

· 实验技术及其应用 ·

# 亚慢性染毒苯并[a]芘诱导肝细胞铁死亡引起小鼠肝损伤的研究

丁诗涵<sup>1</sup>, 周潮丽<sup>1</sup>, 何慧<sup>1</sup>, 马智瑞<sup>1</sup>, 陈洁<sup>1</sup>, 郭星笛<sup>1</sup>, 吕懿<sup>1</sup>, 郑金平<sup>1,2</sup>

1. 山西医科大学公共卫生学院卫生毒理学教研室, 山西 太原 030001;

2. 长治医学院公共卫生与预防医学系, 老年健康研究中心, 衰老机制研究与转化应用山西省重点实验室(厅市共建), 长治市衰老与再生医学技术创新中心, 山西 长治 046000

**摘要:**目的 探讨亚慢性染毒苯并[a]芘[benzo (a) pyrene, BaP]是否通过诱导小鼠肝细胞铁死亡导致肝损伤, 为进一步研究 BaP 的肝脏毒性机制提供依据。方法 将 48 只 3 周龄的雄性 C57BL/6 小鼠随机分为对照组(玉米油)、低剂量 BaP 组(2.5 mg/kg)、中剂量 BaP 组(5 mg/kg)、高剂量 BaP 组(10 mg/kg)、铁死亡抑制剂 Fer-1 组(3-氨基-4-环己基氨基苯甲酸乙酯, 1 mg/kg)和高剂量 BaP(10 mg/kg)+Fer-1(1 mg/kg)组, 每组 8 只。BaP 溶于玉米油内灌胃, 腹腔注射染毒 Fer-1, 隔日染毒, 持续 90 d。苏木精-伊红染色法(HE)和 Masson 染色观察肝脏结构及胶原纤维沉积, 透射电子显微镜(TEM)观察肝细胞超微结构。试剂盒测试小鼠肝组织的丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)活力和组织铁、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽(GSH)含量及谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性。Western blotting 法检测小鼠肝组织的谷胱甘肽过氧化物酶 4(GPX4)、酰基辅酶 A 合成酶长链家族成员 4(ACSL4)水平。结果 与对照组相比, 高剂量 BaP 组小鼠体重降低( $t=4.921, P=0.006$ ), 中、高剂量 BaP 组肝脏系数降低( $t_{中}=4.967, P<0.05; t_{高}=6.568, P=0.001$ ); BaP 剂量组小鼠肝组织的 ALT 和 AST 水平均升高( $F_{ALT}=218.200, P<0.001; F_{AST}=421.200, P<0.001$ ); HE 染色结果显示 BaP 剂量组小鼠肝脏出现不同程度的肝细胞排列紊乱, 肝窦扩张、充血及炎性浸润, Masson 染色显示 BaP 剂量组小鼠肝组织出现不同程度的胶原纤维沉积; BaP 剂量组小鼠肝组织铁含量增加 ( $W=41.730, P<0.001$ ), GSH 浓度、GSH-Px 活性均降低 ( $W_{GSH}=49.640, P<0.001; F_{GSH-Px}=252.400, P<0.001$ ), MDA 浓度升高 ( $F=207.700, P<0.001$ ); BaP 剂量组小鼠肝脏 GPX4 蛋白表达水平降低( $F=56.790, P<0.001$ ), ACSL4 蛋白的表达水平升高( $F=429.400, P<0.001$ )。与高剂量 BaP 组相比, 高剂量 BaP+Fer-1 组的小鼠体重变化( $t=5.970, P<0.001$ )、肝脏系数( $t=11.510, P<0.001$ )、肝脏形态学改变和肝组织 ALT( $q=21.730, P<0.001$ )、AST( $q=32.870, P<0.001$ )、组织铁( $t=5.045, P=0.009$ )、GSH( $t=10.600, P<0.001$ )、GSH-Px( $q=9.977, P<0.001$ )、MDA( $q=21.580, P<0.001$ )水平以及 ACSL4( $q=8.629, P<0.001$ )、GPX4( $q=5.146, P=0.03$ )蛋白表达水平均改善。结论 亚慢性染毒 BaP 可诱导小鼠肝细胞铁死亡引起肝损伤。

**关键词:** 苯并[a]芘; 铁死亡; 肝损伤; 亚慢性毒性试验; C57BL/6 小鼠

中图分类号: R994.6 文献标志码: A 文章编号: 1003-8507(2025)09-1687-07

DOI: 10.20043/j.cnki.MPM.202412398

## Sub chronic Benz [a]Pyrene-induced ferroptosis in hepatocytes leading to liver injury in mice

DING Shi-han\*, ZHOU Chao-li, HE Hui, MA Zhi-rui, CHEN Jie, GUO Xing-di, LV Yi, ZHENG Jin-ping

\*Department of Environmental Toxicology, School of Public Health, Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China

**Abstract: Objective** To investigate whether sub chronic exposure to Benz [a]pyrene (BaP) induces ferroptosis in mouse hepatocytes, leading to liver injury, thereby providing a basis for further study of the hepatic toxicity mechanisms of BaP. **Methods** Forty-eight male C57BL/6 mice aged three weeks were randomly divided into six groups: control group (corn oil), low-dose BaP group (2.5 mg/kg), medium-dose BaP group (5 mg/kg), high-dose BaP group (10 mg/kg), ferroptosis inhibitor Fer-1 group (3-amino-4-cyclohexylaminobenzoic acid ethyl ester, 1 mg/kg), and high-dose BaP + Fer-1 group (10 mg/kg + 1 mg/kg). BaP was administered via gastric gavage dissolved in corn oil, and Fer-1 was injected intraperitoneally every other day for 90 days. Hepatic structure and collagen fiber deposition were observed using HE and Masson staining, while transmission electron microscopy (TEM) was used to examine the ultrastructure of hepatocytes. The levels of alanine

基金项目: 山西省自然科学基金(202203021211106); 山西省“1331 工程”项目(2021-5-2-2-B1); 长治医学院创新团队(CX202001)

作者简介: 丁诗涵(1998—), 女, 硕士在读, 研究方向: 卫生毒理学

通信作者: 郑金平, E-mail: zheng\_jp@sxmu.edu.cn

aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) in mouse liver tissues, as well as tissue iron, malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH) content, and glutathione peroxidase (GSH-Px) activity, were measured using kits. Western blotting was employed to detect the levels of glutathione peroxidase 4 (GPX4) and acyl-CoA synthetase long-chain family member 4 (ACSL4) in mouse liver tissues. **Results** Compared to the control group, the high-dose BaP group exhibited a decrease in body weight ( $t=4.921, P=0.006$ ) and a reduction in liver coefficient in both medium and high-dose BaP groups ( $t_{\text{medium}}=4.967, P<0.05; t_{\text{high}}=6.568, P=0.001$ ). The ALT and AST levels in liver tissues of BaP-treated mice were elevated ( $F_{\text{ALT}}=218.200, P<0.001; F_{\text{AST}}=421.200, P<0.001$ ). HE staining revealed varying degrees of hepatocyte disarray, sinusoidal dilation, congestion, and inflammatory infiltration in the liver of BaP-treated mice, while Masson staining indicated collagen fiber deposition. Iron content in the liver tissues of BaP-treated mice increased ( $W=41.730, P<0.001$ ), and both GSH concentration and GSH-Px activity decreased ( $W_{\text{GSH}}=49.640, P<0.001; F_{\text{GSH-Px}}=252.400, P<0.001$ ), with an increase in MDA concentration ( $F=207.700, P<0.001$ ). The expression level of GPX4 protein in the liver of BaP-treated mice decreased ( $F=56.790, P<0.001$ ), while the expression level of ACSL4 protein increased ( $F=429.400, P<0.001$ ). Compared to the high-dose BaP group, the high-dose BaP + Fer-1 group showed improvements in body weight changes ( $t=5.970, P<0.001$ ), liver coefficient ( $t=11.510, P<0.001$ ), morphological changes in the liver, and levels of ALT ( $q=21.730, P<0.001$ ), AST ( $q=32.870, P<0.001$ ), tissue iron ( $t=5.045, P=0.009$ ), GSH ( $t=10.600, P<0.001$ ), GSH-Px ( $q=9.977, P<0.001$ ), MDA ( $q=21.580, P<0.001$ ), as well as the expression levels of ACSL4 ( $q=8.629, P<0.001$ ) and GPX4 ( $q=5.146, P=0.03$ ) proteins. **Conclusion** Sub chronic exposure to BaP can induce ferroptosis in mouse hepatocytes, resulting in liver injury.

**Keywords:** Benz[a]pyrene; Ferroptosis; Liver injury; Sub chronic toxicity test; C57BL/6 mice

苯并[a]芘[benzo (a) pyrene, BaP]作为典型的多环芳烃类化合物,广泛存在于环境中,主要来源于煤炭、石油、天然气等燃料的不完全燃烧以及食物的高温烘焙<sup>[1]</sup>,因其免疫毒性、神经毒性及生殖毒性而备受关注<sup>[2]</sup>。近来多项研究表明,BaP暴露可通过影响细胞自噬、氧化应激等机制造成肝损伤,具有肝脏毒性<sup>[3-4]</sup>。

铁死亡是铁依赖性的程序性细胞死亡,表现为细胞  $\text{Fe}^{2+}$  蓄积,活性氧(ROS)水平升高,线粒体皱缩、膜密度增高、嵴减少,脂质过氧化物累积等特征<sup>[5]</sup>。谷胱甘肽过氧化物酶 4(GPX4)和酰基辅酶 A 合成酶长链家族成员 4(ACSL4)是细胞铁死亡的关键调节蛋白,作为谷胱甘肽过氧化物酶家族的一员,GPX4 能够利用谷胱甘肽(GSH)清除细胞内的脂质过氧化物并抑制铁死亡<sup>[6]</sup>,ACSL4 通过催化多不饱和脂肪酸(PUFA)转化为脂肪酰基辅酶 A(acyl-CoA),促使细胞发生脂质过氧化而促进铁死亡的发生<sup>[7]</sup>。Fer-1 作为一种高效的铁死亡抑制剂,可与亚铁离子形成复合物而减少脂质过氧化过程中产生的烷氧基自由基<sup>[8]</sup>,并通过激活 GPX4/ACSL4 轴抑制铁死亡<sup>[9]</sup>。有研究表明,细胞铁死亡在肝缺血再灌注损伤、肝纤维化、肝硬化、肝细胞癌等肝脏疾病中起到重要作用<sup>[10-11]</sup>。近期也有研究采用代谢组学和蛋白质组学分析发现,GPX4 是 BaP 肝细胞毒性的重要靶点之一<sup>[12]</sup>,提示 BaP 有可能通过诱导细胞铁死亡造成肝损伤。因此,本研究参考职业人群 BaP 的暴露水平,按照小鼠 LD50 (500 mg/kg)<sup>[13]</sup>的 1/200、1/100 和 1/50 设计染毒剂量,构建 C57BL/6 小鼠 BaP 亚慢性染毒模型,并使用铁死亡抑制剂 Fer-1 进行干预,观察 BaP 是否可通过诱导肝细胞铁死亡

对小鼠肝脏产生损伤,为深入研究 BaP 暴露导致肝损伤的机制提供依据。

## 1 对象与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** 48 只 3 周龄健康雄性 C57BL/6 小鼠(清洁级),由山西医科大学实验动物中心提供[许可证号:SCXK(晋)2019-0007],适应一周后开展实验。饲养于 12h/12h 光照黑暗周期,温度 22℃~26℃,相对湿度 40%~60%,自由饮水摄食。本研究实验动物的使用和管理已获得长治医学院伦理委员会的批准(伦理审批号:DW2021086)。

**1.1.2 主要试剂** BaP(纯度>97%,Sigma,美国),玉米油(索莱宝,中国),Fer-1(SELLECK,中国),4%多聚甲醛固定液(Sigma,美国),2%戊二醛固定液(塞维,中国),丙二醛(MDA)试剂盒(碧云天,中国),组织铁试剂盒、GSH 试剂盒、GSH-Px 试剂盒、丙氨酸氨基转移酶(ALT)试剂盒、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)试剂盒(南京建成生物工程研究所,中国),兔抗鼠 -GPX4 单克隆抗体(Abcam,英国),兔抗鼠 -ACSL4 单克隆抗体(Abcam,英国),兔抗鼠 -GAPDH 多克隆抗体、羊抗兔 -IgG 抗体(三鹰,武汉)。

**1.1.3 主要仪器** DNM-9602G 酶标仪(普朗公司,北京),超声细胞破碎机(新芝公司,宁波),Universal HoodII 凝胶成像仪(Bio-Rad 公司,美国)。

### 1.2 动物分组与实验方法

**1.2.1 动物分组与处理** 将 3 周龄 C57BL/6 雄鼠随机分为 6 组,即对照组、低剂量 BaP 组(2.5 mg/kg)、中剂量 BaP 组(5 mg/kg)、高剂量 BaP 组(10 mg/kg)、铁死亡抑制剂 Fer-1 组(1 mg/kg)和高剂量 BaP(10

mg/kg) + Fer-1 (1 mg/kg) 组, 每组 8 只。适应一周后, BaP 溶于玉米油中隔日灌胃染毒, Fer-1 于灌胃染毒次日腹腔注射给药, 染毒 90 d。

**1.2.2 体重和脏器系数** 染毒开始时记录体重, 解剖当天记录其终体重, 称量肝脏重量, 计算肝脏脏器系数。

**1.2.3 肝功能检测** 取一定重量肝脏组织, 按照 ALT、AST 试剂盒说明书步骤进行测定和计算。

**1.2.4 肝组织苏木精 - 伊红染色法 (HE) 染色及 Masson 染色** 取小鼠肝组织, 固定于多聚甲醛中 24 h 后脱水、石蜡包埋后制作成 5 μm 的石蜡切片, 染色后脱水至透明, 封片, 显微镜下观察。取石蜡切片, 苏木素染色液染色, Masson 蓝化液反蓝, 再用丽春红染色液染色, 脱水, 透明, 封片, 显微镜下观察组织, 其中蓝色部分为胶原沉积。

**1.2.5 观察肝细胞超微结构** 选取 1 mm × 1 mm × 1 mm 小鼠肝脏组织块固定 (2% 戊二醛固定液), 梯度乙醇脱水, 浸透后包埋, 切片后染色, 透射电子显微镜采集图像。

**1.2.6 肝组织组织铁、MDA、GSH 含量及 GSH-Px 活性检测** 取小鼠肝脏组织, 匀浆后按照各检测指标的说明书步骤测定和计算。

**1.2.7 Western blotting** 取 50 mg 肝组织加入 RIPA 裂解液和广谱磷酸酶抑制剂 (1 : 100), 于 4 °C 裂解 15 min 后用组织研磨仪研磨组织。研磨组织, 冰上静置 30 min 后, 4 °C, 离心 15 min (13 000 转 / 分), 吸取上清即总蛋白。取 15 μl 蛋白原液, BCA 法测定浓度, 其余样品加入上样缓冲液, 100 °C 煮沸 5 min。取蛋白样品电泳, 转膜, 封闭 2 h (5% 脱脂牛奶, 室温), TBST 溶液洗膜 5 min, 重复 3 次, 转移到一抗中 4 °C 孵育过夜。二抗孵育 1 h (室温), 洗膜后显影, Image J 软件分析蛋白灰度, 用目标蛋白与内参蛋白的比值进行蛋白相对表达含量分析。

**1.3 统计学分析** 采用 SPSS 24.0 软件和 GraphPad Prism 9.0 软件统计分析数据, 结果用 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。当数据满足正态和方差齐时, 多组间比较采用单因素方差分析, 多重比较采用 Turkey 检验; 当数据满足正态但方差不齐时, 多组间比较采用 Welch 检验, 多重比较采用 Dunnett 检验。双侧检验, 检验水准  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

**2.1 体重及脏器系数变化** 高剂量组小鼠体重变化低于对照组 ( $t=4.921, P=0.006$ )。与对照组相比, 高剂量 BaP 组脏器系数降低 ( $t=6.568, P=0.001$ )。见表 1。

表 1 BaP 暴露对小鼠体重及脏器系数变化的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Effects of BaP exposure on body weight and liver coefficient changes in mice ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	体重变化(g)	脏器系数(%)
对照组	16.738 ± 1.964	3.865 ± 0.447
低剂量组	15.575 ± 1.422	3.297 ± 0.134
中剂量组	14.438 ± 0.936	3.097 ± 0.119*
高剂量组	12.863 ± 1.050**	2.759 ± 0.165**
Fer-1 组	17.000 ± 1.655	3.902 ± 0.228
高剂量 + Fer-1 组	14.575 ± 0.709	3.154 ± 0.138*

注: 与对照组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

**2.2 肝脏组织病理学改变** HE 染色结果显示, 对照组和 Fer-1 组的小鼠肝细胞排列整齐、胞浆染色均匀、核染清晰, 未见炎性细胞浸润, 肝小叶结构清晰, 肝索呈放射状排列; 低、中、高剂量 BaP 组和高剂量 + Fer-1 组出现不同程度的肝细胞排列紊乱, 肝窦扩张、充血, 炎性浸润。与高剂量 BaP 组相比, 高剂量 + Fer-1 组肝损伤有所减轻。见图 1。

**2.3 肝脏组织胶原纤维沉积情况** Masson 染色结果显示, 对照组和 Fer-1 组小鼠肝脏组织未见有纤维化, BaP 剂量组小鼠肝脏组织出现不同程度的胶原纤维沉积; 与高剂量组比较, 高剂量 + Fer-1 组小鼠肝脏组织纤维化程度减轻。见图 2。

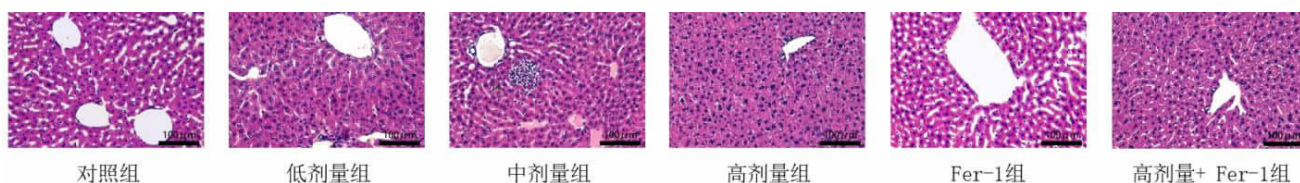


图 1 小鼠肝脏病理学形态 (HE 染色, × 200)

Figure 1 Histopathological morphology of mouse liver (hematoxylin-eosin, × 200)

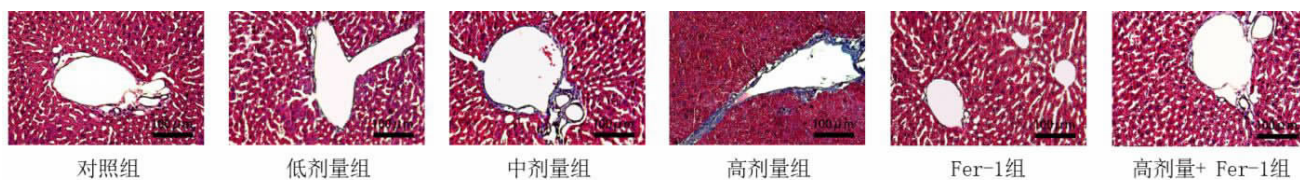
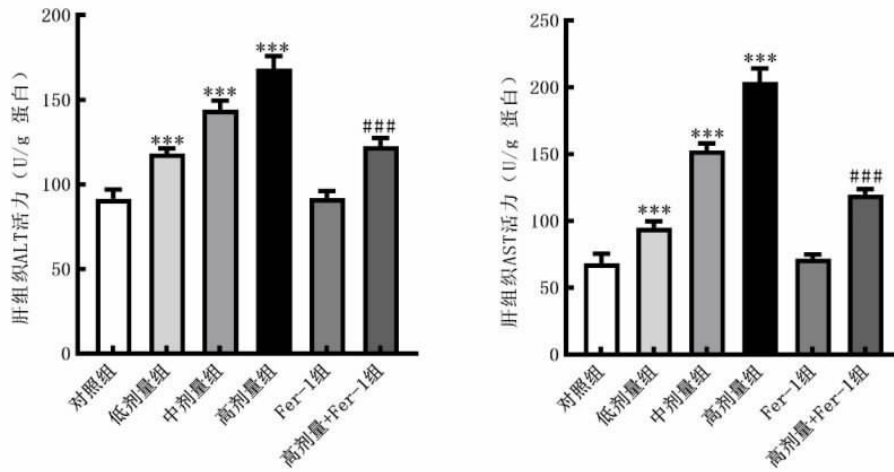


图 2 小鼠肝组织胶原纤维沉积 (Masson 染色, × 200)

Figure 2 Collagen deposition of mouse liver tissues (masson staining, × 200)

2.4 BaP 暴露对小鼠肝功能的影响 与对照组相比, 剂量组小鼠肝组织中 ALT、AST 水平均升高 ( $F_{ALT}=218.200, P<0.001; F_{AST}=421.200, P<0.001$ )。与

高剂量组相比, 高剂量 +Fer-1 组 ALT、AST 水平均降低 ( $q_{ALT}=21.730, P<0.001; q_{AST}=32.870, P<0.001$ ), 提示 Fer-1 可减轻了 BaP 引起的肝功能损伤。见图 3。



注:与对照组比较, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ ;与高剂量组比较, ### $P<0.001$ 。

图 3 小鼠肝组织内 ALT、AST 水平的变化

Figure 3 Changes in ALT and AST levels in mouse liver tissue

2.5 小鼠肝细胞线粒体超微结构变化 对照组和 Fer-1 组小鼠的肝细胞线粒体形态正常。低、中剂量组和高剂量 +Fer-1 组小鼠肝细胞线粒体萎缩、线粒

体嵴减少、膜密度增加, 而高剂量组出现大量线粒体皱缩、线粒体嵴减少甚至消失, 膜密度显著增加。见图 4。

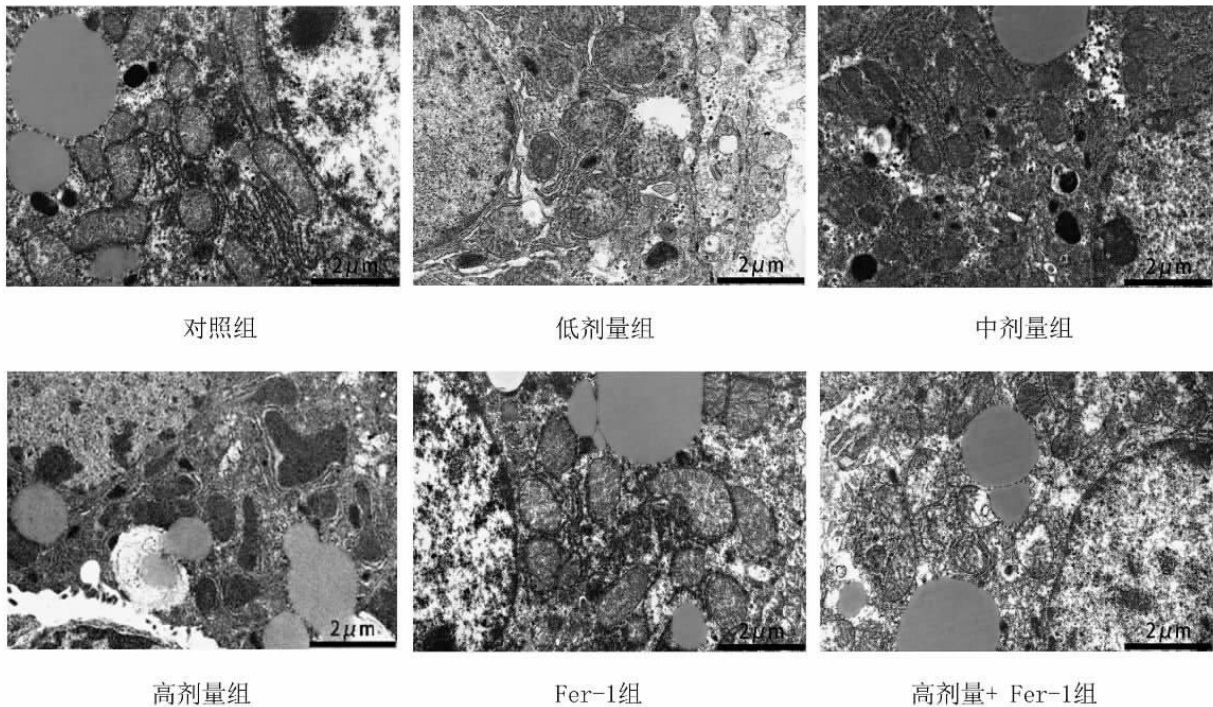
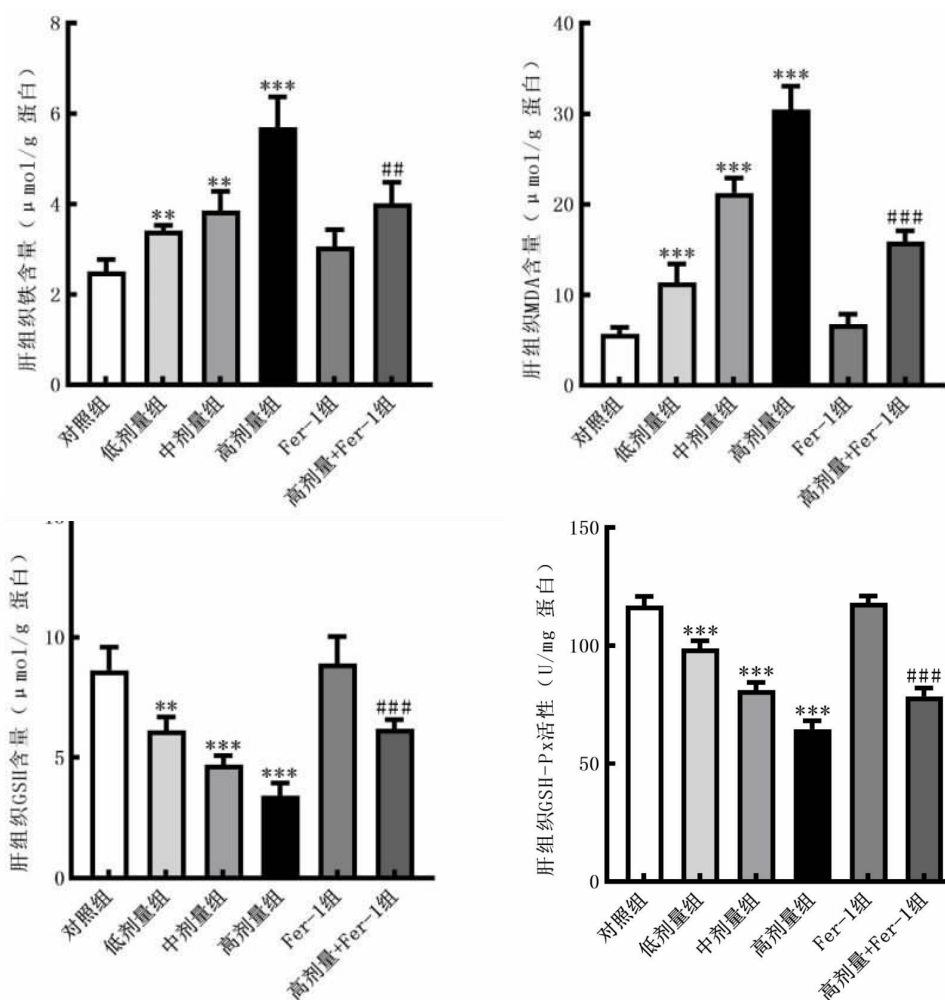


图 4 小鼠肝细胞线粒体超微结构变化(TEM, × 20 000)

Figure 4 Ultrastructural changes of mitochondria of mouse hepatocytes (TEM, × 20 000)

2.6 小鼠肝细胞组织 Fe、GSH、MDA 含量及 GSH-Px 活性检测 与对照组相比, BaP 剂量组小鼠肝组织铁含量、MDA 水平均升高 ( $W_{Fe}=41.730, P<0.001; F_{MDA}=207.700, P<0.001$ ), GSH、GSH-Px 水平均降低 ( $W_{GSH}=49.640, P<0.001; F_{GSH-Px}=252.400, P<$

$0.001$ )。与高剂量组比较, 高剂量 +Fer-1 组的铁含量下降 ( $t=5.045, P=0.009$ )、MDA 水平降低 ( $q=21.580, P<0.001$ )、GSH 和 GSH-Px 的水平升高 ( $t_{GSH}=10.600, P<0.001; q_{GSH-Px}=9.977, P<0.001$ )。见图 5。



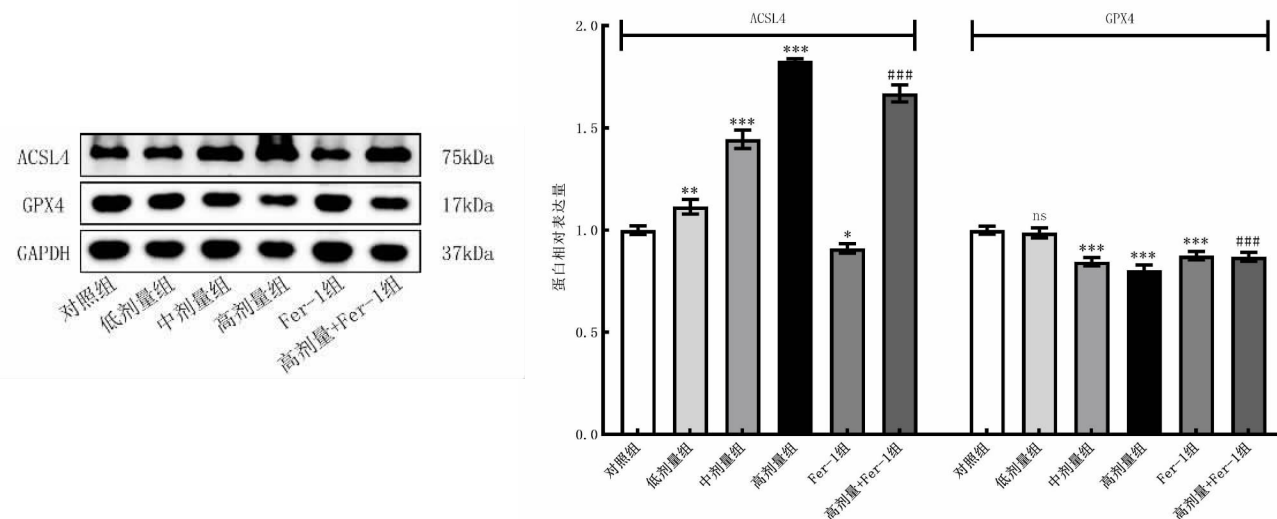
注:与对照组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ,\*\*\* $P < 0.001$ ;与高剂量组组比较,\* $P < 0.05$ ,### $P < 0.001$ 。

图 5 小鼠肝组织内 Fe、MDA、GSH 及 GSH-Px 活性的变化

Figure 5 Changes in the levels of Fe, MDA, GSH, and GSH-Px in mouse hepatocytes

2.7 肝组织铁死亡相关蛋白的表达水平变化  
Western blotting 结果显示,与对照组相比,剂量组的 ACSL4 蛋白表达水平升高 ( $F=429.400, P < 0.001$ )、GPX4 蛋白表达水平降低 ( $F=56.790, P < 0.001$ );而与

高剂量 BaP 组相比,高剂量 BaP+Fer-1 组 ACSL4 蛋白表达水平降低 ( $q=8.629, P < 0.001$ )、GPX4 蛋白表达水平升高 ( $q=5.146, P=0.03$ )。见图 6。



注:与对照组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ,\*\*\* $P < 0.001$ ;与高剂量组组比较,## $P < 0.01$ ,### $P < 0.001$ 。

图 6 小鼠肝组织 ACSL4 及 GPX4 蛋白表达情况

Figure 6 Expression of ACSL4 and GPX4 proteins of mouse liver tissues

### 3 讨论

研究表明, BaP 能够通过诱导细胞 DNA 损伤、线粒体功能障碍、氧化应激等途径诱发机体损伤, 进而损害健康<sup>[14]</sup>。肝脏作为 BaP 在体内的主要代谢场所, 是其主要的毒作用靶器官<sup>[15]</sup>。有研究发现 BaP 可破坏肝脏脂质代谢, 通过诱导氧化应激和线粒体功能障碍引发肝损伤<sup>[4]</sup>。

铁死亡是一种调节性细胞死亡<sup>[16]</sup>, 会使细胞产生区别于其他细胞死亡方式的特征性改变, 主要表现为线粒体形态的变化, 比如线粒体皱缩、膜破裂<sup>[17-18]</sup>。细胞铁死亡受铁稳态和氧化应激通路调节, 细胞铁稳态改变导致铁含量增多<sup>[19]</sup>, 细胞成分发生脂质过氧化后代谢为 MDA, 脂质过氧化增加会消耗大量 GSH, 进而降低 GSH-Px 的活性, 减少对脂质过氧化物的清除而导致铁死亡。GSH/GPX4 轴减少特定磷脂氢过氧化物的产生从而抑制细胞铁死亡<sup>[20]</sup>, 脂质代谢调节因子 ACSL4 参与催化花生四烯酸和肾上腺酸, 最终通过在细胞膜中积累氧化的磷脂促进铁死亡<sup>[21]</sup>。因此组织铁、MDA、GSH 含量和 GSH-Px 活性以及 GPX4、ACSL4 蛋白表达水平等指标常被作为反映细胞是否存在铁死亡的生物标志<sup>[22-23]</sup>。Fer-1 作为一种抗氧化剂, 可以防止脂质过氧化、清除自由基、减少脂质过氧化物, 并能有效阻断铁蛋白沉积, 是常见的铁死亡抑制剂之一<sup>[24]</sup>, 在本研究中我们使用 Fer-1 进行干预, 观察是否能够减轻小鼠肝损伤以进一步验证细胞铁死亡。

实验结果显示, 与对照组相比, BaP 剂量组的小鼠肝脏组织的 AST、ALT 水平均升高, 出现不同程度的肝细胞排列紊乱, 肝窦扩张、充血、炎性浸润及胶原纤维沉积, 显示 BaP 暴露引起了小鼠肝损伤。经电子显微镜观察, 线粒体萎缩、线粒体嵴减少、膜密度增加, 呈现典型的铁死亡形态特征。我们又检测了反映细胞铁死亡的标志, 结果显示, 铁含量增加, GSH 含量和 GSH-Px 活性降低, 脂质过氧化产物 MDA 升高, 蛋白标志物 GPX4 蛋白表达水平降低, 而 ACSL4 蛋白表达水平升高, 均提示肝细胞发生了铁死亡。我们用铁死亡特异抑制剂 Fer-1 进行干预后发现, Fer-1 大大缓解了高剂量 BaP 引起的肝脏形态学及上述与铁死亡相关的检测指标的变化, 进一步证实了亚慢性染毒小鼠肝细胞存在铁死亡的发生。推测 BaP 暴露使细胞铁代谢失衡, 铁离子水平升高, 引发芬顿反应, 诱发细胞脂质过氧化; 同时 BaP 暴露耗竭 GSH, 抑制 GPX4 表达, 导致 GSH-Px 活性降低, 加速了细胞脂质过氧化; ACSL4 是调节脂质组成的关键酶, 活化长链多不饱和脂肪酸(LCPUFAs)参与膜磷脂的合成, LCPUFAs 氧化后进一步引发细胞的铁死亡。

BaP 暴露诱导 ACSL4 蛋白表达水平升高, 增加了 BaP 诱发脂质过氧化的易感性, 最终引起脂质过氧化产物堆积, 损伤线粒体形态及功能, 诱发细胞铁死亡。因此, 亚慢性染毒 BaP 诱发的肝细胞铁死亡可能是多种机制共同作用的结果。

综上试验结果, 推测亚慢性 BaP 暴露可能是通过干扰肝细胞 GPX4/ACSL4 轴, 使细胞铁代谢失衡引起 Fe<sup>2+</sup> 水平升高, 抗氧化能力降低, 脂质过氧化水平增高导致细胞 MDA 等脂质过氧化产物堆积, 导致线粒体损伤, 从而诱发肝细胞铁死亡。

本研究结果显示, 亚慢性染毒 BaP 可通过诱导小鼠肝细胞铁死亡而引起肝损伤。本研究初步探讨了 BaP 暴露引起肝损伤的潜在作用机制, 为探索 BaP 的肝毒性及机制研究提供了线索, 其具体机制仍需进一步深入研究。

利益冲突声明 本研究不存在任何利益冲突

### 参考文献

- [1] Deng J, Wei L, Chen Y, et al. Identification of benzo(a)pyrene-related toxicological targets and their role in chronic obstructive pulmonary disease pathogenesis: a comprehensive bioinformatics and machine learning approach [J]. BMC Pharmacology and Toxicology, 2025, 26 (1): 33.
- [2] Jorge BC, Reis ACC, Stein J, et al. Parental exposure to benzo(a)pyrene in the peripubertal period impacts reproductive aspects of the F1 Generation in rats [J]. Reproductive Toxicology, 2021, 35 (1): 126-136.
- [3] Li Y, Liang N, Tang T, et al. Low-dose benzo [a]pyrene exposure induces hepatic lipid deposition through LCMT1/PP2Ac-mediated autophagy inhibition[J]. Food Chem Toxicol, 2023, 179: 113986.
- [4] Yang M, Mao K, Cao X, et al. Integrated network toxicology, transcriptomics and gut microbiomics reveals hepatotoxicity mechanism induced by benzo[a]pyrene exposure in mice[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2024, 491: 117050.
- [5] Wu ZY, Zhang Y, Zhong WD, et al. Targeting ferroptosis: a promising approach for treating lung carcinoma[J]. Cell Death Discovery, 2025, 11(1): 33.
- [6] Huang B, Wang H, Liu S, et al. Palmitoylation-dependent regulation of GPX4 suppresses ferroptosis[J]. Nature Communications, 2025, 16 (1): 867.
- [7] Gan BY. ACSL4, PUFA, and ferroptosis: new Arsenal in anti-tumor immunity[J]. Signal Transduct Target Ther, 2022, 7(1): 128.
- [8] Zhang H, Tian LQ, Wang P, et al. Ferrostatin-1 mitigates acute lung injury by reducing ferroptosis levels in gas explosions [J]. Tissue & Cell, 2025, 94: 102773.
- [9] Zhang M, Liu ZM, Zhou W, et al. Ferrostatin-1 attenuates hypoxic-ischemic brain damage in neonatal rats by inhibiting ferroptosis[J]. Transl Pediatr, 2023, 12(11): 1944-1970.
- [10] Xing G, Meng L, Cao S, et al. PPAR $\alpha$  alleviates Iron overload-induced ferroptosis in mouse liver [J]. EMBO Reports, 2022, 23(8): e52280.
- [11] Luo J, Song G, Chen N, et al. Ferroptosis contributes to ethanol-

- induced hepatic cell death via labile Iron accumulation and GPx4 inactivation[J]. *Cell Death Discov*, 2023, 9(1): 311.
- [ 12 ] Wang YW, Zhao JH, Xu YP, et al. Uncovering SOD3 and GPX4 as new targets of Benzo [a]pyrene-induced hepatotoxicity through Metabolomics and Chemical Proteomics[J]. *Redox Biology*, 2023, 67: 102930.
- [ 13 ] Li Y, Cao J, Hao Z, et al. Aspirin ameliorates the cognition impairment in mice following benzo [a]pyrene treatment via down-regulating BDNF IV methylation [J]. *Neurotoxicology*, 2022, 89: 20-30.
- [ 14 ] Zhao C, Jin H, Lei Y, et al. The dual effects of Benzo(a)pyrene/Benzo (a)pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide on DNA Methylation [J]. *Science of the Total Environment*, 2024, 950: 175042.
- [ 15 ] Zhang YQ, Wang YQ, Zheng H, et al. Increased mortality risk from airborne exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2024, 474: 134714.
- [ 16 ] Dixon SJ, Olzmann JA. The cell biology of ferroptosis [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2024, 25(6): 424-442.
- [ 17 ] Pedrera L, Prieto Clemente L, Dahlhaus A, et al. Ferroptosis triggers mitochondrial fragmentation via Drp1 activation [J]. *Cell Death & Disease*, 2025, 16(1): 40.
- [ 18 ] Onukwufor JO, Dirksen RT, Wojtovich AP. Iron dysregulation in mitochondrial dysfunction and alzheimer's disease [J]. *Antioxidants*, 2022, 11(4): 692.
- [ 19 ] Wang Z, Wu C, Yin D, et al. Ferroptosis: mechanism and role in diabetes-related cardiovascular diseases [J]. *Cardiovascular Diabetology*, 2025, 24(1): 60.
- [ 20 ] Ursini F, Maiorino M. Lipid peroxidation and ferroptosis: The role of GSH and GPx4 [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2020, 152: 175-185.
- [ 21 ] Wang Y, Hu M, Cao J, et al. ACSL4 and polyunsaturated lipids support metastatic extravasation and colonization[J]. *Cell*, 2025, 188 (2): 412-429.
- [ 22 ] Chen X, Comish PB, Tang D, et al. Characteristics and biomarkers of ferroptosis[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9(9): 637162.
- [ 23 ] Hu XD, Bao YT, Li M, et al. The role of ferroptosis and its mechanism in ischemic stroke[J]. *Experimental Neurology*, 2024, 372: 114630.
- [ 24 ] Tan Q, Wu D, Lin Y, et al. Identifying eleven new ferroptosis inhibitors as neuroprotective agents from FDA-approved drugs [J]. *Bioorganic Chemistry*, 2024, 146: 107261.

收稿日期: 2024-12-22

## (上接第 1641 页)

- system[J]. *China Health Insurance*, 2024, (3): 106-113.(In Chinese)
- [ 8 ] 张秋, 郑柏枫, 熊睿, 等. 多层次医疗保障体系下惠民保发展的“粤浙范式”[J]. *卫生经济研究*, 2022, 39(10): 44-47.
- Zhang Q, Zheng BF, Xiong R, et al. "Guangdong and Zhejiang paradigm" for the development of Universal health insurance in the context of Multi-Level medical security system[J]. *Health Economics Research*, 2022, 39(10): 44-47.(In Chinese)
- [ 9 ] 王欣, 陈文, 张璐莹. 多层次保障体系下普惠型商业医疗保险的作用研究[J]. *中国卫生经济*, 2023, 42(3): 10-13.
- Wang X, Chen W, Zhang LY. The role of inclusive commercial medical insurances in multi-layer medical security system [J]. *Chinese Health Economics*, 2023, 42(3): 10-13.(In Chinese)
- [ 10 ] Estrada M. Policy modeling: Definition, classification and evaluation [J]. *Journal of Policy Modeling*, 2011, 33(4): 523-536.
- [ 11 ] 顾一纯, 何达, 黄佳好, 等. 基于 PMC 指数模型的我国健康医疗大数据发展的政策环境研究 [J]. *中国卫生政策研究*, 2022, 15(4): 45-51.
- Gu YC, He D, Huang JY, et al. Research on the policy environment of China's healthcare big data development based on PMC index model[J]. *Chinese Journal of Health Policy*, 2022, 15(4): 45-51.(In Chinese)
- [ 12 ] 张永安, 耿喆. 我国区域科技创新政策的量化评价 -- 基于 PMC 指数模型[J]. *科技管理研究*, 2015, 35(14): 26-31.
- Zhang YA, Geng Z. The quantitative evaluation of regional science and technology innovation policy: based on the index of PMC model [J]. *Science and Technology Management Research*, 2015, 35(14): 26-31.(In Chinese)
- [ 13 ] 孙琪, 郭锋, 翟铁民, 等. 基于 PMC 指数模型的我国长期护理保险政策量化评价 [J]. *现代预防医学*, 2024, 51(21): 3929-3935.
- Sun Q, Guo F, Zhai TM, et al. Quantitative evaluation of long-term care insurance policies in China based on the PMC index model[J]. *Modern Preventive Medicine*, 2024, 51(21): 3929-3935.(In Chinese)
- [ 14 ] 楚美金, 徐文, 马漫遥. 基于 PMC 指数模型的我国药品网络销售监管政策量化评价 [J]. *现代预防医学*, 2023, 50(18): 3358-3366.
- Chu MJ, Xu W, Ma MY. Quantitative evaluations of China's drug online sales regulatory policies based on the PMC index model[J]. *Modern Preventive Medicine*, 2023, 50(18): 3358-3366.(In Chinese)
- [ 15 ] 吴勤德, 赵梓钧, 谢贤宇, 等. 基于 PMC 指数模型的我国 DRG 收付费改革政策文本分析 [J]. *中国卫生经济*, 2022, 41(11): 8-12.
- Wu QD, Zhao ZJ, Xie XY, et al. Evaluation of DRG payment reform policy in China based on PMC index model [J]. *Chinese Health Economics*, 2022, 41(11): 8-12.(In Chinese)
- [ 16 ] 郭桐桐, 张欣怡, 嵇丽红, 等. 我国残疾人康复政策量化研究: 基于政策建模一致性指数模型 [J]. *中国康复理论与实践*, 2024, 30(6): 621-629.
- Guo TT, Zhang XY, Ji LH, et al. Quantitative research on China's disability rehabilitation policy using policy modeling consistency index model [J]. *Chinese Journal of Rehabilitation Theory and Practice*, 2024, 30(6): 621-629.(In Chinese)

收稿日期: 2024-09-06