]	16.86±1.18 ^{**}
F		5.01	52.56	13.82	587.99
P		0.04	0.00	0.00	0.00

[注]*: 与对照组比较, $P<0.05$; #: 与矽肺壹期组比较, $P<0.05$; △: 与矽肺叁期组比较, $P<0.05$ 。

2.3 血清中CTGF水平

由见表2可见,随着矽肺分期的增高,血清中CTGF水平明显增高,矽肺观察对象组、矽肺壹期组、矽肺贰期组、矽肺叁期组均明显高于血清对照组($P<0.05$); 但矽肺观察对象组、矽肺壹期组、矽肺贰期组组间差异无统计学意义($P>0.05$),矽肺贰期组与矽肺叁期组间差异也无统计学意义($P>0.05$)。

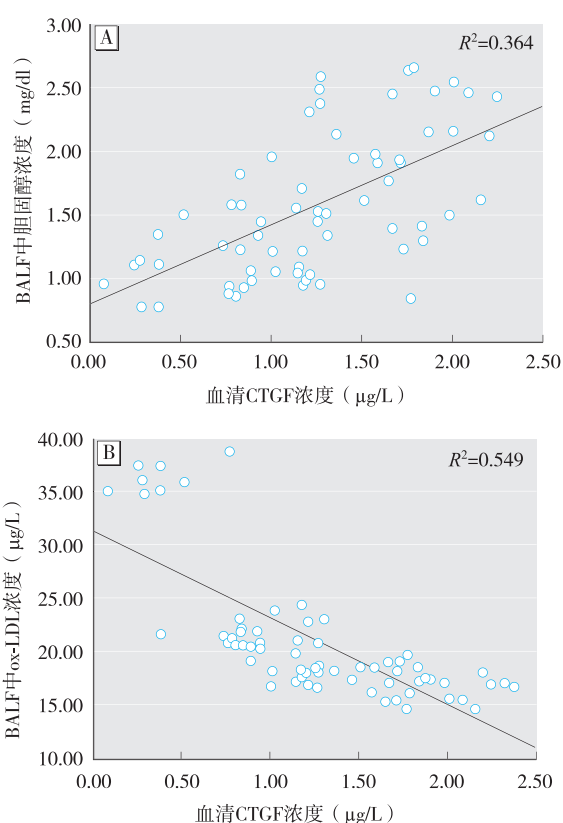
表2 各组血清中CTGF水平比较($\bar{x}\pm s$)

分组	n	CTGF(μg/L)	F	P
血清对照	12	0.50±0.28		
矽肺观察对象	5	1.10±0.26 ^{*△}		
矽肺壹期	18	1.15±0.33 ^{*△}	23.21	0.00
矽肺贰期	17	1.42±0.43 [*]		
矽肺叁期	24	1.73±0.42 [*]		

[注]*: 与对照组比较, $P<0.05$; △: 与矽肺叁期组比较, $P<0.05$ 。

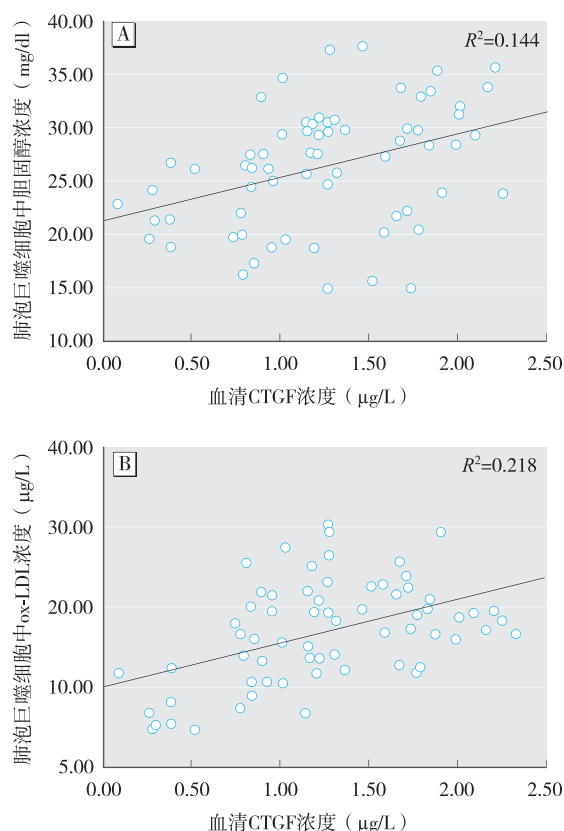
2.4 相关性分析

相关分析结果显示,肺泡巨噬细胞中的胆固醇、ox-LDL,及BALF中的胆固醇与CTGF的r值分别为0.380、0.467、0.611,均 $P<0.05$; BALF中ox-LDL与CTGF的r值为-0.765, $P<0.05$ 。见图2、3。



[注] A: 胆固醇; B: ox-LDL。

图2 血清CTGF浓度与BALF中胆固醇及ox-LDL水平的相关性



[注] A: 胆固醇; B: ox-LDL。

图3 血清CTGF浓度与肺泡巨噬细胞中胆固醇及ox-LDL水平的相关性

3 讨论

矽肺是以肺间质纤维化为主要病理变化的全身性疾病,其发生具有不可逆性。巨噬细胞胆固醇代谢稳态的失衡则是导致泡沫细胞形成的关键,胆固醇流出受阻是巨噬细胞泡沫化形成的重要原因之一^[7]。研究发现,胆固醇外流是调节巨噬细胞胆固醇动态平衡的重要环节,对减少细胞内胆固醇蓄积、防止泡沫细胞形成具有重要意义^[8]。

Romero等^[3]研究博来霉素致大鼠肺纤维化模型发现,纤维化前期的细胞损伤可促进II型上皮细胞外脂质蓄积,随着纤维化进展,II型上皮细胞脂质释放加剧,再摄取减少,BALF中表面活性脂质含量升高,同时伴随脂质受体表达上调,巨噬细胞功能改变,转化为泡沫细胞。CTGF是动物实验和临床研究均已证实的一种重要的促纤维化细胞因子,在组织、血液或体液中CTGF的表达水平与纤维化程度和严重性呈正相关^[9-11]。肺纤维化组织中过度表达的CTGF,与其它致肺纤维化细胞因子联合介导成纤维细胞转变为肌成纤维细胞,使胶原沉积,导致器官瘢痕和机能障碍,最终导致进展性纤维化^[12]。本实验研究结果显示,随着矽肺期别的增高,患者体内血清CTGF水平显著升高,肺泡巨噬细胞及BALF中胆固醇含量增加,且与血清中CTGF水平存在显著正相关,说明随着肺纤维化的进展,肺泡巨噬细胞中胆固醇蓄积。这可能与肺泡巨噬细胞泡沫化,胆固醇排出受阻有关,因而,减少肺泡巨噬细胞中胆固醇蓄积可能对矽肺的防治具有重要意义^[3]。

ox-LDL可诱导巨噬细胞内胆固醇蓄积^[13]。体内ox-LDL可通过巨噬细胞、血管内膜平滑肌细胞、单核细胞等对LDL进行氧化修饰。ox-LDL通过结合特异性受体等方式改变血管的正常生理作用,导致炎症细胞因子和炎症细胞聚集,血管内膜损伤,形成一系列的炎症和纤维化,参与疾病的发生和发展进程。ox-LDL与正常LDL主要区别在于其中的氧化成分,如氧化胆固醇组分等。巨噬细胞通过A型清道夫受体吞噬大量ox-LDL,细胞内胆固醇代谢失衡,胆固醇酯合成增加,分解减少,并以脂滴形式大量聚集在细胞中,导致细胞内脂质蓄积,最终形成泡沫细胞^[14-15],甚至死亡崩解,其主要原因在于ox-LDL中的氧化成分对巨噬细胞的氧化损伤^[16]。ox-LDL还可促进巨噬细胞释放多种致炎细胞因子加剧细胞损伤^[17],同时促进单核细胞聚集,引起平滑肌细胞迁移、增殖,影响巨噬细胞本

身功能^[18]。本研究结果发现,肺泡巨噬细胞内 ox-LDL 水平随着矽肺期别升高而升高,与血清 CTGF 呈显著正相关,细胞外 ox-LDL 水平随着期别升高而降低,与血清 CTGF 呈显著负相关,提示在矽肺纤维化进展中肺泡巨噬细胞大量摄取 ox-LDL,同时提示 ox-LDL 对肺泡巨噬细胞胆固醇代谢存在一定作用。

综上所述,本研究发现在矽肺纤维化发展进程中,矽肺患者肺泡巨噬细胞中胆固醇大量蓄积,ox-LDL 水平升高,其原因可能与巨噬细胞胆固醇代谢紊乱有关,具体机制仍有待进一步研究。

·作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

参考文献

- [1] Cong C, Mao L, Zhang Y, et al. Regulation of silicosis formation by lysophosphatidic acid and its receptors[J]. *Exp Lung Res*, 2014, 40(7): 317-326.
- [2] Lee EH, Lee EJ, Kim HJ, et al. Overexpression of apolipoprotein A1 in the lung abrogates fibrosis in experimental silicosis[J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e55827.
- [3] Romero F, Shah D, Duong M, et al. A Pneumocyte-macrophage paracrine lipid axis drives the lung toward fibrosis[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2015, 53(1): 74-86.
- [4] 刘韵蝉, 赵兰, 梅元英. 慢性阻塞性肺病患者脂质代谢研究[J]. *贵阳医学院学报*, 2001, 26(1): 34-35.
- [5] Basset-Léobon C, Lacoste-Collin L, Aziza J, et al. Cut-off values and significance of oil red o-positive cells in bronchoalveolar lavage fluid[J]. *Cytopathology*, 2010, 21(4): 245-250.
- [6] Hayes DJr, Kirkby S, S McCoy K, et al. Reduction of lipid-laden macrophage index after laparoscopic Nissen fundoplication in cystic fibrosis patients after lung transplantation[J]. *Clin Transplant*, 2012, 27(1): 121-125.
- [7] 涂剑, 廖端芳, 周志刚, 等. Caveolin-1 在氧化型低密度脂蛋白诱导的巨噬细胞荷脂过程中的表达[J]. *南华大学学报·医学版*, 2009, 37(4): 390-392.
- [8] 赵国军, 汤石林, 田国平, 等. PDTC 对 ox-LDL 诱导的 THP-1 巨噬细胞脂质蓄积和胆固醇流出的影响[J]. *中南医学科学杂志*, 2013, 41(3): 225-228.
- [9] Wang Q, Usinger W, Nichols B, et al. Cooperative interaction of CTGF and TGF- β in animal models of fibrotic disease[J]. *Fibrogenesis Tissue Repair*, 2011, 4(1): 4.
- [10] Ruttenstock EM, Doi T, Dingemann J, et al. Prenatal administration of retinoic acid upregulates connective tissue growth factor in the nitrofen CDH model[J]. *Pediatr Surg Int*, 2011, 27(6): 573-577.
- [11] Liu Y, Liu H, Meyer C, et al. Transforming growth factor- β (TGF- β)-mediated connective tissue growth factor(CTGF) expression in hepatic stellate cells requires Stat3 signaling activation[J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(42): 30708-30719.
- [12] Arribillaga L, Dotor J, Basagoiti M, et al. Therapeutic effect of a peptide inhibitor of TGF- β on pulmonary fibrosis[J]. *Cytokine*, 2011, 53(3): 327-333.
- [13] Yao S, Sang H, Song G, et al. Quercetin protects macrophages from oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis by inhibiting the endoplasmic reticulum stress-C/EBP homologous protein pathway[J]. *Exp Biol Med*, 2012, 237(7): 822-831.
- [14] Miller YI, Choi SH, Fang L, et al. Lipoprotein modification and macrophage uptake: role of pathologic cholesterol transport in atherogenesis[M]//Harris JR. *Cholesterol Binding and Cholesterol Transport Proteins*. Netherlands: Springer, 2010: 229-251.
- [15] Sekiya M, Osuga J, Igarashi M, et al. The role of neutral cholesterol ester hydrolysis in macrophage foam cells[J]. *J Atheroscler Thromb*, 2011, 18(5): 359-364.
- [16] Seimon T, Tabas I. Mechanisms and consequences of macrophage apoptosis in atherosclerosis[J]. *J Lipid Res*, 2009, 50(Suppl): S382-S387.
- [17] 张弛, 黄靓, 余美华, 等. 褪黑素对 ox-LDL 所致巨噬细胞 TNF- α 释放及核因子 κ B 活性的影响[J]. *中南医学科学杂志*, 2011, 39(1): 14-17.
- [18] Zeng Q, Song R, Ao L, et al. Augmented osteogenic responses in human aortic valve cells exposed to ox-LDL and TLR4 agonist: a mechanistic role of Notch1 and NF- κ B interaction[J]. *PLoS One*, 2014, 9(5): e95400.

(收稿日期: 2016-07-15)

(英文编辑: 汪源; 编辑: 洪琪; 校对: 陈姣)