

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20200320001

郑璐, 潘一帆, 秦会, 等. 全氟辛烷磺酸(PFOS)对人骨髓间充质干细胞 PPARs 亚型及分化潜能的影响[J]. 生态毒理学报, 2021, 16(2): 151-157
Zheng L, Pan Y F, Qin H, et al. Interference of perfluorooctane sulfonate (PFOS) on PPARs subtypes and differentiation potential in human bone marrow mesenchymal stem cells [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2021, 16(2): 151-157 (in Chinese)

全氟辛烷磺酸 (PFOS) 对人骨髓间充质干细胞 PPARs 亚型及分化潜能的影响

郑璐, 潘一帆, 秦会, 张疆雨, 刘薇*

大连理工大学环境学院, 工业生态与环境工程教育部重点实验室, 大连 116024

收稿日期: 2020-03-20 录用日期: 2020-06-08

摘要: 过氧化物酶体增殖物激活受体(peroxisome proliferators-activated receptors, PPARs)是全氟辛烷磺酸(perfluorooctane sulfonate, PFOS)的首要分子靶标,但 PPARs 各亚型在 PFOS 毒性效应中可能产生不同调控作用,相关机理并不清楚。本研究采用人骨髓间充质干细胞体外分化模型,研究 PFOS 暴露对 PPARs 亚型的干扰,及其与细胞分化之间的关联。结果显示,PFOS 在 0.1、1 和 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下诱导 *PPAR α* 、*PPAR β* 和 *PPAR γ* 的 mRNA 表达水平上调,在 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下分别最高上调至对照组的 6.31 倍、6.44 倍和 15.4 倍。与 *PPAR γ* 激活一致,PFOS 促进细胞成脂分化,脂质形成升高。同时,PFOS 暴露抑制细胞成骨分化,钙结节形成下降,成骨分化早期标志物基因 Runt 相关转录因子 2(runt-related transcription factor 2, Runx2)和碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)表达下调。此外,PFOS 作用下,细胞基因表达谱中差异表达基因的富集分析显示,受干扰的通路主要涉及细胞分化、骨代谢和脂质代谢相关通路。相反,PFOS 暴露使骨保护素的 mRNA 水平升高,与 *PPAR β* 上调一致。研究结果提示,PFOS 对 PPARs 各亚型的激活在对干细胞分化的干扰效应中可能产生不同的作用,有必要进一步研究,以深入理解全氟多氟烷基化合物的毒性机制。

关键词: 全氟辛烷磺酸; 干细胞; 过氧化物酶体增殖物激活受体; 多向分化潜能

文章编号: 1673-5897(2021)2-151-07 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Interference of Perfluorooctane Sulfonate (PFOS) on PPARs Subtypes and Differentiation Potential in Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells

Zheng Lu, Pan Yifan, Qin Hui, Zhang Jiangyu, Liu Wei*

Key Laboratory of Industrial Ecology and Environmental Engineering of Ministry of Education, School of Environmental Science and Technology, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China

Received 20 March 2020 accepted 8 June 2020

Abstract: Peroxisome proliferators-activated receptors (PPARs) are the primary targets of perfluorooctane sulfonate (PFOS). However, three subtypes of PPARs may exert diverse effects on the toxic response induced by PFOS, whereas related mechanism remains unclear. In the present study, an *in vitro* differentiation model of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells (hBMSCs) was employed to evaluate the interference of PFOS exposure

基金项目: 国家重点研发计划项目(2016YFC0401108); 国家自然科学基金资助项目(21777020)

第一作者: 郑璐(1993—), 女, 硕士, 研究方向为干细胞环境毒理学, E-mail: zhenglulu@mail.dlut.edu.cn

* 通讯作者 (Corresponding author), E-mail: liu_wei@dlut.edu.cn

on PPARs subtypes and the association with abnormal cell differentiation. The results showed that PFOS induced upregulation of mRNA expression of *PPAR α* , *PPAR β* , and *PPAR γ* at concentrations of 0.1, 1 and 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, up to 6.31 folds, 6.44 folds, and 15.4 folds in the treatment group of 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ of PFOS compared to vehicle control. Being consistent with *PPAR γ* activation, PFOS promoted adipogenic differentiation and increased lipid formation in hBMSCs. Meanwhile, PFOS exposure inhibited osteogenic differentiation, decreased calcium nodule formation, and reduced the expression of runt-related transcription factor 2 (Runx2) and alkaline phosphatase (ALP), which are the marker genes of early osteogenic differentiation. In addition, the enrichment analysis of differentially expressed genes affected by PFOS in the gene profile of hBMSCs revealed that the disturbed pathways were mainly related to cell differentiation, bone metabolism and lipid metabolism. In contrast, PFOS exposure increased the mRNA expression of osteoprotectin, consistent with the upregulation of *PPAR β* . The results demonstrate that the activation of PPARs subtypes by PFOS may exert different effects on stem cell differentiation. Further research is necessary to gain an insight to understand the toxicity mechanism of per- and polyfluoroalkyl compounds.

Keywords: PFOS; stem cells; peroxisome proliferator-activated receptors; multidirectional differentiation potential

全氟辛烷磺酸(perfluorooctane sulfonate, PFOS)具有良好的热稳定性、疏水和疏油等特殊的理化性质,曾被广泛用于工业和民用领域数十年^[1-2]。PFOS具有环境持久性、高生物累积性、远距离迁移性和多种毒性作用^[3],在地表水、底泥和灰尘等多种环境介质以及人体中均检测到PFOS,对生态环境和人类健康造成严重威胁。因此,2009年5月斯德哥尔摩公约正式将PFOS列入持久性有机污染物名单^[4]。目前环境残留是PFOS的重要暴露来源,PFOS的毒性机理研究对于其他全氟及多氟烷基化合物(per- and polyfluoroalkyl substances, PFASs)的研究具有重要参考价值。

由于PFOS与过氧化物酶体增殖物激活受体(peroxisome proliferators-activated receptors, PPARs)的天然配体脂肪酸的结构相似,使得PPARs成为其毒性作用的首要分子靶标^[5],PPARs包括*PPAR α* 、*PPAR β* 和*PPAR γ* 这3种亚型。动物实验发现*PPAR α* 是PFASs对啮齿类动物的主要靶标,是诱导肝肿瘤的重要机制,但人体*PPAR α* 的敏感性明显低于啮齿类动物^[6],因此根据动物实验结果评估PFASs的健康风险具有较强的不确定性。此外,PPARs各亚型在调控细胞分化中起到不同甚至相反的作用。*PPAR γ* 为脂肪形成的主要调节剂,其表达可促进干细胞/祖细胞的成脂分化并抑制其成骨分化,从而增加细胞脂质水平并减少骨形成^[7]。此外,*PPAR γ* 激活可促进破骨作用。因此*PPAR γ* 在调节骨量和骨代谢中也起到重要作用。与*PPAR γ* 相反,*PPAR β* 作为骨转换的关键调节因子,其被激活而抑制成骨细胞介导的破骨细胞生成^[8]。因此,研究

PFOS与PPARs的相互作用,对于阐明其分子毒理学机制和毒性预测具有重要意义。

传统毒理学评价动物模型存在伦理学限制、种属差异和效率低等局限性,肿瘤细胞体外毒性测试体系受异常细胞周期调控等因素影响。人干细胞具有自我更新和多向分化能力,相比动物体内实验和动物细胞模型与人体健康相关性更强^[9-10]。笔者前期研究发现PFOS在人骨髓间充质干细胞(human bone marrow-derived mesenchymal stem cells, hBMSCs)定向分化条件下,抑制细胞成骨分化,刺激成脂分化,与流行病学调查发现PFOS与骨密度降低以及骨质疏松症相关的结果一致,提示PFOS对hBMSCs分化的影响研究可准确有效识别该类污染物的毒性机理^[11-12]。本研究采用hBMSCs成骨/成脂双向分化模型,研究PFOS暴露对PPARs各亚型的干扰,及其与干细胞成骨/成脂分化平衡的关联。研究结果可为揭示PFASs的毒性机理和分子靶标及其健康风险评估提供理论依据。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 试剂材料

PFOS($\text{C}_8\text{F}_{17}\text{KO}_3\text{S}$)、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)、地塞米松、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(3-isobutyl-1-methylxanthine, IBMX)、吡啶美辛、茜素红S、油红O、十六烷基氯化吡啶和罗格列酮(rosiglitazone, ROSI)购自Sigma-Aldrich。重组人骨形态发生蛋白(recombinant human bone morphogenetic protein 2, BMP2)购自PeproTech。异丙醇购自天津科密欧化学试剂厂。CCK-8试剂盒购自碧云天生物。总

RNA 急速提取试剂盒购自上海飞捷生物技术有限公司。反转录试剂盒和 SYBR 荧光染料 qPCR 试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司。

1.2 仪器

CO₂ 细胞培养箱 (NU-4750E, NUAIRE, 美国); 光学显微镜 (YS100, Nikon, 日本); 全自动酶标仪 (Infinite 200 PRO, Tecan, 奥地利); 高速冷冻离心机 (Microfuge 20R, Beckman Coulter, 美国); 荧光定量 PCR 仪 (Stepone Plus, Applied Biosystems, 美国)。

1.3 细胞培养和暴露

hBMSCs、基础培养基和成骨诱导分化培养基购自赛业生物科技有限公司。细胞在 37 °C 和 5% CO₂ 条件细胞箱中培养, 在实验室增殖培养至第 6 代用于本研究。根据流行病学调查中一般人群和职业暴露人群的血液 PFOS 浓度设定细胞实验暴露浓度范围。例如, 中国上海 299 名孕妇脐带血的血浆中 PFOS 的最高浓度为 0.12 μmol·L⁻¹[13]; 美国 773 名成年人血清中 PFOS 的算数平均浓度为 0.36 μmol·L⁻¹[14]; 在位于湖北省的中国最大的 PFOS 相关产品生产工厂之一, 36 个工人血清样本中检测到 PFOS 的几何平均浓度为 2.58 μmol·L⁻¹[15]。因此, 本研究选择 PFOS 暴露浓度为 0.1、1 和 10 μmol·L⁻¹, 具有良好的人体暴露相关性。未分化细胞经 PFOS 暴露 7 d 后, 测定细胞活性和关键基因表达水平。

1.4 细胞活性测定

将 hBMSCs 以 4 000 个·孔⁻¹ 的密度接种于 96 孔板中, 每组设置 3 个平行。在 CO₂ 细胞培养箱中培养 24 h 后, 换用含体积比为 0.1% DMSO 的溶剂对照培养基以及含 PFOS 的暴露培养基, 每 3 d 更换暴露液。使用 CCK-8 试剂盒检测细胞活性, 根据公式计算细胞活性: 细胞活性 = (暴露组吸光度 - 空白对照组吸光度) ÷ (溶剂对照组吸光度 - 空白对照吸光度)。

1.5 成骨/成脂双向诱导分化

作为成骨细胞和成脂细胞共同的祖细胞, hBMSCs 的成骨和成脂分化之间相互制约抗衡, 通过分化平衡维持骨骼素态, hBMSCs 双向诱导分化是一种常用的干细胞生物学模型, 适合于研究外源化学物质对细胞分化的影响[16-17]。本研究采用成骨/成脂双向诱导分化体系, 研究 PFOS 对成骨成脂分化平衡的影响。采用成骨诱导因子 BMP2 和成脂诱导因子 ROSI 作为阳性对照。hBMSCs 汇合度达 100% 以上后分别换用含 0.1% DMSO、200 ng·mL⁻¹

BMP2、500 nmol·L⁻¹ ROSI 或 PFOS 的成骨/成脂双向诱导培养基, 混合培养基包含体积比为 1:1 的成骨诱导培养基(赛业)和成脂诱导培养基(低糖基础培养基、10% 胎牛血清、1% 青链霉素、0.5 mmol·L⁻¹ IBMX、0.5 μmol·L⁻¹ 地塞米松和 50 μmol·L⁻¹ 吡哆美辛), 每 3 d 更换暴露液, 共暴露 14 d。在细胞分化第 14 天, 分别通过钙结节形成和脂质形成表征成骨分化和成脂分化水平。用茜素红染色的方法表征钙结节形成。吸去暴露液, 用磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 洗涤。使用体积比为 70% 的乙醇固定细胞 1 h 后, 再次用 PBS 洗涤, 用 40 mmol·L⁻¹ 茜素红染液染色细胞 20 min, 用 PBS 冲洗。加入 10% 氯化十六烷基吡啶萃取 20 min, 将萃取溶液加入 96 孔板中, 用酶标仪在 584 nm 检测吸光度。

用油红 O 染色表征脂质形成。吸去暴露液, 用 PBS 洗涤。使用 4% 甲醛固定细胞 30 min 后, 再次用 PBS 洗涤, 用油红 O 染液染色细胞 30 min, 用 PBS 冲洗。加入异丙醇萃取 20 min, 将萃取溶液加入 96 孔板中, 用酶标仪在 584 nm 检测吸光度。

1.6 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR)

将 hBMSCs 以 8×10⁴ 个·孔⁻¹ 的密度接种于 6 孔板中, 每组设置 3 个平行。接种 48 h 后将基础培养基分别更换为含 0.1% DMSO 的溶剂对照培养基或含 PFOS 的暴露培养基, 每 3 d 更换暴露液。暴露 7 d 后, 使用总 RNA 急速提取试剂盒进行 RNA 抽提。以总 RNA 为模板, 使用反转录试剂盒进行反转录, 反应条件为: 42 °C 孵育 15 min, 85 °C 加热 5 s。引物由上海生工合成, 以 cDNA 为模板进行 PCR 反应, 反应条件为: 94 °C, 30 s; 94 °C, 5 s; 60 °C, 15 s; 72 °C, 10 s。每个平行样本 3 个复孔进行 RT-qPCR 分析。以 GAPDH 基因为内参基因, 对目的基因进行标准化, 用 StepOne 软件进行 C_T 值分析, 用 2^{-ΔΔC_T} 法计算基因相对表达倍数。

1.7 基因芯片分析

细胞经 0.1 μmol·L⁻¹ PFOS 或 0.1% DMSO 连续暴露 7 d 后, 使用 TRIzol 提取细胞总 RNA, 按照 Affymetrix 表达谱芯片的标准流程由上海伯豪生物公司进行微阵列测定[12]。筛选差异表达基因的标准为 P<0.05 且 log₂(表达差异倍数)>0.3。使用基因富集分析 (Gene Set Enrichment Analysis, GSEA) 对差异表达基因进行分析, 识别 PFOS 影响的生物学通路。原始数据已上传至 GEO 数据库 (GSE115836)。

1.8 统计分析

数据结果用平均值±标准误差表示,采用 SPSS 统计分析软件进行单因素方差分析(One-Way ANOVA)。用 GSEA 筛选差异表达基因和通路富集。“*、**”表示两组之间有显著性差异($P<0.05$ 、 $P<0.01$)。

2 结果 (Results)

2.1 PFOS 对 hBMSCs 未分化条件下 PPARs 各亚型 mRNA 表达水平的影响

在 $0.1 \sim 10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度范围内,PFOS 暴露 7 d 对细胞增殖未产生显著性影响,细胞存活率均 $>90\%$ (图 1)。因此,选择 $0.1 \sim 10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 作为后续研究的 PFOS 暴露浓度,可避免细胞毒性对机理研究的干扰。在对细胞增殖未产生显著性影响的浓度下,PFOS 暴露诱导 hBMSCs 细胞中 *PPAR α* 、*PPAR β* 和 *PPAR γ* 表达上调(图 2)。在 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PFOS 作用下,PPAR 各亚型 mRNA 表达上调幅度最大,分别上调至对照组的 6.31 倍、6.44 倍和 15.4 倍。其中, *PPAR γ* 显著上调,由于 *PPAR α* 和 *PPAR β* 误差较大,与对照组差异不显著($P>0.05$)。

2.2 PFOS 对 hBMSCs 分化关键调控基因 mRNA 表达水平的影响

ALP 和 *Runx2* 均为成骨分化早期的标志性基因,经 PFOS 暴露 7 d 后,细胞 *ALP* 和 *Runx2* 的 mRNA 表达水平下降(图 3)。PFOS 在 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下产生的抑制作用最强, *ALP* 和 *Runx2* 的 mRNA 表

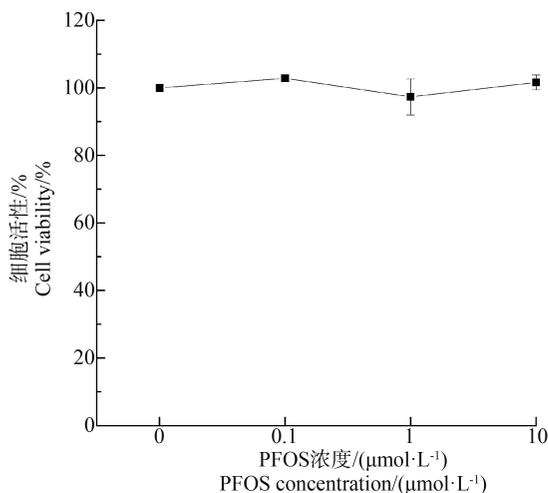


图 1 未分化 hBMSCs 暴露于全氟辛酸磺酸 (PFOS) 7 d 后的细胞存活率

Fig. 1 Cell viability of un-induced hBMSCs after 7 d of perfluorooctane sulfonate (PFOS) exposure

达水平分别下调至对照组的 50.2% 和 67.4%, 但差异不显著($P>0.05$)。

与 *ALP* 和 *Runx2* 相反,PFOS 暴露使 *OPG* 的 mRNA 表达水平升高。在 $0.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PFOS 作用下, *OPG* 表达水平升高至对照组的 2.62 倍,且差异显著($P<0.05$)。

2.3 PFOS 对 hBMSCs 成骨/成脂分化表型标志物的影响

进一步研究 PFOS 暴露对 hBMSCs 成骨/成脂分

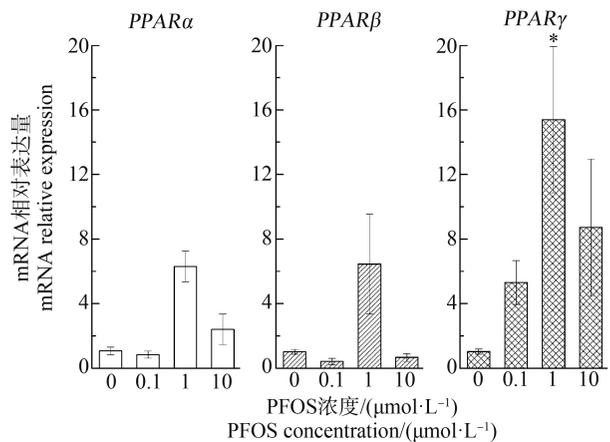


图 2 PFOS 暴露 7 d 对未分化 hBMSCs 中 *PPAR α* 、*PPAR β* 和 *PPAR γ* mRNA 表达水平的影响

注:与对照组相比,* $P<0.05$ 。

Fig. 2 Effects of PFOS on mRNA expressions of *PPAR α* , *PPAR β* , and *PPAR γ* after 7 d of exposure in un-induced hBMSCs

Note: Compared with the control, * $P<0.05$.

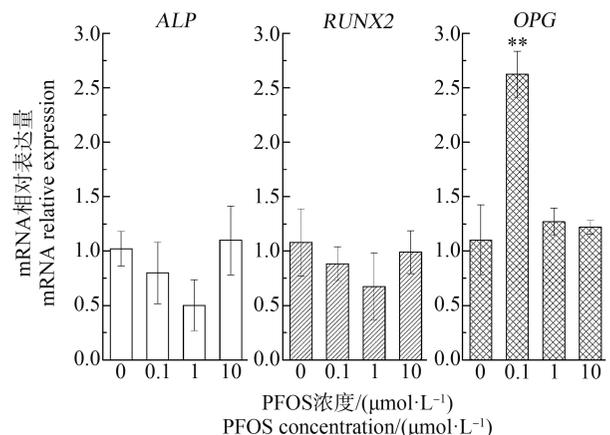


图 3 PFOS 暴露 7 d 对未分化 hBMSCs 中 *ALP*、*RUNX2* 和 *OPG* mRNA 表达水平的影响

注:与对照组相比,** $P<0.01$ 。

Fig. 3 Effects of PFOS on mRNA expressions of *ALP*, *RUNX2*, and *OPG* after 7 d of exposure in un-induced hBMSCs

Note: Compared with the control, ** $P<0.01$.

化的影响。阳性对照成骨诱导因子 BMP2 对钙沉积产生促进作用,但差异不显著。成脂诱导因子 ROSI 对脂肪滴形成产生显著的促进作用(图 4 和图 5)。PFOS 抑制钙沉积,0.1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 PFOS 表现出显著性抑制作用(图 5)。同时,PFOS 呈

剂量依赖性促进脂质形成,在 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下,细胞脂质形成显著升高,分别升高至对照组 2.1 倍和 2.7 倍。

2.4 PFOS 对 hBMSCs 基因表达谱的影响

在未分化条件下经 0.1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PFOS 暴露 7 d 后,hBMSCs 的基因表达谱中筛选出 597 个差异表达基因($P<0.05$ 且 $\log_2(\text{表达差异倍数})>0.3$)。通过 GSEA 对差异基因进行通路富集分析,在表 1 中列出了根据 P 值选取受影响最显著的 10 个通路。其中,细胞凋亡($P=0.028$)与骨质疏松症之间联系紧密,成骨细胞和破骨细胞凋亡可能与骨质疏松直接相关^[18]。剪接体($P=0.106$)通路相关基因异常突变可导致 E/A 剪接复合体功能受损,是骨髓增生异常的发病的主要机理^[19]。

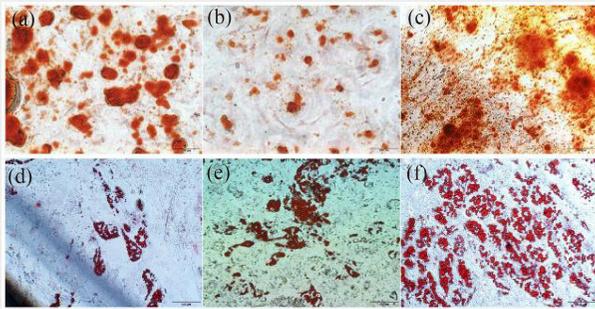


图 4 成骨/成脂双向分化第 14 天用茜素染色测定钙沉积和用油红 O 染色测定脂肪滴

注:(a)~(c)为钙结节染色,依次为溶剂对照、10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PFOS 处理组和阳性对照 BMP2 处理组;(d)~(f)为脂肪滴染色,依次为溶剂对照、10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PFOS 和阳性对照 ROSI 处理组。

Fig. 4 Calcium deposition measured by Alizarin Red S staining and fat droplets measured by Oil Red O staining on day 14th of osteogenic/adipogenic bidirectional differentiation
Note: (a)~(c) show nodule staining of solvent control, 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PFOS treatment group and positive control BMP2 treatment group; (d)~(f) show fat drop staining of solvent control, 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PFOS and positive control ROSI treatment group.

3 讨论 (Discussion)

尽管 PPARs 是 PFOS 的首要分子靶标,PPARs 相关的 PFOS 毒性作用通路仍不清楚。笔者比较研究了 PFOS 对 PPARs 各亚型的干扰及其与细胞分化之间的关联,对深入理解 PFOS 的毒性作用机理具有重要意义。PFOS 暴露诱导 hBMSCs 细胞 $PPAR\alpha$ 、 $PPAR\beta$ 和 $PPAR\gamma$ 表达均上调,与以往研究结果一致。动物毒理学研究表明,PFOS 激活 $PPAR\alpha$ 信号通路,并可诱发小鼠和大鼠肝癌^[20]。Li 等^[21]发现,PFOS 激活 3T3-L1 细胞中 PPARs 信号传导促进脂肪形成,其中 $PPAR\gamma$ 起主要作用, $PPAR\alpha$ 和 $PPAR\beta$ 作用相对较弱,通过分子对接模拟显示 PFOS 直接与 $PPAR\alpha$ 、 $PPAR\beta$ 和 $PPAR\gamma$ 结合。笔者前期研究发现,hBMSCs 在成脂诱导分化条件下,经 0.2 ~ 100 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ PFOS 暴露 7 d 后, $PPAR\gamma$ 的 mRNA 表达水平升高至对照组的 1.05 倍 ~ 1.53 倍^[15],上调倍数低于本研究,主要原因可能为未诱导分化条件下,无其他成脂诱导因子共同作用,PFOS 对 hBMSCs 中 $PPAR\gamma$ 的激活作用更明显。

因为 PPARs 在细胞分化调控中起重要作用,因此进一步测定了 PFOS 暴露对细胞分化关键基因 mRNA 表达的干扰。 $Runx2$ 表达下调与 $PPAR\gamma$ 激活一致。 $PPAR\gamma$ 和 $Runx2$ 均是调节 hBMSCs 细胞分化的关键转录因子,在细胞分化过程中二者转录活性的调控机制密切关联,但变化趋势相反。 $p38$ MAPK 介导丝氨酸磷酸化导致 $PPAR\gamma$ 失活和 $RUNX2$ 激活,而蛋白磷酸化酶 5 通过 $PPAR\gamma$ 和 $Runx2$ 蛋白的去磷酸化,激活 $PPAR\gamma$ 抑制 $RUNX2$ ^[7]。而 OPG 上调与 $PPAR\beta$ 激活一致,主要原因可能为

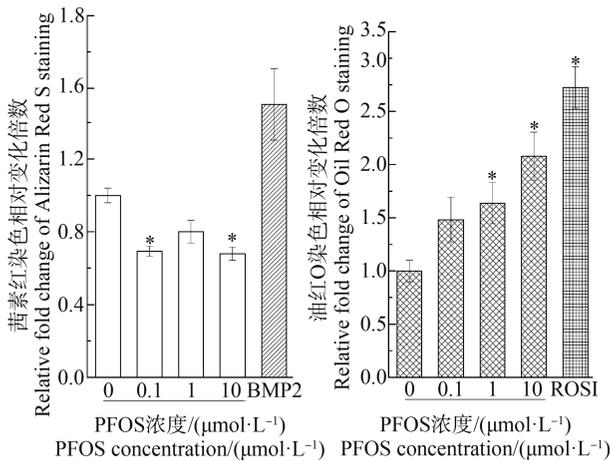


图 5 诱导分化条件下 PFOS 暴露 14 d 对 hBMSCs 中钙结节形成和脂肪滴形成的影响

注:与对照组相比,* $P<0.05$ 。

Fig. 5 Effects of 14 d of exposure to PFOS on calcium nodule formation or droplet formation in hBMSCs cultured in induction medium

Note: Compared with the control, * $P<0.05$.

PPAR β 的激活诱导成骨细胞中 *WNT- β -catenin* 介导的 *OPG* mRNA 表达增加^[8]。*OPG* 为骨转换关键因子,成骨细胞中 *OPG* 与 *RANK* 结合,形成调节骨代谢的 *OPG/RANKL/RANK* 通路有效抑制破骨细胞的发育,并增加骨量^[22]。因此,PPARs 各亚型的激活可能在调控细胞分化中产生不同的作用。

细胞分化表型标志物的分析结果表明,在双向分化条件下,PFOS 暴露抑制成骨分化且促进成脂分化,与 *ALP* 和 *RUNX2* 基因表达下调一致,主要原因可能为 *PPAR γ* 激活。*PPAR γ* 是成脂分化的关键正向调控因子,也是成脂/成骨分化平衡的关键因子。在骨髓中,*PPAR γ* 激活抑制 *Runx2* 介导的骨钙素在成骨细胞中的转录^[22]。笔者经前期研究发现,在分别对 hBMSCs 进行定向成骨分化诱导和成脂分化诱导时,PFOS 抑制成骨分化,促进成脂分化^[15]。本研究发现,在成脂/成骨双向诱导分化模型中,PFOS 干扰骨髓干细胞成骨/成脂分化平衡,进一

步证明 hBMSCs 多向分化是 PFOS 暴露的敏感靶标,对于揭示其毒性作用机制具有重要价值。PFOS 作用下 hBMSCs 基因表达谱中差异表达基因的富集分析显示,受影响通路主要涉及细胞分化、骨代谢和脂质代谢相关通路,进一步证实了 PFOS 对 hBMSCs 分化潜能的损伤,并提示骨代谢和脂代谢相关生物学过程受到干扰。PFOS 激活 *PPAR β* 可能是 *OPG* 表达上调的重要机制^[8],其在 PFOS 干扰细胞分化中的作用,仍需进一步研究。尽管 *OPG* 表达上调,但细胞成骨分化仍受到抑制,可能是因为 PFOS 对 *PPAR γ* 的激活作用强于 *PPAR β* 。此外,PFOS 暴露剂量和暴露时间也是影响细胞分化效应的重要因素。研究结果提示有必要进一步研究 PFOS 以及其他 PFASs 类化学物质对 PPARs 各亚型的激活与 hBMSCs 分化紊态失衡之间的关联,有利于阐明 PFASs 损伤干细胞分化的毒性机理,并为该类化学品健康效应的预测和筛选提供理论依据和方法。

表 1 PFOS 诱导 hBMSCs 差异表达基因富集的生物学通路

Table 1 Biological pathways enriched by the differentially expressed genes affected by PFOS in hBMSCs

通路名称 Pathway name	差异基因数量 Number of differentially expressed genes	P 值 P value	Q 值 Q vale	分类 Class
神经营养蛋白信号通路 Neurotrophin signaling pathway	37	0.012	0.590	神经系统 Nervous system
细胞凋亡 Apoptosis	23	0.028	0.378	细胞生长与死亡 Cell growth and death
剪接体 Spliceosome	25	0.106	0.755	转录 Transcription
TOLL 样受体信号通路 TOLL like receptor signaling pathway	19	0.105	0.642	免疫系统 Immune system
结直肠癌 Colorectal cancer	17	0.184	0.813	癌症 Cancer
幽门螺旋杆菌感染上皮细胞信号传导通路 Cell signaling transduction in epithelial cell infected by <i>Helicobacter pylori</i>	19	0.173	0.69	传染病 Infectious disease
T 细胞受体信号通路 T cell receptor signaling pathway	19	0.193	0.598	免疫系统 Immune system
JAK STAT 信号通路 JAK STAT signaling pathway	28	0.292	0.869	信号转导 Signal transduction
促性腺激素释放激素信号通路 GNRH signaling pathway	15	0.330	0.847	内分泌系统 Endocrine system

通讯作者简介:刘薇(1980—),女,博士,教授,博士生导师,主要研究方向为持久性有机污染物毒性效应和机理,以及干细胞毒理学模型原理和应用。

参考文献(References):

- [1] 史亚利,蔡亚岐.全氟和多氟化合物环境问题研究[J].化学进展,2014,26(4):665-681
Shi Y L, Cai Y Q. Study of per-and polyfluoroalkyl sub-

stances related environmental problems [J]. Progress in Chemistry, 2014, 26(4): 665-681 (in Chinese)

- [2] 周秀鹃,盛南,王建设,等.全氟和多氟化合物替代品的研究进展[J].生态毒理学报,2017,12(3):3-12
Zhou X J, Sheng N, Wang J S, et al. The current research status of several kinds of fluorinated alternatives [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2017, 12(3): 3-12 (in Chinese)

- [3] Olsen G W, Burris J M, Ehresman D J, et al. Half-life of serum elimination of perfluorooctanesulfonate, perfluorohexanesulfonate, and perfluorooctanoate in retired fluorocarbon production workers [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2007, 115(9): 1298-1305
- [4] 王玉, 张倩, 刘薇, 等. 胚胎期和哺乳期全氟辛烷磺酸(PFOS)暴露致大鼠学习记忆能力下降[J]. *生态毒理学学报*, 2013, 8(5): 671-677
- Wang Y, Zhang Q, Liu W, et al. Decline of learning and memory abilities in rats induced by prenatal and lactational exposure to perfluorooctane sulfonate (PFOS) [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2013, 8(5): 671-677 (in Chinese)
- [5] Matilla-Santander N, Valvi D, Lopez-Espinosa M J, et al. Exposure to perfluoroalkyl substances and metabolic outcomes in pregnant women: Evidence from the Spanish INMA birth cohorts [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2017, 125(11): 117004
- [6] DeWitt J C. *Conclusions and Recommendations [M]// Toxicological Effects of Perfluoroalkyl and Polyfluoroalkyl Substances*. Cham: Springer International Publishing, 2015: 479-482
- [7] Jeon M J, Kim J A, Kwon S H, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ inhibits the Runx2-mediated transcription of osteocalcin in osteoblasts [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278 (26): 23270-23277
- [8] Scholtyssek C, Katzenbeisser J, Fu H, et al. PPAR β/δ governs Wnt signaling and bone turnover [J]. *Nature Medicine*, 2013, 19(5): 608-613
- [9] Betts K S. Growing knowledge: Using stem cells to study developmental neurotoxicity [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2010, 118(10): A432-A437
- [10] Kumar V, Jahan S, Singh S, et al. Progress toward the development of *in vitro* model system for chemical-induced developmental neurotoxicity: Potential applicability of stem cells [J]. *Archives of Toxicology*, 2015, 89(2): 265-267
- [11] Pan Y F, Qin H, Liu W, et al. Effects of chlorinated polyfluoroalkyl ether sulfonate in comparison with perfluoroalkyl acids on gene profiles and stemness in human mesenchymal stem cells [J]. *Chemosphere*, 2019, 237: 124402
- [12] Liu W, Qin H, Pan Y F, et al. Low concentrations of perfluorooctane sulfonate repress osteogenic and enhance adipogenic differentiation of human mesenchymal stem cells [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2019, 367: 82-91
- [13] Tian Y P, Zhou Y, Miao M H, et al. Determinants of plasma concentrations of perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances in pregnant women from a birth cohort in Shanghai, China [J]. *Environment International*, 2018, 119: 165-173
- [14] Khalil N, Chen A M, Lee M, et al. Association of perfluoroalkyl substances, bone mineral density, and osteoporosis in the US population in NHANES 2009-2010 [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2016, 124(1): 81-87
- [15] Gao Y, Fu J J, Cao H M, et al. Differential accumulation and elimination behavior of perfluoroalkyl acid isomers in occupational workers in a manufactory in China [J]. *Environmental Science & Technology*, 2015, 49 (11): 6953-6962
- [16] Yang C, Tibbitt M W, Basta L, et al. Mechanical memory and dosing influence stem cell fate [J]. *Nature Materials*, 2014, 13(6): 645-652
- [17] Ye K, Wang X, Cao L P, et al. Matrix stiffness and nanoscale spatial organization of cell-adhesive ligands direct stem cell fate [J]. *Nano Letters*, 2015, 15(7): 4720-4729
- [18] 李曦. 骨质疏松症相关表型的全基因组关联研究——单变量、双变量、通路及基因相互作用分析[D]. 长沙: 湖南师范大学, 2011: 80
- Li X. Genome-wide association study for osteoporosis related phenotypes—Univariate, bivariate, pathway and gene-gene interaction analyses [D]. Changsha: Hunan Normal University, 2011: 80 (in Chinese)
- [19] Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y, et al. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia [J]. *Nature*, 2011, 478(7367): 64-69
- [20] Vanden Heuvel J P, Thompson J T, Frame S R, et al. Differential activation of nuclear receptors by perfluorinated fatty acid analogs and natural fatty acids: A comparison of human, mouse, and rat peroxisome proliferator-activated receptor- α , - β , and - γ , liver X receptor- β , and retinoid X receptor- α [J]. *Toxicological Sciences*, 2006, 92(2): 476-489
- [21] Li C H, Ren X M, Ruan T, et al. Chlorinated polyfluorinated ether sulfonates exhibit higher activity toward peroxisome proliferator-activated receptors signaling pathways than perfluorooctanesulfonate [J]. *Environmental Science & Technology*, 2018, 52(5): 3232-3239
- [22] Kramer I, Halleux C, Keller H, et al. Osteocyte wnt/ β -catenin signaling is required for normal bone homeostasis [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2010, 30(12): 3071-3085