

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20240919003

引用格式: 王潇潇, 陈彩红, 郑关超, 等. 麻痹性贝毒亚慢性暴露对小鼠肝脏脂质代谢的影响[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(3): 8–16.

WANG XX, CHEN CH, ZHENG GC, *et al.* Effects of sub-chronic exposure to paralytic shellfish toxins on liver lipidomics in mice [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(3): 8–16. (in Chinese with English abstract).

麻痹性贝毒亚慢性暴露对小鼠肝脏 脂质代谢的影响

王潇潇¹, 陈彩红¹, 郑关超², 霍善琴², 谭志军², 吴海燕^{2*}

(1. 中国海洋大学食品科学与工程学院, 青岛 266404; 2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 农业部水产品质量安全检测与评价重点实验室, 青岛 266071)

摘要: **目的** 评估亚慢性剂量麻痹性贝毒(paralytic shellfish toxins, PSTs)对小鼠肝脏的影响。**方法** 本研究通过口服灌胃的方式, 采用的脂质组学技术评估不同剂量浓度 PSTs 对肝脏脂质代谢组学的影响。**结果** 高中剂量组(大于 100 $\mu\text{g STXeq/kg BW}$)暴露导致脂质代谢异常, 其中甘油磷脂类(glycerophospholipids, GP)为主要差异脂质代谢物, 磷脂酰乙醇胺(18:3/22:6) [phosphatidylethanolamine (18:3/22:6), PE (18:3/22:6)], PE (16:0/18:0)、16(17)-环氧二十二碳五烯酸的相对含量降低, 而溶血磷脂酰乙醇胺(P-16:0/0:0)的相对含量升高, 这些脂质可作为 PSTs 暴露导致肝脏损伤的生物标志物。相比之下, 低剂量组(45 $\mu\text{g STXeq/kg BW}$)未对小鼠肝脏脂质造成显著性影响。差异脂质的代谢途径富集分析表明, α -亚麻酸代谢、甘油酯代谢、花生四烯酸代谢和类固醇激素的生物合成共同参与了 3 个 PSTs 实验组的脂质代谢。**结论** PSTs 对小鼠肝脏脂质代谢的影响具有剂量依赖性特征, 脂质功能障碍可能影响 PSTs 的神经毒性作用, 本研究为探索 PSTs 对小鼠肝脏损伤机制提供了理论参考。

关键词: 麻痹性贝毒; 脂质组学; 差异脂质; 代谢通路

Effects of sub-chronic exposure to paralytic shellfish toxins on liver lipidomics in mice

WANG Xiao-Xiao¹, CHEN Cai-Hong¹, ZHENG Guan-Chao²,
HUO Shan-Qin², TAN Zhi-Jun², WU Hai-Yan^{2*}

(1. College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266404, China; 2. Key Laboratory of Testing and Evaluation for Aquatic Product Safety and Quality, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

ABSTRACT: Objective To evaluate the effects of sub-chronic doses of paralytic shellfish toxins (PSTs) on the livers of mice. **Methods** In the present study, the effects of different dose concentrations PSTs on hepatic lipid metabolomics were assessed by oral gavage using the lipidomics technique. **Results** Exposure to the high-and medium-dose group

收稿日期: 2024-09-19

基金项目: 国家重点研发计划项目(2022YFC3105203); 中国水产科学研究院基本科研业务费项目(2023TD76)

第一作者: 王潇潇(1999—), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为贝类毒素风险形成机理研究。E-mail: 18264351627@163.com

*通信作者: 吴海燕(1985—), 女, 副研究员, 主要研究方向为贝类毒素风险形成机理研究。E-mail: wuhy@ysfri.ac.cn

(greater than 100 $\mu\text{g STXeq/kg BW}$) resulted in abnormal lipid metabolism, with glycerophospholipids (GP) as the major differential lipid metabolites, phosphatidylethanolamine (18:3/22:6) [PE (18:3/22:6)], PE (16:0/18:0), and 16(17)-epoxydocosapentaenoic acid were lower, whereas the relative content of lysophosphatidylethanolamine (P-16:0/0:0) was elevated in relative levels of these lipids, which might serve as biomarkers of liver injury due to PSTs exposure. In contrast, the low dose group (45 $\mu\text{g STXeq/kg BW}$) did not significantly affect mouse liver lipids. Metabolic pathway enrichment analysis of differential lipids showed that α -linolenic acid metabolism, glyceride metabolism, arachidonic acid metabolism, and steroid hormone biosynthesis were collectively involved in lipid metabolism in the 3 kinds of PSTs experimental groups. **Conclusion** The effects of PSTs on hepatic lipid metabolism in mice are characterized by a dose-dependent pattern, and lipid dysfunction may affect the neurotoxic effects of PSTs. This study provides a theoretical reference for exploring the mechanism of hepatic injury by PSTs in mice.

KEY WORDS: paralytic shellfish toxins; lipidomics; differential lipids; metabolic pathways

0 引言

麻痹性贝毒(paralytic shellfish toxins, PSTs)是全球公认的强效神经毒素,是一类包括 57 种类似物的天然神经毒性生物碱。其主要毒理作用机制是通过与神经细胞的钠离子结合,阻止钠离子穿过膜,从而抑制神经传导^[1]。近年来,在全球变暖、海洋富营养化和酸化的作用下,有害藻华的发生频率逐渐增加,而 PSTs 作为一类危害严重的贝类毒素,对人类的安全健康构成了重大威胁^[2-3]。PSTs 可以通过食物链从浮游动物传递至贝类、鱼类等其他海洋生物,并在其体内积累和转化^[4]。据不完全统计,从 1985 年至 2018 年间,全球共发生 3800 余例 PSTs 中毒事件^[5]。关于 PSTs 的毒性作用机制及差异、毒性限量的安全性及复合毒性作用机制等研究依然是近年来科学研究的焦点^[6-8]。先前关于 PSTs 长期暴露的研究主要集中于双壳类动物和鱼类。研究表明, PSTs 的积累会影响双壳类动物的行为和代谢过程,诱发氧化应激,并导致吸收效率和清除率等变化^[9-10]。人类在食用受 PSTs 污染的贝类后,通常在 0.5 h 到 3 h 内出现中毒症状。症状初期表现为唇舌刺痛和指尖麻木,随后这些感觉会蔓延至四肢乃至全身,严重情况下中毒者可能因呼吸衰竭而死亡,具体取决于摄入的毒素剂量^[11-12]。随着研究的深入,研究人员发现 PSTs 与行为改变和空间记忆丧失有关^[13], PSTs 还可能导致明显的认知障碍和神经细胞损伤,并改变动物模型系统中海马组织蛋白的表达^[14]。并且,雄性小鼠暴露在 98 $\mu\text{g STXeq/kg/d}$ 的剂量下会导致肝脏谷草转氨酶显著升高^[15],这表明 PSTs 具有潜在的肝脏毒性。

肝脏是人体和动物体内以代谢为主的器官,同时也是多种有毒物质作用的靶器官^[16-17]。脂质在维持和调节膜流动性、信号转导和神经功能方面发挥着至关重要的作用^[18-20]。脂质组学是继蛋白组学、代谢组学之后,研究生物不同脂质分子的化学结构、生物功能及其在代谢调控中的动态变化,揭示脂质在生物样本中代谢调控机制的学科^[21],

在揭示毒性作用机制方面扮演着重要角色,已被应用于肥胖、动脉粥样硬化、代谢综合征和癌症等研究^[22-24]。研究表明,大多数的脂质效应标志物与外源性化学物质残留呈正相关,并与疾病风险增加有关^[25]。最新研究表明,微囊藻毒素暴露导致小鼠前额叶皮层和海马的区域特异性脂质组改变^[26]。但前额叶皮层和海马体中的脂质含量变化呈现相反趋势,揭示了脂质功能障碍在微囊藻毒素神经毒性机制中发挥重要作用且具有组织器官特异性。然而,目前关于 PSTs 的毒性评价主要集中在致死毒性剂量和中位致死剂量,而对于其他毒性作用研究较少^[27]。

本研究采用基于超高效液相色谱-串联质谱的非靶向脂质组学技术,评估了亚毒性剂量 PSTs 灌胃暴露后小鼠肝脏脂质组学的变化,结合多元统计分析,探讨了 PSTs 对小鼠肝损伤中差异代谢物的变化规律和对代谢通路的影响,为阐明 PSTs 对小鼠肝脏的损伤机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

24 只健康 SPF 级 ICR 雄性小鼠,6~8 周龄,体重 18~22 g,购买于维通利华(北京)生物技术有限公司,许可证号: SCXK(京)2021-0006。饲养于青岛大学生物医学中心实验动物平台,环境温度为 21~23 $^{\circ}\text{C}$,湿度 40%~60%,光/暗周期: 12/12 h,小鼠自由饮用无菌水和标准啮齿动物饲料。本研究方案已通过中国海洋大学的动物福利研究审查和批准(批准文号: SPXY2023081510)。

PSTs 标准溶液: 石房蛤毒素(saxitoxin, STX)、新石房蛤毒素(neosaxitoxin, NEO)、膝沟藻毒素 1~4 (gonyautxins 1~4, GTX1~4)、膝沟藻毒素 2~3 (gonyautxins 2~3, GTX2~3)、N-磺酰氨基甲酰基类毒素 5 (gonyautoxin 5, GTX5)、N-磺酰氨基甲酰基类毒素 6 (gonyautoxin 6, GTX6)、N-磺酰氨基甲酰基类毒素 1~2 (N-sulfocarbamoylgonyautoxin 1~2, C1~2)、脱氨基甲酰基石房蛤毒素(decarbamoylsaxitoxin, dcSTX)、脱

氨甲酰基新石房蛤毒素(decarbaoylneosaxitoxin, dcNEO)、脱氨甲酰基膝沟藻毒 2~3 (decarbamoylgonyautoxins 2~3, dcGTX2~3), 购自加拿大国家海洋研究中心, 质量浓度分别为: STX 53.91 $\mu\text{g/mL}$ 、NEO 20.51 $\mu\text{g/mL}$ 、GTX1 23.53 $\mu\text{g/mL}$ 、GTX4 7.41 $\mu\text{g/mL}$ 、GTX2 40.57 $\mu\text{g/mL}$ 、GTX3 17.20 $\mu\text{g/mL}$ 、GTX5 21.13 $\mu\text{g/mL}$ 、GTX6 5.22 $\mu\text{g/mL}$ 、C1 53.91 $\mu\text{g/mL}$ 、C2 16.12 $\mu\text{g/mL}$ 、dcSTX 21.40 $\mu\text{g/mL}$ 、dcNEO 10.49 $\mu\text{g/mL}$ 、dcGTX2 35.27 $\mu\text{g/mL}$ 、dcGTX3 10.36 $\mu\text{g/mL}$ 。

乙腈、正己烷(质谱级, 德国 Merck 公司); 甲酸、异丙醇(质谱级, 美国赛默飞世尔科技公司); 乙酸、氯仿、二氯甲烷(质谱级, 美国 Sigma 公司); 磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS), 上海源培生物科技股份有限公司。

BSA124S-CW 分析天平(感量 0.1 mg, 德国 Sartorius 公司); JXFSTPRP-24 组织破碎仪(上海净信实业发展有限公司); PS-60AL 超声破碎仪(深圳市雷德邦电子有限公司); BUCHI R-215 旋转蒸发器(瑞士 BUCHI 公司); Himac CR 22GII 高速离心机(日本 Hitachi 公司); Vanquish Flex UPLC 超高压液相系统配有 Q-Exactive 组合型四极杆高分辨质谱仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 岛津 XD20 液相色谱仪配有 SCIEX-5500 QTRAP 型四极杆质谱仪(美国 SCIEX 公司); ACQUITY UPLC CSH C₁₈ 色谱柱(100 mm \times 2.1 mm, 1.7 μm , 美国 Waters 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 PSTs 提取液制备

提取: 样品为 2020 年采集的 2000 g 阳性贻贝, 参照并改进吴海燕等^[28]的提取方法, 具体如下: 称取 15 g 试样于 50 mL 离心管中, 加入 15 mL 1% 乙酸水溶液, 涡旋混合 90 s。将离心管密封置于沸水中煮沸 5 min, 取出置于流水下冷却至室温, 4500 r/min 离心 10 min, 取上清液后加入 6 mL 1% 乙酸水溶液重复提取一次, 收集并混合所有上清液。60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴旋转蒸发至体积小于 150 mL, 以 8000 r/min 的转速离心 10 min 的 PSTs 上清液作为实验样品。

测定: 取 1 mL 上清液, 分别稀释 50 倍和 100 倍后经固相萃取柱净化, 设置 3 个平行, 取稀释后的提取液 1 mL 于 1.5 mL 离心管中, 加入 5 μL 氨水, 涡旋混匀, 13000 r/min 离心 10 min。依次用 3 mL 乙腈、3 mL 20% 乙腈水溶液(含 1% 乙酸)、3 mL 0.1% 氨水溶液活化 ENVI-CarbTM 固相萃取柱(250 mg/3 mL), 加入 500 μL 提取液, 再用 700 μL 超纯水淋洗, 正压挤干, 最后用 1 mL 75% 乙腈水溶液(含 0.25% 甲酸)洗脱混匀, 13000 r/min 离心 10 min, 上清液倒入进样瓶中, 测定 PSTs 含量。

1.2.2 动物分组

暂养 5 d 后, 将小鼠随机分为 4 组, 分别设置为对照组(KM 组, 生理盐水), 高剂量组(AM 组, 150 μg STXeq/kg BW/d)、中剂量组(BM 组, 100 μg STXeq/kg BW/d)、低剂

量组(CM 组, 45 μg STXeq/kg BW/d)。连续灌胃 28 d, 根据小鼠体重调整灌胃剂量, 具体如下: 1~7 d 灌胃 0.20 mL, 8~15 d 时灌胃 0.25 mL, 16~28 d 时灌胃 0.30 mL。

1.2.3 样品采集

灌胃 28 d 后, 设置 1 d 的恢复期。第 30 d 颈椎脱臼处死小鼠, 解剖并采集肝脏, 生理盐水冲洗去除表面血迹, 并用滤纸擦干后, 剪取一片小鼠肝脏组织于标记好的锡箔纸中, 置于液氮速冻, 随后存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

1.2.4 样脂质组学测定

(1) 脂质提取

样品中脂质的提取参考 GU 等^[29]的方法。称取 10.00 mg \pm 1.00 mg 组织样品, 溶解于 0.35 mL PBS 中。随后, 使用探针超声仪在冰水浴中将组织匀浆, 超声功率设定为 50%, 采用脉冲模式, 每个脉冲持续 12 s, 间隔 12 s, 共计循环 12 次。将匀浆的组织转移到玻璃试管中, 进行脂质提取。首先加入 1.50 mL 的甲醇:氯仿(2:1, V:V)混合溶剂, 旋涡 15 min, 加入 0.60 mL 氯仿和 0.60 mL 水, 再次旋涡 15 min, 12000 r/min 离心 10 min, 收集底层有机相。用 1 mL 氯仿重复提取过程两次, 每次均使用旋涡混合器振荡 15 min 后, 12000 r/min 离心 10 min, 收集底层有机相。将收集到的底层有机相合并, 氮吹至干燥。随后, 加入 1.80 mL 的正己烷:甲醇:水(1:1:0.1, V:V:V)混合溶剂进行进一步的脂质提取, 搅拌 5 min 后, 12000 r/min 离心 10 min, 收集底层有机相。最后, 将底层有机相氮吹至干燥, 加入 150 μL 的二氯甲烷-含内标甲醇(1:1, V:V)溶液进行复溶。另外, 所有样品取等量上清混合成质量控制(quality control, QC)样品上机检测。

(2) 超高效液相色谱-串联质谱法分析

色谱条件: 采用 ACQUITY UPLC CSH C₁₈ 色谱柱(100 mm \times 2.1 mm, 1.7 μm)。A 相: 乙腈/水(6:4, V:V)+10 mmol/L 甲酸铵+0.1% 甲酸, B 相: 异丙醇/乙腈(9:1, V:V)+10 mmol/L 甲酸铵+0.1% 甲酸。流动相梯度: 0~0.50 min, 30% B; 0.50~2.00 min, 30%~75% B; 2.00~5.20 min, 75%~100% B; 5.20~6.80 min, 100% B; 6.80~6.81 min, 100%~30% B; 6.81~10.00 min, 30% B。柱温 40 $^{\circ}\text{C}$, 流速为 0.35 mL/min。

质谱条件: 采用高分辨率串联质谱仪, 在 70000 分辨率下全扫描范围为 m/z 70~1050, 正离子和负离子模式下喷雾电压分别为 3.50 kV、3.00 kV。毛细管温度 300 $^{\circ}\text{C}$, 辅助加热器温度 350 $^{\circ}\text{C}$ 。在全扫描质谱和数据依赖型二级质谱两种模式下完成数据采集, 以 QC 样本进行二级质谱扫描用于脂质定性。

1.3 数据处理

采用 XCMS 3.2.0 软件对采集到的质谱数据进行峰拾取、峰分组、保留时间校正、二次峰分组等预处理。采用特征峰搜库鉴定, 对特征峰的保留时间进行校正,

以提高峰匹配的准确性, 并将一级和二级质谱信息与代谢数据库进行匹配, 质量误差控制在 10 ppm 以内, 并通过二级质谱匹配得分来确定代谢物。根据 LIPID MAPS 数据库对脂质进行命名及分类, 按照 80% 的规则剔除缺失值, 对于剩余的缺失数据, 采用原始矩阵中的最小值进行填补。为了减少样品制备及仪器不稳定性的影响, 采用峰面积归一化法进行相对定量分析, 并进行标准化处理。此外, 删除了在质控样本中相对标准偏差超过 30% 的变量。

归一化后, 进行多元统计分析, 对所有样本进行偏最小二乘判别分析 (partial least squares discrimination analysis, PLS-DA), 同时用正交偏最小二乘判别分析 (orthogonal partial least squares discrimination analysis, OPLS-DA) 验证, 并采用置换检验防止模型过度拟合。基于倍数变化 (fold change, FC)、第一主成分的变量投影重要度 (variable important in projection, VIP) 和 Student's *t* 检验 *P* 值确定差异脂质代谢物, $FC \geq 1.2$ 或 $FC \leq 1/1.2$, $VIP > 1$, $P < 0.05$ 为标准筛选差异脂质代谢物。通过基因组百科全书 (kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 数据库进行差异代谢通路分析, 并通过 Fisher 精确检验获得与实验处理最相关的生物学代谢途径。脂质组学数据使用联川生物在线云平台分析。所有实验设置平行 6 次。使用 SPSS 26.0 软件进行单因素方差分析显著性分析, 以 $P < 0.05$ 为差异显著水平, 实验结果以平均值 \pm 标准偏差表示。

2 结果与分析

2.1 PSTs 提取液测定结果

PSTs 提取液中的麻痹性贝毒各组分含量如图 1 所示, 主要包括 GTX1~4、GTX2~3、C1~2、NEO、STX、GTX5 和 GTX6 共 10 种组分。按照毒性因子, 统一转换为 STXeq 表示。所有毒素组分转化为 STXeq 后, 总毒性为 $(58.40 \pm 7.47) \mu\text{g STXeq/mL}$ 。用生理盐水稀释至实验所需浓度进行暴露实验。

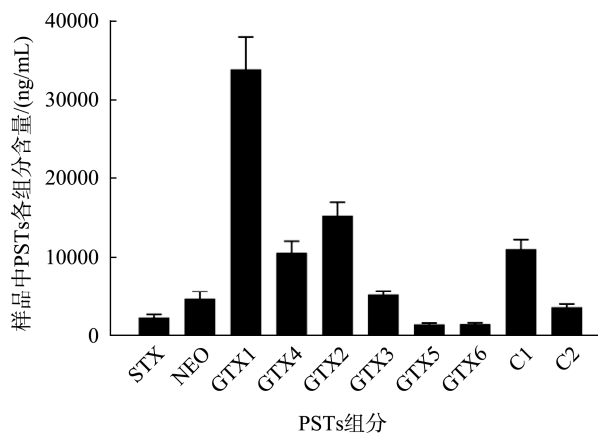


图1 PSTs提取液中毒素组成及含量

Fig.1 Composition and content of toxins in PSTs extracts

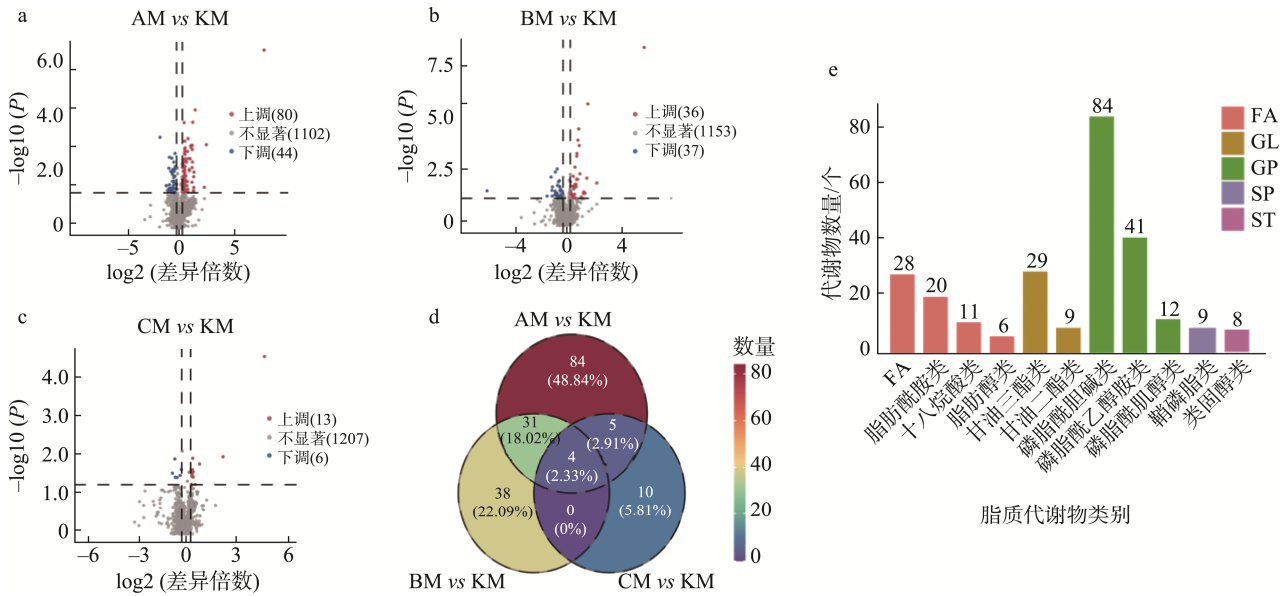
2.2 PSTs 暴露小鼠肝脏脂质变化

小鼠肝脏中共监测到了 20360 种代谢物, 从中筛选出同时满足以下条件的代谢物: $FC \geq 1.2$ 或 $FC \leq 1/1.2$ 、 $P < 0.05$ 、 $VIP \geq 1$ 。AM、BM 和 CM 组分别筛选到 1442 种、891 种和 464 种代谢物。如图 2a~2c 所示, 在 AM、BM 和 CM 组, 分别检测到 124 种 (80 种上调, 44 种下调)、73 种 (36 种上调, 37 种下调) 和 19 种 (13 种上调, 6 种下调) 差异脂质 ($P < 0.05$)。通过比较 AM、BM 和 CM 组与 KM 组的筛选结果, 在 AM、BM 和 CM 组有 4 种共同差异脂质代谢物, 见图 2d。这些代谢物的 LipidMaps 注释分类结果显示, 共注释到 308 种脂质分子种类, 分为 7 大类和 29 个亚类。鉴定到的脂质及其化合物数量比例分别为脂肪酸类 (fatty acids, FA, 占 25.32%)、甘油酯类 (glycerolipids, GL, 占 13.31%)、甘油磷脂类 (glycerophospholipids, GP, 占 46.75%)、多聚乙炔类 (polyketides, PK, 占 1.62%)、孕烯醇酮脂类 (prenol lipids, PR, 占 2.62%); 鞘脂类 (sphingolipids, SP, 占 3.90%)、固醇脂类 (sterol lipids, ST, 占 6.49%)。如图 2e 所示 (图中只标注了代谢物数量大于 5 的脂质分类)。GP 是小鼠肝脏脂质的主要组分, 其次为 FA 和 GL。

为了更好地判断组间差异, 进行了 PLS-DA 和 OPLS-DA 分析, 并通过置换检验对模型进行了验证, 检验次数为 200 次。在 PLS-DA 和 OPLS-DA 得分图中, R^2 和 Q^2 的所有排列值均小于原始值, Q^2 在纵坐标的截距小于 0, 说明模型稳定可靠, 没有出现过拟合现象。在 PLS-DA 图中 (图 3a), PC1 与 PC2 的贡献率分别为 17.45% 和 11.59%, KM 组和 CM 组在 X 轴上重叠较大, 而 AM 组、BM 组和 KM 组在 X 轴上显著分离 ($P < 0.05$), PLS-DA 分析显示样本沿主成分 1 呈剂量依赖性分离。在 OPLS-DA 图中 (图 3b), 3 个 PSTs 组均与 KM 组显著分离 ($P < 0.05$), 与 PLS-DA 结果基本一致。这些结果共同表明 PSTs 暴露导致显著的脂质代谢紊乱。

2.3 PSTs 暴露小鼠肝组织差异脂质

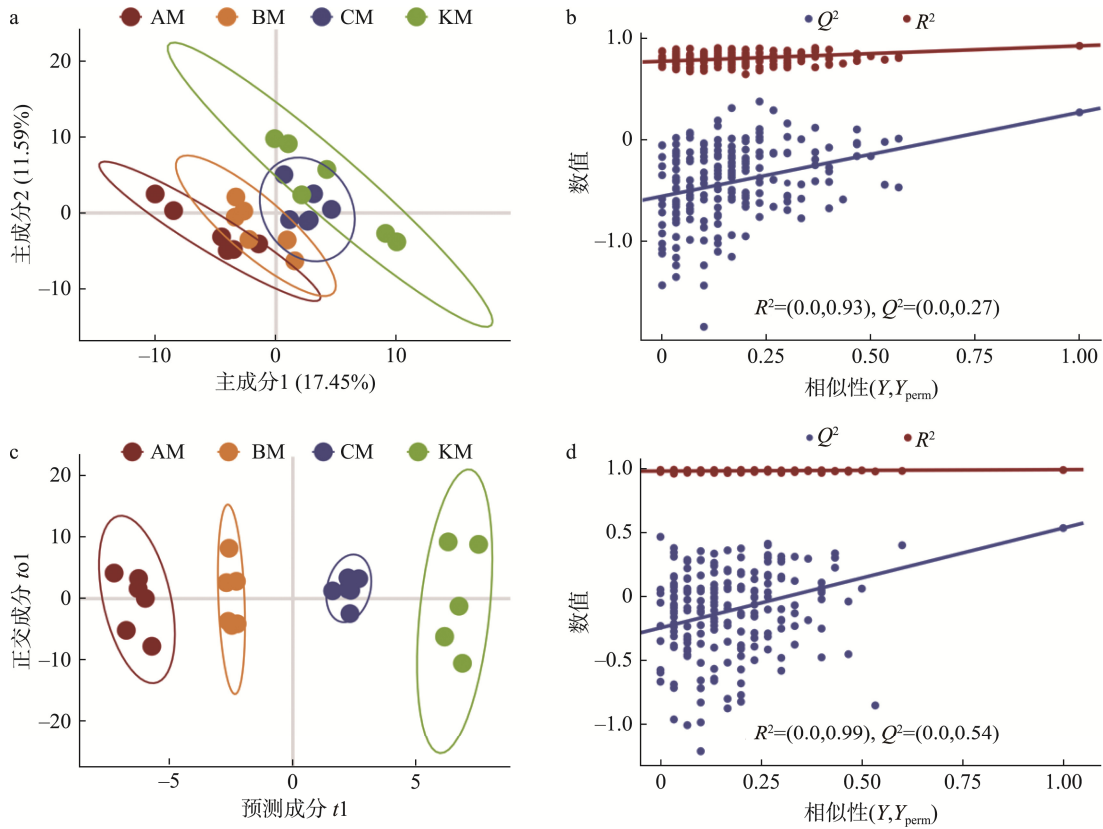
为了进一步探讨 PSTs 组和对照组之间脂质的差异, 根据条件筛选差异脂质, AM 组筛选到 15 种差异脂质, BM 组筛选到 14 种, 而 CM 组筛选到 4 种。相比于 KM 组, AM 组中 10 种脂质下调, 包括 7 种 GP: 磷脂酰胆碱 (15:0/16:0) [phosphatidylcholine (15:0/16:0), PC (15:0/16:0)], PC (15:0/16:0), PC (18:2/22:6), PC (22:5/22:6)、磷脂酰乙醇胺 (16:0/18:0) [phosphatidylethanolamine (16:0/18:0), PE (16:0/18:0)], PE (18:0/18:0), PE (18:0/22:6), PE (18:3/22:6); 2 种 FA 和 1 种 GL。5 种脂质上调, 包括 2 种 GP: PC 37:2 和溶血磷脂酰乙醇胺 (P-16:0/0:0) [lysophosphatidylethanolamine (P-16:0/0:0), LysoPE (P-16:0/0:0)]; 2 种 FA: N-棕榈酰乙醇胺 16:0 (N-palmitoylethanolamine 16:0, NAE 16:0) 和 NAE 18:0 和 1 种 PR, 如图 4a 所示。



注: a. AM 组与 KM 组火山图; b. BM 组与 KM 组火山图; c. CM 组与 KM 组火山图; d. 韦恩图; e. 差异脂质化合物二级分类(数量>5)。

图 2 各组差异脂质代谢物分析

Fig.2 Analysis of differential lipid metabolites in each group



注: a. PLS-DA 得分图; b. PLS-DA 置换检验图; c. OPLS-DA 得分图; d. OPLS-DA 置换检验图。

图 3 不同剂量 PSTs 暴露对小鼠肝脏脂质代谢物影响差异

Fig.3 Effects of different doses of PSTs exposure on lipid metabolites in mice liver

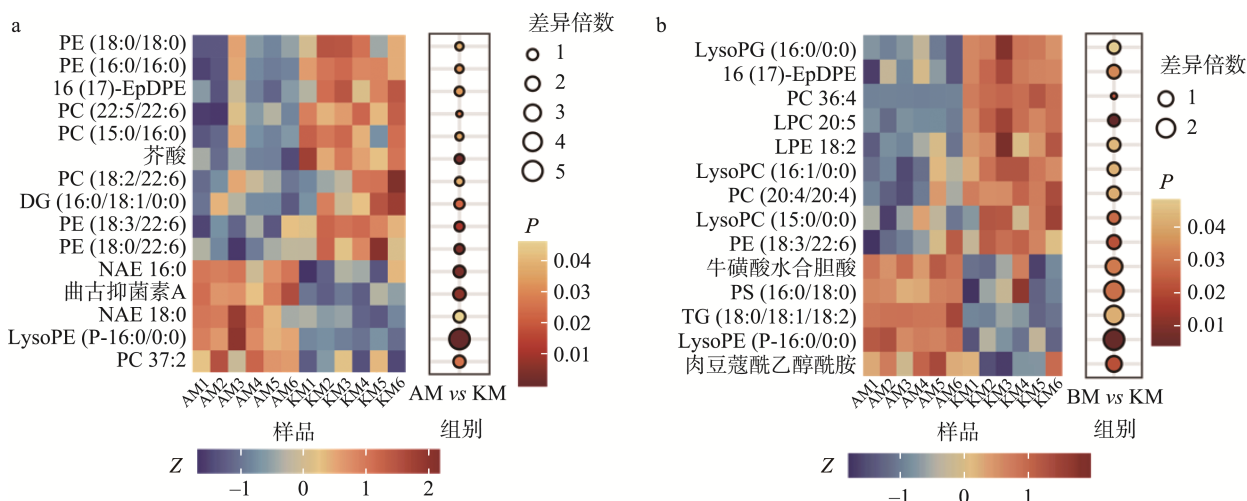
BM 组 9 种脂质下调, 包括 8 种 GP: PC 36:4、PC (20:4/20:4)、PE (18:3/22:6)、溶血磷脂酰胆碱 20:5 (lysophosphatidylcholine 20:5, LPC 20:5)、溶血磷脂酰乙醇胺 18:2 (lysophosphatidylethanolamine 18:2, LPE 18:2)、溶血磷脂酰胆碱(16:1/0:0) [lysophosphatidylcholine (16:1/0:0), LysoPC (16:1/0:0)]、LysoPC (15:0/0:0)、溶血磷脂酰甘油(16:0/0:0) [lysophosphatidylglycerol (16:0/0:0), LysoPG (16:0/0:0)]和 1 种 FA。5 种脂质上调, 包括 2 种 GP: 磷脂酰丝氨酸(16:0/18:0) [phosphatidylserine (16:0/18:0), PS (16:0/18:0)] 和 LysoPE (P-16:0/0:0); 1 种 FA、1 种 GL 和 1 种 ST。如图 4b 所示。

CM 组仅有 4 种差异脂质, 相对于 AM 组和 BM 组, 未对小鼠肝脏脂质造成显著性影响。在 AM 组和 BM 组 GP 类为主要差异脂质且主要呈下调趋势。由此可见, PSTs 对小鼠肝脏脂质的影响具有显著的剂量效应。

2.4 差异脂质代谢物富集分析

对鉴定到的所有脂质代谢物进行 KEGG 数据库富集, 随后对经过差异值去除之后的所有脂质代谢物进行 KEGG 通路统计。其中三组共同富集到 α -亚麻酸代谢、甘油酯代谢、花生四烯酸代谢和类固醇激素的生物合成通路 ($P < 0.05$) (图 5a)。仅 AM 组富集到不饱和脂肪酸的生物合成途径 ($P < 0.05$), AM 组与 CM 组共同富集到亚油酸代谢通路。结合上述结果, 小鼠肝脏受 PSTs 影响的途径与脂质分解代谢和合成密切相关, 并对其产生影响。

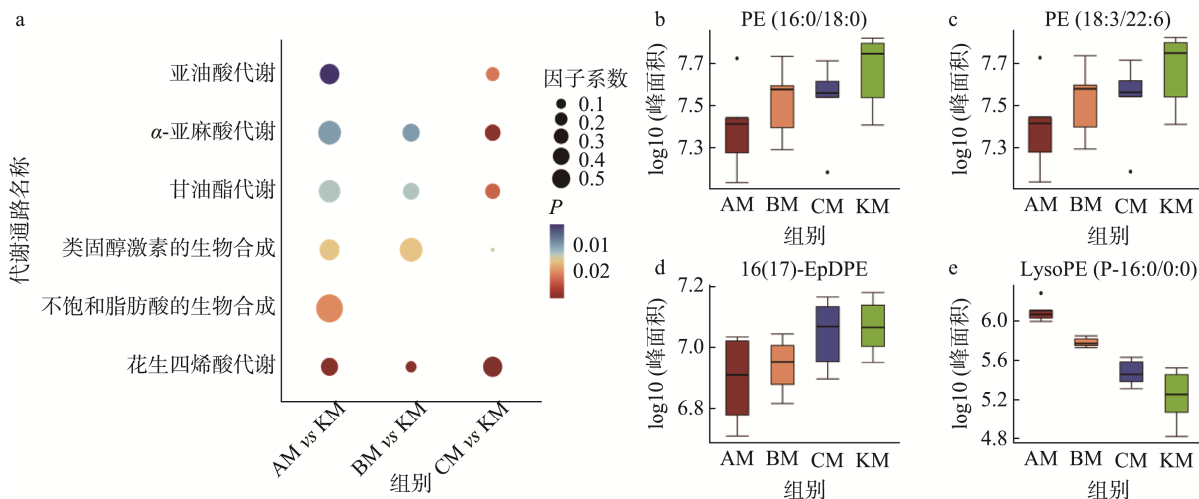
通过对代谢通路中关键脂质分子进行归一化处理。PE (18:3/22:6)、PE (16:0/18:0) 和 16(17)-环氧二十二碳五烯酸 [16(17)-epoxydocosapentaenoic acid, 16(17)-EpDPE] 的相对含量在 PSTs 的影响下降低, 而 LysoPE (P-16:0/0:0) 的含量则相反, 且均存在剂量依赖性, 如图 5b~c 所示。



注: a. AM 与 KM 组; b. BM 与 KM 组。

图 4 不同剂量 PSTs 暴露对小鼠肝脏关键差异脂质热图

Fig.4 Heatmaps of key differential lipids in mice livers exposed to different doses of PSTs



注: a. KEGG 富集气泡图; b~e. 脂质代谢物相对含量箱线图。

图 5 关键差异脂质代谢物 KEGG 富集分析及相对含量箱线图

Fig.5 Enrichment analysis of key differential lipid metabolites KEGG and box plot of relative content

3 讨论

研究表明人体主要通过尿液排泄摄入体内的 PSTs 毒素^[30]。采用大鼠模型暴露低剂量的 PSTs 后, 毒素的主要分布器官为肝脏和肾脏^[31]。刘洁生等^[32]通过连续 5 周的大鼠灌胃实验探究 PSTs 可能具有的蓄积性和远期毒性, 结果表明高剂量组(18.4 μg STX/kg)对大鼠肝、肾、心等器官功能等均存在不同程度的损害, 显示出一定的功能毒性。然而, 关于 PSTs 对肝脏脂质影响的研究仍然不足, 这限制了对 PSTs 神经毒性作用及其潜在机制影响研究。与之类似, 腹泻性贝毒给药后 24 h 在肝脏中检测到相对较低浓度的毒素, 未见明显组织异常病变^[33]。长期暴露于低剂量的腹泻性贝毒可以改变大鼠的结肠微生物群落结构, 而不会造成肝脏损伤^[34]。本研究发现, PSTs 可引起小鼠肝脏脂质代谢的紊乱(AM 和 BM 组), 低剂量组(CM 组)的差异脂质数量最少且通过 PLS-DA 分析显示与对照组无显著差异, 因此, PSTs 对小鼠肝脏脂质具有显著的剂量效应关系, 且一定剂量的 PSTs 对小鼠肝脏具有显著的毒性影响。

PLS-DA 和 OPLS-DA 分析揭示了 PSTs 暴露能够显著改变小鼠肝脏的总体脂质组成, 其中最显著的变化发生在 GP 类别中。全氟辛烷磺酸(perfluorooctane sulfonate, PFOS)暴露的研究结果与之类似, PFOS 是一种与肝损伤相关的有机污染物, 它同样主要影响 GP 代谢^[35]。GP 作为细胞膜的基本组成部分, 对维持正常的细胞信号传导和调控细胞凋亡至关重要^[36], 参与调节多种通过 G 蛋白偶联受体(G protein-coupled receptor, GPCR)或离子通道介导的细胞信号传递途径^[37-38]。此外, 有证据显示 GP 水平的变化与氧化应激指标之间存在显著的相关性^[39]。在本研究中, GP 水平的显著下调可能会引发细胞结构损伤, 并干扰细胞间的信号识别过程, 从而影响肝脏的整体功能。

磷脂酰胆碱(phosphatidylcholine, PC)和磷脂酰乙醇胺(phosphatidylethanolamine, PE)是细胞质膜中含量最丰富的两种主要甘油磷脂, 是肝脏组织应激调控的主要脂质代谢物。如酒精引起的急性肝损伤模型中观察到 PC 和 PE 的水平在肝脏中同样显著下降^[40]。在 PFOS 所导致的肝损伤中 PC 的水平被上调而 PE 则被下调^[41]。本研究中暴露于 PSTs 后 PC 和 PE 的水平均显著下调。研究表明, PC 可以抑制脂肪酸的累积, 广泛用于治疗由心肌缺血、脑血管疾病、痴呆症和脂肪肝引起的肝功能障碍^[42]。PC 还可以显著减轻 CCl_4 对小鼠的肝毒性作用^[42]。然而, 肝脏 PC 含量的减少可抑制低密度脂蛋白的分泌, 进而导致甘油三酯在肝脏中积造成肝脏损伤^[43]。由此可见, 在 PSTs 暴露情况下 PC 含量的减少, 可能是机体的一种应对策略以抵抗 PSTs 引起的肝毒性。此外, PC 主要在肝脏中通过 PE 的 N-甲基化合成^[44]。PE 是哺乳动物细胞中含量第二丰富的磷脂, 可协助某些膜蛋白的折叠, 进而启动自噬反应^[45]。自

噬在降解肝细胞内过量的脂质堆积方面发挥着关键作用, 从而维持肝脏脂质代谢的平衡状态^[46]。在 PSTs 暴露情况下, PE 含量的减少会影响细胞自噬的功能, 进而导致细胞功能异常和形态损伤。

花生四烯酸代谢途径在小鼠肝脏对 PSTs 暴露的应激反应发挥了重要作用。已有研究表明, 花生四烯酸相关通路在贻贝中应对 PSTs 诱导的机体炎症反应过程中发挥着重要的调控作用^[47], 而对于小鼠而言, 其具体的解毒机制仍有待进一步探究。研究发现, 高氯酸盐暴露造成小鼠肝脏损伤和脂代谢紊乱, 其中花生四烯酸和二十二碳六烯酸水平显著下降^[48]。16(17)-EpDPE 作为二十二碳六烯酸的代谢产物, 其相对含量的降低可能反映了二十二碳六烯酸在小鼠体内的减少。此外, 溶血磷脂酰乙醇胺(lysophosphatidylethanolamine, LPE)的代表物质 LysoPE (P-16:0/0:0)相对含量的升高也值得关注。LPE 通过激活 GPCR 诱导细胞内钙动员、趋化迁移和细胞侵袭^[49], 而 GPCR 的功能紊乱与多种疾病的发生发展密切相关。这些发现不仅揭示了脂质代谢在 PSTs 诱导的肝脏损伤中的作用机制, 也为未来的研究和潜在干预策略提供了新的思路。

4 结论

本研究采用非靶向脂质组学技术全面鉴定了不同剂量亚慢性 PSTs 暴露下小鼠肝脏中的脂质分子。研究表明, PSTs 显著改变了肝脏中的脂质整体组成, 对 GP 的影响尤为显著。通过对差异脂质的代谢途径进行富集分析, 发现 α -亚麻酸代谢、甘油酯代谢、花生四烯酸代谢以及类固醇激素的生物合成参与了 PSTs 灌胃组的脂质代谢调节。本研究旨在揭示不同剂量亚慢性 PSTs 暴露下小鼠肝脏脂质组成的变化, 为后续更深入地阐明 PSTs 对肝脏损伤的潜在机制提供了理论依据。

参考文献

- [1] WANG D. Neurotoxins from marine dinoflagellates: A brief review [J]. *Marine Drugs*, 2008, 6(2): 349-371.
- [2] WIESE M, D'AGOSTINO PM, MIHALI TK, et al. Neurotoxic alkaloids: Saxitoxin and its analogs [J]. *Marine Drugs*, 2010, 8(7): 2185-2211.
- [3] 杨翠琪, 赵力超, 李献, 等. 构建用于相关基因筛选的微小亚历山大藻产毒株基因组文库[J]. *食品工业科技*, 2017, 38(6): 179-184.
YANG CQ, ZHAN LC, LI X, et al. Construction of a genomic library of toxic strains of *Microcystis aeruginosa* for screening related genes [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2017, 38(6): 179-184.
- [4] 包振民, 孔令玲, 史蛟霞, 等. 双壳类累积转化麻痹性贝毒的研究进展[J]. *中国海洋大学学报*, 2021, 51(10): 1-11.
BAO ZM, KONG LL, SHI JX, et al. Research progress on the accumulation and transformation of paralytic shellfish toxins in bivalve molluscs [J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2021, 51(10): 1-11.
- [5] HALLEGRAEFF GM, ANDERSON DM, BELIN C, et al. Perceived

- global increase in algal blooms is attributable to intensified monitoring and emerging bloom impacts [J]. *Communications Earth & Environment*, 2021, 2(1): 117.
- [6] SELWOOD AI, WAUGH C, HARWOOD DT, *et al.* Acute toxicities of the saxitoxin congeners gonyautoxin 5, gonyautoxin 6, decarbamoyl gonyautoxin 2 3, decarbamoyl neosaxitoxin, c-1 2 and c-3 4 to mice by various routes of administration [J]. *Toxins*, 2017, 9(2): 73–73.
- [7] CHEN J, NOORLANDER A, WESSELING S, *et al.* Integrating in vitro data and physiologically based kinetic modeling to predict and compare acute neurotoxic doses of saxitoxin in rats, mice, and humans [J]. *Environmental Science & Technology*, 2023, 57(30): 10974–10984.
- [8] FINCH SC, WEBB NG, BOUNDY MJ, *et al.* A sub-acute dosing study of saxitoxin and tetrodotoxin mixtures in mice suggests that the current paralytic shellfish toxin regulatory limit is fit for purpose [J]. *Toxins*, 2023, 15(7): 437.
- [9] NAVARRO JM, CONTRERAS AM. An integrative response by *Mytilus chilensis* to the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* [J]. *Marine Biology*, 2010, 157(9): 1967–1974.
- [10] MAT AM, KLOPP C, PAYTON L, *et al.* Oyster transcriptome response to alexandrium exposure is related to saxitoxin load and characterized by disrupted digestion, energy balance, and calcium and sodium signaling [J]. *Aquatic Toxicology*, 2018, 199(6): 127–137.
- [11] SCHANTZ EJ. Biochemical studies on paralytic shellfish poisons [J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1960, 90(3): 843–855.
- [12] ETHERIDGE SM. Paralytic shellfish poisoning: Seafood safety and human health perspectives [J]. *Toxicon*, 2010, 56(2): 108–122.
- [13] DIEHL F, RAMOS PB, DOS-SANTOS JM, *et al.* Behavioral alterations induced by repeated saxitoxin exposure in drinking water [J]. *Journal of Venomous Animals & Toxins Including Tropical Diseases*, 2016, 22(1): 18–18.
- [14] SUN Q, CHEN X, LIU W, *et al.* Effects of long-term low dose saxitoxin exposure on nerve damage in mice [J]. *Aging*, 2021, 13(13): 17211–17226.
- [15] FINCH SC, WEBB NG, BOUNDY MJ, *et al.* Sub-acute feeding study of saxitoxin to mice confirms the effectiveness of current regulatory limits for paralytic shellfish toxins [J]. *Toxins*, 2021, 13(9): 627–627.
- [16] ÖSTLUND C, HERNANDEZ-ONO A, SHIN J. The nuclear envelope in lipid metabolism and pathogenesis of nafld [J]. *Biology*, 2020, 9(10): 338–338.
- [17] 王昕璐, 王蒙, 翟文磊. 脂质组学在毒理学研究中的应用[J]. *生物技术通报*, 2023, 39(3): 69–80.
- WANG XL, WANG M, ZHAI WL. Application of lipidomics in toxicology research [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2023, 39(3): 69–80.
- [18] LAUWERS E, GOODCHILD R, VERSTREKEN P. Membrane lipids in presynaptic function and disease [J]. *Neuron*, 2016, 90(1): 11–25.
- [19] ZHOU C, CAI M, WANG Y, *et al.* The effects of repetitive transcranial magnetic stimulation on cognitive impairment and the brain lipidome in a cuprizone-induced mouse model of demyelination [J]. *Frontiers in Neuroscience*, 2021, 15(6): 706786.
- [20] SMITH CC, SHEEDY DL, MCEWEN HP, *et al.* Lipidome changes in alcohol-related brain damage [J]. *Journal of Neurochemistry*, 2022, 160(2): 271–282.
- [21] 王杰, 俞喜娜, 张燕平, 等. 脂质组学技术及其在水产中的应用研究进展[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(4): 7.
- WANG J, YU XN, ZHANG YP, *et al.* Progress in lipidomics technology and its application in aquatics [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2020, 41(4): 7.
- [22] JI J, KLINE AE, AMOSCATO A, *et al.* Lipidomics identifies cardiolipin oxidation as a mitochondrial target for redox therapy of brain injury [J]. *Nature Neuroscience*, 2012, 15(10): 1407–1413.
- [23] YANG K, HAN X. Lipidomics: Techniques, applications, and outcomes related to biomedical sciences [J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2016, 41(11): 954–969.
- [24] URSULA L, LAURENT P, BART V, *et al.* Lipidomics reveals diurnal lipid oscillations in human skeletal muscle persisting in cellular myotubes cultured *in vitro* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(41): 8565–8574.
- [25] 陈倩倩, 由蕾, 管朋维, 等. 基于暴露组-脂质组关联研究的代谢相关脂肪性肝病血清中外源性化学物质的风险分析[J]. *色谱*, 2024, 42(2): 164–175.
- CHEN QQ, YOU L, GUAN PW, *et al.* Risk analysis of exogenous chemicals in the serum of metabolic-associated fatty liver disease based on exposome-lipidome association studies [J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2024, 42(2): 164–175.
- [26] HE J, CHEN Y, DAI S, *et al.* First insights into region-specific lipidome alterations of prefrontal cortex and hippocampus of mice exposed chronically to microcystins [J]. *Environment International*, 2023, 177: 108018.
- [27] MUNDAY R, THOMAS K, GIBBS R, *et al.* Acute toxicities of saxitoxin, neosaxitoxin, decarbamoyl saxitoxin and gonyautoxins 1&4 and 2&3 to mice by various routes of administration [J]. *Toxicon*, 2013, 76(12): 77–83.
- [28] 吴海燕, 郭萌萌, 邵晓菲, 等. 液相色谱-四极杆/线性离子阱复合质谱测定双壳类中麻痹性贝类毒素[J]. *海洋与湖沼*, 2017, 48(3): 508–515.
- WU HY, GUO MM, BING XF, *et al.* Determination of paralytic shellfish toxins in bivalve molluscs by liquid chromatography-quadrupole/linear ion trap hybrid mass spectrometry [J]. *Oceanologia Et Limnologia Sinica*, 2017, 48(3): 508–515.
- [29] GU T, LIU P, WANG Y, *et al.* Diazobutanone-assisted isobaric labelling of phospholipids and sulfated glycolipids enables multiplexed quantitative lipidomics using tandem mass spectrometry [J]. *Nature Chemistry*, 2024, 16(5): 762–770.
- [30] GESSNER BD, BELL P, DOUCETTE GJ, *et al.* Hypertension and identification of toxin in human urine and serum following a cluster of mussel-associated paralytic shellfish poisoning outbreaks [J]. *Toxicon*, 1997, 35(5): 711–722.
- [31] 刘洁生, 杨莉, 杨维东, 等. 麻痹性贝类毒素在大鼠体内的分布与累

- 积[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2007, 21(6): 516–520.
- LIU JS, YANG L, YANG WD, *et al.* Distribution and accumulation of paralytic shellfish toxins in rats [J]. Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology, 2007, 21(6): 516–520.
- [32] 刘洁生, 刘玉荣, 聂利华, 等. 大鼠低剂量长期摄入麻痹性贝毒的毒性研究[J]. 中国病理生理杂志, 2005, 21(7): 1368–1373.
- LIU JS, LIU YR, NIE LH, *et al.* Toxicity study of low-dose long-term intake of paralytic shellfish toxins in rats [J]. Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology, 2005, 21(7): 1368–1373.
- [33] LOUZAO MC, ABAL P, COSTAS C, *et al.* Dsp toxin distribution across organs in mice after acute oral administration [J]. Marine Drugs, 2021, 19(1): 23–23.
- [34] LIU Y, ZHENG J, PENG X, *et al.* Changes in colonic microbiotas in rat after long-term exposure to low dose of okadaic acid [J]. Chemosphere, 2020, 254(prepublish): 126874.
- [35] STOFFELS CBA, ANGERER TB, ROBERT H, *et al.* Lipidomic profiling of pfoa-exposed mouse liver by multi-modal mass spectrometry analysis [J]. Analytical Chemistry, 2023, 95(16): 6568–6576.
- [36] SOFRONIEVA M, KARTSOLI A, TSAGARATSI M, *et al.* Lipidomics in non-alcoholic fatty liver disease [J]. World Journal of Hepatology, 2020, 12(8): 15.
- [37] DONG SI. Intercellular lipid mediators and gPCR drug discovery [J]. Biomolecules & Therapeutics, 2013, 21(6): 411–422.
- [38] TUFAN KM, JOHANNES M, DIRK T. Photopharmacological control of cell signaling with photoswitchable lipids [J]. Current Opinion in Pharmacology, 2022, 63: 102202–102202.
- [39] GAO Y, LIU Y, MA F, *et al.* Lactobacillus plantarum y44 alleviates oxidative stress by regulating gut microbiota and colonic barrier function in balb/c mice with subcutaneous *D*-galactose injection [J]. Food & Function, 2021, 12(1): 373–386.
- [40] KOELMEL JP, TAN WY, LI Y, *et al.* Lipidomics and redox lipidomics indicate early stage alcohol-induced liver damage [J]. Hepatology Communications, 2022, 6(3): 513–525.
- [41] LI X, LI T, WANG Z, *et al.* Distribution of perfluorooctane sulfonate in mice and its effect on liver lipidomic [J]. Talanta, 2021, 226: 122150–122150.
- [42] NA JY, SONG K, KIM S, *et al.* Hepatoprotective effect of phosphatidylcholine against carbon tetrachloride liver damage in mice [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2015, 460(2): 308–313.
- [43] VEEN DVNJ, KENNELLY PJ, WAN S, *et al.* The critical role of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine metabolism in health and disease [J]. Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 2017, 1859(9 Pt B): 1558–1572.
- [44] DU Z, ZHAO X, SUN L, *et al.* Untargeted lipidomics-based study reveals the treatment mechanism of qingxue bawei tablets on atherosclerotic in apoe(-/-) mice [J]. Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2023, 1229(1): 123889.
- [45] PATEL D, WITT SN. Ethanolamine and phosphatidylethanolamine: Partners in health and disease [J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2017, 2017(7): 1–18.
- [46] 黄莹, 张芳, 丁文军. 肝脏脂质代谢与自噬[J]. 中国科学院大学学报, 2016, 33(4): 570–575.
- HUANG Y, ZHANG F, DING WJ. Lipid metabolism and autophagy in the liver [J]. Journal of University of Chinese Academy of Sciences, 2016, 33(4): 570–575.
- [47] 张倩茹, 谭志军, 郑关超, 等. 花生四烯酸调控网络在贻贝麻痹性贝毒代谢中的作用[J]. 海洋学报, 2023, 45(11): 142–152.
- ZHANG QR, TAN ZJ, ZHENG GC, *et al.* Role of the arachidonic acid regulatory network in the metabolism of paralytic shellfish toxins in mussels [J]. Haiyang Xuebao, 2023, 45(11): 142–152.
- [48] 彭秋红, 宋婉莹, 胡培豪, 等. 高氯酸盐对高脂膳食小鼠脂质代谢的影响[J]. 食品安全质量检测学报, 2023, 14(6): 167–172.
- PENG QH, SONG WY, HU PH, *et al.* Effects of perchlorate on lipid metabolism in mice fed a high-fat diet [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2023, 14(6): 167–172.
- [49] PARK S, LEE K, KANG S, *et al.* Lysophosphatidylethanolamine utilizes lpa1 and cd97 in mda-mb-231 breast cancer cells [J]. Cellular Signalling, 2013, 25(11): 2147–2154.

(责任编辑: 韩晓红 于梦娇)