

# 超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱 探究 4-HO-MiPT 染毒斑马鱼脑部代谢组学变化

陈宇彬<sup>1</sup>, 于交远<sup>2</sup>, 孟梁<sup>3</sup>, 刘猛<sup>1</sup>, 赵森<sup>1</sup>

(1. 浙江警察学院, 浙江省毒品防控技术研究重点实验室, 浙江 杭州 310053; 2. 呼伦贝尔市公安局刑事侦查支队, 内蒙古 呼伦贝尔 021001; 3. 福建警察学院, 福建 福州 350007)

**摘要:** 为评价色胺类新精神活性物质 4-羟基-N-甲基-N-异丙基色胺(4-HO-MiPT)对大脑的毒性效应, 本实验以斑马鱼为模式生物进行自发活动行为记录分析, 采用超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱(UHPLC-Q/Orbitrap HRMS)分析斑马鱼大脑长期染毒后的代谢产物, 并在转录水平上检测斑马鱼脑部目标基因的变化。结果表明, 注射药物 4-HO-MiPT 后, 斑马鱼运动速度明显减慢, 运动范围明显缩小。从斑马鱼大脑检测出 37 种差异代谢产物, 其中 7 种升高, 30 种降低, 并导致 6 条代谢通路改变。脑部基因转录水平检测发现, 4 个神经系统的基因转录水平下降, 对大脑细胞产生影响。本实验证明了 4-HO-MiPT 对斑马鱼大脑产生毒性效应, 对神经系统、免疫功能造成损害并影响体内代谢, 对斑马鱼行为产生明显的抑制效果, 同时从 4-HO-MiPT 造成的内源性影响推测其可能致癌。

**关键词:** 4-羟基-N-甲基-N-异丙基色胺(4-HO-MiPT); 超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱(UHPLC-Q/Orbitrap HRMS); 斑马鱼; 行为模型; 代谢组学

中图分类号: O657.63 文献标志码: A 文章编号: 1004-2997(2024)05-0699-13

doi: 10.7538/zpxb.2023.0126

## Study on the Brain Metabolomic Changes of 4-HO-MiPT Infected Zebrafish by UHPLC-Q/Orbitrap HRMS

CHEN Yu-bin<sup>1</sup>, YU Jiao-yuan<sup>2</sup>, MENG Liang<sup>3</sup>, LIU Meng<sup>1</sup>, ZHAO Sen<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Drug Prevention and Control Technology of Zhejiang Province, Zhejiang Police College, Hangzhou 310053, China; 2. Criminal Investigation Detachment of Hulunbuir Public Security Bureau, Hulunbuir 021001, China; 3. Fujian Police College, Fuzhou 350007, China)

**Abstract:** This study aimed to assess the neurotoxic effects of the novel psychoactive substance 4-hydroxy-N-methyl-N-isopropyltryptamine (4-HO-MiPT) on brain. By employing zebrafish as a model organism, the study applied a multifaceted approach, including the recording and analysis of spontaneous behavioral activities, identification of brain metabolic products *via* ultra-high performance liquid chromatography coupled with quadrupole-Orbitrap high resolution mass spectrometry (UHPLC-Q/Orbitrap HRMS), and examination of changes in the transcriptional level of target genes. Following the injection of 4-HO-MiPT, zebrafish exhibits a pronounced reduction in

movement speed and range, indicating a significant alteration in locomotor activity. The subsequent analysis of brain metabolic products finds 37 differential metabolites, including 7 elevated and 30 reduced ones, alongside notable alterations in 6 metabolic pathways. Moreover, the examination of transcriptional level of key genes in zebrafish brain underscores a discernible decrease in transcriptional level of genes associated with the nervous system, implying a substantial impact on neuronal function and synaptic transmission. The experimental findings substantiate the neurotoxic effects of 4-HO-MiPT on the zebrafish brain, shedding light on its deleterious repercussions on both the nervous and immune systems. Furthermore, the perturbations observed in metabolic processes and behavioral responses emphasize the profound impact of 4-HO-MiPT exposure on fundamental physiological functions. The identification of potential carcinogenicity associated with 4-HO-MiPT further underscores the urgent need for comprehensive risk assessment and regulatory scrutiny. This study represents a crucial step towards unraveling the intricate neurotoxic mechanisms underlying 4-HO-MiPT exposure. The research has far-reaching implications, not only in advancing our understanding of the adverse health effects associated with novel psychoactive substances, but also in guiding the development of targeted interventions and regulatory strategies aiming at safeguarding public health and well-being. Continued exploration into the long-term consequences of 4-HO-MiPT exposure, alongside comprehensive toxicological evaluations, holds promise in mitigating its potential hazards and ensuring the safety of individuals and communities exposed to this emerging threat.

**Key words:** 4-hydroxy-*N*-methyl-*N*-isopropyltryptamine (4-HO-MiPT); ultra-high performance liquid chromatography coupled with quadrupole-Orbitrap high resolution mass spectrometry (UHPLC-Q/Orbitrap HRMS); zebrafish; behavioral model; metabolomics

色胺类新精神活性物质是一类含有色胺结构的化合物,可致幻<sup>[1]</sup>,其主要通过影响人体中的5-羟色胺受体,对5-羟色胺神经递质的功能产生作用,进而引起感知、情绪和意识状态的变化<sup>[2-4]</sup>,主要用于改善情绪、调节情绪波动、减轻抑郁和焦虑等症状的治疗<sup>[5]</sup>。然而,滥用色胺类新精神活性物质的情况愈发严重,由其产生的一系列社会问题也越来越多<sup>[6]</sup>。因此,研究色胺类新精神活性物质的作用机制、生理效应、行为表现以及代谢毒性等具有重要意义。

4-羟基-*N*-甲基-*N*-异丙基色胺(4-HO-MiPT)的结构示于图1。目前,尚未见4-HO-MiPT毒性效应的报道,但已有关于色胺类新精神活性物质的大量研究。黑海等<sup>[7]</sup>研究了色胺类新精神活性物质的结构、毒性、成瘾特性、滥用情况以及检验方法。李楠等<sup>[8]</sup>采用“上下增减剂量法”详细研究了5-甲氧基-2-甲基色胺(5-methoxy- $\alpha$ -methyltryptamine, 5-MEO-AMT)的毒性,发现其与甲基苯丙胺类似,均能诱发强烈的精神活性作用。赵森等<sup>[9]</sup>以斑马鱼为模式生物进行自发活动行为测试及镜像反射行为模型,分析5-甲氧

基-*N*-甲基-*N*-异丙基色胺(5-MeO-MiPT)对斑马鱼的毒性效应,发现斑马鱼先天的群集性发生改变,出现焦虑、思维紊乱等症状,表明药浴5-MeO-MiPT对斑马鱼的行为活动有较明显的抑制作用。

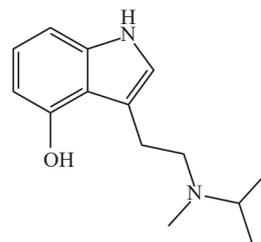


图1 4-HO-MiPT 结构式

Fig. 1 Structure of 4-HO-MiPT

代谢组学法着重研究生物整体、器官或组织的内源性代谢物质的代谢途径及其所受内外在因素的影响和随时间变化的规律<sup>[10-11]</sup>。随着代谢组学技术的快速发展,基于代谢组学的研究方法已广泛用于不同生物体内代谢物的定性及定量分析<sup>[12]</sup>。

本工作拟采用代谢组学法研究4-HO-MiPT

在斑马鱼体内的代谢产物,以斑马鱼为模式生物,建立行为学评价模型,通过观察行为运动的变化来反映模式生物内在的症状。同时,通过代谢产物差异探索斑马鱼行为变化的内在因素,以期从代谢角度解释4-HO-MiPT的毒性机理。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器和装置

Scientific Dionex Ultimate 3000 超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱联用仪、SCIOGEX D3024R 离心机、Lab Tower 纯水制备系统:美国 Thermo Fisher Scientific 公司产品;斑马鱼独立养殖单元、成鱼观测箱、梯形水箱:中国杭州纽蓝科技有限公司产品;Multi Reax 全能型振荡器:德国 Heidolph 公司产品;JXFSTPRP-CL 全自动样品冷冻研磨仪:中国上海净信实业发展有限公司产品;Etho Vision XT 14 分析系统:荷兰 Noldus Information Technology 公司产品;IV007 视频侦查系统:中国浙江捷尚视觉科技股份有限公司产品;BIO-RAD CFX Connect Real-Time System 荧光定量 PCR 仪:美国 bio-rad 公司产品;普通 PCR 仪、scandrop100 超微量核酸蛋白测定仪:德国耶拿分析仪器公司产品。

移液器、低位白色 PCR 反应管、光学封膜:美国 bio-rad 公司产品;25  $\mu$ L 微量注射器:上海高鸽工贸有限公司产品;200  $\mu$ L 无 RNA 酶 PCR 反应管:美国 AXGEN 公司产品;移液枪枪头、1.5 mL 无 RNA 酶 EP 管:美国 Thermo Fisher Scientific 公司产品。

### 1.2 材料与试剂

4-HO-MiPT 标准品:美国 Cerilliant 公司产品;甲醇、乙腈:美国 Sigma-aldrich 公司产品;3 月龄斑马鱼(W/AB 品系,雌雄比 1:1):由武汉国家斑马鱼资源中心提供;超纯水:中国杭州泽南科技有限公司产品;反转录试剂盒:北京艾德莱生物科技有限公司产品;2 $\times$ SYBR<sup>®</sup> Green 预混液:美国 Thermo Fisher Scientific 公司产品。

### 1.3 实验条件

**1.3.1 色谱条件** 色谱柱:ACQUITY UPLC<sup>®</sup> HSS T3 柱(2.1 mm $\times$ 150 mm $\times$ 1.8  $\mu$ m);流动相:A 为 0.1%甲酸水溶液,B 为 0.1%甲酸乙腈溶液;柱温 40  $^{\circ}$ C;流速 0.3 mL/min;进样量 5  $\mu$ L;梯度洗脱:1~3 min(99%A),3~5 min(99%~1%A),5~6 min(1%~99%A),6~7 min(99%A)。

**1.3.2 质谱条件** 电喷雾离子源(ESI),正、负离子检测模式;毛细管温度 300  $^{\circ}$ C;喷射电压 3 000 V。采用 Full MS-ddMS<sup>2</sup> 模式采集数据,一级质谱分辨率 35 000,动态增益控制目标  $1\times 10^6$ ,质量扫描范围  $m/z$  70~1 000;二级质谱分辨率 17 500,动态增益控制目标  $2\times 10^5$ ,质量筛选窗口  $m/z$  1.5,碰撞能量 17.5、35、52.5 eV<sup>[13]</sup>。

### 1.4 斑马鱼代谢组学前处理方法

选取 64 条状态良好的 3 月龄斑马鱼,分为空白组和药物注射组,每组 32 条,进行成鱼代谢组学实验。采取腹腔注射法以角度 30~45 $^{\circ}$  注射腹鳍基部,深度以刚好没过针头为宜,其中空白组每条斑马鱼每 3 天注射 10  $\mu$ L 超纯水,药物注射组每条斑马鱼每 3 天注射 10  $\mu$ L 10 mg/L 4-HO-MiPT。各组共注射 10 次,然后处死斑马鱼,解剖出其脑部,每 4 个斑马鱼脑置于 1 个研磨管,向每个研磨管中加入 3 颗研磨珠(直径 3.5 mm)与 1.5 mL 乙腈,随后将研磨管放入全自动样品冷冻研磨仪中进行研磨,设置参数为:运行时间 40 s,中断时间 20 s,研磨 10 次,频率 65 Hz,温度-50  $^{\circ}$ C。研磨完毕后取出研磨管,冰水浴超声 10 min,以 12 000 r/min 离心 10 min。离心完毕后,取上清液于内插管,每个样品取 5  $\mu$ L 混合于同一进样瓶内,制成质量控制样本 QC,将样品和 QC 组进行 UHPLC-Q/Orbitrap HRMS 分析检测。QC 进样规则:在整个注射过程中,每注射 4 次后对 QC 进行分析,以确保系统的稳定性和性能。在正、负离子模式下对 QC 样品结果的评估在 $\pm 2SD$  范围内,表明建立的斑马鱼中毒模型数据符合稳定性要求。

### 1.5 斑马鱼行为学实验方法

选取 40 条状态良好的 3 月龄斑马鱼,分为空白组和药物注射组,每组 20 条,进行成鱼行为学实验。按照 1.4 节方法进行注射,空白组每条斑马鱼注射 10  $\mu$ L 超纯水,药物注射组每条斑马鱼注射 10  $\mu$ L 10  $\mu$ g/mL 4-HO-MiPT,30 min 后分别将其放入矩形成鱼观察箱中,用成鱼观察箱顶端与侧面摄像头实时记录其 5 min 内的行为运动情况<sup>[14]</sup>。空白组与药物注射组均用 IV007 视频侦查系统和 EthoVision XT14 分析系统进行成鱼行为数据记录与处理。

### 1.6 斑马鱼大脑目标基因转录水平分析

选取 18 条状态良好的 3 月龄斑马鱼,分为空

白组和药物注射组, 每组 9 条, 进行脑组织转录组分析。与代谢组学实验同时进行前期注射处理, 处理完毕后处死, 并解剖出脑部, 每 3 个生物检材置于 1 个研磨管, 向每个研磨管中加入 300  $\mu$ L 裂解液与 2 颗研磨珠(直径 3.5 mm), 随后将研磨管放入全自动样品冷冻研磨仪中进行研磨, 设置参数为: 运行时间 1 s, 中断时间 3 s, 研磨次数 60 次, 频率 50 Hz, 温度 4  $^{\circ}$ C。研磨完毕后, 加入 300  $\mu$ L 裂解液, 3 min 后, 以 12 000 r/min 离心 5 min, 取

上清液, 加入同等体积 75%乙醇, 过柱后洗脱, 提取 RNA, 使用超微量核酸蛋白测定仪检测 RNA 的 OD 值, 采用 A260/A280 比值。根据 RNA 进行反转录, 采用反转录试剂盒进行反转录操作, 使用 20  $\mu$ L 反应体系, 反转录反应条件为: 45  $^{\circ}$ C、40 min, 65  $^{\circ}$ C、10 min, 反应结束得到 cDNA。得到 cDNA 后配置 PCR 扩增体系, 采用的引物序列列于表 1, 最后得到了对应基因转录水平 (mRNA) 的变化数据。

表 1 引物信息

Table 1 Primer information

基因序号 No.	引物名称 Primer name	序列 Sequence (5' to 3')	退火温度 Annealing temperature/ $^{\circ}$ C
1	NR2A-a-F	CGCAGAGACATACGACAC	60
	NR2A-a-R	TGGGATACATTGGTTTGAGG	
2	NR2A-b-F	CTCCTATCGGCACATATACC	60
	NR2A-b-R	CTCGGCATCCTCTTGTAG	
3	GRIK3-F	CGCAGAGACATACGACAC	60
	GRIK3-R	TGGGATACATTGGTTTGAGG	
4	bcl-2-F	GAGATGAGTCCGCTTGTG	60
	bcl-2-R	CATCCTCCTTGGCTTTGG	

## 2 实验结果

### 2.1 代谢产物分析

**2.1.1 无监督的主成分分析** 将 QC 样本导入 SIMCA-P14.1 软件中进行主成分分析 (PCA)<sup>[15]</sup>, 结果表明, 在正、负离子模式下对 QC 样本的差异峰面积重复率均在 2 倍标准差范围内, 表明实验方法和仪器具有足够的稳定性。对实验组样

本进行 PCA 分析的结果示于图 2。在 UHPLC-Q/Orbitrap HRMS 正、负离子模式下分别检测出 922、357 种代谢物, 将研究结果导入到 CD 软件中预处理, 经 PCA 分析后, 空白组与药物注射组的数据完全分离, 表明注射 4-HO-MiPT 对斑马鱼代谢产生了明显影响。

**2.1.2 正交偏最小二乘法判别分析** 正交偏最

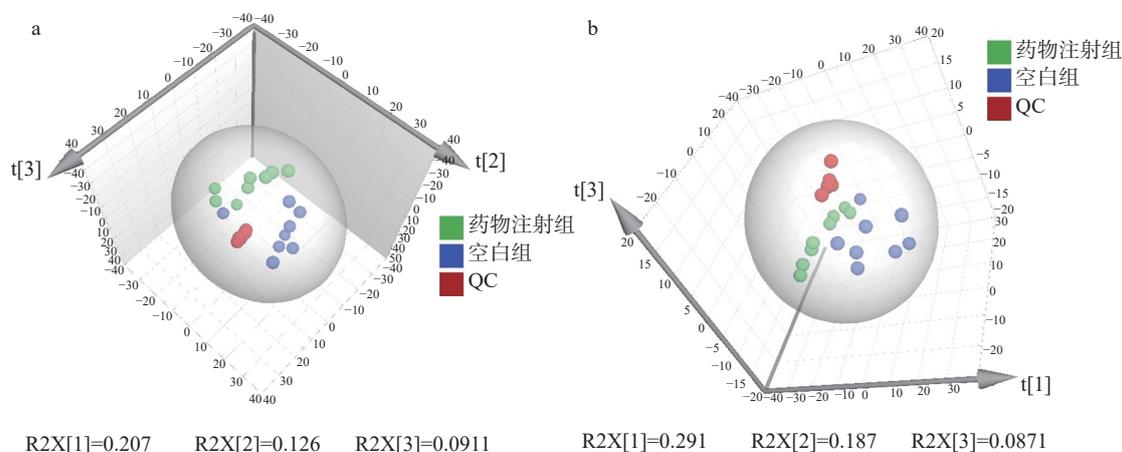


图 2 正(a)、负(b)离子模式下, 斑马鱼空白组与药物注射组 PCA 分析结果 3D 得分图

Fig. 2 3D PCA score plots of metabolomic analysis data for the brain of zebrafishes in blank control group (blue) and drug-treated group (green) under positive (a) and negative (b) ion modes

小二乘法判别分析(OPLS-DA)是一种监督模型,可以降低系统噪声并提取可变信息,将各实验组间差异可视化,具有比 PCA 分析更强的分类能力<sup>[16]</sup>。药物注射组与空白组进行对照得到的 OPLS-DA 得分图示于图 3。其中,横坐标表示各组主成分的得分值,可进行组间差异成分的判别;纵坐标表示正交成分的得分值,可进行组内差异成分的判别。由图 3 可见,组别之间的数据具有较好的区分度。为进一步确定差异代谢物,药物注射组与空白组对应的差异代谢物 S-plot 图示于图 4,突出显示了几个潜在的生物标记(以 VIP 值前 100 且大于 1 为筛选条件),

并将其标记为红色,图中每个点表示 1 种代谢物。将药物注射组与空白组进行对比,发现代谢物有显著变化,验证了 PCA 分析结果<sup>[17]</sup>。

为防止 OPLS-DA 分析模型的过度拟合,对其进行了 200 次响应排序检验。通过对数据进行随机排序,再建立对应的 OPLS-DA 模型,以获取随机模型的 R<sup>2</sup>(模型对 X 和 Y 矩阵的解释率)和 Q<sup>2</sup>(模型的预测能力),与原模型进行线性回归,得到回归直线,并通过回归直线与 y 轴的截距,观察模型是否具有良好的可重复性和可预测性,结果示于图 5。可以看出, R<sup>2</sup> 回归直线的斜率在 0.3~0.4 之间,且 Q<sup>2</sup> 回归直线的截距均小

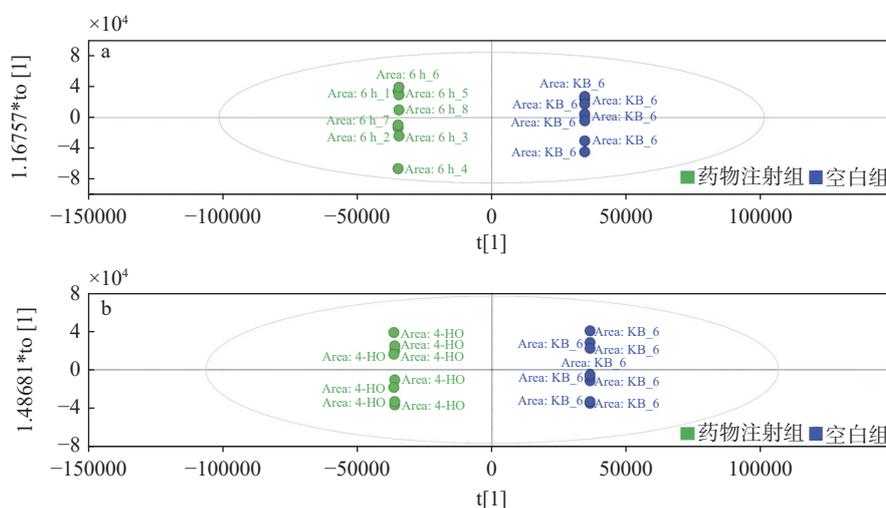


图 3 正(a)、负(b)离子模式下,药物注射组与空白组比较的 OPLS-DA 得分图

Fig. 3 OPLS-DA score plots of metabolomic analysis data for the brain of zebrafishes in blank control group (blue) and drug-treated group (green) under positive (a) and negative (b) ion modes

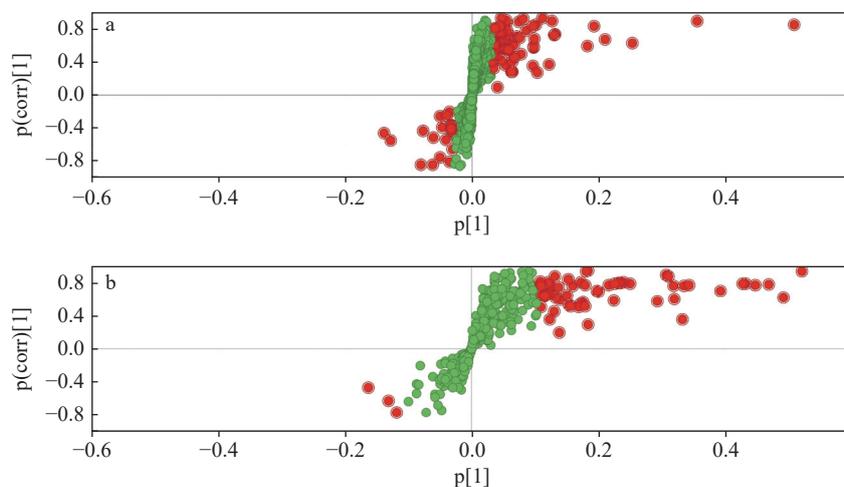


图 4 正(a)、负(b)离子模式下对应的差异代谢物 S-plot 图

Fig. 4 S-plot plots of corresponding differential metabolites under positive (a) and negative (b) ion modes

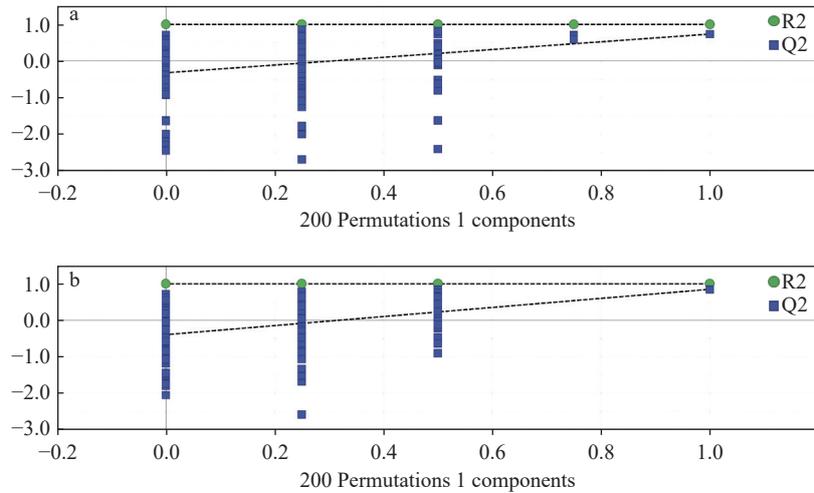


图5 正(a)、负(b)离子模式下,200次离子响应排序结果图

Fig. 5 Charts of the ranking of 200 ion responses under positive (a) and negative (b) ion modes

于0,表明模型的拟合度较好<sup>[18]</sup>。

**2.1.3 差异代谢物分析** 使用 GraphPad Prism 8 对代谢物数据进行统计分析,以平均标准偏差(SD)表示,并换算为帕累托方差。使用 Student's T 检验分析组间的统计差异,以  $P < 0.05$  作为第一步筛选条件。

在进行 OPLS-DA 分析的同时,以 VIP 值前 100 且大于 1 为条件进一步筛选出差异代谢物。将筛选出的差异代谢物与基因组百科全书(KEGG)和 mzCloud 数据库比对后,共鉴定出 37 种差异代谢物,正、负离子模式分别为 23、14 种,具体的代谢物信息列于表 2、3。

表 2 正离子模式下差异代谢物信息

Table 2 Information of metabolic differentiator under positive ion mode

代谢物 Metabolite	化学式 Chemical formula	保留时间 Retention time/min	差异倍数取log2 log2 transformation of fold change	P值 P-value	VIP值 VIP-value	趋势 Trend
肌酸	$C_4H_9N_3O_2$	0.757	-0.4	0.01	16.7	↓
L-组氨酸	$C_6H_9N_3O_2$	0.385	-1.38	0.01	11.6	↓
δ-戊丙酰胺	$C_5H_9NO$	1.331	0.41	0.02	4.2	↑
乙酰左旋肉碱	$C_9H_{17}NO_4$	0.525	-0.93	0.004	6.3	↓
加波沙朵	$C_6H_8N_2O_2$	0.692	-0.53	0.01	4.3	↓
烟酰胺	$C_6H_6N_2O$	0.693	-0.53	0.01	4.3	↓
2-氨基-4-甲基嘧啶	$C_5H_7N_3$	0.382	-1.39	0.009	4.1	↓
咪唑乙酸	$C_6H_8N_2O_3$	0.535	-0.9	0.006	3.3	↓
N-乙酰基-L-组氨酸	$C_8H_{11}N_3O_3$	0.552	-0.86	0.008	3.1	↓
肌酐	$C_4H_7N_3O$	0.54	-0.89	0.01	2.3	↓
7-甲基-3-硝基咪唑并[1,2-a]吡啶	$C_8H_7N_3O_2$	0.384	-1.38	0.006	2.6	↓
2-[(二甲基氨基)亚甲基]茚-1-酮	$C_{12}H_{13}NO$	1.529	7.26	0.000000000001	1.3	↑
叠氮氯霉素	$C_{11}H_{13}N_3O_5$	9.117	3.19	0.0009	2.6	↑
高迪奥甙 C	$C_{25}H_{42}O_9$	0.012	-6.36	0.0002	1.8	↓

续表

代谢物 Metabolite	化学式 Chemical formula	保留时间 Retention time/min	差异倍数取log2 log2 transformation of fold change	P值 P-value	VIP值 VIP-value	趋势 Trend
$\gamma$ -氨基丁酸	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	0.673	-0.57	0.001	1.2	↓
12H-苯并 [5,6][1,4]恶嗪并 [2,3-b]喹啉	C <sub>14</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O	7.605	9.57	0.0001	2.0	↑
巴豆酸	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	0.696	-0.52	0.005	1.1	↓
N6, N6, N6-三甲基- L-赖氨酸	C <sub>9</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.46	-1.12	0.004	1.0	↓
新蝶呤	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	0.09	-3.47	0.002	1.4	↓
二羟甲基咪唑啉	C <sub>11</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	1.352	7.08	0.0002	1.1	↑
琥珀酸	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	0.069	-3.86	0.004	1.1	↓
鸟嘌呤	C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N <sub>3</sub> O	0.644	-0.64	0.01	1.8	↓
牛磺酸	C <sub>2</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>3</sub> S	0.123	-3.02	0.0006	1.2	↓

表 3 负离子模式下差异代谢物信息

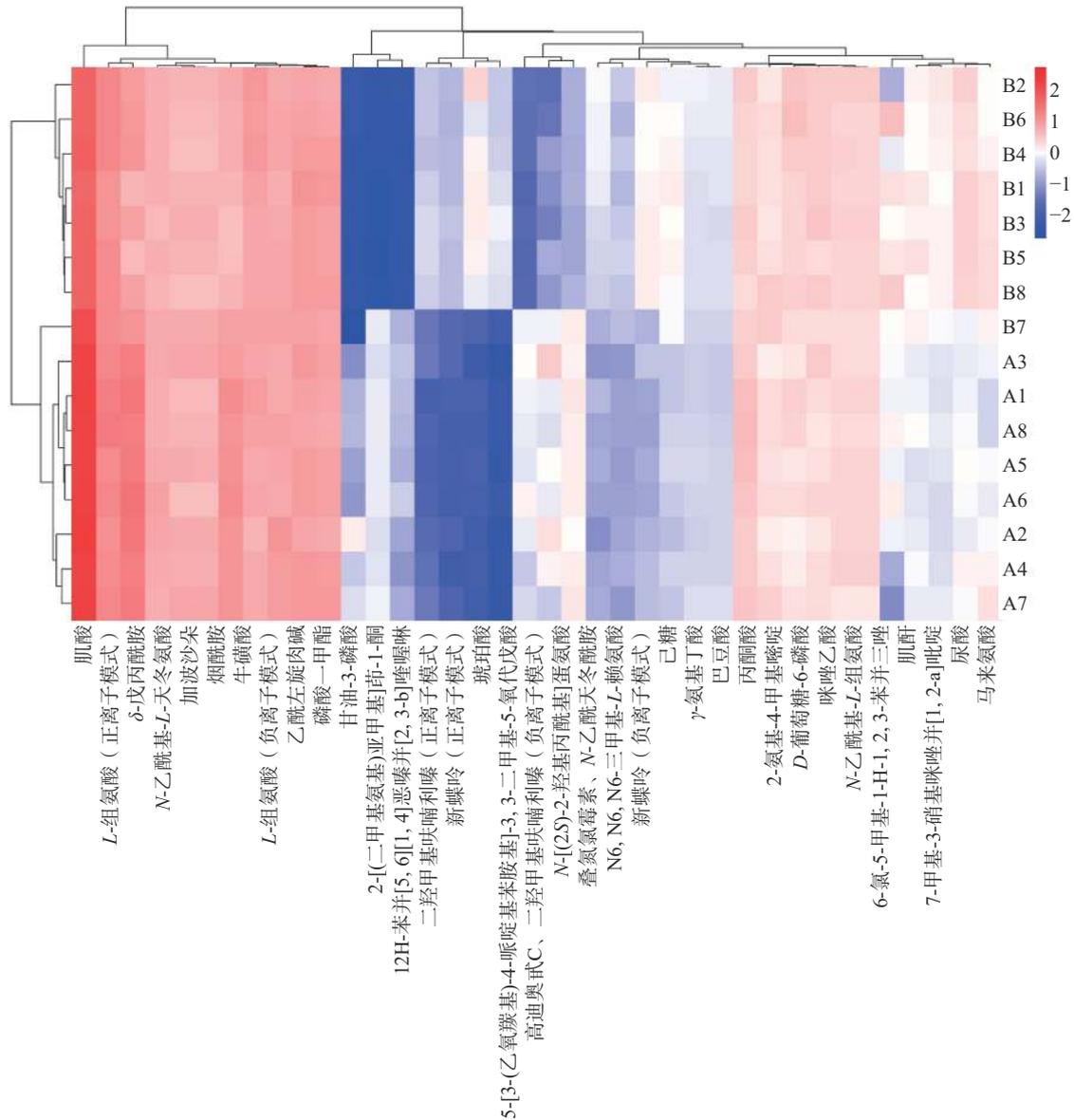
Table 3 Information of metabolic differentiator under negative ion mode

代谢物 Metabolite	化学式 Chemical formula	保留时间 Retention time/min	差异倍数取log2 log2 transformation of fold change	P值 P-value	VIP值 VIP-value	趋势 Trend
磷酸一甲酯	CH <sub>3</sub> O <sub>4</sub> P	0.391	-1.36	0.0004	4.4	↓
L-组氨酸	C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	0.336	-1.57	0.004	4.9	↓
甘油-3-磷酸	C <sub>3</sub> H <sub>9</sub> O <sub>6</sub> P	0.376	-1.41	0.0003	4.2	↓
马来氨酸	C <sub>4</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>3</sub>	0.654	-0.61	0.0003	2.8	↓
N-乙酰基-L-天冬氨酸	C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>5</sub>	0.604	-0.73	0.00008	2.9	↓
丙酮酸	C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	0.577	-0.79	0.02	1.3	↓
D-葡萄糖-6-磷酸	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> O <sub>9</sub> P	0.449	-1.15	0.02	2.2	↓
尿酸	C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	0.276	-1.86	0.0009	2.1	↓
己糖	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	0.288	-1.8	0.0004	1.4	↓
二羟甲基咪唑啉	C <sub>11</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	5.665	5.82	0.0003	1.1	↑
N-[(2S)-2-羟基丙酰基]蛋氨酸	C <sub>8</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>4</sub> S	11.31	3.5	0.004	1.2	↑
新蝶呤	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	0.128	-2.97	0.0002	1.6	↓
N-乙酰天冬酰胺	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	0.244	-2.03	0.01	1.0	↓
6-氯-5-甲基-1-H-1,2,3-苯并三唑	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> ClN <sub>3</sub>	0.05	-4.32	0.001	1.3	↓

通过 BioLadder 网站(<https://www.bioladder.cn>)绘制实验组差异代谢物热图, 示于图 6, 其中纵坐标 A 与 B 分别表示药物注射组与空白组, 数字表示不同的组别, 横坐标表示差异代谢物。由于不同组别之间含量差异较大, 对组间含量的比值进行 log<sub>2</sub> 倍数变化, 以更直观地展示结果。对筛选的差异代谢物之间的相互关系进行行列聚类分析, 并利用 Spearman 算法绘制相关性热

图, 示于图 7。横、纵坐标均为筛选出的差异代谢物, 2 种差异代谢物对应的方格越红, 表示二者的关联性越强, 对应的方格越蓝, 表明二者的关联性越不明显<sup>[19]</sup>。从图 6、7 可知, 染毒组与对照组的代谢物具有明显差异, 且各差异代谢物的相对丰度差异明显。

**2.1.4 代谢通路分析** 经 OPLS-DA 和统计学分析后, 将筛选出的差异代谢物在 MetaboAnalyst5.0



注: 红色越深表明相对含量越高; 蓝色越深表明相对含量越低

图6 药物注射组斑马鱼体内显著性差异代谢物热图

Fig. 6 Heat map of significant differential metabolites in the brain of zebrafishes in the drug injection group

网站 (<https://www.metaboanalyst.ca>) 进行代谢通路富集分析<sup>[20]</sup>, 结果示于图8。可见, 4-HO-MiPT显著影响的代谢通路有6条: 丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢通路, 精氨酸和脯氨酸代谢通路, 丁酸代谢通路, 柠檬酸盐(TCA)循环通路, 新霉素、卡那霉素和庆大霉素生物合成通路, 甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢通路。

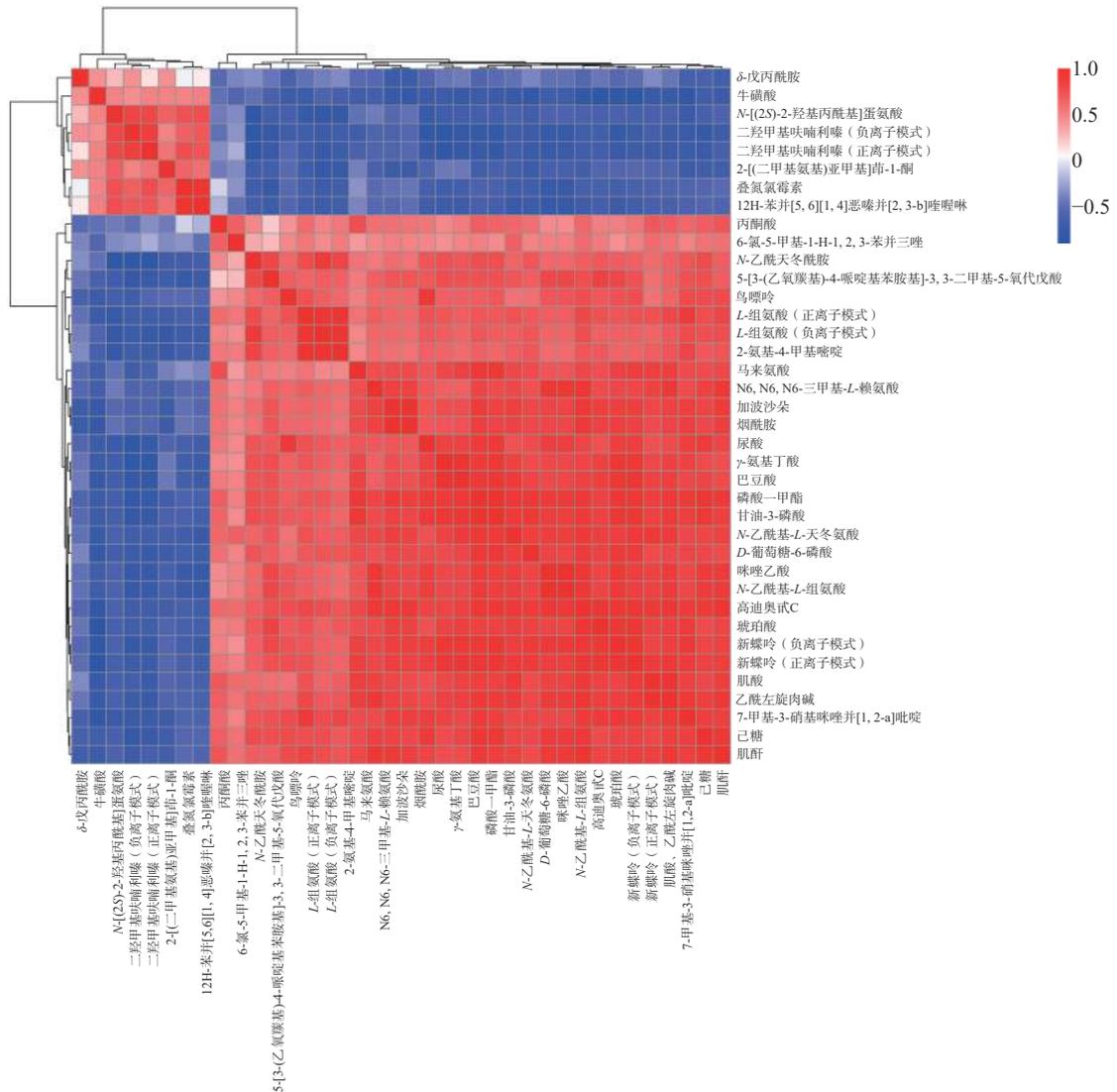
## 2.2 斑马鱼行为学考察

使用EthoVision XT14软件分析斑马鱼注射药物后5 min内的行为, 发现斑马鱼的移动距离、速度、活跃度、角速度等指标均发生了明显

变化。以标准偏差(mean, ±SD)表示数据结果, 示于图9。对比空白组与药物注射组的数据发现, 药物注射后, 斑马鱼移动距离缩短、速度显著下降、狂躁频率上升、活跃与静止频率均明显下降、运动角速度下降, 表明其认知能力下降。

## 2.3 斑马鱼大脑基因转录水平变化分析

通过PCR技术对目标mRNA对应的DNA扩增后, 使用超微量核酸测定仪测定各目标基因mRNA浓度, 以Actin为内参, 利用 $2^{-(\Delta\Delta C_t)}$ 计算各样品目标基因的相对转录水平, 以±SD表示数据比较结果, 示于图10。可以发现, 实验组目标



注: 右侧图例数字大于0表示正相关, 小于0表示负相关

图 7 差异代谢相关性聚类分析热图

Fig. 7 Heatmap of differential metabolic correlation clustering analysis

基因 nr2a-a、nr2a-b、grik3、bcl-2 的转录水平均明显下降 ( $P < 0.05$ )。

### 3 分析与讨论

向斑马鱼注射 4-HO-MiPT 后, 代谢物水平发生显著变化, 其中, 7 种代谢物水平升高、30 种代谢物水平降低。在水平升高的代谢物中, 2-[(二甲基氨基)亚甲基]茛-1-酮通常用作蛋白激酶的抑制剂, 其水平升高表明斑马鱼体内蛋白激酶活性可能增加<sup>[21]</sup>, 该变化与某些癌症和发育相关疾病的风险增加相关。此外, 二羟甲基咪唑啉的显著升高可能提示体内异常出血, 而

*N*-[(2*S*)-2-羟基丙酰基]蛋氨酸的升高表明机体正在通过增强抗氧化防御机制来应对膜脂质过度氧化造成的损伤。在水平降低的代谢物中, 需要注意的是多种与机体免疫功能直接相关的物质, 如新蝶呤的下降可能表明机体免疫活化能力降低, 琥珀酸的减少表示机体抗炎和免疫功能减弱<sup>[22]</sup>。牛磺酸和 *N*-乙酰天冬酰胺的降低进一步证实了免疫系统和中枢神经系统可能遭受影响<sup>[23]</sup>。另外, 部分代谢物的变化还表明对机体代谢过程的广泛影响。如, *L*-组氨酸缺乏可能导致发育迟缓; *N6, N6, N6*-三甲基-*L*-赖氨酸减少则影响心脏能量代谢<sup>[24]</sup>; 尿酸和己糖降低能够减慢机体排出有毒物质的速率。

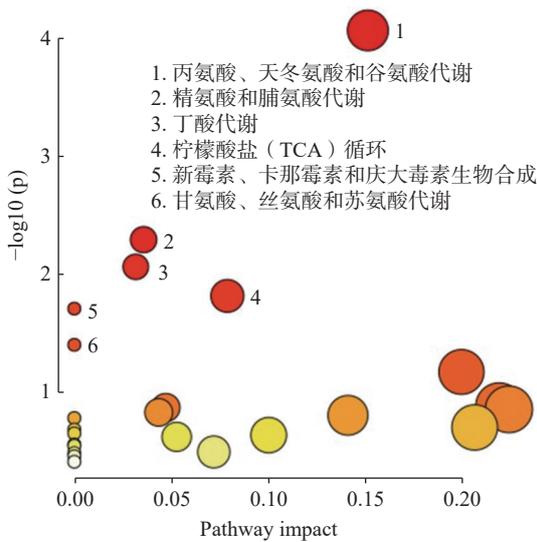


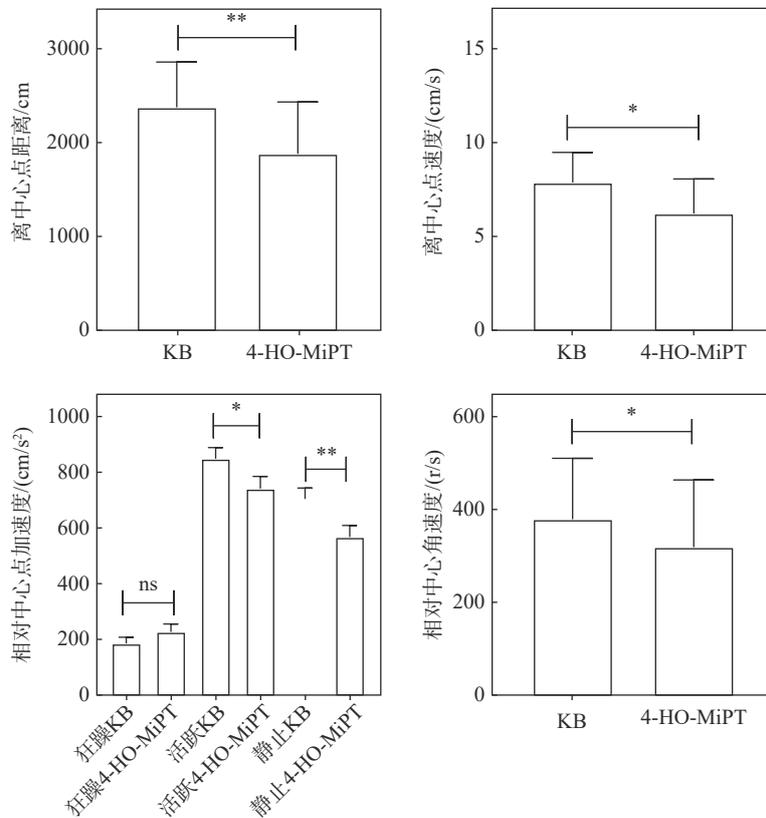
图8 代谢通路分析散点图

Fig. 8 Scatterplot of metabolic pathway analysis

在代谢通路的调整中,多种氨基酸扮演着神经递质或神经调节剂的角色<sup>[25]</sup>。4-HO-MiPT对丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸的代谢通路影响尤为显著,可能对神经细胞和视感细胞产生显著的

细胞毒性<sup>[26]</sup>;天冬氨酸在嘧啶类物质的生产中发挥关键作用,而嘧啶是DNA和RNA的关键组成部分,该代谢通路的变化可能对遗传信息传递产生影响;天冬氨酸和谷氨酸在大脑中高度集中,作为主要的兴奋性神经递质,它们的代谢变化会对中枢神经系统的功能产生重要影响。此外,本研究发现,经4-HO-MiPT处理后,精氨酸-脯氨酸的代谢途径发生显著变化,精氨酸在多个代谢过程中发挥作用,其代谢途径的改变可能会干扰多种细胞功能,如,精氨酸在神经元中参与一氧化氮(NO)的合成,这可能导致神经毒性或呈现神经保护效应<sup>[27]</sup>。三羧酸循环(TCA)不仅对碳水化合物化合物的分解至关重要,而且在脂肪酸和蛋白质的分解中也发挥重要作用。TCA为氨基酸合成提供中间产物,因此,该通路的改变会造成中间产物的变化,间接影响不同氨基酸的代谢路径。本研究结果揭示了4-HO-MiPT对生物体代谢网络的广泛影响,表明其对细胞功能和神经系统可能产生深远影响。

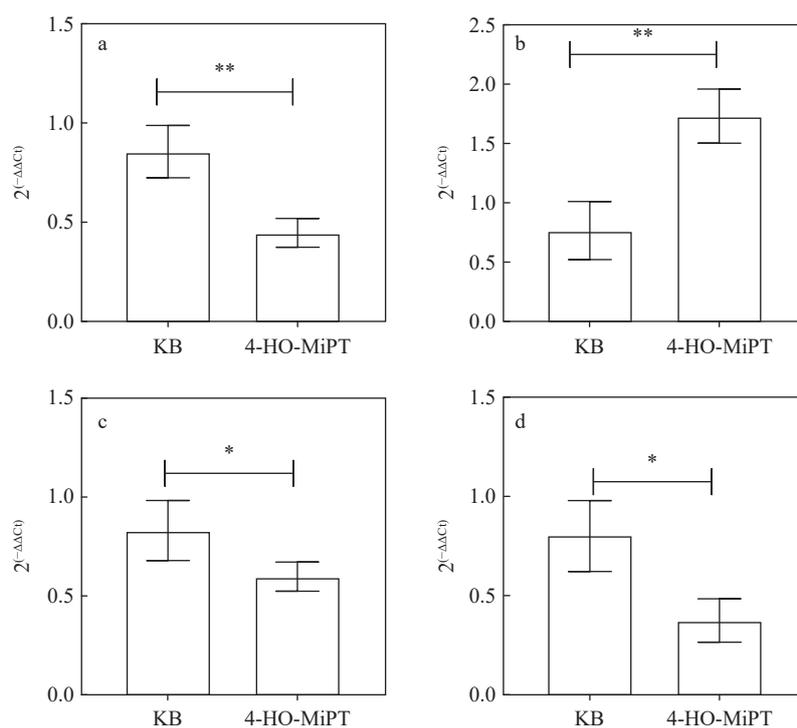
目标基因nr2-a作为脑部NMDA受体的关键



注: \* $P < 0.05$  表示差异有统计学意义; \*\* $P < 0.01$  表示差异显著; \*\*\* $P < 0.001$  表示差异非常显著

图9 药物暴露5 min内斑马鱼的行为效应

Fig. 9 Behavioral effects of zebrafish exposed to the drug within 5 min



注: a. nr2a-a; b. nr2a-b; c. grik3; d. bcl-2

图 10 药物注射组斑马鱼脑部目标基因转录水平变化

Fig. 10 Changes in transcription level of genes in the brain of zebrafishes exposed to the drug

跨膜亚基,在脑发育和维持正常生理功能中发挥着重要作用。本实验发现, nr2a-a、nr2a-b 转录水平降低,表明 4-HO-MiPT 对 NMDA 受体产生了负面影响,使脑部神经元的树突和轴突结构发生显著变化。同样, grik3 作为一种重要的兴奋性神经递质受体,其转录水平下降,表明斑马鱼在药物作用后对外界刺激的反应敏感度减弱,其感知能力遭受损害<sup>[28]</sup>。此外, bcl-2 基因的转录水平降低,表明斑马鱼脑部细胞凋亡速度加快,从而加速了神经元的退化过程,对大脑功能造成损伤。水平显著升高的二羟甲基咪唑三嗪与致癌性直接关联<sup>[29]</sup>,这与 bcl-2 转录水平的下降相互印证。

#### 4 结论

本研究分析了注射 4-HO-MiPT 后斑马鱼的代谢产物、代谢通路和基因变化。结果表明, 4-HO-MiPT 会对斑马鱼产生内源性影响,引起氨基乙酸、哌啶-2-酮、甲氧基膦酸等物质的相对含量发生变化,从而对斑马鱼产生毒性效应。此外,确定了受 4-HO-MiPT 影响的 6 条代谢通路。通过分析斑马鱼脑部基因发现, nr2a-a、nr2a-b、grik3、bcl-2 等与脑部神经系统相关的基因转录水平均明显下降,证明 4-HO-MiPT 对斑马鱼大

脑产生影响,进而影响其行为表现。应用行为学、代谢组学、基因学研究新精神活性物质对斑马鱼的毒理效应,可为其他领域提供研究思路,也为实际生产生活中新精神活性物质的研究与治疗提供数据支撑和思路。

#### 参考文献:

- [1] ANASTOS N, BARNETT N W, PFEFFER F M, LEWIS S W. Investigation into the temporal stability of aqueous standard solutions of psilocin and psilocybin using high performance liquid chromatography[J]. *Science & Justice*, 2006, 46(2): 91-96.
- [2] FITZGERALD K T, BRONSTEIN A C. Selective serotonin reuptake inhibitor exposure[J]. *Topics in Companion Animal Medicine*, 2013, 28(1): 13-17.
- [3] ANDERSON I M. Selective serotonin reuptake inhibitors versus tricyclic antidepressants: a meta-analysis of efficacy and tolerability[J]. *Journal of Affective Disorders*, 2000, 58(1): 19-36.
- [4] HEILS A, TEUFEL A, PETRI S, STÖBER G, RIEDERER P, BENGEL D, LESCH K P. Allelic variation of human serotonin transporter gene expression[J]. *Journal of Neurochemistry*, 1996, 66(6): 2 621-2 624.
- [5] DINGER J, WOODS C, BRANDT S D, MEYER M R,

- MAURER H H. Cytochrome P450 inhibition potential of new psychoactive substances of the tryptamine class[J]. *Toxicology Letters*, 2016, 241: 82-94.
- [6] MALACA S, LO FARO A F, TAMBORRA A, PICHINI S, BUSARDÒ F P, HUESTIS M A. Toxicology and analysis of psychoactive tryptamines[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(23): 9 279.
- [7] 黑海, 王继芬. 色胺类新精神活性物质检验方法研究进展[J]. *化学研究与应用*, 2019, 31(11): 1 869-1 878. HEI Hai, WANG Jifen. Advances in the methods for detecting new psychoactive substances of tryptamine[J]. *Chemical Research and Application*, 2019, 31(11): 1 869-1 878(in Chinese).
- [8] 李楠, 李锋, 魏佳韵, 乔艳玲, 李香豫, 王优美, 徐鹏, 狄斌. 新型色胺类毒品的急性毒性分析 1 例[J]. *中国药物滥用防治杂志*, 2021, 27(4): 549-551, 573. LI Nan, LI Feng, WEI Jiayun, QIAO Yanling, LI Xiangyu, WANG Youmei, XU Peng, DI Bin. Acute toxicity analysis of novel tryptamine drugs: a case report[J]. *Chinese Journal of Drug Abuse Prevention and Treatment*, 2021, 27(4): 549-551, 573(in Chinese).
- [9] 赵森, 徐蒙晨, 姚伟宣, 杨志超, 孟梁. 5-MeO-MiPT 对斑马鱼毒性及生物转化途径研究[J]. *中国法医学杂志*, 2022, 37(2): 194-197. ZHAO Sen, XU Mengchen, YAO Weixuan, YANG Zhichao, MENG Liang. Analysis of the toxic effects and biotransformation pathways of *N*-methyl, *N*-isopropyl-5-methoxytryptamine in zebrafish[J]. *Chinese Journal of Forensic Medicine*, 2022, 37(2): 194-197(in Chinese).
- [10] FERNIE A R, SCHAUER N. Metabolomics-assisted breeding: a viable option for crop improvement?[J]. *Trends in Genetics*, 2009, 25(1): 39-48.
- [11] MOCO S, VERVOORT J, BINO R J, de VOS R C H, BINO R. Metabolomics technologies and metabolite identification[J]. *TrAC-Trends in Analytical Chemistry*, 2007, 26(9): 855-866.
- [12] 李运, 周德来, 王苗. 基于代谢组学分析揭示白花前胡和紫花前胡的差异代谢物[J]. *特产研究*, 2023, 136: 1-11. LI Yun, ZHOU Delai, WANG Miao. Metabolomics analysis revealed the differential metabolites of *Peucedani radix* and *Peucedani decursivi radix*[J]. *Special Wild Economic Animal and Plant Research*, 2023, 136: 1-11 (in Chinese).
- [13] 李丽, 张英秀, 赵日杂, 蔡汶甫, 张志锋. 基于 GC-MS 代谢组学的云南紫苑和臭蚤草的多元统计分析及其抑菌活性研究[J]. *药学报*, 2021, 56(11): 3 118-3 129. LI Li, ZHANG Yingxiu, ZHAO Riza, CAI Wenfu, ZHANG Zhifeng. Multivariate statistical analysis based on GC-MS metabolomics and antibacterial activity of *Aster yunnanensis* and *Pulicaria insignis*[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2021, 56(11): 3 118-3 129(in Chinese).
- [14] 张鹏宇, 王宝堃, 刘可春, 靳梦. 双酚芬对斑马鱼神经行为的影响及毒性作用机制[J]. *生态毒理学报*, 2022, 17(3): 157-166. ZHANG Pengyu, WANG Baokun, LIU Kechun, JIN Meng. Toxic effects of bisphenol fluorene on zebrafish neurobehavior and its underlying mechanism[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2022, 17(3): 157-166(in Chinese).
- [15] NICHOLSON J K, LINDON J C, HOLMES E. 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli *via* multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data[J]. *Xenobiotica*, 1999, 29(11): 1 181-1 189.
- [16] TRYGG J, WOLD S. Orthogonal projections to latent structures (O-PLS)[J]. *J Chemometr*, 2002, 16: 119-128.
- [17] KANG C, ZHANG Y, ZHANG M, QI J, ZHAO W, GU J, GUO W, LI Y. Screening of specific quantitative peptides of beef by LC-MS/MS coupled with OPLS-DA[J]. *Food Chemistry*, 2022, 387: 132 932.
- [18] BOCCARD J, RUTLEDGE D N. A consensus orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) strategy for multiblock Omics data fusion[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2013, 769: 30-39.
- [19] LIVINGSTON E H. Who was student and why do we care so much about his t-test?[J]. *The Journal of Surgical Research*, 2004, 118(1): 58-65.
- [20] 韩春月, 任红微, 王影, 刘二伟, 付志飞. 基于代谢组学和肠道菌群研究褐藻寡糖对脂多糖诱导的何首乌致大鼠肝损伤的影响[J]. *中南药学*, 2023, 21(7): 1 700-1 706. HAN Chunyue, REN Hongwei, WANG Ying, LIU Erwei, FU Zhifei. Protective effect of alginate oligosaccharide on live injury induced by *Polygoni multiflori radix* in lipopolysaccharide activated rats based on gut microbiota and metabonomics[J]. *Central South Pharmacy*, 2023, 21(7): 1 700-1 706(in Chinese).
- [21] LIU C, KE P, ZHANG J, ZHANG X, CHEN X. Protein kinase inhibitor peptide as a tool to specifically inhibit protein kinase A[J]. *Frontiers in Physiology*, 2020, 11: 574 030.
- [22] 黄松华. 健脾益肾汤联合甲泼尼龙琥珀酸钠治疗慢性肾小球肾炎及对肾功能指标的改善作用[J]. *吉林医学*,

- 2023, 44(8): 2 266-2 269.
- HUANG Songhua. Jianpi Yishen Decoction combined with methylprednisolone sodium succinate in the treatment of chronic glomerulonephritis and its improvement on renal function index[J]. *Jilin Medical Journal*, 2023, 44(8): 2 266-2 269(in Chinese).
- [23] 孙晓敬, 田甜, 马茜, 张磊, 李薇, 姚佳, 汪洋. 弓形虫天冬氨酸蛋白酶 2(TgASP2)的生物信息学分析及多克隆抗体的制备[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2023(15): 18-24, 129-130.
- SUN Xiaojing, TIAN Tian, MA Xi, ZHANG Lei, LI Wei, YAO Jia, WANG Yang. Bioinformatics analysis and preparation of polyclonal antibody against *Toxoplasma gondii* aspartic protease 2 (TgASP2)[J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2023(15): 18-24, 129-130(in Chinese).
- [24] KAZAKS A, MAKRECKA-KUKA M, KUKA J, VORONKOVA T, AKOPJANA I, GRINBERGA S, PUGOVICS O, TARS K. Expression and purification of active, stabilized trimethyllysine hydroxylase[J]. *Protein Expression and Purification*, 2014, 104: 1-6.
- [25] SANTOS D, BATOREU M C, ALMEIDA I, RAMOS R, SIDORYK-WEGRZYNOWICZ M, ASCHNER M, MARREILHA dos SANTOS A P. Manganese alters rat brain amino acids levels[J]. *Biological Trace Element Research*, 2012, 150(1): 337-341.
- [26] ENGSKOG M K R, ERSSON L, HAGLÖF J, ARVIDSSON T, PETTERSSON C, BRITTEBO E.  $\beta$ -N-Methylamino-l-alanine (BMAA) perturbs alanine, aspartate and glutamate metabolism pathways in human neuroblastoma cells as determined by metabolic profiling[J]. *Amino Acids*, 2017, 49(5): 905-919.
- [27] TRIPATHY D, CHAKRABORTY J, MOHANAKUMAR K P. Antagonistic pleiotropic effects of nitric oxide in the pathophysiology of Parkinson's disease[J]. *Free Radical Research*, 2015, 49(9): 1 129-1 139.
- [28] 吴伊雪, 肖斌, 孙朝晖, 陈丽丹, 黄晓燕, 李林海. 稳定表达 GRIK3 乳腺癌 MDA-MB-231 细胞株的筛选及鉴定[J]. *临床肿瘤学杂志*, 2018, 23(11): 973-977.
- WU Yixue, XIAO Bin, SUN Zhaohui, CHEN Lidan, HUANG Xiaoyan, LI Linhai. Screening and identification of breast cancer cell line MDA-MB-231 stably expressing GRIK3[J]. *Chinese Clinical Oncology*, 2018, 23(11): 973-977(in Chinese).
- [29] TAKAHASHI M, NAGASE S, TAKAHASHI S, EMI Y, NAKAE D, UCHIDA K, KONISHI Y. Carcinogenic effects of 3-di(hydroxymethyl)-amino-6-(5-nitro-2-furylthienyl)-1,2,4-triazine in the small intestine of Ishibashi and Wistar rats[J]. *Experimental Pathology*, 1984, 26(4): 213-219.

(收稿日期: 2023-11-08; 修回日期: 2024-04-03)