

矽肺大鼠肺脏对不同侵入途径、不同抗原的免疫应答

汤俊豪, 黄曙海, 葛宪民, 潘瑞辉, 郑艳艳, 欧军荣, 周少诗

(广西职业病防治研究所, 广西 南宁 530021)

摘要: 目的 通过观察矽肺大鼠肺脏对不同途径、不同抗原的免疫应答, 探讨矽肺易受感染的免疫学机制。方法 分别 2 次通过气道、腹腔途径给予矽肺大鼠模型及正常对照动物绵羊红细胞 (SRBC) 或卡介苗 (BCG) 进行免疫后, 再观察皮内注射 SRBC 及 BCG 动物迟发性变态反应; 实验终期检测血清和肺灌洗回收液特异性 IgG 水平及细胞因子浓度。结果 SRBC 免疫后矽肺气道免疫组表现出异常强烈的迟发性变态反应, 矽肺气道 BCG 免疫各组出现相同反应; 两种抗原免疫后矽肺动物血清及肺灌洗液特异性 IgG 水平显著高于正常对照组; BCG 免疫动物中, 矽肺气道免疫组动物肺灌洗液 IFN- γ 水平显著高于矽肺腹腔免疫组及正常对照组, 3 个组的 TNF- α 水平差异无显著性; SRBC 免疫动物 3 个组的 IFN- γ 水平差异无显著性。结论 矽肺对肺局部以及机体免疫功能具有明显影响, 导致对外来抗原产生异常强烈的体液免疫反应和迟发性变态反应; 肺局部参与细胞免疫调节的细胞因子对不同抗原有不同反应。

关键词: 矽肺大鼠; SRBC 抗原; BCG 抗原; 免疫应答; 细胞因子

中图分类号: R135.2; R392 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2003)06-0338-04

Immune response to varied antigen via different portals of entry in the lungs of silicotic rats

TANG Jun-hao, HUANG Shu-hai, GE Xian-min, PAN Rui-hui, ZHENG Yan-yan, OU Jun-rong, ZHOU Shao-shi

(Guangxi Institute for Occupational Health, Nanning 530021, China)

Abstract: **Objective** To observe immune response to varied antigen via different portals of entry in the lungs of silicotic rats and to explore immunologic mechanism of susceptibility of infection in silicotics. **Method** Silicotic rats were immunized with sheep red blood cells (SRBC) or Bacille Calmette Guérin (BCG) via intratracheal and intraperitoneal injections. Normal rats were instilled intratracheally with normal saline as controls. Delayed type hypersensitivity (DTH) reaction was induced by intracutaneous injection of SRBC or BCG. Levels of specific anti SRBC IgG, anti-BCG IgG and cytokines (e.g., interferon γ , INF- γ , tumor necrosis factor α , TNF- α) were measured in their serum and bronchoalveolar lavage fluids (BALF) at the end stage of the study. **Result** Significantly stronger DTH reaction was observed in silicotic rats with intratracheal SRBC immunization, as well as in those with intratracheal BCG immunization, than that in controls. Levels of anti-SRBC IgG and anti-BCG IgG both in serum and BALF were significantly higher in silicotic rats immunized either intratracheally or intraperitoneally than in those without immunization. Level of INF- γ in BALF was significantly higher in those with intratracheal BCG immunization than that in those with intraperitoneal route. There was no significant difference in levels of TNF- α and INF- γ between the three groups of rats. **Conclusion** Silicosis might induce stronger humoral immune response and DTH to some antigens, and the cytokines which mediate cellular immune reaction, responded differently to various antigens.

Key words: Silicotic rats; Sheep red blood cell (SRBC); Bacille Calmette Guérin (BCG); Immune response; Cytokines

流行病学调查提示, 矽肺患者中 19.35% 并发结核, 此外矽肺患者还易发生呼吸系统感染, 类风湿尘肺 (Caplan 综合征), 表明矽肺病变过程中伴随着肺局部和全身的免疫功能异常。矽肺合并结核后, 病变相互促进、病情复杂, 抗结核治疗的效果很差, 是矽肺的重要死亡原因。目前矽肺患者易感结核及其他呼吸系统感染的免疫机制尚不清楚, 本研究分别通过矽

肺大鼠气道和腹腔注入绵羊红细胞或卡介苗抗原, 观察不同途径抗原刺激后矽肺动物肺脏的免疫应答表现, 探讨矽肺易感结核等呼吸系统感染的免疫学基础。

1 材料与方法

1.1 矽肺动物模型制备

选择体重 180~200 g 清洁级雄性 SD 大鼠 (中山大学实验动物中心提供) 102 只, 其中 72 只大鼠乙醚麻醉后气道注入 20 mg 石英粉尘 (中国预防医学科学院提供) 悬液, 45 d 后第二次染尘, 染尘量 20 mg。粉尘悬液以及器械严格消毒, 染尘时无菌操作, 悬液中未加抗生素, 以免影响矽肺动物对抗原的免疫

收稿日期: 2003-02-24

基金项目: 广西留学回国人员科学基金 (桂科回 0009010); 广西“十百千人才工程”专项基金 (2000226)

作者简介: 汤俊豪 (1962—), 男, 从事劳动卫生及免疫毒理学工作。

应答。其余 30 只气道注入生理盐水作为正常对照组。实验过程中大鼠在洁净动物饲养柜中饲养, 可达到清洁级动物饲养要求。

1.2 实验动物分组和肺内抗原免疫

根据抗原种类、免疫途径将动物随机分为矽肺绵羊红细胞 (SRBC) 气道免疫组 (1 组, 7 只)、矽肺 SRBC 腹腔免疫组 (2 组, 7 只)、正常 SRBC 气道免疫组 (3 组, 6 只)、矽肺卡介苗 (BCG) 气道免疫组 (4 组, 7 只)、矽肺 BCG 腹腔免疫组 (5 组, 7 只)、正常 BCG 气道免疫组 (6 组, 6 只)。第一次染尘后 25 d 按各组相应抗原及相应途径进行初次免疫, 二次染尘后 30 d 再次以同等量相同抗原通过相同途径进行二次免疫。其中, 第 1 至第 3 组每次每只动物给予 5×10^8 个 SRBC, 第 4 至第 6 组每次每只动物给予 0.25 mg BCG 进行免疫。

1.3 迟发性变态反应 (DTH) 测定

1.3.1 SRBC 抗原免疫 DTH 测定 第 1 至第 3 组第二次 SRBC 免疫后 20 d, 大鼠背部右侧皮内注射 SRBC, 左侧注入等量生理盐水, 于 24 h 用游标卡尺测量皮疹直径。

1.3.2 BCG 抗原免疫 DTH 测定 第 4 至第 6 组二次抗原免疫 20 d, 大鼠右侧皮内注射 BCG, 左侧注入等量生理盐水, 24 h 测量皮疹直径。

1.4 肺灌洗

实验终期 (第 1 至第 3 组第二次免疫后 27 d、第 4 至第 6 组第二次免疫后第 35 d) 股动脉放血处死大鼠, 收集血液分离血清, 对大鼠行肺灌洗术并回收灌洗液 (BALF), 测定血清以及 BALF 中特异性 IgG、TNF- α 、IFN- γ 含量。

1.5 血清及 BALF 特异性 IgG 测定

1.5.1 第 1 至第 3 组血清特异性抗 SRBC-IgG 测定 采用酶联免疫吸附 (ELISA) 法, 用本室制备的 SRBC 膜抗原包被酶标板, 牛血清白蛋白 (Sigma) 封闭后

加入待测血清, 酶标抗体为兔抗大鼠 IgG-HRP (Sigma), 底物为 OPD (Sigma), 在 $\Sigma 960$ 全自动酶标仪 490 nm 波长处读取吸光度 A 值, 结果以 A_{490 nm} 表示。

1.5.2 第 4 至第 6 组特异性抗 BCG-IgG 测定 2.5 mg/L 结核菌纯蛋白抗原 (PPD, 兰州生物制品研究所) 包被酶标板, 余操作同特异性抗 SRBC-IgG 测定。

1.6 血清及 BALF 中 TNF- α 、IFN- γ 测定

采用晶美生物工程 (北京) 有限公司大鼠 TNF- α 、IFN- γ 试剂盒, 按试剂盒提供的方法测定。

1.7 数据统计学处理

以均数和标准差表示各组观察指标, 各指标组间差异显著性用 SPSS 8.0 统计软件分析, 计量资料用 t 检验。

2 结果

2.1 迟发性变态反应

表 1 结果可见, (1) 对 SRBC 抗原的迟发性变态反应, 皮内注射抗原 24 h 矽肺气道免疫组动物阳性反应 (红斑硬结直径 > 5 mm) 例数明显高于矽肺腹腔免疫及正常气道免疫组, 且多数动物在红斑的基础上有水泡形成, 72 h 全部阳性反应动物出现结痂, 显示出强烈的迟发性变态反应; 正常对照组大多数动物在 48 h 后已完全消退。(2) 对 BCG 抗原的迟发性变态反应, 皮内注射抗原 24 h 后, 各组盐水对照部位均无红肿现象, BCG 免疫部位有轻微红肿, 矽肺气道免疫组、矽肺腹腔免疫组、正常气道免疫组皮疹直径均值差异无显著性。

2.2 实验动物血清特异性 IgG 水平及细胞因子含量

表 2 结果显示, 动物实验终期各组特异性 IgG 水平以矽肺气道免疫组最高, 矽肺腹腔免疫组次之, 正常气道免疫组为最低, 各组间差异有显著性 ($P < 0.01$)。

表 1 实验动物 DTH 测定结果

序号	组别	动物数	mm					
			24 h		48 h		72 h	
			阳性数	$\bar{x} \pm s$	阳性数	$\bar{x} \pm s$	阳性数	$\bar{x} \pm s$
1	矽肺 SRBC 气道免疫	7	7	13.2 $\pm$ 2.5 $\square$	7	12.1 $\pm$ 2.8	7	11.0 $\pm$ 2.5
2	矽肺 SRBC 腹腔免疫	7	2	14.7 $\pm$ 0.2	2	8.1 $\pm$ 5.9	1	11.1
3	正常 SRBC 气道免疫	6	4	7.1 $\pm$ 1.2	1	5.5	1	6.7
4	矽肺 BCG 气道免疫	7	6	6.0 $\pm$ 0.7	0	0	0	0
5	矽肺 BCG 腹腔免疫	7	5	5.8 $\pm$ 0.5	0	0	0	0
6	正常 BCG 气道免疫	6	3	5.9 $\pm$ 0.3	0	0	0	0

1 组、2 组与 3 组比较, $P < 0.01$; 1 组与 2 组比较, $\square P < 0.01$

表 2 实验动物血清特异性 IgG 及细胞因子测定结果 ($\bar{x} \pm s$)

序号	组别	动物数	特异性 IgG ($A_{490\text{nm}}$ 值)	细胞因子浓度 ($\mu\text{g/L}$)	
				IFN- γ	TNF- α
1	矽肺 SRBC 气道免疫	7	2.52 $\pm$ 0.18 □	39.2 $\pm$ 12.0	201.4 $\pm$ 20.8
2	矽肺 SRBC 腹腔免疫	7	1.93 $\pm$ 0.33	36.4 $\pm$ 22.4	217.1 $\pm$ 64.1
3	正常 SRBC 气道免疫	6	1.25 $\pm$ 0.25	63.7 $\pm$ 47.6	228.3 $\pm$ 111.4
4	矽肺 BCG 气道免疫	7	0.47 $\pm$ 0.26 ■	41.1 $\pm$ 12.5	182.1 $\pm$ 46.4
5	矽肺 BCG 腹腔免疫	7	0.74 $\pm$ 0.48 ■	61.3 $\pm$ 46.3	228.6 $\pm$ 67.1
6	正常 BCG 气道免疫	6	0.23 $\pm$ 0.21	10.5 $\pm$ 8.6	203.6 $\pm$ 28.6

1 组、2 组与 3 组比较, $P<0.01$; 1 组与 2 组比较, □ $P<0.01$; 4 组、5 组与 6 组比较, ■ $P<0.05$ 。

2.3 实验动物 BALF 特异性 IgG 水平及细胞因子含量

BALF 中特异性 IgG 以矽肺气道免疫组水平最高, 矽肺腹腔免疫组次之, 正常气道免疫组最弱, 各组间差异有显著性 ($P<0.01$)。矽肺气道免疫动物中 (1 组与 4 组相比较) IFN- γ 含量在不同抗原间差异有显著性 ($P<0.01$), 以 BCG 抗原免疫组浓度较高, 以

SRBC 抗原免疫的实验动物, 各组间差异无显著性; 以 BCG 抗原免疫的实验动物, 以矽肺气道免疫组浓度最高, 矽肺腹腔免疫组次之, 正常气道免疫组最弱, 组间差异有显著性 ($P<0.01$)。TNF- α 不同抗原间差异有显著性 ($P<0.05$), 以 BCG 抗原免疫组浓度较高。结果见表 3。

表 3 实验动物 BALF 特异性 IgG 及细胞因子测定结果 ($\bar{x} \pm s$)

序号	组别	动物数	特异性 IgG ($A_{490\text{nm}}$ 值)	细胞因子浓度 ($\mu\text{g/L}$)	
				IFN- γ	TNF- α
1	矽肺 SRBC 气道免疫	7	1.20 $\pm$ 1.20 □	186.9 $\pm$ 81.4 △△	237.5 $\pm$ 118.8 △
2	矽肺 SRBC 腹腔免疫	7	1.01 $\pm$ 0.16 □	257.5 $\pm$ 131.0	346.3 $\pm$ 259.9
3	正常 SRBC 气道免疫	6	0.09 $\pm$ 0.09	194.1 $\pm$ 135.9	156.3 $\pm$ 152.2
4	矽肺 BCG 气道免疫	7	1.22 $\pm$ 0.65 ■	593.1 $\pm$ 267.1 ●	444.4 $\pm$ 193.1
5	矽肺 BCG 腹腔免疫	7	0.80 $\pm$ 0.58 *	196.6 $\pm$ 135.2	306.3 $\pm$ 165.7
6	正常 BCG 气道免疫	6	0.20 $\pm$ 0.25	183.8 $\pm$ 124.8	300.0 $\pm$ 166.9

1 组、2 组与 3 组比较, $P<0.01$; 1 组与 2 组比较, □ $P<0.05$; 4 组与 6 组比较, ■ $P<0.01$; 5 组与 6 组比较, * $P<0.05$; 1 组与 4 组比较, △ $P<0.05$, △△ $P<0.01$; 4 组与 5 组比较, ● $P<0.01$ 。

3 讨论

据报道, 矽肺死亡病例中, 死于呼吸系统疾病者占 59.34%, 其中, 肺结核死亡病例为 34.25%^[1]。有资料显示, 矽肺的存在增加了机体对结核的易感性, 而结核病的发生又进一步加剧了矽肺间质纤维化的发展^[2]。矽肺患者或长期接触二氧化硅粉尘的作业人员常出现免疫功能异常表现, 如不同作业工种工人血清 IgG、IgM、IgA、IgE 呈现多克隆升高, 抗核抗体、风湿因子、循环免疫复合物 (CIC) 异常增加^[3~6]。表明该人群机体一方面存在着体液免疫功能亢进, 另一方面临床上又表现出肺局部易受感染, 发生这种现象的免疫学机制目前还不清楚。

本研究以不同抗原 (SRBC 及 BCG) 经不同途径 (气道和腹腔) 对矽肺动物模型进行免疫刺激, 观察实验动物被诱发的免疫应答。实验中我们观察到血清特异性 IgG 在两种抗原诱发的免疫应答中, 矽肺动物均较正常动物反应强烈, 不同途径或不同抗原引发的 IgG 反应强度有差异性。有文献报道, 矽肺病变的发生发展是引起机体对外来抗原体液免疫异常的原因,

而且在没有受到抗原攻击的情况下多克隆体液免疫异常亢进的现象已经存在^[7]。我们还观察到, SRBC 可引起矽肺动物异常强烈的 DTH 反应。通常认为, DTH 和细胞介导的免疫反应 (CMI) 是同一免疫过程的两个方面, DTH 是 CMI 的标志, DTH 反应越强, 则表明 CMI 功能越强。而近来随着对肺结核免疫机制的深入研究, 越来越多的观点认为, DTH 和细胞介导免疫 (CMI) 并不完全一致, 甚至是两种不同的免疫学反应。结核菌体中的 RNA 能激发 CMI, 但无 DTH, 而结核菌蛋白及脂质仅引起 DTH, 而不引起 CMI; 糖蛋白引起特异性抗体反应, 但不产生 CMI。其次, 介导反应的 T 细胞亚群不同, 介导 DTH 的是 T_{DTH}, 而介导 CMI 的是 Th1。菌量或抗原负荷差异导致 Th1/Th2 平衡偏移, 菌量大、毒性强时, 向 Th2 偏移, 出现以 DTH 为主的反应; 菌量少、毒性弱时, 以 Th1 介导的 CMI 为主。CMI 激活 M Φ 杀灭吞噬的细菌, DTH 杀死含菌未激活的 M Φ 以及邻近组织^[8]。因此, 当机体以 CMI 反应为主时可清除细菌, 而当 DTH 反应占优势时会导致组织损伤。本实验中, SRBC 引起矽肺动物

强烈的 DTH 反应并不意味着矽肺动物机体 CMI 增强。CMI 是由辅助性 T 细胞中的 Th1 细胞介导,对体液免疫的调节主要是通过 Th1 分泌 IFN- γ , IFN- γ 抑制 Th0 向 Th2 分化对体液免疫进行调节。本实验 SRBC 免疫矽肺动物 BALF 中的特异性 IgG 水平存在明显的组间差异,这种差异与矽肺病变有直接联系,但各组间 IFN- γ 浓度差异无显著性。相反,BCG 不同途径免疫未能引出矽肺动物的强烈的 DTH 反应,但经气道 BCG 免疫的矽肺动物 BALF 中,IFN- γ 的含量却明显高于相同抗原但不同途径免疫的矽肺对照组以及相同免疫途径的无矽肺对照组,这一现象提示矽肺的病理改变影响了肺组织对不同抗原的免疫应答,使机体对某些抗原产生异常强烈的 DTH 反应。矽肺的发病机制目前仍不完全清楚,但肺巨噬细胞在矽肺的发生发展过程中是一关键环节已得到确认^[9]。我们在同一项目研究中发现矽肺动物肺泡巨噬细胞吞噬 SRBC 功能受损^[10]。肺泡巨噬细胞是肺脏主要的抗原递呈细胞,一旦功能受损,对抗原的处理能力下降或消失,将会影响其将抗原信息正确传递给 Th 细胞的能力。以上分析说明,矽肺患者呼吸道易受感染,尤其是结核菌感染的免疫学机制可能与矽尘对肺泡巨噬细胞的毒性作用有关。矽尘使巨噬细胞死亡,吞噬功能受损,分泌免疫调节细胞因子的功能异常,导致免疫功能异常,加上肺部弥漫性纤维化使肺部血液循环和淋巴循

环不畅,这些因素都可能导致矽肺患者呼吸道易受感染,尤其是结核的感染。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国卫生部、全国尘肺流行病学调查办公室. 全国尘肺流行病学调查研究资料集 (1948~1986) [M]. 第 2 版. 北京: 北京医科大学协和医科大学联合出版社, 1992. 526.
- [2] Hong Kong Chest Service/Tuberculosis Research Centre, Madras/ British Medical Research Council. A double-blind placebo-controlled clinical trial of three antituberculosis chemoprophylaxis regimens in patients with silicosis in Hong Kong [J]. Am Rev Respir Dis, 1992, 145: 36-41.
- [3] Doll NJ, Stankus RP, Hughes J, et al. Immune complexes and autoantibodies in silicosis [J]. J Allergy Clin Immunol, 1981, 68: 281-285.
- [4] Kamik AB, Saiyed HN, Nigam SK. Humoral immunological dysfunction in silicosis [J]. Ind Med Res, 1990, 92: 440-442.
- [5] Nigam SK, Saiyed HN, Makviya R, et al. Role of circulating immune complexes in the immunopathogenesis of silicosis [J]. Toxicol Lett, 1990, 51: 315-320.
- [6] Nagoka T, Tabata M, Kobayashi K, et al. Studies on production of anticollagen antibodies in silicosis [J]. Environ Res, 1993, 60: 12-29.
- [7] Huang SH, Hubbs AH, Weissman DN, et al. Immunoglobulin responses to experimental silicosis [J]. Toxicol Science, 2001, 59: 108-117.
- [8] 谢惠安 阳国太, 林善梓, 等. 现代结核病学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000. 151.
- [9] 何凤生 王世俊, 任引津, 等. 中华职业医学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1999. 813.
- [10] 黄曙海, 葛宪民, 潘瑞辉, 等. 大鼠矽肺模型对绵羊红细胞抗原的免疫应答 [J]. 中华劳动卫生与职业病杂志, 2002, 20: 440-443.

· 消 息 ·

中华预防医学会系列杂志 2002 年评优工作结束

为提高中华预防医学会系列杂志的政治、学术、编辑、出版质量,中华预防医学会在 2002 年期刊审读的基础上,开展了系列杂志评优活动。在广西北海召开的中华预防医学会 2003 年编辑出版工作会议上,对此次评优活动的获奖期刊予以了表彰。

此次评优活动是中华预防医学会组织的规模最大的一次,共有 54 本期刊参加,采取专家审读与分项打分的方法,评出优秀期刊一等奖 2 名、二等奖 7 名、三等奖 8 名及优秀编辑质量、学术质量、出版质量等单项奖若干。

一等奖: 中华劳动卫生职业病、中华医院感染

二等奖: 家庭医学、中国公共卫生、中国工业医学、中国职业医学、工业卫生与职业病、卫生毒理、环境与职业医学

《中国工业医学杂志》此次获奖,与各级领导的关心支持、专家们的精心扶植、编辑部同志的辛勤努力是分不开的。本刊编辑部将以此为契机,发扬成绩,查找不足,使杂志工作再上新台阶。

《中国工业医学杂志》第三届编委会特邀编委名单

(以姓氏笔画为序) 王广松 王广荣 王世文 王景江 马永志 孙志杰 孙金艳 李建国 李晓军 李群力 刘宝英 刘金玲 吕金标 朱崇法 陈建超 陈葆春 杜秀兰 汤乃军 肖吕武 肖全华 严雁翎 张一峰 罗颖 杨晓发 岳宏微 郭平 欧阳毅 徐忠玉 魏玉苗