

3 讨论

Morris 水迷宫测试实验动物空间学习记忆能力, 是反映脑学习记忆功能的良好量化指标, 其包含定位航行及空间探索实验两部分^[4]。其中, 定位航行实验用于测试动物学习和记忆的获取能力, 逃避潜伏期延长提示学习能力下降^[5], 游泳速度反映动物的运动能力是否受损, 空间探索实验用于测试动物空间位置记忆的保持能力, 测量值减少提示记忆保持能力降低^[6]。本研究结果显示, 各剂量组游泳速度差异无统计学意义, 提示各组小鼠运动能力未受损。高剂量 1, 2-DCE 染毒组小鼠的逃避潜伏期均显著高于其他各组, 各染毒组的小鼠在目标象限停留时间随染毒剂量的增加而减少, 但与对照组相比差异无统计学意义。提示亚慢性 1, 2-DCE 染毒对小鼠获得空间记忆的能力损伤明显, 而对小鼠的空间记忆保留能力损伤较弱。

Glu、Asp 和 GABA 是 CNS 中常见且重要的神经递质。Glu 和 Asp 是重要的兴奋性氨基酸 (EAAs), 广泛存在于哺乳动物的中枢神经系统中, 对脑神经元有普遍而强烈的兴奋作用, 是调节学习记忆的重要神经递质^[7]。GABA 是典型的抑制性氨基酸 (IAAs), 对脑神经元的兴奋性具有抑制作用, 其含量的过度增加对学习记忆有负面调节作用^[8]。本实验结果显示, 各组间 Glu 和 Asp 含量差异均无统计学意义, 而高剂量组小鼠脑组织中 GABA 含量均显著高于其他各组, 进而导致 Glu/GABA 比值的降低, 提示高剂量组小鼠脑组织中 GABA 含量升高可能是导致小鼠空间学习能力下降的原因之一。

综上所述, 亚慢性 1, 2-DCE 染毒可影响小鼠脑组织中氨基酸类神经递质的含量, 导致脑组织中 EAAs 与 IAAs 比例的下降, 对小鼠的空间学习能力产生抑制性作用。亚慢性 1, 2-

DCE 染毒对脑组织中氨基酸类神经递质的影响可能是其神经毒性损伤的作用机制之一。

参考文献:

- [1] 齐莹, 石磊, 高岚岳, 等. 亚急性 1, 2-二氯乙烷染毒对小鼠行为及脑神经递质含量的影响 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2011, 29 (6): 413-416.
- [2] 齐莹, 石磊, 高岚岳, 等. 1, 2-二氯乙烷染毒对小鼠脑组织氨基酸类神经递质的影响 [J]. 中国工业医学杂志, 2010, 23 (6): 439-441.
- [3] 武密山, 赵素芝, 高维娟, 等. 升麻苷 H-1 对脑缺血大鼠纹状体氨基酸类神经递质含量的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2016, 32 (5): 831-835.
- [4] Morris RG, Anderson E, Lynch GS, *et al.* Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an *N*-methyl-*D*-aspartate receptor antagonist, AP5 [J]. *Nature*, 1986, 319 (6056): 774-776.
- [5] Zhang L, Jin C, Liu Q, *et al.* Effects of subchronic aluminum exposure on spatial memory, ultrastructure and L-LTP of hippocampus in rats [J]. *J Toxicol Sci*, 2013, 38 (2): 255-268.
- [6] Cui B, Wu M, She X. Effects of chronic noise exposure on spatial learning and memory of rats in relation to neurotransmitters and NMDAR2B alteration in the hippocampus [J]. *J Occup Health*, 2009, 51 (2): 152-158.
- [7] Gécz J. Glutamate receptors and learning and memory [J]. *Nat Genet*, 2010, 42 (11): 925-926.
- [8] Matsuyama S, Taniguchi T, Kadoyama K, *et al.* Long-term potentiation-like facilitation through GABAA receptor blockade in the mouse dentate gyrus in vivo [J]. *Neuroreport*, 2008, 19 (18): 1809-1813.

矽尘对小鼠外周血免疫相关基因 PD-1 和 PD-L1 mRNA 表达的影响

Effects of silica dust on expression of immune related gene PD-1 and PD-L1 mRNA in peripheral blood of mice

张兆强¹, 韩贵芝¹, 张恒硕², 邵波¹, 林立¹, 张春芝¹

(1. 济宁医学院职业卫生与环境医学重点实验室, 山东 济宁 272067; 2. 兰州大学第一临床学院, 甘肃 兰州 730000)

摘要: 将 40 只昆明种小鼠随机分为染尘 2 h、4 h、8 h 组以及对照组, 共染尘 30 d。染尘结束后, 立即称量小鼠体重及肺脏、胸腺、脾脏重量, 计算各脏器系数。提取外周血总 RNA, RT-qPCR 法检测各组小鼠外周血免疫相关基因 PD-1 和 PD-L1 mRNA 的相对含量。结果显示, 与对照组比较, 各染尘时间组小鼠体重增长速度减慢, 肺脏系数升高, 胸腺系数和脾脏系数降低 (P 均 < 0.05), PD-L1 mRNA 相对含量均升高

($P < 0.05$), 4 h 和 8 h 染尘组 PD-1 mRNA 相对含量升高 ($P < 0.05$)。提示矽尘可导致小鼠免疫力损伤, 该损伤可能与矽尘上调外周血 PD-1 和 PD-L1 mRNA 表达有关。

关键词: 矽尘; 免疫损伤; 程序性死亡受体-1 (PD-1); 程序性死亡配体-1 (PD-L1)

中图分类号: R994 文献标识码: B

文章编号: 1002-221X(2018)04-0278-03

DOI: 10.13631/j.cnki.zggyyx.2018.04.007

矽肺患者临床表现多样, 其中之一为机体免疫力的显著下降^[1,2]。其发生的具体机制尚未完全阐明。研究显示, 程序性死亡受体-1 (programmed cell death 1, PD-1) 和程序性死亡配体-1 (programmed cell death ligand 1, PD-L1) 是一组协同

收稿日期: 2018-01-03; 修回日期: 2018-03-04

基金项目: 山东省自然科学基金 (ZR2017MH085); 济宁医学院 2017 国家自然科学基金培育项目 (JYP201719)

作者简介: 张兆强 (1970—), 男, 硕士, 副教授, 研究方向: 矽肺发病机制及防治。

调控机体细胞免疫的基因, 该组基因病理状态下的异常激活, 常导致患者免疫力的降低^[3]。目前对 PD-1 和 PD-L1 的研究多集中于肿瘤发病^[4,5], 尚未见矽肺患者该类基因的文献报告。本研究拟采用小鼠整体染尘的方法, 观察矽尘对小鼠体重及肺、脾、胸腺等脏器系数的影响, 并运用 RT-qPCR 技术, 检测外周血 PD-1 和 PD-L1 mRNA 的表达, 为矽肺患者免疫力的降低提供合理的生物学解释。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

电子分析天平 (北京赛多利斯仪器系统有限公司)、TD5M-WS 离心机 (上海卢湘离心机仪器有限公司)、C1000 Touch™ 荧光定量 PCR 仪 (Bio-Rad Laboratories)、Arktik5020 型多功能 PCR 仪 (Thermo Fisher Scientific)、微量紫外分光光度计 (美国 QUAWELL 公司)、Alphalmager MINI 凝胶成像系统 (美国 Protein Simple 公司), Trizol、M-MuLV 第一链 cDNA 合成试剂盒、2×SG Fast qPCR Master Mix、引物及内参的设计与合成 [生工生物工程 (上海) 有限责任公司]、矽尘 (天津市北联精细化学品有限公司)。

1.2 实验动物

健康昆明种小鼠 40 只, 雌雄各半, 由济宁医学院动物中心提供。动物合格证编号: SYXK (晋) 2009—0001。所有动物均饲养于该中心, 饲养条件: 温度 20℃, 相对湿度: 65%。

1.3 方法

1.3.1 动物的分组及处理 将矽尘研磨至符合实验要求 (滤

膜溶解涂片法测得直径 < 5 μm 的占 95%, 焦磷酸法测得游离 SiO₂ > 95%)。小鼠随机分为对照组 (不染尘) 和 3 个染尘组 (每天染尘时间分别为 2 h、4 h、8 h), 每组 10 只。染尘组小鼠置于染尘柜中, 用鼓风机将研磨后的矽尘吹起, 浓度维持在 125 mg/m³^[6]。除实验因素外, 各组小鼠饲养条件完全相同。共染尘 30 d。

1.3.2 一般情况和脏器系数 染尘过程中, 密切注意小鼠的一般情况, 染尘结束, 立即称取小鼠的体重。内眦静脉丛取血后, 处死动物, 分离肺、胸腺和脾脏并称量, 计算脏器系数。脏器系数 = 脏器重量 (mg) / 体重 (g)。

1.3.3 外周血总 RNA 的提取 Trizol 法提取外周血总 RNA, 琼脂电泳法监控其质量, 紫外分光光度法测定浓度和纯度, 并稀释至 200 ng/μl。使用 M-MuLV 第一链 cDNA 合成试剂盒将其逆转录成 cDNA, 反应条件: 42℃, 45 min; 70℃, 10 min; 灭活多余的酶, 4℃ 保存备用。

1.3.4 PD-1、PD-L1 mRNA 的测定 各基因及内参 GAPDH 引物的设计及合成均由生工生物工程 (上海) 有限责任公司完成。见表 1。按照 2×SG Fast qPCR Master Mix 说明书对上述 cDNA 样本进行 RT-qPCR 操作, 反应条件: 95℃ 预变性 3 s、变性 3 s, 60℃ 延伸 30 s, 共 40 个循环。添加溶解曲线, 温度范围 60~95℃, 每升高 0.5℃ 进行一次荧光摄影。所有样本均设 3 个复孔。反应结束后, 按公式 2^{-ΔΔCT} 计算各样品 mRNA 的含量。以对照组的任一个样本为基准值, 计算各样本的相对含量。

表 1 目的基因和内参基因 PCR 引物序列

基因名称	上游引物	下游引物	扩增片段长度 (bp)
PD-L1	TCACGATGGAGTGCAGATTC	GGCTTAAGGTCTCTCTCC	121
PD-1	GCCCTAGTGGGTATCCCTGT	GCTCCTCCTCAGAGTGTCC	118
GAPDH	GGTTGTCTCTCGGACTTCA	TGTTCCAGGGTTCTTACTCC	179

1.4 统计分析

采用 SPSS13.0 统计学软件进行分析, 数据表述为 $\bar{x} \pm s$, 采用 *F* 检验分析组间的总体差异, LSD 法比较各染尘时间与对照组的差异, *P* < 0.05 表明差异有统计学意义。

2 结果

2.1 矽尘对小鼠一般情况及各脏器的影响

染尘 30 d 后, 染尘组小鼠食欲不振, 活动量减少, 8 h 组尤为明显, 对照组无明显变化。与对照组相比, 染尘组小鼠

体重增加减慢 (*P* < 0.05)。镜下肉眼可见染尘组小鼠肺组织损伤, 对照组表面色泽光润, 触摸感质软, 有弹性。染尘 2 h 组表面有少量散在砂粒状结节, 并伴有少量点状出血; 4 h 组表面色泽灰白, 可见明显的结节, 触摸感质硬, 弹性降低; 8 h 组表面有多处出血点及淤血点, 可见较大结节, 触摸感质硬, 弹性差。与对照组比较, 各染尘时间组小鼠的肺脏系数升高, 胸腺与脾脏系数显著降低, 差异均有统计学意义 (*P* < 0.05)。见表 2。

表 2 各暴露时间组小鼠体重和脏器系数 ($\bar{x} \pm s$, *n* = 10)

组别	小鼠体重 (g)	肺脏系数	胸腺系数	脾脏系数
对照组	27.21 ± 2.55	5.52 ± 0.81	2.81 ± 0.63	3.67 ± 0.54
染尘 2 h 组	25.60 ± 3.01	7.03 ± 0.78 *	1.92 ± 0.70 *	2.95 ± 0.63 *
染尘 4 h 组	24.20 ± 2.63 *	8.48 ± 0.93 *	1.56 ± 0.71 *	2.77 ± 0.66 *
染尘 8 h 组	22.13 ± 3.12 *	8.99 ± 0.85 *	1.10 ± 0.68 *	2.00 ± 0.59 *
<i>F</i> 值	10.53	28.34	10.30	12.90
<i>P</i> 值	0.00	0.00	0.00	0.00

注: *, 与对照组比较, *P* < 0.05

2.2 小鼠外周血 PD-1 和 PD-L1 mRNA 的表达

与对照组相比, 染尘 4 h 和 8 h 组 PD-1 mRNA 相对含量升

高 (*P* < 0.05), 2 h 组差异无统计学意义 (*P* > 0.05); 各染尘时间组 PD-L1 mRNA 相对含量均升高 (*P* < 0.05)。见表 3。

表 3 矽尘对小鼠外周血 PD-1 和 PD-L1 mRNA 的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	PD-1 mRNA 相对含量	PD-L1 mRNA 相对含量
对照组	0.85±0.503	1.06±0.640
染尘 2 h 组	0.68±0.293	3.05±3.876*
染尘 4 h 组	1.93±0.350*	2.47±3.166*
染尘 8 h 组	3.44±2.345*	8.64±4.909*
F 值	7.39	13.71
P 值	0.00	0.00

注: *, 与对照组比较, P<0.05

3 讨论

PD-1 是机体重要的负性免疫调控基因之一, 位于 T 淋巴细胞和 NKT 细胞表面。PD-1 与其配体 PD-L1 结合, 可显著抑制 T 细胞的活化和增殖, 损伤机体的细胞免疫功能^[6-8], 使病变组织、细胞逃脱免疫系统的监视和杀伤^[5]。这是机体进化过程中形成维持稳态的重要机制之一, 目的在于避免淋巴细胞对短暂出现的炎性细胞产生误杀。然而该稳态也给机体带来负面影响, 即机体无法通过免疫系统高效的清除作用, 实现对病损部位的修复。矽肺患者细胞免疫明显降低, 与 PD-1 和 PD-L1 mRNA 的表达是否有关, 是本研究的中心内容。

本研究以高浓度的矽尘染毒小鼠, 与对照组比较, 各染尘组小鼠体重增长速度减慢、肺脏系数升高、弹性下降, 肺脏出现明显损伤。各染尘时间组小鼠的胸腺系数和脾脏系数均低于对照组, 提示免疫力下降。与对照组相比, 染尘 4 h 和 8 h 组 PD-1 mRNA 相对含量及各染尘时间组 PD-L1 mRNA 相对含量均升高。染尘时间越长, PD-1 和 PD-L1 mRNA 表达越高, 免疫力下降就越明显, 小鼠肺部炎症也越严重, 三者之间存在一定的关联。因此, 可认为矽尘通过上调 PD-1 和 PD-L1 mRNA 的表达, 降低机体的免疫力, 使受损的组织、细胞无法被及时清除, 加重肺脏的炎症。在此过程中, 甚至会诱导产生 NF- κ B p65、TGF β 1 等细胞因子, 引起肺组织的纤维化^[6,9]。另外, 免疫力的下降还会导致肺结核、肺癌及其他机会感染的发生^[10]。合理使用抗 PD-1 和 PD-L1 药物, 可抑制 T 细胞的凋亡, 提高细胞免疫, 清除异化的细胞, 消除矽尘引

起的肺部炎症, 有助于预防矽肺的发生。但该假设还需要验证。本研究采用的是较高浓度、较短时间的染尘, 该结果是否在长期染尘动物中出现, 以及能否在矽肺患者中出现, 尚待进一步的研究。

参考文献:

[1] 刘英姿, 王东升, 张皓东, 等. 矽肺患者免疫功能的研究 [J]. 工业卫生与职业病, 2009, 35 (6): 369-370.

[2] 李淑岷. 矽肺患者周围血淋巴细胞亚群、TNF- α 、sIL-2R 水平分析 [J]. 中国实用医药, 2010, 5 (1): 18-19.

[3] Ishii H, Azuma K, Kawahara A, et al. Programmed cell death-ligand 1 expression and immunoscore in stage II and III non-small cell lung cancer patients receiving adjuvant chemotherapy [J]. Oncotarget, 2017, 8 (37): 61618-61625.

[4] 姜战胜, 潘战宇, 任秀宝. PD-1/PD-L1 抑制剂在晚期非小细胞肺癌中的治疗进展 [J]. 中国肺癌杂志, 2017, 20 (2): 138-142.

[5] Ock CY, Kim S, Keam B, et al. Changes in programmed death-ligand 1 expression during cisplatin treatment in patients with head and neck squamous cell carcinoma [J]. Oncotarget, 2017, 8 (58): 97920-97927.

[6] 张兆强, 蔡妮琼, 张春芝, 等. 矽尘对小鼠外周血 TLR4 mRNA 与 RelA mRNA 表达的影响 [J]. 环境与职业医学, 2017, 34 (1): 63-67.

[7] Jo JC, Kim M, Choi Y, et al. Expression of programmed cell death 1 and programmed cell death ligand 1 in extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type [J]. Ann Hematol, 2017, 96 (1): 25-31.

[8] Gibson A, Ogeese M, Sullivan A, et al. Negative regulation by PD-L1 during drug-specific priming of IL-22-secreting T cells and the influence of PD-1 on effector T cell function [J]. J Immunol, 2014, 192 (6): 2611-2621.

[9] 张兆强, 张春芝, 聂继池, 等. 矽尘对小鼠外周血 NF- κ B p65 mRNA 与 TGF β 1 mRNA 表达的影响 [J]. 毒理学杂志, 2017, 31 (2): 94-97.

[10] 李小萍, 葛宪民, 秦少珍, 等. 矽肺及矽肺结核患者 T 淋巴细胞与免疫球蛋白水平及相关性分析 [J]. 中国职业医学, 2008, 35 (6): 527-528.

(上接第 275 页)

[30] 李良忠, 张宏印, 刘开泰. 氟对体外培养软骨细胞超微结构的影响 [J]. 中国地方病防治杂志, 2009, 24 (3): 167-169.

[31] Kronenberg HM. The role of the perichondrium in fetal bone development [J]. Ann N Y Acad Sci, 2007 (1116): 59-64.

[32] Shen G. The role of type X collagen in facilitating and regulating endochondral ossification of articular cartilage [J]. Orthod Craniofac Res, 2005, 8 (1): 11-17.

[33] 徐建. DKK1 重组蛋白干预染氟软骨细胞增殖及 X 型胶原表达的研究 [D]. 华中科技大学, 2013.

[34] 许鹏, 郭雄, 姚建锋, 等. 过量氟对实验大鼠软骨细胞分化及 II 和 X 型胶原表型表达的影响 [J]. 中华风湿病学杂志, 2002, 6 (4): 231-234.

[35] 倪雪岩, 蔡家骏, 侯立中, 等. 过量氟对兔髌状软骨细胞外基质胶原和蛋白多糖代谢的影响 [J]. 中华口腔医学杂志, 1997, 32 (1): 53-55.

[36] 朴春吉, 侯立中, 杨同书. 过量氟化物对软骨基质胶原蛋白代谢的影响 [J]. 中国地方病防治杂志, 1996, 11 (2): 75-77.

[37] 林开颜, 唐菊菊, 鲍崇忠. 慢性氟中毒大鼠软骨酶活性的实验观察 [J]. 贵州医药, 2001, 25 (10): 910-911.

[38] 颜炜群, 刘颖, 侯立中, 等. 过量氟对实验大鼠软骨代谢的影响 [J]. 中国地方病防治杂志, 1995, 10 (3): 142-143.

[39] 冀芳, 刘开泰, 姚华. 过量氟与软骨代谢 [J]. 中国地方病防治杂志, 2005, 20 (1): 14-18.

[40] 刘爽, 谭天瑶, 郭晓英. 氟对体外培养大鼠跖骨纵向生长的影响及病理学改变 [J]. 中华地方病学杂志, 2015, 34 (8): 564-568.

[41] 徐能义, 霍建勋. 高氟对儿童少年生长发育的影响 [J]. 中国公共卫生, 2001, 20 (1): 46.

[42] 戴国钧, 李晶, 张志瑜, 等. 地方性氟中毒病区青少年骨龄延迟及其干预的研究 [J]. 中国地方病学杂志, 1991, 6 (6): 31-33.