

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20231011001

赵芳, 严晓, 何绵, 等. F-53B 对人肝癌细胞 HepG2 和 Hep3B 的细胞毒性效应研究[J]. 生态毒理学报, 2024, 19(2): 232-241

Zhao F, Yan X, He M, et al. Cytotoxic effects of F-53B on human hepatoma cells HepG2 and Hep3B [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2024, 19(2): 232-241 (in Chinese)

F-53B 对人肝癌细胞 HepG2 和 Hep3B 的细胞毒性效应研究

赵芳^{1,2}, 严晓^{1,2}, 何绵³, 王远芳³, 康亭亭³, 蔡凤珊², 郑晶^{1,2,*}, 谢春¹

1. 贵州医科大学公共卫生与健康学院, 环境污染与疾病监控教育部重点实验室, 贵阳 561113

2. 生态环境部华南环境科学研究所新污染物研究团队, 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. 中山大学第七附属医院科研中心, 深圳 518000

收稿日期: 2023-10-11 录用日期: 2024-01-08

摘要: 研究氯化多氟烷基醚磺酸盐(6:2 chlorinated polyfluorinated ether sulfonate, 商品名 F-53B) 对人肝癌细胞 HepG2 和 Hep3B 的毒性效应, 并初步探讨其作用机制。选择常用的全氟辛烷磺酸盐(perfluorooctane sulfonate, PFOS) 和全氟辛酸(perfluorooctanoic acid, PFOA) 与 F-53B 同时进行毒性评估, 检测细胞形态、细胞活力、凋亡、活性氧(reactive oxygen species, ROS), 过氧化氢酶(catalase, CAT)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、凋亡相关因子(*Bax*, *Caspase-3*, *PARP*, *Caspase-9*等) 表达水平。F-53B 对细胞活性具有明显的抑制作用且毒力显著大于 PFOS, 并呈剂量依赖性; F-53B 显著诱导 ROS 释放和细胞凋亡, 并降低了抗氧化酶 CAT 活性; 进一步证明促凋亡相关因子(*Bax*, *Caspase-3*, *PARP*, *Caspase-9*) 表达增加, 抑制凋亡因子 *Bcl-2* 表达水平降低。F-53B 可诱导细胞凋亡和氧化应激, 且线粒体内在途径可能参与细胞毒性作用。

关键词: 氯化多氟烷基醚磺酸盐; 肝细胞; 细胞凋亡; 氧化应激

文章编号: 1673-5897(2024)2-232-10 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Cytotoxic Effects of F-53B on Human Hepatoma Cells HepG2 and Hep3B

Zhao Fang^{1,2}, Yan Xiao^{1,2}, He Mian³, Wang Yuanfang³, Kang Tingting³, Cai Fengshan², Zheng Jing^{1,2,*}, Xie Chun¹

1. School of Public Health, the Key Laboratory of Environmental Pollution Monitoring and Disease Control, Ministry of Education, Guizhou Medical University, Guiyang 561113, China

2. State Environmental Protection Key Laboratory of Environmental Pollution Health Risk Assessment, Research Center of Emerging Contaminants, South China Institute of Environmental Sciences, Ministry of Ecology and Environment, Guangzhou 510655, China

3. Scientific Research Center, The Seventh Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Shenzhen 518000, China

Received 11 October 2023 accepted 8 January 2024

Abstract: 6:2 chlorinated polyfluorinated ether sulfonate, known as F-53B, is widely used as an important substitute of perfluorooctane sulfonate (PFOS) in industry, which may bring serious environmental and health risks. In this study, we will explore the potential hepatotoxic effects and related mechanism induced by F-53B in human

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(42007392, 42077404, 4222711)

第一作者: 赵芳(1998—), 女, 硕士研究生, 研究方向为劳动卫生与环境卫生, E-mail: fangzhao1217@163.com

* 通信作者 (Corresponding author), E-mail: zhengjing@scies.org

hepatoma cells. Three perfluorinated compounds, including F-53B, PFOS and perfluorooctanoic acid (PFOA), were selected to assess their effects on cell morphology, cell viability and apoptosis in HepG2 and Hep3B cells. Markers of oxidative stress, such as reactive oxygen species (ROS), catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), were compared among these three compounds. The protein levels of several apoptosis-related factors were also detected after chemicals exposure. Treatment with F-53B resulted in strong dose-dependent decrease in hepatoma cell viability, the effect of which was significantly higher than those obtained in the group treated with PFOS or PFOA. F-53B induced ROS release and decreased the activity of antioxidant enzyme CAT. F-53B also caused cell apoptosis, which was proved by the increased expression of pro-apoptotic factors (*Bax*, *Caspase-3*, *PARP*, *Caspase-9*) and decreased expression level of apoptotic factor *Bcl-2*. F-53B can induce hepatoma cell apoptosis and oxidative stress through mitochondrial intrinsic pathway.

Keywords: F-53B; hepatocytes; apoptosis; oxidative stress

全氟辛烷磺酸(perfluorooctane sulfonate, PFOS) 是环境、生物群和人体组织中大量存在的全氟化合物之一^[1-3]。据报道,PFOS 对生物体具有不良影响,包括神经毒性、肝脏毒性、致癌性等^[4-9]。由于其潜在的毒性,其主要制造商 3M 公司已经主动淘汰 PFOS,并采取了一系列措施限制该化合物的生产,从而导致近年来对 PFOS 替代品需求量的增加^[10]。6:2 氯化多氟烷基醚磺酸(6:2 chlorinated polyfluorinated ether sulfonate, 商品名 F-53B)作为 PFOS 的重要替代品之一,在 1975 年首次由中国科学院上海有机化学研究所开发并作为电镀工业的抑雾剂使用^[11]。目前 F-53B 在中国铬雾抑制剂市场占主导地位,年产量约为 20 ~ 30 t,预计未来还将持续增加^[12]。由于对 F-53B 的生产与排放并无具体的限制,研究显示其在我国水体、土壤等环境介质和人体样品中均广泛检出,部分区域浓度甚至高于 PFOS。此外,研究者还在格陵兰岛的虎鲸、海豹和北极熊的肝脏中检测到了低浓度的 F-53B,证实 F-53B 具有远距离迁移能力^[13-14]。而通过 COSMOtherm 获得的 F-53B 与 PFOS 的正辛醇/水分配系数(K_{ow})也表明,F-53B 的生物累积能力可能高于 PFOS^[15-16]。F-53B 在母乳、指甲、尿液等人体样品中也普遍检出^[17],普通人群的血清中 F-53B 的检出率高达 99%,暴露水平在 1.55 ~ 8.64 ng · mL⁻¹ 之间^[18]。另一项研究则发现血清中 F-53B 浓度检出范围为 1.26 ~ 3.34 ng · mL⁻¹,并观察到 F-53B 与低密度脂蛋白胆固醇之间呈正相关^[19]。而对电镀工人的研究则发现,其血清中 F-53B 浓度可高达 5.04 μg · mL⁻¹^[20]。F-53B 的大量使用与广泛检出带来了极大的环境风险。

F-53B 作为铬雾抑制剂的使用已有 40 多年,但

毒性研究还相对较少。有限的流行病学研究显示 F-53B 可能导致血脂异常、内分泌功能紊乱等^[18, 21-22]。同时,有学者在动物实验中提出 F-53B 具有肝脏毒性、神经毒性和生殖发育毒性等^[23-25]。在 2013 年首次报道了 F-53B 在斑马鱼中的急性毒性($LC_{50-96h} = 15.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)^[26]。有研究报道通过向大鼠脑内注射相同剂量的 PFOS 和 F-53B,观察到 F-53B 组表现出更强的电生理变化,表明 F-53B 具有比 PFOS 更严重的神经毒性^[24]。而肝脏作为 F-53B 生物蓄积的主要靶器官之一^[27],其肝脏毒性也受到广泛关注,但已有研究结果并不一致。研究表明 F-53B 可致脂质代谢紊乱^[23, 25],在一项慢性暴露的研究中,血清总胆固醇(serum total cholesterol, TC)水平升高,而甘油三酯(triglyceride, TG)明显降低^[23]。然而在另一项研究中报道了不一致的结果,TC 和 TG 都同步升高^[25],造成不一致结果的作用机制仍不确定。此外,F-53B 可能通过调节过氧化物酶体增植物激活受体(peroxisome proliferators-activated receptors, PPARs)和孕烷 X 受体(pregnanane X receptor, PXR)通路来诱导肝毒性^[28],但具体毒性机制仍需进一步研究。并且有研究表明 F-53B 与肝脏脂肪酸结合蛋白结合能力是大于 PFOS 与其结合能力的,根据 F-53B 和 PFOS 结构的相似性,F-53B 可能会引起比 PFOS 更大的肝脏毒性^[29]。但关于 F-53B 的肝脏毒性效应尚不明确,因此针对 F-53B 开展相关毒性研究具有重要意义。本研究基于人肝癌细胞模型 HepG2 和 Hep3B,探讨了 F-53B 的肝细胞毒性及其潜在机制,为科学评价 F-53B 环境风险提供支撑。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 实验仪器

直热式二氧化碳培养箱(日本松下公司, MCO-

20AIC),生物安全柜(中国济南鑫贝西生物技术有限公司, BSC-1100IIA2-X),全波长多功能酶标仪(美国 BioTek 公司, Synergy H1M),倒置显微镜(OLYMPUS 中国深圳分公司, CKX53),小型高速离心机(德国 Eppendorf 公司, 5425),梯度 PCR 扩增仪(新加坡 Life 公司, Proflex),荧光定量 PCR 仪(新加坡 Bio-Rad 公司, CFX96 Touch),双色红外荧光成像系统(美国 Bio-Rad 公司, ChemiDoc MP Imaging System),水浴锅(中国上海一恒科技有限公司, BWS-0505),紫外可见分光光度计(美国赛默飞, Nanodrop one),金属浴(中国杭州米欧仪器有限公司, DKT200-2),流式细胞仪(中国苏州贝克曼库尔特生物科技有限公司, CytoFLEX),细胞计数仪(中国江苏卓微生物科技有限公司, JIMBIOCL)。

1.2 实验试剂

人肝癌细胞 HepG2 和 Hep3B 购自美国 ATCC 公司, DMEM 高糖培养基、磷酸盐缓冲液(PBS)、胎牛血清(FBS)及青链霉素混合液(双抗)均购自美国 Gibco, F-53B 纯度 $\geq 99\%$, 购自中国江莱生物科技有限公司, PFOA、PFOS 纯度 $\geq 99\%$, 均购自中国上海麦克林公司, Annexin V-PI 凋亡试剂盒和 CCK-8 检测试剂盒购自中国上海百赛生物技术股份有限公司, SYBR Prime Script RT-PCR 试剂盒购自中国南京诺唯赞生物科技股份有限公司, 2',7'-二氯荧光素双乙酸盐(DCFH-DA)购自中国万类生物科技有限公司, CAT、SOD 检测试剂盒购自中国南京建成生物科技有限公司, 抗 Bax、抗 Bcl-2、Apoptosis Antibody Sampler Kit 购自美国 Cell Signaling Technology 公司。

1.3 细胞培养

HepG2 和 Hep3B 细胞都采用加入 10% FBS、100 $U \cdot mL^{-1}$ 青霉素和 100 $\mu g \cdot mL^{-1}$ 链霉素的 DMEM 高糖培养基进行培养, 培养条件为 37 $^{\circ}C$ 、5% CO_2 , 细胞长至 80% ~ 90% 汇合时进行传代。在 37 $^{\circ}C$ 水浴锅预热待使用试剂, 首先吸弃培养基, 用 PBS 洗涤细胞后并用 0.25% 的胰蛋白酶消化, 观察到细胞脱落后加入培养基终止消化, 1 000 $r \cdot min^{-1}$ 离心 5 min, 弃去上清液并加入新鲜培养基混匀放入培养箱中培养, 传代 2 ~ 3 次后用处于对数生长期的细胞进行暴露实验, 使用细胞计数仪计数, 在倒置显微镜下观察细胞状态及生长状况。

1.4 细胞活力测定

细胞毒性作用通过细胞计数试剂盒-8(CCK-8)

方法测定。将对数生长的 HepG2 和 Hep3B 细胞以 5×10^3 、 1.5×10^3 个 \cdot 孔 $^{-1}$ 种植在 96 孔板中, 并使其生长 24 h。F-53B、PFOA、PFOS 均用 DMSO 溶解配制为 1 $mol \cdot L^{-1}$ 的原液。将细胞分别暴露于 1 000、500、250、125、62.5、31.25、15.625、7.812、3.906 $\mu mol \cdot L^{-1}$ 的 PFOA、PFOS、F-53B 中, 对照组暴露于 0.1% DMSO 中(细胞活力测定结果显示 0.1% 的 DMSO 对细胞无毒性)。每组浓度设置 3 个平行, 细胞暴露 72 h 后, 每孔加入 10 μL 细胞活力检测试剂 CCK-8, 将 96 孔板置于 37 $^{\circ}C$ 的培养箱中孵育 2 h, 使用酶标仪在吸光度 450 nm 的条件下检测细胞活力。使用 Graphpad Prism 10 做出量效关系曲线。细胞相对活力(%)计算公式为:

$$(OD_{实验} - OD_{空白}) / (OD_{对照} - OD_{空白}) \times 100\%$$

式中: $OD_{实验}$ 为实验组吸光度值; $OD_{空白}$ 为空白组吸光度值; $OD_{对照}$ 为对照组吸光度值。

1.5 ROS 测定

为了评估 HepG2 和 Hep3B 细胞产生的活性氧, 将细胞接种在 96 孔板内, 过夜后将其暴露于相应浓度的 F-53B、PFOA、PFOS 中, 暴露 12 h 后, 用无血清培养基清洗细胞 3 遍, 加入 100 μL 浓度为 10 $\mu mol \cdot L^{-1}$ 的 DCFH-DA 进行避光孵育 30 min, 使用荧光酶标仪测定荧光强度, 荧光强度与总细胞数的比值是相对 ROS 水平。

1.6 CAT、SOD 测定

采用 CAT(A007-1-1)、SOD(A001-1-2)活性检测试剂盒检测细胞内抗氧化酶的活性。首先将 HepG2、Hep3B 细胞接种在 6 孔板内, 过夜后将其暴露于 PFOA、PFOS、F-53B 中, 暴露 12 h 后, 用 PBS 清洗细胞 3 遍, 加入 1 mL PBS 吹打均匀, 在冰浴条件下, 对各组细胞进行超声破碎, 破解结束后, 在 4 $^{\circ}C$ 条件下, 10 000 $r \cdot min^{-1}$ 离心 5 min 并收集上清液。按照 CAT、SOD 试剂盒说明书, 依次加入检测试剂, 反应结束后使用酶标仪检测各组 CAT、SOD 的活性。

1.7 流式细胞术分析

采用 Annexin V-PI 凋亡试剂盒评估凋亡率。将 HepG2、Hep3B 细胞铺板于 6 孔板中, 并将 HepG2、Hep3B 分别暴露于 100 $\mu mol \cdot L^{-1}$ 的 PFOA、PFOS、F-53B 中 24 h 后。用不含 EDTA 的胰酶消化, 1 300 $r \cdot min^{-1}$, 4 $^{\circ}C$ 离心 5 min 收集细胞; 用预冷的 PBS 洗涤 2 次并收集 2×10^5 个细胞, 用 100 μL 的结合缓冲液重悬细胞。每管加入 Annexin V 和 PI 工作液(准备两管额外的细胞, 每管只加入一种单染

染料,用于流式单染的补偿调节),室温避光孵育 10 ~ 15 min;孵育结束后每管加入 400 μL 的 PBS,并尽快使用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.8 定量聚合酶链式反应测定

为了评估 HepG2 和 Hep3B 细胞中 RNA 表达,将 HepG2、Hep3B 分别暴露于 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 PFOA、PFOS、F-53B 中 12 h。使用总 RNA 提取试剂盒从细胞中提取 RNA,并用逆转录试剂盒将 RNA 逆转录得到 cDNA,以 cDNA 为模板,使用 SYBR Green 实时荧光定量 PCR 评估凋亡相关基因的表达。使用 GAPDH 作为内参基因进行标准化,并用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算结果。所用引物序列如表 1 所示。

1.9 蛋白印迹分析

将 HepG2、Hep3B 分别暴露于 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 PFOA、PFOS、F-53B 中 12 h,使用配制好的 RIPA 裂解液裂解细胞,将裂解液混合物放冰上裂解 30 min,于 4 $^{\circ}\text{C}$, 12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min。使用 BSA 测定法制备蛋白样品,并通过 SDS-PAGE 分离,将分离的蛋白样品转移到聚偏二氟乙烯膜(polyvinylidene fluoride),用 5% 脱脂奶常温封闭 1 h,用相对应的一抗在 4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床进行过夜孵育,随后用 TBST 洗涤并用二抗在常温孵育 1 h。用 ECL 显影液显色,在凝胶成像仪观察并拍照蛋白条带。使用 ImageJ 软件对蛋白条带进行定量。

1.10 统计分析

以上实验均设置 3 个独立平行和重复,所有数

据以均值 \pm 标准差来表示。使用 GraphPad Prism 10 软件对实验数据进行单因素方差分析(Ordinary one-way ANOVA)来比较样本之间的差异性;随后采用 Tukey 检验做事后多重比较;若 $P < 0.05$,表明结果有显著性差异。

2 结果(Results)

2.1 F-53B 诱导的细胞形态

用 0、10、100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 PFOA、PFOS、F-53B 分别诱导 HepG2、Hep3B 细胞 12 h,然后在倒置显微镜下观察细胞形态的变化。如图 1 所示,在 DMSO 对照组中,HepG2 细胞呈球形且紧密相连,并呈团块生长。在 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 3 种化合物处理后,对细胞形态均没有影响。如图 1 所示,在 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理下,3 组细胞的细胞间隙逐渐增大,细胞融合率降低,细胞边缘不整齐,表现出不规则形状。F-53B 暴露组细胞在 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 细胞数量急剧减少,细胞无法成片生长。同时也可看到 Hep3B 细胞的形态与对照组细胞的形态不同,观察到细胞收缩、细胞计数减少和漂浮细胞等。

2.2 细胞活力评估

F-53B、PFOS、PFOA 剂量效应曲线结果见图 2。对于 F-53B,剂量反应曲线清楚地显示了浓度依赖性效应,在 2 种细胞系中,细胞毒性在 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 左右急剧增强,在低浓度下(0 ~ 15 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),F-53B 对细胞活力几乎没有影响,暴露 72 h 后,对 3 种化合

表 1 用于实时荧光定量聚合酶链式反应(RT-PCR)的引物序列

Table 1 Primer sequences used for real-time polymerase chain reaction (RT-PCR)

基因 Gene	引物 Primer	序列(5' ~ 3') Sequence (5' ~ 3')
<i>GAPDH</i>	正向 Forward	GTCTCTCTGACTTCAACAGCG
	反向 Reverse	ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA
<i>Bax</i>	正向 Forward	TCAGGATGCGTCCACCAAGAAG
	反向 Reverse	TGTGTCCACGGCGGAATCATC
<i>Bcl-2</i>	正向 Forward	ATCGCCCTGTGGATGACTGAGT
	反向 Reverse	GCCAGGAGAAATCAAACAGAGGC
<i>PARP</i>	正向 Forward	CCAAGCCAGTTCAGGACCTCAT
	反向 Reverse	GGATCTGCCTTTTGCTCAGCTTC
<i>Caspase-3</i>	正向 Forward	GGAAGCGAATCAATGGACTCTGG
	反向 Reverse	GCATCGACATCTGTACCAGACC
<i>Caspase-9</i>	正向 Forward	GTTTGAAGACCTTCGACCAGCT
	反向 Reverse	CAACGTACCAGGCCACTCTT
<i>TP53</i>	正向 Forward	CCTCAGCATCTTATCCGAGTGG
	反向 Reverse	TGGATGGTGGTACAGTCAGAGC

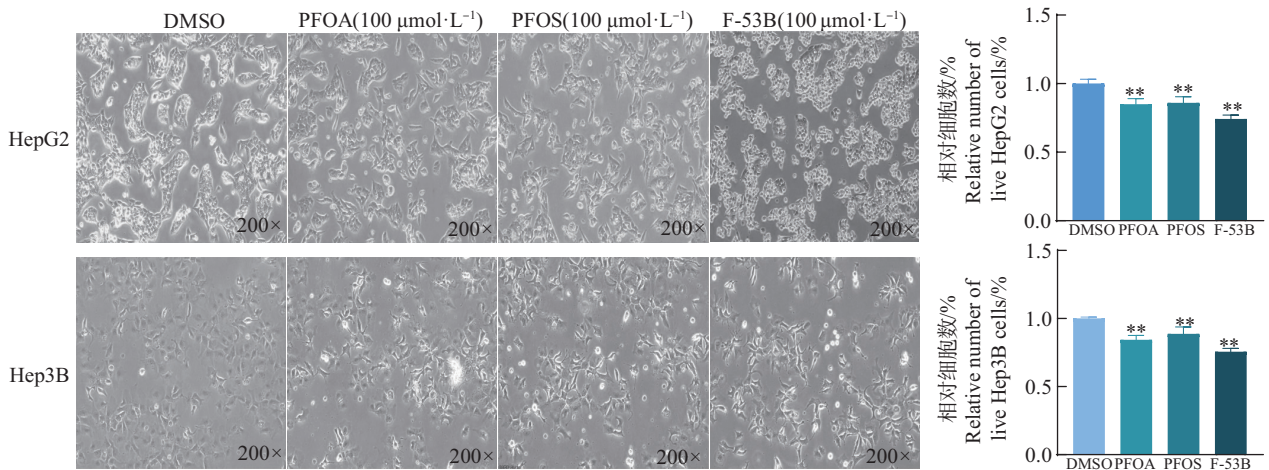


图1 经氯化多氟烷基醚磺酸(F-53B)、全氟辛烷磺酸(PFOS)、全氟辛酸(PFOA)暴露后HepG2和Hep3B的细胞形态

注: DMSO表示二甲基亚砜, 值为平均值±标准差(*n*=3); ** *P*<0.01, * *P*<0.05。

Fig. 1 Cell morphology of HepG2 and Hep3B after exposure to 6:2 chlorinated polyfluorinated ether sulfonate (F-53B), perfluorooctane sulfonate (PFOS), and perfluorooctanoic acid (PFOA)

Note: DMSO stands for dimethyl sulfoxide; the value is the means±SD (*n*=3); ** *P*<0.01, * *P*<0.05.

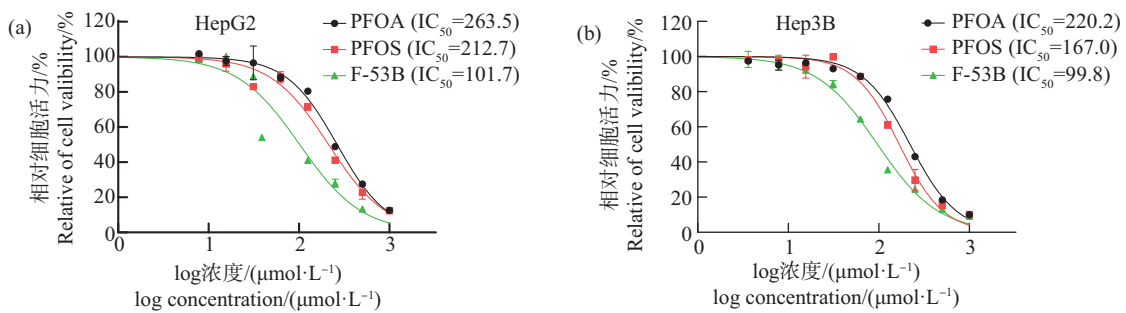


图2 F-53B、PFOS和PFOA暴露72 h对HepG2(a)和Hep3B(b)细胞活力的影响

Fig. 2 Effect of F-53B, PFOS and PFOA exposure for 72 h on the viability of HepG2 (a) and Hep3B (b) cells

物浓度进行对数转换处理,与细胞活力值进行非线性拟合,得出,F-53B的半抑制浓度 $IC_{50 HepG2} = 101.7 \mu mol \cdot L^{-1}$, $IC_{50 Hep3B} = 96.6 \mu mol \cdot L^{-1}$;PFOS的半抑制浓度 $IC_{50 HepG2} = 212.3 \mu mol \cdot L^{-1}$, $IC_{50 Hep3B} = 167.0 \mu mol \cdot L^{-1}$;PFOA的半抑制浓度 $IC_{50 HepG2} = 263.5 \mu mol \cdot L^{-1}$, $IC_{50 Hep3B} = 220.2 \mu mol \cdot L^{-1}$ 。在后续实验中,选取低浓度的 IC_{50} 进行暴露,对F-53B的 IC_{50} 取整数,采用 $100 \mu mol \cdot L^{-1}$ 进行暴露。

2.3 使用流式细胞术评估凋亡率

在揭示了F-53B、PFOS、PFOA对2种细胞的细胞活力影响后,采用流式细胞术进一步研究了这3种化合物对细胞凋亡的影响。如图3所示,在HepG2细胞中F-53B、PFOS、PFOA这3组的凋亡率分别为:(23.25 ± 3.445)%、(8.99 ± 3.14)%、(2.91 ± 1.52)%。与对照组相比,F-53B处理组对细胞凋亡

影响最大(*P*<0.05);在Hep3B细胞中,3组化合物对细胞凋亡的影响与HepG2呈现相同的趋势,F-53B、PFOS、PFOA这3组凋亡率分别为:(12.9 ± 2.63)%、(8.84 ± 1.69)%、(5.21 ± 2.27)%。总的来说,在2种细胞中,F-53B对细胞凋亡影响最大。

2.4 ROS、CAT和SOD的评估

进一步评估了3组化合物暴露12 h后对细胞内ROS生成、CAT和SOD酶活性的影响。如图4所示,在低浓度 $50 \mu mol \cdot L^{-1}$ 的暴露下,与对照组相比,活性氧几乎没有变化;在 $100 \mu mol \cdot L^{-1}$ 、 $125 \mu mol \cdot L^{-1}$ 的F-53B、PFOS、PFOA组中,可以看到ROS显著增加。CAT酶活性随F-53B、PFOS、PFOA浓度增加逐渐降低。且在相同浓度处理下,与PFOS和PFOA相比,F-53B处理组CAT酶活性显著降低(*P*<0.01);图4中可以看到,当F-53B、PFOS、

PFOA 浓度较低时(0 ~ 100 μmol·L⁻¹),SOD 活性基本不变,在 125 μmol·L⁻¹、200 μmol·L⁻¹时显著增加。结果表明 F-53B 能引起氧化应激并触发 ROS 的产生。

2.5 蛋白质印迹分析

用 100 μmol·L⁻¹的 F-53B、PFOS 和 PFOA 分别处理 12 h 后,测定了细胞凋亡相关因子的变化,使用 GAPDH 作为归一化控制。如图 5 所示,在 2 种细胞系中,线粒体介导的细胞凋亡相关蛋白的表达(Bax、Caspase-3、Cleaved-Caspase-3、PARP、Cleaved-PARP)因为化合物的处理而增加,特别是 F-53B 处理组的 Bax、Caspase-3、PARP 和 Caspase-9 明显高于对照组,而 Bcl-2 蛋白水平明显下降($P<0.05$),表明 F-53B 能诱导 HepG2 和 Hep3B 细胞凋亡。

2.6 实时荧光定量 PCR 分析

为评估 F-53B、PFOS、PFOA 暴露后 HepG2 和 Hep3B 细胞中凋亡相关基因的表达,本研究进行了 QPCR 测定。如图 6 所示,在 HepG2 细胞中,与 DMSO 处理的对照组相比,F-53B、PFOS、PFOA 处理组的 Bax、TP53、PARP、Caspase-9 和 Caspase-3 的 mRNA 水平明显升高,F-53B 组的 Bax 和 TP53 的表

达明显高于 PFOS 组和 PFOA 组,抑制凋亡基因 Bcl-2 也显著低于 PFOS 组和 PFOA 组($P<0.05$)。在 Hep3B 细胞中,也能看到 F-53B 处理组的 Bax 和 Caspase-3 显著增加,Bcl-2 显著降低。

3 讨论 (Discussion)

污染物暴露后,肝脏是其在机体内蓄积的主要靶器官,流行病学和动物实验证据表明 F-53B 暴露与肝脏毒性可能存在联系,但其引起的肝毒性及机制研究处于初步阶段,需进一步对其毒性进行评估。此前,应用啮齿类动物模型发现 F-53B 可以导致肝脏病理变化^[17];Zhang 等^[28]研究发现 F-53B 可诱导成年小鼠肝脏损伤、肿大和扰乱脂质代谢,且 F-53B 比 PFOS 表现出了更严重的肝脏毒性。在一项体外暴露的研究中发现 $IC_{50F-53B} < IC_{50PFOS} < IC_{50PFOA}$ ^[29]。本研究选择了 PFOA 和 PFOS 与 F-53B 同时进行毒性评估,当 3 种化合物暴露于 HepG2 和 Hep3B 细胞,F-53B 组表现出最低的 IC_{50} ,与先前的研究结果一致,表明其对 HepG2 和 Hep3B 细胞的活力影响更大,因此 F-53B 对人类健康的影响应该受到高度关注,深入研究其毒性及其机制是必要的。

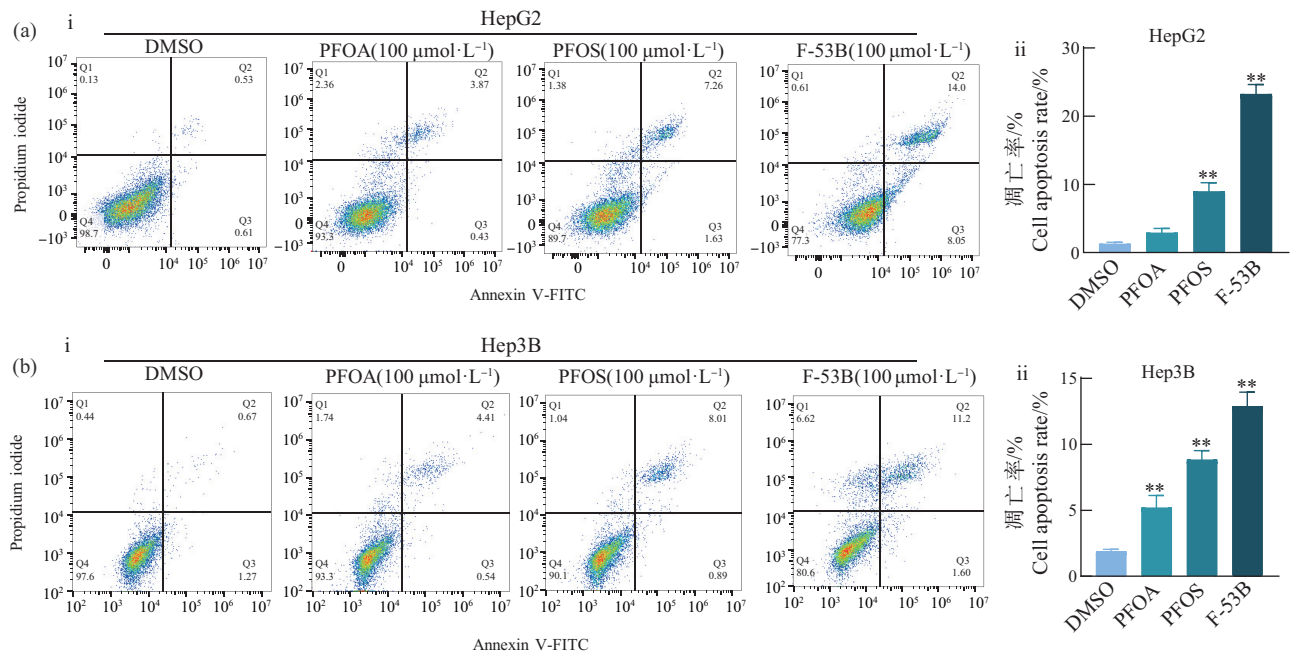


图 3 F-53B、PFOS、PFOA 暴露 24 h 对 HepG2 (a) 和 Hep3B (b) 细胞凋亡的流式分析结果

注:(i)用膜联蛋白 V-荧光素异硫氰酸盐(FITC)荧光与碘化丙啶(PI)荧光标记流式细胞轮廓图;(ii)凋亡率(%), Q2 和 Q3 的总和;值为平均值±标准差(n=3);** $P<0.01$ 、* $P<0.05$ 。

Fig. 3 Results of flow analysis of apoptosis in HepG2 (a) and Hep3B (b) cells exposed to F-53B, PFOS, and PFOA for 24 h Note: (i) Flow cell profile labeled with annexin V-fluorescein isothiocyanate (FITC) fluorescence and propidium iodide (PI); (ii) Apoptosis rate (%), the sum of Q2 and Q3; the value is the means±SD (n=3); ** $P<0.01$ 、* $P<0.05$.

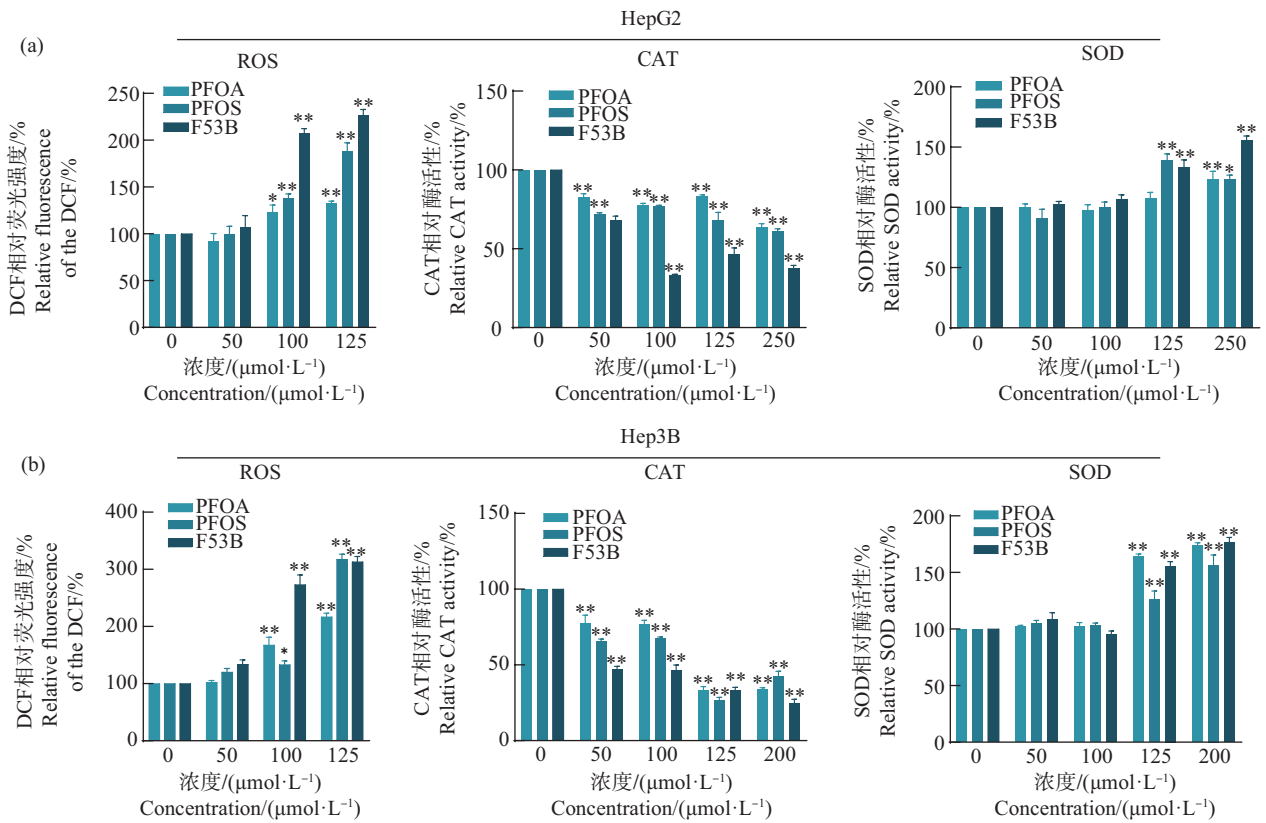


图 4 F-53B、PFOS 和 PFOA 对 HepG2 (a) 和 Hep3B (b) 细胞活性氧 (ROS) 生成、过氧化氢酶 (CAT) 和超氧化物歧化酶 (SOD) 活性的影响

注: 值为平均值±标准差(n=3); ** P<0.01, * P<0.05。

Fig. 4 Effect of F-53B, PFOS, and PFOA on reactive oxygen species (ROS) generation, catalase (CAT) enzyme activity, and superoxide dismutase (SOD) enzyme activity in HepG2 (a) and Hep3B (b) cells

Note: The value is the means±SD (n=3); ** P<0.01, * P<0.05.

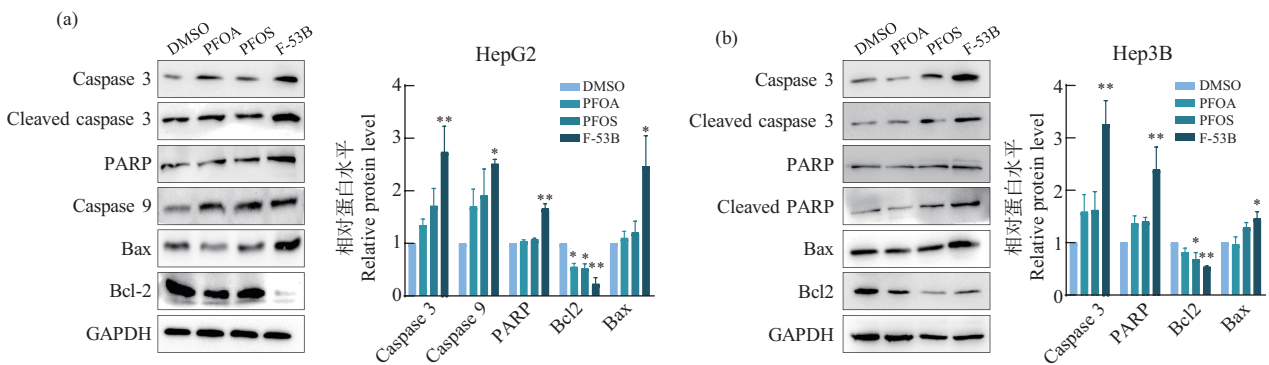


图 5 F-53B、PFOS、PFOA 暴露后对 HepG2 (a) 和 Hep3B (b) 细胞中凋亡相关蛋白的影响

注: 所有数据均与对照组(DMSO)进行比较, 值为平均值±标准误(n=4); ** P<0.01, * P<0.05。

Fig. 5 Effect of F-53B, PFOS, and PFOA after exposure on apoptosis-related proteins in HepG2 (a) and Hep3B (b) cells

Note: All data were compared with the controls (DMSO); the value is the means±SEM (n=4); ** P<0.01, * P<0.05.

氧化应激被认为是污染物诱发毒性和疾病的常见途径。肝脏的抗氧化系统是对抗外部环境压力的主要防御系统,当机体与细胞的氧化还原水平被破

坏,ROS 过度积累,环境趋于氧化,就会发生氧化应激,从而对蛋白质、脂质、DNA 等产生不利影响^[30]。以斑马鱼为模型分析 F-53B 暴露与氧化应激关联的

研究中,暴露组中的丙二醛、谷胱甘肽、抗氧化酶活性(SOD、CAT)以及大多数抗氧化酶基因的 mRNA 和蛋白质水平都降低,结果表明 F-53B 可以诱导斑马鱼氧化应激^[1]。在本研究中,与对照组相比,F-53B 暴露组细胞内 ROS 水平显著升高,表明其可以诱导氧化应激。CAT 和 SOD 是重要的抗氧化酶,可以防止环境污染物引起的氧化应激^[2]。研究观察到 CAT 酶活性显著降低,而 CAT 活性的降低可能是因为肝细胞内 ROS 大量累积导致抗氧化酶的消耗,表明机体内氧化应激的影响超过了 CAT 抗氧化的能力。而 SOD 作为抵抗氧化应激的第一道防线,可以催化超氧阴离子自由基(O₂⁻)歧化为 H₂O₂,进

一步由 CAT 转化为水和氧气^[3]。在本研究中观察到 SOD 活性升高,SOD 活性增加是为了清除 ROS,保护细胞不受氧化损伤,使更多的 O₂⁻ 转化为 H₂O₂,但 CAT 无法清除过多的 H₂O₂,进一步导致其活性下降^[4-5]。细胞水平上 F-53B 诱导的 CAT 和 SOD 活性变化与动物水平并不完全一致^[6],相关研究报道,SOD 基因缺失后在细胞培养和小鼠实验中观察到了相反的结果^[7],造成这种现象原因尚不清楚,可能是体内体外暴露水平不一样,导致暴露环境不同,因此产生了不一样的现象,具体机制仍需进一步探究。整体而言,F-53B 是通过破坏机体抗氧化系统从而诱发氧化应激的。

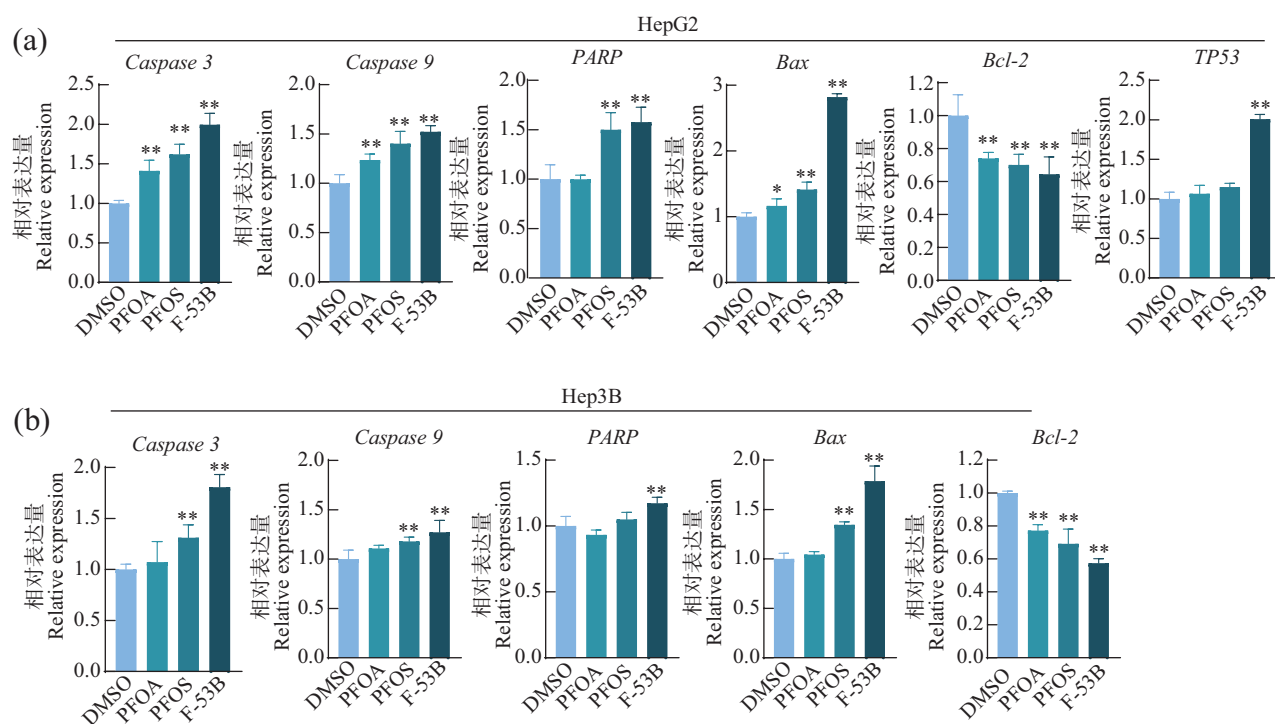


图 6 F-53B、PFOS、PFOA 暴露后,HepG2 (a) 和 Hep3B (b) 细胞中 mRNA 水平变化

注:所有数据均与对照组(DMSO)进行比较,值为平均值±标准差(n=4);** $P < 0.01$ 、* $P < 0.05$ 。

Fig. 6 Changes in mRNA levels in HepG2 (a) and Hep3B (b) cells after F-53B, PFOS and PFOA exposure

Note: All data were compared with the controls (DMSO), and the value is the means±SD (n=4); ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$.

线粒体被认为是氧化应激的关键靶点,它作为细胞内 ROS 的主要来源,特别容易受到氧化损伤,当抗氧化防御系统损害,ROS 过量产生,进一步诱导细胞死亡或凋亡^[38]。细胞凋亡通常是由 Bax、Bcl-2 基因表达调控,Bcl-2 家族在线粒体途径发挥着重要作用,在受到凋亡刺激后,Bax 干扰线粒体膜电位,促使 Cyt C 释放,导致 Caspase-9 的活化,进而激活 Caspase-3,诱发细胞凋亡^[39]。作为抗凋亡基因

Bcl-2 和 Bcl-XL,可以阻止 Cyt C 释放从而抑制细胞凋亡。mRNA 和蛋白的表达结果显示,Caspase-9 和 Caspase-3 的活性均增加,说明 F-53B 可以通过内途径诱导细胞凋亡。本实验的研究结果显示的 Bax 增加和 Bcl-2 降低与 Caspase 活性变化一致。而 PARP 是一种 DNA 修复酶,其作为 Caspase-3 主要的切割产物表达也显著上调^[28],这都表明 F-53B 能诱导肝细胞凋亡。

在这项研究中,我们使用 HepG2 和 Hep3B 细胞作为研究模型,通过测试 ROS、抗氧化系统(SOD、CAT)、凋亡率、凋亡家族蛋白等来研究 F-53B 的肝脏毒性,结果表明,氧化损伤可能是 F-53B 毒性的部分原因。经文献查阅,这是为数不多的针对肝细胞中 F-53B 毒性影响的研究之一,证明了 F-53B 能诱导 HepG2 和 Hep3B 细胞凋亡,结合之前动物实验等研究,进一步表明 F-53B 的肝脏毒性可能大于 PFOS,但是具体的机制仍需进一步的研究。在后续研究中,应结合体内暴露实验进行深入探究。另外,此研究测试所使用的剂量高于人类暴露的相关水平,因此不能推广到普通人群。本研究获得的关于 F-53B 的基础毒性数据,对 F-53B 的健康风险评价具有重要的科学指导意义。

通信作者简介: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] Krafft M P, Riess J G. Selected physicochemical aspects of poly- and perfluoroalkylated substances relevant to performance, environment and sustainability-part one [J]. *Chemosphere*, 2015, 129: 4-19
- [2] Bossi R, Strand J, Sortkjaer O, et al. Perfluoroalkyl compounds in Danish wastewater treatment plants and aquatic environments [J]. *Environment International*, 2008, 34(4): 443-450
- [3] Chen H, Zhang C, Han J B, et al. PFOS and PFOA in influents, effluents, and biosolids of Chinese wastewater treatment plants and effluent-receiving marine environments [J]. *Environmental Pollution*, 2012, 170: 26-31
- [4] Lin C Y, Chen P C, Lin Y C, et al. Association among serum perfluoroalkyl chemicals, glucose homeostasis, and metabolic syndrome in adolescents and adults [J]. *Diabetes Care*, 2009, 32(4): 702-707
- [5] Lv Q Y, Wan B, Guo L H, et al. *In vivo* immunotoxicity of perfluorooctane sulfonate in BALB/c mice: Identification of T-cell receptor and calcium-mediated signaling pathway disruption through gene expression profiling of the spleen [J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2015, 240: 84-93
- [6] Reismann D, Stefanowski J, Günther R, et al. Longitudinal intravital imaging of the femoral bone marrow reveals plasticity within marrow vasculature [J]. *Nature Communications*, 2017, 8(1): 2153
- [7] Saikat S, Kreis I, Davies B, et al. The impact of PFOS on health in the general population: A review [J]. *Environmental Science Processes & Impacts*, 2013, 15(2): 329-335
- [8] Steenland K, Tinker S, Frisbee S, et al. Association of perfluorooctanoic acid and perfluorooctane sulfonate with serum lipids among adults living near a chemical plant [J]. *American Journal of Epidemiology*, 2009, 170(10): 1268-1278
- [9] Wang Y, Shi Y L, Cai Y Q. Spatial distribution, seasonal variation and risks of legacy and emerging per- and polyfluoroalkyl substances in urban surface water in Beijing, China [J]. *The Science of the Total Environment*, 2019, 673: 177-183
- [10] Liu Z Y, Lu Y L, Wang P, et al. Pollution pathways and release estimation of perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoic acid (PFOA) in central and Eastern China [J]. *The Science of the Total Environment*, 2017, 580: 1247-1256
- [11] Huang J, Liu Y, Wang Q Y, et al. Concentration-dependent toxicokinetics of novel PFOS alternatives and their chronic combined toxicity in adult zebrafish [J]. *The Science of the Total Environment*, 2022, 839: 156388
- [12] Ti B W, Li L, Liu J G, et al. Global distribution potential and regional environmental risk of F-53B [J]. *The Science of the Total Environment*, 2018, 640-641: 1365-1371
- [13] Gebbink W A, Bossi R, Rigét F F, et al. Observation of emerging per- and polyfluoroalkyl substances (PFASs) in Greenland marine mammals [J]. *Chemosphere*, 2016, 144: 2384-2391
- [14] Pan Y T, Zhang H X, Cui Q Q, et al. Worldwide distribution of novel perfluoroether carboxylic and sulfonic acids in surface water [J]. *Environmental Science & Technology*, 2018, 52(14): 7621-7629
- [15] Wu Y M, Deng M, Jin Y X, et al. Toxicokinetics and toxic effects of a Chinese PFOS alternative F-53B in adult zebrafish [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2019, 171: 460-466
- [16] Gomis M I, Wang Z Y, Scheringer M, et al. A modeling assessment of the physicochemical properties and environmental fate of emerging and novel per- and polyfluoroalkyl substances [J]. *The Science of the Total Environment*, 2015, 505: 981-991
- [17] Wang Y, Shi Y L, Vestergren R, et al. Using hair, nail and urine samples for human exposure assessment of legacy and emerging per- and polyfluoroalkyl substances [J]. *The Science of the Total Environment*, 2018, 636: 383-391
- [18] Mi X, Yang Y Q, Zeeshan M, et al. Serum levels of per- and polyfluoroalkyl substances alternatives and blood

- pressure by sex status: Isomers of C8 health project in China [J]. *Chemosphere*, 2020, 261: 127691
- [19] Han X, Meng L L, Zhang G X, et al. Exposure to novel and legacy per- and polyfluoroalkyl substances (PFASs) and associations with type 2 diabetes: A case-control study in East China [J]. *Environment International*, 2021, 156: 106637
- [20] Shi Y L, Vestergren R, Xu L, et al. Human exposure and elimination kinetics of chlorinated polyfluoroalkyl ether sulfonic acids (Cl-PFESAs) [J]. *Environmental Science & Technology*, 2016, 50(5): 2396-2404
- [21] Cui Q Q, Pan Y T, Wang J H, et al. Exposure to per- and polyfluoroalkyl substances (PFASs) in serum versus semen and their association with male reproductive hormones [J]. *Environmental Pollution*, 2020, 266 (Pt 2): 115330
- [22] Cong J P, Chu C, Li Q Q, et al. Associations of perfluorooctane sulfonate alternatives and serum lipids in Chinese adults [J]. *Environment International*, 2021, 155: 106596
- [23] Shi G H, Cui Q Q, Wang J X, et al. Chronic exposure to 6:2 chlorinated polyfluorinated ether sulfonate acid (F-53B) induced hepatotoxic effects in adult zebrafish and disrupted the PPAR signaling pathway in their offspring [J]. *Environmental Pollution*, 2019, 249: 550-559
- [24] Zhang Q, Liu W, Niu Q, et al. Effects of perfluorooctane sulfonate and its alternatives on long-term potentiation in the hippocampus CA1 region of adult rats *in vivo* [J]. *Toxicology Research*, 2016, 5(2): 539-546
- [25] Yi S J, Chen P Y, Yang L P, et al. Probing the hepatotoxicity mechanisms of novel chlorinated polyfluoroalkyl sulfonates to zebrafish larvae: Implication of structural specificity [J]. *Environment International*, 2019, 133 (Pt B): 105262
- [26] Wang S W, Huang J, Yang Y, et al. First report of a Chinese PFOS alternative overlooked for 30 years: Its toxicity, persistence, and presence in the environment [J]. *Environmental Science & Technology*, 2013, 47(18): 10163-10170
- [27] Zhang B, He Y, Yang G, et al. Legacy and emerging poly- and perfluoroalkyl substances in finless porpoises from East China Sea: Temporal trends and tissue-specific accumulation [J]. *Environmental Science & Technology*, 2022, 56(10): 6113-6122
- [28] Zhang H X, Zhou X J, Sheng N, et al. Subchronic hepatotoxicity effects of 6:2 chlorinated polyfluorinated ether sulfonate (6:2 Cl-PFESA), a novel perfluorooctanesulfonate (PFOS) alternative, on adult male mice [J]. *Environmental Science & Technology*, 2018, 52(21): 12809-12818
- [29] Sheng N, Cui R N, Wang J H, et al. Cytotoxicity of novel fluorinated alternatives to long-chain perfluoroalkyl substances to human liver cell line and their binding capacity to human liver fatty acid binding protein [J]. *Archives of Toxicology*, 2018, 92(1): 359-369
- [30] Valko M, Rhodes C J, Moncol J, et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer [J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2006, 160(1): 1-40
- [31] Wu Y M, Deng M, Jin Y X, et al. Uptake and elimination of emerging polyfluoroalkyl substance F-53B in zebrafish larvae: Response of oxidative stress biomarkers [J]. *Chemosphere*, 2019, 215: 182-188
- [32] Wang J, Wang J X, Xu C, et al. Molecular mechanism of catalase activity change under sodium dodecyl sulfate-induced oxidative stress in the mouse primary hepatocytes [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2016, 307: 173-183
- [33] Zheng J L, Yuan S S, Wu C W, et al. Chronic waterborne zinc and cadmium exposures induced different responses towards oxidative stress in the liver of zebrafish [J]. *Aquatic Toxicology*, 2016, 177: 261-268
- [34] Mandraffino G, Sardo M A, Riggio S, et al. Smoke exposure and circulating progenitor cells: Evidence for modulation of antioxidant enzymes and cell count [J]. *Clinical Biochemistry*, 2010, 43(18): 1436-1442
- [35] 曹亚衡, 程瑞文. RSV 诱导非小细胞肺癌 A549 细胞氧化应激的分子机制[J]. *生物技术*, 2022, 32(1): 55-61, 5
- Cao Y H, Cheng R W. Molecular mechanism of RSV-induced oxidative stress in non-small cell lung cancer A549 cells [J]. *Biotechnology*, 2022, 32(1): 55-61, 5 (in Chinese)
- [36] Wu Y M, Huang J, Deng M, et al. Acute exposure to environmentally relevant concentrations of Chinese PFOS alternative F-53B induces oxidative stress in early developing zebrafish [J]. *Chemosphere*, 2019, 235: 945-951
- [37] Wang Y, Branicky R, Noë A, et al. Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling [J]. *The Journal of Cell Biology*, 2018, 217(6): 1915-1928
- [38] Kiraz Y, Adan A, Kartal Yandim M, et al. Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis [J]. *Tumour Biology*, 2016, 37(7): 8471-8486
- [39] Wu C C, Bratton S B. Regulation of the intrinsic apoptosis pathway by reactive oxygen species [J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2013, 19(6): 546-558 ◆