

DOI: 10.12264/JFSC2020-0021

## 基于代谢组学技术的无机砷对三疣梭子蟹鳃组织的毒性作用机制研究

刘鸽<sup>1,2</sup>, 李焕军<sup>2</sup>, 张秀珍<sup>2</sup>, 崔艳梅<sup>2</sup>, 姜芳<sup>2</sup>, 何金霞<sup>2</sup>, 曹伟<sup>2</sup>, 王明磊<sup>2</sup>,  
田秀慧<sup>2</sup>, 徐英江<sup>2</sup>

1. 上海海洋大学食品学院, 上海 201306;

2. 山东省海洋资源与环境研究院, 山东省海洋生态修复重点实验室, 山东 烟台 264006

**摘要:** 通过非靶向代谢组学方法对比分析暴露于 0.3 mg/L 三价砷( $\text{As}^{3+}$ )、0.3 mg/L 五价砷( $\text{As}^{5+}$ )环境中 96 h 的雌性成体三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)代谢物组成及含量的变化, 探究  $\text{As}^{3+}$ 、 $\text{As}^{5+}$  对三疣梭子蟹鳃组织毒性相关分子机制。结果发现, 经 0.3 mg/L  $\text{As}^{3+}$  暴露共获得 100 个差异代谢产物, 主要富集于 ABC 转运体、花生四烯酸代谢、蛋白质消化吸收、氨基酸代谢及氨酰基-tRNA 的生物合成等代谢通路; 经 0.3 mg/L  $\text{As}^{5+}$  暴露共获得 59 个差异代谢产物, 主要富集于 ABC 转运体、氨基酸代谢、氨酰基-tRNA 的生物合成、谷胱甘肽代谢等代谢通路。根据筛选出的差异代谢物的生理功能及其涉及的代谢通路分析, 探究  $\text{As}^{3+}$ 、 $\text{As}^{5+}$  对三疣梭子蟹鳃组织毒性作用的分子机制及三疣梭子蟹的响应调控机制, 为后期深入研究致毒机制提供理论依据。

**关键词:** 三疣梭子蟹; 三价砷( $\text{As}^{3+}$ ); 五价砷( $\text{As}^{5+}$ ); 代谢组学; 组织毒性; 代谢通路

**中图分类号:** S941

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1005-8737-(2021)05-0602-12

砷(arsenic, As)是一种常见的有毒类金属, 是危害最严重的环境污染物之一, 其在自然界中以有机化合物和无机化合物的形式广泛存在<sup>[1]</sup>。近年来金属冶炼、工农业污染等人类活动加剧了砷在环境中的累积, 导致砷污染日益严重。研究证实, 我国四大海域均有不同程度的砷污染, 尤其是海湾及河流入海口<sup>[2-5]</sup>, 海水中砷的浓度日渐升高<sup>[6]</sup>, 海洋砷污染已然成为我国重要的潜在卫生安全问题。海水中溶解态的砷主要以无机态五价的砷酸盐和甲基砷的形式存在<sup>[7]</sup>, 砷的毒性与其存在形态关系密切, 无机态的亚砷酸盐和砷酸盐毒性较大, 是世界公认的致癌物质<sup>[8]</sup>。As 被海洋生物吸收后易在体内蓄积并沿着食物链传递逐级放大, 具有严重的危害性<sup>[9]</sup>。无机砷暴露导致细胞凋亡相关的蛋白的表达, 进而引发细胞凋

亡<sup>[10-11]</sup>。Wu 等<sup>[12]</sup>通过蛋白组学实验发现  $\text{As}^{5+}$  暴露使得菲律宾蛤仔组织中细胞凋亡相关蛋白质含量显著下调。Datta 等<sup>[13]</sup>发现斑马鱼暴露于 37.5  $\mu\text{g/L}$  的  $\text{As}^{3+}$  环境中 30 d 后出现细胞凋亡现象。其次, 无机砷在生物体内发生甲基化代谢过程中与 DNA 甲基化竞争甲基供体, 打乱机体基因的稳定性, 诱导基因毒性的发生<sup>[14]</sup>。此外, 无机砷在海洋生物体内的代谢过程可以干扰组织中氧化应激反应, 引起体内膜脂、蛋白质、核酸等生物大分子产生氧化损伤, 导致脂质过氧化、酶蛋白失活、DNA 断裂等<sup>[15-16]</sup>。

三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)是中国重要海水养殖蟹类之一<sup>[17-18]</sup>, 经常被用作实验对象阐明海洋污染物的毒性效应, 如镉(Cd)、三苯氧胺和土霉素<sup>[19-21]</sup>。目前有关海洋生物中砷的研究

**收稿日期:** 2020-11-10; **修订日期:** 2021-01-28.

**基金项目:** 国家重点研发计划项目(2017YFC1600702); 自然资源部重点实验室开放基金项目(MBSMAT-201904); 2019 年山东省技术创新引导计划项目; 山东省现代农业产业技术体系藻类创新团队加工与质量安全控制岗(SDAIT-26-05); 烟台市科技创新发展计划项目(2020YT06000242).

**作者简介:** 刘鸽(1995-), 女, 硕士, 研究方向为水产品质量与安全. E-mail: liuge4028@163.com

**通信作者:** 徐英江, 副研究员, 研究方向为水产品质量与安全. E-mail: xuyingjiang@yeah.net

主要集中在各海域中不同海洋生物砷的浓度、赋存形态及蓄积特异性的调查<sup>[22-25]</sup>, 有少量研究通过室内砷暴露模拟实验探究海洋生物对环境和食物中砷的蓄积、组织分布和迁移转化机制<sup>[26-27]</sup>, 砷毒性作用机制及生物体的响应调控机制仍处于相对空白阶段。而当机体累积浓度达到元素的毒性阈值时就会诱导产生相应的毒性效应<sup>[28]</sup>, 所以有必要对三疣梭子蟹中砷诱导的毒性机制及生物效应进行表征。

目前有关于砷的毒性机制研究主要集中在甲基化代谢、氧化应激、细胞毒性等方面<sup>[29-31]</sup>。有研究表明长期慢性砷暴露可引起机体谷胱甘肽(glutathione, GSH)水平下降, 但这种应激性反应的机制尚未完全阐明<sup>[32]</sup>。代谢组学作为继基因组学和蛋白质组学后发展起来的一门学科, 通过研究生物体内源性代谢物的整体变化, 能够实时无损地监测机体的生理状态, 动态地评价污染物的毒性效应, 从而更好地解释重金属的毒性机制及生物体的响应胁迫机制, 这也是国内外海洋生态环境领域研究的热点<sup>[33]</sup>。

鉴于此, 本研究以三疣梭子蟹为模式生物, 基于超高效液相色谱(ultra performance liquid chromatography, UPLC)飞行时间质谱的非靶向代谢组学方法, 结合多变量数据统计分析方法, 探讨 0.3 mg/L  $\text{As}^{3+}$ 、 $\text{As}^{5+}$  暴露 96 h 后三疣梭子蟹鳃组织中内源性代谢物的变化及可能的通路分析, 从代谢物水平阐述无机砷对三疣梭子蟹的毒性作用分子机制及三疣梭子蟹的响应调控机制, 为环境污染的监测、健康损害及其综合治理提供理论依据和技术支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物、材料与试剂

成年雌性三疣梭子蟹, 平均体长 17 cm, 体重 (200±30) g, 活力旺盛无外伤; 购于莱州市人工养殖厂。暂养于实验室聚乙烯水族箱内 3 d, 水温 13~15 °C, 每 24 h 换水 1 次, 换水量为 1/3~1/2, 连续充氧以保证水体中氧气充足, 暂养及后续暴露实验中均禁食。

砷酸钠( $\text{Na}_3\text{AsO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ), 亚砷酸钠( $\text{NaAsO}_2$ ) 分析纯; LCMS Methanol, LCMS Acetonitrile,

LCMS Formic Acid, LCMS WATER 购于 Fisher Chemical; 所有分离用有机溶剂均为国产分析纯。

### 1.2 仪器与设备

高通量组织破碎仪[型号 FastPrep-24TM5G, MPBiomedicals(Shanghai)公司]; 超高效液相色谱仪(型号 ACQUITY UPLC, 美国 Waters 公司); 质谱仪(型号 QE, 美国 thermo 公司); 超高效液相色谱串联傅里叶变换质谱 UHPLC-Q Exactive 系统(美国 thermo 公司)。

### 1.3 方法

**1.3.1 动物实验及模型建立** 实验采用第二类海水水质即水产养殖区域要求的总砷限量的 10 倍进行半静态染毒实验。将  $\text{As}^{3+}$ 、 $\text{As}^{5+}$  配制成浓度为 2 mg/mL 的储备液, 置于 4 °C 冰箱中保存。用海水将上述储备液稀释成 0.3 mg/L 染毒溶液。每个实验组设置 8 个平行, 每个平行组投放 8 只蟹, 同时用正常海水设置对照组, 将暂养结束的三疣梭子蟹随机投入。水温 13~15 °C, 每 24 h 更换一次染毒溶液以保证实验浓度恒定不变, 实验持续 96 h。

**1.3.2 样品采集** 暴露实验结束后, 随机抽取每个平行组的 8 只三疣梭子蟹的鳃组织合为一个样品, 实验组和对照组分别设置 8 个平行样本, 置于冻存管中, 液氮中速冻后转移到-80 °C 冰箱中冻存待检。取样全程于冰上进行。

**1.3.3 代谢物提取** 精密称取 50 mg 样品同一颗直径 6 mm 的钢珠一同加入 2 mL 加厚离心管中, 用 400  $\mu\text{L}$  提取液(甲醇: 水=4: 1)进行提取, 同时加入 20  $\mu\text{L}$  内标(0.3 mg/mL L-2-氯-苯丙氨酸, 乙腈配制), 在-10 °C 下用研磨仪研磨 6 min 成匀浆。研磨后低温超声提取 30 min, 提取温度 5 °C; -20 °C 静置 30 min; 4 °C 条件下高速离心 15 min, 移取上清液上机分析。

**1.3.4 LC-MS 检测** 色谱条件: 色谱柱为 BEH  $\text{C}_{18}$  柱(100 mm×2.1 mm i.d., 1.7  $\mu\text{m}$ ; Waters, Milford, USA); 流动相 A 为水(含 0.1% 甲酸), 流动相 B 为乙腈/异丙醇(1/1)(含 0.1% 甲酸); 流速为 0.40 mL/min, 进样量为 2  $\mu\text{L}$ , 柱温为 40 °C。对代谢物采用梯度洗脱: 0.0~3.0 min, 流动相 A 95%, 流动相 B 5%; 3.0~9.0 min, 流动相 A 80%, 流动相 B 20%; 9.0~13.0 min, 流动相 A 5%, 流动相 B 95%; 13.0~

13.1 min, 流动相 A 95%, 流动相 B 5%; 13.1~16.0 min, 流动相 A 95%, 流动相 B 5%。

质谱条件: 样品质谱信号采集分别采用正负离子扫描模式, 离子源加热温度 400 °C; 鞘气体积流量 40 arb; 辅助加热气体体积 10 arb; 正离子模式离子喷雾电压 3.5 kV, 负离子模式离子喷雾电压 2.8 kV; 扫描范围 M/Z: 70~1050。

#### 1.4 数据处理

利用软件 Progenesis QI (Waters Corporation, Milford, USA) 进行基线校正、峰识别、保留时间校正、峰对齐等处理, 获得一个保留时间、质荷比和峰面积的数据矩阵。将数据进行预处理, 整理形成二维数据矩阵形式, 通过 ropls (R packages) 进行主成分分析(principal components analysis, PCA) 和正交偏最小二乘法判别分析(orthogonal partial least squares discriminate analysis, OPLS-DA), 根据 OPLS-DA 模型所得的 VIP 值和 *T* 检验所得的 *P* 值( $P < 0.05$ ) 为标准, 找出差异性代谢物; 在 HMDB、KEGG 等数据库对此代谢物进行结构鉴

定, 找到对应的代谢通路, 探讨潜在生物标志物的生物学意义, 分析  $\text{As}^{3+}$ 、 $\text{As}^{5+}$  对三疣梭子蟹鳃组织毒性作用分子机制及三疣梭子蟹的响应调控机制。

## 2 结果与分析

### 2.1 PCA 分析

在正离子模式及负离子模式下对三疣梭子蟹的鳃组织样本进行 PCA 分析。从图 1a、图 1b 可以看出, 对照组与  $\text{As}^{3+}$  暴露样品点之间的分布有所分离, 说明两组样品之间的代谢物存在一定的差异性, 但在空间上仍有少部分重叠未实现完全分离; 从图 1c、图 1d 可以看出对照组与  $\text{As}^{5+}$  暴露组也具有一定的分离度, 表明两组间代谢物存在差异, 但重叠部分较  $\text{As}^{3+}$  大。

### 2.2 OPLS-DA 分析

为了更充分地分析筛选样本间的差异代谢物, 进一步在正离子模式及负离子模式下对三疣梭子蟹鳃组织样本采用 OPLS-DA 数据分析, 结果见

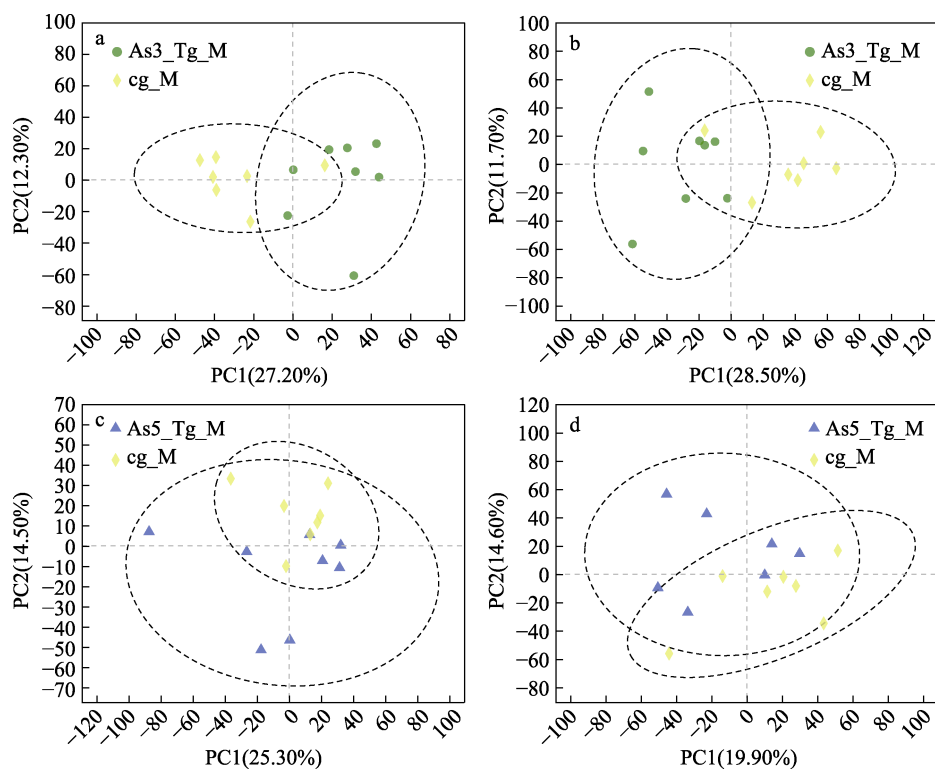


图 1  $\text{As}^{3+}$ 、 $\text{As}^{5+}$  在三疣梭子蟹实验组与对照组对比的 PCA 得分图

a, c. 基于正离子模式; b, d. 基于负离子模式。

Fig. 1 PCA score chart of  $\text{As}^{3+}$  and  $\text{As}^{5+}$  in the exposure group and control group of *Portunus trituberculatus*  
a and c are based on positive ion modes; b and d are based on negative ion modes.

图 2。As<sup>3+</sup>、As<sup>5+</sup> 实验组和对照组的样品点分别聚成一簇，分布在不同位置且明显不相交，实现不同样品组间的完全分离，表明 As<sup>3+</sup>、As<sup>5+</sup>暴露后的三疣梭子蟹鳃组织和对照组中的代谢物种类和(或)含量存在明显差异。所有样本均处于 95% 分组置信圈内。OPLS-DA 模型质量参数，a: R<sup>2</sup>Y=

0.994, Q<sup>2</sup>=0.628; b: R<sup>2</sup>Y=0.998, Q<sup>2</sup>=0.781; c: R<sup>2</sup>Y=0.98, Q<sup>2</sup>=0.588; d: R<sup>2</sup>Y=0.977, Q<sup>2</sup>=0.607; R<sup>2</sup> 反映模型的拟合程度, Q<sup>2</sup> 反映模型的预测能力, 两者均大于 0.5, 说明 OPLS-DA 状态下模型对具有较高的自变量拟合能力和较好的预测能力, 可以用于后续的组间差异成分的寻找与分析。

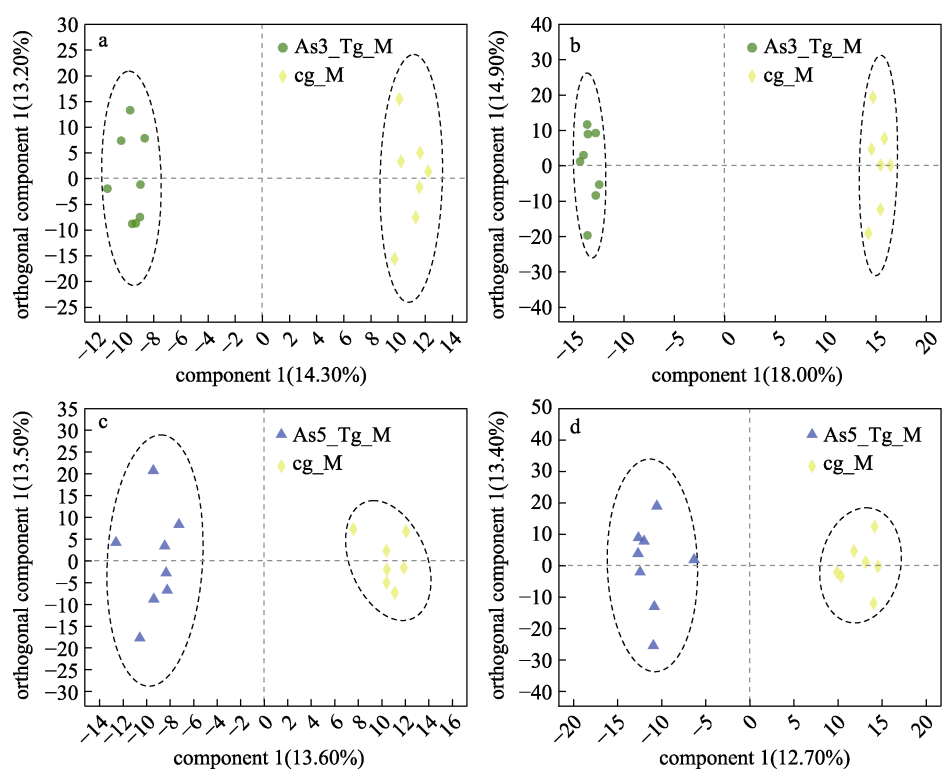


图 2 As<sup>3+</sup>、As<sup>5+</sup>在三疣梭子蟹实验组与对照组的 OPLS-DA 得分图  
a, c. 基于正离子模式, b, d. 基于负离子模式。

Fig. 2 OPLS-DA score chart of As<sup>3+</sup> and As<sup>5+</sup> in the exposure group and control group of *Portunus trituberculatus*  
a and c are based on positive ion modes, and b and d are based on negative ion modes.

2.3 差异代谢物筛选

通过 OPLS-DA 分析结合 *T* 检验, 寻找同时满足变量重要性(VIP)>1 以及 *P*<0.05 的差异性代谢物, 与 KEGG (京都基因与基因组百科全书)、HMDB (人类代谢组数据库)数据库进行比对获得注释信息, As<sup>3+</sup>暴露组与对照组共注释到 1989 个代谢物, 其中有 100 个差异代谢物; As<sup>5+</sup>暴露组与对照组共注释到 1049 个代谢物, 其中有 59 个差异代谢物。将筛选的差异代谢物结果以全离子模式下的火山图形式进行可视化, 通过计算每组中各个代谢物的 *P* 值以及差异倍数(fold-change)结合 OPLS-DA 模式下所得的 VIP 值, 得到 As 暴露

组与对照组的差异代谢物的分布如图 3 所示, As<sup>3+</sup>暴露组与对照组对比, 上调的差异代谢物有 74 个, 下调的有 26 个; As<sup>5+</sup>暴露组与对照组对比, 上调的差异代谢物有 37 个, 下调的有 22 个。

将主要差异代谢产物在 KEGG、HMDB 等在线数据库中进行结构、名称比对确认, 结果显示, 与对照组相比, As<sup>3+</sup>暴露组三疣梭子蟹鳃组织中发生显著性变化的代谢物主要集中在氨基酸类(L-proline、L-arginine、Trans-4-hydroxy-L-proline、L-Ornithine、L-lysine)、脂类和类脂分子(类花生酸、甘油磷脂、孕烯醇酮脂、脂肪酰基、萜类)及泛酸(图 4); As<sup>5+</sup>暴露组三疣梭子蟹鳃组织中差

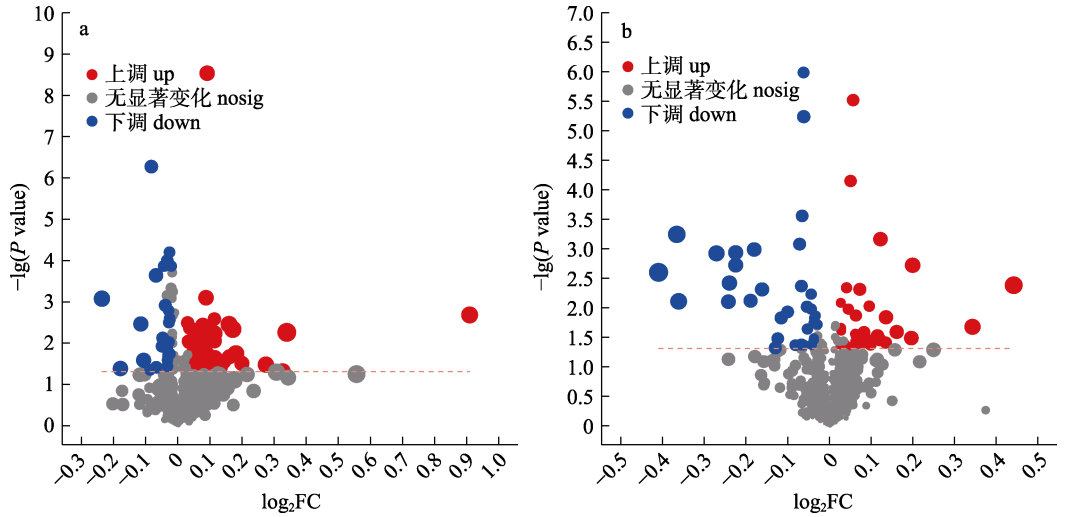


图 3  $As^{3+}$  (a)、 $As^{5+}$  (b)在三疣梭子蟹实验组与对照组的差异代谢物火山图  
Fig. 3 Volcano map of differential metabolite of  $As^{3+}$  (a) and  $As^{5+}$  (b) in the exposure group and the control group of *Portunus trituberculatus*

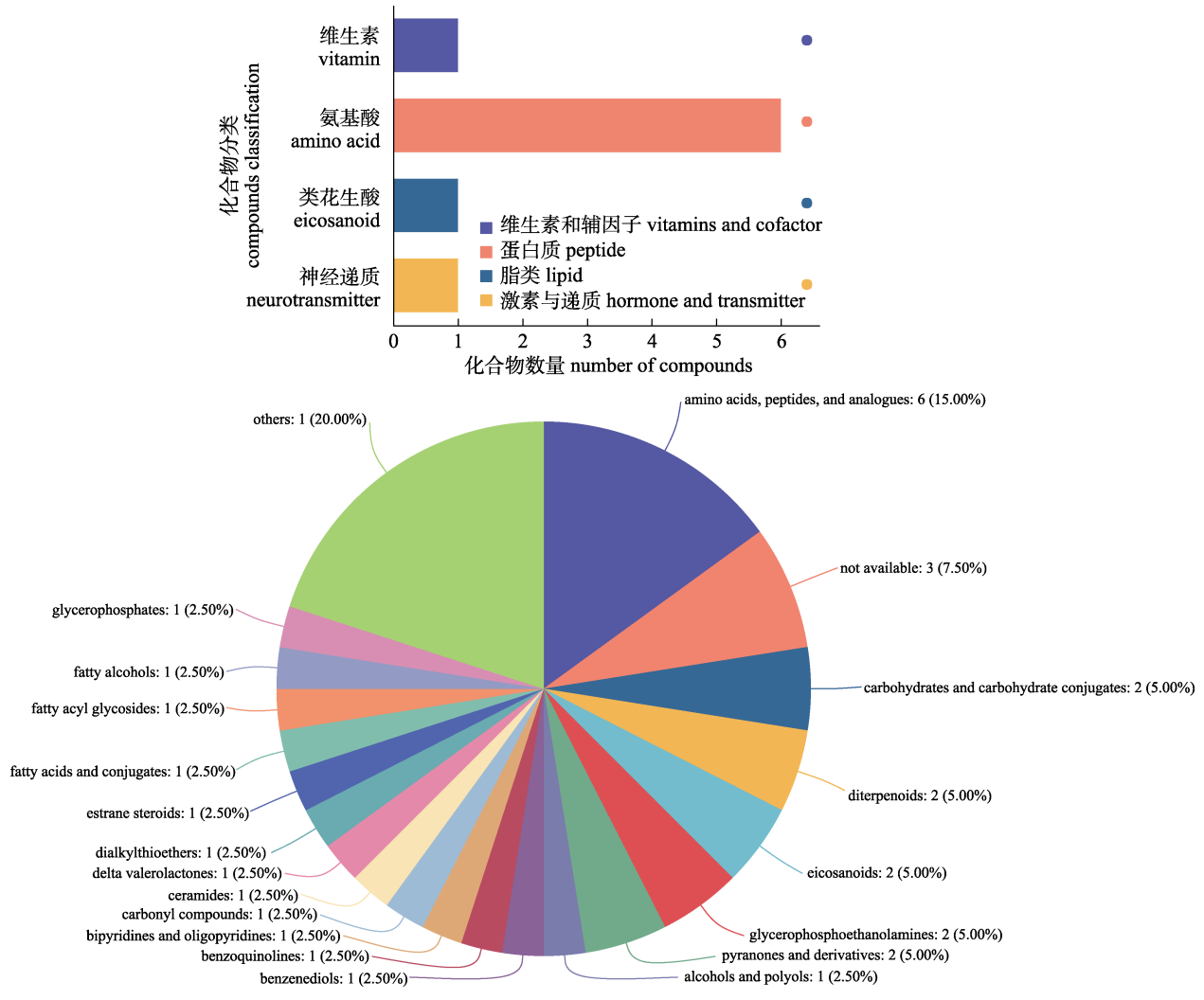


图 4  $As^{3+}$ 在三疣梭子蟹实验组与对照组差异代谢物化合物分类图  
Fig. 4 Compound classification chart of  $As^{3+}$  differential metabolite in the exposure group and control group of *Portunus trituberculatus*

异代谢物集中在氨基酸类(vinylacetylglutamine、N<sub>2</sub>-γ-glutamylglutamine、γ-glutamylglutamic acid、asparaginyl-isoleucine、glutamylisoleucine、prolylphenylalanine)、脂类和类脂分子(甘油磷酸、磷脂、孕烯醇酮脂类、类花生酸、萜类、亚油酸、脂肪醇)以及核苷酸类(thymine)(图 5)。

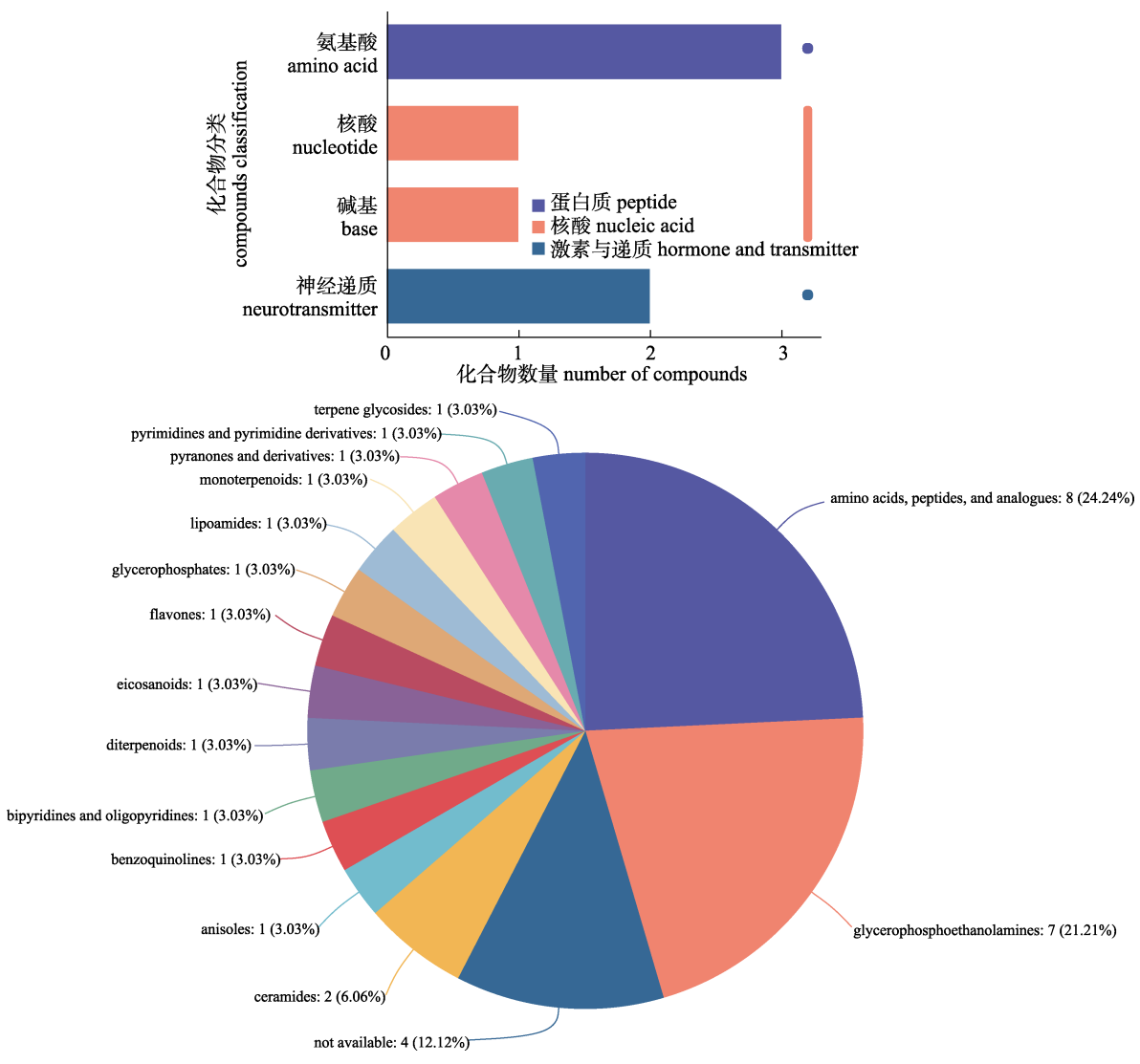


图 5 As<sup>5+</sup>在三疣梭子蟹实验组与对照组差异代谢物化合物分类图

Fig. 5 Compound classification chart of As<sup>5+</sup> differential metabolite in *Portunus trituberculatus* exposure group and control group

2.4 差异代谢通路分析

将差异代谢物进行 KEGG 功能通路注释分析得知, As<sup>3+</sup>导致三疣梭子蟹鳃损伤的作用机制可能与 5 类 21 条代谢通路有关(图 6a)。结合 KEGG 通路富集分析发现, ABC 转运体、花生四烯酸代谢、氨基酸代谢与生物合成(精氨酸和脯氨酸代谢、赖氨酸退化、精氨酸生物合成等)、氨酰基-tRNA 的生物合成、蛋白质消化吸收、癌症的中心碳代

谢等是其影响的主要代谢通路(图 7a)。As<sup>5+</sup>导致三疣梭子蟹鳃损伤的作用机制可能与 6 类 26 条代谢通路有关(图 6b), 结合 KEGG 通路富集发现, 影响的主要代谢通路是 ABC 转运体、氨酰基-tRNA 的生物合成、氨基酸代谢与生物合成(精氨酸和脯氨酸代谢、谷氨酰胺和谷氨酸代谢、精氨酸生物合成等)、谷胱甘肽代谢、癌症的中心碳代谢等(图 7b)。

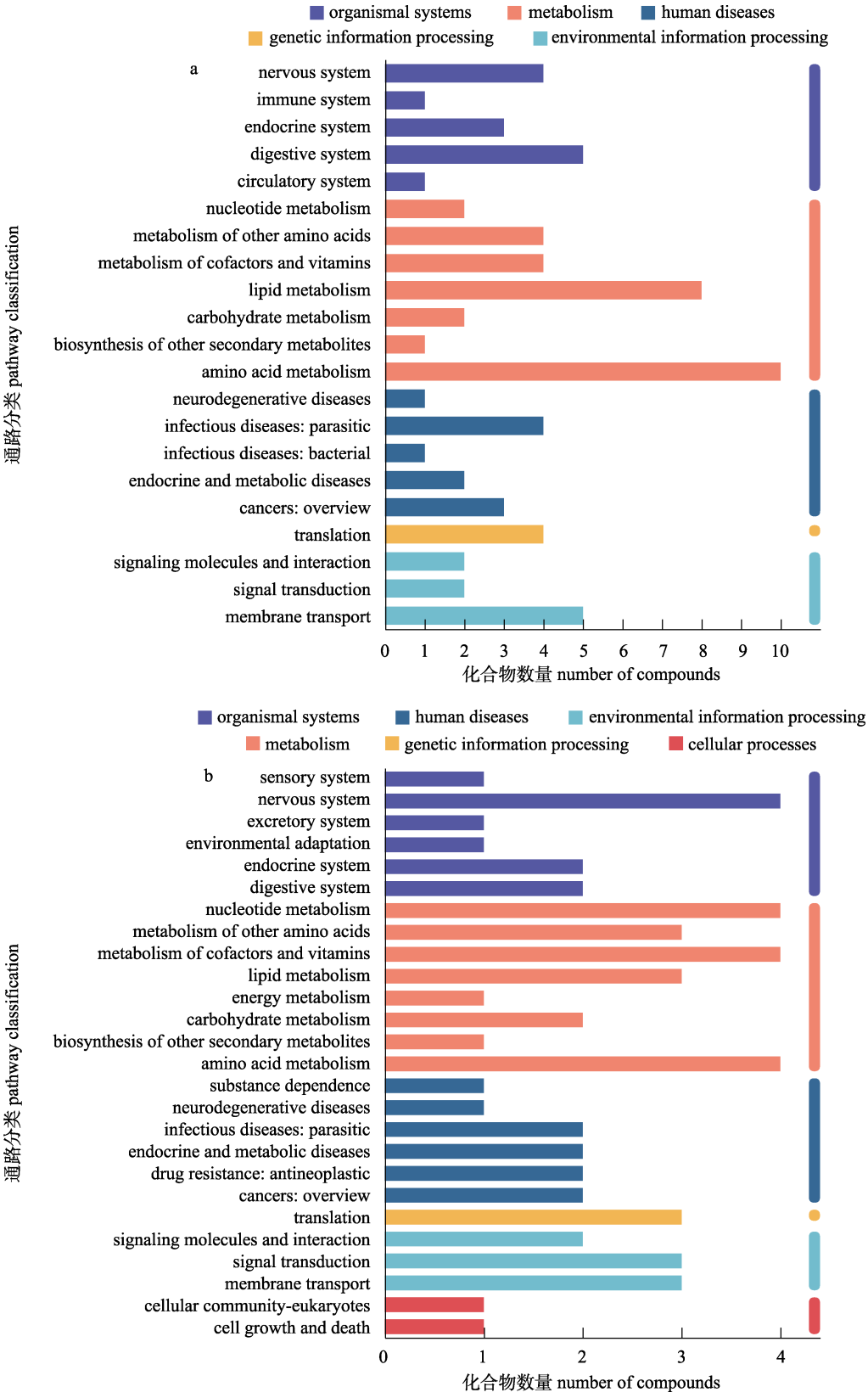


图 6  $As^{3+}$  (a)、 $As^{5+}$  (b)在三疣梭子蟹实验组与对照组差异代谢物的 KEGG 功能通路统计图  
Fig. 6 KEGG functional pathway statistic chart of  $As^{3+}$  (a) and  $As^{5+}$  (b) differential metabolite in *Portunus trituberculatus* from exposure groups and control group



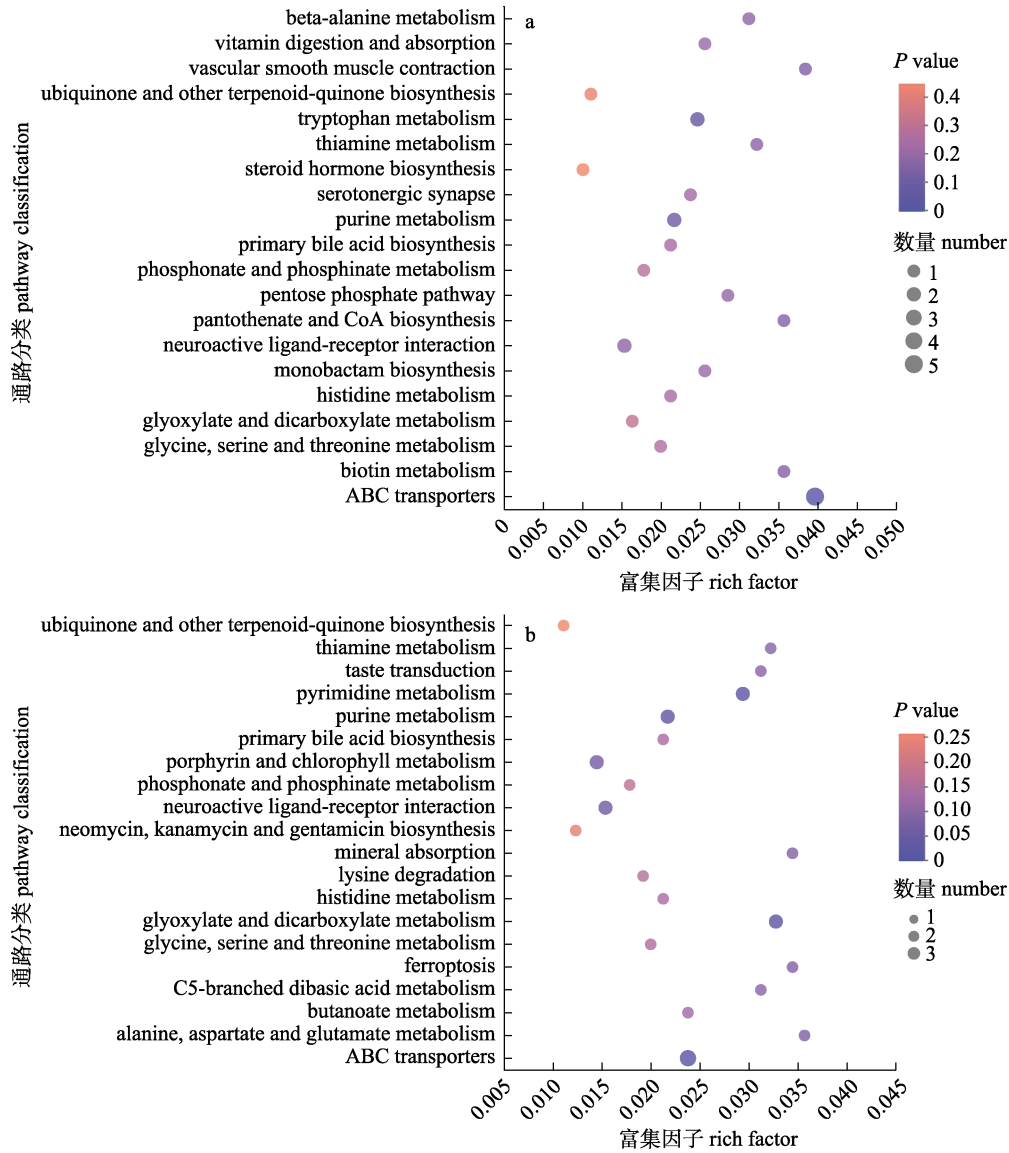


图 7  $As^{3+}$ (a)、 $As^{5+}$ (b)在三疣梭子蟹实验组与对照组差异代谢物的通路富集散点图  
Fig. 7 Scatter plot of enrichment of differential metabolite pathways between  $As^{3+}$ (a) and  $As^{5+}$ (b) in *Portunus trituberculatus* from exposure groups and control group

### 3 讨论

砷为类金属,广泛存在于自然界中<sup>[34]</sup>,其中危害最大的是砷酸盐和亚砷酸盐,毒性作用存在一定的差异性。两种化合物均具有较强的神经毒性和致癌作用<sup>[35]</sup>,人体长期接触可能导致皮肤癌、肝癌肺癌等<sup>[36]</sup>。本研究发现  $As^{3+}$ 、 $As^{5+}$ 暴露后会使得三疣梭子蟹鳃组织中影响癌症中心碳代谢的氨基酸含量发生改变,这可能是其诱导癌症发生的原因之一。也有研究认为无机砷通过抑制线粒体呼吸作用,形成活性氧(ROS),进而引起

DNA 突变导致癌症的产生<sup>[37]</sup>。

本研究结果显示,  $As^{3+}$ 、 $As^{5+}$ 均对 ABC 转运体产生影响,进而干扰膜转运。 $As^{3+}$ 通过水通道蛋白进入生物体细胞中<sup>[38]</sup>,由于  $As^{3+}$ 胁迫导致脯氨酸、精氨酸两种蛋白质氨基酸代谢紊乱,致使水通道蛋白功能异常;而  $As^{5+}$ 与磷酸盐结构相似,通过细胞膜磷酸通道进入细胞<sup>[39]</sup>,推测是差异代谢物谷氨酸、甘氨酸异常导致。同时,有研究表明,  $As^{5+}$ 通过与磷酸盐的竞争能够破坏细胞内的磷酸化作用,从而干扰糖酵解和氧化磷酸化等能量代谢途径导致 ATP 合成减少<sup>[40]</sup>。



无机砷代谢过程中活性氧 ROS 主要是由花生四烯酸代谢通路、线粒体呼吸链、黄嘌呤氧化酶的反应过程和还原型辅酶 II (NADPH) 反应过程 4 个途径产生<sup>[41]</sup>。本研究结果显示, 经  $\text{As}^{3+}$  半静态染毒后的三疣梭子蟹鳃组织中的白三烯 E4 等 4 种代谢物含量发生变化, 对花生四烯酸的代谢产生影响, 由此可以推测, 无机砷可能引起花生四烯酸代谢出现紊乱, 产生大量的 ROS, 从而引起氧化损伤。此外, 无机砷进入生物体内主要通过氧化甲基化反应而代谢<sup>[42]</sup>, 而无机砷甲基转移酶和单甲基砷甲基转移均以 As (III) 为底物, 因此  $\text{As}^{5+}$  需要还原成为  $\text{As}^{3+}$  才能进行甲基化反应<sup>[43]</sup>。无机砷在体内的代谢模式有两种途径<sup>[44]</sup>, 但这两种途径均需要消耗谷胱甘肽(GSH)。GSH 作为解除重金属毒性最重要的抗氧化物质, 一方面可以清除 ROS, 另一方面能与重金属络合排出体外<sup>[45]</sup>。本研究发现 As 暴露会导致三疣梭子蟹鳃组织中谷氨酸、鸟氨酸、甘氨酸代谢物上调, 这些物质与 GSH 代谢通路有关, 推测三疣梭子蟹由此进行调控, 响应 As 胁迫引起的氧化应激反应。有学者证实无机砷能够诱导斑马鱼<sup>[46]</sup>、日本沼虾 (*Macrobrachium nipponense*)<sup>[47]</sup>、金头鲷 (*Sparus aurata*)<sup>[48]</sup>、紫贻贝 (*Mytilus galloprovincialis*) 鳃组织<sup>[49]</sup>、淡水贻贝<sup>[50]</sup> 等激活抗氧化防御体系以响应氧化应激反应。氨基酸类是  $\text{As}^{3+}$ 、 $\text{As}^{5+}$  对三疣梭子蟹鳃损伤的重要生物标志物, KEGG 通路富集结果显示,  $\text{As}^{3+}$ 、 $\text{As}^{5+}$  均对精氨酸和脯氨酸的代谢产生影响。Sharma 等<sup>[51]</sup> 研究发现脯氨酸可以通过避免酶脱水以及渗透调节等方面降低重金属毒性; 而精氨酸是三疣梭子蟹体内重要的功能性必需氨基酸, 参与蛋白质合成及一氧化氮(NO)、多胺和肌酸的产生过程, 发生应激反应时, 精氨酸被大量用于生产 NO。由此推测, 三疣梭子蟹通过上调精氨酸、脯氨酸含量来应对 As 胁迫引发的氧化应激反应。此外, KEGG 通路分析表明,  $\text{As}^{3+}$ 、 $\text{As}^{5+}$  显著干扰三疣梭子蟹氨酰基-tRNA 生物合成过程, 氨酰基-tRNA 是翻译的底物, 该过程是将氨基酸合成蛋白质的关键步骤。有实验证实斑马鱼氨酰基-tRNA 生物合成过程受到干扰会出现明显的脊柱侧弯和畸形<sup>[52]</sup>。经  $\text{As}^{5+}$  染毒后, 三疣梭子蟹鳃

组织中产生的差异代谢物甘氨酸还会对信号传递造成影响, 产生一定的神经毒性。类似的结果在无机砷对菲律宾蛤仔实验中也有出现<sup>[53]</sup>。另外实验发现  $\text{As}^{3+}$ 、 $\text{As}^{5+}$  均会造成氨基酸代谢紊乱, 进而干扰中枢神经系统功能, 同时无机砷代谢过程中产生的活性氧(ROS)也可以作为一种信号干扰对氧化还原敏感的信号通路<sup>[54]</sup>。

综上所述, 本实验采用 LC-MS 结合多变量数据统计分析方法对  $\text{As}^{3+}$ 、 $\text{As}^{5+}$  暴露后的三疣梭子蟹鳃组织进行差异代谢物及通路分析, 结果显示,  $\text{As}^{3+}$  组三疣梭子蟹鳃组织中脯氨酸、精氨酸、鸟氨酸、赖氨酸等氨基酸及其衍生物含量上调, 类花生酸、甘油磷脂等脂类含量发生显著变化, 导致 ABC 转运体、氨基酸代谢、花生四烯酸代谢、消化吸收、氨酰-tRNA 生物合成等通路紊乱, 从而产生毒性效应;  $\text{As}^{5+}$  组中乙烯基乙酰基甘氨酸、N2- $\gamma$ -谷氨酰谷氨酰胺、 $\gamma$ -谷氨酰谷氨酸、天冬酰胺-异亮氨酸、谷氨酰异亮氨酸、脯氨酰苯丙氨酸代谢发生异常, 甘油磷脂、亚油酸等脂类含量显著变化及胸腺嘧啶代谢量上调, 会干扰 ABC 转运体, 影响氨基酸代谢, 扰乱信号传导造成神经毒性, 进而对三疣梭子蟹产生毒性效应, 为后期深入研究致毒机制提供一定的依据。

#### 参考文献:

- [1] Cullen W R, Liu Q Q, Lu X F, et al. Methylated and thiolated arsenic species for environmental and health research—A review on synthesis and characterization[J]. Journal of Environmental Sciences, 2016, 49: 7-27.
- [2] Xia N N, Wang J, Shi Y D, et al. Countermeasures for heavy metals pollution in marine environment[J]. China Population, Resources and Environment, 2012, 22(S1): 343-346. [夏娜娜, 王军, 史云娣, 等. 海洋重金属污染防治的对策研究[J]. 中国人口·资源与环境, 2012, 22(S1): 343-346.]
- [3] Li Y, Tan L J, Wang J T. The temporal and spatial distribution of cadmium, plumbum, mercury, arsenic of Shandong southern coastal surface sea water[J]. Periodical of Ocean University of China, 2010, 40(S1): 179-184. [李月, 谭丽菊, 王江涛. 山东半岛南部近海表层海水中镉、铅、汞、砷的时空变化[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2010, 40(S1): 179-184.]
- [4] Shi Y H, Li M Y, Li B, et al. Spatial and temporal distribution of heavy metals in the sediment of Shenzhen bay[J].

- Marine Environmental Science, 2017, 36(2): 186-191, 208. [时运红, 李明远, 李波, 等. 深圳湾沉积物重金属污染时空分布特征[J]. 海洋环境科学, 2017, 36(2): 186-191, 208.]
- [5] Peng P F, Li X L, Yang Q, et al. Distribution and evaluation of heavy metals in surface seawaters and sediments in Huangmao sea of the Pearl River Estuary[J]. The Administration and Technique of Environmental Monitoring, 2017, 29(4): 28-32, 64. [彭鹏飞, 李绪录, 杨琴, 等. 珠江口黄茅海表层海水和沉积物中重金属的分布及评价[J]. 环境监测管理与技术, 2017, 29(4): 28-32, 64.]
- [6] Wong S C, Li X D, Zhang G, et al. Heavy metals in agricultural soils of the Pearl River Delta, South China[J]. Environmental Pollution, 2002, 119(1): 33-44.
- [7] Fattorini D, Alonso-Hernandez C M, Diaz-Asencio M, et al. Chemical speciation of arsenic in different marine organisms: Importance in monitoring studies[J]. Marine Environmental Research, 2004, 58(2-5): 845-850.
- [8] Hung D Q, Nekrassova O, Compton R G. Analytical methods for inorganic arsenic in water: A review[J]. Talanta, 2004, 64(2): 269-277.
- [9] Wang W W, Pan J F. The transfer of metals in marine food chains: A review[J]. Acta Ecologica Sinica, 2004, 24(3): 599-604. [王文维, 潘进芬. 重金属在海洋食物链中的传递[J]. 生态学报, 2004, 24(3): 599-604.]
- [10] Huang C S, Ma W Y, Li J X, et al. Arsenic induces apoptosis through a c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase-dependent, p53-independent pathway[J]. Cancer Research, 1999, 59(13): 3053-3058.
- [11] Sadaf N, Kumar N, Ali M, et al. Arsenic trioxide induces apoptosis and inhibits the growth of human liver cancer cells[J]. Life Sciences, 2018, 205: 9-17.
- [12] Wu H F, Liu X L, Zhang X Y, et al. Proteomic and metabolomic responses of clam *Ruditapes philippinarum* to arsenic exposure under different salinities[J]. Aquatic Toxicology, 2013, 136-137: 91-100.
- [13] Datta S, Mazumder S, Ghosh D, et al. Low concentration of arsenic could induce caspase-3 mediated head kidney macrophage apoptosis with JNK-p38 activation in *Clarias batrachus*[J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2009, 241(3): 329-338.
- [14] Lin S, Cullen W R, Thomas D J. Methylarsenicals and arsinothiols are potent inhibitors of mouse liver thioredoxin reductase[J]. Chemical Research in Toxicology, 1999, 12(10): 924-930.
- [15] Lushchak V I. Contaminant-induced oxidative stress in fish: A mechanistic approach[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2016, 42(2): 711-747.
- [16] Flora S J S. Arsenic-induced oxidative stress and its reversibility[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2011, 51(2): 257-281.
- [17] Feng J, Tian X L, Dong S L, et al. Comparative analysis of the energy fluxes and trophic structure of polyculture ecosystems of *Portunus trituberculatus* based on Ecopath model[J]. Aquaculture, 2018, 496: 185-196.
- [18] Yuan Y, Wang X X, Jin M, et al. Influence of different lipid sources on growth performance, oxidation resistance and fatty acid profiles of juvenile swimming crab, *Portunus trituberculatus*[J]. Aquaculture, 2019, 508: 147-158.
- [19] Liu M M, Feng Q M, Francis D S, et al. Tamoxifen affects the histology and hepatopancreatic lipid metabolism of swimming crab *Portunus trituberculatus*[J]. Aquatic Toxicology, 2019, 213: 105220.
- [20] Ren X Y, Wang Z Q, Gao B Q, et al. Toxic responses of swimming crab (*Portunus trituberculatus*) larvae exposed to environmentally realistic concentrations of oxytetracycline[J]. Chemosphere, 2017, 173: 563-571.
- [21] Dong F X, Zhu J Q, Jin S, et al. Expression and function analysis of metallothionein in the testis of *Portunus trituberculatus* exposed to cadmium[J]. Aquatic Toxicology, 2013, 140-141: 1-10.
- [22] Zhang W, Guo Z Q, Song D D, et al. Arsenic speciation in wild marine organisms and a health risk assessment in a subtropical bay of China[J]. Science of the Total Environment, 2018, 626: 621-629.
- [23] Liu Y, Liu G J, Yuan Z J, et al. Presence of arsenic, mercury and vanadium in aquatic organisms of Laizhou Bay and their potential health risk[J]. Marine Pollution Bulletin, 2017, 125(1-2): 334-340.
- [24] Riani E, Cordova M R, Arifin Z. Heavy metal pollution and its relation to the malformation of green mussels cultured in Muara Kamal waters, Jakarta Bay, Indonesia[J]. Marine Pollution Bulletin, 2018, 133: 664-670.
- [25] Maher W, Waring J, Krikowa F, et al. Ecological factors affecting the accumulation and speciation of arsenic in twelve Australian coastal bivalve molluscs[J]. Environmental Chemistry, 2018, 15(2): 46-57.
- [26] Zhang S Y, Sun G X, Yin X X, et al. Biomethylation and volatilization of arsenic by the marine microalgae *Ostreococcus tauri*[J]. Chemosphere, 2013, 93(1): 47-53.
- [27] Kalman J, Smith B D, Bury N R, et al. Biodynamic modeling of the bioaccumulation of trace metals (Ag, As and Zn) by an infaunal estuarine invertebrate, the clam *Scrobicularia plana*[J]. Aquatic Toxicology, 2014, 154: 121-130.
- [28] Broerse M, Oorsprong H, Gestel C A M V. Cadmium affects

- toxicokinetics of pyrene in the collembolan *Folsomia candida*[J]. *Ecotoxicology*, 2012, 21(3): 795-802.
- [29] Sele V, Sloth J J, Julshamn K, et al. A study of lipid- and water-soluble arsenic species in liver of Northeast Arctic cod (*Gadus morhua*) containing high levels of total arsenic[J]. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 2015, 30: 171-179.
- [30] Ghatak S, Biswas A, Dhali G K, et al. Oxidative stress and hepatic stellate cell activation are key events in arsenic induced liver fibrosis in mice[J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2011, 251(1): 59-69.
- [31] Allen T, Rana S V S. Effect of arsenic ( $\text{As}^{\text{III}}$ ) on glutathione-dependent enzymes in liver and kidney of the freshwater fish *Channa punctatus*[J]. *Biological Trace Element Research*, 2004, 100: Article No. 39.
- [32] Wu G Y, Fang Y Z, Yang S, et al. Glutathione metabolism and its implications for health[J]. *The Journal of Nutrition*, 2004, 134(3): 489-492.
- [33] Babayigit A, Thanh D D, Ethirajan A, et al. Assessing the toxicity of Pb- and Sn-based perovskite solar cells in model organism *Danio rerio*[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 18721.
- [34] Jomova K, Jenisova Z, Feszterova M, et al. Arsenic: toxicity, oxidative stress and human disease[J]. *Journal of Applied Toxicology*, 2011, 31(2): 95-107.
- [35] Bardach A E, Ciapponi A, Soto N, et al. Epidemiology of chronic disease related to arsenic in Argentina: A systematic review[J]. *Science of the Total Environment*, 2015, 538: 802-816.
- [36] Li Y F, Ye F, Wang A W, et al. Chronic arsenic poisoning probably caused by arsenic-based pesticides: Findings from an investigation study of a household[J]. *International Journal of Environ Research and Public Health*, 2016, 13(1): 1-14.
- [37] Fowler B A, Selene C H, Chou J R, et al. Arsenic[M]// *Handbook on the toxicology of metals*. Amsterdam: Elsevier, 2015: 581-624.
- [38] Villa-Bellosta R, Sorribas V. Role of rat sodium/phosphate cotransporters in the cell membrane transport of arsenate[J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2008, 232(1): 125-134.
- [39] Uzcátegui N L, Figarella K, Bassarak B, et al. Trypanosoma brucei aquaglyceroporins facilitate the uptake of arsenite and antimonite in a pH dependent way[J]. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2013, 32(4): 880-888.
- [40] Gresser M J. ADP-arsenate. Formation by submitochondrial particles under phosphorylating conditions[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1981, 256(12): 5981-5983.
- [41] Inupakutika M A, Sengupta S, Devireddy A R, et al. The evolution of reactive oxygen species metabolism[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2016, 67(21): 5933-5943.
- [42] Banerjee M, Marensi V, Conseil G, et al. Polymorphic variants of MRP4/ABCC4 differentially modulate the transport of methylated arsenic metabolites and physiological organic anions[J]. *Biochemical Pharmacology*, 2016, 120: 72-82.
- [43] Currier J M, Douillet C, Drobná Z, et al. Oxidation state specific analysis of arsenic species in tissues of wild-type and arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase-knockout mice[J]. *Journal of Environmental Science*, 2016, 49: 104-112.
- [44] Watanabe T, Hirano S. Metabolism of arsenic and its toxicological relevance[J]. *Archives of Toxicology*, 2013, 87(6): 969-979.
- [45] Guilherme S, Válega M, Pereira M E, et al. Erythrocytic nuclear abnormalities in wild and caged fish (*Liza aurata*) along an environmental mercury contamination gradient[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2008, 70(3): 411-421.
- [46] Sarkar S, Mukherjee S, Chattopadhyay A, et al. Low dose of arsenic trioxide triggers oxidative stress in zebrafish brain: Expression of antioxidant genes[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2014, 107: 1-8.
- [47] Liu X, Wang M, Liu J J, et al. Effects of oxidative stress on *Macrobrachium nipponense* induced by single and joint exposure to mercury and arsenic[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2016, 11(6): 144-152. [刘祥, 王敏, 刘俊杰, 等. 汞和砷单一及联合暴露对日本沼虾的氧化应激效应[J]. *生态毒理学报*, 2016, 11(6): 144-152.]
- [48] Morcillo P, Esteban M Á, Cuesta A. Heavy metals produce toxicity, oxidative stress and apoptosis in the marine teleost fish SAF-1 cell line[J]. *Chemosphere*, 2016, 144: 225-233.
- [49] Li Q M, Wang Q, Yu Q, et al. Study on the effects of  $\text{As}(\text{III})$  exposure on antioxidant enzymes and lipid peroxidation of *Mytilus galloprovincialis*[J]. *Marine Science Bulletin*, 2013, 32(4): 429-433. [李巧梅, 王清, 于倩, 等.  $\text{As}(\text{III})$ 暴露对紫贻贝抗氧化酶活性和脂质过氧化的影响[J]. *海洋通报*, 2013, 32(4): 429-433.]
- [50] Chakraborty S, Ray M, Ray S. Toxicity of sodium arsenite in the gill of an economically important mollusc of India[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2010, 29(1): 136-148.
- [51] Sharma S S, Dietz K J. The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance[J]. *Trends in Plant Science*, 2009, 14(1): 43-50.
- [52] Yan L, Gong C X, Zhang X F, et al. Perturbation of metabolome of embryo/larvae zebrafish after exposure to fipronil[J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*,

- 2016, 48: 39-45.
- [53] Freitas R, Coppola F, De Marchi L, et al. The influence of Arsenic on the toxicity of carbon nanoparticles in bivalves[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2018, 358: 484-493.
- [54] Mukhopadhyay D, Srivastava R, Chattopadhyay A. Sodium fluoride generates ROS and alters transcription of genes for xenobiotic metabolizing enzymes in adult zebrafish (*Danio rerio*) liver: Expression pattern of Nrf2/Keap1 (INrf2)[J]. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 2015, 25(5): 364-373.

## Research on toxicity mechanism of inorganic arsenic on *Portunus trituberculatus* gill tissue revealed by metabonomics

LIU Ge<sup>1,2</sup>, LI Huanjun<sup>2</sup>, ZHANG Xiuzhen<sup>2</sup>, CUI Yanmei<sup>2</sup>, JIANG Fang<sup>2</sup>, HE Jinxia<sup>2</sup>, CAO Wei<sup>2</sup>, WANG Minglei<sup>2</sup>, TIAN Xiuhui<sup>2</sup>, XU Yingjiang<sup>2</sup>

1. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
2. Shandong Marine Resource and Environment Research Institute; Shandong Key Laboratory of Marine Ecological Restoration, Yantai 264006, China

**Abstract:** To explore the molecular mechanisms of the toxicity of inorganic arsenic on *Portunus trituberculatus*, we exposed adult female *P. trituberculatus* to 0.3 mg/L As<sup>3+</sup> and 0.3 mg/L As<sup>5+</sup> for 96 h. The non-targeted metabolomics method was used to compare and analyze the changes in the composition and content of metabolites in gill tissue. Compared with the control group, a total of 100 and 59 differential metabolites were obtained in the As<sup>3+</sup> and As<sup>5+</sup> exposure groups, respectively. According to the physiological functions of the afore-mentioned metabolites and the analysis of their corresponding metabolic pathways, it is speculated that As<sup>3+</sup> upregulates proline, arginine, ornithine, lysine and other amino acids, and eicosanoids, glycerophospholipids, and other lipids, leading to disruptions in ABC transporter, amino acid metabolism, arachidonic acid metabolism, digestion and absorption, and aminoacyl tRNA biosynthesis. Toxic effects occur as a result, with As<sup>5+</sup> causing abnormal metabolism of vinyl acetylglycine, N2-γ-glutamyl glutamine, γ-glutamyl glutamate, asparagine-isoleucine, glutamyl isoleucine, prolyl phenylalanine, interference with ABC transporter, amino acid metabolism, and glutathione metabolism. The observations of these toxic effects on *P. trituberculatus* provide a theoretical basis for future in-depth investigations of the mechanisms resulting from toxic exposure to inorganic arsenic.

**Key words:** *Portunus trituberculatus*; As<sup>3+</sup>; As<sup>5+</sup>; metabolomics; tissue toxicity; metabolic pathway

**Corresponding author:** XU Yingjiang. E-mail: xuyingjiang@yeah.net