

医药卫生

热浪对 ApoE 基因敲除小鼠 sICAM—1 的影响研究

刘昊辰^{1,2} 张书余^{2,3} 田颖^{1,2} 周妍妍^{1,2} 况正中^{1,2}

(南京信息工程大学应用气象学院¹, 南京 210044; 中国气象局兰州干旱气象研究所², 兰州 730020;
甘肃省干旱气候变化与减灾重点实验室³, 兰州 730020)

摘要 模拟热浪过程,对比热浪前后 Apo E^{-/-}小鼠血液样本中 sICAM—1 含量、体重、体温变化,探讨热浪对 sICAM—1 的影响,为进一步探讨热浪对心脑血管疾病的影响奠定基础。通过分析南京市实际气象要素资料,选取一次典型热浪过程;并利用气象环境模拟箱模拟,将 Apo E^{-/-}小鼠分为热浪组、热浪 BH4 组和对照组,每组 6 只,每日测量体重、体温,采用 ELISA 法测定热浪后小鼠 sICAM—1 含量变化。结果对比小鼠 sICAM—1 含量可明显看出,热浪后热浪组 Apo E^{-/-}小鼠 sICAM—1 含量均高于热浪 BH4 组和对照组,且实验结果具有统计学差异。说明热浪过程对 Apo E^{-/-}小鼠 sICAM—1 含量变化存在影响,可以推断血管功能异常的患者会受到热浪天气的影响,加重心脑血管疾病患者的病情。同时 BH4 作为一种抗自由基药物,可以增加散热,减缓热浪的影响。

关键词 热浪 Apo E^{-/-}小鼠 sICAM—1 BH4 心脑血管疾病

中图法分类号 R331.36; **文献标志码** A

心脑血管疾病是一类严重损害人类健康的疾病,它具有发病率高、致残率高、死亡率高等特点,其中冠心病、心肌梗塞、脑卒中对健康威胁最为严重。而且,这类疾病的发生和人员的死亡与气象条件的剧烈变化存在着非常密切的关系^[1]。在全球气候变暖的大背景下,热浪在国内外众多地区的发生频次和强度都有所增加,高温可导致中暑、热衰竭、热痉挛等多种疾病,对人体健康的影响尤为显著,每年因高温热浪直接或间接致死的人数以千计^[2]。在众多热浪引发的健康事件中,心脑血管疾病发生和死亡占有很大的比例。

已有研究表明,细胞黏附分子(intercellular adhesion molecule, ICAM)可以作为心血管危险性评估标志物,它与冠心病的发生发展密切相关^[3]。Van Hove C 的研究表明,血清可溶性细胞间黏附分子—1(solubility intercellular adhesion molecule—1, sICAM—1)在促进炎症反应和血栓形成过程中的作用尤为显著,因此 sICAM—1 水平可作为动脉粥样

硬化冠心病发生的一个分子标志^[4]。

四氢生物蝶呤(tetrahydrobiopterin, BH4)是 NO 合酶(NOS)的必要辅助因子,影响 NO 和氧自由基生成。当 BH4 水平降低时, NOS 则会产生超氧阴离子而不再产生一氧化氮(nitric oxide, NO),从而 NO 的体内含量降低,导致血管内皮功能的异常,使血管正常扩张受到限制,机体比正常情况下散热差,提供外源性的 BH4 能够明显改善内皮细胞功能异常,提高机体 NO 水平,恢复血管扩张,增加散热,增强机体对热的适应。利用南京市实际气象资料,模拟一次典型热浪过程对 Apo E^{-/-}小鼠进行热刺激,分析热浪对 Apo E^{-/-}小鼠 sICAM—1 的影响。为研究热浪对心脑血管疾病的影响提供一个参考。

1 材料与方法

1.1 气象数据获取

本次实验所使用的气象数据为江苏省南京市(2001~2010)年(6~8)月份逐时气象要素资料,资料包括气温、气压、水汽压、相对湿度、风向、风速。在本次研究中采用气温这一单一要素。热浪的定义采用中国气象局制定的标准,即日最高气温≥35℃为高温且高温持续时间≥3 d。因而选取南京市(2001~2010)年间夏季日最高气温≥35℃且持续天数≥3 d 的一次热浪的实际天气过程数据进行模拟。对照组实验温度选取方法为此 10 年间南京市

2013 年 9 月 5 日收到,10 月 8 日修改 国家自然科学基金项目(41375121)资助
第一作者简介:刘昊辰(1989—),男,河北邯郸人,硕士研究生,研究方向:医疗气象学。E-mail: xingchen19891228@sina.com。
*通信作者简介:张书余。研究方向:人类生物气象学, E-mail: zhangsy@cma.gov.cn。

夏季的平均气温 27 ℃,从而得到实验过程温度曲线和对照组实验曲线,见图 1。

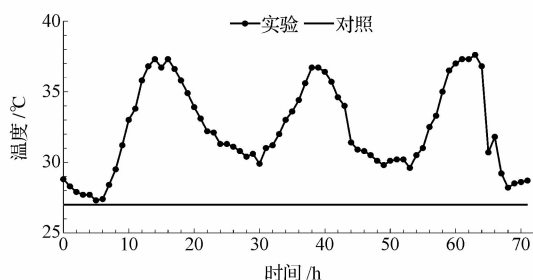


图1 热浪实验温度曲线

1.2 实验动物选取

实验动物选用的是购自北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证编号 SCXK(京)2006—0008。SPF 级 8 周龄 ApoE 基因敲除小鼠。ApoE 基因敲除小鼠无论正常或高脂饮食,由于富含胆固醇的脂蛋白清除障碍,均可形成高脂血症,从而使得血浆胆固醇水平较高^[5]。Nakashima 等的研究表明,动脉粥样硬化各阶段的病理表现均存在于 ApoE 基因敲除小鼠中,而且它能够在所有胸腹动脉中形成广泛的粥样硬化病变,认为 ApoE 基因敲除小鼠的动脉粥样硬化病变的发展同人类极其相似^[6]。近年来,ApoE 基因敲除小鼠已成为研究动脉粥样硬化发病机制以及抗动脉粥样硬化药理学研究等方面最重要的动物模型之一^[7]。

1.3 仪器设备

TEM1880 气象环境模拟试验箱。由天津普林特环境试验设备有限公司提供,用于模拟热浪温度随时间变化,并将实验 ApoE^{-/-}小鼠放入其中使其受到热刺激。通过试验箱主控板,可以设定热浪过程中温压值、温压变化斜率、程序运行方式(定值或程式)、程式段数、循环设置、预约设置以及设置温度(PID 区间)的境界值等,且该设备能保证实验过程中有新鲜的空气进入,满足实验动物呼吸生理需求。

离心机,TDZ4—W,长沙平凡仪器仪表有限公司生产,实验时离心 3 000 r/min,15 min 后分离血浆并储存于 -80 ℃ 低温冰箱中待检。

小鼠细胞间黏性分子 1(sICAM—1)酶联免疫分析测定试剂盒,购于武汉 EIAAB 科技有限公司。

1.4 动物饲养及分组

实验采用 8 周龄 SPF 级 ApoE^{-/-}小鼠 18 只,体重为 24.5 ~ 30.2 g,进行标准西方饮食饲养 8 周,严格控制昼夜节律,每日光照开始于 08 时,结束于 20 时,室内湿度保持在 45% 左右,环境温度控制在 27 ℃。然后将 18 只小鼠按照体重配对并分为热浪

组,热浪 BH4 组和对照组,每组 6 只。热浪组和热浪 BH4 组小鼠放入气象环境模拟试验箱,暴露于一个完整的热浪天气温度变化过程中,而对照组则继续按照适应期条件饲养。

1.5 实验方案

对进行实验的小鼠进行分组后,首先按照适应期条件进行空白对照饲养一周,测量小鼠体重并记录。实验前一天对热浪 BH4 组小鼠进行 10 mg/kg 剂量的 BH₄ 药物灌胃。然后将 12 只热浪组、热浪 BH4 组 ApoE^{-/-}小鼠放入气象环境模拟试验箱中按照实验温度设好程序,对小鼠进行热刺激。逐日测量小鼠体重、肛温。待热浪刺激结束后,取出小鼠测量体重,并采用 7% 的水合氯醛按照体重 0.3 mL/100 g 计量立即进行麻醉。麻醉后采用断头采血法采取小鼠血液,将采集的血液置于离心机中,3 000 r/min,15 min 后分离血浆并储存于 -80 ℃ 低温冰箱中待检。最后,采用 ELISA 法,利用小鼠细胞间黏性分子-1(sICAM—1)酶联免疫分析测定试剂盒测定血液样本中 sICAM—1 水平。

1.6 统计分析

数据采用 SPSS19.0 软件进行分析处理,采用独立样本的 t 检验(independent-sample t test)及 ANOVA 检验,认为组别 sICAM—1 水平具有统计学差异($P < 0.01$)。

2 实验结果

在实验过程中,在 0 h、24 h、48 h 和 72 h 四个取样点分别监测小鼠体温体重变化。体重、体温是小鼠的基本生理指标,在模拟热浪期间,小鼠体温的波动能够直接体现小鼠对热刺激的反映。图 2 所示为各小组小鼠体重变化情况,经统计检验发现各组小鼠在实验前后体重无明显差异($P > 0.05$);图 3 为各小组小鼠肛温的变化情况,可以明显看出热浪组小鼠肛温在热浪期具有显著的上升趋势,且与对照组和热浪 BH₄ 组相比具有统计学差异($P < 0.01$);热浪 BH₄ 组小鼠比对照组肛温略高,但是经统计分析发现其并不具有统计学差异($P > 0.05$)。

图 4 显示的是此次实验得到的对照组、热浪组和热浪组 BH4 组 18 只小鼠经过不同气象条件刺激后 sICAM—1 含量对比情况。通过本次实验结果可以明确看出,按照实际气象资料模拟的热浪过程确实对 ApoE^{-/-}小鼠 sICAM—1 水平具有一定影响。热浪组的 ApoE^{-/-}小鼠 sICAM—1 水平均在对照组 ApoE^{-/-}小鼠之上,并且通过统计分析也证明了两组实验结果具有统计学差异($P < 0.05$)。四氢生物蝶呤(BH₄)作为一种抗自由基药物,已有动物研究

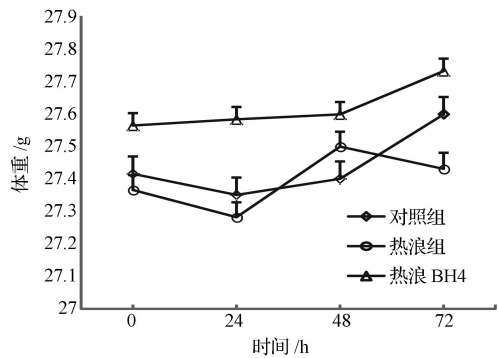


图2 对照组、热浪组、热浪 BH₄ 组小鼠体重变化

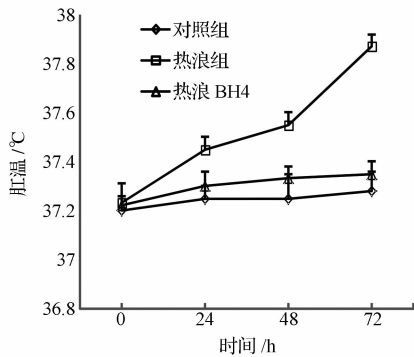


图3 对照组、热浪组、热浪 BH₄ 组小鼠肛温变化
注: * * $P < 0.01$ 与对照组相比;
$P < 0.01$ 与热浪 BH₄ 组相比

表明,外源性补充 BH₄ 可减少各种氧自由基的产生,降低脂质过氧化的水平,从而延缓并减少心脑血管疾病的发生及进展^[8]。实验结果也显示,热浪 BH₄ 组小鼠 sICAM—1 含量明显低于热浪组,且结果具有统计学差异($P < 0.05$)。

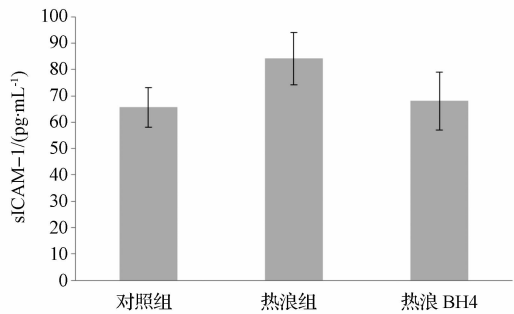


图4 对照组、热浪组、热浪 BH₄ 组 sICAM—1 含量对比

注: * * $P < 0.05$ 与对照组相比;## $P < 0.05$ 与热浪 BH₄ 组相比

3 讨论

心血管疾病(又称为循环系统疾病),是一系列涉及循环系统的疾病。循环系统指人体内运送血液

的组织和器官,主要包括心脏、血管(动脉、静脉、微血管),可以细分为急性和慢性,一般都是与动脉硬化有关。动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是一种严重威胁人类健康的疾病,特别是由此引起的关于心脑血管事件,在世界范围内是导致中老年人死亡最主要的原因。过去几十年的研究证实,AS 是一种全身性改变,主要累及大中型动脉,包括冠状动脉、脑动脉、颈动脉、主动脉、肾动脉以及四肢动脉。以上所涉及的血管具有相同的病理过程,即从内皮功能损害开始,发展到血管内膜增厚,最后形成粥样硬化斑块。而高血脂是引起心脑血管疾病的最重要的因素^[9,10]。气象要素的剧烈变化往往容易产生和加重心脑血管疾病,甚至导致人员的死亡。张大辉等^[11]曾统计了河北(1998 ~ 2010)年心脑血管年发病例数年际变化。其中 7 月、8 月心脑血管疾病发病呈明显上升趋势,说明热刺激对心脑血管疾病确有影响。并认为心脑血管病发病与短期天气变化密切相关。当日温差 $\geq 12\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时,未来 2 ~ 4 d 心脑血管病发病例数明显增多。心脑血管发病例数与前 3 天日最高气温关系密切,当日最高气温大于 $33\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时,未来 2 ~ 4 d 发病人数明显增多。本次实验中所模拟的热浪过程,其持续时间为 3 d,日最高温度分别为 $37.3\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $36.7\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $37.6\text{ }^{\circ}\text{C}$,平均气温为 $30.6\text{ }^{\circ}\text{C}$,高温持续时间分别为 7 h、5 h 和 6 h,高温平均持续时间为 6 h/d。

sICAM—1 属免疫球蛋白超家族类,正常情况下表达水平较低或不表达,当内皮细胞因炎症损伤等因素激活后其表达增强,血清中可溶性 CIAM—1 (sCIAM—1)是其胞外区脱落至血液循环中的片段,其水平与体内血管内皮细胞表面 ICAM—1 的表达水平相一致。sICAM—1 可以作为存在动脉粥样斑块的独立相关因子。心脑血管疾病患者体内 sICAM—1 均有明显的高表达^[12]。

BH₄ 可通过多种途径对人体血管内皮功能产生影响。大量的研究也已经证明了 BH₄ 与心血管疾病存在密切的关系^[13]。从实验结果中也能够看出,给予 BH₄ 的小鼠体温与对照组无显著差异,且明显低于热浪组。说明 BH₄ 能够达到协助扩张血管的作用,以此来弥补内皮功能缺陷,使得 sICAM—1 水平较热浪组有明显的降低,并有效增加机体的散热,维持正常体温,以免受高温热浪的危害。

本次的实验结果显示了:热浪后 Apo E 基因敲除小鼠内 sICAM—1 含量明显高于对照组,由于 Apo E^{-/-}小鼠本身富含胆固醇的脂蛋白清除障碍,均可形成高脂血症,从而使得血浆胆固醇水平较高,经过适应性饲养认为 Apo E 基因敲除小鼠已存在动脉粥

样硬化病变。经过高温热刺激的高温组小鼠 sICAM—1 水平又有明显升高,可认为热浪会加重动脉粥样硬化病变,即加大了患冠状动脉性心脏病等心脑血管疾病的风险。有研究表明热刺激使得交感神经兴奋,促进儿茶酚胺激素释放使血小板数目增多,黏附聚集力增强,血黏度升高,造成组织血液流动缓慢,甚至瘀滞,使组织缺血,易于形成血栓^[14]。热刺激使原已受损的系统负荷增加,是促成死亡的重要外因之一。以此可以推断,热浪期间,动脉粥样硬化、冠心病等血管功能异常的患者受到高温热浪天气的影响,会加重心脑血管疾病患者的病情。而 BH4 具有减缓热刺激对机体的影响,对机体散热、降低 sICAM—1 水平具有积极意义。因此,在高温热浪之前和期间有必要做好防范举措,采用外源性补充 BH4 等措施有助于尽可能减轻高温热浪对人体的损害。

参 考 文 献

1 高霞,李素芹,张大辉. 心脑血管疾病与气象条件关系分析研究. 第 28 届中国气象学会年会—S14 气候环境变化与人体健康. 北京:中国气象学会出版社, 2011: 135—141

2 刘建军,郑有飞,吴荣军. 热浪灾害对人体健康的影响及其方法研究. 自然灾害学报, 2008; 17(1): 151—156

3 李云波,杨丽霞,郭瑞威. 血清可溶性细胞间黏附因子-1 在冠心病中的发病学意义. 中国医疗前沿, 2013; (6): 4—5

4 C Van Hove, Fabienne C B, Joseph G, *et al.* Long-term treatment with the NO-donor molsidomine reduces circulating ICAM—1 levels in patients with stable angina. *Atherosclerosis*, 2005;180 (2): 399—405

5 张晓明,杨继红. ApoE 与动脉粥样硬化的关系及 ApoE 基因敲除小鼠在动脉粥样硬化研究中的应用. 昆明医学院学报,2012; (Z1):169—172

6 Szmítko P E, Verma S. C-reactive protein and the metabolic syndrome: useful addition to the cardiovascular risk profile? *Journal of the cardiometabolic syndrome*, 2006; 1(1): 66—69

7 Alain T, Ziad M. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiological Reviews*,2006;86 (2): 515—581

8 张华,王峰,陆伟,等. 叶酸与四氢生物喋呤对高脂血症兔内皮功能的影响. 实用医药杂志(山东), 2005; 22 (11): 997—999

9 李秀清. 心脑血管疾病的危险因素及预防方法分析. 亚太传统医药, 2012;8(1): 179—181

10 张君怡. 老年人外周动脉狭窄与心脑血管事件的相关性研究. 北京:协和医学院,2008

11 张大辉,高霞. 心脑血管疾病与气象条件关系分析. 河北医学, 2012;18(2): 161—163

12 严丽荣. 细胞粘附分子及 C 反应蛋白等与老年心脑血管疾病相关性的临床研究. 苏州:苏州大学,2004

13 吴磊,李晓强,曹凤宏,等. 四氢生物喋呤代谢紊乱导致血管内皮功能障碍分子机制的研究进展. 华北煤炭医学院学报, 2013;15(2):189—191

14 张书余. 医疗气象预报. 北京:气象出版社,2010:38—39

Research on Influence of Heat Wave on sICAM—1 of ApoE Knockout Mice

LIU Hao-chen^{1,2},ZHANG Shu-yu^{1,2*},TIAN Ying^{1,2},ZHOU Yan-yan^{1,2},KUANG Zheng-zhong^{1,2}
(College of Applied Meteorology, Nanjing University of Information Science and Technology¹, Nanjing 210044,P. R. China;
Lanzhou Institute of Arid Meteorological, China Meteorological Administration², Lanzhou 730020,P. R. China;
Key Laboratories of Arid Climatic Change and Reducing Disaster of Gansu Province³, Lanzhou 730020,P. R. China)

[Abstract] Simulated the process of heat wave and compared Apo E^{-/-} mice' sICAM—1 levels, body weight and rectal temperature,explore the effect of heat wave on sICAM—1, in order to further investigate the impact of heat wave on cardiovascular disease, Eighteen Apo E Knockout Mice were divided into the heat wave group,BH4 and control group. The body weight and rectal temperature of every mouse were measured every day. Used of meteorological environment simulation box to simulate the process of heat wave, and determinates sICAM—1 of Apo E Knockout Mice after heat wave, measured by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The results ware the sICAM—1 and rectal temperature of Apo E Knockout Mice in group of heat wave were much higher than that in BH4 and control group. There were statistically significance among control group BH4 and heat wave group ($P < 0.05$). It is Concluded that influence of heat wave on sICAM—1 of Apo E Knockout Mice indeed exists. The patients can be deduced who have vascular dysfunction can be influent by the process of heat wave. What's more, BH4 may reduce the hazards caused by heat wave weather.

[Key words] heat wave Apo E Knockout Mice sICAM—1 BH4 cardiovascular disease