

慢性砷中毒患者头发代谢物特征的代谢组学研究

杜航¹, 龚进¹, 代华², 苗欣雨², 唐蓉², 王丽萍², 岳静文², 莫婷婷², 夏茵茵²

摘要:

[目的] 分析和对比慢性砷中毒患者与健康对照者的头发样本, 筛选差异代谢物, 分析相关代谢途径, 为砷毒性机制研究提供理论依据。

[方法] 采用气相色谱/质谱联用法(GC/MS)和代谢组学方法, 研究5名慢性砷中毒患者(观察组)和5名健康者(对照组)的头发样本的代谢物差异。利用主成分分析法(PCA)和偏最小二乘判别分析(PLS-DA)分析两组的代谢图谱差异, 找出差异代谢物。

[结果] 慢性砷中毒患者尿砷[(1.32±0.09)μmol/L]明显高于砷中毒标准(1.17 μmol/L)和对照组[(0.29±0.10)μmol/L] ($P<0.001$)。共检出10种差异代谢物, 在慢性砷中毒患者中有4种上调, 6种下调。代谢通路分析筛选出4种有意义的差异代谢物, 与对照组相比, 在观察组中分别为苯乙醛和γ-氨基丁酸含量升高, 而谷胱甘肽和丙氨酸含量降低。这4种代谢物均与机体氧化应激相关。

[结论] 验证了砷的慢性毒性机制主要涉及氧化应激, 同时为探索氧化应激的发生机制提供了可能的思路和线索。

关键词: 慢性砷中毒; 代谢组学; 头发; 主成分分析; 偏最小二乘判别分析

引用: 杜航, 龚进, 代华, 等. 慢性砷中毒患者头发代谢物特征的代谢组学研究[J]. 环境与职业医学, 2018, 35(2): 163-167. DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2018.17472

Metabonomics study on metabolic profile of hair samples from chronic arsenic poisoning patients DU Hang¹, GONG Jin¹, DAI Hua², MIAO Xin-yu², TANG Rong², WANG Li-ping², YUE Jing-wen², MO Ting-ting², XIA Yin-yin² (1. Physical and Chemical Lab, Chongqing Municipal Hospital for Prevention and Control of Occupational Diseases, Chongqing 400060, China; 2. School of Public Health and Management, Research Center for Medicine and Social Development, Innovation Center for Social Risk Governance in Health, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China). Address correspondence to MO Ting-ting, E-mail: tingtingmo_mo@163.com · The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract:

[Objective] To compare hair samples of diagnosed chronic arsenic poisoning patients and healthy controls, screen differential metabolites, analyze related metabolic pathways, and provide a potential theoretical basis for further studies on the mechanism of arsenic toxicity.

[Methods] Gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS) and metabonomics approach were used to analyze differential metabolites in hair samples collected from five chronic arsenic poisoning patients (observation group) and five healthy controls (control group). Principal component analysis (PCA) and partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) were conducted to analyze metabolic profile differences between the two groups.

[Results] The urinary arsenic level of the observation group [(1.32±0.09)μmol/L] was significantly higher than the diagnostic criteria (1.17 μmol/L) and that of the control group [(0.29±0.10)μmol/L] ($P<0.001$). Ten differential metabolites were found between the two groups, among which four metabolites were up-regulated and six metabolites were down-regulated in the observation group when comparing with the control group. Four valid metabolites were selected according to related metabolic pathway analysis

· 作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

[基金项目] 重庆市卫生计生委医学科研基金(编号: 2015MSXM219)

[作者简介] 杜航(1985—), 男, 硕士, 主管技师; 研究方向: 职业性砷中毒; E-mail: 646698773@qq.com

[通信作者] 莫婷婷, E-mail: tingtingmo_mo@163.com

[作者单位] 1. 重庆市职业病防治院理化检验科, 重庆 400060; 2. 重庆医科大学公共卫生与管理学院, 医学与社会发展研究中心, 健康领域社会风险预测治理协同创新中心, 重庆 400016

of differential metabolites. Compared with the control group, benzene acetaldehyde and γ -aminobutyric acid levels were increased, while glutathione and alanine levels were decreased in the observation group. Furthermore, all the four metabolites were related to oxidative stress *in vivo*.

[Conclusion] The present study verifies the involvement of oxidative stress in the mechanism of chronic arsenic poisoning, and provide an insight into a possible mechanism of oxidative stress.

Keywords: chronic arsenic poisoning; metabonomics; hair; principal component analysis; partial least squares discriminant analysis

Citation: DU Hang, GONG Jin, DAI Hua, et al. Metabonomics study on metabolic profile of hair samples from chronic arsenic poisoning patients[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2018, 35(2): 163-167. DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2018.17472

砷是一种有毒的类金属,广泛存在于空气、土壤、地下水和食物中,是类金属中毒的常见原因之一。慢性砷中毒可致恶心呕吐等消化道症状、皮肤改变、感觉和运动神经异常、肝肾等多器官多系统损害。慢性砷中毒的实验室诊断依据为尿砷水平。研究的慢性砷中毒毒性机制,需要能反映长期代谢和应激变化的生物样品,缓慢生长的头发是研究慢性砷中毒的合适样品。

代谢组学是对生物体体液(如血液、唾液、尿液等)内的一切代谢物进行定性和定量分析的学科。代谢组学利用核磁共振(NMR)、气相色谱/质谱联用法(GC/MS)和液相色谱/质谱联用法(LC/MS)等主要技术,通过测量生物样品中的小分子物质,发现疾病标志以及提示疾病发病机制。近年来对砷毒性的研究不断进展,代谢组学作为一门新兴学科,为砷毒性的研究提供了新的思路和方法。GC/MS具有能提供结构信息、高通量、精确度合理等优点,已被广泛运用于砷毒性研究中,但目前对代谢组学在砷毒性研究中的应用报道较少^[1]。

因此,本研究运用GC/MS对慢性砷中毒患者(观察组)与正常人(对照组)的头发进行代谢组学研究。利用主成分分析法(PCA)和偏最小二乘判别分析(PLS-DA)分析二者代谢物的差异,筛选慢性砷中毒患者头发中的特异差异代谢物,分析相关代谢通路,为砷毒性机制研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象

选取2015年11月重庆市职业病防治院确诊的慢性砷中毒患者5名(3男2女),平均年龄34岁(6~59岁)。入院前5个月左右,5名患者分别因各种原因导致的身体不适到不同医院就诊,随后仍相继出现恶心、头晕、呕吐伴或不伴腹痛、四肢麻木乏力伴疼痛和灼烧感及皮肤色素沉着等症状,陆续到重庆市职业

病防治院进一步诊治。选取相同时间段入院体检的,年龄与性别均与观察组一对一匹配的5名健康者作为对照组。

1.2 主要仪器与试剂

7385037型超低温冷冻干燥系统(Labconco,美国),Vortex Genius 3型涡旋振荡仪和高速分散机(IKA,德国),GC7890型气相色谱仪和MSD5977型质谱仪系统(Agilent,美国),ECH-1型电子控温加热板(上海新仪微波化学科技有限公司,中国),原子荧光光度计(北京海光仪器有限公司,中国)。

亚砷酸钠(上海化学试剂总厂,中国),甲醇、氢氧化钾、氯仿、碳酸氢钠和氢氧化钠(Merck Chemicals,德国),D4-丙氨酸、氯甲酸钾(MCF)和吡啶(Sigma-Aldrich,美国),以上试剂均为分析纯级别。

1.3 样品制备

沿发根取约5 cm的头发5 mg,在纯净水和甲醇中分别洗涤两次。然后将头发放入玻璃小瓶,加入400 μ L氢氧化钾和20 μ L D4-丙氨酸,于54 $^{\circ}$ C中孵育18 h。碱性水解后,加入67 μ L硫酸,中和至pH 7。加入1 mL甲醇除去盐和蛋白质,4000 r/min(半径9.6 cm)离心5 min,保留上清液,用真空离心蒸发浓缩器将上清液干燥8 h,储存于-80 $^{\circ}$ C。

将头发样品加入200 μ L氢氧化钠中,混匀20 s,转移样品到硅烷化玻璃管中,依次加入167 μ L甲醇、34 μ L吡啶、20 μ L MCF,混匀30 s,再加入20 μ L MCF,混匀30 s,加入400 μ L氯仿,混匀10 s,加入400 μ L碳酸氢钠,混匀10 s,1500 r/min(半径9.6 cm)离心5 min,弃去水层,加入少量无水硫酸钠吸收剩余水分,转移样品至专用样品管中进行GC/MS分析。

1.4 GC/MS分析条件

色谱条件:ZB-1701 GC石英毛细管柱(30 m $\times$ 250 μ m, 0.15 μ m),载气为99.999 9%高纯氦气,流速1.0 mL/min;每次自动进样1 μ L,不分流,界面温度

250℃,四级杆温度200℃,电压70eV。色谱柱升温程序如下:色谱柱开始温度为45℃,维持2min;以9℃/min的速度升温至180℃,维持5min;以40℃/min的速度,分别升温至220℃、240℃和280℃,在前两个温度均维持5min,最后在280℃时维持2min。

质谱条件:电离模式EI,电子能量70eV;离子源温度230℃,四极杆温度150℃,质谱全扫描范围为38~550m/z(质荷比),检验阈值为100个离子。质谱扫描范围为38~550m/z,延迟5.5min开始采集。

1.5 尿砷的采样与测定

按照WS/T 474—2015《尿中砷的测定 氢化物发生原子荧光法》要求,采集研究对象的尿样并测定其中的砷浓度。

1.6 统计学分析

GC/MS 色谱图使用全扫描和 AMDIS (2.66 版) 软件进行分析,使用内部MCF质谱数据库进行实验结果匹配和代谢物鉴定,选择匹配度>70%者作为筛选结果。代谢物的质谱数据通过SIMCA-P 11.5软件进行处理,运用PCA和PLS-DA分析两组代谢物的潜在差异。在PLS-DA模型中使用 R^2X 和 Q^2 评价模型的完美程度。 R^2X 代表模型每次畸形分类后对所有应变变量X的变化进行说明的部分; Q^2 代表可以通过模型的交叉验证进行应变变量X变化预测的部分。 R^2X 和 Q^2 越接近1,说明模型越完美。借助SPSS 20.0软件作配对t检验($P<0.05$),筛选出具有特异性的差异代谢物。由在线代谢途径分析工具(www.metaboanalyst.ca),查找特异性差异代谢物的有意义的相关代谢途径。

2 结果

2.1 临床资料

对照组与观察组的年龄、性别差异无统计学意义($P>0.05$)。观察组尿砷浓度在1.19~1.41 μmol/L之间,均高于砷中毒标准(1.17 μmol/L)及配对对照组个

体(0.19~0.44 μmol/L)。两组尿砷水平[对照组(0.29 ± 0.10) μmol/L、观察组(1.32 ± 0.09) μmol/L]差异有统计学意义($P<0.001$)(表1)。

表1 观察组和对照组的一般情况及尿砷浓度比较

配对号	性别	对照组		观察组	
		年龄	尿砷(μmol/L)	年龄	尿砷(μmol/L)
1	男	6	0.19	6	1.39
2	男	24	0.44	23	1.32
3	女	27	0.32	25	1.19
4	男	58	0.31	57	1.28
5	女	62	0.20	59	1.41
均值($\bar{x} \pm s$)		—	0.29 ± 0.10	—	1.32 ± 0.09

2.2 代谢组学分析结果

由PCA得分图(图1)看出,对照组和观察组之间存在明显的分离趋势,提示两组的代谢物存在明显差异。PLS-DA模型的 $R^2X=0.984$, $Q^2=0.972$,证明模型稳定性高以及预测效果好。以匹配度>70%为标准,筛选出代谢物130种。通过配对t检验得出10种差异代谢物($P<0.05$),其中4种上调,6种下调(表2)。由在线代谢途径分析工具,查找到4种有意义差异代谢物[γ-氨基丁酸(γ-aminobutyric, GABA)、谷胱甘肽(glutathione, GSH)、丙氨酸、苯乙醛]的相关代谢途径(表3)。

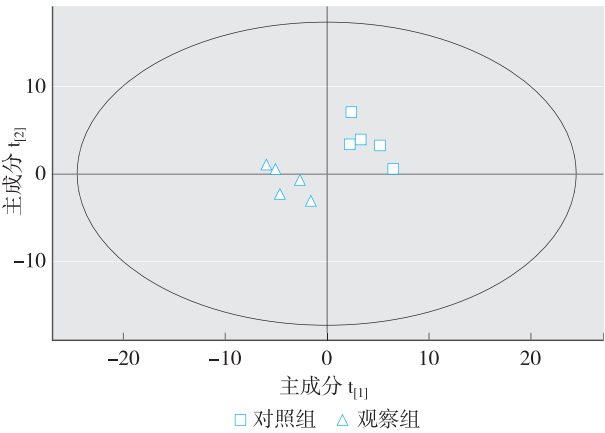


图1 PCA得分图

表2 GC/MS分析差异性代谢物(n=5)

代谢物	匹配度(%)	保留时间(min)	峰值(m/z) ($\bar{x} \pm s$)		P	观察/对照
			对照组	观察组		
丙氨酸	98	14.88	46014 ± 44 58	37 155 ± 3 731	0.000	0.81
苯乙醛	94	9.58	1082 ± 123	1 321 ± 83	0.001	1.22
乙醚	94	9.17	18012 ± 898	20414 ± 1 385	0.010	1.13
谷胱甘肽	92	19.17	20888 ± 1 720	16 168 ± 1 839	0.005	0.77
(4-二乙基氨基亚苄基氨基)-2-甲基-4-硝基-苯	92	29.93	16 730 ± 2 078	12 908 ± 2 108	0.047	0.77
2-氨基丁酸	90	12.41	60056 ± 6 899	45 511 ± 7 048	0.004	0.76
4-羟基苯磺酸	82	11.08	414 ± 33	504 ± 31	0.041	1.22

续表 2

代谢物	匹配度(%)	保留时间(min)	峰值(m/z) ($\bar{x} \pm s$)		P	观察/对照
			对照组	观察组		
氨基吡啶	76	22.55	957 ± 159	610 ± 49	0.029	0.64
十三烷	75	11.33	18 158 ± 2 082	10 330 ± 1 682	0.008	0.57
γ-氨基丁酸	74	15.07	15 222 ± 961	17 289 ± 1 392	0.000	1.16

[注]*: 代谢物的变化趋势。“↑”和“↓”分别代表,与对照组相比,代谢物在观察组上调或下调。

表 3 差异代谢物的代谢通路分析

代谢物	化学式	HMDB ID	相关代谢通路
γ-氨基丁酸	C ₄ H ₉ NO ₂	HMDB00112	丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢, β-丙氨酸代谢, 丁酮代谢, 精氨酸和脯氨酸代谢
谷胱甘肽	C ₁₀ H ₁₇ N ₃ O ₆ S	HMDB00125	半胱氨酸和蛋氨酸代谢
丙氨酸	C ₃ H ₇ NO ₂	HMDB00161	牛磺酸和亚牛磺酸代谢, 硒氨基酸代谢, 丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢, 半胱氨酸和蛋氨酸代谢, 氨酰-tRNA 生物合成
苯乙醛	C ₈ H ₈ O	HMDB06236	谷胱甘肽代谢, 半胱氨酸和蛋氨酸代谢

[注]HMDB: 人类代谢组数据库。

3 讨论

本研究中,慢性砷中毒患者入院时的尿砷含量 $[(1.32 \pm 0.09) \mu\text{mol/L}]$ 均高于中毒限值 $(1.17 \mu\text{mol/L})$,且高于正常对照 $[(0.29 \pm 0.10) \mu\text{mol/L}]$ 。目前对砷毒性的代谢组学研究多采用血液和尿液标本^[1],尿和血样本均反映短期体内砷导致的代谢改变情况。人的头发平均每月生长1 cm,可以反映砷中毒后机体的长期代谢情况。故本研究采集患者发根部5 cm头发,运用代谢组学方法,检测患者头发中因砷中毒而导致的特异性代谢变化,发现砷中毒后人体的特异性生物标志^[2],从而研究砷中毒的毒性机制。

研究表明,慢性砷暴露会干扰氨基酸代谢^[3]。蛋白质是组成人体结构与实现功能的重要生物大分子,氨基酸是组成蛋白质的基本单元。如果氨基酸代谢发生紊乱,生物体的结构和功能将受到影响。本研究的代谢组学分析发现,慢性砷中毒患者头发中存在10种与正常对照有差异的代谢物,代谢物相关代谢通路分析筛选出4种有意义的差异代谢物。与对照组相比,在慢性砷中毒组中,分别是苯乙醛和GABA峰值升高,而GSH和丙氨酸峰值降低。

还原型GSH是由半胱氨酸、谷氨酸和甘氨酸组成的三肽,半胱氨酸可由蛋氨酸分解代谢形成。GSH是细胞内重要的抗氧化剂,GSH缺乏可致机体产生氧化应激,而氧化应激在人体的老化和许多疾病(例如癌症、神经退行性疾病和HIV等)的发生发展中起着重要的推动作用^[4]。另外,GSH还可在谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GPx)介导的过氧化物还原反应中作为辅助因子而发挥作用^[5];GPx也是体内

重要的抗氧化剂,它能还原有害的过氧化氯(同时氧化GSH,生成氧化型GSH),从而减少体内的氧化应激^[6]。有研究对砷暴露孕妇尿液进行代谢组学分析,发现与低砷暴露组相比,GSH含量在高砷暴露组中下降,与本研究结果一致^[7]。此外,有研究表明苯乙醛可以使GPx失活,增加体内活性氧类(reactive oxygen species, ROS)生成,而过量的ROS将对机体造成有潜在危害的氧化应激^[8]。ROS被认为与神经退行性疾病(如帕金森氏病和阿尔兹海默病)以及由于脑部损伤和老化引起的脑部功能障碍有关,是体内氧化应激的一大来源^[9]。有实验证明,丙氨酸可以通过防止ROS生成,防止脂质和蛋白质氧化,防止细胞中抗氧化酶活性以及GSH的水平降低,对机体氧化损伤以及凋亡发挥保护作用^[10]。有研究通过代谢组学方法分析小鼠尿液中代谢物质的变化,发现丙氨酸在砷暴露组小鼠中下降,与本实验结果吻合^[11]。因此,本研究的三个差异代谢物在慢性砷中毒组中含量的变化(苯乙醛含量升高,而GSH和丙氨酸含量降低)均提示慢性砷中毒时机体发生了氧化应激。

GABA是人体主要的抑制性神经递质,在机体受到外源性损害及应激条件下升高,可减少体内ROS释放,帮助维持体内氧化与抗氧化平衡。在本研究中,慢性砷中毒患者体内GABA升高,表明在受到砷氧化应激损害后,机体代偿性地增加了GABA生成以对抗体内氧化损伤,但体内氧化与抗氧化失衡仍然存在。近年来的研究表明,砷暴露会导致各种细胞系统中ROS生成增加^[12],同时砷能通过ROS介导的机制使酶失活并诱导细胞坏死^[13],本研究再次证明慢性砷

暴露会导致氧化应激。

本研究通过代谢组学方法,筛选慢性砷中毒患者与正常对照间存在的差异代谢物,并研究其相关的有效代谢通路,筛选出4种与砷毒性密切相关的差异代谢物,均与机体氧化应激相关。实验结果印证了砷对人体的长期毒性作用主要是降低体内GSH和增加体内ROS,增加体内的氧化应激,同时也为探索氧化应激的发生机制提供了可能的思路和线索。但由于本研究中样本量较少,可能存在偏倚和误差,需要进一步扩大样本量,并在多组织器官中验证氧化应激是否在砷毒性中起主要作用。另外,本研究代谢通路分析中发现的4种差异性代谢物,也待进一步验证其在砷慢性毒性以及氧化应激中发挥的作用,并分析其可能影响的相关信号通路。

参考文献

- [1] 张海洋,管小菊,毛广运,等.代谢组学在砷中毒研究的进展和趋势[J].浙江预防医学,2016,28(6): 591-593.
- [2] hindmarsh TJ, DEKERKHOVE D, GRIME G, et al. Hair Arsenic as an Index of Toxicity[M]. Oxford: Elsevier Science Ltd., 1999: 41-49.
- [3] WANG X, MU X, ZHANG J, et al. Serum metabolomics reveals that arsenic exposure disrupted lipid and amino acid metabolism in rats: a step forward in understanding chronic arsenic toxicity[J]. Metallomics, 2015, 7(3): 544-552.
- [4] WU G, FANG Y, YANG S, et al. Glutathione metabolism and its implications for health[J]. J Nutr, 2004, 134(3): 489-492.
- [5] CNUBBEN NH, RIETJENS IM, WORTELBOER H, et al. The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense[J]. Environ Toxicol Phar, 2001, 10(4): 141-152.
- [6] FLOHE L. The fairytale of the GSSG/GSH redox potential[J]. BBA-Gen Subjects, 2013, 1830(5): 3139-3142.
- [7] LI H, WANG M, LIANG Q, et al. Urinary metabolomics revealed arsenic exposure related to metabolic alterations in general Chinese pregnant women[J]. J Chromatogr A, 2017, 1479: 145-152.
- [8] TABATABAIE T, FLOYD RA. Inactivation of glutathione peroxidase by benzaldehyde[J]. Toxicol Appl Pharm, 1996, 141(2): 389-393.
- [9] TABNER BJ, TURNBULL S, EI-AGANF OM, et al. Production of reactive oxygen species from aggregating proteins implicated in alzheimers disease, parkinsons disease and other neurodegenerative diseases[J]. Curr Top Med Chem, 2001, 1(6): 507-517.
- [10] LI HT, FENG L, JIANG WD, et al. Oxidative stress parameters and anti-apoptotic response to hydroxyl radicals in fish erythrocytes: Protective effects of glutamine, alanine, citrulline and proline[J]. Aquat Toxicol, 2013, 126: 169-179.
- [11] GARCIA-SEVILLANO MA, CONTRERAS-ACUNA M, GARCIA-BARRERA T, et al. Metabolomic study in plasma, liver and kidney of mice exposed to inorganic arsenic based on mass spectrometry[J]. Anal Bioanal Chem, 2014, 406(5): 1455-1469.
- [12] SHI H, SHI X, LIU K J. Oxidative mechanism of arsenic toxicity and carcinogenesis[J]. Mol Cell Biochem, 2004, 255(1/2): 67-78.
- [13] SAMIKKANNU T, CHEN CH, YIH LH, et al. Reactive oxygen species are involved in arsenic trioxide inhibition of pyruvate dehydrogenase activity[J]. Chem Res Toxicol, 2003, 16(3): 409-414.

(收稿日期: 2017-07-26; 录用日期: 2017-11-28)

(英文编辑: 汪源; 编辑: 陶黎纳; 校对: 丁瑾瑜)