



大气污染对糖尿病前期及健康人群的心肺及代谢系统健康效应的前瞻性定组研究

王彦文^{1†}, 韩逸群^{1†}, 朱彤^{1*}, 李卫菊², 张宏印²

1. 北京大学环境科学与工程学院, 环境模拟与污染控制国家重点联合实验室, 北京 100871;

2. 北京大学医院, 北京 100871

† 同等贡献

* 联系人, E-mail: tzhu@pku.edu.cn

收稿日期: 2017-04-19; 接受日期: 2017-05-16; 网络版发表日期: 2017-08-28

国家自然科学基金(批准号: 41421064, 21190051, 41121004)和中国博士后基金(批准号: 154248)资助

摘要 大气污染物是心肺系统疾病的重要风险因子, 然而其对代谢系统疾病(如糖尿病等)的影响尚不明确. 我国大气污染形势严峻, 糖尿病患病人口基数大, 对应疾病负担严重, 因而研究大气污染物暴露对糖尿病发病及病理进程影响机制十分必要. 现有的研究证据对回答心血管异常疾病患者对于大气污染物是否易感, 以及大气污染物是否会通过特定生物机制通路而加剧血糖代谢异常病理进程等问题仍存在不足. 本课题组基于已有研究结果以及以往研究局限性, 建立针对上述科学问题的前瞻性定组研究(SCOPE). 本研究针对糖尿病前期及健康对照人群, 通过1年间4次重复随访采样分析大气污染物的健康效应, 对环境暴露及健康终点进行综合评价, 并比较两组人群对大气污染响应的效应差异. 健康终点评价方面, 通过生物标志物测量血糖代谢异常、胰岛素抵抗、内皮功能损伤、系统性炎症等多种生物机制通路损伤. 环境暴露方面, 对颗粒物组分及粒径进行精细测量, 同时加入个体水平暴露评价. 本研究有助于深入探索大气污染物对心血管代谢异常人群的健康效应, 及其对应的机制通路.

关键词 定组研究, 大气污染, 糖尿病, 易感人群, 心血管代谢异常

全球疾病负担研究表明, 大气颗粒物是我国排名第4的过早死亡风险因子^[1]. 本课题组基于嵌套网格空气质量预报系统(nested air quality prediction modeling system, NAQPMS)评估得到, 空气动力学粒径小于2.5 μm 的颗粒物(PM_{2.5})暴露可导致我国137万成年人过早死亡^[2]. 上述风险评估均基于现有的毒理学及流行病学研究证据, 仅关注呼吸系统及心血管系统相关疾病, 而未考虑以II型糖尿病为代表的代谢系统疾病,

因而估算可能存在低估.

2010年, 我国成年人中糖尿病及糖尿病前期的年龄校正患病率分别为11.6%及50.1%(约合1.139及4.934亿人)^[3]. 最新的全国范围内前瞻性研究发现, 糖尿病患者的心血管及其他疾病死亡风险均显著高于未患病人群^[4]. 我国庞大的糖尿病患者人口基数及其对应的沉重疾病负担, 使得研究大气污染物等患病风险因子变得尤为重要. 基于以上, 本课题组重点关注

引用格式: 王彦文, 韩逸群, 朱彤, 等. 大气污染对糖尿病前期及健康人群的心肺及代谢系统健康效应的前瞻性定组研究. 中国科学: 生命科学, 2017, 47: 1079-1089, doi: [10.1360/N052017-00177](https://doi.org/10.1360/N052017-00177)

英文版见: Wang Y W, Han Y Q, Zhu T, et al. A prospective study (SCOPE) comparing the cardiometabolic and respiratory effects of air pollution exposure on healthy and pre-diabetic individuals. *Sci China Life Sci*, 2017, in press, doi: [10.1007/s11427-017-9074-2](https://doi.org/10.1007/s11427-017-9074-2)

如下两方面科学问题: 心血管代谢异常的个体是否对大气污染物更加易感? 大气污染物是否会加剧心血管代谢异常疾病的进程?

已有研究提示, 大气污染物暴露对 II 型糖尿病的发病进程存在贡献. 基于美国地区的横断面研究表明, $\text{PM}_{2.5}$ 浓度每升高 $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 对应 II 型糖尿病患病率增加 1%^[5]. 德国^[6] 及美国^[7] 的两个女性人群队列研究均表明长期暴露交通源污染物(如 $\text{PM}_{2.5}$ 及 NO_2 等)与 II 型糖尿病患病风险增加相关. 一项加拿大的队列研究也表明, 低浓度的 $\text{PM}_{2.5}$ 暴露可增加 II 型糖尿病的患病风险^[8] 及死亡率^[9].

少数研究试图探索上述损伤效应背后可能的机制通路. O'Neill 等人^[10] 发现, 日均黑碳(black carbon, BC) 及 $\text{PM}_{2.5}$ 暴露浓度与 II 型糖尿病患者的血管内皮功能相关生物标志物水平存在正相关关系. 一项在台湾横断面研究发现, 空气动力学粒径小于 $10 \mu\text{m}$ 的颗粒物(PM_{10}) 年均浓度增加与血糖及血脂代谢异常相关, 表现为总胆固醇、甘油三酯、空腹血糖、糖化血红蛋白等指标浓度升高, 该损伤效应在不同年龄段的成年人均有表现^[11,12]. 一项在伊朗儿童中开展的研究也表明, 连续 7 天的 PM_{10} 累积暴露与炎症、氧化应激、胰岛素抵抗等相关生物标志物水平增加相关, 且校正多个潜在混杂因子后效应依然显著^[13]. 部分前瞻性研究提示, 颗粒物的各粒径段均与胰岛素抵抗指数(homeostasis model assessment-insulin resistance, HOMA-IR)、胰岛素、甘油三酯、低密度脂蛋白等浓度增加以及心率变异率(heart rate variability, HRV)、血管弹性、血管扩张能力降低显著相关^[9,14-16]. 近年来也有部分研究采用脉搏波分析及反应性充血指数等指标探索大气污染物对血管内皮功能的损伤, 对相关机制通路进行更全面的评价^[17-19].

已有研究对上述科学问题进行了探索, 但在大气污染物暴露对心血管代谢异常个体的健康损伤问题中仍存在局限性. (i) 大部分研究均为横断面等描述性研究设计, 难以探索大气污染物浓度的动态变化作用于代谢系统的因果关系. (ii) 研究缺乏对心血管代谢异常及健康个体在大气污染物暴露后的效应响应的比较. (iii) 早期研究中作为健康终点的机制通路生物标志物十分有限, 难以对心血管代谢状态的变化进行完善评价. 最后, 现有研究对于个体水平的颗粒物

$\text{PM}_{2.5}$ 精细组分和粒径的健康效应评估仍存在不足.

人群定组研究设计对于弥补上述不足存在多方面的优势. (i) 定组研究可理解为在短时间内完成的高强度前瞻性研究, 对于受试个体的重复测量尽可能排除了个体间差异所带来的影响, 在因果推断能力上优于横断面及病例对照研究设计. (ii) 人群定组研究能够将心血管代谢异常受试者与同等生理条件的健康对照受试相匹配, 能够更细致地评估人群易感性. (iii) 定组研究在短期内对小范围人群进行随访, 为同时评估多种精细健康终点以及暴露指标的水平提供可能. 综上, 定组研究对于探索大气污染物对人体健康损伤的急性效应机制、识别大气污染物中关键毒性物种具有极大的优势.

针对上述科学问题, 同时基于对以往研究结果和局限性的总结和比较, 本研究(SCOPE)利用前瞻性定组研究设计, 分析糖尿病前期及健康个体在大气污染物暴露下心血管代谢及呼吸系统的急性效应, 并比较该损伤在两组人群中的效应强度差异. 结合本研究组以往研究经验, SCOPE 在方案设计中健康终点以及环境暴露指标均进行了详尽评价. 在健康终点方面通过对功能性、细胞及分子水平等多种指标的测量, 对呼吸系统及心血管系统炎症^[20,21]、氧化应激^[22]、自主神经功能障碍^[23]、血栓^[24,25]、II 型糖尿病进程相关指标(如胰岛素抵抗)、以及内皮功能等多条生物机制通路进行评估. 本研究同时应用了代谢组学这一近年来快速发展的强大分析技术, 可以为进一步探索代谢通路中的不良效应提供帮助^[26]. 在空气污染物暴露评估方面, 本研究利用固定观测站点的在线及离线仪器, 对气态污染物及颗粒物浓度、颗粒物粒径谱分布、碳质组分和重金属元素等详细理化特征进行全面评估. 此外, SCOPE 研究还加入了颗粒物个体采样器, 获得高精度的暴露评价.

本研究的目的是包括如下 3 个方面: (i) 分析大气污染物暴露是否对呼吸及心血管代谢系统造成急性损伤. 着重评价污染物暴露后, II 型糖尿病进程相关的生物标志物是否变化; (ii) 探索心血管代谢异常的人群相比其健康对照, 对大气污染物暴露是否更加易感, 以及主要体现在哪些机制通路; (iii) 定量分析不同粒径及化学组分的颗粒物健康效应强度, 识别造成健康损伤的关键毒性物种.

1 研究设计与方法

1.1 人群招募条件及基本信息

本研究招募的受试者均来自居住地在北京大学校园附近,且参与北京大学医院2013年年度体检的人群。在年度体检的22343名参与者中,SCOPE共招募60名糖尿病前期及60名健康受试者。其中,糖尿病前期的确定标准为:最近一次年度体检中空腹血糖水平处于6.1~7.0 mmol/L(未采用糖耐量受损作为入选标准)。本研究选取糖尿病前期而非确诊糖尿病患者作为病例组,主要考虑糖尿病前期个体的血糖代谢能力已出现早期损伤,相比健康人群更易发展为糖尿病患者;但同时其尚未确诊糖尿病,因而尽可能排除了糖尿病用药等因素对血糖及血脂等生物标志物水平的影响。本研究同时对吸烟及疾病史等可能影响暴露的健康效应评估的变量进行控制,具体如表1所示。

人群招募主要基于年度体检信息进行筛选,同时结合电话招募以及北京大学医院内海报张贴等方式开展。本研究首先基于表1中的入选标准,对年度体检人群进行筛选,逐级筛选流程及对应满足条件受试者人数标注于网络版补充材料1;其次随机抽取满足入选条件的潜在受试者进行进一步的电话筛选,并询问参与项目意愿。另外,共有2名糖尿病前期个体以及8名健康个体,通过医院内张贴的项目介绍海报参与本研究。受试者主要为北京大学教职工,其中部分受试者居住地集中在北京大学附近的教职工小区(网络版补充材料2)。81名(67.5%)受试者居住在北京大学固定观测站点周围5 km范围内,4名(0.3%)受试者居住在10 km范围外。受试者居住位置描述见网络版补充材料3。入选

受试者均已被告知项目具体流程,并完成基线问卷以记录其收入、饮食习惯、职业暴露、用药等情况。本项目由北京大学生物医学伦理委员会审核通过,参与项目的受试者均签署纸质版项目知情同意书。

表2展示了项目受试者的基线信息,并对糖尿病前期及健康人群的数值及类型变量分别进行*t*检验及卡方检验,通过*P*值比较了两组人群的人口学特征差异。在全部人群中,女性受试者略多于男性(69:51)。糖尿病前期及健康两组人群的年龄、身高、体重、性别比等均未出现显著差异。健康组受教育程度略高于糖尿病前期组,其中82%的健康受试者完成了大学教育,而糖尿病前期组中为65%,教育程度在两者并未表现出显著差异($P=0.06$)。在人群后期几次随访中发现8名受试者仍间断吸烟(糖尿病前期个体5名,健康个体3名,在基线及前期随访中均汇报不吸烟)。由于这些受试者已完成几次随访体检,因此未予以排除,后续数据分析中将吸烟情况作为协变量。

1.2 研究流程

以往对于大气污染物急性效应的流行病学研究大多基于两周内的污染物暴露观测^[27],因此本研究在随访前两周开始固定站点观测。受试者在1年内不同季节完成4次随访,流程见图1。大气污染物暴露由3方面进行评估,详见表3,其中主要包括:(i)北京大学固定站点在线观测,包括随访前1~14天的常规大气污染物的高时间分辨率观测数据;(ii)固定站点离线观测,基于随访前1~14天每日滤膜采样获得颗粒物组分信息;(iii)受试者在随访体检前佩戴离线个体采样仪器24 h,收集颗粒物PM_{2.5}用于分析个体暴露的颗粒物

表1 人群招募筛选条件

入选条件
1 糖尿病前期受试者(6.1 mmol<空腹血糖<7.0 mmol) 健康受试者(空腹血糖<6.1 mmol)
2 50<年龄<65
3 不吸烟或戒烟3年以上
排除条件
1 确诊糖尿病
2 糖尿病家族史
3 心血管系统及代谢系统疾病史,包括高血压、高血脂、肿瘤、冠心病、心肌症、心律不齐、中风、甲乙型肝炎、白血病、胆结石、甲状腺结节、病窦综合征、佩戴心脏起搏器、甲亢及甲减、多发性骨髓瘤、类风湿症、胰腺炎、反流食管炎、甲状腺切除等

表 2 项目受试者基础信息

		总人群	糖尿病前期人数	健康人数	P值
人数		120	60	60	
性别	男	51 (43%)	24 (40%)	27 (45%)	0.71
	女	69 (58%)	36 (60%)	33 (55%)	
年龄(岁)		57.0±4.3	57.7±4.2	56.4±4.4	0.10
身高(cm)		165.2±8.2	164.3±8.7	166.1±7.6	0.24
体重(kg)		67.0±11.2	67.2±10.6	66.8±11.9	0.86
BMI		24.5±3.4	24.9±3.3	24.2±3.5	0.25
受教育程度	中学及以下	32 (27%)	21 (35%)	11 (18%)	0.06
	大学及以上	88 (73%)	39 (65%)	49 (82%)	
工作状态	在职	73 (61%)	33 (55%)	40 (67%)	0.26
	退休	47 (39%)	27 (45%)	20 (33%)	



图 1 本研究重复随访流程图(网络版彩图)

浓度及组分信息. 随访当日, 受试者将采样器返还研究人员, 并完成相应健康指标采集, 包括随访问卷(记录随访前3日内睡眠习惯、污染物暴露、用药等情况)、功能性指标测量、生物样本采集等. 每次随访采样在1 h内完成, 暴露评价及健康指标测量内容描述见图1.

1.3 暴露评估

(1) 固定站点观测. 本研究通过设置在北京大学理科六楼顶的固定站点进行大气污染物观测^[28]. 通过微量振荡天平(TEOM; Thermo Scientific, 美国)测量PM_{2.5}质量浓度; 通过在线分析仪(Model 48i, 42i, 43c, 49i,

表3 暴露观测指标汇总

污染物类型	指标	方法/仪器	时间分辨率
颗粒物	PM _{2.5} 质量浓度	TEOM/Thermo RP1400a	h
	BC质量浓度	MAAP/Thermo Model 5012	h
	粒径数浓度 ($D=5.6\sim 560\text{ nm}$)	FMPS/TSI 3091	h
	EC/OC	Sunset	d
	水溶性离子	Dionex ICS-2500/2000	d
	水溶性有机酸	Liquid Chromatogram	d
	金属元素	Thermo X series ICP-MS	d
	PAHs	Agilent GC-MS	d
气态污染物	CO	NDIR/Thermo Model 48i	h
	NO _x	化学发光检测/ Thermo Model 42i	h
	SO ₂	荧光检测/Thermo Model 43c	h
	O ₃	紫外吸光检测/ Thermo Model 49i	h
气象参数	温度、相对湿度、气压、风速、风向	Met One	h

Thermo Scientific)测量气态污染物(CO, NO_x, SO₂, O₃)浓度;通过高速迁移粒子测量仪(FMPS Model 3091, TSI Inc., 美国)测量5.6~560 nm颗粒物的粒径谱分布;通过多角度吸收光度计(MAAP Model 5012, Thermo Scientific)测量碳质组分BC浓度;通过Met One(Thermo Scientific)测量温度、湿度、气压、风速、风向五参数. 仪器每周定期进行校准及维护.

随访期间,利用特氟龙和石英滤膜采集PM_{2.5}样品,并后续进行实验室分析,包括元素碳(EC)、有机碳(OC), SO₄²⁻, NO₃⁻, NH₄⁺, Na⁺, K⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, F⁻, Cl⁻等离子,水溶性有机物(包括甲酸、甲磺酸、乙酸、草酸),以及多环芳烃(PAHs)等^[29]. 为了对应评估随访逐日暴露水平,离线膜采样定为每天早08:00开始,次日7:30结束.

(2) 个体采样. 本研究采用美国环境保护署推荐的个体采样仪(Libra Model L-4, A.P. Buck, Inc., 美国),并配合PM_{2.5}采样切割头以及37 mm石英滤膜,获得PM_{2.5}、元素碳、有机碳、以及多环芳烃质量浓度^[29]. 石英滤膜在使用前首先在马弗炉中进行5.5 h 550℃烘烤以去除本底有机碳. 滤膜称重前均在恒温恒湿(25℃, 40%)超净室内平衡超过24 h. 每次采样前,采样泵流量均校正至4 L/min. 每名受试者均被告知在随访预约时间前24 h打开个体采样仪,并建议外出时随身佩戴,室内活动(如做饭、睡觉)时尽量放置于附近位置.

1.4 随访检测指标

表4总结了SCOPE中涉及的健康终点及相关机制通路,本节对功能性指标测量、生物样品采集、以及细胞和分子水平生物标志物的实验室分析进行介绍.

(1) 功能性指标. 为最大程度减少系统误差,本研究中功能性指标测量均由固定研究人员进行操作.

血压. 肱动脉血压先于其他心血管相关指标的检测,通过水银血压计测量受试者的收缩压(systolic blood pressure, SBP)及舒张压(diastolic blood pressure, DBP). 受试者在血压测试前需静坐休息5 min,之后保持坐姿,将惯用手手臂放置于与心脏位置齐平的平台进行血压测量.

脉搏波分析. 脉搏波分析使用SphygmoCor PxPulse Wave Analysis System (SphygmoCor; AtCor Medical, 澳大利亚)进行无创评估. 通过放置于受试者右手桡动脉的高保真微压计,自动记录并筛选得到最优稳定波形,基于外周动脉波形以及内置算法换算得到脉搏波相关参数.

脉搏波形测量的一致性通过系统内置的操作者指数进行评估,主要参考指标包括波峰高度均值、波峰高度变异率、波形变异率、舒张时间等. 操作者指数>85(满分100)对应的测试结果为有效数据.

本研究选择脉搏波分析中几个关键指标表征

表 4 本研究相关健康终点

机制通路	样品/仪器	健康终点
血压及内皮功能	水银血压计	收缩压/舒张压
	SphygmoCor	脉搏波分析: AP/AP75/AIx/AIx75/ED/SEVR
	EndoPat 2000	反应性充血指数
心率变异率	EndoPat 2000	SDNN/RMSSD/PNN50/HF/LF/HR
呼吸系统炎症	呼出气	FE _{NO}
	呼出气冷凝液	pH
		IL1 α /IL1 β /IL2/IL6/IL8/TNF- α /IFN- γ
心血管系统炎症	血清	CRP
	血浆	IL1 α /IL1 β /IL2/IL6/IL8/TNF- α /IFN- γ
		白细胞/中性粒细胞/单核细胞/淋巴细胞
心血管代谢系统	血清	甘油三酯/高密度脂蛋白/低密度脂蛋白/总胆固醇
	血浆	空腹血糖/空腹胰岛素/HOMA-IR
		糖化血红蛋白
氧化应激	晨尿	丙二醛/肌酐

血管内皮以及心脏功能,包括中心动脉血压、增强压(augmented pressure, AP)、增强压指数(augmented pressure index, AIx)、射血时间(ejection time, ED)、心内膜下心肌活力率(subendocardial viability ratio, SEVR)。

中心动脉血压由肱动脉血压以及仪器记录脉搏波形换算得到。增强压为最高中心收缩压减去反射波位置对应血压值,增强压指数为增强压与脉压差比值(表示为百分比)。增强压或增强压指数升高提示外周血管反射波的增加或提前,指征血管硬化及血管阻力程度的增加^[30]。由于升主动脉压力受心率影响,增强压及增强压指数均校正至心率75次/min对应数值(分别表示为AP75及AIx75)以控制个体差异。射血时间为脉搏开始至径向张力测量波的重搏切迹间的时长。心内膜下心肌活力率为舒张压与收缩压张力时间比值,并经射血时间校正获得。射血时间及心内膜下心肌活力率表征心内膜下心肌灌注强度^[31]。

反应性充血指数。反应性充血指数通过体积描记仪(EndoPAT2000; Itamar Medical, Ltd., 以色列)对双手指尖动脉血容量进行无创评估,具体操作如下:将血压袖带绑在受试者非惯用手大臂,增加袖带压力至受试者收缩压50 mmHg以上,以阻断肱动脉血流,5 min后去除加压,以诱发反应性充血现象。此过程中,对侧手臂作为空白对照。通过放置于两手食指指尖的指套,

检测平静期、阻断期、反应性充血期的脉动血容量变化。反应性充血指数为阻断手臂的反应性充血期与平静期的脉搏搏动幅度均值的比值,除以空白对照手臂的两时期脉搏搏动幅度均值的比值,再乘以基线校正因子^[32]。反应性充血指数反映微血管内皮功能,是动脉粥样硬化进程的早期指征指标^[33]。

心率变异率(heart rate variability, HRV)。心率变异率数据通过EndoPAT 2000仪器的内皮功能测试过程中5.5 min平静期数据获得。HRV各指标测量均参考欧洲心脏病协会和北美心脏起搏及电生理协会标准^[33]。心率变异率的指标可以分为时域及频域两类。时域分析基于心率的波动间距变化,指标包括窦性心搏R-R间期、N-N间期标准差(standard deviation of all NN intervals, SDNN)、逐次差分均方根(root mean square of successive differences, RMSSD)、相邻N-N间期大于50 ms的个数(NN50s)、相邻N-N间期大于50 ms的个数占总N-N个数的比例(pNN50)。频域分析评估R-R间期特定频段的谱密度,包括0.04~0.15 Hz低频信号(low frequency, LF)及0.15~0.40 Hz高频信号(high frequency, HF)。

(2) 生物样品。呼出气。本研究根据美国胸腔协会及欧洲呼吸协会推荐的操作流程采集呼出气样品。受试者首先清洗口腔,保持150 mL/s稳定流速呼气至

4 L铝制气袋. 详细操作流程及质量控制见本研究组既往研究^[21]. 呼出气冷凝液. 呼出气冷凝液通过Jaeger EcoScreen (Erich Jaeger, 德国)仪器采集. 采样前仪器首先开机预热30 min以上, 以保证冷凝腔稳定至 -20°C . 受试者佩戴鼻夹, 通过吹嘴向冷凝管平静呼气10 min; 呼出气体经由冷凝装置低温冷凝为液体并收集^[34]. 呼出气冷凝液样品分装至离心管并保存至 -80°C 进行后续细胞因子分析. 血样. 血样在每次随访09:30前由护士采集, 以防止受试者低血糖风险. 受试者采血前均空腹超过12 h以减少外部因素对血小板状态影响. 血浆样品使用紫帽EDTA管进行收集, 采集后立即放入冰盒. 血清样品采用无涂层的红帽凝血管收集, 室温凝结30 min后放入冰盒保存. 部分生物标志物在样品采集后立即进行检测, 下文详述. 剩余样品在 4°C 条件下2 h内分装完毕, 保存至 -80°C 冰箱用于后续细胞因子及代谢组学分析. 尿样. 本研究采集晨尿样品以评估氧化应激水平、及特定代谢分子浓度. 受试者随访当天晨起后, 使用15 mL聚丙烯样品管采集中段尿样, 在随访现场交于研究者保存. 样品分装至离心管并保存至 -20°C 冰箱中用于后续分析.

(3) 生物标志物分析. 呼出气一氧化氮. 呼出气一氧化氮(FE_{NO})是表征急性呼吸道炎症的亚临床指标. 气袋样品采集后4 h内通过化学发光法在线仪器 (model 42i; Thermo Scientific)测量其中一氧化氮浓度^[20,21]. 呼出气冷凝液pH. 呼出气冷凝液pH是指征气道酸性程度的重复性较好的稳健指标^[35]. 呼出气冷凝液采集后立即测量pH (InLab Micro; Metler Toledo, 瑞士)并记录数据, 随后使用高纯氦气吹拂样品表面5 min, 以去除样品中 CO_2 , 之后再次测量pH并记录数据. 心血管代谢指标. 为表征心血管代谢状态, 血样采集后, 血糖及血脂代谢相关指标立即由医院检验科进行分析. 具体来讲, 空腹血糖及空腹血脂(甘油三酯、高密度脂蛋白、低密度脂蛋白、总胆固醇)由Olympus AU2700生化分析仪进行检测; 糖化血红蛋白由Bio-Rad Variant II涡轮增压仪进行检测; 基于内稳态模型的HOMA-IR指标由空腹血糖及空腹胰岛素计算获得, 表征基础胰岛素抵抗程度. 血细胞数及C反应蛋白. 全血样本由EDTA涂层管采集, 并由医院检验科分析31种临床指标(Sysmex XE-2100 Automated Hematology System), 包括白细胞、中心粒细胞、单核细胞、淋巴细胞、红细胞、血小板等. 血浆中C反应蛋白通过自动浊度

测定法检测. 呼出气冷凝液及血清中细胞因子. 大气污染物暴露与多种细胞因子水平升高相关, 如 $\text{IL}1\alpha$, $\text{IL}1\beta$, $\text{IL}2$, $\text{IL}6$, $\text{IL}8$, $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IFN-}\gamma$ 等^[36,37]. 本研究通过分析呼出气冷凝液和血清中多种细胞因子以评价呼吸系统及心血管系统炎症水平, 细胞因子测量利用BD FACSCalibur流式细胞仪(Becton Dickinson, 美国)并采用流式微球阵列分析技术^[38]. 呼出气冷凝液及血清样品首先进行适当比例稀释, 包被特定抗体的捕获小球在缓冲液中悬浮, 并与样品均匀混合以保证细胞因子充分结合. 室温下1 h孵育后, 将对应缓冲液稀释后的荧光检测抗体加入样品管, 随后避光室温孵育1.5 h使荧光抗体充分结合. 将缓冲溶液加入样品混合溶液进行洗脱, 离心并去除上清液后, 加入检测试剂进行重悬浮. 随后利用BD FACSCalibur流式细胞仪进行分析, 数据处理软件为FCAP Array version 3.0. 流式细胞仪上样前均使用经销商提供的标准微球进行校准. 尿样中氧化应激生物标志物. 本研究分析尿样中丙二醛(malondialdehyde, MDA)以及8-羟基脱氧鸟苷(8-hydroxy-2 deoxyguanosine, 8OHdG)以评估氧化应激水平. 丙二醛为活性氧物种攻击细胞膜后生成的脂质过氧化产物, 其可与包括低密度脂蛋白在内的特定蛋白质结合并影响其功能^[39]. 8-羟基脱氧鸟苷是自由基引发DNA损伤的主要产物之一, 可在尿样中稳定存在^[40]. 丙二醛及8-羟基脱氧鸟苷的分析方法于本课题组之前文献中详细介绍^[22]. 尿样中丙二醛浓度测量采用2-硫代巴比妥酸显色法, 结合高效液相色谱仪-紫外分光法(Waters 2695-2998)检测532 nm处吸光值. 尿样中8-羟基脱氧鸟苷的分析首先采用固相萃取法排除尿样中杂质干扰, 随后采用高效液相色谱及电化学检测器(Waters 2695- 2465)进行分析. 尿样中肌酐浓度利用分光光度法(波长510 nm处)测量, 以校正丙二醛及8-羟基脱氧鸟苷浓度. 质量控制. 本研究中生物标志物分析及检测相关仪器均进行定期校准. 例如, 一氧化氮检测仪在测量范围内进行5个浓度水平的标定, 其校准系数(R^2)达到0.98以上. 每周对仪器进行零点校准. pH仪每周利用标准溶液(pH=4.01, 7.0, 9.21)进行室温校准, 检测电极保存于3 mol/L KCl, 测样前用去离子水冲洗. 生化分析仪及血液分析系统由医院检验科每天进行校准.

(4) 代谢组学分析. 血浆样品通过气相色谱-质谱联用及液相色谱-质谱联用的方法进行高通量非

靶向代谢组学分析. 血样前处理方法已在文献中有报道, 其核心步骤为蛋白质沉淀及萃取^[26]. 本研究应用较广泛认可的分析方法, 以保证对代谢物种检测的较全面覆盖^[41]. 首先在室温下(15°C~20°C)向血浆样品中加入3倍体积的甲醇溶液, 促进蛋白质沉淀. 在4°C条件下以10000 r/min离心10 min后, 收集上清液并冻干, 随后进行化学法衍生(GC-MS; Agilent 7200 Q-TOF system)或利用50% (v/v)甲醇重构(LC/MS; Agilent 6550 iFunnel Q-TOF System). 数据初步分析软件为MassHunter Workstation Software, 具体分析方法仍处于优化过程中.

1.5 统计学分析

在线观测数据均转化为小时均值及日均值进行分析. 为与随访时间进行匹配, 日均值暴露数据采用每日8:00开始的24 h均值; 若当日缺失数据多于8 h, 则认为当日数据无效. 健康终点指标均进行正态性检验, 对于未通过正态性检验指标进行对数变换后进行统计模型分析.

本研究采用混合线性模型对重复测量中的个体内变化进行分析, 固定及随机效应值利用约束极大似然法进行估计. 模型对年龄、BMI、性别、心血管代谢状态(糖尿病前期或健康)等变量进行了控制. 对于具有非线性贡献的混杂因子, 如温度、相对湿度、工作日等, 本研究选择最高自由度为3的自然样条函数对这些变量进行拟合, 并根据AIC最小原则筛选模型参数. 具体模型如下:

$$E(Y_{ij}|X_{ij}) = \alpha_0 + \beta_1 \cdot X_{ij} + f_{ns}(\text{Temp}_{24 \text{ h}ij}, \text{df}) \\ + f_{ns}(\text{RH}_{24 \text{ h}ij}, \text{df}) + f_{ns}(\text{Temp}_{7 \text{ d}ij}, \text{df}) \\ + f_{ns}(\text{Temp}_{7 \text{ d}ij}, \text{df}) + f_{ns}(\text{DOW}_{7 \text{ d}ij}, \text{df}) \\ + \beta_2 \cdot \text{Age}_{ij} + \beta_3 \cdot \text{BMI}_{ij} + \beta_4 \cdot \text{Sex}_{ij} + \varepsilon_{ij}.$$

其中, i 表示受试者, j 表示随访次数, X_{ij} 和 Y_{ij} 分别表示受试者 i 的第 j 次随访中污染物暴露浓度以及生物标志物水平, f_{ns} 为自然样条函数, df 为自由度, DOW 为一周工作日的第几天(即星期几).

本研究首先利用混合线性模型将个体的污染物暴露及所有健康指标水平建立联系. 健康效应评估表示为污染物浓度每升高四分位间距, 对应健康指标浓度变化的百分比. 为表征污染物暴露累积效应, 大气污染物浓度换算为随访前1~24 h及1~14天的各时间段

累积均值. 进一步, 模型通过加入污染物暴露和心血管代谢类型的交互项, 定量比较糖尿病前期及健康人群对大气污染物暴露的效应强度是否存在显著差异.

2 讨论

SCOPE研究旨在探索大气污染物如何影响心血管代谢异常人群, 特别关注II型糖尿病进程相关的机制通路损伤过程. 本研究还将进一步探索心血管代谢异常状态是否会增加人群对大气污染暴露的易感性. 本文详尽介绍了研究设计及其背后的考虑因素. 在此基础上, 本研究组将对一系列相关的研究结果进行报道及讨论. 基于我国庞大的糖尿病患者人口基数以及严峻的大气污染物现状, 本研究中的发现具有重要的公共卫生意义.

越来越多的文献证据提示, 大气污染物暴露可以影响代谢综合征相关的多条机制通路, 但已有的研究对象分布于不同人群(儿童、成人、老年人、哮喘患者、糖尿病患者等), 且仅关注特定人中的少数机制通路, 因此结果并不一致, 难以比较. 因此, 本研究选择糖尿病前期及健康对照人群, 通过同时测量多条生物通路相关生物标志物, 对大气污染物暴露造成的损伤进行系统性分析.

血糖代谢异常(包括胰岛素抵抗)、血管内皮功能异常、以及系统性炎症是II型糖尿病加剧的3个主要因素^[10,12,13,15]. 本研究评估一系列功能性、细胞以及分子水平的健康终点, 以涵盖多种损伤机制通路. 具体来说, 本研究测量了: (i) 空腹血糖、空腹胰岛素、甘油三酯、总胆固醇、及HOMA-IR, 以评价血糖血脂代谢水平; (ii) 血压、脉搏波分析、反应性充血指数, 以评价血管内皮功能; (iii) 白细胞数、C反应蛋白、呼出气冷凝液及血清中细胞因子, 以评价呼吸系统及心血管系统炎症水平.

关于血糖代谢异常个体是否对大气污染物暴露更加易感, 以往的研究证据非常有限, 难以回答. 现有研究大多为生态学或横断面研究设计, 研究证据提示, II型糖尿病的患病状态可增加大气颗粒物相关的心血管疾病入院率及死亡率^[42,43]、血管内皮功能损伤敏感性^[44]. 本研究利用前瞻性人群定组研究同时分析糖尿病前期及健康对照人群的生理状态改变, 可填补此类研究的空白.

糖尿病前期及健康人群对大气污染物暴露的损

伤差异可能表现在如下3个方面。(i) 基于颗粒物暴露引发呼吸系统及心血管系统损伤的动物实验研究证据, 两组人群效应差异可体现于特定机制通路及靶器官。例如, 高脂饮食小鼠(*Mus musculus*)相对于健康饮食小鼠, 在颗粒物PM_{2.5}暴露后更易发展为动脉粥样硬化^[45]。基于糖尿病兔活体的肺巨噬细胞研究提示心血管代谢疾病可加剧呼吸系统炎症^[46]。本研究组之前的人群定组研究结果也指出, II型糖尿病患者的呼出气一氧化氮水平显著高于糖尿病前期人群^[20]。(ii) 糖尿病前期与健康对照人群对不同粒径及组分的颗粒物暴露的响应也可能存在差异。相对而言, 粒径更小的颗粒物在大气中的数浓度高、更易在气道沉积, 且具备更大的比表面积活性, 因而更易吸附多种毒性有机化合物^[47]。研究表明, 包括持久性有机污染物在内的多种有机物会加剧II型糖尿病进程^[48]。(iii) 两组人群的污染物累积效应可能存在差异。糖尿病前期人群在血糖代谢能力及血管内皮功能方面均呈现出早期损伤, 血管通透性以及血糖代谢功能发生改变。上述病生理特征可能加强大气污染物暴露后的损伤, 表现为强度更高、出现时间更早、持续时间更长的损伤效应。以上的潜在差异在研究设计初期即进行了充分考虑, 将在后续分析中进行验证。

SCOPE研究具有如下优势:(i) 利用前瞻性人群研究设计探索大气污染物暴露与心血管代谢系统疾病关联;(ii) 通过比较两组人群对污染物暴露的响应强度, 探索心血管代谢异常状态是否会加剧对大气污染物的易感性;(iii) 通过测量多种功能性、细胞及分子水平的健康终点, 评价呼吸系统及心血管系统状态

的动态变化, 为进一步探索糖尿病进程及易感性的机制通路提供支持;(iv) 对包括不同粒径及化学组分的颗粒物在内的多种大气污染物浓度进行详细分析, 识别其中的关键毒性污染物种;(v) 采用个体采样仪器对颗粒物浓度及其中过渡金属元素及碳质化学组分进行精细测量, 提高暴露评估准确性;(vi) 利用代谢组学方法建立生物标志物矩阵, 全面评估受试对象的暴露及病生理状态, 为探索新的生物标志物及揭示新的生物机制提供了可能。

本研究在以下3个方面尚有不足。(i) 个体暴露评估在暴露时长方面存在局限。由于佩戴个体采样器对于受试者存在一定负担, 本研究仅采集随访前一日颗粒物滤膜。为弥补以上不足, 本研究详尽分析了颗粒物中的化学组分, 并通过固定站点的长期观测获得大气污染物累积暴露数据。(ii) 受试者年龄为50~65岁, 且为相对高收入人群。因此本研究对于年龄高于65岁及相对低收入人群的外推性有限, 而该人群可能对大气污染物暴露更加易感。(iii) 本研究对包括颗粒物理化组分在内的多种大气污染物进行了全面观测, 因而基于可行性, 本研究环境观测周期相对较短, 主要关注污染物暴露2周内的急性效应。定组研究主要用于探索污染物暴露的急性损伤, 因此在识别大气污染物长期暴露对糖尿病等慢性心血管代谢疾病的状态变化存在一定局限。因此在本研究基础上, 开展大气污染物长期暴露对II型糖尿病进程影响的研究十分必要。最后, 尽管与传统定组研究相比, 本研究的样本量相对较大, 但对于识别特定生物标志物响应的统计检验效力可能存在不足。

致谢 感谢北京大学医院的工作人员协助完成项目。

参考文献

- 1 Yang G, Wang Y, Zeng Y, et al. Rapid health transition in China, 1990–2010: findings from the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*, 2013, 381: 1987–2015
- 2 Liu J, Han Y, Tang X, et al. Estimating adult mortality attributable to PM_{2.5} exposure in China with assimilated PM_{2.5} concentrations based on a ground monitoring network. *Sci Total Environ*, 2016, 568: 1253–1262
- 3 Xu Y, Wang L, He J, et al. Prevalence and control of diabetes in Chinese adults. *JAMA*, 2013, 310: 948–958
- 4 Bragg F, Holmes M V, Iona A, et al. Association between diabetes and cause-specific mortality in rural and urban areas of China. *JAMA*, 2017, 317: 280–289
- 5 Pearson J F, Bachireddy C, Shyamprasad S, et al. Association between fine particulate matter and diabetes prevalence in the U.S.. *Diabetes Care*,

- 2010, 33: 2196–2201
- 6 Krämer U, Herder C, Sugiri D, et al. Traffic-related air pollution and incident type 2 diabetes: results from the SALIA cohort study. *Environ Health Perspect*, 2010, 118: 1273–1279
 - 7 Coogan P F, White L F, Jerrett M, et al. Air pollution and incidence of hypertension and diabetes mellitus in black women living in Los Angeles. *Circulation*, 2012, 125: 767–772
 - 8 Chen H, Burnett R T, Kwong J C, et al. Risk of incident diabetes in relation to long-term exposure to fine particulate matter in Ontario, Canada. *Environ Health Perspect*, 2013, 121: 804–810
 - 9 Brook R D, Xu X, Bard R L, et al. Reduced metabolic insulin sensitivity following sub-acute exposures to low levels of ambient fine particulate matter air pollution. *Sci Total Environ*, 2013, 448: 66–71
 - 10 O'Neill M S, Veves A, Sarnat J A, et al. Air pollution and inflammation in type 2 diabetes: a mechanism for susceptibility. *Occup Environ Med*, 2007, 64: 373–379
 - 11 Chuang K J, Yan Y H, Cheng T J. Effect of air pollution on blood pressure, blood lipids, and blood sugar: a population-based approach. *J Occupat Environ Med*, 2010, 52: 258–262
 - 12 Chuang K J, Yan Y H, Chiu S Y, et al. Long-term air pollution exposure and risk factors for cardiovascular diseases among the elderly in Taiwan. *Occupat Environ Med*, 2011, 68: 64–68
 - 13 Kelishadi R, Mirghaffari N, Poursafa P, et al. Lifestyle and environmental factors associated with inflammation, oxidative stress and insulin resistance in children. *Atherosclerosis*, 2009, 203: 311–319
 - 14 Kim J H, Hong Y C. GSTM1, GSTT1, and GSTP1 polymorphisms and associations between air pollutants and markers of insulin resistance in elderly Koreans. *Environ Health Perspect*, 2012, 120: 1378–1384
 - 15 Schneider A, Neas L, Herbst M C, et al. Endothelial dysfunction: associations with exposure to ambient fine particles in diabetic individuals. *Environ Health Perspect*, 2008, 116: 1666–1674
 - 16 Yeatts K, Svendsen E, Creason J, et al. Coarse particulate matter (PM_{2.5-10}) affects heart rate variability, blood lipids, and circulating eosinophils in adults with asthma. *Environ Health Perspect*, 2007, 115: 709–714
 - 17 Brook R D, Sun Z, Brook J R, et al. Extreme air pollution conditions adversely affect blood pressure and insulin resistancenovelty and significance. *Hypertension*, 2016, 67: 77–85
 - 18 Sun Z, Mukherjee B, Brook R D, et al. Air-Pollution and Cardiometabolic Diseases (AIRCMD): a prospective study investigating the impact of air pollution exposure and propensity for type II diabetes. *Sci Total Environ*, 2013, 448: 72–78
 - 19 Zhao X, Sun Z, Ruan Y, et al. Personal black carbon exposure influences ambulatory blood pressure novelty and significance. *Hypertension*, 2014, 63: 871–877
 - 20 Han Y, Zhu T, Guan T, et al. Association between size-segregated particles in ambient air and acute respiratory inflammation. *Sci Total Environ*, 2016, 565: 412–419
 - 21 Lin W, Huang W, Zhu T, et al. Acute respiratory inflammation in children and black carbon in ambient air before and during the 2008 Beijing Olympics. *Environ Health Perspect*, 2011, 119: 1507–1512
 - 22 Lin W, Zhu T, Xue T, et al. Association between changes in exposure to air pollution and biomarkers of oxidative stress in children before and during the Beijing Olympics. *Am J Epidemiol*, 2015, 181: 575–583
 - 23 Sun Y, Song X, Han Y, et al. Size-fractioned ultrafine particles and black carbon associated with autonomic dysfunction in subjects with diabetes or impaired glucose tolerance in Shanghai, China. *Part Fibre Toxicol*, 2015, 12: 8
 - 24 Gong J, Zhu T, Kipen H, et al. Comparisons of ultrafine and fine particles in their associations with biomarkers reflecting physiological pathways. *Environ Sci Technol*, 2014, 48: 5264–5273
 - 25 Rich D Q, Kipen H M, Huang W, et al. Association between changes in air pollution levels during the Beijing Olympics and biomarkers of inflammation and thrombosis in healthy young adults. *JAMA*, 2012, 307: 2068–2078
 - 26 Yin P Y, Lehmann R, Xu G W. Effects of pre-analytical processes on blood samples used in metabolomics studies. *Analyt Bioanalyt Chem*, 2015, 407: 4879–4892
 - 27 Brook R D, Rajagopalan S, Pope C A, et al. Particulate matter air pollution and cardiovascular disease: an update to the scientific statement from the american heart association. *Circulation*, 2010, 121: 2331–2378
 - 28 Guo S, Hu M, Zamora M L, et al. Elucidating severe urban haze formation in China. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111: 17373–17378
 - 29 Lin Y, Ma Y, Qiu X, et al. Sources, transformation, and health implications of PAHs and their nitrated, hydroxylated, and oxygenated derivatives in PM_{2.5} in Beijing. *J Geophys Res Atmos*, 2015, 120: 7219–7228
 - 30 Weber T, Auer J, O'Rourke M F, et al. Arterial stiffness, wave reflections, and the risk of coronary artery disease. *Circulation*, 2004, 109: 184–189

- 31 Chemla D, Nitenberg A, Teboul J L, et al. Subendocardial viability ratio estimated by arterial tonometry: a critical evaluation in elderly hypertensive patients with increased aortic stiffness. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2008, 35: 909–915
- 32 Hamburg N M, Keyes M J, Larson M G, et al. Cross-sectional relations of digital vascular function to cardiovascular risk factors in the framingham heart study. *Circulation*, 2008, 117: 2467–2474
- 33 Gandhi P G, Rao G H. The spectral analysis of photoplethysmography to evaluate an independent cardiovascular risk factor. *Int J Gen Med*, 2014, 7: 539–547
- 34 Barraza-Villarreal A, Sunyer J, Hernandez-Cadena L, et al. Air pollution, airway inflammation, and lung function in a cohort study of mexico city schoolchildren. *Environ Health Perspect*, 2008, 116: 832–838
- 35 Vaughan J, Ngamtrakulpanit L, Pajewski T N, et al. Exhaled breath condensate pH is a robust and reproducible assay of airway acidity. *Eur Respir J*, 2003, 22: 889–894
- 36 Calderon-Garciduenas L, Cross J V, Franco-Lira M, et al. Brain immune interactions and air pollution: macrophage inhibitory factor (MIF), prion cellular protein (PrP(C)), Interleukin-6 (IL-6), interleukin 1 receptor antagonist (IL-1Ra), and interleukin-2 (IL-2) in cerebrospinal fluid and MIF in serum differentiate urban children exposed to severe vs. low air pollution. *Front Neurosci*, 2013, 7: 183
- 37 Ouyang Y, Virasch N, Hao P, et al. Suppression of human IL-1 β , IL-2, IFN- γ , and TNF- α production by cigarette smoke extracts. *J Allergy Clin Immunol*, 2000, 106: 280–287
- 38 Li R, Qiu X, Xu F, et al. Macrophage-mediated effects of airborne fine particulate matter (PM_{2.5}) on hepatocyte insulin resistance *in vitro*. *ACS Omega*, 2016, 1: 736–743
- 39 Suzuki H, Sasaki T, Kumagai T, et al. Malondialdehyde-modified low density lipoprotein (MDA-LDL)-induced cell growth was suppressed by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *J Toxicol Sci*, 2010, 35: 137–147
- 40 Wu L L, Chiou C C, Chang P Y, et al. Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetes. *Clin Chim Acta*, 2004, 339: 1–9
- 41 Dunn W B, Broadhurst D, Begley P, et al. Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nat Protoc*, 2011, 6: 1060–1083
- 42 Goldberg M S, Burnett R T, Yale J F, et al. Associations between ambient air pollution and daily mortality among persons with diabetes and cardiovascular disease. *Environ Res*, 2006, 100: 255–267
- 43 Zanobetti A, Schwartz J. Cardiovascular damage by airborne particles: are diabetics more susceptible? *Epidemiology*, 2002, 13: 588–592
- 44 O'Neill M S, Veves A, Zanobetti A, et al. Diabetes enhances vulnerability to particulate air pollution-associated impairment in vascular reactivity and endothelial function. *Circulation*, 2005, 111: 2913–2920
- 45 Sun Q, Wang A, Jin X, et al. Long-term air pollution exposure and acceleration of atherosclerosis and vascular inflammation in an animal model. *JAMA*, 2005, 294: 3003–3010
- 46 Mo Y, Wan R, Wang J, et al. Diabetes is associated with increased sensitivity of alveolar macrophages to urban particulate matter exposure. *Toxicology*, 2009, 262: 130–137
- 47 Oberdorster G, Oberdorster E, Oberdorster J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect*, 2005, 113: 823–839
- 48 Rignell-Hydbom A, Lidfeldt J, Kiviranta H, et al. Exposure to p,p'-DDE: a risk factor for type 2 diabetes. *PLoS ONE*, 2009, 4: e7503