

大气颗粒物暴露儿童血清多环芳烃加合物与白细胞 miR-638 的剂量-效应关系

林杨, 尹京晶, 孟庆玉, 王振杰, 吴难, 张丽雅, 王婷, 王艳华, 段化伟

中国疾病预防控制中心职业卫生与中毒控制所, 北京 100050

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2021.21214

摘要：

[背景] 大气颗粒物 (PM) 及其多环芳烃 (PAH) 组分的暴露可导致外周血白细胞 microRNA (miRNA) 表达改变, 引起机体氧化应激和炎症反应等早期损伤。儿童是颗粒物暴露的敏感人群, 然而颗粒物对儿童血液中的 miRNA 影响研究较少。

[目的] 探讨颗粒物暴露儿童血清 PAH-白蛋白加合物与白细胞 miR-638 表达的剂量-效应关系。

[方法] 选取大气颗粒物高暴露区域的 162 名寄宿制学校儿童为高暴露组, 低暴露区域 108 名寄宿制学校儿童为低暴露组。收集两个地区全年的 PM_{2.5}、PM₁₀ 浓度数据, 通过定点采样确定校园内 PM_{2.5} 浓度及其附着的苯并[a]芘 (BaP) 浓度, 依据尿可替宁浓度评估儿童的烟草暴露水平, 检测血清中反式二氢二醇环氧苯并[a]芘 (BPDE)-白蛋白加合物浓度, 评估 PAH 长期暴露水平; 实时荧光定量 PCR 法检测外周血白细胞 miR-638 表达水平。线性回归模型分析不同亚组白细胞 miR-638 表达差异和血清 BPDE-白蛋白加合物与白细胞 miR-638 表达水平剂量-效应关系。

[结果] 大气颗粒物高暴露组儿童 PM_{2.5} (79.00 $\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$)、PM₁₀ (175.00 $\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$) 年均暴露水平以及血清 BPDE-白蛋白加合物 [(82.41 $\pm$ 20.12) nmol·L⁻¹] 水平高于低暴露组 [46.00 $\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$, 82.00 $\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$, (64.84 $\pm$ 14.26) nmol·L⁻¹] ($P<0.05$)。暴露评估结果表明 PM_{2.5} 与 BaP ($r=0.691$, $P<0.001$) 呈正相关。高暴露组白细胞 miR-638 相对表达水平 [$M(P_{25}, P_{75})$: 1.00 (0.62, 1.53)] 均高于低暴露组 [$M(P_{25}, P_{75})$: 0.70 (0.47, 1.20)] ($P<0.05$)。线性回归模型分析结果显示, 校正年龄、性别、尿可替宁、体重指数 (BMI) z-评分和白细胞计数水平后, 儿童血清中 BPDE-白蛋白加合物水平每增加一个四分位数间距 (IQR) (27.09 nmol·L⁻¹), 白细胞 miR-638 水平增加 24.56% ($P<0.001$); 其中高暴露组儿童血清 BPDE-白蛋白加合物水平每增加一个 IQR (25.95 nmol·L⁻¹), 白细胞 miR-638 水平增加 19.28% ($P=0.003$)。亚组分析发现, 男生和女生血清 BPDE-白蛋白加合物水平每增加一个 IQR (27.34、28.84 nmol·L⁻¹), 白细胞 miR-638 水平分别增加 20.60% ($P=0.007$) 和 34.57% ($P=0.012$); 在正常体重组的儿童中, 血清 BPDE-白蛋白加合物水平每增加一个 IQR (24.74 nmol·L⁻¹), 白细胞 miR-638 水平增加 26.89% ($P<0.001$); 在尿可替宁未检出组儿童中, 血清 BPDE-白蛋白加合物每增加一个 IQR (25.06 nmol·L⁻¹), miR-638 水平增加 23.78% ($P<0.001$)。

[结论] 大气颗粒物中 PAH 组分可致儿童外周血白细胞 miR-638 水平升高, 血清中 BPDE-白蛋白加合物与白细胞 miR-638 表达水平存在较好的剂量-效应关系。

关键词：颗粒物；多环芳烃；儿童；miR-638

Dose-effect relationship between serum polycyclic aromatic hydrocarbon adducts and leukocyte miR-638 in children exposed to ambient particulate matter LIN Yang, YIN Jingjing, MENG Qingyu, WANG Zhenjie, WU Nan, ZHANG Liya, WANG Ting, WANG Yanhua, DUAN Huawei (National Institute for Occupational Health and Poison Control, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100050, China)

Abstract:

[Background] Exposure to particulate matter (PM) and polycyclic aromatic hydrocarbon composition can influence the expression of microRNA (miRNA) in leukocytes, which can induce oxidative stress, inflammatory response, and immune response. Children are sensitive to PM exposure, but there are few studies on the changes of miRNA in their peripheral blood in association with PM.

组稿专家

施小明 (中国疾病预防控制中心环境与健康相关产品安全所), E-mail: shixm@chinacdc.cn

基金项目

国家自然科学基金 (81872664, 82073525); 国家重点研发计划 (2017YFC0211604); 北京市自然科学基金 (7214279); 环境毒理学北京市重点实验室开放基金 (2020hjd104)

作者简介

林杨 (1996—), 女, 硕士生;
E-mail: ly199609@126.com

通信作者

段化伟, E-mail: duanhw@niohp.chinacdc.cn

伦理审批 已获取

利益冲突 无申报

收稿日期 2021-05-14

录用日期 2021-08-27

文章编号 2095-9982(2021)10-1099-07

中图分类号 R122.7

文献标志码 A

►引用

林杨, 尹京晶, 孟庆玉, 等. 大气颗粒物暴露儿童血清多环芳烃加合物与白细胞 miR-638 的剂量-效应关系 [J]. 环境与职业医学, 2021, 38 (10): 1099-1105.

►本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2021.21214

Funding

This study was funded.

Correspondence to

DUAN Huawei, E-mail: duanhw@niohp.chinacdc.cn

Ethics approval Obtained

Competing interests None declared

Received 2021-05-14

Accepted 2021-08-27

►To cite

LIN Yang, YIN Jingjing, MENG Qingyu, et al. Dose-effect relationship between serum polycyclic aromatic hydrocarbon adducts and leukocyte miR-638 in children exposed to ambient particulate matter[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2021, 38(10): 1099-1105.

►Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2021.21214

[Objective] The study aims to investigate potential dose-effect relationship between polycyclic aromatic hydrocarbon-albumin adducts in serum and miR-638 in leukocytes among children exposed to PM.

[Methods] A total of 162 children from boarding schools in an area with high PM exposure were selected as the high-PM exposure group, while 108 children from boarding schools in an area with low PM exposure were as the low-PM exposure group. The annual levels of PM_{2.5} and PM₁₀ in the two areas were collected. The concentrations of PM_{2.5} and benzo[a]pyrene (BaP) in PM_{2.5} on campus were determined at fixed monitoring sites. Tobacco exposure was assessed according to the concentration of urinary cotinine. The long-term exposure level of PAH was assessed by serum benzo[a]pyrene diol epoxide (BPDE)-albumin adducts. The expression of miR-638 was detected by real-time quantitative PCR. Linear regression model was used to analyze the differences in miR-638 among different subgroups and the dose-effect relationship between serum BPDE-albumin adducts and miR-638 level in leukocytes.

[Results] The concentrations of annual PM_{2.5} (79.00 µg·m⁻³), annual PM₁₀ (175.00 µg·m⁻³), and serum BPDE-albumin adducts [(82.41±20.12) nmol·L⁻¹] in the high-PM exposure group were higher than those in the low-PM exposure group [46.00 µg·m⁻³, 82.00 µg·m⁻³, (64.84±14.26) nmol·L⁻¹] ($P<0.001$). PM_{2.5} level was positively correlated with BaP level ($r=0.691$, $P<0.001$). The level of leukocyte miR-638 [$M(P_{25}, P_{75})$: 1.00 (0.62, 1.53)] in the high-PM exposure group was significantly higher than that in the low-PM exposure [$M(P_{25}, P_{75})$: 0.70 (0.47, 1.20)] ($P<0.05$). After adjusting for age, sex, urinary cotinine, body mass index (BMI) z-scores, and white blood cell counts, the results of linear regression model showed that an interquartile range (IQR, 27.09 nmol·L⁻¹) increase in serum BPDE-albumin adducts was associated with 24.56% ($P<0.001$) increment of miR-638 among children; an IQR (25.95 nmol·L⁻¹) increase in serum BPDE-albumin adducts was associated with 19.28% ($P=0.003$) increase of miR-638 in the high-PM exposure group. After stratification, with each IQR (27.34, 28.84, 24.74, 25.06 nmol·L⁻¹) increase of serum BPDE-albumin adducts, the expression levels of miR-638 increased by 20.60% ($P=0.007$) in boys, 34.57% ($P=0.012$) in girls, 26.89% ($P<0.001$) in normal weight children, and 23.78% ($P<0.001$) in the children without urinary cotinine detected.

[Conclusion] PAH components in PM could induce elevated miR-638 in leukocytes among selected school children. There is a significant dose-effect relationship between serum BPDE-albumin adducts and miR-638 in leukocytes.

Keywords: particulate matter; polycyclic aromatic hydrocarbon; child; miR-638

最近的世界卫生组织研究报告指出,空气污染每年可导致全球约380万人过早死亡^[1]。在全球大多数地区,大气颗粒物(particulate Matter, PM)仍然是主要的空气污染物^[2]。儿童的呼吸系统发育还不够完善,是大气颗粒物的敏感人群^[3]。流行病学研究表明,颗粒物及其富集的多环芳烃(polycyclic aromatic hydrocarbons, PAH)组分可致儿童哮喘、肺部感染和过敏风险增加^[4]。PM组分复杂,其中附着在表面的PAH是毒性较为明确且含量高的组分,大部分人群流行病学研究通过监测其在体内的代谢物,如羟基PAH代谢物和多环芳烃加合物,用于评估PM暴露水平^[5-7]。苯并[a]芘(benzo[a]pyrene, BaP)是致癌性最强的一种多环芳烃,经机体代谢产生活性产物二羟环氧苯并芘(benzo[a]pyrene diol epoxide, BPDE),结合血液中的白蛋白后,形成稳定且容易被检测的BPDE-白蛋白加合物,可作为多环芳烃长期暴露生物标志物^[8]。

表观遗传学在环境暴露和健康相关事件之间扮演着重要角色。微小RNA(microRNA, miRNA)属于表观遗传学中的非编码RNA分子,约有21~22个核苷酸,是基因表达的关键调节分子,靶向结合mRNA的3'端非翻译区,改变基因表达^[9]。miRNA调控相关靶基因介导PM暴露引起不良健康损害如炎症反应、氧化应激损伤和心血管系统疾病发生,具有成为PM暴露生物标志物潜力^[10]。miR-638位于染色体19p13.2上,参与调控

氧化应激、DNA损伤和衰老等损伤相关靶基因的表达,在心血管疾病、呼吸系统疾病和免疫系统疾病中起重要作用^[11-13]。有研究表明PAH可异常调控儿童外周血白细胞miRNA表达,减弱机体炎症反应^[5],目前关于PM及PAH组分与儿童miR-638表达改变的流行病学研究较少。本研究通过测定大气颗粒物暴露儿童血清中BPDE-白蛋白加合物与外周血白细胞miR-638表达水平,探讨多环芳烃与白细胞miR-638的剂量-效应关系。

1 对象与方法

1.1 研究对象及颗粒物暴露情况

1.1.1 研究对象 于2016年秋季,在华东地区某市两所寄宿制学校招募符合标准的学龄儿童,详细信息可以参考课题组已发表的文献^[5, 14]。儿童纳入研究标准:(1)本地常住人口,居住年限≥6个月;(2)选取住宿制学生,每周住校至少5d;(3)无免疫功能缺陷和感染性疾病;(4)调查期间一个月内无抗生素药物接触史。低暴露组学校在高暴露组学校上风向至少30 km以外区域,高暴露组学校附近有耐火材料公司、钢铁公司、石油公司等。本次研究最终纳入273名学龄儿童,其中高暴露组163人,低暴露组110人。由于有3人的白细胞RNA质量和完整性不符合质控要求,最终纳入分析的高暴露组162人,低暴露组有108人。本研究通过了中国疾病预防控制中心职业卫生与中毒

控制所伦理委员会审查(伦理编号:NIOHP 201809),体检开始前告知学生家长并签署知情同意书。

1.1.2 环境暴露评估 收集2016年两学校附近监测站点的全年颗粒物暴露数据,包括 $PM_{2.5}$ 、 PM_{10} 数据。在学校内进行固定点采样,使用空气总悬浮微粒采样器(TH150D II,中国武汉)收集颗粒物。称重法测定 $PM_{2.5}$ 浓度,气相色谱-质谱仪(450-320,美国Bruker公司)测定BaP浓度。

1.2 问卷调查

对调查员进行培训和统一标准后,由学生家长填报调查信息,调查儿童年龄、性别、被动吸烟等情况,身高和体重由专业人员按照统一标准进行测量。

1.3 生物样本采集

体检当天上午采集血液和尿液样本,采样前学生至少空腹8h,由经过统一培训的护士采集前臂静脉乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)抗凝血和不抗凝血约5 mL,中段尿30~50 mL,向用于提取RNA的血液中加入适量的RNAlater (AM7021,美国赛默飞公司),分装后放于 -80°C 冰箱储存。

1.4 实验室检测

1.4.1 白细胞计数 使用血细胞分析仪(Sysmex XE 5000,日本Sysmex株式会社)对白细胞进行计数。

1.4.2 尿可替宁测定 烟草是BaP的来源之一,测定尿可替宁水平是为了评估烟草暴露水平。使用气相色谱-质谱仪(450-320,美国Bruker公司)检测尿中可替宁浓度,检出限为 $20\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$,样品浓度低于检出限的用1/2检出限代替。

1.4.3 血清BPDE-白蛋白加合物检测 使用BPDE-白蛋白试剂盒(美国Trevigen公司),ELISA法检测血清中BPDE-白蛋白加合物浓度。按照说明书操作,使用多功能酶标仪(VICTOR™ X3,美国Perkin Elmer公司)在450 nm波长检测微孔板并进行读数。每块板中保证均有质控样本、低暴露组和高暴露组样本,每个样本设置2个复孔。血清BPDE-白蛋白加合物检出限为 $5\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$,批内差异在0.47%~3.55%之间,批间差异为14.61%。

1.4.4 白细胞RNA提取 将血液样本从 -80°C 取出后置于 4°C 融化,吸取含有200 μL 血液的样本放入管中,加入750 μL PBS缓冲液,7253 $\times g$ 离心3 min后,弃上清,加入1 mL Trizol(美国赛默飞公司)吹打混匀,再加入 $2.5\times 10^{-4}\text{ nmol}$ miRNA检测外参应用液(CR100,北京天根生化科技有限公司);加入氯仿后离心,经异丙醇和75%乙醇处理后,加入无RNA去离子水溶解RNA。

分光光度计(NanoDrop 2000c,美国赛默飞公司)测定RNA浓度,使用琼脂糖凝胶电泳鉴定RNA的完整性。

1.4.5 实时荧光定量PCR检测 miR-638表达使用miRcute plus miRNA cDNA第一链合成试剂盒(KR211,北京天根生化科技有限公司)将提取的RNA逆转录合成cDNA。使用miRcute增强型miRNA荧光定量检测试剂盒(SYBR Green)(FP411,北京天根生化科技有限公司)定量检测。外参引物(CD200-01)和miR-638(引物序列:AGGGAUCGCGGGCGGGUGGCGGCCU)购于北京天根生化科技有限公司。使用荧光定量PCR仪(Quant Studio 12K,美国赛默飞公司)检测miR-638表达,PCR反应程序: 95°C 、15 min; 94°C 、20 s; 60°C 、34 s,扩增40个循环。样本定量设置重复孔,复孔间Ct值标准差 <0.5 ;去离子水做空白对照,无非特异性扩增;板间设置同一质量控制样本,板间质控CV $<15\%$;否则重做。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算miRNA的相对表达量。

1.5 统计学分析

数据分析采用R 4.0.3统计软件。正态性数据采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,年龄、血清BPDE-白蛋白加合物两组间比较采用t检验。非正态性资料采用 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示,两组间 $PM_{2.5}$ 、 PM_{10} 、白细胞计数、miR-638表达比较采用Wilcoxon秩和检验。根据世界卫生组织颁布的儿童生长标准将体重指数(body mass index, BMI)z-评分 >1 划为超重,反之为正常体重^[15]。按照尿可替宁是否高出检出限($>20\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)分为尿可替宁检出组和非检出组,反映烟草暴露情况。计数资料如性别、BMI z-评分、尿可替宁检出率的比较采用 χ^2 检验。白细胞miR-638、血清BPDE-白蛋白加合物、白细胞计数经自然对数($\ln$)转换后纳入线性回归模型分析。以组别为自变量,miR-638表达水平为应变量,调整年龄、性别、BMI z-评分,血清BPDE-白蛋白加合物、尿可替宁和白细胞计数协变量后,分析两组儿童白细胞miR-638表达差异;以血清BPDE-白蛋白加合物为自变量,白细胞miR-638为应变量,采用线性回归分析血清BPDE-白蛋白加合物与miR-638表达剂量-效应关系。在体重、尿可替宁水平和性别分层分析中,线性回归分析选择不同的协变量进行校正。所有检验均为双侧检验,检验水准为 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 两组儿童颗粒物暴露水平和基本特征

高暴露组区域 $PM_{2.5}$ 、 PM_{10} 年平均暴露水平(环境监

测站) 均高于低暴露组, 分别是低暴露组的 1.7 和 2.1 倍 ($P<0.001$)。大气颗粒物高暴露组区域 (学校定点采样) $PM_{2.5}$ ($98.79\mu g\cdot m^{-3}$) 均比低暴露组 ($54.20\mu g\cdot m^{-3}$) 高 ($P=0.025$), 且 $PM_{2.5}$ 与 BaP 浓度 ($r=0.691$, $P<0.001$) 呈正相关。未发现两组儿童间年龄、性别、尿可替宁检出比例、白细胞计数有差异 ($P>0.05$) ; 高暴露组儿童血清 BPDE- 白蛋白加合物水平 [$(82.41\pm 20.12)\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$] 高于低暴露组 [$(64.84\pm 14.26)\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$] ($P<0.001$) ; 高暴露组儿童 BMI z- 评分超重比例 (34.57%) 高于低暴露组 (23.15%) ($P=0.045$)。见表 1。

表 1 颗粒物暴露组儿童人群基本情况
Table 1 General characteristics of children exposed to particulate matter

特征 Characteristic	低暴露组 (n=108) Low-PM exposed group	高暴露组 (n=162) High-PM exposed group	$t/\chi^2/W$	P
大气颗粒物年平均浓度 (Annual concentration of PM) [$M(P_{25}, P_{75})$]				
$PM_{2.5}/(\mu g\cdot m^{-3})$	46.00 (32.00, 66.00)	79.00 (57.00, 111.25)	14 898.00	<0.001 ^a
$PM_{10}/(\mu g\cdot m^{-3})$	82.00 (57.00, 106.25)	175.00 (126.00, 256.25)	25 983.00	<0.001 ^a
学校定点采样浓度 (Pollutant concentration at fixed monitoring sites) ($\bar{x}\pm s$)				
$PM_{2.5}/(\mu g\cdot m^{-3})$	54.20±12.69	98.79±52.09	-2.63	0.025 ^b
BaP/ (ng·m ⁻³)	1.27±0.35	3.24±2.87	-2.15	0.059 ^b
年龄/岁 (Age/years) ($\bar{x}\pm s$)	13.65±0.35	13.68±0.38	-0.77	0.442 ^b
性别 [n (构成比/%)] {Sex [n (constituent ratio/%)] }			2.34	0.126 ^c
男生 (Boys)	60 (55.56)	105 (64.81)		
女生 (Girls)	48 (44.44)	57 (35.19)		
BMI z- 评分 [n (构成比/%)] {BMI z-score [n (Proportion/%)] }			4.02	0.045 ^c
正常组 (Normal group)	83 (76.85)	106 (65.43)		
超重组 (Overweight group)	25 (23.15)	56 (34.57)		
尿可替宁检出比例 [n (构成比/%)] ^d {Urinary cotinine positive rate [n (Proportion/%)] } ^d	19 (18.27)	32 (20.00)	0.12	0.728 ^c
白细胞计数/ (10 ⁹ 个·L ⁻¹) [White blood cell count/ (10 ⁹ ·L ⁻¹)] [$M(P_{25}, P_{75})$]	6.43 (5.56, 7.49)	6.60 (5.80, 7.73)	8 012.5	0.242 ^a
血清 BPDE- 白蛋白加合物/ (nmol·L ⁻¹) [BPDE-Alb adducts/ (nmol·L ⁻¹)] ($\bar{x}\pm s$)	64.84±14.26	82.41 ±20.12	-8.39	<0.001 ^b

[注] a : Wilcoxon 秩和检验 ; b : t 检验 ; c : 卡方检验 ; d : 有 6 个缺失数据。
[Note] a: Wilcoxon rank sum test; b: t test; c: Chi-square test; d: Missing data in six cases.

2.2 颗粒物暴露与儿童白细胞 miR-638 表达改变

线性回归模型分析结果显示, 校正年龄、性别、BMI z- 评分、尿可替宁和白细胞计数水平后, 大气颗粒物高暴露组儿童白细胞 miR-638 表达升高, 是低暴露组的 1.4 倍 ($P<0.001$)。亚组分析发现, 校正协变量

后, 在男生中, 高暴露组白细胞 miR-638 表达水平高于低暴露组 ($P=0.002$) ; 在正常体重儿童中, 高暴露组 miR-638 表达水平高于低暴露组 ($P=0.011$) ; 在尿可替宁未检出儿童中, 高暴露组 miR-638 表达水平高于低暴露组 ($P=0.006$)。见表 2。

表 2 两组儿童外周血白细胞 miR-638 水平比较
Table 2 Comparison of miR-638 expression in peripheral blood leukocytes between low- and high-PM exposed groups

特征 (Characteristic)	低暴露组 (Low-PM exposed group)		高暴露组 (High-PM exposed group)		W	P ^a	t	P
	n	M (P ₂₅ , P ₇₅)	n	M (P ₂₅ , P ₇₅)				
性别 (Gender)								
男生 (Boys)	60	0.67 (0.47, 1.18)	105	0.98 (0.62, 1.53)	2 250.50	0.002	3.12	0.002 ^c
女生 (Girls)	48	0.76 (0.48, 1.36)	57	1.05 (0.61, 1.67)	1 103.50	0.089	0.96	0.339 ^c
BMI z- 评分 (BMI z-score)								
正常组 (Normal group)	83	0.68 (0.44, 1.19)	106	0.97 (0.58, 1.50)	3 268.00	0.002	2.56	0.011 ^d
超重组 (Overweight group)	25	0.79 (0.58, 1.30)	56	1.05 (0.64, 1.56)	567.50	0.177	1.01	0.314 ^d
尿可替宁 (Urinary cotinine)								
未检出组 (Negative group)	85	0.68 (0.45, 1.18)	128	0.92 (0.61, 1.43)	4 166.00	<0.001	2.79	0.006 ^e
检出组 (Positive group)	19	0.91 (0.62, 1.46)	32	1.37 (0.63, 1.95)	237.00	0.195	1.13	0.266 ^e
总体 (Total)	108	0.70 (0.47, 1.20)	162	1.00 (0.62, 1.53)	6 669.00	<0.001	2.96	0.003 ^b

[注] miR-638、白细胞计数经 ln 转换。a : Wilcoxon 秩和检验 ; b : 线性回归校正年龄、性别、BMI z- 评分、尿可替宁和白细胞计数水平 ; c : 线性回归校正年龄、尿可替宁、BMI z- 评分、白细胞计数水平 ; d : 线性回归校正年龄、性别、尿可替宁、白细胞计数水平 ; e : 线性回归校正年龄、性别、BMI z- 评分、白细胞计数水平。
[Note] miR-638 and white blood cell counts are converted by ln transformation. a: Wilcoxon rank sum test; b: The linear regression model adjusts age, gender, BMI z-score, urinary cotinine, and white blood cell count; c: The linear regression model adjusts age, urinary cotinine, BMI z-score, and white blood cell count; d: The linear regression model adjusts age, gender, urinary cotinine, and white blood cell count; e: The linear regression model adjusts age, gender, BMI z-score, and white blood cell count.

2.3 血清 BPDE- 白蛋白加合物与白细胞 miR-638 相关性分析

如图1所示, 全人群、高暴露组儿童中血清 BPDE- 白蛋白加合物与白细胞 miR-638 表达水平呈正相关 (r 值分别为 0.25、0.22, $P < 0.05$)。

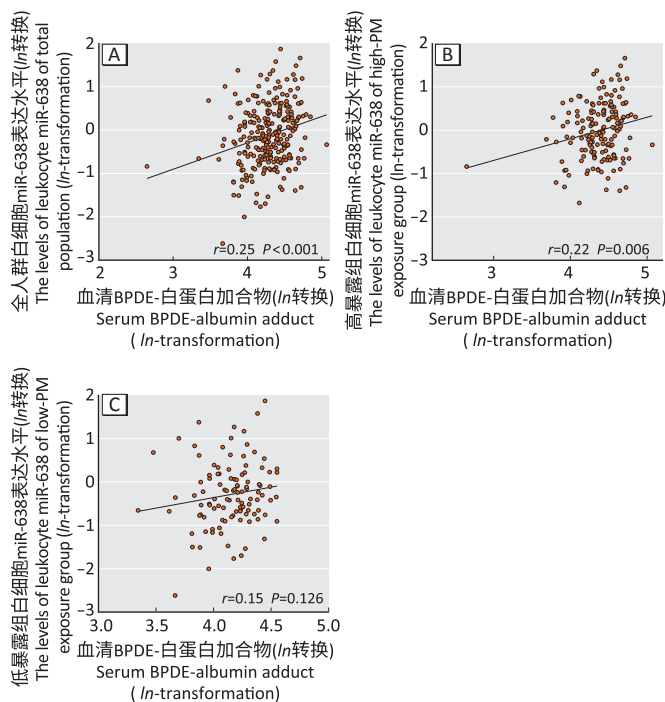


图1 全人群 (A)、高暴露组 (B) 和低暴露组 (C) 血清 BPDE- 白蛋白加合物与白细胞 miR-638 相关分析

Figure 1 Correlation between serum BPDE-albumin adducts and leukocyte miR-638 expression among total population (A), high-PM exposure group (B), and low-PM exposure group (C)

2.4 血清 BPDE- 白蛋白加合物与白细胞 miR-638 剂量-效应关系分析

线性回归模型分析结果显示, 校正年龄、性别、尿可替宁、BMI z-评分和白细胞数目等变量后, 儿童血清 BPDE- 白蛋白加合物每增加一个 IQR ($27.09 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 外周血白细胞 miR-638 表达增加 24.56% ($P < 0.001$); 高暴露组儿童血清 BPDE- 白蛋白加合物每增加一个 IQR ($25.95 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 其白细胞 miR-638 表达增加 19.28% ($P = 0.003$)。亚组分析中, 男生和女生血清 BPDE- 白蛋白加合物每增加一个 IQR ($27.34 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $28.84 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 白细胞 miR-638 表达增加 20.60% 和 34.57% ($P < 0.05$); 正常体重儿童组, 血清 BPDE- 白蛋白加合物每增加一个 IQR ($24.74 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$), miR-638 表达增加 26.89% ($P < 0.001$); 在尿可替宁未检出组中, 儿童血清 BPDE- 白蛋白加合物每增加一个 IQR ($25.06 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$), miR-638 表达增加 23.78% ($P < 0.001$)。详见表 3。

表3 不同人群中 BPDE- 白蛋白加合物与 miR-638 剂量-效应关系分析

Table 3 Dose-effect relationship between BPDE-albumin adducts and miR-638 in different groups of children

特征 Characteristic	IQR	改变量百分比 (95% CI) / % ^a Percent change (95% CI) / % ^a	t	P
全人群 (n=270) ^b Total ^b	27.09	24.56 (11.34, 39.35)	3.86	<0.001
高暴露组 (n=162) ^b High-PM exposure group ^b	25.95	19.28 (6.27, 33.90)	3.01	0.003
低暴露组 (n=108) ^b Low-PM exposure group ^b	18.54	10.26 (-9.17, 33.85)	1.00	0.320
性别 ^c Gender ^c				
男生 (n=165) Boys	27.34	20.60 (5.36, 38.05)	2.74	0.007
女生 (n=105) Girls	28.84	34.57 (6.76, 69.62)	2.55	0.012
BMI z-评分 ^d BMI z-score ^d				
正常组 (n=189) Normal group	24.74	26.89 (11.81, 44.01)	3.71	<0.001
超重组 (n=81) Overweight group	30.71	14.68 (-8.88, 44.32)	1.19	0.239
尿可替宁 ^e Urinary cotinine ^e				
未检出组 (n=213) Negative group	25.06	23.78 (9.43, 40.02)	3.41	<0.001
检出组 (n=51) Positive group	27.16	27.02 (-0.74, 62.55)	1.95	0.057

[注] miR-638、血清 BPDE- 白蛋白加合物、白细胞计数经 $\ln$ 转换。a: 血清 BPDE- 白蛋白加合物每改变一个 IQR, miR-638 变化百分数; b: 调整年龄、性别、BMI z-评分、尿可替宁水平和白细胞计数; c: 调整年龄、尿可替宁水平、BMI z-评分和白细胞计数; d: 调整年龄、性别、尿可替宁水平和白细胞计数; e: 调整年龄、性别、BMI z-评分和白细胞计数。

[Note] miR-638, serum BPDE-albumin adduct, white blood cell count are converted by $\ln$ transformation. a: The percentage change of miR-638 for each IQR increase of serum BPDE-albumin adducts; b: The model adjusts age, gender, BMI z-score, urinary cotinine, and white blood cell count; c: The model adjusts age, urinary cotinine, BMI z-score, and white blood cell count; d: The model adjusts age, gender, urinary cotinine, and white blood cell count; e: The model adjusts age, gender, BMI z-score, and white blood cell count.

3 讨论

大气颗粒物可以引发儿童体内的氧化应激和炎症反应改变, 进而导致呼吸系统和心血管系统疾病^[16-17]。大气颗粒物中较为关注的有机类有害组分是 PAH, 其中 BaP 经机体代谢产生 BPDE- 白蛋白加合物, 在血液中半衰期较长, 可反映多环芳烃的长期暴露^[18-19]。结合暴露评估和表观遗传学生物标志物分析, 本研究发现高水平颗粒物暴露组儿童中, 血清 BPDE- 白蛋白加合物与白细胞 miR-638 正相关, 并表现出较好的剂量-效应关系。这提示在儿童等敏感人群中, 颗粒物中 PAH 组分可以通过调控 miRNA 等分子改变, 诱导机体

的有害效应。

暴露于环境污染物时,外周血白细胞 miR-638 表达失调,可调控相关靶基因参与 DNA 损伤、氧化应激反应^[11, 20-23]。本研究结果显示,大气颗粒物高暴露组儿童外周血白细胞 miR-638 高于低暴露组,并与 PAH 组分具有暴露-反应关系。Li 等^[22]研究发现 miR-638 在 16HBE 细胞中表达与 BaP 呈剂量-效应依赖式增加,人群研究验证发现与对照组相比,暴露于 PAH 的焦炉工人外周血白细胞 miR-638 表达增加了 72%,这与本研究结果相一致。体外研究发现,亚硝酸盐染毒后,人 Jurkat 细胞 miR-638 表达水平也升高^[23]。Christenson 等^[13]发现 miR-638 随着肺气肿的严重程度增加而表达上调,提示 miR-638 靶向调控细胞外基质修复相关基因,导致修复能力下降,引起氧化损伤并进一步加重肺气肿的进程。

暴露于 PM_{2.5} 中的 PAH 组分时,无论是成人还是儿童,男性的吸入率和暴露时间均高于女性^[24]。本研究发现男生和女生体内的血清 BPDE-白蛋白加合物水平与 miR-638 水平存在剂量-效应关系,但是两组间比较时发现高暴露组男生白细胞 miR-638 水平高于低颗粒物暴露组,这可能是男生较女生暴露较多的颗粒物及有害组分。

环境烟草暴露是大气颗粒物研究中的主要混杂因素,也会影响儿童的健康^[25]。本研究采用尿可替宁水平评估儿童烟草暴露情况,研究发现在尿可替宁未检出组,高颗粒物暴露组儿童白细胞 miR-638 水平升高。而尿可替宁检出组却没有发现该差异。提示不存在烟草暴露时,儿童外周血白细胞 miR-638 表达水平升高,可能是颗粒物 PAH 组分致儿童血清 BPDE-白蛋白加合物升高所致;烟草中其他成分暴露可能干扰了白细胞 miR-638 表达,颗粒物是否与香烟产生协同作用影响 miR-638 表达的机制尚不清楚,值得进一步研究。本研究中,正常体重儿童中高暴露组 miR-638 表达水平高于低暴露组,且存在剂量-效应关系,而超重儿童两组间没有差异。Iacomino 等^[26]也发现儿童超重/肥胖是血液中 miRNA 改变的危险因素,可引起外周血中大部分 miRNA 表达降低。

本研究的主要优势为:(1) 研究人群为寄宿制学校的儿童,选择学校附近监测站数据能够反映儿童长期暴露水平,两个学校食堂不提供烧烤类食品,孩子的家庭中均使用清洁燃料,减少了大部分饮食和室内污染多环芳烃来源的影响;(2) 检测了尿可替宁水平

评估烟草暴露,作为协变量纳入统计模型,排除了烟草混杂因素的影响,从而增加血清 BPDE-白蛋白加合物评估颗粒物暴露水平的可靠性;(3) 据了解这是第一个研究儿童颗粒物暴露与白细胞 miR-638 表达水平关系,分析血清 BPDE-白蛋白加合物与白细胞 miR-638 的剂量-效应关系。本研究也存在一定的局限性:(1) 作为一项横断面调查研究,不足以进行因果关系的推断,还需要进一步深入研究;(2) 由于学龄儿童上课、体育运动等特殊性质,较难开展个体暴露监测,只能通过定点采样结果评估两组儿童 PM 暴露水平。

综上所述,大气颗粒物暴露可致儿童外周血白细胞 miR-638 水平升高,颗粒物中的多环芳烃组分可能是引起白细胞 miR-638 表达改变的主要有害因素。儿童血清中的多环芳烃-白蛋白加合物与 miR-638 存在剂量-效应关系。研究提示,在儿童等敏感人群的环境健康保护工作中,不仅要监测和控制颗粒物水平,更要关注其中多环芳烃等有害组分的控制和标志物研究。

参考文献

- [1] World Health Organization. Household air pollution and health [R]. Geneva: WHO, 2018.
- [2] JUNAID M, SYED JH, ABBASI NA, et al. Status of indoor air pollution (IAP) through particulate matter (PM) emissions and associated health concerns in South Asia [J]. Chemosphere, 2018, 191: 651-663.
- [3] SCHWARTZ J. Air pollution and children's health [J]. Pediatrics, 2004, 113 (4S): 1037-1043.
- [4] OLIVEIRA M, SLEZAKOVA K, DELERUE-MATOS C, et al. Children environmental exposure to particulate matter and polycyclic aromatic hydrocarbons and biomonitoring in school environments: A review on indoor and outdoor exposure levels, major sources and health impacts [J]. Environ Int, 2019, 124: 180-204.
- [5] LI J, WANG T, WANG Y, et al. Particulate matter air pollution and the expression of microRNAs and pro-inflammatory genes: Association and mediation among children in Jinan, China [J]. J Hazard Mater, 2020, 389: 121843.
- [6] JIN L, XIE J, WONG CK, et al. Contributions of city-specific fine particulate matter (PM_{2.5}) to differential *in vitro* oxidative stress and toxicity implications between Beijing and Guangzhou of China [J]. Environ Sci Technol, 2019, 53

- (5) : 2881-2891.
- [7] NEOPHYTOU A M, HART J E, CHANG Y, et al. Short-term traffic-related exposures and biomarkers of nitro-PAH exposure and oxidative DNA damage [J] . *Toxics*, 2014, 2 (3) : 377-390.
- [8] BAI Y, FENG W, WANG S, et al. Essential metals zinc, selenium, and strontium protect against chromosome damage caused by polycyclic aromatic hydrocarbons exposure [J] . *Environ Sci Technol*, 2016, 50 (2) : 951-960.
- [9] CHEN L, HEIKKINEN L, WANG C, et al. Trends in the development of miRNA bioinformatics tools [J] . *Brief Bioinform*, 2019, 20 (5) : 1836-1852.
- [10] TUMOLO MR, PANICO A, DE DONNO A, et al. The expression of microRNAs and exposure to environmental contaminants related to human health : a review [J] . *Int J Environ Health Res*, 2020, 12 : 1-23.
- [11] KUCHER A N. Sensitive to the effects of environmental factors miR-638 and common diseases [J] . *Ecol Genet*, 2019, 17 (3) : 99-110.
- [12] WAN Y, CUI R, GU J, et al. Identification of four oxidative stress-responsive MicroRNAs, miR-34a-5p, miR-1915-3p, miR-638, and miR-150-3p, in hepatocellular carcinoma [J] . *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017 : 5189138.
- [13] CHRISTENSON SA, BRANDSMA CA, CAMPBELL JD, et al. miR-638 regulates gene expression networks associated with emphysematous lung destruction [J] . *Genome Med*, 2013, 5 (12) : 114.
- [14] WANG T, WANG Y, XU M, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons in particulate matter and serum club cell secretory protein change among schoolchildren : A molecular epidemiology study [J] . *Environ Res*, 2021, 192 : 110300.
- [15] World Health Organization. WHO Child Growth Standards : Length/height-for-age, weight-for-age, weight-for-length, weight-for-height and body mass index-for-age : methods and development [M] . Geneva : World Health Organization, 2006 : 229-303.
- [16] LI X, ZHANG X, ZHANG Z, et al. Air pollution exposure and immunological and systemic inflammatory alterations among schoolchildren in China [J] . *Sci Total Environ*, 2019, 657 : 1304-1310.
- [17] BAE S, PAN X C, KIM S Y, et al. Exposures to particulate matter and polycyclic aromatic hydrocarbons and oxidative stress in schoolchildren [J] . *Environ Health Perspect*, 2010, 118 (4) : 579-583.
- [18] FERTMANN R, TESSERAUX I, SCHÜMANN M, et al. Evaluation of ambient air concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons in Germany from 1990 to 1998 [J] . *J Expo Sci Environ Epidemiol*, 2002, 12 (2) : 115-123.
- [19] WANG H, YANG X B, LIU A L, et al. Significant positive correlation of plasma BPDE-albumin adducts to urinary 1-hydroxypyrene in coke oven workers [J] . *Biomed Environ Sci*, 2007, 20 (3) : 179-183.
- [20] VRABEC K, BOŠTJANČIČ E, KORITNIK B, et al. Differential expression of several miRNAs and the host genes AATK and DNM2 in leukocytes of sporadic ALS patients [J] . *Front Mol Neurosci*, 2018, 11 : 106.
- [21] TE J L, DOZMOROV I M, GUTHRIDGE J M, et al. Identification of unique microRNA signature associated with lupus nephritis [J] . *PLoS One*, 2010, 5 (5) : e10344.
- [22] LI D, WANG Q, LIU C, et al. Aberrant expression of miR-638 contributes to benzo (a) pyrene-induced human cell transformation [J] . *Toxicol Sci*, 2012, 125 (2) : 389-391.
- [23] STURCHIO E, COLOMBO T, BOCCIA P, et al. Arsenic exposure triggers a shift in microRNA expression [J] . *Sci Total Environ*, 2014, 472 : 672-680.
- [24] MO Z, WANG Z, MAO G, et al. Characterization and health risk assessment of PM_{2.5}-bound polycyclic aromatic hydrocarbons in 5 urban cities of Zhejiang Province, China [J] . *Sci Rep*, 2019, 9 (1) : 7296.
- [25] BENOWITZ N L, JAIN S, DEMPSEY D A, et al. Urine cotinine screening detects nearly ubiquitous tobacco smoke exposure in urban adolescents [J] . *Nicotine Tob Res*, 2016, 19 (9) : 1048-1054.
- [26] IACOMINO G, RUSSO P, MARENA P, et al. Circulating microRNAs are associated with early childhood obesity : results of the I. Family study [J] . *Genes Nutr*, 2019, 14 : 2.

(英文编辑：汪源；责任编辑：陈姣)