

龚阿芳,李银生. 全氟辛烷磺酸盐对大鼠胚胎发育及胎盘 IGF-1 表达的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(1): 76-79,83.

Gong AF, Li YS. Effects of exposure to perfluorooctane sulphonate at different doses on embryonic development and expression of placental IGF-1 in rats [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(1): 76-79,83.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019.01.013

全氟辛烷磺酸盐对大鼠胚胎发育及胎盘 IGF-1 表达的影响

龚阿芳¹, 李银生^{2*}

(1. 郑州澍青医学高等专科学校, 郑州 450064; 2. 新乡医学院, 河南 新乡 453003)

【摘要】 目的 探讨不同剂量全氟辛烷磺酸盐(perfluorooctane sulphonate, PFOS)染毒对大鼠胚胎发育及胎盘胰岛素样生长因子-1(insulin-like growth factor 1, IGF-1)表达的影响。**方法** 将孕 12 d 的 48 只 SD 雌性大鼠, 随机分为 4 组给予不同剂量的 PFOS(0, 5, 10, 20 mg/kg), 连续灌胃 7 d, 在孕 19 d 时处死孕鼠, 检测孕鼠和胎鼠的体质量、胎鼠肝系数、孕鼠血清 PFOS 和糖皮质激素(glucocorticoid, GC)水平、胎盘 IGF-1 表达水平。**结果** 与对照组相比, 随着 PFOS 剂量增加, 染毒组孕鼠血清 PFOS 显著蓄积, 孕鼠体质量、胎鼠体质量和体长、胎盘质量均逐渐下降, PFOS 20 mg/kg 组差异有显著性($P < 0.001$); 胎鼠肝系数也表现相同趋势, 低中高剂量染毒组均显著低于对照组($P < 0.05$), 血液生化丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)与天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)也随着 PFOS 给药剂量的增加而增高($P < 0.05$); PFOS 10 mg/kg 组, 孕鼠血清 GC 水平升高($P < 0.05$); 胎盘 IGF-1 表达水平随 PFOS 剂量升高而降低。**结论** 孕期长期暴露 PFOS 会导致孕鼠血清 PFOS 含量蓄积, 进而导致胎鼠肝毒性, GC 含量升高, 胎盘 IGF-1 表达水平降低, 最终影响胎鼠的生长发育。

【关键词】 全氟辛烷磺酸盐; 染毒; 胎鼠生长; IGF-1; 糖皮质激素; 大鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019) 01-0076-04

Effects of exposure to perfluorooctane sulphonate at different doses on embryonic development and expression of placental IGF-1 in rats

GONG Afang¹, LI Yinsheng^{2*}

(1. Zhengzhou Shuqing Medical College, Zhengzhou 450064, China. 2. Xinxiang Medical College, Xinxiang 453003)

【Abstract】 Objective To explore the effects of exposure to perfluorooctane sulphonate (PFOS) at different doses on embryonic development and expression of placental insulin-like growth factor 1 (IGF-1) in rats. **Methods** At gestational day 12, pregnant rats were exposed to different doses of PFOS (0, 5, 10, and 20 mg/kg) by gavage for 7 d. At gestational day 19, the body masses of pregnant and fetal rats, liver organ coefficient of fetal rats, serum PFOS and glucocorticoid (GC) levels of pregnant rats, and IGF-1 mRNA level of placenta were measured. **Results** Compared with those in the control group, the serum PFOS levels of pregnant rats in the treatment groups were significantly higher with increasing PFOS dose, while the body mass of pregnant rats and the body mass and length of fetal rats exposed to 20 mg/kg PFOS were significantly lower ($P < 0.001$). Fetal rat liver organ coefficient in the treatment group showed the same trend of a marked decrease ($P < 0.05$). Blood biochemical alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase

[作者简介] 龚阿芳(1982—), 女, 硕士研究生, 讲师, 研究方向: 人体解剖学与组织胚胎学。E-mail: kaixinshide2008@163.com

[通信作者] 李银生(1965—), 男, 副教授, 博士研究生, 研究方向: 中医药抗肺纤维化研究。E-mail: guxiao19820@163.com

(AST) also increased with the dose of PFOS ($P < 0.05$). Treatment with 10 mg/kg PFOS increased the serum GC level of pregnant rats ($P < 0.05$). IGF-1 mRNA level decreased with the increasing PFOS dose in placenta. **Conclusions** PFOS exposure during pregnancy can lead to liver toxicity in fetal rats through the maternal accumulation of PFOS in the serum, increased GC concentration, and decreased IGF-1 mRNA expression, thereby affecting the growth and development of offsprings.

【Keywords】 perfluorooctane sulphonate (PFOS); exposure; embryonic development; IGF-1; glucocorticoid (GC); rat

全氟辛烷磺酸盐(perfluorooctane sulfonate, PFOS)作为重要的全氟化表面活性剂,广泛应用于杀虫剂、灭火剂、纸张等日常生活用品生产^[1-2]。由于PFOS在人体的蓄积率较高,目前在人体血清、脐带血、乳汁中均能检测到PFOS的存在,特别是青少年人群蓄积严重^[3]。前期毒理学研究显示,PFOS对肝、神经生殖、心血管和生殖发育均有显著的毒性作用^[4-7]。研究显示,肝是PFOS毒力的主要靶器官,影响脂肪代谢,越过胎盘屏障,危害子代健康^[8-9]。糖皮质激素(glucocorticoid, GC),简称皮质醇,是一类甾体激素。研究认为,GC在胎儿的生长发育过程中有着重要作用,GC既可以在细胞水平影响受体、酶、离子通道和载体,也能调控细胞结构蛋白、连接蛋白和信号途径以及不同生长因子的表达,GC水平过高还能抑制蛋白质合成,甚至导致生长停滞,胎儿宫内GC过高会对子代的生长发育产生深远的影响^[10-12]。

本研究通过不同剂量PFOS对孕鼠的染毒处理,检测孕鼠和胎鼠的各项生理生化指标、孕鼠血清PFOS蓄积、GC含量、胎盘胰岛素样生长因子((insulin-like growth factor 1, IGF-1)的变化,以期对PFOS导致的胎儿的生长异常研究提供参考。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF级成年雌性SD大鼠48只(孕11 d),体重240~280 g,购自第三军医大学动物中心,实验动物生产许可证号[SCXK(渝)2015-0005]。饲养于新乡医学院 SPF级动物房[SYXK(豫)2017-022],饲养条件:室温20℃~24℃,相对湿度40%~70%,光暗循环12 h/12 h,自由饮水摄食。并按实验动物使用的3R原则给予人道的关怀。实验动物福利伦理审查号:2017062302。

1.2 主要试剂与仪器

全氟辛烷磺酸钾(H2012067, 99.00%分析纯,美国Sigma公司); Tween 20(H2017231, Sigma

Aldrich, 美国); RT-PCR试剂盒(北京天根生化科技有限公司); RT-PCR引物由上海英维捷基贸易有限公司合成; 血清糖皮质激素ELISA试剂盒(S2018031, 武汉华美生物技术公司); RNA提取试剂盒(S2017023, 美国Omega公司)。全自动酶标仪(Bio-Rad iMark, 美国); 冷冻离心机(Eppendorf Microfuge 20R, 德国); 实时荧光定量PCR仪(StepOne, 美国ABI公司); 5500 QTRAP四极杆-线性离子阱复合质谱检测系统(AB SCIEX公司); ZorbaxXDB C-18色谱柱(Narrow Agilent, 美国); 低温冰箱(Thermo Scientific Forma, 美国); 电子天平(Sartorius公司, 德国); 手动式超声波细胞破碎仪(Thermo公司, 美国); Milli-Q超纯水仪(Millipore公司); XW-80A旋涡混合器(上海医大仪器厂)。

1.3 实验方法

1.3.1 分组和染毒

随机分为4组, 对照组(0.5%体积分数的Tween 20), 低剂量染毒组(5 mg/kg PFOS)、中剂量染毒组(10 mg/kg PFOS)和高剂量染毒组(20 mg/kg PFOS), 每组12只。染毒组SD孕鼠每天灌胃PFOS 1次, 从孕12 d到孕18 d持续染毒7 d, 对照组给予含体积分数为0.5% Tween 20的水溶液。孕19 d时戊巴比妥钠麻醉后剖腹取胎, 取出胎鼠和胎盘后, 检测胎鼠体质量、体长和胎盘质量。每窝取3~6只幼鼠, 断头处死, 尽快分离组织, 液氮速冻, -80℃保存待用。

1.3.2 孕鼠血清PFOS和GC水平测定

将孕鼠血液3000 r/min, 4℃离心30 min后收集上清。采用高效液相色谱/质谱法测定血清PFOS含量, 方法依照文献^[13]。按照血清糖皮质激素ELISA试剂盒说明书操作, 用酶标仪检测记录GC浓度水平。

1.3.3 胎鼠肝系数测量

取出胎鼠后, 迅速将胎鼠肝用生理盐水漂洗, 用滤纸吸干肝水分后立即称重。脏器系数计算方法: 脏器系数=[胎鼠肝质量(g)/胎鼠体质量(g)]×100%。

1.3.4 胎盘 IGF-1 的 mRNA 表达水平测定

每组随机取 4 个胎盘 30 mg 组织加 0.5 mL TRIzol 液,用组织研磨杵充分研磨,根据试剂盒说明,提取 SD 鼠胎盘的总 RNA、逆转录为 cDNA,实时荧光定量 PCR 仪检测 IGF-1 表达,以 Rps16 为内参计算 IGF-1 表达量。反应条件 95℃ 预变性 5 min,此后每循环变性 95℃、30 s,退火 60℃、30 s,延伸 72℃、30 s,45 个循环数。引物序列为:正向:5'-ACTCTGCTTGCTCACCTTTACC-3';反向:5'-TCATCCACAATGCCCCGTC-3'。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 18.0 软件进行数据分析,Excel 软件作图。全部数据用平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 *t* 检验对各组数据进行分析,以 *P* < 0.05 表示差异有显著性。

2 结果

2.1 不同剂量 PFOS 处理对孕鼠和胎鼠基本生长情况的影响

实验中未发现孕鼠和胎鼠有死亡畸形,实验显示,染毒后孕鼠的体质量出现了明显的下降,随着 PFOS 剂量的加大体质量降低趋势愈加明显,高剂量 PFOS 染毒组(20 mg/kg)孕鼠体质量为(208.78 ± 19.45) g,与对照组(0 mg/kg)相比差异有显著性(*P* < 0.001)。胎鼠的体质量、体长和胎盘的质量表

现出相同的降低趋势,高剂量 PFOS 染毒组(20 mg/kg)下降最为严重(*P* < 0.001),见表 1。

2.2 PFOS 染毒对孕鼠血清 PFOS 及 GC 含量的影响

结果显示,持续灌胃 7 d 后低、中、高实验组孕鼠血清中 PFOS 含量逐渐增加,与低剂量组相比,中、高剂量组 PFOS 累积更加严重(*P* < 0.001)。于此同时,孕鼠血清 GC 在高剂量组(20 mg/kg)表达显著增加(表 2,*P* < 0.05)。

2.3 PFOS 染毒对胎鼠肝系数及胎盘 IGF-1 表达的影响

不同剂量 PFOS 染毒后,胎鼠的肝系数随着 PFOS 剂量增加显著降低。与对照组相比,中剂量 PFOS 染毒组(10 mg/kg)和高剂量 PFOS 染毒组(20 mg/kg)差异均有显著性(分别为 *P* < 0.05 和 *P* < 0.001)。IGF-1 表达水平在低、中、高剂量 PFOS 染毒组胎盘中逐渐降低,差异有显著性(表 3)。

2.4 PFOS 染毒对胎鼠肝生化的影响

不同剂量 PFOS 染毒后,胎鼠血液生化丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)与天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)也随着 PFOS 给药剂量的增加而增高。与对照组相比,低、中、高 PFOS 染毒组(20 mg/kg)差异均有显著性(均为 *P* < 0.05)(表 4)。

表 1 PFOS 染毒后孕鼠和胎鼠体质量和生长状况($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Body mass and growth of pregnant and fetal rats after PFOS exposure

PFOS 剂量 (mg/kg) PFOS dose	孕鼠数量 Number of pregnant mice	染毒前孕 鼠体质量(g) Body mass of pregnant mice before PFOS exposure	染毒后孕鼠 体质量(g) Body mass of pregnant mice after PFOS exposure	胎鼠数量 Number of fetal mice	胎鼠体 质量(g) Body mass of fetal rats	胎鼠体长(cm) Body length of fetal rats	胎盘质量(g) Placental mass
0	12	252.09 ± 18.03	327.13 ± 16.34	10.53 ± 2.69	2.72 ± 0.05	3.20 ± 0.66	0.53 ± 0.10
5	12	260.45 ± 15.67	341.23 ± 18.56	10.34 ± 2.65	2.46 ± 0.04***	3.17 ± 0.29	0.49 ± 0.03***
10	12	268.89 ± 17.34	315.09 ± 15.34	10.92 ± 1.74	2.27 ± 0.04*	3.02 ± 0.37	0.46 ± 0.12
20	12	254.43 ± 19.56	208.78 ± 19.45***	11.31 ± 1.95	2.08 ± 0.06***	2.47 ± 0.06***	0.39 ± 0.01***

注:与对照组比较,**P* < 0.05,***P* < 0.01,****P* < 0.001。
Note. Compared with the control group,**P* < 0.05,***P* < 0.01,****P* < 0.001.

表 2 PFOS 染毒后孕鼠血清 PFOS 及 GC 的平均浓度($\bar{x} \pm s$, *n* = 12)

Table 2 Average concentrations of PFOS and GC in serum of pregnant rats after PFOS exposure

PFOS 剂量(mg/kg) PFOS dose	孕鼠 PFOS 浓度(μg/mL) PFOS concentration in pregnant rats	孕鼠 GC 浓度(ng/mL) GC concentration in pregnant rats
0	ND [#]	8.21 ± 0.21
5	4.02 ± 0.42	8.94 ± 0.12
10	8.35 ± 0.69 ^{ΔΔΔ}	8.53 ± 0.34
20	14.19 ± 0.47 ^{ΔΔΔ}	10.87 ± 0.19*

注:[#]低于检测限。与低剂量组(5 mg/kg)比较,^{ΔΔΔ}*P* < 0.001;与对照组比较,**P* < 0.05。
Note.[#]Lower than the detection limit. Compared with the low-dose group (5 mg/kg),^{ΔΔΔ}*P* < 0.001. Compared with the control group,**P* < 0.05.

表 3 PFOS 染毒对胎鼠脏器系数及胎盘 IGF-1 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effects of PFOS exposure on organ coefficient and placental IGF-1 expression in fetal rats

PFOS 剂量 (mg/kg) PFOS dose	胎鼠脏器 系数 (%) Organ coefficient of fetal rats	胎盘 IGF-1 表达量 Expression level of IGF-1 in placenta
0	8.66 ± 0.37	0.38 ± 0.13
5	8.82 ± 0.19	0.18 ± 0.32 *
10	7.89 ± 0.32 *	0.15 ± 0.41 **
20	5.54 ± 0.24 ***	0.11 ± 0.26 ***

注:与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。
Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

表 4 PFOS 染毒对胎鼠血液生化的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Effects of PFOS on the blood biochemistry of fetal rats

PFOS 剂量 (mg/kg) PFOS dose	天门冬氨酸氨 基转移酶 (U/L) AST	丙氨酸氨基 转移酶 (U/L) ALT
0	168.88 ± 18.31	56.78 ± 7.35
5	182.12 ± 15.23 *	65.61 ± 6.89 *
10	198.32 ± 17.22 *	77.34 ± 8.23 *
20	208.97 ± 16.89 *	82.49 ± 6.94 *

注:与对照组比较, * $P < 0.05$ 。
Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$.

3 讨论

PFOS 作为一种常见的有机污染物,能够通过胎盘屏障,对子代产生持续的发育毒性^[14-15]。随着 PFOS 愈加广泛的应用,国内外对其在生殖、发育、神经等种生命过程中直接或间接毒性作用研究愈加深入,特别是孕期 PFOS 暴露导致子代高死亡率已经早有报道^[16]。

母鼠与仔鼠的不同毒性效应显示成年和新生儿对 PFOS 的敏感度不同,暴露同样剂量的 PFOS 可能对胚胎和新生儿的毒害作用更大。类似的胚胎期暴露和两代繁殖实验表明 PFOS 能够造成大小鼠的仔鼠死亡率升高和发育延迟^[17-18],本研究也发现 PFOS 的胚胎期暴露会导致仔鼠的发育延迟。

本研究发现孕鼠血清 PFOS 蓄积严重且随着 PFOS 剂量浓度升高而显著增加。同时胎鼠的体质量、体长、胎盘质量、胎鼠肝系数随着 PFOS 剂量浓度升高而显著降低,说明孕期大鼠 PFOS 暴露可以导致孕鼠血清 PFOS 蓄积从而使未出生的胎鼠肝功能受损,最终降低胎鼠的体质量、体长、胎盘质量。肝作为 PFOS 毒性作用的主要靶器官,一旦受损,外源化合物代谢将受到严重影响。PFOS 能够导致严

重的肝损伤,因此 PFOS 对孕鼠和胎鼠的毒性作用可以从肝系数变化上得到一定程度的体现^[19-20]。

本研究显示,随着 PFOS 剂量浓度的升高,孕鼠血清中的 GC 与 PFOS 表现出同样的变化趋势,与 PFOS 染毒浓度正相关,而胎盘中 IGF-1 表达水平却表现出相反的趋势,随 PFOS 染毒剂量的升高 IGF-1 表达逐渐降低。GC 对胎儿的生长发育起着重要作用,既能借助促进细胞的快速分化来帮助胎儿健全器官的发育和成熟;相反又可以介乎抑制细胞的增殖速度来调控胎儿不同组织的发育^[12]。胰岛素样生长因子(IGF-1)是一种结构上类似于胰岛素且功能接近的多肽,功能上在体内参与帮助胚胎以及胎儿的个体发育,代谢上 IGF-1 可以影响脂肪、蛋白质以及糖的代谢^[21]。有报道显示,在胎儿发育过程中胎儿、胎盘的生长发育会受到 IGF-1 的调控,与此同时 IGF-1 的表达会受到母源高 GC 水平的抑制^[22]。

本研究通过孕期不同剂量 PFOS 染毒处理,证实其对孕鼠和胎鼠的生长有显著的影响,对胎鼠的肝功能造成损伤。进一步对孕鼠血清 PFOS 含量、GC 含量和胎盘 IGF-1 表达水平分析发现,其变化趋势与 PFOS 染毒剂量浓度密切相关。PFOS 毒性机制可能是由于 PFOS 暴露并在孕鼠体内蓄积导致母源性 GC 水平升高,降低了胎盘的 IGF-1 表达,从而使胎鼠肝受损,影响胎鼠的正常发育。

参考文献:

[1] Chen T, Zhang L, Yue JQ, et al. Prenatal PFOS exposure induces oxidative stress and apoptosis in the lung of rat offspring [J]. Reprod Toxicol, 2012, 33(4): 538-545.

[2] Naile JE, Khim JS, Wang T, et al. Perfluorinated compounds in water, sediment, soil and biota from estuarine and coastal areas of Korea [J]. Environ Pollut, 2010, 158(5): 1237-1244.

[3] 孙燕霞, 杨海, 董文洪, 等. 全氟辛烷磺酸盐的危害及其处理进展研究 [J]. 广东化工, 2018, 45(2): 108-110.

[4] Rosen MB, Schmid JE, Das KP, et al. Gene expression profiling in the liver and lung of perfluorooctane sulfonate-exposed mouse fetuses: comparison to changes induced by exposure to perfluorooctanoic acid [J]. Reprod Toxicol, 2009, 27(3-4): 278-288.

[5] Chang SC, Thibodeaux JR, Eastvold ML, et al. Thyroid hormone status and pituitary function in adult rats given oral doses of perfluorooctane sulfonate (PFOS) [J]. Toxicology, 2008, 243(3): 330-339.

[6] Fei C, McLaughlin JK, Tarone RE, et al. Perfluorinated chemicals and fetal growth: a study within the Danish National Birth Cohort [J]. Environ Health Perspect, 2007, 115(11): 1677-1682.

(下转第 83 页)