

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20150307005

耿柠波, 张海军, 张保琴, 等. 短链氯化石蜡暴露对 HepG2 细胞代谢的影响[J]. 生态毒理学报, 2015, 10(4): 115-122

Geng N B, Zhang H J, Zhang B Q, et al. Effects of SCCPs exposure on the metabolism in HepG2 cells [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2015, 10(4): 115-122 (in Chinese)

短链氯化石蜡暴露对 HepG2 细胞代谢的影响

耿柠波^{1,2}, 张海军^{1,#}, 张保琴¹, 王菲迪^{1,2}, 任晓倩^{1,2}, 陈吉平^{1,*}

1. 中国科学院大连化学物理研究所, 大连 116023

2. 中国科学院大学, 北京 100049

收稿日期: 2015-03-07 录用日期: 2015-05-21

摘要: 短链氯化石蜡 (short-chain chlorinated paraffins, SCCPs) 是一组成分复杂的氯代正构烷烃, 在环境中普遍存在。然而有关其毒性机理的信息十分有限, 限制了对健康风险的评估。本研究采用液相色谱-串联质谱 (LC-MS/MS) 分析技术, 研究了不同剂量的 SCCPs 暴露 (0、1.0、10.0 和 100.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; C_{13} -CPs; 55.0% Cl) 对人体肝癌细胞 HepG2 的糖代谢、氨基酸代谢和脂肪酸代谢的影响。通过偏最小二乘判别分析 (PLS-DA) 鉴别各组代谢产物谱差异, 发现 3 个 SCCPs 暴露剂量组均能够与对照组完全分开, 表明 SCCPs 短期暴露能够引起细胞代谢活动的显著改变。SCCPs 的低剂量暴露可明显刺激 HepG2 细胞对氨基酸的吸收。与对照组相比, SCCPs 低剂量暴露组 (1.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 培养基中谷氨酰胺、色氨酸和丝氨酸的含量显著 ($P < 0.05$) 降低。而高剂量 SCCPs (100.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 暴露抑制了细胞对氨基酸和葡萄糖吸收, 但促进了乳酸、丙氨酸、半胱氨酸的生成。氨基酸吸收的抑制不可避免地会影响蛋白质的合成。同时, SCCPs 的暴露使饱和脂肪酸代谢紊乱, 使不饱和脂肪酸水平上调。为确定 SCCPs 的毒性作用方式, 有必要从转录组和蛋白组层面进一步研究其毒性机制。

关键词: SCCPs; HepG2; 代谢物; 氨基酸代谢; 脂肪酸代谢

文章编号: 1673-5897(2015)4-115-08 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Effects of SCCPs Exposure on the Metabolism in HepG2 Cells

Geng Ningbo^{1,2}, Zhang Haijun^{1,#}, Zhang Baoqin¹, Wang Feidi^{1,2}, Ren Xiaoqian^{1,2}, Chen Jiping^{1,*}

1. Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China

2. Graduate School of Chinese Academy of Science, Beijing 100049, China

Received 7 March 2015 accepted 21 May 2015

Abstract: Short chain chlorinated paraffins (SCCPs, C_{10-13}) are a large and complex group of polychlorinated *n*-alkanes, and ubiquitously found in the environment. However, very limited information is available for their toxicity mechanism, limiting the evaluation of their health risks. In this study, liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) was adopted to investigate the influence of SCCPs exposure with different doses (0, 1.0, 10.0 and 100.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; C_{13} -CPs; 55.0% Cl) on the metabolism of glucose, amino acids and fatty acids in human hepatoma HepG2 cells. The result of partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) showed that all SCCPs exposure groups were clearly distinct from the control group, indicating a significant metabolic perturbation in-

基金项目: 国家“863”项目 (2013AA065203); 国家自然科学基金 (21337002, 21277141)

作者简介: 耿柠波 (1985-), 女, 博士研究生, 研究方向为环境毒理学, E-mail: gengningbo@dicp.ac.cn;

* 通讯作者 (Corresponding author), E-mail: chenjp@dicp.ac.cn

共同通讯作者 (Co-corresponding author), E-mail: hjzhang@dicp.ac.cn

duced by SCCPs. Low-dose SCCPs exposure promoted the import of extracellular amino acids into cells. Compared with the control group, the contents of glutamine, tryptophan and serine in the culture medium of low-dose SCCPs exposure group ($1.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) were significantly decreased ($P<0.05$). However, the high-dose SCCPs exposure ($100.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) inhibited the transport of amino acids and glucose into cells, and significantly up-regulated the biosynthesis of lactic acid, alanine and cysteine. The disorder of amino acids metabolism would inevitably affect the protein biosynthesis. Meanwhile, SCCPs perturbed the metabolism of unsaturated fatty acids, and markedly up-regulated the contents of polyunsaturated fatty acids. In order to make sure the mode of action of SCCPs, transcriptomic and proteomic evidences on SCCPs toxicity should be further provided.

Keywords: SCCPs; HepG2; metabolites; amino acid metabolism; fatty acid metabolism

短链氯化石蜡(short-chain chlorinated paraffins, SCCPs)是链长为10~13个碳原子,氯化程度在30%~70%的氯化石蜡,其组成复杂,具有远距离环境迁移能力、环境持久性、生物蓄积性等 POPs 特性^[1-2]。2006年,SCCPs被欧盟等成员国提议列为持久性有机污染物(POPs)候选物质。SCCPs被广泛用作金属加工润滑剂、增塑剂、塑料添加剂、皮革加脂剂以及阻燃剂等,并在生产和使用过程中释放进入环境,在各种环境介质均能检测到 SCCPs^[3-6]。在中国辽东半岛地区,SCCPs在土壤中的含量为 $57\sim 189 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1} \text{ dw}$ ^[5],在沉积物中的含量为 $65\sim 541 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1} \text{ dw}$,在水生生物体内含量为 $1.6\sim 7.0 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1} \text{ dw}$ ^[7]。研究表明,SCCPs在地表水中的含量约为 $0\sim 1.7 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[8]。在英国的人类母乳样本中也检出了 SCCPs,其浓度为 $49\sim 820 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ 脂重^[9]。过去的几十年内,美国、欧盟和日本已对 SCCPs 的生态风险和人体健康风险进行了初步的评估。已有的动物试验研究表明,SCCPs能增加啮齿类动物肝脏、甲状腺、肾脏腺瘤和癌发病率^[3],并使肝细胞中过氧化物酶体增殖,同时使肝细胞中尿苷二磷酸葡萄糖醛酸基转移酶的活性增加,从而导致血浆中甲状腺激素增加^[10-11];SCCPs对水生动物的毒性较大,在 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 水平就具有慢性毒性效应。对虹鳟鱼的慢性毒性主要表现为肝组织损伤^[12]。到目前为止,SCCPs的毒性作用机制尚不明确,系统的毒性评价依然缺乏,人类细胞暴露于 SC-CPs的潜在健康风险评估还鲜有报道。

SCCPs对器官组织功能、酶活性和内分泌的一系列影响可灵敏地反映在对生物体氨基酸、脂肪酸、糖和其他小分子化合物代谢的影响。近年来。随着生物体代谢物数据库的不断完善,以及小分子代谢物生物学特性研究的不断发展,从代谢层面对环境污染物的毒性进行研究更具有生物学意义。目前尚没有涉及 SCCPs 对生物体代谢影响的研究。本实

验选择人肝癌细胞 HepG2 为受试细胞,探讨了环境浓度 SCCPs 暴露对细胞小分子代谢物的干扰作用,通过对糖代谢、氨基酸和脂肪酸代谢干扰的评估,在代谢组层面揭示 SCCPs 的毒性效应。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 实验材料

细胞培养基(DMEM)和胎牛血清(FBS)购自美国 Gibco 公司,青霉素-链霉素购自 Hyclone 公司(Logan, UT)。MTT (3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐)购自美国 AMRESCO 公司,纯度 $>98\%$;二甲基亚砜(DMSO)和甲醇等其他化学试剂均为国产色谱纯试剂。脂肪酸、氨基酸、乳酸、尿素、葡萄糖和甘油等标样、以及甲基叔丁基醚(MTBE)购自阿拉丁试剂公司。色谱纯乙酸铵和甲酸购自百灵威公司。色谱纯乙腈和甲醇购自 Fisher 公司(Fair Lawn, NJ, USA)。所有的实验用水均为来自 Milli-Q 系统的超纯水(Millipore, Billerica, MA, USA)。所用 SCCPs 为 C_{13} -CP,氯含量为 55% ,在实验室通过烷烃氯化反应得到^[13]。

1.2 受试生物

HepG2 细胞购自中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所。细胞培养所用培养基为含有 10% 胎牛血清, 1% 双抗的 DMEM (体积分数)。取对数生长期的细胞,用胰蛋白酶消化后,将细胞数调整到 3×10^5 细胞每孔,种植于6孔培养板中,置于培养箱内($37\text{ }^\circ\text{C}$, $5\% \text{ CO}_2$)培养。待6孔板铺满 80% 后吸弃原培养基,换上含有 SCCPs 的培养基培养 24 h 。SCCPs通过溶于 DMSO 引入细胞培养液, DMSO 在培养基中的最终含量为 0.05% (体积分数),4个剂量组 SCCPs 含量分别为 0 、 1.0 、 10.0 和 $100.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,每组设6个平行样,对照组只加入体积分数为 0.05% 的 DMSO。

1.3 实验仪器

Galaxy 48 R 型 CO₂ 培养箱(美国 New Brunswick 公司), Tecan 多功能酶标仪(Tecan Genesis, 瑞士), Biofuge[®] Stratos 全能台式高速冷冻离心机(德国 Heraeus 公司), TSQ-QuantumMax 高效液相色谱串联质谱(HPLC-MS/MS)(美国 Thermo 公司)。

1.4 实验方法

代谢物提取参考 Whiley 等^[14]建立的小分子代谢物提取方法。细胞暴露 24 h 后,将细胞培养液移至 2 mL 离心管中,6 000 g × 4 °C 条件下离心 10 min,取上清液 200 μL 冻干,加入 400 μL MTBE 室温条件下涡旋提取 20 min;然后加入 260 μL 超纯水混匀,10 000 g × 4 °C 条件下离心 15 min,取上清 350 μL 于样品管中氮气吹干,用 350 μL 乙腈复溶,经过 0.22 μm 滤膜过滤后用于非极性组分的分析。剩余部分用于极性组分的提取,依次加入 100 μL MTBE 和 130 μL 甲醇。室温条件下涡旋 20 min,10 000 g × 4 °C 条件下离心 15 min,提取体系明显分层,上层为 MTBE 相,下层为甲醇-水相。从下层甲醇-水相中取 200 μL 经过 0.22 μm 滤膜过滤后,

直接用于极性组分的分析。提取前于样品中加入 10 μL 混合内标(正亮氨酸,十一酸和十九酸,浓度分别为 200,54 和 34 μmol·L⁻¹,溶剂为乙腈)。

游离脂肪酸组分的分析采用的色谱柱为 Ufavour C8 柱(150 mm×2.1 mm, 3.0 μm);流动相 A 为 H₂O, B 为 5 mmol·L⁻¹ 乙酸钠的乙腈, C 为乙腈;流动相梯度为(时间, B%, C%, 流速): 0~5 min, 20% B, 70% C, 250 μL·min⁻¹; 7~15 min, 20% B, 80% C, 250 μL·min⁻¹; 16~20 min, 20% B, 70% C, 300 μL·min⁻¹; 柱温箱温度为 40 °C, 进样量为 10 μL。质谱扫描模式为 ESI(-)MRM。喷雾电压为 2 500 V;辅助气为 5 psi;鞘气为 30 psi;整个分析过程在 20 min 内完成。游离氨基酸组分的分析采用 Atlantis C18 高效液相色谱柱(waters, 150 mm×2.1 mm, 3.0 μm);流动相 A 为 0.5% 甲酸的 H₂O, 流动相 B 为甲醇;流动相梯度为: 0~2 min, 95% A 和 5% B;然后在 3 min 之内 A 减少为 40%, B 增加为 60%, 维持 4 min;在 1 min 内 A 增加到 95%, 维持 8 min, 总流速为 200 μL·min⁻¹, 进样量为 2 μL。质谱扫描模式为 ESI(+)MRM。喷雾电压为 3000 V;辅助气

表 1 极性组分分析的 MS/MS 参数

Table 1 The MS/MS parameters for polar fraction analysis

名称 Name	扫描模式 Scan mode	母离子/(m·z ⁻¹) Precursor ion/(m·z ⁻¹)	子离子/(m·z ⁻¹) Product ion/(m·z ⁻¹)	碰撞能/eV Collision energy/eV	透镜电压/V Tube lens voltage/V
甘氨酸 Glycine	+	76.0	30.7	12	51
丙氨酸 Alanine	+	90.0	44.5	9	48
丝氨酸 Serine	+	106.0	60.5	11	68
脯氨酸 Proline	+	116.0	70.3	13	60
缬氨酸 Valine	+	118.0	72.2	7	68
苏氨酸 Threonine	+	120.0	103.3	15	64
半胱氨酸 Cysteine	+	122.0	105.1	10	72
亮氨酸 Leucine	+	132.0	86.4	6	70
异亮氨酸 Isoleucine	+	132.0	86.4	6	70
正亮氨酸 Norleucine	+	132.0	86.4	6	70
天冬酰胺 Asparagine	+	133.0	74.4	5	60
天冬氨酸 Aspartate	+	134.0	116.2	6	86
谷氨酰胺 Glutamine	+	147.0	130.2	16	72
赖氨酸 Lysine	+	147.0	84.3	16	84
谷氨酸 Glutamate	+	148.0	130.2	9	76
甲硫氨酸 Methionine	+	150.0	133.2	5	73
组氨酸 Histidine	+	156.0	110.2	15	75
苯丙氨酸 Phenylalaine	+	166.0	120.2	11	70
精氨酸 Arginine	+	175.0	70.4	22	72
酪氨酸 Tyrosine	+	182.0	136.1	11	78
色氨酸 Tryptophan	+	205.0	146.2	16	80
尿素 Urea	+	61.2	44.6	20	88
甘油 Glycerol	+	93.2	45.4	19	58
乳酸 Lactate	+	91.1	45.4	9	30
葡萄糖 Glucose	-	179.0	89.0	11	62

表2 非极性组分分析的 MS/MS 参数

Table 2 The MS/MS parameters for apolar fraction analysis

名称 Name	扫描模式 Scan mode	母离子/($m \cdot z^{-1}$) Precursor ion/($m \cdot z^{-1}$)	子离子/($m \cdot z^{-1}$) Product ion/($m \cdot z^{-1}$)	碰撞能/eV Collision energy/eV	透镜电压/V Tube lens voltage/V
己酸 Hexanoic acid	-	115	115	6	96
辛酸 Octanoic acid	-	143	143	5	66
癸酸 Capric acid	-	171	171	6	82
十一烷酸 Undecanoic acid	-	185	185	10	73
十二烷酸 Lauric acid	-	199	199	8	55
十四烷酸 Myristic acid	-	227	227	7	64
十六烷酸 Palmitic acid	-	255	255	11	63
十八碳三烯酸 Linolenic acid	-	277	277	6	40
十八碳二烯酸 Linoleic acid	-	279	279	10	51
十八碳一烯酸 Oleic acid	-	281	281	12	47
十八烷酸 Stearic acid	-	283	283	5	54
十九烷酸 Nonadecanoic acid	-	297	297	18	91
二十碳五烯酸 Eicosapentaenoic acid	-	301	301	6	77
二十碳四烯酸 Arachidonic acid	-	303	303	12	58
二十碳三烯酸 Epoxyeicosatrienoic acids	-	305	305	9	46
二十碳二烯酸 Eicosadienoic acid	-	307	307	7	46
二十碳一烯酸 Eicosenoic acid	-	309	309	15	98
二十烷酸 Arachidic acid	-	311	311	15	77
二十二碳六烯酸 Docosahexaenoic acid	-	327	327	5	54
二十二碳四烯酸 Adrenic acid	-	331	331	12	87
二十四烷酸 Tetracosanoic acid	-	367	367	11	62

为 5 psi;鞘气为 30 psi;整个分析过程 18 min 内完成。

1.5 数据处理

利用 Thermo fisher Xcalibur 2.1 数据处理软件进行定量分析,SPSS18 统计软件(SPSS Inc., Chicago, IL)用于单因素方差分析(one way ANOVA),实验组数据与对照组数据之间的比较采用最小显著差数法(LSD), $P < 0.05$ 被认为是显著性差异的数据, $P < 0.01$ 表示差异极显著。偏最小二乘判别分析(PLS-DA)基于网络在线分析系统(<http://www.metaboanalyst.ca/MetaboAnalyst/faces/Home.jsp>)。

2 结果 (Results)

2.1 小分子代谢产物的 PLS-DA 分析

为探讨 SCCPs 暴露是否对 HepG2 细胞带来影响。分别对不同剂量暴露组和对照组细胞的小分子代谢产物数据进行了 PLS-DA 分析,并建立包含第一个主成分(component 1)和第二个主成分(component 2)的二维空间模型,结果如图 1 所示。其中表示模型解释能力的参数 $R^2 = 0.87$,表示模型预测能力的参数 $Q^2 = 0.65$,表明该模型结果可靠,不存在过拟合现象。从图 1 可见,3 个 SCCPs 暴露剂量组均能够与对照组明显区分开,表明 SCCPs 短期暴露能够引起细胞代谢活动的变化,使细胞小分子代谢物

发生改变。在 3 个 SCCPs 暴露剂量组中,低剂量组($1.0 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)和中剂量组($10.0 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)在得分图上有明显的重合,但均能与高剂量组($100.0 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)区分开,表明 SCCPs 对细胞小分子代谢物的干扰存

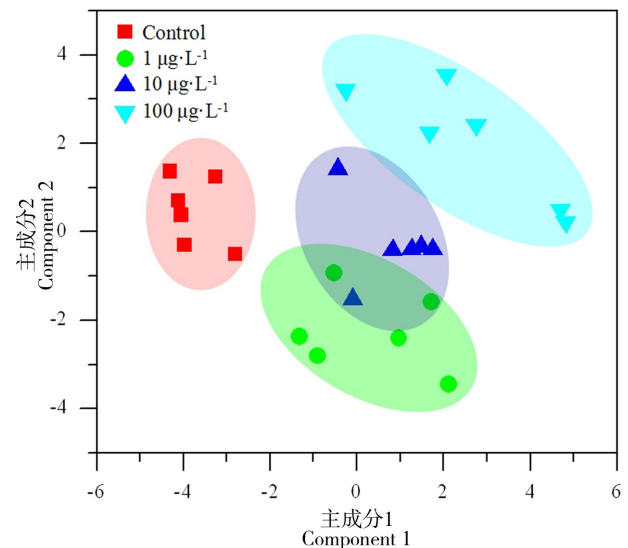


图1 SCCPs 暴露组与对照组小分子代谢产物的 PLS-DA 得分图

Fig. 1 PLS-DA score plot of metabolites for control and SCCPs exposure groups

在一定的剂量依赖性。

2.2 小分子代谢产物的聚类分析

对 22 种显著变化的小分子代谢物进行聚类分析,结果如图 2 所示。细胞的代谢物主要表现出 3 种变化趋势。与对照组相比,大部分不饱和脂肪酸,以及半胱氨酸,丙氨酸,缬氨酸,乳酸和葡萄糖在 SCCPs 暴露组中呈现增加趋势。饱和脂肪酸,如癸酸(10:0),十二烷酸(12:0),十六烷酸(16:0),十八烷酸(18:0)和二十烷酸(20:0),随 SCCPs 暴露剂量的增加表现出非单调变化趋势;从低剂量组到中剂量组,饱和脂肪酸含量变化趋势为先降低后升高,当暴露剂量增加到 $100.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,其含量出现反弹。第 3 组包括谷氨酸,苏氨酸,异亮氨酸,苯丙氨酸,丝氨酸,赖氨酸,色氨酸和谷氨酰胺,与对照组相比,这些代谢产物在低中高 3 个 SCCPs 暴露剂量组均呈现降低趋势。

在生物体内每种小分子代谢产物都参与多种代

谢通路,受到胁迫后其含量的变化会呈现单调和非单调剂量效应关系,这一现象在代谢组学研究中多有报道^[15]。在本研究中,随着 SCCPs 暴露剂量的增加,某些氨基酸和脂肪酸含量出现波动并表现出非单调剂量效应关系,暗示细胞在 SCCPs 的毒性作用下进行了自我调控。这可能是由于 SCCPs 的多个毒性作用通路共同作用的结果。另外,受到小剂量有害刺激后,细胞会产生预适应,在应激后一段时间内产生保护作用^[16],这也是细胞代谢波动的原因。

2.3 对细胞葡萄糖和氨基酸代谢的影响

图 3 显示了 SCCPs 暴露 24 h 后几个重要差异代谢物的浓度变化情况。其中葡萄糖、谷氨酰胺、色氨酸和丝氨酸为细胞培养基中添加的营养物质;乳酸、丙氨酸、谷氨酸和半胱氨酸为细胞合成物质;葡萄糖、乳酸和丙氨酸是糖酵解的中间代谢产物。与对照组相比,SCCPs 高剂量暴露组的葡萄糖水平略有升高,意味着葡萄糖代谢被抑制。细胞中的乳酸

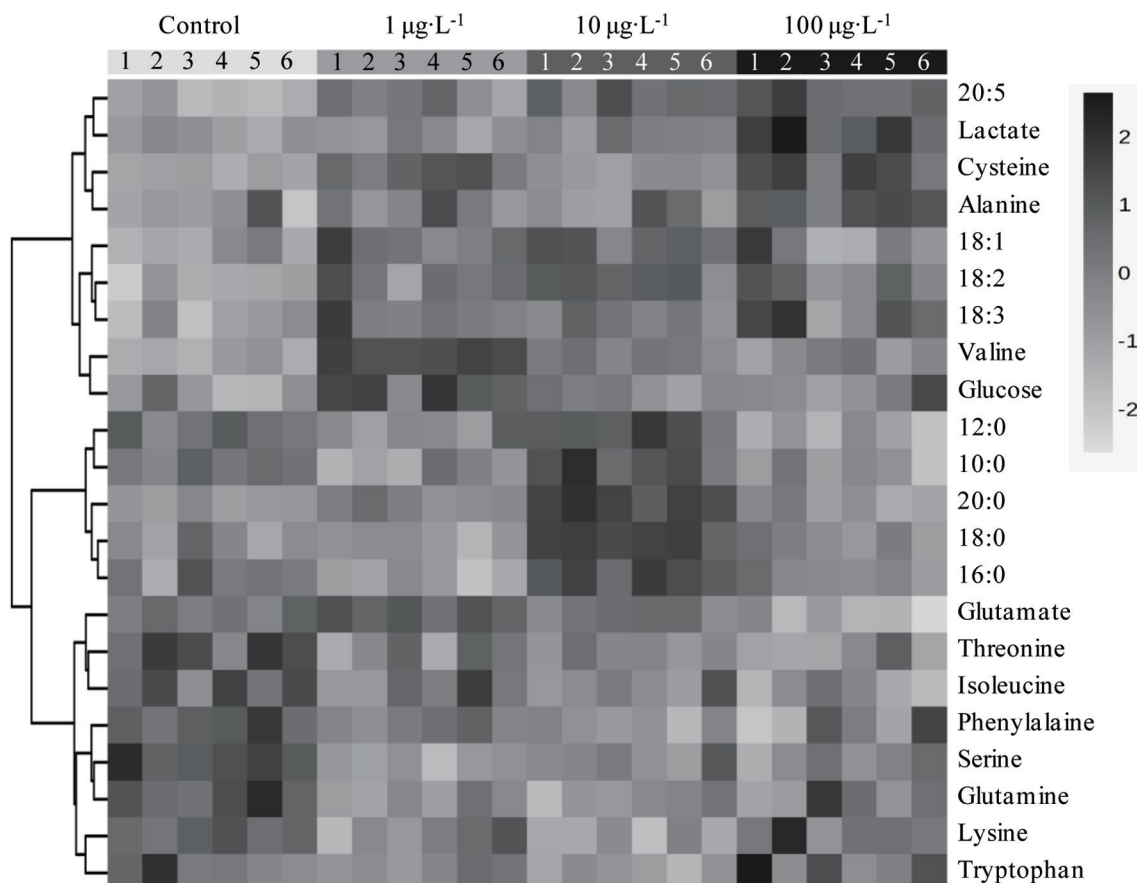


图 2 SCCPs 暴露后 22 种差异代谢物的热图和聚类分析结果

注:颜色由浅到深表示代谢物倍率变化由低到高。

Fig. 2 Heat map clustering analysis result of the 22 significantly changed metabolites after SCCPs exposure

Note: The colors from gray to black indicate the fold changes of metabolite contents from low to high.

绝大部分由葡萄糖通过糖酵解途径生成,另一方面,细胞中的其他氨基酸可以作为前体物质,间接生成乳酸。乳酸是细胞毒性的重要标志物,在本试验中,高剂量 SCCPs 的暴露使乳酸的生成量与对照组相比增加了 1 倍,增加的乳酸有可能对细胞造成了一

定的毒性作用。另外,丙氨酸的水平在高剂量 SCCPs 暴露下也表现出显著增加。谷氨酰胺和谷氨酸是参与谷氨酰胺代谢的重要物质,谷氨酰胺通过谷氨酰胺酶生成谷氨酸,并进一步通过谷氨酸脱氢酶或转氨酶生成 α -酮戊二酸进入三羧酸循环,为细胞

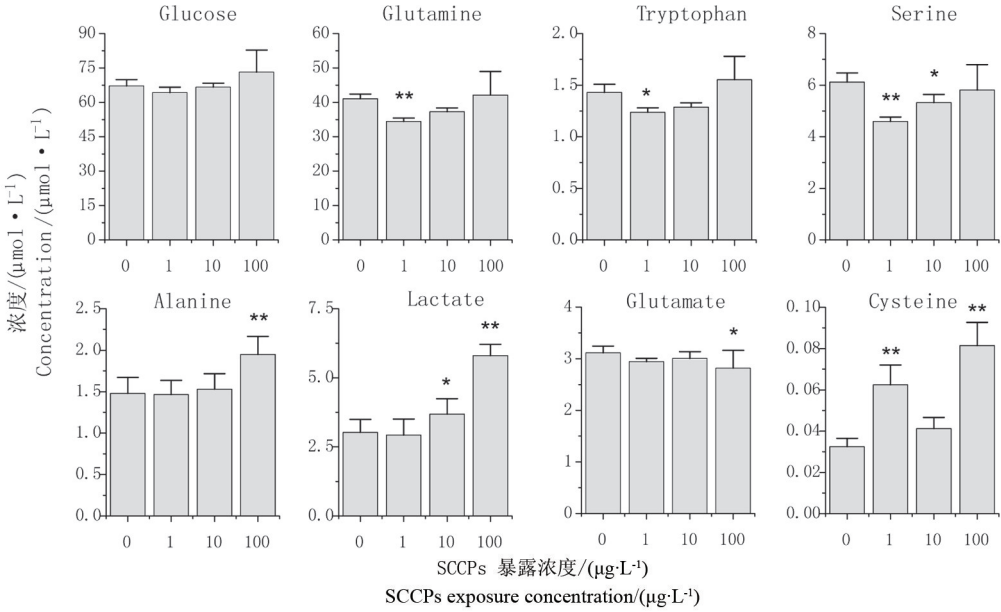


图 3 SCCPs 暴露对 HepG2 细胞葡萄糖、乳酸和氨基酸代谢的影响

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与对照组相比。

Fig. 3 Effect of SCCPs on the metabolism of glucose, lactic acid and amino acids in HepG2 cells

Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with control.

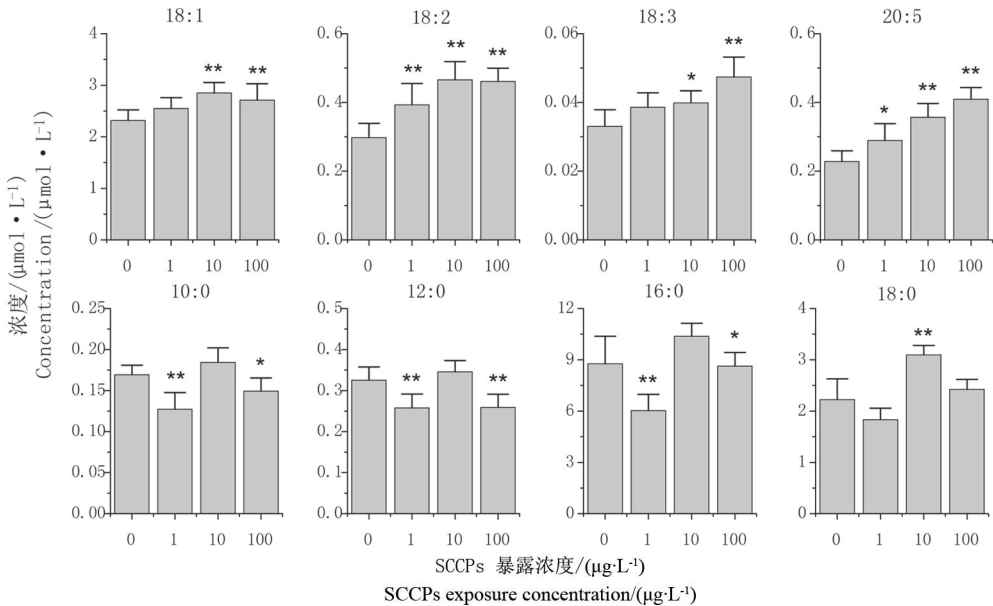


图 4 SCCPs 暴露对 HepG2 细胞脂肪酸代谢的影响

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与对照组相比。

Fig. 4 Effect of SCCPs on fatty acid metabolism in HepG2 cells

Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with control.

提供中间代谢物质和能量。与对照组相比,谷氨酰胺水平在 SCCPs 中低暴露剂量组显著降低,说明中低剂量水平的 SCCPs 能够促进细胞对谷氨酰胺的吸收。但当 SCCPs 浓度增加到 $100.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,谷氨酰胺水平略有增加,表明高浓度 SCCPs 抑制了细胞对谷氨酰胺的吸收。随着 SCCPs 暴露剂量的增加,谷氨酸水平呈现轻微降低趋势;相反,半胱氨酸含量显著增加;而色氨酸和丝氨酸则先降低后增加。

2.4 对细胞脂肪酸代谢的影响

如图4所示,不饱和脂肪酸含量在3个 SCCPs 暴露组均有上调。与对照组相比,十八碳一烯酸在 SCCPs 中剂量暴露组有显著增加,十八碳三烯酸在 SCCPs 中剂量和高剂量暴露组显著上调;而十八碳二烯酸和二十碳五烯酸的变化最为显著,即使在低剂量暴露组亦有显著增加。在3个暴露剂量组中,饱和脂肪酸的变化趋势比较一致,呈现先降低,后升高,最后下调的趋势。与对照组相比,癸酸(10:0)、十二烷酸(12:0)、十六烷酸(16:0)和十八烷酸(18:0)在低剂量暴露组均呈现显著降低,并且癸酸和十二烷酸在高剂量暴露组也有明显下降。脂肪酸含量的改变能够影响细胞生物膜的形成,对细胞的增殖分化产生不利作用。

3 讨论(Discussion)

到目前为止,对 SCCPs 的健康风险评估大多是基于对模式动物的毒理学暴露试验,体外细胞实验研究很少。已有研究发现,高浓度 SCCPs 的长期暴露对大鼠有致癌作用^[17],其对大鼠的无可见有害作用水平(NOAEL)为 $10 \text{ mg}\cdot\text{d}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$ ^[10],但 SCCPs 在 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 水平就对水生生物具有慢性毒性效应。Thompson 等^[18]研究了 SCCPs (C_{10-13} , 58% C1)对糠虾(mysid shrimp)和大型蚤(*Daphnia magna*)的毒性作用,发现96 h的半数效应浓度分别为14和 $18 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。本实验以 HepG2 细胞为研究对象,探讨了环境浓度水平 SCCPs 对细胞小分子代谢物的干扰作用。结果表明 SCCPs 暴露后,HepG2 细胞小分子代谢物与对照组相比有明显的变化,细胞在糖代谢、氨基酸代谢和脂肪酸代谢方面发生不同程度的紊乱。

糖代谢和谷氨酰胺代谢是细胞能量的主要供应途径。葡萄糖和氨基酸消耗的分析结果表明,低剂量 SCCPs 可刺激细胞对多种氨基酸的吸收,而当暴露剂量增加到 $100.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 后,SCCPs 会抑制细胞对培养基中葡萄糖、谷氨酰胺和多种氨基酸的吸收。葡萄糖通过糖酵解途径为细胞提供中间代谢物质和能量,同时可生成乳酸。谷氨酰胺可通过三羧酸循环为细胞

提供中间代谢物质和能量。高剂量 SCCPs 暴露后,细胞对葡萄糖和谷氨酰胺消耗减弱,糖酵解和谷氨酰胺代谢可能被抑制,这一变化可能会造成细胞内能量供给不足,从而影响细胞的生长增殖和分化。同时,细胞对氨基酸的吸收和转化的变化会影响细胞内蛋白质的合成。本研究还发现,尽管糖酵解途径可能受阻,但乳酸的产生量却大量增加,此时细胞需要借助其他的途径产生过量的乳酸。乳酸是细胞毒害作用的重要标志物^[19],增加的乳酸会对肝癌细胞造成一定的毒性作用。这一结果与文献报道的二噁英对 HepG2 细胞代谢的干扰是一致的^[20]。

脂肪酸类物质在细胞中的平衡对于稳定细胞膜功能、调控基因表达、维持细胞脂蛋白平衡和促进生长分化等方面起着重要作用。SCCPs 的暴露使饱和脂肪酸水平紊乱,使不饱和脂肪酸水平上调,引起细胞脂代谢异常。由于动物细胞细胞膜的流动性主要依赖于不饱和脂肪酸的含量,细胞外不饱和脂肪酸含量随 SCCPs 暴露剂量的增加而增加;同时高剂量组饱和脂肪酸含量降低,表明 SCCPs 可能对细胞膜有损伤作用,导致细胞膜流动性降低,这可能是细胞运送营养物质功能降低的主要原因。SCCPs 在生物体内与相关代谢降解酶相互作用会导致一定的氧化压力,脂肪酸代谢紊乱可能是氧化应激和脂质过氧化的结果。Warnasuriya 等^[21]在研究 SCCPs 肾毒性作用机制时发现,SCCPs 能够作为一种过氧化物酶体增殖促进剂加速大鼠肾脏的过氧化物酶体增殖;Brunstrom 等^[22]研究发现,SCCPs 能够影响小鸡胚胎中细胞色素 P-450 酶的含量和微粒体酶的活性;Darnerud^[23]对老鼠进行 SCCPs 暴露后发现,SCCPs 能够被细胞色素 P-450 酶代谢。细胞脂肪酸代谢的紊乱可能主要受 PPAR 信号通路的调控。Elcombe 等^[24]研究发现,SCCPs 暴露后引起大鼠肝脏过氧化物酶体增殖,由于过氧化物酶体增殖活化受体(PPAR)能够调控肝细胞脂肪酸代谢相关基因的表达,本研究中细胞脂肪酸代谢的紊乱可能受 PPAR 信号通路的调控。在今后的研究中,应该从转录组和蛋白组层面追踪 SCCPs 干扰 PPAR 信号通路的分子机制。

通讯作者简介:陈吉平(1964),男,分析化学博士,研究员,主要从事分析化学与环境化学及其相关的基础与应用研究,发表学术论文90余篇。

参考文献(References):

[1] Houde M, Muir D C G, Tomy G T, et al. Bioaccumulation

- and trophic magnification of short- and medium-chain chlorinated paraffins in food webs from lake Ontario and lake Michigan [J]. *Environmental Science & Technology*, 2008, 42(10): 3893–3899
- [2] Iozza S, Muller C E, Schmid P, et al. Historical profiles of chlorinated paraffins and polychlorinated biphenyls in a dated sediment core from lake Thun (Switzerland) [J]. *Environmental Science & Technology*, 2008, 42: 1045–1050
- [3] Ali T El-S, Legler J. Overview of the mammalian and environmental toxicity of chlorinated paraffins. [M]// de Boer J, Ed. *Chlorinated Paraffins*. Springer Berlin Heidelberg, 2010: 135–154
- [4] Barber J L, Sweetman A J, Thomas G O, et al. Spatial and temporal variability in air concentrations of short-chain (C_{10} - C_{13}) and medium-chain (C_{14} - C_{17}) chlorinated n-alkanes measured in the U.K. atmosphere [J]. *Environmental Science & Technology*, 2005, 39(12): 4407–4415
- [5] Gao Y, Zhang H J, Su F, et al. Environmental occurrence and distribution of short chain chlorinated paraffins in sediments and soils from the Liaohu River Basin, P. R. China [J]. *Environmental Science & Technology*, 2012, 46(7): 3771–3778
- [6] Yuan B, Wang T, Zhu N L, et al. Short chain chlorinated paraffins in Mollusks from coastal waters in the Chinese Bohai Sea [J]. *Environmental Science & Technology*, 2012, 46(12): 6489–6496
- [7] Ma X D, Zhang H J, Wang Z, et al. Bioaccumulation and trophic transfer of short chain chlorinated paraffins in a marine food web from the Liaodong Bay, North China [J]. *Environmental Science & Technology*, 2014, 48(10): 5964–5971
- [8] Bayen S, Obbard J P, Thomas G O, Chlorinated paraffins: A review of analysis and environmental occurrence [J]. *Environment International*, 2006, 32(7): 915–929
- [9] Thomas G, Farrar D, Braekvelt E, et al. Short and medium chain length chlorinated paraffins in UK human milk fat [J]. *Environment International*, 2006, 32(1): 34–40
- [10] European Chemicals Bureau. European Union Risk Assessment Report, Alkanes, C_{10-13} , chloro [R]. United Kingdom, Institute for Health and Consumer Protection, 1999
- [11] Wyatt I, Coutss C T, Elcombe C R. The effect of chlorinated paraffins on hepatic enzymes and thyroid hormones [J]. *Toxicology*, 1993, 77(1-2): 81–90
- [12] Cooley H M, Fisk A T, Wiens S C, et al. Examination of the behavior and liver and thyroid histology of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to high dietary concentrations of C_{10} -, C_{11} -, C_{12} - and C_{14} -polychlorinated n-alkanes [J]. *Aquatic Toxicology*, 2001, 54(1–2): 81–99
- [13] Tomy G T, Billeck B, Stern G A. Synthesis, isolation and purification of C_{10} - C_{13} polychloron-alkanes for use as standards in environmental analysis [J]. *Chemosphere*, 2000, 40: 679–683
- [14] Whiley L, Godzien J, Ruperez F J, et al. In-vial dual extraction for direct LC-MS analysis of plasma for comprehensive and highly reproducible metabolic fingerprinting [J]. *Analytical Chemistry*, 2012, 84(14): 5992–5999
- [15] Zeng J, Kuang H, Hu C X, et al. Effect of bisphenol A on rat metabolic profiling studied by using capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry [J]. *Environmental Science & Technology*, 2013, 47(13): 7457–7465
- [16] Birnbaum L S. Environmental chemicals: Evaluating low-dose effects [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2012, 120(4): A143–A144
- [17] Bucher J R, Alison R H, Montgomery C A, et al. Comparative toxicity and carcinogenicity of two chlorinated paraffins in F344/N rats and B6C3F1 mice [J]. *Fundamental and Applied Toxicology: Official Journal of the Society of Toxicology*, 1987, 9(3): 454–468
- [18] Thompson R S, Madeley J R. The acute and chronic toxicity of a chlorinated paraffin to *Daphnia magna* [R]. Imperial Chemical Industries PLC, Devon, England (Brixham Report No BL/B/2358), 1983
- [19] Schurr A, Payne R S, Miller J J, et al. Blockade of lactate transport exacerbates delayed neuronal damage in a rat model of cerebral ischemia [J]. *Brain Research*, 2001, 895(1-2): 268–272
- [20] 张保琴, 张海军, 王龙星, 等. 采用代谢流量分析方法评估二噁英对细胞的代谢干扰[J]. *环境化学*, 2012, 31(11): 1797–1802
- Zhang B Q, Zhang H J, Wang L X, et al. The influence of dioxin on cell metabolism evaluated by the metabolic network flexibility analysis [J]. *Environmental Chemistry*, 2012, 31(11): 1797–1802 (in chinese)
- [21] Warnasuriya G D, Elcombe B M. A mechanism for the induction of renal tumours in male fischer 344 rats by short-chain chlorinated paraffins [J]. *Archives of Toxicology*, 2010, 84(3): 233–243
- [22] Brunstrom B. Effects of chlorinated paraffins on liver weight cytochrome P-450 concentration and microsomal enzyme activities in chick embryos [J]. *Archives of Toxicology*, 1985, 57(1): 69–71
- [23] Darnerud P O. Chlorinated paraffins: Effect of some microsomal-enzyme inducers and inhibitors on the degradation of $1-^{14}C$ -Chlorododecanes to $^{14}CO_2$ in mice [J]. *Acta Pharmacologica et Toxicologica*, 1984, 55(2): 110–115
- [24] Elcombe C R, Watson S C, Wyatt I, et al. Chlorinated paraffins (CP): Mechanisms of carcinogenesis [J]. *Toxicologist*, 1994, 14(1): 276