

交通相关 PM_{2.5} 及其不同成分对哮喘大鼠 Th17 细胞和相关细胞因子的影响

赵会超, 王静, 吴红燕, 张志红

山西医科大公共卫生学院环境卫生学教研室, 山西 太原 030001

摘要:

[背景] Th17 细胞在一些自身免疫性疾病发生过程中发挥着重要作用, 其可通过分泌特征性细胞因子白介素 (IL) -17 发挥强致炎作用, 并依靠 IL-23 维持扩增存活状态。

[目的] 本研究探讨交通相关 PM_{2.5} 及其水溶、有机成分对哮喘大鼠亚急性染毒后, Th17 细胞及其相关细胞因子在加重哮喘发作中的作用。

[方法] 选择 80 只体重 180~220 g 的 SD 雄性大鼠, 随机分为 8 组, 每组 10 只, 分别为生理盐水对照组、哮喘对照组、PM_{2.5} 染毒组、低水溶成分染毒组、高水溶成分染毒组、DMSO 对照组、低有机成分染毒组、高有机成分染毒组。各染毒组用卵清蛋白 (OVA) 致敏, 以 OVA 进行雾化激发建立大鼠哮喘模型, 激发阶段气管滴注 PM_{2.5} 及其水溶、有机成分, 构建哮喘加重模型。分析大鼠脏器系数变化, 检测大鼠支气管肺泡灌洗液 (BALF) 中白细胞总数和细胞分类计数; ELISA 法检测大鼠 BALF 中 IL-17 及 IL-23 的表达水平, 流式细胞计数法检测大鼠外周血中 Th17 细胞比例。

[结果] 经 OVA 致敏激发后, 哮喘模型大鼠均出现明显的直立喘息、呼吸急促、前肢缩抬、抓脸等哮喘症状, 而生理盐水对照组大鼠无上述症状。PM_{2.5} 染毒组及高水溶成分染毒组中左肺脏器系数升高, 与哮喘对照组间差异有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。PM_{2.5} 及其水溶、有机成分均可引起 BALF 中白细胞总数升高, PM_{2.5} 水溶和有机成分均可以引起嗜酸性粒细胞百分比升高与巨噬细胞百分比降低, PM_{2.5} 水溶成分可单独引起中性粒细胞百分比升高 (均 $P < 0.05$)。PM_{2.5} 水溶和有机成分高剂量染毒组 IL-17 表达量 [(66.04±12.70)、(57.95±7.25) pg/mL] 高于其低剂量染毒组 [(45.32±12.66)、(39.35±6.47) pg/mL] (均 $P < 0.05$); 对比 PM_{2.5} 水溶、有机成分染毒组, PM_{2.5} 引起更高的 IL-23 [(304.78±86.08) pg/mL] 表达 (均 $P < 0.05$)。PM_{2.5} 水溶和有机成分高剂量染毒组 Th17 细胞百分比 [(3.76±1.44) %、(4.41±1.55) %] 高于其低剂量染毒组 [(2.18±0.84) %、(2.06±0.63) %]、哮喘对照组 [(1.79±0.26) %]、DMSO 对照组 [(1.33±0.81) %] (均 $P < 0.05$)。

[结论] 研究显示 PM_{2.5} 全颗粒物及其水溶、有机成分均可以通过升高 Th17 细胞比例并高表达 IL-17、IL-23 加重哮喘发作。PM_{2.5} 水溶成分对肺脏毒性作用强于 PM_{2.5} 有机成分, 且 PM_{2.5} 在介导 Th17 加重哮喘发作中的作用强于其单一成分的作用。

关键词: 交通相关 PM_{2.5}; 哮喘; Th17 细胞; IL-17; IL-23

Effects of traffic related PM_{2.5} and its components on Th17 cells and related cytokines in asthmatic rats ZHAO Hui-chao, WANG Jing, WU Hong-yan, ZHANG Zhi-hong (Department of Environmental Hygiene, School of Public Health, Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi, 030001, China)

Abstract:

[Background] Th17 lymphocytes play an important role in the development of some autoimmune diseases by secreting the characteristic cytokine IL-17 to exert their strong inflammatory effects and relying on IL-23 for expansion and maintenance.

[Objective] This study is to investigate the role of Th17 lymphocytes and related cytokines in an asthmatic rat model exacerbated by subacute exposure to traffic related PM_{2.5} and its aqueous and organic extracts.

[Methods] Eighty SD rats weighing 180-220 g were randomly divided into eight groups, with 10 rats in each group, including saline control group, asthma control group, PM_{2.5} group, low-dose aqueous extract group (low AE group), high-dose aqueous extract group (high AE group), DMSO

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2019.18748

基金项目

国家自然科学基金 (81872589); 山西省回国留学人员科研资助项目 (2017-060)

作者简介

赵会超 (1993—), 男, 硕士生;
E-mail: 1051038974@qq.com

通信作者

张志红, E-mail: zzh1973@sxmu.edu.cn

伦理审批 已获取

利益冲突 无申报

收稿日期 2018-11-09

录用日期 2019-02-11

文章编号 2095-9982(2019)05-0438-07

中图分类号 R128

文献标志码 A

►引用

赵会超, 王静, 吴红燕, 等. 交通相关 PM_{2.5} 及其不同成分对哮喘大鼠 Th17 细胞和相关细胞因子的影响 [J]. 环境与职业医学, 2019, 36 (5): 438-444.

►本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2019.18748

Funding

This study was funded.

Correspondence to

ZHANG Zhi-hong, E-mail: zzh1973@sxmu.edu.cn

Ethics approval Obtained

Competing interests None declared

Received 2018-11-09

Accepted 2019-02-11

►To cite

ZHAO Hui-chao, WANG Jing, WU Hong-yan, et al. Effects of traffic related PM_{2.5} and its components on Th17 cells and related cytokines in asthmatic rats[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2019, 36(5): 438-444.

►Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2019.18748

control group, low-dose organic extract group (low OE group), and high-dose organic extract group (high OE group). All the exposed groups were sensitized with ovalbumin (OVA) and challenged with aerosolized OVA to establish an asthmatic rat model. PM_{2.5} and its aqueous and organic extracts were intratracheally instilled into the asthmatic rats during the challenge phase to construct an asthmatic exacerbation rat model. Changes of organ coefficients and total and differential white blood cells in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were calculated. The expression levels of IL-17 and IL-23 in BALF were determined by ELISA. The percentages of Th17 cells in peripheral blood were measured by flow cytometry.

[Results] After OVA sensitization and challenge, the asthmatic rats showed obvious symptoms of wheezing, shortness of breath, forelimb contraction, and scratching face, while the rats in the saline control group had no such symptoms. The left lung coefficients of the PM_{2.5} group and the high AE group were significantly higher than that of the asthma control group ($P < 0.05$). PM_{2.5} and its aqueous or organic components induced elevated white blood cells; PM_{2.5} aqueous and organic extracts led to increased eosinophil percentage and decreased macrophage percentage; PM_{2.5} aqueous extracts resulted in elevated neutrophil percentage ($P < 0.05$). The expression levels of IL-17 in BALF of the high AE and OE groups [(66.04±12.70), (57.95±7.25) pg/mL] were both higher than those of the low AE and OE groups [(45.32±12.66), (39.35±6.47) pg/mL] ($P < 0.05$); PM_{2.5} induced a higher IL-23 expression level [(304.78±86.08) pg/mL] than any PM_{2.5} AE or OE groups ($P < 0.05$). The percentages of Th17 cells in the high AE and OE groups [(3.76±1.44)%, (4.41±1.55)%] were significantly higher than those of the low AE and OE groups [(2.18±0.84)%, (2.06±0.63)%], the asthma control group [(1.79±0.26)%], and the DMSO control group [(1.33±0.81)%] ($P < 0.05$).

[Conclusion] The study have demonstrated that PM_{2.5} and its aqueous and organic extracts aggravate asthma attacks by increasing the proportion of Th17 lymphocytes and up-regulating the expressions of IL-17 and IL-23. PM_{2.5} aqueous extracts have stronger toxicity to the lung than its organic extracts, and PM_{2.5} plays a more potent role in mediating exacerbation of asthma attacks by Th17 than its individual extracts.

Keywords: traffic related PM_{2.5}; asthma; Th17 cell; IL-17; IL-23

近年来,雾霾问题成为广大民众十分关注的话题,大气细颗粒物(PM_{2.5})是其主要的污染成分。已有流行病学资料显示,大气PM_{2.5}浓度的上升与哮喘发作存在密切关联^[1-2]。支气管哮喘是一种多基因遗传的复杂疾病,发生和发展受遗传与环境因素共同作用。由天然T细胞前体Th0细胞分化而来的Th17细胞,是一种与Th1、Th2细胞不同且具有独立分化和发育方式的炎症性T淋巴细胞,在促炎症反应和自身免疫性疾病中发挥着重要作用^[4]。Th17细胞分泌的细胞因子白介素(interleukin, IL)-17可以诱导细胞因子释放,促进气道内炎症细胞募集和激活,与哮喘气道炎症的急性加重密切相关^[5]。IL-23在维持Th17细胞特征及诱导IL-17分泌中起重要作用^[6]。因此,对Th17及其细胞因子开展研究可以为哮喘的发病与治疗提供新的视角与方法。

PM_{2.5}粒径小,比表面积大,可携带多种有毒有害物质。大气颗粒物的化学成分与其产生的健康效应密切相关,PM_{2.5}中有机物如多环芳烃(polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)是致DNA损伤的主要成分^[7];无机水溶离子如SO₄²⁻、NO₃⁻、Cl⁻等也可引起细胞毒性,造成细胞炎症反应和氧化应激等^[8]。杨轶骞等^[9]研究表明PM_{2.5}有机提取物染毒可促进BEAS-2B细胞释放IL-8、IL-1β、可溶性细胞间黏附分子等炎症因子,刺激炎性细胞释放炎性介质,导致气道炎症损伤,从而诱发哮喘的发病。孙哲琳等^[10]发现PM_{2.5}水溶成分可以改变慢性阻塞性肺疾病相关基因和蛋白的表达,造成肺上皮细胞的凋亡,影响肺部屏障系统。

本研究通过建立PM_{2.5}及其不同成分染毒的哮喘大鼠模型,分析哮喘大鼠外周血Th17淋巴细胞及支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)中各种炎症细胞及IL-17、IL-23的表达情况,为探讨PM_{2.5}加重哮喘发作的致病机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

TH-150C智能中流量空气总悬浮颗粒物采样器(中国武汉天虹),真空冷冻干燥仪(美国GOLD SIM),FACS Calibur型流式细胞仪(美国Becton Dickinson),倒置显微镜(日本OLYMPUS),90mm玻璃纤维滤膜(中国泰山),grade II鸡卵蛋白、Al(OH)₃(美国Sigma),大鼠IL-17、IL-23 ELISA试剂盒(中国上海西唐),酶标仪(美国Bio-Rad),淋巴细胞分离液(中国天津灏洋),细胞内固定及透化缓冲液试剂盒、FITC标记的CD4抗体、藻红蛋白(PE)标记的IL-17抗体(美国eBioscience)。

1.2 方法

1.2.1 PM_{2.5}的采集与处理 采用颗粒物采样器进行采样,采样时间为2017年11—12月,时间段为7:00—19:00,雨雪等极端天气不采样。采样点位于车流量较大的路口,距地面高度约1.5m(呼吸带高度),记录采样期间的温度、湿度、采样体积。采样完毕后,将已标记滤膜放入干燥器内。将载有PM_{2.5}的滤膜剪为1.5cm×1.5cm大小,浸入适量去离子水中,冰浴超声振荡20 min 3次,洗脱PM_{2.5},振荡液用6层纱布过滤,滤液真空冷

冻干燥, 获得的颗粒物干粉于 -20°C 保存备用。

1.2.2 $\text{PM}_{2.5}$ 水溶成分与有机成分染毒液的配制 用生理盐水将 $\text{PM}_{2.5}$ 全颗粒物配制成 3 mg/mL 的全颗粒物原液, 4°C 保存。部分过滤液经过离心 ($12\,000\text{ r/min}$, 20 min , 离心半径 5 cm), 取上清液用 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤, 得到 $\text{PM}_{2.5}$ 水溶成分, 经过真空冷冻干燥等步骤制备 $\text{PM}_{2.5}$ 水溶成分干粉。称取 7.2 mg $\text{PM}_{2.5}$ 水溶成分干粉加入生理盐水, 配制成 7.2 mg/mL 的水溶成分原液, 4°C 保存。

将载有 $\text{PM}_{2.5}$ 的滤膜用二氯甲烷浸泡并使用索氏提取器提取颗粒物有机成分, 水浴 (65°C 以下) 挥干二氯甲烷得到有机提取物。用少量 DMSO 溶解有机提取物, 用 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤, 加入生理盐水配制成 2.4 mg/mL 的染毒液, 作为 $\text{PM}_{2.5}$ 有机提取物原液, 4°C 保存。

1.2.3 动物分组及模型的建立 80 只雄性 SD 大鼠, 体重 $180\sim 220\text{ g}$, 购于山西医科大学实验动物中心, 合格证号 SCXK (晋) 2015-0001。将大鼠按体重随机分为 8 组, 每组 10 只, 分别为生理盐水对照组、哮喘对照组、 $\text{PM}_{2.5}$ 染毒组、低水溶成分染毒组 (1.8 mg/kg)、高水溶成分染毒组 (7.2 mg/kg)、DMSO 对照组、低有机成分染毒组 (0.6 mg/kg)、高有机成分染毒组 (2.4 mg/kg)。

各组染毒剂量参照课题组以往研究, 并结合我国大气 $\text{PM}_{2.5}$ 排放 II 级标准及大鼠每日潮气量综合估算, 低染毒剂量根据对颗粒物成分提取后水溶、非水溶、有机成分质量比 ($3:1:1$) 计算所得。大鼠哮喘模型建立依据参考文献 [11]。除生理盐水对照组, 其他 7 个哮喘处理组于实验流程的第 1 天腹腔注射生理盐水混悬液 [卵清蛋白 (ovalbumin, OVA) 与 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 各 100 mg] 1 mL 致敏, 第 8 天、第 15 天腹腔注射 10 mg OVA 和 100 mg $\text{Al}(\text{OH})_3$ 的生理盐水混悬液 1 mL 致敏, 生理盐水组则以生理盐水代替致敏剂注射。

激发阶段, 各哮喘处理组在第 3 次致敏 1 周后, 将大鼠放于雾化箱中, 给以 3% OVA 激发液 50 mL 高频雾化吸入激发, 每天 1 次, 每次 30 min , 连续 15 d , 生理盐水对照组以生理盐水代替 OVA 进行雾化激发。

从第 25 天开始, 对大鼠进行气管滴注 $\text{PM}_{2.5}$ 或不同成分染毒液, 每 3 天 1 次, 共染毒 5 次。最后一次染毒后处死大鼠, 取材测定相应指标。本实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和国家及本地法规, 并遵守《动物实验体内实验研究报告规范指南》。

1.2.4 腹主动脉采血、BALF 及肺组织的收集 大鼠麻醉后, 取 3 mL 腹主动脉血进行流式细胞检测。处死大鼠后, 计算各脏器系数值。结扎大鼠左侧的支气管, 向右侧肺组织注入 5 mL 生理盐水 (37°C), 回收生理盐水, 重复上述操作 3 次。每次灌洗后回收 BALF 至离心管, 回收率均大于 80% 为合格。BALF 回收以后, 1500 r/min 离心 10 min , 离心半径 6.25 cm , 分装上清液, 置于 -80°C 冰箱冻存, 用以检测其中细胞因子含量。

1.2.5 BALF 中细胞分类计数 每组取 5 只大鼠的 BALF, 离心分离后的细胞沉淀中加入 0.5 mL 的 PBS 重悬, 取 $20\text{ }\mu\text{L}$ 混悬液, 加入 PBS 稀释 20 倍。取 $10\text{ }\mu\text{L}$ 在光学显微镜下于血细胞计数板进行细胞总数计数。取稀释 20 倍后的 BALF 进行吉姆萨染色。400 倍镜下计数 200 个白细胞并依据形态学特点将其分为中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、淋巴细胞和巨噬细胞, 计算各自百分比。

1.2.6 BALF 中细胞因子测定 将“1.2.4”制备的 BALF 上清液 4°C 解冻后, 每组取 3 只大鼠的 BALF 并按照 ELISA 试剂盒说明书步骤, 在全自动酶标仪波长 450 nm 下检测 IL-17 和 IL-23 水平。

1.2.7 外周血中 Th17 细胞检测 每组随机选取 3 只大鼠, 取 3 mL 外周血至淋巴细胞分离液上方, 离心取淋巴细胞层。将取出的淋巴细胞加入 PBS 混匀后, 加入 $0.5\text{ }\mu\text{L}$ FITC 标记的 CD4 抗体, 室温避光孵育 20 min , PBS 清洗。加入 IL-17 固定液, 37°C 下孵育 15 min , PBS 清洗。加入破膜液并于 37°C 下孵育 50 min , 离心并 PBS 清洗。加入 $1.25\text{ }\mu\text{L}$ PE 标记的 IL-17A 抗体, 37°C 避光孵育 30 min 后 PBS 清洗, 并加入 $200\text{ }\mu\text{L}$ PBS 重悬上机检测。

1.3 统计学分析

本实验采用 SPSS 22.0 统计软件对数据进行整理分析。对服从正态分布的计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 进行描述, 不服从正态分布则使用中位数及四分位间距进行描述。采用方差分析进行多组间比较, 若各组间方差齐, 则采用 LSD-t 法进行两两比较, 对不服从正态分布的多组间中位数比较采用 Kruskal-Wallis H 检验, 两两比较使用 Kruskal-Wallis 单因素方差分析。检验水准 $\alpha=0.05$, 两两比较检验水准均经 Bonferroni 校正。

2 结果

2.1 一般状况

经 OVA 致敏激发后, 哮喘大鼠均出现明显的烦躁不安、直立喘息、呼吸急促、弓背、前肢缩抬、抓脸等

典型症状, 对照组大鼠无上述症状。试验期间各组大鼠体重差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.2 大鼠肺脏、脾脏脏器系数变化

各组大鼠左肺脏器系数、脾脏脏器系数之间差异均有统计学意义 ($\chi^2=40.064$, $P<0.01$; $\chi^2=15.69$, $P=0.047$)。两两比较结果显示: $PM_{2.5}$ 染毒组大鼠左肺脏器系数高于哮喘对照组 ($P=0.001$); 高水溶成分染毒组大鼠的左肺脏器系数高于哮喘对照组 ($P=0.024$), 但有机成分染毒组与哮喘对照组差异均无统计学意义 ($P>0.05$); 高有机成分染毒组大鼠的左肺、脾脏脏器系数均低于 $PM_{2.5}$ 染毒组大鼠 ($P=0.01$)。见表 1。

表 1 交通相关 $PM_{2.5}$ 及其成分染毒大鼠各组间脏器系数 ($n=10$)
Table 1 Organ coefficients of rats exposed to traffic related $PM_{2.5}$ and its extracts

分组 (Group)	左肺 (Left lung)		脾脏 (Spleen)	
	M	$P_{25} \sim P_{75}$	M	$P_{25} \sim P_{75}$
生理盐水对照组 (Saline control group)	0.18	0.18~0.22	0.16	0.16~0.19
哮喘对照组 (Asthma control group)	0.17	0.17~0.18	0.16	0.14~0.18
$PM_{2.5}$ 染毒组 ($PM_{2.5}$ group)	0.23 ^b	0.22~0.25	0.18	0.16~0.22
低水溶成分染毒组 (Low aqueous extract group)	0.20	0.19~0.22	0.16	0.15~0.17
高水溶成分染毒组 (High aqueous extract group)	0.21 ^b	0.20~0.26	0.17	0.14~0.18
DMSO 对照组 (DMSO control group)	0.18 [◇]	0.16~0.20	0.15	0.15~0.18
低有机成分染毒组 (Low organic extract group)	0.18	0.18~0.20	0.15	0.14~0.16
高有机成分染毒组 (High organic extract group)	0.17 [◇]	0.16~0.18	0.14 [◇]	0.13~0.16

[注] b: 与哮喘对照组相比, $P<0.05$; ◇: 与 $PM_{2.5}$ 染毒组相比, $P<0.05$ 。

[Note] b: Compared with the asthma control group, $P<0.05$; ◇: Compared with the $PM_{2.5}$ group, $P<0.05$.

2.3 BALF 中白细胞总数及分类计数百分比

$PM_{2.5}$ 染毒组的白细胞总数高于生理盐水对照组、

哮喘对照组、低水溶成分染毒组、低有机成分染毒组 ($P<0.05$)。水溶、有机成分高剂量染毒组的细胞总数高于其低剂量染毒组 ($P<0.05$)。高、低水溶成分染毒组中性粒细胞百分比高于生理盐水及哮喘对照组 ($P<0.05$)。水溶成分高、低剂量染毒组嗜酸性粒细胞百分比均高于生理盐水组 ($P<0.05$)。高有机成分染毒组大鼠 BALF 中的嗜酸性粒细胞百分比高于 $PM_{2.5}$ 染毒组、低有机成分染毒组、生理盐水对照组和 DMSO 对照组 ($P<0.05$)。高、低剂量有机成分染毒组大鼠的嗜碱性粒细胞百分比均高于 DMSO 对照组 ($P<0.05$)。水溶、有机成分染毒各组大鼠巨噬细胞数量均低于生理盐水对照组与哮喘对照组 ($P<0.05$)。各组大鼠淋巴细胞百分比差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见表 2。

2.4 BALF 中 IL-17、IL-23 测定结果

高剂量水溶、有机成分染毒组大鼠的 IL-17 表达水平明显高于各自低剂量染毒组的表达水平 ($P=0.036$, $P=0.001$)。 $PM_{2.5}$ 全颗粒物染毒组 IL-23 表达水平最高, 高水溶成分染毒组、高有机成分染毒组次之, 与生理盐水对照组比较差异均有统计学意义 ($P<0.05$), 在水溶、有机成分低、高剂量染毒组之间差异未见统计学意义 ($P>0.05$)。见表 3。

2.5 大鼠外周血中 Th17 细胞亚群测定

$PM_{2.5}$ 高水溶成分染毒组的大鼠外周血中 Th17 细胞的百分比高于生理盐水对照组、哮喘对照组、低水溶成分染毒组; 高有机成分染毒组大鼠外周血 Th17 细胞的百分比高于生理盐水对照组、哮喘对照组、DMSO 对照组及低有机成分染毒组, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。见图 1、图 2。

表 2 交通相关 $PM_{2.5}$ 及其成分染毒大鼠 BALF 中白细胞总数及细胞分类计数 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)
Table 2 Total and differential white blood cells in BALF of rats exposed to traffic related $PM_{2.5}$ and its extracts

组别 Group	白细胞总数 ($\times 10^6/\text{mL}$) Total white blood cells	白细胞分类计数 (Differential white blood cells, %)				
		中性粒细胞 Neutrophils	嗜酸性粒细胞 Eosnophils	嗜碱性粒细胞 Basophils	巨噬细胞 Macrophages	淋巴细胞 Lymphocytes
生理盐水对照组 (Saline control group)	2.79±1.37	10.00±3.12	7.89±3.23	11.78±8.49	35.39±7.22	34.94±12.71
哮喘对照组 (Asthma control group)	5.30±1.61	9.75±3.86	25.88±11.34 ^a	10.38±3.01	32.75±8.68	21.25±10.31
$PM_{2.5}$ 染毒组 ($PM_{2.5}$ group)	16.54±3.53 ^{ab}	20.92±7.24 ^{ab}	14.42±9.04 ^b	12.58±6.51	21.75±16.98	30.33±17.08
低水溶成分染毒组 (Low aqueous extract group)	6.26±1.37 ^{a◇}	25.33±5.92 ^{ab}	21.83±3.33 ^a	17.00±4.00	10.83±5.30 ^{ab}	25.00±10.97
高水溶成分染毒组 (High aqueous extract group)	29.40±1.47 ^{ab◇*}	27.67±6.84 ^{ab}	25.17±5.61 ^{a◇}	18.42±3.02	7.42±2.42 ^{ab◇}	21.33±5.74
DMSO 对照组 (DMSO control group)	3.93±0.80 [◇]	11.38±2.43 [◇]	17.75±2.36	10.38±5.34	24.38±15.14	36.13±9.56
低有机成分染毒组 (Low organic extract group)	9.84±3.21 [◇]	11.88±1.38 [◇]	18.75±0.87	18.13±4.33 ^f	9.25±2.50 ^{ab}	42.00±2.97
高有机成分染毒组 (High organic extract group)	21.52±7.79 ^{ab#}	13.30±3.15 [◇]	27.40±2.22 ^{af◇#}	23.10±2.49 ^{bf◇}	9.30±0.91 ^{ab}	26.90±4.52

[注] a: 与生理盐水对照组相比, $P<0.05$; b: 与哮喘对照组相比, $P<0.05$; ◇: 与 $PM_{2.5}$ 染毒组相比, $P<0.05$; *: 与低水溶成分染毒组相比, $P<0.05$; f: 与 DMSO 对照组相比, $P<0.05$; #: 与低有机成分染毒组相比, $P<0.05$ 。

[Note] a: Compared with the saline control group, $P<0.05$; b: Compared with the asthma control group, $P<0.05$; ◇: Compared with the $PM_{2.5}$ group, $P<0.05$; *: Compared with the low aqueous extract group, $P<0.05$; f: Compared with the DMSO control group, $P<0.05$; #: Compared with the low organic extract group, $P<0.05$.

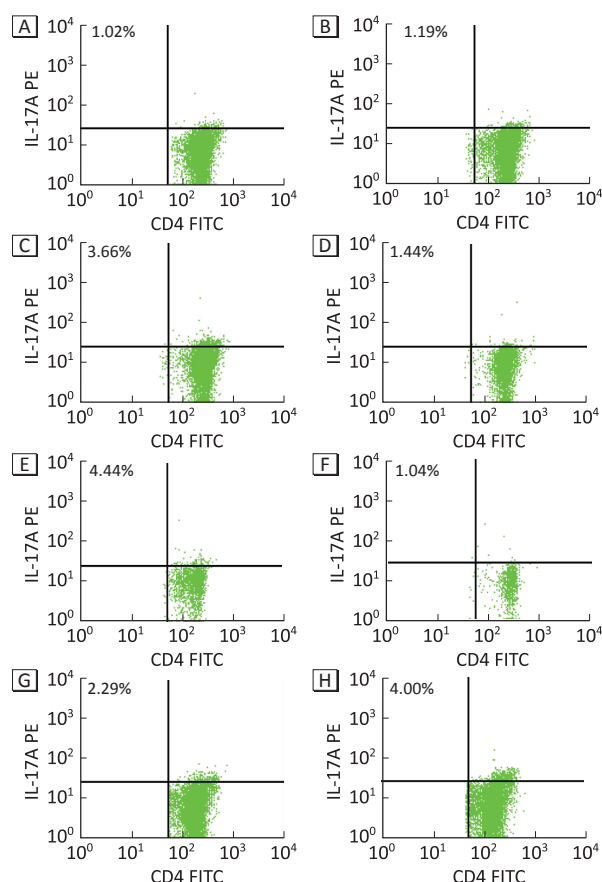
表3 交通相关PM_{2.5}及其成分染毒大鼠BALF中IL-17、IL-23的表达水平 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$, pg/mL)

Table 3 IL-17 and IL-23 levels in BALF of rats exposed to traffic related PM_{2.5} and its extracts

分组 (Group)	IL-17	IL-23
生理盐水对照组 (Saline control group)	32.62±6.70	46.38±8.60
哮喘对照组 (Asthma control group)	43.85±2.24	92.00±16.48
PM _{2.5} 染毒组 (PM _{2.5} group)	52.22±5.29 ^a	304.78±86.08 ^{ab}
低水溶成分染毒组 (Low aqueous extract group)	45.32±12.66	147.35±63.01 [◇]
高水溶成分染毒组 (High aqueous extract group)	66.04±12.70 ^{ab*}	199.64±55.30 ^a
DMSO 对照组 (DMSO control group)	37.57±6.53 [◇]	116.97±33.80 [◇]
低有机成分染毒组 (Low organic extract group)	39.35±6.47	129.88±27.45 [◇]
高有机成分染毒组 (High organic extract group)	57.95±7.25 ^{ab#}	179.50±47.13 ^a

[注] a: 与生理盐水对照组相比, $P<0.05$; b: 与哮喘对照组相比, $P<0.05$; ◇: 与PM_{2.5}染毒组相比, $P<0.05$; *: 与低水溶成分染毒组相比, $P<0.05$; f: 与DMSO对照组相比, $P<0.05$; #: 与低有机成分染毒组相比, $P<0.05$ 。

[Note] a: Compared with the saline control group, $P<0.05$; b: Compared with the asthma control group, $P<0.05$; ◇: Compared with the PM_{2.5} group, $P<0.05$; *: Compared with the low aqueous extract group, $P<0.05$; f: Compared with the DMSO control group, $P<0.05$; #: Compared with the low organic extract group, $P<0.05$.

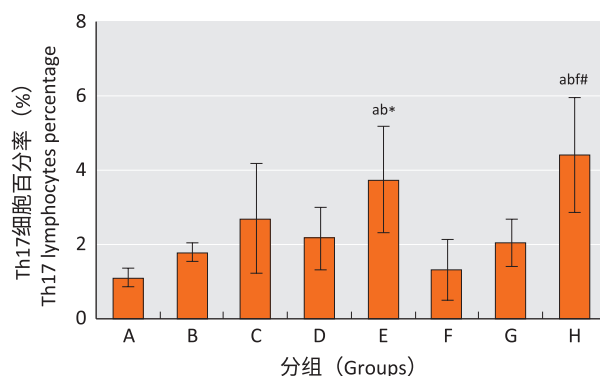


[注] A: 生理盐水对照组; B: 哮喘对照组; C: PM_{2.5}染毒组; D: 低水溶成分染毒组; E: 高水溶成分染毒组; F: DMSO对照组; G: 低有机成分染毒组; H: 高有机成分染毒组。

[Note] A: Saline control group; B: Asthma control group; C: PM_{2.5} group; D: Low aqueous extract group; E: High aqueous extract group; F: DMSO control group; G: Low organic extract group; H: High organic extract group.

图1 交通相关PM_{2.5}及其成分染毒大鼠外周血Th17细胞流式细胞术检测结果

Figure 1 Peripheral blood Th17 lymphocytes of rats exposed to traffic related PM_{2.5} and its extracts by flow cytometry



[注] A: 生理盐水对照组; B: 哮喘对照组; C: PM_{2.5}染毒组; D: 低水溶成分染毒组; E: 高水溶成分染毒组; F: DMSO对照组; G: 低有机成分染毒组; H: 高有机成分染毒组。a: 与生理盐水组相比, $P<0.05$; b: 与哮喘对照组相比, $P<0.05$; *: 与低水溶成分染毒组相比, $P<0.05$; f: 与DMSO对照组相比, $P<0.05$; #: 与低有机成分染毒组相比, $P<0.05$ 。

[Note] A: Saline control group; B: Asthma control group; C: PM_{2.5} group; D: Low aqueous extract group; E: High aqueous extract group; F: DMSO control group; G: Low organic extract group; H: High organic extract group. a: Compared with the saline control group, $P<0.05$; b: Compared with the asthma control group; *: Compared with the low aqueous extract group, $P<0.05$; f: Compared with the DMSO control group, $P<0.05$; #: Compared with the low organic extract group, $P<0.05$.

图2 交通相关PM_{2.5}及其成分染毒大鼠外周血中Th17细胞亚群百分率

Figure 2 Th17 lymphocyte percentages in peripheral blood of rats exposed to traffic related PM_{2.5} and its extracts

3 讨论

支气管哮喘是一种由自身免疫紊乱引发的慢性气道炎症性疾病, 长期以来, “Th2 优势”一直作为哮喘发作的主要机制。有研究指出Th1/Th2平衡理论并不能完全解释哮喘发作机制^[12], Th17细胞也在哮喘发作中起到重要致炎作用^[13]。本研究提取了PM_{2.5}水溶、有机成分对哮喘大鼠进行气管滴注染毒, 进而对比两种成分在诱导Th17细胞加重哮喘发作中的作用。

PM_{2.5}主要成分可以分为水溶性离子盐、有机污染物、各种重金属、碳质成分、微生物等。PM_{2.5}组分因排放源、天气、地域、时间等因素的不同而具有一定的差异性。本研究的大气PM_{2.5}从交通路口采集, 主要来自汽车尾气、燃煤飞灰及道路扬尘。

本研究发现, PM_{2.5}水溶成分可以引起左肺脏器系数上升, 而有机成分的该效应却不明显。这可能是由于PM_{2.5}水溶成分中SO₄²⁻、NO₃⁻等可溶性离子进入肺组织, 造成肺内酸性环境, 导致肺组织炎性水肿, 而PM_{2.5}中过渡金属也可能在细胞氧化应激中发挥重要作用^[14]。颗粒物粒径越小, 越容易进入气管下部, 酸性气溶胶越容易造成人体肺功能损伤^[15]。PM_{2.5}有

机成分则更容易造成细胞内DNA损伤,进而引发致癌、致畸、致突变作用。

本研究发现PM_{2.5}高有机成分染毒组大鼠(2.4 mg/kg)脾脏脏器系数下降。相关研究表明高剂量PAHs可引起实验动物胸腺、脾、骨髓、淋巴结及肠系膜淋巴结等淋巴组织的萎缩,可能与PAHs诱导程序性细胞死亡有关,而免疫系统的损伤可能引起T淋巴细胞和一些细胞因子的改变^[16],这可能与哮喘加重有关。

PM_{2.5}各成分均可以引起BALF中炎性细胞增多,其中水溶成分引起嗜酸性、中性粒细胞增多,而有机成分可以引起嗜酸性粒、嗜碱性粒细胞增多。哮喘作为一种多细胞共同参与的慢性免疫性疾病,多以中性粒以及嗜酸性粒细胞增多为主,而嗜碱性粒细胞对过敏性反应的启动及维持具有重要作用,同时作为哮喘等变态反应疾病的启动细胞,参与体内Th2应答的全部过程^[17]。巨噬细胞在人体非特异性免疫中起重要清除作用,PM_{2.5}水溶、有机成分均可以引起巨噬细胞数量下降。研究表明沙尘暴PM_{2.5}中水溶、有机成分均可以引起小鼠巨噬细胞质膜通透性增加,使胞质内乳酸脱氢酶渗漏到细胞外,降低其吞噬作用,使气道失去保护屏障,导致颗粒物对机体造成更大的损伤^[18]。

Th17细胞作为一种在生长发育及作用上明显区别于Th1、Th2型细胞的CD4⁺细胞亚型,具有IL-23依赖性分泌IL-17的特性。IL-17已经被证明有强致炎作用,在人体内每个组织中IL-17均可强烈诱导基质细胞,产生炎性细胞因子和招募嗜酸性粒细胞及中性粒细胞^[19],在一定程度上也解释了PM_{2.5}致BALF中嗜酸性粒以及中性粒细胞数量升高。IL-23对Th17细胞和自身免疫病的产生具有非常重要的作用。然而,IL-23并不参与Th17细胞最初的分化过程,而是作用于已经分化好的Th17细胞,起到稳定和维持Th17细胞特性的作用^[6]。本研究结果表明,PM_{2.5}及其成分均可以引起哮喘大鼠BALF中IL-17及IL-23表达水平升高,且外周血中Th17细胞百分率上升,表明Th17细胞参与了PM_{2.5}及其成分加重哮喘发作的过程并分泌IL-17发挥致炎作用。杨凌等^[20]研究表明,PM_{2.5}染毒小鼠BALF中IL-17以及Th17细胞的特异性转录因子维A酸相关孤儿受体γt (retinoic acid-associated orphan receptor gamma t, RORγt) mRNA相对表达水平升高。IL-23作为IL-23/IL-17轴的上游细胞因子且水平明显升

高,进一步说明IL-23/IL-17轴可能参与PM_{2.5}各成分加重哮喘的发作。且研究发现,PM_{2.5}染毒通过Th17和IL-23/IL-17轴加重哮喘发作的作用明显强于同一水平下提取的水溶成分及有机成分的效果。颗粒物中碳质成分可以引起系统性炎症^[21-22],而重金属(如Hg、Cd)也可能与肺癌发病相关^[23]。本研究尚未对以上成分进行研究,颗粒物作为一个复杂的整体,其成分之间可能存在协同作用,共同产生呼吸毒性并加剧哮喘的发作。

综上,PM_{2.5}及其不同成分均可以通过Th17细胞和IL-23/IL-17轴加重哮喘发作,而相对于单一成分,PM_{2.5}全颗粒物可以产生更强的效应。脏器系数中水溶组分染毒组可以引起肺组织水肿,导致左肺脏器系数升高,而有机成分可以引起脾脏组织脏器系数下降,我们推测这可能与水溶性的离子成分更易对肺部产生炎症损伤,而有机成分易对免疫器官造成损害有关。

参考文献

- [1] PETERS A, SKORKOVSKY J, KOTESOVEC F, et al. Associations between Mortality and Air Pollution in Central Europe [J]. Environ Health Perspect, 2000, 108 (4): 283-287.
- [2] OSTRO B, BROADWIN R, GREEN S, et al. Fine particulate air pollution and mortality in nine california counties: results from CALFINE [J]. Environ Health Perspect, 2006, 114 (1): 29-33.
- [3] ANNESI-MAESANO I, MOREAU D, CAILLAUD D, et al. Residential proximity fine particles related to allergic sensitisation and asthma in primary school children [J]. Respir Med, 2007, 101 (8): 1721-1729.
- [4] TUMES DJ, PAPADOPOULOS M, ENDO Y, et al. Epigenetic regulation of T-helper cell differentiation, memory, and plasticity in allergic asthma [J]. Immunol Rev, 2017, 278 (1): 8-19.
- [5] DO NASCIMENTO CAMARGO L, RIGHETTI RF, DE CÁSSIA ROLIM BARBOSA ARISTÓTELES LR, et al. Effects of anti-IL-17 on inflammation, remodeling, and oxidative stress in an experimental model of asthma exacerbated by LPS [J]. Front Immunol, 2017, 8: 1835.
- [6] 郑钰涵, 吴晓东, 孙兵. Th17细胞分化和功能的研究进展 [J]. 生命科学, 2010, 22 (6): 534-538.
- [7] OH SM, KIM HR, PARK YJ, et al. Organic extracts of urban air pollution particulate matter (PM_{2.5})-induced genotoxicity and oxidative stress in human lung bronchial epithelial cells (BEAS-2B cells) [J]. Mutat Res, 2011, 723 (2): 142-151.

- [8] ZOU Y, JIN C, SU Y, et al. Water soluble and insoluble components of urban PM_{2.5} and their cytotoxic effects on epithelial cells (A549) *in vitro* [J]. Environ Pollut, 2016, 212 : 627-635.
- [9] 杨轶戩, 宋宏. 大气 PM_{2.5} 有机提取物暴露对 BEAS-2B 细胞因子表达的影响 [J]. 卫生研究, 2006, 35 (6) : 687-689.
- [10] 孙哲琳, 陈重军, 杨令延, 等. PM_{2.5} 水溶性和有机组分对肺上皮细胞损伤及 COPD 相关基因和蛋白表达影响 [J]. 环境科学学报, 2016, 36 (11) : 4262-4271.
- [11] 张佳琪, 郑鑫, 张志红, 等. miR155 和 STAT6 在大气 PM_{2.5} 加重大鼠哮喘中的作用 [J]. 环境与职业医学, 2017, 34 (3) : 239-244.
- [12] ROGALA B, BOZEK A, GLUCK J, et al. Prevalence of IgE-mediated allergy and evaluation of Th1/Th2 cytokine profiles in patients with severe bronchial asthma [J]. Postepy Dermatol Alergol, 2015, 32 (4) : 274-280.
- [13] SINGH A, YAMAMOTO M, RUAN J, et al. Th17/Treg ratio derived using DNA methylation analysis is associated with the late phase asthmatic response [J]. Allergy Asthma Clin Immunol, 2014, 10 (1) : 32.
- [14] 曹强, 钱孝琳, 张澍, 等. 大气细颗粒物水溶成分和非水溶成分的细胞毒性 [J]. 环境科学学报, 2008, 28 (6) : 1167-1172.
- [15] BERICO M, LUCIANI A, FORMIGNANI M. Atmospheric aerosol in an urban area—measurements of TSP and PM₁₀ standards and pulmonary deposition assessments [J]. Atmos Environ, 1997, 31 (21) : 3659-3665.
- [16] 樊晶光. 多环芳烃的免疫毒性及其机理 [J]. 国外医学卫生学册, 1997, 24 (2) : 80-81.
- [17] 姜家利, 饶晓红, 李小双. 嗜碱性粒细胞活化状态对哮喘患儿急性发作次数的影响分析 [J]. 临床肺科杂志, 2018, 23 (8) : 1410-1413.
- [18] 耿红, 孟紫强, 张全喜. 沙尘暴 PM_{2.5} 水溶和有机成分对巨噬细胞的损伤 [J]. 中国环境科学, 2006, 26 (1) : 20-24.
- [19] 林芳, 王慧芬. Th17 细胞相关细胞因子的研究进展 [J]. 医学综述, 2009, 15 (7) : 1000-1003.
- [20] 杨凌, 马琼锦, 李莉珊, 等. PM_{2.5} 亚慢性染毒对小鼠肺部炎症及 Th17/Treg 的影响 [J]. 卫生研究, 2014, 43 (3) : 387-392.
- [21] WU S, DENG F, WEI H, et al. Chemical constituents of ambient particulate air pollution and biomarkers of inflammation, coagulation and homocysteine in healthy adults : A prospective panel study [J]. Part Fibre Toxicol, 2012, 9 : 49.
- [22] WU S, DENG F, JING H, et al. Blood pressure changes and chemical constituents of particulate air pollution : results from the healthy volunteer natural relocation (HVNRR) study [J]. Environ Health Perspect, 2013, 121 (1) : 66-72.
- [23] 李奕霖. 成都经济区居民呼吸道疾病与大气尘重金属元素的相关性 [D]. 成都 : 成都理工大学, 2009.

(英文编辑 : 汪源 ; 编辑 : 王晓宇 ; 校对 : 汪源)

· 告知栏 ·

《环境与职业医学》杂志发表论文可直接使用的英文缩写名单

为优化文章易读性, 本刊对可直接使用的英文缩写或格式约定如下。

常用名词 : ICR 小鼠、SD 大鼠、AIDS (获得性免疫缺陷综合征)、WHO (世界卫生组织)、HE 染色、SPF (无特定病原体)、PM₁₀、PM_{2.5}、OR (比值比)、95%CI (95% 置信区间)、RR (相对危险度)

培养基 : RPMI-1640、DMEM/F12、DMEM、DEME、IMDM、MEM、OPTI

实验方法 : ELISA、PCR、MTT、TUNEL、Bradford、Lowry、SDS/PAGE、RFLP

仪器及试剂 : Tris、Tris-HCl、Triton X-100、EDTA、EDTA-2Na\EDTA-Na₂、TBST 缓冲液、TBS 缓冲液、PBS、Annexin V、FITC、RNase、DNase、PI、TRIzol、DAPI、DCFH-DA、EP 管、5×buffer、SDS/PAGE、DCF

《环境与职业医学》编辑部

2019年5月25日