

参考文献

- 1 罗勤, 张晓莉, 李兵, 等. 单核细胞增生李斯特菌 PrfA 蛋白转录调控毒力基因表达的分子机制. 微生物学通报, 2008, 35(2): 275 - 280
- 2 Whitchurch CB, Tolker - Nielsen T, Ragas PC, *et al.* Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science*, 2002, 295(5559): 1487
- 3 Jeong DK, Frank JF. Growth of *Listeria monocytogenes* at 10°C in biofilms with micro - organisms isolated from meat and dairy processing environments. *Food protection*, 1994, 57: 415 - 424
- 4 Branda SS, Vik A, Friedman L, *et al.* Biofilms: the matrix revisited. *Trends in Microbiology*, 2005, 13(1): 20 - 26
- 5 Djordjevic D, Wiedmann M, Mclelland LA. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68(6): 2950 - 2958
- 6 Borucki MK, Peppin JD, White D, *et al.* Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(12): 7336 - 7342
- 7 Rieu A, Weidmann S, Garmyn D, *et al.* Agr system of *Listeria monocytogenes* EGDe: role in adherence and differential expression pattern. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(12): 6125 - 6133
- 8 Sela S, Frank S, Belasov E, *et al.* Mutation in the LuxS gene influences *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72(12): 5653 - 5658
- 9 Gueriri I, Cyneynatus C, Dubrac S, *et al.* The DegU orphan response regulator of *Listeria monocytogenes* autorepresses its own synthesis and is required for bacterial motility, virulence and biofilm formation. *Microbiology*, 2008, 154(8): 2251 - 2264
- 10 Begley M, Kerr C, Hill C. Exposure to bile influences biofilm formation by *Listeria monocytogenes*. *Gut Pathogens*, 2009, 1: 11 - 14
- 11 Hain T, Hossain H, Chatterjee SS, *et al.* Temporal transcriptomic analysis of the *Listeria monocytogenes* EGD - e sigmaB regulon. *BMC Microbiol*, 2008, 8: 20
- 12 Begley M, Sleator RD, Gahan CG, *et al.* Contribution of three bile - associated loci, bsh, pva, and btlB, to gastrointestinal persistence and bile tolerance of *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun*, 2005, 73(2): 894 - 904
- 13 Kreft J, Vazquez - Boland JA. Regulation of virulence genes in *Listeria*. *Int J Med Microbiol*, 2001, 291(2): 145 - 157
- 14 Navarre WW, Schneewind O. Surface proteins of gram - positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiology and Molecular Biology*, 1999, 63(1): 174 - 229
- 15 Glaser P, Frangeul L, Buchrieser C, *et al.* Comparative Genomics of *Listeria* Species. *Science*, 2001, 294(5543): 849 - 852
- 16 Cafiso V, Bertuccio T, Santagati M, *et al.* Presence of the ica operon in clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* and its role in biofilm production. *Clinical microbiology and infections*, 2004, 10(12): 1081 - 1088
- 17 Toledo - Arana A, Valle J. The Enterococcal surface protein Esp is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67(10): 4538 - 4545
- 18 Li YH, Hanna MN, Svendsaeter G, *et al.* Cell density modulates acid adaptation in *Streptococcus mutans*: implications for survival in biofilms. *Journal of bacteriology*, 2001, 183(23): 6875 - 6884
- 19 Senadheera MD, Guggenheim B, Huang YC, *et al.* A VicRK signal transduction system in *Streptococcus mutans* affects gtfBCD, gbpB, and ftf expression, biofilm formation, and genetic competence development. *Journal of bacteriology*, 2005, 187(12): 4064 - 4076

(收稿: 2010 - 05 - 04)

北京地区哮喘儿童 ORMDL3 基因表达水平、生活方式与室内空气质量的相关性研究

金 哲 蔡 欣 王 强 李 红 徐春雨 王 秦 方建龙 高 洁 付文亮 徐东群 徐东刚

摘 要 目的 研究北京地区儿童 ORMDL3 基因表达水平、生活方式、室内空气质量与哮喘发生的相关性。方法 采用病例 - 对照方法进行实验设计。使用 RT - PCR 法检测儿童 ORMDL3 基因表达水平;通过《国际儿童哮喘及过敏研究 (ISSAC) 问卷》收集儿童生活方式信息;并根据《室内空气质量标准 (GB/T18883 - 2002)》中规定的检验方法对室内空气中 PM_{2.5}、VOCs、甲醛浓度及空气温湿度进行监测。使用 *t* 检验、卡方检验分析病例组与对照组儿童 ORMDL3 基因表达水平,生活方式与室内空气质量差异;使用 *Logistic* 逐步回归来分析 ORMDL3 基因表达水平,生活方式与室内空气质量对与哮喘之间相关性。**结果**

基金项目:国家科技支撑计划项目课题 (2006BAI9B05 - 3)

作者单位:100850 北京,中国人民解放军军事医学科学院基础医学所 (金哲、蔡欣、高洁、付文亮、徐东刚);中国疾病预防控制中心环境与健康相关产品安全所 (王强、李红、徐春雨、王秦、方建龙、徐东群) (注:金哲、蔡欣为共同第一作者)

通讯作者:徐东刚,电子信箱:xudg@nic.bmi.ac.cn;徐东群,电子信箱:dongqunxu@126.com

ORMDL3 基因表达水平在病例组与对照组中有显著差异 ($P < 0.05$)。在早发型哮喘患儿中,ORMDL3 基因表达水平、哮喘家族史与哮喘显著相关 ($P < 0.05$)。而在迟发型哮喘患儿中,ORMDL3 基因表达水平、采暖方式、室内空气湿度与哮喘显著相关 ($P < 0.05$)。结论 ORMDL3 基因表达水平与儿童哮喘的发生密切相关,早发型哮喘患儿与遗传因素有显著关联,而迟发型哮喘患儿中遗传因素与环境因素均与哮喘相关。

关键词 室内空气质量 生活方式 儿童哮喘 ORMDL3 基因 病例对照队列

Study of Association between ORMDL3 Expression Level, Life - style Characters, Indoor Air Qualities and Childhood Asthma in Beijing.

Jin Zhe, Cai Xin, Wang Qiang, Li Hong, Xu Chunyu, Wang Qin, Fang Jianlong, Gao Jie, Fu Wenliang, Xu Dongqun, Xu Donggang.
Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China

Abstract Objective To Study whether ORMDL3 expression level, life - style and indoor air quality were associated with childhood asthma in Beijing, China. **Methods** We used case - control design to perform our study. Life - style information was collected through ISAAC (International Study of Asthma and Allergies in Childhood) questionnaire results. RT - PCR was performed to test ORM - DL3 expression levels. PM2.5, VOC, formaldehyde and humidity in bedrooms and living rooms were monitored by Indoor Air Quality Standard (GB/T18883 - 2002). T - test, chi - square and logistic regression with stepwise selection ($SLE = 0.2$, $SLS = 0.2$) analysis were used to test the association between ORMDL3 expression level, life - style, indoor air quality and childhood asthma. **Results** Expression level of ORMDL3 was associated with childhood asthma ($P < 0.05$). ORMDL3 expression level and parent asthma history were associated with early - onset childhood asthma ($P < 0.05$), while ORMDL3 expression level, the way of heating and humidity were associated with late - onset childhood asthma. **Conclusion** ORMDL3 expression level was associated with childhood asthma in Beijing, China. Genetic factors were associated with early - onset childhood asthma, and both genetic factors and environmental factors were associated with late - onset asthma.

Key words Indoor air quality; Life - style characters; Childhood asthma; ORMDL3; Case - control cohort

哮喘是一种复杂的疾病,涉及到机体免疫状态、遗传、变应原和环境等多种因素,其详细的发病机制尚未阐明^[1]。近年来基因连锁和基因关联研究已经确定 25 个以上的哮喘或过敏易感基因位点,然而,这些特性在不同地域的不同人种中存在差异。Moffat 等发现,候选基因 ORMDL3 的 SNP 特征与儿童哮喘的易感性及哮喘严重程度相关,但仍存在显著的种族差异^[2-5];同时,更多的证据表明室内空气质量与哮喘显著关联。候选基因 ORMDL3 SNP 的关联差异及各种空气污染物激发作用的差异均提示哮喘的病理机制与环境因素及遗传因素相关。尽管环境基因组研究工作已经开展,由于介导哮喘的候选基因及环境因素众多,相关研究结果仍有待进一步验证^[6-10]。ORMDL3 作为一个新发现的哮喘候选基因已在多个种族的人群中进行了研究,而在中国北方地区人群中尚属空白^[2-5,11]。本研究拟通过儿童哮喘的病例对照研究分析 ORMDL3 基因表达水平、生活习惯、空气质量与儿童哮喘相关性,探索环境及遗传因素对儿童哮喘发生的影响,以期进一步揭示儿童哮喘的发病机制。

对象与方法

1. 研究对象:以在北京市儿童医院及首都儿科研究所确诊的门诊及住院儿童哮喘新发病例及遗传性过敏症患者为病

例组;来自上述两个医院的健康体检儿童及外科非炎症病人为对照组,所有对照组儿童均无过敏反应家族史及个人过敏反应疾病史,且均无哮喘史。共取得对照组 182 例样本,病例组 217 例样本。研究对象均为北京地区汉族儿童。

2. 方法:(1)模板 cDNA 的制备:选取病例和对照组中各 60 例样本血液,收集白细胞后加入 TRNzol(天根生化科技,北京)提取总 RNA,使用 TIANScript cDNA 试剂盒(天根生化科技,北京)反转录合成 cDNA 模板,紫外检测其浓度为 100 ~ 500ng/μl。(2)引物设计与合成:在 NCBI 提供的 Genbank 数据库中查询到 ORMDL3 基因序列,利用 Primer 5.0 软件设计引物,由北京博迈德生物公司合成。上游引物序列:5' TTGATCTTCGCCCCACACA 3',下游引物序列:5' GCACATGCTTTTACCCTAC 3',其 PCR 产物为 462bp。(3)RT - PCR 反应条件:反应体系体积 20μl,包括 cDNA 模板 0.5μl(25μg/ml),引物各 1μl(20mmol/L),dNTPs(2.5mmol/L)2μl,10 × Ex Buffer 2μl,ExTaq DNA 聚合酶(5U/μl)0.5μl(TaKaRa,日本),用灭菌重蒸馏水 12.5μl 补至 20μl。PCR 反应循环参数:95℃ 预变性 5min;95℃ 变性 30s,58℃ 复性 30s,72℃ 延伸 35s,30 个循环后 72℃ 再延伸 10min。PCR 反应使用 MY CYCLER (BIARAD,美国)基因扩增仪。(4)ORMDL3 基因表达水平测定:使用 BandScan 软件比较(Glyko, Inc)PCR 扩增产物与内参(GAPDH)的灰度值,分析得到 ORMDL3 基因表达水平。(5)生活方式信息收集:通过《国际儿童哮喘及过敏研究(international study of asthma and allergies in childhood, ISAAC)问卷》收集信息,主要包括:患儿年龄、性别、哮喘家族史、烹饪所用燃料、家庭吸烟习惯、居住环境、采暖方式这 7 个代表性数

据。(6)室内空气污染物的采样及分析方法:采样前通知受试对象至少关闭门窗 12h。VOCs 采用 TenaxTA 吸附管采样,采样流量 200ml/min,采集 30min;甲醛用气泡吸收管采样,采样流量 500ml/min,采集 45min;NO₂ 采用多孔玻板吸收管,采样流量为 500ml/min,采样时间 45min;PM_{2.5} 采用 SKC 个体采样器,用玻璃纤维滤膜以 4000ml/min 采样流量,连续采样 6h。VOCs 的分析采用二次热解吸/毛细管气相色谱法,甲醛的分析采用 AHMT 分光光度法,NO₂ 分析采用改进的 Saltzman 比色法,PM_{2.5} 分析采用重量法。室内温度湿度测量具体操作参见《室内空气质量标准(GB/T 18883-2002)》。(7)统计分析:使用 SAS9.1 软件(SAS Institute, 美国)进行统计分析。使用 *t* 检验分析病例组与对照组室内空气质量,ORMDL3 基因表达水平间差异;使用卡方检验分析病例组与对照组儿童生活方式差异;使用 Logistic 逐步回归(*SLE* = 0.2, *SLS* = 0.2)分析 ORMDL3 基因表达水平、生活方式、室内空气质量与哮喘发生的相关性。

结 果

1. 病例组与对照组 ORMDL3 基因表达水平比较:由 *t* 检验发现 ORMDL3 基因表达比率(图 1)及水平(图 2)在儿童哮喘病例组与对照组中有显著差异(*P* < 0.0001)。

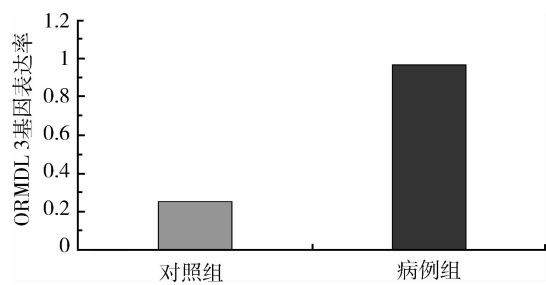


图 1 ORMDL3 基因在病例组及对照组间的表达比率差异

2. 病例组与对照组儿童室内空气质量比较:经 *t* 检验病例组与对照组哮喘儿童居住环境空气污染物浓度 TVOC(*P* = 0.33), PM_{2.5}(*P* = 0.70), 甲醛(*P* =

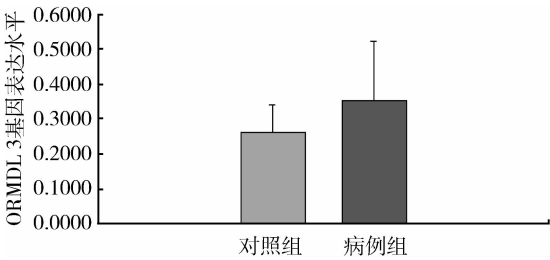


图 2 ORMDL3 基因在病例组及对照组间的表达水平差异

0.17)、NO₂(*P* = 0.91) 浓度与对照组相比无显著差异。而病例组与对照组中哮喘儿童居住环境空气温度没有差异(*P* = 0.647), 而空气湿度有显著差异(*P* = 0.041)。

3. 病例组与对照组儿童生活方式差异:经卡方检验,家庭哮喘史(*P* < 0.0001)及住房供暖方式(*P* = 0.015)在病例组与对照组间存在显著差异;而住所位置(*P* = 0.207)、烹饪所用燃料(*P* = 0.221)、家庭吸烟习惯(*P* = 0.191)在两组间无显著差异。

4. ORMDL3 基因表达水平、儿童生活方式、室内空气质量与儿童早发型哮喘、迟发型哮喘相关性分析:根据患儿信息,3 岁以下(含)归类为早发型哮喘,3 岁以上 14 岁以下归类为迟发型哮喘^[12]。由 Logistic 逐步回归(*SLE* = 0.2, *SLS* = 0.2)对 ORMDL3 基因表达水平、儿童生活方式与儿童哮喘相关性进行分析。在早发型哮喘中,ORMDL3 基因表达水平、哮喘家族史与儿童哮喘相关(表 1);而在迟发型 ORMDL3 基因表达水平,采暖方式及室内空气湿度与儿童哮喘相关(表 2)。

表 1 ORMDL3 基因表达水平、生活方式、室内空气质量与早发型儿童哮喘相关性分析

相关因素	β	STB	<i>P</i>	OR(95% CI)
ORMDL3 表达水平	-2.3908	-0.6155	0.0111	0.092(0.014~0.579)
哮喘家族史	-2.5439	-0.5791	0.0073	0.079(0.012~0.503)

表 2 ORMDL3 基因表达水平、生活方式、室内空气质量与迟发型儿童哮喘相关性分析

相关因素	β	STB	<i>P</i>	OR(95% CI)
ORMDL3 表达水平	-2.5845	-0.7081	<0.0001	0.075(0.029~0.199)
哮喘家族史	-1.0762	-0.2400	0.0509	0.341(0.116~1.004)
采暖方式	0.7064	0.2524	0.0380	2.027(1.040~3.949)
室内空气湿度	2.7494	0.2812	0.0265	15.633(1.378~177.391)

讨 论

Moffatt 等最近完成的关于哮喘的全基因组关联

研究(GWA)鉴定出染色体 17q21 是白种儿童哮喘的一个候选位点^[2]。他们继续研究发现其关联性是由

染色体上 ORMDL3 基因上的 SNP 确定的。尽管 ORMDL3 基因是在人体内部普遍表达的,但是它的功能及其在相关病理过程中所扮演的角色目前仍未明了。因此,我们选择 ORMDL3 基因作为相关性研究中的遗传因素来进行分析。本研究发现在北京地区其表达水平与儿童哮喘的发生密切相关。

本研究首次研究了 ORMDL3 基因表达水平,儿童生活方式与室内空气质量与儿童哮喘的发病的关联性。我们发现不同年龄哮喘患儿中相关因素有显著变化,因此我们将病例组分为早发型哮喘儿童(≤ 3 岁)与迟发型哮喘儿童(3~14岁)。使用 Logistic 逐步回归的方法分析了 ORMDL3 基因表达水平、患儿年龄、性别、哮喘家族史、家庭吸烟习惯、室内空气质量后,室内空气污染物均被剔除。而由表 1、表 2 标准化偏回归系数(STB)可见,以 ORMDL3 基因表达水平及哮喘家族史为代表的遗传因素是儿童哮喘发生的最重要因素,即印证了遗传因素对哮喘影响的主导作用;而采暖方式、室内空气质量等因素的贡献则表明了环境因素可能存在的协同作用。遗传因素主要与早发型儿童哮喘相关;而遗传因素、环境因素与迟发型儿童哮喘相关。这个结果提示了在一定遗传背景下,环境因素对儿童哮喘可能具有激发作用。环境因素可能改变了某些基因的活化区域,从而在某些特定环境背景下调控哮喘的基因活化或表达上调,即携带易感基因型的易感人群经环境因素的协同作用激发了哮喘的发病。因室内空气采样所需时间较长,对被测家庭生活影响较大,故我们获得的样本量相对较小,其监测结果可能存在一定的抽样误差。同时室内空气污染物含量在病例组及对照组中没有统计学差异,且均低于中《室内空气质量标准(GB/T 18883-2002)》所规定的上限。所以室内空气污染物与儿童哮喘没有显著相关性的结果需要更多的验证。此外,我们对家庭室内污染物的监测只做了一次监测,而不是连续动态的监测结果,因此还不能认为室内空气污染物与儿童哮喘不相关。另外,也还需要在其他国家的不同种族的人群中进行重复验证。

综上所述,本研究在国内首次证明了 ORMDL3 基因是北京儿童哮喘的重要相关遗传因素,并且随着

年龄的增加,采暖方式、室内空气湿度等环境因素与儿童哮喘密切相关。研究表明除了遗传因素外,环境因素对儿童哮喘的发生亦有一定影响。

参考文献

- 1 Ober C. Perspectives on the past decade of asthma genetics [J]. Clin Immunol, 2005, 116(2): 274-278
- 2 Moffatt MF, Kabesch M, Liang L, *et al.* Genetic variants regulating ORMDL3 expression contribute to the risk of childhood asthma [J]. Nature, 2007, 448(7152): 470-473
- 3 Galanter J, Choudhry S, Eng C, *et al.* ORMDL3 gene is associated with asthma in three ethnically diverse populations [J]. Am Respir Crit Care Med, 2008, 177(11): 1194-1200
- 4 Hirota T, Harada M, Sakashita M, *et al.* Genetic polymorphism regulating ORM1-like3 (*Saccharomyces cerevisiae*) expression is associated with childhood atopic asthma Japanese population [J]. Clin Immunol, 2008, 121(4): 769-770
- 5 TF Leung, H S Sy, *et al.* Asthma and atopy are associated with chromosome 17q21 markers in Chinese children [J]. Allergy, 2009, 64(4): 621-628
- 6 Wu H, Romieu I, *et al.* Genetic variation in ORM1-like 3 (ORMDL3) and gasdermin-like (GSDML) and childhood asthma [J]. Allergy, 2009, 64(4): 629-635
- 7 Salam MT, Islam T, Gauderman J, *et al.* Roles of arginase variants, atopy, and ozone in childhood asthma [J]. Allergy Clin Immunol, 2009, 123(3): 596-602
- 8 Li YF, Gauderman WJ, Conti DV, *et al.* Glutathione S-Transferase P1, Maternal Smoking, and Asthma in Children: A Haplotype-Based Analysis [J]. Environmental Health Perspectives, 2008, 116(3): 409-415
- 9 Bouzigon E, Corda E, Aschard H, *et al.* Effect of 17q21 variants and smoking exposure in early-onset asthma [J]. N Engl Med, 2008, 359(19): 1985-1994
- 10 Islam T, Berhane K, McConnell R, *et al.* Glutathione-S-transferase (GST) P1, GSTM1, exercise, ozone and asthma incidence in school children [J]. Thorax, 2009, 64(3): 197-202
- 11 Tavendale R, Macgregor DF, Mukhopadhyay S, *et al.* A polymorphism controlling ORMDL3 expression is associated with asthma that is poorly controlled by current medications [J]. Allergy Clin Immunol, 2008, 121(4): 860-863
- 12 Per-Hsuan Liang, Shyh-Dar Shyw, *et al.* Risk factors and characteristics of early-onset asthma [J]. Microbiol Immunol Infect, 2006, 39(5): 414-421

(收稿:2010-04-30)