

DOI:10.12025/j.issn.1008-6358.2019.20191401

室内空气污染对哮喘儿童血清 miR-155 水平的影响

王诗敏¹, 孙素静¹, 纪一伦^{2*}

1. 西安市第四医院儿科, 西安 710000

2. 西安市第四医院儿童保健科, 西安 710000

[摘要] 目的:探讨室内空气污染与儿童哮喘的关系及潜在的分子机制。方法:选择176名健康受试者作为对照组,176例哮喘患儿作为哮喘组。应用实时荧光定量PCR技术检测受试者血清miR-155水平。测量甲醛(HCHO)、NO₂和颗粒(PM₁₀、PM_{2.5}和PM₁)。通过单因素和多因素logistic回归分析,评价空气污染物与哮喘风险的关系。结果:哮喘组血清miR-155水平明显高于对照组($P < 0.001$)。两组儿童过敏史、母乳喂养史、环境烟草烟雾史、PM_{2.5}、HCHO差异与儿童哮喘发作相关($P < 0.05$)。哮喘组血清miR-155水平与室内PM_{2.5}、HCHO水平密切相关($P < 0.05$),对照组无此相关性。结论:哮喘患儿血清miR-155水平与室内PM_{2.5}和HCHO水平密切相关。室内空气污染加重了西安地区儿童哮喘的发生,并诱导其miR-155水平变化。

[关键词] 哮喘;空气污染;microRNA-155**[中图分类号]** R 725.6 **[文献标志码]** A

Effects of indoor air pollution on asthma and serum level of miR-155 in children

WANG Shi-min¹, SUN Su-jing¹, JI Yi-lun^{2*}

1. Department of Pediatrics, Xi'an Fourth Hospital, Xi'an 710000, Shanxi, China

2. Department of Child Healthcare, Xi'an Fourth Hospital, Xi'an 710000, Shanxi, China

[Abstract] **Objective:** To explore the relationship between indoor air pollution and asthma in children and its potential molecular mechanism. **Methods:** A total of 176 healthy subjects were selected as control group and 176 asthmatic children as asthma group. The level of serum miR-155 was detected by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (PCR). HCHO, NO₂, and particles (PM₁₀, PM_{2.5}, and PM₁) were measured. Univariate and multivariate logistic regression analysis were used to evaluate the relationship between air pollutants and asthma risk. **Results:** The serum level of miR-155 in asthma group was significantly higher than that in control group ($P < 0.001$). Allergy history of Children, breastfeeding history, environmental tobacco smoke history, PM_{2.5}, and HCHO were related to the occurred of asthma ($P < 0.05$). The level of serum miR-155 in asthma group was related to the levels of PM_{2.5} and HCHO in the room ($P < 0.05$), and this relationship was not observed in the control group. **Conclusions:** The level of serum miR-155 is closely related to the levels of PM_{2.5} and HCHO in children with asthma. Indoor air pollution aggravates the incidence of asthma in children in Xi'an province of China, and induces change of miR-155 level.

[Key Words] asthma; air pollution; microRNA-155

哮喘是儿童常见的疾病,全球目前约有2.35亿哮喘患者,350万儿童至少有1次哮喘发作^[1-2]。为了有效地治疗哮喘,探究其病因及发病的分子机制十分重要。环境因素在哮喘发作风险中起重要作用,如空气污染^[3]。空气污染可导致肺功能降低、咳嗽、鼻部疾病、哮喘发作、鼻黏膜炎症和皮疹等,所有这些都可能与哮喘有关。虽然与交通相关的空气污染可加重呼吸系统疾病,并诱导现有哮喘发

作。但是,儿童在室内的时间更多,因此研究室内空气污染对其哮喘发作的影响至关重要^[4]。

暴露在空气中的污染物,如CO、NO₂、SO₂、PM₁₀和PM_{2.5}在哮喘发作中起重要作用^[5]。miR-155是研究最多的miRNA之一,与复杂的细胞活动有关。变态反应常由高活性的CD4⁺辅助性T细胞2(Th2)引起,而miR-155在调节过敏性哮喘的细胞免疫活性中起重要作用^[6]。本研究旨在探讨血

[收稿日期] 2019-08-14

[接受日期] 2019-08-27

[作者简介] 王诗敏,主治医师。E-mail: 527806094@qq.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 029-87441536, E-mail: 928561940@qq.com

清 miR-155 的变化与空气污理性哮喘的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 对 2017 年 9 月至 2019 年 3 月在西安市多家医院就诊的 176 例哮喘患儿(哮喘组)及进行体检的 176 名健康儿童(对照组)进行国际儿童哮喘和过敏研究(the international study of asthma and allergies in childhood, ISAAC)问卷调查。所有受试对象有身份证或户口本,如汉族、回族等民族信息均可以通过相关证件进行区分。本次研究所有程序均经医院伦理委员会批准。问卷由儿童的父母或监护人填写,问卷回收率为 100%,所有数据均由本院 2 名专业医师进行核实。调查问题包括:过敏史、呼吸道症状、家族遗传信息、生活环境、生活习惯等。哮喘的严重程度通过肺功能测试(pulmonary function tests, PFTS)来评估^[7]。所有儿童的父母或监护人签署知情同意书。

1.2 纳入与排除标准 哮喘纳入标准:(1)哮喘和室内空气污染史同时存在;(2)存在气流阻塞(连续 3 d 或 3 d 以上咳嗽、喘息和呼吸困难,发生 2 次或 2 次以上);(3) β 受体激动剂吸入后,第 1 秒用力呼气容积(FEV₁)增加 15%;(4)本实验之前,持续性哮喘至少发生 3 个月。排除标准:(1)哮喘发生 3 个月内使用维生素和(或)抗生素进行治疗;(2)有严重的器官衰竭,严重的心脏、肾脏等疾病。

1.3 miR-155 检测 每名受试者抽取 5 mL 静脉血,置于含有 2%乙二胺四乙酸抗凝剂的一次性试管中,并充分混合,在 4℃下以 1 500 r/min 离心 15 min,收集血清,存储于 -80℃。采用 RT-PCR 法定量检测血清 miR-155。用 microRNA 分析试剂盒(Invitrogen)合成 cDNA。用 5 μ L RNA 提取液、0.2 μ L 100 mmol/L dNTPs、1.5 μ L 逆转录酶(50 U/ μ L)、2 μ L 10 \times 缓冲液、0.2 μ L RNA 酶抑制剂(20 U/ μ L)、0.5 μ L 引物(20 μ m,正向引物:5'-GCG GTT AAT GTA ATC GTG AT-3',反向引物:5'-GTG CGG GCG AGG T-3')和 9.6 μ L 双蒸水在 20 μ L 反应体系下进行反应。将预混物在 16℃下反应 30 min,42℃反应 30 min,90℃反应 5 min。另外,用 12 μ L 预混物、1.2 μ L 引物和 6.8 μ L 无 RNA 的双蒸水扩增 5 μ L cDNA 溶液(最终共

25 μ L)。在 7500 实时 PCR 系统(美国赛默费希尔科学公司)上进行 qPCR,在 94℃下反应 5 min,进行 45 个循环(共 10 s),在 66℃下反应 45 s。根据 $\Delta\Delta$ CT 法计算 U6 核小 RNA(正向引物:5'-CTC GCT CGC AGC CA-3';反向引物,5'-AAC GCT TCA ATT TGC GT-3')与 miR-155 的相对水平。

1.4 室内空气采集及质量分析 根据中国《室内空气质量标准》(GB/T1883-2002)进行采样,采样点应高出地面 1.0~1.5 m,所有门窗在采样前关闭 12 h^[8]。根据 ISO 10012-1 和 ISO 14644 以及美国联邦标准 209^[9],用手持粒子计数器(美国 Lighthouse 3016IAQ)测量室内粒子(PM₁₀、PM_{2.5}和 PM₁)浓度。

从起居室和卧室采集多个颗粒样品,采样率设定为 2.83 L/min,家庭成员正常生活期间,从周一至周五 19:00 至 20:00 每天采样 1 h。采用大气采样器(北京国际环境卫生研究所环境保护研究所)采集甲醛(HCHO)和 NO₂ 样品,采用 N-(1-萘基)-乙二胺二氢氯化物分光光度法测定。同时对客厅和卧室的空气污染物进行测量,测量时间为 2 个月。1.5 统计学处理 采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析。计数资料以[n(%)]表示,组间比较采用 *t* 检验。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用卡方检验;不符合正态分布的数据以 M(P₂₅, P₇₅)表示,组间比较采用 Mann-Whitney *U* 非参数检验。对哮喘的诱发因素进行单因素和多因素回归分析。血清 miR-155 水平与室内空气污染水平的关系采用 Spearman 秩相关系数分析。检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 两组儿童基本资料的比较 结果(表 1)表明:两组儿童性别构成、年龄、体质指数、民族分布差异无统计学意义。

2.2 两组儿童血清 miR-155 水平的比较 从 500 μ L 血清中分离得到总 RNA 的 0.05~0.29 μ g/ μ L。结果(图 1)显示:哮喘组的血清 miR-155 水平为((7.61 \pm 2.47) μ g/ μ L,大于对照组[3.31 \pm 1.24] μ g/ μ L],差异有统计学意义($P < 0.001$)。

表1 两组儿童基本资料的比较

N=176

| 指标 | 哮喘组 | 对照组 | 统计值 | P值 |
|----------------------------|------------|------------|--------|-------|
| 男/女 | 98/78 | 100/76 | 0.046 | 0.830 |
| 年龄/岁 | 10.48±3.12 | 10.21±2.73 | 0.864 | 0.119 |
| 体质指数/(kg·m ⁻²) | 24.37±4.79 | 24.84±4.84 | -0.916 | 0.384 |
| 哮喘严重程度评分/分 | 4.33±1.28 | - | - | - |
| 民族 n(%) | | | 1.378 | 0.502 |
| 汉族 | 146(82.95) | 141(80.11) | | |
| 回族 | 24(13.63) | 31(17.61) | | |
| 其他 | 6(3.41) | 4(2.27) | | |

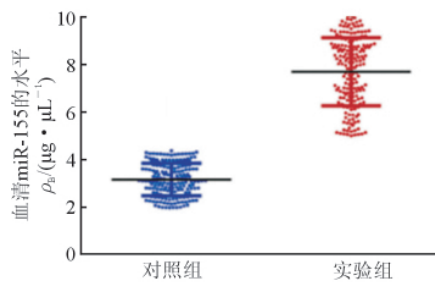


图1 两组儿童血清中 miR-155 水平

2.3 两组室内空气污染物比较 结果(表2)表明:哮喘组室内 PM₁₀、PM_{2.5}、PM₁、HCHO、NO₂ 浓度均高于对照组(P<0.05)。

2.4 两组哮喘其他危险因素比较 单因素分析(表3)显示:两组儿童过敏史、母乳喂养、环境烟草烟雾(environmental tobacco smoke, ETS)暴露、室内植物比例差异有统计学意义(P<0.05),鼻炎史无差异。

表2 两组室内空气污染物的比较

N=176; M(P₂₅, P₇₅)

| 指标 | 哮喘组 | 对照组 | Z值 | P值 |
|------------------|------------------------|------------------------|--------|-------|
| PM ₁₀ | 204.64(138.86, 310.53) | 157.38(110.56, 249.53) | -2.464 | 0.004 |
| PM ₂₅ | 43.15(28.75, 54.86) | 26.43(18.53, 36.85) | -4.490 | 0.001 |
| PM ₁ | 15.38(9.56, 28.31) | 12.25(7.65, 17.43) | -3.085 | 0.001 |
| HCHO | 36.59(22.31, 58.43) | 25.32(15.46, 45.63) | -1.663 | 0.017 |
| NO ₂ | 30.21(20.45, 44.97) | 22.04(16.43, 32.45) | -2.894 | 0.003 |

HCHO:甲醛

表3 两组儿童哮喘相关病史及环境因素比较

N=176, n(%)

| 项目 | 哮喘组 | 对照组 | χ ² | P值 |
|-------|------------|------------|----------------|--------|
| 过敏史 | 91(55.11) | 31(17.61) | 45.160 | <0.001 |
| 鼻炎史 | 44(25.00) | 33(18.75) | 2.011 | 0.156 |
| 母乳喂养 | 91(51.70) | 130(73.86) | 18.493 | <0.001 |
| ETS暴露 | 125(71.02) | 74(42.05) | 30.070 | <0.001 |
| 室内植物 | 76(43.18) | 158(89.77) | 85.718 | <0.001 |

ETS:环境烟草烟雾

表4 儿童哮喘危险因素的 logistic 多因素回归分析

N=176

| 变量 | B | S.E. | Wald | P值 | OR | 95%CI |
|-------------------|--------|-------|--------|-------|-------|--------------|
| 过敏史 | 1.859 | 0.483 | 14.583 | 0.001 | 5.583 | 2.578~17.745 |
| 母乳喂养 | -0.854 | 0.418 | 4.253 | 0.039 | 0.431 | 0.194~0.925 |
| ETS | 1.162 | 0.431 | 7.259 | 0.007 | 3.569 | 1.182~7.338 |
| PM _{2.5} | 0.814 | 0.256 | 7.673 | 0.002 | 2.351 | 1.053~4.629 |
| HCHO | 0.556 | 0.193 | 8.325 | 0.001 | 2.845 | 1.079~5.253 |

ETS:环境烟草烟雾;HCHO:甲醛

2.5 儿童哮喘危险因素的 logistic 多因素回归分析 将上述有差异的危险因素纳入 logistic 多因素回归分析,结果(表4)显示:儿童过敏史、母乳喂养、ETS、PM_{2.5}、HCHO 与哮喘发作相关(P<0.05),其中母乳喂养对儿童哮喘有保护作用。

2.6 血清 miR-155 水平与儿童哮喘危险因素的相关性分析 结果(表5)显示:哮喘组血清 miR-155 水平与儿童过敏史、母乳喂养、ETS、PM_{2.5}、HCHO 均相关(P<0.05);对照组无此相关性。

表5 血清 miR-155 水平与儿童哮喘因素的相关性

N=176

| 影响因素 | miR-155(50%截断点) $\rho_B/(ng \cdot \mu L^{-1})$ | 哮喘组 | | 对照组 | |
|-------------------|---|-----------------|-------|-----------------|-------|
| | | OR(95%CI) | P 值 | OR(95%CI) | P 值 |
| 过敏史 | 1.25±0.16 | 2.35(0.28~4.58) | 0.031 | 1.21(0.41~1.89) | 0.172 |
| 母乳喂养 | 0.75±0.03 | 0.25(0.04~0.69) | 0.001 | 0.98(0.18~1.83) | 0.093 |
| ETS | 0.97±0.08 | 1.59(0.56~2.74) | 0.028 | 1.31(0.85~1.92) | 0.064 |
| PM _{2.5} | 1.09±0.19 | 1.35(0.63~2.92) | 0.018 | 1.22(0.61~2.38) | 0.125 |
| HCHO | 1.84±0.31 | 2.51(0.39~5.02) | 0.021 | 1.36(0.51~2.90) | 0.082 |

ETS:环境烟草烟雾;HCHO:甲醛

3 讨论

空气污染物加重了儿童哮喘症状的严重程度。空气污染中的颗粒物与儿童呼出的高浓度 NO₂ 有关;柴油废气颗粒和汽车排放的 NO₂ 会降低儿童血液的酸碱度,而较低的酸碱度可引起气道炎症^[10]。研究^[11]报道,肺泡液中较低的酸碱度和较高水平的表皮生长因子可导致哮喘患者发生全身炎症。多环芳烃是大气污染的主要成分,超过 30%的多环芳烃可被人体吸入^[12]。多环芳烃能破坏抗氧化防御系统,间接导致儿童哮喘的发作。此外,控制空气污染引起的氧化应激和防止呼吸器官损伤可减少儿童哮喘的发作。

本研究显示,西安市哮喘儿童家庭室内 PM₁₀、PM_{2.5}、PM₁、HCHO 和 NO₂ 均较高,可能与汽车尾气排放和工业发展有关。在中国,烹饪和吸烟是与室内 PM_{2.5} 的主要来源。其中,使用煤炭的家庭室内颗粒物比较高,而使用燃气或电做饭可使 PM_{2.5} 降低 40%~70%^[13]。PM_{2.5} 常在公共室内场所(如吸烟休息室)被检测到,主要含有苯并芘、多环芳烃和邻苯二甲酸酯等^[14]。一般认为,室内吸烟、烹饪、ETS 和家庭装饰增加了室内颗粒物的浓度,使儿童哮喘的发生风险增加。

本研究 logistic 多因素回归分析显示,室内 PM_{2.5} 暴露是儿童哮喘发生的独立危险因素(P<0.05)。HCHO 是主要的室内空气污染物之一,具有强烈的刺激性气味。研究表明,HCHO 也是儿童哮喘发生的独立危险因素(P<0.05)。母乳含有大量的 IgA、细胞因子、长链脂肪酸和低聚糖等物质,可以改善婴儿的免疫状态^[15]。本研究发现,母乳喂养是避免儿童哮喘发作的一个保护因素(P<0.05)。

miR-155 在哺乳动物呼吸系统中表达较广泛,

是通过降低 Th2 来调节炎症活性的潜在治疗靶点,且在哮喘进展中起重要作用^[6]。microRNA 检测是诊断小儿哮喘的一种简单、无创的方法。本研究发现,miR-155 可能与儿童哮喘的风险增加有关。本研究为儿童哮喘的基因治疗和环境因素控制提供了理论依据,但还需要进一步的工作来证实。

本研究存在的局限性:未能分析 miR-155 与儿童哮喘关系的相关分子机制;同时未能分析空气污染通过影响血清 miR-155 水平诱发哮喘的分子机制;未分析室内污染物产生的原因。与吸烟相比,烹饪可能是增加室内颗粒物的主要因素。今后还需要进一步的研究来深入探讨上述问题。

综上所述,室内空气污染与西安市儿童哮喘的发生有关,并使其血清 miR-155 水平升高;哮喘患儿血清 miR-155 水平与室内 PM_{2.5} 和 HCHO 水平密切相关。因此,血清 miR-155 水平可能成为判断哮喘的潜在指标。

参考文献

[1] 邱沂遥, 关继涛, 阎锡新. 生活环境中主要空气污染物浓度与哮喘患者肺功能、呼出气一氧化氮和血清 IgE 水平的关系[J]. 山东医药, 2017, 57(11):84-87.

[2] 张莉, 马琳, 安会波, 等. 石家庄市空气污染与儿科呼吸系统疾病住院率的相关性研究[J]. 国际呼吸杂志, 2017, 37(20):1532-1534.

[3] WOODARD L J, KAHALEH A A, NASH J D, et al. Healthy people 2020: assessment of pharmacists' priorities[J]. Public Health, 2018, 155:69-80.

[4] DENG Q, LU C, LI Y, et al. Exposure to outdoor air pollution during trimesters of pregnancy and childhood asthma, allergic rhinitis, and eczema[J]. Environ Res, 2016, 150:119-127.

[5] GUO H, HUANG S, CHEN M. Air pollutants and asthma patient visits: Indication of source influence[J]. Sci Total Environ, 2018, 625:355-362.

[6] OKOYE I S, CZIESO S, KTISTAKI E, et al.

- Transcriptomics identified a critical role for Th2 cell-intrinsic miR-155 in mediating allergy and antihelminth immunity[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2014, 111(30):E3081-E3090.
- [7] O'BYRNE P M, D'URZO T, BECK E, et al. Dose-finding evaluation of once-daily treatment with olodaterol, a novel long-acting β_2 -agonist, in patients with asthma; results of a parallel-group study and a crossover study[J]. Respir Res, 2015, 16:97.
- [8] LU Y W, WANG D H, MA C F, et al. The effect of activated carbon adsorption on the photocatalytic removal of formaldehyde[J]. Build Environ, 2010, 45(3):615-621.
- [9] LAPPALAINEN S, SALONEN H, SALMI K, et al. Indoor air particles in office buildings with suspected indoor air problems in the Helsinki area[J]. Int J Occup Med Environ Health, 2013, 26(1):155-164.
- [10] 秦晨光, 邹敏书, 聂国明. PM(2.5)对儿童支气管哮喘影响的研究进展[J]. 华南国防医学杂志, 2017, 31(8): 573-575.
- [11] 王 晴, 李和权, 姚一楠, 等. 肝素结合表皮生长因子在 Th17 细胞诱导的支气管哮喘气道重塑进程中的作用[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2011, 34(1):42.
- [12] 陈卫红, 周 芸. 关注多环芳烃导致的呼吸系统健康损害[J]. 公共卫生与预防医学, 2017, 28(5):1-5.
- [13] LI T, CAO S, FAN D, et al. Household concentrations and personal exposure of PM 2.5, among urban residents using different cooking fuels[J]. Sci Total Environ, 2016, 548-549:6-12.
- [14] LI L, HO S S H, CHOW J C, et al. Characterization and health risk assessment of PM2.5-bound organics inside and outside of Chinese smoking lounges[J]. Chemosphere, 2017, 186:438-445.
- [15] 胡 瑞. 母乳 miRNA 的研究进展[J]. 国际儿科学杂志, 2017, 44(11):795-798,803.

[本文编辑] 姬静芳