原创精选
Selected article

硝酸镧对成年雌性小鼠免疫功能及细胞病理学的影响

汤猛猛[a]，葛建鸿[a]，曹凯鑫[a]，李泽康[a]，王晓芸[a]，肖倩倩[a,b]，蒋建军[a,b]，魏雪涛[a,b]

北京大学公共卫生学院 a. 毒理学系 b. 食品安全毒理学研究与评价北京市重点实验室，北京 100191

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2020.19739

摘要：

[背景] 镧是一种重要的稀土元素，能引起多种器官和系统损伤，然而其对免疫系统影响的研究尚不全面，且目前我国尚未提出公认的镧的安全阈值。

[目的] 探讨硝酸镧对成年雌性小鼠免疫功能和细胞病理学的影响。

[方法] 将50只6~8周龄雌性BALB/c小鼠随机分为5组，每组10只，灌胃给予硝酸镧溶液，剂量分别为0（超纯水）、0.2、2.0、20.0、200.0 mg·kg^{-1}，每日灌胃1次，连续灌胃30 d。染毒结束后，颈椎脱臼法处死小鼠，分离胸腺、脾脏和肠系膜淋巴结称重并计算脏器系数，用刀豆蛋白A（ConA）和细菌脂多糖（LPS）诱导的淋巴细胞转化实验测定脾脏T、B细胞增殖能力，用乳酸脱氢酶法（LDH）测定脾脏NK细胞活性，用流式细胞术测定胸腺、脾脏和肠系膜淋巴结主要免疫细胞分型。

[结果] 与对照组相比，2.0、20.0、200.0 mg·kg^{-1}组小鼠脾T细胞增殖能力降低（分别是0.65±0.13、0.67±0.13、0.64±0.14 vs 0.85±0.20，$P<0.05$）；20.0、200.0 mg·kg^{-1}组小鼠脾B细胞增殖能力降低（分别是0.34±0.10、0.29±0.05 vs 0.52±0.07，$P<0.01$），且存在剂量-效应关系（$r=-0.96$，$P<0.01$）。仅在2.0 mg·kg^{-1}组观察到小鼠脾脏NK细胞活性降低（0.28±0.06 vs 0.45±0.04，$P<0.01$）。与对照组相比，2.0 mg·kg^{-1}组小鼠脾脏$CD4^+/CD8^+$值升高（2.27±0.29 vs 1.81±0.33，$P<0.01$），200.0 mg·kg^{-1}组小鼠脾脏$CD4^+CD8^-$和$CD4^-CD8^+$型T细胞比例升高（分别是30.26±3.96 vs 24.19±2.70和21.01±5.11 vs 13.59±2.77，$P<0.05$）、脾脏B细胞比例下降（38.07±6.71 vs 50.63±6.71，$P<0.01$）、肠系膜淋巴结$CD4^+CD8^-$型T细胞比例下降（28.21±7.38 vs 40.78±10.19，$P<0.01$）；0.2、2.0 mg·kg^{-1}组小鼠肠系膜淋巴结$CD4^+/CD8^+$值升高（分别是3.64±0.24和4.55±1.01 vs 2.84±0.62，$P<0.05$和$P<0.01$）；2.0 mg·kg^{-1}组肠系膜淋巴结$CD4^+CD8^-$型T细胞比例升高（55.55±4.03 vs 40.78±10.19，$P<0.05$），而$CD4^-CD8^+$型T细胞比例下降（0.43±0.30 vs 1.57±0.52，$P<0.05$）。

[结论] 经口摄入2.0、20.0、200.0 mg·kg^{-1}硝酸镧后能引起成年雌性小鼠机体免疫系统和肠系膜淋巴结局部免疫功能紊乱，产生免疫毒性作用。30 d硝酸镧灌胃染毒引起成年雌性小鼠免疫系统功能紊乱的最小毒性反应剂量为2.0 mg·kg^{-1}。

关键词：硝酸镧；T淋巴细胞；B淋巴细胞；免疫功能；细胞病理学

Effects of lanthanum nitrate on immune function and cell pathology in adult female mice

TANG Meng-meng[a], GE Jian-hong[a], CAO Kai-xin[a], LI Ze-kang[a], WANG Xiao-yun[a], XIAO Qian-qian[a,b], JIANG Jian-jun[a,b], WEI Xue-tao[a,b] (a.Department of Toxicology b.Beijing Key Laboratory of Toxicological Research and Risk Assessment for Food Safety, School of Public Health, Peking University, Beijing 100191, China)

Abstract:

[Background] As an important rare earth element, lanthanum can cause damage to multiple organs and systems. However, the impacts of lanthanum on the immune system are not comprehensively studied and no recognized safety threshold of lanthanum has been established in China.

[Objective] The present study is designed to explore the effects of lanthanum nitrate on the immune function and cell pathology in adult female mice.

[Methods] Fifty female BALB/c mice (6-8 weeks old) were randomly divided into five groups of ten each. Lanthanum nitrate was administered once daily by gavage at concentrations of 0

基金项目
国家重点研发计划（2017YFC1600203）

作者简介
汤猛猛（1993—），男，硕士生；
E-mail：649746511@qq.com

通信作者
魏雪涛，E-mail：weixt@263.net

伦理审批 已获取
利益冲突 无申报
收稿日期 2019-10-30
录用日期 2020-02-04

文章编号 2095-9982(2020)05-0447-06
中图分类号 R114
文献标志码 A

▸引用
汤猛猛，葛建鸿，曹凯鑫，等. 硝酸镧对成年雌性小鼠免疫功能及细胞病理学的影响[J]. 环境与职业医学，2020，37（5）：447-452.

▸本文链接
www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2020.19739

Funding
This study was funded.

Correspondence to
WEI Xue-tao, E-mail: weixt@263.net

Ethics approval Obtained
Competing interests None declared
Received 2019-10-30
Accepted 2020-02-04

▸To cite
TANG Meng-meng, GE Jian-hong, CAO Kai-xin, et al. Effects of lanthanum nitrate on immune function and cell pathology in adult female mice[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2020, 37(5): 447-452.

▸Link to this article
www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2020.19739

(ultrapure water), 0.2, 2.0, 20.0, and 200.0 mg·kg^{-1}, respectively, per day for 30 d. After designed treatment, the mice were sacrificed by cervical dislocation and then the thymus, spleen, and mesenteric lymph nodes were isolated and weighed to calculate organ coefficients. Concanavalin A (ConA) and lipopolysaccharide (LPS)-induced lymphocyte proliferation test was conducted to evaluate the proliferation capacity of T and B cells from the spleen. Lactate dehydrogenase (LDH) release of target cells was measured to express the viability of NK cells. Flow cytometry was used to detect types of major immune cells in the thymus, spleen, and mesenteric lymph nodes.

[Results] Compared with the control group, there was a decrease in T lymphocyte proliferation in the 2.0, 20.0, and 200.0 mg·kg^{-1} lanthanum nitrate groups (0.65±0.13, 0.67±0.13, and 0.64±0.14 vs 0.85±0.20, respectively, $P<0.05$); there was also a decrease in B lymphocyte proliferation in the 20.0 and 200.0 mg·kg^{-1} lanthanum nitrate groups (0.34±0.10 and 0.29±0.05 vs 0.52±0.07, respectively, $P<0.01$) in a dose-effect relationship (r=–0.96, $P<0.01$). The spleen NK cell viability was only reduced in the 2.0 mg·kg^{-1} lanthanum nitrate group (0.28±0.06 vs 0.45±0.04, $P<0.01$). Compared with the control group, in the 2.0 mg·kg^{-1} lanthanum nitrate group, the CD4$^+$/CD8$^+$ ratio in spleen increased (2.27±0.29 vs 1.81±0.33, $P<0.01$); in the 200.0 mg·kg^{-1} lanthanum nitrate group, the CD4$^+$CD8$^-$ and CD4$^-$CD8$^+$ T cell ratios increased (30.26±3.96 vs 24.19±2.70, 21.01±5.11 vs 13.59±2.77, $P<0.05$), the spleen B cell percentage decreased (38.07±6.71 vs 50.63±6.71, $P<0.01$), and the CD4$^+$CD8$^-$ T cell ratio in mesenteric lymph nodes decreased (28.21±7.38 vs 40.78±10.19, $P<0.01$); in the 0.2 and 2.0 mg·kg^{-1} lanthanum nitrate groups, the CD4$^+$/CD8$^+$ T cell ratio in mesenteric lymph nodes increased (3.64±0.24 and 4.55±1.01 vs 2.84±0.62, respectively, $P<0.05$ and $P<0.01$); in the 2.0 mg·kg^{-1} lanthanum nitrate group, the CD4$^+$CD8$^-$ T cell ratio in mesenteric lymph nodes increased (55.55±4.03 vs 40.78±10.19, $P<0.05$), and the CD4$^-$CD8$^+$ T cell ratio decreased (0.43±0.30 vs 1.57±0.52, $P<0.05$).

[Conclusion] Oral intake of lanthanum nitrate at the doses of 2.0, 20.0, and 200.0 mg·kg^{-1} could exert a toxic effect on the immune system of adult female mice, disrupting the function of immune system and local mesenteric lymph nodes. The lowest observed adverse effect level of lanthanum nitrate exposure by gavage for 30 d inducing immune function disorder in adult female mice is 2.0 mg·kg^{-1}.

Keywords: lanthanum nitrate; T lymphocyte; B lymphocyte; mesenteric lymph node; cell pathology

稀土元素包括镧系元素及钪和钇，广泛存在于自然界中。我国是稀土大国，储量居全球第一，开采和使用也遥遥领先。稀土因其良好的理化性质而被广泛应用于农业、材料学、医学等领域，影响着人们生产生活的方方面面。稀土元素能进入土壤、水体和空气等多种环境介质中[1]，并通过消化道、呼吸道、皮肤等多种途径进入人体[2-3]，在多个部位如脑、骨髓和脾脏等蓄积[4-7]，甚至可以通过胎盘屏障[8]和乳汁[9]进入胎儿和婴幼儿体内。这些发现引起了人们对稀土元素安全性问题的担忧。1991 年我国曾出台标准对植物中稀土元素含量进行限定，虽然该标准于 2016 年被废除[10]，但是稀土元素对人体的潜在危害仍不容小觑。目前我国尚未提出公认的稀土元素每日允许摄入量，稀土元素的毒理学研究仍不够丰富，因此需要在规范的实验室条件下按照国际公认的毒性评价指南开展系统、规范的稀土元素毒性研究，为完善稀土元素的风险评估，提出健康指导值和制订修订稀土限值标准提供足够的科学依据。

镧是一种重要的轻稀土元素，能引起生长抑制[11]，损伤生殖器官的结构和影响生殖细胞的发生发育以及胚胎成熟[12-14]，还能引起认知能力下降[15]和行为能力衰退。免疫系统对于维持人体健康有着重要的作用，同时也是镧毒性作用的敏感靶点。目前的研究发现，镧对免疫系统的损伤呈现低剂量兴奋效应，即低剂量下促进免疫功能，而高剂量下抑制免疫功能[16]，镧还能引起脾脏组织出现氧化性损伤，降低外周血 T、B 和 NK 细胞数目降低[17]。因此，开展更多免疫毒理学研究对于确定镧对动物和人体的安全剂量是很有必要的。目前研究多关注镧对胸腺脾脏等主要免疫器官的影响，而缺少对肠系膜淋巴结等局部黏膜相关淋巴组织影响的研究。本研究将从细胞水平探究不同剂量硝酸镧对成年雌性小鼠胸腺、脾脏和肠系膜淋巴结主要免疫细胞比例变化和免疫系统功能的影响及可能的机制，为提出镧的健康指导值提供更多理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康成年的 SPF 级 BALB/c 小鼠，6~8 周龄，体重 18~20 g，雌性，购自北京大学医学部实验动物科学部［合格证号 SCXK（京）2016-0010］。实验期间小鼠饲养在屏障环境内，自由饮水和进食，饲料为符合国家标准的 SPF 级大小鼠维持饲料，无菌垫料，饮用水经过高压蒸汽灭菌处理。动物房内保持安静、清洁、通风状态，温度为 20~25 ℃，相对湿度为 40%~70%，维持 12 h/12 h 明暗交替循环，动物实验符合北京大学动物福利和管理委员会的相关规定（批准号：LA2019053）。每天观察动物的活动能力、精神状态、行为表现、被毛和粪便情况等。

1.2 主要试剂与仪器

主要试剂：六水合硝酸镧晶体［$La(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$，

纯度为99.99%]、刀豆蛋白A（concanavalin A，ConA）、细菌脂多糖（lipopolysaccharide，LPS）（Sigma，美国），抗小鼠抗体（CD4、CD8、B220、CD14、F4/80）（Biolegend，美国），红细胞裂解液（天津灏洋TBD，中国），噻唑兰（thiazolyl blue tetrazolium bromide，MTT）（Amresco，美国），碘硝基氯化四氮唑兰（Iodonitrotetrazolium，INT）（bioruler，美国）。主要仪器：多功能酶标仪（Omega，德国），流式细胞仪（Beckman，美国），二氧化碳培养箱（Thermo，美国），低温高速离心机（Heraeus，德国）。

1.3 动物分组和实验方法

1.3.1 实验动物与处理 50只6~8周龄雌性BALB/c小鼠适应性喂养3 d后，按体重随机分为对照组、低剂量组、次低剂量组、中剂量组和高剂量组，每组10只。各组小鼠均经灌胃给予硝酸镧溶液。参考人群暴露水平和既往研究结果[16, 18]，本研究将剂量设定为0、0.2、2.0、20.0、200.0 mg·kg^{-1}（按体重计，下同），对照组为超纯水，灌胃容量为0.02 mL·g^{-1}，每天灌胃1次，连续灌胃30 d。

1.3.2 小鼠体重及脏器系数 染毒开始后，每日灌胃前将小鼠称重并记录体重，灌胃量根据当日体重进行调整，在处死当天记录其终体重。采用颈椎脱臼法处死小鼠，分离脾脏、胸腺和肠系膜淋巴结并称重，进行相关指标检测。

1.3.3 T/B淋巴细胞转化实验 无菌分离并研磨脾脏成单细胞悬液，用MTT法测定T、B淋巴细胞增殖能力，其中ConA和LPS终浓度为1 μg·mL^{-1}和10 μg·mL^{-1}，MTT浓度为5 mg·mL^{-1}，50 μL·孔$^{-1}$，用多功能酶标仪检测，结果以波长570 nm处的光密度（D）表示。T淋巴细胞增殖能力=（$D_{\text{ConA孔}}-D_{\text{对照组}}$）×100%，B淋巴细胞增殖能力=（$D_{\text{LPS孔}}-D_{\text{对照组}}$）×100%。

1.3.4 乳酸脱氢酶法测定NK细胞活性 无菌分离并研磨脾脏成单细胞悬液，用乳酸脱氢酶法测定NK细胞活性，其中靶细胞为小鼠淋巴瘤细胞（YAC-1细胞），效应细胞为脾细胞，效靶比为50∶1，用多功能酶标仪检测，测定490 nm处的光密度（D）。NK细胞活性=（$D_{\text{反应孔}}-D_{\text{靶细胞自然释放孔}}$）×100%。

1.3.5 各种主要免疫细胞分型检测 分离胸腺、肠系膜淋巴结和脾脏并研磨至单细胞悬液，用流式细胞术对各种主要免疫细胞表面抗原进行检测。其中胸腺细胞悬液检测的表面抗原为CD4和CD8，肠系膜淋巴结细胞悬液检测的表面抗原分别为CD4、CD8、F4/80和B220，脾细胞悬液处理前用1×红细胞裂解液裂解红细胞（4°C，2 min），检测的表面抗原同肠系膜淋巴结细胞悬液。

1.4 数据处理和统计学分析

采用SPSS 22.0统计软件进行数据分析。多组均数间比较采用单因素方差分析，方差不齐时采用Dunnett-t检验，数据表达方式为$\bar{x}\pm s$。采用GraphPad Prism统计软件分析各指标的剂量-效应关系，将染毒剂量取对数后，选取线性模型进行拟合，用Pearson相关进行相关性分析。检验水准α=0.05。

2 结果

2.1 一般情况、体重和脏器系数

染毒开始前，各硝酸镧组小鼠体重和对照组相比无明显变化，一般情况均良好；染毒结束后，200 mg·kg^{-1}硝酸镧组小鼠体重较对照组明显下降（P<0.01），且出现精神萎靡、行动减少、被毛无光泽和粪便形态改变等现象，而胸腺指数和脾脏指数与对照组相比均未出现明显变化。染毒期间小鼠体重的变化曲线如图1所示，200 mg·kg^{-1}组小鼠体重在染毒期间明显低于对照组，其他组和对照组无明显差异。

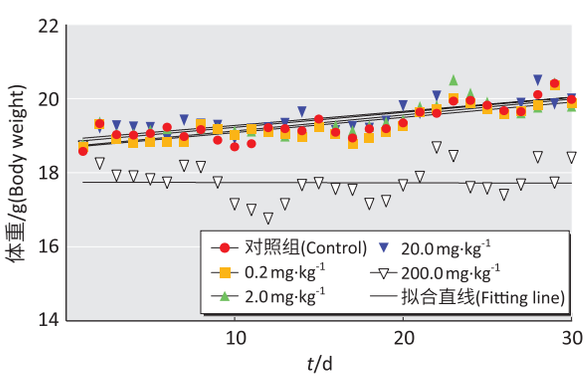


图1 硝酸镧对小鼠体重的影响

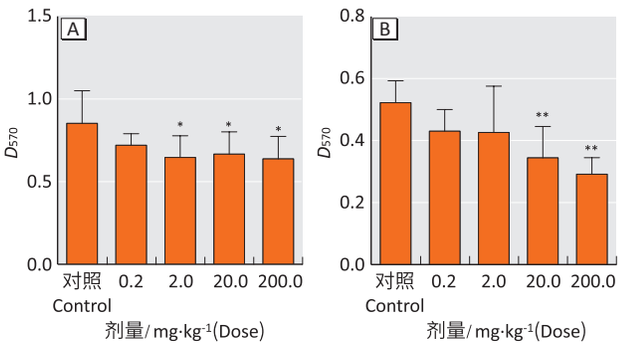
Figure 1 Effects of lanthanum nitrate on body weight in mice

2.2 脾脏T、B淋巴细胞增殖功能

如图2所示，与对照组相比：2.0、20.0、200.0 mg·kg^{-1}硝酸镧组小鼠脾脏T细胞增殖能力降低（P<0.05）；20.0、200.0 mg·kg^{-1}组脾脏B细胞增殖能力降低（P<0.01），且存在剂量-效应关系（r=−0.96，P<0.01）。

2.3 脾脏NK细胞活性

如图3所示，与对照组相比，硝酸镧染毒后，仅在2.0 mg·kg^{-1}组观察到小鼠脾脏NK细胞活性降低（P<0.01），而在其他各硝酸镧组均未观察到NK细胞活性的变化。

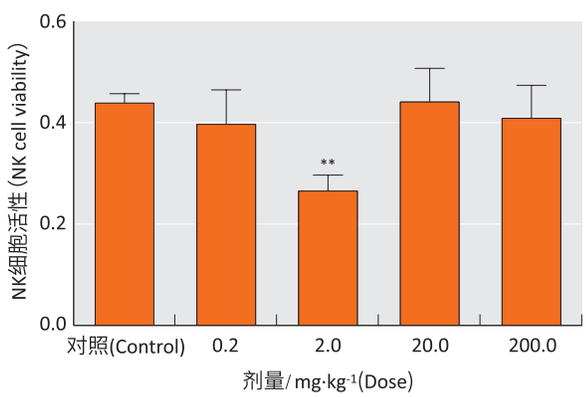


[注] A：T细胞增殖能力；B：B细胞增殖能力。与对照组比较，*：P<0.05；**：P<0.01。

[Note] A: T lymphocyte proliferation; B: B lymphocyte proliferation. Compared with the control group, *: P<0.05；**: P<0.01.

图2 硝酸镧对小鼠脾脏T、B淋巴细胞增殖能力的影响

Figure 2 Effects of lanthanum nitrate on spleen T and B lymphocyte proliferation in mice



[注] **：与对照组比较，P<0.01。

[Note] Compared with the control group, **: P<0.01.

图3 硝酸镧对小鼠脾脏NK细胞活性的影响

Figure 3 Effects of lanthanum nitrate on the viability of spleen NK cells in mice

2.4 免疫细胞分型

2.4.1 胸腺T淋巴细胞 如表1所示，与对照组相比，各硝酸镧组T细胞分型比例和$CD4^+/CD8^+$值差异均无统计学意义（P>0.05）。

表1 硝酸镧对小鼠胸腺T淋巴细胞分型的影响（$\bar{x}\pm s$，n=10，%）

Table1 Effects of lanthanum nitrate on thymus T lymphocyte typing in mice ($\bar{x}\pm s$, n=10, %)

剂量/mg·kg^{-1} Dose	$CD4^+CD8^+$	$CD4^+CD8^-$	$CD4^-CD8^+$	$CD4^-CD8^-$	$CD4^+/CD8^+$
对照（Control）	81.75±3.78	10.68±2.33	3.53±0.98	4.04±0.94	1.08±0.02
0.2	79.66±2.10	11.44±1.02	4.39±0.90	4.19±0.41	1.08±0.01
2.0	79.52±2.49	11.83±1.80	3.90±0.45	4.75±0.69	1.10±0.02
20.0	84.48±1.29	8.86±1.16	3.19±0.41	3.46±0.39	1.06±0.01
200.0	81.55±4.30	10.72±3.02	3.88±0.90	3.85±0.59	1.08±0.03

2.4.2 脾脏免疫细胞 如表2所示，与对照组相比，硝酸镧染毒后，在脾脏总细胞中，200.0 mg·kg^{-1}组观察到小鼠$CD4^+CD8^-$型、$CD4^-CD8^+$型T细胞比例升高和B细胞比例下降（均P<0.05），其他各组各型T细胞比例与对照组相比差异无统计学意义；在2.0 mg·kg^{-1}组观察到$CD4^+/CD8^+$值高于对照组（P<0.01）；各硝酸镧组相比于对照组巨噬细胞比例未出现明显变化。

2.4.3 肠系膜淋巴结免疫细胞 如表3所示，硝酸镧灌胃30 d后，与对照组相比，小鼠肠系膜淋巴结总细胞中$CD4^+CD8^-$型T细胞比例在2.0 mg·kg^{-1}时升高（P<0.05），而在200.0 mg·kg^{-1}时降低（P<0.01）；$CD4^-CD8^+$型T细胞在2.0 mg·kg^{-1}时降低（P<0.05）；0.2、2 mg·kg^{-1}组小鼠$CD4^+/CD8^+$值均高于对照组（P<0.05和P<0.01）；各硝酸镧组小鼠肠系膜淋巴结中巨噬细胞和B细胞比例与对照组相比差异均无统计学意义（表3）。

表2 硝酸镧对小鼠脾脏T淋巴细胞分型和其他免疫细胞比例的影响（$\bar{x}\pm s$，n=10，%）

Table 2 Effects of lanthanum nitrate on spleen T lymphocyte typing and other immunocyte ratios in mice ($\bar{x}\pm s$, n=10, %)

剂量/mg·kg^{-1} Dose	T淋巴细胞分型（T lymphocyte typing）				其他免疫细胞（Other immunocytes）	
	$CD4^+CD8^+$	$CD4^+CD8^-$	$CD4^-CD8^+$	$CD4^+/CD8^+$	巨噬细胞（Macrophages）	B细胞（B lymphocytes）
对照（Control）	0.38±0.06	24.19±2.70	13.59±2.77	1.81±0.33	6.69±1.43	50.63±6.71
0.2	0.36±0.03	25.47±5.54	12.67±3.89	2.04±0.38	6.59±1.16	51.63±8.40
2.0	0.39±0.05	25.96±3.41	11.38±2.24	2.27±0.29**	6.64±1.81	54.14±8.46
20.0	0.45±0.08	25.80±2.82	17.16±2.77	1.50±0.12	6.10±1.25	47.75±4.41
200.0	0.42±0.05	30.26±3.96*	21.01±5.11**	1.47±0.24	6.68±1.00	38.07±6.71**

[注] 与对照组比较，*：P<0.05；**：P<0.01。[Note] Compared with the control group, *: P<0.05; **: P<0.01.

表3 硝酸镧对小鼠肠系膜淋巴结T淋巴细胞分型和其他免疫细胞比例的影响（$\bar{x}\pm s$，n=10，%）

Table 3 Effects of lanthanum nitrate on mesenteric lymph nodes T lymphocyte typing and other immunocyte ratios in mice ($\bar{x}\pm s$, n=10, %)

剂量/mg·kg^{-1} Dose	T淋巴细胞分型（T lymphocyte typing）				其他免疫细胞（Other immunocytes）	
	$CD4^+CD8^+$	$CD4^+CD8^-$	$CD4^-CD8^+$	$CD4^+/CD8^+$	巨噬细胞（Macrophages）	B细胞（B lymphocytes）
对照（Control）	15.27±6.36	40.78±10.19	1.57±0.52	2.84±0.62	1.55±0.51	21.10±6.16
0.2	17.78±1.72	50.06±3.72	0.89±0.74	3.64±0.24*	1.56±0.42	20.67±3.78
2.0	15.60±3.82	55.55±4.03*	0.43±0.30*	4.55±1.01**	1.27±0.22	19.10±3.51
20.0	18.02±4.38	35.12±2.84	1.76±0.21	2.70±0.18	1.62±0.65	19.20±2.20
200.0	16.05±2.90	28.21±7.38**	2.08±0.46	2.45±0.12	1.72±0.38	18.74±1.68

[注] 与对照组比较，*：P<0.05；**：P<0.01。[Note] Compared with the control group, *: P<0.05; **: P<0.01.

3 讨论

镧等稀土元素在茶叶中检出量超标的问题引起了社会的广泛关注。近年来，研究发现镧等稀土元素能引起人体广泛的损害，其中免疫系统是镧毒性作用的敏感靶点，对于确定镧的安全阈值更有意义。有研究报道，腹腔注射硝酸镧溶液后，小鼠T细胞增殖能力和巨噬细胞吞噬能力在0.1、0.2、2 mg·kg^{-1}硝酸镧组明显升高，而在10、20 mg·kg^{-1}组明显下降[16]，这提示镧及其化合物对于免疫系统的影响可能呈现低剂量兴奋效应，即高剂量下表现为免疫抑制作用而在低剂量下表现为免疫毒性兴奋作用。为了全面研究硝酸镧对小鼠免疫系统的影响，本研究将剂量设定为0、0.2、2、20、200.0 mg·kg^{-1}。

本研究发现，200.0 mg·kg^{-1}硝酸镧组小鼠在连续30 d硝酸镧溶液灌胃后出现体重的明显降低、精神萎靡、行动减少、被毛无光泽和粪便形态改变等现象，提示该剂量下硝酸镧不仅会引起免疫系统的影响，还会对动物生长发育等方面产生不良影响。李树蕾等[19]研究也发现大鼠在20 mg·kg^{-1}硝酸镧和混合稀土“常乐”灌胃后生长激素水平明显下降。

T、B淋巴细胞增殖能力是评价机体细胞、体液免疫功能的重要指标。本研究发现，2.0、20.0、200.0 mg·kg^{-1}硝酸镧染毒能引起小鼠T细胞增殖能力的抑制，20.0、200.0 mg·kg^{-1}硝酸镧灌胃能引起B细胞增殖能力降低，且表现出剂量-效应关系。刘佳梅等[20]对大鼠以不同剂量硝酸镧灌胃6月后发现2 mg·kg^{-1}组大鼠脾T淋巴细胞增殖能力表现为升高，与本实验结果不一致，这种差异可能与物种不同有关。刘洁[17]发现小鼠用硝酸镧溶液灌胃30 d后，60 mg·kg^{-1}组出现外周血T、B细胞数目降低，这说明硝酸镧也可以使外周血T、B细胞增殖能力下降，但也不能排除诱导T、B细胞凋亡的可能性，需要进一步开展研究进行验证。

NK细胞活性可以反映机体的固有性免疫应答功能。本研究结果显示，仅2.0 mg·kg^{-1}组小鼠在硝酸镧灌胃30 d后出现脾脏NK细胞活性降低，20.0、200.0 mg·kg^{-1}组NK细胞活性与对照组无差异，而刘洁[17]用硝酸镧溶液对小鼠灌胃30 d后，在20、60 mg·kg^{-1}组小鼠也观察到外周血NK细胞数降低，焦冰清等[21]用硝酸镧溶液对大鼠灌胃30 d后同样发现60 mg·kg^{-1}组雄性大鼠外周血NK细胞数明显减少，这一点看似与本研究结果不一致，实际上并不矛盾，因为高剂量硝酸镧可以抑制NK细胞从骨髓向外周血和脾脏等外周免疫器官转移，而不影响NK细胞的活性。

T细胞依据其表面抗原CD4和CD8的表达可分为双阴性细胞（CD4$^-$CD8$^-$）、双阳性细胞（CD4$^+$CD8$^+$）和单阳性细胞（CD4$^+$CD8$^-$和CD4$^-$CD8$^+$）三种。CD4$^+$/CD8$^+$值是反映机体免疫状态的重要指标。本实验结果显示，硝酸镧染毒30 d后，200.0 mg·kg^{-1}组小鼠脾脏出现CD4$^+$CD8$^-$型和CD4$^-$CD8$^+$型T细胞比例升高，而相同剂量下小鼠胸腺T细胞分型与对照组相比并未出现差异，这提示硝酸镧可能影响脾脏T细胞的凋亡或者迁移而非T细胞阳性选择过程；此外，2 mg·kg^{-1}组小鼠脾脏CD4$^+$/CD8$^+$值高于对照组，这说明低剂量下硝酸镧能通过影响脾脏T淋巴细胞分型引起免疫系统紊乱；同时小鼠在200.0 mg·kg^{-1}剂量下出现脾脏B细胞比例下降，结合20.0、200.0 mg·kg^{-1}组小鼠出现B淋巴细胞增殖能力降低的结果，提示高剂量（200 mg·kg^{-1}）下硝酸镧能通过降低B细胞增殖能力，引起体液免疫毒性。此外，刘洁[17]在20、60 mg·kg^{-1}硝酸镧组小鼠观察到血清免疫球蛋白IgM含量降低，该现象也可以用硝酸镧降低了浆细胞的增殖能力解释，但也有可能是硝酸镧抑制了浆细胞产生抗体的能力，有待进一步研究证实。

肠系膜淋巴结是肠相关淋巴组织的淋巴液引流的目的外周免疫器官。肠相关淋巴组织在摄取肠道抗原和黏膜免疫应答中发挥重要的作用。本实验发现，小鼠肠系膜淋巴结中CD4$^+$/CD8$^+$值在0.2、2.0 mg·kg^{-1}组升高，结合脾脏CD4$^+$/CD8$^+$值在2.0 mg·kg^{-1}组也升高的结果，提示硝酸镧经口进入机体后可能通过启动肠道黏膜免疫应答，引起肠系膜淋巴结功能紊乱进，而致使全身免疫系统失衡，但是由于本研究未对其他局部淋巴结T细胞分型进行检测，上述改变也可能是硝酸镧进入机体后通过干扰全身免疫系统平衡，影响T细胞的分化，从而引起局部淋巴结免疫功能紊乱。

以往有研究认为，硝酸镧对于免疫系统功能具有低剂量兴奋效应[16, 20]，然而本研究并未观察到这一现象。可能有以下几个原因：①物种差异，如刘佳梅等[20]观察到0.1、0.2、2、10 mg·kg^{-1}剂量灌胃6个月后脾T淋巴细胞增殖能力升高，其研究所用实验动物为Wistar大鼠，而本研究实验动物是BALB/c小鼠；②染毒方式和染毒量差异，如宋宇等[16]观察到0.1、0.2、2 mg·kg^{-1}剂量组小鼠脾T淋巴细胞增殖能力升高和腹腔巨噬细胞吞噬功能增强，其研究染毒方式为腹腔注射，每10 d一次，共3次，该研究小鼠染毒量较低，而

本研究染毒方式为灌胃，1次·d^{-1}，连续30 d，即使是低剂量组小鼠体内硝酸镧的蓄积量也远远高于前者；③性别差异，如上述两项研究所用实验动物均为雄性，而本研究实验动物性别为雌性，焦冰清等[21]用硝酸镧对大鼠灌胃30 d的研究中同样出现雌雄大鼠免疫毒性效应不同，据此推测性激素可能与硝酸镧的免疫毒性作用有关。

综上，本研究选用BALB/c雌鼠作为研究对象，运用多种免疫功能评价方法和流式细胞技术，从多方面评价了硝酸镧对于成年雌性小鼠免疫系统的影响。研究结果显示硝酸镧对成年雌性小鼠免疫系统具有一定的毒性作用，经口摄入2.0、20.0、200.0 mg·kg^{-1}硝酸镧后能引起机体免疫系统和肠系膜淋巴结局部免疫功能紊乱，产生免疫毒性作用；根据本实验的结果，2.0 mg·kg^{-1}组小鼠出现脾脏和肠系膜淋巴结$CD4^+/CD8^+$值升高和脾T细胞增殖功能降低，20.0、200.0 mg·kg^{-1}组小鼠出现脾B细胞增殖能力降低，200.0 mg·kg^{-1}组小鼠出现脾B细胞比例下降，初步认为，30 d硝酸镧连续染毒引起雌性小鼠免疫系统功能紊乱的最小毒性反应剂量为2.0 mg·kg^{-1}。

参考文献

[1] 包田美，田颖，王丽霞，等. 包头市稀土矿周边居民区环境中镧、铈、镨、钕水平的调查 [J]. 环境与职业医学，2018，35 (2)：158-162.

[2] 梁青青，阴海静，郝金奇，等. 白云鄂博矿区小学生尿中稀土元素镧铈钕水平的调查 [J]. 环境与健康杂志，2014，31 (11)：1003-1004.

[3] 高兆华，孟玉秀，陈清，等. 我国不同类型稀土矿区环境卫生学调查——矿区农民自然生活环境和头发中稀土水平 [J]. 环境科学，1995，16 (4)：78-82.

[4] FENG L，XIAO H，HE X，et al. Long-term effects of lanthanum intake on the neurobehavioral development of the rat [J]. Neurotoxicol Teratol，2006，28 (1)：119-124.

[5] 陈祖义，朱旭东. 稀土元素的骨蓄积性、毒性及其对人群健康的潜在危害 [J]. 生态与农村环境学报，2008，24 (1)：88-91.

[6] LIU J，LI N，MA L，et al. Oxidative injury in the mouse spleen caused by lanthanides [J]. J Alloys Compd，2010，489 (2)：708-713.

[7] MARZEC-WRÓBLEWSKA U，KAMIŃSKI P，ŁAKOTA P，et al. Determination of rare earth elements in human sperm and association with Semen Quality [J]. Arch Environ Contam Toxicol，2015，69 (2)：191-201.

[8] 张卫，任爱国，杨孜，等. 产妇毛发、静脉血及胎儿脐血微量元素相关性分析 [J]. 中国生育健康杂志，2005，16 (4)：209-212.

[9] 彭瑞玲，潘小川，解清，等. 稀土矿区哺乳期婴幼儿及其母亲指血和乳汁中的稀土元素含量 [J]. 中华预防医学杂志，2005，39 (1)：6.

[10] 新国家标准发布茶叶稀土限量标准取消 [J]. 茶世界，2017 (4)：19-21.

[11] FANG H Q，YU Z，ZHI Y，et al. Subchronic oral toxicity evaluation of lanthanum：a 90-day，repeated dose study in rats [J]. Biomed Environ Sci，2018，31 (5)：363-375.

[12] 陈言峰，张小雪，张林达. 镧对小鼠睾丸组织和睾丸酶活力的影响 [J]. 毒理学杂志，2009，23 (1)：28-30.

[13] 朱子玉，沈爱英，沈颂东. 稀土对小鼠卵母细胞成熟和孤雌活化的影响 [J]. 中国公共卫生，2005，21 (3)：281-282.

[14] 陈言峰. 稀土元素镧对雄性小鼠生殖毒性的实验研究 [D]. 贵州：贵州大学，2008.

[15] 杨敬华，刘秋芳，巫生文，等. 生长发育期氯化镧暴露对大鼠海马神经元和神经突触超微结构的影响 [J]. 环境与健康杂志，2010，27 (8)：659-661.

[16] 宋宇，黄可欣，李冬梅，等. 硝酸镧对小鼠特异性抗体的形成、淋巴细胞转化和腹腔巨噬细胞吞噬功能的影响 [J]. 吉林大学学报 (医学版)，2012，38 (6)：1048-1051.

[17] 刘洁. 稀土元素对小鼠免疫和肝功能影响 [D]. 苏州：苏州大学，2010.

[18] 王艳敏，周鸿，刘源. 江西省市售食品中稀土元素污染状况调查 [J]. 中国卫生检验杂志，2017，27 (19)：2854-2857，2860.

[19] 李树蕾，陈曦，聂毓秀，等. 长期口服硝酸稀土对大鼠腺垂体生长激素细胞的影响 [J]. 中国稀土学报，2003，21 (6)：691-694.

[20] 刘佳梅，陈东，王晓明，等. 硝酸镧对大鼠脾脏形态及脾细胞IL-2和IFN-γ分泌水平的影响 [J]. 吉林大学学报 (医学版)，2002，28 (2)：121-123.

[21] 焦冰清，梁春来，杨辉，等. 硝酸镧对大鼠免疫功能影响 [J]. 中国食品卫生杂志，2019，31 (2)：99-105.

（英文编辑：汪源；责任编辑：王晓宇）