

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20201127002

印月, 镇华君, 修光利. 基于 HepG2 细胞脂质组学方法对黄浦江水质的综合评价[J]. 生态毒理学报, 2021, 16(4): 141-150

Yin Y, Zhen H J, Xiu G L. Comprehensive evaluation of water quality of Huangpu River using HepG2 cell-based lipidomics approach [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2021, 16(4): 141-150 (in Chinese)

基于 HepG2 细胞脂质组学方法对黄浦江水质的综合评价

印月^{1,2}, 镇华君^{1,2,3#}, 修光利^{1,2,3*}

1. 上海市环境保护化学污染物环境标准与风险管理重点实验室, 华东理工大学资源与环境工程学院, 上海 200237

2. 国家环境保护化工过程环境风险评价与控制重点实验室, 华东理工大学资源与环境工程学院, 上海 200237

3. 上海污染控制与生态安全研究院, 上海 200092

收稿日期: 2020-11-27

录用日期: 2021-01-14

摘要: 环境水体中复合污染的毒性识别一直是环境科学界关注的热点。基于代谢组学的生物监测方法通过监测暴露前后生物内源性代谢物的变化, 在评估复合污染导致的综合毒性效应中具有广泛的应用前景。本研究从污染物对细胞脂类代谢的影响角度出发, 采用体外肝癌细胞(HepG2)暴露和脂质组分析相结合的方法, 对黄浦江干流和支流共 27 个采样点的水质进行了综合评价。研究发现, 水样对 HepG2 细胞的脂代谢影响程度与采样点所属河段紧密相关。黄浦江中游水样对 HepG2 细胞的平均脂代谢影响程度(3.40%)高于上游(1.65%)和下游(0.78%), 而流经城区的支流水样对细胞的脂代谢影响(5.20%)明显高于干流水样(1.80%)。此外, 在采集的水样中超过 70% 的样品都导致 HepG2 细胞内甘油三酯(TG)大量蓄积, 揭示了黄浦江水体中的复合污染物可能诱导肝脏产生脂毒性损伤。本研究为环境水质监测提供新的方法, 研究结果为上海市生态环境和水质安全管理部门提供重要的参考信息。

关键词: 复合污染物; HepG2 细胞; 综合毒性评价; 脂质组学; 黄浦江

文章编号: 1673-5897(2021)4-141-10 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Comprehensive Evaluation of Water Quality of Huangpu River Using HepG2 Cell-based Lipidomics Approach

Yin Yue^{1,2}, Zhen Huajun^{1,2,3#}, Xiu Guangli^{1,2,3*}

1. Shanghai Environmental Protection Key Laboratory for Environmental Standard and Risk Management of Chemical Pollutants, School of Resources & Environmental Engineering, East China University of Science & Technology, Shanghai 200237, China

2. State Environmental Protection Key Lab of Environmental Risk Assessment and Control on Chemical Processes, School of Resources & Environmental Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China

3. Shanghai Institute of Pollution Control and Ecological Security, Shanghai 200092, China

Received 27 November 2020

accepted 14 January 2021

Abstract: Toxicity characterization of complex environmental mixtures has become one of the main focuses of attention among environmental scientists. And biomonitoring using metabolomics-based approaches have the poten-

基金项目: 上海市浦江人才计划资助项目(20PJ1402700); 国家自然科学基金项目(21707035)

第一作者: 印月(1994—), 女, 硕士研究生, 研究方向为环境毒理学, E-mail: yinyue0924@126.com

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

共同通讯作者 (Co-corresponding author), E-mail: zhenhuajun@ecust.edu.cn

tial of providing valuable ecotoxicological information for complex environmental mixtures. In the current study, a cell-based lipidomics approach has been developed to assess the water quality of Huangpu River in Shanghai. The magnitude of impact on HepG2 lipidome was found to be dependent on the specific location of sampling sites along the river. The impact on HepG2 lipidome from the middle reaches samples (3.40%) is higher than that from upstream (1.65%) and downstream (0.78%), and the impact from tributaries that flow across the downtown area (5.20%) was significantly higher than that from the mainstream (1.80%). The exposed HepG2 cells exhibited a common pattern of triglyceride (TG) accumulation, implying the hepatic lipotoxicity of complex mixtures of pollutants that are present in Huangpu River. Overall, this study demonstrated the utility of cell-based lipidomics as an effective tool for assessing the biological effects of complex pollutant mixtures. It also provided important information on water quality that could potentially aid in the management of ecological safety and water quality in Shanghai.

Keywords: complex environmental mixtures; HepG2 cells; mixture toxicity assessment; lipidomics; Huangpu River

环境水体中存在着大量浓度低,但具有潜在生态和健康风险的污染物,例如环境激素类物质、医药品和个人护理产品类物质、工业添加剂、农药以及抗生素等^[1-5]。如何有效地评价环境水体的综合毒性效应是环境科学界关注的热点问题。传统的针对特定物质的化学分析法能监测所关注污染物的浓度水平,但不能反映复合污染暴露下的真实环境风险^[6]。而针对污染物毒性效应的生物监测方法则成为评价复合污染毒性效应的主流思路之一。近年来,毒理基因组学技术(转录组学、蛋白质组学和代谢组学等)因能够综合评价污染物暴露后对多生物学通路造成的影响,成为评价单一污染物或复杂组分样品毒性效应的重要方法^[7-9]。

代谢组处于基因调控网络和蛋白质作用网络的下游,聚焦于机体内所有小分子代谢物(分子量<1.5 kDa的多肽、氨基酸及其衍生物、胺类物质、脂类物质等)的丰度变化。相比于其他组学手段,代谢组学与生物表型特征之间的联系更为紧密,是机体对外界变化产生的最终应答^[10-11]。脂质作为机体内源性代谢物的重要组成部分,如作为细胞膜骨架组分、机体能量来源和信号分子等,参与着细胞的生长、增殖和凋亡^[12]。因此,脂质代谢紊乱被视为细胞结构改变和功能受损的重要标志。研究表明,很多典型的环境污染物,例如多氯联苯^[13]、全氟类化合物^[14]、有机磷阻燃剂^[15]、双酚A^[16]和重金属^[17]等,都能影响生物体的脂代谢平衡。此外,有研究显示,在复合污染暴露中,共暴露污染物之间产生的协同、加合或拮抗作用也能在暴露对象的脂质组成分析结果中得到反映^[18]。此前,Zhen等^[19]采用基于斑马鱼肝细胞体外暴露实验的代谢组学方法,研究了美国某河流上游污水处理厂的污水排放对下游自来水源水水质的影

响,发现部分脂肪酸类物质能灵敏地指示河流中存在未知来源的污染物排放,揭示了基于细胞脂类代谢物的毒性测试方法在环境监测中的潜在应用前景。

鉴于此,本研究以人体肝癌细胞(HepG2)作为暴露实验模型,利用基于脂质组学的毒性效应测试手段,对实际环境水体(上海市黄浦江)的污染状况进行综合性评价。研究所采用的 HepG2 细胞的生物学功能与正常肝细胞极为相似,是一种研究肝脏脂质代谢的代表性细胞模型^[20-21]。本研究旨在评价基于细胞脂质组学的环境水质监测方法的有效性,同时研究结果可为上海市生态环境和水质安全管理部门提供重要的参考信息。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 化学试剂

高糖液体培养液(DMEM,含1%双抗;青霉素和链霉素)、胎牛血清蛋白(FBS)、磷酸缓冲液(PBS)均购自北京赛澳美细胞技术有限公司(中国);DMEM粉状培养基、胰蛋白酶-EDTA均购自于美国Sigma-Aldrich公司;缓冲液Hepes购自北京索莱宝科技有限公司(中国);碳酸氢钠(NaHCO_3),纯度 $\geq 99.5\%$,购自上海国药集团(中国);MTT细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司(中国);SPLASH® Lipidomix™脂类标准品购自美国Avanti Polar Lipids公司,包括14种常见脂类物质的同位素内标磷脂酰胆碱 d7-PC(15:0/18:1)(纯度>99%)、磷脂酰乙醇胺 d7-PE(15:0/18:1)(纯度>99%)、磷脂酰丝氨酸 d7-PS(15:0/18:1)(纯度>99%)、磷脂酰甘油 d7-PG(15:0/18:1)(纯度>99%)、磷脂酰肌醇 d7-PI(15:0/18:1)(纯度>99%)、磷脂酰胆碱烷基醚 d9-PC-e(18:1/18:1)(纯度>99%)、磷脂酰乙醇胺烷基醚 d9-PE-e(18:1/18:1)(纯度>99%)、溶血性磷脂酰

胆碱 d7-LPC(18:1) (纯度>99%)、溶血性磷脂酰乙醇胺 d7-LPE(18:1) (纯度>99%)、甘油二酯 d7-DG(15:0/18:1) (纯度>99%)、甘油三酯 d7-TG(15:0/18:1/15:0) (纯度>99%)、鞘磷脂 d9-SM(d18:1/18:1) (纯度>99%)、神经酰胺 Cer(d18:1/12:0) (纯度>99%)、胆固醇 d7-Cholesterol (纯度>99%); LC-MS 级溶剂和添加剂,包括甲醇(MeOH)、乙腈(ACN)、异丙醇(IPA)和甲酸铵(ammonium formate)均购自美国 Fisher Scientific 公司;实验用水均采用 Milli-Q 超纯水(电阻率 $\geq 18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$)并经过 $0.1 \mu\text{m}$ 的灭菌滤膜处理。

1.2 水样采集

2019 年 8 月 2 日(汛期,夏季)于黄浦江共采集 27 个水样,各采样点地理位置如图 1 所示。黄浦江干流及部分支流(S2、S4、S12 和 S13)共布设 15 个采样点。其中,S1~S5 之间的上游河段位于上海郊区,周边主要以农业活动为主,同时也作为上海市饮用水水源地之一。黄浦江中游(S6~S10)和下游采样点(S11、S14 和 S15)则分布于人口密集的城市地区。目前,上海已有 42 座城市污水处理厂(WWTPs)投入使用,日处理能力 834.3 万 m^3 。此前的研究表明,WWTPs 的出水是环境水体的一个主要污染源^[22]。因此,为了更好地评价黄浦江整体的水质情况,考虑到 WWTPs 出水的影响,剩余 12 个支流采

样点(1-1/2、2-1/2、4-1/2、5-1/2 和 6-1/2)选取在中心城区 6 个 WWTPs 出水口的上下游约 $0.5 \sim 1 \text{ km}$ 范围之内。所有采集到的水样储存在 500 mL 经预清洗的棕色玻璃容器中,在低温避光条件下运输回实验室,置于 $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存直至实验分析。

1.3 水样暴露

HepG2 细胞(购自中国科学院上海生命科学研究院细胞库)接种于含有 10% FBS 的 DMEM 培养液中,置于 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 CO_2 含量为 5% 的培养箱中培养,并定期进行换液或传代。由于采样点数量较多,所采集的 27 个水样的暴露实验分 4 次(A/B/C/D)完成。以第一次暴露实验 A 为例,将 3 个 T182 培养瓶中收集的 HepG2 细胞分配到 63 个 6 cm 的培养皿中(7 个采样点,每个采样点的暴露实验包含 7 个生物学重复样本;14 个实验对照(CON)样本),预培养 24 h 使细胞贴壁完全。随后,将经过 $0.1 \mu\text{m}$ 滤膜过滤的水样与 4 倍浓缩的细胞培养液以 3:1 的体积比混合调配成细胞暴露培养液,并对预培养中的培养溶液进行置换,开始 48 h 的 HepG2 细胞暴露培养。48 h 后,采用基于 Teng 等^[23]建立的方法进行细胞猝灭和脂质提取,提取得到的脂质组分使用真空浓缩仪(Concentrator plus,美国 Eppendorf 公司)进行浓缩处理,随后储存于 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 直至分析。

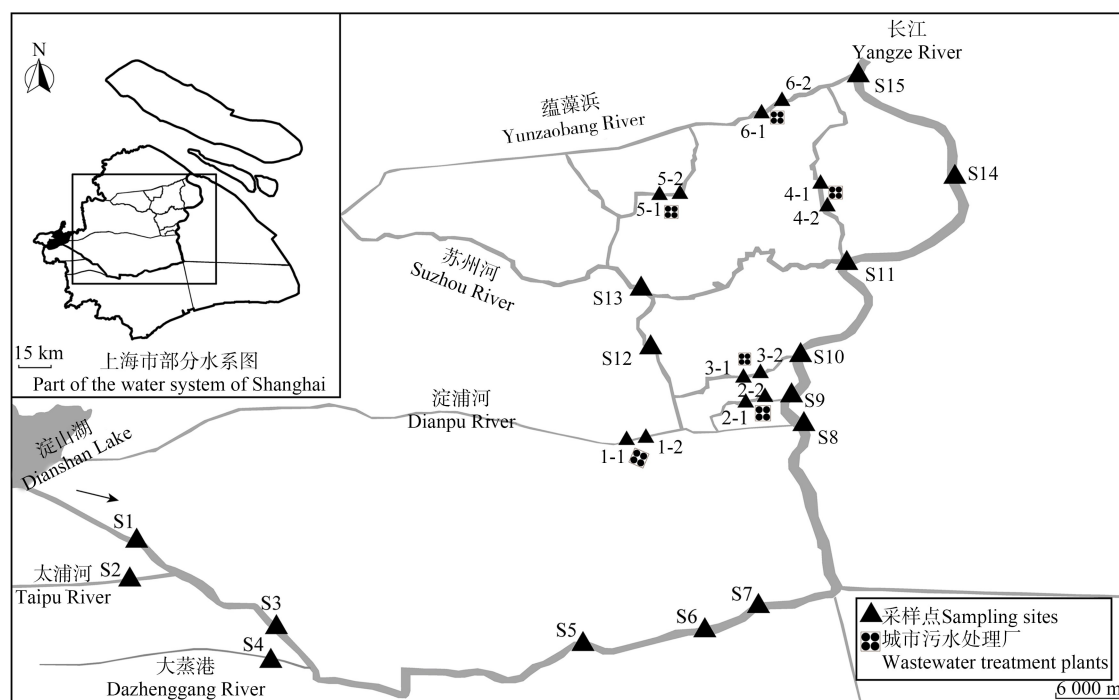


图1 黄浦江采样点图

Fig. 1 Sampling sites of Huangpu River

1.4 脂类鉴定

将真空浓缩得到的样品重新溶解于 200 μL 含有脂质内标的混合溶剂 ($V(\text{MeOH}):V(\text{IPA}):V(\text{H}_2\text{O})=65:30:5$) 中, 中速涡旋 30 s 后置于低温冰盒保存。利用高效液相色谱-四极杆轨道阱质谱仪(Q-Exactive plus, 美国 Thermo 公司)对脂类组成进行分析检测, 本研究中脂质鉴定采用 MS Dial 2.0 和 Lipid Match 这 2 种软件包。

液相色谱条件: 使用 CSH C18 色谱柱(Waters, 1.7 μm 填料内径, 2.1 mm $\times$ 100 mm)进行分离, 柱温 65 $^{\circ}\text{C}$, 进样体积 2 μL , 流速 0.5 mL $\cdot\text{min}^{-1}$ 。流动相组成为水相 A($V(\text{ACN}):V(\text{H}_2\text{O})=60:40$)和有机相 B ($V(\text{ACN}):V(\text{IPA})=10:90$), 其中, A 相、B 相都含有 10 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ 甲酸铵。洗脱梯度条件为: 0 min, 30% B; 1.0 min, 30% B; 10.0 min, 85% B; 10.1 min, 99% B; 12.0 min, 99% B; 12.1 min, 30% B; 15.0 min, 30% B。

质谱条件: 利用加热电喷雾电离源(HESI)在 Full Scan 模式下进行正负离子交替信号采集。质谱扫描范围 $m/z=200\sim1\,200$, 正负离子喷雾电压为 3.2 kV, 毛细管温度 350 $^{\circ}\text{C}$, 汽化温度 300 $^{\circ}\text{C}$, 载气流量和辅助气流量分别为 35 Arb 和 10 Arb。进样分析过程中使用质量控制样品(QC)指示仪器的稳定性, QC 由所有样品等量混合制成。在样品检测的开始、结束以及每间隔 10 个样品时进行一次 QC 分析。

1.5 数据处理和统计分析

采用基于 R 语言的内部开发程序对采集的质谱数据进行分析处理。主要步骤包括使用 ProteoWizard 对原始数据文件进行格式转换, 利用 XCMS 软件包对采集信号进行解卷积和保留时间校正处理, 采用 CAMERA 软件包对同位素和加合离子信号进行注释。在至少 80% 的样品中检测到的脂质才被保留, 而在所有 QC 样品中信号强度的相对标准偏差(RSD) $>30\%$ 的脂质则被排除在最终数据列表之外。最后, 对样品中所有脂质分子信号强度进行归一化处理。

本文所有数据均以平均值 $\pm$ 标准误差(mean $\pm$ SE)的形式表示, 采用 SIMCA14.1 进行数据的多变量分析, 使用 SPSS 24.0 进行差异统计分析, 利用单向方差分析(one way ANOVA)和 Tukey 事后检验法检验主成分分析结果中的组间差异, 采用学生 t 检验法比较实验组与 CON 之间的脂质丰度差异(进行假阳性 FDR 校正, $q<0.1$)。本研究中的统计分析结

果将 $P<0.05$ 定义为显著性差异。

2 结果与讨论 (Results and discussion)

2.1 HepG2 细胞脂类组成分析

A/B/C/D 这 4 次暴露实验的最终脂质组数据结果分别包含 998、1 089、810 和 810 个脂质信号, 其中, 分别相对地鉴定出了 344、356、322 和 322 种脂质。按照国际脂类分类和命名委员会发布的分类标准, 上述鉴定出来的脂质涵盖了八大脂类中的 6 类, 分别是甘油磷脂类、鞘脂类、甘油酯类、脂肪酸类、固醇脂类和孕烯醇酮脂类。4 次暴露实验中 HepG2 脂质组成(包括亚类)基本一致, 在此以 A 组暴露实验中的 CON 为例进行说明。如图 2(a)所示, 在 HepG2 细胞非极性组分提取物中鉴定出: (1)甘油磷脂 181 种, 包括 9 大亚类 PC、PE、PS、PG、PI、LPC、LPE、PC-e 和 PE-e; (2)鞘脂 61 种, 包括四大亚类 SM、Cer、己糖基神经酰胺(HexCer)和二己糖基神经酰胺(Hex2Cer); (3)甘油酯 98 种, 包括 TG 和 DG 两个亚类; (4)脂肪酸 2 种, 均为酰基肉碱(CAR); (5)固醇脂 1 种, 为 Cholesterol; (6)孕烯醇酮脂 1 种, 为辅酶 Q10(Ubiquinones)。在上述脂类中, 甘油脂类是细胞储存能量的主要化合物; 鞘脂类是细胞结构组分之一, 影响着细胞与外界的物质与信号的交换和传导, 是调节细胞生长和凋亡活动的第二信使; 而甘油磷脂类主要参与细胞膜固定、膜内外信号转导、膜蛋白结合以及底物转运等多种生物代谢过程^[24]。

在鉴定出的六大脂类中, 甘油磷脂、鞘脂和甘油酯三大脂类的组分众多, 这三大脂类及其分别包含的亚脂类的物质的量浓度百分比如图 2(b)所示。甘油磷脂类在 HepG2 细胞内属于高丰度脂类, 占比超过 50%, 主要以 PC 和 PE 为主, 其浓度占比分别为 30.11% 和 19.88%; 甘油脂类的丰度次之(约 35%), 其中 TG 和 DG 的浓度占比分别是 31.44% 和 4.01%; 鞘脂类的丰度约 10%, 主要亚类为 SM, 浓度占比约为 9.52%。纵观 HepG2 细胞主要脂质的分类及组成, 可以发现 TG 在所有亚脂类中丰度最高, 而 TG 的蓄积是非酒精性肝炎(NAFLD)发生的一个标志性特征^[25], 因此研究结果进一步佐证了 HepG2 细胞是研究 NAFLD 的良好细胞模型。

2.2 HepG2 细胞脂质代谢的总体变化

暴露 48 h 后, 各个采样点的 HepG2 细胞存活率分布在 95%~102% 范围内, 实验组与 CON 之间以及不同实验组之间的细胞存活率无显著差异($P>$

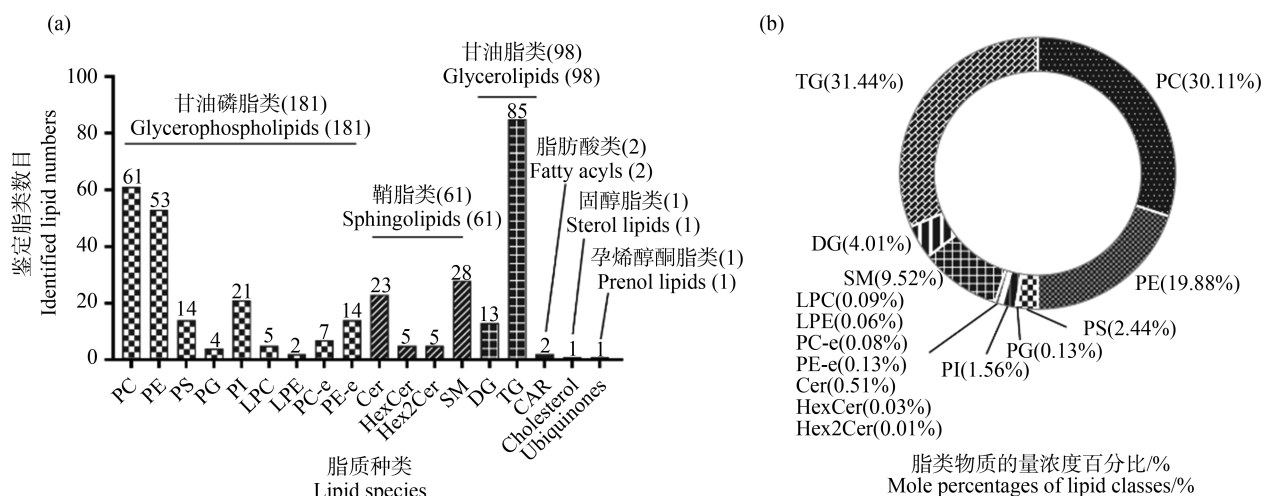


图2 A组暴露实验中 HepG2 细胞对照组 (CON) 的脂类组成

注:PC 表示磷脂酰胆碱,PE 表示磷脂酰乙醇胺,PS 表示磷脂酰丝氨酸,PG 表示磷脂酰甘油,PI 表示磷脂酰肌醇,LPC 表示溶血性磷脂酰胆碱,LPE 表示溶血性磷脂酰乙醇胺,PC-e 表示磷脂酰胆碱烷基醚,PE-e 表示磷脂酰乙醇胺烷基醚,Cer 表示神经酰胺,HexCer 表示己糖基神经酰胺,Hex2Cer 表示二己糖基神经酰胺,SM 表示鞘磷脂,DG 表示甘油二酯,TG 表示甘油三酯,CAR 表示酰基肉碱,Cholesterol 表示胆固醇,Ubiquinones 表示辅酶 Q10。

Fig. 2 The composition of lipids in HepG2 cells from control group (CON) in experiment A

Note: PC means phosphatidylcholine; PE means phosphatidylethanolamine; PS means phosphatidylserine; PG means phosphatidylglycerol;

PI means phosphatidylinositol; LPC means lyso-phosphatidylcholine; LPE means lyso-phosphatidylethanolamine; PC-e means

phosphatidylcholine with ether- or vinyl ether- linkages; PE-e means phosphatidylethanolamine with ether- or vinyl ether- linkages;

Cer means ceramide; HexCer means hexaglycosylceramide; Hex2Cer means dihexaglycosylceramide; SM means sphingomyelin;

DG means diacylglycerol; TG means triacylglycerol; CAR means acyl carnitine; ubiquinones means Coenzyme Q10.

0.05)。主成分分析(PCA)是考察多个变量间相关性的一种多元统计方法,能够基于暴露后细胞脂类丰度信息,表征实验组相对于 CON 的脂质组成变化。4 次暴露实验的主成分分析如图 3 所示,图 3 中每个数据点代表一个采样点,根据不同采样点沿第一主分(PC1)或第二主分(PC2)方向上与 CON 的分离程度,并结合方差分析(ANVOA)结果,来评估各组之间的脂代谢差异。可以看出大部分实验组和 CON 在第一和/或第二主成分上有明显的区分。

由图 3 可知,黄浦江干流 11 个采样点与 CON 的区分程度与采样点所属河段紧密相关。位于上游的 S1、S3、S5 以及中游的 S6、S7 与 CON 在 PC1 和 PC2 坐标轴上均无显著差异(图 3(a)),仅 S2 与 CON 在 PC1 上呈现显著差异($P<0.001$);位于中游的 S8 和 S9 与 CON 在 PCA(图 3(b))上差异显著(PC1: $P<0.05$, PC2: $P<0.001$),而 S10 则与 CON 在 PC1 和 PC2 上无显著差异(图 3(c));位于下游的 S11、S14 和 S15(图 3(b)),仅 S15 与 CON 在 PC2 上呈现显著差异($P<0.05$)。综合来看,对 HepG2 脂代谢影响较大的黄浦江干流水样主要来自中游河段,上游和下

游河段对细胞脂质代谢影响相对较弱。位于黄浦江支流的 16 个采样点,除去 1-2(图 3(b))和 4-2(图 3(d)),剩余 14 个支流采样点,其暴露后的脂质代谢变化与 CON 相比差异显著,表明大多数污染主要发生在位于中心城区的黄浦江支流,这一结论与黄浦江某些单一污染物(药物和个人护理品、全氟化合物)的调查结果一致^[26-27]。

本研究对暴露后 HepG2 细胞脂质代谢的整体变化进行了定量评估。具体做法是比较各个实验组与 CON 之间所有脂质组分的相对丰度,将具有显著性差异的丰度组分进行绝对值的加和处理,最终得到一个表征细胞脂类代谢物受影响程度的数值,可更为直观地比较每个采样点暴露后脂质变化的整体情况。如图 4 所示,黄浦江中游的脂代谢受影响程度(0.01% ~ 7.07%,均值 3.40%)要高于上游(0.01% ~ 6.67%,均值 1.65%)和下游(0.03% ~ 1.27%,均值 0.78%);支流水样的脂代谢受影响程度(0.01% ~ 9.15%,均值 5.20%)要高于干流水样(0.01% ~ 7.07%,均值 1.80%),此结果与 PCA 分析结果一致。另外,位于各个 WWTP 上下游的支流点(1-1/2、2-1/2、

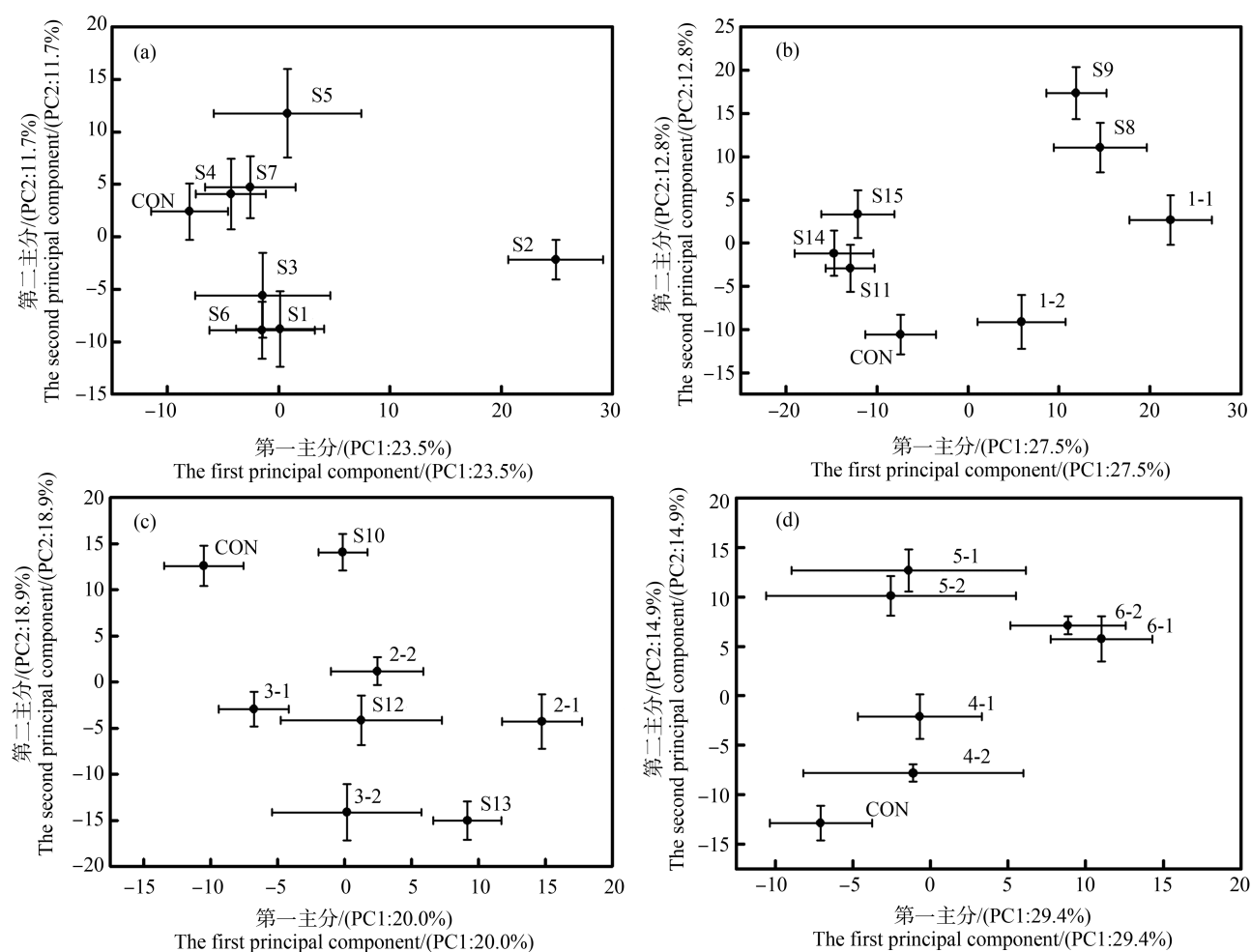


图3 27个采样点细胞脂质组分的主成分分析得分图

Fig. 3 Two-component score plots of lipid composition in cell extracts from 27 sampling sites

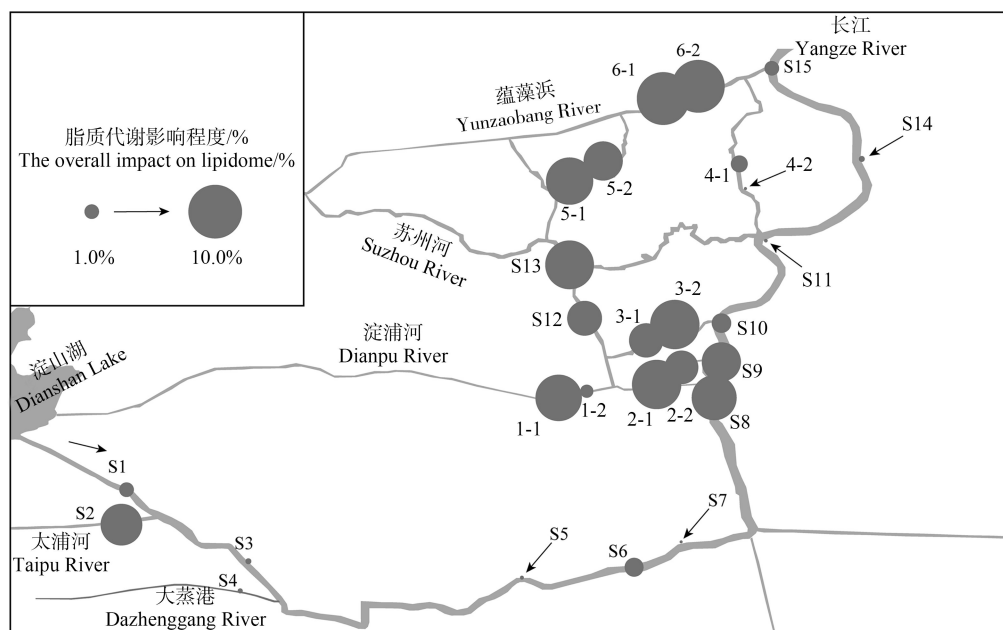


图4 不同水样对 HepG2 细胞脂代谢的影响程度

Fig. 4 The overall impact of samples from different sites on lipidome of HepG2 cells

3-1/2、4-1/2、5-1/2、6-1/2),其脂质受影响程度无明显差异(成对 t 检验, $P>0.05$)。

造成干流和支流之间脂质代谢变化的主要原因可能是黄浦江自身的水力条件。黄浦江干流河道宽阔,河水流速较快,污染物的有效停留时间相较于支流较短。同时,黄浦江夏季平均水位约为 4.48 m,较高的水位和较快的流速会产生较强的稀释效应,有利于污染物的扩散和稀释,类似的结论在 Liu 等^[28]研究也有报道。但 S8 和 S9 位于黄浦江干流,其脂质代谢受影响程度分别为 7.07% 和 5.38%,表明了 S8 与 S9 所在区域受到的环境胁迫压力更大,污染物排放所造成的影响大于河流自身的稀释效应。因此,研究推测 S8 与 S9 附近可能存在其他重要的污染排放源,多涉及未经处理的生活污水和工业废水等。随着河流的流动,下游各点的脂质代谢受影响程度逐渐减弱,造成此现象的原因可能是黄浦江下游无明显的污染排放源。值得注意的是, S15 位于黄浦江和长江交汇处,属于典型的潮汐河口,且伴随着大量往返的船只,水中沉积物会反复经历悬浮(S15 浊度:126 NTU), S15 和 CON 之间的脂质代谢差异可能是长江中的污染物回流所致。另外,本研究也尝试探索了 WWTPs 对于支流河道污染程度的贡献,发现 WWTPs 的上下游并没有显著差异。特别是在某些支流河道, WWTPs 上游水样对 HepG2 脂质代谢受影响程度要明显高于下游水样。而且,没有接纳 WWTPs 出水的部分支流河道(S12、S13),其

水样对 HepG2 脂质代谢影响程度也维持在较高水平。因此,本研究结果表明, WWTPs 出水不是造成黄浦江支流水质恶化的主要污染源,具体污染成因有待进一步研究。

黄浦江上游水源地供应上海市约 30% 的饮用水,其水质状况直接关系到上海市及周边地区的人群健康。本研究发现, S2 水样对 HepG2 脂质代谢的影响程度(6.70%)明显高于黄浦江其他上游点,推测 S2 点附近可能存在未知的污染源,而农业活动可能是造成这种现象的主要原因。黄浦江上游有集约化养殖业,每年生产近千万吨的畜禽粪便。Jiang 等^[29]评估,每年约有 20% 畜禽粪便和 50% 尿液未经任何处理就排入了黄浦江,检出的黄浦江上游夏季的抗生素浓度可达 $1\,011\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ 。与此同时,对此次采集的水样中典型的药品和个人护理品类污染物进行了分析检测(未发表),但是并未发现 S2 与上游其他采样点的浓度水平存在显著差异。因此,有必要进一步地对 S2 水样中的主要污染物进行分析鉴定,并对该点附近的潜在污染排放源进行调查。

2.3 HepG2 细胞脂类的变化特征

为了进一步探讨不同水样暴露后 HepG2 细胞的脂质变化特征,本研究将暴露后 HepG2 细胞的不同脂类丰度值经对数转换后以热图形式呈现,并通过脂类的代谢路径图进行辅助说明(图 5)。由图 5(a)可知,于河流中游和中心城区支流采集的水样导致 HepG2 细胞内 TG 水平出现不同程度的上调。如

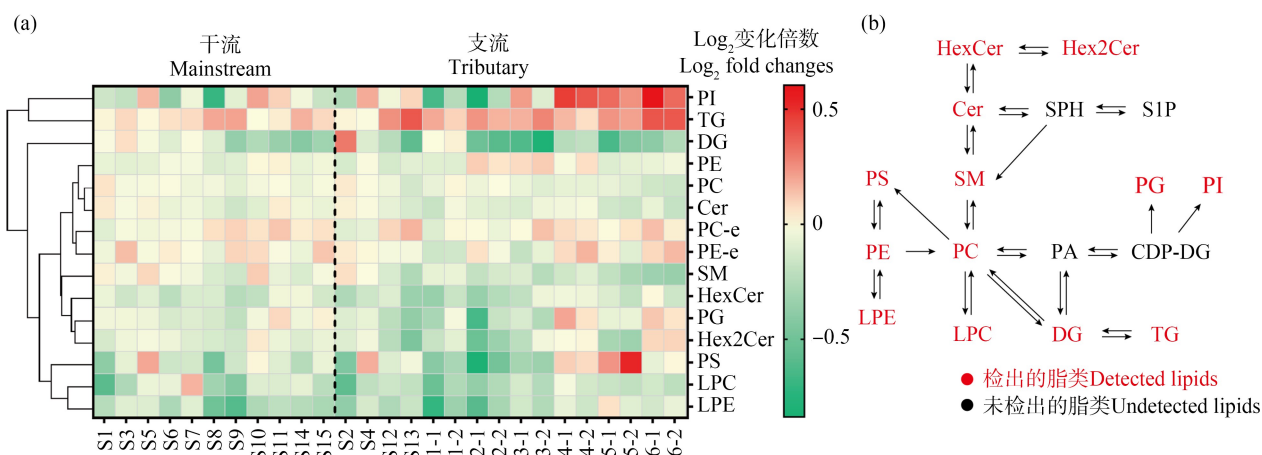


图5 不同脂类变化热图与脂类的代谢路径

注:(a)热图;(b)脂类的代谢路径;SPH、S1P、PA 和 CDP-DG 分别表示鞘氨醇、磷酸鞘氨醇、磷脂酸和胞苷二磷酸-二酰甘油。

Fig. 5 Heat map and metabolic pathway of individual lipid classes

Note: (a) heat map; (b) metabolic pathway of lipid classes; SPH, S1P, PA, CDP-DG stand for sphingosine, sphingosine-1-phosphate, phosphatidic acid, 1,2-diacyl-sn-glycerol, respectively.

前所述, TG 在肝组织中的积聚是 NAFLD 等肝脏疾病的标志性特征。因此, 上述现象表明水样中的复合污染物能诱导 HepG2 细胞内 TG 的蓄积, 可能诱发产生 NAFLD 的健康风险。细胞体内, 游离脂肪酸与 TG 时刻维持着动态平衡, 即细胞内多余的脂肪酸能够被转化为 TG 进行能量储存, 反之 TG 也能释放出游离的脂肪酸为细胞供能。因此, 脂肪酸合成的增加或脂肪酸 β -氧化的减少是导致 TG 在细胞内积累的主要原因。大量研究表明 CAR 作为脂肪酸进入线粒体进行 β -氧化降解的重要载体, 是表征线粒体功能是否受损的重要生物标志物^[30-33]。为此, 本研究对 CAR 和 TG 二者之间的关联性进行了探索, 结果如图 6 所示, 27 种不同水样暴露后, CAR 和 TG 的丰度变化呈现显著性的负相关。由此可见, 环境水样暴露造成的线粒体功能受损是造成 HepG2 细胞 TG 蓄积的主要原因之一。

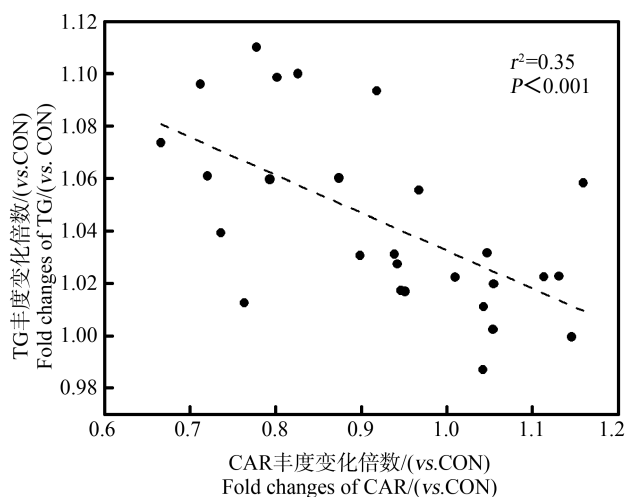


图 6 不同实验组 HepG2 细胞内 CAR 和 TG 丰度相对变化关系 (vs. CON)

Fig. 6 Correlation analysis of the fold changes of CAR and TG in HepG2 cells after exposure (vs. CON)

除 TG 大范围上调之外, 由图 5(a)可知, DG 在包括中下游以及大部分支流的 HepG2 脂质组中出现了普遍性的下调; PI 在部分脂代谢影响程度高的水样中出现了明显的上调(4-1/2, 5-1/2, 6-1/2), 在 S8、1-1/2、2-1/2 水样中则呈现明显的下调。此前已有文献报道^[34], DG 和 PI 可以通过胰岛素信号通路来调节细胞内脂质储存。研究指出 DG 可以激活蛋白激酶 C(PKC)进而调节胰岛素受体活性使细胞产生胰岛素耐受性。因此, DG 的下调有可能诱使细

胞胰岛素通路激活, 促使细胞内脂肪酸的合成并抑制 TG 的代谢分解。另外, 胰岛素信号通路的重要组成部分——磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)信号通路包含一系列重要中间体, 例如磷脂酰肌醇二磷酸(PIP2)和三磷酸肌醇(PIP3), 而 PI 是合成这些中间体的重要前体物质, PI 的代谢紊乱进一步表明暴露后 HepG2 细胞的胰岛素耐受性可能发生了改变。最新的一项研究指出^[35], 低剂量的双酚 A(BPA)能介导斑马鱼 PI3K 通路信号改变, 并导致 DG 和 PI 的上调, 而相同浓度的双酚 S(BPS)暴露则诱导斑马鱼 DG 和 PI 的下调。上述结果表明, 不同污染物可能对 DG 和 PI 代谢产生不同类型的影响。在复合污染情况下, 污染物借由包括 PI3K 在内的胰岛素信号通路导致脂类代谢紊乱的机制仍有待进一步的研究。

各个实验组与 CON 相比, PC 和 PE 这 2 种主要的甘油磷脂亚类未呈现明显的变化, 而 2 种主要的鞘脂亚类 SM 和 Cer 的水平经大部分支流水样暴露后则出现了不同程度的下调。由图 5(b)可知, SM 和 Cer 二者在细胞体内相互转化, 它们共同参与着细胞生命活动的调节, 例如细胞增殖、凋亡和炎症调控。许多研究已经证明^[36-37], 通过鞘磷脂酶(SMase)水解 SM 产生的 Cer 可以介导细胞生长停滞。而对于癌细胞来说, 低水平的 Cer 有利于细胞的生长增殖, 此外, 内源性 Cer 水平上调或暴露于外源性 Cer 已被证明是有效的抗癌干预策略^[38]。此前, Zhang 等^[39]利用三氯生(TCS)分别对人体肝细胞(L02)和 HepG2 细胞进行暴露, 并探究了 TCS 对 2 种细胞的脂代谢影响, 发现低浓度的 TCS 对 L02 细胞产生了一定的毒性损伤, 造成 L02 细胞内 SM 和 Cer 水平显著上调; 相同剂量的 TCS 则对 HepG2 细胞的活力无显著影响, 而 HepG2 细胞内 SM 和 Cer 水平显著下调。本研究中, 部分暴露组 HepG2 较低的 SM 和 Cer 水平可能意味着细胞对水环境的污染物应激源产生了一定的耐受性。

综上所述, 本研究从污染物影响细胞脂质代谢这一视角出发, 系统性地评估了上海市黄浦江的综合水质情况, 发现于黄浦江中游以及支流采集的水样暴露会导致 HepG2 细胞内脂质代谢紊乱, 造成细胞内大量的 TG 积累, 揭示了环境水体中复合污染物可能诱导肝脏产生脂毒性损伤。研究结果证明基于 HepG2 细胞体外暴露的脂质组学方法可以有效地丰富目前环境生物监测方法和毒性评价手段。

通讯作者简介:修光利(1972—),男,博士,教授,主要研究方向为大气环境化学、大气污染控制以及环境风险评价与规划管理。

共同通讯作者简介:镇华君(1985—),男,博士,副研究员,主要研究方向为污染物的生态和环境健康效应。

参考文献 (References):

- [1] Hao X D, Chen G H, Yuan Z G. Water in China [J]. Water Research, 2020, 169: 115256
- [2] Tian Z Y, Peter K T, Gipe A D, et al. Suspect and nontarget screening for contaminants of emerging concern in an urban estuary [J]. Environmental Science & Technology, 2020, 54(2): 889-901
- [3] Han D M, Currell M J, Cao G L. Deep challenges for China's war on water pollution [J]. Environmental Pollution, 2016, 218: 1222-1233
- [4] Wang J Y, Da L J, Song K, et al. Temporal variations of surface water quality in urban, suburban and rural areas during rapid urbanization in Shanghai, China [J]. Environmental Pollution, 2008, 152(2): 387-393
- [5] Hartung T. Toxicology for the twenty-first century [J]. Nature, 2009, 460(7252): 208-212
- [6] Zhang L L, Li Q, Chen L, et al. Toxicity of surface water from Huangpu River to luminous bacteria (*Vibrio qinghaiensis* SP. Q67) and zebrafish (*Danio rerio*) embryos [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2015, 112: 137-143
- [7] 王志浩, 彭颖, 王萍萍, 等. 基于斑马鱼毒理基因组学的化学品测试技术研究进展[J]. 生态毒理学报, 2018, 13(5): 1-10
- Wang Z H, Peng Y, Wang P P, et al. Advances of chemical testing methodologies based on zebrafish toxicogenomics [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2018, 13(5): 1-10 (in Chinese)
- [8] Xia P, Zhang X W, Zhang H X, et al. Benchmarking water quality from wastewater to drinking waters using reduced transcriptome of human cells [J]. Environmental Science & Technology, 2017, 51(16): 9318-9326
- [9] Wang P P, Xia P, Yang J H, et al. A reduced transcriptome approach to assess environmental toxicants using zebrafish embryo test [J]. Environmental Science & Technology, 2018, 52(2): 821-830
- [10] 张家敏, 彭颖, 方文迪, 等. 有害结局路径(AOP)框架在水体复合污染监测研究中的应用[J]. 生态毒理学报, 2017, 12(1): 1-14
- Zhang J M, Peng Y, Fang W D, et al. Application of adverse outcome pathways framework in monitoring of toxic chemicals from aquatic environments [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2017, 12(1): 1-14 (in Chinese)
- [11] Yang K, Han X L. Lipidomics: Techniques, applications, and outcomes related to biomedical sciences [J]. Trends in Biochemical Sciences, 2016, 41(11): 954-969
- [12] Ibáñez C, Mouhid L, Reglero G, et al. Lipidomics insights in health and nutritional intervention studies [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(36): 7827-7842
- [13] Aminov Z, Haase R F, Pavuk M, et al. Analysis of the effects of exposure to polychlorinated biphenyls and chlorinated pesticides on serum lipid levels in residents of Anniston, Alabama [J]. Environmental Health, 2013, 12: 108
- [14] Lai K P, Lee J C Y, Wan H T, et al. Effects of in utero PFOS exposure on transcriptome, lipidome, and function of mouse testis [J]. Environmental Science & Technology, 2017, 51(15): 8782-8794
- [15] Zhao F R, Wan Y, Zhao H Q, et al. Levels of blood organophosphorus flame retardants and association with changes in human sphingolipid homeostasis [J]. Environmental Science & Technology, 2016, 50(16): 8896-8903
- [16] Ortiz-Villanueva E, Navarro-Martín L, Jaumot J, et al. Metabolic disruption of zebrafish (*Danio rerio*) embryos by bisphenol A. An integrated metabolomic and transcriptomic approach [J]. Environmental Pollution, 2017, 231(Pt 1): 22-36
- [17] Wu K, Luo Z, Hogstrand C, et al. Zn stimulates the phospholipids biosynthesis via the pathways of oxidative and endoplasmic reticulum stress in the intestine of freshwater teleost yellow catfish [J]. Environmental Science & Technology, 2018, 52(16): 9206-9214
- [18] Jungnickel H, Potratz S, Baumann S, et al. Identification of lipidomic biomarkers for coexposure to subtoxic doses of benzo[a]pyrene and cadmium: The toxicological cascade biomarker approach [J]. Environmental Science & Technology, 2014, 48(17): 10423-10431
- [19] Zhen H J, Ekman D R, Collette T W, et al. Assessing the impact of wastewater treatment plant effluent on downstream drinking water-source quality using a zebrafish (*Danio rerio*) liver cell-based metabolomics approach [J]. Water Research, 2018, 145: 198-209
- [20] Li Y H, Darwish W S, Chen Z, et al. Identification of lead-produced lipid hydroperoxides in human HepG2 cells and protection using rosmarinic and ascorbic acids

- with a reference to their regulatory roles on Nrf2-Keap1 antioxidant pathway [J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2019, 314: 108847
- [21] Ye G Z, Ding D X, Gao H, et al. Comprehensive metabolic responses of HepG2 cells to fine particulate matter exposure: Insights from an untargeted metabolomics [J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 691: 874-884
- [22] Wang Z M, Shao D G, Westerhoff P. Wastewater discharge impact on drinking water sources along the Yangtze River (China) [J]. *Science of the Total Environment*, 2017, 599-600: 1399-1407
- [23] Teng Q, Ekman D R, Huang W L, et al. Impacts of 17 α -ethynylestradiol exposure on metabolite profiles of zebrafish (*Danio rerio*) liver cells [J]. *Aquatic Toxicology*, 2013, 130-131: 184-191
- [24] Han X L. Lipidomics for studying metabolism [J]. *Nature Reviews Endocrinology*, 2016, 12(11): 668-679
- [25] Donnelly K L, Smith C I, Schwarzenberg S J, et al. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease [J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2005, 115(5): 1343-1351
- [26] Mei X B, Sui Q, Lyu S G, et al. Pharmaceuticals and personal care products in the urban river across the megacity Shanghai: Occurrence, source apportionment and a snapshot of influence of rainfall [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2018, 359: 429-436
- [27] Sun R, Wu M H, Tang L, et al. Perfluorinated compounds in surface waters of Shanghai, China: Source analysis and risk assessment [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2018, 149: 88-95
- [28] Liu S, Liu X R, Liu M, et al. Levels, sources and risk assessment of PAHs in multi-phases from urbanized river network system in Shanghai [J]. *Environmental Pollution*, 2016, 219: 555-567
- [29] Jiang L, Hu X L, Yin D Q, et al. Occurrence, distribution and seasonal variation of antibiotics in the Huangpu River, Shanghai, China [J]. *Chemosphere*, 2011, 82(6): 822-828
- [30] Ress C. Mechanisms of intrahepatic triglyceride accumulation [J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2016, 22(4): 1664
- [31] McGill M R, Li F, Sharpe M R, et al. Circulating acylcarnitines as biomarkers of mitochondrial dysfunction after acetaminophen overdose in mice and humans [J]. *Archives of Toxicology*, 2014, 88(2): 391-401
- [32] Kawano Y, Cohen D E. Mechanisms of hepatic triglyceride accumulation in non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Journal of Gastroenterology*, 2013, 48(4): 434-441
- [33] Feng S M, Gan L, Yang C S, et al. Effects of stigmasterol and β -sitosterol on nonalcoholic fatty liver disease in a mouse model: A lipidomic analysis [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66(13): 3417-3425
- [34] Liu Y, Wang W, Shui G H, et al. CDP-diaclyglycerol synthetase coordinates cell growth and fat storage through phosphatidylinositol metabolism and the insulin pathway [J]. *PLoS Genetics*, 2014, 10(3): e1004172
- [35] Gibert Y, Yoganantharajah P, McGee S, et al. Bisphenol A, but not bisphenol S, exposure increases lipid deposition by acting on the PI3K pathway *in vivo* [J]. *The FASEB Journal*, 2019, 33(S1): DOI:10.1096/fasebj.2019.33.1_supplement.488.7
- [36] Hannun Y A, Obeid L M. Many ceramides [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(32): 27855-27862
- [37] Nikolova-Karakashian M. Alcoholic and non-alcoholic fatty liver disease: Focus on ceramide [J]. *Advances in Biological Regulation*, 2018, 70: 40-50
- [38] Hu C X, Zhou Y, Feng J, et al. Untargeted lipidomics reveals specific lipid abnormalities in nonfunctioning human pituitary adenomas [J]. *Journal of Proteome Research*, 2020, 19(1): 455-463
- [39] Zhang H N, Shao X J, Zhao H Z, et al. Integration of metabolomics and lipidomics reveals metabolic mechanisms of triclosan-induced toxicity in human hepatocytes [J]. *Environmental Science & Technology*, 2019, 53(9): 5406-5415