

第十章 食品中化学物质的免疫毒性

免疫毒理学(Immunotoxicology)是毒理学的一个分支学科,主要研究外源化学物和物理因素对人和实验动物免疫系统产生的有害作用及其机制。免疫毒理学是在免疫学和毒理学基础上发展起来的学科。研究食品中化学物质的免疫毒性是免疫毒理学的重要内容之一,该学科是随着免疫学的发展而发展起来的,是毒理学的一个新分支。

免疫毒理学的研究内容有以下几方面:

1. 建立和改进免疫毒性检测与评价方法 进一步改进和确定免疫功能检测与宿主抵抗力试验;建立检测外源化学物免疫毒性的体外试验方法;建立评价外源化学物对局部免疫功能(肺、皮肤、胃肠道)影响的方法;建立从动物免疫毒性检测结果外推到人的数学模型等。

2. 免疫毒性机制的研究 外源化学物对机体免疫系统的影响,包括直接和间接影响两方面,应从这两方面入手,采用行之有效的研究手段,将整体、细胞、分子、基因水平上的研究方法有机结合,综合分析外源化学物免疫毒性机制,它包括外源化学物引起免疫抑制或免疫缺损的机制和引起超敏反应以及自身免疫反应或自身免疫病的机制。

3. 对有拮抗外源化学物致免疫毒性的药品或保健品的研究 为保护人群身体健康及职业接触者的安全,应加强这方面的研究,尽量减少外源化学物对人体造成的不良影响,从天然资源获取具有免疫调节作用的保健品尤为重要。

过去在对食品进行安全性评价时,常常是根据一般毒理学的检查,例如急性毒性、蓄积毒性、亚慢性或慢性毒性检测,包括动物的生长率或功能障碍,重要器官的重量及功能变化,血液生化指标的改变、遗传学指标及行为、神经等方面的指标改变。但有时在长期小剂量接触某种化学物质后,虽然不足以引起以上各方面的变化,但却可表现出对免疫系统的作用。所以研究外源性化学物质(包括食品中化学物质)对免疫功能的影响,一方面可对它们的毒性做出全面的评价,另外还可以从对免疫功能的检查中寻求外源性化学物质对机体损害的早期指标。免疫功能变化是十分灵敏的,通常产生变态反应效应的剂量绝大多数比出现毒性作用剂量低若干个数量级。

免疫应答是机体的一个重要防护和调节机制。如果免疫系统受损,传染病的发病率就会大大地增加,从而间接影响到动物的生命。外源性化学物质本身多是小分子的物质,并不能引起免疫应答,但是当器官操作以后,化学物和损伤的组织成分相结合就可能产生抗原性,引起免疫病理性损伤,对免疫功能的检测有助于对外源性化学物质所造成损害的临床表现及病理过程有进一步的了解。免疫毒性的研究还有助于我们了解化学物质损害机体的生物学机制。由于免疫应答具有高度的选择性和特异性,并且由多种免疫细胞和免疫因子参与完成的。现在我们可以利用体外培养各种免疫细胞的方法,在培养基内加入各种外源性化学物质,从而了解这些外源性化学物质作用的部位,并提供有关外源性化学物质与生物效应之间作用性质方面的资料。因此目前国内对于食物中化学物质的免疫毒性研究已取得了长足的进展。

第一节 机体的免疫系统及免疫功能

高等动物具有完善的免疫功能,而免疫功能又是由免疫系统完成的。免疫系统首先识别各种异物,激活免疫细胞,产生特异杀伤或解毒效应。机体的免疫系统包括免疫器官、免疫细胞和免疫分子。

根据免疫器官的发生和作用不同,免疫器官可分成两类,一类称中枢免疫器官(primary lymphatic organs),包括胸腺、法氏囊(鸟类)或法氏囊类似器官;另一类是周围免疫器官(secondary lymphatic organs),包括淋巴结、脾脏、扁桃体与阑尾等。中枢淋巴器官是造血

干细胞增殖、分化为 T 和 B 淋巴细胞的场所,周围淋巴器官是免疫反应的重要场所。胸腺是一个很重要的中枢淋巴器官,其结构和大小随年龄而有明显的变化。新生儿胸腺约 10~15g,其皮质比较发达。青春期胸腺的重量可达 30~35g,皮质变薄而髓质发达。随着性成熟,胸腺逐渐退化,其中淋巴细胞减少,而到老年期胸腺仅有 15g 或更小,其中主要为脂肪组织。通过动物实验已经证明,新生期作胸腺试验的动物,其外周免疫器官的胸腺依赖区(thymus dependent area 或称 T 细胞区)内的淋巴细胞稀少,血中淋巴细胞显著减少,失去对同种异体移植的免疫排斥反应,细胞免疫功能低下,体液功能受损。

参与免疫反应的细胞,即免疫细胞有淋巴细胞、单核细胞、中性粒细胞、嗜酸性粒细胞和肥大细胞等。这些细胞的起源是造血干细胞。淋巴细胞的形态与功能十分复杂。以往根据淋巴细胞功能、寿命、分布、理化性状、对有丝分裂的反应和对药物的敏感性不同,将它分成 T 细胞和 B 细胞。而后来发现淋巴细胞表面具有特殊的结构,统称表面标记(surface marker),一般指表面抗原、表面免疫球蛋白和表面受体。根据淋巴细胞的表面标记不同,可将淋巴细胞分成 T 细胞、K 细胞和 NK 细胞,免疫分子主要包括免疫球蛋白(immunoglobulin,Ig)、补体(complement)和淋巴因子(lymphokine)。

机体的免疫反应功能主要表现在三个方面,即防御功能、稳定功能和监视功能。防御功能(defense)是指病原体侵入机体后,通过各种屏障,包括呼吸道、消化道、血脑屏障及各种抗体、补体所起的防御作用。防御功能正常状态就能杀灭各种病原体。但防御功能过高或过低都有可能产生疾病,过高可产生变态反应,过低则易造成免疫缺损,出现反复感染。稳定功能(homeostasis)是指机体在正常情况下有清除衰老和损伤细胞的功能,从而保持机体的动态稳定,这种功能发生异常,就会产生自身免疫。监视功能(surveillance)是指识别和清除体内突变细胞的功能。人体在正常情况下,具有清除突变细胞的能力,众所周知体细胞突变是肿瘤发生的基础,一旦监视功能过低就有可能发生肿瘤。

机体的免疫过程是很复杂的,它是由吞噬细胞系和淋巴细胞系共同完成的,这一个过程包括免疫细胞对抗原的识别,即抗原分子与免疫细胞间的相互作用;免疫细胞的活化和分化过程,即免疫细胞间的相互作用,效应细胞和效应分子的效应作用。

第二节 外源化学物对免疫系统的影响

外源化学物对免疫系统的影响表现在三个方面,即免疫抑制,超敏反应及自身免疫反应。

一、免疫抑制

1. 具有免疫抑制作用的外源化学物

(1) 多卤代芳烃类:多氯联苯(PCB)、多溴联苯(PBB)、六氯苯(HCB)、四氯二苯呋喃(TCDF)、四氯二苯对二恶英(TCDD)等。

(2) 多环芳烃类:苯并(a)蒽(BA)、7,12-二甲苯并(a)蒽(DMBA)、三甲基胆蒽(3-MCA)、苯并(a)芘(B(a)P)等。

(3) 农药类:DDT、敌百虫、甲基对硫磷等。

(4) 金属:铅、镉、砷、汞、铬、镍、锌、铜、甲基汞、有机锡等。

(5) 大气污染物:二氧化氮、二氧化硫、臭氧、一氧化碳等。

(6) 工业污染物:氯乙烯、苯、苯乙烯、联苯胺、三硝基甲苯、石棉等。

(7) 治疗用药物:环磷酰胺、氨甲蝶呤、6-巯基嘌呤、5-氟尿嘧啶、环孢菌素 A、雌二醇、白消安等。

2. 外源化学物对免疫功能的抑制作用 外源化学物对免疫功能的抑制作用包括体液免疫功能、细胞免疫功能、巨噬细胞功能、NK 细胞功能及宿主抵抗力等,以多卤代烃类对啮齿类动物免疫功能影响为例,见表 10-1。

表 10-1 多卤代烃类对啮齿类动物免疫功能及宿主抵抗力的影响

检测项目	化学物质			
	PCB	PBB	TCDD	TCDF
宿主抵抗力				
细菌	↓	—	↓	ND
内毒素	↓	—	↓	ND
病毒	↓	ND	↓	ND
寄生虫	↓	—	ND	ND
肿瘤细胞	↓	ND	↓	ND
细胞免疫				
DTH	↓	ND	↓	↓
淋巴细胞增殖	↓	↓	↓	↓
体液免疫				
PFC	↓	↓	↓	ND
抗体滴度	↓	↓	↓	ND
巨噬细胞功能	ND	—	—	ND

↓下降 ↑增强 —无影响 ND未检测

凡具有免疫抑制的化学物均能降低机体对细菌、病毒、肿瘤及寄生虫的抵抗力。

人群中由于用免疫抑制剂治疗某些自身免疫病、结缔组织病、慢性炎症性疾患及防止移植器官的排斥等，可引起由细菌、病毒、霉菌及寄生虫感染导致的合并症。接受器官移植病人的另一个合并症是继发癌症的发生率增高，如果治疗停止后，继发癌症可部分或完全消失。通过对大量存活 10 年以上肾移植病人的调查，几乎有 50% 的病人发生癌症。癌症的类型各异，皮肤癌、唇癌的发生率比一般人群高 21 倍，非何杰金氏病高 28~49 倍，卡波齐氏肉瘤高 400~500 倍，颈部癌症高 14 倍，以上资料表明免疫抑制与癌症的发生有密切的关系。

二、超敏反应

超敏反应(hypersensitivity reaction)又称变态反应(allergy)，是指机体受同一抗原再次刺激后产生的一种异常或病理性免疫反应。超敏反应与免疫反应本质上都是机体对某些抗原物质的特异性免疫应答，但超敏反应主要表现为组织损伤和 / 或生理功能紊乱，免疫反应则主要表现为生理性防御效应。

1. 超敏反应的分类 1963 年 Cell 和 Coombs 根据超敏反应发生的机制和临床特点，将其分为四型，见表 10-2。

表 10-2 Cell 和 Coombs 对超敏反应的分类

类别	靶部位	临床表现	参与分子和细胞
I 型			
速发型	胃肠道	胃、肠变态反应	IgE，可能有 IgG
	皮肤	荨麻疹，特应性皮炎	肥大细胞、嗜碱性粒细胞
	呼吸道	鼻炎、哮喘	
	血管	过敏性休克	
II 型			
细胞毒型	红细胞	溶血性贫血、输血反应	IgC 或 IgM、补体、巨噬细胞
	白细胞	粒细胞减少	K 细胞

	血小板	血小板减少性紫癜、肺-肾综合征	
III型			
免疫复合型	血管、细胞核	脉管炎、红斑狼疮	IgC、IgA 或 IgA
	肾	慢性肾小球肾炎	补体、中性粒细胞
	关节	类风湿性关节炎	嗜碱性粒细胞
IV型			
迟发型	皮肤	接触性皮炎	T 淋巴细胞
	肺	结核	
	中枢神经系统	变态反应性脑炎	
	甲状腺	甲状腺炎	
	其他器官	移植排斥	

I、II、III型超敏反应是由抗体介导的，发生较快，数分钟到数小时即可产生反应。IV型超敏反应是由致敏 T 淋巴细胞介导的，一般在二次抗原注入后 24~48h 反应达高峰，称迟发型超敏反应。

2. 由于职业接触而引起的超敏反应 由于职业暴露可引起各型超敏反应，现仅介绍最常见的两种。

(1) 接触性皮炎：某些染料、油漆、金属、塑料、药物等物质与人体接触，使机体致敏，机体再次接触同样的物质，能发生湿疹样反应称接触性皮炎。这类接触性皮炎约占整个职业性皮炎的 60%，由致敏 T 淋巴细胞引起的IV型超敏反应，表现为红肿、硬结、严重的反应可引起局部组织坏死、皮肤溃疡及剥脱性皮炎。其组织学表现为血管周围有单核细胞浸润，在表皮与真皮间发生水肿。

(2) 过敏性肺病：在过敏性肺病中，最具代表性的是哮喘。在欧洲和美国职业哮喘人群约占 0.2%~6%，日本约有 15%的哮喘病例与职业有关。甲苯二异氰酸酯(TDI)是异氰酸酯类化合物，广泛应用于制造泡沫塑料、粘合剂、橡胶、合成纤维、特种油漆等。TDI对人粘膜有刺激作用和致敏作用。1951年Fucks报道第 1 例TDI-哮喘病例，60~70 年代已报道TDI引起哮喘病例数百例。人长期接触低浓度TDI，甚至低到 0.39mg / m³时，仍可发生呼吸道刺激症状和哮喘。TDI作业工人中，哮喘患病率约为 5%~10%，其发病过程符合变应性机制。TDI哮喘患者变应原支气管激发实验呈阳性反应，乙酰胆碱吸入实验也呈现气道高反应性，即使脱离接触后，这种高反应性可持续 3 年。TDI哮喘患者血中抗原特异性IgE抗体呈阳性，阳性率为 100%。近年来已证实患者血中特异性IgG4 水平也有增高。

3. 常用药物所致的超敏反应 某些药物在不同个体或同一个体，由于使用方式不同，可出现不同类型的超敏反应。如青霉素所致的超敏反应通常以过敏性休克、荨麻疹、哮喘等 I 型超敏反应为主，亦可引起局部 Arthus 反应和关节炎等III型超敏反应；当长期大剂量静脉注射时，可引起II型超敏反应，表现为溶血性贫血；若反复多次局部涂抹，则造成由IV型超敏反应引起的接触性皮炎。其他药物如磺胺、巴比妥也可引起各种类型的超敏反应(表 10-3)

表 10-3 常用药物所致的超敏反应

超敏反应型别	超敏反应性疾病	青霉素	磺胺	巴比妥
I 型	过敏性休克	++	—	—
	荨麻疹	+++	+++	+
	哮喘	+	—	+

II型	溶血性贫血	++	—	+
	粒细胞减少症	—	+++	+
	血小板减少症	—	+	+
III型	局部 Arthus 反应	++	+	—
	关节炎	+	+	+
	发 热	+	+	+
IV型	接触性皮炎	++	+	+++
	剥脱性皮炎	+	+	++

三、自身免疫

自身免疫(autoimmunity)是机体对自身组织成分或细胞抗原性失去免疫耐受性, 导致自身免疫效应细胞和自身抗体产生, 称为自身免疫。自身免疫反应达到一定强度, 以致破坏正常组织结构并引起相应临床症状时, 就成为自身免疫病。

1. 引起自身免疫的外源化学物 目前已发现许多外源化学物可引起自身免疫病, 其中研究最多的是药物, 表 10-4 列举部分引起人类自身免疫病的外源化学物。

表 10-4 引起人群自身免疫性疾病的外源化学物

外源化学物	自身免疫性疾病
重金属	
金	免疫复合物性肾小球肾炎
镉	免疫复合物性肾小球肾炎
汞	免疫复合物性肾小球肾炎
药 物	
锂	自身免疫性甲状腺病
青霉素	自身免疫性溶血性贫血
甲基多巴	自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性肝炎
吡啶硫胺素	天疱疮
氟烷	自身免疫性肝炎
有机溶剂、工业化学物	
联苯胺	系统性红斑狼疮
多溴联苯	自身免疫性甲状腺疾患
多氯联苯	自身免疫性甲状腺疾患
氯乙烯	全身性硬皮病
食品中的化学物、食品添加剂	
酒石酸	系统性红斑狼疮
掺假的菜籽油	全身性硬皮病

2. 外源化学物引起自身免疫的病理特征及特点

外源化学物引起自身免疫反应和自身免疫病, 其基本病理特征为化学物质诱导体内自身抗原, 刺激机体免疫活性细胞, 特别是辅助 T 细胞, 进而激活 B 细胞, 产生一种或多种自身抗体, 抗原与抗体结合形成免疫复合物, 随血液循环到某些部位沉积下来, 干扰相应器官的正常生理功能, 并通过激活补体, 促使炎性细胞浸润, 造成组织损伤。如氯化汞引起的自身免疫性肾炎, 可见染毒鼠血清 IgE 和 IgC 浓度明显升高, 膈窝淋巴结(PLN)明显增重, 脾脏 IgG 分泌细胞增多, 血清中抗核抗体、抗 DNA 抗体和抗肾小球基底膜抗体阳性, 病理切

片可见肾小球基底膜和外周血管有线状或颗粒状免疫复合物沉积。

外源化学物引起自身免疫的一个重要特点是有明显的个体差异,即在同物种间可表现为遗传易感性和遗传抗性,如某些品系的小鼠(新西兰黑小鼠 New Zealand Black mice, NZB 小鼠)自身免疫病的发病率特别高。在遗传因素与自身免疫病发病的关系中,主要组织相容性复合体特别受到重视。在人类则与 HIA 抗原(人类 MHC 编码抗原)有关,如胍苯吡嗪易在 MEg-DR4 特异性抗原人群中诱发系统性红斑狼疮,硫代金盐诱发的免疫肾病却易发生在 HLA-DR3 和 HLA-B8 特异性抗原的人群中。

四、外源化学物对免疫系统作用特点

1. 反应的灵敏性 很多外源化学物对免疫系统造成不良反应的剂量往往低于它们的一般毒性作用剂量。如小鼠长期接触低剂量的甲基汞、四乙基铅和砷酸钠在表现出明显毒性反应之前,就出现免疫功能改变。又如前苏联学者研究大气和水体中化学污染物的毒性时,发现许多污染物引起超敏反应的浓度比出现一般毒性作用的浓度低若干数量级,因此前苏联于 1981 年明确规定,凡用于生产的新化学物质必须进行对免疫系统不良影响的鉴定。

2. 反应的复杂性 外源化学物对免疫系统影响的复杂性主要表现在免疫反应的双重性和作用的选择性。一种外源化学物对机体可产生免疫增强或免疫抑制两种效应,它取决于化学物质剂量大小、进入机体途径以及检测时间。如给抗原前给实验动物腹腔注射镉,可观察到动物抗体生成细胞(PFC)增加,但在给抗原后 2 天给镉,则 PFC 明显减少。氨基硫羰基咪唑啉酮在一定剂量下具有免疫抑制作用,但当剂量加大时免疫抑制作用反而不明显。很多外源化学物可选择性地损伤免疫反应的一个方面或是某种免疫细胞的亚类。例如皮质类固醇损伤辅助 T 细胞(TH),而环孢菌素对各类 T 细胞均有损伤作用,环磷酰胺主要对活化增殖的细胞有毒性,而且对 B 细胞的毒性比 T 细胞大。

五、外源化学物免疫抑制机制

近年来国外许多学者对外源化学物免疫抑制机制进行了大量的研究,归纳起来可分为直接作用机制和间接作用机理。

(一) 直接作用

许多外源化学物的免疫抑制作用是通过其原形或其代谢产物直接作用于机体的免疫器官和免疫细胞而引起的。

1. 细胞毒作用

外源化学物直接作用于免疫细胞和免疫器官,引起细胞死亡,免疫细胞数目减少,免疫器官萎缩,免疫功能抑制。

根据细胞死亡的形态学和生物化学改变,细胞死亡分为坏死(necrosis)和凋亡(apoptosis)。凋亡细胞染色质凝聚、细胞质浓缩,膜包绕的核质以及胞质成分称凋亡小体。细胞凋亡是机体自我调节的一种生理现象,既可是一种生理过程,也可是一种病理过程。有机锡化学物是一类广泛应用于塑料工业、农业和防腐涂料中的化学物。三-n-丁基锡(Tri-n-butyltin, TBT)是防腐涂料中最常用的有机锡,其毒作用的靶部位主要是免疫系统。较低浓度的有机锡就可引起胸腺萎缩,皮质区胸腺数目减少,抑制巨噬细胞和 NK 细胞活性。TBT 引起胸腺细胞死亡的主要机理可能是由于胞内游离钙浓度升高而引起细胞凋亡。Aw 等人的研究表明,50 $\mu\text{mol/L}$ 的 TBT 在体外与大鼠胸腺细胞作用 6h,有 40% 的细胞死亡,在细胞死亡前 1h,胞内游离钙浓度明显升高并伴有 DNA 片段出现。将胸腺细胞在无钙缓冲液中与 TBT 共育或用细胞内钙离子螯合剂 Quin-2 或 BAPTA 来抑制 TBT 引起的胞内游离钙升高,这两种方法均能有效地阻止 DNA 片段的形成和细胞死亡的发生,说明钙离子浓度的升高是 TBT 诱发细胞凋亡的因素。低浓度镉(4~10 $\mu\text{mol/L}$)也可引起人类 T 细胞系 GEM-C12 细胞凋亡。

2. 对淋巴细胞成熟过程的影响 淋巴细胞是由骨髓多能干细胞发育而来。干细胞是一群未分化的母细胞,其中一部分进入胸腺,在胸腺素的作用下,发育成熟为 T 淋巴细胞。T

淋巴细胞的正常发育需要胎肝或骨髓不断向胸腺提供淋巴干细胞,因此,某些外源化学物对骨髓干细胞的毒性作用可能是引起免疫抑制的机制之一。

3. 对淋巴细胞增殖、分化的影响 淋巴细胞在受到抗原或有丝分裂原的刺激,产生免疫应答的最初阶段,是使静止的淋巴细胞活化增殖成为有活性的细胞。其活化过程是,抗原或有丝分裂原与淋巴细胞膜上受体结合后,激活膜上的GTP结合蛋白,GTP结合蛋白进一步激活膜上的磷脂酶C(PLC),PLC水解磷脂酰肌醇二磷酸(PIP₂),使其分解成肌醇三磷酸(IP₃)和甘油二酯(DAG)。胞内游离Ca²⁺浓度升高,导致淋巴因子的产生,如白介素-2(IL-2)的产生和IL-2受体的表达,淋巴细胞活化。对活化过程中任一环节的影响都会改变淋巴细胞的增殖与分化,进而影响免疫功能。

Palardy 等人发现二甲基苯蒽(DMBA)在体外可明显抑制 PHA 或单克隆抗体 OKT3 刺激的人外周血单核细胞的增殖反应,但 DMBA 必须在加刺激原以前与单核细胞作用,才能产生这种抑制作用,说明 DMBA 干扰单核细胞增殖的早期过程。

(二) 间接作用

1. 对内分泌网络的影响 外源化学物对下丘脑-垂体-肾上腺轴(HPA)的激活,可分泌许多内分泌素及一些生物活性物质,如糖皮质激素、儿茶酚胺、乙酰胆碱、性激素、内啡肽、甲状腺素、生长激素等。这些内分泌素对免疫系统均有调节作用,其中研究最多的是糖皮质激素,它几乎对所有的免疫细胞都有抑制作用,包括淋巴细胞、中性粒细胞、巨噬细胞、肥大细胞等。

2. 对营养和代谢的影响

营养状况能影响机体免疫功能。营养不良可使免疫系统一级和二级淋巴器官的大小、重量、结构和细胞组成都有明显改变,其严重程度依次为胸腺、脾脏、肠系膜淋巴结、颈部与咽窝淋巴结及阑尾。营养不良时,体液免疫、细胞免疫均降低,增加对感染的易感性。单一营养素的缺乏也会对免疫功能有明显的影 响,如维生素 A 缺乏可引起脾脏、胸腺退化,外周血淋巴细胞数减少,NK 细胞数明显下降,抗体产生减少。

六、食品中化学物对免疫功能影响及其作用机制

食品中的某些化学物,如食品添加剂、食品中污染物、农药残留等都可以影响的免疫功能,具体表现有以下几个方面。

(一) 使免疫功能受到抑制或产生免疫缺损

很多化学物质可以对免疫功能包括体液免疫功能和细胞免疫功能产生抑制作用,但必须指出的是并不是所有的化学物质都可以引起免疫抑制。例如许多金属对免疫功能有抑制作用,但是硒却可以增强免疫反应,在给抗原前或与抗原同时给硒,反应增强最明显。另外锌在体外试验也是增加抗体反应的能力,实验动物在接触某些化学物后,其免疫功能抑制的程度取决于所接触化学物的剂量。

(二) 改变宿主的防御功能,降低机体抵抗力

机体在接触外源性化学物后,可以改变其对细胞、病毒、寄生虫及可移植肿瘤和自发肿瘤的抵抗力,一般来说由于细胞介导免疫(cell mediated immunity, CMI)或体液免疫(humoral mediated immunity,HMI)严重抑制而造成宿主对一些感染因子敏感性增加,抵抗力下降。当动物接触化学物后用肿瘤细胞去激发,可以发现肿瘤发生率在接触化学物的动物组中明显高于对照组。

(三) 产生变态反应

变态反应是病理性免疫反应,当机体受抗原刺激后产生异常的体液或细胞免疫反应,导致生理功能紊乱或组织损伤。引起变态反应性病变的变应原可以是完全抗原,如异种血清蛋白质、微生物、霉菌、植物、花粉等,也可以是半抗原,许多分子量较小的化学物或某些金属元素,它们本身没有抗原性,但当它们与某些大分子物质结合成复合物,则能引起动物产

生抗体,此抗体又能与原来的小分子物质发生特异性结合。化学物质引起的变态反应主要有以下几个特点:①反应表现不同于该物质的一般毒性反应,组织病变也不同于该物质的中毒变化,而是变态反应性炎症;②通常接触某种化学物后,经1~2周再次接触该物质,反应即可出现;③变态反应不存在剂量—反应关系,很小的剂量进入体内就可以致敏,再接触小剂量即可出现症状。

根据变态反应出现的快慢及抗体是否存在,把变态反应分成如下四型:

1. 第I型速发型或反应素型(anaphylactic sensitivity) 该型变态反应是由IgE介导的,当过敏体质的机体初次接触变应原时,可产生IgE抗体,抗体结合于肥大细胞或嗜碱性粒细胞表面,使机体处于致敏状态,可维持半年至数年。当致敏的机体再次接触相同的变应原时,变应原即和细胞表面的IgE结合,使细胞脱颗粒并释放多种化学介质,引起毛细血管扩张,通透性增加,腺体分泌增多及平滑肌收缩为特点的病理变化并引起一系列的临床症状。某些食品或食品中污染物(如霉菌、农药、金属型等)均可引起I型变态反应,检测可获皮肤试验阳性,血清可测得特异及非特异性IgE抗体。

2. 第II型细胞毒型或溶细胞型(antibody dependent cytotoxic hypersensitivity)该型变态反应是抗体(IgG或IgM)引起抗原的组织细胞损伤或功能障碍。IgG或IgM与机体靶细胞表面的抗原结合,引起活化补体、巨噬细胞吞噬或K细胞的抗体依赖细胞毒作用,最后引起细胞的破坏死亡。某些化学物具有半抗原性,在体内与细胞膜上的蛋白质结合,形成化学物红细胞复合物而具有抗原性,刺激机体产生IgG抗体。当化学物再次进入,抗体与结合在膜上的化学物结合,激活血清中的补体,产生溶血反应。另外当化学物进入机体,在血液中形成游离的化学物抗体复合物,这种复合物可吸附于红细胞、白细胞或血小板上。在吸附过程中补体被固定并激活,使细胞溶解,引起溶血、白细胞减少或血小板减少。

3. 第III型免疫复合型(complex-mediated hypersensitivity) 该型变态反应是由于抗原—抗体复合物在组织中沉着而引起的炎症反应。炎症反应涉及补体的活化和中性粒细胞的浸润,释放出许多水解酶并造成组织损伤。

4. 第IV型迟发型或细胞免疫型(cellmediated hypersensitivity) 该型变态反应是由免疫的TD或TK细胞与特异抗原的反应而引起组织损伤。表面具有特异性受体的致敏T淋巴细胞再次与抗原相遇,引起细胞增殖,其中TD细胞可释放淋巴因子,吸引和激活非特异性的巨噬细胞。由于细胞的增殖和浸润,可诱发迟发型变态反应。在该反应中受抗原刺激而增殖和分化的细胞是T细胞,在缺乏T细胞的情况下不产生迟发型变态反应。

外源性化学物对免疫功能作用可通过直接作用机制和间接作用机制。直接作用表现在食品中存在的某些化学物的细胞毒性作用,它们可以直接作用于免疫器官以及免疫细胞,如食品污染物TCDD可以对体液免疫、细胞免疫及宿主抵抗力都产生抑制作用,TCDD直接作用于胸腺,使其发生严重萎缩,在皮层的胸腺明显减少。某些化学物还可直接作用于淋巴细胞、浆细胞以及一些辅助细胞;关于化学物作用于淋巴细胞的具体机制并不十分清楚,有可能是改变免疫细胞表面特异的膜受体,有些化学物如有机氯使膜的稳定性产生变化而影响细胞的功能,膜上的ATP酶的活性改变能使细胞功能发生变化。间接作用主要是内分泌的作用,营养缺乏是其中一个重要原因。营养不良常常会增加对感染的易感性及降低免疫力。儿童缺乏蛋白质及大鼠营养缺乏时血清中肾上腺皮质激素可升高,皮质激素的升高可抑制体液免疫功能。B族维生素和矿物质缺乏可造成细胞免疫功能降低以及对传染病的抵抗力下降。

第三节 化学致癌物引起的肿瘤免疫

肿瘤的病因是十分复杂的,但大量流行病学调查和动物实验证明人类肿瘤的 80%~85% 是环境因素引起的,其中包括食品中的化学因素,因此化学致癌是人们关注的问题,化学致癌物引起的肿瘤免疫更是当前人们研究的特点。

(一) 肿瘤细胞的抗原及其特点

正常细胞在突变、转化成细胞的过程中基因发生变化导致细胞膜结构及成分的改变,也就是抗原性发生变化,癌细胞抗原的主要特点是器官特异抗原的丢失;胚胎性抗原的重现及新生肿瘤特异抗原的出现。肿瘤特异抗原(tumor specific antigen,TSA)只存在于肿瘤细胞而不存在于正常细胞。在动物中这类肿瘤抗原是由移植排斥实验来证实的,所以也称为肿瘤特异移植抗原(tumor-specific transplantation antigen, TSTA)。肿瘤相关抗原(tumor associated antigen,TAA)是另外一类存在于肿瘤细胞表面的大分子,这类物质并非肿瘤细胞所特有,但在细胞癌变时其含量明显增加,只有量的变化而缺乏严格的肿瘤特异性。带瘤宿主的免疫系统不能识别这类抗原,因它们不具有抗原性。但这类抗原的出现与肿瘤有关,因此称它们为肿瘤相关抗原。胚胎性抗原即是这一类抗原的代表,如癌胚抗原与消化道肿瘤有关,甲胎蛋白与肝癌有关。

(二) 化学致癌物诱发肿瘤的特点

化学致癌物致癌性不同,所致肿瘤抗原性强弱不同,如由三甲基胆蒽(3-MC)诱导小鼠肉瘤,其抗原性较二苯丙蒽(DBA)诱变者为强,而由二苯酰吡喃诱发的小鼠肉瘤抗原性则弱。肿瘤发病潜伏期短,抗原性较强,潜伏期长,抗原性弱。在纯系动物中用化学致癌物诱发出的肿瘤最明显的特点是肿瘤抗原具有个体特异性,如用 3-MC 诱发的大鼠肉瘤抗原,只能对自身的大鼠抗血清起特异免疫反应,而其他的同系大鼠同样是由 3-MC 诱发的肉瘤彼此无交叉反应。也有人发现用同一种化学物质在同一宿主的不同部位诱发的两个肿瘤,其抗原性也不尽相同。

(三) 机体的抗肿瘤免疫机制

目前已知至少有 5 种细胞在肿瘤免疫中起作用,这 5 种细胞是 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞、裸细胞或 K 细胞、巨噬细胞和 NK 细胞。尽管各种细胞杀瘤的作用和途径不同,但最终均是细胞膜溶解成孔,细胞内容物外溢,细胞破裂而死亡。

1. T 淋巴细胞的细胞毒作用 T 细胞的溶瘤作用在肿瘤免疫中起重要作用,它不仅可特异性地直接破坏瘤细胞,而且还可释放淋巴因子活化巨噬细胞以杀伤瘤细胞。T 淋巴细胞对瘤细胞杀伤作用的特点是具有免疫特异性;一般需几小时至 24 小时发生反应;不需补体参与;瘤细胞必须与致敏淋巴细胞密切接触。

2. 抗体依赖的细胞介导细胞毒作用 T 细胞是一种能发挥细胞毒性作用的淋巴细胞,由于它的杀伤作用依赖于抗体的存在,所以称为抗体依赖细胞。K 细胞是直接来自于骨髓的淋巴样细胞,它不依赖于胸腺,例如裸鼠缺乏胸腺,但仍有 K 细胞功能。K 细胞的功能是由于它的细胞膜上 Fc 受体可与已结合于瘤细胞上的 IgG 型抗体的 Fc 段结合,从而激发 K 细胞的活性,将靶细胞杀伤和破坏,这个杀伤作用是非特异性、无选择性的。

3. NK 细胞的杀伤作用 NK 细胞是一类无需预先致敏即有迅速溶肿瘤细胞作用的淋巴细胞。它们不同于致敏的 T 细胞、K 细胞、巨噬细胞,故称为天然杀伤细胞,它们有自发性淋巴细胞介导的细胞毒性作用。NK 细胞主要存在于外周血及脾脏中,其活性随年龄而有变化。NK 细胞在免疫监视上起重要作用,对各种类型的肿瘤细胞均有溶解作用,因此有人提出 NK 细胞是宿主抗癌的天然屏障或第一道防线。

(四) 免疫毒性与致癌作用

很多化学物可以引起免疫功能下降,特别是细胞免疫功能受到抑制,NK 细胞活性降低,为癌症的发生提供了有利条件。机体正常细胞可在环境因素作用下发生突变、并恶性转化形成肿瘤细胞,这时在肿瘤细胞表面出现新的抗原,此时机体可通过免疫监视作用识别肿瘤抗

原是“外来”或“非己”细胞，从而调动免疫系统进行防御直到最后消灭肿瘤细胞。近年来NK细胞在免疫监视中的作用越来越受到重视，已证明化学致癌物的致癌作用是与NK细胞活性有关的，有人曾用10种多环芳烃物质进行实验证实，凡是具有免疫抑制作用的多环芳烃物质都具有致癌作用，免疫抑制作用的大小与致癌作用的强弱是相一致的。

第四节 免疫毒理学试验方法

一、免疫毒性检测方案

1. 美国国家毒理学计划(NTP)推荐的小鼠免疫毒性检测方案(表 10-5)

表 10-5 NTP 推荐的小鼠免疫毒性检测方案(Luster, 1988)

检测项目	检测内容
筛选(一级)	
免疫病理	血液学——白细胞总数及分类 脏器重量——体重、脾脏、胸腺、肾、肝 细胞学——脾脏 组织学——脾脏、胸腺、淋巴结
体液免疫	对 T 淋巴细胞依赖性抗原(SRBC)产生 IgM 空斑细胞数 对有丝分裂原 LPS 反应
细胞免疫	对有丝分裂原 ConA 反应及混合淋巴细胞反应
非特异性免疫	自然杀伤(NK)细胞活性
广泛研究(二级)	
免疫病理	脾脏中 T、B 淋巴细胞数
体液免疫	对 SRBC 的 IgC 抗体形成细胞数
细胞免疫	细胞毒 T 细胞(CTL)的溶细胞效应及迟发型变态反应(DTH)
非特异性免疫	巨噬细胞——腹腔巨噬细胞数及吞噬能力(静止及活化)
宿主抵抗力的攻击模型	同基因型肿瘤细胞
(观察终点)	PYB6 肉瘤(肿瘤发生率) B16F10 黑色素瘤(肺部肿瘤的结节数) 细菌模型 李斯特菌(死亡率) 链球菌(死亡率) 病毒模型 流感病毒(死亡率) 寄生虫模型 疟原虫(寄生物血症)

2. 荷兰 NIPHEH 推荐的大鼠免疫毒性检测方案(表 10-6)

表 10-6 荷兰 NIPHEH 推荐的大鼠免疫毒性检测方案
(VosandHenkvailLoveren, 1989)

项目	检测内容
一级	
免疫病理学	常规血液学(白细胞分类、计数) 血清 IgM、IgA、IgC 含量 骨髓细胞构成 器官重量(胸腺、脾脏、淋巴结) 组织病理学(胸腺、脾脏、淋巴结、肠系膜淋巴结、支气管相关淋巴组织) 选择指标：淋巴组织免疫细胞化学和流式细胞计数
二级	
细胞介导免疫	对 T 淋巴细胞依赖性抗原(如卵蛋白、结核菌素、李斯特菌)的敏感性及皮肤激发试验

体液免疫	对特异性抗原(李斯特菌)的淋巴细胞增殖反应; 有丝分裂原(ConA、PHA)对 T 淋巴细胞的刺激作用
巨噬细胞功能	对 T 淋巴细胞依赖抗原(卵清蛋白、破伤风类毒素、旋毛虫)反应的血清 IgM、IgG、IgA、IgE 的浓度
自然杀伤细胞功能	对非 T 淋巴细胞依赖性抗原 LPS 反应的血清 IgM 浓度
宿主抵抗力	对 B 淋巴细胞有丝分裂原 LPS 的淋巴细胞增殖反应
	脾粘附细胞和腹腔巨噬细胞在体外对李斯特菌的吞噬和杀伤作用
	脾粘附细胞和腹腔巨噬细胞对 YAC-1 淋巴瘤细胞的溶解作用
	脾非粘附细胞对 YAC-1 淋巴瘤细胞的溶解作用
	对旋毛虫的激发效应(肌肉幼虫计数及幼虫驱出), 对李斯特菌的激发反应(脾脏和肺脏的清除)

3. 推荐适合于我国的小鼠免疫毒性检测方案

参考国外学者推荐的免疫毒性检测方案, 考虑到目前我国免疫毒理学工作开展的现况, 我国学者推荐了国内进行免疫毒性检测的方案(表 10-7)。

表 10-7 国内推荐的实验动物免疫毒性检测方案(北京医科大学毒理室, 1991)

项 目	检 测 内 容
病理毒性	脏器重量: 体重、脾脏重、胸腺重
体液免疫	一般血液学检查: 白细胞总数及分类 对胸腺依赖抗原——羊红细胞的抗体空斑反应(PFC) 血清抗体滴度(血凝法、ELISA 法)
细胞免疫	用有丝分裂原(LPS)刺激淋巴细胞转化 T 细胞数——ANAE 染色法 用有丝分裂原(ConA、PHA)刺激淋巴细胞转化 迟发型变态反应(DTH)
巨噬细胞功能	腹腔巨噬细胞对鸡红细胞的吞噬作用 单核巨噬细胞对碳粒的廓清能力
宿主抵抗力	对肿瘤细胞的敏感性(TD10-20) 内毒素的过敏反应(LDI0-20)

4. 人群免疫毒性检测方案

80 年代由美国国家研究委员会(National Research Council, NRC)提出的人群免疫毒性检测方案分为三个阶段, 所有接触免疫毒物的人均需进行第一阶段检测, 在第一阶段检测中发现有异常的人及选择部分接触人群进行第二阶段检测, 第三阶段检测是在第二阶段中发现有异常的人中进行。世界卫生组织(WHO)也对人群免疫毒性检测提出建议, 在 WHO 推荐的方案中包括七个方面: 血液学检查、体液免疫、细胞免疫、非特异性免疫、淋巴细胞的表面标记、自身抗体、临床化学检查等。表 10-8 为 WHO 提出的人群免疫毒性检测方案。

表 10-8 WHO 推荐的人群免疫毒性检测方案(WHO, 1992)

1	全血细胞计数及分类
2	抗体介导免疫(检测一项或多项) 对蛋白抗原的初次抗体反应 血清中免疫球蛋白水平(IgM, IgG, IgA, IgE) 对蛋白抗原的二次抗体反应(白喉、破伤风或脊髓灰质炎) 对回忆抗原的增殖反应
3	用流式细胞仪分析淋巴细胞的表型 分析淋巴细胞表面标记 Cly3, CD4, CD8, CD20
4	细胞免疫 用试剂盒检测皮肤迟发型过敏反应

	对蛋白抗原(KLH)的初次 DTH 反应
	对血型抗原的天然免疫(如抗 A, 抗 B)
5	自身抗体和炎症
	C—反应蛋白
	自身抗体滴度
	对过敏原产生的 IgE 水平
6	非特异性免疫的检测
	NK 细胞数(CD56 或 CD60)或对 K562 细胞的溶解性
	吞噬作用(NBT 或化学发光)
7	临床化学指标检测

二、免疫抑制的检测方法

1. 免疫病理学检查 包括淋巴器官重量、病理检查及流式细胞术检测细胞表面标记。

(1) 淋巴器官重量: 实验动物接触外源化学物后, 对免疫系统的毒性作用可表现为淋巴器官重量的改变。通过称重了解淋巴器官重量的变化, 最常用来检测淋巴器官重量的是胸腺、脾脏、淋巴结。根据接触外源化学物的途径, 对不同部位的淋巴结进行称重, 如经口接触则对肠系膜淋巴结称重, 经呼吸道接触对支气管淋巴结称重。进行肠系膜淋巴结称重时应注意将周围的脂肪组织去除干净, 以保证称重的准确。

(2) 病理检查: 除对胸腺、脾脏及淋巴结进行病理检查外, 根据暴露途径的不同, 对粘膜免疫系统和皮肤免疫系统的组织病理也应进行检查。开始用常规的苏木素—伊红染色, 进一步针对特殊的细胞类型可采用免疫酶染色法。

有许多单克隆抗体可用来对小鼠、大鼠及人的免疫细胞的分化抗原、细胞粘附分子及活化的标记进行测定。组织病理学的检查只能对所产生的影响做半定量的估计。

(3) FACS 检测细胞表面标记: 荧光激活的细胞分类仪(fluorescenceactivatedcellsortor, FACS)是用于流式细胞术的一种自动分析仪器, 利用免疫荧光与细胞生物学、流体力学、光学和电子计算机等多种技术, 进行细胞和分子水平研究。用 FACS 分析外源化学物对细胞表面标记的影响, 是鉴定化学物免疫毒性十分敏感的指标。

2. 淋巴细胞增殖反应 淋巴细胞增殖试验是测定B淋巴细胞和T淋巴细胞功能的简便方法, 重复性也较好。在进行该试验时需有丝分裂原刺激淋巴细胞转化, 常用的有丝分裂原有细菌脂多糖(LPS)、植物血凝素(PHA)、刀豆素(ConA)等, LPS主要刺激B淋巴细胞, PHA、ConA刺激T淋巴细胞。经刺激后增殖的淋巴细胞用形态学方法、同位素掺入法和比色分析法进行检测。形态学方法简单, 在光学显微镜下计数转化细胞, 但客观性差。同位素掺入法常用³H—TdR掺入到DNA后, 用液体闪烁仪进行测定, 以cpm数来表示转化程度, 该法能客观反映淋巴细胞转化情况, 但需要有³H标记的TdR和能测同位素的仪器, 因此难以在一般实验室进行。1983年Mosmann介绍一种比色分析测定活细胞及增殖细胞, 它的原理是活细胞及增殖细胞能代谢MTF[3, (3,4—dimethylthiazolyl)-2,5- dephenylte- trazoliumbromide]产生甲瓚(fonnazan)。甲瓚是一种紫色结晶, 用酸性异丙醇或二甲基亚砷溶解结晶后, 在ELISA 仪或 721 分光光度计上测定, 根据颜色深浅判断淋巴细胞转化程度。该法简单、快速, 在对一定数量细胞测定时, 具有与同位素掺入同样的灵敏度, 值得推广。

淋巴细胞增殖反应在检测外源化学物对免疫系统毒性上不是一个灵敏的方法, 这是因为细胞在体外培养条件下, 需经几天时间才能达到反应的高峰, 这段时间有些受到损伤的细胞得到恢复, 这是体外试验或半体外试验中一个共同的问题。

3. 体液免疫功能 有许多方法可用来检测体液免疫功能, 包括抗体形成细胞(plaqueformingcell, PFC)、抗体产生的量及B细胞受体等。

在检测外源化学物引起实验动物体液免疫功能变化上, 最常用的方法是 PFC 测定。在

PFC 测定时需用抗原免疫动物,常用的抗原有绵羊红细胞(SRBC)、牛血清白蛋白(BSA)、钥孔血蓝蛋白(KLH)及脂多糖(LPS)等。动物经 SRBC 免疫后 4~5 天,血清中出现特异性抗体,脾脏中有大量抗体形成细胞。对抗体可用血凝法、酶免疫吸附分析法(ELISA)、免疫电泳、免疫扩散等方法进行检测,对抗体形成细胞可用 Jeme 改良玻片法、Cunningham 小室法进行测定,方法简单、特异,不需要特殊的仪器,在很多实验室里均可进行。

实验结果以 PFC / 106 脾细胞或 PFC / 全脾来表示,如果 PFC 减少与剂量有关,表明有免疫抑制作用。

4. 细胞免疫功能检测 检测细胞免疫功能的方法有体内法和体外法。体内法包括迟发型变态反应、皮肤移植排斥反应、移植物抗宿主反应;体外法有淋巴细胞增殖、T 细胞毒性及淋巴因子的产生等。体外法虽然经常采用,但是体内法测定迟发型变态反应应用更广。通常迟发型变态反应可以反映机体细胞免疫状况。

对实验动物进行迟发型变态反应检测时,常用的抗原有 KLH, BSA, SRBC 等。它是将抗原定量注入皮内,24~48h 后观察结果,若注射部位出现红肿、硬结为阳性结果。

迟发型变态反应是在整体动物身上进行的试验,它比用体外试验更能反映外源化学物对机体免疫功能的影响。Luster(1992 年)报道,在老鼠身上进行 DTH 反应测定,对鉴定外源化学物的免疫毒性有很好的预测价值,当与 NK 细胞检测及 PFC 测定结果一起进行分析,其预测价值就更高。

5. NK 细胞活性检测 NK 细胞在机体抗肿瘤、抗感染及免疫调节中起着重要作用,外源化学物对 NK 细胞活性的影响已越来越受到重视。

检测 NK 细胞活性的方法主要有同位素释放法和乳酸脱氢酶(LDH)释放法。检测人 NK 细胞活性常用 14562 细胞株作为靶细胞,测定小鼠脾脏 NK 细胞活性用 YAC-1 细胞株作为靶细胞。

同位素释放法虽较客观、灵敏,但需价格昂贵的仪器,并有放射性污染环境的问题。LDH 释放法同样可得到客观、准确的结果,却无上述的缺点,因此它不失为检测 NK 细胞活性较好的方法。

6. 宿主抵抗力检测 外源化学物诱发免疫毒性可表现为机体对感染因子或肿瘤细胞的抵抗力发生改变。宿主抵抗力的检测大部分是在老鼠身上进行的,包括对细菌、病毒、寄生虫及可移植肿瘤细胞的抵抗力,只有个别是在大鼠身上进行的。常用的细菌有李斯特菌、链球菌、绿脓杆菌等,病毒有脑炎-心肌病毒(EMC)、单纯疱疹性病毒(HSV)、流感 A 型病毒(FLU)等,常用的寄生虫有毛线虫和疟原虫,肿瘤细胞有 PYB6 细胞株,是由多形瘤病毒(Polymavires)在 C57BL / 6 小鼠诱发的一种肿瘤,除此而外,还可用 B16F10 黑色素瘤细胞株、Madison109 肺癌细胞株和 LsL~s 肺癌细胞株等。

在进行宿主抵抗力检测时,所用感染因子的剂量及动物数是十分重要的,因为剂量太高太低都得不到满意的结果。在 NIEHS 实验室里过去所选用的剂量为使 10%~30%对照组动物产生肿瘤或死亡,目前将所用的剂量略降低而使实验的敏感性有所提高。

尽管很多宿主抵抗力试验在操作上很简单,但需要较多的动物,与免疫功能检测相比其敏感性较差。因此在免疫毒性筛选上,一般不做宿主抵抗力检测。

三、超敏反应的检测方法

1. 皮肤超敏反应的检测 外源化学物引起皮肤超敏反应的检测方法最常用的有两种,即局部封闭涂皮法(Buehler test, BT)及皮内和涂皮相结合的方法(Guinea Pig Maximization Test, GPMT),局部涂皮法用于强致敏物的筛选,致敏途径与实际接触途径相似,操作简便,但接触剂量不易控制。皮内和涂皮相结合的方法,致敏性强,检出率高,尤适于弱致敏物的检测,该两种方法均以豚鼠为实验模型,豚鼠实验方法繁杂,费用较贵,近年来发展两种检测方法,小鼠耳肿实验(mouse ear swelling test, MEST)及啮齿类局部淋巴结实验

(murinelo-cslymphnodeassay, LLNA)由于方法简单,小鼠价格低廉,实验用材少,而且能较好的预测人群接触外源化学物的致敏性,得到广泛应用。

2. 呼吸道超敏反应的检测 可采用激发试验、血清中 IgE 的检测及辅助 T 细胞(Th2)分泌的因子等。

激发试验是模拟自然发病条件,以少量抗原引起一次较轻的超敏反应发作,用以确定过敏原的试验,主要用于 I 型超敏反应。常用的激发试验有支气管激发试验,鼻粘膜激发试验等,血清中 IgE 检测对 I 型超敏反应的诊断和超敏原的确定有价值,常用的检测方法有放射免疫吸附试验(BAST)、酶联免疫吸附测定(ELISA)及间接血凝法。

四、免疫毒理学研究中应考虑的问题

(一) 体内试验

1. 实验动物选择

在免疫毒理学研究中,最常用的是啮齿类动物,因为对啮齿类动物及其细胞成分了解的最多,而且有各种商品化的试剂。除啮齿类动物外,鱼类也用的较多,鱼类生活在自然环境中,是研究环境污染物对机体免疫功能影响很好的模型。

在进行免疫毒理学研究时,最好选用纯系动物,这样可以减少个体差异,美国 NTP 推荐用 B6C3F1 小鼠作为实验动物。实验动物年龄多选择成年动物,也可根据不同研究目的,选用不同年龄的动物进行实验。

2. 接触受试物的时间 实验动物接触受试物时间的长短,对免疫系统的影响不同。对有些药物如抗菌素在临床上应用时间较短,实验动物接触 1~2 周即可,长时间的接触会产生耐受。然而对某些长期使用的药物,动物接触至少一个月,以评价药物的长期作用。

3. 接触受试物的剂量 在进行免疫毒性检测时,应避免选用有明显一般毒性的剂量。为了确定剂量—反应关系及未观察到不良影响的水平(NOEL),至少应设三个剂量。高剂量要低于产生明显毒性的剂量,一般应低于LD₁₀量应不引起免疫毒性,在高剂量与低剂量间设一中间剂量。选择适当的剂量是十分重要的,特别是对实验结果的解释上,不能受严重的应激及营养不良的影响与干扰。

4. 实验中用的抗原 抗原的来源、给予途径、剂量、免疫后检测时间等均对免疫反应有一定的影响。羊红细胞(SRBC)是最常用的抗原,建议采用静脉注射途径,剂量以每只小鼠 $5 \times 10^6 \sim 1.5 \times 10^8$ 个细胞为宜。

5. 注意免疫毒性的器官特异性 如 5-氟尿嘧啶抑制小鼠脾脏及肺脏的 NK 细胞活性,但却增强肠道 NK 细胞活性。

6. 重视局部免疫功能的检测 有些外源化学物经呼吸道进入体内,其主要的靶器官是肺,因此对肺脏局部免疫的影响则应引起足够的注意。对肺部免疫功能的检测包括干扰素的产生、肺脏巨噬细胞功能、自然杀伤细胞活性、细胞毒性 T 细胞活性等。

(二) 体外试验

体外试验常用在机理的探讨上,如果用体外试验进行安全性评价时,有以下几个问题:

1. 免疫系统是一个复杂的和由许多细胞、分子组成的精细的生理调节系统,任何一种体外系统都很难模拟。在体外细胞培养系统中可加入 S9 混合物,但 S9 也不能代表所有的代谢酶。

2. 细胞在体外生存环境发生很大变化,随着细胞在体外培养时间延长,传代次数增多,细胞的生理、生化、代谢方面都发生很大变化,这将影响实验结果。

3. “神经—内分泌—免疫”三大系统在体内相互作用,相互制约,构成一个复杂的网络,任何环节的紊乱或失调都能直接或间接影响其他系统的功能,这三大系统也只有体内才能发挥作用。

正因为如此,有时体内、体外实验结果不一致,从而造成过高或过低估计免疫毒性效应,

在进行安全性评价时用体外浓度难以推算体内浓度。

(三) 免疫功能改变的生物学及临床意义

对实验动物免疫毒性检测应综合考虑其统计学的意义和生物学意义,特别是注意分析其剂量—反应和毒性的可逆性。而且,涉及多个细胞、多种成分的免疫功能改变要比单一的检测终点的改变更具有生物学意义。人群免疫毒性检测,对于确定外源化学物对人体免疫毒性有十分重要的意义。

第五节 检测食品中化学物免疫毒性的常用方法

要鉴定食品中化学物对免疫功能的影响,必须建立一些灵敏、快速、特异的免疫学方法。由于免疫系统的复杂性,参与免疫应答的器官不是单一的,参与免疫反应的细胞也是多种多样的,因此要确定食品中某一化学成分对免疫功能的影响,决不是用一个实验就能说明的,需要进行一组实验来研究其对体液免疫、细胞免疫以及单核巨噬细胞的功能等的影响。

(一) 细胞学和免疫病理学检查

可进行血液学检查,主要进行白细胞总数的测定和白细胞的分类计数。

为了检测外源性化学物对实验动物机体的免疫功能是否有不良影响,在实验结束后常又要对其胸腺及脾等免疫器官及动物肝脏和肾脏进行大体观察,并称其重量,计算其脏器系数,必要时进行组织学检查。脏器系数是指每 100g 体重的某一脏器(湿重)的重量(g)。胸腺萎缩与否是评价细胞免疫功能状态的一个十分有用的指标,脾脏重量减轻或脾淋巴滤泡的萎缩表明机体的体液免疫功能降低。

(二) 细胞免疫功能的测定

1. 酸性 α -醋酸萘酯酶(ANAE)测定淋巴细胞中含有各种酶类 不同的淋巴细胞亚群所含的酶类不同,其含量和酶谱均有不同。T 淋巴成熟期可明显增加酸性 α -醋酸萘酯酶的活性。因此可用细胞化学反应法检测 ANAE,作为鉴别 T 淋巴细胞的一种方法。其检测原理是 T 淋巴细胞浆内的 ANAE,在弱酸性条件下能使底物 α -醋酸萘酯水解成醛酸和 α -萘酚。后者与六偶氮副品红偶联,生成不溶性的红色沉淀物,沉积在 T 淋巴细胞浆内酯酶所在的部位。经甲基绿复染,反应颗粒变暗而呈红黑色。在显微镜油镜下观察 ANAE 阳性的淋巴细胞呈灰或灰绿色,胞浆内有大小不等、数量不一,界限分明的红黑色颗粒或斑块。ANAE 阴性的淋巴细胞呈淡绿或棕黄色,无着色颗粒。每份标本至少计数 100~200 个淋巴细胞,求 ANAE 的阳性率。

2. 淋巴细胞转化实验 可采用外周血分离淋巴细胞培养法或微量全血培养法。其原理是将外周血或分离的白细胞和植物血球凝集素(PHA)混合进行体外培养,数日后取培养细胞作涂片染色和镜检,可见大部分淋巴细胞转化为体积较大的原始淋巴母细胞,细胞核内生成核仁,并有部分细胞发生分裂的现象。由于 PHA 只激发 T 淋巴细胞转化,因此计数 200 个淋巴细胞,计算出转化细胞的百分率,即得淋巴细胞转化率(简称转化率)。T 淋巴细胞主要参与机体的细胞免疫,故淋巴细胞转化实验反映的是机体的细胞免疫功能状态。

此外 ^3H -胸腺嘧啶核苷(简称 ^3H -TdR)掺入实验也是体外淋巴细胞转化实验的一种方法,该方法客观、重复性好、结果准确。其原理是当淋巴细胞受到分裂原(如 PHA 等)或特异性抗原刺激而发生转化时,必然伴有 DNA 的大量合成,此时若将具有放射性的 ^3H -TdR 加到培养液内,则可作为 DNA 的原料被摄入转化的细胞内,因此测定细胞内放射性物质的相对数量(以脉冲数表示),就能客观地反映淋巴细胞对刺激物的应答水平。

目前国外的免疫毒理学工作者常常选择混合淋巴细胞培养法来进行淋巴细胞转化实验。混合淋巴细胞培养又可分成双向法和单向法两种。双向混合淋巴细胞培养法的原理是将同种异体的淋巴细胞共同培养,由于相互刺激,使双方淋巴细胞发生增殖、分化和形态上出现母

细胞化的转变。其增殖程度与不相容性程度成正比，因此免疫毒理学实验中常将淋巴细胞增殖程度看作为淋巴细胞反应能力强弱的标志。单向混合淋巴细胞培养法的原理主要是应用检测混合淋巴细胞培养中某一方淋巴细胞反应的能力，将另一方的淋巴细胞先以 X 射线或自力霉素 C 处理，使其失去增殖反应能力但仍保持抗原性，作为刺激细胞与被检淋巴细胞混合培养，以检测未经处理的被检淋巴细胞的增殖反应能力。

3. 二硝基氟苯诱导小鼠迟发型超敏反应 迟发型超敏反应 (DTH) 是依赖 T 细胞的反应，其主要特征是致敏机体在抗原攻击部位出现迟发型炎症反应，又称接触性过敏反应。其检测原理是二硝基氟苯 (DNFB) 为一种半抗原，将其稀释后涂抹于动物的腹壁皮肤，4-7 天后再将其涂抹于耳部或足、爪皮肤，使局部产生迟发型变态反应。一般在抗原攻击后 24~48 小时反应达到高峰，因此在此时测定肿胀程度。

4. CD4 / CD8 比值的测定 T 细胞按其表面抗原及其在免疫应答中的功能分为 CD4 和 CD8 两大亚群。在正常免疫应答的情况下，T 细胞亚群之间存在着促进或制约的关系，即 CD4 和 CD8 的比值是稳定的。而当 CD4 和 CD8 之间的平衡遭到破坏时，就会表现出异样的免疫应答，如免疫缺陷或自身免疫疾病。在免疫毒理学的实验中，测定 CD4 和 CD8 的比值可直接反应出细胞免疫的状况。此方法简单、快速、是国外免疫毒性实验的首选指标之一。目前检测 CD4 / CD8 比值的方法有两大类，即免疫荧光法和免疫酶标记法。

免疫荧光法的原理是将淋巴细胞加以分离，制成薄涂片，干燥固定后用荧光标记的 CD 单克隆抗体染色，洗去未结合的荧光抗体后，在荧光显微镜下观察结果，计算 CD4 / CD8 比值。免疫酶法测定的原理基本与荧光法相同，只是实验中用兔抗鼠 IgG 抗体为二抗代替荧光抗体，加入酶底物后阳性细胞显色，用普通光学显微镜即可观察结果。

(三) 体液免疫功能测定

1. 溶血空斑实验 该实验简称 PFC 实验，又称抗体生成细胞的检测，是体外检查和计数产生 IgM 及其他类型 Ig 抗体生成细胞的一种方法。

琼脂平板溶血空斑实验的原理是将羊红细胞免疫 4 天的小鼠取出脾脏制成脾细胞悬液，在半固体琼脂凝胶介质中使脾细胞与羊红细胞混合，浇在平皿内使之形成薄层，37℃ 恒温孵育。抗体生成细胞可释放溶血性抗体，使其周围的羊红细胞致敏，在补体参与下导致脾细胞周围的羊红细胞直接溶血，在其周围形成一个肉眼可见的局部性的圆形透明溶血区，称为溶血空斑。本方法测出的细胞主要是 IgM 抗体生成细胞，每个空斑表示一个抗体生成细胞，空斑大小表示抗体生成细胞产生抗体的多少。

除琼脂平板溶血空斑实验也可采用琼脂玻片溶血空斑实验，其原理与琼脂平板法相同。

间接进行溶血素测定 (或半数溶血值测定) 也可作为抗体生成细胞检测的方法。其原理是经绵羊红细胞免疫过的动物，其淋巴细胞可以产生抗体—溶血素，并释放至外周血中。分离出致敏动物的血清，与绵羊红细胞一起培养，在补体参与下可以产生溶血现象。致敏动物血清中溶血素的含量可以通过溶血过程中释放的血红蛋白的量测出。

2. 单项免疫扩散实验测定血清中 IgG、IgA 和 IgM 该方法的原理是将一定量的抗体 (一般采用的是特异性抗血清) 与加热溶化的含缓冲液的琼脂或琼脂糖在 56~60℃ 混匀后，浇于玻璃板或平皿上，成为适当厚度的凝胶层。打孔后加入一系列不同浓度的标准抗原，在合适的温度、湿度环境中，经过一定时间，抗原由小孔向四周呈辐射状扩散，与已混匀在琼脂凝胶中的抗体相互作用。当抗原扩散到一定的距离，抗原和抗体形成的沉淀到一定时间后不再继续增大，此时沉淀环的大小 (直径或面积) 与抗原浓度在一定范围内成直线关系。以抗原浓度的对数作为横坐标，以环直径或面积作为纵坐标绘制标准曲线。该方法可以测定体液中多种免疫球蛋白，如 IgG、IgA、IgM 等。

(四) 单核—巨噬细胞功能测定

1. 观察巨噬细胞吞噬功能的滴片法 该法的原理是巨噬细胞具有吞噬功能，是机体的

非特异性免疫指标之一。将鸡红细胞注入小鼠腹腔后，小鼠腹腔内巨噬细胞迅速聚集，吞噬鸡红细胞，若干小时后，用 Hank's 液冲洗小鼠腹腔，并用冲洗液滴片，温育后染色。在油镜下计数并计算巨噬细胞的吞噬百分比和吞噬指数，据此来判断巨噬细胞的吞噬功能。通常油镜下每只支物分析 100 个巨噬细胞，记录每个巨噬细胞是否吞噬了鸡红细胞以及吞噬鸡红细胞的数目。

$$\text{吞噬百分率} = \frac{\text{吞噬鸡红细胞的巨噬细胞数}}{100 \text{ 个 (巨噬细胞数)}} \times 100\%$$

$$\text{吞噬指数} = \frac{100 \text{ 个巨噬细胞吞噬鸡红细胞的总数}}{100 \text{ (巨噬细胞数)}}$$

2. 碳粒廓清实验 其原理是小鼠肝脏和脾脏血管内固有的吞噬细胞能吞噬碳粒，如果静脉注入碳粒，上述细胞可以将其从血流中除去。正常小鼠肝脏枯否氏细胞吞噬清除 90% 碳粒，脾脏巨噬细胞约吞噬清除 10% 碳粒。从而自定量静脉注入印度墨汁起计时。间隔一定时间取静脉血，测定血中碳粒的浓度，用血流中碳粒廓清的速度，可以间接表示单核细胞的功能。血流中碳粒浓度的对数与注入碳粒后取血的时间呈直线关系，直线的斜率 K ，即吞噬指数，表明吞噬碳粒的速度。 K 值大小除了与吞噬细胞的吞噬活性有关外，还与小鼠肝脏、脾脏的重量有关，因此 K 值大小除了与吞噬细胞的吞噬活性有关外，还与小鼠肝脏、脾脏的重理有关，因此 K 值需进行校正。

(王 枫 侯祥红 曹 瑞 曹子鹏)