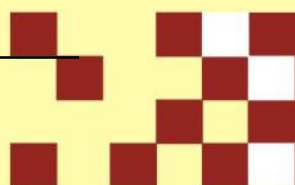


分类号 TS201.4

密 级 公开

学 号 192247



陕西师范大学
SHAANXI NORMAL UNIVERSITY

硕 士 学 位 论 文

(学 术 型)

题 目 苯并(a)芘诱发 Caspase-1 依赖性肝细胞焦亡
的毒性机制及全谷物饮食的干预作用

作 者 李浩

指 导 教 师 袁莉 副教授

一级学科名称 食品科学与工程

二级学科名称 食品科学

提 交 日 期 二〇二二年六月

摘要

苯并(a)芘 (Benzo[a]pyrene, BaP) 广泛存在于高温加工食品中, 是威胁人体健康的主要食品有害物之一。研究发现, BaP 可通过诱发细胞焦亡损伤肝脏组织, 但相关分子机制尚不清楚。全谷物 (Whole Grains, WG) 不仅含有丰富、全面的营养成分, 而且对预防肥胖、血脂异常和炎症具有重要意义。但是, 全谷物饮食对 BaP 诱发肝脏焦亡性损伤的干预作用未见报道。因此, 本论文深入揭示了 BaP 诱发 Caspase-1 依赖性肝细胞焦亡的毒性机制, 并研究了全谷物荞麦 (Whole Grain Buckwheat, WGB) 与全谷物燕麦 (Whole Grain Oat, WGO) 对 BaP 暴露下小鼠肝脏焦亡性损伤的干预作用。研究结果如下:

1、BaP 可降低 HL-7702 人肝细胞活力, 减小细胞体积, 使细胞长期停滞于 S 期, M 期数量骤减, 进而抑制细胞的正常生长增殖。同时, BaP 可促进细胞 LDH 释放, NO 含量、相对电导率、IL-18、IL-1 β 等焦亡特征指标升高, 上调 Caspase-1、GSDMD-N 等焦亡特征蛋白表达, 诱使 GSDMD-N 寡聚化在细胞膜上形成孔洞, 造成细胞发生焦亡性损伤。Caspase-1 抑制剂 Z-VAD-FMK 可抑制 BaP 导致的细胞活力降低、炎症因子和焦亡特征性蛋白高表达, 表明 BaP 可诱发 Caspase-1 依赖性肝细胞焦亡。

2、采用 Mito-TEMPO (mtROS 抑制剂), NAC (总 ROS 抑制剂), PDTC (NF- κ B 抑制剂), MCC950 (NLRP3 炎症小体抑制剂) 分别作用于 ROS、NF- κ B、NLRP3 炎症小体等靶点。结果发现, 与 BaP 组相比, 抑制剂和 BaP 共同处理组可以提高细胞活力, 减少死亡细胞数目, 降低 LDH 释放率、NO 含量和相对电导率水平。同时, Mito-TEMPO、NAC、PDTC、MCC950 预处理可抑制 BaP 诱发的 NF- κ B、NLRP3、ASC、Caspase-1、GSDMD、TNF- α 、IL-1 β 、IL-18 等焦亡特征性蛋白高表达。表明 BaP 通过 ROS/NF- κ B/NLRP3 信号通路诱发 Caspase-1 依赖性肝细胞焦亡。

3、6 周龄健康雄性 Balb/c 小鼠灌胃 50 mg/kg·bw BaP, 同时饲喂 WGB 或 WGO 饲料。结果发现, 与 BaP 组相比, WGB、WGO 干预可显著提高小鼠体重, 降低血清 AST、ALT、TC、TG 水平, 表明摄入 WGB 和 WGO 可缓解 BaP 诱发的肝脏功能紊乱; 同时, WGB 和 WGO 通过降低 AhR、CYP1A1、CYP1B1、GST-P1 mRNA 表达, 抑制 BPDE-DNA 加合物生成, 增强 GSH-Px 和 SOD 酶活性, 降低 H₂O₂ 和 MDA 水平, 进而抑制 BaP 诱发的肝脏 DNA 损伤和氧化损伤; 并通过下调 NLRP3、ASC、Caspase-1、GSDMD、TNF- α 、IL-1 β 、IL-18、INOS、COX-2 等焦亡特征指

标的 mRNA 表达，降低 BaP 诱发的肝脏焦亡性损伤。此外，WGB、WGO 也可以促进短链脂肪酸生成，升高拟杆菌门（*Bacteroidetes*）丰度，降低厚壁菌门（*Firmicutes*）、疣微菌门（*Verrucomicrobia*）、变形菌门（*Proteobacteria*）丰度，进而改善 BaP 诱发的肠道菌群失调。

本论文深入探究了 BaP 诱发肝脏细胞焦亡的分子机制，并系统分析了全谷物饮食对 BaP 暴露下小鼠肝脏损伤的干预作用，为充分揭示 BaP 毒性及其危害控制提供理论依据。

关键词：苯并(a)芘；全谷物；细胞焦亡；肝脏损伤

Abstract

Benzo(a)pyrene (BaP) widely exists in high-temperature processed foods, which is one of the main food hazards threatening human health. It has been reported in the previous studies that long-term intake of BaP can induce pyroptotic injury in the liver tissue, but the related toxic mechanism is still unclear. Whole Grains (WG) not only contain rich and comprehensive nutrients, but also have great significance in preventing obesity, dyslipidemia and inflammation. However, the effect of whole grain diet on BaP-induced hepatic pyroptotic tissue injury has not been reported. Therefore, this thesis deeply reveals the toxic mechanism of Caspase-1-dependent pyroptosis induced by BaP, and studies the intervention effects of Whole Grain Buckwheat (WGB) and Whole Grain Oat (WGO) on liver pyroptotic injury in mice exposed to BaP.

The results were as follows:

1. The addition of BaP reduced cell viability and cell volume, making cells stagnate for a long time in S phase and the number in M phase decrease sharply, which is not conducive to the normal growth and proliferation of cells. At the same time, it could promote the release rate of LDH, NO content, relative conductivity and other indicators to increase, enhance the expression of inflammatory factor proteins such as IL-18 and IL-1 β and pyroptosis characteristic proteins such as Caspase-1 and GSDMD-N, and induce the oligomerization of GSDMD-N to form holes on the cell membrane, resulting in pyroptotic damage to the cells. After intervention with the Caspase-1 inhibitor Z-VAD-FMK, we found that the cell viability, release of inflammatory factors, and expression of pyroptosis characteristic proteins were significantly improved, proving that BaP-induced cellular pyroptotic injury was achieved through the classical pathway dependent by Caspase-1.

2. Mito-TEMPO (mtROS scavenger) and NAC (Total ROS Scavenger), PDTC (NF- κ B inhibitor) and MCC950 (NLRP3 inflammasome inhibitor) were used to act on such targets as ROS, NF- κ B and NLRP3 inflammasome, respectively. The results showed that compared with BaP group, cell viability was increased and the number of dead cells was decreased. The released rate of LDH, NO content and relative conductivity level were decreased, and the expression of pyroptosis characteristic

protein was inhibited, which indicated that inhibition of ROS/NF- κ B/NLRP3 signaling pathway could reduce BaP-induced Caspase-1-dependent pyroptotic injury in cells.

3. Six-week healthy male Balb/c mice were given 50 mg/kg·bw BaP orally, and at the same time, WGB or WGO feed was used for intervention. The results showed that compared with BaP group, the mice ingested WGB and WGO gained weight, improved appetite, decreased AST, ALT, TC and TG, which indicated that WGB and WGO could alleviate the liver function damage induced by BaP. At the same time, WGB and WGO reduce the expression of CYP1A1, CYP1B1, GST-P1 and AhR, and the synthesis of BPDE-DNA adduct to inhibit the transformation of BaP into toxic active metabolites in the liver, up-regulate the levels of GSH-Px and SOD, and down-regulate the levels of H₂O₂ and MDA, thus alleviating the DNA damage and liver oxidative damage induced by BaP. WGB and WGO could also reduce the liver pyroptotic injury induced by BaP by inhibiting the mRNA expression of pyroptosis related factors (NLRP3, ASC, Caspase-1, GSDMD, TNF- α , IL-1 β , IL-18, INOS, COX-2). In addition, WGB and WGO can also promote the formation of short-chain fatty acids, increase the abundance of *Bacteroides*, and reduce the abundance of *Firmicutes*, *Verrucomicrobia* and *Proteobacteria*, thus improving the imbalance of intestinal flora induced by BaP.

In this paper, the molecular mechanism of BaP-induced pyroptosis of liver cells was deeply explored, and in-depth studied the effect of whole grain diet on liver tissue damage in mice exposed to BaP, to provide theoretical support for the control of BaP toxicity in the future.

Key words: Benzo[a]pyrene, Whole Grain, Pyroptosis, Liver injury

英文缩略语表
List of abbreviation

缩写	英文全称	中文译名
BaP	Benzo[a]pyrene	苯并(a)芘
WGB	Whole Grain Buckwheat	全谷物荞麦
WGO	Whole Grain Oat	全谷物燕麦
ALT	Alanine aminotransferase	丙氨酸转氨酶
AST	Aspartate aminotransferase	天冬氨酸转氨酶
TC	Total cholesterol	总胆固醇
TG	Total triglyceride	总甘油三酯
H ₂ O ₂	Hydrogen peroxide	过氧化氢
MDA	Malondialdehyde	丙二醛
GSH-Px	Glutathione peroxidase	谷胱甘肽过氧化物酶
SOD	Superoxide dismutase	超氧化物歧化酶
BPDE	Benzo(a)pyrene 7,8-dihydrodiol 9,10-epoxies	苯并(a)芘 7,8-二氢二醇 9,10-环氧化物
AhR	Aryl Hydrocarbon Receptor	芳香烃受体
SCFAs	Short-chain fatty acids	短链脂肪酸
ASC	apoptosis associated speck-like protein containing a CARD	凋亡相关斑点样蛋白
NLRP3	NLR family pyrin domain-containing 3	NLRP3 炎性小体
ROS	Reactive oxygen species	活性氧
LDH	Lactate dehydrogenase	乳酸脱氢酶

目 录

第一章 绪论.....	1
1.1 苯并(a)芘(BaP)研究现状.....	1
1.1.1 苯并(a)芘(BaP)的结构与性质	1
1.1.2 食品中苯并(a)芘的来源	1
1.1.3 苯并(a)芘的危害	2
1.2 细胞焦亡概述.....	3
1.2.1 细胞焦亡的概念	3
1.2.2 细胞焦亡的特点	4
1.2.3 细胞焦亡途径.....	5
1.2.4 苯并(a)芘对细胞焦亡的影响	6
1.3 全谷物概述.....	6
1.3.1 全谷物概念.....	6
1.3.2 全谷物种类.....	7
1.3.3 全谷物饮食的功能.....	7
1.4 本论文研究目的及内容.....	8
1.4.1 研究目的	8
1.4.2 研究内容	9
第二章 苯并(a)芘诱发 Caspase-1 依赖性肝细胞焦亡	11
2.1 引言.....	11
2.2 材料与仪器.....	11
2.2.1 细胞株.....	11
2.2.2 主要试剂.....	11
2.2.3 试验设备	13
2.3 试验方法.....	13
2.3.1 MTT 细胞活力测定	13
2.3.2 细胞形态观察.....	14
2.3.3 细胞周期检测.....	14
2.3.4 LDH 测定.....	14
2.3.5 NO 测定	14
2.3.6 相对电导率测定	15
2.3.7 细胞焦亡特征蛋白表达测定.....	15
2.3.8 膜孔观察	16
2.3.9 Caspase-1 活力检测	16
2.3.10 统计分析.....	17

2.4 结果与分析.....	17
2.4.1 不同浓度 BaP 对肝细胞活力的影响	17
2.4.2 不同浓度 BaP 对肝细胞形态的影响	18
2.4.3 不同浓度 BaP 对肝细胞周期的影响	18
2.4.4 不同浓度 BaP 对细胞焦亡特征指标的影响	19
2.4.5 Caspase-1 抑制剂对 BaP 处理的肝细胞活力的影响	22
2.4.6 Caspase-1 抑制剂对 BaP 诱发的细胞焦亡特征指标的影响	23
2.5 本章小结.....	25
第三章 苯并(a)芘诱发 Caspase-1 依赖性肝细胞焦亡的机理	27
3.1 引言.....	27
3.2 材料与仪器.....	27
3.2.1 细胞株.....	27
3.2.2 主要试剂及相关药品.....	28
3.2.3 试验设备	29
3.3 试验方法.....	30
3.3.1 MTT 细胞活力测定	30
3.3.2 LDH 测定.....	30
3.3.3 NO 测定	30
3.3.4 相对电导率测定	30
3.3.5 Caspase-1 活力检测	30
3.3.6 细胞焦亡特征蛋白表达测定.....	30
3.3.7 NF- κ B 核易位检测.....	30
3.3.8 活性氧检测	31
3.3.9 统计分析	31
3.4 结果与分析.....	32
3.4.1 NLRP3 抑制剂对 BaP 处理的肝细胞活力的影响.....	32
3.4.2 NLRP3 抑制剂对 BaP 诱发的细胞焦亡特征指标的影响...	32
3.4.3 NF- κ B 抑制剂对 BaP 处理的肝细胞活力的影响.....	34
3.4.4 NF- κ B 抑制剂对 BaP 诱发的 NLRP3 和细胞焦亡特征指标的影响	35
3.4.5 ROS 抑制剂对 BaP 处理的肝细胞活力的影响	36
3.4.6 ROS 抑制剂对 BaP 诱发的 NF- κ B、NLRP3 炎症小体和焦亡特征指标的影响	37
3.5 本章小结.....	39
第四章 全谷物饮食对苯并(a)芘诱发小鼠肝脏焦亡性损伤的干预作用	41
4.1 引言	41

4.2 材料与仪器.....	42
4.2.1 主要试剂.....	42
4.2.2 试验设备.....	43
4.3 试验方法.....	43
4.3.1 饲料.....	43
4.3.2 动物试验设计.....	44
4.3.3 小鼠体重、摄食量、摄水量测定.....	45
4.3.4 血清中 ALT、AST、TC、TG 的测定.....	45
4.3.5 肝脏病理学观察.....	45
4.3.6 肝脏中 BaP 代谢酶、BPDE-DNA 加合物的测定.....	46
4.3.7 肝脏中 H ₂ O ₂ 、MDA、GSH-Px、SOD 的测定.....	46
4.3.8 肝脏中炎症因子及焦亡因子的 mRNA 表达量测定.....	46
4.3.9 粪便短链脂肪酸的测定.....	48
4.3.10 粪便 16S rDNA 扩增子测序.....	49
4.3.11 数据统计分析.....	49
4.4 结果与分析.....	50
4.4.1 全谷物饮食对 BaP 暴露后小鼠摄食量、摄水量、体重的影响.....	50
4.4.2 全谷物饮食对 BaP 诱发的小鼠肝功能紊乱的影响.....	51
4.4.3 全谷物饮食对肝脏 BaP 代谢的影响.....	53
4.4.4 全谷物饮食对 BaP 诱发的小鼠肝脏氧化损伤的影响.....	54
4.4.5 全谷物饮食对 BaP 诱发的小鼠肝脏焦亡性损伤的影响.....	55
4.4.6 全谷物饮食对 BaP 暴露后小鼠粪便短链脂肪酸的影响.....	56
4.4.7 全谷物饮食对 BaP 暴露后小鼠肠道菌群的影响.....	57
4.5 本章小结.....	59
第五章 结论与展望.....	61
5.1 结论.....	61
5.2 创新点.....	61
5.3 展望.....	62
参考文献.....	63

第一章 绪论

1.1 苯并(a)芘 (BaP) 研究现状

1.1.1 苯并(a)芘 (BaP) 的结构与性质

苯并(a)芘 (Benzo[a]pyrene, BaP) 是五个稠环组成的有机物, 是一种典型的多环芳香烃类物质, 可在环境和生物群中长期存在、远距离迁移, 并对生物产生毒性作用^[1,2]。BaP 主要通过对机体的正常生长、存活和发育的一系列诱变, 表现出遗传毒性、致癌和致畸作用^[3-4]。BaP 相对分子量约为 252.3, 分子式为 $C_{20}H_{12}$, 化学结构见图 1-1。在常温条件下, BaP 呈淡黄色, 以晶体形式存在。其熔点、沸点分别为 179℃、312℃, 另外, BaP 不溶于水, 微溶于乙醇, 易溶于苯、甲苯等^[5]。

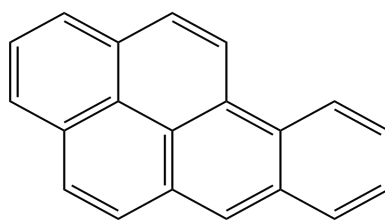


图 1-1 苯并(a)芘化学结构式

Figure. 1-1 Chemical structural formula of BaP

1.1.2 食品中苯并(a)芘的来源

BaP 是有机物不完全燃烧过程中形成的有机致癌物。目前食品中 BaP 的主要来源包括: (1) 环境中的 BaP 对食品原材料的污染: 人类大量工业活动催生的 BaP 经过大自然循环, 进一步污染河流、土壤等, 最终影响环境水土食品的安全性。受到污染的水土食品成为 BaP 的主要来源之一^[6], 摄入 BaP 污染的食品原材料对人体健康造成严重威胁; (2) 食品高温加工过程产生 BaP: 食物原材料中的有机物在烧烤、熏制等加工操作下发生高温裂解反应, 最终造成 BaP 污染物的产生。有研究表明, 食品焦糊前后 BaP 含量相差 10 倍以上^[7]。改善食品加工中烹饪条件是减少 BaP 生成量的重要措施, 应尽可能采取蒸、煮等烹饪条件对食物原材料进行加工处理^[8]。

1.1.3 苯并(a)芘的危害

1.1.3.1 DNA 损伤

由于 BaP 自身在体内的代谢活化具有很强的积极性, 因此对机体造成的 DNA 损伤很严重^[9]。细胞色素 P450-1A1 (CYP1A1) 和微粒体环氧化物水解酶 (mEH) 被认为是参与 BaP 生物活化并能够与 DNA 结合生成高活性衍生物的过程中最重要的酶^[10]。据报道 BaP 进入人体后自身可以结合并激活芳香烃受体 (AhR), AhR 的上调可以促进代谢 BaP 的 CYP 酶 (CYP1A1 和 CYP1B1) 的表达量升高, 从而增强自身的代谢活性^[11,12]。同时, BaP 被 CYP 酶氧化, 并诱发多种 BaP 代谢产物转变, 形成 DNA 加合物^[13,14]。DNA 氧化性损伤以及 DNA 加合物形成后, 会导致 DNA 双链断裂, 进而引发染色体畸变和癌变。

表观遗传变化是 BaP 产生 DNA 损伤的机制之一。BaP 的主要作用机制包括: (1) 产生稳定的脱嘌呤 DNA 加合物; (2) 产生活性氧的重复氧化还原循环; (3) AhR 的激活; (4) 免疫抑制以及不同的表观变化^[15]。BaP 等致癌物干扰表观遗传过程的能力是癌症发展的原因之一, 并已经在体外和体内以及流行病学研究中得到证实。

抑制 BaP 诱发的 DNA 损伤与两个因素有关: (1) 降低 CYP1A1 表达影响 BaP 代谢; (2) 增强 GST 表达消除 BaP 代谢产物。Jee 等研究结果表明杨梅素的加入可以抑制 BaP 转化为 BaP 代谢物和 BaP 与 DNA 结合的代谢物, 从而抑制 8-OHdG 和 BPDE-DNA 加合物的形成, 对 BaP 诱发的 DNA 损伤具有保护作用^[16]。Stiborová 等发现, 17 α -炔雌醇、雌二醇和 BaP 联合作用大鼠时, CYP1A1 酶参与 BaP 诱发 DNA 损伤这一过程, 并受雌二醇及其合成衍生物 17 α -炔雌醇的调控^[17]。

1.1.3.2 氧化损伤

He 等^[18]提出 BaP 可诱导细胞氧化应激和炎症的血管内皮细胞损伤。BaP 通过产生活性氧 (ROS)、干扰抗氧化酶活性、降低非酶促抗氧化剂的水平以及促进细胞因子产生来诱导氧化应激。自由基机制是 BaP 诱导细胞氧化应激的主要机制之一。ROS 是由几种内源性和外源性过程产生的, 它们的负面作用被抗氧化剂防御所中和。氧化应激产生于 ROS 产生和清除之间的不平衡。氧化应激在许多疾病中起着重要作用, 包括动脉粥样硬化、慢性阻塞性肺病、阿尔茨海默病和癌症。研究表明, 一方面 BaP 通过改变过氧化氢、超氧阴离子和脂质过氧化物水平诱导 ROS 的产生。另一方面 BaP 增加脂质过氧化, 诱导 NF- κ B 活化, 降低抗氧化酶活性, 激活 CYP450 和 GST 代谢酶。Lin 等^[19]研究发现, BaP 处理显著增强氧化应

激,降低 CAT mRNA 的表达,增强 SOD mRNA 的表达,这些转录变化与胚胎 H_2O_2 和 MDA 水平的升高相一致。另外, BaP 处理后的鱼与 120 M H_2O_2 处理后的鱼胚胎的水平相似。Ji 等人^[20]评价了不同浓度(10、20 和 50 mol/L)的 BaP 对从脐血中分离的人内皮祖细胞(EPCs)的功能和促炎症反应的影响。他们发现 BaP 处理能显著抑制体外培养的内皮祖细胞的增殖、迁移、粘附和血管生成,并诱导白细胞介素-1 β (IL-1 β)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等炎症因子大量释放。此外, BaP 可以促进 EPCs 细胞中 ROS 的产生和 NF- κ B 的激活,ROS 和 NF- κ B 可能与炎症因子释放相关联。

减缓 BaP 诱发的氧化损伤措施包括:(1)在 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 与 NO $\cdot$ 反应形成 ONOO $\cdot$ 之前,除去 $\text{O}_2^{\cdot-}$;(2)在 H_2O_2 能够形成 OH 或 HO $_x$ 之前,除去 H_2O_2 ;(3)提高谷胱甘肽(GSH)水平;(4)通过活化 Nrf2 信号通路,影响抗氧化酶合成的变化;(5)抑制一氧化氮合酶活化;(6)线粒体抗氧化防御;(7)补充膳食抗氧化剂;(8)抑制氧化还原的异常信号^[21]。

1.1.3.3 肠道菌群失调

肠道微生物群在包括人类在内的所有动物的健康和疾病发病中发挥着重要作用。肠道微生物群的生态失调可以指示宿主的健康状况,并潜在地反映宿主所处的环境质量,因为肠道微生物群很容易被有毒化学化合物扰乱^[22-24]。例如,暴露于苯并(a)芘(BaP)的日本刺参表现出肠道微生物群的转变;暴露的海参失去了与宿主体内有益功能相关的细菌,取而代之的是能降解烷烃的细菌^[25]。Ribière 等^[26]发现亚慢性口腔暴露于 BaP 引起的中度炎症主要发生在回肠粘膜,并改变了粪便和粘膜相关微生物群的相对丰度。在实验开始时,肠道微生物群可能对 BaP 的促炎特性有一种短暂的保护作用,特别是通过增加溶粘类群。然而,在口服暴露 28 天后, BaP 导致了肠道促炎环境,促炎细菌类群增加,抗炎细菌类群减少。He 等^[27]研究表明, BaP 口腔暴露可能导致小鼠结肠损伤和肠道菌群失调,改变肠道微生物组成,特别是一些与炎症有关的细菌。DeBofsky 等同样发现,短期低剂量 BaP 暴露显著改变雌性黑头米诺鱼肠道微生物群落结构^[28]。

1.2 细胞焦亡概述

1.2.1 细胞焦亡的概念

2001 年, Cookson 等人首次使用细胞焦亡(pyroptosis)来形容在巨噬细胞中

发现的半胱天冬酶-1 (Caspase-1) 依赖性细胞死亡方式, 并证实细胞焦亡是一种新的程序性细胞死亡方式, 其特征为依赖于 Caspase-1 活化, 并伴有大量促炎症因子释放^[29]。直至 2015 年, 邵峰院士团队研究发现, Caspase-1 并不是细胞焦亡发生的必要条件, 细胞焦亡还可由脂多糖 (Lipopolysaccharides, LPS) 激活 Caspase-4/5/11 引起, 活化的 Caspase-4/5/11 通过切割激活 Gasdermin 家族蛋白最终诱发细胞焦亡^[30,31]。因此, 2018 年, 细胞死亡命名委员会进一步修正了细胞焦亡的定义: 由 Gasdermin 家族蛋白介导的质膜膜孔形成的可调控性细胞死亡, 经常但并不总因炎症性 Caspase 的活化而完成的细胞程序性坏死^[32]。

1.2.2 细胞焦亡的特点

细胞焦亡的形态学特征、发生及调控机制等均不同于凋亡、坏死等其他细胞死亡方式 (表 1-1)^[33-36]。当细胞发生焦亡时, 细胞核浓缩、DNA 碎片化, 细胞膜上出现直径范围 10-20 nm 孔洞, 细胞电解质平衡丧失, 细胞肿胀破裂、胞内容物外释, 激发固有免疫并使之过度活化, 最终导致细胞炎性死亡。可通过透射电子显微镜观察细胞膜孔洞生成, 以及 Caspase-1 FLICA 和 SYTOX blue 染色呈现双阳性来观测细胞是否发生焦亡。

表 1-1 细胞焦亡、凋亡、自噬、坏死的特征

Table 1-1 Characteristics of pyroptosis, apoptosis, autophagy and necrosis

比较类别	细胞焦亡	细胞凋亡	细胞自噬	细胞坏死
细胞形态	细胞发生渗透性膨胀、变大、裂解, 细胞核和细胞器完整, 细胞呈充气球样	细胞皱缩、变小, 细胞核碎裂, 染色质固缩, 胞质浓缩, 细胞器密度变大	细胞质无定形, 细胞核固缩、碎裂, 胞内形成自噬泡或自噬溶酶体, 细胞器被包裹降解, 细胞呈新月形或杯状	细胞核固缩、碎裂, 死亡细胞与间质融合成模糊颗粒状, 细胞肿胀
细胞膜变	细胞膜上形成孔洞, 失去完整性	细胞膜基本完整, 特化结构消失, 向内凹陷形成凋亡小体	细胞膜基本完整, 特化结构消失	细胞膜破损, 失去完整性
染色体变化	染色质 DNA 无规则断裂降解	核染色质断裂降解为约 180-200bp 或其整数倍核苷酸小片段	染色体随机断裂降解	染色质 DNA 无规则断裂降解
炎症反应	胞内容物外释, 引发级联扩大炎症反应	胞内容物没有外释, 不发生炎症反应	胞内容物没有外释, 不发生炎症反应	胞内容物外释, 引发炎症反应

1.2.3 细胞焦亡途径

最新研究指出^[30,31], 细胞焦亡是 GSDMD 蛋白介导发生的一种程序性细胞死亡方式, 同时伴有大量炎症因子释放, 如 IL-1 β 和 IL-18 等。它是机体受到病原微生物侵袭时启动的一种保护性免疫防御反应, 但是, 长期、过度的细胞焦亡会诱发多种炎症性和免疫性疾病。研究表明^[33,37,38], 细胞焦亡广泛参与动脉粥样硬化、肝炎和肝纤维化等疾病的发生发展。

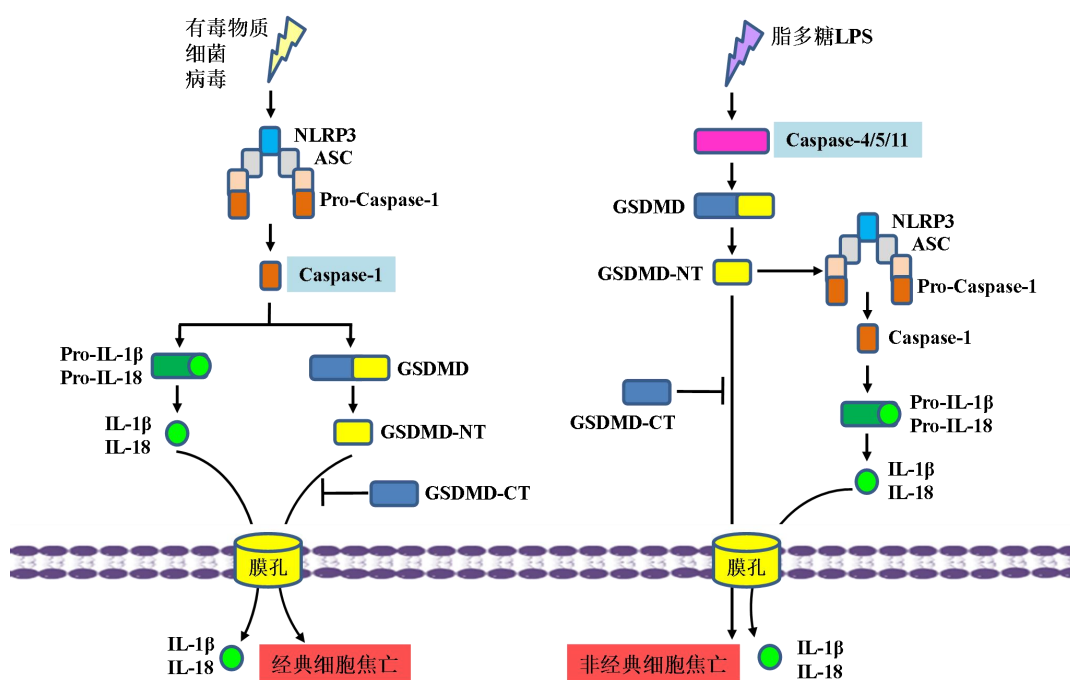


图 1-2 细胞焦亡途径

Figure 1-2 pyroptosis pathway

根据依赖的炎症 Caspase 和外界刺激不同, 细胞焦亡被分为依赖 Caspase-1 的经典焦亡途径和依赖 Caspase-4/5/11 (Caspase-4、Caspase-5 或 Caspase-11) 的非经典焦亡途径 (图 1-2)^[39]。其中, 经典焦亡途径: 细胞中 Caspase-1 蛋白以无活性酶原形式 (Pro-Caspase-1) 存在。当细胞受到外界刺激 (有毒物质、病原体、辐射等) 后, Pro-Caspase-1 通过构成 NLRP3 等炎症小体而被激活成具有酶活性的 Caspase-1, Caspase-1 继而特异性地将 GSDMD 蛋白切割活化形成 N 端结构域 (GSDMD-NT) 和 C 端结构域 (GSDMD-CT), GSDMD-NT 进一步通过寡聚化在细胞膜上形成膜孔, 最终导致细胞破裂、死亡; 同时, 活性 Caspase-1 将促炎症因子白介素 1 β 前体 (Pro-IL-1 β) 和白介素 18 前体 (Pro-IL-18) 剪切为成熟型 IL-1 β 和 IL-18, 经膜孔释放, 并通过诱导其他炎症因子 (如 IL-6, TNF- α)、黏附分子

和趋化因子等合成来扩大炎症反应。非经典焦亡途径：细胞受到细菌脂多糖（LPS）刺激后，LPS 脂质部分直接与 Caspase-4/5/11 结合促进它们活化；活化的 Caspase-4/5/11 剪切 GSDMD 形成 GSDMD-NT，启动焦亡进程；同时，GSDMD-NT 也可通过激活 NLRP3 炎症小体活化 Caspase-1，Caspase-1 进而剪切 Pro-IL-1 β 形成 IL-1 β ，并外释、产生炎症。

1.2.4 苯并(a)芘对细胞焦亡的影响

苯并芘作为一种多环芳烃类物质，是由苯与芘稠合而成。它有两种同分异构体，分别是：苯并(a)芘（3,4-苯并芘）和苯并(e)芘（1,2-苯并芘），前者毒性更强^[40]。一方面，食品在油炸、烧烤等高温条件下，其中的油脂、胆固醇等会发生热裂解反应，经环化、聚合，从而生成苯并(a)芘^[41]；另一方面，苯并(a)芘由人类生活、生产中使用的煤炭、石油等燃料不完全燃烧产生^[42]。肝脏是苯并(a)芘的主要靶器官^[43,44]。我们前期发现，20 $\mu\text{mol/L}$ 苯并(a)芘处理 HL-7702 人肝细胞 24 h 后，细胞相对电导率、NO 释放量、LDH 释放率显著升高；同时 HL-7702 人肝细胞内焦亡特征指标 Caspase-1、IL-1 β 、IL-18 的蛋白表达量增多^[45]。说明苯并(a)芘可诱导 HL-7702 人肝细胞发生焦亡性损伤。基于此，Li 等^[46]研究发现天然黄酮异荭草素通过降低电导率、LDH 和 NO 水平，抑制 Pro-Caspase-1、Cleaved-Caspase-1、iNOS、Cox-2 蛋白表达量，降低 IL-1 β 和 IL-18 的 mRNA 水平，减弱由苯并(a)芘诱导的人肝细胞焦亡性损伤。同时，我们证明苯并(a)芘通过抑制 PI3K/Akt 信号通路诱导 HL-7702 人肝细胞死亡^[47]。

1.3 全谷物概述

1.3.1 全谷物概念

全世界的消费者都对健康饮食感兴趣。全谷物产品，包括谷物和假谷物，是健康饮食的重要组成部分。根据谷物和谷物协会^[48]的定义，全谷物包括完整的、碾碎的、破碎的、剥落的或经过其他处理的谷粒，这些谷粒都是在去除不可食用的部分（如外壳等）后形成的。所有的解剖成分，包括胚乳、胚芽和麸皮，必须以与完整的果仁相同的相对比例存在。

然而，目前市场上的大多数谷物产品都是精制的。精制谷物产品是指缺少完整的籽粒的一个或多个部分的产品^[49]。在传统的小麦精炼工艺中，例如麸皮和胚

芽是从含淀粉的胚乳中分离出来的。含淀粉的胚乳进一步缩小成细白面粉。从营养角度来看,精制过程会从其他谷物部分中去除重要的营养成分、膳食纤维和其他植物化学物质。全谷物产品的膳食纤维含量本质上高于精制谷物产品,而且通常在可溶性与不溶性纤维成分比例具有良好的平衡性^[50]。

1.3.2 全谷物种类

谷物自古以来就是世界上大多数人的主食。全谷物(Whole Grains, WG)是碳水化合物、纤维和具有抗癌、抗氧化和抗血栓作用的生物活性肽的健康来源^[51]。全谷物主要包括小麦、燕麦、水稻、玉米和荞麦等。荞麦产自中国,主要品种包括有苦荞、甜荞、翅荞、米荞等,现阶段市场上主要以前两种为主。以苦荞为例,每 100 g 苦荞中含有 360 卡路里的能量,主要由 12.6%的水分、10%的蛋白质、2.2%的脂肪、72.7%的淀粉、1.4%的纤维、1.1%的灰分等构成。同时苦荞也是多种维生素 B、微量元素(锰、锌)等的主要提供者。由于具有丰富的蛋白、淀粉等营养物质,因此摄入适量的荞麦对人体的正常生理代谢具有重要意义^[52,53]。燕麦通常作为燕麦或优质燕麦卷或磨碎食用,主要用作粥,但也用作制作蛋糕、饼干和面包的原料。100 g 燕麦提供 389 卡路里能量。燕麦由 66%的碳水化合物、11%的膳食纤维、4%的 β -葡聚糖、7%的脂肪和 17%的蛋白质组成^[54-55]。燕麦也是早餐麦片的一种成分,特别是在什锦早餐中。在英国,燕麦被用来生产啤酒。在整个拉丁美洲流行的一种饮料是由磨碎的燕麦和牛奶制成的一种特色的冷、甜饮料。

1.3.3 全谷物饮食的功能

1.3.3.1 维持体重

流行病学证据表明,全谷物的摄入与减轻超重和肥胖有关。这种效应背后的主要影响,可能是在食用这些产品后食欲下降和长时间的饱腹感^[56]。研究表明, β -葡聚糖的摄入可增强餐后饱腹感,降低体重、体重指数 BMI 和总能量摄入^[57,58]。饱腹感延长的机制可能与可溶性 β -葡聚糖和其他可溶性纤维的凝胶形成能力以及不可溶性纤维的膨化效应有关^[59]。荷兰的一项研究发现,无论男性还是女性,全谷物摄入水平与 BMI、超重、肥胖风险之间存在负相关关系,并且男性的关联性比女性的更强^[60]。

1.3.3.2 调节肠道菌群

全谷物富含膳食纤维,通常能量密度较低。膳食纤维作为益生元,在为肠道

菌群提供合适的环境方面也起着至关重要的作用。益生元是抵抗胃酸和酶水解的成分。它们可以在结肠中发酵，从而改变肠道微生物群的组成^[61]。肠道菌群与人类的共生关系在非传染性疾病的风险降低中起着至关重要的作用^[62]。日常饮食中膳食纤维的缺乏会降低肠道微生物群落的多样性^[63]。同样，由于这种多样性的性质，人类肠道微生物群包含不同的微生物基因组，这些基因组可以产生数千种针对膳食纤维的酶^[64]。因此膳食纤维对肠胃健康有积极的影响。

1.3.3.3 预防心血管疾病

动脉粥样硬化和随后的心血管并发症，如心肌梗死、中风和心力衰竭，是全球范围内死亡率较高的疾病^[65]。食用膳食纤维对预防心血管疾病的有益作用在动物和人类研究中都得到了充分的证明。膳食纤维对心血管疾病的保护作用可能是由于可溶性膳食纤维能够形成粘性凝胶，增加肠道内容物的黏度会减少胆汁酸的再吸收，而胆汁酸又会减少血液中胆固醇的循环。可溶性膳食纤维还能触发结肠细菌形成短链脂肪酸^[66]，这些短链脂肪酸包括丁酸、乙酸和丙酸，在人体中具有不同的功能特性。例如，众所周知丁酸可以减少动脉粥样硬化的发展，而丙酸则可以抑制胆固醇的合成及其在肝脏中的积累^[67]。

1.3.3.4 抗炎症

全谷物饮食是可溶性膳食纤维的主要来源，尤其是 β -葡聚糖，具有突出的功能和营养特性。 β -葡聚糖被认为是全谷物饮食中主要的活性成分，可导致肠道菌群的变化和刺激。据报道，增加膳食纤维的摄入具有多种有益作用，包括抗炎作用。也有报道称，富含碳水化合物的饮食和膳食纤维缺乏的饮食在促进炎症方面存在直接联系，从而证实了膳食纤维对炎症有重要影响^[68,69]。Qi 等^[70]评估了全谷物膳食纤维对炎症标记物的影响，发现膳食纤维摄入量与肿瘤坏死因子等炎症相关指示物浓度呈负相关。溃疡性结肠炎是一种主要的炎症性肠病，以胃肠道炎症为特征，由慢性或复发性免疫系统激活引起，并伴随某些促炎症标志物如 IL-1 β 的上调，研究发现全谷物中的 β -葡聚糖在治疗溃疡性结肠炎方面具有重要意义^[71]。

1.4 本论文研究目的及内容

1.4.1 研究目的

细胞焦亡是新近发现的一种程序性细胞死亡方式。我们前期研究发现，BaP

可诱发细胞焦亡，损伤肝脏组织，但相关分子机制仍不清楚。全谷物因为含有丰富的膳食纤维所以较普通谷物具有更好的预防肥胖、抗炎症、保肝功能。首先，我们基于 ROS/NF- κ B/NLRP3 信号通路研究 BaP 诱发 Caspase-1 依赖性细胞焦亡的分子机制。其次探究全谷物饮食对 BaP 诱发肝脏组织焦亡的干预作用，为控制 BaP 毒性提供新的思路。

1.4.2 研究内容

- (1) 明确 BaP 诱发 Caspase-1 依赖性肝细胞焦亡的毒性作用；
- (2) 揭示 BaP 通过 ROS/NF- κ B/NLRP3 信号通路诱发 Caspase-1 依赖性肝细胞焦亡的分子机制；
- (3) 评价全谷物荞麦与全谷物燕麦对 BaP 诱发的肝脏组织焦亡性损伤的干预作用。

第二章 苯并(a)芘诱发 Caspase-1 依赖性肝细胞焦亡

2.1 引言

苯并(a)芘 (BaP)具有很强的肝毒性和致癌性,广泛存在于高温加工食品中。细胞焦亡是一种由 Caspase 蛋白启动并伴随炎症反应的程序性死亡模式。根据依赖的 Caspase 不同可以将焦亡分为:(1) Caspase-1 依赖的经典性焦亡途径;(2) Caspase-4/5/11 依赖的非经典性焦亡途径^[39]。第一种焦亡途径较为常见,一般由食品有害物诱发刺激,而非经典性焦亡途径多由脂多糖等触发。

当细胞发生焦亡时,细胞活力降低,细胞形态异常,细胞周期失衡,产生大量炎症因子,诱使焦亡蛋白 GSDMD-N 寡聚化在细胞膜上形成 10-20 nm 孔洞,细胞电解质平衡丧失,细胞肿胀破裂、胞内容物外释。本章首先通过不同浓度 BaP 作用肝细胞,分析 BaP 对细胞活力、细胞形态、细胞周期、LDH 释放率、NO 含量、相对电导率、焦亡特征蛋白与炎症因子蛋白表达的影响。为进一步明确 BaP 诱发 Caspase-1 依赖性细胞焦亡,采用 Z-VAD-FMK (Caspase-1 抑制剂)干预 BaP 处理的细胞。

2.2 材料与仪器

2.2.1 细胞株

本试验使用的细胞原始株购自于中科院细胞库(上海,中国),细胞种类为 HL-7702 人肝细胞。

2.2.2 主要试剂

表 2-1 试剂及来源

Table 2-1 Main reagents

名称	规格/纯度	生产厂家
苯并(a)芘 (BaP)	≥99%	Sigma
二甲基亚砷 (DMSO)	100 mL	Sigma
RPMI-1640 培养基	500 mL	Thermo Fisher
胎牛血清 (BSA)	100 mL	Thermo Fisher
蛋白浓度测定 (BCA) 试剂盒	100 次	Thermo Fisher
对照 Marker	10 μ L	Thermo Fisher
Caspase-1 活性测定试剂盒	50 次	碧云天生物科技
细胞周期检测试剂盒	100 次	碧云天生物科技
免疫显色溶液 (ECL)	50 mL	碧云天生物科技
细胞裂解液 (RIPA)	100 mL	碧云天生物科技
青霉素链霉素溶液	100 mL	先锋生物有限公司
Z-VAD-FMK	5 g	先锋生物有限公司
LDH 试剂盒	100 次	南京建成公司
PVDF 膜	27 cm $\times$ 3.5 m	晶博科技
PBS 干粉	100 g	晶博科技
乙二胺四乙酸二钠 (EDTA)	100 g	晶博科技

表 2-2 相关抗体

Table 2-2 Main antibody

名称	货号	生产厂家
GSDMD 一抗	20770-1-AP	圣克鲁斯生物技术
IL-1 β 一抗	16806-1-AP	圣克鲁斯生物技术
IL-18 一抗	SC-6179	圣克鲁斯生物技术
Caspase-1 一抗	2225	细胞信号技术
GAPDH 一抗	BA2913	生物世界技术
HRP 二抗	AB6721	先锋生物有限公司

2.2.3 试验设备

表 2-3 试验仪器设备

Table 2-3 Test instrument and equipment

名称	型号	生产厂家
全波长酶标仪	Multiskan SkyHigh	Thermo Fisher
高速低温离心机	HC-3016R	海天友诚实验仪器有限公司
恒温水浴锅	304	苏州威尔科技用品有限公司
标准垂直电泳仪	BG-verMIDI	郑州南北仪器
半干转印槽	DYCF-40C	伯乐公司
化学发光成像仪	Smart Chemi	北京凯慕
漩涡振荡器	15920D	Thermo Fisher
万分之一天平	BSA2202S	北京赛多利斯
-80℃冰箱	308L	广州捷盛
立式压力蒸汽灭菌器	LX-C75L	成都宜恒
倒置荧光显微镜	Ti-S	日本尼康

2.3 试验方法

2.3.1 MTT 细胞活力测定

配置含有 10%胎牛血清和 1%青霉素链霉素的 RPMI-1640 培养基用于细胞培养。首先取冻存细胞进行复苏，用已配置的培养基对复苏后的细胞重悬，随后将培养瓶放入恒温培养箱（5% CO₂，37℃）培养。

MTT 法检测细胞活力。将密度为 1×10^6 个/mL 的 HL-7702 细胞接种到 96 孔板上，随后放置于恒温培养箱中进行培养，待细胞布满板孔面积 90%以上加入不同药物处理细胞，在培养箱中作用 24 h 后，再加入 MTT（0.5 mg/mL）孵育 4 h，之后倒掉细胞培养液与 MTT，每孔加入 100 μ L DMSO，10min 后用酶标仪检测 490 nm 处吸光度，记录数值。其中，HL-7702 细胞的细胞活力表示为处理组细胞与对照组细胞的吸光度之比。

2.3.2 细胞形态观察

将生长良好的细胞进行传代，按 1×10^6 个/mL 的密度分别接种于相同的培养皿中，置于恒温培养箱中次日取出，弃去培养液后对培养皿中的细胞加入不同药物处理 24 h（处理分组同 2.3.1），并做标记。待药物作用完毕，用 PBS 清洗培养皿后，立即放置于倒置荧光显微镜下进行观察，并摄影保存细胞形态图。

2.3.3 细胞周期检测

流式细胞术方法检测细胞周期。从恒温培养箱中取出生长良好的 HL-7702 细胞，以 1×10^6 个/mL 的细胞密度传代于小型细胞皿中，然后放置回培养箱进行培养。待 24 h 后取出培养皿，弃去上清并用 PBS 清洗 3 次，随后向培养皿加入不同药物作用细胞过夜（处理分组同 2.3.1）。之后倒掉上清，并用 PBS 清洗细胞皿，然后继续加入胰蛋白酶消化并吹制成细胞悬液。随后对细胞悬液离心、PBS 重悬、再离心，收集。然后向细胞中加入预冷的 70%乙醇重新混匀，放于 4℃冰箱静置 3h。随后对细胞溶液离心、PBS 重悬、再离心，收集。最后将之前配置的碘化丙啶染液（PI）加入不同处理组细胞样品中混匀，过筛。常温避光半小时后，利用流式细胞仪检测细胞中的荧光强度并分析处理。

2.3.4 LDH 测定

游离上清液中乳酸脱氢酶（Lactate dehydrogenase, LDH）的含量能够反映细胞的通透性。选取生长良好的细胞，以 1×10^6 个/mL 的密度接种于 96 孔板，之后放入恒温培养箱过夜。待细胞长满孔板 90%面积以上，加入不同药物处理 24 h（处理分组同 2.3.1）。随后收集 96 孔板上清液，做好标记。用 LDH 检测试剂盒测定细胞游离上清在 450 nm 处的吸光度，记录数值。

2.3.5 NO 测定

配置 Griess 试剂（含试剂 A 和试剂 B）用于测定细胞中 NO 含量，其中 A 试剂配置方法：浓磷酸与二次水混合做溶剂，配置浓度为 1%的无水对氨基苯磺酸溶液；B 试剂配置方法：二次水做溶剂，配置浓度为 0.1%的 N-1 萘乙二胺盐酸溶液。

另外，配置浓度为 0.69% 的 NaNO_2 标准液用于绘制 NaNO_2 标准曲线，以此为对照计算细胞中 NO 的含量。

首先取生长良好的细胞对 96 孔板布板，随后将 96 孔板放置于恒温培养箱进行培养。待细胞完全贴壁后，加入不同药物处理 24 h（处理分组同 2.3.1），并做好分组标记。作用时间完毕后，收集 96 孔板中各组的细胞上清液，然后重新布板，依次加入细胞上清液、A 试剂、B 试剂，并避光孵育 15 min，然后测定细胞上清液在 540 nm 的吸光度值并记录。最终将吸光度值代入已绘制的 NaNO_2 标准曲线中，得出各组细胞中 NO 的含量。

2.3.6 相对电导率测定

取正常细胞向 96 孔板进行布板，随后放置于恒温培养箱 24 h。待细胞布满 90% 以上面积后，吸去旧培养基，用 PBS 清洗 3 次 96 孔板上的漂浮细胞，然后加入不同药物（处理分组同 2.3.1），做好分组标记。24 h 后，吸取 96 孔板中各组的上清液，用于测定相对电导率。另外，电导率仪对不同分组上清液测定前应调零，以防数据偏差。

2.3.7 细胞焦亡特征蛋白表达测定

2.3.7.1 药物处理

取正常细胞接种至相同的数个培养皿中，然后放入培养箱中继续培养。24h 后取出，首先倒掉上清液并用 PBS 清洗 3 次，确保细胞皿中无漂浮死细胞。随后加入不同药物至细胞皿中（处理分组同 2.3.1），再移至恒温培养箱。等药物作用 24 h 后，弃去细胞皿中的培养液，同时使用 PBS 清洗 3 次，确保药物无残留。

2.3.7.2 提取蛋白

配置细胞裂解液用于提取不同药物处理后的细胞，细胞裂解液包含 100 mmol/L PMSF：RIPA 裂解液=1:100（v/v）。其中，100 mmol/L PMSF 试剂配置方法：无水乙醇作溶剂，配置浓度为 100 mmol/L PMSF。

向药物处理后的培养皿再加入 100 μL 已配置的细胞裂解液（0℃，30 min）。然后用刮片将裂解后的细胞移至新的离心管，并做好标记，离心（4℃，10 min，12000 r）。随后利用 BCA 蛋白浓度试剂盒测定离心后的上清液蛋白浓度，同时记

录。然后以 RIPA 裂解液为溶剂，将所有分组蛋白浓度平衡至同一浓度。随后配置蛋白上样液包括蛋白上清液：Loading buffer = 1:100 (v/v)，并进行高温水浴处理 (90℃, 15 min)，用于后续 Western blot 实验。

2.3.7.3 Western blot

首先向玻璃板间加入二次水，静置 10 分钟，查看是否漏水，确保凝胶模具密封性。随后根据实验目标蛋白浓度确定分离胶浓度与浓缩胶浓度，先加入分离胶，待其凝固后，再加入分离胶至玻璃板顶端，并插入梳子。10 min 后拔出梳子，取不同处理组的蛋白上样液进行上样，最左侧为蛋白 Marker，再进行电泳 (120V, 120 min)。然后依据 Marker 蛋白指示，切取对应蛋白区域凝胶用于转印处理。取出转印后的 PVDF 膜，用 TBST 清洗三次，每次 15 min。随后加入配置好的 5% 脱脂奶粉封闭 (37℃, 3 h)，待封闭结束后用 TBST 清洗三次，每次 15 min。然后根据不同蛋白依次加入对应一抗 (4℃, 12 h)、二抗 (37℃, 3 h)，最后将 PVDF 膜浸泡于 ECL 发光液 10 s 后，在化学发光仪下检测蛋白条带。

2.3.8 膜孔观察

先把细胞爬片放置于 12 孔板中，随后将生长良好的细胞接种至细胞爬片上，然后移至恒温培养箱。待细胞布满细胞爬片 90% 面积以上，取出 12 孔板，弃去旧培养基，再用 PBS 清洗三次，继续加入药物作用细胞 24 h (处理分组同 2.3.1)。之后倒掉旧培养基，加入 2.5% 戊二醛固定细胞 12 h，然后用 PBS 清洗三次。再依次加入不同浓度梯度的乙醇 (30、50、70、90、100% (v/v)) 浸润细胞爬片 20 min、随后弃去乙醇后继续向 12 孔板中加入不同配比的乙醇与乙酸异戊酯混合液 (3:1、1:1、1:3 (v/v)) 分别作用 20 min、然后吸弃混合液后再加入乙酸异戊酯脱水 20 min。之后将细胞爬片放置于干燥器中处理半小时，对干燥后的样品溅射镀金钼，最后用扫描电子显微镜观察细胞膜孔 (3.0 kV)。

2.3.9 Caspase-1 活力检测

取生长良好的细胞传代于 96 孔板，之后放置在恒温培养箱中。24h 后取出 96 孔板，倒掉旧培养基并用 PBS 清洗三次，除去上层漂浮细胞。然后加入不同药物作用细胞 24h 并提取各组细胞蛋白 (方法同 2.3.7 (2) 提取蛋白)。随后利用 BCA

蛋白浓度试剂盒测定不同处理组细胞蛋白浓度，之后按照 Caspase-1 活力检测试剂盒说明书，吸取各组 10-30 mg 蛋白的细胞裂解物与含有 Ac-YVAD-pNA 的反应缓冲液在 37℃ 下发生反应。30 min 后，用酶标仪检测 405nm 处的吸光度。

2.3.10 统计分析

所有实验结果均以平均±标准差 (SD) 表示，每个实验都包括三组重复的实验。并采用方差分析和 Duncan 检验 (SPSSv19.0) 进行分析；显著性水平设为 $p<0.05$ 。

2.4 结果与分析

2.4.1 不同浓度 BaP 对肝细胞活力的影响

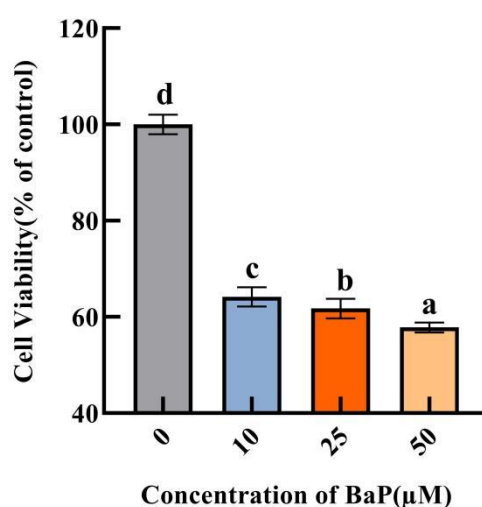


图 2-1 不同浓度 BaP 对肝细胞活力的影响

Figure 2-1 Effects of different concentrations of BaP on hepatocyte viability

细胞活力指细胞在正常生长过程中的活力，是评价细胞是否正常生长的重要内容。为分析不同浓度 BaP (10 μM、25 μM 和 50 μM) 对 HL-7702 人肝细胞活力的影响，本试验采用 MTT 法检测细胞活力。如图 2-1 所示，细胞活力随着 BaP 浓度的增加而降低，与对照组相比，10 μM、25 μM 和 50 μM BaP 处理 24 h 后细胞活力分别下降了 35.73%、38.24% 和 42.15%，且各组间均有显著性差异 ($p<0.05$)。

这一结果充分表明 BaP 可以降低细胞活力，且呈剂量依赖性。

2.4.2 不同浓度 BaP 对肝细胞形态的影响

如图 2-2 所示，通过显微镜观察不同处理组细胞形态发现，正常组的细胞形态完整、数量较多、密度较大；BaP 处理组细胞形态异常、数量减少、密度降低，50 μM BaP 处理组细胞形态不规则、数量骤减、密度最低、细胞受损最严重。结果表明细胞损伤程度与 BaP 的浓度呈正相关。

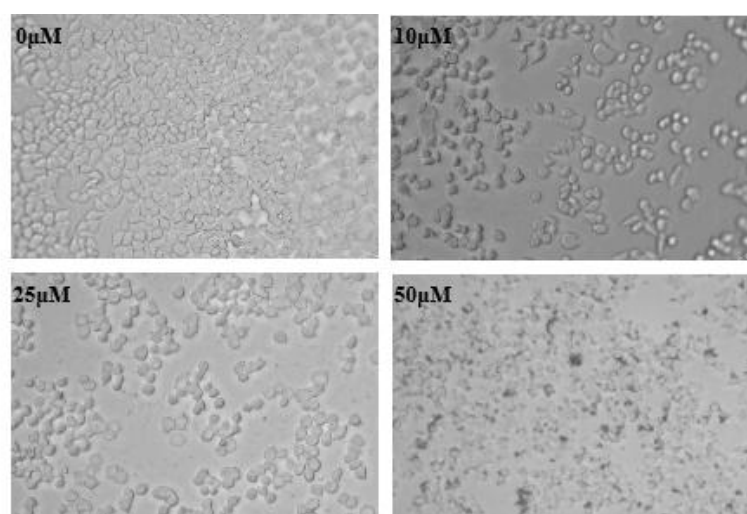


图 2-2 不同浓度 BaP 对肝细胞形态的影响

Figure 2-2 Effects of different concentrations of BaP on the morphology of hepatocytes

2.4.3 不同浓度 BaP 对肝细胞周期的影响

细胞周期指细胞正常生长过程中，从细胞分裂开始至细胞分裂结束的一整个周期，它主要包括两大部分：分裂间期与分裂期。分裂间期又分为合成前期 (G_1)，中期 (S)，后期 (G_2) 三部分，其中 DNA 合成、复制所需要的酶、组蛋白合成等重要阶段都在 S 期完成。分裂期又称 M 期，此时细胞由一个母细胞分裂成为两个子细胞。

本试验通过流式细胞仪检测细胞周期，结果如图 2-3 所示。与空白组相比，不同浓度 BaP 处理后的细胞 S 期延长， G_2 - M 期缩短， G_0 - G_1 期基本稳定。其中，50 μM BaP 处理组 S 期较正常组延长 12.46%， G_2 - M 期较正常组缩短 10.78%。同时，BaP 浓度与 S 期细胞数量呈正相关，与 G_2 - M 期细胞数量呈负相关，而对 G_0 - G_1 期细胞

数量并无较大影响。BaP 使得细胞长期停滞于 DNA 合成、组蛋白合成的 S 期，从而导致 M 期细胞数量骤减，表明 BaP 通过改变细胞周期中各个时期细胞数量，抑制细胞正常生长和分裂。

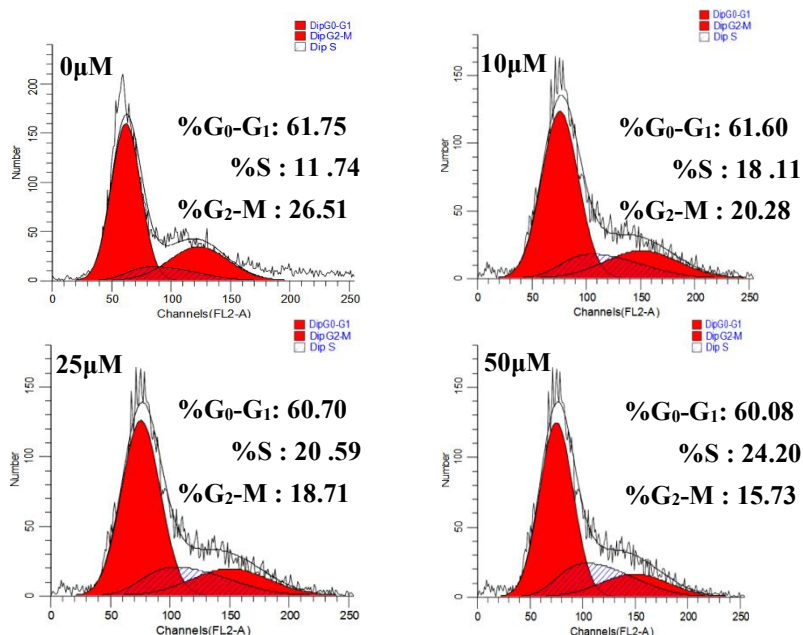


图 2-3 不同浓度 BaP 对肝细胞周期的影响

Figure 2-3 Effects of different concentrations of BaP on cell cycle

2.4.4 不同浓度 BaP 对细胞焦亡特征指标的影响

乳酸脱氢酶 (LDH) 作为一种细胞内部的糖酵解酶，长期稳定处于细胞质内。当细胞遭受攻击时，LDH 会随着细胞膜的破裂而溢出，导致 LDH 释放率升高。因此，LDH 也是诱发细胞焦亡的重要标志之一。如图 2-4 所示，10 μM、25 μM 和 50 μM BaP 处理组细胞 LDH 释放率分别是对照组的 1.48 倍、1.89 倍、2.32 倍，呈现浓度依赖性 ($p < 0.05$)。结果表明，BaP 可促进细胞 LDH 溢出，且 BaP 浓度越高，LDH 释放率越高，细胞受损越严重。

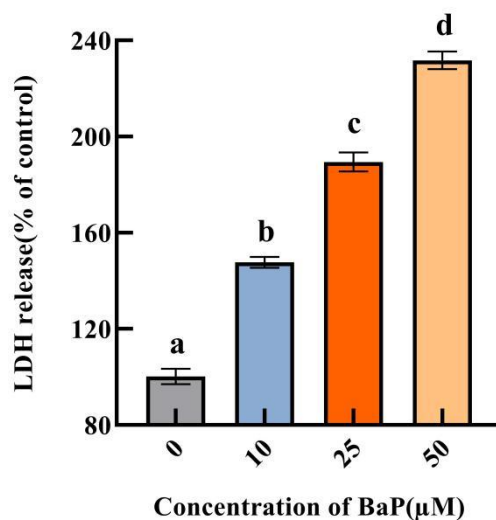


图 2-4 不同浓度 BaP 对 LDH 释放率的影响

Figure 2-4 Effect of different concentrations of BaP on LDH release

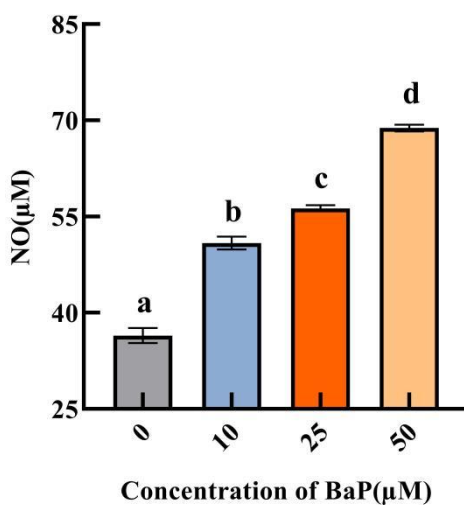


图 2-5 不同浓度 BaP 对 NO 的影响

Figure 2-5 Effect of different concentrations of BaP on NO

细胞受到损伤时会释放大量 NO，而后又被氧化为 NO_2^- ，进而引发细胞炎症反应，因此 NO 含量通常作为细胞焦亡的指示物质。如图 2-5 所示，与对照组相比，三个浓度 BaP 处理后的细胞中 NO 浓度分别显著增加 $14.44 \mu\text{M}$ 、 $19.85 \mu\text{M}$ 、 $32.38 \mu\text{M}$ ，且各组之间具有显著性差异 ($p < 0.05$)。总的来说，BaP 作用细胞后 NO 含量急剧增加，引发细胞发生炎症反应，并且 BaP 浓度越高，细胞炎症反应越强烈。

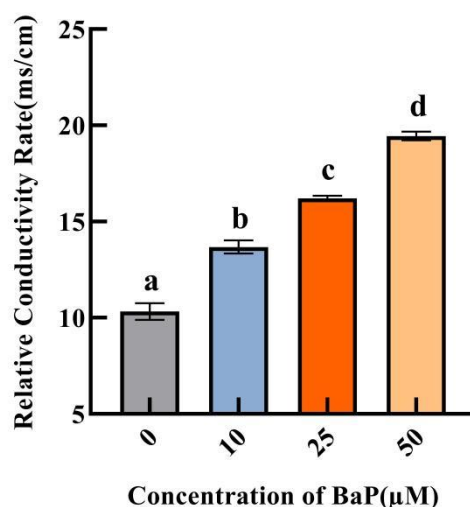


图 2-6 不同浓度 BaP 对相对电导率的影响

Figure 2-6 Effect of different concentrations of BaP on relative conductivity rate

相对电导率是衡量细胞是否发生炎症的重要指标，当细胞发生焦亡时会引发大量炎症因子释放，破坏细胞膜结构，从而使得细胞中部分离子流失，造成细胞培养液中相对电导率发生较大变化。如图 2-6 所示，与对照组相比，10 μM 、25 μM 和 50 μM BaP 处理组细胞的相对电导率显著增加 32.49%、56.96%、88.30% ($p < 0.05$)，各处理组相对电导率的趋势与 LDH 释放率、NO 含量相同。因此 BaP 可导致细胞膜破裂、大量炎症因子释放、相对电导率升高，诱发细胞发生焦亡性损伤。

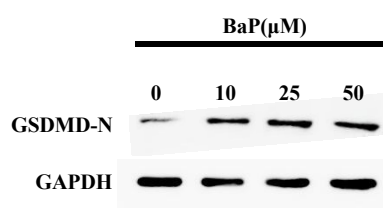


图 2-7 不同浓度 BaP 对焦亡特征蛋白表达的影响

Figure 2-7 Effects of different concentrations of BaP on the expression of characteristic protein of pyroptosis

GSDMD (Gasdermin-D) 蛋白是细胞发生焦亡的执行者，当细胞发生焦亡时，半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 (Caspase) 家族通过作用于 GSDMD 蛋白将其切割为 GSDMD-N 蛋白，进而诱发细胞焦亡性损伤。如图 2-7 所示，与正常组相比，BaP 处理组的蛋白条带灰度增强，说明 BaP 可以促进 GSDMD-N 蛋白高表达，诱发细

胞焦亡，且呈浓度依赖性。

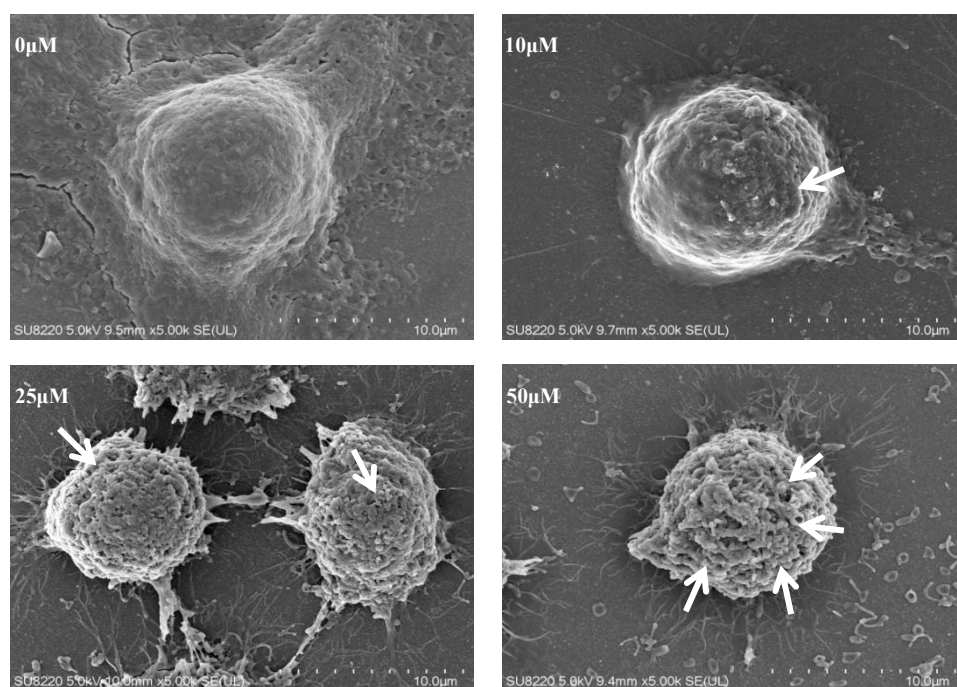


图 2-8 不同浓度 BaP 对细胞膜孔的影响

Figure 2-8 Effects of different concentrations of BaP on cell membrane pores

当细胞焦亡发生时，细胞中的 GSDMD-N 蛋白被激活，随后在细胞膜上齐聚，形成孔隙，从而导致细胞膜通透性的改变。细胞膜孔被认作为焦亡现象的独有特征，因此本试验采用扫描电子显微镜观察焦亡细胞形态特征。如图 2-8 所示，正常组细胞形态均匀，表面平滑，无孔洞生成；而 BaP 处理后的细胞形态不规则，表面粗糙，孔洞数目增多。其中，50 μM BaP 处理组细胞形态异常、孔洞数目最多。即 BaP 作用浓度越高，细胞膜孔越多，焦亡性损伤越严重。

2.4.5 Caspase-1 抑制剂对 BaP 处理的肝细胞活力的影响

细胞焦亡主要分为两种途径：经典性焦亡途径和非经典性焦亡途径。前者主要依靠 Caspase-1 刺激 GSDMD 蛋白加速焦亡，后者则是依靠 Caspase-4/5/11 激活焦亡程序。常见的有害物质以诱导经典性焦亡为主，非经典性焦亡则一般受脂多糖 (LPS) 刺激。为明确 BaP 是否通过细胞焦亡损伤肝细胞，本试验采用 Caspase-1 特异抑制剂 Z-VAD-FMK 与 BaP 共同处理 HL-7702 人肝细胞。结果显示 (图 2-9)，与对照组相比，BaP 处理组 (25 μM) 细胞活力下降至 60.61% ($p < 0.05$)，Z-VAD-FMK

单独处理组与对照组没有显著性差异, Z-VAD-FMK 和 BaP 共同处理组的细胞活力下降至 92.58% ($p<0.05$)。进一步证明, BaP 可通过诱发 Caspase-1 依赖性细胞焦亡降低细胞活力。

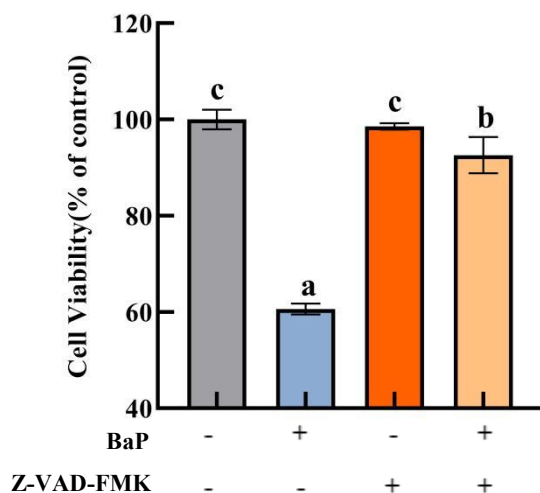


图 2-9 Caspase-1 抑制剂对焦亡细胞活力的影响

Figure 2-9 Effects of Caspase-1 inhibitor on the viability of pyroptotic cells

2.4.6 Caspase-1 抑制剂对 BaP 诱发的细胞焦亡特征指标的影响

细胞发生焦亡时, Caspase-1 激活, 细胞膜通透性增强, LDH、NO、IL-18、IL-1 β 等胞内物质大量释放, 电导率升高, 引发炎症反应。如图 2-10 A 所示, 对照组与 Z-VAD-FMK 单独处理组 Caspase-1 活性无明显差异, BaP 显著增强 Caspase-1 活性 ($p<0.05$), Z-VAD-FMK 预处理可显著降低 BaP 对 Caspase-1 活性的上调作用 ($p<0.05$)。同时, 与对照组相比, BaP 组 LDH 释放率、NO、相对电导率分别显著 ($p<0.05$) 升高 89.42% (图 2-10 B)、55.47% (图 2-10 C)、15.71% (图 2-10 D); 与 BaP 组相比, Z-VAD-FMK 预处理可显著 ($p<0.05$) 降低 26.74% 的 LDH 释放率、4.05% 的 NO、7.14% 的相对电导率。此外, 本试验通过 Western blot 检测 Caspase-1、GSDMD-N 等焦亡特征蛋白表达量。如图 2-11 所示, 与对照组相比, BaP 可显著增强 Caspase-1、GSDMD-N、IL-18、IL-1 β 的蛋白相对表达量。与 BaP 单独处理组相比, Z-VAD-FMK 与 BaP 共同处理组 Caspase-1、GSDMD-N、IL-18、IL-1 β 蛋白相对表达均明显下降。以上结果进一步表明, BaP 可诱发 Caspase-1 依赖性肝细胞焦亡。

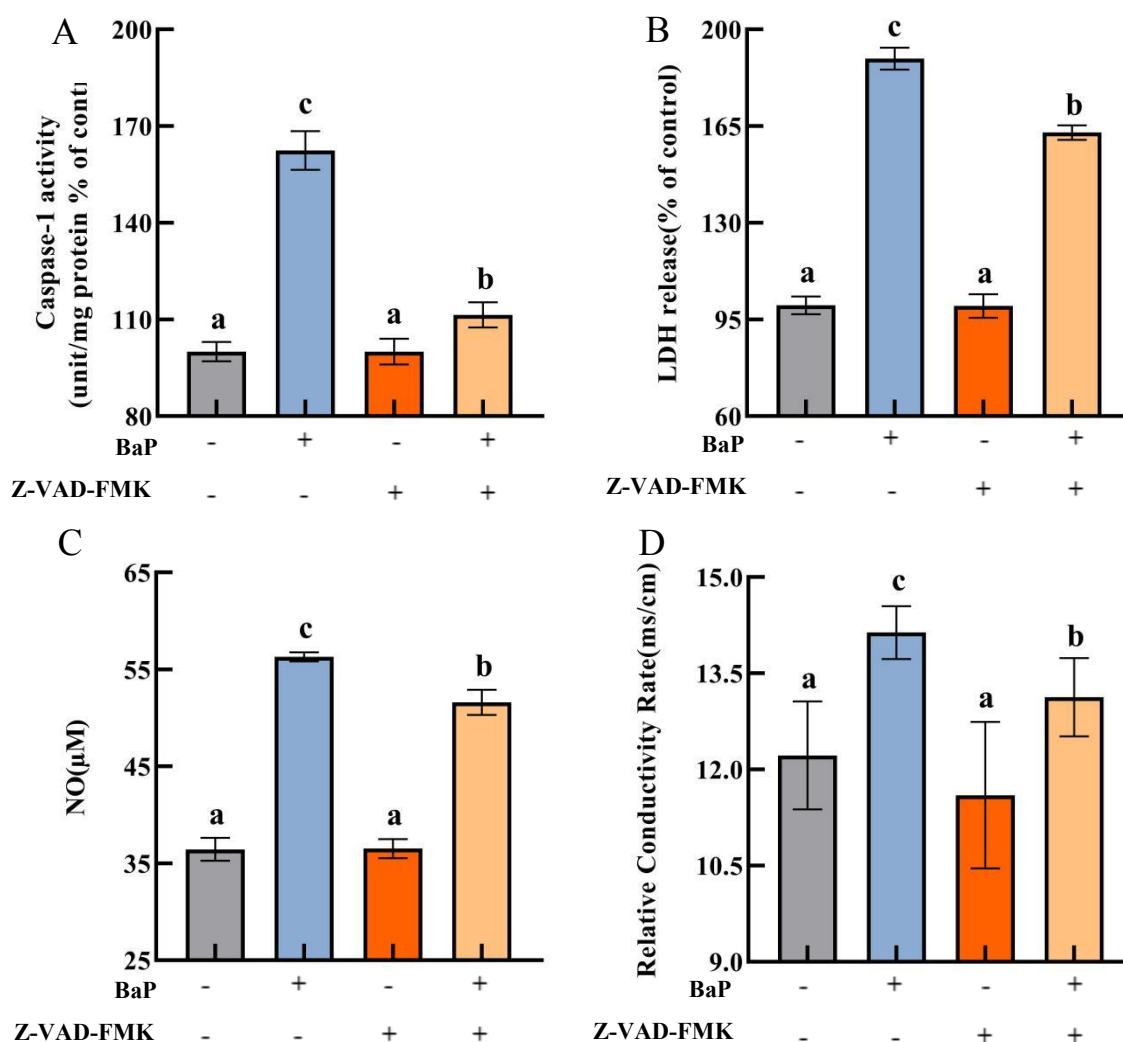


图 2-10 Caspase-1 抑制剂对凋亡损伤的影响

Caspase-1 活性(A), LDH 释放(B), NO(C), 相对电导率(D)

Figure 2-10 Effects of Caspase-1 inhibitor on pyroptotic injury.

Caspase-1 activity(A), LDH release(B), NO(C), relative conductivity rate(D)

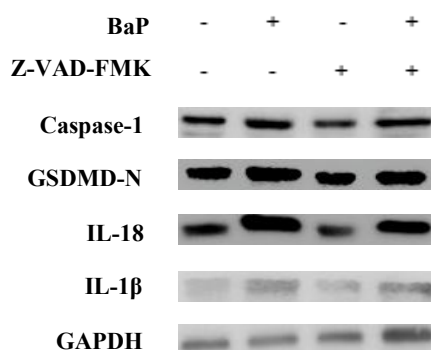


图 2-11 Caspase-1 抑制剂对焦亡特征蛋白表达的影响

Figure 2-11 Effects of Caspase-1 inhibitor on the expression of characteristic protein of pyroptosis

2.5 本章小结

本章明确了 BaP 通过诱发 Caspase-1 依赖性细胞焦亡损伤肝细胞，为之后研究 BaP 诱发 Caspase-1 依赖性肝细胞焦亡的分子机理提供理论基础。

(1) BaP 可以诱发细胞活力降低且呈剂量依赖性；同时通过改变细胞周期正常比例，抑制细胞的正常生长和分裂增殖。

(2) BaP 会促进 LDH 释放率、NO 含量、相对电导率等指标升高、增强焦亡特征蛋白表达，同时诱使 GSDMD-N 寡聚化在细胞膜上形成孔洞。Caspase-1 抑制剂 Z-VAD-FMK 可明显反转 BaP 对细胞活力、炎症因子释放量、焦亡蛋白表达等的作用。BaP 通过诱发 Caspase-1 依赖性细胞焦亡损伤肝细胞。

第三章 苯并(a)芘诱发 Caspase-1 依赖性肝细胞焦亡的机理

3.1 引言

NLR family pyrin domain-containing 3 (NLRP3) 炎症小体是一种多蛋白复合物，由 NLRP3、含有 CARD 的凋亡相关斑点样蛋白 (ASC) 和 Pro-Caspase-1 形成。当肝细胞发生炎症时，它可大量表达^[72]。现有研究已证明 NLRP3 炎症小体在焦亡过程中起着关键作用^[37,73]，它通过促进 Caspase-1 的裂解和激活来诱导焦亡，并导致促炎细胞因子的成熟和分泌^[74]。NLRP3 炎症小体可被额外刺激、线粒体功能障碍、活性氧 (ROS)、溶酶体损伤或细胞内离子稳态紊乱所激活^[75-77]。此外，NLRP3 炎症小体的激活还需要核因子- κ B (NF- κ B) 的刺激^[78]。NF- κ B 是炎症、增殖、分化等生物学过程的关键，它控制着促炎基因的转录，而促炎基因调节趋化因子、细胞因子和粘附分子的合成^[79]。

为了探究 BaP 诱发 Caspase-1 依赖性肝细胞焦亡的分子机理，本章采用 Mito-TEMPO (mtROS 抑制剂) 与 NAC (总 ROS 抑制剂)、PDTC (NF- κ B 抑制剂)、MCC950 (NLRP3 炎症小体抑制剂) 分别作用于 ROS、NF- κ B、NLRP3 炎症小体等靶点，揭示 BaP 是否通过 ROS/NF- κ B/NLRP3 信号通路诱发 Caspase-1 依赖性细胞焦亡。

3.2 材料与仪器

3.2.1 细胞株

本试验使用的细胞原始株购自于中科院细胞库 (上海，中国)，细胞种类为 HL-7702 人肝细胞。

3.2.2 主要试剂及相关药品

表 3-1 试剂及来源

Table 3-1 Main reagents

名称	规格/纯度	试剂来源
苯并(a)芘 (BaP)	≥99%	Sigma
二甲基亚砷 (DMSO)	100 mL	Sigma
RPMI-1640 培养基	500 mL	Thermo Fisher
胎牛血清 (BSA)	100 mL	Thermo Fisher
蛋白浓度测定 (BCA) 试剂盒	100 次	Thermo Fisher
对照 Marker	10 μ L	Thermo Fisher
Caspase-1 活性测定试剂盒	50 次	碧云天生物科技
活性氧检测试剂盒	100 次	碧云天生物科技
免疫显色溶液 (ECL)	50 mL	碧云天生物科技
细胞裂解液 (RIPA)	100 mL	碧云天生物科技
MCC950	1 g	碧云天生物科技
NAC	1 g	碧云天生物科技
PDTC	1 g	碧云天生物科技
Mito-TEMPO	1 g	先锋生物有限公司
青霉素链霉素溶液	100 mL	先锋生物有限公司
Triton X-100	10 g	先锋生物有限公司
DAPI	1 mL	先锋生物有限公司
LDH 试剂盒	100 次	南京建成公司
PVDF 膜	27cm $\times$ 3.5m	晶博科技
PBS 干粉	100 g	晶博科技
乙二胺四乙酸二钠 (EDTA)	100 g	晶博科技

表 3-2 相关抗体

Table 3-2 Main antibody

名称	货号	试剂来源
GSDMD 一抗	20770-1-AP	圣克鲁斯生物技术
IL-1 β 一抗	16806-1-AP	圣克鲁斯生物技术
IL-18 一抗	SC-6179	圣克鲁斯生物技术
NLRP3 一抗	GTX106313	圣克鲁斯生物技术
ASC 一抗	10500-1-AP	圣克鲁斯生物技术
NF- κ B 一抗	10745-1-AP	圣克鲁斯生物技术
Caspase-1 一抗	2225	细胞信号技术
GAPDH 一抗	BA2913	生物世界技术
HRP 二抗	AB6721	先锋生物有限公司
p65/RelA 抗体	A2547	先锋生物有限公司
FITC-IgG (H+L) 抗体	BF05003X	博奥龙科技公司

3.2.3 试验设备

表 3-3 试验仪器设备

Table 3-3 Test instrument and equipment

名称	型号	生产厂家
全波长酶标仪	Multiskan SkyHigh	Thermo Fisher
超高速低温离心机	HC-3016R	海天友诚实验仪器有限公司
电热恒温水浴锅	304	苏州威尔科技用品有限公司
标准垂直电泳仪	BG-verMIDI	河南郑州南北有限公司
半干转印槽	DYCF-40C	伯乐公司
化学发光成像仪	Smart Chemi	北京凯慕
-80℃冰箱	308L	广州捷盛
立式压力蒸汽灭菌器	LX-C75L	成都宜恒
倒置荧光显微镜	Ti-S	日本尼康
共聚焦显微镜	FV1200	奥林巴斯
流式细胞仪	Cell Lab Quanta SC	贝克曼

3.3 试验方法

3.3.1 MTT 细胞活力测定

试验方法同 2.3.1。

3.3.2 LDH 测定

试验方法同 2.3.4

3.3.3 NO 测定

试验方法同 2.3.5

3.3.4 相对电导率测定

试验方法同 2.3.5

3.3.5 Caspase-1 活力检测

试验方法同 2.3.9

3.3.6 细胞焦亡特征蛋白表达测定

试验方法同 2.3.7

3.3.7 NF- κ B 核易位检测

配置 NF- κ B 核位移检测相关试剂。0.25%TritonX-100 试剂：PBST 作溶剂，配置浓度为 0.25%的 TritonX-100；1%BSA 试剂：PBST 作溶剂，配置浓度为 1%的 BSA；p65/RelA 抗体：1%BSA=1:50（v/v）；FITC 标记兔抗小鼠 IgG（H+L）抗

体: 1%BSA=1:100 (v/v)。

灭菌后的细胞爬片放于 6 孔板, 再取生长正常的肝细胞, 以 1×10^6 个/mL 的细胞密度传代于 6 孔板中, 然后将 6 孔板放置于恒温培养箱过夜。待细胞完全贴壁后迅速取出, 吸弃上层旧培养基并用 PBS 反复清洗, 直至 6 孔板中无漂浮细胞。随后向 6 孔板中加入不同药物处理, 24h 后倒掉上清液, 同时加入 PBS 清洗三次。之后依次加入冰甲醇固定 30 min、0.25%TritonX-100 溶液透化 25 min、1%BSA 溶液阻断 1 h、p65/RelA 抗体孵育 2 h、FITC 标记兔抗小鼠 IgG (H+L) 抗体孵育 1 h、PBS 清洗三次, 然后用 $1 \mu\text{g/mL}$ DAPI (一种标记细胞核的荧光 DNA 染料) 染色 1 min, 最后使用奥林巴斯 FV1000 共聚焦系统获得荧光共聚焦图像。

3.3.8 活性氧检测

配置活性氧 (Reactive oxygen species, ROS) 检测相关试剂。DCFH-DA 荧光染色试剂: RPMI-1640 培养基为溶剂, 配置浓度为 0.1% 的 DCFH-DA 染色液。

选取培养箱中生长良好的细胞, 在 12 孔板中进行传代, 随后将传代细胞放置于恒温培养箱中过夜。等细胞生长面积达到孔板 90% 以上, 倒掉上层旧培养基并用 PBS 清洗三次, 确保 12 孔板中无漂浮细胞。然后加入不同药物处理细胞, 做好标记。作用 24 h 后, 弃去上层培养基, 再用 PBS 清洗三次。之后加入已配置好的 DCFH-DA 荧光染色试剂孵育 (37°C , 30 min), 最后用 RPMI-1640 培养基清洗三次。利用荧光显微镜观察活性氧的生成量, 同时使用流式细胞仪检测细胞的荧光强度。

3.3.9 统计分析

所有实验结果均以平均 $\pm$ 标准差 (SD) 表示, 每个实验都包括三组重复的实验。并采用方差分析和 Duncan 检验 (SPSSv19.0) 进行分析, 显著性水平设为 $p < 0.05$ 。

3.4 结果与分析

3.4.1 NLRP3 抑制剂对 BaP 处理的肝细胞活力的影响

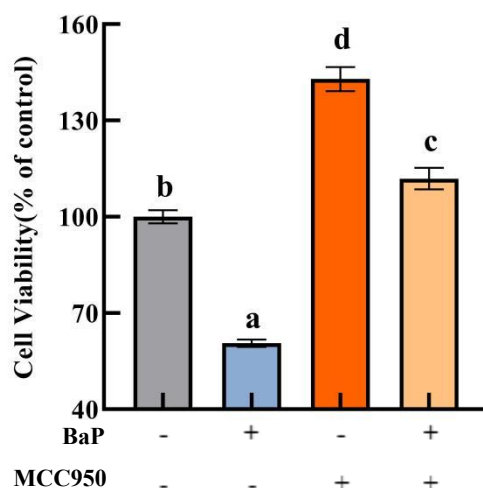


图 3-1 NLRP3 抑制剂对细胞活力的影响

Figure 3-1 Effects of NLRP3 inhibitor on the viability of pyroptotic cells

MCC950 是 NLRP3 的特异性抑制剂。研究表明, MCC950 可以缓解介孔二氧化硅纳米颗粒引起的细胞焦亡^[80],为探究 NLRP3 炎症小体与 BaP 诱发的 Caspase-1 依赖性细胞焦亡的关系,本试验采用 MCC950 与 BaP 共同处理 HL-7702 人肝细胞。如图 3-1 所示, MCC950 预处理可以减轻 BaP 诱发的细胞活力降低 ($p<0.05$)。表明 BaP 可通过激活 NLRP3 炎症小体,降低细胞活力。

3.4.2 NLRP3 抑制剂对 BaP 诱发的细胞焦亡特征指标的影响

炎症小体是一类多蛋白复合物,主要包括 NLRP3、AIM2、Pyrin、NLRC4 和 NLRP1 等。NLRP3 炎症小体由 Pro-Caspase-1、NLRP3 与 ASC 构成,当外界刺激 NLRP3 炎症小体时, Pro-Caspase-1 会自剪切形成活性的 Caspase-1,随后裂解并激活 GSDMD 形成 GSDMD-N,最终引发焦亡^[81,82]。

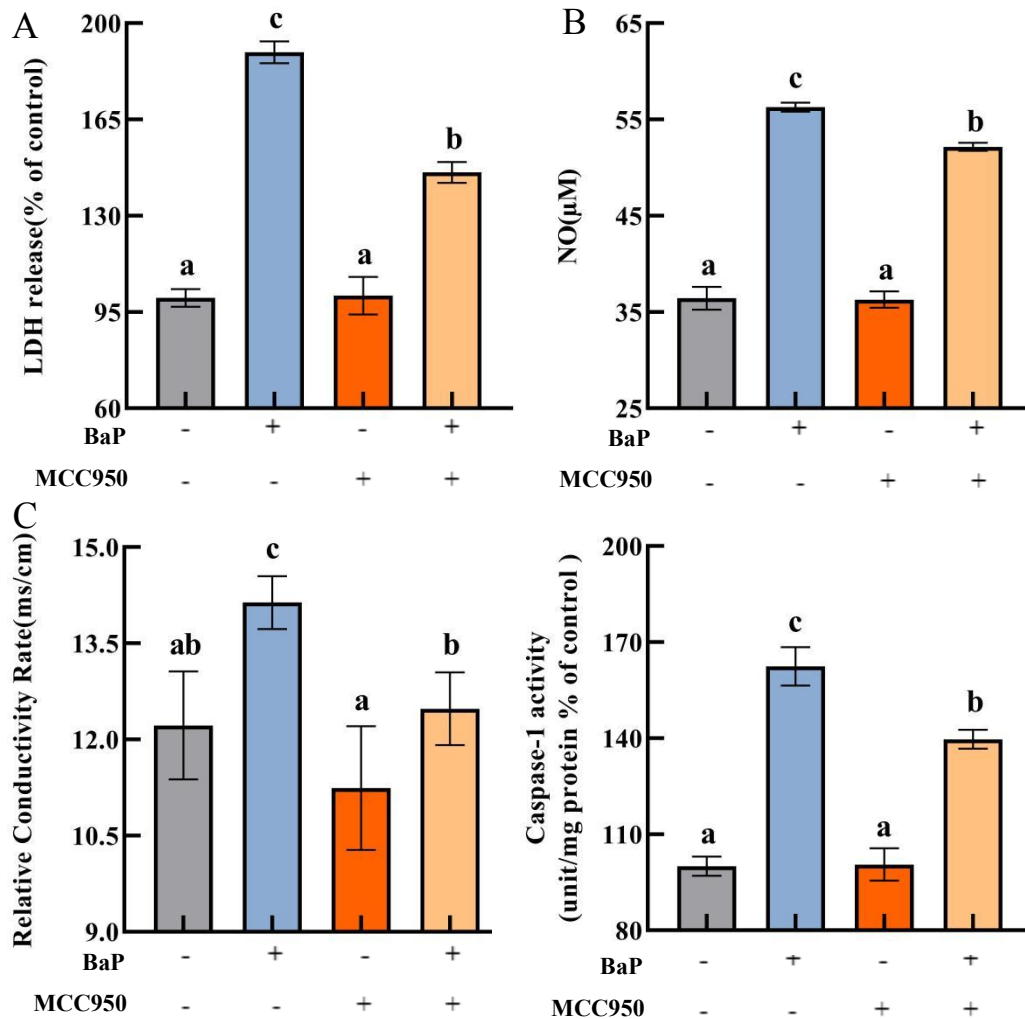


图 3-2 NLRP3 抑制剂对焦亡损伤的影响

LDH 释放(A), NO(B), 相对电导率(C), Caspase-1 活性(D)

Figure 3-2 Effects of NLRP3 inhibitor on pyroptotic injury.

LDH release(A), NO(B), relative conductivity rate(C), Caspase-1 activity(D)

与 BaP 单独处理组相比, MCC950 和 BaP 共同处理组细胞 LDH 释放率 (图 3-2 A)、NO 含量 (图 3-2 B)、相对电导率 (图 3-2 C)、Caspase-1 活性 (图 3-2 D) 分别显著降低 37.90%、21.32%、20.47%、34.99% ($p < 0.05$)。如图 3-3 所示, 与 BaP 处理组相比, MCC950 与 BaP 共同处理组中焦亡特征性蛋白 (NLRP3、ASC、Caspase-1、GSDMD-N、IL-18、IL-1 β) 相对表达明显降低。本试验表明 BaP 可以激活 NLRP3 炎症小体, 继而诱发 Caspase-1 依赖性细胞焦亡。

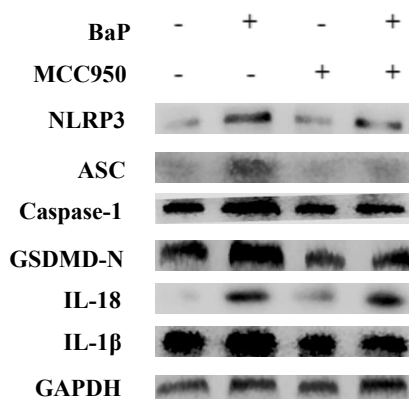
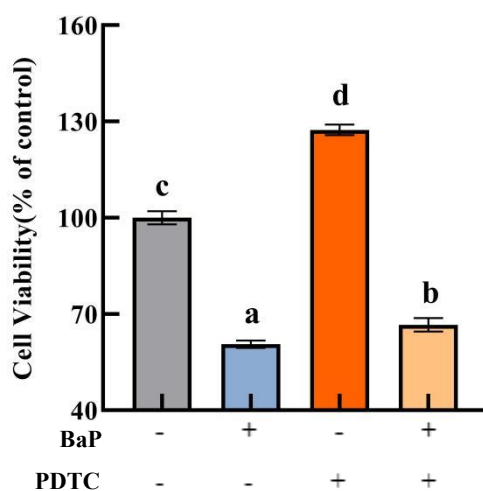


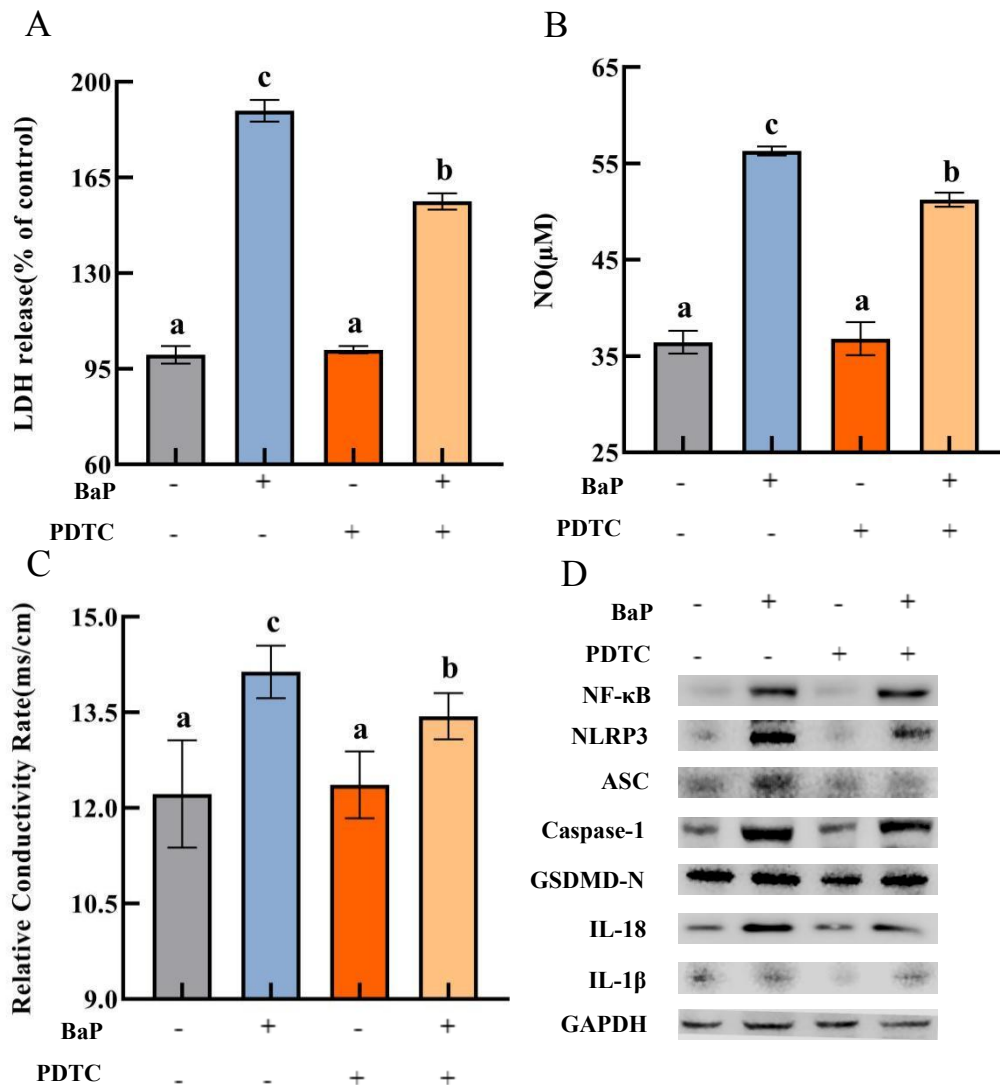
图 3-3 NLRP3 抑制剂对焦亡特征蛋白表达的影响

Figure 3-3 Effects of NLRP3 inhibitor on the expression of characteristic protein of pyroptosis

3.4.3 NF- κ B 抑制剂对 BaP 处理的肝细胞活力的影响

研究发现,抑制 NF- κ B 可有效降低促炎细胞因子的水平,PDTC 作为 NF- κ B 的特异性抑制剂,可以减少 NF- κ B 在细胞中的核易位数目。为探究 NF- κ B 与 NLRP3 炎症小体、Caspase-1 依赖性细胞焦亡的相关性,本试验采用 PDTC 和 BaP 共同作用 HL-7702 人肝细胞。如图 3-4 所示,与 BaP 组相比,PDTC 处理组的细胞活力增长 66.79% ($p<0.05$),PDTC 和 BaP 共同处理组细胞活力增长 6.05% ($p<0.05$),结果表明 BaP 可通过激活 NF- κ B,降低细胞活力。

图 3-4 NF- κ B 抑制剂对细胞活力的影响Figure 3-4 Effects of NF- κ B inhibitor on the viability of pyroptotic cells

3.4.4 NF- κ B 抑制剂对 BaP 诱发的 NLRP3 和细胞焦亡特征指标的影响图 3-5 NF- κ B 抑制剂对焦亡损伤的影响

LDH 释放(A), NO(B), 相对电导率(C), 焦亡特征蛋白表达(D)

Figure 3-5 Effects of NF- κ B inhibitor on pyroptotic injury. LDH release(A), NO(B), relative conductivity rate(C), the expression of characteristic protein of pyroptosis(D)

NF- κ B 是细胞中的一种核转录因子, 它主要参与炎症反应, 具有调节炎症小体表达的作用^[83]。研究发现, 抑制巨噬细胞中的 NF- κ B 和 NLRP3 炎症小体活性可改善小鼠的结肠炎^[84]。本试验采用 NF- κ B 抑制剂 PDTC 与 BaP 共作用细胞, 探究 NF- κ B 是否参与 NLRP3 炎症小体的激活与 Caspase-1 依赖性细胞焦亡。如图 3-5 所示, PDTC 预处理可以明显降低 BaP 诱发的 LDH 释放率、NO 含量、相对电导

率等焦亡特征指标的高表达 ($p<0.05$)；同时，BaP 组相比，PDTC 和 BaP 共同处理组焦亡特征蛋白相对表达量显著下降。

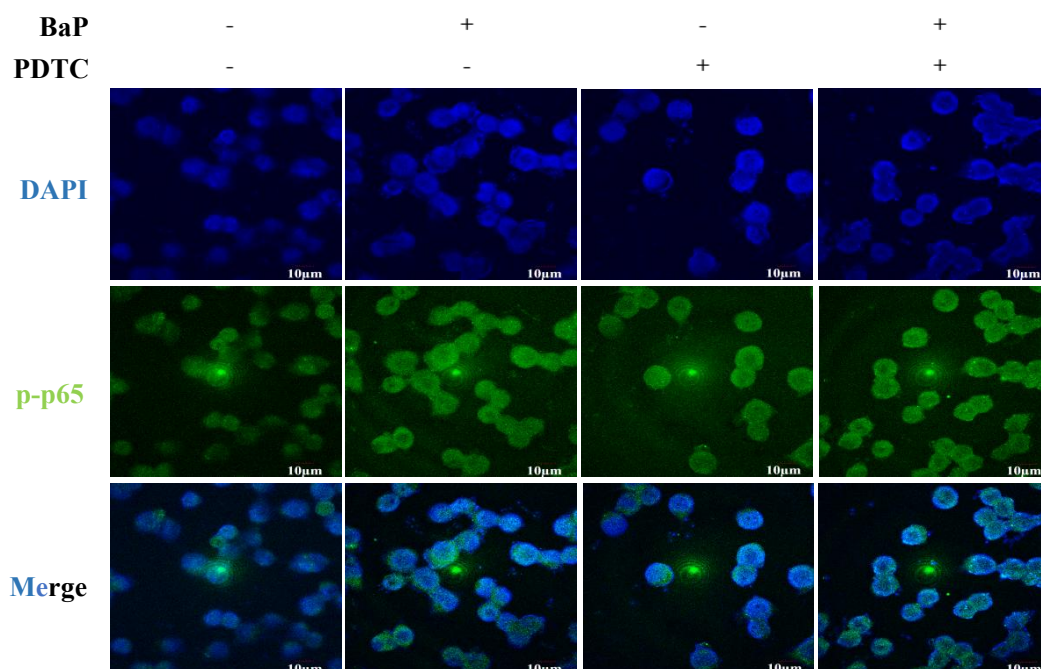


图 3-6 NF- κ B 抑制剂对 NF- κ B 核易位的影响

Figure 3-6 Effects of NF- κ B inhibitor on nuclear translocation of NF- κ B

此外，用 DAPI（蓝色）和抗磷酸化的 p65（绿色）对 PDTC 和 BaP 处理的细胞做免疫荧光标记，共聚焦显微镜观察如图 3-6 所示，与 BaP 组相比，PDTC 预处理可显著降低 NF- κ Bp65 亚基核易位数目。结果表明，PDTC 能抑制 NF- κ Bp65 亚基核易位和 NLRP3 炎症小体的激活，进而降低 BaP 诱发的细胞焦亡性损伤。证实 BaP 可以通过激活 NF- κ B，进而转录激活 NLRP3 炎症小体，最终诱发 Caspase-1 依赖性细胞焦亡。

3.4.5 ROS 抑制剂对 BaP 处理的肝细胞活力的影响

NAC 是一种常见的抗氧化剂，它可以显著降低有毒物质代谢产生的 ROS 数量；Mito-TEMPO 能够特异性地去除线粒体中的 ROS。为了探究 ROS 抑制剂对肝细胞活力的影响，我们采用 NAC 和 Mito-TEMPO 作用 BaP 暴露下的细胞并测定 24 h 后细胞的活力，结果如图 3-7 所示，与 BaP 单独处理组相比，NAC+BaP 和 Mito-TEMPO+BaP 组细胞活力分别提高 19.26%、8.54% ($p<0.05$)。表明 BaP 可

通过促进 ROS 生成，降低细胞活力。

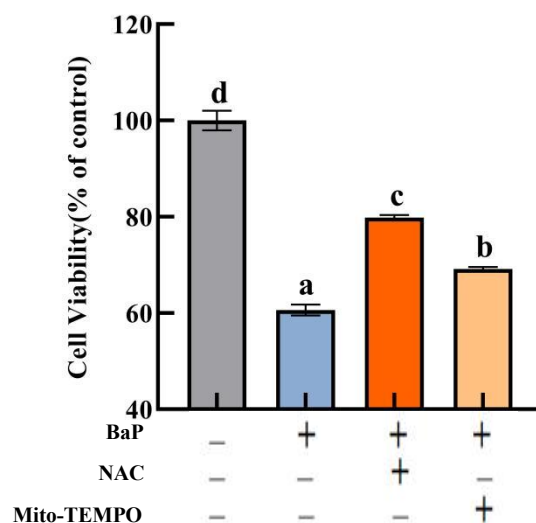


图 3-7 ROS 抑制剂对焦亡细胞活力的影响

Figure 3-7 Effects of ROS inhibitor on the viability of pyroptotic cells

3.4.6 ROS 抑制剂对 BaP 诱发的 NF- κ B、NLRP3 炎症小体和焦亡特征指标的影响

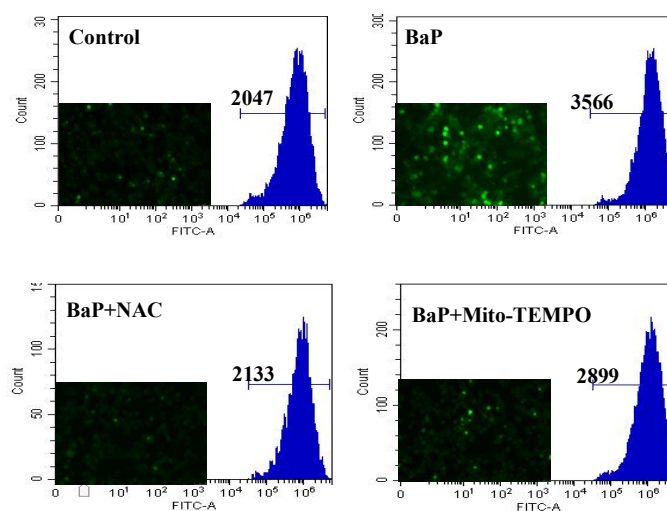


图 3-8 ROS 抑制剂对 ROS 生成量的影响

Figure 3-8 Effects of ROS inhibitor on the content of ROS

当细胞受到损伤或者有害物攻击时会产生大量 ROS, 因此细胞中 ROS 的含量也被作为细胞是否受损的重要参考。本试验使用倒置荧光显微镜和流式细胞仪对细胞中的活性氧数目进行观察和定量。由于无色 DCFH 可以被 ROS 氧化为绿色荧光 (DCF) 的特性, 荧光显微镜观察如图 3-8 所示, 与对照组相比, BaP 组绿色荧光强度明显强烈; 与 BaP 单独处理组相比, NAC 或 Mito-TEMPO 预处理组可以显著降低绿色荧光强度。流式细胞仪检测结果如图 3-8 所示, 对照组、BaP 组、BaP+NAC 组、BaP+Mito-TEMPO 组 ROS 含量分别为 2047、3566、2133、2899。表明 BaP 暴露会产生大量的 ROS, 这与 Cui 等^[85]结果一致, NAC 或 Mito-TEMPO 均可以降低 ROS 数目, 降低细胞受损程度。

ROS 是 NLRP3 炎性小体激活的触发器, 线粒体中的 ROS 也能通过 NF- κ B 通路激活 NLRP3 炎性小体^[86,87]。尼古丁^[88]和慢性乙醇^[89]刺激产生的 ROS 可诱导 NLRP3 炎症小体和 Caspase-1 的激活, 最终导致细胞发生焦亡。Chen 的研究证明, 用 NAC 或 Mito-TEMPO 预处理可抑制 Cd 诱导的 NLRP3 激活和焦亡细胞死亡^[90]。如图 3-9 所示, 与 BaP 组相比, BaP+NAC 组、BaP+Mito-TEMPO 组 LDH 释放率、NO 含量、相对电导率等显著降低 ($p<0.05$)。此外, 参与细胞焦亡发生发展的相关蛋白 (NF- κ B、NLRP3、ASC、Caspase-1、GSDMD-N、IL-18、IL-1 β) 经 ROS 抑制剂处理后均呈现低表达。充分表明 ROS 是 BaP 诱发 Caspase-1 依赖性细胞焦亡的主要贡献者, ROS 的高表达可以激活 NF- κ B 和 NLRP3 炎症小体, 同时揭示 BaP 是通过 ROS/NF- κ B/NLRP3 信号通路诱发 Caspase-1 依赖性细胞焦亡。

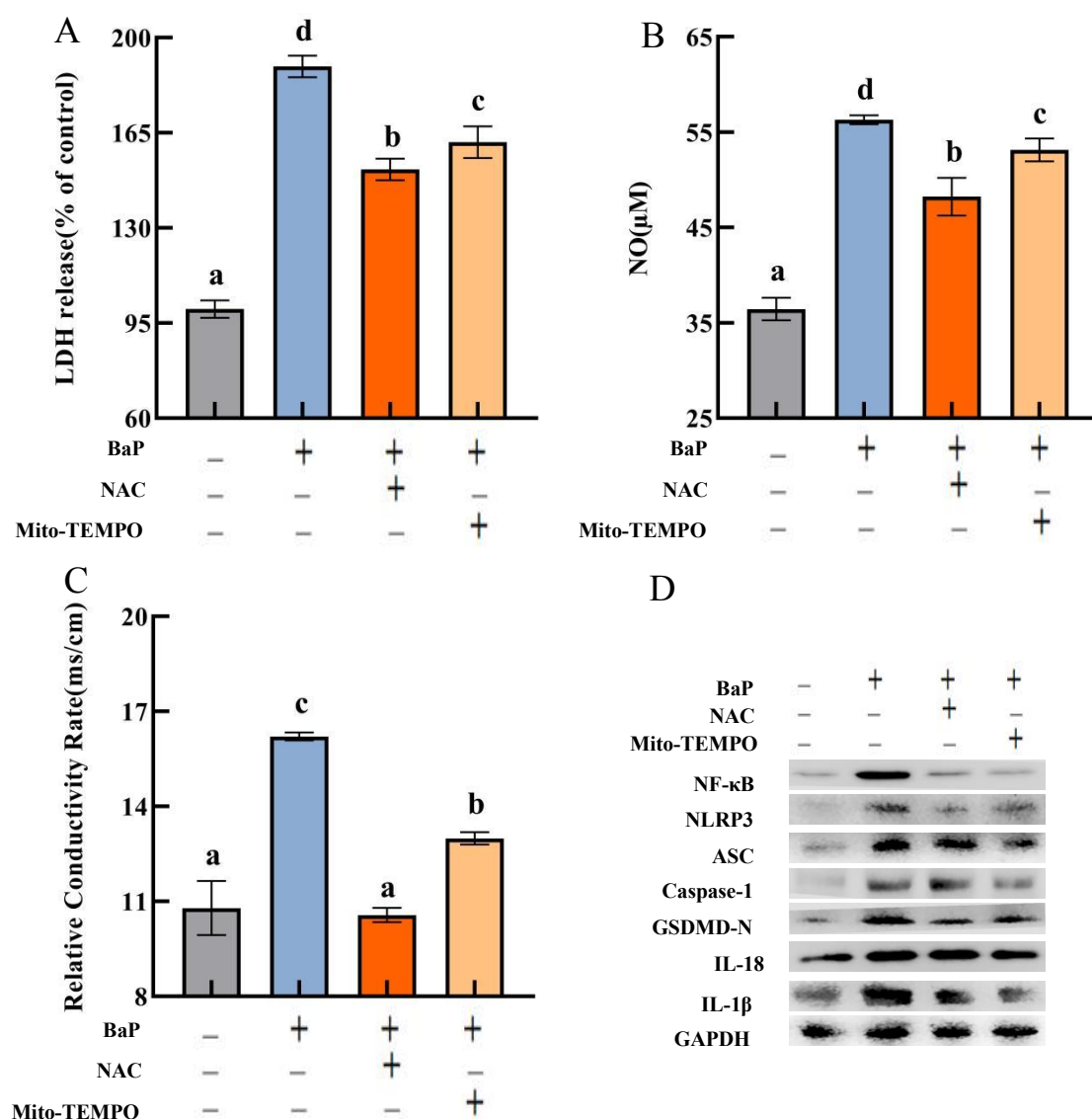


图 3-9 NF-κB 抑制剂对焦亡损伤的影响

LDH 释放(A), NO(B), 相对电导率(C), 焦亡特征蛋白表达(D)

Figure 3-9 Effects of NF-κB inhibitor on pyroptotic injury. LDH release(A), NO(B), relative conductivity rate(C), the expression of characteristic protein of pyroptosis(D)

3.5 本章小结

本章以 ROS、NF-κB、NLRP3 炎症小体等为靶点，探究 BaP 诱发肝细胞焦亡性损伤的机理，结果发现，Mito-TEMPO（mtROS 清除剂）与 NAC（总 ROS 清除

剂)、PDTC (NF- κ B 抑制剂)、MCC950 (NLRP3 炎症小体抑制剂) 的加入均可以减轻 BaP 诱发的焦亡性损伤, 充分阐明 BaP 通过 ROS/NF- κ B/NLRP3 信号通路诱发 Caspase-1 依赖性细胞焦亡的分子机制。

(1) NLRP3 抑制剂可以钝化 BaP 对 NLRP3 炎症小体, 以及 Caspase-1、GSDMD-N、炎症因子 (IL-18、IL-1 β)、LDH、NO 和相对电导率等焦亡特征指标的促进作用。表明 BaP 可以激活 NLRP3 炎症小体, 继而引发 Caspase-1 依赖性细胞焦亡。

(2) NF- κ B 抑制剂可以阻碍 BaP 对 NF- κ B 核易位、NLRP3 炎症小体, 以及 Caspase-1、GSDMD-N、炎症因子 (IL-18、IL-1 β)、LDH、NO 和相对电导率等焦亡特征指标的促进作用。表明 BaP 可以通过激活 NF- κ B, 进而转录激活 NLRP3 炎症小体, 最终诱发 Caspase-1 依赖性细胞焦亡。

(3) ROS 抑制剂可以抑制 BaP 对 ROS 产生、NF- κ B 核易位、NLRP3 炎症小体, 以及 Caspase-1、GSDMD-N、炎症因子 (IL-18、IL-1 β)、LDH、NO 和相对电导率等焦亡特征指标的促进作用。表明 BaP 可通过促进 ROS 产生激活 NF- κ B, 进而转录激活 NLRP3 炎症小体, 最终诱发 Caspase-1 依赖性细胞焦亡。即 BaP 通过 ROS/NF- κ B/NLRP3 信号通路诱发 Caspase-1 依赖性肝细胞焦亡(如图 3-10 所示)。

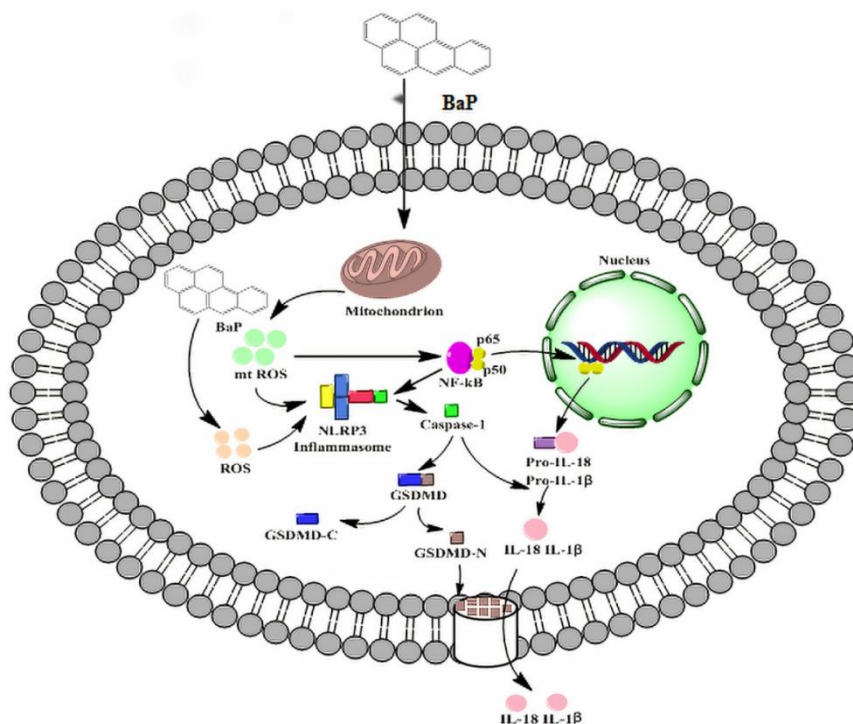


图 3-10 BaP 诱发 Caspase-1 依赖性肝细胞焦亡的机制

Fig. 3-10 Mechanism of Caspase-1-dependent hepatocyte pyroptosis induced by BaP

第四章 全谷物饮食对苯并(a)芘诱发小鼠肝脏焦亡性损伤的干预作用

4.1 引言

长期摄入苯并(a)芘会对小鼠的肝脏造成氧化和焦亡损伤，并有可能发展为患肝癌的风险^[24]。据报道，合理的饮食习惯对改善生理损伤具有重要意义^[91]。《中国居民膳食指南》（2022年版）建议成年人应确保每天全谷物摄入量超过 50 g，但调查显示高达 80%的成年人未达到标准摄入量^[92]。全谷物的消费和推广已成为我国健康饮食发展的重点。全谷物不仅含有一系列重要的营养素，包括膳食纤维、叶酸、硫胺素、镁和铁^[93]，而且还可以通过增加肠道菌群的丰富度来预防肠道疾病^[94]。中国的主要谷物包括燕麦、荞麦和玉米^[95]。然而，全谷物荞麦和燕麦对 BaP 诱导的肝损伤的影响尚不清楚。

本章采用 AIN-93M 饲料、全谷物荞麦（WGB）饲料和全谷物燕麦（WGO）饲料，研究全谷物饮食对 BaP 诱发小鼠肝脏焦亡性损伤的干预作用，为 BaP 的毒性控制提供新的思路。

4.2 材料与仪器

4.2.1 主要试剂

表 4-1 试剂及来源

Table 4-1 Main reagents

名称	规格/纯度	生产厂家
苯并(a)芘 (BaP)	≥99%	Sigma
乙酸 (Acetate)	标准品	Sigma
丙酸 (Propionate)	标准品	Sigma
异丁酸 (Isobutyrate)	标准品	Sigma
丁酸 (Butyrate)	标准品	Sigma
2-乙基丁酸 (2-ethylbutyric acid)	内标	Sigma
蛋白浓度测定 (BCA) 试剂盒	100 次	Thermo Fisher
总甘油三酯 (TG) 试剂盒	50 次	南京建成公司
总胆固醇 (TC) 试剂盒	100 次	南京建成公司
丙氨酸转氨酶 (ALT) 试剂盒	100 次	南京建成公司
天冬氨酸转氨酶 (AST) 测定试剂盒	100 次	南京建成公司
超氧化物歧化酶 (SOD) 试剂盒	100 次	南京建成公司
谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 试剂盒	100 次	南京建成公司
过氧化氢 (H ₂ O ₂) 试剂盒	100 次	南京建成公司
丙二醛 (MDA) 试剂盒	100 次	南京建成公司
BPDE-DNA 加合物试剂盒	100 次	先锋生物有限公司
反转录试剂盒	100 次	英利柏奥公司
qPCR 试剂盒	100 次	英利柏奥公司
Trizol	100 mL	生工生物

4.2.2 试验设备

表 4-2 试验仪器设备

Table 4-2 Test instrument and equipment

名称	型号	生产厂家
全波长酶标仪	Multiskan SkyHigh	Thermo Fisher
微型离心机	JZ-2105A	九州晟欣实验用品有限公司
超高速低温离心机	HC-3016R	海天友诚实验仪器有限公司
电热恒温水浴锅	304	苏州威尔科技用品有限公司
PCR 扩增仪	CFX-384	伯乐公司
万分之一天平	BSA2202S	北京赛多利斯
-80℃冰箱	308L	捷盛
立式压力蒸汽灭菌器	LX-C75L	成都宜恒
倒置荧光显微镜	Ti-S	日本尼康
均质匀浆机	SRS200	上海新勒

4.3 试验方法

4.3.1 饲料

基本维持饲料 (AIN-93M)、含荞麦饲料 (WGO)、含燕麦饲料 (WGB) 购自北京博泰宏达生物技术有限公司, 其中含荞麦饲料与含燕麦饲料中纯度为 40%。三种饲料都提供了相同的能量, 4002.8 千卡 (包括 77.07% 的碳水化合物, 4% 的脂肪, 14% 的蛋白质和 4.93% 的其他)。与 AIN-93M 饲料相比, WGB 和 WGO 粉取代了酪蛋白、蔗糖、玉米淀粉、纤维素和大豆油的部分能量。成分表 4-3 所示。

表 4-3 三种小鼠饲料配方

Table 4-3 Formula of three different feeds

Ingredient 成分	基本维持饲料		含荞麦饲料		含燕麦饲料	
	(AIN-93M)	(g/kg)	(WGB)	(g/kg)	(WGO)	(g/kg)
Casein 酪蛋白	140		80		93.7	
Dextrinized Cornstarch 糊精化玉米淀粉	155		155		155	
Sucrose 蔗糖	100		94		99.2	
Corn Starch 玉米淀粉	465.7		232		184.8	
Cellulose 纤维素	50		14.7		33	
Soybean Oil 豆油	40		20		30	
AIN-93M Mineral Mix 矿物组合	35		35		35	
L-Cystine L-胱氨酸	1.8		1.8		1.8	
AIN-93-VX Vitamin Mix 维生素	10		10		10	
Choline bitartrate 重酒石酸胆碱	2.5		2.5		2.5	
tert-Butylhydroquinone 特丁基对苯二酚	0		0		0	
Whole grain buckwheat powder 燕麦	0		400		0	
Whole grain oat powder 荞麦	0		0		400	
Total weight 总重量	1000		1000		1000	
*Energy ratio 能量占比						
Carbohydrate (kcal%) 碳水化合物	77.07		77.07		77.07	
Fat (kcal%) 脂肪	4.00		4.00		4.00	
Protein (kcal%) 蛋白质	14.00		14.00		14.00	
Other (kcal%) 其他	4.93		4.93		4.93	
Total energy (kcal) 总能量	4002.8		4002.8		4002.8	

4.3.2 动物试验设计

SPF 级 6 周龄健康雄性 Balb/c 小鼠购自西安交通大学实验动物中心。温度 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ，相对湿度 $60 \pm 5\%$ 的饲养环境，并伴随每 12 h 切换光照/黑暗条件；适应 1 周后将 36 只雄性 Balb/c 小鼠随机分成 6 组，每组 6 只。分组如下：空白组(Control)，灌胃 10 ml/kg·bw 橄榄油，饲养 AIN-93M 饲料；苯并(α)芘组(BaP)，灌胃 50 mg/kg·bw BaP（溶于橄榄油），饲养 AIN-93M 饲料；全谷物荞麦组(WGB)，灌胃 10 ml/kg·bw 橄榄油，饲养 WGB 饲料；全谷物燕麦组(WGO)，灌胃 10 ml/kg·bw 橄榄油，饲养 WGO 饲料；全谷物荞麦+苯并(α)芘组(WGB+BaP)，灌胃 50 mg/kg·bw BaP（溶于橄榄油），饲养 WGB 饲料；全谷物燕麦+苯并(α)芘组(WGO+BaP)，

灌胃 50 mg/kg·bw BaP（溶于橄榄油），饲养 WGO 饲料。三种饲料配方见表 1。每天灌胃 1 次，连续灌胃 30 天。处死前禁食 12 h 并收集粪便，采用颈椎脱臼法处死经乙醚麻醉的小鼠。将获取的血液离心后采集上清储存至 4℃冰箱进行后续血清指标测定，解剖后的脏器储存至-80℃冰箱。

4.3.3 小鼠体重、摄食量、摄水量测定

在试验过程中，自适应结束后第一天开始，之后每隔 6 天记录小鼠体重、摄食量、摄水量，并计算指标的变化趋势。

4.3.4 血清中 ALT、AST、TC、TG 的测定

对小鼠眼球取血处理后，将其断颈牺牲。随后将收集的血液离心（25℃，25 min，1000 r），吸取上清液至新的抗凝管。按照试剂盒说明书，使用多功能酶标仪对处理过的小鼠血清进行 AST、ALT、TC、TG 等生化指标含量的测定。

4.3.5 肝脏病理学观察

从-80℃冰箱中取出之前解剖的肝脏组织，迅速切取长度约为 3-4 cm 的小块部分，放置在装满 4%多聚甲醛的离心管中用于固定组织，其余组织尽快放回-80℃冰箱，整个过程在冰上进行。经过观察 H&E 染色切片、油红染色切片分别研究试验处理对肝脏组织病变和脂质合成的影响。

H&E 染色步骤包括：（1）石蜡切片脱蜡：将切片浸泡在二甲苯溶液中 30 min，连续三次，随后浸泡在无水乙醇中 10 min，连续三次，然后再浸泡在 75%酒精 10 min，最后用二次水对浸泡后的切片进行清洗。（2）苏木素染色：使用苏木素对切片入色 6 min，然后用二次水清洗切片，随后向切片上层加入分化液静置 10 s，继续使用二次水清洗切片，最后添加返蓝液用于切片组织返蓝，再用二次水清洗一次。

（3）伊红染色：依次将切片浸泡在 80%、90%酒精中脱水 5-10 min，随后使用伊红入色 10 min。（4）脱水封片：将切片浸泡在无水乙醇中 10 min，连续三次，然后再浸泡在二甲苯中 10min，连续三次，最后使用中性树胶对切片进行封片处理。

（5）倒置显微镜摄取图片并分析。

油红染色步骤包括：（1）切片固定：取冰冻切片放于干燥器中干燥 20 min，

然后加入固定液处理 20 min，随后用二次水清洗切片。（2）油红染色：在避光条件下，使用油红对切片入色 10 min。（3）分化背景：将染色后的切片浸泡在 60% 异丙醇溶液中分化 10 s，连续三次，随后用二次水清洗三次。（4）苏木素染色：向切片上层加入苏木素静置 5 min，然后使用二次水清洗切片上多余的染液。随后依次浸泡于分化液 10 s、返蓝液 2 s、二次水清洗三次。（5）甘油明胶用于封闭切片。（6）倒置显微镜摄取图片并分析。

4.3.6 肝脏中 BaP 代谢酶、BPDE-DNA 加合物的测定

取出储存在 -80℃ 冰箱中的肝脏组织放置在冰上，快速剪取 0.5 g 左右小块，浸泡在装满 5 mL 生理盐水的离心管中，然后使用匀浆机对离心管中的组织溶液进行匀浆，配置成 10% 的肝脏组织匀浆，随后离心（25℃，10 min，3000 r），取上清用于肝脏中 BPDE-DNA 加合物的检测。根据小鼠 BPDE-DNA 加合物 ELISA 检测试剂盒说明书，检测 450 nm 处吸光度并记录数值。BaP 代谢酶的测定方法见 4.3.8。

4.3.7 肝脏中 H₂O₂、MDA、GSH-Px、SOD 的测定

对冰箱里的肝脏组织做预处理（同 4.3.5），制成 10% 的肝脏组织匀浆并离心取上清液（25℃，10 min，3000 r）。根据试剂盒说明书指示，检测小鼠肝脏组织中 H₂O₂、MDA、GSH-Px、SOD 等指标。

4.3.8 肝脏中炎症因子及焦亡因子的 mRNA 表达量测定

4.3.8.1 RNA 提取

剪取约 50mg 肝脏组织置于 2mL 离心管中，然后加入 1mL Trizol 试剂，静置 10 min。随后加入 0.2mL 冰氯仿试剂，反复震荡 30s 后静置 10 min，再将离心管放置于离心机（4℃，10 min，10000 r），取上清液加入冰异丙醇并静置 15 min，再离心（4℃，10 min，10000 r），吸弃上清液。再用冰乙醇清洗三次、干燥后检测离心管中 RNA 浓度，做数据记录。

4.3.8.2 反转录

表 4-4 反转录相关试剂

Table 4-4 Main reagents

成分	体积
mRNA	1 μg ≤ a ≤ 100ng
Super Mix	4 μL
gDNA Remover	1 μL
RNase-free water	Variable
Total volumn	20 μL

- 按照反转录试剂盒说明书（表 4-4），向 8 连管中依次加入试剂。
- 混匀并孵育（42℃，15 min）。
- 高温灭酶活（85℃，5 s）。

4.3.8.3 RT-PCR

表 4-5 引物序列

Table 4-5 Primer sequence

引物	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')	大小
GAPDH	CCTCGTCCCGTAGACAAAATG	TGAGGTCAATGAAGGGGTCGT	133bp
CYP1A1	ACCATGACCGGGAACGTGTG	TGCTGAGGACCAGAAGACCG	307bp
CYP1B1	CCTGCCACTATTACGGACATCT	GACCGTATTCTTGGGGATGTAGTAA	297bp
GST-P1	GATGGAGACCTCACCCCTTACC	GGGCCTTCACGTAGTCATTCTT	196bp
AhR	TGGCTTTGTGCTGGTTGTCA	ACTGCTGAAAGCCCAGGTAATC	83bp
NLRP3	CCGCGTGTTGTCAGGATCTC	AAGGGCATTGCTTCGTAGATAGA	251bp
ASC	CAGCACAGGCAAGCACTCATT	TCATCTTGTCTTGGCTGGTGG	130bp
Caspase-1	CAGGCAAGCCAAATCTTTATCAC	CAGGCAAGCCAAATCTTTATCAC	342bp
GSDMD	TAAGGCTCTGGAGACAACGGTG	TGACAATAGGAACAGGGAGGC	262bp
TNF- α	AGACCCTCACACTCACAACCA	CTTTGAGATCCATGCCGTTG	96bp
IL-1 β	GCATCCAGCTTCAAATCTCGC	TGTTTATCTCGGAGCCTGTAGTG	256bp
IL-18	CCATGTCAGAAGACTCTTGCGT	CAAAGTTGTCTGATTCCAGGTCTC	105bp
INOS	AGCTCGGGTTGAAGTGGTATG	CACAGCCACATTGATCTCCG	245bp
COX-2	ATAGACGAAATCAACAACCCCG	GGATTGGAAGTTCTATTGGCAG	193bp

表 4-6 qPCR 相关试剂

Table 4-6 Main reagents

成分	体积
样品	变量
Forward Primer (10 μ M)	0.4 μ L
Reverse Primer (10 μ M)	0.4 μ L
Tip Green qPCR Supermix	10 μ L
Nuclease-free Water	Variable
Total volumn	20 μ L

- 设计引物，如表 4-5。
- 按照 qPCR 试剂盒说明书（表 4-6），向 8 连管中依次加入试剂。
- 设定程序：先孵育（94℃，30 s），再循环孵育（94℃，5 s；60℃，30 s）40 次。
- 以 GAPDH 为内参，参照 $\Delta\Delta$ Ct 法计算肝脏中炎症因子和焦亡因子 mRNA 的相关表达量。

4.3.9 粪便短链脂肪酸的测定

根据 Burokas 等^[96]的方法测量短链脂肪酸的浓度。使用涡流混合器将粪便样品和 MilliQ 水（1 mL）均质 10 分钟，制备粪便水。然后向样品中加入乙醚（1.6 mL）和 H₂SO₄（50%，w/w），并在台式浓缩器上振荡（4℃，20 min）。随后对混合物进行离心（4℃，5 min，15000 r），上清液用 0.2 μ m 过滤器过滤以除去沉淀细菌和其他固体。再将其转移到 250 μ L 的插入物中，放置于一个 2 mL 的气相色谱小瓶中。采用 GC-2014C 气相色谱仪分析样品中的短链脂肪酸，以 2-ethylbutyric acid（2-乙基丁酸）为内标。用不同浓度的含有 acetate（乙酸）、propionate（丙酸）、iso-butyrate（异丁酸）和 n-butyrate（正丁酸）的标准混合物建立标准曲线。Varian Star Chromatography Workstation 6.0 版软件用于比较曲线的峰值。所有短链脂肪酸数据均以 μ g/g 表示。

4.3.10 粪便 16S rDNA 扩增子测序

采用 CTAB 或 SDS 方法对样本的基因组 DNA 进行提取, 并对 DNA 的纯度和浓度进行检测。根据测序区域的选择, 使用带 Barcode 的特异引物和高保真 DNA 聚合酶对选定的 V3-V4 可变区进行 PCR 扩增。PCR 产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳进行检测, 并对目标片段进行切胶回收, 胶回收采用 AxyPrepDNA 凝胶回收试剂盒 (AXYGEN 公司)。参照电泳初步定量结果, 对 PCR 扩增回收产物用 QuantiFluor™ -ST 蓝色荧光定量系统 (Promega 公司) 进行检测定量, 按照每个样本的测序量要求, 进行相应比例的混合。使用 NEB Next® Ultra™ DNA Library Prep Kit 建库试剂盒进行文库构建。构建好的文库通过 Agilent Bioanalyzer 2100 和 Qubit 进行质检, 文库质检合格后进行上机测序。

4.3.11 数据统计分析

使用 Graphpad 8、SPASS19.0 对数据分析处理及差异性分析 (Duncan 检验), 使用 QIIME 和 R 软件进行肠道菌群分析。

4.4 结果与分析

4.4.1 全谷物饮食对 BaP 暴露后小鼠摄食量、摄水量、体重的影响

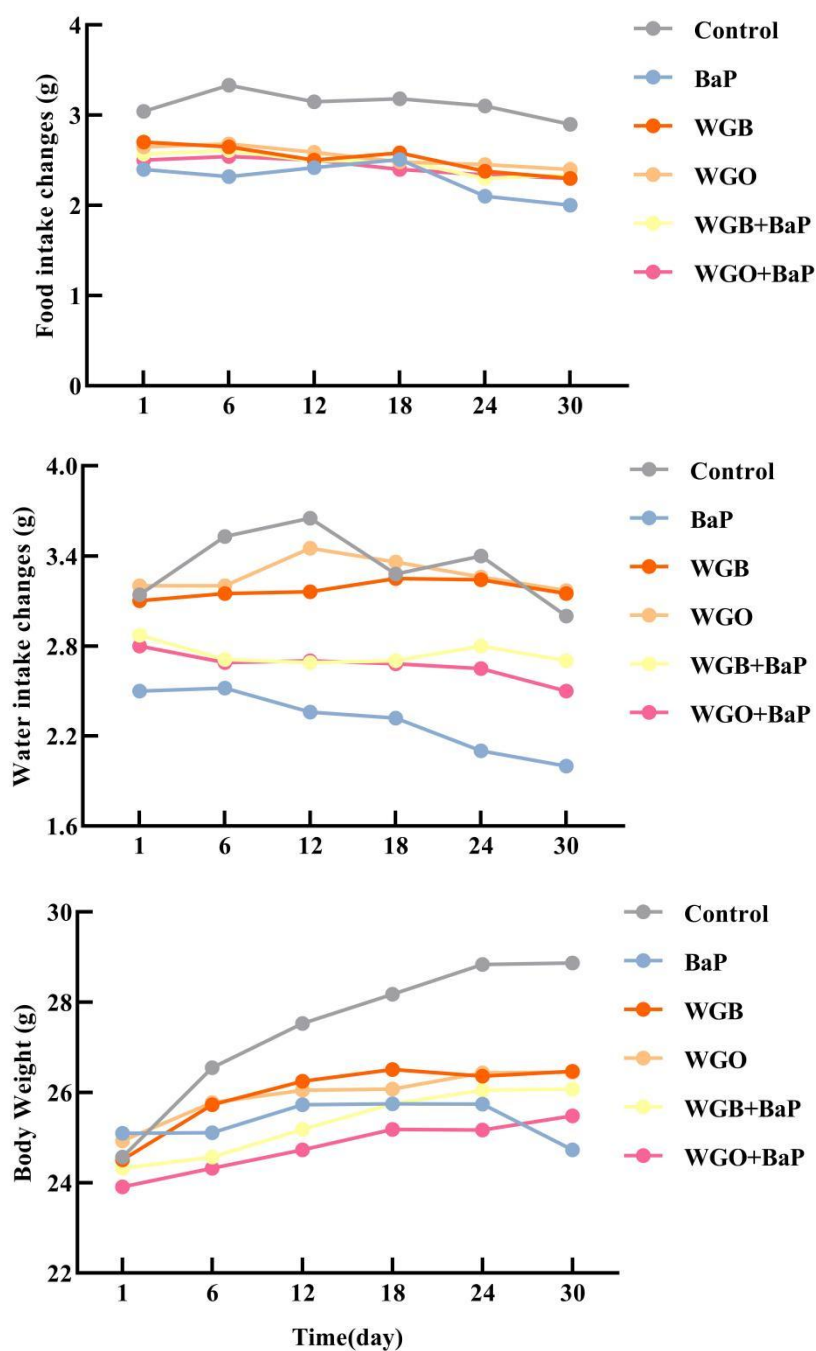


图 4-1 全谷物饮食对小鼠摄食量、摄水量、体重的影响

Figure 4-1 Effect of whole grain diet on food intake, water intake and body weight

体重、摄食量、摄水量如图 4-1 所示。BaP 组小鼠体重从第 18 天开始下降，第 30 天的体重已低于灌胃前小鼠体重，体重平均下降 0.37 g，这与 Li 的结果保持一致^[24]；WGB+BaP、WGO+BaP 组小鼠体重从第 18 天开始趋于稳定，最终的体重相较于灌胃前小鼠体重均有少量提升，摄入 WGB、WGO 的 BaP 暴露小鼠体重分别升高 1.76 g、1.57 g。与此同时，通过摄食量、摄水量的变化表明全谷物膳食对长期摄入 BaP 的小鼠食欲有明显的改善作用。这是因为全谷物中含有的膳食纤维被肠道中的微生物利用，产生一部分短链脂肪酸，可能改善肠道微生物结构，从而对小鼠食欲产生影响^[97-99]。

4.4.2 全谷物饮食对 BaP 诱发的小鼠肝功能紊乱的影响

天冬氨酸转移酶（AST）、谷丙转氨酶（ALT）通常被认作判断肝脏组织是否受损的重要指标^[100]。如图 4-2 A, B 所示，BaP 组与对照组相比，小鼠血清中的 AST、ALT 含量明显升高，BaP 组的 AST 相比于对照组增加 23.85 ± 1.83 ($p < 0.05$)，ALT 增加 32.78 ± 1.96 ($p < 0.05$)，WGB、WGO 干预可以显著降低 AST、ALT 水平，WGB+BaP、WGO+BaP 组 AST 与 BaP 组相比，分别降低 6.55 ± 1.90 、 7.91 ± 1.25 ($p < 0.05$)，ALT 分别降低 20.67 ± 1.89 、 22.67 ± 1.75 ($p < 0.05$)。本研究发现 BaP 会诱发肝脏组织中 AST、ALT 过量表达，导致肝脏组织损伤，大量 AST、ALT 外溢至血清中；而 WGB、WGO 的干预可以一定程度上减轻 BaP 对肝脏组织的损伤作用。正常机体在进行脂质代谢时，血清总胆固醇（TC）与甘油三酯（TG）始终保持动态平衡^[101,102]。如图 4-2 C,D 所示，BaP 组中 TC、TG 含量相比较其他几组有所升高 ($p < 0.05$)，但各组之间差异不大。

此外，肝脏组织病理学结果如图 4-3 所示，对照组、WGB 组、WGO 组肝组织相对正常，BaP 处理组肝细胞排列无序，肝细胞核数量明显减少，细胞间隔明显增加。经 WGB 或 WGO 干预后，肝细胞损伤程度减轻。肝脏的油红 O 染色图像如图 4-3 所示，摄入 BaP 可引起脂质减少和聚集，WGB 和 WGO 干预组对 BaP 诱发的脂质合成紊乱有缓解作用。表明 BaP 不仅会对肝脏功能造成损伤，而且会影响机体中脂质的正常代谢，甚至有发展为动脉粥样硬化等心血管疾病的风险；摄入 WGB、WGO 对 BaP 诱发的肝脏功能紊乱有缓解作用。

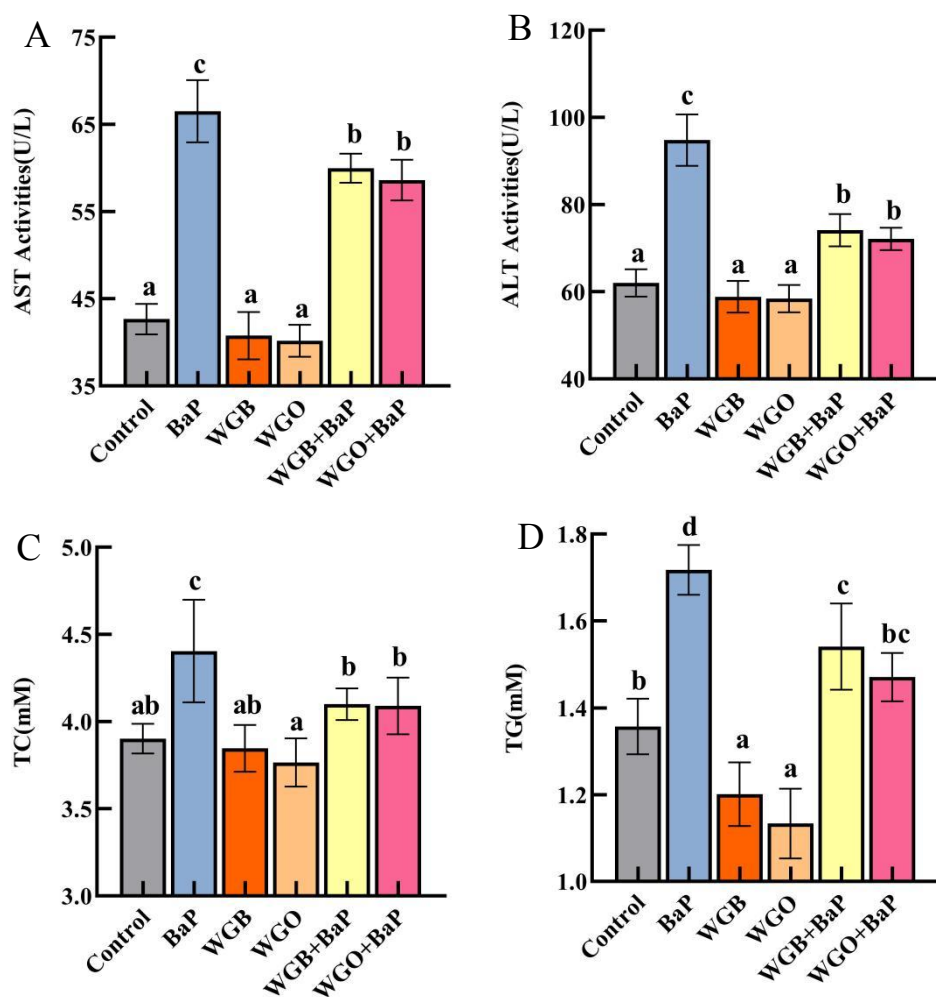


图 4-2 全谷物饮食对 AST(A)、ALT(B)、TC(C)、TG(D)的影响

Figure 4-2 Effects of whole grain diet on AST(A), ALT(B), TC(C) and TG(D)

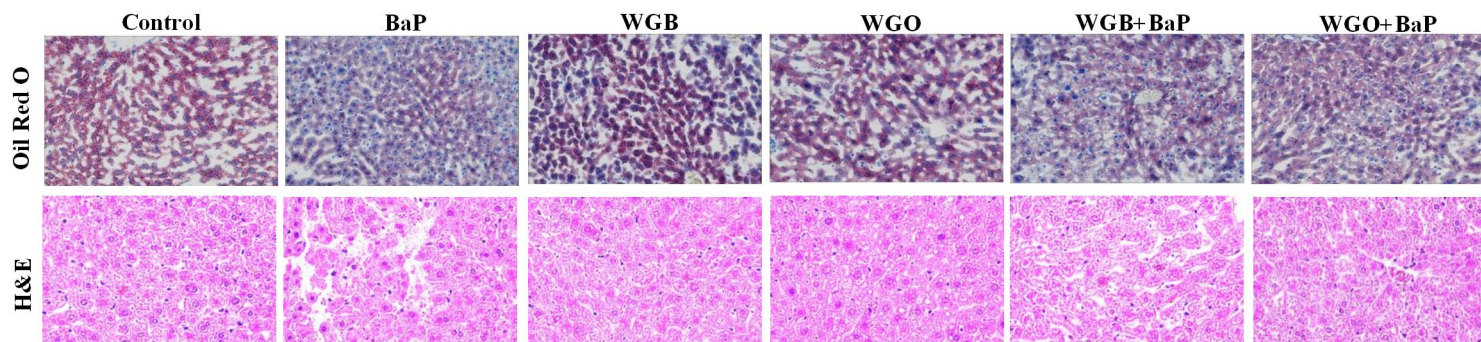


图 4-3 全谷物饮食对肝脏的影响

Figure 4-3 Effects of whole grain diet on liver

4.4.3 全谷物饮食对肝脏 BaP 代谢的影响

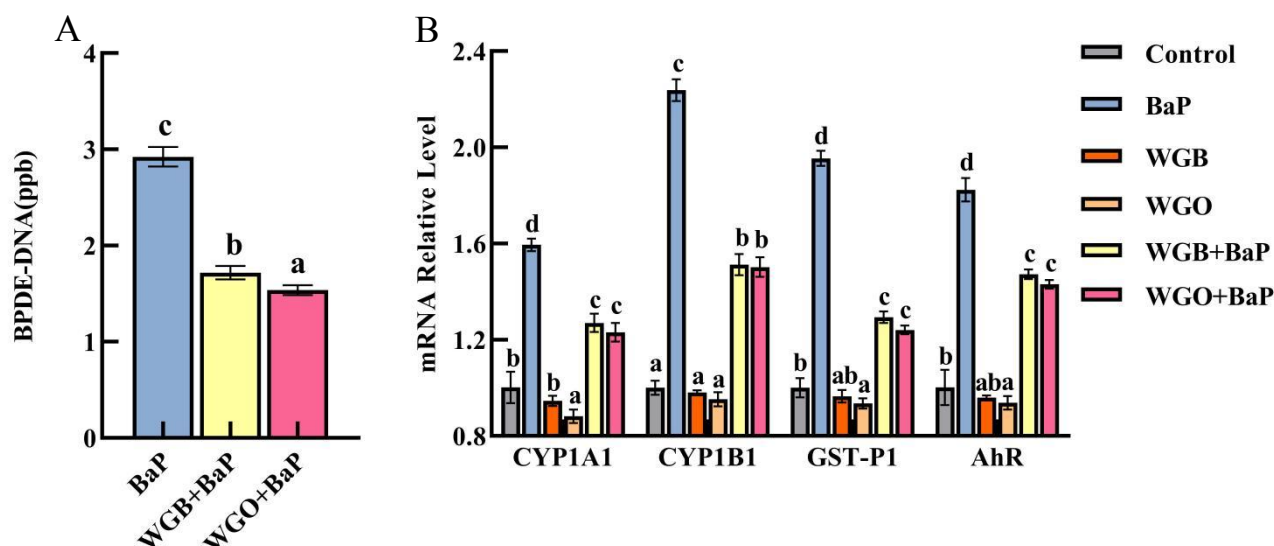


图 4-4 全谷物饮食对肝脏 BaP 代谢的影响

Figure 4-4 Effects of whole grain diet on BaP metabolism in liver

BaP 具有较强的致癌性，但它不是一种直接致癌物。只有当它进入生物体并经过代谢转化形成活性代谢物时，它才会产生致癌作用。BaP 作为外源性配体进入细胞体，与芳基烃受体（Aryl Hydrocarbon Receptor, AhR）结合形成异源二聚体，然后与 AhR 核转运体结合进入细胞核^[103]。CYP450 参与人体间接致癌物的酶促激活，其主要成员包括 CYP1A1、CYP1B1 等^[104]。当 BaP 进入人体后会被 CYP450 催化成为最终致癌物“苯并(a)芘 7,8-二氢二醇 9,10-环氧化物”（Benzo(a)pyrene 7,8-dihydrodiol 9,10-epoxies, BPDE）。BPDE 立即与细胞 DNA 结合并形成 BPDE-DNA 加合物，导致 DNA 损伤^[105]。GST-P1 是受 Nrf2 信号通路转录调控的 II 期解毒酶之一。GST-P1 催化还原性谷胱甘肽与毒物的结合，从而促进毒物代谢并使机体解毒^[106]。以 BPDE-DNA 加合物的含量水平作为 BaP 诱发 DNA 损伤的生物标志物。如图 4-4 A 所示，BaP 组、WGB+BaP 组、WGO+BaP 组小鼠的 BPDE-DNA 加合物含量分别为 2.92 ± 0.10 ppb, 1.72 ± 0.07 ppb 和 1.54 ± 0.05 ppb。表明 WGB、WGO 可以抑制肝脏内 BaP 主动与 DNA 的主动结合，降低 BPDE-DNA 加合物的生成 ($p < 0.05$)，且 WGO 比 WGB 干预效果更好。如图 4-4 B 所示，与对照组相比，长期摄入 BaP 会上调 CYP1A1、CYP1B1、GST-P1 和 AhR 等 mRNA 相对表达量 ($p < 0.05$)。与 BaP 组相比，WGB 或 WGO 可以显著降低 BaP 代谢相关酶表达

水平 ($p<0.05$)。表明 BaP 进入肝脏组织后, 会诱发 AhR 表达并与之结合, 同时刺激 CYP1A1、CYP1B1 和 GST-P1 等解毒酶的高表达 ($p<0.05$), 而摄入 WGB、WGO 能够显著抑制 BaP 转化形成有毒活性代谢物, 减轻 BaP 诱发的肝脏组织损伤。进一步证实, 全谷物荞麦和全谷物燕麦可以通过干预 BPDE-DNA 加合物的形成和抑制肝脏内 BaP 代谢, 进而减弱 BaP 诱发的 DNA 损伤。

4.4.4 全谷物饮食对 BaP 诱发的小鼠肝脏氧化损伤的影响

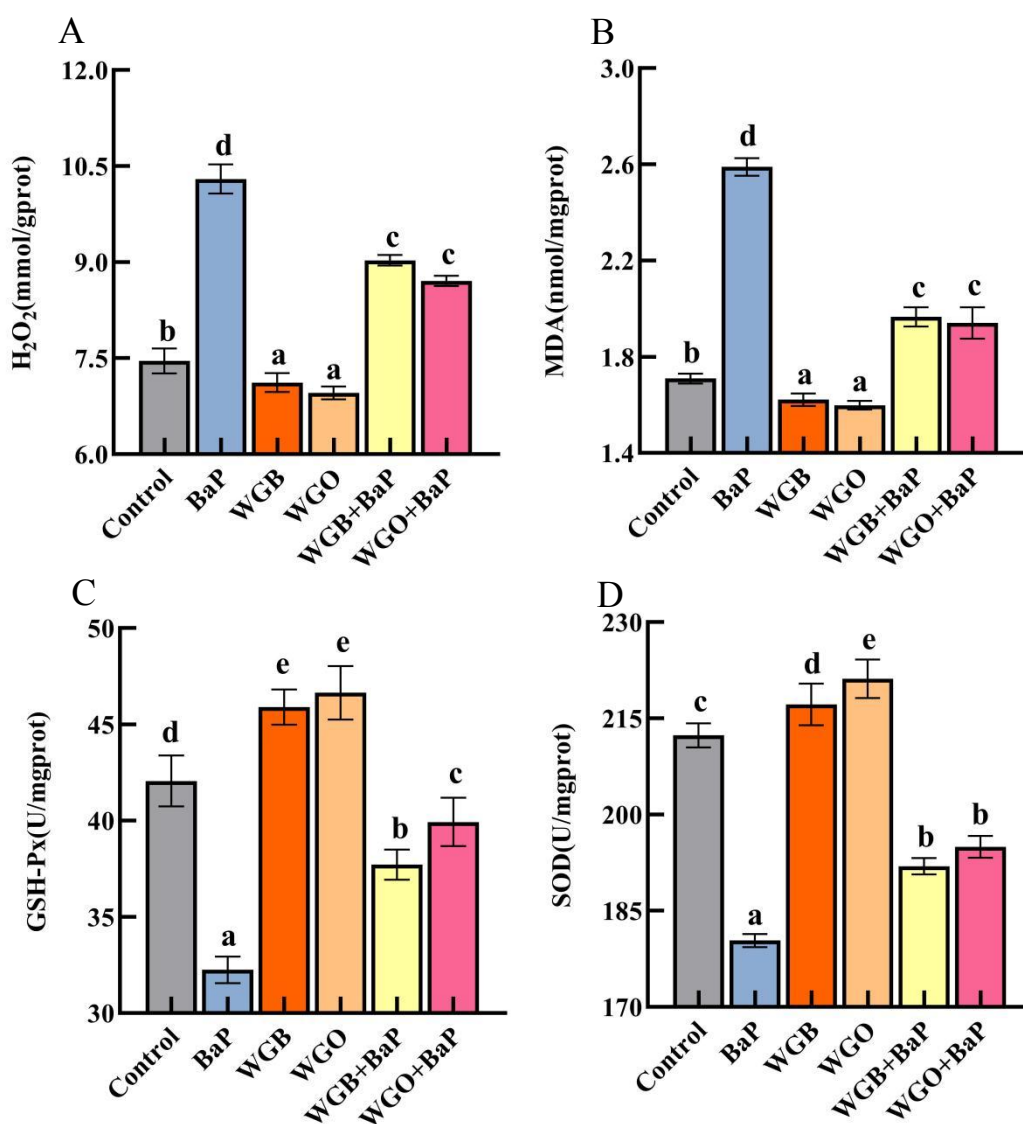


图 4-5 全谷物饮食对 H₂O₂(A)、MDA(B)、GSH-Px(C)、SOD(D)的影响

Figure 4-5 Effects of whole grain diet on H₂O₂(A), MDA(B), GSH-Px(C) and SOD(D)

生物体中 BaP 代谢过程中产生的自由基会导致机体氧化损伤,从而诱导体内的抗氧化系统启动保护机制^[107]。抗氧化系统主要包括 GSH-Px、SOD、CAT 等抗氧化酶,它们在机体的氧化和抗氧化平衡中起着重要作用^[108]。H₂O₂ 是体内最重要的活性氧,而体内的 GSH-Px 可以立即将其分解为完全无害的水^[109]。MDA 是自由基攻击膜不饱和脂肪酸的产物,越高浓度的 MDA 往往表明体内脂质过氧化水平越高^[110]。我们的研究(图 4-5)显示,与正常组相比,BaP 组 H₂O₂、MDA 分别升高 38.11%、51.47% ($p<0.05$),GSH-Px 和 SOD 分别降低 23.33%、15.07% ($p<0.05$),表明 BaP 打破了体内氧化和抗氧化之间的平衡,从而导致肝组织氧化损伤。与 BaP 单独处理组相比,WGB 或 WGO 与 BaP 共同处理组 H₂O₂、MDA 分别降低 12.33% / 15.43%、24.08% / 25.06% ($p<0.05$),GSH-Px 和 SOD 分别升高 16.95% / 23.81%、6.42% / 8.09% ($p<0.05$),表明全谷物荞麦与燕麦干预后可以减轻 BaP 诱发的肝脏氧化损伤。

4.4.5 全谷物饮食对 BaP 诱发的小鼠肝脏焦亡性损伤的影响

前面的章节研究发现,BaP 可以通过激活 NLRP3 炎症小体,引起 HL-7702 人肝细胞发生 Caspase-1 依赖性焦亡损伤。为探究全谷物饮食对 BaP 诱发的小鼠肝脏焦亡性损伤的干预作用,本试验检测了焦亡相关 mRNA 的相对表达水平。如图 4-6 所示,与 BaP 组相比,WGB 或 WGO 可以显著抑制 BaP 诱发的焦亡特征指标的 mRNA (NLRP3、ASC、Caspase-1、GSDMD、TNF- α 、IL-1 β 、IL-18、INOS、COX-2) 相对表达量升高 ($p<0.05$)。表明 WGB 和 WGO 可以抑制 NLRP3 炎症小体的激活,从而削弱 BaP 诱发的 Caspase-1 依赖性焦亡损伤。充分证实全谷物饮食对 BaP 诱发的 Caspase-1 依赖性焦亡损伤具有一定的治疗效果,并为控制 BaP 的毒性提供新的思路。

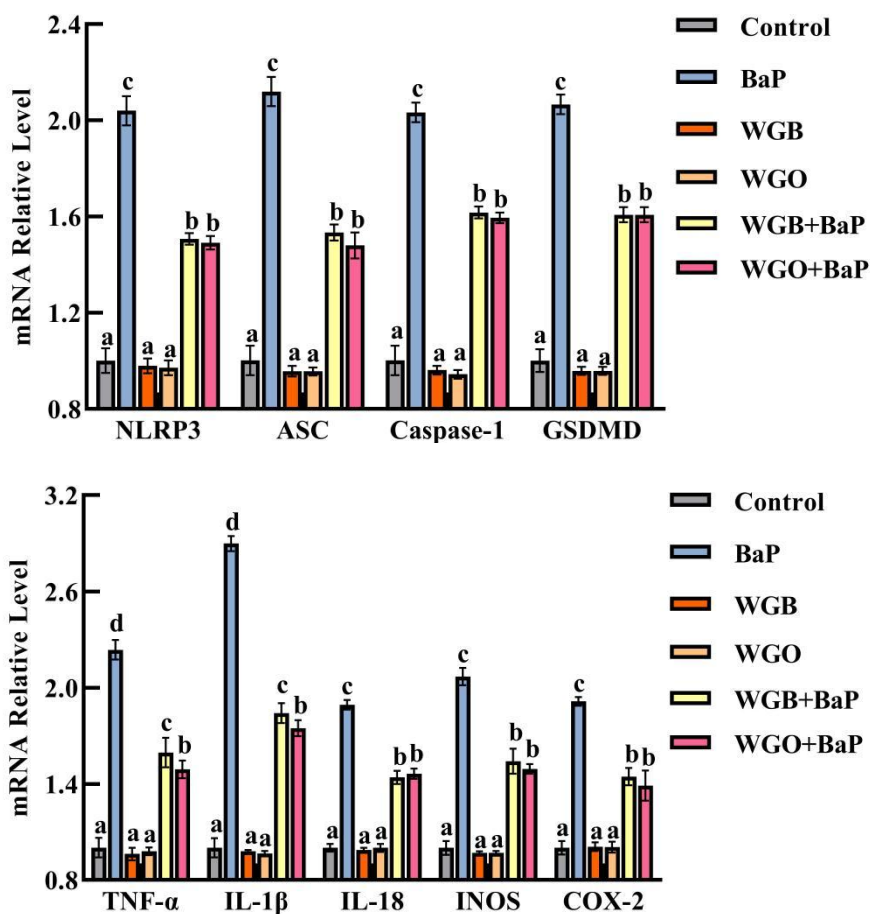


图 4-6 全谷物饮食对焦亡和炎症因子的影响

Figure 4-6 Effects of whole grain diet on pyroptosis and inflammatory

4.4.6 全谷物饮食对 BaP 暴露后小鼠粪便短链脂肪酸的影响

短链脂肪酸 (short-chain fatty acids, SCFAs) 主要由盲肠和结肠微生物群代谢饮食中的膳食纤维、蛋白质、多肽等营养物质产生, 对宿主生理的各个方面都有广泛的影响^[111]。SCFAs 主要包括乙酸、丙酸和丁酸等^[112-114]。乙酸主要负责机体正常的脂质代谢, 对高血压和肥胖的发生有一定的预防作用^[115,116]。丙酸参与机体的正常代谢活动^[117]。与乙酸一样, 丁酸也能降低高血压小鼠的血压, 但不影响健康小鼠的血压^[118]。此外, 丁酸可以降低肝脏的氧化应激反应^[119,120]。各组小鼠粪便中 SCFAs 的含量如图 4-7 所示。与对照组相比, BaP 组的乙酸、丙酸、丁酸和异丁酸含量显著降低 ($p < 0.05$), 表明长期摄入 BaP 会降低 SCFAs 的生成; 同时, WGB+BaP 组和 WGO+BaP 组的 SCFAs 含量均高于 BaP 组 ($p < 0.05$), 说明摄入 WGB 和

WGO 可以缓解 BaP 暴露小鼠粪便中 SCFAs 含量的下降, 尤其是 WGO。

荞麦的重要成分是黄酮类化合物, 可用于治疗炎症性疾病、高血压等^[121,122]。燕麦具有较高的营养价值, 含有蛋白质、脂肪、酚类化合物、矿物质和 β -葡聚糖^[123,124]。 β -葡聚糖只存在于燕麦中, 而不存在于荞麦中。 β -葡聚糖不仅对小鼠免疫功能有积极作用, 增强小鼠抗感染能力^[125], 还可以调节肠道菌群构成^[126], 从而缓解 BaP 诱发的小鼠肝脏损伤。同时, β -葡聚糖的存在可能也是 WGO 比 WGB 治疗效果更好的原因之一。总的来说, 全谷物饮食对身体有有益的影响, 其中 WGO 优于 WGB。荞麦和燕麦均具有降低 BaP 毒性的作用, 这可能是由于摄入黄酮类物质和 β -葡聚糖, 改善肠道菌群组成, 减轻 BaP 诱发的肝脏毒性。

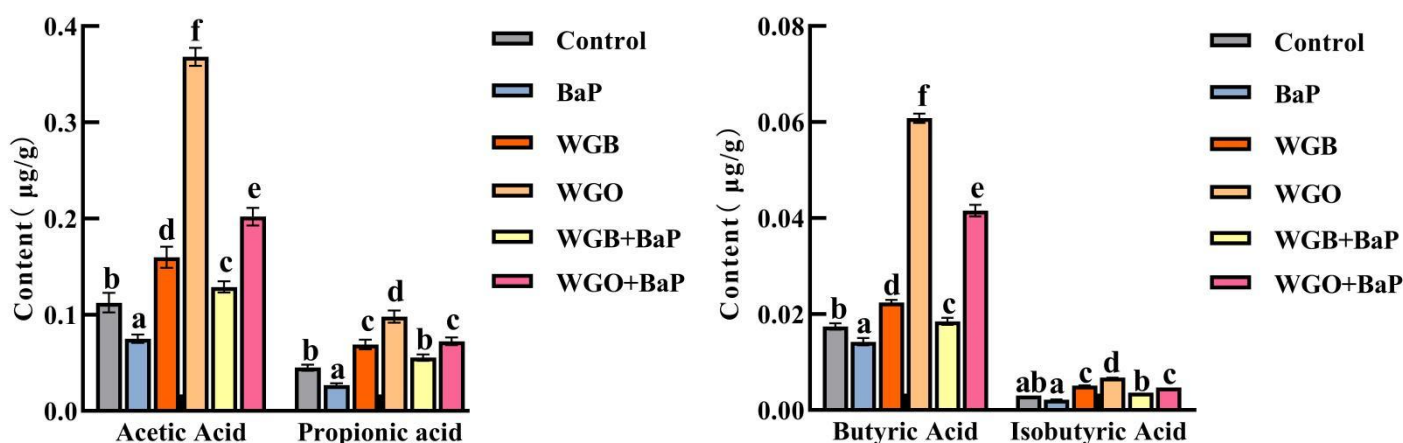


图 4-7 全谷物饮食对短链脂肪酸的影响

Figure 4-7 Effects of whole grain diet on SCFAs

4.4.7 全谷物饮食对 BaP 暴露后小鼠肠道菌群的影响

肠道菌群是一个庞大的整体, 其菌种构成比例、多样性、丰富度与人体健康具有紧密的相关性。不同的肠道菌群构成对人体正常代谢、生理活动以及免疫系统有着不同的影响, 饮食是改善肠道菌群构成的因素之一。当前社会, 饮食已然成为丰富肠道中微生物多样性的重要手段, 并参与肝损伤、心血管代谢异常等疾病的发生发展, 对相关疾病的临床治疗提供新的思路。本试验检测了全谷物饮食对 BaP 暴露后小鼠肠道菌群的相关变化。

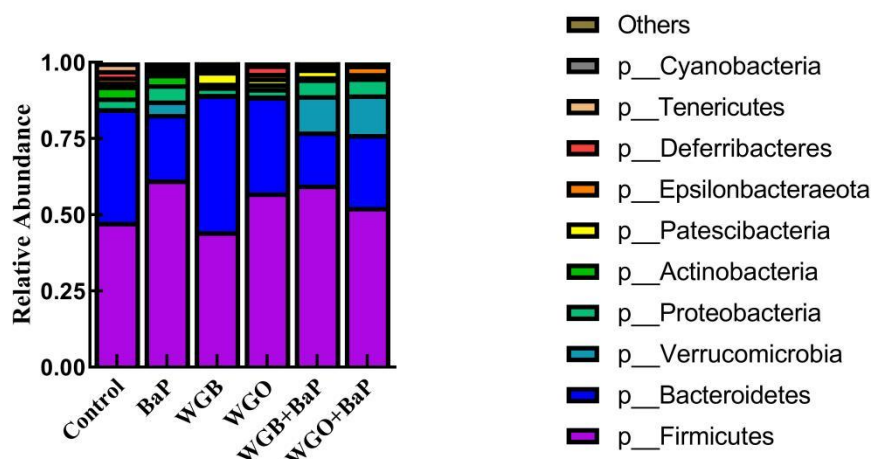


图 4-8 各分组门水平物种相对丰度柱状图

Figure 4-8 The composition of intestinal flora in different groups of mice at phylum level

图 4-8 表示的是各组在门水平的丰度前十的肠道菌群代表。根据图 4-8 可知，BaP 组的厚壁菌门（*Firmicutes*）、疣微菌门（*Verrucomicrobia*）和变形菌门（*Proteobacteria*）丰度较 Control 组增加，而拟杆菌门（*Bacteroidetes*）丰度降低；与 BaP 组相比，WGB、WGO 的添加使得厚壁菌门丰度降低、疣微菌门丰度增加。长期摄入 BaP 会提高厚壁菌门、疣微菌门、变形菌门丰度，降低拟杆菌门丰度，导致厚壁菌门和拟杆菌门的比值升高。李玉串^[127]分析厚壁菌门、变形菌门丰度的提高和拟杆菌门丰度的下降可能与动脉粥样硬化的发生发展有关系。另有研究报道肥胖人群、高血压患者中的厚壁菌门和拟杆菌门的比值偏高^[128,129]，拟杆菌门的产物包括乙酸、丁酸，说明 BaP 可能通过降低拟杆菌门丰度，影响乙酸、丁酸合成速率，从而引起高血压。WGB+BaP、WGO+BaP 组的相关菌群有倾向于对照组的趋势，表明全谷物饮食对高血压有一定的预防作用，其中 WGO 的效果更为显著。

图 4-9 表示为各组小鼠肠道微生物多样性的比较。Shannon 指数与 Simpson 指数表示菌群的多样性，Chao1 指数与 ACE 指数表示菌群的丰度，Observed species 表示为 OTU 数目，Coverage 为测序深度指数。与 Control 组相比，BaP 组 Shannon 指数、Simpson 指数、Observed species 减少；与 BaP 组相比，WGB 组和 WGO 组显著提高菌群多样性与菌群丰度指数。表明 BaP 的加入会降低菌群多样性与菌群丰度，WGB 和 WGO 则可以提高菌群的丰富度。因此全谷物饮食可能通过增加菌群的丰富度以减轻 BaP 诱发的肝脏损伤。

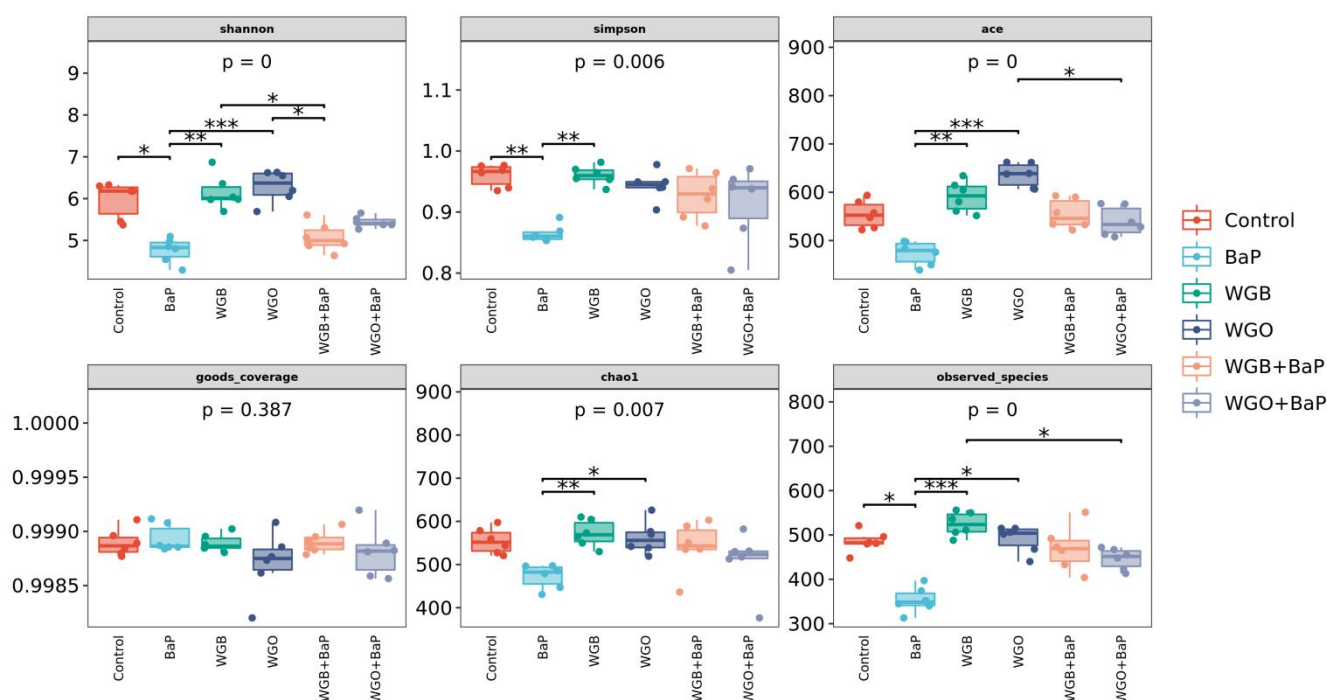


图 4-9 Alpha 多样性指数

Figure 4-9 Alpha diversity of intestinal flora

4.5 本章小结

本章基于 BaP 的毒性作用，采用全谷物饮食干预 BaP 暴露后小鼠，结果发现 WGB、WGO 可以通过抑制肝脏内 BaP 转化形成有毒活性代谢物，减少 BPDE-DNA 加合物形成，降低焦亡因子表达，促进短链脂肪酸生成，改善肠道菌群构成等减轻 BaP 诱发的肝脏损伤。表明全谷物饮食可作为抑制 BaP 毒性作用的有效方法。

(1) 长期摄入 BaP 会降低小鼠的体重、摄食量、摄水量，WGB、WGO 的加入可以改善小鼠的食欲，并抑制因 BaP 诱发的 AST、ALT、TC、TG 等指标上升，减轻肝脏功能紊乱。

(2) WGB、WGO 干预后可以抑制肝脏内 BaP 转化形成有毒活性代谢物有关代谢酶表达 (CYP1A1、CYP1B1 和 GST-P1 等) 和 BPDE-DNA 加合物的形成，同时下调 H_2O_2 、MDA，上调 GSH-Px、SOD 等水平，从而减弱 BaP 诱发的肝脏 DNA 损伤和氧化损伤。

(3) WGB 和 WGO 预处理可以降低焦亡因子 (NLRP3、ASC、Caspase-1、GSDMD) 和炎症因子 (TNF- α 、IL-1 β 、IL-18、INOS、COX-2) 的 mRNA 相对水

平，减轻 BaP 诱发的肝脏焦亡性损伤。

（4）WGB、WGO 的加入可以促进短链脂肪酸的生成，增加小鼠体内的肠道微生物多样性与丰度，对控制 BaP 的毒性具有重要意义。

第五章 结论与展望

5.1 结论

本文首先采用 Caspase-1 抑制剂, 阐明 BaP 诱发 Caspase-1 依赖性细胞焦亡; 基于 ROS/NF- κ B/NLRP3 信号通路, 采用该通路相关靶点抑制剂揭示 BaP 诱发 Caspase-1 依赖性肝细胞焦亡的分子机理; 并进一步探究全谷物饮食对 BaP 暴露下小鼠肝脏损伤的干预作用。结论如下:

(1) BaP (10 μ M、25 μ M 和 50 μ M) 组均呈现细胞活力下降 ($p<0.05$), 细胞周期比例失衡, LDH、NO、相对电导率显著升高 ($p<0.05$), 细胞形态异常并生成膜孔, 焦亡特征蛋白 (Caspase-1、GSDMD-N) 与炎症因子 (IL-18、IL-1 β) 相关蛋白表达量升高等现象。Caspase-1 抑制剂 Z-VAD-FMK 可以显著改善 BaP 诱发的细胞焦亡性损伤, 表明 BaP 可以诱发 Caspase-1 依赖性细胞焦亡。

(2) Mito-TEMPO (mtROS 抑制剂) 与 NAC (总 ROS 抑制剂)、PDTC (NF- κ B 抑制剂)、MCC950 (NLRP3 炎症小体抑制剂) 与 BaP 共同处理组细胞活力、ROS 数量、NF- κ B 核易位数目以及炎症和焦亡相关指标较 BaP 组明显好转, 表明以上抑制剂均可减轻 BaP 诱发的肝脏细胞焦亡, 阐明 BaP 通过 ROS/NF- κ B/ NLRP3 信号通路诱发 Caspase-1 依赖性细胞焦亡。

(3) WGB、WGO 的干预可以改善 BaP 暴露下小鼠的食欲, 减轻 BaP 诱发的肝脏组织损伤, 降低 BaP 造成的 DNA 损伤与肝脏氧化损伤, 抑制焦亡因子高表达。同时 WGB、WGO 的加入可以增加短链脂肪酸的生成量, 改善肠道菌群丰度与多样性。全谷物饮食可有效抑制 BaP 诱发的肝脏焦亡性损伤。

5.2 创新点

(1) 阐明 BaP 是通过 ROS/NF- κ B/NLRP3 信号通路诱发 Caspase-1 依赖性肝细胞焦亡性损伤;

(2) 揭示全谷物饮食对肝脏组织焦亡性损伤的缓解作用, 为预防 BaP 诱发的肝脏毒性提供新的方法。

5.3 展望

本论文揭示 BaP 诱发 Caspase-1 依赖性细胞焦亡的分子机制并探究全谷物饮食对 BaP 诱发的肝脏焦亡性损伤的干预作用。虽然全谷物饮食能够改善肠道菌群构成,但是与肝脏焦亡性损伤之间的联系尚不清楚,因此仍需要进一步深入研究肠道菌群与焦亡发生发展的相关性,揭示肠道菌群与预防 BaP 诱发的肝脏焦亡性损伤的机理。

参考文献

- [1] Alegbeleye O O, Opeolu B O, Jackson V A. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: A Critical Review of Environmental Occurrence and Bioremediation[J]. Environmental Management, 2017, 60(4):758-783.
- [2] Nadal M, Marques M, Mari M, et al. Climate change and environmental concentrations of POPs: A review[J]. Environmental Research, 2015, 143:177-185.
- [3] Fan M, Liu N, Wu X, et al. Tolerance and Removal of Four Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Compounds (PAHs) by Black Soldier Fly (Diptera: Stratiomyidae)[J]. Environmental Entomology, 2020, 49(3), 667-672.
- [4] Jian Y, Wang L, Fu P P, et al. Photomutagenicity of 16 Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from the US EPA Priority Pollutant List[J]. Mutation Research/ Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 2004, 557(1):99-108.
- [5] 王亚萍. 苯并(α)芘含量测定的前处理方法研究进展[J]. 安徽农业科学, 2016, 44(11): 96-98.
- [6] Gauthier P T, Norwood W P, Prepas E E, et al. Metal-PAH mixtures in the aquatic environment: A review of co-toxic mechanisms leading to more-than-additive outcomes[J]. Aquatic Toxicology, 2014, 154:253-269.
- [7] 朱小铃. 烹饪过程中多环芳烃的产生及控制[J]. 卫生研究, 2015, 44(1): 151-157.
- [8] 刘爽. 苯并芘通过抑制自噬诱导 RAW264.7 细胞脂质积聚的机制及营养干预剂的筛选[D]. 吉林: 吉林大学, 2020.
- [9] Baird W M, Hooven L A, Mahadevan B. Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action[J]. Environmental & Molecular Mutagenesis, 2010, 45(2-3):106-114.
- [10] Luch A, Baird W M. Metabolic Activation and Detoxification of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons[M]. 2005, 19-96.
- [11] Hockley S L, Arlt V M, D Brewer, et al. AHR- and DNA-damage-mediated gene expression responses induced by benzo(a)pyrene in human cell lines[J]. Chemical Research in Toxicology, 2007, 20(12):1797-1810.

- [12] Hockley S L, Arlt V M, Jahnke G, et al. Identification through microarray gene expression analysis of cellular responses to benzo(a)pyrene and its diol-epoxide that are dependent or independent of p53[J]. *Carcinogenesis*, 2008, 29(1):202-210.
- [13] Phillips D H, Venitt S. DNA and protein adducts in human tissues resulting from exposure to tobacco smoke[J]. *International Journal of Cancer*, 2012, 131(12): 2733-2753.
- [14] Fang A H, Smith W A, Vouros P, et al. Identification and characterization of a novel benzo[a]pyrene-derived DNA adduct[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 281(2):383-389.
- [15] Birkett N, Al-Zoughool M, Bird M, et al. Overview of biological mechanisms of human carcinogens[J]. *Journal of toxicology and environmental health-part B-critical reviews*, 2019, 22(7-8):288-359.
- [16] Jee S C, Kim M, Kim K S, et al. Protective Effects of Myricetin on Benzo[a]pyrene-Induced 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine and BPDE-DNA Adduct[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2020, 9(5):446.
- [17] Stiborová M, Dračínská H, Bořek-Dohalská L, et al. Exposure to endocrine disruptors 17alpha-ethinylestradiol and estradiol influences cytochrome P450 1A1-mediated genotoxicity of benzo[a]pyrene and expression of this enzyme in rats[J]. *Toxicology*, 2018, 400-401:48-56.
- [18] He J, Pang Q, Huang C, et al. Environmental dose of 16 priority-controlled PAHs mixture induce damages of vascular endothelial cells involved in oxidative stress and inflammation. *Toxicology in Vitro*. 2022, 79: 105296.
- [19] Lin Y C, Wu C Y, Hu C H, et al. Integrated Hypoxia Signaling and Oxidative Stress in Developmental Neurotoxicity of Benzo[a]Pyrene in Zebrafish Embryos[J]. *Antioxidants*, 2020, 9(8):731.
- [20] Tang J F. Benzo[a]pyrene induces oxidative stress and endothelial progenitor cell dysfunction via the activation of the NF-κB pathway[J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2013, 31: 922-930.
- [21] Forman H J, Zhang H. Targeting oxidative stress in disease: Promise and limitations of antioxidant therapy[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2021, 20: 689-709.
- [22] Adamovsky O, Buerger A N, Wormington A M, et al. The Gut Microbiome and Aquatic Toxicology: An Emerging Concept for Environmental Health[J].

- Environmental toxicology and chemistry, 2018, 37(11):2758-2775.
- [23] Bayha K M, Natalie O, Ryan C N, et al. Crude oil impairs immune function and increases susceptibility to pathogenic bacteria in southern flounder[J]. Plos One, 2017, 12(5):0176559.
- [24] Lloyd N A, Janssen S E, Reinfelder J R, et al. Co-selection of Mercury and Multiple Antibiotic Resistances in Bacteria Exposed to Mercury in the *Fundulus heteroclitus* Gut Microbiome[J]. Current Microbiology, 2016, 73(6):834-842.
- [25] Zhao Y, Liu H, Wang Q, et al. The effects of benzo[a]pyrene on the composition of gut microbiota and the gut health of the juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus* Selenka[J]. Fish Shellfish Immunol, 2019, 93: 369-379.
- [26] Ribière C, Peyret P, Parisot N, et al. Oral exposure to environmental pollutant benzo[a]pyrene impacts the intestinal epithelium and induces gut microbial shifts in murine model[J]. Scientific Reports, 2016, 6:31027.
- [27] He X, Qi Z, Hou H, et al. Structural and functional alterations of gut microbiome in mice induced by chronic cadmium exposure[J]. Chemosphere, 2020, 246:125747.
- [28] DeBofsky A, Xie Y, Grimard C, et al. Differential responses of gut microbiota of male and female fathead minnow (*Pimephales promelas*) to a short-term environmentally-relevant, aqueous exposure to benzo[a]pyrene[J]. Chemosphere. 2020, 252:126461.
- [29] Cookson B T, Brennan M A. Pro-inflammatory programmed cell death[J]. Trends in Microbiology, 2001, 9(3):113-114.
- [30] Shi J, Zhao Y, Wang K, et al. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death[J]. Nature, 2015, 526(7575): 660-665.
- [31] Shi J J, Gao W Q, Shao F. Pyroptosis: Gasdermin-mediated programmed necrotic cell death[J]. Trends in Biochemical Sciences, 2017, 42(4):245-254.
- [32] Galluzzi L, Vitale I, Aaronson S A, et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the nomenclature committee on cell death[J]. Cell Death and Differentiation, 2018, 25: 486-541.
- [33] 黄清宇, 杜楚江, 张雨竹, 等. 细胞焦亡研究进展[J]. 中国免疫学杂志, 2020, 36(2): 245-250.
- [34] 凡畅, 吴芙蓉, 张家富, 等. 细胞焦亡在肝纤维化发生发展中的作用[J]. 临床肝胆病杂志, 2020, 36(5):1138-1140.

- [35] 陈逸钊, 苏良平, 丘晓奕, 等. 细胞焦亡及其在肿瘤疾病中的作用[J]. 中国科学: 生命科学, 2020, 50(10):13.
- [36] Darcy M S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy[J]. International Federation for Cell Biology, 2019, 43:582-592.
- [37] Jia C, Chen H, Zhang J, et al. Role of pyroptosis in cardiovascular diseases[J]. International Immunopharmacology, 2019, 67: 311-318.
- [38] Wree A, Eguchi A, Mcgeough M D, et al. NLRP3 inflammasome activation results in hepatocyte pyroptosis, liver inflammation, and fibrosis in mice[J]. Hepatology, 2014, 59(3): 898-910.
- [39] 李楚翎, 邵晨烨, 刘红兵, 等. 介导细胞焦亡的杀手蛋白-Gasdermin D[J]. 医学研究生学报, 2018, 31(4): 435-439.
- [40] Kira S , Katsuse T , Nogami Y , et al. Measurement of Benzo(a)pyrene in Sea Water and in Mussels in the Seto Inland Sea, Japan[J]. Bulletin of Environmental Contamination & Toxicology, 2000, 65(5):631-637.
- [41] 高玮, 邓智辉. 检测食品中苯并芘的方法研究[J]. 粮食科技与经济, 2018, 43(08): 69-73.
- [42] 信维平. 苯并芘的致癌性及快速检测[J]. 肉品卫生, 2000, 02:16-17.
- [43] Chen H, Song Q, Diao X, et al. Proteomic and metabolomic analysis on the toxicological effects of benzo[a]pyrene in pearl oyster *Pinctada martensii*[J]. Aquatic Toxicology, 2016, 175: 81-89.
- [44] Ji X, Li Y, He J, et al. Depletion of mitochondrial Enzyme system in liver, lung, brain, stomach and kidney induced by benzo(a)pyrene[J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2016, 43: 83-93.
- [45] 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 & Food Chemistry, 2017, 65(44):9763-9773.
- [46] Li X, He S, Gao C, et al. Isoorientin attenuates benzo[a]pyrene-induced liver injury by inhibiting autophagy and pyroptosis in vitro and vivo[J]. Food and Agricultural Immunology. 2019, 30:841-861.
- [47] Li Q, Gao C, Deng H, et al. Benzo[a]pyrene induces pyroptotic and autophagic death through inhibiting PI3K/Akt signaling pathway in HL-7702 human normal liver cells[J]. The Journal of Toxicological Sciences, 2019, 44(2):121-131.
- [48] Kamp J, Poutanen K, Seal C J, et al. The HEALTHGRAIN definition of 'whole

- grain'[J]. Food & Nutrition Research, 2014, 58:1-8.
- [49] Johnson J, Wallace T. Whole Grains and their Bioactives[M]. 2019, 135-167.
- [50] Delcour J A , Poutanen K. Fibre-rich and wholegrain foods: improving quality[J]. woodhead publishing limited, 2013.
- [51] Shewry P R, Hawkesford M J, Piironen V, et al. Natural Variation in Grain Composition of Wheat and Related Cereals[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(35): 8295-8303.
- [52] Aune D , Keum N N , Giovannucci E , et al. Whole grain consumption and risk of cardiovascular disease, cancer, and all cause and cause specific mortality: systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies[J]. BMJ, 2016, 353:i2716.
- [53] 周小理, 周一鸣, 肖文艳. 荞麦淀粉糊化特性研究[J]. 食品科学, 2009(13): 45-48.
- [54] Campbell D, Antonio C, Gaetano C, et al. Benefits of the Mediterranean Diet in the Elderly Patient (Cham: Springer, 2018)[J]. Nordicum-Mediterraneum, 2020, 15(1):263-284.
- [55] Matsuda, T. Rice Flour: A Promising Food Material for Nutrition and Global Health[J]. Journal of nutritional science and vitaminology, 2019, 65: S13–S17.
- [56] Smith C E, Tucker K L. Health benefits of cereal fibre: A review of clinical trials[J]. Nutrition Research Reviews, 2011, 24:118-131.
- [57] Vitaglione P, Lumaga R B, Stanzione A, et al. β -Glucan-enriched bread reduces energy intake and modifies plasma ghrelin and peptide YY concentrations in the short term[J]. Appetite, 2009, 53: 338-344.
- [58] Aoe S, Ikenaga T, Noguchi H, et al. Effect of Cooked White Rice with High β -glucan Barley on Appetite and Energy Intake in Healthy Japanese Subjects: A Randomized Controlled Trial[J]. Plant Foods for Human Nutrition, 2014, 69: 325-330.
- [59] Hoad C L, Phillippa R, Spiller R C, et al. In Vivo Imaging of Intra gastric Gelation and Its Effect on Satiety in Humans[J]. Journal of Nutrition, 2004,134: 2293-2300.
- [60] van de Vijver L P L, van den Bosch L M C, van den Brandt P A, et al. Whole-grain consumption, dietary fibre intake and body mass index in the Netherlands cohort study[J]. European Journal of Clinical Nutrition, 2009, 63: 31-38.
- [61] Davani-Davari D, Negahdaripour M, Karimzadeh I, et al. Prebiotics: Definition,

- Types, Sources, Mechanisms, and Clinical Applications[J]. *Foods*, 2019, 8: 92.
- [62] Lin D, Peters B A, Friedlander C, et al. Association of dietary fibre intake and gut microbiota in adults[J]. *British Journal of Nutrition*, 2018, 120(9):1014-1022.
- [63] Sonnenburg E D, Smits S A, Tikhonov M, et al. Diet-induced extinctions in the gut microbiota compound over generations[J]. *Nature*, 2016, 529: 212-215.
- [64] Kaoutari A E , Armougom F , Gordon J I , et al. The abundance and variety of carbohydrate-active enzymes in the human gut microbiota[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2013, 11: 497-504.
- [65] Low Wang C C, Hess C N, Hiatt W R, et al. Clinical Update: Cardiovascular Disease in Diabetes Mellitus: Atherosclerotic Cardiovascular Disease and Heart Failure in Type 2 Diabetes Mellitus-Mechanisms, Management, and Clinical Considerations[J]. *Circulation*, 2016, 133(24): 2459-2502.
- [66] Slavin J L, Martini M C, Jacobs D R, et al. Plausible mechanisms for the protectiveness of whole grains[J]. *American Journal of Clinical Nutrition*, 1999, 70: 459s-463s.
- [67] Prasad K N, Bondy S C. Dietary Fibers and Their Fermented Short-Chain Fatty Acids in Prevention of Human Diseases[J]. *Mechanisms of Ageing Development*, 2019, 17: 30013-30017.
- [68] Sørensen L B, Raben A, Stender S, et al. Effect of sucrose on inflammatory markers in overweight humans[J]. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2005, 82: 421-427.
- [69] Mazidi M, Kengne A P, Mikhailidis D P, et al. Effects of selected dietary constituents on high-sensitivity C-reactive protein levels in US adults[J]. *Annals of Medicine*, 2018, 50:1-6.
- [70] Qi L, Hu F B. Dietary glycemic load, whole grains, and systemic inflammation in diabetes: the epidemiological evidence[J]. *Current Opinion in Lipidology*, 2007, 18(1):3-8.
- [71] Mao L, Kitani A, Strober W, et al. The Role of NLRP3 and IL-1 β in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease[J]. *Frontiers in Immunology*, 2018, 9:2566.
- [72] Vernon P J, Tang D. Eat-Me: Autophagy, Phagocytosis, and Reactive Oxygen Species Signaling[J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2013, 18(6):677-691.
- [73] Bergsbaken T, Fink S L, Cookson B T. Pyroptosis: host cell death and

- inflammation[J]. Nature Reviews Microbiology, 2009, 7(2):99-109.
- [74] Gao J, Cui J Z, To E, et al. Evidence for the activation of pyroptotic and apoptotic pathways in RPE cells associated with NLRP3 inflammasome in the rodent eye[J]. Journal of Neuroinflamm, 2018, 15(1): 15.
- [75] Chen W, Zhang X, Fan J, et al. Tethering Interleukin-22 to Apolipoprotein A-I Ameliorates Mice from Acetaminophen-induced Liver Injury[J]. Theranostics, 2017, 7(17):4135-4148.
- [76] Zhou R, Yazdi AS, Menu P, et al. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. Nature, 2011, 469(7329): 221-225.
- [77] Takahashi M. NLRP3 Inflammasome as a Novel Player in Myocardial Infarction[J]. International Heart Journal, 2014, 55(2):101-105.
- [78] Bauernfeind F G, Horvath G, Stutz A, et al. Cutting Edge: NF-kappaB Activating Pattern Recognition and Cytokine Receptors License NLRP3 Inflammasome Activation by Regulating NLRP3 Expression[J]. Journal of Immunology, 2009, 183(2):787-791.
- [79] Xiang H C, Lin L X, Hu X F, et al. AMPK activation attenuates inflammatory pain through inhibiting NF- κ B activation and IL-1 β expression[J]. Journal of Neuroinflammation, 2019, 16(1): 34.
- [80] Zhang X, Luan J, Chen W, et al. Mesoporous silica nanoparticles induced hepatotoxicity via NLRP3 inflammasome activation and caspase-1-dependent pyroptosis[J]. Nanoscale, 2018, 10: 9141-9152.
- [81] Man S M, Hopkins L J, Nugent E, et al. Inflammasome activation causes dual recruitment of NLRC4 and NLRP3 to the same macromolecular complex[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014, 111(20):7403.
- [82] Van O N, Gurung P, Vande W L, et al. Activation of the NLRP1b inflammasome independently of ASC-mediated caspase-1 autoproteolysis and speck formation[J]. Nature Communications, 2014, 5: 3209.
- [83] Li D, Zhou J, Yang B, et al. microRNA-340-5p inhibits hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis and oxidative stress in cardiomyocytes by regulating the Act1/NF- κ B pathway[J]. Journal of Cellular Biochemistry, 2019, 120: 14618-14627.
- [84] Wu X F, Ouyang Z J, Feng L L, et al. Suppression of NF- κ B signaling and NLRP3

- inflammasome activation in macrophages is responsible for the amelioration of experimental murine colitis by the natural compound fraxinellone.[J]. *Toxicology & Applied Pharmacology*, 2014, 281(1):146-156.
- [85] Cui Q, Chen F Y, Chen H Y, et al. Benzo[a]pyrene (BaP) exposure generates persistent reactive oxygen species (ROS) to inhibit the NF- κ B pathway in medaka (*Oryzias melastigma*)[J]. *Environmental Pollution*, 2019, 251:502-509.
- [86] Sun B, Wang X, Ji Z, et al. NADPH Oxidase-Dependent NLRP3 Inflammasome Activation and its Important Role in Lung Fibrosis by Multiwalled Carbon Nanotubes[J]. *Small*, 2015, 11: 2087-2097.
- [87] Guo C, Wang J, Jing L, et al. Mitochondrial dysfunction, perturbations of mitochondrial dynamics and biogenesis involved in endothelial injury induced by silica nanoparticles[J]. *Environmental Pollution*, 2018, 236: 926-936.
- [88] Wu X, Zhang H, Qi W, et al. Nicotine promotes atherosclerosis via ROS-NLRP3-mediated endothelial cell pyroptosis[J]. *Cell Death & Disease*, 2018, 9(2):171.
- [89] Hoyt L R, Randall M J, Ather J L, et al. Mitochondrial ROS induced by chronic ethanol exposure promote hyper-activation of the NLRP3 inflammasome[J]. *Redox Biology*, 2017, 12: 883-896.
- [90] Chen H, Lu Y, Cao Z, et al. Cadmium induces NLRP3 inflammasome-dependent pyroptosis in vascular endothelial cells[J]. *Toxicology Letters*, 2016, 246:7-16.
- [91] Katsimbri P, Korakas E, Kountouri A, et al. The Effect of Antioxidant and Anti-Inflammatory Capacity of Diet on Psoriasis and Psoriatic Arthritis Phenotype: Nutrition as Therapeutic Tool?[J]. *Antioxidants*, 2021, 10(2):157.
- [92] Wang S S, Lay S, Yu H N, et al. Dietary Guidelines for Chinese Residents (2016): comments and comparisons[J]. *Journal of Zhejiang University Science B*, 2016, 17(9): 649-656.
- [93] Marsh T, Walker K, Gonzalez C R, et al. Nutrition Professionals' Knowledge, Consumption and Recommendations of Whole Grains-ScienceDirect[J]. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 2021, 121(9S): A28.
- [94] Gong L, Cao W, Chi H, et al. Whole cereal grains and potential health effects: Involvement of the gut microbiota[J]. *Food Research International*, 2018, 103:84-102.
- [95] Xin L J, Li P H. Variation of grain consumption characteristics and safety

- cultivated land area in China[J]. Editorial Office of Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2017, 33(13): 1-7.
- [96] Burokas A, Arboleya S, Moloney R D, et al. Targeting the Microbiota-Gut-Brain Axis: Prebiotics Have Anxiolytic and Antidepressant-like Effects and Reverse the Impact of Chronic Stress in Mice[J]. Biological Psychiatry, 2017, 82: 472-487.
- [97] Tremaroli V, Bäckhed F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism[J]. Nature, 2012, 489(7415): 242-249.
- [98] Hughes S A, Shewry P R, Li L, et al. In vitro fermentation by human fecal microflora of wheat arabinoxylans[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(11):4589-4595.
- [99] Cani P D, Possemiers S, Van de Wiele T, et al. Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving G.P-2-driven improvement of gut permeability[J]. Gut, 2009, 58(8):1091-1103.
- [100] Porchezhian E, Ansari S H. Hepatoprotective activity of Abutilon indicum on experimental liver damage in rats[J]. Phytomedicine, 2005, 12(1-2): 62-64.
- [101] 贾连群, 勾蓝图, 傅明德, 等. 血清总胆固醇,甘油三酯与高密度脂蛋白胆固醇比值同高密度脂蛋白亚类组成关系的研究[J]. 中国病理生理杂志, 2006, 22(1): 75-79.
- [102] 张明, 霍海洋, 李占全, 等. 甘油三酯/高密度脂蛋白胆固醇比值对冠心病的诊断价值的探讨[J]. 中华心血管病杂志, 2000, 28(1):33-35.
- [103] Abbott B D, Birnbaum L S, Perdew G H. Developmental expression of two members of a new class of transcription factors: I. Expression of aryl hydrocarbon receptor in the C57BL/6N mouse embryo[J]. Developmental Dynamics, 1995, 204(2):133-143.
- [104] Mitsui Y, Chang I, Kato T, et al. Functional role and tobacco smoking effects on methylation of CYP1A1 gene in prostate cancer[J]. Oncotarget, 2016, 7(31): 49107-49121.
- [105] Xiao M, Xiao S, Straaten T V D, et al. Genetic polymorphisms in 19q13.3 genes associated with alteration of repair capacity to BPDE-DNA adducts in primary cultured lymphocytes[J]. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 2016, 812:39-47.
- [106] Zhang G, Skorokhod O A, Khoo S K, et al. Plasma advanced oxidative protein products are associated with anti-oxidative stress pathway genes and malaria in a

- longitudinal cohort[J]. *Malaria Journal*, 2014, 13(1):134-143.
- [107] Wang C G, Chen Y X, Li Y, et al. Effects of low dose tributyltin on activities of hepatic antioxidant and phase II enzymes in *Sebastiscus marmoratus*[J]. *Bull Environ Contam Toxicol*, 2005, 74(1):114-119.
- [108] Yenkovyan K, Harutyunyan H, Harutyunyan A. A certain role of SOD/CAT imbalance in pathogenesis of autism spectrum disorders[J]. *Free Radical Biology & Medicine*, 2018, 123: 85-95.
- [109] Ahmad P, Jaleel C A, Salem M A, et al. Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2010, 30(3):161-175.
- [110] Vignsnaes L K , Abbeele P , Sulek K , et al. Microbiotas from UC patients display altered metabolism and reduced ability of LAB to colonize mucus[J]. *Scientific Reports*, 2013, 3:1110.
- [111] Kauna-Czaplińska J, Gtarek P, Chartrand M S, et al. Is there a relationship between intestinal microbiota, dietary compounds, and obesity?[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2017, 70:105-113.
- [112] Bourriaud C, Robins R J, Martin L, et al. Lactate is mainly fermented to butyrate by human intestinal microfloras but inter-individual variation is evident[J]. *Journal of applied microbiology*, 2015, 99: 201-212.
- [113] Belenguer A, Duncan S H, Calder A G, et al. Two routes of metabolic cross-feeding between *Bifidobacterium adolescentis* and butyrate-producing anaerobes from the human gut.[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(5):3593-3599.
- [114] Morrison D J, Mackay W G, Edwards C A, et al. Butyrate production from oligofructose fermentation by the human faecal flora: what is the contribution of extracellular acetate and lactate?[J]. *British Journal of Nutrition*, 2006, 96(3): 570-577.
- [115] Pluznick J L. Microbial Short-Chain Fatty Acids and Blood Pressure Regulation[J]. *Current Hypertension Reports*, 2017, 19(4):1-5.
- [116] Li X, Shimizu Y, Kimura I. Gut microbial metabolite short-chain fatty acids and obesity[J]. *Biosci Microbiota Food Health*, 2017, 36(4):135-140.
- [117] Laparra J M, Sanz Y. Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals. *Pharmacol Research*, 2010, 61(3): 219-225.

- [118] Robles-Vera I, Toral M, de la Visitación N, et al. Probiotics Prevent Dysbiosis and the Rise in Blood Pressure in Genetic Hypertension: Role of short-Chain Fatty Acids[J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2020, 64(6):1900616.
- [119] Sun B, Jia Y, Yang S, et al. Sodium butyrate protects against high-fat diet-induced oxidative stress in rat liver by promoting expression of nuclear factor E2-related factor 2[J]. *British Journal of Nutrition*, 2019, 122(4):400-410.
- [120] Roychowdhury S, Glueck B, Han Y, et al. A Designer Synbiotic Attenuates Chronic-Binge Ethanol-Induced Gut-Liver Injury in Mice[J]. *Nutrients*, 2019, 11(1): 97.
- [121] Karki R, Park C H, Kim D W. Extract of buckwheat sprouts scavenges oxidation and inhibits pro-inflammatory mediators in lipopolysaccharide-stimulated macrophages (RAW264.7)[J]. *Journal of Integrative Medicine*, 2013, 11(4): 246-252.
- [122] Tsai H, Deng H, Tsai S, et al. Bioactivity comparison of extracts from various parts of common and tartary buckwheats: evaluation of the antioxidant- and angiotensin-converting enzyme inhibitory activities[J]. *Chemistry Central Journal*, 2012, 6(1): 78-82.
- [123] Pridal A A, Böttger W, Ross A B. Analysis of avenanthramides in oat products and estimation of avenanthramide intake in humans.[J]. *Food Chemistry*, 2018, 253:93-100.
- [124] Grundy M L, Fardet A, Tosh S M, et al. Processing of oat: the impact on oat's cholesterol lowering effect[J]. *Food & Function*, 2018, 9(3): 1328-1343.
- [125] Yun C H, Estrada A, Van Kessel A, et al. Beta-glucan, extracted from oat, enhances disease resistance against bacterial and parasitic infections[J]. *Pathogens & Disease*, 2003, 35(1): 67-75.
- [126] Zhang K, Dong R, Hu X, et al. Oat-Based Foods: Chemical Constituents, Glycemic Index, and the Effect of Processing[J]. *Foods (Basel, Switzerland)*, 2021, 10(6):1304.
- [127] 李玉串. 动脉粥样硬化发生发展中的肠道菌群变化及其致病机制[D]. 浙江: 浙江大学, 2020.
- [128] Ley R H, Turnbaugh P J, Klein S, et al. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity[J]. *Nature*, 2006, 444(7122): 1022-1023.
- [129] Han F, Wang Y, Han Y, et al. Effects of whole-grain rice and wheat on

composition of gut microbiota and short-chain fatty acids in rats[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(25):6326-6335.