

柴油车尾气颗粒物对孕鼠和胎鼠肺脏的病理损伤

王征桦 郑 铃 孙 娜 王章敬 Tong Lu

摘 要 **目的** 探讨柴油车尾气颗粒物暴露对孕鼠和胎鼠肺组织可能造成的病理组织学损害。**方法** 24 只清洁级 ICR 孕鼠随机分为 4 组:高剂量染毒组(170mg/kg)、中剂量染毒组(17mg/kg)、低剂量染毒组(1.7mg/kg)和 PBS 对照组;按规定程序以腹腔途径染毒,染毒结束后取孕鼠和胎鼠肺组织经 HE 染色,行组织病理学检查。**结果** 与对照组相比,各实验组孕鼠和胎鼠的肺脏组织均发生不同程度病理损伤($P < 0.05$),主要表现为肺泡腔不规则扩大,肺泡间隔破裂,甚至融合成肺大泡;肺泡壁伴有轻度中度增宽及炎症细胞的浸润或淤血。此外,组织病理学检查还提示,随着染毒剂量的增加,各实验组孕鼠和胎鼠肺组织的损伤程度也随之加重,呈现一定的剂量反应关系。**结论** 腹腔途径柴油车尾气颗粒物暴露对孕鼠和胎鼠的肺组织均造成一定程度的损伤。

关键词 柴油车尾气颗粒物 孕鼠 胎鼠 肺脏 病理组织学

Pathological Injury of Diesel Exhaust Particulate on Lung of Pregnant Mice and Fetal Mice. Wang Zhenghua, Zheng Ling, Sun Na, et al. Department of Epidemiology and Statistics, College of Public Health, Fujian Medical University, Fujian 350004, China

Abstract Objective To investigate the effect of diesel exhaust particulate exposure on maternal and fetal lung. **Methods** Twenty-four clean ICR pregnant mice were divided into 4 groups: high dose group (170mg/kg), middle dose group (17mg/kg), low dose group (1.7mg/kg) and PBS control group, with 6 in each group. According to prescribed procedures, we used the abdominal cavity exposure route and then collected maternal and fetal lung histopathological examination. **Results** Histopathologic examination revealed that compared with the control group, experimental group mothers and their pups had different degrees of lung pathological injury ($P < 0.05$), mainly as the cavity of alveolus expanding irregularly, the alveolus interval broking and some alveolus being mixed together to form pneumatocele, alveolar wall congesting and inflammatory cells infiltrating. The degree of injury increased with the dose of aggravated in a dose-response relationship. **Conclusion** Diesel exhaust particulate pregnancy will produce a certain injury on maternal and fetal lung.

Key words Diesel exhaust particulate; Pregnant mice; Fetal mice; Lung; Pathology

随着城市化进程的加快和交通事业的日益发达,我国城市汽车数量急剧增加,机动车排放的尾气对城市居住环境的污染已成为公众关注的热点问题^[1]。众所周知,柴油发动机因其具有动力大、效率高、燃料经济等优点而得到广泛的应用;以柴油机为动力的运营车辆、轮船及重型施工机械等正在以惊人的速度不断增加。近年国内外研究表明柴油机排出颗粒物数量是汽油机的 20~100 倍^[2],对环境污染严重,其颗粒物直径细微,一般小于 2.5 μm ,主要成分包括 SO_2 、 NO_x 、CO、多环芳烃化合物 (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)、氟化物和悬浮于空气中的重金属分子

颗粒物等,柴油车尾气颗粒物具有较强的致变性,已得到证实,其中 PAHs 是影响人群健康的主要成分^[3,4]。人群流行病学的调查显示柴油车尾气颗粒物不仅可以通过各种途径损害人群健康,而且可以通过胎盘屏障影响胎儿的正常发育^[5],增加不良妊娠结局或出生缺陷的概率^[6]。但是,目前尚未见孕鼠及胎鼠肺脏的组织病理学损伤现象及其机制研究的相关报道。本研究以 ICR 孕鼠及其胎鼠为研究对象,以腹腔染毒途径初步探讨 DEP 对肺组织的病理损伤作用。

材料与方法

1. 材料:(1)实验动物:4w 清洁级 ICR 健康小鼠,购自上海动物研究中心【许可证编号 SCXK(沪)2007-0005】,雌性 24 只,雄性 12 只,体重 20~24g。雌雄分笼适应性饲养 2 周,每日观察小鼠一般情况。饲养环境为自然光照,温度(25 ± 1) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度 $50\% \pm 10\%$ 。(2)主要试剂:柴油车尾气颗粒物标准品 (standard reference material 2975) 购自美国标准化和技术鉴定分析机构 (National Institute of Standards & Technology Certificate of Analysis),其他试剂均为国产分析纯。

基金项目:福建省科技厅计划重点项目基金资助(2007Y0017)

作者单位:350004 福州,福建医科大学公共卫生学院流行病学与统计学系(王征桦、郑铃、孙娜、王章敬);Mayo Clinic, 200 First St, SW, Rochester, MN 55905 (Tong Lu)

通讯作者:郑铃,电子邮箱:zling2006@163.com

2. 方法: (1) 实验动物受孕与分组: 适应性饲养 2 周后, 每日 18:00 雌雄小鼠以 2:1 同笼, 次日 8:00 查见阴栓者定为受孕, 第 0.5 天并记录当时体重。孕鼠按受孕当日体重随机分为 4 组, 其中 3 组为实验组, 1 组为对照组, 每组 6 只。实验组按染毒剂量的高低, 分为高剂量染毒组 (170mg/kg)、中剂量染毒组 (17mg/kg)、低剂量染毒组 (1.7mg/kg)、对照组 (同等注射量的 PBS 溶液)。(2) 动物染毒: DEP 用灭菌 PBS (pH7.8) 制成 3 种不同浓度的混悬液 (17mg/ml、1.7mg/ml 和 0.17mg/ml) 分别用于高、中和低 3 种染毒剂量实验组孕鼠, 对照组采用同等注射量的 PBS 溶液。染毒方法采用腹腔内注射, 每只孕鼠均按 10ml/kg 的注射量进行, 从受孕第 0.5 天开始隔日染毒 1 次, 至孕第 17 天结束, 第 18 天于麻醉状态下行剖宫产术取孕鼠和胎鼠肺脏行组织病理学检查。(3) 组织病理学检查: 取孕鼠和胎鼠肺脏, 10% 甲醛固定 24h, 经脱水脱蜡后切片, 苏木精-伊红 (HE) 染色法染色^[5], 光镜下每只孕鼠和胎鼠的肺脏切片随机读取 10 个视野, 每个剂量组 60 个视野进行分析。(4) 肺脏组织病理变化分级标准: 孕鼠与胎鼠的肺组织病变程度均按以下标准进行分级判定: 0 级为正常肺组织, 镜下可见为肺泡排列规则, 肺泡壁薄, 肺组织未见病理改变; 1 级为轻度病变之肺组织, 主要表现为肺泡不规则扩张, 偶见肺

泡壁断裂; 2 级为中度病变之肺组织, 主要表现为部分肺泡壁断裂, 肺间质轻度炎症细胞的浸润; 3 级为重度病变之肺组织, 大部分肺泡肺泡壁断裂并融合成肺大泡, 肺间质炎症细胞重度浸润。

3. 统计分析: 应用 SPSS 17.0 for windows 统计软件对肺组织病理评估结果行秩和检验。

结 果

1. 孕鼠一般情况: 各剂量组孕鼠均自由饮食。实验期间, 每日观察各组孕鼠之毛发状况、神态及活动等一般情况, 均未见明显异常现象, 未见异常分泌物。

2. 孕鼠肺脏病理改变: 孕鼠肺组织病理切片镜下观察结果 (图 1) 表明: ①对照组孕鼠肺泡排列整齐, 肺泡壁薄, 肺组织无明显的病理改变; ②低剂量组孕鼠肺泡不规则扩大, 偶见肺泡壁断裂; ③中剂量组孕鼠肺泡壁断裂较为明显, 肺泡壁轻度增宽, 轻度炎症细胞浸润; ④高剂量组孕鼠肺脏组织结构已严重受到破坏, 肺泡融合为大泡, 较少见到正常的肺泡, 肺间质炎症细胞重度浸润, 肺泡壁可见轻度淤血。

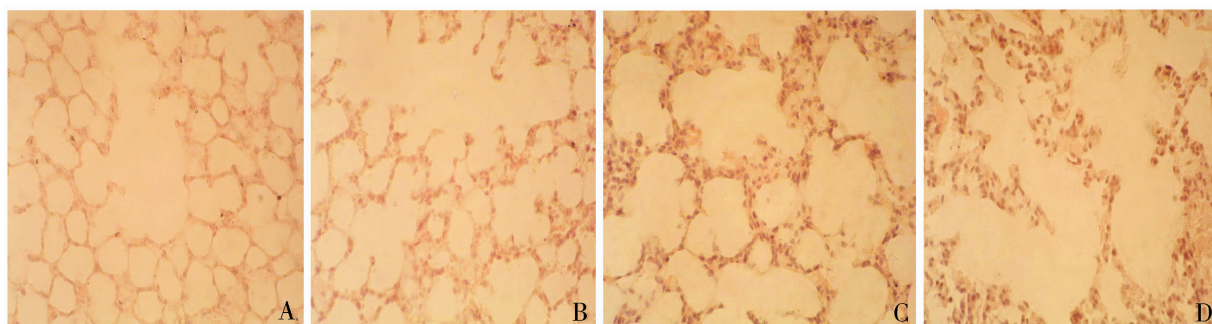


图 1 各实验组孕鼠肺组织病理学变化 (HE, ×400)

A. 对照组孕鼠肺泡排列整齐, 肺泡壁薄, 肺组织无明显的病理改变; B. 低剂量组孕鼠部分肺泡不规则扩张; C. 中剂量组孕鼠肺泡壁断裂, 肺间质炎症细胞轻度浸润; D. 高剂量组孕鼠肺脏组织结构已严重受到破坏, 肺泡融合为肺大泡, 较少见到正常的肺泡, 肺间质炎症细胞重度浸润, 肺泡壁轻度淤血。经检验, 与对照组相比, 各实验组病变差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)

根据上述分级标准, 对孕鼠肺脏组织的病变程度进行分级评估 (表 1) 并对评估结果行秩和检验, 结果表明: 与对照组相比, 各实验组孕鼠肺组织病变程度的差别均具有统计学意义 ($\chi^2 = 123.527, P < 0.05$)。

表 1 各组孕鼠肺脏组织病变程度的比较

组别	孕鼠肺组织的病变程度			
	0 级	1 级	2 级	3 级
	(正常)	(轻度病变)	(中度病变)	(重度病变)
高剂量染毒	4 *	9 *	23 *	24 *
中剂量染毒	8 *	14 *	27 *	11 *
低剂量染毒	21 *	28 *	8 *	3
对照	56	3	1	0

与对照组相比, 差异有统计学意义, * $P < 0.05$

3. 胎鼠肺脏病理改变: 胎鼠肺组织病理切片镜下观察结果 (图 2) 表明: ①对照组胎鼠肺组织结构正常, 肺泡排列整齐; ②低剂量组胎鼠部分肺部分肺泡腔变的不规则, 偶见肺泡壁断裂; ③中剂量组胎鼠部分肺泡壁断裂, 部分肺泡融合, 大部分肺泡腔变的不规则, 肺泡壁轻度增宽和轻度炎症细胞的浸润; ④高剂量组胎鼠的肺组织病变明显, 肺泡壁断裂融合为肺大泡, 肺泡壁有轻度的淤血伴重度炎症细胞的浸润, 同样根据上述分级标准, 对胎鼠肺脏组织的病变程度进行分级评估 (表 2) 并对评估的结果行秩和检验, 结果表明: 与对照组相比, 各实验组胎鼠肺组织病变程度的差别同样均具有统计学意义 ($\chi^2 = 94.235, P < 0.05$)。

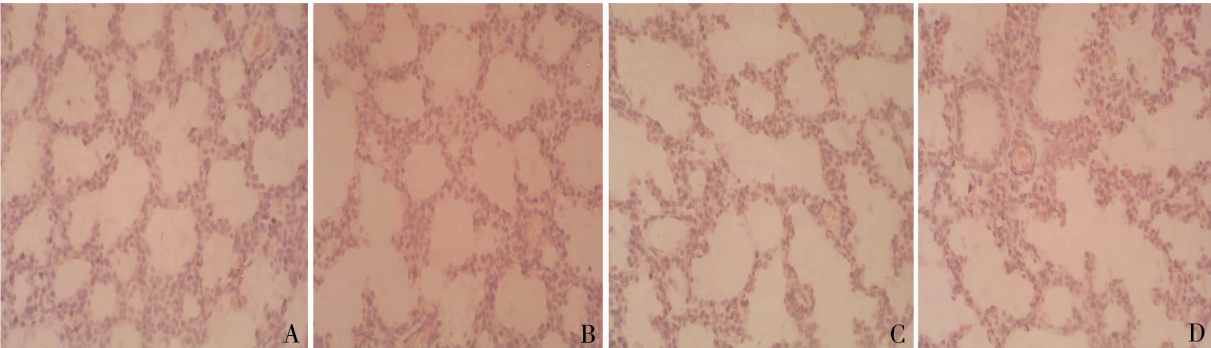


图2 各实验组胎鼠肺组织病理学变化(HE, ×400)

A. 对照组胎鼠肺组织结构正常,肺泡排列整齐;B. 低剂量组胎鼠部分肺部分肺泡腔不规则扩张,偶见肺泡壁断裂;C. 中剂量组胎鼠部分肺泡壁断裂,肺泡融合,大部分肺泡腔变得不规则,肺间质轻度炎症细胞浸润;D. 高剂量组胎鼠的肺组织病变明显,肺泡壁断裂融合为肺大泡,肺间质炎症细胞重度浸润。经检验,与对照组相比,各实验组病变差异具有统计学意义($P < 0.05$)

表2 各组胎鼠肺脏组织病变程度的比较

组别	胎鼠肺组织的病变程度			
	0级	1级	2级	3级
	(正常)	(轻度病变)	(中度病变)	(重度病变)
高剂量染毒	7*	15*	17*	21*
中剂量染毒	13*	18*	20*	9*
低剂量染毒	20*	29*	9*	2
对照	53	6	1	0

与对照组比较,* $P < 0.05$

讨论

研究表明柴油在燃烧过程中所形成的颗粒物量多且粒径小,颗粒物表面吸附多种物质,其中包括已被证明具有致癌作用的多环芳烃等^[7]。本研究采用由美国国家标准技术研究所提供的标准柴油车尾气颗粒物(diesel exhaust particulate, DEP),探索 DEP 对孕鼠和胎鼠肺组织的病理损伤。据美国国家标准技术研究所提供的检测数据,此 DEP 标准物含有 39 种 PAHs 成分。为了较好地控制染毒剂量,探索可能存在的剂量反应关系,本研究采用染毒方法相对简单的腹腔染毒途径。虽然此种染毒方法并不符合孕鼠肺组织的常规损伤途径,但对揭示剂量反应关系具有一定作用;而且,更为重要的是对探索毒物对胎鼠肺脏发育的影响能够提供较为确切的数据。本研究结果表明 DEP 对各实验组孕鼠和胎鼠的肺脏均造成不同程度的组织病理损伤,病变程度从低剂量组的肺泡腔不规则扩张到中剂量组的部分肺泡腔断裂、轻度炎症细胞浸润;高剂量组则发展为大部分肺泡融合成大肺泡,重度炎症细胞浸润,肺组织病变严重,肺组织的病

变程度呈现出随着染毒剂量增加而加重的趋势。这一变化趋势提示 DEP 对肺脏的损伤作用存在剂量反应关系。与对照组相比,各实验组孕鼠和胎鼠肺组织病变的差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。

孕期是个体发育的关键时期,这个阶段造成的损伤很可能会延续到出生后的较长的一段时间,甚至到成人期^[8]。本研究结果提示 DEP 可以通过胎盘屏障对肺脏造成组织病理损伤,可能成为新生儿呼吸窘迫综合征或其他肺部病变的病因之一,对其可能的致病机制有待于进一步的研究和探索。

参考文献

1 贺栋梁,李梓民,周艳,等. 汽车尾气的生殖毒性及对微量元素的影响. 实用预防医学,2008,15(2):306-307

2 Herchel E. Health effect of exposure to diesel exhaust. Washington D C: National Academy press,1981:13-15

3 刘文彪,董胜章. 机动车尾气慢性毒性效应的研究进展. 环境与健康杂志,2002,19:413-416

4 吴水平,左谦,兰天,等. 天津地区冬季总悬浮颗粒物中 PA Hs 污染特征. 环境科学,2004,24(4):13-17

5 Ritz B, Wilhelm M, Ghosh J C, et al. Ambient Air Pollution and Preterm Birth in the Environment and Pregnancy Outcomes Study at the University of California, Los Angeles. Am J Epidemiol,2007,166:1045-1052

6 Perera F P, Tang D, Rauh V, et al. Relationships among polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts, proximity to the World Trade Center, and effects on fetal growth. Environ Health Perspect, 2005, 113(8):1062-1067

7 朴丰源,孙鲜策. 城市大气颗粒物中多环芳烃类化合物浓度及其致突变活性. 大连医科大学学报,2006,28(2):81-83

8 刘娅,金银龙. 多环芳烃宫内暴露对子代健康影响的研究进展. 国外医学·卫生学分册,2007,34(4):221-224

(收稿:2010-10-08)