

DOI:10.7524/AJE.1673-5897.20180305002

姚丹, 吴昊, 江敏. 全氟辛烷磺酸对斑马鱼肝脏影响机制的代谢组学研究[J]. 生态毒理学报, 2018, 13(6): 97-106

Yao D, Wu H, Jiang M. Effects of perfluorooctane sulfonate on the liver metabolism of *Danio rerio* [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2018, 13(6): 97-106 (in Chinese)

全氟辛烷磺酸对斑马鱼肝脏影响机制的代谢组学研究

姚丹¹, 吴昊², 江敏^{1,3,*}

1. 上海海洋大学海洋生态与环境学院, 上海 201306

2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306

3. 上海市水产养殖工程技术研究中心, 上海 201306

收稿日期: 2018-03-05 录用日期: 2018-04-20

摘要: 为探究全氟辛烷磺酸(PFOS)对水生动物肝脏的慢性毒性毒害机制, 寻找其肝脏慢性毒性相关的潜在标志物, 运用气相色谱-质谱联用仪代谢组学方法研究暴露于 PFOS 中斑马鱼肝脏内源性代谢物的变化, 寻找显著性差异代谢物及相关通路。实验分为 4 组: 对照组及 PFOS 浓度分别为 10、100、250 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的实验组, 每组 20 尾斑马鱼, 实验时长 40 d。结果显示, 与对照组相比, PFOS 浓度为 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的斑马鱼肝脏中筛选出 4 种发生显著性变化的代谢物, 分别为牛磺酸、磷酸乙酰胺、 β -D-葡萄糖、油酸, 涉及 4 条代谢通路, 即牛磺酸和亚牛磺酸代谢、鞘脂代谢、甘油磷脂代谢、糖酵解或葡萄糖生成。100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度组的斑马鱼肝脏中筛选出 5 种, 包括牛磺酸、 β -D-葡萄糖、棕榈酸、油酸、胆固醇, 涉及 5 条代谢通路, 即原代胆汁酸生物合成、牛磺酸和亚牛磺酸代谢、类固醇生物合成、类固醇激素生物合成、糖酵解或葡萄糖生成。250 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度组的斑马鱼肝脏中筛选出 5 种, 即牛磺酸、 β -D-葡萄糖、乳酸、甘油-3-磷酸、磷酸乙酰胺, 涉及 5 条代谢通路: 牛磺酸和亚牛磺酸代谢、甘油磷脂代谢、甘油酯代谢、鞘脂代谢、糖酵解或葡萄糖生成。根据筛选出的差异代谢物生理功能及其涉及代谢通路分析, 推测 PFOS 主要通过影响牛磺酸和亚牛磺酸代谢、糖酵解或葡萄糖生成及一些脂类代谢从而对斑马鱼肝脏产生毒性效应, 其中牛磺酸、葡萄糖与油酸这 3 种代谢物可作为斑马鱼受 PFOS 胁迫肝脏代谢异常的潜在标记物。

关键词: PFOS; 斑马鱼; 代谢组学; 潜在标记物

文章编号: 1673-5897(2018)6-097-10 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Effects of Perfluorooctane Sulfonate on the Liver Metabolism of *Danio rerio*

Yao Dan¹, Wu Hao², Jiang Min^{1,3,*}

1. College of Marine Ecology and Environment, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

3. Shanghai Aquaculture Engineering Research Center, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Received 5 March 2018 accepted 20 April 2018

Abstract: In order to explore the mechanism of chronic toxicity of perfluorooctane sulfonate (PFOS) on livers of aquatic animals and to find potential markers related to chronic liver toxicity, a gas chromatography-mass spectrometry metabolomics method was used in this study, so as to study the effects of PFOS exposure on changes in liver

基金项目: 上海市产业技术体系建设项目(沪农科产字(2014)第 5 号); 上海市教委重点学科建设项目(No.J50701); 上海市高校知识服务平台项目(No.ZF1206)

作者简介: 姚丹(1992-), 女, 硕士研究生, 研究方向为环境化学, E-mail: 1824455160@qq.com;

* 通讯作者(Corresponding author), E-mail: mjiang@shou.edu.cn

endogenous metabolites and to discover metabolites that are of significant differences and their related pathways in *Danio rerio*. Four groups were set up including one control group and three experimental groups with PFOS concentration at 10, 100 and 250 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively. 20 pieces of *Danio rerio* were cultured in each group, and the experiment lasted for 40 days. The results showed that compared with the control group, four metabolites including taurine, phosphoric acid amide, β -D-glucose and oleic acid were identified from the liver of *Danio rerio* of the group with PFOS concentration at 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ and four metabolic pathways including taurine and hypotaurine metabolism, sphingolipid metabolism, glycerophospholipid metabolism, and glycolysis or gluconeogenesis were involved. Five metabolites including taurine, β -D-glucose, palmitic acid, oleic acid and cholesterol, were identified from the liver of zebrafish of the group with PFOS concentration at 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, and five metabolic pathways including primary bile acid biosynthesis, taurine and hypotaurine metabolism, steroid biosynthesis, steroid hormone biosynthesis and glycolysis or gluconeogenesis were involved. Four metabolites including taurine, β -D-glucose, lactic acid, glycerol-3-phosphate and phosphoacetamide, were identified from the liver of *Danio rerio* group with PFOS concentration at 250 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, and five metabolic pathways including taurine and hypotaurine metabolism, glycerophospholipid metabolism, glycerolipid metabolism, sphingolipid metabolism and glycolysis or gluconeogenesis were involved. Based on the physiological functions of the identified metabolites and the analysis of their metabolic pathways, it was speculated that PFOS exerts toxic effects on *Danio rerio* liver mainly by interfering the metabolic pathways of taurine and hypotaurine, glycolysis or glucose production, and some lipid metabolism. Among them, the three metabolites including taurine, glucose and oleic acid can be used as potential markers for *Danio rerio* liver metabolism abnormalities induced by PFOS.

Keywords: PFOS; *Danio rerio*; metabolomics; potential markers

全氟辛烷磺酸(perfluorooctane sulfonate, PFOS)属于全氟化合物(fluorinated organic compounds, FOCs),是一种持久性有机污染物,因其具有良好的表面活性、疏水性、疏油性,自1949年由3M公司研制以来,被广泛应用于工业生产和生活用品^[1-3]。PFOS化学结构极其稳定,在生物体内难以被代谢排出,具有生物蓄积性,并且可远距离传播^[4-5]。迄今为止在世界各地环境(如大气、水体、沉积物)^[6-10]、动物^[11-12],甚至人的血清^[13-14]、母乳^[15]、脐带血^[16]中,PFOS都有检出。已有大量研究表明PFOS会对生物心脏、肺、肝脏等多种脏器产生毒性作用,具有潜在的生态风险^[17-24]。肝脏作为生物体主要的有毒物质代谢器官,同样是PFOS主要的靶器官,PFOS可在肝脏中蓄积,导致肝脏肿大、损伤。潘若雷等^[25]研究发现PFOS可引起三角帆蚌肝胰腺显著的氧化损伤,且长期的PFOS暴露会造成肝胰腺细胞实质性损伤;王玲^[26]实验表明PFOS暴露会引起小鼠肝脏内脂肪含量升高,肝糖原含量降低。党红蕾等^[27]研究显示PFOS能引起半滑舌鳎肝细胞产生氧化应激,破坏生物膜系统,从而使细胞增殖和多种代谢途径受到抑制。

代谢组学(metabonomics)技术通过比较药物作用前后生物体液或组织代谢表达的变化,能较全面

地反映生物体内源性代谢物质的整体及其变化规律,并且有着仅通过生物的较少组织样品便可获得大量信息的优势^[28-29]。Kariuki等^[30]运用代谢组学分析大型蚤(*Daphnia magna*)的PFOS暴露亚致死毒性,结果表明PFOS可破坏大型蚤的能量代谢,促进蛋白质降解,并确定了用于PFOS暴露下大型蚤健康评价的几种敏感代谢物指标。Yu等^[31]利用代谢组学研究小鼠的大脑和肝脏发现,全氟辛酸(PFOA)会影响大脑中神经递质5-羟色胺、多巴胺、去甲肾上腺素和谷氨酸的浓度,导致肝脏的炎症,影响脂肪酸 β 氧化和生物合成。近年来,代谢组学已在药物机理^[32-33]、临床诊断^[34-35]、物种差异研究^[36]、毒理学^[37-38]、营养学^[39-40]等研究领域得到了广泛的应用。目前,未见运用代谢组学探究全氟辛烷磺酸对鱼类低剂量的毒性机理的报道。本实验将模式生物斑马鱼置于不同PFOS暴露浓度水平下,取肝脏进行代谢组学检测与分析,以筛选显著性差异代谢物和分析相关代谢通路,为在代谢组学层面探究PFOS对水生生物肝脏毒性机理提供新的思路。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 实验材料

实验斑马鱼购自上海奇溢自然旗舰店,鱼龄3

个月,体长(1.4 ± 0.2) cm,为同批亲本所育。

所用仪器包括:气相色谱-质谱联用仪(Agilent, 7890A/5975);全自动样品快速研磨仪(上海净信科技, TissueLyser-24);Eppendorf 离心机(Centrifuge 5810 R);高速离心浓缩仪(Labogene ScanSpeed40);恒温混匀仪(杭州瑞诚仪器有限公司, TS100)。

实验药品如下:全氟辛烷磺酸钾(Sigma-Aldrich 公司, 98%);HPLC 级甲醇(Sigma-Aldrich 公司);HPLC 级水(Sigma-Aldrich 公司);N,O-双(三甲基硅烷基)乙酰胺(BSTFA, 含 1% TMS)(上海安谱实验科技股份有限公司);吡啶(分析纯, Sigma-Aldrich 公司);甲氧基胺盐酸盐(分析纯, Sigma-Aldrich 公司);2-氯苯丙氨酸(Sigma-Aldrich 公司)。

1.2 实验方法

正式实验前,斑马鱼于 80 L 水体中(水箱体积 $67\text{ cm} \times 50\text{ cm} \times 41\text{ cm}$)暂养一周。一周后选取健康、活泼的斑马鱼 80 条,分为 4 组,分别为对照组和 PFOS 浓度为 10、100、250 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的实验组,每组 20 条,每箱水体 20 L(水箱为聚乙烯材质,体积 $47\text{ cm} \times 32\text{ cm} \times 25.5\text{ cm}$)。实验前斑马鱼 12 h 禁食,实验为期 40 d。养殖用水为充分曝气除氯的自来水,控制水温(25 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,光照:黑暗时间为 14 h : 10 h,全天候充气以维持水中溶解氧处于饱和水平,每天定时喂食薄片饲料(宠物家族)2 次,喂食 30 min 后半换水以保持 PFOS 含量的稳定,实验期间及时清理残饵和死亡斑马鱼。实验结束时各组斑马鱼死亡数分别为 0、3、2 和 4 尾。第 40 天早上取样。将斑马鱼置于冰上冷冻麻醉,迅速取其肝脏,每组取 12 尾鱼,每 3 尾斑马鱼的肝脏混合作为 1 个样品(即每组 4 个样品),样品分别置于离心管中,液氮冷冻。在装有样品的离心管内分别加入 20 μL 0.3 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 2-氯苯丙氨酸(内标)和 800 μL 甲醇水提取液($V_{\text{甲醇}} : V_{\text{水}} = 4 : 1$),在全自动样品研磨仪上匀浆处理后置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱静置 10 min,取出后 $1\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,吸取 600 μL 上清液于进样瓶中,置于高速离心浓缩仪 3 h 挥干溶液。在装有挥干样品的进样瓶中分别加入 100 μL 15 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 甲氧基胺盐酸盐吡啶溶液和 N,O-双(三甲基硅烷基)乙酰胺溶液,之后置于恒温混匀仪 $78\text{ }^{\circ}\text{C}$ 衍生化 1 h,衍生化结束后于气相色谱-质谱联用仪进样检测。

1.3 气相色谱-质谱联用仪条件

气相色谱-质谱联用仪(Agilent, 7890A/5975)检测使用 DB-17MS 毛细管柱($30\text{ m} \times 0.25\text{ mm} \times 0.25$

μm);进样体积为 2 μL ,进样温度为 $260\text{ }^{\circ}\text{C}$,不分流进样;采用程序升温,初始温度为 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$,以 $10\text{ }^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速度 3 min 升到 $315\text{ }^{\circ}\text{C}$, $270\text{ }^{\circ}\text{C}$ 吹扫 3 min,载气为高纯氦气(纯度 $>99.999\%$),恒定流速 $3.0\text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$;质谱接口温度 $280\text{ }^{\circ}\text{C}$,EI 离子源,电子能量 70 eV,离子源温度 $230\text{ }^{\circ}\text{C}$,四极杆温度 $150\text{ }^{\circ}\text{C}$,质量扫描范围 30 ~ 550 amu;以全扫描模式获得总离子流色谱图。

1.4 数据分析

气相色谱-质谱联用仪获得的总离子流色谱图原始数据由 Agilent Mass Hunter Workstation (Qualitative Analysis B.07.00)、MS 定量分析软件进行峰对齐和峰积分等处理,最终获得一个含有化合物编号、保留时间和响应值的 Excel 表格。将表格中的数据整理成含有实验组编号、化合物编号、响应值的 Excel 表格,所得表格导入 SIMCA-P 14.1 软件,采用无监督的主成分分析(PCA)和有监督的正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA)将数据标度化、中心化处理,利用正交信号校正技术过滤代谢物变量信息并筛选出差异代谢物。

1.5 代谢物的鉴定及代谢途径的分析

将上述软件筛选得到的差异代谢物,对照相应出峰时间,利用 MSD ChemStation Data Analysis Application 软件查询数据库 NIST Mass spectral Database,得到高匹配度的化合物,根据化合物结构图,查询 ChemSpider 的 Structure Search (<http://www.chemspider.com/StructureSearch.aspx>) 版块, HMDB (<http://www.hmdb.ca>), KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/compound>) 数据库,根据化学分子式结构图进行确定。将鉴定得到的代谢物整理出实验组名称、代谢物名称、响应值 Excel 表格,导入 MetaboAnalyst 3.0 在线分析软件(<http://www.metaboanalyst.ca/faces/home.xhtml>),对全氟辛烷磺酸影响的代谢通路进行分析。

2 结果 (Results)

2.1 代谢物图谱分析

此次实验共获得 177 个代谢物编号,将不同浓度 PFOS 暴露下含有实验组编号、化合物编号、响应值的斑马鱼肝脏数据导入 SIMCA-P 软件,首先在 PCA 状态下分析对照组与 3 个实验组肝脏组织的代谢谱,可得图 1。图 1 显示,肝脏数据矩阵空间分布对照组与实验组均完全分开,表明从代谢水平上可以观察到 PFOS 暴露所产生的影响。随后,在 OPLS-DA 条件下对肝脏组织数据进行进一步分析,可得图

2(a. $R^2X=0.848$, $Q^2=0.752$; b. $R^2X=0.815$, $Q^2=0.824$;
c. $R^2X=0.867$, $Q^2=0.816$, R^2 表示 OPLS-DA 模型累计
方差值,反映模型的拟合程度, Q^2 表示累计交叉有效

性,反映模型的预测能力), OPLS-DA 状态下模型对
自变量的拟合能力和预测能力皆显示良好,对照组与
实验组在肝脏代谢谱中均可以明显区分。

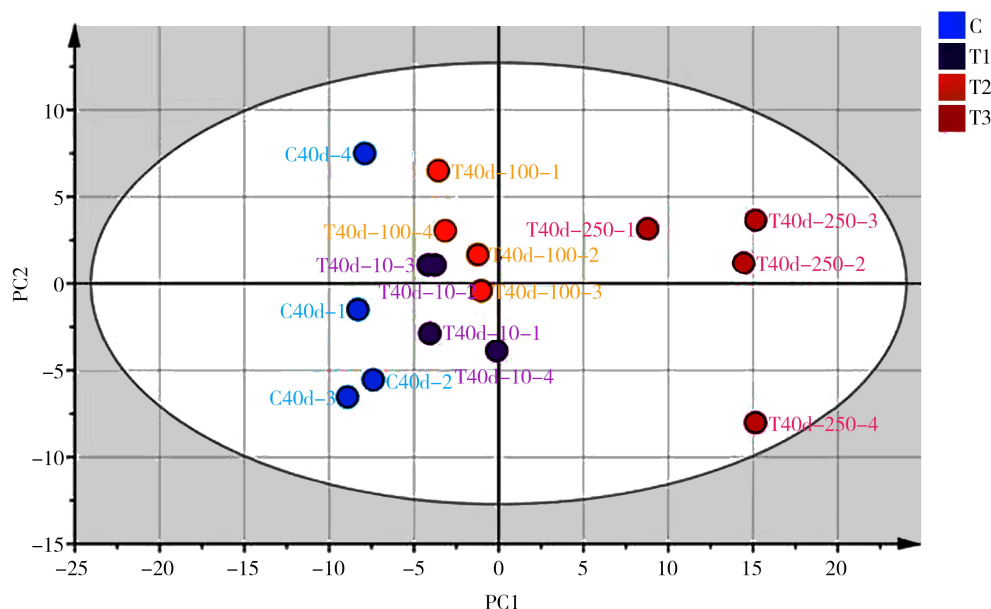


图1 对照组与 10、100、250 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ PFOS 实验组斑马鱼肝脏 PCA 得分图

注: C 为对照组, T1、T2、T3 分别为 PFOS 浓度 10、100 和 250 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的实验组。

Fig. 1 PCA scores plots of zebrafish liver in control group and experimental groups of PFOS at 10, 100 and 250 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

Note: C stands for control group; T1, T2 and T3 stand for experimental groups of PFOS at 10, 100 and 250 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively.

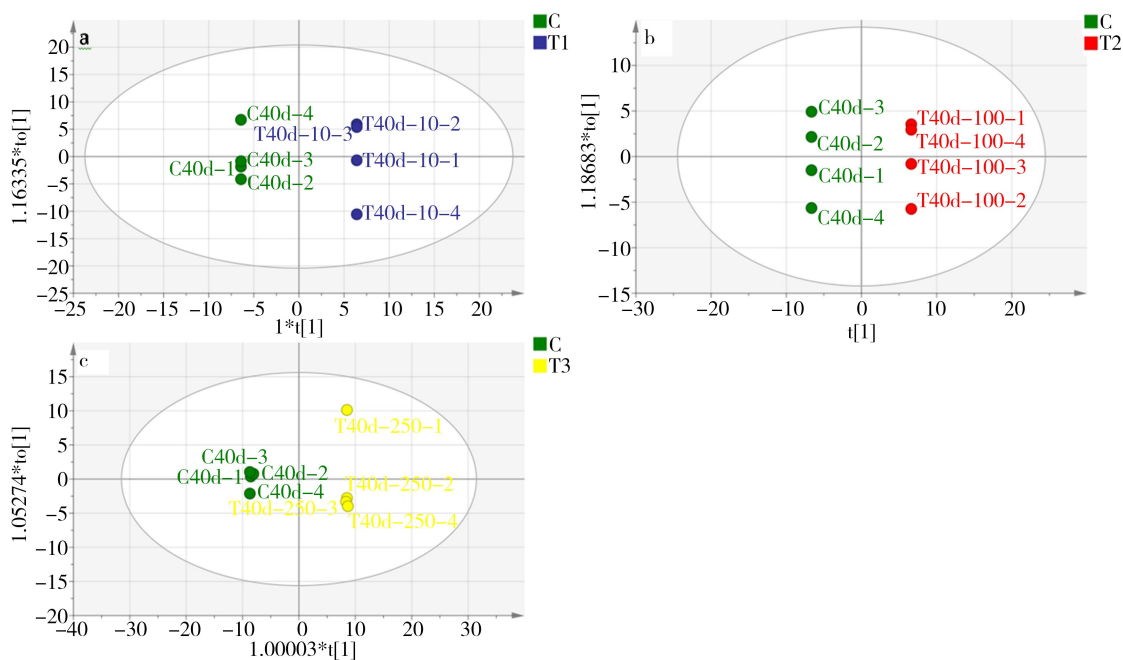


图2 对照组与 10、100、250 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 实验组斑马鱼肝脏 OPLS-DA 得分图

注: C 为对照组, T1、T2、T3 分别为 PFOS 浓度 10、100 和 250 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的实验组。

Fig. 2 OPLS-DA scores plots of zebrafish liver in control group and experimental groups of PFOS at 10, 100 and 250 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

Note: C stands for control group; T1, T2 and T3 stand for experimental groups of PFOS at 10, 100 and 250 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively.

2.2 差异代谢物

为了筛选出能更好反映 PFOS 影响的差异代谢物,将对照组分别与各个实验组进行比较,在 OPLS-DA 分析结果的 S-plot 图中,选择 $|p(\text{corr})| > 0.5$, $|p| > 0.1$,VIP 值 > 1.0 且 P 值 < 0.05 的差异代谢物。通过 NIST 谱库检索,并且利用 HMDB、KEGG 等在线数据库对差异代谢物的结构、名称进行比对确认,与对照组相比,PFOS 浓度为 $10\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的斑

马鱼肝脏中筛选出 4 种发生显著性变化的代谢物,包括牛磺酸、磷酸乙酰胺、 β -D-葡萄糖、油酸;PFOS 浓度为 $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的斑马鱼肝脏中筛选出 5 种代谢物发生显著性变化,分别为牛磺酸、 β -D-葡萄糖、棕榈酸、油酸、胆固醇;PFOS 浓度为 $250\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的斑马鱼肝脏中有 5 种代谢物发生显著性变化,分别为牛磺酸、 β -D-葡萄糖、乳酸、甘油-3-磷酸、磷酸乙酰胺(表 1)。

表 1 不同浓度 PFOS 实验组斑马鱼肝脏中的显著性差异代谢物

Table 1 Significantly changed metabolites of zebrafish liver in experimental groups of PFOS

PFOS 浓度 ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) PFOS concentration ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	编号 No.	差异代谢物 Differential metabolites	VIP 值 VIP value	保留时间/min t_{R}/min	趋势 Trend	代谢途径 Metabolic pathways
10	1	牛磺酸 Taurine	1.368	12.158	$\uparrow^*$	其他氨基酸代谢 Metabolism of other amino acids
	2	磷酸乙酰胺 Acetyl phosphate	2.555	14.697	$\uparrow^{**}$	脂代谢 Lipid metabolism
	3	β -D-葡萄糖 beta-D-Glucose	3.212	15.588	$\uparrow^{**}$	糖代谢 Carbohydrate metabolism
	4	油酸 Oleic acid	1.405	21.476	$\uparrow^*$	脂代谢 Lipid metabolism
100	1	牛磺酸 Taurine	3.099	12.158	$\uparrow^*$	其他氨基酸代谢 Metabolism of other amino acids
	2	β -D-葡萄糖 beta-D-Glucose	3.634	15.588	$\uparrow^{**}$	糖代谢 Carbohydrate metabolism
	3	棕榈酸 Cetylic acid	1.197	15.858	$\uparrow^{**}$	脂代谢 Lipid metabolism
	4	油酸 Oleic acid	1.171	17.403	$\uparrow^*$	脂代谢 Lipid metabolism
	5	胆固醇 Cholesterol	1.466	24.388	$\uparrow^{**}$	脂代谢 Lipid metabolism
250	1	乳酸 Lactic acid	1.583	4.568	$\uparrow^{**}$	糖代谢 Carbohydrate metabolism
	2	牛磺酸 Taurine	2.329	12.158	$\uparrow^{**}$	其他氨基酸代谢 Metabolism of other amino acids
	3	甘油-3-磷酸 Glycerol-3-phosphate	1.608	13.314	$\uparrow^{**}$	脂代谢 Lipid metabolism
	4	磷酸乙酰胺 Acetyl phosphate	2.928	14.697	$\uparrow^{**}$	脂代谢 Lipid metabolism
	5	β -D-葡萄糖 beta-D-Glucose	3.194	15.588	$\uparrow^{**}$	糖代谢 Carbohydrate metabolism

注: $\uparrow$ 为上调, *为差异显著($P<0.05$), **为差异显著($P<0.01$)。

Note: $\uparrow$ stands for upregulation; *stands for significant difference ($P<0.05$); **stands for significant difference ($P<0.01$).

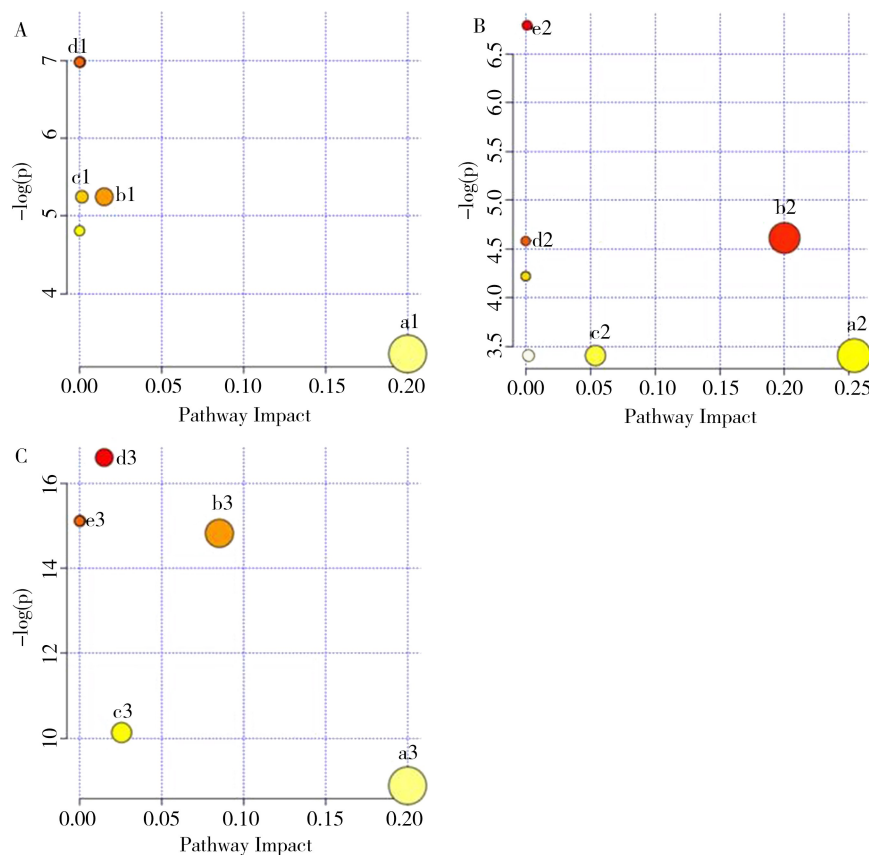


图3 10(A)、100(B)、250(C) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ PFOS 暴露对斑马鱼肝脏代谢通路的影响

注: A 图中 a1.牛磺酸和亚牛磺酸代谢;b1.鞘脂代谢;c1.甘油磷脂代谢;d1.糖酵解或葡萄糖生成;B 图中 a2.原发性胆汁酸生物合成;

b2.牛磺酸和亚牛磺酸代谢;c2.类固醇生物合成;d2.类固醇激素生物合成;e2.糖酵解或葡萄糖生成;

C 图中 a3.牛磺酸和亚牛磺酸代谢;b3.甘油磷脂代谢;c3.甘油脂代谢;d3.鞘脂代谢;e3.糖酵解或葡萄糖生成。

Fig. 3 10(A), 100(B), 250(C) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ PFOS impacts on zebrafish liver metabolism pathway

Note: in Figure A, a1. Taurine and hypotaurine metabolism; b1. Sphingolipid metabolism; c1. Glycerophospholipid metabolism;

d1. Glycolysis or Gluconeogenesis. In Figure B, a2. Primary bile acid biosynthesis; b2. Taurine and hypotaurine metabolism;

c2. Steroid biosynthesis; d2. Steroid hormone biosynthesis; e2. Glycolysis or Gluconeogenesis. In Figure C, a3. Taurine and hypotaurine metabolism;

b3. Glycerophospholipid metabolism; c3. Glycerolipid metabolism; d3. Sphingolipid metabolism; e3. Glycolysis or Gluconeogenesis.

2.3 代谢通路分析

各实验组 PFOS 暴露影响力大于零的代谢途径见图 3(A、B、C 分别为 PFOS 暴露浓度 10、100、250 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组)。结果显示 10、100、250 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ PFOS 浓度组皆影响牛磺酸和亚牛磺酸代谢途径和糖酵解或葡萄糖生成,且对牛磺酸和亚牛磺酸代谢途径影响较大。

3 讨论 (Discussions)

已有研究表明 PFOS 会影响斑马鱼肝脏脂代谢,如胡芹^[41]、崔燕^[42]均在 PFOS 暴露后的斑马鱼肝脏切片中观察到大量脂肪空泡。本研究同样表明 PFOS 暴露可影响斑马鱼肝脏脂代谢。PFOS 浓度

10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组的斑马鱼肝脏中均筛选出具有显著性差异的饱和脂肪酸,PFOS 浓度为 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组筛选出油酸,PFOS 浓度为 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组筛选出油酸、棕榈酸,而 PFOS 浓度为 250 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的实验组斑马鱼肝脏中则未筛选出饱和脂肪酸。推测相比高浓度的 PFOS,较低浓度 PFOS 暴露更倾向于促进饱和脂肪酸的积累,可能对于肝脏脂肪代谢的影响更大。王玲^[26]在硕士论文中曾研究 PFOS 暴露对小鼠肝脏脂肪含量的影响,结果显示 PFOS 暴露后肝脏脂肪含量相比对照组有所升高,低剂量组脂肪含量显著升高,高剂量组虽有升高但不显著,与本实验的研究结果相一致。在筛选出的饱和脂肪酸中,油酸随着 PFOS 浓度的升高由 $P<0.01$ 水平显著升高

变为 $P < 0.05$ 水平显著升高,再到变化不显著 ($P > 0.05$),显示出一定的剂量-效应关系,可作为 PFOS 对斑马鱼肝脏胁迫的潜在标记物。

牛磺酸是一种含硫非蛋白氨基酸,来源于半胱氨酸氧化脱羧。肝脏中的牛磺酸是某些胆酸的组成部分,主要作用是胆汁酸结合形成脂肪吸收所必需的牛磺胆酸。另外,牛磺酸还具有抗氧化损伤的作用,已被证明能显著逆转 PFOS 处理的 PC12 细胞活性降低和 ROS 增加^[43-45]。实验组中,随着 PFOS 暴露浓度的升高,筛选出的牛磺酸由 $P < 0.05$ 水平显著上升变为 $P < 0.01$ 水平显著上升,表明两者之间具有一定剂量-效应关系,可作为斑马鱼在 PFOS 胁迫下肝脏的潜在标记物。PFOS 可造成肝脏氧化损伤^[21,46], $250 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ PFOS 组斑马鱼肝脏中牛磺酸呈显著性上升 ($P < 0.01$),而饱和脂肪酸并未随牛磺酸出现显著上升,由此推测高浓度 PFOS 的暴露下肝脏中上调的牛磺酸可能主要发挥对抗氧化的损伤作用。

葡萄糖为能量的主要来源,实验组与对照组相比,斑马鱼肝脏中 β -D-葡萄糖均显著上升 ($P < 0.01$),通过通路分析其涉及的代谢路径为糖酵解或葡萄糖生成,提示 PFOS 会干扰肝脏糖代谢。

在 PFOS 暴露浓度为 $250 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的实验组,除葡萄糖外还筛选到了与糖代谢相关的乳酸、甘油-3-磷酸。乳酸的上升意味着肝脏无氧呼吸增加,生物在供氧不足的情况下,为了使甘油醛-3-磷酸继续氧化,必须提供氧化型的 NAD^+ ,反应式为^[43]: 丙酮酸 ($\text{CH}_3\text{COCO}_2\text{H}$) + $\text{NADH} + \text{H}^+ \rightleftharpoons$ 乳酸 ($\text{CH}_3\text{CHOHCO}_2\text{H}$) + NAD^+ 。一项新的研究发现乳酸可以为生长中的肿瘤提供燃料,认为乳酸是促进肺癌生长、增殖,甚至可能是肺癌转移的燃料之一^[47];此外也有研究表明,乳酸有利于保护癌细胞,乳酸中毒能有效地使癌细胞免受葡萄糖饥饿法或者剥夺法^[48-50]。乳酸显著上升表明高浓度 PFOS 的暴露可增加肝癌机率;甘油三磷酸可以在细胞质与线粒体膜间隙中穿梭,快速再生 NAD^+ 。 NAD^+ 是一种转递质子的辅酶,它参与细胞物质代谢、抗氧化、能量合成、细胞 DNA 修复、信号传导等过程^[51],PFOS 可能通过影响乳酸与甘油三磷酸间接影响肝细胞多种生理活动。

综上所述,斑马鱼在 PFOS 浓度为 $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $250 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 溶液中暴露 40 d 后,对其肝脏的牛磺酸和亚牛磺酸代谢、糖酵解或葡萄糖、部分脂类代谢均产生影响。其中,对牛磺酸和亚牛磺酸

代谢影响较大,较低浓度 PFOS 暴露更倾向于促进肝脏脂肪的累积;显著性差异代谢物牛磺酸、葡萄糖、油酸可作为 PFOS 造成斑马鱼肝脏代谢异常的潜在标记物,实验结果为进一步研究 PFOS 对水生动物肝脏毒性提供了一定的理论依据。本实验中使用的代谢组学技术为气相色谱质谱联用技术,其优势在于具有高分辨率和高灵敏度,分析成本较低,可重复性进样,具有高质量的商业标准谱库,能对代谢物定性和定量分析,局限性在于需要衍生化处理,不能获得不稳定或是难以挥发的代谢物信息。除此之外,目前主要的代谢组学技术还包括液相色谱质谱联用技术、核磁共振技术,单独使用时亦是各有优缺点,但是如果将它们联合起来则可发挥更强大的作用,这也是现代仪器技术分析手段发展的一个趋势,日后深入研究 PFOS 毒理机制代谢组学可以以此为切入口^[52-53]。

通讯作者简介:江敏(1972—),女,博士,教授,研究方向为渔业水域环境监测与调控、环境化学、环境毒理学。

参考文献 (References):

- [1] Paul A G, Jones K C, Sweetman A J. A first global production, emission, and environmental inventory for perfluorooctane sulfonate [J]. *Environmental Science & Technology*, 2009, 43(2): 386-392
- [2] 张德勇, 许晓路. 全氟辛烷磺酰基化合物(PFOS)类有机污染物在生物体中的污染现状[J]. *生态毒理学报*, 2010, 5(5): 639-646
Zhang D Y, Xu X L. Review on perfluorooctane sulfonate (PFOS) contamination of organisms [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2010, 5(5): 639-646 (in Chinese)
- [3] 梅胜放. 我国 PFOS/PFOA 的生产、应用以及国内外标准现状[J]. *有机氟工业*, 2008(1): 21-25
- [4] 李志芬, 马太玲, 史雅娟. 持久性有机污染物全氟辛烷磺酸 PFOS 污染生态环境研究进展[J]. *山东农业大学学报: 自然科学版*, 2015, 46(2): 204-210
Li Z F, Ma T L, Shi Y J. A review for the studies on polluting ecological environment of the persistent organic pollutant perfluorooctane sulfonate (PFOS) [J]. *Journal of Shandong Agricultural University: Natural Science Edition*, 2015, 46(2): 204-210 (in Chinese)
- [5] 江敏, 袁璐瑶. 全氟辛烷磺酸(PFOS)的环境污染及生态毒性研究进展[J]. *安全与环境学报*, 2014, 14(4): 207-212
Jiang M, Yuan L Y. Research advances on the environmental pollution and ecological toxic harm of the perfluoro-

- rooctane sulfonate (PFOS) [J]. *Journal of Safety and Environment*, 2014, 14(4): 207-212 (in Chinese)
- [6] 宋薇, 山香菊, 王燕丽, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定北京市区灰霾天气空气颗粒物中的全氟化合物[J]. *现代科学仪器*, 2014(3): 149-157
- Song W, Shan X J, Wang Y L, et al. Determination of perfluorinated compounds in airborne Beijing urban area by ultra high performance liquid spectrometry particulate matter of haze in chromatography-tandem mass [J]. *Modern Scientific Instruments*, 2014(3): 149-157 (in Chinese)
- [7] Munoz G, Labadie P, Botta F, et al. Occurrence survey and spatial distribution of perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl surfactants in groundwater, surface water, and sediments from tropical environments [J]. *Science of the Total Environment*, 2017, 607: 243-252
- [8] Zhao Z, Tang J H, Mi L J, et al. Perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances in the lower atmosphere and surface waters of the Chinese Bohai Sea, Yellow Sea, and Yangtze River Estuary [J]. *Science of the Total Environment*, 2017, 599: 114-123
- [9] 李杰, 高月, 王之芬, 等. 汉江水体和沉积物中全氟化合物的风险评估[J]. *北京大学学报: 自然科学版*, 2017, 53(5): 913-920
- Li J, Gao Y, Wang Z F, et al. Risk assessment of perfluoroalkyl compounds (PFCs) in water and sediment samples of Hanjiang River [J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Pekinensis*, 2017, 53(5): 913-920 (in Chinese)
- [10] Becker A M, Gerstmann S, Frank H. Perfluorooctanoic acid and perfluorooctane sulfonate in the sediment of the Roter Main River, Bayreuth, Germany [J]. *Environmental Pollution*, 2008, 156(3): 818-820
- [11] Christensen K Y, Thompson B A, Werner M, et al. Levels of persistent contaminants in relation to fish consumption among older male anglers in Wisconsin [J]. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 2016, 219(2): 184-194
- [12] Sinclair E, Mayack D T, Roblee K, et al. Occurrence of perfluoroalkyl surfactants in water, fish, and birds from New York State [J]. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2006, 50(3): 398-410
- [13] Ehresman D J, Froehlich J W, Olsen G W, et al. Comparison of human whole blood, plasma, and serum matrices for the determination of perfluorooctane sulfonate (PFOS), perfluorooctanoate (PFOA), and other fluorochemicals [J]. *Environmental Research*, 2007, 103(2): 176-184
- [14] 高珂, 傅建捷, 高燕, 等. 武汉市某高校学生血清中全氟烷酸水平及暴露途径初步研究[J]. *环境化学*, 2015, 34(8): 1424-1432
- Gao K, Fu J J, Gao Y, et al. A preliminary study on perfluoroalkyl acids levels in serum and exposure pathways for students from a university in Wuhan [J]. *Environmental Chemistry*, 2015, 34(8): 1424-1432 (in Chinese)
- [15] Völkel W, Mosch C, Kiranoglu M, et al. Perfluorinated compounds (PFC) in human breast milk [J]. *Toxicology Letters*, 2009, 189(Suppl): 151-152
- [16] 金一和, 刘晓, 李彤, 等. 沈阳地区成人血清和脐带血中全氟有机物污染现状[J]. *卫生研究*, 2004, 33(4): 481-483
- Jin Y H, Liu X, Li T, et al. Status of perfluorochemicals in adult serum and umbilical blood in Shenyang [J]. *Journal of Hygiene Research*, 2004, 33(4): 481-483 (in Chinese)
- [17] 刘晓晖, 胡宏, 李双月. 全氟辛烷磺酸神经发育毒性机制研究进展[J]. *生态毒理学报*, 2013, 8(5): 643-649
- Liu X H, Hu H, Li S Y, et al. Research progress on mechanisms in the developmental neurotoxicity of PFOS [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2013, 8(5): 643-649 (in Chinese)
- [18] 万延建. PFOS的肝脏和心脏发育毒性研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2010: 2-5
- Wan Y J. Study on liver and cardio developmental toxicity of PFOS [D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2010: 2-5 (in Chinese)
- [19] Chen T, Zhang L, Yue J Q, et al. Prenatal PFOS exposure induces oxidative stress and apoptosis in the lung of rat off-spring [J]. *Reproductive Toxicology*, 2012, 33(4): 538-545
- [20] Corsini E, Luebke R W, Germolec D R, et al. Perfluorinated compounds: Emerging POPs with potential immunotoxicity [J]. *Toxicology Letters*, 2014, 230(2): 263-270
- [21] Zhang Y H, Wang J, Dong G H, et al. Mechanism of perfluorooctane sulfonate (PFOS)-induced apoptosis in the immunocyte [J]. *Journal of Immunotoxicology*, 2013, 10(1): 49-58
- [21] 赵雪松, 任新, 段小月, 等. 全氟辛烷磺酸盐暴露对斑马鱼胚胎发育毒性与氧化应激的影响[J]. *唐山学院学报*, 2016, 29(6): 12-16
- Zhao X S, Ren X, Duan X Y, et al. On the effect of PFOS on developmental toxicity and oxidative stress in zebrafish embryos [J]. *Journal of Tangshan College*, 2016, 29(6): 12-16 (in Chinese)
- [22] Lai K P, Li J W, Cheung A, et al. Transcriptome sequencing reveals prenatal PFOS exposure on liver disorders [J]. *Environmental Pollution*, 2017, 223: 416-425
- [23] 徐仙. 孕哺期 PFOS 暴露对子代肝糖代谢影响及机制研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2015: 6-31

- Xu X. The study of effects and mechanism of perinatal PFOS exposure on hepatic glucose metabolism of rats [D]. Urumqi: Xinjiang Medical University, 2015: 6-31 (in Chinese)
- [24] 刘清国. 全氟辛烷磺酸对大鼠的肝肾毒性及番茄红素的保护作用[D]. 衡阳: 南华大学, 2010: 4-27
- Liu Q G. The study of PFOS's hepatorenal toxicity and lycopene's protection function in rats [D]. Hengyang: University of South China, 2010: 4-27 (in Chinese)
- [25] 潘若雷, 杨淑雯, 江敏. 全氟辛烷磺酸(PFOS)对三角帆蚌肝胰腺的氧化性损伤[J]. 生态毒理学报, 2016, 11(6): 112-120
- Pan R L, Yang S W, Jiang M. Perfluorooctane sulfonate (PFOS)-induced oxidative damage in hepatopancreas of *Hyriopsis cumingii* [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2016, 11(6): 112-120 (in Chinese)
- [26] 王玲. 全氟辛烷磺酸(PFOS)和全氟辛酸(PFOA)干扰BALB/c小鼠脂类代谢效应研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2011: 26-29
- Wang L. Disturbance effect of perfluorooctane sulfonate and perfluorooctanoic acid on lipid metabolism in BALB/c mice [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2011: 26-29 (in Chinese)
- [27] 党红蕾, 那广水, 高会, 等. 全氟辛烷磺酸(PFOS)对半滑舌鳎肝脏细胞的毒性效应[J]. 生态毒理学报, 2015, 10(4): 162-169
- Dang H L, Na G S, Gao H, et al. Toxicity effects of perfluorooctane sulfonate (PFOS) on liver cells of *Cynoglossus semilaevis* [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2015, 10(4): 162-169 (in Chinese)
- [28] 杜智, 刘树业, 刘运德. 主编. 临床代谢组学[M]. 天津: 天津科技翻译出版有限公司, 2013: 1-2
- [29] Tang H R, Wang Y L. Metabonomics: A revolution in progress [J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 2006, 33(5): 401-417
- [30] Kariuki M N, Nagato E G, Lankadurai B P, et al. Analysis of sub-lethal toxicity of perfluorooctane sulfonate (PFOS) to *Daphnia magna* using ¹H nuclear magnetic resonance-based metabolomics [J]. Metabolites, 2017, 7(2): 1-13
- [31] Yu N Y, Wei S, Li M Y, et al. Effects of perfluorooctanoic acid on metabolic profiles in brain and liver of mouse revealed by a high-throughput targeted metabolomics approach [J]. Scientific Reports, 2016, 6: 1-10
- [32] 孙启慧, 张静, 李壮壮, 等. 基于代谢组学的麻黄细辛附子汤治疗流感小鼠的作用机制研究[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(4): 763-771
- Sun Q H, Zhang J, Li Z Z, et al. Action mechanism of Mahuang Xixin Fuzi decoction for mice with influenza based on metabolomics information [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2017, 42(4): 763-771 (in Chinese)
- [33] 龚梦鹃, 巫圣乾, 岳贺, 等. 基于¹H-NMR护肝片抗大鼠急性肝损伤的代谢组学研究[J]. 中国药理学通报, 2017, 33(12): 1766-1770
- Gong M J, Wu S Q, Yue H, et al. Metabonomic analysis of Hupan Tablets on CCl₄ induced acute hepatic injury in rats based on ¹H-NMR [J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2017, 33(12): 1766-1770 (in Chinese)
- [34] 苟小军, 梁薇, 刘志丹, 等. 过敏性鼻炎患者血液代谢组学研究[J]. 中国医院药学杂志, 2017, 37(18): 1777-1782
- Gou X J, Liang W, Liu Z D, et al. Study on serum metabolomics of patients with allergic rhinitis [J]. Chinese Journal of Hospital Pharmacy, 2017, 37(18): 1777-1782 (in Chinese)
- [35] Du H L, Wang K Q, Su L, et al. Metabonomic identification of the effects of the Zhimu-Baihe saponins on a chronic unpredictable mild stress-induced rat model of depression [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2016, 128: 469-479
- [36] Bollard M E, Keun H C, Beckonert O, et al. Comparative metabonomics of differential hydrazine toxicity in the rat and mouse [J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2005, 204(2): 135-151
- [37] Qi L, Cao C, Hu L, et al. Metabonomic analysis of the protective effect of quercetin on the toxicity induced by mixture of organophosphate pesticides in rat urine [J]. Human & Experimental Toxicology, 2017, 36(5): 494-507
- [38] Zhou L L, Zhang W P, Xie W P, et al. Tributyl phosphate impairs the urea cycle and alters liver pathology and metabolism in mice after short-term exposure based on a metabonomics study [J]. Science of the Total Environment, 2017, 603-604: 77-85
- [39] Zheng R, Yang Y H, Wen Y M, et al. Metabolomic analysis of amino acid and fat metabolism in rats with L-tryptophan supplementation [J]. Amino Acids, 2014, 46(12): 2681-2691
- [40] Yang Y X, Zheng N, Zhao X W, et al. Metabolomic biomarkers identify differences in milk produced by Holstein cows and other minor dairy animals [J]. Journal of Proteomics, 2016, 136(16): 174-182
- [41] 胡芹. 全氟辛烷磺酸(PFOS)对斑马鱼胚胎发育及成鱼的毒性效应研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2009: 30-43
- Hu Q. Embryo developmental and maternal toxicity of perfluorooctane sulfonate (PFOS) in the zebrafish [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2009: 30-43

- (in Chinese)
- [42] 崔燕. 全氟辛烷磺酸对斑马鱼脂代谢和糖代谢毒理作用研究[D]. 温州: 温州医学院, 2012: 12-22
- Cui Y. Altered lipid metabolism and glucose metabolism in zebrafish exposed to perfluorooctane sulphonic acid [D]. Wenzhou: Wenzhou Medical University, 2012: 12-22 (in Chinese)
- [43] 王镜岩等 主编. 生物化学 下[M]. 北京: 高等教育出版社, 2002: 80-336
- [44] 徐贵发, 蔺新英 主编. 功能食品与功能因子[M]. 济南: 山东大学出版社, 2005: 255-258
- [45] Li C N, Liu X H, Liu Q, et al. Protection of taurine against PFOS-induced neurotoxicity in PC12 cells [J]. *Advances in Experimental Medicine & Biology*, 2017, 975 (10): 907-916
- [46] Tsuda S. Differential toxicity between perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoic acid (PFOA) [J]. *Journal of Toxicological Sciences*, 2016, 41: 27-36
- [47] Faubert B, Li K Y, Cai L, et al. Lactate metabolism in human lung tumors [J]. *Cell*, 2017, 171(2): 358-371
- [48] Wu H, Ding Z, Hu D, et al. Central role of lactic acidosis in cancer cell resistance to glucose deprivation-induced cell death [J]. *The Journal of Pathology*, 2012, 227(10): 189-199
- [49] Xie J, Wu H, Dai C, et al. Beyond Warburg effect-dual metabolic nature of cancer cells [J]. *Scientific Reports*, 2014, 4: 1-12
- [50] Chao M, Wu H, Jin K, et al. A nonrandomized cohort and a randomized study of local control of large hepatocarcinoma by targeting intratumoral lactic acidosis [J]. *Elife*, 2016, 5: 1-18
- [51] 张敏, 秦鑫, 张文静, 等. NAD^+ 分子在癌症细胞生物学中的重要地位[J]. *现代生物医学进展*, 2015, 15(32): 6393-6397
- Zhang M, Qin X, Zhang W J, et al. NAD^+ : The key molecule in cancer cell biology [J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2015, 15(32): 6393-6397 (in Chinese)
- [52] 彭超, 黄和, 肖爱华, 等. 代谢组学分析技术平台及方法研究进展[J]. *食品科技*, 2008, 33(9): 220-223
- Peng C, Huang H, Xiao A H, et al. Progress of metabolomics analytical platform and methodologies [J]. *Food Science and Technology*, 2008, 33(9): 220-223 (in Chinese)
- [53] Moco S, Bino R J, Vorst O, et al. A liquid chromatography-mass spectrometry-based metabolome database for tomato [J]. *Physiologia Plantarum*, 2006, 41 (4): 1205-1218 ◆