

DOI:10.7524/AJE.1673-5897.20190527002

吴彬彬, 晏斌, 胡梅, 等. 苯并[a]芘和1-羟基芘诱导人胚胎干细胞分化心肌细胞 ROS、CYP 基因表达和 DNA 损伤[J]. 生态毒理学报, 2020, 15(2): 96-103

Wu B B, Yan B, Hu M, et al. Benzo[a]pyrene and 1-hydroxypyrene induce ROS, CYP gene expression and DNA damage in human embryonic stem cell derived cardiomyocytes [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2020, 15(2): 96-103 (in Chinese)

## 苯并[a]芘和1-羟基芘诱导人胚胎干细胞分化心肌细胞 ROS、CYP 基因表达和 DNA 损伤

吴彬彬<sup>1,2</sup>, 晏斌<sup>3</sup>, 胡梅<sup>4</sup>, 陈曦<sup>1,2,5</sup>, 梁岩<sup>5,\*</sup>

1. 中国科学院深圳先进技术研究院, 深圳 518055

2. 中国科学院大学, 北京 100049

3. 香港大学李嘉诚医学院, 香港

4. 山东省食品药品检验研究院, 济南 250101

5. 电子科技大学资源与环境学院, 成都 611731

收稿日期: 2019-05-27 录用日期: 2019-07-24

**摘要:** 多环芳烃(PAHs)化合物中的苯并[a]芘和 PAHs 暴露检测标志物 1-羟基芘与心脏功能障碍有关,但其生物学机制尚不清楚。为研究苯并[a]芘和 1-羟基芘对心脏的毒性作用,基于人胚胎干细胞分化心肌细胞(hESC-CM)研究了苯并[a]芘和 1-羟基芘对心肌细胞活性氧(ROS)生成、CYP 基因表达和 DNA 损伤等的影响。结果表明,苯并[a]芘和 1-羟基芘对 hESC-CM 活性无影响,但能显著增强细胞 ROS 水平,诱导 DNA 损伤。此外,苯并[a]芘还能诱导细胞线粒体促凋亡基因的表达。研究表明,苯并[a]芘和 1-羟基芘能通过诱导氧化应激和 DNA 损伤事件导致 hESC-CM 损伤,在一定程度上解释了多环芳烃暴露导致心脏疾病的分子机制。

**关键词:** 多环芳烃; 胚胎干细胞分化心肌细胞; DNA 损伤

文章编号: 1673-5897(2020)2-096-08 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

## Benzo[a] pyrene and 1-Hydroxypyrene Induce ROS, CYP Gene Expression and DNA Damage in Human Embryonic Stem Cell Derived Cardiomyocytes

Wu Binbin<sup>1,2</sup>, Yan Bin<sup>3</sup>, Hu Mei<sup>4</sup>, Chen Xi<sup>1,2,5</sup>, Liang Yan<sup>5,\*</sup>

1. Shenzhen Institutes of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, China

2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

3. LKS Faculty of Medicine, The University of Hong Kong, Hong Kong, China

4. Shandong Institute for Food and Drug Control, Ji'nan 250101, China

5. School of Resources and Environment, University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu 611731, China

Received 27 May 2019 accepted 24 July 2019

基金项目: 广东省科技计划项目(2016A020214015); 电子科技大学科研启动基金资助项目(Y03019023601008022); 中国科学院战略性先导科技专项(XDA20060303)

作者简介: 吴彬彬(1988—), 男, 博士研究生, 研究方向为环境毒理学, E-mail: bb.wu@siat.ac.cn

\* 通讯作者( Corresponding author ), E-mail: yliang@uestc.edu.cn

**Abstract:** Benzo[a]pyrene, as a carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) compound, has received great concern due to its high health risk. 1-hydroxypyrene, a metabolite of pyrene, is widely used as one biomarker for PAHs. Previous studies demonstrated that both benzo[a]pyrene and 1-hydroxypyrene related with cardiac dysfunction, but the biological mechanisms have remained unclear. In the present study, toxic mechanisms of these two PAHs were evaluated using human embryonic stem cell derived cardiomyocytes (hESC-CM). The results showed that both benzo[a]pyrene and 1-hydroxypyrene enhanced the intracellular level of ROS and induced DNA damage. Benzo[a]pyrene also induced an expression of cell mitochondrial proapoptotic gene. Overall, the oxidative stress and DNA damage contributed to PAHs toxicity in cardiomyocytes and probably associated with heart diseases.

**Keywords:** polycyclic aromatic hydrocarbon; human embryonic stem cells derived cardiomyocytes; DNA damage

多环芳烃(PAHs)是有机物未充分燃烧产生的化合物,其主要来源有化石燃料、森林火灾和火山爆发等。PAHs 是重要的环境和食品污染物,暴露于 PAHs 能增加基因突变以及患癌症和心血管疾病的风险<sup>[1-2]</sup>。在已知的 150 余种 PAHs 中,苯并[a]芘作为高环 PAH,长期以来被认为可诱导活性氧(ROS)、突变并具有致癌作用。此外,越来越多的证据表明,苯并[a]芘暴露与心脏疾病密切相关<sup>[1,3-4]</sup>,可导致心脏肥大、心脏发育缺陷和致命性缺血性心脏病等。苯并[a]芘可以吸附在大气细微颗粒表面,也可以在抽烟或食物烧烤过程中产生,苯并[a]芘被人体摄入或吸入后,可与芳烃受体(AhR)结合,导致 AhR 转移至细胞核,诱发下游基因(例如 *CYP1A1*)的转录和表达,促使与突变密切相关的二氢二醇环氧苯并[a]芘(benzo[a]pyrene-7,8dihydrodiol-9,10-epoxide, BPDE)-DNA 加合物的形成,而一旦心脏的关键 DNA 序列发生突变,就会产生灾难性的后果<sup>[5-6]</sup>。

为了评估 PAHs 的暴露水平,尿液 1-羟基芘已被广泛用作 PAHs 暴露的标志物<sup>[7-9]</sup>。1-羟基芘是由 *CYP1A1* 催化的芘的代谢物,在尿液中排出。据报道,PAHs 职业暴露后,1-羟基芘浓度与心脏自主神经功能障碍有关<sup>[2]</sup>。然而,目前关于阐释苯并[a]芘和 1-羟基芘对心脏疾病影响的研究鲜有报道。到目前为止,苯并[a]芘和 1-羟基芘诱发人类心脏病的机制尚不清楚,而部分原因是由于缺少基于人源心肌细胞的研究模型。近年来,作为一种新兴的心肌细胞模型,人胚胎干细胞分化心肌细胞(hESC-CM)引起了广泛的关注,它为药物检测、心脏发育、功能和病理生理学研究提供了一个相对便宜和方便的研究载体<sup>[10]</sup>。hESC-CM 能够通过干细胞培养和分化持续获得,且与其他动物细胞相比,对人类而言没有物种差异。因此,hESC-CM 越来越多地被用于心脏疾病的研究中。

基于以上信息,本研究将通过分析苯并[a]芘和 1-羟基芘暴露后 hESC-CM 的 ROS、CYP 基因表达和 DNA 损伤,探讨苯并[a]芘和 1-羟基芘对心脏可能的毒性机制。

## 1 材料与方法 (Materials and methods)

### 1.1 实验材料

H7 细胞购于 WiCell 研究所 (WiCell Research Institute, Inc., 美国),E8 培养基、RPMI 1640 培养基、DMEM/F12 培养基、B27+supplement、Geltrex 和 PrestoBlue 试剂购于美国 Life Technology 公司,Matrigel 购于美国 B&D 公司,Y27632(纯度 $\geq 99\%$ )购于美国 R&D 公司,CHIR 99021(纯度 99.2%)购于美国 Selleck Chemicals 公司。OxiSelect™ comet assay 试剂盒购于美国 Cell Biolabs 公司,CYP1A1 抗体购于英国 Abcam 公司,BPDE-DNA 抗体(5D11)购于美国 Santa Cruz Biotechnology 公司,IWR-1(纯度 $\geq 98\%$ )、苯并[a]芘(纯度 $\geq 96\%$ )和 1-羟基芘(纯度 98%)购于美国 Sigma 公司,6 孔和 96 孔板购于美国康宁公司。PrimeScrip RT 试剂盒购于日本 TAKARA 公司,活性氧检测试剂盒购于碧云天生物技术研究所。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 细胞培养和心肌细胞分化

使用 E8 培养基培养人胚胎干细胞系(H7 细胞)。将未分化的 H7 细胞以每孔  $1 \times 10^5$  个细胞接种在 Matrigel 包被的 6 孔板上直至 80% ~ 90% 汇合,然后在第 0 天加入  $6 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  CHIR 99021。从第 2 天开始,更换为 RPMI/B27 培养基,然后在第 3 天加入  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  IWR-1 并在第 5 天更换 RPMI/B27 培养基一次。将 hESC-CM 维持在 RPMI/B27+培养基中培养。细胞培养 28 d 后,进行后续实验。

#### 1.2.2 细胞活力测定

使用二甲基亚砜(DMSO)溶解苯并[a]芘和 1-羟基芘,并倍数稀释成 200 ~ 6.25  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  系列浓度。

将稀释后的苯并[a]芘和1-羟基芘溶液加入到 Geltrex 预包被的含有 hESC-CM 的 96 孔培养板上, 0.1% DMSO 作为对照组。24 h 后, 将 PrestoBlue 试剂加入各孔, 37 °C 和 5% CO<sub>2</sub> 条件下孵育 30 min, 使用 ELx800Biotek 酶标仪及 Gene5 软件 (Biotek, USA) 检测细胞荧光值。

### 1.2.3 ROS 检测

接种在 Geltrex 预包被培养板上的 hESC-CM 经系列浓度的苯并[a]芘或 1-羟基芘处理 24 h 后, 培养基更换为含有 10 μmol·L<sup>-1</sup> DCFH-DA (上海碧云天生物技术有限公司) 的 RPMI/B27+培养基, 37 °C 细胞培养箱内孵育 20 min, 1×D-PBS (杜氏磷酸盐缓冲液, 不含 Ca<sup>2+</sup> 和 Mg<sup>2+</sup>) 洗涤 2 次, 使用荧光显微镜 (Eclipse 800, Nikon, 日本) 拍照, 使用 Image J 软件进行数据分析。

### 1.2.4 RNA 提取和 qPCR 分析

使用 50 μmol·L<sup>-1</sup> 苯并[a]芘或 1-羟基芘处理 48 h 后, 使用 Trizol 试剂 (Invitrogen, 美国) 提取 hESC-CM 总 RNA, 使用 PrimeScrip RT 试剂盒合成 cDNA。目的基因在 StepOnePlus™ (Applied Biosystem, 美国) 平台上用 SYBR® PremixEx Taq™ 进行扩增, qPCR 条件为 95 °C、3 min 预变性, 35 个循环, 具体为 95 °C、15 s, 60 °C、30 s。采用 GAPDH 作为内参。PCR 引物序列如表 1 所示。

### 1.2.5 免疫荧光实验

使用 50 μmol·L<sup>-1</sup> 苯并[a]芘或 1-羟基芘处理 48 h 后, 使用预冷的 D-PBS 洗涤 2 次, 然后用 4% 多聚甲醛固定 15 min, D-PBS 洗涤 3 次, 室温下用含 10% 胎牛血清的封闭缓冲液孵育 1 h。CYP1A1 抗

体或 BPDE-DNA 抗体 4 °C 孵育过夜, 然后 D-PBS 洗 3 次后, 二抗室温下孵育 1 h。最后再用 D-PBS 洗 3 次, 用荧光显微镜 (Eclipse 800, Nikon, 日本) 拍照, Image J 软件进行数据分析。

### 1.2.6 彗星试验

为了检测 50 μmol·L<sup>-1</sup> 苯并[a]芘或 1-羟基芘诱导的 DNA 损伤, 使用 OxiSelect™ comet assay 试剂盒进行碱性彗星试验。细胞处理 48 h 后, D-PBS 洗涤, 塑料刮收集细胞, 然后将细胞转移到 1.5 mL EP 管中, 700 g 离心 2 min, 预冷的 D-PBS 洗 2 次。然后调整细胞数量为 1×10<sup>5</sup> 个·L<sup>-1</sup>。将细胞与琼脂 (V/V=1:10) 混合, 以 75 μL 每孔涂到载玻片上, 4 °C 下放置 15 min, 然后将载玻片转移到预冷的裂解缓冲液中裂解 1 h, 再置于预冷碱性溶液 30 min。最后, 使用碱性电泳液电泳 30 min, 并进行 DNA 染色。使用荧光显微镜 (Eclipse 800, Nikon, 日本) 对细胞进行拍照, 使用 Image J 进行数据分析。

### 1.2.7 统计分析

采用 Image J 1.52a 软件进行荧光强度分析, 采用 SPSS 22.0 软件进行单因素方差分析 (ANOVA), 数据以平均值±SD 表示, P<0.05 为具有统计学差异。

## 2 结果 (Results)

### 2.1 细胞活力检测

作为国际癌症研究机构确定的一种致癌 PAHs, 已有多项研究报道苯并[a]芘能降低细胞活力 (表 2)。根据细胞培养条件、处理时间和细胞种类的差异, 苯并[a]芘抑制细胞活力的浓度范围为 1~50 μmol·L<sup>-1</sup> (表 2)。然而, Sirenko 等<sup>[11]</sup>通过钙黄绿素-乙酰甲酯 (Calcein-AM) 信号检测发现, 低浓度的苯并[a]芘 (1 μmol·L<sup>-1</sup>) 能增加 hiPSC-CM 细胞活力, 而高浓度 (10 μmol·L<sup>-1</sup>) 时则降低细胞活力; An 等<sup>[12]</sup>研究发现, 苯并[a]芘对 LO2 细胞活力没有影响。因此, 苯并[a]芘对不同细胞毒性可能存在不同。作为具有非增殖特征的新型细胞模型, 苯并[a]芘处理 hESC-CM 后, 并未改变其细胞活力。此外, 1-羟基芘对 hESC-CM 的活力也没有显著影响。

### 2.2 苯并[a]芘和 1-羟基芘诱导 ROS 的产生

通过 DCFH-DA 检测了苯并[a]芘和 1-羟基芘处理后 hESC-CM 内的 ROS 水平。处理 48 h 后, 50 μmol·L<sup>-1</sup> 的高浓度 1-羟基芘能够显著诱导 hESC-CM 内 ROS 的产生, 但低浓度 1-羟基芘 (5 和 25 μmol·L<sup>-1</sup>) 对 ROS 的产生无显著影响 (图 1(a))。但对于苯并[a]芘, hESC-CM 内的 ROS 水平呈现明显

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

基因 Gene	引物 Primer
GAPDH	F 5'-ACAACCTTGGTATCGTGAAGG-3'
	R 5'-GCCATCACGCCACAGTTTC-3'
bad	F 5'-CCAGAGTTTGAGCCGAGTG-3'
	R 5'-CCCATCCCTTCGTCTCCT-3'
bax	F 5'-CCCAGAGGTCCTTTTCCGAG-3'
	R 5'-CCAGCCATGATGGTCTGAT-3'
Bcl-2	F 5'-GGTGGGGTCATGTGTGTGG-3'
	R 5'-CGGTTCCAGGTACTCAGTCATCC-3'
CYP1A1	F 5'-TCGGCCACGGAGTTTCTTC-3'
	R 5'-GGTCAGCATGTGCCAATCA-3'

的剂量-反应关系(图 1(b)), 这与已有报道结果相一致<sup>[15,18]</sup>。10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的苯并[a]芘能显著增加 hESC-

CM 内的 ROS 水平, 表明对于 hESC-CM, 苯并[a]芘诱导 ROS 的能力强于 1-羟基芘。

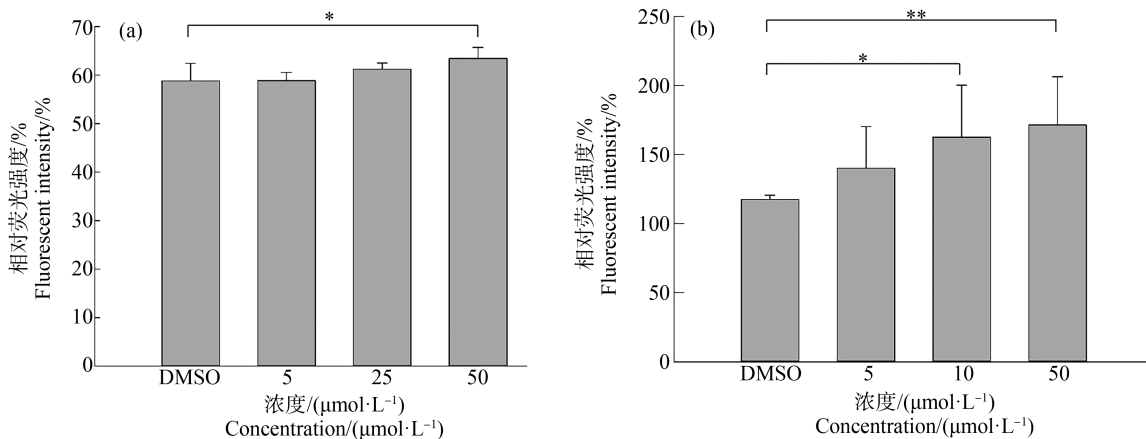


图 1 在 hESC-CM 中 1-羟基芘 (a) 和苯并[a]芘 (b) 诱导活性氧 (ROS) 的生成水平

注: DMSO 表示二甲基亚砜, \* 表示  $P<0.05$ , \*\* 表示  $P<0.01$ 。

Fig. 1 The reactive oxygen species (ROS) production induced by 1-hydroxypyrene (a) and benzo[a]pyrene (b) in hESC-CM

Note: DMSO stands for dimethyl sulfoxide, \* represents  $P<0.05$ , \*\* represents  $P<0.01$ .

表 2 苯并[a]芘对细胞活性的影响

Table 2 The cell activity under benzo[a]pyrene treatment

细胞类型 Cell type	苯并[a]芘浓度/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})^{\#}$ Benzo[a]pyrene concentration/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})^{\#}$	作用时间/h Time/h	检测方法 Method	活力 Activity	参考文献 Reference
hiPSC-CM	1;10	24	Calcein-AM	增加;降低 Increase; Decrease	[11]
L02 细胞 L02 cells	50	2	MTT	无变化 No change	[12]
血细胞 Haemocytes	40 <sup>&amp;</sup>	1	XTT	降低 Decrease	[13]
BEAS-2B 细胞 BEAS-2B cells	5	24,48	MTT	降低 Decrease	[14]
HL-7702 细胞 HL-7702 cells	20	24,48	MTT	降低 Decrease	[15]
HepG2 细胞 HepG2 cells	3.24 <sup>*</sup>	72	MTT	降低 Decrease	[16]
A549 细胞 A549 cells	32,64;16,32,64	24;72	MTT	降低 Decrease	[17]
hESC-CM	$\geq 50$	24	PrestoBlue	无变化 No change	本研究 This study

注: Calcein-AM 表示钙黄绿素-乙酰甲酯, MTT 表示 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐, XTT 表示 2,3-双(2-甲氧基-4-硝基-5-磺酸苯基)-5-[(苯基氨基)羰基]-2H-氢氧化四唑, PrestoBlue 表示基于刃天青的即用型溶液;#, 与对照组相比, 细胞活力有统计学差异 ( $P<0.05$ ); \*, 50% 抑制效应浓度 ( $\text{IC}_{50}$ ); <sup>&</sup>, 单位为  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

Note: Calcein-AM stands for Calcein acetoxyethyl ester; MTT stands for 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide; XTT stands for 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide; PrestoBlue is a ready to use cell permeable resazurin-based solution; #, compared with the control group, there were statistically significant differences in cell activity; \*, 50% inhibitory concentration ( $\text{IC}_{50}$ ); <sup>&</sup>, the unit is  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

### 2.3 线粒体凋亡基因的表达

*Bcl-2*、*bad* 和 *bax* 是细胞内重要的凋亡相关基因,在线粒体凋亡中发挥重要作用。苯并[a]芘作用 hESC-CM 后,诱导了 *bad* 的表达( $P=0.05$ )(图 2(a)),表明苯并[a]芘能够诱导 hESC-CM 凋亡,这与已有研究报道相符<sup>[19]</sup>。1-羟基芘处理 hESC-CM 后,*Bcl-2* 和 *bad* 的表达都略有增加,但均无统计学差异(图

2(b))。1-羟基芘是芘的代谢物,而已有研究表明,芘是一种能刺激 ROS 产生的 PAH<sup>[20-21]</sup>。1-羟基芘处理对 hESC-CM 线粒体凋亡基因的表达无显著影响,提示催化芘转化为 1-羟基芘的关键酶——细胞色素 P450(CYP450)酶可能发挥了重要作用<sup>[22-23]</sup>,其可能催化芘转化为 1-羟基芘,降低了细胞的 ROS 水平,而 ROS 是线粒体凋亡基因表达的重要诱因之一。

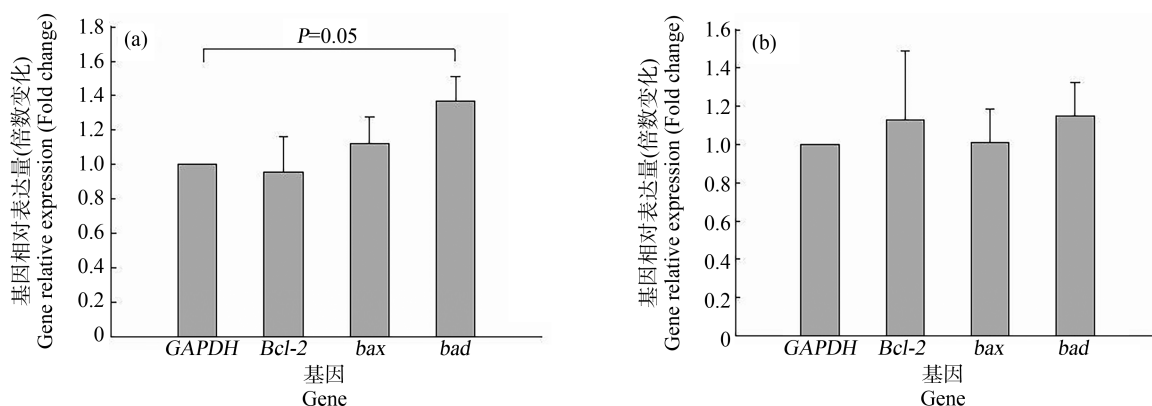


图 2 苯并[a]芘(a)和1-羟基芘(b)诱导hESC-CM线粒体凋亡相关基因表达

Fig. 2 hESC-CM apoptosis-related gene expression induced by benzo[a]pyrene (a) and 1-hydroxypyrene (b)

### 2.4 CYP 基因及蛋白表达水平

苯并[a]芘处理细胞 48 h 后,*CYP1A1* 的表达量与对照相比显著增加(图 3(a))。此外,尽管没有统计学差异,但 1-羟基芘暴露也增加了 hESC-CM 的 *CYP1A1* 表达量( $P>0.05$ ,图 3(b))。进一步通过免疫荧光实验检测了 *CYP1A1* 蛋白的表达水平,结果表明,苯并[a]芘和 1-羟基芘处理均能增加 *CYP1A1* 蛋白的表达(图 3(c)和(d)),与基因表达的结果相一致。

### 2.5 DNA 加合物检测

为了进一步分析苯并[a]芘和 1-羟基芘对 hESC-CM 的毒性作用,通过免疫荧光检测了细胞 DNA 加合物水平。结果表明,苯并[a]芘可以显著诱导 hESC-CM DNA 加合物的产生(图 4(a))。而作为 PAHs 在体内代谢的产物和人体 PAHs 暴露的检测标志物,1-羟基芘暴露也能导致 hESC-CM DNA 加合物的增加(图 4(b)),提示 1-羟基芘也存在诱导心肌细胞损伤的风险。

### 2.6 DNA 损伤检测

分析了苯并[a]芘和 1-羟基芘作用于 hESC-CM 后细胞 DNA 的损伤情况,结果如图 5 所示。与对照组相比, $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  苯并[a]芘增加了 hESC-CM 的 DNA 损伤水平( $P=0.05$ )。此外,虽然 1-羟基芘没

有显著诱导 DNA 损伤,但它具有增加 hESC-CM DNA 损伤的趋势( $P=0.06$ )。

## 3 讨论 (Discussion)

在心脏内,ROS 参与多种细胞信号传导途径,并在许多生物学过程中发挥重要作用。苯并[a]芘诱导细胞 ROS 的产生已被广泛报道<sup>[12,14]</sup>,但苯并[a]芘和 1-羟基芘是否诱导 hESC-CM 产生 ROS 尚不清楚。目前,仅有少量研究报道,1-羟基芘与急性心肌梗死氧化应激有关<sup>[24]</sup>。心肌细胞长期暴露于 ROS 会导致心律失常,缺血再灌注损伤,并通过诱导心脏肥大、坏死和纤维化导致心脏重塑<sup>[25-26]</sup>。此外,作为一种主要在线粒体中产生的自由基<sup>[25]</sup>,ROS 能够通过促进线粒体凋亡基因和 p53 蛋白的表达来诱导心肌细胞的凋亡<sup>[26-27]</sup>,因此,苯并[a]芘诱导 hESC-CM 线粒体凋亡基因 *bad* 的表达与 ROS 密切相关。

人体暴露于 PAHs 后,PAHs 会被人体内的代谢酶所代谢。其中,CYP 家族的主要功能是对内源性和外源性化合物进行转化<sup>[23]</sup>。目前,在哺乳动物 CYP 家族中已发现了几种参与 PAHs 代谢的基因。在这些基因中,*CYP1A1* 在苯并[a]芘的代谢中发挥重要作用。*CYP1A1* 在细胞和组织中普遍表达<sup>[28]</sup>,当细胞暴露于 PAHs 后会诱导 *CYP1A1* 的表达(图

3)。通常, *CYP1A1* 催化苯并[a]芘转化为苯并[a]芘-7,8-环氧化物,其能迅速代谢为苯并[a]芘-7,8-二氢二醇,然后被 *CYP1A1* 进一步活化产生苯并[a]芘-7,8-二氢二醇-9,10-环氧化物(BPDE), PAHs 的毒性主要反映在体内氧化酶的代谢产物中。由 PAHs 产生的代谢物可以进一步与 DNA 反应,形成 BPDE-DNA

加合物(图4),导致基因 DNA 序列中 G 到 T 的碱基突变<sup>[29]</sup>,促进细胞突变和 DNA 损伤(图5)。心肌细胞 DNA 损伤的积累能诱导 DNA 损伤反应的持续激活<sup>[30]</sup>,导致炎性细胞因子的表达增加,进而引发压力超负荷引起的心力衰竭的发生发展<sup>[31]</sup>。此外, DNA 损伤还与细胞衰老密切相关,心肌细胞衰老能

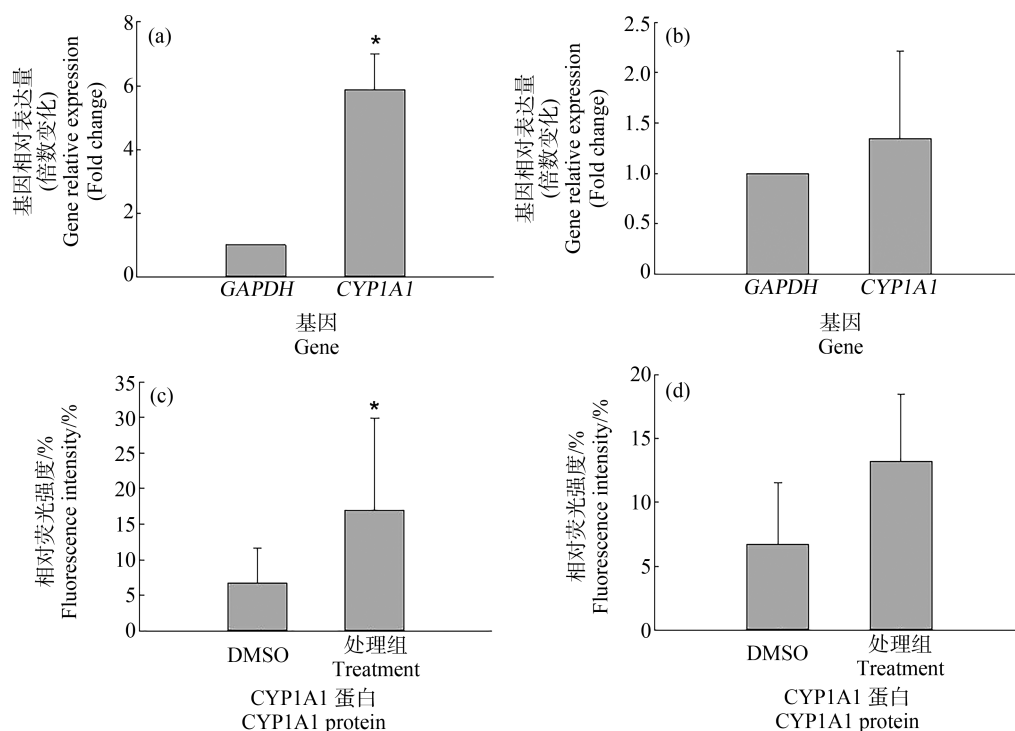


图3 苯并[a]芘和1-羟基芘诱导 hESC-CM CYP1A1 基因和蛋白的表达

注:(a)和(b)为苯并[a]芘和1-羟基芘处理后基因的表达,(c)和(d)为苯并[a]芘和1-羟基芘处理后蛋白的表达;\*表示  $P < 0.05$ 。

Fig. 3 The gene and protein expression of CYP1A1 in hESC-CM induced by benzo[a]pyrene and 1-hydroxypyrene

Note: (a) and (b), gene expression after benzo[a]pyrene and 1-hydroxypyrene treatment; (c) and (d), protein expression after benzo[a]pyrene and 1-hydroxypyrene treatment; \* represents  $P < 0.05$ .

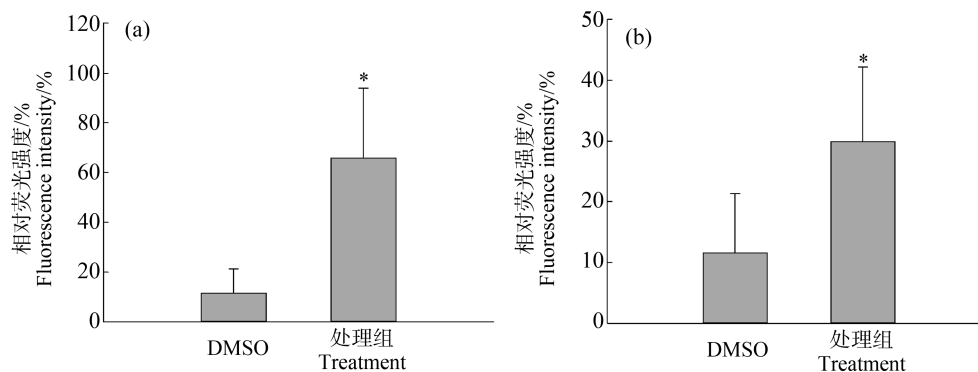


图4 苯并[a]芘(a)和1-羟基芘(b)诱导 DNA 加合物的产生

注:\*表示  $P < 0.05$ 。

Fig. 4 DNA adducts induced by benzo[a]pyrene (a) and 1-hydroxypyrene (b)

Note: \* represents  $P < 0.05$ .

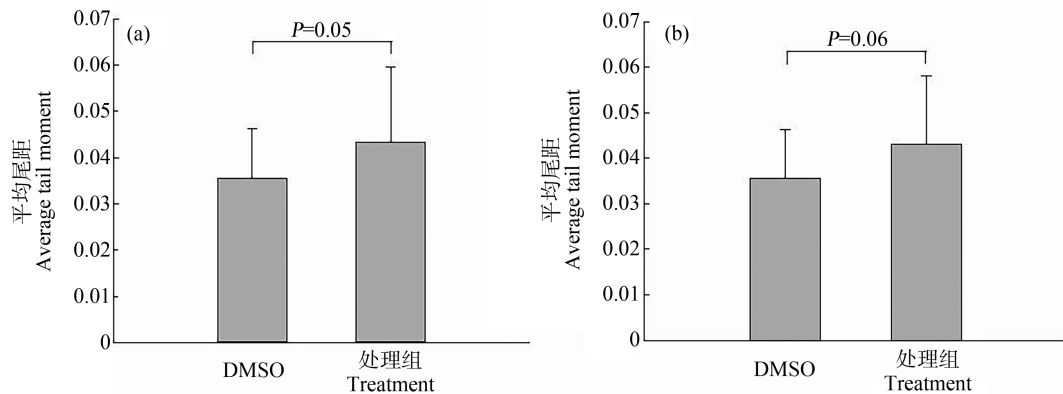


图5 苯并[a]芘(a)和1-羟基芘(b)诱导hESC-CM DNA损伤

Fig. 5 DNA damage of hESC-CM induced by benzo[a]pyrene (a) and 1-hydroxypyrene (b) respectively

促进心血管疾病的发生<sup>[32]</sup>,在衰老和心力衰竭中已观察到异常的心肌变化<sup>[32-33]</sup>。

总之,PAHs与心脏疾病密切相关,本研究基于hESC-CM模型研究了PAHs典型代表性物质苯并[a]芘和人体暴露后检测标志物1-羟基芘的心肌细胞毒性。结果表明,苯并[a]芘和1-羟基芘能导致hESC-CM细胞的氧化应激和DNA损伤。据笔者所知,目前尚未有基于hESC-CM的苯并[a]芘和1-羟基芘导致心肌细胞损伤的报道。因此,本研究在体外实验中首次直接证明了苯并[a]芘和1-羟基芘可以诱导人干细胞源心脏细胞损伤,这为PAHs暴露与心脏功能障碍关系的进一步研究夯实了理论基础。

致谢:感谢香港大学 Kenneth R. Boheler 教授、Ellen Ngar-yun Poon 助理教授及博士研究生 Stanley Chun-ming Wu 在实验中给予的帮助。

通讯作者简介:梁岩(1968—),女,环境科学博士,研究员,主要研究方向为环境污染物及消毒副产物的迁移、转化、降解和毒理。

#### 参考文献(References):

- [1] Burstyn I, Kromhout H, Partanen T, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons and fatal ischemic heart disease [J]. *Epidemiology*, 2005, 16(6): 744-750
- [2] Lee M S, Magari S, Christiani D C. Cardiac autonomic dysfunction from occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons [J]. *Occupational and Environmental Medicine*, 2011, 68(7): 474-478
- [3] Huang L, Gao D, Zhang Y, et al. Exposure to low dose benzo[a]pyrene during early life stages causes symptoms similar to cardiac hypertrophy in adult zebrafish [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2014, 276: 377-382
- [4] Huang L, Wang C, Zhang Y, et al. Benzo[a]pyrene exposure influences the cardiac development and the expression of cardiovascular relative genes in zebrafish (*Danio rerio*) embryos [J]. *Chemosphere*, 2012, 87(4): 369-375
- [5] Ang Y S, Rivas R N, Ribeiro A J S, et al. Disease model of GATA4 mutation reveals transcription factor cooperativity in human cardiogenesis [J]. *Cell*, 2016, 167 (7): 1734-1749
- [6] Zhang X, Chen S, Yoo S, et al. Mutation in nuclear pore component NUP155 leads to atrial fibrillation and early sudden cardiac death [J]. *Cell*, 2008, 135(6): 1017-1027
- [7] Pruneda-Álvarez L G, Pérez-Vázquez F J, Ruiz-Vera T, et al. Urinary 1-hydroxypyrene concentration as an exposure biomarker to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Mexican women from different hot spot scenarios and health risk assessment [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2016, 23(7): 6816-6825
- [8] Hao J N, Yan B. Determination of urinary 1-hydroxypyrene for biomonitoring of human exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons carcinogens by a lanthanide-functionalized metal-organic framework sensor [J]. *Advanced Functional Materials*, 2017, 27(6): 1603856
- [9] de Oliveira Galvão M F, de Queiroz J D F, de Souza Fernandes Duarte E, et al. Characterization of the particulate matter and relationship between buccal micronucleus and urinary 1-hydroxypyrene levels among cashew nut roasting workers [J]. *Environmental Pollution*, 2017, 220: 659-671
- [10] Ovchinnikova E, Hoes M, Ustyantsev K, et al. Modeling human cardiac hypertrophy in stem cell-derived cardiomyocytes [J]. *Stem Cell Reports*, 2018, 10(3): 794-807
- [11] Sirenko O, Grimm F A, Ryan K R, et al. *In vitro* cardiotoxicity assessment of environmental chemicals using an organotypic human induced pluripotent stem cell-derived

- model [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2017, 322: 60-74
- [12] An J, Yin L, Shang Y, et al. The combined effects of BDE47 and BaP on oxidatively generated DNA damage in L02 cells and the possible molecular mechanism [J]. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 2011, 721(2): 192-198
- [13] Gómez-Mendikute A, Etxeberria A, Olabarrieta I, et al. Oxygen radicals production and actin filament disruption in bivalve haemocytes treated with benzo(a)pyrene [J]. *Marine Environmental Research*, 2002, 54(3-5): 431-436
- [14] Zhu W, Cromie M M, Cai Q, et al. Curcumin and vitamin E protect against adverse effects of benzo[a]pyrene in lung epithelial cells [J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e92992
- [15] Yuan L, Liu J, Deng H, et al. Benzo[a]pyrene induces autophagic and pyroptotic death simultaneously in HL-7702 human normal liver cells [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017, 65(44): 9763-9773
- [16] Stepnik M, Spryszyńska S, Smok-Pieniazek A, et al. The modulating effect of ATM, ATR, DNA-PK inhibitors on the cytotoxicity and genotoxicity of benzo[a]pyrene in human hepatocellular cancer cell line HepG2 [J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2015, 40(3): 988-996
- [17] Wang Y, Zhai W, Wang H, et al. Benzo(a)pyrene promotes A549 cell migration and invasion through up-regulating Twist [J]. *Archives of Toxicology*, 2015, 89(3): 451-458
- [18] Kim S M, Lee H M, Hwang K A, et al. Benzo(a)pyrene induced cell cycle arrest and apoptosis in human chorionic carcinoma cancer cells through reactive oxygen species-induced endoplasmic reticulum-stress pathway [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2017, 107: 339-348
- [19] Zhang H M, Nie J S, Li X, et al. Characteristic analysis of peripheral blood mononuclear cell apoptosis in coke oven workers [J]. *Journal of Occupational Health*, 2012, 54(1): 44-50
- [20] Yin G, Wang X, Sun Y, et al. Bioaccumulation and oxidative stress in submerged macrophyte *Ceratophyllum demersum* L. upon exposure to pyrene [J]. *Environmental Toxicology*, 2008, 23(3): 328-336
- [21] Yin Y, Jia J, Guo H Y, et al. Pyrene-stimulated reactive oxygen species generation and oxidative damage in *Carassius auratus* [J]. *Journal of Environmental Science and Health. Part A, Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering*, 2014, 49(2): 162-170
- [22] Shimada T, Takenaka S, Murayama N, et al. Oxidation of pyrene, 1-hydroxypyrene, 1-nitropyrene and 1-acetylpyrene by human cytochrome P450 2A13 [J]. *Xenobiotica*, 2016, 46(3): 1-14
- [23] Zapata-Pérez O, Gold-Bouchot G, Ortega A, et al. Effect of pyrene on hepatic cytochrome P450 1A (CYP1A) expression in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2002, 42(4): 477-485
- [24] Freitas F, Brucker N, Durgante J, et al. Urinary 1-hydroxypyrene is associated with oxidative stress and inflammatory biomarkers in acute myocardial infarction [J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2014, 11(9): 9024-9037
- [25] Chen Y R, Zweier J L. Cardiac mitochondria and reactive oxygen species generation [J]. *Circulation Research*, 2014, 114(3): 524-537
- [26] Giordano F J. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure [J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2005, 115(3): 500-508
- [27] von Harsdorf R, Li P F, Dietz R. Signaling pathways in reactive oxygen species-induced cardiomyocyte apoptosis [J]. *Circulation*, 1999, 99(22): 2934-2941
- [28] Shiizaki K, Kawanishi M, Yagi T. Modulation of benzo[a]pyrene-DNA adduct formation by CYP1 inducer and inhibitor [J]. *Genes and Environment*, 2017, 39(1): 14
- [29] Willis A J, Indra R, Wohak L E, et al. The impact of chemotherapeutic drugs on the CYP1A1-catalysed metabolism of the environmental carcinogen benzo[a]pyrene: Effects in human colorectal HCT116 TP53 (+/+), TP53 (+/-) and TP53 (-/-) cells [J]. *Toxicology*, 2018, 398-399: 1-12
- [30] Bersell K, Choudhury S, Mollova M, et al. Moderate and high amounts of tamoxifen in MHC-MerCreMer mice induce a DNA damage response, leading to heart failure and death [J]. *Disease Models & Mechanisms*, 2013, 6(6): 1459-1469
- [31] Higo T, Naito A T, Sumida T, et al. DNA single-strand break-induced DNA damage response causes heart failure [J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 15104
- [32] Minamino T, Komuro I. Vascular cell senescence: Contribution to atherosclerosis [J]. *Circulation Research*, 2007, 100(1): 15-26
- [33] Dong R, Xu X, Li G, et al. Bradykinin inhibits oxidative stress-induced cardiomyocytes senescence via regulating redox state [J]. *PLoS One*, 2013, 8(10): e77034 ◆