

硬金属粉尘暴露大鼠 Th17 细胞的表达

Expression of Th17 cell in hard-dust exposed rats

薛宁^{1,2,3}, 范晓丽², 陈曾曾⁴, 赵丽², 田雨田², 闫永建²

(1. 济南大学/山东省医学科学院医学与生命科学学院, 山东 济南 250062; 2. 山东省职业卫生与职业病防治研究院, 山东 济南 250062; 3. 济南医院, 山东 济南 250013; 4. 济宁市疾病预防控制中心, 山东 济宁 272499)

摘要: 采用 SPF 级雄性大鼠, 随机分为四组, 硬金属高、低剂量组 (各 9 只)、二氧化硅组 (7 只)、生理盐水组 (7 只)。染尘 30 d 处死大鼠, 灌注取肺组织, 进行病理组织学观察; 大鼠取外周血进行流式细胞术检测 Th17 细胞比例。结果显示, Th17 细胞比例硬金属高、低剂量组与生理盐水对照组比较、硬金属低剂量组与高剂量组比较, 二氧化硅组与硬金属高剂量组比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。提示大鼠硬金属粉尘暴露后, Th17 细胞显著性增高, 说明其可能参与了硬金属粉尘的致病作用, 对 Th17 细胞检测可能对硬金属肺病的确定有辅助诊断参考价值。

关键词: Th17 细胞; 硬金属肺病; 硬金属粉尘; 钴

中图分类号: R135.2 **文献标识码:** B

文章编号: 1002-221X(2018)05-0375-02

DOI: 10.13631/j.cnki.zggyyx.2018.05.023

《职业性硬金属肺病的诊断》(GZB290—2017)于 2017 年 5 月 18 日发布^[1]。硬金属肺病 (HMLD) 初期主要表现为过敏性肺炎, 重复接触、致敏可发展为不可逆的肺间质纤维化^[2]。

研究发现, Th17 细胞在感染免疫、自身免疫性疾病中具有重要意义^[3,4]。我们通过观察不同浓度硬金属粉尘暴露后 Th17 细胞在大鼠体内的变化情况, 初步探讨 Th17 细胞在硬金属粉尘致病中的机制及作用, 为临床诊疗提供实验依据。

1 材料与与方法

1.1 试剂与仪器

碳化钨粉, 钴粉, SiO₂ 粉尘 (80% 1~5 μm), 生理盐水, 离心机, FACSCalibur 流式细胞仪 (BECTON DICKINSON 公司) 等。

1.2 实验动物

购于北京维通利华实验动物技术有限公司 (许可证号: SCXK 2012—0001), SPF 级成年雄性大鼠, 体重 180~220 g。实验前适应性喂养 1 周。

1.3 配制染尘试剂

按照 10:1 的比例称碳化钨粉 54.545 mg、钴粉 5.45 mg, 混于 20 ml 生理盐水中, 配制硬金属混悬液 30 mg/ml, 生理盐水稀

释后分别配制硬金属混悬液至 15 mg/ml、10 mg/ml, 置于玻璃瓶, 高温高压灭菌, 120℃, 40 min, 备用; SiO₂ 粉尘 60 mg, 加入 20 ml 生理盐水中, 配制二氧化硅混悬液 30 mg/ml; 称 3 g 水合氯醛, 溶于 30 ml 生理盐水中, 配制 10% 水合氯醛。

1.4 动物分组及染尘

将大鼠随机分组并染苦味酸标号, 硬金属高、低剂量组各 9 只、二氧化硅组 7 只、生理盐水组 7 只, 分别称重。经气管插管, 10% 水合氯醛按照 0.4 mg/100 g 腹腔注射麻醉, 硬金属混悬液 15 mg/ml、10 mg/ml 分别给予高、低剂量染尘 1 ml; 二氧化硅组滴注 1 ml 混悬液 (30 mg/只); 生理盐水组滴注等体积生理盐水。

1.5 样品处理及检测指标

染尘 30 d 后处死大鼠, 四组分别随机选 2 只, 取肺组织固定、切片, 进行苏木素-伊红 (HE) 染色病理组织学观察; 心脏穿刺取外周血 2~4 ml, 标本编号后置于 -80℃ 冰箱中保存, 流式细胞术检测 Th17 细胞的比例。

1.6 流式细胞术检测

大鼠外周静脉血 2 ml, 肝素抗凝。每流式管中分别加入全血 5 μl, 生理盐水 400 μl 稀释。各管中分别加入 APC-CD3、FITC-CD4、PE-IL17 及同型 IgG1 对照单克隆抗体 10 μl, 混匀, 室温避光孵育 15 min。加入溶血素 2 ml, 室温避光 15 min 溶解红细胞。1 500 r/min, 离心 5 min, 去上清。加入 PBS 5 ml, 1 500 r/min, 离心 5 min, 去上清。重复 2 次。200 μl 多聚甲醛固定 15 min。洗涤后加入异硫氰酸, 荧光素 (FITC) 标记 CD4 抗体及固定破膜液。之后使用藻红素 (PE) 标记 IL-17 抗体进行胞内染色, 并设同型对照管。FACSCalibur 流式细胞仪对细胞进行检测。

1.7 统计分析

分析采用 SPSS19.0 软件。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较应用单因素方差分析。P < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 肺组织病理学改变

HE 染色病理切片, 硬金属高剂量组支气管旁可见结节灶并伴有大量淋巴细胞浸润; 周围结缔组织疏松; 肺组织多处出血, 肺泡中充满大量红细胞和巨噬细胞; 大部分肺泡结构被破坏, 肺泡壁断裂。硬金属低剂量组支气管周围肺泡出血, 肺泡腔内充满大量的红细胞和炎性细胞。二氧化硅组肺组织多处矽结节; 结节灶、支气管和血管周围都伴有大量的炎性细胞浸润; 炎性细胞多为单核细胞和淋巴细胞; 大部分肺泡

收稿日期: 2018-08-04; 修回日期: 2018-09-07

基金项目: 山东省自然科学基金面上项目 (编号: ZR2015YL044); 济南市科技局项目“硬金属肺病诊断标准及尿钴测定方法应用推广研究”

作者简介: 薛宁 (1981—), 女, 硕士在读, 主治医师, 研究方向: 职业病学; 范晓丽 (1987—), 女, 硕士, 主治医师, 研究方向: 职业病学。

通信作者: 闫永建, 研究员, E-mail: yyj1212015@163.com。

和支气管无明显异常。生理盐水组肺组织少量局灶性出血,肺泡腔中有少量红细胞;肺泡壁细胞间分布有多量空泡。

2.2 Th17 细胞测定

外周血 Th17 细胞比例单因素方差分析显示,四组组间比较均值的差异有统计学意义 ($F=12.6, P<0.05$);硬金属高、低剂量组与生理盐水组比较,二氧化硅组与生理盐水组比较,二氧化硅组与硬金属高剂量组、硬金属低剂量组与高剂量组比较,差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。见表 1。

表 1 大鼠外周血 Th17 细胞检测 ($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数	Th17 检测
生理盐水组 (a)	5	24.25±2.79
二氧化硅组 (b)	5	30.27±1.61
硬金属低剂量组 (c)	6	29.31±1.58
硬金属高剂量组 (d)	4	34.50±3.58

注: b、c、d 与 a 比较, $P<0.05$; b 与 d 比较, $P<0.05$; c 与 d 比较, $P<0.05$

3 讨论

我们采用气管内注入的实验方法^[5],分别给予大鼠 15 mg/只、10 mg/只硬金属粉尘 30 d 后建立硬金属粉尘大鼠染尘模型^[6]。本次研究显示,硬金属粉尘致病初期病理可见大量淋巴细胞、炎性细胞及少量巨噬细胞浸润,虽未出现硬金属肺病的典型病理改变,肺泡腔内大量单个核组织细胞及多核巨细胞沉积,与早期硬金属肺病过敏性肺炎样病理改变相符^[7]。

硬金属高、低剂量组外周血淋巴细胞中 Th17 细胞比例均高于生理盐水组 ($P<0.05$),提示 Th17 细胞可能与硬金属肺病形成关系密切。硬金属粉尘致病系自身免疫性疾病, Th17 细胞通过其分泌的 IL-17A 来发挥免疫防御作用^[8]。Th17 细胞是一类新发现的高表达 IL-17 的 CD4+T 细胞亚群, Th17 似乎是自身免疫关键因素^[8]。Th17 细胞受 Th1、Th2 细胞的调控,却有别于 Th1、Th2。CD4+T 细胞还可以分化出 Th2 细胞,进入各种其他效应子集,例如 Th17 细胞、滤泡辅助 T 细胞和诱导的 T reg 细胞。Selman M 等^[9]指出人类 HP 中的微阵列分析显示,在 addi-至 Th1 因子, IL-17 和 IL-17 相关转录物也上调。此外,在慢性暴露于嗜热放线菌, CD4+T 细胞未极化至 Th1,而是与具有 IL-17A 和 IL-17 表达的 TH17 细胞差异表达 IL-22^[10]。这项研究确立了 Th17 细胞在随后肺纤维化发展中的重要作用。遗传缺失或抗体介导的缺失 IL-17 可使炎症减轻和防御该疾病^[11]。IL-23 和 Th17 细胞介导中性粒细胞气道炎症,但也上调 Th2 细胞,介导嗜酸性气道炎症。Th17 细胞与 Th2 细胞极力增强抗原诱导的 Th2 细胞介导的嗜酸性粒细胞再激活,招募进入呼吸道诱导气道高反应性^[12]。

硬金属高、低剂量组 Th17 细胞比例差异有统计学意义,且显示随着硬金属粉尘剂量的增加, Th17 细胞的比例增高。

二氧化硅组与硬金属粉尘高剂量组 Th17 细胞比例差异有统计学意义。矽肺的发生发展是一种慢性炎症病理过程,涉及到多种细胞参与,其具体的病理和免疫机制尚未完全阐明。近年来研究发现,大鼠模型矽肺的发生发展涉及到 Th17 细胞

和 Treg 细胞的参与^[13,14]。二氧化硅可激活各种免疫细胞,调查相关的调节性 T 细胞失衡,应答 T 细胞以及 Th17 细胞可能是进一步了解二氧化硅诱导的自身免疫改变的关键^[15]。

综上所述, Th17 细胞可能参与了急性硬金属粉尘致病的发生,因而对 Th17 细胞相关因子的研究更有助于揭示 Th17 细胞在急性硬金属粉尘致病中的机制,对于疾病的诊断和免疫治疗具有一定意义。

参考文献:

- [1] GZB290—2017, 职业性硬金属肺病的诊断 [S].
- [2] Rehfish P, Anderson M, Berg P, *et al.* Lung function and respiratory symptoms in hard metal workers exposed to cobalt [J]. *J Occup Environ Med*, 2012, 54 (4): 409-413.
- [3] Miossec P, Kolls JK. Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation [J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2012, 11 (10): 763-776.
- [4] Harrington LE, Mangan PR, Weaver CT. Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage [J]. *Current Opinion in Immunology*, 2006, 18 (3): 349-356.
- [5] Moriya Y, Sugihara K, Akasu T, *et al.* Importance of extended lymphadenectomy with lateral node dissection for advanced lower rectal cancer [J]. *World Journal of Surgery*, 1997, 21 (7): 728-732.
- [6] 张战赛, 赵艳芳, 唐亮, 等. 大鼠硬金属肺病模型建立及 KL-6 与 TGF- β 表达的研究 [J]. *中华劳动卫生职业病杂志*, 2017, 35 (4): 293-297
- [7] Okuno K, Kobayashi K, Kotani Y, *et al.* A case of hard metal lung disease resembling a hypersensitive pneumonia in radiological images [J]. *Intern Med*, 2010, 49 (12): 1185-1189.
- [8] Annunziato F, Cosmi L, Liotta F, *et al.* Human Th17 Cells//Th17 Cells in Health and Disease [M]. Springer New York, 2011: 231-242.
- [9] Selman M, Pardo A, Barrera L, *et al.* Gene expression profiles distinguish idiopathic pulmonary fibrosis from hypersensitivity pneumonitis [J]. *Am Respir Crit Care Med*, 2006 (173): 188-198.
- [10] Stockinger B, Veldhoen M, Martin B. Th17 T cells: Linking innate and adaptive immunity [J]. *Seminars in Immunology*, 2007, 19 (6): 353-361.
- [11] Simonian PL, Roark CL, Wehrmann F, *et al.* Th17-polarized immune response in a murine model of hypersensitivity pneumonitis and lung fibrosis [J]. *Journal of Immunology*, 2009, 182 (1): 657.
- [12] Wakashin H, Hirose K, Maezawa Y, *et al.* IL-23 and Th17 cells enhance Th2-cell-mediated eosinophilic airway inflammation in mice [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2008, 178 (10): 1023-1032.
- [13] Liu T, Dai W, Li C, *et al.* Baicalin Alleviates silica-induced lung inflammation and fibrosis by inhibiting the Th17 response in C57BL/6 mice [J]. *Journal of Natural Products*, 2015, 78 (12): 3049-3057.
- [14] Chao L, Du S, Lu Y, *et al.* Blocking the 4-1BB pathway ameliorates crystalline silica-induced lung inflammation and fibrosis in mice [J]. *Theranostics*, 2016, 6 (12): 2052-2067.
- [15] Lee S, Hayashi H, Mastuzaki H, *et al.* Silicosis and autoimmunity [J]. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2017, 17 (2): 78-84.