

核转录因子 NF-E2 相关因子 2 信号通路在 PM_{2.5} 致雌性大鼠生殖损伤中的作用

张丰泉¹, 赵杉², 董恩恒^{1*}, 曹锦程¹, 郭旭东¹

(1. 新乡医学院 公共卫生学院 新乡市大气污染健康效应与干预重点实验室, 新乡 453000; 2. 新乡医学院 基础医学院分析测试实验室, 新乡 453000)

【摘要】 目的 研究核转录因子 NF-E2 相关因子 2 (NF-E2 related factor 2, Nrf-2) 信号通路在 PM_{2.5} 雌性生殖损伤中的作用。**方法** 30 只雌性 SD 大鼠随机分为生理盐水对照组、1.5 mg/kg PM_{2.5} 低剂量组和 37.5 mg/kg PM_{2.5} 高剂量组, 连续暴露染毒 10 d。ELISA 试剂盒检测子宫中肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白介素-1 β (interleukin 1 beta, IL-1 β) 和白介素-6 (interleukin-6, IL-6) 含量。荧光定量 PCR (qPCR) 检测子宫组织 Nrf-2 和血红素加氧酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1) mRNA 表达水平。Western blot 检测子宫组织 Nrf-2 和 HO-1 蛋白表达水平。**结果** 低剂量组和高剂量组子宫 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 含量均明显高于对照组 ($P < 0.05$); 与低剂量组相比, 高剂量组子宫 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 含量明显升高, 差异有显著性 ($P < 0.05$); 且子宫组织炎症因子含量与 PM_{2.5} 暴露量正相关, 随着 PM_{2.5} 暴露浓度的升高, TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 含量不断升高 ($r = 0.870, 0.847$ 和 0.855)。荧光定量 PCR 和 western blot 检测结果显示, 低剂量组和高剂量组子宫组织中 Nrf-2 和 HO-1 的 mRNA 表达水平和蛋白表达水平均明显高于对照组, 差异有显著性 ($P < 0.05$)。**结论** 雌鼠暴露 PM_{2.5} 后, Nrf-2 信号通路被激活, 但 PM_{2.5} 依然能诱发子宫炎症反应, 造成子宫组织损伤。

【关键词】 PM_{2.5}; TNF- α ; IL-1 β ; IL-6; Nrf-2; HO-1; 子宫; 生殖损伤

【中图分类号】 Q95-33

【文献标识码】 A

【文章编号】 1005-4847(2018) 05-0639-05

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2018.05.016

Effect of NF-E₂ related factor 2 pathway activation on PM_{2.5} induced reproductive injury in female rats

ZHANG Fengquan¹, ZHAO Shan², DONG Enheng^{1*}, CAO Jincheng¹, GUO Xudong¹

(1. Key laboratory for Air Pollution Health Effects and Intervention of Xinxiang, School of Public Health, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453000, China; 2. Analytical and testing Laboratory, School of Basic Medicine, Xinxiang 453000)

Corresponding author: DONG Enheng. E-mail: dongphmu@163.com

【Abstract】 Objective To study the effect of NF-E2 related factor 2 (Nrf-2) pathway activation on particulate matter 2.5 (PM_{2.5})-induced reproduction injury in female rats. **Methods** Thirty Sprague Dawley rats were randomly divided into control (normal saline), low dose exposure (1.5 mg/kg PM_{2.5}), and high dose exposure (37.5 mg/kg PM_{2.5}) groups. The levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin 1- β (IL-1 β), and interleukin-6 (IL-6) were measured by enzyme-linked immunosorbent assay. The mRNA and protein expression of Nrf-2 and heme oxygenase-1 (HO-1) were also examined by qPCR and western blot. **Results** There was a significant increase in TNF- α , IL-1 β , and IL-6 expression in the low dose and high dose exposure groups compared with the control groups ($P < 0.05$). The expression

【基金项目】 河南省高校科技创新团队支持计划(14IRTSTHN017)。

Funded by Support Program for Henan University Scientific and Technological Innovation Team (14IRTSTHN017).

【作者简介】 张丰泉(1985—), 男, 实验师, 硕士, 研究方向: 颗粒物对健康的影响。Email: zhangfengquan29@126.com

【通信作者】 董恩恒(1978—), 男, 博士, 研究方向: 空气污染物生物效应、机制及干预措施。Email: dongphmu@163.com

levels were also increased with increasing dose of $PM_{2.5}$ ($r = 0.870, 0.847, \text{ and } 0.855$, respectively). Both the mRNA and protein expressions of Nrf-2 and HO-1 were also significantly increased in the low dose and high dose exposure groups compared with controls ($P < 0.05$). **Conclusions** The Nrf-2 signaling pathway is activated following exposure of $PM_{2.5}$ in female rats, although $PM_{2.5}$ can still induce uterine inflammation and injury.

[Keywords] $PM_{2.5}$; TNF- α ; IL-1 β ; IL-6; Nrf-2; HO-1; uterus; reproduction injury

Conflict of interest statement: We declare that we have no conflict of interest statement.

目前空气污染已被证实是威胁人体健康重要危险因素之一,2012 年全球有约 300 万人死于空气污染相关疾病^[1]。颗粒物是空气污染物的重要组成部分,研究发现细颗粒物(空气动力学直径 $\leq 10 \mu m$)对人体具有更强的危害性^[2]。

已有研究证实, $PM_{2.5}$ 是心血管系统疾病和呼吸系统疾病的危险因素。虽然目前还不能明确 $PM_{2.5}$ 对生殖系统的危害性,但越来越多的研究结果显示 $PM_{2.5}$ 可能是影响生殖系统的重要环境因素之一。过往流行病学调查发现,当孕期 $PM_{2.5}$ 暴露浓度增加 $10 \mu g/m^3$ 时,胎儿出现早产 (OR = 1.10; 95% CI, 1.03 - 1.18)、低出生体重 (OR) = 1.05; 95% CI, 1.02 - 1.07) 和小于胎龄儿 (OR = 1.15; 95% CI, 1.10 - 1.20) 的危险性明显升高^[3]。我们前期研究结果显示, $PM_{2.5}$ 不仅影响雌鼠的内分泌水平,而且可使胎鼠的活胎率明显降低^[4];同时 $PM_{2.5}$ 可破坏子宫的组织结构,使子宫内膜上皮细胞变薄,排列混乱;固有层的基质细胞数量和血管数量也减少^[5]。目前 $PM_{2.5}$ 对生殖系统损伤的研究还比较有限,且 $PM_{2.5}$ 生殖毒性作用机制不明确。Nrf-2 信号通路是机体内重要的防御反应性系统,当机体受有害因素胁迫时可活化 Nrf-2,增加 Nrf-2 蛋白的表达,进而激活其下游的功能性蛋白如 HO-1,发挥抗炎症反应和抗氧化应激反应的作用,对机体具有重要的保护作用。本研究拟将雌性大鼠暴露 $PM_{2.5}$,研究 Nrf-2 信号通路在 $PM_{2.5}$ 致雌性大鼠生殖损伤中的作用和机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物与分组

清洁级 8 周龄雌性 SD 大鼠 30 只,体重 180 ~ 200 g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(京)2012-0001】,饲养于河南省生物精神病学重点实验室【SYXK(豫)2014-0005】。适应性喂养 1 周,采用随机数字法将实验动物分为:生理盐水对照组(control group, control)、1.5 mg/kg $PM_{2.5}$

低剂量暴露组(Low dose exposure group, low Exp)和 37.5 mg/kg $PM_{2.5}$ 高剂量暴露组(high dose exposure group, high exp)^[6]。

1.1.2 试剂与仪器

TNF- α 和 IL-1 β ELISA 试剂盒购于 Abcam 公司,IL-6 ELISA 试剂盒和 TRIzol 试剂盒购于 Invitrogen 公司,Nrf-2 和 HO-1 一抗购于 Abcam 公司,荧光定量 PCR 仪(AB 7500,美国),酶标仪(Enspire,美国 PerkinElmer),凝胶成像系统(FluorChem R,美国 ProteinSimple)。

1.2 实验方法

1.2.1 $PM_{2.5}$ 染毒

将本实验室制备的不同浓度 $PM_{2.5}$ 悬液(浓度分别为 2 和 50 mg/mL)复温后,按照晋乐飞等^[7]的实验方法对雌鼠 $PM_{2.5}$ 染毒暴露。雌鼠麻醉后,将 75 $\mu L/100$ (g·bw) 颗粒物悬液注入雌鼠舌根部,迫使其将 $PM_{2.5}$ 悬液经过口腔吸入肺内。连续染毒 10 d。

1.2.2 子宫组织 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 含量测定

冰浴研磨制备子宫组织匀浆液,取上清液测定子宫组织中炎症因子含量。用 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 ELISA 试剂盒检测子宫组织上清中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 含量。按照各试剂盒说明制备标准品和样品,酶标仪于 450 nm 检测标准品孔和样品孔吸光值,分别绘制 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 标准曲线并计算样品中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的含量。

1.2.3 子宫组织中 Nrf-2 和 HO-1 mRNA 表达检测

按照 TRIzol 试剂盒说明提取子宫组织总 RNA,并反转录合成 cDNA。qPCR 检测 Nrf-2 和 HO-1 mRNA 表达水平。目的基因序列:Nrf-2 上游引物:5'-CTCTCTGGAGACGGCCATGACT-3',下游引物:5'-CTGGGCTGGGGACAGTGGTAGT-3';HO-1 上游引物:5'-CGTGCAGAGAATTCTGAGTTC-3',下游引物:5'-AGACGCTTTACGTAGTGCTG-3'; β -actin CGTCCGTGACATTAAAGAG-3',下游引物:5'-TTGCCGATAGTGATGACCT-3'。扩增反应条件:95 $^{\circ}C$ 3 min,95 $^{\circ}C$ 30 s,57 $^{\circ}C$ 30 s,40 个循环。用

2^{-ΔΔCT}值计算目的基因相对表达量。

1.2.4 子宫组织中 Nrf-2 和 HO-1 蛋白表达检测

研磨并提取子宫组织总蛋白,取蛋白样品,聚丙烯酰胺凝胶电泳后,转膜至 PVDF 膜上,封闭 1.5 h,Nrf-2 一抗(1:500)、HO-1 一抗(1:300)、β-actin 一抗(1:3000)4℃ 过夜孵育,洗膜后加入二抗(1:4000),室温孵育 1 h,ECL 发光,凝胶成像系统成像分析。

1.3 统计学方法

实验数据以($\bar{x} \pm s$)表示。SPSS 19.0 软件进行统计学分析,多组间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)。两两组间比较时,方差齐性时采用 LSD 法/S-N-K 法;方差不齐采用 Tamhane's T2 法/Games-Howell 法。以 $P < 0.05$ 为检验水准。

2 结果

2.1 子宫组织中炎症因子含量

对照组子宫 TNF-α 的含量为(78.67 ± 17.55) pg/(mg·prot),低剂量组子宫 TNF-α 的含量为(112.87 ± 26.76) pg/(mg·prot),与对照组相比,低剂量组子宫 TNF-α 含量明显升高($P = 0.024$);高剂量组子宫 TNF-α 的含量为(269.23 ± 31.36) pg/(mg·prot),也明显高于对照组($P = 0.000$)。另外高剂量组 TNF-α 含量明显高于低剂量组($P = 0.000$)。低剂量组和高剂量组子宫 IL-1β 含量分别为(96.04 ± 22.29) pg/(mg·prot)和(204.21 ± 24.1) pg/(mg·prot),均明显高于对照组,差异有显著性($P = 0.003$ 和 0.000);与低剂量组相比,高剂量组子宫 IL-1β 含量明显升高($P = 0.000$)。与对

照组相比,低剂量组(102.71 ± 22.23) pg/(mg·prot)和高剂量组(184.47 ± 26.24) pg/(mg·prot)子宫 IL-6 含量均明显升高($P = 0.001$ 和 0.000);与低剂量组相比,高剂量组子宫 IL-6 含量明显升高($P = 0.000$)(见表 1)。

子宫组织中炎症因子含量与 PM_{2.5} 浓度呈剂量效应关系,随着 PM_{2.5} 暴露浓度的升高,TNF-α、IL-1β 和 IL-6 不断升高($r = 0.870$ 、 0.847 和 0.855)。

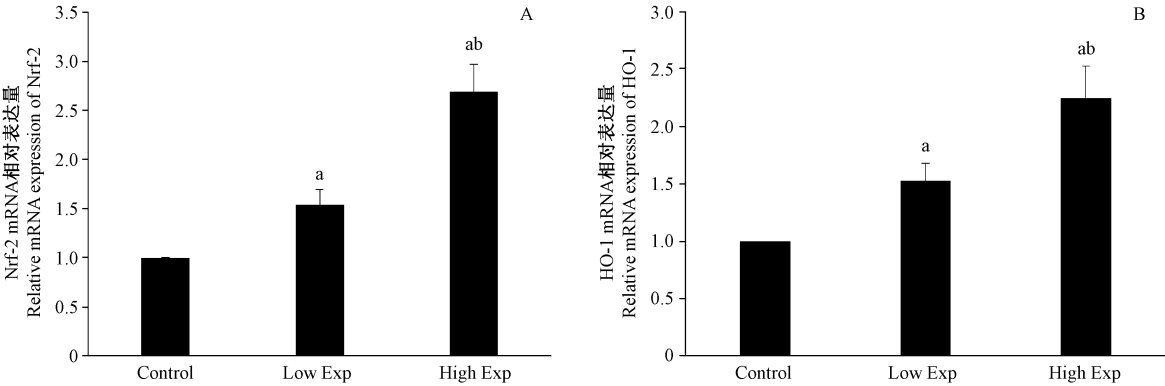
2.2 子宫组织 Nrf-2 和 HO-1 mRNA 表达水平

Nrf-2 和 HO-1 mRNA 相对表达量(与内参基因的相对表达量)见图 1。PM_{2.5} 低剂量组和高剂量组子宫组织 Nrf-2 mRNA 的相对表达量分别为(1.54 ± 0.16)和(2.69 ± 0.28),均显著高于生理盐水对照组,差异有显著性($P = 0.000$ 和 0.000);与 PM_{2.5} 低剂量组相比,高剂量组 Nrf-2 mRNA 表达量显著高于低剂量组($P = 0.000$)。

表 1 PM_{2.5} 对子宫组织中炎症因子含量的影响
[($\bar{x} \pm s$), pg/(mg·prot)]

Table 1 Effects of particulate matter 2.5 (PM _{2.5}) on the expression of tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin 1 beta (IL-1β), and interleukin-6 (IL-6)			
组别 Groups	TNF-α	IL-1β	IL-6
对照组 Control	78.67 ± 17.55	56.54 ± 17.64	54.90 ± 16.12
低剂量组 Low Exp	112.87 ± 26.76 ^a	96.04 ± 22.29 ^a	102.71 ± 22.23 ^a
高剂量组 High Exp	269.23 ± 31.36 ^{ab}	204.21 ± 24.12 ^{ab}	184.47 ± 26.24 ^{ab}

注:^a $P < 0.05$ VS control;^b $P < 0.05$ VS Low Exp。
Note. ^a $P < 0.05$ VS control; ^b $P < 0.05$ VS Low Exp.



注: A 为 Nrf-2 mRNA 的相对表达量;B 为 HO-1 mRNA 的相对表达量。^a $P < 0.05$ VS Control;^b $P < 0.05$ VS Low Exp。

图 1 PM_{2.5} 对子宫 Nrf-2 和 HO-1 mRNA 表达水平的影响

Note. Relative mRNA expressions of Nrf-2 and HO-1 (A and B); ^a $P < 0.05$ VS control; ^b $P < 0.05$ VS Low Exp.

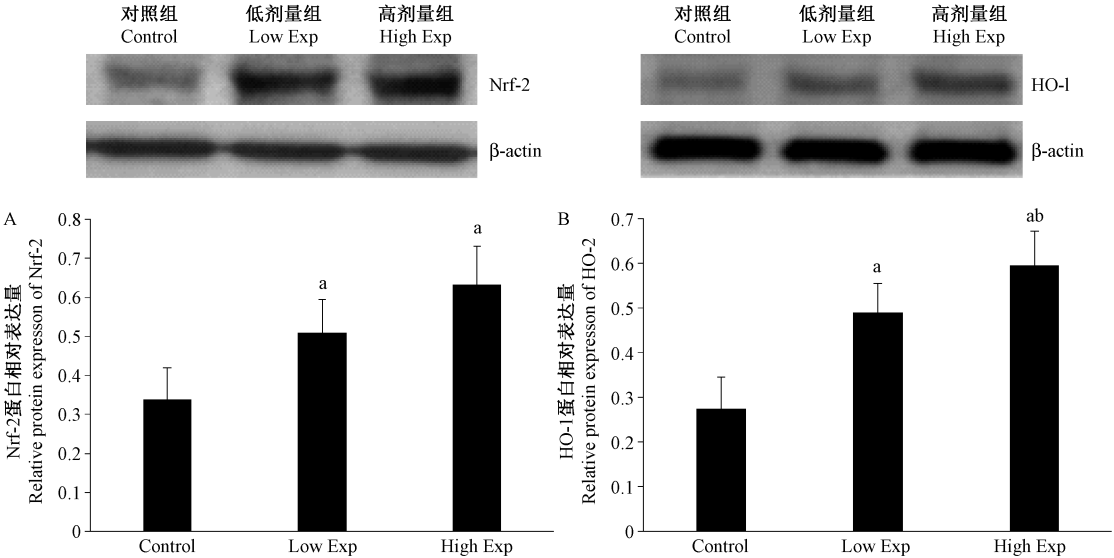
Figure 1 Effects of particulate matter 2.5 (PM_{2.5}) on mRNA expression of NF-E2 related factor 2 (Nrf-2) and heme oxygenase-1 (HO-1) in the rat uterus

三组间子宫中 HO-1mRNA 表达量的变化与 Nrf-2 mRNA 的变化情况相一致。与对照组相比, PM_{2.5} 低剂量组和高剂量组子宫 HO-1 mRNA 表达水平显著升高 ($P = 0.045$ 和 0.000); 与低剂量组相比, 高剂量组子宫 HO-1 mRNA 表达量显著高于低剂量组 ($P = 0.008$)。

2.3 子宫组织 Nrf-2 和 HO-1 蛋白表达水平

对照组、低剂量组和高剂量组大鼠子宫 Nrf-2

蛋白和 HO-1 蛋白的相对表达量见图 2。与对照组相比, 低剂量组和高剂量组子宫 Nrf-2 蛋白 ($P = 0.011$ 和 0.000) 和 HO-1 蛋白 ($P = 0.000$ 和 0.000) 的相对表达量均明显升高。高剂量组子宫 Nrf-2 的表达量虽高于低剂量组, 但差异无显著性 ($P = 0.051$)。与低剂量组相比, 高剂量组子宫 HO-1 蛋白相对表达量明显高于低剂量组子宫 HO-1 蛋白表达量 ($P = 0.037$)。



注: A 为 Nrf-2 蛋白的相对表达量; B 为 HO-1 蛋白的相对表达量。^a $P < 0.05$ VS Control; ^b $P < 0.05$ VS Low Exp。

图 2 PM_{2.5} 对子宫 Nrf-2 和 HO-1 蛋白表达水平的影响

Note. Relative protein expressions of Nrf-2 and HO-1 (A and B); ^a $P < 0.05$ VS control; ^b $P < 0.05$ VS Low Exp.

Figure 2 Effects of PM_{2.5} on the protein expressions of Nrf-2 and HO-1 in the rat uterus tissue

3 讨论

最新的研究报告指出如不改善空气质量, 到 2050 年时每年因空气污染造成的死亡人数将增加到 660 万人^[8]。目前已有许多关于妊娠期暴露空气污染物与妊娠结局相关性的流行病学调查研究。Kingsley 等^[8] 的调查发现孕妇暴露于低浓度的 PM_{2.5} (2.5 μg/m³) 时, 发生早产的危险性升高 1.04 倍, 且新生儿的体重平均减少 15.9 g。加拿大一项关于 81.84 万孕妇的调查中发现, 当孕妇 PM_{2.5} 暴露浓度仅增加 2 μg/m³ 时, 发生早产的可能性增加 4%, 另外如果孕妇伴有糖尿病、先兆子痫时会使早产的危险性分别增加 10.6% 和 8.3%^[9], 由此可见当孕妇暴露于 PM_{2.5} 并伴有其他基础性疾病时, 其出现不良妊娠结局的危险性明显增加。另有研究发现, 妊娠期及新生儿出生后暴露 PM_{2.5} 可显著升高新生儿的死亡率, 新生儿死亡危险性增加 2.66 倍^[10]。但 Kingsley 等^[8] 的研究发现, 妊娠期暴露 PM_{2.5} 虽可

降低新生儿体重, 但与早产没有明显的相关性 (OR = 0.86)。这些研究结果不一致性的原因可能与 PM_{2.5} 暴露时长、浓度和颗粒物所含成分以及所采用调查方法、统计分析方法不同有关。虽然研究结果有不一致性, 但更多的研究结果证实 PM_{2.5} 是影响生殖系统的重要环境因素之一。

PM_{2.5} 对人体损伤作用机制主要包括氧化应激反应、炎症反应、凝血功能异常。已有研究发现颗粒物可诱发呼吸、心血管等系统中炎性因子明显升高, 诱发炎症反应^[11-12], 由此可见炎症反应在颗粒物心肺系统损伤中起重要作用。Michikawa 等^[13] 的研究结果证实, 妊娠早期暴露颗粒物可以影响子宫发育和胎盘的植入, 但未对 PM_{2.5} 生殖损伤的发生机制做进一步的研究。氧化应激和炎症反应密切相关, 氧化应激可触发多种调控细胞内炎性因子的信号通路, 诱发炎症反应。我们前期的研究结果已证实 PM_{2.5} 能够损伤子宫组织结构, 并诱发子宫氧化应激反应^[5]。本次研究中子宫组织炎性因子

TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 含量检测结果显示,暴露 PM_{2.5} 后子宫组织中的 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 含量均明显高于对照组,PM_{2.5} 可诱发子宫组织中炎症因子的释放。PM_{2.5} 暴露组子宫组织 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 含量明显高于对照组,由此可见 PM_{2.5} 能够诱发子宫炎症,且随着暴露 PM_{2.5} 浓度的增加,子宫组织中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 含量不断升高(结果见表 1),PM_{2.5} 暴露与炎症因子释放量呈明显的正相关,这一结果与已有 PM_{2.5} 诱发心肺循环系统炎症反应的结果相一致^[14]。由此我们推测 PM_{2.5} 对生殖系统的损伤与其诱发的子宫炎症反应有关。

为研究 PM_{2.5} 诱发炎症的机制,本次实验中我们检测了 Nrf-2 信号通路的相关因子。Nrf-2 通路是机体重要的防御系统。Nrf-2 是机体氧化应激和炎症反应中的关键的防御性转录因子,具有重要的抗氧化、抗炎、免疫调节作用^[15]。当机体受到外界胁迫时,Nrf2 磷酸化与抗氧化反应元件(antioxidant response element, ARE)结合,进而激活下游的Ⅱ相酶(如 HO-1、GST 等),从而发挥抗炎和抗氧化作用。HO-1 是重要的Ⅱ相酶之一,在机体内发挥抗炎性反应和抗氧化损伤作用^[16]。本次实验结果显示,当雌鼠暴露 PM_{2.5} 10 d 后,暴露组雌鼠子宫组织中 Nrf-2 和 HO-1 在 mRNA 和蛋白水平均明显高于对照组(结果见图 1 和 2),由此可推断 PM_{2.5} 可激活 Nrf-2 及其下游重要的功能蛋白 HO-1,使 Nrf-2 和 HO-1 表达升高,抵抗 PM_{2.5} 对子宫的损伤作用。但本次实验中子宫中炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的含量却因 PM_{2.5} 暴露而显著升高;且随着暴露剂量的增加,子宫炎症因子含量不断升高,进而破坏子宫的组织结构。造成这种结果的原因可能是,PM_{2.5} 虽然激活了 Nrf-2 信号通路,对 PM_{2.5} 的损伤起到一定的拮抗和保护作用,但其保护作用不足以完全抵消 PM_{2.5} 诱发的炎症损伤作用,而最终造成子宫组织损伤。

综合本次实验研究的结果,我们推测雌鼠暴露 PM_{2.5} 后,虽然体内的 Nrf-2 信号通路可被激活,Nrf-2 和其下游的效应因子 HO-1 蛋白的表达升高,但其保护作用不足以完全抵消 PM_{2.5} 的子宫的炎症损伤作用,而最终造成子宫组织造成损伤。在后续的研究中需设法特异性提高 Nrf-2 信号通路中关键蛋白的表达量,从而降低或消除 PM_{2.5} 对生殖系统的损伤作用。

参 考 文 献(References)

- [1] World Health Organization. Ambient air pollution: A global assessment of exposure and burden of disease [EB/OL]. <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/250141/1/9789241511353-eng.pdf?ua=1>, 2016.
- [2] Harrison RM, Yin J. Particulate matter in the atmosphere: which particle properties are important for its effects on health? [J]. *Sci Total Environ*, 2000, 249(1-3):85-101.
- [3] Zhu XX, Liu Y, Chen YY, et al. Maternal exposure to fine particulate matter (PM_{2.5}) and pregnancy outcomes: a meta-analysis [J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2015, 22(5):3383-3396.
- [4] 张丰泉,董恩恒,王茂,等. PM_{2.5} 对雌鼠生殖内分泌水平和妊娠结局的影响[J]. *中国实验动物学报*, 2017, 25(4):455-460.
Zhang FQ, Dong EH, Wang M, et al. Effects of PM_{2.5} on reproductive hormone levels and pregnancy outcome in female rats [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2017, 25(4):455-460.
- [5] 张丰泉,董恩恒,王建强,等. PM_{2.5} 对大鼠子宫组织形态及氧化应激效应的影响[J]. *中国实验动物学报*, 2017, 25(5):524-527.
Zhang FQ, Dong EH, Wang JQ, et al. PM_{2.5} induces oxidative stress and histopathological changes in the uterus of rats [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2017, 25(5):524-527.
- [6] Liu X, Meng Z. Effects of airborne fine particulate matter on antioxidant capacity and lipid peroxidation in multiple organs of rats [J]. *Inhal Toxicol*, 2005, 17(9):467-473.
- [7] 晋乐飞,吴卫东,张巧,等. 吸入式气滴注法的建立[J]. *郑州大学学报(医学版)*, 2015, 50(1):75-78.
Jin YF, Wu WD, Zhang Q, et al. Establishment of an inhalable intratracheal instillation [J]. *J Zhengzhou Univ (Med Sci)*, 2015, 50(1):75-78.
- [8] Kingsley SL, Eliot MN, Glazer K, et al. Maternal ambient air pollution, preterm birth and markers of fetal growth in Rhode Island: results of a hospital-based linkage study [J]. *J Epidemiol Community Health*, 2017, 71(12):1131-1136.
- [9] Lavigne E, Yasseen AS, Stieb DM, et al. Ambient air pollution and adverse birth outcomes: Differences by maternal comorbidities [J]. *Environ Res*, 2016, 148:457-466.
- [10] Son JY, Lee HJ, Koutrakis P, et al. Pregnancy and lifetime exposure to fine particulate matter and infant mortality in Massachusetts, 2001-2007 [J]. *Am J Epidemiol*, 2017, 186(11):1268-1276.
- [11] Wu W, Jin Y, Carlsten C. Inflammatory health effects of indoor and outdoor particulate matter [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2018, 141(3):833-844.
- [12] Brook RD, Urch B, Dvorchak JT, Bard RL, et al. Insights into the mechanisms and mediators of the effects of air pollution exposure on blood pressure and vascular function in healthy humans [J]. *Hypertension*, 2009, 54(3):659-667.
- [13] Michikawa T, Morokuma S, Yamazaki S, et al. Exposure to air pollutants during the early weeks of pregnancy, and placenta praevia and placenta accreta in the western part of Japan [J]. *Environ Int*, 2016, 92-93:464-470.
- [14] Han Y, Zhu T, Guan T, et al. Association between size-segregated particles in ambient air and acute respiratory inflammation [J]. *Sci Total Environ*, 2016, 565:412-419.
- [15] Gold R, Kappos L, Arnold DL, et al. Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 for relapsing multiple sclerosis [J]. *N Engl J Med*, 2012, 367(12):1098-1107.
- [16] Araujo JA, Zhang M, Yin F. Heme oxygenase-1, oxidation, inflammation, and atherosclerosis [J]. *Front Pharmacol*, 2012, 3:119.