生态毒理学报
Asian Journal of Ecotoxicology
第 15 卷 第 4 期 2020 年 8 月
Vol. 15, No.4 Aug. 2020

DOI:10.7524/AJE.1673-5897.20190419001
耿柠波, 任晓倩, 张海军, 等. 蛋白质组学在环境毒理学中的研究进展[J]. 生态毒理学报,2020, 15(4): 88-98
Geng N B, Ren X Q, Zhang H J, et al. A review on the application of proteomic approaches in environmental toxicology [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2020, 15(4): 88-98 (in Chinese)

蛋白质组学在环境毒理学中的研究进展

耿柠波[1], 任晓倩[1,2], 张海军[1,#], 曹蓉[1], 宋肖垚[1], 罗云[1,2], 张保琴[1], 陈吉平[1,*]

1. 中国科学院大连化学物理研究所,中国科学院分离分析化学重点实验室,大连 116023
2. 中国科学院大学,北京 100049

收稿日期:2019-04-19　　**录用日期**:2019-06-19

摘要: 蛋白质组学是系统生物学的重要组成部分,它以整体、动态和定量的原则来研究各种蛋白质的功能,系统地分析生物体内蛋白质表达,蛋白-蛋白相互作用和翻译后修饰等特征,已成为后基因组时代不可或缺的分析工具。蛋白质组学技术具有高通量的特征,能实现对蛋白质的高效快捷的定量分析。将蛋白质组学技术应用于环境毒理学研究,可从蛋白水平上研究外源性化合物对机体的毒性作用机制,并从中筛选出具有较高特异型和高灵敏度的蛋白标志物,为污染物的健康风险评估提供新的技术手段。本文综述了蛋白质组学技术的主要研究方法、研究策略和在环境毒理学研究中的应用,重点讨论了蛋白质组学技术在重金属和有机化合物尤其是持久性有机污染物(POPs)毒性评估中的应用。

关键词: 重金属;有机污染物;空气污染;蛋白质组学;环境毒理学
文章编号: 1673-5897(2020)4-088-11　　**中图分类号**: X171.5　　**文献标识码**: A

A Review on the Application of Proteomic Approaches in Environmental Toxicology

Geng Ningbo[1], Ren Xiaoqian[1,2], Zhang Haijun[1,#], Cao Rong[1], Song Xiaoyao[1], Luo Yun[1,2], Zhang Baoqin[1], Chen Jiping[1,*]

1. CAS Key Laboratory of Separation Science for Analytical Chemistry, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China
2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Received 19 April 2019　　**accepted** 19 June 2019

Abstract: Proteomics is an important component of system biology. It studies the functions of proteins using holistic, dynamic and quantitative approaches, and systematically analyzes the protein expressions, protein-protein interactions and post-translational modifications in living organisms. The high throughput characteristics of proteomics technology make the efficient and rapid quantitative analysis of proteins possible. Proteomics has become an indispensable analytical tool in the post-genome era. The application of proteomics in environmental toxicology study can reveal the toxic mechanism of exogenous compounds on organism and screen highly sensitive protein markers, provide a new technology for assessment of environmental pollutants. In this review, the analytical methods, re-

基金项目:国家自然科学基金委联合重大研究计划资助项目(91543201);国家自然科学基金资助项目(21607152)
第一作者:耿柠波(1985—),女,博士,副研究员,研究方向为环境毒理学,E-mail: gengningbo@dicp.ac.cn
* **通讯作者**(Corresponding author), E-mail: chenjp@dicp.ac.cn
\# **共同通讯作者**(Co-corresponding author), E-mail: hjzhang@dicp.ac.cn

search strategies and applications of proteomics in environmental toxicology were introduced. The problems and future perspective of proteomic research were also discussed. This review focused on the application of proteomic approaches in risk assessment of toxicants such as heavy metals and organic compounds, especially persistent organic pollutants (POPs).

Keywords: heavy metals; organic pollutants; air pollution; proteomics; environmental toxicology

环境毒理学是利用毒理学方法,研究环境污染物对人体健康的影响及其机理的学科,环境毒理学的主要任务是研究环境污染物对机体造成的损害和作用机理,探索环境污染物作用于机体后出现的生物学变化,寻找环境污染物对人体健康损害的早期观察指标,定量评定有毒环境污染物对机体的影响。“21 世纪毒理学测试新方法”倡导用毒性通路的理念来阐述毒物的毒性作用[1]。基因组学、蛋白组学和代谢组学作为系统生物学的重要组成部分,其高通量筛选特征和灵敏的检测能力使其在污染物的毒性通路和作用机制研究上具备很大的优势[2],已成为环境毒理学研究必不可少的工具。组学的实验结果能从细胞和个体乃至物种的整体水平来解释生命现象的本质和规律,比传统毒理学研究更具有整体性和系统性。

人类基因组实现了约 20 687 个蛋白质编码基因的鉴定[3]。然而,仅仅获取了人类基因组的全部序列依然不能充分全面地阐释复杂多变的生物过程。蛋白质作为基因的产物,是细胞内的活性分子。虽然细胞内的蛋白质和基因之间并不是严格的线性关系,但是,蛋白质组学作为基因组学的重要补充,可以帮助我们揭示生命活动的本质,更好地理解疾病相关的药物机制。因此,在 20 世纪 90 年代,致力于实现对生物体所有蛋白质的定性和定量分析的蛋白质组学应运而生[4]。蛋白质组学是研究细胞或机体内所有蛋白质的组成及其变化规律的学科,其最为突出的特点是通过特定的蛋白质分离手段并结合高通量分析鉴定技术,有效地研究特定情况下的蛋白质表达情况。随着生物质谱技术的不断发展,基于质谱技术的分析策略已成为蛋白质组学研究的核心技术[5]。近年来,基于生物质谱的蛋白质组学研究已经在污染物低剂量暴露、生物标志物发现以及复合污染研究等领域发挥了独特的优势。

1　蛋白质组学的研究方法和研究策略(Research methods and strategies of proteomics)

1.1　蛋白质组学概述

蛋白质组学(proteomics)的定义最早起源于 1995 年,是 Wilkins 等[6]根据“蛋白质 (protein)”和“基因组学(genomics)”组合提出。蛋白质组学以整体、动态和定量的原则来研究各种蛋白质的功能,包含生物体内全部蛋白质的鉴定与定量,系统地分析生物体内蛋白质表达、细胞定位、蛋白-蛋白相互作用、翻译后修饰以及不同时间、空间和细胞类型间的蛋白质周转等。与基因组学的研究结果相比,蛋白质组学的实验结果更能从细胞和个体乃至物种的整体水平来解释生命现象的本质和规律。因此,比基因组学的研究更具有广度和挑战性,已经成为后基因组时代的重要学科。

1.2　蛋白质组学研究方法

传统的蛋白质组学研究主要是利用二维凝胶电泳(2D-DIGE)对细胞或组织中的蛋白质进行分离[7],该方法的优点是在一次实验中就能得到上千个蛋白质的斑点,可以涵盖分子量从 10 000 ~ 300 000 Da 的蛋白质。但由于对分离得到的蛋白质无法进行高灵敏并且快速的鉴定,限制了该技术的进一步发展;传统的蛋白质测序主要基于蛋白质 N 端的 Edman 化学降解实现蛋白质和肽段序列的鉴定[8],相较于基因组学中快速灵敏的自动测序技术,该方法实验过程繁琐而且通量很低,严重制约着蛋白质组学的快速发展。20 世纪 80 年代末,质谱仪器发生了两大技术突破,使得蛋白质分析发生了革命性的改变。这 2 种技术就是软电离技术:电喷雾离子化(ESI)技术[9]和基质辅助激光解吸离子化(MALDI)技术[10],这 2 种离子化技术解决了蛋白质或者肽段等不易挥发的生物大分子难以实现高灵敏度离子化的难题,发明这 2 种技术的科学家美国的芬恩(John Fenn)和日本的田中耕一(Koichi Tanaka),也因此被授予了 2002 年的诺贝尔化学奖,以表彰他们分别在发展 ESI 和 MALDI 技术方面做出的杰出贡献。这 2 种软电离技术与质谱技术相结合,在蛋白质和多肽分析中展现出了样品用量少、通量高、操作简单和鉴定准确等优点,已经成为蛋白质组学研究的核心技术之一。

质谱仪主要包括离子源、质量分析器和检测器 3 个部分。软电离技术的出现拓展了质谱的应用空

间,质量分析器的改善推动了质谱仪技术的发展。质谱技术用于蛋白质组学分析的基本原理是,蛋白质和肽段分子离子化后形成分子离子峰,质谱仪器准确地检测其质荷比(m/z)以及相应的价态,得到其分子量信息并进一步结合母离子丰富的多级碎片离子峰,确定蛋白质或者肽段的氨基酸序列。目前,MALDI 和 ESI 离子化技术是蛋白质组学分析中广泛使用的 2 种电离技术[11]。这 2 种离子化方式可以实现生物分子的高效离子化,而不会破坏其结构,故被称为"软"电离技术。MALDI 离子化技术,是将待测样品与基质分子形成共结晶薄层,在激光的照射下,样品分子吸收基质的能量和质子,快速形成气态离子实现离子化。ESI 离子化技术则采用高压电场将分析物溶液形成高电荷密度的微小雾滴,随着雾滴中溶剂分子的进一步挥发,实现样品溶液的离子化,因此,ESI 技术可以实现液相色谱仪与质谱仪联用,用于分析复杂的生物样品。MALDI-MS 技术通常用来分析相对简单的肽段混合物。

质量分析器是质谱仪中的核心技术。目前,常用于蛋白质组学研究的质量分析器主要有 4 种:离子阱(IT)、飞行时间(TOF)、四极杆(Q)和傅立叶变换离子回旋共振(FT-ICR)[12]。它们的结构和性能各不相同,每一种都有自己的长处与不足[13]。它们可以单独使用,也可以互相组合形成功能更强大的仪器。其中,离子阱质谱灵敏度高,扫描速度快,性能稳定,具备多级质谱能力,因此,被广泛应用于蛋白质组学研究,其不足之处是质量精度较低;FT-ICR 也属于阱类的质量分析器,是目前世界上分辨率最高、质量准确度最高的质谱仪,其腔体内部为高真空和高磁场环境,具有非常高的灵敏度以及动态检测范围,但它异常昂贵的造价与操作的复杂性限制了它在蛋白质组学领域的广泛应用;MALDI 通常与 TOF 质量分析器联用分析肽段的精确质量,而 ESI 常与离子阱或三级四极杆质谱联用,通过碰撞诱导解离(CID)获取肽段的碎片信息。为了实现蛋白质及相关多肽的高通量准确鉴定,商品化质谱仪采用串联或并联的模式将多个或多种质量分析器进行组合,例如三重四级杆(QQQ)、四级杆-飞行时间联用(Q-TOF)、三重四级杆-飞行时间联用(QQQ-TOF)和飞行时间联用(TOF-TOF)等。一系列基于静电场轨道阱(Orbitrap)的质谱仪、线性离子阱-静电场轨道离子阱联用(LTQ-Orbitrap)和四级杆-静电场轨道离子阱联用(Q Exactive)等[14],因质量分辨率和准确度的大大改善,尤其是仪器尺寸上的减小,运行成本的降低等优点,已经成为了蛋白质组学研究领域广泛使用的质谱仪。

1.3 蛋白质组学的研究策略

基于生物质谱技术的蛋白质组学研究策略主要可以分为 2 种:自上而下(top-down)和自下而上策略(bottom-up)(图 1)[15]。自上而下的蛋白质组学分析技术,不经过蛋白质酶解的过程,直接对完整蛋白质进行质谱鉴定。完整蛋白首先通过 PAGE 或免疫富集法从复杂的生物样本中分离,然后直接用 ESI 或 MALDI 技术生成离子。生成的离子经碰撞诱导解离(CID)、高能量碰撞诱导解离(HCD)、电子捕获解离(ECD)或电子转移解离(ETD)等方式碎裂,并在串联质谱中分析。"自上而下"研究策略能提供针对完整蛋白质的更精准、更丰富的生物学信息,而且能够保留多种翻译后修饰之间的关联信息,所鉴定到的蛋白质更接近于其在生物体内的真实状态[16],在蛋白鉴定、分析、序列解析及翻译后修饰表征方面具有潜在的研究优势。但是,该策略还面临着很多的技术挑战,包括蛋白质混合物的分离困难、离子化效率低、质谱碎裂效果差、质谱谱图的数据处理困难以及对质谱仪器的要求极高等。

"自下而上"的策略首先是从生物样品中高效地提取蛋白质,将蛋白质进行酶解,然后利用质谱进行鉴定分析,最后通过数据库检索的或者采用从头测序法对质谱谱图进行解析,从而获取完整蛋白质的信息,是一种间接鉴定的策略。其中,质谱对肽段的有效鉴定主要是通过获得肽段的相对分子质量和碎片离子信息来实现。首先,通过一级质谱扫描,获得肽段母离子的质荷比,再通过串联质谱分析,获得一系列肽段碎片离子信息。二级串联质谱得到的图谱能够为我们提供目标肽段的序列信息和翻译后的修饰信息。"自下而上"的研究策略分为基于多维液相色谱分离技术平台的"鸟枪法"蛋白质组学(shotgun proteomics)和以特定目标物为分析对象的靶标蛋白质组学(target proteomics)[17]。前者的实验目的是鉴定的蛋白质越多越好,而后者仅对一小部分目标肽段进行高质量精度、高重复性以及高准确度的定性及定量研究,其中,"鸟枪法"蛋白质组学的应用最为广泛,又被称为发现蛋白质组学(discovery proteomics)。

2 蛋白质组学在环境毒理学研究中的应用(Application of proteomic in environmental toxicology)

环境毒理学是一门研究外源性环境污染物毒性

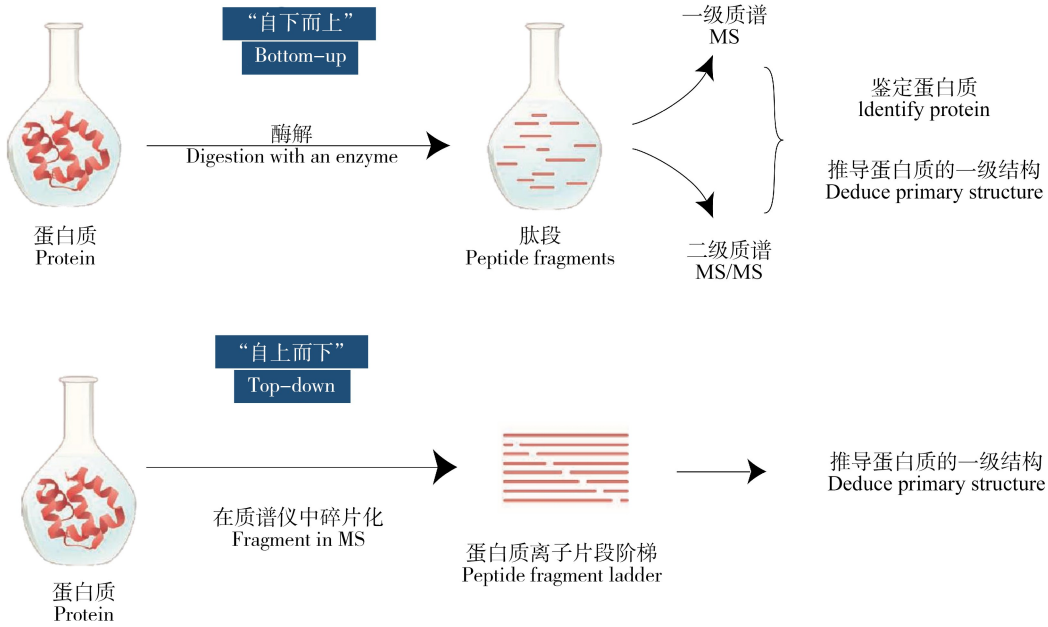

图 1　蛋白质组学研究的 2 个主要策略(“自上而下”和“自下而上”)[15]

注:MS 表示一级质谱,MS/MS 表示二级质谱。

Fig. 1　Two major strategies for the proteomics: The “top-down” and “bottom-up” [15]

Note: MS stands for primary mass spectrum, MS/MS stands for secondary mass spectrometry.

作用的学科。其主要任务是描述环境污染物的毒性作用、阐明毒作用机制以及开展化学物质危险度评价等。蛋白质组学技术具有高通量的特点,能实现对蛋白质的高效快捷定量分析。将蛋白质组学技术和环境毒理学相结合,可从蛋白水平上研究外源性化合物对机体的毒作用机制,并从中筛选出具有较高特异型和灵敏度的蛋白标志物,目前已广泛应用于环境污染物的健康风险评价。

2.1　重金属毒性机制研究

重金属通常指对生物体生长发育有负面影响的有毒金属,如镉(Cd)、铜(Cu)、铬(Cr)、铅(Pb)、镍(Ni)、锰(Mn)、锌(Zn)以及危险金属如砷(As)、汞(Hg)。重金属污染已经给生态环境和人体健康带来了严重威胁,本节综述了近年来基于蛋白质组学对重金属在水生生物、动物和植物毒性研究中的应用。短期 Cd (100 $\mu g \cdot L^{-1}$)暴露对贻贝(*Bathymodiolus azoricus*)蛋白质组的影响较小。采用 2D-DIGE 分离蛋白,进一步利用 MALDI-TOF 鉴定出 12 种差异蛋白,包括结构蛋白、代谢蛋白和应激反应蛋白[18]。而不同蛤(*Ruditapes philippinarum*)对 Cd 暴露的生物学响应也不同,白蛤和斑马蛤暴露于 Cd(200 $\mu g \cdot L^{-1}$)后,对其蛋白质组学的研究结果表明,白蛤中的差异表达蛋白(DEPs)多于斑马蛤。Cd 暴露共同诱导了 2 种蛤的一些关键生物学过程,包括免疫反应和代谢。白蛤的一些与细胞信号传导、蛋白质水解和能量产生有关的过程得到了增强。相比之下,斑马蛤的蛋白质水解和能量产生的某些过程耗竭,基因表达也出现了紊乱。此外,Cd 暴露导致白蛤样品中过氧化氢酶(CAT)和过氧化物酶(POD)活性增加,而斑马蛤样品中超氧化物歧化酶(SOD)和 CAT 活性降低[19]。采用蛋白质组学研究了雄性牡蛎(*Crassostrea angulata*)和雌性牡蛎对锌暴露的不同反应。在 50 $\mu g \cdot L^{-1}$或 500 $\mu g \cdot L^{-1}$ Zn 中暴露 30 d 后,雌性牡蛎性腺中的 Zn 累积量大于雄性牡蛎,雌性牡蛎性腺发育加快,但雄性牡蛎性腺发育不正常。雌牡蛎生殖腺中表达的半胱氨酸、组氨酸脱氢酶等具有锌转运和储存功能的蛋白和多功能蛋白明显高于雄牡蛎[20]。以水蚤(*Daphnia magna*)为模式生物研究了 Pb^{2+}和阿特拉津对水生生物的影响。通过比较对照和胁迫条件下的蛋白图谱,发现 Pb^{2+}和阿特拉津对水蚤的影响几乎相反;Pb^{2+}抑制了大部分 DEPs,而阿特拉津激活了大部分 DEPs [21]。

大鼠连续 5 周暴露于 Mn(200 $mg \cdot L^{-1}$)后,其总行走距离显著降低,主要器官组织学结构清晰,无病理学改变。而基于 iTRAQ(isobaric tag for relative and absolute quantitation)蛋白质组学定量技术对

3 012 种肠道粘膜细胞 Mn 含量修饰蛋白进行了定性和定量分析,共发现 175 种肠粘膜蛋白在 Mn 暴露下差异表达。这些蛋白与胰腺分泌、蛋白质消化吸收、脂肪消化吸收、氨基酸生物合成、甘油脂代谢、阿尔茨海默病、帕金森病和矿物质吸收相关[22]。Hg($HgCl_2$;0.1、1 和 5 $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$ Hg)暴露后,对 SD 大鼠肾脏组织的蛋白质组学分析表明,硒结合蛋白 1(SBP1)是 Hg 给药后大鼠肾皮质中上调最明显的蛋白。另外,尿中 SBP1 的排泄量呈剂量依赖性显著增加。采用 $HgCl_2$、$CdCl_2$ 或顺铂处理正常肾近端小管细胞 24 h,发现 SBP1 在化学诱导肾毒性的病理过程中发挥重要作用,尿中 SBP1 的排泄可作为早期肾损伤的生物标志物[23]。A549 细胞在外源 Cd 中暴露后,对其蛋白质组的研究结果表明,鉴定的 53 个差异蛋白根据其生物学过程进行分类,主要涉及代谢过程、细胞过程、发育过程和细胞成分。根据蛋白的分子功能进行分类,主要涉及催化活性和结合活性。同时,结果表明,Cd 的毒性与必需金属的替代、金属贮存蛋白表达的抑制以及金属主动外排系统的激活有关[24]。对 Pb、As 和甲基汞(MeHg)混合暴露在海马细胞蛋白质水平上的相互作用进行研究,蛋白质组数据的基因功能和通路分析证实了与线粒体功能障碍、氧化应激、m-RNA 剪接和泛素系统功能障碍相关的神经退行性改变发生[25]。重金属对海马细胞的影响顺序为 Pb<As<MeHg。长期接触 Pb、As 和 MeHg 等重金属会增加患神经退行性疾病的风险[26]。嗜热四膜虫(*Tetrahymena thermophila*)可用于检测淡水中的重金属污染,对其细胞中必需的 Zn、Cu 和非必需的 Cd 的金属蛋白组进行研究发现,Cd 的毒性可以从取代 Cu 特别是 Zn 在 MAPKs、转运体和抗氧化酶中的作用来解释[27]。采用蛋白质组学技术研究了跳虫(*Paronychiurus kimi*)体内 Cu、Mn 和 Ni 毒性,结果表明,跳虫的免疫系统、神经元生长和金属离子结合中涉及的几种蛋白均上调[28]。

蛋白质组学研究能够反映植物应对重金属污染的调控过程,展示主要参与细胞解毒和耐受机制的蛋白质网络和代谢途径。大豆(*Glycine max* L.)植株分别暴露于 Pb(30 $\mu g \cdot L^{-1}$)和 Hg(0.5 $\mu g \cdot L^{-1}$)后,叶片和结节的氧化应激水平均增加,抗坏血酸过氧化物酶(AsA-POD)、谷胱甘肽还原酶(GR)和 CAT 的活性也被调节。Pb 和 Hg 分别对 33 种和 43 种蛋白质有显著影响。差异蛋白在功能上与多种细胞功能相关[29]。紫花苜蓿(*Medicago sativa*)长期暴露于 Cd(10 $mg \cdot kg^{-1}$)后,179 个细胞壁蛋白和 30 个可溶性部分蛋白的丰度发生了变化。这些蛋白参与细胞壁重构、防御反应、碳水化合物代谢和促进木质化过程[30]。基于蛋白质组学研究了菌株 Q2-8 诱导小麦植株 Cd 和 As 吸收减少的分子机制:菌株 Q2-8 通过提高 Cd 和 As 胁迫下根系能量代谢、防御和细胞壁生物合成的效率,减轻 Cd 和 As 对小麦幼苗的毒害,降低地上组织 Cd 和 As 的吸收。小麦根中差异表达的细胞壁生物合成相关蛋白仅存在于 Cd 胁迫下小麦植株中[31]。采用蛋白质组对土壤中 Ni、Cu 和 Zn 对植物(*Ocimum basilicum* L.)的影响进行研究时发现,Cu 可导致致敏蛋白浓度升高,严重的 Cu 胁迫还会导致与蒸腾和光合作用相关的特定蛋白质的积累,并得出 Cu 对该植株的危害最大、产生的过敏原最多的结论[32]。水稻(*Oryza sativa* L.)幼苗对六价铬(Cr^{6+})胁迫的蛋白质组学研究结果表明,水稻对 Cr^{6+} 胁迫的响应具有剂量依赖性和组织特异性。鉴定出的 64 种蛋白质参与一系列的细胞过程,包括细胞壁合成、能量生产、初级代谢、电子传递和解毒。细胞壁是水稻抵抗 Cr^{6+} 胁迫的重要屏障,水稻植株应对 Cr^{6+} 胁迫的策略包括将 Cr 离子固定在细胞壁中,减少其易位;激活抗氧化防御,减轻 Cr^{6+} 诱导的氧化应激[33]。对镉(Cd^{2+})、渗透胁迫及其复合胁迫下的短柄草(*Brachypodium distachyon*)幼苗叶片进行了蛋白质组学分析,采用 2D-DIGE 检测到 117 个差异蛋白,包括参与光合作用/呼吸、能量和碳代谢、压力/防御/解毒、蛋白质折叠和降解以及氨基酸代谢的蛋白。Cd^{2+} 和复合胁迫对叶片蛋白质组的影响大于单独的渗透胁迫[34]。

2.2 有机污染物毒性机制研究

有机污染物种类繁多,且毒性较大,本节综述了基于蛋白质组学对典型有机污染物的毒理学研究。多环芳烃(PAHs)是一种高致癌性的污染物,往往在环境中长期存在。为探讨拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)对多环芳烃中菲的氧化应激反应,采用蛋白质组学技术鉴定出 30 种差异表达蛋白,其中,核苷二磷酸激酶 3(NDPK-3)显著上调,进一步研究了 NDPK-3 过表达、敲除和野生型植物中应激反应酶的水平。NDPK-3 过表达体中抗坏血酸过氧化物酶(APX)、CAT、POD 和 SOD 活性均高于野生型;在 NDPK-3 敲除序列中,这些酶的活性降低。这些数据证实 NDPK-3 是拟南芥对 PAHs 胁迫响应的正向

调节因子[35]。采用 2D-DIGE 结合 MALDI-TOF/TOF-MS 对菲暴露的小麦(*Triticum aestivum* L.)根蛋白进行分析和鉴定。菲诱导上调的蛋白与植物的防御反应、抗氧化系统和糖酵解有关;下调的蛋白质涉及高能量化合物的代谢和植物生长[36]。对小麦(*Triticum aestivum* L.)幼苗进行菲暴露后进行亚细胞观察,结果表明,叶绿体发生逆转,失去了结构的完整性。采用 iTRAQ 分析了叶绿体蛋白质谱的变化,共鉴定出 517 种蛋白,其中,8 个与类囊体相关的蛋白被下调,相关基因的表达通过 RT-PCR 验证,证实了类囊体破坏是叶绿体变形的原因[37]。采用鸟枪蛋白质组学方法对大西洋鳕鱼(*Gadus morhua*)的血浆样品进行了分析,共鉴定了 369 种蛋白质,在暴露于 PAHs 的鱼类中,发现了 12 种蛋白水平的显著变化,11 种上调蛋白主要是免疫球蛋白,表明在暴露的鱼体内触发了免疫反应[38]。绵羊长期饲养在污水污泥施肥的牧场上,检测肝脏中的 PAHs 和多氯联苯(PCBs),同时采用二维差分凝胶电泳法对肝脏蛋白进行分离,采用液相色谱/串联质谱法对差异表达的蛋白进行鉴定。发现环境化学品暴露影响了外源化合物脱毒反应过程以及雄性和雌性绵羊的肝蛋白组,包括主要的血浆分泌蛋白和代谢酶。通路分析预测了癌症相关通路的失调和脂质代谢的改变[39]。用 5 种 PAHs(芴、蒽、菲、氟和芘)对蚯蚓(*Eisenia fetida*)进行暴露,并对<20 kDa 的蛋白进行分析,鉴定出 54 个差异蛋白。其中,3 个差异蛋白在暴露于蒽和芘的蚯蚓中表达;一个蛋白选择性地表达于暴露于芴、菲和荧蒽的蚯蚓中[40]。

蛋白质组学为全氟辛烷磺酸(PFOS)毒性效应的分子机制和生物标志物研究提供了方法。斑马鱼胚胎暴露于 PFOS(0.5 mg·L^{-1}) 192 h 后,采用 2D-DIGE 进行蛋白质组学分析,发现了 69 个差异蛋白,进一步采用 MALDI-TOF-MS 对目标蛋白进行鉴定。这些蛋白的功能包括解毒、能量代谢、脂质转运/类固醇代谢过程、细胞结构、信号转导和凋亡[41]。对欧洲杜父鱼(*Cottus gobio*)进行短期 PFOS(0.1 mg·L^{-1}或 1 mg·L^{-1},96 h)暴露,然后采用 2D-DIGE 和 nano-LC-MS/MS 相结合的方法,鉴定出的差异表达蛋白包含了应激反应、泛素-蛋白酶体系统、能量代谢和肌动蛋白细胞骨架等功能[42]。欧洲鳗鱼(*Anguilla anguilla*)外周血单核细胞(PBMC)体外暴露于 PFOS(10 μg·L^{-1}和 1 mg·L^{-1},48 h),共鉴定出 48 个不同功能类群的差异蛋白,涉及细胞骨架、蛋白折叠、细胞信号、蛋白水解途径、碳水化合物和能量代谢[43]。另一项体内暴露研究通过对比利时河流中不同 PFOS 污染程度的鳗鱼(*Anguilla anguilla* L.)进行蛋白质组学分析,用 2D-DIGE 分离蛋白,进一步利用 nano-LC-MS/MS 鉴定出 17 种差异蛋白,且在体内和体外实验中,有 3 种相同的差异蛋白包括质体-2、烯醇化酶和甘油醛 3-磷酸脱氢酶,可作为 PFOS 污染预警的生物标志物[44]。采用胚胎干细胞试验来评估 PFOS 发育毒性(0 μmol·L^{-1},10 d),蛋白质组学分析共鉴定出 176 个差异蛋白,大多数蛋白质主要与催化活性、细胞核定位或细胞成分有关。通路分析显示,32 条信号通路受到影响,尤其是代谢相关的信号通路。结果表明,PFOS 是一种弱的胚胎毒性化学物质,然而,指示发育毒性的几个标记蛋白(Brachyury、GATA4、MEF2C 和 α-actinin)在 PFOS 暴露组显著下调,揭示了 PFOS 在发育性心血管系统中的潜在新靶点[45]。iTRAQ 标记定量蛋白质组技术也被应用于 PFOS 的毒理学研究。PFOS 暴露(1.0、2.5 和 5.0 mg·kg^{-1}·d^{-1})7 d 后小鼠肝脏的差异蛋白主要参与脂质代谢、转运、生物合成过程以及对刺激的反应[46]。人类肝细胞 LO2 暴露于 PFOS(25 ~50 mg·L^{-1}) 72 h 后,蛋白质组学的结果表明,PFOS 能够通过抑制 HNRNPC、HUWE1、UBQLN1 以及诱导 PAF1 参与 p53 和原癌基因的信号通路激活从而触发凋亡过程[47]。另一个人肝细胞株(HL-7702)暴露于 PFOS(50 μmol·L^{-1} 48 h 和 96 h)后[48],差异表达蛋白质与细胞增殖有关,包括肝癌衍生生长因子(Hdgf)和增殖标志物 Mk167 和 Top2α。

多溴联苯醚(PBDEs)是一类溴代芳香族化合物,脂溶性较强,易在生物体和人体内蓄积。采 iTRAQ 蛋白质组学技术对有 PBDEs 暴露风险的电子垃圾回收处理厂附近孕妇脐带组织进行分析,共鉴定出 697 个差异蛋白,主要参与机体抗氧化防御、细胞凋亡、细胞结构和代谢过程。其中,CAT 和谷胱甘肽 S 转移酶(GST)的表达下调,细胞色素 C 的表达下调,这些结果说明,PBDEs 暴露导致的脐带组织抗氧化失衡和细胞凋亡与新生儿不良出生结局有关[49]。在一项经 BDE-47 暴露的大鼠的研究中,共鉴定出 64 个差异蛋白,其中,20 个差异蛋白与细胞凋亡有关,15 个差异蛋白位于线粒体内。此外,研究还发现,BDE-47 诱导了 GC1-spg 细胞凋亡、线粒体损伤,并且降低了 Bcl-2 蛋白表达。这些结果说明,BDE-47 可能通过损害线粒体功能而诱导细胞凋亡[50]。采用

2D-DIGE 结合 MALDI-TOF-MS 对经 BDE-209 和/或 BDE-47 暴露的神经干细胞进行蛋白质组学研究,共鉴定出 19 个差异蛋白可以作为 BDE-209 和/或 BDE-47 暴露的潜在生物标志物[51]。采用 iTRAQ 技术结合 MALDI-TOF/TOF-MS 对经 BDE-47 暴露的雌性和雄性海洋青鳉(*Oryzias melastigma*)性腺蛋白进行研究,在睾丸和卵巢中分别鉴定出 133 个和 144 个差异蛋白,并呈现剂量-效应和性别依赖特征。其中,睾丸中鉴定到 42 个显著下调的蛋白可能会破坏精子的产生,进而导致鱼类不育;卵巢中鉴定到 38 种差异蛋白,卵黄蛋白原和载脂蛋白 A-1 的表达上调,这表明 BDE-47 是一种雌激素类似物,可导致鱼类的生殖系统损伤[52]。Ji 等[53]采用蛋白质组学与代谢组学相结合的方法研究了 BDE-47 暴露对紫贻贝(*Mytilus galloprovincialis*)的性别特异性反应,代谢应答响应结果表明,BDE-47 主要扰乱雄性紫贻贝鳃的能量代谢;雌性紫贻贝的渗透调节和能量代谢均受到了不同程度的扰乱。蛋白质组学分析结果表明,BDE-47 诱导雌紫贻贝和雄紫贻贝的细胞凋亡和活性氧(ROS)生成减少;扰乱雄紫贻贝的蛋白质稳态,此外也扰乱了雌紫贻贝的蛋白质水解。另外,该团队基于代谢组学和蛋白质组学联用的方法开展了 BDE-47 暴露对蚯蚓(*Eisenia fetida*)毒性效应的研究,结果表明,BDE-47 诱导蚯蚓细胞凋亡、氧化应激损伤,扰乱了蛋白质的生物合成与能量代谢[54]。

六溴环十二烷(HBCD)是一种溴代脂环类化合物,易在生物脂肪组织中富集,并通过生物链逐级放大。在一项为期 28 d 的 BALB/c 雌性幼鼠的研究中发现,HBCD 会导致幼鼠肝脏、胸腺和子宫组织发生病变,降低血清 17β 雌二醇(17β-E2)含量,增加血清睾酮/雌二醇比例。脑部蛋白质组学分析结果表明,HBCD 诱导 HSPA8、G6PD 和 SIRT2 蛋白表达失调,这些结果为 HBCD 降低雌二醇(E2)含量提供了分子机制支持[55]。采用 2D-DIGE 结合 MALDI-TOF/TOF 技术分别对甲状腺机能正常和机能减退的雌性大鼠进行研究,结果表明,HBCD 暴露影响雌鼠肝脏功能和甲状腺激素稳态,同时影响了与糖异生/糖酵解、氨基酸代谢和脂质代谢有关的蛋白质含量,诱发了氧化应激反应[56]。在另外一项关于大鼠低剂量短期暴露于 HBCD 的研究中,采用 2D-DIGE 对肝脏组织蛋白质组进行分析,发现 HBCD 暴露引起大鼠肝脏蛋白质组的变化具有性别差异,HBCD 仅引起雄性大鼠肝脏组织中少量蛋白模式的改变;性别依赖性影响还表现在脂类代谢的差异上,主要原因是 HBCD 易积累在白色脂肪组织中,而雄性老鼠的脂肪组织含量较雌性老鼠高[57]。Rasinger 等[58]评估了膳食暴露于持久性有机污染物是否会影响成年小鼠大脑的基因和蛋白表达,幼年雌性小鼠分别饲喂添加有二恶英类(DL)化合物 2,3,7,8-四氯二苯并-*p*-二恶英(TCDD)、非二恶英类(NDL)化合物 HBCD、BDE-47 和 CB-153 的鱼食 28 d,结果表明,所有暴露组均导致大脑神经基因和蛋白表达谱的改变。基因表达数据相关的生物信息学分析强调芳香烃受体(AHR)机制在 DL 化合物毒性效应中的重要性,揭示了 TCDD 通过 AHR 靶向调控脑部锌稳态,而 DL 和 NDL 这 2 类物质均会影响脑部钙离子稳态。蛋白质组学分析数据没有明确区分 DL 和 NDL 的影响差异,所有暴露组小鼠中与兴奋毒性相关的蛋白含量都受到显著影响。多组学综合分析认为,饮食中的污染物暴露破坏了小鼠血脑屏障,并在小鼠脑部蓄积,从而严重扰乱钙稳态和锌稳态,诱发兴奋毒性。

2.3 空气污染的蛋白质组学研究

近年来,空气污染尤其是大气颗粒物污染备受关注,对人类的生产生活和健康带来了不利影响。采用蛋白质组学对空气污染的研究也取得了一定的成果。采用人肺癌细胞株 A549 对钢铁工业环境中含有高浓度 PAHs 和金属的颗粒物暴露并进行了蛋白质组学分析,共鉴定出 1 576 个蛋白,其中,196 个蛋白发生了显著变化。与氧化还原稳态、代谢和细胞能量生成相关的蛋白受到抑制,而与 DNA 损伤和修复等胁迫相关的蛋白过度表达,肿瘤相关蛋白 C1QBP、EWSR1、CAV1 和 CAPER 的表达增加。推断抑制细胞代谢和三磷酸腺苷(ATP)生成将损害细胞修复 DNA 损伤的能力。这可能是颗粒物诱发癌变的驱动力[59]。采用基于 LC-MS/MS 的代谢组学和脂质组学以及 iTRAQ 蛋白质组学技术研究 $PM_{2.5}$ 暴露对人肺癌细胞株 A549 的毒性效应,代谢组学分析发现,$PM_{2.5}$ 处理后,筛选出 56 种差异代谢物(40 种含量升高,16 种含量降低)、22 种差异脂类物质(19 种含量升高,3 种含量降低)和 81 种差异表达蛋白(55 种含量上调,26 种含量下调)。蛋白质组学分析结果显示,有 16 个蛋白与 RNA 剪接相关,主要是上调的丝氨酸/精氨酸富集剪接因子 1/2(SRSF-1/2)、小核核糖核蛋白 70 kDa(snRNP70)、小核核糖核蛋白多肽 B/C/E(SNRP-B/C/E)和下调的异质核糖核酸蛋白(hnRNP UL2)。在代谢水平上,$PM_{2.5}$ 暴露显

著扰乱了 A549 细胞神经酰胺、丝氨酸、鞘氨醇和鞘磷脂的代谢。神经酰胺的累积和 RNA 剪接的改变可以视为 $PM_{2.5}$ 毒理学评价的潜在标志物[60]。在另一项研究中,采用 2D-DIGE 结合 MALDI-TOF/TOF 对经 $PM_{2.5}$ 暴露的 A549 细胞的蛋白组进行分析,鉴定出 22 种差异蛋白。结果表明,氧化应激、代谢紊乱、信号转导失调、蛋白质合成与降解以及细胞骨架破坏是 $PM_{2.5}$ 诱发细胞毒性的主要因素[61]。

蛋白质也常被筛选出来作为空气污染的标志物,研究发现,胎盘组织的蛋白质组学特征与孕妇孕期接触有毒物质有关[62]。与对照组相比,生活在城市空气污染环境中的母亲胎盘中多环芳烃羟化酶(AHH)活性显著升高[63],AHH 是多环芳烃最重要的代谢产物。而另外 2 种细胞解毒指标 GST 和 7-乙氧基香豆素-O-脱乙基酶(ECOD)与空气污染水平的关系表现为:ECOD 活性随着环境空气污染的增加而显著增加,而相同条件下 GST 活性下降[64]。Sorkun 等[65]的一项研究发现,在空气污染水平较高的地区,胎盘金属硫蛋白(MT)的数量显著增加,MT 是一种重要的金属固定和转运蛋白,在控制氧化应激过程中起着重要的作用。胎盘蛋白质组学的另一个应用是作为筛查细胞能量代谢的指示物。丙酮酸激酶是糖酵解过程中的一种必需酶,在污染较严重地区的妇女胎盘组织中表现出显著的活性增加[66]。子痫前期妊娠胎盘组织中这种蛋白水平也升高[67],其特点是胎盘炎症反应过度,这与产前暴露于空气污染中的结果相似。由于糖酵解是胎盘能量产生的一个重要途径,怀孕期间空气污染对这一关键途径的影响需要给予更多关注。另外,蛋白降解或修饰产物也常作为妊娠期间胎盘损伤的生物标志物。过氧亚硝酸盐可将酪氨酸蛋白群修饰为 3-硝基酪氨酸(3-NTp),3-NTp 是一种氧化应激或亚硝化应激的中间产物。基于人群的一项研究发现,胎盘 3-NTp 水平与 $PM_{2.5}$ 和黑炭暴露正相关[68]。这一结果也在动物实验中得到验证,大鼠暴露于柴油尾气污染的空气中胎盘 3-NTp 水平升高[69]。

3　总结与展望(Summary and prospects)

近年来,蛋白质组学技术飞速发展,为环境毒理学研究提供了新的思路和强有力的技术支持。蛋白质组学技术高通量、高灵敏度的分析特征在生物标志物发现、环境污染物低剂量暴露和复合污染研究等领域发挥了独特的优势。近年来,蛋白质组学高效样品预处理技术,高准确度、高覆盖的定性与定量技术和数据解析技术的发展拓宽了蛋白质组分析的应用面,将这些新技术与新方法引入毒理学研究,将有助于全景式地揭示机体暴露于污染物的蛋白质组调控规律。另外,目前,将蛋白质组学应用于环境毒理学研究后,已经发现了一些重要蛋白标志物,但是从标志物到作用机理还未发现确切的关联。毒性作用通路是一个复杂的网络,暴露于外源化学物是如何破坏这些路径并最终导致了负的健康效应,基因、蛋白和小分子代谢物相结合才能为毒理学评估提供综合视角,系统揭示污染物的毒性作用机制。因此,蛋白组学与基因组学和代谢组学相结合,将会成为毒理学发展的必然趋势。

通讯作者简介:陈吉平(1964—),男,博士,研究员,主要研究方向为分析化学与环境健康研究。

共同通讯作者简介:张海军(1974—),男,博士,研究员,主要研究方向为环境化学与毒理学研究。

参考文献(References):

[1] Schmidt C W. TOX21: New dimensions of toxicity testing [J]. Environmental Health Perspectives, 2009, 117(8): A348-A353

[2] Andersen M E, Krewski D. Toxicity testing in the 21st Century: Bringing the vision to life [J]. Toxicological Sciences, 2009, 107(2): 324-330

[3] Kim M S, Pinto S M, Getnet D, et al. A draft map of the human proteome [J]. Nature, 2014, 509(7502): 575-581

[4] Pandey A, Mann M. Proteomics to study genes and genomes [J]. Nature, 2000, 405(6788): 837-846

[5] Mallick P, Kuster B. Proteomics: A pragmatic perspective [J]. Nature Biotechnology, 2010, 28: 695

[6] Wilkins M R, Pasquali C, Appel R D, et al. From proteins to proteomes: Large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis [J]. Biotechnology, 1996, 14(1): 61-65

[7] Gorg A, Weiss W, Dunn M J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics [J]. Proteomics, 2004, 4(12): 3665-3685

[8] Wellner D, Panneerselvam C, Horecker B L. Sequencing of peptides and proteins with blocked N-terminal amino acids: N-acetylserine or N-acetylthreonine [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1990, 87(5): 1947-1949

[9] Fenn J B, Mann M, Meng C K, et al. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules [J]. Sci-

ence, 1989, 246(4926): 64-71

[10] Hillenkamp F, Karas M. Mass Spectrometry of Peptides and Proteins by Matrix-Assisted Ultraviolet Laser Desorption/Ionization [M]// Methods in Enzymology. Academic Press, 1990: 280-295

[11] Steen H, Mann M. The abc's (and xyz's) of peptide sequencing [J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2004, 5: 699-711

[12] Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics [J]. Nature, 2003, 422(6928): 198-207

[13] Han X, Aslanian A, Yates J R. Mass spectrometry for proteomics [J]. Current Opinion in Chemical Biology, 2008, 12(5): 483-490

[14] Gallien S, Duriez E, Crone C, et al. Targeted proteomic quantification on quadrupole-Orbitrap mass spectrometer [J]. Molecular & Cellular Proteomics, 2012, 11(12): 1709-1723

[15] Chait B T. Mass spectrometry: Bottom-up or top-down? [J]. Science, 2006, 314(5796): 65-66

[16] Catherman A D, Skinner O S, Kelleher N L. Top down proteomics: Facts and perspectives [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2014, 445(4): 683-693

[17] Doerr A. Mass spectrometry-based targeted proteomics [J]. Nature Methods, 2012, 10: 23

[18] Company R, Antúnez O, Cosson R P, et al. Protein expression profiles in *Bathymodiolus azoricus* exposed to cadmium [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2019, 171: 621-630

[19] Lu Z, Wang S, Shan X, et al. Differential biological effects in two pedigrees of clam *Ruditapes philippinarum* exposed to cadmium using iTRAQ-based proteomics [J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2019, 65: 66-72

[20] Luo L, Zhang Q, Kong X, et al. Differential effects of zinc exposure on male and female oysters (*Crassostrea angulata*) as revealed by label-free quantitative proteomics [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2017, 36(10): 2602-2613

[21] Le V Q A, Ahn J Y, Heo M Y, et al. Proteomic profiles of *Daphnia magna* exposed to lead (Ⅱ) acetate trihydrate and atrazine [J]. Genes & Genomics, 2017, 39(8): 887-895

[22] Wang H, Wang S, Cui D, et al. iTRAQ-based proteomic technology revealed protein perturbations in intestinal mucosa from manganese exposure in rat models [J]. RSC Advances, 2017, 7(50): 31745-31758

[23] Lee E K, Shin Y J, Park E Y, et al. Selenium-binding protein 1: A sensitive urinary biomarker to detect heavy metal-induced nephrotoxicity [J]. Archives of Toxicology, 2017, 91(4): 1635-1648

[24] Zhao W J, Zhang Z J, Zhu Z Y, et al. Time-dependent response of A549 cells upon exposure to cadmium [J]. Journal of Applied Toxicology, 2018, 38(11): 1437-1446

[25] Kumar V, Karri V, Edwin M, et al. A system-based comparative proteomics approach to investigate heavy metals mixtures toxicity mechanism relates to the neurodegeneration on hippocampal cell line [J]. Toxicology Letters, 2018, 295(1): S203-S203

[26] Karri V, Ramos D, Martinez J B, et al. Differential protein expression of hippocampal cells associated with heavy metals (Pb, As, and MeHg) neurotoxicity: Deepening into the molecular mechanism of neurodegenerative diseases [J]. Journal of Proteomics, 2018, 187: 106-125

[27] Chasapis C T, Andreini C, Georgiopolou A K, et al. Identification of the zinc, copper and cadmium metalloproteome of the protozoon *Tetrahymena thermophila* by systematic bioinformatics [J]. Archives of Microbiology, 2017, 199(8): 1141-1149

[28] Son J, Lee Y S, Lee S E, et al. Bioavailability and toxicity of copper, manganese, and nickel in *Paronychiurus kimi* (Collembola), and biomarker discovery for their exposure [J]. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2017, 72(1): 142-152

[29] Baig M A, Ahmad J, Bagheri R, et al. Proteomic and ecophysiological responses of soybean (*Glycine max* L.) root nodules to Pb and Hg stress [J]. BMC Plant Biology, 2018, 18(1): 283

[30] Gutsch A, Keunen E, Guerriero G, et al. Long-term cadmium exposure influences the abundance of proteins that impact the cell wall structure in *Medicago sativa* stems [J]. Plant Biology, 2018, 20(6): 1023-1035

[31] Wang X H, Wang Q, Nie Z W, et al. *Ralstonia eutropha* Q2-8 reduces wheat plant above-ground tissue cadmium and arsenic uptake and increases the expression of the plant root cell wall organization and biosynthesis-related proteins [J]. Environmental Pollution, 2018, 242: 1488-1499

[32] Georgiadou E C, Kowalska E, Patla K, et al. Influence of heavy metals (Ni, Cu and Zn) on nitro-oxidative stress responses, proteome regulation and allergen production in basil (*Ocimum basilicum* L.) plants [J]. Frontiers in Plant Science, 2018, 9: 862

[33] Zeng F, Wu X, Qiu B, et al. Physiological and proteomic alterations in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings under hexavalent chromium stress [J]. Planta, 2014, 240(2): 291-308

[34] Cheng Z W, Chen Z Y, Yan X, et al. Integrated physiological and proteomic analysis reveals underlying response and defense mechanisms of *Brachypodium distachyon* seedling leaves under osmotic stress, cadmium and their combined stresses [J]. Journal of Proteomics, 2018, 170: 1-13

[35] Liu H, Weisman D, Tang L, et al. Stress signaling in response to polycyclic aromatic hydrocarbon exposure in *Arabidopsis thaliana* involves a nucleoside diphosphate kinase, NDPK-3 [J]. Planta, 2015, 241(1): 95-107

[36] Shen Y, Du J, Yue L, et al. Proteomic analysis of plasma membrane proteins in wheat roots exposed to phenanthrene [J]. Environmental Science and Pollution Research, 2016, 23(11): 10863-10871

[37] Shen Y, Li J, Gu R, et al. Proteomic analysis for phenanthrene-elicited wheat chloroplast deformation [J]. Environment International, 2019, 123: 273-281

[38] Skogland Enerstvedt K, Sydnes M O, Pampanin D M. Study of the plasma proteome of Atlantic cod (*Gadus morhua*): Effect of exposure to two PAHs and their corresponding diols [J]. Chemosphere, 2017, 183: 294-304

[39] Filis P, Walker N, Robertson L, et al. Long-term exposure to chemicals in sewage sludge fertilizer alters liver lipid content in females and cancer marker expression in males [J]. Environment International, 2019, 124: 98-108

[40] Nam T H, Jeon H J, Mo H H, et al. Determination of biomarkers for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) toxicity to earthworm (*Eisenia fetida*) [J]. Environmental Geochemistry and Health, 2015, 37(6): 943-951

[41] Shi X, Yeung L W Y, Lam P K S, et al. Protein profiles in zebrafish (*Danio rerio*) embryos exposed to perfluorooctane sulfonate [J]. Toxicological Sciences, 2009, 110 (2): 334-340

[42] Dorts J, Kestemont P, Marchand P A, et al. Ecotoxicoproteomics in gills of the sentinel fish species, *Cottus gobio*, exposed to perfluorooctane sulfonate (PFOS) [J]. Aquatic Toxicology, 2011, 103(1): 1-8

[43] Roland K, Kestemont P, Hénuset L, et al. Proteomic responses of peripheral blood mononuclear cells in the European eel (*Anguilla anguilla*) after perfluorooctane sulfonate exposure [J]. Aquatic Toxicology, 2013, 128-129: 43-52

[44] Roland K, Kestemont P, Loos R, et al. Looking for protein expression signatures in European eel peripheral blood mononuclear cells after *in vivo* exposure to perfluorooctane sulfonate and a real world field study [J]. Science of the Total Environment, 2014, 468-469: 958-967

[45] Zhang Y Y, Tang L L, Zheng B, et al. Protein profiles of cardiomyocyte differentiation in murine embryonic stem cells exposed to perfluorooctane sulfonate [J]. Journal of Applied Toxicology, 2016, 36(5): 726-740

[46] Tan F, Jin Y, Liu W, et al. Global liver proteome analysis using iTRAQ labeling quantitative proteomic technology to reveal biomarkers in mice exposed to perfluorooctane sulfonate (PFOS) [J]. Environmental Science & Technology, 2012, 46(21): 12170-12177

[47] Huang Q, Zhang J, Peng S, et al. Proteomic analysis of perfluorooctane sulfonate-induced apoptosis in human hepatic cells using the iTRAQ technique [J]. Journal of Applied Toxicology, 2014, 34(12): 1342-1351

[48] Cui R, Zhang H, Guo X, et al. Proteomic analysis of cell proliferation in a human hepatic cell line (HL-7702) induced by perfluorooctane sulfonate using iTRAQ [J]. Journal of Hazardous Materials, 2015, 299: 361-370

[49] Li M, Huo X, Pan Y, et al. Proteomic evaluation of human umbilical cord tissue exposed to polybrominated diphenyl ethers in an e-waste recycling area [J]. Environment International, 2018, 111: 362-371

[50] Huang S, Cui Y, Guo X, et al. 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether disrupts spermatogenesis, impairs mitochondrial function and induces apoptosis of early leptotene spermatocytes in rats [J]. Reproductive Toxicology, 2015, 51: 114-124

[51] Song J, Li Z H, He Y T, et al. Decabrominated diphenyl ether (BDE-209) and/or BDE-47 exposure alters protein expression in purified neural stem/progenitor cells determined by proteomics analysis [J]. International Journal of Developmental Neuroscience, 2014, 33: 8-14

[52] Fong C C, Shi Y F, Yu W K, et al. iTRAQ-based proteomic profiling of the marine medaka (*Oryzias melastigma*) gonad exposed to BDE-47 [J]. Marine Pollution Bulletin, 2014, 85(2): 471-478

[53] Ji C, Wu H, Wei L, et al. Proteomic and metabolomic analysis reveal gender-specific responses of mussel *Mytilus galloprovincialis* to 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE 47) [J]. Aquatic Toxicology, 2013, 140-141: 449-457

[54] Ji C, Wu H, Wei L, et al. Proteomic and metabolomic analysis of earth worm *Eisenia fetida* exposed to different concentrations of 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether [J]. Journal of Proteomics, 2013, 91: 405-416

[55] Rasinger J D, Carroll T S, Maranghi F, et al. Low dose exposure to HBCD, CB-153 or TCDD induces histopathological and hormonal effects and changes in brain protein and gene expression in juvenile female BALB/c mice [J]. Reproductive Toxicology, 2018, 80: 105-116

[56] Miller I, Serchi T, Cambier S, et al. Hexabromocyclododecane (HBCD) induced changes in the liver proteome of eu- and hypothyroid female rats [J]. Toxicology Letters, 2016, 245: 40-51

[57] Miller I, Diepenbroek C, Rijntjes E, et al. Gender specific differences in the liver proteome of rats exposed to short term and low-concentration hexabromocyclododecane (HBCD) [J]. Toxicological Research, 2016, 5(5): 1273-1283

[58] Rasinger J D, Carroll T S, Lundebye A K, et al. Cross-omics gene and protein expression profiling in juvenile female mice highlights disruption of calcium and zinc signalling in the brain following dietary exposure to CB-153, BDE-47, HBCD or TCDD [J]. Toxicology, 2014, 321: 1-12

[59] Senthil Kumar S, Muthuselvam P, Pugalenthi V, et al. Toxicoproteomic analysis of human lung epithelial cells exposed to steel industry ambient particulate matter (PM) reveals possible mechanism of PM related carcinogenesis [J]. Environmental Pollution, 2018, 239: 483-492

[60] Zhao C, Zhu L, Li R, et al. Omics approach reveals metabolic disorders associated with the cytotoxicity of airborne particulate matter in human lung carcinoma cells [J]. Environmental Pollution, 2019, 246: 45-52

[61] Huang Q, Zhang J, Peng S, et al. Effects of water soluble $PM_{2.5}$ extracts exposure on human lung epithelial cells (A549): A proteomic study [J]. Journal of Applied Toxicology, 2014, 34(6): 675-687

[62] Luyten L J, Saenen N D, Janssen B G, et al. Air pollution and the fetal origin of disease: A systematic review of the molecular signatures of air pollution exposure in human placenta [J]. Environmental Research, 2018, 166: 310-323

[63] Hincal F. Effects of exposure to air pollution and smoking on the placental aryl hydrocarbon hydroxylase (AHH) activity [J]. Archives of Environmental Health, 1986, 41(6): 377-383

[64] Obolenskaya M Y, Teplyuk N M, Divi R L, et al. Human placental glutathione S-transferase activity and polycyclic aromatic hydrocarbon DNA adducts as biomarkers for environmental oxidative stress in placentas from pregnant women living in radioactivity- and chemically-polluted regions [J]. Toxicology Letters, 2010, 196(2): 80-86

[65] Sorkun H C, Bir F, Akbulut M, et al. The effects of air pollution and smoking on placental cadmium, zinc concentration and metallothionein expression [J]. Toxicology, 2007, 238(1): 15-22

[66] Kedryna T, Guminska M, Lucyna Z. Pyruvate kinase activity in the placentas of women living in polluted and unpolluted environments [J]. Medical Science Monitor, 2004, 10(12): CR672-CR678

[67] Bahr B L, Price M D, Merrill D, et al. Different expression of placental pyruvate kinase in normal, preeclamptic and intrauterine growth restriction pregnancies [J]. Placenta, 2014, 35(11): 883-890

[68] Saenen N D, Vrijens K, Janssen B G, et al. Placental nitrosative stress and exposure to ambient air pollution during gestation: A population study [J]. American Journal of Epidemiology, 2016, 184(6): 442-449

[69] Weldy C S, Liu Y, Liggitt H D, et al. In utero exposure to diesel exhaust air pollution promotes adverse intrauterine conditions, resulting in weight gain, altered blood pressure, and increased susceptibility to heart failure in adult mice [J]. PLoS One, 2014, 9(2): e88582 ◆