

网络出版时间:2025-05-12 16:05:12 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20250509.1630.034

HPLC-MS/MS 检测 6 种三羧酸循环代谢物 在孕期 DEHP 暴露小鼠模型中的应用

陶文康^{1,2,3}, 张 伦^{2,3}, 黄倩倩^{2,3}, 余 芸^{2,3}, 蒋 月^{1,2,3},侯梦贞^{1,2,3}, 凌旭涛^{1,2,3}, 谢 芳^{1,2,3}, 王建青^{1,2,3}(¹ 安徽医科大学药学科学学院, 合肥 230032; ² 安徽医科大学第一附属医院北区药学部, 合肥 230012; ³ 安徽省公共卫生临床中心, 合肥 230012)

摘要 目的 利用高效液相色谱串联质谱(HPLC-MS/MS)系统建立三羧酸循环主要有机酸的测定方法,探究孕期邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯(DEHP)暴露小鼠血清、肝脏和胎盘中富马酸、苹果酸、琥珀酸、 α -酮戊二酸、顺乌头酸、枸橼酸 6 种三羧酸循环有机酸成分变化。方法 孕鼠血清、肝脏和胎盘样品经过前处理后,以含 10 mmol/L 乙酸铵的水溶液和 5 μ mol/L 亚甲基二膦酸作流动相 A 和含 10 mmol/L 乙酸铵的 90% 乙腈水溶液和 5 μ mol/L 亚甲基二膦酸作流动相 B,流速为 0.35 ml/min,采用梯度洗脱程序通过 Waters ACQUITY UPLC BEH Amide Column, 130 $\text{\AA}$, 1.7 μ m, (2.1 mm $\times$ 150 mm) 色谱柱进行洗脱,质谱检测系统采用电喷雾离子源,负离子多反应监测。结果 三羧酸循环相关 6 种有机酸代谢物的标准曲线相关系数 r 在定量范围内均大于 0.996,所建立的方法准确度为 97.14% ~ 108.26%,低、中、高浓度日间和日内精密度相对标准偏差(RSD)为 1.35% ~ 6.73%,基质效应为 93.29% ~ 107.47%,提取回收率为 94.82% ~ 112.57%。与对照组相比,孕期 DEHP 暴露组小鼠不同组织样本中富马酸、苹果酸、 α -酮戊二酸、顺乌头酸、枸橼酸均降低($P < 0.05$)。结论 本实验建立 HPLC-MS/MS 方法检测孕期 DEHP 暴露小鼠血清、肝脏和胎盘中 6 种三羧酸循环有机酸成分,方法稳定、灵敏度高、选择性强。孕期 DEHP 暴露引起小鼠肝脏、血清、胎盘中三羧酸循环有机酸代谢物水平变化,提示孕期 DEHP 暴露可能会影响线粒体三羧酸循环过程,在孕期 DEHP 暴露所致疾病的诊断和治疗中具有潜在价值。

关键词 三羧酸循环;三羧酸循环代谢物;高效液相色谱-质谱联用系统;孕鼠;方法学;DEHP

中图分类号 R-331

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2025)05-0897-09

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.05.017

2025-02-10 接收

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:82073566);安徽省公共卫生临床中心安徽医科大学第一附属医院北区科研培育基金项目(编号:2023YKJ14、2023YKJ06、2023YKJ11);安徽医科大学青年科学基金项目(编号:2022xkj043);安徽省卫生健康科研项目(编号:AHWJ2023A20294)

作者简介:陶文康,男,硕士研究生;

王建青,女,教授,主任药师,博士生导师,通信作者, E-mail: jianqingwang81@126.com

三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle, TCA)是线粒体能量合成代谢的核心通路,整合了细胞中的众多生物过程包括糖酵解、糖异生、蛋白质转氨作用和脱氨基作用、脂肪酸 β -氧化和脂肪酸合成等有关氨基酸、脂肪酸和葡萄糖的多个合成代谢和分解代谢途径,是将糖、脂肪和蛋白质三大营养物质代谢联系在一起的重要枢纽和最终分解途径^[1]。邻苯二甲酸酯(phthalic acid ester, PAEs)类物质作为增塑剂

in stem cells of head and neck squamous cell carcinoma. ABCG5-positive cells had stronger proliferation ($P < 0.001$), metastasis ($P < 0.01$), and spheroid formation abilities ($P < 0.001$) than negative cells. The expression levels of some stem cell molecules (SOX2, NANOG, SOX9, OCT4, CD44) in ABCG5-positive cells were higher than those in ABCG5-negative cells. The expression of epithelial cell protein E-cadherin was lower in ABCG5-positive cells than that in ABCG5-negative cells, and the expression of interstitial cell proteins N-cadherin, Slug, Snail 1, and Vimentin were higher ($P < 0.01$). Moreover, interfering with ABCG5 expression significantly inhibited tumor cell spheroid formation ($P < 0.001$), as well as the expression of proteins related to cancer stem cells and epithelial-mesenchymal transition. **Conclusion** ABCG5 has a potential biological role in maintaining the function of head and neck squamous cell carcinoma stem cells.

Key words ABCG5; cancer stem cells; HNSCC; cell proliferation; EMT; transfer

Fund program National Natural Science Foundation of China (No. 82173152)

Corresponding author Yao Changyu, E-mail: 15905600277@163.com

被广泛用于塑料制品中,包括食品容器、儿童玩具和家用化学品等,用来增强其柔韧性、延展性和耐久性^[2-3]。其中使用最广泛的 PAEs 是邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯[di-(2-ethylhexyl) phthalate, DEHP],作为一种内分泌干扰物质,因其与塑料制品通过非共价结合,容易从中缓慢释放到环境中来,已被欧盟列为首要污染物^[4-5]。研究^[6-8]指出,DEHP 暴露可通过诱导炎症和氧化应激导致线粒体生物功能障碍、线粒体质量控制异常及相关信号通路的异常调控,阻断三羧酸循环和呼吸链,扰乱肝脏葡萄糖稳态。

本实验利用高效液相色谱串联质谱(high-performance liquid chromatography-mass spectrometry, HPLC-MS/MS)建立检测孕期 DEHP 暴露小鼠血清、肝脏、胎盘生物样本中三羧酸循环中间代谢有机酸成分的方法,以期 DEHP 暴露诱发相关疾病的临床诊断和治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 CD-1 小鼠(SPF 级,8 周龄,雌性小鼠体重 28~32 g,20 只;雄性小鼠体重 38~40 g,15 只)购自北京维通利华实验动物技术有限公司,实验动物生产许可证号【SCXK(京)2021-0006】,实验动物使用许可证号【SYXK(皖)2020-001】。本研究所使用的动物饲养在安徽医科大学卫生毒理学动物房,在适宜环境(温度 22℃±2℃,湿度 50%±5%,12 h 光暗交替)自由饮水摄食活动。本研究所使用的动物及实验均通过安徽医科大学动物伦理委员会的审查并批准(批准编号:20200523)。

1.1.2 仪器 AB Scientific Export Triple Quad™ 三重四极杆串联质谱系统(美国 AB Scientific Export 公司,型号:4500);高效液相色谱仪(美国安捷伦 Agilent 公司,型号:1200);精密电子天平(Mettler Toledo 公司,型号:XS105DU);涡旋混合器(南通海门其林贝尔仪器制造有限公司,型号:vortex-5);高速低温冷冻离心机(德国 sigma Zentrifugen 公司,型号:1-14k);手持式组织研磨器(上海净信实业发展有限公司,型号:MY-10);超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司,型号:SB-800D);超纯水系统(Milli-pore 公司,型号:Synergy)。

1.1.3 药品与试剂 富马酸、苹果酸、琥珀酸、无水枸橼酸、顺乌头酸、 α -酮戊二酸(均 HPLC 级纯度 $\geq 98\%$,货号:B20404、B20937、B20534、B21313、

B27105、B24374)、DL-苹果酸-2,3,3-D₃(HPLC 级纯度 $\geq 99\%$,丰度 $\geq 98\%$,货号:B72877)均购自上海源叶生物科技有限公司;DEHP(货号:D201154-500 ml)、亚甲基二膦酸(货号:64255-1G-F)购自美国西格玛奥德里奇贸易有限公司;玉米油(货号:C116025-500 ml)购自上海阿拉丁生化有限公司。200 目粉末状活性炭(货号:A805338)、色谱级乙酸铵(货号:A801000)购自上海麦克林生化科技股份有限公司,高效液相色谱级乙腈(货号:A998-4)、甲醇(货号:A452-4)均购自美国赛默飞世尔科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 动物处理与分组 CD-1 小鼠在适宜环境(温度 22℃±2℃,湿度 50%±5%,12 h 光暗交替)自由饮水摄食活动 1 周后,于第 8 天晚上 10 点将小鼠按雌雄 2:1 的比例合笼,第 9 天早上 8 点之前检查是否有阴道栓,见栓鼠为交配成功并定为妊娠第 0 天(gestational day 0, GD0),妊娠小鼠随机分配为 Control 组和 DEHP 组,每组 10 只孕鼠,每日上午 9 点灌胃,DEHP 组灌胃含 200 mg/kg DEHP 的玉米油,Control 组灌胃等量玉米油,从 GD0 到 GD16 持续灌胃 17 d,并于 GD16 禁食 6 h 处死后取材,收集母鼠血清、肝脏和胎盘用于后续实验。

1.2.2 色谱条件 色谱柱:Waters ACQUITY UPLC BEH Amide Column, 130 Å, 1.7 μ m, 2.1 mm×150 mm;色谱柱柱温:40℃;流动相:流动相 A 为含 10 mmol/L 乙酸铵和 5 μ mol/L 亚甲基二膦酸的水溶液,流动相 B 为含 10 mmol/L 乙酸铵和 5 μ mol/L 亚甲基二膦酸的 90% 乙腈水溶液;流动相流速:0.35 ml/min;进样量:1 μ l。样品梯度洗脱程序见表 1。

表 1 样品梯度洗脱条件

Tab.1 Sample gradient elution conditions

Time (min)	Flow (ml/min)	A. Conc (%)	B. Conc (%)
0	0.35	5	95
0.5	0.35	5	95
4.0	0.35	35	65
6.0	0.35	40	60
6.5	0.35	5	95
11.0	0.35	5	95

1.2.3 质谱条件 在多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)扫描方式下,采用电喷雾离子源,负离子模式扫描,雾化气为 45 psi;气帘气为 30 psi;碰撞气为 8 psi;辅助气为 45 psi;电喷雾毛细管电压为 4 500 V;离子源温度为 450℃。6 种三羧酸循环中间有机酸及内标质谱条件优化参数见表 2。

表2 6种三羧酸循环有机酸及内标质谱参数优化
Tab.2 Optimization of mass spectrometry parameters for six tricarboxylic acid cycle organic acids and internal standards

Metabolite name	RT (min)	Q1 Mass (m/z)	Q3 Mass (m/z)	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)
Fumarate	5.19	115	71	-20	-10	-11.5	-7
Malate	5.39	133	115	-20	-10	-15.0	-7
		133	71	-20	-10	-19.0	-7
Succinate	5.04	117	73	-20	-10	-16.7	-7
		117	99	-20	-10	-15.6	-7
α -Ketoglutarate	5.07	145	101	-20	-10	-12.0	-7
		145	57	-20	-10	-17.0	-7
Cis-aconitate	5.16	173	129	-20	-10	-12.0	-7
		173	85	-20	-10	-17.0	-7
Citrate	6.28	191	111	-20	-10	-18.0	-7
		191	87	-20	-10	-23.0	-7
DL-malic-2,3,3-D ₃ acid	5.39	136	117	-25	-10	-15.0	-7
		136	73	-21	-10	-20.0	-7

1.2.4 血清前处理 准确吸取 50 μ l 血清,加入 250 μ l 4 $^{\circ}$ C 预冷的甲醇和乙腈溶液(1:1,V/V)和 50 μ l 预冷 200 ng/ml 的 DL-malic-2,3,3-D₃ acid 内标(internal standard,IS)溶液后(预冷提取溶剂可有效减少代谢物降解或者生物转化),立即充分涡旋混匀 1 min,于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中静置 1 h 以提高蛋白沉淀效率,静置结束后在 4 $^{\circ}$ C 低温预冷高速离心机中以 14 725 r/min 条件充分离心 10 min,小心吸取全部上清液转移至 1.5 ml 离心管中,在氮吹仪中氮气挥干;往干燥沉淀中加入 50 μ l 预冷的体积分数为 50% 的甲醇水溶液复溶涡旋至沉淀完全溶解,在低温预冷高速离心机中以 4 $^{\circ}$ C、14 725 r/min 条件离心 10 min,吸取上清液至进样瓶内插管中上机分析。

1.2.5 肝脏和胎盘前处理 取超低温冷冻样本 20 mg,为防止有机溶剂引入匀浆管中的塑料,先加入 200 μ l 4 $^{\circ}$ C 预冷的超纯水,使用手动匀浆器进行组织匀浆,充分匀浆后向匀浆液中加入 800 μ l 4 $^{\circ}$ C 预冷的甲醇和乙腈溶液(1:1,V/V)作为组织提取液和 100 μ l 内标溶液(DL-malic-2,3,3-D₃ acid,200 ng/ml),充分涡旋 1 min 后,冰浴超声 10 min,冰浴超声结束后放入 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中静置 1 h 以提高蛋白沉淀效率,随后放入离心机 4 $^{\circ}$ C、14 725 r/min 离心 15 min;将全部上清液转移至另一 1.5 ml 离心管中,在氮吹仪中氮气挥干后,加入 100 μ l 4 $^{\circ}$ C 预冷的乙腈和水溶液(1:1,V/V)复溶,充分涡旋 1 min 后,冰浴超声 5 min,于 4 $^{\circ}$ C、14 725 r/min 离心 15 min,吸取上清液上机分析。

1.2.6 空白基质的配制 为检测基质效应的影响,

取适量母鼠血清、肝脏和胎盘的匀浆液,分别添加活性炭使活性炭浓度为 0.1 g/ml 制备成混悬液,将混悬液放置在涡旋仪上充分振荡 1 h 后,在 4 $^{\circ}$ C 预冷低温离心机中以 14 725 r/min 离心 15 min 后,小心吸取上清液低温保存。

1.2.7 混合有机酸标准溶液和内标溶液的制备 精密称定 6 种有机酸分析标准品 10 mg,使用体积分数为 50% 的预冷甲醇水溶液进行充分溶解,并在 10 ml 容量瓶中准确定容至 10 ml,得到 1 mg/ml 的各有机酸标准溶液。接着将 6 种有机酸组分混匀后在容量瓶中定容至 10 ml,使得到的混合有机酸标准溶液中各有机酸浓度均为 100 000 ng/ml,最终用空白基质将混合有机酸标准溶液逐级稀释成系列浓度为 10、20、25、50、100、200、250、500、1 000、2 000、2 500、5 000、10 000、20 000 ng/ml 的混合标准溶液,用于建立标准曲线,在 -80 $^{\circ}$ C 超低温环境中保存。

精密称定内标标准品 DL-苹果酸-2,3,3-D₃ 10 mg,用体积分数为 50% 的预冷甲醇水溶液溶解后,在 10 ml 容量瓶中准确定容为浓度 1 mg/ml 的内标标准溶液,-80 $^{\circ}$ C 超低温保存。用体积分数为 50% 的预冷甲醇水溶液逐级稀释成 200 ng/ml 的内标标准溶液,现配现用。

1.2.8 基质效应考察中标准样品的制备 精确配制 3 种标准样品(A、B、C),每种标准样品梯度稀释配制成低中高 3 个不同浓度(20、100、2 000 ng/ml)。标准样品 A 是采用体积分数为 50% 的预冷甲醇水溶液制备的混合有机酸对照品溶液,标准样品 B 是先采用按照 1.2.6 项下配置的空白基质氮气挥干后,用体积分数为 50% 预冷甲醇水复溶涡旋干燥沉淀配制的混合有机酸对照品溶液,标准样品 C 是采用空白基质配制的有机酸混合对照品溶液。将标准样品分别上机进样分析,记录各有机酸峰面积及内标峰面积^[9]。

1.2.9 统计学处理 使用 SPSS 22.0 软件来进行数据的统计分析,所有计量资料实验数据使用平均数 $\pm$ 标准差表示,两组比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 方法学考察

2.1.1 专属性考察 通过 HPLC-MS/MS 系统确定 6 种有机酸混合标准品与内标化合物相关质谱参数信息,确定母离子(Q1)和子离子(Q3)质荷比,优化不同离子对的碰撞电压和碰撞能,6 种有机酸混合

标准品与内标色谱图见图 1,通过混合标准溶液确定各代谢物的保留时间,在 4~7 min 之内有效洗脱出 6 种代谢物,出峰时间主要集中在 5~7 min。

2.1.2 标准曲线与线性范围考察 使用 MultiQuant3.0.3 软件进行回归分析,以有机酸混合标准溶液中每种有机酸标准品峰面积与内标峰面积的比值为纵坐标(y),对应各有机酸标准品浓度为横坐标(x),使用加权最小二乘法,权重($1/\chi^2$)进行回归运算得到的标准曲线见表 3。结果显示 6 种三羧酸循环有机酸的相关性系数 r 均大于 0.996,线性关系良好。

2.1.3 准确度与精密度考察 将有机酸混合标准溶液配制成 20、100、2 000 ng/ml 低、中、高浓度的对照品溶液作为 QC 质控样品(平行配置 5 份),3 d 连

续进样,记录有机酸和苹果酸内标峰面积。精密度和准确度计算结果如表 4 所示,6 种有机酸的准确度为 97.14%~108.26%,日间、日内精密度相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为 1.35%~6.73%,该方法低、中、高质控样品 RSD 均小于 15%,准确度和精确度良好,符合方法学要求。

2.1.4 基质效应与提取回收率考察 根据 1.3.5 项中步骤,分别进样,记录有机酸峰面积及内标峰面积,计算 B 与 A 的比值为各种标准样品浓度的基质效应,C 与 B 的比值为各种标准样品浓度的提取回收率。结果显示标准样品的基质效应准确度在 93.29%~107.47%,基质效应 RSD 在 2.60%~9.12%,提取回收率在 94.82%~112.57%,提取回收率 RSD 在 1.45%~12.23%,计算结果表明均符合要

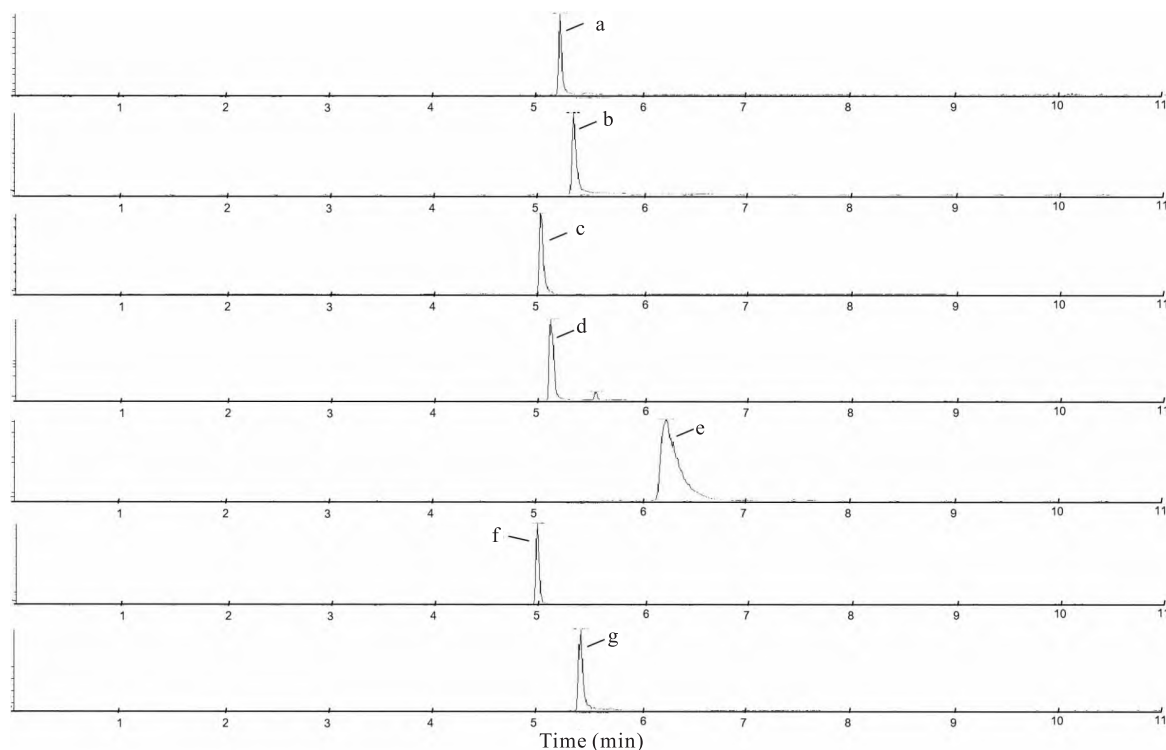


图 1 6 种有机酸和内标 LC-MS/MS 色谱图

Fig.1 Chromatograms of six organic acids and internal standard LC-MS/MS

Organic acid standard mixture chromatogram; a: Fumarate; b: Malate; c: α -Ketoglutarate; d: cis-aconitate; e: Citrate; f: Succinate; g: DL-malic-2, 3,3-D₃ acid (IS).

表 3 6 种有机酸回归方程、相关系数以及线性范围

Tab.3 Linear ranges, regression equations, and correlation coefficients for six organic acids

Metabolite name	Regression equations	r value	Linear range(ng/ml)
Fumarate	$y = 2.22076 \times 10^{-4}x + 0.03510$	0.99919	10–10 000
Malate	$y = 0.00507x + 0.32956$	0.99825	10–20 000
Succinate	$y = 0.00220x + 0.85721$	0.99762	20–20 000
α -ketoglutarate	$y = 0.00143x + 0.52347$	0.99638	10–10 000
Cis-aconitate	$y = 0.01796x + 0.77384$	0.99832	10–2 500
Citrate	$y = 0.03198x + 8.22528$	0.99679	20–10 000

求,各有机酸基质效应和提取回收率的结果见表4。

2.1.5 稳定性考察 精确制备低、中、高3种标准QC质控浓度样品,各质控浓度样品平行准确配置5份,分别进行在液相自动进样器(4℃)放置24 h、室温条件放置6 h、-80℃条件反复冻融3次及-80

℃环境中长期放置冻存90 d后的稳定性考察,结果见表5,均符合方法学要求,保持稳定。

2.2 孕期DEHP暴露母鼠血清、母鼠肝脏和胎盘的有机酸含量 通过建立的HPLC-MS/MS检测三羧酸循环有机酸的方法测定18只孕鼠血清、肝脏和

表4 血清不同浓度样品中各三羧酸循环有机酸的精密度、准确度、基质效应以及提取回收率

Tab.4 Precision, accuracy, matrix effects, and extraction recovery rates of each TCA cycle organic acid in serum samples at different concentrations

Metabolite name	Concentration (ng/ml)	Accuracy (%)	RSD of precision(%)		Matrix effect(%)		Extraction recovery(%)	
			Intra-day	Inter-day	Mean	RSD	Mean	RSD
Fumarate	20	104.63	4.96	5.10	97.91	3.55	96.13	5.50
	100	99.13	2.37	4.11	104.02	4.73	98.50	12.23
	2 000	99.94	2.61	2.37	93.29	4.81	101.24	3.40
Malate	20	105.15	3.48	3.77	103.02	6.45	94.82	4.81
	100	100.93	4.30	5.19	100.76	7.60	109.72	8.77
	2 000	102.22	2.23	2.27	95.59	3.05	100.25	3.54
Succinate	20	104.15	4.64	4.39	107.47	2.79	95.22	5.62
	100	99.13	4.45	4.98	94.64	5.99	99.00	10.10
	2 000	97.81	2.26	2.54	96.17	8.62	96.13	5.26
α -Ketoglutarate	20	101.25	4.11	5.52	105.55	8.98	102.52	7.41
	100	102.62	3.52	4.60	99.90	5.23	106.86	4.44
	2 000	102.62	1.53	2.22	99.60	2.60	100.41	1.97
Cis-aconitic	20	102.18	2.38	4.10	99.34	9.12	100.50	9.17
	100	108.26	3.21	3.92	101.88	5.21	98.72	4.15
	2 000	97.14	2.40	2.16	97.39	3.90	102.30	3.73
Citrate	20	102.30	2.67	4.25	99.08	7.08	96.57	6.00
	100	106.70	4.96	6.73	98.12	8.97	112.57	7.92
	2 000	102.64	1.35	2.64	96.59	3.29	103.38	1.45

表5 低、中、高3种浓度质控样品中各三羧酸循环有机酸的稳定性

Tab.5 Stability of TCA cycle organic acids in low-, medium-, and high-concentration quality control samples

Metabolite name	Concentration (ng/ml)	Stability(%)			
		Autosampler (4℃) for 24 h	Room temperature for 6 h	-80℃ repeated freeze-thaw 3 times	-80℃ for 90 d
Fumarate	20	102.37	97.36	101.94	98.82
	100	100.27	96.17	96.84	96.98
	2 000	101.40	97.44	99.73	100.81
Malate	20	102.97	97.73	101.86	104.05
	100	104.22	101.79	100.26	99.18
	2 000	103.46	101.64	99.65	99.59
Succinate	20	100.14	97.07	100.65	98.95
	100	101.36	96.25	98.09	98.47
	2 000	101.69	99.30	100.34	100.45
α -Ketoglutarate	20	104.53	98.74	99.97	101.47
	100	99.54	98.49	97.87	100.01
	2 000	101.90	97.88	99.83	99.03
Cis-aconitic	20	101.22	96.59	103.46	97.81
	100	100.34	96.04	98.84	96.80
	2 000	98.40	96.97	98.62	98.04
Citrate	20	103.02	95.64	103.22	101.75
	100	100.88	99.41	98.31	100.79
	2 000	101.44	100.56	99.95	99.70

胎盘中的有机酸成分,探究 DEHP 孕期暴露对母鼠血清、肝脏、胎盘三羧酸循环主要代谢有机酸水平的影响。结果如图 2,与对照组相比,DEHP 组孕鼠肝脏中有机酸成分富马酸、苹果酸、 α -酮戊二酸、枸橼酸水平均降低 ($t = 7.372$ 、 6.477 、 3.241 、 3.593 , 均

$P < 0.01$),此外,血清和胎盘中有机酸成分富马酸 ($t = 3.769$ 、 2.789 , $P < 0.05$),苹果酸 ($t = 6.257$ 、 5.216 , $P < 0.001$)、 α -酮戊二酸 ($t = 2.518$ 、 4.463 , $P < 0.05$) 枸橼酸 ($t = 3.914$ 、 3.661 , $P < 0.01$) 顺乌头酸 ($t = 2.810$ 、 2.241 , $P < 0.01$) 水平降低。

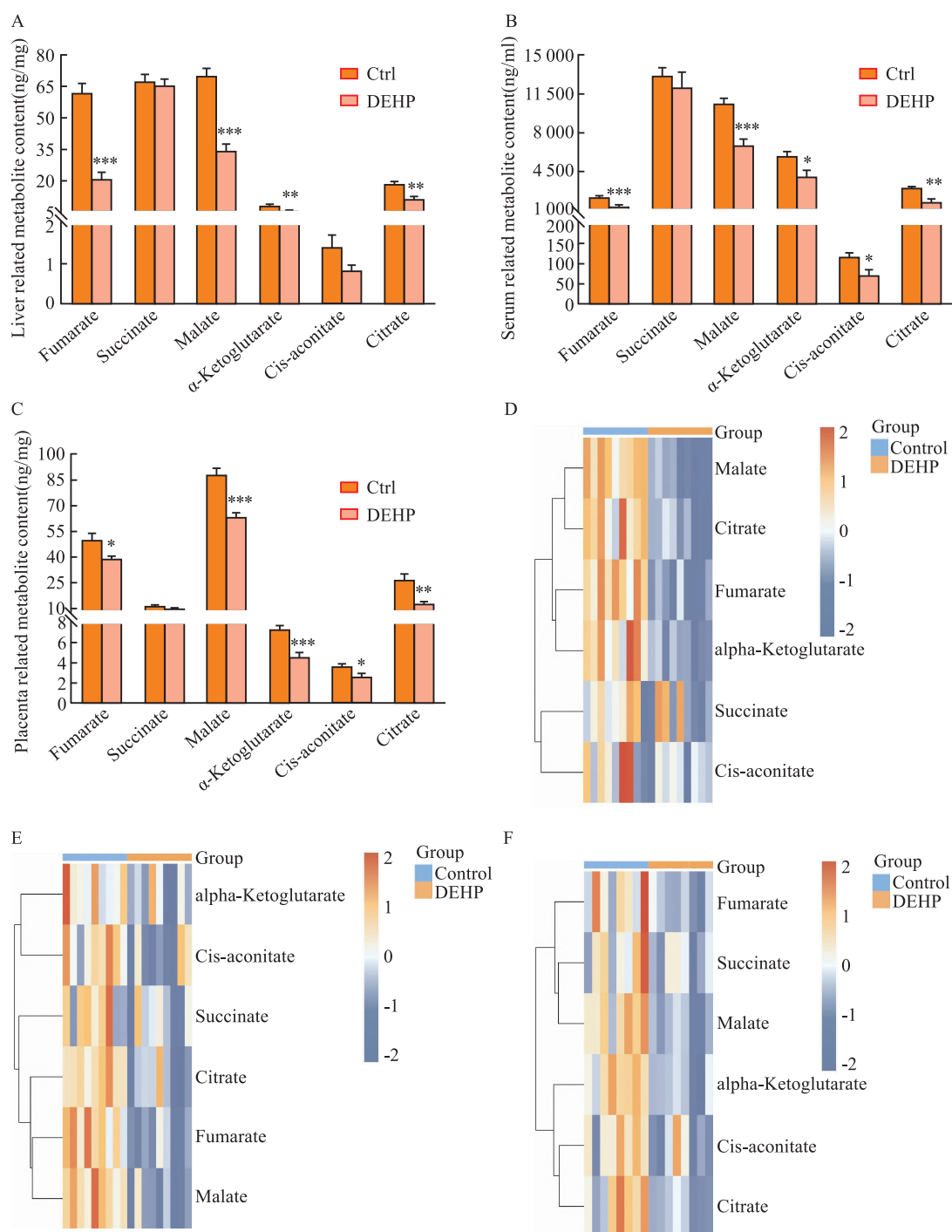


图 2 孕期 DEHP 暴露对孕鼠肝脏、血清和胎盘有机酸水平的影响

Fig.2 The effect of DEHP exposure during pregnancy on liver, serum and placental organic acid levels in pregnant mice

A - C: Liver, serum and placenta organic acid levels; D - F: Clustered heatmaps of organic acid levels in liver, serum, and placenta; * $P < 0.05$,

** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs Ctrl group.

3 讨论

线粒体是细胞内高度动态的细胞器,作为细胞内多种生化过程相互作用的场所,线粒体是细胞内氧化还原状态、能量生产与代谢、钙离子水平、细胞程序性死亡的主要调节者,是有关细胞稳态众多生物过程的重要细胞器,包括能量代谢、脂肪酸代谢、氧化磷酸化、细胞凋亡等。线粒体作为细胞能量、免疫反应和信号转导等不同过程的中心枢纽,其功能的改变不仅会影响细胞代谢,而且严重可能影响到全身代谢、健康甚至寿命。线粒体对细胞内关键的细胞生理生化过程也起重要作用,如细胞自噬、凋亡以及炎症等^[10]。研究^[11]表明,线粒体功能障碍可能参与人类众多疾病的发生与发展,主要包括神经退行性疾病、心血管疾病、代谢症候群和癌症等。在胆汁酸代谢异常如胆汁淤积性肝病中,线粒体障碍介导的细胞凋亡、线粒体蛋白和线粒体生物合成的减少以及线粒体氧化应激等在胆汁淤积性肝病的发展中起着重要的作用^[12]。

DEHP作为一种内分泌干扰物,越来越多的流行病学证据表明,PEAs类物质暴露与肝损伤的高风险之间存在关联^[13-14]。DEHP可通过食品、饮水、医疗、皮肤等途径接触进入人体,长期暴露可引起生殖毒性、肝脏毒性、肾毒性、神经毒性等^[15]。本课题组在前期的研究^[16]发现尿中PEAs的代谢物与妊娠期肝内胆汁淤积症(intrahepatic cholestasis of pregnancy, ICP)的发生存在关联。根据美国环境保护署的参考剂量(reference dose, RFD)和欧盟的每日耐受量(tolerable daily intake, TDI)的定义,一般成年人每天长期摄入DEHP的剂量分别为20 $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 和37 $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ ^[17];还有报道^[18]表明,在正常情况下,人体(体质量以60 kg为基准)的DEHP日摄入量约为2.7 $\text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 。人类通常长期暴露于低剂量的DEHP,而为了更好地模拟孕期DEHP暴露对人类的影响,本研究参考课题组前期孕期DEHP暴露稳定致ICP的剂量200 mg/kg ^[19]。有报道指出DEHP对动物肝脏具有毒性,可导致脂质代谢紊乱、胆汁淤积、肝损伤等^[20]。既往的研究^[6, 20]指出DEHP可影响肝脏线粒体三羧酸循环过程、导致小鼠肝脏线粒体质量控制异常以及线粒体功能障碍。本研究基于HPLC-MS/MS技术探究TCA中间代谢有机酸在孕期DEHP暴露小鼠肝脏、血清、胎盘中的变化,所建立的方法具有较好的线性、准确度和精密度。TCA是线粒体产生能量最主要的生物

过程之一,在氧化代谢和正常的生理功能中发挥主要作用,本研究的检测结果表明,孕期DEHP暴露会导致母鼠肝脏、血清、胎盘部分有机酸水平下降,其中富马酸、苹果酸水平下降较为显著。TCA中间代谢物和衍生物被证明具有一种非代谢的信号传递功能,如调节先天免疫和适应性免疫细胞的激活,以及促炎介质或抗炎介质的生成。如 α -酮戊二酸可直接或间接调控炎症及免疫相关信号通路,通过抑制NF- κ B所介导的炎症来抑制促炎反应和促炎细胞因子的生成^[21-22]。

本课题组在既往的研究^[18]中发现孕期DEHP暴露能显著影响母鼠体内胆汁酸的合成、分泌、转运、代谢等过程,导致胆汁酸水平升高及胎儿的不良预后。同时有研究^[23]表明,线粒体功能障碍是过量胆汁酸诱导胎盘滋养层损伤的主要生物学过程,胆汁酸在胎盘中的有害堆积引起的线粒体功能障碍以及胎盘滋养层细胞凋亡很可能在ICP的发病机制中起关键作用。而在本研究中建立HPLC-MS/MS检测TCA有机酸水平,结果显示孕期DEHP暴露导致肝脏、血清、胎盘TCA部分重要有机酸水平减少,其结果可能为以线粒体为靶点孕期相关疾病的临床诊断和治疗提供新的思路和方法。

参考文献

- [1] Owen O E, Kalhan S C, Hanson R W. The key role of anaplerosis and cataplerosis for citric acid cycle function[J]. J Biol Chem, 2002, 277(34): 30409-12. doi: 10.1074/jbc.R200006200.
- [2] Wang Y, Zhu H, Kannan K. A review of biomonitoring of phthalate exposures[J]. Toxics, 2019, 7(2): 21. doi: 10.3390/toxics7020021.
- [3] Gao M, Bai L, Xiao L, et al. Micro (nano)plastics and phthalate esters drive endophytic bacteria alteration and inhibit wheat root growth[J]. Sci Total Environ, 2024, 906: 167734. doi: 10.1016/j.scitotenv.2023.167734.
- [4] Chen Y, Wang Y, Xu Y, et al. Molecular insights into the catalytic mechanism of plasticizer degradation by a monoalkyl phthalate hydrolase[J]. Commun Chem, 2023, 6(1): 45. doi: 10.1038/s42004-023-00846-0.
- [5] Su H Y, Lai C S, Lee K H, et al. Prenatal exposure to low-dose di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) induces potentially hepatic lipid accumulation and fibrotic changes in rat offspring[J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2024, 269: 115776. doi: 10.1016/j.ecoenv.2023.115776.
- [6] Li G, Zhao C Y, Wu Q, et al. Integrated metabolomics and transcriptomics reveal di-(2-ethylhexyl) phthalate-induced mitochondrial dysfunction and glucose metabolism disorder through oxidative stress in rat liver[J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2021, 228: 112988. doi: 10.1016/j.ecoenv.2021.112988.

- [7] Xu P, Su Y N, Ling C, et al. Mitochondrial dysfunction mediated by thioredoxin-interacting protein: a crucial determinant in di-(2-ethylhexyl) phthalate-induced liver failure[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2024, 272: 116103. doi: 10.1016/j.ecoenv.2024.116103.
- [8] Zhao Y, Li H X, Luo Y, et al. Lycopene mitigates DEHP-induced hepatic mitochondrial quality control disorder *via* regulating SIRT1/PINK1/mitophagy axis and mitochondrial unfolded protein response[J]. *Environ Pollut*, 2022, 292 (Pt B): 118390. doi: 10.1016/j.envpol.2021.118390.
- [9] 赵凡, 张伦, 叶露, 等. LC-MS/MS同时测定22种胆汁酸在孕鼠血清、肝脏、羊水和胎盘中的应用[J]. *安徽医科大学学报*, 2023, 58(8): 1287–92, 1299. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.08.007.
- [9] Zhao F, Zhang L, Ye L, et al. LC-MS/MS simultaneous determination of 22 bile acids in serum, liver, amniotic fluid and placenta of pregnant mice[J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2023, 58(8): 1287–92, 1299. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.08.007.
- [10] Abate M, Festa A, Falco M, et al. Mitochondria as playmakers of apoptosis, autophagy and senescence[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2020, 98: 139–53. doi: 10.1016/j.semdb.2019.05.022.
- [11] Zong Y, Li H, Liao P, et al. Mitochondrial dysfunction: mechanisms and advances in therapy[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2024, 9(1): 124. doi: 10.1038/s41392-024-01839-8.
- [12] Arduini A, Serviddio G, Tormos A M, et al. Mitochondrial dysfunction in cholestatic liver diseases[J]. *Front Biosci (Elite Ed)*, 2012, 4(6): 2233–52. doi: 10.2741/539.
- [13] Yu L, Yang M, Cheng M, et al. Associations between urinary phthalate metabolite concentrations and markers of liver injury in the US adult population[J]. *Environ Int*, 2021, 155: 106608. doi: 10.1016/j.envint.2021.106608.
- [14] Wang Y, Yin L, Du Y Y, et al. Associations between exposure to phthalates and liver function among women undergoing assisted reproductive technology[J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2024, 108: 104463. doi: 10.1016/j.etap.2024.104463.
- [15] Xu B, He T, Yang H, et al. Activation of the p62-Keap1-Nrf2 pathway protects against oxidative stress and excessive autophagy in ovarian granulosa cells to attenuate DEHP-induced ovarian impairment in mice[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2023, 265: 115534. doi: 10.1016/j.ecoenv.2023.115534.
- [16] Wang J Q, Gao H, Sheng J, et al. Urinary concentrations of phthalate metabolites during gestation and intrahepatic cholestasis of pregnancy: a population-based birth cohort study[J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2020, 27(11): 11714–23. doi: 10.1007/s11356-020-07675-x.
- [17] Fan Y, Qin Y, Chen M, et al. Prenatal low-dose DEHP exposure induces metabolic adaptation and obesity: role of hepatic thiamine metabolism[J]. *J Hazard Mater*, 2020, 385: 121534. doi: 10.1016/j.jhazmat.2019.121534.
- [18] Chen M L, Chen J S, Tang C L, et al. The internal exposure of Taiwanese to phthalate—an evidence of intensive use of plastic materials[J]. *Environ Int*, 2008, 34(1): 79–85. doi: 10.1016/j.envint.2007.07.004.
- [19] Zhao F, Zhang L, Qu M, et al. Obeticholic acid alleviates intrauterine growth restriction induced by di-ethyl-hexyl phthalate in pregnant female mice by improving bile acid disorder[J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2023, 30(51): 110956–69. doi: 10.1007/s11356-023-30149-9.
- [20] Zhao Y, Ma D X, Wang H G, et al. Lycopene prevents DEHP-induced liver lipid metabolism disorder by inhibiting the HIF-1 α -induced PPAR α /PPAR γ /FXR/LXR system[J]. *J Agric Food Chem*, 2020, 68(41): 11468–79. doi: 10.1021/acs.jafc.0c05077.
- [21] Asadi Shahmirzadi A, Edgar D, Liao C Y, et al. Alpha-ketoglutarate, an endogenous metabolite, extends lifespan and compresses morbidity in aging mice[J]. *Cell Metab*, 2020, 32(3): 447–56.e6. doi: 10.1016/j.cmet.2020.08.004.
- [22] Liu Z, Gan L, Zhang T, et al. Melatonin alleviates adipose inflammation through elevating α -ketoglutarate and diverting adipose-derived exosomes to macrophages in mice[J]. *J Pineal Res*, 2018, 64(1): 12455. doi: 10.1111/jpi.12455.
- [23] Yang X, Zhou Y, Li H, et al. Autophagic flux inhibition, apoptosis, and mitochondrial dysfunction in bile acids-induced impairment of human placental trophoblast[J]. *J Cell Physiol*, 2022, 237(7): 3080–94. doi: 10.1002/jcp.30774.

Application of HPLC-MS/MS in the analysis of six tricarboxylic acid cycle metabolites in a mouse model of prenatal DEHP exposure

Tao Wenkang^{1,2,3}, Zhang Lun^{2,3}, Huang Qianqian^{2,3}, Yu Yun^{2,3}, Jiang Yue^{1,2,3},

Hou Mengzhen^{1,2,3}, Ling Xutao^{1,2,3}, Xie Fang^{1,2,3}, Wang Jianqing^{1,2,3}

(¹*School of Pharmaceutical Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032;*

²*Dept of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University North District, Hefei 230012;*

³*Anhui Public Health Clinical Center, Hefei 230012)*

Abstract Objective To establish a method for measuring major organic acids in the tricarboxylic acid cycle using

a high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) system, and to investigate the changes in six tricarboxylic acid cycle organic acids (fumaric acid, malic acid, succinic acid, α -ketoglutaric acid, cis-aconitic acid, and citric acid) in the serum, liver, and placenta of mice exposed to di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) during pregnancy. **Methods** The serum, liver and placental samples from pregnant mice were processed and eluted through a Waters ACQUITY UPLC BEH Amide Column (130 Å, 1.7 μ m, 2.1 mm $\times$ 150 mm) using a gradient elution program. Mobile phase A comprised an aqueous solution of 10 mmol/L ammonium acetate and 5 μ mol/L methanephosphonic acid, while mobile phase B consisted of a 90% acetonitrile aqueous solution containing 10 mmol/L ammonium acetate and 5 μ mol/L methanephosphonic acid, with a flow rate maintained at 0.35 ml/min. The mass spectrometry detection system utilized an electrospray ionization technique with negative ion mode for multiple reaction monitoring. **Results** The correlation coefficients of the standard curves for the six tricarboxylic acid cycle organic acid metabolites were all above 0.996 within the quantitative range. The method's accuracy ranged from 97.14% to 108.26%, with inter-day and intra-day precision relative standard deviation between 1.35% and 6.73%. The matrix effect was between 93.29% and 107.47%, and the extraction recovery rate ranged from 94.82% to 112.57%. Analysis of six tricarboxylic acid cycle organic acids in the liver, serum, and placenta of DEHP-exposed mice during pregnancy showed significant reductions in fumaric acid, malic acid, α -ketoglutaric acid, cis-aconitic acid, and citric acid compared to the control group ($P < 0.05$). **Conclusion** The HPLC-MS/MS method established in this study for detecting six tricarboxylic acid cycle organic acids in the serum, liver, and placenta of DEHP-exposed pregnant mice is stable, highly sensitive and selective. Prenatal DEHP exposure induced alterations in the levels of tricarboxylic acid (TCA) cycle organic acid metabolites in the liver, serum, and placenta of mice, suggesting that DEHP exposure during pregnancy may interfere with mitochondrial TCA cycle processes. These findings indicate potential value in the diagnosis and treatment of diseases associated with prenatal DEHP exposure.

Key words tricarboxylic acid cycle; tricarboxylic acid cycle metabolites; high performance liquid chromatography-mass spectrometry system; pregnant mice; methodology; DEHP

Fund programs National Natural Science Foundation of China (No. 82073566); Scientific Research and Cultivation Foundation of The Anhui Public Health Clinical Center, The First Affiliated Hospital (North District) of Anhui Medical University (Nos. 2023YKJ14, 2023YKJ06, 2023YKJ11); Scientific Research Project of Anhui Medical University (No. 2022xkj043); Health Research Project of Anhui Province (No. AHWJ2023A20294)

Corresponding author Wang Jianqing, E-mail: jianqingwang81@126.com