

研究报告

基于脱细胞、细胞和体内彗星试验的全氟辛酸致DNA损伤研究

王倩¹,徐同广²,王天威¹,陈慧慧¹,张文众²

(1. 潍坊医学院公共卫生学院,山东潍坊 261000;2. 皖南医学院,安徽芜湖 241002)

摘要:目的 本研究通过体内外联合试验探索全氟辛酸(PFOA)致DNA损伤情况。方法 以脱细胞核DNA作为模型,0.00、0.13、0.25、0.50 mmol/L PFOA染毒1 h后检测脱细胞核DNA损伤情况。以YAC-1细胞系为模型,采用CCK-8法测定不同染毒剂量对细胞活性的影响。在细胞彗星试验中,PFOA终浓度设定为0、 1.0×10^{-8} 、 1.0×10^{-7} 、 1.0×10^{-6} mol/L,连续暴露3 d,检测DNA损伤情况。0、10、20、40 mg/kg·BW PFOA分别灌胃给予大鼠两次,间隔24 h,末次给予受试物6 h后,采用肝脏、骨髓和外周血细胞开展中性和碱性彗星试验,利用骨髓细胞开展骨髓微核试验。结果 脱细胞碱性彗星试验各剂量组尾部DNA含量显著高于对照组($P<0.05$),呈剂量-反应关系,脱细胞中性彗星试验无显著差异($P>0.05$);细胞碱性彗星试验各剂量组尾部DNA含量显著高于对照组($P<0.05$),呈剂量-反应关系,细胞中性彗星试验无显著差异($P>0.05$);体内彗星联合微核试验表明,与对照组相比,肝脏、骨髓和外周血细胞碱性和中性彗星试验各剂量组尾部DNA含量,以及骨髓微核各剂量组无显著差异($P>0.05$)。结论 PFOA在体外对DNA具有损伤作用,经口染毒未见对大鼠产生DNA损伤。

关键词:全氟辛酸;DNA损伤;脱细胞彗星试验;彗星试验;骨髓微核试验

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2023)07-0981-07

DOI:10.13590/j.cjfh.2023.07.002

Evaluation of DNA damage induced by perfluorooctanoic acid using acellular, cellular, and *in vivo* comet assays

WANG Qian¹, XU Tongguang², WANG Tianwei¹, CHEN Huihui¹, ZHANG Wenzhong²

(1. School of Public Health, Weifang Medical University, Shandong Weifang 261000, China;

2. Wannan Medical College, Anhui Wuhu 241002, China)

Abstract: Objective To examine perfluorooctanoic acid (PFOA)-induced DNA damage using a combined *in vivo* and *in vitro* experiment. **Methods** Acellular nuclear DNA damage was used as a model to test the damage induced by exposure to 0.00, 0.13, 0.25, and 0.50 mmol/L PFOA for 1 h. The YAC-1 cell was used as the research model. In the cytotoxicity study, the effects of different dosages on cell activity were determined *via* CCK-8 assay. The final PFOA concentrations were 0, 1.0×10^{-8} , 1.0×10^{-7} , and 1.0×10^{-6} mol/L. DNA damage was detected after 3 d of exposure. Rats were gavage with 0, 10, 20, 40 mg/kg·BW PFOA twice. The liver, bone marrow, and peripheral blood of rats were removed 6 h after the last administration. Alkaline and neutral comet assay were performed to measure DNA damage. The micronucleus test was performed to measure bone marrow chromosome breakage. **Results** Compared with the control group, acellular and cell alkaline DNA comet assay result showed that the tail DNA% of acellular nuclear DNA increased significantly in each dose group ($P<0.05$) within dose response relationship. The acellular and cell neutral DNA comet assay results showed no DNA breakage in each dose group ($P>0.05$). The tail DNA% of each dose group in the alkaline comet assay was significantly higher than that of the control group ($P<0.05$), showing a dose-response relationship. No significant difference was observed in the neutral comet assay ($P>0.05$). Compared with the control group, the alkaline and neutral comet assay results showed that the tail DNA% of bone marrow, liver, and peripheral blood cells group showed no DNA breakage in each dose group ($P>0.05$). Compared with the control group, the test of bone marrow micronucleus was negative ($P>0.05$). **Conclusion** PFOA can cause DNA single-strand breakage at the subcellular level *in vitro*, and exposure does not induce DNA and chromosome breakage in rats after oral exposure.

收稿日期:2022-11-27

基金项目:中央高校基本科研业务费(3142018038,3142019002);国家重点研发计划(2017YFC1601702)

作者简介:王倩 女 在读研究生 研究方向为毒理学 E-mail:2734783947@qq.com

通信作者:张文众 男 研究员 研究方向为毒理学 E-mail:zhangwz2002@sina.com

Key words: Perfluorooctanoic acid; DNA damage; acellular comet assay; comet assay; micronucleus test

全氟辛酸(Perfluorooctanoic acid, PFOA),广泛存在于食品中,如肉制品、蔬菜制品、水产品和乳制品等,食品中PFOA的浓度与人体PFOA血清浓度呈现正相关,因此膳食摄入是消费者接触PFOA的最主要途径^[1-2]。PFOA由一个全氟化的烷基碳链和一个羧基组成,由于其独特的疏水疏油性能和热/化学稳定性,已被广泛应用于工业生产^[3]。PFOA是一种重要的全氟化表面活性剂,具有环境持久性、高毒性和生物累积性等特征,成为当前备受关注的新型环境污染物^[4]。早期研究表明,约98%的美国人血清中检测到PFOA,并且分布在肾脏中。小鼠暴露于PFOA还可导致小鼠肾脏组织产生表观遗传学改变并促进成纤维细胞活化早期标志物的表达,产生明显的肾毒性^[5]。PFOA还容易聚集在肝脏中,有研究指出,暴露于高剂量PFOA的动物会出现严重的肝毒性,包括肝细胞肥大、肝肿大和空泡化等^[6]。WU等^[7]研究表明,急性暴露PFOA会导致肝损伤。高浓度PFOA还能够抑制生殖细胞的增殖^[8]。过去几十年,全世界不同国家人群的精液质量有所下降,而PFOA有可能是导致此现象出现的原因之一^[8]。目前PFOA的肾毒性、肝毒性、生殖毒性、神经毒性、内分泌干扰毒性均得到证实^[4,9]。但是关于PFOA遗传毒性实验较少,且阴性和阳性实验结果不一致。关于PFOA的阴性实验中,CREBELLI等^[10]连续5周对小鼠灌胃给予PFOA,开展彗星和微核试验,未发现遗传毒性。柯晓静等^[11]使用小鼠红细胞微核试验和小鼠精子畸形试验,探索PFOA对小鼠的遗传毒性影响,结果均为阴性。关于PFOA遗传毒性阳性的研究均为体外实验。如PFOA各剂量组均能引起人淋巴母细胞株的DNA损伤;PFOA还可导致人类永生表皮细胞微核增加和DNA链断裂增加^[12-13]。和PFOA结构类似的全氟辛烷磺酸(Perfluorooctane sulfonate, PFOS)有体内遗传毒性阳性报道,有研究对小鼠进行连续30d灌胃染毒,分别使用小鼠骨髓、肝脏和外周血作为靶器官开展彗星和微核试验研究PFOS的遗传毒性,结果发现PFOS均诱导细胞DNA损伤^[14-16]。由此可见,必须关注食品中PFOA的安全性,尤其是PFOA的遗传毒性试验结果各异,尚无定论,有必要采用系统的遗传毒性实验方法开展研究。本研究采用体外试验和体内试验相结合的方式,系统、全面地探索PFOA的DNA损伤特征,为食品中PFOA科学管控提供依据。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

AX224ZH型电子天平(上海仪天科学仪器有限公司)、3-18K型离心机(Sigma)、HH-4型水浴锅(上海力辰仪器科技有限公司)、生物显微镜和IX71型荧光倒置显微镜(Olympus)。彗星试验电泳系统和彗星图像智能分析软件(CometA1.0)由北京博乐通生物科技有限公司提供。

PFOA(上海麦克林生物科技有限公司,批号:C12029546),Giemsa染液、中性和碱性彗星试验试剂盒(北京博乐通生物科技有限公司,批号:2021021723),磷酸盐缓冲液(Phosphate buffer solution, PBS, pH7.4,美国英杰生命技术有限公司),环磷酰胺、乙醇、胎牛血清(Fetal bovine serum, FBS)、甘油、甲醇和二甲基亚砜(Dimethyl sulfoxide, DMSO)(Sigma)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

YAC-1细胞系购置于国家实验细胞资源共享平台,YAC-1细胞的培养根据平台所提供的细胞培养指南进行。YAC-1细胞复苏后离心弃上清,加入RPMI1640培养液调整细胞密度为 1×10^5 个/mL,培养于37℃、5%CO₂的细胞培养箱中培养。

1.2.2 脱细胞彗星试验方法

优化文献^[17]中的方法提取YAC-1细胞的脱细胞核DNA。根据PFOA的最大溶解度将浓度分别设置为0.00、0.13、0.25、0.50 mmol/L,共4组,每组3张载玻片,PFOA直接作用于脱细胞核DNA染毒1h,分别开展碱性和中性脱细胞彗星试验,碱性彗星实验使用碱性电泳液(pH≥13),中性彗星实验使用中性电泳液(pH=10)。

1.2.3 CCK-8法测定PFOA的细胞毒性

正常培养的YAC-1细胞生长至对数生长期后消化计数,使细胞悬液浓度为 1×10^4 个/100 μL,接种100 μL细胞悬液到96孔培养板中,于培养箱中正常培养24h。根据PFOA的IC₅₀将浓度分别设置为0、 1.0×10^{-9} 、 1.0×10^{-8} 、 1.0×10^{-7} 、 1.0×10^{-6} 、 1.0×10^{-5} 、 1.0×10^{-4} mol/L,向培养体系中加入PFOA,每隔24h换液,PFOA暴露3d后加入CCK-8试剂10 μL,轻轻震荡混匀后,培养箱孵育2h,用酶标仪检测450 nm处的吸光度。

1.2.4 细胞彗星试验方法

将PFOA用DMSO溶解,溶解后于-20℃保存。正常培养的YAC-1细胞生长至对数生长期后,用计

数板计数,调整细胞浓度为 1.0×10^5 个/mL,按 1 mL 体积接种于 24 孔板,采用正常培养基培养 24 h 后,将 PFOA 浓度分别设置为 0、 1.0×10^{-8} 、 1.0×10^{-7} 、 1.0×10^{-6} mol/L,加入培养体系(DMSO 终浓度 < 0.05% 时,不对细胞状态产生明显的影响)。暴露结束后,消化细胞,调整细胞浓度为 1×10^6 个/mL,开展细胞彗星试验。

1.2.5 体内彗星联合微核试验方法

参照《食品安全国家标准 哺乳动物体内碱性彗星试验》(GB 31655—2021)和《食品安全国家标准 哺乳动物红细胞微核试验》(GB 15193.5—2014)开展体内彗星联合微核试验^[18-19]。

1.2.5.1 实验动物与饲养场所

本研究经华北科技学院安全工程学院动物实验伦理委员会批准(伦理号:202107022)。实验动物:无特定病原体(SPF)级 SD 大鼠 100 只,雌雄各半,购自济南朋悦试验动物繁育有限公司,许可证号:SCXK(鲁)20190003。体质量 180~200 g,出生后天数(Postnatal day, PND)42 d,发育表现正常。饲养场所:潍坊医学院科技楼 C 医学实验动物中心。动物实验区环境指标:温度(24 ± 3)°C;湿度 40%~70%;动物照度 15~20 lx;换气次数 ≥ 15 次/h;昼夜交替时间(h) 10/14;与相通房间的最小静压差 10~15 Pa;空气洁净 7 级(万级);噪声 dB(A) ≤ 60 。动物饮水进食情况皆正常。

1.2.5.2 动物染毒剂量、方法和分组

实验动物随机分为 5 组,每组 20 只,雌雄各半。阴性对照组给予无菌水,阳性对照组给予 40 mg/kg·BW 环磷酰胺(CP)(国标推荐阳性物^[20])。以水为溶剂,制作 PFOA 混悬液,根据 PFOA 的 LD₅₀ 将 1/4 剂量作为高剂量,其他剂量依次两倍倍比稀释,即高、中、低剂量依次为 40、20、10 mg/kg·BW。两次给受试物间隔 24 h,第 2 次给受试物后 6 h,动物解剖取肝脏、外周血和骨髓开展彗星联合骨髓微核试验。

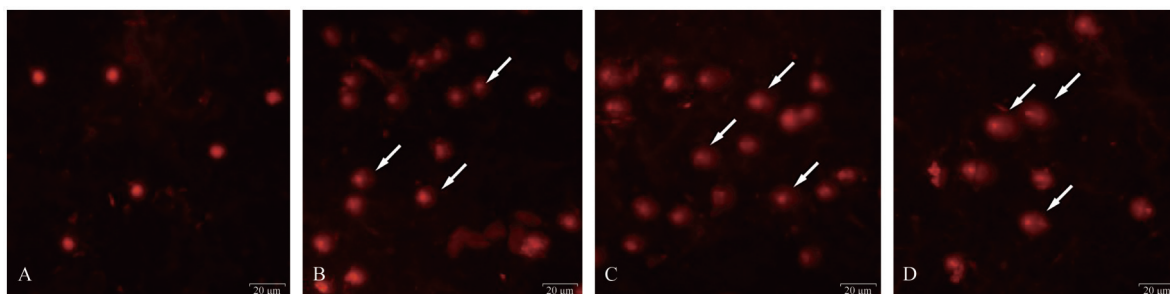
1.3 统计学分析

数据输入 Excel 做成数据集计算均值和标准差($\bar{x} \pm s$);使用 SPSS 18.0 进行统计分析,数据呈正态分布时,彗星试验用单因素方差分析法比较组间差异,方差齐时用 Dunnett's *t* 检验,方差不齐时用 Games-Howell 法;微核试验用 Mann-Whitney *U* 法分析组间差异。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 脱细胞彗星试验

脱细胞碱性彗星试验结果显示,PFOA 各剂量组(0.13、0.25、0.50 mmol/L)尾部 DNA 含量显著高于对照组($P < 0.05$),呈剂量-反应关系;脱细胞中性彗星试验结果显示,PFOA 各剂量组尾部 DNA 含量与对照组相比无显著差异($P > 0.05$)(图 1 和图 2)。



注:A:溶剂对照组;B:PFOA 0.13 mmol/L;C:PFOA 0.25 mmol/L;D:PFOA 0.50 mmol/L;箭头所指为彗星尾

图1 不同浓度PFOA的脱细胞碱性彗星图

Figure 1 Images of Acellular alkaline comets with different concentrations of PFOA

2.2 细胞毒性

利用 CCK-8 法检测了 PFOA 对 YAC-1 的细胞毒性并确定给药浓度,结果如图 3 所示。与对照组相比,暴露于不同浓度 PFOA 3 d 后,浓度低于 1.0×10^{-6} mol/L 时对 YAC-1 细胞活性无影响($P = 0.996$),当浓度大于 1.0×10^{-5} mol/L 时细胞活性显著($P = 0.037$)受到抑制。

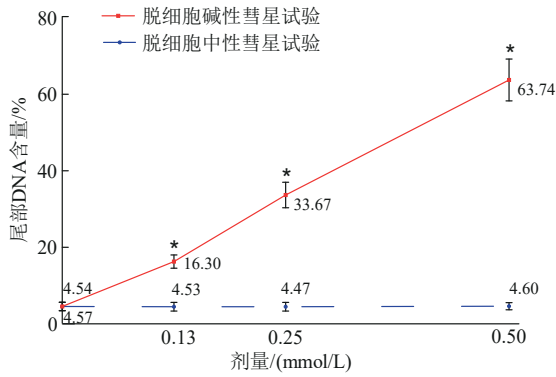
2.3 细胞彗星试验

细胞碱性彗星试验结果显示,PFOA 各剂量组

(10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} mol/L)尾部 DNA 含量显著高于对照组($P < 0.05$),呈剂量-反应关系;细胞中性彗星试验结果显示,PFOA 各剂量组尾部 DNA 含量与对照组相比无显著差异($P > 0.05$)(表 1,图 4)。

2.4 体内彗星试验

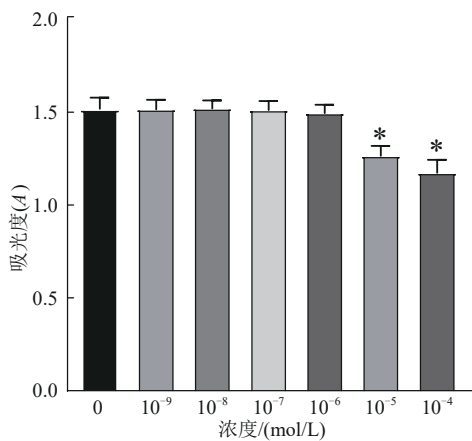
大鼠暴露于 0、10、20、40 mg/kg·BW PFOA 2 d,动物各剂量组体质量无明显变化,精神状态良好,正常饮水进食,自主活动与运动情况等皆正常,未观察到不良状况。



注: *表示与对照组相比, $P < 0.05$

图2 不同浓度PFOA的脱细胞碱性彗星试验结果

Figure 2 Acellular alkaline comet assay results of different concentrations of PFOA



注: *表示与对照组相比, $P < 0.05$

图3 不同浓度PFOA对YAC-1细胞活性的影响

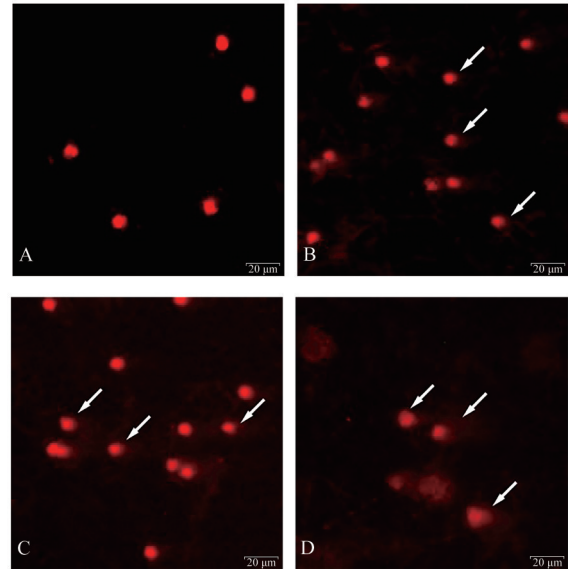
Figure 3 Effects of different concentrations of PFOA on the activity of YAC-1 cells

表1 不同浓度PFOA的细胞彗星试验结果

Table 1 Acellular comet assay results with different concentrations of PFOA

| 浓度/(mol/L) | 碱DNA% | 中DNA% |
|----------------------|-------------|-----------|
| 0 | 4.71±0.91 | 4.50±1.07 |
| 1.0×10 ⁻⁸ | 8.29±1.05* | 4.50±0.95 |
| 1.0×10 ⁻⁷ | 8.76±0.91* | 4.50±1.04 |
| 1.0×10 ⁻⁶ | 16.72±1.05* | 4.53±1.04 |

注: 碱DNA%表示碱性彗星试验尾DNA含量; 中DNA%表示中性彗星试验尾DNA含量; *表示与对照组相比, $P < 0.05$



注: A: 溶剂对照组; B: PFOA 1.0×10⁻⁸ mol/L; C: PFOA 1.0×10⁻⁷ mol/L; D: PFOA 1.0×10⁻⁶ mol/L; 箭头所指为彗星尾

图4 不同浓度PFOA的细胞碱性彗星图片

Figure 4 Cellular alkaline comet images with different concentrations of PFOA

2.4.1 骨髓彗星试验

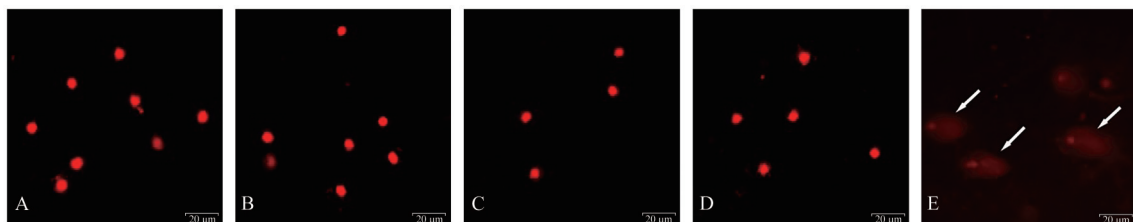
骨髓碱性彗星试验和中性彗星试验结果显示, PFOA各剂量组尾DNA含量与对照组相比无显著差异 ($P > 0.05$) (表2, 图5)。

表2 不同浓度PFOA的大鼠骨髓细胞彗星试验结果

Table 2 The results of comet assay in rat bone marrow cells with different concentrations of PFOA

| 性别 | 剂量/(mg/kg·BW) | 动物数/只 | 碱DNA% | 中DNA% |
|----|----------------|-------|-------------|-----------|
| 雄 | 0 | 10 | 4.54±1.08 | 4.57±1.26 |
| | 10 | 10 | 4.55±0.94 | 4.57±1.12 |
| | 20 | 10 | 4.47±1.09 | 4.53±1.21 |
| | 40 | 10 | 4.56±0.98 | 4.59±1.14 |
| | 40 mg/kg·BW CP | 10 | 89.25±8.15* | 4.56±1.17 |
| 雌 | 0 | 10 | 4.55±1.03 | 4.54±1.10 |
| | 10 | 10 | 4.48±1.09 | 4.55±1.15 |
| | 20 | 10 | 4.54±1.05 | 4.54±1.00 |
| | 40 | 10 | 4.56±1.07 | 4.52±1.16 |
| | 40 mg/kg·BW CP | 10 | 88.46±8.90* | 4.54±1.09 |

注: 碱DNA%表示碱性彗星试验尾DNA含量; 中DNA%表示中性彗星试验尾DNA含量; *表示与对照组相比, $P < 0.05$



注: A: 溶剂对照组; B: PFOA 10 mg/kg·BW; C: PFOA 20 mg/kg·BW; D: PFOA 40 mg/kg·BW; E: CP 40 mg/kg·BW; 箭头所指为彗星尾; 肝脏和外周血彗星试验图片略

图5 不同浓度PFOA的骨髓碱性彗星图片

Figure 5 Bone marrow alkaline comet images with different concentrations of PFOA

2.4.2 肝脏彗星试验

肝脏碱性彗星试验和中性彗星试验显示,PFOA 各剂量组尾 DNA 含量与对照组相比无显著统计学差异($P>0.05$)(表 3)。

表 3 不同浓度 PFOA 的大鼠肝脏细胞彗星试验结果

Table 3 The results of comet assay in rat liver cells with different concentrations of PFOA

| 性别 | 剂量/(mg/kg·BW) | 动物数/只 | 碱 DNA% | 中 DNA% |
|----|----------------|-------|-----------|-----------|
| 雄 | 0 | 10 | 4.57±1.11 | 4.49±1.17 |
| | 10 | 10 | 4.54±1.04 | 4.53±1.35 |
| | 20 | 10 | 4.58±1.22 | 4.53±1.16 |
| | 40 | 10 | 4.51±1.11 | 4.47±1.28 |
| | 40 mg/kg·BW CP | 10 | 4.55±1.12 | 4.49±1.20 |
| 雌 | 0 | 10 | 4.51±1.06 | 4.43±1.08 |
| | 10 | 10 | 4.52±1.22 | 4.42±1.13 |
| | 20 | 10 | 4.47±1.30 | 4.46±1.07 |
| | 40 | 10 | 4.59±1.10 | 4.48±1.05 |
| | 40 mg/kg·BW CP | 10 | 4.52±1.15 | 4.45±1.08 |

注:碱 DNA%表示碱性彗星试验尾 DNA 含量;中 DNA%表示中性彗星试验尾 DNA 含量

2.4.3 外周血彗星试验

外周血碱性彗星试验和中性彗星试验结果显示,PFOA 各剂量组尾 DNA 含量与对照组相比无显著差异($P>0.05$)(表 4)。

表 4 不同浓度 PFOA 的大鼠外周血细胞彗星试验结果

Table 4 The results of comet assay in rat peripheral blood cells with different concentrations of PFOA

| 性别 | 剂量/(mg/kg·BW) | 动物数/只 | 碱 DNA% | 中 DNA% |
|----|----------------|-------|-----------|-----------|
| 雄 | 0 | 10 | 4.45±1.30 | 4.42±1.17 |
| | 10 | 10 | 4.42±1.29 | 4.40±1.07 |
| | 20 | 10 | 4.46±1.14 | 4.47±1.31 |
| | 40 | 10 | 4.46±1.14 | 4.47±1.21 |
| | 40 mg/kg·BW CP | 10 | 4.45±1.19 | 4.44±1.17 |
| 雌 | 0 | 10 | 4.43±1.26 | 4.48±1.08 |
| | 10 | 10 | 4.42±1.17 | 4.51±1.04 |
| | 20 | 10 | 4.48±1.21 | 4.44±1.24 |
| | 40 | 10 | 4.40±1.08 | 4.48±1.12 |
| | 40 mg/kg·BW CP | 10 | 4.44±1.16 | 4.47±1.10 |

注:碱 DNA%表示碱性彗星试验尾 DNA 含量;中 DNA%表示中性彗星试验尾 DNA 含量

2.5 骨髓微核试验

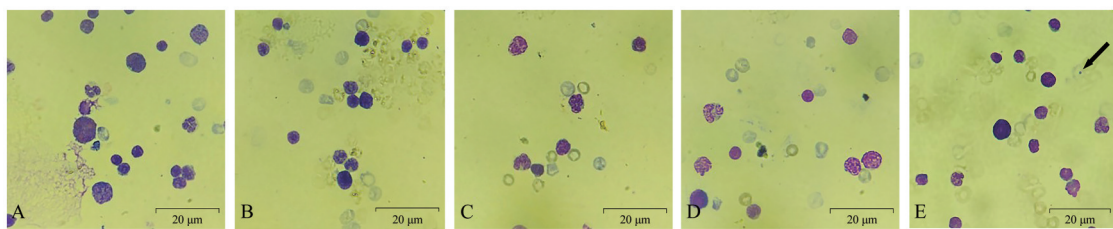
骨髓微核试验结果显示,各剂量组嗜多染红细胞(Polychromatic Erythrocytes, PCE)占 PCE 加正染红细胞(Normochromatic Erythrocyte, NCE)的比值和阳性对照组 PCE/(PCE+NCE)比值与对照组比值之差小于 20%。PFOA 各剂量组微核(Micronucleus, MN)率与对照组相比无显著差异($P>0.05$),阳性对照组 MN 率显著高于对照组($P<0.05$)(表 5,图 6)。

表 5 不同浓度 PFOA 的骨髓微核试验结果

Table 5 Bone marrow micronucleus test results of different concentrations of PFOA

| 性别 | 剂量/(mg/kg·BW) | 动物数/只 | PCE/个/只 | PCE/(PCE+NCE)/(%) | MN 率/% |
|----|----------------|-------|---------|-------------------|-------------|
| 雄 | 0 | 10 | 2 000 | 52.50 | 2.95±0.96 |
| | 10 | 10 | 2 000 | 52.55 | 3.45±0.76 |
| | 20 | 10 | 2 000 | 53.00 | 3.40±0.86 |
| | 40 | 10 | 2 000 | 52.75 | 2.75±0.87 |
| | 40 mg/kg·BW CP | 10 | 2 000 | 47.65 | 24.20±1.83* |
| 雌 | 0 | 10 | 2 000 | 53.10 | 2.85±0.71 |
| | 10 | 10 | 2 000 | 52.60 | 3.20±0.84 |
| | 20 | 10 | 2 000 | 53.00 | 2.55±1.11 |
| | 40 | 10 | 2 000 | 52.60 | 3.35±1.00 |
| | 40 mg/kg·BW CP | 10 | 2 000 | 47.55 | 25.00±2.06* |

注:*表示与对照组相比, $P<0.05$



注:A:溶剂对照组;B: 10 mg/kg·BW PFOA;C: 20 mg/kg·BW PFOA;D: 40 mg/kg·BW PFOA;E: 40 mg/kg·BW CP;箭头所指为微核

图 6 不同浓度 PFOA 的微核试验图片

Figure 6 Micronucleus test pictures of different concentrations of PFOA

3 讨论

脱细胞彗星试验是基于去除细胞膜和核膜的细胞核 DNA 作为模型与受试物直接反应,避免细胞膜和核膜阻碍受试物^[21]。LU 等^[21-22]以双链

DNA 为模型,发现浓度为 0.1 mmol/L PFOA 与双链 DNA 碱基中的氢键结合形成加合物。DNA 加合物是 DNA 损伤类型的一种。本研究以浓度为 0.13、0.25、0.50 mmol/L PFOA 对脱细胞核 DNA 染毒,碱

性彗星实验结果为阳性,且有剂量-反应关系,而中性彗星实验为阴性。即 PFOA 导致 DNA 单链断裂,未造成 DNA 双链断裂。中性彗星实验检测 DNA 双链断裂,碱性彗星实验检测 DNA 单链断裂。对比发现,LU 等^[21-22]设置的 PFOA 形成加合物的剂量低于本研究剂量,推测 PFOA 造成脱细胞 DNA 损伤过程可能是在低剂量下形成加合物,随着剂量升高 DNA 单链发生断裂。

以细胞为模型的研究发现,PFOA 可导致人淋巴瘤细胞(TK6)淋巴细胞出现彗星拖尾,推测 PFOA 对细胞产生了氧化损伤导致细胞 DNA 断裂^[12]。最近一项研究发现,PFOA 能够导致细胞内活性氧含量上升进而引起卵母细胞线粒体膜电位变化,且发现 DNA 断裂标志产物 γ H2AX 在 PFOA 作用下含量显著增加,提示 PFOA 导致卵母细胞 DNA 断裂^[23-26]。PEROPADRE 等^[27]也发现 PFOA 引起人类永生表皮细胞 γ H2AX 含量增加。本研究根据 CCK-8 结果最终选择 1.0×10^{-8} 、 1.0×10^{-7} 、 1.0×10^{-6} mol/L 作为后续试验浓度,且 PFOA 3 个剂量组均导致 YAC-1 细胞 DNA 单链断裂。YAC-1 细胞为本实验室体外实验常用细胞系。上述研究表明,PFOA 可导致细胞 DNA 断裂。

PFOA 经由吸收、分布、代谢、蓄积到达肝脏、骨髓、外周血等多个靶器官。所以本研究使用骨髓、外周血与肝脏联合研究 PFOA 对细胞 DNA 的损伤作用。CREBELLI 等^[10]使用 PFOA 对小鼠进行连续 35 d 染毒实验,在碱性彗星试验中未观察到小鼠肝细胞 DNA 受损。本研究对大鼠经消化道染毒后未发现 PFOA 对骨髓、外周血和肝脏细胞 DNA 产生影响。PFOS 与 PFOA 的化学结构比较接近,理论上毒性具有相似性。有研究对小鼠进行连续 30 d 染毒,分别使用小鼠骨髓细胞、肝脏细胞与外周血细胞作为靶器官研究 PFOS 的遗传毒性发现 3 种细胞均出现彗星拖尾^[14-16]。由此可见,PFOA 与 PFOS 体内彗星试验研究结果不一致。

微核实验有假阳性结果低、方便快捷的特点,常用于检测细胞染色体断裂^[28]。体外研究表明,PFOA 对 HepG2 细胞 24 h 染毒导致双核细胞微核呈剂量依赖性增加^[13]。体外实验研究 PFOA 遗传毒性与体内实验不一致。如体内研究表明 PFOA 对 6 周龄小鼠暴露 24、48 和 72 h 后进行骨髓微核试验和致死性突变检测,未发现染色体损伤的证据^[11]。BUTENHOFF 等^[29]的系统性综述表明 PFOA 的红细胞微核试验、小鼠精子畸形试验和污染物致突变性检测,PFOA 的遗传毒性结果均为阴性。本研究结果与上述体内研究结果一致,即经消化道染

毒 PFOA 无遗传毒性。EKE 等^[14-16]对小鼠进行连续 30 d PFOS 染毒,使用微核试验检测骨髓和外周血细胞染色体损伤,结果显示各剂量组微核率均升高。由此可见,PFOS 对染色体有致断裂作用,而 PFOA 没有。

综上所述,本研究通过体内外研究比较,揭示了 PFOA 在体外致 DNA 单链断裂的事实,在体内无致 DNA 断裂作用的原因可能和毒代动力学有关,有待进一步探索。和之前的同类研究相比,本研究体系完整(脱细胞、细胞和体内试验均涵盖)、检测终点灵敏性高(碱性和中性彗星试验联合体内微核试验)、研究结果明确(PFOA 经口摄入无致 DNA 损伤作用)。

参考文献

- [1] DOMINGO J L. Health risks of dietary exposure to perfluorinated compounds[J]. *Environment International*, 2012, 40: 187-195.
- [2] AVERINA M, BROX J, HUBER S, et al. Perfluoroalkyl substances in adolescents in northern Norway: Lifestyle and dietary predictors[J]. *Environment International*, 2018, 114: 123-130.
- [3] KURWADKAR S, DANE J, KANEL S R, et al. Per- and polyfluoroalkyl substances in water and wastewater: A critical review of their global occurrence and distribution[J]. *The Science of the Total Environment*, 2022, 809: 151003.
- [4] 崔歆, 杨琳, 刘爽, 等. 持久性环境污染物全氟辛烷磺酸和全氟辛酸的污染现状研究进展[J]. *环境与职业医学*, 2010, 27(8): 505-508.
CUI X, YANG L, LIU S, et al. Current situation of the pollution from persistent environmental contaminants perfluorooctane sulfonate and perfluorooctanoate[J]. *Journal of Environmental & Occupational Medicine*, 2010, 27(8): 505-508.
- [5] RASHID F, RAMAKRISHNAN A, FIELDS C, et al. Acute PFOA exposure promotes epigenomic alterations in mouse kidney tissues[J]. *Toxicology Reports*, 2020, 7: 125-132.
- [6] HUI Z, LI R, CHEN L. The impact of exposure to environmental contaminant on hepatocellular lipid metabolism[J]. *Gene*, 2017, 622: 67-71.
- [7] WU X M, LIANG M Q, YANG Z, et al. Effect of acute exposure to PFOA on mouse liver cells in vivo and in vitro[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2017, 24(31): 24201-24206.
- [8] TARAPORE P, OUYANG B. Perfluoroalkyl chemicals and male reproductive health: Do PFOA and PFOS increase risk for male infertility[J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2021, 18(7): 3794.
- [9] LI D Y, ZHANG L C, ZHANG Y, et al. Maternal exposure to perfluorooctanoic acid (PFOA) causes liver toxicity through PPAR- α pathway and lowered histone acetylation in female offspring mice[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2019, 26(18): 18866-18875.
- [10] CREBELLI R, CAIOLA S, CONTI L, et al. Can sustained exposure to PFAS trigger a genotoxic response? A comprehensive

- genotoxicity assessment in mice after subacute oral administration of PFOA and PFBA[J]. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2019, 106: 169-177.
- [11] 柯晓静, 王亚旭, 孟宪华, 等. 全氟辛酸对小鼠的急性毒性以及遗传和免疫毒性的研究[J]. *河北农业大学学报*, 2019, 42(4): 63-68.
- KE X J, WANG Y X, MENG X H, et al. Experimental study on acute toxicity, genetic and immunotoxicity of perfluorooctanoic acid in mice[J]. *Journal of Agricultural University of Hebei*, 2019, 42(4): 63-68.
- [12] YAHIA D, HARUKA I, KAGASHI Y, et al. 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine as a biomarker of oxidative DNA damage induced by perfluorinated compounds in TK6 cells[J]. *Environmental Toxicology*, 2016, 31(2): 192-200.
- [13] YAO X F, ZHONG L F. Genotoxic risk and oxidative DNA damage in HepG2 cells exposed to perfluorooctanoic acid[J]. *Mutation Research*, 2005, 587(1-2): 38-44.
- [14] EKE D, ÇELİK A, YILMAZ M B, et al. Apoptotic gene expression profiles and DNA damage levels in rat liver treated with perfluorooctane sulfonate and protective role of curcumin[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, 104(A): 515-520.
- [15] ÇELİK A, EKE D, EKINCI S Y, et al. The protective role of curcumin on perfluorooctane sulfonate-induced genotoxicity: Single cell gel electrophoresis and micronucleus test[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2013, 53: 249-255.
- [16] EKE D, ÇELİK A. Curcumin prevents perfluorooctane sulfonate-induced genotoxicity and oxidative DNA damage in rat peripheral blood[J]. *Drug and Chemical Toxicology*, 2016, 39(1): 97-103.
- [17] KAWAGUCHI S, NAKAMURA T, HONDA G, et al. Detection of DNA single strand breaks induced by chemical mutagens using the acellular comet assay[J]. *Genes and Environment*, 2008, 30(3): 77-85.
- [18] 国家卫生健康委员会, 国家市场监督管理总局. 食品安全国家标准 哺乳动物体内碱性彗星试验: GB 31655—2021[S]. 北京: 中国标准出版社, 2021.
- National Health Commission of the People's Republic of China, State Administration for Market Regulation. National food safety standard-Alkaline comet assay in mammals: GB 31655—2021[S]. Beijing: Standards Press of China, 2021.
- [19] 国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 哺乳动物红细胞微核试验: GB 15193.5—2014[S]. 北京: 中国标准出版社, 2015.
- National Health and Family Planning Commission. National food safety standard-Mammalian erythrocyte micronucleus test: GB 15193.5—2014[S]. Beijing: Standards Press of China, 2015.
- [20] 张文众, 李宁, 贾旭东. 基于脱细胞-核DNA的遗传毒物检测研究[C]. 中国毒理学会第三届中青年学者科技论坛暨2011年全国前列腺药理毒理学研讨会. 2011: 176.
- ZHANG W Z, LI N, JIA X D. Research on genetic toxicity detection based on acellular -nuclear DNA[C]. *Proceedings of the Third Science and Technology Forum for Young and middle-aged Scholars of the Chinese Society of Toxicology and the 2011 National Symposium on Prostate Pharmacology and Toxicology*. 2011: 176.
- [21] LU L, XU L, KANG T, et al. Investigation of DNA damage treated with perfluorooctane sulfonate (PFOS) on ZrO₂/DDAB active nano-order film[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2012, 35(1): 180-185.
- [22] LU L P, GUO L Q, LI M, et al. Investigation of perfluorooctanoic acid induced DNA damage using electrogenerated chemiluminescence associated with charge transfer in DNA[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2016, 408(25): 7137-7145.
- [23] GUO C H, ZHAO Z H, ZHAO K, et al. Perfluorooctanoic acid inhibits the maturation rate of mouse oocytes cultured in vitro by triggering mitochondrial and DNA damage[J]. *Birth Defects Research*, 2021, 113(14): 1074-1083.
- [24] MARTÍNEZ-QUEZADA R, GONZÁLEZ-CASTAÑEDA G, BAHENA I, et al. Effect of perfluorohexane sulfonate on pig oocyte maturation, gap-junctional intercellular communication, mitochondrial membrane potential and DNA damage in cumulus cells in vitro[J]. *Toxicology in Vitro*, 2021, 70: 105011.
- [25] MARIO T, YVONNE D, VERONICA S, et al. Effects of perfluorooctanoic acid in oxidative stress generation, DNA damage in cumulus cells, and its impact on in vitro maturation of porcine oocytes[J]. *Environmental Toxicology*, 2022, 37(6): 1394-1403.
- [26] 郭聪慧, 李清华, 丁林舒, 等. 全氟辛酸对小鼠卵母细胞的毒性影响[J]. *华南农业大学学报*, 2022, 43(1): 53-58.
- GUO C H, LI Q H, DING L S, et al. Toxic effects of perfluorooctanoic acid on mouse oocytes[J]. *Journal of South China Agricultural University*, 2022, 43(1): 53-58.
- [27] PEROPADRE A, FERNÁNDEZ FREIRE P, HAZEN M J. A moderate exposure to perfluorooctanoic acid causes persistent DNA damage and senescence in human epidermal HaCaT keratinocytes[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2018, 121: 351-359.
- [28] HAYASHI M. The micronucleus test most widely used in vivo genotoxicity test[J]. *Genes and Environment*, 2016, 38(1): 18.
- [29] BUTENHOFF J L, KENNEDY G L, JUNG R, et al. Evaluation of perfluorooctanoate for potential genotoxicity[J]. *Toxicology Reports*, 2014, 1: 252-270.