

分析化学
Chinese Journal of Analytical Chemistry
ISSN 0253-3820, CN 22-1125/O6

《分析化学》网络首发论文

题目： 长期砷暴露的大鼠尿液代谢组学研究
作者： 王晓飞，沈运旺，朱珏，张博
DOI： 10.19756/j.issn.0253-3820.181762
收稿日期： 2018-12-06
网络首发日期： 2019-03-14
引用格式： 王晓飞，沈运旺，朱珏，张博. 长期砷暴露的大鼠尿液代谢组学研究[J/OL]. 分析化学. <https://doi.org/10.19756/j.issn.0253-3820.181762>



网络首发：在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认：纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

长期砷暴露的大鼠尿液代谢组学研究

王晓飞 沈运旺 朱珏 张博*

(厦门大学化学化工学院, 厦门 361005)

摘要 慢性无机砷暴露能够引发多种疾病和损害, 但其所涉及的生物学过程尚未完全阐明。全球约有超过 2 亿人面临饮用水砷污染的威胁。本研究以自由饮水的方式对健康大鼠进行无机砷的长期暴露, 并对大鼠尿液的代谢组变化进行系统分析。结果表明, 长期砷暴露大鼠的尿液代谢组与对照组具有显著区别, 且高剂量砷暴露对大鼠尿液代谢组产生的影响更加显著。本研究共鉴定出 36 种差异代谢物, 其中 14 种与氨基酸代谢相关的代谢物发生了显著变化, 涉及到色氨酸代谢、精氨酸和脯氨酸代谢、赖氨酸降解、 β -丙氨酸代谢、半胱氨酸和蛋氨酸代谢、甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢; 11 种与脂类代谢相关的代谢物, 涉及到的代谢通路有鞘脂代谢、脂肪酸代谢; 同时发现蛋白质的表达与翻译后修饰也受到干扰。这些生物学过程的改变均可作为砷毒性机理的关键分子事件。

关键词 砷暴露; 代谢组学; 尿液; 长期暴露; 液相色谱-质谱

1 引言

砷是一种广泛存在于环境中的类金属物质。无机砷具有极大毒性, 已被国际癌症研究机构 (IARC) 列为 I 类致癌物。饮用水砷污染是人类暴露于砷的主要途径^[1,2], 在全球范围内有超过 2 亿人的饮用水中含有较高浓度的砷。高砷地区的流行病学调查表明, 慢性无机砷暴露与多种疾病风险的增高具有相关性^[3-5], 近期的研究发现, 即使普通环境剂量的饮水砷暴露也存在一定的健康风险^[6,7]。近年来快速发展的组学技术已被应用于砷毒性的研究中, 基于动物模型的蛋白质组学研究发现, 砷暴露能够损害心血管系统的发育和正常功能^[8]。在低剂量砷暴露人群的尿液代谢组学研究中, 发现五价无机砷暴露量的升高与男性不育呈现相关性, 并且砷可能引发氧化应激增强和扰乱性激素代谢过程^[7]。

代谢组学技术是系统生物学的重要组成部分, 基于现代色谱-质谱联用平台对代谢物进行研究, 通过分析生物体中代谢物的变化, 揭示生命活动规律^[9]。代谢组学技术应用于污染物毒性研究, 可以直接观察到与污染物相关的代谢物变化, 进而从小分子层面揭示污染物的毒性机理^[10-12]。代谢组学技术在毒性机理研究中仍存在许多挑战, 如代谢组学技术研究方法的多样性^[13]、追踪代谢物变化所影响的特定代谢途径和毒性效应仍具有挑战性^[14,15]、代谢物浓度的巨大差异带来的检测困难, 以及由于鉴定能力和数据库不完善带来的大量代谢物质谱信息数据浪费^[16]。

代谢物可作为中间桥梁, 将环境风险因素与健康结局关联起来。如血液和尿液中的代谢物变化可以反映种体在分子层面对环境胁迫的响应, 高通量代谢组学能够筛选代谢物的变化^[6,7,17,18], 进而可以全面了解环境胁迫对生物体代谢通路的影响。这一策略已经应用于小鼠、蛤和跳蚤的砷暴露代谢干扰效应研究^[19-22]。但在现有的砷毒性研究中, 大多数采用急性和高剂量的砷暴露模式, 因此不能真实反映出人饮水型长期砷暴露的实际情况。本研究对大鼠进行长期的无机砷饮水暴露, 覆盖了大鼠幼年至成年期, 收集尿液并对尿液代谢组进行深入分析, 基于代谢组学高的分析通量和差异代谢物的筛选功能, 将砷暴露与尿液代谢物的相应变化关联, 结合相关代谢通路分析对长期无机砷暴露的毒性机理进行探究, 以期对长期砷暴露的健康风险评估提供

2018-12-06 收稿; 2019-03-06 接受

本文系国家自然科学基金项目 (Nos. 21475110, 21535007, J1310024)、中国博士后基金项目 (No. 2018M642572)、厦门市科技计划项目 (No. 3502Z20173019) 和中央高校基本科研业务费 (No. 20720160051) 资助

*E-mail: bozhang@xmu.edu.cn

参考。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

ACQUITY 超高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司) -Q Exactive 质谱仪 (美国 Thermo 公司) 联用代谢组学检测平台; 甲醇 (色谱纯, 德国 Merck 公司); 甲酸 (质谱纯, 百灵威 J&K 公司); NaAsO_2 (纯度 > 98.5%, 比利时 Acros 公司); 去离子水由 Milli-Q 超纯水系统 (美国 Millipore 公司) 制备。

2.2 实验方法

2.2.1 动物实验分组与染毒方法

SD (Sprague-Dawley) 雄性大鼠 (4 周龄, 体重 80 g) 购自上海 SLAC 动物实验中心。大鼠饲养于温度为 $(26 \pm 2)^\circ\text{C}$ 、相对湿度为 $50\% \pm 5\%$ 、12/12 小时昼夜循环的动物房内, 所有大鼠自由摄取食物和饮用水。经过一周的适应性饲养和检疫后, 大鼠随机分成 3 组, 每组 10 只。暴露组大鼠分别饮用浓度为 1.0 和 25.0 mg/L 的 NaAsO_2 水溶液, 对照组大鼠饮用去离子水。

经过 150 天暴露后, 利用代谢笼收集大鼠尿液, 在 4°C 以 12000 g 离心 10 min, 于 -80°C 储存, 待分析。

2.2.2 尿液检测

(1) 样品制备: 从 -80°C 取出尿液, 依次在 -20°C 和 4°C 下逐步解冻。每种样品中取出 500 μL 尿液, 加入等体积的去离子水, 在 4°C 以 12000 g 离心 10 min, 取上清液, 待测。同时, 从每种样品中取出 20 μL 混匀, 作为质量控制 (QC) 样品。

(2) 液相色谱分离条件: 利用 UPLC/Q Exactive-MS 联用平台采集尿液代谢指纹图谱, 使用 Waters 公司的 ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱 ($100\text{ mm} \times 2.1\text{ mm} \times 1.8\ \mu\text{m}$); 流动相 A 为含有 0.1% 甲酸的水溶液, 流动相 B 为含有 0.1% 甲酸的甲醇溶液, 梯度洗脱条件: 初始流动相为 0.1% B, 维持 1 min, 4 min 时升至 6.0% B, 15 min 时升至 50% B, 21 min 时升至 99.9% B 并维持 2.5 min, 随后快速恢复初始 0.1% B, 并保持 1.5 min; 进样体积为 10 μL ; 流速为 400 $\mu\text{L}/\text{min}$; 柱温为 40°C 。

(3) 质谱条件: 采用电喷雾离子源 (ESI), 同时在正、负离子模式下采集数据, Full MS 分辨率为 17500, 扫描范围为 m/z 100~1000。载气为氮气, 正、负模式下喷针电压均为 3500 V, 离子传输毛细管温度为 320°C ; 鞘气和辅助气流量分别为 50 和 12.5 L/min。随机进样, 每种样品共检测两次, 以消除人为或仪器造成的系统误差, QC 样品每隔 10 种样品检测一次。Full MS/dd-MS2 模式用于获得标志物的二级质谱结构信息, NCE 设置为 30%。

2.2.3 尿液代谢组检测数据分析

将 UPLC/Q Exactive-MS 联用平台采集到的代谢物指纹图谱数据导入 Compound Discoverer 2.1 软件进行峰对齐、代谢物离子信息提取与鉴定, 得到包含代谢物分子量、分子式、离子峰面积的信息表。数据进行归一化后导入 SIMCA-P (Version 14.1 MKS Umetrics), 首先进行主成分分析 (PCA), 基于 QC 样品聚合情况考察仪器方法的稳定性, 随后进行正交-偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA), 并通过 SPSS (Version 24, IBM) 和 MetaboAnalyst 4.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>) 进行统计学分析。差异代谢物的筛选标准为: VIP 值 (Variable Importance in the Projection) ≥ 1.5 , 两组间变化倍数 ≥ 2 (暴露组 vs 对照组), $p < 0.05$ (暴露组 vs 对照组)。将满足上述条件的代谢物导入 HMDB (<http://www.hmdb.ca/>) 进行检索, 排除非内源性物质和非大鼠物种来源物质, 并对其生物学意义进行分析。

3 结果与讨论

3.1 砷暴露剂量的选择

全球天然水体中砷浓度范围为 0.0005~5.0 mg/L, 如印度西孟加拉邦地区的地下饮用水中砷浓度达到了 3.7 mg/L^[23,24]。饮用水中砷的主要存在状态有 As(III) 和 As(V)^[25], 且 As(III) 的毒性远大于 As(V)^[26], 为了更真实

地反映饮水砷暴露的健康影响，因此选择 NaAsO_2 溶液作为砷暴露源。在本研究中选用 $25.0 \text{ mg/L NaAsO}_2$ 作为最高暴露剂量，相当于 14.4 mg/L 的砷暴露量，依据动物与人类间剂量转换算法^[27]，这相当于人类暴露于 2.3 mg/L 的砷；为了反映人类常规饮水砷暴露状态，选用 1.0 mg/L NaAsO_2 作为低暴露剂量组。同样， $25.0 \text{ mg/L NaAsO}_2$ 暴露量（相当于 4.0 mg/kg bw ）约为大鼠口服半致死量（ 41.0 mg/kg bw ）的 $1/10$ ^[28]。因此，本研究使用的暴露剂量涵盖了环境砷暴露最高水平、常规饮水砷暴露水平和大鼠 NaAsO_2 的半致死量，与环境相关并具有毒理学意义。

3.2 代谢组学分析

在正、负离子两种扫描模式下同时对样品中的代谢物进行检测，尽可能获得所有代谢物的信息。图 1 为大鼠尿液代谢组轮廓的代表性指纹图谱，可以看出谱图中含有丰富的代谢物信息。

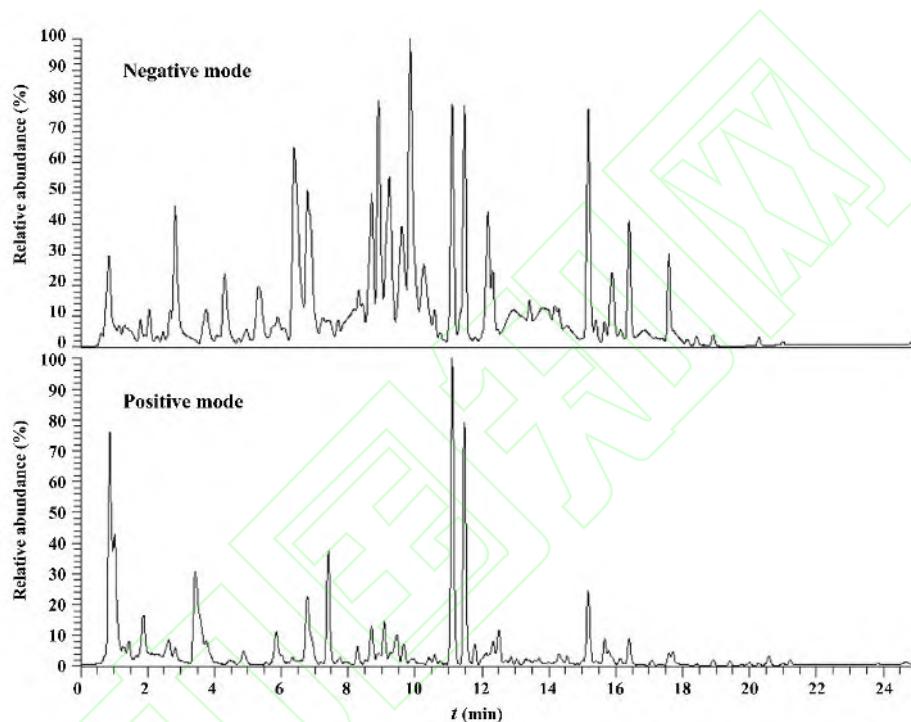


图 1 正负离子模式下大鼠尿液的典型代谢指纹图谱

Fig.1 Representative metabolome profiles of rat urine under positive and negative mode

在代谢组学分析过程中，通常伴随着显著的质谱信号漂移，为了消除这种变化，常添加一种或多种内标校正信号^[29]，以及采用 QC 样品来评估信号漂移状态并进行信号校正^[30,31]。本研究采用 statTarget 工具对所有数据进行校正（QC-RFSC）^[31]。QC 样品（ $n = 9$ ）检测均匀覆盖整种样品分析序列，通过对所有 QC 样品数据中代谢物离子的保留时间和信号强度进行分析，可以检验方法的可靠性及 LC-MS 平台的稳定性。采用 PCA 方法对所有样品数据进行模式识别，结果如图 2 所示，QC 样品聚合良好，表明本研究中代谢组学分析方法稳定可靠，数据质量满足进一步多变量组学分析的要求。

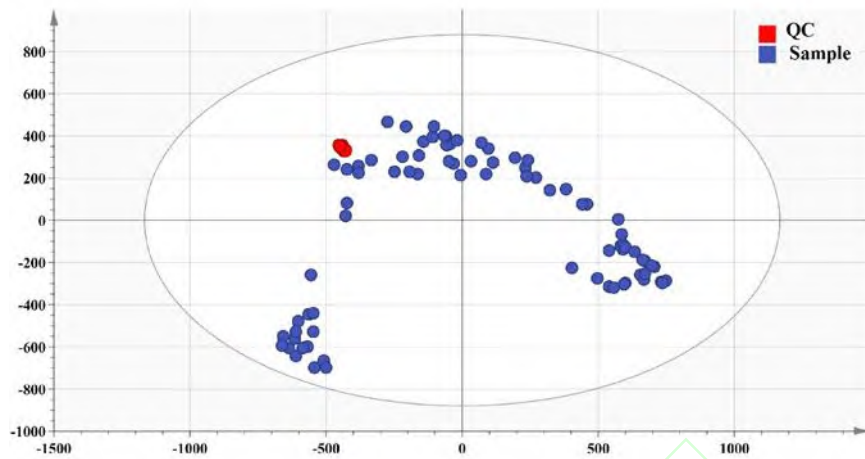


图 2 质量控制样品的PCA聚类分析结果

Fig.2 Quality control (QC) clustering results in principal component analysis (PCA) scoring plots

在代谢组学数据分析中，正交-偏最小二乘判别分析（OPLS-DA）作为偏最小二乘法-判别分析（PLS-DA）的改进方法，常被用于两组或多组数据的区分，与 PLS-DA 相比，OPLS-DA 模型的假阳性率更低，结果更准确^[32]。分别对暴露组与对照组之间进行 OPLS-DA 分析和置换检验。如图 3 所示，OPLS-DA 分析表明，两种剂量组与对照组均能够实现良好的聚类区分，模型经过验证可靠，表明长期饮水砷暴露对大鼠的尿液代谢组产生了显著影响。

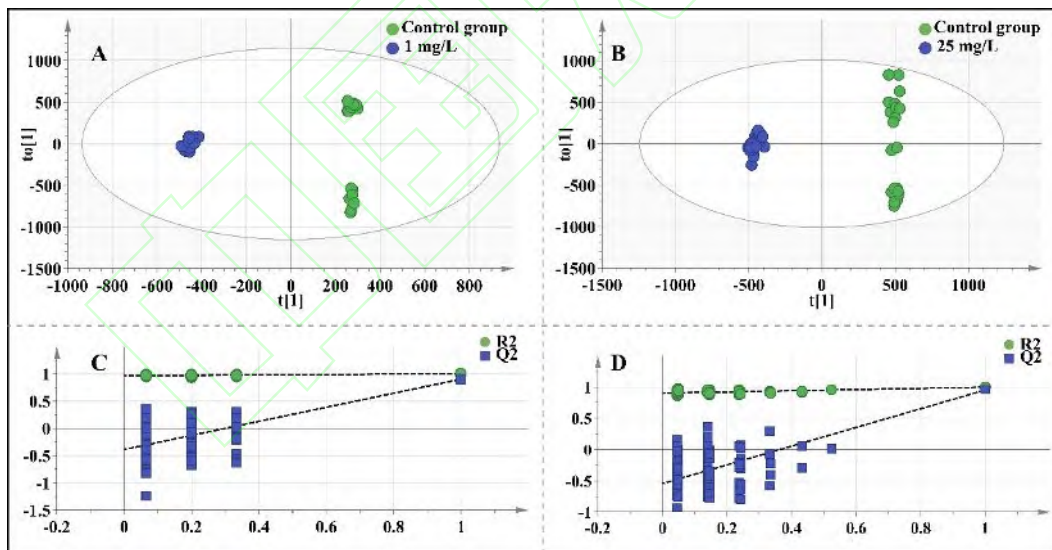


图 3 大鼠尿液代谢组的OPLS-DA分析结果

A: 1.0 mg/L暴露组与对照组间OPLS-DA分析结果; B: 25.0 mg/L暴露组与对照组间OPLS-DA分析结果; C: 1.0 mg/L暴露组与对照组间OPLS-DA模型的99次置换检验结果; D: 25.0 mg/L暴露组与对照组间OPLS-DA模型的99次置换检验结果

Fig.3 Orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) scoring plots of rat urine metabolome profiles

(A) Scoring plots of control and 1 mg/L groups ($R^2X = 0.386$, $R^2Y = 0.998$, $Q^2 = 0.900$); (B) Scoring plots of control and 25 mg/L groups ($R^2X = 0.396$, $R^2Y = 0.997$, $Q^2 = 0.953$); (C) 99-time permutation test of OPLS-DA model in control and 1 mg/L groups (Intercepts: $R^2=(0.0, 0.965)$, $Q^2=(0.0, -0.39)$); (D) 99-time permutation test of OPLS-DA model in control

and 25 mg/L groups (Intercepts: $R^2=(0.0, 0.902)$, $Q^2=(0.0, -0.545)$).

将提取的代谢物离子信息表导入 MetaboAnalyst 4.0 进行统计学分析, 对暴露组和对照组中代谢物离子强度变化倍数 (FC) 及 t 检验的 p 值进行比较 (图 4), 结果表明, 暴露组与对照组的大鼠尿液中存在大量的差异代谢物 (图 4 中红色圆点, $FC > 2$ 且 $p < 0.05$), 且高剂量比低剂量暴露组中存在更多的差异性代谢物离子。依据变量在 OPLS-DA 区分投影中的重要性 (VIP)、两组间变化倍数及差异显著性, 最终共筛选出 36 种差异代谢物 (表 1, 低剂量组 14 种, 高剂量组 32 种, 两种剂量组中同时鉴定到 10 种)。差异代谢物在暴露组与对照组尿液中的变化热图 (图 6) 显示, 13 种差异代谢物在砷暴露组大鼠尿液中的含量显著上调, 23 种代谢物出现了显著下调。将差异代谢物导入 MetaboAnalyst 4.0, 经 Pathway Analysis 和 Statistical Analysis 分析, 表明差异代谢物涉及氨基酸代谢、谷胱甘肽代谢、嘌呤代谢、鞘脂代谢和氨酰基-tRNA 生物合成等通路 (图 5)。

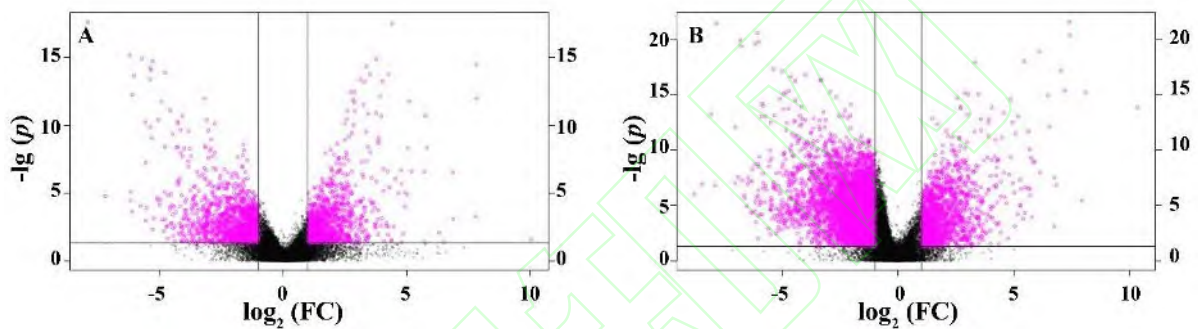


图 4 暴露组与对照组大鼠尿液代谢物离子对比火山图

Fig.4 Comparative volcano plot of metabolites in exposure and control groups

(A) Volcano plot of control and 1.0 mg/L groups; (B) Volcano plot of control and 25.0 mg/L groups

表 1 差异代谢物的代谢通路、变化趋势和两组间的差异性

Table 1 Metabolic pathway classification, fold change (FC) and p value of differential metabolites

差异代谢物 Metabolite	1.0mg/L vs. 对照 1.0mg/L vs. control		25.0mg/L vs. 对照 25.0mg/L vs. control		种类 Class	涉及代谢通路 Pathway
	FC ^a	p ^b	FC ^a	p ^b		
Spermine [#]	0.12	< 0.01	0.14	< 0.01	Amines	Amino acid and glutathione metabolism
Spermidine [#]	0.32	< 0.05	0.09	< 0.01	Amines	Amino acid and glutathione metabolism
Creatine [#]			0.06	< 0.01	Carboxylic acids and derivatives	Amino acid metabolism
Serotonin [#]			2.42	< 0.05	Indoles derivatives	Amino acid metabolism
Tryptamine [*]	0.04	< 0.01			Indoles derivatives	Amino acid metabolism
Dicrotalic acid [#]			0.02	< 0.01	Fatty Acyls	Amino acid metabolism
Amino adipic acid [#]	0.17	< 0.05	0.08	< 0.01	Carboxylic acids and derivatives	Amino acid metabolism
Kynurenic acid [#]	0.19	< 0.05	2.25	< 0.01	Quinolines and derivatives	Amino acid metabolism
Xanthurenic acid [#]	0.29	< 0.01	0.16	< 0.01	Quinolines and derivatives	Amino acid metabolism
Acetylglutamic acid [#]			0.04	< 0.01	Carboxylic acids and derivatives	Amino acid metabolism
6-Oxymelatonin [#]	0.02	< 0.01	0.02	< 0.01	Indoles derivatives	Amino acid metabolism
Acetylglutamide [#]			0.01	< 0.01	Carboxylic acids and derivatives	Amino acid metabolism
Tryptophan [*]	5.19	< 0.05		< 0.01	Indoles derivatives	Amino acid metabolism
Methionine [#]			5.15	< 0.01	Amino acids	Amino acid metabolism and aminoacyl-tRNA biosynthesis
Caproic acid [#]			3.18	< 0.01	Fatty Acyls	Fatty acid biosynthesis
Suberic acid [#]			70.98	< 0.01	Fatty Acyls	Fatty acid metabolism
Suberylglycine [#]			2.75	< 0.01	Carboxylic acids and derivatives	Fatty acid metabolism
Oleamide [*]	0.13	< 0.01			Fatty Acyls	Fatty acid metabolism
Pyroglutamic acid [#]			0.03	< 0.01	Carboxylic acids and derivatives	Glutathione metabolism
Methylbutyrylcarnitine [#]			3.43	< 0.01	Fatty Acyls	Lipid metabolism
Ethylmalonic acid [#]			0.09	< 0.01	Fatty Acyls	Lipid metabolism
Citraconic acid [#]	0.26	< 0.01	0.13	< 0.01	Fatty Acyls	Lipid metabolism
Heptanoic acid [#]			16.05	< 0.01	Fatty Acyls	Lipid metabolism
Pimelic acid [#]			8.19	< 0.01	Fatty Acyls	Lipid metabolism
2,2,-Dimethylsuccinate [#]			0.09	< 0.01	Fatty Acyls	Lipid metabolism
Itaconic acid [#]			0.04	< 0.01	Fatty Acyls	Lipid metabolism
N6-acetyllysine [#]			0.06	< 0.01	Carboxylic acids and derivatives	Protein post-translational modification
Guanine [#]			0.08	< 0.01	Purine derivatives	Purine metabolism
Hypoxanthine [#]	0.13	< 0.01	0.16	< 0.01	Purine derivatives	Purine metabolism
Uric acid [#]			8.27	< 0.01	Purine derivatives	Purine metabolism
Xanthine [#]			8.70	< 0.05	Purine derivatives	Purine metabolism
Ribothymidine [#]	0.07	< 0.05	0.11	< 0.01	Pyrimidine nucleosides	Pyrimidine metabolism
Sphingosine [*]	0.13	< 0.01			Amines	Sphingolipid metabolism

Mevalonic acid [#]			0.15	< 0.01	Fatty Acyls	Terpenoid backbone biosynthesis
3-Hydroxysebacate [#]			0.19	< 0.01	Hydroxy acids and derivatives	Not Available
D-2-Hydroxyglutaric acid [#]	0.12	< 0.01	0.02	< 0.01	Hydroxy acids and derivatives	Not Available

* 1.0 mg/L 暴露组与对照组间所鉴定代谢物; # 25.0 mg/L 暴露组与对照组间所鉴定代谢物; ^a 代谢物在剂量组与对照组间的变化倍数, FC > 2 表示上调, FC < 2 表示下调; ^b 使用方差分析 (ANOVA) 和 LSD 事后检验评估统计学显著性, $p < 0.05$ 表示有显著性差异。

* metabolites identified between control and 1.0 mg/L groups; # metabolites identified between control and 25.0 mg/L groups; ^a Fold change between treatment and control groups, FC > 2 indicates up-regulation, FC < 2 indicates down-regulation; ^b The statistical significance was assessed using analysis of variance (ANOVA) followed by LSD post hoc test, and $p < 0.05$ was considered as significant.

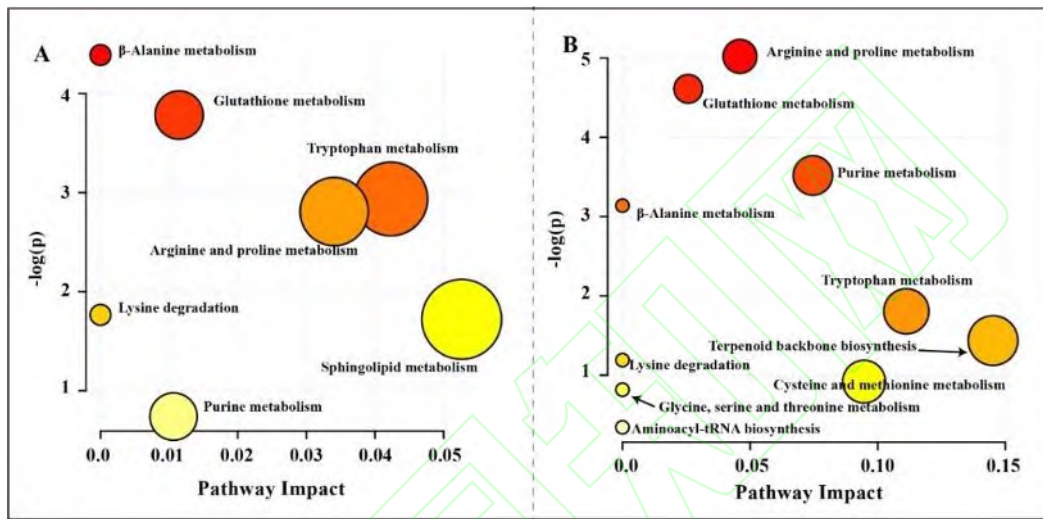


图 5 MetaboAnalyst 代谢通路分析结果

Fig.5 Overview of pathway analysis

(A) Disturbed pathway between control and 1.0 mg/L groups; (B) Disturbed pathway between control and 25.0 mg/L groups; Generated by MetaboAnalyst (<https://www.metaboanalyst.ca/>).

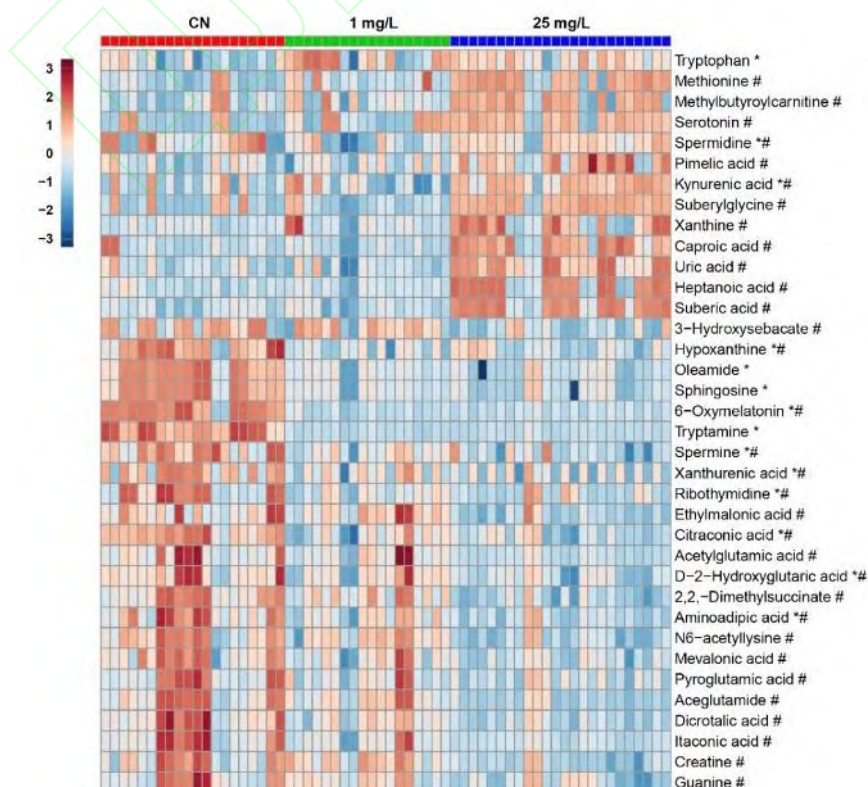


图 6 暴露组和对照组之间差异代谢物的分层聚类热图分析

Fig.6 Hierarchical clustering heatmap analysis of differential metabolites between control and exposure groups
* metabolites identified between control and 1.0 mg/L groups; # metabolites identified between control and 25.0 mg/L groups.

3.3 基于代谢组学分析的神暴露毒性效应

3.3.1 长期神暴露引起生物体整体代谢异常

神暴露会扰乱机体内氧化/抗氧化平衡, 造成机体氧化损伤^[33,34], 影响细胞生长^[35]、DNA 修复^[36]和表达调节^[37-40]。流行病学研究表明, 神暴露是糖尿病^[41-43]和心血管疾病^[44-46]等代谢类疾病的危险因素。尿液中包含了大量代谢物信息, 尿液代谢组学研究已被广泛应用于污染物毒理研究中^[17,47,48], 对大鼠尿液进行代谢组分析, 能够准确地反映出生物体整体代谢轮廓的变化。本研究发现, 经过长期的神暴露, 大鼠尿液中有 14 种与氨基酸代谢相关的代谢物发生了显著变化 (4 种含量上升、10 种含量下降), 在 25.0 mg/L 暴露组鉴定出 12 种, 1.0 mg/L 暴露组鉴定出 8 种, 涉及到的氨基酸通路有色氨酸代谢 (Tryptophan metabolism)、精氨酸和脯氨酸代谢 (Arginine and proline metabolism)、赖氨酸降解 (Lysine degradation)、 β -丙氨酸代谢 (β -Alanine metabolism)、半胱氨酸和蛋氨酸代谢 (Cysteine and methionine metabolism)、甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢 (Glycine, serine and threonine metabolism) (图 5); 同时, 也鉴定出 11 种与脂类代谢相关的代谢物 (6 种含量上升、5 种含量下降), 其中在 25.0 mg/L 暴露组鉴定出 10 种, 1.0 mg/L 暴露组鉴定出 2 种, 涉及到的代谢通路有鞘脂代谢 (Sphingolipid metabolism)、脂肪酸代谢。慢性神暴露已被证明与糖尿病和心血管疾病具有密切关系, 这些疾病的典型特征是生物体内糖类、脂类和氨基酸的代谢紊乱^[49,50]。以上结果表明, 长期神暴露能够引起生物体整体代谢异常, 并且高剂量 (25.0 mg/L) 暴露比低剂量 (1.0 mg/L) 暴露产生的代谢影响更显著。

3.3.2 长期神暴露扰乱氧化/抗氧化平衡引起核苷酸代谢紊乱

神暴露能够引起生物体产生多种损伤, 其毒性机理在分子层面还未完全明确, 氧化/抗氧化失衡导致的氧化应激是被广泛接受和深入研究的方向之一^[51]; 长期神暴露引起的氧化/抗氧化失衡是众多神毒害的诱因, 进而造成致癌、遗传毒性、生殖毒性、皮肤损伤、代谢系统和神经系统病变等^[33]。在神暴露大鼠尿液中鉴定出涉及谷胱甘肽代谢通路的代谢物有精胺 (Spermine)、亚精胺 (Spermidine) 和焦谷氨酸 (Pyroglutamic acid), 且含量均下降。这表明神暴露可能破坏了大鼠体内的谷胱甘肽代谢循环 (机体内维持氧化/抗氧化平衡的重要生物学过程) ^[52,53], 进而对大鼠机体产生氧化损伤。另外, 暴露组中 5 种与核苷酸代谢相关的代谢物产生了显著变化 (2 种含量上升, 3 种含量下降), 其中, 次黄嘌呤 (Hypoxanthine, 下降) 和黄嘌呤 (Xanthine, 上升) 是尿酸 (Uric acid, 上升) 合成的前体, 尿酸是嘌呤氧化的最终产物, 这表明长期神暴露可能通过扰乱机体内氧化/抗氧化平衡, 干扰核苷酸代谢, 并影响机体内正常的生物学过程。

3.3.3 长期神暴露干扰蛋白质表达与翻译后修饰

氨基酸的 tRNA 转运及蛋白质翻译后修饰对于蛋白质的合成和功能化具有重要意义。与对照组相比, 神暴露组中蛋氨酸 (Methionine) 和 *N*-乙酰基-赖氨酸 (*N6*-acetyllysine) 的含量分别显著上升和下降。蛋氨酸与氨酰-tRNA 的生物合成过程相关, *N*-乙酰基-赖氨酸是一种乙酰化氨基酸, 赖氨酸乙酰化是一种重要的蛋白质翻译后修饰, 这说明长期神暴露扰乱了大鼠体内蛋白质的表达和翻译后修饰过程。

4 结论

利用代谢组学技术对不同剂量长期饮水神暴露大鼠尿液的代谢组进行了对比分析, 发现长期神暴露对大鼠体内整体代谢产生了显著影响, 在低剂量和高剂量暴露组中分别鉴定出 14 种和 32 种差异代谢物, 其中 10

种差异代谢物在两种剂量组中均被鉴定出，这表明长期高剂量砷暴露对机体代谢产生的干扰更显著。对差异代谢物涉及的代谢通路进行分析，结果表明，长期砷暴露会导致氨基酸和脂类代谢异常及核苷酸代谢紊乱，并干扰蛋白质的表达与翻译后修饰。以上通路的改变均可作为砷毒性机理的关键分子事件，以此为靶点，结合常规毒理学研究方法和多组学联用技术，对这些生物学过程中的关键节点进行深入研究，有助于对砷毒性分子机制的深度解析。

References

1. Rodríguez-Lado L, Sun G, Berg M, Zhang Q, Xue H, Zheng Q, Johnson CA. *Science*, **2013**, 341(6148):866-868
2. Karn S K. *Environ. Pollut.*, **2015**, 207:434-435
3. Pham L H, Nguyen H T, Tran C V, Nguyen H M, Nguyen T H, Tu M B. *Environ. Geochem. Hlth.*, **2017**, 39(3):1-13
4. Naujokas M F, Anderson B, Ahsan H, Aposhian H V, Graziano J H, Thompson C, Suk W A. *Environ. Health Perspect.*, **2013**, 121(3):295-302
5. Jomova K, Jenisova Z, Feszterova M, Baros S, Liska J, Hudecova D, Rhodes C J, Valko M. *J. App. Toxicol.*, **2011**, 31(2): 95-107
6. Shen H, Xu W, Zhang J, Chen M, Martin FL, Xia Y, Liu L, Dong S, Zhu Y G. *Environ. Sci. Technol.*, **2013**, 47(15): 8843-8851
7. Xu W, Bao H, Liu F, Liu L, Zhu YG, She J, Dong S, Cai M, Li L, Li C, Shen H. *Environ. Health*, **2012**, 11(1): 46
8. Huang Q, Xi G, Alamdar A, Zhang J, Shen H. *Environ. Pollut.*, **2017**, 229:210-218
9. Weng R, Shen S, Tian Y, Burton C, Xu X, Liu Y, Chang C, Bai Y, Liu H. *Sci. Rep.*, **2015**, 5: 11864
10. Vlaanderen J J, Janssen N A, HoeK, G, Keski-Rahkonen P, Barupal D K, Cassee F R, Gosens I, Strak M, Steenhof M, Lan Q, Brunekreef B, Scalbert A, Vermeulen R C H. *Environ. Res.*, **2017**, 156: 341-348
11. Wang Z, Xu X, He B, Guo J, Zhao B, Zhang Y, Zhou Z, Zhou X, Zhang R, Abliz Z. *Ecotox. Environ. Saf.*, **2019**, 169: 232-239
12. Chen C H S, Yuan T H, Shie R H, Wu K Y, Chan C C. *Environ. Inter.*, **2017**, 102: 87-96
13. Karu N, Deng L, Siae M, Guo A C, Sajed T, Huynh H, Win E, Wishart D S. *Anal. Chim. Acta*, **2018**, 1030: 1-24
14. Wishart D S, Mandal R, Stanislaus A, Ramirez-Gaona M. *Metabolites*, **2016**, 6(1):10-26
15. Aretz I, Meierhofer D. *Int. J. Mol. Sci.*, **2016**, 17(5):632
16. Wishart D S. *Bioanalysis*, **2009**, 1(9):1579-1596
17. Zhang J, Liu L, Wang X, Huang Q, Tian M, Shen H. *Environ. Sci. Technol.*, **2016**, 50(11): 5953-5960
18. Wang X, Liu L, Zhang W, Zhang J, Du X, Huang Q, Tian M, Shen H. *Environ. Pollut.*, **2017**, 229: 168-176
19. Nagato E G, Jessica C, Lankadurai B P, Poirier D G, Reiner E J, Simpson A J, Simpson M J. *Chemosphere*, **2013**, 93(2): 331-337
20. Lu K, Ryan P A, Schlieper K A, Graffam M E, Levine S, Wishnok J S, Swenberg J A, Tannenbaum S R, Fox J G. *Environ. Health Perspect.*, **2014**, 122(3): 284-291
21. Shi X, Wei X, Koo I, Schmidt R H, Yin X, Kim S H, Vaughn A, McClain C J, Arteel G E, Zhang X, Watson W H. *J. Proteome Res.*, **2013**, 13(2): 547-554
22. Wu H, Zhang X, Wang Q, Li L, Ji C, Liu X, Zhao J, Yin X. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **2013**, 90: 1-6
23. Sefaur R, Sinha A C, Pati R, Mukhopadhyay D. *Environ. Geochem. Health*, **2013**, 35(1):119-13224.
24. Mandal B K, Chowdhury T R, Samanta G, Basu G K, Chowdhury P P, Chanda C, Lodh D, Karan N K, Dhar R K, Tamili D K, Das D, Saha K C, Chakraborti D. *Curr. Sci.*, **1996**, 70(11): 976-986
25. Nordstrom D K. *Science*, **2002**, 296(5576): 2143-2145
26. Herreweghe S V, Swennen R, Vandecasteele C, Cappuyens V. *Environ. Pollut.*, 2003, 122(3): 323-342
27. Reaganshaw S, Nihal M, Ahmad N. *FASEB J.*, **2008**, 22(3): 659-661
28. Zhang W, Feng H, Gao Y, Sun L, Wang J, Li Y, Wang C, Zhao L, Hu X, Sun H, Wei Y, Sun D. *Biol. Trace Elem. Res.*, **2013**, 151(2): 269-276
29. Veenstra T D. *Genome Med.*, **2012**, 4(4): 40-40

-
30. Dunn W B, Wilson I D, Nicholls A W, Broadhurs D. *Bioanalysis*, 2012 4(18): 2249-2264
31. Luan H, Ji F, Chen Y, Cai Z. *Anal. Chim. Acta*, **2018**, 1036: 66-72
32. Max Bylesjö, Rantalainen M, Cloarec O, Nicholson J K, Holmes E, Trygg J. *J. Chemometr.*, **2010**, 20(8-10): 341-351
33. BAI Cai-Jun, LIU Dan, LI Bing. *Practical Preventive Medicine*, **2012**, 19(2): 314-316
白彩军, 刘丹, 李冰. 实用预防医学, **2012**, 19(2):314-316
34. Shi H, Shi X, Liu K J. *Mol. Cell. Biochem.*, **2004**, 255(1-2): 67-78
35. Zhong F, Zhang S, Shao C, Yang J, Wu X. *Pathol. Oncol. Res.*, **2010**, 16(3): 413-420
36. ZHANG Ai-Hua, LI Jian, PAN Xue-Li, JIANG Xian-Yao, CEN Du-Cai, HUANG Xiao-Xin. *Chinese Journal of Endemiology*, **2005**, 24(2):121-123
张爱华, 李健, 潘雪莉, 蒋宪瑶, 岑笃才, 黄晓欣. 中华地方病学杂志, **2005**, 24(2):121-123
37. Chanda S. *Toxicol. Sci.*, **2006**, 89(2): 431-437
38. Ali S, Ali S. *BMC Med. Genomics*, **2010**, 3(1): 35
39. Wang L, Kou M C, Weng C Y, Hu L W, Wang Y J, Wu M J. *Arch. Toxicol.*, **2012**, 86(6): 879-896
40. Davey J C, Nomikos A P, Wungjiranirun M, Sherman J R, Ingram L, Batki C, Lariviere J P, Hamilton J W. *Environ. Health Perspect.*, **2008**, 116(2): 165-172
41. Peng Q, Harlow S D, Park S K. *Int. J. Hyg. Envir. Heal.*, **2015**, 218(4): 407-413
42. Sung T C, Huang J W, Guo H R. *Biomed. Res. Int.*, **2014**, 2014(17): 368087
43. Pan W C, Seow W J, Kile M L, Hoffman E B, Quamruzzaman Q, Rahman M, Mahiuddin G, Mostofa G, Lu Q, Christiani D C. *Am. J. Epidemiol.*, **2013**, 178(10): 1563-1570
44. Li X, Li B, Xi S, Zheng Q, Wang D, Sun G. *Environ. Health*, **2013**, 12(1): 37
45. Manoochehr M, Dariush S, Sonia O, Shabnam J. *J. Res. Med. Sci.*, **2013**, 18(5): 408-412
46. Tsuji J S, Perez V, Garry M R, Alexander D D. *Toxicology*, **2014**, 323: 78-94
47. Zhang J, Shen H, Xu W, Xia Y, Barr D B, Mu X, Wang X, Liu L, Huang Q, Tian M. *Environ. Sci. Technol.*, **2014**, 48(20): 12265-12274
48. Lee S H, Woo H M, Jung B H, Lee J, Kwon O S, Pyo H S, Choi M H, Chung B C. *Anal. Chem.*, **2007**, 79(16): 6102-6110
49. SONG Xuan-Bo, ZHAO Li-Jun, WEI Yu-Dan. *Chinese Journal of Endemiology*, **2018**, 37(2): 165-168
宋选波, 赵丽军, 魏玉丹. 中华地方病学杂志, **2018**, 37(2):165-168
50. HAN Xiao-Fei, HUANG Yu-Hong, WANG Long-Xing, YANG Qian-Xu, XIAO Hong-Bin, ZHANG De-Qin. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2010**, 38(5): 697-701
韩晓菲, 黄宇虹, 王龙星, 杨乾栩, 肖红斌, 张德芹. 分析化学, **2010**, 38(5): 697-701
51. Hughes M F, Beck B D, Chen Y, Lewis A S, Thomas D J. *Toxicol. Sci.*, **2011**, 123(2): 305-332
52. Leeuwenburgh C, Heinecke J W. *Curr. Med. Chem.*, **2001**, 8(7): 829-838
53. Xiong Y, Xiong Y, Zhou S, Sun Y, Zhao Y, Ren X, Zhang Y, Zhang N. *Rejuv. Res.*, **2017**, 20(2): 85-92

Metabolomics Study of Rat Urine with Long Term Arsenic Exposure

WANG Xiao-Fei, SHEN Yun-Wang, ZHU Jue, ZHANG Bo*

(College of Chemistry & Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract Long term inorganic arsenic exposure can cause many diseases and health damage, and the biological mechanism underneath remains unclear. Globally, over 200 million people are under the threat of arsenic pollution of drinking water. In this study, we performed metabolomics analysis of rat urine samples which were exposed to inorganic arsenic through drinking water for a long term. The results indicated that long-term arsenic exposure could cause significant urinary metabolome change, especially for the high-dose exposure groups. Totally 36 kinds of differential metabolites were identified, in which 14 were related with amino acid metabolism, including tryptophan, arginine, proline, lysine, β -alanine, cysteine, methionine, glycine, serine and threonine, and 11 were related with lipid metabolism, including sphingolipids and fatty acids. The expression and post-translational modifications of proteins were also influenced. Such biological process mutations are the key molecular indicators of arsenic toxicological mechanisms.

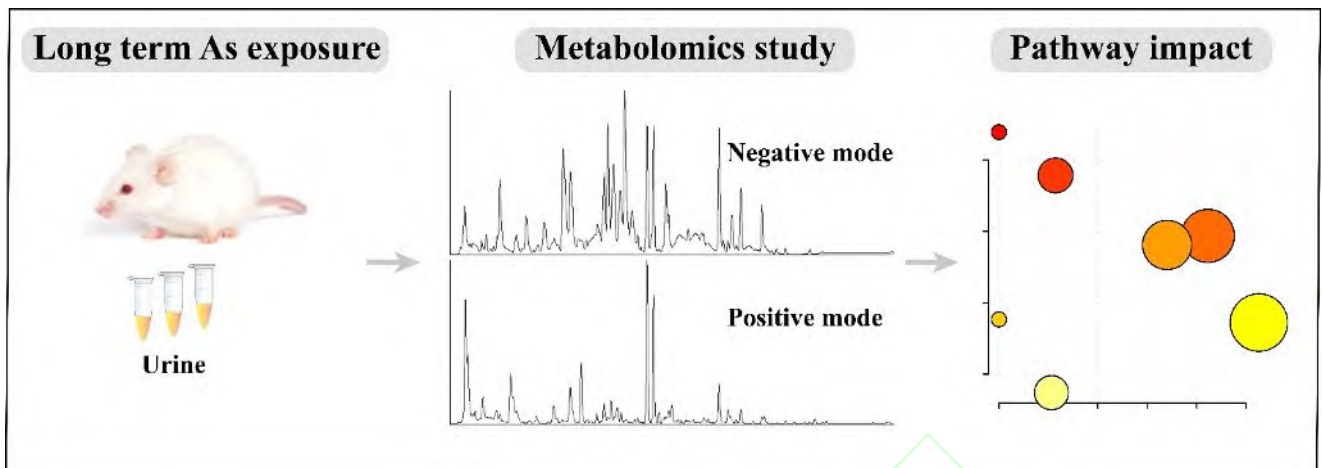
Keywords Arsenic exposure; Metabolomics; Urine; Long-term exposure; Liquid chromatography-mass spectrometry

(Received 6 December 2018; accepted 6 March 2019)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 21475110, 21535007, J1310024), the China Postdoc Foundation (No. 2018M642572), the Xiamen Municipal Science and Technology Plan Project (No. 3502ZZ20173019) and the Fundamental Research Funds for Central Universities of China (20720160051).

图文说明 (Graphical abstract):

本研究以饮水方式对大鼠进行无机砷的长期暴露，并对大鼠尿液代谢组的变化进行了系统分析。结果表明，长期砷暴露大鼠的尿液代谢组与对照组具有显著区别，且高剂量砷暴露对大鼠尿液代谢组产生的影响更加显著。



中国知网