

本文引用:李方方,王丽华,刘影影,等. 柴油机排放颗粒对急性冠状动脉综合征患者外周血单个核细胞白细胞介素1 β 和肿瘤坏死因子 α 表达的影响[J]. 新乡医学院学报, 2016, 33(4): 288-290, 296. DOI: 10.7683/xyxyxb. 2016. 04. 010.

【临床研究】

柴油机排放颗粒对急性冠状动脉综合征患者外周血单个核细胞白细胞介素1 β 和肿瘤坏死因子 α 表达的影响

李方方¹, 王丽华², 刘影影¹, 王守英¹, 刘玲玲², 刘志强², 吴卫东¹

(1. 新乡医学院公共卫生学院, 河南 新乡 453003; 2. 新乡市中心医院心内科, 河南 新乡 453003)

摘要: **目的** 探讨柴油机排放颗粒(DEP)对急性冠状动脉综合征(ACS)患者与非冠状动脉粥样硬化性心脏病(NCHD)患者外周血单个核细胞(PBMC)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)表达的影响。**方法** 采用密度梯度离心法分离ACS和NCHD患者PBMC,用不同浓度的DEP(0、10、50、100 mg \cdot L⁻¹)刺激PBMC 24 h。收集PBMC培养液上清,用酶联免疫吸附试验法检测PBMC培养液上清中IL-1 β 和TNF- α 水平。**结果** 随着DEP浓度的增加,PBMC释放IL-1 β 和TNF- α 的量也随之增高,其中以50 mg \cdot L⁻¹组水平最高($P < 0.05$);在同一DEP浓度下,ACS患者PBMC中IL-1 β 和TNF- α 的相对增加量较NCHD患者高,提示ACS对DEP毒性作用易感。**结论** DEP刺激可增加受试患者尤其是ACS患者的PBMC产生过量炎症因子。

关键词: 空气污染;柴油机排放颗粒;外周血单个核细胞;白细胞介素-1 β ;肿瘤坏死因子- α ;急性冠状动脉综合征
中图分类号: R714.252 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-7239(2016)04-0288-04

Effect of diesel exhaust particle on the expression of interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α in peripheral blood mononuclear cell of acute coronary syndrome patients

LI Fang-fang¹, WANG Li-hua², LIU Ying-ying¹, WANG Shou-ying¹, LIU Ling-ling², LIU Zhi-qiang², WU Wei-dong¹

(1. School of Public Health, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan Province, China; 2. Department of Cardiology, Xinxiang Central Hospital, Xinxiang 453003, Henan Province, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of diesel exhaust particles (DEP) on the expression of including interleukin-1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of acute coronary syndrome (ACS) and non-coronary heart disease (NCHD) patients. **Methods** The PBMC from ACS and NCHD patients were purified through density gradient centrifugation. The PBMC were incubated with different concentrations of DEP (0, 10, 50, 100 mg \cdot L⁻¹) for 24 h. The supernatants were collected and the IL-1 β and TNF- α were measured by enzyme-linked immunosorbent assay. **Results** With increasing of DEP concentration, the IL-1 β and TNF- α expressions in PBMCs were increased, which peaked at the dose of 50 mg \cdot L⁻¹ ($P < 0.05$). At the same concentration, DEP could induce more production of IL-1 β and TNF- α in the PBMCs from ACS patients than that from the NCHD patients, it implied that ACS patients were more susceptible to DEP stimulation. **Conclusion** DEP stimulation increases the over expression of IL-1 β and TNF- α in the PBMCs from the ACS and NCHD patients, especially the former.

Key words: air pollution; diesel exhaust particles; peripheral blood mononuclear cells; interleukin-1 β ; tumor necrosis factor- α ; acute coronary syndrome

空气中的可吸入颗粒物是空气污染物中最重要成分之一。近年来的研究表明,心血管疾病的病

死率与空气中可吸入颗粒物的水平呈正相关^[1]。可吸入颗粒物中空气动力学直径小于2.5 μ m的颗粒(也称PM_{2.5}),可吸附大量有毒物质,通过呼吸进入呼吸道深部。这些颗粒物可引起呼吸道释放炎症因子到血液中或直接穿透肺脏气血屏障进入循环系统,引起心血管系统发生氧化应激及全身炎症反应,最终导致心血管系统疾病的发病率、入院人数以及人群病死率增加^[2]。柴油机排放颗粒物(diesel exhaust particles, DEP)是大气颗粒污染物的主要来源

DOI: 10.7683/xyxyxb. 2016. 04. 010
收稿日期: 2015-11-23
基金项目: 国家自然科学基金面上项目(编号: 81573112, 81373030); 河南省教育厅科技创新团队项目(编号: 14IRTSTHN017); 新乡医学院研究生科研创新支持计划(编号: YJSCX20446Y)。
作者简介: 李方方(1986-), 女, 河南洛阳人, 硕士研究生在读, 研究方向: 空气污染物对心血管系统的影响。
通信作者: 吴卫东(1963-), 男, 河南商丘人, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向: 空气污染与健康; E-mail: wdwu2013@126.com。

之一。流行病学调查结果表明,柴油机排放物与呼吸以及心血管疾病发病率和病死率的升高有关^[3]。急性冠状动脉综合征(acute coronary syndrome, ACS)是心血管系统疾病中最常见和病死率最高的心血管急症。外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC)在ACS病理发生过程中发挥重要作用^[4]。为此,本研究的目的就是检测DEP对ACS患者PBMC炎症因子表达的影响,以了解可吸入颗粒物是否为心血管疾病的潜在危险因素;此外,还进一步探讨ACS患者PBMC对DEP所致的炎症效应是否易感。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择2014年12月至2015年6月新乡市中心医院心内科入院ACS患者(ACS组)和NCHD患者(NCHD组),本研究经过新乡医学院伦理委员会审查批准,受试者知情同意自愿参加本研究。ACS患者23例,男13例,女10例,年龄25~70岁,平均(57.6±11.5)岁;非冠状动脉粥样硬化性心脏病(non-coronary heart disease, NCHD)患者15例,男8例,女7例,年龄28~66岁,平均(44.1±12.4)岁。所有入选ACS病例经冠状动脉造影提示1支或多支冠状动脉堵塞≥70%。上述入选者均无严重肝肾功能异常、近期手术、贫血、风湿性疾病及恶性肿瘤。

1.2 主要仪器与试剂 DEP由美国国家环保总署James M. Samet博士赠送,淋巴细胞分离液购自天津市灏洋公司,RPMI-1640培养基购自北京索莱宝公司,白细胞介素-1β(interleukin-1β, IL-1β)和肿瘤坏死因子α(tumor necrosis factor α, TNF-α)酶联免疫吸附试验测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒购自武汉博士德公司。酶标仪为Perkin Elmer公司产品。

1.3 外周血的采集及处理 受检者采血前空腹12 h,于清晨安静平卧状态下于肘前静脉采血20 mL,分装于含枸橼酸钠的试管中混匀,取2 mL分离血清备用,其余用于PBMC提取。

1.4 PBMC分离 PBMC具体分离步骤如下:1份抗凝血与1份1×磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)充分混匀;在离心管内加入淋巴细胞分离液1份,沿管壁将稀释后的血液缓缓加入分离液面上;水平离心1 600 r·min⁻¹,20 min后,将环状乳白色PBMC层转移至另一离心管内,加5倍体积1×PBS重悬后,1 400 r·min⁻¹离心15 min;弃上清液,再次加入1×PBS,重悬细胞,900 r·min⁻¹离心10 min;弃上清液,用RPMI-1640重悬细胞;细胞计数,调整细胞浓度至2×10⁹ L⁻¹,所获细胞悬液用于

后续试验。

1.5 细胞培养上清中IL-1β和TNF-α水平测定 将DEP混悬液(0、10、50、100 mg·L⁻¹)分别与PBMC在37℃孵育24 h。收集PBMC培养液上清,用ELISA试剂盒分别检测IL-1β和TNF-α水平。具体操作参见试剂盒说明书。

1.6 统计学处理 应用SPSS 17.0软件进行统计分析,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用ANOVA进行数据整理与分析。ACS组和NCHD组之间比较是以各组0 mg·L⁻¹剂量下的炎症因子量作为基线值,分别计算各组10、50和100 mg·L⁻¹剂量下炎症因子产生量与患者基线值的比值,再比较2组同剂量DEP所致炎症因子的相对增加量大小,ACS组和NCHD组之间差异使用两独立样本 t 检验分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 DEP对ACS及NCHD患者PBMC中IL-1β表达的影响 结果见表1。随着DEP刺激浓度的升高,ACS和NCHD患者的PBMC中IL-1β的表达量明显升高,在50 mg·L⁻¹时达到最高($P<0.05$)。

表1 DEP对ACS和NCHD患者PBMC IL-1β表达的影响
Tab.1 Effect of DEP on IL-1β expression in the PBMCs from ACS and NCHD patients ($\bar{x} \pm s$)

DEP 浓度	IL-1β/(ng·L ⁻¹)	
	NCHD 组($n=15$)	ACS 组($n=23$)
0 mg·L ⁻¹	199.43±173.60	35.97±20.18
10 mg·L ⁻¹	267.82±102.80	58.78±23.90 ^a
50 mg·L ⁻¹	346.14±164.12 ^{ab}	125.16±67.91 ^{ab}
100 mg·L ⁻¹	277.01±159.24	103.20±77.51 ^a

注:与0 mg·L⁻¹组比较^a $P<0.05$;与10 mg·L⁻¹组比较^b $P<0.05$ 。

2.2 DEP对ACS及NCHD患者PBMC中TNF-α表达的影响 结果见表2。因DEP刺激后上清数量限制,最终TNF-α实测NCHD为15例,ACS为23例。随着DEP刺激浓度的升高,ACS和NCHD患者的PBMC中TNF-α的表达量明显升高,在50 mg·L⁻¹时达到最高($P<0.05$)。

表2 DEP对ACS和NCHD患者PBMC中TNF-α表达的影响
Tab.2 Effect of DEP on TNF-α expression in the PBMCs from ACS and NCHD patients ($\bar{x} \pm s$)

DEP 浓度	TNF-α/(ng·L ⁻¹)	
	NCHD 组($n=15$)	ACS 组($n=23$)
0 mg·L ⁻¹	157.01±148.15	67.12±58.26
10 mg·L ⁻¹	219.78±172.17	96.71±87.87 ^a
50 mg·L ⁻¹	319.86±184.78 ^a	281.52±240.37 ^{ab}
100 mg·L ⁻¹	271.57±196.32	180.50±150.07 ^a

注:与0 mg·L⁻¹组比较^a $P<0.05$;与10 mg·L⁻¹组比较^b $P<0.05$ 。

2.3 DEP 对 ACS 患者与 NCHD 患者 PBMC 中 IL-1 β 和 TNF- α 表达影响的差别 结果见表 3 和表 4。在 50、100 mg \cdot L⁻¹ 剂量下 2 组患者的比值比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。

DEP 所致 TNF- α 的相对表达量,参照上述 IL-1 β 相对表达量的计算。结果显示,在 100 mg \cdot L⁻¹ 剂量下 2 组患者的比值比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 3 不同剂量 DEP 诱导 ACS 和 NCHD 患者 PBMC 中 IL-1 β 相对表达量比较

Tab. 3 Comparison of DEP-induced relative increase of IL-1 β in PBMC from ACS and NCHD patients ($\bar{x} \pm s$)

比值	IL-1 β	
	NCHD 组 ($n = 15$)	ACS 组 ($n = 23$)
10/0	1.84 \pm 0.31	2.78 \pm 0.39
50/0	2.77 \pm 1.51	14.81 \pm 5.93 ^a
100/0	2.39 \pm 0.51	8.93 \pm 3.67 ^a

注:与 NCHD 组比较^a $P < 0.05$ 。

表 4 不同剂量 DEP 诱导 ACS 和 NCHD 患者 PBMC 中 TNF- α 相对表达量比较

Tab. 4 Comparison of DEP-induced relative increase of TNF- α in PBMC from ACS and NCHD patients ($\bar{x} \pm s$)

比值	TNF- α	
	NCHD 组 ($n = 15$)	ACS 组 ($n = 23$)
10/0	1.48 \pm 0.44	2.26 \pm 1.77
50/0	5.03 \pm 3.88	9.86 \pm 7.19
100/0	2.66 \pm 1.79	8.07 \pm 7.42 ^a

注:与 NCHD 组比较^a $P < 0.05$ 。

3 讨论

DEP 的吸入与呼吸系统疾病心血管疾病的发病率和病死率升高有密切联系^[5-7]。目前认为其致病机制主要通过氧化应激、炎性反应以及血管内皮通透性改变等机制导致心肌梗死、心律失常、血栓形成和动脉粥样硬化等疾病的发生、发展^[5,8]。DEP 中直径小于 2.5 μ m 的颗粒可进入肺泡并沉积,进而进入血液循环,这些物质通过脉管系统直接引起血管和心肌产生前炎性反应、氧化应激反应及全身炎症反应^[9-11]。在动脉粥样硬化病变发生、发展过程中,各种炎症细胞和多种炎症介质参与其中。单核-巨噬细胞是重要的免疫细胞,是动脉粥样硬化形成过程中最常见的炎症细胞,是动脉粥样硬化斑块重要组成部分,同时也是易损斑块形成的重要病理生理学基础^[12]。动脉粥样硬化斑块中的单核-巨噬细胞分泌多种炎性细胞因子,如 IL-1 β 和 TNF- α 等,进一步加剧单核细胞聚集、巨噬细胞的增殖以及平滑肌细胞的迁移、增殖,促使动脉粥样硬化斑块不断进展,成为影响急性冠状动脉综合征发作的重要因素。

研究表明,TNF- α 是由多种细胞如激活的巨噬细胞、单核细胞产生的一种具有多种生物学效应的细胞因子,参与炎症反应的级联过程,在促进动脉粥样硬化形成及斑块不稳定方面起重要作用,其过表达可引起冠状动脉事件的高发^[13-14]。IL-1 β 是一种由单核巨噬细胞产生的重要细胞因子和多肽调节因子,随着 ACS 症状加重,ACS 患者 TNF- α 和 IL-1 β 生成量明显较正常人增高,提示 TNF- α 、IL-1 β 水平可能反映了动脉粥样硬化斑块的严重程度和稳定性状态,在不稳定斑块的破裂过程中起着重要作用^[15]。本研究结果发现,DEP 刺激可显著提高 PBMC 中 TNF- α 、IL-1 β 的表达量,且该作用呈剂量依赖效应。值得强调的是,在 DEP 刺激下,ACS 患者 PBMC 中 TNF- α 和 IL-1 β 的相对表达量均较 NCHD 患者 TNF- α 和 IL-1 β 的相对表达量高。鉴于 PBMC 及其相关炎性因子在 ACS 病理发生过程中的作用,这些研究结果提示,ACS 患者可能对 DEP 毒性作用具有易感性。ACS 和 NCHD 患者 PBMC 在细胞和分子生物学水平存在哪些差异从而导致二者对 DEP 作用产生不同效应,还有待进一步研究。

DEP 是大气污染的一个主要成分。目前我国生活在严重大气污染水平的居民人口众多。鉴于大气污染形成的复杂性和污染源控制的艰巨性,治理大气污染将是一项长期而困难的工作,这就意味着我国大多数城市居民在未来相当长的时间内将生活在大气污染物超标的环境中。在这种形势下,研究大气主要污染物的健康效应及其机制、识别易感人群对有效保护公众健康具有重要的现实意义。本研究结果将为制定有效保护大气中污染区易感居民的健康提供重要实验依据。

参考文献:

[1] YAMAMOTO S S, PHALKEY R, MALIK A A. A systematic review of air pollution as a risk factor for cardiovascular disease in South Asia; Limited evidence from India and Pakistan[J]. *Int J Hyg Environ Health*, 2014, 217 (2): 133-144.

[2] KOULOVA A, FRISHMAN W H. Air pollution exposure as a risk factor for cardiovascular disease morbidity and mortality[J]. *Cardiol Rev*, 2014, 22 (1): 30-36.

[3] FOX J R, COX D P, DRURY B E, et al. Chemical characterization and *in vitro* toxicity of diesel exhaust particulate matter generated under varying conditions[J]. *Air Qual Atmos Hlth*, 2015, 8 (5): 507-519.

[4] JOKSIĆ J, SOPIC M, SPASOJEVIC-KALIMANOVSKA V, et al. Circulating resistin protein and mRNA concentrations and clinical severity of coronary artery disease[J]. *Biochem Medica*, 2015, 25 (2): 242-251.

参考文献:

[1] SESSLER D I, BEN-ELIYAHU S, MASCHA E J, *et al.* Can regional analgesia reduce the risk of recurrence after breast cancer Meth-
odology of a multicenter randomized trial[J]. *Contemp Clin Trials*,
2008, 29(4):517-526.

[2] KAWASAKI T, KAWASAKI C, UEKI M, *et al.* Dexmedetomidine
suppresses proinflammatory mediator production in human whole
blood *in vitro*[J]. *J Trauma Acute Care Surg*, 2013, 74(5):1370-
1375.

[3] 马芝金, 陈铁军, 魏永梅, 等. 几种常用的肿瘤标志物在肺癌诊
治中的应用价值[J]. *检验医学与临床*, 2011, 8(4):414-415,
417.

[4] 王莉, 宁杰, 李艳华, 等. 术侧胸椎旁阻滞对单肺通气期间肺内
分流及氧合的影响[J]. *临床麻醉学杂志*, 2013, 29(6):564-
566.

[5] 戴诗敏, 梁世锋, 谢少娟, 等. 联合检测 5 种血清肿瘤标志物在
肺癌诊断中的意义[J]. *临床肺科杂志*, 2013, 18(5):957-958.

[6] 姜镭, 马春华, 朱子龙, 等. 脑脊液循环肿瘤细胞检测在非小细

胞肺癌脑膜转移诊断中的应用[J]. *中国现代神经疾病杂志*,
2014, 14(8):704-707.

[7] LOONEY M, DORAN P, BUGGY D J. Effect of anesthetic tech-
nique on serum vascular endothelial growth factor C and transfor-
ming growth factor β in women undergoing anesthesia and surgery
for breast cancer[J]. *Anesthesiology*, 2010, 113(5):1118-1125.

[8] 辜晓岚, 何建华, 顾连兵, 等. 超声引导胸椎旁神经阻滞对食管
癌手术患者应激反应的影响[J]. *临床麻醉学杂志*, 2015, 31
(1):18-21.

[9] 乐林莉, 宋学敏, 张宗泽, 等. 电针足三里穴对烫伤后脓毒症大
鼠急性肺损伤的影响[J]. *中华麻醉学杂志*, 2014, 34(1):85-
89.

[10] 杨柳, 迟晓慧, 廖明锋, 等. 胸椎旁神经阻滞用于乳腺癌根治
术后镇痛的临床疗效评价[J]. *临床外科杂志*, 2015, 23(9):
708-710.

[11] 罗明丽, 李小华. 开胸手术后连续胸椎旁神经阻滞止痛患者
的护理[J]. *肿瘤基础与临床*, 2012, 25(3):264-265.

(本文编辑:李胜利 英文编辑:杨 博)

(上接第 290 页)

[5] BRADLEY J M, CRYAR K A, EL HAJJ M C, *et al.* Exposure to
diesel exhaust particulates induces cardiac dysfunction and remodel-
ing[J]. *J Appl Physiol*, 2013, 115(7):1099-1106.

[6] TSENG C Y, CHANG J F, WANG J S, *et al.* Protective effects of N-
acetyl cysteine against diesel exhaust particles-induced intracellu-
lar ROS generates pro-inflammatory cytokines to mediate the vascu-
lar permeability of capillary-like endothelial tubes[J]. *PLoS One*,
2015, 10(7):e0131911.

[7] 陈鹏, 陈宇, 张城, 等. 论述 PM_{2.5} 与心血管疾病的关联[J]. *吉
林医学*, 2014, 35(7):1493-1495.

[8] MILLER M R, MCLEAN S G, DUFFIN R, *et al.* Diesel exhaust
particulate increases the size and complexity of lesions in athero-
sclerotic mice[J]. *Part Fibre Toxicol*, 2013, 10(61):b32.

[9] SIPONEN T, YLI-TUOMI T, AURELA M, *et al.* Source-specific
fine particulate air pollution and systemic inflammation in ischaem-
ic heart disease patients[J]. *J Occup Environ Med*, 2015, 72
(4):277-283.

[10] SIMKHOVICH B Z, KLEINMAN M T, KLONER R A. Air pollu-
tion and cardiovascular injury: epidemiology, toxicology, and

mechanisms[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2008, 52(9):719-726.

[11] BROOK R D, FRANKLIN B, CASCIO W, *et al.* Air pollution and
cardiovascular disease A statement for healthcare professionals
from the expert panel on population and prevention science of the
American Heart Association[J]. *Circulation*, 2004, 109(21):
2655-2671.

[12] LAYNE K, DI GIOIA P, FERRO A, *et al.* LB03. 03: anti-inflam-
matory effects of anti-platelet drugs: implication for atherosclerosis
[J]. *J Hypertens*, 2015, 33:e126.

[13] 曹国良, 乔永芳, 刘新兵, 等. 辛伐他汀早期干预对非 ST 抬高
型急性冠状动脉综合征细胞因子水平的影响[J]. *实用诊断
与治疗杂志*, 2006, 20(7):478-480.

[14] 苟连平, 吕湛, 秦俭, 等. 白细胞介素-6 和肿瘤坏死因子- α 及
白细胞介素-10 在急性冠状动脉综合征中的作用[J]. *中国全
科医学*, 2008, 11(7):559-561.

[15] 罗南萍, 王显刚. 老年急性冠状动脉综合征患者 CRP 与 TNF-
 α , IL-1 β 相关性研究[J]. *放射免疫学杂志*, 2002, 15(4):205-
207.

(本文编辑:杨 博 英文编辑:杨 博)