

尖端 Fe_2O_3 纳米棒驱动的高性能质谱 分析用于构建 $\text{PM}_{2.5}$ 暴露鼠的 代谢指纹图谱

张怡涵¹, 滑天宇², 侯士姣¹, 张洋洋², 殷丹²,
姬向波⁴, 张岩皓², 裴聪聪¹, 张书胜^{1,3}

(1. 郑州大学化学学院, 2. 生态与环境学院, 3. 现代分析与基因测序中心, 郑州 450001;
4. 河南牧业经济学院河南省非常规饲料资源创新利用重点实验室, 郑州 450001)

摘要 激光解吸电离质谱(LDI MS)对复杂样本中代谢物的检测受限于基质材料的选择和设计. 结构调控可以进一步提高基质材料的检测性能. 尖端结构能够有效增强电荷转移和光热转换效率, 有望提升纳米材料在LDI MS代谢物检测中的电离和解吸能力. 因此, 本文构建了基于尖端结构 Fe_2O_3 纳米棒(Nr- Fe_2O_3)的LDI MS平台. Nr- Fe_2O_3 具有纳米表面粗糙、光吸收强、可增强电离能力和光热转换等特性, 显著提高了LDI MS对代谢物检测的选择性和灵敏度[与 Fe_2O_3 纳米颗粒(Np- Fe_2O_3)相比, 信号增强3~10倍; 与商业化有机基质相比, 信号增强10~15倍]. 在实际样本检测中, 将基质材料Nr- Fe_2O_3 用于直径 $<2.5 \mu\text{m}$ 的大气颗粒物($\text{PM}_{2.5}$)暴露前后大鼠的血清代谢指纹图谱采集, 并联合T检验成功筛选了暴露前后具有显著波动的差异性代谢特征值. 本文方法为后续设计高性能基质材料提供了新思路, 也为 $\text{PM}_{2.5}$ 暴露毒理学研究提供了一定的理论支撑.

关键词 代谢分析; 激光解吸电离质谱; 金属氧化物

中图分类号 O657.6

文献标志码 A

doi: 10.7503/cjcu20240376

Tip Fe_2O_3 Nanorods Driven High-performance Mass Spectrometry Analysis for Constructing Metabolic Fingerprint of $\text{PM}_{2.5}$ -exposed Mice

ZHANG Yihan¹, HUA Tianyu², HOU Shijiao¹, ZHANG Yangyang², YIN Dan², JI Xiangbo⁴,
ZHANG Yanhao^{2*}, PEI Congcong^{1*}, ZHANG Shusheng^{1,3}

(1. College of Chemistry, 2. School of Ecology and Environment,
3. Center of Advanced Analysis and Gene Sequencing, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China;
4. Henan Key Laboratory of Unconventional Feed Resource Innovative Utilization,
Henan University of Animal Husbandry and Economy, Zhengzhou 450001, China)

Abstract The performance of laser desorption/ionization mass spectrometry (LDI MS) is greatly limited by the choice and design of the matrix. Structural design of the matrix can further improve the detection performance. The sharper corner can effectively enhance charge transfer and photothermal conversion efficiency, thereby improving the

收稿日期: 2024-07-31. 网络首发日期: 2024-09-29.

联系人简介: 张岩皓, 男, 博士, 研究员, 主要从事基于质谱与纳米材料的环境污染物分析与毒理方面的研究.

E-mail: yhzhang_chem@outlook.com

裴聪聪, 女, 博士, 副研究员, 主要从事基于纳米材料的质谱代谢分析用于疾病体外诊断方面的研究.

E-mail: ccpei@zzu.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 22376190, 22106129)资助.

Supported by the National Natural Science Foundation of China(Nos.22376190, 22106129).

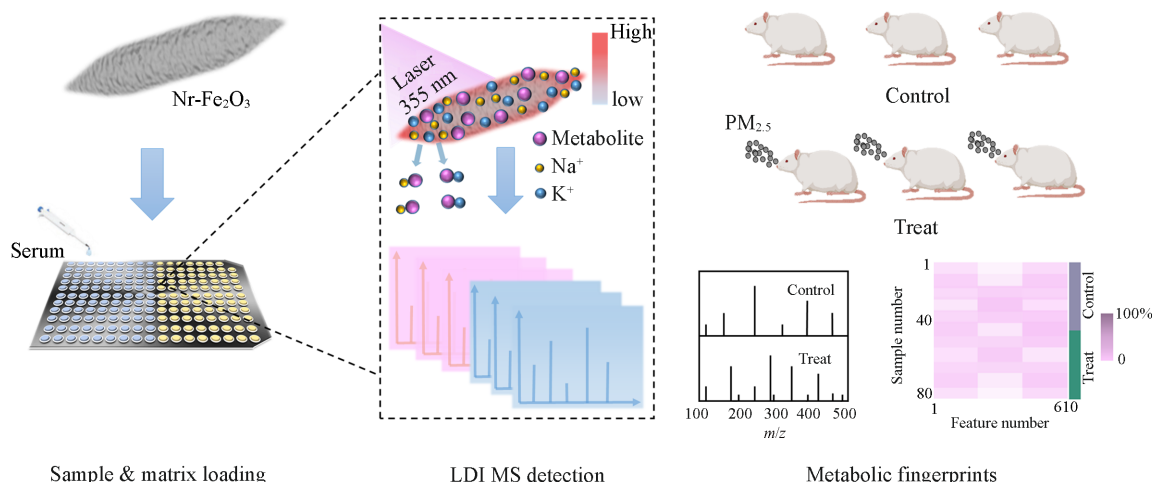
ionization and desorption ability in LDI MS. Therefore, we constructed an LDI MS platform based on tip Fe_2O_3 nanorods ($\text{Nr-Fe}_2\text{O}_3$). The nanoscale surface roughness, strong light absorption, enhanced ionization ability, and photothermal conversion properties of $\text{Nr-Fe}_2\text{O}_3$ have improved the selectivity and sensitivity of LDI-MS for metabolite detection [3–10 fold signal enhancement compared with Fe_2O_3 nanoparticles ($\text{Np-Fe}_2\text{O}_3$), 10–15 fold signal enhanced compared to commercial organic matrices]. In the serum samples, the $\text{Nr-Fe}_2\text{O}_3$ was used to collect serum metabolic fingerprints of fine particulate matter ($\text{PM}_{2.5}$)-exposed mice, and screen the fluctuating features by T-test. Our approach guides us in matrix design for LDI MS metabolic analysis and provides the theoretical support for subsequent $\text{PM}_{2.5}$ exposure toxicology research.

Keywords Metabolic analysis; Laser desorption/ionization mass spectrometry; Metal oxide

代谢指纹分析以系统生物学末端的代谢物为研究对象,可以提供更接近机体表型的实时反馈^[1,2]. 人体体液(如血清)中蕴含丰富的代谢物分子,这些分子能够为体外诊断、毒理研究提供关键性的诊断信息^[3,4]. 体液中代谢物分子的有效检测依赖于基质纳米材料的有效设计和制备,尤其是在激光解吸电离质谱(LDI MS)中^[5,6]. 具有光吸收和热稳定性的无机纳米材料,如贵金属^[7]、金属氧化物^[8,9]和碳材料^[10]已被用作代谢物 LDI MS 检测的基质. 其中,金属氧化物因其半导体特性和较强的紫外光吸收性能而成为 LDI MS 基质的首选材料之一^[11]. 然而,金属氧化物的简单结构在很大程度上限制了其在临床样品检测中对代谢物的电离^[12],导致代谢指纹的提取效率不足. 有效选择组分和设计结构可以进一步提高其性能.

已经有研究发现,与其它金属相比,Fe作为MOFs金属中心离子具有适宜的加成物脱附能(低于3.55 eV)和较低的热耗散,能够实现LDI MS中小分子代谢物信号强度的显著增强^[13]. 目前,基于Fe的金属氧化物的结构对纳米材料辅助解吸/电离过程的影响仍在研究中^[14,15]. 尖端纳米结构通过产生避雷针效应和辐射阻尼可以最大程度地集中入射光^[16],有效增加热电子的产生以及增强光热转换效率^[17,18],有望提升 Fe_2O_3 材料作为基质应用于LDI MS代谢分析时的灵敏度. 空气中直径 $<2.5 \mu\text{m}$ 的大气颗粒物($\text{PM}_{2.5}$)严重危害人体健康^[19],导致许多疾病的发病率增加,例如炎症性肠病、心血管病和肺部疾病^[20,21]. 然而,人们对 $\text{PM}_{2.5}$ 导致机体损伤的机制仍然知之甚少^[22]. 设计尖端结构 Fe_2O_3 纳米棒($\text{Nr-Fe}_2\text{O}_3$)用于LDI MS研究 $\text{PM}_{2.5}$ 介导机体损伤的代谢分子对于了解 $\text{PM}_{2.5}$ 损伤机制十分必要.

本文构建了一个基于尖端结构 Fe_2O_3 纳米棒($\text{Nr-Fe}_2\text{O}_3$)基质的LDI-MS平台,用于采集 $\text{PM}_{2.5}$ 暴露前后大鼠的血清代谢指纹图谱(Scheme 1). $\text{Nr-Fe}_2\text{O}_3$ 基质材料在代谢物检测中表现出高灵敏度[与 Fe_2O_3 纳米颗粒($\text{Np-Fe}_2\text{O}_3$)相比,LDI MS信号增强3~10倍;与商业化有机基质相比,LDI MS信号增强10~15倍]、高重复性[血清样本中的代谢物强度变异系数(CVs) $<14\%$]、分析速度快(每个样品检测时间大约



Scheme 1 Tip $\text{Nr-Fe}_2\text{O}_3$ driven high-performance LDI-MS analysis for constructing metabolic fingerprint of $\text{PM}_{2.5}$ -exposed mice

10 s)并且无需复杂且昂贵的预处理等优势. 本文将基质材料Nr-Fe₂O₃用于采集PM_{2.5}暴露前后大鼠的血清代谢指纹图谱,并联合机器学习和T检验初步分析了暴露前后血清中代谢物的变化,有望为PM_{2.5}暴露造成的机体代谢紊乱和病理性损伤研究提供依据.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

柠檬酸钠(R.G.级,纯度≥98.0%)、*a*-氰基-4-羟基肉桂酸(CHCA, R. G.级,纯度98.0%)、乙酸钠(A. R.级,纯度≥99.0%)、乙二醇(A. R.级,纯度≥99.5%)、氯化苄(R. G.级,纯度99.0%),上海泰坦科技股份有限公司;2,5-二羟基苯甲酸(DHB, R. G.级,纯度≥99.5%),梯希爱(上海)化成工业发展有限公司;吡啶(A. R.级,纯度≥99.5%),佛山西陇化工有限公司;六水合氯化铁(A. R.级,纯度99.0%)、氯化钠(NaCl, A. R.级,纯度99.5%)、氯化钾(KCl, A. R.级,纯度99.8%)、蔗糖(Suc, G. R.级,纯度99.9%),上海麦克林生物科技有限公司;甲醇(A. R.级,纯度99.5%),北京伊诺凯科技有限公司;D-葡萄糖(Glu, A. R.级,纯度99.0%),上海阿拉丁生化科技股份有限公司;L-脯氨酸(Pro, R. G.级,纯度99.0%)、L-缬氨酸(Val, G. R.级,纯度99.0%)、L-亮氨酸(Leu, R. G.级,纯度99.0%)和L-赖氨酸(Lys, R. G.级,纯度98.0%),上海易恩化学技术有限公司;L-组氨酸(His, R. G.级,纯度99.0%),萨恩化学技术(上海)有限公司;D-甘露醇(Man, A. R.级,纯度≥99.0%),天津市科密欧化学试剂有限公司.

TU-1901型紫外-可见(UV-Vis)分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司;Autolab型电化学工作站,瑞士万通有限公司;帕纳科Empyrean型CT断层扫描X射线衍射仪(XRD),荷兰PANalytical公司;Sigma300型场发射扫描电子显微镜(SEM),德国Zeiss集团;蛋白核酸鉴定质谱系统(Autoflex MALDI-MS System),瑞士Bruker公司;JKKJ-1000型PM_{2.5}暴露箱,济南巨康空气净化科技有限公司.

1.2 实验过程

首先,将24.3397 g六水合氯化铁溶于450 mL超纯水中,快速搅拌至样品完全溶解;然后将六水合氯化铁溶液放入烘箱中,于70 °C反应5 h;离心、收集沉淀,将沉淀用超纯水洗涤3次,在40 °C下干燥12 h;将干燥后得到的粉末置于马弗炉中以5 °C/min的速度升温至400 °C,并保持300 min,即得到样品Nr-Fe₂O₃.

首先,将0.7008 g柠檬酸钠和2.8007 g六水合氯化铁溶于100 mL乙二醇中,然后加入4.5005 g乙酸钠,快速搅拌至样品完全溶解;将混合溶液置于内衬聚四氟乙烯的不锈钢高压釜中,于200 °C下反应10 h;离心、收集沉淀,并用乙醇洗涤3次,在40 °C下干燥12 h;将干燥后得到的粉末置于马弗炉中以5 °C/min的速度升温至400 °C,并保持300 min,得到样品Np-Fe₂O₃.

将100 μL苄基氯和2 mL吡啶的混合溶液转移到25 mL圆底烧瓶中;于60 °C搅拌5 h;然后通过旋转蒸发除去过量的吡啶,即得到苯甲基吡啶鎓离子([BP]⁺).除了作为分析物外,[BP]⁺还可用作化学温度计以检测激光解吸过程中Nr-Fe₂O₃和Np-Fe₂O₃向[BP]⁺离子的传热程度.当向[BP]⁺的传热超过解吸反应的临界能量时,[BP]⁺可以解吸为苄基阳离子([BP-pyridine]⁺)和中性吡啶分子(pyridine):



在 m/z 170处检测到的[BP]⁺和在 m/z 91处检测到的片段离子[BP-pyridine]⁺的总强度被确定为[BP]⁺解吸的总强度,表示基质的解吸能力.[BP]⁺的强度与[BP]⁺解吸总强度的相对比例为[BP]⁺的存活率(SY, %),表示传热的程度:

$$\text{SY} = [I_{m/z\ 170} / (I_{m/z\ 170} + I_{m/z\ 91})] \times 100\% \quad (2)$$

式中: $I_{m/z\ 170}$ 为质荷比为170的离子强度; $I_{m/z\ 91}$ 为质荷比为91的离子强度.

从辽宁长生生物公司获得4周龄的SD雄性大鼠(16只),适应7 d后,将其随机分为两组,每组8只;所有大鼠均饲养在标准笼中,每笼2只,共8笼;其中一组大鼠置于洁净舱(过滤去除PM_{2.5}的空气),一组大鼠置于暴露舱(环境浓度PM_{2.5}的空气),人工光照/黑暗周期为12 h,恒温范围为(22±2) °C,相对湿度为60%,随意获取食物和水,每两天更换食物颗粒,每天清洁房间,每7 d称一次

体重; 70 d后, 分别提取暴露于PM_{2.5}环境下的大鼠和未暴露于PM_{2.5}环境下的大鼠的血液, 在3000 r/min的转速下离心15 min, 提取上清液, 置于-80 °C冰箱备用. 所有动物实验均按照郑州大学伦理审查委员会的要求进行.

光电流-时间曲线采用标准三电极系统测定. 以基质材料作为工作电极, Ag/AgCl电极作为参比电极, Pt片作为辅助电极, 0.5 mol/L Na₂SO₄溶液作为电解液, 获得光电流图谱. 将标准小分子(Pro, Lys, His, Glu和Man)溶于去离子水中制备代谢物. 通过检测盐(0.50 mol/L NaCl和0.50 mol/L KCl)和蛋白质[5.00 mg/mL牛血清白蛋白(BSA)]中标准分子(Pro, Lys, Leu, Suc和Man)的混合物, 验证了检测复杂生物流体中小分子的可行性. 将基质材料(Nr-Fe₂O₃和Np-Fe₂O₃)溶于去离子水中配制成浓度为1 mg/mL的溶液. 将粉末状有机基质CHCA和DHB分别溶解在0.1%的TFA缓冲溶液(水和乙腈的体积比为7:3)中, 浓度分别为4.00 mg/mL和10.00 mg/mL. 在LDI MS实验中, 将1 μL分析物溶液和1 μL基质溶液分别滴到靶板上并干燥以进行LDI MS检测. 将[BP]⁺溶解于体积比为1:1的甲醇和水的混合溶液中. 使用配备有355 nm Nd:YAG激光器的Autoflex MALDI-TOF进行LDI MS检测. 设置激光强度为25%, 重复频率为1 kHz, 加速电压为20 kV. LDI MS检测的延迟时间为150 ns, 每次分析的激光发射次数为2000次. 采用标准小分子代谢物进行质量校准以得到准确的测定结果(±10⁻³ Da).

2 结果与讨论

2.1 Nr-Fe₂O₃的制备与表征

通过简单的液相反应和热解即可制得Nr-Fe₂O₃. 为了证明尖端的优势, 合成了Np-Fe₂O₃作为对照. 首先对两种Fe₂O₃纳米材料进行了SEM的表征. 由图1(A)可以看出, 所制备的Nr-Fe₂O₃为具有尖端的纳米棒, 尺寸均一, 平均长度为200 nm左右, 其中尖端宽度为20 nm左右. 由图1(A)还可以看出, Nr-Fe₂O₃表面具有粗糙的纳米级结构, 这可能是由于在热解过程中小颗粒在材料表面烧熔重组而成. 由图1(B)可以看出, Np-Fe₂O₃为均匀的纳米颗粒, 平均粒径为100 nm左右. Nr-Fe₂O₃和Np-Fe₂O₃的XRD谱均显示出属于Fe₂O₃(PDF No. 25-1402)的典型衍射峰, 表明Nr-Fe₂O₃已成功制备[图1(C)].

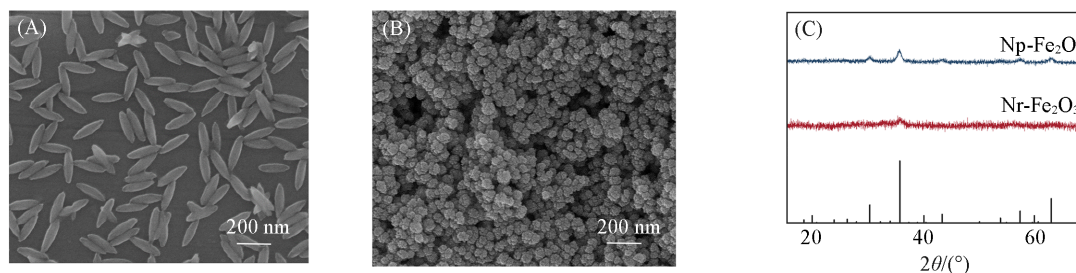


Fig. 1 SEM images(A, B) and XRD patterns(C) of Nr-Fe₂O₃ and Np-Fe₂O₃.
(A) Nr-Fe₂O₃; (B) Np-Fe₂O₃.

2.2 Nr-Fe₂O₃作为LDI MS基质的性能

通过对标准代谢物Glu进行LDI MS检测, 对基质材料的浓度进行了优化. 由图2可以看出, 当基质材料的浓度为1 mg/mL时, 代谢物的检测性能最佳, 因此选择基质材料的浓度为1 mg/mL. 以Pro, Glu和Man作为代表性代谢物, 测试了Nr-Fe₂O₃和Np-Fe₂O₃作为LDI MS基质的性能. 在正离子反射模式下进行LDI MS检测, 从图3(A)~(C)可以看出, 采用两种纳米材料作为基质, 均获得了3种代谢物的Na⁺/K⁺加成峰. *m/z* 138.05和154.05处分别为[Pro+Na]⁺和[Pro+K]⁺的峰, *m/z* 203.16和

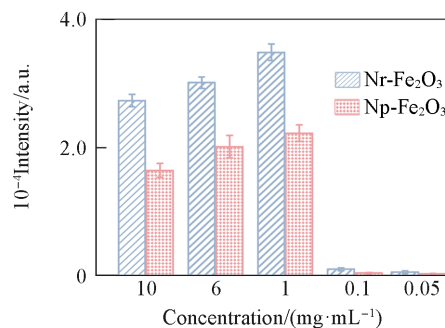


Fig. 2 Mean LDI MS intensities of sodium-adducted peaks for Glu in 5 experiments using Nr-Fe₂O₃ and Np-Fe₂O₃ as matrices with different concentrations

219.26处分别为 $[\text{Glu}+\text{Na}]^+$ 和 $[\text{Glu}+\text{K}]^+$ 的峰, m/z 205.17和221.27处分别为 $[\text{Man}+\text{Na}]^+$ 和 $[\text{Man}+\text{K}]^+$ 的峰. 为了比较两种材料对代谢物LDI MS检测的增强效果, 对5次测试得到的峰值强度进行了统计分析. 由图3(D)可以看出, 以Nr- Fe_2O_3 为基质检测到的3种代谢物的峰值强度是以Np- Fe_2O_3 为基质时的3~10倍, 表明具有尖端形貌的Nr- Fe_2O_3 能够增强LDI MS的代谢物检测性能.

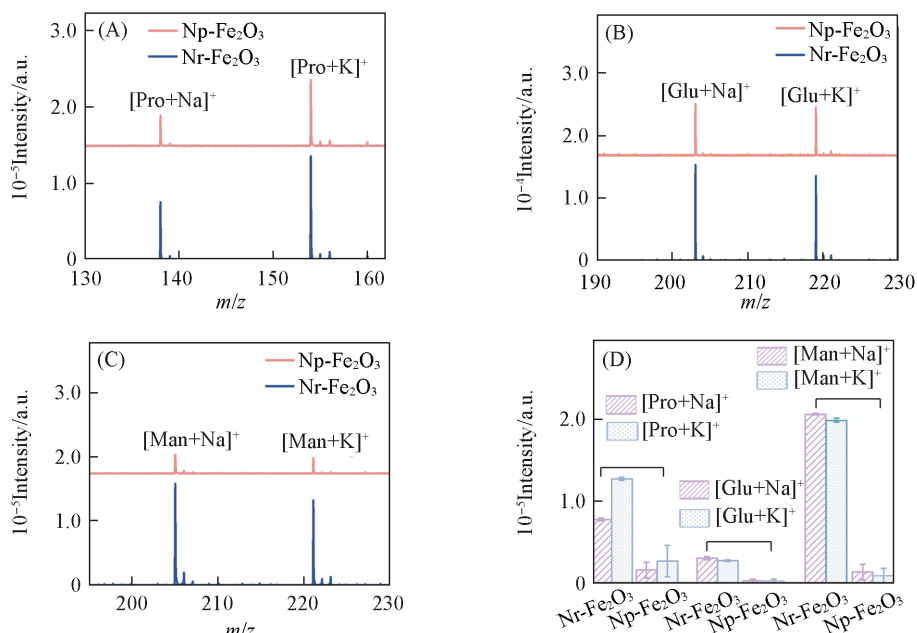


Fig. 3 Typical LDI MS spectra for detection of Pro, Glu and Man(A—C) and the mean intensities (5 experiments) of sodium-adducted peaks/potassium-adducted peaks for Pro, Glu and Man(D) using Nr- Fe_2O_3 and Np- Fe_2O_3 as matrices

对具有尖端形貌的Nr- Fe_2O_3 的增强机理进行了分析. 通常, 基质材料需要吸收质谱激光器发射的355 nm波长的能量, 并进一步通过光电和光热转化将能量传递给分析物^[23]. 因此, 具有较强的紫外吸收是作为基质材料的必要条件^[24]. 首先测试了两种材料的紫外-可见吸收光谱. 由图4(A)可见, 与Np- Fe_2O_3 相比, Nr- Fe_2O_3 在波长355 nm处具有略微增强的光吸收, 表明尖端具有聚集光的能力并可以有效吸收质谱激光的能量. 进一步测试了材料在光激发下的光电流密度. 由光电流-时间曲线[图4(B)]可见, Nr- Fe_2O_3 比Np- Fe_2O_3 表现出更强的光电流强度, 表明尖端能够通过避雷针效应和辐射阻尼最大程度地集中入射光, 产生更多游离的电荷, 进而增强分析物的离子化能力. 除电荷转移外, 基质的光热转换能力对提高LDI MS性能也至关重要. 为了研究Nr- Fe_2O_3 和Np- Fe_2O_3 的光热转换能力, 首先监测了样品悬浊液在紫外光照射下的温度变化. 由图5(A)可以看出, Nr- Fe_2O_3 和Np- Fe_2O_3 的样品悬浊液显示出相似的起始温度, 在照射相同时间后, Nr- Fe_2O_3 溶液的温度升高得更多[图5(B)], 表明其光热转换能力更强.

此外, 为了进一步验证Nr- Fe_2O_3 的光热转换能力, 以 $[\text{BP}]^+$ 为化学温度计, 总 $[\text{BP}]^+$ 强度包括 $[\text{BP}]^+$

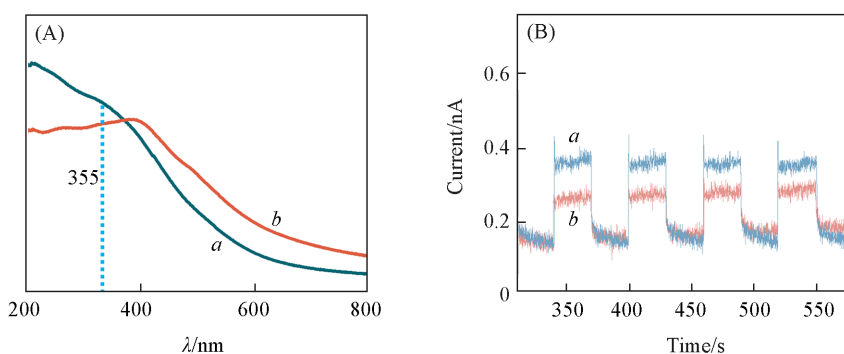


Fig. 4 UV-Vis absorption spectra(A) and photocurrent-time curves(B) of Nr- Fe_2O_3 (a) and Np- Fe_2O_3 (b)

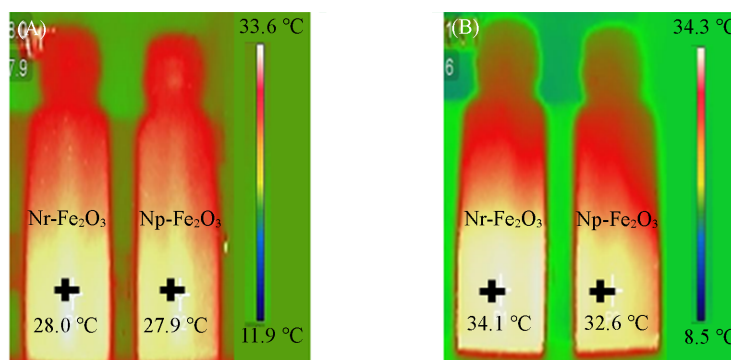


Fig. 5 Infrared thermal images of the initial temperature(A) and the temperature after 30 min of illumination(B) of $\text{Nr-Fe}_2\text{O}_3$ and $\text{Np-Fe}_2\text{O}_3$

及其碎片 $[\text{BP} - \text{pyridine}]^+$ 的强度,代表基质的解吸能力. $[\text{BP}]^+$ 在激光照射下的存活率(SY)与热驱动解吸程度成反比. 由图6(A)可见,与 $\text{Np-Fe}_2\text{O}_3$ 相比, $\text{Nr-Fe}_2\text{O}_3$ 在相同激光强度下表现出更高的解吸效率 $[\text{Nr-Fe}_2\text{O}_3$ 总 $[\text{BP}]^+$ 强度(Median intensity: 225630.96) > $\text{Np-Fe}_2\text{O}_3$ 总 $[\text{BP}]^+$ 强度(Median intensity: 166293.52)],并且其热驱动解吸增强更多[图6(B)]. 结果表明,尖端会引起热驱动解吸增强,这也与 $\text{Nr-Fe}_2\text{O}_3$ 具有较高的光热转换效率一致. 因此,预计 $\text{Nr-Fe}_2\text{O}_3$ 将有助于更有效地将光能转化为热能,从而促进分析物的解吸. 综上所述, $\text{Nr-Fe}_2\text{O}_3$ 的尖端能够最大限度地聚集光,产生更多的电荷并增强光热转换效率,从而增强分析物在LDI-MS中的离子化和解吸能力.

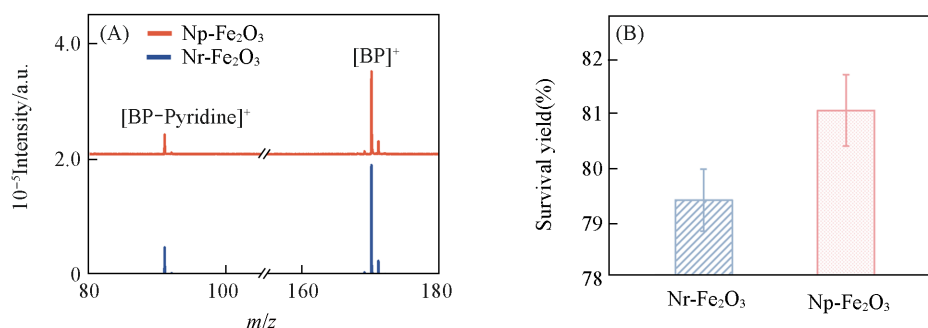


Fig. 6 Typical LDI MS spectra(A) and survival rate of parent ions(B) using $\text{Nr-Fe}_2\text{O}_3$ and $\text{Np-Fe}_2\text{O}_3$ as matrices for desorption $[\text{BP}]^+$

目前,LDI MS的检测通常选用商业化有机基质,比如CHCA和DHB^[25]. 为了进一步证明 $\text{Nr-Fe}_2\text{O}_3$ 在检测小分子代谢物方面的优势,分别以 $\text{Nr-Fe}_2\text{O}_3$, CHCA和DHB为基质,对两种典型的小分子代谢物(Val和His)进行了LDI MS分析. 由图7(A)和(B)可见, $\text{Nr-Fe}_2\text{O}_3$ 提供的Val和His的平均信号强度比CHCA和DHB的平均信号强度增强约10~15倍. 此外,5次LDI-MS测试的结果也验证了以 $\text{Nr-Fe}_2\text{O}_3$ 为

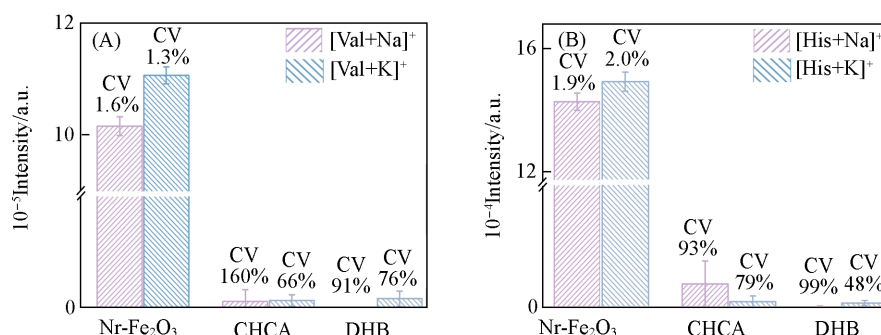


Fig. 7 The mean intensities of sodium-adducted peaks/potassium-adducted peaks of Val(A) and His (B) using $\text{Nr-Fe}_2\text{O}_3$, CHCA, and DHB as the matrices

基质时检测结果具有良好的重现性. 当使用Nr-Fe₂O₃作为基质时, Val和His的CVs为1.3%~2.0%, 低于CHCA(约60%)和DHB(约70%). Nr-Fe₂O₃在代谢分析中的良好重现性主要归因于其与分析物的均匀共结晶. 表面粗糙度测试结果[图8(B)和(C)]表明, Nr-Fe₂O₃的表面高度算术平均偏差(Sa)为68.601 nm[图8(A)], 低于CHCA(Sa=0.108 μm)和DHB(Sa=0.802 μm)的.

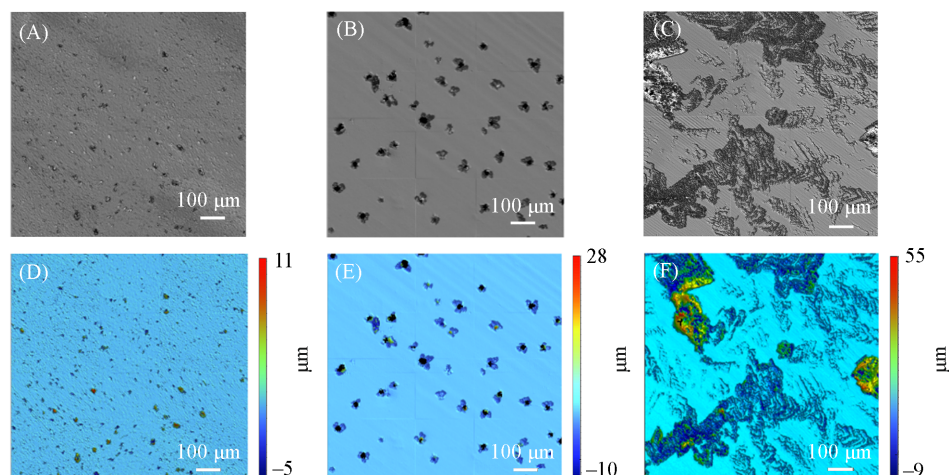


Fig. 8 Dark field images(A—C) and confocal scanning images(D—F) of Nr-Fe₂O₃(A, C), CHCA(B) and DHB(C, F)

基于Nr-Fe₂O₃优异的LDI MS检测能力, 进一步测试了Nr-Fe₂O₃对常见代谢物的最低检出能力. 由图9可以看出, Pro, Lys, Glu和Man的最低检出浓度分别为0.08, 30, 20和2 μmol/L. 其中Lys, Pro和Glu在人体内的平均代谢水平分别为(219.9±29.3), 188.68~272.32及3000~6000 μmol/L^[26]. 以Nr-Fe₂O₃为基质的LDI MS的检出浓度远低于人体的平均代谢水平, 这说明其检测能力足以用于开展代谢小分子检测.

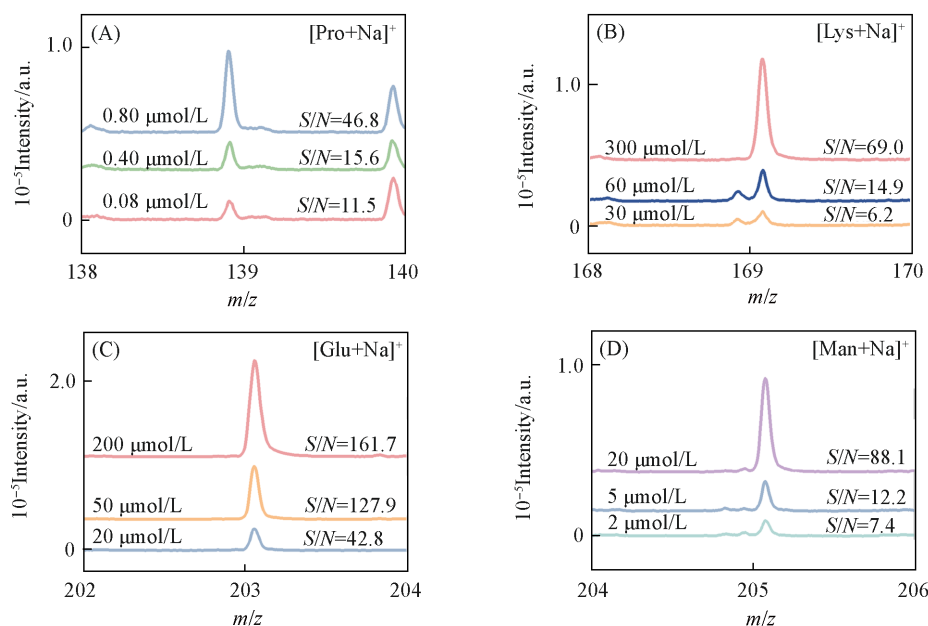


Fig. 9 Typical LDI MS spectra of Pro(A), Lys(B), Glu(C), and Man(D) at different concentrations of Nr-Fe₂O₃ as matrix

为了验证Nr-Fe₂O₃辅助LDI MS对复杂样本中代谢物的检出能力, 分别配制了含高浓度盐离子(0.5 mol/L KCl, 0.5 mol/L NaCl)和高浓度蛋白(5 mg/mL BSA)的小分子代谢物混合液(Lys, Pro, Leu, Man和Suc). 由图10(A)~(C)可以看出, 5种代谢物的特征峰均可以被检测出(箭头符号表示代谢物的钠加合

峰), 表明 $\text{Nr-Fe}_2\text{O}_3$ 作为 LDI MS 基质具有极佳的耐盐耐蛋白性能, 同时也证明了 $\text{Nr-Fe}_2\text{O}_3$ 的纳米级表面粗糙度可以根据尺寸效应用于生物样品中的蛋白质原位分离, 实现对小分子代谢物的选择性富集. 为了进一步验证 $\text{Nr-Fe}_2\text{O}_3$ 对临床样本中代谢物检测的可行性, 采用 $\text{Nr-Fe}_2\text{O}_3$ 作为基质提取大鼠血清样本中的代谢物. 由图 10(D) 可以看出, $\text{Nr-Fe}_2\text{O}_3$ 能够提取到大量的小分子特征峰. 随机选择了 3 个大鼠的血清样本, 分别进行了 5 次独立检测, 通过预处理提取每个 m/z 的信号强度. 由图 10(E) 可以看出, 基于 $\text{Nr-Fe}_2\text{O}_3$ 基质提取的 m/z 信号强度的 CVs 均在 14% 以内 (12%~14%), 证明了 $\text{Nr-Fe}_2\text{O}_3$ 具有较强的稳定性和检测重复性. 因此, $\text{Nr-Fe}_2\text{O}_3$ 辅助的 LDI MS 平台有望用于临床样本灵敏、可重复和全面的代谢分析.

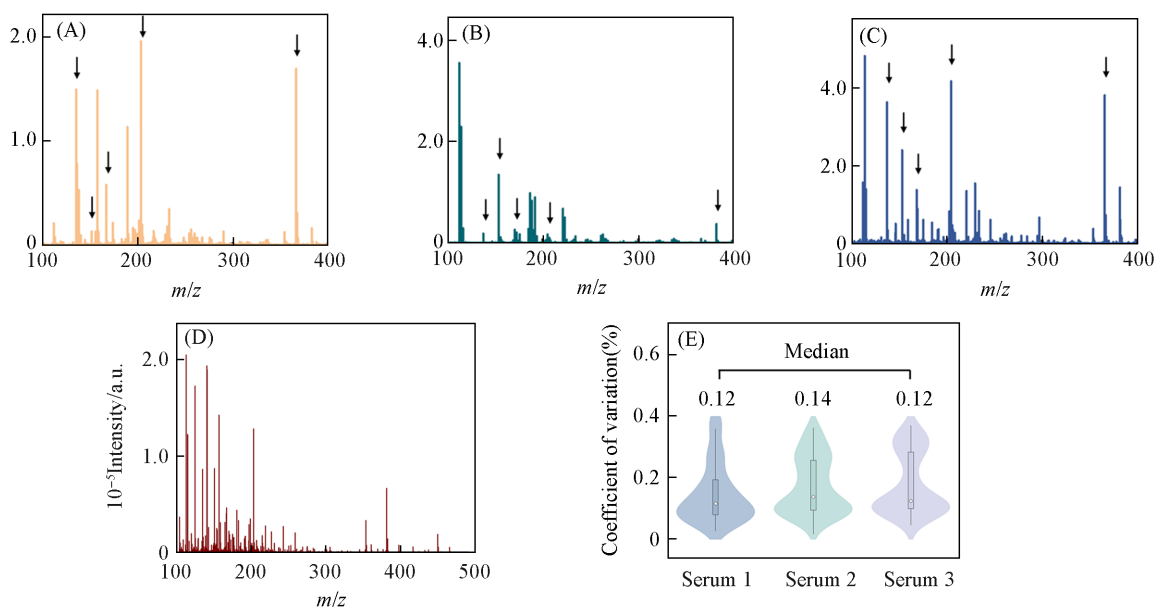


Fig. 10 $\text{Nr-Fe}_2\text{O}_3$ assisted LDI MS in the detection of metabolite in complex samples

(A—C) Typical LDI MS spectra of Man, Lys, Suc, Pro and Leu in 0.5 mol/L NaCl (A), 0.50 mol/L KCl (B) and 5 mg/mL BSA (C) solutions; (D) Typical LDI MS spectra of serum sample; (E) CV distribution of intensities for the apparent signals extracted through data preprocessing using three $\text{PM}_{2.5}$ -exposed mice serum samples by five independent tests using $\text{Nr-Fe}_2\text{O}_3$ as the matrix.

基质的有效光捕获、电荷转移和光热转换等性质对增强代谢物的离子化和解吸能力至关重要^[27]. 本文采用低成本的原材料合成了具有尖端的 $\text{Nr-Fe}_2\text{O}_3$, 并且阐述了 $\text{Nr-Fe}_2\text{O}_3$ 作为 LDI MS 基质用于检测代谢物的优势. 首先, 尖端聚集光的能力可以使 $\text{Nr-Fe}_2\text{O}_3$ 具有较好的光响应能力; 其次, 聚集光的尖端能够产生更多游离的电荷, 增强分析物的离子化能力; 最后, 由于更多游离的电荷聚集在尖端, 电子会被集体激发产生共振, 振动的电子由于阻尼作用将动能转变为热能, 局部热量升高. 因此, $\text{Nr-Fe}_2\text{O}_3$ 具有较强的光热转换能力, 并可促进分析物的热解吸. 上述特点使 $\text{Nr-Fe}_2\text{O}_3$ 在 LDI MS 检测中具有较强的代谢物检测灵敏度. 此外, $\text{Nr-Fe}_2\text{O}_3$ 具有纳米级表面粗糙度, 可以在复杂的生物样本中实现对小分子代谢物的选择性富集. 因此, $\text{Nr-Fe}_2\text{O}_3$ 基质材料非常适合生物样本中代谢物的选择性和高灵敏度检测.

2.3 $\text{PM}_{2.5}$ 暴露鼠的代谢指纹提取

在全球面临的环境问题中, $\text{PM}_{2.5}$ 污染因其对人类健康影响显著而备受关注^[28], 以中国为代表的发展中国家 $\text{PM}_{2.5}$ 污染尤为严重^[29,30]. 长期暴露于 $\text{PM}_{2.5}$ 环境中会诱发肺癌^[31]. 因此, 研究 $\text{PM}_{2.5}$ 的毒理机制十分必要. 代谢组学技术以处于系统生物学末端的代谢物为研究对象, 可以提供与表型最直接相关的信息^[32]. 本文以 $\text{Nr-Fe}_2\text{O}_3$ 作为 LDI-MS 基质研究了 16 份大鼠的血清样本, 其中 8 份大鼠暴露于 $\text{PM}_{2.5}$ 环境下, 8 份大鼠未暴露于 $\text{PM}_{2.5}$ 环境下. 经 T 检验, 暴露于 $\text{PM}_{2.5}$ 环境下的大鼠 (处理组) 和未暴露于 $\text{PM}_{2.5}$ 环境下的大鼠 (对照组) 在周龄和体重方面没有显著差异 [图 11(A)].

通过以 $\text{Nr-Fe}_2\text{O}_3$ 为基质的 LDI MS 平台直接采集 16 份大鼠血清样本中的代谢物. 由血清的典型质谱图 [图 11(B)] 可以看出, 处理组和对照组在低分子 m/z 100~500 范围内存在多个具有差异的特征峰.

原始数据经过重采样、峰值提取、归一化和正则化等预处理后,得到了610个 m/z 信号作为每个血清样本的血清代谢指纹图谱[图11(C)].通过代谢指纹图谱,可以观察到两组样本之间代谢表达水平的细微差异.为了测试基于 $\text{Nr-Fe}_2\text{O}_3$ 获得的代谢指纹图谱能否用于检测暴露于 $\text{PM}_{2.5}$ 环境引起机体代谢物紊乱,本文进一步基于机器学习中常用的随机森林算法对处理组和对照组进行了区分,混淆矩阵获得了80%的准确率[图11(D)].本文选择多个选择标准,即 $P < 0.05$ 和差异倍数(FC) > 2 [图11(E)],从610个 m/z 信号筛选了147个具有显著波动的差异性代谢特征值,为后续 $\text{PM}_{2.5}$ 暴露毒理学研究提供了一定的理论支撑.

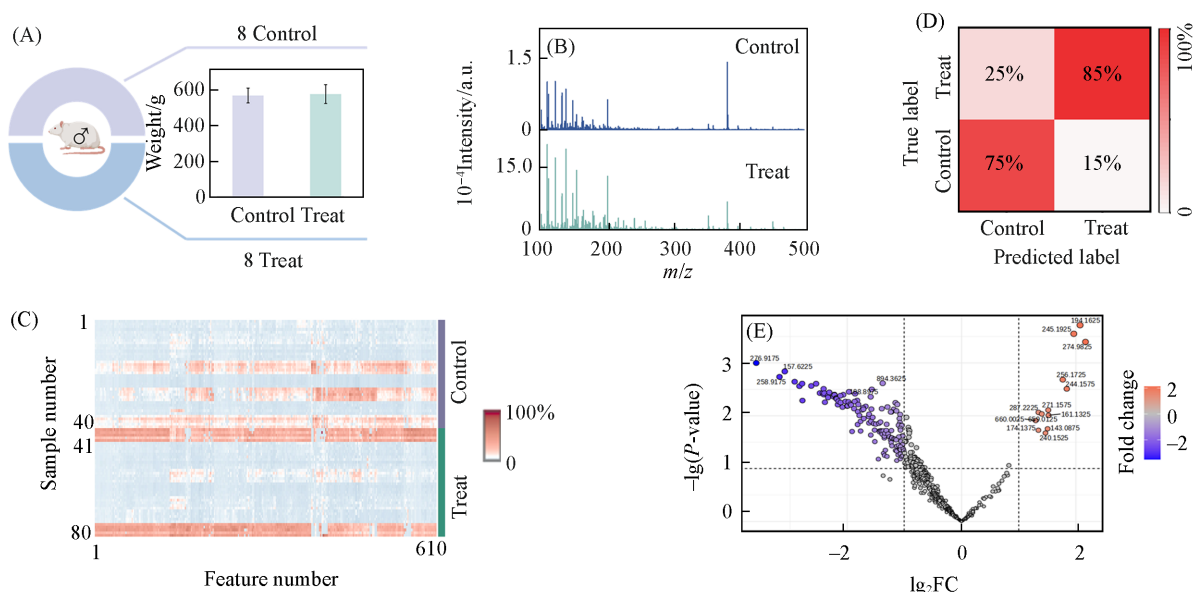


Fig. 11 Analysis of metabolite levels in $\text{PM}_{2.5}$ -exposed mice based on metabolic fingerprint

(A) The weight distribution of control group and treat group, (control group; $\text{PM}_{2.5}$ -unexposed mice, treat group: $\text{PM}_{2.5}$ -exposed mice); (B) the typical LDI MS spectra at m/z of 100—500 of serum samples from a control group and a treat group; (C) heatmaps of serum metabolic patterns in 16 mice; (D) confusion matrix of distinguishing control group from treat group; (E) volcano plot of screening metabolites with significant changes red dots for up-regulated metabolites, blue dots for down-regulated metabolites, and black dots for metabolites with no significant differences.

3 结 论

设计了一种具有尖端的 $\text{Nr-Fe}_2\text{O}_3$ 基质材料.与 $\text{Np-Fe}_2\text{O}_3$ 和商业化基质相比,该基质材料能够选择性捕获小分子代谢物,增强电荷转移能力和光热转换效率,从而提升其用于生物样本代谢物检测时的选择性和灵敏度.以 $\text{Nr-Fe}_2\text{O}_3$ 为基质的LDI MS可以直接用于血清代谢指纹的提取以及快速准确地分析暴露于 $\text{PM}_{2.5}$ 环境中的大鼠体内代谢物水平的变化,为研究 $\text{PM}_{2.5}$ 暴露毒理学提供了新思路.

感谢郑州大学现代分析与基因测序中心及河南牧业经济学院河南省非常规饲料资源创新利用重点实验室在仪器使用方面提供的支持.

参 考 文 献

- [1] Christofk H., Metallo C., Liu G. H., Rabinowitz J., Sparks L., James D., *Cell*, **2024**, *187*(15), 3821—3823
- [2] Shu W. K., Zhang M. J., Zhang C. Q., Li R. X., Pei C. C., Zeng Y., Zhao L., Zhao J., Wan J. J., *Adv. Funct. Mater.*, **2022**, *33*(5), 2210267
- [3] Chen V. L., Du X. M., Chen Y. H., Kuppa A., Handelman S. K., Vohnoutka R. B., Peyser P. A., Palmer N. D., Bielak L. F., Halligan B., Speliotis E. K., *Nat. Commun.*, **2021**, *12*(1), 816
- [4] Huang Y. D., Du S. Q., Liu J., Huang W. Y., Liu W. S., Zhang M. J., Li N., Wang R. M., Wu J., Chen W., Jiang M. Y., Zhou T. H., Cao J., Yang J., Huang L., Gu A., Niu J. Y., Cao Y., Zong W. X., Wang X., Qian K., Wang H. X., *PANS*, **2022**, *119*(12),

- e2122245119
- [5] Cao J., Shi X. J., Gurav D. D., Huang L., Su H. Y., Li K. K., Niu J. Y., Zhang M. J., Wang Q., Jiang M. W., Qian K., *Adv. Mater.*, **2020**, 32(23), 2000906
- [6] Yang J., Wang R., Huang L., Zhang M. J., Niu J. Y., Bao C. D., Shen N., Dai M., Guo Q., Wang Q., Wang Q., Fu Q., Qian K., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2020**, 59(4), 1703—1710
- [7] Huang L., Wan J. J., Wei X., Liu Y., Huang J. Y., Sun X. M., Zhang R., Gurav D. D., Vedarethinam V., Li Y., Chen R. P., Qian K., *Nat. Commun.*, **2017**, 8, 220
- [8] Qiu Z. F., Zheng Z. P., Song Z. J., Sun Y. C., Shan Q. H., Lin Z. W., Xie Z. X., *Talanta*, **2022**, 242, 123299
- [9] Li R. X., Zhou Y. J., Liu C., Pei C. C., Shu W. K., Zhang C. Q., Liu L. Z., Zhou L., Wan J. J., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2021**, 60(22), 12504—12512
- [10] Ding Y. J., Pei C. C., Shu W. K., Wan J. J., *Chem-Asian J.*, **2022**, 17(3), 2101310
- [11] Wang Y., Shu W. K., Lin S., H., Wu J. Y., Jiang M., Li S. M., Liu C., Li R. X., Pei C. C., Ding Y. J., Wan J. J., Di W., *Small*, **2022**, 18(11), 2106412
- [12] Yagnik G. B., Hansen R. L., Korte A. R., Reichert M., D., Vela J., Lee Y. J., *Anal. Chem.*, **2016**, 88(18), 8926—8930
- [13] Yang J., Yin X., Zhang L. Z., Zhang X. W., Lin Y., Zhuang L. Z., Liu W. S., Zhang R., Yan X. C., Shi L., Di W., Feng L., Jia Y., Wang J. L., Qian K., Yao X. D., *Adv. Mater.*, **2022**, 34(26), 2201422
- [14] Kulkarni A. S., Huang L., Qian K., *J. Mater. Chem. B*, **2021**, 9(17), 3622—3639
- [15] Picca R. A., Calvano C. D., Cioffi N., Palmisano F., *Nanomaterials*, **2017**, 7(4), 75
- [16] Hanatani K., Yoshihara K., Sakamoto M., Saitow K. I., *J. Phys. Chem. Lett.*, **2020**, 11(20), 8799—8809
- [17] Chen X. M., Wang T., Lin L. M., Wo F. J., Liu Y. Q., Liang X., Ye H., Wu J. M., *ACS Appl. Mater. Interfaces.*, **2018**, 10(17), 14389—14398
- [18] Yuan L., Lou M., Clark B. D., Lou M. H., Zhou L. N., Tian S., Jacobson C. R., Nordlander P., Halas N. J., *ACS Nano*, **2020**, 14(9), 12054—12063
- [19] Chaudhary E., George F., Saji A., Dey S., Ghosh S., Thomas T., Kurpad A. V., Sharma S., Singh N., Agarwal S., Mehta U., *Nat. Commun.*, **2023**, 14(1), 6955
- [20] Dai S. P., Wang Z. G., Yang Y., Du P., Li X. Q., *J. Hazard. Mater.*, **2022**, 431, 128653
- [21] He Z., Zhang H. N., Song Y. Y., Yang Z., Cai Z. W., *J. Hazard. Mater.*, **2022**, 423, 127129
- [22] Song X. Y., Liu J. H., Geng N. B., Shan Y. C., Zhang B. Q., Zhao B. F., Ni Y. W., Liang Z., Chen J. P., Zhang L. H., Zhang Y. K., *J. Hazard. Mater.*, **2022**, 424, 127573
- [23] Pei C. C., Wang Y., Ding Y. J., Li R. X., Shu W. K., Zeng Y., Yin X., Wan J. J., *Adv. Mater.*, **2023**, 35(18), 2209083
- [24] Pei C. C., Liu C., Wang Y., Cheng D., Li R. X., Shu W. K., Zhang C. Q., Hu W. L., Jin A. H., Yang Y. N., Wan J. J., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2020**, 59(27), 10831—10835
- [25] Sun X. M., Huang L., Zhang R., Xu W., Huang J. Y., Gurav D. D., Vedarethinam V., Chen R. P., Lou J. T., Wang Q., Wan J. J., Qian K., *ACS Central Science*, **2018**, 4(2), 223—229
- [26] Kouchiwa T., Wada K., Uchiyama M., Kasezawa N., Niisato M., Murakami H., Fukuyama K., Yokogoshi H., *Chem Clin. Lab. Med.*, **2012**, 50, 861—870
- [27] Pei C. C., Su R., Lu S. T., Chen X. N., Ding Y. J., Li R. X., Shu W. K., Zeng Y., Lin Y. Y., Xu L., Mi Y. Q., Wan J. J., *J. Mater. Chem. B*, **2023**, 11, 8206—8215
- [28] Zhou S., Xi Y. Y., Chen Y. Y., Zhang Z. Z., Wu C. Y., Yan W., Luo A. Y., Wu T., Zhang J. J., Wu M., Dai J., Shen W., Zhang F., Ding W. J., Wang S. X., *Small*, **2020**, 16(33), 2000845
- [29] Bai Z. P., Han J. B., Azzi M., *Trends Environ. Anal. Chem.*, **2017**, 13, 1—9
- [30] Liu L. J., Luo S. Q., Zhang Y. Y., Yang Z. M., Zhou P. X., Mo S. C., Zhang Y. Q., *Environ. Sci. Technol.*, **2022**, 56(11), 7224—7233
- [31] Fan R. R., Xu L., Cui B. W., Li D. C., Sun X. Y., Qi Y., Rao J. N., Wang K., Wang C., Zhao K. M., Zhao Y. J., Dai J. C., Chen W., Shen H. B., Liu Y., Yu D. K., *Environ. Sci. Technol.*, **2023**, 57(17), 6854—6864
- [32] Wang J. W., Lin L. S., Zhang J. Y., Duan J. C., Huang J., Guo X. B., Wu S. W., Sun Z. W., *J. Hazard. Mater.*, **2022**, 436, 129180

(Ed.: W, K, M)