

经口六价铬暴露毒作用模式中关键毒性通路的生物信息学分析

蒋欣航¹, 王紫薇¹, 彭慧¹, 徐驰¹, 于典科², 靳远², 陈丽萍¹, 陈雯¹

1. 中山大学公共卫生学院卫生毒理学系, 广东 广州 510080

2. 青岛大学公共卫生学院卫生毒理学系, 山东 青岛 266021

摘要:

[背景] 经口六价铬 [Cr(VI)] 暴露可导致小鼠消化道肿瘤发生, 而目前机制尚未明确。通过网络数据挖掘和计算毒理学的分析预测化学物的暴露风险已成为毒理学研究的重要研究手段, 可助于阐述毒作用模式 (MOA) 和识别关键毒性通路。

[目的] 识别并评价经口 Cr(VI) 暴露 MOA 中的关键事件。

[方法] 通过比较毒理基因组数据库 (CTD) 和基因表达综合数据库 (GEO), 分别构建基因集, 并导入 Ingenuity® Pathway Analysis (IPA) 软件进行通路富集分析及生物学功能分析, 识别经口 Cr(VI) 暴露靶器官毒效应的潜在关键毒性通路。基于改良 Bradford Hill 原则, 对 Cr(VI) 经口暴露 MOA 的潜在关键毒性通路进行证据权重 (WOE) 评价。

[结果] CTD 中筛选出与经口 Cr(VI) 暴露相关文献共 54 篇, 其中肝脏及肠道相关文献分别有 18 篇和 9 篇, 对应 125 个和 272 个相关基因。通路富集及生物学功能分析显示, 肝脏及肠道扰动通路主要与细胞应激和损伤、细胞周期调控和凋亡相关。核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2) 通路及芳香烃受体 (AHR) 通路或为关键毒性通路, 参与 Cr(VI) 细胞毒性介导的 MOA。Nrf2 通路激活与小鼠隐窝细胞增殖的染毒剂量 ($\geq 170 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 重铬酸钠) 及出现时间点 (90 d) 相似, 提示 Nrf2 通路激活或为细胞毒性介导的 MOA 关键事件。WOE 评价结果显示这一假设的证据效力为中等, 其中生物学合理性及剂量-反应关系的证据效力较高。

[结论] Nrf2 通路激活或为 Cr(VI) 经口暴露引起小肠肿瘤发生细胞毒性介导的 MOA 中启动或维持隐窝细胞增殖的关键事件。

关键词: 六价铬; 毒作用模式; 小肠; 生物信息学分析; 证据权重评价

Bioinformatics analysis of key toxicity pathways in the mode of action of oral exposure to hexavalent chromium JIANG Xinhang¹, WANG Ziwei¹, PENG Hui¹, XU Chi¹, YU Dianke², JIN Yuan², CHEN Liping¹, CHEN Wen¹ (1. Department of Toxicology, School of Public Health, Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong 510080, China; 2. Department of Toxicology, School of Public Health, Qingdao University, Qingdao, Shandong 266021, China)

Abstract:

[Background] Oral exposure to hexavalent chromium [Cr(VI)] can lead to gastrointestinal tumorigenesis in mice, and the mechanism is not yet clear. To predict health risk due to chemical exposure, data mining and computational toxicology analysis has become an important tool in toxicology research, which can help to elucidate mode of action (MOA) and identify key toxicity pathways.

[Objective] This study aims to identify and evaluate key events in the MOA of oral Cr(VI) exposure.

[Methods] Gene sets established from Comparative Toxicogenomics Database (CTD) and Gene Expression Omnibus (GEO) respectively were imported into Ingenuity® Pathway Analysis (IPA) software for pathway enrichment analysis and biological function analysis to identify potential key toxicity pathways of target organs/tissues toxicity of oral exposure to Cr(VI). Next, the weight of evidence (WOE) of the identified key toxicity pathways in the MOA of oral exposure to Cr(VI) was evaluated based on the modified Bradford Hill principle.

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2021.21154

基金项目

科技部重点研发计划项目 (2017YFC1600200); 国家自然科学基金 (82073580)

作者简介

蒋欣航 (1997—), 男, 硕士生;

E-mail: jiangxh26@mail2.sysu.edu.cn

通信作者

陈雯, E-mail: chenwen@mail.sysu.edu.cn

伦理审批 不需要

利益冲突 无申报

收稿日期 2021-04-11

录用日期 2021-11-03

文章编号 2095-9982(2021)12-1333-07

中图分类号 R114

文献标志码 A

补充材料

<http://www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.21154>

►引用

蒋欣航, 王紫薇, 彭慧, 等. 经口六价铬暴露毒作用模式中关键毒性通路的生物信息学分析 [J]. 环境与职业医学, 2021, 38(12): 1333-1339.

►本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2021.21154

Funding

This study was funded.

Correspondence to

CHEN Wen, E-mail: chenwen@mail.sysu.edu.cn

Ethics approval Not required

Competing interests None declared

Received 2021-04-11

Accepted 2021-11-03

Supplemental material

<http://www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.21154>

► To cite

JIANG Xinhang, WANG Ziwei, PENG Hui, et al. Bioinformatics analysis of key toxicity pathways in the mode of action of oral exposure to hexavalent chromium [J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2021, 38(12): 1333-1339.

► Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2021.21154

[Results] A total of 54 pieces of literature related to oral Cr(VI) exposure were screened in CTD, among which 18 and 9 were related to liver and intestine with 125 and 272 corresponding genes, respectively. The pathway enrichment and biological function analysis results showed that liver and intestinal perturbation pathways were mainly related to cell stress and injury, cell cycle regulation, and apoptosis, indicating that Nrf2 pathway and AHR pathway might be the key toxicity pathways involved in the cytotoxic-mediated MOA. Meanwhile, the dose ($\geq 170 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ sodium dichromate) and the time point (90 d) of the activation of Nrf2 pathway was similar to the emergence of crypt cell proliferation. It was proposed that Nrf2 pathway activation might be a key event for cytotoxic-mediated MOA of small intestinal tumors. The WOE results showed moderate validity of evidence in this hypothesis, with high validity of evidence for biological plausibility and dose-response manner.

[Conclusion] Nrf2 pathway activation might be the key event in the cytotoxic-mediated MOA of small intestinal tumors induced by oral exposure to Cr(VI) via initiating or maintaining crypt cell proliferation.

Keywords: hexavalent chromium; mode of action; small intestinal; bioinformatics analysis; weight of evidence

六价铬 [hexavalent chromium, Cr(VI)] 是常见的环境污染物质, 已有充分证据表明 Cr(VI) 暴露与肺癌发生具有密切关联^[1-3]。Cr(VI) 经口暴露后, 在口腔唾液和胃液的还原作用下, 仅 10%~20% 未被还原的 Cr(VI) 进入小肠^[4-5]。但是流行病学研究显示, 饮用铬污染的水和摄入含铬的蔬菜与胃肠道肿瘤发生风险提高相关^[6-7]。且美国国家毒理学计划 (National Toxicology Program, NTP) 为期两年的饮水染毒实验发现, 长期暴露于 $> 30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Cr(VI) 可诱导小鼠小肠肿瘤的发生^[8], 提示小肠或为经口 Cr(VI) 暴露毒性效应的靶器官。因此, 明确其毒作用模式 (mode of action, MOA), 识别关键事件 (key events, KEs) 势在必行。

MOA 作为一种高效的风险评估工具逐渐被各领域广泛应用^[9-10]。MOA 指从特定化学物质暴露开始, 细胞内物质分子相互作用, 到组织或器官变化, 最终导致某有害效应或不良结局的一系列因果关联的 KEs^[11]。目前认为 Cr(VI) 对机体造成不良效应存在两种 MOA, 分别是细胞毒性和遗传毒性。细胞毒性体现在 Cr(VI) 在还原为 Cr(IV)、Cr(V)、Cr(III) 的过程中产生大量活性氧 (reactive oxygen species, ROS), 导致细胞氧化应激损伤, 促进细胞再生性增生/增殖^[12-13]; 遗传毒性体现在 Cr(IV)、Cr(III) 与 DNA 发生共价结合, 生成 DNA 加合物, 诱导 DNA 双链交联断裂、DNA-蛋白质交联和基因突变^[2, 14]。目前对于两种 MOA 仍存在争议, 并且介导 Cr(IV) 不良效应的具体机制和关键通路尚不清楚。

以往研究尚缺乏对现有生物学信息的充分整合和关键毒性通路的识别, 本研究结合比较毒理基因组数据库 (Comparative Toxicogenomics Database, CTD) 中的文献数据和 PubMed 的基因表达综合数据库 (Gene Expression Omnibus, GEO) 的高通量测序数据, 通过生物信息学分析及证据权重 (weight of evidence,

WOE) 评价, 寻找经口 Cr(VI) 暴露潜在的关键扰动毒性通路, 并探讨靶器官的 MOA, 有助于开展经口 Cr(VI) 暴露引起人群不良健康结局的风险评估。

1 材料与方法

1.1 文献筛选及基因收集策略

在 CTD (<http://ctdbase.org/>) 中进行文献检索, 使用 “Keyword Search Query” 的 “Chemical” 功能模块搜索关键词 “Chromium”, 下载所有查得的参考文献以进行下一步筛选。通过阅读文献题目、摘要和全文, 手动排除不符合标准的文献, 排除标准如下: (1) 非 Cr(VI) 单一暴露; (2) 研究对象为非人源或非鼠源; (3) 模拟经呼吸道暴露、经皮吸收和注射 Cr(VI) 的途径; (4) 无法获得全文 (1 篇) 或非英文撰写 (2 篇)。将筛选后的文献按照毒作用的靶器官或靶组织进行分类, 包括肝脏、肠道和肾脏等。通过 “Chemical-Gene Interactions” 功能模块收集文献所对应的基因, 基因已由数据库统一转化为人同源基因。鉴于筛选出来的文献及基因数量有限, 将鼠源和人源 Cr(VI) 毒作用相关基因合并, 按照组织器官分别取其并集从而获得基因集^[15]。

由于 CTD 缺乏对高通量数据的充分描述, 为全面利用现有生物信息学数据探讨 Cr(VI) 经口暴露后的毒性作用和扰动通路的剂量-反应和时间-效应关系, 本研究另外获取高通量测序完整的数据进行进一步的整理和分析。经上述 CTD 数据库文献筛选, 发现仅有 1 篇有关 Cr(VI) 肠道暴露的高通量数据集的文献, 通过在 GEO (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) 中检索, 获得完整的 Cr(VI) 经饮用水染毒小肠转录组高通量测序数据 (GEO: GSE87262)。该研究以雌性 B6C3F1 小鼠作为动物模型, 染毒剂量参考 2008 NTP Cr(VI) 两年饮水暴露实验, 设定为 0.3、4、14、60、170、520 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 重铬酸钠 (sodium dichromate, SDD) [对应

Cr(VI) 暴露剂量为 0.1、1.4、4.9、20.9、59.3、180 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$], 染毒时间则模拟急性及亚慢性暴露设定为 7 d 及 90 d, 使用 Agilent 小鼠全基因组表达谱芯片(4×44 K)检测十二指肠和空肠基因表达量。使用 GEO 数据库在线 GEO2R 差异基因表达量分析工具, 得到各实验组($n=3$)与其对应的对照组($n=3$)之间的差异表达基因($P<0.05$, $|\text{FC}|>1.5$), 鉴于十二指肠及空肠均出现绒毛萎缩、细胞凋亡和隐窝细胞增生等相似病理改变, 为了解小肠的基因整体扰动状态, 将十二指肠和空肠差异表达基因进行合并。

1.2 生物信息学分析

使用 Ingenuity® Pathway Analysis(IPA)软件的“Core Analysis”功能模块对上述按照器官组织分类筛选获得的基因进行通路富集, 并以 Ingenuity® 数据库提供的信息对富集到的通路进行生物学功能分析。进一步使用 IPA 软件的“Comparison Analysis”功能模块将富集得到的通路以至少 1 个剂量组 $P<0.05$ 且至少 1 个剂量组 $|Z\text{-score}|>2$ 为条件进行筛选。其中 IPA 通路富集中采用确切概率法, $P<0.05$ 认为具有统计学差异。Z-score >2 通路为激活状态, Z-score <-2 通路为抑制状态。

1.3 WOE 评价

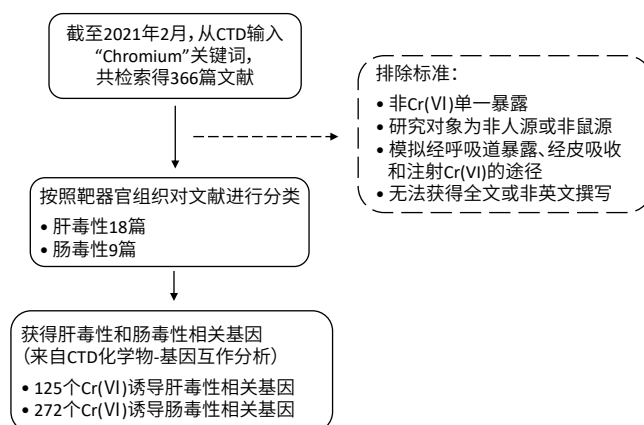
WOE 是指将用于风险评估的证据进行评价和权衡的过程。在 MOA 框架构建中, 首先假定潜在的 MOA 来描述化学物暴露和有害影响是如何在生物学上联系的, 并比较这些假设的 MOA 以及其 KEs 的证据效力。根据世界经合组织, 目前适用于 MOA 进行 WOE 评估的方法主要是 Meek 等^[16]提出的改良 Bradford Hill 原则。应用改良 Bradford Hill 原则, 对通过上述方法获得的潜在关键通路作为 KE 的重要性及 KEs 之间的因果关系进行 WOE 评价。具体评价内容包括生物学合理性、重要性、经验学观察(剂量-反应关系、时效关系、发生率一致性)、物种/器官一致性和可类比性。证据强度以“高、中、低”划分, 各部分评价标准依照 Becker 等提出的准则^[17]。准则要点如下: 生物学合理性, 指 KEs 中涉及到的生物学过程与现有的生物学知识是否一致; 重要性, 指上一环节 KE 未出现时下一环节 KE 无法发生; 经验学观察, 指在低于或出现相似相关有害效应的剂量中 KEs 是否有出现, KEs 出现的顺序是否与假设一致, 该不良反应的发生率是否低于前一个 KE; 物种/器官一致性, 不同物种或器官来源的实验数据结果是否一致; 可类比性, 是否与既往已建立 MOA 的相关化

学物有一致性。

2 结果

2.1 CTD 数据库检索与 Cr(VI) 经口暴露肝肠毒性相关的基因

如图 1, 截至 2021 年 2 月, 在 CTD 数据库中共检索到 366 篇与 Cr(VI) 毒性作用相关的文献。按照排除标准, 筛选得到与经口 Cr(VI) 暴露相关的文献 54 篇。其中, 肝脏及肠道是文献报道最多的器官组织, 分别为 18 篇和 9 篇, 其余器官组织因相关文献较少且提供基因有限, 未进一步描述与分析。NTP 为期两年大小鼠 Cr(VI) 饮水染毒实验, 显示肠道为 Cr(VI) 经口暴露毒性作用的主要靶器官, 对肝脏存在潜在的毒性作用^[8]。结合已有文献及长期动物染毒实验结果, 本研究后续对肠道和肝脏进行生物信息学分析。基于大鼠(F344 和 Wistar 品系)、小鼠(B6C3F1 和 C57BL/6J 品系)以及 CRL-1807 细胞和 HCT116 细胞的实验数据, 共有 272 个基因与 Cr(VI) 的肠毒性相关。基于大鼠(Wistar、Sprague-Dawley 品系)、小鼠(Swiss 和 C57BL/6NTac 品系)以及 L02、Hepa-1、HepG2 和 H4 细胞的实验数据, 共有 125 个基因与 Cr(VI) 的肝毒性相关。



[注] CTD: 比较毒理基因组数据库; Chromium: 铬; Cr(VI): 六价铬。

[Note] CTD: Comparative Toxicogenomics Database; Chromium: Cr; Cr(VI): Hexavalent chromium.

图 1 文献筛选及基因收集流程图

Figure 1 Flow chart of literature screening and gene recruitment

2.2 核因子 E2 相关因子 2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)通路和芳香烃受体(aryl hydrocarbon receptor, AHR)通路或为 Cr(VI) 暴露关键毒性通路

为筛查经口 Cr(VI) 暴露的关键毒性通路和识别 MOA 潜在的 KEs, 利用 IPA 软件分别对上文所述 CTD 中筛选获得的肠道和肝脏毒性相关基因进行通路富

集。富集到的通路按照 $\log(P$ 值) 排序, 肠道和肝脏分别富集的前 20 个通路中的 10 个典型通路见补充材料图 S1。肠道富集到的通路包括: 生长阻滞和 DNA 损伤诱导蛋白通路、Nrf2 通路、AHR 通路和真核起始因子 2(eukaryotic initiation factor 2, eIF2) 信号通路等。肝脏富集到的通路包括: 线粒体功能障碍通路、内质网应激通路、Bcl-2 相关抗死亡基因 2 通路和凋亡通路等。根据 Ingenuity® 数据库信息, 对通路进行生物学功能分类, 如补充材料图 S1 所示, 肠道扰动的通路主要与细胞应激和损伤、细胞周期调控和免疫反应相关, 而肝脏扰动的通路主要与细胞应激损伤和癌症相关。有 2 个器官扰动通路的生物学功能主要参与细胞应激损伤过程, 支持 Cr(VI) 在胞内还原过程中产生大量 ROS 导致氧化应激损伤的细胞毒性介导的 MOA。同时, 肠道与肝脏共同富集到 Nrf2 通路和 AHR 通路, 结合其生物学功能, 提示这两条通路可能为 Cr(VI) 暴露中参与细胞氧化应激损伤和细胞周期调控的潜在关键毒性通路。

2.3 Nrf2 通路激活或为 Cr(VI) 小肠细胞毒性介导的 MOA 的 KE

由于 Cr(VI) 肝脏毒性尚无充分实验数据支持, 因此后续仅探讨经口 Cr(VI) 暴露引起小肠毒性的关键分子通路扰动的剂量-反应和时间-效应关系。利用 IPA 软件对从 GEO 数据库获得的 7 d 与 90 d Cr(VI) 染毒小肠的高通量测序的差异表达基因分别进行通路富集。如补充材料图 S2 所示, 7 d 和 90 d Cr(VI) 经口暴露, 当染毒剂量 $< 60 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ SDD 时, 大部分通路差异无统计学意义或处于无明显激活/抑制状态。染毒剂量 $> 60 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ SDD 时, 7 d 染毒扰动基因与外源化学物代谢 AHR 信号通路、外源化学物代谢组成性雄烷受体信号通路、外源化学物代谢孕 X 受体信号通路等外源化学物代谢通路抑制相关; 而 90 d 染毒扰动基因与胆固醇生物合成 I、胆固醇生物合成 II & III、胆固醇生物合成超通路家族等脂质代谢通路激活密切相关。7 d 和 90 d 染毒, 在大于 $14 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ SDD 的多个剂量组, 与细胞增殖相关的 eIF2 通路均处于激活状态 ($P < 0.05$ 且 $Z\text{-score} > 2$), 同时组织病理观察当中仅在大于 $14 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ SDD 剂量组中发现小鼠小肠开始出现病理改变, 因此推断 eIF2 通路激活可能参与 Cr(VI) 毒性效应的过程。然而, 以上通路 with 细胞损伤和细胞再生性增生/增殖等病理改变之间未发现明显剂量-反应和时间-效应关系。7 d 各剂量染毒没有富集到 Nrf2 通路, 而在 90 d 染毒后 Nrf2 通路在 $170 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 以及 $520 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$

剂量组均为激活状态 ($P < 0.05$ 且 $Z\text{-score} > 2$), 说明 Nrf2 通路激活与观察到隐窝细胞出现增生的染毒时间及剂量均相同。然而在 7 d 各剂量暴露后均未富集到 AHR 通路, 且 90 d 染毒后 AHR 通路也未观测到显著差异 ($P > 0.05$ 或 $Z\text{-score} = 0$)。基于以上结果, Nrf2 通路激活与隐窝细胞出现增生存在剂量-反应和时间-效应关系, 提示 Nrf2 通路激活或为 Cr(VI) 小肠细胞毒性介导的 MOA 的 KE。

2.4 Nrf2 通路激活作为 Cr(VI) 小肠毒性 KEs 的 WOE 评估

通过生物信息学分析, 结合组织病理改变, 本研究提出 Nrf2 通路激活可能是启动或维持隐窝细胞增殖的 KE, 并基于 Bradford Hill 原则对这一假设进行 WOE 评估。上述“2.3”处通路分析结果显示 AHR 通路 with 细胞损伤或病理改变无剂量-反应和时间-效应关系, 且目前缺少 Cr(VI) 与 AHR 通路相关的实验数据, 暂认为 Cr(VI) 暴露致肠道毒性中 AHR 通路没有发挥重要作用, 故未进行进一步的 WOE 评估。结果如表 1 所示, 这一假设的生物学合理性及剂量-反应关系的证据效力较高, 但重要性和时效关系等仍需更多的实验数据支持。因此, Nrf2 通路激活为 Cr(VI) 经口暴露致小肠肿瘤发生的细胞毒性 MOA KE 的证据效力中等。

表 1 Nrf2 通路激活作为经口 Cr(VI) 暴露小肠细胞毒性介导的 MOA 中 KE 的 WOE 评价

Table 1 WOE evaluation of Nrf2 pathway activation as a key event in cytotoxic-mediated MOA of small intestinal induced by oral Cr(VI)-exposure

改良Bradford Hill 因果关系	支持证据	潜在的 不支持 证据	缺乏数据	证据效力
生物学合理性	持续氧化应激造成细胞应激损伤及细胞代偿性增生, 最终导致细胞基因不稳定性增加, 为常见化学物致肿瘤发生的KE	—	—	高
重要性	—	—	缺乏Nrf2敲除或敲入模型Cr(VI)染毒对下游KE影响的实验数据	低
经验学观察				
剂量-反应关系	观察到小鼠隐窝细胞增殖与Nrf2通路激活的染毒剂量相似[$\geq 170 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Cr(VI)] ^[12]	—	—	高
时效关系	Cr(VI) 7 d染毒均未见Nrf2通路激活和隐窝细胞增殖, Cr(VI) 90 d染毒均发现Nrf2通路激活和隐窝细胞增殖 ^[12]	—	缺乏7 d与90 d之间的Cr(VI)染毒的数据	中
发生率一致性	—	—	尚缺	低

续表 1

改良Bradford Hill 因果关系	支持证据	潜在的 不支持 证据	缺乏数据	证据效 力
物种/器官一致性	Nrf2活性下降抑制由 Cr(VI)恶性转化的永生化 人支气管上皮细胞 (BEAS-2B)的增殖及肿瘤 形成 ^[18-20]	—	—	中
可类比性	—	—	尚缺	低

3 讨论

本研究通过整合 CTD 和 GEO 的数据,获得 Cr(VI) 经口暴露靶器官毒性相关基因,旨在探讨经口 Cr(VI) 暴露 MOA 及其关键分子事件。利用生物信息学分析发现 Cr(VI) 经口暴露导致包括 Nrf2、eIF2 和 AHR 等通路扰动,对扰动通路进行生物学功能分析得出引起不良健康结局的 MOA 主要为非诱变性细胞毒性。并结合 WOE 评价,证明 Nrf2 通路激活或为小肠细胞毒性 MOA 中的 KE,为 Cr(VI) 暴露的风险评估提供了基础数据支持。

目前关于 Cr(VI) 经口暴露研究主要以 2008 年 NTP 公布的为期两年饮水染毒实验数据为基础,即 180 mg·L⁻¹ Cr(VI) 剂量下发现大鼠出现口腔肿瘤,≥30 mg·L⁻¹ Cr(VI) 染毒小鼠出现小肠肿瘤,各剂量组的大小鼠均存在肝脏炎症^[8,21],提出小肠为经口 Cr(VI) 暴露潜在的主要毒作用靶器官。随后,国内外多个团队对于 Cr(VI) 经口暴露导致小肠肿瘤发生这一不良健康结局的作用模式为遗传毒性 MOA 还是细胞毒性介导的 MOA 进行了讨论^[22,23-24]。其中细胞毒性介导的 MOA 为 Cr(VI) 导致小肠绒毛上皮细胞毒性,进而引起隐窝细胞持续性增殖,促进细胞突变转化发生小肠肿瘤^[22]。同时研究表明,Cr(VI) 进入十二指肠绒毛上皮肠细胞后,可与生物大分子(如 DNA)发生反应,引起 DNA 双链断裂等遗传毒性损伤^[25]。总体来说,非诱变性细胞毒性和诱变性 DNA 损伤均有一定证据支持,同时又因缺少关键扰动通路的描述,迄今为止,经口 Cr(VI) 暴露主要的 MOA 仍然存在争议。

通过对公共数据库信息进行挖掘,并运用生物信息学方法进行分析,能够以更有效的方式对 MOA/不良结局路径(adverse outcome pathway, AOP)进行构建^[26]。CTD 对于文献的收录有一套较为严格的管理过程,且具备更新周期短和文献收入全面的特点,公认度高^[15]。本研究利用 CTD 收集与 Cr(VI) 毒性相关的基因信息,通过 IPA 软件富集通路,其中肠道富集的通路包括 p53 通路、Nrf2 通路、AHR 通路、丝裂原激活蛋白

激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)通路和 eIF2 通路等,肝脏包括线粒体功能障碍通路、内质网应激通路、Nrf2 通路和 AHR 通路等。两个扰动通路主要参与细胞周期调控和细胞应激及损伤,进一步为细胞毒性介导的 MOA 是 Cr(VI) 暴露的主要 MOA 提供了证据。Lee 等^[27]提出 Cr(VI) 可通过人类激活 MAPK、核因子 κB 和蛋白激酶 B 通路增加白介素-1α 和肿瘤坏死因子的表达,诱导 ROS 的产生,从而促进细胞的凋亡和自噬。亦有体外实验证据表明,Cr(VI) 可通过激活磷脂酰肌醇-3-激酶-Akt 信号转导通路诱导人类肝癌细胞 L02 内质网应激和线粒体功能紊乱^[28]。另外,我们发现两器官共同富集到 Nrf2 通路和 AHR 通路,结合其生物学功能,提示这两条通路可能为 Cr(VI) 暴露中的重要毒性通路。

本研究通过对 GEO 中相关的高通量转录组测序数据进行分析,发现在 90 d 饮水染毒 ≥170 mg·L⁻¹ SDD 时 Nrf2 通路为激活状态,与小肠出现隐窝细胞增殖的染毒剂量和暴露时间相似。这一发现提示 Nrf2 通路激活或在小肠肿瘤发生中发挥重要作用。Nrf2 与细胞内氧化还原的动态平衡密切相关^[29],在传统意义上被认为是一种肿瘤抑制因子,Nrf2 通路激活不但降低肿瘤的发生率^[30-31],还防止肿瘤的转移^[32]。然而越来越多证据发现在持续压力环境下,Nrf2 通路持续激活引起肿瘤细胞产生持续增殖信号、代谢重编程,促进免疫逃避,并诱导血管生成,为肿瘤细胞的增殖、侵袭和转移营造了有利环境^[33-35]。AOP-Wiki 数据库官网(<https://aopwiki.org/>)收录了 Nrf2 通路激活(事件 ID: 478)作为分子始发事件,参与肝脂肪变性这一不良结局。可见 Nrf2 通路激活在疾病发生发展中起到至关重要的作用。基于改良 Bradford Hill 原则,对 Nrf2 通路激活在小肠肿瘤发生中的重要性及与 KE 之间的因果关系进行 WOE 评价,结果显示假设效力为中等。另外,Nrf2 通路 eIF2 通路在生物学功能上具有相似的作用,皆与细胞增殖和生存相关。已有研究表明,在应对环境压力时,eIF2 会通过被磷酸化,整体减少 mRNA 翻译,以减轻细胞损伤或诱导凋亡^[36]。然而当染毒剂量 > 14 mg·L⁻¹ SDD 时 eIF2 通路均为激活状态。推测 Nrf2 通路 eIF2 通路之间可能存在一定的协同作用,为肿瘤发生及肿瘤细胞增殖提供了有利的条件,从而促进小肠肿瘤的发生。

本研究对现有生物信息数据进行整合,通过生物信息学分析,阐述了经口 Cr(VI) 暴露小肠肿瘤发生的细胞毒性介导的 MOA,提出 Nrf2 通路激活可能是 Cr(VI)

暴露引起小肠毒性的 MOA 中启动或维持隐窝细胞增殖的 KE, 为特定靶器官的毒性评估提供了基础数据。本研究虽然已应用 WOE 对分析结果进行了有效的评估, 但结果缺少直接的实验验证, 下一步需通过补充动物及体外实验模型证明, 提高相关 KEs 的证据效力。

参考文献

- [1] BROWNING CL, WISE JP. Prolonged exposure to particulate chromate inhibits RAD51 nuclear import mediator proteins[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2017, 331: 101-107.
- [2] PROCTOR DM, SUH M, CAMPLEMAN SL, et al. Assessment of the mode of action for hexavalent chromium-induced lung cancer following inhalation exposures[J]. *Toxicology*, 2014, 325: 160-179.
- [3] Occupational exposure to hexavalent chromium (Final Rule): 1218 -AB4[S]. USA: Occupational Safety And Health Administration, 2006.
- [4] ZHITKOVICH A. Chromium in drinking water: sources, metabolism, and cancer risks[J]. *Chem Res Toxicol*, 2011, 24(10): 1617-1629.
- [5] DE FLORA S, CAMOIRANO A, BAGNASCO M, et al. Estimates of the chromium(VI) reducing capacity in human body compartments as a mechanism for attenuating its potential toxicity and carcinogenicity[J]. *Carcinogenesis*, 1997, 18(3): 531-537.
- [6] WELLING R, BEAUMONT JJ, PETERSEN SJ, et al. Chromium VI and stomach cancer: a meta-analysis of the current epidemiological evidence[J]. *Occup Environ Med*, 2015, 72(2): 151-159.
- [7] PERALTA-VIDEA JR, LOPEZ ML, NARAYAN M, et al. The biochemistry of environmental heavy metal uptake by plants: implications for the food chain[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2009, 41(8/9): 1665-1677.
- [8] NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM. Toxicology and carcinogenesis studies of sodium dichromate dihydrate (Cas No. 7789-12-0) in F344/N rats and B6C3F1 mice (drinking water studies)[R]. North Carolina: National Institutes of Health, 2008.
- [9] BOOBIS AR, DOE JE, HEINRICH-HIRSCH B, et al. IPCS framework for analyzing the relevance of a noncancer mode of action for humans[J]. *Crit Rev Toxicol*, 2008, 38(2): 87-96.
- [10] JULIEN E, BOOBIS AR, OLIN SS. The Key Events Dose-Response Framework: a cross-disciplinary mode-of-action based approach to examining dose-response and thresholds[J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2009, 49(8): 682-689.
- [11] SONICH-MULLIN C, FIELDER R, WILTSE J, et al. IPCS conceptual framework for evaluating a mode of action for chemical carcinogenesis[J]. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2001, 34(2): 146-152.
- [12] THOMPSON CM, PROCTOR DM, HAWS LC, et al. Investigation of the mode of action underlying the tumorigenic response induced in B6C3F1 mice exposed orally to hexavalent chromium[J]. *Toxicol Sci*, 2011, 123(1): 58-70.
- [13] JIN LF, WANG YY, ZHANG ZD, et al. Cytotoxicity and genome-wide microarray analysis of intestinal smooth muscle cells in response to hexavalent chromium induction[J]. *Dongwuxue Yanjiu*, 2013, 34(E3): E93-E100.
- [14] THOMPSON CM, HAWS LC, HARRIS MA, et al. Application of the U. S. EPA mode of action Framework for purposes of guiding future research: a case study involving the oral carcinogenicity of hexavalent chromium[J]. *Toxicol Sci*, 2011, 119(1): 20-40.
- [15] DAVIS AP, GRONDIN CJ, JOHNSON RJ, et al. The Comparative Toxicogenomics Database: update 2019[J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(D1): D948-D954.
- [16] MEEK ME B, PALERMO CM, BACHMAN AN, et al. Mode of action human relevance (species concordance) framework: Evolution of the Bradford Hill considerations and comparative analysis of weight of evidence[J]. *J Appl Toxicol*, 2014, 34(6): 595-606.
- [17] BECKER RA, ANKLEY GT, EDWARDS SW, et al. Increasing scientific confidence in adverse outcome pathways: application of tailored Bradford-hill considerations for evaluating weight of evidence[J]. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2015, 72(3): 514-537.
- [18] CLEMENTINO M, KIM D, ZHANG Z. Constitutive activation of NAD-dependent sirtuin 3 plays an important role in tumorigenesis of chromium(VI)-transformed cells[J]. *Toxicol Sci*, 2019, 169(1): 224-234.
- [19] SON YO, PRATHEESHKUMAR P, WANG Y, et al. Protection from Cr(VI)-induced malignant cell transformation and tumorigenesis of Cr(VI)-transformed cells by luteolin through Nrf2 signaling[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2017, 331: 24-32.
- [20] ROY RV, PRATHEESHKUMAR P, SON YO, et al. Different roles of ROS and Nrf2 in Cr(VI)-induced inflammatory responses in normal and Cr(VI)-transformed cells[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2016, 307: 81-90.
- [21] STOUT MD, HERBERT RA, KISSLING GE, et al. Hexavalent chromium is carcinogenic to F344/N rats and B6 C3 F1 mice after chronic oral exposure[J]. *Environ Health Perspect*, 2009, 117(5): 716-722.
- [22] BHAT VS, COHEN SM, GORDON EB, et al. An adverse outcome pathway for small intestinal tumors in mice involving chronic cytotoxicity and regenerative hyperplasia: a case study with hexavalent chromium, captan, and folpet[J]. *Crit Rev Toxicol*, 2020, 50(8): 685-706.
- [23] THOMPSON CM, YOUNG RR, DINESDURAGE H, et al. Assessment of the mutagenic potential of hexavalent chromium in the duodenum of big blue® rats[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2017, 330: 48-52.
- [24] KOPEC AK, THOMPSON CM, KIM S, et al. Comparative toxicogenomic analysis of oral Cr(VI) exposure effects in rat and mouse small intestinal epithelia[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2012, 262(2): 124-138.
- [25] SALNIKOW K, ZHITKOVICH A. Genetic and epigenetic mechanisms in metal carcinogenesis and cocarcinogenesis: nickel, arsenic, and chromium[J]. *Chem Res Toxicol*, 2008, 21(1): 28-44.
- [26] GRONDIN CJ, DAVIS AP, WIEGERS TC, et al. Accessing an expanded exposure science module at the comparative toxicogenomics database[J]. *Environ Health Perspect*, 2018, 126(1): 014501.

- [27] LEE YH, SU SB, HUANG CC, et al. N-acetylcysteine attenuates hexavalent chromium-induced hypersensitivity through inhibition of cell death, ROS-related signaling and cytokine expression[J]. *PLoS One*, 2014, 9(9): e108317.
- [28] ZHANG Y, XIAO F, LIU X, et al. Cr(VI) induces cytotoxicity in vitro through activation of ROS-mediated endoplasmic reticulum stress and mitochondrial dysfunction via the PI3 K/Akt signaling pathway[J]. *Toxicol In Vitro*, 2017, 41: 232-244.
- [29] HAYES JD, DINKOVA-KOSTOVA AT. The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism[J]. *Trends Biochem Sci*, 2014, 39(4): 199-218.
- [30] RAMOS-GOMEZ M, KWAK MK, DOLAN PM, et al. Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducers is lost in *nrf2* transcription factor-deficient mice[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(6): 3410-3415.
- [31] IIDA K, ITOH K, KUMAGAI Y, et al. Nrf2 is essential for the chemopreventive efficacy of oltipraz against urinary bladder carcinogenesis[J]. *Cancer Res*, 2004, 64(18): 6424-6431.
- [32] SATOH H, MORIGUCHI T, TAGUCHI K, et al. Nrf2-deficiency creates a responsive microenvironment for metastasis to the lung[J]. *Carcinogenesis*, 2010, 31(10): 1833-1843.
- [33] HAYES JD, MCMAHON M, CHOWDHRY S, et al. Cancer chemoprevention mechanisms mediated through the Keap1-Nrf2 pathway[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2010, 13(11): 1713-1748.
- [34] MOTOHASHI H, YAMAMOTO M. Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism[J]. *Trends Mol Med*, 2004, 10(11): 549-557.
- [35] ZHANG P, SINGH A, YEGNASUBRAMANIAN S, et al. Loss of Kelch-like ECH-associated protein 1 function in prostate cancer cells causes chemoresistance and radioresistance and promotes tumor growth[J]. *Mol Cancer Ther*, 2010, 9(2): 336-346.
- [36] WEK RC, JIANG HY, ANTHONY TG. Coping with stress: eIF2 kinases and translational control[J]. *Biochem Soc Trans*, 2006, 34(Pt 1): 7-11.

(英文编辑: 汪源; 责任编辑: 陈姣)

· 告知栏 ·

《环境与职业医学》被 Scopus、DOAJ 数据库同时收录

由上海市疾病预防控制中心主办的《环境与职业医学》杂志(*Journal of Environmental and Occupational Medicine, JEOM*)被国际数据库 Scopus 和 DOAJ 同时收录! 这是继本刊今年进入《世界期刊影响力指数报告》和 EBSCO 数据库后的又一重要进展。

《环境与职业医学》由上海市疾病预防控制中心主办, 主要着眼于发表环境因素(自然、社会)、职业因素与人群健康的流行病学、毒理学内容的重要研究, 以刊登中文文献为主(含英文摘要), 月刊。所有被录用的稿件均经过同行专家评议。目前保持 CSCD(核心库)、北大核心、科技核心全收录。杂志主页: www.jeom.org。

作为中文期刊,《环境与职业医学》提供 700 字左右英文长摘要。被两大国际数据库 Scopus 和 DOAJ 同时收录, 意味着本刊的期刊方针、声望、学术内容等获得了国际数据库的认可, 促进了本刊国际化传播的力度, 提高论文在国内外的被引频次, 提高作者、期刊、工作单位在国内外的学术地位和知名度。

特别感谢支持《环境与职业医学》的各位专家、作者及读者, 我们将不忘初心, 砥砺前行!

Scopus(<https://www.scopus.com/>)数据库是由全球最大的出版社——爱思唯尔(Elsevier)推出的科研管理、学科规划数据库, 是目前全球规模最大的文摘和引文数据库, 具有严格的评审标准。期刊被 Scopus 数据库收录将有利于提升其国际知名度和影响力, 打通与国际主流学术平台交流的通道, 增强国际学术话语权。

DOAJ(<https://doaj.org/about/>)由瑞典隆德大学图书馆设立于 2003 年 5 月, 收录经同行评审的开放存取期刊, 涵盖了科学、技术、医学、社会科学、艺术和人文的所有领域。DOAJ 的使命是在全球范围内提高高质量、经同行评审的开放性学术研究期刊的知名度、可及性、声誉、使用率和影响力, 不受学科、地理或语言的限制。

《环境与职业医学》编辑部

2021 年 11 月 25 日