

二羟环氧苯并芘短期暴露对人支气管上皮细胞基因表达谱的影响

王慧¹, 吕懿¹, 李玲¹, 李朝菲¹, 郭璨璨¹, 田凤契¹, 穆箭兵², 郑金平^{1,3}

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. 美国国立卫生研究院, 马里兰州 贝塞斯达 20892

3. 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)可引起暴露人群呼吸系统损伤。既往研究表明, BaP及其活性代谢物染毒细胞24 h, 即可引发细胞能量代谢异常、氧化损伤, 导致细胞生存率降低。

[目的] 观察BaP活性代谢物二羟环氧苯并芘(BPDE)短期暴露导致的人支气管上皮细胞(16HBE)基因表达谱的变化, 为探讨BPDE急性毒性机制提供依据。

[方法] 选取人支气管上皮细胞(16HBE), 分别用终浓度0.5、1.0、2.0、4.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的BPDE染毒, 同时设溶剂对照组(加入等体积二甲基亚砜)和空白对照组(加入正常培养基), 处理24 h后, CCK8法检测细胞存活率。根据细胞存活率, 挑选一个剂量染毒组和溶剂对照组利用BGISEQ平台进行转录组测序(RNA-Seq)。使用R语言中的DESeq2包检测不同样本的差异表达基因, 并用phyper函数对差异基因进行基因本体论(GO)功能注释和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路分析。

[结果] 随BPDE染毒剂量的增加, 16HBE细胞存活率呈下降趋势($Z=-7.79$, $P_{趋势}<0.01$); 0.5、1.0、2.0、4.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BPDE染毒组细胞存活率分别为94.56% $\pm$ 1.74%、84.80% $\pm$ 3.19%、80.08% $\pm$ 1.72%、62.72% $\pm$ 1.95%, 均明显低于溶剂对照组(98.61% $\pm$ 0.61%)和空白对照组(100.00% $\pm$ 0.00%) ($P<0.05$)。选取2.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BPDE染毒组和溶剂对照组细胞进行测序, 结果显示, 以基因变化倍数的对数绝对值 $|\log_2FC|>1$, $P<0.05$ 为筛选标准, 暴露组共检测出191个2倍及以上差异表达的基因; 其中上调的基因87个, 下调的基因104个。基因共表达网络分析发现, 趋化因子CXCL6、CXCL1、CXCL3、CXCL8和集落刺激因子CSF2具有较强的关联性。GO分析显示, 差异表达基因主要参与细胞增殖的生物学过程, 并通过KEGG通路分析发现, 这些基因主要富集于白介素(IL)-17信号通路和炎症趋化因子等通路。进一步分析差异表达的mRNA, 发现有670个mRNA表达上调, 878个mRNA表达下调; 差异表达mRNA主要富集于凋亡执行期负调控、细胞外信号转导负调控和信号受体活动的调节等生物学过程, 主要影响铁死亡, 调控干细胞多能性, 赖氨酸退化等信号通路。

[结论] BPDE短期暴露可引起16HBE细胞基因表达谱的改变, 生物信息学分析结果提示IL-17信号通路和铁死亡途径可能参与该细胞损伤的过程。

关键词: 二羟环氧苯并芘; 苯并[a]芘; 短期暴露; mRNA测序; 生物信息学分析

Effects on gene expression profile in human bronchial epithelial cells exposed to benzo[a]pyrene diol epoxide WANG Hui¹, LYU Yi¹, LI Ling¹, LI Zhaoifei¹, GUO Cancan¹, TIAN Fengjie¹, MU Jianbing², ZHENG Jinping^{1,3} (1. Department of Health Toxicology, School of Public Health, Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China; 2. National Institutes of Health (NIH), Bethesda, Maryland 20892, USA; 3. Department of Public Health and Preventive Medicine, Changzhi Medical College, Changzhi, Shanxi 046000, China)

Abstract:

[Background] Benzo[a]pyrene (B[a]P) can cause respiratory damage in people exposed to it. Previous studies indicate that a 24-hour exposure to B[a]P and its active metabolites could cause abnormal cell energy metabolism and oxidative damage, leading to reduced cell survival.

[Objective] This experiment observes the changes of gene expression profile of human bronchial epithelial cells (16HBE) caused by short-term exposure to benzo[a]pyrene diol epoxide

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2021.20337

基金项目

国家自然科学基金项目(30872137); 山西省重点研发计划国际科技合作项目(201703D421021); 山西省青年科技研究基金(201901D211327)

作者简介

王慧(1991—), 女, 硕士生;
E-mail: whtoxi@163.com

通信作者

郑金平, E-mail: zheng_jp@sxmu.edu.cn

伦理审批 不需要

利益冲突 无申报

收稿日期 2020-07-12

录用日期 2020-09-10

文章编号 2095-9982(2021)01-0051-08

中图分类号 R114

文献标志码 A

►引用

王慧, 吕懿, 李玲, 等. 二羟环氧苯并芘短期暴露对人支气管上皮细胞基因表达谱的影响[J]. 环境与职业医学, 2021, 38(1): 51-57, 63.

►本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2021.20337

Funding

This study was funded.

Correspondence to

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

Ethics approval Not required

Competing interests None declared

Received 2020-07-12

Accepted 2020-09-10

►To cite

WANG Hui, LYU Yi, LI Ling, et al. Effects on gene expression profile in human bronchial epithelial cells exposed to benzo[a]pyrene diol epoxide[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2021, 38(1): 51-57, 63.

►Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2021.20337

(BPDE), an active metabolite of B[a]P, and to provide evidence for the potential mechanism of acute toxicity of BPDE.

[Methods] This experiment included four BPDE exposure groups (0.5, 1.0, 2.0, and 4.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively), a solvent control group (dimethyl sulfoxide), and a blank control group (normal saline). CCK8 method was used to measure cell survival rate after 24 h treatment. According to the cell survival rate, an exposure group and a solvent control group were selected for transcriptional sequencing (RNA-Seq) using the BGISEQ platform. The DESeq2 package in R software was used to detect the differentially expressed genes (DEGs) in different samples. The phyper function in R software was used to perform Gene Ontology (GO) functional annotation and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis of the selected DEGs.

[Results] The survival rates of 16HBE cells decreased with the increase of BPDE concentration ($Z=-7.79$, $P_{\text{trend}}<0.01$). The cell survival rates of the 0.5, 1.0, 2.0, and 4.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BPDE groups ($94.56\%\pm 1.74\%$, $84.80\%\pm 3.19\%$, $80.08\%\pm 1.72\%$, and $62.72\%\pm 1.95\%$, respectively) were significantly reduced compared with the solvent control group ($98.61\%\pm 0.61\%$) and the blank control group ($100.00\%\pm 0.00\%$) ($P<0.05$). The cells in the 2.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BPDE group and the solvent control group were selected for sequencing, and 191 DEGs satisfying both $|\log_2\text{FC}|>1$ and $P<0.05$ were detected in the exposure group, including 87 genes up-regulated and 104 genes down-regulated. The results of gene co-expression network found that chemokines *CXCL6*, *CXCL1*, *CXCL3*, and *CXCL8* had strong correlations with colony stimulating factor *CSF2*. The GO analysis results showed that these DEGs were mainly involved in the biological process of cell proliferation, and the KEGG pathway analysis results showed that these genes were mainly enriched in the interleukin (IL)-17 signaling pathway and the inflammatory chemokine signaling pathway. Further mRNA analysis results revealed that 670 mRNAs were up-regulated and 878 mRNAs were down-regulated. The differentially expressed mRNAs were mainly involved in negative regulation of execution phase of apoptosis, negative regulation of extracellular signal transduction, regulation of signal receptor activity, etc., affecting ferroptosis, regulation of stem cells' pluripotency, lysine degradation, and other signaling pathways.

[Conclusion] Short-term exposure to BPDE can cause changes in gene expression profile of 16HBE cells, and bioinformatics analysis results suggest that IL-17 signaling pathway and ferroptosis pathway might be involved in the BPDE associated cell injury.

Keywords: benzo[a]pyrene diol epoxide; benzo[a]pyrene; short-term exposure; mRNA sequencing; bioinformatics analysis

苯并[a]芘 (benzo[a]pyrene, BaP) 是生产与生活中的主要污染物之一, 我们的前期研究发现, 职业暴露于 BaP 的焦炉工人表现出以通气功能障碍为主的肺功能损伤^[1], 可能与肺部的炎症反应和氧化应激相关。近年来多项有关 BaP 毒性机制的研究也证明, 用 BaP 或其在体内形成的活性代谢产物二羟环氧苯并芘 (7, 8-dihydrodiol-9, 10-epoxidebenzo[a]pyrene, BPDE) 染毒细胞, 4~24 h 即可引起细胞信号转导紊乱、细胞周期异常、能量代谢异常以及氧化损伤, 最终导致细胞的生存率明显下降^[2-3]。BaP 可能通过直接作用和体内形成活性代谢产物 BPDE 两种途径引起肺损伤。因此, 深入研究 BPDE 引发细胞急性损伤的分子机制, 能为提出早期防控措施提供线索。本研究通过 BPDE 短期暴露细胞模型, 在转录组水平观察 BPDE 对人支气管上皮细胞 (16HBE 细胞) 基因表达的影响, 为进一步探讨 BaP 致肺损伤的毒性机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 细胞培养与分组

将 16HBE 细胞 (中国广州吉妮欧) 加入细胞培养基培养于 37℃、5% CO₂ 的培养箱中。细胞培养基由 89% 最低必需培养基 (minimum essential medium, MEM; 美国 Gibco), 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS; 中国武汉普诺赛) 和 1% 的青链霉素混合液

(中国武汉普诺赛) 配置而成。BPDE (加拿大 Toronto Research Chemicals) 呈黄色固体状, 纯度为 95%, 溶于有机溶剂二甲基亚砜 (dimethylsulfoxide, DMSO; 中国北京索莱宝) 作为母液, 待细胞生长达 80% 时分为实验组 (终浓度为 0.5、1.0、2.0、4.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BPDE) 和溶剂对照组 (等体积 DMSO, 终浓度 $\leq 0.1\%$) 及空白对照组 (正常培养基), 处理 24 h 后, 用 CCK8 法检测细胞存活率。根据各组细胞存活率, 选取 2.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 染毒组和溶剂对照组进行后续的测序实验。所有实验重复 3 次。

1.2 CCK8 细胞毒性实验

按每孔 2×10^4 个细胞密度将 16HBE 细胞接种于 96 孔板中, 待细胞进入对数生长期, 按“1.1”分组为空白对照组、溶剂对照组和实验组 (4 个染毒浓度), 每组设置 3 个复孔, 更换含有 BPDE 或 DMSO 的培养基继续培养 24 h。随后每孔加入 10 μL CCK-8 溶液, 孵育 1 h 后用 DNM-9602G 酶标分析仪 (中国北京普朗新) 在 450 nm 波长处检测各孔光密度值 (D 值), 计算各组细胞活力, 实验重复 3 次。记录结果, 计算实验组与对照组的细胞存活率, 细胞存活率 = $[(D_{\text{实验}} - D_{\text{空白}}) / (D_{\text{对照}} - D_{\text{空白}})] \times 100\%$ 。

1.3 RNA 提取和 mRNA 库的构建

选取 2.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 染毒组和溶剂对照组, 细胞染毒处理 24 h 后弃去培养基, 加入磷酸缓冲盐溶液

(phosphate buffer saline, PBS), 用细胞刮棒在冰上收集细胞, 并进行细胞计数, 使细胞量不低于每组 1×10^6 个。取适量细胞样品转入 TRIzol 裂解液 (美国 Invitrogen) 中。平放静置 5 min, 使细胞充分裂解。高速低温离心机 (德国 Eppendorf) 4°C , $12\,000 \times g$ 离心 5 min, 将上清转移到含有 0.3 mL 氯仿: 异戊醇 (体积比 24:1, 西陇化工, 中国) 的 EP 管中。用力混匀 15 s, 4°C , $12\,000 \times g$ 离心 10 min。将含有 RNA 的上水相转移至等体积异丙醇的新管中, 4°C , $17\,500 \times g$ 离心 25 min。弃去上清后, 用 1 mL 75% 乙醇洗涤 RNA 沉淀 2 次, 4°C , $17\,500 \times g$ 离心 3 min, 弃上清, 短暂离心后去除残留液体, 在生物安全柜 (新加坡 ESCO) 中烘干 10 min。最后加入 DEPC 水 (美国 Ambion) $30\,\mu\text{L}$ 溶解沉淀。使用 Nano Drop (美国 Thermo Scientific) 进行总 RNA 浓度和纯度的测定, 随后由武汉华大医学检验有限公司通过 BGISEQ500 平台 (中国深圳 BGI) 完成测序。该研究的相关结果数据已收录在国家基因库生命大数据平台 (China National GeneBank DataBase, CNGBdb) 的国家基因库序列归档系统 (a data repository for archiving omics data, CNSA), 项目编号为 CNP0001418。

1.4 数据过滤和比对

使用 SOAPnuke (v1.5.2) [4] 对测序数据进行过滤, 使用 HISAT 软件 [5] 将经过滤得到的读长序列 (clean reads) 比对到参考序列, 参考物种是来源于美国国立生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 的人类 (参考基因组版本: GCF_000001405.38_GRCh38.p12)。应用 Bowtie2 (v2.2.5) 软件 [6] 将 clean reads 与参考编码基因集比对。

1.5 差异表达基因的筛选

用 RSEM (v1.2.12) [7] 计算基因表达量。按基因在不同样本中的表达情况, 用 pheatmap (v1.0.8) 绘制热图。采用基于负二项分布原理的 R 包 DESeq2 (v1.4.5) [8] (<http://bioconductor.org/packages/stats/bioc/DESeq2/>) 进行两组样本间的表达差异分析, 以 $|\log_2\text{FC}| > 1$, $P < 0.05$ 为标准筛选差异表达基因。

1.6 生物信息学分析

使用基于超几何检验的 Phyper 函数 (https://en.wikipedia.org/wiki/Hypergeometric_distribution) 对基因本体论 (Gene Ontology, GO) (<http://www.geneontology.org/>) 和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)

(<https://www.kegg.jp/>) 注释的不同表达基因进行富集分析。Bonferroni 法通过 P 值对达到统计学差异的基因的基因功能和信号通路进行校正, P 值为 0.05。基因共表达网络分析使用华大基因提供的内部定制数据挖掘系统 Dr.Tom 方法。

1.7 统计学分析

用 SPSS 21.0 软件对数据进行统计学分析, 计量资料结果以均数 $\pm$ 标准差表示, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD- t 法。在 SAS 9.4 软件中采用 Cochran-Armitage 方法进行趋势检验。检验水准为 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 CCK-8 法检测细胞活力

随着 BPDE 染毒剂量增加, 细胞存活率呈下降趋势 ($Z = -7.79$, $P_{\text{趋势}} < 0.01$)。0.5、1.0、2.0、 $4.0\,\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 染毒组细胞存活率分别为 $94.56\% \pm 1.74\%$ 、 $84.80\% \pm 3.19\%$ 、 $80.08\% \pm 1.72\%$ 、 $62.72\% \pm 1.90\%$, 低于溶剂对照组 ($98.61\% \pm 0.61\%$) 和空白对照组 (100%), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.2 测序数据质量评估

通过 BGISEQ 平台进行测序, 样品比对基因组和基因集的平均比对率分别为 92.72%、68.95%。相关性分析表示, 各样本间基因表达水平相关性良好, 不存在偏差过大的样本。主成分分析显示, 各个样本能较好地与同类聚在一起。在 mRNA 测序中 Reads 的每个位置上 A 碱基和 T 碱基比例相等, G 碱基和 C 碱基比例相等, 则表明测序没有偏好性。低质量 (Quality < 20) 的碱基比例较低, 说明测序质量较好。

2.3 差异基因统计

用 DESeq2 方法筛选差异表达基因, 以 $|\log_2\text{FC}| > 1$, $P < 0.05$ 为筛选标准, 与对照组相比, 染毒组共筛选出 191 个两倍及以上差异表达的基因; 其中, 上调基因 87 个, 下调基因 104 个。差异表达在两倍及以上的 mRNA 共 1548 个; 其中, 上调 670 个, 下调 878 个。结果见图 1。上调和下调基因名称如表 1 所示。

2.4 差异表达基因的生物信息学分析

从细胞组分 (cellular component, CC)、分子功能 (molecular function, MF) 和生物过程 (biological process, BP) 三个方面对差异基因的功能进行标准化的分类, 如表 2 所示。上述基因主要涉及细胞器、细胞膜和细胞外区域等组分的构成。同时具有分子结

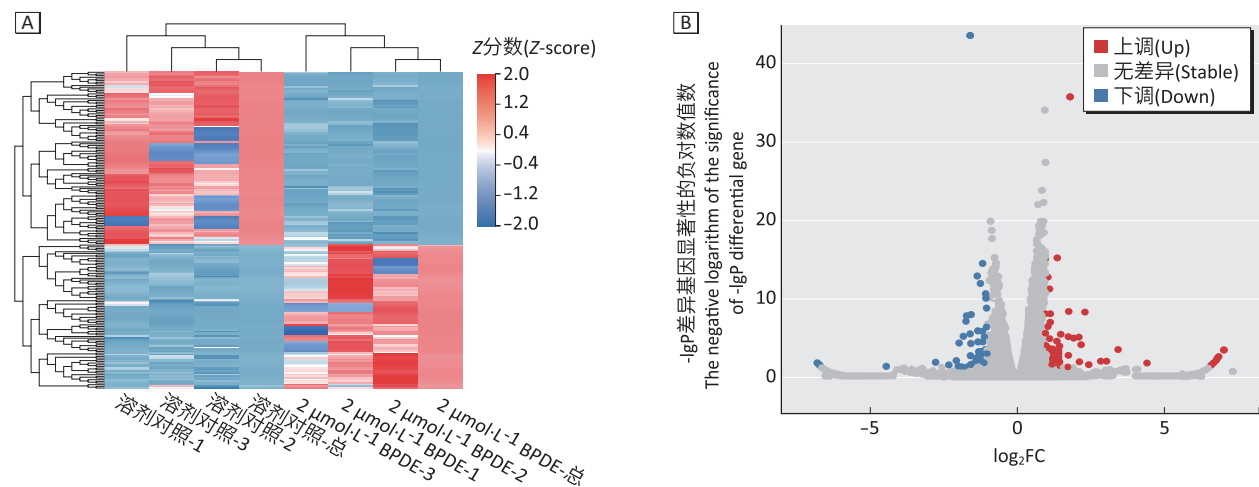


图 1 差异表达基因的聚类热图 (A) 及火山图 (B)
Figure 2 Clustered heat map of differentially expressed genes (A) and volcano plot (B)

表 1 BPDE 急性染毒肺细胞中差异表达的基因

Table 1 Differentially expressed genes in lung cells infected with BPDE

表达趋势 Express trend	基因 Gene	差异倍数 Fold change	P
上调基因 Up-regulated genes	HBA2、UBE2L5、SHOX、CD33、LOC105370399、HIST1H1B、HBA1、C15orf38-AP3S2、SPINK6、MTRNR2L3、PLCG2、PHLDA2、RASD1、MAB21L3、NPPC、HIST1H1E、BCL2L2-PABPN1、SLC35F1、CSF2、HIST1H、AM、SYCE1L、MTRNR2L9、CABP4、MTRNR2L6、HSD17B13、MTRNR2L10、KRT34、ANKRD20A2、TMEM110-MUSTN1、TNFAIP8L2-SCNM1、RGS4、CXCL1、MTRNR2L2、KBTBD12、FAM25A、LAIR1、C12orf75、MTRNR2L8、MTRNR2L1、HSPE1-MOB4、JAK3、CXCL3、CXCL8、RGS2、TMEM238、ATP5F1E、RPSAP58、ATP5ME、CORO7-PAM16、RASL11A、CXCL6、TAGLN	≥ 2	<0.05
下调基因 Down-regulated genes	GSTT2、LOC107987364、ANKRD20A3、SYT13、CCDC33、LOC105379547、GVQW2、NPIPA3、RFTN2、LOC107986113、CHAC1、TLR1、LOC101930307、LOC107986800、TBC1D3I、PRSS35、GABRP、RGPD1、TRIM31、LOC105374103、HSFX1、ACOT12、SLC23A3、CH507-42P11.6、COLCA2、NPIPB6、LOC107986351、TBC1D3G、LOC102724994、LOC102723360、107985971、LOC101060341、LOXL4、TNFSF10、PTGIS、NPIPB11、AMY2B、NPIPA2、TFAP2E、CIDEB、LY75、HRK、SDR16C5、KLHDC7B、LOC105374013、YJEFN3、SPDYA、PGBD3、ZNF107、ADM2、PRICKLE1、RGL4、FAM71F2、POU2F3、NEURL3、NPIPB9、LOC101060022、ZNF334、DOC2A	≥ 2	<0.05

合、催化活性等分子功能，如蛋白结合、RNA 结合、核酸结合和 NADH 脱氢酶等。此外主要参与翻译过程、细胞周期和线粒体功能等生物学过程，如氧化还原过程、翻译、翻译起始和 RNA 聚合酶 II 的转录调控等。

对差异表达基因进行 KEGG 富集分析，结果见表 3。

主要相关通路及参与的基因如表 2 所示，分别有集落刺激因子 CSF2-17 信号通路、军团杆菌病、丁酸甲酯代谢、沙门氏菌感染、细胞因子-细胞因子受体相互作用、趋化因子信号通路、疟疾、卡波西肉瘤相关疱疹病毒感染等，与炎症发生相关。

表 2 差异表达基因 GO 功能分析

Table 2 GO function analysis of differentially expressed genes

一级分类 GO classify 1	差异表达基因 (Differentially expressed genes)				差异表达 mRNA (Differentially expressed mRNA)			
	二级分类 GO classify 2	基因数目 Number of genes	P	-lg P	二级分类 GO classify 2	基因数目 Number of genes	P	-lg P
细胞组分 Cellular component	细胞质 (Cytoplasm)	1749	0.000	55.77	膜 (Membrane)	640	0.000	16.71
	核浆 (Nucleoplasm)	1050	0.000	52.84	细胞核 (Nucleus)	705	0.000	14.63
	线粒体 (Mitochondrion)	552	0.000	50.77	细胞质 (Cytoplasm)	694	0.000	14.63
	胞质 (Cytosol)	1542	0.000	47.13	核质 (Nucleoplasm)	454	0.000	14.14
	核 (Nucleus)	1833	0.000	46.12	胞质溶胶 (Cytosol)	585	0.000	5.42
	线粒体内膜 (Mitochondrial inner membrane)	185	0.000	22.34	细胞骨架 (Cytoskeleton)	165	0.000	5.22
	核糖体 (Ribosome)	105	0.000	19.92	染色体 (Chromosome)	54	0.000	3.56
	呼吸链 (Respiratory chain)	43	0.000	18.99	CERF 复合体 (CERF complex)	5	0.000	3.56
	黏着斑 (Focal adhesion)	195	0.000	18.84	核斑点 (Nuclear speck)	70	0.001	3.00
	细胞外分泌体 (Extracellular exosome)	720	0.000	15.71	NURF 复合体 (NURF complex)	7	0.002	2.81

续表 2

一级分类 GO classify 1	差异表达基因 (Differentially expressed genes)				差异表达 mRNA (Differentially expressed mRNA)			
	二级分类 GO classify 2	基因数目 Number of genes	P	-lg P	二级分类 GO classify 2	基因数目 Number of genes	P	-lg P
分子功能 Molecular function	蛋白结合 (Protein binding)	2402	0.000	244.96	蛋白结合 (Protein binding)	914	0.000	106.24
	RNA 结合 (RNA binding)	525	0.000	22.29	核酸结合 (Nucleic acid binding)	183	0.000	18.49
	核酸结合 (Nucleic acid binding)	348	0.000	11.89	转移酶活动 (Transferase activity)	204	0.000	14.47
	NADH 脱氢酶 (辅酶 Q) 活性 NADH dehydrogenase (ubiquinone) activity	34	0.000	9.28	核苷酸结合 (Nucleotide binding)	197	0.000	13.39
	转录因子结合 (Transcription factor binding)	132	0.000	7.70	水解酶活性 (Hydrolase activity)	149	0.000	7.52
	氧化还原酶活性 (Oxidoreductase activity)	158	0.000	7.70	DNA 结合 (DNA binding)	271	0.000	7.34
	钙黏着蛋白结合 (Cadherin binding)	130	0.000	7.70	激酶活性 (Kinase activity)	101	0.000	6.91
	水解酶活性 (Hydrolase activity)	345	0.000	6.43	核小体依赖性 ATP 酶活性 Nucleosome-dependent ATPase activity	4	0.000	4.43
	转移酶的活性 (Transferase activity)	369	0.000	5.99	连接酶活性 (Ligase activity)	24	0.002	2.76
	核糖体的结构成分 (Structural constituent of ribosome)	106	0.000	4.87	蛋白激酶活性 (Protein kinase activity)	77	0.002	2.63
	氧化还原过程 (Oxidation-reduction process)	230	0.000	20.09	RNA 聚合酶 II 对转录的调控 Regulation of transcription by RNA polymerase II	153	0.000	11.62
	翻译 (Translation)	162	0.000	12.68	染色质组织 (Chromatin organization)	73	0.000	8.65
	翻译起始 (Translational initiation)	106	0.000	12.68	磷酸化作用 (Phosphorylation)	103	0.000	7.94
生物学功能 Biological process	RNA 聚合酶 II 的转录调控 Regulation of transcription by RNA polymerase II	323	0.000	12.09	细胞周期 (Cell cycle)	89	0.000	4.27
	靶向细胞膜的 SRP 依赖性的共翻译蛋白 SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane	83	0.000	11.82	伪足组装的正向调节 Positive regulation of pseudopodium assembly	10	0.000	4.27
	电子传递链 (Electron transport chain)	47	0.000	10.79	凋亡执行器的负调控 Negative regulation of execution phase of apoptosis	6	0.003	2.48
	细胞周期 (cell cycle)	196	0.000	10.36	GTP 酶活性的正向调节 Positive regulation of GTPase activity	56	0.006	2.23
	线粒体电子传递, 从 NADH 到辅酶 Q Mitochondrial electron transport, NADH to ubiquinone	33	0.000	10.28	锌离子跨膜转运 Zinc ion transmembrane transport	9	0.009	2.06
	线粒体呼吸链复合物 I 组装 Mitochondrial respiratory chain complex I assembly	41	0.000	9.90	组蛋白赖氨酸甲基化 Histone lysine methylation	11	0.011	1.94
	核转录的 mRNA 分解代谢过程, 无义介导的衰变 Nuclear-transcribed mRNA catabolic process, nonsense-mediated decay	90	0.000	9.05	细胞内信息传递 Intracellular signal transduction	78	0.011	1.94

表 3 差异表达基因和 mRNA 的 KEGG 通路分析
Figure 3 KEGG Pathway analysis of differentially expressed genes and mRNA

KEGG 通路 KEGG pathway	基因数目 Gene number	P	-lg P
差异表达基因 (Differentially expressed genes)			
IL-17 信号通路 (IL-17 signaling pathway)	5	0.008	2.09
军团杆菌病 (Legionellosis)	4	0.017	1.77
丁酸甲酯新陈代谢 (Butanoate metabolism)	3	0.019	1.73
沙门菌感染 (Salmonella infection)	4	0.020	1.70
细胞因子受体相互作用 Cytokine-cytokine receptor interaction	6	0.025	1.60
趋化因子信号通路 (Chemokine signaling pathway)	5	0.025	1.60
疟疾 (Malaria)	3	0.025	1.60
卡波西肉瘤相关疱疹病毒感染 Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection	5	0.049	1.31
非洲锥虫病 (African trypanosomiasis)	2	0.169	0.77
甲型流感 (Influenza A)	4	0.169	0.77
差异表达 mRNA (Differentially expressed mRNA)			
铁死亡 (Ferroptosis)	12	0.031	1.50

续表 3

KEGG 通路 KEGG pathway	基因数目 Gene number	P	-lg P
调控干细胞多能性的信号通路 Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells	20	0.084	1.08
赖氨酸退化 (Lysine degradation)	16	0.144	0.84
群体感应 (Quorum sensing)	4	0.376	0.42
核糖体 (Ribosome)	10	0.376	0.42
磷脂酶 D 信号通路 (Phospholipase D signaling pathway)	22	0.376	0.42
河马信号通路 —— 苍蝇 (Hippo signaling pathway-fly)	13	0.376	0.42
阿米巴病 (Amoebiasis)	15	0.376	0.42
人类乳头瘤病毒感染 (Human papillomavirus infection)	43	0.376	0.42
长寿调节通路 (Longevity regulating pathway)	16	0.417	0.38

2.5 基因共表达网络分析

对发生两倍及以上表达改变的基因进行共表达网络分析。发现关联强度最大的一组基因, 如图 2 所示。其中趋化因子 CXCL6、CXCL1、CXCL3、CXCL8 和集落刺

激因子 *CSF2* 显著富集于 IL-17 信号通路, 并与 *JAK3* 共同参与趋化因子信号通路, *CSF2* 还与沙门氏菌感染有关并参与肿瘤坏死因子信号通路, 详情参见表 4。

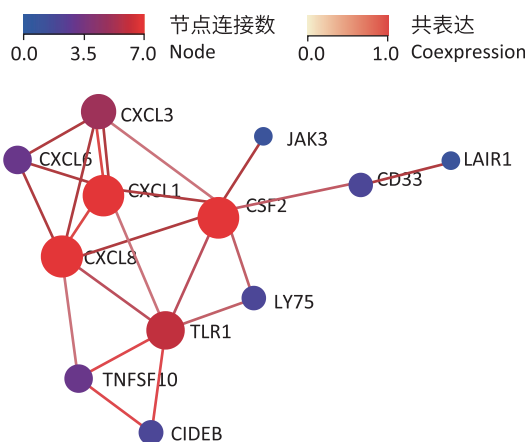


图2 基因共表达网络分析
Figure 2 Gene co-expression network

表4 差异基因富集最具统计学意义的通路
Table 4 The most significantly enriched pathways of differentially expressed genes

KEGG 通路 KEGG pathway	基因数目 Gene number	基因 Gene	P	-lg P
IL-17 信号通路 IL-17 signaling pathway	5	CXCL6, CXCL8, CSF2, CXCL3, CXCL1	0.008	2.09
军团杆菌病 Legionellosis	4	CXCL8, HSPE1-MOB4, CXCL3, CXCL1	0.017	1.77
丁酸甲酯新陈代谢 Butanoate metabolism	3	NPIP66, NPIPB9, NPIPB11	0.018	1.73
沙门氏菌感染 Salmonella infection	4	CXCL8, CSF2, CXCL3, CXCL1	0.020	1.70
细胞因子受体相互作用 Cytokine-cytokine receptor interaction	6	CXCL6, CXCL8, CSF2, CXCL3, TNFSF10, CXCL1	0.025	1.60
趋化因子信号通路 Chemokine signaling pathway	5	CXCL6, CXCL8, JAK3, CXCL3, CXCL1	0.025	1.60

2.5 差异表达 mRNA 的生物信息学分析

从转录水平筛选差异表达的 mRNA, 并通过 GO 功能注释和 KEGG 通路分析探究其参与的生物学过程和信号通路。GO 结果显示, 差异表达 mRNA 主要参与膜、细胞核、细胞质、核质等的构成。并且与蛋白结合、核酸结合、转移酶活动、核苷酸结合、水解酶活性、DNA 结合等功能相关。同时还与 RNA 聚合酶 II 对转录的调控、染色质组织、磷酸化作用、细胞周期、伪足组装的正向调节、凋亡执行器的负调控等生物学过程有关, 见表 2。KEGG 通路分析共得到 319 条相关通路, 以 $P < 0.05$ 为标准筛选最具统计学意义的是铁死亡通路, 包含 12 个 mRNA, 对应 8 个基因, 分别是 *ACSL4*、*ACSL5*、*FTL*、*GCLM*、*NCOA4*、*SLC11A2*、*SLC39A14*、

SLC7A11。其余主要相关通路有调控干细胞多能性的信号通路、赖氨酸退化、群体感应、磷脂酶 D 信号通路、人类乳头瘤病毒感染、脂肪酸生物合成等 (表 3)。

3 讨论

BaP 作为多环芳烃类化合物的代表, 是广泛存在的环境污染物。BaP 进入机体后形成活性代谢产物 BPDE, BPDE 与 DNA、蛋白质等大分子加合, 可引起 DNA 损伤^[9]及表观遗传改变, 蛋白质转录表达异常, 信号转导通路紊乱, 进而导致细胞功能障碍, 细胞生存率下降。本研究通过探讨 BPDE 可能引起的细胞转录组谱改变, 筛选出在 BPDE 染毒早期出现表达谱差异的分子标志, 为揭示 BPDE 致肺细胞损伤的分子机制, 提出早期防控措施提供指导。

在 BPDE 的细胞毒性研究中, 国内外学者一般选择的染毒剂量在 $0.2 \sim 10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间^[2, 10]。我们首先通过检测 BPDE 干预 24 h 对 16HBE 细胞生存状态的影响, 初步判断 BPDE 染毒是否引起细胞表型改变。结果显示, 16HBE 细胞的生存率随着 BPDE 染毒剂量的增加而降低。我们在光镜下观察到, $2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BPDE 染毒组的细胞形态基本正常, 仅可见细胞排列紊乱等轻微变化, 细胞存活率 ($80.08\% \pm 1.72\%$) 较对照组明显降低 ($P < 0.01$)。为进一步探讨 BPDE 通过干预基因表达改变导致细胞存活率下降的可能机制, 我们选择了能导致存活率下降但仍保持 80% 以上, 细胞形态没有出现严重损伤的 $2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BPDE 剂量染毒并进行转录组测序研究。

转录组测序筛选到差异表达倍数在两倍及以上的基因 191 个, 其中上调基因 87 个, 下调基因 104 个。通过 KEGG 通路分析, 筛选出的主要相关通路包括 IL-17 信号通路^[11], 丁酸甲酯代谢、趋化因子信号通路等。近年研究发现, IL-17 信号通路在宿主防御、组织修复和炎症疾病中发挥重要作用, 与自身免疫性疾病、代谢紊乱和癌症等密切相关。我们的生物信息分析结果还提示可能涉及军团杆菌病、沙门氏菌感染、疟疾、卡波西肉瘤相关疱疹病毒感染, 而在这些非特异性通路中包含的 *CXCL8*、*CXCL3*、*CXCL1*、*HSPE1-MOB4* 等基因正是 IL-17 通路中的相关基因, 说明 BPDE 主要是引起了细胞应激反应和炎性改变。趋化因子主要在感染或损伤过程中发挥作用, 表达增加时可以促使白细胞向损伤部位迁移^[12]。集落刺激因子 *CSF2* 的增加能够刺激粒细胞、T 细胞增殖, 增强粒细胞和巨噬细胞功能, 起到

抗感染作用^[13]。趋化因子通路里的 *JAK3* 基因主要在免疫细胞中表达, 在本研究中也发生了明显的上调。*JAK3* 所编码的蛋白质是一种受体酪氨酸激酶, 是 *JAK/STAT* 信号通路的重要成员, 许多细胞因子如干扰素 IFN、白介素 IL-2、生长因子 EGF 等都通过该信号转导途径活化, 诱导细胞的增殖、分化和凋亡^[14]。IL-17 信号通路中的趋化因子和 *CSF2* 表达升高, *JAK3* 上调活化可能与 BPDE 致肺支气管上皮细胞炎性损伤机制有关。

考虑到不同基因对应的 mRNA 数目不一定相同, 因此对差异 mRNA 做了进一步分析。GO 富集显示, 差异表达 mRNA 主要富集在生物学过程中的凋亡执行期负调控、细胞外信号转导负调控等。KEGG 富集分析发现具有统计学意义的通路共有 319 条。其中最引人注目的是铁死亡信号通路, 在具有统计学意义的通路中排列第一位, 它包含 12 个 mRNA, 对应 8 个基因, 分别是 *ACSL4*、*ACSL5*、*FTL*、*GCLM*、*NCOA4*、*SLC11A2*、*SLC39A14*、*SLC7A11*。铁死亡是一种跟铁离子有关并伴随脂质过氧化发生的程序性死亡方式, 谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 耗竭、铁离子蓄积、活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 水平升高是铁死亡的特征性标志^[15]。胱氨酸/谷氨酸逆向转运体 (xc- 系统) 由轻链 xCT (*SLC7A11*) 和重链 4F2 (*SLC3A2*) 组成, 对 GSH 的合成至关重要。BPDE 对 *SLC7A11* 表达的影响可能造成 GSH 合成不足, 从而导致 *GPX4* 活性下降, 导致 ROS 水平升高。酰基辅酶 A 合成酶长链家族成员 4 (acyl-CoA synthetase long-chain family member 4, *ACSL4*) 参与磷脂酰乙醇胺的生物合成和重塑, 影响多不饱和脂肪酸的跨膜, BPDE 诱发 *ACSL4* 表达上调, 可增加脂质过氧化的底物在细胞内聚集而促进铁死亡。细胞内铁离子的积累与输入过多、排出减少, 以及储铁蛋白的功能障碍有关。铁以三价铁 (Fe^{3+}) 进入血液循环, 通过转铁蛋白和转铁蛋白受体进入细胞内的内涵体, 随后经金属还原酶还原成二价铁 (Fe^{2+}), 二价铁通过二价金属离子转运体 *DMT1* (*SLC11A2*) 和锌指蛋白 *ZIP8/14* (*SLC39A14*) 进入细胞质; 铁蛋白轻链 (*FTL*) 和铁蛋白重链储铁能力下降时, 铁离子释放。内涵体和铁池释放的铁通过 Fenton 反应导致铁死亡发生。因此, BPDE 对 *SLC11A2*、*SLC39A14* 和 *FTL* 表达的影响可能通过影响铁离子代谢参与细胞铁死亡机制。核受体共激活因子 4 (nuclear receptor coactivator 4, *NCOA4*) 作为铁蛋白的自噬受体参与铁死亡的发生^[16], 铁离子的积累和耗竭可以调节 RNA 结合蛋白 PCBP1 的

稳定性, 并进一步影响 T 细胞 (包括 *CSF2* 和 *IL-2*) 中促炎性细胞因子的表达^[17]。BPDE 暴露会导致 *NCOA4* 的表达改变, 进而通过自噬引发细胞铁死亡, 因此铁死亡也被认为是一种自噬依赖性细胞死亡方式^[18]。

综上所述, BPDE 短期暴露主要引起以 IL-17 信号通路为主的炎症反应和以铁死亡为特征的肺细胞损伤, 可能与 BPDE 暴露引起的肺损伤有关。本次采用细胞模型探讨了 BaP 代谢产物 BPDE 短期暴露对基因表达的影响, 相关机制还需要在动物实验和暴露人群中进一步验证。

参考文献

- [1] 智永芬, 张红明, 李卫星, 等. 焦炉逸散物暴露对焦炉工人肺功能影响的队列研究 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2015, 33 (7): 481-485.
ZHI YF, ZHANG HM, LI WX, et al. Cohort study of effects on lung function of coke oven workers exposed to coke oven emissions [J]. Chin J Ind Hyg Occu Dis, 2015, 33 (7): 481-485.
- [2] WANG W, WANG R, ZHANG Q, et al. Benzo (a) pyren-7, 8-dihydrodiol-9, 10-epoxide induces human trophoblast Swan 71 cell dysfunctions due to cell apoptosis through disorder of mitochondrial fission/fusion [J]. Environ Pollut, 2018, 233: 820-832.
- [3] HAMOUCHENE H, ARLT VM, GIDDINGS I, et al. Influence of cell cycle on responses of MCF-7 cells to benzo [a] pyrene [J]. BMC Genomics, 2011, 12 (1): 333.
- [4] LI R, LI Y, KRISTIANSEN K, et al. SOAP: short oligonucleotide alignment program [J]. Bioinformatics, 2008, 24 (5): 713-714.
- [5] KIM D, LANGMEAD B, SALZBERG S L. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements [J]. Nat Methods, 2015, 12 (4): 357-360.
- [6] LANGMEAD B, SALZBERG S L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2 [J]. Nat Methods, 2012, 9 (4): 357-359.
- [7] LI B, DEWEY C N. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome [J]. BMC Bioinformatics, 2011, 12: 323.
- [8] LOVE MI, HUBER W, ANDERS S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2 [J]. Genome Biol, 2014, 15 (12): 550.

(下转第 63 页)

- [14] ALMEIDA C M, HORTA M P. Self-esteem and anger in borderline patients with self-injury behavior [J]. *J Nerv Ment Dis*, 2018, 206 (4) : 251-257.
- [15] LEONG C H, WU A M S, POON M Y. Measurement of perceived functions of non-suicidal self-injury for Chinese adolescents [J]. *Arch Suicide Res*, 2014, 18 (2) : 193-212.
- [16] SHEEHY K, NOUREEN A, KHALIQ A, et al. An examination of the relationship between shame, guilt and self-harm : a systematic review and meta-analysis [J]. *Clin Psychol Rev*, 2019, 73 : 101779.
- [17] KEEL P K, JEAN FORNEY K, BUCHMAN-SCHMITT J M, et al. Examining the link between weight suppression and non-suicidal self-injurious behaviors [J]. *Eat Behav*, 2018, 30 : 66-71.
- [18] PISINGER V S, HAWTON K, TOLSTRUP J S. Self-injury and suicide behavior among young people with perceived parental alcohol problems in Denmark : a school-based survey [J]. *Eur Child Adolesc Psychiatry*, 2018, 27 (2) : 201-208.
- [19] AURORA P, KLANECKY A K. Drinking motives mediate emotion regulation difficulties and problem drinking in college students [J]. *Am J Drug Alcohol Abuse*, 2016, 42 (3) : 341-350.
- [20] DOAN S N, SON H, KIM L N. Maternal and paternal emotional contributions to children's distress tolerance : relations to child depressive symptoms [J]. *Psychiatry Res*, 2018, 267 : 215-220.
- [21] GOROSTIAGA A, ALIRI J, BALLUERKA N, et al. Parenting styles and internalizing symptoms in adolescence : a systematic literature review [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2019, 16 (17) : 3192.
- [22] TSCHAN T, SCHMID M, IN-ALBON T. Parenting behavior in families of female adolescents with nonsuicidal self-injury in comparison to a clinical and a nonclinical control group [J]. *Child Adolesc Psychiatry Ment Health*, 2015, 9 : 17.
- [23] 季静敏, 黄迎, 王芳. 农民工家庭教养方式对其幼儿自信心的影响 [J]. *环境与职业医学*, 2016, 33 (6) : 585-587, 591.
- J I J M, HUANG Y, WANG F. Parenting styles of migrant worker households and effects on children's self-confidence [J]. *J Environ Occup Med*, 2016, 33 (6) : 585-587, 591.

(英文编辑：汪源；责任编辑：陈姣)

(上接第 57 页)

- [9] WANG H, CHEN W, ZHENG H, et al. Association between plasma BPDE-Alb adduct concentrations and DNA damage of peripheral blood lymphocytes among coke oven workers [J]. *Occup Environ Med*, 2007, 64 (11) : 753-758.
- [10] NWAGBARA O, DARLING-REED S F, TUCKER A, et al. Induction of cell death, DNA strand breaks, and cell cycle arrest in DU145 human prostate carcinoma cell line by benzo [a] pyrene and benzo [a] pyrene-7, 8-diol-9, 10-epoxide [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2007, 4 (1) : 10-14.
- [11] DE MORALES J M G R, PUIG L, DAUDÉN E, et al. Critical role of interleukin (IL) -17 in inflammatory and immune disorders : An updated review of the evidence focusing in controversies [J]. *Autoimmun Rev*, 2020, 19 (1) : 102429.
- [12] RAJARATHNAM K, SCHNOOR M, RICHARDSON R M, et al. How do chemokines navigate neutrophils to the target site : Dissecting the structural mechanisms and signaling pathways [J]. *Cell Signal*, 2019, 54 : 69-80.
- [13] NAKAGOME K, NAGATA M. Involvement and possible role of eosinophils in asthma exacerbation [J]. *Front Immunol*, 2018, 9 : 2220.
- [14] XIN P, XU X, DENG C, et al. The role of JAK/STAT signaling pathway and its inhibitors in diseases [J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 80 : 106210.
- [15] XIE Y, HOU W, SONG X, et al. Ferroptosis : process and function [J]. *Cell Death Differ*, 2016, 23 (3) : 369-379.
- [16] GAO M, MONIAN P, PAN Q, et al. Ferroptosis is an autophagic cell death process [J]. *Cell Res*, 2016, 26 (9) : 1021-1032.
- [17] WANG Z, YIN W, ZHU L, et al. Iron drives T helper cell pathogenicity by promoting RNA-binding protein PCBP1-mediated proinflammatory cytokine production [J]. *Immunity*, 2018, 49 (1) : 80-92.e7.
- [18] ZHOU B, LIU J, KANG R, et al. Ferroptosis is a type of autophagy-dependent cell death [J]. *Semin Cancer Biol*, 2020, 66 : 89-100.

(英文编辑：汪源；责任编辑：王晓宇)