PDGF 和 p-ERK1/2 的蛋白和 mRNA 表达，目的是研究姜黄素对矽肺纤维化发生时致纤维化的细胞因子 PDGF 以及 ERK 信号通路有否影响，结果显示大鼠矽肺模型中 PDGF 以及磷酸化 ERK1/2 的蛋白和 mRNA 的表达水平均增高，而灌胃给予姜黄素的动物上述指标均有所下调，无论是在蛋白水平还是在 mRNA 水平。本实验结果提示姜黄素可以抑制矽肺纤维化大鼠肺组织中重要的致纤维化因子的表达，以及抑制 MAPK 信号通路中 ERK1/2 的活性形式的表达而起到抑制矽肺纤维化程度的作用，尤其是在矽肺发生的较早阶段应用时。这有可能为矽肺的预防甚至早期治疗提供有益的帮助。

参考文献：

[1] Karakiulakis G，Papakonstantino U E，Aletras A J，*et al*. Cell type-specific effect of hypoxia and plateletderived growth factor-BB on extracellular matrix turnover and its consequences for lung remodeling [J]. J Bio Chem，2007，282 (2)：908-915.

[2] Zheng S，Chen A. Curcumin suppresses the expression of extracellular matrix genes in activated hepatic stellate cells by inhibiting gene expression of connective tissue growth factor [J]. Am J Physio Gastronitest Liver Physio，2006，290 (5)：883-893.

[3] 吴春惠，张斌. 姜黄素抗肝纤维化机制研究进展 [J]. 中国中西医结合杂志，2013，33 (1)：135-137.

[4] 张丽，郝小惠，王宏丽，等. 水通道蛋白 1 在矽肺大鼠肺组织中的表达及意义初探 [J]. 中国工业医学杂志，2012，25 (2)：91-93，161.

[5] Li X，Eriksson U. Novel PDGF family members：PDGF-C and PDGF-D [J]. Cytokine Growth Factor Rev，2003，14 (2)：91-98.

[6] Sarjeant J M，Lawrie A，Kinnear C，*et al*. Apolipoprotein D inhibits platelet-derived growth factor-BB-induced vascular smooth muscle cell proliferated by preventing translocation of phosphorylated extracellular signal regulated kinase 1/2 to the nucleus [J]. Arteriosclerosis，Thrombosis & Vascular Biology，2003，23 (12)：2172-2177.

[7] Zhang D，Huang C，Yang C，*et al*. Antifibrotic effects of curcumin are associated with overexpression of cathepsins K and L in bleomycin treated mice and human fibroblasts [J]. Respir Res，2011，12 (9)：154-165.

抑制性寡脱氧核苷酸对染矽尘小鼠肺炎症的影响

Effect of suppressive oligodeoxynucleotides on silica-induced pulmonary inflammation in mice

宋富军[1]，雷鹏[2]，王世鑫[3]

（1. 天津市滨海新区大港卫生防病站，天津　300270；2. 重庆医科大学检验医学院临床检验诊断学教育部重点实验室，重庆　400016；3. 天津市东丽医院，天津　300300）

摘要：将 Balb/c 小鼠 60 只随机分为 4 组，分别为正常组、矽尘组、抑制性寡脱氧核苷酸（Sup ODN）组、对照寡脱氧核苷酸(Con ODN)组。7 d 后处死动物，检测血清 IFN-γ、TNF-α 水平；瑞氏染色作白细胞分类计数；HE 染色观察肺组织的病理改变。结果 Sup ODN 组与矽尘组、Con ODN 组相比，IFN-γ 水平明显降低（$P<0.01$），Sup ODN 可明显减轻肺组织炎症反应，炎性细胞浸润减少。提示 Sup ODN 对染矽尘小鼠肺部炎症有明显的保护作用。

关键词：抑制性寡脱氧核苷酸；矽尘；矽肺炎症

中图分类号：R994　**文献标识码：**B

文章编号：1002-221X(2014)03-0198-03

DOI：10.13631/j.cnki.zggyyx.2014.03.017

抑制性寡脱氧核苷酸（suppressive oligodeoxynucleotides，Sup ODN）是一类富含多聚 G 结构的具有广泛免疫抑制活性的核苷酸序列。研究表明，Sup ODN 具有下调 Th1 型细胞因子和抑制炎症介质产生的作用[1]。矽肺肺泡炎是由吸入大量游离二氧化硅引起的肺部早期病变。在此过程中，巨噬细胞、中性粒细胞等分泌大量炎症介质，同时伴有初始 T 淋巴细胞转化为 Th1 型细胞，并分泌大量 Th1 型细胞因子[2,3]。为探讨 Sup ODN 对矽肺炎症的抑制效应，特观察 Sup ODN 对染矽尘小鼠肺内炎症的影响。

1　材料与方法

1.1　材料

60 只雌性 Balb/c 小鼠（SPF 级），6～8 周龄，体重 18～22 g，购自北京华阜康生物科技股份有限公司（许可证号：SCXK 京 2009-0004，质量合格证明书编号：0278174）。结晶型 SiO_2 标准品购自 Sigma 公司（99% 直径 1～10 μm，80% 直径 <5 μm，经 200℃ 灭活内毒素）；Sup ODN 序列 TTAGGG TTAGGG TTAGGG TTAGGG；对照 ODN（Con ODN）序列为 TTCAAA TTCAAA TTCAAA TTCAAA，以上 2 个 ODN 序列均由上海生工生物工程有限公司合成并纯化。INF-γ、TNF-α ELISA 试剂盒购自武汉华美生物工程有限公司。

1.2　方法

1.2.1　矽肺动物模型的建立　雌性 Balb/c 小鼠 60 只，随机分为正常组、矽尘组、Sup ODN 组、Con ODN 组。实验动物腹腔注射戊巴比妥钠（60 mg/kg），消毒小鼠颈部皮肤并沿中线剪开约 1 cm 长切口，暴露气管。除正常组经气管一次性注入等量生理盐水外，其余各组经气管软骨间隙一次性注入 0.1 ml SiO_2 悬液（5 g/L）到气管内，肌肉及其它组织复位，缝合皮肤。Sup ODN 和 Con ODN 组在造模前 3 h 分别腹腔注射 Sup ODN、Con ODN 各 0.3 ml（1 mg/ml）。

1.2.2　标本的处理　造模 7 d 后，各组小鼠摘眼球放血，4℃，3000 r/min，离心 10 min 取血清备用；同时取一滴血液

收稿日期：2013-09-23；修回日期：2014-03-12

作者简介：宋富军（1972—），男，副主任医师，从事职业卫生工作。

通讯作者：王世鑫，E-mail：wshx-001@163.com。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

制作血涂片。断颈处死小鼠，取出肺组织于 4% 多聚甲醛固定，石蜡包埋，切片作 HE 染色；按照试剂盒说明测定血清 IFN-γ、TNF-α。

1.2.3 血涂片瑞氏染色 取血涂片，常规瑞氏染色，待涂片干燥后进行显微镜白细胞分类计数，共计数 200 个白细胞。

1.2.4 血清中 IFN-γ 和 TNF-α 表达的 ELISA 方法检测 按试剂盒说明书的步骤操作。每个标准品和血清设 2 个重复孔，并增加 2 孔作为空白显色孔，2 孔只加样本稀释液作为零孔，用酶标仪在 450 nm 处测定各孔的光密度。将零孔设为空白对照，用 Curve Expert 1.3 软件绘制标准曲线，根据标准曲线求出血清中 IFN-γ 的浓度。

1.2.5 肺组织 HE 染色 取石蜡切片，二甲苯脱蜡，梯度乙醇脱水后，常规 HE 染色。

1.3 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS11.5 统计软件分析，两组间比较采用 t 检验，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HE 染色

正常组小鼠肺组织结构基本正常。矽尘组小鼠在注入矽尘 7 d 后，肺泡间隔水肿并明显增厚，成纤维细胞、毛细血管增多，肺组织呈间质性肺炎。Sup ODN 组小鼠肺组织炎症反应与矽尘组相比较轻。Con ODN 组小鼠肺组织炎症反应明显，HE 染色与矽尘组病变程度相似。见图 1（封三）。

2.2 白细胞分类计数

与矽尘组比较，Sup ODN 组中性粒细胞显著减少（$P<0.01$），而 Con ODN 组则无明显差异（$P>0.05$）；与矽尘组比较，淋巴细胞在 Sup ODN 组显著升高（$P<0.01$），Con ODN 组则无明显差异（$P>0.05$）。见表 1。

表 1 各组外周血白细胞分类计数比较（$\bar{x} \pm s$）

组别	中性粒细胞	淋巴细胞	单核细胞	嗜酸粒细胞	嗜碱粒细胞
正常组	31.9 ± 6.1	65.2 ± 5.8	1.13 ± 0.99	1.67 ± 2.22	0.13 ± 0.35
矽尘组	59.3 ± 5.8	38.7 ± 6.1	0.93 ± 0.88	1.00 ± 1.13	0.07 ± 0.26
Sup ODN 组	47.7 ± 6.1**	50.0 ± 5.9**	0.87 ± 0.83	1.13 ± 1.13	0.27 ± 0.59
Con ODN 组	58.7 ± 6.2	38.8 ± 6.7	1.07 ± 0.96	0.73 ± 0.88	0.13 ± 0.35

注：与矽尘组比较，**$P<0.01$。

2.3 血清 IFN-γ、TNF-α 表达

IFN-γ 表达在 Sup ODN 组显著低于矽尘组和 Con ODN 组（$P<0.01$），而 TNF-α 表达在矽尘组、Sup ODN 组和 Con ODN 组间无明显差异（$P>0.05$）。见表 2。

表 2 Sup ODN 对小鼠血清 IFN-γ、TNF-α 水平的影响（$\bar{x} \pm s$）

组别	n	IFN-γ（pg/ml）	TNF-α（pg/ml）
正常组	15	280.1 ± 41.3	98.4 ± 10.7
矽尘组	15	886.3 ± 81.7	152.8 ± 16.4
Sup ODN 组	15	478.5 ± 38.6**	142.0 ± 12.9
Con ODN 组	15	894.5 ± 91.6	148.4 ± 12.5

注：与矽尘组比较，**$P<0.01$。

3 讨论

Sup ODN 是一类富含多聚 G 结构的具有广泛免疫抑制活性的核苷酸序列，这类核苷酸序列在哺乳动物端粒中呈高频出现。研究表明，Sup ODN 具有下调 Th1 型细胞因子和抑制炎症介质产生的作用。基于 Sup ODN 的生物学特征，Sup ODN 可用于以免疫过度活化为特征的组织损伤和自身免疫性疾病的治疗。将 Sup ODN 用于一些疾病动物模型的治疗，显示出不同程度的疗效。据报道[4]，将 Sup ODN 用于刀豆蛋白（CoA）建立的肝损伤小鼠模型，发现 Sup ODN 能抑制 CoA 所致 Th1 型细胞因子 IFN-γ 的产生，并上调 Th2 型细胞因子 IL-4 的表达，对肝损伤小鼠确有保护作用，降低小鼠死亡率。对葡萄膜炎小鼠的治疗亦显示了良好的治疗作用[5,6]。提示 Sup ODN 可能对矽肺炎症也有保护效应。

目前的研究认为，矽肺的主要病理特点是早期的肺泡炎及肉芽肿形成，后期是大量成纤维细胞的病理性增生，以及细胞外基质胶原进行性积聚并取代正常的肺组织结构。

吸入体内的矽尘，部分被肺泡巨噬细胞（alveolar macrophage，AM）吞噬后，AM 活化，释放大量的自由基、细胞因子、生长因子、趋化因子、溶酶体酶，同时，天然免疫系统被激活，大量中性粒细胞募集到肺组织内，周围淋巴结中的大量初始 T 淋巴细胞活化成效应 T 淋巴细胞，并向肺炎症部位迁移，效应 T 淋巴细胞分泌大量的细胞因子等，细胞免疫被激活。此时效应 T 淋巴细胞分泌 Th1 型细胞因子，主要包括 IL-2、IFN-γ 等。肺泡炎的特征性病理表现为细胞性结节，即炎症区域有大量的巨噬细胞、中性粒细胞和淋巴细胞聚集，肺泡灌洗液中能够检测出大量的细胞因子[2,3]。

本研究结果表明，Sup ODN 能减轻 SiO_2 诱导的矽肺炎症反应，减少血清中炎症细胞如中性粒细胞，降低小鼠血清中 IFN-γ 的含量。结合 Sato[7] 等的研究结果，可以认为，Sup ODN 可通过抑制 Th1 型细胞因子和趋化因子的产生，减少炎症细胞的浸润来抑制矽尘所致的肺泡炎，从而起到保护肺组织的作用。

参考文献：

[1] Lkeuchi H，Kinjo T，Klinman D M. Effect of suppressive oligodeoxynucleotides on the development of inflammation-induced papillomas [J]. Cancer Prev Res（Phila），2011，4（5）：752-757.

[2] 孔海霞，陈娟娟，刘伟，等. 肺巨噬细胞在矽肺肺纤维化发生发展中的作用 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志，2012，30（4）：318-320.

[3] 翁东，陶莎莎，刘芳炜，等. 矽肺发生发展的免疫学机制概述 [A]. 中国毒理学会放射毒理专委会联合免疫毒理专委会、中国环境诱变剂学会致突、致畸、致癌专委会 2008 年全国学术会议论文集 [C]. 兰州，2008：104-108.

[4] 全俊，刘悦晖. 抑制性寡脱氧核苷酸对肝损伤小鼠 pSTAT4、pSTAT6 和 T-bet 表达的影响及其意义 [J]. 中华感染控制杂志，

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2010，9（3）：151-154.

[5] Fujimoto C，Klinman D M. A suppressive oligodeoxy-ncleotide inhibits ocular infl ammation [J]. Clinical and Experimental Immunology，2009，156：528-534.

[6] Yagci F C，Aslan O. Mammalian telomeric DNA suppresses endotoxin-induced uveitis [J]. J Biol Chem，2010，285（37）：28806-28811.

[7] Sato T，Shimosato 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 asthmatie 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道黏膜损伤加重，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.zggyyx.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/m^3，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。实验采用动式暴露法，用 O_3 发生仪发生 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 ±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，用细胞甩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 ± 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。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

企业健康促进现状评估指标体系的应用和验证（正文见173～176页）

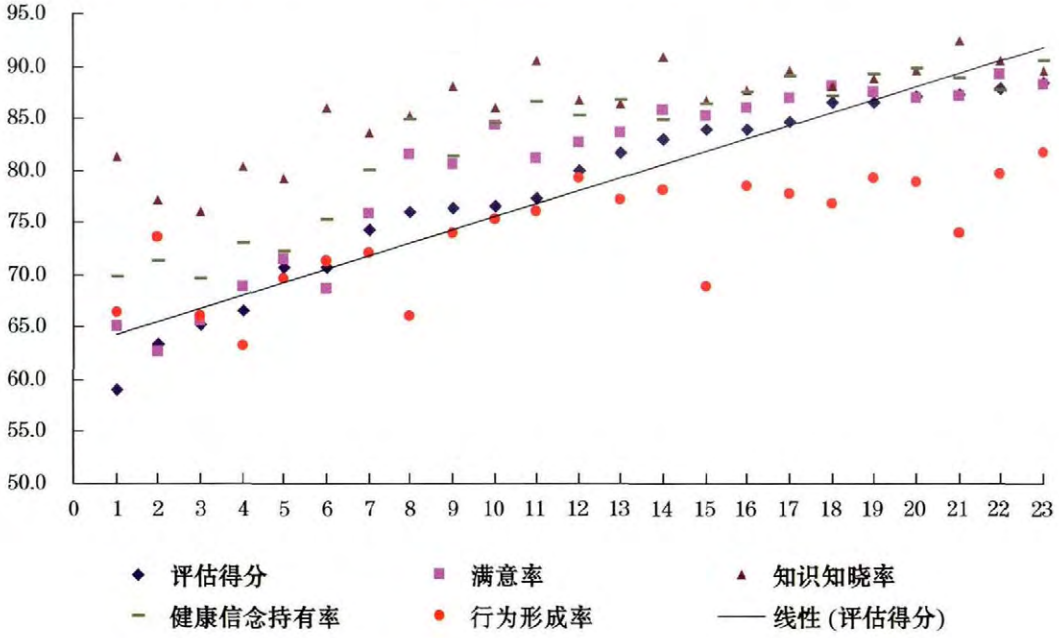

图1　指标体系评估结果与员工满意度及知信行调查情况

抑制性寡脱氧核苷酸对染矽尘小鼠肺炎症的影响（正文见198～200页）

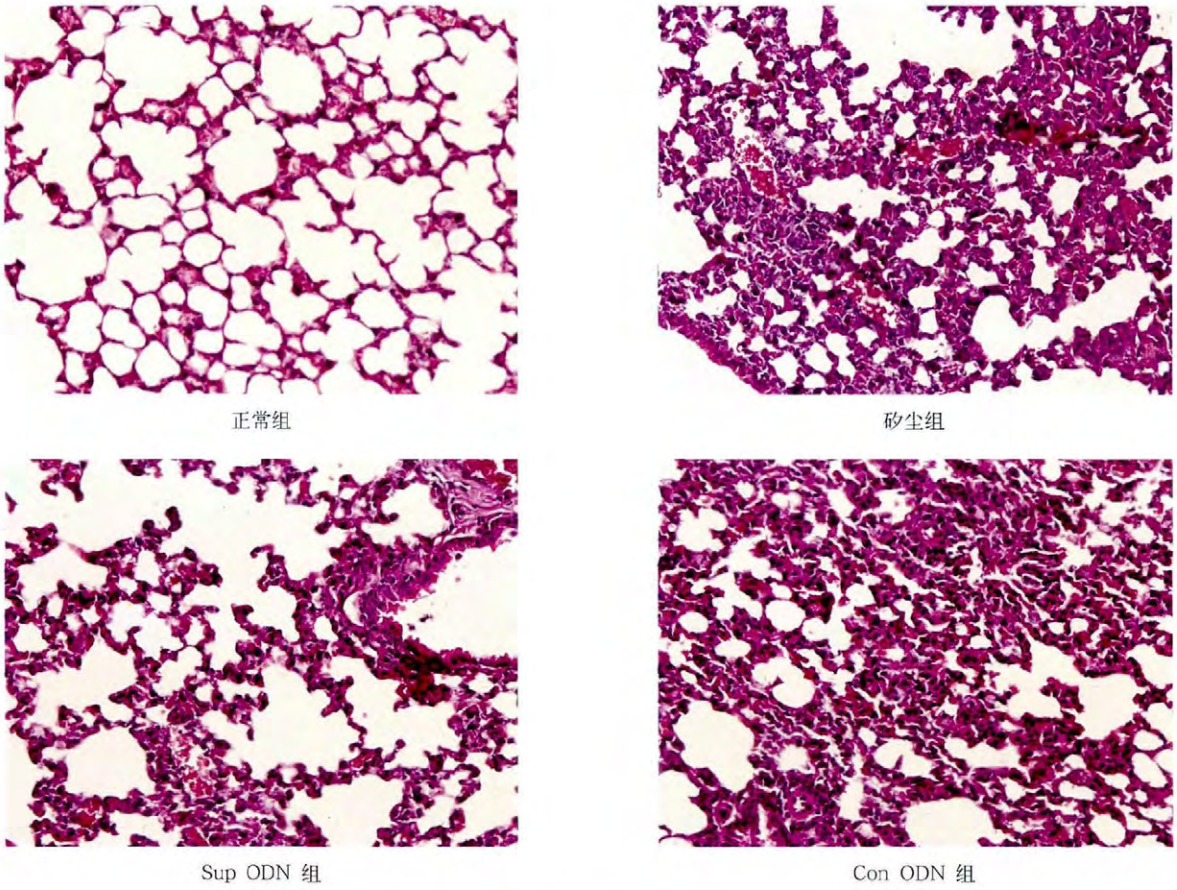

图1　各组肺组织病理观察(HE，×200)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net