

孕期全氟辛烷磺酸盐(PFOS) 暴露诱导胎鼠肺损伤

张春雷, 李洪志, 刘洁婷, 包海花, 吴丹, 初彦辉, 赵冰海*

黑龙江省抗纤维化生物治疗重点实验室 牡丹江医学院医药研究中心 牡丹江 157011

摘要: 为研究全氟辛烷磺酸盐(PFOS)暴露对胎鼠肺部损伤的诱导作用, 孕期 SD 大鼠在 5 ~ 20 mg·kg⁻¹ 剂量范围内的 PFOS 中处理 7 d, 取胎鼠全肺并分析其发育所受的影响。通过形态学比较, 发现随着 PFOS 浓度的增加, 胎鼠体长和体重均显著降低, 高剂量暴露会导致胎鼠死亡。通过组织学检测, 发现胎鼠肺的发育受到 PFOS 暴露的抑制。通过 Western Blot 检测肺泡 I / II 型细胞的发育, 发现肺泡 I 型细胞特异蛋白 Podoplanin 表达显著减少($p < 0.05$), 肺泡 II 型细胞特异蛋白 SP-C 表达减少但未出现显著差异, 此外, 与对照组相比高剂量暴露会引起血管内皮生长因子(VEGF)表达显著减少($p < 0.01$)。实验结果说明, PFOS 暴露会导致胎鼠肺部发育出现损伤, 这种损伤可能是肺泡 I 型细胞及肺部血管发育受抑制引起胎鼠肺部气体交换功能破坏。

关键词: 全氟辛烷磺酸盐; 胎鼠; 肺泡细胞; 血管内皮生长因子; 发育毒性

文章编号: 1673-5897(2012)5-565-05 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Lung Impairments of Embryonic Rat Induced by Prenatal Perfluorooctane Sulfonate (PFOS) Exposure

Zhang Chunlei, Li Hongzhi, Liu Jieting, Bao Haihua, Wu Dan, Chu Yanhui, Zhao Binghai*

Heilongjiang Key Laboratory of Anti-fibrosis Biotherapy, Mudanjiang Medical University, Mudanjiang 157011, China

Received 23 March 2012 accepted 14 May 2012

Abstract: Perfluorooctane sulfonate (PFOS) exposure of pregnancy of SD rat inducing lung impairments of embryonic rat was studied. SD rats were exposed to PFOS at dosages from 5 mg kg⁻¹ to 20 mg kg⁻¹ for 7 days. The whole pups lung was collected and the developmental condition of lung was analyzed. Morphologically, the length and the weights of embryos significantly decreased after prenatal SD rats exposed to PFOS in a dose-dependent manner. Furthermore, higher dose PFOS caused death of embryonic rat. Histological observation reveals that PFOS exposure inhibited the development of pups lung. Western Blot was used to detect the development of type I / II alveolar cell. Results showed that Podoplanin, or the specific protein of type I alveolar cell decreased significantly ($p < 0.05$), while SP-C, or the specific protein of type II alveolar cell decreased but not in a significant level. The vascular endothelial growth factor (VEGF) significantly decreased ($p < 0.01$) in higher doses PFOS exposure compared with the control. Therefore, these results suggested that the mechanism on impairments of pups lung was probably induced by prenatal PFOS exposure impeding the development of type I alveolar cell and pulmonary vasculum, which damaged the pulmonary gas exchange.

Keywords: PFOS; pups; alveolar cell; VEGF; development poisonousness

收稿日期: 2012-03-23 录用日期: 2012-05-14

基金项目: 国家自然科学基金项目(81102149-H2607); 黑龙江省卫生厅科研课题项目(2010-235, 2010-238); 牡丹江医学院科学技术研究项目(2011-16)

作者简介: 张春雷(1983-), 男, 硕士研究生, 助教, 研究方向: 毒理学; E-mail: zclzcl008@foxmail.com;

* 通讯作者(Corresponding author), E-mail: zhaobinghai01@163.com.

全氟辛烷磺酸盐(PFOS)是一种重要的全氟化表面活性剂,同时还是其他 50 多种全氟化合物的代谢产物^[1],被广泛应用于日常生活用品生产^[2-4]。PFOS的大量使用使其已经进入全球范围内的各种环境介质,并通过食物链逐级放大,因此其毒性和生物富集潜力受到环境科学家们的广泛关注^[5-6]。2009 年 5 月,PFOS 以新型持久性有机污染物(POPs)被列入《斯德哥尔摩公约》。由于人类和环境长时间的 PFOS 暴露,目前在人体血清、脐带血和乳汁中均能检测到 PFOS 的存在,PFOS 对人群健康造成巨大的潜在危害^[7-8]。

动物实验表明,PFOS 能诱导实验动物的多系统毒性,包括免疫毒性^[12-13]、发育毒性^[14-15]、内分泌毒性^[16]、生殖毒性^[17-18]和肝脏毒性^[19-20]等。近几年,胚胎期 PFOS 暴露导致子代高死亡率引起毒理学家的广泛关注^[21]。Lau 等报道宫内 PFOS 暴露能导致胎鼠发绀,并呈剂量依赖性,同时能显著降低新生鼠的存活率,因此,推测肺部病变可能与之有关^[1];Olsen 等报道,宫内 PFOS 暴露能导致胎鼠肺脏的病理学改变,并认为肺脏的发育不成熟可能与 PFOS 暴露有关^[22];Han 等也证实,妊娠期高剂量的 PFOS 暴露能诱导胎鼠肺不张等肺部病理学改变^[23];此外,Cui 等将 C57Bl/6 妊娠小鼠在受孕 16 d 经静脉注射或经口暴露于³⁵S-PFOS (12.5 mg·kg⁻¹ body weight),于受孕 18 d、20 d 以及出生当天检测母鼠和胎鼠体内的³⁵S-PFOS 放射性,发现母鼠体内肝脏和肺脏的 PFOS 浓度最高,受孕 18 d 胎鼠体内肺脏、肝脏以及肾脏的 PFOS 浓度是母亲血液浓度的 2~3 倍,在出生当天胎鼠体内肺脏中 PFOS 浓度比受孕 18 日龄胎鼠还高^[24],因此推断肺脏是 PFOS 诱导发育毒性的靶器官之一。

本研究利用成年健康雌性 SD 大鼠,开展 PFOS 发育毒理学研究。旨在研究孕期 PFOS 暴露对胎鼠肺脏发育的影响,检测两种肺泡细胞及肺部血管发育的情况,探讨孕期 PFOS 暴露诱导胎鼠肺损伤的原因,以期为进一步开展此类物质发育毒性研究奠定基础,为制定环境安全政策和生态风险评估等提供科学依据。

1 材料和方法(Materials and methods)

1.1 主要仪器及试剂

PFOS(纯度>98%)购自瑞士 Fluka 公司;IVC 动物房(MN-LM 350P);超薄切片机(Leica 2145);倒置式生物显微镜(奥林巴斯 IX70-142);成像系统(柯达

4000R); Podoplanin (sc-166906, Santa Cruz, 美国); SP-C(sc-13979, Santa Cruz, 美国); 血管内皮生长因子 VEGF (sc-7269, Santa Cruz, 美国); β -Action (bs-0061R, 北京博奥森); Chicken polyclonal Secondary Antibody to Rabbit IgG-H&L(HRP)(ab6829, Abcam); 辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG(H+L)(ZB-2305, 北京中杉金桥生物技术有限公司); 辣根酶标记兔抗山羊 IgG(H+L)(ZB-2306, 北京中杉金桥生物技术有限公司); 浓缩型 DAB 试剂盒(ZLI-9031/9032/9033, 北京中杉金桥生物技术有限公司)。

1.2 实验动物模型制备及取材

成年健康 SPF 级雌性 SD 大鼠(GD11)16 只,体重(260 $\pm$ 8) g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司(许可证编号: SCXK(京)2006-0009)。随机分为 4 组:对照组(0 mg·kg⁻¹) 4 只,低剂量组(5 mg·kg⁻¹) 4 只,中剂量组(10 mg·kg⁻¹) 4 只,高剂量组(20 mg·kg⁻¹) 4 只,按体重灌胃 PFOS 持续处理 7 d。孕鼠于 GD19 处死,于宫腔内取出胎鼠,称重并完整取胎鼠肺脏,保存于 -80℃。

1.3 实验方法

1.3.1 形态学检测

记录胎鼠体重,体长及全肺重量,比较不同处理之间差异。

1.3.2 组织学 HE 染色检测

新鲜组织固定,脱水后石蜡包埋,使用超薄切片机制成 4 μ m 石蜡切片。采用人工苏木素,伊红染色法进行染色,染色结束使用倒置式生物显微镜观察并照相。

1.3.3 Western Blot 检测

每组取 3 只无血缘关系子代,提取肺组织总蛋白,测定浓度后取 100 μ g 样品,聚丙烯酰胺凝胶电泳,将蛋白电泳转至硝酸纤维素膜,转膜成功后,将硝酸纤维素膜用封闭液在室温下封闭 1 h,加入相应的一抗,4℃过夜,洗膜后再与相应的二抗于室温下作用 2 h,使用 DAB 染料显色,于柯达 4000R 成像系统下检测。测定 Podoplanin、SP-C、VEGF 的表达水平,使用 β -Action 作为内参照。照相记录,蛋白条带用柯达自带软件 Carestream Molecular Imagine 测积分灰度值,以各组蛋白表达量与 β -Action 比值进行半定量分析。

1.4 统计学处理

实验数据采用 GraphPad Prism 5.0 进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm \text{SEM}$ 表示,组间采用单因素方差分

析比较差异。

2 结果(Results)

2.1 形态学检测

通过观测,发现胎鼠及胎鼠肺组织随 PFOS 暴露剂量加大体积有下降趋势(图 1)。比较不同组间体重及体长,发现 PFOS 组均降低并有显著差异($p < 0.05$);比较全肺重量,PFOS 组虽有降低,但只有高剂量组下降有显著差异($p < 0.01$),见表 1。实验结果表明,孕期 PFOS 暴露会抑制胎鼠及其肺脏的发育,并与暴露剂量存在一定依赖关系,高剂量暴露会严重影响胎鼠发育并导致死亡。

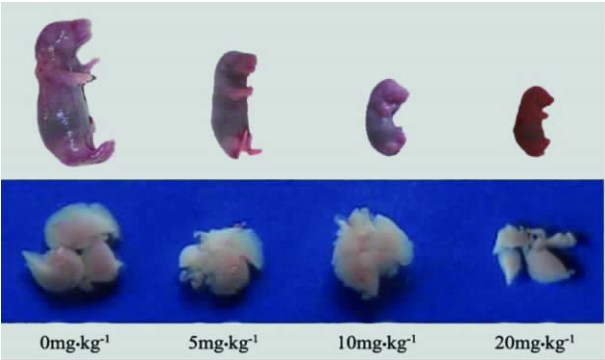


图 1 胎鼠及其肺脏发育

Fig. 1 Development of pups and lungs

表 1 孕期 PFOS 暴露胎鼠的体长、体重及肺重

Table 1 Body length, body weight and lung weight of pups exposed to PFOS during pregnancy

项 目	浓度组/(mg·kg ⁻¹)			
	0	5	10	20
n	39	54	56	62
体重/g	4.060 ± 0.044	3.853 ± 0.033**	3.830 ± 0.042*	2.784 ± 0.066***
体长/cm	3.791 ± 0.020	3.662 ± 0.020	3.654 ± 0.016	2.970 ± 0.037***
肺重/mg	102.6 ± 2.85	91.89 ± 4.40	93.34 ± 5.18	34.72 ± 2.97***

注: 与对照组比较*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ 。

2.2 组织学 HE 染色检测

不同处理组肺脏制成 4 μm 超薄切片并进行 HE 染色,观察肺泡的发育情况。发现 PFOS 暴露的 4 组肺泡均有张开。随 PFOS 暴露剂量加大肺泡张开有缩小的趋势,其中低剂量组及中剂量组张开缩小不明显,但高剂量组肺泡张开严重缩小,说明胚胎期 PFOS 暴露会影响肺泡的发育,尤其是高剂量暴露会严重影响肺泡发育,见图 2。

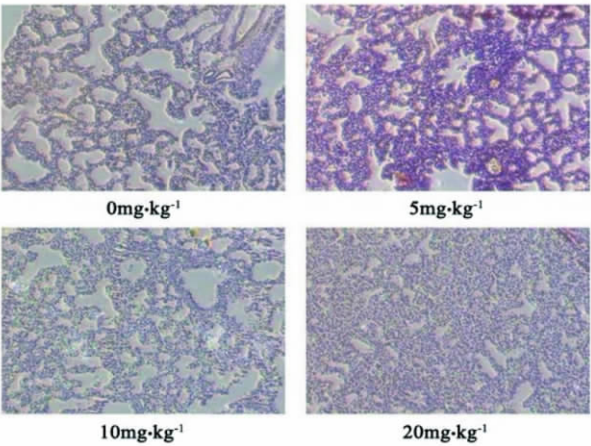


图 2 胎鼠肺脏切片 HE 染色(10 × 20)

Fig. 2 HE staining of pup lungs

2.3 Western Blot 检测

Podoplanin、SP-C 及 VEGF 的 Western Blot 检测

结果见图 3,这 3 种特异性蛋白在胎鼠肺脏中均有表达。通过蛋白表达量与 β -Action 的比值进行半定量分析,不同组间采用单因素方差分析比较差异,发现 Podoplanin 在高剂量组表达下降较对照组存在显著差异($p < 0.05$),VEGF 在 PFOS 组表达均下降并较对照组存在显著差异($p < 0.05$),SP-C 在高剂量组表达虽有下降但未出现显著差异。由 Western Blot 组间比较可以看出,孕期 PFOS 暴露对胎鼠肺部发育造成的影响,主要表现为 Podoplanin 代表的肺泡 I 型细胞和 VEGF 代表的肺部血管发育受到抑制。

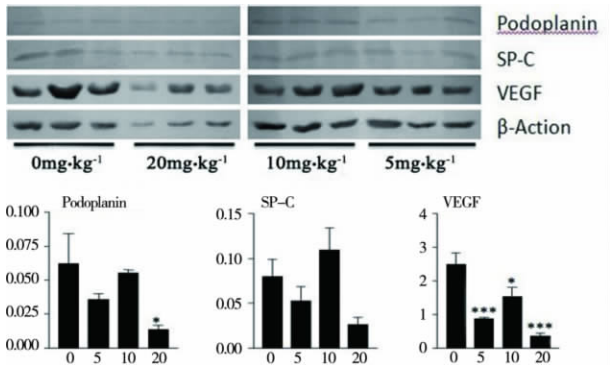


图 3 胎鼠肺脏蛋白表达 Western Blot 结果及差异分析

Fig. 3 Western Blot and variance analysis of pup lung protein expression

3 讨论(Discussion)

PFOS 作为环境污染物对人群健康造成巨大的潜在危害,可诱导多系统毒性^[12-20]。目前,胚胎期 PFOS 暴露导致子代高死亡率已引起毒理学家的广泛关注^[21],Cui 等通过³⁵S-PFOS 放射性暴露实验证明,肺脏是 PFOS 诱导发育毒性重要的靶器官之一^[24],但 PFOS 诱导肺损伤的具体机制仍然不清。Olsen 等证实是由于肺脏的发育不成熟^[22],Han 等认为与胎鼠肺不张等肺部病理学改变相关^[23]。

本研究在国内外已有报道基础上,进一步探讨了孕期 PFOS 暴露诱导胎鼠肺损伤的原因。考虑胎鼠肺的发育过程中可能受抑制的部位有肺泡 I 型细胞、肺泡 II 型细胞及肺部血管,我们通过检测其特异性蛋白 Podoplanin、SP-C 及 VEGF 的表达量变化,来寻找孕期 PFOS 暴露诱导的胎鼠肺损伤发生的主要部位。

形态学比较证明,孕期 PFOS 暴露会导致胎鼠体长和体重显著降低($p < 0.05$)并与暴露剂量呈负相关关系,同时对胎鼠肺脏发育也存在抑制作用,高剂量暴露肺重降为(34.72 ± 2.97) g 与对照组存在显著差异($p < 0.01$),会导致胎鼠死亡。组织学 HE 染色检测发现,胎鼠肺脏的发育确实受到孕期 PFOS 暴露的影响而发生改变,随着暴露剂量的加大组织越发致密、肺泡张开程度有缩小趋势。通过 Western Blot 检测进一步发现,Podoplanin 的表达量在高剂量暴露下较对照显著减少($p < 0.05$),Podoplanin 是一种小分子黏液样跨膜糖蛋白,首先在肾足细胞上被发现,后来发现它主要存在于肺脏及淋巴管内皮细胞,可作为肺泡 I 型细胞的标志物,由其表达量的显著减少说明高剂量的 PFOS 暴露会显著抑制肺泡 I 型细胞的发育,影响肺气体交换功能的实现;人肺表面活性物质相关蛋白 C(SP-C)是检测肺泡 II 型细胞的标志物,参与肺表面张力的构建及肺的张开,PFOS 暴露刺激下 SP-C 的表达量虽有减少但未出现显著差异,说明 PFOS 暴露会抑制肺泡 II 型细胞的发育,但其导致的肺表面张力变化并不是胎鼠致死的主要原因;同时,Western Blot 检测显示,VEGF 的表达量显著减少($p < 0.01$),说明 PFOS 暴露刺激会显著抑制胎鼠肺部血管的生长发育。由以上实验结果,我们得出孕期 PFOS 暴露会抑制胎鼠的生长发育,肺脏是受到发育抑制的靶器官之一,高剂量的暴露会诱导严重的肺损伤并致死。这种孕期 PFOS 暴露诱导的肺损伤,可能是由于肺泡 I 型

细胞及肺部血管的发育受到抑制引起的,最终导致胎鼠肺部气体交换功能受到破坏。

此外,通过本研究我们还发现一个现象,即中剂量组所受发育损伤小于低剂量组及高剂量组,表现为更低的发育毒性,我们推测 PFOS 暴露浓度可能与相关免疫应答通路的激活有关,适量的刺激会激活机体的自身免疫,而过低或过高的刺激反而对机体造成较大伤害,其具体机制仍有待进一步研究。

通讯作者简介:

赵冰海(1977—),男,副教授,主要研究方向为生态毒理学,发表 SCI 学术论文 20 余篇。

参考文献:

- [1] Lau C, Thibodeaux J R, Hanson R G, et al. Exposure to perfluorooctane sulfonate during pregnancy in rat and mouse. II: Postnatal evaluation [J]. *Toxicological Sciences*, 2003, 74(2): 382 - 392
- [2] Giesy J P, Kannan K. Global distribution of perfluorooctane sulfonate in wildlife [J]. *Environmental Science & Technology*, 2001, 35(7): 1339 - 1342
- [3] Pelley J. Canada moves to eliminate PFOS stain repellents [J]. *Environmental Science & Technology*, 2004, 38(23): 452A
- [4] Chen T, Zhang L, Yue J Q, et al. Prenatal PFOS exposure induces oxidative stress and apoptosis in the lung of rat off-spring [J]. *Reproductive Toxicology*, 2012, 33(4): 538 - 545
- [5] Lau C, Anitole K, Hodes C, et al. Perfluoroalkyl acids: A review of monitoring and toxicological findings [J]. *Toxicological Sciences*, 2007, 99(2): 366 - 394
- [6] Naile J E, Khim J S, Wang T, et al. Perfluorinated compounds in water, sediment, soil and biota from estuarine and coastal areas of Korea [J]. *Environmental Pollution*, 2010, 158(5): 1237 - 1244
- [7] Inoue K, Okada F, Ito R, et al. Perfluorooctane sulfonate (PFOS) and related perfluorinated compounds in human maternal and cord blood samples: Assessment of PFOS exposure in a susceptible population during pregnancy [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2004, 112(11): 1204 - 1207
- [8] Dai J, Li M, Jin Y, et al. Perfluorooctanesulfonate and perfluorooctanoate in red panda and giant panda from China [J]. *Environmental Science & Technology*, 2006, 40(18): 5647 - 5652
- [9] Tao L, Kannan K, Kajiwar N, et al. Perfluorooctane-

- sulfonate and related fluorochemicals in albatrosses, elephant seals, penguins, and polar skuas from the Southern Ocean [J]. *Environmental Science & Technology*, 2006, 40(24): 7642 – 7648
- [10] Olivero-Verbel J, Tao L, Johnson - Restrepo B, et al. Perfluorooctanesulfonate and related fluorochemicals in biological samples from the north coast of Colombia [J]. *Environmental Pollution*, 2006, 142(2): 367 – 372
- [11] Kovarova J, Svobodova Z. Perfluorinated compounds: Occurrence and risk profile [J]. *Neuro Endocrinology Letters*, 2008, 29(5): 599 – 608
- [12] 余明东, 袁萍, 何杰颖, 等. 全氟辛烷磺酸对 SD 大鼠的免疫损伤作用[J]. *中南医学科学杂志*. 2011, 39(2): 220 – 223
- Yu M, Yuan P, He J, et al. The immunologic injury effect of PFOS on SD rats [J]. *Journal of Medical Science in Central South China*, 2011, 39(2): 220 – 223 (in Chinese)
- [13] 文红玲, 李梓民, 周艳, 等. 全氟辛烷磺酸(PFOS)对小鼠免疫功能的影响[J]. *南华大学学报(医学版)*, 2010, 38(1): 45 – 47
- Wen H, Li Z, Zhou Y, et al. Effect of perfluorooctane sulfonate (PFOS) on immunity in mice [J]. *Journal of University of South China: Medical Edition*, 2010, 38(1): 45 – 47 (in Chinese)
- [14] 叶露, 吴玲玲, 蒋雨希, 等. PFOS/PFOA 对斑马鱼(*Danio rerio*)胚胎致毒效应研究[J]. *环境科学*, 2009, 30(6): 1727 – 1732
- Ye L, Wu L, Jiang Y, et al. Toxicological Study of PFOS/PFOA to zebrafish (*Danio rerio*) embryos [J]. *Environmental Science*, 2009, 30(6): 1727 – 1732 (in Chinese)
- [15] Mulkiewicz E, Jastorff B, Skladanowski A C, et al. Evaluation of the acute toxicity of perfluorinated carboxylic acids using eukaryotic cell lines, bacteria and enzymatic assays [J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2007, 23(3): 279 – 285
- [16] 郑丽, 董光辉, 于一凡, 等. 全氟辛烷磺酸对小鼠脾细胞 NO 分泌水平影响[J]. *中国公共卫生*, 2010, 26(4): 431 – 432
- Zheng L, Dong G, Yu Y, et al. Effect of perfluorooctane sulfonate (PFOS) on nitric oxide secretion in C57BL/6 mice [J]. *Chinese Journal of Public Health*, 2010, 26(4): 431 – 432 (in Chinese)
- [17] 张小梅, 宋锦兰, 金一和, 等. 全氟辛烷磺酸对雄性鹌鹑生殖毒性影响[J]. *生态毒理学报*, 2011, 6(2): 143 – 148
- Zhang X, Song J, Jin Y, et al. Study on reproductive toxicity of perfluorooctane sulfonate (PFOS) in male quail [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2011, 6(2): 143 – 148 (in Chinese)
- [18] Lau C, Thibodeaux J R, Hanson R G, et al. Effects of perfluorooctanoic acid exposure during pregnancy in the mouse [J]. *Toxicological Sciences*. 2006, 90(2): 510 – 518
- [19] 仇敬运, 屈艾, 胡文静, 等. 全氟辛烷磺酸钾对小鼠肝脏的氧化性损伤研究[J]. *毒理学杂志*. 2011, 25(4): 265 – 268
- Qiu J, Qu A, Hu W, et al. Study on oxidative damage on liver of mice induced by PFOS-K [J]. *Journal of Toxicology*. 2011, 25(4): 265 – 268 (in Chinese)
- [20] Han X, Kemper R A, Jepson G W. Subcellular distribution and protein binding of perfluorooctanoic acid in rat liver and kidney [J]. *Drug and Chemical Toxicology*, 2005, 28(2): 197 – 209
- [21] So M K, Yamashita N, Taniyasu S, et al. Health risks in infants associated with exposure to perfluorinated compounds in human breast milk from Zhoushan, China [J]. *Environmental Science & Technology*, 2006, 40(9): 2924 – 2929
- [22] Olsen G W, Burris J M, Burlew M M, et al. Epidemiologic assessment of worker serum perfluorooctanesulfonate (PFOS) and perfluorooctanoate (PFOA) concentrations and medical surveillance examinations [J]. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 2003, 45(3): 260 – 270
- [23] Han X, Snow T A, Kemper R A, et al. Binding of perfluorooctanoic acid to rat and human plasma proteins [J]. *Chemical Research in Toxicology*. 2003, 16(6): 775 – 781
- [24] 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 Environment Contamination and Toxicology*, 2009, 56(2): 338 – 349
- ◆