

基于UHPLC-Q-Orbitrap-HRMS的ADB-BUTINACA干预大鼠血清代谢组学研究

陈昊¹, 徐昊哲¹, 吴昊², 柯星¹, 赵森¹, 范一雷^{1*}, 周婧^{1*}

(1. 浙江警察学院, 浙江省毒品防控技术研究重点实验室, 浙江 杭州 310052; 2. 浙江迪安司法鉴定中心, 浙江 杭州 310007)

摘要: 合成大麻素 *N*-(1-氨甲酰基-2,2-二甲基丙基)-1-丁基吡唑-3-甲酰胺 (ADB-BUTINACA) 作为一种新精神活性物质, 具有强烈的兴奋和致幻作用, 可引发精神、心血管、肾脏和胃肠道疾病, 严重情况下可导致死亡。然而, 目前对于 ADB-BUTINACA 的代谢途径、对机体的长期影响及其背后的分子机制等毒理学研究报道较少。本研究使用超高效液相色谱法结合高分辨率四级轨道阱质谱技术 (UHPLC-Q-Orbitrap-HRMS) 揭示了低、中、高三种不同剂量 ADB-BUTINACA (0.1、1 和 5 mg·kg⁻¹) 干预后大鼠血清的代谢轮廓。研究确定了 *L*-谷氨酸和 3-羟基丁酸等 50 种潜在标志性差异代谢物, 丙氨酸、天门冬氨酸和谷氨酸代谢途径、视黄醇代谢途径和 TCA 循环等 9 种代谢途径受到扰乱。研究结果为进一步探讨 ADB-BUTINACA 引发机体脂质代谢紊乱和能量代谢紊乱的毒性作用机制提供实验和理论基础, 为 ADB-BUTINACA 毒性的诊断和预防及公共健康提供支持。本研究遵循《赫尔辛基宣言》和美国国立卫生研究院《实验动物护理和使用指南》, 并经过浙江中医药大学动物实验中心批准 (伦理号: 20220718-11)。

关键词: 合成大麻素; *N*-(1-氨甲酰基-2,2-二甲基丙基)-1-丁基吡唑-3-甲酰胺; 血清; 非靶向代谢组学; UHPLC-Q-Orbitrap-HRMS

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870(2025)04-1074-10

Serum metabolomics study of ADB-BUTINACA intervention in rats based on UHPLC-Q-Orbitrap-HRMS

CHEN Hao¹, XU Hao-zhe¹, WU Hao², KE Xing¹, ZHAO Sen¹, FAN Yi-lei^{1*}, ZHOU Jing^{1*}

(1. Key Laboratory of Drug Prevention and Control Technology of Zhejiang Province, Zhejiang Police College, Hangzhou 310052, China; 2. Dian Regional Forensic Science Institute-Zhejiang, Hangzhou 310007, China)

Abstract: Synthetic cannabinoid *N*-(1-carbamoyl-2,2-dimethylpropyl)-1-butylazole-3-formamide (ADB-BUTINACA), as a new psychoactive substance, shows strong stimulant and hallucinogenic effects. It can cause cardiovascular, renal and gastrointestinal diseases, and in severe cases, it can lead to death. However, there are few reports on toxicology studies of the ADB-BUTINACA metabolic pathway and its long-term effects on the organism and the molecular mechanisms behind it. In this study, the metabolic profile of rat serum after low, medium and high doses of ADB-BUTINACA (0.1, 1, and 5 mg·kg⁻¹) intervention were analyzed using UHPLC coupled with a Q-Orbitrap-MS (UHPLC-Q-Orbitrap-HRMS). The results showed that the intervention of ADB-BUTINACA could cause significant changes of 50 metabolites such as *L*-glutamate and 3-hydroxybutyrate, and nine metabolic pathways including alanine, aspartate and glutamate metabolism, retinol metabolism, and TCA cycle were

收稿日期: 2024-07-15; 修回日期: 2024-12-23.

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2023YFC3303903-3); 浙江省自然科学基金资助项目 (LTGC24B050007, LTGC23B050003); 国家级大学生创新创业训练计划项目 (202411483021).

*通讯作者 Tel: 86-571-87787031, E-mail: fanyilei@zjcx.cn; zhoujing@zjcx.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0669

disturbed. These findings provide a novel experimental and theoretical framework for further investigation of the toxicological mechanisms underlying ADB-BUTINACA-induced dysregulation of lipid and energy metabolism. Furthermore, they offer valuable insights that could facilitate the diagnosis and prevention of ADB-BUTINACA toxicity, thereby underscoring their significant implications for public health. The study was conducted in adherence to both the Declaration of Helsinki and the National Institutes of Health's Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals, and received approval from the animal experimental center at the Zhejiang Chinese Medical University (Ethical number: 20220718-11).

Key words: synthetic cannabinoid; *N*-(1-carbamoyl-2,2-dimethylpropyl)-1-butylazole-3-formamide; serum; non-targeted metabolomics; UHPLC-Q-Orbitrap-HRMS

新精神活性物质的滥用问题在世界范围受到广泛关注 and 重视,且数量持续大幅度增加^[1-7]。其中,目前已经报道的合成大麻素种类近350种,占已知新精神活性物质的30.99%^[8],已成为新精神活性物质中规模最大、增长最迅速、滥用最多的一类。合成大麻素对人体的作用机制与天然大麻素四氢大麻酚(δ -9-tetrahydrocannabinol, Δ 9-THC)相似,但能产生比天然大麻素更加强烈的兴奋、致幻效果,其精神活性更强,危害更大^[1,7,9]。鉴于其对公共安全造成的严重危害,我国于2021年对合成大麻素类物质进行了整类列管^[10]。其中,*N*-(1-氨基酰基-2,2-二甲丙基)-1-丁基吡啶-3-甲酰胺(ADB-BUTINACA)作为一种新型的正丁基吡啶酰胺类合成大麻素,近两年在国内多起案件中检出^[11-13]。据统计,北京警方2021年共查获256份疑似合成大麻素烟油或粉末状的样品,其中ADB-BUTINACA样品约占总数的24.22%^[14]。国家毒品实验室浙江分中心2022年针对华东地区收检的新精神活性物质检材样本中,ADB-BUTINACA检出次数最多。ADB-BUTINACA大多以电子烟油等形态出现,已成为在浙江等地滥用最为严重的合成大麻素之一,其滥用已经成为严重威胁人民群众生命健康、社会安全稳定的重大公共安全问题^[15]。然而,目前对于ADB-BUTINACA等合成大麻素的代谢途径、对机体的长期影响及其背后的分子机制等毒理学研究报道较少。因此,探究合成大麻素ADB-BUTINACA在生物体内的代谢转化及暴露生物标志物,挖掘其体内暴露与毒性效应的内在联系,对于监测、管控合成大麻素的使用和保障公众的健康和安全具有重要意义。

代谢组学采用快速、高灵敏度和高通量的检测技术对生物样本中的大量小分子代谢物进行分析,近年来发展迅速,已被广泛用于研究药物干预对健康的影响^[16]。非靶向代谢组学通过分析差异代谢物,揭示其变化的生理机制,可以将代谢途径与生物学机制联系起来。但其在毒品领域应用较少,目前尚缺少合成大麻素ADB-BUTINACA对大鼠血清代谢影响的相关研

究。本研究采用高分辨液质联用技术,从非靶血液代谢组学角度出发,研究合成大麻素ADB-BUTINACA干预对大鼠血液的影响,研究结果为新型毒品合成大麻素的作用机制提供全新依据。

材料与方法

实验动物 SPF级成年雄性Sprague Dawley (SD)大鼠24只,体重(200±10 g),购自上海瑞莱克斯动物有限公司。SD大鼠置于实验环境中适应7天,可以自由进食基础饲料和水。大鼠的饲养环境温度为24±2℃,相对湿度为55%±10%,维持12 h交替的昼夜循环环境。上述动物实验遵循浙江中医药大学动物伦理委员会的规定并通过动物实验伦理审查(批准号:20220718-11)。

药物与试剂 ADB-BUTINACA化合物C₁₈H₂₆N₄O₂的标准品(≥99.8%,上海原思标物科技有限公司);甲酸(HPLC级,纯度≥96%,美国Tedia公司);乙腈和甲醇(HPLC级,德国Merck公司)。

仪器与设备 UltiMateTM 3000超高效液相系统(包括自动进样器、恒温柱温箱、四元泵、真空脱气机)和Q-Exactive高分辨四极杆静电场轨道阱质谱仪(美国Thermo Fisher公司);Milli-Q水纯化系统(法国Millipore公司);ALLEGRA X-15R高速离心机(美国Beckman公司)。

动物分组与给药 24只成年雄性SD大鼠,被随机分为一个对照组和三个实验组,每组6只大鼠。实验组分别为低、中、高剂量ADB-BUTINACA干预组(0.1、1和5 mg·kg⁻¹)。实验组大鼠分别灌胃上述三个剂量浓度ADB-BUTINACA溶液,对照组大鼠灌胃同等体积的蒸馏水。各组大鼠均食用标准食物。

血清分离与处理 连续干预两天后,取大鼠腹主动脉血样后处死大鼠。将血样放在室温下凝固,随后在3 000 r·min⁻¹的转速下离心10 min获得血清并于-80℃条件下进行保存,用于进一步的代谢组学分析。分析前,取150 μL血清样品与预冷的600 μL甲醇混合,涡

旋 1 min, 于 4 °C 下静置 30 min, 以 14 000 r·min⁻¹ 转速于 4 °C 下离心 10 min。上清液用 0.22 μm 聚醚砜滤膜过滤后转移到自动进样瓶中。

质量控制样品制备 为了验证数据的可重复性和可靠性, 将所有 24 只大鼠的等量血清样本混合制备质控样本, 质控样本的制备方法同血样制备方法一致, 从每个样品中抽取 10 μL 血清混合均匀, 作为质控样本。

色谱条件 色谱柱为 ACQUITY UPLC HSS T3 (2.1 mm × 150 mm, 1.8 μm; Waters Corp, Milford, MA)。流动相: A 为 0.1% 甲酸水溶液, B 为 0.1% 甲酸乙腈, 洗脱程序: 0~3 min (2% B), 3~15 min (2%~100% B), 15~18 min (100% B), 18~18.5 min (100%~2% B), 18.5~21 min (2% B)。

质谱条件 电喷雾离子化源 (HESI), 正、负离子扫描方式; 鞘气流量: 40 L·min⁻¹; 辅助气流量: 10 L·min⁻¹; 喷雾电压: 3.5 kV (正离子), 3.4 kV (负离子); 毛细管温度: 350 °C; 扫描模式为 Full MS-ddMS²; 扫描范围: *m/z* 60~900; 分辨率: 70 000/15 000; 碰撞能量电压设为 20、40、60 V; 数据采集软件: XcaliburTM (美国 Thermo Fisher 公司)。

数据分析 将 UHPLC-Q-Orbitrap-HRMS 数据转换到 Mass Frontier 7.0 和 Compound Discoverer 2.1 (美国 Thermo Fisher 公司) 软件中进行分析。参数为峰面积 > 1 000 000; 质量公差 ≤ 5 ppm; 得到的三维矩阵由峰指数、样品名称 (观测值) 和每个峰区域的归一化离子强度组成, 随后导出到 SIMCA (14.1 版) 软件中, 通过 PCA (包括 QC 样品) 和 OPLS-DA 进行多元统计分析。然后, 创建 S-plot 图对 OPLS-DA 预测分量加载进行检查, 以便于模型解释。计算模型中每个变量的投影变量重要性 (VIP) 值, 以表明其对样本分类的贡献。具有 VIP 值前 200 的代谢物可被认为是区分不同组的重要代谢物。使用人类代谢组数据库 (HMDB) (www.hmdb.ca) 和 mzCloud 数据库 (www.mzcloud.org) 鉴定潜在的生物标志物。使用 MetaboAnalyst (https://www.metaboanalyst.ca/) 和 Kyoto Encyclopedia of Genes and

Genomes (KEGG) pathway database (https://www.genome.jp/kegg/) 进行代谢通路分析。

统计学分析 采用 GraphPad Prism 8 和 SPSS 20.0 软件 (IBM, SPSS, Chicago, IL) 进行统计分析。数据以均数 ± 标准误 (SE) 表示, 并按比例缩放为帕累托方差。数据两组间比较, 满足正态性分布者采用独立样本 *t* 检验; 多组间比较, 满足正态性分布者采用单因素方差分析, 以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结果

1 血清代谢图谱分析

通过 UHPLC-Q-Orbitrap-HRMS 方法进行分析, 得到了正、负离子模式下各剂量组的总离子流图 (图 1)。各组间峰的保留时间、形状及强度均非常相似, 难以直观分析代谢图谱间的微小差异, 故采用多元数据分析方法来进一步分析代谢图谱。

2 多元数据分析

使用 UHPLC-Q-Orbitrap-HRMS 在负离子和正离子模式下进行多因素分析。从 PCA 评分图 (图 2) 可以看出, 在正负离子模式下, C 组 (深蓝色点椭圆) 和 M 组 (黄色点椭圆)、H 组 (浅蓝色点椭圆) 之间均有明显的分离, 其他组之间有部分重叠, 而 QC 样本 (绿色点椭圆) 紧密地聚集在一起。为了更好地识别差异代谢物, OPLS-DA 进一步显示分组趋势 (图 2)。OPLS-DA 是一种减少系统噪声和提取变量信息的监督模型, 它比 PCA 模型具有更强的分类能力。如图 3 所示, 在低、中、高剂量 ADB-BUTINACA 干预组与对照组的比较中, 各组的 OPLS-DA 评分图均表现出较强的聚类性。

3 模型验证

为了防止 OPLS-DA 模型过拟合, 需要对模型进行 200 次的置换检验来验证此模型是否合理。结果表明, 在正离子模式下 (图 4), OPLS-DA 模型的低、中、高剂量 ADB-BUTINACA 干预组的 *R*²*X* 分别为 0.617、0.732、0.916, *R*²*Y* 分别为 0.989、0.999、1.000, *Q*² 分别为 0.841、0.947、0.874; 在负离子模式下, OPLS-DA 模型

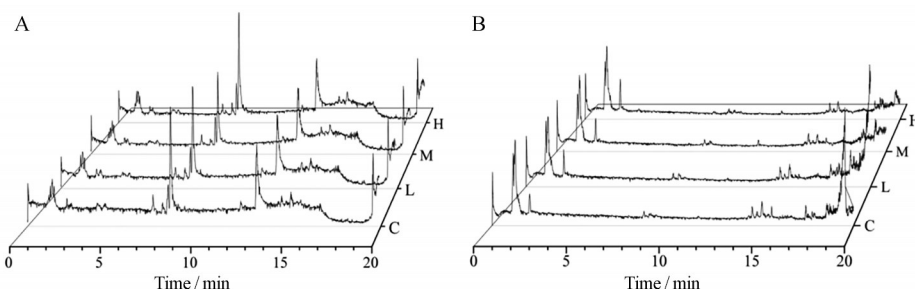


Figure 1 Total ion chromatograms of metabolites in serum of rats under positive ion modes (A) and negative ion modes (B). C: Control group; L: Low-dose group; M: Medium-dose group; H: High-dose group

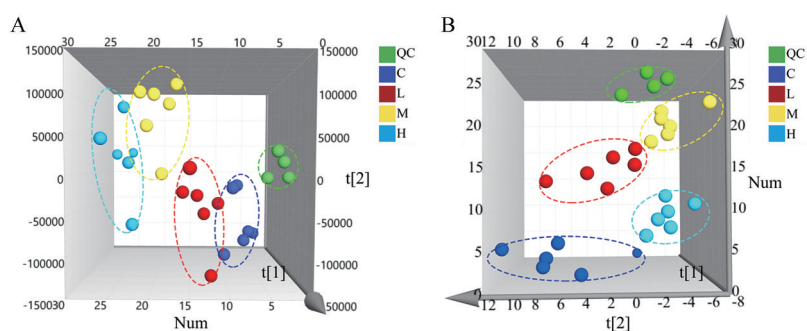


Figure 2 Principal component analyses (PCA) scores plot (3D) generated from serum samples data sets for QC (quality control, green dotted ellipse), control group (dark blue dotted ellipse), low-dose ADB-BUTINACA-treated group (red dotted ellipse), medium-dose ADB-BUTINACA-treated group (yellow dotted ellipse) and high-dose ADB-BUTINACA-treated group (wathet blue dotted ellipse). A: PCA scores plot for all samples in positive mode; B: PCA scores plot for all samples in negative mode. ADB-BUTINACA: *N*-(1-Carbamoyl-2,2-dimethylpropyl)-1-butylazole-3-formamide

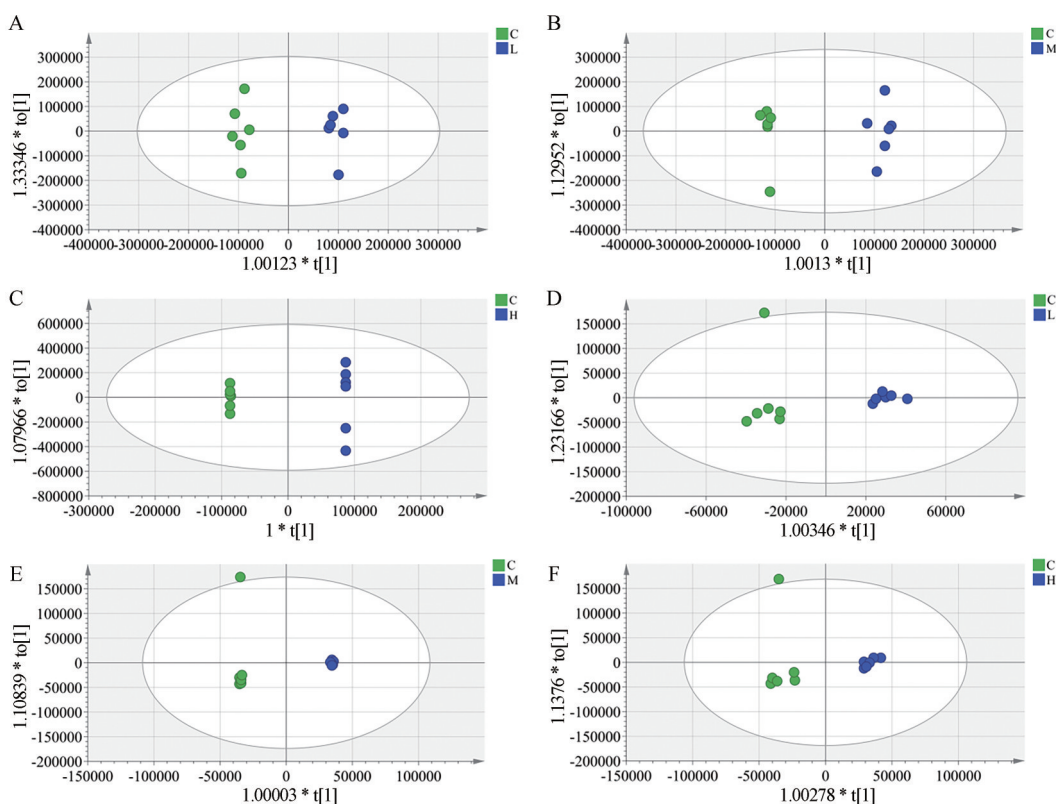


Figure 3 OPLS-DA models derived from the UHPLC-MS/MS analysis for the ADB-BUTINACA and control groups. Data were acquired by positive ionization (A–C) and negative ionization (D–F). Dark blue points represent the ADB-BUTINACA-treated group and green points represent the control group

的低、中、高剂量 ADB-BUTINACA 干预组的 R^2X 分别为 0.652、0.826、0.710, R^2Y 分别为 0.964、1.000、0.969, Q^2 分别为 0.465、0.870、0.721。 R^2 和 Q^2 的值表明模型具有良好的可重复性和可预测性。在模型具有较高 Q^2 的情况下, 验证其是否过拟合具有重要意义。从图 4 中可以看出, 对于正离子模式下和负离子模式下的模型, 其回归线 (蓝色) 与 Y 轴的交集小于 0, 拟合线 (绿

色) 与 Y 轴的交集大于 0, 第一象限两条直线相交, 说明模型都没有过拟合, 具有较高的准确性和较好的预测能力。

4 代谢标志物的初步筛选

为了进一步明确与组分离相关的代谢物, 建立 S-plot 图进行显著性差异代谢物的筛选, 如图 5 所示。图中每一个红色的点即代表大鼠血清样本中 ADB-

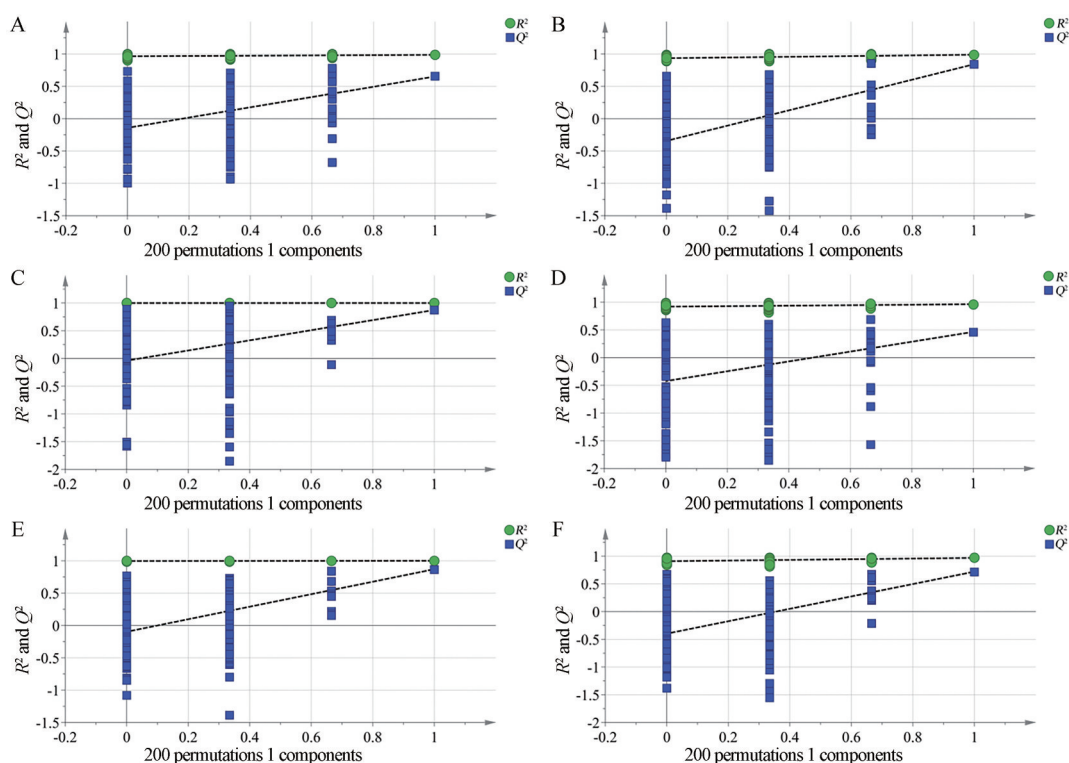


Figure 4 Statistical validation of the OPLS-DA model utilizing permutation analysis (200 times). R^2 represents the explanatory capacity of the model—the variance explained, while Q^2 indicates the model's predictive accuracy. Data were acquired by positive ionization (A–C) and negative ionization (D–F)

BUTINACA 干预后的显著差异性代谢物。当 S-plot 图中的点落在第一象限时, 代表该代谢物在相应数据集中含量上调, 在第三象限时, 代表该代谢物在相应数据集中含量下调。S-plot 图突出显示了与对照组相比, 低、中、高剂量 ADB-BUTINACA 干预组的显著差异代谢物, 说明这些显著性差异代谢物可作为 ADB-BUTINACA 干预后机体潜在的生物标志物。

5 ADB-BUTINACA 干预大鼠后血液的效应标志物研究

以 $VIP > 1$, $P < 0.05$ 作为筛选条件, 筛选得到正负离子模式下 ADB-BUTINACA 干预后的大鼠血液代谢效应标志物, 随后通过 HMDB 和 mzCloud 数据库对差异代谢物进行鉴定, 结果发现, 与对照组相比, 低、中、

高剂量 ADB-BUTINACA 干预组累计有 34 个上调代谢物和 16 个下调代谢物, 如表 1 所示。其中 L-谷氨酸含量在高剂量 ADB-BUTINACA 的干预下显著下降, 3-羟基丁酸含量在低和中剂量 ADB-BUTINACA 的干预下显著上升。为进一步了解不同 ADB-BUTINACA 干预组和对照组的血清代谢变化, 使用聚类热图来可视化代谢物的变化, 热图 (图 6) 展示了差异代谢物在对照组和中剂量 ADB-BUTINACA 干预组的分布。图中红色表示差异代谢物含量高表达, 蓝色表示差异代谢物含量低表达。图 6 可见, 与对照组相比, 中剂量 ADB-BUTINACA 干预组有 40 种代谢物发生了显著变化 ($P < 0.05$)。低、中、高剂量 ADB-BUTINACA 干预组共筛选出 50 种潜在的标志性差异代谢物。

Table 1 Information of significant differential metabolites in the ADB-BUTINACA-treated rat serum. $n = 6$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

No.	Mode of ion	m/z	Component	Chemical formula	t_R /min	C vs L	C vs M	C vs H	Content
1	[M+H] ⁺	113.084 10	Caprolactam	C ₆ H ₁₁ NO	7.99	*			↑
2	[M+H] ⁺	129.151 62	Octylamine	C ₈ H ₁₉ N	8.29			*	↓
3	[M+H] ⁺	262.228 87	Farnesylacetone	C ₁₈ H ₃₀ O	16.87		**		↑
4	[M+H] ⁺	221.104 68	Carbofuran	C ₁₂ H ₁₅ NO ₃	19.58			*	↑
5	[M+H] ⁺	327.276 35	N-Heptadecanoylglycine	C ₁₉ H ₃₇ NO ₃	16.50	**			↑
6	[M+H] ⁺	162.052 52	Diethylpyrocarbonate	C ₆ H ₁₀ O ₅	1.33	**			↑
7	[M+H] ⁺	127.135 82	Coniine	C ₈ H ₁₇ N	19.57	**			↑
8	[M+H] ⁺	208.084 42	L-Kynurenine	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O ₃	6.83			**	↓

Continued

No.	Mode of ion	<i>m/z</i>	Component	Chemical formula	<i>t_R</i> /min	C vs L	C vs M	C vs H	Content
9	[M+H] ⁺	302.223 70	Eicosapentaenoic acid	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	15.48			**	↓
10	[M+H] ⁺	174.111 44	<i>DL</i> -Arginine	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	1.25			*	↓
11	[M+H] ⁺	203.115 42	Acetyl- <i>L</i> -carnitine	C ₉ H ₁₇ NO ₄	2.24	**			↑
12	[M+H] ⁺	117.078 56	Betaine	C ₅ H ₁₁ NO ₂	1.34			*	↑
13	[M+H] ⁺	103.099 91	Choline	C ₅ H ₁₃ NO	1.30		**		↑
14	[M+H] ⁺	117.079 26	<i>L</i> -Valine	C ₅ H ₁₁ NO ₂	2.11	**			↑
15	[M+H] ⁺	164.047 12	2-Hydroxycinnamic acid	C ₉ H ₈ O ₃	3.76		**		↑
16	[M+H] ⁺	86.037 08	Crotonic acid	C ₄ H ₆ O ₂	7.22			**	↓
17	[M+H] ⁺	278.154 01	Diisobutylphthalate	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	15.98		*		↑
18	[M+H] ⁺	131.069 32	Creatine	C ₄ H ₉ N ₃ O ₂	1.43			*	↓
19	[M+H] ⁺	131.094 51	<i>L</i> -Norleucine	C ₆ H ₁₃ NO ₂	4.04	**			↑
20	[M+H] ⁺	199.039 75	Fenclonine	C ₉ H ₁₀ ClNO ₂	7.85		*		↑
21	[M+H] ⁺	523.362 68	Platelet-activating factor	C ₂₆ H ₅₄ NO ₇ P	16.61	*			↑
22	[M+H] ⁺	106.978 40	p-Xylene	C ₈ H ₁₀	13.00	*			↑
23	[M+H] ⁺	134.072 91	2,4-Dimethylbenzaldehyde	C ₉ H ₁₀ O	113.01	*			↑
24	[M+H] ⁺	146.105 34	<i>DL</i> -Lysine	C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	1.15		**		↑
25	[M+H] ⁺	140.105 91	Hexamethylenetetramine	C ₆ H ₁₂ N ₄	19.58		**		↑
26	[M+H] ⁺	132.024 33	3-Methylsulfolene	C ₅ H ₈ O ₂ S	2.33	*			↑
27	[M+H] ⁺	146.068 94	<i>DL</i> -Glutamine	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃	1.29	*			↑
28	[M+H] ⁺	175.099 37	DMACA reagent	C ₁₁ H ₁₃ NO	13.00		**		↑
29	[M+H] ⁺	131.094 51	<i>L</i> -Isoleucine	C ₆ H ₁₃ NO ₂	4.17			*	↓
30	[M+H] ⁺	223.120 29	<i>DL</i> -Cerulein	C ₁₂ H ₁₇ NO ₃	1.47	*			↑
31	[M+H] ⁺	331.188 56	(1 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-2-[(2 <i>S</i>)-2-Amino-2-(3,5-dihydroxyadamantan-1-yl)acetyl]-2-azabicyclo[3.1.0]hexane-3-carbonitrile	C ₁₈ H ₂₅ N ₃ O ₃	14.24		**		↑
32	[M+H] ⁺	145.157 69	Spermidine	C ₇ H ₁₉ N ₃	1.10	**			↓
33	[M+H] ⁺	117.057 88	Indole	C ₈ H ₇ N	13.00		**		↑
34	[M+H] ⁺	157.146 40	2,2,6,6-Tetramethyl-1-piperidinol (TEMPO)	C ₉ H ₁₉ NO	12.67		**		↑
35	[M+H] ⁺	281.271 09	(9 <i>Z</i>)-9-Octadecenamide	C ₁₂ H ₁₇ NO ₃	16.50		**		↑
36	[M+H] ⁺	147.052 87	<i>L</i> -Glutamic acid	C ₅ H ₉ NO ₄	1.34			**	↓
37	[M+H] ⁺	111.043 36	Cytosine	C ₄ H ₅ N ₃ O	2.25		*		↑
38	[M+H] ⁺	301.297 10	Sphinganine	C ₁₈ H ₃₉ NO ₂	13.04		*		↑
39	[M+H] ⁺	194.115 12	PEG-4	C ₈ H ₁₈ O ₅	7.13		**		↓
40	[M+H] ⁺	340.240 15	2,2'-Methylenebis (4-methyl-6-tert-butylphenol)	C ₂₃ H ₃₂ O ₂	17.40	*	**		↓
41	[M+H] ⁺	90.031 67	<i>L</i> -(+)-Lactic acid	C ₃ H ₆ O ₃	2.18	*	*	*	↓
42	[M+H] ⁺	354.219 48	Etretinate	C ₂₃ H ₃₀ O ₃	16.26		*		↓
43	[M+H] ⁺	179.058 24	4-Acetamidobenzoic acid	C ₉ H ₉ NO ₃	8.54			*	↓
44	[M+H] ⁺	133.037 49	<i>L</i> -Aspartic acid	C ₄ H ₇ NO ₄	1.25			*	↓
45	[M+H] ⁺	131.069 44	Creatine	C ₄ H ₉ N ₃ O ₂	1.40			*	↓
46	[M+H] ⁺	104.047 34	3-Hydroxybutyric acid	C ₄ H ₈ O ₃	3.82	*	**		↑
47	[M+H] ⁺	130.063 04	(Hydroxyethyl)methacrylate	C ₆ H ₁₀ O ₃	8.61	**	**	**	↑
48	[M+H] ⁺	116.047 49	Levulinic acid	C ₅ H ₈ O ₃	5.35		**	**	↑
49	[M+H] ⁺	200.014 35	4-Vinylphenol sulfate	C ₈ H ₈ O ₄ S	9.84		**	**	↑
50	[M+H] ⁺	256.105 97	Edoxudine	C ₁₁ H ₁₆ N ₂ O ₅	8.75	*			↑

6 代谢通路富集分析

进一步分析高剂量ADB-BUTINACA干预对大鼠血清代谢途径的扰乱,如图7所示。采用Pareto法对数据进行标准化后,确定血液中谷胱甘肽代谢、丙氨酸、天门冬氨酸和谷氨酸代谢、甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢、视黄醇代谢、柠檬酸盐循环(TCA循环)、乙醚脂质代谢、甘油磷脂代谢、精氨酸和脯氨酸代谢和色氨酸代谢途径共9条代谢途径与ADB-BUTINACA的毒性作用有关。尤其是丙氨酸、天门冬氨酸和谷氨酸代谢途径(impact值:0.27)和视黄醇代谢途径(impact

值:0.24)的影响值大于0.1,表明这两种途径可能是ADB-BUTINACA毒性的潜在关键代谢途径。在这些代谢途径中,研究结果表明ADB-BUTINACA暴露水平与代谢物浓度之间存在显著的剂量反应相关性,长期暴露于高剂量的ADB-BUTINACA会显著降低血清中*L*-天门冬氨酸、*L*-犬尿氨酸和亚精胺含量,而甜菜碱和胆碱的含量则明显增加(图8)。其中甜菜碱、胆碱与*L*-天门冬氨酸在中剂量组较之高剂量组中更加显著的含量变化,可能是由ADB-BUTINACA的效应-剂量关系引起。

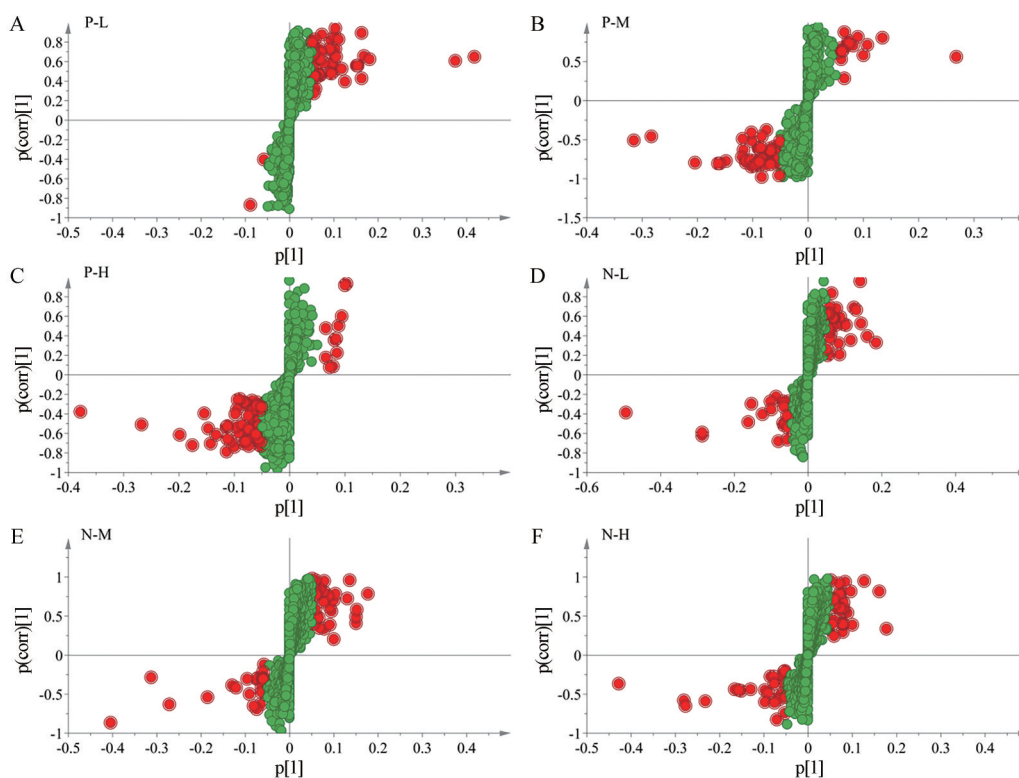


Figure 5 S-plot models associated with the OPLS-DA models of data. Data were acquired by positive ionization (A–C) and negative ionization (D–F)

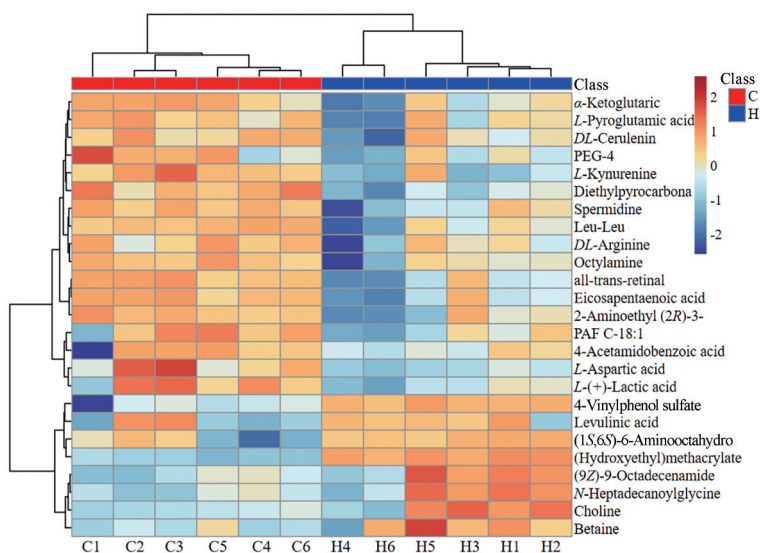


Figure 6 Heatmap of the significant metabolic variations between two study groups: high dosage (class H) of ADB-BUTINACA treatment and a control group (class C). In this visual representation, each column signifies a separate sample, whereas each row corresponds to a distinct metabolite. Metabolites demonstrating a substantial upregulation are represented in red, while those with significant downregulation are depicted in blue

讨论

基于上述9条受扰乱的代谢通路, 其中视黄醇代谢、TCA循环、乙醚脂质代谢与甘油磷脂代谢直接参与了脂质合成与分解过程。视黄醇作为脂质代谢的重要调节因子, 参与了视黄酸信号通路, 调节基因表达,

从而影响脂质合成和分解代谢; 乙醚脂质代谢涉及甘油二酯、甘油三酯、胆固醇及其酯类的代谢, 直接影响脂质储存和信号传导, 可见他们的扰乱直接影响到脂质合成和分解代谢、转运和储存。同时TCA循环是能量代谢的核心, 直接参与脂肪酸 β -氧化产生的乙酰辅

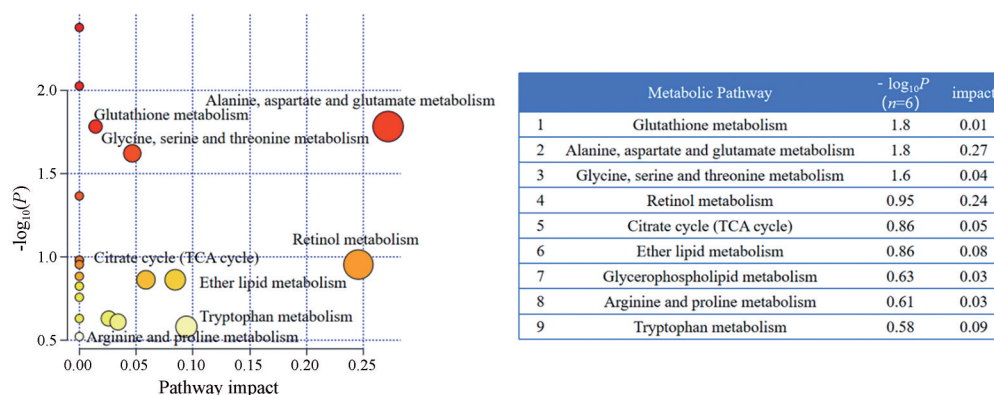


Figure 7 KEGG pathway analysis of metabolic alterations in serum samples post ADB-BUTINACA treatment. Each bubble symbolizes a specific metabolic pathway. The magnitude of the bubble corresponds to the level of impact within each pathway. The significance level of each pathway is represented by a gradient of color, ranging from the most significant (depicted in red) to the least significant (shown in white)

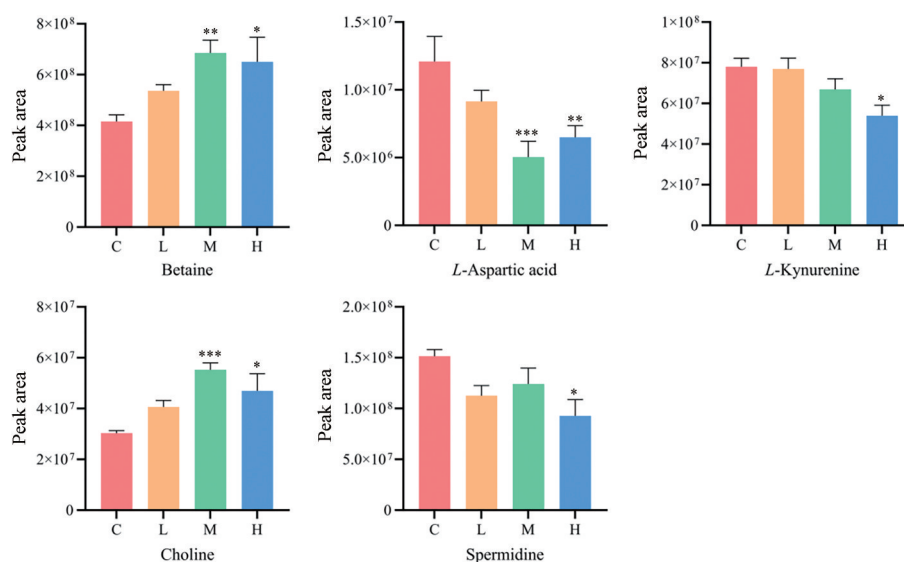


Figure 8 Effects of long-term exposure to ADB-BUTINACA on differential metabolite content in liver. The levels of betaine, *L*-aspartic acid, *L*-kynurenine, choline, and spermidine. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs C (control group)

酶A的进一步氧化分解, 释放能量, 它的扰乱将直接影响脂质代谢和能量代谢。其余5条代谢通路也通过各自的机制间接影响了脂质代谢和能量代谢。

氨基酸是多种必需化合物的代谢底物^[17]。氨基酸代谢失调与肝毒性进展相关^[18]。有研究曾表明, 对乙酰氨基酚、溴苯和四氯化碳等物质诱导的经典肝毒性模型显示出不同的氨基酸代谢改变, 包括精氨酸和脯氨酸, 以及丙氨酸、天门冬氨酸和谷氨酸在内的代谢途径的变化^[19-21]。本结果同样表明 ADB-BUTINACA 的干预极大扰乱了丙氨酸、天门冬氨酸和谷氨酸代谢途径。在肝细胞氧化应激、凋亡或炎症的条件下, 也会发生丙氨酸、天门冬氨酸和谷氨酸代谢途径的转化和变化^[22,23], 这进一步与本研究结果相呼应。因此推测

ADB-BUTINACA 的干预可能通过扰乱氨基酸代谢而引发毒性作用。

视黄醇作为维生素 A 的主要形式, 对体内平衡和正常生理的重要性是公认的, 其关键生物学功能包括在胚胎发育和生长、细胞分化、组织重塑、繁殖、免疫系统完整性、视力、皮肤和膜维持以及造血中的关键作用^[24-26]。视黄醇和维生素 A 化合物 (包括视黄酸) 是脂质代谢、胰岛素信号传导和能量平衡不可或缺的一部分, 它们通过调节或共调节 500 多种遗传反应元件的表达来发挥多效性作用^[27-29]。这些生物作用被认为是其实验性抗癌作用的原因^[30,31]。在本研究中发现 ADB-BUTINACA 的干预对视黄醇途径的扰乱, 这可能会导致脂质代谢紊乱, 严重影响体内平衡和正常生

理机能从而毒害机体。

谷胱甘肽代谢是指谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 在体内的代谢过程, GSH是由L-谷氨酸、L-半胱氨酸和甘氨酸经肽键缩合而成的生物活性三肽化合物^[32]。它是一种抗氧化剂, 可以抵抗自由基的损害, 保护细胞免受紫外线和其他外界因素的损害^[33,34]。由图5可知, ADB-BUTINACA的干预造成L-谷氨酸含量降低, 而其正是合成谷胱甘肽的原料, 这可能导致体内谷胱甘肽含量降低, 从而降低细胞抵御自由基的能力, 使细胞更容易被外界因素影响导致损害。此外, 谷胱甘肽代谢途径中亚精胺含量的降低(图7)进一步表明了ADB-BUTINACA对谷胱甘肽代谢途径的扰动。

3-羟基丁酸作为酮体代谢的一个关键物质, 通常在身体的脂肪酸氧化和肝脏酮体生成过程中产生^[35], 这个过程在身体的糖分解(即糖酵解和TCA循环)无法满足能量需求时发生。本研究中发现ADB-BUTINACA的干预扰乱了TCA循环且使血清中3-羟基丁酸含量升高(图5), 这意味着ADB-BUTINACA的干预导致能量代谢紊乱, 使三羧酸循环无法正常运行, 身体更多地利用脂肪酸进行能量供应, 脂肪酸的氧化增加, 同时产生了更多的酮体如3-羟基丁酸。若肝中合成酮体的量超过肝外组织利用酮体的能力, 二者之间失去平衡, 可能会导致酮血症和酮尿症, 从而增加诱发1型糖尿病并发症的风险^[36,37]。另外, 由于3-羟基丁酸的酸性, 酮体在体内大量堆积还会使血液的pH值下降乃至引起酸中毒。因此推测ADB-BUTINACA的干预可能通过扰乱机体能量代谢来引发酮血症和酮尿症等疾病。

综上所述, ADB-BUTINACA可能通过扰乱氨基酸、视黄醇、谷胱甘肽和酮体代谢等关键代谢途径, 对机体健康产生潜在的毒性影响。本研究揭示了ADB-BUTINACA在体内的代谢轮廓, 确定了50种潜在标志性差异代谢物以及9种被扰乱的代谢途径, 后续可联合使用多组学技术和分子实验进行验证, 进一步探究ADB-BUTINACA造成脂质代谢紊乱和能量代谢紊乱的毒理机制, 从而确定其与酮血症、酮尿症和1型糖尿病等疾病之间的关联。

作者贡献: 本研究思路由范一雷设计; 陈昊、徐昊哲负责实验和论文撰写; 周婧提供论文撰写思路及修改论文; 吴昊、柯星、赵森负责相关文献的调研与收集。

利益冲突: 本文所有作者声明不存在任何利益冲突。

References

- [1] Seely KA, Lapoint J, Moran JH, et al. Spice drugs are more than harmless herbal blends: a review of the pharmacology and toxicology of synthetic cannabinoids [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2012, 39: 234-243.
- [2] Li L, Zhao JB, Yan H, et al. Research progress on metabolite identification of synthetic cannabinoid new psychoactive substances [J]. *J Forensic Med (法医学杂志)*, 2021, 37: 459-469.
- [3] Favretto D, Pascali JP, Tagliaro F. New challenges and innovation in forensic toxicology: focus on the "new psychoactive substances" [J]. *J Chromatogr A*, 2013, 1287: 84-95.
- [4] Vardakou I, Pistos C, Spiliopoulou C. Spice drugs as a new trend: mode of action, identification and legislation [J]. *Toxicol Lett*, 2010, 197: 157-162.
- [5] Lindigkeit R, Boehme A, Eiserloh I, et al. Spice: a never ending story? [J]. *Forensic Sci Int*, 2009, 191: 58-63.
- [6] Auwarter V, Dresen S, Weinmann W, et al. 'Spice' and other herbal blends: harmless incense or cannabinoid designer drugs? [J]. *J Mass Spectrom*, 2009, 44: 832-837.
- [7] Karolina S, Dariusz Z, Karolina L. Analysis of fragmentation pathways of new-type synthetic cannabinoids using electrospray ionization [J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2018, 29: 1941-1950.
- [8] UNODC early warning advisory on new psychoactive substances [EB/OL]. 2023-07-01. <https://www.unodc.org/LSS/Page/NPS/DataVisualisations>.
- [9] Zhou SH, Xu Y, Yu ZF, et al. Investigation of metabolites of synthetic cannabinoid 4CN-MDMB-BUTINAC *in vitro* by liquid-chromatography-quadrupole/orbitrap mass spectrometry [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2022, 57: 3653-3659.
- [10] Ministry of Public Security of the People's Republic of China. Announcement on the inclusion of 18 substances, including synthetic cannabinoids and fluamine, in the "Supplementary Catalogue of Controlled Varieties of Non-medical Narcotic Drugs and Psychotropic Substances" [EB/OL]. 2021-05-12. <https://app.mps.gov.cn/gdnps/pc/content.jsp?id=7881703>.
- [11] Wen W, Zheng XY, Zhao Y, et al. Analysis of multi-method for synthetic cannabinoid ADB-BUTINACA [J]. *J Forensic Med (法医学杂志)*, 2022, 37: 287-290.
- [12] Wen W, Li P, Zheng XY, et al. A new synthetic cannabinoid, ADB-BUTINACA, was detected in suspected drug tobacco and e-liquid [J]. *J Forensic Med (法医学杂志)*, 2021, 36: 474-476.
- [13] Chen SS, Li YQ, Kang G, et al. One case of suspected sexual assault involving the novel synthetic cannabinoid ADB-BUTINACA [J]. *J Forensic Med (法医学杂志)*, 2021, 36: 436-437, 439.
- [14] Jie ZY, Zhang WF, Wang JF, et al. Metabolomic analysis of a novel synthetic cannabinoid ADB-BUTINACA in zebrafish in different time periods [J]. *J Instrum Anal (分析测试学报)*, 2023, 42: 568-576.
- [15] Hout MCV, Hearne E. User experiences of development of dependence on the synthetic cannabinoids, 5f-AKB48 and 5f-PB-22, and subsequent withdrawal syndromes [J]. *Int J Ment Health Addict*, 2017, 15: 1-15.
- [16] Zhao LS, Li Q, Guo CW, et al. Mass spectrometry technology and its application in analysis of biological samples [J]. *Acta*

- Pharm Sin (药学报), 2012, 47: 158-162.
- [17] Paulusma CC, Lamers WH, Broer S, et al. Amino acid metabolism, transport and signalling in the liver revisited [J]. *Biochem Pharmacol*, 2022, 201: 115074.
- [18] Sun M, Zhang J, Liang S, et al. Metabolomic characteristics of hepatotoxicity in rats induced by silica nanoparticles [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2021, 208: 111496.
- [19] Pannala VR, Estes SK, Rahim M, et al. Toxicant-induced metabolic alterations in lipid and amino acid pathways are predictive of acute liver toxicity in rats [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21: 8250.
- [20] Pannala VR, Estes SK, Rahim M, et al. Mechanism-based identification of plasma metabolites associated with liver toxicity [J]. *Toxicology*, 2020, 441: 152493.
- [21] Zhang Y, Li H, Hu T, et al. Metabonomic profiling in study hepatoprotective effect of polysaccharides from *Flammulina velutipes* on carbon tetrachloride-induced acute liver injury rats using GC-MS [J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 110: 285-293.
- [22] Zhu R, Wang Y, Zhang L, et al. Oxidative stress and liver disease [J]. *Hepatol Res*, 2012, 42: 741-749.
- [23] Zhu Y, Zhang Y, Li Y, et al. Integrative proteomics and metabolomics approach to elucidate metabolic dysfunction induced by silica nanoparticles in hepatocytes [J]. *J Hazard Mater*, 2022, 434: 128820.
- [24] Olsen T, Blomhoff R. Retinol, retinoic acid, and retinol-binding protein 4 are differentially associated with cardiovascular disease, type 2 diabetes, and obesity: an overview of human studies [J]. *Adv Nutr*, 2020, 11: 644-666.
- [25] Steinhoff JS, Lass A, Schupp M. Retinoid homeostasis and beyond: how retinol binding protein 4 contributes to health and disease [J]. *Nutrients*, 2022, 14: 1236.
- [26] Blaner WS, Brun PJ, Calderon RM, et al. Retinol-binding protein 2 (RBP2): biology and pathobiology [J]. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2020, 55: 197-218.
- [27] Huang J, Panagiotou OA, Anic GM, et al. Metabolomic profiling of serum retinol in the alpha-tocopherol, beta-carotene cancer prevention (ATBC) study [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 10601.
- [28] Bonet ML, Ribot J, Palou A. Lipid metabolism in mammalian tissues and its control by retinoic acid [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1821: 177-189.
- [29] Chen W, Chen G. The roles of vitamin A in the regulation of carbohydrate, lipid, and protein metabolism [J]. *J Clin Med*, 2014, 3: 453-479.
- [30] Klaassen I, Braakhuis BJ. Anticancer activity and mechanism of action of retinoids in oral and pharyngeal cancer [J]. *Oral Oncol*, 2002, 38: 532-542.
- [31] Bi G, Liang J, Shan G, et al. Retinol saturase mediates retinoid metabolism to impair a ferroptosis defense system in cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2023, 83: 2387-2404.
- [32] Li Y, Wei G, Chen J. Glutathione: a review on biotechnological production [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, 66: 233-242.
- [33] Mari M, Morales A, Colell A, et al. Mitochondrial glutathione, a key survival antioxidant [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2009, 11: 2685-2700.
- [34] Chiang FF, Huang SC, Yu PT, et al. Oxidative stress induced by chemotherapy: evaluation of glutathione and its related antioxidant enzyme dynamics in patients with colorectal cancer [J]. *Nutrients*, 2023, 15: 5104.
- [35] Nishitani S, Fukuhara A, Tomita I, et al. Ketone body 3-hydroxybutyrate enhances adipocyte function [J]. *Sci Rep*, 2022, 12: 10080.
- [36] Puchalska P, Crawford PA. Metabolic and signaling roles of ketone bodies in health and disease [J]. *Annu Rev Nutr*, 2021, 41: 49-77.
- [37] Kanikarla-Marie P, Jain SK. Hyperketonemia and ketosis increase the risk of complications in type 1 diabetes [J]. *Free Radic Biol Med*, 2016, 95: 268-277.