

全氟辛酸致小鼠脾脏氧化损伤的实验研究

王 力,张梦媛,吕 卉,申 玲,张玉媛,赵文红

[摘要] **目的:**探讨不同剂量全氟辛酸(perfluorooctanoic acid, PFOA)对小鼠脾脏组织的脂质过氧化损伤效应。**方法:**40只 SPF 级 ICR 小鼠,按单纯随机抽样方法分为正常对照组和低剂量组(1 mg/kg PFOA)、中剂量组(5 mg/kg PFOA)、高剂量组(25 mg/kg PFOA)3个染毒组,每组10只。染毒组各组每天1次灌胃相应剂量 PFOA 染毒,灌胃溶液体积为0.1 ml/10 g,正常对照组给予等体积0.9%氯化钠注射液,持续14 d,每天称质量1次,观察行为,14 d后称质量处死,计算脾脏系数,检测脾组织中超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、山梨醇脱氢酶(SDH)、乳酸脱氢酶(LDH)、丙二醛(MDA)及一氧化氮(NO)水平。**结果:**各染毒组小鼠出现不同程度的体质量增长缓慢甚至减轻,其中中、高剂量组出现明显减轻($P < 0.01$);各染毒组脾脏系数均明显高于对照组($P < 0.05$);与对照组相比,各剂量组的脾组织匀浆中MDA、NO及LDH含量明显增高,SOD、SDH及GSH-Px活性均明显降低($P < 0.01$)。**结论:**PFOA能抑制小鼠体质量的增长,对脾脏组织造成一定的脂质过氧化损伤。

[关键词] 全氟辛酸;脾组织;氧化损伤;小鼠

[中图分类号] R 284 **[文献标志码]** A **DOI:**10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2015.06.005

The experimental study of spleen oxidation damage induced by perfluorooctanoic acid in mice

WANG Li, ZHANG Meng-yuan, LÜ Hui, SHEN Ling, ZHANG Yu-yuan, ZHAO Wen-hong

(Department of Preventive Medicine, Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233030, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of different doses of perfluorooctanoic acid (PFOA) on the spleen lipid peroxidation damage of mice. **Methods:** Forty SPF ICR mice were divided into the control group, and low (1 mg/kg), medium (5 mg/kg) and high dose (25 mg/kg) PFOA groups (10 mice each group) using the simple random sampling method. All mice were administered by gavage for 14 days. The mice were weighed every day, and their behavior were observed. The spleen/body weight indexes were calculated after 14 days. The activities of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px), sorbitol dehydrogenase (SDH), lactate dehydrogenase (LDH), and the levels of malondialdehyde (MDA), nitric oxide (NO) were analyzed. **Results:** The body weight of mice treated with PFOA grew slowly or lightened, especially in middle and high dose group ($P < 0.01$). The spleen/body weight indexes of mice treated with PFOA were significantly lighter than that in control group ($P < 0.05$). Compared with control group, the levels of MDA, NO and LDH increased, the activities of SOD, GSH-Px and SDH in mice treated with PFOA decreased obviously, respectively ($P < 0.01$). **Conclusions:** PFOA can inhibit the body weight growth of mice, and induce the spleen lipid peroxidation damage.

[Key words] perfluorooctanoic acid; spleen; oxidative damage; mouse

全氟辛酸(perfluorooctanoic acid, PFOA)是全氟化合物(perfluoro-compounds, PFCs)中的一种典型代表,由于其同时具备疏油、疏水且化学性质非常稳定等特性而被广泛应用于各个领域^[1-3],与人们的生活密切相关但由此产生的健康风险也日益加大^[4-5]。PFCs在代谢上表现出的惰性使人们一直认为该类化合物是无毒性的。近年来随着研究的不断深入,发现该类化合物具有广泛毒性,引起了人们对该类化合物的生态毒理效应及其对人类健康危害

的高度重视。本实验采用较低浓度的 PFOA,探讨不同剂量 PFOA 致小鼠脾脏氧化损伤的作用。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器 722s 型分光光度计(上海分析仪器厂);FA2004 电子天平(上海越平科学仪器有限公司);DY89-I 型电动玻璃匀浆机(宁波新芝有限公司);KDC-160HR 高速冷冻离心机(科大创新公司)。PFOA (sigma 公司,美国);超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、山梨醇脱氢酶(SDH)、乳酸脱氢酶(LDH)、丙二醛(MDA)、一氧化氮(NO)及考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒(南京建成生物工程研究所)。

1.2 实验动物 ICR 小鼠,SPF 级,6~8 周龄,体质量 20~23 g。购自安徽省实验动物中心,合格证号

[收稿日期] 2013-09-18

[基金项目] 安徽省自然科学基金项目(1508085QH188);蚌埠医学院省级特色专业“预防医学”专项(皖教高[2011]5号)

[作者单位] 蚌埠医学院 预防医学系,安徽 蚌埠 233030

[作者简介] 王 力(1982-),女,硕士,讲师。

码为 scxk(皖) 2011-002,于蚌埠医学院实验动物中心屏障系统饲养,光照周期为 12 h:12 h(昼:夜),温度控制为 20~26℃,相对湿度为 40%~60%,并具有独立通风循环系统,自由进食饮水。

1.3 实验处理 常规饲养 1 周后按单纯随机抽样方法分成 4 个实验组,每组 10 只,分别为对照组、低剂量组(1 mg/kg PFOA)、中剂量组(5 mg/kg PFOA)和高剂量组(25 mg/kg PFOA)。每日上午 9 时,通过不锈钢灌胃针经口灌注 PFOA,3 个实验组每天分别以 1、5、25 mg/kg 的剂量连续灌胃 14 d,灌胃溶液体积为 0.1 ml/10 g,正常对照组给予等量 0.9% 氯化钠注射液。每天称质量 1 次,14 d 后称质量,颈椎脱臼处死,取出脾脏,用预冷 0.9% 氯化钠注射液冲洗,分离周围组织,滤纸吸干表面水分后用电子天平称脾脏湿质量,计算小鼠的脾脏系数。随后在液氮中迅速冷冻后转入 -80℃ 冰箱中保存。脾脏系数 = 脾脏质量(g)/体质量(g) × 100%。

1.4 脾组织匀浆制备 取部分脾脏,称量,加 4℃ 0.9% 氯化钠注射液制成 10% 的脾匀浆,3 000 r/min 离心 10 min,取上清液,按试剂盒要求检测小鼠脾组织匀浆 MDA 及 NO 含量、SOD、GSH-Px、SDH、LDH 活性。

1.5 统计学方法 采用方差分析和 q 检验。

2 结果

2.1 PFOA 对小鼠外观行为的影响 正常对照组小鼠在实验过程中未出现异常表现,PFOA 各剂量染毒组小鼠则有异常表现。中、高剂量组小鼠从实验第 3 天,低剂量组小鼠从实验第 8 天开始,出现不同程度的行动迟缓,聚成一团,食欲不振,被毛疏松无光泽。

2.2 PFOA 对小鼠体质量及脾脏系数的影响 各组小鼠染毒前体质量(初始体质量)差异均无统计学意义($P > 0.05$);染毒第 3 天高剂量组体质量开始停止增长且有减轻的现象($P < 0.01$);第 14 天,中、高剂量组小鼠体质量均低于对照组($P < 0.01$),高剂量组体质量低于低、中剂量组($P < 0.01$)。小鼠灌胃 14 d 后,低、中、高剂量组脾脏系数均明显低于对照组($P < 0.01$);高剂量组小鼠脾脏系数低于低、中剂量组小鼠($P < 0.01$)(见表 1)。

2.3 PFOA 对小鼠脾组织中 GSH-Px、SOD、SDH 活性的影响 小鼠接触 PFOA 14 d 后,低、中和高剂量组脾脏组织中 GSH-Px、SOD、SDH 活性均显著低于对照组,而中、高剂量组 3 项指标和高剂量组 3 项指

标亦均低于低剂量组与中剂量组($P < 0.05 \sim P < 0.01$)(见表 2)。

表 1 PFOA 对 ICR 小鼠体质量及脾脏系数的影响 ($n_i = 10; \bar{x} \pm s$)

分组	初始 体质量/g	第 3 天 体质量/g	第 14 天 体质量/g	脾脏/ 体质量/%
对照组	22.28 ± 0.49	24.90 ± 0.28	27.00 ± 0.98	0.60 ± 0.03
低剂量组	22.34 ± 0.52	23.28 ± 0.69	23.43 ± 1.51	0.49 ± 0.05
中剂量组	22.31 ± 0.26	24.21 ± 0.42	21.31 ± 0.74**	0.46 ± 0.14*
高剂量组	22.37 ± 0.30	22.10 ± 0.52*	18.14 ± 0.62*** $\Delta\Delta$	0.27 ± 0.14*** $\Delta\Delta$
F	0.09	4.39	132.73	17.68
P	>0.05	<0.01	<0.01	<0.01
$MS_{组内}$	0.167	1.55	1.043	0.011

q 检验:与对照组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与低剂量组比较## $P < 0.01$;与中剂量组比较 $\Delta\Delta P < 0.01$

表 2 PFOA 对小鼠脾组织中 GSH-Px、SOD 和 SDH 活性的影响 ($n_i = 10; \bar{x} \pm s; U/\text{mgprot}$)

分组	GSH-Px	SOD	SDH
对照组	270.63 ± 19.57	151.34 ± 24.06	8.95 ± 0.58
低剂量组	159.49 ± 15.15**	114.64 ± 26.12**	4.69 ± 0.58**
中剂量组	83.35 ± 14.82***	88.11 ± 15.78**	4.19 ± 0.32**
高剂量组	47.45 ± 13.51*** $\Delta\Delta$	21.56 ± 4.86*** $\Delta\Delta$	3.54 ± 0.35*** $\Delta\Delta$
F	307.16	62.56	214.08
P	<0.01	<0.01	<0.01
$MS_{组内}$	253.665	383.442	0.224

q 检验:与对照组比较 * $P < 0.01$;与低剂量组比较## $P < 0.05$,### $P < 0.01$;与中剂量组比较 $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

2.4 PFOA 对小鼠脾组织中 MDA、NO 含量和 LDH 活性的影响 小鼠接触 PFOA 14 d 后,低、中剂量组脾脏组织中 MDA、NO 含量和中、高剂量组 LDH 活性均高于对照组($P < 0.05 \sim P < 0.01$),而中、高剂量组 3 项指标和高剂量组 3 项指标亦均高于低剂量组与中剂量组($P < 0.05 \sim P < 0.01$)(见表 3)。

表 3 PFOA 对小鼠脾组织中 MDA、NO 含量和 LDH 活性的影响 ($n_i = 10; \bar{x} \pm s$)

分组	MDA/(nmol/mgprot)	NO/($\mu\text{mol/gprot}$)	LDH/(U/gprot)
对照组	0.64 ± 0.16	4.15 ± 1.43	2789.99 ± 217.37
低剂量组	1.28 ± 0.14**	5.61 ± 1.04*	2843.92 ± 137.37
中剂量组	2.47 ± 0.20***	6.95 ± 1.16***	3241.49 ± 277.55***
高剂量组	3.08 ± 0.51*** $\Delta\Delta$	8.61 ± 0.91*** $\Delta\Delta$	4153.34 ± 98.21*** $\Delta\Delta$
F	113.84	21.84	83.24
P	<0.01	<0.01	<0.01
$MS_{组内}$	0.086	1.325	38199.860

q 检验:与对照组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与低剂量组比较## $P < 0.05$,### $P < 0.01$;与中剂量组比较 $\Delta\Delta P < 0.01$

3 讨论

在有些动物体内, PFOA 在肝脏和脾脏中的浓度较高, 毒性作用也较强^[6]。而 PFOA 所致的过氧化物酶增生作用先于胸腺和脾脏萎缩^[7], 所以脾脏是 PFOA 比较敏感的靶器官, 且氧化应激出现较快, 很容易造成脂质过氧化损伤。本实验发现 PFOA 可使小鼠体质量增长受到抑制甚至减轻, 脾脏萎缩, 相关酶的指标也相应发生变化, 如氧化应激指标 MDA 明显增加, 抗氧化物质 SOD 与 GSH-Px 明显下降, LDH 活性和 NO 含量明显增加。GSH-Px、SOD 是细胞内主要的抗氧化物质, 其活性的高低反映了机体抗氧化能力和清除自由基的能力; 自由基一直是公认的造成细胞氧化损伤的主要原因之一, MDA 是脂质过氧化物降解的主要产物, 其含量高低间接反映了机体细胞受自由基攻击的严重程度^[8]。本研究各剂量组小鼠脾匀浆中的 GSH-Px、SOD 的活力较对照组显著下降, MDA 的含量显著升高 ($P < 0.01$), 说明小鼠的脾脏受到了自由基的攻击程度比较严重, 而且自身的抗氧化及清除自由基的能力下降。有研究^[9]表明大鼠肝脏细胞液、细胞核及线粒体中大部分蛋白质都能特异性地与 PFOA 结合, 意味着 PFOA 可以通过与功能性蛋白等结合, 干扰正常的代谢和分泌, PFOA 可能由此诱发小鼠脾组织氧化应激, 使自由基异常增多。LDH 广泛存在于人体各组织器官中, 是机体能量代谢中的一种重要酶, SDH 是线粒体的标志酶, 与细胞的能量供应有关, 而线粒体是氧自由基产生的主要场所, 二者一定程度上可作为细胞损伤的重要指标^[10]。本研究显示各剂量组小鼠脾匀浆中的 LDH 活力较对照组明显升高, SDH 活力显著下降 ($P < 0.01$), 进一步证明了小鼠脾脏的能量代谢过程受到损伤, 进而引起代谢紊乱, 导致脾脏萎缩及体质量减轻等一系列症状。NO 作为一种重要的细胞内第二信使, 具有各种生理功能, 主要可以抑制物质与能量代谢相关酶的活性^[11]。实验中, 高剂量组小鼠脾脏匀浆中的 NO 含量显著升高 ($P < 0.01$), 可能反映出大量的 NO 损伤了核酸、脂类等, 影响物质与能量代谢是脾脏损伤的另一

途径。

综上所述, 各剂量的 PFOA 可抑制小鼠体质量增长, 随着染毒时间增长, 甚至出现了体质量下降。同时, 小鼠脾脏萎缩, 可能发生了如增生充血等变化, 相关酶的指标也相应发生变化, 是一种综合毒性效应。

[参 考 文 献]

- [1] Lau C, Anitole K, Hodes C, *et al.* Perfluoroalkyl acids: a review of monitoring and toxicological findings [J]. *Toxicol Sci*, 2007, 99 (2): 366 - 394.
- [2] Luccisano AE, Campbell Jr JL, Butenhoff JL, *et al.* Evaluation of placental and lactational pharmacokinetics of PFOA and PFOS in the pregnant, lactating, fetal and neonatal rat using a physiologically based pharmacokinetic model [J]. *Reprod Toxicol*, 2012, 33(3): 468 - 490.
- [3] Zhao Y, Tan YS, Strynar MJ, *et al.* Perfluorooctanoic acid effects on ovaries mediate its inhibition of peripubertal mammary gland development in balb/c and c57bl/6 mice [J]. *Reprod Toxicol*, 2012, 33(2): 563 - 576.
- [4] 金一和, 丁梅, 翟成, 等. 长江三峡库区江水和武汉地区地面水中 PFOS 和 PFOA 污染现状调查 [J]. *生态环境*, 2006, 15 (3): 486 - 489.
- [5] 金一和, 刘晓, 秦红梅, 等. 我国部分地区自来水和不同水体中的 PFOS 污染 [J]. *中国环境科学*, 2004, 24(2): 166 - 169.
- [6] Han X, Kemper RA, Jepson GW. Subcellular distribution and protein binding of perfluorooctanoic acid in rat liver and kidney [J]. *Drug Chem Toxicol*, 2005, 28(2): 197 - 209.
- [7] Yang Q, Abedi-Valugerdi M, Xie Y, *et al.* Potent suppression of the adaptive immune response in mice upon dietary exposure to the potent peroxisome proliferator, perfluorooctanoic acid [J]. *Int Immunopharmacol*, 2002, 2(2/3): 389 - 397.
- [8] 夏世钧, 吴中亮. 分子毒理学基础 [M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 2001: 84 - 87.
- [9] Olivero VJ, Tao L, Johnson RB, *et al.* Perfluorooctane sulfonate and related fluorochemicals in biological samples from the north coast of Colombia [J]. *Environ Pollut*, 2006, 142(2): 367 - 372.
- [10] 汪洪波, 汪斌, 向小勇. 厄多司坦预处理对大鼠心肌缺血再灌注损伤及心肌细胞凋亡的影响 [J]. *第三军医大学学报*, 2011, 33(1): 61 - 64.
- [11] 赵文红, 张建国, 江城梅. 直链烷基苯磺酸钠致小鼠肝脏氧化损伤的作用 [J]. *第三军医大学学报*, 2012, 34(7): 605 - 608.

(本文编辑 姚仁斌)