

吸附于亚洲沙尘颗粒物上的焦油和脂多糖对卵蛋白诱导的小鼠气道炎症作用的研究

The study of OVA-induced murine lung eosinophilia by exposure of Tar and LPS in Asian sand dust

研究生: 任亚浩

导师: 孙贵范

一级学科: 公共卫生与预防医学

二级学科: 劳动卫生与环境卫生学

论文课题起止时间: 2013年9月—2014年4月

论文完成时间: 2014年4月

中国医科大学(辽宁)

2014年4月

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：任亚浩 日期：2014.5.29

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各单位为中国医科大学，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：任亚浩

指导教师签名：孙贵斌

日期：2014.5.29

目 录

一、摘要	
中文论著摘要	1
英文论著摘要	5
二、英文缩略语	10
三、论文	
论文一	
前言	11
材料与方法	12
实验结果	18
讨论	27
结论	29
论文二	
前言	30
材料与方法	31
实验结果	37
讨论	52
结论	54
四、本研究创新性的自我评价	55
五、参考文献	56
六、附录	
综述	62
在学期间科研成绩	73
致谢	74
个人简介	75

吸附于亚洲沙尘颗粒物上的焦油和脂多糖对 卵蛋白诱导的小鼠气道炎症作用的研究

前 言

亚洲沙尘颗粒物 (Asian sand dust, ASD) 常见于春季。当我国北方和蒙古国发生沙尘暴时, 产生的 ASD 能够扩散到大片地区, 包括我国东部, 朝鲜半岛和日本, 甚至会越过北太平洋到达美国。近年来, ASD 由于对人群健康的不良影响而受到日益广泛的关注。有些报道还提示 ASD 事件与成人和儿童患者呼吸系统症状增加有关。

我们以前的研究表明 ASD 可以加剧卵蛋白 (ovalbumin, OVA) 诱导的嗜酸性粒细胞增多症, 而将 ASD 在 360°C 加热使有毒物质灭活后得到的经加热的 ASD (heat-ASD, H-ASD) 仅能导致轻微效应。在此基础上, 我们推测, 吸附于 ASD 的有机和无机物质可能在加剧嗜酸性粒细胞增多症中起着一定作用。在 ASD 的长途转运过程中, 微生物和大气污染物, 包括焦油 (Tar)、硫酸盐和硝酸盐会吸附于其上。因此, 为了探究 ASD 中的 Tar 和脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 污染是否与 ASD 加剧嗜酸性粒细胞增多症明显相关, 我们进行了本实验, 观察了 Tar 和/或 H-ASD 对 OVA 诱导的嗜酸性粒细胞增多症的加剧作用; LPS 和/或 H-ASD 对 OVA 诱导的嗜酸性粒细胞增多症的加剧作用。

实验方法

1、样品处理

将从蒙古国南部沙漠采集的 ASD 样品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、硫酸盐和硝酸盐等成分, 得到 H-ASD。

将从日本北九州市采集的 ASD 用有机溶剂提取其中的 Tar。

2、实验动物及染毒

从 Charles River 公司（神奈川，日本）购入雄性 ICR 和 BALB/c 小鼠，适应性喂养一周后开始实验。每间隔一周，将小鼠在 4%三氟氯溴乙烷作用下麻醉，经气管注入不同剂量的 Tar 或 LPS、H-ASD（0.1 mg/mouse）和/或 OVA。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。

3、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 大小的碎块，用石蜡包埋，制作成 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。

4、采集支气管肺泡灌洗液（bronchoalveolar lavage fluids, BALF）和血液

小鼠深度麻醉，心脏采血，离心分离血浆，-80 $^{\circ}$ C 深冻冰箱中保存，用于检测血浆中的 OVA 特异性抗体 IgE 和 IgG1 的表达；气管固定，用 37 $^{\circ}$ C 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 $^{\circ}$ C 深冻冰箱中保存，用于检测 BALF 中细胞因子和趋化因子的蛋白表达。

5、BALF 中的炎性细胞计数

将 BALF 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制作细胞涂片，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。

6、BALF 中的细胞因子和趋化因子的检测

应用酶联免疫吸附试验（enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA）试剂盒检测 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、IL-17A 和干扰素（interferon, IFN）- γ 、肿瘤坏死因子（tumor necrosis factor, TNF）- α 、转化生长因子（Transforming growth factor, TGF）- β ；趋化因子包括：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)。

7、OVA 特异性免疫球蛋白 (immunoglobulin, Ig) E 和 IgG1 抗体的检测

用 ELISA 试剂盒检测小鼠血浆中 OVA 特异性 IgE 和 IgG1 抗体的表达。

8、分离培养基因敲除小鼠骨髓来源的巨噬细胞 (bone-marrow derived macrophages, BMDMs)

分离培养来源于野生型 (wildtype, WT)、Toll 样受体 (Toll like receptor, TLR) 2 基因敲除、TLR4 基因敲除、髓样分化因子 (myeloid differentiation factor 88, MyD88) 基因敲除小鼠的 BMDMs, 以 PBS 或 LPS 孵育 12h, 用 Elisa 法检测上清液中的 IL-6、MCP-1、MIP-1 α 和 TNF- α 等细胞因子和趋化因子。

9、统计学分析

本研究应用 SPSS Statistics Client 21 统计学软件进行分析, 统计结果表述为平均数 \pm 标准误, 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 Tukey 法进行组间比较, $p < 0.05$ 具有统计学意义。

实验结果

1、OVA、H-ASD 和 Tar 或 LPS 干预对小鼠 BALF 中细胞分布的影响

OVA 单独作用没有增加这几种细胞中任何一种的数量, 但是当它与 Tar 或 LPS 联合作用时, 这几种细胞的数量都有轻度增加。而且当 H-ASD + Tar 或 H-ASD + LPS 与 OVA 联合作用时, 这几种细胞的数量都明显增加了。

2、OVA、H-ASD 和 Tar 或 LPS 干预对小鼠气道病理改变的影响

H-ASD + OVA + Tar 和 H-ASD + OVA + LPS 导致了小鼠气道上皮中杯状细胞中度增殖, 伴有气道粘膜下嗜酸性粒细胞、中性粒细胞和淋巴细胞中至重度浸

润。

3、OVA、H-ASD 和 Tar 或 LPS 干预对小鼠 BALF 中细胞因子和趋化因子表达的影响

与 Control、OVA 和单独干预组相比, H-ASD + OVA + Tar 和 H-ASD + OVA + LPS 升高了 BALF 中 IL-5、IL-13、eotaxin 和 MCP-3 的水平。

4、OVA、H-ASD 和 Tar 或 LPS 干预对小鼠 OVA-IgE 和 OVA-IgG1 生成的影响

与 Control、OVA 和单独干预组相比, H-ASD + OVA + Tar 和 H-ASD + OVA + LPS 促进了 OVA-IgG1 的生成; H-ASD + OVA + LPS 还促进了 OVA-IgE 的生成。

5、细胞培养上清液中细胞因子和趋化因子的表达

LPS 刺激 TLR4 基因敲除小鼠 BMDMs, 未能诱导 TNF- α 和 IL-6 的表达, 但是 LPS 刺激 TLR2 基因敲除小鼠 BMDMs, 能诱导 TNF- α 和 IL-6 的表达。

结 论

本研究的结果证明, 在 OVA 和 H-ASD 存在的条件下, ASD 上所附着的 Tar 或 LPS 可加剧过敏性肺炎。而且 LPS 的这种作用可能是由 TLR4 依赖性的信号通路介导的。当前研究的结果提示暴露于含有 Tar 和 LPS 的 ASD 可能是成人和儿童哮喘的一个显著危险因素。

关键词

焦油、多环芳烃、脂多糖、亚洲沙尘颗粒物、卵蛋白、嗜酸性粒细胞增多症、细胞因子、趋化因子

• 英文论著摘要 •

The study of OVA-induced murine lung eosinophilia by exposure to Tar and LPS in Asian sand dust

Background

Asian sand dust (ASD) is observed most frequently in the spring. When a large scale sandstorm occurs in Northern China and Mongolia, ASD aerosol spreads over large areas, including East China, the Korean Peninsula and Japan as well as crossing the North Pacific to the United States. In recent years, ASD has received more and more attention as the adverse effects on human health become known. Some reports also suggest that ASD events are associated with increased respiratory symptoms in both adults and children with asthma.

Our previous studies have shown that ASD had aggravating effects on ovalbumin (OVA)-induced lung eosinophilia, whereas ASD heated at 360°C to exclude organic substances and chemicals (H-ASD) caused fewer effects. On the basis of these results, we speculate that the organic substances and chemicals adhering to ASD may contribute to the aggravation of lung eosinophilia. Microbial and by-product materials derived from air-pollutants, including polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), sulfates (SO_4^{2-}) and nitrates (NO_3^-), adhere onto ASD during long-range transportation of the dust.

In the present study, the exacerbating effects of low levels of tar and/or heated ASD on OVA-induced lung eosinophilia were investigated; Lipopolysaccharide (LPS) and/or heated ASD on OVA-induced lung eosinophilia were investigated using BALB/c mice.

Materials and methods

1. Preparation of particles

The ASD were heated at 360°C for 30 min in an electric heater to exclude toxic materials (microbiological materials, sulfate, nitrate, etc.) adhering to them. Tar was extracted from another kind of ASD collected in Japan.

2. Animal and Study protocol

Male ICR and BALB/c mice (6 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 7 weeks of age. OVA, H-ASD, Tar or LPS 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.

3. 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.

4. Bronchoalveolar lavage fluids (BALF) and blood

Blood were collected from heart of mice under deep anesthesia by i.p. injection of pentobarbital, after centrifugation, the plasma were stored at -80°C until it was

analyzed for OVA-specific IgE and IgG1 antibodies. 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, were stored at -80°C until it was analyzed for cytokines and chemokines.

5. 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.

6. 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)-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-12, IL-13, Interferon (IFN)- γ , Keratinocyte chemoattractant (KC), macrophage inflammatory protein (MIP)-1 α , monocyte chemotactic protein (MCP)-1, MCP-3, regulated on activation normal T cell expressed and presumably secreted (RANTES) and eotaxin.

7. 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.

8. Isolation and culture of bone-marrow derived macrophages (BMDMs) of knockout mice

BMDMs from wildtype (WT), Toll like receptor 2 (TLR2) $^{-/-}$, TLR4 $^{-/-}$, myeloid differentiation factor 88 (MyD88) $^{-/-}$ mice were incubated with PBS, LPS (final concentration of 1 $\mu\text{g/ml}$) for 12 h. The IL-6, MCP-1, MIP-1 α and TNF- α levels secreted into the culture medium from BMDMs were measured by ELISA.

9. Statistical analysis

Statistical analyses on the pathologic evaluation in the airway, cytokine and chemokine proteins in BALF were conducted using SPSS Statistics Client 21 software as statistically significant at a level of $p < 0.05$. Results were expressed as mean \pm SE. Multiple comparison were determined using one way analysis of variance followed by Tukey test.

Results

1. Enhancement of cell numbers in BALF by Tar or LPS

OVA alone did not increase any cell numbers but the addition of Tar or LPS increased all cell numbers in BALF samples slightly. When H-ASD + Tar or H-ASD + LPS were added to OVA, a significant increase of numbers of all cells was observed.

2. Enhancement of pathologic changes in the lung by Tar or LPS

H-ASD + OVA + Tar and H-ASD + OVA + LPS caused moderate goblet cell proliferation in the airway epithelium and moderate to marked accumulation of eosinophils, neutrophils and lymphocytes in the submucosa of airways.

3. Enhancement of cytokines and chemokines in BALF by Tar or LPS

H-ASD + OVA + Tar and H-ASD + OVA + LPS enhanced the expression of IL-5, IL-13, eotaxin and MCP-3 compared with the control, OVA and the single treatment.

4. Enhancement of OVA-specific IgE and IgG1 in plasma by Tar or LPS

H-ASD + OVA + Tar and H-ASD + OVA + LPS increased the production of OVA-specific IgG1 as compared with the control, OVA and the single treatment. H-ASD + OVA + LPS 1 also increased the production of OVA-specific IgE as compared with the control, OVA and the single treatment.

5. Cytokine and chemokine production in LPS-stimulated BMDMs of

knockout mice

The LPS exhibited no response to the production of TNF- α and IL-6 in BMDMs from TLR4^{-/-}, but did from TLR2^{-/-}.

Conclusion

This study demonstrates that Tar and LPS contamination in ASD aggravates allergic lung inflammation in the presence of OVA and H-ASD. The aggravation of the allergic lung inflammation by LPS may be caused through the TLR4-dependent signaling pathway. The results of the current study indicate that the exposure to ASD with Tar and LPS may be a significant risk factor for adult and child asthma.

Key Words

Tar, polycyclic aromatic hydrocarbons, Lipopolysaccharide, Asian sand dust, Ovalbumin, Lung eosinophilia, Cytokine, chemokine.

· 英文缩略语 ·

英文缩写	英文全称	中文全称
ASD	Asian sand dust	亚洲沙尘颗粒物
BALF	bronchoalveolar lavage fluids	支气管肺泡灌洗液
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附试验
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony stimulating factor	粒-巨噬细胞集落刺激因子
H-ASD	heated ASD	加热处理的亚洲沙尘颗粒物
ICAM	intercellular adhesion molecule	细胞间粘附分子
IFN	interferon	干扰素
Ig	immunoglobulin	免疫球蛋白
IL	interleukin	白细胞介素
KC	Keratinocyte chemoattractant	角质细胞趋化因子
LPS	lipopolysaccharide	脂多糖
MCP	monocyte chemotactic protein	单核细胞趋化蛋白
MIP	macrophage inflammatory protein	巨噬细胞炎症蛋白
OVA	ovalbumin	卵蛋白
PAHs	polycyclic aromatic hydrocarbons	多环芳烃
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
TGF	transforming growth factor	转化生长因子
TLRs	Toll-like receptors	Toll 样受体
TNF	tumor necrosis factor	肿瘤坏死因子
VCAM	vascular cell adhesion molecule	血管细胞黏附分子

· 论文一 ·

吸附于亚洲沙尘颗粒物上的焦油成分对卵蛋白 诱导的小鼠气道炎症的加剧作用

前言

在干旱、半干旱和土地沙漠化严重的地区，当强风从地面上卷起大量沙尘、使空气混浊，水平能见度明显下降时就会出现沙尘天气。沙尘天气波及范围很广，往往会对影响地区人民健康造成很大损害，主要表现为沙尘颗粒物对呼吸系统的损伤。起源于我国北方和蒙古国南部沙漠的亚洲沙尘颗粒物（Asian sand dust, ASD）能够扩散到大片地区，包括我国东部，朝鲜半岛和日本，甚至会越过北太平洋到达美国^[1-3]，所以 ASD 对人民健康的影响也成为了近年来研究的热点。

近年来，多项研究显示 ASD 升高了过敏性鼻炎、肺炎和哮喘等呼吸系统疾病的发病率。孟紫强等对我国沙尘暴高发地区甘肃省武威市的 6 所大中型医院、1995 年至 2003 年沙尘天气高发季节呼吸系统疾病每日入院人数进行了调查，结果发现：呼吸系统疾病日入院人数的增加均与天气有联系，且表现为滞后效应；沙尘暴对呼吸系统疾病日入院人数的影响大于扬沙或浮尘天气；沙尘天气对人群健康的影响存在滞后效应；沙尘天气引发和加重的呼吸系统疾病主要为各种肺炎、上呼吸道感染、感冒以及急慢性支气管炎^[4]。Kanatani 等分析了日本富山县 8 所主要医疗机构从 2005 年至 2009 年每年 2 月至 4 月的就诊资料，发现 1~15 岁的儿童因哮喘而就诊的人数与沙尘暴的发生显著相关，而且这种相关性持续到了沙尘暴过境后的 4~6 天^[5]。来自韩国的研究也提示 ASD 与哮喘患儿急性呼吸系统症状增加有关^[6]。

由于卵蛋白（ovalbumin, OVA）诱发的小鼠气道炎症模型具有与人类哮喘患者相似的病理改变，为了进一步研究 ASD 对呼吸系统疾病的影响及其机制，我们前期的实验用 ASD 和经 360℃ 加热使有毒物质灭活后得到的经加热的 ASD（heat-ASD, H-ASD），对 OVA 诱发的小鼠气道炎症模型进行了干预，结果表明 ASD 可以加剧 OVA 诱导的嗜酸性粒细胞增多症，而 H-ASD 仅能导致轻微效应^[7, 8]。在此基础上，我们推测，吸附于 ASD 的有机和无机物质可能在加剧嗜酸

性粒细胞增多症中起着重要作用。

在 ASD 的长途转运过程中，微生物和大气污染物，包括焦油（Tar）、硫酸盐和硝酸盐会吸附于其上^[9-12]。2001 年，Mori 等观察了沙尘暴发生时，沙尘颗粒物从中国源地传送到日本后，其上附着的硝酸盐增加了 10 倍，同时硫酸盐也有所增加^[12]。此外，我们的实验所使用的 ASD 中检测到了较高含量的 Tar 成分，其中含有一定量的多环芳烃（polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs），PAHs 是一类环境污染物，是化石燃料如煤、石油和烟草等不完全燃烧的产物，包括苯并[a]芘、苯并[k]荧蒽、苯并[a]花、二萘嵌苯等多种化学物质，早期的研究表明此类物质有致癌、致畸和致突变的作用^[13-15]，近年来有研究提示环境中 PAHs 暴露与哮喘发生有关^[16]，还有研究表明从柴油机尾气颗粒物中提取的 Tar 成分和 PAHs 都能增强 OVA 诱导的实验性哮喘^[17, 18]，但是 ASD 中的 Tar 成分是否有类似的作用并不清楚。因此，为了研究吸附于 ASD 上的 Tar 成分可能对呼吸系统产生的影响，在当前的实验中，我们使用了不同剂量的从 ASD 中提取的 Tar 成分，与 H-ASD 联合对 ICR 小鼠进行干预，观察了对 OVA 诱导的嗜酸性粒细胞增多症的影响。

材料与amp;方法

一、主要试剂

Diff-Quik 染色液（International Reagents, Kobe, Japan）

白细胞介素（interleukin, IL）-1 β 、IL-4、IL-6、IL-13、干扰素（Interferon, IFN）- γ 、角质细胞趋化因子（Keratinocyte chemoattractant, KC）、转化生长因子（Transforming growth factor, TGF）- β 、嗜酸性粒细胞趋化因子（eotaxin）、单核细胞趋化蛋白（monocyte chemotactic protein, MCP）-1、巨噬细胞炎症蛋白（Macrophage inflammatory protein, MIP）-1 α 、受激活调节正常 T 细胞表达和分泌因子（Regulated upon activation normal T cell expressed and presumably secreted, RANTES）等酶联免疫吸附试验（enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA）试剂盒（R&D Systems Inc., MN, USA）。

IL-5 和 IL-12 ELISA 试剂盒（Endógen, Inc., MA, USA）

MCP-3 ELISA 试剂盒（Bender MedSystems Inc., CA, USA）

鼠 OVA 特异性的免疫球蛋白 (OVA-specific immunoglobulin, OVA-Ig) E 和 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)

显微镜 (Nikon Co., Tokyo, Japan)

细胞离心涂片机 (Sakura, Tokyo, Japan)

RH-12 自动固定包埋装置 (Sakura, Tokyo, Japan)

酶标仪 (Spectrafluor, Tecan, Salzburg, Austria)

三、实验动物

从日本 Charles River 公司购入 6 周龄雄性 ICR 小鼠, 在温度为 23°C、湿度为 55–70%、昼夜 (12 h/12 h) 交替的房间里适应性饲养一周后, 筛选出 168 只无体重增长异常和/或病态的小鼠, 开始实验。

四、ASD 样本处理和 Tar

本实验所用的制作 H-ASD 的 ASD 标品收集于蒙古国南部戈壁沙漠, 经精制后使用。该 ASD 样品的粒径分布峰值在 3.9 μm 处, 其中的无机成分包括: 51.6% SiO₂, 14.3% Al₂O₃, 5.5% Fe₂O₃, 1.3% Na₂O, 9.6% CaCO₃, 0.6% CaO, 2.5% MgO, 0.7% TiO₂ 和 2.6% K₂O^[19]。取部分 ASD 样品在电子加热器中经 360 °C 加热 30 min 灭活了吸附于颗粒物表面的有毒物质 (如硫酸盐、硝酸盐和微生物等), 得到了本实验使用的 H-ASD。

本实验使用的提取 Tar 的 ASD 于 2010 年 11 月 13-15 日、一次大规模亚洲沙尘暴期间收集于日本福冈县北九州市产业医科大学院内, 采用下述方法提取: 取部分 ASD 先用 20 ml 二氯甲烷在 15°C 用超声法抽提 15 min, 此过程重复两次。提取物用 NO. 5C 滤纸过滤, 暗处自然干燥后溶于 0.5 ml 乙腈中, 然后用连接着一台 L-7485 型荧光检测器的高效液相色谱仪分析其中的 PAHs。

五、实验动物染毒

将 168 只雄性 ICR 小鼠随机分为 12 组 (每组 14 只), 每组小鼠在 4%三氟氯溴乙烷作用下麻醉后, 经气管内灌注给予一种测试样品 (测试样品用含有 0.02%

Tween 80 的 0.9%的生理盐水配制而成，给予剂量为 0.1 ml/只）：对照组（control，仅给予生理盐水）；Tar 1（1.0 μg Tar）；Tar 5（5.0 μg Tar）；H-ASD（0.1 mg H-ASD）；H-ASD + Tar 1（0.1 mg H-ASD 和 1.0 μg Tar）；H-ASD + Tar 5（0.1 mg H-ASD 和 5.0 μg Tar）；OVA（1 μg OVA）；OVA + Tar 1（1 μg OVA 和 1.0 μg Tar）；OVA + Tar 5（1 μg OVA 和 5.0 μg Tar）；H-ASD + OVA（1 μg OVA 和 0.1 mg H-ASD）；H-ASD + OVA + Tar 1（1 μg OVA, 0.1 mg H-ASD 和 1.0 μg Tar）；H-ASD + OVA + Tar 5（1 μg OVA, 0.1 mg H-ASD 和 5.0 μg Tar）。每两周干预一次，一共干预 4 次，实验期间，动物自由摄食和饮水。

六、血液和支气管肺泡灌洗液（bronchoalveolar lavage fluids, BALF）的采集

每个实验组随机选取 8 只小鼠用于心脏采血和收集 BALF。将小鼠用戊巴比妥麻醉后，心脏采血，3500 rpm 离心 2 min，分离血浆，-80°C 深冻冰箱中保存，用于检测血浆中的 OVA 特异性抗体的表达。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 BALF（约 1.6 ml），4°C 1500 rpm 离心 10 min。取上清液，-80°C 深冻冰箱中保存，用于检测 BALF 中细胞因子和趋化因子的蛋白表达。

七、实验动物的病理检测

每个实验组的另外 6 只小鼠用于病理分析。取小鼠肺脏固定于 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；1，细微变化；2，轻度变化；3，中度变化；4，中重度变化；5，重度变化。细微变化指气道粘膜下 20%以下的嗜酸性粒细胞和淋巴细胞浸润或支气管上皮中 20%杯状细胞增殖；轻度变化指气道粘膜下 21-40%的嗜酸性粒细胞和淋巴细胞浸润或支气管上皮中 21-40%杯状细胞增殖；中度变化指气道粘膜下 41-60%

的嗜酸性粒细胞和淋巴细胞浸润或支气管上皮中 41-60%杯状细胞增殖；中重度变化指气道粘膜下 61-80%的嗜酸性粒细胞和淋巴细胞浸润或支气管上皮中 61-80%杯状细胞增殖；重度变化指气道粘膜下 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^[20, 21]。

八、BALF 中的细胞计数

将 BALF 离心后得到的沉淀悬浮于 100 μ l 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。根据总细胞数取一定量细胞悬液，适当稀释后应用细胞离心涂片机，1500 rpm 离心 10 min，制成细胞涂片，再用 Diff-Quik 染色后，显微镜下观察计数巨噬细胞、中性粒细胞、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。

九、BALF 中的细胞因子和趋化性细胞因子的检测

应用 ELISA 试剂盒检测 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-6、IL-12、IL-13、IFN- γ 和 TGF- β ，趋化性细胞因子包括 KC、MCP-1、MCP-3、MIP-1 α 、RANTES 和 eotaxin。其中 IL-1 β 、IL-4、IL-6、IL-13、IFN- γ 、TGF- β 、KC、MCP-1、MIP-1 α 、RANTES 和 eotaxin 测定的具体步骤如下：

(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) 根据待测样品数量准备所需的板条数;
- (3) 每孔加 50 μ l 的稀释液, 加标准或样品 50 μ l, 覆膜, 轻轻振摇, 室温放置 2h;
- (4) 用洗板机洗涤 5 次, 每次洗涤, 每孔加洗涤液 400 μ l;
- (5) 洗板机吸去洗涤液并倒置沥干残液, 每孔加结合物 100 μ l, 盖上新膜, 轻轻振荡混匀, 室温放置 2h;
- (6) 用洗板机洗涤 5 次, 每次洗涤, 每孔加洗涤液 400 μ l;
- (7) 洗板机吸去洗涤液并倒置沥干残液, 每孔加底物溶液 100 μ l, 室温暗处放置 30 min;
- (8) 每孔加反应停止溶液 100 μ l, 振荡混匀;
- (9) 30 min 之内用酶标仪在 450、550nm 波长处测定各孔的 OD 值。

IL-5 测定的具体步骤如下:

- (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) 根据待测样品数量准备所需的板条数;
- (3) 每孔加 50 μ l 的稀释液, 加标准或样品 50 μ l, 覆膜, 轻轻振摇, 37 $^{\circ}$ C 放置 2h;
- (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, 覆膜, 轻轻振摇, 37 $^{\circ}$ C 放置 1h;
- (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, 室温暗处 30 min;
- (8) 每孔加反应停止液 100 μ l, 振荡混匀;
- (9) 30 min 之内用酶标仪在 450、550nm 波长处测定各孔的 OD 值。

IL-12 测定的具体步骤如下:

- (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) 根据待测样品数量准备所需的板条数;
- (3) 每孔加 50 μ l 的稀释液, 加标准、样品 50 μ l, 覆膜, 轻轻振摇, 室温放

置 1h;

- (4) 用洗板机洗涤 5 次, 每孔加洗涤液 400 μl ;
- (5) 每孔加生物素基化的抗体 100 μl , 覆膜, 轻轻振摇, 室温放置 1h;
- (6) 用洗板机洗涤 5 次, 每孔加洗涤液 400 μl ;
- (7) 每孔加辣根过氧化物酶标记链霉亲和素缓冲液 100 μl , 室温放置 30 min;
- (8) 用洗板机洗涤 5 次, 每孔加洗涤液 400 μl ;
- (9) 每孔加底物溶液 100 μl , 室温暗处 30 min;
- (10) 每孔加反应停止液 100 μl , 振荡混匀;
- (11) 30 min 之内用酶标仪在 450、550nm 波长处测定各孔的 OD 值。

MCP-3 测定的具体步骤如下:

- (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) 根据待测样品数量准备所需的板条数;
- (3) 标准孔每孔加 150 μl 的蒸馏水溶解其中的标准品, 样品孔每孔加 100 μl 蒸馏水;
- (4) 样品孔每孔加 50 μl 样品, 覆膜, 轻轻振摇, 室温放置 3h;
- (5) 用洗板机洗涤 5 次, 每次每孔加洗涤液 400 μl ;
- (6) 每孔加底物溶液 100 μl , 室温暗处 10 min;
- (7) 每孔加反应停止液 100 μl , 振荡混匀;
- (8) 30 min 之内用酶标仪在 450nm 波长处测定各孔的 OD 值。

十、OVA-IgE 和 OVA-IgG1 抗体的检测

鼠 OVA-IgE 和 OVA-IgG1 ELISA 试剂盒检测血清中的 OVA-IgE 和 OVA-IgG1 抗体。根据实验说明书, 具体步骤如下:

- (1) 洗板 5 次, 400 μl /每孔; 加抗 IgE 或抗 IgG1 抗体 50 μl ;
- (2) 加样: 每孔分别加标准溶液或待测样品 10 μl , 注意不要有气泡, 轻轻混匀, 覆膜, 室温反应 1 h;
- (3) 洗板 5 次, 400 μl /每孔;
- (4) 每孔加结合物 100 μl , 室温 30 min;

- (5) 洗板 5 次, 400 μ l/每孔;
- (6) 每孔加发色液 100 μ l, 室温暗处放置 20 min;
- (7) 每孔加终止液 100 μ l, 终止反应;
- (8) 用酶标仪在 450 nm 波长 (副波长 620nm) 测量各孔 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 SPSS Statistics Client 21 统计学软件进行分析, 统计结果表述为平均数 \pm 标准误, 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 Tukey 法进行组间比较, $p < 0.05$ 具有统计学意义。

结果

一、ASD 中所提取的 Tar 成分

ASD 中 Tar 的含量很高, 可达 0.031 g/g, 且 Tar 中检测到了多种 PAHs, 见表 1。其中, 荧蒹的含量最高, 为 217.44 μ g/g, 其次是苯并[e]芘, 为 174.48 μ g/g, 强致癌物苯并[a]芘的含量也达 34.59 μ g/g。

表 1, Tar 中 PAHs 含量

物质	PAHs(μ g/g Tar)
荧蒹	217.44
苯并[e]芘	174.48
茚并	122.25
苯并[j]荧蒹	92.16
芘	73.08
六苯并苯	64.09
苯并[a]蒹	60.14
屈	54.76
苯并[a]花	52.11
二苯并[a,h]蒹	43.31

苯并[a]芘	34.59
苯并[k]荧蒽	27.34
苯并[b]荧蒽	20.77
二萘嵌苯	9.12

二、OVA、H-ASD 和 Tar 干预对小鼠 BALF 中细胞分布的影响

图 1 显示了 BALF 中细胞分布的状况。Control 的 BALF 中基本没有嗜酸性粒细胞，巨噬细胞数可达 $(20.2 \pm 2.40) \times 10^4$ ，Tar 1 和 Tar 5 单独干预分别使巨噬细胞数上升了 65%和 50%。而且与 H-ASD 联合作用时，Tar 1 和 Tar 5 增加了中性粒细胞和淋巴细胞的数量，但是这种差异没有统计学意义，此外，对嗜酸性粒细胞的数量没有影响。OVA 单独作用时，嗜酸性粒细胞的数量有轻度增加，但对其它几种细胞的数量没有影响，但是当它与 Tar 1 或 Tar 5 联合作用时，这几种细胞的数量都有轻度增加。而且当 H-ASD + Tar 1 与 OVA 联合作用时，嗜酸性粒细胞的数量有了显著增加。

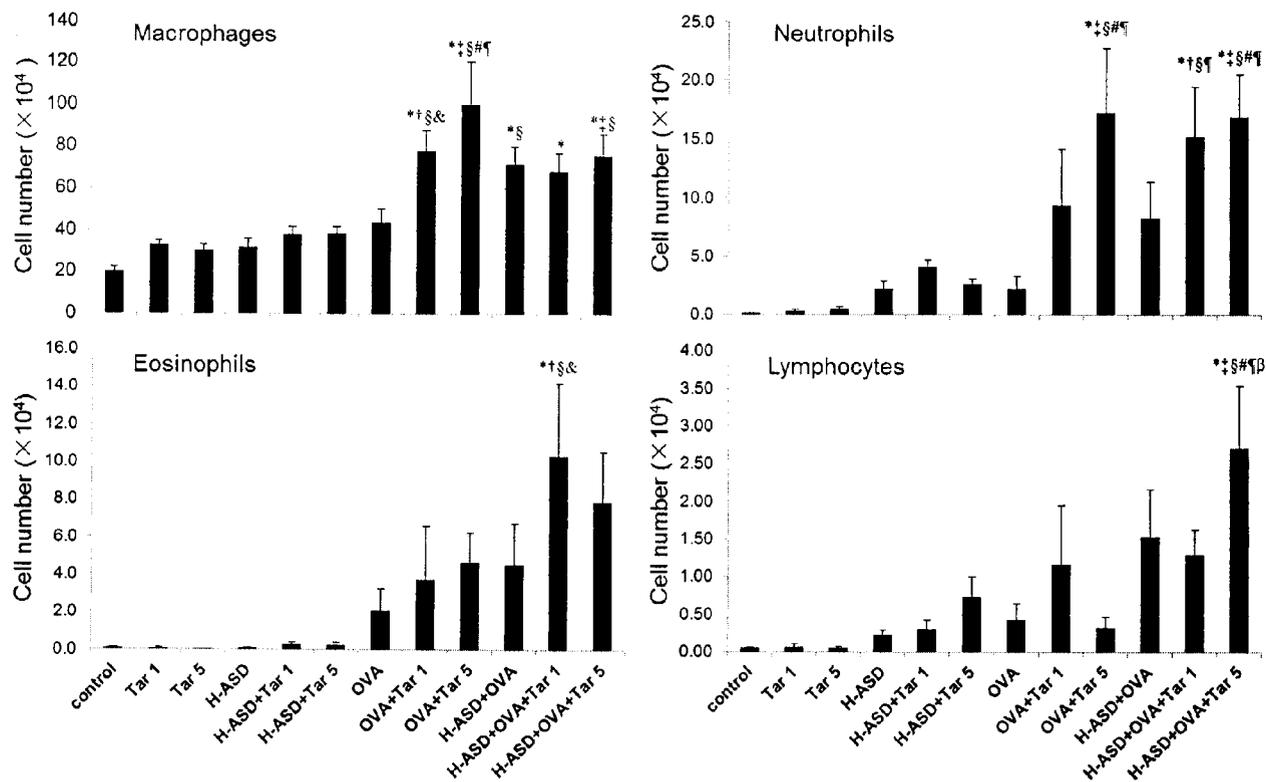


图 1, OVA、H-ASD 和 Tar 干预对小鼠 BALF 中细胞分布的影响

* $p < 0.05$ vs. control; † $p < 0.05$ vs. Tar 1; ‡ $p < 0.05$ vs. Tar 5; § $p < 0.05$ vs. H-ASD; & $p < 0.05$ vs. H-ASD + Tar 1; # $p < 0.05$ vs. H-ASD + Tar 5; ¶ $p < 0.05$ vs. OVA; Ⓡ $p < 0.05$ vs. OVA + Tar 5.

三、OVA、H-ASD 和 Tar 干预对小鼠肺部病理改变的影响

图 2 和图 3 揭示了 Tar 对小鼠肺部病理改变的影响。Control 和 Tar 1 组小鼠肺部未观察到任何病理改变。H-ASD、H-ASD + Tar 1 和 H-ASD + Tar 5 干预仅导致了气道粘膜下少量炎症细胞浸润（图片未列出）。与 Control 相比，OVA 单独干预仅导致了气道上皮中少量杯状细胞增殖，及气道粘膜下少量嗜酸性粒细胞、中性粒细胞和淋巴细胞浸润。OVA + Tar 1 干预所导致的气道病理改变与 OVA 单独干预相似。但 OVA + Tar 5 干预导致了气道上皮中杯状细胞轻到中度增殖，以及气道粘膜下嗜酸性粒细胞轻度浸润。与 OVA 单独干预相比，H-ASD + OVA 也导致了杯状细胞轻度增殖及气道粘膜下嗜酸性粒细胞和淋巴细胞轻度浸润。但是 H-ASD + OVA + Tar 1 和 H-ASD + OVA + Tar 5 干预导致了杯状细胞中度增殖及气道粘膜下嗜酸性粒细胞、中性粒细胞和淋巴细胞中到重度浸润，且 H-ASD + OVA + Tar 1 所致的这些病理改变比 H-ASD + OVA + Tar 5 更为严重。

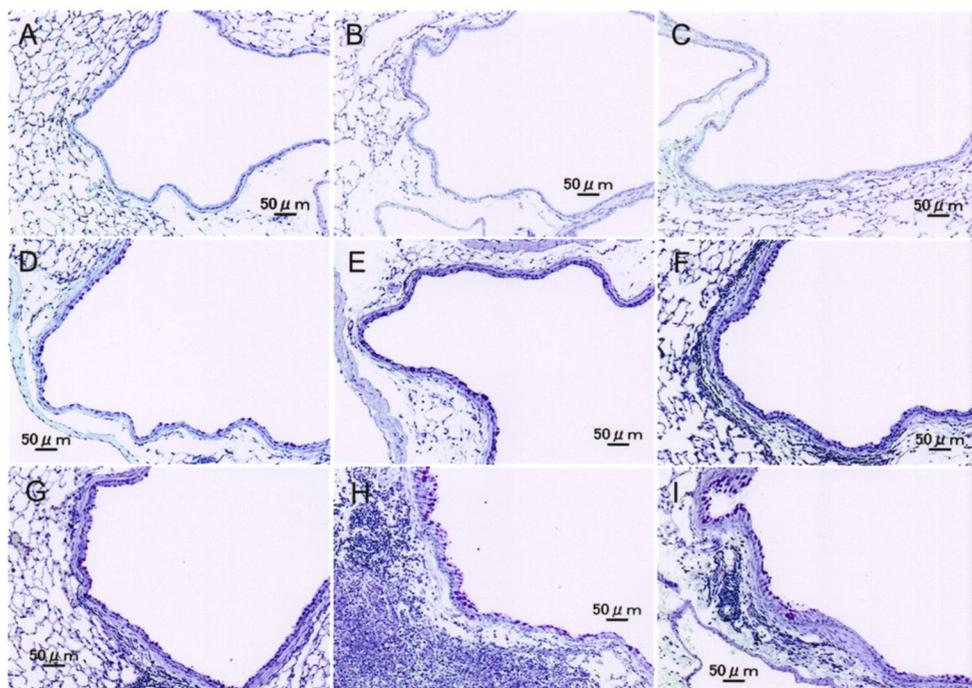


图 2，OVA、H-ASD 和 Tar 干预对小鼠肺部病理改变的影响（PAS）

A: Control; B: Tar 1; C: Tar 5; D: OVA; E: OVA + Tar 1; F: OVA + Tar 5; G: H-ASD + OVA; H: H-ASD + OVA + Tar 1; I: H-ASD + OVA + Tar 5.

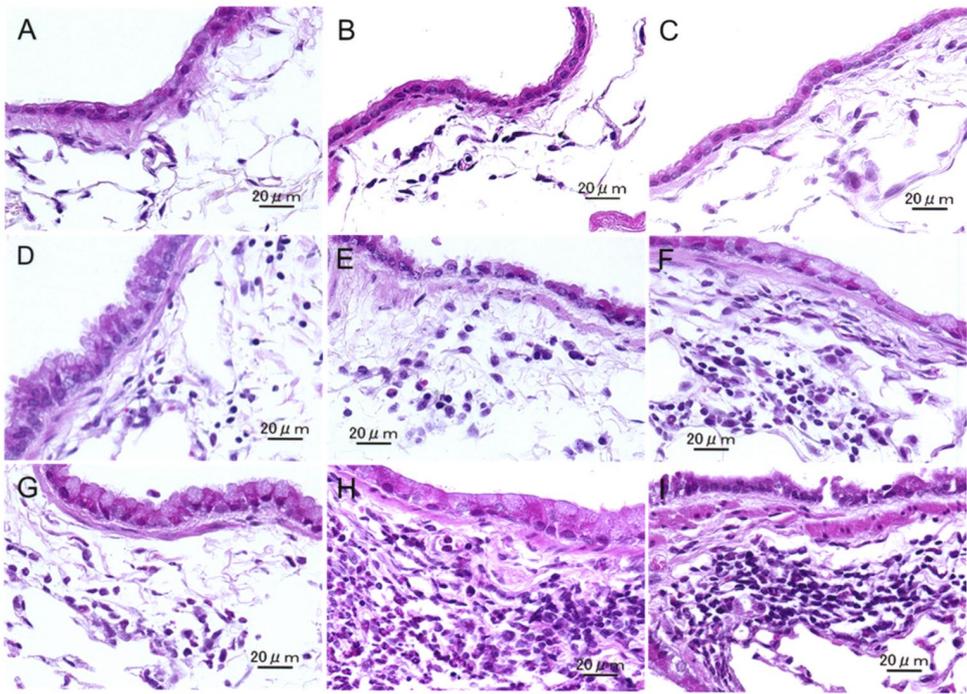


图 3, OVA、H-ASD 和 Tar 干预对小鼠气道炎症细胞浸润的影响 (HE)

A: Control; B: Tar 1; C: Tar 5; D: OVA; E: OVA + Tar 1; F: OVA + Tar 5; G: H-ASD + OVA; H: H-ASD + OVA + Tar 1; I: H-ASD + OVA + Tar 5.

四、OVA, H-ASD 和 Tar 干预对小鼠 BALF 中细胞因子和趋化因子蛋白表达的影响

图 4 显示了 BALF 中 IL-12、KC、MIP-1 α 和 RANTES 的蛋白表达水平。其中 Control 组的蛋白水平从 0.34 ± 0.22 pg/ml(RANTES)到 30.5 ± 5.95 pg/ml(KC)。Tar 1 或 Tar 5 单独干预没有明显升高这几种蛋白的水平, H-ASD 干预明显升高了 MIP-1 α 的水平, 此外, H-ASD + Tar 干预还明显升高了 IL-12, KC 和 MIP-1 α 的水平, RANTES 的表达虽然也有增加, 但是差异没有统计学意义。

OVA 组的蛋白表达, RANTES 最低, 为 1.35 ± 0.43 pg/ml, KC 最高, 为 63.8 ± 13.1 pg/ml。Tar 与 OVA 联合干预使这几种蛋白水平呈剂量依赖性升高。且在 H-ASD 和 OVA 同时存在的情况下, Tar 的干预进一步升高了这几种蛋白的水平。

图 5 显示了 BALF 中 IL-1 β 、IL-6、MCP-1 和 MCP-3 的蛋白表达水平。Control 组的蛋白水平在 0.37 ± 0.37 pg/ml (IL-1 β) 到 1.71 ± 0.92 pg/ml (IL-6) 之间。Tar

单独干预仅使 MCP-3 的水平稍升高。H-ASD 升高了 MCP-1 的水平，但 OVA 却降低了它们的表达。

OVA 组的蛋白水平在 0.92 ± 0.49 pg/ml (IL-6) 到 2.99 ± 1.15 pg/ml (MCP-1) 之间。Tar 与 OVA 联合作用升高了这几种蛋白的表达水平，特别是 OVA 和 Tar 5 联合作用时，IL-1 β 水平的升高最为明显。Tar、H-ASD 与 OVA 联合作用也升高了这几种蛋白的表达水平，且 H-ASD + OVA + Tar 1 升高这几种蛋白的作用最为明显。

图 6 显示了 BALF 中 IL-4、IL-5、IL-13 和 eotaxin 的蛋白表达水平。这些蛋白通常被认为是过敏相关介质。Control 组的蛋白水平在 0 (IL-4 和 eotaxin) 到 6.38 ± 5.01 pg/ml (IL-5) 之间。在没有 OVA 干预的情况下，Tar 和 H-ASD 干预对这几种蛋白的表达影响不大。

OVA 单独干预组，蛋白水平在 0 (eotaxin) 到 16.5 ± 6.38 pg/ml (IL-5) 之间。Tar 与 OVA 联合干预轻度升高了 IL-5、IL-13 和 eotaxin 的蛋白表达水平，但没有检测到 IL-4 的表达。H-ASD 与 OVA 联合作用也使 IL-5 的水平从 1.68 ± 0.51 pg/ml 上升到了 21.5 ± 6.78 pg/ml。在 H-ASD 与 OVA 都存在的条件下，LPS 进一步升高了这几种蛋白的水平，而且，这一作用在 H-ASD + OVA + Tar 1 组比 H-ASD + OVA + Tar 5 组更为明显。

在本研究中，各组小鼠 BALF 中 TGF- β 和 IFN- γ 均未检测到。

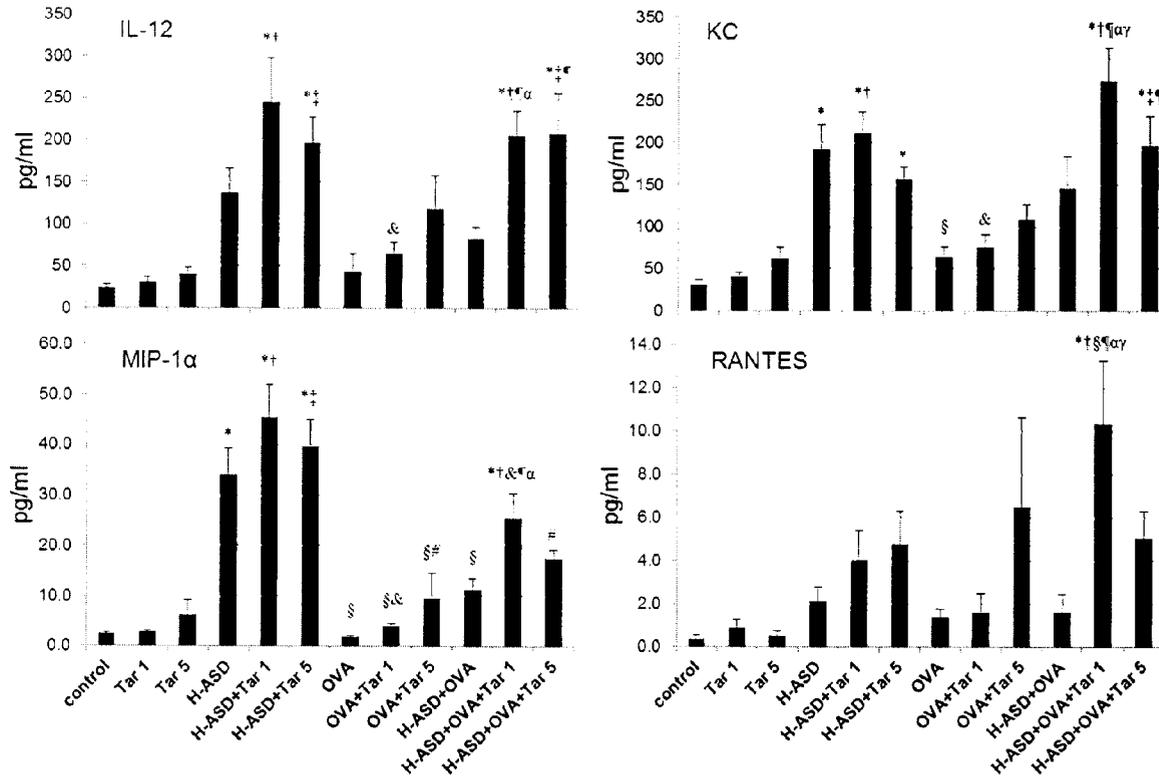


图 4, 各组小鼠 BALF 中 IL-12、KC、MIP-1α 和 RANTES 的蛋白表达水平

* $p < 0.05$ vs. control; † $p < 0.05$ vs. Tar 1; ‡ $p < 0.05$ vs. Tar 5; § $p < 0.05$ vs. H-ASD; & $p < 0.05$ vs. H-ASD + Tar 1; ¶ $p < 0.05$ vs. H-ASD + Tar 5; † $p < 0.05$ vs. OVA; α $p < 0.05$ vs. OVA + Tar 1; γ $p < 0.05$ vs. H-ASD + OVA.

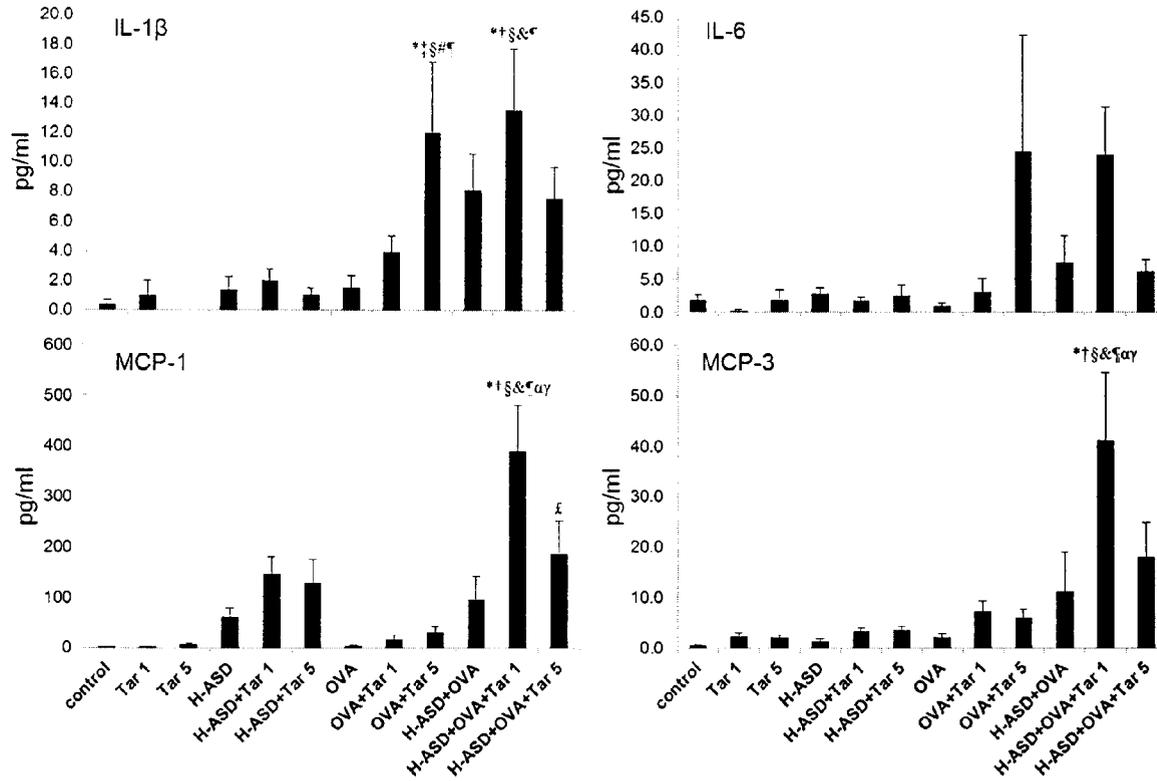


图 5, 各组小鼠 BALF 中 IL-1 β 、IL-6、MCP-1 和 MCP-3 的蛋白表达水平

* $p < 0.05$ vs. control; † $p < 0.05$ vs. Tar 1; ‡ $p < 0.05$ vs. Tar 5; § $p < 0.05$ vs. H-ASD; ¶ $p < 0.05$ vs. H-ASD + Tar 1; # $p < 0.05$ vs. H-ASD + Tar 5; ¹ $p < 0.05$ vs. OVA; ^a $p < 0.05$ vs. OVA + Tar 1; ^y $p < 0.05$ vs. H-ASD + OVA; ^f $p < 0.05$ vs. H-ASD + OVA + Tar 1.

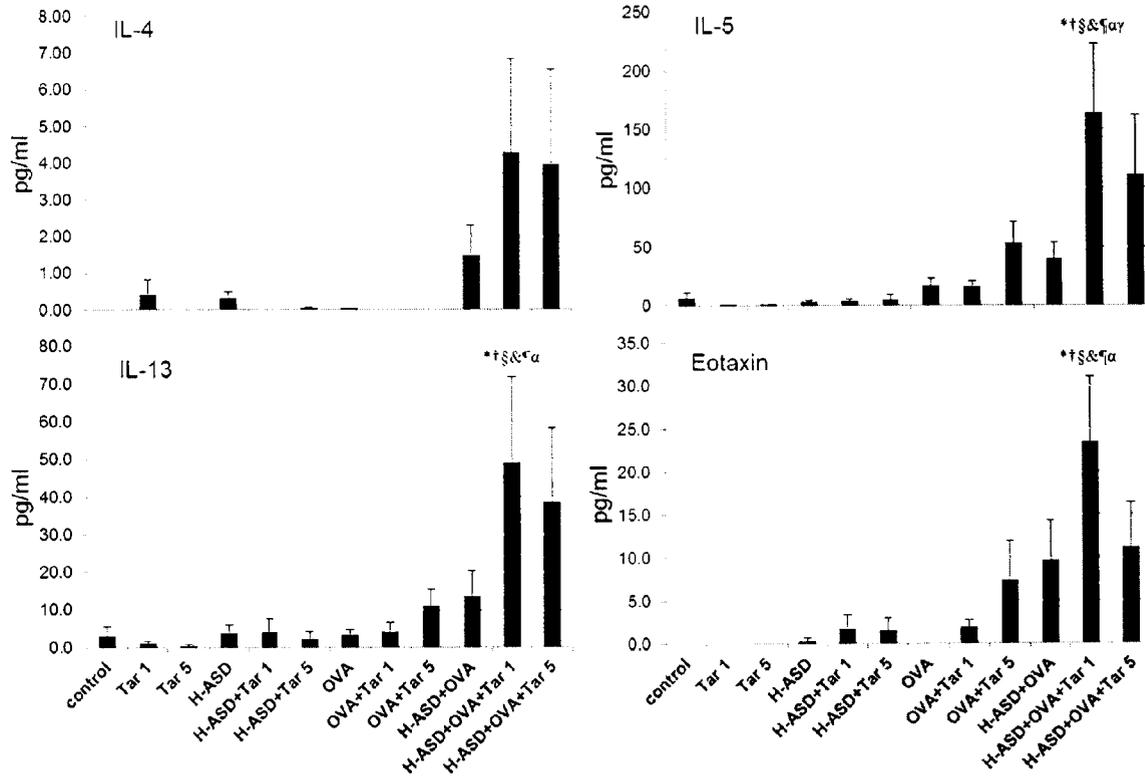


图 6, 各组小鼠 BALF 中 IL-4、IL-5、IL-13 和 eotaxin 的蛋白表达水平

* $p < 0.05$ vs. control; † $p < 0.05$ vs. Tar 1; ‡ $p < 0.05$ vs. Tar 5; § $p < 0.05$ vs. H-ASD; ¶ $p < 0.05$ vs. H-ASD + Tar 1; # $p < 0.05$ vs. H-ASD + Tar 5; †† $p < 0.05$ vs. OVA; ††† $p < 0.05$ vs. OVA + Tar 1; †††† $p < 0.05$ vs. H-ASD + OVA.

五、OVA、H-ASD 和 Tar 干预对小鼠血浆中 OVA-IgE 和 OVA-IgG1 表达的影响

如图 7 所示, 在 control、Tar 1、Tar 5、H-ASD、H-ASD + Tar 1 和 H-ASD + Tar 5 中均未检测到 OVA-IgG1。其他各组 OVA-IgG1 的表达水平, 以 H-ASD + OVA + Tar 1 组最高, H-ASD + OVA + Tar 5 组次之, OVA、OVA + Tar 1、OVA + Tar 5 和 H-ASD + OVA 水平相当。本实验中, 各组小鼠血浆中没有检测到 OVA-IgE。

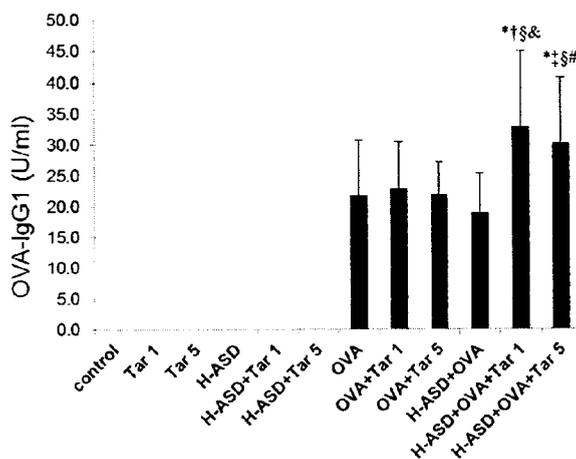


图 7, 各组小鼠血浆中 OVA-IgG1 的蛋白表达水平

* $p < 0.05$ vs. control; † $p < 0.05$ vs. Tar 1; ‡ $p < 0.05$ vs. Tar 5; § $p < 0.05$ vs. H-ASD; & $p < 0.05$ vs. H-ASD + Tar 1; # $p < 0.05$ vs. H-ASD + Tar 5.

讨论

本实验结果证明吸附于 ASD 上的 Tar 成分增强了 OVA 诱导的小鼠肺嗜酸性粒细胞增多症, 而且本实验所用的 Tar 有较高含量的 PAHs, 所以, 这种增强作用可能部分归因于 Tar 所含有的 PAHs。

本实验结果表明, 在没有 OVA 作用的条件下, Tar 单独作用对 BALF 中细胞分布和细胞因子的蛋白表达没有影响, 也未引发小鼠肺部病理改变。然而, H-ASD 单独干预或 H-ASD 与 Tar 联合作用增加了小鼠 BALF 中中性粒细胞的数量, 并升高了中性粒细胞相关的细胞因子如 KC、MIP-1 α 和 RANTES 以及 Th1 类细胞因子 IL-12 的水平。H-ASD 与 Tar 联合作用还导致了轻到中度的支气管炎和肺泡炎, 这

些结果提示 H-ASD 通过升高促炎介质的水平，加剧了 Tar 诱导的肺部炎症。

在仅有 OVA 作用的条件下，1 μg 和 5 μg 的 Tar 导致了巨噬细胞和中性粒细胞明显增加，但嗜酸性粒细胞仅见轻度增加，同时 Th2 类细胞因子 IL-5 和 IL-13 的水平虽有一定上升，但并不明显，这提示 OVA 与 Tar 联合干预只能导致较弱的 Th2 反应。

在同时有 H-ASD 和 OVA 作用的条件下，1 μg 和 5 μg 的 Tar 增加了 BALF 中性粒细胞、嗜酸性粒细胞和淋巴细胞的数量，且 1 μg 的 Tar 比 5 μg 的 Tar 更明显升高了 BALF 中促炎细胞因子（IL-1 β 、IL-4、IL-5、IL-6 和 IL-13）和趋化因子（RANTES、MIP-1 α 、KC、MCP-1、Eotaxin 和 MCP-3）的水平。小鼠肺组织病理改变的结果也表明 1 μg 的 Tar 干预所导致的病理改变——气道粘膜下层嗜酸性粒细胞的浸润和支气管上皮中杯状细胞的增殖，也比 5 μg 的 Tar 作用更为明显。这些结果提示 H-ASD 和 Tar 联合作用能加剧 OVA 所诱导的小鼠气道炎症，而且，这种加剧作用在 H-ASD + OVA + Tar 1 组表现得更强。

嗜酸性粒细胞增加是哮喘气道炎症反应的重要标志之一^[22]，肺部嗜酸性粒细胞的聚集主要通过两条途径：IL-5 依赖途径和非 IL-5 依赖途径，IL-5 是促进嗜酸性粒细胞成熟和分化最为重要的细胞因子^[23]，而 IL-13 是非 IL-5 依赖途径中最重要的细胞因子^[24]。此外，eotaxin 对嗜酸性粒细胞也有很强的趋化作用^[25]，而 MIP-1 α 被中和也会减少过敏性炎症反应中嗜酸性粒细胞的募集^[26]，由此可见，本研究中 H-ASD + OVA + Tar 所致的这些细胞因子和趋化因子的升高加剧了嗜酸性粒细胞增多性肺炎。而嗜酸性粒细胞释放的主要碱性蛋白可以激活中性粒细胞，使其释放超氧化物和 KC^[27]。另一方面，有报道表明 RANTES 和 MCP-1 表达增加也可以导致中性粒细胞增多，使哮喘恶化^[28, 29]。所以联合作用所导致的气道损伤可能是由于加剧了嗜酸性粒细胞增多性气道炎症。这种过敏性炎症不仅募集嗜酸性粒细胞，还会募集中性粒细胞。嗜酸性粒细胞和中性粒细胞通过释放的几种毒性介质一起导致了气道上皮损伤^[30]。

病例对照研究表明暴露于 PAHs 与支气管哮喘和氧化应激水平升高有关^[16]。由 PAHs 所致的氧化应激水平升高会激活核因子（nuclear factor, NF）- κ B 和分裂原活化蛋白激酶，而这些信号级联效应在诱导气道炎症的一些细胞因子、趋化因

子和粘附分子的转录激活中起着重要作用^[31], 这些分子包括 IL-4、IL-5、IL-10、IL-13、KC、RANTES、MIP-1 α 、MCP-3、粒-巨噬细胞集落刺激因子 (granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF), TNF- α , 细胞间粘附分子 (intercellular adhesion molecule, ICAM) -1 和血管细胞粘附分子 (vascular cell adhesion molecule, VCAM) -1^[32]。在当前的研究中, 相对于 H-ASD + OVA, H-ASD + OVA + Tar 联合作用组 IL-4、IL-5、IL-13、RANTES、KC、MIP-1 α 和 MCP-3 等蛋白的表达都较高, 而且本实验所使用的 Tar 也含有芘, 苯并[a]芘和其它 PAHs, 所以 Tar 所含的 PAHs 可能在这些炎症分子表达升高介导的肺部炎症起着重要作用。

另一方面, 在 OVA 和 H-ASD 同时存在的条件下, 1 μ g 和 5 μ g 的 Tar 干预明显升高了血浆中 OVA-IgG1。Stevens 等用 PAHs 含量不同的柴油机尾气颗粒物对 BALB/c 小鼠进行干预, 结果也发现均能增强 OVA 诱导的气道炎症反应, 同时伴有 OVA-IgG1 的明显升高^[18]。抗原特异性 IgG1 可以通过嗜酸性粒细胞表面的 Fc γ RII 受体使其脱颗粒^[33], 释放血小板激活因子、活性氧自由基、白三烯类和主要碱性蛋白等物质, 导致上皮细胞损伤和气道高反应性^[30]。因此, OVA-IgG1 在 H-ASD + OVA + Tar 加剧肺嗜酸性粒细胞增多症中也起着重要的作用。

结论

本研究的结果证明, ASD 上所附着的 Tar 成分和 H-ASD 联合作用, 可通过升高 Th2 类细胞因子和抗原特异性免疫球蛋白加剧 OVA 诱导的小鼠气道炎症。

同时暴露于脂多糖和经加热处理的亚洲沙尘颗粒物对卵蛋白诱导的小鼠气道炎症的加剧作用

前言

近年来, 由于土地沙漠化的加剧, 沙尘暴事件频繁发生, 其中起源于我国北方和蒙古国南部沙漠的亚洲沙尘颗粒物 (Asian sand dust, ASD) 能够扩散到我国东部、朝鲜半岛、日本和美国等广大地区^[1-3], 其对人体健康的不良影响受到了日益广泛的关注。流行病学研究提示, ASD 事件可能与呼吸和循环系统疾病引发的人群死亡率增加有关^[34,35]。另一些报道还表明 ASD 事件与成人和儿童患者呼吸系统症状增加有关^[36,37]。

近年来的研究显示 ASD 可以导致哮喘发病率升高。Yang 等分析了我国台湾省台北市 1996 年至 2001 年间沙尘暴的发生情况和哮喘的就诊资料, 结果发现, 这几年间有 54 次沙尘暴发生, 哮喘的就诊在沙尘暴发生后第 2 天比平时增加了 8%^[38]。而且哮喘发病的增加主要归因于沙尘暴期间大气中可吸入颗粒物 (particles with an aerodynamic diameter of less than 10 μ m, PM₁₀) 浓度的升高。Bell 等的研究进一步显示, 沙尘暴期间, 大气中 PM₁₀ 浓度每增加 28 μ g/m³, 哮喘的入院率就增加 4.8% (95% CI 为 0.71%~8.38) ^[39]。

我们以前的研究表明 ASD 可以加剧卵蛋白 (ovalbumin, OVA) 诱导的嗜酸性粒细胞增多症, 而将 ASD 在 360 $^{\circ}$ C 加热使有毒物质灭活后得到的经加热的 ASD (heat-ASD, H-ASD) 仅能导致轻微效应^[8,9]。因此我们推测, 吸附于 ASD 的有机和无机物质可能在加剧嗜酸性粒细胞增多症中起着一定作用。ASD 的成分通常以二氧化硅为主, 同时含有碳酸钙、氧化铁、氧化铝、氧化钠和氧化镁等多种物质, 但在 ASD 的长途转运的过程中, 微生物和大气污染物, 包括多环芳烃、硫酸盐和硝酸盐等还会吸附于其上^[10-12]。ASD 还会被微量的脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 污染, 这是革兰氏阴性菌的一种细胞壁成分, 常也被称为内毒素。一些流行病学研究提示, 儿童床垫中的内毒素水平与过敏性哮喘的发生呈逆相关^[40], 而另一方面, 其他一些研究又表明内毒素暴露与成人和儿童哮喘发生风险和哮喘的

严重程度呈正相关^[41, 42]。动物研究的结果也存在争议,有趣的是,有一些研究提示低剂量的 LPS 会促进机体对变应原产生 Th2 炎性反应,而较高剂量的 LPS 却会促进 Th1 炎性反应^[43, 44]。我们最近的研究表明,富含 LPS 的 ASD 比富含二氧化硅的 ASD 对小鼠肺嗜酸性粒细胞增多症的加剧作用更强^[45]。因此,为了探究 ASD 中不同水平的 LPS 污染是否与 ASD 加剧肺嗜酸性粒细胞增多症明显相关,我们进行了本实验,观察了低剂量的 LPS 和/或 H-ASD 对 OVA 诱导的肺嗜酸性粒细胞增多症的加剧作用。

材料与方法

一、主要试剂

Diff-Quik 染色液 (International Reagents, Kobe, Japan)

白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 、IL-4、IL-6、IL-13、IL-17A、干扰素(Interferon, IFN) γ 、角质细胞趋化因子(Keratinocyte chemoattractant, KC)、肿瘤坏死因子(Tumor necrosis factor, TNF) α 、转化生长因子(Transforming growth factor, TGF) β 、嗜酸性粒细胞趋化因子(eotaxin)、单核细胞趋化蛋白(monocyte chemotactic protein, MCP)-1、巨噬细胞炎症蛋白(Macrophage inflammatory protein, MIP)-1 α 、受激活调节正常 T 细胞表达和分泌因子(Regulated upon activation normal T cell expressed and presumably secreted, RANTES)等酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒(R&D Systems Inc., MN, USA)。

IL-5 和 IL-12 ELISA 试剂盒 (Endogen, Inc., MA, USA)

MCP-3 ELISA 试剂盒 (Bender MedSystems Inc., CA, USA)

鼠 OVA 特异性的免疫球蛋白(OVA-specific immunoglobulin, OVA-Ig) E 和鼠 OVA-IgG1 ELISA 试剂盒 (Shibayagi Co., Shibukawa, Japan)

LPS (InvivoGen, CA, USA)

灭活的胎牛血清 (Thermo Scientific, South Logan, UT)

粒-巨噬细胞集落刺激因子 (granulocyte-macrophage colony stimulatory factor, GM-CSF) (PeproTech EC, London, UK)

二、主要实验仪器

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

显微镜 (Nikon Co., Tokyo, Japan)

细胞离心涂片机 (Sakura, Tokyo, Japan)

RH-12 自动固定包埋装置 (Sakura, Tokyo, Japan)

酶标仪 (Spectrafluor, Tecan, Salzburg, Austria)

三、实验动物

从日本 Charles River 公司购入 6 周龄雄性 BALB/c 小鼠, 在温度为 23°C、湿度为 55–70%、昼夜 (12 h/12 h) 交替的房间里适应性饲养一周后, 筛选出 168 只无体重增长异常和/或病态的小鼠, 开始实验。

四、ASD 样本处理和 LPS

本实验所用的 ASD 标品收集于蒙古国南部戈壁沙漠, 经精制后使用。该 ASD 样品的粒径分布峰值在 3.9 μm 处, 其中的无机成分包括: 51.6% SiO_2 , 14.3% Al_2O_3 , 5.5% Fe_2O_3 , 1.3% Na_2O , 9.6% CaCO_3 , 0.6% CaO , 2.5% MgO , 0.7% TiO_2 和 2.6% K_2O ^[19]。取部分 ASD 样品在电子加热器中经 360°C 加热 30 分钟灭活了吸附于颗粒物表面的有毒物质 (如硫酸盐、硝酸盐和微生物等), 得到了本试验使用的 H-ASD。超高纯度的 LPS 购于 InvivoGen 公司。

五、实验动物染毒

将 168 只雄性 BALB/c 小鼠随机分为 12 组 (每组 14 只), 每组小鼠以 4% 三氟氯溴乙烷麻醉后, 经气管内灌注给予一种测试样品 (样品用 0.9% 的生理盐水配制而成, 给予剂量为 0.1 ml/只): 对照组 (Control, 仅给予生理盐水); LPS 1 (1 ng LPS); LPS 10 (10 ng LPS); H-ASD (0.1 mg H-ASD); H-ASD + LPS 1 (0.1 mg H-ASD 和 1 ng LPS); H-ASD + LPS 10 (0.1 mg H-ASD 和 10 ng LPS); OVA (2 μg OVA); OVA + LPS 1 (2 μg OVA 和 1 ng LPS); OVA + LPS 10 (2 μg OVA 和 10 ng LPS); H-ASD + OVA (2 μg OVA 和 0.1 mg H-ASD); H-ASD + OVA + LPS 1 (2 μg OVA, 0.1 mg H-ASD 和 1 ng LPS); H-ASD + OVA + LPS 10 (2 μg OVA, 0.1 mg H-ASD 和 10 ng LPS)。每两周干预一次, 一共干预 4 次, 实验期间, 动物自由摄

食和饮水。

六、血液和支气管肺泡灌洗液（bronchoalveolar lavage fluids, BALF）采集

每个实验组随机选取 8 只小鼠用于心脏采血和收集 BALF。将小鼠用戊巴比妥麻醉后，心脏采血，3500 rpm 离心 2 min，分离血浆，-80°C 的深冻冰箱中保存，用于检测血浆中的 OVA 特异性抗体的表达。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 BALF（约 1.6 ml），4°C 1500 rpm 离心 10 min。取上清液，-80°C 的深冻冰箱中保存，用于检测 BALF 中细胞因子和趋化因子的蛋白表达。

七、实验动物的病理检测

每个实验组的另外 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 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上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；1，细微变化；2，轻度变化；3，中度变化；4，中重度变化；5，重度变化。细微变化指气道粘膜下 20%以下的嗜酸性粒细胞和淋巴细胞浸润或支气管上皮中 20%杯状细胞增殖；轻度变化指气道粘膜下 21-40%的嗜酸性粒细胞和淋巴细胞浸润或支气管上皮中 21-40%杯状细胞增殖；中度变化指气道粘膜下 41-60%的嗜酸性粒细胞和淋巴细胞浸润或支气管上皮中 41-60%杯状细胞增殖；中重度变化指气道粘膜下 61-80%的嗜酸性粒细胞和淋巴细胞浸润或支气管上皮中 61-80%杯状细胞增殖；重度变化指气道粘膜下 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^[20,21]。

八、BALF 中的细胞计数

将 BALF 离心后得到的沉淀悬浮于 100 μl 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。根据总细胞数取一定量细胞悬液，适

当稀释后应用细胞离心涂片机，1500 rpm 离心 10 min，制成细胞涂片，再用 Diff-Quik 染色后，显微镜下观察计数巨噬细胞、中性粒细胞、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。

九、BALF 中的细胞因子和趋化性细胞因子的检测

应用 ELISA 试剂盒检测 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、IL-17A、TNF- α 、IFN- γ 和 TGF- β ，趋化性细胞因子包括 KC、MCP-1、MCP-3、MIP-1 α 、RANTES 和 eotaxin。IL-1 β 、IL-4、IL-6、IL-13、IL-17A、TNF- α 、IFN- γ 、TGF- β 、KC、MCP-1、MIP-1 α 、RANTES 和 eotaxin 测定的具体步骤如下：

(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) 根据待测样品数量准备所需的板条数；

(3) 每孔加 50 μ l 的稀释液，加标准或样品 50 μ l，覆膜，轻轻振摇，室温放置 2h；

(4) 用洗板机洗涤 5 次，每次洗涤，每孔加洗涤液 400 μ l；

(5) 洗板机吸去洗涤液并倒置沥干水分，每孔加结合物 100 μ l，盖上新膜，轻轻振荡混匀，室温放置 2h；

(6) 用洗板机洗涤 5 次，每次洗涤，每孔加洗涤液 400 μ l；

(7) 洗板机吸去洗涤液并倒置沥干水分，每孔加底物溶液 100 μ l，室温暗处

放置 30 min;

(8) 每孔加反应停止溶液 100 ul, 振荡混匀;

(9) 30 min 之内用酶标仪在 450、550nm 波长处测定各孔的 OD 值。

IL-5 测定的具体步骤如下:

(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) 根据待测样品数量准备所需的板条数;

(3) 每孔加 50 μ l 的稀释液, 加标准、样品 50 μ l, 覆膜, 轻轻振摇, 37 $^{\circ}$ C 放置 2h;

(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, 覆膜, 轻轻振摇, 37 $^{\circ}$ C 放置 1h;

(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, 室温暗处 30 min;

(8) 每孔加反应停止液 100 ul, 振荡混匀;

(9) 30 min 之内用酶标仪在 450、550 nm 波长处测定各孔的 OD 值。

IL-12 测定的具体步骤如下:

(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) 根据待测样品数量准备所需的板条数;

(3) 每孔加 50 μ l 的稀释液, 加标准、样品 50 μ l, 覆膜, 轻轻振摇, 室温 1h;

(4) 用洗板机洗涤 5 次, 每孔加洗涤液 400 ul;

(5) 每孔加生物素基化的抗体 100 ul, 覆膜, 轻轻振摇, 室温放置 1h;

(6) 用洗板机洗涤 5 次, 每孔加洗涤液 400 ul;

(7) 每孔加辣根过氧化物酶标记链霉亲和素缓冲液 100 ul, 室温放置 30 min;

(8) 用洗板机洗涤 5 次, 每孔加洗涤液 400 ul;

(9) 每孔加底物溶液 100 ul, 室温暗处 30 min;

(10) 每孔加反应停止液 100 ul, 振荡混匀;

(11) 30 min 之内用酶标仪在 450、550 nm 波长处测定各孔的 OD 值。

MCP-3 测定的具体步骤如下：

- (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) 根据待测样品数量准备所需的板条数；
- (3) 标准孔每孔加 150 μ l 的蒸馏水溶解其中的标准品，样品孔每孔加 100 μ l 蒸馏水；
- (4) 样品孔每孔加 50 μ l 样品，覆膜，轻轻振摇，室温放置 3h；
- (5) 用洗板机洗涤 5 次，每次每孔加洗涤液 400 μ l；
- (6) 每孔加底物溶液 100 μ l，室温暗处 10 min；
- (7) 每孔加反应停止液 100 μ l，振荡混匀；
- (8) 30 min 之内用酶标仪在 450nm 波长处测定各孔的 OD 值。

十、OVA-IgE 和 OVA-IgG1 抗体的检测

鼠 OVA-IgE 和 OVA-IgG1 ELISA 试剂盒检测血清中的 OVA-IgE 和 OVA-IgG1 抗体。根据实验说明书，具体步骤如下：

- (1) 洗板 5 次，400 μ l/每孔；
- (2) 加样：每孔分别加标准溶液或待测样品 10 μ l，注意不要有气泡，轻轻混匀，酶标板加上盖，室温反应 1 h；
- (3) 洗板 5 次，400 μ l/每孔；
- (4) 每孔加结合物 100 μ l，室温 30 min；
- (5) 洗板 5 次，400 μ l/每孔；
- (6) 每孔加发色液 100 μ l，室温暗处放置 20 min；
- (7) 每孔加终止液 100 μ l，终止反应；
- (8) 用酶标仪在 450 nm 波长（副波长 620nm）测量各孔 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、分离培养小鼠骨髓来源的巨噬细胞（bone marrow-derived macrophages, BMDMs）

野生型 (wildtype, WT)、Toll 样受体 (Toll like receptor, TLR) 2 基因敲除、TLR4 基因敲除、髓样分化因子 (myeloid differentiation factor 88, MyD88) 基因敲除的小鼠 (BALB/c 小鼠背景) 购于 Oriental Bioservice Inc. (Kyoto, Japan)。小鼠 8 周龄时处死后, 分离股骨, 用 Hanks 液冲洗骨髓, 得到的 BMDMs 培养于含有青霉素/链霉素和灭活的 10%胎牛血清的 RPMI 中, 在培养的第 0 天和第 3 天加入 10 ng/ml 的 GM-CSF。培养 6 天后, 细胞贴壁, 将上清培养基完全弃去, hanks 洗一遍, 加入 0.02%的 EDTA 5 ml/皿, 然后刮下贴壁的 BMDMs, 将其浓度调到 3×10^5 cells/ml, 再接种到 24 孔板上, 1 ml/孔, 以 PBS 或 LPS (终浓度为 0.1 μ g/ml) 孵育 12h, 收集上清液。最后用 Elisa 法检测上清液中的细胞因子和趋化因子。

十二、细胞培养液中细胞因子和趋化因子检测

按照试剂盒说明, 用 Elisa 法检测细胞培养液中 IL-6、MCP-1、MIP-1 α 和 TNF- α 等细胞因子和趋化因子。

十三、统计学分析

本研究应用 SPSS Statistics Client 21 统计学软件进行分析, 实验结果用平均数 \pm 标准误表示, 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 Tukey 法进行组间比较, $p < 0.05$ 具有统计学意义。

结果

一、LPS 干预对基因敲除小鼠 BMDMs 培养液中细胞因子和趋化因子表达的影响

图 8 显示了体外实验中, LPS 刺激基因敲除小鼠 BMDMs 后, 细胞培养液中细胞因子和趋化因子的表达。WT 小鼠的 IL-6、MCP-1、MIP-1 α 和 TNF- α 蛋白表达水平较高, 其中最低的 MIP-1 α 为 136 ± 19.4 pg/ml, 最高的 IL-6 水平达到了 $2,080 \pm 297$ pg/ml。TLR2 基因敲除小鼠, MIP-1 α 为 96.0 ± 16.0 pg/ml, IL-6 达到了 $1,763 \pm 223$ pg/ml。MyD88 基因敲除小鼠的 BMDMs 培养液中仅检测到微量的 MIP-1 α (5.57 ± 1.20 pg/ml) 和 TNF- α (10.4 ± 10.4 pg/ml)。另一方面, IL-6 和 TNF- α 在 TLR4-/-基因敲除小鼠的 BMDMs 培养液中没有检测到, 而且 IL-6 在 MyD88 基因

敲除小鼠的 BMDMs 培养液中也没有检测到。

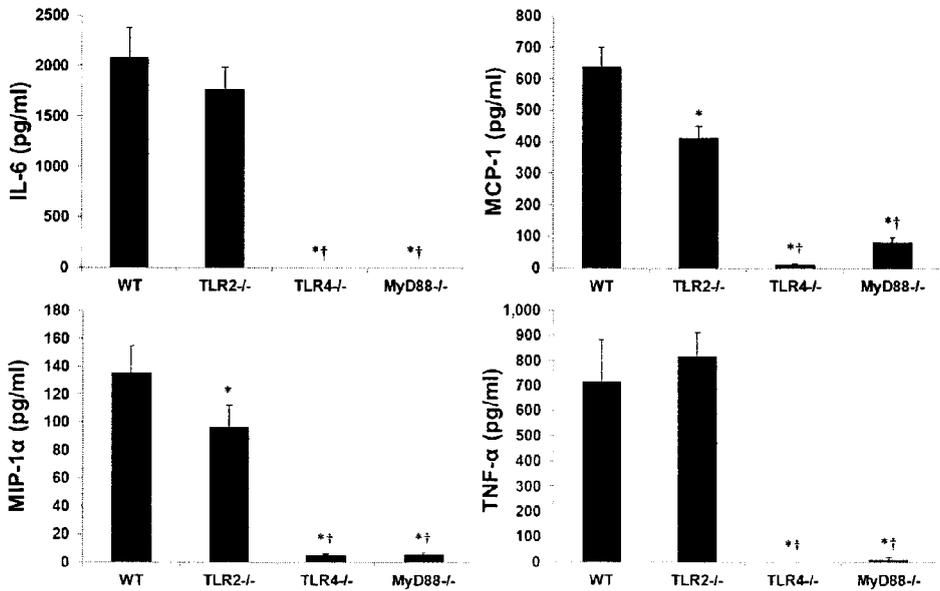


图 8, LPS 干预对小鼠 BMDMs 培养液中细胞因子和趋化因子表达的影响

* $p < 0.05$ vs. WT; † $p < 0.05$ vs. TLR2-/-.

二、OVA、H-ASD 和 LPS 干预对小鼠 BALF 中细胞分布的影响

图 9 显示了 BALF 中细胞分布的状况。Control 的 BALF 中基本没有嗜酸性粒细胞，巨噬细胞数可达 $(12.6 \pm 1.89) \times 10^4$ ，LPS 1 和 LPS 10 单独干预分别使巨噬细胞数上升了 168% 和 137%。而且与 H-ASD 联合作用时，LPS 1 和 LPS 10 明显增加了巨噬细胞、中性粒细胞和淋巴细胞的数量，但对嗜酸性粒细胞的数量没有影响。OVA 单独作用没有增加这几种细胞中任何一种的数量，但是当它与 LPS 1 或 LPS 10 联合作用时，这几种细胞的数量都有轻度增加。而且当 H-ASD + LPS 1 或 H-ASD + LPS 10 与 OVA 联合作用时，这几种细胞的数量都明显增加了，这种增加在巨噬细胞和中性粒细胞呈现出剂量依赖性的关系，但在嗜酸性粒细胞和淋巴细胞却没有。

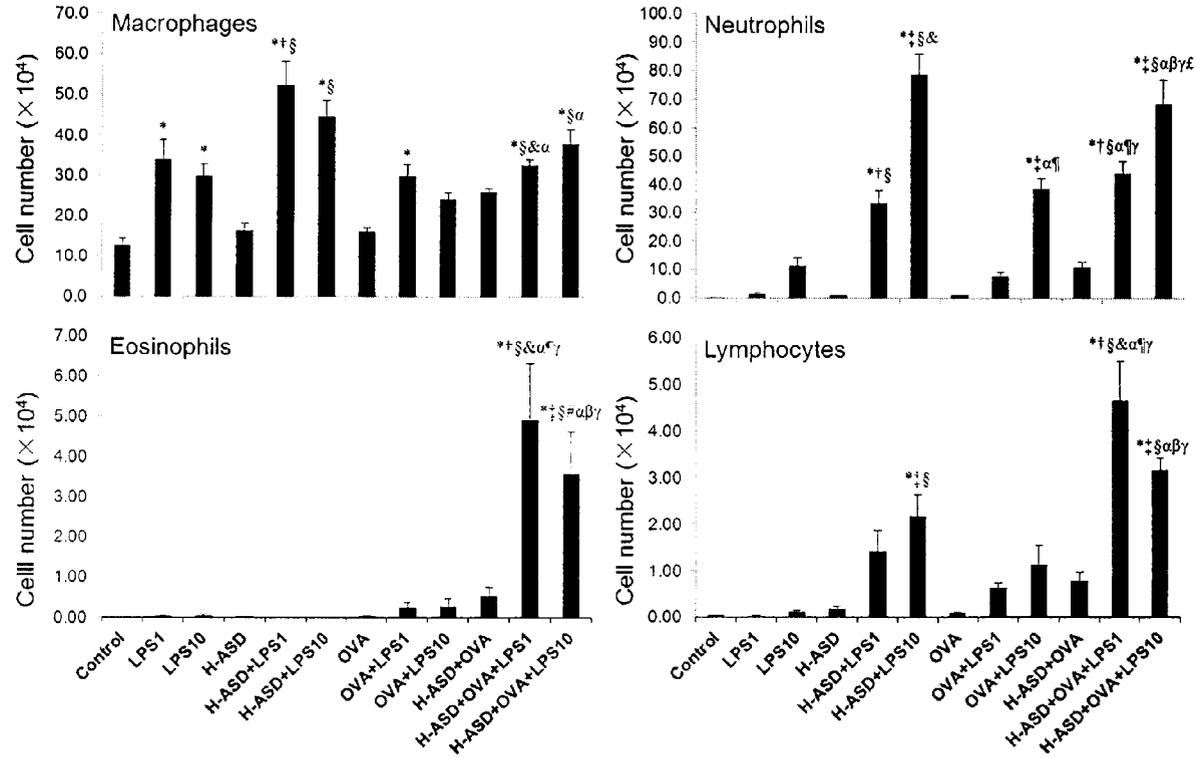


图 9, OVA、H-ASD 和 LPS 干预对小鼠 BALF 中细胞分布的影响

* $p < 0.05$ vs. control; † $p < 0.05$ vs. LPS 1; ‡ $p < 0.05$ vs. LPS 10; § $p < 0.05$ vs. H-ASD; & $p < 0.05$ vs. H-ASD + LPS 1; # $p < 0.05$ vs. H-ASD + LPS 10; ^α $p < 0.05$ vs. OVA; [¶] $p < 0.05$ vs. OVA + LPS 1; ^β $p < 0.05$ vs. OVA + LPS 10; ^γ $p < 0.05$ vs. H-ASD + OVA; ^ε $p < 0.05$ vs. H-ASD + OVA + LPS 1.

三、OVA、H-ASD 和 LPS 干预对小鼠肺部病理改变的影响

图 10 反映了 OVA、H-ASD 和 LPS 干预所致小鼠肺部病理改变的评分。与 Control 相比, LPS 1、LPS 10、H-ASD 和 H-ASD + LPS 1 干预使小鼠肺组织切片上的淋巴细胞有一定程度增加, 从 0.25 ± 0.11 (LPS 1) 到 0.58 ± 0.08 (H-ASD + LPS 1), 同时伴有杯状细胞轻度增加, 从 0.17 ± 0.11 (LPS 1, LPS 10, H-ASD) 到 0.25 ± 0.11 (H-ASD + LPS 1), 但均未发现嗜酸性粒细胞。H-ASD + LPS 10、OVA、OVA + LPS 1、OVA + LPS 10 和 H-ASD + OVA 干预使小鼠肺组织切片上嗜酸性粒细胞、淋巴细胞和杯状细胞有轻到中度增加, 其中嗜酸性粒细胞最低可达 0.25 ± 0.11 , 杯状细胞最高可达 1.67 ± 0.25 。H-ASD + OVA + LPS 1 和 H-ASD + OVA + LPS 10 干预使杯状细胞 (3.25 ± 0.11 和 2.75 ± 0.21)、嗜酸性粒细胞 (2.92 ± 0.15 和 2.50 ± 0.18) 和淋巴细胞 (3.42 ± 0.15 和 3.08 ± 0.20) 都明显增加了, 而且有趣的是, 这种病理改变在 LPS 剂量较低的组 (H-ASD + OVA + LPS 1) 比 LPS 剂量较高的组 (H-ASD + OVA + LPS 10) 更为明显。

图 11 和图 12 揭示了 LPS 对小鼠肺部病理改变的影响。Control 组未观察到任何病理改变。LPS 1 和 LPS 10 干预导致了气道粘膜下中性粒细胞轻度浸润, 而 H-ASD + LPS 1 和 H-ASD + LPS 10 导致了气道上皮中杯状细胞轻度增殖, 并伴有气道中轻到中度的中性粒细胞浸润。OVA 单独干预导致了气道上皮中杯状细胞轻度增殖, 以及气道粘膜下嗜酸性粒细胞、中性粒细胞和淋巴细胞轻度浸润。OVA + LPS 1 干预所导致的肺部病理改变与 OVA 单独干预相似。然而相对于 OVA + LPS 1, OVA + LPS 10 干预所导致的病理改变稍重。H-ASD + OVA 也导致了杯状细胞轻度增殖及气道粘膜下嗜酸性粒细胞和淋巴细胞轻度浸润。但是 H-ASD + OVA + LPS 1 和 H-ASD + OVA + LPS 10 干预导致了杯状细胞中度增殖及气道粘膜下嗜酸性粒细胞、中性粒细胞和淋巴细胞中到重度浸润, 而且 H-ASD + OVA + LPS 1 所致的这些病理改变比 H-ASD + OVA + LPS 10 更为严重。

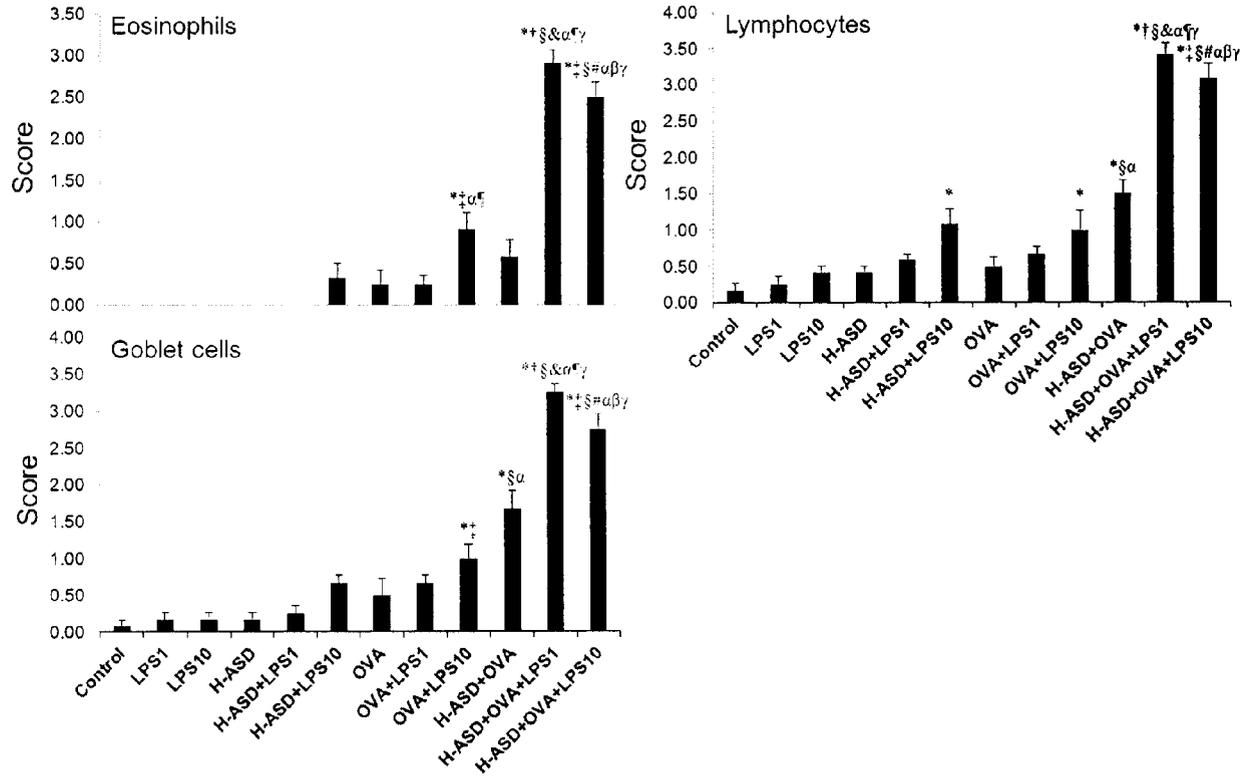


图 10. OVA、H-ASD 和 LPS 干预导致小鼠肺部病理改变的评分

* $p < 0.05$ vs. control; † $p < 0.05$ vs. LPS 1; ‡ $p < 0.05$ vs. LPS 10; § $p < 0.05$ vs. H-ASD; & $p < 0.05$ vs. H-ASD + LPS 1; # $p < 0.05$ vs. H-ASD + LPS 10; α $p < 0.05$ vs. OVA; β $p < 0.05$ vs. OVA + LPS 1; γ $p < 0.05$ vs. OVA + LPS 10; † ‡ § # α β γ $p < 0.05$ vs. H-ASD + OVA.

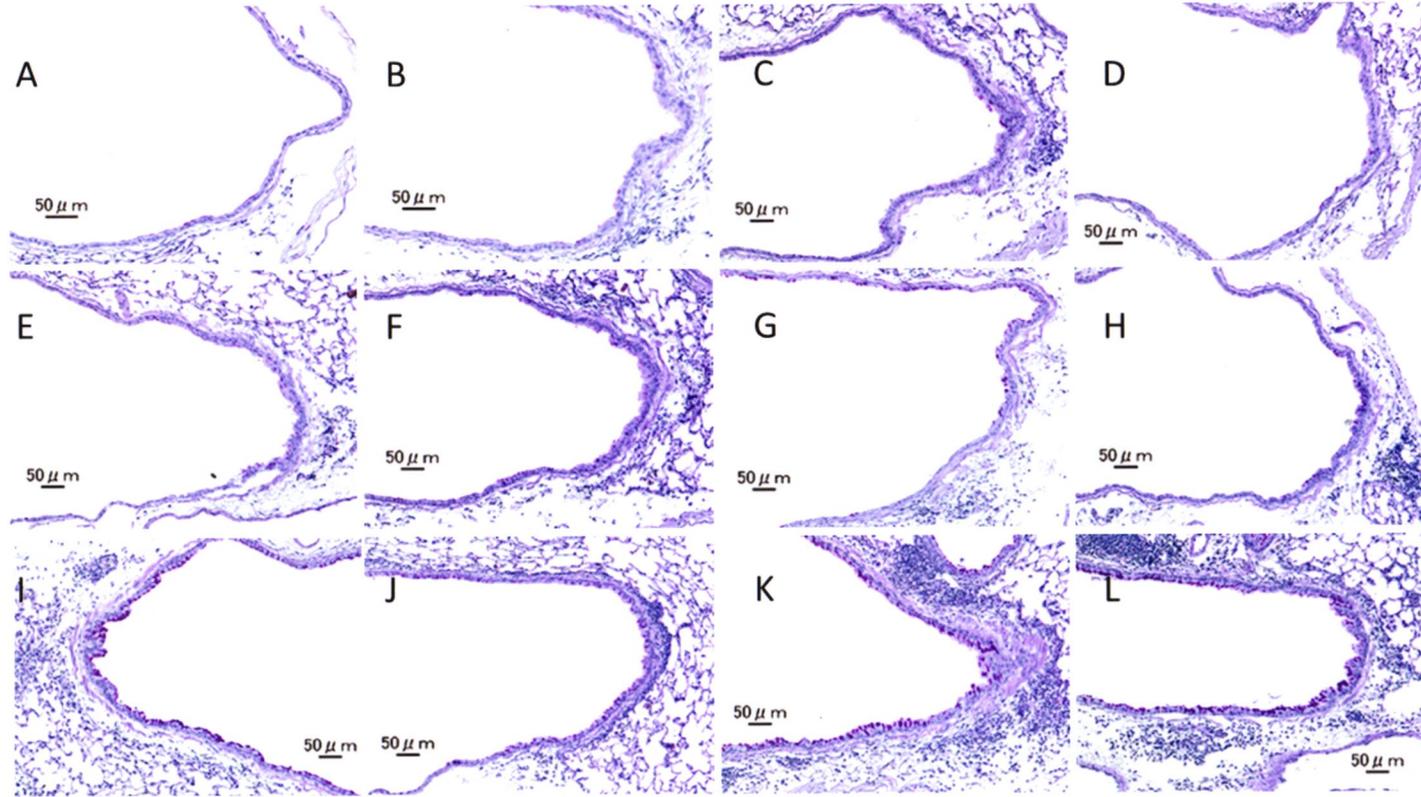


图 11, OVA、H-ASD 和 LPS 干预对小鼠肺部病理改变的影响 (PAS)

A: Control; B: LPS 1; C: LPS 10; D: H-ASD; E: H-ASD + LPS 1; F: H-ASD + LPS 10; G: OVA; H: OVA + LPS 1; I: OVA+ LPS 10; J: H-ASD + OVA; K: H-ASD + OVA + LPS 1; L: H-ASD + OVA + LPS 10.

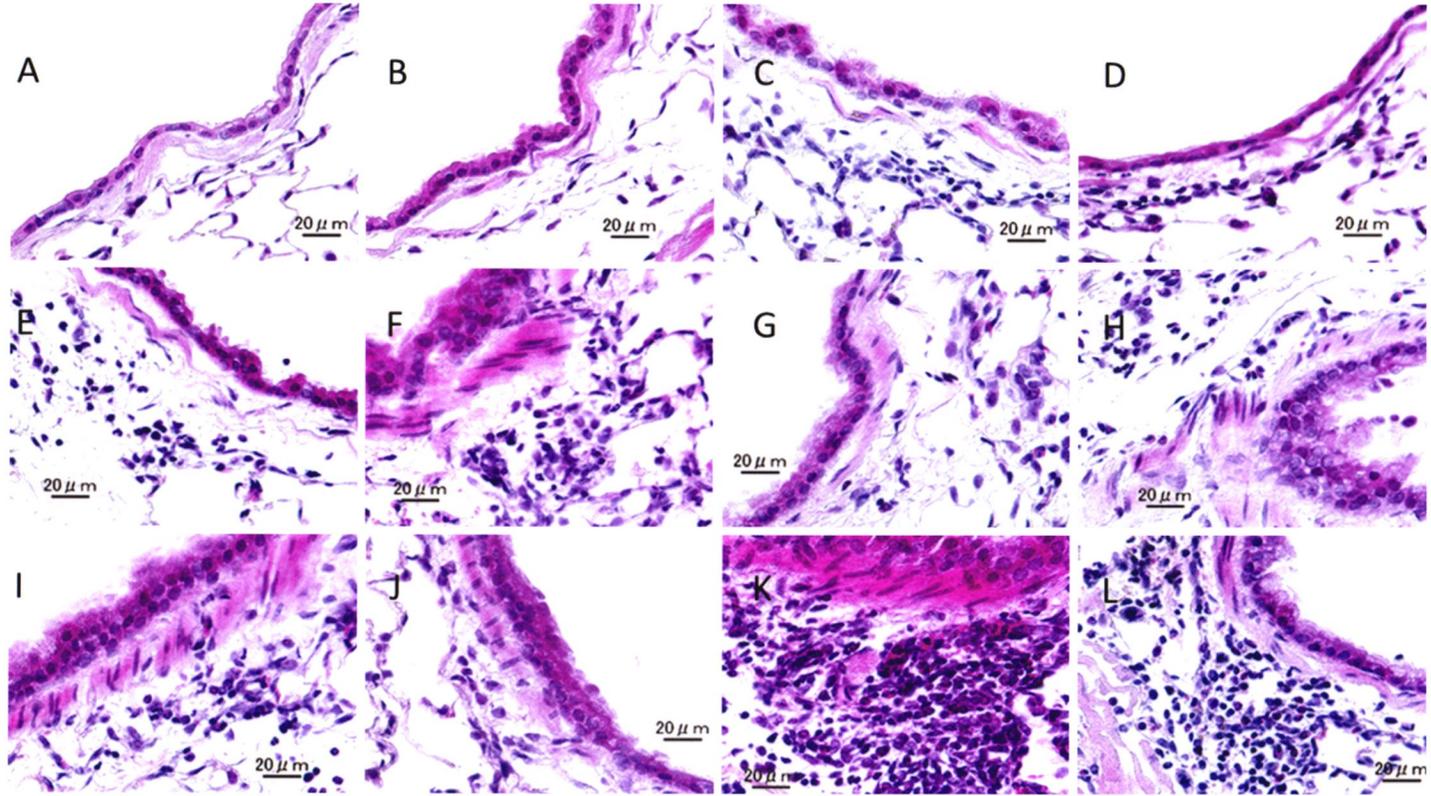


图 12, OVA、H-ASD 和 LPS 干预对小鼠气道炎症细胞浸润的影响 (HE)

A: Control; B: LPS 1; C: LPS 10; D: H-ASD; E: H-ASD + LPS 1; F: H-ASD + LPS 10; G: OVA; H: OVA + LPS 1; I: OVA + LPS 10; J: H-ASD + OVA; K: H-ASD + OVA + LPS 1; L: H-ASD + OVA + LPS 10.

四、OVA, H-ASD 和 LPS 干预对小鼠 BALF 中细胞因子和趋化因子蛋白表达的影响

图 13 显示了 BALF 中 IL-12、KC、MCP-1 和 RANTES 的蛋白表达水平。其中 Control 组的蛋白水平从 0 (IL-12) 到 22.8 ± 1.27 pg/ml (KC)。LPS 1 单独干预没有明显升高这几种蛋白的水平, 但 LPS 10 干预的作用较为明显——从 5.14 ± 1.28 pg/ml (MCP-1) 到 145 ± 32.5 pg/ml (IL-12)。H-ASD 干预明显升高了 IL-12、KC 和 MCP-1。H-ASD + LPS 干预明显升高了所有蛋白的水平, 特别是 H-ASD + LPS 10, 使 IL-12 表达增加了 99%, RANTES 表达增加了 1179%。

OVA 单独干预组的蛋白表达, MCP-1 最低, 为 1.39 ± 0.52 pg/ml, KC 最高, 为 25.8 ± 4.17 pg/ml。LPS 与 OVA 联合干预使这几种蛋白水平呈剂量依赖性升高。在 H-ASD 和 OVA 同时存在的情况下, 加入 LPS, 这几种蛋白水平也呈剂量依赖性升高。

图 14 显示了 BALF 中 IL-1 β 、IL-6、MIP-1 α 和 TNF- α 的蛋白表达水平。Control 组的蛋白水平在 0 (TNF- α) 到 7.82 ± 3.17 pg/ml (IL-1 β) 之间。LPS 的干预剂量依赖性升高了这几种蛋白的水平。H-ASD 也升高了这几种蛋白的水平, 但 OVA 却降低了它们的表达。H-ASD 单独干预使 IL-1 β 的水平比 Control 升高了 218%。LPS 10 与 H-ASD 联合干预使 IL-6 升高了 327%, 但 LPS 1 与 H-ASD 联合干预却导致了 IL-6 轻度下降 (11%)。

OVA 组的蛋白水平在 0 (TNF- α) 到 2.31 ± 0.51 pg/ml (IL-1 β) 之间。LPS 10 与 OVA 联合作用使 IL-1 β 的水平从 2.31 ± 0.51 pg/ml 上升到了 5.92 ± 0.82 pg/ml, 但 LPS 1 与 OVA 联合作用却使其下降到了 1.79 ± 0.44 pg/ml。在 H-ASD 和 OVA 都存在的情况下, LPS 剂量依赖性升高了所有这几种蛋白的水平, 其中 H-ASD + OVA + LPS 10 组的蛋白水平, 从 12.3 ± 2.3 pg/ml (TNF- α) 到 29.2 ± 4.31 pg/ml (MIP-1 α), 在各组中最高。

图 15 显示了 BALF 中 IL-5、IL-13、eotaxin 和 MCP-3 的蛋白表达水平。这些蛋白通常被认为是过敏相关介质。Control 组的蛋白水平在 0 (IL-13) 到 6.76 ± 0.94 pg/ml (MCP-3) 之间。在这几个蛋白中, 除了 H-ASD 组, 其他各组均以 MCP-3

水平最高, H-ASD 组未检测到 MCP-3, H-ASD + OVA + LPS 10 的 MCP-3 高达 65.3 ± 16.3 pg/ml。

OVA 单独干预组, 蛋白水平从 1.14 ± 0.38 pg/ml (IL-13) 到 10.8 ± 0.87 pg/ml (MCP-3), 可见 OVA 导致了所有这几种蛋白表达轻度增加。LPS 与 OVA 联合干预明显升高了 IL-5 的水平, 但是其它几种蛋白的水平仅见轻度升高。H-ASD 与 OVA 联合作用也使 IL-5 的水平从 1.68 ± 0.51 pg/ml 上升到了 21.5 ± 6.78 pg/ml。在 H-ASD 与 OVA 都存在的条件下, LPS 进一步导致了这几种蛋白水平的上升, 而且, IL-5 和 IL-13 水平的升高在 H-ASD + OVA + LPS 1 组(448%和 302%)比 H-ASD + OVA + LPS 10 组(211%和 133%)更为明显。

图 16 显示了 BALF 中 IL-4 和 IL-17A 的表达。它们在 control、LPS 1、LPS 10 和 H-ASD 组都未被检测到。IL-4 的水平从 0 到 2.55 ± 1.52 pg/ml (H-ASD + OVA + LPS 1), IL-17A 的水平从 0 到 14.6 ± 5.14 pg/ml (H-ASD + OVA + LPS 10)。这两种蛋白在 H-ASD + LPS 1、OVA、OVA + LPS 1 和 H-ASD + OVA 组也没有显著的表达, 但是可以看出 H-ASD 与 LPS 的联合作用明显增加了它们的表达。

在本研究中, 各组小鼠 BALF 中 TGF- β 和 IFN- γ 均未检测到。

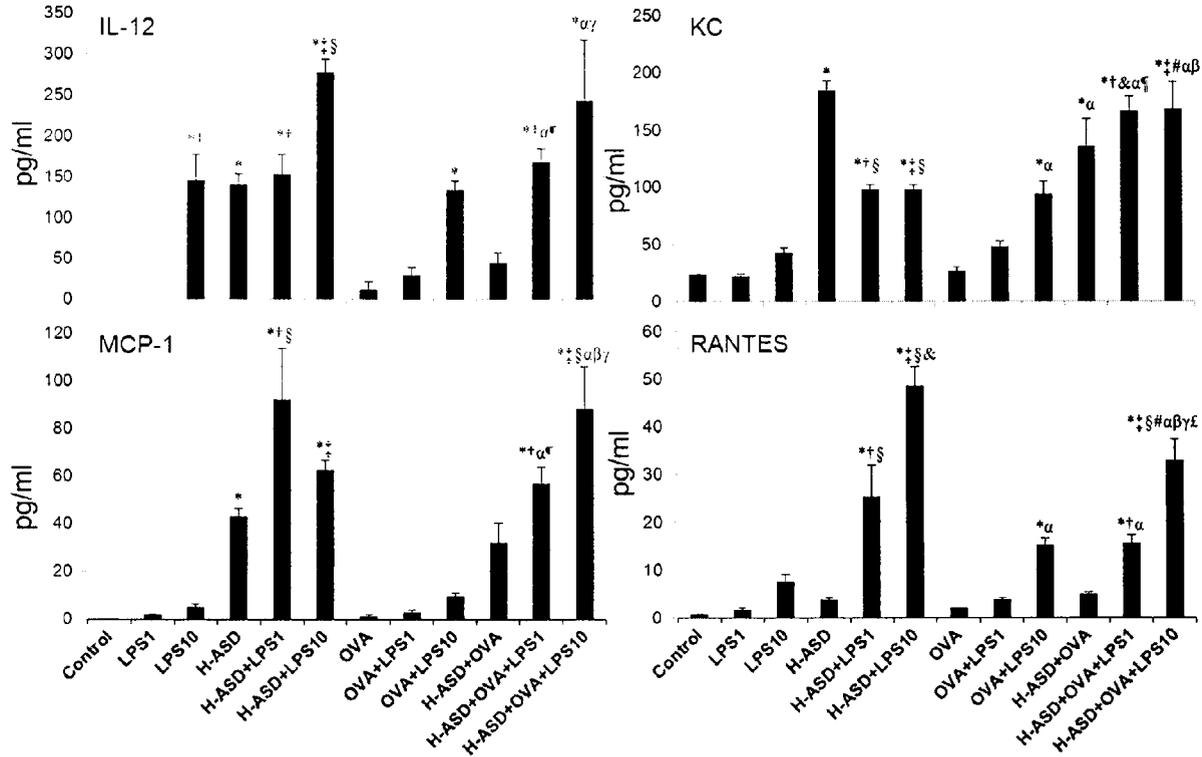


图 13, 各组小鼠 BALF 中 IL-12、KC、MCP-1 和 RANTES 的蛋白表达水平

* $p < 0.05$ vs. control; † $p < 0.05$ vs. LPS 1; ‡ $p < 0.05$ vs. LPS 10; § $p < 0.05$ vs. H-ASD; & $p < 0.05$ vs. H-ASD + LPS 1; # $p < 0.05$ vs. H-ASD + LPS 10; α $p < 0.05$ vs. OVA; β $p < 0.05$ vs. OVA + LPS 1; γ $p < 0.05$ vs. OVA + LPS 10; ε $p < 0.05$ vs. H-ASD + OVA + LPS 1.

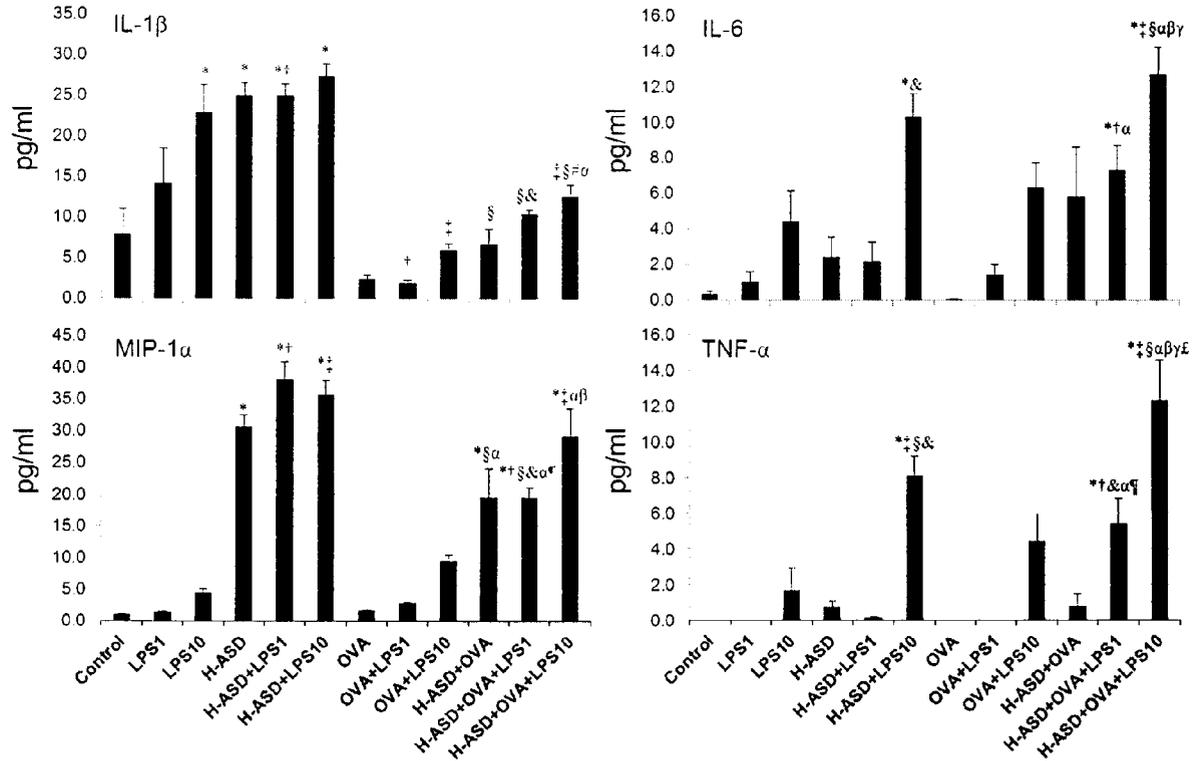


图 14, 各组小鼠 BALF 中 IL-1 β 、IL-6、MIP-1 α 和 TNF- α 的蛋白表达水平

* $p < 0.05$ vs. control; † $p < 0.05$ vs. LPS 1; ‡ $p < 0.05$ vs. LPS 10; § $p < 0.05$ vs. H-ASD; & $p < 0.05$ vs. H-ASD + LPS 1; # $p < 0.05$ vs. H-ASD + LPS 10; ^a $p < 0.05$ vs. OVA; ^b $p < 0.05$ vs. OVA + LPS 1; ^c $p < 0.05$ vs. OVA + LPS 10; ^d $p < 0.05$ vs. H-ASD + OVA; ^e $p < 0.05$ vs. H-ASD + OVA + LPS 1.

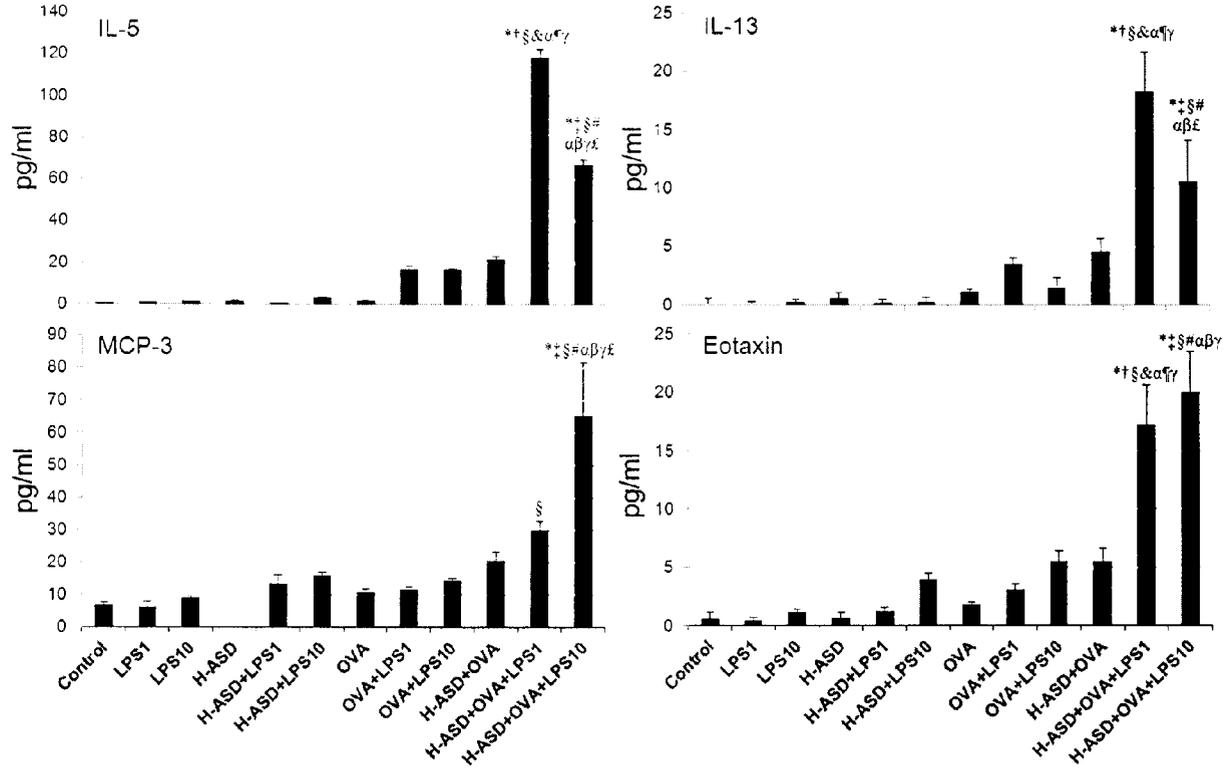


图 15, 各组小鼠 BALF 中 IL-5、IL-13、eotaxin 和 MCP-3 的蛋白表达水平

* $p < 0.05$ vs. control; † $p < 0.05$ vs. LPS 1; ‡ $p < 0.05$ vs. LPS 10; § $p < 0.05$ vs. H-ASD; & $p < 0.05$ vs. H-ASD + LPS 1; # $p < 0.05$ vs. H-ASD + LPS 10; ^a $p < 0.05$ vs. OVA; [†] $p < 0.05$ vs. OVA + LPS 1; ^β $p < 0.05$ vs. OVA + LPS 10; ^γ $p < 0.05$ vs. H-ASD + OVA; ^ε $p < 0.05$ vs. H-ASD + OVA + LPS 1.

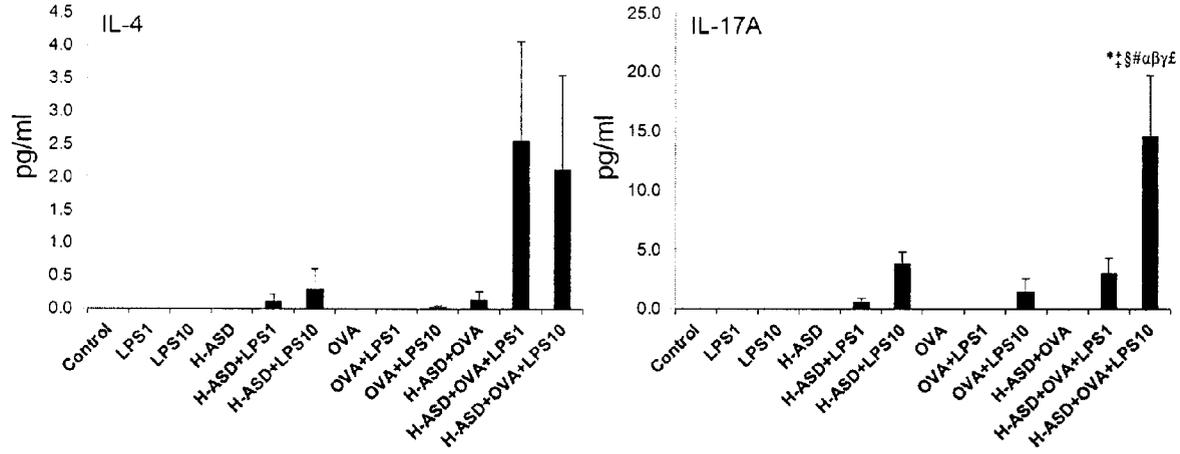


图 16, 各组小鼠 BALF 中 IL-4 和 IL-17A 的蛋白表达水平

* $p < 0.05$ vs. control; † $p < 0.05$ vs. LPS 1; ‡ $p < 0.05$ vs. LPS 10; § $p < 0.05$ vs. H-ASD; & $p < 0.05$ vs. H-ASD + LPS 1; # $p < 0.05$ vs. H-ASD + LPS 10; ^a $p < 0.05$ vs. OVA; ^b $p < 0.05$ vs. OVA + LPS 1; ^c $p < 0.05$ vs. H-ASD + OVA; ^d $p < 0.05$ vs. H-ASD + OVA + LPS 1.

五、OVA, H-ASD 和 LPS 干预对小鼠血浆中 OVA-IgE 和 OVA-IgG1 表达的影响

如图 17 所示, 在 Control、LPS 1、LPS 10、H-ASD、H-ASD + LPS 1 和 H-ASD + LPS 10 中均未检测到 OVA-IgE 和 OVA-IgG1。OVA 组检测到了微量 OVA-IgE, 但也没有 OVA-IgG1 表达。H-ASD + OVA 和 H-ASD + OVA + LPS 10 组有较高且水平相近的 OVA-IgE 表达。H-ASD + OVA + LPS 1 组 OVA-IgE 和 OVA-IgG1 水平最高。

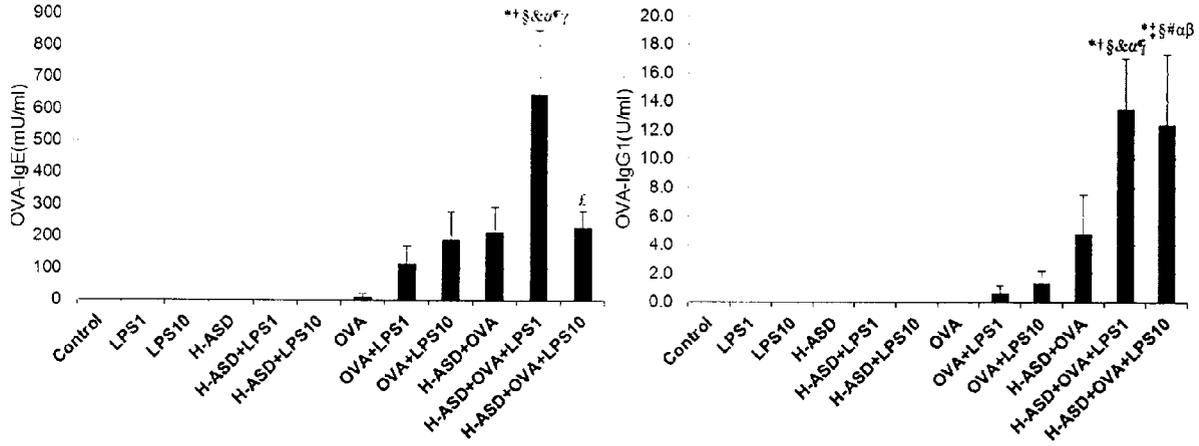


图 17, 各组小鼠血浆中 OVA-IgE 和 OVA-IgG1 的蛋白表达水平

* $p < 0.05$ vs. control; † $p < 0.05$ vs. LPS 1; ‡ $p < 0.05$ vs. LPS 10; § $p < 0.05$ vs. H-ASD; & $p < 0.05$ vs. H-ASD + LPS 1; # $p < 0.05$ vs. H-ASD + LPS 10; ^a $p < 0.05$ vs. OVA; ¹ $p < 0.05$ vs. OVA + LPS 1; ^β $p < 0.05$ vs. OVA + LPS 10; ^γ $p < 0.05$ vs. H-ASD + OVA; ^ξ $p < 0.05$ vs. H-ASD + OVA + LPS 1.

讨论

暴露于 LPS 被认为是导致哮喘发生和加剧的一个显著危险因素^[46,47]。因此, LPS 污染 ASD 可能会使过敏性肺炎加重。以往报道表明,在实验性哮喘模型中, TLR2 的配体 Pam3Cys 与 OVA 联合作用引发了 OVA 相关的 Th2 型免疫反应^[48]。由于通常商业售卖的 LPS 都混有 TLR2 的配体,所以在本实验中我们使用了超高纯度的 LPS。在进行体内实验之前,我们使用 WT、TLR2 基因敲除、TLR4 基因敲除、和 MyD88 基因敲除小鼠的 BMDMs 研究了这种超高纯度的 LPS 是否只通过 TLR4 起作用。正如图 1 显示的那样,这种 LPS 不会对 TLR2 基因缺失小鼠的 BMDMs 分泌细胞因子 (TNF- α 和 IL-6) 产生影响,但对 TLR4 基因缺失小鼠的 BMDMs 分泌细胞因子有影响。以前的研究证明吸入低剂量 (0.1 μg) 的 LPS 会增强 OVA 诱发的小鼠 Th2 型气道炎症,而吸入较高剂量 (10 μg , 100 μg) 的 LPS 后,它与抗原联合作用会导致 Th1 反应^[43,44]。

在没有 OVA 作用的条件下,10 ng LPS 单独作用能导致 BALF 中中性粒细胞轻度增加,1 ng LPS 的作用较弱。然而,在有 H-ASD 作用的条件下,10 ng LPS 干预使 BALF 中中性粒细胞显著增加,并伴有促炎介质 IL-12、RANTES、MCP-1、IL-6 和 TNF- α 水平升高。病理改变方面,10 ng LPS 还导致了中度的支气管炎和肺泡炎,这些结果提示 H-ASD 通过升高促炎介质的水平,加剧了 LPS 诱导的肺部炎症。

在有 OVA 作用的条件下,1 ng 和 10 ng 的 LPS 导致了嗜酸性粒细胞轻度上升。10 ng 的 LPS 导致了中性粒细胞中度增加,并伴有 BALF 中促炎介质 IL-12、KC、RANTES、MCP-1、IL-6 和 TNF- α 水平上升,但是 Th2 类细胞因子 IL-5 和 IL-13 的水平很低,这提示 OVA 与 LPS 10 联合干预不能导致很强的 Th2 反应。

在同时有 H-ASD 和 OVA 作用的条件下,1 ng 和 10 ng 的 LPS 增加了中性粒细胞和嗜酸性粒细胞的数量。特别是,10 ng 的 LPS 比 1 ng 的 LPS 更明显升高了 BALF 中促炎细胞因子 (IL-1 β 、IL-6、IL-12、IL-17A 和 TNF- α) 和趋化因子 (RANTES、MIP-1 α 、KC、MCP-1、Eotaxin 和 MCP-3) 的水平。然而,1 ng 的 LPS 干预所导致的病理改变——气道粘膜下层嗜酸性粒细胞的浸润和支气管上皮中杯状细胞的增殖,以及 Th2 类细胞因子 IL-5 和 IL-13 水平的升高,均比 10 ng

的 LPS 的作用更为明显。这提示 H-ASD 和 OVA 与 1 ng LPS 联合作用所导致的 Th2 反应比与 10 ng LPS 联合作用所导致的 Th2 反应更强。在当前的研究中, Th2 类细胞因子与升高的嗜酸性粒细胞相关的趋化因子 (eotaxin 和 MCP-3) 一起加剧了嗜酸性粒细胞增多性肺炎。

综上所述, H-ASD 在加剧气道病理改变中扮演了一个重要角色。嗜酸性粒细胞与过敏性哮喘的组织损伤有关^[49]。因为嗜酸性粒细胞来源的毒性蛋白, 如主要碱性蛋白, 能导致哮喘患者的支气管粘膜损伤, 这可能会加重哮喘的症状^[50]。Th2 细胞分泌的 IL-5 可以募集和激活嗜酸性粒细胞^[51], IL-13 已被证明可以刺激 B 细胞分泌抗原特异性抗体^[52], 还会促进粘液分泌和粘液细胞生成, 如导致支气管上皮中的杯状细胞增殖^[53]。因此, 联合作用所导致的气道损伤可能是由于加剧了嗜酸性粒细胞增多性气道炎症。这种过敏性炎症不仅募集嗜酸性粒细胞, 还会募集中性粒细胞, 曾有报道表明 IL-17A 对过敏性哮喘气道炎症中中性粒细胞的浸润有促进作用^[54]。

TLR 是一组模式识别受体, 在动物免疫中起着重要作用^[55]。众所周知, TLR4 是 LPS 的受体。以往的体内研究显示低剂量的 LPS 可以导致机体对 OVA 产生 TLR4 依赖性的 Th2 反应^[43, 56]。而且 LPS 的这一作用是通过 MyD88 介导的^[57]。在本研究中, 对促炎因子的诱导可能是通过 TLR4 依赖性的信号通路, 而不是 TLR2 依赖性的, 因为由我们体外实验的结果看来, 我们所使用的 LPS 中未混有 TLR2 的配体。

在仅有 OVA 存在的条件下, 1 ng 和 10 ng LPS 都未能引发明显的 Th2 反应, 但是在 OVA 和 H-ASD 同时存在的条件下, 这两个剂量的 LPS, 特别是 1 ng 的 LPS 显著增强了 Th2 反应。这可能是通过 MyD88 激活了 TLR4 依赖性的信号通路所导致的。不论 OVA 是否存在, 低剂量的 LPS 都未影响到 Th1 类细胞因子 IFN- γ 的表达, 这提示低剂量的 LPS 不具有引发 Th1 反应的能力。IFN- γ 已被报道可以抑制小鼠过敏反应的进展^[58]。因此, 我们推测, 缺少 IFN- γ 的表达使得肺部炎症偏向于 Th2 型占主导地位。然而, 当前的研究未能提供足够的资料来解释 H-ASD 在增强 Th2 反应中的作用。我们以前的体外实验已经表明, 在有 LPS 存在的条件下, H-ASD 干预可以剂量依赖性升高来自于 ICR 小鼠的 BMDMs 所分泌的炎症介质

[45]。在当前的体内研究中，H-ASD 和 LPS 联合干预加剧了中性粒细胞性炎症，还升高了 BALF 中炎症介质的水平。由 H-ASD 和 TLR4 信号通路激活所导致的抗原递呈细胞，如巨噬细胞数量的增加可能会引发 Th2 相关的适应性免疫反应。尽管在本研究中，激活 Th2 的通路尚不清楚，但清楚的是：在低剂量 LPS 存在的条件下，H-ASD 可以引发较弱的反应。在革兰氏阴性细菌——克雷伯氏菌，或真菌——烟管菌所致的肺炎中，H-ASD 被发现具有类似的作用^[59, 60]。

另一方面，在 OVA 和 H-ASD 同时存在的条件下，1 ng 的 LPS 干预明显升高了血浆中 OVA-IgE 和 IgG1。这种升高作用与此混合干预物质激活的 Th2 反应有关。过敏原刺激机体产生特异性抗体可能会促进炎细胞的募集，因为过敏原可以通过 IgE 介导肥大细胞脱颗粒反应^[61]。抗原特异性 IgG1 可以通过嗜酸性粒细胞表面的 Fc γ RII 受体使其脱颗粒^[33]。因此，抗体在 H-ASD + OVA + LPS 加剧嗜酸性粒细胞增多症中起着重要的作用。

结论

本研究的结果证明，在 OVA 和 H-ASD 存在的条件下，ASD 上所附着的微量 LPS 即可加剧过敏性肺炎。而且这种作用可能是由 TLR4 依赖性的信号通路介导的。当前研究的结果提示暴露于含有 LPS 的 ASD 可能是成人和儿童哮喘的一个显著危险因素。

本研究创新性自我评价

本实验首次采用不同剂量的、从 ASD 中提取的 Tar，观察不同剂量的 Tar 单独或与 H-ASD 联合作用对 OVA 诱导的小鼠气道炎症的作用；同时采用微量的 LPS，观察它们单独或与 H-ASD 联合作用对 OVA 诱导的小鼠气道炎症的作用，从而探讨 ASD 中的不同成分对 OVA 诱导的小鼠气道炎症的影响及其机制，为相关疾病的防治提供了科学资料。

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(4464): 1522-4.
- 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 孟紫强, 卢彬, 周义等. 沙尘天气对呼吸系统疾病日入院人数影响的时间序列研究(1995~2003年). *环境科学学报*. 2006; 26(11): 1900-1908.
- 5 Kanatani KT, Ito I, Al-Delaimy WK, et al. Desert dust exposure is associated with increased risk of asthma hospitalization in children. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010; 182(12): 1475-81.
- 6 Yoo Y, Choung JT, Yu J, et al. Acute effects of Asian dust events on respiratory symptoms and peak expiratory flow in children with mild asthma. *J Korean Med Sci*. 2008; 23(1): 66-71.
- 7 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*. 2008; 55(3): 348-57.
- 8 He M, Ichinose T, Yoshida S, et al. Airborne Asian sand dust enhances murine lung eosinophilia. *Inhal Toxicol*. 2010; 22(12): 1012-25.
- 9 Kim W, Doh SJ, Yu Y, et al. Role of Chinese wind-blown dust in enhancing environmental pollution in Metropolitan Seoul. *Environ Pollut*. 2008; 153: 333-341.
- 10 Chen PS, Tsai FT, Lin CK, et al. Ambient influenza and avian influenza virus during dust storm days and background days. *Environ Health Perspect*. 2010; 118(9): 1211-6.
- 11 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): 4556-62.
- 12 Mori I, Nishikawa M, Tanimura T, et al. Change in size distribution and chemical composition of kosa (Asian dust) aerosol during long-range transport. *Atmospheric Environment*. 2003; 37(30): 4253-4263.
- 13 Boffetta P, Jourenkova N, Gustavsson P. Cancer risk from occupational and environmental

- exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Causes Control*. 1997; 8(3): 444-72
- 14 Schultz TW, Dumont JN, Buchanan MV. Toxic and teratogenic effects of chemical class fractions of a coal-gasification electrostatic precipitator tar. *Toxicology*. 1983; 29(1-2): 87-99.
 - 15 Maertens RM, Bailey J, White PA. The mutagenic hazards of settled house dust: a review. *Mutat Res*. 2004; 567(2-3): 401-25.
 - 16 Suresh R, Shally A, Mahdi AA, et al. Assessment of association of polycyclic aromatic hydrocarbons with bronchial asthma and oxidative stress in children: a case-control study. *Indian J Occup Environ Med*. 2009; 13(1): 33-7.
 - 17 Yanagisawa R, Takano H, Inoue KI, et al. 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.
 - 18 Stevens T, Cho SH, Linak WP, et al. Differential potentiation of allergic lung disease in mice exposed to chemically distinct diesel samples. *Toxicol Sci*. 2009; 107(2): 522-34.
 - 19 Masataka Nishikawa M, Dashdondog Batdor D, Ukachi M, et al. Preparation and chemical characterisation of an Asian mineral dust certified reference material. *Anal. Methods*, 2013; 5: 4088–4095.
 - 20 He M, Ichinose T, Song Y, Yoshida Y, Arashidani K, Yoshida S, Liu B, Nishikawa M, Takano H, Sun G. Effects of two Asian sand dusts transported from the dust source regions of Inner Mongolia and northeast China on murine lung eosinophilia. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2013; 272(3): 647-55.
 - 21 He M, Ichinose T, Yoshida S, Takano H, Nishikawa M, Sun G, Shibamoto T. Induction of immune tolerance and reduction of aggravated lung eosinophilia by co-exposure to Asian sand dust and ovalbumin for 14 weeks in mice. *Allerg Asthma Clin Immunol*. 2013; 9: 19–29.
 - 22 Puxeddu I, Levi-Schaffer F. Mast cells and eosinophils: the hallmark of asthma. *Paediatr Respir Rev*. 2004; 5 Suppl A: S31-4.
 - 23 Borish L, Rosenwasser LJ. Update on cytokines. *J Allergy Clin Immunol*. 1996; 97(3): 719-33.
 - 24 马小娟, 薛藜, 丁剑冰. 白细胞介素与哮喘. *细胞与分子免疫学杂志*. 2012; 28 (10): 1117-1119.

- 25 Gonzalo JA, Lloyd CM, Kremer L, et al. Eosinophil recruitment to the lung in a murine model of allergic inflammation. The role of T cells, chemokines, and adhesion receptors. *J Clin Invest.* 1996; 98(10):2332-45.
- 26 Lukacs NW, Strieter RM, Warmington K, et al. Differential recruitment of leukocyte populations and alteration of airway hyperreactivity by C-C family chemokines in allergic airway inflammation. *J Immunol.* 1997; 158(9): 4398-404.
- 27 Haskell MD, Moy JN, Gleich GJ, Thomas LL. Analysis of signaling events associated with activation of neutrophil superoxide anion production by eosinophil granule major basic protein. *Blood.* 1995; 86(12): 4627-37.
- 28 Pan ZZ, Parkyn L, Ray A, Ray P. Inducible lung-specific expression of RANTES: preferential recruitment of neutrophils. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000; 279(4): L658-66.
- 29 Johnston B, Burns AR, Suematsu M, et al. Chronic inflammation upregulates chemokine receptors and induces neutrophil migration to monocyte chemoattractant protein-1. *J Clin Invest.* 1999; 103(9): 1269-76.
- 30 Gleich GJ. The eosinophil and bronchial asthma: current understanding. *J Allergy Clin Immunol.* 1990; 85(2): 422-36.
- 31 Li N, Hao M, Phalen RF, et al. Particulate air pollutants and asthma. A paradigm for the role of oxidative stress in PM-induced adverse health effects. *Clin Immunol.* 2003, 109(3):250-65.
- 32 Pandya RJ, Solomon G, Kinner A, et al. Diesel exhaust and asthma: hypotheses and molecular mechanisms of action. *Environ Health Perspect.* 2002, 110 Suppl 1:103-12.
- 33 Kaneko M, Swanson MC, Gleich GJ, Kita H. Allergen-specific IgG1 and IgG3 through Fc gamma RII induce eosinophil degranulation. *J Clin Invest.* 1995; 95(6): 2813-21.
- 34 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): 1-5.
- 35 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): 151-5.
- 36 Watanabe M, Yamasaki A, Burioka N, et al. Correlation between Asian dust storms and worsening asthma in Western Japan. *Allergol Int* 2011; 60: 267-275.

- 37 Kanatani KT, Ito I, Al-Delaimy WK, et al. Desert dust exposure is associated with increased risk of asthma hospitalization in children. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010; 182(12): 1475-81.
- 38 Yang CY, Tsai SS, Chang CC, et al. Effects of Asian dust storm events on daily admissions for asthma in Taipei, Taiwan. *Inhal Toxicol*. 2005; 17(14): 817-21.
- 39 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): 104-11.
- 40 Braun-Fahrlander C, Riedler J, Herz U, et al. Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. *N Engl J Med*. 2002; 347(12): 869-77.
- 41 Thorne PS, Kulhánková K, Yin M, et al. Endotoxin exposure is a risk factor for asthma: the national survey of endotoxin in United States housing. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005; 172(11): 1371-7.
- 42 Wickens K, Lane JM, Fitzharris P, et al. Farm residence and exposures and the risk of allergic diseases in New Zealand children. *Allergy*. 2002; 57(12): 1171-9.
- 43 Eisenbarth SC, Piggott DA, Huleatt JW, et al. Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen. *J Exp Med*. 2002; 196(12): 1645-51.
- 44 Kim YK, Oh SY, Jeon SG, et al. Airway exposure levels of lipopolysaccharide determine type 1 versus type 2 experimental asthma. *J Immunol*. 2007; 178(8): 5375-82.
- 45 He M, Ichinose T, Song Y, et al. Effects of two Asian sand dusts transported from the dust source regions of Inner Mongolia and northeast China on murine lung eosinophilia. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2013; 272(3): 647-55.
- 46 Alexis NE, Eldridge MW, Peden DB. Effect of inhaled endotoxin on airway and circulating inflammatory cell phagocytosis and CD11b expression in atopic asthmatic subjects. *J Allergy Clin Immunol*. 2003; 112(2): 353-61.
- 47 Smit LA, Heederik D, Doekes G, et al. Exposure-response analysis of allergy and respiratory symptoms in endotoxin-exposed adults. *Eur Respir J*. 2008; 31(6): 1241-8.
- 48 Redecke V, Häcker H, Datta SK, et al. Cutting edge: activation of Toll-like receptor 2 induces a Th2 immune response and promotes experimental asthma. *J Immunol* 2004; 172: 2739–2743.

- 49 Kidd, P. Th1/Th2 balance: The hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern Med Rev* 2003; 8: 223–246.
- 50 Bradley BL, Azzawi M, Jacobson M, et al. Eosinophils, T-lymphocytes, mast cells, neutrophils, and macrophages in bronchial biopsy specimens from atopic subjects with asthma: comparison with biopsy specimens from atopic subjects without asthma and normal control subjects and relationship to bronchial hyperresponsiveness. *J Allergy Clin Immunol*. 1991; 88(4): 661–674.
- 51 Foster PS, Hogan SP, Ramsay AJ, et al. Interleukin 5 deficiency abolishes eosinophilia, airways hyperreactivity, and lung damage in a mouse asthma model. *J Exp Med*. 1996; 183(1): 195-201.
- 52 Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989; 7: 145–173.
- 53 Tesfaigzi Y. Regulation of mucous cell metaplasia in bronchial asthma. *Curr Mol Med* 2008; 8: 408–415.
- 54 Iwakura Y, Nakae S, Saijo S, et al. The roles of IL-17A in inflammatory immune responses and host defense against pathogens. *Immunol Rev* 2008; 226: 57-79.
- 55 Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 200; 1(2): 135-45.
- 56 Dabbagh K, Dahl ME, Stepick-Biek P, et al. Toll-like receptor 4 is required for optimal development of Th2 immune responses: role of dendritic cells. *J Immunol* 2002; 168: 4524-4530.
- 57 Piggott DA, Eisenbarth SC, Xu L, et al. MyD88-dependent induction of allergic Th2 responses to intranasal antigen. *J Clin Invest* 2005; 115(2): 459-467.
- 58 Lack G, Bradley KL, Hamelmann E, et al. Nebulized IFN-gamma inhibits the development of secondary allergic responses in mice. *J Immunol*. 1996; 157(4): 1432-1439.
- 59 He M, Ichinose T, Yoshida S, et al. Asian sand dust enhances murine lung inflammation caused by *Klebsiella pneumoniae*. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 2012; 258 (2): 237-247.
- 60 Liu B, Ichinose T, He M, et al. Lung inflammation by fungus, *Bjerkandera adusta* isolated from Asian sand dust (ASD) aerosol and enhancement of ovalbumin -induced lung eosinophilia by ASD and the fungus in mice. *Allerg Asthma Clin Immunol*. 2014; 10(1): 10. doi: 10.

1186/1710-1492-10-10.

- 61 Zweiman B. The late-phase reaction: role of IgE, its receptor and cytokines. *Curr Opin Immunol.* 1993; 5(6): 950-5.

· 综述 ·

沙尘颗粒物对呼吸系统疾病的影响及其机制

近年来,随着土地沙漠化的加剧,沙尘暴的发生越来越频繁,波及范围也越来越广,沙尘颗粒物的传播会使途经地区的空气质量在短时间内迅速下降^[1-3],给波及地区居民的健康带来了严重危害。所以沙尘暴对人类健康的影响受到了日益广泛的关注,也成为了公共卫生领域研究的热点。

依照中国气象局 2003 年发布的规定,将沙尘天气分为浮尘、扬沙、沙尘暴和强沙尘暴四类。浮尘是指尘土、细沙均匀地浮游在空中,使水平能见度小于 10 公里的天气现象;扬沙是指风将地面尘沙吹起,使空气相当混浊,水平能见度在 1-10 公里以内的天气现象;沙尘暴是指强风将地面大量尘沙吹起,使空气很浑浊,水平能见度小于 1 公里的天气现象;强沙尘暴是指大风将地面沙尘吹起,使空气非常混浊,水平能见度小于 500 米的天气现象^[4]。全世界有四大沙尘暴多发区,分别位于中非、中亚、北美和澳大利亚。我国的沙尘暴区属于中亚沙尘暴区,起源于我国西北干旱、半干旱地区和蒙古国南部沙漠区,可随风波及我国东部,朝鲜半岛、日本,甚至越过北太平洋,到达美国西部,称为亚洲沙尘暴^[5-7]。研究显示,与沙尘暴发生前一天比较,沙尘暴发生当天,成人急性刺激症状有不同程度的增多,具体表现有眼睛发干、眼部异物感、流泪、畏光、鼻腔干痒、咽痛、咳嗽、嘴唇干燥、嘴唇干裂、皮肤干燥、皮肤过敏和皮肤感染等发生率升高^[8]。国内外多项研究报道沙尘暴能够使受影响地区居民呼吸系统和循环系统疾病发生率增加^[9-14],甚至导致波及区域人口死亡率增加^[15-17]。本文仅就近年来有关沙尘颗粒物对呼吸系统影响及可能的机制的研究做一综述。

一、对呼吸系统疾病的影响

(一)呼吸系统的急性刺激症状

沙尘颗粒物可引起人体呼吸系统的急性刺激症状^[8,18,19]。赵春霞等对我国甘肃省兰州市和敦煌市 1094 名小学生和 1748 名成人的调查研究发现,与沙尘暴发生前一天比较,沙尘暴发生当天,儿童呼吸系统症状发生率有不同程度的升高,具

体表现为鼻腔干燥、流涕、鼻塞、流鼻血、咽部干痒、咽痛、咳嗽、咳痰及胸部憋闷等症状发生率升高。而沙尘天气过境后 1-5 天，儿童和成人的急性呼吸道症状逐渐减轻。此外沙尘暴发生前有身体不适、支气管炎和上呼吸道感染等病史者，在沙尘暴期间呼吸系统症状发生的危险性升高^[8, 18]。2004 年 3 月的沙尘暴期间，彭瑞玲等对我国内蒙古包头市 918 名小学生和 1770 位成人的调查研究显示：从沙尘暴发生前 1 天到发生后 7 天这段时间，人群的呼吸系统相关的各症状如打喷嚏、咳痰等的发生率，以沙尘暴发生当天最高，而且在这段时间，随着当地大气中细微颗粒物（particles with an aerodynamic diameter of less than 2.5 μm , PM_{2.5}）浓度的增加和降低，呼吸系统相关的各症状的发生率也随之增加和降低，所以推测沙尘暴期间大气中 PM_{2.5} 的浓度可能会影响呼吸系统各种症状的发生^[19]。

（二）呼吸系统疾病

沙尘颗粒物可引发或加重肺炎、过敏性鼻炎和哮喘等呼吸系统疾病^[9, 20-28]。孟紫强等对我国沙尘暴高发地区甘肃省武威市的 6 所大中型医院、1995 年至 2003 年沙尘天气高发季节呼吸系统疾病每日入院人数进行了调查，结果发现：呼吸系统疾病日入院人数的增加均与天气有联系，且表现为滞后效应；沙尘暴对呼吸系统疾病日入院人数的影响大于扬沙或浮尘天气；沙尘天气对人群健康的影响存在滞后效应；沙尘天气引发和加重的呼吸系统疾病主要为各种肺炎、上呼吸道感染、感冒以及急性慢性支气管炎^[9]。Chang 等分析了我国台湾省台北市 1997 年至 2001 年间沙尘暴的发生情况和过敏性鼻炎的就诊资料，结果发现，这几年间有 49 次沙尘暴发生，过敏性鼻炎的就诊往往在沙尘暴发生后第 2 天明显增加，比平时增加了 19%^[20]。Yang 等的研究也显示哮喘的就诊在沙尘暴发生后第 2 天比平时增加了 8%^[21]。而且两者的研究提示过敏性鼻炎和哮喘发病的增加主要归因于沙尘暴期间大气中可吸入颗粒物（particles with an aerodynamic diameter of less than 10 μm , PM₁₀）浓度的升高。Bell 等的研究进一步显示，沙尘暴期间，大气中 PM₁₀ 浓度每增加 28 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ，哮喘的入院率就增加 4.8%（95% CI 为 0.71%~8.38）^[22]。同样是在台北，Kang 等研究了 2000 年至 2009 年台北市 1933247 位被诊断为肺炎的患者的资料，发现与没有发生沙尘暴时相比，沙尘暴当天和之后 1~4 天，肺炎的入院率都明显升高^[23]。Kanatani 等分析了日本富山县 8 所主要医疗机构从 2005 年至

2009年每年2月至4月的就诊资料,发现1-15岁的儿童因哮喘而就诊的人数与沙尘暴的发生显著相关,而且这种相关性持续到了沙尘暴过境后的4-6天^[24]。来自西印度群岛特立尼达的研究发现,沙尘天气使空气能见度由16km下降到了7km,同时儿童哮喘的入院人数也由平均每天7.8人上升到了9.25人^[25]。Park和Yoo等对成人和儿童哮喘患者的研究发现,沙尘暴发生时,大气中PM₁₀浓度升高,患者夜间上、下呼吸道症状如咳嗽、气促和喘鸣等均有加重;而且最大呼气流速(peak expiratory flow rate, PEFR)的变异率也增大了,PEFR也明显降低^[26,27]。PEFR是哮喘监测常用的一个重要指标,国内叶晓芳等对包头市107名小学生的研究显示:PM_{2.5}和PM₁₀的日均浓度与沙尘天气当日及之后三天内的PEFR日均值都存在明显的负相关,且PM_{2.5}对儿童PEFR值降低的效应比PM₁₀更强^[28]。

(三) 沙漠尘肺

除了引发上述急性呼吸系统损害外,长期慢性接触沙尘还可以导致沙漠尘肺^[29-34]。尘肺的发生,本来是由于在职业活动中长期吸入生产性粉尘,并在肺内滞留而引起的以肺组织纤维化为主的疾病。我国法定十二种尘肺有:矽肺、煤工尘肺、电墨尘肺、碳墨尘肺、滑石尘肺、水泥尘肺、云母尘肺、陶工尘肺、铝尘肺、电焊工尘肺、铸工尘肺。尘肺患者常有咳嗽、咳痰、胸痛、呼吸困难和咳血等症状,还可能并发肺内感染、肺结核和肺癌等。尘肺病是危害我国工人健康最严重的职业病^[35]。而沙漠尘肺是一种非职业性尘肺,是生活在沙漠地区的居民,由于长期吸入过量沙尘而引起的疾病。Policard等于1952年对撒哈拉沙漠居民的研究首次发现了3例沙漠尘肺^[29]。此后,在世界其它沙漠地区也相继发现了沙漠尘肺^[30-32]。我国郭茜等通过对甘肃省风沙地区居民肺组织改变的初步研究,从395例居民中检出了28例沙漠尘肺^[33]。为了解我国沙尘天气多发地区沙漠尘肺的发病情况,孟紫强等于2008年从甘肃省民勤县6个乡镇选取了从未接触过职业性沙尘的1500名成人进行了调查,分析结果表明有8例沙漠尘肺,患病率高达5.33%^[34]。

二、沙尘颗粒物引发或加重呼吸系统疾病的机制

为了阐明沙尘颗粒物引发或加重呼吸系统疾病的机制,国内外学者从多方面进行了广泛的科学研究。考虑到肺泡巨噬细胞广泛分布于肺泡内及气道上皮表面,

是呼吸道第一道防线，在吞噬颗粒物和分泌细胞因子中发挥着重要作用^[36]。黄雪莲等用不同浓度的沙尘暴 PM_{2.5} 和 PM₁₀ 作用于大鼠肺巨噬细胞，结果发现二者均能对大鼠巨噬细胞的吞噬功能造成损伤，且存在剂量依赖效应。此外两者还可刺激大鼠肺泡巨噬细胞分泌炎症因子一氧化氮（nitric oxide, NO）、白细胞介素（interleukine, IL）-8 和肿瘤坏死因子（tumor necrosis factor-alpha, TNF- α ）^[37, 38]。由此可见沙尘颗粒物这种对肺巨噬细胞吞噬功能的损伤和炎症效应的促进可能对呼吸系统疾病的发生发展起一定作用。

金昱等用 50、100、150 和 200 μ g/ml 的沙尘暴 PM_{2.5} 和 PM₁₀ 对人肺成纤维细胞进行染毒，24 小时后检测结果显示：50 μ g/ml 以上的沙尘暴颗粒物就可剂量依赖性的抑制人肺成纤维细胞线粒体中琥珀酸脱氢酶活力，且更高浓度的沙尘暴颗粒物可引起细胞外乳酸脱氢酶和酸性磷酸酶漏出增加。这表明沙尘暴颗粒物对人肺成纤维细胞可产生明显的毒性作用^[39]。特别值得注意的是，在还没有影响到细胞膜通透性和溶酶体功能的情况下，低浓度的沙尘暴颗粒物就可抑制线粒体中琥珀酸脱氢酶活力，这提示线粒体可能是其作用的敏感部位，而线粒体与细胞的氧化损伤和凋亡有着密切联系，对线粒体的损伤可能会引发后续对细胞的一系列损伤效应。

孟紫强等以 1.5、7.5 和 37.5mg/kg 剂量的沙尘暴 PM_{2.5} 和正常天气 PM_{2.5} 对大鼠进行了气管灌注，测定了这些组织中超氧化物歧化酶、谷胱甘肽和过氧化脂质的水平，结果发现两者对大鼠肺、心和肝组织均有不同程度的氧化损伤作用，且对肺脏的损伤作用最强^[40]。而 Tao 等通过对以往研究资料的分析，早就指出大气污染颗粒物可能通过其中所含有的金属、半醌、脂多糖、烃类和一些超细组分刺激肺组织中巨噬细胞、上皮细胞、中性粒细胞产生活性氧自由基，导致氧化应激，从而引发了机体肺损伤^[41]。由此可见沙尘颗粒物对肺组织的氧化损伤也是其促进呼吸系统疾病发生发展的机制之一。

由于卵蛋白（ovalbumin, OVA）诱导的小鼠气道炎症模型与人类哮喘患者有相似的肺部病理表现，所以越来越多的学者开始使用此模型研究各种物质引发呼吸系统疾病的机制。Hiyoshi 等用采集于中国腾格里沙漠的沙尘颗粒物对小鼠进行气管灌注，观察对 OVA 诱导的小鼠气道炎症的作用，结果发现这些沙尘颗粒可以

导致小鼠肺部中性粒细胞及相关细胞因子增多；此外它们还能加剧 OVA 诱导的肺部嗜酸性粒细胞增多、气道杯状细胞增殖，而这种表现正与过敏性哮喘患者的肺部病理表现相似。该实验中，沙尘颗粒物还升高了嗜酸性粒细胞相关的细胞因子 IL-5 和单核细胞趋化蛋白（monocyte chemotactic protein, MCP）-1，IL-5 是哮喘发生发展中一个关键的细胞因子，对嗜酸性粒细胞的最终成熟和由骨髓向外周血释放起着重要的调节作用^[42]，所以推测沙尘颗粒物加剧 OVA 诱导的肺部嗜酸性粒细胞增多的这种作用可能是通过刺激了 IL-5 和 MCP-1 等细胞因子升高所致。

Ichinose 和 He 等将亚洲沙尘颗粒物（Asian sand dust, ASD）在 360 摄氏度加热 30 分去除 ASD 上附着的各种无机和有机物质，如硝酸盐、硫酸盐、焦油类和微生物等，得到加热的 ASD（heated-ASD, H-ASD），然后分别采用 ASD 和 H-ASD 对小鼠进行气管灌注，观察对 OVA 诱导的小鼠气道炎症的作用。结果显示，ASD 可以导致支气管炎和肺泡炎以及粘膜下层淋巴细胞的轻度堆积，而这些病理改变在 H-ASD 组则很轻微；同时发现 ASD 或 H-ASD 与 OVA 联合作用，可以加重这些病变，并升高了辅助性 T 淋巴细胞（helper T cell, Th）2 型细胞因子 IL-13，嗜酸性粒细胞相关性细胞因子 IL-5 和 MCP-3，以及 OVA 特异性的免疫球蛋白（OVA-specific immunoglobulin, OVA-Ig）E 和 OVA-IgG1 等，其中 ASD 与 OVA 联合作用的效应更强一些；在体外实验中，ASD 还增加了 Toll 样受体（Toll-like receptor, TLR）2 mRNA 的表达，而 H-ASD 却没有^[43, 44]。分析这些结果，H-ASD 能引起小鼠肺部轻微的病理改变，可能是由于 H-ASD 含有矿物质如长石和石英，以往的研究已经证明矿物纤维和石英等可以对肺细胞产生细胞和遗传毒性^[45, 46]，可以促进大鼠肺部炎性细胞因子的生成而导致炎症反应^[47, 48]。而 ASD 无论单独作用还是与 OVA 联合作用，对小鼠肺部病理改变和相关炎性细胞因子的效应都分别强于 H-ASD 和 H-ASD 与 OVA 联合作用的效应。这揭示了沙尘颗粒物上附着的各种无机和有机物质可能通过上调 TLR2 的表达，进而刺激了 Th2 型细胞因子的释放，从而增强了 OVA 诱导的小鼠气道炎症反应。

随后，刘博莹等通过分离培养，得到了附着于 ASD 表面的 7 种微生物，进一步的研究表明 ASD 上附着的白腐菌属能够加剧 OVA 诱导的小鼠气道炎症^[49]。而最近 Yamada 等的研究结果也显示沙尘颗粒物中的水溶性物质有很强的细胞毒效

应^[50]。

综上所述，近年来由于沙尘天气发生频繁，而且波及范围极广，沙尘颗粒物不仅对沙源地居民的呼吸系统健康产生了很大危害，而且还可以引发或加剧广大波及地区居民的呼吸系统疾病，而目前对其致病的机制还不完全清楚。而且正由于沙尘颗粒物的远距离传输，其上往往附着了各种无机和有机物质，如硫酸盐、硝酸盐、脂多糖、细菌、真菌、焦油类物质（常含有多环芳烃）等^[51, 52]，而其中很多物质如细菌、脂多糖、多环芳烃等对肺部炎症反应可能都具有一定影响^[49, 53-56]，此外不同来源、经不同路径传播而来的沙尘颗粒物的成分还有很大不同。所以以后我们一方面要努力保护好环境，做好防风固沙，适当地退耕还林，减少沙尘暴发生的频率和强度；另一方面需要进行大量的实验来分析：不同来源，经不同途径传播的沙尘颗粒物的成分；颗粒物上附着的各种无机和有机物质对人体健康的影响及它们之间的协同作用，为人类相关疾病的防治提供科学资料。

参考文献

- 1 杜吴鹏, 高庆先, 王跃思等。沙尘天气对我国北方城市大气环境质量的影响。环境科学研究。2009; 22 (9) : 1021-1026。
- 2 曾令建, 缪启龙, 高庆先等。沙尘天气对北京大气环境质量及太阳辐射的影响。环境科学研究。2011; 24 (4) : 432-439。
- 3 Kim W, Doh SJ, Yu Y, et al. Role of Chinese wind-blown dust in enhancing environmental pollution in Metropolitan Seoul. *Environ Pollut.* 2008; 153(2): 333-41.
- 4 中国气象局。沙尘天气预警业务服务暂行规定(修订)。2003。
- 5 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(4464): 1522-4.
- 6 Husar RB, Tratt DB, Schichtel BA, et al. Asian dust events of April 1998. *J Geophys Res.* 2001; 106: 18316-18330.
- 7 Kim BG, Han JS, Park SU. Transport SO₂ and aerosol over the Yellow Sea. *Atmos Environ.* 2001; 35: 727-737.
- 8 赵春霞, 王振全, 连素琴, 等。沙尘暴对成人健康效应的影响。环境与健康杂志。2010; 27 (9): 776-779。
- 9 孟紫强, 卢彬, 周义等。沙尘天气对呼吸系统疾病日入院人数影响的时间序列研究(1995~2003年)。环境科学学报。2006; 26 (11): 1900-1908。
- 10 Tao Y, An X, Sun Z, et al. Association between dust weather and number of admissions for patients with respiratory diseases in spring in Lanzhou. *Sci Total Environ.* 2012; 423: 8-11.
- 11 Tam WW, Wong TW, Wong AH, et al. Effect of dust storm events on daily emergency admissions for respiratory diseases. *Respirology.* 2012; 17(1): 143-8.
- 12 Thalib L, Al-Taiar A. Dust storms and the risk of asthma admissions to hospitals in Kuwait. *Sci Total Environ.* 2012; 433: 347-51.
- 13 Chen YS, Yang CY. Effects of Asian dust storm events on daily hospital admissions for cardiovascular disease in Taipei, Taiwan. *J Toxicol Environ Health A.* 2005; 68(17-18): 1457-64.
- 14 Kang JH, Liu TC, Keller J, et al. Asian dust storm events are associated with an acute increase

- in stroke hospitalisation. *J Epidemiol Community Health*. 2013; 67(2): 125-31.
- 15 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): 1-5.
 - 16 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): 151-5.
 - 17 Chan CC, Ng HC. A case-crossover analysis of Asian dust storms and mortality in the downwind areas using 14-year data in Taipei. *Sci Total Environ*. 2011; 410-411: 47-52.
 - 18 赵春霞, 王振全, 牛静萍等. 沙尘暴对儿童呼吸系统症状的影响. *环境与健康杂志*. 2010; 27 (9): 772-775.
 - 19 彭瑞玲, 潘小川, 张翼翔等. 包头市沙尘暴与人群急性健康效应关系的初步研究. *环境与健康杂志*. 2005; 22 (4): 249-251.
 - 20 Chang CC, Lee IM, Tsai SS, et al. Correlation of Asian dust storm events with daily clinic visits for allergic rhinitis in Taipei, Taiwan. *J Toxicol Environ Health A*. 2006; 69(3-4): 229-35.
 - 21 Yang CY, Tsai SS, Chang CC, et al. Effects of Asian dust storm events on daily admissions for asthma in Taipei, Taiwan. *Inhal Toxicol*. 2005; 17(14): 817-21.
 - 22 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): 104-11.
 - 23 Kang JH, Keller JJ, Chen CS, et al. Asian dust storm events are associated with an acute increase in pneumonia hospitalization. *Ann Epidemiol*. 2012; 22(4): 257-63.
 - 24 Kanatani KT, Ito I, Al-Delaimy WK, et al. Desert dust exposure is associated with increased risk of asthma hospitalization in children. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010; 182(12): 1475-81.
 - 25 Gyan K, Henry W, Lacaille S, et al. African dust clouds are associated with increased paediatric asthma accident and emergency admissions on the Caribbean island of Trinidad. *Int J Biometeorol*. 2005; 49(6): 371-6.
 - 26 Park JW, Lim YH, Kyung SY, Effects of ambient particulate matter on peak expiratory flow rates and respiratory symptoms of asthmatics during Asian dust periods in Korea. *Respirology*. 2005; 10(4): 470-6.
 - 27 Yoo Y, Choung JT, Yu J, et al. Acute effects of Asian dust events on respiratory symptoms and

- peak expiratory flow in children with mild asthma. *J Korean Med Sci.* 2008; 23(1): 66-71.
- 28 叶晓芳, Kim DS, 张翼翔等. 沙尘天气大气颗粒物对学龄儿童最大呼气流速的影响. *环境与健康杂志.* 2008; 25 (7): 571-574.
- 29 Policard A, Collet A. Deposition of siliceous dust in the lungs of the inhabitants of the Saharan regions. *AMA Arch Ind Hyg Occup Med.* 1952; 5(6): 527-34.
- 30 Menachem H, Bar-Ziv J, Lehmann E, et al. Simple Siliceous Pneumoconiosis of Bedouin Females in the Negev Desert. *Clinical Radiology.* 1974; 25(4): 507-510.
- 31 Hawass ND. An Association between Desert Lung and Cataract-a New Syndrome. *British Journal of Ophthalmology,* 1987; 71(9): 694-697.
- 32 Saiyed HN, Sharma YK, Sadhu HG, et al. Non-occupational Pneumoconiosis at High Altitude Villages in Central Ladakh. *British Journal of Industrial Medicine.* 1991; 48: 825-829.
- 33 郭茜, 徐秀珍, 蔡曦光等. 28 例沙漠尘肺的胸部 X 线和临床资料分析. *中国工业医学杂志.* 1996; 9 (5): 288-290.
- 34 孟紫强, 杨振华, 潘竞界等. 沙尘天气多发区民勤县发现多例非职业性尘肺病. *生态毒理学报.* 2008; 3 (4): 337-342.
- 35 孙贵范主编. 职业卫生与职业医学. 第七版. 北京: 人民卫生出版社. 2012; 171.
- 36 Nathan CF. Secretory products of macrophages. *J Clin Invest.* 1987; 79(2): 319-26.
- 37 黄雪莲, 金昱, 郭新彪等. 沙尘暴 $PM_{2.5}$ 、 PM_{10} 对大鼠肺泡巨噬细胞吞噬功能的影响. *卫生研究.* 2004; 33 (2): 154-157.
- 38 黄雪莲, 金昱, 郭新彪等. 沙尘暴 $PM_{2.5}$ 、 PM_{10} 对大鼠肺泡巨噬细胞炎性因子分泌的影响. *环境与健康杂志.* 2004; 21 (1): 38-40.
- 39 金昱, 郭新彪, 黄雪莲等. 沙尘暴颗粒物对人肺成纤维细胞的细胞毒性研究. *环境与健康杂志.* 2004; 21 (4): 199-201.
- 40 孟紫强, 张全喜. 沙尘暴 $PM_{2.5}$ 对大鼠肺、心、肝组织的氧化损伤效应. *卫生研究.* 2006; 35 (6): 690-693.
- 41 Tao F, Gonzalez-Flecha B, Kobzik L. Reactive oxygen species in pulmonary inflammation by ambient particulates. *Free Radic Biol Med.* 2003; 35(4): 327-40.
- 42 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(3): 361-8.
- 43 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.* 2008; 55(3): 348-57.
- 44 He M, Ichinose T, Yoshida S, et al. Airborne Asian sand dust enhances murine lung eosinophilia. *Inhal Toxicol.* 2010; 22(12): 1012-25.
- 45 Liu W, Ernst JD, Broaddus VC. Phagocytosis of crocidolite asbestos induces oxidative stress, DNA damage, and apoptosis in mesothelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2000; 23(3): 371-8.
- 46 Schins RP, Duffin R, Höhr 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(9): 1166-73.
- 47 Murphy SA, Bérubé KA, Pooley FD, et al. The response of lung epithelium to well characterised fine particles. *Life Sci.* 1998; 62(19): 1789-99.
- 48 Ernst H, Rittinghausen S, Bartsch W, et al. 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(2): 109-26.
- 49 刘博莹. 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。中国医科大学。
- 50 Yamada P, Hatta T, Du M, et al. Inflammatory and degranulation effect of yellow sand on RBL-2H3 cells in relation to chemical and biological constituents. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2012; 84: 9-17.
- 51 Chen PS, Tsai FT, Lin CK, et al. Ambient influenza and avian influenza virus during dust storm days and background days. *Environ Health Perspect.* 2010; 118(9): 1211-6.
- 52 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): 4556-62.
- 53 李鸿佳, 王苏娟, 李艳丽等. 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。

- 54 Okamoto M, Takeda K, Lucas JJ, et al. Low-dose lipopolysaccharide affects lung allergic responses by regulating Jagged1 expression on antigen-pulsed dendritic cells. *Int Arch Allergy Immunol.* 2012; 157(1): 65-72.
- 55 Jung KH, Yan B, Moors K, et al. Repeated exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and asthma: effect of seroatopy. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2012; 109(4): 249-54.
- 56 Suresh R, Shally A, Mahdi AA, et al. Assessment of association of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons with bronchial asthma and oxidative stress in children: A case control study. *Indian J Occup Environ Med.* 2009; 13(1): 33-7.

• 在学期间科研成绩 •

1、**Ren Y**, Ichinose T, He M, Song Y, Yoshida Y, Youshida S, Nishikawa M, Takano H, Sun G, Shibamoto T. Enhancement of OVA-induced murine lung eosinophilia by co-exposure to contamination levels of LPS in Asian sand dust and heated dust. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*. 2014, 10(1):30.

2、**Ren Y**, Ichinose T, He M, Arashidani K, Yoshida Y, Youshida S, Nishikawa M, Takano H, Sun G, Shibamoto T. Aggravation of ovalbumin-induced murine asthma by co-exposure to desert-dust and organic chemicals: an animal model study. *Environmental Health*. 2014, 13:83.

· 致谢 ·

值此论文完成之际，首先向导师孙贵范教授、市赖孝道教授和杨军教授致以最诚挚的谢意，感谢三位导师三年来在学习和生活中对我的悉心指导和无私帮助。他们渊博的知识、严谨的治学态度和认真负责的工作作风将使我受益终生。

衷心感谢贺淼在整个实验和论文撰写上给予的无私帮助。感谢皮静波教授、陈杰教授、金亚平教授、席淑华教授和李冰教授在论文修改方面所给予的热心指导，同时感谢劳动卫生教研室、营养与食品卫生教研室和日本大分县大分市县立看护科学大学的各位老师和同学在整个实验中的无私帮助。

· 个人简介 ·

姓 名：任亚浩

性 别：男

民 族：汉族

出生日期：1982 年 5 月 12 日

学习经历：

2000 年 9 月——2005 年 7 月 中国医科大学预防医学系获医学学士学位

2005 年 8 月——2008 年 6 月 中国医科大学营养与食品卫生学硕士

2011 年 9 月——2014 年 6 月 中国医科大学 攻读博士学位