

论著

孕期硝酸镧暴露对子代大鼠免疫的影响

刘丹丹^{1,2}, 杨辉², 张文众², 贾旭东², 刘兆平², 宋雁², 裴秋玲¹(1. 山西医科大学公共卫生学院, 山西 太原 030001; 2. 国家食品安全风险评估中心
卫生部食品安全风险评估重点实验室, 北京 100022)

摘要:目的 通过检测孕期染毒大鼠的干扰素、白细胞介素, 脾 T 淋巴细胞、脾 B 淋巴细胞增殖能力, 自然杀伤 (NK) 细胞功能等指标, 探讨大鼠孕期染毒硝酸镧对子代大鼠免疫的影响。方法 选取 SPF 级成年 SD 大鼠按雌雄 2:1 的比例交配, 每日观察阴栓确定受孕情况, 获得 40 只孕鼠, 随机分为对照组、低剂量组、中剂量组、高剂量组, 每组 10 只, 于妊娠的第 7 天至第 16 天灌胃硝酸镧溶液, 剂量分别为 0、2、20、60 mg/kg BW。子代大鼠出生后第 4 天 (PND4) 进行窝标准化, 使得每窝子代大鼠数目均为 4 只, 雌雄各半。断乳后子代大鼠分笼饲养, 每窝选取雌雄各一只作为 A 队列, 另每窝选取雌雄各一只作为 B 队列。其中 A 队列 80 只子代大鼠出生后第 52 天 (PND52) 进行免疫毒性评价, 观察指标为主要脏器脏体比, 外周血淋巴细胞分型以及血清 γ -干扰素 (γ -IFN)、白细胞介素-2 (IL-2)、IL-4、IL-1 α 、IL-10、肿瘤坏死因子 (TNF) 含量的检测; B 队列 80 只子代大鼠于出生后第 55 天 (PND55) 取脾进行 T 细胞依赖抗体反应试验以及检测脾 T 淋巴细胞和脾 B 淋巴细胞增殖能力。试验期间每周称取子代大鼠体质量。结果 子代大鼠体质量低、中、高剂量组与对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。肝、肾、肺、脑、脾、胸腺相对重量与对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。高剂量组雄性子代大鼠脾 T 淋巴细胞增殖能力高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 且存在剂量-反应关系; 试验组雌性子代大鼠全血 NK 细胞数量均较对照组升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 且存在明显的剂量-反应关系。从试验结果得出基准剂量下限为 0.21 mg/kg BW。结论 本试验条件下母鼠孕期染毒硝酸镧对子代大鼠的 NK 细胞、脾 T 淋巴细胞产生轻微刺激作用, 但未发现硝酸镧对子代大鼠产生免疫毒性作用。

关键词: 稀土; 硝酸镧; 大鼠; 免疫; 干扰素; 白细胞介素; 脾 T 淋巴细胞; NK 细胞; 毒理试验; 免疫毒性

中图分类号: R155 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-8456(2017)03-0257-07

DOI: 10.13590/j.cjfh.2017.03.002

Immune response of lanthanum nitrate exposure on rat offspringLIU Dan-dan^{1,2}, YANG Hui², ZHANG Wen-zhong², JIA Xu-dong²,
LIU Zhao-ping², SONG Yan², PEI Qiu-ling¹

(1. School of Public Health, Shanxi Medical University, Shanxi Taiyuan 030001, China;

2. Key Laboratory of Food Safety Risk Assessment of Ministry of Health, China National Center
for Food Safety Risk Assessment, Beijing 100022, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of lanthanum nitrate on immune development of offspring rats, which exposed to pregnant rats, by measuring the level of interferon, interleukin, and the proliferation of spleen T lymphocyte, spleen B lymphocyte and natural killer (NK) cells. **Methods** Pregnant SD rats were randomly divided into control group, low dose group, middle dose group and high dose group, with 10 rats in each group. The rats were treated with lanthanum nitrate at of 0, 2, 20, and 60 mg/kg BW respectively, from gestation day 7 to gestation day 16. On postnatal day 4 (PND4), the number of rats was reduced to 4 (2 male and 2 female per litter), about 160 rats in the four groups. One male and one female from each litter were chosen as A queue, and the other one male and one female were B queue. On postnatal day 52 (PND52), rats of the A queue were observed including body weight, peripheral blood lymphocyte typing and serum γ -interferon (γ -IFN), interleukin-2 (IL-2), IL-4, IL-1 α , IL-10, and tumor necrosis factor (TNF) content. The rats of B queue were detected T-dependent antigen response and lymphocytes proliferation on postnatal day 55 (PND55). Offspring rats were weighed every week during the experiment. **Results** There was no significant difference between the experimental

收稿日期: 2017-04-18

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (81402683)

作者简介: 刘丹丹 女 硕士生 研究方向为食品毒理 E-mail: 690255864@qq.com

通信作者: 裴秋玲 女 教授 研究方向为卫生毒理 E-mail: 924969007@qq.com

宋雁 女 副研究员 研究方向为食品安全风险评估和食品毒理学 E-mail: songyan@cfsa.net.cn

groups and the control group ($P > 0.05$), including the relative weight of liver, kidney, lung, brain, spleen and thymus. Spleen T lymphocyte proliferation in male rats of the high dose group was higher than the control group ($P < 0.05$), with a dose-response relationship. The number of blood NK cells in female rats of the experimental groups were more than the control group ($P < 0.05$) with, a dose-response relationship. The results show that benchmark dose lower bound was 0.21 mg/kg BW.

Conclusion Exposure to lanthanum nitrate during pregnant period had a slight stimulation on NK cell and spleen T lymphocytes, however, there was no significant toxicity on the immune system development of rats offspring.

Key words: Rare earth; lanthanum nitrate; rat; immune; interferon; interleukin; spleen T lymphocytes; natural killer cell; toxicological tests; immunotoxicity

稀土元素(REEs)包括15种镧系元素及钪和钇共17种元素,镧是稀土元素的一种,是自然界中含量较多的稀土元素,是最具代表性的轻稀土元素之一,化学性质活泼,几乎能与所有的元素发生反应。镧离子主要通过静电引力与配位体形成离子配位键络合物,镧元素的离子半径和化学性能与钙相近,可影响钙的转运和生理功能。镧可起非特异性磷酸酶作用,还可与生物体内多种组织成分,如氨基酸、蛋白质、糖、维生素、含氧酸、辅酶等相互作用,从而导致细胞内一系列生理、生化的变化。我国是世界上稀土资源最丰富的国家,镧尤其是硝酸镧在我国得到广泛应用,以致环境中稀土元素水平逐渐上升,土壤、饮用水中均可检出镧元素,部分食品中稀土元素含量较高,尤其是茶叶中稀土含量超过现行食品安全限量标准的比例较大,中国是茶叶的主要生产国、出口国、消费国,因而逐渐引起学术界专家学者的注意^[1-2]。已有报道^[3]称长期摄入镧元素可能会引起免疫毒性,但目前缺乏相关毒理学资料,且毒性机制、敏感靶点和生物标志物还不清楚。免疫系统是机体较为敏感的系统,免疫系统效应变化是毒理学安全性评价中较为敏感的指标,可从整体、细胞、分子上的不同水平评价免疫功能变化^[3]。本试验选用硝酸镧作为受试物,探讨大鼠孕期染毒硝酸镧对子代免疫的影响,并获得敏感的生物标志物。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

试验采用健康成年SD大鼠(SPF级),雄鼠体重质量300~350g,雌鼠体重质量220~260g,年龄在8周左右,购自华阜康生物科技股份有限公司[合格证号:SCXK(京)-2014-0004],并饲养于中国疾病预防控制中心职业卫生所实验动物所[许可证号:SYXK(京)-2014-0043]。试验期间大鼠摄食饲料购自北京科澳协力饲料有限公司[合格证号:SCXK(京)-2014-0010],动物自由饮水和进食,动物房内保持安静、清洁、通风和自然光照状态,温度

21~24℃,相对湿度40%~70%,动物照度15~20Lx,换气次数 ≥ 15 次/h,12h昼夜交替,空气清洁度7级,噪声db(A) ≤ 60 。每天观察动物的一般状况,包括活动能力、精神状态、行为表现、被毛和粪便情况等。

1.1.2 主要仪器与试剂

流式细胞仪(美国BD FACS Calibur)、酶标仪(Denley Dragon,美国Thermo)、二氧化碳培养箱、超净工作台、磁力搅拌器、电子秤、恒温水浴锅。

氧化镧粉末(用稀硝酸溶液配制,纯度为99.99%,北京有色金属研究总院),绵羊红细胞、冻干豚鼠血清均购自北京博尔西科技有限公司,水杨酸(SA)缓冲液(行知生物科技有限公司),Hank's液、RPMI1640培养液、青链霉素、胎牛血清均购自美国HyClone,磷酸盐(PBS)缓冲液、氨基酸溶液、谷氨酰胺均购自美国Gibco,刀豆蛋白(ConA)、脂多糖(LPS)均购自美国Sigma,T/B/NK流式检测抗体、CD4/CD8/CD3流式检测抗体、CBA Flex检测试剂盒、染色液均购自美国BD,琼脂糖、MTS细胞检测试剂盒均购自美国Promega。

硝酸镧:氧化镧粉末加热溶解于稀硝酸溶液(1:1稀释),完全溶解为无色透明溶液后制成硝酸镧储备液。使用前用去离子水稀释硝酸镧储备液,稀释过程中不断加热(< 60 ℃)并滴加少量饱和氢氧化钠溶液调节pH至6.0。

ConA液:用1×PBS配制200μg/ml的ConA液,临用时用0.2μm的微孔滤膜过滤除菌,并将ConA液稀释至50μg/ml。(LPS液配制同上。)

完全培养基(200ml):RPMI1640培养液加20ml 10%胎牛血清,加2ml 1%谷氨酰胺(200mmol/L),加1ml青霉素(100U/ml),加1ml链霉素(100μg/L),加1ml氨基酸(100×),4℃保存。

1.2 方法

1.2.1 动物处理

SPF级SD大鼠按雌雄2:1的比例交配,发现阴栓视为孕鼠,将40只孕鼠随机分为4组,即对照组以及硝酸镧低、中、高剂量组,每组10只。于孕鼠妊娠的第7天至第16天灌胃硝酸镧水溶液,每日一

次,硝酸镉的剂量分别为 2、20、60 mg/kg BW,对照组灌胃等量蒸馏水,按体质量每隔 3 d 调整一次灌胃量。子代大鼠出生后第 4 天(PND4)进行窝标准化,随机剔除多余子代大鼠,使得每窝子代大鼠数目均为 4 只,雌雄各半,每组 10 窝。断乳后处死母鼠,子代大鼠按组分笼饲养,每窝选取雌雄各 1 只作为 A 队列共 80 只,另每窝选取雌雄各 1 只作为 B 队列共 80 只。

1.2.2 体质量及脏器系数

选取 A 队列 80 只子代大鼠,其中包括 40 只雌鼠 40 只雄鼠,记录子代大鼠出生后周体质量,在 PND52 称终体质量、真空采血管采血 2 支[1 支为乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝管,另外 1 支为普通非抗凝管,分别用于测全血淋巴细胞分型和血清细胞因子],迅速摘取肝、肾、肺、脑、脾、胸腺称重后保存备用。

1.2.3 脾 T 淋巴细胞依赖抗体反应试验(TDAR)

选取 B 队列 80 只子代大鼠,其中包括 40 只雌鼠 40 只雄鼠,进行 TDAR 和淋巴细胞增殖试验。

脱纤维绵羊血用 PBS 洗涤 3 次,2 000 r/min 离心 10 min,配制成 2% 绵羊红细胞溶液,每只子代大鼠腹腔注射 0.6 ml。5 d 后大鼠麻醉处死,取脾脏称重,放在盛有 Hank's 液的平皿内,清洗后磨碎分离脾 T 淋巴细胞,将细胞悬浮于 1 ml Hank's 液,1 000 r/min 离心 10 min,Hank's 液洗 2 次,细胞离心后悬浮于 1 ml RPMI1640 培养液中计数,将细胞浓度调整为 5×10^6 个/ml。0.8% 琼脂糖溶液与 pH = 7.2~7.4 等量、两倍浓度 Hank's 液混合,47 °C 水浴中分装,每份脾细胞悬液平行做两个,在小试管中逐一加入 350 μ l 琼脂液、25 μ l 10% 的绵羊红细胞溶液、100 μ l 脾细胞、25 μ l 豚鼠补体,共 500 μ l 液体迅速倾倒在 30 mm 小平皿内,37 °C 孵育 3 h 后用肉眼或者放大镜观察溶血空斑的数量^[4-6]。

1.2.4 淋巴细胞增殖试验

ConA 诱导的脾 T 淋巴细胞增殖试验:将细胞浓度调整为 1×10^6 个/ml。将细胞悬液分两孔加入 96 孔培养板中,每孔 90 μ l,一孔加 10 μ l 50 μ g/ml ConA 液,另一孔加 10 μ l 完全培养基作对照,另设不加细胞的空白对照;置于 5% CO₂ 孵箱,37 °C 培养 72 h,培养结束前 4 h,每孔加 20 μ l 四唑盐(MTS),继续培养 4 h,培养结束后,酶标仪 490 nm 处测定吸光度值。

LPS 诱导的脾 B 淋巴细胞增殖试验:按照 1.1.2 所述方法配制 50 μ g/ml 的 LPS 液,配制完全培养基。获得 1×10^6 个/ml 的脾细胞悬液,加入到 96 孔培养板中,每孔 90 μ l,制作两份平行样品,其中一孔加 10 μ l 50 μ g/ml LPS 液,另一孔加

10 μ l 完全培养基做对照,另设不加细胞的空白对照;将培养板置于 5% CO₂ 孵箱,37 °C 培养 68 h,每孔加 20 μ l MTS,继续培养 4 h,培养结束后,酶标仪 490 nm 处测定吸光度值^[7]。

1.2.5 外周血淋巴细胞分型

将淋巴细胞重悬于染色液中,每管加入 1 ml 预冷的染色液,4 °C 1 247 r/min 离心 5 min,重复 2 次,用预冷的染色液调整细胞终浓度为 2×10^7 个/ml,将 100 μ l 细胞悬液(10^6 个细胞)转移至流式管中,每管加入适量特异性表面抗体,冰上避光孵育 20 min。用适量的染色液清洗细胞 2 次,每次 1 ml/管,1 247 r/min 离心 5 min,倒掉上清,轻拍试管混匀细胞。每个试管加 0.5 ml 染色液重悬细胞后上流式细胞仪检测。

1.2.6 血清细胞因子检测

用 4 ml 稀释液稀释细胞因子标准品,室温放置 15 min,取 9 支流式管作为标准管,每管加入 500 μ l 稀释液,梯度稀释为 1:2、1:4、1:8、1:16、1:32、1:64、1:128、1:256,最后一只加入 500 μ l 稀释液作为阴性对照。按照每个指标每份样品 1 μ l 微球的量,50 倍稀释混合 Rat Soluble Protein Flex Set 捕捉微球待用。样品管中每管加入 50 μ l 待测样品,轻轻混匀捕捉混合微球,吸取 50 μ l 加入样品管中,室温孵育 1 h。所有试验管中加入藻红蛋白(PE)检测试剂 50 μ l,轻轻振荡混匀。室温孵育 2 h。加入 1 ml wash buffer 清洗液 1 018 r/min 离心 5 min,去上清。加入 300 μ l wash buffer 清洗,振荡重悬微球。上机检测 γ -干扰素(γ -IFN)、白细胞介素-2(IL-2)、IL-4、IL-1 α 、IL-10、肿瘤坏死因子(TNF)含量。用 FCAP Array 3.0 进行标准曲线绘制及数据分析^[8]。

1.3 数据处理及统计学分析

1.3.1 各组间均数比较

试验结果以均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 19.0 软件进行单因素方差分析,方差齐时组间均数比较采用 LSD 法,方差不齐时组间均数比较采用 Dunnett's T3 法,设定检验水准 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

1.3.2 基准剂量(BMD)法分析剂量-反应关系

使用基准剂量软件 BMD5 2.6.0.1(美国环境保护署)分析大鼠各指标的剂量-反应关系。根据数据选择指数模型、希尔模型、线性模型和幂模型。基准效应(BMR)选择 5% 或 10%,拟合优度检验 $P > 0.1$ 时接受该模型,当多个模型通过拟合优度检验时根据赤池信息量准则(AIC)选择 AIC 最小的模型,并获得基准剂量下限(BMDL)。

2 结果

2.1 子代大鼠周体质量变化

表1可见,各剂量组雄性子代大鼠体质量增高

于雌性子代大鼠,PND28高剂量组(60 mg/kg BW)子代大鼠体质量低于对照组(0 mg/kg BW),差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表1 子代大鼠出生后体质量变化情况($\bar{x} \pm s, g$)

Table 1 Body weight changes of offspring rats

性别	分组	PND7	PND14	PND21	PND28	PND35	PND42	PND49	终体质量
雄性	0 mg/kg BW	18.72 ± 1.30	34.45 ± 3.05	53.16 ± 6.29	90.23 ± 7.27	155.28 ± 14.44	249.51 ± 18.49	290.29 ± 21.53	318.72 ± 21.13
	2 mg/kg BW	18.84 ± 3.38	35.40 ± 2.18	54.11 ± 5.23	90.87 ± 5.97	155.17 ± 20.19	239.96 ± 29.48	277.59 ± 31.81	305.01 ± 27.90
	20 mg/kg BW	20.13 ± 2.05	35.05 ± 4.22	55.76 ± 4.08	92.19 ± 10.05	156.94 ± 16.88	248.42 ± 19.71	287.97 ± 21.80	302.08 ± 25.31
	60 mg/kg BW	20.73 ± 2.17	34.50 ± 3.59	54.36 ± 4.85	88.53 ± 8.68 ^a	154.49 ± 15.15	250.02 ± 20.39	293.46 ± 22.30	309.27 ± 23.581
雌性	0 mg/kg BW	18.34 ± 1.30	33.95 ± 4.23	50.16 ± 3.17	86.46 ± 5.48	141.35 ± 11.59	192.94 ± 11.78	210.67 ± 13.08	218.73 ± 10.95
	2 mg/kg BW	19.84 ± 1.90	33.60 ± 2.60	52.66 ± 5.80	87.17 ± 8.92	134.37 ± 14.74	191.24 ± 14.52	206.78 ± 16.47	215.33 ± 15.30
	20 mg/kg BW	19.94 ± 1.60	35.05 ± 4.22	53.54 ± 7.23	89.27 ± 7.03	135.70 ± 14.61	181.18 ± 13.33	203.08 ± 14.55	209.26 ± 17.52
	60 mg/kg BW	19.28 ± 2.93	32.50 ± 3.59	53.25 ± 5.63	87.33 ± 10.17	141.53 ± 13.69	194.29 ± 15.94	212.61 ± 18.19	222.24 ± 18.64

注:a表示与0 mg/kg BW组比较, $P < 0.05$

2.2 脏器重量

表2可见,硝酸镧3个剂量组子代大鼠肝脏、肺

脏、肾脏、脑的绝对和相对重量与对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表2 子代大鼠主要脏器相对重量($\bar{x} \pm s, %$)

Table 2 Relative organ weight of offspring rats

性别	分组	肝脏	肾脏	肺脏	脾脏	胸腺	脑
雄性	0 mg/kg BW	3.25 ± 0.18	0.81 ± 0.04	0.48 ± 0.05	0.26 ± 0.03	0.18 ± 0.13	0.60 ± 0.05
	2 mg/kg BW	3.42 ± 0.35	0.85 ± 0.05	0.52 ± 0.07	0.25 ± 0.14	0.22 ± 0.12	0.65 ± 0.13
	20 mg/kg BW	3.60 ± 0.62	0.84 ± 0.10	0.51 ± 0.09	0.28 ± 0.03	0.29 ± 0.06	0.62 ± 0.07
	60 mg/kg BW	3.56 ± 0.20	0.84 ± 0.08	0.50 ± 0.03	0.29 ± 0.12	0.22 ± 0.12	0.58 ± 0.07
雌性	0 mg/kg BW	3.32 ± 0.22	0.84 ± 0.08	0.56 ± 0.07	0.31 ± 0.06	0.34 ± 0.03	0.83 ± 0.03
	2 mg/kg BW	3.23 ± 0.35	0.84 ± 0.09	0.59 ± 0.05	0.28 ± 0.04	0.34 ± 0.06	0.84 ± 0.05
	20 mg/kg BW	3.26 ± 0.19	0.82 ± 0.04	0.58 ± 0.07	0.28 ± 0.04	0.29 ± 0.05	0.84 ± 0.06
	60 mg/kg BW	3.38 ± 0.23	0.86 ± 0.07	0.58 ± 0.06	0.32 ± 0.04	0.31 ± 0.05	0.79 ± 0.04

2.3 淋巴细胞增殖能力和脾T细胞依赖抗体反应能力

如表3所示,高剂量组(60 mg/kg BW)雄性子代大鼠脾T淋巴细胞增殖能力均高于对照组(0 mg/kg BW),差异有统计学意义($P < 0.05$),存在剂量-反应关系。3个剂量组雌性子代大鼠空斑形成细胞个数(PFC)低于对照组,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。3个剂量组脾B淋巴细胞增殖能力雌雄均高于对照组(0 mg/kg BW),但差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表3 子代大鼠PFC和细胞增殖结果($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Results of PFC and cell proliferation in offspring rats

性别	分组	PFC/(个/10 ⁶ 脾细胞)	脾T淋巴细胞增殖能力	脾B淋巴细胞增殖能力
雄	0 mg/kg BW	141.25 ± 9.45	0.43 ± 0.12	0.56 ± 0.25
	2 mg/kg BW	136.35 ± 11.38	0.49 ± 0.11	0.58 ± 0.16
	20 mg/kg BW	136.90 ± 10.69	0.52 ± 0.16	0.57 ± 0.13
	60 mg/kg BW	141.50 ± 8.06	1.09 ± 0.35 ^{a,b,c}	0.59 ± 0.27
雌	0 mg/kg BW	135.20 ± 13.76	0.25 ± 0.07	0.48 ± 0.08
	2 mg/kg BW	133.75 ± 10.99	0.31 ± 0.10	0.49 ± 0.14
	20 mg/kg BW	130.85 ± 7.89	0.27 ± 0.15	0.53 ± 0.27
	60 mg/kg BW	133.45 ± 12.35	0.33 ± 0.41	0.58 ± 0.10

注:a表示与对照组(0 mg/kg BW)比较, $P < 0.05$;b表示与低剂量组(2 mg/kg BW)比较, $P < 0.05$;c表示与中剂量组(20 mg/kg BW)比较, $P < 0.05$

2.4 外周血免疫细胞检测

如表4所示,雌性子代大鼠NK细胞各剂量组均高于对照组,且随着剂量增大,NK细胞百分比增加,与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。硝酸镧不同剂量组雌、雄子代大鼠CD4/CD8比值、T淋巴细胞数和B淋巴细胞数与对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。雄性、雌性子代大鼠淋巴细胞分型结果见图1和2。

2.5 血清细胞因子结果

如表5所示,硝酸镧3个剂量组雌、雄子代大鼠血清 γ -IFN、IL-2、IL-4、IL-5、IL-10、TNF水平与对照组比较均差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.6 子代大鼠各剂量组剂量-反应关系

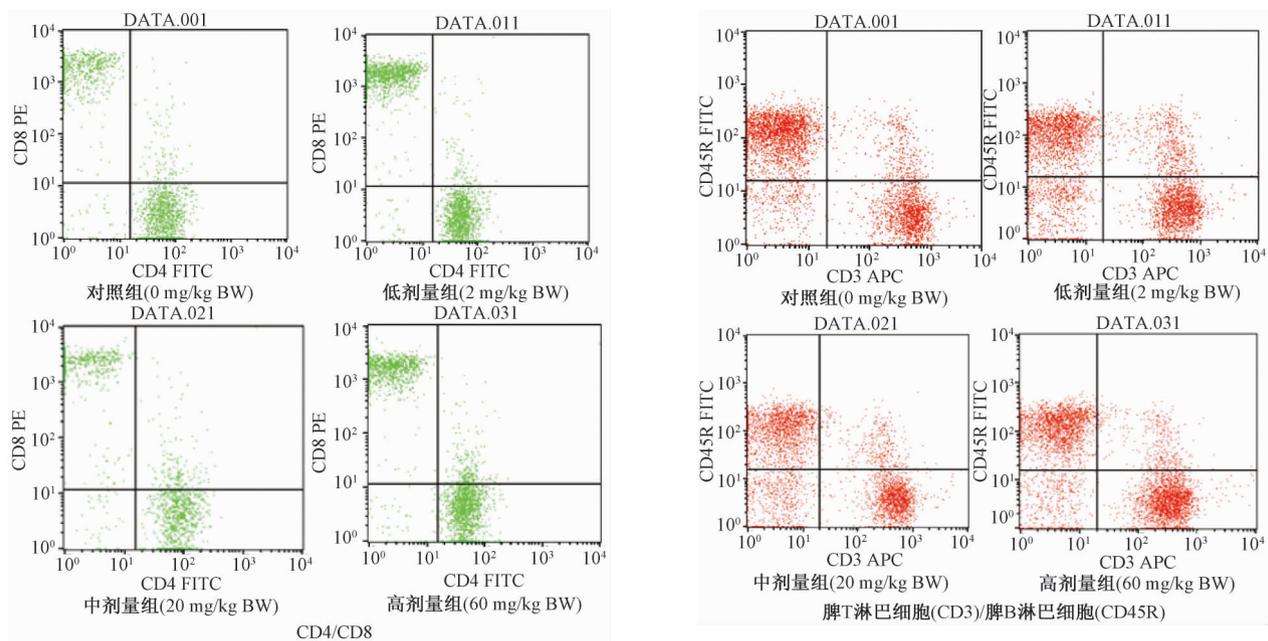
根据本试验数据,选取脾T淋巴细胞增殖能力和NK细胞数两个指标进行BMD分析。表6显示拟合优度检验结果,根据赤池信息量准则(AIC)选择AIC最小、 P 值最大的模型,脾T淋巴细胞增殖能力最适用模型为幂模型,BMD值为43.38 mg/kg BW, BMDL为21.40 mg/kg BW,剂量-反应曲线如图3;NK细胞适用模型为希尔模型,BMD值为2.73 mg/kg BW, BMDL为0.21 mg/kg BW,剂量-反应

表4 子代大鼠外周血免疫细胞检测结果($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Results of peripheral blood immune cells in offspring rats

性别	分组	CD4/CD8	脾 T 淋巴细胞/%	脾 B 淋巴细胞/%	NK 细胞/%
雄性	0 mg/kg BW	1.73 ± 0.21	48.96 ± 7.94	42.27 ± 7.85	9.32 ± 3.24
	2 mg/kg BW	1.64 ± 0.34	51.24 ± 4.26	38.08 ± 5.05	11.51 ± 3.30
	20 mg/kg BW	1.50 ± 0.43	42.54 ± 3.14 ^b	45.58 ± 3.17 ^b	13.78 ± 4.61
	60 mg/kg BW	1.43 ± 0.43	46.01 ± 5.35	44.55 ± 4.52	9.46 ± 2.05
雌性	0 mg/kg BW	2.12 ± 0.68	54.40 ± 3.66	35.62 ± 3.87	7.39 ± 1.73
	2 mg/kg BW	1.52 ± 0.33	52.85 ± 6.08	38.18 ± 7.76	9.94 ± 2.23 ^a
	20 mg/kg BW	1.52 ± 0.33	51.87 ± 2.95	37.74 ± 3.74	10.10 ± 2.75 ^a
	60 mg/kg BW	1.68 ± 0.31	53.09 ± 3.76	37.41 ± 4.51	10.91 ± 3.94 ^a

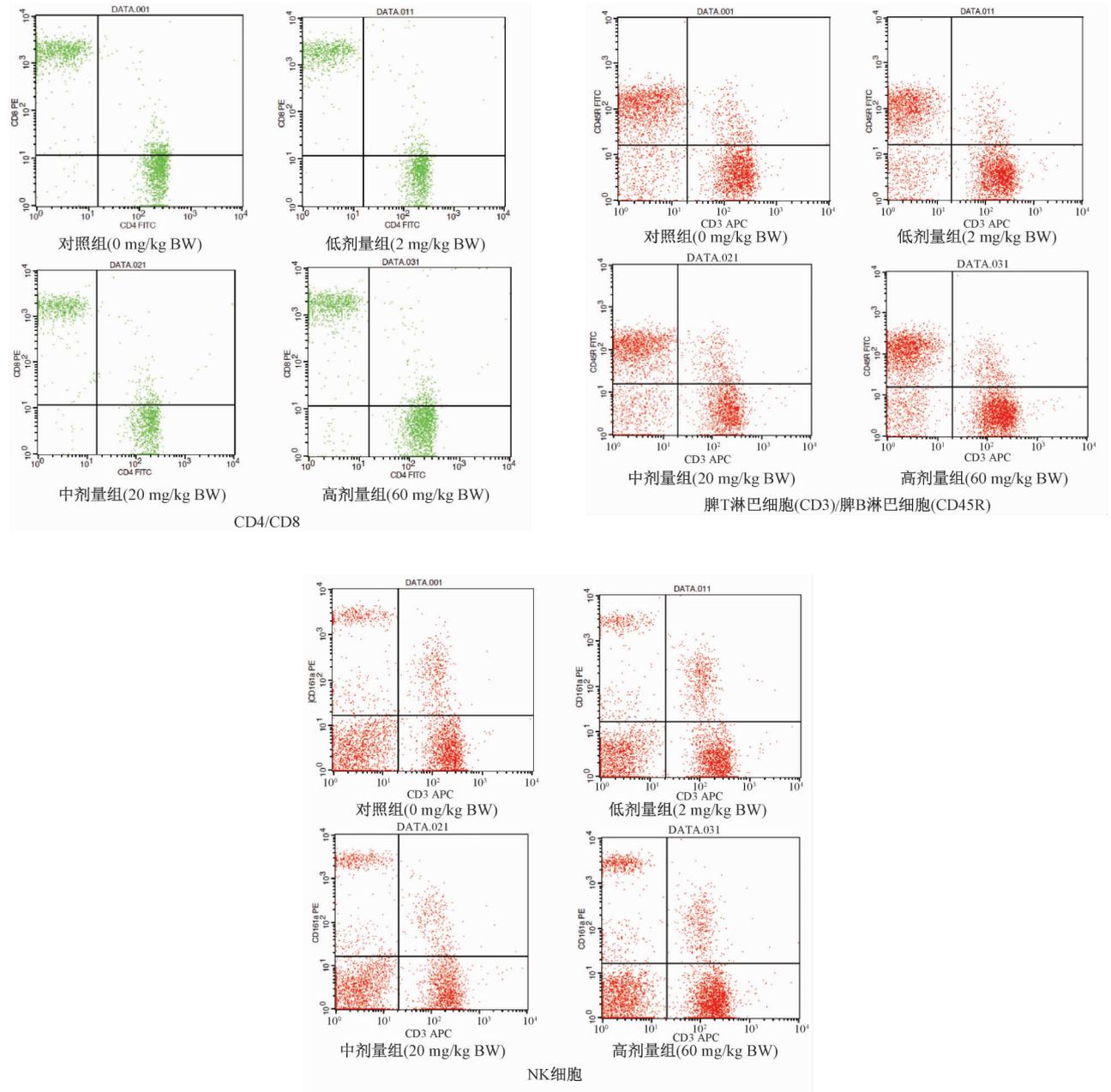
注:a 表示与对照组(0 mg/kg BW)比较, $P < 0.05$; b 表示与低剂量组(2 mg/kg BW)比较, $P < 0.05$



注:图1 分别是对照组、低剂量组、中剂量组、高剂量组的1号雄性子代大鼠全血淋巴细胞分型流式图,其中 CD3 为脾 T 淋巴细胞的表面标志物,CD45R 为脾 B 淋巴细胞的表面标志物,CD161a 为 NK 细胞的细胞表面标志物;APC 为别藻兰蛋白;FITC 为异硫氰酸荧光素;PE 为藻红蛋白

图1 雄性子代大鼠淋巴细胞分型结果

Figure 1 Results of lymphocyte typing in male offspring rats



注:图2分别是对照组、低剂量组、中剂量组、高剂量组的1号雌性子代大鼠全血淋巴细胞分型流式图,其中CD3为脾T淋巴细胞的表面标志物,CD45R为脾B淋巴细胞的表面标志物,CD161a为NK细胞的细胞表面标志物;APC为别藻兰蛋白;FITC为异硫氰酸荧光素;PE为藻红蛋白

图2 雌性子代大鼠淋巴细胞分型结果

Figure 2 Results of lymphocyte typing in female offspring rats

表5 子代大鼠血清细胞因子结果($\bar{x} \pm s$, pg/ml)

Table 5 Serum cytokines of offspring rats

性别	分组	IL-1 α	γ -IFN	IL-10	IL-4	TNF	IL-2
雄性	0 mg/kg BW	5.84 \pm 4.76	2.75 \pm 0.20	17.50 \pm 9.44	3.74 \pm 5.76	8.43 \pm 2.67	7.13 \pm 7.53
	2 mg/kg BW	5.03 \pm 1.70	2.85 \pm 0.11	15.18 \pm 3.18	1.91 \pm 1.32	7.81 \pm 0.87	4.57 \pm 1.68
	20 mg/kg BW	3.32 \pm 1.02	2.79 \pm 0.17	14.33 \pm 2.69	1.25 \pm 0.76	7.62 \pm 1.38	4.00 \pm 1.32
	60 mg/kg BW	4.13 \pm 2.09	2.75 \pm 0.16	19.25 \pm 10.43	2.70 \pm 3.51	7.34 \pm 0.92	5.03 \pm 2.91
雌性	0 mg/kg BW	2.47 \pm 1.09	2.90 \pm 0.15	13.95 \pm 1.91	1.46 \pm 1.11	7.22 \pm 0.75	4.23 \pm 1.46
	2 mg/kg BW	2.40 \pm 1.56	3.00 \pm 0.19	15.60 \pm 6.56	2.53 \pm 3.13	7.26 \pm 1.25	4.99 \pm 2.80
	20 mg/kg BW	2.94 \pm 2.39	3.22 \pm 0.47	23.39 \pm 20.41	2.02 \pm 1.89	6.89 \pm 0.61	5.03 \pm 3.11
	60 mg/kg BW	1.82 \pm 0.59	3.10 \pm 0.36	22.27 \pm 17.88	1.43 \pm 1.10	6.97 \pm 0.62	3.62 \pm 1.04

表6 BMD分析硝酸镧对脾T淋巴细胞增殖能力和NK细胞数的剂量-反应曲线拟合优度检验

Table 6 BMD analysis of the goodness of fit test of the dose response curve of lanthanum nitrate on proliferation of spleen T lymphocytes and NK cells

模型名称	脾T淋巴细胞增殖能力		NK细胞	
	P	AIC	P	AIC
指数模型	—	—	N/A	130.72
希尔模型	N/A	-21.82	0.525	126.24
线性模型	0.615	-24.96	0.098	128.47
多项式模型	0.738	-23.82	0.053	129.57
幂模型	0.740	-23.82	0.098	128.47

注:—表示不适用于该模型;N/A表示指标在此模型下运行错误

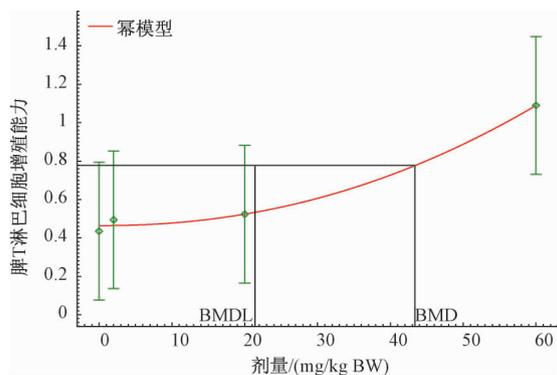


图3 雄性子代大鼠脾T淋巴细胞增殖能力剂量-反应关系曲线

Figure 3 Dose response relationship of T lymphocyte proliferation in male offspring rats

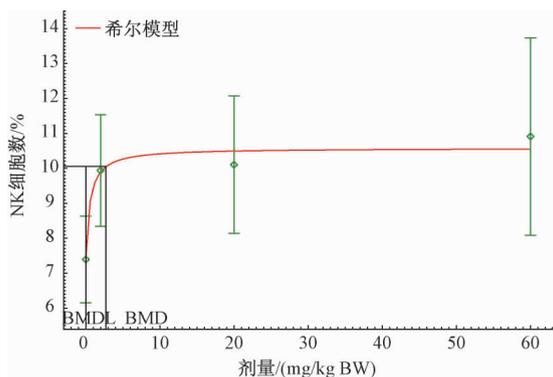


图4 雌性子代大鼠NK细胞数剂量-反应关系曲线
Figure 4 Dose response curves of NK cells in offspring female rats

曲线如图4;因此,0.21 mg/kg BW可作为硝酸镧最敏感的免疫毒性参考值。

3 讨论

发育免疫毒理学已逐渐发展成为免疫毒理学的新领域,胚胎早期暴露免疫毒性物质可以对免疫系统的发育产生短期或长期的影响^[9-10]。有研究^[11-13]表明,镧可能具有一定免疫毒性,表现为低剂量促进、高剂量抑制的现象,但目前对镧的免疫毒理学效应报道各异。试验结果可见体液免疫未

出现有生理学意义的变化,细胞免疫指标中雄性子代大鼠 ConA 诱导脾 T 淋巴细胞增殖能力随剂量增加而增强,存在剂量-反应关系。可见硝酸镧对子代大鼠免疫系统产生作用时,细胞免疫较体液免疫更早出现反应,更加敏感,较早出现可检测的改变。高剂量组雄性子代大鼠脾 T 淋巴细胞增殖能力高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),但同样的改变在雌性子代大鼠上并未发生,可见硝酸镧对雌雄子代大鼠脾 T 淋巴细胞增殖能力的影响雌雄表现不同,或者可以认为不同性别子代大鼠不同性别脾 T 淋巴细胞增殖能力对硝酸镧的敏感性有差异。机体正常免疫系统可以维持淋巴细胞亚群的稳定,使之形成一定的比例范围。硝酸镧 3 个不同剂量组雌性子代大鼠外周血 NK 细胞均高于对照组,且随着剂量增大,NK 细胞数量增加。可见染毒硝酸镧影响淋巴细胞亚群的百分比,使 NK 细胞数量增加。综上可知,本试验条件下母鼠孕期染毒硝酸镧对子代大鼠的 NK 细胞、脾 T 淋巴细胞产生轻微刺激作用,但未发现硝酸镧对子代大鼠产生免疫毒性作用。

参考文献

- [1] 汪伟,李冬梅,黄可欣,等.混合稀土染毒对小鼠免疫功能的影响[J].毒理学杂志,2012,26(6):458-459.
- [2] 刘志宏,雷志明,魏雪涛,等.硝酸稀土经乳汁对小鼠仔代免疫功能的影响[J].中华预防医学杂志,2002,36(6):35-38.
- [3] 马文强,冯杰.稀土元素对动物免疫功能的影响[J].饲料工业,2006,27(4):52-54.
- [4] 宋雁,贾旭东,崔文明,等.不同途径和剂量环磷酸腺苷建立小鼠免疫抑制模型的对比研究[J].中国食品卫生杂志,2013,25(3):218-225.
- [5] 方瑾.丙烯酰胺及苦瓜提取物对小鼠的免疫毒性研究[D].北京:中国疾病预防控制中心,2014.
- [6] 胡静.大鼠发育免疫评价模型的建立及其在转基因水稻食用安全性研究中的应用[C].中国毒理学会食品毒理专业委员会第六次学术会议论文集,2014:10.
- [7] 徐一凡,支媛,汪会玲,等.重组人乳铁蛋白对子代大鼠免疫功能影响的一代繁殖毒性扩展试验[J].中国食品卫生杂志,2016,28(2):155-159.
- [8] 程洁.氯化铈对肝脏及免疫功能的影响及分子机制研究[D].苏州:苏州大学,2013.
- [9] 陈成章.发育免疫毒性的危险度评估[M].郑州:郑州大学出版社,2008:166-174.
- [10] 胡爱武.元素镧和氟对动物免疫和内分泌的影响[D].安徽:安徽医科大学,2007.
- [11] 宋雁,刘兆平,贾旭东.稀土元素的毒理学安全性研究进展[J].卫生研究,2013,42(5):885-892.
- [12] 宋宇,黄可欣,李冬梅,等.硝酸镧对小鼠特异性抗体的形成、淋巴细胞转化和腹腔巨噬细胞吞噬功能的影响[J].吉林大学学报(医学版),2012,38(6):1048-1051.
- [13] 孙静,秦新英,刘会芳.氯化铈和氯化镧对小鼠免疫细胞作用的体外实验[J].河北大学学报(自然科学版),2012,32(3):281-285.