

· 论 著 ·

夜间光暴露小鼠肝脏非靶向代谢组学研究

张榕¹, 刘春华², 胡爽¹, 李鹏翔¹, 魏守刚¹

1.首都医科大学公共卫生学院, 北京 100069; 2.潍坊工程职业学院招生就业处

摘要: **目的** 观察夜间光暴露下小鼠肝脏代谢谱变化。**方法** 选择健康雄性C57BL/6J小鼠随机分为夜间光暴露组和对照组, 每组8只。夜间光暴露组光照/黑暗周期为24 h/0 h, 对照组为12 h/12 h, 连续10 d。采用高效液相色谱-串联质谱分析法检测两组小鼠的肝脏代谢物, 采用主成分分析和正交偏最小二乘法判别分析等方法评价小鼠夜间光暴露建模效果, 利用KEGG数据库分析两组小鼠代谢物变化。**结果** 相较于对照组, 夜间光暴露组小鼠共检出9种主要差异代谢物, 其中甘氨酸-甜菜碱、谷胱甘肽、酪氨酸、甜菜碱、赖氨酸、次黄嘌呤、组氨酸和蛋氨酸含量降低, 甘露糖-6-磷酸含量升高。代谢通路权重分析显示, 夜间光暴露对小鼠肝脏物质代谢通路影响较大的主要有苯丙氨酸-酪氨酸-色氨酸代谢、酪氨酸代谢、果糖和甘露糖代谢、半胱氨酸和蛋氨酸代谢、组氨酸代谢。**结论** 夜间光暴露小鼠肝脏关键差异代谢物为酪氨酸、蛋氨酸、组氨酸和甘露糖-6-磷酸等, 可能影响氨基酸和糖代谢通路。

关键词: 夜间光暴露; 代谢组学; 差异代谢物; 代谢通路

中图分类号: R589

文献标识码: A

文章编号: 2096-5087 (2021) 02-0130-05

Effect of light at night on liver metabolism in mice by untargeted metabolomics

ZHANG Rong*, LIU Chunhua, HU Shuang, LI Pengxiang, WEI Shougang

*School of Public Health, Capital Medical University, Beijing 100069, China

Abstract: **Objective** To observe the changes of liver metabolism in mice exposed to artificial light at night. **Methods** Healthy male C57BL/6J mice were randomly divided into the light at night group and the control group, with 8 mice in each group. The daily light/dark cycle was 12/12 hours in the control group, and 24/0 hours in the light at night group for 10 consecutive days. The hepatic metabolite profiles of the two groups of mice were detected by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. The modelling was assessed by combining principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA). The changes of metabolites in the two groups were compared through KEGG database. **Results** Compared with the control group, 9 different metabolites were detected in the light at night group, among which the down-regulated metabolites were glycine-betaine, glutathione, tyrosine, betaine, lysine, hypoxanthine, histidine and methionine, and the up-regulated ones were mannose-6-phosphate. The weight analysis of the metabolic pathways showed that the major influences on liver of light at night group were phenylalanine-tyrosine-tryptophan metabolism, tyrosine metabolism, fructose and mannose metabolism, cysteine and methionine metabolism and histidine metabolism. **Conclusion** The metabolism of various amino acids and sugars in light at night mice is disturbed, and the key differential metabolites are tyrosine, methionine, histidine and mannose-6-phosphate.

Keywords: light at night; metabolomics; differential metabolites; metabolic pathway

DOI: 10.19485/j.cnki.issn2096-5087.2021.02.006

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81773451)

作者简介: 张榕, 硕士在读

通信作者: 魏守刚, E-mail: shangwei@ccmu.edu.cn

人类和动物的活动皆遵循并适应自然界昼夜光照变化的规律,以维持机体健康。但随着现代社会的发展,人类生活环境光污染日益严重,夜间光暴露成为一个全球性公共卫生问题。人们在夜间进行长时间工作、娱乐,熄灯后房间内电器设备上的LED指示灯,以及室外各种光透入室内均可造成夜间过度光暴露^[1]。夜间光暴露可作为人体氧化应激的应激源,也可作为一种环境内分泌干扰物影响健康^[2-3],并且与恶性肿瘤、肥胖、心脏病、糖尿病、情绪障碍和抑郁症的发生有关^[4-5]。近年来有研究发现,夜间光暴露可能影响机体代谢稳态,即使微弱的夜间光照也会引起代谢紊乱^[6-8]。为了解夜间光暴露对机体代谢的影响及其有效的特异性标志物,本研究采用非靶向代谢组学研究方法分析夜间光暴露小鼠肝脏的代谢图谱,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物 选择健康雄性 C57BL/6J 小鼠 16 只,SPF 级,8 周龄,体重 22~25 g,由首都医科大学实验动物中心提供,用普通饲料常规饲养于实验动物中心 SPF 级动物房内,实验动物使用许可证号为 SYXK(京)2015-0012,每笼 4 只,自由摄食和饮水。动物饲养及实验符合《实验动物管理条例》规定,并通过首都医科大学伦理委员会审查(AEEI-2018-080)。

1.2 夜间光暴露模型构建 小鼠随机分为夜间光暴露组 and 对照组,每组 2 笼 8 只。夜间光暴露组小鼠置于 24 h 光照环境,连续 10 d。采用短直管型日光灯照明,灯管置于鼠笼正上方,每笼 1 根,功率 12 W,光源至笼底距离 60 cm,笼底光照度 1 000 lx,照度均匀无阴影。对照组小鼠置于正常日夜周期变化环境,即光照与黑暗各 12 h,连续 10 d,7:00—19:00 开灯光照,光源设置及笼底光照度与夜间光暴露组相同,其他时间熄灯黑暗,黑暗期间笼底光照度不超过 5 lx。干预完成后,测量小鼠体重。称重后,用 10% 水合氯醛按 4 mL/kg 剂量腹腔注射麻醉小鼠,纵行剪开腹腔,取肝脏,生理盐水清洗干净,液氮速冻后转移至-80℃冰箱保存待测。

1.3 代谢物提取 精确称取 50 mg 肝组织,用 500 μ L 甲醇-水(1:1)匀浆,以离心半径 10 cm、15 000 r/min 离心 10 min,取上清液。沉淀加入 600 μ L 冷的二氯甲烷-甲醇(3:1),匀浆,以离心半径 10 cm、15 000 r/min 离心 10 min,取上清液。将 2 次离心上清液分别进行真空常温浓缩,各用 120 μ L 甲醇-水

(1:1)复溶,合并复溶溶液,以离心半径 10 cm、15 000 r/min 离心 10 min,取上清液采用高效液相色谱-质谱检测。同组别 2 只小鼠肝脏提取物等量混匀后,作为 1 份检测样品检测。

1.4 高效液相色谱-串联质谱检测 色谱条件: Nexera UHPLC LC-30A 色谱仪(岛津 SHIMADZU 公司); Waters HSS T3 色谱柱(150 mm $\times$ 3 mm, 1.8 μ m); 流动相 A 为 0.1% 甲酸溶液; 流动相 B 为乙腈; 柱温 35℃; 流速 0.3 mL/min。梯度洗脱程序: 第 0~10 min, 0%~50%B; 10~13 min, 50%~95%B; 13~14 min, 95%~100%B; 14~15 min, 100%B。

质谱条件: TripleTOF5600+质谱仪(AB SCIEXTM 公司); 扫描模式 DIA; 扫描范围 m/z 100~1 500; 毛细管电压为正极电压 5 000 V, 负极电压 4 500 V; 毛细管温度 500℃; 去簇电压 60 V; 碰撞电压 35 V。

1.5 建模效果分析 将高效液相色谱-质谱的峰提取、去噪音、反卷积、峰对齐、峰匹配和峰强度矫正等操作的原始数据导入 MS-DIAL 2.76 软件进行预处理,并将结果转化为包含化合物保留时间、质核比和质谱响应强度(峰面积)信息的 csv 格式文件,再导入到 EZinfo 2.0 软件,分别进行非监督模式的主成分分析(principal component analysis, PCA)和有监督模式的正交偏最小二乘判别分析(orthogonal partial least squares discrimination analysis, OPLS-DA),获得对实验干预措施(主成分)或模型的解释率,评价小鼠夜间光暴露建模效果。PCA 得分图中每个点代表 1 个样本,每个样本的位置由其代谢成分决定,处于相同生理病理状态的样品通常由相似的代谢物组成,因此在得分图上处于相近或相似位置;反之,彼此距离越远表示其生理病理状态相差越大。与 PCA 相比, OPLS-DA 能将样品分类信息用于建模,从而放大组间差异,还能剔除与分类无关的变量,减少噪音干扰,凸显重要变量,有利于标志代谢物的识别。

1.6 差异代谢物分析 将两组样本检测的所有化合物通过 KEGG 数据库进行差异代谢物筛选,筛选标准设定为同时满足以下 3 个条件: (1) 差异代谢物对本组的贡献值 VIP 大于 1; (2) 与 KEGG 数据库对应物质的相似度大于 700; (3) 夜间光暴露组与对照组的差异代谢物含量差异有统计学意义($P<0.05$)。所筛选的差异代谢物导入 MetaboAnalyst (<https://www.metaboanalyst.ca>) 软件中的 Pathway Analysis 模块,与 KEGG 数据库中的代谢物名称进行匹配后,自动生成代谢通路图。

1.7 统计分析 采用 SPSS 20.0 软件统计分析。定量

资料服从正态分布,采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)描述,两组比较采用 t 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠一般情况 实验期间两组小鼠摄食、饮水、活动度及体重变化均未见异常。干预 10 d 后,夜间光暴露组小鼠体重为 (26.20 ± 1.07) g,对照组为 (26.81 ± 1.20) g,差异无统计学意义($t=1.167$, $P=0.751$)。

2.2 夜间光暴露建模效果 PCA 得分图中表示对照组的点较为分散,但夜间光暴露组和对照组可以完全分开,在非监督模式下两组小鼠的代谢物有明显差异,见图 1。OPLS-DA 得分图显示,暴露组和对照组可以完全分开,软件参数为 $R^2 Y=0.99$, $Q^2=0.88$,均接近 1,模型质量较好;暴露组与对照组代谢物在有监督模式下也存在较大差异,说明此夜间光暴露模型建模成功,见图 2。

2.3 差异代谢物分析

2.3.1 潜在差异代谢物筛选 通过 KEGG 数据库筛选得到 9 个差异代谢物,其中暴露组较对照组含量降低的差异代谢物为甘氨酸-甜菜碱、谷胱甘肽、酪氨酸、甜菜碱、赖氨酸、次黄嘌呤、组氨酸和蛋氨酸,含量升高的差异代谢物为甘露糖-6-磷酸。见表 1。

以 $\log_2$ (倍数检验)作为横坐标,以 $-\log_{10}$ (P 值)为纵坐标,得到差异代谢物的火山图,见图 3。图中黑点为倍数检验 >2 且 t 检验 $P<0.05$ 的物质,距离原点越远表示对两组间区分的贡献越大,代谢物

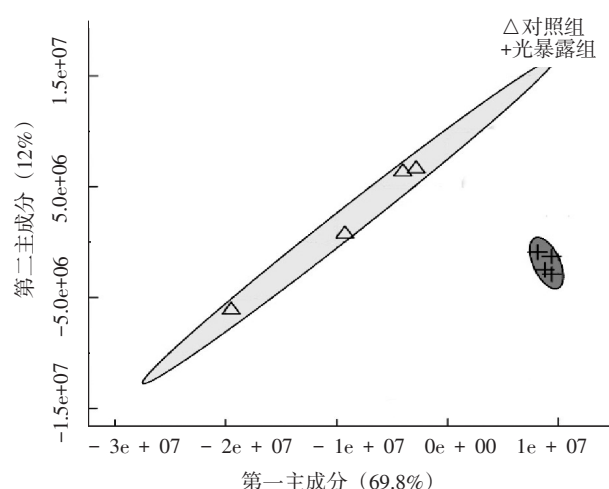


图 1 夜间光暴露组与对照组 PCA 得分图

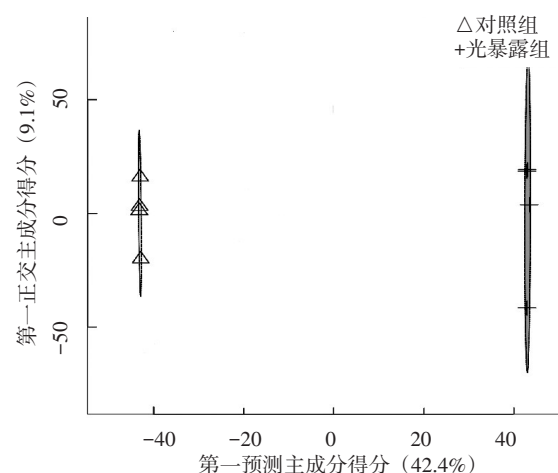


图 2 夜间光暴露组与对照组 OPLS-DA 得分图

差异越明显。图中差异代谢物也在 9 种左右,与 KEGG 数据库筛选结果基本一致。

表 1 夜间光暴露组的差异代谢物

代谢物	分子式	质荷比	保留时间 (min)	VIP	代谢通路	趋势 ^a	P 值
甘氨酸-甜菜碱	C5H11NO2	118.09	1.25	23.29	甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢	下降	0.002
谷胱甘肽	C20H32N6O12S2	613.16	1.43	18.43	谷胱甘肽代谢	下降	0.003
酪氨酸	C9H11NO3	182.08	2.32	17.26	苯丙氨酸-酪氨酸-色氨酸代谢; 酪氨酸代谢	下降	0.014
D-甘露糖-6-磷酸	C6H13O9P	259.02	1.42	5.60	果糖和甘露糖代谢; 氨基糖和核苷酸糖代谢	上升	0.001
甜菜碱	C5H11NO2	118.09	1.33	4.08	甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢	下降	0.011
L- (+) -赖氨酸	C6H14N2O2	147.11	1.08	3.15	氨酰基-tRNA 生物合成; 赖氨酸退化	下降	0.027
次黄嘌呤	C5H4N4O	137.05	1.74	3.06	嘌呤代谢	下降	0.025
L-组氨酸	C6H9N3O2	156.08	1.09	1.46	组氨酸代谢	下降	0.006
蛋氨酸	C5H11NO2S	150.06	1.73	1.39	氨基糖和核苷酸糖代谢; 半胱氨酸和蛋氨酸代谢	下降	0.002

注: a 表示夜间光暴露组对比对照组变化趋势。

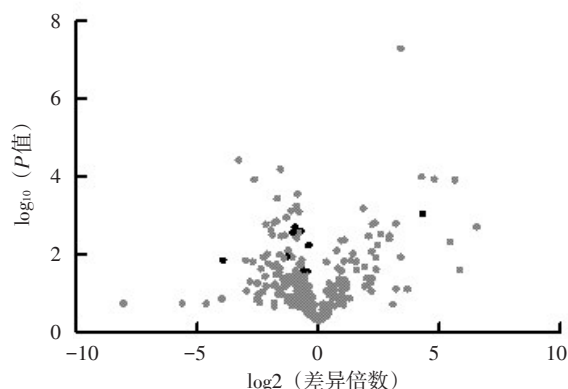


图3 夜间光暴露组和对照组小鼠的差异代谢物火山图

2.3.2 代谢通路分析 代谢通路图中圆点代表不同的代谢通路，圆点直径越大，对代谢通路的重要性越大，结果表明苯丙氨酸-酪氨酸-色氨酸代谢、酪氨酸代谢、果糖和甘露糖代谢、半胱氨酸和蛋氨酸代谢以及组氨酸代谢通路是重要的相关代谢途径，见图4。与上述5种代谢通路相对应的关键差异代谢物分别为含量降低的酪氨酸、蛋氨酸、组氨酸和含量升高的甘露糖-6-磷酸。苯丙氨酸-酪氨酸-色氨酸代谢、酪氨酸代谢、半胱氨酸和蛋氨酸代谢及组氨酸代谢通路均受到夜间光暴露的抑制（表1），酪氨酸、蛋氨酸、组氨酸可作为代谢标志物；果糖和甘露糖代谢水平升高，甘露糖-6-磷酸可作为代谢标志物。

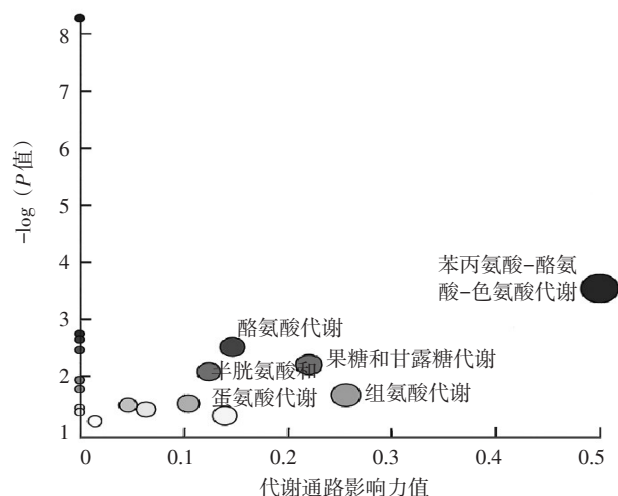


图4 夜间光暴露小鼠主要累及的代谢通路

3 讨论

研究结果表明，夜间光暴露降低小鼠体内苯丙氨酸-酪氨酸-色氨酸代谢、酪氨酸代谢、半胱氨酸和蛋氨酸代谢、组氨酸代谢通路，升高果糖和甘露糖代谢通路的代谢物水平，其关键差异代谢标志物为酪氨酸、蛋氨酸、组氨酸和甘露糖-6-磷酸。

光是情绪和认知的调节器^[9]，有研究发现长期夜间光暴露可诱导小鼠发生类似抑郁的行为^[10]，且极其微弱强度的夜间光暴露也会增加抑郁风险^[11]，而酪氨酸与色氨酸联合有很好的抗抑郁作用^[12]。酪氨酸由苯丙氨酸合成，是人体的半必需氨基酸和生酮生糖氨基酸，还是儿茶酚胺、甲状腺素和黑色素合成的前体物质。补充酪氨酸可以防止精神压力引起的去甲肾上腺素的消耗，以治疗抑郁症^[13]。本实验发现夜间光暴露小鼠酪氨酸水平降低并且关联苯丙氨酸-酪氨酸-色氨酸代谢通路，提示夜间光暴露增加抑郁发生的风险可能与此种代谢抑制有关，苯丙氨酸-酪氨酸-色氨酸代谢通路障碍导致抑郁的机制可能与继发的慢性炎症反应有关^[13]。

蛋氨酸是必需氨基酸中唯一含硫的氨基酸，是合成蛋白质的关键原料之一。蛋氨酸在人体组织中主要有2种代谢途径，即转甲基和转硫途径、转氨途径。通过转甲基作用，蛋氨酸可为机体合成胆碱、核酸等一些重要的甲基化合物提供活性甲基。通过转硫作用生成的牛磺酸，具有明显的降压作用，生成的谷胱甘肽等抗氧化物质可清除体内的过氧化氢和脂质过氧自由基。蛋氨酸还通过转氨途径参与精胺、半精胺等与细胞分裂增殖及生长发育相关化合物的合成。夜间光暴露引起蛋氨酸代谢通路抑制及肝脏蛋氨酸含量降低，将会给人体造成广泛的健康影响，值得后续进一步研究。本文特别提出的一点是，蛋氨酸能促进肝内脂肪代谢，减少肝内脂肪积聚。有研究表明，在日粮蛋氨酸缺乏的情况下，脂肪肝浸润发生快而明显，肝内脂肪沉积量可达50%^[14]。多项流行病学研究均发现夜间光暴露与肥胖发生率增加具有正相关关系^[15]，本研究结果提示，夜间光暴露致蛋氨酸代谢通路抑制可能是其诱发肥胖的机制之一。另有研究表明，蛋氨酸与抗炎性因子的生成有关^[16]，提示夜间光暴露引起蛋氨酸水平下降可能易于慢性炎症状态的形成，而后者也是肥胖发生的一个重要因素。

夜间光暴露小鼠肝脏组氨酸代谢水平下降也可能与肥胖等代谢疾病的发生有关。有文献报道，肥胖女性血清组氨酸水平较低，且与炎症、氧化应激呈负相关，在患有代谢综合征的肥胖女性中，补充组氨酸已被证明可降低胰岛素抵抗、体质指数和脂肪质量，抑制炎症和氧化应激^[17]。

本研究还发现，夜间光暴露小鼠肝脏中甘露糖-6-磷酸水平升高。甘露糖-6-磷酸是果糖和甘露糖代谢通路的一种中间产物，其主要代谢途径是被磷酸甘露糖异构酶催化生成果糖-6-磷酸，进入糖酵解途径

分解(占95%~98%),少量被磷酸甘露糖变位酶催化生成甘露糖-1-磷酸,参与蛋白质糖基化途径(约占2%)。甘露糖与葡萄糖经由细胞膜上的同种转运体蛋白进入细胞,在细胞内甘露糖以甘露糖-6-磷酸的形式存在并被进一步代谢。甘露糖并不影响细胞对葡萄糖的摄取,但细胞内甘露糖-6-磷酸含量升高会抑制参与葡萄糖代谢的己糖激酶、磷酸葡萄糖异构酶和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶,进而影响糖酵解、三羧酸循环、磷酸戊糖途径及聚糖合成^[18]。因此,推测夜间光暴露小鼠肝脏甘露糖-6-磷酸增高将会抑制肝细胞内葡萄糖的代谢。夜间光暴露最终影响的是葡萄糖代谢。有研究表明,夜间光暴露会降低葡萄糖耐量^[19],本研究结果可能揭示了其中一种代谢发生机制,并可解释夜间光暴露与代谢综合征及肥胖患病率上升密切相关的原因^[20]。

综上所述,夜间光暴露抑制多种氨基酸代谢和糖代谢通路,对机体代谢健康有广泛影响,可能是诱发代谢性疾病和抑郁等多种疾病的危险因素。本文仅分析了连续10天的短期光暴露结果,长期夜间光暴露效应有待继续观测。本研究筛选了夜间光暴露小鼠的4种差异代谢标志物,它们是否符合人类夜间光暴露代谢情况,以及夜间光暴露有无其特异性的代谢谱变化标志物有待进一步研究。

参考文献

- BAUER M, GLENN T, MONTEITH S, et al. The potential influence of LED lighting on mental illness [J]. *World J Biol Psychiatry*, 2018, 19 (1): 59-73.
- ASKENAZI L, HAIM A. Effect of light at night on oxidative stress markers in golden spiny mice (*Acomys russatus*) liver [J]. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 2013, 165 (3): 353-357.
- RUSART K L G, NELSON R J. Light at night as an environmental endocrine disruptor [J]. *Physiol Behav*, 2018, 190: 82-89.
- CHO Y M, RYU S H, LEE B R, et al. Effects of artificial light at night on human health: a literature review of observational and experimental studies applied to exposure assessment [J]. *Chronobiol Int*, 2015, 32 (9): 1294-1310.
- MARK Y M, WHITE A J, JACKSON C L, et al. Association of exposure to artificial light at night while sleeping with risk of obesity in women [J]. *JAMA Intern Med*, 2019, 179 (8): 1061-1071.
- FONKEN, LAURA K et al. Dim light at night disrupts molecular circadian rhythms and increases body weight [J]. *J Biol Rhythms*, 2013, 28 (4): 262-271.
- OPPERHUIZEN A L, STENVERS D J, JANSEN R D, et al. Light at night acutely impairs glucose tolerance in a time-, intensity- and wavelength-dependent manner in rats [J]. *Diabetologia*, 2017, 60 (7): 1333-1343.
- CAILOTTO C, LEI J, VAN DER VLIET J, et al. Effects of nocturnal light on (clock) gene expression in peripheral organs: a role for the autonomic innervation of the liver [J]. *PLoS One*, 2009, 4 (5): e5650.
- YAN L, LONSTEIN J S, NUNEZ A A. Light as a modulator of emotion and cognition: lessons learned from studying a diurnal rodent [J]. *Horm Behav*, 2019, 111: 78-86.
- AN K, ZHAO H, MIAO Y, et al. A circadian rhythm-gated subcortical pathway for nighttime-light-induced depressive-like behaviors in mice [J]. *Nat Neurosci*, 2020, 23 (7): 869-880.
- OBAYASHI K, SAEKI K, KURUMATANI N. Bedroom light exposure at night and the incidence of depressive symptoms: a longitudinal study of the HEIJO-KYO Cohort [J]. *Am J Epidemiol*, 2018, 187 (3): 427-434.
- GELENBERG A J, GIBSON C J. Tyrosine for the treatment of depression [J]. *Nutr Health*, 1984, 3 (3): 163-173.
- STRASER B, SPERNER-UNTERWEGER B, FUCHS D, et al. Mechanisms of inflammation-associated depression: immune influences on tryptophan and phenylalanine metabolisms [J]. *Curr Top Behav Neurosci*, 2017, 31: 95-115.
- MARKOVA M, PIVOVAROVA O, HORNEMANN S, et al. Isocaloric diets high in animal or plant protein reduce liver fat and inflammation in individuals with type 2 diabetes [J]. *Gastroenterology*, 2017, 152 (3): 571-585.
- NELSON R J, CHBEIR S. Dark matters: effects of light at night on metabolism [J]. *Proc Nutr Soc*, 2018, 77 (3): 223-229.
- 张频, 黄砚青, 王雪芬, 等. 腺苷蛋氨酸对酒精性肝损伤大鼠甲硫氨酸代谢和脂质过氧化的影响 [J]. *临床肝胆病杂志*, 2007, 23 (1): 31-33.
- FENG R N, NIU Y C, SUN X W, et al. Histidine supplementation improves insulin resistance through suppressed inflammation in obese women with the metabolic syndrome: a randomised controlled trial [J]. *Diabetologia*, 2013, 56 (5): 985-994.
- GONZALEZ P S, O'PREY J, CARDACI S, et al. Mannose impairs tumour growth and enhances chemotherapy [J]. *Nature*, 2018, 563 (7733): 719-723.
- FIGUEIRO M G, RADETSKY L, PLITNICK B, et al. Glucose tolerance in mice exposed to light-dark stimulus patterns mirroring dayshift and rotating shift schedules [J/OL]. *Sci Rep*, 2017, 7 [2020-11-25]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28079162>. DOI: 10.1038/srep40661.
- VERSTEEG R I, STENVERS D J, KALSBECK A, et al. Nutrition in the spotlight: metabolic effects of environmental light [J]. *Proc Nutr Soc*, 2016, 75 (4): 451-463.

收稿日期: 2020-10-10 修回日期: 2020-11-25 本文编辑: 徐文璐