

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20200305001

朱亭, 严晓, 邹忠杰, 等. 磷酸三(1,3-二氯-2-丙基)酯导致小鼠神经毒性结局的潜在靶点研究[J]. 生态毒理学报, 2021, 16(2): 158-166

Zhu T, Yan X, Zou Z J, et al. A potential target research of neurotoxicity induced by tris(1,3-dichloro-2-propyl) phosphate (TDCPP) in mice [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2021, 16(2): 158-166 (in Chinese)

## 磷酸三(1,3-二氯-2-丙基)酯导致小鼠神经毒性结局的潜在靶点研究

朱亭<sup>1,2,3</sup>, 严晓<sup>2</sup>, 邹忠杰<sup>4</sup>, 王美欢<sup>2</sup>, 唐斌<sup>2</sup>, 许榕发<sup>2</sup>, 郑晶<sup>2,\*</sup>, 麦碧娴<sup>1</sup>, 于云江<sup>2</sup>

1. 中国科学院广州地球化学研究所, 有机地球化学国家重点实验室, 广州 510640

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

3. 中国科学院大学, 北京 100049

4. 广东药科大学中药学院, 广州 510006

收稿日期: 2020-03-05 录用日期: 2020-06-01

**摘要:** 磷酸三(1,3-二氯-2-丙基)酯(TDCPP)在环境介质及生物样本中被广泛检出, 为探究 TDCPP 的潜在神经毒性以及作用机制, 以 C57BL/6 小鼠为动物模型, 考察经 300 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> 的 TDCPP 持续染毒 35 d 后, 小鼠大脑皮层神经功能相关因子及血清代谢组学的变化。结果显示, 小鼠在 TDCPP 染毒 35 d 后, 大脑皮层中 5-羟色胺(5-HT)含量和乙酰胆碱酯酶(AChE)活性无显著变化( $P>0.05$ ), 而促炎性细胞因子白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)及胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)基因表达水平显著上调( $P<0.05$ ), 神经营养因子-3(Ntf3)基因表达水平显著下调( $P<0.05$ ); 同时, TDCPP 染毒显著干扰了小鼠的代谢过程, 引起异亮氨酸、谷氨酸、甘氨酸和 $\beta$ -葡萄糖等多种神经性疾病相关生物标志物的改变, 以及氨基酸代谢、糖类代谢和脂质代谢紊乱。研究结果表明, TDCPP 的神经毒性效应与神经炎症和神经元损伤相关因子转录水平改变, 以及代谢失衡引起的信号紊乱有关。

**关键词:** 磷酸三(1,3-二氯-2-丙基)酯; 小鼠; 神经毒性; 代谢组学; 生物标志物

文章编号: 1673-5897(2021)2-158-09 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

## A Potential Target Research of Neurotoxicity Induced by Tris(1,3-dichloro-2-propyl) Phosphate (TDCPP) in Mice

Zhu Ting<sup>1,2,3</sup>, Yan Xiao<sup>2</sup>, Zou Zhongjie<sup>4</sup>, Wang Meihuan<sup>2</sup>, Tang Bin<sup>2</sup>, Xu Rongfa<sup>2</sup>, Zheng Jing<sup>2,\*</sup>, Mai Bixian<sup>1</sup>, Yu Yunjiang<sup>2</sup>

1. State Key Laboratory of Organic Geochemistry, Guangzhou Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510640, China

2. 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

3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

**基金项目:** 广州市科技计划项目(201804010074); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助项目(PM-zx703-201904-122); 国家自然科学基金重点项目(41931290)

**第一作者:** 朱亭(1993—), 女, 博士, 研究方向为环境污染与健康, E-mail: ztzoe\_093@163.com

\* **通讯作者** (Corresponding author), E-mail: zhengjing@scies.org

4. School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

Received 5 March 2020      accepted 1 June 2020

**Abstract:** Tris(1,3-dichloro-2-propyl) phosphate (TDCPP) was widely detected in a variety of environmental media and biota samples. C57BL/6 mice were used as an animal model to study the potential neurotoxicity mechanisms caused by TDCPP. Changes of the neural function related factors in cerebral cortex and serum metabolomics in mice were investigated after continuous exposure to TDCPP at  $300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  for 35 d. The results showed that, after 35 d of TDCPP exposure, the concentrations of 5-hydroxytryptamine (5-HT) and activities of acetylcholinesterase (AChE) in the cerebral cortex had no significant change ( $P > 0.05$ ). Significant up-regulations of the gene expression levels of the proinflammatory cytokine interleukin-6 (*IL-6*), interleukin-1 $\beta$  (*IL-1\beta*), tumor necrosis factor- $\alpha$  (*TNF- $\alpha$* ), inducible nitric oxide synthase (*iNOS*) and glial cell line-derived neurotrophic factor (*GDNF*) were observed ( $P < 0.05$ ) in exposed mice. However, the gene expression level of neurotrophic factor-3 (*Ntf3*) was significantly down-regulated ( $P < 0.05$ ). Meanwhile, TDCPP exposure interfered with the metabolic process of amino acid metabolism, glycometabolism and lipid metabolism, leading to changes in the levels of biomarkers such as isoleucine, glutamate, glycine and  $\beta$ -glucose, which were associated with a variety of neurological diseases. The results showed that the neurotoxic effects of TDCPP were related to changes in the transcriptional levels of neuroinflammation and neuronal damage-related factors as well as the metabolic signal disorder caused by metabolic imbalance.

**Keywords:** tris(1,3-dichloro-2-propyl) phosphate; mouse; neurotoxicity; metabolomics; biomarkers

近年来随着各国对溴系阻燃剂的逐步禁用和淘汰,有机磷系阻燃剂(organophosphate flame retardants, OPFRs)作为替代品其生产量和使用量快速增长<sup>[1]</sup>。磷酸三(1,3-二氯-2-丙基)酯(tris(1,3-dichloro-2-propyl) phosphate, TDCPP)是目前使用量最大的 OPFRs 之一,被广泛用于家具、儿童塑料玩具和汽车的内饰中<sup>[1-2]</sup>。作为添加型助剂, TDCPP 以非化学结合的方式添加到材料中<sup>[3]</sup>,使用过程中极易释放到环境中,研究显示,在世界各地的大气、室内灰尘、饮用水和生物体样本中,以及电脑和手机等电子设备表面均检测出一定浓度的 TDCPP<sup>[4-6]</sup>,生活环境中的高检出率增加了人体暴露风险, TDCPP 在人体尿液、血液和头发等样品中也被广泛检出<sup>[7-8]</sup>。多项研究证实, TDCPP 可能具有神经毒性、生殖发育毒性、内分泌干扰毒性和致癌性等<sup>[2,9-10]</sup>。由于 TDCPP 与具有较强神经毒性的有机磷农药(organophosphate pesticides, OPs)氯吡硫磷(chlorpyrifos, CPF)结构相似,其潜在的神经毒性尤其值得关注。有研究发现, TDCPP 能改变 PC12 细胞的神经元分化,从而影响神经发育<sup>[11]</sup>;此外, TDCPP 能下调成年斑马鱼的神经系统发育相关基因的表达以及破坏神经元功能,引起神经毒性<sup>[2]</sup>;也有研究表明, TDCPP 引起大鼠脑组织氧化损伤和炎症反应<sup>[12]</sup>。然而目前关于 TDCPP 对哺乳动物的神经毒性及其作用机制的相关研

究依然很缺乏。

代谢组学是一种研究生物体液或组织中的小分子代谢物整体变化情况的组学分析方法<sup>[13]</sup>。利用代谢组学寻找生物效应标志物可以明确环境污染物对生物代谢途径的影响,为揭示毒性机制提供新思路。血液运输是生物体内物质循环的主要方式,因此血液代谢组学在机体损伤和疾病状态的生物标志物筛选上也具有独特优势。目前,已有不少研究利用血液代谢组学探讨神经功能改变或帕金森病(Parkinson's disease, PD)<sup>[14]</sup>、阿尔茨海默症(Alzheimer's disease, AD)<sup>[15]</sup>和重度抑郁症(major depressive disorder, MDD)<sup>[16]</sup>等神经疾病的发生和发展机制。此外,也有研究通过血液代谢组学探讨空气污染与中枢神经系统疾病发生之间的关联<sup>[17]</sup>。

本研究使用基于<sup>1</sup>H-NMR 的代谢组学技术结合脑组织神经因子基因表达量分析了 TDCPP 对小鼠神经系统的潜在毒性作用,筛选早期毒性标志物,为 TDCPP 的污染防治和毒性风险评估提供基础数据。

## 1 材料与方法 (Materials and methods)

### 1.1 实验试剂与仪器

TDCPP(纯度 > 95%, J&K Scientific 百灵威科技,中国); SV Total RNA Isolation Kit 试剂盒(Promega 公司,美国); PrimeScript<sup>TM</sup> RT reagent Kit、SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>TM</sup> Kit 试剂盒购自日本 Takara

公司;5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)、乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AChE)试剂盒购自中国南京建成生物工程研究所;氘水(D<sub>2</sub>O)、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 购自美国 Sigma 公司。

NanoDrop One 微量核酸蛋白分析仪(Thermo Fisher Scientific 公司,美国);Step One Plus 实时荧光定量 PCR 仪(Applied Biosystems 公司,美国);高速冷冻离心机 5424R(Eppendorf 公司,德国);Spectra-Max i3x 酶标仪(Molecular Devices 公司,奥地利)。AVANCE III 500 MHz 全数字化超导核磁共振谱仪(Bruker 公司,瑞士)。

## 1.2 实验动物分组、染毒及样品采集

4 周龄 SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠 16 只,体质量 15~18 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,饲养于中国科学院广州生物医药与健康研究院 SPF 级动物房中,保持 12 h/12 h 的日/夜光照循环,室内温度 20~24 °C,湿度 40%~60%,实验动物自由饮水和摄食。将小鼠随机分为溶剂对照组(给予等体积的玉米油)和 TDCPP 染毒组(300 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>),每组 8 只。染毒方式为灌胃染毒,灌胃体积 0.1 mL,每日灌胃 1 次,连续染毒 35 d。每 3 d 准确称取并记录小鼠体质量。根据世界卫生组织(WHO)报

道的雄性小鼠经口摄入 TDCPP 的 LD<sub>50</sub> 为 2 670 mg·kg<sup>-1</sup>[18],本研究所选用剂量约为 1/10 LD<sub>50</sub>。

末次染毒 24 h 后,使用 3% 戊巴比妥钠(0.15 mL/100 g)腹腔注射麻醉动物,待小鼠翻正反射消失且无疼痛反应后,用眼眶静脉取血法采集血液样品,全血室温静置 30 min 后 3 500 r·min<sup>-1</sup> 离心 30 min,取血清置于-80 °C 冰箱保存。随后将小鼠脱颈椎处死,取全脑在冰上分离大脑皮层,称量质量后放入样品冻存管,液氮速冻后置于-80 °C 冰箱保存。

## 1.3 神经炎症关键基因表达的检测

将小鼠大脑皮层组织在液氮中研磨后提取总 RNA,以反转录获得的 cDNA 为模板进行实时荧光定量 PCR 检测。检测的基因包括神经营养因子-3(*Ntf3*)、胶质细胞源性神经营养因子(*GDNF*)和成纤维细胞生长因子-22,-23(*fgf-22*、*fgf-23*)、诱导型一氧化氮合酶(*iNOS*)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (*TNF- $\alpha$* )、白细胞介素-6(*IL-6*)和白细胞介素-1 $\beta$ (*IL-1 $\beta$* ),内参基因为  $\beta$ -actin。设计引物序列如表 1 所示,采用 20  $\mu$ L 体系,每个样本进行 3 次平行试验。

## 1.4 5-HT 含量和 AChE 活性检测

小鼠大脑皮层中神经递质 5-HT 含量采用酶联免疫吸附试验(ELISA)法,AChE 活性采用化学比色

表 1 qPCR 基因引物序列

Table 1 Gene primer sequences for qPCR

基因名称 Gene	引物序列(5'~3') Primer sequences (5'~3')	大小/bp Size/bp	退火温度/°C Annealing/°C
<i>iNOS</i>	F: 5'-CCTCCTCCACCCTACCAAGT-3' R: 5'-CACCCAAAGTGCTTCAGTCA-3'	199	60
<i>TNF-<math>\alpha</math></i>	F: 5'-TACTGAACTTCGGGGTATTGGTCC-3' R: 5'-CAGCCTTGTCCTTGAAGAGAACC-3'	297	60
<i>IL-6</i>	F: 5'-ATCCAGTTGCCTTCTTGGGACTGA-3' R: 5'-CAGCCTTGTCCTTGAAGAGAACC-3'	290	58
<i>IL-1<math>\beta</math></i>	F: 5'-CAGGATGAGGACATGAGCACC-3' R: 5'-CTCTGCAGACTCAAACCTCCAC-3'	447	58
<i>Ntf3</i>	F: 5'-GGCAACAACAGAGACGCTACAAT-3' R: 5'-TCCTCCGTGGTGATGTTCTA-3'	133	60
<i>GDNF</i>	F: 5'-ATGTCAGTACTGGGTTTGGG-3' R: 5'-GCTTACAGGAACCGCTACAA-3'	76	60
<i>fgf-22</i>	F: 5'-ATTCTAGAATGCGCAGCCGCTCTGG-3' R: 5'-ATGGGCCCTCAAGACGAGACCAAGAC-3'	482	58
<i>fgf-23</i>	F: 5'-ACTTGGCCTTTATTAGCCGGGTCT-3' R: 5'-AGATGGCCTCTTCCCTGTGTCAA-3'	98	60
$\beta$ -actin	F: 5'-TGTGATGGTGGGAATGGGTCAG-3' R: 5'-TTTGATGTCACGCACGATTTC-3'	514	60

法,均使用南京建成试剂盒测定。

### 1.5 血清样品处理

小鼠血清室温解冻,混匀后取 200  $\mu\text{L}$  加至 5 mm 的 NMR 测试管中,再加入 150  $\mu\text{L}$  磷酸缓冲液(含  $0.2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{Na}_2\text{HPO}_4$  和  $0.2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.4)和 150  $\mu\text{L}$   $\text{D}_2\text{O}$ ,振荡混匀,待上机测试。

### 1.6 $^1\text{H-NMR}$ 测定及数据处理

小鼠血清样品的 $^1\text{H-NMR}$  试验在 500 MHz 超导核磁共振谱仪上进行,实验温度为  $24.85^\circ\text{C}$ ;采用 Carr-Purcell-Meibom-Gill(CPMG)脉冲序列抑制血清中蛋白质及脂蛋白较宽的共振信号,总回波时间  $2n\tau=100 \text{ ms}$ ,弛豫延迟时间 4 s,采样时间 3.28 s。

采用线宽为 0.3 Hz 的指数窗函数进行傅里叶变换。运用软件 MestReNova 6.1(Mestrelab Research S.L, Santiago de Compostela, 西班牙)对所获谱图进行手动相位和基线校正后,参照乳酸的甲基共振双重峰( $\delta$  1.33)进行定标。切除  $\delta$  4.68 ~ 5.22 范围内的谱图,在  $\delta$  0.5 ~ 9.5 区域按  $\delta$  0.01 等间隔分段积分,对各分段积分值进行归一化处理。

### 1.7 统计学分析及通路分析

使用 SPSS 20.0 软件进行数据分析。组间差异使用单因素方差分析,  $P < 0.05$  时认为在统计学上具有显著差异。归一化的代谢组学数据使用 SIMCA-P 12.0(Umetrics AB, Umea, 瑞典)进行基于多变量统计的模式识别分析,经 Pareto 标度化预处理后,进一步进行正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)。根据变量重要性因子(VIP 值) $>1$  来筛选潜在特征代谢物,并进行  $t$  检验获得差异代谢物,显著性水平设为  $P < 0.05$ 。用 MetaboAnalyst 在线数据库(<http://www.Metaboanalyst.ca>)对差异代谢物进行功能分析和通路定位,寻找显著影响的关键代谢通路。

## 2 结果 (Results)

### 2.1 小鼠一般体征

小鼠在研究过程中体质量变化如图 1 所示。试验期间对照组和 TDCPP 染毒组小鼠体质量均呈增长趋势,两组间无显著性差异( $P > 0.05$ )。TDCPP 染毒组小鼠在研究过程中未出现肉眼可见畸变或行为异常。染毒 35 d 后,对照组与 TDCPP 染毒组小鼠体质量分别为( $25.55 \pm 0.61$ ) g 和( $23.56 \pm 1.26$ ) g。

### 2.2 大脑皮层 5-HT 含量及 AChE 活性

5-HT 和 AChE 作为大脑中调节活动的重要神经递质和神经传导的关键性酶,是神经系统功能变化的重要标志物,常用于污染物神经毒性评价<sup>[19-20]</sup>。如图 2 所示,经 TDCPP 持续染毒 35 d 后,TDCPP 染毒组与对照组小鼠大脑皮层 5-HT 含量和 AChE 活性没有显著差异( $P > 0.05$ )。

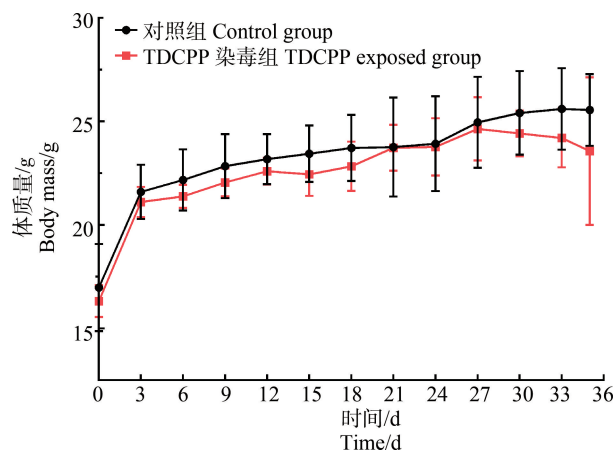


图 1 对照组与磷酸三(1,3-二氯-2-丙基)酯(TDCPP)染毒组小鼠体质量

Fig. 1 Body mass of mice from control group and tris (1,3-dichloro-2-propyl) phosphate (TDCPP) exposed group

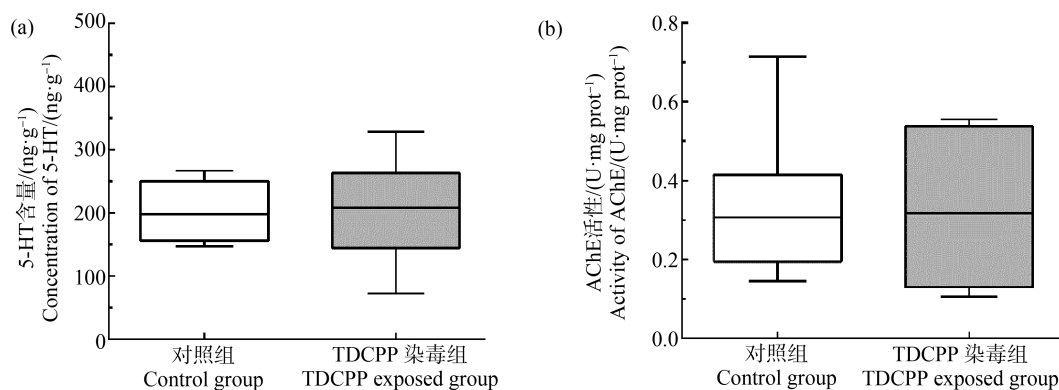


图 2 小鼠大脑皮层 5-HT 含量和 AChE 活性

Fig. 2 Concentration of 5-HT and activity of AChE in mice cerebral cortex

### 2.3 大脑皮层神经毒性相关基因表达

促炎性细胞因子  $TNF-\alpha$ 、 $IL-6$  和  $IL-1\beta$ , 神经营养因子  $Ntf3$ 、 $GDNF$ 、 $fgf-22$  和  $fgf-23$ , 以及一氧化氮合酶  $iNOS$  在大脑皮层中 mRNA 相对表达量如图 3 所示。研究结果显示, 小鼠经 TDCPP 持续染毒 35 d 后,  $TNF-\alpha$ 、 $IL-6$ 、 $IL-1\beta$ 、 $iNOS$  和  $GDNF$  的 mRNA 表达量显著上调 ( $P < 0.05$ ), 其表达水平分别是对照组的 1.6 倍、4.1 倍、2.9 倍、1.3 倍和 2.0 倍。而  $Ntf3$  的 mRNA 表达量显著下调 ( $P < 0.05$ ), 其表达水平仅为对照组的 53%。成纤维细胞生长因子  $fgf-22$  和  $fgf-23$  的基因表达水平在对照组与 TDCPP 染毒组小鼠之间无显著差异 ( $P > 0.05$ )。

### 2.4 小鼠代谢表型的改变

采用 OPLS-DA 研究对照组与 TDCPP 染毒组小

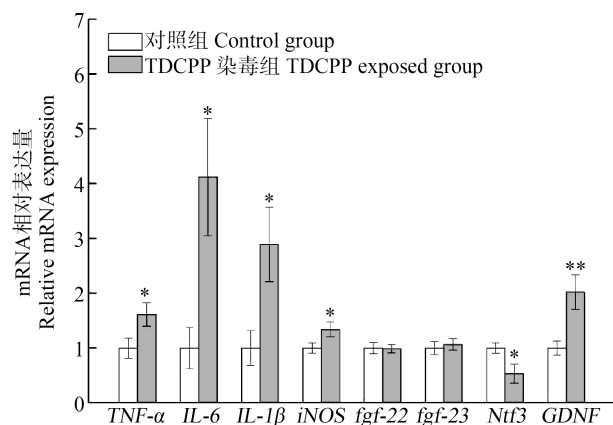


图 3 小鼠大脑皮层神经毒性相关基因的相对表达量

注: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , 与对照组相比。

Fig. 3 Relative expression of genes for nervous toxic effect in mice cerebral cortex

Note: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , compared with control group.

鼠的代谢物图谱差异, 结果如图 4(a) 所示。TDCPP 染毒组小鼠血清中的代谢物与对照组在 PC1 维度上完全区分开, 表明 TDCPP 染毒后小鼠机体的生理状态和物质代谢发生了明显变化。同时, 采用置换检验(permutation test)验证 OPLS-DA 模型的过拟合程度和可靠性(图 4(b))。OPLS-DA 的主要参数为:  $R^2 X = 0.83$ ,  $R^2 Y = 0.97$ ,  $Q^2 = 0.88$ 。模型置换得到的  $R^2$ 、 $Q^2$  点均低于原始点, 且  $Q^2$  回归线与纵坐标轴的截距均小于零, 说明建立的模型符合样本数据的真实情况, 且如有新样本加入对原有分布情况影响不大, 可以充分解释两组样本间的差异。

### 2.5 TDCPP 诱导的差异代谢物与代谢通路分析

采用 OPLS-DA 模型, 筛选同时满足 VIP 值  $> 1$  和独立样本  $t$  检验  $P < 0.05$  的代谢物作为 TDCPP 诱导的差异代谢物(表 2)。结果显示, 小鼠在 TDCPP 持续染毒 35 d 后, 血清中多种代谢物水平发生显著变化, 包括氨基酸、生物碱、羧酸、糖类、生长因子和脂质。进一步应用 MetaboAnalyst 对差异代谢物进行代谢通路分析(Pathway Analysis), 结果如表 3 所示。在 TDCPP 显著影响的小鼠关键代谢通路中, 3 条通路与氨基酸代谢相关, 2 条通路与糖代谢相关。根据差异代谢通路绘制 TDCPP 诱导小鼠体内代谢紊乱的通路图如图 5 所示。

## 3 讨论 (Discussion)

广泛使用的有机磷系阻燃剂 TDCPP 在多种环境介质和生物体中被检出且具有较高浓度, 其潜在的慢性神经毒性引起研究者们的高度关注。研究显示, TDCPP 能够引起禽类步态模式和翼瓣反射等行为学异常<sup>[21]</sup>, 改变斑马鱼孵化率、存活率和游动速率并诱导自噬<sup>[22]</sup>, 并且影响大鼠的学习记忆能力和空

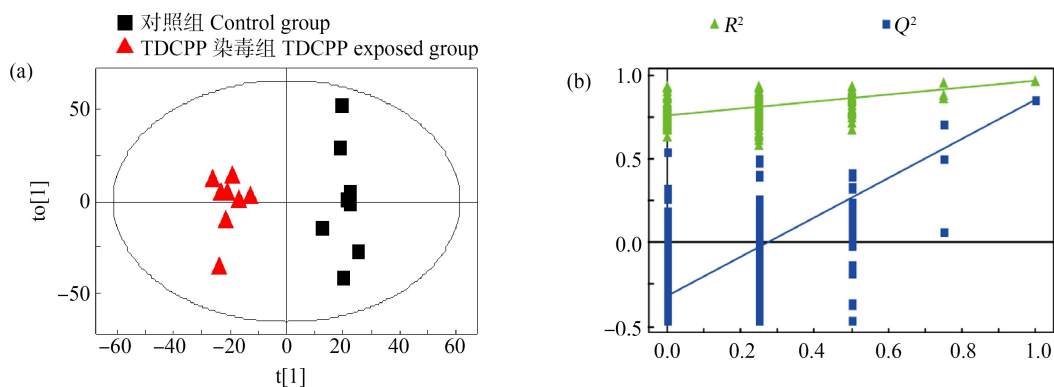


图 4 小鼠血清<sup>1</sup>H-NMR 谱的 OPLS-DA 得分图 (a) 和置换检验验证图 (b)

Fig. 4 OPLS-DA score plot (a) and permutation test (b) derived from <sup>1</sup>H-NMR spectra of mice serum

间探索能力<sup>[12]</sup>。代谢组学是研究机体代谢产物变化的一种系统生物学方法,可通过揭示代谢产物变化规律来解释机体物质代谢途径改变。本研究利用代谢组学技术研究 TDCPP 对机体代谢网络的影响,并结合神经毒性指标相互验证和补充,为探索 TDCPP 的潜在神经毒性作用机制提供依据。

AChE 是重要的中枢神经酶,作为生物标志物常用来评估环境物质的神经毒性。AChE 活性受到抑制也是 OPs 的常见神经毒性作用机制之一。5-HT 作为中枢神经递质和外周调质,参与多项重要的生理和病理过程。本研究中小鼠经  $300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  的 TDCPP 持续染毒 35 d 后,未观察到脑组织中 AChE 活性和 5-HT 含量的显著改变( $P>0.05$ )。以往研究也获得了类似的结果,鲮鱼<sup>[23]</sup>和斑马鱼<sup>[2]</sup>经急性或慢性 TDCPP 暴露后,大脑中 AChE 活性和神经递

质水平均没有显著变化。提示与 CPF 等 OPs 不同, TDCPP 可能并不是典型的乙酰胆碱酯酶抑制毒物,或许其对生物体的神经毒性存在其他作用机制<sup>[2,23]</sup>。

神经炎症反应是中枢神经系统产生的抵御感染和损伤的复杂级联反应,长期的慢性炎症反应可诱发或加重重度抑郁障碍(MDD)、阿尔兹海默症(AD)、帕金森病(PD)等神经退行性疾病的病变<sup>[17,24-25]</sup>。TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-1 $\beta$  是 3 类重要的促炎性细胞因子,iNOS 则是一类可被促炎性细胞因子诱导产生的一氧化氮(NO)合酶,TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  和 iNOS 均在慢性神经炎症发展过程中积聚,对神经元造成损伤,其在脑组织中的表达量可反映机体炎症水平和组织的损伤程度<sup>[26-27]</sup>。本研究发现,TDCPP 染毒组小鼠大脑皮层中 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  和 iNOS 基因表达水平显著升高( $P<0.05$ ),提示 TDCPP 暴露

表 2 对照组与 TDCPP 染毒组小鼠血清中的差异代谢物

Table 2 Potential biomarkers in mice serum between control group and TDCPP exposed group

代谢物 Metabolites	化学位移(峰多样性) <sup>a</sup> Chemical shift (multiplicity) <sup>a</sup>	VIP	差异倍数 Fold change	TDCPP 染毒组趋势 <sup>b</sup> Tends in TDCPP exposed group <sup>b</sup>
乳酸 Lactate	1.33(d), 4.12(q)	12.81, 4.45	0.77	↓**
异亮氨酸 Isoleucine	1.45(m)	1.28	0.83	↓**
脂质 Lipid	2.75(m)	1.27	1.49	↑*
磷酸胆碱 Phosphocholine	3.22(s)	3.75	1.12	↑*
$\beta$ -葡萄糖 $\beta$ -Glucose	3.25(d), 4.65(d)	2.46, 1.84	1.13	↑*
甜菜碱 Betaine	3.27(s)	2.13	0.81	↓**
鲨肌醇 Scyllo-inositol	3.36(s)	1.07	1.40	↑*
甘氨酸 Glycine	3.55(s)	2.24	1.19	↑**
谷氨酸 Glutamate	3.75(m)	2.64	1.18	↑**
肌酸 Creatine	3.92(s)	2.64	1.19	↑**

注:<sup>a</sup>峰多样性表示中,s 为单峰;d 为双重峰;q 为四重峰;m 为多重峰;<sup>b</sup>与对照组相比,↑和↓分别表示 TDCPP 染毒组代谢物水平上调和下调,\*和\*\*分别表示在  $P<0.05$  和  $P<0.01$  有统计学差异。

Note:<sup>a</sup> in peak multiplicities, s represents singlet, d represents doublet, t represents triplet, q represents quartet, and m represents multiplet; <sup>b</sup> compared to control group, ↑ and ↓ represent relative increase and relative decrease in TDCPP exposed group; \*and \*\*represent statistical differences at  $P<0.05$  and  $P<0.01$  level, respectively.

表 3 与 TDCPP 暴露相关的关键代谢通路

Table 3 Key metabolism pathways related to TDCPP exposure

代谢通路 Pathway name	总计 Total	节点 Hit	P 值 P-value	影响率/% Impact/%
甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢 Glycine, serine and threonine metabolism	34	3	0.001	31.8
谷胱甘肽代谢 Glutathione metabolism	28	2	0.009	10.8
乙醛酸和二羧酸代谢 Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	32	2	0.011	10.6
精氨酸和脯氨酸代谢 Arginine and proline metabolism	38	2	0.016	10
D-谷氨酸和 D-谷氨酰胺代谢 D-glutamine and D-glutamate metabolism	6	1	0.032	50

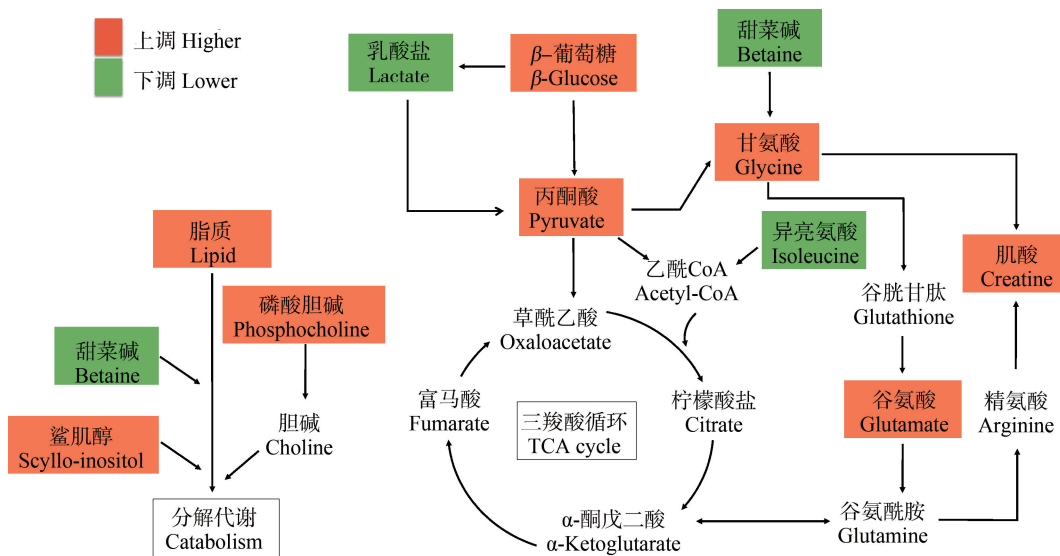


图5 TDCPP 诱导小鼠代谢紊乱的代谢通路图

注:红色和绿色标记分别表示 TDCPP 染毒后小鼠血清中上调和下调的代谢物。

Fig. 5 TDCPP induced metabolic pathway disturbance in mice

Note: Metabolite names marked with red and green represent up-regulated and down-regulated in mice serum after TDCPP exposure, respectively.

可能诱导小鼠脑组织发生炎症反应,而*iNOS*基因的过度表达可导致NO增加,进一步加重脑组织损伤。NTF、FGF和GDNF是3类重要的神经营养因子,在神经系统发育、减轻神经退行性病变和神经损伤的修复过程中发挥着重要作用<sup>[28]</sup>。本研究结果表明,与对照组相比,TDCPP染毒组小鼠大脑皮层中*GDNF*基因表达量显著升高,*Ntf3*基因表达量显著降低( $P<0.05$ ),*fgf-22*和*fgf-23*基因表达量无显著改变( $P>0.05$ ),提示TDCPP对神经营养因子转录水平的影响可能具有选择性。相似的神经营养因子基因表达水平的改变也在TDCPP慢性暴露的鲑鱼脑组织中被报道<sup>[23]</sup>。研究结果显示,神经炎症与神经损伤可能在TDCPP诱导的小鼠神经毒性中发挥作用。

血清代谢组学研究显示,TDCPP暴露显著干扰了小鼠的代谢过程,主要表现为氨基酸代谢、脂质代谢和糖类代谢的改变。多项代谢组学研究均证实,谷氨酸、甘氨酸、异亮氨酸等氨基酸和葡萄糖是包括MDD、PD在内的等多种神经性疾病的生物标志物,在患者血清中含量发生显著改变<sup>[29]</sup>。异亮氨酸属于支链氨基酸,对中枢神经系统内星形胶质细胞的产生具有重要作用,且与5-HT等神经递质的含量关系密切,其缺乏可能引发抑郁<sup>[30]</sup>。谷氨酸作为兴奋性中枢神经系统神经递质,过量可引发“兴奋性毒性”,导致受体过度激活和*iNOS*酶活性增加,破坏神经元完整性<sup>[31]</sup>。甘氨酸是中枢神经系统中谷氨酸

及其N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体的抑制性神经递质和调节剂,过度积累也和抑郁症的病理生理有关<sup>[29]</sup>。肌酸是磷酸肌酸前体,磷酸肌酸作为高能磷酸化合物,能刺激突触囊泡对谷氨酸的摄取和过度释放,诱导神经毒性<sup>[32]</sup>。在本研究中,TDCPP染毒组小鼠血清中异亮氨酸显著降低,谷氨酸、甘氨酸、肌酸和 $\beta$ -葡萄糖显著升高( $P<0.05$ ),表明TDCPP可能通过影响氨基酸代谢中神经功能相关因子,诱导神经系统功能失调,增加神经性疾病患病风险。

Sethi等<sup>[33]</sup>研究发现,脂质、胆碱和肌醇等脂质代谢相关因子是精神分裂症患者血清中主要差异代谢物。TDCPP染毒组小鼠血清中脂质水平显著升高( $P<0.05$ ),提示脂质代谢可能受到干扰。在脂质代谢中,磷酸胆碱、鲨肌醇和甜菜碱均发挥重要作用。磷酸胆碱是细胞膜磷脂的前体并且与纹状体脂质周转相关<sup>[34]</sup>,胆碱代谢的改变引起神经信号转导紊乱<sup>[29]</sup>;鲨肌醇不仅能代谢脂肪和胆固醇,还能减少大脑中 $\beta$ -淀粉样蛋白浓度和斑块损伤,改善大脑学习障碍和认知缺陷<sup>[35]</sup>;甜菜碱能通过提高脂肪分解酶的活性促进脂肪分解,并且能降低血浆中的半胱氨酸浓度,从而减轻由半胱氨酸引起的神经混乱症状如抑郁、沮丧等<sup>[36]</sup>。本研究结果中经TDCPP染毒的小鼠血清中磷酸胆碱和鲨肌醇水平显著降低( $P<0.05$ )而甜菜碱水平显著升高( $P<0.01$ ),表明TDCPP染毒引起小鼠体内脂质代谢失衡,可能导致神经信

号紊乱和障碍。

综上所述,小鼠经  $300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  的 TDCPP 持续染毒 35 d 对脑组织中 AChE 活性和 5-HT 含量无显著影响,但可引起小鼠大脑皮层中神经炎症和神经营养相关基因表达量改变,成为大脑神经炎症发生和神经元损伤的潜在诱因;同时 TDCPP 持续染毒显著干扰了小鼠的氨基酸代谢、糖类代谢和脂质代谢,引起异亮氨酸、谷氨酸、甘氨酸和葡萄糖等多种神经性疾病相关生物标志物的改变,进一步影响神经系统功能,增加疾病风险。

**通讯作者简介:**郑晶(1986—),男,博士,研究员,主要研究方向为环境污染物的健康效应机制。

#### 参考文献 (References):

- [1] van der Veen I, de Boer J. Phosphorus flame retardants: Properties, production, environmental occurrence, toxicity and analysis [J]. *Chemosphere*, 2012, 88(10): 1119-1153
- [2] Wang Q W, Lam J C, Man Y C, et al. Bioconcentration, metabolism and neurotoxicity of the organophorous flame retardant 1,3-dichloro 2-propyl phosphate (TDCPP) to zebrafish [J]. *Aquatic Toxicology*, 2015, 158: 108-115
- [3] Betts K S. Exposure to TDCPP appears widespread [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2013, 121(5): a150
- [4] van den Eede N, Dirtu A C, Neels H, et al. Analytical developments and preliminary assessment of human exposure to organophosphate flame retardants from indoor dust [J]. *Environment International*, 2011, 37(2): 454-461
- [5] He C T, Zheng J, Qiao L, et al. Occurrence of organophosphorus flame retardants in indoor dust in multiple microenvironments of Southern China and implications for human exposure [J]. *Chemosphere*, 2015, 133: 47-52
- [6] Zheng X B, Sun R X, Qiao L, et al. Flame retardants on the surface of phones and personal computers [J]. *Science of the Total Environment*, 2017, 609: 541-545
- [7] Qiao L, Zheng X B, Zheng J, et al. Analysis of human hair to assess exposure to organophosphate flame retardants: Influence of hair segments and gender differences [J]. *Environmental Research*, 2016, 148: 177-183
- [8] Xu F C, Eulaers I, Alves A, et al. Human exposure pathways to organophosphate flame retardants: Associations between human biomonitoring and external exposure [J]. *Environment International*, 2019, 127: 462-472
- [9] Behl M, Hsieh J H, Shafer T J, et al. Use of alternative assays to identify and prioritize organophosphorus flame retardants for potential developmental and neurotoxicity [J]. *Neurotoxicology and Teratology*, 2015, 52(Pt B): 181-193
- [10] Wei G L, Li D Q, Zhuo M N, et al. Organophosphorus flame retardants and plasticizers: Sources, occurrence, toxicity and human exposure [J]. *Environmental Pollution*, 2015, 196: 29-46
- [11] Dishaw L V, Powers C M, Ryde I T, et al. Is the PentaBDE replacement, tris (1,3-dichloro-2-propyl) phosphate (TDCPP), a developmental neurotoxicant? Studies in PC12 cells [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2011, 256(3): 281-289
- [12] 王思敏, 李学彦, 周启星, 等. 三(1,3-二氯-2-丙基)磷酸酯对大鼠的神经毒性效应[J]. *生态毒理学报*, 2019, 14(3): 186-195
- [13] Wang S M, Li X Y, Zhou Q X, et al. Tris(1,3-dichloro-2-propyl) phosphate (TDCPP) induced neurotoxic effects in rats [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2019, 14(3): 186-195 (in Chinese)
- [14] Nagana Gowda G A, Raftery D. Recent advances in NMR-based metabolomics [J]. *Analytical Chemistry*, 2017, 89(1): 490-510
- [15] Chahine L M, Stern M B, Chen-Plotkin A. Blood-based biomarkers for Parkinson's disease [J]. *Parkinsonism & Related Disorders*, 2014, 20(Suppl 1): S99-S103
- [16] Peña-Bautista C, Roca M, Hervás D, et al. Plasma metabolomics in early Alzheimer's disease patients diagnosed with amyloid biomarker [J]. *Journal of Proteomics*, 2019, 200: 144-152
- [17] Zheng P, Gao H C, Li Q, et al. Plasma metabolomics as a novel diagnostic approach for major depressive disorder [J]. *Journal of Proteome Research*, 2012, 11(3): 1741-1748
- [18] Block M L, Calderón-Garcidueñas L. Air pollution: Mechanisms of neuroinflammation and CNS disease [J]. *Trends in Neurosciences*, 2009, 32(9): 506-516
- [19] World Health Organization. Flame retardants: Tris(chloro-propyl) phosphate and tris(2-chloroethyl) phosphate [R]. Geneva: World Health Organization, 1998
- [20] Songa E A, Okonkwo J O. Recent approaches to improving selectivity and sensitivity of enzyme-based biosensors for organophosphorus pesticides: A review [J]. *Talanta*, 2016, 155: 289-304
- [21] Xu J, Hu X T, Khan H, et al. Converting solution viscosity to distance-readout on paper substrates based on enzyme-mediated alginate hydrogelation: Quantitative determination of organophosphorus pesticides [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2019, 1071: 1-7
- [22] Bradley M, Rutkiewicz J, Mittal K, et al. In ovo exposure to organophosphorus flame retardants: Survival, devel-



- opment, neurochemical, and behavioral changes in white leghorn chickens [J]. *Neurotoxicology and Teratology*, 2015, 52(Pt B): 228-235
- [22] Li R W, Zhang L, Shi Q P, et al. A protective role of autophagy in TDCIPP-induced developmental neurotoxicity in zebrafish larvae [J]. *Aquatic Toxicology*, 2018, 199: 46-54
- [23] Yuan L L, Li J S, Zha J M, et al. Targeting neurotrophic factors and their receptors, but not cholinesterase or neurotransmitter, in the neurotoxicity of TDCPP in Chinese rare minnow adults (*Gobiocypris rarus*) [J]. *Environmental Pollution*, 2016, 208(Pt B): 670-677
- [24] Colombo E, Farina C. Astrocytes: Key regulators of neuroinflammation [J]. *Trends in Immunology*, 2016, 37(9): 608-620
- [25] Walker A K, Kavelaars A, Heijnen C J, et al. Neuroinflammation and comorbidity of pain and depression [J]. *Pharmacological Reviews*, 2014, 66(1): 80-101
- [26] Heneka M T, Carson M J, Khoury J E, et al. Neuroinflammation in Alzheimer's disease [J]. *The Lancet Neurology*, 2015, 14(4): 388-405
- [27] Lee Mosley R, Benner E J, Kadiu I, et al. Neuroinflammation, oxidative stress, and the pathogenesis of Parkinson's disease [J]. *Clinical Neuroscience Research*, 2006, 6(5): 261-281
- [28] Pathare G, Anderegg M, Albano G, et al. Elevated FGF23 levels in mice lacking the thiazide-sensitive NaCl cotransporter (NCC) [J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 3590
- [29] MacDonald K, Krishnan A, Cervenka E, et al. Biomarkers for major depressive and bipolar disorders using metabolomics: A systematic review [J]. *American Journal of Medical Genetics Part B, Neuropsychiatric Genetics*, 2019, 180(2): 122-137
- [30] Baranyi A, Meinitzer A, Rothenhäusler H B, et al. Metabolomics approach in the investigation of depression biomarkers in pharmacologically induced immune-related depression [J]. *PLoS One*, 2018, 13(11): e0208238
- [31] Heales S J R, Bolaños J P, Stewart V C, et al. Nitric oxide, mitochondria and neurological disease [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1999, 1410(2): 215-228
- [32] Xu C J, Klunk W E, Kanfer J N, et al. Phosphocreatine-dependent glutamate uptake by synaptic vesicles [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271(23): 13435-13440
- [33] Sethi S, Pedrini M, Rizzo L B, et al.<sup>1</sup>H-NMR, <sup>1</sup>H-NMR T<sub>2</sub>-edited, and 2D-NMR in bipolar disorder metabolic profiling [J]. *International Journal of Bipolar Disorders*, 2017, 5(1): 23
- [34] Lan M J, McLoughlin G A, Griffin J L, et al. Metabonomic analysis identifies molecular changes associated with the pathophysiology and drug treatment of bipolar disorder [J]. *Molecular Psychiatry*, 2009, 14(3): 269-279
- [35] Fenili D, Brown M, Rappaport R, et al. Properties of scyllo-inositol as a therapeutic treatment of AD-like pathology [J]. *Journal of Molecular Medicine*, 2007, 85(6): 603-611
- [36] 刘燕燕, 曾新安, 朱思明, 等. 甜菜碱的生理功能与药物活性[J]. *现代食品科技*, 2008, 24(1): 96-100
- Liu Y Y, Zeng X A, Zhu S M, et al. Physiological functions and pharmacological activities of betaine [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2008, 24(1): 96-100 (in Chinese) ◆