第 18 卷 第 2 期 2018 年 1 月
1671—1815(2018)002-0056-10

科 学 技 术 与 工 程
Science Technology and Engineering

Vol. 18 No. 2 Jan. 2018

引用格式:张书余, 张夏琨, 周 骥, 等. 冷空气与霾对动脉粥样硬化大鼠影响的实验研究[J]. 科学技术与工程, 2018, 18(2): 56—65
Zhang Shuyu, Zhang Xiakun, Zhou Ji, et al. The cold air and haze experimental study of the impact of atherosclerosis in rats[J]. Science Technology and Engineering, 2018, 18(2): 56—65

生物科学

冷空气与霾对动脉粥样硬化大鼠影响的实验研究

张书余[1,2] 张夏琨[3] 周 骥[4] 田 颖[5] 马守存[6] 况正中[2,7]

(河北省气象局[1],石家庄 050021;河北省气象与生态环境重点实验室[2],石家庄 050021;
长三角环境气象预报预警中心[3],上海 200030;国家气象中心[4],北京 100081;内蒙古自治区气象培训中心[5],
呼和浩特 010051;青海省气象服务中心[6],西宁 810001;重庆市石柱县气象局[7],重庆 409100)

摘 要 通过 2015 年 11 月 29 日 ~12 月 3 日一次实时霾、冷空气天气过程与模拟本次冷空气(完全排除了霾的影响)天气过程及 PM2.5 对动脉粥样硬化大鼠影响的对比实验研究,探讨霾与冷空气共同作用对心血管疾病影响的机理。将 24 只雄性健康大鼠随机分为 4 组,每组 6 只,并制作成动脉粥样硬化模型大鼠,分别为霾与冷空气天气影响组(自然组)、模拟冷空气影响组(模拟组)、PM2.5 影响组(PM2.5 组)和对照组 4 组。分别采用三种形式进行影响暴露,一是根据河北省气象台制作的天气和空气质量预报,在 2015 年 11 月 29 日 ~12 月 3 日进行霾和冷空气天气过程实时对自然组的影响暴露;二是应用 TEM1880 气象环境模拟箱模拟 2015 年 11 月 29 日 ~12 月 3 日的冷空天气过程(排除了霾)对模拟组的影响暴露;三是将 2015 年 11 月 27 日 ~12 月 3 日采集的 PM2.5 颗粒,制作悬浮溶液,给予 PM2.5 组气管滴入 PM2.5 悬浮溶液的影响暴露。检测各组心率、血压和肛温等生理指标,并腹腔主动脉采血和摘取心尖进行匀浆,测量各组动脉粥样硬化大鼠氧化因子(T-SOD、GSH)、炎性因子(IL-6、hs-CRP、TNF-α、sICAM-1)、心血管危险因素(TC、TG、HDL-c、LDL-c、cTnT、Mb)、血管收缩因子(ET-1、NE、EPI、Ang Ⅱ)及反应血栓形成的因子(D-dimer、PAI-1)的生化指标的含量。结果表明动脉粥样硬化大鼠受霾与冷空气的共同影响,各生理、生化指标均比冷空气或 PM2.5 单独影响变化显著,霾与冷空气具有交互作用,冷空气加剧了霾对冠状动脉及心脏的毒性,使心血管疾病明显加重,甚至导致心肌梗死急性发作猝死,初步探索了霾与冷空气的共同作用对心血管疾病影响的机理。
关键词 霾 冷空气 PM2.5 心血管 动脉粥样硬化 氧化因子 炎性因子 血栓形成因子 机理
中图法分类号 Q142.2; **文献标志码** B

流行病学研究认为急性或者长期暴露于大气颗粒物都能引起心血管疾病发病和死亡的急剧增加[1—3]。这种增加的机制多见于颗粒物暴露引起了心血管系统氧化应激损伤和炎症等有关[4,5]。冷空气作为心血管系统的又一危险因素,它与心血管疾病的增加呈负相关,气温越低心血管疾病危险性越大[6]。冷空气刺激可以诱发机体血压升高及其他心血管疾病危险因子水平的升高,如血纤维蛋白原、血脂、血管紧张素Ⅱ等[7, 8]。有流行病学研究认为,冷空气及大气颗粒物在对心血管系统的影响中存在交互作用,冷空气能增强 PM2.5 对心血管系统的毒性作用,造成心血管疾病发病和死亡的升高[9]。由此可见,低温刺激下 PM2.5 的心血管系统毒性可能增强。现利用冷空气、冷空气与霾、PM2.5 对动脉粥样硬化大鼠进行暴露实验,通过对比分析,研究冷空气与霾交互作用对动脉粥样硬化大鼠心脏的毒性作用。

1 实验仪器和材料

TEM1880 气象环境模拟箱(天津普林特环境试验设备有限公司提供),可以提供温湿压联合试验环境,温度可控于 −30 ~120 ℃,波动范围 ±0.5 ℃,湿度可控范围为 30% ~98%,波动度为 ±3%RH(≥75%RH),±0.5%RH(<75%RH),根据试验需求和基本功能,试验箱可提供高低温湿热联合试验环境,同时保证实验过程中有新鲜空气补入,以满足实验动物的正常呼吸需求。

TH212 专用测温仪,范围在 −30 ~50 ℃之间,精度和分辨率为 ±0.2 ℃、0.1 ℃。医用离心机,电子天平,超低温冰箱,酶标仪,动物血压计、显微镜、

2017 年 5 月 29 日收到 国家自然科学基金(41405108)资助
第一作者简介:张书余(1958—),男,汉族,河北安平人。研究方向:人类生物气象学研究。E-mail:zhangsy@cma.gov.cn。

切片机、生物组织包埋机、全自动生化分析仪。

实验用到的检测试剂盒主要有,IL-6、GSH、c-TnT、Mb、ET-1、NE、EPI、sICAM-1、AngⅡ、TNF-α、D-dimer、PAI-1 酶联免疫分析测定试剂盒、总超氧化物歧化酶(T-SOD)羟胺法试剂盒和血脂四项(TC、TG、HDL-c 和 LDL-c)检测试剂盒,水合氯醛。

2　实验前期准备

2.1　实验动物及分组

雄性健康大鼠 24 只购买于维通利华中国公司,合格证号:SCXK(京)2012-0001,大鼠随机分 4 组,每组 6 只,其中分为霾与冷空气天气影响组(自然组)、模拟冷空气影响组(模拟组)、PM2.5 影响组(PM2.5 组)和对照组 4 组。大鼠为 10 周龄,体重 210.9 ~246.5 g。

2.2　实验动物的适应性饲养

所有大鼠均在塑料钢网笼中饲养。饲养室温度利用恒温器恒定在(保定 11 月平均最高气温)16 ℃,相对湿度控制在 45%,日夜节律 12 h/12 h(每日光照时间 08:00 ~20:00),空气质量为优,给予充足的普通标准饲料和水。饲料为北京科奥协力有限公司提供的标准饲料。垫料为胶囊状玉米芯,每日对其进行整理。每日对大鼠进行捉拿训练以减少实验过程中捉拿带来的影响。

2.3　动脉粥样硬化大鼠的制备

动脉粥样硬化模型的制作:24 只健康雄性大鼠,适应性喂养 1 周后,给予各组大鼠动脉粥样硬化饲料喂养,同时给予每只 30 万 IU/kg 体重维生素 D_3 右下肢肌肉注射。动脉粥样硬化饲料是高脂饲料,包括 10% 猪油、10% 胆固醇、2% 胆盐,其余为基础饲料;均由北京科澳协力有限公司提供,共喂养 12 周,每周记录一次体重。12 周后所有大鼠均存活。

给予动脉粥样硬化饲料喂养 12 周后,测量总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白(LDL)和动脉粥样硬化指数(AI),动脉粥样硬化各组大鼠指标较正常组均明显增高,具有统计学意义。动脉粥样硬化各组大鼠心肌、血管的病理形态学也发生明显改变。光镜下可见:健康组心肌中的冠脉分支管腔规则,内膜完整光滑,内弹力板连续,中膜平滑肌细胞呈梭形、排列规整。在动脉粥样硬化各组冠脉分支中,可见典型的斑块形成,向管腔内隆起的斑块表面内皮细胞缺失,内弹力板断裂,大量的脂肪细胞堆积于内膜,使内膜变厚,而中膜受压变薄;绝大多数冠脉分支管腔变得狭窄不规则,内膜遭破坏,内皮细胞缺失,内弹力板断裂,中膜平滑肌细胞排列紊乱,平滑肌增生明显。证实给予动脉粥样硬化饲料喂养 12 周后可以成功制作出动脉粥样硬化大鼠模型。

2.4　大气细颗粒物 PM2.5 采集

智能中流量总悬浮微粒无碳刷采样器与 PM2.5 切割器配合使用。于 2015 年 11 月 27 日 ~12 月 3 日霾天气过程期间在保定河北省信息工程学校进行采样,采样器距地面 1.5 m,周围 100 m 内无主要污染源、建筑及遮挡物。以石英纤维滤膜连续采集 PM2.5,采样流量为 100 L/min,采样每隔 24 h 更换一次滤膜,采样 7 d,同时现场记录好时间、地点、编号、采样时间起止、采样体积等。滤膜采样前恒温干燥 24 h 称重,采样后在同样条件下平衡 24 h 再称重,-20 ℃避光保存,备用。

3　实验过程

3.1　实际霾天气过程中的暴露实验

根据河北省气象台制作的天气和空气质量预报,2015 年 11 月 29 日 ~12 月 3 日有一次霾和冷空气天气过程,实验于 2015 年 11 月 29 日上午 10 时 04 分将自然组从饲养室内移出放置到室外进行自然暴露刺激,此时室外气温为 1.6 ℃,对照组仍在饲养室内饲养,所有环境条件不变。气温和 PM2.5 变化见图 1,12 月 2 日凌晨冷空气开始影响保定市,最低气温出现在 5 时 59 分,气温为 -6.1 ℃,PM2.5 下降到 40 μg/m^3,7 时整取回自然组,首先对自然组和对照组检测心率、血压和肛温等生理指标,而后进行腹腔主动脉采血,并对心脏组织进行匀浆,所采样本进行 3 000 r/min ×10 min 离心之后,采集血清,血浆和心脏组织上清液保存于 -20 ℃低温冰箱待检。

3.2　PM2.5 暴露实验

首先将 2015 年 11 月 27 日 ~12 月 3 日采集的 PM2.5 颗粒,制作悬浮溶液。而后对 PM2.5 组进行实验。用戊巴比妥 40 mg/kg 给大鼠腹腔内注射麻醉后,给予气管滴入 PM2.5 悬浮溶液,PM2.5 悬浮液按10 mg/kg体重溶解在 0.3 mL 生理盐水中给予气管内滴入。于气管滴入 PM2.5 溶液前及滴入后 24 h 分别采集静脉血,采血后立即置于冰块中,一部分不加任何试剂,提取血清,储存在 -20 ℃冰箱待检测;一部分加枸橼酸钠抗凝,2 h 内 3 000 r/min 离心 10 min,提取上清液,储存于 -80 ℃冰箱等待分析。

3.3　模拟冷空气的暴露实验

应用气象环境模拟箱模拟 2015 年 11 月 29 日 ~12 月 3 日的冷空天气过程,完全排除了霾的影响。按图 1 给出的霾天气过程监测的气象要素逐时设定气象环境模拟箱温度、气压、湿度变化值,提前 30 min 打开气象环境模拟箱,让箱体内环境达到

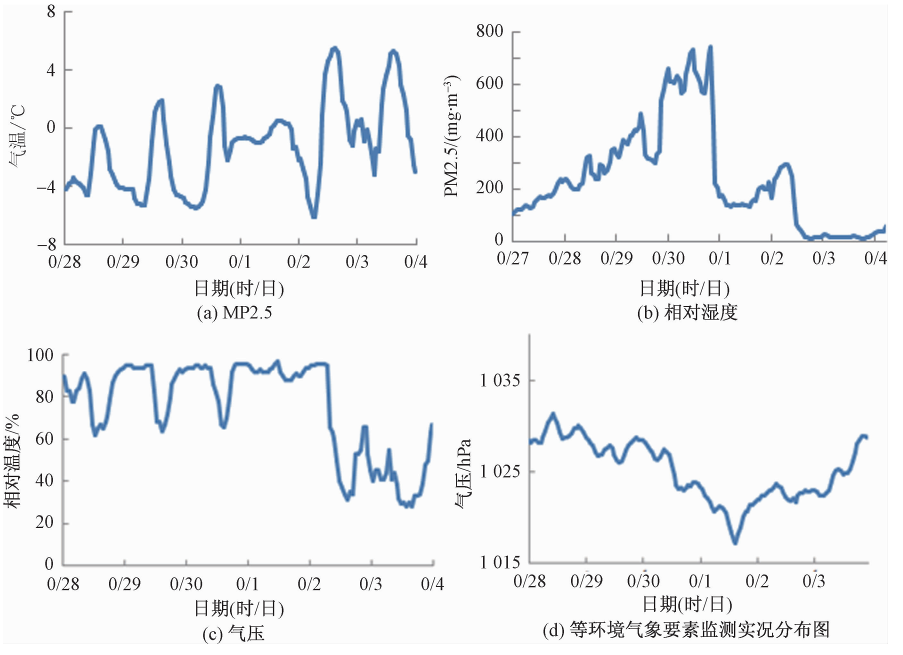


图 1 2015 年 11 月 28 日 ~ 12 月 3 日霾天气过程温度

Fig. 1 On November 28-December 3, 2015 haze weather process temperature

稳定后,将模拟组动脉粥样大鼠放入气象环境模拟箱内,分别在气象环境模拟箱模拟到 12 月 2 日凌晨 7 时取出模拟组,逐一测量其心率、血压和肛温等生理指标,而后进行腹腔主动脉采血,并对心脏组织进行匀浆,所采样本进行 3 000 r/min × 10 min 离心之后,采集血清,血浆和心脏组织上清液保存于 −20 ℃低温冰箱待检。

3.4 生化指标测定

生化指标测定是在河北大学医学实验中心进行的。测定前首先将血浆、血清及心脏组织上清液冻品在 37 ℃条件下进行解冻。利用 ELISA 试剂盒和酶标仪对 hs-CRP、IL-6、GSH、cTnT、Mb、ET-1、NE、EPI、sICAM-1、AngⅡ、PAI-1、D-dimer 、TNF-α 等指标进行处理和测定;利用硝酸还原酶法检测 NO;T-SOD 采用羟胺法测定,通过黄嘌呤及黄嘌呤氧化酶反应系统产生的超氧阴离子自由基,后者氧化羟胺形成亚硝酸盐,在显色剂的作用下呈现紫红色,用可见光分光光度计测其吸光度。当被测样本中含 SOD 时,则对超氧阴离子自由基有专一性的抑制作用,使形成的亚硝酸盐减少,比色时测定管的吸光度值低于对照管的吸光度值,通过公式计算可求出被测样品中的 SOD 活力;血脂 TG、TC 和 HDL、LDL 四项测定分别采用 GPO-PAP 法、CHOD-PAP 法和 CAT 法。

4 统计分析

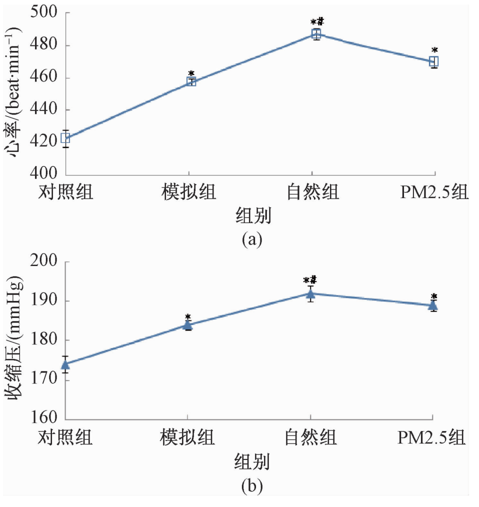
采用 SPSS19.0 统计软件进行统计分析。资料数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,适应性饲养前后所有资料进行配对 t 检验,组间各指标结果用单因素方差分析,两两比较采用独立样本 t 检验,$P < 0.05$ 被认为有统计学差异。

5 实验结果分析

实验目的是对比分析模拟冷空气、实际发生的霾与冷空气、PM2.5 及正常室温条件下对动脉粥样化大鼠影响差异、交互作用和对不同生化指标的敏感性及其导致心血管疾病发生发展的机理。

5.1 心率及血压变化分析

如图 2 是不同实验动脉粥样化大鼠心率、收缩压对比分析图。从图 2 中可以看出,模拟冷空气影响组(模拟组)、实际霾与冷空气天气过程影响组(自然组)和 PM2.5 影响组与实验室内正常饲养组(对照组)比较,心率、收缩压均比对照组大,存在统计学显著差异($P < 0.05$),实际霾与冷空气天气过程对动脉粥样化大鼠影响的最明显,心率、收缩压分别是 486 beat/min、192 mmHg,分别比对照组大 63 beat/min、18 mmHg,其次是 PM2.5 影响组,心率、收缩压分别是 469 beat/min、189 mmHg,分别比对照组大 46 beat/min、15 mmHg,三是模拟冷空气影响组,心率、收缩压分别是 457 beat/min、184 mmHg,分别比对照组大 34 beat/min、10 mmHg,而且自然组与模拟组和 PM2.5 组比较,均存在统计学显著差异($P < 0.05$)。可见霾与冷空气共同对动脉粥样硬化大鼠心率、收缩压的影响明显大于单独冷空气或 PM2.5 的影响,而且交互作用显著。



∗为与对照组比较($P<0.05$);#为与模拟组比较 $P<0.05$

图 2　不同实验动脉粥样化大鼠心率、收缩压对比分析图

Fig. 2　Different experimental atherosis rat heart rate and systolic blood pressure contrast analysis diagram

5.2　总超氧化物歧化酶(T-SOD)变化分析

SOD 是一类抗氧化生物酶,在细胞内外均可清除脂质过氧化产生的过氧自由基,维持氧化与抗氧化平衡,保护生物体不受自由基损。如图 3 所示,模拟冷空气影响组(模拟组)、实际霾与冷空气天气过程影响组(自然组)和 PM2.5 影响组的总超氧化物歧化酶(T-SOD)与对照组相比,均显著减少($P<0.05$),其减少值分别为 22.845 U/mL、47.937 U/mL、35.46 U/mL,其中,实际霾与冷空气天气过程影响组(自然组)与模拟冷空气组(模拟组)、PM2.5 影响组(PM2.5 组)比较,也明显减少($P<0.05$),而且模拟组与 PM2.5 组也存在显著差异。可见霾与冷空气共同对 T-SOD 的影响均比冷空气或 PM2.5 单独影响要明显,有明显的交互作用。因此霾与冷空气共同作用对清除过氧自由基能力显著减弱,更有利于脂质氧化。

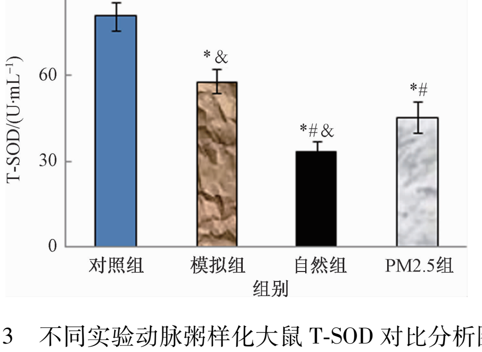


图 3　不同实验动脉粥样化大鼠 T-SOD 对比分析图

Fig. 3　Different experimental rats atherosis T-SOD contrast analysis diagram

5.3　谷胱甘肽变化分析

谷胱甘肽是一种体内广泛存在的硫醇三肽化合物。血液中的谷胱甘肽主要由肝细胞分泌,在肺、肾等组织中被利用分解,水解后的氨基酸成分经血液循环被肝或其他器官摄取重新合成谷胱甘肽[10],GSH 可清除活性氧。如图 4 所示,模拟冷空气影响组(模拟组)、实际霾与冷空气天气过程影响组(自然组)和 PM2.5 影响组的谷胱甘肽(GSH)与对照组相比,均显著减少($P<0.05$),其减少值分别为 1.992 μg/mL、4.757 μg/mL、3.271 μg/mL,其中,自然组与模拟组和 PM2.5 组相比,霾与冷空气天气过程共同作用对谷胱甘肽(GSH)的影响最显著($P<0.05$),而且模拟组与 PM2.5 组也存在显著差异。可见霾与冷空气共同对 GSH 的影响均比冷空气或 PM2.5 单独影响要显著,有明显的交互作用。因此霾与冷空气共同作用可使 GSH 显著减少,清除活性氧能力明显减小,使氧化还原电位逐渐升高,向氧化方向偏移,引起脂质过氧化,内皮细胞、巨噬细胞、平滑肌细胞的氧化损伤进而促进冠心病的发生发展[11]。

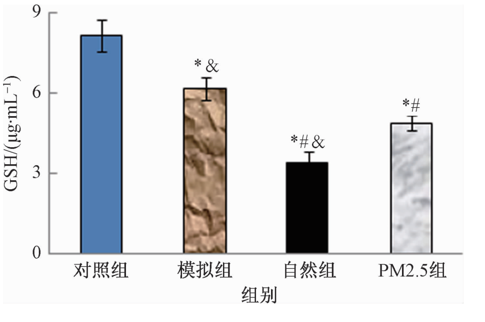


图 4　不同实验动脉粥样化大鼠 GSH 对比分析图

Fig. 4　Different experimental rats atherosis GSH contrast analysis diagram

5.4　诱发系统性炎症指标的变化分析

IL-6 是一种多功能、多基因、多效应的细胞因子,属于典型的炎症因子,在体内具有广泛的生物学效应,由体内不同细胞产生,包括淋巴细胞、单核细胞和上皮细胞等,IL-6 具有增强各种炎症因子及使炎性细胞聚集的作用,是反映机体早期炎症反应的敏感指标[13,14]。IL-6 可促进冠状动脉粥样硬化发展,在冠心病的血管损伤和急性心肌缺血中起重要作用,可以诱导肝脏合成 CRP 和血浆纤维蛋白原,促进血栓形成[15]。如图 5 是不同实验动脉粥样化大鼠 IL-6 对比分析。与对照组相比,模拟冷空气影响组(模拟组)、实际霾与冷空气天气过程影响组(自然组)和 PM2.5 影响组的白介素-6(IL-6)均为显著增加($P<0.05$),增加值分别为 3.477 pg/mL、7.234 pg/mL、5.805 pg/mL,其中实际霾与冷空气天气过程影响组(自然组)增加的最显著,而且与模拟冷空气组和 PM2.5 组存在显著差异。可见霾与冷空气有明显的交互作用,冷空气增强了霾对动脉粥

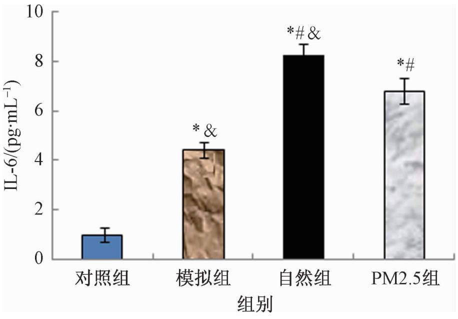


图 5 不同实验动脉粥样化大鼠 IL-6 对比分析图
Fig. 5 Different experimental rats atherosis IL-6 contrast analysis diagram

样化大鼠 IL-6 的影响,加大了血管内皮细胞炎性反应,进一步加快了动脉粥样硬化和血栓形成。

CRP 是一个非常重要的急性期蛋白,属非特异性反应蛋白,是机体非特异性炎性反应的敏感标志物之一[16]。炎症反应时,单核巨噬细胞分泌 IL-6,刺激肝细胞合成 CRP。发现 CRP 在动脉粥样硬化的发生和发展中起重要作用,并与动脉粥样硬化的严重程度有关[17],CRP 的浓度越高,炎症范围就越大,冠脉损伤就越重,心性猝死综合征(CHD)病变程度越重,严重心律失常及心脏事件的发生率也越高,CRP 是冠心病的独立危险因素,是心肌梗死、不稳定型心绞痛预后不良的预报指标[18]。另外,CRP 还促进单核巨噬细胞释放细胞黏附因子,如 TNF-α 等,加剧血管炎症[19]。CRP 水平不仅能准确预测冠状动脉粥样硬化的危险,而且能帮助识别哪些患者有心源性猝死的危险[20]。如图 6 所示,与对照组相比,模拟冷空气影响组(模拟组)、实际霾与冷空气天气过程影响组(自然组)和 PM2.5 影响组的血清高敏 C 反应蛋白(hs-CRP)均为显著增加($P<0.05$),增加值分别为 23.036 ng/dL、49.435 ng/dL、33.159 ng/dL,其中实际霾与冷空气天气过程影响组(自然组)增加的最显著,而且与模拟冷空气组和 PM2.5 组存在显著差异。可见霾与冷空气有明显的交互作用,冷空气增强了霾对动脉粥样化大鼠 hs-CRP 的影响,加大了血管内皮细胞炎性反应范围,加重了冠状动脉损伤,提高了心源性猝死的危险。

肿瘤坏死因子 α(TNF-α)是机体主要的炎症介质,它是全身效应的细胞因子,参与机体的炎症反应,引起心肌细胞损伤或重构,与心肌缺血程度及冠心病等心血管疾病的发生密切相关[21]。另外,TNF-α 等细胞因子还可诱使黏附分子(sICAM-1)表达增加[22]。如图 7 所示,与对照组相比,模拟冷空气影响组(模拟组)、实际霾与冷空气天气过程影响组(自然组)和 PM2.5 影响组的肿瘤坏死因子(TNF-α)均为显著增

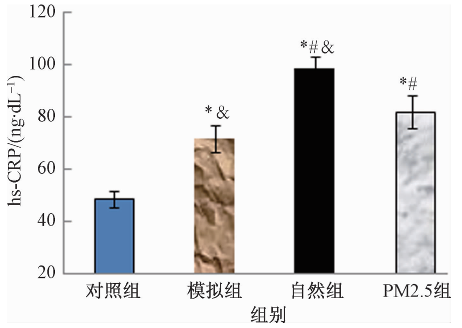


图 6 不同实验动脉粥样化大鼠 hs-CRP 对比分析图
Fig. 6 Different experimental rats atherosis hs-CRP contrast analysis diagram

加($P<0.05$),增加值分别为 3.188 pg/mL、9.038 pg/mL、3.62 pg/mL,其中实际霾与冷空气天气过程影响组(自然组)增加的最显著,而且与模拟冷空气组和 PM2.5 组存在显著差异。可见,霾与冷空气有明显的交互作用,冷空气加剧了霾对心脏的毒性作用,导致心肌细胞损伤及冠心病等心血管疾病更加严重。

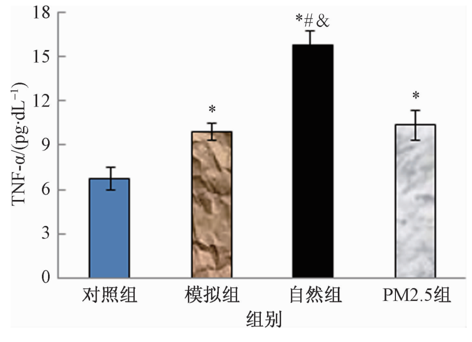


图 7 不同实验动脉粥样化大鼠 TNF-α 对比分析图
Fig. 7 Different experimental rats atherosis TNF-α contrast analysis diagram

ICAM 是一类具有调节细胞与细胞或细胞与细胞外基质相互识别、黏附及信号传递作用功能的糖蛋白分子,广泛分布于体内,调节细胞的生长分化及细胞间相互作用,参与机体炎症与免疫应答、凝血及血栓形成等多种生理病理过程[22—24]。研究表明[23]血中 sICAM-1 是表征内皮细胞活化的标志,并且反映冠脉炎症反应的程度。sICAM-1 是机体内主要的炎性因子,林昌勇等[25,26]研究指出,炎症的发生正是始于白细胞与血管内皮间的粘附作用,在 sICAM-1 的介导下,白细胞、血小板可实现黏附聚集,炎症细胞会黏附于血管内皮,并渗透到内皮细胞下分泌细胞活性物质,导致血管平滑肌细胞增生、形成泡沫细胞,造成动脉粥样硬化形成及发展,严重的可以形成血栓,所以 sICAM-1 与动脉粥样硬化及冠心病的发生发展密切相关[25]。Luc 等[27]对 300 多名冠心病患者跟踪 5 年观察发

现,血浆 sICAM-1 水平升高与心绞痛、心梗等疾病的发生及死亡事件相关。

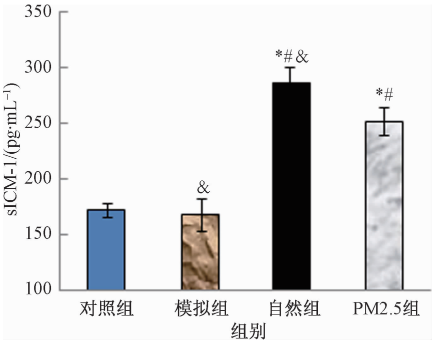


图 8　不同实验动脉粥样化大鼠 sICAM-1 对比分析图

Fig. 8　Different experimental rats atherosis sICAM-1 contrast analysis diagram

sICAM-1 每升高 100 ng/mL,冠脉事件风险将增加 30%[28]。如图 8 所示,与对照组相比,模拟冷空气影响组(模拟组)稍有减少,但不存在显著性差异,实际霾与冷空气天气过程影响组(自然组)和 PM2.5 影响组的细胞间黏附因子(sICAM-1)均为显著增加($P<0.05$),增加值分别为 113.307 pg/mL、79.451 pg/mL,其中实际霾与冷空气天气过程影响组(自然组)增加的最显著,而且与模拟冷空气组和 PM2.5 组存在显著差异。冷空气加剧了霾对心脏的毒性作用,使动脉粥样硬化发展加速,增加了冠脉事件风险程度。

5.5　心血管危险因素分析

冠脉疾病的危险因素检测主要包括总胆固醇、甘油三酯、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)四项。心肌损伤和心肌梗死检测包括目肌红蛋白(Mb)和心肌肌钙蛋白(cTn)I 或 T 等进行诊断与鉴别诊断,这些标志物在正常情况下存在于心肌细胞中,当心肌梗死发作后释放入血。如表 1 表明,动脉粥样硬化大鼠受霾与冷空气共同影响,心血管疾病的危险因素,除高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)以外,总胆固醇(Tc)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、肌钙蛋白(cTnT)和肌红蛋白(Mb)均呈正增长,HDL-C 与其他指标变化相反,随着霾与冷空气暴露的增强呈减小趋势。与对照组相比,除 HDL-C 以外,模拟冷空气影响组(模拟组)、实际霾与冷空气天气过程影响组(自然组)和 PM2.5 影响组的 Tc、TG、LDL-C、cTnT 和 Mb 均为显著增加($P<0.05$),其中实际霾与冷空气天气过程影响组(自然组)增加的最显著,与模拟冷空气组和 PM2.5 组存在显著差异,并且模拟冷空气组与 PM2.5 组比较,也存在显著差异。可见霾与冷空气有明显的交互作用,冷空气加剧了霾对心血管疾病影响的危险程度,促进了心肌梗死疾病的发作。

5.6　血管收缩物质的变化分析

心血管疾病的血管收缩物质主要包括肾上腺素(EPI)、去甲肾上腺素(NE)、血管内皮素－1(ET-1)、血管紧张素Ⅱ(ANGⅡ)。如表 2 表明,动脉粥样硬化大鼠受霾与冷空气共同影响,肾上腺素(EPI)、去甲肾上腺素(NE)、血管内皮素－1(ET-1)、血管紧张素Ⅱ(ANGⅡ)均呈正增长,与对照组相比,模拟冷空气影响组(模拟组)、实际霾与冷空气天气过程影响组(自然组)和 PM2.5 影响组的 EPI(除模拟组外)、NE、ET-1 和 ANGⅡ均为显著增加($P<0.05$),其中实际霾与冷空气天气过程影响组(自然组)增加得最显著,与模拟冷空气组和 PM2.5 组存在显著差异,并且模拟冷空气组与 PM2.5 组比较,也存在显著差异。可见霾与冷空气有明显的交互作用,进一步加重了全身血管的收缩,对高血压影响加重,心肌缺血性疾病更加严重。

表 1　不同实验对心血管影响的危险因素对比分析表($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

Table 1　The impact of different experiment on cardiovascular risk factors analysis table($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

危险指标	对照组	模拟组	自然组	PM2.5 组
Tc/(mmol·L⁻¹)	1.758 2 ± 0.329	$3.119\,7\pm0.327^{*\&}$	$5.410\,5\pm0.217^{*\#\&}$	$4.148\,7\pm0.287^{*\#}$
TG/(mmol·L⁻¹)	0.626 3 ± 0.241	$0.870\,5\pm0.193^{*\&}$	$1.380\,2\pm0.426^{*\#\&}$	$0.989\,5\pm0.359^{*\#}$
HDL-C/(mmol·L⁻¹)	1.381 9 ± 0.381	$1.148\,2\pm0.401^{*\&}$	$0.962\,3\pm0.323^{*\#\&}$	$1.079\,6\pm0.427^{*\#}$
LDL-C/(mmol·L⁻¹)	0.837 1 ± 0.419	$0.940\,2\pm0.093^{*\&}$	$1.881\,3\pm0.042^{*\#\&}$	$1.091\,6\pm0.081^{*\#}$
cTnT/(pg·mL⁻¹)	56.412 ± 15.41	$95.844\pm14.04^{*\&}$	$170.219\pm43.21^{*\#\&}$	$111.109\pm23.52^{*\#}$
Mb(ng·mL⁻¹)	4.320 4 ± 0.269	$5.980\,2\pm1.218^{*\&}$	$10.287\pm2.782^{*\#\&}$	$8.662\pm3.674^{*\#}$

注:* 表示与对照组比较($P<0.05$);#表示与模拟组比较($P<0.05$);& 表示与 PM2.5 组比较($P<0.05$)。

表 2　不同实验对血管收缩物质影响的对比分析表($n=6$, $x\pm s$)

Table 2　Different experimental comparison analysis of the impact of vasoconstrictor($n=6$, $x\pm s$)

危险指标	对照组	模拟组	自然组	PM2.5 组
EPI/(pg·mL⁻¹)	54.799 ± 3.96	$59.825\pm4.31^{\&}$	$115.32\pm30.6^{*\#\&}$	$91.83\pm21.3^{*\#}$
NE/(ng·mL⁻¹)	0.687 1 ± 0.21	$0.813\,1\pm0.34^{*\&}$	$1.329\,4\pm0.62^{*\#\&}$	$0.972\pm0.75^{*\#}$
AngⅡ/(pg·mL⁻¹)	682.03 ± 31.9	$794.67\pm34.1^{*\&}$	$914.19\pm45.9^{*\#\&}$	$810.4\pm29.3^{*\#}$
ET-1/(pg⁻¹mL⁻¹)	122.17 ± 14.7	$136.41\pm12.8^{*\&}$	$162.96\pm16.3^{*\#\&}$	$150.3\pm21.7^{*\#}$

注:* 表示与对照组比较($P<0.05$);#表示与模拟组比较($P<0.05$);& 表示与 PM2.5 组比较($P<0.05$)。

5.7　反应血栓形成的指标变化分析

D-二聚体(D-dimer)是反映凝固系统的指标,在正常动脉内几乎没有 D-dimer 的存在。它是交联纤维蛋白及其特异性降解产物,血液中它的出现表明体内有纤维蛋白形成和溶解,其水平增高反映体内存在血液凝固和纤溶系统的双重激活,可作为体内高凝状态和继发纤溶亢进的重要依据[29]。研究表明 D-dimer 与心血管疾病存在密切关系,是敏感的血栓形成指示物,可作为体内血栓形成或溶解的分子标志之一,并且它的降解产物是血小板激活的特异性物质。D-dimer 可使血管内皮细胞和血管平滑肌细胞的炎性蛋白 -1 和 IL-6 的表达增强,促发炎症反应而导致急性冠脉综合征(ACS)的发生[30]。如图 9 所示,模拟冷空气影响组(模拟组)、实际霾与冷空气天气过程影响组(自然组)和 PM2.5 影响组的 D-dimer 均为显著增加($P<0.05$),增加值分别为 2.235 ng/dL、9.63 ng/dL、5.61 ng/dL,其中实际霾与冷空气天气过程影响组(自然组)增加得最显著,而且与模拟冷空气组和 PM2.5 组存在显著差异。可见霾与冷空气有明显的交互作用,冷空气加剧了霾对心血管疾病影响的危险程度,加速冠状动脉血栓形成,促使心肌梗死疾病急性发作。

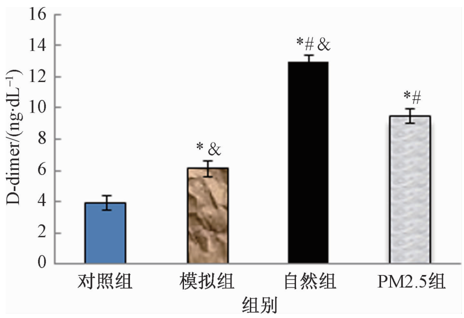


图 9　不同实验动脉粥样化大鼠 D-dimer 对比分析图

Fig. 9　Different experimental rats atherosis D-dimer contrast analysis diagram

纤溶酶原激活物抑制剂-I(PAI-1)是一种糖蛋白,主要由血管内皮细胞产生,在肝脏灭活,它是纤溶酶原活化的基本调节物质,对纤溶酶原活性的平衡起主要作用。Pal-1 在健康人即有一定水平的表达,作为体液调节的正常组成部分,维持凝血纤溶系统的平衡。PAI-1 是组织型纤溶酶原激活物(t-PA)的抑制物,能够迅速有效地抑制 t-PA 的活性,正常情况下血浆 t-PA 与 PAI-1 处于平衡状态,如果这种平衡破坏,PAI-1 抑制纤溶活性,可导致血管局部纤溶蛋白分解的活性降低,使纤维蛋白易于沉积,微血栓不断形成,集聚形成血栓,导致 AMI 的发作,所以 PAI-1 水平升高与 AMI 的形成有密切的关系[31]。PAI-1 在动脉粥样硬化的发生发展过程中也起重要作用,PAI-1 水平如果持续升高,使机体处于低纤溶状态,导致纤维蛋白网架形成,使成纤维细胞在其上聚集、增殖,释放间质胶原,加速纤维化进程,促进动脉粥样硬化的发生。血浆 PAI-1 水平是冠心病和心肌梗死的独立预测因子,可作为 ACS 病变严重程度的预测指标。如图 10 所示,模拟冷空气影响组(模拟组)、实际霾与冷空气天气过程影响组(自然组)和 PM2.5 影响组的 PAI-1 均为显著增加($P<0.05$),增加值分别为 43.159 ng/dLL、87.035 ng/dLL、48.96 ng/dLL,其中实际霾与冷空气天气过程影响组(自然组)增加的最显著,而且与模拟冷空气组和 PM2.5 组存在显著差异。可见霾与冷空气有明显的交互作用,冷空气加剧了霾对心血管疾病影响的危险程度,加速冠状动脉血栓形成,促使心肌梗死疾病急性发作。

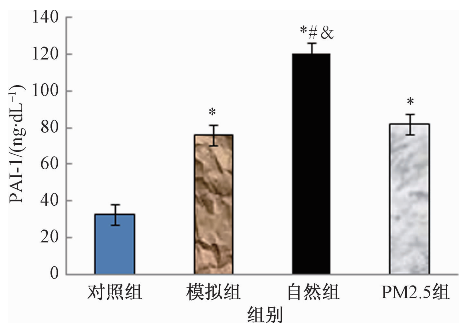


图 10　不同实验动脉粥样化大鼠 PAI-1 对比分析图

Fig. 10　Different experimental rats atherosis PAI-1 contrast analysis diagram

6　小结

(1)霾与冷空气对动脉粥样硬化大鼠心率和血压的影响。实验结果表明,冷空气、霾与冷空气和 PM2.5 分别对动脉粥样硬化大鼠心率、收缩压的影响与对照组相比均显著升高,而且霾与冷空气共同对动脉粥样硬化大鼠心率、收缩压的影响明显大于单独冷空气或 PM2.5 的影响,并且存在交互作用。

(2)霾与冷空气对动脉粥样硬化大生化指标的影响。实验结果表明,受霾与冷空气共同影响,其中对 sICAM-1、sPECAM-1、hs-CRP 和 IL-6 等炎性因子的影响均呈现正增长,对 T-SOD、GSH 等氧化因子的影响均呈负增长,对总胆固醇(Tc)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、肌钙蛋白(cTnT)和肌红蛋白(Mb)等血管危险性因素的影响均呈正增长,HDL-C 与其他指标变化相反,对 EPI、NE、ET-1 和 ANGⅡ等血管收缩物质的影响均呈明显的正增长,对 D-dimer、PAI-1 等血栓形成因子的

影响均呈明显的正增长,而且霾与冷空气共同对它们的影响比单独冷空气或 PM2.5 的影响更显著,冷空气加剧了霾对冠状动脉及心脏的毒性,使心血管疾病明显加重,甚至导致心肌梗死急性发作猝死。

(3)霾与冷空气的共同作用对心血管疾病影响的机理。受霾与冷空气共同影响,肺脏受到低于零度冷空气与霾的刺激,导致炎症和氧化应激发生,使血液中总超氧化物歧化酶(T-SOD)、谷胱甘肽(GSH)显著减少,打破了氧化与抗氧化的平衡,使过氧自由基增多,加速脂蛋白氧化,血脂 TC、TG 及 LDL-C 明显上升,HDL-C 减小,血粘稠度加大;冷空气与霾导致 IL-6 显著增加,IL-6 是典型的炎症因子,它本身具有增强各种炎症因子及使炎性细胞聚集的作用,促进冠状动脉粥样硬化发展,同时它可以促进血清高敏 C 反应蛋白(hs-CRP)和 TNF-α 等细胞炎性介质分泌增多,CRP 可使动脉血管发炎,使冠状血管损伤,TNF-α 是全身性炎性因子,引起血管炎症,使血管壁通透性增强,使血脂渗透到血管壁上,加速了血管硬化,TNF-α 还可诱使黏附分子(sICAM-1)增加,sICAM-1 是表征内皮细胞活化的标志,可反映冠脉炎症反应的程度,在 sICAM-1 的介导下,白细胞、血小板可实现黏附聚集,炎症细胞会粘附于血管内皮,并渗透到内皮细胞下分泌细胞活性物质,导致血管平滑肌细胞增生、形成泡沫细胞,造成动脉粥样硬化形成及发展,导致冠心病发生,严重的可以形成血栓,炎性因子 IL-6、TNF-α 及 CRP 均可以导致心肌损伤及心肌梗死,进而肌钙蛋白(cTnT)和肌红蛋白(Mb)也显著增多,一旦 cTnT 增多,就表明心肌梗死已经发生了;冷空气与霾导致血管收缩物质 EPI、NE、ANGⅡ及 ET-1 增多,导致全身血管收缩,使血压升高,引起心肌缺血性心脏病发生;白细胞介素 -6 直接或间接促进诱导一氧化氮合成酶(iNOS)产生增加,继之生成大量的游离一氧化氮自由基,导致组织和细胞损伤。急性炎症反应和氧化应激,导致凝固系统激活,使血液处于高凝状态,PAI-1 水平增高,纤维蛋白形成,D-dimer 水平增高,有利于冠状动脉血栓形成,导致心肌梗死。

参 考 文 献

1 Burgan O, Smargiassi A, Perron S, *et al.* Cardiovascular effects of sub-daily levels of ambient fine particles: a systematic review. Environ Health, 2010;(9):21—26

2 Lee B J, Kim B, Lee K. Air pollution exposure and cardiovascular disease. Toxicol Res, 2014;30(2):71—75

3 Zhang P, Dong G, Sun B, *et al.* Long-term exposure to ambient air pollution and mortality due to cardiovascular disease and cerebrovascular disease in Shenyang, China. PLoS One, 2011; 6(6): 208—217

4 赵金镯, 曹 强, 钱孝琳, 等. 大气 PM_(2.5)对大鼠心血管系统的急性毒性作用. 卫生研究, 2007;(04):417—420
Zhao Jinzhuo; Cao Qiang; Qian Xiaolin, *et al.* Acute effects of fine particle on cardiovascular system of rats. Journal of Hygiene Research, 2007;(04):417—420

5 邓芙蓉, 郭新彪, 陈 威, 等. 大气 PM2.5 对自发性高血压大鼠心律的影响及其机制研究. 环境与健康杂志, 2009;(03):189—191
Deng Furong, Guo Xinbiao, Chen Wei, *et al.* Effect of PM2.5 intratracheal instillation on heart rhythm in SHR rats. J Environ Health, 2009;26(3):189—191

6 Ma W, Chen R, Kan H. Temperature-related mortality in 17 large Chinese cities: how heat and cold affect mortality in China. Environ Res, 2014;134C:127—133

7 Luo B, Zhang S, Ma S, *et al.* Effects of different cold-air exposure intensities on the risk of cardiovascular disease in healthy and hypertensive rats. Int J Biometeorol, 2014;58(2):185—194

8 罗 斌, 张书余, 周 骥, 等. 探讨模拟冷空气降温过程对健康大鼠和高血压大鼠凝血功能的影响. 中国应用生理学杂志, 2012;28(5):390—393
Luo Bin, Zhang Shuyu, Zhou Ji, *et al.* Study on the effect of coId air over the coagdation function by exposing healthy rats and hypertensive rats to a simulated cold air. Chin J Appl Physiol, 2012;28(5):390—393

9 Cheng Y, Kan H. Effect of the interaction between outdoor air pollution and extreme temperature on daily mortality in Shanghai, China. J Epidemiol, 2012;22(1):28—36

10 Sun Y, Ma I, Wang H Y, *et al.* Spectroscopy and spectral analysis, J Epidemiol, 2002;22(4):637—638

11 Cereser C, Guichard J, Drai J, *et al.* Health and air pollution. Journ of Chromatography B, 2001, 752(2):123—124

12 Ulrich M M, Alink G M, Kumarathasan P, *et al.* Health effects and time course of particulate matter on the cardiopulmonary system in rats with lung inflammation. J Toxicol Environ Health A, 2002; 65(3):1571—1595

13 Van S J. IL-6: an overview. Annu Rev Immunol, 1990; 8(1): 253—278

14 Woods A, Brull D J, Humphries S E, *et al.* Genetic of inflammation and risk of coronary artery disease: the central role of interleukin-6. Eur Health J. 2000;21(3):1574—1583

15 梁 春, 吴宗贵. 急性冠状动脉综合征血清学标志物研究进展. 中华老年心脑血管病杂志, 2001;3(5):350—353
Liang Chun, Wu Zonggui. Acute coronary syndrome serological markers were reviewed. Chinese Journal of Geriatric Cardiovscular and Cerebrovascular Diseases, 2001;3(5):350—353

16 Torzewski J, Torzewski M, Bowyer D E, *et al.* C-reactive protein frequently colocalizes with the terminal complement complex in the intima of early atherosclerotic lesions of human coronary arteries. Arterioscler Thromb Vasc Bi01, 1998;18(9):1386—1392

17 郭远林, 张 伟, 陈纪林. 易损斑块的分子病理学研究进展. 中国分子心脏病学杂志, 2004;4(6):358—360
Guo Yuanlin, Zhang Wei, Chen Jilin. The research progress in molecular pathology of vulnerable plaques. Molecular Cardiology of China, 2004;4(6):358—360

18 宋文宣,王大鹏. C 反应蛋白与冠心病. 中国医刊,2004;39(8):8—11

Song Wenxuan,Wang Dapeng. C-reactive protein and coronary heart disease. Chinese Journal of Medicine,2004;39(8):8—11

19 王拥军. 氯吡格雷稳定易损斑块. 国外医学:脑血管疾病分册. 2005;13(10):734—736

Wang Yongjun. Green pyrazole gray stability vulnerable plaques. Foreign Medical Sciences Cerebrovascular Diseases,2005;13(10):734—736

20 杨胜利,何秉贤,何学生,等. C 反应蛋白是急性冠脉综合征的一种危险因子. 中华心血管病杂志,2002;30(10):618—619

Yang Shengli, He Bingxian, He Xuesheng, *et al*. C-reactive protein is a kind of acute coronary syndrome risk factors. Chin J Cardiol, 2002;30(10):618—619

21 Zhao S P, Xu T D. Elevated tumor necrosis factor alpha of blood, mononuclear cells in patients with congestive heart failure. Int J Cardiol,1999;71(3):257—261

22 申文祥. 可溶性细胞间黏附分子-1 和可溶性血管细胞黏附分子-1 与冠心病的相关性. 郑州:郑州大学学位论文,2007

Shen Wenxiang. Soluble intercellular adhesion molecule-1 and soluble vascular cell adhesion molecule-1 and the correlation of coronary heart disease, Zhengzhou:Zhengzhou University Academic Degree Thes is,2007

23 徐延光. 可溶性 E-选择素和可溶性细胞间黏附分子与 2 型糖尿病及 2 型糖尿合并下肢血管斑块形成病变的相关性研究. 天津:天津医科大学学位论文,2005

Xu Yanguang. Soluble E-select element and soluble intercellular adhesion molecule with type 2 diabetes and type 2 diabetes mellitus and lower limb vascular pathological changes of plaque formation correlation studies. Tianjin:Tianjin Medical University Academic Degree Thesis,2005

24 薛艳军. TNF-α 对 EMs 在位内膜体外培养细胞 ICAM-1,sICAM-1 及 ICAM-1 脱落率的影响. 广州:暨南大学,2008

Xue Yanjun. For EMs in ectopic TNF-α in vitro culture cell ICAM-1, loss rate of sICAM-1 and ICAM-1. Guangzhou:Jinan University, 2008

25 林昌勇. 冠心病病人血清 IMA, sICAM 与 hs-CRP 变化及其意义. 青岛:青岛大学,2011

Lin Changyong. Coronary heart disease patients serum IMA, sICAM with hs-CRP changes and its significance. Qingdao:Qingdao University,2011

26 张 宏,方佩华,赵 伟,等. 血清 sICAM-1 水平与高甘油三酯血症相关性探讨. 全国首届代谢综合征的基础与临床专题学术会议论文汇编,2004

Zhang Hong,Fang Peihua,Zhao Wei, *et al*. Serum level of sICAM-1 correlation between high blood triglycerides and discussed in this paper. Proceedings of the First Academic Conference of the Basis and Clinical Feature of the Metabolic Syndrome,2004

27 Luc G, Arveiler D, Evans A. Circulating soluble adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1 and incident coronary heart disease: the PRIME study. Atherosclerosis,2003;170(1):169—176

28 刘晓利. ICAM-1, IL-6 的血浆水平及基因多态性与脑梗塞. 北京:中国协和医科大学学位论文,2005

Liu Xiaoli. The plasma level of ICAM-1, IL-6 and gene polymorphism and cerebral infarction. Beijing:Peking Union Medical College Acmdemic Degree Thesis,2005

29 Abdlmouttableb I,Danchin N,Iiardo C,*et al*. C-reactive protein and coronary artery disease:additional evidence of the implication of an inflammatory process in acute coronary syndrome. Am Heart J,1999;137(20):346—351

30 Salmaa V, Stinson V,Kark J D,*et al*. Association of fibfionlytic parameters with early atherosclerosis. Circulation, 1995; 91 (4): 284—290

31 Haverkate E. Levels of homeostatic factors,arteriosclarosis and vascular disease. Vase Pharmacol, 2002;39(3):109—112

The Cold Air and Haze Experimental Study of the Impact of Atherosclerosis in Rats

ZHANG Shu-yu[1,2], ZHANG Xia-kun[3], ZHOU Ji[4], TIAN Ying[5], MA Shou-cun[6], KUANG Zheng-zhong[2,7]

(Hebei Provincial Meteorological Bureau[1], Shijiazhuang 050021, China; Key Laboratory of Meteorology and Ecological Environment of Hebei Province[2], Shijiazhuang 050021, China; Yangtze River Delta Environmental Meteorological Forecast Warning Center[3], Shanghai 200030, China; National Meteorological Centre[4], Beijing 100081, China; Inner Mongolia Meteorological Training Centre[5], Hohhot 010051, China; Qinghai Province Meteorological Service Center[6], Xining 810001, China; Shizhu County Bureau of Meteorology[7], Chongqing 409100, China)

[**Abstract**] Through the November 29, 2015-December 3 a real-time haze, cold weather process and the simulation process of the cold weather (completely ruled out the influence of haze) and PM2.5 effect on atherosclerosis rats contrast experiment research, To discuss Haze and cold air joint action mechanism of the effect on cardiovascular disease. 24 healthy male rats were randomly divided into four groups, each group of 6, and made into atherosclerosis model rats, respectively, haze and the cold weather group (natural group), simulation of cold air influence group (simulated group), PM2.5 impact group (PM2.5 group) and control group in four groups. Using three kinds of forms to affect exposure respectively, First is made according to the hebei province meteorological observatory weather and air quality forecast, on November 29-December 3, 2015 for haze and cold weather process in real time to expose the influence of natural group, Simulation case simulation application TEM1880 meteorological environment on November 29, 2015-December 3 empty cold weather process of simulating the effect of group, Three is to November 27, 2015-December 3 collection of PM2.5 particles, suspended solution, give PM2.5 group of trachea drip into the exposed to the influence of PM2.5 suspension solution. Test each physiological indexes such as heart rate, blood pressure and anus temperature, and abdominal aortic blood and gather the apex homogenate, measuring between groups atherosclerosis rats oxidation factor (T-SOD, GSH), inflammatory factors (IL-6, hs-CRP, TNF-α, sICAM-1) and cardiovascular risk factors (ET-1, NE, EPI, Ang Ⅱ), vasoconstriction factor and reaction of thrombosis factor (D-dimer, PAI-1) of biochemical indexes of content. Results show that atherosclerosis rats by haze and cold air from the combined impact of all the physiological and biochemical indexes than the cold air or PM2.5 significantly affect change alone, haze interact with cold air, cold air exacerbated the haze of the coronary artery and heart toxicity, aggravate cardiovascular disease significantly, even lead to sudden death of acute myocardial infarction, preliminary explored the haze and cold air joint action of the mechanism of the effect on cardiovascular disease.

[**Key words**] haze cold air PM2.5 cardiovascular atherosclerosis oxidation factor inflammatory factor thrombosis factor mechanism