· 实验研究 ·

基于 UPLC-MS 研究纳米二氧化钛对成年小鼠血浆代谢谱的影响

姬海南[1],康　辉[2],李海山[1],宋乃宁[1],徐宝梁[1],赵　潺[1],李文涛[1],沈国林[1]
(1 中国检验检疫科学研究院化学品安全研究所,北京 100176; 2 河南中医药大学,郑州 450046)

[摘要] **目的**:观察不同染毒剂量的纳米二氧化钛(TiO_2)对 C57BL/6 成年小鼠血浆代谢谱的变化,探讨其产生毒性效应可能的作用机制,并尝试寻求其毒性相关生物靶点。**方法**:运用纳米 TiO_2 制备不同染毒剂量的小鼠模型,将小鼠随机分为对照组及 10,30,100 和 300 $mg\cdot kg^{-1}$ 组。利用 UPLC-MS 技术结合主成分分析、偏最小二乘分析等方法对血浆数据进行分析,鉴定出潜在生物标志物,通过变量对模型的重要性(variable important in projection,VIP)及非参数检验筛选差异代谢物;运用 Pathway Analysis 数据库对差异标志物进行拓扑分析。**结果**:从血浆中筛选出 35 种差异代谢物,发现纳米 TiO_2 发挥干预作用可能与亚油酸代谢、鞘脂代谢、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的生物合成、组氨酸代谢、花生四烯酸代谢、烟酸酯和烟酰胺代谢、甘油磷脂代谢等通路有关。**结论**:纳米 TiO_2 经过 28 d 染毒后,所产生的毒性作用机制可能与体内氨基酸代谢、脂质类代谢异常相关。

[关键词] 纳米二氧化钛;代谢组学;血浆;生物靶点
[中图分类号] R965.1　　[文献标志码] A　　[文章编号] 1003 - 3734(2021)14 - 1323 - 11

Investigation on the effect of nano-TiO_2 on the plasma metabolic spectrum in mice based on UPLC-MS

JI Hai-nan[1], KANG Hui[2], LI Hai-shan[1], SONG Nai-ning[1], XU Bao-liang[1], ZHAO Chan[1], LI Wen-tao[1], SHEN Guo-lin[1]
(1 *Institute of Chemicals Safety, Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing* 100176, *China*; 2 *College of Pharmacy, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou* 450046, *China*)

[**Abstract**] **Objective**: To investigate the changes of the plasma metabolic spectrum of C57BL/6 young mice treated with different doses of nano-TiO_2, explore the possible mechanism of its toxic side effects, and identify its toxicity-related biological targets. **Methods**: Mice were randomly assigned to receive nano-TiO_2 at doses of 0 (control group), 10, 30, 100, or 300 $mg\cdot kg^{-1}$. The plasma data were analyzed using UPLC-MS technology combined with principal component and partial least squares analyses. The results revealed differences between the control group and each nano-TiO_2 group, with the effect becoming more pronounced with increasing doses. Topological analysis of the different metabolites was conducted using the Pathway Analysis database. **Results**: In total, 35 different metabolites were screened from plasma, and Nano-TiO_2 treatment was revealed to affect linoleic acid metabolism, biosynthesis of valine, leucine and isoleucine, sphingolipid metabolism, arachidonic acid metabolism,

[基金项目] 国家重点研发计划资助项目(2017YFF0211201);国家市场监督管理总局业务费化学品质量安全检测能力提升专项资金资助项目(15002000000019);公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助项目(2019JK027, 2018JK023, 2018JK021, 2017JK047);基本科研业务费专项资助项目(2020JK035):婴幼儿化妆品防腐体系安全评价研究

[作者简介] 姬海南,男,硕士,助理研究员,主要从事化学品安全研究。E-mail:1446678196@qq.com。
[通讯作者] 沈国林,男,博士,副研究员,主要从事化学品安全研究。E-mail:shengl@aqsiqch.ac.cn。李文涛,男,博士,副研究员,主要从事产品质量安全研究。E-mail:liwt@caiq.gov.cn。

glycerophospholipid metabolism, nicotinate and nicotinamide metabolism, histidine metabolism, and other pathways. **Conclusion**: The results indicated that the toxicity mechanism of Nano-TiO_2 after 28 days of exposure may be related to abnormal amino acid and lipid metabolism.

[**Key words**] nano-TiO_2; metabolomics; plasma; biological targets

二氧化钛(TiO_2)是元素钛的氧化物,为白色无味粉末,是目前应用最广泛的颜料之一,全世界每年大约生产 400 万吨 TiO_2,约占色素总产量的 70%[1],其主要应用于生产食品、药品和牙膏等产品[2]。相比于常规 TiO_2,纳米 TiO_2 具有更小的粒径、更高的白色度并可以提高营养物质的吸收率,因此,纳米技术已被广泛应用于食品产业链的各个环节[3-4]。同时大量的纳米材料被添加到人们日常消费的食品中,并最终经消化道吸收进入人体产生各种生物效应[5]。前期研究表明,人造纳米颗粒可以引起靶器官炎症反应、氧化应激等不良反应[6-8]。2010 年,美国环保局曾出具详细报告,提示纳米 TiO_2 对环境及人类健康存在潜在风险[9]。因此,纳米材料的安全性问题越来越受到人们的关注[10-12]。

近年来,国内外已经开始利用代谢组学(metabolomics)技术对纳米材料的生物安全性进行评价[13-14],使用高分辨质谱进行代谢组学分析,生物样品不需要衍生化,并且能够检测众多的化合物,已成为非靶标代谢产物分析的有效方法。UPLC-MS[15-17]与不同染毒剂量纳米 TiO_2 的代谢组学研究相关的报道较少。因此,本研究选用处于成年期的小鼠,采用代谢组学技术比较研究经口摄入纳米 TiO_2 对成年小鼠血浆代谢谱的影响,为完善纳米 TiO_2 的安全性评价及应用进一步提供代谢组学数据。

材料与方法

1 仪器

DV215CD 电子分析天平(Sartorius 公司);电子天平(德国 Mettler Toledo 公司);KQ-250 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);离心机(美国 Sigma 公司);-80 ℃冰箱(美国 Thermo Fisher 公司);Dionex Ultimate 3000 超高效液相色谱仪(美国 Themo Fisher 公司);Thermo Q Exactive 质谱仪(Themo Fisher 公司);C_{18}色谱柱(美国 Thermo Syncronis 公司,100 mm×2.1 mm,1.7 μm);Milli-Q AdvantageA10 型超纯水仪(美国 Millipore 公司);全自动血液生化分析仪(日本东芝公司)。

2 试药和试剂

纳米 TiO_2(锐钛矿,北京百灵威科技有限公司,粒径:10~25 nm,比表面积:30 $m^2 \cdot g^{-1}$,纯度:99.9%,批号:LLC0S74);甲酸、甲酸铵、甲醇、乙腈均为色谱纯,购于美国 Themo Fisher 公司;总蛋白(TP)试剂盒(批号:20-0113)、白蛋白(ALB)试剂盒(批号:20-0107)、谷丙转氨酶(ALT)试剂盒(批号:20-0119)、三酰甘油(TG)试剂盒(批号:19-1230)、总胆固醇(TCHOL)试剂盒(批号:20-0305)、谷草转氨酶(AST)试剂盒(批号:19-1014)、肌酐(CREA)试剂盒(批号:19-1107)、葡萄糖(Glu)试剂盒(批号:19-1223)、Na 试剂盒(批号:20-0121)、K 试剂盒(批号:20-0203)均购自北京九强生物技术有限公司。

3 实验动物

C57BL/6 小鼠,雌性,体重约 18~22 g,6~7 周龄,购于北京维通利华实验动物技术有限公司,成年小鼠饲养于中国检验检疫科学院检测中心 SPF 级动物房中,许可证编号:SCXK(京)2012-0001。实验前禁食 24 h,自由饮水。

4 染毒实验

小鼠适应性饲养结束后,设置 1 个对照组和 4 个实验组,染毒剂量分别为 10,30,100 和 300 $mg \cdot kg^{-1}$,灌胃(*ig*),*qd*,连续 28 d。末次染毒后,空腹,眼静脉丛取血置于预放肝素钠的离心管中,3 500 $r \cdot min^{-1}$离心 10 min,取血浆冻存于 -80 ℃冰箱。

5 成年小鼠血浆样品处理

分析进样前将血浆样品放置室温下解冻,涡流 30 s,取 50 μL,加入乙腈 450 μL,涡流 30 s,充分沉淀蛋白,高速离心(13 000 $r \cdot min^{-1}$,15 min),取上清液于进样小瓶中进样分析。

6 色谱条件

采用 Dionex Ultimate 3000 超高效液相色谱仪,色谱柱为 Thermo Syncronis C_{18}(100 mm×2.1 mm,1.7 μm);流动相 A 为水(含 0.1%甲酸及 2 $mmoL \cdot L^{-1}$甲酸铵),流动相 B 为乙腈。梯度洗脱程序:0~1 min,95% A;1~5 min,95%~40% A;5~8 min,40%~0 A;

8 ~ 11 min, 0 A;11 ~ 14 min,0 ~ 40% A;14 ~ 15 min, 40% ~ 95% A;15 ~ 18 min,95% A。

7 MS/MS2 条件

电喷雾离子源(ESI),采用正负离子同时扫描模式,电喷雾电压为 2.8 kV,鞘气流速为 35 arb,辅助气流速为 10 arb,毛细管温度为 320 ℃;一级全扫描(full scan),分辨率为 70 000,扫描范围为 70 ~ 1 050 *m/z*;二级数据依赖性扫描(full MS/dd-MS),分辨率为 17 500,Stepped NCE 值为 20,40 和 60 V。

8 数据处理及分析[18]

采用 mzCloud 对小鼠血浆内源标志物进行鉴定,利用分子式和分子量确定差异标志物,同时在 Trace Finder 软件进行自建生物标志物数据库,Metlin(http://metlin.scripps.edu/),HMDB(www.hmdb.ca)及 KEGG(www.genome.jp/kegg/ligand.html)数据库中进行检索和确认。实验采用 Metaboanalyst 3.3.0 进行主成分分析(principal component analysis, PCA)和偏最小二乘判别分析(partial least squared discriminant, PLS-DA)及拓扑分析,使用 R 统计软件包进行[R × 64 3.2.4(http://cran.r-project.org)]高通量代谢通路分析。

结　果

1 纳米 TiO_2 对小鼠血浆生化指标的影响

为了确证纳米 TiO_2 较长时间染毒是否对小鼠肝脏及肾脏造成损伤,我们检测了血浆生化指标,实验所得数据见表 1。从表中数据可以看出,染毒各剂量组 AST,ALB 和碱性磷酸酶(ALP)项指标均显著高于对照组,这些指标的变化表明纳米 TiO_2 引起了肝脏损伤导致肝功能异常;CHOL,K^+,Na^+ 和 CREA 与对照组相比明显增加,Glu、血尿素氮(BUN)、TG 明显降低,这些指标的异常说明持续染毒纳米 TiO_2 可能引起肾脏损伤。

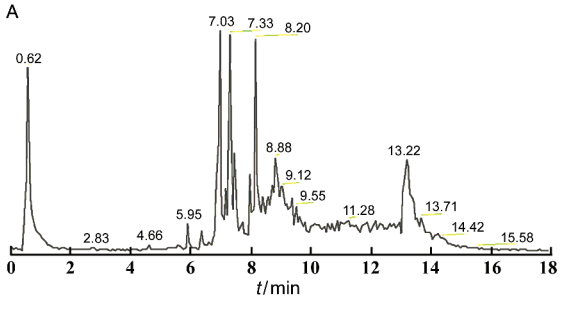
表 1 28 d 染毒纳米 TiO_2 对小鼠血浆生化指标的影响　$\bar{x} \pm s, n = 10$

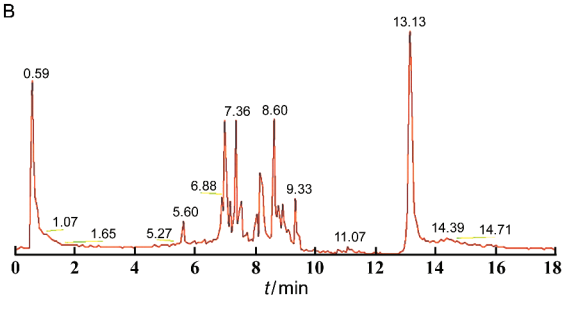
组别	对照组	10 mg·kg^{-1}	30 mg·kg^{-1}	100 mg·kg^{-1}	300 mg·kg^{-1}
AST/U·L^{-1}	89.90 ± 19.58	116.00 ± 15.23^b	104.10 ± 24.46	106.63 ± 15.85	84.25 ± 5.97
ALB/g·L^{-1}	33.12 ± 0.68	34.66 ± 1.54^a	33.12 ± 1.35	33.66 ± 1.54	33.04 ± 1.75
ALP/U·L^{-1}	94.00 ± 10.02	123.2 ± 27.08^b	119 ± 20.03^b	112.10 ± 20.72^a	115.22 ± 25.45^a
Glu/mmol·L^{-1}	9.08 ± 0.58	6.89 ± 1.30^b	6.49 ± 0.71^b	7.07 ± 0.86^b	7.84 ± 1.36^a
BUN/μmol·L^{-1}	5.55 ± 0.39	5.53 ± 0.47	4.84 ± 0.45^b	4.85 ± 0.56^b	4.71 ± 0.78^b
CREA/mmol·L^{-1}	12.80 ± 1.14	14.90 ± 2.08	16.20 ± 2.30^b	13.9 ± 2.33	29.11 ± 12.63^b
TG/mmol·L^{-1}	2.61 ± 0.53	1.17 ± 0.37^b	1.3 ± 0.28^a	1.26 ± 0.2^b	1.41 ± 0.53^b
CHOL/mmol·L^{-1}	2.74 ± 0.41	3.09 ± 0.54^a	3.18 ± 0.30^a	3.33 ± 0.58^a	3.17 ± 0.46^a
K^+/mmol·L^{-1}	5.95 ± 0.57	6.99 ± 0.55^b	6.44 ± 0.25^b	6.48 ± 0.53^a	6.47 ± 0.37^a
Na^+/mmol·L^{-1}	149.90 ± 1.37	153.9 ± 3.73^b	151.92 ± 2.23^b	153.50 ± 3.54^b	150.67 ± 4.58

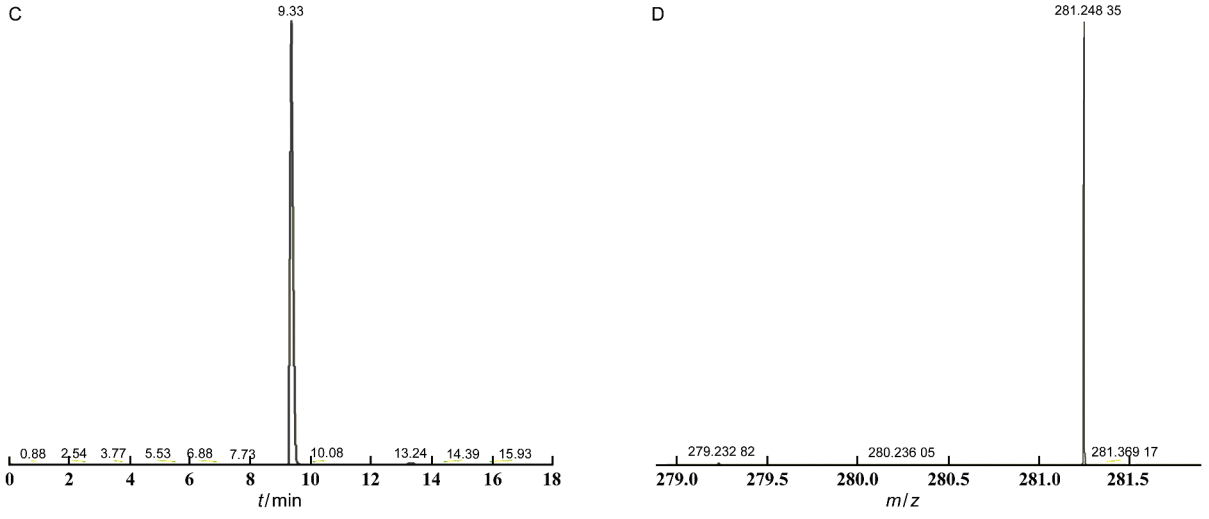
与对照组比较,a:$P < 0.05$,b:$P < 0.01$

2 血浆总离子图及鉴别方式

采用 mzCloud 对血浆内源性标志物进行鉴定,利用分子式和分子量确定标志物,见图 1,同时利用 TraceFinder 软件进行内源性标志物数据库的建立[15-17]。







A:正、负离子模式下的色谱图;B:负离子模式下 9.33 min 出现的色谱峰;C:负离子模式下 9.33 min 出现的色谱峰;D:负离子模式下 9.33 min 出现的色谱峰所对应的母核离子碎片

图 1 全扫描检测小鼠血浆总离子流图及油酸鉴别模式识别

3 多变量分析各组成年小鼠血浆 UPLC-MS 数据的模式识别

利用 PCA 对成年小鼠的对照组及各剂量组之间的差异进行无监督分析,发现各组数据能够较好地聚类在一起,样本无需剔除(见图 2A)。为了进一步获取理想的组间分离和差异代谢物筛选,进行了 PLS-DA 分析。如图 2B 所示,对照组与各剂量组基本分开,说明染毒后小鼠内源物质水平发生了变化。图 2B 中,对照组、各剂量组之间基本没有重叠,随着染毒剂量的增加,各组逐渐偏离对照组,表明给予纳米 TiO_2 后成年小鼠血浆部分内源性代谢轮廓发生改变,从一定程度上说明纳米 TiO_2 能够影响成年小鼠的代谢。结果显示,模型的 Q2 为 0.905(R2X = 0.99,R2Y = 0.98),即其中 99% 的变量被作为用来建立模型的主要成分,90.5% 的样本符合模型的判别,而建模后模型的预测能力为 98%。

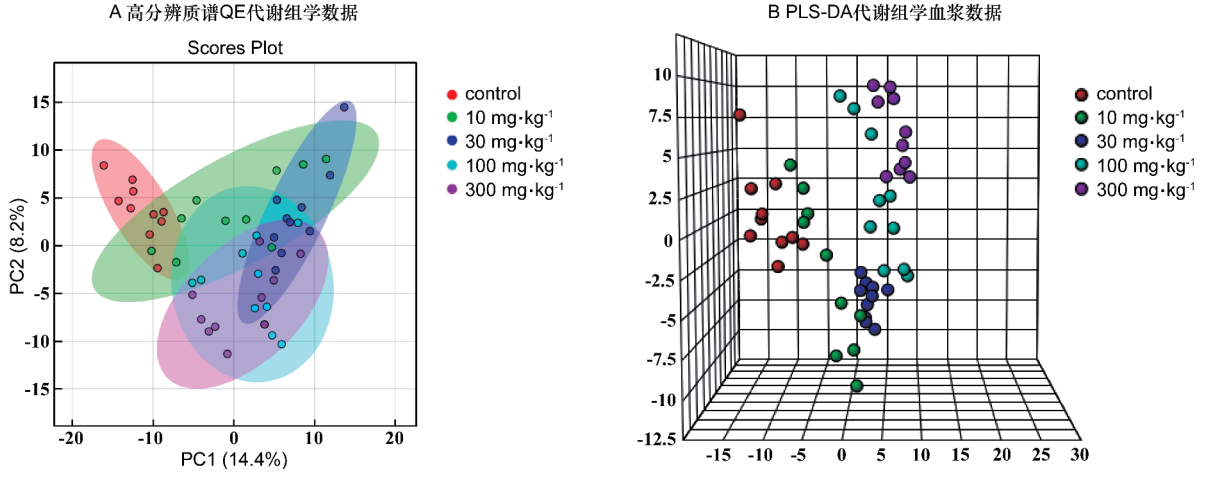


图 2 对照组和不同纳米 TiO_2 染毒剂量组小鼠血浆代谢组学分析

4 潜在生物标志物的鉴定及验证

4.1 潜在生物标志物的鉴定 PLS-DA 分析后,结合变量对模型的重要性(variable important in projection,VIP)>1 及 $P<0.05$ 的筛选条件筛选出潜在的生物标志物。并与文献进行比较,在成年小鼠血浆中分别鉴定出 35 种潜在的生物标志物,其质谱数据信息见表 2 和表 3。

表 2 小鼠血浆主要差异性标志物的平均变化 $\bar{x} \pm s$

内源性代谢物	变化百分比/%			
	10 mg·kg^{-1}/对照组	30 mg·kg^{-1}/对照组	100 mg·kg^{-1}/对照组	300 mg·kg^{-1}/对照组
niacinamide	70.36 ± 18.1[b]	30.65 ± 9.71[b]	17.58 ± 3.63[b]	3.4 ± 0.85[b]
citrulline	106.36 ± 21.42[a]	107.81 ± 11.12[a]	67.31 ± 15.2[b]	81.14 ± 16.07[b]
arachidonic acid	96.92 ± 17.58[b]	275.26 ± 59.79[a]	197.92 ± 56.53[a]	201.84 ± 45.71[a]
hexadecasphinganine	73.07 ± 14.95[b]	88.29 ± 21.5[b]	143.88 ± 35.36[a]	167.71 ± 35.77[a]
linoleic acid	81.95 ± 15.12[b]	182.04 ± 46.14[a]	163.46 ± 43.02[a]	170.74 ± 45.42[a]
oleic acid	87.87 ± 16.52[b]	141.19 ± 20.03[a]	159.91 ± 30.72[a]	137.86 ± 13.32[a]
SM[d18:0/24:1(15*Z*)]	329.62 ± 28.93[a]	423.12 ± 44.64[a]	408.66 ± 29.01[a]	356.42 ± 45.88[a]
allysine	58.38 ± 14.81[b]	50.65 ± 7.32[b]	41.05 ± 11.29[b]	30.66 ± 7.99[b]
adenine	93.5 ± 18.93[b]	58.45 ± 8.08[b]	56.76 ± 12.61[b]	46.11 ± 13.55[b]
L-acetylcarnitine	136.07 ± 42.36[a]	131.73 ± 37.78[a]	144.82 ± 38.13[a]	142.32 ± 32.43[a]
cholesterol sulfate	139.46 ± 28.34[a]	139.97 ± 38.07[a]	176.16 ± 44.93[a]	149.28 ± 18.7[a]
adenosine	45.52 ± 12.44[b]	28.59 ± 10.07[b]	18.97 ± 5.28[b]	10.03 ± 3.07[b]
histamine	71.91 ± 18.79[b]	70.41 ± 11.17[b]	61.37 ± 15.43[b]	65.84 ± 17.47[b]
SM(d18:1/22:0)	386.85 ± 65.26[a]	543.75 ± 90.33[a]	506.18 ± 55.64[a]	401.34 ± 35[a]
allopurinol	1 961.07 ± 398.08[a]	2 436.98 ± 386.65[a]	1 340.8 ± 482.57[a]	1 875.92 ± 564.06[a]
SM[d18:0/16:1(9*Z*)]	126.43 ± 17.35[a]	139.42 ± 18.81[a]	130.9 ± 18.57[a]	132.29 ± 26.96[a]
SM(d18:1/24:0)	644.88 ± 40.42[a]	869.95 ± 95.2[a]	882.69 ± 62.9[a]	668.83 ± 62.36[a]
PC[20:3(5*Z*,8*Z*,11*Z*)/20:3(5*Z*,8*Z*,11*Z*)]	70.27 ± 4.95[b]	65.19 ± 7.91[b]	79.66 ± 10.23[b]	78.04 ± 7.14[b]
LysoPC[16:1(9*Z*)]	118.21 ± 22.27[a]	122.67 ± 33.54[a]	79.43 ± 21.96[b]	77.85 ± 13.47[b]
pregabalin	83.55 ± 16.36[b]	118.89 ± 39.71[a]	140.91 ± 28.13[a]	158.51 ± 35.4[a]
LysoPC[20:1(11*Z*)]	111.86 ± 25.82[a]	132.16 ± 34.16[a]	123.19 ± 26.75[a]	135.57 ± 22.23[a]
LysoPC(17:0)	113.6 ± 24.65[a]	145 ± 20.85[a]	123.08 ± 26.9[a]	114.65 ± 27.03[a]
SM(d17:1/24:0)	296.5 ± 61.09[a]	408.72 ± 32.83[a]	451.89 ± 48.6[a]	351.89 ± 49.71[a]
LysoPE[0:0/20:4(8*Z*,11*Z*,14*Z*,17*Z*)]	62.44 ± 14.73[b]	77.55 ± 16.28[b]	91.51 ± 16.91[b]	124.35 ± 29.84[a]
docosapentaenoic acid	152.05 ± 43.91[a]	210.31 ± 49.62[a]	168.94 ± 55.36[a]	120.93 ± 38.47[a]
L-Proline	111.53 ± 25.72[a]	102 ± 21.26[a]	91.52 ± 13.64[b]	74.86 ± 10.67[b]
phytosphingosine	142.93 ± 36.28[a]	119.26 ± 24.96[a]	134.98 ± 23.55[a]	74.77 ± 13.82[b]
PC[o-16:1(9*Z*)/18:0]	132.63 ± 27.69[a]	151.71 ± 26.11[a]	275.8 ± 78.59[a]	165.63 ± 40.89[a]
SM(d18:1/16:0)	126.46 ± 17.7[a]	139.13 ± 19.47[a]	130.59 ± 18.38[a]	132.7 ± 26.18[a]
L-leucine	86.54 ± 11.78[b]	83.26 ± 18.38[b]	75.82 ± 10.85[b]	81.76 ± 14.68[b]
epinephrine	4.72 ± 1.34[b]	30.35 ± 10.79[b]	3.57 ± 1.04[b]	63.41 ± 19.2[b]
PC[14:0/22:1(13*Z*)]	115.69 ± 12.44[a]	110.38 ± 7.43[a]	122.59 ± 25.72[a]	115.97 ± 13.79[a]
SM[d18:1/22:1(13*Z*)]	175.32 ± 45.68[a]	238.66 ± 36.39[a]	236.93 ± 46.86[a]	202.5 ± 21.81[a]
PC[14:0/18:1(9*Z*)]	72.32 ± 15.31[b]	56.88 ± 12.58[b]	75.86 ± 15.37[b]	61.05 ± 5.63[b]
PC[16:1(9*Z*)/22:5(7*Z*,10*Z*,13*Z*,16*Z*,19*Z*)]	106.1 ± 15.39[a]	94.19 ± 12.71[b]	114.55 ± 21.69[a]	106.72 ± 12.55[a]

a/b:与对照组比较,纳米 TiO_2 不同剂量组的代谢产物明显上调/下调

表 3 小鼠血浆内不同生物标志物的相关检测信息(VIP > 1)

编号	代谢产物	VIP	*t*/min	离子峰	*m/z*
1	niacinamide	9.038 8	0.67	M + H	123.055 28
2	citrulline	4.765 5	10.02	M + H	176.102 96
3	arachidonic acid	4.186 3	8.77	M − H	303.232 95
4	hexadecasphinganine	3.318 4	5.94	M + H	274.274 05
5	linoleic acid	3.106 6	8.89	M − H	279.232 95
6	oleic acid	2.889 1	9.37	M − H	281.248 60
7	SM[d18:0/24:1(15*Z*)]	2.484	13.20	M + H	815.700 05
8	allysine	2.434 7	1.48	M + H	146.081 16
9	adenine	2.315 1	1.55	M + H	136.061 77

续表 3

编号	代谢产物	VIP	*t*/min	离子峰	*m/z*
10	*L*-acetylcarnitine	2.312 5	0.62	M + H	204.123 03
11	cholesterol sulfate	2.226 3	13.18	M + H	465.304 40
12	adenosine	2.136 9	8.80	M - H	268.104 03
13	histamine	2.075 6	9.77	M - H	112.086 92
14	SM(d18:1/22:0)	1.873	13.20	M + H	787.668 75
15	allopurinol	1.772 1	1.93	M + H	136.061 77
16	SM[d18:0/16:1(9*Z*)]	1.565 2	13.15	M + H	703.574 85
17	SM(d18:1/24:0)	1.526 9	13.20	M + H	816.707 87
18	PC[20:3(5*Z*,8*Z*,11*Z*)/20:3(5*Z*,8*Z*,11*Z*)]	1.401 5	13.20	M + H	834.600 73
19	LysoPC[16:1(9*Z*)]	1.381 7	6.76	M + H	494.324 11
20	octanoicacid,2-amino-	1.334 7	0.57	M + H	160.133 20
21	LysoPC[20:1(11*Z*)]	1.297 6	8.31	M + H	550.386 71
22	LysoPC(17:0)	1.151 8	7.74	M + H	510.355 41
23	SM(d17:1/24:0)	1.150 2	13.15	M + H	802.692 22
24	LysoPE[0:0/20:4(8*Z*,11*Z*,14*Z*,17*Z*)]	1.133 9	7.01	M + H	502.292 81
25	docosapentaenoic acid	1.122 4	8.82	M - H	329.248 60
26	*L*-proline	1.104 2	0.62	M + H	116.070 60
27	phytosphingosine	1.100 6	5.94	M + H	318.300 27
28	PC[o-16:1(9*Z*)/18:0]	1.099 9	8.86	M + H	746.605 81
29	SM(d18:1/16:0)	1.076 7	13.20	M + H	704.582 67
30	*L*-leucine	1.076	0.62	M - H	132.101 90
31	epinephrine	1.075 6	0.57	M + H	184.096 81
32	PC[14:0/22:1(13*Z*)]	1.066 9	13.20	M + H	788.616 38
33	SM[d18:1/22:1(13*Z*)]	1.062 4	13.20	M + H	785.653 10
34	PC[14:0/18:1(9*Z*)]	1.037 5	13.20	M + H	732.553 78
35	PC[16:1(9*Z*)/22:5(7*Z*,10*Z*,13*Z*,16*Z*,19*Z*)]	1.004 4	13.20	M - H	806.569 43

与对照组比,成年鼠各染毒剂量组的脂肪酰胺类[花生四烯酸(AA)、亚油酸、油酸、二十二碳五烯酸(EPA)、2-氨基辛酸]、鞘磷脂类{SM(d18:0/24:1,SM(d18:1/24:0),SM[d18:0/16:1(9*Z*)],SM(d18:1/16:0)SM[d18:1/22:1(13*Z*)],SM(d18:1/22:0),SM(d17:1/24:0)(15*Z*)}、植物鞘氨醇、甘油磷脂类{PC[o-16:1(9*Z*)/18:0],PC14:0/22:1(13*Z*)],PC[16:1(9*Z*)/22:5(7*Z*,10*Z*,13*Z*,16*Z*,19*Z*)],LysoPC[20:1(11*Z*)],LysoPC(17:0)}、*L*-乙酰肉碱、胆固醇硫酸盐、别嘌呤醇、脯氨酸含量均明显升高,并随剂量的增加,升高趋势越明显升高;尼克酰胺、赖氨酸、腺嘌呤、腺苷、组氨酸、亮氨酸、甘油磷脂类{(LysoPE[0:0/20:4(8*Z*,11*Z*,14*Z*,17*Z*)],PC[20:3(5*Z*,8*Z*,11*Z*)/20:3(5*Z*,8*Z*,11*Z*)],PC[14:0/18:1(9*Z*)]}含量均明显降低,并随剂量的增加,降低趋势越明显。这些代谢产物的变化差异预示着成年小鼠不同剂量染毒后,机体代谢功能发生了紊乱。

4.2 潜在生物标志物的验证 筛查潜在血浆生物标志物是临床诊断的一项重要任务,应用 ROC 曲线评价生物标志物的诊断准确性是常用的临床诊断统计方法[19-20]。0.9 和 0.7 之间的 AUC 代表某种生物标志物的诊断准确性,AUC > 0.9 生物标志物具有极高的准确性。ROC 曲线通过使用平衡子采样的蒙特卡罗交叉验证(MCCV)生成。在每个 MCCV 中,2/3 的样本用于评估特征重要性。然后使用前 2,3,5,10…100(最大)重要特征来构建分类模型,其在被省略的样品的 1/3 上验证。多次重复该过程计算每个模型的性能和置信区间。

多元化 ROC 曲线分析是基于 3 个多变量算法——支持向量机(SVM)、PLS-DA 和随机森林,该方法广泛应用于医学诊断试验性能的评价。通过改变诊断临界值,获得多对灵敏度与特异度值,以灵敏度为横坐标,1-特异度为纵坐标,绘制 ROC 曲线,计算 ROC 曲线下面积来评价诊断效率。ROC 曲线比较高剂量组与对照组血浆差异标志物的精密度和灵敏性见图 3。

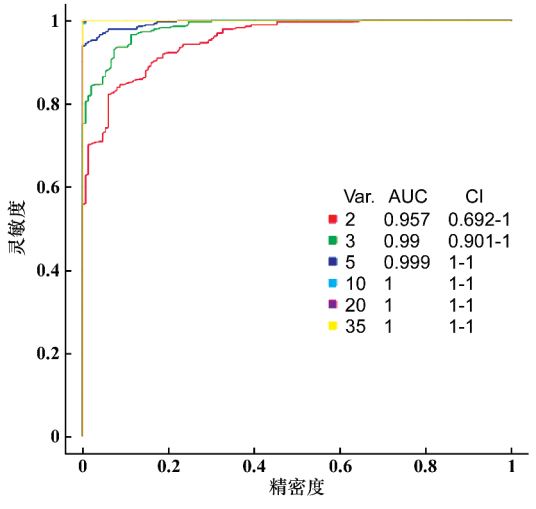


图 3 对照组和 300 mg·kg^{-1}剂量组小鼠血浆样本差异标志物多元化 ROC 曲线分析

5 应用相关性分析与分层聚表类分析分析血浆数据结果

5.1 血浆差异性标志物相关性分析结果 对成年小鼠血浆中差异标志物进行相关性分析(见图 4),水平轴和垂直轴均代表差异标志物的变量信息,颜色越深反映其差异标志物的相关性越强,红色表示正相关,绿色表示负相关,因此,根据图 4 可以明显看出差异性内源标志物之间的相关性强弱。从横轴看,在同一小分支下的差异标志物,它们的正相关性最强,即某一差异标志物含量升高或者降低,则与之相关性强的差异标志物会随之升高或降低。

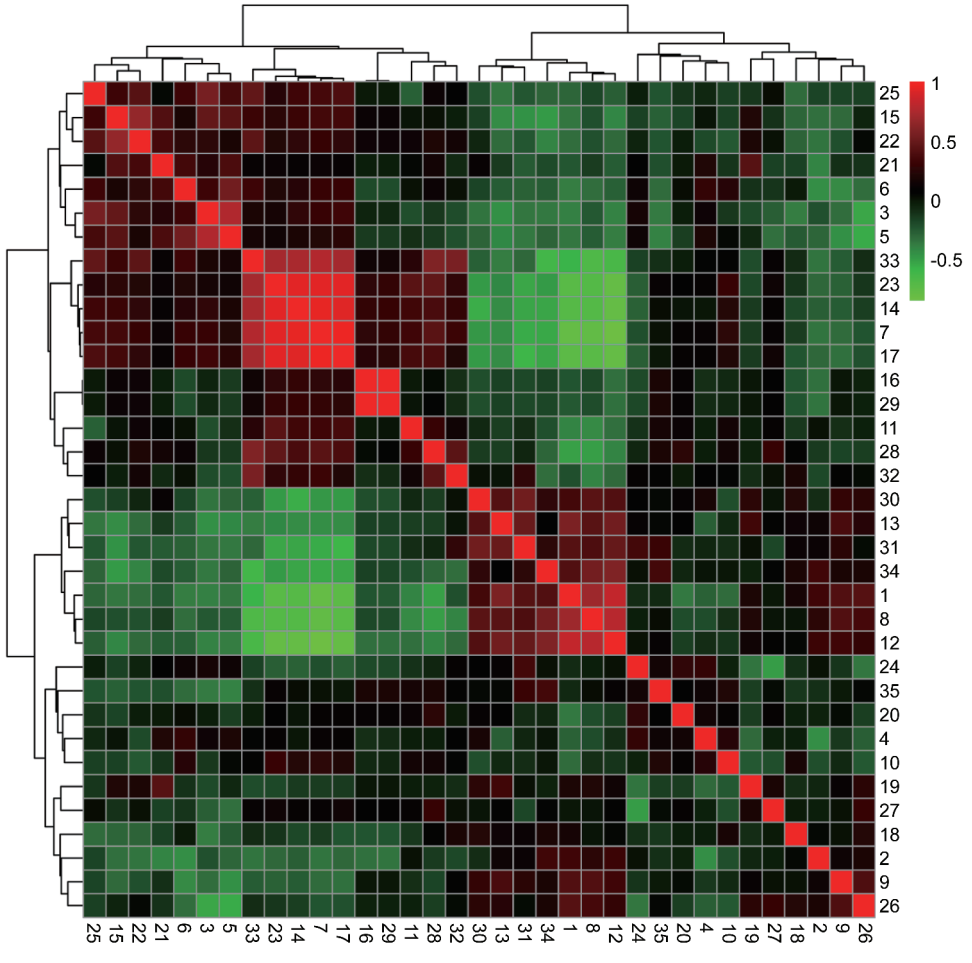


图 4 热图分析差异性标志物

5.2 血浆差异标志物分层聚类分析结果 分层聚类分析获得血浆差异标志物的热图见图 5,其可直观显示出成年小鼠差异标志物在各组间的含量相关性。图中纵向是样品的聚集,横向是代谢物的聚类,聚类枝越短代表相似性越高,从纵向聚类可以看出样品间代谢物含量的表达模式聚类。颜色深

浅反映代谢物之间相关大小，红色表示呈正相关，绿色表示呈负相关。从图 5 中可以看出，对照组与其他各组显著分开，各组均不在一个分支下面，其中对照组、各剂量组之间没有重叠，随着染毒剂量的增加，各组逐渐远离于对照组，表明给予纳米 TiO_2 后成年小鼠血浆部分内源性代谢模式发生改变，从一定程度上说明纳米 TiO_2 能够影响成年小鼠的代谢。

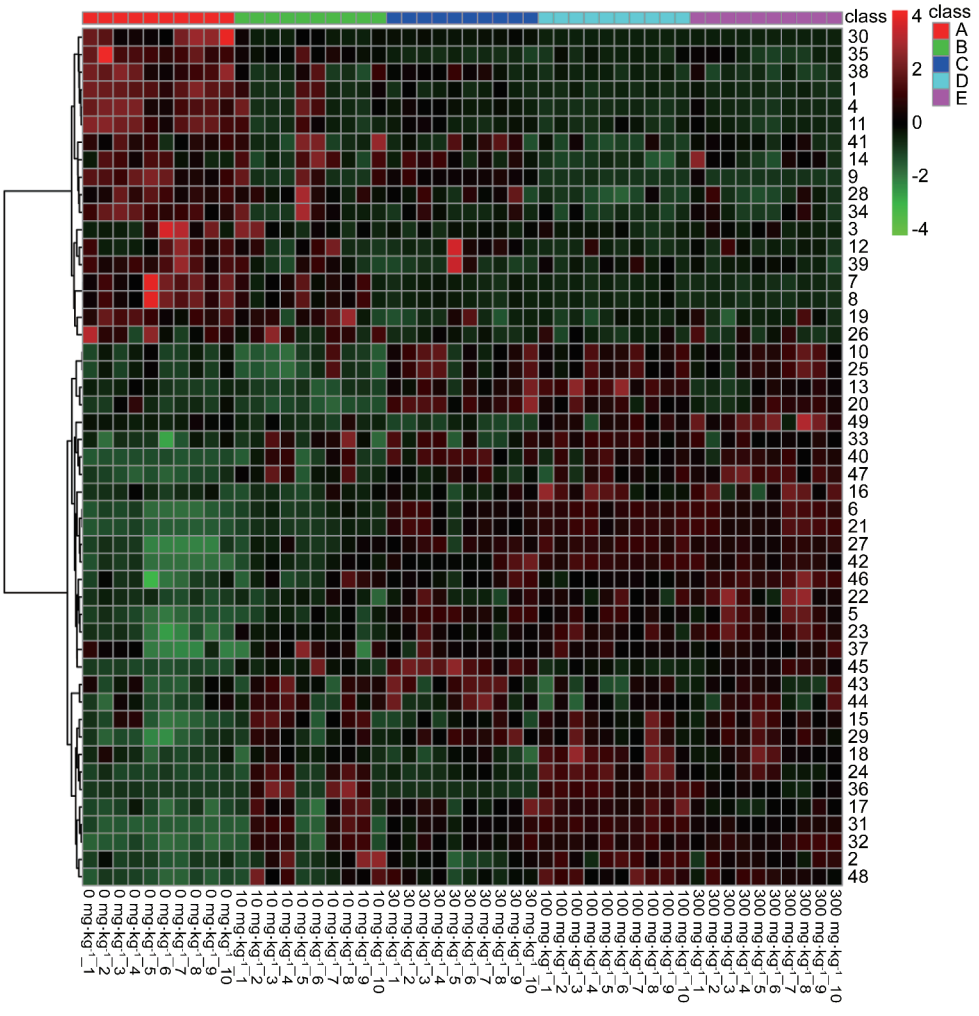


图 5　分层聚类分析各组小鼠血浆差异标志物

6　潜在生物标志物的代谢通路分析

利用 Metabo Analyst 3.3.0 网站对成年小鼠差异性代谢产物进行代谢通路分析，选择 KEGG 作为数据库，代谢通路影响值的临界设置为 0.10，>0.10 认为是潜在的靶标路径；经代谢通路拓扑分析发现亚油酸代谢、鞘脂代谢、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的生物合成、组氨酸代谢、AA 代谢、烟酸酯和烟酰胺代谢、甘油磷脂代谢等 7 条通路是差异性代谢通路（见图 6 和表 4）。表明在纳米 TiO_2 染毒的过程中成年小鼠体内上述代谢通路受到严重的影响。

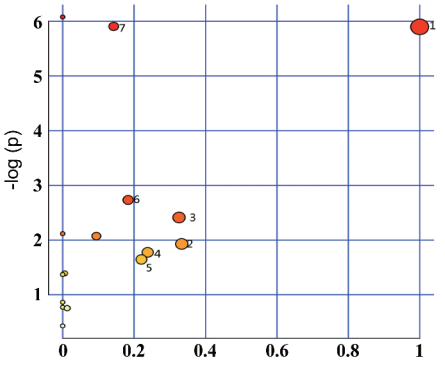


图 6　使用 MetPA 数据库构建差异标志物相关代谢通路

表 4 用 MetPA 构建分析通路结果

编号	通路	Total	Hits	影响值
1	linoleic acid metabolism	6	2	1.00
2	valine, leucine and isoleucine biosynthesis	11	1	0.33
3	arachidonic acid metabolism	36	2	0.33
4	nicotinate and nicotinamide metabolism	13	1	0.24
5	histidine metabolism	15	1	0.22
6	glycerophospholipid metabolism	30	2	0.18
7	sphingolipid metabolism	21	3	0.14

讨　论

本研究利用 UPLC-MS 高灵敏检测技术尝试从代谢组学的角度对纳米 TiO_2 进行安全性评价。对机体差异代谢物的监测有利于进一步阐述纳米 TiO_2 对成年小鼠毒性机制。以下围绕部分潜在靶点的生物学意义展开讨论。

研究发现,对照组和各染毒组小鼠血浆代谢组的整体轮廓存在明显差异,具有很好的区分度。共检出了 35 种差异代谢物,包括甘油磷脂类、鞘脂类、脂肪类、氨基酸及其衍生物类等。差异代谢物中,8 种属于甘油磷脂类,甘油磷脂包括磷脂酰胆碱(PC)类、PE 类等,是构成细胞膜结构的重要生物分子,参与大量生物调节过程,LPC 是 PC 在磷脂酶 A2(PLA2)作用下的水解产物,在炎症中起着至关重要的作用[21-22],它也是低密度脂蛋白的氧化型产物。不同剂量染毒后,小鼠体内甘油磷脂类代谢物出现不同程度的异常,这可能与纳米 TiO_2 能够诱导机体引起炎症反应和氧化损伤有关[23-24],与 AST,ALB,ALP 指标异常结果相一致。

鞘脂是细胞膜普遍存在的一类成分,参与细胞的多种细胞活动[25-26]。实验筛选出的 7 种显著性差异鞘脂均为鞘磷脂(sphingomyelins,SM)。鞘脂还作为重要的细胞信号转导分子也在诸如细胞生长、分化、衰老及死亡等过程中发挥重要作用[27-28],鞘脂可以在鞘磷脂酶的作用下生成 Cer,然后通过神经酰胺酶和鞘氨醇激酶的作用下转化为鞘氨醇和 1-磷酸鞘氨醇(SIP)[29-30]。1-磷酸鞘氨醇可以通过激活不同的信号通路介导多种生物过程[31]。1-磷酸鞘氨醇和鞘氨醇激酶与肥大细胞的活化、气道高反应性及气道炎症等有关[32],SM 的升高可能与纳米 TiO_2 能引起小鼠机体产生氧化应激相关[33]。

脂类代谢包括脂肪酸生物合成、脂肪酸伸长、脂肪酸降解、酮的合成和类固醇生物合成、AA 代谢、初级胆汁酸合成等多种途径。大量的差异性脂类及其衍生物在成年小鼠血浆内被检测并鉴定,包括 2-氨基辛酸、油酸、EPA、AA、亚油酸。亚油酸是动物机体不可缺少的不饱和脂肪酸,高浓度的亚油酸可以促进纤维细胞分泌炎性介质,释放出多种炎症因子[如肿瘤坏死因子(TNF)、白介素-1β(IL-1β)、白介素-6(IL-6)和白介素-8(IL-8)],进而引起局部炎症反应[34]。TNF 可以对不同组织的成纤维细胞产生不同的影响并且具有浓度依赖性,高浓度的亚油酸可以抑制成纤维细胞增殖[35-36]。IL-1β 能够抑制增生部位成纤维细胞的生长,却刺激正常皮肤成纤维细胞的生长,IL-6 对机体纤维细胞均起负调控作用[37]。亚油酸经转化生成 AA 和亚麻酸。在体内亚麻酸经脱氢酶、碳链延长酶的作用,生成一系列重要代谢产物(如 EPA)。因此,亚麻酸可以有效降低炎症疾病的发生率[38-39]。染毒后,观察到 AA、亚油酸、油酸,EPA,2-氨基辛酸含量升高,分析可能染毒后,机体细胞生物膜持续被破坏,无法正常及时修复所致,导致脂肪酸的蓄积加重了机体能量代谢的异常。这与纳米 TiO_2 可能会通过氧化应激来影响能量代谢结果相一致[40]。

在差异代谢物中,与氨基酸代谢有关的化合物有脯氨酸、尼克酰胺、赖氨酸、组氨酸、*L*-乙酰肉碱、亮氨酸等。亮氨酸为支链氨基酸(BCAA),BCAA 可以缓解肌肉的分解[41-42]。亮氨酸对于机体中肌肉蛋白的合成、骨骼肌微细损伤的修复、糖异生以及骨骼肌葡萄糖的摄取等方面都起着重要的调节作用[43]。去甲肾上腺素(NA)是用于间充质干细胞诱导分化的药物,同时具有抗氧化和抗炎作用,参与细胞多种生物学活动[44]。乙酰肉碱是脂类代谢的中间产物,在(酰基)酯酶 A 的作用下相互转化,参与了能量代谢和氧化反应[45]。赖氨酸在体内发挥着重要的生理功能,参与体内能量代谢过程,是生酮氨基酸之一,当体内缺乏碳水化合物时,可被分解为葡萄糖或酮体来提供能量;赖氨酸也是脂代谢中肉毒碱的前体物质,通过参与肉碱的生物合成改善神经细胞的能量代谢,从而增强细胞的抗氧化能力,降低细胞的氧化损伤[46-47]。与对照组相比,各染毒剂量组中脯氨酸和 *L*-乙酰肉碱含量升高,尼克酰胺、赖氨酸、组氨酸、亮氨酸含量降低,这些氨基酸的异常可能与纳米 TiO_2 能引起小鼠机体产生氧化应激相关。

本研究表明不同染毒剂量的纳米 TiO_2 能够影响成年小鼠的相关代谢：亚油酸代谢、鞘脂代谢、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的生物合成、组氨酸代谢、AA 代谢、烟酸酯和烟酰胺代谢、甘油磷脂代谢等，其毒性机制具有多通路、多靶点的特点。其次，本研究只观察了血浆的代谢组学特征，应进一步开展尿液、各脏器及不同周期染毒样本的研究，以准确反映纳米 TiO_2 的长期毒性作用机制。

[参 考 文 献]

[1] BAAN RA. Carcinogenic hazards from inhaled carbon black, titanium dioxide, and talc not containing asbestos or asbestiform fibers: recent evaluations by an IARC monographs working group [J]. *Inhal Toxicol*, 2007, 19(Suppl 1): S213 - S228.

[2] SHI HB, MAGAYE R, CASTRANOVA V, *et al*. Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data[J]. *Part Fibre Toxicol*, 2013, 10(1): 15.

[3] 张永亮，殷钰欣，叶艺璇，等. 不同粒径二氧化钛短期摄入对幼年大鼠小肠铁和葡萄糖吸收的影响[J]. 环境与职业医学，2017,34(9)：778 - 784.

[4] BOUWMEESTER H, DEKKERS S, NOORDAM MY, *et al*. Review of health safety aspects of nanotechnologies in food production[J]. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2009, 53(1): 52 - 62.

[5] FRÖHLICH E, ROBLEGG E. Models for oral uptake of nanoparticles in consumer products[J]. *Toxicology*, 2012, 291(1 - 3): 10 - 17.

[6] LAM CW, JAMES JT, MCCLUSKEY R, *et al*. Pulmonary toxicity of single-wall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation[J]. *Toxicol Sci*, 2004, 77(1): 126 - 134.

[7] ZHANG Q, KUSAKA Y, SATOK, *et al*. Differences in the extent of inflammation caused by intratracheal exposure to three ultrafine metals: role of free radicals[J]. *J Toxicol Environ Heal Part A*, 1998, 53(6): 423 - 438.

[8] OBERDÖRSTER G, FERIN J, GELEIN R, *et al*. Role of the alveolar macrophage in lung injury: studies with ultrafine particles[J]. *Environ Health Perspect*, 1992, 97: 193 - 199.

[9] COLVIN VL. The potential environmental impact of engineered nanomaterials[J]. *Nat Biotechnol*, 2003,21(10):1166 - 1170.

[10] SERVICE RF. Is nanotechnology dangerous? [J]. *Science*,2000, 290(5496): 1526 - 1527.

[11] 丁玲，刘鹏，李世迁. 纳米材料毒性和安全性研究进展[J]. 材料导报，2010，24(5)：29 - 44.

[12] DONALDSON K. Nanotoxicology[J]. *Occup Environ Med*,2004, 61(9): 727 - 728.

[13] LINDON JC, HOLMES E, NICHOLSON JK. Pattern recognition methods and applications in biomedical magnetic resonance[J]. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc*, 2001, 39(1): 1 - 40.

[14] NICHOLSON JK, CONNELLY J, LINDON JC, *et al*. Metabonomics: aplatform for studying drug toxicity and gene function [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2002, 1: 153 - 161.

[15] XIE W, ZHANG W, REN J, *et al*. Metabonomics indicates inhibition of fatty acid synthesis, β-oxidation, and tricarboxylic acid cycle in triclocarban-induced cardiac metabolic alterations in male mice[J]. *J Agric Food Chem*, 2018, 66(6): 1533 - 1542.

[16] ZHOU LL, ZHANG WP, XIE WP, *et al*. Tributyl phosphate impairs the urea cycle and alters liver pathology and metabolism in mice after short-term exposure based on a metabonomics study [J]. *Sci Total Environ*, 2017, 603(604): 77 - 85.

[17] SHEN GL, ZHOU LL, LIU W, *et al*. Di(2-ethylhexyl) phthalate alters the synthesis and β-oxidation of fatty acids and hinders ATP supply in mouse testes via UPLC-Q-exactive orbitrap MS-based metabonomics study[J]. *J Agric Food Chem*, 2017, 65(24): 5056 - 5063.

[18] 姬海南，王朋倩，吴茵，等. 基于 UHPLC-MS 的吴茱萸汤影响虚寒呕吐大鼠尿液代谢谱的研究[J]. 中草药，2019，50(18)：4352 - 4363.

[19] WU H, XUE RY, TANG ZQ, *et al*. Metabolomic investigation of gastric cancer tissue using gas chromatography/mass spectrometry[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2010, 396(4): 1385 - 1395.

[20] LI YJ, SONG X, ZHAO XJ, *et al*. Serum metabolic profiling study of lung cancer using ultra high performance liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*,2014,966: 147 - 153.

[21] FUCHS B, BONDZIO A, WAGNER U, *et al*. Phospholipid compositions of sera and synovial fluids from dog, human and horse: a comparison by 31P-NMR and MALDI-TOF MS[J]. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*, 2009, 93(4): 410 - 422.

[22] FUCHS B, SCHILLER J, WAGNER U, *et al*. The phosphatidylcholine/lysophosphatidylcholine ratio in human plasma is an indicator of the severity of rheumatoid arthritis: investigations by 31P NMR and MALDI-TOF MS[J]. *Clin Biochem*, 2005, 38(10): 925 - 933.

[23] 周迪，陈章健，胡贵平，等. 纳米二氧化钛亚急性经口暴露对大鼠氧化/抗氧化生物标志和炎性因子的影响[J]. 北京大学学报(医学版)，2020，52(5)：821 - 827.

[24] 宋明芬，王玉文，王翀，等. 纳米二氧化钛致小鼠肝组织 DNA 氧化损伤的研究[J]. 环境与职业医学，2015，32(4)：358 - 361.

[25] HANNUN YA, OBEID LM. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008, 9(2): 139 - 150.

[26] HARVALD EB, OLSEN ASB, FÆRGEMAN NJ. Autophagy in the light of sphingolipid metabolism[J]. *Apoptosis*, 2015, 20(5): 658 - 670.

[27] AOKI M, AOKI H, RAMANATHAN R, *et al*. Sphingosine-1-phosphate signaling in immune cells and inflammation: roles and therapeutic potential[J]. *Mediat Inflamm*, 2016, 2016: 1 - 11.

[28] HUANG FC. De Novo sphingolipid synthesis is essential for Salmonella-induced autophagy and human beta-defensin 2 expression in intestinal epithelial cells[J]. *Gut Pathog*, 2016, 8: 5.

[29] NISHIUMA T, NISHIMURA Y, OKADA T, *et al*. Inhalation of sphingosine kinase inhibitor attenuates airway inflammation in asthmatic mouse model[J]. *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol*, 2008, 294(6): L1085 - L1093.

[30] UHLIG S, GULBINS E. Sphingolipids in the lungs[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2008, 178(11): 1100 - 1114.

[31] SANCHEZ T, HLA T. Structural and functional characteristics of S1P receptors[J]. *J Cell Biochem*, 2004, 92(5): 913 - 922.

[32] SALUJA R, KUMAR A, JAIN M, *et al*. Role of sphingosine-1-phosphate in mast cell functions and asthma and its regulation by non-coding RNA[J]. *Front Immunol*, 2017, 8: 587.

[33] BORM PJ, KREYLING W. Toxicological hazards of inhaled nanoparticles-potential implications for drug delivery[J]. *J Nanosci Nanotechnol*, 2004, 4(5):521 - 531.

[34] 江琼，吴伯瑜，陈晓东. 亚油酸对成纤维细胞增殖和分泌炎症介质影响的实验研究[J]. 中华损伤与修复杂志(电子版)，2011,6(5)：731 - 739.

[35] DEMIRJIAN L, ABBOUD RT, LI H, *et al*. Acute effect of cigarette smoke on TNF-alpha release by macrophages mediated through the erk1/2 pathway[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1762(6): 592 - 597.

[36] GROTENDORST GR, DUNCAN MR. Individual domains of con-

nective tissue growth factor regulate fibroblast proliferation and myofibroblast differentiation[J]. *Faseb J*, 2005, 19(7): 729 – 738.

[37] 徐少骏, 王志刚, 鲍卫汉. 瘢痕疙瘩和正常皮肤成纤维细胞对白介素-1β 和白介素-6 的反应[J]. 中华整形烧伤外科杂志, 1998, 14(1): 23 – 25.

[38] 李英霞, 武继彪, 钟方晓. α-亚麻酸的研究进展[J]. 中草药, 2001, 32(7):667.

[39] 徐丁洁, 徐洪, 赵舒, 等. 基于 GC-TOFMS 的虚寒证原发性痛经患者尿液代谢组学[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013,19(13): 182 – 185.

[40] ZHAO JY, DINGWJ, ZHANG F. Effect of nano-sized TiO_2 particles on rat kidney function by metabonomic approach[J]. *J Toxicol*, 2009, 23(3): 201 – 204.

[41] YUEN KCJ, BILLER BMK, MOLITCH ME, *et al*. Is lack of recombinant growth hormone (GH)-releasing hormone in the United States a setback or time to consider glucagon testing for adult GH deficiency? [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2009, 94(8): 2702 – 2707.

[42] 史仍飞, 袁海平. 支链氨基酸代谢与运动[J]. 上海体育学院学报, 2003, 27(5): 65 – 67.

[43] HAN X, PATTERS AB, JONES DP, *et al*. The taurine transporter: mechanisms of regulation[J]. *Acta Physiol (Oxf)*, 2006, 187(1 – 2): 61 – 73.

[44] 穆长征, 李宏丹, 蔡红玉, 等. 尼克酰胺与胰腺损伤提取物诱导小鼠骨髓间充质干细胞分化为胰岛素产生细胞的比较[J]. 解剖学报, 2010,41(6): 852 – 856.

[45] 彭琳秀, 陈良慧, 狄留庆, 等. 基于 UPLC/LTQ-Orbitrap-MS 技术的复方祖师麻片抗类风湿关节炎的血浆代谢组学研究[J]. 中草药, 2017, 48(10): 1964 – 1970.

[46] ZHANG R, ZHANG H, ZHANG Z, *et al*. Neuroprotective effects of pre-treatment with l-carnitine and acetyl-L-carnitine on ischemic injury *in vivo* and *in vitro*[J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13(2): 2078 – 2090.

[47] 赵湘云, 刘承斌, 吴运东, 等. 用于基因传输的聚合物载体研究进展[J]. 中国医药工业杂志, 2007, 4(12): 885 – 889.

编辑: 刘卓越/接受日期: 2020 – 11 – 27