实验研究

323

关现 m 元 Experiment

人支气管上皮样细胞中苯并 [a] 芘代谢物-DNA 加 合物图谱:基于染色质免疫共沉淀测序技术

冀婷玉¹, 曹彬¹, 吕懿¹, 佟晓敏¹, 孙宏宇¹, 郑金平^{1,2}

1. 山西医科大学公共卫生学院卫生毒理学教研室,山西太原 030001
 2. 长治医学院公共卫生与预防医学系,山西长治 046000

摘要:

[背景] 苯并 [*a*] 芘(BaP)的活性代谢产物 7,8-二羟-9,10-环氧苯并 [*a*] 芘(BPDE)可与 DNA 加合,但 BPDE-DNA 加合物图谱尚不明确。

[目的] 采用染色质免疫共沉淀测序技术(ChIP-Seq),在全基因组水平上鉴定 BPDE 加合位点 分布及加合基因,为深入研究 BaP 的毒作用机制提供依据。

[方法] 人支气管上皮样细胞 16HBE 培养至第四代达对数生长期。收获细胞并加入染色质免疫共沉淀裂解缓冲液,将裂解产物等分为实验组和对照组,实验组添加终浓度 20 µmol·L⁻¹ 的BPDE 溶液,对照组添加相同体积的二甲基亚砜溶液,在 37 ℃环境下孵育 24 h。超声获得100~500 bp 的染色质小片段。使用 BPDE 特异性抗体(anti-BPDE 8E11)富集与 BPDE 加合的DNA 片段,高通量测序检测 BPDE 加合位点,使用 MEME 和 DREME 软件对前 1000 个峰序列进行模体分析,注释 BPDE 在全基因组水平的加合靶基因,并通过生物信息学技术对 BPDE 加合靶基因进行基因本体论(GO)功能分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路分析。

[结果] 高通量测序共检测出 842 个 BPDE 结合位点,在各染色体上均有分布。BPDE 可以与基 因编码区和非编码区共价结合,73.9%的结合位点分布在基因间区,19.6%分布在内含子区, 上游 2 千碱基区域、外显子区、下游 2 千碱基区域及 5'非翻译区也有少量分布。对前 1000 个峰序列进行分析,寻找到 4 条可靠的模体,发现富含鸟嘌呤(G)和腺嘌呤(A)的位点易于结 合。对结合位点进行富集,共鉴定出 199 个 BPDE 加合靶基因,大多分布在 1 号、5 号、7 号、 12 号、17 号和 X 染色体上。GO 分析显示,靶基因主要富集于核酸和蛋白质结合,参与调节 催化活性、转运活性、翻译延伸因子活性,在细胞分裂、分化、运动、物质运输和信息传递方 面发挥重要作用。KEGG 分析显示靶基因主要富集于心血管疾病、癌症、免疫炎症反应等相 关通路。

[结论] 利用 ChIP-Seq 在全基因组水平上共鉴定出 199 个 BPDE 加合靶基因,主要影响细胞分裂、分化、运动、物质运输和信息传递等生物学功能,与心血管疾病、肿瘤及免疫炎症反应密 切相关。

关键词:7,8-二羟-9,10-环氧苯并 [a] 芘;人支气管上皮样细胞;染色质免疫共沉淀测序; DNA 加合物;生物信息学

Map of benzo[*a*]pyrene metabolites-DNA adducts in human bronchial epithelial-like cells: Based on chromatin immunoprecipitation followed by sequencing technology JI Tingyu¹, CAO Bin¹, LYU Yi¹, TONG Xiaomin¹, SUN Hongyu¹, ZHENG Jinping^{1,2} (1. Department of Hygienic Toxicology, School of Public Health, Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China; 2. Department of Public Health and Preventive Medicine, Changzhi Medical College, Changzhi, Shanxi 046000, China)

Abstract:

[Background] The active metabolite of benzo[*a*]pyrene (BaP), 7,8-dihydroxy-9,10-epoxybenzo[*a*] pyrene (BPDE), can form adducts with DNA, but the spectrum of BPDE-DNA adducts is unclear.

[Objective] To identify the distribution of BPDE adduct sites and associated genes at the wholegenome level by chromatin immunoprecipitation followed by sequencing (ChIP-Seq), and serve as a basis for further exploring the toxicological mechanisms of BaP.

[Methods] Human bronchial epithelial-like cells (16HBE) were cultured to the fourth generation in



基金项目

山西省重点研发计划(国际合作)项目 (201703D421021);山西省"1331工程"提质 增效项目(2021-5-2-2-81);山西省基础研究 计划(自由探索类) 青年科学研究项目 (20210302124301)

作者简介 并列第一作者。

冀婷玉(1998—),女,硕士生; E-mail: jitingyu0211@163.com 曹彬(1993—),男,硕士生; E-mail: bcao@cdc.zj.cn

通信作者 郑金平, Email: zheng_jp@sxmu.edu.cn

作者中包含编委会成员 无 伦理审批 不需要 利益冲突 无申报 收稿日期 2023-09-24 录用日期 2024-01-20

文章编号 2095-9982(2024)03-0323-07 中图分类号 R11 文献标志码 A

补充材料

www.jeom.org/article/cn/10.11836/JEOM23333

▶引用

冀婷玉,曹彬,吕懿,等. 人支气管上皮样细 胞中苯并 [a] 芘代谢物-DNA 加合物图谱:基 于染色质免疫共沉淀测序技术 [J]. 环境与职 业医学,2024,41(3):323-329.

▶本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.11836/JEOM23333

Funding This study was funded.

, Correspondence to

ZHENG Jinping, E-mail: zheng_jp@sxmu.edu.cn

Editorial Board Members' authorship No Ethics approval Not required Competing interests None declared Received 2023-09-24 Accepted 2024-01-20

Supplemental material

www.jeom.org/article/en/10.11836/JEOM23333

To cite

JI Tingyu, CAO Bin, LYU Yi, et al. Map of benzo[*a*]pyrene metabolites-DNA adducts in human bronchial epithelial-like cells: Based on chromatin immunoprecipitation followed by sequencing technology[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2024, 41(3): 323-329.

Link to this article

ww.jeom.org/article/en/10.11836/JEOM23333

the logarithmic growth phase. Cells were harvested and added to chromatin immunoprecipitation lysis buffer. The lysate was divided into experimental and control groups. The experimental group received a final concentration of 20 μ mol·L⁻¹ BPDE solution, while the control group received an equivalent volume of dimethyl sulfoxide solution. The cells were then incubated at 37 °C for 24 h. Chromatin fragments of 100-500 bp were obtained through sonication. BPDE-specific antibody (anti-BPDE 8E11) was used to enrich DNA fragments with BPDE adducts. High-throughput sequencing was conducted to detect BPDE adduct sites. The top 1000 peak sequences were subjected to motif analysis using MEME and DREME software. BPDE adduct target genes at the whole-genome level were annotated, and Gene Ontology (GO) functional analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway analysis of BPDE adduct target genes were conducted using bioinformatics techniques.

[Results] The high-throughput sequencing detected a total of 842 BPDE binding sites, distributed across various chromosomes. BPDE covalently bound to both coding and non-coding regions of genes, with 73.9% binding sites located in intergenic regions, 19.6% in intronic regions, and smaller proportions in upstream 2 kilobase, exonic, downstream 2 kilobase, and 5' untranslated regions. Regarding the top 1 000 peak sequences, four reliable motifs were identified, revealing that sites rich in adenine (A) and guanine (G) were prone to binding. Through the enrichment analysis of binding sites, a total of 199 BPDE-adduct target genes were identified, with the majority located on chromosomes 1, 5, 7, 12, 17, and X. The GO analysis indicated that these target genes were mainly enriched in nucleic acid and protein binding, participating in the regulation of catalytic activity, transport activity, translation elongation factor activity, and playing important roles in cell division, differentiation, motility, substance transport, and information transfer. The KEGG analysis revealed that these target genes were primarily enriched in pathways related to cardiovascular diseases, cancer, and immune-inflammatory responses.

[Conclusion] Using ChIP-Seq, 199 BPDE adduct target genes at genome-wide level are identified, impacting biological functions such as cell division, differentiation, motility, substance transport, and information transfer. These genes are closely associated with cardiovascular diseases, tumors, and immune-inflammatory responses.

Keywords: 7,8-dihydroxy-9,10-epoxybenzo[*a*]pyrene; human bronchial epithelial-like cell; chromatin immunoprecipitation followed by sequencing; DNA adduct; bioinformatics

苯并 [a] 芘(benzo[a]pyrene, BaP)作为多环芳烃 环境污染物的典型代表,具有致畸、致癌、致突变作用^[1]。 其进入人体后,经细胞色素 P450 代谢形成活性代谢 产物 7,8-二羟-9,10-环氧苯并 [a] 芘(7,8-dihydroxy-9,10epoxybenzo[a]pyrene, BPDE)。BPDE 可与 DNA 的鸟嘌 呤(guanine, G)的 N2 位结合形成 N2-BPDE-dG 加合物, 并主要诱导胞嘧啶鸟嘌呤(cytosine-guanine, CG)到腺 嘌呤胸腺嘧啶(adenine-thymine, AT)突变,诱发肿瘤等 多种疾病发生^[2]。通过³²P 后标记、液相色谱-串联质谱 (liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)等,针对 BPDE-DNA 加合物进行定性定量检测, 能够很好地反映生物有效作用剂量信息,可作为接触 BaP 及 DNA 损伤的生物标志物^[3-5]。然而,由于 DNA 加 合物的发生频率低,加合物分析也一直具有很大的挑 战性。以往研究更多关注 BPDE-DNA 加合物水平与相 关基因转录水平的相关性^[6-9],无法精确识别 BPDE-DNA 加合位点及加合基因分布规律。本研究拟通过一 种基于染色质免疫共沉淀测序(chromatin immunoprecipitation followed by sequencing, ChIP-seq)的技术,在 全基因组上分析 BPDE-DNA 加合物的分布规律。

1 材料与方法

1.1 实验设计

获取人支气管上皮样细胞株 16HBE(广州吉妮欧,

中国) DNA 裂解物,将其等分,设对照组与 BPDE 染毒 组进行处理,将 DNA 进行片段化,基于染色质免疫共 沉淀技术(chromatin Immunoprecipitation, ChIP)的原 理,通过 BPDE 特异性抗体(anti-BPDE 8E11, Trevigen, 美国)对 16HBE 细胞富集到的 BPDE-DNA 加合物进行 高通量测序以获得 BPDE-DNA 加合物形成的全基因组 图谱。

1.2 细胞培养与处理

使用含 10%胎牛血清(武汉普诺赛,中国)和 1%青链霉素(武汉博士德,中国)的 MEM 培养基(Gibco,美国),于 37°C、5% CO₂,相对湿度 90%的培养箱中培养 16HBE 细胞。使用 0.25%的胰酶(武汉博士德,中国)进 行传代,将培养至第四代的 16HBE 细胞接种到 10 cm 的培养皿中。待细胞密度达到 70%~80%且生长状态良 好时,开始后续实验。

1.3 通过 ChIP 获得 BPDE 加合的 DNA 片段

细胞加入终浓度 1%的甲醛(Sigma,美国)室温交 联 10 min 后用 10×甘氨酸(Merck,美国)终止交联,随 后用预冷的磷酸盐缓冲液(上海生工生物工程,中国) 洗涤后收集细胞并加入染色质免疫共沉淀裂解缓冲 液,冰上孵育。染色质免疫共沉淀裂解缓冲液由 0.01% 十二烷基硫酸钠(北京博奥拓达,中国)、1.1%曲拉通 X-100(北京博奥拓达,中国)、1.2 mmol·L⁻¹乙二胺四乙 酸(上海易恩化学,中国)、16.7 mmol·L⁻¹三羟甲基氨 基甲烷盐酸盐(北京索莱宝,中国)、167 mmol·L⁻¹氯化 钠(北京索莱宝,中国)配成,pH=8.1。将裂解产物等分 为实验组和对照组,实验组添加终浓度 20 μmol·L⁻¹的 BPDE 溶液,对照组添加相同体积的二甲基亚砜(Sigma, 美国)溶液,在 37 ℃环境下培养 24 h。使用 SCIENTZ-II D 型超声破碎仪(宁波新芝生物,中国)获取 100~ 500 bp 的染色质小片段。超声处理后,12000×g 离心 10 min,以除去不溶性物质,加入 1 μL 核糖核酸酶 A(10 mg·mL⁻¹)。从实验组和对照组中分别取 10 μL(2%) 上清液作为阳性对照组。采用 ChIP 技术,每组加入 anti-BPDE 4 μg 及 A/G 磁珠富集 BPDE-DNA 加合物。

1.4 高通量测序和模体分析

委托安诺优达公司(中国北京)使用高通量测序检 测 BPDE 加合基因。对前 1000 个峰序列进行模体分 析,搜索模式为每个模体在每个序列中最多出现一次, 并且允许模体在其互补链上出现。模体分析使用软件 DREME(4.12.0 版)和 MEME(4.12.0 版)。

1.5 BPDE 加合基因 GO 和 KEGG 分析

利用微生信平台(https://www.bioinformatics.com. cn/)对 BPDE 加合基因进行基因本体论(Gene Ontology, GO)富集分析和京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)通路分析, 筛选标准为 P < 0.05。

2 结果

2.1 BPDE 结合位点分析

通过对比实验组与对照组样品测序结果,对 16HBE 细胞全基因组 BPDE 结合位点进行定位与注释。 最终获得了 842 个 BPDE 结合位点,平均长度为 496 bp, 富集达到 4 倍到 9 倍的峰占比最大。BPDE 可以与基 因编码区和非编码区共价结合,73.9%的结合位点分 布在基因间区,19.6%分布在内含子区,3.2%分布在上 游 2 千碱基区,外显子区、下游 2 千碱基区域及 5'非 翻译区也有少量分布(图 1A)。BPDE 结合位点在人类 染色体上的分布以竖线标示(图 1B),每条染色体上均 有 BPDE 结合位点的分布。

2.2 模体分析

对前 1000 个峰序列进行分析,以寻找可靠的模体。共鉴定出四条典型的模体序列,在这四条序列中 G 和 A 的含量较高(见补充材料图 S1、图 S2)。

2.3 BPDE 加合靶基因的筛选

在获得的 842 个 BPDE 结合位点中,注释为基因 片段的有 218 个,这些结合位点涵盖了 199 个加合基 因。有关 BPDE 加合基因的详细列表以及在染色体上的分布情况,请参见表 1。



[注] A 为不同基因组区域的峰值分布图, B 为 BPDE 结合位点在人类染 色体上的分布图。MT 为线粒体染色体。

> 图 1 BPDE 结合位点分析图 Figure 1 Analysis charts of BPDE binding sites

2.4 GO 分析

对 BPDE 加合基因进行 GO 富集分析,获得在分子 功能、生物过程、细胞成分每个层面的前 10 个 GO 条 目(图 2)。在分子功能层面, BPDE 加合基因主要富集 在突触融合蛋白结合(GO: 0019905)、鸟苷三磷酸酶 活性(GO: 0003924)、微管结合(GO: 0015631)、可溶 性 N-乙基马来酰亚胺敏感因子附着蛋白受体(GO: 0000149)、磷酸转移酶活性磷酸基团受体(GO: 0016776)、突触后结构成分(GO: 0099186)、突触的结 构成分(GO: 0098918)、翻译延伸因子活性(GO: 0003746)、钙黏蛋白(GO: 0045296)、多聚腺苷酸结合 (GO: 0008143);在生物过程层面主要富集于谷氨酸受 体信号通路(GO: 0007215)、毒素转运(GO: 1901998)、 膜对接(GO: 0022406)、基于肌动蛋白丝运动的调节 (GO: 1903115)、蛋白质在突触后特化膜上的定位 (GO: 0099633)、神经递质受体在突触后特化膜上的 定位(GO: 0099645)、囊泡对接(GO: 0048278)、通过 膜束缚定位细胞器(GO: 0140056)、突触后组织(GO: 0099173)、突触后膜神经递质受体水平的调节(GO: 0099072);在细胞成分层面主要富集干不对称突触 (GO: 0032279)、突触后膜(GO: 0045211)、神经元间 突触(GO: 0098984)、突触膜(GO: 0097060)、突触后 密度(GO: 0014069)、突触后特化(GO: 0099572)、肌 膜(GO: 0042383)、神经元致密核心囊泡(GO:

0098992)、阳离子通道复合体(GO: 0034703)、肌原纤维(GO: 0030016)。

表 1 BPDE 加合基因在染色体上的分布

Table 1 Distribution of BPDE adduct genes on chromosomes

染色体 位置	加合基因 数量/个	加合基因名称
1号	20	GPATCH2, MRPL37, EDEM3, C1orf21, TRIM67, ARF1, GBAP1, GNG4, MARCKSL1, PLD5, PDE4B, RYR2, ZNF847P, AL355482.1, LINC01748, AL023755.1, AL356108.1, AL359924.1, LYPD8, MROH7-TTC4
2号	11	OSBPL6, CYP20A1, LRRFIP1, CNTNAP5, ALK, LRRTM4, AC068051.1, BMPR2, MBD5, LINC02613, AC007402.1
3号	12	NEK11, SPATA16, STXBP5L, ZNF385D, CPB1, FBXL2, SYNPR, OSTN, GRM7, EGFEM1P, LINC02614, TFP1
4号	5	LDB2, ADH7, AC004053.1, AC093772.1, LINC02511
5号	19	WDR70, CDH9, CDH18, FBXL17, MTMR12, ADAMTS12, ICE1, EDIL3, ESM1, GUSBP1, AC091862.1, NR2F1-AS1, AC106799.2, AC112206.2, LINC02112, AC010451.1, LINC01950, LINC01847, AC104109.4
6号	9	MCM9, KHDRB52, SLC22A2, MTO1, AL590867.1, LINC00240, AL354892.1, AL138830.2, OR5V1
7号	14	THSD7A, LAMB4, SNX8, CHCHD3, DPP6, ELMO1, GRM8, ABCA13, STK31, EPHB4, XRCC2, SSPO, AC004917.1, AC073878.1
8号	4	PABPC1, ARHGAP39, RPL8, C8orf89
9号	10	DNM1, GOLM1, TSTD2, RGS3, GNA14, BNC2, TUBB4B, EEF1A1P5, VPS13A, SLC25A25-AS1
10号	7	SH2D4B, CTNNA3, AC022387.1, AL157834.1, RPL13AP5, C10orf143, NSUN6
11号	12	MYBPC3, INTS4, DLG2, NELL1, TMEM135, PLEKHA7, MMP26, PRDM10, DCDC1, AP000893.2, AC090458.1, DISC1FP1
12号	18	CHFR, ACACB, TESC, SLC8B1, NT5DC3, NME2P1, RNFT2, KLRG1, RPL14P1, RITA1, DDX23, AC024940.1, NELL2, CFAP54, TEAD4, LRCOL1, AC124947.1, AC090115.1
13号	2	MTUS2, AL354809.1
14号	5	SCFD1, CHD8, GPHN, LINC02291, AL161757.4
15号	5	UNC13C, CASC4, PPIP5K1, DNAAF4, AGBL1
16号	5	ITGAL, KIAA0556, EARS2, ATF7IP2, GAN
17号	12	RAI1, WBP2, TAOK1, STX8, RAB37, ACTG1, P4HB, ZNF286A, KIAA0753, RPL13P12, LINC02086, AC139530.2
18号	1	GREB1L
19号	4	CACNG7, EEF2, BSG, CAPN12
20号	6	NINL, SALL4, PRPF6, WFDC2, KCNB1, WFDC11
21号	4	HUNK, NCAM2, TIAM1, PPIAP22
22号	1	ARHGAP8
х	13	NEXMIF, KIF4A, TEX11, MORF4L2, IRS4, MSN, ZNF711, AC107419.1, XIST, PTCHD1-AS, TSIX, MIR325HG, AL807742.1

2.5 KEGG 分析

对 BPDE 加合基因进行 KEGG 信号通路富集分析, 以获得这些靶基因富集的生物学通路,前 10 个通路 分别为:致心律失常性右心室心肌病、肥厚性梗阻型 心肌病、Hippo 信号通路、扩张型心肌病、白细胞跨内 皮迁移、磷脂酰醇酶 D 信号通路、催产素信号通路、 紧密连接、谷氨酸能突触和丙酮酸盐代谢等信号通路 (图 3)。



[注]使用圆形展示富集结果。从外到内依次为:分类(颜色一样的为同 一分类)和 GO 条目名,条目总基因数(颜色表示该条目富集的 P), BPDE 加合基因与该条目重叠的基因数,富集因子。

图 2 BPDE 加合基因 GO 分析 Figure 2 GO analysis of BPDE adduct genes



图 3 BPDE 加合基因 KEGG 富集分析 Figure 3 KEGG enrichment analysis of BPDE adduct genes

3 讨论

BaP 是我们生活中广泛接触的环境多环芳烃之一^[10], 国际癌症研究机构明确列为"一类致癌物",其进入人 体后,经代谢形成内源性活性产物 BPDE^[11]。BPDE 具 有亲电子性,可以与 DNA 共价结合,形成 BPDE-DNA 加合物,直接阻碍关键基因的转录或导致 DNA 损伤, 引发基因突变^[8,12]。尽管细胞能够修复多种类型的 DNA 损伤,但在修复功能缺陷的情况下,DNA 损伤会 逐渐积累,最终导致突变的发生^[13]。BPDE-DNA 加合物 水平可作为疾病的风险性生物标志物,各种癌症和肺 部炎症与 BPDE-DNA 加合物水平升高显著相关^[14-17]。 常用的检测 BPDE-DNA 加合物水下升高显著相关^[14-17]。 常用的检测 BPDE-DNA 加合物的方法都只是基于单基 因或部分基因分析,很少有研究在全基因组水平上探 索 BPDE-DNA 加合物的形成及分布规律。本研究采用 ChIP-Seq 技术,在全基因组水平上探究 BPDE 加合基 因及分布规律,旨在为深入研究 BaP 的毒作用机制提 供依据。

在本研究鉴定的 4 条可靠的模体序列中, A 和 G 的含量相对较高,这表明富含 A 和 G 的位点易于结合。 有研究表明, BPDE 主要在 G 的 N2 位置形成稳定的 DNA 加合物, 若核苷酸切除修复没有有效清除这些 DNA 加合物, 便会导致突变和癌症^[18]。我们的结果也 表示 BPDE 主要与富含 G 和 A 的 DNA 序列结合,从而 调控基因的表达。共发现 842 个 BPDE 结合位点,在各 染色体上均有分布。这些结合位点涵盖了 199 个基因, 主要分布于1号、5号、7号、12号、17号以及X染色 体。有研究表明, BPDE-DNA 加合物在人肺上皮细胞系 中的结合热点位于着丝粒区域附近,比如在染色体7、 10、11 和 12 上^[19]。这与我们的研究结果相符, BPDE 结合位点在染色体上并非随机分布。Li 等^[12]研究中发 现在人正常肺上皮细胞 BEAS-2B 中 BPDE 可以与基因 的编码区和非编码区共价结合,但在编码区中存在偏 好性。然而,本研究发现在 16HBE 细胞中, BPDE 结合 位点大部分位于基因间区和内含子区。通常人们只关 注直接编码蛋白质的基因编码区,从而忽略了对非编 码区的研究。已经有众多研究指出,基因调控过程中 非编码区域也发挥着关键的作用^[20]。例如,在癌症遗 传学中,人们越来越意识到仅关注蛋白质编码基因不 足以解释肿瘤遗传因素的全部复杂性[21-22]。内含子作 为基因编码区却不编码蛋白而一直被忽略,但现有研 究发现其可以通过影响转录速率、核输出和转录本稳 定性来提高转录水平;另外,内含子还可以调节 mR-NA 翻译的效率^[23]。这提示研究 BaP 的毒作用机制也 需要关注基因间区和内含子区的调节作用。

GO 分析结果显示, BPDE 加合靶基因主要富集于 核酸和蛋白质结合,参与调控翻译延伸因子活性、催 化活性、转运活性等。提示这些基因产物具备与 RNA 结合的能力,并具有转运物质和调节翻译延伸因子活 性的功能。因此,推测 BPDE 加合靶基因可能通过调节 翻译延伸因子活性在翻译过程中发挥作用,进而影响 蛋白质的合成。此外, BPDE-DNA 加合物的形成影响细 胞分裂、分化及运动等生物学功能,在物质运输和信 息传递方面扮演着关键的角色。

KEGG 通路富集分析显示 BPDE 加合靶基因主要 富集于心血管疾病、癌症、免疫炎症反应等相关通路, 涉及的相关基因有 RYR2、CTNNA3、ACTG1、CACNG7、 MYBPC3、BMPR2、DLG2、TEAD4、ITGAL、MSN 等。 Piberger 等¹⁸通过高通量的实时定量聚合酶链反应量 化 BPDE 对 DNA 损伤、DNA 修复、氧化应激、细胞周 期阻滞、细胞增殖和凋亡等 95 个基因转录水平的影 响,发现 BPDE 激活了 DNA 损伤信号传导、p53 和激 活蛋白-1 依赖性信号传导、氧化应激和凋亡。与本研 究相比, Piberger 等的研究仅涉及对 95 个基因的分析, 主要关注特定基因的转录水平变化。众所周知, RYR2 负责在心脏和骨骼肌中调控钙离子释放, RYR2 基因突 变可能导致一些心脏疾病,如心律失常。研究表明, RYR2 作为心肌细胞成熟的调节因子与未折叠蛋白反 应有关, RYR2 功能障碍会激活未折叠蛋白反应阻碍心 肌细胞成熟^[24]。已有文献表明,子宫内受到 BaP 暴露 会导致子代大鼠晚年心血管功能障碍^[25]。BaP 通过激 活芳烃受体/细胞色素 P450 家族成员 1A1 信号通路, 诱导 BPDE-DNA 加合物生成,引发斑马鱼胚胎心脏固 有细胞凋亡^[26]。然而,目前关于 BaP 引起心脏缺陷的 具体机制以及涉及的相关信号通路尚不明确。本研究 也发现 BPDE 可以与 RYR2 等基因加合从而调控致心 律失常性右心室心肌病、肥厚性梗阻型心肌病信号通 路,这为进一步探索 BaP 引起心血管疾病的相关机制 提供了方向。DLG2 是 11 号染色体上的一个肿瘤抑制 基因,之前已经证实与 DNA 修复有关, DLG2 过表达会 促进 p53 介导的细胞凋亡^[27],*DLG2* 表达缺失是导致各 种肿瘤细胞增殖及存活率降低的原因[28-29]。因此, BPDE 可能通过与 DLG2 加合从而参与 DNA 损伤反应、 肿瘤抑制基因调控及细胞凋亡等过程。TEAD4 作为 Hippo 信号通路的下游分子,调控细胞增殖、细胞存活、 组织再生,在癌症中发挥重要的作用^[30]。本研究富集 到的癌症相关的信号通路除了显著的 Hippo 信号通路 外,也有 Ras 信号通路。既往有关 BaP 引起肺癌的机 制研究主要集中在 p53 信号通路^[31]。因此,我们的研 究也提供了另一种可能, BaP 还可以通过与 TEAD4 等 基因加合调控 Hippo 信号通路从而引发各种癌症。也 有研究发现 BPDE-DNA 加合物的形成也会诱导 K-Ras

基因突变,这种突变与吸烟诱导的癌症突变一致^[32]。 这可能与 BPDE-DNA 加合物诱导的 Ras 信号通路激活 有关。*ITGAL* 在免疫系统中发挥着重要作用,其突变或 异常可能会影响免疫细胞的正常黏附和相互作用。此 外,*ITGAL* 也作为肿瘤预后的生物标志物,调节肿瘤免 疫微环境,导致预后不良^[33-34]。妊娠中期暴露于 BaP 的母鼠其后代由于 T 细胞中存在 BPDE-DNA 加合物, 更易产生免疫抑制,但机制尚不明确^[3]。我们推测这或 许与 *ITGAL* 等 BPDE 加合基因有关。以上结果表明 BPDE-DNA 加合物的形成与心血管疾病、癌症、免疫炎 症反应密切相关。

综上所述,本研究通过 ChIP-Seq 对 BPDE 加合基 因及加合位点进行全基因组分析,发现富含 G 和 A 的 位点易于结合,大多数结合位点分布在基因间区和内 含子区。同时,我们鉴定了 199 个 BPDE 加合基因,参 与细胞分裂、分化、运动、物质运输及信息传递等生 物功能,并且可能与心血管疾病、癌症、免疫炎症反应 等疾病有关。这为深入研究 BaP 的毒作用机制并寻找 潜在的治疗靶点提供了依据。

参考文献

- [1] LIU D, ZHAO Y, QI Y, et al. Benzo(a)pyrene exposure induced neuronal loss, plaque deposition, and cognitive decline in APP/PS1 mice[J]. J Neuroinflammation, 2020, 17(1): 258.
- [2] WEI SJ, CHANG RL, WONG CQ, et al. Dose-dependent differences in the profile of mutations induced by an ultimate carcinogen from benzo[a] pyrene[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991, 88(24): 11227-11230.
- [3] MOOLENAAR-WIRSIY P J, WIRSIY Y G, URSO P. Presence of CD4⁺ SP and DP (γδ, αβ) T-cells expressing BPDE-DNA adducts in progeny of mouse dams exposed to Benzo(α) pyrene at mid-gestation [J]. J Immunotoxicol, 2007, 4(4): 267-277.
- [4] GENNARO LA, VADHANAM M, GUPTA RC, et al. Selective digestion and novel cleanup techniques for detection of benzo[a]pyrene diol epoxide-DNA adducts by capillary electrophoresis/mass spectrometry[J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2004, 18(14): 1541-1547.
- [5] GUO L, JIANG X, TIAN H Y, et al. Detection of BPDE-DNA adducts in human umbilical cord blood by LC-MS/MS analysis[J]. J Food Drug Anal, 2019, 27(2): 518-525.
- [6] AKERMAN G S, ROSENZWEIG B A, DOMON O E, et al. Gene expression profiles and genetic damage in benzo(a)pyrene diol epoxide-exposed TK6 cells[J]. Mutat Res, 2004, 549(1/2): 43-64.
- [7] BELITSKAYA-LEVY I, HAJJOU M, SU W C, et al. Gene profiling of normal human bronchial epithelial cells in response to asbestos and benzo(a)pyrene diol epoxide (BPDE)[J]. J Environ Pathol Toxicol Oncol, 2007, 26(4): 281-294.
- [8] PIBERGER AL, KRÜGER CT, STRAUCH BM, et al. BPDE-induced genotoxicity: relationship between DNA adducts, mutagenicity in the in vitro PIG-A assay, and the transcriptional response to DNA damage in TK6 cells[J]. Arch Toxicol, 2018, 92(1): 541-551.
- [9] DAI M, HUANG W, HUANG X, et al. BPDE, the migration and invasion of

human trophoblast cells, and occurrence of miscarriage in humans: roles of a novel *IncRNA-HZ09*[J]. Environ Health Perspect, 2023, 131(1): 017009.

- [10] BUKOWSKA B, MOKRA K, MICHAŁOWICZ J. Benzo[a]pyrene-environmental occurrence, human exposure, and mechanisms of toxicity[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(11): 6348.
- [11] MADEEN E, SIDDENS LK, UESUGI S, et al. Toxicokinetics of benzo[a]pyrene in humans: extensive metabolism as determined by UPLC-accelerator mass spectrometry following oral micro-dosing[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2019, 364: 97-105.
- [12] LI M, LIU J, ZHOU J, et al. DNA adduct formation and reduced EIF4A3expression contributes to benzo[a]pyrene-induced DNA damage in human bronchial epithelial BEAS-2B cells [J]. Toxicol Lett, 2021, 351: 53-64.
- [13] POIRIER M.C. Chemical-induced DNA damage and human cancer risk[J]. Nat Rev Cancer, 2004, 4(8): 630-637.
- [14] LEE B M, KWACK S J, KIM H S. Age-related changes in oxidative DNA damage and benzo(a)pyrene diolepoxide-I (BPDE-I)-DNA adduct levels in human stomach [J]. J Toxicol Environ Health A, 2005, 68(19): 1599-1610.
- [15] KUANG H, DAI Y, DING X, et al. Association among blood BPDE-DNA adduct, serum interleukin-8 (IL-8) and DNA strand breaks for children with pulmonary diseases [J]. Int J Environ Health Res, 2021, 31(7): 823-834.
- [16] JIN Y, XU P, LIU X, et al. Cigarette smoking, BPDE-DNA adducts, and aberrant promoter methylations of tumor suppressor genes (TSGs) in NSCLC from Chinese population [J]. Cancer Invest, 2016, 34(4): 173-180.
- [17] LIN W S, CHENG W C, HO P Y, et al. Regulation of xenobiotic-metabolizing enzymes by 5-demethylnobiletin and Nobiletin to mitigate Benzo[a] pyrene-induced DNA damage *in vitro* and *in vivo*[J]. J Agric Food Chem, 2023, 71(40): 14604-14614.
- [18] ZHAO B, WANG J, GEACINTOV N E, et al. Poln, Pol
 and Rev1 together are required for G to T transversion mutations induced by the (+)- and (-)*trans-anti-BPDE-N*²-dG DNA adducts in yeast cells[J]. Nucleic Acids Res, 2006, 34(2): 417-425.
- [19] JIANG Y, MINGARD C, HUBER SM, et al. Quantification and mapping of alkylation in the human genome reveal single nucleotide resolution precursors of mutational signatures [J]. ACS Cent Sci, 2023, 9(3): 362-372.
- [20] ELLINGFORD J M, AHN J W, BAGNALL R D, et al. Recommendations for clinical interpretation of variants found in non-coding regions of the genome [J]. Genome Med, 2022, 14(1): 73.
- [21] RHEINBAY E, NIELSEN M M, ABASCAL F, et al. Analyses of non-coding somatic drivers in 2, 658 cancer whole genomes[J]. Nature, 2020, 578(7793): 102-111.
- [22] SAKTHIKUMAR S, ROY A, HASEEB L, et al. Whole-genome sequencing of glioblastoma reveals enrichment of non-coding constraint mutations in known and novel genes[J]. Genome Biol, 2020, 21(1): 127.
- [23] SHAUL O. How introns enhance gene expression [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2017, 91(Pt B): 145-155.
- [24] GUO Y, CAO Y, JARDIN B D, et al. Ryanodine receptor 2 (RYR2) dysfunction activates the unfolded protein response and perturbs cardiomyocyte maturation[J]. Cardiovasc Res, 2023, 119(1): 221-235.
- [25] JULES G E, PRATAP S, RAMESH A, et al. In utero exposure to benzo(a) pyrene predisposes offspring to cardiovascular dysfunction in later-life[J]. Toxicology, 2012, 295(1/3): 56-67.
- [26] ZOU H, ZHANG M, CHEN J, et al. AHR-mediated DNA damage contributes to BaP-induced cardiac malformations in zebrafish[J]. Sci Total Environ, 2024, 906: 167636.
- [27] KEANE S, DE WEERD HA, EJESKÄR K. DLG2 impairs dsDNA break repair

and maintains genome integrity in neuroblastoma [J]. DNA Repair (Amst), 2022, 112: 103302.

- [28] KEANE S, HERRING M, ROLNY P, et al. Inflammation suppresses DLG2 expression decreasing inflammasome formation [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2022, 148(9): 2295-2311.
- [29] KEANE S, AMÉEN S, LINDLÖF A, et al. Low DLG2 gene expression, a link between 11q-deleted and MYCN-amplified neuroblastoma, causes forced cell cycle progression, and predicts poor patient survival [J]. Cell Commun Signal, 2020, 18(1): 65.
- [30] CHEN M, HUANG B, ZHU L, et al. Structural and functional overview of TEAD4 in cancer biology[J]. Onco Targets Ther, 2020, 13: 9865-9874.
- [31] ALEXANDROV K, CASCORBI I, ROJAS M, et al. *CYP1A1* and *GSTM1* genotypes affect benzo[*a*]pyrene DNA adducts in smokers' lung: comparison with

aromatic/hydrophobic adduct formation [J]. Carcinogenesis, 2002, 23(12): 1969-1977.

- [32] TRETYAKOVA N, MATTER B, JONES R, et al. Formation of benzo[a]pyrene diol epoxide-DNA adducts at specific guanines within *K-ras* and *p53* gene sequences: stable isotope-labeling mass spectrometry approach[J]. Biochemistry, 2002, 41(30): 9535-9544.
- [33] ZHANG J, WANG H, YUAN C, et al. ITGAL as a prognostic biomarker correlated with immune infiltrates in gastric cancer[J]. Front Cell Dev Biol, 2022, 10: 808212.
- [34] LI R, WU X, XUE K, et al. ITGAL infers adverse prognosis and correlates with immunity in acute myeloid leukemia[J]. Cancer Cell Int, 2022, 22(1): 268.

(英文编辑:汪源;责任编辑:陈姣)

(上接第 322 页)

- [8] NEGERI Z F, LEVIS B, SUN Y, et al. Accuracy of the Patient Health Questionnaire-9 for screening to detect major depression: updated systematic review and individual participant data meta-analysis[J]. BMJ, 2021, 375: n2183.
- [9] JIA X, WANG Z, HUANG F, et al. A comparison of the mini-mental state examination (MMSE) with the Montreal Cognitive Assessment (MoCA) for mild cognitive impairment screening in Chinese middle-aged and older population: a cross-sectional study [J]. BMC Psychiatry, 2021, 21(1): 485.
- [10] 裴芳, 孟涛, 张凯旋, 等. 简易智能状态检查量表和蒙特利尔认知评估量表在老年人认知功能障碍筛查中的比较[J]. 中国药物与临床, 2020, 20(11):1771-1774.
 PEI F, MENG T, ZHANG KX, et al. Value of MMSE vs MoCA in screening

cognitive dysfunction in elderly[J]. Chin Remed Clin, 2020, 20(11): 1771-1774.

- [11] JIA L, DU Y, CHU L, et al. Prevalence, risk factors, and management of dementia and mild cognitive impairment in adults aged 60 years or older in China: a cross-sectional study[J]. Lancet Public Health, 2020, 5(12): e661e671.
- [12] 王鹏飞, 刘馨雅, 杨婷婷, 等. 上海市虹口区社区老人轻度认知障碍患病 现状及影响因素分析[J]. 阿尔茨海默病及相关病杂志, 2023, 6(2): 97-103.

WANG PF, LIU XY, YANG TT, et al. Analysis of the prevalence and influencing factors of mild cognitive impairment among the older adults in Hongkou District, Shanghai[J]. Chin J Alzheimer's Dis Related Disorders, 2023, 6(2): 97-103.

- [13] 唐玉青, 谭靖宇, 胡欣, 等. 上海市社区老年人轻度认知障碍的潜在危险 因素[J]. 公共卫生与预防医学, 2020, 31(2): 126-130.
 TANG YQ, TAN JY, HU X, et al. Potential risk factors for mild cognitive impairment in the elderly population in communities of Shanghai[J]. J Pub Health Prev Med, 2020, 31(2): 126-130.
- [14] 上海市卫生健康委员会, 上海市中医药管理局. 2022年上海市老年人口 和老龄事业监测统计信息[EB/OL]. (2023-04-12)[2023-08-10]. https://

wsjkw.sh.gov.cn/tjsj2/20230412/899c76cbff2e4c93997b03593ccb946e. html.

Shanghai Municipal Health Commission, Shanghai Administration of Traditional Chinese Medicine. Monitoring statistics of the elderly population and aging undertakings in Shanghai in 2022[EB/OL]. (2023-04-12)[2023-08-10]. https://wsjkw.sh.gov.cn/tjsj2/20230412/899c76cbff2e4c93997b0 3593ccb946e.html.

- [15] MORLEY J.E. An overview of cognitive impairment [J]. Clin Geriatr Med, 2018, 34(4): 505-513.
- [16] SANFORD A.M. Mild cognitive impairment[J]. Clin Geriatr Med, 2017, 33(3): 325-337.
- [17] 倪秀石, 吴方, 宋娟, 等. 老年人认知障碍评估中国专家共识(2022)[J]. 中华老年医学杂志, 2022, 41(12): 1430-1440.

NI X S, WU F, SONG J, et al. Chinese expert consensus on assessment for cognitive impairment in the elderly[J]. Chin J Geriatr, 2022, 41(12): 1430-1440.

- [18] 曲艺, 刘畅, 张若馨. 沈阳市养老机构老年人认知功能与日常生活能力的相关性研究[J]. 中国医科大学学报, 2021, 50(11): 970-975.
 QU Y, LIU C, ZHANG RX. Correlation between cognitive ability and daily living ability of older adults in nursing homes in Shenyang[J]. J China Med Univ, 2021, 50(11): 970-975.
- [19] 马佳, 张韶伟, 刘文斌, 等. 社区老年轻度认知障碍患者抑郁焦虑状况及影响因素研究[J]. 中国全科医学, 2020, 23(33): 4246-4251.
 MA J, ZHANG SW, LIU W B, et al. Prevalence and associated factors of depression and anxiety in elderly patients with mild cognitive impairment in community: a cross-sectional study[J]. Chin General Pract, 2020, 23(33): 4246-4251.
- [20] 禹延雪, 白茹玉, 于文龙, 等. ≥60岁人群认知功能障碍发生现状及影响因素研究[J]. 中国全科医学, 2023, 26(21): 2581-2588.
 YU YX, BAI RY, YU WL, et al. Occurrence status and influencing factors of cognitive dysfunction in population aged 60 and above[J]. Chin General

Pract, 2023, 26(21): 2581-2588.

(英文编辑:汪源; 责任编辑:汪源)