

低浓度二氧化硫对哮喘大鼠 CD4⁺ CD 25⁺ 调节性 T 细胞及转录因子 Foxp3 表达的影响

魏明

(郑州大学第五附属医院, 河南 郑州 450052)

摘要: 目的 探讨低浓度二氧化硫(sulfurdioxide, SO₂) 暴露对哮喘大鼠 CD4⁺ CD 25⁺ 调节性 T 细胞(regulatory T cells, Treg) 数量及转录因子 Foxp3 表达的影响。方法 将 60 只雄性 Wistar 大鼠按随机数字表法分为正常对照组、低浓度 SO₂ 暴露组、哮喘组和低浓度 SO₂ 暴露哮喘组, 每组 15 只; 哮喘组采用卵清白蛋白(OVA) 致敏并吸入激发制备哮喘模型, 正常对照组吸入雾化生理盐水, 低浓度 SO₂ 暴露组采用吸入低浓度 SO₂, 低浓度 SO₂ 暴露哮喘组于每日雾化激发 OVA 前给予低浓度 SO₂ 吸入。采用流式细胞术检测外周血 CD4⁺ CD 25⁺ Treg 细胞占 CD4⁺ T 细胞的比例, 酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 检测外周血和肺组织 γ -干扰素(interferon- γ , γ -INF) 以及白细胞介素-4(interleukin-4, IL-4) 含量; Western blot 检测肺组织 Foxp3 蛋白表达水平。结果 哮喘组大鼠 CD4⁺ CD 25⁺ Treg 为 (5.78 ± 1.26)%, 低于正常对照组的 (9.63 ± 1.37)%; 低浓度 SO₂ 暴露哮喘组为 (3.15 ± 0.82)%, 低于正常对照组和哮喘组, 差异有统计学意义 (P 均 < 0.01)。哮喘组大鼠血浆和肺组织中 IL-4 含量 [23.51 ± 4.86) ng/L 和 (0.93 ± 0.16) ng/L] 高于正常对照组 [11.24 ± 2.53) ng/L 和 (0.29 ± 0.06) ng/L], 差异有统计学意义 (P 均 < 0.01); 低浓度 SO₂ 暴露哮喘组血浆和肺组织中 IL-4 含量 [36.73 ± 7.46) ng/L 和 (1.67 ± 0.41) ng/L] 高于正常对照组和哮喘组, 差异有统计学意义 (P 均 < 0.01); 哮喘组血浆和肺组织中 γ -INF 含量 [63.82 ± 21.78) ng/L 和 (0.49 ± 0.15) ng/L] 低于正常对照组 [156.98 ± 60.23) ng/L 和 (1.58 ± 0.18) ng/L], 差异有统计学意义 (P < 0.01), 低浓度 SO₂ 暴露哮喘组 γ -INF 含量 [(10.02 ± 1.68) ng/L 和 (0.43 ± 0.12) ng/L] 低于正常对照组和哮喘组, 差异有统计学意义 (P < 0.01)。哮喘组 Foxp3 蛋白表达为 (8.23 ± 0.56), 低于正常对照组的 (11.87 ± 0.65) (P < 0.05); 低浓度 SO₂ 暴露哮喘组为 (6.05 ± 0.36), 低于正常对照组和哮喘组 (P < 0.05)。结论 低浓度 SO₂ 暴露可能通过下调 CD4⁺ CD 25⁺ Treg 数量并抑制 Foxp3 蛋白表达, 进一步加重哮喘的 Th1/Th2 比例失衡, 可能是诱发哮喘发病的因素。

关键词: 哮喘; 低浓度 SO₂; T 淋巴细胞; 调节性; 转录因子

中图分类号: R992; O613.51

文献标识码: A

文章编号: 1002-221X(2013)01-0010-06

Effect of low concentration sulfurdioxide on regulatory T cells and transcription factor Foxp3 in asthmatic rats

WEI Ming

(Department of Clinical Laboratory, The Fifth Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of low level sulfurdioxide (SO₂) exposure on the amount of CD4⁺ CD 25⁺ regulatory T cells (Treg) and expression of transcription factor Foxp3 in asthmatic rats. **Methods** Sixty male Wistar rats were divided into 4 groups ($n=15$ for each group) according to random digits table, they were normal control group, SO₂ exposure group, asthmatic group (by inhaling aerosolized ovalbumin) and combined OVA and SO₂ exposure group. 8 weeks later, the percentage of CD4⁺ CD 25⁺ T cells was determined by flow cytometry analysis, the levels of interleukin-4 (IL-4) and interferon- γ (γ -INF) in peripheral blood and lung homogenates were measured by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), while the protein expression of Foxp3 in the lung tissues was detected by Western blot. **Results** The percentage of CD4⁺ CD 25⁺ T cells in asthmatic group (5.78 ± 1.26)% was significantly lower than that of normal control group [(9.63 ± 1.37)%, P < 0.01], this percentage in low level SO₂ exposure plus asthmatic group (3.15 ± 0.82)% was remarkably lower than that of normal control group and asthmatic group (P < 0.01). IL-4 levels both in plasma (23.51 ± 4.86) ng/L and lung (0.93 ± 0.16) ng/L were significantly increased in asthmatic rats compared with normal control group [(11.24 ± 2.53) ng/L and (0.29 ± 0.06) ng/L respectively, P < 0.01]; the levels mentioned above in SO₂ exposed group [(36.73 ± 7.46) ng/L and (1.67 ± 0.41) ng/L, respectively] were also significantly higher than that of control and asthmatic groups (P < 0.01). The γ -INF levels of plasma (63.82 ± 21.78) ng/L and lung tissues (0.49 ± 0.15) ng/L in asthmatic group significantly decreased compared with the normal control group [(156.98 ± 60.23) ng/L and (1.58 ± 0.18) ng/L, respectively, P < 0.01], and these levels in

收稿日期: 2012-06-25; 修回日期: 2012-09-04

作者简介: 魏明 (1968—), 男, 副主任技师, 研究方向: 哮喘发病机制。

asthmatic plus SO₂ group [10.02 ± 1.68] ng/L and [0.43 ± 0.12] ng/L were all significantly lowered compared with asthmatic group and normal control group ($P < 0.01$). As for protein expression of Foxp3, the level in asthmatic group (8.23 ± 0.56) was lower than that of normal control group (11.87 ± 0.65, $P < 0.05$), while the level in asthmatic plus SO₂ group (6.05 ± 0.36) was also lower than that of normal control group and asthmatic group ($P < 0.05$). **Conclusion** The results suggested that low level SO₂ exposure may down regulate the amount of CD4⁺CD25⁺Treg cells and inhibit the expression of Foxp3, thereby further aggravate the disbalance of Th1/Th2 ratio in asthma, which may be one of the important factors to trigger asthma seizures.

Key words: asthma; low concentration sulfurdioxide; T-lymphocyte; regulatory; transcription factor

随着世界各国工业化的进展,人们在享受工业文明带来的富裕与舒适的同时,也承受着环境污染对人类健康的危害。在过去几十年中,哮喘的发病率显著上升,其上升速度之快,无法用遗传基因的改变来解释^[1~3]。因此人们考虑哮喘发病率升高是否与日益加重的空气污染有关。国内外的流行病学调查显示,哮喘发病率的上升与空气污染密切相关^[4]。二氧化硫(SO₂)是大气污染物中的最主要成分,它是一种辛辣、窒息性气体,能使呼吸系统生理功能减退,肺泡弹性减弱,肺功能降低,引起气管炎、支气管哮喘、肺气肿等^[5]。本实验模拟空气中 SO₂ 的浓度作为刺激因子,在大鼠吸入 SO₂ 后,通过电生理的方法测定大鼠气道的反应性,以及支气管肺泡灌洗和肺组织病理切片 HE 染色的方法,观察吸入 SO₂ 后对大鼠气道炎症和气道反应性的影响。并分析 SO₂ 暴露对哮喘大鼠 CD4⁺CD25⁺Treg 数量及 Foxp3 表达有何影响,旨在探讨 SO₂ 损伤气道诱发哮喘及慢性气管炎的机制,为呼吸系统疾病如哮喘的防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

取 6~8 周龄雄性(清洁级)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 ± 15) g,在 22~25℃、相对湿度 50%~60% 的清洁环境中分笼饲养,采用 12/12 h 照明,按随机数字表法分为 4 组:正常对照组、SO₂ 暴露组、哮喘组和 SO₂ 暴露哮喘组,每组 15 只。

1.2 主要试剂和仪器

卵清白蛋白(OVA)和低浓度 SO₂ 购自美国 Sigma 公司。大鼠 γ-干扰素(γ-INF)和白细胞介素-4(IL-4) ELISA 试剂盒(美国 BD 公司),抗大鼠 Foxp3 和 β-肌动蛋白的单克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司),藻红蛋白(PE)标记抗大鼠 CD4。单克隆抗体和异硫氰酸荧光素(FITC)标记抗大鼠 CD25 单克隆抗体为美国 Biolengend 公司产品。FASCCalibur 流式细胞仪(美国 BD 公司),半干转移仪和电泳仪(美国 Hoefer Scientific Instruments 公司),超声波细胞粉碎

机(宁波新芝科器研究所),KC-6120 型综合采样器(青岛崂山电子仪器公司),A402I 型雾化器(江苏鱼跃医疗设备有限公司),RM-6280 多智能生理记录及分析处理系统和 BL-420 医用微机实控仪由上海医用器材公司生产。胞核-胞质蛋白制备试剂盒购于北京普利莱基因技术有限公司。

1.3 动物模型复制

参考文献[6]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 × 10⁹ 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;非哮喘组生理盐水代替免疫原液及 1% 卵清白蛋白。

1.4 动态 SO₂ 暴露

SO₂ 暴露组和 SO₂ 暴露哮喘组 SO₂ 暴露浓度为 1.0 mg/(m³·h);正常对照组和哮喘组进行过滤空气(活性炭过滤)暴露,暴露时间为 6 d、3 h/d。1.0 mg/m³ 接近三级空气污染的 SO₂^[7]。整个实验过程控制温度和湿度变化在 ±10% 以内。

1.5 标本采集和保存

于 OVA 末次激发 72 h 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,用磷酸盐缓冲液行支气管-肺泡灌洗,回收支气管-肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)离心后的沉淀用无水乙醇固定,用细胞电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 流式细胞仪检测外周血 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞占 CD4⁺T 细胞的比例

采用溶红细胞法检测,取大鼠抗凝血 100 μ l,置于流式细胞仪测量管中。分别加入异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记的 CD4。单克隆抗体 1 μ l 和藻红蛋白 (PE) 标记的 CD25 单克隆抗体 (1 μ l),充分混匀,4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min。加入 2 ml 红细胞裂解液,充分混匀,室温裂解 10 min。3000 r/min 离心 5 min,弃上清液, PBS 缓冲液清洗 1 次。1 ml PBS 重悬细胞,流式细胞仪检测分析。每次检测均设立同型对照;同型对照分别加入 FITC 标记的 IgG 单克隆抗体 (1 μ l) 和 PE 标记的 IgG 单克隆抗体 (1 μ l)。

1.7 血浆和肺组织匀浆液中 IL-4 和 γ -INF 含量的测定

应用 ELISA 试剂盒检测 IL-4 和 γ -INF 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-4 和 γ -INF 浓度。

1.8 Western blot 法检测肺组织 Foxp3 蛋白含量

称取 100 mg 冰冻肺组织,采用胞核-胞质蛋白制备试剂盒提取肺组织核蛋白,提取过程按试剂盒说明进行,考马斯亮蓝法测定蛋白浓度。以每孔 40 μ g 上样,用 5.0% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白,半干法转移至 PVDF 膜上,与小鼠抗大鼠的 Foxp3 (1:1 000) 和 β -肌动蛋白 (1:1 000) 单克隆抗体孵育 4 $^{\circ}$ C 过夜,洗膜后,用辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠的 IgG 抗体 (1:1 000) 孵育 2 h,用发光试剂盒显示蛋白条带, X 线片曝光,将 X 线片输入电脑,应用图像分析软件分析 Foxp3 蛋白的灰度值,同时以内参照 β -肌动蛋白表达的强度为基准,按公式计算相对系数:表达强度 (相对系数) = 转录因子/ β -肌动蛋白的灰度值。

1.9 统计学处理

采用 SPSS13.0 软件,所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析,多组样本均数两两比较,方差齐者用 LSD 检验,方差不齐者用 Dunnett T 检验。

2 结果

2.1 大鼠哮喘模型的建立

2.1.1 哮喘大鼠的症状和体征 抗原激发后哮喘模型大鼠立即表现为呼吸急促、呼吸减慢或节律整,并伴有烦躁不安、腹肌痉挛、二便失禁,口唇轻度发绀;连续激发后部分大鼠出现喘息和/或哮鸣音。正常对照组未见上述改变。

2.1.2 哮喘大鼠气道反应性增加 超声雾化吸入 0.0025% 氯化乙酰胆碱 2 min 后两组大鼠呼吸变化见表 1。哮喘大鼠在氯化乙酰胆碱激发后表现为呼吸频率增加,呼吸幅度增大,呈现明显的气道高反应性,与正常对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 1 哮喘大鼠激发前后呼吸变化情况

组别	例数	无明显改变	呼吸频率增加	呼吸幅度增加
对照组	15	14	1	0
哮喘组	12	1	10	11

注:呼吸频率增加指呼吸频率增加在 10% 以上;呼吸幅度增大指呼吸幅度增加在 5% 以上。

2.1.3 哮喘大鼠气道呈过敏性炎症改变 哮喘大鼠 BALF 中细胞分类计数嗜酸性细胞百分比与正常对照组比较差异有统计学意义,见表 2 ($P < 0.01$),呈现典型过敏性炎症的改变。病理显示哮喘大鼠支气管、肺泡、黏膜下及支气管平滑肌内均有大量嗜酸性粒细胞、巨噬细胞、中性粒细胞及淋巴细胞等多种炎性细胞浸润 (见图 1)。

表 2 哮喘大鼠 BALF 中细胞分类变化情况

组别	例数	嗜酸粒细胞	中性粒细胞	淋巴细胞
对照组	15	0.65 $\pm$ 0.47	3.14 $\pm$ 0.78	6.15 $\pm$ 1.71
哮喘组	12	22.32 $\pm$ 2.35*	9.45 $\pm$ 1.68*	10.62 $\pm$ 2.31*

注:与对照组比较, * $P < 0.01$ 。

2.2 各组大鼠肺组织病理学变化

支气管肺组织切片中可以观察到,正常对照组支气管纤毛排列整齐,管腔圆整,血管腔、肺泡腔、肺间质均未见嗜酸粒细胞浸润,基底膜较薄;哮喘组气道壁和肺组织中以淋巴细胞为主并伴有嗜酸粒细胞浸润、黏膜皱褶增多和气道壁增厚;SO₂ 暴露组大鼠气道可见中性粒细胞和淋巴细胞浸润;SO₂ 暴露哮喘组气道壁和肺组织中可见大量淋巴细胞及嗜酸粒细胞和中性粒细胞浸润,气道壁明显增厚 (见图 1)。



正常对照组

哮喘组

SO₂ 组

SO₂ 暴露哮喘组

图 1 各组大鼠肺组织 (HE, $\times 400$)

2.3 各组大鼠外周血 CD4⁺CD 25⁺Treg 细胞占 CD4⁺T 细胞的百分比

正常对照组 (9.63 ± 1.37) % 与总体 (4.98 ± 1.03) % (包括哮喘组、SO₂ 暴露组、SO₂ 暴露哮喘组) 比较差异有统计学意义。哮喘组大鼠 CD4⁺CD 25⁺Treg 低于正常对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); SO₂ 暴露哮喘组低于正常对照组和哮喘组, 差异有统计学意义 (P 均 < 0.01); SO₂ 暴露组大鼠 CD4⁺CD 25⁺Treg 低于正常对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 见表 3。

2.4 各组大鼠血浆和肺组织 IL-4 和 γ -INF 含量

正常对照组血浆 IL-4 和 γ -INF [(11.24 ± 2.53) ng/L、(156.98 ± 60.23) ng/L] 与总体 [(26.12 ± 3.62) ng/L、(75.92 ± 20.46) ng/L] (包括哮喘组、SO₂ 暴露组、SO₂ 暴露哮喘组) 比较差异均有统计学

表 4 各组大鼠血浆和肺组织中 IL-4 和 γ -INF 含量的比较

ng/L

组别	鼠数	IL-4		γ -INF	
		血浆	肺组织	血浆	肺组织
正常对照组	15	11.24 ± 2.53	0.29 ± 0.06	156.98 ± 60.23	1.58 ± 0.18
SO ₂ 暴露组	15	14.25 ± 2.16	0.37 ± 0.08	123.41 ± 56.27	1.28 ± 0.16
哮喘组	12	23.51 ± 4.86*	0.93 ± 0.16*	63.82 ± 21.78*	0.49 ± 0.15*
SO ₂ 暴露哮喘组	11	36.73 ± 7.46* #	1.67 ± 0.41* #	10.02 ± 1.68*	0.43 ± 0.12*

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

2.5 各组大鼠肺脏 Foxp3 蛋白表达

Western blot 分析显示, 在蛋白质相对分子量为 48 000 和 43 000 处哮喘组 Foxp3 蛋白表达低于正常对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); SO₂ 暴露哮喘组低于哮喘组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); SO₂ 暴露哮喘组低于正常对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 见表 5。

表 5 各组大鼠肺组织中 Foxp3 蛋白表达的 Western blot 检测结果

组别	例数	Foxp3 蛋白/ β -actin
正常对照组	15	11.87 ± 0.65
哮喘组	12	8.23 ± 0.56*
SO ₂ 暴露组	15	7.31 ± 0.47
SO ₂ 暴露哮喘组	11	6.05 ± 0.36* #

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

3 讨论

3.1 SO₂ 对大鼠气道的影响

SO₂ 是空气污染物主要成分之一, 流行病学调查发现当空气中 SO₂ 浓度升高后, 呼吸系统疾病的住院率明显上升。对于已存在呼吸系统疾病者, 空气中 SO₂ 浓度升高可使患者咳嗽、咳痰、呼吸困难等症状

表 3 各组大鼠外周血 CD4⁺CD 25⁺Treg 细胞占 CD4⁺T 细胞的百分比

组别	例数	CD4 ⁺ CD 25 ⁺ Treg/CD4 ⁺ T
正常对照组	15	9.63 ± 1.37
哮喘组	12	5.78 ± 1.26*
SO ₂ 暴露组	15	5.61 ± 1.25*
SO ₂ 暴露哮喘组	11	3.15 ± 0.82* #

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

意义。正常对照组肺组织 IL-4 和 γ -INF [(0.29 ± 0.06) ng/L、(1.58 ± 0.18) ng/L] 与总体 [(0.98 ± 0.21) ng/L、(0.71 ± 0.13) ng/L] 比较差异均有统计学意义。哮喘组大鼠血浆和肺组织中 IL-4 含量高于正常对照组 (P 均 < 0.01), SO₂ 暴露哮喘组血浆和肺组织中 IL-4 含量高于哮喘组和正常对照组 (P 均 < 0.01); 哮喘组血浆中 γ -INF 含量低于正常对照组 ($P < 0.05$), SO₂ 暴露哮喘组 γ -INF 含量低于哮喘组和正常对照组 ($P < 0.01$), 表 4。

加重, 肺功能下降^[7]。关于 SO₂ 诱发哮喘及慢性气管炎的机制非常复杂, 这也正是目前各国研究的热点。有关研究显示, 在 SO₂ 长期持久的作用下, 可使呼吸道防御机能受到破坏, SO₂ 可改变气道 pH 值, 刺激气道产生大量氧自由基; 并促使多种细胞因子如 TNF- α 、IL-1、IL-6、IL-8 释放增加; 也可通过刺激气道内副交感神经引起气道平滑肌收缩^[8,9]。本实验结果显示, 以低浓度 SO₂ 刺激大鼠气道后, 激发大鼠气道内压力升高 20% 所需的乙酰甲胆碱 (Mch) 浓度值明显减少, 表明吸入 SO₂ 后, 大鼠气道反应性明显升高。同时, SO₂ 暴露组 BALF 中炎性细胞总数明显升高, 证实吸入 SO₂ 后, 大鼠肺组织产生了炎症反应。HE 染色显示, SO₂ 暴露组支气管黏膜上皮纤毛粘连、变短、倒伏, 黏膜下层及平滑肌层可见大量炎性细胞浸润。提示吸入 SO₂ 后大鼠气道有炎症产生, 诱导气道高反应, 从而导致了慢性支气管炎与哮喘的发生与发展。

3.2 SO₂ 暴露对哮喘大鼠 CD4⁺CD 25⁺ 调节性 T 细胞及转录因子 Foxp3 表达的影响

哮喘是一种以肥大细胞反应、嗜酸性细胞和 T 细胞浸润为主, 伴有淋巴细胞、巨噬细胞等参与调节

的气道慢性炎症性疾病。从全球范围来看, 20 多年来哮喘发病率在世界大部分地区正以惊人的速度呈现上升趋势^[1], 尤其是儿童哮喘病已成为儿童最常见的慢性疾病^[1]。研究认为, 在排除遗传因素的影响外, 环境因素如大气污染可能是导致哮喘发病率上升的危险因素之一^[2,13]。随着世界工业的发展以及大气污染问题日趋严重, 大气污染物暴露(如颗粒物、二氧化硫、氮氧化物、挥发性有机化合物^[14]、柴油机尾气颗粒物^[15]以及多环芳烃等)与哮喘发病关系的研究已成为环境卫生领域研究的热点之一。

文献报道, 辅助性 T 细胞在接受抗原递呈细胞的信息传递后除分化为 Th1 和 Th2 细胞外, 还存在一个功能和细胞因子产生方面既不同于 Th1 也不同于 Th2 的 T 细胞亚群, 称为调节性 T 细胞(regulatory T cell, Treg), Treg 分为 4 种亚型, 具有免疫应答低下和免疫抑制两大特征^[16,17]。其中 CD4⁺CD25⁺T 细胞是 Treg 的主要组成部分, 占外周血中 CD4⁺T 细胞的 5%~10%。最近研究表明, CD4⁺CD25⁺Treg 以抑制的方式控制其他 CD4⁺CD25⁺效应细胞的活性或功能, 但具体作用机制尚未阐明。CD25⁺细胞缺失则 IgE、嗜酸性粒细胞水平升高, 并导致多种自身免疫性疾病, 如甲状腺炎、炎症性肠病及严重的湿疹和食物过敏。Foxp3 特异性地高表达于 CD4⁺CD25⁺Treg, 不仅是 CD4⁺CD25⁺Treg 特异性的标志, 更是活化的标志, 其表达与 Treg 抑制功能相关, 而其他 CD4⁺CD25⁻Treg 效应 T 细胞则很少表达^[18], 因此检测 CD4⁺CD25⁺Treg 的 Foxp3 mRNA 和蛋白表达水平更能直接反映该细胞的功能。

CD4⁺CD25⁺Treg 及转录因子 Foxp3 在哮喘发病中的作用尚不清楚。有研究表明, 哮喘儿童 BALF 中 CD4⁺CD25⁺Treg 数量减少, 而且其体外分离后对 CD4⁺CD25⁻Treg 的 T 细胞的抑制功能减弱, 当吸入糖皮质激素治疗后 CD4⁺CD25⁺Treg 数量及抑制 CD4⁺CD25⁻T 细胞增殖的功能有所恢复^[9]。本研究表明, 哮喘组大鼠 CD4⁺CD25⁺Treg 低于正常对照组, SO₂ 暴露哮喘组低于正常对照组和哮喘组, SO₂ 组大鼠 CD4⁺CD25⁺Treg 低于正常对照组, 差异均有统计学意义($P < 0.01$)。与此同时, 肺组织 Foxp3 蛋白表达下降, 因此推测 CD4⁺CD25⁺Treg 数量减少及 Foxp3 蛋白表达减少可能是哮喘发病的一个重要原因。提示 Treg 在机体中以抑制的方式调控效应细胞的活性或功能, 具有调节 Th1/Th2 比例平衡的作用, 因此, CD4⁺CD25⁺Treg 数量减少和 Foxp3 蛋白表达减少可能在哮喘的 Th1/Th2 失衡中扮演重

要角色。

γ -INF 和 IL-4 是一对相互拮抗而又自身促进的细胞因子, IL-4 选择性地诱导、促进 B 淋巴细胞产生 IgE^[20~22]。本研究表明, 哮喘组大鼠血浆和肺组织中 IL-4 含量高于正常对照组, SO₂ 暴露哮喘组血浆和肺组织中 IL-4 含量高于哮喘组和正常对照组; 哮喘组血浆中 γ -INF 含量低于正常对照组, SO₂ 暴露哮喘组 γ -INF 含量低于哮喘组和正常对照组。结果表明, 当哮喘组给予低浓度 SO₂ 暴露后, 血浆和肺组织 IL-4 持续升高, 血浆 γ -INF 进一步降低, 提示低浓度 SO₂ 暴露可以促进过敏原引起以 Th2 为主的体液免疫, 从而加重哮喘的过敏反应, 同时 Th1 细胞功能受到抑制, γ -INF 产生减少。因此笔者认为低浓度 SO₂ 暴露可以使哮喘已存在的免疫失衡持续恶化。

总之, 低浓度 SO₂ 暴露可能在哮喘的发病过程中通过下调 CD4⁺CD25⁺Treg 数量并抑制其功能, 进一步加重哮喘患者体内的 Th1/Th2 比例失衡, 促进哮喘发生和发展。但大气污染物暴露(如 SO₂ 等)与哮喘发病的关系还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 胡伟, 魏复盛, Zhang J. 空气污染与呼吸系统疾病对儿童肺功能的交互影响 [J]. 安全与环境报, 2004, 24 (1): 22-26.
- [2] Sunyer J, Spix C, Querrel P, et al. Urban air pollution and emergency admissions for asthma in four European cities: the APHEA project [J]. Thorax, 1997, 52 (3): 760-765.
- [3] Lin S, Hwang S A, Pantea C, et al. Childhood asthma hospitalizations and ambient air sulfurdioxide concentrations in Bronx Country, New York [J]. Arch Environ Health, 2004, 59 (5): 266-275.
- [4] Brunekreef B, Holgate S T. Air pollution and health [J]. Lancet, 2002, 360 (10): 1233-1242.
- [5] Seunyr J, Atkinson R, Ballester F, et al. Respiratory effects of sulphurdioxide: a hierarchical multicity analysis in the APHEA 2 study [J]. Occup Environ Med, 2003, 60 (3): 200-212.
- [6] 沈华浩, 王萃莉. 支气管哮喘小鼠模型应用评价 [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2005, 28 (3): 284-286.
- [7] Brauer M, Hoek G, Van Vliet P, et al. Air pollution from traffic and the development of respiratory infections and asthmatic and allergic symptoms in children [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2002, 166 (8): 1092-1098.
- [8] Koksai N, Yildirim Z, Gokirmak M, et al. The role of nitric oxide and cytokines in asthma-like syndrome induced by sulfurdioxide exposure in agricultural environment [J]. Clin Chim Acta, 2003, 336 (1): 115-122.
- [9] Gokirmak M, Yildirim Z, Canan Hasanoglu H, et al. The role of oxidative stress in bronchoconstriction due to occupational sulfurdioxide exposure [J]. Clin Chim Acta, 2003, 331 (1): 119-126.
- [10] 张景明, 宋宏, 郭艳. 低浓度臭氧暴露对哮喘大鼠气道炎症的影响 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2003, 17 (2): 151-154.

(下转第 60 页)

带廊拟采用全封闭结构,微负压运行,焚烧炉、管道等设备采取密闭措施,设置有机通风设施。预测在正常生产情况下工作场所空气中毒物浓度应小于职业接触限值。但需防范事故和设备维修时,因局部通风不良吸入一氧化碳、氨、硫化氢、甲硫醇等毒物而导致急性职业中毒的发生。

2.8 噪声危害分析

该项目主要噪声源为破碎机、送风机、旋风除尘器、抽风机及气流排放产生的流体噪声等,项目拟采取消声、隔声、减振等综合措施,结合类比调查检测结果,各岗位巡检作业为主,合理安排巡检时间,轮流作业,预测工人接触噪声强度符合职业接触限值。

2.9 高温危害分析

焚烧炉各观察口为高温作业点,工人轮流巡检作业,预测巡检工接触高温 WBGT 指数符合限值要求。该项目焚烧炉露天布置,余热管道和设备采用保温材料隔热,工艺自动化水平较高,工人巡检为主,轮流操作,值班室和控制室安装空调,夏季工作场所采取综合防暑降温措施,可避免中暑发生。

2.10 密闭空间作业危害分析

工人进入焚烧炉、管道等密闭空间进行检修及抢修作业时,可因通风不足,局部空间毒物浓度较高;在炉内从事电焊等耗氧作业,并产生高浓度氮氧化物、锰烟,致存在缺氧窒息、急性职业中毒事故发生风险。

2.11 职业病危害关键控制点

粉尘关键控制点为垃圾卸料、输送、破碎、焚烧炉、出渣、检修等;毒物控制点为垃圾输送、破碎、锅炉等;噪声关键控制点为破碎机、风机、除尘器等。

3 讨论

该项目产生的一氧化碳、氨、二氧化氮、硫化氢均是《高毒物品目录》所载明的高毒物品。垃圾焚烧炉、出渣的游离二氧化硅含量大于 10%,粉尘性质属于矽尘。根据《建设

项目职业病危害分类管理办法》,判定该项目属于职业病危害严重的建设项目。该项目应补充和完善有关职业病危害防护设施设计,项目建成投产后工作场所的职业病危害是可以预防和控制的,从职业病防治角度分析该建设项目是可行的。

粉尘、毒物、噪声是该项目主要职业病危害因素,应采取综合技术措施,控制职业病危害。建议补充以下措施:(1)完善职业病防治管理,补充氨、甲硫醇、硫化氢事故应急救援预案,加强职业卫生培训工作。(2)在工程技术治理手段仍无法达到职业卫生限值时,应根据作业工人岗位特点,及时发放符合职业病防治要求的个人防护用品并督促佩戴。(3)在工作场所醒目位置设置警示标识及一氧化碳、氨、二氧化氮、硫化氢等中文警示说明,并安装相应的毒物报警装置。(4)垃圾运输及检修作业外包时应委托具备职业病防护条件的单位,委托外包或其他方式的合同上明确列入防粉尘、防毒和防噪声技术措施和应急救援内容。

余热处理城市生活垃圾是利用水泥生产过程中多余的热量作为垃圾燃烧^[1]的燃料,不需煤或油,既节约能源又保护环境;燃烧产生的热量及灰渣又利用到水泥生产中,符合当前世界各国比较提倡的低碳环保经济项目,随着社会对简单焚烧处理垃圾的争议越来越多,该工艺会不断得到提倡,随着此类项目的兴建,从事该行业的人员日益增多,其职业卫生评价也倍受关注。针对项目主要职业病危害的预测与分析,旨在为今后此类项目的建设、职业病防护措施设施、卫生评价、职业卫生管理提供参考。

参考文献:

- [1] 冯鸿义,周维新,朱锡生. 垃圾焚烧发电厂职业病危害因素分布及其控制效果评价 [J]. 中国煤炭工业医学杂志, 2010, 05.
- [2] 杨泽云,覃江纯,徐雯,等. 某垃圾焚烧热电联产项目职业病危害控制效果评价 [J]. 中国安全生产科学技术, 2011, 06.
- [3] al impairment of pulmonary CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells pediatric asthma [J]. J Allergy Clin Immunol, 2007, 119 (9): 1258-1266.
- [4] 吴奎,孙鲲,毕玉田,等. 哮喘小鼠 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞数量及功能的改变 [J]. 中国呼吸与危重监护杂志, 2005, 4 (6): 455-458.
- [5] Lucycj, Smyth C S, Jorgen V, et al. CD4⁺ CD25⁺ regulatory cells in COPD patients [J]. Chest, 2007, 132 (1): 156-163.
- [6] Barcelo B, Pons J, Ferrer J M, et al. Phenotype characterization of T lymphocytes in COPD: abnormal CD4⁺ CD25⁺ regulatory T lymphocyte response to tobacco smoking [J]. Eur Respir J, 2008, 31 (3): 555-562.
- [7] Martin P, Villares R, Rodriguez-Mascarenhas S, et al. Control of T helper 2 cell function and allergic airway inflammation by PKC zeta [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102 (10): 9866-9871.
- [8] Rissoan M C, Soumelis V, Kadowak N, et al. Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation [J]. Science, 1999, 283 (9): 1183-1186.

(上接第 14 页)

- [1] 李明华,殷凯生,朱栓立,等. 哮喘病学 [M]. 北京:人民卫生出版社, 2005: 33.
- [2] 杨锡强. 小儿哮喘的免疫学发病机制及其对策 [J]. 中国当代儿科杂志, 2001, 3 (5): 487.
- [3] Nicolai T. Pollution. Environmental factors and childhood respiratory allergic disease [J]. Toxicology, 2002, 181-182 (3): 317-321.
- [4] Kunzli N, McConnell R, Bates D, et al. Breathless in Los Angeles: the exhausting search for an air [J]. Am J Public Health, 2003, 93 (9): 1494-1499.
- [5] Delfino R J. Epidemiological evidence for asthma and exposure to air toxics: linkages between occupational, indoor and community air pollution research [J]. Environ Health Perspect, 2002, 110 (4): 573-589.
- [6] Thurston G D, Bates D V. Air pollution as an under appreciated cause of asthma symptoms [J]. JAMA, 2003, 290 (12): 1915-1917.
- [7] Hard D, Koher B, Mehlhom A T, et al. Quantitative and function-