

中国医科大学研究生学位论文独创性声明

本人申明所呈交的学位论文是我本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得我校或其他教育机构的学位或证书而使用过的材料，与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示谢意。

申请学位论文与资料若有不实之处，本人承担一切相关责任。

论文作者签名： 贺 冰 日期： 2010年5月12日

中国医科大学研究生学位论文授权使用授权书

本人完全了解中国医科大学有关保护知识产权的规定，即：研究生在攻读学位期间论文工作的知识产权单位属中国医科大学。本人保证毕业离校后，发表论文或使用论文工作成果时署名为中国医科大学，且导师为通讯作者，通讯作者单位亦署名为中国医科大学。学校有权保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅。学校可以公布学位论文的全部或部分内容（保密内容除外），以采用影印、缩印或其他手段保存论文。

论文作者签名： 贺 冰

指导教师签名： 孙书英

日 期： 2010年5月12日



目 录

一、摘要

中文论著摘要 1

英文论著摘要 8

二、英文缩略语 16

三、论文

论文一

前言 18

材料与方法 19

实验结果 24

讨论 39

结论 42

论文二

前言 43

材料与方法 44

实验结果 49

讨论 62

结论 65

论文三

前言 66

材料与方法 68

实验结果 71

讨论 75

结论 77

四、本研究创新性的自我评价 78

五、参考文献 79

六、附录

综述87

在学期间科研成绩107

致谢108

个人简介109

大气污染颗粒物对卵蛋白诱导的哮喘小鼠

气道炎症的作用及其机制研究

前 言

大气污染是影响公众健康的首要环境危险因素之一。大气污染物是由诸多污染物组成的复杂混合物,目前公认的各种大气污染物中,可吸入颗粒物(particulate matter, PM)与人群健康效应各终点的流行病学联系最为密切,是定量评价大气污染健康危害的标志性污染物。颗粒物,特别是空气动力学直径 $\leq 10\text{ }\mu\text{m}$ 的可吸入颗粒物(PM₁₀)是国内外许多大城市的首要污染物。大量流行病学调查研究表明,可吸入颗粒物与人类呼吸系统疾病的发病率、死亡率密切相关,能引起哮喘、肺功能下降、呼吸系统炎症,甚至累及心血管系统、神经系统、免疫系统、促进癌症发生^[1-5]。对欧洲29个国家的调查研究表明,PM₁₀每升高 $10\text{ }\mu\text{g}/\text{m}^3$,呼吸系统疾病的病死率提高 0.58% ^[6]。德国科学家于1985-1994年对4757名妇女进行了调查研究,结果显示慢性暴露于PM₁₀以及居住在主干道路附近的妇女肺功能受到了有害的影响,慢性阻塞性肺炎的发病率上升^[7]。在我国,对于中国现有的颗粒物暴露和死亡率关系的剂量-反应关系资料的Meta分析表明,PM₁₀每增加 $10\text{ }\mu\text{g}/\text{m}^3$,急性死亡率增加 0.38% ^[8]。对于太原市空气颗粒物与呼吸系统疾病每日住院率相关性研究发现,PM₁₀每增加 $10\text{ }\mu\text{g}/\text{m}^3$,呼吸系统疾病每日住院率上升 $0.72\%-2.15\%$ ^[9]。据统计,地球上每年PM₁₀的生成量约几十亿吨,一个成年人一昼夜会吸入约数万个甚至数十万个大气颗粒物。因此,大气污染颗粒物对人群健康的影响已成为世界各地环境、气象和医务工作者极为关注的前沿性课题。

支气管哮喘(简称哮喘)是一种以嗜酸性粒细胞为主的众多炎症细胞和炎症因子参与的慢性气道炎症性疾病^[10]。近年来,其患病率及死亡率均呈逐年上升趋势。在一些发达国家,例如美国的儿童哮喘患病率从1980年的 3.6% 上升到2003年的 5.8% ^[11];而我国儿童哮喘患病率也从1990年的 2.03% 上升到2000年的 4.63% ^[12]。专家警告:到2025年,如果全球人口的城市化比例从现有的 45% 升至 59% ,哮喘病患者将有可能达到4亿人,每250例死亡病例中就有1例由哮喘病导致。哮喘已经成

为仅次于癌症的世界第二大致死和致残疾病，而中国已经成为全球哮喘死亡率最高的国家之一^[13]。既往流行病学调查研究表明，大气中可吸入颗粒物浓度升高与哮喘患者数量增加密切相关^[14-15]；在亚洲沙尘暴发生的时段中，台湾和韩国地区哮喘病的日就诊率明显增加^[16-17]；同时实验研究发现暴露于来源于美国洛杉矶高速公路附近的PM₁₀能够导致卵蛋白(ovalbumin, OVA)诱导的哮喘小鼠气道炎症反应增强^[18]。因此，研究大气污染颗粒物对哮喘小鼠的损伤作用机制对加强颗粒物污染防治及敏感人群的健康保护具有重要的现实意义和指导意义。

呼吸道是可吸入颗粒物的靶器官，肺巨噬细胞是呼吸道内部重要的防御屏障。在它吞噬颗粒物进行消化过程中，加速各种炎性因子的合成与释放，扰乱了细胞因子网络平衡，从而启动了炎症过程，促进炎症发展，对肺部造成损伤^[19]。Toll样受体(Toll-like receptors, TLRs)是近年来备受关注的一种病原体识别受体，主要表达于巨噬细胞和树突状细胞表面^[20]。TLRs 是跨膜蛋白，通过辨认识别生物体内保守的病原相关分子模式(pathogens associated molecular patterns, PAMPs)，活化巨噬细胞和树突状细胞，产生细胞因子和趋化性细胞因子，启动天然免疫应答，构成机体免疫反应的第一道防线^[21]。PAMPs 是广泛存在于病原体细胞表面的分子标志，如酵母细胞壁上的甘露糖，以及脂多糖、肽糖、胞壁酸等各种细菌的细胞壁成分^[22]。巨噬细胞可以通过其细胞表面表达的 TLRs 来识别和结合 PAMPs，从而激发细胞内的信号传导，而引起机体天然免疫反应^[23]。同时 TLRs 与 PAMP 的结合还可以刺激抗原递呈细胞产生致炎细胞因子激发被动免疫^[24]。然而，其他的模式识别受体如 Nod 样受体(Nod-like receptors, NLRs)也参与天然免疫的介导^[25]。NLRs 家族的成员 NALP3 (NACHT-, LRR- and pyrin-domain containing protein 3)是细胞质受体，被微生物配体肽聚糖和细胞损伤的内源性标记物(如 ATP 和尿酸结晶等)激活^[26]。具有活性的 NALP3 与衔接蛋白如凋亡相关的斑点样蛋白(apoptosis-associated speck-like protein containing caspase recruitment domain, ASC)结合而形成 NALP3 炎症复合体^[27]。该复合体激活半胱氨酸蛋白酶-1(caspase-1)，进而分泌白细胞介素-1 β (Interleukin 1 β , IL-1 β)，促进炎症反应^[28]。本研究中的应用大气污染颗粒物对小鼠巨噬细胞进行染毒，通过检测细胞中 TLRs 和 NALP3 炎症复合体的基因表达而探讨大气污染颗粒物对哮喘小鼠损伤作用的机制。

在本研究中使用电子加热器将采集于我国北京空气中的城市空气颗粒物 (urban particulate matter, UPM) 和采集于日本壹歧岛空气中的亚洲沙尘暴浮尘颗粒物 (air-borne Asian sand dust, AASD) 的部分样本进行加热处理, 以去除吸附于其表面的微生物、 SO_4^{2-} 和 NO_3^- 等成分。本实验中应用 OVA 致敏小鼠, 采用气管灌注的方法, 分别将加热处理的 UPM (heated UPM, H-UPM)、未加热处理的 UPM、加热处理的 AASD (heated AASD, H-AASD) 和未加热处理的 AASD 的悬浮液注入小鼠体内, 观察小鼠肺组织病理形态学变化, 支气管肺泡灌洗液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 中炎症细胞的分布变化, BALF 中细胞因子和趋化性细胞因子的蛋白表达改变, 以及血清中 OVA 特异性 IgE 和 IgG1 抗体的表达变化。体外培养小鼠巨噬细胞系 (RAW264.7) 观察 TLRs 和 NALP3 炎症复合体的基因表达变化, 从而探求北京城市空气颗粒物和亚洲沙尘暴浮尘对机体健康危害的机制。本研究是关于北京城市空气颗粒物和亚洲沙尘暴浮尘对于 OVA 诱导哮喘小鼠气道炎症作用的首次实验研究。

实验方法

1、样本处理

分别将采集到的 UPM 和 AASD 样本在电子加热器中经过 360°C 加热处理 30 min, 以除去吸附于颗粒物表面的微生物、 SO_4^{2-} 和 NO_3^- 等成分。

2、真菌检测

应用荧光显微镜和真菌菌相 Y 荧光染料检测 UPM 和 AASD 样本中的真菌。参照真菌菌相 Y 荧光染料的实验说明书, 将 $2.5\ \mu\text{g}$ 的样本悬浮于 $40\ \mu\text{l}$ 荧光染料中, 经过 5 min 后制作成玻璃切片, 于荧光显微镜下观察。激发波长为 $472.5\ \text{nm}$, 发射波长为 $520.0\ \text{nm}$ 。

3、水溶性成份、脂多糖及 β -葡聚糖的检测

应用离子色谱和电感耦合等离子体-原子发射光谱分析 UPM 和 AASD 样本中的水溶性成份如 SO_4^{2-} 和 NO_3^- 等。应用 Endospec ES test MK 检测 UPM 和 AASD 样本中的脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 含量, 应用 Fungitec G test MK 检测 UPM 和 AASD 样本中的 β -葡聚糖含量。

4、实验动物及染毒

从Charles River公司（神奈川，日本）购入雄性ICR小鼠，适应性喂养一周后开始实验。每间隔一周，将小鼠在4%三氟溴氯乙烷作用下麻醉，经气管注入颗粒物（0.1 ml/mouse）和/或OVA（0.1 ml/mouse）。最后一次染毒的第二天，经小鼠腹腔注射戊巴比妥，将其深度麻醉，放血处死。

5、实验动物的病理检测

剖取小鼠肺部固定于 10%中性福尔马林缓冲液中，肺叶分离后，将其切割成 2 mm 大小的碎块，用石蜡包埋，制作成 3 μm 厚的切片。HE 染色后观察呼吸道由近端向远端嗜酸性粒细胞和淋巴细胞浸润情况。PAS 染色后观察支气管上皮杯状细胞的增殖情况。应用显微镜对每个切片的炎症细胞和上皮细胞进行观察分析。

6、采集支气管肺泡灌洗液和血液

小鼠深度麻醉，心脏采血，离心后取上清液，-80℃的深度冰箱中保存，用于检测血清中的OVA特异性抗体IgE和IgG1的表达；气管固定，用无菌生理盐水灌洗小鼠肺部，收集灌洗液后离心取上清液，-80℃的深度冰箱中保存，用于检测BALF中细胞因子和趋化性细胞因子的蛋白表达。

7、支气管肺泡灌洗液中的细胞计数

将支气管肺泡灌洗液离心后得到的沉淀溶于生理盐水中，制成细胞悬液，显微镜下应用血细胞计数器直接计数总细胞数。细胞悬液应用细胞离心涂片机，应用Diff-Quik染色，显微镜下观察计数嗜酸性粒细胞等炎性细胞。

8、肺泡灌洗液中的细胞因子和趋化性细胞因子的检测

应用酶联免疫反应检测BALF中细胞因子和趋化性细胞因子的蛋白表达。其中细胞因子包括：白细胞介素(Interleukin, IL)-4、IL-5、IL-12、IL-13和干扰素(interferon, IFN)- γ ；趋化性细胞因子包括：角质细胞趋化因子(Keratinocyte chemoattractant, KC)、巨噬细胞炎症蛋白(macrophage inflammatory protein, MIP)-1 α 、单核细胞趋化蛋白(monocyte chemotactic protein, MCP)-1、MCP-3、调节激活正常T细胞表达和分泌细胞因子(regulated on activation normal T cell expressed and presumably secreted, RANTES)和嗜酸性粒细胞趋化因子(eotaxin)。

9、OVA特异性IgE和IgG1抗体的检测

应用鼠OVA-IgE ELISA试剂盒和鼠OVA-IgG1 ELISA试剂盒检测血清中的OVA特异性IgE和IgG1抗体。

10、细胞培养及染毒

本研究中采用由BALB/c雄性小鼠中提取的巨噬细胞系RAW264.7。将加热、未加热的UPM和AASD样本分别配置成DMEM悬浮液，使其浓度均为3 mg/ml，观察细胞生长状态良好。每个培养皿中加入40 μ l的UPM或AASD悬浮液，使其终浓度为30 μ g/ml，在含5% CO₂的37℃培养箱中，培养3 h后提取RNA。

11、RT-PCR

ISOGEN提取RNA后，冰上操作反转录获得cDNA，进行RT-PCR分析TLRs和NALP3炎症复合体的基因表达。

12、统计学分析

本研究应用 SPSS13.0 统计学软件进行分析，统计结果表述为平均数 $\pm$ 标准差，采用单因素方差分析比较不同染毒组的实验数据；当组间差异具有统计学意义时，采用 SNK 法进行组间比较， $p < 0.05$ 具有统计学意义。

实验结果

1、附着于颗粒物表面的真菌检测

在未加热的UPM和AASD表面明显呈现荧光，该现象表明未经过加热处理的颗粒物表面吸附了真菌微生物。

2、颗粒物中化学成分、水溶性成分、脂多糖和 β -葡聚糖的含量

UPM中的主要化学成分为二氧化硅（约占32%）和碳（约占12%）。AASD中的主要化学成分为二氧化硅（约占60%）。UPM和AASD均含有一定量的SO₄²⁻、NO₃⁻、Cl⁻、NH₄⁺、LPS和 β -葡聚糖；而经过加热处理的UPM和AASD中上述水溶性成分、LPS和 β -葡聚糖的含量均未检测到。

3、颗粒物致小鼠肺部病理学改变的观察

OVA + UPM和OVA + AASD联合处理组的小鼠肺支气管上皮中杯状细胞显著增殖，在PAS反应中呈现粉色，呼吸道周围结缔组织中有明显的嗜酸性粒细胞

和淋巴细胞浸润，其病理学改变分别强于OVA + H-UPM和OVA + H- AASD联合处理组。

4、颗粒物对小鼠支气管肺泡灌洗液中炎症细胞分布的影响

OVA + UPM和OVA + AASD联合处理组小鼠的支气管肺泡灌洗液中的中性粒细胞、巨噬细胞、嗜酸性粒细胞以及淋巴细胞数量显著高于其他各处理组。

5、颗粒物对小鼠支气管肺泡灌洗液中细胞因子和趋化性细胞因子表达的影响

与OVA单独处理组相比，OVA + UPM和OVA + AASD联合处理组小鼠的支气管肺泡灌洗液中细胞因子IL-4、IL-5、IL-12和趋化性细胞因子MCP-1、MCP-3、嗜酸性粒细胞趋化因子的蛋白表达显著增加。

6、颗粒物对小鼠血清中OVA特异性IgE和IgG1表达的影响

与OVA单独处理组相比，OVA + UPM和OVA + AASD联合处理组小鼠的血清中OVA特异性IgE和IgG1抗体的表达明显增加。

7、颗粒物对鼠巨噬细胞中TLR2和TLR4 mRNA表达的影响

与对照组相比，AASD使小鼠巨噬细胞中TLR2表达mRNA显著增加，而TLR4表达mRNA显著减少，H-AASD处理组的mRNA表达无显著变化。

8、亚洲沙尘暴浮尘颗粒物对小鼠巨噬细胞中NALP3炎症复合体mRNA表达的影响

与对照组相比，AASD使小鼠巨噬细胞中NALP3炎症复合体的基因表达显著增加，H-AASD处理组NALP3炎症复合体的基因表达无显著变化。

结 论

1、北京城市空气颗粒物和亚洲沙尘暴浮尘颗粒物通过增加Th2反应相关的细胞因子和趋化性细胞因子的表达而激活Th2免疫反应，进而加重OVA诱导哮喘小鼠的气道炎症反应；城市空气颗粒物和亚洲沙尘暴浮尘中的二氧化硅成分以及吸附于颗粒物表面的燃料燃烧产物、真菌、细菌可能在上述反应过程中发挥重要作用。

2、亚洲沙尘暴浮尘颗粒物导致小鼠巨噬细胞中TLR2和NALP3炎症复合体基因表达增加。

关键词

大气污染颗粒物、卵蛋白、哮喘、细胞因子、趋化性细胞因子、Toll 样受体、
NALP3 炎症复合体

• 英文论著摘要 •

Atmospheric Pollutant Enhanced Ovalbumin-Induced Airway Inflammation in Asthmatic Murine

Preface

Air pollution is the primary environmental risk factor of public health. Air pollutants are formed by a complex mixture of many pollutants, and the currently accepted range of air pollutant is particulate matter, which closely connected with the health effects of epidemiology and is a sign of health hazards pollutants. Particulate matter (PM), especially the aerodynamic diameter $\leq 10 \mu\text{m}$ (PM_{10}) is the primary pollutant in many major cities at home and abroad. Previous epidemiologic studies have indicated that exposure to ambient particulate matter in a metropolitan area closely relates to increases in mortality and morbidity of cardiovascular and respiratory diseases. A survey of 29 countries in European showed that, when PM_{10} increased $10 \mu\text{g per m}^3$, the mortality of respiratory diseases increased 0.58%. German scientists surveyed 4757 women in the year of 1985-1994, and the results showed that the women living near the trunk roads and chronic exposed to PM_{10} suffered harmful effects of chronic obstructive pneumonia. In China, Meta-analysis of data of current dose - response relationship between particulate matter exposure and mortality showed that, when PM_{10} increased $10 \mu\text{g per m}^3$, acute mortality increased 0.38%. The study on the relationship between Taiwan air particles and daily maintenance rate of respiratory diseases found that, when PM_{10} increased $10 \mu\text{g per m}^3$, the daily hospitalization rate of respiratory diseases increased by 0.72% -2.15%. It is reported that there are billions of tons of PM_{10} on the earth about every year. An adult one day and night is exposed to some tens of thousands or even hundreds of thousands of atmospheric particles.

Therefore, the workers of environment, meteorology and medical are focus on the health effects of particulate matter in the air pollution.

Asthma is a complex syndrome broadly defined by inflammation of the airways associated with airway hyperresponsiveness and mucus hypersecretion. In recent years, its prevalence and death rates showed a rising trend year by year. In some countries, such as the United States, asthma prevalence increased from 3.6% in 1980 to 5.8% in 2003; the prevalence of asthma in children in China increased from 2.03% in 1990 to 4.63% in 2000. Experts warn: by 2025, if the urbanization of global population increased from 45% to 59%, asthma patients will reach 400 million people. One of 250 cases of deaths caused by asthma. Asthma has become the world's second largest debilitating diseases following the death of cancer, while China has become the one of the highest mortality of asthma. Epidemiological studies showed that atmospheric concentration of particles increase the number of patients with asthma. Recent epidemiologic studies have shown that Asian dust storm events coincided with an increase in daily admissions and clinic visits for asthma and allergic rhinitis in Taipei, Taiwan. Experimental studies have also reported that exposure to ambient PM near a heavily trafficked Los Angeles freeway enhanced inflammatory and allergic responses in ovalbumin (OVA)-sensitized BALB/c mice. Therefore, the study of injury mechanisms of particulate matter on asthma in mice has important practical significance for pollution prevention and protecting the health of sensitive populations.

Respiratory tract is the target organ of particulate matter, and the lung macrophage is an important defensive barrier within the respiratory tract. Lung macrophages digest phagocytic particles, induce the synthesis and release of all kinds of inflammatory factors, disrupte the balance of cytokine network, which launched the inflammatory

process, promote the development of inflammation and cause damage to the lungs. The innate immunity is the first barrier in the protection against ocular infections. The Toll-like receptors (TLRs), that belong to pattern recognition receptors (PRRs) family, have been the molecules involved in the recognition of pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) that lead to ocular inflammatory process. Nevertheless, other PRRs such as Nod-like receptor (NLR) could also be participating in this phenomenon. NALP3 (nucleotide-binding domain-, leucine-rich repeat-, and pyrin domain-containing protein 3) of NLR family members is cytoplasmic receptor which is activated by microbial ligands like peptidoglycan as well as endogenous markers of cellular damage (for example ATP or uric acid crystals). The activate NALP3 interacts with adaptor proteins like ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase activating and recruitment domain) to form NALP3 inflammasome. The inflammasome activates caspase-1. NALP3 inflammasome complex with the active caspase-1 can produce active IL-1 β with pro-IL-1 β . Recent research has shown that silica and asbestos are sensed by NALP3 inflammasome, whose subsequent activation leads to IL-1 β production.

In the present study, we used UPM collected from the atmosphere in Beijing and AASD collected from the atmosphere from Iki-island in Japan. Comparison of allergic inflammation between aggravating effects of UPM/AASD that had been excluded of toxic materials (microbial materials, sulfate, etc.) by heating, and crude UPM/AASD were performed in the murine lungs. In this *in vitro* study, the gene expression of TLRs and NALP3 inflammasome in RAW264.7 cells was measured in the presence of heat UPM/AASD and crude UPM/AASD to investigate the role of TLRs and NALP3 inflammasome in the enhancement by UPM/AASD. This is the first experimental study on biochemical and pathologic evidences of Beijing dust and airborne dust in Japan exacerbating asthma caused by OVA.

Materials and methods

1.Preparation of particles

The samples were heated at 360°C for 30 min in an electric heater to exclude toxic materials (microbiological materials, sulfate, nitrate, etc.) adhering to them.

2.Detection of fungi in particles

The fungi of the samples were detected by an all-in-one fluorescence microscope and fluorescent dye Fungiflora Y. According to the manufacture's protocol, in brief, approximately 2.5 µg of each particle sample was suspended in 40 µl Fungiflora Y, and after 5 min slides of the particles were completed. Then the slides were observed with the all-in-one fluorescence microscope when the excitation wavelength was 472.5 nm, and the emission wavelength was 520.0 nm.

3.Analysis of water soluble components, lipopolysaccharide (LPS), and β-glucan in particles

The concentration of water soluble components, such as sulfate (SO_4^{2-}) and nitrate (NO_3^-), in the samples was determined using an ion chromatograph and ICP-AES. Each particle sample was measured by kinetic assay using Endospec ES test MK for LPS activity and by Fungitec G test MK for β-glucan activity.

4.Animal and Study protocol

Male ICR mice (5 wk of age) were purchased from Charles River Japan, Inc. (Kanagawa, Japan). After 1 week of screening out sick mice, mice with abnormal body weight and mice stressed from different environmental breeding, mice were used at 6 weeks of age. OVA and particles were dissolved in the same saline. The instillation dose of particles was 0.1 mg per mouse. Mice were intratracheally instilled with these particles through a polyethylene tube under anesthesia with 4% halothane 4 times at 2-week intervals. The control mice were instilled intratracheally with 0.1 ml of normal saline per mouse. One day after the last intratracheal administration, the mice from all groups were killed by exsanguination under deep anesthesia by i.p. injection of pentobarbital at 12 weeks of age.

5.Pathological evaluation

The lungs were fixed by 10% neutral phosphate-buffered formalin. After separation of the lobes, 2-mm-thick blocks were taken for paraffin embedding. Embedded blocks were sectioned at a thickness of 3 µm, and then were stained with

hematoxylin and eosin (H&E) to evaluate the degree of infiltration of eosinophils or lymphocytes in the airway from proximal to distal. The sections were also stained with periodic acid–Schiff (PAS) to evaluate the degree of proliferation of goblet cells in the bronchial epithelium. A pathological analysis of the inflammatory cells and epithelial cells in the airway of each lung lobe on the slides was performed using a Nikon ECLIPSE light microscope.

6. Bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and blood

In brief, the tracheas were cannulated after the collection of blood. The lungs were lavaged with sterile saline by syringe. The lavaged fluid was harvested by gentle aspiration. The total amount of the lavages collected from individual mice was measured for calculating the protein levels of cytokines and chemokines in BALF. The fluids from the two lavages were combined, cooled to 4°C, and centrifuged at 1,500 rpm for 10 min. The BALF supernatants were stored at –80°C until it was analyzed for cytokines and chemokines.

7. Cell profile in BALF

The total cell counts of a fresh fluid specimen were determined using a hemocytometer. Differential cell counts were assessed on cytologic preparations. Slides were prepared using a Cytospin and stained with Diff-Quik to identify eosinophils with red granules. A total of 300 cells were counted under oil immersion microscopy.

8. Quantitation of cytokines and chemokines in BALF

The protein levels of cytokine and chemokine in the BALF were determined using enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA). Including: Interleukin (IL)-4, IL-5, IL-12, IL-13, Interferon (IFN)- γ , IL-1 β , Keratinocyte chemoattractant (KC), monocyte chemotactic protein (MCP)-1, macrophage inflammatory protein (MIP)-1 α , regulated on activation normal T cell expressed and presumably secreted (RANTES), eotaxin and MCP-3.

9. OVA -specific IgE and IgG1 antibodies

OVA-specific IgE and IgG1 antibodies were measured using a Mouse OVA-IgE ELISA kit and a Mouse OVA-IgG1 ELISA kit.

10. Cell culture

RAW264.7 cells, which are macrophage-like cells derived from BALB/c male

mice, were cultured at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂–95% air and maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium with 10% heat inactivated fetal bovine serum (FBS). They were plated at a concentration of 4×10^5 cells per 60-mm dish, and then sample with or without heating treatment were added to cells to give a final concentration of 3 µg/ml for 3 hr.

11. Gene expression analysis

Total RNA was extracted by standard procedures using 0.5 ml of Isogen (Nippon Gene) per dish. After DNase treatment of the total RNA, cDNA was synthesized by reverse transcription using M-MLV. Quantitative PCR was performed using an ABI Prism 7000 Sequence Detection System (ABI) under the same conditions. Two wells were used for each sample. The relative expression of each sample was calculated as the mean value divided by the mean value for GAPDH.

12. Statistical analysis

Statistical analyses on the pathologic evaluation in the airway, cytokine and chemokine proteins in BALF, and gene expression in RAW264.7 cells were conducted using SPSS 13.0 software as statistically significant at a level of $p < 0.05$. Results were expressed as mean $\pm$ SD. Differences among groups were determined using one way analysis of variance followed by Student-Newman-Keuls test when F was significant.

Results

1. The detection of fungi in the particles

Bright fluorescence of particles after being stained with Fungiflora Y. was clearly observed in crude samples.

2. Contents of chemical elements, water soluble components, LPS and β -glucan in the particles

The oxide composition in this UPM sample was 32% SiO₂ and 12% total carbonin, however, in this AASD sample was 60% SiO₂. There were SO₄²⁻, NO₃⁻, Cl⁻, NH₄⁺, LPS and β -glucan in crude samples but non-detected in the heated samples.

3. Enhancement of pathologic changes in the lung by the particles

OVA + UPM and OVA + AASD caused marked accumulation of lymphocytes and eosinophils infiltration in the airway compared with OVA group. The degree of the accumulation was higher in OVA + UPM and OVA + AASD than in OVA + H-UPM

and OVA + H-AASD

4.Enhancement of cell numbers in BALF by the particles

OVA + UPM and OVA + AASD resulted in a remarkable elevation of neutrophils, macrophages, eosinophils and lymphocytes compared with the control, OVA and the single treatment.

5.Enhancement of cytokines and chemokines in BALF by the particles

OVA + UPM and OVA + AASD enhanced the expression of IL-4, IL-5 and IL-12 compared with the control, OVA and the single treatment. OVA + UPM and OVA + AASD synergistically increased protein levels of eosinophil relevant cytokines, such as Eotaxin, MCP-1 and MCP-3 in BALF compared with the each single treatment.

6.Enhancement of OVA-specific IgE and IgG1 in serum by the particles

OVA + UPM and OVA + AASD markedly elevated the production of OVA-specific IgE and IgG1as compared with the control and OVA.

7.TLRs mRNA expression in RAW264.7 cells

UPM and AASD significantly increased the expression of TLR2 mRNA compared with saline addition. And AASD decreased the expression of TLR4 mRNA.

8.NALP3 inflammasome mRNA expression in RAW264.7 cells

AASD significantly increased the expression of NALP3 inflammasome compared with control. However, there was no significantly change of caspase-1.

Conclusion

1.Our findings suggest that UPM and AASD aggravate OVA-induced lung inflammation, possibly by activation of the Th2-associated immune response via cytokine and chemokine. The chemical products from fossil fuel combustion, fungi, bacteria, and silica-carrying contained in UPM and AD may be partly responsible for allergen-induced lung inflammation.

2.TLR2 and NALP3 inflammasome may play an important role in this phenomenon.

Key Words

particulate matter, ovalbumin, murine lung eosinophilia, cytokine, chemokine,
Toll-like receptors, NALP3 inflammasome

• 英文缩略语 •

英文缩写	英文全称	中文全称
PM	particulate matter	可吸入颗粒物
OVA	ovalbumin	卵蛋白
TLRs	Toll-like receptors	Toll 样受体
PAMPs	pathogen-associated molecular patterns	病原体相关分子模式
NLRs	Nod-like receptors	Nod 样受体
ASC	apoptosis-associated speck-like protein containing caspase recruitment domain	凋亡相关的斑点样蛋白
IL	interleukin	白细胞介素
UPM	urban particle matter	城市空气颗粒物
AASD	air-borne Asian sand dust	亚洲沙尘暴浮尘颗粒物
H-UPM	heated UPM	加热处理的城市空气颗粒物
H-AASD	heated AASD	加热处理的亚洲沙尘暴浮尘颗粒物
BALF	bronchoalveolar lavage fluid	支气管肺泡灌洗液
Ig	immunoglobulin	免疫球蛋白
IFN	interferon	干扰素
KC	Keratinocyte chemoattractant	角质细胞趋化因子
MCP	monocyte chemotactic protein	单核细胞趋化蛋白
MIP	macrophage inflammatory protein	巨噬细胞炎症蛋白
RANTES	regulated on activation normal T cell expressed and presumably secreted	调节 T 细胞表达和持续分泌细胞因子
LPS	lipopolysaccharide	脂多糖
ASD	Asian sand dust	亚洲沙尘颗粒
PRRs	pattern recognition receptors	模式识别受体
LRR	leucine rich repeated	富含亮氨酸的重复结构域

续前页

英文缩写	英文全称	中文全称
IL-1R	Interleukin-1 receptor	白细胞介素-1 受体
NF-κB	nuclear factor kappa B	核转录因子
PYD	pyrin domain	热蛋白样结构域
CARD	caspase recruitment domain	聚集半胱氨酸蛋白酶募集域
BIR	baculovirus inhibitor of apoptosis protein repeat	凋亡蛋白重复序列
TLR2ab	TLR2 antibody	TLR2 抗体
TLR4ab	TLR4 antibody	TLR4 抗体
LTA	lipoteichoic acid	脂磷壁酸

北京城市空气颗粒物对卵蛋白诱导的

哮喘小鼠气道炎症的作用

前 言

近年来,随着人口的增加,城市化扩展,车辆的增加和能源的消耗,北京的空气污染程度越来越大。污染物主要来源于机动车排放物(柴油机烟碳等)、地面扬尘、植物的花粉、孢子、燃料燃烧产物、工业生产排放物等,污染物的组成也很复杂,形成了复合型污染,使得大气环境比较脆弱。由于北京东、西、北三面环山,仅南面是平原,所以只有在冷空气带来的北风吹拂下,污染物向南面扩散,空气质量才能转好。而如果是其它的风向,遇到了大山的阻拦,污染物依然会漂浮在城区。根据2006年12月13-15日在印尼日惹召开的第5届空气质量研讨会的报道,中国北京是亚洲国家当中空气污染问题最严重的城市,其每立方米空气中威胁健康的可吸入颗粒物(particulate matter, PM)的含量达到了142 μg ,比世界卫生组织规定的安全标准(20 μg)的高出了六倍。

北京的城市空气颗粒物(urban particle matter, UPM)以粒径在10 μm 以下的可吸入颗粒物(PM₁₀)为主^[29]。大量流行病学调查研究表明,在所有的空气污染物中PM₁₀与肺炎、哮喘、肺动脉栓塞及慢性阻塞性肺病等肺部疾病的发病率和死亡率密切相关,严重影响人们的呼吸系统健康^[30-31]。早在上个世纪七十年代就有研究指出,空气中PM₁₀浓度的增加导致慢性支气管炎的患病率升高^[32];近年来的研究显示,长期吸入空气中的PM₁₀导致呼吸道疾病症状显著增加^[33]。Matthew等通过对加利福尼亚儿童哮喘发病率与大气污染物的时间序列分析发现,1-18岁的儿童哮喘发病与大气颗粒物暴露浓度密切相关^[34]。

城市空气颗粒物给人体的呼吸系统健康造成了巨大的危害,各国的科研学者一直在对其作用的机制进行实验研究。既往研究表明,采集于美国洛杉矶高速公路周围空气中的污染颗粒物能够加重BALB/c小鼠卵白蛋白(ovalbumin, OVA)诱导哮喘的过敏反应和炎症反应,使小鼠体内炎症反应相关的细胞因子如白细胞介素-5 (interleukin 5, IL-5)和 IL-13 表达增加, OVA 特异性相关的免疫球蛋白 E

(immunoglobulin E, IgE)和 IgG1 表达升高^[18, 35]; 采集于东京空气中的悬浮污染颗粒物能够使大鼠肺部内分泌细胞增生^[36]。但是, 来源于中国北京的城市空气颗粒物对于哮喘小鼠气道炎症作用的实验研究, 目前国内外尚无报导。

在本研究中, 应用大气采样器由北京空气中采集 UPM, 将一部分 UPM 样品在电子加热器中 360℃加热 30 min, 以去除吸附于 UPM 表面的微生物、SO₄²⁻和 NO₃⁻等成分。将 UPM 和经过加热处理的 UPM (heated UPM, H-UPM)经由气管注入小鼠体内, 观察小鼠肺组织病理形态学变化, 计数小鼠支气管肺泡灌洗液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF)中各种炎症细胞的数量, 测定 BALF 中炎症相关的细胞因子、趋化性细胞因子的蛋白表达以及血清中 OVA 特异性 IgE 和 IgG1 的抗体表达。

材料与方法

一、主要试剂

真菌菌相Y荧光染料(Technicon International, Inc., Tokyo)

Diff-Quik (International Reagents, Kobe, Japan)

IL-4、IL-13、角质细胞趋化因子(Keratinocyte chemoattractant, KC)、单核细胞趋化蛋白-1 (monocyte chemotactic protein, MCP)-1、巨噬细胞炎症蛋白-1 α (macrophage inflammatory protein, MIP)-1 α 、调节激活正常T细胞表达和分泌细胞因子(regulated on activation normal T cell expressed and presumably secreted, RANTES)、嗜酸性粒细胞趋化因子(eotaxin) (R&D Systems Inc. Minneapolis, MN)

IL-5、IL-12、干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ) (Endogen, Inc. Cambridge, MA) MCP-3 (Bender MedSystems Inc. Burlingame, CA)

鼠OVA-IgE ELISA试剂盒和鼠OVA-IgG1 ELISA试剂盒(Shibayagi Co., Shibukawa, Japan)

二、主要实验仪器

电子加热器(SSTR-25K, Isuzu Seisakusho Co., Ltd. Japan)

多合一荧光显微镜(BZ-9000, BIORIVO, Keyence, Japan)

超微针(UD-201 type, Tomy, Tokyo, Japan)

显微镜(Nikon Co., Tokyo, Japan)

细胞离心涂片机(Sakura, Tokyo, Japan)

酶标仪(Spectrafluor, Tecan, Salzburg, Austria)

real-time PCR仪(Applied Biosystem, USA)

三、实验动物

从Charles River公司(神奈川, 日本)购入5周大的雄性ICR小鼠, 在温度为23°C, 湿度为55–70%, 昼夜(12 h/12 h)交替的房间里, 采用商业饲料和自由给水方式饲养。适应性喂养一周后, 筛选出体重异常和/或病态的小鼠, 开始实验。

四、UPM样本处理

本研究组既往研究已经报道北京UPM的样本采集与分析过程^[29]: 应用带有石英纤维过滤器的大流量空气采样器(2500QT-UP, Pallflex)在中国北京采集空气中的颗粒物; 应用图像分析软件(OLS3500/SFT-3500, Olympus and Shimadzu)分析显微图像得到颗粒物的粒径大小, 该方法最低检出限为1 μm , 99%的北京空气颗粒物样本的粒径均小于10 μm , 粒径分布峰值为7 μm ; 应用电感耦合等离子体-原子发射光谱(61E Trace and ICP-750, Thermo Jarrell-Ash, USA)测定颗粒物中化学成分; 应用x射线衍射仪(RINT 2000, Rigaku Corporation, Japan)分析颗粒物的矿物组成, 确切检测到石英、长石、黏土矿物和石膏成分的峰值; 应用元素分析仪(FLUSH EA 1112, Thermo, USA)确定颗粒物中碳元素的含量。将采集到的部分北京UPM样本在电子加热器中经过360°C加热处理30 min, 以除去吸附于颗粒物表面的微生物。

五、UPM的真菌检测

应用荧光显微镜和真菌菌相Y荧光染料检测UPM样本中的真菌。真菌菌相Y荧光染料能够特异性地与 β -多糖类(如 β -葡聚糖)结合, 该方法是检测真菌细胞壁成分最为有效的方法^[37]。参照真菌菌相Y荧光染料的实验说明书, 将2.5 μg 的UPM或H-UPM样本悬浮于40 μl 荧光染料中, 经过5 min后制作成玻璃切片, 于多合一荧光显微镜下观察。激发波长为472.5 nm, 发射波长为520.0 nm。

六、UPM中水溶性成份、脂多糖及 β -葡聚糖的检测

应用离子色谱(DX-100, Dionex, Sunnyvale, CA, USA)和电感耦合等离子体-原子发射光谱(61E Trace and ICP-750, Thermo Jarrell-Ash, USA)分析UPM样本中的水

溶性成份如 SO_4^{2-} 和 NO_3^- 等。

参照实验说明书, 将2.5 μg UPM样本悬浮于1 ml水(LPS-free; Otuka Co., Kyoto, Japan)中, 室温1 h后, 应用Endospec ES test MK (Seikagaku Cop., Tokyo, Japan)检测UPM样本中的脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)含量, 该方法最低检出限为0.001 EU/ml; 将2.5 μg UPM样本悬浮于1 ml的水(β -glucan-free; Otuka Co., Kyoto, Japan)中, 室温2 h后, 应用Fungitec G test MK (Seikagaku Cop., Tokyo, Japan)检测UPM样本中的 β -葡聚糖(β -glucan)的含量, 该方法最低检出限为2 pg/ml。

七、实验动物染毒

根据UPM种类的不同将实验动物分为6个组, 每组16只, 各实验组分别为: Control组(生理盐水)、H-UPM组、UPM组、OVA组、OVA + H-UPM组和OVA + UPM组。UPM样本悬浮于0.9%生理盐水中, 浓度为1 mg/ml, 在冷却条件下, 应用超微针超声粉碎5 min。OVA溶解于相同的生理盐水中, 浓度为10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。每间隔一周, 将小鼠在4%三氟溴氯乙烷作用下麻醉, 经气管注入UPM (0.1 ml / mouse) 和/或OVA (0.1 ml / mouse)。最后一次染毒的第二天, 经小鼠腹腔注射戊巴比妥, 将其深度麻醉, 放血处死。

如果小鼠的体重为36 g, 潮气量为0.15 ml, 呼吸频率为200 次/min, 吸入的颗粒物100%沉积于肺部, 则根据中国城市空气质量标准(总悬浮颗粒物不超过0.15 mg/m^3) 2周中小鼠肺内沉积的空气颗粒物为90.72 μg ($0.15 \times 200 \times 0.15 \times 2 \times 7 \times 24 \times 60 \div 10^3$), 实验中经气管注入小鼠体内的UPM约为该剂量的1.1倍。根据对于呼吸道模型的研究, 粒径为6 μm 左右的空气颗粒物的肺沉积率为3%^[38], 则沉积于小鼠肺部的空气颗粒物量为2.72 μg ($90.72 \times 3\%$), 实验中经气管注入小鼠体内的UPM约为该剂量的36.8倍。根据本研究组既往的实验研究, 每间隔一周经小鼠气管注入1 μg OVA能够导致小鼠肺部过敏性炎症^[39]。因此, 本实验选择UPM的染毒剂量为0.1 mg/mouse, OVA的染毒剂量为1 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ 。

八、实验动物的病理检测

每个实验组随机选取8只小鼠用于病理分析。取小鼠肺部固定于10%中性福尔马林缓冲液中, 肺叶分离后, 将其切割成2 mm大小的碎块, 用石蜡包埋, 制作成3 μm 厚的切片。HE染色后观察呼吸道由近端向远端嗜酸性粒细胞和淋巴细

胞浸润情况。PAS 染色后观察支气管上皮杯状细胞的增殖情况。应用显微镜对每个切片的呼吸道中的炎症细胞和上皮细胞进行观察分析。呼吸道中嗜酸性粒细胞和淋巴细胞浸润的情况以及支气管上皮中杯状细胞的增殖情况,分级如下:0,没有任何变化(not present);1,细微变化(slight);2,轻度变化(mild);3,中度变化(moderate);4,中重度变化(moderate to marked);5,重度变化(marked)。细微变化指呼吸道中 10%的嗜酸性粒细胞和淋巴细胞浸润或支气管上皮中 10%杯状细胞增殖;轻度变化指呼吸道中 20-30%的嗜酸性粒细胞和淋巴细胞浸润或支气管上皮中 20-30%杯状细胞增殖;中度变化指呼吸道中 40-50%的嗜酸性粒细胞和淋巴细胞浸润或支气管上皮中 40-50%杯状细胞增殖;中重度变化指呼吸道中 60-70%的嗜酸性粒细胞和淋巴细胞浸润或支气管上皮中 60-70%杯状细胞增殖;重度变化指呼吸道中 80%以上的嗜酸性粒细胞和淋巴细胞浸润或支气管上皮中 80%以上杯状细胞增殖^[39]。所得到的数据计算其平均数和标准差 ($n=8$)。

九、采集血液和肺泡灌洗液

每个实验组的另外8只小鼠用于心脏采血和收集肺泡灌洗液。小鼠心脏采血,1500 rpm 离心 10 min,取上清液, -80℃的深度冰箱中保存,用于检测血清中的OVA特异性抗体的表达。小鼠深度麻醉及心脏采血后,气管固定,用0.8 ml 37℃无菌生理盐水灌洗小鼠肺部2次,收集灌洗液(约1.6 ml),4℃ 1500 rpm 离心10 min。取上清液, -80℃的深度冰箱中保存,用于检测肺泡灌洗液中细胞因子和趋化性细胞因子的蛋白表达。

十、肺泡灌洗液中的细胞计数

将肺泡灌洗液离心后得到的沉淀悬浮于生理盐水中,制成细胞悬液,显微镜下应用血细胞计数器直接计数总细胞数。细胞悬液应用细胞离心涂片机,1500 rpm 离心10 min,制成细胞涂片。应用Diff-Quik染色后,显微镜下观察计数中性粒细胞、巨噬细胞、嗜酸性粒细胞和淋巴细胞。

Diff-Quik染色具体步骤如下:

- (1) 细胞涂片制备完成后,水平放置,空气中自然干燥;
- (2) 细胞涂片浸入Diff-Quik固定液中6 s,将细胞涂片直立于吸水纸上以除去多余的固定液;

(3) 细胞涂片浸入Diff-Quik染色液 I 中14 s, 将细胞涂片直立于吸水纸上以除去多余的染色液 I;

(4) 细胞涂片浸入Diff-Quik染色液 II 中12 s, 将细胞涂片直立于吸水纸上以除去多余的染色液 II;

(5) 超纯水浸洗细胞涂片10-15 s, 以除去多余的染色液;

(6) 将细胞涂片直立以去除水分, 空气中自然干燥。

十一、支气管肺泡灌洗液中的细胞因子和趋化性细胞因子的检测

应用酶联免疫反应检测BALF中细胞因子和趋化性细胞因子的蛋白表达。其中细胞因子包括: IL-4、IL-5、IL-12、IL-13和IFN- γ ; 趋化性细胞因子包括: KC、MCP-1、MCP-3、MIP-1 α 、RANTES和eotaxin。

酶联免疫反应具体步骤如下:

(1) 使用前, 将所有试剂充分混匀, 不使液体产生大量的泡沫, 以免产生加样上的误差;

(2) 根据待测样品数量加上标准品的数量决定所需的板条数。每个标准品和空白孔做复孔。每个样品根据自己的数量来定, 使用复孔;

(3) 加入稀释好后的标准品50 μ l于反应孔、加入待测样品50 μ l于反应孔内。盖上膜板, 轻轻振荡混匀, 室温2 h;

(4) 用洗板机洗涤5次, 每孔加洗涤液400 μ l;

(5) 每孔加结合物100 μ l, 盖上新膜板, 轻轻振荡混匀, 室温2 h;

(6) 用洗板机洗涤5次, 每孔加洗涤液400 μ l;

(7) 每孔加底物溶液100 μ l, 室温暗室30 min;

(8) 每孔加停止反应溶液100 μ l, 振荡混匀;

(9) 30 min之内用酶标仪在450nm波长处测定各孔的OD值。

十二、OVA特异性IgE和IgG1抗体的检测

鼠OVA-IgE ELISA试剂盒和鼠OVA-IgG1 ELISA试剂盒检测血清中的OVA特异性IgE和IgG1抗体。

根据实验说明书, 具体步骤如下:

(1) 加样: 分别设空白孔、标准孔、待测样品孔。除空白孔外, 余孔分别加标准

溶液或待测样品 100 ul, 注意不要有气泡, 轻轻混匀, 酶标板加上盖, 37℃反应 120 min;

(2) 弃去液体, 甩干, 不用洗涤;

(3) 每孔加检测溶液 A 工作液 100 ul, 37℃, 60 min, 洗板 3 次, 350 ul/每孔;

(4) 每孔加检测溶液 B 工作液 100ul, 37℃, 60 min, 洗板 5 次, 350 ul/每孔;

(5) 依序每孔加底物溶液 90 ul, 37℃避光显色 30 min (此时肉眼可见标准品的前 3-4 孔有明显的梯度兰色, 后 3-4 孔梯度不明显);

(6) 依序每孔加终止溶液 50 ul, 终止反应 (此时兰色立转黄色)。用酶联仪在 450 nm 波长依序测量各孔的光密度 (OD 值)。

根据试剂盒说明书, 对于OVA-IgE, 1U为1.3 ng的OVA-IgE抗体; 对于OVA-IgG1, 1U为160 ng的OVA-IgE抗体。

十三、统计学分析

本研究应用 SPSS13.0 统计学软件进行分析, 统计结果表述为平均数±标准差, 采用单因素方差分析比较不同染毒组的实验数据; 当组间差异具有统计学意义时, 采用 SNK 法进行组间比较, $p < 0.05$ 具有统计学意义。

实验结果

一、附着于UPM表面的真菌检测结果

图1为进行真菌菌系Y染色后UPM表面的荧光检测结果。H-UPM表面没有荧光出现 (图1A和B), 而UPM表面明显呈现荧光 (图1C和D)。该现象表明经过加热处理去除了吸附于UPM表面的真菌微生物。

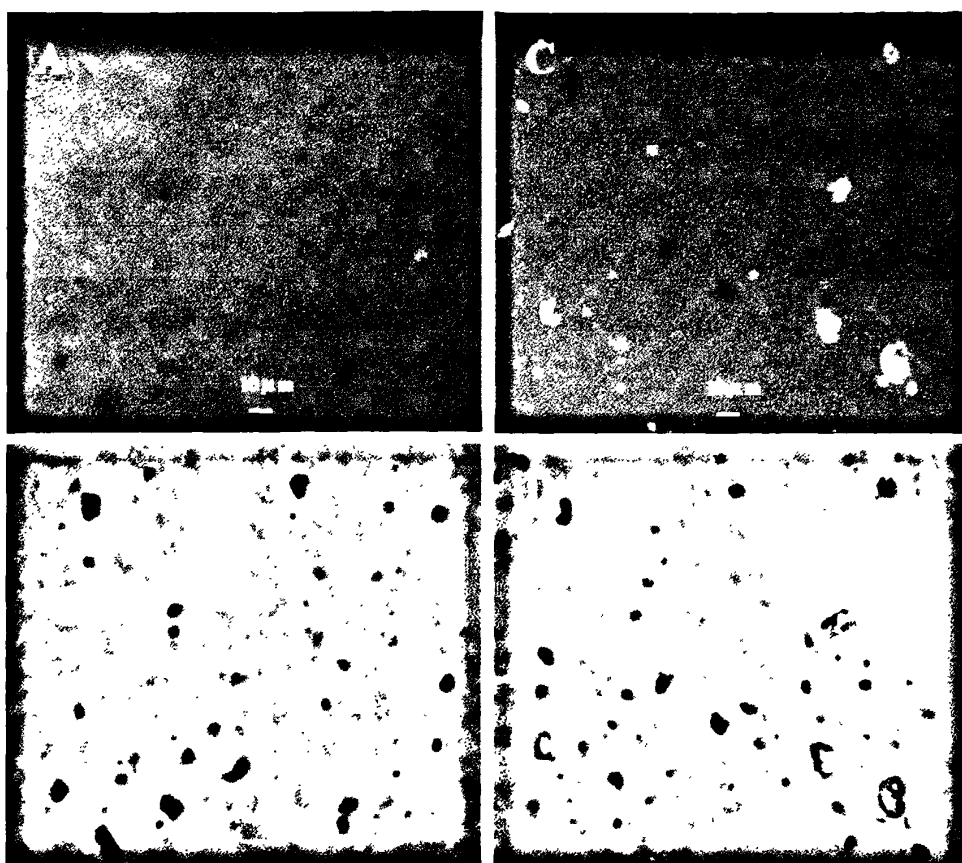


图1，真菌菌系Y染色后UPM表面的荧光检测结果

(A、B为H-UPM组；C、D为UPM组；A、C应用滤光片；B、D未应用滤光片)

二、UPM中的化学元素、水溶性成分、LPS和 β -葡聚糖的含量

表1为UPM中各种化合物成分的含量。其中， SiO_2 约占32%， Al_2O_3 约占9.5%， Fe_2O_3 约占7.2%， Na_2O 约占1.3%， CaO 约占9.0%， MgO 约占2.3%， TiO_2 约占0.5%， K_2O 约占1.7%，碳含量约为12%。表2为UPM中水溶性成分、LPS和 β -葡聚糖的含量。UPM中含有的 SO_4^{2-} 约为10000 $\mu\text{g/g}$ ， NO_3^- 约为1900 $\mu\text{g/g}$ ， Cl^- 约为600 $\mu\text{g/g}$ ， NH_4^+ 约为100 $\mu\text{g/g}$ ，LPS约为0.03 EU/mg， β -葡聚糖约为2704 pg/mg ；而经过加热处理的UPM中水溶性成分、LPS和 β -葡聚糖的含量均未检测到。

表1, UPM中各种化合物成分的含量

化合物成分	(%)
SiO ₂	32
Al ₂ O ₃	9.5
Fe ₂ O ₃	7.2
Na ₂ O	1.3
CaO	9.0
MgO	2.3
TiO ₂	0.5
K ₂ O	1.7
Total carbon	12
Elemental carbon	7.2
Organic carbon	4.8
Benzo(b)fluoranthen	(10 ppm)
Benzo(e)pyrene	(3 ppm)
Benzo(a)pyrene	(1 ppm)

UPM: 从中国北京大气中采集到的城市空气颗粒物。

表2, UPM中各种水溶性成分、LPS及β-葡聚糖的含量

Particles	SO ₄ ²⁻ (μg/g)	NO ₃ ⁻ (μg/g)	Cl ⁻ (μg/g)	NH ₄ ⁺ (μg/g)	LPS (EU/mg)	β-glucan (pg/mg)
UPM	10,000	1,900	600	100	0.03	2704
H-UPM	ND	ND	ND	ND	ND	ND

UPM: 从中国北京大气中采集到的城市空气颗粒物;

H-UPM: 在电子加热器中经过 360°C 处理 30 min 的 UPM;

ND (not detected): 未检测到。

三、UPM对小鼠肺部病理学改变的影响

图2和图3为UPM对小鼠肺呼吸道病理学改变的影响。表3为UPM对小鼠肺呼吸道上皮中杯状细胞增殖作用以及周围组织中嗜酸性粒细胞和淋巴细胞的浸润情况。结果显示,对照组的小鼠肺部无明显的病理学改变(图2 A和图3 A); H-UPM单独作用不能引起小鼠肺呼吸道上皮中杯状细胞增殖(图2 B); H-UPM单独作用引起小鼠肺呼吸道上皮细胞轻微增殖(图3 B); UPM单独作用导致小鼠轻微的支气管炎(图2 C)和肺泡细胞轻微增殖(图3 C); OVA单独处理导致小鼠肺呼吸道上皮的杯状细胞轻微增殖,在PAS染色中呈现粉色(图2 D),并伴有粘膜下层嗜酸性粒细胞轻微浸润(图3 D);与对照组相比, OVA + H-UPM(图2 E)和OVA + UPM(图2 F)联合处理引起小鼠肺呼吸道上皮中的杯状细胞显著增殖($p < 0.001$);与OVA单独作用组相比, OVA + H-UPM($p < 0.05$)和OVA + UPM($p < 0.001$)联合处理均导致周围组织中大量嗜酸性粒细胞浸润,且OVA + UPM组中嗜酸性粒细胞浸润程度大于OVA + H-UPM组; OVA + H-UPM(图3 E)和OVA + UPM(图3 F)联合处理也能够引起周围组织中淋巴细胞浸润($p < 0.001$),且OVA + UPM组中淋巴细胞浸润程度大于OVA + H-UPM组。

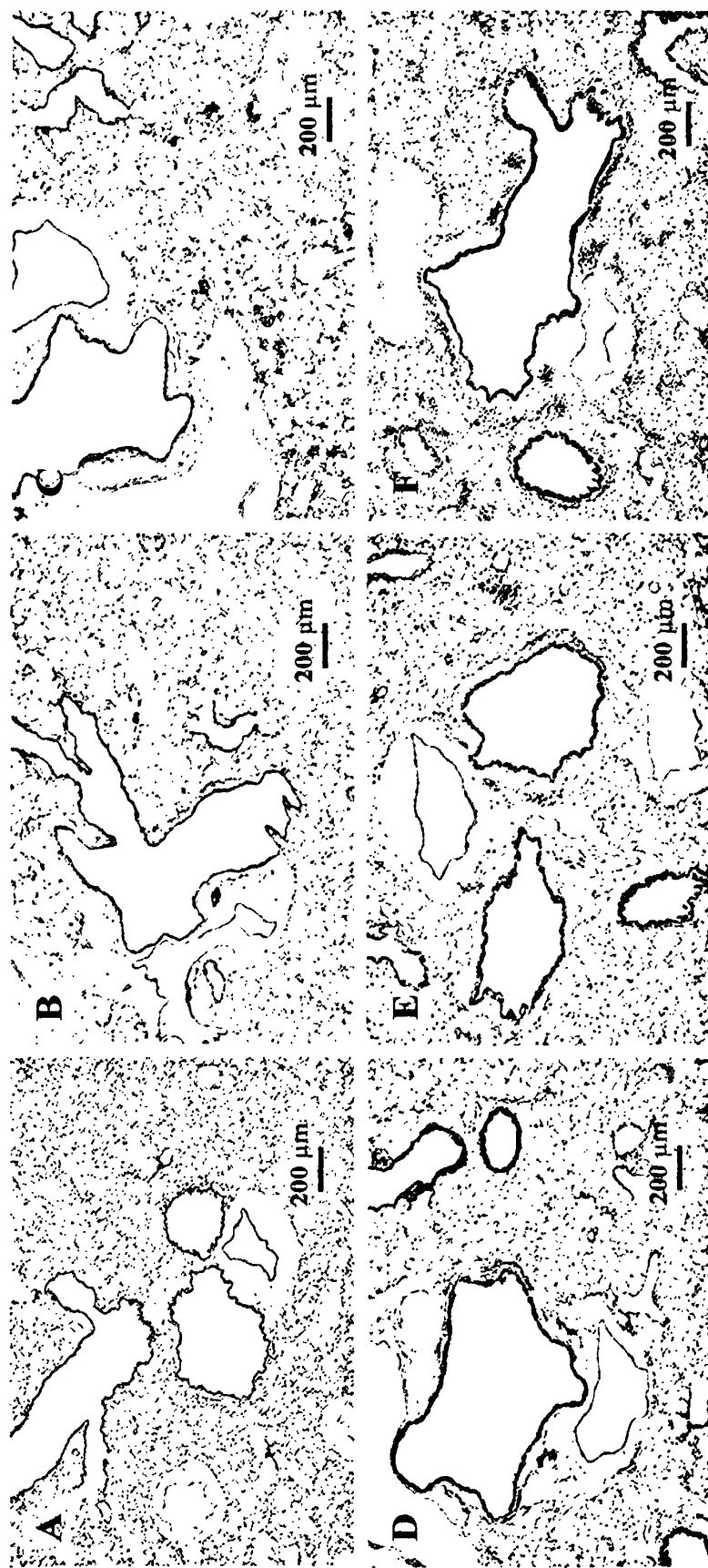


图2, UPM对小鼠肺部病理学改变的影响

A为对照组, B为H-UPM组; C为UPM组; D为OVA组; E为OVA + H-UPM组; F为OVA + UPM组。对照组和H-UPM处理组的小鼠肺部无明显的病理学改变(图2 A和B); UPM处理组的小鼠肺部细胞增生并有轻微的肺泡炎症(图2 C); OVA处理组的小鼠肺呼吸道上皮中的杯状细胞轻度增殖, 在PAS染色中呈现粉色, 肺呼吸道周围结缔组织中有轻微的炎症细胞浸润(图2 D); OVA和H-UPM联合处理引起小鼠肺呼吸道上皮中的杯状细胞中度增殖以及肺呼吸道周围结缔组织中中度的炎症细胞浸润(图2 E); OVA和UPM联合处理组的小鼠肺呼吸道上皮中的杯状细胞显著增殖以及肺呼吸道周围结缔组织中明显的炎症细胞浸润(图2 F)。A-F, PAS染色, bar=200 μ m。

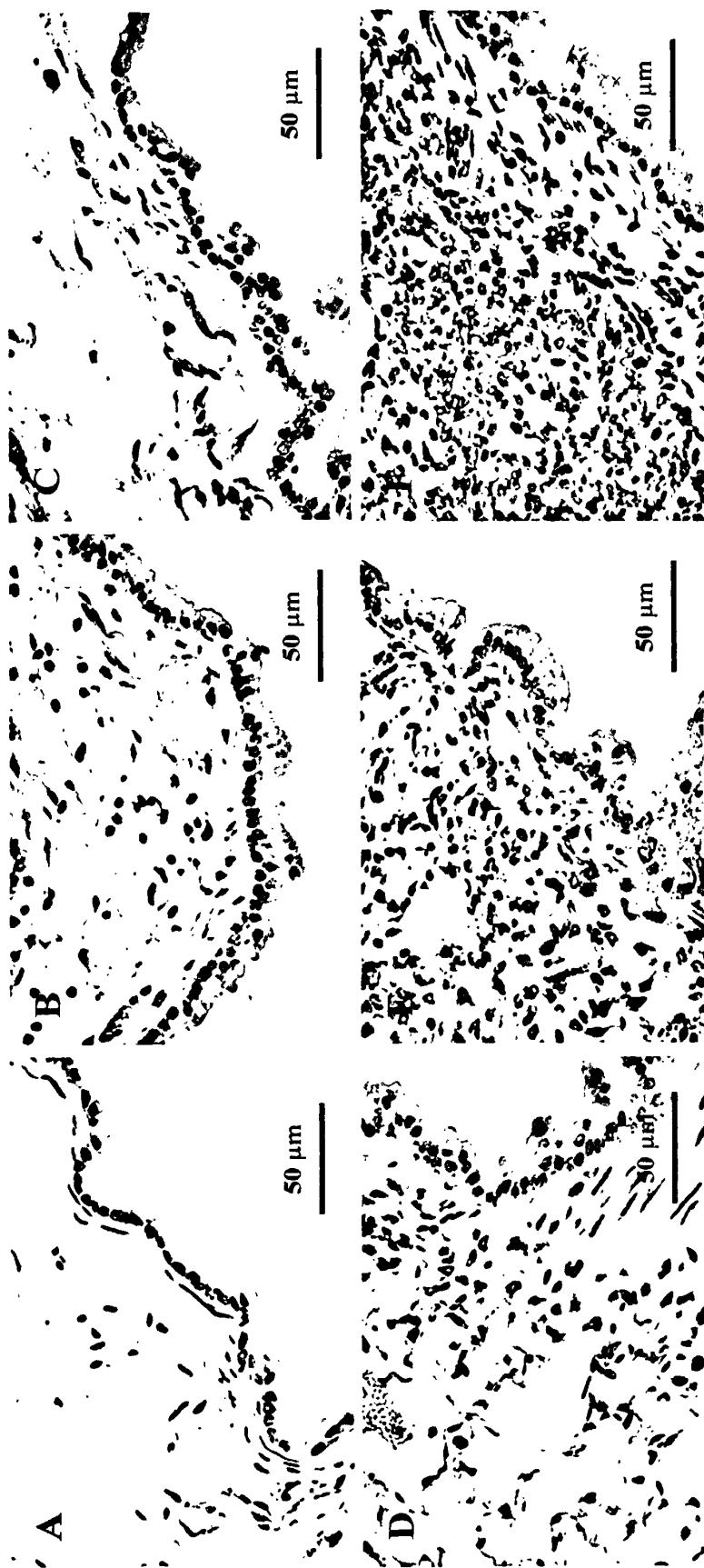


图3, UPM对小鼠呼吸道炎症细胞浸润的影响

A为对照组; B为H-UPM组; C为UPM组; D为OVA + H-UPM组; E为OVA + UPM组。对照组小鼠的呼吸道无明显病理学改变(图3 A); H-UPM处理组小鼠的呼吸道中有轻微的炎症细胞浸润(图3 B); UPM处理组小鼠的呼吸道中有明显的炎症细胞浸润(图3 C); OVA处理组小鼠呼吸道上皮的粘膜下层有轻微的嗜酸性粒细胞和淋巴细胞浸润(图3 D); OVA和H-UPM联合处理引起小鼠呼吸道周围结缔组织中中度的嗜酸性粒细胞和淋巴细胞浸润(图3 E); OVA和UPM联合处理组小鼠呼吸道周围结缔组织中明显的嗜酸性粒细胞和淋巴细胞浸润(图3 F)。A-F, HE染色, bar=50 μm。

表3, UPM对小鼠呼吸道病理学改变的影响

分组*	动物数(n)	病理学变化		
		淋巴细胞	嗜酸性粒细胞	杯状细胞
Control	8	0.13 ± 0.23	0	0.19 ± 0.26
H-UPM	8	0.19 ± 0.26	0	0.06 ± 0.18
UPM	8	0.57 ± 0.82	0.31 ± 0.88	0.25 ± 0.53
OVA	8	1.69 ± 1.07 [†]	0.88 ± 0.83	1.56 ± 1.02 [§]
OVA + H-UPM	8	2.50 ± 0.65 ^{†¶}	2.06 ± 0.98 ^{†¶¶}	2.31 ± 1.13 ^{†¶}
OVA + UPM	8	3.25 ± 0.60 ^{†‡**}	2.89 ± 0.83 ^{†‡**}	3.25 ± 0.60 ^{†‡**}

*实验分为 6 组, 分别为对照组 (Control)、加热城市空气颗粒物组 (H-UPM)、未加热城市空气颗粒物组 (UPM)、卵蛋白组 (OVA)、卵蛋白和加热城市空气颗粒物组 (OVA + H-UPM) 以及卵蛋白和未加热城市空气颗粒物组 (OVA + UPM)。

小鼠呼吸道病理变化评价: (0) 无变化; (1) 轻度变化; (2) 中度变化; (3) 中度变化; (4) 中度变化; (5) 重度变化。

[†] $p < 0.001$ vs. Control, [‡] $p < 0.001$ vs. OVA, [§] $p < 0.01$ vs. Control, [¶] $p < 0.05$ vs. OVA, ^{†¶} $p < 0.001$ vs. H-UPM, ^{**} $p < 0.001$ vs. UPM

四、UPM对小鼠支气管肺泡灌洗液中炎症细胞分布的影响

图4为UPM对小鼠支气管肺泡灌洗液中炎症细胞分布的影响。与对照组相比, UPM处理组小鼠的BALF中性粒细胞数量明显增加 ($p < 0.001$), 而H-UPM处理组小鼠的BALF中性粒细胞数量与对照组相比无明显变化; OVA + UPM联合处理组小鼠的BALF中性粒细胞数量显著高于对照组、OVA组以及UPM单独处理组 ($p < 0.001$), 而OVA + H-UPM处理组小鼠的BALF中性粒细胞数量无此种变化。OVA组、OVA + H-UPM处理组以及OVA + UPM处理组小鼠的BALF巨噬细胞数量显著高于对照组 ($p < 0.001$)。与对照组相比, H-UPM、UPM以及OVA单独处理组小鼠的BALF嗜酸性粒细胞数量无显著变化; OVA + H-UPM以及OVA + UPM联合处理组的小鼠的BALF嗜酸性粒细胞数量显著高于对照组、OVA组以及UPM单独处理组 ($p < 0.001$); OVA + UPM处理组小鼠的BALF嗜酸性粒细胞数量显著高于OVA + H-UPM处理组; 与对照组、UPM以及OVA单独处理组相比, OVA + UPM处理组小鼠的BALF淋巴细胞数量明显增加 ($p < 0.001$)。

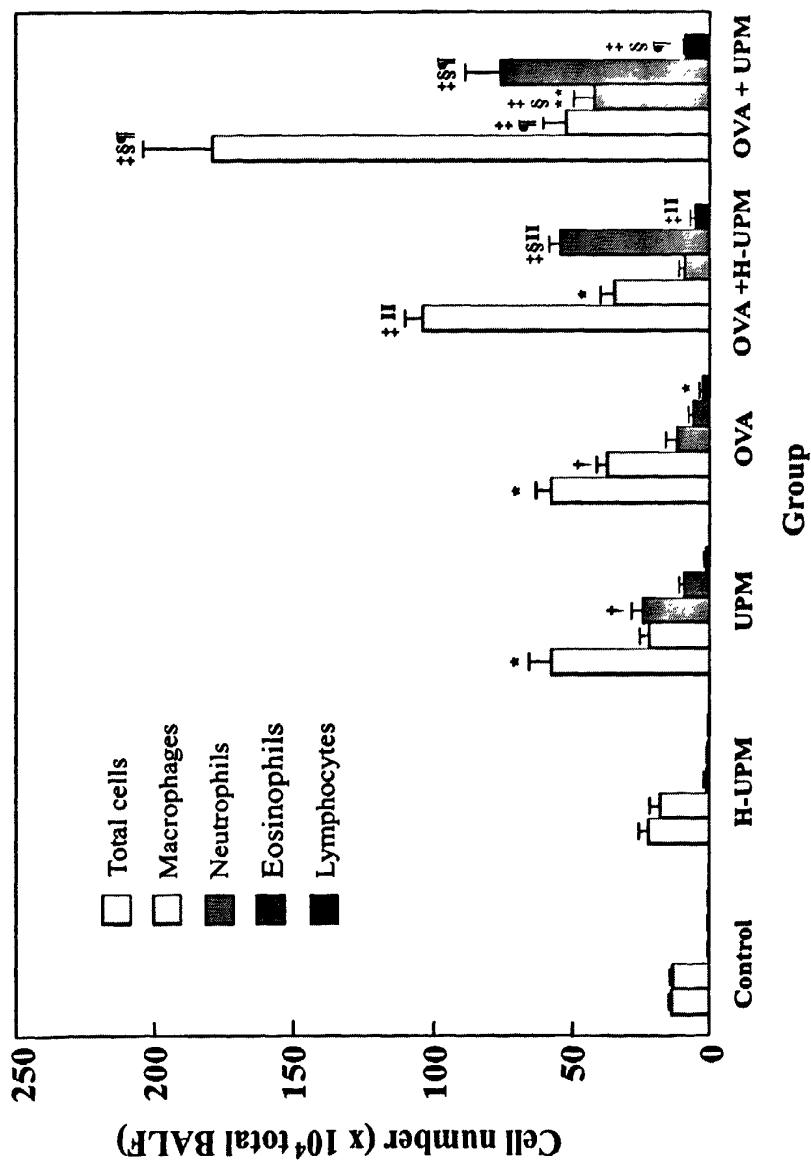


图 4, UPM 对小鼠支气管肺泡灌洗液中炎症细胞分布的影响

* $p < 0.05$ vs. control, † $p < 0.01$ vs. control, ‡ $p < 0.001$ vs. control,

§ $p < 0.001$ vs. OVA, ¶ $p < 0.001$ vs. H-UPM, ¶ $p < 0.001$ vs. UPM, ** $p < 0.05$ vs. UPM.

五、UPM对小鼠支气管肺泡灌洗液中细胞因子表达的影响

表4为UPM对小鼠支气管肺泡灌洗液中细胞因子表达的影响。与对照组相比，H-UPM、UPM以及OVA单独处理组小鼠BALF中IL-4、IL-5和IL-13的表达无显著变化；OVA + H-UPM与OVA + UPM联合处理组小鼠BALF中IL-4、IL-5和IL-13的表达显著高于对照组以及各单独处理组 ($p < 0.001$)。OVA + UPM联合处理组小鼠BALF中IL-12的表达显著高于对照组 ($p < 0.001$)，其他各个处理组小鼠BALF中IL-12的表达无明显变化。OVA + H-UPM联合处理组小鼠BALF中IFN- γ 的表达显著低于对照组 ($p < 0.001$)，OVA + UPM联合处理组小鼠BALF中IFN- γ 的表达显著低于对照组和UPM单独处理组 ($p < 0.001$)。

表 4, UPM 对支气管肺泡灌洗液中细胞因子蛋白表达的影响

分组*	动物数(n)	细胞因子(pg protein/total BALF)				
		IL-4	IL-5	IL-13	IL-12	IFN-γ
Control	8	0	0	0	0	419 ± 92.6
H-UPM	8	0.46 ± 0.46	0	0	91.7 ± 36.0	400 ± 94.9
UPM	8	0.17 ± 0.17	5.04 ± 3.26	4.47 ± 4.47	116 ± 36.1	455 ± 90.4
OVA	8	0	42.2 ± 16.6	18.2 ± 9.12	99.7 ± 61.7	302 ± 47.5
OVA + H-UPM	8	13.8 ± 4.38 †‡	175 ± 26.2 †‡‡	105 ± 16.5 †‡‡	315 ± 41.5	120 ± 18.6 †
OVA + UPM	8	18.1 ± 6.37 ‡‡‡	256 ± 51.7 †‡‡	161 ± 26.3 †‡‡	576 ± 260 †	99.1 ± 33.4 †‡‡

*实验分为 6 组, 分别为对照组 (Control)、加热城市空气颗粒物组 (H-UPM)、未加热城市空气颗粒物组 (UPM)、卵蛋白组 (OVA)、卵蛋白和加热城市空气颗粒物组 (OVA + H-UPM) 以及卵蛋白和未加热城市空气颗粒物组 (OVA + UPM)。

每间隔一周进行气管灌注。最后一次气管灌注 24 h 后收集支气管肺泡灌洗液。

† $p < 0.05$ vs. Control ‡ $p < 0.05$ vs. OVA § $p < 0.01$ vs. Control †† $p < 0.01$ vs. OVA
‡‡ $p < 0.001$ vs. OVA ††† $p < 0.001$ vs. H-UPM ‡‡‡ $p < 0.001$ vs. UPM §§ $p < 0.01$ vs. UPM

六、UPM对小鼠支气管肺泡灌洗液中趋化性细胞因子表达的影响

表5 为UPM对小鼠支气管肺泡灌洗液中细胞趋化因子表达的影响。OVA + UPM联合处理组小鼠BALF中RANTES的表达显著高于对照组、OVA组和UPM单独处理组 ($p < 0.001$); 其他处理组小鼠BALF中RANTES的表达无明显变化。H-UPM和UPM处理组小鼠BALF中KC的表达显著高于对照组 ($p < 0.001$); OVA + H-UPM联合处理组小鼠BALF中KC的表达显著高于对照组和OVA组 ($p < 0.001$); OVA + UPM联合处理组小鼠BALF中KC的表达显著高于对照组、OVA组和UPM单独处理组 ($p < 0.001$)。UPM单独处理组小鼠BALF中MIP-1 α 的表达显著高于对照组 ($p < 0.001$); OVA + UPM联合处理组小鼠BALF中MIP-1 α 的表达显著高于对照组和OVA组 ($p < 0.001$)。OVA + UPM联合处理组小鼠BALF中Eotaxin、MCP-1和MCP-3的表达显著高于对照组、OVA组和UPM单独处理组 ($p < 0.001$); OVA + H-UPM联合处理组小鼠BALF中MCP-1的表达显著高于对照组、OVA组和H-UPM单独处理组 ($p < 0.001$); OVA + H-UPM联合处理组小鼠BALF中MCP-3的表达显著高于对照组 ($p < 0.001$)。

表5, UPM对肺泡灌洗液中趋化性细胞因子蛋白表达的影响

分组*	动物数(n)	趋化性细胞因子(pg protein/total BALF)					
		RANTES	KC	MIP-1	Eotaxin	MCP-1	MCP-3
Control	8	0	24.3 ± 7.33	0	0	0	0
H-UPM	8	0	296 ± 44.4 [†]	5.40 ± 9.06	0	40.6 ± 16.1	0
UPM	8	7.66 ± 3.29	336 ± 29.8 [§]	31.4 ± 6.43 [†]	0	70.9 ± 25.6	55.4 ± 46.3
OVA	8	3.62 ± 2.83	175 ± 49.4	5.23 ± 5.23	1.46 ± 0.97	73.6 ± 68.2	110 ± 110
OVA + H-UPM	8	9.81 ± 2.34	438 ± 44.3 ^{††}	16.5 ± 5.50	0.64 ± 0.36	392 ± 76.0 ^{†‡†}	425 ± 105 [†]
OVA + UPM	8	27.3 ± 7.75 ^{†**§§}	582 ± 98.3 ^{†***§§}	33.5 ± 9.72 ^{§‡}	19.1 ± 6.53 ^{†***‡‡}	511 ± 100 ^{†***‡‡}	1091 ± 217 ^{†***‡‡}

*实验分为 6 组, 分别为对照组 (Control)、加热城市空气颗粒物组 (H-UPM)、未加热城市空气颗粒物组 (UPM)、卵蛋白组 (OVA)、卵蛋白和加热城市空气颗粒物组 (OVA + H-UPM) 以及卵蛋白和未加热城市空气颗粒物组 (OVA + UPM)。

每间隔一周进行气管灌注。最后一次气管灌注 24 h 后收集支气管肺泡灌洗液。

[†] $p < 0.05$ vs. Control [‡] $p < 0.05$ vs. OVA [§] $p < 0.01$ vs. Control ^{||} $p < 0.01$ vs. OVA

^{††} $p < 0.001$ vs. Control ^{**} $p < 0.001$ vs. OVA ^{††} $p < 0.01$ vs. H-UPM ^{‡‡} $p < 0.001$ vs. UPM ^{§§} $p < 0.01$ vs. UPM

七、UPM对小鼠血清中OVA特异性IgE和IgG1表达的影响

图 5 为 UPM 对小鼠血清中 OVA 特异性 IgE 和 IgG1 表达的影响。OVA + H-UPM 与 OVA + UPM 联合处理组小鼠血清中 OVA 特异性 IgE 抗体表达显著高于对照组和 OVA 单独处理组 ($p < 0.001$); 且 OVA + UPM 联合处理组小鼠血清中 OVA 特异性 IgE 抗体表达高于 OVA + H-UPM 联合处理组。OVA + UPM 联合处理组小鼠血清中 OVA 特异性 IgG1 抗体表达高于对照组和 OVA 单独处理组($p < 0.001$)。

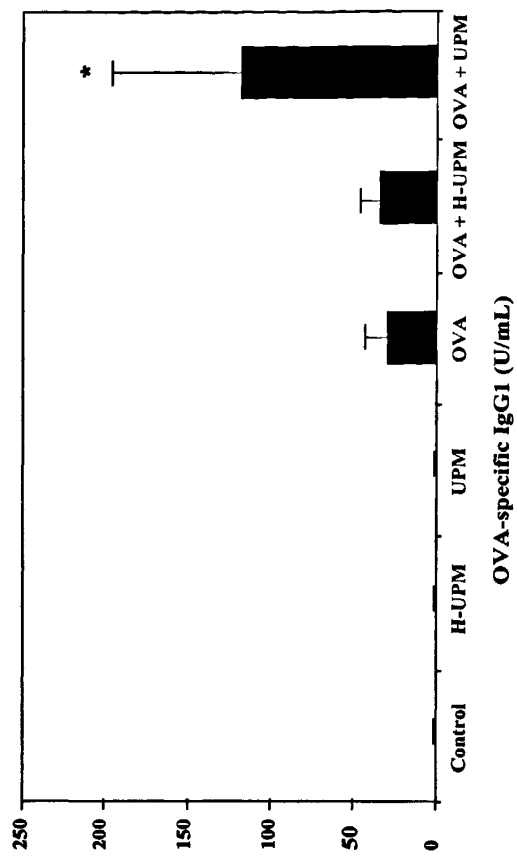
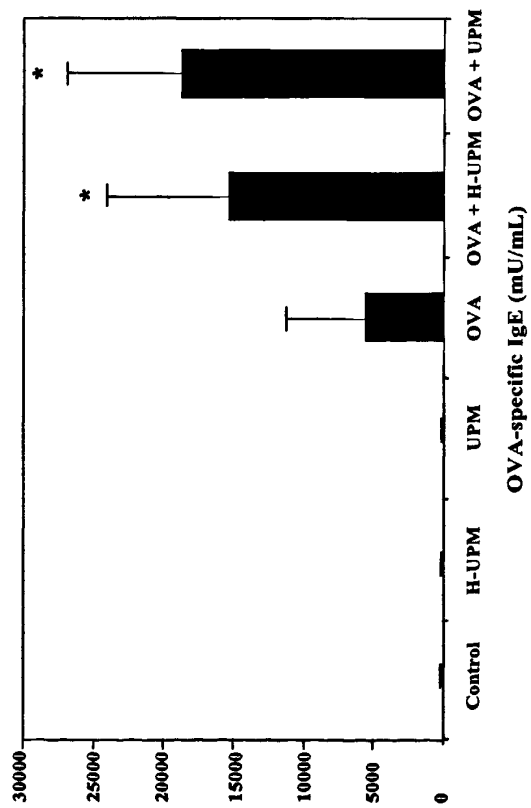


图5, UPM对小鼠血清中OVA特异性IgE和IgG1表达的影响

* $p < 0.05$ vs. Control、OVA、H-UPM、UPM

讨 论

国内外许多城市的空气颗粒物浓度超标,成为城市的首要污染物。城市空气颗粒物与人体健康的关系已成为世界各地环境、气象和医务工作者极为关注的前沿性课题。国外的一些流行病学调查发现,工业化国家空气污染严重的地区过敏性疾病的患病率升高,同时发现城市空气颗粒物可以使大鼠 IgE 抗体的产生增加,人体鼻腔灌洗液中总 IgE 和特异性 IgE 的水平升高^[40]。Polosa 认为随着城市化的进程和交通运输的发展,由汽车尾气带来的交通污染是过敏性疾病的主要危险因素,由汽车排出的颗粒物污染可以介导过敏性炎症、增强 IgE 应答和提高气道的超敏反应^[41]。既往研究阐明城市空气颗粒物包含很多成分,如来源于空气污染物的元素碳、有机碳(多环芳烃类)、 SO_4^{2-} 和 NO_3^- 等给人体的呼吸系统健康带来严重危害。尽管我国大都市的空气污染已经由过去的燃煤型污染转变为燃煤/机动车排放混合型污染,但是采集于中国北京空气的城市空气颗粒物的化学组成成分与欧美等国家的大都市空气污染物的成分并不相同^[42]。例如,北京城市空气颗粒物中铅和铝的百分比含量低于美国城市空气颗粒物;而钠的百分比含量是美国城市空气颗粒物的二至四倍^[29]。另外,本研究中的北京城市空气颗粒物除了包含上述来源于空气污染的成分以外,还含有二氧化硅(32%)、氧化铝(9.5%)以及微生物如 LPS 和 β -葡聚糖等,大约有一半的成分来源于土壤。因此,探讨北京城市空气颗粒物对机体健康危害的影响及其机制具有特殊意义。

本研究中经过加热处理而除去吸附于其表面的微生物的 H-UPM 能够导致小鼠肺部轻微的病理学改变。但是,未经过加热处理的 UPM 能引起小鼠支气管炎和肺炎,使肺泡灌洗液中的中性粒细胞增加以及中性粒细胞相关趋化性细胞因子(如 KC、MIP-1 α 等)和 Th1 炎症反应相关细胞因子(如 IL-12)表达增加。据报道 LPS 或 β -葡聚糖能够诱导上述中性粒细胞性炎症相关的细胞因子和细胞趋化因子表达增加^[43-44];多环芳烃类也能够诱导上述炎性介质的表达^[45]。该结果提示,吸附于城市空气颗粒物表面的微生物或者城市空气颗粒物中的多环芳烃类成分通过促进上述炎性介质的表达而导致小鼠中性粒细胞性炎症。

以往的研究显示,嗜酸性粒细胞是哮喘气道炎症的关键效应细胞,哮喘患者有明显的嗜酸性粒细胞增多,嗜酸性粒细胞浸润的程度与哮喘的严重程度相关^[46]。

本研究表明：OVA能够导致小鼠气道中的杯状细胞轻度增殖以及嗜酸性粒细胞和淋巴细胞轻度浸润，该现象与哮喘患者病理检查的结果相一致。UPM能够加重OVA诱导的哮喘小鼠的气道炎症并导致呼吸道上皮中的杯状细胞增殖，该结果与肺泡灌洗液中各种炎症细胞分布变化和肺组织病理检查结果相一致。OVA相关的气道炎症加剧伴随着支气管肺泡灌洗液中炎症分子（如嗜酸性粒细胞趋化因子、IL-5和MCP-3）的蛋白表达增加以及血清中OVA特异性抗体表达增加。OVA + UPM联合处理组的哮喘小鼠气道炎症加重程度高于OVA + H-UPM组。该结果提示经过加热处理而除去的吸附于UPM表面的各种微生物和有机物成分可能在上述反应中发挥重要作用。

Th细胞可分为Th1和Th2两种类型，均由Th0分化而来。正常情况下，Th0按一定比例向Th1、Th2分化，两者处于相对平衡状态，维持着机体正常的细胞免疫和体液免疫功能。哮喘被认为是机体针对外在抗原产生了不恰当的Th2型炎症反应所导致的肺部炎症^[47]。Moverare R等人认为，过敏原对支气管哮喘患者T细胞的活化具有选择性，使特异性个体对外界抗原倾向于表现Th2优势应答。特异性个体受到过敏原刺激对，可促进Th2细胞优势分化，上述平衡被打破，使免疫系统Th1/Th2平衡向Th2漂移，通过分泌大量的Th2型细胞因子介导哮喘炎症反应^[48]。目前认为，Th1/Th2失衡和Th2细胞功能亢进是哮喘发病的主要免疫学机制。

IL-4是参与哮喘变态反应性炎症的特征性Th2型细胞因子。支气管哮喘患者急性发作期体内IL-4浓度较正常人明显升高^[49]。目前认为，IL-4是原始Th细胞向Th2细胞发育的主要诱导因子，使机体对外来抗原的免疫反应向Th2型发展；而且，IL-4能促进抗原特异性IgE的分泌，通过多种途径介导哮喘炎症反应^[50]。IL-5是参与哮喘变态反应的另一重要的Th2型细胞因子，支气管哮喘患者急性发作期体内IL-5浓度较正常人显著升高，支气管活检组织中IL-5 mRNA的表达升高^[49]。IL-5在哮喘炎症反应中的作用和嗜酸性粒细胞密切相关，哮喘患者雾化吸入IL-5后血清中的嗜酸性粒细胞数目显著升高^[51]。IL-5对于嗜酸性粒细胞的产生、成熟、活化和存活至关重要，并趋化嗜酸性粒细胞聚集到气道局部，参与哮喘患者肺部的变态反应，最终导致气道高反应性的形成^[52]。IL-13也是一种新发现的Th2细胞因子，它在哮喘中发病中起重要作用。哮喘小鼠肺泡灌洗液中可见IL-13的表达增高，IL-13

可通过信号传导途径诱导气道反应性和杯状细胞增生^[53]。本研究中H-UPM和UPM单独处理组小鼠的肺泡灌洗液中哮喘相关的细胞因子的表达并没有增加。但是,与OVA处理组相比,OVA + H-UPM和OVA + UPM联合处理组小鼠肺泡灌洗液中Th2型细胞因子的表达显著增加。OVA + H-UPM和OVA + UPM联合处理组小鼠支气管肺泡灌洗液中嗜酸性粒细胞相关的趋化性细胞因子如MCP-1、MCP-3和RANTES的表达显著增加。嗜酸性粒细胞趋化因子是嗜酸性粒细胞最主要的趋化蛋白,只有在OVA+UPM联合处理中表达增加。OVA + UPM联合处理组的小鼠肺泡灌洗液中上述细胞因子和趋化性细胞因子的表达均高于OVA + H-UPM联合处理组,该结果提示经过加热处理而除去的吸附于UPM表面的各种微生物和有机成分通过释放上述化学介质而加重哮喘小鼠气道炎症和肺泡嗜酸性粒细胞募集,而且小鼠肺泡灌洗液中炎症介质的表达变化与其肺部的病理改变相一致。

另一方面,IFN- γ 主要由Th1细胞分泌,是特征性Th1细胞因子,能诱导Th0细胞向Th1分化和抑制Th2型细胞因子的分泌;同时Th2淋巴细胞释放的IL-4、IL-5、和IL-13能够抑制IFN- γ 的表达^[54]。哮喘患者或动物肺泡灌洗液中均有IFN- γ 水平的降低,且其降低程度与哮喘发病的严重程度相关^[55]。本研究中OVA + H-UPM和OVA + UPM联合处理能够抑制小鼠肺泡灌洗液中IFN- γ 的表达,可能是由于Th2细胞因子分泌增加而引起的。

本研究中的城市空气颗粒物中含有大量的来自于空气污染物SO₂的SO₄²⁻,而经过加热处理被完全清除。既往研究报道,亚洲沙尘颗粒(Asian sand dust, ASD)和ASD + SO₄²⁻均能加重肺泡和呼吸道黏膜下层中OVA诱导的嗜酸性粒细胞募集反应;但是增加SO₄²⁻的作用剂量并没有观察到嗜酸性粒细胞募集反应加重^[56]。该结果提示SO₄²⁻并不能使呼吸道和肺泡灌洗液中的嗜酸性粒细胞增加。因此,来源于空气污染物的SO₄²⁻不能加重哮喘小鼠气道过敏性炎症。另一方面,有机毒物如LPS和 β -葡聚糖吸附于城市空气颗粒物表面。LPS是革兰氏阴性菌细胞外壁的主要成分,是该细菌引起炎症反应的最主要成分^[57]。 β -葡聚糖是真菌细胞壁的特有的组成成分^[58]。H-UPM处理组只能够引起小鼠肺部轻微的病理学改变,可能是由于H-UPM经过加热处理除去了吸附于其表面的LPS和 β -葡聚糖。因此,我们认为吸附于UPM表面的微生物能够加重小鼠支气管炎和肺泡炎。

本研究中UPM的主要无机成分是来自于石英的二氧化硅和碳^[29]。据报道石英、无定形硅或晶体硅均能够导致大鼠肺部炎症反应并伴有炎症介质表达增多^[59]。既往研究报道即使在1 μg OVA抗原作用下, 硅晶体(粒径小于5 μm 的标准石英DQ12)或无定形硅就能够诱导小鼠产生抗原相关的IgE和IgG1抗体^[60]。另一方面, 碳元素如炭黑(粒径为14 nm和50 nm)和柴油颗粒物, 能够加重肺嗜酸性粒细胞增多症并伴有促炎介质表达增加和OVA特异性的IgE和IgG1抗体表达增加^[61]。因此, 在H-UPM处理组小鼠过敏性炎症加重并伴有OVA特异性的IgE抗体表达增加可能是由于H-UPM中含有二氧化硅和碳元素的原因。

结 论

本研究发现UPM可能通过激活Th2免疫反应而加重OVA诱导的哮喘小鼠肺部气道炎症反应。微生物和来源于空气污染的化学物在上述反应中发挥重要作用。空气暴露于来源于燃料燃烧的化学污染物、细菌、真菌和硅颗粒物等可能通过产生呼吸系统过敏反应而直接影响人类健康。

亚洲沙尘暴浮尘颗粒物对卵蛋白 诱导的哮喘小鼠气道炎症的作用

前 言

沙尘暴是我国北方地区出现的强灾害性天气,近半个世纪以来强沙尘暴发生频率越来越高并且波及的范围越来越广,给国民经济建设和人民生命财产安全造成严重损失和极大的危害^[62]。起源于我国中部和西北部干旱地区(戈壁沙漠和黄土塬区)的亚洲沙尘暴,不仅造成我国北方地区严重的空气污染,而且沙尘暴气溶胶颗粒能够进行长距离的传播,影响朝鲜半岛、日本甚至飘过太平洋到达美国^[63]。研究显示,亚洲地区沙尘暴50%以上的粒径在源地分布在30-10 μm 范围内,但经过远距离输送后,则演变成尘暴或浮尘,粒径在10 μm 以下的颗粒占55%以上^[64],由于其吸附性强,可携带重金属、硫酸盐、有机物、病毒等进入呼吸道和肺部,主要沉积在气管和支气管;粒径小于2.5 μm 的可吸入颗粒物可达到肺泡,危害更为严重。

最近流行病学调查研究发现在亚洲沙尘暴发生的时段中,台湾地区浮尘天气的发生情况与哮喘病的每日入院率及门诊就诊率明显增加;日本花粉症患者的过敏性鼻炎的症状显著加重;韩国的哮喘病患者(特别是儿童患者)症状明显加重^[65-66]。本研究组既往的动物实验研究也发现,直接采集于中国宁夏沙坡头沙漠的亚洲沙尘暴颗粒(Asian sand dust, ASD)可以加重卵蛋白(ovalbumin, OVA)诱导的哮喘小鼠的气道炎症反应,并且加重花粉导致的小鼠过敏性鼻炎^[39, 67]。但是,到目前为止经过长距离传播的亚洲沙尘暴浮尘颗粒物(air-borne Asian sand dust, AASD)对于机体影响的实验研究还未见报道。

在本研究中,应用大气采样器由日本壹歧岛空气中采集 AASD,将一部分 AASD 样品在电子加热器中 360℃加热 30 min,以去除吸附于 AASD 表面的微生物、 SO_4^{2-} 和 NO_3^- 等成分。将 AASD 和经过加热处理的 AASD (heated AASD, H-AASD)经由气管注入小鼠体内,观察小鼠肺组织病理形态学变化,计数小鼠支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)中各种炎症细胞的数量,测定

BALF 中炎症相关的细胞因子、趋化性细胞因子的蛋白表达以及 OVA 特异性 IgE 和 IgG1 的抗体表达, 从而探求经过长距离传播的 AASD 对机体健康危害的机制。

材料与方法

一、主要试剂

真菌菌相Y荧光染料(Technicon International, Inc., Tokyo)

Diff-Quik (International Reagents, Kobe, Japan)

IL-4、IL-13、角质细胞趋化因子(Keratinocyte chemoattractant, KC)、单核细胞趋化蛋白-1 (monocyte chemotactic protein, MCP)-1、巨噬细胞炎症蛋白-1 α (macrophage inflammatory protein, MIP)-1 α 、调节激活正常T细胞表达和分泌细胞因子(regulated on activation normal T cell expressed and presumably secreted, RANTES)、嗜酸性粒细胞趋化因子(eotaxin) (R&D Systems Inc. Minneapolis, MN)

IL-5、IL-12、干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ) (Endogen, Inc. Cambridge, MA) MCP-3 (Bender MedSystems Inc. Burlingame, CA)

鼠OVA-IgE ELISA试剂盒和鼠OVA-IgG1 ELISA试剂盒(Shibayagi Co., Shibukawa, Japan)

二、主要实验仪器

电子加热器(SSTR-25K, Isuzu Seisakusho Co., Ltd. Japan)

荧光显微镜(BZ-9000, BIOREVO, Keyence, Japan)

超微针(UD-201 type, Tomy, Tokyo, Japan)

显微镜(Nikon Co., Tokyo, Japan)

细胞离心涂片机(Sakura, Tokyo, Japan)

酶标仪(Spectrafluor, Tecan, Salzburg, Austria)

real-time PCR仪(Applied Biosystem, USA)

三、实验动物

从Charles River公司(神奈川, 日本)购入5周大的雄性ICR小鼠, 在温度为23°C, 湿度为55–70%, 昼夜(12 h/12 h)交替的房间里, 采用商业饲料和自由给水方式饲养。适应性喂养一周后, 筛选出体重异常和/或病态的小鼠, 开始实验。

四、AASD样本采集与处理

在2002年3月22日即中国发生大规模的沙尘暴之后的第三天,应用带有石英纤维过滤器的大流量空气采样器(2500QT-UP, Pallflex)在日本壹歧岛采集空气中的AASD;应用电子扫描显微镜(JSM-5800 JEOL Ltd., Tokyo, Japan)分析AASD的粒径大小,粒径分布峰值为6 μm ;应用电感耦合等离子体-原子发射光谱(61E Trace and ICP-750, Thermo Jarrell-Ash, USA)测定颗粒物中化学成分。将采集到的部分AASD样本在电子加热器中经过360°C加热处理30 min,以除去吸附于颗粒物表面的物质。

五、AASD的真菌检测

应用荧光显微镜和真菌菌相Y荧光染料检测AASD样本中的真菌。真菌菌相Y荧光染料能够特异性地与 β -多糖类(如 β -葡聚糖)结合,该方法是检测真菌细胞壁成分最为有效的方法^[37]。参照真菌菌相Y荧光染料的实验说明书,将2.5 μg 的AASD或H-AASD样本悬浮于40 μl 荧光染料中,经过5 min后制作成玻璃切片,于荧光显微镜下观察。激发波长为472.5 nm,发射波长为520.0 nm。

六、AASD中水溶性成份、脂多糖及 β -葡聚糖的检测

应用离子色谱(DX-100, Dionex, Sunnyvale, CA, USA)和电感耦合等离子体-原子发射光谱(61E Trace and ICP-750, Thermo Jarrell-Ash, USA)分析AASD样本中的水溶性成份如 SO_4^{2-} 和 NO_3^- 等。

参照实验说明书,将2.5 μg AASD样本悬浮于1 ml水(LPS-free; Otuka Co., Kyoto, Japan)中,室温1 h后,应用Endospec ES test MK(Seikagaku Cop., Tokyo, Japan)检测AASD样本中的脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)含量,该方法最低检出限为0.001 EU/ml;将2.5 μg AASD样本悬浮于1 ml的水(β -glucan-free; Otuka Co., Kyoto, Japan)中,室温2 h后,应用Fungitec G test MK(Seikagaku Cop., Tokyo, Japan)检测AASD样本中的 β -葡聚糖(β -glucan)的含量,该方法最低检出限为2 pg/ml。

七、实验动物染毒

根据AASD种类的不同将实验动物分为6个组,每组16只,各实验组分别为:Control(生理盐水)、H-AASD组、AASD组、OVA组、OVA+H-AASD组和OVA+

AASD组。AASD样本悬浮于0.9%生理盐水中，浓度为1 mg/ml，在冷却条件下，应用超微针超声粉碎5 min。OVA溶解于相同的生理盐水中，浓度为10 µg/ml。每间隔一周，将小鼠在4%三氟溴氯乙烷作用下麻醉，经气管注入AASD (0.1 ml / mouse)和/或OVA (0.1 ml / mouse)。最后一次染毒的第二天，经小鼠腹腔注射戊巴比妥，将其深度麻醉，放血处死。

如果小鼠的体重为36 g，潮气量为0.15 ml，呼吸频率为200 次/min，吸入的颗粒物100%沉积于肺部，则根据日本城市空气质量标准（总悬浮颗粒物不超过0.1 mg/m³）2周中小鼠肺内沉积的空气颗粒物为60.48 µg (0.15×200×0.1×2×7×24×60÷10³)，实验中经气管注入小鼠体内的AASD约为该剂量的1.65倍。根据对于呼吸道模型的研究，粒径为6 µm左右的空气颗粒物的肺沉积率为3%^[38]，则沉积于小鼠肺部的空气颗粒物量为1.81 µg (60.48×3%)，实验中经气管注入小鼠体内的AASD约为该剂量的55.2倍。根据本课题组既往的实验研究，每间隔一周经小鼠气管注入1 µg OVA能够导致小鼠肺部过敏性炎症^[39]。因此，本实验选择AASD的染毒剂量为0.1 mg/mouse，OVA的染毒剂量为1 µg/mouse。

八、实验动物的病理检测

每个实验组随机选取8只小鼠用于病理分析。取小鼠肺部固定于10%中性福尔马林缓冲液中，肺叶分离后，将其切割成2 mm大小的碎块，用石蜡包埋，制成3 µm厚的切片。PAS染色后观察支气管上皮杯状细胞的增殖情况。应用显微镜对每个切片的呼吸道中的炎症细胞和上皮细胞进行观察分析。呼吸道中嗜酸性粒细胞和淋巴细胞浸润的情况以及支气管上皮中杯状细胞的增殖情况，分级如下：0，没有任何变化(not present)；1，细微变化(slight)；2，轻度变化(mild)；3，中度变化(moderate)；4，中重度变化(moderate to marked)；5，重度变化(marked)。细微变化指呼吸道中10%的嗜酸性粒细胞和淋巴细胞浸润或支气管上皮中10%杯状细胞增殖；轻度变化指呼吸道中20-30%的嗜酸性粒细胞和淋巴细胞浸润或支气管上皮中20-30%杯状细胞增殖；中度变化指呼吸道中40-50%的嗜酸性粒细胞和淋巴细胞浸润或支气管上皮中40-50%杯状细胞增殖；中重度变化指呼吸道中60-70%的嗜酸性粒细胞和淋巴细胞浸润或支气管上皮中60-70%杯状细胞增殖；重度变化指呼吸道中80%以上的嗜酸性粒细胞和淋巴细胞浸润或支气管上皮中80%以上杯

状细胞增殖^[39]。所得到的数据计算其平均数和标准差($n = 8$)。

九、采集血液和支气管肺泡灌洗液

每个实验组的另外8只小鼠用于心脏采血和收集肺泡灌洗液。小鼠心脏采血, 1500 rpm 离心 10 min, 取上清液, -80°C 的深度冰箱中保存, 用于检测血清中的OVA特异性抗体的表达。小鼠深度麻醉及心脏采血后, 气管固定, 用0.8 ml 37°C 无菌生理盐水灌洗小鼠肺部2次, 收集灌洗液(约1.6 ml), 4°C 1500 rpm 离心10 min。取上清液, -80°C 的深度冰箱中保存, 用于检测肺泡灌洗液中细胞因子和趋化性细胞因子的蛋白表达。

十、支气管肺泡灌洗液中的细胞计数

将肺泡灌洗液离心后得到的沉淀悬浮于生理盐水中, 制成细胞悬液, 显微镜下应用血细胞计数器直接计数总细胞数。细胞悬液应用细胞离心涂片机, 1500 rpm 离心10 min, 制成细胞涂片。应用Diff-Quik染色后, 显微镜下观察计数中性粒细胞、巨噬细胞、嗜酸性粒细胞和淋巴细胞。

Diff-Quik染色具体步骤如下:

- (1) 细胞涂片制备完成后, 水平放置, 空气中自然干燥;
- (2) 细胞涂片浸入Diff-Quik固定液中6 s, 将细胞涂片直立于吸水纸上以除去多余的固定液;
- (3) 细胞涂片浸入Diff-Quik染色液 I 中14 s, 将细胞涂片直立于吸水纸上以除去多余的染色液 I ;
- (4) 细胞涂片浸入Diff-Quik染色液 II 中12 s, 将细胞涂片直立于吸水纸上以除去多余的染色液 II ;
- (5) 超纯水浸洗细胞涂片10-15 s, 以除去多余的染色液;
- (6) 将细胞涂片直立以去除水分, 空气中自然干燥。

十一、支气管肺泡灌洗液中的细胞因子和趋化性细胞因子的检测

应用酶联免疫反应检测BALF中细胞因子和趋化性细胞因子的蛋白表达。其中细胞因子包括: IL-1 β 、IL-4、IL-5、IL-12、IL-13和IFN- γ ; 趋化性细胞因子包括: KC、MCP-1、MCP-3、MIP-1 α 、RANTES和eotaxin。

酶联免疫反应具体步骤如下:

(1) 使用前, 将所有试剂充分混匀, 不使液体产生大量的泡沫, 以免产生加样上的误差;

(2) 根据待测样品数量加上标准品的数量决定所需的板条数。每个标准品和空白孔做复孔。每个样品根据自己的数量来定, 使用复孔;

(3) 加入稀释好后的标准品50 ul于反应孔、加入待测样品50 ul于反应孔内。盖上膜板, 轻轻振荡混匀, 室温2 h;

(4) 用洗板机洗涤5次, 每孔加洗涤液400 ul;

(5) 每孔加结合物100 ul, 盖上新膜板, 轻轻振荡混匀, 室温2 hr;

(6) 用洗板机洗涤5次, 每孔加洗涤液400 ul;

(7) 每孔加底物溶液100 ul, 室温暗室30 min;

(8) 每孔加停止反应溶液100 ul, 振荡混匀;

(9) 30 min之内用酶标仪在450nm波长处测定各孔的OD值。

十二、OVA特异性IgE和IgG1抗体的检测

鼠OVA-IgE ELISA试剂盒和鼠OVA-IgG1 ELISA试剂盒检测血清中的OVA特异性IgE和IgG1抗体。具体步骤如下:

(1) 加样: 分别设空白孔、标准孔、待测样品孔。除空白孔外, 余孔分别加标准溶液或待测样品 100 ul, 注意不要有气泡, 轻轻混匀, 酶标板加上盖, 37℃反应120 min;

(2) 弃去液体, 甩干, 不用洗涤;

(3) 每孔加检测溶液 A 工作液 100 ul, 37℃, 60 min, 洗板 3 次, 350 ul/每孔;

(4) 每孔加检测溶液 B 工作液 100ul, 37℃, 60 min, 洗板 5 次, 350 ul/每孔;

(5) 依序每孔加底物溶液 90 ul, 37℃避光显色 30 min (此时肉眼可见标准品的前 3-4 孔有明显的梯度兰色, 后 3-4 孔梯度不明显);

(6) 依序每孔加终止溶液 50 ul, 终止反应 (此时兰色立转黄色)。用酶联仪在 450 nm 波长依序测量各孔的光密度 (OD 值)。

根据试剂盒说明书, 对于OVA-IgE, 1U为1.3 ng的OVA-IgE抗体; 对于OVA-IgG1, 1U为160 ng的OVA-IgE抗体。应用酶标仪在450 nm吸收波长出检测IgE和IgG1的抗体表达。

十三、统计学分析

本研究应用 SPSS13.0 统计学软件进行分析,统计结果表述为平均数±标准差,采用单因素方差分析比较不同染毒组的实验数据;当组间差异具有统计学意义时,采用 SNK 法进行组间比较, $p<0.05$ 具有统计学意义。

实验结果

一、附着于AASD表面的真菌检测结果

图1为进行真菌菌系Y染色后AASD表面的荧光检测结果。未经过加热处理的AASD表面呈现明显的绿色荧光,该现象表明AASD表面吸附了大量的真菌微生物。

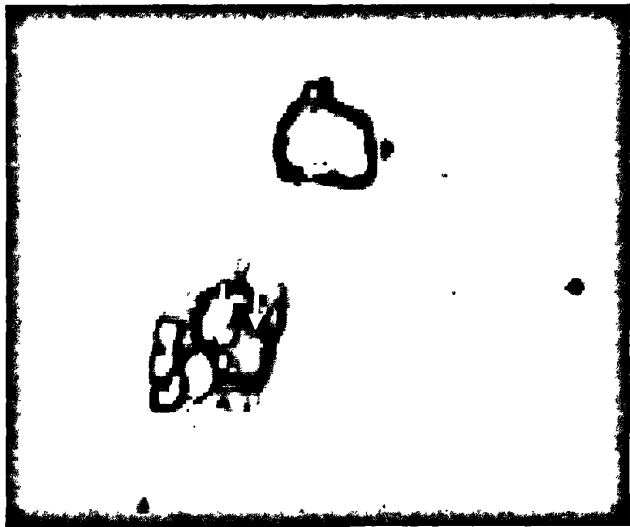


图6, 真菌菌系Y染色后AASD表面的荧光检测结果。Bar=5 μ m

二、AASD中化学元素、水溶性成分、LPS和 β -葡聚糖的含量

表6为AASD中各种化合物成分的含量。其中, SiO_2 约占61.8%, Al_2O_3 约占13.6%, Fe_2O_3 约占5.7%, Na_2O 约占1.2%, CaO 约占5.4%, MgO 约占3.3%, TiO_2 约占0.01%, K_2O 约占2.6%。其化学组成成分与由沙尘暴源地直接采集的沙尘成分相似。表7为AASD中水溶性成分、LPS和 β -葡聚糖的含量。AASD中含有的 SO_4^{2-} 约为15000 $\mu\text{g/g}$, NO_3^- 约为5000 $\mu\text{g/g}$, Cl^- 约为7000 $\mu\text{g/g}$, LPS约为1.06 EU/mg, β -葡聚糖约为76 pg/mg ; 而经过加热处理的AASD中水溶性成分、LPS和 β -葡聚糖的

含量均未检测到。

表 6, AASD 中各种化合物成分的含量

化合物成分	AASD (%)	ASD (%)
SiO ₂	61.8	60
Al ₂ O ₃	13.6	11.1
Fe ₂ O ₃	5.7	4.1
Na ₂ O	1.2	1.8
CaO	5.4	9.0
MgO	3.3	2.5
TiO ₂	0.01	0.7
K ₂ O	2.6	2.2

AASD: 从日本壹歧岛大气中采集到的亚洲沙尘暴浮尘颗粒物;

ASD: 直接采集于亚洲沙尘暴源地的沙尘暴颗粒物。

表7, UPM中各种水溶性成分、LPS及β-葡聚糖的含量

Particles	SO ₄ ²⁻ (μg/g)	NO ₃ ⁻ (μg/g)	Cl ⁻ (μg/g)	LPS (EU/mg)	β-glucan (pg/mg)
UPM	15000	5000	7000	1.06	76.0
H-UPM	ND	ND	ND	ND	ND

AASD: 从日本壹歧岛大气中采集到的亚洲沙尘暴浮尘颗粒物;

H- AASD: 在电子加热器中经过360℃处理30 min的AASD;

ND (not detected) : 未检测到。

三、AASD对小鼠肺部病理学改变的影响

图7和表8为AASD对小鼠肺部病理学改变的影响。对照组的小鼠肺部无病理学改变（图2 A）；H-AASD处理组的小鼠呼吸道上皮细胞轻微增殖（图2 B）；AASD处理组的小鼠肺泡细胞增殖引起支气管和肺泡炎并有中性粒细胞性炎症（图2 C）；OVA处理组的小鼠呼吸道粘膜下层嗜酸性粒细胞轻微增殖以及呼吸道

上皮中的杯状细胞轻微增殖，在PAS染色中呈现粉色（图2 D）；OVA + H-AASD（图2 E）和OVA + AASD（图2 F）联合处理引起小鼠呼吸道上皮中的杯状细胞显著增殖，与对照组相比具有统计学差异（ $p < 0.001$ ），且OVA + AASD处理组的增殖程度大于OVA + H-AASD处理组；OVA + H-AASD（图2 E）和OVA + AASD（图2 F）联合处理引起小鼠呼吸道结缔组织中的嗜酸性粒细胞浸润，与OVA组相比具有统计学差异（ $p < 0.001$ ），且OVA + AASD处理组的浸润程度大于OVA + H-AASD处理组；OVA + H-AASD（图2 E）和OVA + AASD（图2 F）联合处理引起小鼠呼吸道中淋巴细胞中重度聚集，且OVA + AASD处理组的聚集程度大于OVA + H-AASD处理组。

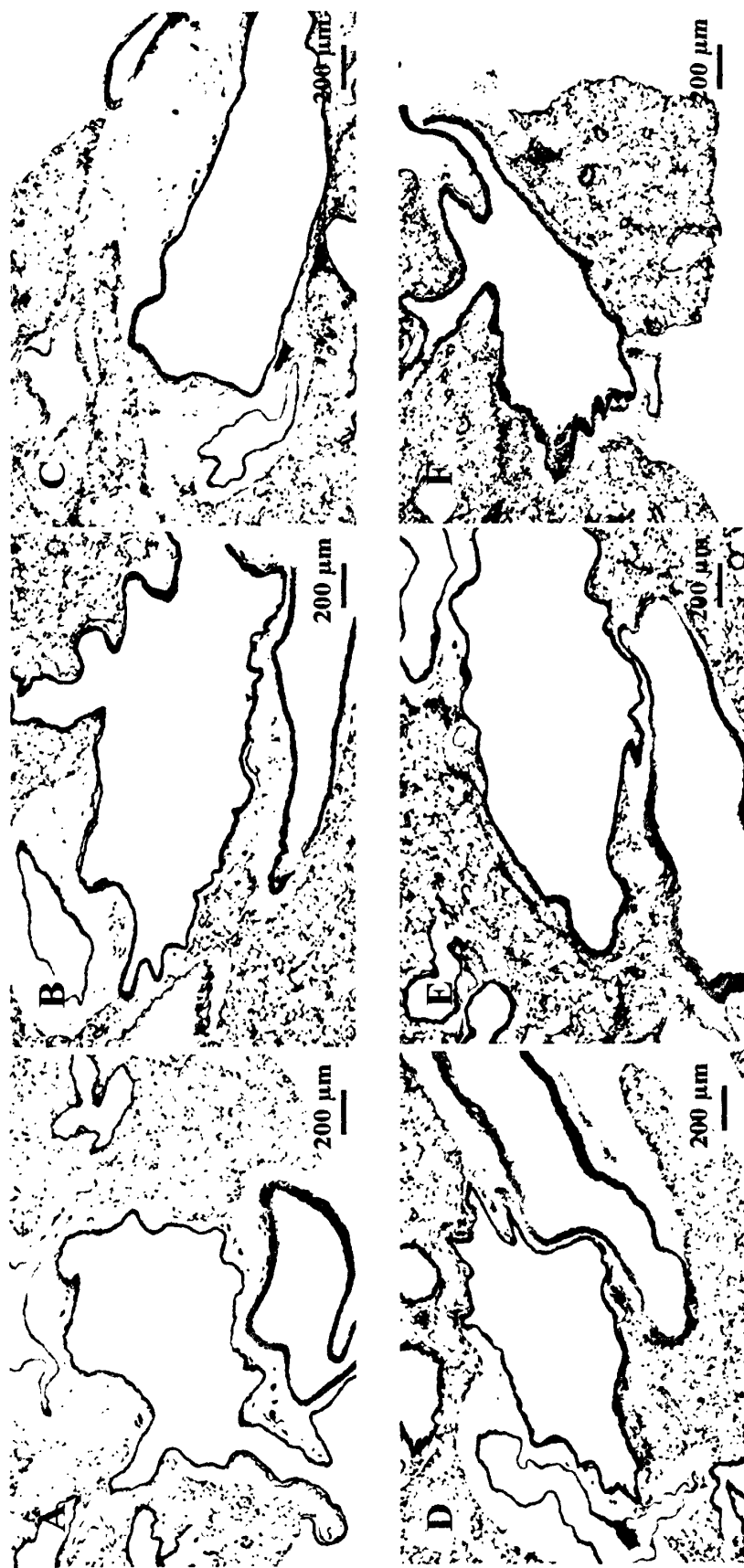


图7, AASD对小鼠肺部病理学改变的影响

A为对照组, B为H-AASD组; C为AASD组; D为OVA组; E为OVA+H-AASD组; F为OVA+AASD组。对照组小鼠肺部无明显病理学改变, H-AASD组小鼠呼吸道无明显病理学改变, 有轻微的肺泡炎(图2B); AASD组小鼠呼吸道中炎症细胞(中性粒细胞和淋巴细胞)聚集, 肺泡细胞增殖以及肺泡炎(图2C); OVA组小鼠呼吸道上皮中轻微的高脚杯细胞增殖, 在PAS染色反应中细胞粘液呈现粉色, 炎症细胞轻微浸润到呼吸道周围的结缔组织中(图2D); OVA+H-AASD组小鼠呼吸道上皮中高脚杯细胞增殖并有炎症细胞受润到呼吸道周围的结缔组织中(图2E); OVA+AASD组小鼠呼吸道上皮中高脚杯细胞严重增殖并有大量炎症细胞, 肺泡中聚集大量的炎症细胞(图2F)。A-F为PAS染色, bar=200 μm

表8, AASD对小鼠呼吸道病理学改变的影响

分组*	动物数(n)	病理学变化		
		淋巴细胞	嗜酸性粒细胞	杯状细胞
Control	8	0	0	0
H-AASD	8	0.5 ± 0.27	0	0.25 ± 0.27
AASD	8	1.06 ± 0.5 [†]	0.13 ± 0.23	0.5 ± 0.65
OVA	8	0.88 ± 0.58 [§]	0.44 ± 0.42	1.19 ± 0.80 [‡]
OVA + H-AASD	8	2.56 ± 0.78 ^{†¶¶}	2.13 ± 0.95 ^{†¶¶}	2.94 ± 0.56 ^{†¶¶}
OVA + AASD	8	3.44 ± 0.42 ^{†¶¶}	3.38 ± 0.64 ^{†¶¶}	3.56 ± 0.56 ^{†¶¶}

*实验分为 6 组, 分别为对照组 (Control)、加热亚洲沙尘暴颗粒物组 (H-AASD)、未加热亚洲沙尘暴颗粒物组 (AASD)、卵蛋白组 (OVA)、卵蛋白和加热亚洲沙尘暴颗粒物组 (OVA + H-AASD) 以及卵蛋白和未加热亚洲沙尘暴颗粒物组 (OVA + AASD)。

小鼠呼吸道病理变化评价: (0) 无变化; (1) 轻微变化; (2) 轻度变化; (3) 中度变化; (4) 重度变化; (5) 重度变化。

[†] $p < 0.05$ vs. Control, [‡] $p < 0.01$ vs. Control, [§] $p < 0.001$ vs. Control, [¶] $p < 0.001$ vs. OVA, ^{¶¶} $p < 0.001$ vs. H-AASD, ^{††} $p < 0.001$ vs. AASD.

四、AASD对小鼠支气管肺泡灌洗液中炎症细胞分布的影响

图8为AASD对小鼠支气管肺泡灌洗液中炎症细胞分布的影响。与对照组相比, AASD单独处理组小鼠的BALF中巨噬细胞和中性粒细胞数量明显增加 ($p < 0.05$); 而H-AASD处理组小鼠的BALF中巨噬细胞和中性粒细胞数量与对照组相比无明显变化; OVA单独处理不能够引起小鼠的BALF中的炎症细胞数量变化; OVA + H-AASD联合处理组小鼠的BALF中巨噬细胞、中性粒细胞、嗜酸性粒细胞和淋巴细胞数量显著高于对照组、OVA组以及H-AASD单独处理组; OVA + AASD联合处理进一步导致小鼠的BALF中巨噬细胞、嗜酸性粒细胞和淋巴细胞数量显著高于对照组、OVA组以及AASD单独处理组 ($p < 0.001$); OVA + AASD联合处理也能够引起中性粒细胞数量显著高于对照组和OVA组, 但是与AASD单独处理组相比无统计学意义。

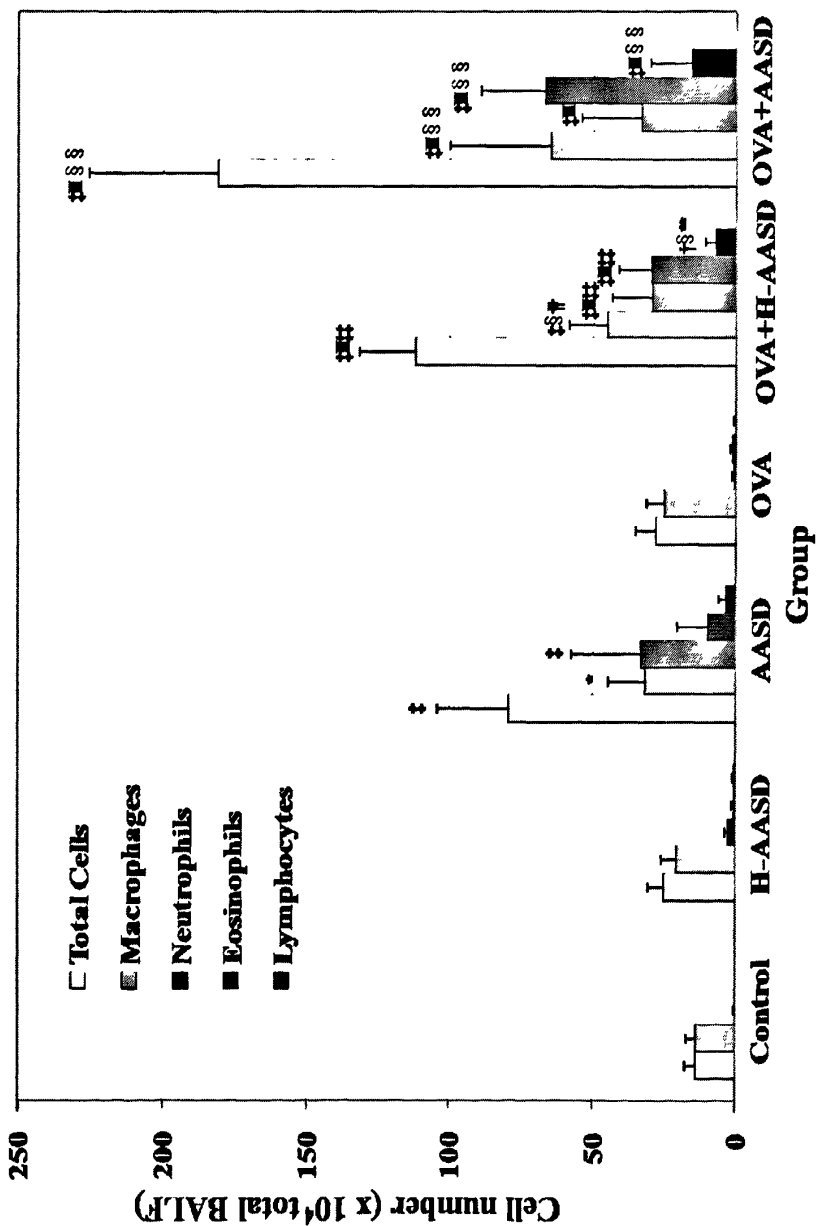


图8, AASD对小鼠支气管肺灌洗液中炎症细胞分布的影响

* $p < 0.05$ vs. Control, † $p < 0.01$ vs. Control, ‡ $p < 0.001$ vs. Control, § $p < 0.05$ vs. OVA, ¶ $p < 0.001$ vs. OVA, ** $p < 0.05$ vs. H-AASD, †† $p < 0.01$ vs. H-AASD, ‡‡ $p < 0.001$ vs. H-AASD, §§ $p < 0.001$ vs. AASD

五、AASD对小鼠支气管肺泡灌洗液中细胞因子表达的影响

表 9 为 AASD 对小鼠支气管肺泡灌洗液中细胞因子表达的影响。与对照组相比, AASD 单独作用组的小鼠 BALF 中 IL-1 β ($p < 0.001$)、IL-12 ($p < 0.01$) 和 IFN- γ ($p < 0.001$) 的表达显著增加, 而 H-AASD 单独作用组的小鼠 BALF 中 IL-1 β 、IL-12 和 IFN- γ 的表达无变化; OVA + H-AASD 和 OVA + AASD 联合处理引起小鼠 BALF 中 IL-1 β 显著高于对照组和 OVA 单独处理组, 但是分别与 H-AASD 和 AASD 相比, 无显著增加; OVA + AASD 联合处理引起小鼠 BALF 中 IL-12 的表达显著高于对照组和 OVA 处理组 ($p < 0.001$); OVA + AASD 联合处理引起小鼠 BALF 中 IFN- γ 的表达显著高于 AASD 单独处理组 ($p < 0.01$)。OVA + AASD 联合处理有使 BALF 中 Th2 细胞因子 IL-4 表达增加的趋势, OVA + AASD 联合处理导致 BALF 中 Th2 细胞因子 IL-13 表达显著高于任何单独处理组; OVA + H-AASD 和 OVA + AASD 联合处理引起小鼠 BALF 中嗜酸性粒细胞相关的细胞因子 IL-13 的表达高于任何单独处理组; OVA + AASD 联合处理引起小鼠 BALF 中 IL-5 和 IL-13 的表达增加程度高于 OVA + H-AASD 组, 分别为 OVA + H-AASD 组的 1.8 和 1.44 倍。

表 9, AASD 对支气管肺泡灌洗液中细胞因子蛋白表达的影响

分组*	动物数(n)	细胞因子(pg protein/total BALF)					
		IL-1 β	IL-4	IL-5	IL-13	IL-12	IFN- γ
Control	8	11.1 $\pm$ 7.64	0	0	0	6.71 $\pm$ 6.71	0
H-AASD	8	50.7 $\pm$ 12.2	0	2.39 $\pm$ 2.39	0	311 $\pm$ 35.5	8.75 $\pm$ 8.75
AASD	8	245 $\pm$ 32.6 [§]	0	6.76 $\pm$ 6.76	3.38 $\pm$ 3.38	693 $\pm$ 59.0 [‡]	81.9 $\pm$ 27.6 [§]
OVA	8	0	0	22.3 $\pm$ 6.67	0	27.0 $\pm$ 14.3	0
OVA + H-AASD	8	111 $\pm$ 34.9 ^{†II}	0	152 $\pm$ 20.1 ^{†III‡}	74.8 $\pm$ 17.2 ^{‡***§§}	467 $\pm$ 41.1	0
OVA + AASD	8	160 $\pm$ 21.8 ^{§††}	4.67 $\pm$ 4.67	273 $\pm$ 69.3 ^{§††***}	108 $\pm$ 29.1 ^{§††****}	1061 $\pm$ 300 ^{§††}	12.3 $\pm$ 12.3 ^{III}

*实验分为 6 组, 分别为对照组 (Control)、加热亚洲沙尘暴浮尘颗粒组 (H-AASD)、未加热亚洲沙尘暴浮尘颗粒组 (AASD)、卵蛋白组 (OVA)、卵蛋白和加热亚洲沙尘暴热浮尘颗粒组 (OVA+H-AASD) 以及卵蛋白和未加热亚洲沙尘暴浮尘颗粒组 (OVA+AASD)。

每间隔一周进行气管灌注。最后一次气管灌注 24 h 后收集肺泡灌洗液。

[†] $p < 0.05$ vs. Control,

[‡] $p < 0.01$ vs. Control,

[§] $p < 0.001$ vs. Control,

^{II} $p < 0.05$ vs. OVA,

^{**} $p < 0.01$ vs. OVA,

^{††} $p < 0.001$ vs. OVA,

^{‡‡} $p < 0.05$ vs. H-AASD,

^{§§} $p < 0.01$ vs. H-AASD,

^{III} $p < 0.01$ vs. AASD,

^{***} $p < 0.001$ vs. AASD.

六、AASD对小鼠支气管肺泡灌洗液中趋化性细胞因子表达的影响

表 10 为 AASD 对小鼠肺泡灌洗液中趋化性细胞因子表达的影响。H-AASD 和 AASD 单独处理引起小鼠 BALF 中 KC 和 MIP-1 α 的表达显著高于对照组 ($p < 0.001$); OVA + H-AASD 和 OVA + AASD 联合处理引起小鼠 BALF 中 KC 的表达显著高于对照组和 OVA 处理组 ($p < 0.001$), 但是 KC 的表达增加程度分别与 H-AASD 和 AASD 单独处理组相似; 与对照组相比, AASD 单独作用组的小鼠 BALF 中 RANRES 的表达显著增加 ($p < 0.01$), 但是与 AASD 单独作用组相比, OVA + AASD 联合处理组的小鼠 BALF 中 RANRES 的表达并没有进一步增加; OVA + H-AASD 和 OVA + AASD 联合处理引起小鼠 BALF 中嗜酸性粒细胞相关的趋化性细胞因子 MCP-1 的表达高于任何单独处理组; OVA + AASD 联合处理引起小鼠 BALF 中嗜酸性粒细胞相关的趋化性细胞因子 Eotaxin 和 MCP-3 的表达高于任何单独处理组; OVA + AASD 联合处理引起小鼠 BALF 中 Eotaxin、MCP-1 和 MCP-3 的表达增加程度高于 OVA + H-AASD 组, 分别为 OVA + H-AASD 组的 3.83、1.56 和 2.56 倍。

表10, AASD对支气管肺泡灌洗液中趋化性细胞因子蛋白表达的影响

分组*	动物数(n)	趋化性细胞因子(pg protein/total BALF)					
		RANTES	KC	MIP-1 α	Eotaxin	MCP-1	MCP-3
Control	8	0	31.6 $\pm$ 12.5	0	0	0	0
H-AASD	8	13.5 $\pm$ 9.75	593 $\pm$ 89.0 [†]	62.1 $\pm$ 7.29 [†]	0	267 $\pm$ 58.5	3.98 $\pm$ 3.98
AASD	8	73.0 $\pm$ 16.2 [†]	517 $\pm$ 63.1 [†]	62.9 $\pm$ 4.31 [†]	0	342 $\pm$ 83.8	47.2 $\pm$ 24.6
OVA	8	0	80.8 $\pm$ 18.7	0	0	0	4.13 $\pm$ 4.13
OVA + H-AASD	8	16.9 $\pm$ 6.03	419 $\pm$ 32.9 ^{†‡}	13.5 $\pm$ 4.11 ^{††}	12.0 $\pm$ 6.11	1132 $\pm$ 302 ^{†§**}	396 $\pm$ 165
OVA + AASD	8	77.1 $\pm$ 23.8 ^{†§}	583 $\pm$ 56.2 ^{†‡}	21.7 $\pm$ 2.61 ^{†§††}	45.9 $\pm$ 15.4 ^{†‡††}	1771 $\pm$ 340 ^{†‡††}	1012 $\pm$ 224 ^{†‡††}

*实验分为6组,分别为对照组(Control)、加热亚洲沙尘暴浮尘颗粒物组(H-AASD)、未加热亚洲沙尘暴浮尘颗粒物组(AASD)、卵蛋白组(OVA)、卵蛋白和加热亚洲沙尘暴热浮尘颗粒物组(OVA+H-AASD)以及卵蛋白和未加热亚洲沙尘暴浮尘颗粒物组(OVA+AASD)。

每间隔一周进行气管灌注。最后一次气管灌注24h后收集肺泡灌洗液。

[†] $p < 0.01$ vs. control, [‡] $p < 0.001$ vs. control, [§] $p < 0.01$ vs. OVA, ^{||} $p < 0.001$ vs. OVA, ^{**} $p < 0.05$ vs. H-AASD, ^{††} $p < 0.001$ vs. H-AASD, ^{†††} $p < 0.001$ vs. AASD.

七、AASD 对小鼠血清中 OVA 特异性 IgE 和 IgG1 表达的影响

图 9 为 AASD 对小鼠血清中 OVA 特异性 IgE 和 IgG1 的表达的影响。与对照组相比, OVA + H-AASD 有使 OVA 特异性 IgE 表达增加的趋势; OVA 和 AASD 导致 OVA 特异性 IgE 表达显著高于对照组、OVA 组合 AASD 单独作用组 ($p < 0.05$)。OVA + H-AASD 和 OVA + AASD 联合处理引起小鼠 OVA 特异性 IgG1 表达显著高于对照组和单独处理组, OVA + AASD 联合处理的 OVA 特异性 IgG1 表达高于 OVA + H-AASD 联合处理组。

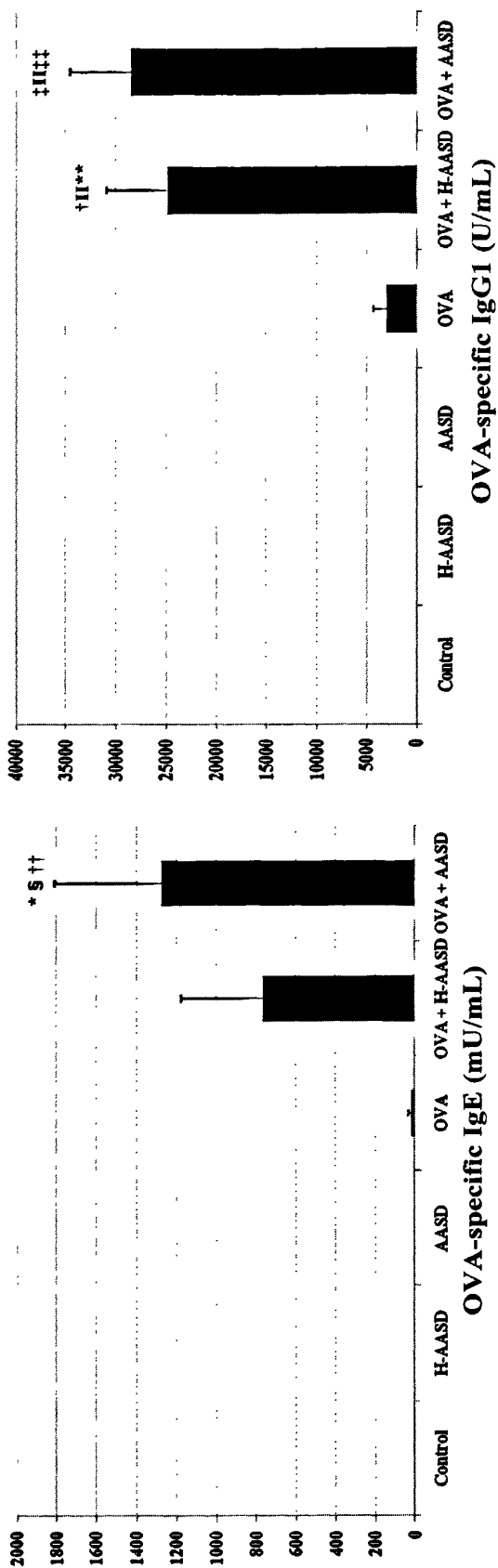


图9, AASD对小鼠血清中OVA特异性IgE和IgG1表达的影响

* $p < 0.05$ vs. Control, † $p < 0.01$ vs. Control, ‡ $p < 0.001$ vs. Control, § $p < 0.05$ vs. OVA, || $p < 0.001$ vs. OVA, ** $p < 0.001$ vs. H-AASD, †† $p < 0.05$ vs. AASD, ‡‡ $p < 0.001$ vs. AASD

讨 论

随着科技进步和社会生产力的极大提高、人口剧增、资源过度消耗、环境污染和生态破坏等问题也愈演愈烈。尤其是沙尘暴,近半个世纪以来强沙尘暴发生强度和次数在我国呈明显上升趋势。起源于我国中部和西北部干旱地区(戈壁沙漠和黄土塬区)的亚洲沙尘暴,在西北风带的推动下,横穿我国华北和华东地区,飞越黄海、朝鲜和日本,被传输到北太平洋西部。有时还可以被送到美国的阿拉斯加乃至北极圈,波及大半个北半球^[68]。强沙尘暴将其颗粒物长途传输而进入人口密集的城镇和大都市,恶化环境,影响广大居民的健康。据报道2002年3月20日,既中国北京出现沙尘暴后,韩国发生了强烈的沙尘风暴,航班停飞,学校停课,呼吸系统疾病及哮喘疾病患者数量显著增加,从而给韩国各领域造成了一系列损害^[69]。

进行长距离传播的亚洲沙尘暴浮尘颗粒物中含有来源于空气污染物的 SO_4^{2-} 、 NO_3^- 以及微生物成分(如LPS和 β -葡聚糖等)。本研究组既往研究发现直接采集于中国沙坡头沙漠的沙尘中 SO_4^{2-} 、 NO_3^- 、LPS和 β -葡聚糖的含量分别为:900 $\mu\text{g/g}$ 、500 $\mu\text{g/g}$ 、1.9 EU/mg和12.0 pg/mg,明显低于本研究中采集于日本壹歧岛的亚洲沙尘暴浮尘颗粒物。另一方面,本研究中的亚洲沙尘暴浮尘颗粒物与采集于中国沙坡头沙漠的沙尘在矿物质组成成分上基本相同。该现象提示沙尘暴颗粒物在经过长距离传播的过程中吸附了大量空气污染物、细菌微生物等成分,给人体呼吸系统带来严重危害。因此,研究长距离传播的亚洲沙尘暴浮尘颗粒物对OVA诱导的哮喘小鼠气道炎症的作用可能为人类呼吸系统疾病防治提供理论依据。

本研究中经过加热处理而除去吸附于其表面微生物的H-AASD能够导致小鼠肺部轻微的病理学改变。但是,未经过加热处理的AASD能引起小鼠支气管炎和肺炎,使支气管肺泡灌洗液中的中性粒细胞增加以及中性粒细胞相关趋化性细胞因子(如KC、MIP-1 α 等)和Th-1炎症反应相关细胞因子(如IL-12)表达增加。据报道LPS或 β -葡聚糖能够诱导上述中性粒细胞性炎症相关的细胞因子和细胞趋化因子表达增加^[43-44]。该结果提示,吸附于城市空气颗粒物表面的微生物可能通过促进上述炎性介质的表达而导致小鼠中性粒细胞性炎症。

以往的研究显示,嗜酸性粒细胞是哮喘气道炎症的关键效应细胞,哮喘患者

有明显的嗜酸性粒细胞增多,嗜酸性粒细胞浸润的程度与哮喘的严重程度相关^[46]。本研究中,OVA能够导致小鼠气道中的杯状细胞轻度增殖以及嗜酸性粒细胞和淋巴细胞轻度浸润,该现象与哮喘患者病理检查的结果相一致。AASD能够加重OVA诱导的哮喘小鼠的气道炎症并导致呼吸道上皮中的杯状细胞增殖,该结果与肺泡灌洗液中各种炎症细胞分布变化和肺组织病理检查结果相一致。OVA相关的气道炎症加剧伴随着支气管肺泡灌洗液中炎症分子(如嗜酸性粒细胞趋化因子、IL-5和MCP-3)的蛋白表达增加以及血清中OVA特异性抗体表达增加。OVA + AASD联合处理组的哮喘小鼠气道炎症加重程度高于OVA + H-AASD组。该结果提示可能是吸附于AASD表面的有机成分、细菌及真菌微生物引起上述炎症反应。

本研究中的AASD中含有大量的来自于空气污染物SO₂的SO₄²⁻,而经过加热处理被清除。既往研究报道,ASD和ASD+SO₄²⁻均能加重肺泡和呼吸道黏膜下层中OVA诱导的嗜酸性粒细胞募集反应;但是增加SO₄²⁻的作用剂量并没有观察到嗜酸性粒细胞募集反应加重^[56]。该结果提示SO₄²⁻并不能使呼吸道和肺泡灌洗液中的嗜酸性粒细胞增加。因此,来源于空气污染物的SO₄²⁻不能加重肺嗜酸性粒细胞增多症和OVA引起的气道炎症。另一方面,有机毒物如LPS和β-葡聚糖吸附于AASD表面。LPS是革兰氏阴性菌细胞外壁的主要成分,是该细菌引起炎症反应的最主要成分⁵⁷。β-葡聚糖是真菌细胞壁的特有的组成成分^[58]。H-AASD处理组只能够引起小鼠肺部轻微的病理学改变,可能是由于H-AASD经过加热处理去除了吸附于其表面的LPS和β-葡聚糖。因此,我们认为吸附于AASD表面的微生物能够加重小鼠支气管炎和肺泡炎症。

哮喘是一种以气道高反应性、肺部嗜酸粒细胞浸润、支气管上皮增生,以及支气管粘液过度分泌等为主要特征的慢性变态反应性疾病^[70]。目前对于哮喘研究较多,广泛接受的发病机制学说认为:机体在过敏原初次接触后致敏T细胞,再次接触过敏原时,致敏T细胞通过各种机制使嗜酸性粒细胞迁移至肺中并活化释放各种炎症介质而导致哮喘的发作。嗜酸性粒细胞被认为是哮喘气道炎症的标记,是哮喘发病机制中最重要的炎症效应细胞^[71]。哮喘发生时,嗜酸粒细胞在各种趋化剂的作用下,被募集到炎症部位,通过脱颗粒释放多种生物活性物质如血小板激活因子、活性氧自由基、白三烯和嗜酸粒细胞阳离子蛋白、主要碱性蛋白和嗜酸

粒细胞过氧化物酶等使气道处于高反应状态,并引支气管粘膜损伤^[72],在哮喘中嗜酸性粒细胞也导致支气管平滑肌细胞死亡^[73]。OVA + H-AASD 处理组和 OVA + AASD 处理组中 OVA 诱导的呼吸道上皮细胞转化为杯状细胞的情况与黏膜下层的嗜酸性粒细胞浸润程度相一致。因此,激活嗜酸性粒细胞可能导致呼吸道上皮细胞损伤以及杯状细胞细胞增殖。AASD 处理组的损伤情况比 H-AASD 处理组严重。

哮喘的发病机制较为复杂,研究表明:哮喘的本质是气道慢性炎症,其中 Th1/Th2 失衡起着重要作用。气道中所有的炎症细胞和结构细胞均参与该炎症过程,包括 T 淋巴细胞和嗜酸性粒细胞等,它们通过释放多种炎性介质和细胞因子来发挥效应,引起血管渗漏、粘液过度分泌、平滑肌收缩、上皮脱落、杯状细胞增生以及气道高反应性等改变^[74]。其中 T 细胞又可以进一步分为 Th1 和 Th2 亚群淋巴细胞。Th2 淋巴细胞通过释放 IL-4、IL-5 和 IL-13 等细胞因子,促进支气管粘膜嗜酸性粒细胞的聚集以及血清 IgE 的产生^[75]。而 Th1 淋巴细胞分泌细胞因子 IFN- γ , Th2 细胞释放 IL-4、IL-5 和 IL-13 等细胞因子能对抗 Th1 细胞的作用,抑制 Th1 细胞增殖、分化和抑制 Th1 细胞释放 IFN- γ ^[76]。本研究中 H-AASD 和 AASD 单独处理组小鼠的肺泡灌洗液中的哮喘相关的炎症介质的表达并没有增加。但是,与 OVA, H-AASD 或 AASD 单独处理组相比, OVA + H-AASD 和 OVA + AASD 联合处理组小鼠肺泡灌洗液中嗜酸性粒细胞相关的趋化性细胞因子如 MCP-1、MCP-3 和 RANTES 等以及 Th2 细胞因子 IL-4、IL-5 和 IL-13 的表达显著增加。嗜酸性粒细胞趋化因子是嗜酸性粒细胞最主要的趋化蛋白,只有在 OVA + AASD 联合处理中表达增加。OVA + AASD 联合处理组的小鼠支气管肺泡灌洗液中各种细胞因子和细胞趋化因子的表达均高于 OVA + H-AASD 联合处理组,提示经过加热处理而除去的吸附于 AASD 表面的各种微生物和有机物成分通过释放上述化学介质而加重小鼠呼吸道和肺泡嗜酸性粒细胞募集。而且小鼠肺泡灌洗液中的生物成分的变化与其肺部的病理变化相一致。另一方面, OVA 与 H-AASD 或 AASD 联合处理能够抑制小鼠肺泡灌洗液中 Th1 炎症介质如 IFN- γ 的表达。Th2 淋巴细胞释放的 IL-4、IL-5、和 IL-13 能够抑制 IFN- γ 的表达。因此, IFN- γ 的抑制作用可能是由于 Th2 细胞因子分泌增加而引起的。

论文一中 UPM 的主要无机成分为二氧化硅(约 32%)和碳(约 12%),而本实验中 AASD 的主要成分为二氧化硅(约 60%),但是经过加热处理的 H-UPM 和

H-AASD均能导致小鼠肺部轻微的炎症反应并使OVA特异性的IgE和IgG1抗体表达增加。据报道石英、无定形硅或晶体硅均能够导致大鼠肺部炎症反应并伴有炎症介质表达增多^[59]。既往研究报道即使在1 μgOVA抗原作用下,硅晶体(粒径小于5 μm的标准石英DQ12)或无定形硅就能够诱导小鼠产生抗原相关的IgE和IgG1抗体^[60]。因此,在H-AASD处理组小鼠气道炎症加重并伴有OVA特异性的IgE和IgG1抗体表达增加可能是由于H-AASD中含有二氧化硅的原因。UPM和AASD在漂浮过程中其表面均吸附大量空气污染物、细菌以及真菌微生物。OVA + UPM和OVA + AASD联合作用均能够加重OVA诱导的哮喘小鼠气道炎症、使其肺部嗜酸粒细胞浸润,支气管上皮增生,可能是吸附于UPM和AASD表面的微生物在上述炎症反应中发挥作用。

结 论

本研究发现AASD通过激活Th2免疫反应,促进Th2细胞释放炎症相关的细胞因子进而使OVA诱导的哮喘小鼠气道炎症反应加重,微生物和来源于空气污染的化学物在上述反应中发挥重要作用。空气暴露于来源于燃料燃烧的化学污染物、细菌、真菌和硅颗粒物等可能通过产生呼吸系统过敏反应而直接影响人类健康。

亚洲沙尘暴浮尘颗粒物对小鼠巨噬细胞中 Toll样受体和NALP3炎症复合体表达的影响

前 言

Toll样受体(Toll-like receptors, TLRs)是新近发现的细胞跨膜受体,作为连接天然免疫与特异性免疫的关键元件,在免疫抑制、急性炎症反应、细胞信号转导方面起重要作用,其表达异常在哮喘发生发展中起重要作用。哺乳动物TLRs是一类与天然免疫关系密切的模式识别受体(pattern recognition receptors, PRRs),通过识别病原微生物特定的病原体相关分子模式(Pathogen-associated molecular patterns, PAMPs)启动天然免疫应答并激活获得性免疫^[25]。其共同特点是胞外段有富含亮氨酸的重复结构域(leucine rich repeated, LRR),胞内段与白细胞介素-1受体(interleukin-1 receptor, IL-1R)具有同源性;其信号转导主要经IL-1R相关激酶,导致NF- κ B (nuclear factor kappa B)激活,继而产生细胞因子^[77]。

然而,其他的模式识别受体如Nod样受体(Nod-like receptor, NLR)也参与天然免疫的介导。既往研究表明哺乳动物NLR家族包括20多个成员,均由3个结构域构成:碳末端的LRR区域,中间的NACHT结构域,以及可能是热蛋白样结构域(pyrin domain, PYD),聚集半胱氨酸蛋白酶募集域(caspase recruitment domain, CARD)或者较为保守的凋亡蛋白重复序列(baculovirus inhibitor of apoptosis protein repeat, BIR)结构域的效应性氨基末端^[27]。

NLR家族成员NALP3(NACHT-, LRR- and pyrin-domain containing protein 3)又被称为NLRP3(Nucleotide-binding domain, leucine rich repeated and pyrin domain containing protein 3),其最主要的特征就是能够通过PYD-PYD的相互作用而与凋亡相关的斑点样蛋白(apoptosis-associated speck-like protein containing caspase recruitment domain, ASC)相互作用。ASC是一种含CARD-和PYD-的蛋白质,被认为是包含PYD-和CARD-的蛋白的转接分子。ASC与NALP3相互作用时,ASC的PYD-和NALP3的PYD-相互作用,而ASC的CARD-招募半胱氨酸蛋白酶1原酶(pro-caspase-1)而激活半胱氨酸蛋白酶-1(caspase-1)^[78-79]。在活化的巨噬细胞和单

核细胞中激活的caspase-1能够激活并分泌白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)^[80]。当NALP3与ASC相互作用激活caspase-1时,形成细胞内复合物即为NALP3炎症复合体(NALP3 Inflammasome)^[25,27]。研究表明在病原菌提取分子、无菌炎症诱导物及无病原微生物的成孔毒素等多种前炎症因子刺激的反应中NALP3炎症复合体被激活并持续表达^[81-82]。

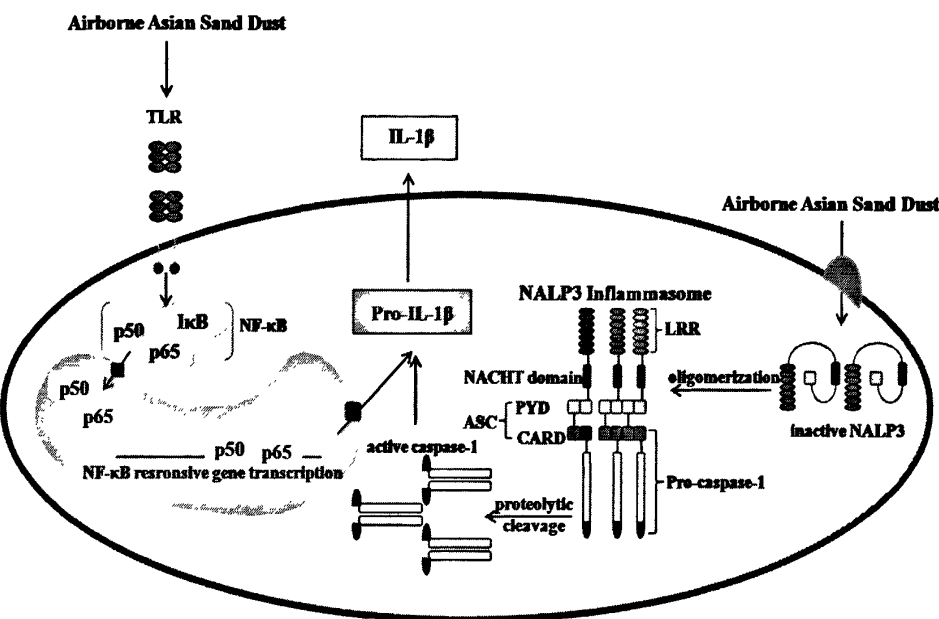


图10, 巨噬细胞中Toll样受体和NALP3炎症复合体表达

本研究论文二中的实验结果表明采集于日本南部靠近中国的壹歧岛的亚洲沙尘暴浮尘颗粒物能够加重哮喘小鼠的气道炎症,使其肺泡灌洗液中的中性粒细胞和嗜酸性粒细胞增多,并伴有与炎症相关的细胞因子和趋化性细胞因子蛋白表达增加(如IL-5、单核细胞趋化因子-3和角质细胞趋化因子等),而TLRs和NALP3炎症复合体可能参与上述的炎症反应。在本试验中,体外培养小鼠巨噬细胞系RAW264.7,以日本南部壹歧岛采集的亚洲沙尘暴浮尘颗粒物样本染毒,同时应用TLR2抗体(TLR2 antibody, TLR2ab)和TLR4抗体(TLR4 antibody, TLR4ab),检测细胞中TLR2、TLR4、NALP3、ASC、caspase-1和IL-1 β 的基因表达,进而探明TLRs和NALP3炎症复合体在大气污染颗粒物加重哮喘的气道炎症中的作用机制。

材料与方法

一、主要试剂

血清、DMEM培养液(GIBCO, USA)

ISOGEN RNA提取液(Nippon Gene, Tokyo, Japan)

氯仿、异丙醇、75%乙醇(Wako, Osaka, Japan)

DNase反应液、无RNase的DNase、DNase反应停止液(Promega, WI, USA)

M-MLV RTase、第一链反应液(Invitrogen, CA, USA)

dNTP(Rosch, Basel, Switzerland)

随机引物(TaKaRa, Shiga, Japan)

巨噬细胞系RAW264.7 (Nippon, Tokyo, Japan)

二、主要实验仪器

real-time PCR仪(Applied Biosystem, USA)

三、细胞培养

本试验中采用由BALB/c雌性小鼠中提取的巨噬细胞系RAW264.7。具体细胞复苏及培养步骤如下:

(1) 从液氮中取出冻存管, 迅速置于温水浴(37℃)中并不断搅动, 使冻存管中的冻存细胞迅速融化。

(2) 打开冻存管, 将细胞悬液吸到离心管中。

(3) 1000 rpm离心10分钟, 弃去上清液。

(4) 沉淀中加入10 ml含10%血清的DMEM培养液, 吹打均匀, 再1000 rpm离心10 min, 弃上清液。

(5) 加适当培养液后, 调整细胞浓度为 $4 \times 10^5/\text{ml}$, 以每个培养皿4 ml, 接种到60 mm的培养皿中, 于含5% CO₂的培养箱中, 37℃培养, 第二天观察生长情况并进行染毒。

四、浮尘颗粒物样本处理

将一部分从日本南部的壹歧岛采集的AASD于360℃电子加热器中加热30 min, 以去除吸附在AASD表面的细菌及微生物。分别应用加热和未加热的沙尘样

本染毒。

五、细胞染毒

将加热和未加热的沙尘样本分别溶于DMEM培养液中，使其浓度均为3 mg/ml。观察细胞生长状态良好，每个培养皿中加入40 μ l的沙尘样本溶液，使其终浓度为30 μ g/ml。细胞于含5% CO₂的37℃培养箱中，培养3 h后提取RNA。

六、基因表达检测

(1) RNA提取

- ① 每个培养皿中加入0.5 ml ISOGEN RNA提取液，室温放置5 min后吸取到EP管中；
- ② 加入0.1 ml氯仿，涡旋15 s，室温放置5 min；
- ③ 15000 rpm，4℃离心10 min，取上清液于1.5 ml EP管中；
- ④ 加入0.25 ml异丙醇，涡旋2-3 s，室温放置10 min；
- ⑤ 15000 rpm，4℃离心10 min，弃去上清液；
- ⑥ 加入0.7 ml 4℃冷藏的75%乙醇，涡旋15 s；
- ⑦ 15000 rpm，4℃离心10 min，弃去上清液；
- ⑧ 倒扣于桌面上，室温干燥20-120 min；
- ⑨ 每管中加入35 μ l 4℃冷藏无RNase的DDW，于-80℃冰箱中冷藏保存。

(2) RNA反转录获得cDNA

- ① 整个反转录过程尽量在冰上操作。
- ② 应用10×DNase Buffer、无RNase的DDW、RNasin和DNase配置DNase处理液。
- ③ 应用Stop Sol和无RNase的DDW配制DNase失活液。
- ④ 从-80℃冰箱中取出RNA，涡旋10 s。
- ⑤ 每个样品取5 μ l到EP管中。
- ⑥ 向每个样品中加入15 μ l DNase处理液，37℃放置60 min。
- ⑦ 向每个样品中加入5 μ l DNase失活液，65℃放置10 min，冰上放置5-20 min。
- ⑧ 应用Random Primer、5×Buffer、dNTP、无RNase的DDW和M-MLV RTase配制反转录反应液。
- ⑨ 向每个样品中加入75 μ l反转录反应液，37℃反应60 min，95℃反应10 min，于

-30℃冰箱中冷藏保存。

(3) PCR

- ① 按照比例配制反应体系：TaqMan混合液12.5 μl，TaqMan荧光探针250 nM，各种引物300 nM，cDNA5 μl，水7.5 μl，总体积共25 μl。
- ② 设定real-time定量检测程序为：95℃，10 min，之后每一步变性95℃15 s，退火延伸60℃60 s，共进行40个循环，每次在延伸阶段读取吸光值。
- ③ 制作熔解曲线：PCR结束后，在95℃变性1 min，然后冷却至55℃，使DNA双链充分结合；从55℃开始到95℃，每一步增加0.5℃，保持30 s，同时读取吸光值。

(4) 分析数据：以GAPDH作为内参照，计算每个样品相对于GAPDH表达的平均值。本实验中引物和探针序列如表11。

表 11，引物和探针序列

Primers & probes	Gene Sequence
GAPDH sense	TGCACCACCAACTGCTTAG
GAPDH antisense	GGATGCAGGGATGATGTTC
GAPDH probe	CAGAAGACTGTGGATGGCCCCCTC
TLR2 sense	GAATTGCATCAC CGGTCAGAA
TLR2 antisense	CTGAGCAGA ACAGCGTTTGC
TLR2 probe	CGTCAAATCTCAGAGGATGCTACGAGC
TLR4 sense	AGGACTCTGATCA TGGCACTGTT
TLR4 antisense	GAGTTTCTGATC CATGCATTGG
TLR4 probe	CCAGGAAGCTTGAATCCCTGCATAGAGG
IL-1β sense	TCCTGAACTCAACTGTGAAATGC
IL-1β antisense	AGCCCAGGTCAAAGGTTTGG
IL-1β probe	AGCAGCCCTTCATCTTTTGGGGTCCG
Nalp3 sense	TGGAGAAAATGCCTTGGGAGAC
Nalp3antisense	GGTCAGAGCTGAACAACAGATTG
Nalp3 probe	AGGCCGGAATTCACCAACCCCAGCT
CARD sense	AGCTGCAAACGACTAAAGAAGAG
CARD antisense	ACCCTGGCAATGAGTGCTTG
CARD probe	CCACAAAGTGTCTGTTCTGGCTGTACTCT
Casp1 sense	TCACGCCCTGTTGGAAAGG
Casp1 antisense	CTCACTGAGTTGATAAATTGCTTCC
Casp1 probe	CTTTGCCCTCAGGATCTTGTCAGCCATG

七、统计学分析

本研究应用 SPSS13.0 统计学软件进行分析,统计结果表述为平均数±标准差,采用单因素方差分析比较不同染毒组的实验数据;当组间差异具有统计学意义时,采用 SNK 法进行组间比较, $p < 0.05$ 具有统计学意义。

实验结果

一、AASD 对小鼠巨噬细胞中 TLR2 和 TLR4 mRNA 表达的影响

AASD处理组小鼠巨噬细胞中TLR2 mRNA表达显著高于对照组 ($p < 0.001$); TLR2ab处理组小鼠巨噬细胞中TLR2 mRNA表达明显低于AASD处理组 ($p < 0.001$), TLR2ab有效抑制TLR2 mRNA表达。AASD处理组小鼠巨噬细胞中TLR4 mRNA表达显著低于对照组 ($p < 0.001$); TLR4ab不能有效抑制TLR4 mRNA表达。

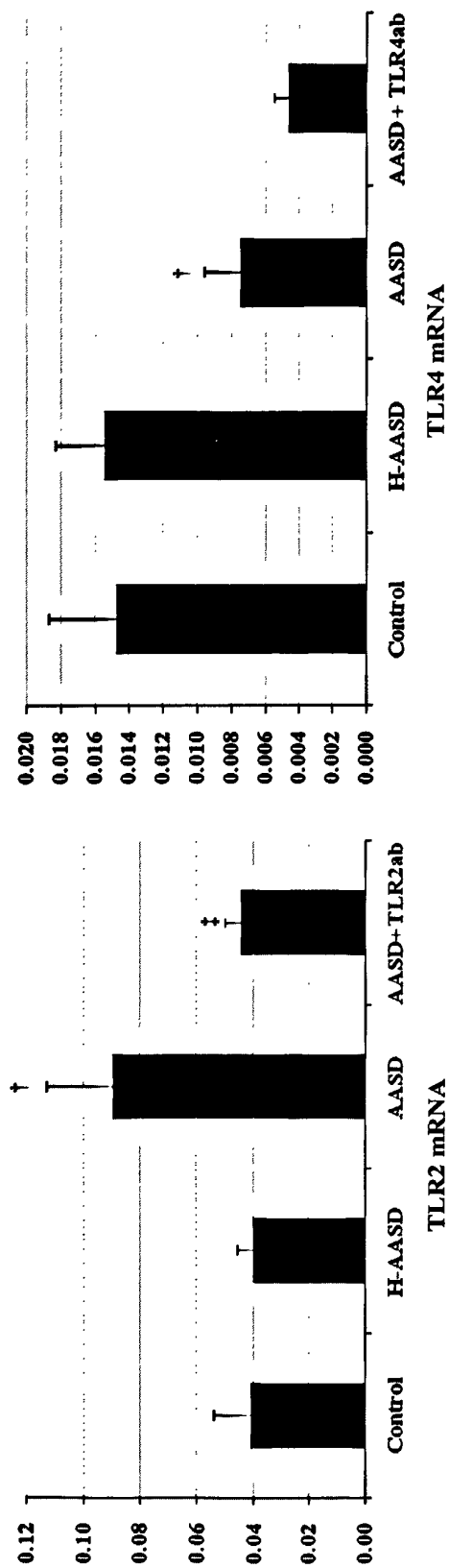


图11, 小鼠巨噬细胞中TLR2和TLR4 mRNA表达

† $p < 0.001$ vs. control, H-AASD; ‡ $p < 0.001$ vs. AASD

二、AASD对小鼠巨噬细胞中NLRP3 mRNA表达的影响

AASD导致小鼠巨噬细胞中NLRP3基因表达明显高于对照组和H-AASD组 ($p < 0.001$)；而经过加热处理的H-AASD对于小鼠巨噬细胞中NLRP3基因表达无明显作用。

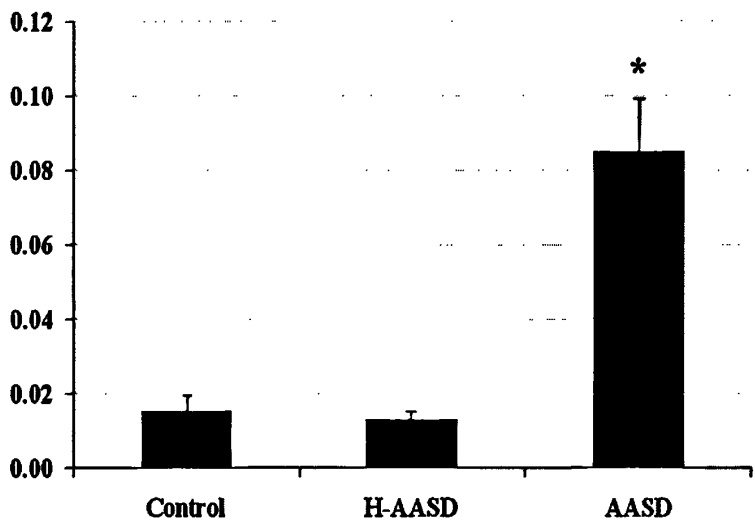


图12, 小鼠巨噬细胞中NALP3 mRNA表达

* $p < 0.001$ vs. Control, H-AASD

三、AASD对小鼠巨噬细胞中ASC mRNA表达的影响

AASD导致小鼠巨噬细胞中ASC基因表达明显高于对照组和H-AASD组 ($p < 0.001$)；而经过加热处理的H-AASD对于小鼠巨噬细胞中ASC基因表达无明显作用。

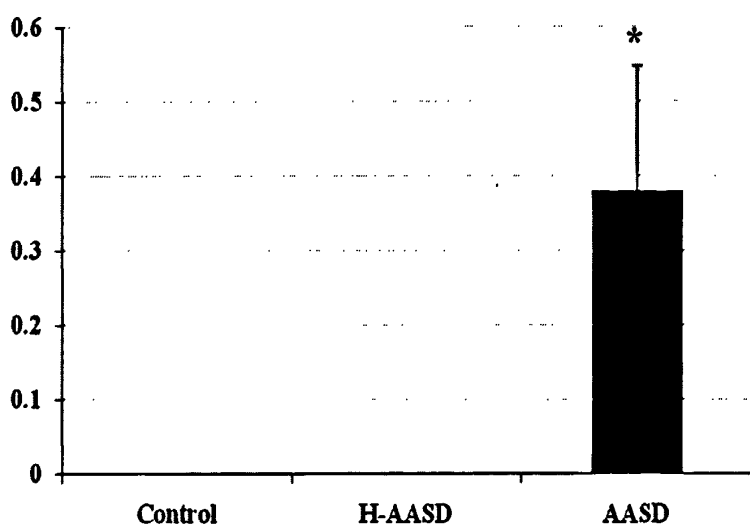


图13, 小鼠巨噬细胞中ASC mRNA表达

* $p < 0.001$ vs. Control, H-AASD

四、AASD对小鼠巨噬细胞中caspase-1 mRNA表达的影响

AASD使小鼠巨噬细胞中caspase-1基因表达略微高于对照组和H-AASD组, 但是不具有统计学意义 ($p > 0.001$)。

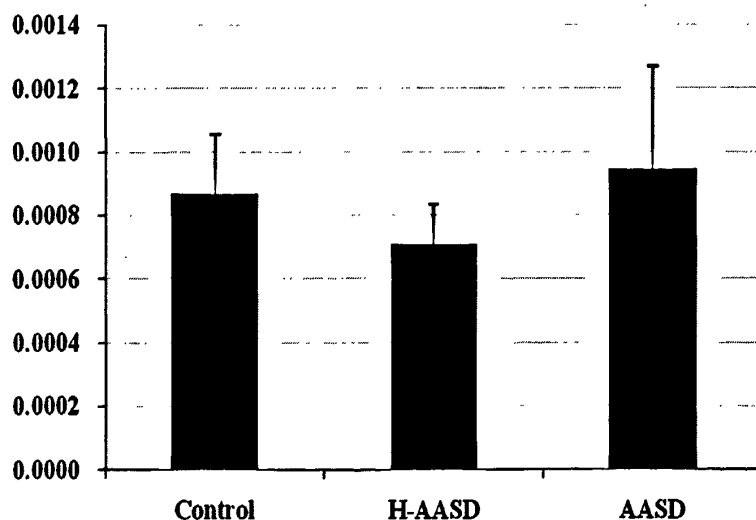


图14, 小鼠巨噬细胞中caspase-1 mRNA表达

五、AASD对小鼠巨噬细胞中IL-1 β mRNA表达的影响

AASD导致小鼠巨噬细胞中IL-1β基因表达明显高于对照组和H-AASD组 ($p < 0.001$)；而经过加热处理的H-AASD对于小鼠巨噬细胞中IL-1β基因表达无明显作用。AASD + TLR2ab处理组IL-1β基因表达明显高于对照组但是低于AASD组 ($p < 0.001$)。

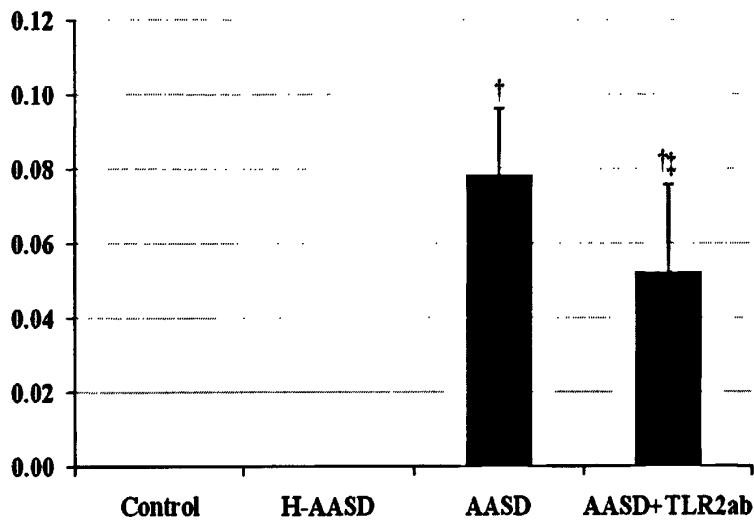


图15，小鼠巨噬细胞中IL-1β mRNA表达

† $p < 0.001$ vs. control, H-AASD; ‡ $p < 0.001$ vs.AASD

讨 论

TLRs介导着绝大部分哺乳动物、昆虫及植物的宿主防御，主要负责识别致病性真菌和细菌，它们在识别微生物保守分子成分，预警机体天然免疫系统抵御外来入侵病原体过程中发挥重要作用^[83]。TLR2和TLR4 mRNA在巨噬细胞内的含量最高，这可能与它们主要参与机体天然免疫有关^[84]。当病原体及其产物与TLRs结合后，巨噬细胞即活化并释放大量细胞因子或炎症介质，参与天然和获得性免疫的炎症反应^[85]。TLR2是酵母多糖（β-葡聚糖）和革兰氏阳性菌的主要成分肽聚糖的受体^[86]，TLR4是革兰氏阴性菌细胞外壁的主要成分脂多糖（lipopolysaccharide, LPS）的受体^[87]。TLR2配体能够激活OVA相关的Th2型免疫反应，诱导产生Th2免疫反应相关的细胞因子如IL-13和IL-5以及OVA特异性IgE和IgG1抗体产生。TLR2配体能够促进Th2免疫反应相关疾病（如哮喘）的病情进展^[88]。TLR4结合LPS

等病原体相关分子模式后通过释放细胞因子可促进炎症反应，但目前尚没有足够证据证明TLR4能直接参与Th2型免疫应答^[89]。在本科研组前期的实验中ASD能够加重OVA诱导的小鼠肺嗜酸性粒细胞增多症，我们认为吸附于ASD表面的微生物成分通过TLR2（而不是TLR4）激活Th2免疫反应，进而加重小鼠肺嗜酸性粒细胞增多症^[39]。本研究中的AASD能够增加TLR2的基因表达，但是TLR4的基因表达降低。因此，可能是吸附于AASD表面的微生物成分通过TLR2信号转导加重了OVA诱导的哮喘小鼠的气道炎症，而不是TLR4。

NLR家族的成员NALP3是细胞质受体，被微生物配体肽聚糖和细胞损伤的内源性标记物（如ATP和尿酸结晶等）激活。具有活性的NALP3与衔接蛋白如ASC结合而形成NALP3炎症复合体。该复合体激活caspase-1，进而将pro-IL-1 β 激活使之成为IL-1 β 。NALP3主要由单核细胞，粒细胞和关节软骨细胞表达^[90]。最初在小鼠外周血淋巴细胞中发现NALP3的mRNA表达，与假定的炎症反应相对应^[91]。既往体内实验研究指出，LPS诱导的小鼠炎症中肺部表达NALP3^[92]；体外实验研究表明，脂磷壁酸（lipoteichoic acid, LTA）和LPS能够诱发人原代单核细胞持续表达NALP3^[93]。ASC是一种含CARD和PYD的蛋白质，PYD和CARD是同源蛋白-蛋白相互作用结构域，并在ASC的寡聚化中起着非常重要的作用。ASC的表达可以被IL-1 α 、IL-1 β 和LPS等暂时性地上调，参与多条信号转导途径，可与多种因子发生相互作用。ASC可以利用其特定的结构域在细胞凋亡、炎症介导、免疫调节以及肿瘤形成等方面均发挥重要作用。ASC主要在淋巴细胞、上皮细胞、毛囊、外周血淋巴细胞以及严重局部炎症反应中的中性粒细胞中充分表达^[94]。既往体外实验研究表明，任何TLRs激活剂和细菌都不能使ASC缺陷的巨噬细胞分泌IL-1 β ^[95]；体内实验研究表明，ASC缺陷的小鼠对于LPS攻击后内毒素耐受反应增强；并且与NALP3缺陷的小鼠相比，ASC缺陷的小鼠能够耐受更高剂量的LPS攻击^[96-97]。这些实验结果证明ASC是NALP3下游的转接分子，可能起作用与NALP3炎症复合体并不重合。Caspase-1对于大量的病原菌来说是重要的宿主防御，沙门氏菌、志贺氏菌、军团菌以及假单胞菌均能感染巨噬细胞，激活caspase-1，释放IL-1 β ，进而细胞快速死亡^[98]。caspase-1是NALP3炎症复合体的另一个组成分子，对于激活IL-1 β 发挥重要作用。LPS作用于caspase-1缺陷的小鼠后不能诱导其产生IL-1 β ，而

且caspase-1缺陷的小鼠耐受LPS诱导的内毒素反应^[99]。细菌RNA能够通过NALP3炎症复合体产生IL-1 β ^[100]。IL-1 β 是体内非常重要的促炎症细胞因子,在病原微生物PAMPs即细胞膜上TLRs和NALP3炎症复合体对天然免疫受体的刺激作用下,单核细胞分泌IL-1 β ^[101]。PAMPs激活TLR后通过MyD88/NF- κ B途径上调pro-IL-1 β ; NALP3和ASC通过PYD-PYD相互作用结合,而ASC的CARD-招募pro-caspase-1激活caspase-1,继而caspase-1介导切割pro-IL-1 β 而释放出活性分子IL-1 β ^[102]。

本研究中, AASD能够使NALP3、ASC和IL-1 β 的基因表达显著增加,而caspase-1的基因表达并无明显的变化,但是由于AASD处理组中IL-1 β 的基因表达显著增加,该现象提示事实上caspase-1确实被激活了。而与对照组相比, H-AASD处理组NALP3、ASC和IL-1 β 的基因表达无显著变化。因此,在本研究中可能吸附于AASD表面的LPS或肽聚糖刺激激活NALP3炎症复合体的表达,进而释放出IL-1 β 。

在本研究论文二体内实验部分, H-AASD和AASD处理组的小鼠肺泡灌洗液中IL-1 β 的蛋白表达增加,并且AASD处理组的小鼠肺泡灌洗液中IL-1 β 的蛋白表达高于H-AASD处理组。H-AASD处理组的小鼠肺泡灌洗液中IL-1 β 的蛋白表达增加可能是由于活性氧等危险信号触发激活NALP3炎症复合体的表达。据既往研究报道, NADPH氧化酶对于二氧化硅的吞噬作用产生的活性氧能够激活NALP3炎症复合体^[103]。而在AASD处理组中除了活性氧以外, 吸附于AASD表面的肽聚糖或LPS通过病原体相关分子模式进一步激活NALP3炎症复合体的表达。由H-AASD或AASD诱导释放的IL-1 β 进一步导致产生炎症反应。事实上, H-AASD或AASD单独处理组导致小鼠中性粒细胞性肺炎, AASD处理组的严重程度大于H-AASD处理组。迟发超敏反应中IL-1 β 参与激活抗原特异性T细胞以及产生局部炎症^[104]。本研究中, OVA存在的条件下, AASD诱导产生的IL-1 β 可能激活Th2细胞, 导致与过敏性炎症相关的Th2细胞因子IL-4、IL-5、IL-13以及IgE、IgG₁抗体表达。

结 论

亚洲沙尘暴浮尘颗粒物在漂浮传播的过程中吸附空气中大量的污染物以及微生物, 如 β -葡聚糖和LPS等, 这些微生物能够有效地促进小鼠巨噬细胞中TLR2和NALP3炎症复合体的基因表达, 进而释放IL-1 β , 加重炎症反应。

• 本研究创新性的自我评价 •

本研究采用动物体内实验与体外细胞培养相结合的实验方法，首次报道北京城市污染颗粒物能够加重卵蛋白诱导的哮喘小鼠气道过敏性炎症；同时本研究还报道了沙尘暴过后其颗粒物进行远距离漂浮而形成的浮尘也能够引起卵蛋白诱导的哮喘小鼠气道炎症反应加重；Toll样受体和NALP3炎症复合体在上述反应中基因表达增加，可能发挥重要作用。本研究探求大气污染颗粒物对哮喘小鼠的损伤作用机制对加强颗粒物污染防治及敏感人群的健康保护具有重要的现实意义和指导意义。

• 参考文献 •

- 1 Roberts S, Martin M A. Methods for bias reduction in time-series studies of particulate matter air pollution and mortality. *J Toxicol Environ Health A*, 2007, 70(8): 665-675.
- 2 Roberts S, Martin M A. A distributed lag approach to fitting non-linear dose-response models in particulate matter air pollution time series investigations. *Environ Res*, 2007, [Epub ahead of print].
- 3 Ostro B, Broadwin R, Green S, Feng W Y, Lipsett M. Fine particulate air pollution and mortality in nine California counties: results from CALFINE. *Environ Health Perspect*, 2006, 114(1): 29-33.
- 4 Bell M L, Samet J M, Dominici E. Time-series studies of particulate matter. *Annu Rev Public Health*, 2004, 25: 247-280.
- 5 Ballester F, Tenias J M, Perez-Hoyos S. Air pollution and emergency hospital admissions for cardiovascular diseases in Valencia. Spain *J Epidemiol Community health*, 2001, 55: 57-65.
- 6 Analitis A, Katsouyanni K, Dimakopoulou K, *et al*. Short-Term Effects of Ambient Particles on Cardiovascular and Respiratory Mortality. *Epidemiology*, 2006, 17(2): 230-233.
- 7 Schikowski T, Sugiri D, *et al*. Long-term air pollution exposure and living close to busy roads are associated with COPD in women. *Respir Res*, 2005, 6: 152.
- 8 阚海东, 陈秉衡. 我国大气颗粒物暴露于人群健康效应的暴露-反应关系分析. *环境与健康杂志*, 2002, 19(6): 422-424.
- 9 张燕萍, 张志琴, 李晋芬. 空气颗粒物与呼吸及心脑血管疾病每日住院率相关性研究. *中华预防医学杂志*, 2008, 42(2): 96-102.
- 10 Goetzel E J. Changing paradigms in the immunological science of allergy. *Curr Allergy Asthma Rep*, 2008, 8(1): 28-31.
- 11 Eder W, Ege M J, Von Mutius E. The asthma epidemic. *N Engl J Med*, 2006, 355: 2226-2235.
- 12 全国儿科哮喘协作组. 中国城市儿童哮喘患病情况调查. *中华儿科杂志*, 2003, 41: 123-127.
- 13 屈能胜. 来势汹汹的哮喘病. *医药与保健*, 2004, 12(11): 4-5.
- 14 Romieu I, Meneses F, Ruiz S, Siemra J J, Huerta J, White M C, Etzel R A. Effects of air pollution on the respiratory health of asthmatic children living in Mexico City. *Am J Respir Crit Care Med*, 1996, 154: 300-307.
- 15 Schwartz J, Slater D, Larson T V, Pierson W E, Koenig J Q. Particulate air pollution and hospital emergency room visits for asthma in Seattle. *Am Rev Respir Dis*, 1993, 147: 826-831.
- 16 Yang C Y, Tsai S S, Chang C C, Ho S C. Effects of Asian dust storm events on daily

- admissions for asthma in Taipei, Taiwan. *Inhal Toxicol*, 2005, 17: 817-821.
- 17 Young Y, Choung J T, Yu J, Kim D K, Koh Y. Acute Effects of Asian Dust Events on Respiratory Symptoms and Peak Expiratory Flow in Children with Mild Asthma. *J Korean Med Sci*, 2008, 23: 66-71.
 - 18 Kleinman M T, Sioutas C, Froines J R, Fanning E, Hamade A, Mendez L, Meacher D, Oldham M. Inhalation of concentrated ambient particulate matter near a heavily trafficked road stimulates antigen-induced airway responses in mice. *Inhal Toxicol*, 2007, 19: 117-126.
 - 19 戴海夏, 宋伟民. 大气颗粒物健康效应生物学机制研究进展. *环境与职业医学*, 2003, 20(4): 308-311.
 - 20 Visintin A, Mazzoni A, Spitzer J H, Wyllie D H, Dower S K, Seagal D M. Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells. *J Immunol*. 2000, 166: 249-255.
 - 21 Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway C A. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, 1997, 388: 394-397.
 - 22 Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 2006, 124: 783-801.
 - 23 Mariathasan S and Monack D M. Inflammasome adaptors complex useful for the activation of IL-1 β , Caspase-1 and sensors: intracellular regulators of infection and inflam deficient mice carry a defect in the production of mature maton. *Nature Reviews Immunology*, 2007, 7(1): 31-40.
 - 24 Parkinson T. The future of Toll-like receptor therapeutics. *Curr. Opin. Mol*. 2008, 181: 17-21.
 - 25 Mariathasan S, Monack D M. Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 2007, 7 (1): 31-40.
 - 26 Sutterwala F S, Ogura Y, Flavell R A. The inflammasome in pathogen recognition and inflammation. *J Leukoc Biol*, 2007, 82:259-264.
 - 27 Fritz J H, Ferrero R L, Philpott D J, Girardin S E. Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease. *Nat Immunol*, 2006, 7: 1250-1257.
 - 28 Agostini L, Martinon F, Burns K, McDermott M F, Hawkins P N, Tschopp J. NALP3 forms an IL-1 β -processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder. *Immunity*, 2004, 20: 319-325.
 - 29 Mori I, Nishikawa M. Characteristic of the NIES CRM No.28 urban aerosols. Abstract of the 25th symposium on aerosol science & technology in conjunction with international aerosol symposium. 319-320. Kanazawa, Japan, August 20-22, 2008. Japan Association of Aerosol Science and Technology.
 - 30 Schwartz J. Short term fluctuations in air pollution and hospital admissions of the elderly for respiratory disease. *Thorax*, 1995, 50(5): 531-538.
 - 31 Atkinson R W, Anderson H R, Sunyer J, *et al*. Acute effects of particulate air pollution on

- respiratory admissions: results from APHEA 2 project. *Air Pollution and Health: a European Approach*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001, 164 (10 Pt 1): 1860-1866.
- 32 Bouhuys A, Beck G J, Schoenberg J B. Do present levels of air pollution outdoors affect respiratory health? *Nature*, 2003, 276 (5687): 466-471.
 - 33 Karakatsani A, Andreadaki S, Katsouyanni K, *et al*. Air pollution in relation to manifestations of chronic pulmonary disease: a nested casecontrol study in Athens, Greece. *Eur J Epidemiol*, 2003, 18 (1): 45-53.
 - 34 Matthew J, Neidel L. Air pollution, health, and socio. Economic status: The effect of outdoor air quality on childhood asthma. *J Health Economics*, 2004, 23(6): 1 209-1 236.
 - 35 Kleinman M T, Hamade A, Meacher D, Oldham M, Sioutas C, Chakrabarti B, Stram D, Froines J R, Cho A K. Inhalation of concentrated ambient particulate matter near a heavily trafficked road stimulates antigen-induced airway responses in mice. *J Air Waste Manag Assoc*, 2005, 55(9):1277-1288.
 - 36 Ito T, Ohyama K, Kusano T, Usuda Y, Nozawa A, Hayashi H, Ohji H, Kitamura H, Kanisawa M. Pulmonary endocrine cell hyperplasia and papilloma in rats induced by intratracheal injections of extract from particulate air pollutants. *Exp Toxicol Pathol*, 1997, 49 (1-2): 65-70.
 - 37 Nishiyama Y, Aoki Y, Yamaguchi H. Morphological aspects of cell wall formation during protoplast regeneration in *Candida albicans*. *J Electron Microsc*, 1995, 44: 72-78.
 - 38 James A C, Stahlhofen W, Rudolf G, Briant J K, Egan M J, Nixon W, Birchall A, Annexe D. Deposition of inhaled particles. In *International Commission on Radiological Protection (ICRP) human respiratory tract model for radiological protection*, ICRP Publication 66, 1994. Oxford, UK: Pergamon Press.
 - 39 Ichinose T, Yoshida S, Hiyoshi K, Sadakane K, Takano H, Nishikawa M, Mori I, Yanagisawa R, Kawazato H, Yasuda A, and Shibamoto T. The effects of microbial materials adhered to Asian sand dust on allergic lung inflammation. *Arch Environ Contam Toxicol*, 2008, 55:348-357.
 - 40 Takafuji S, Nakagawa T. Air pollution and allergy. *J Investigol Clin Immunol*, 2000, 10(1): 5-10.
 - 41 Polosa R. The interaction between particulate air pollution and allergens in enhancing allergic and airway response. *Curt Allergy Asthma Rep*, 2001, 1(2): 102-107.
 - 42 Wang H, Zhuang Y, Wang Y, Sun Y, Yuan H, Zhuang G, Hao Z. Long-term monitoring and source apportionment of PM_{2.5}/PM₁₀ in Beijing, *China*. *J Environ Sci*, 2008, 20:1323-1327.
 - 43 Standiford T J, Kunkel S L, Lukacs N W, Greenberger M J, Danforth J M, Kunkel R G, Strieter R M. Macrophage inflammatory protein-1 alpha mediates lung leukocyte recruitment, lung capillary leak, and early mortality in murine endotoxemia. *J. Immunol*. 1995, 155: 1515-1524.
 - 44 Young SH, Robinson VA, Barger M, Porter DW, Frazer DG, Castranova V. Acute

- inflammation and recovery in rats after intratracheal instillation of a 1 $\rightarrow$ 3-beta-glucan (zymosan A). *J Toxicol Environ Health A*, 2001, 64: 311-325.
- 45 Goulaouic S, Foucaud L, Bennasroune A, Laval-Gilly P, Falla J. Effect of polycyclic aromatic hydrocarbons and carbon black particles on pro-inflammatory cytokine secretion: impact of PAH coating onto particles. *J Immunotoxicol*, 2008, 5: 337-345.
 - 46 Hayashi T, Adaehi Y, Hasegawa K, et al. Less sensitivity for late airway inflammation in males than females in BALB/c mice. *Scand J Immunol*, 2003, 57(6): 562-568.
 - 47 Robinson DS, Humid Q, Ying S, et al. Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N Engl J Med*. 1992, 326(5): 298-304.
 - 48 Moverare R, glfinan L, Stahnheim E, et al. Study of the Th1 / Th2 balance, including IL-10 production, in cultures of peripheral blood mononuclear cells from birch-pollen-allergic patients *Allergy*, 2000, 55(2): 171-175
 - 49 Humbert M, Corrigan CJ, Kiwitt P, et al. Relationship between IL-4 and IL-5 mRNA expression and di sease severity in atopic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1997, 156: 704-708.
 - 50 Bergeron C, Pag6 N, Joubert P, et al. Regulation of procollagen I (alpha1) by interleukin-4 in human bronchial fibroblasts: a possible role in airway remodeling in asthma. *Clin Exp Allergy*, 2003, 33: 1389-1397.
 - 51 Shi HZ, Xiao Cq Zhong D, et al. Effect of inhaled interleukin-5 On airway hyperreactivity and eosinophilia in asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998, 157: 204-209.
 - 52 施焕中, 肖常青, 梁国容等. 白细胞介素-5 可致哮喘患者气道反应性增高. *中华结核和呼吸杂志*, 1998, 21(1): 48.
 - 53 Nakano T, Inoue H, Fukuyama S, et al. Niflumic Acid Suppresses Interleukin-13-Induced Asthma Phenotypes. *Am J Respir Crit Care Med*, 2006; 173(11): 1216-1221.
 - 54 Glare E M, Divjak M, Bailey M J, et al. The usefulness of competitive PCR: airway gen express of IL-4, IL-5, IL-12 and IFN- γ in the asthma. *Thorax*, 2001, 56: 541-548.
 - 55 Contoli M, et al. Role of deficient type III interferon-lambda production in asthma exacerbations. *Nat. Med*. 2006, 12: 1023-1026.
 - 56 Hiyoshi K, Ichinose T, Sadakane K, Takano H, Nishikawa M, Mori I, Yanagisawa R, Yoshida S, Kumagai Y, Tomura S, Shibamoto T. Asian sand dust enhances ovalbumin-induced eosinophil recruitment in the alveoli and airway of mice. *Environ Res*, 2005, 99:361-368.
 - 57 Knapp S, Florquin S, Golenbock D T, van der Poll T. Pulmonary lipopolysaccharide (LPS)-binding protein inhibits the LPS-induced lung inflammation in vivo. *J Immunol*, 2006, 176: 3189-3195.

- 58 Hearn V M, Sietsma J H. Chemical and immunological analysis of the *Aspergillus fumigatus* cell wall. *Microbiology*, 1994, 140: 789-795.
- 59 Ernst H, Rittinghausen S, Bartsch W, Creutzenberg O, Dasenbrock C, Gorlitz B D, Hecht M, Kairies U, Muhle H, Muller M, Heinrich U, Pott F. Pulmonary inflammation in rats after intratracheal instillation of quartz, amorphous SiO₂, carbon black, and coal dust and the influence of poly-2-vinylpyridine-N-oxide (PVNO). *Exp Toxicol Pathol*, 2002, 54: 109-126.
- 60 Mancino D, Ovary Z. Adjuvant effects of amorphous silica and of aluminium hydroxide on IgE and IgG1 antibody production in different inbred mouse strains. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 1980, 61: 253-258.
- 61 Yanagisawa R, Takano H, Inoue K I, Ichinose T, Sadakane K, Yoshino S, Yamaki K, Yoshikawa T, Hayakawa K. Components of diesel exhaust particles differentially affect Th1/Th2 response in a murine model of allergic airway inflammation. *Clin Exp Allergy*, 2006 36: 386-395.
- 62 王式功, 董光荣, 陈惠忠, 等. 沙尘暴研究的进展. *中国沙漠*, 2000, 20(4): 349-356.
- 63 Dale W G. Atmospheric Movement of Microorganisms in Clouds of Desert Dust and Implications for Human Health. *Clinical Microbiology Reviews*, 2007, 7: 459-477.
- 64 张宁, 倾继祖, 黄维, 等. 沙尘暴对大气背景值的影响及遥感技术应用研究. *甘肃环境研究与监测*, 1997, 10(3): 14-19.
- 65 Yang CY, Tsai S S, Chang C C, Ho S C. Effects of Asian dust storm events on daily admissions for asthma in Taipei, Taiwan. *Inhal Toxicol*, 2005, 17: 817-821.
- 66 17. Sato T. The study on the Change of Symptoms in Allergic Rhinitis during Asian Sand Dust Phenomenon. *Jibi Ryensyuu* (in Jananese), 2009, 102:831-839.
- 67 Ichinose T, Hiyoshi K, Yoshida S, Takano H, Inoue K, Nishikawa M, Mori I, Kawazato H, Yasuda A, Shibamoto T. Asian sand dust aggravates allergic rhinitis in guinea pigs induced by Japanese cedar pollen. *Inhal Toxicol*, 2009 21: 985-993.
- 68 孟紫强, 胡敏, 郭新彪, 李德鸿, 潘小川. 沙尘暴对人体健康影响的研究现状. *中国公共卫生*, 2003, 19 (4): 471-472.
- 69 秋长珉. 黄沙对韩国的影响及预防对策. *社会-经济展望*, 2005 年夏季号, 63-68.
- 70 Sugita M, Kuribayashi K Nakagomit, *et al.* Allergic bronchial asthma-airway inflammation and hyperresponsiveness. *Intern Med*, 2003, 42(8): 636-643.
- 71 Shen Huahao. Eosinophil: central mediator of allergic asthma? *Chin Med J*, 2005, 118(1): 4-5.
- 72 Gleich G J. The eosinophil and bronchial asthma: current understanding. *J Allergy Clin Immunol*, 1990, 85: 422-436.
- 73 Solarewicz-Madejek K, Basinski T M, Cramer R, Akdis M, Akkaya A, Blaser K, Rabe K F, Akdis CA, Jutel M. T cells and eosinophils in bronchial smooth muscle cell death in asthma.

Clin Exp Allergy, 2009, 39: 845–855.

- 74 Busse W W, Lemanske R F Jr. Asthma. N. Engl. J. Med. 2001, 344:350–62.
- 75 Huang T J, MacAry P A, Eynott P, Moussavi A, Daniel K C, *et al.* Allergen-specific Th1 cells counteract efferent Th2 cell-dependent bronchial hyperresponsiveness and eosinophilic inflammation partly via IFN- γ . J. Immunol. 2001, 166: 207-217.
- 76 Randolph D A, Stephens R, Carruthers C J, Chaplin D D. Cooperation between Th1 and Th2 cells in a murine model of eosinophilic airway inflammation. J. Clin. Invest. 1999, 104: 1021-1029.
- 77 Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. Nature Reviews Immunology, 2001, 1: 135.
- 78 Martinon F, Hofmann K, Tschopp J. The pyrin domain: a possible member of the death domain-fold family implicated in apoptosis and inflammation. Current Biology, 2001, 11 (4): 118-120.
- 79 Srinivasula S M, Poyet J L, Razmara M, Datta P, Zhang Z, Alnemri, E S. The PYRIN-CARD protein ASC is an activating adaptor for caspase-1. The Journal of Biological Chemistry, 2002 277 (24): 21119-21122.
- 80 Thornberry N A, Bull H G, Calaycay J R. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 β processing in monocytes. Nature, 1992, 356 (6372): 768-774.
- 81 Mariathasan S, Weiss D S, Newton K, McBride J, O'Rourke K. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. Nature, 2006, 440: 228-232.
- 82 Kanneganti T D, Ozoren N, Body-Malapel M, Amer A, Park, J H. Bacterial RNA and small antiviral compounds activate caspase-1 through cryopyrin/Nalp3. Nature, 2006, 440: 233-236.
- 83 Akira S, Takeda K. Functions of toll-like receptors: lessons from KO mice. C R Biol, 2004, 327: 581-589.
- 84 Caramalho I, Lopes Carvalho T, Ostler D, *et al.* Regulatory T cells selectively express Toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide. J Exp Med, 2003, 197: 403-411.
- 85 Eicher S D, McMunn K A, Hammon H M, *et al.* Toll-like receptors 2 and 4, and acute phase cytokine gene expression in dexamethasone and growth hormone treated dairy calves. Vet Immunol Immunopathol, 2004, 98(324):115-125.
- 86 Schwandner R, Dziarski R, Wesche H, Rothe M, Kirschning C J. Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. J Biol Chem, 1999 274: 17406–17409.
- 87 Beutler B. TLR4 as the mammalian endotoxin sensor. Curr Top Microbiol Immunol, 2002, 27: 109-120.
- 88 Redecke V, Häcker H, Datta S K, Fermin A, Pitha P M, Broide D H, Raz E. Cutting edge: activation of Toll-like receptor 2 induces a Th2 immune response and promotes experimental asthma. J Immunol, 2004, 172: 2739–2743.

- 89 李鸿佳, 王淑娟, 李艳丽。董亮不同剂量脂多糖预处理对哮喘小鼠肺部炎症的影响的研究。细胞与分子免疫学杂志, 2008, 24 (10): 1008-1010。
- 90 Aganna E, Martinon F, Hawkins P N. Association of mutations in the NALP3/CIAS1/PYPAF1 gene with a broad phenotype including recurrent fever, cold sensitivity, sensorineural deafness, and AA amyloidosis. *Arthritis & Rheumatism*, 2002, 46 (9): 2445-2452.
- 91 Anderson J P, Mueller J L, Rosengren S. Cutting edge: CIAS1/cryopyrin/PYPAF1/NALP3/CATERPILLER 1.1 is an inducible inflammatory mediator with NF- κ B suppressive properties. *The Journal of Immunology*, 2003, 171 (12): 6329-6333.
- 92 Jos'e F G, Marco A J, Sandra R, Mario E C, Francisco G, Juan C C. The NALP3/Cryopyrin-Inflammasome Complex is Expressed in LPS-Induced Ocular Inflammation. *Mediators of Inflammation* doi:10.1155/2008/614345.
- 93 O'Connor W J, Harton JA, Zhu X, Linhoff M W, Ting J Y. Cutting edge: CIAS1/cryopyrin/PYPAF1/NALP3/CATERPILLER 1.1 is an inducible inflammatory mediator with NF- κ B suppressive properties. *The Journal of Immunology*, 2003, 55 (5): 6329-6333.
- 94 Shiohara M, Taniguchi S, Masumoto J. ASC, which is composed of a PYD and a CARD, is up-regulated by inflammation and apoptosis in human neutrophils. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2002, 293 (5): 1314-1318.
- 95 Mariathasan S, Newton K, Monack D M. Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. *Nature*, 2004, 430 (6996): 213-218.
- 96 Sutterwala F S, Ogura Y, Szczepanik M, Lara-Tejero M, Lichtenberger G S, Grant E P, Bertin J, Coyle A J, Galan J E, Askenase P W, Flavell R A. Critical role for NALP3/CIAS1/cryopyrin in innate and adaptive immunity through its regulation of caspase-1. *Immunity*, 2006, 24: 317-327.
- 97 Mariathasan S, Weiss D S, Newton K, McBride J, O'Rourke K, Roose-Girma M, Lee W P, Weinrauch Y, Monack D M, Dixit V M. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature*, 2006, 440: 228-232.
- 98 Fayyaz S S, Yasunori O, Richard A F. The inflammasome in pathogen recognition and inflammation. *Journal of Leukocyte Biology*, 2007, 82: 259-264.
- 99 Li P, Allen H, Banerjee S. Mice deficient in IL-1 β -converting enzyme are defective in production of mature IL-1 β and resistant to endotoxic shock. *Cell*, 1995, 80 (3): 401-411.
- 100 Kanneganti T D, O'zoren N, Body-Malapel M. Bacterial RNA and small antiviral compounds activate caspase-1 through cryopyrin/Nalp3. *Nature*, 2006, 440 (7081): 233-236.
- 101 Alan A. Interleukin-1 β Targeted Therapy in Severe Persistent Asthma (SPA) and Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD): Proposed Similarities between Biphasic Pathobiology of SPA/COPD and Ischemia-Reperfusion Injury. *Allergy and Clinical*

Immunology, 2008, 10: 837-842.

- 102 Ogura Y, Sutterwala F S, Flavell R A. The inflammasome: first line of the immune response to cell stress. *Cell*, 2006, 126: 659-662.
- 103 Dostert C, Pétrilli V, Van Bruggen R, Steele C, Mossman B T, Tschopp J. Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science*, 2008, 320: 674-677.
- 104 Nambu A, Nakae S, Iwakura Y. IL-1beta, but not IL-1alpha, is required for antigen-specific T cell activation and the induction of local inflammation in the delayed-type hypersensitivity responses, 2006, 18: 701-712.

肺部炎症疾病中的细胞因子作用研究进展

细胞因子(cytokine)是由多种结构细胞(包括上皮细胞、内皮细胞、平滑肌细胞、成纤维细胞和炎性细胞等)分泌的小分子蛋白,它们与各自的穿膜受体结合发挥作用,调节炎性细胞的移动和活性。目前已经确认大约有 50 多种细胞因子在肺部炎症中发挥作用,根据其结构和功能将这些细胞因子分为 6 类:①淋巴因子(lymphokine)是由淋巴细胞产生且调节免疫反应的细胞因子;②干扰素(interferon, IFN)是最早发现的细胞因子,因其具有干扰病毒感染和复制的能力故称干扰素;③肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)是 Garwell 等在 1975 年发现的一种能使肿瘤发生出血坏死的物质;④集落刺激因子(colony stimulating factor, CSF)是指能够刺激多能造血干细胞和不同发育分化阶段的造血祖细胞增殖分化,在半固体培养基中形成相应细胞集落的细胞因子;⑤生长因子(growth factor)是具有刺激细胞生长作用的细胞因子;⑥趋化性细胞因子(chemokine)是招募血液中的单核细胞、中性粒细胞、淋巴细胞等进入感染发生的部位,导致炎症细胞出现趋化现象的细胞因子。

哮喘(asthma)是由多种细胞特别是肥大细胞、嗜酸性粒细胞和T淋巴细胞参与的慢性气道炎症,在易感者中此种炎症可引起反复发作的喘息气促、胸闷和(或)咳嗽等症状,气道对多种刺激因子反应性增高。慢性阻塞性肺疾病(COPD)是一种具有气流受限特征的疾病,气流受限不完全可逆,呈进行性发展,与肺部对有害气体或有害颗粒的异常炎症反应有关。COPD是一种累及全部气道、肺泡壁和肺部血管的慢性炎症。本文以哮喘和COPD为例对细胞因子的国内外最新的研究进展作一综述。

一、淋巴因子

淋巴因子主要包括由 T 淋巴细胞释放的细胞因子,在哮喘炎症的调节上发挥重要的作用,而且是 COPD 患者炎症中观察到的主要的细胞因子。在哮喘和 COPD 患者的呼吸道中检测到浸润的 T 淋巴细胞分泌不同种类的细胞因子,这些细胞因子通过募集不同种类的炎症细胞和对呼吸道结构细胞的不同调节作用而与这两种

疾病中不同种类的炎症相关。

(一) Th2 细胞因子

Th2 细胞因子是由初始 CD4⁺T 细胞分化的 Th2 细胞所分泌的细胞因子。哮喘患者的呼吸道中 CD4⁺T 细胞增加,而且主要是 Th2 细胞¹。Th2 细胞主要分泌白细胞介素(Interleukin, IL)-4、IL-5、IL-9 和 IL-13。转录因子 GATA 结合蛋白 3(GATA3)调节初始 T 细胞分化为 Th2 细胞和 Th2 细胞因子的分泌²。缓解期哮喘患者的呼吸道中 GATA3⁺T 细胞数量明显增加³。经由抗原提呈细胞与 T 细胞抗原受体和 T 细胞辅助受体相连接后, GATA3 被 p38 MAPK 磷酸化激活,导致细胞质及细胞核移位,激活 Th2 细胞特征性的转录基因⁴。活化 T 细胞的核因子是 T 细胞特异性的转录因子,通过 GATA3 提高启动子 *IL4* 的转录活性²。最后, IL-33, IL-1 家族细胞因子之一,通过核转位及染色质结构而调节转录,促进 Th2 细胞分化⁵;但是同时也选择性趋化 Th2 细胞⁶。尽管 COPD 被认为是 I 型免疫疾病¹,但是在 COPD 患者中也能检测到 Th2 细胞因子增加;例如, IL-4 表达增加被认为是来自于支气管肺泡灌洗液的 CD8⁺T(Tc2)细胞⁷。

IL-4 在未分化的 Th0 细胞向 Th2 细胞分化的过程中至关重要,可能在抗原初始致敏中发挥重要作用。在 B 细胞由产生 IgG 向产生 IgE 的同型转换中也发挥重要作用。IL-13 模拟 IL-4 诱导 IgE 分泌并且导致呼吸道结构改变,但是在促进 Th2 细胞分化的过程中并不发挥作用⁸。IL-13 通过由 IL-4 受体 α 链(IL-4R α)和特殊的 IL-13 结合链(IL-13R α)组成的异源二聚体进行信号传导;IL-4R α 的使用取决于 IL-4R α 和 IL-13R α 的共用作用且受 STAT6 的激活作用调节。IL-13 也与不出现在信号转导中且被认为是诱骗受体的 IL-13R α 2 结合。在哮喘病的治疗中 IL-13 作为治疗靶项备受关注,在哮喘的动物模型中 IL-13 不仅能诱导气道高反应性而且产生在慢性哮喘中常见的几种结构变化,如高脚杯细胞增殖,呼吸道平滑肌增生和上皮纤维化⁹。IL-13 通过刺激多种趋化性细胞因子的表达而诱导炎症,如来自于呼吸道结构细胞(上皮细胞)的嗜酸性粒细胞活化趋化性细胞因子(CCL11)。IL-13 在呼吸道上皮通过激活 STAT6 而诱导气道高反应性和粘液高分泌⁹,增加酸性哺乳动物几丁酶表达¹⁰。实际上,酸性哺乳动物几丁酶的中和作用抑制 IL-13 介导的气道高反应性和 Th2 炎症反应。除了 Th2 细胞外,其他类型的 T

细胞（包括 Th1 细胞，Tc2 细胞和 NKT 细胞）和炎症细胞（肥大细胞，嗜碱性粒细胞和嗜酸性粒细胞）也产生 IL-13。在哮喘患者呼吸道中 IL-13 的表达增加，而严重的 COPD 患者中 IL-13 的表达减少¹¹。抗原激发后，肺泡灌洗液中 IL-4 表达瞬间增加，而 IL-13 的表达持续且与呼吸道中嗜酸性粒细胞的数目相关¹²。哮喘患者的血清和肺中几丁酶样蛋白水平增加，可能反应 IL-13 表达增加¹³。Pitrakinra 重组白介素 IL-4 的变异体通过阻断 IL-4 和 IL-13 与 IL-4 α 受体复合物的结合来抑制哮喘患者皮下注射抗原或吸入抗原后的 Th2 介导的变应性炎症¹⁴。

IL-5 在嗜酸性粒细胞介导的炎症反应中发挥重要作用，IL-5 与骨髓前体细胞向嗜酸性粒细胞的分化密切相关且能延长嗜酸性粒细胞的存活。哮喘患者全身注射 IL-5 后导致循环中嗜酸性粒细胞和 CD34⁺ 嗜酸性粒细胞前体数明显增多¹⁵。在实验动物中，IL-5 的特殊封闭抗体能够减少肺部的嗜酸性粒细胞并且抑制抗原反应。在哮喘患者中人的 IL-5 特殊封闭抗体(mepolizumab)能显著减少循环中和痰液中的嗜酸性粒细胞数但是对于抗原反应或气道高反应性没有抑制作用。哮喘发作期患者中，mepolizumab 尽管能显著减少循环中的嗜酸性粒细胞数但没有临床效应¹⁶。但是，mepolizumab 并不能完全消除呼吸道中的嗜酸性粒细胞，这可能说明了为什么 mepolizumab 没有临床作用¹⁷。

IL-9 在小鼠中过度表达引起嗜酸性粒细胞介导的炎症，粘液增生，肥大细胞增多症，气道高反应性且增加其他 Th2 细胞因子和 IgE 的表达¹⁸。抗原激发后的敏感小鼠中 IL-9 阻滞能够抑制肺部嗜酸性粒细胞增多症，粘液过度分泌和气道高反应性。哮喘患者呼吸道中 IL-9 及其受体表达增多¹⁸。小鼠中许多 IL-9 的效应（嗜酸性粒细胞炎症和粘液过度分泌）通过 IL-13 的释放所介导，其对于肥大细胞扩张和 B 细胞的作用更直接¹⁹。IL-9 在肥大细胞的分化和增殖及与 SCF 的交互作用中具有重要作用。

（二）Th1 和 Tc1 细胞因子

转录因子 T-bet 在 Th1 细胞分化和分泌 Th1 细胞因子 IFN- γ 的过程中有重要作用。在哮喘病中 T-bet 与 Th2 细胞的显著作用相一致，与未患哮喘的人相比哮喘患者呼吸道 T 细胞中 T-bet 表达减少²⁰。T-bet 磷酸化后，与 GATA3 结合通过阻

止 GATA3 与 DNA 靶序列结合而抑制其功能²¹。接下来 GATA3 通过抑制 STAT4 而抑制 Th1 细胞因子的产生, STAT4 是由 IL-12 产生的 T-bet 所激活的主要的转录因子²²。Th1 细胞主要是 CD4⁺T 细胞, 在肺 COPD 患者中主要表达的 CD8⁺T 细胞是 Tc1 细胞²³, 但是它们在 COPD 的发病过程中的作用并不清楚。

IFN- γ 是由 Th1 细胞和 Tc1 细胞分泌的主要的细胞因子, 通过释放趋化因子在 COPD 患者炎症中发挥重要作用。相反, 尽管在疾病危重症和急性加重期患者中 IFN- γ 表达水平提高, 但是在哮喘患者中其表达减少²⁴。IFN- γ 通过 STAT1 激活 T-bet 而导致编码 Th1 细胞因子的基因表达而编码 Th2 细胞因子的基因受到抑制²⁵。IFN- γ 通过上调 Th1 细胞和 Tc1 细胞的趋化因子受体 CXCR3 和释放 CXCR3 激活细胞因子 CCL9 (也称作 Mig), CCL10 (也称作 IP-10) 和 CCL11 (也称作 I-TAC), 在 COPD 患者肺部 Th1 细胞和 Tc1 细胞浸润中也有重要作用²³。与此相一致, 在 COPD 患者呼吸道中分泌 IFN- γ 的 T 细胞数目增加²⁶。

(三) IL-12 和相关细胞因子

IL-12 由巨噬细胞, 树突状细胞和呼吸道上皮细胞产生, 在 Th1 细胞分化和激活过程中有重要作用²⁷。IL-12 诱导 T 细胞分泌 IFN- γ , 调节 IL-12R β 2 的表达因而维护 Th1 细胞分化, 但是 IL-4 抑制 IL-12R β 2 的表达因而对抗 Th1 细胞分化。在哮喘患者中有全血细胞释放的 IL-12 水平很低, 表明可能 IL-12 的分泌降低²⁸。轻度哮喘患者中重组 IL-12 导致循环中的嗜酸性粒细胞进行性减少但是在抗原反应和气道高反应性中并不减少²⁹。IL-12 是由 p40 和 p35 亚单位组成的异二聚体, p40 也是组成 IL-23 的亚单位。p40 亚单位也形成 IL-12 p80 同源二聚体, 且 p40 和 IL-12 p80 单体通过与 IL-12R β 1 结合成为 IL-12 和 IL-23 的功能拮抗剂³⁰。但是通过激活 IL-12R β 1 它们具有促炎症作用, 导致例如巨噬细胞趋化作用³⁰。IL-12 的大部分作用均由 STAT4 的激活所介导, STAT4 在 COPD 患者呼吸道和肺泡灌洗液的淋巴细胞中被磷酸化²⁶。

IL-18 原来被认为是 IFN- γ 释放因子, 具有与 IL-12 不同的激活机制, 可能不依赖于 IL-12 而增强 Th1 反应³¹。IL-12 和 IL-18 在诱导 IFN- γ 释放和抑制依赖于 IL-4 的 IgE 产生及 AHR 方面具有协同作用。在 COPD 患者中, IL-18 在肺泡巨噬细胞中和呼吸道 CD8⁺T 细胞中表达增加, 且与病情相关³²。

IL-27 是 IL-12 家族成员之一,通过依赖于 STAT1 而不依赖于 IL-12 的机制促进 Th1 细胞分化³³。它由激活的抗原呈递细胞产生,通过下调 GATA3 的表达及上调 T-bet 的表达而增强 Th1 反应,从而促进 Th1 细胞因子的表达,而进一步抑制 GATA3 的表达³⁴。IL-27 在哮喘和 COPD 中的作用正在研究中。

(四) IL-17 细胞因子

Th17 细胞是 CD4⁺T 细胞的亚群,在炎症疾病中发挥重要作用,被转录因子维甲酸孤立受体(ROR γ t)调节³⁵。在人 Th17 细胞的分化中包括 IL-6, IL-1 β , TGF- β 和 IL-23^{35,36}。Th17 细胞在哮喘和 COPD 中的作用还不清楚,但是在哮喘患者痰中 IL-17A (Th17 细胞的主要产物)增加³⁷,呼吸道中 Th17 细胞增加³⁸。通过诱导呼吸道上皮细胞和呼吸道平滑肌细胞释放中性粒细胞趋化因子 CXCL1 和 CXCL8, IL-17A 及与其紧密相关的 IL-17F 与中性粒细胞介导的炎症相关联³⁹,因此可能在哮喘和 COPD 中性粒细胞炎症发挥作用⁴⁰。在人呼吸道上皮细胞中 IL-17 增加粘蛋白编码基因 (MUC5AC 和 MUC5B) 的表达⁴¹。但是 IL-17 在哮喘中的功能性作用还不清楚,在变应原致敏的动物模型中包括 IL-17,但是抑制过敏动物的嗜酸性粒细胞炎症⁴⁰。

Th17 细胞也产生 IL-21,对于 Th17 细胞分化具有重要作用因而是一种积极的自身调节因子⁴²。IL-21 也抑制叉头样转录因子 P3 (FOXP3)的表达因而影响调节性 T 细胞的进程⁴²。IL-22 也是由 Th17 细胞产生,刺激 IL-10 和急性时相蛋白的产生。我们还需要进一步研究证明 Th17 细胞在哮喘和 COPD 中的作用及其调节,在未来的治疗中它们可能是新的重要的靶目标。

IL-25 (也叫 IL-17E) 是 IL-17 超级家族的另外一个成员,由 Th2 细胞,肥大细胞和上皮细胞分泌。IL-25 诱导 IL-4, IL-5 和 IL-13 的表达,导致由嗜酸性粒细胞介导的炎症,增加 IgE 的表达和小鼠的气道高反应性⁴³。它也促进人类 Th2 细胞分泌 Th2 细胞因子⁴⁴。IL-25 特异性封闭抗体抑制小鼠抗原反应中的气道高反应性的进展和临床上哮喘的进展⁴⁵。

(五) 致炎性细胞因子

在哮喘患者的呼吸道中 IL-1 β 表达增加,且激活许多在哮喘中表达的炎症基因。小鼠 IL-1 受体拮抗剂 (IL-1Ra) 给药能够减少抗原诱导的气道高反应性,但

是人重组的 IL-1Ra (Anakinra) 对于哮喘的治疗没有作用⁴⁶。COPD 患者中 IL-1 β 显著激活巨噬细胞分泌炎症细胞因子, 趋化性细胞因子和基质金属蛋白酶⁴⁷, 目前封闭 COPD 患者中 IL-1 β 的抗体的疗效正在研究之中。

通常 IL-6 和其他细胞因子共同作用, 为机体天然免疫和获得性免疫提供关联。哮喘患者肥大细胞激活后痰中的 IL-6 含量增加⁴⁸。可能在 Th2 和 Th17 细胞扩增中发挥作用, 因此在哮喘中具有导致炎症作用。COPD 患者, 特别是加重期患者的痰, 呼出气和血浆中 IL-6 含量增加⁴⁹。肝脏中 IL-6 释放 c 反应蛋白, 可能与 COPD 患者的全身症状如肌无力和内皮功能障碍相关。

人胸腺基质淋巴细胞生成素(TSLP)是属于 IL-7 家族的细胞因子, 在哮喘病患者呼吸道上皮和肥大细胞中的表达明显增加⁵⁰。呼吸道上皮细胞释放 TSLP, 它与 IL-1 β 和 TNF- α 协同相互作用导致肥大细胞不依赖于 T 细胞独立释放 Th2 细胞因子⁵¹。TSLP 在气道树突状细胞的形成的过程中发挥重要作用, 释放 CCL17 和 CCL22 细胞趋化因子, 对于 Th2 细胞在呼吸道中的募集很重要⁵²。TSLP 也直接刺激 CD4⁺T 细胞释放 Th2 细胞因子。OX40 配体在介导 TSLP 诱导变态反应性炎症中发挥重要作用, 非人灵长类和小鼠中就像该受体的特异性封闭抗体一样完全抑制 TSLP 诱导的 Th2 细胞激活⁵³。

二、干扰素

根据来源和理化性质, 干扰素分为 α 、 β 、 γ 和 λ 四种类型。IFN- α 有十几种亚型。IFN- α 和 IFN- β 主要由浆细胞样树突状细胞及病毒感染的细胞产生, 合称为 I 型干扰素。IFN- γ 主要由活化 T 细胞和 NK 细胞产生, 也称为 II 型干扰素。IFN- λ 为 III 型干扰素。

I 型 IFNs(IFN- α 和 IFN- β) 和 III 型 IFNs(IFN- λ) 在对抗病毒感染的天然免疫中发挥重要作用, 但是在哮喘患者上皮细胞中 IFN- β 和 IFN- λ 表达减少且与鼻病毒复制增加相关, 可能是哮喘患者病毒性加重的先兆^{54,55}。天然免疫中这些缺陷的分子机制还不清楚。在严重糖皮质激素抵抗的哮喘患者中低剂量的 IFN- α 有明显的效用, 但是机制不清楚⁵⁶。

三、肿瘤坏死因子

包括单核细胞, 肥大细胞, T 细胞, 上皮细胞和呼吸道平滑肌细胞在内的许

多细胞都能够分泌肿瘤坏死因子。在哮喘, COPD 和炎症反应加剧的患者的痰和肺泡灌洗液中发现致炎性细胞因子如 TNF- α , IL-1 β 及 IL-6 的含量增加, 可能他们通过激活 NF- κ B, 导致多种炎症基因表达增加。在其他慢性炎症疾病如类风湿关节炎和炎症性肠病中, 封闭这些细胞因子证明具有临床效应, 在呼吸道炎症疾病中证明同样的方法是否有用具有极大的价值。正常个体吸入 TNF- α 诱导气道高反应性和中性粒细胞介导的呼吸道炎症⁵⁷。TNF- α 直接作用于呼吸道平滑肌增强收缩气管的收缩反应且可能在哮喘的气道高反应性中发挥重要作用。过敏性哮喘患者气道中多种细胞, 特别是肥大细胞表达 TNF- α , 可能在通过激活 NF- κ B 而放大过敏性哮喘炎症中发挥重要作用⁵⁸。在难治性哮喘病人的小型研究中用依那西普(一种融合蛋白包括人 sTNFR 与人 IgG1 的 Fc 组件相关)封闭 TNF- α 能够减少 AHR 和提高肺功能⁵⁹。另外, 用英利昔(人 TNF- α 特异性嵌合抗体)封闭 TNF- α 能够缩短中度哮喘患者的加重期⁶⁰。COPD 患者雾化吸入高渗盐水诱导痰液中 TNF- α 水平增加, 特别是在加重期⁶¹。而且, 体重减少的 COPD 患者循环细胞释放的 TNF- α 增加。但是, 当英利昔的摄入量与治疗类风湿关节炎有效的剂量相一致时, 对于 COPD 患者的症状, 肺功能和运动能力并没有缓解作用⁶²。对于有恶病质的严重的 COPD 患者也没有任何作用⁶³。这些惊人的发现提示可能药物的剂量不能充分中和局部 TNF- α 的浓度, 或者其他的细胞因子更重要。在应用闭锁 TNF- α 功能的药物治疗的 COPD 患者中, 肺部感染和癌症的发病率增加, 可能抑制 TNF- α 对于已经患有肺部细菌感染和癌症的 COPD 患者有害的。

四、集落刺激因子

目前发现的集落刺激因子有粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、粒细胞集落刺激因子。此外, 红细胞生成素、干细胞生长因子、血小板生成素和 IL-11 也是重要的造血刺激因子。

GM-CSF 在中性粒细胞, 嗜酸性粒细胞和巨噬细胞的分化与存活中发挥作用, 而且与哮喘和 COPD 相关。它的受体由一个 α 链和一个 β 链组成, α 链是 GM-CSF 特异性受体, β 链也是 IL-3 和 IL-5 的受体组成部分。GM-CSF 主要由炎症刺激反应中的巨噬细胞, 表皮细胞和 T 细胞分泌。哮喘患者的呼吸道表皮细胞主要表达 GM-CSF, 可能在树突状细胞的条件下知道 Th2 免疫且延长嗜酸性粒细胞存活⁶⁴。

在 COPD 中肺泡巨噬细胞释放 GM-CSF, 对于增加呼吸道中的中性粒细胞和巨噬细胞的存活很重要⁶⁵。特别是在加重期的 COPD 患者的肺泡灌洗液中 GM-CSF 的浓度增加, 与中性粒细胞的数目增加相关⁶⁶

五、生长因子

呼吸道炎症相关的细胞因子能够促进炎症细胞的分化和存活, 或者导致结构细胞的增殖和激活, 在气道重塑中发挥重要作用。由于这些作用的结果, 在本综述中归结为生长因子。

干细胞因子(stem cell factor, SCF)是 c-kit 酪氨酸激酶受体的配体, 由呼吸道的结构细胞和炎症细胞所表达⁶⁷。SCF 由表皮细胞, 呼吸道平滑肌细胞, 内皮细胞, 成纤维细胞, 肥大细胞和嗜酸性粒细胞所产生。它是肥大细胞的关键生长因子, 促进其有 CD34⁺祖细胞产生。SCF 诱导肥大细胞的存活, 黏附, 趋化性和脱颗粒, 分泌组胺和类胰蛋白酶, 合成致炎性细胞因子和趋化因子。炎症刺激上调 SCF 且哮喘患者中呼吸道表皮细胞表达增加⁶⁷。小鼠中 SCF 诱导气道高反应性, SCF 的特异性闭锁抗体抑制抗原暴露后嗜酸性粒细胞介导的炎症和气道高反应性⁶⁸。伊马替尼, c-kit 的小分子抑制剂, 在致敏小鼠中抑制抗原诱导的肺部炎症和气道高反应性⁶⁹。目前报道了哮喘患者中的为阻断研究, 但是 SCF 特异性封闭抗体在体外减少哮喘患者的肺泡灌洗液中肥大细胞的趋化活性⁷⁰。

神经营养素是对于自主神经的功能, 增殖和存活具有重要作用的细胞因子。在感觉神经中, 神经营养素增加速激肽的反应性和表达。神经生长因子(NGF)可能由肥大细胞, 淋巴细胞, 巨噬细胞, 嗜酸性粒细胞以及结构细胞如上皮细胞, 成纤维细胞和呼吸道平滑肌细胞等产生。尽管神经营养素主要对于神经细胞起作用, 但是它们也可以作为炎症细胞的生长因子, 如增加肥大细胞的趋化性和嗜酸性粒细胞的存活^{71, 72}。在各种哮喘的动物模型如豚鼠, 大鼠和小鼠中, 神经营养素诱导气道高反应性, NGF 的特异性抗体或其受体 TrkA 均能抑制该诱导作用⁷¹。哮喘患者进一步抗原激发后肺泡灌洗液中 NGF 水平增加。

转化生长因子 β (TGF- β) 是一组细胞外分泌型信号多肽, 通过控制细胞的生长、增殖、分化、凋亡、移行等对机体的生理功能起到重要的调节作用, 在哮喘和 COPD 中具有重要作用。TGF- β 是多功能生长因子, 促进成纤维细胞和呼吸道平

滑肌细胞增殖, 细胞外基质(extracellular matrix, ECM)沉积, 上皮修复。通过氧化应激和蛋白酶作用由其前体产生 TGF- β 。TGF- β 也有免疫调节作用, 大部分通过 Tregs 诱导 FOXP3, 导致 Th1 和 Th2 细胞受抑制⁷³。特别是在过敏性哮喘患者气道的嗜酸性粒细胞中, TGF- β 1 的表达增加, 与上皮下纤维化相关联⁷⁴。据报重症哮喘患者 TGF- β 2 的表达增加⁷⁵。COPD 患者中小气道的呼吸道上皮细胞和巨噬细胞中 TGF- β 表达增加^{76, 77}。COPD 患者小气道的基因阵列法研究表明与 TGF- β 活性相关的分子包括血小板反应素(thrombospondin, TSP)和尿激酶型纤溶酶原激活物表达增加⁷⁸。TGF- β 的许多纤维化作用通过增加结缔组织生长因子分泌而介导, COPD 患者肺的基因芯片分析中表达增加⁷⁹。

表皮生长因子激活表皮生长因子受体酪氨酸激酶, 酪氨酸激酶也被 TGF- α 活化, 在哮喘和 COPD 患者的粘液分泌调节中发挥重要作用。人呼吸道上皮细胞中酪氨酸激酶被氧化应激激活, 而活化 THF- α 转换酶(TACE, 也叫作 ADAM-17)。TACE 酶切与细胞膜结合的 TGF- α 而释放可溶性细胞因子, 导致表皮生长因子受体磷酸化, 从而表达粘蛋白基因(MUC5AC and MUC5B)⁸⁰。哮喘病患者呼吸道上皮细胞中表皮生长因子受体表达增加, 与 MUC5A/C 表达增加相关⁸¹。COPD 患者的呼吸道中表皮生长因子和表皮生长因子受体表达增加, 呼吸道上皮细胞中相关细胞因子 heregulin 表达增加。

血管内皮生长因子在调节哮喘呼吸道中新血管的生长和血管外渗发挥重要作用⁸²。哮喘呼吸道中血管增加与血管内皮生长因子及其受体表达增加相关⁸³。但是在 COPD 患者的痰和肺中血管内皮生长因子的浓度降低⁸⁴。阻断血管内皮生长因子受体诱导肺内皮细胞凋亡和肺气肿的形成⁸⁵。

六、趋化性细胞因子

趋化性细胞因子对于哮喘和 COPD 患者从呼吸道循环招募炎症细胞具有重要作用⁸⁶。目前在哮喘和 COPD 中趋化因子的作用很受关注, 因为它们通过 GPCRs 的信号传导, 相对来讲研发小分子拮抗剂很容易⁸⁷。根据它们结合不同的受体, 分为 3 类: ①CC 趋化性细胞因子的近氨基端存在两个相邻的半胱氨酸(CC), 其受体被命名为 CC 趋化性细胞因子受体(CCRs); ②CXC 趋化性细胞因子的近氨基端存在 CXC(半胱氨酸—其他氨基酸—半胱氨酸)基序, 其受体被命名为 CXC 趋化性细胞因子受体

(CXCRs)；③CX3C趋化性细胞因子的近氨基端存在CXXXC(半胱氨酸-3个其他氨基酸-半胱氨酸)基序，其受体被命名为CX3C趋化性细胞因子受体(CX3CRs)。

(一) CC趋化性细胞因子受体

CCL2(也叫做单核细胞化学趋向蛋白-1, monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)在单核细胞和T细胞激活CCR。在COPD患者的痰,肺泡灌洗液和肺中CCL2的水平增加,CCL2在肺泡巨噬细胞,T细胞和表皮细胞中也表达^{88, 89}。CCL2是单核细胞有力的趋化因子,因此可能与COPD患者肺中巨噬细胞聚集相关。

CCR3主要在嗜酸性粒细胞中表达,介导几种细胞趋化因子的趋化反应,包括CCL11,CCL24(也叫做eotaxin-2),CCL26(也叫做eotaxin-3),CCL13(也叫做MCP-4)和CCL5(也叫做RANTES),在哮喘病患者中这些细胞因子的表达均增加⁹⁰。CCR3的小分子拮抗剂有效抑制暴露于抗原CCR3的小鼠肺部嗜酸性粒细胞炎症,可能对于嗜酸性粒细胞从骨髓细胞释放及其分化很重要⁹¹。而且,人Th2细胞和肥大细胞也表达CCR3。尽管CCL11十分受关注,但是CCL24和CCL26对于抗原暴露后延长嗜酸性粒细胞存活具有重要作用⁹²。慢性支气管炎加重期患者的呼吸道中CCR3和CCL11的表达上调,可能导致观察到这些患者中一些人痰嗜酸性粒细胞增多⁹³。尽管目前毒理学机制不清楚,但是已经研发出几种CCR3拮抗剂在临床上治疗哮喘。

抗原吸入刺激后,Th2细胞选择性表达CCR4,被哮喘呼吸道中的呼吸道表皮细胞和树突状细胞释放出来的CCL22和CCL17激活⁵⁰,进而在肺泡灌洗液中表达增加,与Th2细胞因子增加相关⁹⁴。Th2细胞也表达CCL8,但是在哮喘气道中CCL8及其配体CCL1(也叫做I-309)表达均不增加⁵⁰。

CCR5被CCL3(也叫做巨噬细胞炎性蛋白-1 α , MIP-1 α)CCL4(也叫做巨噬细胞炎性蛋白-1 β , MIP-1 β)和CCL5激活,它们在COPD患者肺中表达均增高。轻至中度COPD患者呼吸道和痰中T细胞表达CCR5增加^{95, 96}。Th1细胞和Tc细胞选择性表达CCR5,在COPD患者中有助于这些细胞向呼吸道募集²³。加重期COPD患者呼吸道和痰中CCL5表达增加,提示CCR5在加重期对于T细胞,嗜酸性粒细胞和巨噬细胞的募集具有一定作用⁹⁷。在哮喘呼吸道特别是呼吸道上皮和呼吸道平滑肌细胞中CCL5表达也增加⁹⁸。

(二) CXC趋化性细胞因子受体

CXCL8激活CXCR1, 且对于该细胞因子具有特异性, CXCR2也被几种相关的CXCL趋化因子激活, 包括CXCL1(也叫做GRO- α)和CXCL5(也叫做ENA-78)。COPD患者的痰中CXCL1和CXCL8的表达水平显著增加, 且与中性粒细胞所占增大相关⁸⁹。COPD加重期的患者CXCL8的表达进一步增加⁹⁰, COPD加重期的患者呼吸道表皮表达CXCL5显著增加¹⁰⁰。动物体内试验中CXCR2的小分子抑制剂SB225002阻断CXCL8和CXCL1对于中性粒细胞和单核细胞的趋化反应¹⁰¹。加重期哮喘患者的痰和呼吸道中CXCL8表达增加¹⁰², 感染导致哮喘加重¹⁰³, 与痰中中性粒细胞增多相关。

COPD患者外周气道的T细胞中CXCR3表达增加²³, 其被IFN- γ 产生的CXCL9, CXCL10和CXCL11激活。COPD患者痰中这些CXCR3细胞趋化因子表达增加且与疾病严重程度相关⁹⁶。COPD患者小呼吸道中支气管上皮细胞和平滑肌细胞中CXCL10表达增加¹⁰⁴。由于COPD患者Th1细胞和Tc1细胞产生IFN- γ , 就提供了潜在的放大的循环加重肺部T细胞蓄积。哮喘中CXCR3细胞趋化因子的作用并不是十分清楚, 但是呼吸道平滑肌细胞产生的CXCL10吸引肥大细胞, 表达CXCR3, 可能使哮喘呼吸道平滑肌中的肥大细胞数目增加¹⁰⁵。CXCR3可能在抗原刺激后T细胞募集中发挥作用¹⁰⁶。另一方面, CXCR3配体拮抗剂CCR3提示它们可能抑制嗜酸性粒细胞炎症¹⁰⁷。

Th2细胞优先表达CXCR4并被CXCL12(也叫做SDF-1 α)激活。CXCR4小分子抑制剂(AMD3100)减轻抗原吸入暴露致敏小鼠的炎症和AHR, 而这些反应与Th2细胞因子减少相关¹⁰⁸。CXCL12可能与来源于骨髓的嗜酸性粒细胞祖细胞的活化相关, 因为嗜酸性粒细胞表达CXCR4⁹¹。

(三) CX3C趋化性细胞因子受体

CX3CL1(也叫做fractalkine)是CX3C细胞趋化因子第三家族唯一的成员, 由TNF- α , IL-1 β 和IFN- γ 刺激后的呼吸道上皮细胞所产生¹⁰⁹。CX3CL1趋化单核细胞, T细胞和肥大细胞, 以细胞膜结合的方式发挥黏附分子的功能¹¹⁰。哮喘患者抗原刺激后肺泡灌洗液中的CX3CL1表达增加且表皮细胞和内皮细胞也增加¹¹¹。

综上所述, 多种细胞因子及炎症介质介导了肺炎症疾病, 这些细胞因子在炎症细胞向气道聚集、活化中起重要作用。并且这些细胞因子在体内的作用与细胞因子、化学因子和介质的网络密切相关; 细胞因子之间有许多生物学效应相互重叠, 相互促进或相互抑制, 细胞因子在体内的效应是这些相互作用的总和。研究

这些细胞因子在肺炎症疾病发病机制中的作用，有利于揭示发病的真正原因，进而为诊断、治疗提供新思路。

参考文献

- 1 Barnes, P.J. 2008. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nat. Rev. Immunol.* 8:183–192.
- 2 Ho, I.C., and Pai, S.Y. 2007. GATA-3 - not just for Th2 cells anymore. *Cell. Mol. Immunol.* 4:15–29.
- 3 Caramori, G., et al. 2001. Expression of GATA family of transcription factors in T-cells, monocytes and bronchial biopsies. *Eur. Respir. J.* 18:466–473.
- 4 Maneechotesuwan, K., et al. 2007. Regulation of Th2 cytokine genes by p38 MAPK-mediated phosphorylation of GATA-3. *J. Immunol.* 178:2491–2498.
- 5 Carriere, V., et al. 2007. IL-33, the IL-1-like cytokine ligand for ST2 receptor, is a chromatin-associated nuclear factor in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104:282–287.
- 6 Komai-Koma, M., et al. 2007. IL-33 is a chemoattractant for human Th2 cells. *Eur. J. Immunol.* 37:2779–2786.
- 7 Barczyk, A., et al. 2006. Cytokine production by bronchoalveolar lavage T lymphocytes in chronic obstructive pulmonary disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* 117:1484–1492.
- 8 Wills-Karp, M. 2004. Interleukin-13 in asthma pathogenesis. *Immunol. Rev.* 202:175–90.
- 9 Kuperman, D.A., et al. 2002. Direct effects of interleukin-13 on epithelial cells cause airway hyperreactivity and mucus overproduction in asthma. *Nat. Med.* 8:885–889.
- 10 Zhu, Z., et al. 2004. Acidic mammalian chitinase in asthmatic Th2 inflammation and IL-13 pathway activation. *Science.* 304:1678–1682.
- 11 Boutten, A., et al. 2004. Decreased expression of interleukin 13 in human lung emphysema. *Thorax.* 59:850–854.
- 12 Kroegel, C., Julius, P., Matthys, H., Virchow, J.C., Jr., and Luttmann, W. 1996. Endobronchial secretion of interleukin-13 following local allergen challenge in atopic asthma: relationship to interleukin-4 and eosinophil counts. *Eur. Respir. J.* 9:899–904.
- 13 Chupp, G.L., et al. 2007. A chitinase-like protein in the lung and circulation of patients with severe asthma. *N. Engl. J. Med.* 357:2016–2027.
- 14 Wenzel, S., Wilbraham, D., Fuller, R., Getz, E.B., and Longphre, M. 2007. Effect of an interleukin-4 variant on late phase asthmatic response to allergen challenge in asthmatic patients: results of two phase 2a studies. *Lancet.* 370:1422–1431.
- 15 Stirling, R.G., van Rensen, E.L., Barnes, P.J., and Chung, K.F. 2001. Interleukin-5 induces CD34(+) eosinophil progenitor mobilization and eosinophil CCR3 expression in asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 164:1403–1409.
- 16 Flood-Page, P., et al. 2007. A study to evaluate safety and efficacy of mepolizumab in patients with moderate persistent asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 176:1062–1071.
- 17 Flood-Page, P.T., Menzies-Gow, A.N., Kay, A.B., and Robinson, D.S. 2003. Eosinophil's role

- remains uncertain as anti-interleukin-5 only partially depletes numbers in asthmatic airways. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 167:199–204.
- 18 Zhou, Y., McLane, M., and Levitt, R.C. 2001. Interleukin-9 as a therapeutic target for asthma. *Respir. Res.* 2:80–84.
 - 19 Steenwinckel, V., et al. 2007. IL-13 mediates in vivo IL-9 activities on lung epithelial cells but not on hematopoietic cells. *J. Immunol.* 178:3244–3251.
 - 20 Finotto, S., et al. 2002. Development of spontaneous airway changes consistent with human asthma in mice lacking T-bet. *Science.* 295:336–338.
 - 21 Hwang, E.S., Szabo, S.J., Schwartzberg, P.L., and Glimcher, L.H. 2005. T helper cell fate specified by kinase-mediated interaction of T-bet with GATA-3. *Science.* 307:430–433.
 - 22 Usui, T., et al. 2006. T-bet regulates Th1 responses through essential effects on GATA-3 function rather than on IFNG gene acetylation and transcription. *J. Exp. Med.* 203:755–766.
 - 23 Grumelli, S., et al. 2004. An immune basis for lung parenchymal destruction in chronic obstructive pulmonary disease and emphysema. *PLoS Med.* 1:e8.
 - 24 Kumar, R.K., Webb, D.C., Herbert, C., and Foster, P.S. 2006. Interferon-gamma as a possible target in chronic asthma. *Inflamm. Allergy Drug Targets.* 5:253–256.
 - 25 Szabo, S.J., et al. 2002. Distinct effects of T-bet in TH1 lineage commitment and IFN-gamma production in CD4 and CD8 T cells. *Science.* 295:338–342.
 - 26 Di Stefano, A., et al. 2004. STAT4 activation in smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Eur. Respir. J.* 24:78–85.
 - 27 Trinchieri, G., Pflanz, S., and Kastelein, R.A. 2003. The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. *Immunity.* 19:641–644.
 - 28 van der Pouw Kraan, T.C., et al. 1997. Reduced production of IL-12 and IL-12-dependent IFN-gamma release in patients with allergic asthma. *J. Immunol.* 158:5560–5565.
 - 29 Bryan, S., et al. 2000. Effects of recombinant human interleukin-12 on eosinophils, airway hyperreactivity and the late asthmatic response. *Lancet.* 356:2149–2153.
 - 30 Cooper, A.M., and Khader, S.A. 2007. IL-12p40: an inherently agonistic cytokine. *Trends Immunol.* 28:33–38.
 - 31 Dinarello, C.A. 2007. Interleukin-18 and the pathogenesis of inflammatory diseases. *Semin. Nephrol.* 27:98–114.
 - 32 Imaoka, H., et al. 2008. Interleukin-18 production and pulmonary function in COPD. *Eur. Respir. J.* 31:287–297.
 - 33 Owaki, T., et al. 2005. A role for IL-27 in early regulation of Th1 differentiation. *J. Immunol.* 175:2191–2200.
 - 34 Yoshimoto, T., Yoshimoto, T., Yasuda, K., Mizuguchi, J., and Nakanishi, K. 2007. IL-27 suppresses Th2 cell development and Th2 cytokines production from polarized Th2 cells: a novel therapeutic way for Th2-mediated allergic inflammation. *J. Immunol.* 179:4415–4423.

- 35 Manel, N., Unutmaz, D., and Littman, D.R. 2008. The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgamma. *Nat. Immunol.* 9:641–649.
- 36 Volpe, E., et al. 2008. A critical function for transforming growth factor-beta, interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human T(H)-17 responses. *Nat. Immunol.* 9:650–657.
- 37 Bullens, D.M., et al. 2006. IL-17 mRNA in sputum of asthmatic patients: linking T cell driven inflammation and granulocytic influx? *Respir. Res.* 7:135.
- 38 Pene, J., et al. 2008. Chronically inflamed human tissues are infiltrated by highly differentiated th17 lymphocytes. *J. Immunol.* 180:7423–7430.
- 39 Dragon, S., et al. 2007. IL-17 enhances IL-1beta-mediated CXCL-8 release from human airway smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 292:L1023–L1029.
- 40 Schmidt-Weber, C.B., Akdis, M., and Akdis, C.A. 2007. TH17 cells in the big picture of immunology. *J. Allergy Clin. Immunol.* 120:247–254.
- 41 Chen, Y., et al. 2003. Stimulation of airway mucin gene expression by interleukin (IL)-17 through IL-6 paracrine/autocrine loop. *J. Biol. Chem.* 278:17036–17043.
- 42 Nurieva, R., et al. 2007. Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature.* 448:480–483.
- 43 Fort, M.M., et al. 2001. IL-25 induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-associated pathologies in vivo. *Immunity.* 15:985–995.
- 44 Wang, Y.H., et al. 2007. IL-25 augments type 2 immune responses by enhancing the expansion and functions of TSLP-DC-activated Th2 memory cells. *J. Exp. Med.* 204:1837–1847.
- 45 Ballantyne, S.J., et al. 2007. Blocking IL-25 prevents airway hyperresponsiveness in allergic asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 120:1324–1331.
- 46 Rosenwasser, L.J. 1998. Biologic activities of IL-1 and its role in human disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* 102:344–350.
- 47 Culpitt, S.V., et al. 2003. Impaired inhibition by dexamethasone of cytokine release by alveolar macrophages from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 167:24–31.
- 48 Erin, E.M., et al. 2008. Rapid anti-inflammatory effect of inhaled ciclesonide in asthma: a randomised, placebo-controlled study. *Chest.* Online publication ahead of print. doi:10.1378/chest.07-2575.
- 49 Bhowmik, A., Seemungal, T.A., Sapsford, R.J., and Wedzicha, J.A. 2000. Relation of sputum inflammatory markers to symptoms and lung function changes in COPD exacerbations. *Thorax* 55:114–120.
- 50 Ying, S., et al. 2005. Thymic stromal lymphopoietin expression is increased in asthmatic airways and correlates with expression of Th2-attracting chemokines and disease severity. *J.*

Immunol. 174:8183–8190.

- 51 Allakhverdi, Z., et al. 2007. Thymic stromal lymphopoietin is released by human epithelial cells in response to microbes, trauma, or inflammation and potently activates mast cells. *J. Exp. Med.* 204:253–258.
- 52 Liu, Y.J., et al. 2007. TSLP: an epithelial cell cytokine that regulates T cell differentiation by conditioning dendritic cell maturation. *Annu. Rev. Immunol.* 25:193–219.
- 53 Seshasayee, D., et al. 2007. In vivo blockade of OX40 ligand inhibits thymic stromal lymphopoietin driven atopic inflammation. *J. Clin. Invest.* 117:3868–3878.
- 54 Wark, P.A., et al. 2005. Asthmatic bronchial epithelial cells have a deficient innate immune response to infection with rhinovirus. *J. Exp. Med.* 201:937–947.
- 55 Contoli, M., et al. 2006. Role of deficient type III interferon-lambda production in asthma exacerbations. *Nat. Med.* 12:1023–1026.
- 56 Simon, H.U., Seelbach, H., Ehmann, R., and Schmitz, M. 2003. Clinical and immunologicaleffects of low-dose IFN-alpha treatment in patients with corticosteroid-resistant asthma. *Allergy.* 58:1250–1255.
- 57 Thomas, P.S., Yates, D.H., and Barnes, P.J. 1995. Tumor necrosis factor- α increases airway responsiveness and sputum neutrophils in normal human subjects. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 152:76–80.
- 58 Kips, J.C., Tavernier, J.H., Joos, G.F., Peleman, R.A., and Pauwels, R.A. 1993. The potential role of tumor necrosis factor α in asthma. *Clin. Exp. Allergy.* 23:247–250.
- 59 Berry, M.A., et al. 2006. Evidence of a role of tumor necrosis factor alpha in refractory asthma. *N. Engl.J. Med.* 354:697–708.
- 60 Erin, E.M., et al. 2006. The effects of a monoclonal antibody directed against tumour necrosis factor-alpha in asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 174:753–762.
- 61 Aaron, S.D., et al. 2001. Granulocyte inflammatory markers and airway infection during acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 163:349–355.
- 62 Rennard, S.I., et al. 2007. The safety and efficacy of infliximab in moderate-to-severe chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 175:926–934.
- 63 Dentener, M.A., et al. 2008. Effect of infliximabon local and systemic inflammation in chronicobstructive pulmonary disease: a pilot study.*Respiration.* 76:275–282. doi:10.1159/000117386.
- 64 Gajewska, B.U., Wiley, R.E., and Jordana, M. 2003. GM-CSF and dendritic cells in allergic airway inflammation: basic mechanisms and prospects for therapeutic intervention. *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy.* 2:279–292.
- 65 Culpitt, S.V., et al. 2003. Impaired inhibition by dexamethasone of cytokine release by alveolar macrophages from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit.*

Care Med. 167:24–31.

- 66 Balbi, B., et al. 1997. Increased bronchoalveolar granulocytes and granulocyte/macrophage colonystimulating factor during exacerbations of chronic bronchitis. *Eur. Respir. J.* 10:846–850.
- 67 Reber, L., Da Silva, C.A., and Frossard, N. 2006. Stem cell factor and its receptor c-Kit as targets for inflammatory diseases. *Eur. J. Pharmacol.* 533:327–340.
- 68 Berlin, A.A., Lincoln, P., Tomkinson, A., and Lukacs, N.W. 2004. Inhibition of stem cell factor reduces pulmonary cytokine levels during allergic airway responses. *Clin. Exp. Immunol.* 136:15–20.
- 69 Berlin, A.A., and Lukacs, N.W. 2005. Treatment of cockroach allergen asthma model with imatinib attenuates airway responses. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 171:35–39.
- 70 Olsson, N., Rak, S., and Nilsson, G. 2000. Demonstration of mast cell chemotactic activity in bronchoalveolar bronchoalveolar lavage fluid collected from asthmatic patients before and during pollen season. *J. Allergy Clin. Immunol.* 105:455–461.
- 71 Freund-Michel, V., and Frossard, N. 2008. The nerve growth factor and its receptors in airway inflammatory diseases. *Pharmacol. Ther.* 117:52–76.
- 72 Nassenstein, C., Kutschker, J., Tumes, D., and Braun, A. 2006. Neuro-immune interaction in allergic asthma: role of neurotrophins. *Biochem. Soc. Trans.* 34:591–593.
- 73 Wan, Y.Y., and Flavell, R.A. 2007. Regulatory T cells, transforming growth factor-beta, and immune suppression. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 4:271–276.
- 74 Minshall, E.M., et al. 1997. Eosinophil-associated TGF-beta1 mRNA expression and airways fibrosis in bronchial asthma. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 17:326–333.
- 75 Balzar, S., et al. 2005. Increased TGF-beta2 in severe asthma with eosinophilia. *J. Allergy Clin. Immunol.* 115:110–117.
- 76 de Boer, W.I., et al. 1998. Transforming growth factor beta1 and recruitment of macrophages and mast cells in airways in chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 158:1951–1957.
- 77 Takizawa, H., et al. 2001. Increased expression of transforming growth factor-beta1 in small airway epithelium from tobacco smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 163:1476–1483.
- 78 Wang, I.M., et al. 2008. Gene expression profiling in patients with chronic obstructive pulmonary disease and lung cancer. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 177:402–411.
- 79 Ning, W., et al. 2004. Comprehensive gene expression profiles reveal pathways related to the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101:14895–14900.
- 80 Shao, M.X., and Nadel, J.A. 2005. Neutrophil elastase induces MUC5AC mucin production in human airway epithelial cells via a cascade involving protein kinase C, reactive oxygen species,

and TNF-alpha-converting enzyme. *J. Immunol.* 175:4009–4016.

- 81 Takeyama, K., Fahy, J.V., and Nadel, J.A. 2001. Relationship of epidermal growth factor receptors to goblet cell production in human bronchi. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 163:511–516.
- 82 Siddiqui, S., et al. 2007. Vascular remodeling is a feature of asthma and nonasthmatic eosinophilic bronchitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 120:813–819.
- 83 Feltis, B.N., et al. 2006. Increased vascular endothelial growth factor and receptors: relationship to angiogenesis in asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 173:1201–1207.
- 84 Kanazawa, H., Asai, K., Hirata, K., and Yoshikawa, J. 2003. Possible effects of vascular endothelial growth factor in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Med.* 114:354–358.
- 85 Kasahara, Y., et al. 2000. Inhibition of VEGF receptors causes lung cell apoptosis and emphysema. *J. Clin. Invest.* 106:1311–1319.
- 86 Lukacs, N.W., Hogaboam, C.M., and Kunkel, S.L. 2005. Chemokines and their receptors in chronic pulmonary disease. *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy.* 4:313–317.
- 87 Donnelly, L.E., and Barnes, P.J. 2006. Chemokine receptors as therapeutic targets in chronic obstructive pulmonary disease. *Trends Pharmacol. Sci.* 27:546–553.
- 88 de Boer, W.I., et al. 2000. Monocyte chemoattractant protein 1, interleukin 8, and chronic airways inflammation in COPD. *J. Pathol.* 190:619–626.
- 89 Traves, S.L., Culpitt, S., Russell, R.E.K., Barnes, P.J., and Donnelly, L.E. 2002. Elevated levels of the chemokines GRO- α and MCP-1 in sputum samples from COPD patients. *Thorax.* 57:590–595.
- 90 Ying, S., et al. 1999. Eosinophil chemotactic chemokines (eotaxin, eotaxin-2, RANTES, monocyte chemoattractant protein-3 (MCP-3), and MCP-4), and C-C chemokine receptor 3 expression in bronchial biopsies from atopic and nonatopic (Intrinsic) asthmatics. *J. Immunol.* 163:6321–6329.
- 91 Dorman, S.C., et al. 2005. Progenitor egress from the bone marrow after allergen challenge: role of stromal cell-derived factor 1 α and eotaxin. *J. Allergy Clin. Immunol.* 115:501–507.
- 92 Ravensberg, A.J., et al. 2005. Eotaxin-2 and eotaxin-3 expression is associated with persistent eosinophilic bronchial inflammation in patients with asthma after allergen challenge. *J. Allergy Clin. Immunol.* 115:779–785.
- 93 Bocchino, V., et al. 2002. Eotaxin and CCR3 are upregulated in exacerbations of chronic bronchitis. *Allergy.* 57:17–22.
- 94 Pilette, C., Francis, J.N., Till, S.J., and Durham, S.R. 2004. CCR4 ligands are up-regulated in the airways of atopic asthmatics after segmental allergen challenge. *Eur. Respir. J.* 23:876–884.
- 95 Di Stefano, A., et al. 2001. Decreased T lymphocyte infiltration in bronchial biopsies of

- subjects with severe chronic obstructive pulmonary disease. *Clin. Exp. Allergy*. 31:893–902.
- 96 Costa, C., et al. 2008. CXCR3 and CCR5 chemokines in the induced sputum from patients with COPD. *Chest*. 133:26–33.
 - 97 Zhu, J., et al. 2001. Exacerbations of Bronchitis: bronchial eosinophilia and gene expression for interleukin-4, interleukin-5, and eosinophil chemoattractants. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 164:109–116.
 - 98 Berkman, N., et al. 1996. Expression of RANTES mRNA and protein in airways of patients with mild asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 154:1804–1811.
 - 99 Aaron, S.D., et al. 2001. Granulocyte inflammatory markers and airway infection during acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 163:349–355.
 - 100 Qiu, Y., et al. 2003. Biopsy neutrophilia, chemokine and receptor gene expression in severe exacerbations of COPD. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 168:968–975.
 - 101 Hay, D.W.P., and Sarau, H.M. 2001. Interleukin-8 receptor antagonists in pulmonary diseases. *Curr. Opin. Pharmacol*. 1:242–247.
 - 102 Jatakanon, A., et al. 1999. Neutrophilic inflammation in severe persistent asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 160:1532–1539.
 - 103 Norzila, M.Z., Fakes, K., Henry, R.L., Simpson, J., and Gibson, P.G. 2000. Interleukin-8 secretion and neutrophil recruitment accompanies induced sputum eosinophil activation in children with acute asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 161:769–774.
 - 104 Saetta, M., et al. 2002. Increased expression of the chemokine receptor CXCR3 and its ligand CXCL10 in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 165:1404–1409.
 - 105 Brightling, C.E., et al. 2005. The CXCL10/CXCR3 axis mediates human lung mast cell migration to asthmatic airway smooth muscle. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 171:1103–1108.
 - 106 Thomas, S.Y., Banerji, A., Medoff, B.D., Lilly, C.M., and Luster, A.D. 2007. Multiple chemokine receptors, including CCR6 and CXCR3, regulate antigen-induced T cell homing to the human asthmatic airway. *J. Immunol*. 179:1901–1912.
 - 107 Xanthou, G., Duchesnes, C.E., Williams, T.J., and Pease, J.E. 2003. CCR3 functional responses are regulated by both CXCR3 and its ligands CXCL9, CXCL10 and CXCL11. *Eur. J. Immunol*. 33:2241–2250.
 - 108 Lukacs, N.W., Berlin, A., Schols, D., Skerlj, R.T., and Bridger, G.J. 2002. AMD3100, a CxCR4 antagonist, attenuates allergic lung inflammation and airway hyperreactivity. *Am. J. Pathol*. 160:1353–1360.
 - 109 Sukkar, M.B., et al. 2004. Fractalkine/CX3CL1 production by human airway smooth muscle cells: induction by IFN-gamma and TNF-alpha and regulation by TGF-beta and corticosteroids. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol*. 287:L1230–L1240.

- 110 El Shazly, A., et al. 2006. Fractalkine produced by airway smooth muscle cells contributes to mast cell recruitment in asthma. *J. Immunol.* 176:1860–1868.
- 111 Rimaniol, A.C., et al. 2003. The CX3C chemokine fractalkine in allergic asthma and rhinitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 112:1139–1146.

• 在学期间科研成绩 •

1、Miao He, Takamichi Ichinose, Seiichi Yoshida, Masataka Nishikawa, Ikuko Mori, Rie Yanagisawa, Hirohisa Takano, Ken-ichiro Inoue, Guifan Sun, Takayuki Shibamoto. Urban particulate matter in Beijing, China enhances Allergen-Induced Murine Lung Eosinophilia. *Inhalation Toxicology*.

doi: 10.3109/08958371003631608.

2、Miao He, Takamichi Ichinose, Seiichi Yoshida, Masataka Nishikawa, Ikuko Mori, Rie Yanagisawa, Hirohisa Takano, Ken-ichiro Inoue, Guifan Sun, Takayuki Shibamoto. Airborne Asian Sand Dust Enhances Murine Lung Eosinophilia by Activation of Th2-Immune Response via TLR2 and NALP3 Inflammasome. *Inhalation Toxicology*. (Revised in April 15th, 2010)

3、Xu YY, Wang Y, Li X, He M, Xue p, Fu JQ, Wang HH, Sun GF. Variations in arsenic methylation capacity and oxidative DNA lesions over 2-year period in a high arsenic exposed population. *Int Arch Occup Environ Health*. 2009, 82(2): 251-258.

4、贺淼, 李冰, 徐苑苑, 梁秀芬, 富景奇, 薛鹏, 徐磊, 吕秀强, 孙贵范。不同饮水砷暴露人群尿中的砷代谢物水平。环境与健康杂志。2007, 24(9): 658-660。

5、李冰, 徐苑苑, 贺淼, 富景奇, 薛鹏, 徐磊, 孙鲜策, 孙贵范。地方性砷中毒病区饮用水中形态砷化物水平调查。中国地方病学杂志。2007, 26(2): 173-175。

6、薛鹏, 徐苑苑, 富景奇, 贺淼, 徐磊, 孙贵范, 金亚平, 张新荣。山西省山阴县地方性饮水型砷中毒病区饮用水中砷与微量元素分布的研究。环境与健康杂志。2007, 24(12): 112-113。

7、富景奇, 薛鹏, 金亚平, 贺淼, 徐苑苑, 李冰, 李昕, 王毅, 徐磊, 孙贵范。巯基化合物还原5价无机砷的实验研究。卫生研究。2008, 37(1): 19-21。

8、徐磊, 孙贵范, 徐苑苑, 贺淼, 富景奇, 薛鹏, 李革新。海苔摄入对尿中多形态砷化合物排泄影响。中国公共卫生。2008, 24(9): 1093-1094。

9、徐苑苑, 王毅, 李昕, 王惠惠, 薛鹏, 贺淼, 富景奇, 孙贵范。饮水型砷暴露对人体DNA氧化损伤的影响。中国地方病学杂志。2008, 27(4): 382-384

10、王惠惠, 徐苑苑, 李冰, 李昕, 薛鹏, 贺淼, 王毅, 孙贵范。亚砷酸钠致Chang liver细胞氧化应激作用的研究。环境与健康杂志。2008, 25(7): 568-570。

• 致谢 •

孙贵范教授严谨的治学态度、丰富渊博的知识、敏锐的学术思维、精益求精的工作态度以及诲人不倦的师者风范是我终生学习的楷模；这五年中还得到郑全美、金亚平、李冰、李昕等众多教授的关心支持和帮助，他们的高深精湛的造诣与严谨求实的治学精神，将永远激励着我。

在本次论文完成过程中，日本大分县立看护科学大学的市濂孝道教授和吉田成一副教授对该论文从选题，构思到最后定稿的各个环节给予细心指导，使我得以最终完成毕业论文。在此，谨向两位老师致以衷心的感谢和崇高的敬意！

最后，我要向百忙之中抽时间对本文进行审阅，评议和参与本人论文答辩的各位老师表示感谢！

• 个人简介 •

姓名 贺淼

性别 女

年龄 29

民族 汉

主要学习经历

2000.9 - 2005.7 中国医科大学预防医学 学士学位

2005.9 - 2010.7 中国医科大学公共卫生学院劳动卫生与环境卫生专业 硕博连读

(2008.11 - 2010.3 日本大分县立看护科学大学 实验研究)