

DOI:10.7524/AJE.1673-5897.20180316001

张宵月, 肖静, 徐苗苗, 等. PFOS致大鼠肝毒性及其作用机制研究[J]. 生态毒理学报, 2018, 13(6): 226-233

Zhang X Y, Xiao J, Xu M M, et al. The mechanism of PFOS inducing liver toxicity in rats [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2018, 13(6): 226-233 (in Chinese)

PFOS致大鼠肝毒性及其作用机制研究

张宵月, 肖静*, 徐苗苗, 彭美娟, 朱晓凡, 高尚, 张桃娜

南通大学公共卫生学院 职业卫生与环境毒理学教研室, 南通 226019

收稿日期: 2018-03-16 录用日期: 2018-06-20

摘要: 通过全氟辛烷磺酸(perfluorooctane sulfonate, PFOS)大鼠灌胃染毒实验评价 PFOS 对肝功能的影响, 探讨 PFOS 肝毒性反应的潜在机制与可能途径。将 Sprague Dawley (SD) 雄性大鼠随机分为 3 组, 分别以 $0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ PFOS 灌胃染毒 28 d。以 HE 和油红染色法观察大鼠肝脏形态改变。ELISA 法测定各组谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、谷草转氨酶(aspartate transaminase, AST)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)含量变化。化学比色法测定肝匀浆脂代谢水平和氧化产物含量。RT-PCR 法检测肝脏内氧化应激以及脂代谢相关基因表达水平。结果表明, PFOS 暴露大鼠体重显著降低而肝脏系数显著增加($P < 0.05$), 与对照组相比 PFOS 组血清肝功能酶均出现随 PFOS 浓度增加而升高($P < 0.05$)。同时大鼠肝脏谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-px)和丙二醛(malondialdehyde, MDA)水平在高剂量组显著升高($P < 0.05$), 超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)含量先显著升高($P < 0.05$)后显著降低($P < 0.05$)。且肝脏中脂代谢水平也随 PFOS 浓度的增加而出现显著改变($P < 0.05$)。PFOS 组基因表达均较对照组显著上升($P < 0.05$)。以上结果说明 PFOS 具有明显的肝毒性作用, 可影响肝脂代谢水平, 这可能与 PFOS 引起的氧化应激所导致的损伤有关。

关键词: PFOS; 雄性大鼠; 肝损伤; 氧化应激

文章编号: 1673-5897(2018)6-226-08 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

The Mechanism of PFOS Inducing Liver Toxicity in Rats

Zhang Xiaoyue, Xiao Jing*, Xu Miaomiao, Peng Meijuan, Zhu Xiaofan, Gao Shang, Zhang Taona
Department of Occupational Medicine and Environmental Toxicology, School of Public Health, Nantong University, Nantong 226019, China

Received 16 March 2018 accepted 20 June 2018

Abstract: In order to reveal the toxic effect of perfluorooctane sulphonic acid (PFOS) on SD male rats, the potential mechanisms and possible pathways of PFOS hepatotoxicity were investigated in this study. 30 male SD rats were randomly divided into three groups and 0, 5, 10 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ PFOS were gavaged continuously for 28 days. Morphological changes of the rats liver tissue were examined by HE and Oil red staining. The contents of alanine aminotransferase (ALT), aspartate transaminase (AST), alkaline phosphatase (ALP) in serum were determined by ELISA. The content of triglyceride (TG) and total cholesterol (TC) in the liver was measured by chemical colorimetry. Activity of superoxide dismutase (SOD) was determined by Xanthine oxidase kits and glutathione peroxidase (GSH-Px) was determined by DTNB directly. Malondialdehyde (MDA) in SD male rats was measured by

基金项目: 国家自然科学基金(81202228); 南通市科技项目(MS12016054); 南通大学大学生创新训练项目(2016106)

作者简介: 张宵月(1993-), 女, 硕士研究生, 研究方向为环境毒理学, E-mail: YUE984743632@163.com;

* 通讯作者 (Corresponding author), E-mail: dicp_1802@163.com

Glucosinolates barbituric kits. At the same time, real time fluorescence quantitative PCR was used to detect the levels of gene (*Nrf2*, *NQO1*, *HO-1*, *CD36* and *SREBP1c*) expression related to oxidative stress and lipid metabolism. The results demonstrated that body weight of rats exposed to $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ PFOS showed significant deterioration and the liver coefficient of rats exposed to $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ and $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ were significantly increased compared with the control in male rats ($P < 0.05$). Compared with the control, the levels of ALT, ALP and AST increased significantly ($P < 0.05$). Furthermore, the GSH-Px activity and MDA content in $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ PFOS exposure group and MDA content in $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ PFOS exposure group were significantly increased compared with the control in male rats ($P < 0.05$). While SOD activity was increased significantly in $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ PFOS group ($P < 0.05$) and was reduced significantly in $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ PFOS group ($P < 0.05$). In addition, the level of TG in liver was increased while TC was reduced in $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ PFOS group and increased significantly in $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ PFOS group ($P < 0.05$). Several genes related to oxidative stress and lipid metabolism such as *Nrf2*, *HO-1*, *CD36* and *SREBP1c* were significantly up-regulated in PFOS exposure groups. In conclusion, these results suggest that PFOS has obvious liver toxicity, which may affect the level of liver lipid metabolism. It may be related to the damage caused by PFOS-induced oxidative stress.

Keywords: PFOS; male rat; hepatic injury; oxidative stress

全氟辛烷磺酸(perfluorooctane sulfonate, PFOS)是全氟化合物的代表性化合物,具有良好的热及化学稳定性,自面世以来,被广泛应用于生产生活的诸多方面,如纺织、涂料、皮革、包装等^[1-2]。但同时以上稳定的性质也使PFOS进入环境后难以降解,并且能随环境介质的变化产生迁移和蓄积^[3]。人或生物体则可通过呼吸、饮食等因素间接或直接接触到PFOS,研究发现PFOS在生物体中能长期停留,并发挥毒性效应^[4]。目前已发现PFOS具有神经、生殖发育、免疫等多重器官毒性,其中又以肝脏毒性最为常见^[2,5-6]。作为主要的蓄积和效应器官,PFOS可引起肝细胞空泡出现,诱发肝肿大和肝细胞凋亡,同时导致肝糖脂代谢紊乱。有研究者提出这种干扰效果与PFOS对组成型雄甾烷受体(constitutive androstane receptor, CAR)、孕烷X受体(preg-nane X receptor, PXR)及肝X受体(liver X receptor, LXR)等核受体的过度激活有关^[7-8]。但也有实验证实,部分基因敲除动物和转染细胞中以上PFOS的诱导损害作用并未消失,进一步研究也表明PFOS对以上核受体的活化作用在不同种属动物及脏器间具有差异,因此有研究提出PFOS可能存在其他的调控方式^[9-10]。

氧化应激已被证实与化学性肝损伤、病毒性肝炎、肝纤维化及肝癌等多种肝脏病变有关。近年来,有研究表明PFOS可以通过氧化应激影响肝的脂肪代谢^[11],有学者认为这可能是由于PFOS激活了细胞的抗氧化机制,从而激活了调控脂肪生成的相关

基因,最终导致肝脂肪累积^[12],但是具体的机制还不明确。核转录因子E2相关因子2(Nuclear factor E2 related factor 2, Nrf2)作为细胞内一个重要的抗氧化信号分子,在保护细胞组织,对抗氧化损伤中有重要的作用。目前研究发现*Nrf2*在调节脂肪代谢过程中也扮演着重要的作用。Kitteringham等^[13]研究发现*Nrf2*敲除的成年小鼠肝脏内的脂质含量相对于野生型小鼠会有所降低。最近,也有研究报道了PFOS与*Nrf2*的关系。Shi等^[14]在研究中发现,斑马鱼胚胎可以通过激活*Nrf2*来对抗PFOS引起的氧化应激。Xu等^[15]发现PFOS可以通过Nrf2信号通路促进脂肪前体细胞的增殖分化。鉴于以上原因,我们拟通过动物实验考察PFOS对大鼠肝脏毒效应表现及对氧化应激相关分子的影响,借此探讨PFOS肝毒性反应的潜在机制与可能途径,为PFOS生态毒理学研究提供基础数据。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 试剂与仪器

试剂:全氟辛烷磺酸(Assay LC-MS 98%, Sigma-Aldrich公司,美国);RT-PCR试剂及引物(TaKa-Ra大连宝生物公司,中国);丙氨酸转氨酶试剂盒、谷草转氨酶试剂盒、碱性磷酸酶试剂盒(Applied Biosystems公司,美国);丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)试剂盒(碧云天生物研究所,中国);甘油三酯(triglyceride, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)(南京建成生物工程研究所);二喹啉甲酸(BCA)蛋白定量试剂盒(北京博迈德

科技发展有限公司);其他试剂均为国产分析纯。

仪器:5332型PCR仪(Eppendorf公司,德国)、MODEL550酶标仪(Bio-Rad公司,美国)、RM2126切片机(Leica公司,德国)、CK40显微镜(Olympus公司,日本)、CFI60数码相机(Nikon,日本)。

1.2 试验动物及染毒

考虑到文献报道中PFOS对雄性大鼠具有较为明显的毒性效应^[17],本次实验选用成年SD雄性大鼠30只,体重220~250g,上海西普尔必凯实验动物有限公司提供(SCXK沪2008-0016),实验室驯养1周后随机分为0 mg·kg⁻¹ PFOS(对照组)、5 mg·kg⁻¹ PFOS(低剂量组)和10 mg·kg⁻¹ PFOS(高剂量组)(*n*=10),灌胃染毒28 d。期间每周称重并于实验结束颈椎脱臼处死动物,采集血清及肝脏样本进行相关指标检测。动物饲养室温18~23℃,相对湿度45%~55%。实验期间自由饮水摄食。

1.3 指标检测

1.3.1 脏器系数

大鼠处死前称重,处死后用预冷生理盐水漂洗肝脏,滤纸吸干称取肝重计算脏器系数:脏器系数(%)=脏器重量(g)/大鼠体重(g)×100%。

1.3.2 肝脏病理观察

暴露结束后处死大鼠并取肝脏组织,制作冰冻切片进行油红染色,同时取肝组织用10%中性福尔马林溶液固定,常规脱水后石蜡包埋制备4 μm切片,HE染色后显微镜观察其病理学变化。

1.3.3 肝功能指标测定

大鼠下腔静脉取血后室温3 000 r·min⁻¹离心分离血清,ELISA试剂盒检测血清中谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)水平。

1.3.4 脂代谢和氧化还原水平的测定

处死大鼠后立即分离肝脏,精确称取100 mg肝组织,加入无水乙醇1 mL,制成10%匀浆。BCA蛋白定量试剂盒测定上清液蛋白浓度,化学比色法测定肝匀浆甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)水平,硫代巴比妥酸(TBA)法测定丙二醛(MDA)含量,黄嘌呤氧化酶法测定超氧化物歧化酶(SOD)含量,谷胱甘肽氧化酶活力的测定方法(DTNB直接法)测定谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)含量。

1.3.5 基因表达水平检测

大鼠处死后迅速剖腹摘取肝脏,称取100 mg肝组织,Trizol抽提总RNA,紫外分光光度计测定OD260/OD280比值以检验纯度,两步法进行反转录

和实时PCR。反应体系为10 μg·μL⁻¹ cDNA模板2 μL、10 μmol·L⁻¹引物各0.4 μL、2×SYBR 10 μL、ddH₂O补充总体积为20 μL。反应条件为95℃、5 s,退火温度65℃、30 s、72℃、30 s,反应40个循环计算相对表达量。基因引物设计如表1所示。

1.4 统计学分析

实验数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,用SPSS 24.0统计软件分析数据。采用单因素方差分析,方差齐性用Least-significant difference进行检验,组间比较用Student-Newman-Keuls法检验,*P*<0.05表示有显著性差异。

表1 基因引物设计

Table 1 Primer sequences of different gene detected by PCR

基因 Gene	引物 Primer sequence (5' to 3')
<i>Nrf2</i>	GCTATTTCCATTCCCGAGTTA ATTGCTGTCCATCTCTGTACAG
<i>NQO1</i>	CATCATTTGGGCAAGTCC ACAGCCGTGGCAGAACTA
<i>HO-1</i>	CTTCAGAAGGGTCAGGTGTCTC TGCTTGTTCGCTCTATCTCC
<i>CD36</i>	AAGCTATTGCGACATGATT CGAACACAGCGTAGATAGAC
<i>SREBP1c</i>	CGCTACCGTTCCTCTATCA AGTTTCTGGTTGCTGTGCTG
<i>β-Actin</i>	CAGTGTGGGTGACCCCGT CCCAGCCATGTACGTTGCTA

表2 全氟辛烷磺酸(PFOS)暴露对大鼠体重的影响
($\bar{x}\pm s$, *n*=10)

Table 2 Effect of perfluorooctane sulfonate (PFOS) exposure on body weight of male rats ($\bar{x}\pm s$, *n*=10)

暴露时间/d Exposure time/d	0 mg·kg ⁻¹	5 mg·kg ⁻¹	10 mg·kg ⁻¹
0	286.13±10.76	280.33±10.73	286.57±10.94
6	334.68±21.03	322.75±19.14	326.63±15.74
12	368.64±27.70	356.05±19.95	351.32±19.95
18	396.81±28.75	373.49±26.83	340.14±32.90* #
24	399.41±37.14	389.00±26.36	332.39±45.92* #
28	411.55±36.05	386.59±31.01	330.76±50.03* #

注:*表示与0 mg·kg⁻¹组相比 *P*<0.05, #表示与5 mg·kg⁻¹组相比 *P*<0.05。
Note: *indicates *P*<0.05 compared with 0 mg·kg⁻¹ group; # indicates *P*<0.05 compared with 5 mg·kg⁻¹ group.

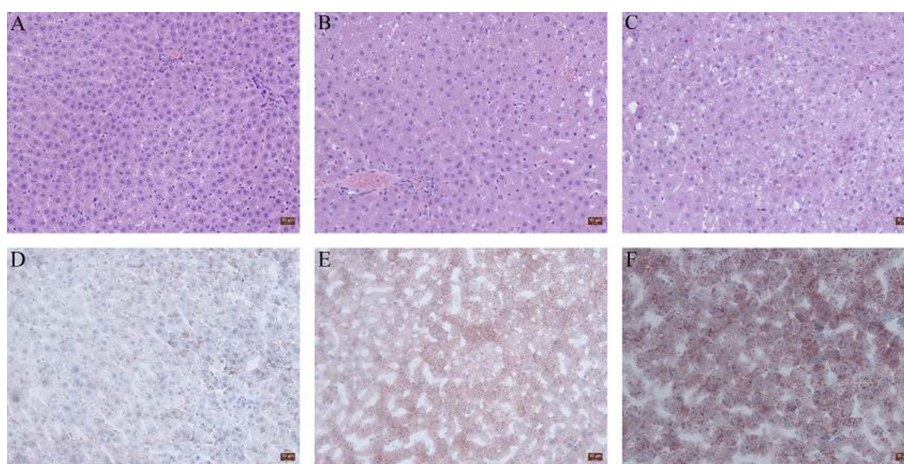


图1 PFOS对大鼠肝脏组织病理的影响

注:A~C为HE染色;D~F为油红染色。A和D为0 mg·kg⁻¹;B和E为5 mg·kg⁻¹;C和F为10 mg·kg⁻¹。标尺=10 μm。

Fig. 1 Effect of PFOS on liver tissue morphology of male rats

Note: A-C, HE staining; D-F, Oil red staining; A and D, 0 mg·kg⁻¹; B and E, 5 mg·kg⁻¹; C and F, 10 mg·kg⁻¹. Bar=10 μm.

表3 PFOS暴露对大鼠肝重和脏器系数的影响($\bar{x}\pm s$, $n=10$)
Table 3 Effect of PFOS exposure on liver weight and organ index of male rats ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别 Group	肝重/g Liver weight/g	肝脏系数/% Liver organ coefficient/%
0 mg·kg ⁻¹	15.32±1.43	3.73±0.28
5 mg·kg ⁻¹	20.20±2.61*	5.22±0.46*
10 mg·kg ⁻¹	17.96±3.74	5.51±0.60*

注:*表示与0 mg·kg⁻¹组相比 $P<0.05$ 。

Note: * indicates $P<0.05$ compared with 0 mg·kg⁻¹ group.

表4 PFOS暴露对大鼠血清肝代谢酶的影响($\bar{x}\pm s$, $n=6$)
Table 4 Effect of PFOS on liver metabolic enzyme activity in serum of male rats ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

处理组 Group	AST/(U·L ⁻¹)	ALT/(U·L ⁻¹)	ALP/(U·L ⁻¹)
0 mg·kg ⁻¹	133.42±16.25	40.36±10.24	183.87±20.03
5 mg·kg ⁻¹	163.84±11.43*	67.14±12.10*	231.32±19.87*
10 mg·kg ⁻¹	177.43±32.22*	92.09±22.22*#	279.09±28.5*#

注:AST、ALT和ALP分别表示血清中谷丙转氨酶、谷草转氨酶和碱性磷酸酶水平。*表示与0 mg·kg⁻¹组相比 $P<0.05$, #表示与5 mg·kg⁻¹组相比 $P<0.05$ 。

Note: AST stands for serum aspartate transaminase; ALT stands for serum alanine aminotransferase; ALP stands for serum alkaline phosphatase. * indicates $P<0.05$ compared with 0 mg·kg⁻¹ group; # indicates $P<0.05$ compared with 5 mg·kg⁻¹ group.

2 结果 (Results)

2.1 PFOS暴露对大鼠一般状况的影响

染毒初期,大鼠活动在三组间无明显异常,但随

染毒时间延长,PFOS组大鼠出现不同程度活动减缓、消瘦和毛发暗淡竖直,2周后个别大鼠出现腹泻、脱毛和易怒现象,尤以10 mg·kg⁻¹组大鼠更为典型。

如表2、3所示,实验第2周时,5 mg·kg⁻¹暴露组大鼠体重与0 mg·kg⁻¹组相比即出现降低,但差异并不显著($P>0.05$)。从第18天开始,10 mg·kg⁻¹暴露组大鼠体重显著降低,并呈现剂量反应关系($P<0.05$)。肝脏系数在整个试验期间,差异显著($P<0.05$)。

2.2 PFOS暴露对大鼠肝组织形态学的影响

如图1所示,大鼠大体解剖可见0 mg·kg⁻¹组大鼠肝脏色泽正常,表面光滑无结节,质地柔软,HE染色显示肝索排列规整,细胞核分布正常,胞质均匀。油红染色少见脂滴沉着。但PFOS暴露组大鼠肝脏质地较脆,颜色暗沉,边缘钝化且肝表面分布大小不同的黄色斑点。HE染色和油红染色结果显示PFOS组肝细胞出现不同程度肿胀和核的偏移,镜下可见细胞空泡和大小不等的脂滴出现,细胞内可见红色深染脂肪滴,10 mg·kg⁻¹组改变最明显。

2.3 PFOS暴露对大鼠血清中肝脏代谢酶水平影响

如表4所示,PFOS暴露造成ALT、AST、ALP水平显著上升($P<0.05$),其中ALT和ALP水平均随暴露浓度增高显著上升($P<0.05$),AST水平在PFOS各暴露组中均显著高于0 mg·kg⁻¹组($P<0.05$),但不同剂量组间差异并不显著($P>0.05$)。

2.4 PFOS暴露对大鼠匀浆氧化还原能力和脂代谢水平的影响

如表5所示,对各组大鼠肝细胞匀浆中氧化还

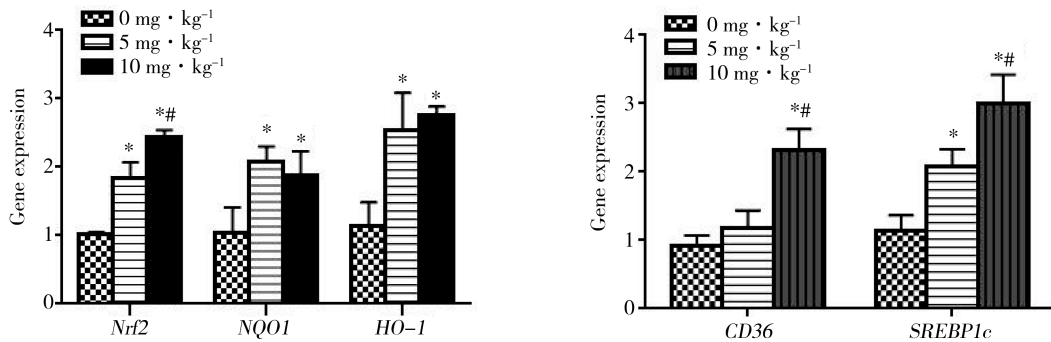


图2 PFOS暴露对基因表达水平影响($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

注: * 表示与 0 mg·kg⁻¹ 组相比 $P<0.05$, # 表示与 5 mg·kg⁻¹ 组相比 $P<0.05$ 。

Fig. 2 Effect of PFOS on expression of related gene ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Note: * indicates $P<0.05$ compared with 0 mg·kg⁻¹ group; # indicates $P<0.05$ compared with 5 mg·kg⁻¹ group.

原酶水平的检测发现, 5 mg·kg⁻¹ PFOS 暴露组大鼠肝脏 SOD 活性相对对照组显著增高, 但随着染毒剂量的增高又出现了显著降低($P<0.05$)。与 SOD 改变不同的是, GSH-Px 活性虽然随着 PFOS 剂量的增加而出现上升, 但仅在 10 mg·kg⁻¹ 有显著差异, MDA 水平改变与 GSH-Px 趋势类似, 在暴露组中随 PFOS 浓度增加 MDA 水平也随之显著升高($P<0.05$)。另外对肝脏匀浆中脂肪水平的检测发现, 与 0 mg·kg⁻¹ 组相比, 10 mg·kg⁻¹ 组无论是 TC 还是 TG 水平都出现了显著增高($P<0.05$), 同样的情况也出现在 5 mg·kg⁻¹ 组, 但差异并不显著($P>0.05$)。

2.5 PFOS 暴露对大鼠肝脏相关基因表达影响

如图 2 所示, 对肝脏中氧化应激相关的调控相关因子 *Nrf2* 表达水平进行检测发现, PFOS 暴露后大鼠肝脏 *Nrf2* 水平与 0 mg·kg⁻¹ 组相比分别上调了约 1.8 和 2.4 倍, 且随着暴露剂量增加差异更为显著, 同时 *Nrf2* 信号相关基因醌氧化还原酶抗体(Quinone oxidoreductase 1, NQO 1)和血红素氧合酶 1

(Hemeoxygenase 1, HO-1)的表达也在暴露后上调 2 倍左右, 但不同剂量组未见显著差异。同时, 脂代谢调控基因脂肪酸转移酶(Cluster of differentiation 36, CD36)和 SREBP1c 的表达也在 10 mg·kg⁻¹ 出现了显著增高, 尤其 SREBP1c 受 PFOS 影响更为显著, 表现出明显的剂量反应关系。

3 讨论 (Discussion)

PFOS 作为全氟化合物(perfluorocarbons, PFCs)的代表化合物, 对生殖发育、免疫神经等多器官间接或直接的损伤近年来备受关注, 尤其肝脏作为 PFOS 的蓄积器官, 关于 PFOS 所诱导的肝脏损伤常有报道, 但具体机制尚未完全清楚。本实验中发现 PFOS 暴露后大鼠 AST 等肝功能酶发生显著改变, 提示肝细胞膜结构和功能的损伤, HE 和油红染色病理结果也显示 PFOS 暴露组具有明显的肝脏形态异常, 这和其他啮齿类及鱼类等动物模型中得到的结论一致^[16-18]。同时我们还发现, 肝脏中 TC 和 TG

表 5 PFOS 暴露对大鼠肝组织中氧化还原酶和脂代谢的影响($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Table 5 Effect of PFOS on oxidoreductase and lipid metabolism in rat liver tissue ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

处理组	SOD	GSH-Px	MDA	TC	TG
Group	/(U·mg ⁻¹ pro)	/(U·mg ⁻¹ pro)	/(nmol·mg ⁻¹ pro)	/(mg·mg ⁻¹ pro)	/(mg·mg ⁻¹ pro)
0 mg·kg ⁻¹	89.63±10.00	104.64±21.50	3.00±0.58	3.37±0.44	6.09±0.83
5 mg·kg ⁻¹	117.76±17.83*	122.22±20.02	4.01±0.60*	3.21±0.39	6.90±1.22
10 mg·kg ⁻¹	66.04±18.11*#	155.28±29.05*	5.68±0.99*	3.95±0.34*	10.34±0.88*

注: * 表示与 0 mg·kg⁻¹ 组相比 $P<0.05$, # 表示与 5 mg·kg⁻¹ 组相比 $P<0.05$ 。SOD、GSH-Px、MDA、TC、TG 表示超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶、丙二醛、总胆固醇、甘油三酯。

Note: SOD, GSH-Px, MDA, TC and TG stand for superoxide dismutase, glutathione peroxidase, malondialdehyde, total cholesterol and triglyceride. * indicates $P<0.05$ compared with 0 mg·g⁻¹ group; # indicates $P<0.05$ compared with 5 mg·kg⁻¹ group.

的水平出现了显著的增高,在高剂量组中较为显著,这和 Cui 等^[16]研究结果一致,以上现象可能与 PFOS 对脂肪代谢途径中调控因子的影响有关。

本次实验中发现 PFOS 暴露能显著上调 *SREBP1c* mRNA 表达。这与 Lv 等^[17]在宫内暴露子鼠肝脏中发现的结果一致。SREBP 是位于内质网膜上一种膜连接蛋白,具有 3 种亚型,其中 SREBP 1c 证明在脂肪合成调节中发挥重要作用,能影响下游乙酰辅酶 A 羧化酶 1(Acetyl-CoA carboxylase 1, ACC1)、脂肪酸合成酶(Fatty acid synthetase, FAS)、硬脂酰辅酶 A 去饱和酶 1(Stearyl-CoA desaturase 1, SCD1)等重要脂代谢酶的表达,改变细胞炎症趋化因子配体 2(Inflammatory chemokine 2, CCL2)和成纤维细胞生长因子 21(Fibroblast growth factor-21, FGF21)水平,诱导肉毒碱棕榈酰基转移酶(Carnitine palmitoyltransferase 1 A, CPT1A)的表达改变,并能通过与胆固醇调节元件结合蛋白裂解激活蛋白(Sterol regulatory element binding proteins cleavage-activating protein, SCAP)的作用调控低密度脂蛋白受体(Low-density lipoprotein receptor, LDLR)及载脂蛋白 E(Apolipoprotein E, ApoE)等脂转运相关基因的表达,打破脂蛋白受体(Lipoprotein receptor)和 HMGCoA 还原酶(HMG-CoA reductase)的反馈平衡^[19-23]。这可能是造成 PFOS 组动物肝中 TG 和 TC 指标上升的原因之一。同时实验中也发现 PFOS 组抗氧化指标和机体抗氧化基因 *Nrf2* 的改变,也可能与这种脂代谢紊乱后机体被迫加速脂肪 β 氧化后产生大量活性氧(reactive oxygen species, ROS)有关。

Nrf2 是抗氧化酶表达过程中的关键调控因子,对平衡体内氧化-抗氧化系统,抵抗 ROS 导致的损害起到关键作用。当出现氧化应激、亲电子物质或者化学物质刺激时,*Nrf2* 可借助胞质接头蛋白(Kelch like ECH associated protein 1, Keap1)的构象改变来完成活化转核,与细胞核内小 Maf 蛋白结合形成二聚体,借此启动由抗氧化作用元件(Antioxidant response element, ARE)介导的 *HO1* 和 *NQO1* 等抗氧化反应,参与氧化应激状态下的细胞保护及修复过程^[24]。有研究表明,*Nrf2* 的表达可以引起肝脏脂质积聚^[25]。More 等^[26]在长期高脂饮食诱导的肥胖小鼠模型中发现,Keap1 敲除小鼠的肝脏中出现较野生型小鼠更加严重的脂质沉积。Pi 等^[27]在啮齿类动物实验中发现 *Nrf2* 可以转录调节过氧化物酶

体增植物激活受体 γ (PPAR- γ)和 CCAAT/增强子结合蛋白(CEBP)以增强脂肪前体细胞分化,从而导致脂质的合成增加。最近也有研究发现,在双酚 A (BPA)暴露的小鼠肝脏中,*Nrf2* 和 *SREBP1c* 共同参与了肝脏脂质的沉积,同时在 *Nrf2* 转染和萝卜硫素(*Nrf2* 激动剂)处理肝细胞中发现,*SREBP1c* 的表达会显著增加^[28]。以往研究中发现 PFOS 能够诱导细胞氧化应激出现,同时上调 *Nrf2* 及下游基因的表达。因此,我们推测 PFOS 导致的大鼠肝脏脂质沉积可能与 *Nrf2* 的激活有关。

同时也有研究表明,*Nrf2* 入核后通过与下游反应原件的结合,能够以不依赖过氧化物酶体增植物激活受体(Peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR)的方式上调 *CD36* 表达^[29]。本次结果中也发现 PFOS 暴露组 *CD36* 受到显著影响。*CD36* 属于 B 类清道夫受体家族,能识别包括氧化低密度脂蛋白(Low density lipoprotein, LDL)、长链脂肪酸(Long chain fatty acid, LCFA)、非修饰脂蛋白和淀粉样蛋白等在内的内源性配体,可由 ROS 激活其 3 个外显子的转录活性,参与由代谢过剩所触发的多器官慢性低丰度性炎症反应^[30]。*CD36* 可通过过氧化物酶 MPO-H₂O₂-NO₂ 系统,与 Toll 样受体(Toll-like receptor, TLR)TLR4 和 TLR6 结合成异三聚体,进入细胞膜和脂筏后募集形成 *CD36*/Lyn/TLRs 多聚体,影响脂质的摄取和转运^[31]。小鼠实验发现 *CD36* 表达改变能影响心肌、骨骼肌、脂肪等多个组织部位的脂肪储留,而不同药物或 RNA 干扰动物中上调或降低肝脏 *CD36* 表达可造成实验动物出现脂毒性及脂肪转运能力的改变^[32]。同时 *CD36* 能调控前炎症相关信号通路如核转录因子- κ B(Nuclear factor kappa B, NF- κ B)、核转录抑制因子(Inhibitory factor kappa B, $\text{i}\kappa$ B)和细胞外调节蛋白激酶 1/2(Extracellular regulated protein kinases 1/2, ERK1/2)的活化,调节粘附分子、趋化因子、炎症因子、一氧化氮合成酶(NOS)等分子表达改变,激活肝星状细胞诱发自身免疫,导致线粒体解偶联蛋白(Uncoupling protein, UCP)及脂肪酸合成酶 Fas 配体诱导活化,形成“二次打击”使肝脏损害呈现恶性循环^[33]。

综上所述,PFOS 具有明显的肝毒性作用,可导致肝脏形态异常并影响肝脂代谢水平,这可能与 PFOS 引起的氧化应激所导致的损伤有关。

通讯作者简介:肖静(1980—),女,环境卫生专业博士,副教

授,主要研究方向为环境内分泌干扰物。

参考文献 (References):

- [1] Liu B, Zhang H, Xie L, et al. Spatial distribution and partition of perfluoroalkyl acids (PFAAs) in rivers of the Pearl River Delta, southern China [J]. *Science of the Total Environment*, 2015, 524-525: 1-7
- [2] Mirallesmarco A, Harrad S. Perfluorooctane sulfonate: A review of human exposure, biomonitoring and the environmental forensics utility of its chirality and isomer distribution [J]. *Environment International*, 2015, 77: 148-159
- [3] Fromme H, Tittlemier S A, Völkel W, et al. Perfluorinated compounds—Exposure assessment for the general population in Western countries [J]. *International Journal of Hygiene Environmental Health*, 2009, 212(3): 239-270
- [4] Louis G M, Chen Z, Schisterman E F, et al. Perfluorochemicals and human semen quality: The LIFE study [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2015, 123(1): 57
- [5] Keil D E, Mehlmann T, Butterworth L, et al. Gestational exposure to perfluorooctane sulfonate suppresses immune function in B6C3F1 mice [J]. *Toxicological Sciences*, 2008, 103(1): 77-85
- [6] Zheng L, Dong G H, Jin Y H, et al. Immunotoxic changes associated with a 7-day oral exposure to perfluorooctanesulfonate (PFOS) in adult male C57BL/6 mice [J]. *Archives of Toxicology*, 2009, 83(7): 679-689
- [7] Elcombe C R, Elcombe B M, Foster J R, et al. Hepatocellular hypertrophy and cell proliferation in Sprague-Dawley rats from dietary exposure to potassium perfluorooctane sulfonate results from increased expression of xenosensor nuclear receptors PPAR α and CAR/PXR [J]. *Toxicology*, 2012, 293(1-3): 16-29
- [8] Ren H, Vallanat B, Nelson D M, et al. Evidence for the involvement of xenobiotic-responsive nuclear receptors in transcriptional effects upon perfluoroalkyl acid exposure in diverse species [J]. *Reproductive Toxicology*, 2009, 27(3): 266-277
- [9] Jacquet N, Maire M, Landkocz Y, et al. Carcinogenic potency of perfluorooctane sulfonate (PFOS) on Syrian hamster embryo (SHE) cells [J]. *Archives of Toxicology*, 2012, 86(2): 305-314
- [10] Abbott B D, Wolf C J, Das K P, et al. Developmental toxicity of perfluorooctane sulfonate (PFOS) is not dependent on expression of peroxisome proliferator activated receptor-alpha (PPAR α) in the mouse [J]. *Reproductive Toxicology*, 2009, 27(3): 258-265
- [11] Zhang H, Shi Z, Liu Y, et al. Lipid homeostasis and oxidative stress in the liver of male rats exposed to perfluorododecanoic acid [J]. *Toxicology Applied Pharmacology*, 2008, 227(1): 16-25
- [12] Wan H T, Zhao Y G, Wei X, et al. PFOS-induced hepatic steatosis, the mechanistic actions on β -oxidation and lipid transport [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2012, 1820(7): 1092-1101
- [13] Kitteringham N R, Abdullah A J, Randle L, et al. Proteomic analysis of Nrf2 deficient transgenic mice reveals cellular defence and lipid metabolism as primary Nrf2-dependent pathways in the liver [J]. *Journal of Proteomics*, 2010, 73(8): 1612-1631
- [14] Shi X, Zhou B. The role of Nrf2 and MAPK pathways in PFOS-induced oxidative stress in zebrafish embryos [J]. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, 2010, 115(2): 391
- [15] Xu J, Shimpi P, Armstrong L, et al. PFOS induces adipogenesis and glucose uptake in association with activation of Nrf2 signaling pathway [J]. *Toxicology & Applied Pharmacology*, 2015, 290: 21-30
- [16] Cui L, Zhou Q F, Liao C Y, et al. Studies on the toxicological effects of PFOA and PFOS on rats using histological observation and chemical analysis [J]. *Archives of Environmental Contamination & Toxicology*, 2009, 56(2): 338
- [17] Lv Z, Li G, Li Y, et al. Glucose and lipid homeostasis in adult rat is impaired by early - life exposure to perfluorooctane sulfonate [J]. *Environmental Toxicology*, 2013, 28(9): 532-542
- [18] Wang L, Wang Y, Liang Y, et al. PFOS induced lipid metabolism disturbances in BALB/c mice through inhibition of low density lipoproteins excretion [J]. *Scientific Reports*, 2014, 4(1): 4582
- [19] Bai X, Hong W, Cai P, et al. Valproate induced hepatic steatosis by enhanced fatty acid uptake and triglyceride synthesis [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2017, 324: 12
- [20] Wang W D, Wang J, Fan L L, et al. SREBP-1c knock-down attenuated fatty degeneration in hepatic L02 cells and inhibited CCL2 and FGF21 protein expression [J]. *Chinese Journal of Hepatology*, 2011, 19(9): 664-669
- [21] Zhang Y, Tian M, Ling Z, et al. Xylometal B attenuates fatty acid-induced lipid accumulation via the SREBP-1c pathway in NAFLD models [J]. *Marine Drugs*, 2017, 15(6): 163
- [22] Zhang K, Chen Y, Zhang T, et al. A novel role of Id₁ in regulating oscillatory shear stress-mediated lipid uptake in endothelial cells [J]. *Annals of Biomedical Engineering*,

- 2018, 46(6): 849-863
- [23] Htm H, Ha N C, Thom L T, et al. Squalene promotes cholesterol homeostasis in macrophage and hepatocyte cells via activation of liver X receptor (LXR) α and β [J]. *Biotechnology Letters*, 2017, 39(8): 1-7
- [24] Chambel S S, Santosgonçalves A, Duarte T L. The dual role of Nrf2 in nonalcoholic fatty liver disease: Regulation of antioxidant defenses and hepatic lipid metabolism [J]. *Biomed Research International*, 2015, 2015(10): 597134
- [25] Schneider K S, Chan J Y. Emerging role of Nrf2 in adipocytes and adipose biology [J]. *Advances in Nutrition*, 2013, 4(1): 62
- [26] More V R, Xu J, Shimpi P C, et al. Keap1 knockdown increases markers of metabolic syndrome after long-term high fat diet feeding [J]. *Free Radical Biology & Medicine*, 2013, 61(8): 85-94
- [27] Pi J, Leung L, Xue P, et al. Deficiency in the nuclear factor E2-related factor-2 transcription factor results in impaired adipogenesis and protects against diet-induced obesity [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(12): 9292
- [28] Shimpi P C, More V R, Paranjpe M, et al. Hepatic lipid accumulation and Nrf2 expression following perinatal and peripubertal exposure to Bisphenol A in a mouse model of nonalcoholic liver disease [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2017, 125(8): 87005
- [29] Olagnier D, Lavergne R A, Meunier E, et al. Nrf2, a PPAR γ alternative pathway to promote CD36 expression on inflammatory macrophages: Implication for malaria [J]. *Plos Pathogens*, 2011, 7(9): e1002254
- [30] Kiyani Y, Tkachuk S, Hilfikerkleiner D, et al. oxLDL induces inflammatory responses in vascular smooth muscle cells via urokinase receptor association with CD36 and TLR4 [J]. *Journal of Molecular & Cellular Cardiology*, 2014, 66(1): 72-82
- [31] Kang L L, Zhang D M, Ma C H, et al. Cinnamaldehyde and allopurinol reduce fructose-induced cardiac inflammation and fibrosis by attenuating CD36-mediated TLR4/6-IRAK4/1 signaling to suppress NLRP3 inflammasome activation [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 27460
- [32] Glatz J F, Angin Y, Steinbusch L K, et al. CD36 as a target to prevent cardiac lipotoxicity and insulin resistance [J]. *Prostaglandins Leukotrienes & Essential Fatty Acids*, 2013, 88(1): 71-77
- [33] Ferrari D, Speciale A, Cristani M, et al. Cyanidin-3-O-glucoside inhibits NF-kB signalling in intestinal epithelial cells exposed to TNF- α and exerts protective effects via Nrf2 pathway activation [J]. *Toxicology Letters*, 2016, 264: 51-58 ◆