

基于快速高分辨液相色谱-质谱的中波 紫外线辐射诱导大鼠急性光损伤的代谢组学研究

王恩鹏¹ 孙岩¹ 越皓¹ 陈焕文³ 王洋¹ 陈长宝¹ 刘淑莹^{* 1,2}

¹(长春中医药大学吉林省人参科学研究院, 长春 130117)

²(中国科学院长春应用化学研究所长春质谱中心, 长春 130022) ³(东华理工大学应用化学系, 抚州 344000)

摘 要 利用快速高分辨液相色谱-四极杆-飞行时间质谱(RRLC-Q-TOF-MS) 联用技术结合多元统计分析方法, 考察在中波紫外线(Ultraviolet B, UVB) 辐射前后, 大鼠尿液中内源性代谢物谱的变化, 研究 UVB 辐射导致急性光损伤的生理机制。急性光损伤大鼠模型由窄谱中波紫外线光源(TL-01, 峰值 312 nm) 照射, 采用离心沉降后四倍稀释法处理尿液样本, Supelco Ascentis[®] Express C₁₈ 色谱柱, 水(含 0.1% 甲酸) 与乙腈为流动相梯度洗脱, 液相色谱-串联质谱分析测定。利用主成分分析(PCA) 法、聚类分析(CA) 法等对辐射前后的大鼠尿液样本进行代谢轮廓分析, 寻找对分组贡献大的差异代谢物及通路, 并阐明其作用机制; 运用偏最小二乘判别分析(PLS-DA) 法建立预测模型, 考察此模型在 UVB 致光损伤模型诊断上的预测能力。多元统计分析结果显示, 空白对照组与 UVB 模型组能够获得很好地区分, 通过将差异代谢物与数据库、串联质谱数据及标准品比对, 发现并鉴定出 11 种潜在生物标记物, 表明 UVB 辐射可影响正常大鼠的鞘脂类代谢、核酸代谢、亚油酸代谢、氨基酸代谢等通路, 这些差异代谢物对 UVB 辐射致光损伤类疾病的诊断具有较好的预判能力。

关键词 代谢组学; 中波紫外线; 辐射; 快速高分辨液相色谱-四极杆-飞行时间质谱

1 引言

紫外线(Ultraviolet, UV) 辐射具有强烈的生物学效应, 可导致皮肤衰老、晒伤、炎症、免疫抑制, 甚至引发皮肤癌^[1-3]。中波紫外线(Ultraviolet B, UVB, 290~320nm) 又称紫外线的晒伤(红) 段, 短时间的 UVB 照射即可使皮肤发生红斑效应和损伤, 如组织脱水, 皮肤脱落等; 长时间的 UVB 照射, 皮肤会出现红斑, 严重者可引发皮肤癌, 所以它是重点预防的紫外线波段^[4-7]。关于紫外线照射而引起的生物学效应已有诸多报道, 但是关于其机制的研究主要集中在观察一些生理生化指标和大分子标记物的含量或表达的改变, 如 DNA、蛋白质、酶类等^[8-13]; 小分子物质虽然也有报道, 如尿刊酸(UCA)、神经酰胺类等, 但都只是着眼于局部的变化, 系统、全面地评价紫外线对生物体扰动产生的内源性标记物变化^[14-17]的报道不多。

代谢组学(Metabonomics/Metabolomics) 是从整体分析生物体系受外界刺激或扰动后其内源性代谢产物种类、数量及其变化规律的科学^[18,19], 其代表分析手段有核磁共振技术、液相色谱-质谱联用技术等, 核磁共振技术的优点在于其对样本分析的高选择性及无损伤性, 而液相色谱-质谱技术则有更高的灵敏度和分辨率, 随着快速高分辨液相色谱(RRLC) 及超高效液相色谱(UPLC) 的发展, 更高灵敏度、更高分辨率及分离度的方法被开发出来, 使该技术更适合于代谢组学的研究^[20,21]。

本研究通过建立代谢组学的分析思路与方法, 考察 UVB 照射前后的大鼠尿液中内源性代谢物谱的变化, 研究 UVB 辐射导致急性光损伤的生理机制, 为早期临床治疗提供依据。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

Agilent1200 快速分离液相色谱系统(美国 Agilent Technologies 公司), 配备高压二元泵, 控温自动

2016-02-21 收稿; 2016-04-22 接受

本文系吉林省教育厅“十二五”科学技术研究项目(No.20150344) 及长春市科技局重大科技攻关项目(No.14KG057) 资助

* E-mail: sylu19@yahoo.com.cn

进样器; Agilent 6520 Q-TOF 质谱仪(美国 Agilent Technologies 公司), 配有 ESI 离子源和在 Mass Hunter 数据采集处理系统; Eppendorf 5804R 高速离心机(德国 Eppendorf 公司), TL-01 窄谱中波紫外线光源采用飞利浦紫外线灯(峰值 311~313 nm); UV-340A 紫外线辐照计(280~400 nm, 台湾路昌公司)。乙腈(色谱级, 美国 TEDIA 公司); 和甲酸(色谱级, 美国 Sigma 公司); 超纯水由美国 Millipore 公司的 Milli-Q 系统制得。标准品购自 Sigma-Aldrich 公司。

2.2 实验动物

雄性 Wistar 大鼠 16 只, 体重(180 ± 30) g, 动物合格证号: SCXK-(吉) 2011-0007, 由长春生物制品有限公司动物中心提供。在标准环境下(湿度 50%±10%; 温度(25±2) °C; 12 h 昼夜循环) 进食进水, 放入代谢笼内适应性饲养 3 天, 实验前禁食 12 h, 实验过程中所有动物都受到精心照顾。

2.3 实验方法

2.3.1 色谱条件 采用 Supelco Ascentis® Express C₁₈ HPLC 色谱柱(50 mm×3.0 mm, 2.7 μm), 流动相: A 为超纯水(含体积百分比 0.1% 甲酸), B 为乙腈; 流动相梯度: 正谱: 0~12 min, 5%~25% B; 12~20 min, 25%~70% B; 20~25 min, 100% B; 负谱: 0~7 min, 5%~25% B; 7~15 min, 25%~70% B; 15~21 min, 100% B。每次进样前, 色谱柱在初始流动相条件下平衡 8 min。柱温: 35 °C; 流速: 0.3 mL/min, 进样量 8 μL。

2.3.2 质谱条件 采用正负两种电离模式, 气体温度: 350 °C; 干燥气流速: 8 L/min; 喷雾气压: 276 kPa; 毛细管电压: 3.5 kV; 裂解电压: 220 V; 锥孔电压: 65 V; 质量扫描范围: m/z 50~1000。在样品测试之前, 使用调谐液校正质量轴。

2.4 动物模型及样本处理

取上述雄性大鼠 16 只, 用婴儿理发器剃除整个大鼠背部(尾部至颈部)的绒毛, 每 3 天剃毛一次, 实验前随机分成空白对照组与 UVB 模型组, 每组 8 只。UVB 辐照剂量和造模周期与文献[5, 22] 相似, 并适当改进: 在对将照射 Wistar 大鼠置于自制的鼠盒中, 自由活动, 活动期间禁食不禁水。UVB 照射时, 大鼠背部暴露在距光源 30~42 cm 处, 每次剂量为 170 mJ/cm², 连续 UVB 照射 5 天, 从第 6 天开始, 每 2 天照射一次, 共 14 天(10 次), UVB 总剂量为 2.38 J/cm², 照射后送回动物饲养室。连续收集 14 天健康对照组、UVB 模型组的 24 h 尿液样品, 于-80 °C 冷冻贮藏。样品采用离心沉降后四倍稀释法^[23], 检测前, 室温融化尿液样品, 在 4 °C 以 12000 r/min 离心 10 min, 取 250 μL 上清液蒸馏水稀释至 1 mL, 用 0.22 μm 滤膜过滤, 供 RRLC-Q-TOF-MS 测定。

2.5 数据处理

样品用 RRLC/MS 进行检测, 得到样品的总离子流色谱图, 用 Mass Hunter 软件分子特征提取(Molecular feature extract, MFE) 模式下进行峰校准、背景扣除、面积归一化和数据简化处理, 将结果转化为包含化合物的保留时间和质荷比信息的化合物转换文件(Compound exchange file, CEF), 之后将 CEF 文件导入 Mass Profiler Professional (MPP, Agilent Technologies, USA) 统计软件进行滤噪和归一化, 单变量数据统计采用 t 检验(t -test), 倍性变化分析(Fold-change analysis, FC), 参数检验(One way ANOVA) 等方法, 用 p 值评估单变量方法处理的数据是否具有统计学意义, 当 $p < 0.05$ 被认为具有统计学意义, Fold-change 分析中, 倍数(FC) ≥ 2 时被认为差异具有意义。多变量数据分析采用主成分分析法(PCA), 通过 PCA 载荷图发现可作为生物标记物的化合物。运用偏最小二乘判别分析(PLS-DA) 法建立预测模型, 选取基于 PCA 分析得出的特征项列表, 以原样本的 2/3 建立训练集, 剩余的 1/3 作为验证集, 验证该特征项在 UVB 辐射致光损伤模型诊断上的预测能力。在鉴定潜在生物标时用到以下数据库: HMDB (<http://www.hmdb.ca/>), METLIN (<http://metlin.scripps.edu/>), MASSBANK (<http://www.massbank.jp/>), KEGG (<http://www.genome.jp/>)。

2.6 方法学验证

从所有待测尿液样品中各取 50 μL 混合, 制成质控样品, 用于方法验证。每 5 个样品运行一个质控样品, 根据结果评价系统稳定性及重现性。正离子模式和负离子模式各选取 5 个离子, 选取的正离子为 m/z 126.0892, 238.1078, 311.1618, 180.0467 和 436.1628; 选取的负离子为 m/z 296.2363, 165.

0673, 189.9957, 314.249 和 269.033, 提取它们的保留时间和峰面积进行方法学验证。

3 结果与讨论

3.1 数据可靠性评价

RRLC-Q-TOF-MS 系统的重复性和稳定性结果显示: 这 10 个离子的保留时间、质荷比和峰面积的系统稳定性分别为 0.13%~0.38%, 0.0001%~0.0007% 和 6.8%~8.5%。结果表明, 在整个分析过程中, 色谱分离和质谱检测均具有很好的稳定性和重现性。

3.2 色谱分离结果

图 1 是空白对照组与 UVB 模型组的大鼠尿液经 RRLC-Q-TOF-MS 分析、优化色谱条件得到的正离子模式(ESI^+) 和负离子模式(ESI^-) 下的基峰强度(Base peak intensity, BPI) 色谱图。

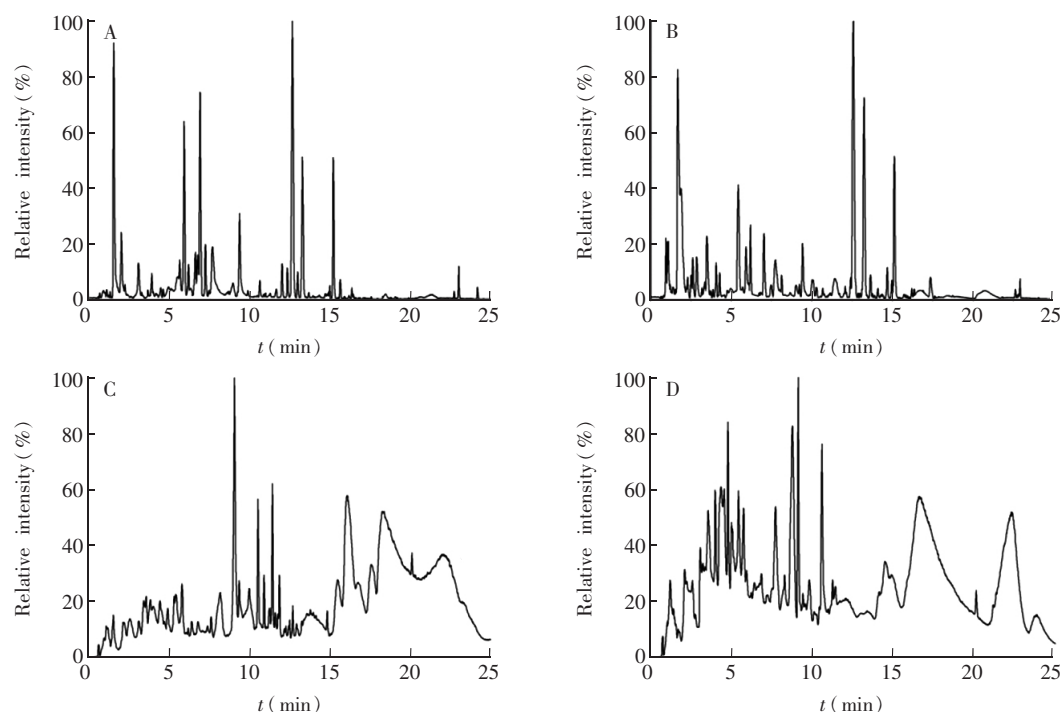


图 1 空白对照组和 UVB 模型组的尿液样本基峰强度色谱图

正离子模式下: A 空白对照组尿样, B UVB 模型组尿样; 负离子模式下: C 空白对照组尿样, D UVB 模型组尿样。

Fig.1 Representative base peak intensity chromatograms of urine samples from control group and ultraviolet B (UVB) model group

ESI^+ : control group (A), model group (B); ESI^- : control group (C); model group (D)

3.3 数据分析结果

3.3.1 单变量统计结果 通过 Agilent Mass Hunter Workstation 对 RRLC-Q-TOF-MS 获得数据进行分子特征识别, 将提取出来的化合物列表导入 MPP 软件, 经过处理, 在正离子模式下获得了 15938 个化合物数据, 经 t 检验分析, 得到 88 个在两组比较中具有统计学意义的变量($p < 0.05$), 经 FC 分析, 得到 $\text{FC} \geq 2$ 的共有 88 个变量; 负离子模式下, 得出 7448 个化合物数据, t 检验分析得到具有显著差异的变量 470 个($p < 0.05$), 经 FC 分析, 得到 $\text{FC} \geq 2$ 的共有 470 个变量。

3.3.2 多变量统计结果 为了观察大鼠总体代谢轮廓的变化, 将所有 14 天所采集的模型组的大鼠尿液进行动态的代谢物分析, 将 RRLC-Q-TOF-MS 采集的分析样本 PCA 分析, 每天数据样为一组, 选取其中具有代表性的 3 组与空白对照组比较, 其得分图(PCA Scores plot) 见图 2, 图 2 显示的大鼠尿液样本有 6 个明显的聚类, 包括空白对照组第 3 天、模型组第 3 天, 空白对照组第 9 天、模型组第 9 天, 空白对照组第 14 天及模型组第 14 天, 显示出空白组与模型组大鼠的动态代谢变化。实验第 3 天, 未

经照射的大鼠生理代谢与照射模型组大鼠有一定的区分,但不明显;通过生理药理实验得出(该部分工作另行发表),模型组大鼠在照射第3天开始出现畏光,进食量减少,背部皮肤出现大面积红斑,最明显的是耳缘部位出现黑色晒伤结痂生理病理改变。随着UVB照射剂量的继续加大,大鼠皮肤及体内各个脏器所受到的损伤同时加重,系统免疫功能下降,在图2中表现为空白组与模型组在第9天与第14天区分进一步加大。

为了进一步对数据进行分析,对实验第14天大鼠的尿液进行了PCA分析,在正离子模式和负离子模式下,空白对照组与UVB模型组在PCA Scores图中获得了明显区分,如图3所示,图中每个点都代表一个样本在二维平面的投影,每个样本的位置由其自身的代谢决定,处于相同生理病理状态的样本,通常具有相似的代谢物组成,因此在得分图上也处于相似的位置,彼此之间距离越远,表示其生理病理状态相差越大。结果表明,经UVB辐射后的大鼠的尿液代谢物谱发生了明显的变化。

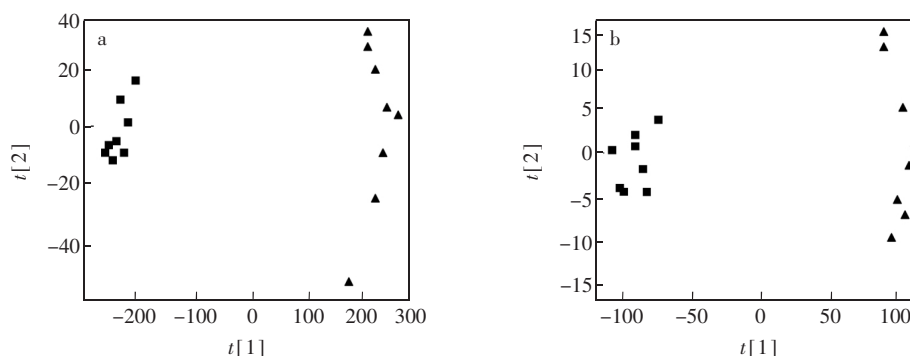


图3 实验第14天区分正常组与模型组的PCA得分图

(a) 正离子模式; (b) 负离子模式。(■ 空白对照组, ▲ 模型组第14天)。

Fig.3 PCA Scores plot of urine samples on the 14th day

(a) ESI⁺; (b) ESI⁻. (■ Control group, ▲ Model group on the 14th day) .

利用MPP软件包中的聚类分析(Cluster Analysis)功能对样本数据进行系统聚类,基于 t 检验筛选出的化合物且 $FC \geq 2$ 的变量作为分析对象,以化合物的强度作为考察指标,统计不同类别之间的距离时,采用重心法(Centroid clustering)计算,结果如图4所示,图中纵向的矩阵代表样本,横向代表化合物,化合物在样本中的强度用颜色的深浅来表示,相似颜色表示样本中含有该化合物的强度相似,上方树状结构为根据化合物在所有样本中强度的相似程度进行的层次聚类。从图4可见,在正负离子模式下,性质相近的变量聚为一类,空白对照组与UVB模型组被分成性质不同的两大类,并且在组内各样本间化合物强度都比较相似,组间相似性差异较大,说明UVB照射对正常大鼠尿液代谢产生了较大的影响。

3.3.3 差异性变量的筛选与鉴定 基于非监督模式的主成分分析(PCA)法对空白对照组与UVB模型

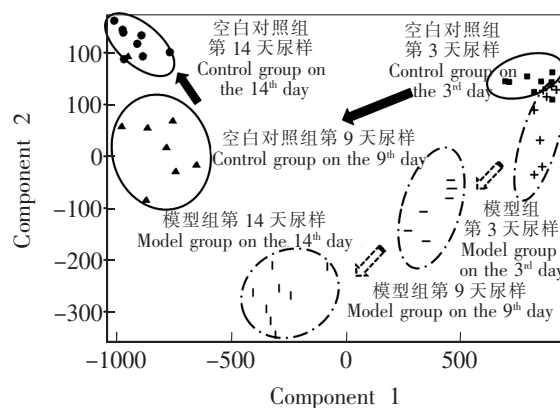


图2 正离子模式下的大鼠尿液代谢随时间变化的PCA动态得分图

(■) 空白对照组第3天尿样, (▲) 空白对照组第9天尿样, (●) 空白对照组第14天尿样, (+) 模型组第3天尿样, (-) 模型组第9天尿样, (|) 模型组第14天尿样。

Fig. 2 Principal component analysis (PCA) scores plot of urine samples in positive ion mode

(■) Control group on the 3rd day, (▲) Control group on the 9th day, (●) Control group on the 14th day, (+) Model group on the 3rd day, (-) Model group on the 9th day, (|) Model group on the 14th day.

组大鼠尿液代谢物进行区分, 变量载荷图 (Loadings) 如图 5 所示。根据载荷图的结果, 选取其中距离原点较远, 即对分组模型贡献较大的代谢物作为潜在生物标记物, 在正离子模式下选定 3 个, 负离子模式下选定 11 个。本研究的潜在标记物的鉴定是利用高分辨质谱检测到的分子离子与同位素丰度比确定其分子组成后, 进一步通过串联质谱结果与数据库进行解析校对; 或通过购买标准品, 比较两者的精确分子量、串联质谱数据及保留时间来完成的; 由于代谢组学考察的内源性代谢物的分子量范围在 1000 g/mol 以内, 而质谱的质量精度在 1000 g/mol 时误差在为 1×10^{-6} , 所以在使用数据库考察潜在生物标记物时, 应选择测量值与真实值分子量误差差距小于 1×10^{-6} 的化合物。通过以上的的方法共鉴定出

11 种潜在的生物标记物, 结果见表 1, 它们分别是正离子模式下的: 神经碱(Neurine)、3-亚甲基-假吲哚(3-Methylene-indolenine)、植物鞘氨醇(Phytosphingosine); 负离子模式下的: 7-甲基鸟嘌呤(7-Methyl-guanine)、马尿酸(Hippuric acid)、L-甲硫氨酸(L-Methionine)、黄素单核苷酸(Flavine mononucleotide, FMN)、N-乙酰基-L-谷酰基-5-磷酸(N-Acetyl-L-glutamyl 5-phosphate)、9,10-二羟基-12(Z)-十八碳烯酸(9,10-dihydroxy-12(Z)-octadecenoic acid)、7-脱氢孕烯醇酮(7-Dehydropregnenolone)、13-羟基十八碳二烯酸(13(S)-Hydroxyoctadecadienoic acid, 13-HODE)。

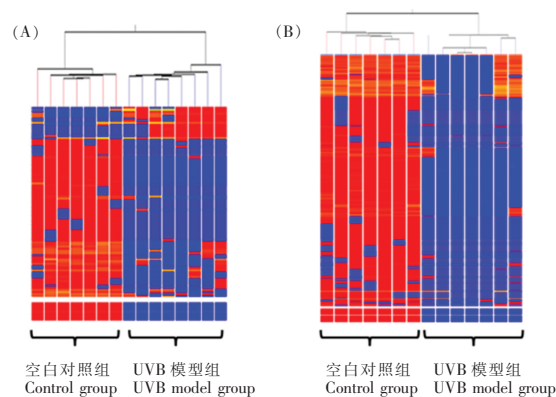


图 4 实验第 14 天区分正常组与模型组的聚类分析图。

Fig.4 Clustering analysis on urine samples of UVB model group and control group on the 14th day

A: 正离子模式; B: 负离子模式。A: $[\text{ESI}^+]$, B: $[\text{ESI}^-]$ 。

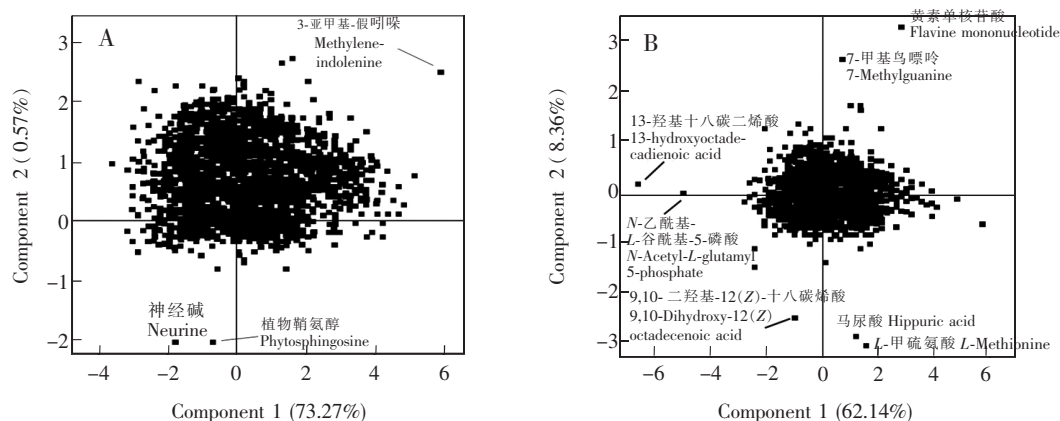


图 5 区分正常组与模型组的 PCA 载荷图 A: 正离子模式; B: 负离子模式。

Fig.5 Loadings plots from PCA for the common components. A: $[\text{ESI}^+]$, B: $[\text{ESI}^-]$ 。

表 1 区分正常组与模型组的潜在生物标记物的鉴定结果

Table 1 Identification result of biomarkers between UVB model group and control group

保留时间 Retention time (min)	质荷比 (m/z)	化合物 Identified compound	质量偏差 Mass deviation ($\times 10^{-6}$)	10^4 P 值 (UVB 模型组对空白组) 10^4 P value (UVB model group vs Control group)	变化趋势 (模型组对空白组) Change trends (UVB model group vs Control group)	变化倍数 Fold change
ESI ⁺						
2.26	126.0892	神经碱 Neurine	2.6	12.8	下调 Down	2.7
6.80	130.0643	3-亚甲基-假吲哚 3-Methylene-indolenine	6.4	49.3	下调 Down	2.4
16.36	318.2993	植物鞘氨醇 Phytosphingosine	3.1	36.3	下调 Down	2.5

续表 1(Continued to Table 1)

保留时间 Retention time (min)	质荷比 (m/z)	化合物 Identified compound	质量偏差 Mass deviation ($\times 10^{-6}$)	10^4 P 值 (UVB 模型组对空白组) 10^4 P value (UVB model group vs Control group)	变化趋势 (模型组对空白组) Change trends (UVB model group vs Control group)	变化倍数 Fold change
ESI ⁻						
1.15	164.0594	7-甲基鸟嘌呤 7-Methylguanine	9.7	22.4	上调 Up	2.7
1.25	178.0528	马尿酸 Hippuric acid	10.0	0.63	下调 Down	3.2
1.44	148.0451	L-甲硫氨酸 L-Methionine	8.9	22.6	下调 Down	2.7
1.63	188.9878	C ₆ H ₆ O ₅ S	—	22.2	下调 Down	2.7
4.02	160.0297	C ₃ H ₇ N ₅ OS	—	0.66	下调 Down	3.2
4.20	455.0962	黄素单核苷酸 Flavine mononucleotide (FMN)	2.5	1.69×10^{-13}	下调 Down	3.8
9.35	268.0251	N-乙酰基-L-谷酰基-5-磷酸 N-Acetyl-L-glutamyl 5-phosphate	8.6	19.2	下调 Down	2.7
11.07	229.1332	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O	—	0.15	下调 Down	3.3
13.82	313.2411	9,10-二羟基-12(Z)-十八碳烯酸 9,10-dihydroxy 12(Z)- octadecenoic acid	1.8	22.4	下调 Down	2.7
14.07	313.2205	7-脱氢孕烯醇酮 7-Dehydropregnenolone	10.0	79.9	下调 Down	2.5
16.05	295.2284	13-羟基十八碳二烯酸 13(S)-Hydroxyoctadeca- dienoic acid	1.8	102	下调 Down	2.4

图 6 所示为负离子模式下的离子 m/z 164.0594 鉴定过程, 图 6A 为该离子的提取离子流图, 将其精确分子质量与数据库进行比对, 初步鉴定为 7-甲基鸟嘌呤, 串联质谱分析结果证明了此结论, 见图 6B, 此结果与购买的标准品串联质谱结果及保留时间完全吻合。综上, 此标记物被确定为 7-甲基鸟嘌呤, 其它生物标记物的鉴定过程同上所述。

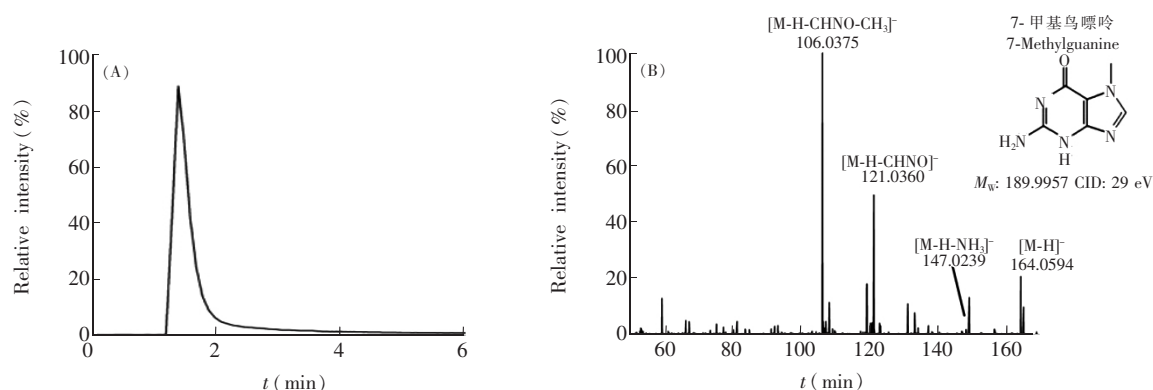


图 6 潜在标记物 7-甲基鸟嘌呤的鉴定: (A) 负离子模式下 7-甲基鸟嘌呤的提取离子色谱图; (B) 串联质谱图, 碰撞能量为 20 eV

Fig.6 Identification of a selected marker 7-methylguanine: (A) 7-methylguanine in extracted ion chromatogram with negative mode; (B) MS/MS spectrum, the collision energy was 20 eV

3.3.4 UVB 致光损伤模型诊断能力预测 利用 PLS-DA 法对全体样本数据, 基于 PCA 分析得出的特征项, 即 t 检验与倍性变化分析筛选出的标志物($p < 0.05$, 且 $FC \geq 2$) 为分析对象, 得出在正负离子模式下, 该模型对 UVB 致光损伤模型诊断能力准确度为 100%。

3.4 UVB 照射诱导大鼠尿液代谢物谱变化的作用机制

植物鞘氨醇(Phytosphingosine)作为皮肤的重要组成部分,具有诱导癌细胞凋亡、抗炎、抗真菌剂、抑制痤疮的作用,本实验中UVB照射的直接结果是导致大鼠体内植物鞘氨醇的水平下调,UVB可导致机体免疫器官、呼吸器官损伤,正常水平的植物鞘氨醇可以一定程度上维持这两种器官的正常生理功能,而当植物鞘氨醇水平下调时,容易使受损器官细胞由炎症向癌症发展;本实验中UVB照射而导致的间接结果是,UVB照射刺激或干扰了鞘磷脂代谢通路(Sphingolipid metabolism pathway)的正常运行,照射可导致丝氨酸棕榈酰转移酶(Serine palmitoyltransferase)和神经酰胺酶(CDase)活性的下降,从而使其下游产物的含量发生变化,前者是UV长期照射而导致的结果,后者低剂量的UV即可发生^[24]。推测体内植物鞘氨醇水平的下调可能与Serine palmitoyltransferase活性的下降有关,CDase活性的抑制,可导致神经酰胺(Ceramide)在细胞内大量累积,造成细胞生长受到抑制或者凋亡。本实验涉及Ceramide的刺激源包括UVB的直接照射、由照射引发的体内细胞因子TNF- α 、IL-1 β 和维生素D水平的升高, Serine palmitoyltransferase活性下降同样会导致Ceramide和S-1-P的产量下降,由于受UV照射影响,S-1-P的下降速度更快,从而影响细胞内二者的比值Ceramide/S-1-P,最终的结果可能是导致细胞的凋亡^[25-30]。

7-甲基鸟嘌呤(7-Methylguanine, m7Gua)是在正常人生物流体中发现的DNA甲基化和脱嘌呤产物,被认为是肺癌的重要生物标记物。烟草中的烟草特异性亚硝胺(Tobacco-specific nitrosamines, TSNA),经代谢活化后,可以形成许多DNA加合物,其中的m7Gua占总加合物量的70%~90%^[31]。DNA加合物可导致变异的发生,具有潜在的致癌作用,这些变异如果发生在调控细胞生长作用的基因中,将会引发良性肿瘤,并进一步发展成恶性肿瘤(癌症)^[32]。本实验中UVB照射对正常大鼠的影响包括呼吸、免疫、皮肤等多器官的损伤,同时对大鼠的饮食也产生了一定的负作用,m7Gua的上调验证了大鼠的正常身体状态受到了影响,与上述报道结果一致。

黄素单核苷酸(Flavin mononucleotide, FMN)是核黄素激酶催化核黄素(维生素B2)的产物,是各种氧化还原酶,在催化循环的过程中,其氧化形式FMN,半醌式FMNH $\cdot$, FMNH $_2$ 式结构可在各种氧化还原酶的催化下相互转换。FMN是一种比NAD还要强的强氧化剂,因为它可以参与1个或2个电子的转移,主要以核黄素的形式存在于细胞和组织中。维生素B2又叫核黄素,当体内缺乏该物质时,将会影响机体的生物氧化,影响叶酸、维生素B6和维生素B12等其他B族维生素的代谢进而影响机体的抗氧化能力,致使代谢发生障碍^[33]。由于体内维生素B2的储存是很有限的,因此每天都要由饮食提供。维生素B2的两个性质是造成其损失的主要原因:(1)对光敏感,光照下不稳定,可由光照破坏;(2)在热碱溶液中不稳定。游离型的核黄素对日光照射,特别是紫外线照射高度敏感,在碱性溶液中能光解为光黄素而丧失活性^[34]。在本实验中,UVB的高剂量照射可能破坏模型组的大鼠体内维生素B2结构,导致体内的维生素B2的大量损失,其下游产物FMN在体内的含量也随之下下降,可见UVB可以通过干预核黄素代谢通路来影响FMN在体内的含量。

本研究利用代谢组学的方法,通过使用RRLC-Q-TOF高分辨质谱手段研究UVB辐射诱导大鼠尿液中代谢物的变化机制,通过单变量数理统计结合多元统计分析数据表明,正常对照组与UVB模型组能够很好地区分,发现并鉴定了11种差异代谢物,它们在UVB模型组大鼠尿液中浓度的变化,表明了UVB辐射可影响正常大鼠的鞘脂类代谢、核酸代谢、亚油酸代谢、氨基酸代谢等通路,经鉴定的11种差异代谢物可作为UVB辐射造成大鼠损伤的潜在潜在的生物标志物。经PLS-DA分析验证,该模型中的差异代谢物对UVB辐射导致的光损伤疾病具有较好的预测能力。

References

- 1 Eller M S, Asarch A, Gilchrist B A. *Photochem. Photobiol.*, **2008**, 84(2): 339-349
- 2 Halliday G M, Damian D L, Rana S, Byrne S N. *J. Dermatol. Sci.*, **2012**, 66(3): 176-182
- 3 Griffin L L, Ali F R, Lear J T. *Clin. Med.*, **2016**, 16(1): 62-65

- 4 Mohammad A, Jung Ho B, Xiuwei T, Kwang Ho K, Levy K, Bickers D R, Kim A L. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **2007**, 224(3) : 274–283
- 5 Legat F J, Griesbacher T, Schicho R, Althuber P, Schuligoi R, Kerl H, Wolf P. *Neurosci Lett.*, **2002**, 329(3) : 309–313
- 6 Nandakumar V, Vaid M, Tollefsbol T O, Katiyar S K. *Carcinogenesis*, **2011**, 32(4) : 597–604
- 7 Crispin M K, Fuentes-Duculan J, Gulati N, Johnson-Huang L M, Lentini T, Sullivan-Whalen M, Gilleaudeau P, Cueto I, Suarez-Farinas M, Lowes M A, Krueger J G. *J. Invest. Dermatol.*, **2013**, 133(3) : 692–701
- 8 Birch-Machin M A, Russell E V, Latimer J A. *Brit. J. Dermatol.*, **2013**, 169(Supplement s2) : 9–14
- 9 Douki T, Cadet J. *Biochemistry-US*, **2001**, 40(8) : 2495–2501
- 10 Zhaorigetu S, Yanaka N, Sasaki M, Watanabe H, Kato N. *Photochem. Photobiol.*, **2003**, 71(s 1-3) : 11–17.
- 11 Stéphane M, Coralie P, Jocelyne G C, Akos B, Szilvia K, Dimitra M, Thierry D. *Org. Biomol. Chem.*, **2010**, 8(7) : 1706–1711
- 12 An K P, Athar M, Tang X, Katiyar S K, Russo J, Beech J, Aszterbaum M, Kopelovich L, Epstein E H, Mukhtar H. *Photochem. Photobiol.*, **2002**, 76(1) : 73–80
- 13 Reeve V E, Tyrrell R M, Allanson M, Domanski D, Blyth L. *J. Invest. Dermatol.*, **2009**, 129(6) : 1539–1546
- 14 Shimizu H, Banno Y, Sumi N, Naganawa T, Kitajima Y, Nozawa Y. *J. Invest. Dermatol.*, **1999**, 112(5) : 769–774
- 15 Magnoni C, Euclidi E, Benassi L, Bertazzoni G, Cossarizza A, Seidenari S, Giannetti A. *Toxicol. in Vitro*, **2002**, 16(4) : 349–355
- 16 Charruyer A, Bell S M, Kawano M, Douangpanya S, Yen T-Y, Macher B A, Kumagai K, Hanada K, Holleran W M, Uchida Y. *J. Biol. Chem.*, **2008**, 283(24) : 16682–16692
- 17 Douki T, Cadet J. *Biochemistry-US*, **2001**, 40(8) : 2495–2501
- 18 Nicholson J K, Lindon J C. *Nature*, **2008**, 455(7216) : 1054–1056
- 19 GU Jin-Ning, NIU Jun, PI Zi-Feng, YUE Hao, WU Sui-Sheng, LIU Shu-Ying. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2013**, 41(3) : 371–376
- 谷金宁, 牛俊, 皮子凤, 越皓, 吴绥生, 刘淑莹. *分析化学*, **2013**, 41(3) : 371–376
- 20 Dubey A, Rangarajan A, Pal D, Atreya H S. *Anal. Chem.*, **2015**, 87(24) : 12197–12205
- 21 Cajka T, Fiehn O. *Anal. Chem.*, **2016**, 88(1) : 524–545
- 22 Kimura Y, Sumiyoshi M. *J. Nutr.*, **2009**, 139(11) : 2079–2086
- 23 CHEN Yan-Hua, ZHANG Rui-Ping, SONG Yong-Mei, DONG Li-Jia, ZHAN Qi-Min, Abliz ZEPER. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2011**, 39(2) : 173–177
- 陈艳华, 张瑞萍, 宋咏梅, 董立佳, 詹启敏, 再帕尔·阿不力孜. *分析化学*, **2011**, 39(2) : 173–177
- 24 Loft S, Svoboda P, Kasai H, Tjonneland A, Moller P, Sorensen M, Overvad K, Autrup H, Raaschou-Nielsen O. *Int. J. Cancer*, **2007**, 121(7) : 1579–1584
- 25 Nagahara Y, Shinomiya T, Kuroda S, Kaneko N, Nishio R, Ikekita M. *Cancer Sci.*, **2005**, 96(2) : 83–92
- 26 Park M T, Kang J A, Choi J A, Kang C M, Kim T H, Bae S, Kang S, Kim S, Choi W I, Cho C K, Chung H Y, Lee Y S, Lee S J. *Clin. Cancer Res*, **2003**, 9(2) : 878–885
- 27 Quintans J, Kilkus J, McShan C L, Gottschalk A R, Dawson G. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1994**, 202(2) : 710–714
- 28 Santana P, Pena L A, HaimovitzFriedman A, Martin S, Green D, McLoughlin M, CordonCardo C, Schuchman E H, Fuks Z, Kolesnick R. *Cell*, **1996**, 86(2) : 189–199
- 29 Kim D S, Kim S Y, Lee J E, Kwon S B, Joo Y H, Youn S W, Park K C. *Arch. Pharm. Res.*, **2003**, 26(9) : 739–746
- 30 Kendall A C, Nicolaou A. *Prog. Lipid Res.*, **2013**, 52(1) : 141–164
- 31 Fearon E R, Jones P A. *Faseb J.*, **1992**, 6(10) : 2783–2790
- 32 Rydberg B, Lindahl T. *Embo. J.*, **1982**, 1(2) : 211–216
- 33 Radda G K, Calvin M. *Biochemistry-US*, **1964**, 3(3) : 384–393
- 34 Kaduce T L, Figard P H, Leifur R, Spector A A. *J. Biol. Chem.*, **1989**, 264(12) : 6823–6830

Urinary Metabonomic Investigation into Acute Photo Damage of Rats Induced by Ultraviolet B Irradiation using Rapid Resolution Liquid Chromatography–Mass Spectrometry

WANG En-Peng¹, SUN Yan¹, YUE Hao¹, CHEN Huan-Wen³, WANG Yang¹, CHEN Chang-Bao¹, LIU Shu-Ying*^{1,2}

¹(*Jilin Ginseng Academy, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China*)

²(*Changchun Center of Mass Spectrometry, Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130022, China*)

³(*Department of Applied Chemistry, East China Institute of Technology, Fuzhou 344000, China*)

Abstract A rapid resolution liquid chromatography quadruple time-of-flight mass spectrometric (RRLC-Q-TOF/MS) method combined with multivariate statistical analysis was applied to investigate the changes of endogenous metabolites in murine urine before and after ultraviolet B (UVB) irradiation for the purpose of discussing the physiological mechanism of acute injury caused by UVB radiation. A narrow-band UVB (NB-UVB) (TL-01, peak value 312nm) was used to establish the acute light damage model. The urine samples were centrifuged before four times dilution treatment, subsequently the diluted urine samples were separated on a Supelco Ascentis Express C₁₈ column using water (0.1% formic acid) and acetonitrile as mobile phase by gradient elution. The differences metabolites with major contribution for grouping were found out based on the metabolic profiling analysis of principal component analysis (PCA) and cluster analysis (CA), which could illustrate their possible mechanism of actions by means of relevant pathways. A prediction model was built to investigate the forecasting ability of the acute photo damage induced by UVB irradiation through the partial least square discriminant analysis (PLS-DA). The results of multivariate statistical analysis showed that the blank control group was separated from UVB model group quite well, 11 endogenous metabolites were identified as the potential biomarkers through comparison with the database, tandem mass spectrum data and standard substance, which indicated the UVB radiation may affect the sphingolipid metabolism, nucleic acid metabolism, linoleic acid metabolism and amino acid metabolism pathways. These different metabolites could be helpful for diagnosing the light damage induced by UVB radiation.

Keywords Metabonomics; Ultraviolet B; Radiation; Rapid resolution liquid chromatography quadruple time-of-flight mass spectrometry

(Received 21 February 2016; accepted 22 April 2016)