

普通高温放线菌与饲草土尘 在家兔的实验尘肺研究

张世珍 朱宣人 陈怀涛 李建唐

(甘肃农业大学)

摘 要

用从饲草中分得的土尘和从甘肃河西地区气喘病马肺中分到的一株普通高温放线菌(*Thermooactinomyces vulgaris*—T.v.), 对50只家兔进行了实验尘肺的研究。病理形态上可见, 只有在土尘和菌尘先后感染或同时感染后其病理学改变才与河西地区马气喘病自然病例的病变更为相似。电镜检查, 在实验兔肺泡巨噬细胞内可见到尘粒和T.v.孢子残骸。CIEP和ELISA检测, 在染菌8次以上实验兔血清中检出了沉淀素抗体和循环免疫复合物。免疫荧光技术查明在肺组织内有T.v.孢子和IgG沉着。结果表明, 在混合性尘肺的发病机理中, 土尘和普通高温放线菌存在相互协同的关系, 且尘肺的发生是由机体对土尘所致肺泡损伤的非特异修复及对这种放线菌孢子侵害发生Ⅰ、Ⅳ型变态反应所引起的。

关键词 高温放线菌, 土尘, 家兔, 尘肺

马类动物气喘病, 现多称慢性阻塞性肺病(COPD), 是一种散发性的慢性呼吸系统疾病。国外对本病的研究证实, 它是由嗜热放线菌等变应原所致的有机尘肺^[8, 9]。国内的研究报道, 其病因不尽相同。业已证明甘肃河西地区马气喘病是由吸入有机尘和无机尘所致的混合性尘肺^[1], 其中有机尘主要是普通高温放线菌(T.v)等嗜热放线菌, 无机尘主要为SiO₂和硅酸盐化合物。为明确两类致病因素的致病性差异及其在尘肺发病机制中的相互关系, 特设计了本实验研究。

材 料 和 方 法

一、动物模型复制

(一) 从病区采集饲草土尘, 200目过筛, 500℃灰化除去有机杂质, 并测其分散度, 直径小于5μm的尘粒占66.6%。另选从病马肺中分到的一株普通高温放线菌, 葡萄糖蛋白胨琼脂基上培养, 刮取菌落, 干燥后防护罩内研制成菌粉。

(二) 选健康、体重1.5~2.0kg青紫蓝兔55只, 按设计随机分组。实验各组每期剖杀4~5只, 对照组每期扑杀1只(表1)。并以上述土尘和菌粉, 采用套袋吸入法感染实验兔。土尘每次给量为150mg/kg体重; 菌粉为100mg/只。

二、检查项目

(一) 动物剖杀前经心脏采血, 制备血清, 用CIEP和ELISA检测兔血清内特异性

* 本试验得到王秋辉、项光华及王旭东、王生奎的大力协助, 病理切片室程燕蓉、何美珍承担部分制片工作, 谨致谢意。

** 本文于1989年5月27日收稿。

表1 实验动物分组及试验设计

处理类别	实 验			对 照
	先土后菌组	先菌后土组	土菌混合组	
动物数	15	20	15	5
感染物及总感染次数	土尘14, 菌尘10	菌尘5, 土尘14	土菌混合14	—
感染间隔(日)	5	5	5	—
剖杀时间(天)	50、75、120	13、23、75、120	23、75、120	13、23、50 75、120

沉淀素抗体和循环免疫复合物(CIC)。其中ELISA参照pernice等^[13]介绍的方法进行。正式试验前进行实验条件测定(聚苯乙烯板抽样检查、包被用羊抗T.v、IgG工作浓度测定、血清和酶结合物最适浓度测定)。测“未接触”菌尘的10份家兔血清正常O.D.值,取 $\bar{x} \pm 3SD$ 为正常上限($0.42 + 3 \times 0.058 = 0.6$),O.D.值大于正常值者为阳性。

(二)取病变严重部肺组织,固定于冷10%中性福尔马林中,4℃常规脱水,制做石蜡切片,经胰蛋白酶消化后,参照张保真^[8]介绍的免疫荧光染色法进行间接法、直接法染色。其中兔抗T.v.血清依淋巴结-皮下免疫程序制备,使用最适稀释度为1:10;羊抗兔IgG荧光抗体(由卫生部北京生物制品研究所提供)最适稀释度为1:8。

(三)动物处死后,立即剖胸取材,按裴正礼^[6]介绍的程序制做超薄切片,JEM-100CX电镜观察。剩余肺组织经气管灌注10%福尔马林后投入固定液中浸渍固定,石蜡切片,H.E.染色观察。部分切片进行Del-Rio-Hortega网状纤维染色及PAS染色观察。其他器官同法制做切片,H.E.染色观察。

结 果

一、血清免疫学检查 DIEP测定:(见表2)值得一提的是土菌混合处理组每期动物血清抗体滴度高于同期先菌后土处理组。ELISA试验:发现在染菌3次以上实验兔血清中即查到CIC,5次时达到高峰,之后随感染次数增加而渐降低。

二、免疫荧光染色检查(见表2)

间接法染色检查抗原(孢子),其特异性阳性反应表现为:肺泡隔及其他细胞增生区显示颗粒状荧光物或由荧光颗粒集聚成细胞轮廓的荧光团。经H.E.和PAS染色反复对照,证实该荧光物(团)为吞噬了放线菌孢子的巨噬细胞或巨细胞。

以荧光标记羊抗兔IgG直接法染色检测肺组织有无IgG沉着。其阳性反应为:1、部分肺泡隔增生区细胞间有强线状荧光。2、在肺泡内壁和小血管内膜可见线状或条索状荧光物。

三、病理形态学变化

(一)肺眼观变化。三个实验组的动物肺主要表现为结节性变化。结节从初期针尖大灰黄、灰白色发展到后期小米大灰黑色,且数目渐增。土菌混合组在后期还伴有肺硬化等变化。

(二)肺病理组织学改变(见表3):

表2 免疫荧光染色及对流免疫电泳测定结果

处理类别			先土后菌组			先菌后土组			土菌混合组			对照	
感染物及感染次数			±10	±14、 菌1	±14、 菌10	菌3	菌5	菌5、 ±10	菌5、 ±14	土菌5	土菌14	土菌14	—
扑杀时间			50	75	120	13	23	75	120	23	75	120	13、23、50 75、120
检查例数			4	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5
免疫荧光染色	间接法	阳性	0	3	4	2	4	4	1	2	4	2	0
		可疑	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
		阴性	4	1	0	3	1	1	4	3	1	3	5
	直接法	阳性	0	0	4	1	4	3	3	3	4	5	0
		可疑	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1
		阴性	4	3	1	3	1	1	2	1	1	0	4
对流免疫电泳测定	血清沉淀素 抗体滴度*	0	0	16	2	16	16	8	16	32	16	0	
		0	0	16	0	4	4	4	32	16	16	0	
		0	1	8	1	8	16	2	16	8	32	0	
		0	0	8	0	8	8	0	8	16	8	0	
				8	4	4	4	1	4	8	4	0	
阳性率			0	1/4	5/5	3/5	5/5	5/5	4/5	5/5	5/5	5/5	0

*为出现阳性反应孔的最高血清稀释度。其中“1”示原倍血清阳性，“0”示原倍血清阴性。

表3 肺病理组织学变化及其统计

处理类别		先土后菌组			先 菌 后 土 组				土菌混合组			对照
感染物及感染次数		±10	±14, 菌1	±14, 菌10	菌3	菌5	菌5, ±10	菌5, ±14	±菌5	±菌14	±菌14	—
扑杀时间		50	75	120	13	23	75	120	23	75	120	13, 23, 50 75, 120
检查例数		4	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5
间质性肺炎		4/4	4/4	5/5	2/5	1/5	4/5	5/5	4/5	5/5	5/5	0
		+	++	+++	+	+	+++	+++	++	++	+++	
支气管炎及其周围炎		4/4	3/4	5/5	0	1/5	4/5	5/5	5/5	5/5	5/5	0
		++	++	+++		+	+++	+++	+	++	+++	
血管炎及周围淋巴组织增生		1/4	0	2/5	1/5	2/5	1/5	4/5	1/5	2/5	2/5	0
		++		++	+	+	+	+++	+	+	++	
单核巨噬细胞性肺炎		0	0	4/5	5/5	4/5	2/5	1/5	4/5	5/5	4/5	0
				+++	++	+++	+	+	+	+++	++	
巨噬细胞上皮样细胞肉芽肿	肺泡	0	0	5/5	4/5	3/5	1/5	0	2/5	4/5	3/5	0
				++	++	++	+		+	++	+	
	间质	0	0	4/5	3/5	4/5	0	0	3/5	4/5	3/5	0
				+	+	+++			+	++	++	
淋巴小结内的全细胞灶		2/4	1/4	2/5	0	0	2/5	1/5	0	1/5	2/5	0
		++	++	+			+	+		+	+	
肺泡气肿		0	1/4	0	0	1/5	2/5	0	1/5	1/5	0	0
			++			+	+		++	++		

1. 先土后菌组: (1) 慢性支气管及其周围炎: 支气管、尤其细支气管粘膜上皮多有程度不等粘液变性和脱落。支气管粘膜固有层及周围淋巴细胞浸润, 甚至形成淋巴小结, 有的小结中可见尘灶或尘细胞堆集。这一变化在各期均可见到, 且随时间延长逐渐加重。(2) 间质性肺炎: 肺泡隔、肺膜下、支气管与血管周围呈慢性增生性炎症反应, 其中以肺泡隔最明显(图1)。120天时除上述变化外, 在肺泡隔区还见到单核巨噬细胞性肉芽肿, 偶见上皮样细胞-巨细胞肉芽肿(图2)。后期在支气管周围和肺泡隔区有网状纤维增生。(3) 单核巨噬细胞性肺炎及巨噬细胞-上皮样细胞肉芽肿形成: 仅见于120天剖检的动物。表现为肺泡腔内充满数目不等的巨噬细胞、巨细胞(图3), 及在肺泡隔出现中央为大量巨噬细胞或上皮样细胞, 外周少量淋巴细胞浸润的肉芽肿。部分动物的肺泡腔和肉芽肿区的巨噬细胞浆内出现PAS染色阳性颗粒。

2. 先菌后土组: 实验动物均有程度不等单核巨噬细胞性肺炎、巨噬细胞-上皮样细胞肉芽肿形成。这些变化在13、23天(此期单纯染菌)已很明显, 至75、120天时逐渐减轻, 其细胞成分也发生改变。同时见到血管炎及周围炎变化, 表现为小血管内皮增生, 管壁及周围不同程度淋巴细胞浸润(图4)。随土尘的不断感染, 间质性肺炎、慢性支气管及其周围炎逐渐加重。

3. 土菌混合组: 同时存在前两组的各种病变。其中间质性肺炎、支气管及其周围炎、血管及其周围炎变化随时间延长加重。单核巨噬细胞性肺炎在23天时轻微, 75天时加重, 120天又趋轻微。肺泡气肿与间质性肺炎并存, 两者交替分布, 使肺结构呈蜂窝状。

(三) 其他器官变化: 具说明意义的是在肺门淋巴结内看到单个存在的尘细胞灶(7/12)(图5)。

四、肺组织超微结构变化

肺泡Ⅰ型上皮肿胀, 基底膜明显增厚, “气血屏障”结构疏松; Ⅱ型上皮增生, 胞浆内含数目不等的嗜银板层小体; 肺泡隔巨噬细胞增多聚集, 胞浆内有多量吞噬溶酶体和残体, 部分胞浆内还见到尘粒或孢子残骸(图6)。

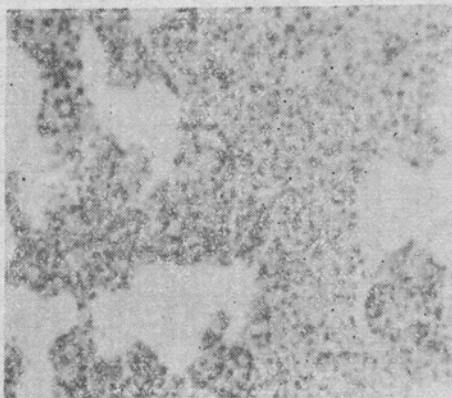


图1 间质性肺炎 H.E.200×

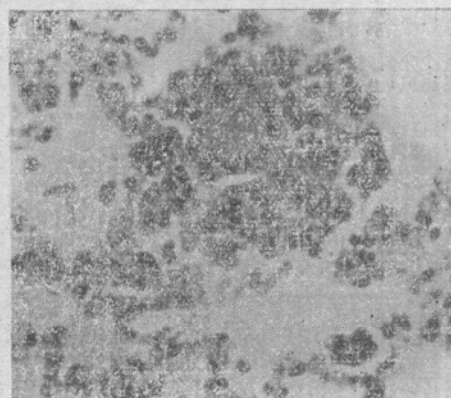


图2 上皮样细胞-巨细胞肉芽肿 H.E.400×

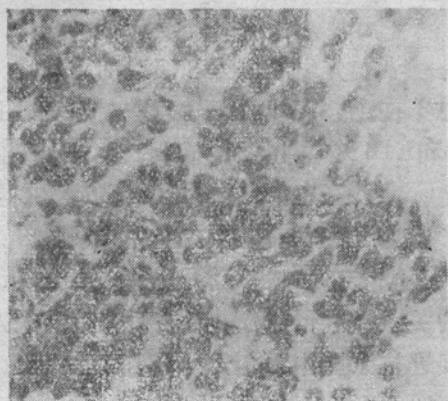


图3 单核巨噬细胞性肺炎 H.E. (PAS染色时巨噬细胞浆内出现阳性颗粒) 400×

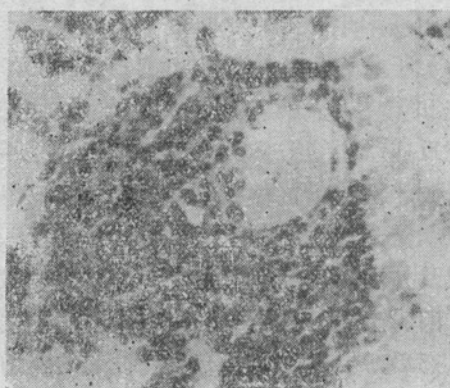


图4 小静脉及其周围炎 H.E. 400×

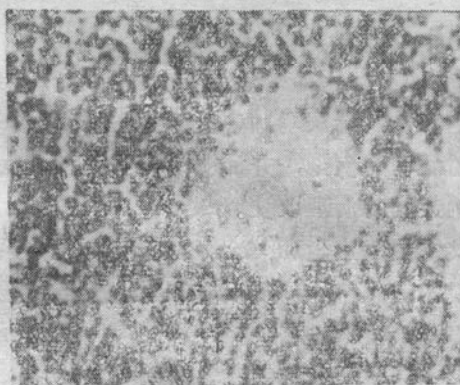


图5 肺门淋巴结内尘细胞结节 H.E. 400×

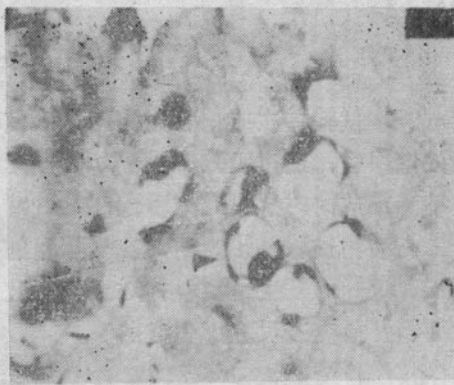


图6 巨噬细胞浆内孢子残骸(▲) E.M. 10000×

分析与讨论

一、本试验用病区饲草土尘和从病马肺中分到的T.v感染动物,以不同处理组合复制出尘肺动物模型。其病变同于McPherson(1974)[7]、陈怀涛(1988)[2]对马气喘病病变的描述,进一步证实了两类致病因子的致病性。

二、从病理组织学改变可见,单纯土尘感染,主要表现为间质性肺炎和慢性支气管及其周围炎,而T.v感染主要引起单核巨噬细胞性肺炎、巨噬细胞-上皮样细胞肉芽肿形成等改变。且致病性和病程发展上亦有差异。土尘感染10次以后才出现明显病变,而T.v往往在感染3次以后即可看到明显改变。

三、土尘所致病变主要定位于富含淋巴管的肺间质,即肺泡隔和支气管、血管周围组织。且在肺门淋巴结内看到了尘细胞;电镜观察表现为肺泡巨噬细胞溶酶体的改变。这些都说明无机土尘的致病机制是以巨噬细胞反应为中心环节,尘细胞沿淋巴途径转移所致。尘粒进入肺泡后,部分被游离巨噬细胞吞噬;部分粘附I型上皮,使其肿胀、变性破裂,尘粒进入间质而被间质巨噬细胞吞噬。尘粒或位于局部间质引起损伤;或沿淋

巴途径转输到邻近肺间质进一步作用。在此间期往往有大量Ⅱ型上皮细胞增生修复,导致肺间质增生、纤维化。

关于嗜热放线菌的致病机制。自60年代部分学者曾先后通过人和实验动物的血清学检查和免疫荧光染色观察,并据过敏性肺病的临床变化、病理组织学改变提出Ⅲ、Ⅳ型变态反应学说〔5、10、11、12〕。本试验采用CIEP和ELISA,在吸入感染3次以上兔血清中查到了沉淀素抗体和CIC。荧光标记羊抗兔IgG直接法染色,在肺组织显示了线状、条索状荧光,说明肺组织内有IgG沉着。病理形态学观察,确也存在上皮样细胞肉芽肿形成及外围淋巴细胞增生浸润等改变。故使Ⅲ、Ⅳ型变态反应学说得到进一步证实。

四、土尘和嗜热放线菌在尘肺病理发生中的关系探讨。部分学者在研究矽肺病人免疫状态后,提出矽尘具有免疫佐剂的作用,可促进抗原抗体反应〔6〕。本试验中土菌混合处理组及土菌先后作用时的病理组织学改变表明,不论两类致病因素感染的先后次序如何,其病程发展和病变程度均有加快、增强趋势。CIEP表明土菌混合组沉淀素抗体滴度高于同期染菌的其他两组。说明土尘和T.v在尘肺病理发生上起协同或相互促进作用。

结 论

一、本试验首次应用甘肃河西地区饲草土尘和从气喘病马肺中分到的一株T.v,以不同处理组合,通过吸入感染成功复制了马气喘病动物模型,并证明只有当两种致病因子交替感染或同时感染时方引起和马气喘病病例类同的病理改变。

二、动物试验初步表明,在气喘病的病理发生中,土尘和T.v存在相互协同关系。

三、尘肺的发生是由机体对土尘所致肺泡损伤的非特异修复反应和对T.v孢子侵袭发生Ⅲ、Ⅳ型变态反应而引起的。

参 考 文 献

- 〔1〕 甘肃农业大学马气喘病研究组, 1987. 马类动物气喘病研究, 第一报, 概述. 甘肃农大学报, (4): 1~6.
- 〔2〕 陈怀涛等, 1988, 甘肃河西地区马类动物气喘病形态变化及病理发生. 甘肃农大学报, (1): 71~84.
- 〔3〕 张保真, 1984, 免疫组织化学理论与技术. 第四军医大学.
- 〔4〕 裴正礼, 1986, 细胞超微结构基础. 兰州医学院.
- 〔5〕 车东媛等, 1986, 实验性“农民肺”光镜、电镜及免疫组化研究. 中华结核与呼吸系疾病杂志, 9(4): 236~238.
- 〔6〕 王勋等, 1983, 矽肺病人免疫状态的研究. 工业卫生与职业病, (2): 103~104.
- 〔7〕 McPherson, E. A. et al., 1974, Some aspects of chronic obstructive pulmonary disease of horses and methods used in their investigation. Equine Vet. J., 6(1): 1~8.
- 〔8〕 McPherson, E. A. et al., 1979, Chronic obstructive pulmonary disease (COPD): Factors influencing the occurrence. Equine Vet. J., 11(3): 167~171.
- 〔9〕 Seeligen, H. D. R. et al., 1975, Farmer's lung in animal. Vet. Bulletin, 45(9), 660 (Abstract).
- 〔10〕 Emanuel, D. A. et al., 1964, Farmer's lung: clinical, pathologic and immunologic study

- of twenty-four patients. Am. J. Med., 37 (9) : 392~399.
- [11] Reyes, Cesar N. et al., 1982, The pulmonary pathology of farmer's lung disease. Chest, 82 (2) : 142~146.
- [12] Cesar, T. et al., 1974, Immunopathological studies in patients with farmer's lung. Clinical Allergy, 4, 119~128.
- [13] Pernice, W. et al., 1979, Antigen-specific detection of HBsAg-containing immune complexes in the course of hepatitis B virus infection. Clin. Exp. Immunol., 37, 376~380.

STUDIES ON EXPERIMENTAL PNEUMOCONIOSIS IN RABBITS BY THERMOACTINOMYCES VULGARIS AND SOIL DUST

Zhang shizhen, Zhu xuanren, Chen huaitao, Li Jiantang

(Gansu Agricultural University, Lanzhou)

Abstract

Studies on experimental pneumoconiosis by *Thermoactinomyces vulgaris* (from a heaved horse in Hexi district, Gansu) and Soil dust (from the fodder) were carried out in 50 rabbits. In rabbits exposed to the dust followed by the bacteria or *vice versa*, as well as those subjected to both simultaneously, pathologic picture were found very much the same as those in heave-stricken horses in Hexi district, Gansu province. In rabbits having access to Soil dust and *T. vulgaris*, mineral crystals and spore remains could be discovered in alveolar macrophages under electron microscope. The specific precipitins and circulating immune complexes were detected by CIEP and ELIRA in sera of rabbits exposed to *T. vulgaris* above 3 times. Spores of *T. vulgaris* and deposits of IgG were disclosed in the lung tissue by immunofluorescent technique. The results proved that there were synergistic action between soil dust and bacteria dust in pathogenesis, and the mixed pneumoconiosis were resulted from non-specific repair of the damaged alveolar epithelium caused by soil dust and type III, type IV hypersensitivity reaction to the allergen of *Thermoactinomyces*.

Key words *Thermoactinomyces*, Soil dust, Rabbit, Pneumoconiosis

畜牧兽医学报 增刊 第2期目录(1989年)

1. 畜禽后裔测定的最佳后裔数
2. 奶牛乳房性状的数量化理论分析
3. 广西矮马血清蛋白型变异的研究
4. 优质黄羽肉鸡石岐黄鸡快慢羽品系的选育及其自别雌雄杂种鸡的研究
5. 估测猪半胴骨重量的最优回归方程
6. 内江猪生长发育的研究
7. 钼在我国八个草原类别中的分布状况
8. 缺锌对雏鸡增重、骨生长及血锌含量的探讨
9. 荧光法鉴定冷冻胚胎活力的研究
10. 湖羊胎儿期与生后期的卵巢发育
11. 骆驼的人工授精
12. 驼毛组织学构造及其品质分析
13. 皮质酮免疫对北京鸭某些生产性能的影响
14. 奶山羊血液蛋白质多态性与产奶性能关系的研究
15. 奶山羊初乳孕酮和 17β -雌二醇的含量及注射初乳对乳中激素水平的影响
16. 土壤—植物—动物系统中的硒
17. 填白鹅幽门部G细胞5-羟色胺的观察
18. 关于半番鸭及其亲本羽毛的微量金属组分的比较分析
19. 硒的生物学效应及动物缺硒病发病机理的研究
20. 提高乳牛隐性乳腺炎检出率的研究
21. 矩量-叠加联用法研究药物的体内过程
22. Beige裸鼠(C57BL/6PB₁-beige/nude)的育成及其基本特性
23. 猪流行性腹泻的病理学研究——免疫酶组化法(间接法)抗原定位的研究
24. 鸡的大肠杆菌性脑病
25. 用荧光抗体技术和肠细胞粘附试验检测K88⁺E.coli对仔猪小肠上皮的粘附作用
26. 大肠杆菌K88ac、K99和987P纤毛抗原的纯化及抗血清的制备
27. 红细胞吸附解脱提纯兔瘟病毒
28. 对鼠痘病毒抗体的血清学检测
29. 应用细菌质粒分析技术进行禽源大肠杆菌耐药性和流行病学调查的初步探讨
30. 一种小鸡体液免疫应答能力指示系统的建立
31. 鸭淀粉样变病的发病学研究
32. 褐马鸡食羽症病因研究
33. 猪急性出血坏死性胰腺炎一例报告
34. 幼雏早期鸡新城疫弱毒苗免疫后, 鸡哈德氏腺的免疫形态学、组织化学及机理的研究
35. 用牛SL和SD抗原的PPA-ELISA检测人班氏丝虫病抗体的研究
36. 指形长刺线虫生活史的研究
37. 胰阔盘吸虫成虫体表的扫描电镜观察
38. 甘肃结节虫季节动态的调查
39. 鸽毛滴虫离体培养的研究
40. 喉瘤盘尾丝虫在湖南的发现
41. 波斯锐缘蜱生活史研究
42. 平体吸虫属一新种
43. 甘肃结节虫对宿主致病性的研究
44. 双趾马第Ⅰ趾(指)的解剖结构
45. 问性奶山羊卵巢颗粒细胞瘤一例 一株直径约15nm仔猪腹泻病毒的分离和鉴定
46. 对实验鼠群LCM抗体检测方法研究
47. 鸡大肠杆菌病防治的研究
48. 兔瘟病理形态学研究
49. 牛膀胱肿瘤的组织学分类的研究——对《家畜膀胱肿瘤国际组织学分类》的增补