

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.10.004

文章编号: 1005-8982(2016)10-0016-04

论著

大气细颗粒物对大鼠白细胞介素 17 表达的影响及莲花清瘟的干预作用

韩书芝¹, 梁会朋², 张凤蕊¹, 平芬¹

(1. 河北省人民医院 呼吸科, 河北 石家庄 050051; 2. 河北省胸科医院, 河北 石家庄 050048)

摘要: **目的** 探讨大气细颗粒物(PM2.5)急性暴露对大鼠肺部损伤的作用, 及高、中、低剂量莲花清瘟对其的保护作用。 **方法** 48 只 Wistar 大鼠, 随机分为 4 个实验组(PM2.5 染尘组及高、中、低剂量莲花清瘟干预组)和 2 个对照组(空白对照组及生理盐水对照组)。由石家庄市环境监测中心提供空气细颗粒物, 制备 PM2.5 悬液, 采用气管内滴注法。空白对照组无任何干预措施; 生理盐水对照组给予气管滴注生理盐水(1 ml/kg); 染尘组给予一次性气管内滴入 PM2.5 悬液(7.5 mg/kg); 3 组干预组首先分别连续灌胃给予低(生药 2 g/kg)、中(生药 4 g/kg)、高(生药 8 g/kg)剂量的莲花清瘟溶液 4 d, 第 4 天灌胃给药后分别经气管滴入 PM2.5 悬液(7.5 mg/kg)。应用酶联免疫分析(ELISA)法测定各实验组动物血清白细胞介素 17(IL-17)及肺表面活性蛋白 A(SP-A)水平, 并在光镜下观察肺组织病理形态变化。 **结果** 空白对照组和生理盐水对照组间血清 IL-17 及 SP-A 差异无统计学意义($P > 0.05$), 染尘组血清 IL-17 及 SP-A 水平较生理盐水对照组及空白对照组显著升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 高、中、低剂量干预组较染尘组血清 IL-17 及 SP-A 水平均有不同程度降低, 中高剂量组差异有统计学意义($P < 0.05$)。 **结论** PM2.5 急性暴露可以导致大鼠肺部损伤, 莲花清瘟对肺部损伤有保护作用。

关键词: 环境细颗粒物(PM2.5); 肺损伤; 白细胞介素 17; 肺表面活性蛋白 A; 莲花清瘟

中图分类号: R-332

文献标识码: A

Effect of surrounding fine particulate matter (PM2.5) on IL-17 expression in rats and antagonistic effects of Lianhuaqingwen

Shu-zhi Han¹, Hui-peng Liang², Feng-rui Zhang¹, Fen Ping¹

(1. Department of Respiratory Diseases, Hebei General Hospital, Shijiazhuang, Hebei 050051, China; 2. Hebei Hospital of Thoracic Diseases, Shijiazhuang, Hebei 050048, China)

Abstract: Objectives To explore the lung injury of rats due to acute exposure to PM2.5, and to discuss the antagonistic role of Lianhuaqingwen to the injury. **Methods** Forty-eight healthy adult Wistar rats were randomly assigned into four experimental groups (PM2.5 group, low-dose Lianhuaqingwen group, medium-dose Lianhuaqingwen group and high-dose Lianhuaqingwen group) and two control groups (control group and saline control group). The PM2.5 suspension was prepared with fine particulates provided by Shijiazhuang Environmental Monitoring Center. The rat models were developed by exposure to PM2.5 through intratracheal drip. The saline control group was instilled with saline (1 ml/kg) once; the PM2.5 group was instilled with suspension of PM2.5 via trachea (7.5 mg/kg); the three intervention groups were given diet supplemented with different doses of Lianhuaqingwen (2 g/kg, 4 g/kg and 8 g/kg respectively) for 4 days before drip with suspension of PM2.5. Interleukin 17 (IL-17) and surfactant protein A (SP-A) in the serum were measured using ELISA. Pathological changes of the lungs were observed at the same time. **Results** The serum levels of IL-17 and SP-A were not significantly different between the saline control group and the control group ($P > 0.05$). The levels of IL-17 and SP-A in the PM2.5 group were markedly higher than those in the saline control group and the control group ($P < 0.05$). The level of IL-17 was significant different

收稿日期: 2015-12-04

between the high-dose Lianhuaqingwen group and the PM2.5 group ($P < 0.05$), and the level of IL-17 in each intervention group was markedly changed compared with that in the PM2.5 group ($P < 0.05$). **Conclusions** The acute exposure to PM2.5 can induce injury to rat's lungs. Lianhuaqingwen could produce antagonistic effects to inflammatory injury to rat's lung tissues.

Keywords: fine particulate matter (PM2.5); inflammatory injury; interleukin 17; surfactant protein A; Lianhuaqingwen

大量流行病学研究表明,大气细颗粒物(PM2.5)与呼吸系统、心血管系统疾病及癌症等的入院率、发病率、死亡率密切相关^[1]。PM2.5 对健康的不利影响首先表现在呼吸系统,它会增加呼吸道感染、肺结核、肺癌等呼吸系统疾病的发病率^[2]。PM2.5 通过损伤呼吸道黏膜上皮细胞,部分沉积在肺泡内或肺间质内,激活肺内的免疫细胞,引起气道炎症反应,造成呼吸系统疾病^[3]。中药复方制剂连花清瘟胶囊具有清瘟解毒,宣肺泄热的功效,已被广泛地应用于多种流感病毒感染引起的呼吸系统疾病^[4]。本研究采集本地区大气细颗粒物,制备 PM2.5 悬液,观察 PM2.5 暴露及连花清瘟干预后大鼠血清中白细胞介素 17(interleukin, IL-17)及表面活性蛋白 A(surfactant protein, SP-A)的变化,探讨 PM2.5 对大鼠肺的损伤作用及连花清瘟的保护作用。

1 材料与方法

1.1 PM2.5 悬液配制

PM2.5 由石家庄市环境监测中心提供,采用 TEOM1405D 双通道颗粒物监测仪收集大气细颗粒物,洗脱滤膜颗粒物,冷冻干燥,使用前以灭菌注射用水配制成浓度为 7.5 mg/ml PM2.5 悬液,超声震荡混匀。连花清瘟溶液为连花清瘟干膏粉 41.73 g、20.87 g 及 10.43 g 分别加入羟甲基纤维素钠溶液,配制成 80%、40%和 20%的高、中、低剂量连花清瘟溶液。

1.2 实验动物分组及给药方法

48 只雄性 Wistar 大鼠(河北医科大学实验动物中心提供),体重 180 ~ 200 g,随机分为 4 个实验组(PM2.5 染尘组及高、中、低剂量连花清瘟干预组)和 2 个对照组(空白对照组及生理盐水对照组),每组 8 只。实验动物在丙戊酸钠腹腔注射麻醉下气管注入 PM2.5 悬液染尘。空白对照组不予任何干预措施,生理盐水对照组给予气管内注入生理盐水(1 ml/kg) 1 次。染尘组给予气管内注入 PM2.5 悬液 1 ml/kg (7.5 mg/kg) 1 次。连花清瘟干预组给予连花清瘟溶液 10 ml/kg (相当于给予高、中、低剂量连花清瘟 8g/kg、4 g/kg 及 2 g/kg)灌胃,共给药 4 d,第 4 天灌胃

后给予 PM2.5 悬液染尘,剂量及次数同染尘组。

1.3 标本采集

丙戊酸钠腹腔注射麻醉下腹主动脉采集动脉血 5 ml 后放血处死大鼠(空白对照组直接处死,生理盐水对照组气管注入生理盐水后 24 h 处死,各实验组均染尘 24 h 后处死)。所取动脉血 1 500 r/min 离心 15 min,分离血清,-80℃冰箱保存。

1.4 指标检测

采用酶联免疫分析(ELISA)法测定(试剂盒购自美国 BG 公司)血清中 IL-17 和 SP-A 水平,操作步骤按试剂盒说明书进行。

1.5 统计学方法

采用 SPSS17.0 统计软件进行数据分析,数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠肺组织病理

2 个对照组病理切片未见异常表现(见图 1、2);染尘组(见图 3)光镜下可见肺泡间隔增厚,肺泡腔缩小,炎症细胞渗出,小支气管壁增厚,管腔内杯状细胞增生,周围炎症细胞浸润,肺间质纤维组织增生,间质水肿,毛细血管充血,小血管管壁增厚,周围可见嗜酸性粒细胞浸润。各干预组(见图 4~6)可见随连花清瘟剂量增加,肺泡腔内炎症细胞渗出逐渐减轻。

2.2 对照组、染尘组及连花清瘟组血清 IL-17 和 SP-A 水平的变化

空白对照组及生理盐水对照组大鼠血清 IL-17 和 SP-A 水平差异无统计学意义(均 $P > 0.05$),染尘组大鼠血清 IL-17 和 SP-A 水平均显著高于空白对照组及生理盐水对照组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);中、高剂量连花清瘟干预组血清 IL-17 和 SP-A 水平均低于染尘组,差异有统计学意义($P < 0.05$);低剂量连花清瘟干预组血清 IL-17 和 SP-A 水平低于染尘组,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。见附表。

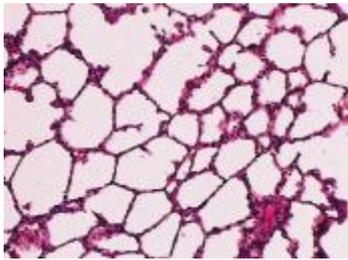


图 1 生理盐水对照组 (×200)

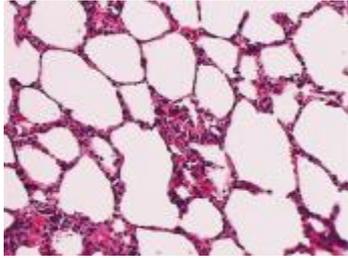


图 2 空白对照组 (×200)

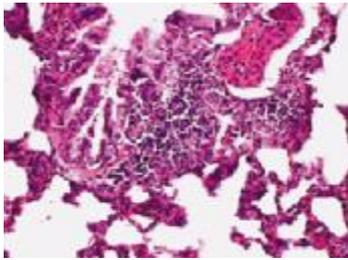


图 3 PM2.5 染尘组 (×200)

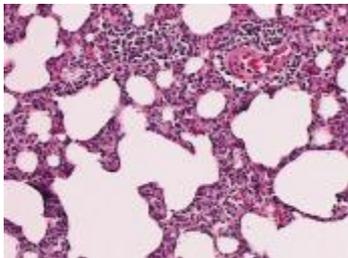


图 4 低剂量莲花清瘟干预组 (×200)

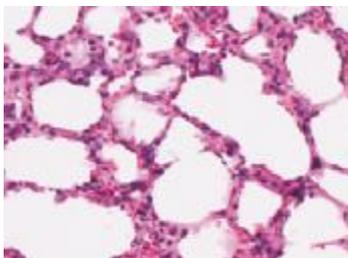


图 5 中剂量莲花清瘟干预组 (×200)

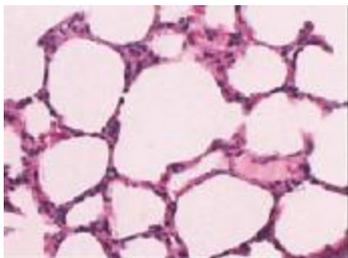


图 6 高剂量莲花清瘟干预组 (×200)

附表 对照组、染尘组及莲花清瘟干预组血清 IL-17 和 SPA 水平的比较 (n=8, $\bar{x} \pm s$)

分组	IL-17/(pg/ml)	SP-A/(mg/L)
空白对照组	98.99 ± 12.26	3.36 ± 0.92
生理盐水对照组	96.56 ± 10.82	3.75 ± 1.07
PM2.5 染尘组	163.51 ± 13.26	12.49 ± 2.53
低剂量莲花清瘟组	158.37 ± 15.92	11.17 ± 1.13
中剂量莲花清瘟组	132.96 ± 15.01	8.56 ± 1.55
高剂量莲花清瘟组	108.65 ± 11.23	5.07 ± 1.51
F 值	33.62	38.31
P 值	0.000	0.000

3 讨论

大气污染物经呼吸道吸收可直接作用于呼吸系统,因大气污染物含有害气体、化学物质及金属等,对机体的影响可因含有的物质不同而不同,其中颗粒物 PM2.5 对人体的损害较大,它不但自身有危害性,还可以吸附多种有害气体和病原微生物^[5]。PM2.5 可随空气进入小气道和肺泡并持续作用,当其到达肺泡时,被气道纤毛系统清除或者被巨噬细胞吞噬^[6]。PM2.5 被 AM 吞噬过程中可通过与之相关的编码转录因子和炎症相关因子基因转录水平的增高诱导大量促炎症因子释放,破坏细胞因子网络平衡,从而调节和启动肺局部炎症反应,诱导肺部炎症损伤。另一方面,PM2.5 对肺部机械屏障作用的破坏使其清除异物作用下降,进一步诱导更严重的炎症反应^[7]。

莲花清瘟主要成分为连翘、金银花、麻黄、杏仁、石膏、板蓝根、绵马贯众、鱼腥草、广藿香、大黄、红景天、薄荷脑、甘草,从中药成分来看符合中医治疗炎症疾病的特点,它除了具有明确的抗病毒作用,对急性肺部感染效果显著,还具有一定的免疫调节作用^[8]。流行病学调查及临床试验证实其提高细胞免疫功能,抑制病毒感染后的肺部炎症性损害^[7]。研究发现处方中麻黄、甘草能抑制大鼠肺组织肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor α , TNF- α),白细胞介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)含量升高,具有较强抗炎作用;大黄游离蒽醌也可抑制 TNF- α 等炎症介质的释放,减轻机体炎症反应^[9-10]。夏敬文等^[11]研究也发现莲花清瘟可显著降低慢性阻塞性肺病大鼠模型血清、肺组织匀浆及肺泡灌洗液中 IL-8 和 TNF- α 含量,提示莲花清瘟对气道炎症有抑制作用。

IL-17 是近年来人们发现的一种新的细胞因

子,主要由 Th17 细胞产生。IL-17 是一种促炎症细胞因子,也是炎症反应的早期启动子,因其在诱导炎症方面具有强大的作用而备受重视。IL-17 与其受体结合,主要通过 NF- κ B-DNA 途径和有丝分裂原激活激酶途径发挥其生物学作用^[12]。IL-17 能诱导 IL-8、IL-6、TNF- α 等多种细胞因子和炎症介质的产生,导致机体产生强烈的炎症反应。而 IL-8、IL-6、TNF- α 在吸烟导致肺损伤的发病机制中具有重要作用^[13]。IL-17 还可通过促进 C-X-C 趋化因子诱导中性粒细胞活化和募集,促进气道炎症反应,参与肺损伤^[14-15]。本研究结果提示 PM2.5 染尘组 IL-17 明显高于空白对照组和生理盐水对照组,中、高剂量连花清瘟干预组 IL-17 明显低于染尘组,提示 PM2.5 通过诱导炎症反应导致肺损伤,连花清瘟通过抑制炎症反应减轻 PM2.5 导致的肺损伤。

肺表面活性物质是覆盖于肺泡表面,分为有 4 种特定表面活性蛋白 A、B、C 和 D,SP-A、SP-D 为水溶性蛋白,主要调节肺免疫功能。SP-A 可通过损伤的肺泡-毛细血管膜屏障进入血液循环而成为肺损伤的血清标志物。血清中 SP-A 的量和肺损伤程度密切相关。SP-A 是先天免疫系统的一部分,可通过与抗原递呈细胞和 T 淋巴细胞相互作用来调节先天免疫系统;也可直接作用于 B 淋巴细胞或间接通过刺激免疫细胞产生细胞因子作用于 B 淋巴细胞,使其激活并产生免疫球蛋白;通过抑制某些细胞因子和炎症介质的合成与释放,从而抑制炎症反应,可与特异性变应原结合,在气道炎症中起重要的免疫调节作用^[16]。本研究结果提示 PM2.5 染尘组 SP-A 明显高于空白对照组和生理盐水对照组,中、高剂量连花清瘟干预组 SP-A 明显低于染尘组,提示 PM2.5 通过损害肺的免疫功能导致肺损伤,连花清瘟通过调节免疫功能拮抗 PM2.5 导致的肺损伤。

综上所述,本实验证实 PM2.5 急性暴露可导致大鼠免疫功能受损及肺部炎症,中、高剂量连花清瘟可保护免疫功能,抑制炎症反应,其具体调节机制有待进一步研究。

参 考 文 献:

- [1] TALBOTT E O, RAGER J R, BENSON S, et al. A case-crossover analysis of the impact of PM2.5 On cardiovascular disease hospitalizations for selected CDC tracking states[J]. *Environ Res*, 2014, 134 (10): 455-465.
- [2] DELFINO R J, WU J, TJOA T, et al. Asthma morbidity and ambient air pollution: effect modification by residential traffic-related air pollution[J]. *Epidemiology*, 2014, 25(1): 48-57.
- [3] SHUKLA A, TIMBLIN C, BERUBE K, et al. Inhaled particulate matter Causes expression of nuclear factor (NF)-kappaB-related genes and oxidant-dependent NF-kappaB activation in vitro[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2000, 23(2): 182-187.
- [4] 赵明敬, 赵晓琴, 赵威. 连花清瘟胶囊治疗急性上呼吸道感染的临床效果评价[J]. *中华医院感染学杂志*, 2015, 25(4): 839-841.
- [5] LAUMBACH R J. Outdoor air pollutants and patient health[J]. *Am Fam Physician*, 2010, 81(2): 175-180.
- [6] LUO B, SHI H, WANG L, et al. Rat lung response to PM2.5 exposure under different cold stresses [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2014, 11(12): 12915-12926.
- [7] PHIPPS J C, ARONOFF D M, CURTIS J L, et al. Cigarette smoke exposure impairs pulmonary bacterial clearance and alveolar macrophage complement-mediated phagocytosis of streptococcus pneumoniae[J]. *Infect Immun*, 2010, 78(3): 1214-1220.
- [8] 董樑, 夏敬文, 龚益, 等. 连花清瘟胶囊治疗慢性阻塞性肺疾病急性加重期的临床疗效和作用机制[J]. *中成药*, 2014, 36(5): 926-929.
- [9] 赵杰, 余林中, 方芳, 等. 麻黄-甘草药对的抗炎作用及机制研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(15): 163-166.
- [10] 张燕, 王平, 杨永茂, 等. 大黄游离蒽醌对犬重症急性胰腺炎早期肠损伤的保护作用[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(5): 172-176.
- [11] 夏敬文, 陈小东, 张静, 等. 连花清瘟胶囊对慢性阻塞性肺病的治疗作用[J]. *复旦学报(医学版)*, 2008, 35(3): 441-444.
- [12] 张莉, 刘卫敏, 吴开松, 等. 慢性阻塞性肺疾病患者白介素 2、6、10、17 及 22 表达研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2011, 21(24): 3067-3069.
- [13] 王立婧, 闫亮. 吸烟对 COPD 患者肺功能及 IL-8 和 TNF- α 的影响[J]. *医学综述*, 2014, 20(24): 4606-4607.
- [14] YAMADA H, NAKASHIMA Y, OKAZAKI K, et al. Th1 but not Th17 cells predominate in the joints of patients with rheumatoid arthritis[J]. *Ann Rheum Dis*, 2008, 67(9): 1299-1304.
- [15] ZHANG J, CHU S, ZHONG X, et al. Increased expression of CD4+IL-17+cells in the lung tissue of patients with stable chronic obstructive pulmonary disease(COPD) and smokers[J]. *International Immunopharmacology*, 2013, 15(1): 58-66.
- [16] 闫立成, 曹福源, 赵海鹰, 等. 肺表面活性蛋白作为矽肺患者早期生物标志物的研究[J]. *现代预防医学*, 2015, 42(9): 1562-1563. (张蕾 编辑)