

磷酸三苯酯致大鼠肝脏代谢紊乱的生物信息学分析

胡维, 王姝, 于海兵, 丁元林

广东医科大学公共卫生学院流行病学与卫生统计学教研室, 广东 东莞 523808

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2020.19501

摘要:

[背景] 磷酸三苯酯 (TPHP) 是目前应用最广泛的有机磷酸酯类阻燃剂之一, 已在多种环境介质中被检测到。由于该化合物的多重毒性, 近年来 TPHP 的健康风险引起了广泛的关注。然而, 有关 TPHP 暴露对肝脏代谢影响的研究较少。

[目的] 基于转录组测序数据, 采用生物信息学方法探讨 TPHP 暴露对大鼠肝脏代谢紊乱的效应。

[方法] 基于基因表达数据库 (GEO) 获得基因表达谱数据集。采用主成分分析和层次聚类分析方法, 依据不同剂量组的基因表达模式的相似程度将样本归类至对照组 (0 mg·kg⁻¹, 含 5 个样本)、低剂量组 (55.0、110.0、220.0 mg·kg⁻¹, 含 9 个样本) 和高剂量组 (441.0、881.0 mg·kg⁻¹, 含 6 个样本); 利用 R 3.5.3 软件中 limma 包筛选差异表达基因 (DEGs)。运用 clusterProfiler 包对 DEGs 进行基因本体 (GO)、京都基因和基因组数据库 (KEGG) 富集分析。利用 STRING 网络数据库建立蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络, 并运用 Cytoscape 3.7.1 软件的网络分析插件 CytoHubba 筛选中心基因。最后, 运用 clusterProfiler 包对重要的中心基因进行基因集富集分析 (GSEA)。

[结果] 与对照组相比, 低剂量组 DEGs 共 53 个, 其中表达上调的基因 30 个, 表达下调的基因 23 个; 而高剂量组 DEGs 共 151 个, 其中表达上调的基因 80 个, 表达下调的基因 71 个。GO 和 KEGG 富集分析显示, 两个剂量组与对照组的 DEGs 富集的功能相似, 主要涉及昼夜节律、碳水化合物代谢、脂质代谢、氨基酸代谢、过氧化物酶体增殖物激活受体 (PPAR) 信号通路等生物学途径。PPI 网络分析和 GSEA 显示, *Arntl* 基因是唯一一个在低、高剂量组 PPI 网络中都存在的中心基因, *Arntl* 基因低表达、高表达组分别在 6、19 条通路上富集, 并且其高表达富集于不饱和脂肪酸的生物合成、PPAR 信号通路等生物学途径。

[结论] TPHP 可诱导大鼠肝脏中昼夜节律、碳水化合物、脂质和氨基酸代谢途径受到干扰。节律基因 *Arntl* 可能在 TPHP 暴露导致的肝脏代谢紊乱中发挥重要作用, 并影响内分泌功能。

关键词: 磷酸三苯酯; 生物信息学; 代谢紊乱; 昼夜节律; *Arntl* 基因

Bioinformatic analysis on hepatic metabolic disorders induced by triphenyl phosphate HU Wei, WANG Shu, YU Hai-bing, DING Yuan-lin (Department of Epidemiology and Medical Statistics, School of Public Health, Guangdong Medical University, Dongguan, Guangdong, 523808, China)

Abstract:

[Background] Triphenyl phosphate (TPHP) is one of the most widely used organophosphate flame retardants and has been detected in a variety of environmental media. Due to its multiple toxicities, the human health risks of TPHP have attracted much attention in recent years. However, few studies have been done on the effects of TPHP exposure on liver metabolism.

[Objective] Bioinformatic methods are used to investigate the hepatic metabolic disorders of rats exposed to different doses of TPHP based on transcriptome sequencing data.

[Methods] Gene expression profile datasets were obtained from Gene Expression Omnibus (GEO) database. Principal component analysis and hierarchical clustering analysis were used to classify the samples into control group (0 mg·kg⁻¹, including 5 samples), low dose group (55.0, 110.0, and 220.0 mg·kg⁻¹, including 9 samples), and high dose group (441.0 and 881.0 mg·kg⁻¹, including 6 samples) according to the similarity of gene expression patterns in different dose groups. Differentially expressed genes (DEGs) were screened using the limma package in R 3.5.3 software. Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)

基金项目

国家自然科学基金面上项目 (81273166); 广东省科技计划项目 (2017A020215061); 广东医学院建博科技创新团队项目 (STIF201121); 高校教育人才“组团式”帮扶专项 (4SG19046G)

作者简介

胡维 (1991—), 男, 硕士生;
E-mail: huw1991@hotmail.com

通信作者

丁元林, E-mail: gdmusbd@gdmu.edu.cn

利益冲突 无申报

收稿日期 2019-07-25

录用日期 2019-11-27

文章编号 2095-9982(2020)02-0111-10

中图分类号 R114

文献标志码 A

►引用

胡维, 王姝, 于海兵, 等. 磷酸三苯酯致大鼠肝脏代谢紊乱的生物信息学分析 [J]. 环境与职业医学, 2020, 37 (2): 111-120.

►本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2020.19501

Funding

This study was funded.

Correspondence to

DING Yuan-lin, E-mail: gdmusbd@gdmu.edu.cn

Competing interests None declared

Received 2019-07-25

Accepted 2019-11-27

►To cite

HU Wei, WANG Shu, YU Hai-bing, et al. Bioinformatic analysis on hepatic metabolic disorders induced by triphenyl phosphate[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2020, 37(2): 111-120.

►Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2020.19501

enrichment analyses of DEGs were performed by clusterProfiler package. Protein-protein interaction (PPI) network was established using STRING network database, and central genes were screened by a network analysis plug-in CytoHubba in Cytoscape 3.7.1 software. Finally, gene enrichment analysis (GSEA) was performed on the central genes using clusterProfiler package.

[Results] Compared with the control group, there were 53 DEGs in the low dose group, including 30 up-regulated genes and 23 down-regulated genes, and there were 151 DEGs in the high dose group, including 80 up-regulated genes and 71 down-regulated genes. The results of GO and KEGG enrichment analyses showed that the functions of DEGs enriching in the two dose groups were similar to those in the control group, mainly involving biological pathways such as circadian rhythm, carbohydrate metabolism, lipid metabolism, amino acid metabolism, and peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) signaling pathway. The results of PPI network analysis and GSEA showed that *Arntl* was the only gene presenting in the PPI networks of both low and high dose groups, enriching in 6 and 19 pathways of low and high expression groups respectively, and its high expression enriched in biosynthesis of unsaturated fatty acid, PPAR signaling pathway, and other biological pathways.

[Conclusion] TPHP could induce disruption of circadian rhythm, carbohydrate, lipid, and amino acid metabolic pathways in the liver of rats. *Arntl*, a rhythmic gene, may play an important role in hepatic metabolic disorder induced by TPHP exposure and in affecting endocrine function.

Keywords: triphenyl phosphite; bioinformatics; metabolic disorder; circadian rhythm; *Arntl* gene

磷酸三苯酯 (triphenyl phosphate, TPHP) 是目前应用最广泛的有机磷酸酯类阻燃剂之一, 作为多溴联苯醚的替代品, 用于电子设备、塑料制品、液压油、胶水、指甲油和铸造树脂中^[1-3]。TPHP 与多溴联苯醚类似, 可通过物理添加方式结合到材料中, 由于缺乏化学键的束缚作用且挥发性强, 因此, 在生产和使用的过程中易从材料中以挥发、渗出等方式释放, 并持久存在于周围环境中^[4]。近年来, 室内空气和粉尘、土壤、污水处理厂废水、地表水等环境介质和野生动物中均可检出 TPHP^[5-9]。此外, TPHP 可通过膳食途径被摄入, 在人体样本中也可检出 TPHP 及其代谢产物, 由此引起了人们对 TPHP 健康风险的关注^[10-13]。最初, 学者们预计 TPHP 的健康风险较低, 但是现有的研究结果表明 TPHP 具有明显的毒作用, 如生殖和发育毒性、神经毒性、干扰代谢、扰乱内分泌平衡^[14-16]。

因此, 进行 TPHP 毒效应研究和健康风险评估势在必行。传统上, 主要采用毒理学或分子生物学实验方式研究化学物质在体内通过哪些生物学过程、途径及其相关基因发挥毒性作用。近年来, 随着各种高通量技术的兴起, 通过生物信息学技术对基因组学和其他组学数据进行分析, 能够实现对毒物-基因关系的高通量筛选, 快速定位毒物干扰的生物学通路及通路上的基因, 有效地分析其效应机制和途径。本研究基于转录组测序数据, 采用生物信息学的方法, 发现 TPHP 扰乱肝脏代谢平衡的潜在靶点, 为进一步研究肝脏代谢紊乱的毒理机制提供科学依据。

1 材料与方法

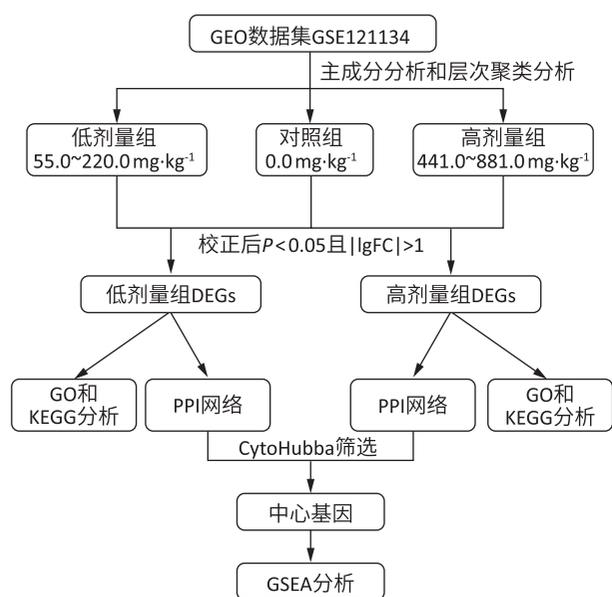
从美国国家生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 的基因表达数据

库 (Gene Expression Omnibus, GEO) 下载有关 TPHP 染毒大鼠肝脏的基因微阵列数据; 通过主成分分析和层次聚类方法分析不同剂量组基因表达模式的相似性并重新分组; 通过 limma 软件包筛选不同 TPHP 染毒剂量组的差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs), 并分别进行基因本体 (Gene Ontology, GO) 富集分析、京都基因和基因组数据库 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 通路富集分析; 基于 STRING 数据库建立蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络, 并采用 Cytoscape 软件中用于识别中心节点的 CytoHubba 插件筛选中心基因; 采用基因集富集分析 (gene set enrichment analysis, GSEA) 对中心基因及其相关的重要信号通路进行定位 (具体流程见图 1), 从而筛选出可能参与 TPHP 肝脏代谢紊乱的生物学过程和途径。

1.1 数据收集与分析

以 “triphenyl phosphate” AND (“hepatic” OR “liver”) 为检索词在 GEO 数据库中检索数据集。数据集需满足下列要求: 样本取自于大鼠肝脏组织, 实验对象必须包括 TPHP 染毒的实验组以及同期未染毒的对照组, 实验组和对照组的样本量不少于 3 个。

符合检索要求的仅有数据集 GSE121134。数据集 GSE121134 由美国国家毒理学计划提供, 其对经 TPHP 染毒的雄性 SD 大鼠进行了转录组学研究^[17]。该研究把 TPHP 溶解在玉米油中, 通过口服强饲每日一次, 共 4 d, 以 6 个 TPHP 剂量 (0.0、55.0、110.0、220.0、441.0、881.0 mg·kg⁻¹) 进行测试, 其中 0.0 mg·kg⁻¹ 剂量有 5 个样本, 其余 5 个剂量均为 3 个样本。在第 5 天, 处死大鼠取肝脏组织, 使用 Affymetrix Rat Genome 230 2.0 微阵列 (基于 GPL1355 平台) 检测基因表达量。



[注] |logFC|: 变化倍数对数值的绝对值; DEGs: 差异表达基因; GO: 基因本体; KEGG: 京都基因和基因组数据库; PPI: 蛋白质-蛋白质交互作用; GSEA: 基因集富集分析。

[Note] |logFC|: Absolute value of log fold change; DEGs: Differentially expressed genes; GO: Gene Ontology; KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; PPI: Protein-protein interaction; GSEA: gene set enrichment analysis.

图1 生物信息学分析流程图
Figure 1 Bioinformatics analysis flow chart

下载矩阵数据后,采用分位数标准化法对基因表达矩阵进行组间标准化。采用主成分分析和层次聚类分析方法,依据不同剂量组的基因表达模式的相似程度将20个样本归类至对照组(0.0 mg·kg⁻¹,含5个样本)、低剂量组(55.0~220.0 mg·kg⁻¹,含9个样本)和高剂量组(441.0~881.0 mg·kg⁻¹,含6个样本)。

1.2 DEGs 筛选和富集分析

低剂量组与对照组之间的DEGs和高剂量组与对照组之间的DEGs均采用R 3.5.3软件的limma包进行筛选^[18],并以火山图进行可视化,筛选标准为校正后 $P < 0.05$ 且 $|\logFC| > 1$ 。|logFC|表示变化倍数对数值的绝对值。

采用clusterProfiler包对DEGs进行GO分析^[19],包括生物学过程、分子功能及细胞组成,并进行KEGG通路富集分析。校正后 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义,对明显富集的功能及信号通路进行图形可视化。

1.3 PPI网络构建和中心基因筛选

STRING是一个蛋白质相互作用的生物学网络数据库^[20],将DEGs列表上传至STRING(<https://string-db.org/>)构建PPI网络。以置信度 ≥ 0.9 为阈值条件,并隐藏网络中未连接的节点。采用Cytoscape 3.7.1软件可视化PPI网络^[21],并采用网络分析插件CytoHubba筛

选中心基因^[22],中心基因对应的蛋白质通常为具有重要生理调节功能的核心蛋白。

1.4 GSEA

将6个剂量组的20个样本根据芳香烃受体核转运类似蛋白(aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator like, *Arntl*)基因表达量的上四分位数(P_{25} ,包含5个样本)和下四分位数(P_{75} ,包含5个样本)分为*Arntl*高表达组和*Arntl*低表达组。采用clusterProfiler包进行GSEA,参考基因集来自msigdb包的c2.cp.kegg.v6.2.symbols基因集^[23],每次分析置换次数1000次。以 $P < 0.05$ 和错误发现率(false discovery rate, FDR) < 0.25 作为明显富集基因集的判定标准,分析*Arntl*基因的表达水平对各种生物通路可能的作用机制。

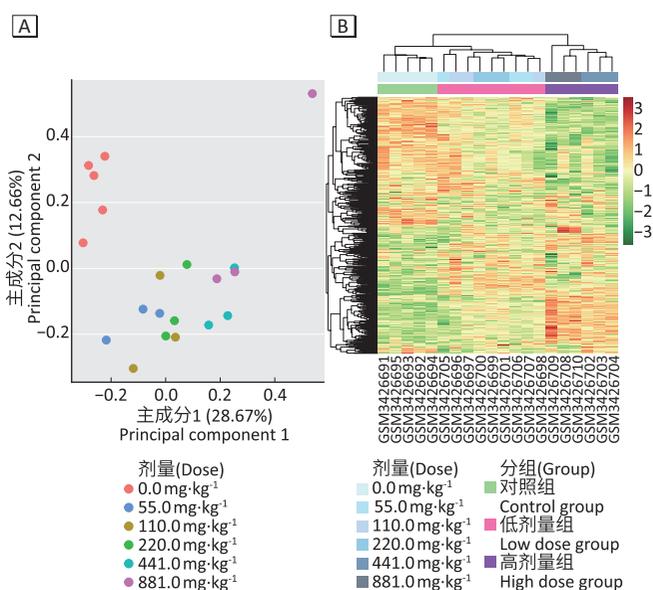
1.5 统计学分析

应用Cytoscape 3.7.1软件进行PPI网络分析及可视化,其余绘图及统计学处理均采用R 3.5.3软件完成。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 DEGs 筛选

通过主成分分析和层次聚类分析发现55.0、110.0、220.0 mg·kg⁻¹三个剂量组的基因表达模式相似性较高,并且441.0、881.0 mg·kg⁻¹两个剂量组的基因表达模式也呈现较高的相似性,见图2。



[注] A: 主成分分析; B: 聚类分析; 图B热图数值表示标准化后的基因表达量。

[Note] A: Principal component analysis; B: Clustering analysis; Values in heat map (Figure 2B) indicate standardized gene expressions.

图2 GSE121134数据集样本分组信息
Figure 2 GSE121134 dataset sample grouping information

低剂量组样本与对照组样本的 DEGs 共 53 个, 其中表达上调的基因 30 个, 表达下调的基因 23 个; 高剂量组样本与对照组样本的 DEGs 共 151 个, 其中表达上调的基因 80 个, 表达下调的基因 71 个。不同剂量组的 DEGs 信息详见表 1, 以校正后 P 值从小到大排序列出前 10 个 DEGs。

表 1 不同剂量组的差异表达基因

Table 1 Differentially expressed genes in different dose groups

组别 Group	差异表达基因 Differentially expressed gene	差异倍数的 对数值 Lg fold change	P	校正后 P Adjusted P	调节作用 Regulating effect
低剂量组 Low dose group	<i>Dbp</i>	3.88	4.64×10^{-13}	7.07×10^{-9}	↑
	<i>Hsd17b2</i>	2.36	6.57×10^{-12}	5.01×10^{-8}	↑
	<i>Tubb2a</i>	-1.92	2.44×10^{-10}	9.30×10^{-7}	↓
	<i>Nr1d2</i>	1.57	8.32×10^{-10}	2.46×10^{-6}	↑
	<i>Cdkn1a</i>	-2.12	9.68×10^{-10}	2.46×10^{-6}	↓
	<i>Npas2</i>	-1.15	1.47×10^{-9}	2.71×10^{-6}	↓
	<i>Per3</i>	1.80	1.62×10^{-9}	2.71×10^{-6}	↑
	<i>Lgalsl</i>	-1.32	1.63×10^{-9}	2.71×10^{-6}	↓
	<i>Avpr1a</i>	-1.21	1.93×10^{-9}	2.71×10^{-6}	↓
	<i>Arntl</i>	-1.44	2.48×10^{-9}	2.71×10^{-6}	↓
高剂量组 High dose group	<i>Slc6a6</i>	-3.93	1.62×10^{-13}	2.47×10^{-9}	↓
	<i>Abcc3</i>	3.45	3.13×10^{-11}	1.91×10^{-7}	↑
	<i>Aldh1a1</i>	1.43	3.75×10^{-11}	1.91×10^{-7}	↑
	<i>Dbp</i>	4.15	9.97×10^{-11}	3.05×10^{-7}	↑
	<i>Ces2c</i>	3.64	1.00×10^{-10}	3.05×10^{-7}	↑
	<i>Ugt2b1</i>	1.51	3.21×10^{-10}	8.16×10^{-7}	↑
	<i>Asb5</i>	2.11	4.97×10^{-10}	1.08×10^{-6}	↑
	<i>Lgalsl</i>	-1.84	1.11×10^{-9}	2.11×10^{-6}	↓
	<i>Oat</i>	-2.04	2.06×10^{-9}	3.49×10^{-6}	↓
	<i>LOC102556334</i>	2.25	3.40×10^{-9}	5.18×10^{-6}	↑

[注] ↑: 上调; ↓: 下调。

[Note] ↑: Up-regulation; ↓: Down-regulation.

2.2 GO 和 KEGG 分析

GO 功能富集分析显示, 低剂量组和高剂量组与对照组的 DEGs 所富集的功能较一致, 主要影响碳水化合物和脂质代谢等内分泌调节作用。其中, 低剂量组与对照组的 DEGs 共富集了 153 条记录, 其中生物学过程和分子功能分别为 138 条和 15 条。根据校正后 P 值, 选取生物学过程和分子功能富集程度最高的前 10 条, 所富集的功能主要表现在昼夜节律、节律过程、脂质代谢调节过程、单羧酸生物合成过程、光刺激应

答、小分子代谢调节过程等, 详见图 3A。

高剂量组与对照组的 DEGs 共富集了 246 条记录, 其中生物学过程和分子功能分别为 223 条和 23 条。根据校正后 P 值, 选取生物学过程和分子功能富集程度最高的前 10 条, 所富集的功能主要表现在羧酸生物合成过程、有机酸生物合成过程、辅助因子代谢过程、营养应答、脂肪酸代谢过程、胰岛素应答等, 详见图 3B。

KEGG 通路富集分析显示, 低剂量组与对照组的 DEGs 共富集了 8 条通路, 涉及昼夜节律、膀胱癌、甲状旁腺激素合成、子宫内膜癌症、Janus 激酶-信号转导子和转录激活子 (janus kinase-signal transducers and activators of transcription, JAK-STAT) 信号通路、过氧化物酶体增殖物激活受体 (peroxisome proliferator-activated receptors, PPAR) 信号通路、表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, ErbB) 信号通路、结直肠癌等, 详见图 4A。

高剂量组与对照组的 DEGs 共富集了 17 条通路, 涉及细胞色素 P450 介导的异生物素代谢、视黄醇代谢、化学致癌作用、胆汁分泌、ATP 结合盒 (ATP-binding cassette, ABC) 转运、戊糖和葡萄糖醛酸的相互转化、卟啉和叶绿素代谢、细胞色素 P450 介导的药物代谢、PPAR 信号通路、类固醇激素生物合成、昼夜节律、甘氨酸丝氨酸和苏氨酸代谢、胆固醇代谢、肝细胞癌、抗坏血酸和新陈代谢、流体剪切应力和动脉粥样硬化等, 详见图 4B。

2.3 PPI 网络中心基因

基于低剂量组样本与对照组样本的 DEGs 和高剂量组样本与对照组样本的 DEGs, 通过 STRING 数据库分别构建了两个 PPI 网络。其中低剂量组 PPI 网络由 30 个节点和 60 条连线组成, 详见图 5A; 高剂量组 PPI 网络由 104 个节点和 256 条连线组成, 详见图 5B; 节点代表 DEGs, 节点之间的连线代表基因间存在相互作用。

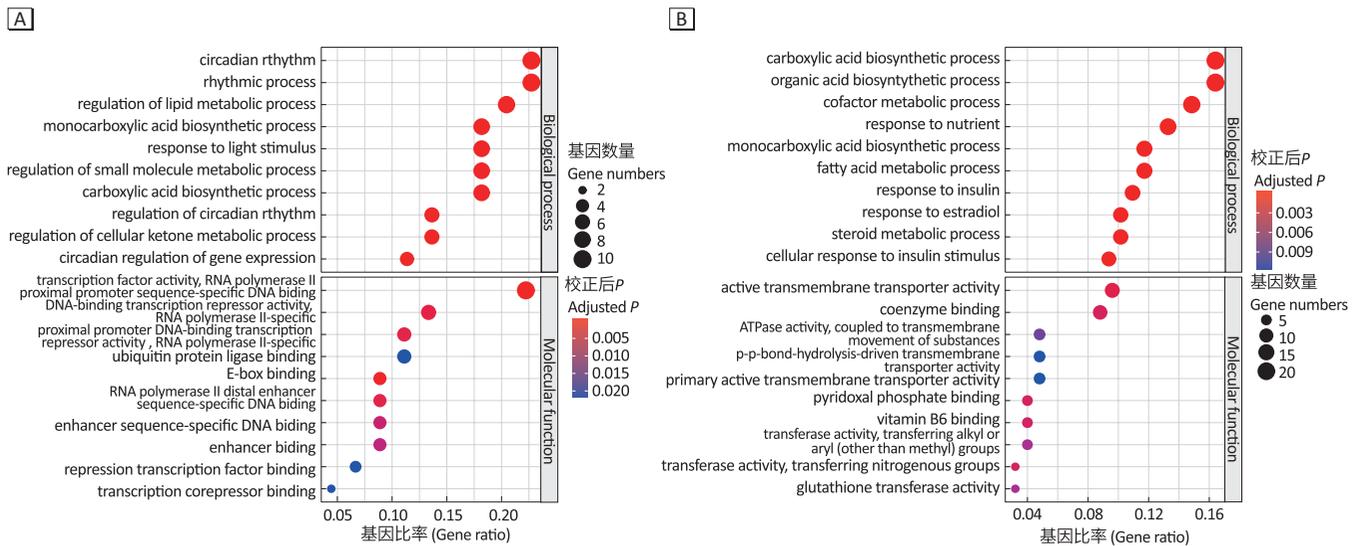
根据网络中每个基因的连接度, 颜色越深代表在整个网络中的作用相对越大, 选取各自 PPI 网络中排名前 10 的基因作为中心基因。基于 CytoHubba 插件的网络分析显示, 低剂量组中心基因包含 *Arntl*、*Nr1d2*、*Nr1d1*、*Per3*、*Npas2*、*Bhlhe40*、*Egfr*、*Nfil3*、*Cdkn1a*、*Dbp*; 高剂量组中心基因包含 *Arntl*、*Hmox1*、*Cyp1a1*、*Aldh1a1*、*nqo1*、*Scd1*、*Gstp1*、*Hmger*、*Alas1*、*Cyp3a23*。其中 *Arntl* 基因在两个网络中均排在第一

位, 并且也是唯一一个在两个网络中都存在的中心基因 (低剂量组 IgFC=-1.44, 校正后 $P < 0.001$; 高剂量组 IgFC=-2.15, 校正后 $P < 0.001$)。GO 和 KEGG 分析结果表明 *Arntl* 基因对应的蛋白在 TPHP 染毒后起着重要的生理调节功能。因此, 通过 GSEA 进一步探索与该基因相关的生物学途径及其参与调节的功能。

2.4 GSEA

Arntl 基因高表达组和低表达组的 GSEA 结果显示, 一共有 25 条通路被富集, 其中 *Arntl* 基因高表达组有 19 条通路, 涉及精氨酸和脯氨酸代谢、背腹轴线形成、朊病毒疾病、扩张型心肌病、造血细胞系、致

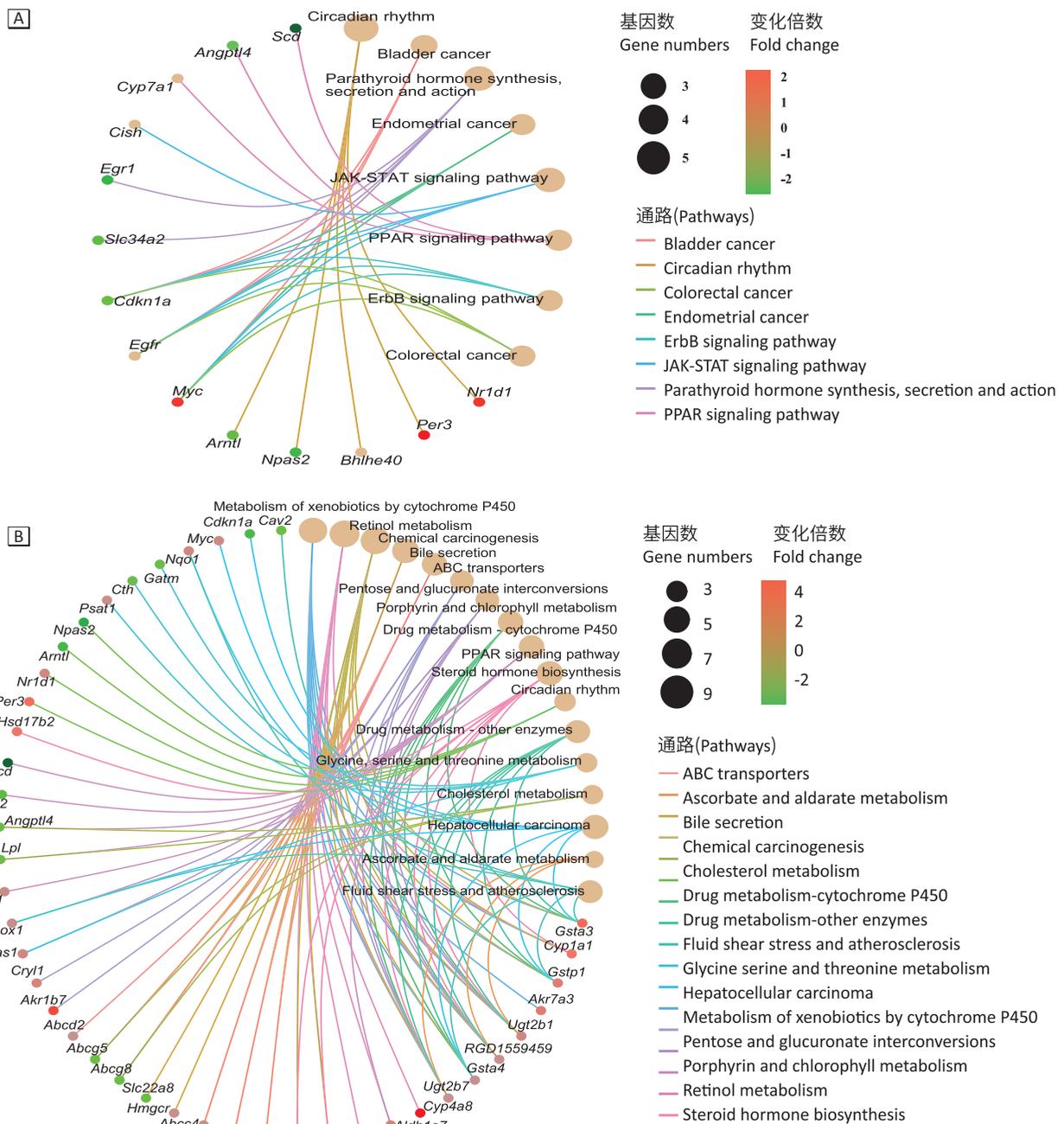
病性大肠杆菌感染、细胞外基质受体相互作用、黏着斑、细胞黏附分子、细胞间隙连接、利什曼原虫感染、转化生长因子- β (transforming growth factor-beta, TGF- β) 信号通路、血管平滑肌收缩、哮喘、不饱和脂肪酸的生物合成、PPAR 信号通路、细胞因子-受体相互作用、白细胞跨内皮迁移、系统性红斑狼疮生物途径; 低表达组有 6 条通路, 包括甾体生物合成、同源重组、DNA 复制、其他甘氨酸降解、核苷骨架生物合成和丁酸甲酯代谢生物途径, 详见图 6。GSEA 结果提示, *Arntl* 基因可能通过以上生物学通路影响 TPHP 的代谢紊乱效应。



[注 (Note)] circadian rhythm: 昼夜节律; rhythmic process: 节律过程; regulation of lipid metabolic process: 脂质代谢调节过程; monocarboxylic acid biosynthetic process: 单羧酸生物合成过程; response to light stimulus: 光刺激应答; regulation of small molecule metabolic process: 小分子代谢调节过程; carboxylic acid biosynthetic process: 羧酸生物合成过程; regulation of circadian rhythm: 昼夜节律调节; regulation of cellular ketone metabolic process: 细胞酮代谢调节过程; circadian regulation of gene expression: 昼夜调节基因表达; transcription factor activity, RNA polymerase II proximal promoter sequence-specific DNA binding: 抑制因子活性, RNA 聚合酶 II 近端启动子序列特异性; DNA-binding transcription repressor activity, RNA polymerase II-specific: DNA 结合转录抑制子活性, RNA 聚合酶 II 特异性; proximal promoter DNA-binding transcription repressor activity, RNA polymerase II-specific: 近端启动子 DNA 转录抑制子活性, RNA 聚合酶 II 特异性; ubiquitin protein ligase binding: 泛素化蛋白连接酶结合; E-box binding: E 盒增强子结合; RNA polymerase II distal enhancer sequence-specific DNA binding: RNA 聚合酶 II 远端增强子序列特异性 DNA 结合; enhancer sequence-specific DNA binding: 增强子序列特异性 DNA 结合; enhancer binding: 增强子结合; repression transcription factor binding: 抑制转录因子结合; transcription corepressor binding: 转录辅阻遏物结合; organic acid biosynthetic process: 有机酸生物合成过程; cofactor metabolic process: 辅助因子代谢过程; response to nutrient: 营养物应答; fatty acid metabolic process: 脂肪酸代谢过程; response to insulin: 胰岛素应答; response to estradiol: 雌二醇应答; steroid metabolic process: 类固醇代谢过程; cellular response to insulin stimulus: 细胞对胰岛素刺激的反应; active transmembrane transporter activity: 活性跨膜转运蛋白激活; coenzyme binding: 辅酶结合; ATPase activity, coupled to transmembrane movement of substances: ATE 酶活性, 与物质的跨膜运动相结合; p-p-bond-hydrolysis-driven transmembrane transporter activity: p-p 键水解驱动的跨膜转运蛋白激活; primary active transmembrane transporter activity: 主要的活性跨膜转运蛋白激活; pyridoxal phosphate binding: 磷酸吡哆醛结合; vitamin B6 binding: 维生素 B6 结合; transferase activity, transferring alkyl or aryl (other than methyl) groups: 转移酶活性、转移烷基或芳基 (甲基除外) 基团; transferase activity, transferring nitrogenous groups: 转移酶活性, 转移含氮基团; glutathione transferase activity: 谷胱甘肽转移酶激活; biological process: 生物学过程; molecular function: 分子功能。

图 3 低剂量组 (A) 和高剂量组 (B) 的 GO 富集结果

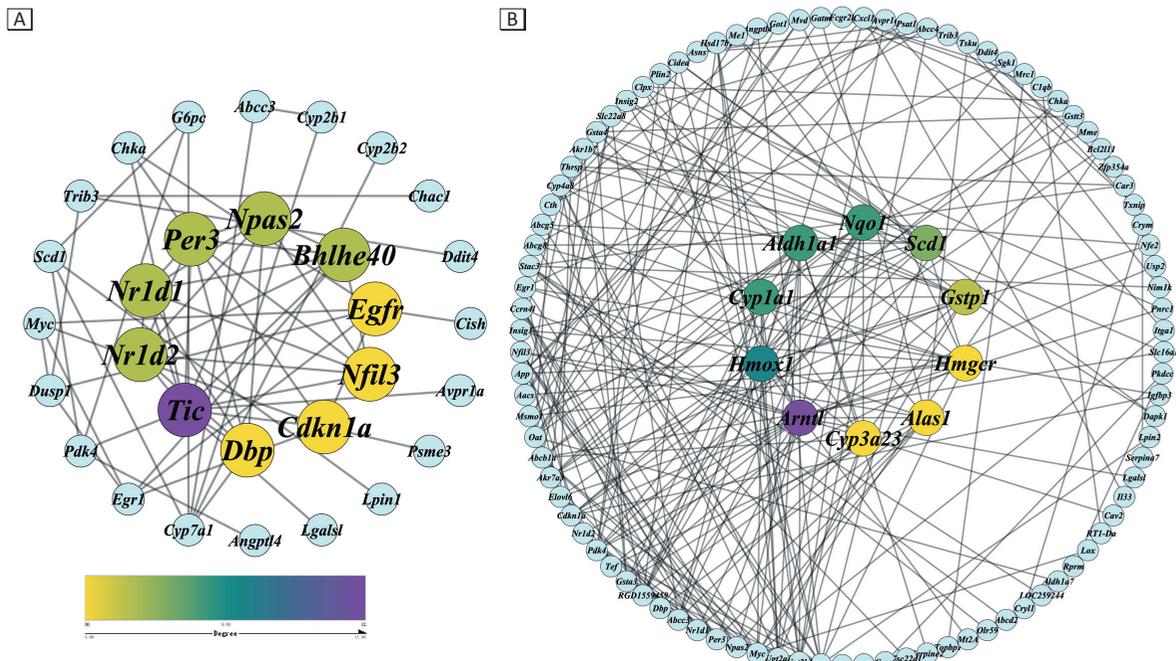
Figure 3 GO enrichment results in low dose group (A) and high dose group (B)



[注 (Note)] Bladder cancer : 膀胱癌 ; Circadian rhythm : 昼夜节律 ; Colorectal cancer : 结肠直肠癌 ; Endometrial cancer : 子宫内膜癌 ; ErbB signaling pathway : ErbB 信号通路 ; JAK-STAT signaling pathway : JAK-STAT 信号通路 ; Parathyroid hormone synthesis, secretion and action : 甲状旁腺激素的合成、分泌和作用 ; PPAR signaling pathway : PPAR 信号通路 ; ABC transporters : ABC 转运子 ; Ascorbate and aldarate metabolism : 抗坏血酸和新陈代谢 ; Bile secretion : 胆汁分泌 ; Chemical carcinogenesis : 化学致癌作用 ; Cholesterol metabolism : 胆固醇代谢 ; Drug metabolism - cytochrome P450 : 药物代谢 - 细胞色素 P450 ; Drug metabolism - other enzymes : 药物代谢 - 其他酶 ; Fluid shear stress and atherosclerosis : 流体剪切应力和动脉粥样硬化 ; Glycine serine and threonine metabolism : 甘氨酸丝氨酸和苏氨酸代谢 ; Hepatocellular carcinoma : 肝细胞癌 ; Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450 : 细胞色素 P450 对异生物素的代谢 ; Pentose and glucuronate interconversions : 戊糖和葡萄糖醛酸的相互转化 ; Porphyrin and chlorophyll metabolism : 卟啉和叶绿素代谢 ; Retinol metabolism : 视黄醇代谢 ; Steroid hormone biosynthesis : 类固醇激素生物合成。基因名称 (Gene names) : *Arntl*, *Nr1d1*, *Per3*, *Npas2*, *Bhlhe40*, *Egfr*, *Myc*, *Cdkn1a*, *Egr1*, *Slc34a2*, *Cish*, *Cyp7a1*, *Angptl4*, *Scd*, *Cav2*, *Nqa1*, *Gatm*, *Cth*, *Psat1*, *Npas2*, *Hsd17b2*, *Plin2*, *Lpl*, *Me1*, *Hmox1*, *Alas1*, *Cryl1*, *Akr1b7*, *Abcd2*, *Abcg5*, *Abcg8*, *Slc22a8*, *Hmgcr*, *Abcc4*, *Abcc3*, *Abcb1a*, *3a1*, *Cyp3a23*, *Aldh1a1*, *Ugt2b7*, *Gsta4*, *RGD1559459*, *Ugt2b1*, *Akr7a3*, *Gstp1*, *Cyp1a1*, *Gsta3*。

图4 低剂量组 (A) 和高剂量组 (B) 的KEGG通路富集分析结果

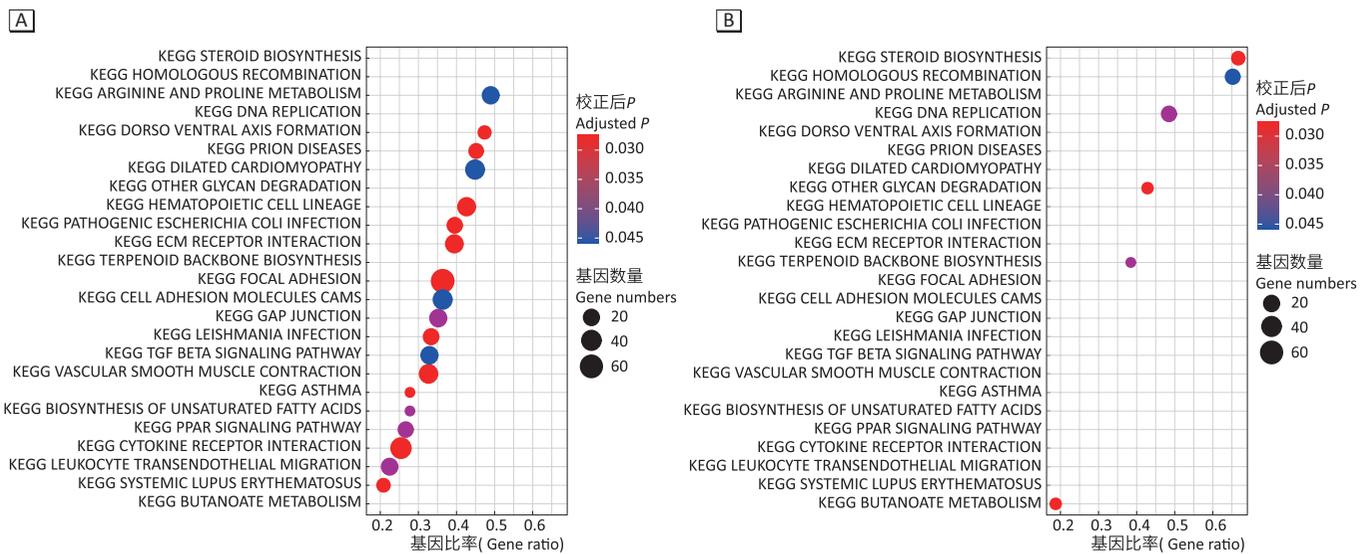
Figure 4 KEGG pathway enrichment analysis results in low dose group (A) and high dose group (B)



[注 (Note)] 基因名称 (Gene names) : *Arntl*, *Nr1d2*, *Nr1d1*, *Per3*, *Npas2*, *Bhlhe40*, *Egfr*, *Nfil3*, *Cdkn1a*, *Dbp*, *Hmax1*, *Cyp1a1*, *Aldh1a1*, *Nqo1*, *Scd1*, *Gstp1*, *Hmger*, *Alas1*, *Cyp3a23*。

图5 低剂量组 (A) 和高剂量组 (B) 的 PPI 网络分析

Figure 5 PPI network analysis in low dose group (A) and high dose group (B)



[注 (Note)] KEGG STEROID BIOSYNTHESIS: 甾体生物合成; KEGG HOMOLOGOUS RECOMBINATION: 同源重组; KEGG ARGININE AND PROLINE METABOLISM: 精氨酸和脯氨酸代谢; KEGG DNA REPLICATION: DNA 复制; KEGG DORSO VENTRAL AXIS FORMATION: 背腹轴线形成; KEGG PRION DISEASES: 朊病毒疾病; KEGG DILATED CARDIOMYOPATHY: 扩张型心肌病; KEGG OTHER GLYCAN DEGRADATION: 其他甘氨酸降解; KEGG HEMATOPOIETIC CELL LINEAGE: 造血细胞系; KEGG PATHOGENIC ESCHERICHIA COLI INFECTION: 致病性大肠杆菌感染; KEGG ECM RECEPTOR INTERACTION: 细胞外基质受体相互作用; KEGG TERPENOID BACKBONE BIOSYNTHESIS: 萜类骨架生物合成; KEGG FOCAL ADHESION: 黏着斑; KEGG CELL ADHESION MOLECULES CAMS: 细胞黏附分子; KEGG GAP JUNCTION: 细胞间隙连接; KEGG LEISHMANIA INFECTION: 利什曼原虫感染; KEGG TGF BETA SIGNALING PATHWAY: TGF-β 信号通路; KEGG VASCULAR SMOOTH MUSCLE CONTRACTION: 血管平滑肌收缩; KEGG ASTHMA: 哮喘; KEGG BIOSYNTHESIS OF UNSATURATED FATTY ACIDS: 不饱和脂肪酸的生物合成; KEGG PPAR SIGNALING PATHWAY: PPAR 信号通路; KEGG CYTOKINE RECEPTOR INTERACTION: 细胞因子-受体相互作用; KEGG LEUKOCYTE TRANSENDOTHELIAL MIGRATION: 白细胞跨内皮迁移; KEGG SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS: 系统性红斑狼疮; KEGG BUTANOATE METABOLISM: 丁酸甲酯代谢。

图6 高剂量组 (A) 和低剂量组 (B) 的基因集富集分析

Figure 6 Gene set enrichment analysis in high dose group (A) and low dose group (B)

3 讨论

通过检索 GEO 数据库, 获得关于 TPHP 不同剂量染毒大鼠的转录组表达谱数据集 GSE121134, 该数据集由美国国家毒理学计划提供, 旨在通过短期的体内转录组学评估 TPHP 对敏感基因和胆碱酯酶抑制的基准剂量值。本研究利用生物信息学方法筛选 TPHP 低剂量染毒和高剂量染毒较未染毒的大鼠肝脏组织样本的 DEGs, 并应用 GO 功能注释和 KEGG 通路分析探索 TPHP 染毒后 DEGs 的生物学作用, 再基于 DEGs 构建 PPI 网络筛选中心基因, 发现 TPHP 对肝脏代谢毒性作用的潜在靶点。

通过主成分分析和层次聚类分析将不同染毒浓度的大鼠样本分对照组、低剂量组和高剂量组, 发现不同剂量组间的基因表达模式存在差异。因此, 分别对低剂量组与对照组的 DEGs 和高剂量组与对照组的 DEGs 进行 GO 分析和 KEGG 分析, 试图寻找不同剂量染毒对肝脏代谢生物学功能和途径的作用差异。GO 功能富集分析显示, 尽管全局的基因表达模式存在差异, 但是不同剂量组与对照组的 DEGs 所富集的生物学功能较一致, 其中羧酸生物合成过程、有机酸生物合成过程、营养应答、脂肪酸代谢过程、胰岛素应答、昼夜节律、脂质代谢调节过程、单羧酸生物合成过程等生物过程与碳水化合物和脂质代谢相关。KEGG 通路富集分析也表现了类似的结果, 昼夜节律、PPAR 信号通路、胆汁分泌、ABC 转运、戊糖和葡萄糖醛酸的相互转化、类固醇激素生物合成、甘氨酸丝氨酸和苏氨酸代谢、胆固醇代谢、抗坏血酸和新陈代谢、流体剪切应力和动脉粥样硬化等通路均与碳水化合物和脂质代谢相关。TPHP 是一种内分泌干扰物, TPHP 暴露会破坏碳水化合物和脂质代谢, 进而促进肥胖及其代谢性疾病进展^[24-26]。Tung 等^[27]发现 TPHP 可以通过调控过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma, *PPARG*) 的表达, 促进人原代前脂肪细胞的脂肪生成。使用小鼠 3T3-L1 前脂肪细胞, 进一步发现 TPHP 可以明显增加 *PPARG* 介导的 *aP2* (一种成熟脂肪细胞标记物) 增强子活性^[28]。此外, Wang 等^[24]将 TPHP 定义为诱胖剂, 即不恰当地改变脂质体内平衡和脂肪储存、破坏能量平衡或改变食欲和饱腹感调节以促进脂肪堆积和肥胖的外源性化学物质; 同时, 还观察到在子宫内和哺乳期暴露于 TPHP 会导致子代雄性小鼠的体重、肝脏重量和脂肪量增加, 以及肝脂肪变性、葡萄糖稳态受损和胰岛素

抵抗。不过, 也有研究发现 TPHP 及其代谢物磷酸二苯酯暴露均对子宫重量、葡萄糖耐量和雌二醇分泌没有影响, 但是 TPHP 在雄性小鼠中存在剂量依赖性作用, 其低毒性剂量上调脂质相关代谢物, 而高毒性剂量下调丙酮酸代谢和三羧酸循环^[16]。

除代谢紊乱外, KEGG 富集分析显示甲状旁腺激素合成、ErbB 信号通路、JAK-STAT 信号通路和癌症相关通路与细胞周期、增殖、分化、凋亡相关。Du 等^[26]通过对斑马鱼肝脏组织的转录组学和代谢组学研究发现了类似结果, TPHP 暴露不仅能够干扰碳水化合物代谢和脂质代谢, 还会影响细胞周期, 阻碍 DNA 损伤修复系统。此外, KEGG 富集分析结果还涉及药物代谢和维生素代谢, 这可能由于肝脏是药物的主要清除器官, 并且作为多种维生素贮存和代谢的场所^[29]。

为了明确基因间的相互作用程度, 通过构建 PPI 网络, 同时运用 CytoHubba 插件从两个 PPI 网络中分别筛选出了 10 个中心基因。其中节律基因 *Arntl* 在两个 PPI 网络中均占据最重要的位置, 此外, 无论是 TPHP 低剂量染毒组还是高剂量染毒组, 该基因的表达均下调, 并且在低剂量组中排在前 10 位。节律基因 *Arntl* (也写作 *BMAL1*) 编码一种 bHLH/PAS 结构域转录因子家族蛋白质, 是昼夜节律振荡器的关键元件, 对于哺乳动物昼夜节律的产生是必需的, 参与多种生理功能的调节, 包括新陈代谢、睡眠、内分泌、免疫等^[30]。Dyar 等^[31]发现 *Arntl* 基因的肌肉特异性丧失与代谢障碍、肌肉甘油三酯生物合成受损以及脂质和氨基酸积累相关。Li 等^[32]发现 *Arntl* 通过组蛋白去乙酰化酶 5 途径促进肝脏糖异生基因表达, 并且 *Arntl* 的过度磷酸化可能导致 2 型糖尿病的高血糖症。Harada 等^[33]构建了他莫昔芬诱导的 β 细胞 *Arntl* 基因特异性敲除小鼠, 发现 *Arntl* 缺乏会导致葡萄糖、腺苷酸环化酶激活剂、胰高血糖素样肽 -1 受体激动剂和超极化刺激的胰岛素分泌减少。Pérez-Mendoza 等^[34]认为 PPAR 信号通路是代谢和生物钟之间的联系枢纽。*Arntl* 基因参与内分泌调控在 GSEA 中也有所体现, 比如, 不饱和脂肪酸的生物合成、PPAR 信号通路、细胞因子-受体相互作用、精氨酸和脯氨酸代谢、甾体生物合成、其他甘氨酸降解、丁酸甲酯代谢等通路的富集。

本研究提供了 TPHP 在大鼠肝脏中毒性作用的系统分析, 结果表明 TPHP 在短期暴露后导致肝脏代谢紊乱, 即使在较低剂量 (55.0~220.0 mg·kg⁻¹) 时也是如此。大鼠肝脏中昼夜节律、碳水化合物、脂质和氨

基酸代谢途径受到干扰,表明TPHP可诱导肝脏乃至全身的综合代谢紊乱,进而影响内分泌系统。此外,TPHP暴露也影响细胞周期以及与细胞的增殖、分化、凋亡相关的生物途径。节律基因*Arntl*可能在TPHP暴露导致的代谢紊乱中发挥重要作用,并且会影响内分泌功能。本研究使用的数据样本较少,并且仅包含转录组数据,“大数据”时代单一组学向多组学联合分析发展是大势所趋,下一步亟需通过多组学联合分析全面阐释TPHP对肝脏代谢毒性的效应,并进一步通过实验验证*Arntl*基因表达异常与TPHP暴露的相关性,探讨*Arntl*基因表达改变与肝脏代谢紊乱的关联。

参考文献

- [1] TOKUMURA M, SEO M, WANG Q, et al. Dermal exposure to plasticizers in nail polishes : An alternative major exposure pathway of phosphorus-based compounds [J]. *Chemosphere*, 2019, 226 : 316-320.
- [2] BALLESTEROS-GÓMEZ A, BRANDSMA SH, DE BOER J, et al. Analysis of two alternative organophosphorus flame retardants in electronic and plastic consumer products : resorcinol bis- (diphenylphosphate) (PBDPP) and bisphenol A bis (diphenylphosphate) (BPA-BDPP) [J]. *Chemosphere*, 2014, 116 : 10-14.
- [3] 印红玲, 刘琴, 廖林群, 等. 塑胶跑道中有机磷酸酯的含量及健康风险 [J]. *环境科学*, 2017, 38 (11) : 4868-4873.
- [4] VAN DER VEEN I, DE BOER J. Phosphorus flame retardants : properties, production, environmental occurrence, toxicity and analysis [J]. *Chemosphere*, 2012, 88 (10) : 1119-1153.
- [5] SUN Y, LIU LY, SVERKO E, et al. Organophosphate flame retardants in college dormitory dust of northern Chinese cities : occurrence, human exposure and risk assessment [J]. *Sci Total Environ*, 2019, 665 : 731-738.
- [6] KIM UJ, OH JK, KANNAN K. Occurrence, removal, and environmental emission of organophosphate flame retardants/plasticizers in a wastewater treatment plant in New York State [J]. *Environ Sci Technol*, 2017, 51 (14) : 7872-7880.
- [7] KHAIRY MA, LOHMANN R. Organophosphate flame retardants in the indoor and outdoor dust and gas-phase of Alexandria, Egypt [J]. *Chemosphere*, 2019, 220 : 275-285.
- [8] JI Y, WANG Y, YAO Y, et al. Occurrence of organophosphate flame retardants in farmland soils from Northern China : Primary source analysis and risk assessment [J]. *Environ Pollut*, 2019, 247 : 832-838.
- [9] GUO J, VENIER M, SALAMOVA A, et al. Bioaccumulation of Dechloranes, organophosphate esters, and other flame retardants in Great Lakes fish [J]. *Sci Total Environ*, 2017, 583 : 1-9.
- [10] ZHAO L, JIAN K, SU H, et al. Organophosphate esters (OPEs) in Chinese foodstuffs : dietary intake estimation via a market basket method, and suspect screening using high-resolution mass spectrometry [J]. *Environ Int*, 2019, 128 : 343-352.
- [11] ZHANG T, BAI XY, LU SY, et al. Urinary metabolites of organophosphate flame retardants in China : health risk from tris (2-chloroethyl) phosphate (TCEP) exposure [J]. *Environ Int*, 2018, 121 : 1363-1371.
- [12] LI J, ZHAO L, LETCHER RJ, et al. A review on organophosphate Ester (OPE) flame retardants and plasticizers in foodstuffs : levels, distribution, human dietary exposure, and future directions [J]. *Environ Int*, 2019, 127 : 35-51.
- [13] KIM JW, ISOBE T, MUTO M, et al. Organophosphorus flame retardants (PFRs) in human breast milk from several Asian countries [J]. *Chemosphere*, 2014, 116 : 91-97.
- [14] MITCHELL CA, REDDAM A, DASGUPTA S, et al. Diphenyl phosphate-induced toxicity during embryonic development [J]. *Environ Sci Technol*, 2019, 53 (7) : 3908-3916.
- [15] HONG X, CHEN R, HOU R, et al. Triphenyl phosphate (TPHP) -induced neurotoxicity in adult male Chinese rare minnows (*Gobiocypris rarus*) [J]. *Environ Sci Technol*, 2018, 52 (20) : 11895-11903.
- [16] WANG D, ZHU W, CHEN L, et al. Neonatal triphenyl phosphate and its metabolite diphenyl phosphate exposure induce sex- and dose-dependent metabolic disruptions in adult mice [J]. *Environ Pollut*, 2018, 237 : 10-17.
- [17] National Toxicology Program. NTP research report on *in vivo* repeat dose biological potency study of triphenyl phosphate (CAS No. 115-86-6) in male Sprague Dawley rats (Hsd : Sprague Dawley SD) (gavage studies) [M]. Durham, USA : National Institute of Environmental Health Sciences, 2018 : 11-13.
- [18] RITCHIE ME, PHIPSON B, WU D, et al. *limma* powers

- differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43 (7) : e47.
- [19] YU G, WANG LG, HAN Y, et al. ClusterProfiler : an R package for comparing biological themes among gene clusters [J]. *OMICS*, 2012, 16 (5) : 284-287.
- [20] SZKLARCZYK D, GABLE AL, LYON D, et al. STRING v11 : protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47 (D1) : D607-D613.
- [21] SHANNON P, MARKIEL A, OZIER O, et al. Cytoscape : a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks [J]. *Genome Res*, 2003, 13 (11) : 2498-2504.
- [22] CHIN CH, CHEN SH, WU HH, et al. *CytoHubba* : identifying hub objects and sub-networks from complex interactome [J]. *BMC Syst Biol*, 2014, 8 Suppl 4 : S11.
- [23] LIBERZON A, BIRGER C, THORVALDSDOTTIR H, et al. The molecular signatures database hallmark gene set collection [J]. *Cell Syst*, 2015, 1 (6) : 417-425.
- [24] WANG D, YAN S, YAN J, et al. Effects of triphenyl phosphate exposure during fetal development on obesity and metabolic dysfunctions in adult mice : impaired lipid metabolism and intestinal dysbiosis [J]. *Environ Pollut*, 2019, 246 : 630-638.
- [25] SCHANG G, ROBAIRE B, HALES BF. Organophosphate flame retardants act as endocrine-disrupting chemicals in MA-10 mouse tumor leydig cells [J]. *Toxicol Sci*, 2016, 150 (2) : 499-509.
- [26] DU Z, ZHANG Y, WANG G, et al. TPHP exposure disturbs carbohydrate metabolism, lipid metabolism, and the DNA damage repair system in zebrafish liver [J]. *Sci Rep*, 2016, 6 : 21827.
- [27] TUNG EW, PESHDARY V, GAGNÉ R, et al. Adipogenic effects and gene expression profiling of firemaster® 550 components in human primary preadipocytes [J]. *Environ Health Perspect*, 2017, 125 (9) : 097013.
- [28] TUNG EW, AHMED S, PESHDARY V, et al. Firemaster® 550 and its components isopropylated triphenyl phosphate and triphenyl phosphate enhance adipogenesis and transcriptional activity of peroxisome proliferator activated receptor (PPAR γ) on the adipocyte protein 2 (aP2) promoter [J]. *PLoS One*, 2017, 12 (4) : e0175855.
- [29] ZHANG Q, JI S, CHAI L, et al. Metabolic mechanism of Aryl phosphorus flame retardants by cytochromes P450 : a combined experimental and computational study on triphenyl phosphate [J]. *Environ Sci Technol*, 2018, 52 (24) : 14411-14421.
- [30] ANGELOUSI A, KASSI E, NASIRI-ANSARI N, et al. Clock genes alterations and endocrine disorders [J]. *Eur J Clin Invest*, 2018, 48 (6) : e12927.
- [31] DYAR KA, HUBERT MJ, MIR AA, et al. Transcriptional programming of lipid and amino acid metabolism by the skeletal muscle circadian clock [J]. *PLoS Biol*, 2018, 16 (8) : e2005886.
- [32] LI J, LV S, QIU X, et al. BMAL1 functions as a cAMP-responsive coactivator of HDAC5 to regulate hepatic gluconeogenesis [J]. *Protein Cell*, 2018, 9 (11) : 976-980.
- [33] HARADA N, INAGAKI N. Role of clock genes in insulin secretion [J]. *J Diabetes Investig*, 2016, 7 (6) : 822-823.
- [34] PÉREZ-MENDOZA M, RIVERA-ZAVALA JB, RODRÍGUEZ-GUADARRAMA AH, et al. Daily cycle in hepatic lipid metabolism in obese mice, *Neotomodon alstoni* : sex differences [J]. *Chronobiol Int*, 2018, 35 (5) : 643-657.

(英文编辑：汪源；编辑：韩凤婵，汪源；校对：陈姣)