

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20200423002

姬海南, 李海山, 宋乃宁, 等. 纳米 TiO₂ 对幼年小鼠血浆代谢谱影响的代谢组学研究[J]. 生态毒理学报, 2021, 16(2): 203-211

Ji H N, Li H S, Song N N, et al. Metabonomics study on the effect of nano-TiO₂ on the plasma metabolism spectrum of young mice [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2021, 16(2): 203-211 (in Chinese)

纳米 TiO₂ 对幼年小鼠血浆代谢谱影响的代谢组学研究

姬海南, 李海山, 宋乃宁, 赵潺, 李文涛, 徐宝梁, 沈国林*

中国检验检疫科学研究院化学品安全研究所, 北京 100123

收稿日期: 2020-04-23 录用日期: 2020-06-03

摘要: 观察不同染毒剂量的纳米 TiO₂ 对 ICR 幼年小鼠血浆代谢谱变化的影响, 寻找潜在的毒性效应的生物标志物。将幼年小鼠随机分为对照组以及 10、30、100 和 300 mg·kg⁻¹ 不同纳米 TiO₂ 染毒组进行 28 d 短期毒性试验, 利用代谢组学技术初步筛选出 TiO₂ 毒性作用潜在的生物标志物, 运用 KEGG 数据库对生物标志物进行拓扑分析; 并利用靶向定量技术检测血浆胆酸、去氧胆酸、熊去氧胆酸和牛磺胆酸的含量变化, 从而探究 TiO₂ 毒性作用相对应的生物标志物。从血浆中筛选出 49 种差异代谢物, 发现纳米 TiO₂ 染毒后主要导致磷脂类及胆汁酸类化合物的异常。小鼠经过纳米 TiO₂ 28 d 染毒后, 其毒性作用可能与磷脂代谢及胆汁酸代谢异常相关, 血浆中的胆汁酸可以作为纳米 TiO₂ 产生肝脏毒性作用的生物标志物。

关键词: 纳米 TiO₂; 幼年小鼠; 代谢组学; 血浆; 胆汁酸; 磷脂代谢

文章编号: 1673-5897(2021)2-203-09 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Metabonomics Study on the Effect of Nano-TiO₂ on the Plasma Metabolism Spectrum of Young Mice

Ji Hainan, Li Haishan, Song Naining, Zhao Chan, Li Wentao, Xu Baoliang, Shen Guolin*

Institute of Chemicals Safety, Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100123, China

Received 23 April 2020 accepted 3 June 2020

Abstract: Changes in the plasma metabolism of young ICR mice after exposure to nano-TiO₂ at different doses were measured to investigate the mechanism of its toxic side-effects and to identify its toxicity-related biological targets. Mice were assigned randomly to control group and nano-TiO₂ (10, 30, 100, or 300 mg·kg⁻¹) exposure groups. Plasma data were analyzed using metabonomics technology to identify potential biomarkers. Topology of biomarkers was determined using the KEGG database. Contents of cholic acid, deoxycholic acid, ursodeoxycholic acid and taurocholic acid in plasma were measured by targeted quantitative methods to find the biomarkers corresponding to the toxic effects of TiO₂. Forty-nine metabolites were screened from plasma. The toxicity of nano-TiO₂ resulted mainly from an abnormality of phospholipids and bile-acid compounds. The toxicity of nano-TiO₂ in mice after 28 d exposure may be related to the abnormal metabolism of phospholipids and bile-acid compounds.

Keywords: nano-TiO₂; young mice; metabonomics; plasma; bile acid; phospholipid metabolism

基金项目: 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); 国家重点研发计划资助项目(2017YFF0211201)

第一作者: 姬海南(1989—), 男, 助理研究员, 研究方向为化学品安全评估, E-mail: 1446678196@qq.com

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

TiO₂(titanium dioxide, TiO₂), 俗称“钛白粉”, 在食品工业中常作为着色剂用于口香糖、糖果、甜点和沙拉酱等食品^[1-2]。相比于常规 TiO₂, 纳米 TiO₂ 具有粒径小、白色度高, 并可以提高营养物质的吸收率, 故纳米 TiO₂ 已被广泛开发应用于食品产业链的各个环节^[3-4]。体内研究表明, 纳米 TiO₂ 可以通过皮肤、呼吸系统和消化道等途径进入体内, 对机体产生毒性^[5-6]。纳米 TiO₂ 可以使小鼠脑组织中的胶质细胞过度增殖同时伴有脑出血现象, 并且脑组织出现氧化应激反应^[7]。纳米 TiO₂ 导致大鼠肝脏和肾脏组织出现细胞凋亡以及 DNA 损伤^[8]。目前, 纳米 TiO₂ 的毒性研究主要集中在环境污染物中纳米 TiO₂ 的肺部吸入是否会导致肺部炎症和哮喘, 及从消化道摄入是否会导致克罗恩病和癌症的发生^[9-10]。有报道指出, 儿童每天通过食品摄入体内的纳米 TiO₂ 量在美国达到 2 mg·kg⁻¹ bw, 而在英国可达 3 mg·kg⁻¹ bw, 约为成年人每日摄入量的 3 倍~5 倍^[11-12]。由于, 儿童的肠道功能尚未健全, 屏障功能弱, 纳米食品添加剂对其影响更加严重^[13-14]。这使得纳米 TiO₂ 对婴幼儿带来的安全隐患不断加大, 人们应当对纳米 TiO₂ 的生物安全性予以重视。

代谢组学研究关注的是生物体系受到外在和内在因素刺激下所导致的内源性代谢产物的变化, 可以对那些能够揭示和描述代谢循环情况的关键内源性物质进行定性或定量的分析。血液中含有多种代谢物, 能够较为全面反映生物体的代谢状况^[15], 且血浆样品的收集方便等特点使操作简便易行。本研究利用代谢组学技术研究经口摄入纳米 TiO₂ 对小鼠血浆代谢谱的影响, 寻找与纳米 TiO₂ 相关的生物标志物, 揭示小鼠体内可能受到影响的代谢途径, 以期为进一步阐明纳米 TiO₂ 对机体的毒性作用机制奠定基础。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 仪器与试剂

DV215CD 型电子分析天平(德国赛多利斯公司), MS304TS/02 型电子天平(梅特勒-托利多国际贸易有限公司), 88 700V 型-80 °C 冰箱(赛默飞世尔科技有限公司), UltiMate 3000 型超高效液相色谱仪(赛默飞世尔科技有限公司), Q-Exactive 型高分辨质谱仪(赛默飞世尔科技有限公司), Waters C18(1.7 μm, 2.1 mm×100 mm)色谱柱(美国沃特世公司), Milli-QAdvantageA10 型超纯水仪(美国 Millipore 公司), X-30R 型离心机(美国西格玛奥德里奇公司), 乙

腈、甲醇、甲酸和甲酸铵均为色谱纯, 购于赛默飞世尔科技有限公司, 其他试剂均为分析纯。

1.2 实验动物

ICR 幼年小鼠, 雌性, 周龄 3~4 周, 体质量约 10 g, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 小鼠饲养于 SPF 级动物房中, 适应性饲养一周后按体质量随机分为对照组和纳米 TiO₂ 染毒组。该实验经中国检验检疫科学院化学品安全研究所动物伦理委员会批准, 4% 的异氟烷麻醉取血, 二氧化碳麻醉处死, 实验前禁食 24 h, 自由饮水。

1.3 染毒实验

小鼠适应性饲养结束后, 设置 1 个空白对照组和 4 个染毒剂量组, 每组 15 只, 染毒剂量分别为 10、30、100 和 300 mg·kg⁻¹, 每天灌胃染毒一次, 连续染毒 28 d。末次染毒后, 4% 的异氟烷麻醉取血, 于含有肝素钠的 2 mL 无菌离心管中 3 500 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取血浆冻存于-80 °C 冰箱。二氧化碳麻醉处死, 取心、肝、脾和肺等脏器称量质量, 并计算脏器系数(脏器系数=脏器质量/动物体质量×100%)。

1.4 血浆样品的高分辨质谱检测^[16]

分析前将血浆样品于 4 °C 冰箱中解冻, 取 50 μL, 加入沉淀剂(V(甲醇): V(乙腈)=1:1)450 μL(含正内标普萘洛尔 10 ng·mL⁻¹ 和负内标甲苯磺丁脲 50 ng·mL⁻¹), 涡流 30 s, 涡旋混匀 60 s, 13 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 吸取 100 μL 采用高分辨质谱仪 QE-Orbitrap 进行检测。色谱流动相: A 为乙腈, B 为水(含 0.1% 甲酸及 2 mmol·L⁻¹ 甲酸铵); 梯度洗脱: 0~1 min, 5% A; 1~5 min, 5%~60% A; 5~8 min, 60%~100% A; 8~11 min, 100% A; 11~14 min, 100%~60% A; 11~15 min, 60%~5% A; 15~18 min, 5% A; 柱温 30 °C, 流速 0.25 mL·min⁻¹, 进样量 5 μL, 进样盘温度 4 °C。在电喷雾离子源(ESI)正负离子模式下采集数据, 喷雾电压 3 kV; 蒸发温度 350 °C; 毛细管温度 320 °C; S-lens RF 为 50; 一级全扫描(full scan)的分辨率为 70 000, 扫描范围为 70~1 050 (*m/z*)。二级数据依赖性扫描(full MS/dd-MS2): 分辨率为 17 500; AGC target 为 1e⁵; Maximu TT 为 50 ms; NCE 为 20、40 和 60。

1.5 小鼠血浆胆汁酸含量的检测^[17]

小鼠血浆 50 μL 加入含内标的(V(甲醇): V(乙腈)=1:1)沉淀剂 450 μL, 涡旋混匀 60 s, 13 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 吸取 100 μL 进行测定, 胆汁酸检测色谱条件: A 为水(含 0.1% 甲酸), D 为乙腈; 梯度

洗脱,梯度洗脱程序为 0~0.5 min,30% D;0.5~2.5 min,30%~60% D;2.5~4.0 min,60%~95% D;4.0~6.0 min,95% D;6.0~6.1 min,95%~30% D;6.1~8.0 min,30% D,分析时间 0~8 min,每次进样 5 μL ,流速为 0.3 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。色谱柱:Thermo Hypersil Gold C18 (3 μm ,2.1 $\text{mm}\times 100\text{ mm}$),色谱柱温度为 30 $^{\circ}\text{C}$,自动进样器的温度保持在 4 $^{\circ}\text{C}$ 。胆汁酸检测在电喷雾离子源(ESI)负离子 SIM 模式下采集数据,喷雾电压为 2 500 V;蒸发温度为 350 $^{\circ}\text{C}$;鞘气为 40 Arb;辅助气为 10 Arb;毛细管温度为 350 $^{\circ}\text{C}$;S-lens RF 为 50。胆酸(CA)为 407.28030、脱氧胆酸(DCA)为 391.28538、熊脱氧胆酸(UDCA)为 391.28538 和牛磺胆酸(TCA)为 514.28440。

1.6 代谢通路分析

根据文献方法鉴定内源性代谢物和处理数据(图 1)^[18]。利用 Metaboanalyst 4.0 分析对照组与纳米 TiO₂ 不同染毒剂量组小鼠血浆内源性代谢物的差异,找出 VIP 值>1 的内源性代谢物,绘制主成分分析(principal component analysis, PCA)、偏最小二乘判别分析(partial least squared discriminant, PLS-DA)以及拓扑分析图,再利用 MetaboAnalyst 4.0 网站中的 Pathway Analysis 分析纳米 TiO₂ 影响血浆的代谢通路,选择 Impact 值>0.1 的代谢通路作为纳米 TiO₂ 影响血浆的主要代谢通路。

1.7 统计学分析

采用 Metaboanalyst 4.0 进行主成分分析、偏最小二乘判别分析以及拓扑分析,同时分析 Impact 值>0.1 的作为纳米 TiO₂ 影响血浆的主要代谢通路。相关数据采用 SPSS16.0 软件进行数据分析,试验数据用平均值 $\pm$ 标准偏差(Mean $\pm$ SD)表示,数据比较采用单因素方差分析法(one-way ANOVA)分析各实验组之间的差异,再用 Tukey's test 比较各实验组与

对照组之间的差异,*代表 $P<0.05$,**代表 $P<0.01$ 。

2 结果与分析 (Results and analysis)

2.1 纳米 TiO₂ 对 ICR 幼年小鼠精神状况、饮水量及脏器系数的影响

纳米 TiO₂ 28 d 染毒后,各个染毒剂量组的幼鼠先后出现不同程度的精神萎靡、体质量减轻、进食饮水减少等现象,由表 1 可知,与对照组比较,随着剂量的增加小鼠的体质量以及心脏、肝脏和肺脏的脏器系数呈下降趋势,说明纳米 TiO₂ 28 d 染毒后可以影响小鼠自身和脏器正常的生理状态,而且影响程度随着染毒剂量的升高而增加。

2.2 血浆总离子图及鉴别方式

采用 mzcloud 对血浆内源性代谢物质进行鉴定,利用分子式和分子量及二级离子碎片确定内源性物质,同时用 TraceFinder 软件进行自建内源性物质^[19-20],血浆样品总离子图及鉴别方式如图 1 所示。

2.3 纳米 TiO₂ 对小鼠血浆内代谢的影响

根据文献方法鉴定内源性物质和处理数据(图 1)^[21],利用 Metaboanalyst 4.0 中的 Statistical Analysis 模块计算 PCA 和 PLS-DA,PCA(图 2(a))和 PLS-DA(图 2(b))结果显示,对照组和纳米 TiO₂ 不同剂量染毒组血浆之间都能彻底分开,模型质量参数:Accuracy=0.91, $R^2=0.93$, $Q^2=0.85$,即其中 93% 的变量被作为建立模型的主要成分,91% 的样本符合模型的判别,而模型的预测能力为 85%。这表明,幼鼠经不同剂量染毒后,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 TiO₂ 能够影响幼鼠机体的代谢轮廓。通过 PLS-DA 方法对各组的代谢物差异进行分析,选择 VIP 值>1 的内源性物质作为进一步分析纳米 TiO₂ 影响血浆代谢通路的种类。由表 2 可知,血浆中内源性代谢物 VIP 值>1 的总共有

表 1 纳米 TiO₂ 对小鼠体质量及脏器系数的影响 (Mean $\pm$ SD, $n=10$)

Table 1 The influence of nano-TiO₂ on body mass and viscera coefficient of mice (Mean $\pm$ SD, $n=10$)

	对照组 Control	10 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ TiO ₂	30 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ TiO ₂	100 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ TiO ₂	300 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ TiO ₂
体质量 Body mass	30.17 $\pm$ 1.06	25.72 $\pm$ 2.69**	25.14 $\pm$ 1.64**	24.71 $\pm$ 2.16**	24.06 $\pm$ 2.47**
心/% Heart/%	0.94 $\pm$ 0.10	0.75 $\pm$ 0.20**	0.68 $\pm$ 0.26*	0.64 $\pm$ 0.29**	0.57 $\pm$ 0.06**
肝/% Liver/%	7.89 $\pm$ 2.12	6.04 $\pm$ 1.74*	5.89 $\pm$ 1.42*	6.12 $\pm$ 1.64*	5.48 $\pm$ 0.88*
脾/% Spleen/%	0.68 $\pm$ 0.11	0.65 $\pm$ 0.16	0.58 $\pm$ 0.19	0.65 $\pm$ 0.15	0.60 $\pm$ 0.05
肺/% Lungs/%	1.07 $\pm$ 0.19	0.97 $\pm$ 0.16	1.08 $\pm$ 0.36	1.04 $\pm$ 0.33	0.72 $\pm$ 0.06**

注:与对照组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。
Note: Compared to the control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

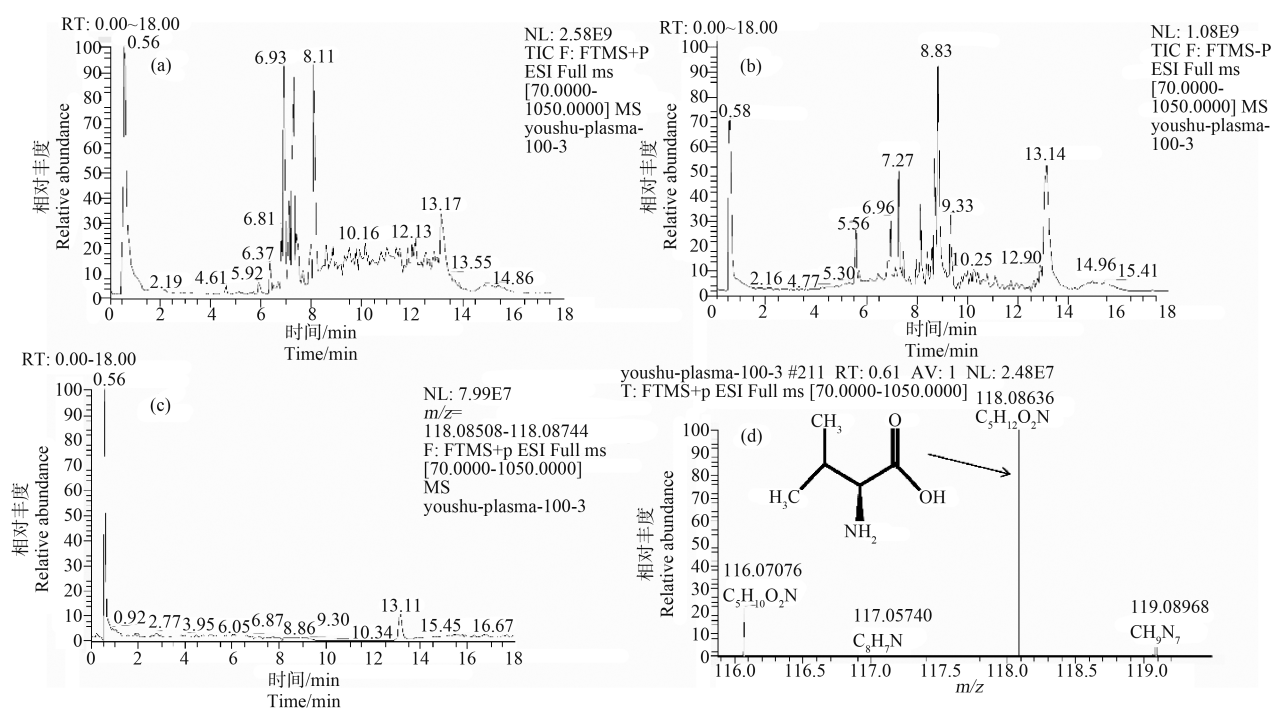


图 1 全扫描检测幼鼠血浆总离子流图及缬氨酸鉴别模式识别

注:(a)正离子模式下的色谱图;(b)负离子模式下的色谱图;(c)缬氨酸色谱图;(d)缬氨酸相应的精确质量数和分子式。

Fig. 1 Full-scan detected total ion maps and valine identification pattern recognition of young mice plasma

Note: (a) Total ion current chromatography (TIC) of plasma samples derived from the positive ion scanning; (b) Total ion current chromatography (TIC) of plasma samples derived from the negative ion scanning; (c) Valine chromatogram; (d) The exact mass and molecular formula of valine.

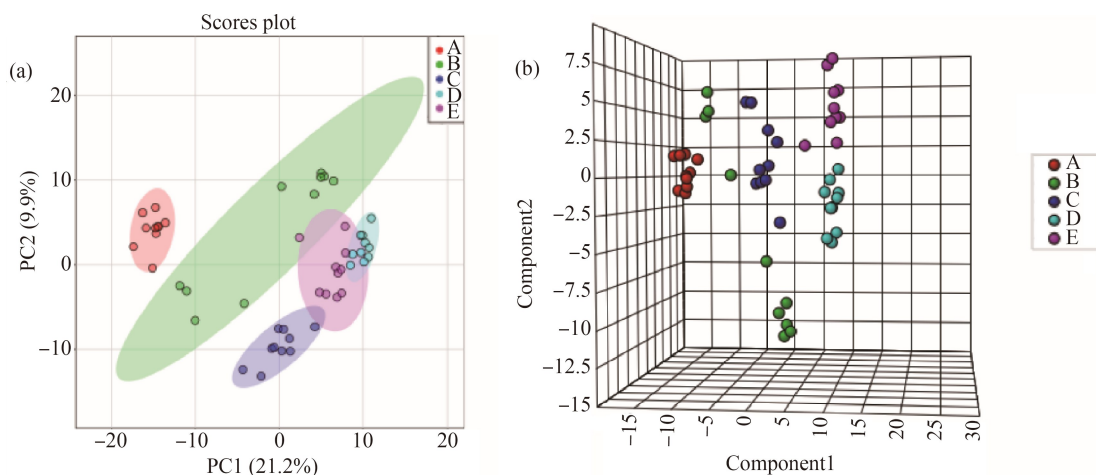


图 2 高分辨质谱 QE-Orbitrap 检测的代谢组学数据分析

注:(a) PCA 模型分析,(b) PLS-DA 分析;A 为对照组,B 为 10 mg·kg⁻¹ 纳米 TiO₂ 染毒组,

C 为 30 mg·kg⁻¹ 纳米 TiO₂ 染毒组,D 为 100 mg·kg⁻¹ 纳米 TiO₂ 染毒组,E 为 300 mg·kg⁻¹ 纳米 TiO₂ 染毒组。

Fig. 2 Analysis of metabolomics data detected by high resolution mass spectrometry QE Orbitrap

Note: (a) PCA model analysis, (b) PLS-DA analysis; A represents control group; B represents 10 mg·kg⁻¹ nano-TiO₂ group;

C represents 30 mg·kg⁻¹ nano-TiO₂ group; D represents 100 mg·kg⁻¹ nano-TiO₂ group; E represents 300 mg·kg⁻¹ nano-TiO₂ group.

49 种,其中,31 种内源性物质的比例主要是上升,另 18 种主要呈下降趋势。由表 3 可知,与对照组相比,各个染毒剂量组中的牛磺胆酸、胆酸、脱氧胆酸

和熊脱氧胆酸均升高。以上结果表明纳米 TiO₂ 影响了小鼠血浆内源性物质的代谢分泌,使它们的含量发生明显变化。

表 2 幼鼠血浆主要差异性标志物的平均变化

Table 2 Average changes of major plasma differential markers in young mouse

内源性代谢物 Endogenous metabolites	平均变化百分比/% Percentage of average changes/%			
	10 mg·kg ⁻¹ TiO ₂	30 mg·kg ⁻¹ TiO ₂	100 mg·kg ⁻¹ TiO ₂	300 mg·kg ⁻¹ TiO ₂
LysoPC(20:3(5Z,8Z,11Z))	23.22±1.80 ↓	29.81±9.20 ↓	26.51±3.02 ↓	30.93±4.08 ↓
PC(18:0/20:4(8Z,11Z,14Z,17Z))	122.41±24.99 ↑	125.50±29.03 ↑	187.44±40.04 ↑	198.35±38.3 ↑
烟酰胺 Niacinamide	42.48±3.94 ↓	41.05±3.74 ↓	34.20±5.50 ↓	39.79±8.90 ↓
LysoPE(0:0/20:4(8Z,11Z,14Z,17Z))	12.53±1.48 ↓	29.44±2.18 ↓	11.32±2.31 ↓	16.16±3.37 ↓
LysoPC(20:1(11Z))	145.29±19.39 ↑	239.52±28.77 ↑	207.43±30.53 ↑	269.04±58.19 ↑
SM(d18:0/24:1(15Z))	297.66±41.25 ↑	609.51±92.56 ↑	682.00±57.44 ↑	796.52±100.9 ↑
腺苷 Adenosine	36.54±14.88 ↓	18.24±5.12 ↓	13.74±4.04 ↓	12.79±0.97 ↓
神经氨酸 Neuraminic acid	39.53±13.81 ↓	20.71±5.07 ↓	13.74±4.04 ↓	12.20±4.18 ↓
2-氨基辛酸 Aminooctanoic acid	1.62±0.27 ↓	50.07±11.88 ↓	1.46±0.69 ↓	0.72±0.13 ↓
SM(d18:0/16:1(9Z))	78.08±5.11 ↓	132.96±21.76 ↑	122.51±16.83 ↑	141.52±21.70 ↑
LysoPE(0:0/18:2(9Z,12Z))	18.01±5.75 ↓	28.34±5.51 ↓	19.5±6.49 ↓	24.85±6.47 ↓
PC(16:1(9Z)/22:5(7Z,10Z,13Z,16Z,19Z))	28.10±2.84 ↓	51.97±19.94 ↓	35.79±5.19 ↓	48.56±9.48 ↓
左旋肉碱 Carnitine	66.80±11.92 ↓	157.97±31.33 ↑	178.11±16.72 ↑	149.03±27.7 ↑
二十二碳六烯酸 Docosahexaenoic acid	151.41±30.01 ↑	85.20±25.55 ↓	40.92±6.72 ↓	74.51±17.88 ↓
LysoPC(17:0)	145.47±23.69 ↑	118.54±29.47 ↑	134.45±21.81 ↑	157.96±29.42 ↑
组胺 Histamine	80.78±19.75 ↓	142.40±30.76 ↑	192.00±73.80 ↑	272.99±74.13 ↑
L-缬氨酸 L-valine	149.88±31.38 ↑	164.06±26.32 ↑	187.03±21.09 ↑	158.48±15.66 ↑
LysoPC(16:1(9Z))	107.7±17.57 ↑	107.05±29.87 ↑	153.47±25.82 ↑	150.22±38.60 ↑
PC(18:1(9Z)/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z))	85.33±19.03 ↓	55.15±6.77 ↓	57.92±5.53 ↓	72.95±7.89 ↓
L-乙酰肉碱 L-acetylcarnitine	64.79±15.77 ↓	167.26±22.89 ↑	127.07±20.84 ↑	136.09±32.31 ↑
SM(d18:1/24:0)	478.96±72.85 ↑	1 482.69±359.72 ↑	1 464.67±171.06 ↑	1 756.49±241.03 ↑
1-O-hexadecyl-lyso-sn-glycero-3-phosphocholine	109.68±23.87 ↑	145.53±31.17 ↑	141.25±30.47 ↑	199.88±53.78 ↑
LysoPC(20:0)	138.21±27.15 ↑	156.22±26.6 ↑	157.74±22.54 ↑	199.74±19.57 ↑
LysoPC(14:0)	496.61±66.25 ↑	203.25±60.3 ↑	556.38±132.1 ↑	296.87±54.63 ↑
SM(d18:1/16:0)	78.08±14.11 ↓	132.09±20.87 ↑	121.48±16.82 ↑	139.63±22.88 ↑
腺嘌呤 Adenine	75.58±26.91 ↓	39.22±8.84 ↓	38.54±11.46 ↓	33.76±5.92 ↓
SM(d18:1/22:0)	272.26±70.54 ↑	381.12±78.57 ↑	413.08±26.42 ↑	436.07±41.21 ↑
肉豆蔻酸 Myristic acid	78.98±16.34 ↓	76.01±11.67 ↓	41.13±6.74 ↓	54.00±5.98 ↓
LysoPC(P-18:0)	156.79±32.08 ↑	202±50.32 ↑	182.4±37.3 ↑	213.50±39.92 ↑
胞嘧啶 Cytosine	1 375.21±149.97 ↑	1 009.95±101.3 ↑	1 361.43±71.5 ↑	1 181.5±108.18 ↑
肌酐 Creatinine	269.39±49.74 ↑	249.05±25.12 ↑	274.66±23.45 ↑	322.05±30.88 ↑
LysoPC(18:3(6Z,9Z,12Z))	113.03±14.06 ↑	113.63±11.12 ↑	116.06±9.81 ↑	124.71±10.25 ↑
二十碳五烯酸 Eicosapentaenoic acid	35.63±10.43 ↓	42.77±12.51 ↓	30.58±8.45 ↓	41.24±4.74 ↓
硫酸吲哚酚 Indoxyl-sulfate	47.62±10.24 ↓	28.02±7.24 ↓	31.16±7.70 ↓	30.63±10.40 ↓
胆酸 Cholic acid	3 073.47±669.21 ↑	287.86±97.41 ↑	2 277.19±308.91 ↑	1 679.68±475.03 ↑
2-酮丁酸 2-Oxobutanoate	185.8±38.97 ↑	183.22±42.15 ↑	186.03±31.97 ↑	208.65±34.45 ↑
LysoPE(0:0/18:1(9Z))	34.07±7.41 ↓	56.79±13.52 ↓	40.91±5.61 ↓	40.96±6.7 ↓
PC(18:3(6Z,9Z,12Z)/16:0)	23.39±7.73 ↓	26.02±7.01 ↓	41.54±10.37 ↓	44.99±6.22 ↓
LysoPC(P-16:0)	200.93±51.05 ↑	300.1±55.29 ↑	232.85±61.52 ↑	290.71±54.18 ↑
LysoPC(22:5(7Z,10Z,13Z,16Z,19Z))	51.71±7.72 ↓	65.57±20.09 ↓	49.04±6.68 ↓	76.95±11.03 ↓
SM(d17:1/24:0)	200.68±26.57 ↑	311.56±81.51 ↑	371.89±31.71 ↑	387.42±47.28 ↑
花生四烯酸 Arachidonic acid	119.85±30.35 ↑	156.75±33.29 ↑	101.24±26.6 ↑	126.79±31.86 ↑
γ-亚麻酸 γ-linolenic acid	157.49±33.54 ↑	170.26±44.38 ↑	122.5±19.69 ↑	168.11±47.59 ↑

续表 2

内源性代谢物 Endogenous metabolites	平均变化百分比/% Percentage of average changes/%			
	10 mg·kg ⁻¹ TiO ₂	30 mg·kg ⁻¹ TiO ₂	100 mg·kg ⁻¹ TiO ₂	300 mg·kg ⁻¹ TiO ₂
2-羟基丁酸 2-Hydroxybutanoic acid	157.94±28.90 ↑	294.54±41.57 ↑	147.73±19.45 ↑	248.18±42.18 ↑
SM(d18:1/22:1(13Z))	140.21±33.99 ↑	167.34±26.62 ↑	145.46±12.16 ↑	227.47±25.65 ↑
LysoPC(O-18:0)	141.19±32.92 ↑	149.29±39.24 ↑	138.3±31.67 ↑	195.83±31.41 ↑
PC(20:0/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z))	167.92±40.01 ↑	218.31±57.96 ↑	314.03±56.97 ↑	304.69±78.22 ↑
PC(20:3(5Z,8Z,11Z)/14:1(9Z))	68.23±13.03 ↓	33.51±9.64 ↓	144.72±26.12 ↑	253.54±63.55 ↑

注:与对照组相比,纳米 TiO₂ 不同剂量组的代谢产物明显上调(↑)或下调(↓)。
Note: Compared with the control, metabolites are significantly up-regulated (↑) or down-regulated (↓) in the nano-TiO₂ groups with different doses.

表 3 不同剂量纳米 TiO₂ 对血浆胆汁酸浓度的影响 (Mean±SD, n=5)
Table 3 The changes of bile acid concentration in plasma under the influence of different doses of nano-TiO₂ (Mean±SD, n=5)

胆汁酸 Bile acid	对照组 Control	10 mg·kg ⁻¹ TiO ₂	30 mg·kg ⁻¹ TiO ₂	100 mg·kg ⁻¹ TiO ₂	300 mg·kg ⁻¹ TiO ₂
牛磺胆酸(TCA)/(ng·mL ⁻¹) Taurocholate acid (TCA)/(ng·mL ⁻¹)	495.3±114.8	956.1±134.2	577.9±195.8	600.7±162.3	779.6±142.1
胆酸 (CA)/(ng·mL ⁻¹) Cholic acid (CA)/(ng·mL ⁻¹)	251.5±43.3	4 324.9±348.2	532.2±85.6	3 240.2±466.9	2 370.7±772.6**
去氧胆酸 (DCA)/(ng·mL ⁻¹) Deoxycholic acid (DCA)/(ng·mL ⁻¹)	54.9±19.6	1 169.1±110.2	106.0±14.6	1 031.0±177.4	851.1±214.3
熊脱氧胆酸 (UDCA)/(ng·mL ⁻¹) Ursodeoxycholic acid (UDCA)/(ng·mL ⁻¹)	62.0±17.2	18.7±6.2	46.5±16.1	70.4±32.3	64.6±13.1

注:与对照组相比,** P<0.01。
Note: Compared to the control group, ** P<0.01.

2.4 纳米 TiO₂ 对小鼠血浆内源性物质代谢通路的影响

如图 3 和表 4 所示,血浆内源性物质相关代谢通路受到纳米 TiO₂ 影响的主要有 6 条,包括缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的生物合成(valine, leucine and isoleucine biosynthesis)、花生四烯酸代谢(arachidonic acid metabolism)、烟酸酯和烟酰胺代谢(nicotinate and nicotinamide metabolism)、组氨酸代谢(histidine metabolism)、醚脂质代谢(ether lipid metabolism)和甘油磷脂代谢(glycerophospholipid metabolism)等,以上结果说明,纳米 TiO₂ 染毒 28 d 后主要影响小鼠血浆中氨基酸和脂肪酸的合成和代谢,从而导致小鼠血浆中内源性物质含量的变化。

2.5 差异性内源性物质相关性和分层聚类分析

血浆中差异性内源性物质相关性分析结果如图 4(a)所示,图中水平轴和垂直轴均代表变量信息,颜色越深反映相关性越强,颜色越浅反映相关性越弱,

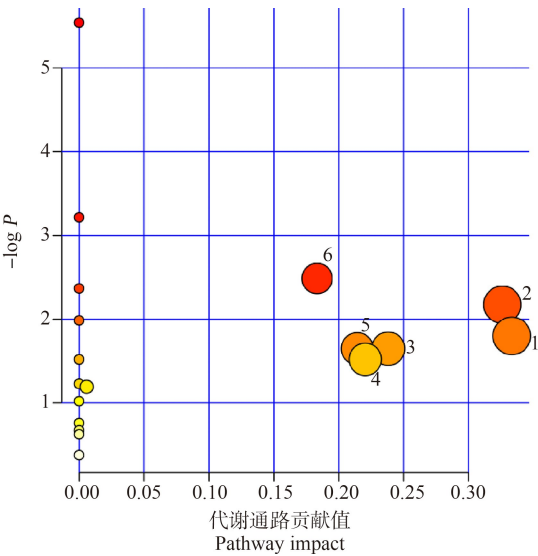


图 3 使用 MetPA 数据库构建重要内源性小分子相关代谢通路

Fig. 3 The pathway analysis summary diagram obtained by MetPA

红色表示正相关,绿色表示负相关,根据图 4(a)可知差异性内源性物质之间的相关性。从水平轴看,在同一小分支下的物质的正相关性最强,即某一个物质含量升高或者降低,则与之相关性强的物质会随之升高或降低。分层聚类分析获得的热图如图 4(b)所示,图中水平轴和垂直轴分别代表样本与变量信息。颜色深浅反映变量值大小,红色表示含量升高,绿色表示含量降低,颜色越深表明变化量越大,从图 4(b)图中可直观看 49 种差异性内源性物质在各组间的含量变化趋势。以上结果进一步证明染毒 28 d 后纳米 TiO₂ 影响了小鼠血浆内源性物质含量。

3 讨论 (Discussion)

磷脂不仅是细胞膜和各种细胞器(线粒体、内质

网和细胞核等)膜的重要组成成分,还参与调节生物体内的许多重要功能,如神经传导、降血脂和降低胆固醇等^[22],由代谢通路拓扑分析结果可知,纳米 TiO₂ 影响了小鼠机体的磷脂代谢(Impact 值>0.1)。如表 2 所示,与甘油磷脂代谢通路相关的差异性标志物中,不同剂量染毒引起了细胞内膜主要组成成分磷脂酰胆碱(PCs)及其水解产物溶血磷脂(LysoPCs)发生异常变化,而且随着染毒剂量的增加变化更显著,表明小鼠全身 PCs 和 LysoPCs 的代谢发生异常,文献报道溶血磷脂含量的升高会导致细胞膜流动性增强,从而影响膜脂蛋白的有序性,破坏细胞膜结构,进而导致细胞死亡^[23],这表明纳米 TiO₂ 对机体的毒性作用可能与 LysoPCs 的升高有关。此外,细胞外膜的主要组成成分鞘磷脂(SMs)的水平在

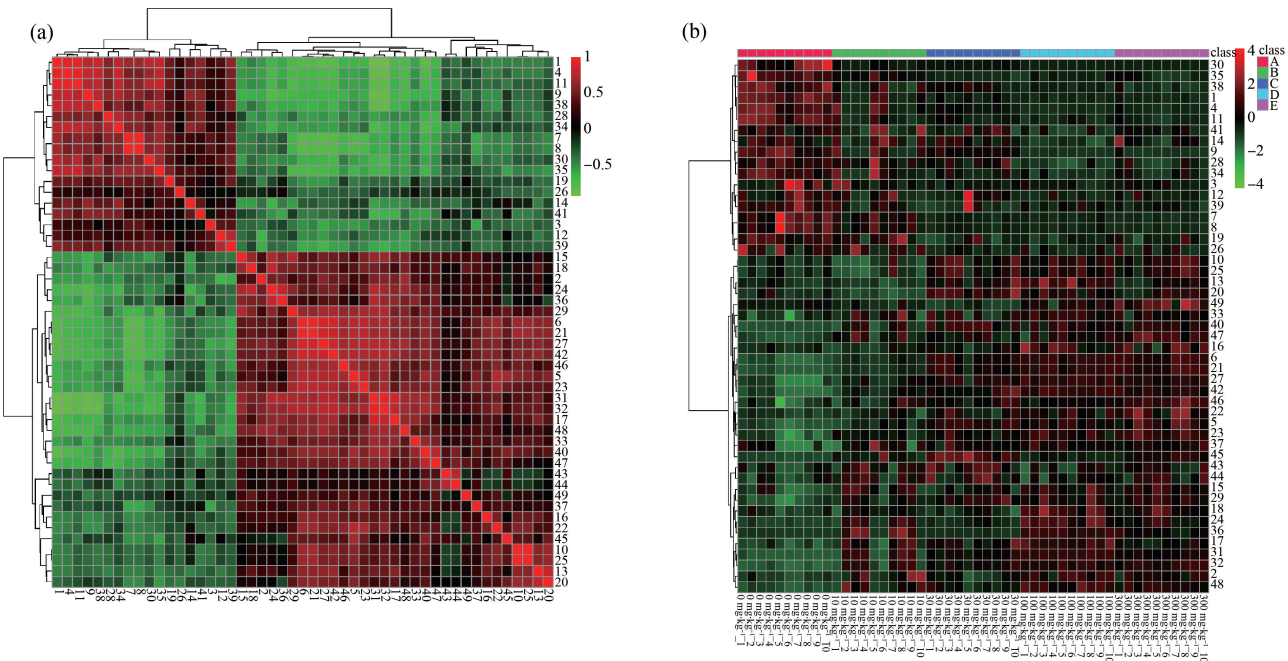


图 4 应用相关性分析与分层聚类分析法分析血浆数据

Fig. 4 Plasma data were analyzed using correlation analysis and hierarchical clustering

表 4 用 MetPA 构建分析通路结果

Table 4 Result from pathway analysis with MetPA

序号 No.	通路 Pathway	总数 Total	端点 Hits	影响力 Impact
1	缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的生物合成 Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	11	1	0.33
2	花生四烯酸代谢 Arachidonic acid metabolism	36	2	0.33
3	烟酸酯和烟酰胺代谢 Nicotinate and nicotinamide metabolism	13	1	0.24
4	组氨酸代谢 Histidine metabolism	15	1	0.22
5	醚脂质代谢 Ether lipid metabolism	13	1	0.21
6	甘油磷脂代谢 Glycerophospholipid metabolism	30	2	0.18

不同染毒剂量组中均呈现显著升高趋势,表明小鼠全身 SMs 的代谢降解可能被抑制。与对照组相比,溶血磷脂酰乙醇胺(LysoPEs)的比例随着染毒剂量的升高均明显降低,表明纳米 TiO_2 可能抑制了全身磷脂酰乙醇胺(PEs)水解生成 LysoPEs 的反应。以上结果证实了纳米 TiO_2 将影响小鼠磷脂类的代谢。

笔者前期研究发现,纳米 TiO_2 染毒导致部分 LysoPCs 含量升高,溶血磷脂酰胆碱是磷脂酶 A2 作用于磷脂酰胆碱的产物,磷脂酰胆碱主要来源是食物和胆汁分泌的磷脂。文献报道健康人每天经胆道分泌大量的磷脂酰胆碱必须经水解释放,最终以溶血磷脂酰胆碱的形式被肠道吸收入血形成肠肝循环^[24],说明胆汁是磷脂类物质主要来源之一。胆汁酸由胆固醇在肝细胞中转化而来,是胆汁的主要成分。其在体内的合成、转运受到多种因素的调节^[25]。笔者研究发现,当小鼠暴露于纳米 TiO_2 28 d 后,与对照组相比,随着染毒剂量的增加血浆中胆酸的比例呈上升趋势(表 2),通过定量检测发现血浆中胆酸、脱氧胆酸、熊去氧胆酸和牛磺胆酸的含量都呈上升趋势(表 3),说明纳米 TiO_2 可以引起肝脏胆汁酸代谢的变化,相关研究表明胆汁酸可以作为生物标识物用来表征肝脏毒性^[26-27],由此推断胆汁酸(胆酸、脱氧胆酸、熊去氧胆酸和牛磺胆酸)可以作为纳米 TiO_2 引起小鼠肝脏毒性的生物标志物。

通讯作者简介:沈国林(1980—),男,博士,副研究员,主要研究方向为化学品安全评价。

参考文献(References):

- [1] Bouwmeester H, van der Zande M, Jepson M A. Effects of food borne nanomaterials on gastrointestinal tissues and microbiota [J]. WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology, 2018, 10(1): 11-15
- [2] 李英杰,白明. 二氧化钛的特性及在食品中的应用[J]. 食品安全导刊, 2010(8): 58-59
Li Y J, Bai M. The characteristics of titanium dioxide and its application in food [J]. China Food Safety Magazine, 2010(8): 58-59 (in Chinese)
- [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
Zhang Y L, Yin Y X, Ye Y X, et al. Effects of short-term exposure to different sizes of titanium dioxide on iron and glucose absorption in small intestine young rats [J]. Journal of Environmental & Occupational Medicine, 2017, 34(9): 778-784 (in Chinese)
- [4] Bouwmeester H, Dekkers S, Noordam M Y, et al. Review of health safety aspects of nanotechnologies in food production [J]. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2009, 53(1): 52-62
- [5] Wu J H, Liu W, Xue C B, et al. Toxicity and penetration of TiO_2 nanoparticles in hairless mice and porcine skin after subchronic dermal exposure [J]. Toxicology Letters, 2009, 191(1): 1-8
- [6] Liu D, Hong F S, Zhou J L, et al. Lung inflammation caused by long-term exposure to titanium dioxide in mice involving in NF- κ B signaling pathway [J]. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2017, 105(3): 720-727
- [7] Ze Y G, Zheng L, Zhao X Y, et al. Molecular mechanism of titanium dioxide nanoparticles-induced oxidative injury in the brain of mice [J]. Chemosphere, 2013, 92(9): 1183-1189
- [8] Meena R, Paulraj R. Oxidative stress mediated cytotoxicity of TiO_2 nano anatase in liver and kidney of Wistar rat [J]. Toxicological & Environmental Chemistry, 2012, 94(1): 146-163
- [9] Song Z M, Chen N, Liu J H, et al. Biological effect of food additive titanium dioxide nanoparticles on intestine: An *in vitro* study [J]. Journal of Applied Toxicology, 2015, 35(10): 1169-1178
- [10] MacNicol A, Kelly M, Aksoy H, et al. A study of the uptake and biodistribution of nano-titanium dioxide using *in vitro* and *in vivo* models of oral intake [J]. Journal of Nanoparticle Research, 2015, 17(2): 1-20
- [11] Geraets L, Oomen A G, Krystek P, et al. Tissue distribution and elimination after oral and intravenous administration of different titanium dioxide nanoparticles in rats [J]. Particle and Fibre Toxicology, 2014, 11: 30
- [12] Heringa M B, Geraets L, van Eijkeren J C, et al. Risk assessment of titanium dioxide nanoparticles via oral exposure, including toxicokinetic considerations [J]. Nanotoxicology, 2016, 10(10): 1515-1525
- [13] Wang Y, Chen Z J, Ba T, et al. Susceptibility of young and adult rats to the oral toxicity of titanium dioxide nanoparticles [J]. Small, 2013, 9(9-10): 1742-1752
- [14] Sanz Y, Olivares M, Moya-Pérez Á, et al. Understanding the role of gut microbiome in metabolic disease risk [J]. Pediatric Research, 2015, 77(1-2): 236-244
- [15] 朱超,梁琼麟,王义明,等. 代谢组学的整合化发展及其新进展[J]. 分析化学, 2010, 38(7): 1060-1068
Zhu C, Liang Q L, Wang Y M, et al. Integrated development of metabonomics and its new progress [J]. Chinese

- Journal of Analytical Chemistry, 2010, 38(7): 1060-1068 (in Chinese)
- [16] Ji H N, Song N N, Ren J, et al. Metabonomics reveals bisphenol A affects fatty acid and glucose metabolism through activation of LXR in the liver of male mice [J]. Science of the Total Environment, 2020, 703: 134681
- [17] Ji H N, Song N N, Ren J, et al. Systems toxicology approaches reveal the mechanisms of hepatotoxicity induced by diosbulbin B in male mice [J]. Chemical Research in Toxicology, 2020, 33(6): 1389-1402
- [18] 王朋倩, 吴茵, 戴丽, 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
Wang P Q, Wu Y, Dai L, et al. Effect of Wuzhuyu Decoction on urine metabolic spectrum in rats with deficiency cold and vomit based on UPLC-MS.[J]Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2019, 50(18): 4352-4363 (in Chinese)
- [19] Cui Y, Han J Y, Ren J, et al. Untargeted LC-MS-based metabonomics revealed that aristolochic acid I induces testicular toxicity by inhibiting amino acids metabolism, glucose metabolism, β -oxidation of fatty acids and the TCA cycle in male mice [J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2019, 373: 26-38
- [20] 李海山, 姬海南, 宋乃宁, 等. 不同种间、性别和年龄小鼠肝脏代谢谱的差异研究 [J]. 中国药物警戒, 2020, 17(1): 6-16
Li H S, Ji H N, Song N N, et al. Study on the difference of liver metabolism spectrum among different species, sexes and ages of mice [J]. Chinese Journal of Pharmacovigilance, 2020, 17(1): 6-16 (in Chinese)
- [21] Li W T, Zhang W P, Chang M Y, et al. Quadrupole orbitrap mass spectrometer-based metabonomic elucidation of influences of short-term di(2-ethylhexyl) phthalate exposure on cardiac metabolism in male mice [J]. Chemical Research in Toxicology, 2018, 31(11): 1185-1194
- [22] Vance J E, Vance D E. Phospholipid biosynthesis in mammalian cells [J]. Biochemistry and Cell Biology, 2004, 82(1): 113-128
- [23] Weltzien H U. Cytolytic and membrane-perturbing properties of lysophosphatidylcholine [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1979, 559(2-3): 259-287
- [24] Canty D J, Zeisel S H. Lecithin and choline in human health and disease [J]. Nutrition Reviews, 1994, 52(10): 327-339
- [25] Chiang J Y L. Bile acid metabolism and signaling [J]. Comprehensive Physiology, 2013, 3(3): 1191-1212
- [26] Jaeschke H, Gores G J, Cederbaum A I, et al. Mechanisms of hepatotoxicity [J]. Toxicological Sciences, 2002, 65(2): 166-176
- [27] Nunes de Paiva M J, Pereira Bastos de Siqueira M E. Increased serum bile acids as a possible biomarker of hepatotoxicity in Brazilian workers exposed to solvents in car repainting shops [J]. Biomarkers: Biochemical Indicators of Exposure, Response, and Susceptibility to Chemicals, 2005, 10(6): 456-463 ◆