

短期二氧化硫吸入对小鼠免疫器官的损伤作用

白剑英, 孟紫强

(山西大学环境医学与毒理学研究所, 山西 太原 030006)

摘要: 目的 探讨短期二氧化硫较大剂量染毒对小鼠免疫器官的影响。方法 用 56, 112, 168 mg/m³ 二氧化硫分别对小鼠连续染毒 7d 用 HE 染色法观察二氧化硫对小鼠脾脏组织结构的影响, 用 DNA 凝胶电泳法和流式细胞技术观察二氧化硫吸入对小鼠脾脏细胞凋亡的影响。结果 (1) 用 HE 染色法各剂量组均未观察到脾脏结构有明显改变; (2) DNA 凝胶电泳分析在 168 mg/m³ 组可见明显 DNA ladder; (3) 流式细胞分析显示高剂量染毒组的小鼠脾细胞凋亡率与对照组相比差异有显著性, $P < 0.05$ 。结论 短期二氧化硫吸入对小鼠脾脏的组织学结构影响不明显, 但在剂量达到一定水平时可能引起脾细胞凋亡加速, 对免疫器官造成一定损伤。

关键词: 二氧化硫; 脾脏; 细胞凋亡

中图分类号: R135.1 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2002)06-0325-03

Effects of short term inhalation of sulfur dioxide on immune organs in mice

BAI Jian-ying, MENG Zi-qiang

(Institute for Environmental Medicine and Toxicology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract: Objective To study the effects of short term inhalation of sulfur dioxide on immune organs in mice. **Methods** Mice were exposed to sulfur dioxide at doses of 56 mg/m³, 112mg/m³ and 168mg/m³, respectively, for seven days with a group of unexposed mice as control. The structure of mice spleen was observed with HE staining. DNA agarose gel electrophoresis analysis and flow cytometry analysis were used to study apoptosis of the spleen cells in mice. **Results** (1) No significant change was observed in the structure of the spleen in exposed mice. (2) DNA ladder of apoptosis was significantly found in DNA agarose gel electrophoresis in the spleen of mice exposed to 168mg/m³ of sulfur dioxide. (3) Flow cytometry analysis showed that there was significant difference in apoptosis rate between high exposure group and control mice, with a P value less than 0.05. **Conclusions** Short term exposure to sulfur dioxide had no significant effect on the histological structure of the spleen in mice. Short term exposure to certain level of sulfur dioxide could increase apoptosis in spleen cells and cause damage, to a certain extent, in immune organs.

Key words: Sulfur dioxide; Spleen; Apoptosis

研究表明二氧化硫可引起呼吸系统黏膜纤毛上皮细胞活性降低, 纤毛运动能力降低^[1], 肺泡表面活性物质的动力学特性发生改变^[2]。还有实验发现, 二氧化硫染毒后可引起受试动物支气管黏膜粘液分泌亢进, 同时在支气管中一种类似气管炎患者中的抗原物质的滴度增加^[3]。这些是否会造成机体免疫器官因免疫负荷加重而发生功能与结构的改变呢? 本文通过体内实验研究二氧化硫吸入对小鼠脾脏组织结构和细胞凋亡水平的影响, 探讨短期二氧化硫吸入对机体免疫器官损伤的机制。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

收稿日期: 2002-07-19; 修回日期: 2002-09-04

作者简介: 白剑英 (1968-), 女, 山西五台人, 山西医科大学公共卫生学院环卫教研室讲师, 山西大学环境科学专业博士研究生, 研究方向: 环境毒理学。

孟紫强 (1939-), 男, 博士生导师, 研究方向: 环境医学与毒理学。?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

二氧化硫气体(纯度为 99.99%, 北京氦谱北分气体有限公司), 蛋白酶 K(Merck), RNA 酶(Sigma), 碘化丙啶(Sigma), 其余试剂均为国产分析纯。

1.2 动物染毒

健康昆明种雄性小鼠(购自中国辐射防护研究所动物室), 体质量 20 g 左右, 4~5 周龄, 随机分为 4 组, 每组 6 只。第 1 组、第 2 组、第 3 组分别以 56 mg/m³、112 mg/m³、168 mg/m³ 二氧化硫气体吸入染毒, 连续 7 d, 每天 6 h, 第 4 组为正常对照组。染毒期间各组均禁水、禁食, 其余时间正常饮食, 末次染毒结束后, 禁食过夜。第 2 天颈椎脱臼处死小鼠进行下面各项实验。

1.3 脾组织结构病理学观察

取一半新鲜脾组织立即固定于 10% 福尔马林中, 乙醇梯度脱水, 石蜡包埋, 半薄切片, 行常规 HE 染色。另一半制成浓度为 1×10^6 /ml 的脾细胞悬液分别用于 DNA 凝胶电泳分析和流式细胞仪分析。

1.4 脾脏 DNA 凝胶电泳分析

取上述细胞悬液 1 ml 离心去上清, 加适量细胞消化液 (10 mmol/L Tris HCl, 100 mmol/L NaCl, 10 mmol/L EDTA, 1% SDS, 200 μg/ml 蛋白酶 K), 37 °C 消化过夜, 加 10⁴ U RNA 酶 (100 mg/ml), 继续消化 1 h 后分别以等体积的饱和苯酚和氯仿/异戊醇 (24 : 1) 提取, 4 °C 12 000 r/min 离心 15 min, 阔口吸管吸取上清, 3 mol/L 醋酸钠和无水乙醇沉淀, 过夜后离心, 以适量 TE 溶液溶解 DNA 沉淀, 1.5% 凝胶 60 V 电压电泳约 1 h, 溴化乙啶染色, 凝胶成像分析仪观察并记录结果。

1.5 流式细胞仪分析脾脏细胞凋亡情况

取适量脾细胞悬液离心去上清, 加 37 °C 预温红细胞裂解液去除红细胞, PBS 清洗后迅速用预冷的 70% 乙醇固定, 4 °C 保存待检。上机前用碘化丙啶溶液避光染色 30 min, 用 B-D 公司 FACS Calibur 流式细胞分选仪检测, CellQuest 软件采集数据, 每个样品计数 10 000 个细胞, ModFit LT V2.0 对数据进行分析, 计算各组细胞凋亡率。

1.6 统计分析

采用 SPSS 统计软件分析, 数据经平方根变换后各处理组细胞凋亡率与对照组比较采用 Dunnett *t* 检验。

2 结果

2.1 脾组织光镜检测结果

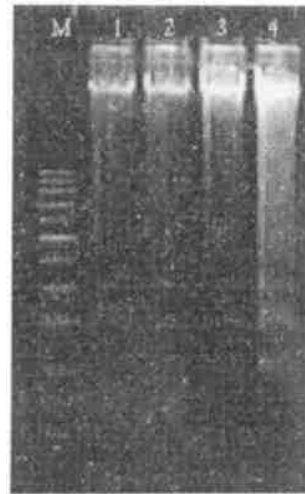
HE 染色观察发现, 56 mg/m³、112 mg/m³、168 mg/m³ 组的脾脏组织结构均无明显改变, 镜下可见脾组织被膜清楚, 小梁结构清晰, 白髓未见异常, 脾索及脾窦均清晰可见, 各剂量组均可见许多代表活跃造血功能的巨核细胞。

2.2 DNA 凝胶电泳分析

经图 1 DNA 凝胶电泳分析表明, 在高剂量组小鼠脾细胞 DNA 降解为典型梯形条带即出现 DNA ladder, 其发生率为 2/6。而 DNA 梯形条带的出现是细胞发生凋亡的典型生化特征, 说明二氧化硫具有潜在的诱导脾细胞凋亡功能。

2.3 流式细胞仪分析结果

由表 1 可见, 168 mg/m³ 二氧化硫染毒组小鼠脾组织的细胞凋亡率显著高于对照组, 虽然在流式细胞分选图上并未见到典型的亚二倍体峰, 但 168 mg/m³ 组的细胞凋亡率与对照组比差异有显著性, *P* < 0.05。提示在二氧化硫达到一定浓度时可能对外周免疫器官造成不良影响, 使其凋亡过度。



图中 M、1、2、3、4 分别代表 200bp DNA Marker, 对照组, 56 mg/m³、112 mg/m³、168 mg/m³ 二氧化硫分别染毒 1 周后小鼠脾脏 DNA 提取物。

图 1 不同浓度二氧化硫吸入染毒 1 周后小鼠脾细胞 DNA 凝胶电泳图

表 1 不同浓度二氧化硫连续染毒 1 周后小鼠脾脏细胞凋亡情况 (*n* = 6 $\bar{x} \pm s$)

二氧化硫浓度 mg/m ³	样本数	凋亡率 (%)
0	6	1.100 0 ± 0.518 6
56	6	1.798 3 ± 1.477 0
112	6	2.103 3 ± 0.818 3
168	6	5.030 0 ± 2.350 7 *

* 与对照组相比 *P* < 0.05。

3 讨论

二氧化硫是一种广泛存在的环境污染物, 在大气中浓度较低而在某些作业车间超标非常严重。研究表明二氧化硫除了对呼吸系统有损伤作用外, 还可引起其他脏器的脂质过氧化损伤, 当其进入血液系统后, 可使血液流变学特性发生改变, 红细胞压积增加, 变形性减弱, 脆性增加, 还可引起硫铁血红蛋白血症^[4], 使血液输送氧气能力下降。二氧化硫吸入也可造成大鼠血浆中维生素 C 和血浆铜蓝蛋白含量降低^[5]。当进入脑组织后可引起脑组织中硫代巴比妥酸反应物含量增加, 轴索萎缩, 导致由外向中枢传输冲动速度减慢等一系列与衰老相关的改变^[6]。但二氧化硫对于免疫方面的影响报道则相对较少。

一些流行病学研究发现, 大气颗粒物、二氧化硫、吸烟等可导致儿童非特异性免疫功能减低和肺脏功能低下^[7], 二氧化硫进入机体是否会对特异性免疫器官产生不良影响? 本次研究表明, 56 mg/m³、112 mg/m³、168 mg/m³ 二氧化硫持续吸入染毒 1 周对其一般组织学结构影响较小, 但 DNA 凝胶电泳分析

表明高剂量二氧化硫可引起小鼠脾细胞出现明显的凋亡改变, 出现典型的 DNA 梯形条带 DNA ladder, 即由于核酸内切酶的激活 DNA 降解成核小体大小或其整数倍大小的 DNA 片段, 而且在流式细胞分析中也发现高剂量组的细胞凋亡率与对照组相比有显著性差异, 提示相当浓度的二氧化硫有可能使脾细胞凋亡加速, 使外周免疫器官脾脏的功能受到一定程度的损害。

细胞凋亡在生物体的发育过程中起着与细胞增殖同样重要的作用, 它对于清除机体中衰老、突变、不需要的细胞确实起着非常有益的作用, 但如果正常组织凋亡过度, 则可能带来一定的不良后果, 如发生在免疫器官则可使机体免疫功能低下, 使机体清除病原体的能力下降而易发感染或感染后不易控制, 也可使机体对潜在肿瘤细胞清除不力而易患肿瘤。已有研究表明长期二氧化硫吸入与肺部肿瘤密切相关, 一方面可能与二氧化硫直接损伤肺部细胞遗传物质使其突变率增加易患肿瘤有关^[8~11], 另一方面也可能与二氧化硫引起机体的免疫功能低下有关, 本次实验提示在一定剂量下二氧化硫可引起小鼠脾脏细胞凋亡加速, 造成机体免疫功能降低。

参考文献:

[1] Riechelmann H, Maire J, Kierast K, et al. Respiratory epithelium exposed to sulfur dioxide-functional and ultrastructural alterations [J]. *Laryngoscope*, 1995, 105: 295-299.

[2] Podgorski A, Sosnowski TR, Fradon L. Deactivation of the pulmonary surfactant dynamics by toxic aerosols and gases [J]. *J Aerosol Med*, 2004, 14: 455-466.

[3] Gumuslu S, Korgun DK, Biomen S, et al. Effects of sulfur dioxide inhalation plasma Vitamin C and ceruloplasmin in aging rats [J]. *Ind Health*, 2000, 38: 319-322.

[4] Koshin T, Bhaskar KR, Reid LM, et al. Recovery of and epitope recognized by a novel monoclonal antibody from airway lavage during experimental induction of chronic bronchitis [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1990, 2: 453-462.

[5] Gumuslu S, Korgun DK, Biomen S, et al. Effects of sulfur dioxide inhalation plasma Vitamin C and ceruloplasmin in aging rats [J]. *Ind Health*, 2000, 38: 319-322.

[6] Yargicoglu P, Agar A, Gumuslu S, et al. Age-related alteration in antioxidant enzymes, lipid peroxide levels, and somatosensory-evoked potentials; effect of sulfur dioxide [J]. *Arch Environ contam toxicol*, 1999, 37: 554-560.

[7] 李勇, 陈于, 张渝, 等. 环境污染因素对儿童溶菌酶及肺功能影响的典型相关分析 [J]. *环境与健康杂志*, 1993, 10: 53-56.

[8] 孟紫强, 桑楠, 张波, 等. 二氧化硫体内衍生物诱发小鼠骨髓嗜多染红细胞微核的效应 [J]. *环境科学学报*, 2000, 20: 239-243.

[9] Meng Z Q, Zhang L Z. Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by sodium bisulfite [J]. *Mutat Res*, 1992, 298: 63-69.

[10] 孟紫强. 中国田鼠卵巢细胞自发和亚硫酸氢钠诱发突变的基因分子分析 [J]. *中国环境科学*, 1997, 17: 172-174.

[11] Meng Z, Zhang B, Ruan A, et al. Micronuclei induced by sulfur dioxide inhalation in mouse bone-marrow cells in vivo [J]. *Inhal Toxicol*, 2002, 14: 303-309.

缅怀我国著名劳动卫生与职业病学家、医学教育家刘世杰教授

我国著名的公共卫生教育学家、劳动卫生和职业病学家、中国预防医学和劳动卫生学的奠基人之一——刘世杰教授, 因病医治无效, 于 2002 年 8 月 23 日逝世, 享年 89 岁。8 月 30 日, 来自卫生部、北京大学、中华预防医学会、国家疾病预防控制中心和北京市文教卫生系统、有关出版社和医学杂志编辑部等单位领导、专家、教授和亲友 200 余人前往八宝山殡仪馆为刘世杰教授送行, 深切悼念这位我国公共卫生事业的先驱者。

刘世杰教授原名侯扶桑, 祖籍江苏省无锡市, 1913 年生于日本东京。1935 年毕业于沈阳满洲医科大学, 1940 年进入日本庆应大学, 成为第一位在日获得公共卫生学博士学位的中国人。1942 年底归国, 曾在北京大学医学院兼授公共卫生课程。1946 年赴解放区, 任教于晋察冀军区白求恩卫生学校 (白求恩医科大学前身)。中华人民共和国成立后, 刘教授任卫生部保健处第一任处长。1950 年 10 月, 赴抗美援朝第一线, 任东北军区和中国人民志愿军卫生部防疫保健处处长。1952 年秋, 回北京医学院任教, 先后任劳动卫生教研室教授、主任, 卫生系主任, 公共卫生学院名誉院长等职, 为我国的卫生教育事业作出了重大贡献。1954 年, 他和苏联专家一起, 培养了我国第一批公共卫生事业专家。1960 年, 他主编了我国第一部高等医学院校专用的《劳动卫生学》教材。1955 年, 他为我国培养了第一批劳动卫生专业研究生, 迄今为止共培养了 9 名硕士、19 名博士和 4 名博士后。1989 年, 刘世杰教授荣获北京医科大学“桃李奖”。

多年来, 他始终着眼于解决实际工作中最迫切的劳动卫生问题, 经常深入厂矿, 亲自实验研究, 致力于尘肺防治数十年; 他率先提出膜毒理学的概念和理论, 并应用于二氧化硅、镍、镉、铬等的损伤及防治研究。他曾多次获得卫生部科技进步二、三等奖, 2000 年获得卫生部授予的“全国职业卫生先进工作者”光荣称号。1993 年, 在他 80 寿辰时, 成立了“刘世杰预防医学奖励基金委员会”, 奖励基层作出突出贡献的中青年劳动卫生工作者, 为推动我国劳动卫生事业的发展发挥了积极作用。

刘世杰教授的一生, 是为发展我国的公共卫生事业拼搏奋斗的一生, 即使在他生命垂危时刻, 还关心着《职业病防治法》的贯彻实施情况, 关心着西部大开发的卫生防病工作。他生活艰苦朴素, 平易近人, 公正无私、胸怀坦荡, 受到广大师生和社会各界的无比尊敬和爱戴。大家都为失去这样一位披荆斩棘的先驱、诲人不倦的良师、可敬可亲的益友深感悲痛。

(北京大学第三医院职业病研究中心 赵金垣 供稿)