

基于核磁共振氢谱的氟咯草酮 90d 染毒大鼠尿液特征代谢物研究

薛黎明¹, 金玉娥¹, 张素慧², 周志俊², 卢大胜¹, 汪国权¹

1. 上海市疾病预防控制中心化学品毒性检定所, 上海 200336

2. 复旦大学公共卫生学院, 上海 200032

摘要:

[背景] 氟咯草酮 (FLC) 是一种吡咯烷酮类芽前施用的选择性除草剂, 用于防制多种阔叶类和禾本科杂草, 常施用于向日葵、马铃薯、胡萝卜、小麦和玉米等作物以防其周边杂草生长。

[目的] 研究农药 FLC 90 d 染毒大鼠尿液的代谢物特征, 寻找染毒特征性代谢物, 探索 FLC 毒理机制。

[方法] 48 只 Wistar 大鼠, 按体重随机分为 31.25、125.0、500.0 mg·kg⁻¹ FLC 染毒组和溶媒对照组, 每组 12 只, 雌雄各半。灌胃染毒 90 d 后, 收集大鼠的尿液。采用 600 MHz 核磁共振氢谱 (¹HNMR) 法检测, 得到一维氢谱图, 以相对化学位移 δ 为 0.04 区间进行分段积分。采用模式识别技术主成分分析和偏最小二乘法判别分析 (PLS-DA) 法分析, 寻找 FLC 染毒特征性代谢物。

[结果] 四组雄性大鼠 PLS-DA 分析交叉验证模型合理 ($P < 0.05$), FLC 染毒雄性大鼠各剂量组与溶媒对照组散点分类明确; 而雌性大鼠模型不合理 ($P > 0.05$), 各组散点分类不明显。各组内部雌雄大鼠 PLS-DA 分析, 溶媒对照组雌雄大鼠差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 各染毒组模型均不合理 ($P > 0.05$)。单个染毒组与溶媒对照组 PLS-DA 模型合理 ($P < 0.001$), 预测值 > 0.6 , 受试者特征曲线下面积 > 0.75 , 分类明确。尿液核磁图谱共鉴定出 35 个代谢物, FLC 染毒的差异有统计学意义的代谢物有脯氨酸、肌酸/肌酐、肌醇、氧化三甲胺、牛磺酸、甘露醇、苯丙氨酸; 雄性高剂量染毒组与溶媒对照组的特征代谢物共 15 个, 其中乙酸和尿酸升高, 苯丙氨酸、乳酸、牛磺酸、3-羟基丁酸、脯氨酸、氧化三甲胺、二甲胺、肌酸、肌酐、肌醇、葡萄糖、甘露醇、柠檬酸盐降低。而雌性染毒仅柠檬酸盐、肌酸、肌酐和苯丙氨酸 4 个代谢物降低。

[结论] FLC 染毒对雄性大鼠更敏感, 代谢物差异变化更明显, 呈现一定量效关系; 同时随染毒剂量的增高, 组内雌雄大鼠代谢物的差异降低。高剂量染毒雄性大鼠的 15 个特征代谢物主要参与糖代谢和多种氨基酸代谢, 呈现一定的肝毒性和肾毒性。

关键词: 氟咯草酮; 核磁共振氢谱; 代谢组学; 特征性代谢物; 糖代谢

¹HNMR-based study on characteristic metabolites in urine of mice following 90 d of flurochloridone exposure XUE Li-ming¹, JIN Yu-e¹, ZHANG Su-hui², ZHOU Zhi-jun², LU Da-sheng¹, WANG Guo-quan¹ (1.Division of Chemical Toxicity and Safety Assessment, Shanghai Municipal Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 200336, China; 2.School of Public Health, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Abstract:

[Background] Flurochloridone (FLC), a kind of selective preemergence herbicides, is mainly used to control a variety of broad-leaved and gramineous weeds, commonly applied in sunflower, potato, carrot, wheat, and corn.

[Objective] This study aims to describe the urinary metabolites in rats after 90 d of FLC exposure, identify characteristic metabolites, and explore the toxicological mechanism of FLC.

[Methods] Forty-eight Wistar rats were randomly divided into four groups by weight: 31.25, 125.0, and 500.0 mg·kg⁻¹ FLC exposure groups and a solvent control group, with 12 rats in each group, half male and half female. Urine samples were collected after 90 d of intragastric administration. After 600 MHz ¹H nuclear magnetic resonance (¹HNMR) spectroscopy, one-dimensional hydrogen spectrum was obtained, and the spectral region was integrated into regions with chemical shifts δ over an interval of 0.04. Principal component analysis and partial

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2020.19590

基金项目

上海市卫计委面上项目 (201740068); 上海市自然科学基金项目 (18ZR1432200); 国家自然科学基金项目 (81872643)

作者简介

薛黎明 (1982—), 男, 博士, 主管技师; E-mail: xueliming@scdc.sh.cn

通信作者

汪国权, E-mail: wangguoquan@scdc.sh.cn
卢大胜, E-mail: ludasheng@scdc.sh.cn

伦理审批 已获取

利益冲突 无申报

收稿日期 2019-08-29

录用日期 2019-12-12

文章编号 2095-9982(2020)03-0197-08

中图分类号 R114

文献标志码 A

►引用

薛黎明, 金玉娥, 张素慧, 等. 基于核磁共振氢谱的氟咯草酮 90 d 染毒大鼠尿液特征代谢物研究 [J]. 环境与职业医学, 2020, 37 (3): 197-204.

►本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2020.19590

Funding

This study was funded.

Correspondence to

WANG Guo-quan, E-mail: wangguoquan@scdc.sh.cn

LU Da-sheng, E-mail: ludasheng@scdc.sh.cn

Ethics approval Obtained

Competing interests None declared

Received 2019-08-29

Accepted 2019-12-12

► To cite

XUE Li-ming, JIN Yu-e, ZHANG Su-hui, et al. ¹HNMR-based study on characteristic metabolites in urine of mice following 90 d of flurochloridone exposure [J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2020, 37(3): 197-204.

► Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2020.19590

least squares discriminant analysis (PLS-DA) were applied to determine the characteristic metabolites of FLC.

[Results] The PLS-DA cross validation analysis results showed that the male rat model was reasonable ($P < 0.05$), with obvious classification of scattered points among the three dose groups and the solvent control group, while the female rat model was unreasonable ($P > 0.05$), with obscure classification results. The PLS-DA intragroup analysis results showed that there was a significant difference between male and female rats in the solvent control group ($P < 0.05$), but not in the three exposure groups ($P > 0.05$). The PLS-DA model between single FLC exposure group and the solvent control group was reasonable ($P < 0.001$), with accuracy > 0.6 and area under curve of Receiver Operating Characteristic > 0.75 , providing a clear classification between groups. Thirty-five metabolites were identified by urinary nuclear magnetic resonance, and the significantly changed metabolites after FLC exposure were proline, creatine/creatinine, inositol, trimethylamine oxide, taurine, mannitol, and phenylalanine; 15 characteristic metabolites were obtained between the male rats in the high-dose FLC group and the solvent control group, including increased acetate and uric, and decreased phenylalanine, lactic acid, taurine, 3-hydroxybutyric acid, proline, trimethylamine oxide, dimethylamine, methylamine, creatine, creatinine, inositol, glucose, mannitol, and citrate. However, only citrate, creatine, creatinine, and phenylalanine were significantly decreased in the female rats after FLC exposure.

[Conclusion] Male rats are more sensitive to FLC as the changes of metabolites are more obvious, showing a dose-response relationship. With the increase of FLC exposure dose, the differences of metabolites are reduced between male and female rats in the same group. The 15 characteristic metabolites in male rats exposed to high dose of FLC are mainly involved in carbohydrate metabolism and amino acid metabolism, indicating hepatotoxicity and nephrotoxicity.

Keywords: flurochloridone; ^1H nuclear magnetic resonance; metabolomics; characteristic metabolite; glucose metabolism

氟咯草酮 (flurochloridone, FLC), 商品名为 Racer, Rainbow, 化学名为 3-氯-4-氯甲基-1-(α, α, α -三氟间甲基)-2-吡咯烷酮, 属于吡咯烷酮类芽前除草剂, 具有高效、高选择性特点, 在国内外广泛施用于冬小麦、向日葵、胡萝卜等作物, 防制大多数阔叶类杂草^[1]。FLC 经杂草根茎吸收后, 可导致类胡萝卜素合成受阻, 叶绿素分解和叶片褪色及坏死^[2]。我国 FLC 出口量与使用量呈现逐年快速递增趋势, 2014 年在我国被列为农药优势开发项目^[3-5]。然而 FLC 的毒性资料非常有限, 对生态环境和人群健康安全性研究迫在眉睫, 其毒性评价受到学术界和政府组织的广泛关注。尽管 2014 年企业向欧盟食品安全局 (European Food Safety Authority, EFSA) 报告了 FLC 无基因遗传毒性, 致癌性和神经毒性^[6]。但有研究发现 FLC 引起洋葱根分生组织细胞的染色体异常、细胞周期异常与细胞分裂阻滞^[7]。对仓鼠卵巢细胞 CHO 和两栖动物蝌蚪造成细胞毒性与遗传毒性, 对体外哺乳动物细胞造成单链 DNA 损伤^[8], 同时促进肝癌 HepG2 细胞凋亡^[9-11]。前期研究发现 FLC 对 Wistar 大鼠连续 90 d 口服灌胃染毒, 睾丸、附睾、肝和造血系统均产生明显毒性, 且毒性效应会随着染毒剂量和时间的延长而加重^[5, 12-13]。本课题组前期基于 LC-QExactive 高分辨质谱技术, 结合生物样品代谢物计算机模拟预测和数据库技术, 在大鼠心、肝、脾、肺、肾、脑、骨骼肌 (简称肌肉)、储备脂 (简称脂肪)、子宫或睾丸、附睾等 11 个组织样品中共鉴定出 FLC 的 335 个外源性代谢物^[14]。目前 FLC 毒性研究仅局限于细胞和动物的常规毒性效应, 尚未在内源性代谢物层面进行系统分析。基于核磁共振

氢谱 (^1H nuclear magnetic resonance, $^1\text{H NMR}$) 的代谢组学分析技术重现性好, 高通量, 样品处理方法简单, 可以获得几乎全部内源性代谢物含氢化合物的信息, 在临床诊断、毒理学、药物分析和生物标志物发现等研究方面广泛应用。本研究通过 $^1\text{H NMR}$ 代谢组学技术对 FLC 染毒后大鼠尿液的內源性代谢物轮廓比较分析, 筛选 FLC 染毒特征代谢物, 探讨 FLC 长期染毒的毒性作用机制, 为 FLC 健康风险评估提供参考。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

核磁共振仪 Bruke 600 MHz (Varian 600 MHz, Spectrospin AG, 瑞士); 涡旋仪 (德国 ika 集团); 高压灭菌锅 (SN200C); 冷冻高速离心机 (Sorvall™ LYNX™); 代谢笼和 CLAMS 小动物新陈代谢系统 (Columus 公司, 美国); 超低温冰箱 (海尔 DW-86L288)。

FLC 原药 (纯度 $> 95.5\%$, 江西安利达化工有限公司); 羧甲基纤维素钠 (carboxymethyl Cellulose Sodium, CMC-Na, 中国医药集团上海化学试剂公司), 氘代水 (D_2O), 磷酸盐缓冲溶液 ($\text{pH}=7.4$, $0.2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NaH}_2\text{PO}_4 + 0.2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ Na}_2\text{HPO}_4$), 3-三甲基硅丙烷磺酸钠 (sodium trimethylsilylpropionate, TSP), 均为分析纯。鼠用钴 60 辐照灭菌饲料 (上海斯莱克实验动物有限责任公司), 玉米芯垫料 (上海茂生衍生物科技有限公司)。饮用水: 自来水。

1.2 动物分组与染毒

清洁级健康成年 Wistar 大鼠, 48 只, 6~7 周, 由上海斯莱克实验动物有限公司 [SCXK (沪) 2012-0002]

提供。Wistar大鼠置于清洁级动物房饲养，动物饲养许可证号：SYXK(沪)2011-0125。光照周期：12h明(6:00—18:00)，12h暗(18:00—次日晨6:00)。动物按性别分笼饲养，每笼的动物数3只。所有动物在温度为(22±2)℃，湿度为40%~70%，通风良好的环境下饲养，常规喂饲，自由采食，饮水量不限。每周2次更换垫料，保持笼具的清洁、干燥。动物实验前适应性饲养1周后，按体重随机分为4组，每组12只，雌雄各半。包括溶媒对照组(S, 0.5%CMC-Na组, S1-6为雌性, S7-12为雄性)、FLC低(L, FLC 31.25 mg·kg⁻¹, L13-18为雌性, L19-24为雄性)、中(M, FLC 125.0 mg·kg⁻¹, M25-30为雌性, M31-36为雄性)、高(H, FLC 500.0 mg·kg⁻¹, H37-42为雌性, H43-48为雄性)染毒组。FLC染毒剂量基于FLC大鼠LD₅₀剂量基准(3650 mg·kg⁻¹, 按体重计, 后同)的1/10~1/8为高剂量染毒组的原则设定。采用灌胃染毒方式, 染毒90d后, 采尿液前一天, 禁食, 仅提供饮用水。下午将大鼠单只置入代谢笼中, 收集20:00至次日8:00的尿液。4℃下1534×g离心10min, 取上清液0.5mL, 置于-80℃冰箱备用。

1.3 尿样前处理

尿液常温解冻后, 在4℃以9591×g离心10min, 取上清液500μL, 转移到5mm Norell核磁管中, 加入100μL磷酸盐缓冲液(含0.2 mol·L⁻¹ Na₂HPO₄+0.2 mol·L⁻¹ NaH₂PO₄, pH=7.4), 100% D₂O(含内标TSP)作为化学位移位置和定量内标(δ=0.00), 混合均匀, 待测。

1.4 ¹HNMR数据采集和分析

600MHz核磁共振仪使用一维的NOESYPPR1D脉冲序列采集¹HNMR谱。实验参数如下: 实验温度为298K, 谱宽(SW)为20, 等待时间(RD)为2s, 混合时间(tm)为100ms, 采样点数(TD)为32点, 累加次数(NS)为64次, 空扫(DS)为8次。其他采样参数: 90度脉宽值及其所对应的功率值, 压水功率值, 压水频率根据实际样品进行测定。应用MestRenova 10.0软件, 将核磁共振谱仪采集到的最原始的数据(自由感应衰减信号)导入, 进行傅立叶转换, 水峰压制, 基线和相位调整后, 得到标准核磁图谱。选取δ为0~10范围谱图, 以δ为0.04区间进行分段积分, 得到250个化学位移段和化学位移值相对应的积分值, 数据保存在Excel(2010版)文档。

1.5 统计学分析

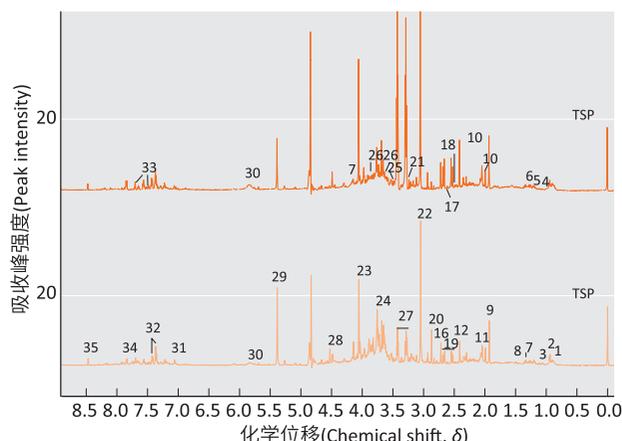
实验结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用SPSS软件经方差分析检验差异有统计学意义(α=0.05), 再用SNK对每两

组进行两两比较; 核磁数据经归一化和标准化后, 采用SIMCA P14.0软件, 进行多元统计主成分分析(PCA)和最小二乘法判别分析(PLS-DA)。PCA和PLS-DA模型参数R²X表示拟合X变量代表原始X变量的程度, Q²表示拟合模型的预测能力。采用残差分析、CV-ANOVA交叉验证和受试者工作特征(ROC)曲线验证PLS-DA模型合理性。

2 结果

2.1 ¹HNMR尿液代谢轮廓分析和谱峰归属

根据所采集核磁图谱对应代谢物的化学位移、裂峰情况等信息, 通过参考文献和数据库BMRB(<http://www.bmrblib.org/>)和HMDB(<http://www.hmdb.ca/>)中标准¹HNMR图谱比对匹配, 从大鼠尿液核磁图谱中共鉴定了35种尿液代谢物, 以溶媒对照组和高剂量染毒组大鼠尿液¹HNMR为例(见图1)。



[注] 1. 异亮氨酸; 2. 亮氨酸; 3. 缬氨酸; 4. 异丁酸盐; 5. 3-羟基丁酸; 6. 苏氨酸; 7. 乳酸; 8. 丙氨酸; 9. 醋酸盐; 10. 蛋氨酸; 11. 脯氨酸; 12. 琥珀酸盐; 13. 丙酮酸盐; 14. 乙酰乙酸; 15. 谷氨酸; 16. 二甲胺; 17. 甲胺; 18. 2-酮戊二酸; 19. 柠檬酸盐; 20. 三甲胺; 21. 氧化三甲胺; 22. 肌酸; 23. 肌酐; 24. 甘露醇; 25. 甘氨酸; 26. 葡萄糖; 27. 牛磺酸; 28. β-葡萄糖; 29. 尿素; 30. 尿酸; 31. 组氨酸; 32. 苯丙氨酸; 33. 色氨酸; 34. 胞苷; 35. 甲酸盐。TSP: 为3-三甲基硅丙烷磺酸钠, 内标校正(δ=0.0)。

[Note] 1.Isoleucine; 2.Leucine; 3.Valine; 4.Isobutyrate; 5.3-Hydroxy butyrate; 6.Threonine; 7.Lactate; 8.Alanine; 9.Acetate; 10.Methionine; 11.Proline; 12.Succinate; 13.Pyruvate; 14.Acetoacetate; 15.Glutamine; 16.Dimethylamine (DMA); 17.Methylamine; 18.2-Oxoglutarate; 19.Citrate; 20.Trimethylamine; 21.Trimethylamine N-oxide (TMAO); 22.Creatine; 23.Creatinine; 24.Mannitol; 25.Glycine; 26.Glucose; 27.Taurine; 28.β-Glucose; 29.Urea; 30.Lotion Uric acid; 31.Histidine; 32.Phenylalanine; 33.Tryptophan; 34.Cytidine; 35.Formate. TSP: Sodium trimethylsilylpropionate, calibration of internal standard (δ=0.0).

图1 溶媒对照组(上)和高剂量FLC染毒组(下)尿液¹HNMR轮廓

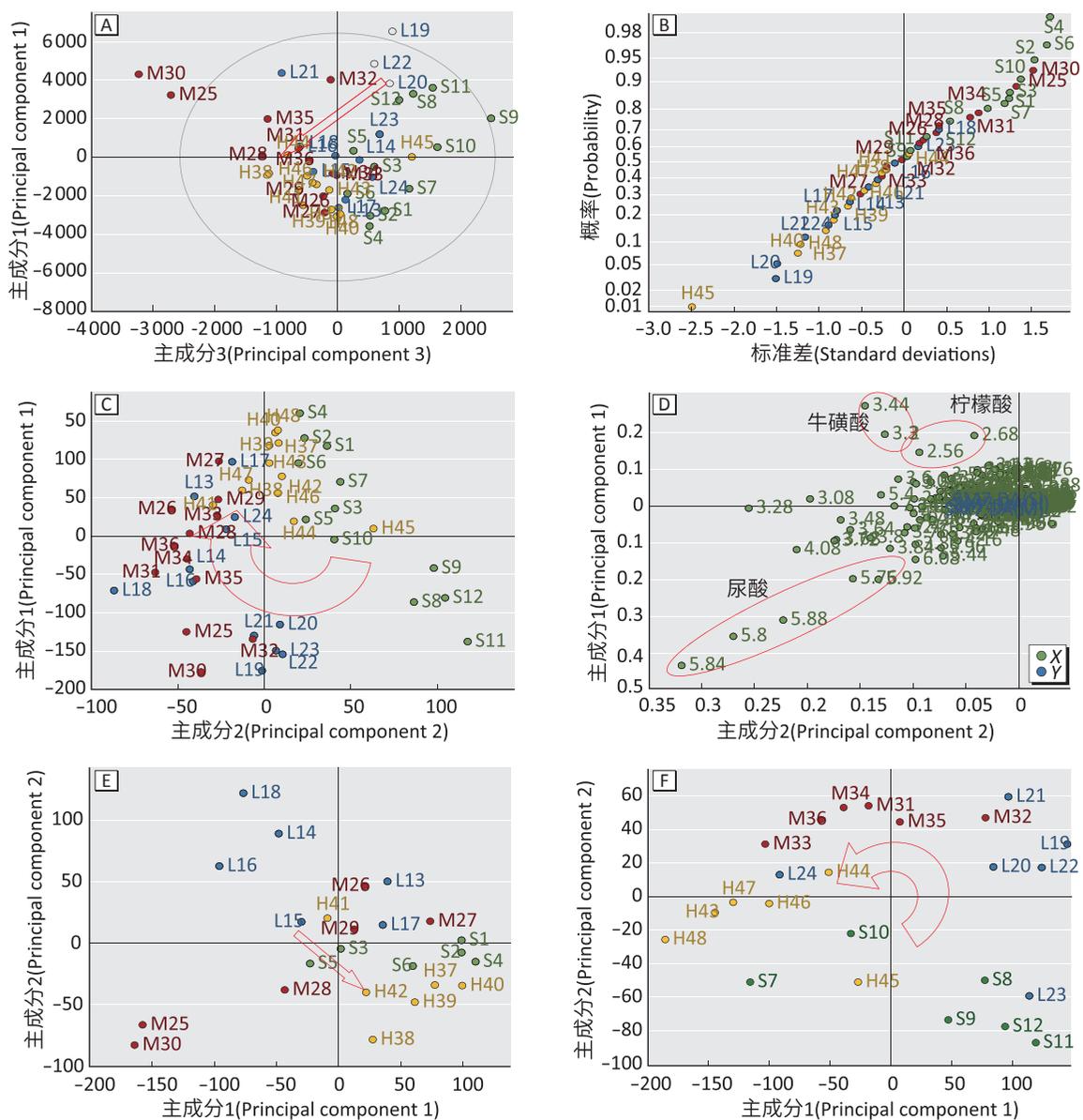
Figure 1 Urine ¹HNMR profiling of solvent control group (upper) and high-dose FLC group (lower)

2.2 溶媒对照组与各染毒组总体PCA分析

PCA模型自动拟合4个主成分, R^2X 为0.897, Q^2 为0.757。表示拟合四个主成分可以代表250维自变量数据的89.7%信息, 该模型预测能力达到75.7%, 模型合理。有低剂量组一个样品(L19)、中剂量组二个样品(M25、M30)落在95%区间外。溶媒对照组和染毒组整体分布未明显分离, 多数样品集中在第三、第四象限(图2A)。高剂量染毒组比较集中, 位于左下角第三象限, 组内差异小, 低剂量、中剂量和溶媒对照组相对比较分散, 说明样品组内差异较大。

2.3 溶媒对照组与各染毒组总体PLS-DA分析

溶媒对照组与高、中、低剂量染毒组的PLS-DA模型方差检验 $P < 0.05$, 表明模型合理, 其中 R^2X 为0.824, Q^2 为0.368, 表示代表自变量数据的82.4%信息, 模型预测能力36.8%。ROC曲线是二元分类图, 显示各组预测能力。ROC曲线下面积(AUC)越接近0.5, 说明分类越差; 越接近1, 说明模型分类越好。各组ROC曲线AUC, 溶媒对照组为0.98, 低剂量染毒组为0.93, 中剂量染毒组为0.94和高剂量染毒组为0.96, 说明本模型对各组分类明确。见表1。



[注] A: PCA散点图; B: 残差分析图; C: PLS-DA散点图; D: PLS-DA载荷图; E: 雌性PLS-DA散点图; F: 雄性PLS-DA散点图。S: 溶媒对照组; L: 低剂量组; M: 中剂量组; H: 高剂量组。X: 模型中X变量为化学位移; Y: 模型中Y变量为分类组别。

[Note] A: Score plot of PCA; B: Residual plot; C: Score plot of PLS-DA; D: Loading plot of PLS-DA; E: Score plot of female rats; F: Score plot of male rats. S: Solvent control; L: Low dose; M: Medium dose; H: High dose. X: Chemical shift; Y: Classification.

图2 高、中、低剂量FLC染毒组和溶媒对照组的PCA和PLS-DA分析

Figure 2 PCA and PLS-DA analysis among high, middle, and low dose FLC groups and solvent control group

表1 四组样品PCA和PLS-DA多元统计分析模型参数

Table 1 Multivariate analysis model parameters of PCA and PLS-DA on designed four groups

模型 Model	拟合主成分数 Component No.	X的拟合程度 R^2X	预测能力 Q^2	P	受试者工作特征曲线下面积 AUC			
					溶媒对照 Solvent control	低剂量 Low dose	中剂量 Medium dose	高剂量 High dose
主成分分析 (PCA)								
所有四组样品 (All four groups)	4	0.897	0.757					
偏最小二乘法-判别分析 (PLS-DA)								
所有四组样品 (All four groups)	4	0.824	0.368	0.001	0.98	0.93	0.94	0.96
四组雌性 (Female rats)	3	0.809	0.278	0.063	0.94	0.80	0.87	0.95
四组雄性 (Male rats)	2	0.571	0.271	0.010	0.97	0.78	0.94	0.81
溶媒对照与低剂量 (Solvent control vs low dose)	2	0.626	0.801	<0.001	0.97	0.79		
溶媒对照与中剂量 (Solvent control vs medium dose)	2	0.811	0.704	<0.001	0.98		0.93	
溶媒对照与高剂量 (Solvent control vs high dose)	2	0.867	0.627	<0.001	0.96			0.77

图2B为残差方差分析,合理的模型残差是随机的和呈正态分布的,残差的正态概率图具有所有点的横坐标位于-4和4标准化标准差之间的直线上。在-4或4标准偏差之外的实验运行是异常值。本实验未发现异常样本, H45相较于样品点残差处于-2.5, 呈现最大的偏差。PLS-DA分析样品整体离散状态显示(图2C),高剂量组散点基本与其他组分开,中剂量和低剂量组样品混合在一起,未达到分离。高剂量染毒组比较集中,组内差异小。低剂量、中剂量和溶媒对照组,相对比较分散,说明样品组内差异较大。依据箭头标识,各组样品总体呈现依次为溶媒对照组、低剂量、中剂量和高剂量的分布。载荷图(图2D)显示自变量对分布的贡献程度,距离中心点越远,贡献越大。发现 δ 为5.80~5.92的尿酸峰贡献最大, $\delta=3.44$ 的牛磺酸, $\delta=2.56$ 和 $\delta=2.68$ 的柠檬酸盐等代谢物均具有较大贡献。

2.4 溶媒对照组与染毒组不同性别分布特点

2.4.1 雌性 PLS-DA模型自动拟合3个主成分, R^2X 为0.809, Q^2 为0.278。CV-ANOVA分析P值为0.063,差异不具有统计学意义。四组ROC曲线值见表1,溶媒对照组0.94,低剂量染毒组0.80,中剂量染毒组0.87和高剂量染毒组0.95。说明本模型对溶媒对照组和高剂量组分类明确。图2E散点图发现溶媒对照组与高剂量染毒组比较接近,以箭头方向,各组分别为低剂量、中剂量、溶媒对照、和高剂量组。

2.4.2 雄性 PLS-DA模型自动拟合2个主成分, R^2X 为0.571, Q^2 为0.271。CV-ANOVA分析P值为0.010,差异具有统计学意义。四组ROC曲线值见表1,溶媒对照组0.97,低剂量染毒组0.78,中剂量染毒组0.94和高剂量染毒组0.81,说明本模型对溶媒对照组和中剂量组分类明确。图2F散点图发现溶媒对照组与染毒组

明显分离,以箭头方向,各组分别为溶媒对照、低剂量、中剂量、和高剂量组。

2.5 溶媒对照组与不同染毒组PLS-DA分析

溶媒对照组与各染毒组全部样品的PLS-DA模型自动拟合2个主成分, R^2X 和 Q^2 均>0.6。CV-ANOVA分析均 $P<0.001$,表明模型构建合理。ROC曲线AUC值显示溶媒对照组与各染毒组均大于0.75,显示分类明显。见表1。

溶媒对照组与各染毒组的组内雌雄大鼠的PLS-DA模型自动拟合2个主成分, R^2X 均>0.5,溶媒对照组和中剂量染毒组的 Q^2 均大于0.6,预测能力较强,而高、低剂量染毒组分别为0.331和0.428,预测能力一般。溶媒对照组的CV-ANOVA分析均 $P<0.05$,差异有统计学意义,PLS-DA模型合理。同时高剂量染毒组的AUC面积低于0.75,表明分类不明确(表2)。

表2 各组不同性别PLS-DA模型参数

Table 2 PLS-DA model parameters between male and female rats in four groups

组别 Group	拟合主成分数 Component No.	X的拟合程度 R^2X	预测能力 Q^2	P	受试者工作特征曲线下面积 AUC	
					雌性 Female	雄性 Male
溶媒对照 Solvent control	2	0.862	0.739	0.033	0.90	0.85
低剂量组 Low dose	2	0.532	0.428	0.515	0.93	0.85
中剂量组 Medium dose	2	0.581	0.628	0.178	0.96	0.80
高剂量组 High dose	2	0.597	0.331	0.833	0.70	0.74

图3A散点图显示高剂量染毒组与溶媒对照组,基本分离;图3B、C散点图显示中剂量、低剂量染毒组与溶媒对照组能明显分离。

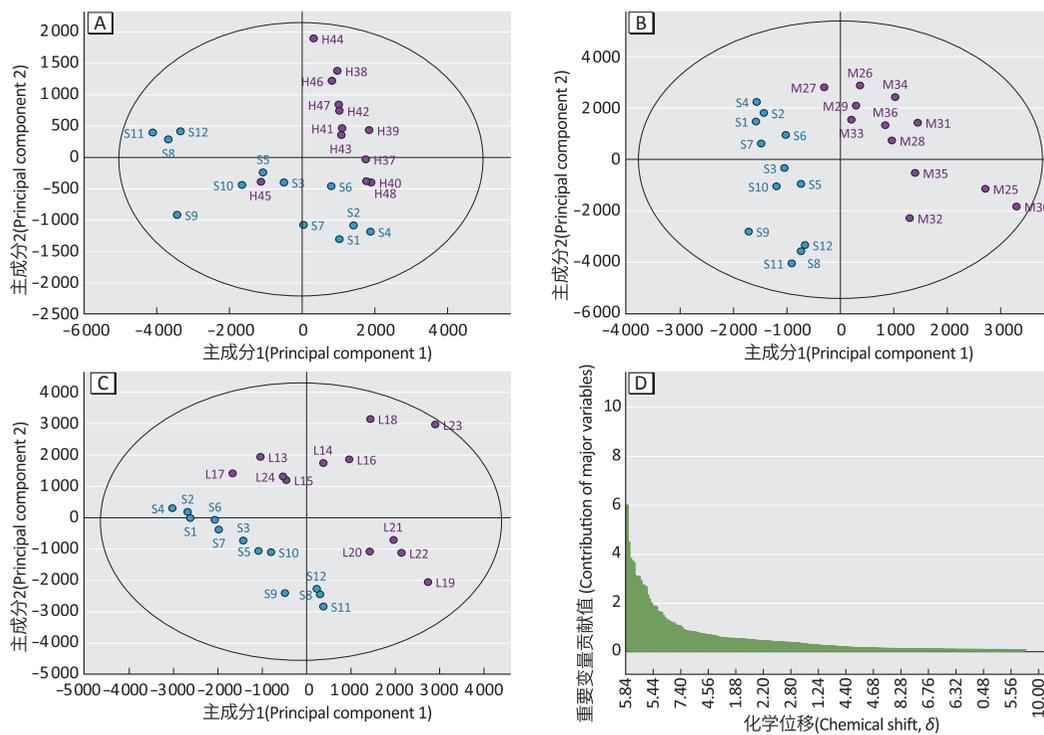
图3D为高剂量染毒模型的重要变量贡献图,由对

PLS-DA模型贡献值 (variable importance for the projection, VIP) 显示, 通常 $VIP > 1.5$, 认为是有意义的贡献变量。

对原始采集数据比较分析, 发现高剂量染毒组有 11 个代谢物与溶媒对照组差异具有统计学意义, 除尿酸外, 乳酸、脯氨酸、柠檬酸盐、二甲胺、氧化三甲胺、牛磺酸、葡萄糖、肌酸、肌酐和苯丙氨酸均明显降低; 而中剂量染毒组柠檬酸盐明显降低, 甘露醇和尿酸升高; 低剂量染毒组尿酸和氧化三甲胺升高。所有特征代谢物均随着染毒剂量的增加, 含量呈递减趋势 (见表 3)。

特征代谢物在溶媒对照组雌雄差异最大, 肌酐、

肌醇、牛磺酸、脯氨酸、苯丙氨酸和甘露醇均显示差异有统计学意义, 低剂量染毒组雌雄差异代谢物有牛磺酸、氧化三甲胺、尿酸和甘露醇, 中剂量染毒组中牛磺酸差异具有统计学意义, 高剂量组雌雄代谢物差异无统计学意义 (表 3)。溶媒对照组与高剂量染毒组的代谢物对比分析, 除甘露醇外, 特征代谢物在雄性大鼠中差异均具有统计学意义; 而雌性大鼠中, 仅柠檬酸盐、苯丙氨酸和肌酸/肌酐差异具有统计学意义。雌性大鼠与雄性大鼠代谢物的比例, 正常情况同批次应该是相对恒定的, 在高剂量染毒后, 乳酸和苯丙氨酸的比例降低, 其他代谢物均增高, 其中尿酸增高近 10 倍。



[注] A、B、C 分别为高、中、低剂量组与溶媒对照组比较的散点图; D 为高剂量染毒模型的重要变量贡献图。S: 溶媒对照组; L: 低剂量组; M: 中剂量组; H: 高剂量组。

[Note] The score plots of A high dose FLC group, B medium dose group, and C low dose group versus the solvent control group, respectively; D. Contribution plot of major variables in the high dose FLC group. S: Solvent control; L: Low dose; M: Medium dose; H: High dose.

图 3 不同剂量染毒组与溶媒对照组比较的 PLS-DA
Figure 3 PLS-DA analysis between control and different FLC exposure groups

表 3 代谢物鉴定及各组中的含量

Table 3 Identification and levels of characteristic metabolites in designed four groups

代谢物 Metabolites	相对化学位移 δ	峰形 Peak shape	溶媒对照 Solvent control	高剂量 High dose	中剂量 Medium dose	低剂量 Low dose	溶媒与高剂量 t 检验 t test between solvent control and high dose groups		雌/雄性比例 Female/male ratio	
							雄性 Male	雌性 Female	溶媒对照 Solvent control	高剂量 High dose
乳酸 (Lactate)	1.36	d	242±190	87.6±102.3*↓	—	—	*		1.18	0.81
乙酸 (Acetate)	1.96	s	329±172	347±382	402±452	—	*		0.60	1.67
脯氨酸 (Proline)	2.08	s	512±326#	379±141*↓	—	—	*		0.43	1.14
3-羟基丁酸 (3-Pydoxybutyrate)	2.32	s	243±216	178±118	—	—	*		0.18	0.80
柠檬酸盐 (Citrate)	2.56	dd	541±349	107±88.9**↓	267±200**↓	518±337	*	*	0.58	1.98
	2.68	dd	428±245	83.9±73.2***↓	89.0±53.2*↓	346±302	**	*	0.51	1.44

续表 3

代谢物 Metabolites	相对化 学位移 δ	峰形 Peak shape	溶媒对照 Solvent control	高剂量 High dose	中剂量 Medium dose	低剂量 Low dose	溶媒与高剂量 t 检验 t test between solvent control and high dose groups		雌 / 雄性比例 Female/male ratio	
							雄性 Male	雌性 Female	溶媒对照 Solvent control	高剂量 High dose
							二甲胺 (Dimethylamine)	2.72	s	368±242
肌酸 / 肌酐 (Creatine/creatinine)	3.04 -3.08	s	380±303#	58.5±127**↓	—	—	**	*	0.45	0.41
氧化三甲胺 Trimethylamine oxide (TMAO)	3.28	s	1002±530###	365±193**↓	935±444#↓	1603±643**#↑	***	—	0.37	0.65
牛磺酸 (Taurine)	3.32	t	1421±1062#	508±309*↓	1001±856	1461±1753#	*	—	0.34	0.68
	3.44	t	1838±1236###	459±243**↓	974±676###↓	1720±1153#	**	—	0.28	0.68
α -葡萄糖 (α -Glucose)	3.48	m	384±318	153±97.0*↓	—	—	*	—	0.54	0.75
葡萄糖 (Glucose)	3.6 -3.64	m	502±244	156±130**↓	—	—	**	—	0.59	0.70
甘露醇 (Mannitol)	3.8 -3.88	m	2055±1261#	2234±875	3497±1966*↑	3139±1650#↑	—	—	0.45	0.83
肌酸 (Creatine)	3.92	s	515±310#	679±260	—	—	*	*	0.44	0.90
肌醇 (Inositol)	4.08	t	1075±574###	777±303	1628±794	1569±888	*	—	0.46	0.77
尿酸 (Uric acid)	5.8	s	262±31.3	520±170**↑	515±854***↑	872±578***↑	*	—	0.35	3.80
苯丙氨酸 (Phenylalanine)	7.36	m	254±158###	40.3±75.4***↓	—	—	***	*	0.34	0.14

[注] 各组与溶媒对照组比较, * : $P < 0.05$; ** : $P < 0.01$; *** : $P < 0.001$ 。组内雄性和雌性比较, # : $P < 0.05$; ## : $P < 0.01$; ### : $P < 0.001$ 。— : 表示非特征性代谢物; ↑ 增高; ↓ 降低。

[Note] Compared with the solvent control group, * : $P < 0.05$; ** : $P < 0.01$; *** : $P < 0.001$. Compared between male rats and female rats in the same group, # : $P < 0.05$; ## : $P < 0.01$; ### : $P < 0.001$. — : Non-characteristic metabolites; ↑ : Increased; ↓ : Decreased.

3 讨论

研究发现雄性大鼠对 FLC 染毒更为敏感。相较于雌性大鼠, 雄性大鼠各组 PLS-DA 模型更合理, 更符合染毒剂量 - 毒性效应关系, 各组 ROC 曲线分类明确, 具有更强的代表性和预测能力, 原因可能与性别生理有关, 如生长激素及代谢酶等差异, 从而导致代谢物不同。FLC 染毒后均导致雌、雄大鼠产生应激, 随着染毒剂量的增大, 雌雄大鼠的尿液代谢物分离差异越来越不明显, 高剂量染毒后雌雄大鼠代谢物趋向于相同, 表明 FLC 染毒导致的代谢物差异强于大鼠性别差异。高剂量染毒后, 苯丙氨酸和乳酸在雌性与雄性中的比例降低, 其他 13 个代谢物的比例均提高, 表明染毒导致了这些代谢物在雄性动物体内生成量低于雌性, 因此, 雄性大鼠 FLC 染毒后, 特征代谢物变化更大, 对染毒更敏感。低、中剂量染毒组与溶媒对照组的 PLS-DA 代谢物差异, 可能主要体现在溶媒对照组和染毒组的雌性差异上, 而高剂量染毒组代谢物差异更倾向于 FLC 染毒带来的差异。

葡萄糖和甘露醇均为糖代谢原料, 柠檬酸盐是细胞线粒体有氧呼吸三羧酸循环 (TCA cycle) 的中间产物, 乙酸盐、乳酸、丙酮酸盐与三羧酸循环与细胞能量代谢和糖酵解途径相关。乙酸中的乙酰基, 是生物化学中所有生命的基础, 乙酰辅酶 A 是丙氨酸氧化脱羧, 脂肪酸 β 氧化反应的关键中间产物, 柠檬酸也是

由乙酰基与草酰乙酸反应合成, 参与线粒体有氧呼吸。乳酸是体内糖酵解反应的中间产物, 当机体缺氧时或有氧呼吸无法满足机体正常能量需求时, 就会促进肌肉或组织细胞的糖原转化和糖酵解反应。丙酮酸在乳酸脱氢酶的作用下生成大量乳酸。而在糖异生过程中, 乳酸也可由乳酸脱氢酶催化生成丙酮酸, 因此, 丙酮酸被认为是三大营养物质代谢联系的中心枢纽^[15]。本研究中葡萄糖、甘露醇、乳酸、丙酮酸均明显降低, 表示机体代谢降低, 三羧酸循环和糖酵解能力下降, 机体供能下降, 整个能量代谢异常, 说明氟洛草酮的毒性与肝脏能量代谢功能异常相关。而所有相关代谢产物均下降, 说明 FLC 导致大鼠整个机体能量代谢异常降低, 无法为机体提供足够的能量有关。

尿酸是嘌呤代谢的终产物, 尿酸增高主要是由于肾近曲小管功能障碍, 抑制尿酸的重吸收, 使尿酸排泄增加。肌酐、肌酸不仅参与嘌呤代谢, 同时又是肌肉毒性的指标。肌酐是肌肉在人体内代谢的产物, 主要由磷酸肌酸分解产生, 正常情况下含量基本恒定, 大部分从肾小球滤过, 不被肾小管吸收, 是临床肾功能的重要指标。磷酸肌酸是人体内高能化合物, 是细胞的能量载体和储备, 常蓄积于心肌、骨骼肌、脑等组织, 当机体需要大量能量时, 通过线粒体氧化磷酸化成 ATP 参与能量代谢^[16]。FLC 导致体内肌酸、肌酐明显降低, 说明机体肌肉萎缩、磷酸肌酸分解不足,

肌酐的生成量也减少。尿肌酐下降,说明肌酐清除能力的下降,可能由于肾功能障碍导致。牛磺酸是合成胆汁的主要成分,在肝脏中,牛磺酸与胆汁结合形成牛磺胆汁酸,发挥调节脂类代谢的作用,其水平的显著改变通常提示肝脏功能的改变。肌酸酐在雄性染毒组尿液中大幅度下降,但在雌性染毒组中未见明显变化。尿液中氧化三甲胺(TMAO),是一种渗透质,铵盐中毒的标志物,储存于肾髓质,浓度降低被认为是肾乳头受损害^[17],氧化三甲胺在氧化三甲胺脱甲基酶的作用下转化为二甲胺和甲醛。FLC染毒导致氧化三甲胺和二甲胺均明显降低,可能引起肾损伤。

前期研究FLC染毒90d雄性大鼠发现肝脏系数显著提高,大鼠肾脏系数增加,FLC可能引起一定的肝肾毒性^[5]。本研究发现雄性高剂量染毒组与溶媒对照组的特征代谢物有15个,包括苯丙氨酸、乳酸、牛磺酸、醋酸盐、3-羟基丁酸、脯氨酸、氧化三甲胺、二甲胺、肌酸、肌酐、肌醇、葡萄糖、甘露醇、柠檬酸盐和尿酸,主要涉及糖代谢、嘌呤代谢和多个氨基酸代谢。

参考文献

- [1] 杨剑波, 庞怀林, 黄超群. 氟咯草酮的合成研究 [J]. 精细化工中间体, 2005, 35 (4) : 24-27.
- [2] LIU MY, SHI D Q. Design, synthesis, and herbicidal activities of 3-Aryl-4-substituted-5- [3- (trifluoromethyl) phenoxy] -1, 2, 4-triazoles [J]. J Heterocycl Chem, 2014, 51 (S1) : E335-E339.
- [3] 徐蕾蕊, 赵乾魁, 娄丹, 等. 氟咯草酮染毒对成年大鼠睾丸的影响 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2014, 32 (7) : 516-520.
- [4] 王恒智, 郭文磊, 王兆振, 等. 氟咯草酮及其混剂对棉田杂草防除效果及安全性 [J]. 中国农学通报, 2016, 32 (32) : 66-70.
- [5] ZHANG S, CHENG X, WANG Y, et al. Ninety day toxicity and toxicokinetics of flurochloridone after oral administration in rats [J]. Int J Environ Res Public Health, 2015, 12 (5) : 4942-4966.
- [6] European Food Safety Authority. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance flurochloridone (notified active substance) [J]. EFSA J, 2010, 8 (12) : 1869.
- [7] SOLONESKI S, NIKOLOFF N, LARRAMENDY M L. Analysis of possible genotoxicity of the herbicide flurochloridone and its commercial formulations : Endo III and Fpg alkaline comet assays in Chinese Hamster Ovary (CHO-K1) cells [J]. Mutat Res/Genet Toxicol Environ Mutagen, 2016, 797 : 46-52.
- [8] NIKOLOFF N, NATALE G S, MARINOD D, et al. Flurochloridone-based herbicides induced genotoxicity effects on *Rhinella arenarum* tadpoles (Anura : Bufonidae) [J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2014, 100 : 275-281.
- [9] NIKOLOFF N, LARRAMENDY M L, SOLONESKI S. Comparative evaluation *in vitro* of the herbicide flurochloridone by cytokinesis-block micronucleus cytome and comet assays [J]. Environ Toxicol, 2014, 29 (8) : 884-892.
- [10] NIKOLOFF N, LARRAMENDY M L, SOLONESKI S. Assessment of DNA damage, cytotoxicity, and apoptosis in human hepatoma (HepG2) cells after flurochloridone herbicide exposure [J]. Food Chem Toxicol, 2014, 65 : 233-241.
- [11] YUZBAŞIOĞLU D, ÜNAL F, SANCAK C, et al. Cytological effects of the herbicide racer "flurochloridone" on *Allium cepa* [J]. Caryologia, 2003, 56 (1) : 97-105.
- [12] LI R, ZHOU S, ZHU H, et al. Low dose of flurochloridone affected reproductive system of male rats but not fertility and early embryonic development [J]. Reprod Biol Endocrinol, 2019, 17 (1) : 64-70.
- [13] 吴松林, 徐蕾蕊, 周志俊. 氟咯草酮对大鼠原代培养支持-生精细胞氧化应激的影响 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2016, 34 (11) : 801-804.
- [14] LU D, ZHANG S, WANG D, et al. Identification of flurochloridone metabolites in rat urine using liquid chromatography/high resolution mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2016, 1445 : 80-92.
- [15] SHENG H, GHERGUROVICH J M, MORSCHER R J, et al. Glucose feeds the TCA cycle via circulating lactate. Nature, 2017, 551 (7678) : 115-118.
- [16] WYSS M, KADDURAH-DAOUK R. Creatine and creatinine metabolism [J]. Physiol Rev, 2000, 80 (3) : 1107-1213.
- [17] WATERS NJ, HOLMES E, WILLIAMS A, et al. NMR and pattern recognition studies on the time-related metabolic effects of α -naphthylisothiocyanate on liver, urine, and plasma in the rat : an integrative metabolomic approach [J]. Chem Res Toxicol, 2001, 14 (10) : 1401-1412.

(英文编辑: 汪源; 编辑: 丁瑾瑜; 校对: 王晓宇)