

中国医科大学

硕士学位论文

吸附于沙尘暴颗粒物上的微生物对卵蛋白诱导的小鼠气道炎症
的实验研究

姓名：刘博莹

申请学位级别：硕士

专业：公共卫生与预防医学；劳动卫生与环境卫生学

指导教师：孙贵范

201205

• 中文论著摘要 •

吸附于沙尘暴颗粒物上的微生物对卵蛋白诱导的小鼠 气道炎症的实验研究

前 言

沙尘暴(sand dust, SD) 是中国北方较为常见的一种灾害性天气现象, 近年来沙尘暴的发生频率越来越高并且波及范围越来越广。常发生在春季的亚洲沙尘暴(ASD)起源于戈壁沙漠、塔克拉玛干沙漠等中国内陆黄土地区, 颗粒物向下风向地区扩散, 不仅波及中国东部、朝鲜半岛和日本, 更远的可以飘过太平洋最终到达美国, 遍及大半个北半球。ASD 由于吸附性强, 可携带多种化学物质, 如来源于大气污染物(SO_2 , NO_2) 的硫酸盐(SO_4^{2-}) 和硝酸盐(NO_3^-), 还包括一些微生物, 如细菌、真菌、真菌孢子和病毒。近年来, 随着这种生物气溶胶(生物颗粒) 对所波及地区的生态系统和人类健康造成严重影响, 吸附于 ASD 上的微生物群落引起了广泛关注。

亚洲沙尘暴浮尘颗粒物及这些微生物与呼吸系统的健康状况及迅速增长的发病率、死亡率有关。大量的流行病学调查显示, 在沙尘暴发生期间, 中国的肺炎入院率和韩国首尔的每日死亡率都有增加。有报道称, 在台湾, 沙尘暴发生与死亡率、心血管疾病的急诊处理以及肺炎入院率的增多保持一致。类似的现象在日本也有报道, 日本雪杉树引起的花粉病、季节性变应性鼻炎的恶化以及成人和儿童哮喘的加剧都在沙尘暴发生期间出现。因此, 流行病调查结果表明在沙尘暴发生期间, 由微生物和 ASD 联合作用可引起肺炎或过敏性疾病的恶化, 需要实验性的研究来证实流行病调查的结果。

我们以前的研究显示, 在 OVA 刺激的小鼠气道上皮组织中发现, 通过观察支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 和组织学检查细胞图像, 野生型 ASD 可增强过敏性气道炎症及杯状细胞的增殖, 同时发现伴有嗜酸性粒细胞的抗原相关气道炎症加剧了, BALF 中促炎症细胞因子如 IL-5、MCP-3、IL-13、嗜酸细胞活化趋化因子和抗原特异抗体的产物(IgE, IgG1) 的表达增强。然而, 经过 360°C 加热除去毒性物质(如微生物、 SO_4^{2-} 、 NO_3^- 等) 的 ASD (heated ASD,

H-ASD) 却只造成了轻微的影响，因此沙尘暴颗粒物表面附着物对炎症加剧起到了重要作用。

本研究中使用电子加热器将采集于日本福冈县北九州市的沙尘暴颗粒的样本进行加热处理，以除去吸附于其表面的微生物、 SO_4^{2-} 和 NO_3^- 等成分。本实验采用的微生物来自于石川县珠洲市上空的颗粒表面，共 7 种微生物，有：*Nocardiosis* sp. (No.1-4)，*Bacillus* sp.，*Streptomyces* sp.和*Bjerkandera* sp.。本研究应用 OVA 致敏小鼠，采用气管灌注的方法，分别将加热处理的 ASD (H-ASD)、和加入各种微生物的 H-ASD 悬浮液注入小鼠气管内，观察小鼠肺组织病理形态学变化，支气管肺泡灌洗液 (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。从中筛选出一种恶化作用最为强烈的微生物，进行进一步验证实验。本研究是关于沙尘暴颗粒物附着的微生物对 OVA 诱导哮喘小鼠气道炎症作用的研究。

实验方法

1、样本的采集

本研究使用的黄沙在 2011 年 5 月 1 日至 3 日在日本福冈北九州市折尾地区的产业医科大学上空采集，由 LIDAR (Light Detection And Ranging) 检测这批颗粒物的密度变化为 $350 \mu\text{g}\sim 550 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (结果来自于日本长崎县公共健康与环境科学省)。应用图像分析软件 (OLS3500/SFT-3500, Olympus and Shimadzu) 分析显微图像得到颗粒的粒径大小，该方法最低检出限为 $1 \mu\text{m}$ ，粒径分布主要在 $2.8\sim 5.9 \mu\text{m}$ 。

2、样本的处理

分别将采集到的 ASD 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。

3、微生物的分离及获取

本研究使用的 7 种微生物是在 2008 年 5 月 7 日日本石川县珠洲市采集的黄沙颗粒上分离培养的。将采集到的黄沙分别用营养琼脂、血琼脂、马铃薯葡萄糖琼

脂以及沙保罗培养基培养，得到 7 种微生物。经过 DNA 分析，确定它们分别是 *Nocardiopsis* sp. (No.1-4), *Bacillus* sp., *Streptomyces* sp. 和 *Bjercandera* sp.。这些微生物用 1%福尔马林 1 小时失活，而后以 1500rpm 离心 10 min，去掉上清液，余下减压干燥备用。

4、实验动物及染毒

从 Charles River 公司（神奈川，日本）购入 5 周龄雄性 ICR 小鼠，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。根据微生物种类的不同将实验动物分成 9 个组，每组 1-5 只不等，各实验组分别为：卵白蛋白（Ovalbumin, OVA）组，OVA+H-ASD 组，OVA+H-ASD+*Nocardiopsis* sp.（No.1-4），OVA+H-ASD+*Bacillus* sp.，OVA+H-ASD+*Streptomyces* sp. 和 OVA+H-ASD+*Bjercandera* sp.，共 29 只。每周将小鼠在 4%三氟溴氯乙烷作用下麻醉，经气管注入 H-ASD (0.1 ml/mouse) 和 OVA (0.1 ml/mouse) 以及 7 种失活微生物 3.5 μ g，共投与四次。

在取得实验结果之后，选出作用最强的一种微生物，继续动物实验。每间隔一周，将小鼠 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) 和/或微生物 (2 μ g/mouse 或 8 μ g/mouse)。最后一次染毒的第二天，经小鼠腹腔注射 20%戊巴比妥，将其深度麻醉，用放血法处死。

5、实验动物的病理检测

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 厚的碎块，用石蜡包埋，制成 3 μ m 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炎症细胞和上皮细胞进行观察。

6、采集支气管肺泡灌洗液和血液

小鼠深度麻醉后心脏采血，1500 rpm 离心 10 min，取上清液，-80 $^{\circ}$ C 的深度冰箱中保存用于检测血清 OVA 特异性抗体 IgG1 和 IgE 的表达。取小鼠心脏血后，气管固定，用无菌生理盐水灌洗小鼠肺部两次，收集灌洗液后离心。取上清液，-80 $^{\circ}$ 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因子的蛋白表

达。

7、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细胞总数。细胞悬液应用细胞离心涂片机，离心后制成细胞涂片。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。

8、支气管肺泡灌洗液中的细胞因子和趋化因子的检测

应用酶联免疫反应检测 BALF 中细胞因子和趋化因子的蛋白表达。其中细胞因子包括：白细胞介素(Interleukin, IL)-1 β 、IL-4、IL-5、IL-6、IL-12、IL-13、干扰素(interferon, INF)- γ 和肿瘤坏死因子 (Tumor Necrosis Factor, TNF- α)、趋化因子包括：嗜酸性粒细胞趋化因子(Eotaxin)、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)、巨噬细胞炎症蛋白(macrophage inflammatory protein, MIP)-1 α 、角化细胞趋化因子(Keratinocyte chemoattractant, KC)、单核细胞趋化蛋白(monocyte chemotactic protein, MCP)-1 和 MCP-3。

9、OVA 特异性 IgE 和 IgG1 抗体的检测

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、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、ASD 表面成分的检测结果

ASD 颗粒物的大小主要分布为 2.8~5.9 μm 。ASD 颗粒物的各种元素分布为

28% Si、7% Al、3.8% Fe、3.2% Ca、1.8% Mg、0.36% Ti、0.10% P、0.091% Mn、0.051% Ba 和 0.025% Sr。

2、7 种微生物对小鼠肺部病理学改变的影响

OVA+H-ASD+*Streptmyces* sp. 与 OVA+H-ASD+*Bjerkandera* sp. 组发现，与 OVA+H-ASD 组相比，小鼠肺呼吸道上皮中的杯状细胞显著增殖，特别是 *Bjerkandera* sp. 组增生最显著，小鼠气管粘膜下嗜酸性粒细胞显著增多。

3、7 种微生物对小鼠支气管肺泡灌洗液中炎症细胞分布的影响

OVA+H-ASD+*Bjerkandera* sp. 组小鼠 BALF 中巨噬细胞数、中性粒细胞、嗜酸性粒细胞和淋巴细胞与 OVA 组比较显著增多。

4、7 种微生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

Bjerkandera 联合作用组的 KC、MCP-1、RANTES、MCP-3、IL-12 水平升高。

5、*Bjerkandera* sp. 对小鼠肺部病理学改变的影响

OVA+H-ASD+B.sp 联合作用能引起小鼠肺呼吸道上皮的杯状细胞重度增殖，且气管粘膜下嗜酸性粒细胞和淋巴细胞显著增多，基底膜增厚，呈现玻璃样变。

6、*Bjerkandera* sp. 对小鼠支气管肺泡灌洗液中炎症细胞分布的影响

与 OVA+H-ASD 相比，OVA+H-ASD+B.sp 组小鼠 BALF 中巨噬细胞的含量增多。与 H-ASD+B.sp₂ 和 H-ASD+B.sp₈ 组分别比较，OVA+H-ASD+ B.sp₂/B.sp₈ 联合处理进一步导致小鼠 BALF 中的嗜酸性粒细胞数增多。

7、*Bjerkandera* sp. 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

OVA+H-ASD+ B.sp₈ 联合作用组中 BALF 的 IL-1 β 、IL-6、IL-13 和 TGF- β 1 明显高于对照组和 OVA 单独作用组，另外，IL-1 β 、IL-5、IL-13 和 TGF- β 1 表达也强于 H-ASD 单独作用组。H-ASD+B.sp₈ 组的小鼠 BALF 中 Eotaxin、RANTES、

KC 和 MCP-1 的水平与对照组及 *B.sp₈* 单独处理组相比显著升高。

8、*Bjerkandera sp.*对小鼠血清中 OVA 特异性 IgE 和 IgG1 表达的影响

OVA+H-ASD+*B.sp₈* 组小鼠血清中 OVA 特异性 IgG1 表达比 *B.sp₈* 和 H-ASD+*B.sp₈* 组的表达增强。在所有组别中未见 OVA 特异性 IgE 的表达。

结 论

1、7 种微生物，特别是 *Bjerkandera sp.*，能加剧 OVA 诱导的哮喘小鼠的气道炎症反应。

2、*Bjerkandera sp.*通过 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。

关键词

亚洲沙尘暴颗粒物、卵蛋白、哮喘、细胞因子、趋化性细胞因子、Th2 免疫反应、*Bjerkandera sp.*

Microorganisms attached onto Asian sand dust enhanced Ovalbumin-induced respiratory inflammation in asthmatic murine

Preface

Asian sand dust (ASD) storms arise from the Gobi Desert, the Taklimakan desert, and loess areas of interior China during the spring season. ASD aerosol spreads downwind areas, such as East China, the Korean Peninsula, and Japan, as far as across the Pacific Ocean to the United States. ASD reportedly is transported one full circuit around the globe. ASD contains various chemical species, such as sulfate (SO_4^{2-}) or nitrate (NO_3^-) derived from air pollutants (SO_2 , NO_2) as well as microbial agents, including bacteria, fungi, fungal spores, and viruses. Recently the microbial communities transported with ASD have attracted much attention as bioaerosols (biological particles) affecting downwind ecosystem and human health.

The airborne sand dust and these microorganisms may be associated with the respiratory health and increased mortality and morbidity. Because, epidemiologic studies have demonstrated that an increase of hospitalization for pneumonia in China and an increase in daily mortality in Seoul, Korea caused during dust storm events. In Taiwan, ASD events coincided with an increase of mortality, and emergency treatment for cardiovascular disease and hospitalization for pneumonia have been reported. In Japan, the deterioration of Japanese cedar pollinosis, seasonal allergic rhinitis, and exacerbation of adult asthma and child asthma occurred during a dust storm event also have been reported. Therefore, experimental studies to confirm the epidemiological results, suggesting that ASD causes the deterioration of pneumonia or allergic diseases induced by microbial agents and ASD during a dust storm event, are in order.

Our previous studies have shown that crude ASD enhanced allergic airway inflammation and the proliferation of goblet cells in the airway epithelium in

OVA-stimulated mice, which was evidenced by cellular profiles of bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and histological examination. The exacerbated antigen-related airway inflammation with eosinophils was concomitant with amplified expression of pro-inflammatory molecules like IL-5, MCP-3, IL-13, eotaxin in BALF as well as the production of antigen-specific antibodies (IgE, IgG1). However, ASD heated at 360°C to exclude toxic materials (microbiological materials, sulfate, nitrate, etc.) caused less effect. Therefore, the materials absorbed onto the ASD particles may play an important role on the aggravation of respiratory inflammation.

In the present study, we used ASD collected from the atmosphere from Orio in Kitakyushu, Japan. The particles had been excluded of toxic materials (microbial materials, sulfate, etc.) by heating. In addition, the microbes used in this study was collected over Noto peninsula, Suzu City in Ishikawa prefecture, and seven kinds of bacillus and mold (*Nocardiopsis* sp. BASZUN0801; *Nocardiopsis* sp. BASZUN0802; *Nocardiopsis* sp. BASZUN0803; *Nocardiopsis* sp. BASZUN0804; *Bacillus* sp. BASZUB0801; *Streptomyces* sp. BASZUB0802; *Bjerkandera* sp. BASZUP0801) from ASD were separated in Ichinose's laboratory in Oita University of Nursing and Health Sciences, Oita, Japan. We instilled OVA-induced ICR mice intratracheally by H-ASD, seven kinds of bacillus and mold. Several investigation included pathologic changes in airway, cytological alteration in bronchoalveolar lavage fluids (BALF), changes of inflammatory cytokines and chemokines in BALF. We selected one of the most serious bacterial for further research. This is the important study on microbes of Asian sand dust in Japan exacerbating asthma caused by OVA.

Materials and methods

1. Collection of the particles

The present study used ASD collected using a high-volume air sampler with a Teflon filter from the atmosphere in University of Occupational and Environmental Health, Kitakyushu, Fukuoka, Japan May 1st-3rd, 2011 after a massive 3-day dust storm

event in East Asia. The density ranges of the ambient particulate matter by LIDAR (Light Detection And Ranging) in May 1–3 was 350 μ g ~ 550 μ g /m³ in Nagasaki, Japan.

2. Preparation of particles

ASD was collected from Orio in Kitakyushu, Japan. 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.

3. Preparation of microbes

ASD bioaerosols were collected at a height of 400 m using a tethered balloon and bioaerosol sampler on May 7, 2008 over Noto peninsula, Suzu City in Ishikawa prefecture. After they were cultivated using a Nutrient agar, blood agar, potato dextrose agar and Sabouraud dextrose agar, eight strains of isolates were obtained. A homology test revealed that B.sp used in this study is one of the ASD bioaerosols. B.sp had been inactivated with 10% formalin for 1 h followed by centrifugation at 1500rpm for 10 min. After that the supernatant was removed and the remaining material was dried under reduced pressure.

4. Animal and Study protocol

Male ICR mice (5 weeks of age) were purchased from Charles River Japan, Inc. (Kanagawa, Japan). After one week of screening out sick mice, mice with abnormal body weight and mice stressed from different environmental breeding, the remaining mice were used at 6 weeks of age. They were fed a commercial diet CE-2 (CLEA Japan, Inc., Tokyo, Japan) and given water *ad libitum*. The mice were housed in plastic cages lined with soft wood chips. The cages were placed in a conventional room, which was air conditioned at 23°C and 55–70% humidity with a light/dark (12 h/12 h) cycle. ICR mice were divided into 9 groups: OVA, OVA+H-ASD, OVA+H-ASD+Nocardiosis (No.1-4), OVA+H-ASD+Bacillus, OVA+H-ASD+Streptomyces, OVA+H-ASD+Bjerkandera. After the most serious bacterial was chosen, twelve groups (n = 14, each

group) according to the treatment with particles were set: control (normal saline), heated ASD (H-ASD, 0.1 mg/mouse), bacterial₂ (2 µg/mouse), bacterial₈ (8 µg/mouse), H-ASD + bacterial₂, H-ASD+ bacterial₈, OVA (0.1 mg/mouse), OVA+H-ASD, OVA+ bacterial₂, OVA+ bacterial₈, OVA+H-ASD+ bacterial₂ and OVA+H-ASD+ bacterial₈.

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 periodic acid-schiff (PAS) to evaluate the degree of proliferation of goblet cells in the bronchial epithelium. The sections were also stained with hematoxylin and eosin (H&E) to evaluate the degree of infiltration of eosinophils or lymphocytes in the airway from proximal to distal. 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 average volume retrieved was 90% of the amount instilled (1.6 ml). The fluids from the two lavages were combined, cooled to 4°C, and centrifuged at 1500 rpm for 10 min. The total amount of the lavages collected from individual mice was measured for calculating the protein levels of cytokines and chemokines in BALF. 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 cytokine protein levels in the BALF were determined using enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA). IL-5, IL-12, Monocyte chemotactic protein (MCP)-3, Keratinocyte chemoattractant (KC), MCP-3, macrophage inflammatory protein (MIP)-1 α , regulated on activation normal T cell expressed and presumably secreted (RANTES), tumor necrosis factor (TNF)- α , eotaxin, interferon (IFN)- γ , transforming growth factor(TGF)- β 1, interleukin (IL)-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 and IL-33 were measured.

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. Statistical analysis

Statistical analysis on the pathologic evaluation in the airway, cytokine and chemokine proteins in BALF were conducted using SPSS13.0 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. Preparation of particles

The size distribution peak of ASD particles was at 2.8~5.9 μ m. The element compositions in this ASD sample were 28% Si, 7% Al, 3.8% Fe, 3.2% Ca, 1.8% Mg, 0.36% Ti, 0.10% P, 0.091% Mn, 0.051% Ba, and 0.025% Sr.

2. Enhancement of pathologic changes in the lung by seven kinds of bacterial and molds

The proliferation of goblet cells and eosinophils in the airway in OVA+H-ASD+*Streptomyces* sp. and OVA+H-ASD+*Bjerkandera* sp. group are marked compared with OVA+H-ASD, especially *Bjerkandera* combination group.

3. Enhancement of cell numbers in BALF by seven kinds of bacterial and molds

The numbers of macrophages, eosinophils, neutrophils and lymphocytes were increased in OVA+H-ASD+*Bjerkandera* sp. group compared with OVA alone.

4. Enhancement of cytokines and chemokines in BALF by seven kinds of bacterial and molds

The protein level of KC, MCP-1, RANTES, MCP-3 and IL-12 increased in OVA+H-ASD+*Bjerkandera* sp. group compared with OVA alone.

5. Enhancement of pathologic changes in the lung by *Bjerkandera* sp.

The proliferation of goblet cells and eosinophils in the airway of OVA+H-ASD+*Bjerkandera* sp. group are marked, and the basal membrane become thick and glass-like degeneration.

6. Enhancement of cell numbers in BALF by *Bjerkandera* sp.

The quantity of macrophages went up in OVA+H-ASD+B.sp group considerably in comparison with OVA+H-ASD. Furthermore, OVA+H-ASD combination with B.sp₂ or B.sp₈ showed a substantial elevation of eosinophils compared with H-ASD+B.sp₂ and H-ASD+B.sp₈, respectively.

7. Enhancement of cytokines and chemokines in BALF by *Bjerkandera* sp.

Almost all the cytokines and chemokines went up in OVA+H-ASD+B.sp₈ group in comparison with the control (Eotaxin, MIP-1 α , KC, MCP-3, IL-1 β , IL-5, TGF- β , $p<0.001$; IL-6, IL-13, MCP-1, $p<0.01$; IL-10, $p<0.05$), H-ASD alone (Eotaxin, MIP-1 α , MCP-3, IL-5, TGF- β , $p<0.001$; IL-1 β , IL-13, $p<0.01$; KC, $p<0.05$) and OVA alone

(Eotaxin, MIP-1 α , KC, MCP-3, IL-1 β , IL-5, TGF- β , $p<0.001$; IL-6, IL-13, MCP-1, $p<0.01$; IL-10, IL-12, $p<0.05$). It also increased eosinophil-relevant cytokines including IL-5, IL-13 and TGF- β 1 compared with B.sp₈ alone and OVA+H-ASD. Moreover, RANTES, IL-12 and TGF- β 1 manifested a higher concentration in OVA+H-ASD+B.sp₈ group than that of in H-ASD+B.sp₈.

8. Expression of OVA-specific IgG1 and IgE in serum by *Bjerkandera* sp.

IgG1 in OVA+H-ASD+B.sp₈ group was considerably greater than that of in B.sp₈ and H-ASD+B.sp₈ ($p<0.001$). OVA-specific IgE could not be induced in all the groups.

Conclusion

1. These seven kinds of bacterial and mold, especially *Bjerkandera* sp., may aggravate OVA-induced lung inflammation.

2. *Bjerkandera* sp. deteriorated OVA-induced lung inflammation possibly by activation of the Th2-associated immune response via cytokines and chemokines.

Key words

Asian sand dust, ovalbumin, murine lung eosinophilia, cytokine, chemokine, Th2-associated immune response, *Bjerkandera* sp.

• 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
IL	interleukin	白细胞介素
ASD	Asian sand dust	亚洲沙尘暴颗粒物
H-ASD	heated ASD	加热处理的亚洲沙尘暴颗粒物
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	调节激活正常 T 细胞表达 和分泌细胞因子
LPS	lipopolysaccharide	脂多糖
TGF	transforming growth factor	转化生长因子
B.sp	<i>Bjercandera</i> sp.	白腐菌属

吸附于沙尘暴颗粒物上的微生物对卵蛋白诱导的 小鼠气道炎症的实验研究

前 言

每到春季,起源于我国干旱半干旱地区(包括戈壁沙漠和塔克拉玛干沙漠)的沙尘暴,不仅对我国北方地区造成严重的环境污染,而且沙尘暴气溶胶能进行长距离的传播,可波及朝鲜半岛和日本,更远的可以飘过太平洋最终到达美国,遍及大半个北半球^[1-3]。这种生物气溶胶(生物颗粒)对所波及地区的生态系统和人类健康造成严重影响。由于这些颗粒物吸附了中国东部工厂煤及其它化学燃料燃烧的产物,颗粒物表面常附着 SO_4^{2-} 和 NO_3^- 等化学物质^[4]。除此之外,病毒、细菌、真菌及 β -葡聚糖等也会附着在颗粒物表面^[5,6]。近来,由于吸附于颗粒物上的微生物群落影响到下风向的生态环境,故引起广泛关注。

流行病学调查发现亚洲沙尘暴发生期间,台湾地区心血管疾病的死亡率和急诊入院率,以及肺炎的入院率都有增高^[7-10]。另外,沙尘暴与台湾和韩国首尔的每日死亡率的增长有相关性^[11-12],日本的成人和儿童哮喘恶化多发^[13-14]。除流行病学外,实验动物学研究也发现,通过观察 OVA 诱导的哮喘小鼠支气管肺泡灌洗液(BALF)和气道上皮组织学检查细胞图像,亚洲沙尘暴颗粒可增强过敏性气道炎症及杯状细胞的增殖,同时发现伴有嗜酸性粒细胞的抗原相关气道炎症加剧,BALF 中促炎症细胞因子如 IL-5、MCP-3、IL-13、嗜酸细胞活化趋化因子和抗原特异抗体的产物(IgE, IgG1)的表达增强^[15-19]。然而,经过 360°C 加热除去毒性物质(如微生物、 SO_4^{2-} 和 NO_3^- 等)的 ASD (heated ASD, H-ASD)却只造成了轻微的影响^[20-21]。因此,我们推断附着在沙尘暴颗粒物上的微生物在沙尘暴诱发的肺部炎症中起到重要作用。然而,能引起肺部炎症恶化的微生物种类并不清楚。

微生物和微生物的产物可以附着在气道上皮细胞,进而对人类呼吸系统炎症造成影响。为探索附着于 ASD 表面的微生物是否能够恶化哮喘小鼠的气道炎症,我们进行了直接采样,分离培养和 ASD 颗粒物的鉴定来得到附着于 ASD 表面的

微生物共 7 种微生物, 有: *Nocardiosis* sp. (No.1-4), *Bacillus* sp., *Streptomyces* sp. 和 *Bjerkandera* sp.。其中 *Bjerkandera* sp. 在过敏性真菌引起的咳嗽病例中, *Bjerkandera adusta* 敏感组较非敏感组的淋巴细胞活性测试更有活力^[22]。本研究应用 OVA 致敏小鼠, 采用气管灌注的方法, 分别将加热处理的 ASD (H-ASD)、和加入各种微生物的 H-ASD 悬浮液注入小鼠气管内, 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。从中筛选出一种恶化作用最为强烈的微生物, 进行进一步验证实验。本研究是关于沙尘暴颗粒物附着的微生物对 OVA 诱导哮喘小鼠气道炎症作用的研究。

材料与方法

一、主要试剂

Diff-Quik (International Reagent, Kobe, Japan)

角质细胞趋化因子(Keratinocyte chemoattractant, KC)、单核细胞趋化蛋白 (Monocyte chemotactic protein, MCP)-3、巨噬细胞炎症蛋白 (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)、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- α 、嗜酸粒细胞趋化因子(Eotaxin)、干扰素(interferon, IFN)- γ 、转化生长因子(transforming growth factor, TGF)- β 1、白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-13、IL-33 ELISA 试剂盒 (R&D Systems Inc. Minneapolis, MN)

IL-5、IL-12 ELISA 试剂盒 (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)

MCP-3 ELISA 试剂盒 (eBioscience, San Diego, CA, USA)

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)

超微针(UD-201type, Tomy, Tokyo, Japan)

显微镜(Nikon Co., Tokyo, Japan)

细胞涂片离心机(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 周龄雄性 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、黄沙及微生物的收集、处理及检测

本研究使用的黄沙（Asian sand dust, ASD）是采用一种配备聚四氟乙烯过滤器的高容积空气采样器，在 2011 年 5 月 1 日至 3 日在日本福岡北九州市折尾地区的产业医科大学上空采集，这 3 天是经日本气象局确定的有亚洲沙尘暴来袭。由 LIDAR（Light Detection And Ranging）检测这批颗粒物的密度变化为 350 μg –550 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ （结果来自于日本长崎县公共健康与环境科学省）。应用图像分析软件（OLS3500/SFT-3500, Olympus and Shimadzu）分析显微图像得到颗粒的粒径大小，该方法最低检出限为 1 μm ，粒径分布主要在 2.8–5.9 μm 。将 ASD 颗粒物用混合酸（68%硝酸：38%氢氟酸：70%高氯酸=5:1:1）180 °C 消化 3 小时后，应用电感耦合等离子体-原子发射光谱（61E Trace and ICP-750, Thermo Jarrell-Ash, MA）测定颗粒物中的化学成分。随后，将采集到的 ASD 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。

本研究使用的 7 种微生物是在 2008 年 5 月 7 日日本石川县珠洲市采集的黄沙颗粒上分离培养的。将采集到的黄沙分别用营养琼脂、血琼脂、马铃薯葡萄糖琼脂以及沙保罗培养基培养，得到 7 种微生物。经过 DNA 分析，确定它们分别是 *Nocardiopsis* sp. (No.1-4)，*Bacillus* sp.，*Streptomyces* sp.和 *Bjerkandera* sp.。这些微生物用 1%福尔马林 1 小时失活，而后以 1500rpm 离心 10 min，去掉上清液，余下减压干燥备用。

五、实验动物染毒

根据微生物种类的不同将实验动物分成 9 个组, 每组 1-5 只不等, 各实验组分别为: 卵白蛋白(Ovalbumin, OVA)组, OVA+H-ASD 组, OVA+H-ASD+*Nocardiosis* sp. (No.1-4), OVA+H-ASD+*Bacillus* sp., OVA+H-ASD+*Streptomyces* sp. 和 OVA+H-ASD+*Bjerkandera* sp., 共 29 只。H-ASD 样本悬浮于 0.9%生理盐水中, 浓度为 1 mg/ml, 在冷却条件下, 应用超微针声粉碎 5 min。OVA 同样溶解于生理盐水中, 浓度为 10 μ g/ml。将小鼠在 4%三氟溴氯乙烷作用下麻醉, 经气管注入 H-ASD (0.1 ml/mouse) 和 OVA (0.1 ml/mouse) 以及 7 种失活微生物 3.5 μ g, 每个星期投与一次, 共投与四次。

根据实验结果选择恶化作用最明显的微生物, 将新购入的实验动物分成 12 个组, 每组 14 只, 各实验组分别为: 对照组(生理盐水组)、bacterial 2 μ g 组、bacterial 8 μ g 组、H-ASD+ bacterial 2 μ g 组、H-ASD+ bacterial 8 μ g 组、卵白蛋白(Ovalbumin, OVA) 组, OVA+ bacterial 2 μ g 组、OVA+ bacterial 8 μ g 组、OVA+H-ASD 组、OVA+H-ASD+ bacterial 2 μ g 组、OVA+H-ASD+ bacterial 8 μ g 组, 共 168 只。H-ASD 样本悬浮于 0.9%生理盐水中, 浓度为 1 mg/ml, 在冷却条件下, 应用超微针声粉碎 5 min。OVA 同样溶解于生理盐水中, 浓度为 10 μ g/ml。将小鼠在 4%三氟溴氯乙烷作用下麻醉, 经气管注入 H-ASD (0.1 ml/mouse) 和 OVA (0.1 ml/mouse) 以及 bacterial 2 μ g 或 8 μ g, 每隔一周, 共投与四次。

最后一次染毒的第二天, 经小鼠腹腔注射 20%戊巴比妥(武田药品工业株式会社, 大阪), 将其深度麻醉, 用放血法处死。

如果小鼠的体重为 36g, 潮气量为 0.15 ml, 呼吸频率为 200 次/分钟, 吸入的颗粒物 100%沉积于肺部, 根据中国城市空气质量标准(总悬浮颗粒物不超过 0.15 mg/m³), 小鼠在两周中肺内沉积的空气颗粒物为 90.72 μ g (0.15 $\times$ 200 $\times$ 0.15 $\times$ 2 $\times$ 7 $\times$ 24 $\div$ 60 $\div$ 10³), 实验中经气管注入小鼠体内的 H-ASD 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 μ m 左右的空气颗粒物的肺沉积率为 3%^[23], 则沉积于小鼠肺部的空气颗粒物量为 2.72 μ g(90.72 $\times$ 3%), 实验中经气管注入小鼠体内的 H-ASD 约为该剂量的 36.8 倍。根据本研究组既往的实验研究, 每隔一周经小鼠气管注入 1 μ g OVA 能够导致小鼠肺部过敏性炎症^[17]。因此,

本实验选择 H-ASD 的染毒剂量为 0.1 mg/只, OVA 的染毒剂量为 1 μ g/只。

由于加热后沙尘暴颗粒物的重量会减轻 10%, 因为我们设定加入微生物进行进一步实验时的剂量为 2 μ g 和 8 μ g。

六、实验动物的病理检查

每个实验组随机抽取 6 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 厚的碎块, 用石蜡包埋, 制成 3 μ m 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炎症细胞和上皮细胞进行观察。

呼吸道中嗜酸性粒细胞和淋巴细胞浸润情况以及支气管上皮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)。细胞变化指呼吸道中 10%的嗜酸性粒细胞和淋巴细胞浸润或支气管上皮 10%杯状细胞增殖; 轻度变化指呼吸道 20-30%嗜酸性粒细胞和淋巴细胞浸润或支气管上皮 20-30%杯状细胞增殖; 中度变化指呼吸道 40-50%嗜酸性粒细胞和淋巴细胞浸润或支气管上皮 40-50%杯状细胞增殖; 中重度变化指呼吸道 60-70%嗜酸性粒细胞和淋巴细胞浸润或支气管上皮 60-70%杯状细胞增殖; 重度变化指呼吸道 80%以上嗜酸性粒细胞和淋巴细胞浸润或支气管上皮 80%以上杯状细胞增殖^[17]。

七、采集血液及支气管肺泡灌洗液

每个实验组的另外 8 只小鼠进行心脏采血和肺泡灌洗液收集。小鼠深度麻醉后心脏采血, 1500 rpm 离心 10 min, 取上清液, -80 $^{\circ}$ C 的深度冰箱中保存, 用于检测血清 OVA 特异性抗体 IgG1 和 IgE 的表达。取小鼠心脏血后, 气管固定, 用 0.8ml37 $^{\circ}$ C 无菌生理盐水灌洗小鼠肺部两次, 收集灌洗液约 1.6 ml, 在 4 $^{\circ}$ C 条件下 1500rpm 离心 10 min。取上清液, -80 $^{\circ}$ 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因子的蛋白表达。

八、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细胞总数。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 后，将其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，将其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，将其直立于吸水纸上以除去多余的染色液 II；
- (5) 用超纯水浸洗细胞涂片 10-15 s，以除去多余的染色液，而后将其直立于吸水纸上除去水分，空气中自然干燥。

九、支气管肺泡灌洗液中的细胞因子和趋化因子的检测

应用酶联免疫反应检测 BALF 中细胞因子和趋化因子的蛋白表达。其中细胞因子包括：IL-1 β 、IL-4、IL-5、IL-6、IL-12、IL-13、INF- γ 和 TNF- α ；趋化因子包括：Eotaxin、RANTES、MIP-1 α 、KC、MCP-1 和 MCP-3。

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，以免产生加样时的误差；
- (2) 根据待测样品及标准品的数量确定所需的板条数。每个标准品和空白孔做复孔；
- (3) 加 50 μ l Assay Diluent 于每孔中，再分别加入稀释好后的标准品及待测样品 50 μ l 于反应孔内。盖上封膜，轻轻摇匀，室温下 2 h；
- (4) 用洗板机洗涤 5 次，每孔加洗涤液 400 μ l；

- (5) 每孔加结合剂 100 μl , 盖上新膜板, 轻轻摇匀, 室温 2 h;
- (6) 用洗板机洗涤 5 次, 每孔加洗涤液 400 μl ;
- (7) 每孔加底物溶液 100 μl , 室温暗室 30 min;
- (8) 每孔反应终止液 100 μl , 轻轻摇匀。
- (9) 30 min 内用酶标仪在 450 nm 波长处测定各孔的 OD 值。

十、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) 所有试剂从冰箱中取出, 置于室温 1 小时。
- (2) 每孔加入生物素结合抗鼠 IgE 抗体 50 μl 。分别设空白孔、标准孔及待测样品孔, 加标准溶液或待测样品 10 μl 。振荡 10 s 三次, 盖膜室温静置 1 h。
- (3) 洗净 3 次, 每孔加入 100 μl 过氧化物酶亲和结合物, 振荡 10 s 三次, 盖膜室温静置 30 min。
- (4) 洗净 3 次, 每孔加入 100 μl 发色液, 振荡 10 s 三次, 室温静置 20 min。
- (5) 每孔加入 100 μl 反应停止液。用酶标仪在 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-IgG1 抗体。

十一、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。

结 果

一、ASD 表面成分的检测结果

ASD 颗粒物的大小主要分布为 2.8~5.9 μm 。ASD 颗粒物的各种元素分布为

28% Si、7% Al、3.8% Fe、3.2% Ca、1.8% Mg、0.36% Ti、0.10% P、0.091% Mn、0.051% Ba 和 0.025% Sr。

二、7 种微生物对小鼠肺部病理学改变的影响

图 1 和图 2 为 7 种微生物对小鼠肺部呼吸道病理改变的影响,其中图 1 为 PAS 染色结果。结果显示, OVA+H-ASD 联合处理引起小鼠肺呼吸道上皮中的杯状细胞增殖 (图 1A)。OVA+H-ASD+*Nocardiosis* sp.与 OVA+H-ASD+*Bacillus* sp.联合作用与 OVA+H-ASD 相比未见显著差异 (图 1B)。OVA+H-ASD+*Streptomyces* sp. (图 1C) 与 OVA+H-ASD+*Bjerkandera* sp. (图 1D) 组发现, 小鼠肺呼吸道上皮中的杯状细胞显著增殖, 特别是 *Bjerkandera* sp.组增生最显著。

图 2 为 HE 染色结果。OVA+H-ASD 组仅引起气管粘膜下嗜酸性粒细胞少量的增殖 (图 2A)。OVA+H-ASD+*Nocardiosis* sp.与 OVA+H-ASD+*Bacillus* sp.联合作用与 OVA+H-ASD 相比未见显著差异 (图 2B)。OVA+H-ASD+*Streptomyces* sp. (图 2C) 与 OVA+H-ASD+*Bjerkandera* sp. (图 2D) 组发现, 与 OVA+H-ASD 组相比, 小鼠气管粘膜下嗜酸性粒细胞显著增多, 特别是 *Bjerkandera* sp.组增生最显著。另外, 这两组小鼠气管粘膜下的其它炎症细胞, 如淋巴细胞和中性粒细胞均可见。

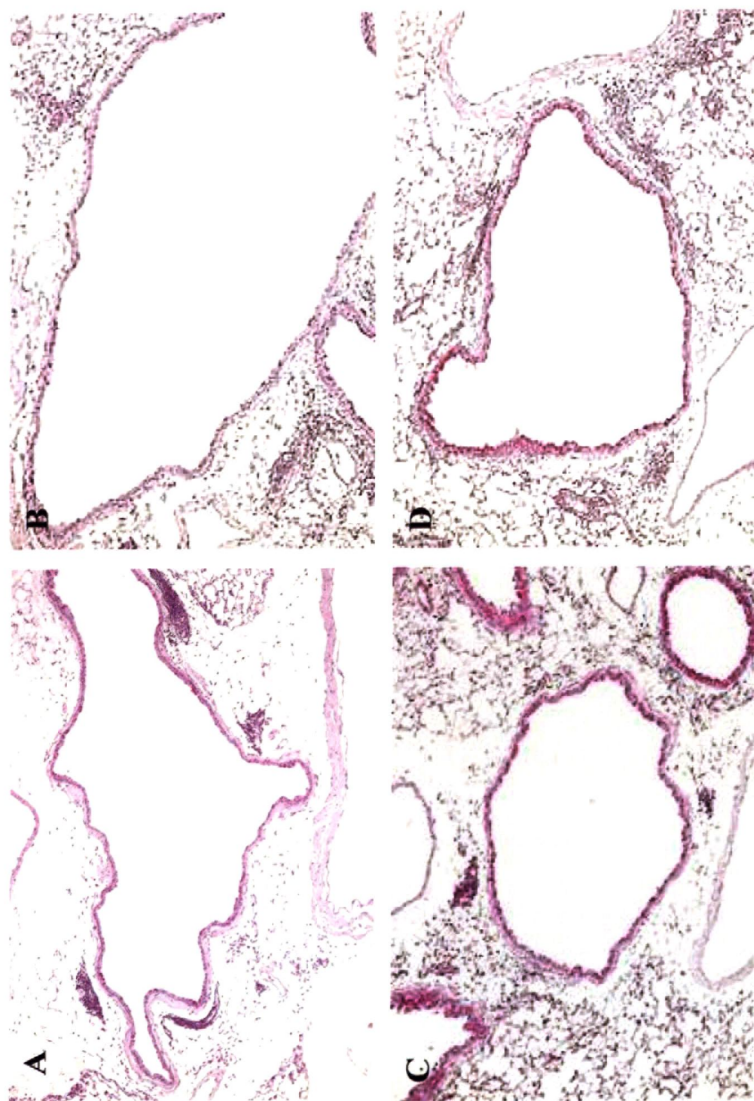


图 1, 7 种微生物对小鼠肺部病理学改变的影响

A 为 OVA+H-ASD 组; B 为 OVA+H-ASD + *Nocardiosis* sp. 组; C 为 OVA + H-ASD + *Streptomyces* sp. 组; D 为 OVA + H-ASD + *Bjerkandera* sp. 组。OVA+H-ASD 联合处理引起小鼠肺呼吸道上皮中的杯状细胞增殖 (图 1A)。OVA+H-ASD+*Nocardiosis* sp. 与 OVA+H-ASD+*Bacillus* sp. 联合作用与 OVA+H-ASD 相比未见显著差异 (图 1B)。OVA+H-ASD+*Streptomyces* sp. (图 1C) 与 OVA+H-ASD+*Bjerkandera* sp. (图 1D) 组发现, 与 OVA+H-ASD 组相比, 小鼠肺呼吸道上皮中的杯状细胞显著增殖, 特别是 *Bjerkandera* sp. 组增生最显著。A-D, PAS 染色。

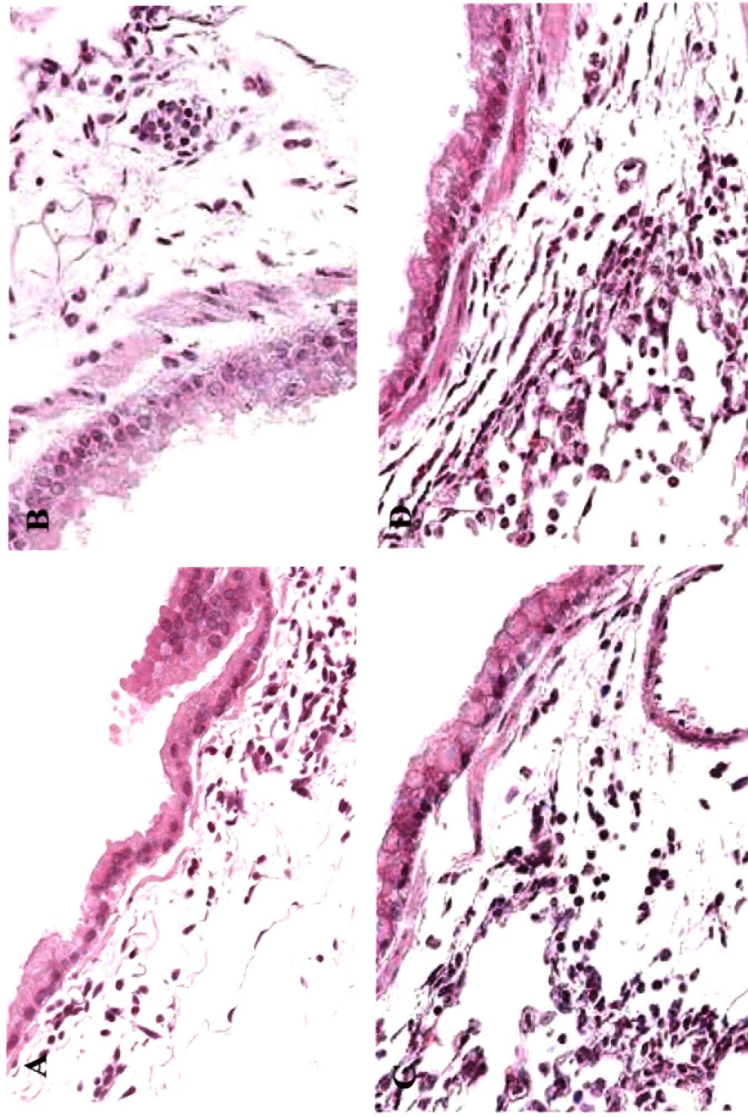


图 2, 7 种微生物对小鼠呼吸道炎症细胞浸润的影响

A 为 OVA+H-ASD 组; B 为 OVA+H-ASD + *Streptomyces* sp. 组; C 为 OVA+H-ASD + *Nocardiopsis* sp. 组; D 为 OVA+H-ASD + *Bjerkandera* sp. 组。OVA+H-ASD 组仅引起气管黏膜下嗜酸性粒细胞少量增殖 (图 2A)。OVA+H-ASD+*Nocardiopsis* sp. 与 OVA+H-ASD+*Bacillus* sp. 联合作用与 OVA+H-ASD 相比未见显著差异 (图 2B)。OVA+H-ASD+*Streptomyces* sp. (图 2C) 与 OVA+H-ASD+*Bjerkandera* sp. (图 2D) 组发现, 与 OVA+H-ASD 组相比, 小鼠气管黏膜下嗜酸性粒细胞显著增多, 特别是 *Bjerkandera* sp. 组增生最显著。另外, 这两个组小鼠气管黏膜下的其它炎症细胞, 如淋巴球和中性粒细胞均可见。A-D, HE 染色。

三、7 种微生物对小鼠支气管肺泡灌洗液中炎症细胞分布的影响

图 3 为 7 种微生物对小鼠支气管肺泡灌洗液中炎症细胞分布的影响。与 OVA 组相比, OVA+H-ASD 组小鼠 BALF 中总细胞数虽有增长, 但未见明显差异。OVA+H-ASD+*Nocardiosis* sp. 与 OVA+H-ASD+*Bacillus* sp. 联合作用与 OVA+H-ASD 相比, 总细胞数虽有增加, 但未见显著性差异。OVA+H-ASD+*Streptomyces* sp.组小鼠 BALF 中总细胞数与 OVA 和 OVA+H-ASD 组相比均明显增多 ($p<0.01$; $p<0.05$)。OVA+H-ASD+ *Bjerkandera* sp.组小鼠 BALF 中总细胞数与 OVA 和 OVA+H-ASD 组相比均明显增多 (p 均 <0.001)。另外, 观察 BALF 中巨噬细胞, 与 OVA 组相比, OVA+H-ASD 联合作用组巨噬细胞增多, 但无统计学差异 ($p>0.05$)。OVA+H-ASD+*Nocardiosis* sp. (No.3 和 No.4) 组小鼠 BALF 中巨噬细胞数与 OVA 组比较增多 ($p<0.05$; $p<0.01$)。OVA+H-ASD+*Streptomyces* sp.与 OVA+H-ASD+*Bjerkandera* sp.组小鼠 BALF 中巨噬细胞数与 OVA 组比较增多 ($p<0.01$; $p<0.05$)。

OVA+H-ASD 和 OVA+H-ASD 与除 *Bjerkandera* sp.外的其它微生物组小鼠 BALF 中中性粒细胞和嗜酸性粒细胞与 OVA 组相比, 均有升高, 但无统计学差异 ($p>0.05$)。OVA+H-ASD+*Bjerkandera* sp.联合作用组中中性粒细胞、嗜酸性粒细胞与 OVA 和 OVA+H-ASD 比较均显著增多 ($p<0.001$)。另外, OVA+H-ASD 组和除 *Bjerkandera* sp.外的联合作用组淋巴细胞较 OVA 单独作用组相比, 稍有增多但无统计学差异。OVA+H-ASD+*Bjerkandera* sp.联合作用组中淋巴细胞与 OVA 和 OVA+H-ASD 比较均显著增多 (p 均 <0.05)。

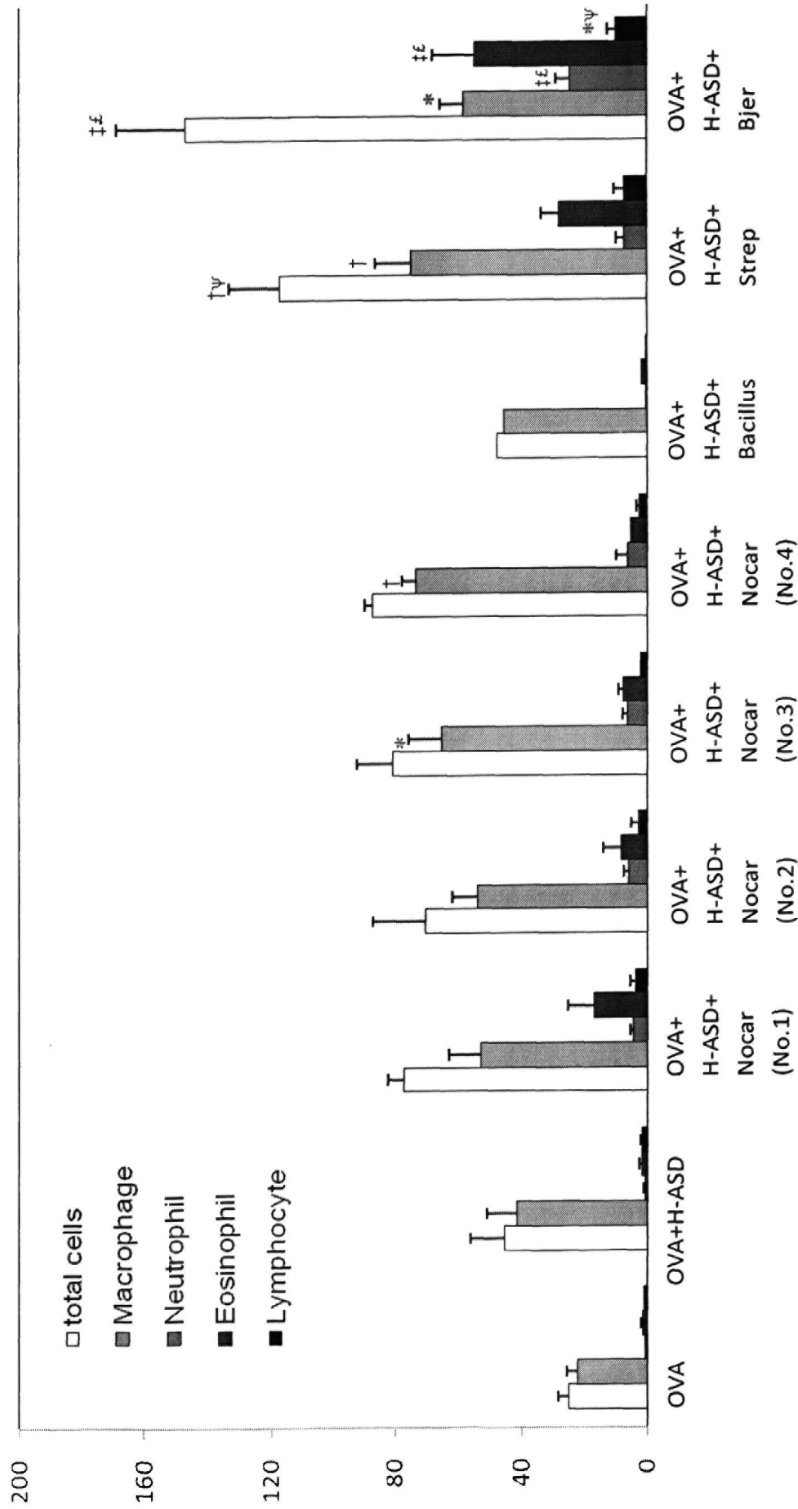


图 3, 7 种微生物对小鼠支气管肺泡灌洗液中炎症细胞分布的影响

*p<0.05 versus OVA; †p<0.01 versus OVA; ‡p<0.001 versus OVA; §p<0.05 versus OVA; ¶p<0.01 versus OVA+H-ASD; †p<0.001 versus OVA+H-ASD; ‡p<0.001 versus OVA+H-ASD.

四、7 种微生物对小鼠支气管肺泡灌洗液中细胞因子表达的影响

表 1 为 7 种微生物对小鼠支气管肺泡灌洗液中细胞因子表达的影响。OVA、OVA+H-ASD, OVA+H-ASD+*Nocardiopsis* sp.和 *Bacillus* sp.组均未检测到 IL-1 β 、IL-4、IL-5、IL-6、IL-13、IFN- γ 和 TNF- α 。OVA+H-ASD+*Bjerkandera* sp.组小鼠 BALF 中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 与 OVA 和 OVA+H-ASD 比较均有显著升高。OVA+H-ASD+*Streptomyces* sp.组和 *Bjerkandera* sp.组小鼠 BALF 中 IL-5 和 IL-13 都有增多, 但与 OVA 和 OVA+H-ASD 相比无显著差异 ($p>0.05$)。OVA+H-ASD 与除 *Bacillus* 外的各种微生物联合作用后, IL-12 均高于 OVA 单独作用组。其中 *Bjerkandera* sp.与 OVA 和 OVA+H-ASD 组比较显著升高 ($p<0.05$; $p<0.01$)。

表 1, 7 种微生物对小鼠支气管肺泡灌洗液中细胞因子表达的影响

分组	动物数	细胞因子(pg/ml)							INF- γ	TNF- α
	(n)	IL-1 β	IL-4	IL-5	IL-6	IL-12	IL-13			
OVA	3	ND	ND	ND	ND	14.48 $\pm$ 3.73	ND	ND	ND	ND
OVA+H-ASD	5	ND	ND	ND	ND	41.99 $\pm$ 26.92	ND	ND	ND	ND
OVA+H-ASD+Nocardiosis (No.1)	3	ND	ND	ND	ND	119.06 $\pm$ 28.50	ND	ND	ND	ND
OVA+H-ASD+Nocardiosis (No.2)	3	ND	ND	ND	ND	113.99 $\pm$ 28.38	ND	ND	ND	ND
OVA+H-ASD+Nocardiosis (No.3)	3	ND	ND	ND	ND	101.42 $\pm$ 37.16	ND	ND	ND	ND
OVA+H-ASD+Nocardiosis (No.4)	3	ND	ND	ND	ND	84.83 $\pm$ 25.28	ND	ND	ND	ND
OVA+H-ASD+Bacillus	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
OVA+H-ASD+Streptomyces	3	ND	ND	25.42 $\pm$ 21.46	ND	125.94 $\pm$ 15.55	21.27 $\pm$ 18.04	ND	ND	ND
OVA+H-ASD+Bjerkandera	5	42.42 $\pm$ 18.33 ^{vw}	ND	51.74 $\pm$ 24.87	42.28 $\pm$ 17.74 ^{vw}	239.49 $\pm$ 63.02 ^{vw}	49.90 $\pm$ 27.17	ND	77.01 $\pm$ 27.14 ^{vw}	

* 实验分为 9 组, 分别是卵蛋白组 (OVA)、卵蛋白和加热的沙尘颗粒物 (OVA+H-ASD)、OVA+H-ASD+Nocardiosis(No.1-No.4)、OVA+H-ASD+Bacillus、OVA+H-ASD+Streptomyces 和 OVA+H-ASD+Bjerkandera。每周进行一次气管灌注。最后一次气管灌注 24 h 后收集支气管肺泡灌洗液。

^{vw}p<0.05 versus OVA; ^{vw}p<0.001 versus OVA; ^{vw}p<0.05 versus OVA+H-ASD; ^{vw}p<0.01 versus OVA+H-ASD; ^{vw}p<0.001 versus OVA+H-ASD.

五、7 种微生物对小鼠支气管肺泡灌洗液中趋化因子表达的影响

表 2 为 7 种微生物对小鼠支气管肺泡灌洗液中趋化因子表达的影响。OVA+H-ASD+ *Bjerkandera* sp.联合作用组小鼠 BALF 中 Eotaxin 和 RANTES 增高,与 OVA 和 OVA+H-ASD 组无显著差异 ($p>0.05$)。OVA+H-ASD 与除 *Bjerkandera* sp.外的其它微生物联合作用组 KC 水平升高,但未见统计学差异 ($p>0.05$)。OVA+H-ASD+*Bjerkandera* sp.联合作用组小鼠 BALF 中 KC 与 OVA 和 OVA+H-ASD 相比明显增高 ($p<0.001$)。除 *Bacillus* 外的每种微生物作用组 MCP-1 水平较 OVA 和 OVA+H-ASD 都升高,但无统计学差异 ($p>0.05$)。*Bjerkandera* 联合作用组的 MCP-3 水平升高。OVA 组小鼠 BALF 中未检测到 MIP-1 α , 其它各组均有检出,特别是 *Nocardiosis* (No.3) 组小鼠 BALF 中 MIP-1 α 水平与 OVA 和 OVA+H-ASD 相比增高显著 ($p<0.01$; $p<0.05$)。

表 2, 7 种微生物对小鼠支气管肺泡灌洗液中趋化因子表达的影响

分组*	趋化性细胞因子 (pg/ml)						
	动物数 (n)	Eotaxin	RANTES	MIP-1 α	KC	MCP-1	MCP-3
OVA	3	ND	ND	ND	16.14 $\pm$ 4.98	ND	9.10 $\pm$ 0.51
OVA+H-ASD	5	ND	ND	36.04 $\pm$ 23.31	35.28 $\pm$ 7.14	ND	9.04 $\pm$ 0.63
OVA+H-ASD+Nocardiosis (No.1)	3	ND	ND	9.55 $\pm$ 2.92	71.75 $\pm$ 17.72	7.52 $\pm$ 3.31	9.46 $\pm$ 2.08
OVA+H-ASD+Nocardiosis (No.2)	3	ND	ND	52.40 $\pm$ 39.51	73.93 $\pm$ 19.44	20.37 $\pm$ 12.67	15.25 $\pm$ 4.65
OVA+H-ASD+Nocardiosis (No.3)	3	ND	ND	255.44 $\pm$ 143.72 ^{***}	65.08 $\pm$ 11.15	5.00 $\pm$ 2.14	9.11 $\pm$ 0.47
OVA+H-ASD+Nocardiosis (No.4)	3	ND	ND	10.21 $\pm$ 3.02	42.33 $\pm$ 3.70	2.85 $\pm$ 0.27	10.33 $\pm$ 0.65
OVA+H-ASD+Bacillus	1	ND	ND	3.42	45.44	ND	11.17
OVA+H-ASD+Streptomyces	3	ND	ND	4.58 $\pm$ 1.76	68.36 $\pm$ 4.86	8.78 $\pm$ 3.48	10.43 $\pm$ 1.06
OVA+H-ASD+Bjerkandera	5	3.76 $\pm$ 3.02	33.03 $\pm$ 20.60	27.44 $\pm$ 7.11	250.59 $\pm$ 42.35 ^{***www}	146.92 $\pm$ 91.03	225.09 $\pm$ 186.80

*实验分为 9 组, 分别是卵蛋白组 (OVA)、卵蛋白和加热的沙尘暴颗粒物 (OVA+H-ASD)、OVA+H-ASD+Nocardiosis (No.1-No.4)、OVA+H-ASD+Bacillus、OVA+H-ASD+Streptomyces 和 OVA+H-ASD+Bjerkandera。每周进行一次气管灌注。最后一次气管灌注 24 h 后收集支气管肺泡灌洗液。

¹p<0.05 versus OVA; ^{**}p<0.01 versus OVA; ^{***}p<0.001 versus OVA; ^yp<0.05 versus OVA+H-ASD; ^{ww}p<0.01 versus OVA+H-ASD; ^{www}p<0.001 versus OVA+H-ASD.

六、*Bjerkandera* sp.对小鼠肺部病理学改变的影响

图 4 和图 5 分别为 *Bjerkandera* sp. 对小鼠肺呼吸道病理学改变的影响，其中图 4 为 PAS 染色结果，图 5 为 HE 染色结果。结果显示，对照组的小鼠肺部无明显的病理学改变（图 4A 和图 5A），H-ASD 单独作用不能引起小鼠肺呼吸道上皮杯状细胞的增殖（图 4C），粘膜下层仅见少许的嗜酸性粒细胞（图 5C）。B.sp₈ 单独作用能引起轻度的上皮杯状细胞增殖（图 4B）和轻度的粘膜下层嗜酸性粒细胞和淋巴细胞浸润（图 5B）。B.sp₈ 与 H-ASD 联合作用能引起中度的上皮杯状细胞增殖（图 4D）和大量的炎症细胞浸润（图 5D）。

在 OVA 相关作用组中，OVA 单独作用引起小鼠肺呼吸道上皮的杯状细胞轻微增殖（图 4E），并伴有粘膜下层嗜酸性粒细胞的轻微浸润（图 5E）。与 OVA 组相比，OVA+H-ASD 组小鼠杯状细胞增殖更为显著（图 4G），且炎症细胞增多（图 5G）。B.sp₈+OVA 组联合作用发现，小鼠肺呼吸道上皮的杯状细胞中度增殖，且基底膜增厚，呈现玻璃样变（图 4F），粘膜下层嗜酸性粒细胞和淋巴细胞中重度增殖（图 5F）。OVA、H-ASD 和 B.sp₈ 联合作用导致小鼠呼吸道上皮的杯状细胞重度增殖，基底膜增厚显著（图 4H），粘膜下层嗜酸性粒细胞、中性粒细胞和淋巴细胞重度浸润（图 5H）。

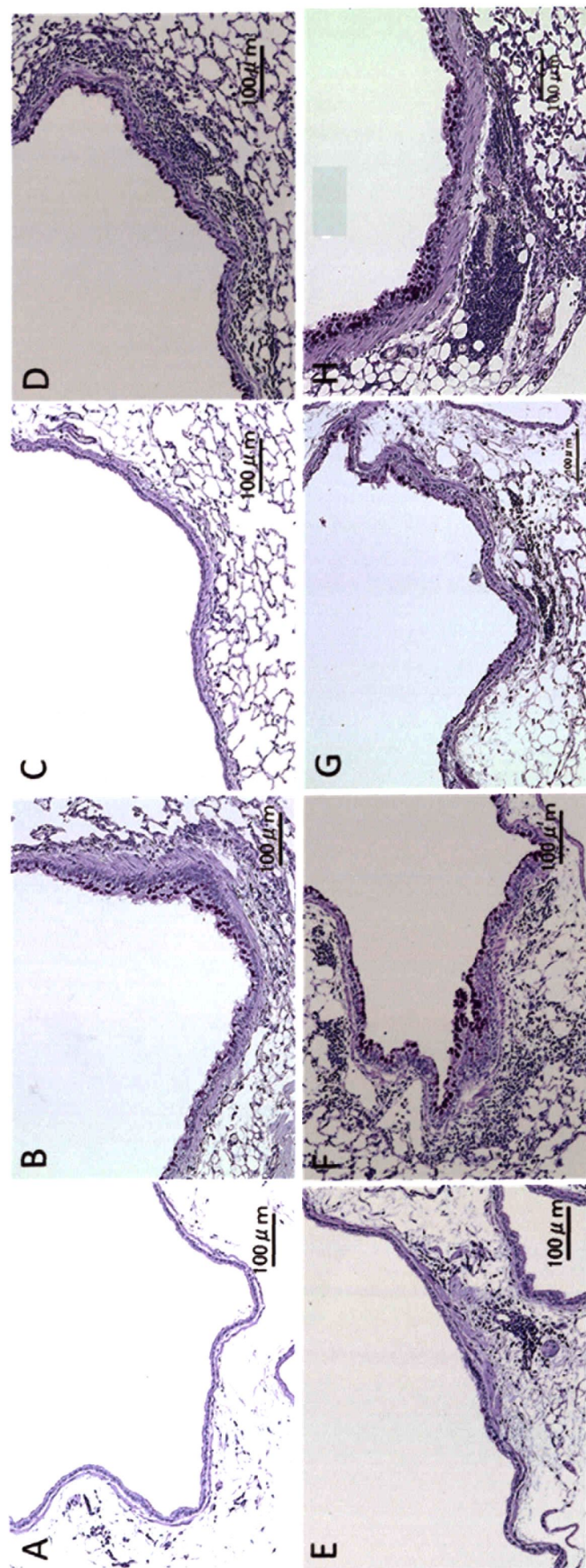


图 4, *B. pertussis* sp. 对小鼠肺部病理学改变的影响

A 为对照组（生理盐水组）；B 为 B.sp₈ 组；C 为 H-ASD 组；D 为 H-ASD+B. sp₈ 组；E 为 OVA 组；F 为 OVA+B. sp₈ 组；G 为 OVA+H-ASD 组；H 为 OVA+H-ASD+B. sp₈ 组。A-H, PAS 染色。

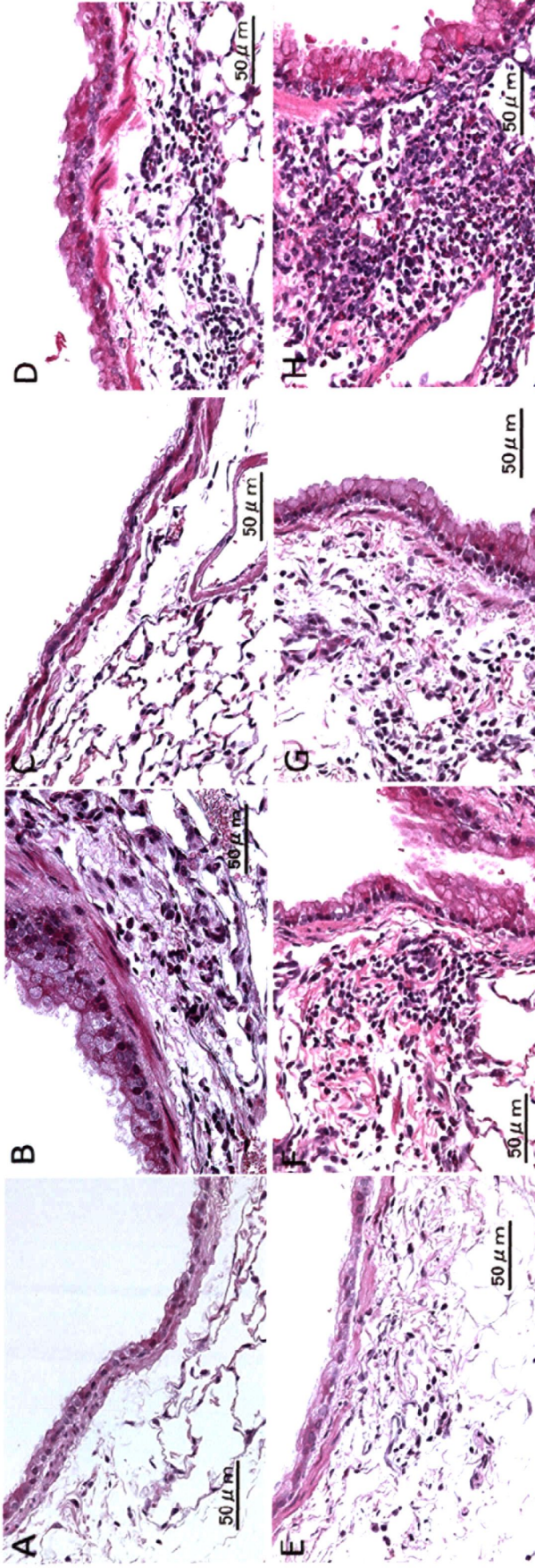


图 5, *Bjerlkandera sp.* 对小鼠呼吸道炎症细胞浸润的影响

A 为对照组 (生理盐水组); B 为 B.sp₈ 组; C 为 H-ASD 组; D 为 H-ASD+B. sp₈ 组; E 为 OVA 组; F 为 OVA+B. sp₈ 组; G 为 OVA+H-ASD 组; H 为 OVA+H-ASD+B. sp₈ 组。A-H, HE 染色。

七、*Bjerkandera* sp.对小鼠支气管肺泡灌洗液中炎症细胞分布的影响

图 6 为 *Bjerkandera* sp.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, B.sp₈ 和 H-ASD+B.sp₈ 组小鼠的 BALF 中巨噬细胞、中性粒细胞、嗜酸性细胞及淋巴细胞数量明显增加($p<0.05$), 但是 B.sp₂ 组的四种细胞数量与对照组相比无明显变化。与 B.sp₂ 和 H-ASD 单独作用组相比, H-ASD+B.sp₂ 组小鼠的中性粒细胞、嗜酸性粒细胞和淋巴细胞数量明显增加($p<0.05$)。类似地, 与 B.sp₈ 和 H-ASD 单独作用组相比, H-ASD+B.sp₈ 组小鼠的嗜酸性粒细胞和淋巴细胞数量明显增加($p<0.05$)。

OVA 单独作用组和 OVA+H-ASD 与对照组相比, 并不能引起小鼠 BALF 中的中性粒细胞和嗜酸性细胞的明显增高($p<0.05$)。OVA、B.sp 和/或 H-ASD 组小鼠 BALF 中巨噬细胞和嗜酸性粒细胞与对照组和 OVA 单独作用组相比有明显升高($p<0.05$)。与 OVA+H-ASD 相比, OVA+H-ASD+B.sp 组小鼠 BALF 中巨噬细胞的含量增多。另外, 分别与 H-ASD+B.sp₂ 和 H-ASD+B.sp₈ 组比较, OVA+H-ASD+B.sp₂/B.sp₈ 联合处理引起小鼠 BALF 中的嗜酸性粒细胞数减少。同时, 与 OVA+B.sp₂ 和 OVA+B.sp₈ 相比, 这两个联合作用组中巨噬细胞数显著提高($p<0.05$)。此外, 与对照组及 OVA 单独作用组相比, OVA、H-ASD 和 B.sp 联合作用也能引起小鼠 BALF 中的中性粒细胞明显增多($p<0.05$)。

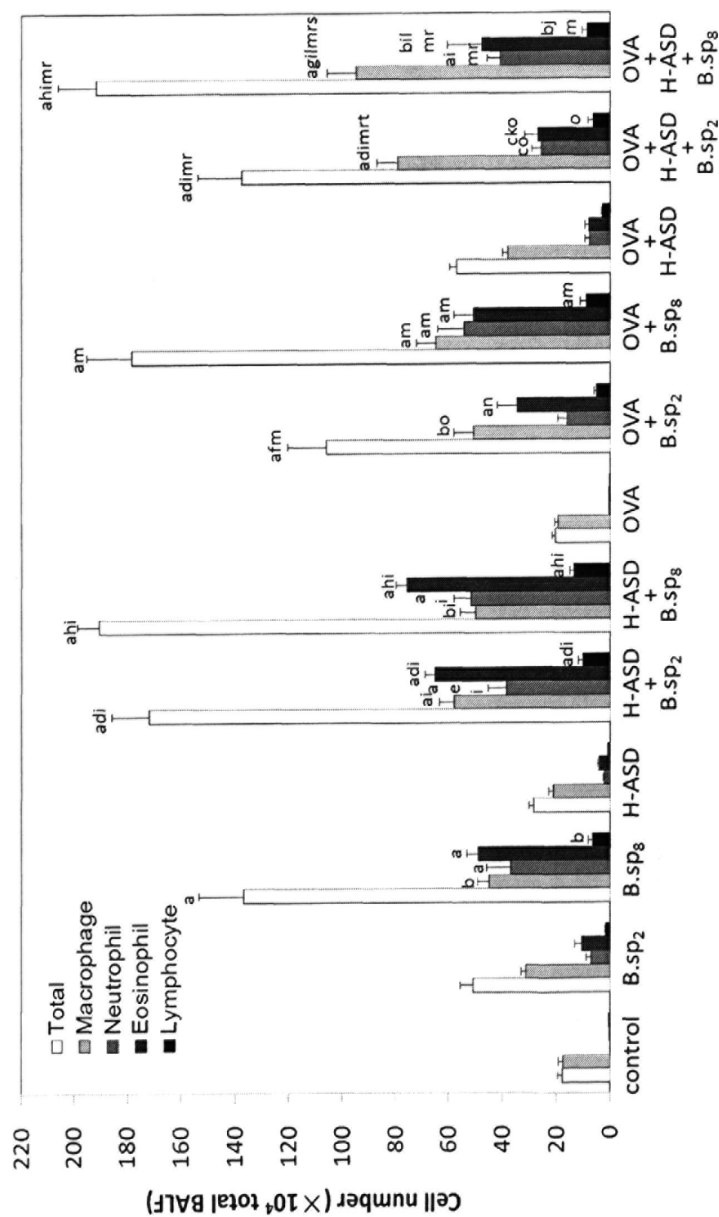


图 6, 对小鼠支气管肺灌洗液中炎症细胞分布的影响

所有的值均用均数 $\pm$ 标准差表示。

^a $p < 0.001$ versus Control; ^b $p < 0.01$ versus Control; ^c $p < 0.05$ versus Control; ^d $p < 0.001$ versus B.sp2; ^e $p < 0.01$ versus B.sp2; ^f $p < 0.05$ versus B.sp2; ^g $p < 0.001$ versus B.sp3; ^h $p < 0.05$ versus B.sp3; ⁱ $p < 0.001$ versus H-ASD; ^j $p < 0.01$ versus H-ASD; ^k $p < 0.001$ versus H-ASD; ^l $p < 0.05$ versus H-ASD+B.sp2; ^m $p < 0.05$ versus H-ASD+B.sp3; ⁿ $p < 0.001$ versus OVA; ^o $p < 0.05$ versus OVA; ^p $p < 0.001$ versus OVA+H-ASD; ^q $p < 0.05$ versus OVA+B.sp2; ^r $p < 0.05$ versus OVA+B.sp3.

八、*Bjerkandera* sp. 对小鼠支气管肺泡灌洗液中细胞因子表达的影响

图 7-图 12 为 *Bjerkandera* sp. 对小鼠支气管肺泡灌洗液中细胞因子表达的影响。*B.sp* 单独作用组与对照组相比, 细胞因子的表达无变化; 与对照组(IL-1 β , $p<0.001$; IL-12, $p<0.05$)、*B.sp*₂($p<0.05$)和 H-ASD 组(IL-1 β , $p<0.01$)相比, H-ASD+*B.sp*₂ 组的小鼠 BALF 中 IL-1 β 和 IL-12 明显升高。H-ASD+*B.sp*₈ 联合处理可引起小鼠 IL-1 β 、IL-12、IL-6、IL-13 和 TGF- β 明显高于对照组和 H-ASD 组, 其中 IL-1 β 、IL-12、IL-6 和 TGF- β 1 水平明显高于 *B.sp*₈ 单独作用组。

在 OVA 处理的六个组别中, 与 OVA 单独作用组相比, OVA+*B.sp*₈ 组小鼠 BALF 中 IL-1 β 、IL-5、IL-10 和 TGF- β 1 水平明显升高(IL-5, $p<0.01$; IL-1 β , IL-10 和 TGF- β 1, $p<0.05$), 且相较于 *B.sp*₈ 单独作用组, IL-10 和 TGF- β 1 水平明显升高($p<0.05$)。另外, 与对照组、H-ASD 和 OVA 单独作用组相比, OVA+H-ASD+*B.sp*₂ 联合作用可引起 IL-1 β 和 TGF- β 1 水平的明显升高。同样的, 可观察到 OVA+H-ASD+*B.sp*₈ 联合作用组中 BALF 的 IL-1 β 、IL-6、IL-13 和 TGF- β 1 明显高于对照组和 OVA 单独作用组, 此外, IL-1 β 、IL-5、IL-13 和 TGF- β 1 表达也强于 H-ASD 单独作用组。

H-ASD 和 *B.sp* 单独处理并不能引起 TGF- β 1 的表达增强, 但是 OVA+H-ASD+*B.sp*₂ 联合作用组小鼠 BALF 中 TGF- β 1 水平与 H-ASD+*B.sp*₂、OVA+H-ASD ($p<0.001$)和 OVA+*B.sp*₂ ($p<0.05$)相比显著增多。而与 *B.sp*₈ 单独处理组和 OVA+H-ASD 组相比, OVA+H-ASD+*B.sp*₈ 联合作用组小鼠 BALF 中 TGF- β 1 水平明显升高, 其含量大约为 OVA+*B.sp*₈ 组的 TGF- β 1 含量的 3 倍。*B.sp* 不能引起 IL-33, IFN- γ 和 TNF- α 的表达。

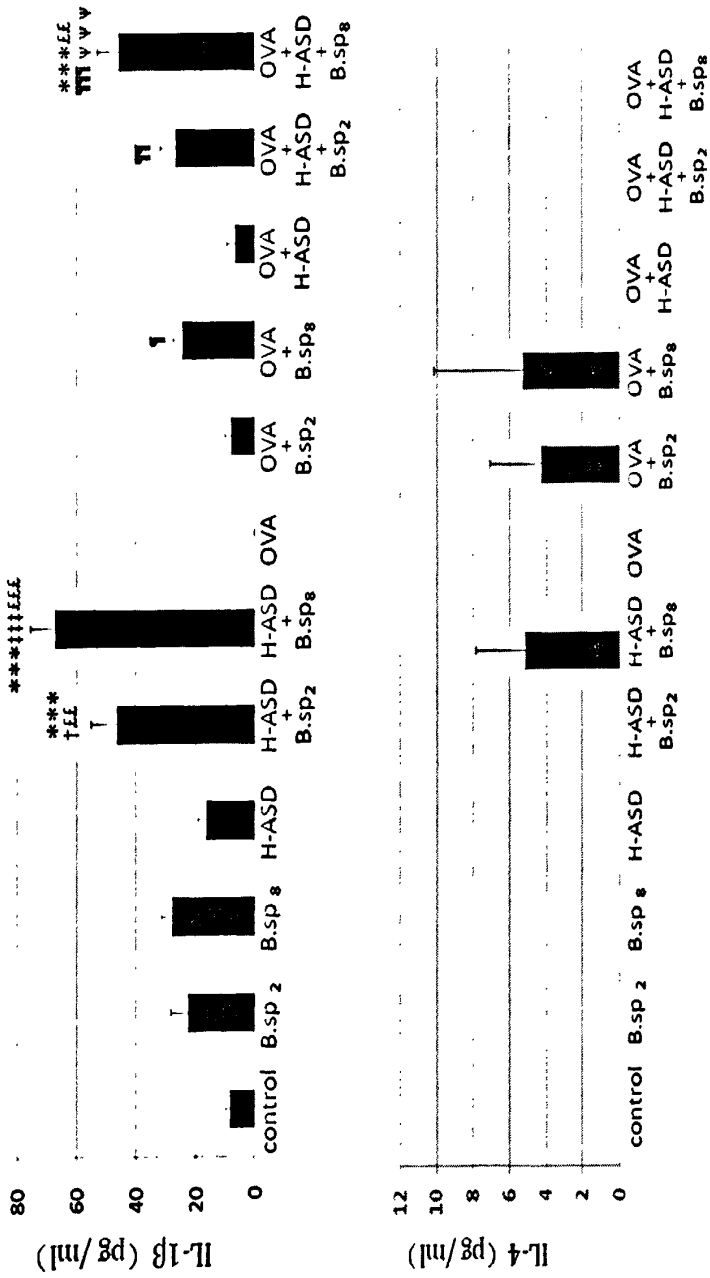


图 7, *Bjerkandera* sp. 对小鼠支气管肺泡灌洗液中 IL-1 β 和 IL-4 表达的影响。
 *实验分为 12 组, 分别是对照组 (生理盐水组)、*Bjerkandera* sp. 2 μ g 组、*Bjerkandera* sp. 8 μ g 组、H-ASD+*Bjerkandera* sp. 2 μ g 组、H-ASD+*Bjerkandera* sp. 8 μ g 组、OVA+*Bjerkandera* sp. 2 μ g 组、OVA+*Bjerkandera* sp. 8 μ g 组、OVA+H-ASD+*Bjerkandera* sp. 2 μ g 组、OVA+H-ASD+*Bjerkandera* sp. 8 μ g 组。每隔一周进行一次气管灌注。最后一次气管灌注 24 h 后收集支气管肺泡灌洗液。所有的值均用均值 $\pm$ 标准差表示。ND: 未检测到。***p<0.001 versus Control; †p<0.05 versus B.sp₂; ††p<0.001 versus B.sp₂; †††p<0.001 versus B.sp₈; ††††p<0.001 versus H-ASD; †††††p<0.001 versus OVA; ††††††††p<0.001 versus OVA; ††††††††p<0.001 versus OVA; ††††††††p<0.001 versus OVA+H-ASD.

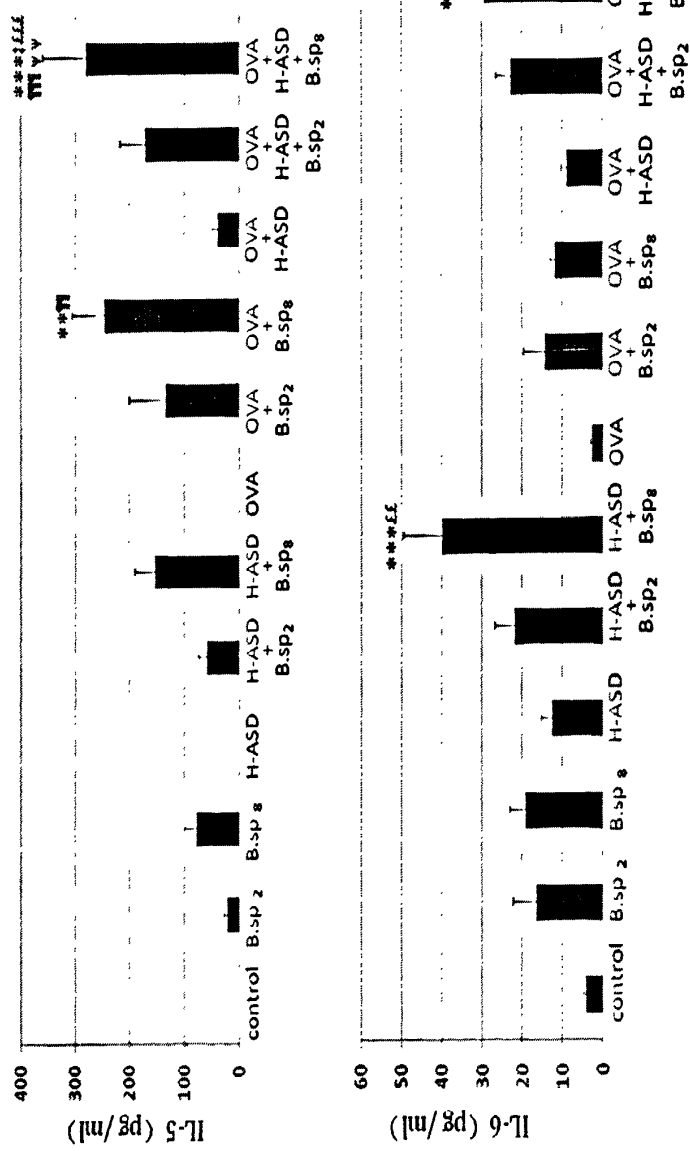


图 8, *Bjerkandera* sp.对小鼠支气管肺泡灌洗液中 IL-5 和 IL-6 表达的影响。

*实验分为 12 组, 分别是对照组 (生理盐水组)、*Bjerkandera* sp. 2 μ g 组、*Bjerkandera* sp. 8 μ g 组、H-ASD+*Bjerkandera* sp. 2 μ g 组、H-ASD+*Bjerkandera* sp. 8 μ g 组、OVA+*Bjerkandera* sp. 2 μ g 组、OVA+*Bjerkandera* sp. 8 μ g 组、OVA+H-ASD+*Bjerkandera* sp. 2 μ g 组、OVA+H-ASD+*Bjerkandera* sp. 8 μ g 组。每隔一周进行一次气管灌注。最后一次气管灌注 24 h 后收集支气管肺泡灌洗液。所有的值均用均值 $\pm$ 标准差表示。ND: 未检测到。*** $p<0.001$ versus Control; ** $p<0.01$ versus OVA; ^{fff} $p<0.001$ versus H-ASD; ^{ttt} $p<0.01$ versus OVA; ^{vv} $p<0.01$ versus OVA+H-ASD.

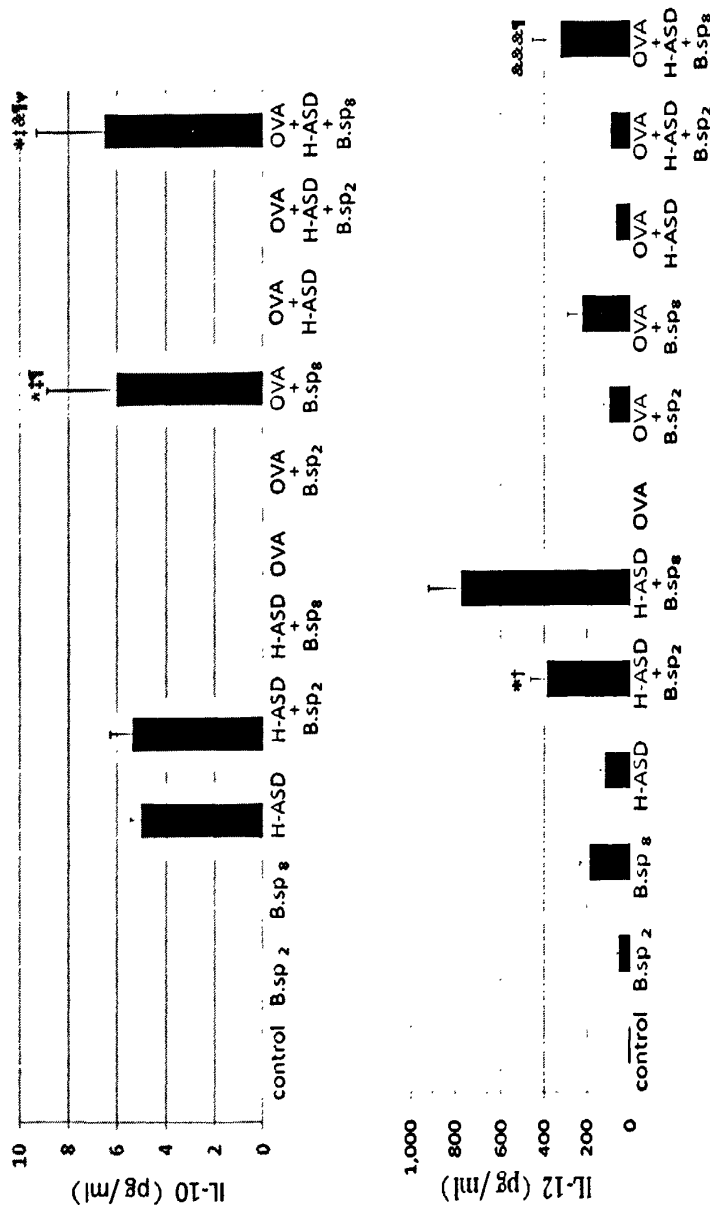


图 9, *Bjerkandera* sp.对小鼠支气管肺泡灌洗液中 IL-10 和 IL-12 表达的影响。

*实验分为 12 组，分别是对照组（生理盐水组）、*Bjerkandera* sp. 2 μ g 组、*Bjerkandera* sp. 8 μ g 组、H-ASD+*Bjerkandera* sp. 2 μ g 组、H-ASD+*Bjerkandera* sp. 8 μ g 组、Ovalbumin (Ovalbumin, OVA) 组、OVA+*Bjerkandera* sp. 2 μ g 组、OVA+*Bjerkandera* sp. 8 μ g 组、OVA+H-ASD+*Bjerkandera* sp. 2 μ g 组、OVA+H-ASD+*Bjerkandera* sp. 8 μ g 组、每隔一周进行一次气管灌注。最后一周进行一次气管灌注。最后一次气管灌注 24 h 后收集支气管肺泡灌洗液。所有的值均用均值 $\pm$ 标准差表示。ND: 未检测到。* $p<0.05$ versus Control; † $p<0.05$ versus B.sp₂; ‡ $p<0.05$ versus B.sp₈; § $p<0.05$ versus OVA; & $p<0.05$ versus H-ASD+B.sp₂; †† $p<0.001$ versus H-ASD+B.sp₈。

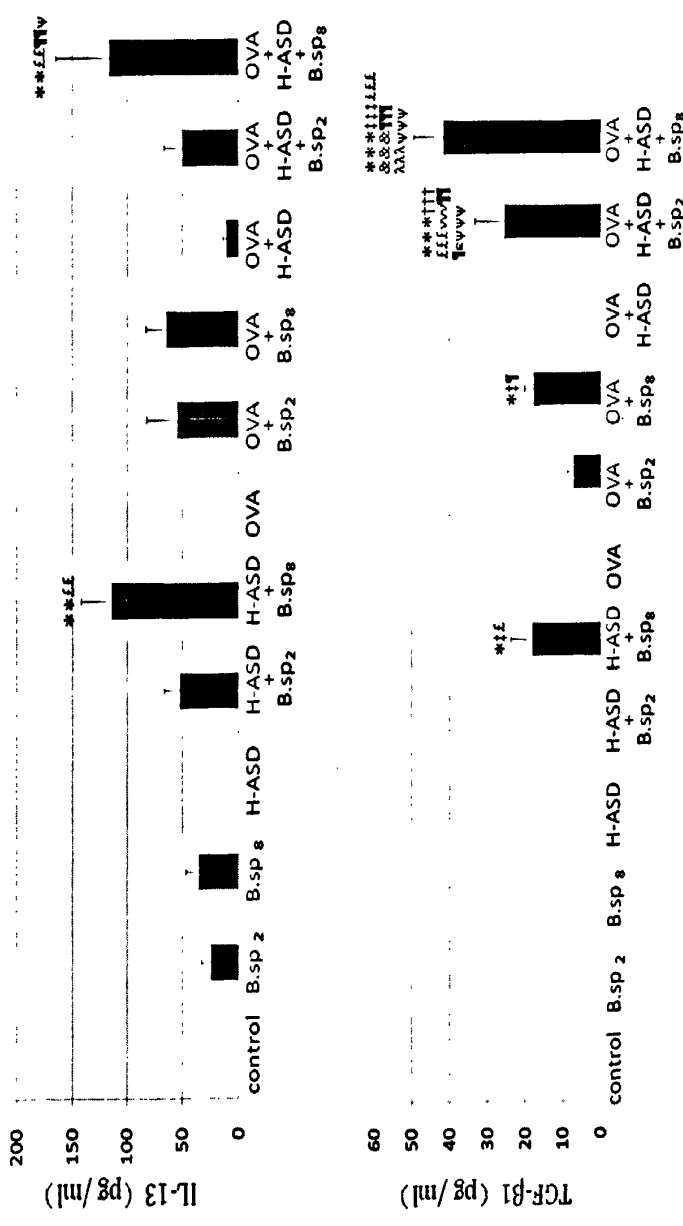


图 10, *Bjerkandera* sp. 对小鼠支气管肺泡灌洗液中 IL-13 和 TGF-β1 表达的影响。

*实验分为 12 组, 分别是对照组 (生理盐水组)、*Bjerkandera* sp. 2 μg 组、*Bjerkandera* sp. 8 μg 组、H-ASD+*Bjerkandera* sp. 2 μg 组、H-ASD+*Bjerkandera* sp. 8 μg 组、OVA+*Bjerkandera* sp. 2 μg 组、OVA+*Bjerkandera* sp. 8 μg 组、H-ASD+OVA+*Bjerkandera* sp. 2 μg 组、H-ASD+OVA+*Bjerkandera* sp. 8 μg 组、OVA+H-ASD+*Bjerkandera* sp. 2 μg 组、OVA+H-ASD+*Bjerkandera* sp. 8 μg 组、OVA+H-ASD+*Bjerkandera* sp. 2 μg 组+OVA+H-ASD+*Bjerkandera* sp. 8 μg 组。每隔一周进行一次气管灌注。最后一次气管灌注 24 h 后收集支气管肺泡灌洗液。所有的值均用均值±标准差表示。ND: 未检测到。* $p<0.05$ versus Control; ** $p<0.01$ versus Control; *** $p<0.001$ versus Control; $^{\dagger}p<0.001$ versus B.sp2; $^{\ddagger}p<0.05$ versus B.sp8; $^{\S}p<0.001$ versus H-ASD; $^{\xi}p<0.01$ versus H-ASD; $^{\zeta}p<0.001$ versus H-ASD; $^{\eta}p<0.05$ versus OVA; $^{\theta}p<0.001$ versus OVA; $^{\iota}p<0.001$ versus OVA+B.sp2; $^{\kappa}p<0.001$ versus OVA+B.sp8; $^{\lambda}p<0.001$ versus OVA+B.sp2+B.sp8; $^{\mu}p<0.001$ versus OVA+B.sp2; $^{\nu}p<0.001$ versus OVA+B.sp8; $^{\omega}p<0.001$ versus OVA+B.sp2+B.sp8.

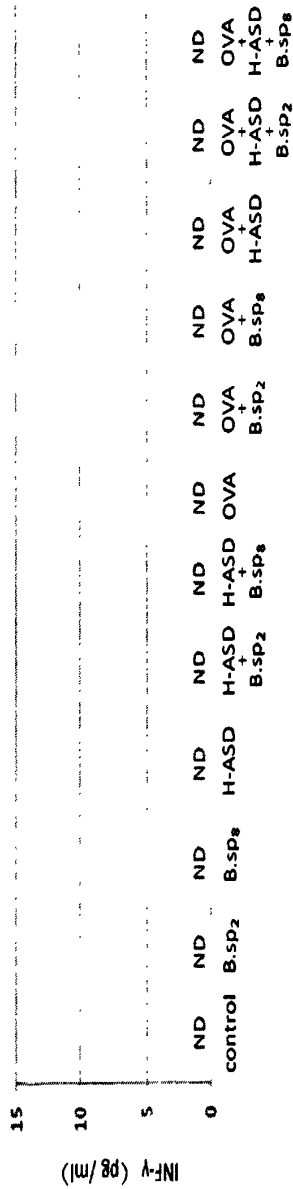
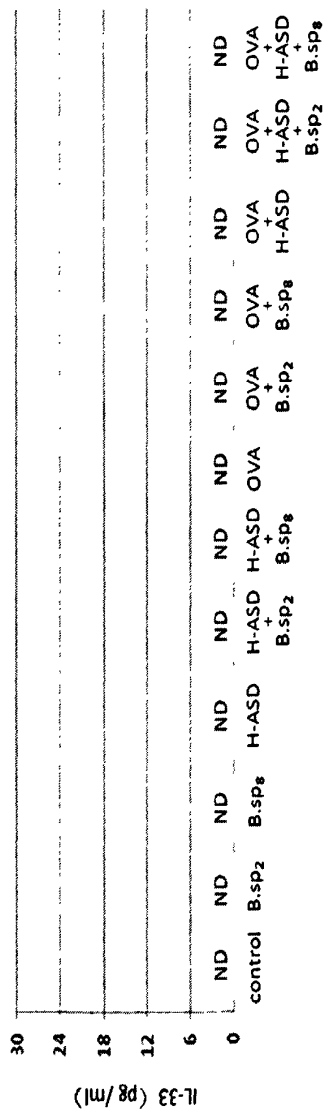


图 11, *Bjerkandera* sp. 对小鼠支气管灌洗液中 IL-33 和 INF- γ 表达的影响。

*实验分为 12 组, 分别是对照组 (生理盐水组)、*Bjerkandera* sp. 2 μ g 组、H-ASD+*Bjerkandera* sp. 2 μ g 组、H-ASD+*Bjerkandera* sp. 8 μ g 组、Ovalbumin, OVA 组、OVA+*Bjerkandera* sp. 2 μ g 组、OVA+*Bjerkandera* sp. 8 μ g 组、OVA+H-ASD 组、OVA+H-ASD+*Bjerkandera* sp. 2 μ g 组、OVA+H-ASD+*Bjerkandera* sp. 8 μ g 组。每隔一周进行一次气管灌注。最后一次气管灌注 24 h 后收集支气管肺泡灌洗液。所有的值均用均值 $\pm$ 标准差表示。ND: 未检测到。

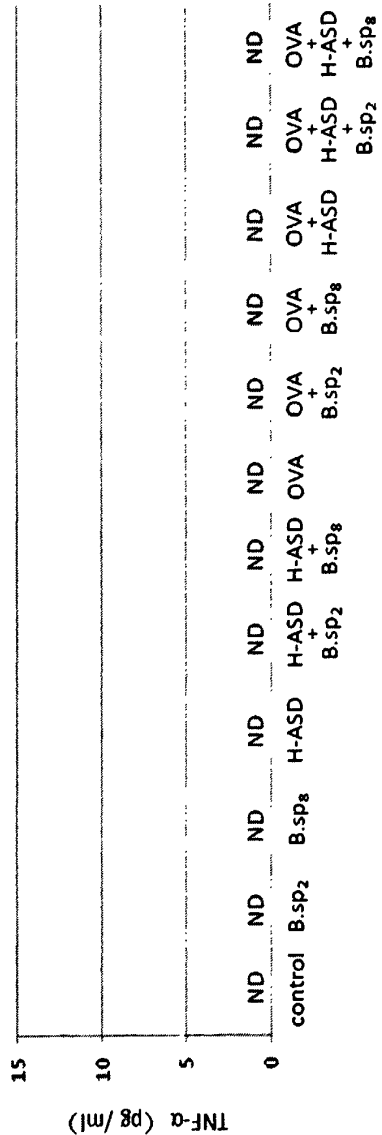


图 12, *Bjerkandera* sp.对小鼠支气管肺泡灌洗液中 TNF-α 表达的影响。

*实验分为 12 组，分别是对照组（生理盐水组）、*Bjerkandera* sp. 2 μg 组、*Bjerkandera* sp. 8 μg 组、H-ASD+*Bjerkandera* sp. 2 μg 组、H-ASD+*Bjerkandera* sp. 8 μg 组、卵白蛋白（Ovalbumin, OVA）组、OVA+*Bjerkandera* sp. 2 μg 组、OVA+*Bjerkandera* sp. 8 μg 组、OVA+H-ASD 组、OVA+H-ASD+*Bjerkandera* sp. 2 μg 组、OVA+H-ASD+*Bjerkandera* sp. 8 μg 组。每隔一周进行一次气管灌注。最后一次气管灌注 24 h 后收集支气管肺泡灌洗液。所有的值均用均值±标准差表示。ND：未检测到。

九、*Bjerkandera* sp. 对小鼠支气管肺泡灌洗液中趋化因子表达的影响

表 3 为 *Bjerkandera* sp. 对小鼠支气管肺泡灌洗液中趋化因子表达的影响。与对照组相比, B.sp₂ 和 B.sp₈ 单独处理可引起 KC 的增高 ($p<0.01$ 和 $p<0.001$)。H-ASD 只引起 MIP-1 α 的增高 ($p<0.001$)。与对照组和 B.sp₂ 组相比, H-ASD+B.sp₂ 组的小鼠 BALF 中 MIP-1 α 和 KC 明显升高。H-ASD+B.sp₈ 组的小鼠 BALF 中 Eotaxin、RANTES、KC 和 MCP-1 的水平与对照组及 B.sp₈ 单独处理组相比显著升高。

在 OVA 处理的六个组别中, 与对照组及 OVA 单独作用组相比, OVA+B.sp₂ 和 OVA+B.sp₈ 组小鼠 BALF 中 KC 都明显升高 ($p<0.001$)。OVA+H-ASD+B.sp₂ 与对照组和 OVA 组相比, MIP-1 α 和 KC 水平显著升高, 其中 KC 与 H-ASD 组及 OVA+H-ASD 组比较有显著性差异 ($p<0.001$)。OVA+H-ASD+B.sp₈ 组 BALF 中测得趋化因子 (除 RANTES 外) 水平较对照组和 OVA 处理组均有升高, 其中嗜酸性相关趋化因子 Eotaxin、MCP-1 和 MCP-3 与 B.sp₈、OVA+H-ASD 有显著区别。另外, OVA+H-ASD+B.sp₈ 组小鼠 BALF 中 RANTES 水平与 H-ASD+B.sp₈ 相比明显升高, 特别是 MCP-3 含量约是 H-ASD+B.sp₈ 组的 4 倍。

十、*Bjerkandera* sp.对小鼠血清中 OVA 特异性 IgE 和 IgG1 表达的影响

图 13 为 *Bjerkandera* sp.对小鼠血清中 OVA 特异性 IgE 和 IgG1 表达的影响。*B.sp.*和 H-ASD+*B.sp.* 组不能介导 OVA 特异性 IgG1 的表达。OVA+*B.sp.* 和 OVA+H-ASD 能够引起 OVA 特异性 IgG1 的表达增多,但与对照组及 OVA 单独作用组比较无统计学差异。与对照组、H-ASD 组和 OVA 组相比, OVA+H-ASD+*B.sp.*₂ 组小鼠血清中 OVA 特异性 IgG1 表达显著增多,特别是与 *B.sp.*₂ 和 H-ASD+*B.sp.*₂ 组相比有增多趋势。另外, OVA+H-ASD+*B.sp.*₈ 组小鼠血清中 OVA 特异性 IgG1 表达比 *B.sp.*₈ 和 H-ASD+*B.sp.*₈ 组的表达更强。在所有组别中未见 OVA 特异性 IgE 的表达。

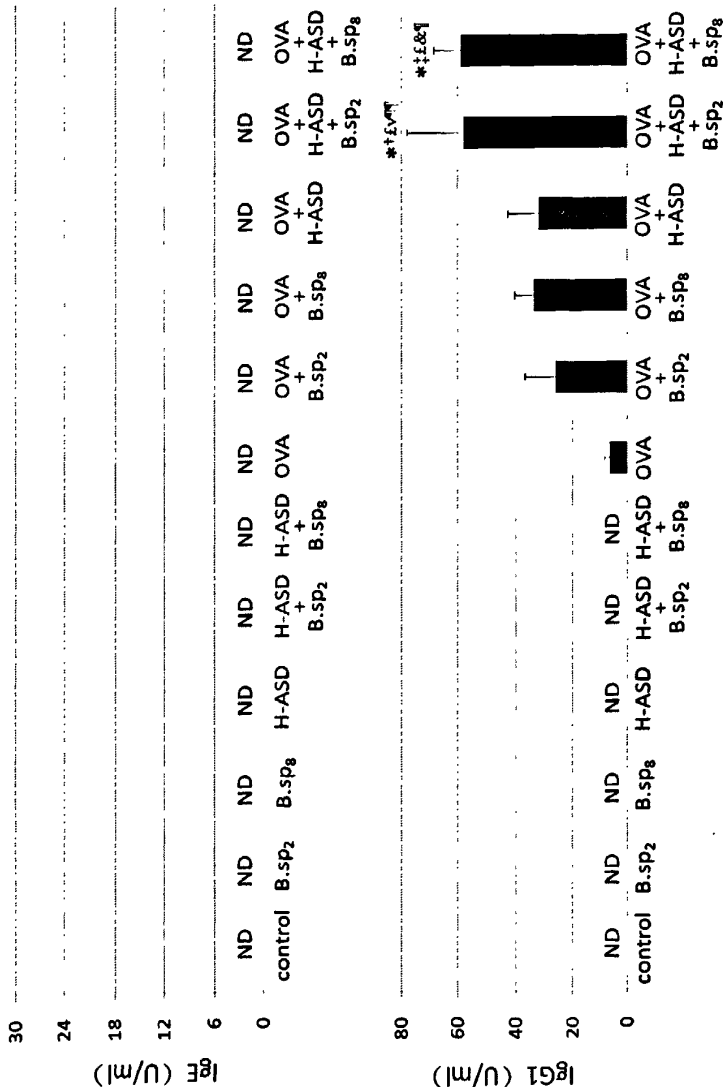


图 13, *Bjerkandera sp.*对小鼠血清中 OVA 特异性 IgE 和 IgG1 表达的影响

所有的值均用均值±标准差来表示。

* $p<0.001$ versus Control; † $p<0.001$ versus B.sp2; ‡ $p<0.001$ versus B.sp8; § $p<0.001$ versus H-ASD; ¶ $p<0.001$ versus H-ASD+B.sp2; & $p<0.001$ versus H-ASD+B.sp8; ¶ $p<0.01$ versus OVA; ¶ $p<0.001$ versus OVA.

讨 论

中国西北地区由于独特的地理环境,是沙尘暴频繁发生的地区,主要源地有古尔班通古特沙漠、塔克拉玛干沙漠等。近半个世纪以来,沙尘暴波及的范围愈来愈广,造成的损失愈来愈重。起源于我国的沙尘暴,在西北风带的推动下,贯穿我国东部地区,飞越黄海、朝鲜半岛和日本,有时越过太平洋直达美国,波及大半个地球^[1-3]。这种生物气溶胶(生物颗粒)对所波及地区的生态系统和人类健康造成严重影响。大量研究表明,携带了各种微生物物质的沙尘暴颗粒会引起人类呼吸系统的疾病^[5-6]。我们以前的研究发现,野生型的沙尘暴颗粒可诱导人类的支气管炎和变应性鼻炎,但是加热后去除颗粒物表面有毒物质的颗粒仅能引起轻微的病理改变^[17,20,21],因此我们认为吸附于沙尘暴颗粒物表面的污染物能够加重小鼠呼吸炎症。以前一项研究报道,ASD 和 ASD+SO₄²⁻均能加重 OVA 诱导小鼠肺泡和呼吸道粘膜下层嗜酸性粒细胞的募集,但增加 SO₄²⁻的剂量并没有观察到嗜酸性粒细胞募集的加剧^[15]。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。另一项肺炎克雷伯氏菌的实验表明,这种自然界广泛存在的人类感染肺炎最常见的革兰氏阴性菌能够增加促炎症因子的产生且诱导呼吸系统炎症^[24]。在我们这项研究中,7 种从沙尘暴颗粒表面提取得到的微生物, *Nocardiopsis* sp. (No.1-4), *Bacillus* sp., *Streptomyces* sp. 和 *Bjerkandera* sp., 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。

Nocardiopsis sp. 是一种嗜碱性放线菌,通常存在于盐湖、盐碱地、海水、晒盐池和盐渍食物等环境中。*Bacillus* sp. 属芽孢杆菌属,革兰氏阳性菌,直杆状,常以成对或链式排列,具圆端或方端,芽孢椭圆、卵圆、柱状、圆形,能抗许多不良环境^[25]。芽孢杆菌在自然界中分布非常广泛,土壤、空气、肥料、饲料、食物等生境中都有存在,甚至在沙漠沙土、海洋沉淀物等较为恶劣环境中也有存在^[26]。*Streptomyces* sp., 属链霉菌,革兰氏阳性菌,好气,不抗酸。气生菌丝发育良好,孢子链直,波曲,有的呈穗状;孢子大小、形状不一,杆状,或多角形,好氧生长。

Bjerkandera sp. 是一种白腐菌,它能够降解芳香烃类^[5,27], 合成染料^[28]和不同

的木制材料^[29]。它也是真菌相关慢性咳嗽的一种病原菌^[22]，过敏性真菌性咳嗽的一个特征是对 *Bjerkandera* sp.敏感。以往的研究显示，小鼠支气管肺泡灌洗液中不同的生物成分能够准确反应肺部健康状况。其中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有关^[30]。

通常认为，Th 细胞在免疫调节中起重要作用，可分为 Th1 和 Th2 两种类型，均由 Th0 分化而来。一般情况下，Th0 按一定比例向 Th1 和 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^[31]。Mowbray 等人认为，过敏原对支气管哮喘 T 细胞的活化具有选择性，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 移动，通过分泌大量的 Th2 型细胞因子诱导哮喘^[32]。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。其中 Th2 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及血清 IgE 的产生^[33]。而 Th1 淋巴细胞分泌细胞因子 IFN- γ 和 TNF- α ，Th2 细胞释放的细胞因子能抑制 Th1 细胞增殖、分化以及抑制 Th1 细胞释放 IFN- γ 和 TNF- α ^[34]。在本研究中，*B.sp*₈ 单独作用能够引起小鼠 BALF 中性粒细胞和嗜酸性粒细胞的增殖，同时可引起中性粒细胞相关趋化因子，MIP-1 α 、KC、RANTES^[35,36]和嗜酸性粒细胞相关因子的表达，如 MCP-3、IL-5 和 IL-13^[37-39]。此外，气道粘膜上皮杯状细胞中度浸润。由此推断，*B.sp* 单独作用可以引起小鼠气道的炎症反应。

以往的研究发现，加热后的沙尘暴颗粒（H-ASD）仅能引起轻微的炎症反应，这可能是由于其本身的无机成分，如矿物纤维和石英等，它们可以对肺细胞产生细胞毒性和遗传毒性^[40,41]。然而，H-ASD 和 *B.sp*₂/*B.sp*₈ 联合作用使炎症细胞和促炎性介质分泌增多，如 Th2 相关细胞因子 IL-5 和 IL-13，以及趋化性细胞因子 eotaxin^[42]和 MCP-3。由于 H-ASD 单独作用并不能引起这些因子水平的增高，表明这种伴随着趋化因子和细胞因子的过敏反应是由 *B.sp* 诱导的。另外，可观察到中度的杯状细胞增殖和嗜酸性粒细胞浸润，这种气道上皮细胞向杯状细胞的转化与大量的嗜酸性粒细胞浸润气道粘膜下层有关。嗜酸性粒细胞可通过释放介质来

引起上皮损伤和气道高反应，这些介质包括血小板活化因子、活性氧自由基、白细胞三烯以及主要的基础蛋白质^[43]。因此，*B.sp* 可增强嗜酸性粒细胞相关炎症反应。

在 OVA 相关作用组中，OVA 单独处理并不能引起小鼠 BALF 中嗜酸性粒细胞的增多，仅见呼吸道嗜酸性粒细胞和淋巴细胞的轻度浸润和杯状细胞的轻度增殖。在 OVA+*B.sp* 联合作用组中 *B.sp* 加剧呼吸道上皮细胞转化为杯状细胞的情况与粘膜下层的嗜酸性粒细胞浸润程度相一致，同时可导致 BALF 中嗜酸性粒细胞的增多和相关细胞因子、趋化因子水平的增强，如 IL-5、eotaxin、MCP-1^[44]、MCP-3 和 Th2 相关因子 IL-13。另外，中性粒细胞相关趋化因子，如 KC、RANTES、MIP-1 α 和 Th1 相关细胞因子 IL-12 都比对照组和 OVA 单独处理组水平高。所有这些结果表明，吸附于 ASD 上的微生物，如 *B.sp*，与加剧嗜酸性粒细胞的募集有关，这是通过肺泡中的化学介质来实现的，同时 BALF 中的细胞性状的变化以及肺部病理改变可以准确地反应呼吸系统的健康状况。

另外，OVA、H-ASD 和 *B.sp* 的协同作用能够诱发最显著的嗜酸性粒细胞相关因子水平的增高，如 IL-5、eotaxin 和 MCP-3。而且中性粒细胞相关趋化因子，如 KC、RANTES 和 MIP-1 α 与 OVA 和 OVA+H-ASD 组比较有显著升高。然而，OVA 和 *B.sp* 联合作用并不能引起 IFN- γ 和 TNF- α 水平的增高，这可能是由于 Th2 细胞释放的 IL-4、IL-5 和 IL-13 抑制了 IFN- γ 和 TNF- α 的产生^[45]。在 OVA、H-ASD 和 *B.sp* 联合处理组，Th1 相关趋化因子，如 RANTES 和 KC，尤其是 IL-12 的活性被 Th2 细胞的活化抑制了。Th2 过敏反应主要是由 OVA 和 *B.sp* 介导的。

哮喘气道不可逆阻塞，主要原因是气道的持续性损伤和结构异常，即气道重构。气道重构是机体对损伤性刺激的一种修复反应，但修复后的组织结构和功能均与正常组织不同，如慢性心功能不全时的心肌重构和 COPD 的气道与肺血管重构，进而引起不同组织和细胞活力增强导致气管壁的加厚^[46-48]。在这个过程中细胞产生大量的炎性细胞因子和生长因子^[49,50]。基底膜的增厚是抑制炎症细胞和蛋白的保护性机制。这些炎症细胞和蛋白是由扩增的粘膜下层血管释放的，然后侵入到上皮破坏其完整性。Doucet 等研究显示，肺成纤维细胞的不同亚型不仅是哮喘发病机理中一种重要的效应细胞，也在由 IL-4 和 IL-13 活化的肺部重构过程中

起到作用^[51]。同时，其它一些细胞因子的表达，如 TGF- β 1 也在气道重构中起到关键的作用^[52,53]。在我们这个研究中，B.sp 诱导 IL-5、IL-13 和 TGF- β 1 的释放，并且在 B.sp 和 OVA 组表达增强。此外，OVA、H-ASD 和 B.sp 联合作用组小鼠气管基底膜显著增厚及玻璃样变，这也是气道重构重要的病理改变。

在这个研究中，B.sp 和 OVA 的联合作用可引起 OVA 特异性 IgG1 的表达。与此相比，B.sp、OVA 和 H-ASD 联合作用会增强 OVA 特异性 IgG1 的表达。可见，特异性抗体在由 B.sp 和 OVA 诱导的过敏反应的恶化作用中起作用。

虽然 OVA、H-ASD 和 B.sp 联合作用组中嗜酸性粒细胞的数量较 OVA+B.sp 组减少，但是细胞因子和趋化因子的表达和病理学检查都表明肺部损伤加剧了。我们认为这个剂量的 B.sp 和 OVA 能够引起严重的肺损伤和细胞死亡，所以更多的炎症细胞被吸附在上皮表面，进而造成 BALF 中炎症细胞数量的减少。因此，我们想采用较低剂量的 B.sp 进行进一步实验，体外实验同时进行。

结 论

本研究发现，从沙尘暴颗粒物上提取的 7 种微生物中 B.sp 可以通过激活 Th2 免疫反应，促进 Th2 细胞释放免疫炎症相关的细胞因子，进而恶化 OVA 诱导的小鼠哮喘症状。微生物在上述反应中发挥重要作用。

• 本研究创新性的自我评价 •

本研究采用动物体内实验的方法，首次研究了亚洲沙尘暴附着微生物能够加重卵蛋白诱导的哮喘小鼠气道过敏性炎症，并确定了能加重炎症的微生物的种类，并探求其对哮喘小鼠的损伤作用机制。

• 参考文献 •

- 1 Duce RA, Unni CK, Ray BJ, *et al.* Long-range atmospheric transport of soil dust from Asia to the tropical North Pacific: temporal variability. *Science*. 1980; 209: 1522-1524.
- 2 Husar RB, Tratt DB, Schichtel BA, *et al.* Asian dust events of April 1998. *J Geophys Res*. 2001; 106: 18316-18330.
- 3 Kim BG, Han JS, Park SU, Transport SO₂ and aerosol over the Yellow Sea. *Atmos Environ*. 2001; 35: 727-737.
- 4 Mori I, Nishikawa M, Tanimura T, *et al.* Change in size distribution and chemical composition of Kosa (Asian dust) aerosol during long-range transport. *Atmos Environ*. 2003; 37: 4253-4263.
- 5 Kobayashi F, Kodanikuchi K, Kakikawa M, *et al.* Direct samplings, separated culture, and identifications of kosa bioaerosols over Noto Peninsula, Suzu City (Japanese) *Eaorozu Kenkyu*. 2010; 25(1): 23-28.
- 6 Maki T, Susuki S, Kobayashi F, *et al.* Phylogenetic analysis of atmospheric halotolerant bacterial communities at high altitude in an Asian dust (KOSA) arrival region, Suzu City. *Sci Total Environ*. 2010; 408(20): 4556-562.
- 7 Bell ML, Levy JK, Lin Z. The effect of sandstorms and air pollution on cause-specific hospital admissions in Taipei, Taiwan. *Occup Environ Med*. 2008; 65(2): 104-111.
- 8 Chan CC, Chuang KJ, Chen WJ, *et al.* Increasing cardiopulmonary emergency visits by long-range transported Asian dust storms in Taiwan. *Environ Res*. 2008; 106(3): 393-400.
- 9 Cheng MF, Ho SC, Chiu HF, *et al.* Consequences of exposure to Asian dust storm events on daily pneumonia hospital admissions in Taipei, Taiwan. *J Toxicol Environ Health A*. 2008; 71(19): 1295-1299.
- 10 Chiu HF, Cheng MH, Yang CY. Air pollution and hospital admissions for pneumonia in a subtropical city: Taipei, Taiwan. *Inhal Toxicol*. 2009; 21(1): 32-37.
- 11 Chen YS, Sheen PC, Chen ER, *et al.* Effects of Asian dust storm events on daily mortality in Taipei, Taiwan. *Environ Res*. 2004; 95(2): 151-155.
- 12 Kwon HJ, Cho SH, Chun Y, *et al.* Effects of the Asian dust events on daily mortality in Seoul,

- Korea. Environ Res. 2002; 90: 1-5.
- 13 Watanabe M, Yamasaki A, Burioka N, *et al.* Correlation between Asian dust storms and worsening asthma in western Japan. Allergol Int. 2011; 60 (3): 267-275.
 - 14 Kanatani KT, Ito I, Al-Delaimy WK, Toyama Asian Desert Dust, Asthma Study Team, *et al.* Desert dust exposure is associated with increased risk of asthma hospitalization in children. Am J Respir Crit Care Med. 2010; 182(12): 1475-1481.
 - 15 Hiyoshi K, Ichinose T, Sadakane K, *et al.* Asian sand dust enhances ovalbumin-induced eosinophil recruitment in the alveoli and airway of mice. Environ Res. 2005; 99: 361-368.
 - 16 Ichinose T, Sadakane K, Takano H, *et al.* Enhancement of mite allergen-induced eosinophil infiltration in the murine airway and local cytokine/chemokine expression by Asian sand dust. J Toxicol Environ Health. 2006; A6: 1571-1585.
 - 17 Ichinose T, Yoshida S, Hiyoshi K, *et al.* The effects of microbial materials adhered to Asian sand dust on allergic lung inflammation. Arch Environ Contam Toxicol. 2008a; 55: 348-357.
 - 18 Ichinose T, Yoshida S, Sadakane K, *et al.* Effects of Asian sand dust, Arizona sand dust, amorphous silica and aluminum oxide on allergic inflammation in the murine lung. Inhal Toxicol. 2008b; 20: 685-694.
 - 19 Ichinose T, Hiyoshi K, Yoshida S, *et al.* Asian sand dust aggravates allergic rhinitis in guinea pigs induced by Japanese cedar pollen. Inhal Toxicol. 2009; 21: 985-993.
 - 20 He M, Ichinose T, Yoshida S, *et al.* Airborne Asian sand dust enhances murine lung eosinophilia. Inhal Toxicol. 2010a; 22(12): 1012-1025.
 - 21 He M, Ichinose T, Yoshida S, *et al.* Urban particulate matter in Beijing, China, enhances allergen-induced murine lung eosinophilia. Inhal Toxicol. 2010b; 22: 709-718.
 - 22 Ogawa H, Fujimura M, Takeuchi Y, *et al.* Is *Bjerkandera adusta* important to fungus-associated chronic cough (FACC) as an allergen? Eight cases' report. J Asthma. 2009; 46: 849-855.
 - 23 James AC, Stahlhofen W, Rudolf G, *et al.* 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.

- 24 He M, Ichinose T, Yoshida S, *et al.* Asian sand dust enhances murine lung inflammation caused by *Klebsiella pneumonia*. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2012; 258(2): 237-247.
- 25 薛恒平.微生态制剂浅析[J].饲料工业,1996,17(1): 30-35.
- 26 周鼎年,译. 生物技术在饲料工业中的应用[M]. 北京: 农业出版社, 1995.
- 27 Field JA, de Jong E, Feijoo Costa G, *et al.* Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by new isolates of white rot fungi. *Appl Environ Microbiol.* 1992; 58: 2219-2226.
- 28 Heinfling A, Martinez MJ, Martinez AT, *et al.* Transformation of industrial dyes by manganese peroxidases from *Bjerkandera adusta* and *Pleurotus eryngii* in a manganese-independent reaction. *Appl Environ Microbiol.* 1998; 64: 2788-2793.
- 29 Gutierrez A, del Rio JC, Martinez MJ, *et al.* Fungal degradation of lipophilic extractives in *Eucalyptus globulus* wood. *Appl Environ Microbiol.* 1999; 65: 1367-1371.
- 30 Hayashi T, Adachi 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.
- 31 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.
- 32 Moverare R, Gllfinan 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.
- 33 Huang TJ, MacAry PA, Eynott P, *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.
- 34 Randolph DA, Stephens R, Carruthers CJ, *et al.* Cooperation between Th1 and Th2 cells in a murine model of eosinophilic airway inflammation. *J Clin Invest.* 1999; 104: 1021-1029.
- 35 Akahoshi T, Endo H, Kondo H, *et al.* Essential involvement of interleukin-8 in neutrophil recruitment in rabbits with acute experimental arthritis induced by lipopolysaccharide and interleukin-1. *Lymphokine Cytokine Res.* 1994; 13: 113-116.
- 36 Pan ZZ, Parkyn L, Ray P. Inducible lung-specific expression of RANTES: preferential

- recruitment of neutrophils. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000; 279: L658- 666.
- 37 Nagase H, Yamaguchi M, Jibiki S, *et al.* Eosinophil chemotaxis by chemokines: A study by a simple photometric assay. *Allergy.* 1999; 54: 944-950.
 - 38 Borish I, Rosenwasser LJ. Update on cytokines. *J Allergy Clin Immunol.* 1996; 97: 719-733.
 - 39 Leigh R, Ellis R, Wattie JN, *et al.* Type 2 cytokines in the pathogenesis of sustained airway dysfunction and airway remodeling in mice. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004; 169: 860-867.
 - 40 Liu W, Ernst JD, Courtney BV. Phagocytosis of crocidolite asbestos induces oxidative stress, DNA damage, and apoptosis in mesothelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2001; 23: 371-378.
 - 41 Schins RP, Duffin R, Hohn D, *et al.* Surface modification of quartz inhibits toxicity, particle uptake, and oxidative DNA damage in human lung epithelial cells. *Chem Res Toxicol.* 2002; 15: 1166-1173.
 - 42 Scheerens J, van Gessel SB, Nijkamp FP, *et al.* Eotaxin protein levels and airway pathology in a mouse model for allergic asthma. *Eur J Pharmacol.* 2002; 453: 111-117.
 - 43 Gleich GJ. The eosinophil and bronchial asthma: current understanding. *J Allergy Clin Immunol.* 1990; 85: 422-436.
 - 44 Dunzendorfer S, Kaneider NC, Kaser A, *et al.* Functional expression of chemokine receptor 2 by normal human eosinophils. *J Allergy Clin Immunol.* 2001; 108: 581-587.
 - 45 D'Andrea A, Ma X, Aste-Amezaga M, *et al.* Stimulatory and inhibitory effects of interleukin (IL)-4 and IL-13 on the production of cytokines by human peripheral blood mononuclear cells: Priming for IL-12 and tumor necrosis factor alpha production. *J Exp Med.* 1995; 181: 537-546.
 - 46 Bousquet J, Vignola AM, Chané P, *et al.* Airways remodeling in asthma: no doubt, no more? *Int Arch Allergy Immunol.* 1995; 107: 211-214.
 - 47 Bousquet J, Chané P, Campbell AM, *et al.* Cellular inflammation in asthma. *Clin Exp Allergy.* 1995; (Suppl) 2: 39-42.
 - 48 Bousquet J, Lacoste JY, Chané P, *et al.* Bronchial elastic fibres in normal subjects and asthmatic patients. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996; 153: 1648-1654.

- 49 Hamid Q, Azzawi M, Ying S, *et al.* Expression of mRNA for interleukin-5 in mucosal bronchial biopsies from asthmatics. *J Clin Invest.* 1991; 87: 1541-1546.
- 50 Bradding P, Feather I, Howarth PH, *et al.* Interleukin-4 is localized to and released by human mast cells. *J Exp Med.* 1992; 172: 381-386.
- 51 Doucet C, Brouty-Boye D, Pottin-Clemenceau C, *et al.* Interleukin (IL)-4 and IL-13 act on human lung fibroblasts implication in asthma. *J Clin Invest.* 1998; 101: 2129-2139.
- 52 Le AV, Cho JY, Miller M, *et al.* Inhibition of allergen-induced airway remodeling in Smad 3-deficient mice. *J Immunol.* 2007; 178: 7310-7316.
- 53 McMillan SJ, Xanthou G, Lloyd CM. Manipulation of allergen-induced airway remodeling by treatment with anti-TGF-beta antibody: effect on the Smad signaling pathway. *J Immunol.* 2005; 17: 5774-5780.

可吸入颗粒物对肺部炎症疾病的作用研究进展

城市化的快速进程加剧了环境污染，由此引起的肺部炎症疾病的发病率死亡率都有升高，因此深入地认识空气污染对慢性肺部炎症的影响是十分必要的。大量的流行病学调查表明，可吸入颗粒物的暴露可使已有的肺部疾病的症状恶化，如可导致慢性阻塞性肺疾病（COPD）的发病率和死亡率升高^[1-13]。呼吸道中可吸入颗粒物的沉积主要依据颗粒的大小，较大的颗粒常停留在呼吸道的上方和较大的气路，较小的颗粒可渗透到肺泡区。可吸入颗粒物在气道中不能有效的清除可引起颗粒物在肺组织的滞留，引起慢性的低水平的炎症反应，对肺部炎症疾病的影响在发病机制上非常重要。本文以 COPD 和哮喘为例对可吸入颗粒物对肺部炎症疾病的影响作用作一综述。

一. 可吸入颗粒物、COPD 及哮喘的概述

可吸入颗粒物（particles with an aerodynamic diameter of less than $10\mu\text{m}$, PM_{10} ）：指粒径小于 $10\mu\text{m}$ 的颗粒物，它是悬浮在空气中微小固体和液体的混合物，是雾、烟和空气尘埃的主要成分，也是大气中对人体有害的污染物。按其空气动力学直径可分为：①粗颗粒物（ $\text{PM}_{2.5-10}$ ），直径在 $2.5\sim 10\mu\text{m}$ ；②微细颗粒物（particles with an aerodynamic diameter of less than $2.5\mu\text{m}$, $\text{PM}_{2.5}$ ），直径小于 $2.5\mu\text{m}$ 。 PM_{10} 和 $\text{PM}_{2.5}$ 可以随呼吸进入下呼吸道，特别是 $\text{PM}_{2.5}$ 易在肺泡沉积，甚至进入血液。由于可吸入颗粒物吸附性强，可富集重金属、酸性氧化物、有机污染物（如多环芳烃），同时也是细菌、病毒和真菌的载体，是对人体危害最大的污染物，它与人体健康的关系已成为世界各地环境、医务工作员极为关注的问题。

与可吸入颗粒物相关的肺部炎症疾病包括：慢性阻塞性肺疾病（chronic obstructive pulmonary disease, COPD），它是一种以气流受限为特征的疾病，气流受限不能完全可逆，并渐进性发展；多与肺部对有害颗粒气体的炎症反应相关，其炎症过程的特征是：在终端气道的炎性免疫细胞的募集^[14,15]。由于工业的发展、环境的污染，COPD 在全球的发病率呈明显上升趋势。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）咳嗽症状，气道对多种刺激因子反应性增高。

以往的流行病学调查显示，PM₁₀ 的暴露可以恶化肺部炎症并使 COPD 及哮喘的发病率死亡率升高^[1-13]。同时，一些动物实验也证明 PM₁₀ 加剧气道炎症反应。因此 PM₁₀ 对肺部炎症疾病影响的作用过程及机制成为目前研究的焦点。

二. PM₁₀ 对肺部炎症疾病的作用过程

2.1 PM₁₀ 在呼吸系统的沉积与清除

颗粒物的大小和形状决定颗粒最终进入人体的部位和对人体的危害程度，PM₁₀ 可按粒子大小沉积于呼吸道的不同部位，粒径>5 μ m 的颗粒物由于惯性力的作用可被鼻毛和呼吸道粘液排除，粒径<5 μ m 的尘埃能避开上呼吸道的保护组织而进入肺中，其中粒径为 0.5~5 μ m 的可以沉积在细支气管中，经数小时后可由纤毛作用排除掉，清除机制的正常进行与纤毛的数量及功能、纤毛摆动相互间的协调性、纤毛间液的量与性质、黏液的流体力学性质和量有关。而粒径<0.5 μ m 的微粒可到达并滞留于肺泡中数周、数月或数年，甚至可能进入血液通往全身^[16]。这些不能被黏液纤毛作用和咳嗽排出的 PM₁₀ 主要被肺吞噬细胞防御，肺吞噬细胞是细胞对肺吸入颗粒物和微生物反应的重要防御屏障^[17]。在这些肺吞噬细胞中最重要的是肺泡巨噬细胞（alveolar macrophage, AM），AM 位于肺泡或气道的上皮细胞表面，其主要作用就是通过吞噬颗粒来拦截 PM₁₀^[18,19]。

2.2 PM₁₀ 介导的肺炎症：

尽管大多数文献关注 PM₁₀ 的大小，但许多研究人员都发现 PM₁₀ 组成的重要性^[20]。PM 从地理因素和人为因素的来源众多，主要来源有：工业燃料、城市建设、交通排放、生活排放、森林大火等^[21]。这些来源的 PM₁₀ 造成的有害影响，既有只作用于肺部的，也有全身系统性的。AM 与气管和肺泡上皮细胞都是参与 PM₁₀ 炎症作用的主要细胞。在这个过程当中，它们产生促炎性介质，进而引起肺部炎症反应，甚至是系统性的炎性反应^[22,23]。

2.2.1 AM 对 PM₁₀ 暴露的反应:

PM₁₀ 的暴露影响了 AM 的吞噬活力, 引发活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的产生和氧化应激, 释放促炎性介质, 如肿瘤坏死因子 (Tumor Necrosis Factor, TNF- α)、白细胞介素 (IL) -1 β 。这些促炎性介质在调节肺部及系统炎症反应中都起到了重要作用^[23]。除急性反应细胞因子 TNF- α 和 IL-1 β 外, AM 也产生了其它多种细胞因子, 包括 IL-6, IL-8 及巨噬细胞炎性蛋白 (macrophage inflammatory protein, MIP-1) 和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF)^[24]。IL-8 作为化学诱导剂和白细胞活化剂, 能协助募集多核形白细胞和单核细胞。GM-CSF 不仅是造血生长因子, 也是一种重要的粒细胞脱粒因子, 它能加剧由粒细胞诱导的组织损伤。IL-1 β 是一种“急性反应”细胞因子, 这种细胞因子能由多种细胞诱导产生细胞因子, IL-1 β 对 B 细胞和 T 细胞有广泛的刺激作用。IL-10 能抑制促炎性细胞因子如 TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 的生成, 然而, 它不能被暴露的 PM₁₀ 活化^[24], 这表明 PM₁₀ 不能诱导显著的抗炎症细胞因子反应。同样的, 暴露于 PM₁₀ 之后由 AM 释放出的这些细胞因子通过刺激其它细胞, 如上皮细胞和内皮细胞, 来引起促炎症反应。这些细胞能控制和促进白细胞募集到肺组织和有气体的空间。此外, PM₁₀ 的暴露还可以调节 AM 对感染因子的反应, 这可能是由 AM 降低的吞噬细胞能力所引起的一系列氧自由基介导的过程^[25-27]。

目前, 一些动物实验证明了氧化应激在 PM₁₀ 介导的气道炎症中起到重要作用^[25,26]。如气管注入微细颗粒物可引起中性粒细胞渗透和 NO 产物增多, 黏液分泌和气道高反应性增强, 所有这些都作用于 COPD 和哮喘等呼吸系统疾病的发病机理^[27-31]。若用超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 或 NO 合酶抑制剂对小鼠进行前处理, 可抑制这种作用^[30]。另外, 硫醇抗氧化物如布西拉明这类的消炎镇痛药可以抑制微细颗粒物对卵蛋白 (ovalbumin, OVA) 诱导的小鼠过敏反应产生的佐剂效应^[32]。

以上研究表明, AM 的功能性防御能力是由 PM₁₀ 的暴露降低了的肺宿主防御的途径调节的。因此, COPD 等有肺部炎症的患者对 PM₁₀ 的暴露及其在肺内的滞留是肺部炎症持续性至关重要的因素。

2.2.2 肺上皮细胞对 PM₁₀ 的反应:

肺上皮细胞表面积较大, 它承担 PM₁₀ 的主要冲击, 在接触这些颗粒的过程中至关重要。研究表明, 暴露颗粒物的肺上皮细胞能生成几种促炎性介质, 如 GM-CSF、IL-1 β 、IL-8、MCP-1 和白血球抑制因子 (Leukemia Inhibitory Factor, LIF) [28-30]。这些介质是重要的粒细胞化学诱导物, 能上调表达粘附分子, 如细胞间粘附分子 (Intercellular Adhesion Molecule, ICAM-1), 进而促进白细胞的募集。另有研究显示, 持续存在的腺病毒 E1A 基因在 COPD 患者中吸烟诱导的肺炎症中起到了放大的作用[31-33]。PM₁₀ 暴露使伴随腺病毒 E1A 基因转染的肺上皮细胞使促炎性介质的产量增多, 表明肺部 PM₁₀ 的滞留存在其它途径对 COPD 的肺炎症起持续作用[32,33]。同时, PM₁₀ 的暴露可促进 AM 和肺上皮与促炎性介质协同产物的交互作用, 如 GM-CSF 和 IL-6[28]。在人群的研究中显示, PM₁₀ 可引起志愿者的气道炎症反应, 同时伴有中性粒细胞的转运和炎症细胞因子和趋化因子的增多[34,35]。这些炎症介质能够损伤气道, 引起对细菌、真菌或病毒感染更高的敏感性, 从而诱导适应性的免疫应答, 进而恶化哮喘或 COPD 的症状[30,36]。

以上这些研究均表明, AM 和肺上皮细胞决定了 PM₁₀ 暴露后的肺内介质免疫应答的属性和强度。有趣的是, 这些介质与参与 COPD 病理改变及发展进程中的介质非常相似, 表明当不同来源的 PM₁₀ (如吸烟或烧柴) 进入并存在于肺内时, 刺激了潜在的相同的炎症反应通路。

三. PM₁₀ 的表面成分对炎症的影响

PM₁₀ 具有很大的表面积来吸收环境中的物质, 如有机化学成分、盐类、重金属、酸性氧化物以及细菌、病毒和真菌等微生物, 它们沉积于肺部导致对呼吸系统的不利影响。

Seaton 等提出 PM₁₀ 对呼吸道的急性影响可能是由于其中某种过渡金属元素通过产生自由基引起呼吸道损伤。由于铁在环境中普遍存在, 因此 PM₁₀ 上铁的研究受到普遍重视, 铁对健康影响的途径之一是通过 Fenton 反应将弱反应性的超氧阴离子、H₂O₂ (过氧化氢) 等转化为高反应活性的羟自由基, 参与对细胞和组

织的损伤。Roemer 等通过研究 PM_{10} 的成分对儿童的肺功能和呼吸道症状的影响发现 PM_{10} 中可溶性元素硅和铁与急性呼吸道影响有关，它们的浓度变化与峰值呼气流速（peak expiratory flow, PEF）负相关并与咳嗽症状正相关^[37]。

既往研究报道，亚洲沙尘暴颗粒（Asian sand dust, ASD）和 $ASD+SO_4^{2-}$ 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 SO_4^{2-} 的作用剂量并没有观察到嗜酸性粒细胞募集反应加重，提示 SO_4^{2-} 并不能使呼吸道和肺泡灌洗液中的嗜酸性粒细胞增多，来源于空气污染物的 SO_4^{2-} 不能加重哮喘小鼠气道过敏性炎症^[38]。

最近的一项沙尘暴悬浮颗粒物中的体外试验研究中发现，在 OVA 刺激的小鼠气道上皮组织中发现，通过观察支气管肺泡灌洗液（BALF）和组织学检查细胞图像，野生型 PM_{10} 可增强过敏性气道炎症及杯状细胞的增殖，同时伴有嗜酸性粒细胞的抗原相关气道炎症加剧，BALF 中促炎症细胞因子如 IL-5、MCP-3、IL-13、嗜酸细胞活化趋化因子和抗原特异抗体的产物（IgE, IgG1）的表达增强^[39,40]。然而，经过 360°C 加热除去毒性物质（如微生物，硫酸盐，硝酸盐等）的 PM_{10} 只造成了轻微的影响。这与早前脂多糖（LPS）和 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趋化因子表达增加的研究结果一致，说明经过加热处理而除去的吸附于 PM_{10} 表面的各种微生物和有机成分可能在颗粒物介导的肺部炎症反应中发挥重要作用^[41,42]。

四. PM_{10} 暴露与肺部炎症疾病的流行病学关系

严重的空气污染对呼吸系统疾病的发病率和死亡率的影响是十分明显的，且其发病率和死亡率与肺炎、哮喘、肺栓塞及 COPD 的入院率有关^[1-13,43]。即使是将吸烟等相关危险因素调整之后， PM_{10} 在所有空气污染物中仍表现出与呼吸健康副效应强烈的相关性^[44]。急性的 COPD 恶化、慢性支气管炎或肺气肿都与短期暴露空气污染物有关，同样的，高水平的 PM_{10} 暴露会使慢性支气管炎发生率增高^[43]。尽管各研究中 PM_{10} 暴露量的检测和健康状态的终点是不同的，但最终，这些研究都支持一个观点： PM_{10} 暴露和增长的 COPD 发病率相关^[45]。除发病率外，流行病学调查显示，暴露于包括 SO_2 ， NO_2 和 PM_{10} 在内的大气污染物之后，COPD

患者的死亡率增长^[45,46]。在我国,对现有的 PM_{10} 暴露和死亡率关系的剂量-反应关系资料的 Meta 分析表明, PM_{10} 每增加 $10 \mu g/m^3$, 急性死亡率增加 0.38%^[47]。

近年来的研究热点主要集中在 PM_{10} 长期作用与呼吸系统疾病之间的联系性^[48]。横断面研究显示,有暴露于城市交通的 PM_{10} 可引起一秒用力呼气容积(Forced expiratory volume in one second, FEV1)的下降及 COPD 的渐进性发展^[49]。在该研究中, Schikowski 等用 GOLD 标准来确诊 COPD, PM_{10} 每升高 $7 \mu g/m^3$, FEV1 就快速下降大约 5.1%, 患 COPD 的危险指数(odd ratio, OR) 值为 1.33。另外, 住在距主干道 100 米内的居民肺功能损害的 OR 为 1.79^[49]。在英国的一项调查中, 超过大气质量标准水平的 PM_{10} 造成每年由于气道疾病恶化而多于平均的 8000 个死亡病例和 10000 多入院患者^[50]。Dominici 和 Zanobetti 的研究提示, $PM_{2.5}$ 每增加 $10 \mu g/m^3$, COPD 的入院率就增长一倍, 因呼吸系统疾病的入院率增高 2.07%^[29,51,52]。对我国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, PM_{10} 每增加 $10 \mu g/m^3$, 呼吸系统疾病每日住院率上升 0.72%-2.15%^[53]。以上这些研究均表明, 长期 PM_{10} 暴露和居住在主干道路周围两者都能增加肺部炎症疾病的危险性, 并加速肺功能的损伤。

综上, 大量的流行病学研究表明, PM_{10} 暴露能恶化肺部炎症, 引起发病率、死亡率升高。 PM_{10} 和 $PM_{2.5}$ 对呼吸系统的氧化损伤和炎症反应远比较大的颗粒严重。肺部炎症的患者肺内颗粒物主要来源于周围空气污染颗粒物和香烟, 它们都与炎症的进程和发展有关。随着城市的快速发展, 不同来源的 PM_{10} 以及 PM_{10} 表面成分对肺部炎症的影响的深入研究将对疾病的预防性方法起到指导作用。

- 12 Liang WM, Wei HY, Kuo HW. Association between daily mortality from respiratory and cardiovascular diseases and air pollution in Taiwan. *Environ Res.* 2009; 109(1): 51-58.
- 13 Jason D.Sacks, Lindsay WichersStanek, Thomas J.Luben, *et al.* Particulate Matter–Induced Health Effects Who Is Susceptible? *Environmental Health Perspectives.* 2011, 119(4): 446-454.
- 14 Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, *et al.* The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med.* 2004; 350(26):2645-2653.
- 15 Hogg JC. Pathophysiology of airflow limitation in chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet.* 2004; 364(9435):709-721.
- 16 Shao Longyi, Shi Zongbo, Huang Qin. A study of inhalable particles in the urban ambient air. *Environment Protection*, 2000, 1: 24-27.
- 17 Oberdorster G, Ferin J, Gelein R, Soderholm SC, Finkelstein J. Role of the alveolar macrophage in lung injury: studies with ultrafine particles. *Environ Health Perspect.* 1992; 97: 193-199.
- 18 Kreyling WG. Intracellular particle dissolution in alveolar macrophages. *Environ Health Perspect.* 1992; 97: 121-126.
- 19 Geiser M. Morphological aspects of particle uptake by lung phagocytes. *Microsc Res Tech.* 2002; 57(6):512-522.
- 20 Alfaro-Moreno E, Nawrot TS, Nemmar A, Nemery B. Particulate matter in the environment: pulmonary and cardiovascular effects. *Curr Opin Pulm Med.* 2007; 13(2):98-106.
- 21 Englert N. Fine particles and human health – a review of epidemiological studies. *Toxicol Lett.* 2004; 149(1–3):235-242.
- 22 Li XY, Gilmour PS, Donaldson K, MacNee W. Free radical activity and pro-inflammatory effects of particulate air pollution (PM10) in vivo and in vitro. *Thorax.* 1996; 51(12):1216-1222.
- 23 van Eeden SF, Yeung A, Quinlan K, Hogg JC. Systemic response to ambient particulate matter: relevance to chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc.* 2005; 2(1):61-67.

参考文献

- 1 Nel A, Xia T, Madler L, Li N. Toxic potential of materials at the nano level. *Science*. 2006; 311: 622–627.
- 2 Sunyer J, Basagana X. Particles, and not gases, are associated with the risk of death in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Epidemiol*. 2001;30: 1138-1140.
- 3 Downs SH, Schindler C, Liu L-JS, the SAPALDIA Team, *et al*. Reduced Exposure to PM₁₀ and Attenuated Age- Related Decline in Lung Function. *The New England Journal of Medicine*. 2007; 357: 2338-2347.
- 4 McCreanor J, Cullinan P, Nieuwenhuijsen MJ, *et al*. Respiratory effects of exposure to diesel traffic in persons with asthma. *The New England Journal of Medicine*. 2007; 357: 2348-2358.
- 5 Miller KA, Siscovick DS, Sheppard L, *et al*. Long-term exposure to air pollution and incidence of cardiovascular events in women. *The New England Journal of Medicine*. 2007; 356: 447-458.
- 6 Mittleman MA. Air pollution, exercise, and cardiovascular risk. *N Engl J Med*. 2007;357: 1147-1149.
- 7 Mutlu GM, Green D, Bellmeyer A, *et al*. Ambient particulate matter accelerates coagulation via an IL-6-dependent pathway. *J Clin Invest* 2007; 117: 2952-2961.
- 8 Nemmar A, Hoet PH, Vanquickenborne B, *et al*. Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans. *Circulation*. 2002; 105: 411-414.
- 9 Nemmar A, Nemery B, Hoet PH, Vermeylen J, Hoylaerts MF. Pulmonary inflammation and thrombogenicity caused by diesel particles in hamsters: role of histamine. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168:1366-1372.
- 10 Sun Q, Wang A, Jin X, Natanzon A, Duquaine D, Brook RD, Aguinaldo JG, Fayad ZA, Fuster V, Lippmann M, Chen LC, Rajagopalan S. Long-term air pollution exposure and acceleration of atherosclerosis and vascular inflammation in an animal model. *JAMA* 2005;294:3003-3010.
- 11 Kan H, Chen B, Zhao N, London SJ, Song G, *et al*. Part 1. A time-series study of ambient air pollution and daily mortality in Shanghai, China. *Res Rep Health Eff Inst*. 2010;(154):17-78.

- 24 van Eeden SF, Tan WC, Suwa T, *et al.* Cytokines involved in the systemic inflammatory response induced by exposure to particulate matter air pollutants (PM(10)). *Am J Respir Crit Care Med.* 2001; 164(5): 826-830.
- 25 Mundandhara SD, Becker S, Madden MC. Effects of diesel exhaust particles on human alveolar macrophage ability to secrete inflammatory mediators in response to lipopolysaccharide. *Toxicol In Vitro.* 2006; 20(5):614–624.
- 26 Amakawa K, Terashima T, Matsuzaki T, Matsumaru A, Sagai M, Yamaguchi K. Suppressive effects of diesel exhaust particles on cytokine release from human and murine alveolar macrophages. *Exp Lung Res.* 2003; 29(3):149–164.
- 27 Yang HM, Barger MW, Castranova V, Ma JK, Yang JJ, Ma JY. Effects of diesel exhaust particles (DEP), carbon black, and silica on macrophage responses to lipopolysaccharide: evidence of DEP suppression of macrophage activity. *J Toxicol Environ Health A.* 1999; 58(5):261-278.
- 28 Fujii T, Hayashi S, Hogg JC, *et al.* Interaction of alveolar macrophages and airway epithelial cells following exposure to particulate matter produces mediators that stimulate the bone marrow. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2002; 27(1): 34-41.
- 29 Fujii T, Hayashi S, Hogg JC, Vincent R, Van Eeden SF. Particulate matter induces cytokine expression in human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2001; 25(3):265-271. -
- 30 Gilmour PS, Rahman I, Hayashi S, Hogg JC, Donaldson K, MacNee W. Adenoviral E1A primes alveolar epithelial cells to PM(10)-induced transcription of interleukin-8. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2001; 281(3): L598-L606.
- 31 Meshi B, Vitalis TZ, Ionescu D, *et al.* Emphysematous lung destruction by cigarette smoke. The effects of latent adenoviral infection on the lung inflammatory response. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2002; 26(1):52-57.
- 32 Keicho N, Elliott WM, Hogg JC, Hayashi S. Adenovirus E1A upregulates interleukin-8 expression induced by endotoxin in pulmonary epithelial cells. *Am J Physiol.* 1997; 272(6 Pt 1): L1046-L1052.

- 33 Fujii T, Hogg JC, Keicho N, Vincent R, Van Eeden SF, Hayashi S. Adenoviral E1A modulates inflammatory mediator expression by lung epithelial cells exposed to PM10. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2003; 284(2): L290-L297.
- 34 Ghio AJ, Kim C, Devlin RB. Concentrated ambient air particles induce mild pulmonary inflammation in healthy human volunteers. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000; 162(3 Pt 1): 981-988.
- 35 Salvi SS, Nordenhall C, Blomberg A, *et al*. Acute exposure to diesel exhaust increases IL-8 and GRO- α production in healthy human airways. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000; 161(2 Pt 1): 550-557.
- 36 de Haar C, Hassing I, Bol M, Bleumink R, Pieters R. Ultrafine but not fine particulate matter causes airway inflammation and allergic airway sensitization to co-administered antigen in mice. *Clin Exp Allergy*. 2006; 36(11):1469-1479.
- 37 Roemer W, Hoek G, Brunekreef B, *et al*. PM10 elemental composition and acute respiratory health effects in European children (PEACE project). *Eur Respir J*. 2000; 15: 553-559.
- 38 Hiyoshi K, Ichinose T, Sadadane K, *et al*. Asian sand dust enhances ovalbumin-induced eosinophil recruitment in the alveoli and airway of mice. *Environ Res*. 2005, 99: 361-368.
- 39 He M, Ichinose T, Yoshida S, *et al*. Airborne Asian sand dust enhances murine lung eosinophilia. *Inhal Toxicol*. 2010a; 22(12):1012-1025.
- 40 He M, Ichinose T, Yoshida S, *et al*. Urban particulate matter in Beijing, China, enhances allergen-induced murine lung eosinophilia. *Inhal Toxicol*. 2010b; 22: 709-718.
- 41 Fort MM, *et al*. IL-25 induces L-4, IL-5, and IL-13 and Th2- associated pathologies in vivo. *Immunity*. 2001; 15: 985-995.
- 42 Wang YH, *et al*. IL-25 augments type 2 immune responses by enhancing the expansion and functions of TSLP-DC-activated Th2 memory cells. *J Exp Med*. 2007; 204: 1837-1847.
- 43 Atkinson RW, Anderson HR, 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.
- 44 Schwartz J. Short term fluctuations in air pollution and hospital admissions of the elderly for

- respiratory disease. *Thorax*. 1995; 50(5):531-538.
- 45 Sint T, Donohue JF, Ghio AJ. Ambient air pollution particles and the acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Inhal Toxicol*. 2008; 20(1): 25-29.
- 46 Papi A, Luppi F, Franco F, Fabbri LM. Pathophysiology of exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc*. 2006; 3(3):245-251.
- 47 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.
- 48 Karakatsani A, Andreadaki S, Katsouyanni K, *et al*. Air pollution in relation to manifestations of chronic pulmonary disease: a nested case control study in Athens, Greece. *Eur J Epidemiol*. 2003;18(1):45-53.
- 49 Schikowski T, Sugiri D, Ranft U, *et al*. Long-term air pollution exposure and living close to busy roads are associated with COPD in women. *Respir Res*. 2005; 6: 152.
- 50 MacNee W, Donaldson K. Exacerbations of COPD: environmental mechanisms. *Chest*. 2000; 117(5 Suppl 2): 390S-397S.
- 51 Dominici F, Peng RD, Bell ML, *et al*. Fine particulate air pollution and hospital admission for cardiovascular and respiratory diseases. *JAMA*. 2006; 295(10): 1127-1134.
- 52 Antonella Zanobetti, Meredith franklin, Petros Koutrakis, Joel Schwartz. Fine particulate air pollution and its components in association with cause-specific emergency admissions. *Environmental Health*. 2009; 8: 58.
- 53 张燕萍, 张志琴, 李晋芬. 空气颗粒物与呼吸及心脑血管每日住院率相关性研究. *中华预防医学杂志*. 2008, 42(2): 96-102

• 在学期间科研成绩 •

发表论文:

刘博莹,王达,姜泓,卢响响,杨博逸,孙贵范.保存条件与反复冻融对尿砷形态稳定性的影响. 环境与健康. 2011, 28(9):771-773.

刘博莹,王达,张强,郑全美,孙贵范.吸烟和饮酒对不同浓度饮水型砷暴露人群尿砷代谢的影响. 中国地方病学杂志.2012, 31(1):28-31.

刘博莹,姜泓,卢响响,赵立谦,裴晓华,王达,张强,郑全美,孙贵范.人尿中形态砷的高效液相色谱-氢化物发生-原子荧光联用分析. 现代仪器.2012,1: 102-104.

王达,王惠惠,张强,刘博莹,林琳,孙贵范.不同血砷消化方法的比较. 环境与健康. 2011, 28(1):63-65.

李冰,李昕,朱博,刘博莹,王达,刘丹,邢晓越,孙贵范.叔丁基对苯二酚对Chang肝细胞无机砷甲基化代谢的影响.环境与健康.2011, 28(7):576-579.

国际会议:

2011 年 9 月 14-16 日

参加日本大气环境年会, 长崎, 日本

2011 年 10 月 27-28 日

参加日本药学会-卫生药理学环境毒理学论坛 2011

“Effect of microorganisms attached onto yellow dust on inflammatory cytokines and TLRs expression in mouse macrophages.” 展报, 金泽, 日本

参与课题:

1、卫生部: 推荐性行业卫生标准项目——“尿中砷的高效液相色谱-氢化物发生-原子荧光光谱测定方法”(2010-2011)

2、国家科技部“十一五”科技支撑计划重点项目(2006BAI06B04)(2008.1-2010.12): 砷暴露与健康效应及其评估技术的研究。

3、国家自然科学基金项目(81072243)——与甲基和巯基供体 SAM 及 GSH 生成相关的外源性因素对砷代谢及其所致氧化损伤的影响

• 致谢 •

值此论文完成之际，我首先衷心感谢孙贵范教授，感谢孙老师的言传身教，老师严谨的治学态度、丰富渊博的知识、精益求精的工作态度和诲人不倦的师者风范是我终生学习的楷模；感谢郑全美、金亚平、李冰、李昕等众多教授的关心支持和帮助，他们高深精湛的造诣和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濑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！

感谢金亚平教授、陈杰教授、徐兆发教授、蔡原教授、刘扬教授在科研设计和论文修改方面对我提出的宝贵意见。

感谢贺淼、张强、王惠惠、郑怡、王海旭、王达、杨博逸、卢响响等前辈、同学对我的支持和帮助。

深深的感谢我的家人尤其是我的父母，感谢他们给予我精神上和物质上最大的支持，感谢他们一直以来地陪伴，感谢他们与我一同感受艰辛和快乐。

感谢所有给过我帮助和关注的朋友。

• 个人简介 •

姓名：刘博莹

性别：女

民族：汉

出生年月：1986 年 3 月

主要学习经历

2000.9-2009.7 中国医科大学预防医学 学士

2009.9-2012.7 中国医科大学生公共卫生学院劳动卫生与环境卫生学专业 硕士
(2011.4-2012.2 日本大分县立看护科学大学 实验研究)