

• 基础论著 •

# PM<sub>2.5</sub>暴露对大鼠系统性炎症及动脉组织黏附分子表达的影响

常乐 赵明月 马振华 马艳琴

**【摘要】** 目的 研究PM<sub>2.5</sub>短期暴露对大鼠系统性炎症及主动脉细胞间黏附分子-1(ICAM-1)及血管细胞黏附分子-1(VCAM-1)基因表达的影响,初步探讨PM<sub>2.5</sub>心血管毒性损伤机制。方法 采集空气中PM<sub>2.5</sub>样本并制备成20 mg/ml的混悬液。24只SD大鼠随机分为对照组、低剂量染毒组和高剂量染毒组,每组8只,分别给予气管内灌注生理盐水或不同浓度混悬液,每日1次,连续染毒7 d。采用ELISA技术检测各组大鼠血清中炎症因子白细胞介素-6(IL-6)和单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)的水平;采用荧光定量PCR技术检测大鼠主动脉VCAM-1、ICAM-1基因表达水平。结果 PM<sub>2.5</sub>暴露显著增加了血清MCP-1和IL-6水平。对照组、低剂量组和高剂量组血清MCP-1浓度分别为(5.28±0.24) pg/ml、(7.00±0.55) pg/ml和(11.02±1.00) pg/ml ( $P<0.01$ );各组血清IL-6浓度分别为(40.17±1.79) pg/ml、(56.08±4.39) pg/ml ( $P<0.05$ )和(76.15±4.60) pg/ml ( $P<0.01$ )。低剂量组和高剂量组动脉组织ICAM-1 mRNA水平分别为对照组的1.8倍和4.1倍;VCAM-1 mRNA水平分别为对照组的4.0倍和4.6倍。结论 暴露于PM<sub>2.5</sub>可引起大鼠血清炎症因子水平及动脉组织相关黏附分子表达增加,且呈剂量依赖性。诱导系统性炎症可能是PM<sub>2.5</sub>心血管毒性机制之一。

**【关键词】** PM<sub>2.5</sub>; 系统性炎症; 黏附分子; 荧光定量PCR

**Effects of PM<sub>2.5</sub> exposure on rat systemic inflammation and the mRNA expression of some adhesion molecules in the aorta** Chang Le, Zhao Mingyue, Ma Zhenhua, Ma Yanqin. College of Life Science, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China

Corresponding author: Ma Yanqin, Email: mayanqin466@163.com

**【Abstract】** **Objective** To investigate the effect of exposure to PM<sub>2.5</sub> on the systemic inflammation and the mRNA expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in the rat aorta. **Methods** Fine particles were collected and made into suspension of 20 mg/ml. 24 SD rats were randomly categorized into 3 groups ( $n=8$ ): control group, low-dosed group and high-dosed group, which were submitted to instillation of different dose of fine particle for 7 days. Biomarkers of systemic inflammation (MCP-1 and IL-6) in serum were analyzed by ELISA. Real-time PCR was applied to investigate the mRNA expression of VCAM-1 and ICAM-1 in the aorta. **Results** The serum levels of MCP-1 and IL-6 increased significantly in rats exposed to low-dose or high-dose PM<sub>2.5</sub> in comparison with that of the control group. MCP-1 levels in the serum of the three groups were (5.28±0.24) pg/ml, (7.00±0.55) pg/ml and (11.02±1.00) pg/ml ( $P<0.01$ ) respectively. And the IL-6 levels were (40.17±1.79) pg/ml, (56.08±4.39) pg/ml ( $P<0.05$ ) and (76.15±4.60) pg/ml ( $P<0.01$ ) respectively. Exposure to low dose or high dose PM<sub>2.5</sub> significantly upregulated the expression of VCAM-1 and ICAM-1 in the aorta of rats. The levels of ICAM-1 mRNA of low-dose exposed rats and high-dose exposed rats were 1.8 and 4.1 times compared with that of the control group. The same trends were shown

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2014.12.027

基金项目: 山西省大学生创新创业训练项目(2012080); 山西农业大学博士科研启动项目(2013YJ39); 山西农业大学大学生科技创新项目(10-044)

作者单位: 030801 山西太谷, 山西农业大学生命科学院

通讯作者: 马艳琴, Email: mayanqin466@163.com

in the levels of VCAM-1 mRNA, which were 4.0 and 4.6 times in the two experimental groups compared with the control group. **Conclusion** Exposure to PM<sub>2.5</sub> can increase the levels of inflammation biomarkers in rat serum. Also, the expression of the adhesion molecules in the aorta was increased which showed dose-effect relationship. In conclusion, PM<sub>2.5</sub> exposure could cause systemic inflammation, which may be one of the pathophysiological mechanisms linking PM<sub>2.5</sub> and cardiovascular diseases.

**【Key words】** PM<sub>2.5</sub>; Systemic inflammation; Adhesion molecules; QRT-PCR

大气颗粒物 (particulate matter, PM) 是指悬浮在空气中的微小的固态颗粒物或小液滴。PM的致病性与其颗粒大小有关, 它可进一步分为两类: 即空气动力学直径 (aerodynamic diameter, AD) 在 2.5~10 μm 的粗颗粒和 AD < 2.5 μm 的细颗粒。PM<sub>2.5~10</sub> 容易沉积在靠上的较大的气道, 而 PM<sub>2.5</sub> 可以达到最小的气道和肺泡, < 0.1 μm 的极细颗粒还可以通过气血屏障而进入血液循环, 造成全身性的损伤。另一方面, PM<sub>2.5</sub> 不但可对机体造成物理性损伤, 还携带大量有害的物质如多环芳烃类化合物、重金属甚至富集许多病原微生物进入体内造成新的损伤<sup>[1]</sup>。目前 PM<sub>2.5</sub> 主要是由于人类工业、交通、发电等活动中矿物燃烧造成的, 在某些地区也可以来自于做饭、室内活动或着火等人类活动<sup>[2]</sup>。2012年, PM<sub>2.5</sub> 纳入我国《环境空气质量标准》(GB3095-2012), 尤其是在2013年1月期间我国京、津、冀等地区强雾霾频发, 引起社会对大气污染健康影响的广泛关注<sup>[3]</sup>。

流行病学调查表明, PM<sub>2.5</sub> 短期或长期接触与心血管系统疾病的发生呈正相关。美国进行的国家大气污染相关发病死亡研究是最权威的大气污染短期健康效应研究, 结果提示空气中PM的增加可提高因缺血性心脏病、脑血管疾病、心力衰竭和心律失常而入院的风险<sup>[4]</sup>。另外, 颗粒污染物的长期接触还可导致心脑血管疾病的基础病变——动脉粥样硬化的发生<sup>[5]</sup>。对于PM<sub>2.5</sub>对心血管系统的毒性作用的机制, 有研究者提出与PM<sub>2.5</sub>诱导的炎症反应及氧化应激机制有关<sup>[6-8]</sup>。本研究拟采集空气中PM<sub>2.5</sub>样本对大鼠进行气管滴注染毒, 采用ELISA技术检测染毒大鼠血清中炎症因子白细胞介素-6 (IL-6) 和单核细胞趋化蛋白-1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) 的水平; 采用荧光定量PCR技术检测大鼠主动脉血管细胞黏附分子-1 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1) 和细胞间黏附分子-1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1) 基因表达水平, 为进一步探讨PM<sub>2.5</sub>的心血管毒性机制奠定基础。

## 材料与方法

### 一、材料

1. 试剂: Trizol试剂 (Takara, 大连)、Two Step SYBR RT-PCR Kit (Takara, 大连)、DEPC (Sigma公司)、大鼠IL-6、MCP-1 ELISA检测试剂盒 (R&D公司)。

2. 仪器: GI-200型大流量采样器 (美国Andersen公司)、Mx3000P实时荧光定量PCR仪 (Stratagene公司)、D-3752高速冷冻离心机 (Sigma公司)、Thermocycler PCR仪 (Biometra公司)、超低温冰箱 (ThermoFisher公司)、核酸蛋白测定仪 (Eppendorf公司)、全波长扫描仪 (美国Thermo公司)。

### 二、方法

1. 大气PM<sub>2.5</sub>的采集与处理: 实验用PM<sub>2.5</sub>由山西农业大学资源环境学院提供。2013年12月至2014年2月于晋中市城区采集。采用GI-200型PM<sub>2.5</sub>采样器, 采集大气PM<sub>2.5</sub>于玻璃纤维滤膜, 去离子水将滤膜颗粒物超声洗脱下来, 经冷冻真空干燥后, 保存于-20℃冰箱。使用时用生理盐水配置成20 mg/ml的混悬液, 超声震荡混匀。

2. 实验动物分组、染毒及样本采集: 健康清洁级雄性SD大鼠24只, 体重180~200 g, 由山西医科大学实验动物中心提供, 饲养于山西农业大学生命科学学院实验动物中心。随机分为3组, 每组8只, 分别为对照组 (生理盐水0.5 ml气管滴注)、低剂量染毒组 (PM<sub>2.5</sub>混悬液0.2 ml加生理盐水0.3 ml混匀气管滴注) 和高剂量染毒组 (PM<sub>2.5</sub>混悬液0.5 ml气管滴注), 每天染毒一次, 连续染毒7 d。7 d后, 3%戊巴比妥钠30 mg/kg腹腔注射麻醉大鼠, 心脏采血2 ml, 分离血清并于-20℃冰箱保存, 用于血清炎症因子的检测。胸主动脉段去除周围结缔组织并迅速置于1.5 ml经DEPC处理过的离心管, 液氮保存, 后-80℃冰箱保存备用。

3. 血清MCP-1和IL-6水平的检测: 采用双抗夹心ELISA法检测大鼠血清MCP-1和IL-6含量, 按试

表1 大鼠主动脉组织黏附分子荧光定量RT-PCR引物

基因	引物(5'→3')	扩增产物位置	产物大小(bp)	Gene bank登录号
$\beta$ -actin	F:TACCCAGGCATGCTGACAG R:AGCCACCAATCCACAGAG	997~1 111	115	NM_031144.2
ICAM-1	F:TGGGGTTGGAGACTAACTGG R:GTGCCACAGTTCTCAAAGCA	206~323	118	NM_012967
VCAM-1	F:GAAATGCCACCCTCACCTTA R:GAGATCCAGGGGAGATGTCA	872~1 021	150	NM_012889

剂盒说明书操作。

4. 荧光定量PCR检测动脉组织ICAM-1和VCAM-1 mRNA水平: 利用Trizol法提取大鼠主动脉总RNA, 并进行质量鉴定。按照试剂盒说明书进行反转录反应及Real-time PCR过程。反转录条件: 70 °C 5 min, 37 °C 60 min, 95 °C 5 s。应用Primer3 plus软件设计引物, 以待测样品中的 $\beta$ -actin为内参, 引物详细资料见表1。扩增条件为: 95 °C 10 s, 1个循环; 95 °C 5 s, 61 °C 20 s, 72 °C 6 s, 50个循环; 95 °C 1 min、55 °C 30 s、95 °C 30 s, 1个循环(溶解曲线分析)。目的基因表达量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行计算。

### 三、统计学分析

数据导入GraphPad Prism 5软件, 统计分析采用ANOVA分析, 继而进行Tukey's Multiple Comparison Test比较组间差异显著性检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 结 果

### 一、大鼠血清MCP-1和IL-6水平的测定

结果见图1, 对照组、低剂量染毒组和高剂量染毒组血清MCP-1浓度分别为(5.28±0.24) pg/ml、(7.00±0.55) pg/ml和(11.02±1.00) pg/ml ( $P < 0.01$ ); 各组血清IL-6浓度分别为(40.17±1.79) pg/ml、(56.08±4.39) pg/ml ( $P < 0.05$ )和(76.15±4.60) pg/ml ( $P < 0.01$ )。结果表明, 低剂量染毒组和高剂量染毒组大鼠血清MCP-1和IL-6浓度与对照组相比均增加( $P < 0.05$ ), 且高剂量组水平高于低剂量组, 但差异无统计学意义。

### 二、主动脉内皮细胞黏附分子基因表达检测

由图2可知, 低剂量和高剂量PM<sub>2.5</sub>短期暴露均引起大鼠主动脉组织黏附分子ICAM-1和VCAM-1基因表达增加。低剂量组和高剂量组动脉组织ICAM-1 mRNA水平分别为对照组的1.8倍和4.1倍( $P < 0.05$ ); VCAM-1 mRNA水平分别为对照组的

4.0倍( $P < 0.01$ )和4.6倍( $P < 0.05$ )。高剂量组ICAM-1和VCAM-1基因表达量与低剂量组相比有增加趋势, 但差异无统计学意义。

## 讨 论

多项流行病学资料已经证实空气中PM<sub>2.5</sub>浓度与心血管疾病的病死率和发病率相关。对于其发病机制研究还不是很清楚。近年国内外研究者提出颗粒物引起的氧化应激反应导致的全身炎症和心血管的急性反应是其毒性作用机制之一<sup>[9]</sup>。本研究通过PM<sub>2.5</sub>气管灌注的方法对大鼠进行急性染毒, 以研究PM<sub>2.5</sub>暴露对系统炎症和血管内皮功能的影响。

血清炎症标志物MCP-1和IL-6是反映机体早期炎症反应的敏感指标。急性冠状动脉综合征的患者血清MCP-1水平增加, 而缺乏MCP-1受体的小鼠对动脉粥样硬化不易感。MCP-1的水平增加可作为预测动脉粥样硬化发生的重要因子<sup>[10]</sup>。IL-6主要由单核/巨噬细胞分泌, 具有诱导炎症和调节免疫的功能。IL-6可以刺激血管活性物质释放, 是诱导肝急性期反应蛋白即纤维蛋白原和C反应蛋白产生的主要介质。血清IL-6水平的升高被认为是冠心病的独立的危险因素, 与不稳定心绞痛的发作相关<sup>[11]</sup>, 并在动脉粥样硬化的发生发展中发挥了重要的作用<sup>[12]</sup>。本研究结果显示PM<sub>2.5</sub>暴露的大鼠血清MCP-1和IL-6水平增加, 结果与曹娟等<sup>[13]</sup>报道的镍污染区大气PM<sub>2.5</sub>引起大鼠急性炎症反应的结果一致。

内皮细胞(endothelial cell, EC)活化是心血管系统疾病, 尤其是血管病变的始动因素。已有研究表明, 多种因素可以激活内皮细胞, 释放多种血管活性物质, 引起动脉组织炎症反应<sup>[14]</sup>。黏附分子ICAM-1和VCAM-1是公认的EC激活标志, 可促进单核细胞在内皮细胞表面黏附, 在动脉炎症发生、发展中起着重要作用<sup>[15]</sup>。本研究发现, PM<sub>2.5</sub>的短期暴露可引起大鼠动脉组织黏附分子ICAM-1和VCAM-1 mRNA表达增加。引起内皮损伤继而诱导

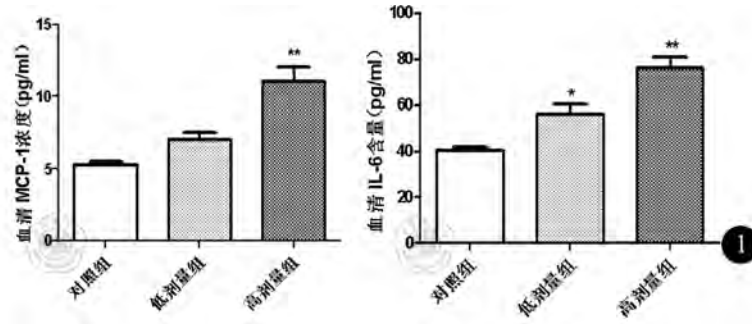


图1 不同剂量PM2.5染毒大鼠血清MCP-1和IL-6水平 (n=8)。与对照组比较, 经ANOVA分析, 继而进行Tukey's Multiple Comparison Test进行组间差异显著性检验, \*表示P<0.05, \*\*表示P<0.01

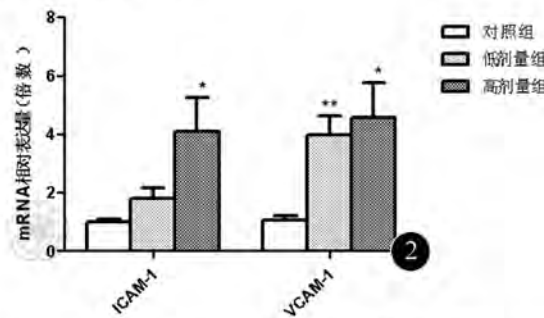


图2 PM2.5暴露对大鼠主动脉ICAM-1和VCAM-1 mRNA表达的影响

心血管系统炎症反应可能是PM<sub>2.5</sub>心血管毒性的机制之一。

参 考 文 献

[1] 崔蓉, 郭新彪, 邓芙蓉, 等. 北京市大气颗粒物中多环芳烃及碳元素分析[J]. 中国公共卫生, 2009, 25 (4): 431-432.

[2] Martinelli N, Olivieri O, Girelli D. Air particulate matter and cardiovascular disease: a narrative review[J]. Eur J Intern Med, 2013, 24(4): 295-302.

[3] 周桔. 大气环境污染的健康效应研究回顾[J]. 中国科学院院刊, 2013, 28 (3): 371-377.

[4] Dockery DW, Pope CA 3rd, Xu X, et al. An association between air pollution and mortality in six U. S. cities[J]. N Engl J Med, 1993, 329(24): 1753-1759.

[5] Kunzli N, Perez L, von KS, et al. Investigating air pollution and atherosclerosis in humans: concepts and outlook[J]. Prog Cardiovasc Dis, 2011, 53(5): 334-343.

[6] Bai N, Kido T, Suzuki H, et al. Changes in atherosclerotic plaques induced by inhalation of diesel exhaust[J]. Atherosclerosis, 2011, 216(2): 299-306.

[7] Brook RD, Rajagopalan S, Pope CA 3rd, et al. Particulate matter air pollution and cardiovascular disease: An update to the scientific statement from the American Heart Association[J]. Circulation, 2010, 121(21): 2331-2378.

[8] Wang G, Jiang R, Zhao Z, et al. Effects of ozone and fine particulate matter (PM<sub>2.5</sub>) on rat system inflammation and cardiac function[J]. Toxicol Lett, 2013, 217(1): 23-33.

[9] Xu X, Deng F, Guo X, et al. Association of systemic inflammation with marked changes in particulate air pollution in Beijing in 2008[J]. Toxicol Lett, 2012, 212(2): 147-156.

[10] Kim EJ, Park WH, Ahn SG, et al. 5'-nitro-indirubinoxime inhibits inflammatory response in TNF-alpha stimulated human umbilical vein endothelial cells[J]. Atherosclerosis, 2010, 211(1): 77-83.

[11] Biasucci LM, Vitelli A, Liuzzo G, et al. Elevated levels of interleukin-6 in unstable angina[J]. Circulation, 1996, 94(5): 874-877.

[12] Hoshi T, Kitagawa K, Yamagami H, et al. Relation between interleukin-6 level and subclinical intracranial large-artery atherosclerosis[J]. Atherosclerosis, 2008, 197(1): 326-332.

[13] 曹娟, 牛静萍, 罗小峰, 等. 镍污染区大气 PM<sub>2.5</sub> 对大鼠血清白介素-6 和 C 反应蛋白水平的影响[J]. 环境与健康杂志, 2009, 26(11): 962-964.

[14] 何晓琳, 刘志. 卡托普利对 LPS 致血管内皮细胞活化及损伤的拮抗作用[J]. 中国病理生理杂志, 2004, 20 (11): 2105-2109.

[15] 刘倩, 石颖, 殷惠军. p38MAPK 信号通路与内皮细胞激活[J]. 中国分子心脏病学杂志, 2011, 11 (5): 308-312.

(收稿日期: 2014-05-14)

(本文编辑: 戚红丹)