

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20220419001

彭博, 杨凯歌, 胡康蝶, 等. 妊娠期孕妇尿液中的外源性雌激素水平及其与代谢相关的改变[J]. 生态毒理学报, 2023, 18(2): 269-285

Peng B, Yang K G, Hu K D, et al. Level of exoestrogens in urine of pregnant women during pregnancy and related metabolic changes [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2023, 18(2): 269-285 (in Chinese)

妊娠期孕妇尿液中的外源性雌激素水平及其与代谢相关的改变

彭博¹, 杨凯歌¹, 胡康蝶¹, 张舟易¹, 梁红², 闫超¹, 吴明媛^{1, #}, 王彦^{1, *}

1. 上海交通大学药学院, 上海 200240

2. 上海市计划生育研究所, 上海 200237

收稿日期: 2022-04-19 录用日期: 2022-07-15

摘要: 外源性雌激素是具有雌激素活性的外源性化学物质, 通过模拟或抑制内源性雌激素从而干扰生物体的正常内分泌活动。处于妊娠期的孕妇摄入过量外源性雌激素不仅会对自身产生危害, 还会对其胎儿产生不利影响, 并且外源性雌激素摄入程度与孕妇代谢过程变化之间具有关联性。本文通过液相色谱-三重四极杆质谱联用技术测定孕妇尿液样本中的8种外源性雌激素含量, 并根据样本中的外源性雌激素含量将尿液样本分为外源性雌激素水平不同的3组, 在3组间有6种外源性雌激素含量具有显著性差异, 其中黄豆苷原、染料木黄酮和肠内酯已被美国环境保护局列入内分泌干扰物审查程序清单中。然后, 利用液相色谱-高分辨质谱联用技术分析孕妇尿液样本中的代谢组。通过多维统计分析比较外源性雌激素水平不同的孕妇尿液样本代谢组, 同时筛选差异代谢物。根据差异代谢物进行生物信息分析可知, 孕妇摄入不同程度外源性雌激素引起的代谢过程变化主要有氨基酸代谢、脂肪酸生物合成、柠檬酸循环和氮代谢过程等。此外, 3组样本中表达差异和诊断价值较大的共同差异代谢物有甜菜碱和龙胆酸, 它们和体内对抗氧化应激相关。差异代谢物反映了外源性雌激素摄入程度对孕妇代谢过程的影响, 可作为生物标志物, 并为外源性雌激素作用机制研究提供参考。

关键词: 外源性雌激素; 孕妇; 慢性毒性; 氧化损伤; 液相色谱-质谱; 摄入程度; 尿液代谢组学; 差异代谢物

文章编号: 1673-5897(2023)2-269-17 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Level of Exoestrogens in Urine of Pregnant Women During Pregnancy and Related Metabolic Changes

Peng Bo¹, Yang Kaige¹, Hu Kangdie¹, Zhang Zhouyi¹, Liang Hong², Yan Chao¹, Wu Mingyuan^{1, #}, Wang Yan^{1, *}

1. School of Pharmacy, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

2. Shanghai Institute of Planned Parenthood, Shanghai 200237, China

Received 19 April 2022 accepted 15 July 2022

Abstract: Exoestrogens are exogenous chemical substances with estrogenic activity, which can affect normal physiological functions by interfering with the endocrine system of humans or other animals. Intake of exoestrogens by pregnant women during pregnancy will not only cause harm to themselves, but also adversely affect their fetuses.

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81874307, 21874088); 上海市科委“科技创新行动计划”(19142203100, 2014220400, 19DZ2202200)

第一作者: 彭博(1993—), 男, 硕士研究生, 研究方向为代谢组学, E-mail: alaric_pb@163.com

* 通信作者 (Corresponding author), E-mail: wangyan11@sjtu.edu.cn

共同通信作者 (Co-corresponding author), E-mail: wumingyuan@sjtu.edu.cn

Interestingly, there is a possible correlation between the intake level of exoestrogens and changes in the metabolic process of pregnant women. In this paper, first, the content of exoestrogens in urine samples of pregnant women was determined by liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry, and the samples were classified into three groups, according to the content of exoestrogens, as “high, middle and low”. Among the three groups, the levels of daidzein, genistein, glycitein, enterodiol, enterolactone, and 3-(4-hydroxyphenyl) chroman-7-ol had a significant difference, where three of them, daidzein, genistein and enterolactone, had already been included in the list of Endocrine Disruptor Screening Program by U.S. Environmental Protection Agency. Second, metabolomes of the three groups of urine samples were analyzed by liquid chromatography-high resolution mass spectrometry, then, they were compared by multidimensional statistical analysis, and the differential metabolites were screened. There were 11 up-regulated and 6 down-regulated metabolites screened in the “high” group compared to the “middle” one, and 40 up-regulated and 40 down-regulated metabolites screened in the “middle” one compared to the “low” group. At the same time, comparison of the “high” group vs the “low” one showed 27 up-regulated and 21 down-regulated metabolites. Furthermore, bioinformatics analysis of differential metabolites showed that the metabolic process changes related to the intake level of exoestrogens mainly included amino acid metabolism, fatty acid biosynthesis, citric acid cycle and nitrogen metabolism. In addition, the common differential metabolites with a greater expression difference and diagnostic value were betaine and gentisic acid, which were related to anti-oxidative stress *in vivo*. Betaine is an important methyl donor in the methyl transfer reaction *in vivo* and can improve sulfur-containing amino acid metabolism against oxidative stress. On the other hand, gentianic acid is a polyhydroxy acid and its two phenolic hydroxyl groups are in the para position to each other, so it can play a role of antioxidant and free radical scavenger under different types of physical and chemical stimuli. In conclusion, by exploring the relationship between the intake level of exoestrogens and the changes in the metabolic process of pregnant women, this paper provides a reference for further understanding the toxicity mechanism of exoestrogens, as well as a guidance to a reasonable diet and good living habits for pregnant women.

Keywords: exoestrogens; pregnant women; chronic toxicity; oxidative damage; liquid chromatography-mass spectrometry; intake level; metabolomics of urine samples; differential metabolites

外源性雌激素(exoestrogens, EE)是指具有雌激素活性的外源性化学物质, 又被称为环境雌激素(environmental estrogens)或异源雌激素(xenoestrogens), 这类物质具有雌激素样活性, 可以通过模拟或抑制内源性雌激素来发挥广泛的雌激素作用, 从而改变内分泌与生殖系统的生理功能^[1-2]。EE 主要来源于植物或真菌中的天然产物, 如大豆和鹰嘴豆中的异黄酮、亚麻籽中的木脂素、黄豆芽和绿豆芽籽中的香豆素等, 以及人工合成衍生物, 如某些药物(口服避孕药等)、杀虫剂、化妆品、塑料、烟雾、工业副产品和金属等。因此, EE 广泛存在于食品和环境。

多项研究表明, 摄入 EE 会影响生物体的生理功能。人工合成类的外源性雌激素对生物体具有毒害作用, 不仅会损伤女性和男性的生殖系统发育, 并且相关代谢疾病以及骨骼健康与 EE 的摄入也有显著的关联性^[3-4]。而植物源性的外源性雌激素一方面也会扰乱生物体的正常内分泌活动, 另一方面在

正常的剂量范围内对人体有一定的益处^[3-4]。

妊娠期孕妇作为一个独特的群体, 摄入过量的 EE 不仅会对自身产生危害, 还会对其胎儿产生不利影响。在生殖系统方面, 多项研究表明, 女性在妊娠期摄入双酚 A(bisphenol A, BPA)和己烯雌酚(diethylstilbestrol, DES)等 EE 不仅会增加自身乳腺癌和子宫内膜异位症等生殖系统疾病的发病率, 还会增加下一代未来患乳腺癌和子宫内膜异位症等生殖系统疾病的风险, 并且风险随着年龄的增加更加显著^[5-8]。胚胎期暴露于对羟基苯甲酸丙酯会加剧雌性大鼠成年后卵巢氧化应激、炎症和纤维化, 从而通过激活线粒体凋亡途径促进卵泡闭锁, 加速卵巢衰老^[9]。男性生殖系统健康方面的问题(如精液质量下降、睾丸癌、尿道下裂和隐睾症)也与 EE 的过量摄入有关, 且在胚胎期和婴幼儿时期过量摄入 EE 造成的不利影响更为显著^[10]。在代谢方面, 妊娠期内摄入 EE 会影响胎儿的代谢调节过程, 例如在子宫

内暴露于极低剂量 BPA 的雌性大鼠胎儿的肝脏中参与胆固醇和脂肪酸生物合成和运输的蛋白质受到显著的调节作用^[11]。此外,在影响婴幼儿发育方面,孕妇在妊娠期摄入 BPA 等酚类 EE 与胎儿生长参数的不利影响相关(与出生身长呈负相关,与体质量指数呈正相关,与胎龄呈负相关),且在女婴中的影响更大^[12-13];孕妇在妊娠期摄入 EE 还会影响其胎儿的神经发育过程,例如有研究表明妊娠期摄入 BPA 与注意缺陷多动障碍(尤其在男孩中)相关联^[14]。

鉴于妊娠期孕妇因为 EE 摄入引起的代谢过程和生理病理变化与 EE 摄入程度具有关联性,因此,本研究首先基于超高效液相色谱-三重四级杆质谱建立孕妇尿液样本中 8 种 EE 的定量方法并测定 EE 含量,然后根据样本中的 EE 含量将样本分为低、中和高 EE 水平组;再借助基于高分辨质谱的非靶向代谢组学策略分析不同 EE 水平的孕妇尿液样本的代谢组,通过多维统计分析、差异代谢物筛选和代谢通路分析等手段,探索 EE 摄入程度与孕妇代谢过程和生理病理变化之间的关联性。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 孕妇尿液样本的收集

本研究中所用尿液样本由上海市生殖研究所提供,所有采集的尿液样本均与提供者签署了书面知情同意书,并经伦理委员会批准。本次实验共采集了 90 例尿液样本,尿液样本经采集后置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存直至使用。

1.2 仪器、试剂与材料

液相色谱-三重四级杆质谱联用仪(6490 QqQ-MS, Agilent, 美国); ACQUITY UPLC BEH C18 色谱柱(100 mm \times 2.1 mm, 1.7 μm , Waters, 美国); Vanquish UHPLC system & Q Exactive plus Mass spectrometer (ThermoFisher, 美国); ACQUITY UPLC HSS T3 (100 mm \times 2.1 mm, 1.7 μm , Waters, 美国); XW-80A 涡旋混合器(上海青浦沪西仪器厂, 中国); 离心浓缩干燥仪 T120(江苏太仓华利达仪器公司, 中国); 冷冻离心机(Centrifuge 5417R, Eppendorf, 德国); KQ5200DE 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司, 中国), SHB-III 循环水多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司, 中国)。

超纯水由 Molcell 1805V 摩尔细胞型纯水机(重庆摩尔水处理设备有限公司, 中国)制备; 甲醇、乙腈(色谱纯, Merck, 德国); 甲酸、甲酸铵、乙酸铵(色谱纯, CNW, 德国); 乙酸乙酯(色谱纯, 国药, 中国); 黄

豆苷原(daidzein, DAD)、染料木黄酮(genistein, GEN)、黄豆黄素(glycitein, GLY)、肠二醇(enterodiol, END)、肠内酯(enterolactone, ENT)、雌马酚(3-(4-hydroxyphenyl)chroman-7-ol, EQU)、松脂醇(pinoresinol, PRS)、罗汉松脂素(matairesinol, MTR)和磺胺甲噁唑(sulfamethoxazole, SMZ)均购自 Sigma 公司; β -葡萄糖醛酸酶(Tyep HP-2, 100 000 units $\cdot\text{mL}^{-1}$, Sigma, 英国); L-2-氯苯丙氨酸(Sigma Aldrich, 美国); LPC 17:0(Avanti 公司, 美国)。

1.3 基于三重四级杆质谱的外源性雌激素定量方法建立

准确称取外源性雌激素各对照品适量, 分别以甲醇溶解, 得到 $10^3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的贮备液。稀释后得 $0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 工作液, 经 QqQ 质谱优化各对照品的质谱参数。

色谱条件: 色谱柱为 ACQUITY UPLC BEH C18 色谱柱(100 mm \times 2.1 mm, 1.7 μm , Waters, 美国); 流动相 A 为 0.1% 甲酸水溶液, 流动相 B 为乙腈; 流速为 $0.25\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 进样量为 5 μL ; 柱温为室温; 梯度洗脱如下: 0 min, 30% B; 0.0 ~ 1.0 min, 30% ~ 50% B; 1.0 ~ 4.0 min, 50% ~ 90% B; 4.0 ~ 4.5 min, 90% ~ 100% B。每 2 针样品间以初始流动相梯度(30% B)平衡 1 min, 即 4.5 ~ 4.6 min, 100% ~ 30% B; 4.6 ~ 5.6 min, 30% B。

质谱条件: ESI 电离源, 负离子模式, 毛细管电压为 3 kV, 干燥气温度(gas temp.)为 $130\text{ }^{\circ}\text{C}$, 干燥气流量 $11\text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$, 雾化器压力 344.738 kPa , 鞘流气温度 $275\text{ }^{\circ}\text{C}$, 鞘流气流速 $12\text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$, 采用 MRM 模式, 各化合物 MRM 参数如表 1 所示。

1.4 尿液样本中的外源性雌激素含量测定

标准曲线配制: 取适量 $10^3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 8 种 EE 对照品贮备液, 用甲醇配成浓度为 1.25×10^{-3} 、 2.5×10^{-3} 、 5×10^{-3} 、 10×10^{-3} 、 20×10^{-3} 、 40×10^{-3} 、0.1、0.2、0.5、1 和 $2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的混合对照品溶液; 取 0.1 mL 各浓度的混合标准品溶液, 分别加入 10 μL 内标 SMZ($0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)后待测。线性以标准品与内标的峰面积比值和标准品浓度梯度进行线性回归, 得到线性回归方程。在本研究建立的分析方法中, 检测限(LOD)是生物样品按照分析方法的要求进行提取处理并检测, 能区分于噪声的最低检出浓度, 检出限对应的响应值一般为基线噪声的 3 倍; 定量限(LOQ)是通过一系列含有已知浓度被测物的试样进行分析, 在准确度和精密度都符合要求的情况下, 来确定被测物能

被定量的最小量,即标准曲线浓度的最小值。

分析方法验证:本研究中分析方法验证包括精密度、回收率和基质效应。精密度通常包括日内(批内)精密度和日间(批间)精密度。在标准曲线范围的高、中、低3个浓度(1 、 0.2 和 $5 \times 10^{-3} \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)分别制备6个样品,连续测定3批,以测定该方法的精密度。变异系数(CV%)常用于表示精密度,当日间和日内精密度的CV%不超过 $\pm 15\%$ 时,该方法精密度良好。其中, $\text{CV}\% = (\text{标准偏差}(\text{SD})/\text{平均值}(\text{Mean})) \times 100\%$ 。本研究使用内标法进行提取回收率和基质效应测定。选取浓度为 $200 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液用作验证,提取回收率为内标加入后提取的峰面积与内标溶液峰面积的百分比,基质效应的测定则是提取后添加内标峰面积与内标标准的峰面积的百分比,所有的测定均进行3组平行。

样本前处理:取 0.1 mL 尿液样品,加入 0.5 mL $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸铵缓冲液和 $20 \mu\text{L}$ β -葡萄糖醛酸酶($20 \text{ KU} \cdot \text{mL}^{-1}$, $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸铵缓冲液配制),充分混匀后置于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温摇床中水解过夜。水解后加入 $10 \mu\text{L}$ 内标SMZ溶液($200 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)和 1 mL 乙酸乙酯,充分振荡 3 min ,于 $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 离心 15 min ,准确吸取上清液于另一试管中。重复上述步骤,混匀2次上清液。将上清液在室温条件下

于离心浓缩干燥仪中浓缩干燥,干燥后加入 $110 \mu\text{L}$ 甲醇,充分涡旋,于 $10000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 离心 10 min ,然后将液体转移至液相进样小瓶中,待测。

1.5 尿液样本分组

尿液样本中测定的8种EE浓度经肌酐进行校正。以GEN为代表,将GEN含量标准化并排序后绘制90例孕妇尿液样本中GEN的含量变化;然后根据GEN含量将90例孕妇尿液样本分为3组:前30例为低EE水平组(Exp-L),中间30例为中EE水平组(Exp-M),后30例为高EE水平组(Exp-H)。然后对3组样本中8种EE的标准化含量变化进行比较。

1.6 基于高分辨质谱的尿液样本非靶向代谢组学分析

非靶向代谢组学尿液样本前处理:取 0.1 mL 尿液样品,加入 0.2 mL 甲醇-乙腈溶液($2:1, V:V$)和 $10 \mu\text{L}$ 的双内标(L-2-氯苯丙氨酸,甲醇配制, $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; LPC 17:0, 甲醇配制, $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$),涡旋震荡 60 s 后,于冰水浴中超声提取 10 min ,然后放置于 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 中静置 30 min 。将静置后的混合溶液于 $13000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 下离心 15 min ,取 $160 \mu\text{L}$ 上清液装入带内衬管的液相进样小瓶中,待测。此外,所有尿液样本取等量($20 \mu\text{L}$)均匀混合,用作质控样本(quality control, QC),并按上述前处理方法相同处理。

表1 8种外源性雌激素和内标的质谱参数

Table 1 MS parameters of 8 exoestrogens and internal standard sulfamethoxazole

| 植物雌激素/内标 Phytoestrogens/Internal standard | 定量离子对 Quantitative ion pair | 碰撞能量(CE)/V Collision energy (CE)/V | 定性离子对 Qualitative ion pair | 碰撞能量(CE)/V Collision energy (CE)/V |
|---|--------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------|---------------------------------------|
| 木黄酮(GEN) Genistein (GEN) | 269.0 ~ 133.0 | 30 | 269.0 ~ 159.1 | 30 |
| 黄豆苷原(DAD) Daidzein (DAD) | 253.0 ~ 223.0 | 35 | 253.0 ~ 228.0 | 30 |
| 肠二醇(END) Enterodiol (END) | 301.1 ~ 253.1 | 25 | 301.1 ~ 106.1 | 35 |
| 肠内酯(ENT) Enterolactone (ENT) | 297.0 ~ 253.1 | 20 | 297.0 ~ 107.0 | 25 |
| 雌马酚(EQU) 3-(4-hydroxyphenyl)chroman-7-ol (EQU) | 241.1 ~ 119.0 | 25 | 241.1 ~ 135.1 | 15 |
| 松脂醇(PRS) Pinoresinol (PRS) | 357.1 ~ 136.1 | 40 | 357.1 ~ 151.1 | 25 |
| 黄豆黄素(GLY) Glycitein (GLY) | 282.9 ~ 268.0 | 15 | 282.9 ~ 232.9 | 25 |
| 罗汉松脂素(MTR) Matairesinol (MTR) | 357.1 ~ 83.1 | 25 | 357.1 ~ 122.0 | 35 |
| 磺胺甲噁唑(SMZ) Sulfamethoxazole (SMZ) | 252.1 ~ 156.1 | 15 | 252.1 ~ 92.1 | 25 |

色谱条件:色谱柱为 ACQUITY UPLC HSS T3 柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm);流动相 A 为 0.1% 甲酸-水溶液,流动相 B 为 0.1% 甲酸-乙腈溶液;流速为 0.4 mL·min⁻¹;进样体积为 1 μL;柱温为 45 °C;梯度洗脱如下:0 min, 1% B;0 ~ 12 min, 1% ~ 90% B;12 ~ 13 min, 90% B。每 2 针样品间以初始流动相梯度(1% B)平衡 2 min, 即 13 ~ 13.1 min, 90% ~ 1% B;13.1 ~ 15.1 min, 1% B。

质谱条件:ESI 电离源,正负离子模式;碰撞气、雾化气为氮气(99.999%);正离子模式下喷射电压为 3.2 kV,负离子模式下喷射电压为 2.8 kV;毛细管温度为 320 °C;s-lens RF level 为 50 V;扫描模式为 DDA 模式(1 full scan followed by 5 MS/MS scans);一级碰撞能为 15 V,二级碰撞能为 30 V;质量扫描范围为 70 ~ 1 000 *m/z*;全扫描分辨率为 70 000,自动增益目标值(AGC target)为 1e6,注入时间(IT)为 100 ms;二级扫描(dd-MS/MS)分辨率为 17 500,AGC target 为 5e5,IT 为 50 ms。数据通过 Xcalibur 3.0 软件采集。

1.7 非靶向代谢组学数据分析

非靶向代谢组学分析获得的原始数据经代谢组学处理软件 Progenesis QI v2.3 软件(Nonlinear Dynamics, Newcastle, 英国)进行基线过滤、峰识别、积分、保留时间校正、峰对齐和归一化。其主要参数为 precursor tolerance: 0.0005%; product tolerance: 0.001%; product ion threshold: 5%。化合物的鉴定基于精确质量数、二级碎片以及同位素分布,使用 The Human Metabolome Database (HMDB) 和 Lipidmaps(v2.3)以及 METLIN 数据库进行定性。对提取到的数据,删除缺失值(0 值)>50% 的离子峰,并将 0 值以质谱响应峰面积最小值的一半替换,并根据化合物定性结果打分(Score)对定性得到的化合物进行筛选。最后将正负离子数据合并成一个数据矩阵表。

根据 QC、低 EE 水平(Exp-L)组、中 EE 水平(Exp-M)组和高 EE 水平(Exp-H)组孕妇尿液样本中鉴定出的代谢物及其相对含量进行主成分分析(principal component analysis, PCA),再将低 EE 水平组(Exp-L)、中 EE 水平(Exp-M)和高 EE 水平组(Exp-H)孕妇尿液样本的代谢物进行两两正交偏最小二乘法判别分析(orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA),同时根据 OPLS-DA 得到在样本区分中贡献较大的变量,即变量权重(variable importance for the projection, VIP)。使用

GraphPad Prism 8 软件通过 moderate t-statistic 计算 *P*-value,并基于 *P*-value、差异倍数(fold change, FC)和 VIP 筛选出 3 组样品之间的差异代谢物,并绘制火山图。基于筛选获得的差异代谢物进行 KEGG 通路分析,根据 $-\log_{10}$ *P*-value 排序的 top15 通路通过 Origin 2019b 软件绘制气泡图展示。使用 SPSS 软件根据筛选获得的差异代谢物进行接受者操作特性曲线(ROC)分析,并计算曲线下面积(AUC)。

2 结果 (Results)

2.1 外源性雌激素的定量方法和含量测定

2.1.1 定量方法建立

在本研究中,基于 UPLC-QqQ-MS 的 MRM 模式对 8 种 EE 进行含量测定,8 种 EE 和内标 SMZ 定量离子对和定性离子对的总离子流图如图 1 所示。8 种 EE 的标准曲线如表 2 所示,回归系数均>0.99,线性关系良好;8 种 EE 检测限和定量限如表 2 所示;且回收率为 55.9% ~ 99.8%,基质效应为 74.1% ~ 110.7%,日内精密密度为 5.0% ~ 8.1%,日间精密密度为 5.7% ~ 8.8%。上述参数均符合要求,说明建立的 LC-QqQ-MS 方法能够用于检测孕妇尿液样本中 8 种 EE 的含量。

2.1.2 含量测定分析及样本分组

基于上述 LC-QqQ-MS 方法测定了 90 例孕妇尿液样本中的 8 种 EE 浓度,并经肌酐进行校正。GEN 是一种具有抗氧化特性的异黄酮类植物雌激素,90 例孕妇尿液样本中 GEN 含量的变化幅度较大,如图 2(a)所示。根据 GEN 含量将 90 例孕妇尿液样本分为 Exp-L、Exp-M 和 Exp-H 3 组后,其他 7 种 EE 含量趋势与 GEN 一致,即当孕妇体内 GEN 水平较低时,其他 7 种 EE 水平也是较低的;中水平和高水平亦是如此,如图 2(b)所示。这可能是由于饮食等生活习惯或身处环境相似的群体,她们的 EE 摄入种类和程度也较为相近。并且,90 例孕妇尿液样本分为 3 组后,GEN、DAD 和 GLY 这 3 种 EE 含量在 Exp-L、Exp-M 和 Exp-H 组间都具有显著性差异;END、ENT 和 EQU 这 3 种 EE 含量至少在 2 组间具有显著性差异;PRS 和 MTR 的含量在 3 组间尽管有差异,却不具备显著性。但是,大部分 EE 含量在 3 组间的显著性差异说明该分组方式的有效性,具有统计学意义。此外,本研究中分析的 8 种 EE 中,显著性差异较大的 GEN、DAD 和 ENT 已被美国环境保护局(US EPA)列入内分泌干扰素审查程序(Endocrine Disruptor Screening Program, EDSP)清单

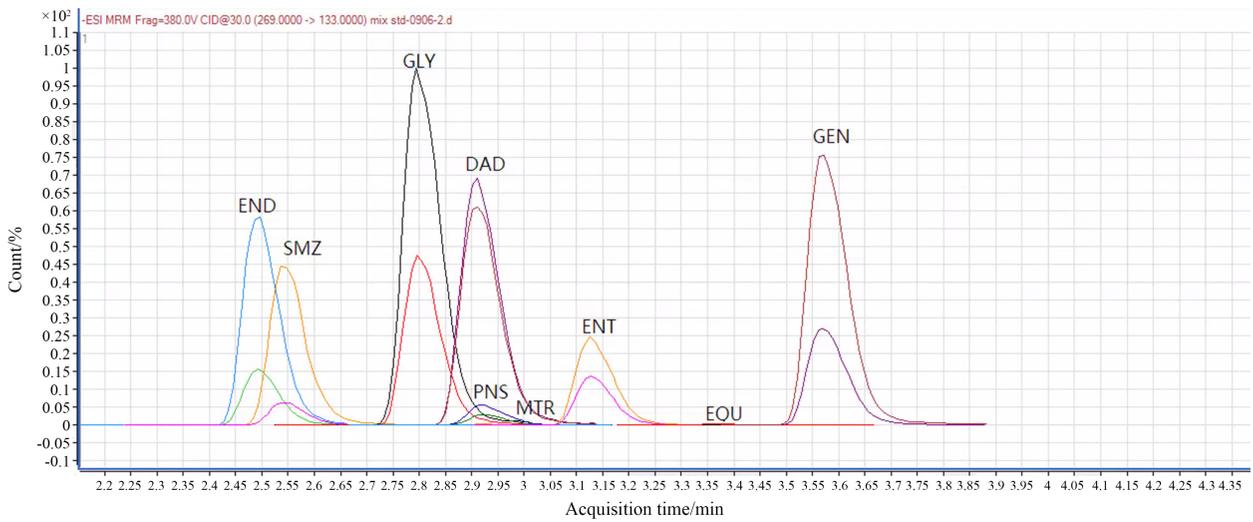


图 1 8 种外源性雌激素和内标的定量和定性离子对 LC-MS/MS 分离图

Fig. 1 LC-MS/MS chromatograms of quantitative ion pair and qualitative ion pair of 8 exoestrogens and internal standard

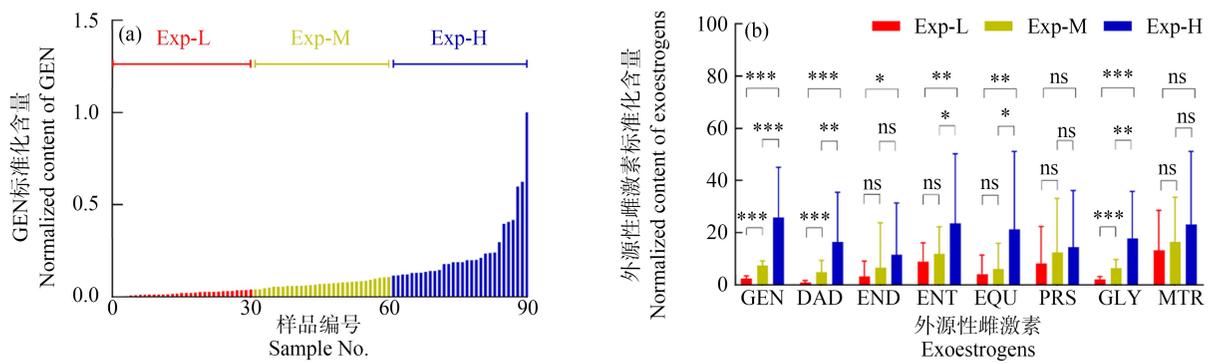


图 2 孕妇尿液样本中外源性雌激素的含量比较

注: (a) 90 例尿液样品中 GEN 浓度变化趋势; (b) 低 EE 水平组 (Exp-L)、中 EE 水平组 (Exp-M) 和高 EE 水平组 (Exp-H) 组尿液样本中 8 种外源性雌激素的含量对比; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

Fig. 2 Content comparison of exoestrogens in the urine samples of pregnant women

Note: (a) Trend of GEN concentration in 90 urine samples; (b) Content comparison of 8 exoestrogens in the urine samples of low EE level group (Exp-L), medium EE level group (Exp-M) and high EE level group (Exp-H) groups; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

表 2 基于 LC-QqQ-MS 方法的 8 种外源性雌激素的标准曲线、检测限 (LOD) 和定量限 (LOQ)

Table 2 Standard curves, limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) of 8 exoestrogens measured by LC-QqQ-MS method

| 外源性雌激素 Exogenous estrogen | 标准曲线方程 Equation of standard curve | R^2 | LOD/(ng·mL ⁻¹) | LOQ/(ng·mL ⁻¹) |
|------------------------------|--------------------------------------|--------|----------------------------|----------------------------|
| GEN | $y = 39.749x + 0.5103$ | 0.9930 | 0.070 | 0.300 |
| DAD | $y = 18.854x + 0.0406$ | 0.9985 | 0.100 | 0.700 |
| END | $y = 55.321x - 0.4338$ | 0.9995 | 0.100 | 0.700 |
| ENT | $y = 47.291x + 0.0173$ | 0.9984 | 0.070 | 0.300 |
| EQU | $y = 0.116x + 0.0001$ | 0.9924 | 30.000 | 70.000 |
| PRS | $y = 0.629x - 0.0035$ | 0.9988 | 7.000 | 10.000 |
| GLY | $y = 65.047x - 0.6882$ | 0.9972 | 0.001 | 0.003 |
| MTR | $y = 16.285x - 0.0355$ | 0.9989 | 1.000 | 3.000 |

中。因此,我们可以 GEN 为代表,将 EE 水平作为尿液样本的分组依据,并研究不同程度的 EE 摄入对妊娠期孕妇的生理过程和代谢过程的影响。

2.2 不同外源性雌激素水平的孕妇尿液样本代谢组学分析

2.2.1 多维统计分析

根据孕妇尿液样本中的 EE 含量将 90 例样本分为低 Exp-L、Exp-M 和 Exp-H 组,利用液相色谱-质谱联用技术分析尿液样本中的代谢组。多维统计分析可同时考察所有变量(代谢物)对样本的影响,找出样本与变量之间的关系,并且能够在简化复杂数据的同时,最大程度地保留原始信息。因此,可以通过多维统计分析获得样本的代谢特征,并通过降维可视化不同组之间的分离程度。

首先通过无监督的 PCA 对 Exp-L、Exp-M 和 Exp-H 组孕妇尿液样本以及 QC 质控样本的代谢组

数据做一个总体的趋势分析,确定不同 EE 水平是否会影响孕妇的代谢过程。由 PCA 得分图(图 3(a))可知,样本基本上均匀分布在 95% 的可信区间内(圈外个别离奇值需要剔除),其中, QC 样本聚集良好,表明检测样本批次之间误差可控,仪器和方法的精密度和稳定性满足实验需求。进一步观察,各组样本分布均较广,且几何位置相近,区分并不明显,不同组别难以通过 PCA 良好地区分,提示需要进一步的统计分析。

有监督的 OPLS-DA 结合了正交信号校正和偏最小二乘法这 2 种方式,能将主要差距集中在预测主成分中,因此可以更好地模拟和区分结果。Exp-L、Exp-M 和 Exp-H 组孕妇尿液样本两两之间进行 OPLS-DA,由 OPLS-DA 得分图(图 3(b): Exp-H vs Exp-M;图 3(c): Exp-M vs Exp-L;图 3(d): Exp-H vs Exp-L)可知,Exp-L、Exp-M 和 Exp-H 组孕妇尿液样

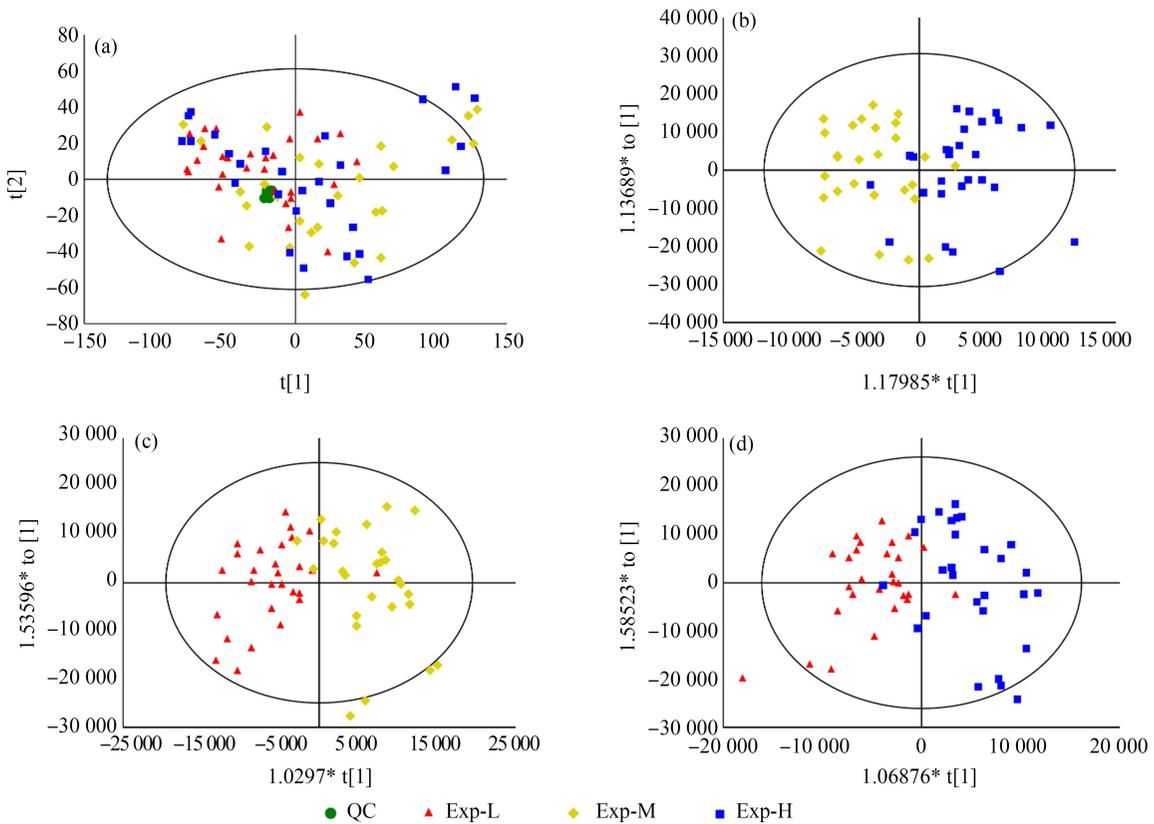


图 3 Exp-L、Exp-M 和 Exp-H 组孕妇尿液样本代谢组的多维统计分析得分图

注:(a) QC、Exp-L、Exp-M 和 Exp-H 组的 PCA 得分图;(b) Exp-H vs Exp-M 的 OPLS-DA 得分图;(c) Exp-M vs Exp-L 的 OPLS-DA 得分图;(d) Exp-H vs Exp-L 的 OPLS-DA 得分图。

Fig. 3 Score plots of multivariate statistical analysis of metabolome in the pregnant women's urine samples of Exp-L, Exp-M and Exp-H groups

Note: (a) PCA score plot of QC, Exp-L, Exp-M and Exp-H groups; (b) OPLS-DA score plot of Exp-H vs Exp-M; (c) OPLS-DA score plot of Exp-M vs Exp-L; (d) OPLS-DA score plot of Exp-H vs Exp-L.

本可以良好地区分开,表明孕妇摄入不同程度的EE与其生理代谢过程变化之间具有关联性。此外,通过OPLS-DA还可以根据VIP值得到在样本区分中贡献较大的变量,用于下一步筛选差异代谢物。

2.2.2 差异代谢物筛选

代谢组学分析的主要目的是寻找不同组间具有重要生物学意义的差异代谢物,以阐明生物体的代谢过程和生理病理变化机制。而差异代谢物的筛选是代谢组学分析中重要的步骤,后续的代谢通路和代谢网络分析等都是基于差异代谢物进行的。在筛选差异代谢物的过程中,一般会选择多标准的评价方法,以提高筛选的准确度和可信度。

FC指的是2组间某一变量的平均值之比,该参数可在宏观角度比较变量在2组间的表现;根据单维统计分析 Student's t-test 检验得到的 P -value 可衡量变量在2组间差异的显著性;考察所有变量的多维统计分析中获得的VIP值也可用于差异代谢物的筛选。因此,在本实验中,结合以上3个参数,即 $FC > 1.11$ 或 < 0.90 , P -value < 0.05 , $VIP > 1$,对Exp-L、Exp-M和Exp-H组孕妇尿液样本中的差异代谢物进行筛选。

由图4可知,我们能够直观合理地观察并筛选得到3组孕妇尿液样本中的差异代谢物。图4(a)和表3展示了Exp-H组与Exp-M组间筛选到的17个差异代谢物,其中11个差异代谢物上调,6个差异代谢物下调;图4(b)和表4展示了Exp-M组与Exp-L组间筛选到的80个差异代谢物,其中40个差异代谢物上调,40个差异代谢物下调;图4(c)和表5展示了Exp-H组与Exp-L组间筛选到的48个差异代

代谢物,其中27个差异代谢物上调,21个差异代谢物下调。

2.2.3 差异代谢物的生物信息分析

通过上述筛选过程获得的差异代谢物具有重要的生物学意义,可以阐明生物体的代谢过程和生理病理变化机制。本实验中,我们将获得的差异代谢物通过KEGG数据库寻找与其相关的代谢通路,探究孕妇摄入不同程度EE与孕妇体内的代谢过程和生理病理过程变化之间的关联性。

Exp-H与Exp-M组间差异代谢物相关的通路如图5(a)所示;Exp-M与Exp-L组间差异代谢物相关的通路如图5(b)所示;Exp-H与Exp-L组间差异代谢物相关的通路如图5(c)所示。由差异代谢物相关的代谢通路可知,孕妇摄入不同程度EE造成的孕妇代谢过程和生理病理过程变化主要有氨基酸代谢、脂肪酸生物合成、柠檬酸循环和氮代谢过程等。这与许多研究结果相一致,即生物体摄入EE会对其氨基酸代谢和柠檬酸循环等能量代谢过程造成显著的影响且代谢过程变化与体内EE水平具有关联性。这些代谢过程的变化与孕妇妊娠期EE摄入造成的孕妇生殖系统受损以及婴幼儿发育影响等相关联且与EE摄入水平呈正相关。

为了验证这些差异代谢物用于辅助临床诊断和鉴别的价值,进一步对于上述的差异代谢物进行ROC分析,并根据AUC大小确定哪些关键差异代谢物可以成为用于探究孕妇体内EE水平影响代谢过程的潜在生物标志物。Exp-L、Exp-M和Exp-H组孕妇尿液样本间差异代谢物的AUC值如表3、表4和表5所示。由表可知,单个差异代谢物的AUC值并不是很大,用于预测模型的效果一般。

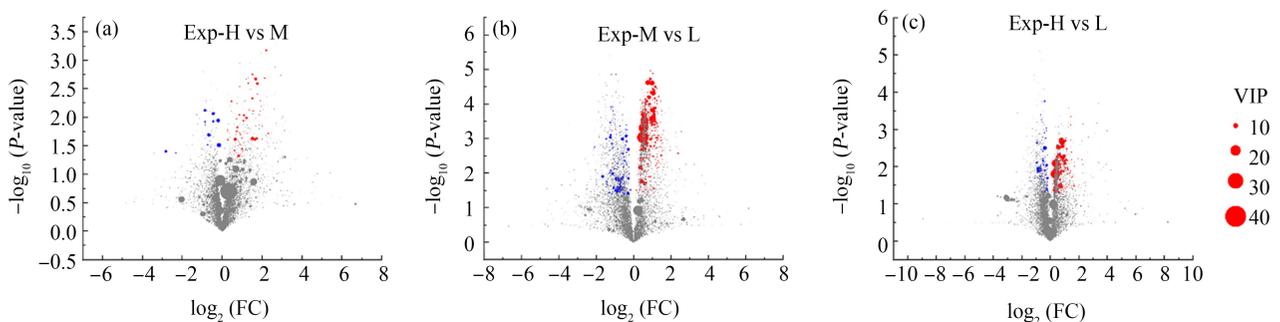


图4 Exp-L、Exp-M和Exp-H组孕妇尿液样本代谢物的火山图

注:(a) Exp-H vs Exp-M;(b) Exp-M vs Exp-L;(c) Exp-H vs Exp-L。

Fig. 4 Volcano plots of metabolites in the pregnant women's urine samples of Exp-L, Exp-M and Exp-H groups

Note: (a) Exp-H vs Exp-M; (b) Exp-M vs Exp-L; (c) Exp-H vs Exp-L.

表 3 Exp-H 和 Exp-M 组孕妇尿液样本中的差异代谢物
Table 3 Differential metabolites between urine samples of the Exp-H and Exp-M pregnant women

| No. | Metabolites | 代谢物 | m/z | 分子式 Formula | VIP | P-value | FC | AUC |
|-----|-----------------------------------|--------------|----------|---|--------|---------|--------|--------|
| 1 | Glycerophosphocholine | 甘油磷酸胆碱 | 258.1105 | C ₈ H ₂₀ NO ₆ P | 1.1518 | 0.0478 | 1.8379 | 0.5714 |
| 2 | 3-hydroxytetradecanedioic acid | 3-羟基十四烷二酸 | 273.1708 | C ₁₄ H ₂₆ O ₅ | 2.3095 | 0.0470 | 1.7481 | 0.6653 |
| 3 | 3-methyl-2-oxovaleric acid | 3-甲基-2-氧代戊酸 | 129.0556 | C ₆ H ₁₀ O ₃ | 2.1289 | 0.0188 | 1.8421 | 0.6825 |
| 4 | Allocholic acid | 别胆酸 | 453.2858 | C ₂₄ H ₄₀ O ₅ | 1.2603 | 0.0485 | 8.1712 | 0.6111 |
| 5 | Deoxyribose 5-phosphate | 脱氧核糖-5-磷酸 | 213.0170 | C ₅ H ₁₁ O ₇ P | 1.5400 | 0.0195 | 2.4024 | 0.7143 |
| 6 | Methyl propenyl ketone | 甲基丙烯酮 | 129.0556 | C ₃ H ₆ O | 4.7664 | 0.0047 | 2.8539 | 0.7249 |
| 7 | 4-hydroxy-2-oxoglutaric acid | 4-羟基-2-氧代戊二酸 | 207.0144 | C ₅ H ₆ O ₆ | 5.0920 | 0.0479 | 1.7830 | 0.6415 |
| 8 | Isovalerylsarcosine | 异戊酰肌氨酸 | 174.1128 | C ₈ H ₁₅ NO ₃ | 1.0283 | 0.0291 | 1.3275 | 0.6680 |
| 9 | Apigenin | 芹菜素 | 271.0604 | C ₁₅ H ₁₀ O ₅ | 1.7520 | 0.0283 | 6.6463 | 0.7123 |
| 10 | L-gulonolactone | L-古洛内酯 | 177.0403 | C ₆ H ₁₀ O ₆ | 3.4311 | 0.0249 | 1.2211 | 0.6614 |
| 11 | 2-methylacetoacetic acid | 2-甲基乙酰乙酸 | 115.0399 | C ₅ H ₈ O ₃ | 1.5454 | 0.0179 | 1.6111 | 0.6508 |
| 12 | L-glutamic acid | L-谷氨酸 | 148.0606 | C ₅ H ₉ NO ₄ | 3.2589 | 0.0307 | 0.6071 | 0.6720 |
| 13 | Oxypurinol | 羟嘌呤 | 153.0410 | C ₃ H ₄ N ₄ O ₂ | 4.6004 | 0.0118 | 0.7390 | 0.6786 |
| 14 | Threonic acid | 苏糖酸 | 135.0297 | C ₄ H ₈ O ₅ | 8.3785 | 0.0310 | 0.8988 | 0.7037 |
| 15 | 2-aminobenzoic acid | 2-氨基苯甲酸 | 138.0552 | C ₇ H ₇ NO ₂ | 6.3751 | 0.0205 | 0.6282 | 0.6534 |
| 16 | L-glyceric acid | L-甘油酸 | 151.0260 | C ₃ H ₆ O ₄ | 6.2022 | 0.0087 | 0.7365 | 0.6958 |
| 17 | L-4-hydroxyglutamate semialdehyde | L-4-羟基谷氨酸半醛 | 146.0457 | C ₅ H ₉ NO ₄ | 3.5148 | 0.0210 | 0.6596 | 0.7077 |

表 4 Exp-M 和 Exp-L 组孕妇尿液样本中的差异代谢物
Table 4 Differential metabolites between urine samples of the Exp-M and Exp-L pregnant women

| No. | Metabolites | 代谢物 | m/z | 分子式 Formula | VIP | P-value | FC | AUC |
|-----|-----------------|--------|----------|--|--------|---------|--------|--------|
| 1 | Adenine | 腺嘌呤 | 136.0620 | C ₅ H ₅ N ₅ | 1.5149 | 0.0038 | 2.1848 | 0.7146 |
| 2 | Betaine | 甜菜碱 | 140.0685 | C ₃ H ₇ NO ₂ | 1.0627 | 0.0000 | 2.0791 | 0.8174 |
| 3 | Citric acid | 柠檬酸 | 210.0611 | C ₆ H ₈ O ₇ | 8.1615 | 0.0173 | 1.3674 | 0.6616 |
| 4 | Fumaric acid | 富马酸 | 134.0450 | C ₄ H ₄ O ₄ | 1.1703 | 0.0015 | 1.7486 | 0.7510 |
| 5 | L-aspartic acid | L-天冬氨酸 | 132.0301 | C ₄ H ₇ NO ₄ | 1.5666 | 0.0062 | 1.2188 | 0.6909 |
| 6 | Isocitric acid | 异柠檬酸 | 215.0165 | C ₆ H ₈ O ₇ | 1.5143 | 0.0319 | 1.3626 | 0.6475 |
| 7 | Palmitic acid | 棕榈酸 | 274.2742 | C ₁₆ H ₃₂ O ₂ | 6.2758 | 0.0016 | 1.3782 | 0.7510 |

续表4

| No. | Metabolites | 代谢物 | m/z | 分子式 Formula | VIP | P-value | FC | AUC |
|-----|--------------------------------|---------------------|----------|---|--------|---------|--------|--------|
| 8 | Thymine | 胸腺嘧啶 | 125.0355 | C ₅ H ₆ N ₂ O ₂ | 2.5128 | 0.0001 | 1.5303 | 0.7778 |
| 9 | delta-hexanolactone | δ-己内酯 | 115.0755 | C ₆ H ₁₀ O ₂ | 1.5150 | 0.0003 | 1.3550 | 0.7676 |
| 10 | Dodecanoic acid | 十二烷酸 | 218.2118 | C ₁₂ H ₂₄ O ₂ | 1.9739 | 0.0003 | 1.4239 | 0.7816 |
| 11 | Malonic acid | 丙二酸 | 103.0035 | C ₃ H ₄ O ₄ | 1.2262 | 0.0011 | 1.5228 | 0.7369 |
| 12 | S-sulphocysteine | S-磺基半胱氨酸 | 199.9690 | C ₃ H ₇ NO ₃ S ₂ | 1.8310 | 0.0060 | 1.9000 | 0.7101 |
| 13 | Myristic acid | 肉豆蔻酸 | 246.2430 | C ₁₄ H ₂₈ O ₂ | 2.0996 | 0.0006 | 1.4772 | 0.7842 |
| 14 | Stearic acid | 硬脂酸 | 302.3056 | C ₁₈ H ₃₆ O ₂ | 3.8232 | 0.0022 | 1.3945 | 0.7612 |
| 15 | L-valine | L-缬氨酸 | 118.0864 | C ₃ H ₇ NO ₂ | 3.1987 | 0.0153 | 1.3187 | 0.6820 |
| 16 | Pyridine | 吡啶 | 80.0496 | C ₅ H ₅ N | 1.3274 | 0.0089 | 1.5408 | 0.6692 |
| 17 | Behenic acid | 山嵛酸 | 358.3681 | C ₂₂ H ₄₄ O ₂ | 3.8333 | 0.0002 | 1.3714 | 0.7727 |
| 18 | 4-imidazolone-5-propionic acid | 4-咪唑酮-5-丙酸 | 155.0461 | C ₆ H ₈ N ₂ O ₃ | 1.8622 | 0.0001 | 1.5283 | 0.7816 |
| 19 | 3-aminopropionaldehyde | 3-氨基丙醛 | 74.0602 | C ₃ H ₇ NO | 1.3252 | 0.0004 | 1.3963 | 0.7548 |
| 20 | Iminospartic acid | 亚氨基天冬氨酸 | 130.0144 | C ₄ H ₅ NO ₄ | 1.5759 | 0.0009 | 1.5250 | 0.7292 |
| 21 | Carbon monoxide | 一氧化碳 | 72.9930 | CO | 1.8563 | 0.0010 | 1.5223 | 0.7356 |
| 22 | alpha-CEHC | α-甲基-4-(异丁基)苯甲基青霉素钠 | 279.1593 | C ₁₆ H ₂₂ O ₄ | 6.5399 | 0.0002 | 1.3844 | 0.7727 |
| 23 | Palmitaldehyde | 棕榈醛 | 258.2794 | C ₁₆ H ₃₂ O | 1.9050 | 0.0003 | 1.5043 | 0.7791 |
| 24 | Carbon dioxide | 二氧化碳 | 88.9880 | CO ₂ | 2.9419 | 0.0001 | 1.6003 | 0.7918 |
| 25 | Phytol | 植物醇 | 314.3419 | C ₂₀ H ₄₀ O | 1.0463 | 0.0001 | 1.3689 | 0.7931 |
| 26 | Cyanate | 氰酸盐 | 88.0039 | CHNO | 2.8792 | 0.0004 | 1.5315 | 0.7650 |
| 27 | Aminoacetone | 氨基丙酮 | 74.0602 | C ₃ H ₇ NO | 2.6360 | 0.0005 | 1.6597 | 0.7522 |
| 28 | Arachidic acid | 花生酸 | 330.3369 | C ₂₀ H ₄₀ O ₂ | 3.5318 | 0.0006 | 1.3590 | 0.7727 |
| 29 | Oxalic acid | 草酸 | 88.9880 | C ₂ H ₂ O ₄ | 3.4082 | 0.0019 | 1.5067 | 0.7216 |
| 30 | Pyruvatoxime | 丙酮肟 | 102.0195 | C ₃ H ₅ NO ₃ | 1.2054 | 0.0017 | 1.6183 | 0.7599 |
| 31 | 1-methyladenosine | 1-甲基腺苷 | 282.1199 | C ₁₁ H ₁₅ N ₅ O ₄ | 3.6901 | 0.0027 | 5.2094 | 0.6807 |
| 32 | Pyrimidine | 嘧啶 | 81.0449 | C ₄ H ₄ N ₂ | 2.4461 | 0.0006 | 1.4060 | 0.7497 |
| 33 | D-ornithine | D-鸟氨酸 | 133.0974 | C ₅ H ₁₂ N ₂ O ₂ | 1.0030 | 0.0001 | 1.3856 | 0.7650 |
| 34 | gamma-caprolactone | γ-己内酯 | 115.0755 | C ₆ H ₁₀ O ₂ | 1.0150 | 0.0003 | 1.3845 | 0.7637 |
| 35 | Imidazole-4-acetaldehyde | 咪唑-4-乙醛 | 109.0406 | C ₅ H ₆ N ₂ O | 2.2735 | 0.0001 | 1.5307 | 0.7918 |
| 36 | 5-aminoimidazole | 5-氨基咪唑 | 84.0558 | C ₃ H ₅ N ₃ | 1.8699 | 0.0007 | 1.4342 | 0.7522 |
| 37 | 2-O-methylcytosine | 2-O-甲基胞嘧啶 | 126.0664 | C ₅ H ₇ N ₃ O | 1.6405 | 0.0011 | 1.4031 | 0.7305 |
| 38 | Imidazolone | 咪唑酮 | 83.0250 | C ₃ H ₄ N ₂ O | 3.7349 | 0.0003 | 1.5209 | 0.7650 |

续表4

| No. | Metabolites | 代谢物 | m/z | 分子式 Formula | VIP | P-value | FC | AUC |
|-----|-----------------------------------|--------------|----------|---|--------|---------|--------|--------|
| 39 | L-glycic acid | L-甘油酸 | 151.0260 | C ₃ H ₆ O ₄ | 2.8580 | 0.0196 | 1.3089 | 0.6718 |
| 40 | L-4-hydroxyglutamate semialdehyde | L-4-羟基谷氨酸半醛 | 146.0457 | C ₅ H ₉ NO ₄ | 2.2870 | 0.0296 | 1.5424 | 0.7216 |
| 41 | Tetrahydrobiopterin | 四氢生物蝶呤 | 242.1250 | C ₉ H ₁₅ N ₅ O ₃ | 1.6380 | 0.0015 | 0.7584 | 0.7254 |
| 42 | Adenosine | 腺苷 | 312.0950 | C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄ | 1.5747 | 0.0040 | 0.4830 | 0.7229 |
| 43 | Cyclic AMP | 循环 AMP | 330.0600 | C ₁₀ H ₁₂ N ₅ O ₆ P | 1.1510 | 0.0217 | 0.7951 | 0.6769 |
| 44 | Gentisic acid | 龙胆酸 | 153.0192 | C ₇ H ₆ O ₄ | 1.4375 | 0.0353 | 0.4971 | 0.7637 |
| 45 | Indoleacetic acid | 吲哚乙酸 | 176.0709 | C ₁₀ H ₉ NO ₂ | 1.5917 | 0.0410 | 0.4386 | 0.7905 |
| 46 | Oxoglutaric acid | 氧戊二酸 | 191.0196 | C ₅ H ₆ O ₅ | 6.5187 | 0.0391 | 0.8194 | 0.6590 |
| 47 | Pantothenic acid | 泛酸 | 220.1182 | C ₉ H ₁₇ NO ₅ | 5.1580 | 0.0148 | 0.6481 | 0.6705 |
| 48 | 2-methylbutyrylcarbamite | 2-甲基丁酰肉碱 | 246.1702 | C ₁₂ H ₂₃ NO ₄ | 3.6695 | 0.0258 | 0.7133 | 0.7050 |
| 49 | 18-hydroxycortisol | 18-羟基皮质醇 | 423.2025 | C ₂₁ H ₃₀ O ₆ | 1.2136 | 0.0450 | 0.6358 | 0.6564 |
| 50 | 5-hydroxy-L-tryptophan | 5-羟基-L-色氨酸 | 221.0923 | C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₃ | 2.5458 | 0.0049 | 0.7713 | 0.7126 |
| 51 | Cinnamic acid | 肉桂酸 | 166.0866 | C ₉ H ₈ O ₂ | 6.0655 | 0.0008 | 0.7579 | 0.7548 |
| 52 | Citraconic acid | 柠檬酸 | 129.0192 | C ₅ H ₆ O ₄ | 3.1286 | 0.0034 | 0.7089 | 0.7229 |
| 53 | Homo-L-arginine | 同型 L-精氨酸 | 189.1349 | C ₇ H ₁₆ N ₄ O ₂ | 2.2348 | 0.0006 | 0.7822 | 0.7561 |
| 54 | L-leucine | L-亮氨酸 | 132.1021 | C ₆ H ₁₃ NO ₂ | 6.7217 | 0.0010 | 0.6655 | 0.7969 |
| 55 | Kynurenic acid | 犬尿酸 | 190.0501 | C ₁₀ H ₇ NO ₃ | 2.8153 | 0.0016 | 0.7484 | 0.7369 |
| 56 | Glycylproline | 甘氨酸脯氨酸 | 173.0924 | C ₇ H ₁₂ N ₂ O ₃ | 2.5656 | 0.0060 | 0.7088 | 0.7063 |
| 57 | Hydroxykynurenine | 羟基犬尿酸 | 225.0872 | C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O ₄ | 1.4622 | 0.0203 | 0.3252 | 0.7139 |
| 58 | N-acetyl-L-aspartic acid | N-乙酰-L-天冬氨酸 | 174.0406 | C ₆ H ₉ NO ₅ | 3.8360 | 0.0012 | 0.7738 | 0.7561 |
| 59 | Xanthurenic acid | 黄尿酸 | 204.0300 | C ₁₀ H ₇ NO ₄ | 1.5719 | 0.0353 | 0.7295 | 0.6552 |
| 60 | N-acetylaspartylglutamic acid | N-乙酰天冬氨酸谷氨酸 | 305.0981 | C ₁₁ H ₁₆ N ₂ O ₈ | 1.5714 | 0.0025 | 0.7679 | 0.7216 |
| 61 | Methyl propenyl ketone | 甲基丙烯酮 | 129.0556 | C ₃ H ₈ O | 1.6639 | 0.0082 | 0.4324 | 0.6539 |
| 62 | Allysine | 赖氨酸 | 144.0665 | C ₆ H ₁₁ NO ₃ | 2.3579 | 0.0067 | 0.8377 | 0.7114 |
| 63 | Dimethyl-L-arginine | 二甲基-L-精氨酸 | 203.1505 | C ₈ H ₁₈ N ₄ O ₂ | 3.1886 | 0.0310 | 0.8950 | 0.6539 |
| 64 | Cystathionine ketimine | 胱硫醚酮亚胺 | 248.0233 | C ₇ H ₉ NO ₄ S | 1.0912 | 0.0272 | 0.6986 | 0.6692 |
| 65 | 4-hydroxy-2-oxoglutaric acid | 4-羟基-2-氧代戊二酸 | 207.0144 | C ₅ H ₆ O ₆ | 3.7596 | 0.0003 | 0.4252 | 0.7688 |
| 66 | Carnosol | 鼠尾草酚 | 375.1812 | C ₂₀ H ₂₆ O ₄ | 1.2538 | 0.0081 | 0.4424 | 0.7190 |
| 67 | Imidazoleacetic acid riboside | 咪唑乙酸核苷 | 303.0833 | C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₆ | 2.1605 | 0.0006 | 0.7518 | 0.7625 |
| 68 | Aspartyl-L-proline | 天冬氨酸-L-脯氨酸 | 231.0978 | C ₉ H ₁₄ N ₂ O ₃ | 1.4706 | 0.0473 | 0.8268 | 0.6884 |
| 69 | 4-nitrocatechol | 4-硝基儿茶酚 | 173.0560 | C ₆ H ₅ NO ₄ | 1.2122 | 0.0202 | 0.6561 | 0.6897 |

续表4

| No. | Metabolites | 代谢物 | m/z | 分子式 Formula | VIP | P-value | FC | AUC |
|-----|---|----------------|----------|---|--------|---------|--------|--------|
| 70 | N-methylnicotinamide | N-甲基烟酰胺 | 137.0712 | C ₇ H ₈ N ₂ O | 2.5420 | 0.0455 | 0.6510 | 0.6705 |
| 71 | Deoxyribose | 脱氧核糖 | 179.0560 | C ₅ H ₁₀ O ₄ | 2.2890 | 0.0384 | 0.7864 | 0.6577 |
| 72 | Dihydrocortisol | 二氢皮质醇 | 409.2231 | C ₂₁ H ₃₂ O ₅ | 1.2068 | 0.0155 | 0.3330 | 0.7727 |
| 73 | Nicotinic acid | 烟尿酸 | 179.0461 | C ₈ H ₈ N ₂ O ₃ | 1.8782 | 0.0122 | 0.7837 | 0.6948 |
| 74 | 4-guanidinobutanoic acid | 4-胍基丁酸 | 146.0926 | C ₅ H ₁₁ N ₃ O ₂ | 4.9093 | 0.0324 | 0.5524 | 0.6628 |
| 75 | L-gulonolactone | L-古洛内酯 | 177.0403 | C ₆ H ₁₀ O ₆ | 2.2532 | 0.0004 | 0.7603 | 0.7522 |
| 76 | N6-methyladenosine | N6-甲基腺苷 | 282.1199 | C ₁₁ H ₁₅ N ₅ O ₄ | 5.3837 | 0.0134 | 0.6717 | 0.6948 |
| 77 | 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycolaldehyde | 3-甲氧基-4-羟基苯乙醇醛 | 200.0920 | C ₉ H ₁₀ O ₄ | 1.2096 | 0.0039 | 0.6902 | 0.7305 |
| 78 | 5-methoxyindoleacetate | 5-甲氧基吲哚乙酸酯 | 250.0720 | C ₁₁ H ₁₁ NO ₃ | 1.4755 | 0.0233 | 0.4443 | 0.6450 |
| 79 | N4-acetylytidine | N4-乙酰胞苷 | 286.1036 | C ₁₁ H ₁₅ N ₃ O ₆ | 3.1599 | 0.0010 | 0.6419 | 0.7497 |
| 80 | D,L-methylisocitrate | D,L-甲基异柠檬酸盐 | 205.0352 | C ₇ H ₁₀ O ₇ | 1.2715 | 0.0087 | 0.7865 | 0.7075 |

表5 Exp-H 和 Exp-L 组孕妇尿液样本中的差异代谢物
Table 5 Differential metabolites between urine samples of the Exp-H and Exp-L pregnant women

| No. | Metabolites | 代谢物 | m/z | 分子式 Formula | VIP | P-value | FC | AUC |
|-----|--------------------------------|---------------------|----------|---|--------|---------|--------|--------|
| 1 | Adenine | 腺嘌呤 | 136.0620 | C ₅ H ₅ N ₅ | 1.3136 | 0.0432 | 1.7770 | 0.6059 |
| 2 | Betaine | 甜菜碱 | 140.0685 | C ₅ H ₁₁ NO ₂ | 1.1249 | 0.0005 | 1.8683 | 0.7032 |
| 3 | Citric acid | 柠檬酸 | 210.0611 | C ₆ H ₈ O ₇ | 8.1043 | 0.0194 | 1.2804 | 0.6527 |
| 4 | Thymine | 胸腺嘧啶 | 125.0355 | C ₅ H ₆ N ₂ O ₂ | 2.4746 | 0.0068 | 1.4082 | 0.6564 |
| 5 | delta-hexanolactone | δ-己内酯 | 115.0755 | C ₆ H ₁₀ O ₂ | 1.4228 | 0.0242 | 1.2353 | 0.6416 |
| 6 | Creatinine | 肌酐 | 112.0515 | C ₄ H ₇ N ₃ O | 1.0183 | 0.0316 | 1.2586 | 0.5936 |
| 7 | Dodecanoic acid | 十二烷酸 | 218.2118 | C ₁₂ H ₂₄ O ₂ | 1.9913 | 0.0474 | 1.3056 | 0.6096 |
| 8 | Myristic acid | 肉豆蔻酸 | 246.2430 | C ₁₄ H ₂₈ O ₂ | 2.1765 | 0.0315 | 1.2923 | 0.6330 |
| 9 | Behenic acid | 山箭酸 | 358.3681 | C ₂₂ H ₄₄ O ₂ | 3.2716 | 0.0356 | 1.2134 | 0.6170 |
| 10 | 4-imidazolone-5-propionic acid | 4-咪唑酮-5-丙酸 | 155.0461 | C ₆ H ₈ N ₂ O ₃ | 1.8360 | 0.0066 | 1.4129 | 0.6589 |
| 11 | 3-aminopropionaldehyde | 3-氨基丙醛 | 74.0602 | C ₃ H ₇ NO | 1.1963 | 0.0124 | 1.2769 | 0.6404 |
| 12 | Iminoaspartic acid | 亚氨基天冬氨酸 | 130.0144 | C ₄ H ₅ NO ₄ | 1.2465 | 0.0211 | 1.3220 | 0.6379 |
| 13 | Carbon monoxide | 一氧化碳 | 72.9930 | CO | 1.4596 | 0.0223 | 1.3206 | 0.6453 |
| 14 | alpha-CEHC | α-甲基-4-(异丁基)苯甲基青霉素钠 | 279.1593 | C ₁₆ H ₂₂ O ₄ | 5.0771 | 0.0449 | 1.2433 | 0.6207 |
| 15 | Palmitaldehyde | 棕榈醛 | 258.2794 | C ₁₆ H ₃₂ O | 1.7625 | 0.0310 | 1.3082 | 0.6318 |
| 16 | Carbon Dioxide | 二氧化碳 | 88.9880 | CO ₂ | 2.5155 | 0.0069 | 1.3904 | 0.6539 |

续表5

| No. | Metabolites | 代谢物 | m/z | Formula | VIP | P-value | FC | AUC |
|-----|---|-------------------|----------|--|--------|---------|--------|--------|
| 17 | Cyanate | 氰酸盐 | 88.0039 | CHNO | 2.6090 | 0.0099 | 1.3786 | 0.6515 |
| 18 | Aminoacetone | 氨基丙酮 | 74.0602 | C ₃ H ₇ NO | 1.9447 | 0.0250 | 1.3633 | 0.6293 |
| 19 | Oxalic acid | 草酸 | 88.9880 | C ₂ H ₂ O ₄ | 2.6061 | 0.0295 | 1.3071 | 0.6379 |
| 20 | Pyruvatoxime | 丙酮脒 | 102.0195 | C ₃ H ₅ NO ₃ | 1.0082 | 0.0155 | 1.3342 | 0.6441 |
| 21 | 1-methyladenosine | 1-甲基腺苷 | 282.1199 | C ₁₁ H ₁₅ N ₅ O ₄ | 3.4983 | 0.0331 | 3.2170 | 0.5702 |
| 22 | Pyrimidine | 嘧啶 | 81.0449 | C ₄ H ₄ N ₂ | 2.0651 | 0.0154 | 1.2662 | 0.6502 |
| 23 | gamma-caprolactone | γ-己内酯 | 115.0755 | C ₆ H ₁₀ O ₂ | 1.0359 | 0.0463 | 1.2391 | 0.6207 |
| 24 | Imidazole-4-acetaldehyde | 咪唑-4-乙醛 | 109.0406 | C ₅ H ₆ N ₂ O | 2.3931 | 0.0055 | 1.4396 | 0.6638 |
| 25 | 5-aminoimidazole | 5-氨基咪唑 | 84.0558 | C ₃ H ₅ N ₃ | 1.5898 | 0.0120 | 1.2913 | 0.6527 |
| 26 | 2-O-methylcytosine | 2-O-甲基胞嘧啶 | 126.0664 | C ₅ H ₇ N ₃ O | 1.4619 | 0.0125 | 1.2843 | 0.6466 |
| 27 | Imidazolone | 咪唑酮 | 83.0250 | C ₃ H ₄ N ₂ O | 3.5516 | 0.0086 | 1.3853 | 0.6539 |
| 28 | α-ketoisovaleric acid | α-酮异戊酸 | 115.0399 | C ₅ H ₈ O ₃ | 1.0898 | 0.0122 | 0.8554 | 0.6761 |
| 29 | Genticic acid | 龙胆酸 | 153.0192 | C ₇ H ₆ O ₄ | 1.5174 | 0.0226 | 0.5174 | 0.7266 |
| 30 | Homo-L-arginine | 同型 L-精氨酸 | 189.1349 | C ₇ H ₁₆ N ₄ O ₂ | 3.7540 | 0.0002 | 0.7582 | 0.7611 |
| 31 | Kynurenic acid | 犬尿酸 | 190.0501 | C ₁₀ H ₇ NO ₃ | 2.7582 | 0.0095 | 0.7989 | 0.7044 |
| 32 | N-acetyl-L-aspartic acid | N-乙酰-L-天冬氨酸 | 174.0406 | C ₆ H ₉ NO ₅ | 3.2321 | 0.0398 | 0.8471 | 0.6724 |
| 33 | Ribothymidine | 核苷 | 259.0928 | C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₆ | 1.1422 | 0.0387 | 0.8101 | 0.6650 |
| 34 | N-acetylaspartylglutamic acid | N-乙酰天冬氨酸谷氨酸 | 305.0981 | C ₁₁ H ₁₆ N ₂ O ₈ | 2.0237 | 0.0091 | 0.8184 | 0.6897 |
| 35 | N-acetylneuraminosyl(α2-6)lactosamine | N-乙酰神经氨酸(α2-6)乳糖胺 | 673.2311 | C ₂₅ H ₄₂ N ₂ O ₁₉ | 1.3084 | 0.0118 | 0.8591 | 0.6860 |
| 36 | Allysine | 赖氨酸 | 144.0665 | C ₆ H ₁₁ NO ₃ | 2.8960 | 0.0483 | 0.8861 | 0.6305 |
| 37 | L-dopachrome | 左旋多巴色素 | 211.0716 | C ₉ H ₇ NO ₄ | 1.0439 | 0.0117 | 0.4141 | 0.7525 |
| 38 | Dimethyl-L-arginine | 二甲基-L-精氨酸 | 203.1505 | C ₈ H ₁₈ N ₄ O ₂ | 5.3492 | 0.0205 | 0.8648 | 0.6687 |
| 39 | S-(2-carboxypropyl)-Cysteamine | S-(2-羧丙基)-半胱胺 | 164.0742 | C ₆ H ₁₃ NO ₂ S | 1.6478 | 0.0257 | 0.7371 | 0.6749 |
| 40 | Imidazoleacetic acid riboside | 咪唑乙酸核苷 | 303.0833 | C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₆ | 2.8688 | 0.0017 | 0.8052 | 0.7278 |
| 41 | Chenodeoxycholic acid 3-sulfate | 鹅去氧胆酸-3-硫酸盐 | 471.2421 | C ₂₄ H ₄₀ O ₇ S | 1.9517 | 0.0498 | 0.5519 | 0.5653 |
| 42 | Sulfolithocholylglycine | 硫代胆碱基甘氨酸 | 512.2686 | C ₂₆ H ₄₃ NO ₇ S | 3.5713 | 0.0140 | 0.5307 | 0.6724 |
| 43 | Ursodeoxycholic acid 3-sulfate | 熊去氧胆酸-3-硫酸盐 | 471.2421 | C ₂₄ H ₄₀ O ₇ S | 1.0823 | 0.0493 | 0.6312 | 0.6170 |
| 44 | 2-methylglutaconic acid | 2-甲基戊二酸 | 189.0403 | C ₆ H ₈ O ₄ | 1.1211 | 0.0438 | 0.8643 | 0.6884 |
| 45 | 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycolaldehyde | 3-甲氧基-4-羟苯乙醇醛 | 200.0920 | C ₉ H ₁₀ O ₄ | 1.6560 | 0.0006 | 0.6479 | 0.7475 |
| 46 | beta-cortol | β-皮质醇 | 543.2813 | C ₂₇ H ₄₄ O ₁₁ | 1.2406 | 0.0302 | 0.7145 | 0.6700 |
| 47 | N4-acetytyridine | N4-乙酰胞苷 | 286.1036 | C ₁₁ H ₁₅ N ₃ O ₆ | 2.6298 | 0.0086 | 0.7285 | 0.7155 |
| 48 | Prolylhydroxyproline | 脯氨酸羟脯氨酸 | 229.1185 | C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₄ | 5.0393 | 0.0408 | 0.8358 | 0.7020 |

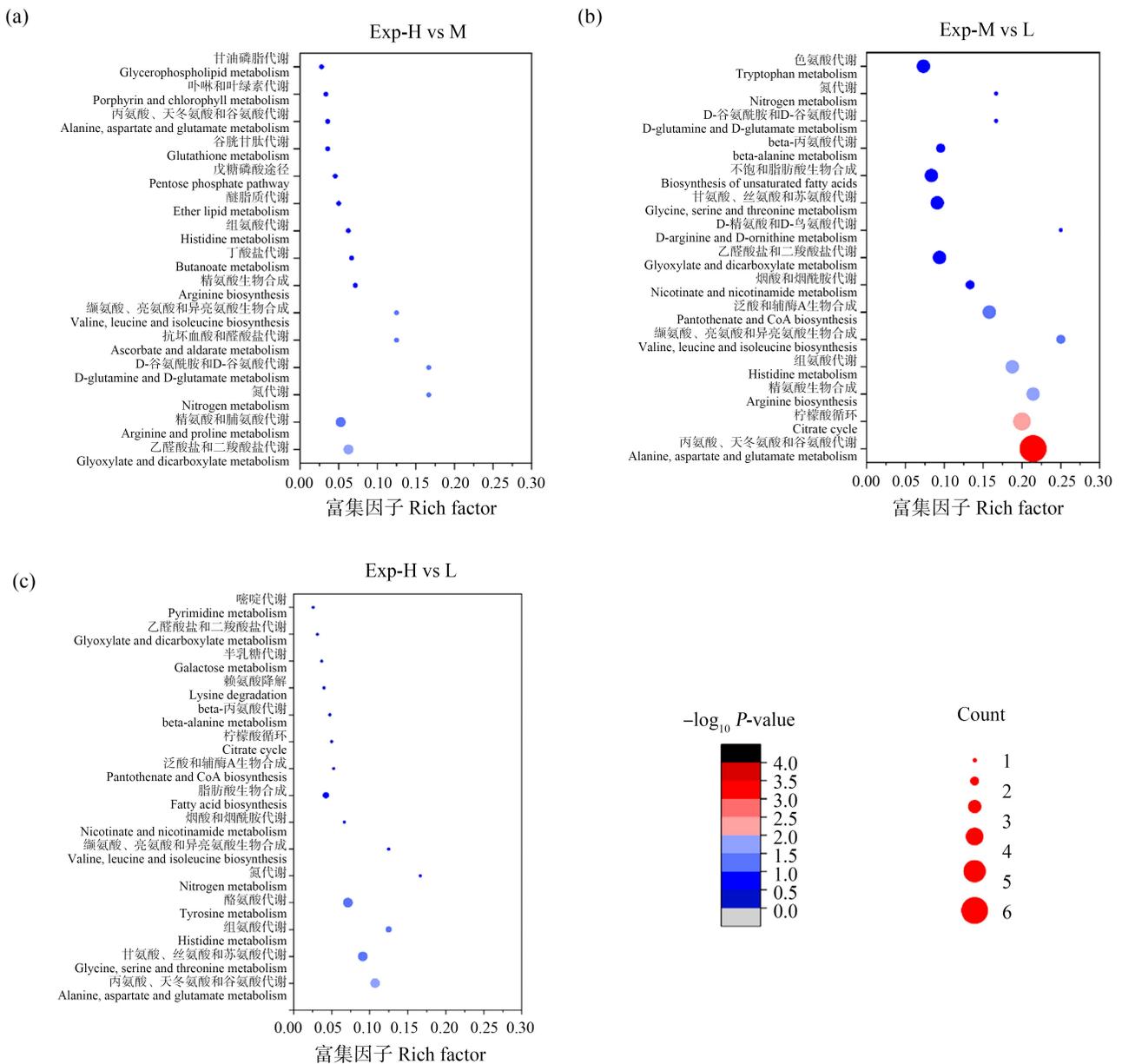


图 5 Exp-L、Exp-M 和 Exp-H 组孕妇尿液样本间差异代谢物的 KEGG 通路气泡图

注:(a) Exp-H vs Exp-M;(b) Exp-M vs Exp-L;(c) Exp-H vs Exp-L。

Fig. 5 Bubble diagrams of KEGG pathways of differential metabolites between the pregnant women's urine samples of Exp-L, Exp-M and Exp-H groups

Note: (a) Exp-H vs Exp-M; (b) Exp-M vs Exp-L; (c) Exp-H vs Exp-L.

进一步从 3 个比较组(Exp-H vs Exp-M, Exp-M vs Exp-L, Exp-H vs Exp-L)中筛选表达差异和诊断价值较大(FC<1/1.85 或>1.85, AUC>0.7)的共同差异代谢物,其中至少同时出现在 2 个比较组中的共同差异代谢物有甜菜碱(betaine)和龙胆酸(gentisic acid)。作 Exp-L、Exp-M 和 Exp-H 组孕妇尿液样本中甜菜碱和龙胆酸含量的柱状图。如图 6 所示, Exp-M 组 Exp-H 组孕妇尿液样本中甜菜碱和龙胆

酸含量没有显著差异,而 Exp-M, Exp-H 组孕妇尿液样本和 Exp-L 组孕妇尿液样本中甜菜碱和龙胆酸含量具有显著差异。这表明孕妇的 EE 摄入程度与体内甜菜碱和龙胆酸含量变化具有相关性,但是当 EE 值到达一定水平区间时(以 GEN 为代表的 EE 含量为 0.5 ~ 12.0 ng·mL⁻¹),将不再会引起甜菜碱和龙胆酸含量的显著变化。

甜菜碱(N,N,N-三甲基甘氨酸)是一种季铵碱类

物质,广泛存在于麦麸、小麦胚芽、菠菜、甜菜等植物中。膳食甜菜碱的摄入量对身体的甜菜碱含量起着决定性的作用。除了饮食摄入外,甜菜碱还可以从体内的胆碱合成。甜菜碱具有重要的生物学意义,一方面是一种重要的渗透保护剂,可在细胞中积累而不会破坏细胞功能,在渗透压力下保护细胞、蛋白质和酶,另一方面是体内甲基转移反应的重要甲基

供体。甜菜碱可改善含硫氨基酸(SAA)代谢对抗氧化应激,如甜菜碱-同型半胱氨酸甲基转移酶(BH-MT)可催化甲基从甜菜碱转移到同型半胱氨酸上以形成蛋氨酸,蛋氨酸进一步转化为产生 S-腺苷甲硫氨酸(SAM)^[15]。因此,由图 6(a)可知,摄入 EE 可能会降低甜菜碱代谢效率,即甜菜碱体内浓度上升,且与 EE 摄入程度具有一定的相关性。

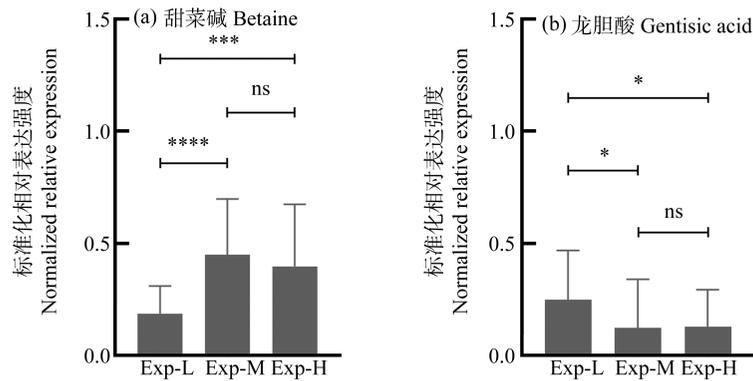


图 6 Exp-L、Exp-M 和 Exp-H 组孕妇尿液样本中甜菜碱和龙胆酸相对含量对比

注:(a)甜菜碱;(b)龙胆酸。

Fig. 6 Relative content comparison of betaine and gentisic acid in the pregnant women's urine samples of Exp-L, Exp-M and Exp-H groups

Note: (a) Betaine; (b) Gentisic acid.

龙胆酸(2,5-二羟基苯甲酸)是一种多羟基酸,它是水杨酸经肾代谢之后的次要产物,也是龙胆属植物根部的天然产物,存在于龙胆、葡萄、柑橘、紫檀、芝麻、猕猴桃、苹果、苦瓜、黑莓以及梨等植物和水果中。龙胆酸具有广泛的生物活性,具有抗氧化、抗炎、抗诱变性、保肝、神经保护和抗菌等作用。龙胆酸具有 2 个彼此处于对位的酚羟基,可以在不同类型的物理和化学刺激下发挥抗氧化剂和自由基清除剂的作用,如诱导性高氧大鼠在口服阿司匹林后血浆中的 GSH 水平和龙胆酸水平显著升高^[16]。由图 6(b)可知,孕妇摄入 EE 会降低体内龙胆酸水平且与 EE 摄入程度具有一定的相关性。这可能是由于 EE 会影响龙胆酸代谢,降低其抗氧化剂和自由基清除剂的作用,从而不利于 ROS 的消除,产生氧化应激作用。

3 讨论 (Discussion)

通过对非靶向代谢组学结果的分析,发现了甜菜碱和龙胆酸这 2 种代谢物在 Exp-L 与 Exp-M 和 Exp-H 组孕妇尿液样本间具有较大的表达差异和诊断价值。甜菜碱作为体内重要的甲基供体可改善

SAA 代谢以对抗氧化应激;龙胆酸的抗氧化剂和自由基清除功能也能起到消除 ROS、对抗氧化应激的作用。在 EE 摄入程度不同的孕妇体内,甜菜碱和龙胆酸的含量差异揭示了 EE 摄入能引起孕妇体内的氧化应激,并且氧化应激水平与 EE 摄入程度具有一定的相关性。如图 5 所示,在孕妇摄入不同程度 EE 造成的代谢过程变化中,含有与氧化应激相关的通路也能证实该论点,如谷胱甘肽代谢(glutathione metabolism)和嘧啶代谢(pyrimidine metabolism)等。ROS 刺激可通过 Nrf2 通路诱导下游抗氧化响应元件表达,进而诱导谷胱甘肽 S-转移酶等基因表达,从而通过 GSH 代谢过程调节体内 ROS 含量^[17];同时氧化应激会直接刺激 caspase-3 活性,导致 DNA 的损伤,而 DNA 的损伤和修复过程则与嘧啶代谢密切相关^[18-19]。

不仅是本研究中分析的 8 种 EE,动植物等摄入其他种类的 EE 同样也会引起氧化应激,诱发一系列不良后果。Kanwar 等^[20]发现经 BPA 处理的番茄的膜脂过氧化和 ROS 积累增加且呈剂量依赖性,同时 BPA 还提高了 GSH 含量、谷胱甘肽 S-转移酶和

谷胱甘肽还原酶的活性,用以缓解 BPA 引起的氧化应激和毒性;Wang 等^[21]发现 BPA 能通过增加 ROS 产生和减弱人类皮质神经元中的抗氧化防御来导致氧化应激,并通过调节 Bcl-2 家族和 caspase 依赖性信号通路触发细胞凋亡,产生神经毒性;Le 等^[22]发现外源性苯甲酸雌二醇能显著降低雄性小鼠睾丸中过氧化氢酶、超氧化物歧化酶和谷胱甘肽过氧化物酶的表达和活性,破坏小鼠睾丸中的氧化还原平衡,引起氧化损伤,进而诱导雄性小鼠无精子症。

已有许多研究表明,氧化应激与孕妇健康和胎儿发育的不利影响具有紧密联系。在怀孕期间,氧化应激的平衡状态能够确保子宫血管适应和胎盘发育正常。而当孕妇摄入外源性雌激素等内分泌干扰物质后,其代谢状态发生改变时,促氧化剂的产生和生物活性超过了抗氧化剂的保护作用,即氧化应激失衡,会导致子宫血管形成失调或异常血管形成等结果,从而进一步引发一系列妊娠疾病,如先兆子痫、妊娠糖尿病和胎儿生长受限等^[23-24]。在相关机制研究中,Deng 等^[25]发现在滋养层细胞模型 HTR-8/SVneo 中,氧化应激会诱导 AKT 途径改变从而引发细胞死亡增加;Tang 等^[26]发现在绒毛外滋养层细胞模型 JEG-3 中,氧化应激可通过激活 ERK1/2、MAPK 和 JNK 蛋白介导细胞凋亡;Curtis 等^[27]发现在子宫内生长受限女性的足月胎盘中,自噬泡的数量增加并定位于胎盘的滋养层,且 BeWo 细胞系经氧化应激培养处理后能检测到自噬体的存在,表明氧化应激能增加有害自噬并与子宫内生长受限诱发相关。

因此,通过调节过度氧化应激的健康管理方案可能有益于孕妇及其胎儿。然而,由于潜在的致畸作用,怀孕期间的药物干预很少被研究,被批准使用的药物也相当有限。通过饮食摄入预防妊娠疾病,不仅相当简便且可能具备显著的效果,受到了广泛的关注^[24]。选择健康食品的饮食干预可提高孕妇体内的抗氧化能力,如富含脂肪酸、硒等微量元素和维生素 D 等的食品。二十二碳六烯酸(DHA)等 Omega-3 脂肪酸具有抗氧化和抗炎特性,能在促进胎盘血管系统中发挥作用^[28];硒可以通过抑制多种类型细胞(如 HUVEC 细胞等)中的 NF- κ B、toll 样受体和 MAPK 通路来减轻炎症,并能够通过激活 D-葡萄糖摄取和代谢,逆转氧化应激,降低妊娠糖尿病患者的高血糖状态^[29];维生素 D 可激活胎盘内皮中的维生素 D 受体,防止氧化应激和内皮功能失调的代谢,减少线粒体氧化磷酸化^[30]。

综上所述,本文首先基于三重四极杆质谱的液相色谱-质谱联用技术测定孕妇尿液样本中的 8 种 EE 含量,并根据 EE 含量将尿液样本分为低 EE 水平组、中 EE 水平组和高 EE 水平组;然后基于液相色谱-高分辨质谱联用技术的非靶向代谢组学策略分析不同 EE 水平的孕妇尿液样本的代谢组,通过多维统计分析、差异代谢物筛选和差异代谢物生物信息分析,探究 EE 摄入程度对孕妇体内代谢过程的影响,可以为孕妇的合理饮食和健康管理提供借鉴。

通信作者简介:王彦(1971—),女,博士,副教授,主要研究方向为代谢组学。

共同通信作者简介:吴明媛(1975—),女,博士,副研究员,主要研究方向为免疫和抗体药物。

参考文献 (References):

- [1] 林涵,蒋学武. 外源性雌激素与男性生殖系统发育异常[J]. 中国男科学杂志, 2004, 18(4): 65-68
- [2] Xu Z X, Liu J, Wu X H, et al. Nonmonotonic responses to low doses of xenoestrogens: A review [J]. Environmental Research, 2017, 155: 199-207
- [3] Singleton D W, Khan S A. Xenoestrogen exposure and mechanisms of endocrine disruption [J]. Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library, 2003, 8: s110-s118
- [4] Wang L H, Chen L R, Chen K H. *In vitro* and *vivo* identification, metabolism and action of xenoestrogens: An overview [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(8): 4013
- [5] Hoover R N, Hyer M, Pfeiffer R M, et al. Adverse health outcomes in women exposed *in utero* to diethylstilbestrol [J]. The New England Journal of Medicine, 2011, 365(14): 1304-1314
- [6] Signorile P G, Spugnini E P, Mita L, et al. Pre-natal exposure of mice to bisphenol A elicits an endometriosis-like phenotype in female offspring [J]. General and Comparative Endocrinology, 2010, 168(3): 318-325
- [7] Missmer S A, Hankinson S E, Spiegelman D, et al. *In utero* exposures and the incidence of endometriosis [J]. Fertility and Sterility, 2004, 82(6): 1501-1508
- [8] Cai L Y, Izumi S, Suzuki T, et al. Dioxins in ascites and serum of women with endometriosis: A pilot study [J]. Human Reproduction, 2011, 26(1): 117-126
- [9] Li M L, Zhou S, Wu Y L, et al. Prenatal exposure to propylparaben at human-relevant doses accelerates ovarian aging in adult mice [J]. Environmental Pollution, 2021,

- 285: 117254
- [10] Toppari J, Larsen J C, Christiansen P, et al. Male reproductive health and environmental xenoestrogens [J]. *Environmental Health Perspectives*, 1996, 104(Suppl 4): 741-803
- [11] Tonini C, Segatto M, Bertoli S, et al. Prenatal exposure to BPA: The effects on hepatic lipid metabolism in male and female rat fetuses [J]. *Nutrients*, 2021, 13(6): 1970
- [12] Zhou B, Yang P, Deng Y L, et al. Prenatal exposure to bisphenol A and its analogues (bisphenol F and S) and ultrasound parameters of fetal growth [J]. *Chemosphere*, 2020, 246: 125805
- [13] Yang P, Lin B G, Zhou B, et al. Sex-specific associations of prenatal exposure to bisphenol A and its alternatives with fetal growth parameters and gestational age [J]. *Environment International*, 2021, 146: 106305
- [14] Minatoya M, Kishi R. A review of recent studies on bisphenol A and phthalate exposures and child neurodevelopment [J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2021, 18(7): 3585
- [15] Zhao G F, He F, Wu C L, et al. Betaine in inflammation: Mechanistic aspects and applications [J]. *Frontiers in Immunology*, 2018, 9: 1070
- [16] Abedi F, Razavi B M, Hosseinzadeh H. A review on genistic acid as a plant derived phenolic acid and metabolite of aspirin: Comprehensive pharmacology, toxicology, and some pharmaceutical aspects [J]. *Phytotherapy Research*, 2020, 34(4): 729-741
- [17] 袁圣武, 黄超, 季晓亚, 等. 环境污染导致氧化应激的关键信号通路及其检测方法 [J]. *生态毒理学报*, 2017, 12(1): 25-37
- Yuan S W, Huang C, Ji X Y, et al. Main signaling pathways and detection methods of oxidative stress caused by environmental pollutants [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2017, 12(1): 25-37 (in Chinese)
- [18] Zhu Y, Zhang Y K, Li Y B, et al. Integrative proteomics and metabolomics approach to elucidate metabolic dysfunction induced by silica nanoparticles in hepatocytes [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2022, 434: 128820
- [19] Bordin D L, Lirussi L, Nilsen H. Cellular response to endogenous DNA damage: DNA base modifications in gene expression regulation [J]. *DNA Repair*, 2021, 99: 103051
- [20] Kanwar M K, Xie D L, Yang C, et al. Melatonin promotes metabolism of bisphenol A by enhancing glutathione-dependent detoxification in *Solanum lycopersicum* L. [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2020, 388: 121727
- [21] Wang H O, Zhao P Q, Huang Q S, et al. Bisphenol-A induces neurodegeneration through disturbance of intracellular calcium homeostasis in human embryonic stem cells-derived cortical neurons [J]. *Chemosphere*, 2019, 229: 618-630
- [22] Le J H, Lei X C, Ren Y P, et al. Exogenous oestradiol benzoate induces male mice azoospermia through modulation of oxidative stress and testicular metabolic cooperation [J]. *Molecular Medicine Reports*, 2019, 19(6): 4955-4963
- [23] Gómez-Roig M D, Pascal R, Cahuana M J, et al. Environmental exposure during pregnancy: Influence on prenatal development and early life: A comprehensive review [J]. *Fetal Diagnosis and Therapy*, 2021, 48(4): 245-257
- [24] Prins J R, Schoots M H, Wessels J I, et al. The influence of the dietary exposome on oxidative stress in pregnancy complications [J]. *Molecular Aspects of Medicine*, 2022, 87: 101098
- [25] Deng Q Y, Yin N L, Chen Y, et al. Downregulated N-acetylglucosaminyltransferase III is involved in attenuating trophoblast migration and invasion under hypoxia - reoxygenation condition [J]. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 2019, 32(14): 2369-2375
- [26] Tang C L, Liang J, Qian J F, et al. Opposing role of JNK-p38 kinase and ERK1/2 in hydrogen peroxide-induced oxidative damage of human trophoblast-like JEG-3 cells [J]. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 2014, 7(3): 959-968
- [27] Curtis S, Jones C J P, Garrod A, et al. Identification of autophagic vacuoles and regulators of autophagy in villous trophoblast from normal term pregnancies and in fetal growth restriction [J]. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 2013, 26(4): 339-346
- [28] Jones M L, Mark P J, Waddell B J. Maternal dietary omega-3 fatty acids and placental function [J]. *Reproduction*, 2014, 147(5): R143-R152
- [29] Karamali M, Dastyar F, Badakhsh M H, et al. The effects of selenium supplementation on gene expression related to insulin and lipid metabolism, and pregnancy outcomes in patients with gestational diabetes mellitus: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial [J]. *Biological Trace Element Research*, 2020, 195(1): 1-8
- [30] Wu M F, Wu Y, Xu K Z, et al. Protective effects of 1, 25 dihydroxyvitamin D3 against high-glucose-induced damage in human umbilical vein endothelial cells involve activation of Nrf2 antioxidant signaling [J]. *Journal of Vascular Research*, 2021, 58(4): 267-276