

DOI:10.7524/AJE.1673-5897.20190304002

李珂娴, 方晶晶, 江璐, 等. 低浓度甲硫醇亚慢性暴露对大鼠肺组织的影响[J]. 生态毒理学报, 2020, 15(4): 177-183

Li K X, Fang J J, Jiang L, et al. Effects of subchronic exposure to low concentration methylmercaptan on lung tissue in rats [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2020, 15(4): 177-183 (in Chinese)

低浓度甲硫醇亚慢性暴露对大鼠肺组织的影响

李珂娴¹, 方晶晶^{1,*}, 江璐¹, 徐新宏¹, 乔江波²

1. 海军军医大学海军特色医学中心, 上海 200433

2. 海军核化安全研究所, 北京 100077

收稿日期: 2019-03-04 录用日期: 2019-05-27

摘要: 本实验利用低浓度甲硫醇亚慢性暴露模型, 研究甲硫醇低剂量慢性暴露的肺毒性效应, 为该物质对健康损伤的评价及制订有效防治措施提供参考。大鼠在 $(1.0 \pm 0.2) \text{ mg} \cdot \text{m}^{-3}$ 甲硫醇下暴露 30 d, 每天暴露 6 h, 考察了肺组织湿干重比、血清生化指标、肺组织病理及免疫组化指标, 分析了暴露对肺组织水通道蛋白(AQP4)和基质金属蛋白酶(MMP-9)的表达影响。研究表明, 低浓度甲硫醇亚慢性暴露对大鼠肺组织产生一定损害, 湿干重比显著增加, 组织损伤程度随暴露时间增加呈现加重趋势, 暴露组的肺组织中 AQP4 表达下调, MMP-9 表达上调, 提示暴露可能造成肺气肿或者哮喘等呼吸道疾病。

关键词: 甲硫醇; 肺组织; 慢性毒性; 水通道蛋白; 金属基质蛋白

文章编号: 1673-5897(2020)4-177-07 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Effects of Subchronic Exposure to Low Concentration Methylmercaptan on Lung Tissue in Rats

Li Kexian¹, Fang Jingjing^{1,*}, Jiang Lu¹, Xu Xinhong¹, Qiao Jiangbo²

1. Naval Medical Centre, Naval Military Medical University, Shanghai 200433, China

2. Naval Nuclear and Chemical Safety Research Institute, Beijing 100077, China

Received 4 March 2019 accepted 27 May 2019

Abstract: In this study, the pulmonary toxicity of low-dose chronic exposure to methylmercaptan was studied by using the subchronic exposure model of Sprague-Dawley (SD) rats, which could evaluate toxic effect caused by this substance and propose effective prevention and treatment measures. Rats were exposed in methylmercaptan at $(1.0 \pm 0.2) \text{ mg} \cdot \text{m}^{-3}$ for 30 d and 6 h per day. After exposure, the ratio of wet to dry weight of lung tissue, serum biochemical parameters, pathology of lung tissue and immunohistochemical parameters were studied. The effects of exposure on the expression of aquaporin and matrix metalloproteinase in lung tissue were analyzed. It was found that subchronic exposure to low concentration of methylmercaptan caused adverse effect to the lung tissues of rats, including the significant increase of the wet/dry lung weight ratios. The degree of tissue damage increased with prolonging of the exposure time. The expression of AQP4 of the exposure groups in the lung tissues were down-regulated, while the expression of MMP-9 was up-regulated, suggesting that exposure may cause respiratory disease.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(21507161); 海军装备部基金资助项目(16A307)

第一作者: 李珂娴(1981—), 女, 硕士, 助理研究员, 研究方向为辐射安全控制和毒理学, E-mail: 4534566673@qq.com

* 通讯作者(Corresponding author), E-mail: 552417745@qq.com

ses such as emphysema or asthma.

Keywords: methylmercaptan; lung tissue; chronic toxicity; aquaporin; matrix metalloproteinase

恶臭污染是城市生活垃圾处理和工业发展中最为普遍和亟待解决的城市环境问题之一。甲硫醇(CH_3SH)属于一种恶臭化合物,用于制造业等工业中,因其具有很强的气味,可添加到天然气中,以帮助检测泄漏。在填埋场的空气中广泛检测到硫化物,包括甲硫醇(CH_3SH)、二甲基硫醚(CH_3SCH_3)、二甲基二硫醚(CH_3SSCH_3)和硫化氢(H_2S),这些硫化物的浓度为 $1.1 \sim 464 \mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$,具有一定毒性和刺激性,对人类健康构成威胁^[1]。甲硫醇在厌氧环境中产生,在沉积物和垃圾污水中浓度很高。此外,甲硫醇在葡萄酒和奶酪等食品中以低浓度存在。接触甲硫醇等还原硫化物的工人表现出血红素合成酶活性降低^[2]。一些研究表明,经高浓度含硫化合物暴露后,工人患气流阻塞、刺激性职业性哮喘的几率增加了,并有可能因缺血性心脏病而死亡的几率也有所增加^[3]。长时间接触恶臭污染会影响呼吸和中枢神经系统^[4]。一旦甲硫醇进入呼吸系统,会直接通过进入血液系统代谢。甲硫醇与红细胞和蛋白质结合并反应生成硫代磺胺嘧啶,该物质进一步氧化代谢形成硫代硫酸盐和硫酸盐。甲硫醇代谢成硫酸根离子的半衰期约为 9.6 h。甲硫醇毒性的决定因素是空气中的浓度、个体的呼吸速率以及暴露于污染空气的时间;其高浓度暴露会引起肺损伤,抑制中枢神经系统,并导致呼吸中枢系统麻痹,严重时引起昏迷和死亡。甲硫醇对呼吸系统的主要毒作用机制是其能够与细胞色素 C 氧化酶结合,并抑制其活性,从而造成细胞的“化学窒息”。甲硫醇对神经系统的毒作用机制主要是抑制脑钠(Na^+)和钾(K^+)-AT-Pase 活性,其神经系统毒作用机制与氰化物和硫化氢相似^[5]。关于甲硫醇的毒性研究多集中在高浓度的急性毒作用方面,低浓度亚慢性毒性研究较少。Tansy 等^[6]将 SD 大鼠暴露于 3.9、33.3 和 111.7 $\text{mg}\cdot\text{m}^{-3}$ 甲硫醇气体中 3 个月,观察其亚慢性毒性,任何一组均未发生死亡。最明显的现象是体重下降和血清生化指标的变化,但脏器的重量没有变化,暴露后的大鼠氧气消耗有所下降,病理检查和切片结果表明,肺部结构改变,肝脏有结节病变,胆小管有炎性细胞,该浓度的慢性暴露对肝功能有一定影响。

本实验利用低浓度甲硫醇亚慢性暴露模型,进一步观察甲硫醇染毒后大鼠肺组织的病理学变化特

点,分析暴露对血液生化及肺组织水通道蛋白和基质金属蛋白酶的表达影响,探讨甲硫醇低剂量慢性暴露的肺毒性效应,为该物质对健康损伤的评价及制订有效防治措施提供参考。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 动物暴露模型的制备

实验开始时选用体重(160 ± 20) g 的健康雄性和雌性 SD 大鼠。SD 大鼠随机分为对照组(C组:雄性 $n=15$,雌性 $n=15$)和甲硫醇暴露组(T组:雄性 $n=15$,雌性 $n=15$)。在(21 ± 1) °C 和 50% 湿度的环境下饲养在不锈钢丝笼内($170 \text{ mm (W)} \times 294 \text{ mm (D)} \times 176 \text{ mm (H)}$),每笼 5 只大鼠。让大鼠适应性饲养 7 d,并记录各组大鼠的初始体重。随后大鼠在 0.6 m^3 动态染毒暴露装置(8050D 型,合普工贸有限公司,天津,中国)中进行甲硫醇染毒实验。将 $98 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$ 的标准气瓶(海洲特种气体有限公司,上海,中国)减压后用空气稀释送入暴露室。用便携式仪器实时监测甲硫醇气体浓度(Konor JA903 型,科尔诺电子科技有限公司,深圳,中国),甲硫醇暴露浓度为 (1.0 ± 0.2) $\text{mg}\cdot\text{m}^{-3}$ 。暴露方案为亚慢性暴露 30 d、每天暴露 6 h。为了尽量减少暴露期间喂养行为可能带来的差异,对照组和实验组在暴露期间被剥夺食物。每组的水供应都配备有标准塑料水瓶和不锈钢饮水嘴,在饮水嘴内有一钢球,以便最大限度地减少甲硫醇的溶解。暴露 10、20 和 30 d 后分批处死大鼠,收集肺组织和血液样本。

1.2 试验方法

1.2.1 肺组织湿干重比

肺湿重与干重之比被用来衡量肺水肿。暴露 30 d 后采集并称量大鼠肺右下叶的新鲜组织,并放入 $80 \text{ }^\circ\text{C}$ 烘箱中干燥 72 h。然后对干燥的组织进行称重,以确定湿干重量比。

1.2.2 血清生化指标

在多聚甲醛麻醉下,心脏穿刺采集血样,在 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 以 $4000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,所得血清在 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存,使用全自动生化分析仪(Advia 2120i,西门子诊断公司,美国)测定小鼠血清 18 个指标,分别是总蛋白(STP)、白蛋白(ALB)、白蛋白/球蛋白(A/G)、总胆红素(TBIL)、直接胆红素(DBIL)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、碱性磷酸酶(ALP)、天门冬氨酸氨基转移酶(ASTm)、

天冬氨酸转氨酶(AST)、乳酸脱氢酶(LDH)、肌酐(CREA)、尿素(UREA)、葡萄糖(GLU)、尿酸(UA)、半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C(CysC)、肌酸激酶(CK)、肌酸激酶同工酶(CK-MB)和血管紧张素转换酶(ACE)。

1.2.3 肺组织病理切片

切除肺组织并用多聚甲醛溶液快速固定,进行组织病理学检查。固定 24 h 后,将脱水盒放进吊篮里于脱水机内进行酒精梯度脱水,将浸好蜡的组织于包埋机内进行包埋并于 -20°C 冷冻工作台(JB-L5,武汉俊杰电子有限公司,中国)冷却修整。将修整好的蜡块置于石蜡切片机上切片,片厚 $4\ \mu\text{m}$ 。摊片机上将组织展平,用载玻片将组织放进 60°C 烘箱内烘烤,用苏木精和伊红(HE)染色。组织病理学照片使用光学显微镜(Olympus® BX50,奥林巴斯有限公司,日本)获得。

1.2.4 肺组织免疫组化染色

通过组织免疫组化染色分析肺组织内水通道蛋白(AQP4)和基质金属蛋白酶-9(MMP-9)的表达情况。组织切片置于盛满乙二胺四乙酸抗原修复缓冲液的修复盒中,于微波炉内进行抗原修复。自然冷却后将玻片置于磷酸盐缓冲溶液(PBS)中,在脱色摇床上晃动洗涤 3 次,每次 5 min。切片放入 3% 过氧化氢溶液,室温避光孵育 25 min,将玻片置于 PBS 中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次,每次 5 min。滴加 3% 牛血清白蛋白(BSA)均匀覆盖组织,室温封闭 30 min,在切片上滴加用 PBS 按一定比例配好的一抗,切片平放于湿盒内 4°C 孵育过夜。滴加二抗覆盖组织,室温孵育 50 min。切片稍干后在圈内滴加新鲜配制的显色液,自来水冲洗切片终止显色。显微镜镜检,图像采集分析,阳性为棕黄色,阳性细胞计数通过 ImageJ2X 软件计算(Wayne Rasband,美国国立卫生研究院),取 5 个独立的样本计数的平均值。

1.2.5 统计分析

暴露组与对照组之间的数据首先判断方差是否均匀或分布是否正态,方差均匀或分布正态采用双尾 t 检验,否则采用非参数检验。分析中使用的软件是 SPSS (version21, IBM Inc., 美国)。如果 $P < 0.05$,则认为差异具有统计学意义。

2 结果 (Results)

2.1 肺组织干湿重比

暴露 30 d 后,肺水肿程度和肺内皮通透性由肺湿干重比决定。与对照组相比,暴露组湿干重显著增加,4 组之间比率值不同,如图 1 所示。雄性暴露

组湿干重比(4.52 ± 0.31)显著高于雄性对照组(4.09 ± 0.05) ($P < 0.01$),雌性暴露组湿干重比(7.83 ± 4.47)显著高于雌性对照组(5.31 ± 0.26) ($P < 0.05$)。

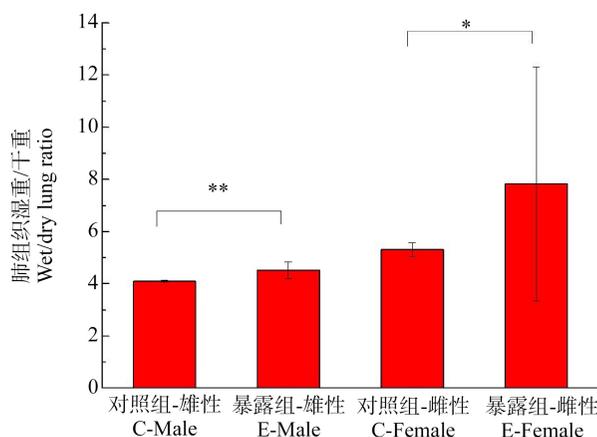


图 1 肺组织的干湿重比 (W/D)

注: C 代表对照组, E 代表暴露组; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $n = 5$ 。

Fig. 1 Wet and dry weight ratio (W/D) of lung tissue

Note: C represents control group; E represents exposure group;

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $n = 5$ 。

2.2 大鼠血液生化指标

雄性和雌性大鼠的血清生化试验结果如表 1 所示。这些参数与肝功能、肾功能和心血管功能有关。亚慢性甲硫醇暴露后,除 UREA、GLU、CK-MB 和 ACE 外,各时间点(10、20 和 30 d)其余血清生化指标水平平均无明显变化。而 UREA、GLU、CK-MB 和 ACE 的变化只在 10 d 和 20 d 时观察到,在 30 d 时没有发现对照组和暴露组之间的差异,推断为生物体自身保护的一种补偿性变化。

2.3 组织病理学研究

对照组肺组织的肺泡囊、肺泡和细支气管正常,肺泡囊无充血或塌陷的迹象(图 2(a)1、(b)1、(a)2、(b)2、(a)3 和 (b)3),暴露组则有明显变化。大鼠暴露于甲硫醇 10 d 后,细支气管出现明显的杯状细胞。甲硫醇暴露刺激肺组织,导致细支气管内出现明显突起的杯状细胞,终末细支气管收缩,虽部分肺泡囊仍清晰,肺泡和肺叶间隔可见,但肺泡充血,红细胞、纤维蛋白和单核细胞渗出,肺泡壁增厚,尤其是在雌性暴露组(图 2(c)1 和 (d)1)。暴露 20 d 后,肺泡壁进一步增厚并充满红细胞,出现纤维蛋白、单核细胞和少量淋巴细胞渗出物,雌性暴露组情况比雄性暴露组更加严重(图 2(c)2 和 (d)2)。暴露 30 d 后暴露组的肺泡气道阻塞,腺体增生,中性粒细胞浸润、水肿和

间质浸润进一步加剧,这与气管和支气管周围大量炎性渗出物有关,肺泡周围也观察到这些渗出物,整体结论是甲硫醇暴露导致支气管肺炎和刺激性肺水肿(图2(c)3和(d)3)。该结果与肺组织湿干重比变化规律相对应。

2.4 肺组织免疫组化相关蛋白指标变化

免疫组化法结果如图3所示,甲硫醇亚慢性暴露后,大鼠肺组织中AQP4表达水平明显下调,所有暴露组与对照组均有显著性差异($n=5, *P<0.05$),甲硫醇亚慢性暴露影响AQP4表达,从而进一步影响肺内液体转运及血气屏障通透性。甲硫醇亚慢性暴露30 d后大鼠肺组织MMP-9表达水平明显上调,所

有暴露组和对照组均有显著性差异($n=5, *P<0.05$)。

3 讨论 (Discussion)

水通道蛋白(AQPs)是一种位于细胞膜上的蛋白质(内在膜蛋白),在细胞膜上组成“孔道”,可控制水在细胞中的进出,是广泛分布于动植物细胞膜上的具有高度选择性的水通道特异小分子跨膜蛋白质家族。AQPs广泛分布于机体组织细胞中,参与水的分泌、吸收及细胞内外水的平衡。而器官的许多生理功能都有水分子的参与,同时许多脏器疾病如肺水肿涉及肺内水运动平衡的紊乱^[7]。血气屏障及肺表面活性物质是肺内液体转运的屏障。肺泡与肺部

表1 甲硫醇暴露不同阶段SD大鼠血清生化指标水平

Table 1 Serum biochemical index values of SD rats at different stages of exposure to methylmercaptan

| 指标 Parameter | 10 d | | 20 d | | 30 d | |
|------------------------------|---------------|----------------|---------------|----------------|---------------|----------------|
| | 对照 Control | 暴露 Exposure | 对照 Control | 暴露 Exposure | 对照 Control | 暴露 Exposure |
| STP/(g·L ⁻¹) | 54.5±2.07 | 52.1±2.40 | 53.0±2.41 | 54.6±5.32 | 64.5±8.05 | 61.0±2.83 |
| ALB/(g·L ⁻¹) | 26.6±1.37 | 24.8±1.60 | 25.17±1.30 | 26.00±2.83 | 27.00±2.55 | 26.67±0.82 |
| A/G | 0.95±0.08 | 0.92±0.10 | 0.87±0.06 | 0.85±0.05 | 0.72±0.07 | 0.78±0.08 |
| TBIL/(mg·L ⁻¹) | 1.82±0.31 | 1.28±0.56 | 0.95±0.33 | 1.28±0.35 | 1.17±0.58 | 1.40±0.72 |
| DBIL/(mg·L ⁻¹) | 0.73±0.15 | 0.80±0.48 | 0.52±0.33 | 0.53±0.23 | 0.55±0.34 | 0.75±0.53 |
| ALT/(IU·L ⁻¹) | 66.1±12.2 | 71.1±14.7 | 59.8±10.4 | 65.1±24.4 | 72.8±36.8 | 68.2±14.2 |
| ALP/(IU·L ⁻¹) | 234±45.5 | 244±66.7 | 203±65.4 | 203±28.8 | 159±66.4 | 197±68.4 |
| ASTm/(IU·L ⁻¹) | 42.6±20.2 | 34.3±12.2 | 33.4±15.6 | 38.7±13.4 | 30.00±8.38 | 32.0±5.66 |
| AST/(IU·L ⁻¹) | 160±42.9 | 160.8±52.6 | 150.67±52.7 | 232±176 | 164.50±48.50 | 179±29.5 |
| LDH/(IU·L ⁻¹) | 783±276 | 1 107±257 | 1 107±677 | 1 750±716 | 975±275 | 1 053±107 |
| CREA/(mg·L ⁻¹) | 32.0±2.10 | 32.6±2.25 | 32.8±3.35 | 33.5±3.94 | 37.1±4.27 | 37.3±4.59 |
| UREA/(mmol·L ⁻¹) | 5.77±1.31 | 5.02±0.37 | 5.42±0.25 | 6.22±0.46** | 6.62±0.90 | 6.45±0.67 |
| GLU/(mg·L ⁻¹) | 12.0±1.45 | 14.2±1.33* | 12.5±1.97 | 13.4±7.04 | 13.5±3.70 | 12.8±2.21 |
| UA/(μmol·L ⁻¹) | 101±16.1 | 94.5±21.2 | 109±35.0 | 132±76.3 | 168±71.6 | 120±22.6 |
| CysC/(mg·L ⁻¹) | 0.18±0.04 | 0.12±0.06 | 0.13±0.01 | 0.14±0.01 | 0.11±0.04 | 0.11±0.03 |
| CK/(IU·L ⁻¹) | 3 043±2 058 | 4 130±2 293 | 2 097±1 293 | 2 223±707 | 2 641±1 479 | 3 908±1 876 |
| CK-MB/(IU·L ⁻¹) | 852±305 | 928±390 | 721±193 | 1 196±264** | 671±286 | 760±104 |
| ACE/(IU·L ⁻¹) | 287±26.9 | 250±21.5* | 200±34.2 | 201±26.7 | 259±44.0 | 258±18.2 |

注:STP表示总蛋白,ALB表示白蛋白,A/G表示白蛋白/球蛋白,TBIL表示总胆红素,DBIL表示直接胆红素,ALT表示丙氨酸氨基转移酶,ALP表示碱性磷酸酶,ASTm表示天门冬氨酸氨基转移酶,AST表示天冬氨酸转氨酶,LDH表示乳酸脱氢酶,CREA表示肌酐,UREA表示尿素,GLU表示葡萄糖,UA表示尿酸,CysC表示半胱氨酸蛋白酶抑制剂C,CK表示肌酸激酶,CK-MB表示肌酸激酶同工酶,ACE表示血管紧张素转换酶;数值表示为平均值±SEM, $n=10$;* $P<0.05$ 、** $P<0.01$,与对照组相比。

Note: STP stands for serum total protein; ALB stands for albumin; A/G stands for albumin/globin; TBIL stands for total bilirubin; DBIL stands for direct bilirubin; ALT stands for serum total protein; ALP stands for alkaline phosphatase; ASTm stands for aspartate aminotransferase isoenzyme; AST stands for aspartate aminotransferase; LDH stands for lactate dehydrogenase; CREA stands for creatinine; UREA stands for carbamide; GLU stands for glucose; UA stands for uric acid; CysC stands for Cystatin C; CK stands for creatine kinase; CK-MB stands for creatine kinase isoenzymes; ACE stands for angiotensin converting enzyme; values are expressed as mean±SEM, $n=10$; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, compared with control group.

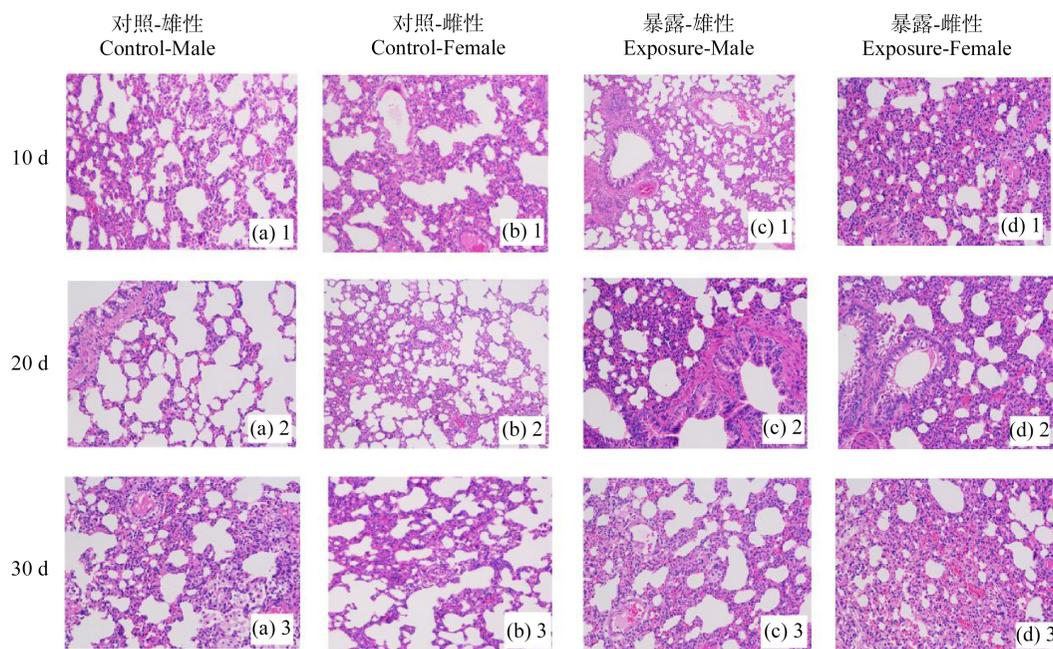


图 2 对照组和暴露组肺组织的病理学特征

注:苏木精-伊红(H&E)染色($\times 200$)。

Fig. 2 Histological appearances of the lung tissue of control and exposure groups

Note: Hematoxylin and eosin (H&E) stain ($\times 200$).

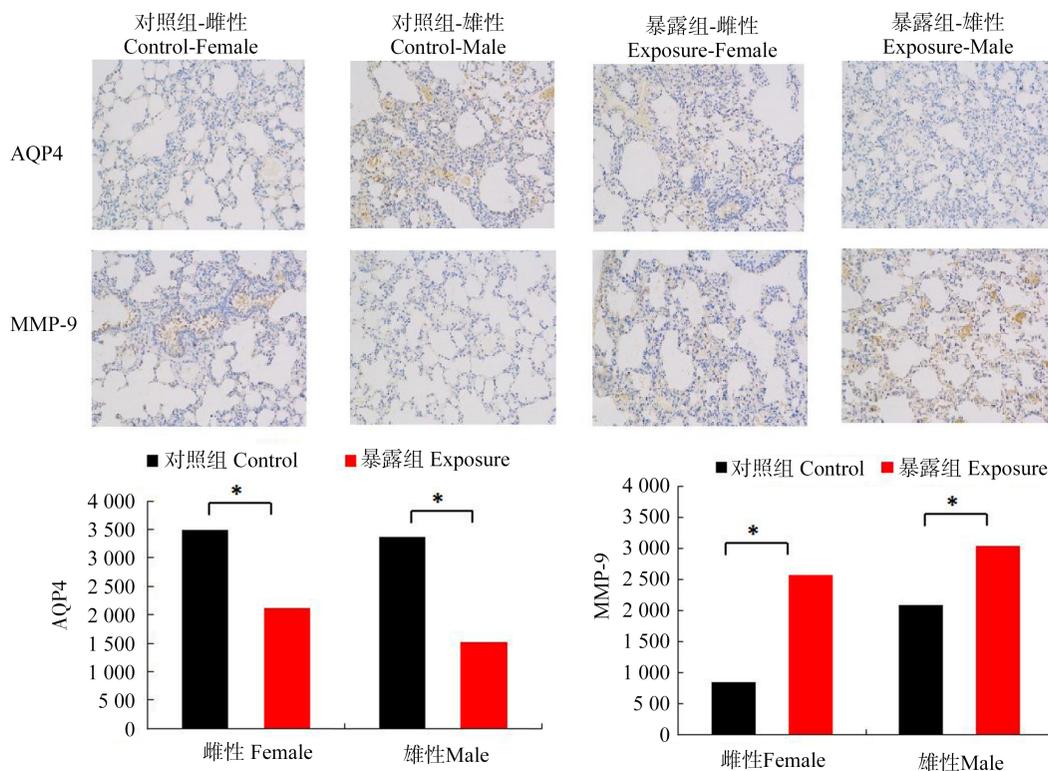


图 3 暴露 30 d 后肺组织中 AQP4 和 MMP-9 的变化 ($\times 200$) 及定量分析

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $n = 5$ 。

Fig. 3 Changes of AQP4 and MMP-9 in lung tissue ($\times 200$) and quantitative analysis after 30 d of exposure

Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $n = 5$.

毛细血管紧密相连,由肺泡表面液体层、I型肺泡细胞与基膜、薄层结缔组织、毛细血管基膜与内皮组成血气屏障,有助于气体快速扩散;肺表面活性物质由肺泡II型上皮细胞分泌,是一种复杂的脂蛋白,分布于肺泡液体分子层表面,具有降低肺泡表面张力的作用,能维持大小肺泡容量的相对稳定,阻止肺泡毛细血管中液体向肺泡内滤出至肺组织中。因此,肺组织内血气屏障的存在与肺泡表面活性物质一起构成了肺内液体转运的屏障,保护肺组织免受损伤。AQPs的表达还受生长因子、炎性介质的调节。病毒感染致肺炎及脂多糖致肺损伤时,肺组织中AQP1和AQP5表达下调,AQPs参与水或其他分子跨膜转运的分子生物学机制是参与肺水调节的基础^[8-10]。各种肺损伤及肺内积液常伴有肺内水运动的紊乱及AQPs的改变,因此,研究水通道蛋白与肺脏疾病及肺内水运动的平衡关系对毒物暴露效应具有重要意义。有研究发现,在缺氧时星形胶质细胞内AQP4表达较对照组明显减少,而复氧后蛋白表达升高并因时间延长明显增加^[11]。Yamamoto等^[12]也有相似的研究结果,缺氧条件下,星形胶质细胞内AQP4蛋白的表达减少低于正常表达。甲硫醇暴露组大鼠AQP4表达显著降低,由此推测,暴露导致肺部产生缺氧环境,在此条件下,AQP4蛋白的表达减少,导致了肺泡-毛细血管间水转运障碍,可能进一步导致液体在肺泡腔、肺间质的积聚。

细胞外基质(ECM)位于上皮或内皮细胞下层或结缔组织细胞周围,为组织、器官甚至机体的完整性提供支持并参与相关生理活动,其成分主要是一些多糖和蛋白质,或蛋白多糖。ECM除了具有连接、支持、保水、抗压及保护等物理学作用,在细胞的基本生命活动中发挥着全方位的生物学作用。ECM组成的变化常常与疾病的发生发展有紧密联系^[13-15]。气道基底膜增厚是哮喘气道重塑的特征性改变,肺组织上皮的ECM蛋白大量沉积是哮喘气道重塑的重要组成部分。基质金属蛋白酶(MMPs)是一组Zn或Ca依赖的ECM降解酶。MMPs对降解细胞外基质有着主导作用。MMPs在支气管哮喘患者气道炎症及组织重塑中发挥重要作用。许多研究者对支气管哮喘患者的诱导痰液、支气管肺泡灌洗液(BALF)、肺活检标本以及体外培养的巨噬细胞进行了MMPs检测分析,其MMP-9产生明显增高。MMP-9主要来源于嗜酸细胞、巨噬细胞和中性粒细胞。MMP-9可降解IV型胶原、纤维连接蛋白等

ECM,MMP-9正常释放可以维持ECM稳定^[16]。若其比例失衡,则ECM沉积使上皮下纤维化^[17]。Barbaro等^[18]通过研究呼出气冷凝液中MMP-9表达与第一秒用力呼气容积等的相关性证实,MMP-9在不同的哮喘表型中有不同程度的释放,随哮喘及气道重塑的加重而增加并在哮喘急性发作时表达进一步增加,可作为哮喘持续气道重塑的标志物。MMP-9表达与哮喘患者肺功能成负相关,提示MMP-9可用于评估哮喘严重程度、监测气道重塑。哮喘早期也可通过检测MMP-9来评估气道重塑,并作为哮喘预测性生物标志物。免疫组化法结果显示,甲硫醇亚慢性暴露30d后大鼠肺组织和海马组织中MMP-9表达水平明显上调。肺组织病理切片和湿干重比变化规律和上述结果相互印证,肺组织切片可观察到支气管、血管周围炎性细胞浸润,暴露诱导了气道/肺部炎症。中性粒细胞分泌氧自由基、炎症因子、炎症介质和各类蛋白酶,包括弹性蛋白酶、基质金属蛋白酶等,可促进炎症形成和肺泡破坏。上述这些结果提示了毒物进一步引发肺气肿或者哮喘等呼吸道疾病的可能性。

低浓度甲硫醇亚慢性暴露对大鼠肺组织的产生一定损害,湿干重比显著增加,组织损伤程度随暴露时间增加呈现加重趋势,肺泡气道阻塞,腺体增生,中性粒细胞浸润、水肿和间质浸润进一步加剧,暴露组的气管和支气管周围有大量炎性渗出物,暴露组的肺组织中AQP4表达下调,MMP-9表达上调,提示暴露可能导致肺气肿或者哮喘等呼吸道疾病。

通讯作者简介:方晶晶(1978—),博士,副研究员,硕士生导师,主要研究方向为密闭环境化学有害物质检测及控制。

参考文献(References):

- [1] Fang J J, Yang N, Cen D Y, et al. Odor compounds from different sources of landfill: Characterization and source identification [J]. *Waste Management*, 2012, 32(7): 1401-1410
- [2] Tenhunen R, Savolainen H, Jappinen P. Mortality from asthma and chronic obstructive pulmonary disease among workers in a soft paper mill: A case referent study [J]. *British Journal of Industrial Medicine*, 1983, 46:192-195
- [3] Torén K, Hagberg S, Westberg H. Health effects of working in pulp and paper mills: Exposure, obstructive airways diseases, hypersensitivity reactions, and cardiovascular diseases [J]. *American Journal of Industrial Medicine*, 1996, 29(2): 111-122

- [4] Heaney C D, Wing S, Campbell R L, et al. Relation between malodor, ambient hydrogen sulfide, and health in a community bordering a landfill [J]. *Environmental Research*, 2011, 111(6): 847-852
- [5] Luttrell W E, Bobo M E. Methyl mercaptan [J]. *Journal of Chemical Health and Safety*, 2015, 22(5): 37-39
- [6] Tansy M F, Kendall F M, Fantasia J, et al. Acute and sub-chronic toxicity studies of rats exposed to vapors of methyl mercaptan and other reduced-sulfur compounds [J]. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 1981, 8(1-2): 71-88
- [7] Levin M H, Sullivan S, Nielson D, et al. Hypertonic saline therapy in cystic fibrosis: Evidence against the proposed mechanism involving aquaporins [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281: 25803-25812
- [8] 胡琼. 水通道蛋白与肺水肿[J]. *临床军医杂志*, 2007, 35(6): 733-735
Hu Q. Aquaporin and pulmonary edema [J]. *Journal of Clinical Military Medicine*, 2007, 35(6): 733-735 (in Chinese)
- [9] 李玉梅, 戴春来, 李恒, 等. 水通道蛋白与肺水肿关系的研究进展[J]. *中国实验诊断学*, 2010, 14(10): 1675-1677
Li Y M, Dai C L, Li H, et al. Advances in the study of the relationship between aquaporin and pulmonary edema [J]. *Chinese Experimental Diagnostics*, 2010, 14(10): 1675-1677 (in Chinese)
- [10] 刘洋, 王月兰, 宋秀梅. 水通道蛋白与肺水肿的研究进展[J]. *临床麻醉学杂志*, 2011, 27(122): 1139-1140
Liu Y, Wang Y L, Song X M. Progress in aquaporin and pulmonary edema [J]. *Journal of Clinical Anesthesiology*, 2011, 27(122): 1139-1140 (in Chinese)
- [11] 高磊, 邓方, 韩威, 等. 缺氧/复氧对星形胶质细胞 AQP4 表达的影响[J]. *中国神经免疫学和神经病学杂志*, 2009, 16(2): 136-140
Gao L, Deng F, Han W, et al. Effects of hypoxia/reoxygenation on the expression of AQP4 in astrocytes [J]. *Chinese Journal of Neuroimmunology and Neurology*, 2009, 16(2): 136-140 (in Chinese)
- [12] Yamamoto N, Yonda K, Asai K, et al. Alterations in the expression of the AQP family in cultured rat astrocytes during hypoxia and reoxygenation [J]. *Molecular Brain Research*, 2001, 90(1): 26-38
- [13] Stetler-Stevenson W G, Hewitt R, Corcoran M. Matrix metalloproteinases and tumor invasion: From correlation and causality to the clinic [J]. *Seminars Cancer Biology*, 1996, 7(3): 147-154
- [14] 孙永安, 赵合庆. 基质金属蛋白酶与中枢神经系统疾病研究进展[J]. *医学综述*, 2004, 10(3): 168-170
Sun Y A, Zhao H Q. Advances in matrix metalloproteinases and central nervous system diseases [J]. *Medical Review*, 2004, 10(3): 168-170 (in Chinese)
- [15] Firszt R, Francisco D, Church T D, et al. Interleukin-13 induces collagen type-1 expression through matrix metalloproteinase-2 and transforming growth factor-beta1 in airway fibroblasts in asthma [J]. *European Respiratory Journal*, 2014, 43(2): 464-473
- [16] Grzela K, Litwiniuk M, Zagorska W, et al. Airway remodeling in chronic obstructive pulmonary disease and asthma: The role of matrix metalloproteinase-9 [J]. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 2016, 64(1): 47-55
- [17] Vogel E R, Britt R D, Faksh A, et al. Moderate hyperoxia induces extracellular matrix remodeling by human fetal airway smooth muscle cells [J]. *Pediatric Research*, 2016, 81(2): 376-383
- [18] Barbaro M P, Spanevello A, Palladino G P, et al. Exhaled matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in different biological phenotypes of asthma [J]. *European Journal of Internal Medicine*, 2014, 25(1): 92-96