

國立臺灣大學公共衛生學院

職業醫學與工業衛生研究所

碩士論文

Institute of Occupational Medicine and Industrial Hygiene

College of Public Health

National Taiwan University

Master thesis

大氣微粒對心肌受損大鼠之心血管毒性研究

- 1、氣管灌注大氣微粒對心肌受損大鼠之左心室功能研究
- 2、亞慢性呼吸暴露大氣微粒對心肌受損大鼠之心血管效應

**Cardiovascular Toxicity of Ambient Particles in Rats with  
Myocardial Injury**

- 1、Effects of ambient particles on left ventricular function in rats with myocardial injury
- 2、Effects of subchronic exposure to concentrated ambient particles on cardiovascular toxicity in rats with myocardial injury

李偉量

Li, Wei-Liang

指導教授：鄭尊仁 博士

Cheng, Tsun-Jen, MD, Sc.D.

中華民國九十七年七月 July, 2008

## 致謝

感謝天公伯，讓我看似跌跌撞撞卻又順利的走到這一步，自認不是個優秀的學生，但指導教授鄭尊仁老師總是不厭其煩的帶領我、指導我做學問的方法，更重要的是，對事物保持熱誠與積極進取的態度，這些都是我所敬仰且需要學習的。相信未來不管遇到甚麼樣的挑戰，都會受用無窮。感謝口試委員王鵬堯老師、陳文鍾醫師、翁祖輝老師以及簡國龍老師，你們專業的指導與建議，讓我的碩士論文更加完善，更重要的是，讓我的心臟變大顆了！

兩年，很長也很短；長的是實驗發生問題不知道該如何解決的時光、報告時被定在台上不知道該做何反應的窘境、書寫論文時文不思泉不湧的困挫(比便秘還痛苦)；短的是與同學、學長姐、學弟妹以及助理群相處的快樂時光。感謝實驗室的于芳跟小梅，謝謝妳們這麼罩我；戰友子威與妙娟，一同抵禦外敵浴血奮戰的感覺真的很棒；偽後進萌萌與熊咕，無論實驗或生活上都感謝你們了；感謝助理哲雯、蓉燕和虹如，實驗遇到瓶頸、行政遇到問題、出去玩找不到民宿，找妳們就對啦；最後，還有學長群校奇、元鴻與凱任，最後關鍵時刻多虧你們的提點，感恩！感恩！

生命中的貴人，特別感謝急診醫學部的黃建華醫師在超音波技術上的指導。95級同學感謝你們的支持與打氣。好兄弟啾文、鍾孟欽、游輝聖、老爹、狗耕等巴拉巴拉，與你們在一起總是讓我放鬆。

感謝我的家人和張舒舒，因為有你們的扶持與陪伴，我才能一直走下去。人生總是有苦有樂，痛苦過後嚐到的果實總是特別的甘甜，我永遠不會忘記口試完後心裡的悸動與滿足，在我未來的人生，都會是最最美好的回憶與留念。

## 目錄

致謝 .....	I
目錄 .....	II
表目錄.....	IV
圖目錄.....	V
摘要 .....	1
Abstract.....	2
一、研究目的 .....	4
二、文獻探討 .....	5
2-1 微粒流行病學研究.....	5
2-2 粒狀空氣污染物的心血管健康效應.....	6
2-3 微粒易感受性族群.....	6
2-4 心臟衰竭.....	6
2-5 心臟衰竭之病生理.....	7
2-6 微粒導致心衰竭之流行病學與毒理學研究.....	7
2-7 急性心肌梗塞與微粒空氣汙染.....	8
2-8 濃縮大氣微粒的健康相關研究.....	9
2-9 氣管灌注與呼吸暴露方式比較.....	10
2-10 細粒徑微粒濃縮器.....	10
2-11 心臟衰竭疾病動物模式.....	11
2-12 心臟衰竭及心肌損傷評估指標.....	12
2-12-1 心臟超音波.....	12
2-12-2 Brain Natriuretic Peptide, BNP.....	12
2-12-3 Troponin.....	13
三、氣管灌注大氣微粒對心肌受損大鼠之左心室功能研究.....	14
3-1 摘要.....	15
3-2 背景.....	16
3-3 材料與方法.....	17
3-3-1 實驗動物.....	17
3-3-2 微粒蒐集與製備.....	17
3-3-3 實驗流程.....	18
3-3-4 氣管內灌注(Intratracheal Installation, IT)暴露模式.....	18
3-3-5 心臟超音波.....	18
3-3-6 統計分析.....	19
3-4 結果.....	20
3-4-1 實驗動物基本特性及心臟肥大程度.....	20
3-4-2 微粒急性效應.....	20

3-4-3 微粒慢性效應 .....	20
3-5 討論 .....	22
3-6 結論與建議 .....	25
3-7 表格與圖片 .....	26
<b>四、亞慢性呼吸暴露大氣微粒對心肌受損大鼠之心血管效應 .....</b>	<b>34</b>
4-1 摘要 .....	35
4-2 背景 .....	36
4-3 材料與方法 .....	37
4-3-1 UFPC 細粒徑微粒濃縮器 .....	37
4-3-2 全身暴露系統 (Whole-Body Exposure System) .....	37
4-3-3 實驗流程 .....	38
4-3-4 BNP 與 Troponin 之測定 .....	38
4-3-5 統計分析方法 .....	38
4-4 結果 .....	39
4-4-1 UFPC 系統 .....	39
4-4-2 全身暴露系統 .....	39
4-4-3 實驗動物基本特性 .....	39
4-4-4 BNP .....	40
4-4-5 Troponin I .....	40
4-5 討論 .....	41
4-6 結論與建議 .....	45
4-7 表格與圖片 .....	46
<b>五、參考文獻 .....</b>	<b>56</b>

## 表目錄

### 三、氣管灌注大氣微粒對心肌受損大鼠之左心室功能研究

表 1、實驗動物基本特性.....	26
表 2、心臟肥大程度.....	26
表 3、左心室短縮分率(FS).....	27
表 4、左心室舒張末期內徑(LVDd).....	28

### 四、亞慢性呼吸暴露大氣微粒對心肌受損大鼠之心血管效應

表 1、操作條件與監測項目.....	46
表 2、實驗動物基本特性.....	47
表 3、血清中 BNP 濃度.....	47
表 4、血清中 cTnI 濃度.....	48



## 圖目錄

### 三、氣管灌注大氣微粒對心肌受損大鼠之左心室功能研究

圖 1、實驗架構與時間流程.....	29
圖 2、第一次 IT 前後之 FS 變化.....	30
圖 3、第二次 IT 前後之 FS 變化.....	30
圖 4、第一次 IT 前後之 LVDd 變化.....	31
圖 5、第二次 IT 前後之 LVDd 變化.....	31
圖 6、第一次 IT 前到第二次 IT 前之 FS 變化.....	32
圖 7、第一次 IT 前到第二次 IT 後之 FS 變化.....	32
圖 8、第一次 IT 前到第二次 IT 前之 LVDd 變化.....	33
圖 9、第一次 IT 前到第二次 IT 後之 LVDd 變化.....	33

### 四、亞慢性呼吸暴露大氣微粒對心肌受損大鼠之心血管效應

圖 1、氣流引進管線.....	49
圖 2-1、UFPC 系統架構.....	49
圖 2-2、細粒徑微粒濃縮器系統全貌.....	50
圖 3、粒子計數器 (CPC) .....	50
圖 4-1、全身性呼吸暴露腔.....	51
圖 4-2、全身性呼吸暴露腔.....	51
圖 5、實驗架構與流程.....	52
圖 6、UFPC 系統入口與出口數目濃度之相關.....	53
圖 7、實驗期間重量濃度逐日變化.....	53
圖 8、實驗期間濃縮倍率逐日變化.....	54
圖 9、血清中 BNP 濃度.....	55
圖 10、血清中 BNP 濃度之變化量.....	55

## 摘要

流行病學研究指出，大氣微粒會造成心臟衰竭住院率及死亡率的上升。但探討微粒與心臟衰竭相關性之毒理研究仍相當有限。因此本研究欲針對心室受損之大鼠暴露在大氣微粒的心臟毒性進行探討。

本研究可概分為兩大部分

第一部分：利用氣管灌注的方式，將注射 isoproterenol 後產生心肌損傷大鼠，分別在一周及八周後暴露大氣 PM<sub>2.5</sub> 微粒、PM<sub>10</sub> 微粒及生理食鹽水之控制組，以心臟超音波觀察其心臟的急性及慢性效應。研究結果未呈現一致性的微粒急性效應；此外，微粒的慢性效應在本研究中也未發現。但由於測量工具及研究設計部分之限制，暴露大氣微粒是否造成心肌受損大鼠心室功能下降之效應及其詳細機轉，仍待未來研究深入探討之。

第二部分：以細粒徑微粒濃縮器進行微粒的長期暴露，利用心肌損傷後大鼠亞慢性暴露大氣濃縮微粒的心臟毒性，並檢視該濃縮微粒系統長期使用之效能及穩定性。將注射 isoproterenol 後產生心肌損傷大鼠三天後進行全身性呼吸暴露，以吸入大氣濃縮微粒為暴露組，呼吸過濾空氣之實驗動物為對照組，進行為期一個月、每周四天，每天五小時的連續暴露，並分別在暴露前、暴露後兩周及四周後進行尾部靜脈採血測定心肌損傷及心臟衰竭程度。研究結果發現，大氣濃縮微粒暴露會使心臟衰竭功能指標 BNP 較慢恢復到穩定值，但心肌損傷指標 cTnI 卻無發現這樣的結論，顯示大氣微粒可能在急性暴露下會有毒性效應，但其詳細作用時間及機轉仍待未來研究進一步探討。

**關鍵字：**心臟衰竭，心肌損傷，超音波，BNP，Troponin I，大氣濃縮微粒，細粒徑微粒濃縮器

## Abstract

Numerous epidemiologic studies have shown that the mortality and hospital admissions of heart failure are associated with ambient particle. However, the toxicological researches on the relationship between ambient particle and heart failure are limited. Thus, we used an animal model of myocardial injury to investigate the cardiovascular toxicity of ambient particle.

Our study are composed of two major parts :

Part I : Rats were received 150 mg/kg isoproterenol by subcutaneous injection to induce myocardial injury. Then, rats were exposed to PM<sub>2.5</sub> 、PM<sub>10</sub> and saline by intratracheal instillation one and eight weeks after the injection of ISO. The acute and chronic cardiovascular effects were observed using echocardiography. The results showed that acute PM<sub>2.5</sub> exposure would lead to decreased LV function, but the similar effects were not observed in PM<sub>10</sub>. Further, we didn't observe chronic effect of particles. Because of limitations of echocardiography and study design, the exact relationship between ambient particle and heart failure need further study.

Part II : Ultrafine particle concentrator (UFPC) was used to conduct a subchronic exposure in rats administered with 150 mg/kg of isoproterenol by subcutaneous injection. Animals were exposed to concentrated ambient particles (CAPs) for 5-hr/day, 4-day/week for 4-weeks, and controls were exposed to filtered air (FA). BNP for left ventricular function status and cTnI for myocardial injury were measured before exposure, 2 and 4 weeks after exposure. Results of BNP concentration suggest that animals exposed to CAPs may return to normal level later than FA group. As to cTnI, PM didn't induce further myocardial injury at both CAPs and FA group. Our results suggest that CAPs may cause LV dysfunction shortly after myocardial injury.



**Key words** : Heart failure, Myocardial injury, Echocardiography, BNP, Troponin I, CAPs, UFPC



## 一、研究目的

大氣微粒的心血管毒性，在許多流行病學研究中均陸續被證實與死亡率和住院率的上升相關，罹患有糖尿病、粥狀動脈硬化、心律不整、腦血管疾病、血栓性栓塞疾病以及心臟衰竭之病人，易受到空氣中的微粒影響，而有較高的危險性；此外，隨年齡結構的老化，心臟衰竭之健康議題也日漸受到重視，流行病學研究也指出受到微粒會造成心臟衰竭病人的急診住院率及死亡率的上升，惟微粒與心臟衰竭的毒理研究仍相當有限，另外，微粒導致心血管毒性之機制也有許多尚待釐清之處，因此，我們選擇氣管灌注及全身性呼吸暴露兩種方式，將注射 isoproterenol 後大鼠暴露大氣微粒，利用心肌受損動物模式，探討大氣微粒對左心室功能的影響。

### 研究一

利用氣管灌注方式，探討大氣微粒中  $PM_{2.5}$  及  $PM_{10}$  的心血管急性與慢性效應，並檢視微粒的尺寸效應。



### 研究二

利用細粒徑微粒濃縮器濃縮大氣微粒，以全身呼吸暴露方式，亞慢性暴露大氣微粒探討微粒的慢性效應，並檢視細粒徑微粒濃縮器應用於長期毒理實驗之效用。

## 二、文獻探討

### 2-1 微粒流行病學研究

流行病學研究指出，大氣中細粒徑微粒濃度的增加會造成研究區域民眾總死亡率的上升，而主要的貢獻來自心臟血管及呼吸道疾病(Dockery et al., 1993; Samet et al., 2000; Pope et al., 2002; Ostro et al., 2006)，並造成呼吸道疾病及心臟血管疾病的住院率上升(Dominici et al., 2006)。而空氣污染中的細粒徑微粒(fine particle; PM<sub>2.5</sub>)是造成心肺血管疾病的主要環境因子(Weinhold., 2004)；就心臟血管疾病而言，微粒空氣污染暴露與心肌梗塞、心室纖維顫動、心跳增加、心跳變異性下降以及心律不整等心臟血管疾病有相關性存在(Dockery et al., 2001)。Dominici 等人將由美國國家醫療保險給付資料庫所得到之 1999~2002 年心臟血管與肺部疾病入院率，與美國環保署空氣品質系統資料庫之 PM<sub>2.5</sub> 資料作對照，發現同日中 PM<sub>2.5</sub> 濃度每上升 10 µg/m<sup>3</sup>，會增加 1.28% 心臟衰竭的入院率，而在包含心律不整、腦血管病變、缺血性心臟病、心臟衰竭及週邊血管病變等心臟血管疾病，以及慢性阻塞性肺炎與呼吸道感染等肺部疾病中，PM<sub>2.5</sub> 濃度增加都會造成其住院率的上升(Dominici et al., 2006)。Wong 等人指出當大氣中汙染物(NO<sub>2</sub>、O<sub>3</sub>、SO<sub>2</sub> 及 PM<sub>10-2.5</sub>)濃度上昇時，所有肺部疾病、心血管病、慢性肺阻塞以及心臟衰竭的住院率也跟著隨之上升(Wong et al., 2006)。此外，Pope 等人整理微粒相關流行病學研究結果指出當空氣中 PM<sub>2.5</sub> 濃度每增加 50 µg/m<sup>3</sup> 會增加 25% 的呼吸道疾病死亡，11% 的心血管疾病死亡，且微粒造成的額外死亡中心血管疾病的比例約為呼吸道疾病的二倍(Pope et al., 2002)。在台灣，類似的研究也顯現相同的結果，粒狀汙染物會造成心臟血管疾病死亡率及入院率的上升(Chang et al., 2005)；而由北方蒙古高原所來之沙塵暴更會造成因心肺疾病造成的死亡率與疾病率上升(Chen et al., 2004, 2005; Yang et al., 2005a,b)。

## 2-2 粒狀空氣污染物的心血管健康效應

美國心臟協會 (American Heart Association) 在 2004 年的 *Circulation* 期刊上發表了一篇有關空氣污染與心血管疾病的關係及其各種可能的機制：暴露於懸浮微粒會引起肺部的發炎反應，引致系統性發炎反應產生，然後導致氧化壓力增加、內皮功能失調以及白血球與血小板的活化，進而導致動脈硬化以及凝血功能的異常，甚至造成血栓的形成以心肌梗塞的發生。空氣微粒進入呼吸道後，可能刺激肺部產生反射作用 (pulmonary reflexes)，影響自主神經對心血管的控制，導致自主神經系統的衡定性失調，產生心跳血壓與心跳速率變異 (heart rate variability) 等變化 (Cheng et al., 2003; Chang et al., 2004, 2005)，經由對自主神經系統產生的刺激與抑制作用，其結果則可能造成心臟收縮能力異常以及致死性心律不整 (Brook et al., 2004)。

## 2-3 微粒易感受性族群

到目前為止，流行病學研究已顯示空氣懸浮微粒與心血管及呼吸道疾病有關，但實際上一般健康族群並不容易受影響，而本身有呼吸道、心血管疾病者或是老年人 (Cakmak et al., 2007) 則被認為是空氣懸浮微粒的易感受族群。患有心血管疾病的病人，特別是罹患糖尿病、粥狀動脈硬化、心律不整、腦血管疾病及血栓性栓塞疾病、以及心臟衰竭之病人，易受到空氣中的微粒影響，而有較高的危險性 (Hoek et al., 2001; Wellenius et al., 2006)。

## 2-4 心臟衰竭

心臟衰竭是臨床醫師在日常診療時常會碰到的課題。它的特徵是一組症狀與徵候，表示在心臟機能異常的狀態下，心臟壓出血液的速率不足以應付組織代謝所需要的量。根據美國心臟協會統計，從住院率來看，從 1999 到 2000 年，全美國約有三百四十萬人因心臟衰竭而進入急診就醫，而全世界則約有一千五百萬人

患有此症。以發生率而言，全美國約有四十萬病人被診斷為心臟衰竭，尤其是 65 歲以上的老人，因心臟血管機能退化、高血壓及血管硬化等，其發生率高達千分之十。同時本病往往是老人致死的原因，據估計，2002 年，美國有 286,700 人直接或間接死於心臟衰竭，這個數目還有越來越增加的趨勢，而心臟衰竭的發生率在任何種族、性別均隨年齡之增加而劇增，現在已是 65 歲以上老年人最常見的住院與死亡原因；而美國在 2007 年，與心臟衰竭直接或間接的關係而造成的花費，更高達 332 億美金 (Rosamond et al., 2007)。由於我國已邁入高齡化社會，心臟衰竭的病人也逐年增加，此問題也特別值得注意。

## 2-5 心臟衰竭之病生理

心臟衰竭常見的原因為高血壓、冠狀動脈疾病、心肌梗塞、瓣膜性心臟病、心肌炎及擴張性心肌症等。當心臟的功能不足以應付身體代謝需要時，就會出現心臟衰竭，程度輕微時，病人在休息時可能沒有症狀，但容易疲倦，而運動時會有輕度呼吸困難，有時有咳嗽及夜間呼吸困難等。但隨著心臟衰竭程度的增加，則上述症狀明顯加劇，且會四肢冰冷，更嚴重時會造成肺水腫，因而含有劇咳及泡沫狀痰，有時會含血絲。長期心臟衰竭會造成四肢水腫、肝脾腫大及腹水。此時身體會產生一連串的代償性變化，以便維持足夠的心輸出量 (cardiac output)。這些代償性變化包括 (1) 交感神經的興奮；(2) 腎素-血管張力素-留鹽激素 (Renin-Angiotensin-Aldosterone system; RAA 系統) 之激發；(3) 血管壓縮激素 (vasopressin) 之釋放；及(4)心房利鈉激素 (Atrial Natriuretic Factor; ANF) 之分泌。這些代償性活動會增加血液的容量，並增加全身性血管阻力，因而心臟衰竭的初期可以提高血壓並維持心輸出量；但若心臟衰竭的原因不能除去，最後會加重心臟衰竭的程度，成為一惡性循環。

## 2-6 微粒導致心臟衰竭之流行病學與毒理學研究

許多研究顯示，暴露微粒會造成鬱血性心臟衰竭 (congestive heart failure) 病

情的惡化: 1995 年 Schwartz 與 Morris 首先發表一篇報告, 指出在底特律,  $PM_{10-2.5}$  與一氧化碳均與心臟衰竭的入院率有顯著的相關 (Schwartz et al., 1995)。後來陸續有許多流行病學研究探討微粒與因心臟衰竭急診入院的相關性, 並發現顯著相關性的存在 (Burnett., 1999; Wong et al., 1999; Wellenius et al., 2005, 2006)。而罹患心臟衰竭的病人對於空氣污染物, 尤其是  $PM_{2.5}$ , 特別敏感 (Goldberg., 2001; Wellenius., 2005)。Wellenius 與 Schwartz 在 2006 年發表一篇關於  $PM_{10}$  與鬱血性心臟衰竭相關性之研究, 發現同一天中, 空氣中  $PM_{10}$  濃度每增加  $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ , 因鬱血性心臟衰竭而入院的比率會上升 0.72%。Kwon 等人在南韓首爾所做的一個世代研究調查顯示, 患有心臟衰竭病人在與一般族群的人相比較下, 發現環境中的  $PM_{10}$  濃度的每上升一個四分位差 ( $42.1 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ), 心臟衰竭病人的死亡率也會上升 5.8%, 且為一般人的 4.1 倍 (Kwon et al., 2000)。Symons 利用個案交叉對照研究法的方式, 比照因心臟衰竭入院的時間點與  $PM_{2.5}$  濃度的關係, 發現將  $PM_{2.5}$  暴露時間以八小時作分隔, 可以發現在  $PM_{2.5}$  濃度上升後的兩天, 因心臟衰竭惡化而住院的相對危險性為 1.09% (Symons et al., 2006)。在 2007 年, Zanobetti 與 Schwartz 針對心肌梗塞預後之病人與  $PM_{10}$  濃度進行分析, 發現每增加  $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$  的  $PM_{10}$  會導致 1.4 倍因心臟衰竭而入院的危險比 (Zanobetti et al., 2007)。但有許多同時針對一氧化碳 (CO) 與微粒作為暴露基準之研究卻指出心臟衰竭的健康效應與 CO 有相關性存在, 因此有關於微粒對心臟衰竭之影響更待進一步動物實驗探討。

## 2-7 急性心肌梗塞與微粒空氣污染

心肌梗塞 (Myocardial infarction, MI) 為心臟衰竭 (Heart Failure, HF) 的主要病因之一, 心肌梗塞後之患者有 9.4% 的機會會在醫院內死亡, 剩下的在經過 4~8 天後可以出院 (Rosamond et al., 2007), 流行病學研究指出, 根據 von Klot 等人在五個歐洲城市 (Augsburg, Germany; Barcelona, Spain; Helsinki, Finland; Rome, Italy; and Stockholm, Sweden), 從 1992 到 2000 年間蒐集 22,006 個因急性心肌梗塞入院,

而又康復出院的病人，進一步針對急性暴露空氣汙染物與心肌梗塞的再次入院率，探討兩者的相關性，研究結果發現空氣汙染物包含 PM<sub>10</sub>、CO、NO<sub>2</sub>、臭氧都會造成心肌梗塞病人再入院率的相對危險性顯著的上升 (von Klot et al., 2005)。而在慢性微粒暴露對急性心肌梗塞之後續健康情況發展相關研究尚屬有限，Zanobetti 與 Schwartz 將 1985 到 1999 年中 21 個美國城市因急性心肌梗塞入院而康復出院的個案共 196,000 人，將其個人層級之暴露資料與醫療資料庫資料結合，發現 PM<sub>10</sub> 每增加 10 μg/m<sup>3</sup>，會導致死亡率、再次 MI 入院及鬱血性心衰竭入院率分別增加 1.3 [95% CI, 1.2-1.5]、1.4 [95% CI, 1.1-1.8] 及 1.4 [95% CI, 1.2-1.7] 倍的 hazard ratio (Zanobetti et al., 2007)。以上研究指出無論慢性或長期的暴露 PM<sub>10</sub> 均會造成心肌梗塞後續的心臟毒性，然針對較小粒徑之 PM<sub>2.5</sub> 的流病相關研究相對缺乏，毒理學領域則尚未進行相關研究探討微粒對心肌梗塞後導致病人之效應，對照心臟衰竭與微粒之效應，流行病學指出 PM<sub>10</sub> 及 PM<sub>2.5</sub> 均會造成心臟衰竭的病情惡化而導致住院率的上升 (Burnett et al., 1999. Wong et al., 1999. Wellenius et al., 2005. Wellenius et al., 2006.)，綜合以上，急性心肌梗塞後長期暴露微粒是否會造成後續心臟功能下降及心肌的損傷甚至到嚴重的心臟衰竭，及其可能的機制，為本研究所關注的重點。

## 2-8 濃縮大氣微粒的健康相關研究

濃縮大氣微粒(Concentrated Ambient Particles, CAPs)的健康相關研究已經被廣泛應用人體及動物的毒理試驗上；在人體試驗方面，許多研究利用 CAPs 進行全身性暴露，發現暴露 CAPs 會造成肺部發炎反應 (Ghio et al., 2000)、系統性發炎反應 (Gong et al., 2003)、小呼吸道功能失調 (small airway dysfunction)及心跳變異性下降 (Gong et al., 2003; Devin et al., 2003)等健康效應。在動物毒理實驗部分，研究指出急性暴露 CAPs 會導致肺部及系統發炎反應上升 (Lei et al., 2004)、神經系統的損害 (Sirivelu et al., 2006)、肺部及心臟氧化壓力的上升 (Gurgueira et al., 2002)等健康

效應，在心血管毒性方面 CAPs 已被證實會導致心律不整 (Nadziejko et al., 2004)、心跳及血壓的改變 (Cheng et al., 2003; Chang et al., 2004)、心跳變異性的下降 (Chang et al., 2005) 以及心肌缺血惡化 (Wellenius., 2003) 等健康效應。以上研究均是應用在急性暴露 CAPs 的健康效應上，惟目前針對 CAPs 長期的健康效應之研究仍屬有限；Inhalation Toxicology 毒理期刊在 2005 年針對亞慢性(subchronic)暴露 CAPs 的健康效應出版一輯特別討論(special issue)，紐約大學利用 Sioutas 發展之 UFPC 系統，將健康小鼠(C57)及缺乏脂質處理蛋白(apolipoprotein E)而易產生粥狀動脈硬化的小鼠(ApoE<sup>-/-</sup>)進行為期六個月的全身性暴露，結果發現在 CAPs 的暴露會造成心跳、心跳變異性、動脈粥狀硬化程度、基因表現以及腦細胞分布等健康效應的改變。CAPs 的毒性在上述毒理研究中已有初步的討論，但針對急性心肌梗塞後之暴露仍未發現確切相關，因此本研究之研究方向乃致力於釐清急性心肌梗塞後亞慢性暴露 CAPs 微粒是否會產生負面的健康效應。

## 2-9 氣管灌注與呼吸暴露方式比較

微粒的毒理試驗，氣管灌注(intratracheal instillation)及呼吸暴露 (inhalation exposure) 都是學界經常使用的暴露模式。而兩種方法各有其優缺點，從劑量的角度出發，相較於呼吸暴露，氣管灌注更能確定實際暴露的劑量；實驗的方便性，氣管灌注模式之操作相對簡便；就模擬真實暴露來說，呼吸暴露模式較氣管灌注模式更貼近真實暴露情境，因此更能模擬人體暴露的情況；以暴露時程而言，氣管灌注模式由於其實驗方法較為侵入性，較之呼吸暴露而言較不具長期暴露的可用性。總的來說，短期微粒暴露實驗可以選擇技術門檻及成本較低之氣管灌注暴露模式；然針對長期暴露之毒理試驗，選擇貼近真實暴露情境之呼吸暴露方式。

## 2-10 細粒徑微粒濃縮器

使用虛擬衝擊法之細粒徑微粒濃縮器 (Ultrafine Particle Concentrator, UFPC)，是 Constantinos Sioutas 博士在 1994 年發展出來，Sioutas 博士更在 1998 年發展可



同時濃縮細粒徑與超細粒徑之微粒濃縮器，隨著研究的發展，許多學者也針對 UFPC 系統進行改善的研究，其中中央大學石宜鑫針對 UPFPC 的控制系統進行自動控制系統改良，以利後續相關毒理實驗之用(石, 2001)。

UFPC 之特色有：1、可同時濃縮超細微粒(ultrafine particles)及細微粒(fine particles)兩種微粒。2、濃縮粒子之倍率可依研究需求調整，該倍率端視主流與次流之比率而定，本研究預定採用之濃縮倍率其理論值為 11 倍，產生之濃縮流量約在 10 LPM 至 5 LPM 之間，可供一般粒子特性分析及動物實驗使用。3、常見之微粒濃縮器常需在氣流入口處加裝分徑器以去除較大粒徑之微粒( $>10\ \mu\text{m}$ )，然本系統因使用冷凝系統會造成較大粒徑之微粒在冷凝過程中因重力作用沉降而自動移除。4、此系統於濃縮出口處之壓力差僅為 0.01 大氣壓(亦即出口處之壓力為 0.99 atm)，此特性使該系統可不經壓力調整即可應用於動物實驗。5、由於微粒濃縮之原理是利用慣性分離之方式，因此只濃縮懸浮微粒，不會濃縮其他氣體。

## 2-11 心臟衰竭疾病動物模式

常用來發展心臟衰竭疾病動物模式的機制有心肌梗塞、高血壓、壓力超載 (pressure overload)、容積超載(volume overload)及毒性物質造成之心肌症 (Muders and Elsner, 2000)。

在毒理實驗上一種常見的動物模式係利用綁住冠狀動脈造成心肌缺血而後引致後續心臟衰竭之動物模式，但由於該方法需進行開胸手術，因此死亡率較高，再者，存活之實驗動物僅有約 40~50%的機率會發展出心臟衰竭的症狀 (Pfeffer et al., 1979);因此在心臟衰竭的動物模式選擇時，希望可以利用較不具侵入性之方式，isoproterenol (iso)為一種合成的兒茶粉胺(catecholamine)及 $\beta$ 腎上腺素興奮劑，當低劑量時可用以做為治療的藥物，但高劑量時會由於交感神經的刺激導致心肌收縮力及耗氧量的上升、鈣離子通道開啟心肌收縮力的提高、脂質氧化物生成以及凝血因子活化等作用引致心肌的損傷。

本實驗室之前研究指出，灌注 150 mg/kg iso 之大鼠在一周過後會造成其左心室功能的下降 (Yan et al., 2008)，而針對 iso 造成心肌損傷引致後續心臟衰竭之研究，Okuda 等人將 5 周大雄性 SD 大鼠連續兩天注射 150 mg/kg 的 iso，結果顯示三個月後之實驗動物有心肌肥大、肌纖維解體以及纖維化等與心臟衰竭中一致的現象 (Okuda et al., 2005)。Teerlink 等人將 Wistar 大鼠分別注射 0、85、170 或 340 mg/kg 之 iso，六周後發現心肌壞死程度、左心室壓力以及心室結構變大等均與劑量成正比。

許多研究均顯示 iso 可成功的誘導心肌損傷及後續心臟衰竭，的但針對 iso 注射後反應出心臟衰竭確切之劑量與時間並無一致性之研究，故本研究第一部分預計將注射 iso 後之大鼠分別於一周及八周時灌注微粒，檢視急性心肌損傷期及後續心臟衰竭時期微粒暴露的效應。

## 2-12 心臟衰竭及心肌損傷評估指標

### 2-12-1 心臟超音波

在臨床上常用來使用以當作測量心臟功能及構造以做為評估心臟衰竭程度的工具之一，其最大特點為其非侵入性，可有效持續監測左心室構造與功能，而由於科技的進步，高頻率探頭(probe)的使用可幫助心臟超音波應用至較小的動物上。心臟衰竭的定義為心臟壓出血液的速率不足以應付組織代謝所需要的量，在此定義的前提下，心臟超音波的利用可以幫助我們得到包括左心室尺寸、左心房尺寸及左心室收縮功能等參數用以診斷心臟衰竭的嚴重程度 (Sjaastad et al., 2000)，因此本研究選用左心室輸出分率 (Fraction Shortening, FS)及左心室舒張末期直徑 (Left Ventricular End Diastolic Diameter, LVDd)作以評量心臟衰竭之指標。

### 2-12-2 Brain Natriuretic Peptide, BNP

針對心臟衰竭程度評估指標，腦利納尿肽為臨床上常用來評估心臟功能的一個指標，當心室受到的壓力增加或受到神經體液的刺激時，心肌細胞會分泌出

由108個胺基酸所組成的BNP 的前驅物，經過特定的蛋白質酶作用分解成32個胺基酸組成的BNP 與76個胺基酸組成的N-terminal element, NT-proBNP (Hama et al., 1995)。BNP是生理上的活化胺基酸，會引起血管的舒張、利尿以及鈉的排出。許多研究報告指出BNP及N-terminal BNP與心血管疾病、左心室射出率 (LVEF)、紐約心臟協會分類 (NYHA class)以及心臟衰竭的預後有相關性存在 (De Lemos et al., 2003; Richards et al., 2003)，BNP作為評論心臟衰竭的指標，當把濃度標準訂於 100 pg/ml時的敏感度及特異度分別為 90%及 76%；將標準訂於 50 pg/ml，敏感度更高達 97%，特異度則為 62% (Maisel et al., 2002)。

### 2-12-3 Troponin

Troponin 為廣泛存在骨骼積極心肌中用以調節 actin 及 myosin 間交互作用的蛋白質，而在存在心肌中之 Troponin 其胺基酸序列與骨骼肌中有所差異，因此可利用免疫分析的方法，辨識出特定於心肌之 Troponin，而由於其優越的敏感性及特異性，因此被歐洲心臟協會 European Society of Cardiology (ECS)及美國心臟學會 American College of Cardiology (ACC)認為是診斷心肌壞死的黃金標準，Troponin 可分為三種，Troponin C (cTnC)、Troponin T (cTnT)、Troponin I(cTnI)，而 cTnI 及 cTnT 又被認為對於心肌較具特異性，研究報告指出 Troponin 可有效預測心肌梗塞壞死的程度及較差的預後 (Antman et al., 1996; Babuin et al., 2005)。

### 三、氣管灌注大氣微粒對心肌受損大鼠之左心室功能研究

## **Effects of ambient particles on left ventricular function in rats with myocardial injury**



### 3-1 摘要

流行病學研究指出，大氣微粒會造成心臟衰竭住院率及死亡率的上升。但相關的毒理研究並不多。因此我們利用氣管灌注的方式，將注射 isoproterenol 後預期產生心肌損傷大鼠，分別在靜置一周及八周後暴露大氣微粒，觀察其心臟的急性及慢性效應。

本實驗將大鼠注射劑量 150 mg/kg 的 isoproterenol 誘導心肌損傷，分別在靜置一星期及八星期後以氣管灌注方式，將實驗動物進行大氣微粒的暴露，本實驗分為三組，暴露 PM<sub>2.5</sub> 微粒、PM<sub>10</sub> 微粒及生理食鹽水之控制組。並在暴露前後 24 小時進行心臟超音波，測定其左心室尺寸 (LVDD)及左心室收縮功能 (FS)。

動物實驗結果顯示注射 isoproterenol 一周後之大鼠之 FS 在暴露 PM<sub>2.5</sub> 微粒組有顯著的下降；LVDD 則是無論是在灌注微粒或控制組均未發現暴露前後有顯著的差異，第二次暴露微粒前後，發現 FS 無顯著的變化，LVDD 則在暴露 PM<sub>2.5</sub> 微粒有顯著的改變。為檢視微粒的慢性效應，分別將第二次暴露前、後與第一次暴露前相比，第二次暴露前與第一次暴露前之比較，發現 PM<sub>2.5</sub> 及控制組之 FS 有顯著的下降，PM<sub>10</sub> 則無；LVDD 的變化量則是所有組別均有顯著的上升。第二次暴露後與第一次暴露前比較，PM<sub>2.5</sub> 與控制組之 FS 有顯著的下降，PM<sub>10</sub> 則無，不同組別之比較則無顯著不同；LVDD 的上升量在 PM<sub>2.5</sub> 與控制組中發現顯著，PM<sub>10</sub> 則無，在微粒效應的比較上並未呈現不同組別有不同的變化，本研究並未發現微粒的慢性效應。

本研究結果未呈現一致性的微粒急性效應；此外，微粒的慢性效應在本研究中也未發現。但由於測量工具及研究設計部分之限制，暴露大氣微粒是否造成心肌受損大鼠心室功能下降之效應及其詳細機轉，仍待未來研究深入探討之。

**關鍵字：**大氣微粒，氣管灌注，超音波，心臟衰竭，心肌梗塞

### 3-2 背景

流行病學研究指出，大氣中細粒徑微粒濃度的增加會造成研究區域民眾總死亡率的上升，而主要的貢獻來自心臟血管及呼吸道疾病(Dockery et al., 1993; Samet et al., 2000; Pope et al., 2002; Ostro B et al., 2006)，並造成呼吸道疾病及心臟血管疾病的住院率上升(Dominici F et al., 2006)。而空氣污染中的細粒徑微粒(fine particle;  $PM_{2.5}$ )是造成心肺血管疾病的主要環境因子(Weinhold B., 2004)。心臟衰竭之病人，易受到空氣中的微粒影響，而有較高的危險性(Hoek et al., 2001; Wellenius et al., 2006)。心臟衰竭是臨床醫師在日常診療時常會碰到的課題，從1999到2000年，而全世界則約有一千五百萬人患有此症。許多研究顯示，暴露微粒會造成鬱血性心臟衰竭(congestive heart failure)病情的惡化：1995年Schwartz與Morris首先發表一篇報告，指出在底特律， $PM_{10-2.5}$ 與一氧化碳均與心臟衰竭的入院率有顯著的相關(Schwartz et al., 1995)。後來陸續有許多流行病學研究探討微粒與因心臟衰竭急診入院的相關性，並發現顯著相關性的存在(Burnett., 1999; Wong et al., 1999; Wellenius et al., 2005, 2006)。而罹患心臟衰竭的病人對於空氣污染物，尤其是 $PM_{2.5}$ ，特別敏感(Goldberg., 2001; Wellenius., 2005)。毒理學實驗的部分，Yan等人將心肌梗塞後大鼠氣管灌注柴油引擎微粒，發現柴油引擎微粒會造成其心室收縮功能的下降(Yan et al., 2008)，但對於實際暴露大氣微粒之相關毒理實驗仍屬有限，因此本研究預定使用採自新莊超級測站之 $PM_{10}$ 及 $PM_{2.5}$ 微粒，進行氣管灌注探討大氣微粒對左心室異常大鼠之心臟毒性。超級測站位於台北縣立新莊運動公園，其介於交通要道之間，提供了大量交通污染的來源。因此測站的所在位置能充分反映出交通來源所形成的微粒污染狀況。

### 3-3 材料與方法

#### 3-3-1 實驗動物

本實驗使用購自於樂斯科生技公司之六週大雄性 Sprague Dawley rats (SD rats)，飼養於台灣大學實驗動物中心。本實驗通過台大醫學院暨公衛學院動物實驗管理小組審查，符合動物實驗倫理規範。

#### 3-3-2 微粒蒐集與製備

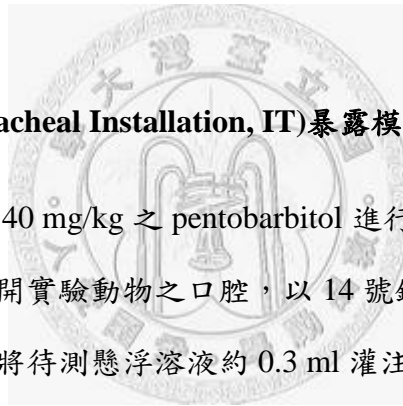
係使用由 Rupperecht & Patashnick 公司製造之質量濃度連續監測儀(R&P 1400a)，其採集與測量原理為採用「慣性質量法」原理，自動量測空氣中懸浮微粒的質量再加以換算成質量濃度。微粒隨氣流被採樣器收集，氣流通過一錐形原件 (tapered element)，而微粒被收集在錐形原件上所放置的 Teflon 濾紙上。其錐形原件即為質量轉換器，其質量轉換器是為一下端固定，上端是懸浮的錐形構造，懸浮的一端覆有 Teflon 濾紙，可自由的擺盪。此法適用於空氣中粒徑在 10 微米 ( $\mu\text{m}$ ) 以下之粒狀污染物 ( $\text{PM}_{10}$ ) 濃度之自動測定，其適用濃度範圍介於  $0 \sim 5 \times 10^6 \mu\text{g} / \text{m}^3$  ( $5 \text{ g} / \text{m}^3$ )。本實驗採用新莊超級測站 95 年 9~11 月及 96 年 2-4 月之  $\text{PM}_{10}$  及  $\text{PM}_{2.5}$  微粒，在實驗期間之  $\text{PM}_{2.5}$  微粒平均重量濃度為  $32.00 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、 $\text{PM}_{10}$  平均濃度為  $46.28 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ， $\text{PM}_{2.5}$  佔  $\text{PM}_{10}$  中之 68.54%。

本次實驗所使用之  $\text{PM}_{2.5}$  及  $\text{PM}_{10}$ ，劑量為  $800 \mu\text{g}/\text{kg}$  的實驗。氣管灌注前兩天，將微粒依照不同粒徑  $\text{PM}_{2.5}$ 、 $\text{PM}_{10}$ ，分別進行濾紙準備及調理，於防潮箱內調理 48 小時，進行秤重，再放入 50 mL 離心管懸浮於生理緩衝液中，超音波震盪 40 分鐘，取出濾紙，將懸浮液儲存於  $-20^\circ\text{C}$  冰箱備用，處理後之濾紙再進行調理 48 小時，進行秤重並計算濃度。於氣管灌注前分別配置成懸浮溶液(normal saline, containing Tween 80, 0.1%)。為了減少空氣污染微粒在懸浮溶液中凝結(aggregation)，在溶液配置及氣管灌注前，於超音波震盪器震盪 40 分鐘，並在 1 分鐘之內均勻混和，完

成進行氣管灌注。

### 3-3-3 實驗流程

由 isoproterenol 導致之心肌細胞受損，而誘使之左心室功能異常被認為可有效建立心臟衰竭之動物模式，本次實驗採用八週大之 SD 品系大鼠，以腹腔注射方式施打 150 mg/kg 之 isoproterenol，並在施打後靜置台大動物代養中心一週，待其發展為心臟衰竭後進行超音波測定，評估心臟衰竭之嚴重性。24 小時過後，進行第一次氣管灌注，分別給予生理食鹽水及濃度為 800  $\mu\text{g}/\text{kg}$  之  $\text{PM}_{2.5}$ 、 $\text{PM}_{10}$  微粒，並分別於 24 小時後進行超音波檢查。為評估重複暴露對心臟衰竭病人之影響，第一次氣管灌注過後七周，再進行第二次氣管灌注，並在暴露前後 24 小時分別進行超音波測定 (圖 1)。



### 3-3-4 氣管內灌注(Intratracheal Installation, IT)暴露模式

實驗動物以腹腔注射 40 mg/kg 之 pentobarbitol 進行麻醉，採仰角 60 度仰臥姿勢固定四肢。另以器械張開實驗動物之口腔，以 14 號鐵氟龍靜脈留置管裝於 1 cc 針筒，經由口腔伸入氣管將待測懸浮溶液約 0.3 ml 灌注進入。再以 5 cc 針筒灌氣數次，以求灌注物均勻抵達深部肺頁組織，並防止實驗動物因氣管阻塞窒息致死。移除灌注管後，將實驗動物至於溫暖烤燈下進行麻醉恢復。

### 3-3-5 心臟超音波

使用位於台大醫院急診醫學部之超音波儀器 (System V, GE, Chicago)，利用 M-mode 可知左心室收縮後期及舒張末期之心室的最大與最小範圍，由此可量左心室舒張及收縮直徑，心肌梗塞後之心臟會產生代償反應導致心臟的重塑 (remodeling)，使心室容積增大容納更多的血液量，而利用量測左心室腔室舒張末期之直徑可用以評估心臟衰竭之程度；並利用轉換可算得藉以評估左心室收縮功能。



$$\text{Fractional Shortening (\%)} = [(LVD - LVs) / LVD] \cdot 100$$

### 3-3-6 統計分析

所有數值均以平均值±標準差的形式呈現，比較同一組別前後變化 paired-T test 進行檢定，以 ANOVA test 檢定實驗組與控制組心臟功能與構造數值，並就不同濃度，進行統計分析。p-value<0.05 則視為統計上顯著意義。



### 3-4 結果

#### 3-4-1 實驗動物基本特性及心臟肥大程度

本實驗在二次 IT 過後進行實驗動物的犧牲，針對全心重量及左心室重量進行量秤，評估其心臟肥大程度。結果顯示，體重在第一次及第二次 IT，三個組別 PM<sub>10</sub>、PM<sub>2.5</sub> 及控制組中均無差異(表 1)。而全心重量不管有無校正體重，在三組中皆無統計上顯著意義。左心室重量在三組中有顯著的不同 (p value=0.043)，但在校正體重過後之左心室重量各組則無顯著差異(表 2)。顯示微粒並未造成體重、心臟重量及心室重量的效應。

#### 3-4-2 微粒急性效應

##### 左心室短縮分率(Fractional Shortening; FS)

如表 3 所示，藉由比較第一次 IT 前後及第二次 IT 前後的 FS，可以推論左心室功能受到微粒暴露的急性影響。比較第一次暴露微粒前後之心室短縮分率(FS)下降，結果顯示，PM<sub>2.5</sub> (p=0.015)之 FS 在第一次暴露微粒後 (1<sup>st</sup>-post) 顯著低於暴露前 (1<sup>st</sup>-pre) (圖 2)，PM<sub>10</sub> 及控制組之 FS 則未顯著低於暴露前。第二次暴露微粒前後 (圖 3)，各組均未發現顯著差異。

##### 左心室舒張末期內徑(Left Ventricle End Diastolic Diameter; LVDd)

如表 4 所示，兩次氣管灌注前後 24 小時分別進行超音波測量左心室舒張期內徑 (LVDd)，第一次暴露前後之各組，其前後比較均無統計上的增加 (圖 4)。灌注 PM<sub>2.5</sub> 微粒組，在第二次暴露前後其 LVDd 有顯著變化 (p=0.012)，其餘兩組則無發現類似結果 (圖 5)。

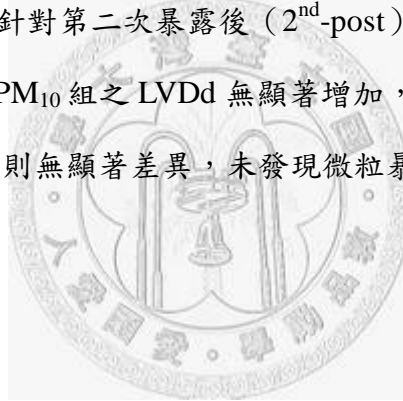
#### 3-4-3 微粒慢性效應

##### 左心室短縮分率(Fractional Shortening; FS)

如表 3 所示，在第一次 IT 過後，將實驗動物靜置七周，主要原因有二：一為靜待 Isoproterenol 誘使發展為較嚴重之心臟衰竭，二為檢視重覆暴露對心臟衰竭較嚴重之大鼠是否有較嚴重之效應存在。經過七周的靜置後，PM<sub>2.5</sub> 及控制組之 FS 較之第一次 IT 前有顯著的下降；PM<sub>10</sub> 則無明顯下降；比較組間之 FS 變化量，未發現微粒的效應（圖 6）。同樣的結果也在第二次暴露後與第一次暴露前之 FS 變化的比較中發現（圖 7）。

### 左心室舒張末期內徑(Left Ventricle End Diastolic Diameter; LVDD)

如表 4 所示，PM<sub>2.5</sub>、PM<sub>10</sub> 及控制組在第二次暴露前（2<sup>nd</sup>-pre）之 LVDD 皆顯著高於第一次暴露前（1<sup>st</sup>-pre）；但各組 LVDD 升高幅度並無顯著不同（圖 8）。為比較重覆暴露微粒效應，針對第二次暴露後（2<sup>nd</sup>-post）與第一次暴露前（1<sup>st</sup>-pre）之 LVDD 進行統計檢定，PM<sub>10</sub> 組之 LVDD 無顯著增加，PM<sub>2.5</sub> 與控制組均有明顯增加；三組之 LVDD 變化量則無顯著差異，未發現微粒暴露會造成左心室結構的變化（圖 9）。



### 3-5 討論

在本實驗中，為了檢視微粒的急性心血管效應，分別在暴露前後 24 小時進行超音波測定，我們僅發現第一次暴露 PM<sub>2.5</sub> 微粒組的功能性指標 FS 有顯著下降，第二次暴露前後各組之 FS 則均無顯著的變化；第一次暴露微粒前後，LVDd 不論是在暴露微粒或是生理食鹽水組均未發現顯著改變，第二次暴露後 PM<sub>2.5</sub> 之 LVDd 發現與第二次暴露前有顯著差異，故微粒的急性心臟效應在本研究中之 PM<sub>10</sub> 組未被發現，但 PM<sub>2.5</sub> 則存在急性效應，推論由於在心肌受損後心臟功能代償反應尚未回復至正常，此時微粒的暴露會導致較大的毒性。在微粒的慢性心血管效應方面，本研究在第一次氣管灌注後七周進行第二次微粒暴露，第二次暴露後測定之數值，可歸因下列三種因素：1、注射 isoproterenol 所誘使之心臟衰竭嚴重度。2、第一次微粒暴露慢性延遲效應。3、第二次微粒暴露急性效應。綜合以上效應，再利用控制組屏除疾病病程因素，即可視為暴露微粒之效應；將其與完全未暴露微粒前之 FS 及 LVDd 進行比較，在功能性指標 FS 上，第二次暴露前及暴露後之 FS 與第一次暴露前相比較，發現 PM<sub>2.5</sub> 及控制組由於注射 isoproterenol 故相較於第一次暴露前均有顯著下降，但 PM<sub>10</sub> 則未呈現顯著的下降，而比較各組間的變化量，則未發現明確之微粒毒性；LVDd 在第二次暴露前與第一次暴露前的變化量則在每組中均發現有顯著的上升，而各組間的變化量比較則無顯著差異，僅發現 isoproterenol 之效用，而非微粒的效應；本研究針對微粒之急性及慢性效應進行探討，但研究結果並未證實微粒的慢性效應，PM<sub>10</sub> 並未發現急性的效應，而 PM<sub>2.5</sub> 則在心肌受損初期會造成左心室收縮功能的下降，然本研究之研究設計與測量方法仍有需要進之處，因此更詳細之微粒對心臟衰竭之效應及其機轉，尚待後續研究進一步證實。

流行病學研究指出暴露 PM<sub>2.5</sub> 及 PM<sub>10</sub> 的微粒均會對心血管疾病造成急性及慢性的效應 (Dockery et al., 1993; Samet et al., 2000; Pope et al., 2002; Ostro B et al., 2006)，包括住院率和死亡率的上升，其中關於微粒對於心臟衰竭的影響也有研究

指出會導致其住院率 (Schwartz et al., 1995) 及死亡率 (Kwon et al., 2000) 的上升，而罹患心臟衰竭的病人對於空氣污染物，尤其是 PM<sub>2.5</sub>，特別敏感 (Goldberg., 2001; Wellenius., 2005)，這個論點在本研究中未發現 PM<sub>2.5</sub> 較之 PM<sub>10</sub> 有較明顯之效應存在。

本研究之 FS 在注射 isoproterenol 一周後時分別為 52.1 % - PM<sub>2.5</sub>、51.2% - PM<sub>10</sub> 及 51.6% - control，本實驗室其他的研究中發現注射 isoproterenol 一周後，FS 為 45.57% 及 41.85 (Yan et al., 2008)，本實驗之 FS 發現較以往之研究為高，顯示左心室收縮能力所受到的影響較 Yan 等人的發現為小，但比較健康大鼠之 FS 可發現本研究之大鼠左心室收縮能力下降程度雖未如之前研究大，但 isoproterenol 的效應仍然存在。而注射 isoproterenol 八周過後 FS 分別降低為 38.6 % - PM<sub>2.5</sub>、43.7% - PM<sub>10</sub> 及 38.8% - control，Sjaastad 等人研究指出，在心肌梗塞的大鼠其 FS 為 21 %、心臟衰竭大鼠則為 13 %，可推斷本研究之實驗動物在注射 isoproterenol 後之心肌受損未嚴重導致心臟衰竭之程度。

由於 LVDD 係屬於結構性的指標，左心室的重塑一般發生於較嚴重之疾病進程時，因此並未顯示急性效應。心臟衰竭為空氣污染之易感受族群，主要作用在病程較嚴重之病人上，因此在第一次氣管灌注後七周我們進行第二次微粒暴露，然而在第二次暴露後之左心室功能下降程度尚未至心臟衰竭之程度，雖然本研究未顯示微粒的心臟毒性，但無法以此作為微粒不存在心血管毒性之推論。

本研究之限制如下：1、本實驗暴露微粒方式選擇較易定量之氣管內灌注暴露模式，微粒之粒徑理論上經過超音波震盪後較不會有凝結現象，但惟與實際呼吸暴露仍有所不同。2、心臟功能之測定以超音波為主要評估指標，心臟超音波為臨床上廣泛使用評估心臟構造與功能之工具，LVFS 與心臟衰竭之嚴重程度成正相關，但其評估基準係屬個人主觀認定，因此尚須其他相關指標輔助評估心臟功能及嚴重程度。3、Isoproterenol 導致之心肌細胞受損而誘使之左心室功能異常被認為可

有效建立心臟衰竭之動物模式 (Teerlink, 1994)，惟大鼠對於該藥物之感受性存在個體間差異，導致 baseline 的不同，因此對於微粒的感受度也會有所不同。



### 3-6 結論與建議

本研究未發現確切之微粒心臟毒性，然本研究之諸多限制有待進一步改良以求進行更完善之毒理試驗之用，因此後續實驗建議改善重點如下。

1、暴露方式改進：接續實驗暴露方式預計使用 real-time 濃縮微粒以全身暴露方式模，以求貼近真實大氣微粒暴露情形。

2、微粒吸入為連續不間斷之暴露，因此未來將使用慢性微粒暴露方式，探討易感受族群慢性暴露微粒之心臟毒性。

3、Isoproterenol 誘發心肌壞死之心臟衰竭動物模式需重新檢視，本研究所使用之 150 mg/kg 劑量，可往上提升至 300 mg/kg 分兩天注射，以求建立更確立之心臟衰竭大鼠以供後續微粒毒理實驗之用。



### 3-7 表格與圖片

表 1、實驗動物基本特性

		Control (n=6)	PM <sub>2.5</sub> (n=7)	PM <sub>10</sub> (n=6)	p-value
BW	1 <sup>st</sup> , g	275 ± 26	329 ± 50	302 ± 43	0.096
	2 <sup>nd</sup> , g	447 ± 35	477 ± 80	420 ± 29	0.210

BW-1<sup>st</sup> 表示第一次 IT 時之體重

BW-2<sup>nd</sup> 表示第二次 IT 時之體重



表 2、心臟肥大程度

		Control (n=6)	PM <sub>2.5</sub> (n=7)	PM <sub>10</sub> (n=6)	p-value
HW-	Unadjust, mg	1461 ± 140	1584 ± 242	1324 ± 279	0.158
	Adjusted, mg/g	3.27 ± 0.25	3.36 ± 0.47	3.14 ± 0.54	0.686
LVW-	Unadjust, mg	1042 ± 100	1080 ± 168	880 ± 121	0.043 *
	Adjusted, mg/g	2.34 ± 0.20	2.28 ± 0.28	2.09 ± 0.22	0.206

HW 表示全心之重量

LVW 表示左心室之重量

Adjusted 表以體重校正

\* 表示以 ANOVA test 分析，比較組別間之差異， p-value<0.05



表 3. 左心室短縮分率(FS)

		Control, % (n=6)	PM <sub>2.5</sub> , % (n=7)	PM <sub>10</sub> , % (n=6)	p-value
1 <sup>st</sup> IT	Pre	51.6 ± 13.4	52.1 ± 4.1	51.2 ± 12.4	
	Post	46.5 ± 14.8	44.6 ± 7.5 *	49.9 ± 10.2	
2 <sup>nd</sup> IT	Pre	38.5 ± 8.0 **	40.7 ± 5.0 **	45.4 ± 11.8	
	Post	38.8 ± 8.3 **	38.6 ± 8.1 **	43.7 ± 8.2	
Chronic A	Diff	-13.04 ± 6.78	-11.39 ± 2.64	-5.83 ± 7.96	0.127
Chronic B	Diff	-12.76 ± 7.66	-13.55 ± 6.25	-7.47 ± 9.81	0.364

Chronic A 表示第二次 IT 前與第一次 IT 前之 FS 變化量

Chronic B 表示第二次 IT 後與第一次 IT 前之 FS 變化量

\* 表示以 paired T test 分析，相較於該組第一次 IT 前 p-value<0.05

\*\*表示以 paired T test 分析，相較於該組第一次 IT 前 p-value<0.01

組別間之 FS 變化量比較以 ANOVA test 分析之

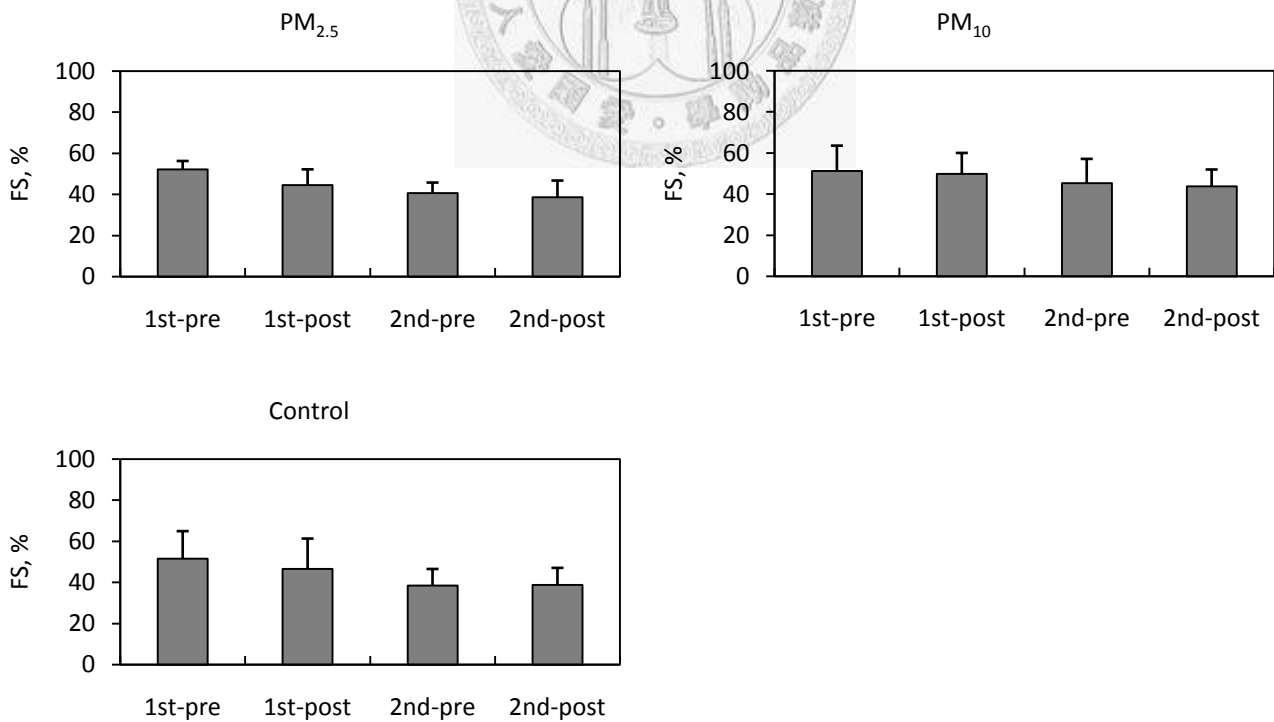


表 4、左心室舒張末期內徑(LVDd)

		Control, % (n=6)	PM <sub>2.5</sub> , % (n=7)	PM <sub>10</sub> , % (n=6)	p-value
1 <sup>st</sup> IT	Pre	6.37 ± 0.62	6.73 ± 0.65	6.39 ± 1.05	
	Post	6.53 ± 0.75	7.03 ± 0.91	5.98 ± 1.04	
2 <sup>nd</sup> IT	Pre	7.61 ± 0.70 **	7.86 ± 0.60 **	7.25 ± 0.77 **	
	Post	7.47 ± 0.44 ** †	7.37 ± 0.84 **	6.88 ± 0.62	
Chronic A	Diff	1.24 ± 0.51	1.14 ± 0.27	0.87 ± 0.44	0.292
Chronic B	Diff	1.10 ± 0.64	0.64 ± 0.37	0.49 ± 0.85	0.251

Chronic A 表示第二次 IT 前與第一次 IT 前之 LVDd 變化量

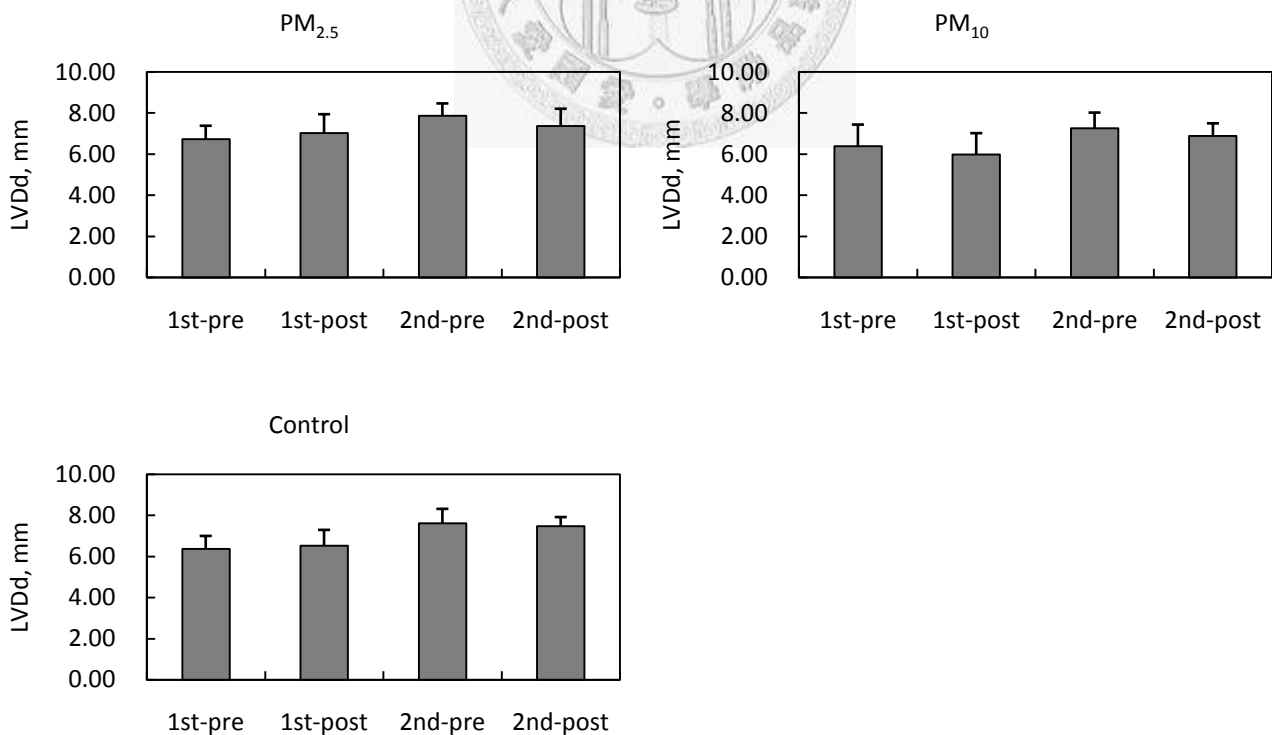
Chronic B 表示第二次 IT 後與第一次 IT 前之 LVDd 變化量

\* 表示以 paired T test 分析，相較於該組第一次 IT 前 p-value<0.05

\*\*表示以 paired T test 分析，相較於該組第一次 IT 前 p-value<0.01

† 表示以 paired T test 分析，相較於該組第二次 IT 前 p-value<0.05

組別間之 LVDd 變化量比較以 ANOVA test 分析之



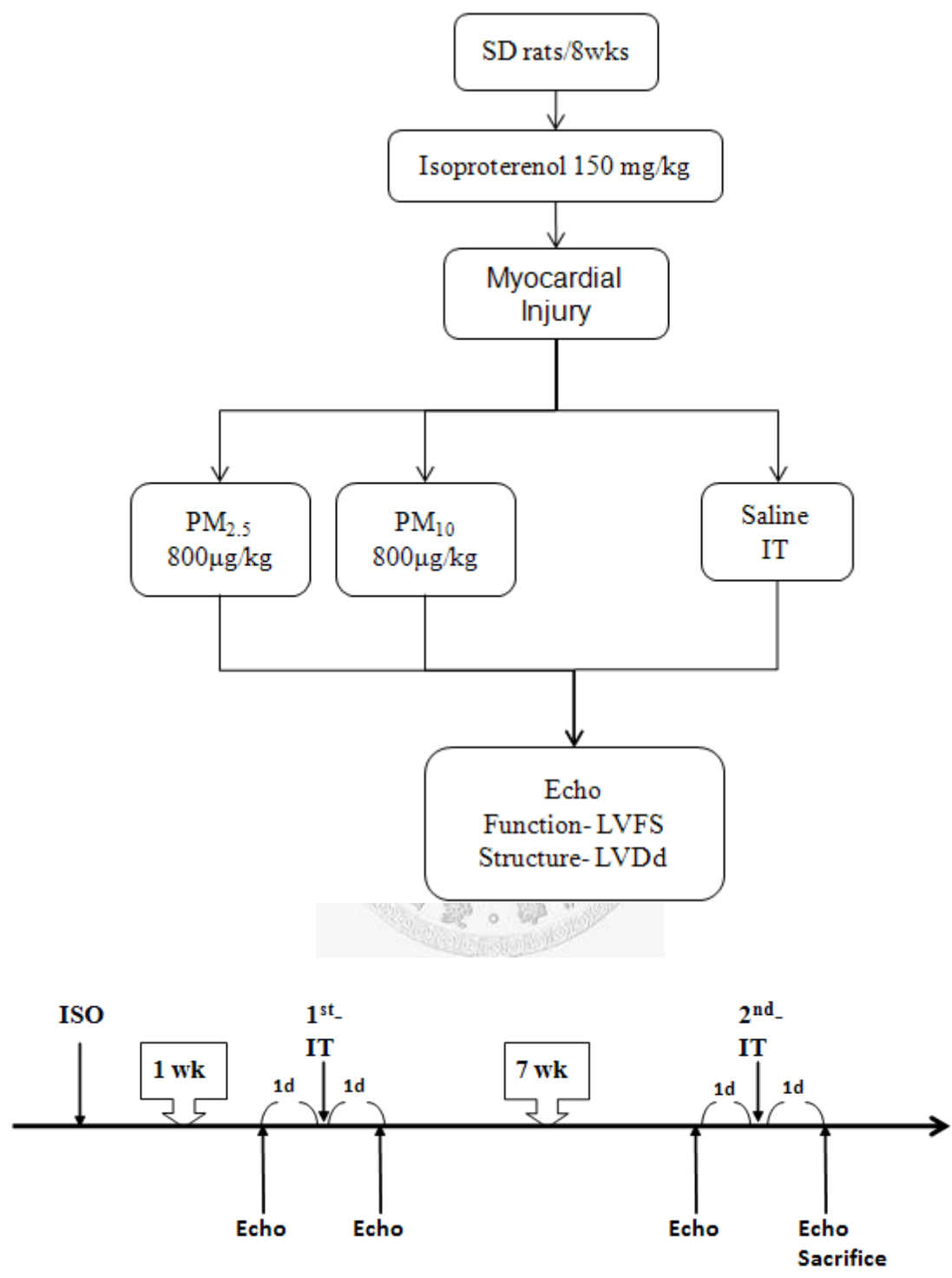


圖 1、實驗架構與時間流程

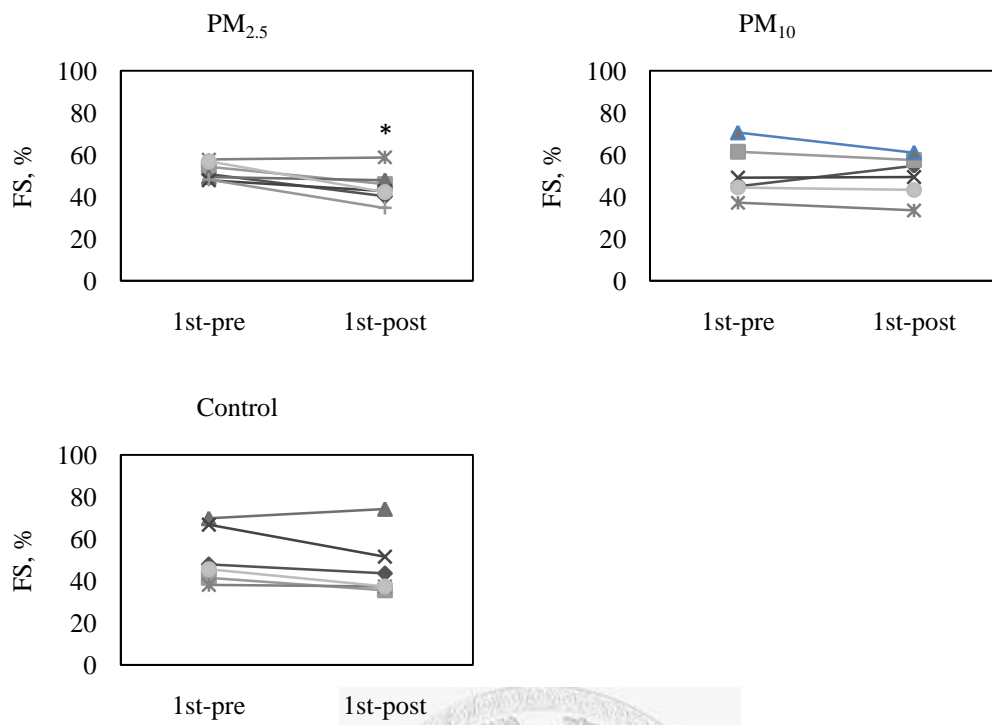


圖 2、第一次 IT 前後之 FS 變化

\* 表示以 paired t test 分析暴露前後，p value < 0.05

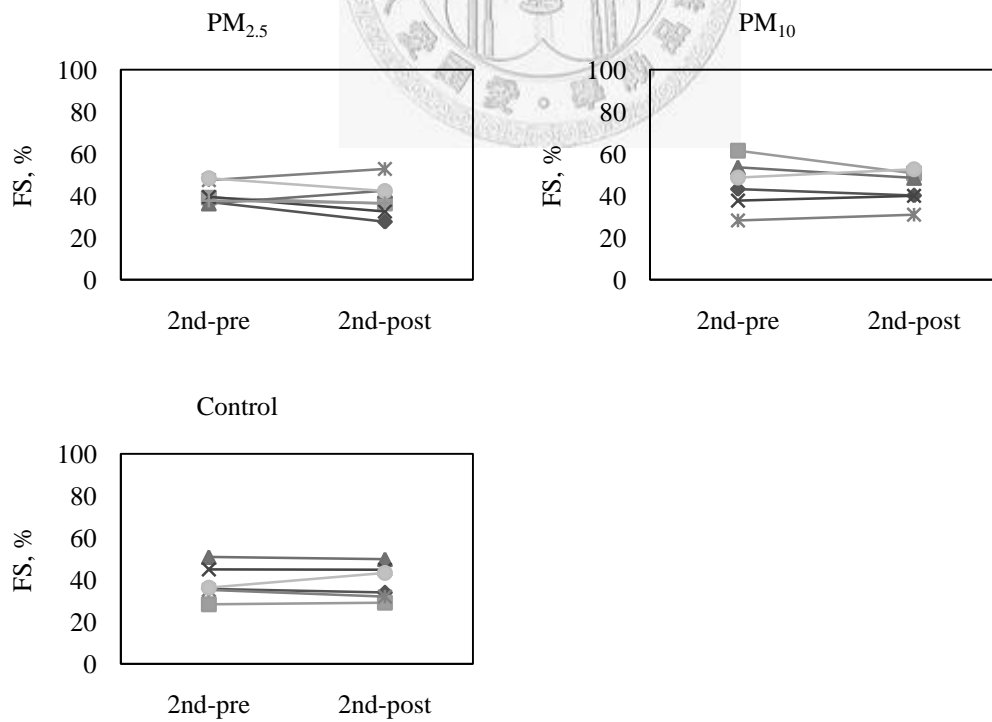


圖 3、第二次 IT 前後之 FS 變化

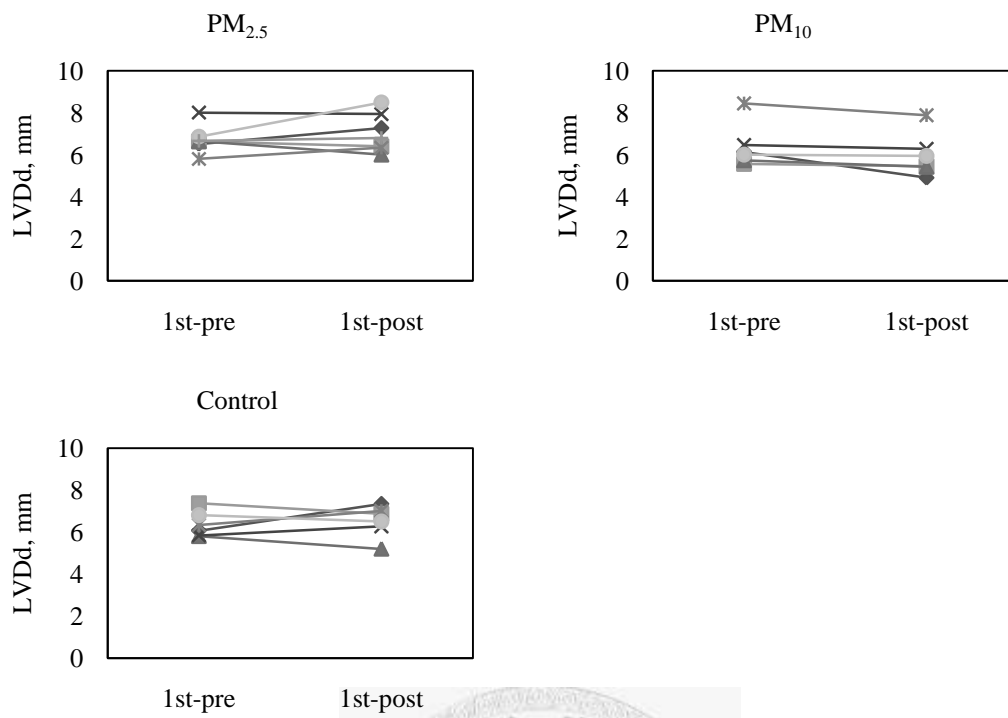


圖 4、第一次 IT 前後之 LVDd 變化

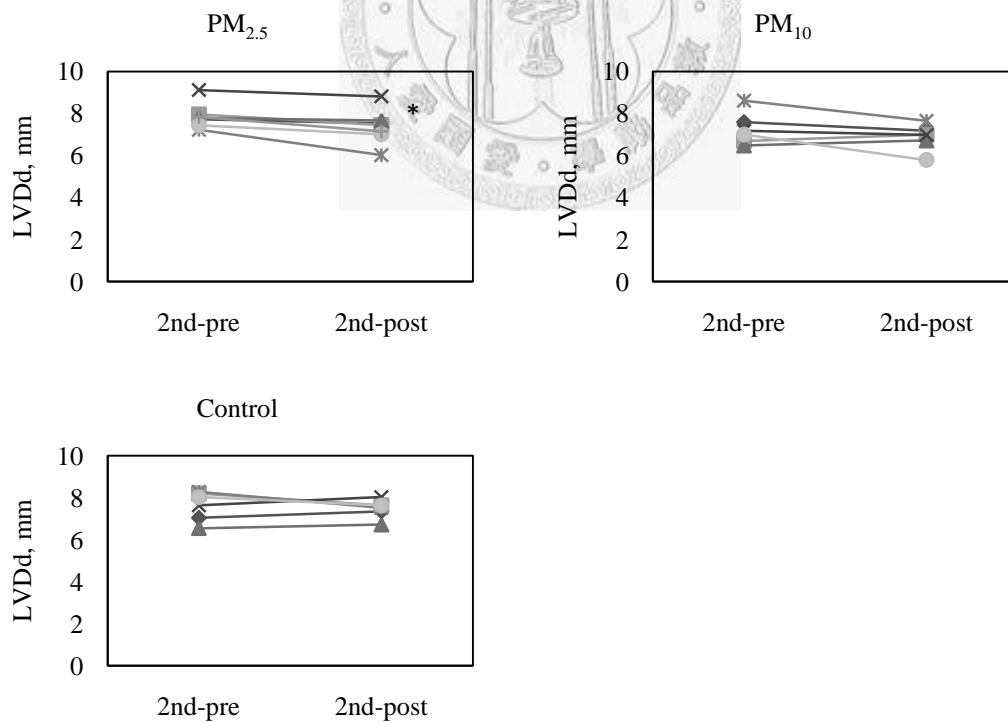


圖 5、第二次 IT 前後之 LVDd 變化

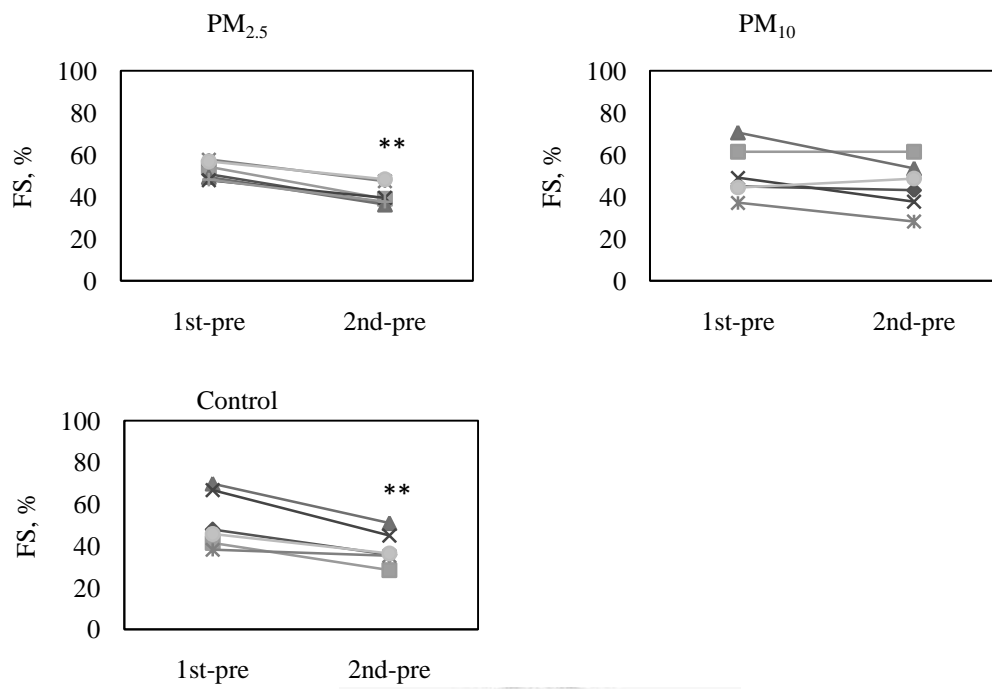


圖 6、第一次 IT 前到第二次 IT 前之 FS 變化

\*\*表示以 paired t test 分析第一次 IT 前到第二次 IT 前之 FS 變化量，p value < 0.01

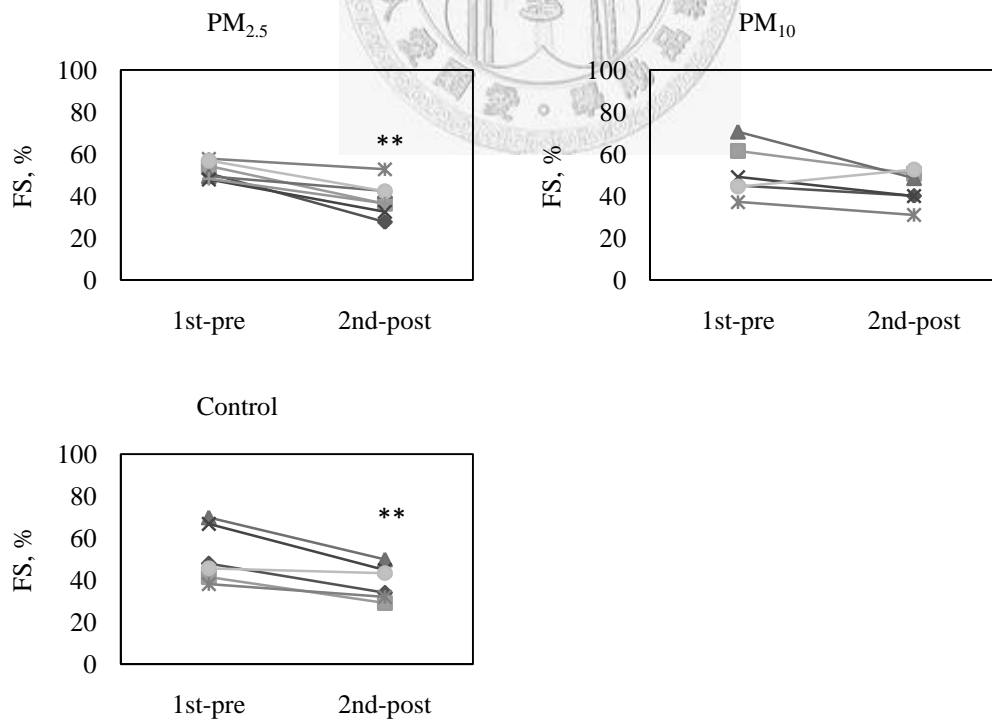


圖 7、第一次 IT 前到第二次 IT 後之 FS 變化

\*\*表示以 paired t test 分析第一次 IT 前到第二次 IT 後之 FS 變化量，p value < 0.01

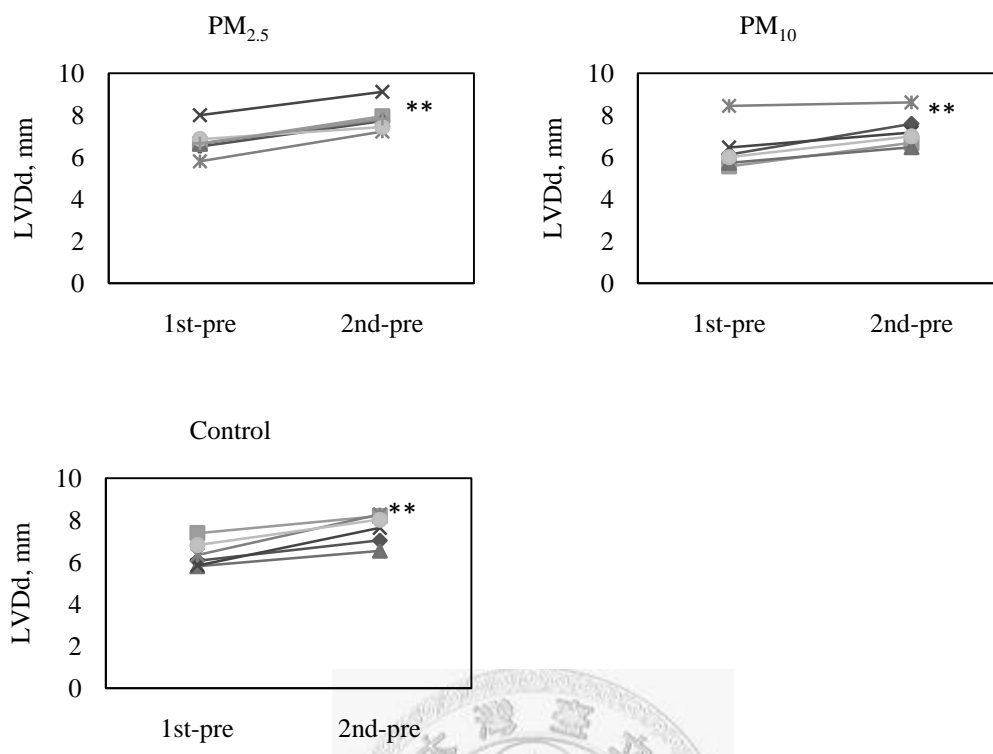


圖 8、第一次 IT 前到第二次 IT 前之 LVDd 變化

\*\*表示以 paired t test 分析第一次 IT 前到第二次 IT 前之 LVDd 變化量, p value < 0.01

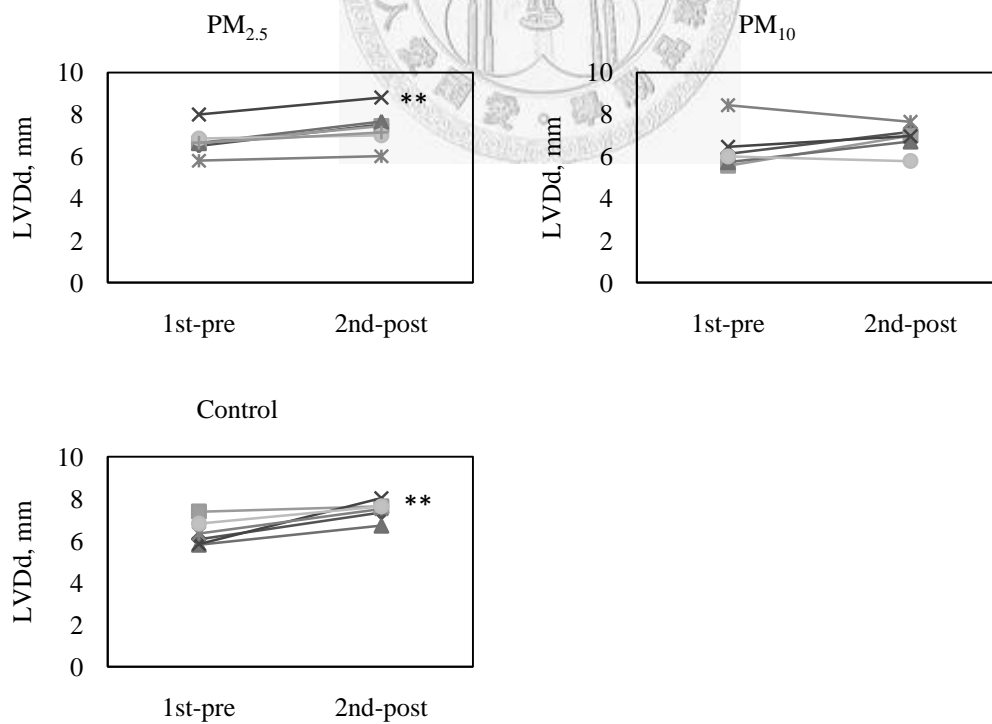


圖 9、第一次 IT 前到第二次 IT 後之 LVDd 變化

\*\*表示以 paired t test 分析第一次 IT 前到第二次 IT 後之 LVDd 變化量, p value < 0.01

四、亞慢性呼吸暴露大氣微粒對心肌受損大鼠之心血管效應

**Effects of subchronic exposure to concentrated ambient particles on  
cardiovascular toxicity in rats with myocardial injury**





#### 4-1 摘要

流行病學研究指出大氣中之PM<sub>10</sub>濃度上升會造成因急性心肌梗塞入院後康復出院的個案中，因鬱血性心衰竭而再入院率的上升。然卻沒有進一步的毒理實驗證實其相關性及詳細機轉。本研究以細粒徑微粒濃縮器進行微粒的長期暴露，然本實驗室尚未使用該儀器進行過長期連續性的暴露實驗，因此將目標焦點於UFPC長期使用的穩定性上。本研究之目的為探討利用心肌損傷後大鼠亞慢性暴露大氣濃縮微粒的心臟毒性，並檢視該濃縮微粒系統長期使用之效能及穩定性。

本實驗將大鼠注射劑量 150 mg/kg 的 Isoproterenol 誘導心肌損傷，在靜置三天後進行尾部靜脈採血，而後以全身性呼吸暴露，於實驗動物進行大氣濃縮微粒 (CAPs) 的暴露，我們以細粒徑微粒濃縮器產生之濃縮大氣微粒，進行為期一個月、每周四天，每天五小時的連續暴露，而以呼吸過濾空氣之實驗動物為對照組，分別在暴露後兩周及四周後進行尾部靜脈採血測定心肌損傷及心臟損傷程度。

實驗結果發現在心臟衰竭功能性指標 BNP 中，暴露前、兩周及四周後，暴露微粒組及對照組均無統計上的顯著差異，但 CAPs 組 BNP 濃度恢復到穩定值的時間有較對照組慢的趨勢。而心肌傷害指標 cTnI 則在兩組均未顯示嚴重心肌的損害。

本研究發現，大氣濃縮微粒暴露會使心臟衰竭功能指標較慢回到穩定值，但心肌損傷指標卻無發現這樣的結論，顯示大氣微粒可能在急性暴露下會有毒性效應，但其詳細作用時間及機轉仍待未來研究進一步探討。

**關鍵字：**大氣濃縮微粒，心臟衰竭，BNP，Troponin I，細粒徑微粒濃縮器

## 4-2 背景

心肌梗塞 (Myocardial infarction, MI) 為心臟衰竭 (Heart Failure, HF) 的主要病因之一。流行病學研究指出，急性心肌梗塞入院病人在急性暴露 PM<sub>10</sub> 後會導致其再次入院率的上升 (von Klot et al., 2005)，Zanobetti 等人的研究亦發現罹患急性心肌梗塞入院而後康復出院的個案，大氣中之 PM<sub>10</sub> 濃度每增加 10 µg/m<sup>3</sup>，因鬱血性心臟衰竭而再入院率增加 1.4 倍的 hazard ratio (Zanobetti et al., 2007)。以上研究指出無論慢性或長期的暴露 PM<sub>10</sub> 均會造成心肌梗塞後續的心臟毒性，然針對較小粒徑之 PM<sub>2.5</sub> 的流病相關研究相對缺乏，毒理學領域則尚未進行相關研究探討微粒對心肌梗塞後導致病人之效應，急性心肌傷害後長期暴露微粒是否會造成後續心臟功能下降及心肌的持續損傷甚至到嚴重的心臟衰竭，及其可能的機制，為本研究所關注的重點。

大氣濃縮微粒 (CAPs) 的健康相關研究已經被廣泛應用人體及動物的毒理試驗上，但大多都是在探討暴露 CAPs 的急性健康效應上，目前針對 CAPs 長期的健康效應之研究仍屬有限，CAPs 的毒性在上述毒理研究中已有初步的討論，但針對急性心肌損傷後之暴露仍未發現確切相關，因此本研究之研究方向乃致力於釐清急性心肌損傷後亞慢性暴露 CAPs 是否會產生負面的健康效應。

使用虛擬衝擊法之細粒徑微粒濃縮器 (Ultrafine Particle Concentrator, UFPC)，是 Constantinos Sioutas 博士在 1994 年發展出來，Sioutas 博士更在 1998 年發展可同時濃縮細粒徑與超細粒徑之微粒濃縮器，隨著研究的發展，許多學者也針對 UFPC 系統進行改善的研究，本研究以配備自動控制系統之 UFPC 系統進行微粒的長期暴露，然此設備本實驗室尚未進行過長期連續性的暴露實驗，因此本研究除討論微粒的亞慢性效應外，也將目標針對該 UFPC 在長期使用的穩定性上。

### 4-3 材料與方法

#### 4-3-1 UFPC 細粒徑微粒濃縮器

UFPC 細粒徑微粒濃縮器放置於公衛大樓九樓第二實驗室(901R)，其濃縮原理說明如下：將管線由距離窗戶 30 ~ 40 公分處拉至飽和蒸汽箱中(圖 1)，含微粒之空氣經過一溫暖且含飽和蒸氣之水面時，空氣中之相對濕度隨之提高。富含水氣之溫暖空氣其溫度若忽然降低(約攝氏 25 度)，此空氣將處於過飽和狀態，過多之水氣將附著於微粒之表面而使粒徑增大。當微粒成長至 2 至 3 微米時，可經由虛擬衝擊器加以濃縮，濃縮後之微粒再經由乾燥管去除水分以還原成原來粒子之大小(圖 2-1、圖 2-2)。並使用粒子計數器 (Condensation Particle Counter, CPC model 3022A, TSI, Inc, 圖 3)即時監控微粒數目，藉由系統出口(outlet)與入口(inlet)之數目濃度的比值，可計算系統之微粒濃縮倍率(Enrichment Factor, EF)。


$$EF = \frac{\text{Number Conc. of outlet}}{\text{Number Conc. of inlet}}$$

#### 4-3-2 全身暴露系統 (Whole-Body Exposure System)

本研究採用全身暴露系統進行急性心肌梗塞大鼠之 CAPs 暴露，本實驗室過往進行之 CAPs 暴露實驗乃採用鼻腔暴露系統(nose-only exposure)，然鼻腔暴露系統並不適用於長期暴露研究，因此選擇全身暴露系統(whole-body exposure system)作為本研究之用，該暴露腔系統係由不鏽鋼材質製成(51 × 30.4 × 15.2 cm)，中間由不鏽鋼網(40%面積由直徑 3mm 的孔洞組成)分隔，並可依研究需求分為 6 個隔間(for rat)及 32 個隔間(for mice)，而在每個隔間上方覆以不鏽鋼網 (40%面積由直徑 3mm 的孔洞組成)以避免實驗動物爬行至鄰近隔間造成實驗誤差。在氣體導入管路部分，每個暴露腔均由六支鋁製中空管(每支 22 cm 長)，管上每隔 13.5 mm 有一直徑為 0.25 mm 之孔洞以供氣體由管線進入暴露腔內。在暴露腔底部，利用兩支鋁

製管(40 cm)，上覆 28 個直徑為 0.5 mm 的孔洞以供氣體排出(圖 4-1、圖 4-2)。

### 4-3-3 實驗流程

本實驗使用由 Isoproterenol 誘導之心肌細胞受損，被認為可產生急性心肌梗塞之有效的疾病動物模式，本次實驗採用購自樂斯科生技公司之六週大雄性 Sprague Dawley rats (SD rats)，在八週大時以腹腔注射方式施打 150 mg/kg 之 Isoproterenol，並在施打後靜置休養三天，待其 Isoproterenol 藥物造成之死亡情況停止後進行尾部靜脈抽血，評估心臟之功能及受損情形。24 小時過後，開始進行 CAPs 的暴露，實驗組別分為暴露 UFPC 產生之 CAPs (暴露組)及呼吸經 teflon filter (47mm, 1 $\mu$ m pole, Pall Corporation, Ann Arbor, Michigan)及 HEPA 過濾後之 filtered air (控制組, FA)，暴露時間從早上十點開始到下午三點結束，每天五小時、每周四天、連續四周，並分別在暴露兩周及四周後並採取尾部靜脈血進行 BNP 及 Troponin I 之濃度分析(圖 5)。

### 4-3-4 BNP 與 Troponin 之測定

疾病動物暴露空氣微粒前 24 小時，及暴露後兩周及四周等時間點進行尾部靜脈抽血，將抽取之血清以購自 Peninsula Laboratories Inc.公司之 ELISA 產品 BNP-32 測試 (S-1251; Bachem, Peninsula laboratories, San Carlos, CA, USA)，並根據製造公司提供之標準方法進行實驗。cTnI 則是採用 Rat Cardiac Tn-I 96-well ELISA (2010-2-HS)，並依照製造公司提供之標準步驟進行實驗 (Life Diagnostics, Inc., West Chester, Penn)。

### 3-4-5 統計分析方法

數值均以平均值 $\pm$ 標準差的形式呈現，利用 Student T test 比較不同組別之差異，而比較同一組別前後變化而以 paired-T test 進行比較，p-value<0.05 則視為統計上顯著意義。

## 4-4 結果

### 4-4-1 UFPC 系統

UFPC 系統的使用在暴露期間共 16 天裡，因微粒計數器(CPC)在實驗頭兩天(5/20、5/21)儀器出現微粒數目過低之情況，經故障排除，後續實驗之數目濃度方達至合理之範圍，故前兩天之數據不予採計，僅呈現 5/23~24、5/26~29、6/2~5、6/9~12 等十四天之操作參數(表 1)。在 UFPC 的操作參數上，平均入口溫度為  $27.7 \pm 1.3^{\circ}\text{C}$ 、入口濕度則為  $62.8 \pm 7.4\%$ ，外界的溫度呈現穩定之狀態，而相對濕度則由於天氣狀態的不穩定而有所波動(雨：晴=6 天：8 天)。而利用自動控制系統操控之各部位組件亦呈現穩定之狀態，飽和蒸氣箱水溫  $58.0 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 、冷凝器入口溫度  $41.6 \pm 0.8^{\circ}\text{C}$ 、冷凝器出口溫度  $33.6 \pm 0.7^{\circ}\text{C}$ ；在氣流流量部分，主流流量為  $91.5 \pm 0.7$  lpm、CAPs 組次流流量  $4.3$  lpm、FA 組次流流量  $4.10 \pm 1.25$  lpm。系統入口微粒數目濃度  $26,714 \pm 7,737 \text{ \#/cm}^3$ ，在經過 UFPC 系統濃縮過後之微粒數目濃度平均為  $150,329 \pm 46,623 \text{ \#/cm}^3$ ，重量濃度  $202.2 \pm 81.3 \text{ \mu g/m}^3$ (圖 7)，微粒的濃縮倍率則為  $6.05 \pm 1.36$  倍(圖 8)。

### 4-4-2 全身暴露系統

為提供適當的環境于實驗動物，以避免干擾因素造成實驗的誤差，本研究在測試階段針對暴露腔內之溫度、相對濕度、氧氣含量、一氧化碳濃度以及二氧化氮濃度進行監測，結果發現暴露腔內溫度  $25.7 \pm 0.9^{\circ}\text{C}$ 、相對溼度  $81.5 \pm 8.8\%$ 、一氧化碳濃度  $4.39 \pm 3.35$  ppm、二氧化氮  $0.20 \pm 0.02$  ppm 及氧氣含量  $19.81 \pm 0.26\%$  等均能維持穩定(表 1)。

### 4-4-3 實驗動物基本特性

本實驗採用之八周大 SD 大鼠在注射 Isoproterenol 藥物過後，其平均體重分別為  $313.3 \pm 30.7$  g (CAPs)及  $311.7 \pm 11.7$  g (FA)，並無顯著差異；隨著暴露的進行，老鼠之體重在相同組別沒有顯著差異(表 2)。

#### 4-4-4 BNP

以 ELISA 測量血清中 BNP 在 CAPs 與 filtered air 組別的濃度，比較兩組在三個時間點差異(表 3)，暴露前( $0.508 \pm 0.173$  v.s  $0.572 \pm 0.121$ , p-value=0.521)、第 2 周( $0.365 \pm 0.126$  v.s  $0.229 \pm 0.130$ , p-value=0.185)及第 4 周( $0.198 \pm 0.284$  v.s  $0.231 \pm 0.172$ , p-value=0.829)的差異，結果發現均無統計上顯著差異。考量時間因素，分別將暴露第二周及第四周之 BNP 濃度與暴露前比較，在 CAPs 組，均無發現顯著的下降；而 Filtered Air 組在第二周 (p=0.017)與第四周 (p=0.028)的 BNP 濃度較之暴露前顯著的下降 (圖 9)。為檢視大氣微粒暴露是否會造成 BNP 濃度改變量的差異，比較 CAPs 與 Filtered Air 兩組 BNP 濃度變化量，在暴露前到第二周(pre to 2)、第二周到第四周(2 to 4)及暴露前到第四周(pre to 4)之濃度變化均無統計上的顯著差異，但在暴露前到第二周，卻呈現 FA 組下降量較 CAPs 大之趨勢 (圖 10)。

#### 4-4-5 Troponin I

評量心肌受損程度之 cTnI，以 ELISA 測量血清中 cTnI 在 CAPs 與 filtered air 組別的濃度，比較兩組在三個時間點的差異(表 4)，結果發現除暴露前平均濃度為  $0.094 \pm 0.040$  ng/ml (CAPs)及  $0.096 \pm 0.045$  ng/ml (FA)，第二周及第四周的 cTnI 平均濃度均為  $0.078$  ng/ml (CAPs)及  $0.078$  ng/ml (FA)；兩組間的 cTnI 濃度差異則在各個時間點中均未發現。

## 4-5 討論

UFPC 理論上可穩定濃縮大氣微粒，從大氣的溫溼度以及天氣型態來說，UFPC 濃縮效能不會受到大氣溫度的影響而有劇烈變動，但相對濕度卻很大程度影響微粒的濃縮效率，在實驗期間晴雨天的分布 (雨：晴=6 天：8 天)可解釋濃縮倍率每日間差異的程度。從本實驗之實驗結果來看，在自動控制系統的正常運作下，飽和蒸氣箱、冷凝器入口、冷凝器出口均可維持穩定的數值，分別為  $58.0 \pm 0.5$  °C、 $41.6 \pm 0.8$  °C 及  $33.6 \pm 0.7$  °C，然針對出口溫濕度的監測元件，因受潮而導致接頭生鏽而失去功能，無法持續監控系統出口之溫濕度。本系統所預設之入口流量為 110 LPM，其中主流 100 LPM、兩個暴露腔次流分別為 5 LPM，然而在流量的表現上，主流流量  $91.5 \pm 0.7$  LPM、暴露腔次流 (filtered air)次流  $4.10 \pm 1.25$  LPM 及暴露腔次流 (CAPs) 4.3 LPM，主流、次流(FA)及次流(CAPs)之流量分別與系統預設值有 8.5 LPM、0.9 LPM 及 0.7 LPM 之差距，推測可能係由於暴露腔、管路或 filter 等氣體流經之套件造成之壓損而導致流量的不足，而流量的不足可能會造成暴露腔換氣率的下降，導致動物本身所產生之污染物，如：二氧化碳、動物皮屑或氨，過度累積而造成動物之不適進而對實驗結果產生誤差(Kleinman et al., 2008)。暴露腔次流 (CAPs)由於其流量感測器未裝設訊號輸出裝置至自動控制系統，因而無即時監測資料，僅以實驗者觀察記錄之。在微粒濃縮倍率方面，利用微粒計數器 TSI CPC 即時監測之資料，微粒濃縮後之數目濃度達到  $150,329 \pm 46,623$  #/cm<sup>3</sup>，相較於大氣濃度  $26,714 \pm 7,737$  #/cm<sup>3</sup>，可以達到  $6.05 \pm 1.36$  倍的濃縮倍率，此外，針對 UFPC 系統長期使用的穩定性，本研究初探性連續使用一個月、一周四天、一天五小時，結果發現實驗期間的濃縮倍率雖會受到大氣環境及系統參數因素的影響，但大致上仍可維持 6 倍以上的濃縮效率 (圖 8)，也說明此微粒濃縮系統可持續且有效的進行微粒的濃縮。我們利用濾紙接上暴露腔(FA)，分別量測濾紙前、後重所得之重量濃度為  $202.2 \pm 81.3$  µg/m<sup>3</sup>。

暴露腔中各種氣體與環境之監測對於實驗動物是很重要的，我們在測試階段針對溫度、相對濕度、氧氣含量、一氧化碳濃度以及二氧化氮濃度進行監測，氧氣含量、一氧化碳濃度以及二氧化氮濃度分別穩定的維持在  $19.81 \pm 0.26\%$ 、 $4.39 \pm 3.35$  ppm 及  $0.20 \pm 0.02$  ppm，而溫度  $25.7 \pm 0.9$  °C 已超過老鼠最舒適的溫度 20~22 °C，但大鼠可接受的最高範圍約為 28~29°C (McClellan et al., 1995)，因此尚在可接受範圍；相對濕度部分，老鼠適合之濕度為 30~70%，本實驗暴露腔中濕度  $81.5 \pm 8.8\%$  也過於潮濕，這個部份需要設法改善，否則會影響到老鼠的生理狀況造成實驗的誤差。雖然暴露腔溫度尚屬大鼠可接受範圍，但仍未到達大鼠舒適溫度，因此目前我們採用在暴露腔的周圍鋪上冰塊以求降溫，但其效果與穩定性並不適用於長期暴露實驗，故有必要針對該部分進行改善；在暴露腔溫度的改進上，由 UFPC 系統的角度切入，冷凝器出口溫度  $33.6 \pm 0.7$  °C 明顯高於老鼠適溫，可利用改善冷凝器的效率，例如加長冷凝管之長度延長空氣經過冷凝管之時間，達致更好之冷凝效果，使進入暴露腔之空氣溫度下降；另一方面，可以從暴露腔的環境控制著手，利用類似冷凝管之原理，在暴露腔外面設立隔水冷卻系統，以降低暴露腔之溫度。而暴露腔濕度部分，水氣的來源主要有兩部分：老鼠本身呼出之水氣與經過乾燥系統而未去除完全之水氣，針對老鼠呼出之水氣部分，與前述流量不足息息相關，如果換氣率充足可將老鼠本身所產生之水氣等物質有效排出，降低暴露腔中濕度；此外，乾燥系統效能的改善也是長期暴露亟需克服的重點，以往短期暴露實驗間隔時間較長，管線中之水氣可有效蒸散，但長期連續暴露會造成水氣累積於管線中，並在實驗的後期造成暴露腔濕度過高超過老鼠最適濕度，因此欲改善此問題必須針對 UFPC 之乾燥系統進行改善，減少管線中累積之水氣，造成暴露腔濕度過高之情形。

本研究顯示 SD 大鼠在注射 isoproterenol 3 天後之 BNP 濃度在暴露 CAPs 及 FA 兩組間並無差異，同樣的結果也呈現在第 2 周及第 4 周上。在時間的因素考量上，FA 第 2 周及第 4 周的 BNP 濃度均顯著低於暴露前，而 CAPs 組則隨時間呈現下降



的趨勢，但並未達到統計上的顯著意義。為檢視微粒的效應，我們針對 CAPs 及 FA 組 BNP 濃度的變化量進行比較，分別比較暴露前到第 2 周、暴露前到第 4 周及第 2 周到第 4 周；結果發現，FA 組的 BNP 濃度在暴露前到暴露後 2 周之 BNP 濃度下降量有比 CAPs 組較大之趨勢，我們知道在注射 isoproterenol 所誘使之急性心肌損傷，其 BNP 濃度在急性期較高，而隨著病情的穩定，BNP 濃度亦會隨之下降，然在注射 isoproterenol 兩周過後，暴露微粒較之未暴露之 BNP 下降量卻呈現較小之趨勢，因此推論微粒可能在急性心肌損傷後 0 到 2 周對心臟造成影響，導致 BNP 濃度下降較小之趨勢。

Isoproterenol 藥物的注射會導致心肌損傷，本實驗在注射三天後進行 BNP 測定發現 CAPs 平均為 0.508 ng/ml、FA 組為 0.572 ng/ml，第二周及第四周之濃度則降到 0.2~0.3 ng/ml 左右，對照本實驗室之前研究(黃., 2007)，在注射完三周及六周後之 BNP 濃度與本實驗二周及四周之濃度來的較低，因此可推論其心臟衰竭程度尚屬輕微之程度，但黃等人之研究係連續兩天注射 150 mg/kg 之 isoproterenol，劑量較本實驗為高，因此產生之後續心臟衰竭程度亦較嚴重。

cTnI 一般在健康個體的循環系統中並不存在，其濃度在急性心肌梗塞數小時內會急遽上升，高峰會維持數天，此時如未發生進一步心肌損傷，cTnI 濃度會在七天左右降低至正常水準。本實驗之實驗動物在急性心肌梗塞後三天時，CAPs 與 FA 兩組中僅各一隻實驗動物之樣本高於偵測下限，剩下各個樣本均低於偵測下限而無法判讀；第二周及第四周的 CAPs 和 FA 組則是全部沒有偵測到 cTnI 的濃度。其可能原因推論如下：根據 Life Diagnostics 出產之 cTnI ELISA kit，其所提供之資料中顯示，利用兔子的心肌缺血模式確立 cTnI 在血漿出現的時間，發現在基準值時其濃度為低於偵測下限，因此推論本實驗之 rat 其心肌梗塞程度與預期有所出入，在本實驗之設計中，在注射 isoproterenol 後三天進行 cTnI 的測定，但實驗大鼠之心肌梗塞而造成心肌壞死之程度相當輕微，因此造成濃度低於偵測下限而無法獲

取所需資訊的現象。



#### 4-6 結論與建議

本實驗立意乃一初探性研究，旨在建立長期暴露大氣微粒的適當方法及其心血管毒性之評估指標，由本研究之結果顯示，採用 UFPC 系統的全身暴露模式可穩定的用以長期的大氣微粒毒理實驗，而針對心臟衰竭之指標，cTnI 較適用於微粒的急性效應，BNP 則是一個適合用以探討微粒長期毒性之指標。

以本實驗為立基，針對後續長期大氣微粒心血管毒理試驗之建議如下：

- 1、UFPC 系統參數監測系統的改善，特別是容易因受潮而損壞之套件，以商用可取得之溫濕度計取代損壞率高之套件以取得更完整之系統參數資料。
- 2、流量的增加，以加大幫浦流量或增加管徑以減少壓損等方式，增加系統流量達致理想狀態。
- 3、暴露腔即時監測資料的建立，包括溫度、相對濕度、氧氣含量以及各種常見空氣污染物的濃度，如能建立暴露與控制組之比較更佳。
- 4、暴露腔溫度及相對濕度的改善，從改善冷凝管之降溫效率著手，或在暴露腔周圍設立循環降溫系統，以帶走熱度；濕度則從擴散乾燥器的效能著手，加上流量的增大，以減少因系統或實驗動物呼出氣體之高濕度環境。
- 5、心臟衰竭大鼠動物模式的改善，採用劑量更高以誘導心肌損傷之心臟衰竭模式，以建立確切之心臟衰竭大鼠。
- 6、實驗設計的改善，在微粒暴露的一周內較密集的採集樣本，以探討大氣微粒的急性效應。

#### 4-7 表格與圖片

表 1、各種操作條件與監測項目

	Values
Conditions of UFPC	
Inlet Temperature, °C	27.7 ± 1.3
Inlet RH, %	62.8 ± 7.4
Humidifier Temperature, °C	58.0 ± 0.5
Cooler Inlet Temperature, °C	41.6 ± 0.8
Cooler Outlet Temperature, °C	33.6 ± 0.7
Minor Flow (FA), LPM	4.10 ± 1.25
Minor Flow (CAPs), LPM	4.3
Major Flow, LPM	91.5 ± 0.7
Number Concentration (Inlet), #/cm <sup>3</sup>	26,714 ± 7,737
Number Concentration (Outlet), #/cm <sup>3</sup>	150,329 ± 46,623
Enrichment Factor, EF	6.05 ± 1.36
Mass Concentration, µg/m <sup>3</sup>	202.2 ± 81.3
Conditions of exposure system	
Chamber Temperature, °C	25.7 ± 0.9
Chamber RH, %	81.5 ± 8.8
CO, ppm	4.39 ± 3.35
NO <sub>2</sub> , ppm	0.20 ± 0.02
Oxygen, %	19.81 ± 0.26

表 2、實驗動物基本特性

	Pre, g	2 <sup>nd</sup> , g	4 <sup>th</sup> , g
CAPs	313.3 ± 30.7	363.3 ± 19.7	434 ± 25.1
Filtered Air	311.7 ± 11.7	371.7 ± 24.1	426.7 ± 30.1
p-value	0.904	0.526	0.675

以 t test 分析組別間之差異

表 3、血清中之 BNP 濃度

	Pre, ng/ml	2 <sup>nd</sup> , ng/ml	4 <sup>th</sup> , ng/ml
CAPs	0.508 ± 0.174	0.365 ± 0.126	0.198 ± 0.284 <sup>a</sup>
Filtered Air	0.572 ± 0.121	0.229 ± 0.130 *	0.231 ± 0.172 *
p-value	0.521	0.185	0.829

\* 表示以 paired t test 與同組別之暴露前相比，p value < 0.05

<sup>a</sup> CAPs 組在第四周有三隻之 BNP 濃度低於偵測下限，因此以偵測下限之 1/2 (0.008) 做為其代表值

表 4、血清中 cTnI 濃度

	Pre, ng/ml	2 <sup>nd</sup> , ng/ml	4 <sup>th</sup> , ng/ml
CAPs	0.094 ± 0.040	0.078 <sup>a</sup>	0.078 <sup>a</sup>
Filtered Air	0.096 ± 0.045	0.078 <sup>a</sup>	0.078 <sup>a</sup>
p-value	0.934	0.934	0.934

<sup>a</sup> 表示該組所有實驗動物之 cTnI 濃度低於偵測下限，因此以偵測下限之 1/2 (0.078) 做為其代表值



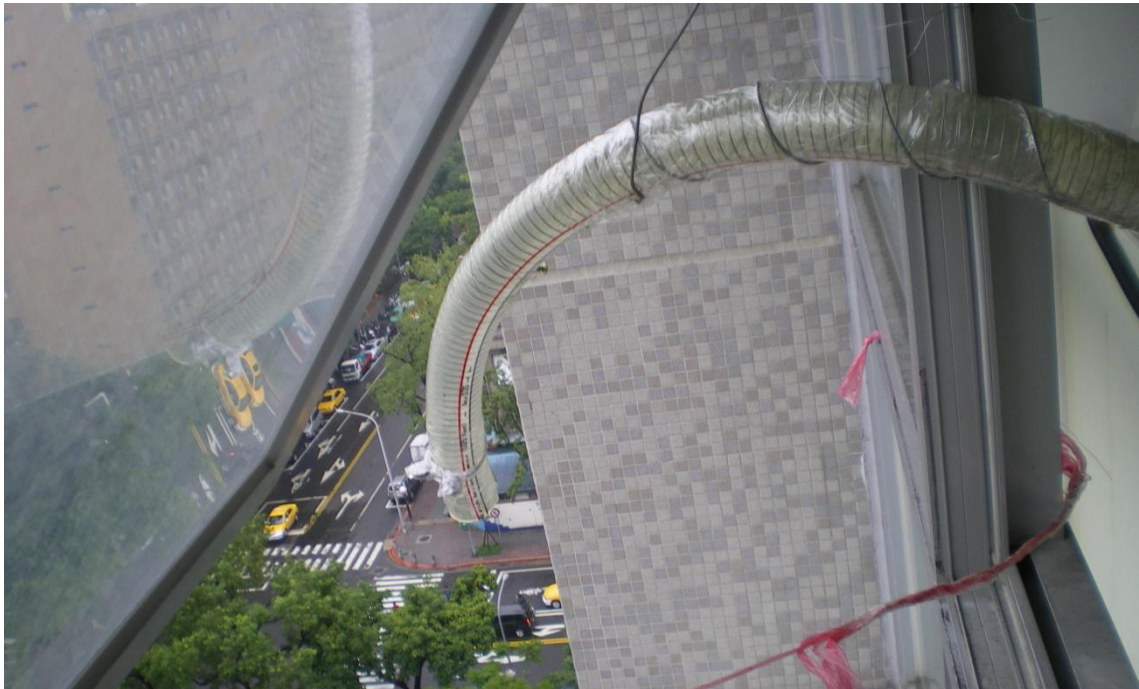


圖 1、氣流引進管線

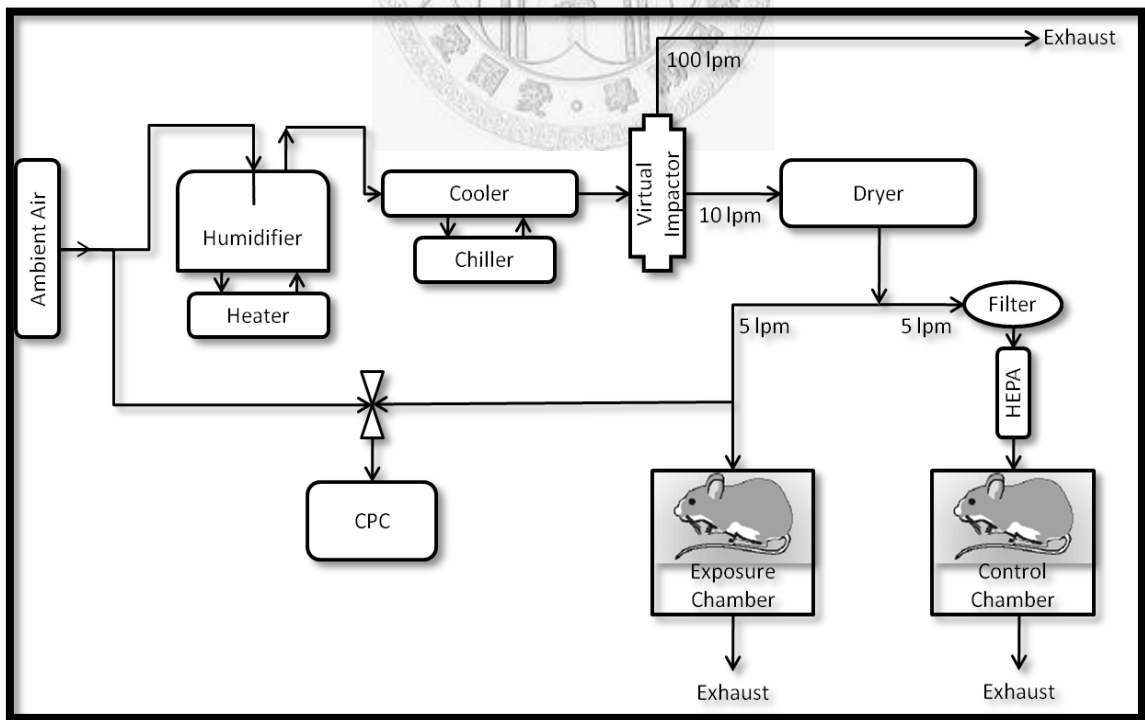


圖 2-1、UFPC 系統架構

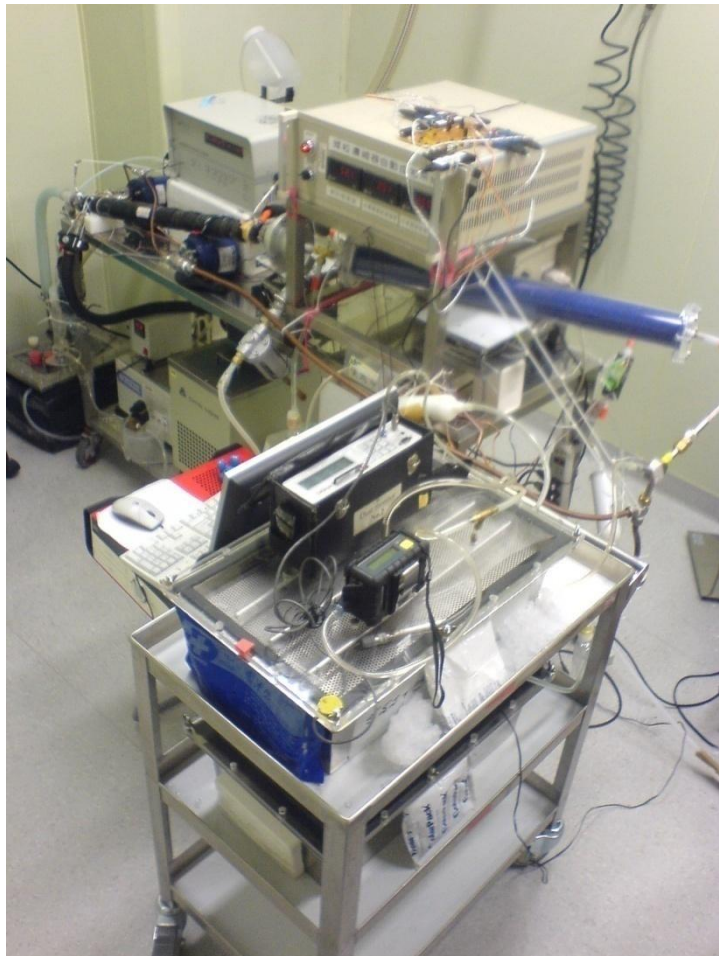


圖 2-2、細粒徑微粒濃縮器系統全貌



圖 3、粒子計數器 (CPC)





圖 4-1 全身性呼吸暴露腔

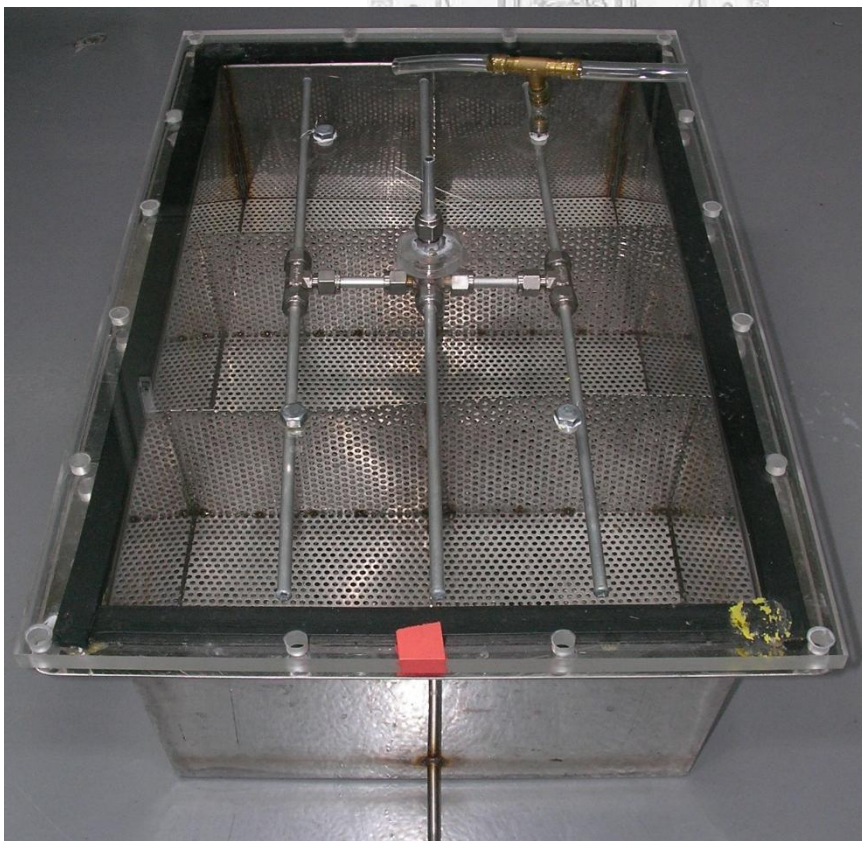


圖 4-2 全身性呼吸暴露系統

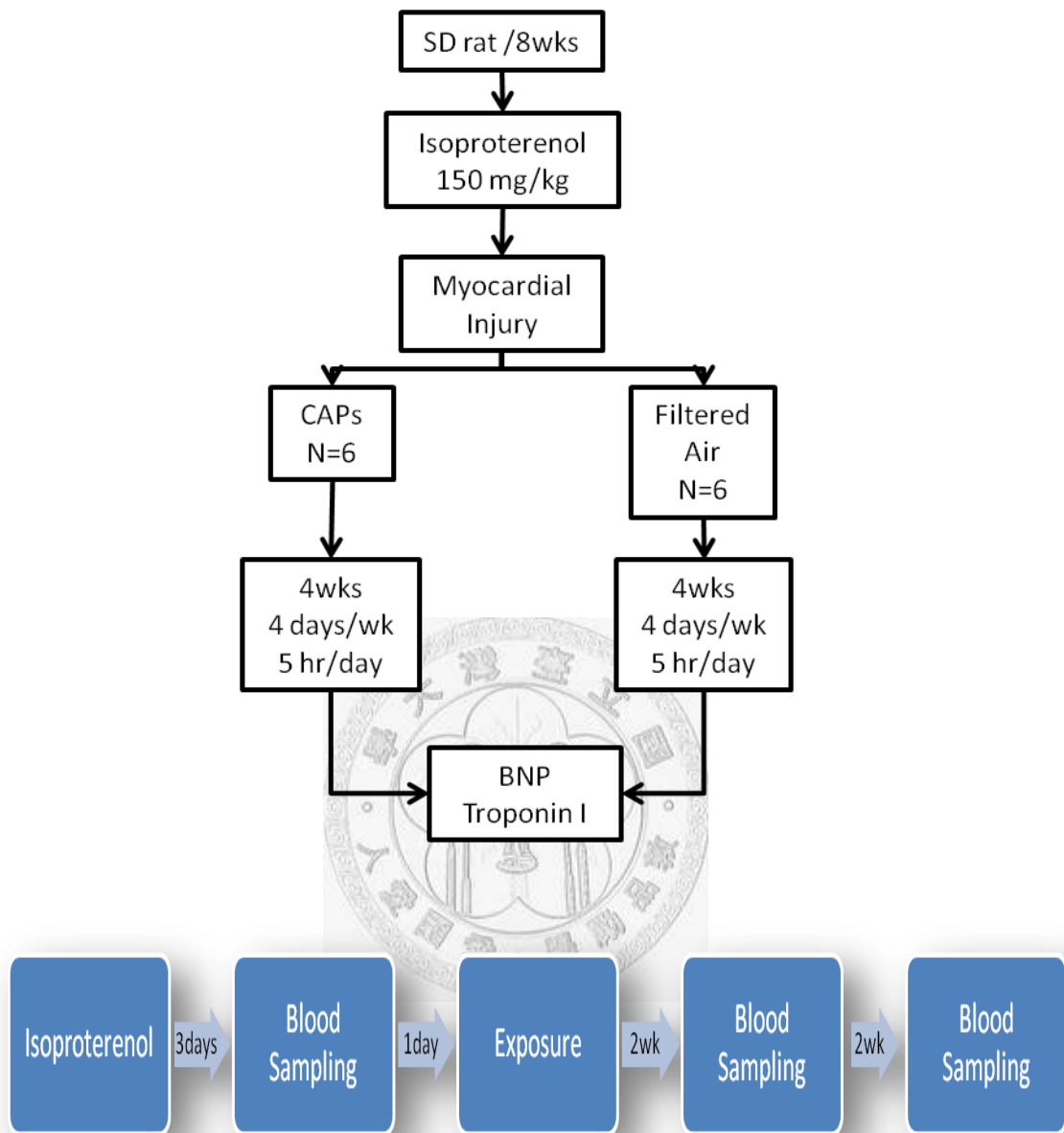


圖 5 實驗架構與流程

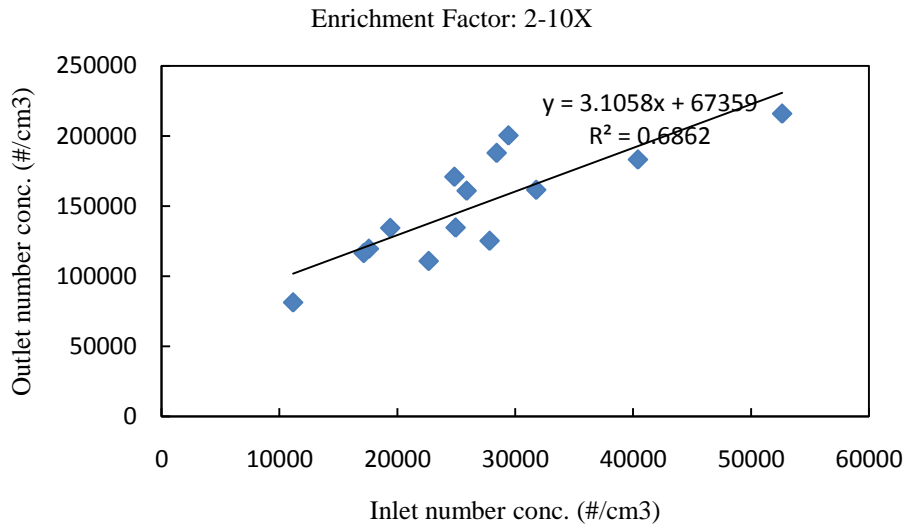


圖 6、UFPC 系統入口與出口數目濃度之相關

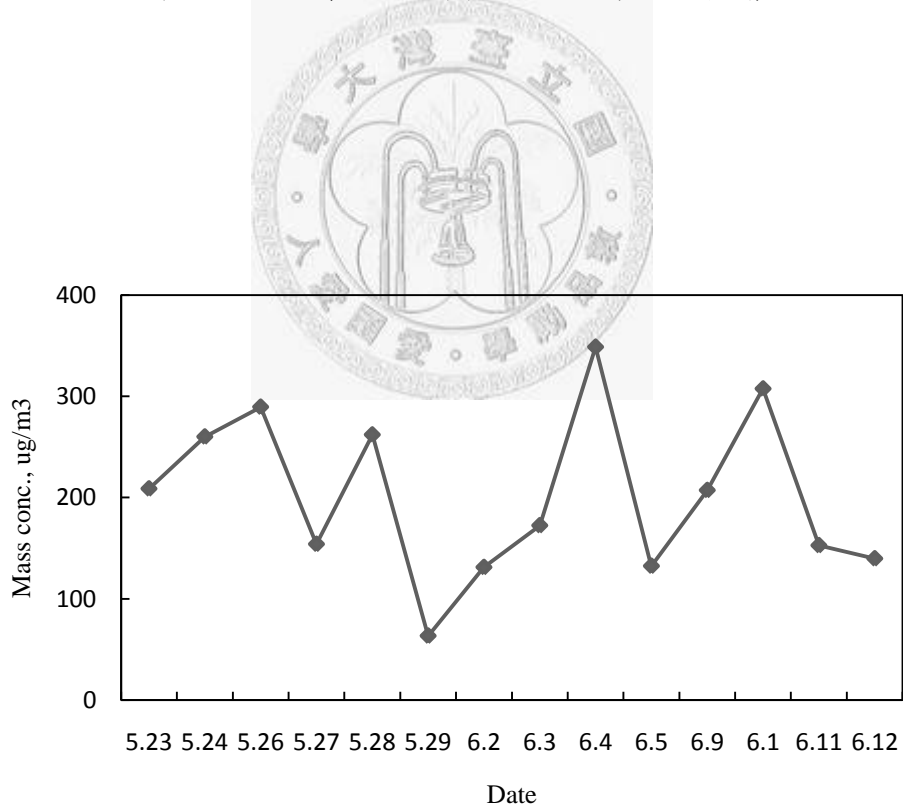


圖 7、實驗期間重量濃度逐日變化。

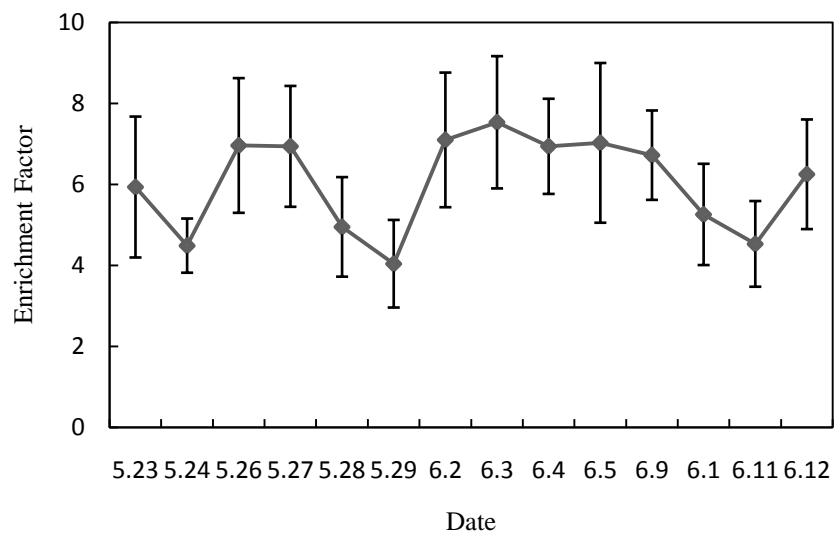


圖 8、實驗期間濃縮倍率逐日變化。



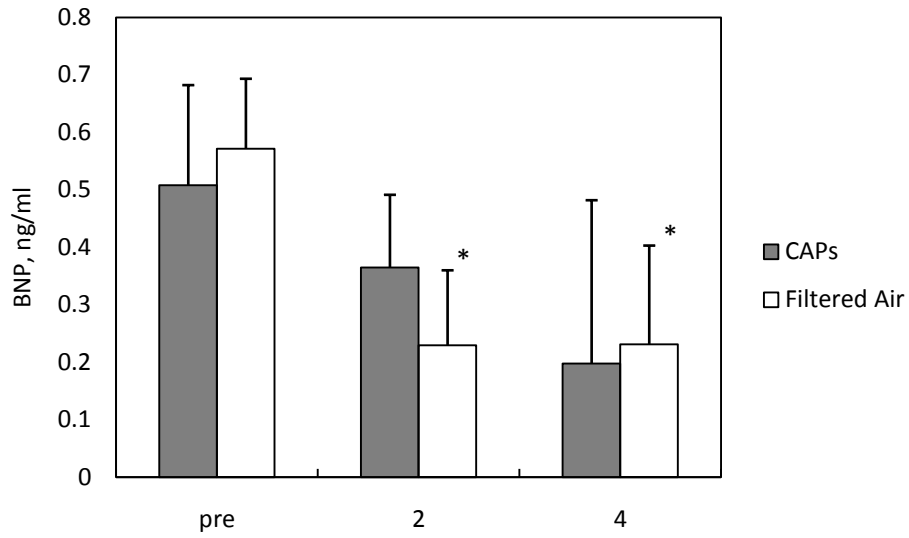


圖 9、血清中 BNP 濃度

\* 表示以 paired t test 與同組別之暴露前相比，p value<0.05

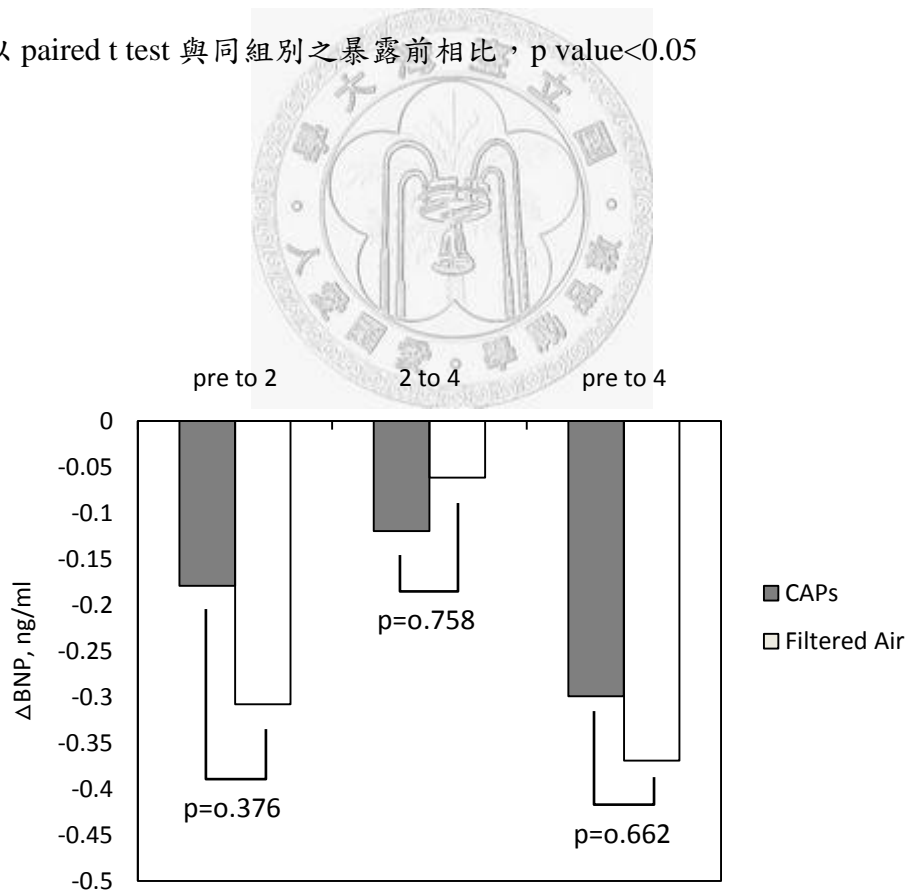


圖 10、血清中 BNP 濃度之變化量，分別為暴露前到第二周、第二周到第四周以及暴露前到第四周

## 五、參考文獻

- Antman EM, Tanasijevic MJ, Thompson B, Schactman M, McCabe CH, Cannon CP, et al. 1996. Cardiac-specific troponin I levels to predict the risk of mortality in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med.* 335:1342-1350.
- Babuin L, Jaffe AS. 2005. Troponin: the biomarker of choice for the detection of cardiac injury. *CMAJ.* 173:1191-1202
- Birmili W, Allen AG, Bary F, Harrison RM. 2006. Trace metal concentrations and water solubility in size-fractionated atmospheric particles and influence of road traffic. *Environ Sci Technol.* 40:1144-1153.
- Brook RD, Franklin B, Cascio W, Hong Y, Howard G, Lipsett M, et al. 2004. Air pollution and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the Expert Panel on Population and Prevention Science of the American Heart Association. *Circulation.* 109:2655-71.
- Burnett RT, Dales R, Krewski D, Vincent R, Dann T, Brook JR. 1995. Associations between ambient particulate sulfate and admissions to Ontario hospitals for cardiac and respiratory diseases. *Am J Epidemiol.* 142:15-22.
- Cakmak S, Dales RE, Vidal CB. 2007. Air Pollution and Mortality in Chile: Susceptibility among the Elderly. *Environ Health Perspect.* 115:524-527.
- Chang CC, Hwang JS, Chan CC, Wang PY, Cheng TJ. 2004. Effects of concentrated ambient particles on heart rate, blood pressure, and cardiac contractility in spontaneously hypertensive rats. *Inhalation Toxicology.* 16:421-429.
- Chang CC, Hwang JS, Chan CC, Wang PY, Hu TH, Cheng TJ. 2005. Effects of concentrated ambient particles on heart rate variability in spontaneously

hypertensive heart rats. *J Occup Health.* 47:471-80.

Cheng TJ, Hwang JS, Wang PY, Tsai CF, Chen CY, Lin SH, et al. 2003. Effects of concentrated ambient particles on heart rate and blood pressure in pulmonary hypertensive rats. *Environ Health Perspect.* 111:147-50.

Chang CC, Tsai SS, Ho SC, Yang CY. 2005. Air pollution and hospital admissions for cardiovascular disease in Taipei, Taiwan. *Environmental Research.* 98:114-119.

Chen YS, Yang CY. 2005. Effects of Asian dust storm events on daily hospital admissions for cardiovascular disease in Taipei, Taiwan. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A* 68:1457-1464.

Chen YS, Sheen PC, Chen ER, Liu YK, Wu TN, et al. 2004. Effects of Asian dust storm events on daily mortality in Taipei, Taiwan. *Environmental Research.* 95:151-155.

Choi JH, Xu QS, Park SY, Kim JH, Hwang SS, Lee KH, et al. 2007. Seasonal variation of effect of air pollution on blood pressure. *Epidemiol Community Health.* 61:314-318.

Chuang KJ, Chan CC, Su TC, Lee CT, Tang CS. 2007. Urban air pollution on inflammation, oxidative stress, coagulation and autonomic dysfunction in young adults. *AJRCCM.* 15;176:370-6.

Dales R, Liu L, Szyszkowicz M, Dalipaj M, Willey J, Kulka R, et al. 2007. Particulate air pollution and vascular reactivity: the bus stop study. *Int Arch Occup Environ Health.* 81:159-64.

De Lemos JA, Morrow DA, Bentley JH, Omland T, Sabatine MS, McCabe CH, et al. 2001. The prognostic value of B-type natriuretic peptide in patients with acute coronary syndromes. *N Eng J Med.* 345:1014-1021.

Devlin RB, Chio AJ, Kehrl H, Sanders G, Cascio W. 2003. Elderly humans exposed to

concentrated air pollution particles have decreased heart rate variability. *Eur Respir J.* 21: Suppl. 40, 76s-80s.

Dockery DW, Pope CA, Xu X, Spengler JD, Ware JH, Fay ME, et al. 1993. An Association between Air Pollution and Mortality in Six U.S. Cities. *N Engl J Med.* 329:1753-1761.

Dockery DW. 2001. Epidemiologic evidence of cardiovascular effects of particulate air pollution. *Environ Health Perspect.* 109:483-486.

Ghio AJ, Kim C, Delvin RB. 2000. Concentrated ambient air particles induce mild pulmonary inflammation in healthy human volunteers. *Am J Respir Crit Care Med.* 162:981-988

Gibson HL, Suh HH, Coull BA, Dockery DW, Sarnat SE, Schwartz J, et al. 2006. Effects of Air Pollution on Heart Rate Variability in Senior Adults in Steubenville, Ohio. *JOEM.* 48:780-788.

Goldberg MS, Burnett RT, Bailar JC III, et al. 2001. The association between daily mortality and ambient air particle pollution in Montreal, Quebec. 2. Cause-specific mortality. *Environ Res.* 86:26-36.

Gong Jr H, Linn WS, Sioutas C, Terrell SL, Clark KW, Anderson KR. 2003. Controlled exposures of healthy and asthmatic volunteers to concentrated ambient fine particles in Los Angeles. *Inhalation Toxicology.* 15:305-325.

Gryparis A, Forsberg B, Katsouyanni K, Analitis A, Touloumi G, Schwartz J, et al. 2004. Acute Effects of Ozone on Mortality from the "Air Pollution and Health: A European Approach" Project. *Am J Respir Crit Care Med.* 170:1080-1087.

Gurgueira SA, Lawrence J, Coull B, Murthy GGK, González-Flecha B. 2002. Rapid increases in the steady-state concentration of reactive oxygen species in the lungs



and heart after particulate air pollution inhalation. *Environ Health Perspect.* 110:749-755.

Hama N, Itoh H, Shirakami G, Nakagawa O, Suga S, Ogawa Y, et al. 1995. Rapid ventricular induction of brain natriuretic peptide gene expression in experimental acute myocardial infarction. *Circulation.* 92:1558-1564.

Hoek G, Brunekreef B, Fischer P, van Wijnen J. 2001. Association between air pollution and heart failure, arrhythmia, embolism, thrombosis, and other cardiovascular causes of death in a time series study. *Epidemiology.* 12:355-361.

Janssen NAH, Schwartz J, Zanobetti A, Suh HH. 2002. Air Conditioning and Source-Specific Particles as Modifiers of the Effect of PM<sub>10</sub> on Hospital Admissions for Heart and Lung Disease. *Environ Health Perspect.* 110:43-49.

Kwon HJ, Cho SH, Nyberg F, Pershagen G. 2000. Effects of ambient air pollution on daily mortality in a cohort of patients with congestive heart failure. *Epidemiology.* 12:413-419.

Lanki T, Pekkanen J, Aalto P, Elosua R, Berglind N, D'Ippoliti D, et al. 2006. Associations of traffic related air pollutants with hospitalisation for first acute myocardial infarction: the HEAPSS study. *Occup Environ Med.* 63:844-851.

Lei YC, Chan CC, Wang PY, Lee CT, Cheng TJ. 2004. Effects of Asian dust event particles on inflammation markers in peripheral blood and bronchoalveolar lavage in pulmonary hypertensive rats. *Environmental Research.* 95:71-76.

Lippmann M. 2005. Special Issue: Effects of subchronic exposure to concentrated ambient particles. *Inhalation Toxicology.* 17:177-261.

Maisel A, Krishnaswamy P, Novak RM, Mccord J, Hollander JE, Duc P, et al. Rapid measurement of b-type natriuretic peptide in the emergency diagnosis of heart failure. *N Engl J Med.* 347:161-167.

McClellan RO, Henderson RF. Concepts in Inhalation Toxicology. 2<sup>nd</sup> ed., Washington, DC: Taylor & Francis, 1995; 1-638.

Muders F, Elsnere D. 2000. Animal Models of Chronic Heart Failure. Pharmacol Res. 43:605-612.

Nadziejko C, Fang K, Narciso S, Zhong M, Su WC, Gordon T. 2004. Effect of Particulate and Gaseous Pollutants on Spontaneous Arrhythmias in Aged Rats. Inhalation Toxicology. 16:373-380.

Okuda N, Hayashi T, Mori T, Inamoto S, Okabe M, Mieno S, Horimoto H, Kitaura Y. 2005. Nifedipine enhances the cardioprotective effect of an angiotensin- II receptor blocker in an experimental animal model of heart failure. Hypertens Res. 28:431-438.

Ostro B, Broadwin R, Green S, Feng WY, Lipsett M. 2006. Fine Particulate Air Pollution and Mortality in Nine California Counties: Results from CALFINE. Environ Health Perspect. 114:29-33.

Pfeffer MA, Pfeffer JM, Fishbein MC, Fletcher PJ, Spadaro J, Klonere RA, et al. 1979. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. Circ Res. 44:503-512.

Richards AM, Nicholls MG, Espiner EA, Lainchbury EG, Troughton RW, Elliott J, et al. 2003. B-type natriuretic peptides and ejection fraction for prognosis after myocardial infarction. Circulation. 107:2786-2792.

Rosamond W, Flegal K, Friday G, Furie K, Go A, Greenlund K, et al. 2007. Heart Disease and Stroke Statistics—2007 Update: A Report From the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Circulation. 115:e69-e171.

Salma I, Maenhaut W. 2006. Changes in elemental composition and mass of atmospheric aerosol pollution between 1996 and 2002 in a Central European city.

Environ. Pollut. 143:479-88.

Samet JM, Dominici F, Curriero FC, Coursac I, Zeger SL. 2000. Fine particulate air pollution and mortality in 20 U.S. cities, 1987-1994. *N Engl J Med.* 343:1742-1749.

Schwartz J, Litonjua A, Suh H, Verrier M, Zanobetti A, Syring M, et al. 2005. Traffic related pollution and heart rate variability in a panel of elderly subjects. *Thorax.* 60:455-461.

Srivvelu MP., MohanKumar SMJ, Wagner JG, Harkema JR, MohanKumar PS. 2006. Activation of the Stress Axis and Neurochemical Alterations in Specific Brain Areas by Concentrated Ambient Particle Exposure with Concomitant Allergic Airway Disease. *Environ Health Perspect.* 114:870-874.

Sjaastad I, Sejersted OM, Ilebakk A, Bjørnerheim R. 2000. Echocardiographic criteria for detection of postinfarction congestive heart failure in rats. *J Appl Physiol.* 89:1445-1454.

Symons J M, Wang L, Guallar E, Howell E, Dominici F, Schwab M, et al. 2006. A Case-Crossover Study of Fine Particulate Matter Air Pollution and Onset of Congestive Heart Failure Symptom Exacerbation Leading to Hospitalization. *Am J Epidemiol.* 164:421-33.

Teerlink JR, Pfeffer JM, Pfeffer MA. 1994. Progressive ventricular remodeling in response to diffuse isoproterenol-induced myocardial necrosis in rats. *Circ Res.* 75:105-113.

Tertre AL, Medina S, Samoli E, Forsberg B, Michelozzi P, Boumghar A, et al. 2002. Short-term effects of particulate air pollution on cardiovascular diseases in eight European cities. *J Epidemiol Community Health.* 56:773-779.

The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee.

2000. Myocardial infarction redefined — A consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the Redefinition of Myocardial Infarction. *European Heart Journal*. 21:1502-1513
- Von Klot S, Peters A, Aalto P, Bellander T, Berglind N, D'Ippoliti D, et al. 2005. Ambient air pollution is associated with increased risk of hospital cardiac readmissions of myocardial infarction survivors in five European cities. *Circulation*. 112:3073-3079.
- Wellenius GA, Bateson TF, Mittleman MA, Schwartz J. 2005. Particulate air pollution and the rate of hospitalization for congestive heart failure among Medicare beneficiaries in Pittsburgh, Pennsylvania. *Am J Epidemiol*. 161:130-136.
- Wellenius GA, Coull BA, Godleski JJ, Koutrakis P, Okabe K, Savage, ST. 2003. Inhalation of Concentrated Ambient Air Particles Exacerbates Myocardial Ischemia in Conscious Dogs. *Environ Health Perspect*. 111:402-408.
- Wellenius GA, Schwartz J, Mittleman MA. 2006. Particulate air pollution and hospital admissions for congestive heart failure in seven United States Cities. *Am J Cardiol*. 97:404-408.
- Wong TW, Lau TS, Yu TS, Neller A, Wong SL, Tam W, et al. 1999. Air pollution and hospital admissions for respiratory and cardiovascular diseases in Hong Kong. *Occup Environ Med*. 56:679-683.
- Yan YH, Huang CH, Chen WJ, Wu MF, Cheng TJ. 2008. Effects of diesel exhaust particles on left ventricular function in isoproterenol-induced myocardial injury and healthy rats. *Inhalation Toxicology*. 20:199-203.
- Yang CY, Tsai SS, Chang CC, HoSC. 2005. Effects of Asian Dust Storm Events on Daily Admissions for Asthma in Taipei, Taiwan. *Inhalation Toxicology*. 17:817-821.

Yang CY, Chen YS, Chiu HF, Goggins WB. 2005. Effects of Asian dust storm events on daily stroke admissions in Taipei, Taiwan. *Environmental Research*. 99:79-84.

Yue W, Schneider A, Stölzel M, Ruckerl R, Cyrus J, Pan X. 2007. Ambient source-specific particles are associated with prolonged repolarization and increased levels of inflammation in male coronary artery disease patients. *Mutat Res: Fundam Mol Mech Mutagen*. 621:50-60.

Zanobetti A, Schwartz J. 2006. Air pollution and emergency admissions in Boston, MA. *J. Epidemiol. Community Health*. 60:890-895.

Zanobetti A, Schwartz J. 2007. Particulate Air Pollution, Progression, and Survival after Myocardial Infarction. *Environ Health Perspect*. 115:769-775.

Zeka A, Sullivan JR, Vokonas PS, Sparrow D, Schwartz J. 2006. Inflammatory markers and particulate air pollution: characterizing the pathway to disease. *International Journal of Epidemiology*. 35:1347-1354.

石宜鑫、王鵬堯：超細粒徑微粒濃縮器操作介面之改善與自動化之研究。國立中央大學 2001.

黃于芳、鄭尊仁：微粒空氣污染物對心臟功能不全大鼠之心血管研究。國立台灣大學 2007.