

赵丽娟, 张洪, 王创云, 等. 啉虫脒对斑马鱼血浆代谢物的影响[J]. 环境化学, 2018, 37(8): 1873-1875.

ZHAO Lijuan, ZHANG Hong, WANG Chuangyun, et al. The effect of acetamiprid on the metabolites in blood plasma of Zebra fish [J]. Environmental Chemistry, 2018, 37(8): 1873-1875.

ThermoFisher
S C I E N T I F I C 赛默飞世尔科技

啉虫脒对斑马鱼血浆代谢物的影响*

赵丽娟¹ 张洪² 王创云^{3**} 张建华¹

(1. 忻州师范学院生物系, 太原, 034000; 2. 山西省分析科学研究院, 太原, 030006; 3. 山西省农业科学院作物研究所, 忻州, 030031)

摘 要 为了辨析亚致死剂量啉虫脒对斑马鱼生长代谢的影响, 采用气质联用技术, 分析斑马鱼血浆代谢物含量的变化. 研究表明, 亚致死剂量的啉虫脒诱导斑马鱼血浆多种代谢物含量上升, 涉及到氨基酸代谢、糖代谢、三羧酸循环以及遗传物质合成多条代谢途径. 亚致死剂量啉虫脒能扰乱非靶标生物的正常代谢, 进而产生慢性毒性, 所以亚致死剂量农药对非靶标生物的影响不可忽视.

关键词 啉虫脒, 气质联用, 斑马鱼血浆, 代谢物.

农药作为农业生产必不可少的化学物质, 对环境污染和非靶标生物安全一直是值得关注的问题. 随着农药市场管理不断规范化, 急性中毒事件不断减少. 然而, 低剂量的农药仍然能通过漂移和淋溶等方式进入到水体中, 对非靶标生物造成慢性毒性, 破坏水体生态平衡. 斑马鱼作为水环境毒理研究的模式生物, 其代谢物的变化能反应水体中农药对非靶标生物代谢的影响.

本研究采用气质联用技术, 结合格列姆代谢物数据库 (GMD) 分析亚致死剂量啉虫脒对斑马鱼血浆代谢物的影响, 以期农药对非靶标生物风险评估提供重要数据.

1 材料与amp;方法

1.1 啉虫脒亚致死量的确定

参照 GB/T31270《化学农药环境安全评价试验准则》第 12 部分: 鱼类急性毒性试验的方法, 测定啉虫脒对斑马鱼的致死剂量为 $19.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 并选择 $1/10 \text{ LC}_{50}$ 作为试验剂量对斑马鱼进行亚致死剂量的毒理学试验.

1.2 代谢物的提取

将暴露在亚致死剂量中 8 d 的斑马鱼, 断尾取血; 剪断尾柄, 用毛细管取血, 高速离心取血浆. 血浆 $200 \mu\text{L}$ 放入离心管中, 加入 0.5 mL 的甲醇和水 ($1/1, V/V$), 超声波提取 30 min, 离心机温度 4°C , 转速 $6000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 取 $100 \mu\text{L}$ 上清液放入 2 mL 色谱进样小瓶中. 氮气吹干. 加入 $50 \mu\text{L}$ 的 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸甲氧胺盐酸盐吡啶溶液, 其中含 $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 内标物二十四烷, 37°C 反应 90 min, 再加入 $50 \mu\text{L}$ BSTFA (Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide) 双(三甲基硅烷基)三氟乙酰胺 + 1% TMCS (Trimethylchlorosilane 三甲基氯硅烷), 37°C 反应 30 min. 冷却后, 进行 GC-MS 分析.

1.3 GC-MS 分析

本实验分析仪器为 TRACE1300 气相色谱仪配 TSQ8000evo 三重四级杆串联质谱 (美国 Thermo Fisher 公司). TR-5MS 毛细管柱 ($0.25 \text{ mm} \times 30 \text{ m}, 0.25 \mu\text{m}$). 进样口温度 280°C ; 载气 (He) 流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 不分流进样. 升温程序: 70°C 保持 5 min, 以 $5^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 升至 220°C , 保持 2 min; 以 $10^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速率升至 320°C , 保持 4 min. 质谱采用电子轰击 (EI) 离子源; 电子能量 70 eV ; 传输线温度 280°C ; 离子源温度 200°C ; 质量扫描范围 m/z 50—650. 溶剂延迟时间为 5 min, 进样量 $1 \mu\text{L}$.

2 结果与amp;讨论

2.1 数据预处理

GC-MS 谱图信息采用 AMDIS 软件进行图谱滤波、校正漂移、从紧密相邻的共洗脱峰中提取出单个峰等一系列处理, GMD 代谢数据库检索, 设置最小匹配值为 75%.

2.2 代谢物的定性分析

GC-MS 图谱分析结合保留指数 (Retention Index, RI) 定性分析技术, 对不同处理斑马鱼的代谢产物进行辨识, 共鉴定出 40 种代谢物, 分别为氨基酸、有机酸、糖类物质和其它化合物, 典型的血浆的 GC-MS 代谢图谱见图 1.

* 忻州师范学院博士科研启动金和国家自然科学基金青年基金 (31700413) 资助.

** 通讯联系人: E-mail: zhao6286145@126.com

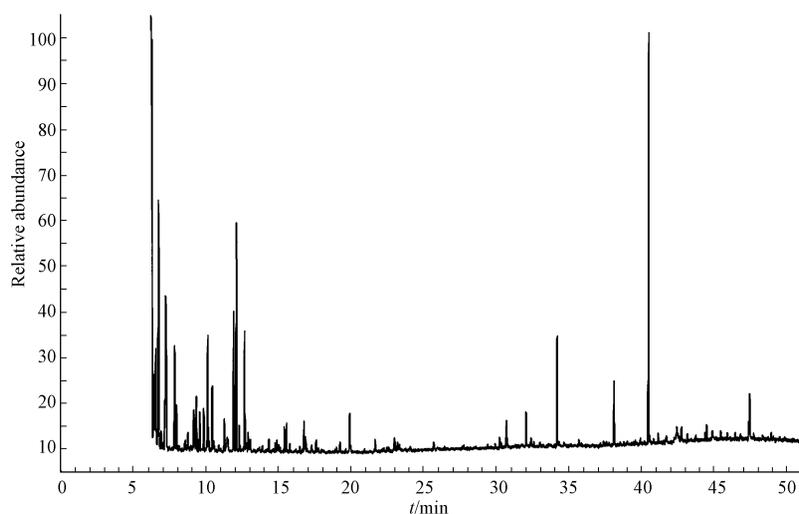


图 1 斑马鱼血浆代谢物 GC-MS 总离子色谱图

2.3 斑马鱼血浆代谢物变化

由表 1 可见,亚致死剂量啶虫脒对斑马鱼的生命没有威胁,但检测其血浆代谢物发现,代谢物含量与对照组相比均有变化.多数氨基酸含量上升,亮氨酸、脯氨酸、鸟氨酸和酪氨酸含量上升较高分别是 4519%、2976%、3698%和 2114%;其次是丙氨酸、肌氨酸、缬氨酸、甘氨酸、天冬氨酸、蛋氨酸、焦谷氨酸、谷氨酸和苯丙氨酸(104%—667%);上升较少的是丝氨酸和苏氨酸(28%和 60%);酸类物质和糖类物质的上升均低于氨基酸,最高分别为 1351%和 1107%.

糖类物质蔗糖、葡萄糖和甘露糖含量均上升,分别为 1107%、25%和 23%.酸类物质除磷酸、亚牛磺酸、十八酸含量(47%—94%)下降外,其余均上升(9%—1351%).剩余的其它代谢物则除胆固醇含量下降外,其余含量也均上升.

表 1 啶虫脒暴露斑马鱼血浆代谢物变化

代谢物	保留时间/min	保留指数(RI)	匹配率/%	化合物相对定量		变化/%
				CK	啶虫脒 1/10LC ₅₀	
丙氨酸	11.49	1075.46	76	0.193	1.482	667 ↑
肌氨酸	12.52	1125.98	75	0.007	0.013	104 ↑
缬氨酸	15.02	1187.10	87	0.011	0.046	320 ↑
丝氨酸	16.17	1252.52	79	0.017	0.022	28 ↑
亮氨酸	16.69	1264.43	86	0.028	1.293	4519 ↑
脯氨酸	17.31	1285.77	75	0.024	0.748	2976 ↑
甘氨酸	17.62	1303.64	88	0.092	0.281	207 ↑
苏氨酸	19.99	1362.07	90	0.010	0.016	60 ↑
天冬氨酸	20.71	1422.05	81	0.011	0.073	563 ↑
蛋氨酸	23.18	1515.87	86	0.006	0.023	288 ↑
焦谷氨酸	23.22	1521.72	87	0.122	0.582	377 ↑
谷氨酸	23.43	1528.20	86	0.074	0.388	424 ↑
苯丙氨酸	23.67	1556.05	84	0.032	0.153	376 ↑
鸟氨酸	28.51	1750.77	74	0.025	0.965	3698 ↑
赖氨酸	30.62	1849.23	91	0.003	0.001	77 ↓
酪氨酸	31.26	1887.23	75	0.031	0.686	2114 ↑
丙酮酸	9.73	1037.28	90	0.458	0.499	9 ↑
乳酸	10.15	1044.47	75	2.021	2.405	19 ↑
磷酸	16.82	1262.42	75	0.476	0.252	47 ↓
富马酸	18.66	1346.80	81	0.008	0.019	127 ↑
苹果酸	22.60	1478.99	79	0.027	0.131	386 ↑
亚牛磺酸	25.11	1605.89	75	0.011	0.003	70 ↓
牛磺酸	26.73	1668.74	83	0.005	0.042	733 ↑

续表1

代谢物	保留时间/min	保留指数(RI)	匹配率/%	化合物相对定量		变化/%
				CK	啶虫脒 1/10LC ₅₀	
柠檬酸	30.31	1804.71	85	0.005	0.008	64 ↑
古洛糖酸	32.85	1984.30	87	0.200	0.672	236 ↑
十八酸	38.16	2243.45	93	0.050	0.003	94 ↓
二十四碳烯酸	40.16	2383.67	75	0.008	0.116	1351 ↑
二十二碳六烯酸	42.43	2575.85	81	0.030	0.035	15 ↑
甘露糖	32.45	1885.22	87	1.710	2.103	23 ↑
蔗糖	43.76	2622.87	79	0.036	0.435	1107 ↑
葡萄糖	27.37	1650.36	85	0.025	0.031	25 ↑
甘油	16.83	1262.29	95	0.210	3.419	1528 ↑
胸腺嘧啶	20.22	1397.96	81	0.025	0.083	230 ↑
腐胺	28.24	1734.98	75	0.008	0.050	526 ↑
3-磷酸甘油	29.10	1750.51	90	0.011	0.012	13 ↑
次黄嘌呤	29.63	1808.98	93	0.007	0.063	802 ↑
半乳糖苷	31.61	1806.47	87	0.061	0.276	353 ↑
肌醇	35.72	2080.23	91	0.052	0.332	544 ↑
尿苷	41.42	2467.70	82	0.013	0.033	154 ↑
腺苷	42.98	2612.19	91	0.015	0.249	1563 ↑
胆固醇	47.43	3188.14	93	0.134	0.015	89 ↓
肌氨酸酐	42.86	2582.01	91	0.019	0.107	462 ↑

气质联用检测结果表明:亚致死剂量的啶虫脒引起斑马鱼血浆中氨基酸代谢紊乱,同时三羧酸循环、能量代谢和神经递质平衡被破坏。

氨基酸作为蛋白质基本单位,为多个代谢通路提供重要的前体物质,保证生物的正常生理活动和营养状况。支链氨基酸是调节动物生长和代谢的关键因子。其中,亮氨酸和缬氨酸可直接参与能量代谢。研究发现,亚致死剂量啶虫脒暴露下,亮氨酸和缬氨酸含量上升,表明两种氨基酸参与的能量代谢通路受阻。此外,两种氨基酸含量的增加与器官组织病变密切相关。前期关于啶虫脒对人体肺细胞有细胞毒性和遗传毒性也印证了这个结论。

前期研究发现,丝氨酸和甘氨酸是癌细胞生长过程中蛋白、核酸和脂肪合成的重要前体。丝氨酸合成异常活跃,是癌症发病机理的重要过程,丝氨酸或甘氨酸的生物合成能直接影响细胞的抗氧化能力。亚致死剂量啶虫脒暴露下,斑马鱼甘氨酸含量上升大于丝氨酸,两者代谢异常,因此推测低剂量啶虫脒长时间胁迫可能会导致癌细胞的产生。

脯氨酸作为动物抗逆境胁迫的重要指标,在蛋白质合成和代谢、细胞能量感知、细胞分化、抗氧化反应和免疫方面起着重要的作用。亚致死剂量啶虫脒暴露下,斑马鱼血浆中脯氨酸上升 2976%,可提高斑马鱼的抗逆境能力。

亚致死剂量啶虫脒暴露下,斑马鱼血浆中鸟氨酸含量上升,表明啶虫脒造成蛋白质分解加速,产生较高毒性-NH₂,高含量的鸟氨酸可以将其转化为低毒的尿素排出体外,达到解毒的作用。斑马鱼血浆中腐胺含量也上升,腐胺的增加可以调节生物体内 pH,还可以他参与保护神经突触,这与啶虫脒是神经性杀虫剂相吻合。

此外,值得注意的是亚致死剂量啶虫脒胁迫诱导血浆中丙氨酸的积累,丙氨酸积累是目前公认的生物体受胁迫的第一信号,可以调节末梢神经系统,通过影响甘氨酸受体的活性,从而抑制神经活性。斑马鱼血浆中丙氨酸含量的积累有助于拮抗由于啶虫脒引起的神经兴奋。

动物体自身不能合成蔗糖,斑马鱼血浆中蔗糖含量上升的原因可能是,斑马体内与蔗糖分解代谢相关的酶受损,蔗糖分解速度降低,从而引起了蔗糖浓度的上升。

斑马鱼血浆中苹果酸、富马酸,此类三羧酸循环中的物质的积累,表明啶虫脒使得三羧酸循环受阻。此外,脂肪代谢的中间产物甘油也上升,表明脂肪代谢发生异常。糖酵解中间产物丙酮酸和 3-磷酸甘油上升,直接影响能量的供给,与之相对应的能量载体肌酸酐也显著上升。

胸腺嘧啶是组成 DNA、RNA 重要的核苷酸,次黄嘌呤是组成核苷酸的重要碱基,腺苷是合成腺嘌呤的重要中间体,三者代谢的异常变化,表明斑马鱼在亚致死剂量啶虫脒的暴露下,核糖核酸和脱氧核糖核酸的合成分解异常。

3 结论

亚致死剂量的啶虫脒诱导斑马鱼血浆多种代谢物含量上升,涉及到氨基酸代谢、糖代谢、三羧酸循环以及遗传物质合成多条代谢途径。亚致死剂量啶虫脒能扰乱非靶标生物的正常代谢,进而产生慢性毒性,所以亚致死剂量农药对非靶标生物的影响不可忽视。