实验研究
Experiment

氟咯草酮对肝细胞 BRL-3A 的毒性作用

薛黎明[1a,1b]，徐佳乐[1a,1b]，冯超[1a,1b]，邱歆磊[1a,1b]，林元杰[1a,1b]，徐骞[1a,1b]，周志俊[2]，卢大胜[1a,1b]，汪国权[1a,1b]

1. 上海市疾病预防控制中心 a. 化学品毒性检定所 b. 国家环境保护新型污染物环境监控影响评价重点实验室，上海 200336
2. 复旦大学公共卫生学院，上海 200032

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2021.20568

摘要：

[背景] 氟咯草酮（FLC）是一种广泛使用的除草剂。动物毒理研究发现 FLC 具有潜在肝毒性，但对 FLC 暴露肝细胞的毒性作用和机制的研究十分有限。

[目的] 探索 FLC 对大鼠肝细胞 BRL-3A 的毒性作用和潜在毒性机制。

[方法] 采用四甲基偶氮唑盐微量酶反应比色法（MTT 法）考察 0.1、1、10、100 μmol·L^{-1} FLC 染毒 24 h 后对 BRL-3A 肝细胞活性的影响，确定后续试验染毒浓度为 1、10、100 μmol·L^{-1}。应用免疫荧光技术检测肝细胞内的活性氧（ROS）水平的变化，用逆转录聚合酶链反应（RT-PCR）方法检测锰超氧化物歧化酶（SOD2）和谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px）的 mRNA 表达水平，采用流式细胞术检测肝细胞的死亡率及凋亡率，采用 Western blotting 法检测环氧合酶 -3（Cox3）、凋亡促进因子 Bax 和 B- 淋巴细胞瘤 -2（Bcl-2）蛋白的表达水平。

[结果] 相对于对照组：1、10、100 μmol·L^{-1} 浓度 FLC 染毒肝细胞 BRL-3A 后，细胞存活率分别为（91.4±4.2）%、（73.5±13.1）% 和（66.7±5.5）%（均 $P<0.05$）；10 μmol·L^{-1} 染毒细胞内 ROS 水平增高至（126.2±12.4）%（$P<0.05$）；1~100 μmol·L^{-1} 的 FLC 染毒后 *SOD2* 的 mRNA 表达降低至（29.8±2.1）%、（25.5±2.2）% 和（6.6±0.4）%，而 *GSH-Px* 的 mRNA 表达降低至（63.6±4.2）%，（49.9±4.1）% 和（26.5±2.1）%（$P<0.001$）；10、100 μmol·L^{-1} 浓度 FLC 分别促进细胞凋亡率达（2.2±0.1）、（12.5±0.8）倍，Bax 的蛋白表达增高至（1.2±0.1）、（1.4±0.1）倍（$P<0.001$），Bcl-2 的蛋白表达降低至（41.6±4.0）% 和（41.9±3.2）%（$P<0.001$），Bcl-2/Bax 值降低至（35.2±4.0）% 和（30.9±3.1）%（$P<0.001$），同时 Cox-3 的蛋白表达下调至（84.1±8.0）% 和（54.2±4.2）%。

[结论] FLC 对肝细胞 BRL-3A 具有明显的毒性效应，随浓度的升高而增强，其毒性机制可能是通过诱发肝细胞氧化损伤，进而促使细胞凋亡。

关键词：氟咯草酮；肝细胞；氧化应激；细胞凋亡；细胞毒性

Toxicity of fluorochloridone on BRL-3A cells

XUE Liming[1a,1b], XU Jiale[1a,1b], FENG Chao[1a,1b], QIU Xinlei[1a,1b], LIN Yuanjie[1a,1b], XU Qian[1a,1b], ZHOU Zhijun[2], LU Dasheng[1a,1b], WANG Guoquan[1a,1b] (1.a.Division of Chemical Toxicity and Safety Assessment b.State Environmental Protection Key Laboratory of Environmental Health Impact Assessment of Emerging Contaminants, Shanghai Municipal Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 200336, China; 2.School of Public Health, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Abstract:

[Background] Fluorochloridone (FLC) is a widely used herbicide. Previous studies have found that FLC has potential hepatotoxicity, but associated effects and mechanisms are rarely reported.

[Objective] This experiment explores the toxic effect and underlying mechanism of FLC on rat BRL-3A cells.

[Methods] BRL-3A cells were exposed to FLC (0.1, 1, 10, and 100 μmol·L^{-1}) for 24 h, then the 1, 10, and 100 μmol·L^{-1} FLC showed significant cytotoxicity by methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay and were used for further experiments. The levels of reactive oxygen species (ROS) in hepatocytes induced by FLC were detected by immunofluorescence. The mRNA expression levels of superoxide dismutase (SOD2) and glutathione peroxidase (GSH-Px) were detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The mortality and apoptosis rates of cells induced by FLC were detected by flow cytometry. The protein expression levels of

基金项目
上海市自然科学基金项目（18ZR1432200）；国家自然科学基金项目（81872643）；上海市卫生健康委项目（2020YZ001）

作者简介
薛黎明（1982—），男，博士，副主任技师；E-mail：xueliming@scdc.sh.cn

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

伦理审批 不需要
利益冲突 无申报
收稿日期 2020-12-03
录用日期 2021-02-15

文章编号 2095-9982(2021)06-0649-05
中图分类号 R114
文献标志码 A

▸引用
薛黎明，徐佳乐，冯超，等 . 氟咯草酮对肝细胞 BRL-3A 的毒性作用 [J] . 环境与职业医学，2021，38（6）：649-653.

▸本文链接
www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2021.20568

Funding
This study was funded.

Correspondence to
LU Dasheng, E-mail: ludasheng@scdc.sh.cn
WANG Guoquan, E-mail: wangguoquan@scdc.sh.cn

Ethics approval Not required
Competing interests None declared
Received 2020-12-03
Accepted 2021-02-15

▸To cite
XUE Liming, XU Jiale, FENG Chao, et al. Toxicity of fluorochloridone on BRL-3A cells[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2021, 38(6): 649-653.

▸Link to this article
www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2021.20569

cyclooxygenase-3 (Cox-3), as well as apoptosis-related proteins Bax and B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) were detected by Western blotting.

[Results] Compared with the control BRL-3A cells, the survival rates of cells exposed to 1, 10, and 100 μmol·L^{-1} FLC decreased by (91.4±4.2) %, (73.5±13.1) %, and (66.7±5.5) %, respectively (P<0.05). Exposure to 10 μmol·L^{-1} FLC increased the intracellular ROS level to (126.2±12.4) % (P<0.05). After the 1-100 μmol·L^{-1} FLC treatment, the mRNA expression levels of *SOD2* were decreased to (29.8±2.1) %, (25.5±2.2) %, and (6.6±0.4) %, and the mRNA expression levels of *GSH-Px* were decreased to (63.6±4.2) %, (49.9±4.1) %, and (26.5±2.1) %, respectively (P<0.001). The FLC exposure at 10 and 100 μmol·L^{-1} significantly elevated apoptosis rates to 2.2±0.1 and 12.5±0.8 times and the protein expression levels of Bax to 1.2±0.1 and 1.4±0.1 times of the control group (P<0.001), while decreased the protein expression levels of Bcl-2 to (41.6±4.0) % and (41.9±3.2) %, the ratio of Bcl-2/Bax to (35.2±4.0) % and (30.9±3.1) %, and the protein expression levels of Cox-3 to (84.1±8.0) % and (54.2±4.2) % respectively.

[Conclusion] FLC has a significant toxic effect on BRL-3A cells, and the effect increases with a higher FLC concentration. The toxic mechanism of FLC is to induce oxidative damage of hepatocytes, and then promote apoptosis.

Keywords: fluorochloridone; hepatocyte; oxidative stress; apoptosis; cytotoxicity

氟咯草酮（fluorochloridone，FLC）是一种芽前施用选择性除草剂[1]，进入我国市场后被广泛使用[2]，但对其毒性研究有限。根据2010年欧洲食品安全局（European food safety authority，EFSA）的报告，FLC具有雄性生殖毒性以及心血管系统毒性，不具有遗传毒性、致癌性或神经毒性[3]。FLC的雄性生殖毒性机制为通过促进睾丸支持-生精细胞的氧化应激水平和细胞凋亡水平，进而产生生殖毒性损害[4-5]。研究也发现FLC对雌性仓鼠卵巢细胞及蝌蚪具有遗传毒性[6-8]。目前缺乏系统研究FLC毒性作用的报道，其危害并未引起重视。对FLC亚慢性毒性试验发现其可导致大鼠肝脏系数、血液脂质及血糖水平等变化，FLC对肝脏损伤及肝功能代谢有一定影响，呈现一定肝毒性[9]。通过建立模拟肝细胞代谢的小鼠3T3细胞肝微粒孵育体系，考察FLC肝微粒体孵育后对于3T3细胞毒性，发现FLC的细胞毒性增加，表明FLC 经肝代谢后，毒性增强[10]。前期代谢组学结果发现500 mg·kg^{-1}剂量FLC灌胃暴露大鼠尿液中葡萄糖、甘露醇、乳酸、丙酮酸等能量代谢相关代谢物紊乱，导致机体能量代谢异常，表明FLC的毒性可能与肝脏能量代谢功能异常相关[9, 11]，而呈现肝毒性，但FLC体外对肝细胞的毒理作用研究尚未见报道。因此，本研究采用大鼠正常肝细胞BRL-3A作为研究模型，从细胞毒性、氧化损伤和细胞凋亡等角度考察FLC对肝细胞的毒性作用和机制。

1 材料与方法

1.1 材料

BRL-3A肝细胞系购自中国科学院细胞库。主要试剂：杜尔贝科改良伊格尔培养基（Dulbecco's modified Eagle medium，DMEM）完全培养基、磷酸盐缓冲液（phosphate buffered solution，PBS）、胰酶、胎牛血清（fetal bovine serum，FBS）、青霉素-链霉素双抗（美国Gibco），FLC（德国Dr.Ehrenstorfer GmbH），噻唑 蓝（methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide，MTT；美国Sigma），二甲基亚砜（dimethylsulfoxide，DMSO；中国国药集团化学试剂有限公司），活性氧（reactive oxygen species，ROS）检测试剂盒（中国碧云天生物技术有限公司），二喹啉甲酸（bicin choninic acid，BCA）蛋白定量试剂盒、放射免疫沉淀法（radio-immunoprecipitation assay，RIPA）细胞裂解液（美国Thermo Fisher），eBioscience膜联蛋白V（Annexin V）-异硫氰酸荧光素（fluorescein isothiocyanate，FITC）细胞凋亡试剂盒（美国Invitrogen），B淋巴细胞瘤-2（B-cell lymphoma-2，Bcl-2）抗体、Bax抗体（英国Abcam），环氧合酶-3（cyclooxygenase-3，Cox-3）抗体、甘油醛-3-磷酸脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase，GAPDH）抗体、核酸提取试剂盒、反转录试剂盒和扩增试剂盒（美国Thermo Fisher），锰超氧化物歧化酶（manganese superoxide dismutase，SOD2）、谷胱甘肽过氧化物酶（glutathione peroxidase，GSH-Px）和GAPDH引物由生工生物工程有限公司合成；96孔板、6孔板、15 mL离心管、25 cm^{2}培养瓶、75 cm^{2}培养瓶（美国Corning），刻度吸管、计数板（美国Bio-rad），1.5 mL离心管（美国Axygen），水相针式滤器（0.45 μm，中国安谱实验科技股份有限公司）。

1.2 仪器

主要仪器：CO_2培养箱（美国Thermo Scientific）、DMI3000倒置显微镜（德国Leica）、细胞计数仪（美国Bio-rad）、流式细胞仪（美国BD Biosciences）、酶标仪（瑞士Tecan）、水浴超声仪（美国BRANSON）。

1.3 BRL-3A细胞培养

将BRL-3A细胞用胰酶消化至70%脱落，加入培养基终止消化。吹打混匀后以5×10^{5}个·瓶$^{-1}$接种于含1%双抗、10% FBS的DMEM培养基中，37℃、5% CO_2孵育

培养，48 h后传代。

1.4 MTT细胞活性检测

取对数生长期细胞接种，以1×10^{4}个·孔$^{-1}$密度接种于96孔板，置于37°C、5% CO_2培养24 h。弃培养基，分别加入0.1 mL含0.1、1、10、100 μmol·L^{-1}的FLC培养基，继续培养24 h，每个浓度设立10个复孔。染毒完成后，每孔加入20 μL MTT溶液（5 mg·mL^{-1}），37°C孵育4 h。弃培养基，加入150 μL DMSO。完成后每轻轻振摇至晶体溶解，用多功能酶标仪测量490 nm处光密度。

1.5 细胞凋亡检测

取对数生长期细胞，以1×10^{5}个·孔$^{-1}$密度接种于6孔板，置于37 °C、5% CO_2培养24 h，加入含1、10、100 μmol·L^{-1}的FLC染毒24 h，按照Annexin V-FITC细胞凋亡试剂盒测定细胞凋亡率。用胰酶消化细胞，用标记荧光素FITC的Annexin V和碘化丙啶（propidium iodide，PI）染色，采用流式细胞仪测定细胞凋亡水平。

1.6 ROS水平检测

按照方法“1.5”染毒方法对细胞染毒，阳性对照孔中加入4-丁基过氧化氢（Rosup）作为阳性对照，染毒24 h后，采用试剂盒测定细胞内ROS水平。

1.7 *SOD2*、*GSH-Px*的mRNA表达检测

按照方法“1.5”染毒方法对细胞染毒24 h后，依据试剂盒说明书进行提取总RNA和反转录后，分别对*GAPDH*、*SOD2*和*GSH-Px*进行逆转录聚合酶链反应（reverse transcription-polymerase chain reaction，RT-PCR）扩增，引物序列见表1。PCR反应条件：采用预变性95°C 10 min，变性95°C 45 s，退火60°C 45 s，延伸72°C 50 s，循环40次，总反应体系10 μL。

表1 引物序列列表

Table 1 Primer sequences

基因	正向引物（5′-3′）	反向引物（5′-3′）
SOD2	GCCTCAGCAATGTTGTGTCG	ATTGTTCACGTAGGTCGCGT
GSH-Px	GACATCAGGAGAATGGCAAGAA	GTGGGATCGTCACTGGGTG
GAPDH	ACAGCAACAGGGTGGTGGAC	TTTGAGGGTGCAGCGAACTT

1.8 Bcl-2、Bax和Cox3蛋白表达检测

取对数生长期细胞，以2×10^{6}个·瓶$^{-1}$密度接种于75 cm^{2}培养瓶，置于37 °C、5% CO_2培养24 h，加入含1、10、100 μmol·L^{-1}的FLC染毒24 h，用预冷的PBS洗涤3遍，加入RIPA细胞裂解液，4°C下裂解30 min后，12 000×*g*离心10 min，取上清液，用BCA蛋白定量试剂盒进行蛋白定量。经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（sodium dodecyl sulfate-polyacryamide gel electropHoresis，SDS-PAGE）分离后，转移到聚偏氟乙烯（polyvinylidene fluoride，PVDF）膜，经5%脱脂牛奶封闭1 h，加入一抗Bcl-2、Bax和Cox3抗体，在4°C下孵育过夜，含0.05% Tween20的三羟甲基氨基甲烷缓冲液（tris buffered saline with Tween 20，TBST）洗3次；室温孵育二抗1 h，TBST洗3次，电化学发光法拍照，检测相关蛋白的位置和含量。

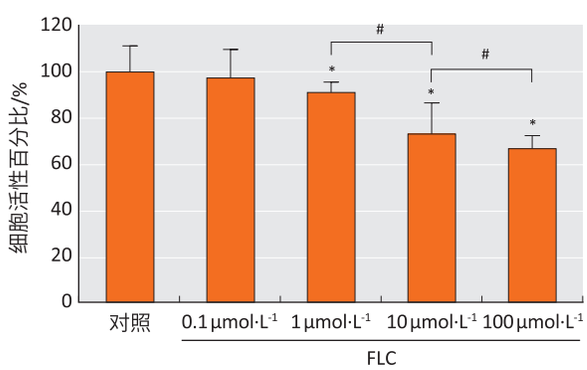
1.9 统计学分析

每组试验重复3次，结果采用平均值±标准差表示，统计分析均采用SPSS 18.0软件进行处理，多组间均数比较采用单因素方差分析（One-Way ANOVA），组间均数两两比较采用LSD-*t*检验。差异有统计学意义，检验水准α=0.05。

2 结果

2.1 细胞活性

如图1所示，在染毒剂量为0.1 μmol·L^{-1}时，染毒组与对照组之间BRL-3A细胞活性差异并无统计学意义（P>0.05）。1、10、100 μmol·L^{-1}组细胞活性较对照组明显下降（P<0.05），且呈现随浓度的升高而降低的趋势。



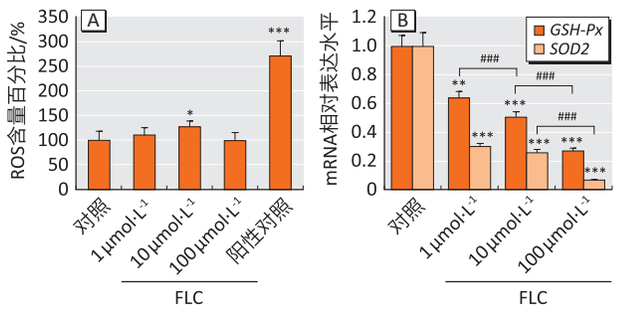
［注］*：与对照组相比，P<0.05；#：与10 μmol·L^{-1}相比，P<0.05。

图1 MTT法测定FLC对BRL-3A细胞存活率的影响（*n*=3）

Figure 1 Effect of FLC on the survival rate of BRL-3A cells by MTT assay (*n*=3)

2.2 ROS，*GSH-Px*、*SOD2*的mRNA水平

细胞内ROS结果如图2A所示。阳性对照组ROS提高至（270.4±30.4）%，说明试剂盒有效。染毒浓度1 μmol·L^{-1}时ROS含量为对照组的（110.3±15.4）%，100 μmol·L^{-1}时为（98.4±16.8）%，差异都不具有统计学意义（P>0.05），染毒浓度为10 μmol·L^{-1}时ROS含量升高至对照组的（126.2±12.4）%（P<0.05）。与对照组相比，各染毒组中*GSH-Px*和*SOD2*的mRNA表达量均有下调，差异具有统计学意义（P<0.05）（见图2B）。



[注] 与对照组相比，*：$P<0.05$；**：$P<0.01$；***：$P<0.001$。###：与 10 μmol·L^{-1} 相比，$P<0.001$。

图 2 FLC 染毒 BLR-3A 细胞中 ROS 水平 (A) 和 *GSH-Px* (B) 和 *SOD2* (B) 的 mRNA 相对表达含量 (n=3)

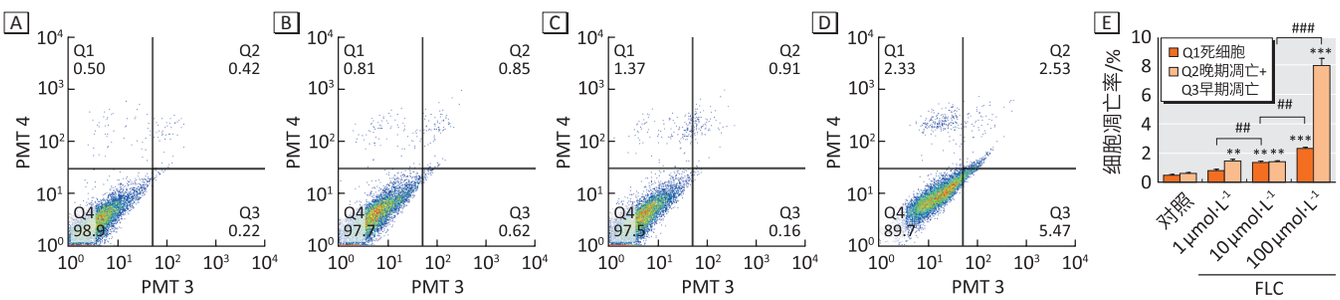
Figure 2 The levels of ROS (A) and *GSH-Px* (B) and *SOD2* (B) mRNA in BLR-3A cells exposed to FLC (n=3)

2.3 细胞凋亡

细胞凋亡检测结果如图 3A~3D 所示。随染毒剂量上升，细胞死亡率呈现逐渐升高的趋势：与对照组比较，1、10、100 μmol·L^{-1} 的 FLC 染毒组细胞死亡率分别升高至 (1.6±0.2)、(2.7±0.1) 和 (4.7±0.3) 倍；细胞凋亡率 (早期凋亡及晚期凋亡之和) 也上升 (图 3E)：与对照组比较，染毒组分别升高至 (2.3±0.2)、(2.2±0.1) 和 (12.5±0.8) 倍，与细胞活性 MTT 结果趋势一致。

2.4 Bcl-2、Bax 和 Cox3 蛋白表达水平

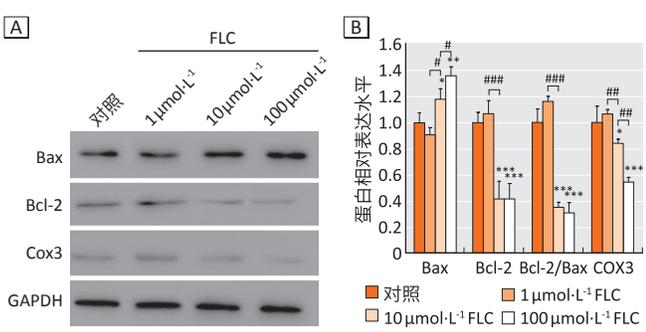
蛋白含量检测结果如图 4 所示。与对照组相比，10、100 μmol·L^{-1} 暴露组促凋亡蛋白 Bax 的蛋白表达增高至 (1.2±0.1) 和 (1.4±0.1) 倍 ($P<0.001$)，Bcl-2 的蛋白表达降低至 (41.6±4.0) % 和 (41.9±3.2) % ($P<0.001$)，Bcl-2/Bax 值降低至 (35.2±4.0) % 和 (30.9±3.1) % ($P<0.001$)。Cox3 表达在 10、100 μmol·L^{-1} 染毒浓度时下调至 (84.1±8.0) % 和 (54.2±4.2) %。



[注] A：对照组；B：1 μmol·L^{-1} FLC；C：10 μmol·L^{-1} FLC；D：100 μmol·L^{-1} FLC；E：细胞死亡和凋亡率。Q1：死细胞；Q2：晚期凋亡；Q3：早期凋亡；Q4：活细胞。与对照组相比，**：$P<0.01$；***：$P<0.001$。与 10 μmol·L^{-1} 组相比，##：$P<0.01$；###：$P<0.001$。

图 3 FLC 染毒对 BRL-3A 细胞凋亡水平流式细胞图像

Figure 3 Effect of FLC on apoptosis of BRL-3A cells by flow cytometry



[注] A：电泳条带图；B：相对灰度值统计图。与对照组相比，*：$P<0.05$；**：$P<0.01$；***：$P<0.001$。与 10 μmol·L^{-1} 组相比，#：$P<0.05$；##：$P<0.01$；###：$P<0.001$。

图 4 FLC 染毒 BLR-3A 细胞中 Cox3、Bcl-2 和 Bax 相对蛋白表达

Figure 4 Relative expression of Cox3, Bcl-2, and Bax proteins in BRL-3A cells exposed to FLC

3 讨论

肝脏是人体代谢毒性化合物的重要器官，肝细胞凋亡和氧化应激上升是肝细胞损伤的重要表现。线粒体功能调节细胞凋亡，机制是当线粒体不能产生足够的 ATP 而导致细胞功能衰退和死亡，而 ROS 引发的氧化应激是引起肝损伤的生理基础。体外研究也发现 FLC 可使睾丸支持 - 生精细胞共培养体系中的过氧化氢酶、超氧化物歧化酶、总谷胱甘肽过氧化物酶活性降低和凋亡线粒体通路中 *Bax*、*Cyt-c*、*Caspase-9* 和 *Caspase-3* 的 mRNA 表达升高[4-5]，本研究对大鼠肝细胞进行 FLC 染毒，考察了氧化应激和细胞凋亡通路相关指标的影响。结果表明，FLC 可抑制细胞活性，促进细胞凋亡，且呈现剂量依赖性。其中高剂量 100 μmol·L^{-1} FLC 暴露可以促进肝细胞凋亡，降低 Bcl-2/Bax 的表达比例，降低 *SOD2* 和 *GSH-Px* 的 mRNA 表达。

在通常情况下，少量的 ROS 能在机体中发挥生理功能，但在毒性化合物暴露时，大量产生的 ROS 会促使细胞凋亡。Bcl-2 蛋白可以抑制由毒物暴露引起的细胞凋亡，甚至死亡，增强细胞对 DNA 损伤因子的抵抗性，*Bcl-2* 基因的表达越高证明细胞对毒物的抵抗性越强。而 *Bax* 基因是最主要的凋亡基因，能拮抗 *Bcl-2* 基因的保护效果，促使细胞凋亡。*Bcl-2* 与 *Bax* 两基因之

间的比例关系决定了细胞凋亡的状态，Bcl-2/Bax值越高，抑制细胞凋亡作用越强。本研究结果发现，FLC染毒后，BLR-3A细胞Bax表达增加而Bcl-2表达被抑制，说明FLC确实能够导致肝细胞凋亡。

ROS异常增高使体内氧化与抗氧化作用失衡，导致中性粒细胞炎性浸润，产生大量氧化中间产物，从而导致组织损伤。SOD催化超氧阴离子自由基歧化生成氧和过氧化氢，在机体氧化与抗氧化平衡中起到至关重要的作用。SOD2主要存在于线粒体基质中，其表达以及活性的降低将导致对线粒体内产生的超氧离子的清除作用降低，从而导致线粒体DNA的过氧化损伤。GSH-Px是一种重要的过氧化物分解酶，催化GSH变为氧化型谷胱甘肽，使有毒的过氧化物还原成无毒的羟基化合物，保护细胞膜的结构及功能不受过氧化物的干扰及损害。本试验结果发现FLC染毒后，BLR-3A细胞中ROS含量升高，*SOD2*、*GSH-Px* mRNA表达降低，表明FLC能够促进肝细胞的氧化应激状态，引起肝损伤。Cox-3是一种新型Cox亚型结构，具有环氧合酶和过氧化物酶两种活性，具有抗炎作用，可降低ROS引起的炎症浸润，同时参与细胞凋亡[12-13]。本试验发现FLC染毒后BLR-3A细胞中Cox-3水平降低，进一步证实了FLC可引起细胞炎症损伤。

综上，本研究发现在100 μmol·L^{-1}的FLC剂量暴露时，大鼠肝细胞的细胞活性降低，细胞死亡率和凋亡率升高，氧化应激水平升高，表明FLC对肝细胞具有确切的毒性作用，而毒性机制可能是通过引起肝细胞的氧化损伤，进一步促进细胞凋亡和死亡。

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.
YANG J B，PANG H L，HUANG C Q. Synthesis of herbicide fluorochloridone [J]. Fine Chem Intermed，2005，35（4）：24-27.

[2] 刘诗宏，石劲敏，张素慧，等. 氟咯草酮生物毒性的研究现状 [J]. 环境与职业医学，2015，32（10）：987-989，996.
LIU S H，SHI J M，ZHANG S H，et al. Research status of biotoxicity caused by flurochloridone [J]. J Environ Occup Med，2015，32（10）：987-989，996.

[3] 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.

[4] 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.
WU S L，XU L R，ZHOU Z J. Effect of fluorochloridone on oxidative stress in primary co-cultured sertoli-germ cell of rat [J]. Chin J Ind Hyg Occup Dis，2016，34（11）：801-804.

[5] 宋晴雯，徐蕾蕊，常秀丽，等. 氟咯草酮诱导共培养大鼠睾丸支持-生精细胞凋亡及其可能机制 [J]. 环境与职业医学，2016，33（1）：18-23.
SONG Q W，XU L R，CHANG X L，et al. Potential mechanism of co-cultured sertolli-germ cells apoptosis induced by fluorochloridone [J]. J Environ Occup Med，2016，33（1）：18-23.

[6] NIKOLOFF N，SOLONESKI S，LARRAMENDY M L. Genotoxic and cytotoxic evaluation of the herbicide flurochloridone on Chinese hamster ovary（CHO-K1）cells [J]. Toxicol In Vitro，2012，26（1）：157-163.

[7] 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.

[8] NIKOLOFF N，NATALE G S，MARINO D，et al. Flurochloridone-based herbicides induced genotoxicity effects on *Rhinella arenarum* tadpoles（Anura：Bufonidae）[J]. Ecotoxicol Environ Saf，2014，100：275-281.

[9] ZHANG S，CHENG X，WANG Y，et al. Ninety day toxicity and toxicokinetics of fluorochloridone after oral administration in rats [J]. Int J Environ Res Public Health，2015，12（5）：4942-4966.

[10] 胡玥，周谖，刘诗宏，等. 人肝微粒-小鼠3T3细胞联合模型评价氟咯草酮代谢后的体外细胞毒性 [J]. 毒理学杂志，2017，31（5）：335-339.
HU Y，ZHOU S，LIU S H，et al. Evaluation of fluorochloridone metabolism-dependent cytotoxicity with human liver microsome and mouse 3T3 cell system [J]. J Toxicol，2017，31（5）：335-339.

[11] 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.
XUE L M，JIN Y E，ZHANG S H，et al. 1HNMR-based study on characteristic metabolites in urine of mice following 90d of flurochloridone exposure [J]. J Environ Occup Med，2020，37（3）：197-204.

[12] BOTTING R M. Mechanism of action of acetaminophen：is there a cyclooxygenase 3? [J]. Clin Infect Dis，2000，31 Suppl 5：S202-S210.

[13] 康星欣，蒋世云，徐丹，等. 环氧合酶3在抗炎方面的研究 [J]. 山东化工，2016，45（6）：33-37，40.
KANG X X，JIANG S Y，XU D，et al. Research on the anti-inflammatory of COX-3 [J]. Shandong Chem Ind，2016，45（6）：33-37，40.

（**英文编辑**：汪源；**责任编辑**：王晓宇）