

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20200511001

胡立新, 熊倩, 陈晓雯, 等. FTIR 在环境毒理学研究中的应用[J]. 生态毒理学报, 2021, 16(3): 107-114

Hu L X, Xiong Q, Chen X W, et al. Application of Fourier transform infrared spectroscopy in environmental toxicology [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2021, 16(3): 107-114 (in Chinese)

FTIR 在环境毒理学研究中的应用

胡立新^{1,2}, 熊倩^{1,2}, 陈晓雯³, 赵佳慧^{1,2}, 赵建亮^{1,2}, 刘有胜^{1,2}, 应光国^{1,2,*}

1. 华南师范大学环境学院, 广州 510006

2. 广东省化学品污染与环境安全重点实验室 & 环境理论化学教育部重点实验室, 华南师范大学, 广州 510006

3. 国家环境保护环境污染健康风险评估重点实验室, 生态环境部华南环境科学研究所, 广州 510655

收稿日期: 2020-05-11 录用日期: 2020-06-16

摘要: 傅里叶变换红外光谱(FTIR)作为一种常用化学分析方法,与多元统计分析方法相结合,可以识别生物分子的变化情况。红外光谱具有操作简单、快速、灵敏、样品无损等特点,逐渐在环境监测和污染物毒性效应方面被广泛应用。通过研究生物体受到外界胁迫时生物大分子在结构上的变化情况,可从分子水平揭示污染物的毒性效应及其毒性机制。笔者从 FTIR 在环境毒理学中的研究进展、技术优势,以及其在毒理学中的应用等方面进行了综述。

关键词: 红外光谱;生物大分子;环境污染物;环境毒理学;分子指纹特征

文章编号: 1673-5897(2021)3-107-08 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Application of Fourier Transform Infrared Spectroscopy in Environmental Toxicology

Hu Lixin^{1,2}, Xiong Qian^{1,2}, Chen Xiaowen³, Zhao Jiahui^{1,2}, Zhao Jianliang^{1,2}, Liu Yousheng^{1,2}, Ying Guangguo^{1,2,*}

1. School of Environment, South China Normal University, Guangzhou 510006, China

2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Chemical Pollution and Environmental Safety & MOE Key Laboratory of Theoretical Chemistry of Environment, South China Normal University, Guangzhou 510006, China

3. State Environmental Protection Key Laboratory of Environmental Pollution Health Risk Assessment, South China Institute of Environmental Sciences, Ministry of Ecology and Environment, Guangzhou 510655, China

Received 11 May 2020 accepted 16 June 2020

Abstract: As a conventional chemical analysis tool, Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) combined with multivariate statistical analysis can identify the changes of biomolecules in biota. FTIR has been widely used in environmental monitoring and toxic effects of chemical pollutants because of its simple, rapid, sensitive and non-destructive characteristics. By analyzing the structural alterations of biomacromolecules under external stress, the toxic effects and mechanisms of pollutants can be revealed at the biochemical level. In this paper, research status, technical advantages, applications and future prospect of FTIR in environmental toxicology are reviewed.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(41907343)

第一作者: 胡立新(1993—),男,博士,研究方向为基于生物光谱技术的毒性测试, E-mail: lixin.hu@m.scnu.edu.cn

* 通讯作者 (Corresponding author), E-mail: guangguo.ying@m.scnu.edu.cn

Keywords: FTIR; bio-macromolecules; environmental pollutant; environmental toxicology; molecular fingerprint characteristics

环境毒理学是研究环境污染物对生物的毒性效应及作用机制的一门学科,其主要内容是研究环境污染物毒性效应的监测、毒性作用机制的认识、生物标志物的提取及污染物的风险评价。环境污染物在一定剂量下对生态环境中的生物都存在着直接或间接的毒害作用。基于单一效应终点的传统毒性测试方法很难准确地评估污染物的毒性效应。因此,发展多指标、高综合性的毒性测试方法对研究污染物的毒性效应、评估化学物质的环境风险具有重要的意义。

红外光谱是通过研究分子内部原子之间振动、转动信息来确定化合物结构的技术。对于正常细胞而言,生物体内蛋白质、脂质、核酸和糖类等生物大分子的含量始终保持在平衡状态。当生物受到外界刺激时,污染物作用于不同的生物大分子或者因污染物的存在使得某些生物大分子在构型和构象等方面发生变化,进而引起相应的红外光谱吸收峰的改变。通过对特征峰的分析,可以更加准确地得到污染物介导的细胞内生物大分子的变化情况,从而在生物大分子水平对污染物的毒性效应进行评价。相比于传统的毒性测试方法,基于光谱手段的毒性测试方法不仅技术便捷、灵敏,而且能够提供更加丰富的生物大分子变化的信息,为进一步的毒性机制和毒性通路研究提供新的思路。

1 红外光谱概述 (Overview of infrared spectroscopy)

红外光谱是将分子中在振动和转动过程中引起的偶极矩变化信息转化为可视化的透射和吸收形式的谱图,从而用以分析化学物质以及生物大分子(脂质、蛋白质及核酸等)在构型和构象上变化的技术^[1-2]。由于红外光谱在样品检测方面具有样品无损、非标记性等优势,该技术已经成为生物大分子结构研究的重要手段之一,在医学、法医学和生命科学等多个领域被广泛应用^[3]。

在生物大分子研究中,主要能够提供有用光谱信息的振动区域在 $3\ 050 \sim 2\ 800\ \text{cm}^{-1}$ 和 $1\ 800 \sim 900\ \text{cm}^{-1}$ 这2个波段。前者被称为碳氢伸缩振动区,后者被称为生化指纹区。碳氢伸缩振动区主要反映的是 C—H 键的伸缩振动信息,与脂质烷基链的结构信息息息相关,主要包括与不饱和脂肪酸相

关的=C—H 伸缩振动,与饱和脂肪酸相关的一 CH_2 和— CH_3 的对称和反对称伸缩振动。生化指纹区主要反映的是生物大分子基本振动模式^[1],包括与脂质相关的羰基基团,与蛋白质结构相关的酰胺 I、酰胺 II 和酰胺 III 振动信息,与核酸结构相关的磷酸二酯键的振动信息,以及与碳水化合物相关的 C—OH 基团的振动信息^[4]。

红外光谱作为生物大分子结构分析中的常用技术,在毒理学研究中也广泛被应用。通过对受试生物在生物大分子水平上结构变化情况,来表征环境污染物对细胞、组织或者器官等的毒性效应,一方面可以灵敏、有效地评估污染物的毒性效应,另一方面还可以基于大分子水平推断其毒理机制。红外光谱应用于环境毒理学研究中的优势主要包括;能够用以分析环境浓度污染物介导的毒性损伤作用;样品分析用时较短;样品无需复杂的前处理过程,且不会引起二次污染的问题;光谱信息具有很强的特征性,同时还能提供丰富的生物分子的变化信息;光谱检测对样品的形态要求不高,适用于多种生物(细菌、细胞、植物和动物等)的检测分析^[2]。

2 生物大分子的光谱特征峰识别 (Characteristic recognition of biological macromolecules)

生物样本主要由蛋白质、脂质、核酸和糖类等生物大分子组成,而这些大分子在结构组成上因具有独特的化学键而呈现出具有特征性的红外光谱振动峰^[5]。因此,可以用生物样本的光谱振动信息来表征细胞内生物大分子的变化情况^[2]。通过对生物大分子的变化情况进行进一步的分析,可以从分子水平揭示污染物胁迫对受试生物的影响^[4]。

2.1 蛋白质

蛋白质是生物的重要组成部分,其结构信息与活性及功能密切相关。结构稳定是蛋白质发挥正常功能的前提条件。当受试生物受到来自外界环境的胁迫或刺激时,会引起细胞内蛋白质在结构上发生改变^[6]。在基于红外光谱的蛋白质结构研究中,与蛋白质相关的振动区域主要有酰胺 I、酰胺 II 和酰胺 III。酰胺 I 的振动信息主要发生在 $1\ 650\ \text{cm}^{-1}$ 左右,该区域的振动峰主要是由碳氧双键和少量的碳氮单键贡献^[7]。酰胺 II 主要由碳氮键的面内弯曲和碳氢的伸缩振动贡献,振动峰在 $1\ 550\ \text{cm}^{-1}$ 左右^[8]。

酰胺Ⅲ主要在 $1\ 400 \sim 1\ 200\ \text{cm}^{-1}$ 区域,是由氮氢弯曲和碳氮伸缩振动构成^[9]。

基于红外光谱的蛋白质二级结构分析主要以酰胺Ⅰ为主。该区域的振动峰出现在 $1\ 700 \sim 1\ 600\ \text{cm}^{-1}$ 范围内,通过二级倒数和解卷积算法,可以得到 $8 \sim 11$ 个与蛋白质二级结构相关的振动峰(表1)。其中, β 折叠结构主要在较低的波数($1\ 620 \sim 1\ 640\ \text{cm}^{-1}$)、其次为无规则卷曲($1\ 640 \sim 1\ 648\ \text{cm}^{-1}$)、 α 螺旋($1\ 650 \sim 1\ 658\ \text{cm}^{-1}$)、 3_{10} 螺旋($1\ 663\ \text{cm}^{-1}$)、 β 转角($1\ 666 \sim 1\ 690\ \text{cm}^{-1}$)以及反平行 β 折叠($1\ 690 \sim 1\ 695\ \text{cm}^{-1}$)^[6]。由于红外光谱可以准确、灵敏地反映蛋白质二级结构信息的变化,使得光谱技术在蛋白质结构分析领域快速发展^[10]。在环境毒理学研究中,当受试生物受到污染物胁迫,蛋白质二级结构中折叠结构发生改变,酰胺Ⅰ振动峰主要表现为窄峰;当蛋白质结构比较松散,呈现出无序结构的特征时,酰胺Ⅰ以宽峰为主^[11]。蛋白质结构中另外一种构象形式为 α 螺旋结构,该结构的变化情况与谷氨酸、甘氨酸和脯氨酸有关。甘氨酸和脯氨酸含量的增加往往会导致螺旋结构发生强烈改变^[12]。与 β 折叠结构关系较为密切的是缬氨酸和谷氨酸,蛋白质结构的错误折叠会引起细胞功能发生紊乱、蛋白质聚集等^[13]。甘氨酸和脯氨酸的含量变化与 β 转角结构有关,而 β 转角的变化可以用来表征球形蛋白的形成以及磷酸化和糖基化的氨基酸侧链修饰^[14]。无规卷曲结构一般与折叠、螺旋和转角结构一起用于说明蛋白质变性情况^[15]。

在蛋白质结构研究中,由于红外光谱对蛋白质的二级结构非常敏感,因此也被广泛应用于蛋白质聚集的研究中。Miller 等^[10]综述了蛋白质聚集的红外光谱检测表征技术,发现具有高信噪比的同步辐射光源的光谱仪可以对蛋白质的错误折叠和聚集进行检测;在阿尔茨海默症、帕金森等疾病的病变组织进行光谱分析发现,蛋白质聚集与 α 螺旋和 β 折叠之间的转换存在相关性,这一结论与圆二色光谱和核磁共振结果相一致。此外,红外光谱还可以用于蛋白质翻译后修饰的研究。Zhang 等^[16]运用红外光谱研究曲古霉素 A 介导的 Hela 细胞在蛋白质乙酰化水平上的变化情况,发现可以通过 $A(\text{CH}_3)/A(\text{CH}_2)$ 和 α -螺旋的含量来定量分析蛋白质乙酰化水平。此外,红外光谱还可以用于蛋白质磷酸化的研究中,以 $970\ \text{cm}^{-1}$ 的变化情况来表征磷酸化水平。这是因为当细胞内蛋白质中的羟基被磷酸根离子取

代后,维持分子内层构象的氢键被打破,使得 β 折叠含量出现明显的下降,因此可以用磷酸基团的振动信息与酰胺Ⅰ的振动信息综合反映蛋白质磷酸化水平^[17]。

总的来说,红外光谱能够很便捷地对生物大分子中官能团的变化进行表征。通过对与蛋白质相关的红外光谱振动信息的变化来阐释生化过程中蛋白质分子在结构上的差异性;通过对酰胺Ⅰ中各二级结构的分析,对污染物介导蛋白质二级结构变化进行评估。因此,基于红外光谱的蛋白质结构研究,有助于揭示环境污染物与细胞内蛋白质之间的动态关系,为污染物毒理机制的研究提供新的思路。

2.2 脂质

脂质是细胞膜的重要组成部分,主要由磷酸基和磷酸胆碱基的极性亲水头部和以长链脂肪酸为主的中性脂分子的疏水尾部两部分组成。脂质分子中不饱和和双键的数目以及脂肪酸烷基链长度的变化均会引起细胞膜在结构与功能上的改变^[18]。基于红外光谱的细胞膜脂质研究,一方面可以说明磷脂分子在结构上的变化,另外一方面还可以分析细胞膜上蛋白和脂质过氧化等现象^[19]。在脂质分子的红外光谱图来看,脂质分子的红外吸收峰主要分布在碳氢伸缩振动区域以及部分生化指纹区域。在碳氢伸缩振动区域,主要包括与不饱和碳氢键相关的振动峰($\sim 3\ 010\ \text{cm}^{-1}$)、 CH_3 的对称和反对称伸缩振动($\sim 2\ 870\ \text{cm}^{-1}$ 和 $\sim 2\ 960\ \text{cm}^{-1}$)以及 CH_2 的对称和反对称伸缩振动($\sim 2\ 850\ \text{cm}^{-1}$ 和 $\sim 2\ 920\ \text{cm}^{-1}$)。通过对该区域与碳氢相关的振动信息分析,可以获得不饱和和脂肪酸与饱和脂肪酸之间的变化情况^[20]。通过对 CH_2 基团的振动峰进行分析,可以得到与脂质分子亚甲基的堆积、烷基链的长度以及烷基链的无序化信息等^[21]。通过对甲基和亚甲基的含量进行分析,可以用亚甲基的含量总和来表征总脂肪酸的量^[22],用不饱和和碳氢与总脂的比值来说明脂肪酸的不饱和程度,用甲基和亚甲基的比值来说明膜脂的流动性^[23]。

在生物指纹区,与脂质相关的振动峰主要出现在 $1\ 800 \sim 1\ 700\ \text{cm}^{-1}$ 范围内。当振动信息出现在低波数($1\ 705\ \text{cm}^{-1}$)时,可以表征氢键化的羰基基团;而在高波数($1\ 740\ \text{cm}^{-1}$)表征的是非氢键化的羰基基团;在 $1\ 710\ \text{cm}^{-1}$ 左右的振动峰表征的是羧基。羰基基团与亚甲基基团的比值,可以用来分析脂质过氧化程度^[24]。综合 2 个振动区域的光谱信息,可

以从结构和功能上对细胞膜的损伤作用进行评价。

综上所述,细胞膜上脂质分子在结构上发生微小的变化,都可以在光谱振动信息上得到明显的表征。细胞膜结构的稳定性决定其功能的完整性^[25]。细胞膜上烷基链长度、膜的流动性、脂肪酸饱和度以及过氧化程度都可以作为指示环境污染物胁迫的生物标志物^[26]。基于红外光谱的细胞膜脂研究,可以为污染物介导的膜损伤机制研究提供便利。

2.3 核酸

核酸是生命体存储遗传信息的重要组成。核酸分子结构的变化往往会影响生物体的生长发育。基于红外光谱的核酸分子研究中,DNA/RNA 的特征振动信息在 $1\ 300 \sim 860\ \text{cm}^{-1}$ 区域,主要用以说明 DNA 分子的构型信息^[27]。与 DNA 分子相关的振动信息主要包括基于 DNA 骨架结构在 $1\ 300 \sim 1\ 000\ \text{cm}^{-1}$ 的振动信息,以及 $900 \sim 800\ \text{cm}^{-1}$ 的五碳糖的振动信息。DNA 在结构上主要由具有刚性特点的 A-DNA、柔性特点的 B-DNA 以及左手 Z-DNA 组成。其中,B-DNA 的振动峰主要在 $1\ 225\ \text{cm}^{-1}$ 和 $1\ 080\ \text{cm}^{-1}$ 左右, $>1\ 225\ \text{cm}^{-1}$ 的振动峰归属于 A-DNA, $1\ 025\ \text{cm}^{-1}$ 归属于 Z-DNA^[28]。当 DNA 分子受到外界环境的刺激和胁迫时(如高盐度环境下),左手 Z-DNA 容易形成,而 A-DNA 和 B-DNA 容易发生相互的转化^[29]。因此,可以通过 DNA 分子结构变化信息反映 DNA 损伤程度。

3 在环境毒理学研究中的应用 (Application in environmental toxicology research)

截至目前,红外光谱在毒理学研究中主要应用于环境污染物的快速毒性检测以及在生物大分子水平上的毒性机制的研究。但是该领域的发展很大程度上依赖于生物信息学方面的支持。总而言之,红外光谱结合多元统计的手段,以环境中常见的生物,如细菌、细胞、绿藻、浮萍、斑马鱼和小鼠等为研究对象,对环境污染物的毒性效应进行识别和分析,在污染物毒性筛查以及毒性机制研究中起到很重要的作用。

3.1 红外光谱在重金属毒性研究中的应用

在重金属的毒性研究中,Palaniappan 和 Vijaya-sundaram^[30]基于红外光谱研究了砷对南亚野鲮(*Labeo rohita*)肾脏毒性,发现砷会对肾脏组织产生损伤作用。通过对肾脏光谱信息解析发现,砷中毒会引起肾脏组织中脂质和蛋白质等生化组成发生显著性改变,并在分子水平引起肾脏组织的组成和结构发

生改变。Senthamilselvan 等^[31]研究镍和汞对尖吻鲈(*Lates calcarifer*)组织的毒性作用时,发现镍和汞中毒的肌肉组织的光谱差异主要集中在与脂类、蛋白质和核酸相关的振动信息。且在亚致死浓度下,2种重金属均会引起蛋白质二级结构的变化,表现为 α 螺旋结构的减少和无规则卷曲结构的增加。Kardas 等^[32]研究发现,钴会引起细菌细胞膜和细胞壁结构的改变,同时还发现蛋白质构象自由度降低。Llabjani 等^[33]利用不同浓度的砷、铜和硒处理 MCF-7 细胞,发现 3 种重金属的关键靶分子是脂质和蛋白质,但是不同重金属的指纹特征又存在特异性。同时,光谱数据表明 3 种重金属均会引起活性氧(ROS)的产生,可对细胞的生长起到刺激或损伤作用。在对镍和铬的细菌毒性研究中,发现镍和铬联合暴露存在协同效应^[34]。Hu 等^[35]研究铜离子暴露对大肠杆菌(*Escherichia coli*)的毒性,发现红外光谱在细菌膜脂、核酸、肽聚糖和蛋白质等的检测中灵敏度高,并且能够检测到短时间暴露引起的磷脂组成的变化。Dao 等^[36]运用红外光谱研究铅对绿藻(*Chlorella* sp. FleB1 和 *Scenedesmus acutus* YaA6)毒性,发现铅会引起碳水化合物和脂质含量增加,蛋白质和磷酸化分子含量下降;且光谱技术结合化学计量学方法能从分子水平快速揭示污染物毒性特征,还可以通过细胞内分子损伤水平预测污染物的暴露水平。

3.2 红外光谱在有机化合物毒性研究中的应用

红外光谱在有机物的毒性研究中应用较为广泛。在持久性有机污染物毒理学研究方面,Barber 等^[37]研究低剂量多溴联苯醚(PBDEs),包括 PBDEs 同系物 47、99、153、183 和 209 对 MCF-7 的毒性时发现,当暴露浓度 $<10^{-9}\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,PBDEs 引起的细胞内生物分子的变化可以被光谱信息捕获。Llabjani 等^[38]研究了 PBDEs(同系物 47、153、183 和 209)、苯并(a)芘(B[a]P)、杂环胺(PHIP)、雌二醇(E2)及林丹对 MCF-7 细胞的毒性作用,结果表明,即使在极低的暴露浓度($10^{-12}\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),PBDE 处理组与对照组之间光谱信息仍然具有显著性差异,且主要出现在与脂质和蛋白质二级结构相关的振动区域。Llabjani 等^[39]运用红外光谱进一步研究了 PBDEs(同系物 47、153、183 和 209)和多氯联苯(PCBs)(同系物 126 和 153)的联合毒性作用,发现 PCB126 与 PBDEs 的联合作用表现为拮抗作用,而 PCB153 与 PBDEs 的联合作用表现为协同作用。Pang 等^[40]研究

了 B[a]P 对不同周期(S 期和 G0/G1 期)细胞的毒性作用,结果表明,B[a]P 对 S 期和 G0/G1 期细胞的影响均呈现剂量-效应关系,主要影响的是 DNA/RNA、蛋白质二级结构和脂质。Gorrochategui 等^[41]运用红外光谱研究全氟辛酸化合物对非洲爪蟾 A6 肾上皮细胞的毒性效应,发现全氟及多氟烷基化合物(PFASs)类化合物主要影响细胞 DNA/RNA、蛋白质二级结构和脂肪酸等。

在激素类物质的毒性研究中,Cakmak 等^[42]运用红外光谱研究 17 β -雌二醇对虹鳟鱼(rainbow trout)肝脏的毒性作用时发现,处理组肝脏组织中糖原和蛋白质水平降低,甘油三酯和核酸的含量增加,还发现肝脏细胞膜流动性下降,膜脂结构发生改变;研究者同时对比了 17 β -雌二醇和壬基酚处理组中肝脏组织的光谱差异,证实二者对未发育成熟虹鳟鱼具有类似的作用。Johnson 等^[43]开展了 17 β -雌二醇介导雌激素效应的研究,发现传统的 E-screen 方法和红外光谱方法检测 17 β -雌二醇的半数抑制浓度(EC₅₀)分别为 2.29 ng·L⁻¹ 和 2.56 ng·L⁻¹,说明光谱技术是一种快速、灵敏的雌激素筛查方法。Duan 等^[8]运用红外光谱研究了壬基酚(4-NP)对大鼠睾丸组织和睾丸支持细胞的毒性效应,发现 4-NP 主要影响的光谱振动区域为酰胺、脂质和 DNA/RNA,其中处理组多肽聚集水平、酰胺 I 与酰胺 II 的比值,以及磷酸基团和碳水化合物的比值出现明显的下降,说明光谱手段可以用于睾丸组织生物分子损伤的研究中。

在农药和杀菌剂类物质的毒性研究中,Dakha-khni 等^[44]在 2,4-二氯苯酚(2,4-D)的肝毒性研究中,发现 2,4-D 能够显著降低大鼠肝脏蛋白质含量,引起脂质碳链疏松以及脂质极性改变,证明红外光谱在细胞毒性检测和毒物介导生物膜和蛋白质损伤监测方面具有明显的优势。Strong 等^[45]运用红外光谱研究多菌灵和氟唑啉对非洲爪蟾 A6 细胞的单一毒性和联合毒性,结果表明,2 种化合物单一暴露均会影响细胞的蛋白质和磷脂分子,并且二者的联合暴露还会对 DNA 和碳水化合物产生影响,说明红外光谱是一项研究细胞水平上环境浓度杀菌剂毒性效应的灵敏度较高的技术。Xin 等^[46]运用红外光谱从分子水平揭示三氯生和卡马西平对淡水绿藻(*Chlo-rococccum* sp.)的毒性效应,发现三氯生对淡水绿藻的毒性效应远大于卡马西平,三氯生主要通过抑制绿藻的脂肪酸合成以及引起蛋白质聚集从而产生毒

性,而卡马西平主要通过与其磷脂双分子层相互作用破坏细胞膜而产生毒性。

3.3 红外光谱在纳米材料毒性研究中的应用

在对纳米材料的毒性研究中,Palaniappan 和 Pramod^[47]运用红外光谱研究了纳米二氧化钛(nTiO₂)对斑马鱼鳃组织的毒性作用,发现 nTiO₂ 暴露会引起鳃组织中蛋白质和脂质组成之间的变化,对蛋白质结构进一步研究发现 nTiO₂ 暴露还会增加蛋白质的 α 螺旋结构,减少 β 折叠结构。在碳纳米颗粒毒性研究中,结果表明,光谱信息的变化情况与纳米颗粒的浓度之间呈现剂量-效应关系,同时还发现多壁碳纳米管和富勒烯主要影响细菌的脂质、酰胺 II 和 DNA,并且碳纳米颗粒的毒性大小与其尺寸相关^[48]。Li 等^[49]也运用红外光谱研究了碳纳米颗粒的毒性效应,发现光谱技术结合化学计量学的方法可以检测到 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 级别的碳纳米颗粒对细胞的毒性效应。Novak 等^[50]在研究氧化钨纳米纤维对鼠妇(*Porcellio scaber*)的毒性时,发现传统的毒性测试方法没有检测到氧化钨纳米纤维的毒性效应,而红外光谱却检测到了脂质过氧化以及 DNA 结构的变化。Rhiem 等^[51]研究多壁纳米管对绿藻细胞的毒性时发现,多壁纳米管会影响绿藻细胞的生物组成。Li 等^[52]研究银离子和纳米银对大肠杆菌的杀菌作用,发现银离子和纳米银均会影响巯基基团、蛋白质、脂多糖和 DNA 的振动信息,但是二者呈现出不同的动力学特征。

4 展望 (Prospects)

随着光谱技术的不断进步,红外光谱在毒理学领域的应用越来越广泛。红外光谱因其具有样品无损、非标记和样品前处理简单等优点,有望成为一种新的毒理学研究工具。但是,红外光谱在毒理学研究中目前处于起步阶段,各项基础性工作还需要进一步完善。从仪器平台来说,高分辨的红外光谱和具有成像功能光谱仪的应用将丰富生物光谱信息,提高我们对生物样本分子层面的认识;从数据分析来说,更加准确和便捷的统计模型以及模式识别方法、特征提取手段等的应用可以辅助我们进一步深入理解生物大分子构型构象等的变化;从峰值指认来说,各个红外吸收峰对应的化学键的振动信息以及归属问题的解决,将对我们的光谱解析与分析给予关键支持,并且使我们对疾病诊断和毒性机理的认识更加准确;除此之外,红外光谱数据库的建设,基于分子构型构象变化的生物信息数据与基于质谱

的蛋白质组学、代谢组学等的结合将是未来光谱技术发展的重要方向。

通讯作者简介: 应光国(1964—), 男, 博士, 研究员, 博士生导师, 主要研究方向为污染物化学和生态毒理学。

参考文献(References):

- [1] Baker M J, Trevisan J, Bassan P, et al. Using Fourier transform IR spectroscopy to analyze biological materials [J]. *Nature Protocols*, 2014, 9(8): 1771-1791
- [2] Martin F L, Kelly J G, Llabjani V, et al. Distinguishing cell types or populations based on the computational analysis of their infrared spectra [J]. *Nature Protocols*, 2010, 5(11): 1748-1760
- [3] Gautam R, Vanga S, Ariese F, et al. Review of multidimensional data processing approaches for Raman and infrared spectroscopy [J]. *EPJ Techniques and Instrumentation*, 2015, 2: 8
- [4] Movasaghi Z, Rehman S, ur Rehman D I. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues [J]. *Applied Spectroscopy Reviews*, 2008, 43(2): 134-179
- [5] Trevisan J, Angelov P P, Carmichael P L, et al. Extracting biological information with computational analysis of Fourier-transform infrared (FTIR) biospectroscopy datasets: Current practices to future perspectives [J]. *The Analyst*, 2012, 137(14): 3202-3215
- [6] Kong J, Yu S. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures [J]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2007, 39(8): 549-559
- [7] Yang H Y, Yang S N, Kong J L, et al. Obtaining information about protein secondary structures in aqueous solution using Fourier transform IR spectroscopy [J]. *Nature Protocols*, 2015, 10(3): 382-396
- [8] Duan P, Liu B S, Morais C L M, et al. 4-nonylphenol effects on rat testis and Sertoli cells determined by spectrochemical techniques coupled with chemometric analysis [J]. *Chemosphere*, 2019, 218: 64-75
- [9] Staroszczyk H, Sztuka K, Wolska J, et al. Interactions of fish gelatin and chitosan in uncrosslinked and crosslinked with EDC films: FT-IR study [J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2014, 117: 707-712
- [10] Miller L M, Bourassa M W, Smith R J. FTIR spectroscopic imaging of protein aggregation in living cells [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 2013, 1828(10): 2339-2346
- [11] Byler D M, Susi H. Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra [J]. *Biopolymers*, 1986, 25(3): 469-487
- [12] Wong T S, Roccatano D, Zacharias M, et al. A statistical analysis of random mutagenesis methods used for directed protein evolution [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2006, 355(4): 858-871
- [13] Evans M S, Sander I M, Clark P L. Cotranslational folding promotes β -helix formation and avoids aggregation *in vivo* [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2008, 383(3): 683-692
- [14] Suat K, Jois S. Design of β -turn based therapeutic agents [J]. *Current Pharmaceutical Design*, 2003, 9(15): 1209-1224
- [15] Guo Y L, Huang W C, Wu Y F, et al. Conformational changes of proteins and oil molecules in fish oil/water interfaces of fish oil-in-water emulsions stabilized by bovine serum albumin [J]. *Food Chemistry*, 2019, 274: 402-406
- [16] Zhang F Q, Huang Q, Yan J W, et al. Assessment of the effect of trichostatin A on HeLa cells through FT-IR spectroscopy [J]. *Analytical Chemistry*, 2015, 87(4): 2511-2517
- [17] Chen L, Holman H Y N, Hao Z, et al. Synchrotron infrared measurements of protein phosphorylation in living single PC12 cells during neuronal differentiation [J]. *Analytical Chemistry*, 2012, 84(9): 4118-4125
- [18] Yehuda S, Rabinovitz S, Carasso R L, et al. The role of polyunsaturated fatty acids in restoring the aging neuronal membrane [J]. *Neurobiology of Aging*, 2002, 23(5): 843-853
- [19] Nadochenko V A, Rincon A G, Stanca S E, et al. Dynamics of *E. coli* membrane cell peroxidation during TiO₂ photocatalysis studied by ATR-FTIR spectroscopy and AFM microscopy [J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2005, 169(2): 131-137
- [20] Sinclair R G, McKay A F, Myers G S, et al. The infrared absorption spectra of unsaturated fatty acids and esters [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1952, 74(10): 2578-2585
- [21] Dias M, Naik A, Guy R H, et al. *In vivo* infrared spectroscopy studies of alkanol effects on human skin [J]. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2008, 69(3): 1171-1175
- [22] Dreissig I, Machill S, Salzer R, et al. Quantification of brain lipids by FTIR spectroscopy and partial least squares regression [J]. *Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2009, 71(5): 2069-2075

- [23] Goates C Y, Knutson K. Enhanced permeation of polar compounds through human epidermis. I. Permeability and membrane structural changes in the presence of short chain alcohols [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1994, 1195(1): 169-179
- [24] Mignolet A, Mathieu V, Goormaghtigh E. HTS-FTIR spectroscopy allows the classification of polyphenols according to their differential effects on the MDA-MB-231 breast cancer cell line [J]. *Analyst*, 2017, 142(8): 1244-1257
- [25] Furnkranz A, Leitinger N. Regulation of inflammatory responses by oxidized phospholipids: Structure-function relationships [J]. *Current Pharmaceutical Design*, 2004, 10(8): 915-921
- [26] Goormaghtigh E, Raussens V, Ruysschaert J M. Attenuated total reflection infrared spectroscopy of proteins and lipids in biological membranes [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes*, 1999, 1422(2): 105-185
- [27] Ahmed M K, Amiama F, Sealy E A. Unique spectral features of DNA infrared bands of some microorganisms [J]. *Spectroscopy*, 2009, 23(5-6): 291-297
- [28] Taillandier E, Liquier J. *Infrared Spectroscopy of DNA [M]/DNA Structures Part A: Synthesis and Physical Analysis of DNA*. Amsterdam: Elsevier, 1992: 307-335
- [29] Zhang F Q, Huang Q, Yan J W, et al. Histone acetylation induced transformation of B-DNA to Z-DNA in cells probed through FT-IR spectroscopy [J]. *Analytical Chemistry*, 2016, 88(8): 4179-4182
- [30] Palaniappan P R, Vijayasundaram V. Arsenic-induced biochemical changes in *Labeo rohita* kidney: An FTIR study [J]. *Spectroscopy Letters*, 2009, 42(5): 213-218
- [31] Senthamilselvan D, Chezian A, Kabilan N, et al. FTIR study of nickel and mercury induced biochemical changes in the muscles tissues of *Lates calcarifer* [J]. *International Journal of Environmental Sciences*, 2012, 2(4): 1976-1983
- [32] Kardas M, Gozen A G, de Severcan F. FTIR spectroscopy offers hints towards widespread molecular changes in cobalt-acclimated freshwater bacteria [J]. *Aquatic Toxicology*, 2014, 155: 15-23
- [33] Llabjani V, Hoti V, Pouran H M, et al. Bimodal responses of cells to trace elements: Insights into their mechanism of action using a biospectroscopy approach [J]. *Chemosphere*, 2014, 112: 377-384
- [34] Gupta A D, Karthikeyan S. Individual and combined toxic effect of nickel and chromium on biochemical constituents in *E. coli* using FTIR spectroscopy and principle component analysis [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2016, 130: 289-294
- [35] Hu X J, Liu Z X, Wang Y D, et al. Synchrotron FTIR spectroscopy reveals molecular changes in *Escherichia coli* upon Cu^{2+} exposure [J]. *Nuclear Science and Techniques*, 2016, 27(3): 1-8
- [36] Dao L, Beardall J, Heraud P. Characterisation of Pb-induced changes and prediction of Pb exposure in microalgae using infrared spectroscopy [J]. *Aquatic Toxicology*, 2017, 188: 33-42
- [37] Barber J L, Walsh M J, Hewitt R, et al. Low-dose treatment with polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) induce altered characteristics in MCF-7 cells [J]. *Mutagenesis*, 2006, 21(5): 351-360
- [38] Llabjani V, Jones K C, Thomas G O, et al. Polybrominated diphenyl ether-associated alterations in cell biochemistry as determined by attenuated total reflection Fourier-transform infrared spectroscopy: A comparison with DNA-reactive and/or endocrine-disrupting agents [J]. *Environmental Science & Technology*, 2009, 43(9): 3356-3364
- [39] Llabjani V, Trevisan J, Jones K C, et al. Binary mixture effects by PBDE congeners (47, 153, 183, or 209) and PCB congeners (126 or 153) in MCF-7 cells: Biochemical alterations assessed by IR spectroscopy and multivariate analysis [J]. *Environmental Science & Technology*, 2010, 44(10): 3992-3998
- [40] Pang W, Li J, Ahmadzai A A, et al. Identification of benzo[a]pyrene-induced cell cycle-associated alterations in MCF-7 cells using infrared spectroscopy with computational analysis [J]. *Toxicology*, 2012, 298(1-3): 24-29
- [41] Gorrochategui E, Lacorte S, Tauler R, et al. Perfluoroalkylated substance effects in *Xenopus laevis* A6 kidney epithelial cells determined by ATR-FTIR spectroscopy and chemometric analysis [J]. *Chemical Research in Toxicology*, 2016, 29(5): 924-932
- [42] Cakmak G, Togan I, de Severcan F. 17β -estradiol induced compositional, structural and functional changes in rainbow trout liver, revealed by FT-IR spectroscopy: A comparative study with nonylphenol [J]. *Aquatic Toxicology*, 2006, 77(1): 53-63
- [43] Johnson C M, Pleshko N, Achary M, et al. Rapid and sensitive screening of 17β -estradiol estrogenicity using Fourier transform infrared imaging spectroscopy (FT-IRIS) [J]. *Environmental Science & Technology*, 2014, 48(8): 4581-4587
- [44] Dakhakhni T H, Raouf G A, Qusti S Y. Evaluation of the toxic effect of the herbicide 2,4-D on rat hepatocytes: An FT-IR spectroscopic study [J]. *European Biophysics Jour-*

- nal, 2016, 45(4): 311-320
- [45] Strong R J, Halsall C J, Jones K C, et al. Infrared spectroscopy detects changes in an amphibian cell line induced by fungicides: Comparison of single and mixture effects [J]. *Aquatic Toxicology*, 2016, 178: 8-18
- [46] Xin X Y, Huang G H, Liu X, et al. Molecular toxicity of triclosan and carbamazepine to green algae *Chlorococcum* sp.: A single cell view using synchrotron-based Fourier transform infrared spectromicroscopy [J]. *Environmental Pollution*, 2017, 226: 12-20
- [47] Palaniappan P L, Pramod K S. FTIR study of the effect of nTiO₂ on the biochemical constituents of gill tissues of zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2010, 48(8-9): 2337-2343
- [48] Riding M J, Martin F L, Trevisan J, et al. Concentration-dependent effects of carbon nanoparticles in Gram-negative bacteria determined by infrared spectroscopy with multivariate analysis [J]. *Environmental Pollution*, 2012, 163: 226-234
- [49] Li J, Strong R, Trevisan J, et al. Dose-related alterations of carbon nanoparticles in mammalian cells detected using biospectroscopy: Potential for real-world effects [J]. *Environmental Science & Technology*, 2013, 47(17): 10005-10011
- [50] Novak S, Drobne D, Vaccari L, et al. Effect of ingested tungsten oxide (WO_x) nanofibers on digestive gland tissue of *Porcellio scaber* (Isopoda, Crustacea): Fourier transform infrared (FTIR) imaging [J]. *Environmental Science & Technology*, 2013, 47(19): 11284-11292
- [51] Rhiem S, Riding M J, Baumgartner W, et al. Interactions of multiwalled carbon nanotubes with algal cells: Quantification of association, visualization of uptake, and measurement of alterations in the composition of cells [J]. *Environmental Pollution*, 2015, 196: 431-439
- [52] Li H, Gao Y, Li C, et al. A comparative study of the antibacterial mechanisms of silver ion and silver nanoparticles by Fourier transform infrared spectroscopy [J]. *Vibrational Spectroscopy*, 2016, 85: 112-121 ◆