

2010, 9 (3): 151-154.

- [6] Fujimoto C, Klinman D M. A suppressive oligodeoxy-nucleotide inhibits ocular inflammation [J]. Clinical and Experimental Immunology, 2009, 156: 528-534.
- [7] Yagci F C, Aslan O. Mammalian telomeric DNA suppresses endotoxin-induced uveitis [J]. J Biol Chem, 2010, 285 (37): 28806-28811.

- [8] Sato T, Shimamoto T, Alvord W G, et al. Suppressive oligodeoxynucleotides inhibit silica-induced pulmonary inflammation [J]. J Immunol, 2008, 180 (11): 7648-7654.

低浓度臭氧暴露对哮喘大鼠支气管肺泡灌洗液炎症因子的影响

Effect of low concentration ozone exposure on inflammatory factor of bronchoalveolar lavage fluid in asthmatic rats

魏明, 刘佳, 涂玲, 梁颖红, 龚艳杰, 张宜花, 张俊华

(郑州大学第五附属医院, 河南 郑州 450052)

摘要: 观察低浓度臭氧 (O_3) 暴露后过敏性哮喘大鼠支气管-肺泡灌洗 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 中炎症细胞及 IL-2 等细胞因子的改变情况。结果显示, 大鼠气道呈变应性炎症改变和气管黏膜损伤加重, 同时支气管-肺泡灌洗液中细胞因子发生改变, 表明 IL-2、IL-6 和 IL-8 等细胞因子在 O_3 介导的气道炎症过程中起重要作用。

关键词: 臭氧; 哮喘; 支气管肺泡灌洗液; 细胞因子

中图分类号: R994 **文献标识码:** B

文章编号: 1002-221X(2014)03-0200-02

DOI: 10.13631/j.cnki.zgggxyx.2014.03.018

臭氧 (O_3) 是光化学烟雾的主要成分, 研究表明 O_3 暴露是哮喘的促发因素, 有多种炎症介质和细胞因子参与了此作用过程^[1]。本研究观察低浓度情况下, O_3 暴露后过敏性哮喘大鼠支气管-肺泡灌洗 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 中炎症细胞及 IL-2 等细胞因子的改变情况, 现报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

取 6~8 周龄雄性 Wistar 大鼠 (郑州大学医学院实验动物中心提供) 60 只, 平均体重 (128 ± 12) g, 在 22~25℃、相对湿度 50%~60% 的清洁环境中分笼饲养, 按随机数字表法分为 4 组: 正常对照组、 O_3 暴露组、哮喘组和 O_3 暴露哮喘组, 每组 15 只。

1.2 主要试剂和仪器

卵清白蛋白 (OVA) 和 O_3 购自美国 Sigma 公司。大鼠 IL-2、IL-6、IL-8、NO ELISA 试剂盒是美国 BD 公司产品。

1.3 动物模型复制

参照文献^[2]方法制备哮喘模型, 取 1 ml 免疫原液 (含卵清白蛋白 100 mg、氢氧化铝 150 mg 及热灭活百日咳杆菌菌苗 5×10^9 个), 采用 sc 多点注射 (两侧腋下、胸部、两侧腹股沟) 和腹腔注射, 同时取免疫原液 1:10 倍稀释, 分别于 1 d、3 d、5 d 超声雾化吸入 20 min 使大鼠致敏; 14 d 用 1% 卵清白蛋白超声雾化吸入 20 min 激发哮喘发作, 15 d、16

d、17 d 各重复 1 次; 非哮喘组用正常对照代替免疫原液及 1% 卵清白蛋白。哮喘组和对照组大鼠, 超声雾化吸入 0.0025% 氯化乙酰胆碱 2 min, 观察刺激前后呼吸幅度、频率与节律变化。

1.4 O_3 暴露

参考文献^[3, 4], 选择 O_3 暴露浓度 0.5 mg/m³, O_3 暴露组和 O_3 暴露哮喘组进行 O_3 暴露; 正常对照组和哮喘组进行过滤 (用活性炭过滤) 空气暴露; 暴露时间为 18 d。各实验组均被急性 1 次暴露, 暴露时间为 3 h。实验采用动态暴露法, 用 O_3 发生器发生 O_3 , 用 8810 型紫外吸收式 O_3 分析仪测定各实验组实际 O_3 暴露水平, 每 30 s 测定并记录 1 次 O_3 浓度值。整个实验过程控制温度和湿度变化在 $\pm 10\%$ 以内。

1.5 标本采集和保存

于 OVA 末次激发 24 h 内麻醉动物, 开腹暴露下腔静脉, 取静脉血 4 ml, 肝素抗凝, 离心并留取上清液, EP 管分装, -80℃ 冰箱中冻存备用。取出左肺组织, 用 PBS 行支气管肺泡灌洗后收 BALF, 回收 BALF 离心后的沉淀用无水乙醇固定, 用细胞片机将一定数量的灌洗液细胞直接平铺在载玻片上, 晾干后 HE 染色, 高倍光学显微镜下计数 200 个细胞进行分类。再用预冷 PBS 清洗后, 放入焦碳酸二乙酯 (DEPC) 处理过的冻存管中, -80℃ 冰箱中冻存备用。右肺中叶石蜡包埋, 称重右肺其余肺组织 100 mg 后置于匀浆容器中, 加入 1 ml 的正常对照, 冰浴匀浆, 离心留取上清液置于 EP 管中, -80℃ 冰箱中冻存备用。

1.6 IL-2、IL-6、IL-8、NO 含量的测定

应用 ELISA 试剂盒检测 IL-2、IL-6、IL-8、NO 水平, 实验步骤按试剂盒说明书进行。根据标准品吸光度 (A) 值, 求出标准曲线回归方程, 将样品 A 值代入标准曲线并乘以相应的稀释倍数, 计算出 IL-2、IL-6、IL-8、NO 浓度。

1.7 统计学处理

采用 SPSS17.0 软件, 所有数据均数 $\pm$ 标准差表示, 多组间比较采用方差分析, 多组样本均数两两比较, 以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 O_3 对支气管-肺泡灌洗液中细胞分类的影响

O_3 暴露组和 O_3 暴露哮喘组 BALF 中嗜酸性细胞、淋巴细

收稿日期: 2013-03-25; 修回日期: 2014-03-21

作者简介: 魏明 (1968—), 男, 副主任技师, 主要从事自身免疫性疾病研究。

胞和中性粒细胞与正常对照组相比均显著增加 ($P < 0.01$), 表明大鼠气道呈变应性炎症改变; 上皮细胞 (脱落上皮细胞) 亦增加, 提示气道黏膜损伤加重; 其中哮喘组大鼠 BALF 炎

症细胞以嗜酸性细胞增加为主, O_3 暴露组以非嗜酸性细胞增加为主, 而 O_3 暴露哮喘组嗜酸性细胞和中性粒细胞均有显著增加, 呈混合浸润型。详见表 1。

表 1 大鼠支气管肺泡灌洗液细胞变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	嗜酸粒细胞	淋巴细胞	巨噬细胞	中性粒细胞	上皮细胞
正常对照组	1.0 ± 0.7	5.0 ± 1.2	92.1 ± 3.0	2.23 ± 1.2	1.7 ± 0.9
哮喘组	25.4 ± 4.5**	12.0 ± 2.9**	48.9 ± 4.2**	10.1 ± 1.5**	4.9 ± 1.5*
O_3 暴露组	4.0 ± 1.4*#	11.8 ± 2.8*	72.4 ± 3.6*#	6.1 ± 1.3*#	6.0 ± 1.2*
O_3 暴露哮喘组	23.1 ± 4.2**	17.8 ± 2.9**	35.2 ± 4.8*	17.2 ± 2.8**	12.1 ± 1.6*

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与臭氧暴露组比较, # $P < 0.05$ 。

2.2 O_3 对支气管-肺泡灌洗液中细胞因子的影响

哮喘组 IL-2 显著高于正常对照组 ($P < 0.01$), O_3 暴露组 IL-2 和 IL-6 显著高于正常对照组 ($P < 0.01$), O_3 暴露哮喘组 IL-2、IL-6 和 IL-8 均显著高于正常对照组, O_3 暴露组和哮喘组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。见表 2。

表 2 大鼠支气管肺泡灌洗液细胞因子变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	IL-2 ($\mu\text{g/L}$)	IL-6 (ng/L)	IL-8 ($\mu\text{g/L}$)
正常对照组	1.48 ± 0.24	66.3 ± 16	0.23 ± 0.07
哮喘组	2.41 ± 0.37*	69.8 ± 17*	0.27 ± 0.06
O_3 暴露组	3.10 ± 0.42*#	109.6 ± 14*#	0.31 ± 0.08
O_3 暴露哮喘组	3.46 ± 0.45*#	121.4 ± 12*#	0.56 ± 0.12*#

注: 与对照组比较, * $P < 0.01$; 与哮喘组比较, # $P < 0.01$ 。

2.3 臭氧对支气管-肺泡灌洗液中 NO 水平的影响

各实验组大鼠 BALF 中 NO 水平与正常对照组比较均有显著增加 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), O_3 暴露哮喘组显著高于 O_3 暴露组 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 大鼠支气管肺泡灌洗液中 NO 变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	NO ($\mu\text{mol/L}$)
正常对照组	11.2 ± 3.4
哮喘组	23.1 ± 5.6*
O_3 暴露组	15.2 ± 5.9*
O_3 暴露哮喘组	27.8 ± 5.4#

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与哮喘组比较, # $P < 0.05$ 。

3 讨论

本实验结果显示, 正常对照组以非嗜酸性细胞增加为主, 而哮喘组呈嗜酸性细胞和中性粒细胞混合浸润型, 表明 O_3 暴露后大鼠气道呈变应性炎症反应, 并且表现为不同类型的炎症细胞浸润。有学者^[9]认为哮喘患者气道炎症细胞呈混合浸润时嗜酸性细胞脱颗粒最明显。近年证实, NO 这一高效而多样性的生物调节分子与免疫系统关系密切, 可直接参与细胞因子特别是与炎症有关的细胞因子的调节。 O_3 暴露 (6 mg/ m^3 , 6 h) 使正常大鼠肺诱生型一氧化氮合酶 (iNOS) mRNA 表达增加, 并在暴露后 2 h 达到最大值^[9], 与本研究正常对照组大鼠在 O_3 暴露前后 NO 变化结果一致。NO 可能是通过上调 IL-8 水平从而在 O_3 暴露后的持续性气道炎症过程中起重要作用^[9]。

有学者研究发现 0.44 mg/ m^3 O_3 暴露 4 h 后, 早期可使 IL-6 和 IL-8 分别增加 10 和 6 倍, 且与后来多形核细胞 (polymorphonuclearneutrophils, PMNs) 的增加相关。另有学者^[8]观察了中性粒细胞聚集和 T 细胞在急性炎症反应中的作用, 发现

健康人 O_3 暴露 (0.4 mg/ m^3 2 h, 最小通气量 30 L/min) 后 BALF 中 PMNs 和上皮细胞增加了 3 倍, 并伴随 IL-8、肿瘤生长相关因子- α 和总蛋白浓度升高, 且 IL-8 及肿瘤生长相关因子- α 与 BALF 中 PMNs 的比例呈正相关。本实验结果显示, O_3 暴露组、哮喘组和 O_3 暴露哮喘组大鼠 BALF 中 IL-2 水平与正常对照组比较均有显著增加, 提示 IL-2 在 O_3 介导的急性呼吸道炎症反应过程中起重要作用; IL-6 在 O_3 暴露后 (O_3 暴露组和 O_3 暴露哮喘组) 显著高于对照组, 表明 IL-6 在 O_3 介导的炎症反应中是一必要介质; IL-8 在 O_3 介导的急性呼吸道炎症反应过程中起关键作用, 本实验 IL-8 仅在 O_3 暴露哮喘组显著增加, 提示哮喘大鼠在 O_3 暴露后存在更为严重的气道炎症反应。

总之, 低浓度 O_3 急性暴露可加重哮喘大鼠变应性气道炎症反应, IL-2、IL-6 和 IL-8 等细胞因子在 O_3 介导的气道炎症过程中起重要作用, NO 在该过程中的作用有待进一步探讨。

参考文献:

- [1] 魏明, 酒涛, 涂玲. 膀胱癌 CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ 调节性 T 淋巴细胞数量和分布及 Foxp3 基因表达与肿瘤分期的相关性研究 [J]. 中华实验外科杂志, 2011, 28 (6): 1005-1006.
- [2] 李翔, 王笑梅, 张坚松. 两种气道高反应大鼠模型的建立与比较 [J]. 湖南师范大学学报 (医学版), 2009, 6 (1): 45-47.
- [3] Paulu C, Smith A E. Tracking associations between ambient ozone and asthma-related emergency department visits using case-crossover analysis [J]. J Pub Heal Man and Prac, 2008, 14 (3): 723-726.
- [4] Krishna M T, Madden J, Teran L M, et al. Effects of 0.2 ppm ozone on biomarkers of inflammation in bronchoalveolar lavage fluid and bronchial mucosa of healthy subjects [J]. Eur Respir J, 1998, 11 (10): 1294-1300.
- [5] Gibson P G, Norzila M Z, Fakes K, et al. Pattern of airway inflammation and its determinants in children with acute severe asthma [J]. Pediatr Pulmonol, 1999, 28 (4): 261-270.
- [6] Haddad E B, Liu S F, Salmon M, et al. Expression of inducible nitric oxide synthase mRNA in brown Norway rats exposed to ozone: effect of dexamethasone [J]. Eur J Pharmacol, 1995, 293 (3): 287-290.
- [7] Inoue H, Aizawa H, Nakarm H, et al. Nitric oxide synthase inhibitors attenuate ozone-induced airway inflammation in guinea pigs. Possible role of intedeuldn-8 [J]. Am J Respir Care Met, 2000, 161 (1): 249-256.
- [8] Torres A, Utell M J, Morow P E, et al. Airway inflammation in smokers and nonsmokers with varying responsiveness to ozone [J]. Am J Respir Care Met, 1997, 156 (3 Pt 1): 728-736.