**文章编号：**2095-9982(2017)07-0577-09 **中图分类号：**R114 **文献标志码：**A

**【论著 | 原创精选】**

# 苯对 C3H/He 小鼠骨髓细胞转录组表达的影响：基于转录组测序技术

曹萌，孙凤梅，尹立红，浦跃朴，张娟

**摘要：**

［目的］ 应用转录组测序（RNA sequencing，RNA-seq）技术，研究苯对小鼠骨髓细胞转录组表达和信号通路的影响，为苯对小鼠骨髓细胞毒性的可能作用机制提供科学线索。

［方法］ 将C3H/He小鼠随机分为苯暴露组［160 mg/（kg·d）］与对照组［0 mg/（kg·d）］，每组10只，以皮下注射的方式染毒，每周5次，连续4周。分离小鼠的骨髓细胞，应用RNA-seq技术对苯暴露和对照组小鼠的骨髓细胞进行转录组测序，并对测序结果进行基因差异表达、基因功能与信号通路富集以及基因共表达分析。

［结果］ RNA-seq结果显示，苯染毒后共有227个基因的表达发生明显变化，其中122个基因下调，105个基因上调。基因功能与信号通路富集分析结果显示，这些差异基因主要富集在免疫、凋亡、代谢、氧化应激、造血谱系等功能和通路上。差异基因共表达分析显示，调控度大于10的基因有14个，其中*Ccr9*、*Xaf1*、*Flt3*、*Cd72*分别是细胞免疫、细胞凋亡、造血细胞谱系、造血细胞分化等通路上的重要基因。

［结论］ 苯暴露可导致小鼠骨髓细胞基因表达谱发生变化，可引起小鼠骨髓细胞免疫、凋亡、代谢、氧化应激、造血谱系等功能与通路发生变化，其中*Ccr9*、*Xaf1*、*Flt3*、*Cd72*可能起关键性调控作用。

**关键词**：苯；RNA-seq；骨髓细胞；差异表达；信号通路

**引用：**曹萌，孙凤梅，尹立红，等. 苯对C3H/He小鼠骨髓细胞转录组表达的影响：基于转录组测序技术［J］. 环境与职业医学，2017，34（7）：577-585. **DOI**: 10.13213/j.cnki.jeom.2017.17281

**Effects of benzene on transcriptome expression of bone marrow cells in C3H/He mice: Based on RNA sequencing technique** *CAO Meng, SUN Feng-mei, YIN Li-hong, PU Yue-pu, ZHANG Juan (Key Laboratory of Environmental Medicine Engineering of Ministry of Education, School of Public Health, Southeast University, Nanjing, Jiangsu* 210009*, China). Address correspondence to ZHANG Juan, E-mail: 101011288@seu.edu.cn* · *The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.*

**Abstract:**

［Objective］ To evaluate the effects of benzene on genes and signal pathways of mouse bone marrow cells using RNA sequencing (RNA-seq), and to provide novel clues for studying potential mechanism of benzene toxicity to bone marrow cells.

［Methods］ C3H/He mice were randomly divided into two groups with ten mice each: control [0 mg/(kg·d)] and benzene exposure [160 mg/(kg·d)] groups. Mice were injected subcutaneously five times per week for four weeks. The separated bone marrow cells were sequenced by RNA-seq technique, and the gene differential expression, enrichment of gene function and signal pathway, and gene co-expression were analyzed.

［Results］ The RNA-seq results showed that there were 227 genes differently expressed after the designed benzene exposure, of which 122 genes were down-regulated and 105 genes were up-regulated. The enrichment analysis results of gene function and signal pathway showed that these differential genes were mainly enriched in immunization, apoptosis, metabolism, oxidative stress, and hematopoietic cell lineage related functions and pathways. The results of gene co-expression analysis showed that there were 14 genes with regulation degrees greater than 10, in which *Ccr9*, *Xaf1*, *Flt3*, and *Cd72* were critical genes involved in immunization,

·**作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。**

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目（编号：81373034）

**[作者简介]** 曹萌（1989—），女，硕士生；研究方向：环境毒理学；E-mail：caomeng8510693@163.com

**[通信作者]** 张娟，E-mail：101011288@seu.edu.cn

**[作者单位]** 东南大学公共卫生学院，环境医学工程教育部重点实验室，江苏 南京 210009

apoptosis, hematopoietic cell lineage, and hematopoietic cell differentiation, respectively.

[Conclusion] Benzene exposure could induce altered transcriptome expression in bone marrow cells in mice and affect immunization, apoptosis, metabolic process, oxidative stress, and hematopoietic cell lineage related functions and pathways. *Ccr9*, *Xaf1*, *Flt3*, and *Cd72* might play a key regulatory role in benzene induced hematopoietic toxicity.

**Keywords:** benzene; RNA-seq; bone marrow cell; differential expression; signal pathway

**Citation:** CAO Meng, SUN Feng-mei, YIN Li-hong, et al. Effects of benzene on transcriptome expression of bone marrow cells in C3H/He mice: Based on RNA sequencing technique[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2017, 34(7): 577-585. **DOI**: 10.13213/j.cnki.jeom.2017.17281

苯是生活环境和职业环境中广泛存在的一种有机污染物[1-3]。长期苯暴露可损伤一系列器官和系统，其中以造血系统最为明显，临床表现主要是白细胞和血小板减少，严重者可能会出现再生障碍性贫血，骨髓异常增生，甚至白血病[4-6]。

现有研究表明，苯对机体的毒性作用主要是其代谢产物酚类、醌类等对骨髓造血系统产生的损害。苯代谢所产生的氧化产物及活性氧，可引起机体生物大分子的氧化损伤、基因突变、DNA链断裂、染色体损伤[7-11]。近年来，基于系统生物学的发展与应用，苯暴露后机体的遗传和表遗传的改变有了新发现，为低浓度苯暴露的生物学效应提供了新证据。但苯暴露如何导致骨髓造血细胞毒性的机制尚未完全阐明，还有待进一步研究。

转录组测序（RNA sequencing, RNA-seq），指利用二代高通量测序技术将RNA反转录为cDNA进行测序，可全面、快速地对某一组织或器官在某一状态下的几乎所有RNA进行检测分析[12]。利用RNA-seq对特定组织或细胞的基因表达进行定量和定性研究，可揭示损伤或疾病的分子机制，为疾病的预防和治疗提供科学依据，因此被誉为转录组学发展的革命性技术[13-14]。

由于C3H/He小鼠在苯染毒后容易出现白血病，因而本研究通过苯染毒C3H/He小鼠，分离正常小鼠和苯中毒小鼠的骨髓细胞，应用RNA-seq对两组小鼠的骨髓样本进行检测分析，通过对RNA-seq数据的分析，研究苯中毒小鼠与正常小鼠的基因表达差异，获得可能的信号通路和关键调控基因，为苯造血毒性机制的进一步研究提供科学线索。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料

1.1.1 主要试剂与动物 苯（Sigma，美国），酒精（南京晚晴化玻仪器有限公司，中国），MACS缓冲液（Miltenyi Biotec，德国），玉米油（福临门，中国），Trizol（Thermo Scientific，美国），EDTA-$Na_2$抗凝剂（乔羽生物有限公司，中国），PrimeScript™ RT Master Mix（TaKaRa，日本），SYBR Green qPCR SuperMix（Toyobo，日本）。C3H/He小鼠为雄性，5~6周龄，体重20~25 g，购于南京大学模式动物研究所。

1.1.2 主要仪器 冷冻离心机、梯度基因扩增仪（Eppendorf，德国），荧光定量PCR仪（Applied Biosystems，美国），核酸测定仪（Thermo Scientific，美国），Agilent 2100生物分析仪（Agilent Technologies，美国）。

### 1.2 染毒方法

小鼠饲养在SPF级动物房，饲养条件：昼夜周期为12 h，室温为24 ℃，相对环境湿度为55%左右，小鼠自由饮水进食。小鼠随机分为2组，每组10只，以玉米油为溶剂，分别为对照组［0 mg/（kg·d）］、苯染毒组［160 mg/（kg·d）］，以皮下注射的方式染毒，每周5次，连续4周。本研究中毒性剂量选择的依据为：Paustenbach等[15]在一篇关于苯毒性的综述中报道，有研究发现小鼠经皮下注射80 mg/kg苯未见急性毒性效应，440 mg/kg剂量时红细胞抑制率达到27%，也有研究发现苯皮下注射的半数致死剂量为468 mg/kg。在参考以上文献的基础上，课题组对小鼠进行了皮下注射染毒，发现以40、80、160 mg/kg苯染毒1个月，小鼠均出现明显的血液毒性，未见动物死亡，其中160 mg/kg的毒性最明显[16]，故本研究选用了160 mg/kg的染毒剂量。本研究已通过东南大学实验动物伦理审查。

### 1.3 血常规的检测

染毒结束后处死小鼠，通过眼球后静脉丛取血，在180 μL全血中加入抗凝剂20 μL，轻弹、室温静置后进行血常规检测。

### 1.4 骨髓细胞的采集

颈椎脱臼法处死小鼠，酒精浸泡5 min，在超净台中用剪刀将小鼠后肢减掉，去皮肤和肌肉，用剪刀将骨头两端剪断，暴露出骨髓腔，用1 mL注射器吸取缓

冲液冲洗骨髓腔以获得骨髓细胞，细胞置于1.5 mL离心管内，采集完成后随机抽取3只小鼠的骨髓细胞合并为一个样品，进行后续的检测。骨髓细胞的流式鉴定在前期文章中已发表[17-18]。

1.5 骨髓细胞RNA提取

骨髓细胞收集完成后，每管细胞中加入1 mL的Trizol，吹打混匀后冰上静置5 min；然后每管加入氯仿200 μL，充分震荡30 s后冰上静置15 min分层；4℃，12 000 r/min（13 500×*g*），离心10 min；将上层的无色水样层转移至新的无酶离心管；加入与水样层等体积的预冷的异丙醇，颠倒混匀后室温静置10 min；4℃，12 000 r/min（13 500×*g*），离心10 min；弃上清后加入体积分数75%的乙醇清洗2遍，弃上清，静置15 min待乙醇挥发；加入无酶水20 μL，-80℃保存待用。Agilent 2100生物分析仪精确检测RNA完整性，即28S/18S和RNA完整指数。

1.6 RNA-seq

1.6.1 文库构建与测序 提取RNA后，用寡脱氧胸苷酸磁珠富集有poly-A尾的mRNA，并使其片段化，以片段化的mRNA为模板，随机寡核苷酸为引物，合成cDNA的第一条链，用核糖核酸酶H降解RNA链，并在DNA聚合酶I体系下，以dNTPs为原料合成cDNA第二条链，纯化后的双链cDNA再经过末端修复、加A尾并连接测序接头，用AMPure XP磁珠筛选200 bp左右的cDNA，进行PCR扩增并再次使用AMPure XP磁珠纯化PCR产物，最终获得文库。文库质检合格后，通过Illumina HiSeq/MiSeq测序平台，利用双末端测序进行转录组测序。文库的构建及测序由北京诺禾致源科技股份有限公司完成。

1.6.2 原始数据质量评估和参考序列比对分析 为了保证信息分析质量，在测序获得原始数据之后，经过测序错误率检查，G、C分布检查和原始数据的筛选，获得后续分析可使用的读段数。质量评估完成后，采用Tophat2（version 2.0.9）对过滤后的测序数据进行参考基因组的比对分析。实验所产生的定位测序序列的百分比在正常情况下会高于70%，其中具有多个定位测序序列占总体百分比通常低于10%[13, 19]。

1.6.3 基因差异表达分析 采用基于负二项分布模型DESeq（version 1.12.0）技术进行分析。基因差异表达分析时首先用软件对读段数进行矫正，然后再计算比较组的差异倍数，最后对每一基因的差异倍数进行检验。检验水准$\alpha$=0.05。

1.6.4 基因功能和信号通路富集分析 基因本体论（gene ontology，GO，http://www.gene ontology.org/）是基因功能的标准分类体系。研究差异基因在GO中的分布情况将阐明差异基因富集的生物学功能。使用GOseq（version 1.10.0）和topGO（version 2.10.0）软件进行差异表达基因的功能富集分析。京都基因与基因组百科全书（koyto encyclopedia of genes and genomes，KEGG，http://www.kegg.jp/）是有关信号通路的重要公共数据库[20]，本研究应用KOBAS（version 2.0）软件找出差异表达基因中富集的信号通路。基因功能和信号通路富集均以$P<0.05$，假阳性率（*FDR*）<0.05为有统计学意义。

1.6.5 基因共表达分析 基因共表达网络是根据特异性表达基因的归一化信号强度建立的，可用来鉴定基因之间的相互作用。根据网络中各基因的位置函数计算出该基因在网络中的关系强度。循环节点代表基因，边缘之间两个节点代表基因之间的相互作用，基因共表达分析结果用基因的调控能力来表示，即基因在共表达网络中所调控的基因数目。

1.7 差异表达基因的qRT-PCR验证

为了验证RNA-seq的准确性，随机选择13个差异表达基因进行qRT-PCR验证，引物见表1，RNA提取完成后用PrimeScript™ RT Master Mix将RNA逆转录为cDNA，通过SYBR Green qPCR SuperMix进行扩增，反应体系为10 μL，反应程序为95℃，5 min；95℃，15 s；

**表1 苯染毒4周后小鼠骨髓细胞差异表达基因qRT-PCR引物序列**

Table 1 qRT-PCR primers for differentially expressed genes in mouse bone marrow cells exposed to benzene for four weeks

| 基因 Gene | 上游引物 Forward primer（5'-3'） | 下游引物 Reverse primer（5'-3'） |
|---|---|---|
| *β-actin* | CTATGCTCTCCCTCACGCCA | TCACGCACGATTTCCCTCTC |
| *Xaf1* | TGACAGTCCAGAAGAGGGAGC | GGAGAAGTGCCAGAGGTTAGC |
| *Ccr9* | GTTGTAGGGGAACTGAGACATAAT | GCCAAGAAGTCATCCAAGCAC |
| *Cd72* | CGAGGGTATGTGAGATGTAAAAG | AGAGCGAAGACCAAGGAGAAC |
| *Cdkn1a* | GAGACAGAGACCCCAGATAA | GAAGAGACAACGGCACAC |
| *Zmat3* | GCAGGAAGCCGAGAGAATGT | CAACGGCCAAGTGACAAGTG |
| *Ccng1* | GGCGCTATCTATCCTTGCGT | AGGTCAAATCTCGGCCACTT |
| *Ccnd1* | TCAAGTGTGACCCGGACTG | ATGTCCACATCTCGCACGTC |
| *Bax* | TGCTAGCAAACTGGTGCTCA | TCTTGGATCCAGACAAGCAGC |
| *Bbc3* | GGCCCAGCCTGTAAGATACT | ACAGGTAGTGCCAGATGCTC |
| *Fcer2a* | GAGCTGTGAGTGACAAGTGC | CACCAACATGAGCTGTGTCC |
| *Cd22* | CTTCTGTGGAGATGGTGCCTT | CTTTTCCCCTCCCTCTAGGC |
| *Flt3* | GGAGGAGGGCAGCTACTTTG | TTGCGAGCTGGTAGCGTTTA |
| *Il2ra* | GGCTATCCCAGTGTGCTCTC | GGGCTTCTGTGAATCCCCTAA |

60 ℃，1 min；95 ℃，15 s；60 ℃，1 min；95 ℃，15 s；40 个循环。以*β-actin*为内参，通过$2^{-\Delta\Delta CT}$法计算基因的相对表达水平。

1.8　统计学分析

运用SPSS 19.0对数据进行分析。数据用均数±标准差表示，两组之间的比较运用独立样本*t*检验，检验水准$\alpha$=0.05。

## 2　结果

2.1　一般情况观察

在苯染毒约2周后，苯暴露组小鼠开始出现烦躁情绪且易激怒，与对照组相比，苯暴露组小鼠出现活动减少、精神状态不佳、嗜睡等表现。两组小鼠体重均无明显变化。

2.2　血常规

对照组小鼠的白细胞计数为（7.36±1.45）×$10^9$/L；苯染毒组小鼠的白细胞计数为（3.06±0.98）×$10^9$/L，与对照组相比，白细胞水平明显降低（$P$<0.05）。两组小鼠红细胞、血红蛋白、血小板的差异无统计学意义。见表2。

**表2　苯染毒4周后染毒组和对照组小鼠血常规测定结果**

Table 2　Blood routine test results of mice in benzene exposure and control groups for four weeks

| 分组 Group | 白细胞（$10^9$/L） White blood cell | 红细胞（$10^{12}$/L） Red blood cell | 血红蛋白（g/L） Hemoglobin | 血小板（$10^9$/L） Platelet |
|---|---|---|---|---|
| 对照组 Control | 7.36±1.45 | 7.92±0.41 | 125.9±11.15 | 548.6±196.33 |
| 苯染毒组 Benzene exposure | 3.06±0.98* | 6.26±0.30 | 110.5±5.34 | 663.7±177.38 |

［注］*：与对照组相比，$P$<0.05。

［Note］*：Compared with the control group，$P$<0.05.

2.3　原始数据质量评估与参考序列比对分析

测序产出数据质量显示，过滤后数据中的碱基数（clean reads）数据在6~8 G之间，错误率在0.01~0.02之间，Q20（即碱基正确识别率为99%）和Q30（即碱基正确识别率为99.9%）均大于90%，G、C碱基含量在正常范围内。本研究的6个样品过滤后与参考基因组进行比对，比对到基因组上读段数的比例均高于78%（一般高于70%），比对到多位置的读段数比例均低于5%（一般低于10%），比对到唯一位置的读段数比例均在73%以上，是后续分析内容的基础。与参考基因组比对的具体情况见表3。

**表3　RNA-seq测序参考序列比对情况**

Table 3　RNA-seq reads mapping to the reference genome

| 组别 Group | 样本 Sample | 读段总数 Total reads | 比对上的总读段数 Total mapped | | 比对到多位置的读段数 Multiple mapped | | 比对到唯一位置的读段数 Uniquely mapped | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 读段数 Reads | % | 读段数 Reads | % | 读段数 Reads | % |
| 对照组 Control | 1 | 49165562 | 41536915 | 84.48 | 1629678 | 3.31 | 39907237 | 81.17 |
| | 2 | 46295296 | 38019902 | 82.12 | 1605126 | 3.47 | 36414776 | 78.66 |
| | 3 | 47230436 | 39938095 | 84.56 | 1449925 | 3.07 | 38488170 | 81.49 |
| 苯染毒组 Benzene exposure | 1 | 52498748 | 42841226 | 81.60 | 2299463 | 4.38 | 40541763 | 77.22 |
| | 2 | 56048376 | 44051690 | 78.60 | 2758471 | 4.92 | 41293219 | 73.67 |
| | 3 | 44669156 | 36857243 | 82.51 | 1770475 | 3.96 | 35086768 | 78.55 |

2.4　差异表达基因筛选

使用DESeq进行两组骨髓细胞差异表达基因的筛选，共筛选到227个差异表达基因。与对照组相比，苯染毒组下调的基因为122个，上调的为105个。采用火山图直观地了解差异基因的整体分布情况，差异表达基因见图1A，横坐标表示基因的表达倍数变化，纵坐标表示统计学上基因表达差异的显著性水平。在获得两个比较组差异表达基因后，将表达水平变化模式相同或相近的基因聚集成类，分析差异基因在不同组间的表达模式，见图1B，对照组和染毒组基因表达水平变化明显，颜色从红到蓝，表达差异基因的表达由高到低，以上研究结果显示，苯染毒对小鼠骨髓转录组表达水平有明显影响。

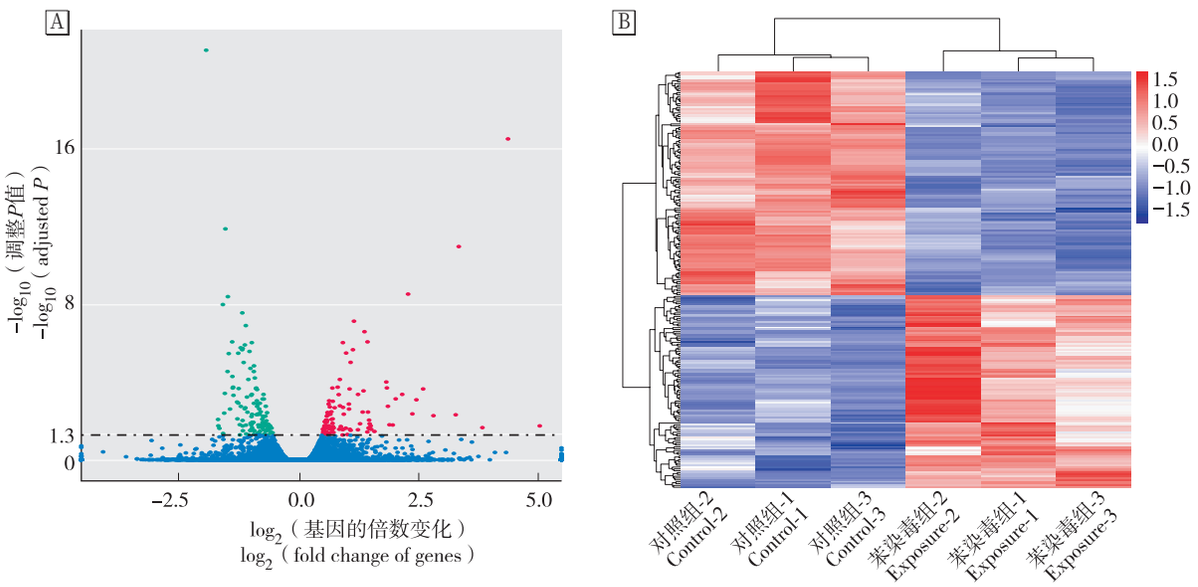
2.5　基因功能和信号通路富集分析

通过对苯染毒组与对照组两组的基因功能富集分析，发现了94个有差异的基因（$P$<0.05，$FDR$<0.05），主要包括免疫、凋亡、代谢、细胞生长、周期等相关功能。在信号通路分析中，发现70条有差异的信号通路，主要包括P53信号通路、造血细胞谱系、细胞免疫、代谢、FoxO信号通路、Jak-STAT信号通路、PI3K-Akt信号通路、周期、谷胱甘肽代谢通路等。前十位与苯损伤相关的富集基因功能和信号通路以及富集的基因见表4、表5。

2.6　差异基因共表达分析

根据筛选出的差异表达基因，计算基因间的共表达关系，然后选择基因间相关性大于0.99的基因来构建共表达调控网络。应用共网络分析，找出主要调控基因，见图2。结果表明，*Cd93*、*Xaf1*、*Aff3*、*C2cd4a*、*Cpm*、*Parp14*、*Fam129c*、*Flt3*、*Snn*、*Ccr9*、*Cd72*、*Dpp4*、*H2-0b*、*Sbk1*调控基因数均超过10个，

其中 *Cd93* 与细胞黏附功能相关，*Xaf1* 位于凋亡相关通路上，*Aff3*、*Parp14* 位于DNA依赖性的转录调控通路上，*Cpm* 与蛋白水解有关，*Flt3* 是造血系统相关通路基因，*Ccr9* 与免疫功能相关，*Cd72* 位于B细胞受体信号通路，*Dpp4* 与代谢功能相关，其调控能力及所在通路详细信息见表6。




［注］A：差异基因火山图，红色代表染毒组高表达基因，绿色代表染毒组低表达基因，蓝色代表没有差异基因，其中 $-\log_{10}(0.05)=1.3$；B：聚类分析图，红色表示高表达基因，蓝色表示低表达基因。

［Note］A：Volcano map，red represents high expression genes，green represents low expression genes，and blue represents no difference genes，$-\log_{10}(0.05)=1.3$；B：Cluster analysis，red represents high expression genes，and blue represents low expression genes.

**图1 苯染毒4周后小鼠骨髓细胞差异表达基因示意图**

Figure 1 Differentially expressed genes in bone marrow cells of mice exposed to benzene for four weeks

**表4 苯染毒4周后小鼠骨髓细胞差异表达基因的功能富集**

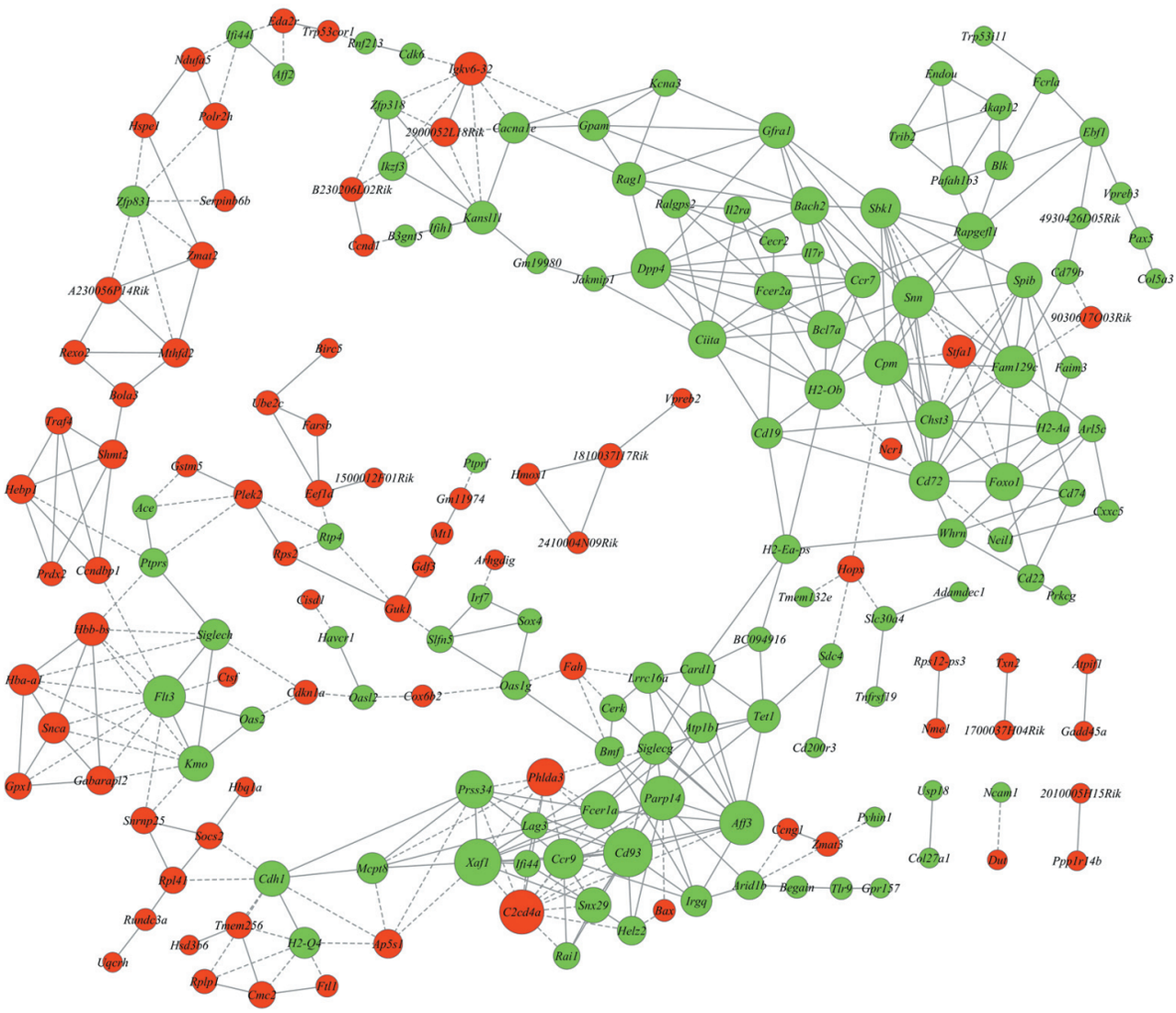
Table 4 Function enrichment of differentially expressed genes in bone marrow cells of mice exposed to benzene for four weeks

| 基因功能分类 Gene function | 基因数 Number of genes | *P* | 假阳性率 False discovery rate | 富集差异基因 Differentially expressed genes |
|---|---|---|---|---|
| 免疫反应 Immune response | 10 | <0.05 | <0.05 | *Ccr9*、*Ifi44l*、*Tlr9*、*H2-Aa*、*Oas2*、*Oasl2*、*Endou*、*Tnfsf8*、*Cd74*、*Ccr7* |
| 凋亡调节过程 Regulation of apoptotic process | 9 | <0.05 | <0.05 | *Ikzf3*、*Birc5*、*Ifih1*、*Traf4*、*Bmf*、*Card11*、*Prdx2*、*Bax*、*Atpif1* |
| 代谢过程 Metabolic process | 17 | <0.05 | <0.05 | *Ctsf*、*Ddx60*、*Ace*、*Ube2c*、*Fah*、*Mthfd2*、*Kmo*、*B3gnt5*、*Dpp4*、*St6gal1*、*Cda*、*Oasl2*、*Gpam*、*Hsd3b6*、*Neil1*、*Gstm5*、*Rag1* |
| 凋亡过程负调控 Negative regulation of apoptotic process | 12 | <0.05 | <0.05 | *Birc5*、*Prdx2*、*Pim1*、*Foxo1*、*Hmox1*、*Gpx1*、*Snca*、*Il2rb*、*Cd74*、*Ccng1*、*Cdkn1a*、*Sox4* |
| 神经细胞凋亡过程的负调控 Negative regulation of neuron apoptotic process | 7 | <0.05 | <0.05 | *Mt1*、*Bax*、*Prdx2*、*Snca*、*Prkcg*、*Hmox1*、*Birc5* |
| T细胞共刺激 T cell costimulation | 4 | <0.05 | <0.05 | *Dpp4*、*Card11*、*Tnfrsf13c*、*Cd80* |
| 过氧化氢分解代谢过程 Hydrogen peroxide catabolic process | 4 | <0.05 | <0.05 | *Hbb-bs*、*Gpx4*、*Prdx2*、*Gpx1* |
| 凋亡过程 Apoptotic process | 12 | <0.05 | <0.05 | *Cecr2*、*Bax*、*Gpx1*、*Traf4*、*Fis1*、*Xaf1*、*Birc5*、*Bmf*、*Foxo1*、*Zmat3*、*Bbc3*、*Phlda3* |
| 细胞数量的稳态 Homeostasis of number of cells | 4 | <0.05 | <0.05 | *Vpreb2*、*Bax*、*Il7r*、*Prdx2* |
| T细胞分化的负调控 Negative regulation of T cell differentiation | 3 | <0.05 | <0.05 | *Dtx1*、*Prdx2*、*Cd74* |

**表 5　苯染毒 4 周后小鼠骨髓细胞差异表达基因的信号通路富集**

Table 5　Pathway enrichment of differentially expressed genes in bone marrow cells of mice exposed to benzene for four weeks

| 信号通路名称 Pathway | 基因数 Number of genes | *P* | 假阳性率 False discovery rate | 富集差异基因 Differentially expressed genes |
|---|---|---|---|---|
| P53 信号通路 (P53 signal pathway) | 8 | <0.05 | <0.05 | *Zmat3*、*Cdkn1a*、*Cdk6*、*Ccng1*、*Ccnd1*、*Bax*、*Bbc3*、*Gadd45a* |
| 造血细胞谱系 (Hematopoietic cell lineage) | 7 | <0.05 | <0.05 | *Fcer2a*、*Cd22*、*Cd19*、*Flt3*、*Il7r*、*Il2ra*、*Siglech* |
| 原发性免疫缺陷 (Primary immunodeficiency) | 5 | <0.05 | <0.05 | *Ciita*、*Cd19*、*Il7r*、*Rag1*、*Tnfrsf13c* |
| 代谢途径 (Metabolic pathways) | 18 | <0.05 | <0.05 | *Pafah1b3*、*Nme1*、*St6gal1*、*Hsd3b6*、*Guk1*、*Cox6b2*、*Mthfd2*、*Fah*、*Polr2h*、*Uqcrh*、*Cda*、*Ndufa5*、*Cox4i1*、*Kmo*、*Gpam*、*Shmt2*、*B3gnt5*、*Dut* |
| FoxO 信号通路 (FoxO signal pathway) | 7 | <0.05 | <0.05 | *Gadd45a*、*Cdkn1a*、*Gabarapl2*、*Ccnd1*、*Rag1*、*Il7r*、*Foxo1* |
| Jak-STAT 信号通路 (Jak-STAT signal pathway) | 7 | <0.05 | <0.05 | *Il2rb*、*Il7r*、*Il2ra*、*Cdkn1a*、*Ccnd1*、*Pim1*、*Socs2* |
| PI3K-Akt 信号通路 (PI3K-Akt signal pathway) | 9 | <0.05 | <0.05 | *Il2ra*、*Il7r*、*Il2rb*、*Col27a1*、*Cdkn1a*、*Cdk6*、*Cd19*、*Ccnd1*、*Col5a3* |
| 细胞周期 (Cell cycle) | 4 | <0.05 | <0.05 | *Cdkn1a*、*Gadd45a*、*Cdk6*、*Ccnd1* |
| 谷胱甘肽代谢 (Glutathione metabolism) | 3 | <0.05 | <0.05 | *Gpx1*、*Gstm5*、*Gpx4* |
| 急性髓性白血病 (Acute myeloid leukemia) | 3 | <0.05 | <0.05 | *Flt3*、*Ccnd1*、*Pim1* |




[注] 红色代表在染毒组中高表达，绿色代表在染毒组中低表达，点越大调控能力相对越强，实线代表基因间呈正相关，虚线代表基因间呈负相关。

[Note] Red represents high expression in the exposure group, green represents low expression in the exposure group, and larger size suggests stronger degree. The solid lines represent a positive correlation between the genes, and the dashed lines represent a negative correlation between the genes.

**图 2　苯染毒 4 周后小鼠骨髓细胞差异表达基因的共表达调控网络图**

Figure 2　Co-expression network of differentially expressed genes in bone marrow cells of mice exposed to benzene for four weeks

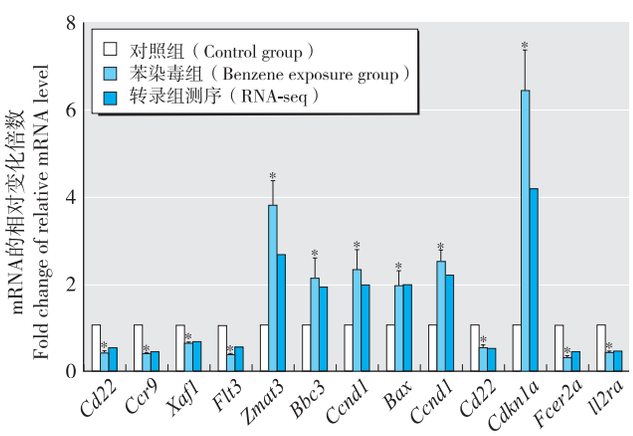
**表6 苯染毒4周后小鼠骨髓细胞差异表达基因共表达分析结果**

Table 6 Co-expression analysis results of differentially expressed genes in bone marrow cells of mice exposed to benzene for four weeks

| 基因 Gene | 调控能力 Regulation degree | 功能分类与通路 Function and pathway |
|---|---|---|
| *Cd93* | 14 | 细胞黏附（Cell adhesion） |
| *Xaf1* | 13 | 凋亡过程（Apoptotic process） |
| *Aff3* | 12 | 转录调控（Regulation of transcription） |
| *Cpm* | 12 | 蛋白水解（Proteolysis） |
| *Parp14* | 12 | 转录调控（Regulation of transcription） |
| *Flt3* | 11 | 前B与B细胞分化、白细胞稳态、细胞增殖的负向调控、前T细胞分化、造血细胞谱系、癌症转录失调、急性髓性白血病<br>Pre-B and B cell differentiation；leukocyte homeostasis；negative regulation of cell proliferation；pre-T cell differentiation；hematopoietic cell lineage；transcriptional misregulation in cancer；acute myeloid leukemia |
| *Ccr9* | 10 | 免疫反应、细胞因子介导的信号通路、细胞质钙离子浓度的消除、肠道免疫网络、细胞-细胞因子受体相互作用<br>Immune response；chemokine-mediated signaling pathway；elevation of cytosolic calcium ion concentration；intestinal immune network；cytokine-cytokine receptor interaction |
| *Cd72* | 10 | B细胞受体信号通路（B cell receptor signal pathway） |
| *Dpp4* | 10 | 代谢过程、T细胞共刺激、细胞粘附、调节T细胞介导的免疫、对缺氧的反应、蛋白质消化吸收<br>Metabolic process；T cell co-stimulation；cell adhesion；regulation of T cell mediated immunity；response to hypoxia；protein digestion and absorption |
| *H2-Ob* | 10 | 抗原呈递（Antigen presentation） |
| *Sbk1* | 10 | 蛋白磷酸化（Protein phosphorylation） |

## 2.7 qRT-PCR验证结果

对随机选取的13个差异基因进行qRT-PCR验证，结果显示，差异基因的相对表达量与RNA-seq检测结果趋势一致，验证了RNA-seq结果的可靠性。见图3。




［注］*：与对照组相比，$P<0.05$。

［Note］*：Compared with the control group，$P<0.05$.

**图3 苯染毒4周后小鼠骨髓细胞差异表达基因的qRT-PCR验证**

Figure 3 Validation of differentially expressed genes by qRT-PCR in mouse bone marrow cells exposed to benzene for four weeks

## 3 讨论

苯作为重要的工业原料，广泛应用于制鞋、涂料、染料、喷漆等行业，在工业生产中已经有一百多年的历史[21]。苯主要通过呼吸道吸入和皮肤接触进入体内，一部分排出体外，一部分在肝脏和骨髓中代谢，苯首先在肝脏由细胞色素P450酶氧化为苯环氧化物，苯环氧化物可经过非酶性重排自发形成苯酚，苯酚可在细胞色素P4502E1的催化下进一步代谢为氢醌、儿茶酚、苯三醇等，上述化合物在骨髓内被髓过氧化物酶催化为终致癌物苯醌[22]。骨髓是苯毒性的重要靶器官，因此本研究选择苯染毒小鼠的骨髓细胞进行转录组测序。

RNA-seq结果显示，苯染毒小鼠与对照组小鼠相比有227个差异表达基因，通过对差异基因的功能和信号通路分析，发现差异基因主要富集在凋亡、免疫、增殖、细胞周期、氧化应激、造血系统相关的功能和信号通路。慢性苯暴露可导致造血功能抑制，引起白细胞和中性粒细胞减少。苯染毒小鼠可引起骨髓细胞活性氧升高，造血干细胞数量明显降低，造血集落明显减少[23-24]。此外还发现炎症、麻疹、结核、糖尿病等相关通路的变化，提示苯除了已知的毒性作用之外，可能还具有未知的毒性作用，值得进一步研究探讨。

对差异基因进行共表达分析，发现14个差异基因发挥主要作用，其调控基因数超过10个。其中*Xaf1*、*Flt3*、*Ccr9*、*Cd72*与造血功能异常相关，*Xaf1*定位于染色体17p13.2，是X染色体连锁的凋亡抑制剂，在介导癌细胞凋亡抵抗中具有重要作用[25]，有研究表明17p缺失与B型慢性淋巴细胞白血病预后不良有关，且*Xaf1*基因的表达水平调节此种疾病中Nutlin-3的细胞毒性反应[26]。研究证明，*Flt3*位于造血系统相关的通路上，该基因编码调节造血功能的Ⅲ型酪氨酸激酶受体，参与骨髓中造血细胞的凋亡、增殖和分化，若突变会导致急性髓性白血病和急性淋巴细胞白血病[27]。*Ccr9*趋化因子受体表达在健康组织中非常受限，但研究证明，其在T细胞谱系急性淋巴细胞白血病和T细胞谱系慢性淋巴细胞白血病中高表达，所以被认为是靶向治疗的候选基因[28-29]。研究报道，*Cd72*可以抑制受体酪氨酸激酶突变的急性髓性白血病细胞系Kasumi-1的生长，而在急性髓性白血病患者也观察到酪氨酸激酶突变，因此*Cd72*可能提供了用酪氨酸激酶突变靶向治疗急性髓性白血病的机会[30]。以上研究结果为

苯毒性机制的阐明和靶基因的筛选提供了新的研究线索。

中国是工业大国, 苯暴露涉及的工种广泛, 苯暴露人群众多,《2013年全国职业病报告情况》显示, 慢性职业苯中毒的发生率位居慢性职业中毒的首位 (http://niohp.chinacdc.cn/sndt/201409/t20140905_104225.html)。目前慢性苯中毒依然是职业中毒的重要防治目标。因此, 阐明苯毒性的机制, 明确苯毒性的调控网络, 可为寻找苯暴露所致的早期损伤标志和制订苯中毒防治策略提供科学依据。

## 参考文献


[1] Fan R, Li J, Chen L, et al. Biomass fuels and coke plants are important sources of human exposure topolycyclic aromatic hydrocarbons, benzene and toluene [J]. Environ Res, 2014, 135: 1-8.

[2] Pyatt D W, Hays S M, English C, et al. United States voluntary children's chemical evaluation program (VCCEP) risk assessment for children exposed to benzene [J]. Toxicol Mech Methods, 2012, 22 (2): 81-104.

[3] Santiago F, Alves G, Otero U B, et al. Monitoring of gas station attendants exposure to benzene, toluene, xylene (BTX) using three-color chromosome painting [J]. Mol Cytogenet, 2014, 7 (1): 15.

[4] Snyder R. Leukemia and benzene [J]. Int J Environ Res Public Health, 2012, 9 (8): 2875-2893.

[5] Schnatter A R, Kerzic P J, Zhou Y, et al. Peripheral blood effects in benzene-exposed workers [J]. Chem Biol Interact, 2010, 184 (1/2): 174-181.

[6] Irons R D, Gross S A, Le A, et al. Integrating WHO 2001-2008 criteria for the diagnosis of Myelodysplastic Syndrome (MDS): a case-case analysis of benzene exposure [J]. Chem Biol Interact, 2010, 184 (1/2): 30-38.

[7] 陈铿铿, 黄振烈, 赖关朝, 等. 低水平职业性苯接触人群健康效应及生物标志物研究 [J]. 中国职业医学, 2015, 42 (6): 606-606.

[8] Li J, Zhang X, He Z, et al. *MGMT* hypomethylation is associated with DNA damage in workers exposed to low-dose benzene [J]. Biomarkers, 2017, 22 (5): 470-475.

[9] Chen Y, Sun P, Guo X, et al. MiR-34a, a promising novel biomarker for benzene toxicity, is involved in cell apoptosis triggered by 1, 4-benzoquinone through targeting Bcl-2 [J]. Environ Pollut, 2017, 221: 256-265.

[10] Xia B, Chen K, Lv Y, et al. Increased oxidative stress and plasma Hsp70 levels among gasoline filling station attendants [J]. Toxicol Ind Health, 2017, 33 (2): 171-181.

[11] Lovreglio P, Doria D, Fracasso M E, et al. DNA damage and repair capacity in workers exposed to low concentrations of benzene [J]. Environ Mol Mutagen, 2016, 57 (2): 151-158.

[12] 陈超. 基于RNA-Seq技术的人转录组分析研究 [D]. 长沙: 中南大学, 2011.

[13] 陈荣. SM22α敲除小鼠血管转录组学分析及差显基因的功能验证 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2014.

[14] Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics [J]. Nat Rev Genet, 2009, 10 (1): 57-63.

[15] Paustenbach D J, Bass R D, Price P. Benzene toxicity and risk assessment, 1972-1992: implications for future regulation [J]. Environ Health Perspect, 1993, 101Suppl 6: 177-200.

[16] 杨文文. 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺陷对苯造血毒性的易感性与机制研究 [D]. 南京: 东南大学, 2016.

[17] Sun R, Zhang J, Xiong M, et al. Altered expression of genes in signaling pathways regulating proliferation of hematopoietic stem and progenitor cells in mice with subchronic benzene exposure [J]. Int J Environ Res Public Health, 2015, 12 (8): 9298-9313.

[18] Wei H, Zhang J, Tan K, et al. Benzene-induced aberrant miRNA expression profile in hematopoietic progenitor cells in C57BL/6 mice [J]. Int J Mol Sci, 2015, 16 (11): 27058-27071.

[19] 崔晓钢. 基于RNA-seq与small RNA-seq进行奶牛产奶性状功能基因挖掘及生物信息学预测牛新miRNA [D]. 北京: 中国农业大学, 2015.

[20] Kanehisa M, Araki M, Goto S, et al. KEGG for linking genomes to life and the environment [J]. Nucleic Acids Res, 2008, 36 (S1): D480-D484.

[21] 张静. DNA损伤修复基因多态与苯作业工人遗传损伤易感性关系的研究 [D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2012.

[22] 陈艳. 苯致血液毒性遗传易感性与外源化合物代谢酶基因多态性 [J]. 卫生研究, 2002, 31 (2): 130-132.

[23] Sun R, Zhang J, Xiong M, et al. Altered expression of genes in signaling pathways regulating proliferation of hematopoietic stem and progenitor cells in mice with subchronic benzene exposure [J]. Int J Environ Res Public Health, 2015, 12 (8):

9298-9318.

[24] Meng X，Zhang J，Yin L，et al. Involvement of hypoxia-inducible factor-1α（HIF-1α）in inhibition of benzene on mouse hematopoietic system［J］. J Toxicol Environ Health A，2016，79（9/10）：402-406.

[25] Liston P，Fong W G，Kelly N L，et al. Identification of XAF1 as an antagonist of XIAP anti-Caspase activity［J］. Nat Cell Biol，2001，3（2）：128-133.

[26] Secchiero P，di Iasio M G，Melloni E，et al. The expression levels of the pro-apoptotic XAF-1 gene modulate the cytotoxic response to Nutlin-3 in B chronic lymphocytic leukemia［J］. Leukemia，2010，24（2）：480-483.

[27] Beitinjaneh A1，Jang S，Roukoz H，et al. Prognostic significance of FLT3 internal tandem duplication and tyrosine kinase domain mutations in acute promyelocytic leukemia：a systematic review［J］. Leuk Res，2010，34（7）：831-836.

[28] Chamorro S，Vela M，Franco-Villanueva A，et al. Antitumor effects of a monoclonal antibody to human CCR9 in leukemia cell xenografts［J］. MAbs，2014，6（4）：1000-1012.

[29] Zhang Q，Li Q，Hu C，et al. Selectively increased expression and functions of chemokine receptor CCR9 on CD4+ T cells from patients with T-cell lineage acute lymphocytic leukemia［J］. Cancer Res，2003，63（19）：6469-6477.

[30] Kataoka T R，Kumanogoh A，Hirata M，et al. CD72 regulates the growth of KIT-mutated leukemia cell line Kasumi-1［J］. Sci Rep，2013，3（1）：2861.

（**收稿日期**：2017-04-07；**录用日期**：2017-05-10）

（英文编辑：汪源；编辑：陈姣；校对：丁瑾瑜）

**【告知栏】**

# 《环境与职业医学》杂志入选中国科学引文数据库（2017—2018，核心库）来源期刊

2017年4月，中国科学院文献情报中心公布了2017—2018年度中国科学引文数据库（Chinese Science Citation Database，CSCD）来源期刊。CSCD分为核心库和扩展库两部分，其中核心库887种，扩展库342种。经由定量遴选、专家定性评估，《环境与职业医学》杂志被收录为CSCD（核心库）来源期刊（http://sciencechina.cn/cscd_source.jsp）。




CSCD创建于1989年，收录我国生物学、医药卫生、环境科学等领域出版的中英文科技核心期刊和优秀期刊千余种，来源期刊每两年遴选一次。CSCD已实现与Web of Science的跨库检索，来源期刊与SCI在同一平台上面向全球提供服务，所有进入CSCD的期刊论文均可经由该平台检索，为国内唯一实现该功能的数据库。

《环境与职业医学》杂志2015年首次成为CSCD（扩展库）来源期刊。多年来，编委会和编辑部成员在提升期刊学术水平、稳定出版质量、布局数字化业务等方面持续付出不懈努力，杂志陆续荣获华东地区优秀期刊、中华预防医学会系列杂志一等奖等荣誉称号，并于今年首次进入CSCD核心库。

杂志的点滴进步都离不开各位编委、审稿专家、作者和读者的支持和关注，特此志谢！衷心希望广大读者和作者一如既往支持本刊工作，踊跃投稿！