

研究报告

经口摄入全氟辛酸对 SD 大鼠血清总抗氧化能力的影响

甄亚平^{1,2}, 张倩华¹, 吴惠慧³, 梁宝璐³, 张淑华³, 李鹏高¹(1. 首都医科大学公共卫生学院, 北京 100069; 2. 右安门临床检验中心, 北京 100069;
3. 公共卫生与预防医学实验教学中心, 北京 100069)

摘要:目的 观察经口摄入全氟辛酸(PFOA)对大鼠血液抗氧化能力指标的影响,为分析PFOA的毒理学作用提供依据。方法 将30只雄性SD大鼠随机分为3个剂量组(0、5、100 mg/kg BW),10只/组,PFOA经口染毒7 d,收集血液,测定血清总抗氧化能力、超氧化物歧化酶(SOD)活性、丙二醛(MDA)含量及总谷胱甘肽(GSH)含量。结果 PFOA染毒(100 mg/kg BW)导致大鼠体重降低、肝脏肿大、血清总抗氧化能力降低、脂质氧化产物MDA含量升高($P < 0.05$),但GSH水平变化差异无统计学意义($P > 0.05$),SOD活性则升高($P < 0.05$)。结论 经口摄入PFOA对SD大鼠具有毒性,可导致肝脏损害,总抗氧化能力下降,但PFOA导致机体氧化损伤的作用机制尚需进一步研究证实。

关键词:全氟辛酸; 毒性; 抗氧化能力; 氧化应激; 食品安全

中图分类号: R155.51; R994.4; X836 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2013)06-0509-04

Effect of oral perfluorooctanoic acid exposure on serum total antioxidant capacity in SD rats

ZHEN Ya-ping, ZHANG Qian-hua, WU Hui-hui, LIANG Bao-lu, ZHANG Shu-hua, LI Peng-gao
(Capital Medical University School of Public Health, Beijing 100069, China)

Abstract: Objective To observe the effect of orally intake of perfluorocaprylic acid (PFOA) on serum antioxidant capacity in SD rats. **Methods** Thirty male SD rats were randomly divided into three groups (0, 5 and 100 mg/kg BW, respectively) and orally exposed to PFOA for 7 days. Serum were collected and the serum total antioxidant capacity, serum superoxide dismutase (SOD) activity, malondialdehyde (MDA) and total glutathione (GSH) contents were determined. **Results** Exposure to PFOA for 7 days caused a significant decrease of body weight and liver enlargement. In 100 mg/kg BW group, the serum total antioxidant capacity was significantly decreased ($P < 0.05$), lipid peroxidation product MDA concentration was significantly increased, but GSH level was only slightly decreased ($P > 0.05$). Meanwhile, serum SOD activity was significantly increased after PFOA exposure. **Conclusion** PFOA is toxic to rats, leading to weight loss, liver damage and a decreased antioxidant capacity in male rats. However, the underlying mechanisms of oxidative damage caused by PFOA exposure still needs further elucidation.

Key words: PFOA; toxicity; antioxidant capacity; oxidative stress; food safety

全氟辛酸(perfluorooctanoic acid, PFOA)是聚四氟乙烯化工产品的关键原材料和强酸性的含氟表面活性剂,具有疏水和疏油的特性,且耐高温和耐强氧化剂,化学结构远较其他表面活性剂稳定,即使长期浸泡在强氧化性溶液中,或在强酸溶液中煮沸也不易发生降解^[1-2]。PFOA可经饮食摄入和空气/灰尘吸

入^[3],在食品方面主要是作为阻燃剂、乳化剂应用于不粘锅涂层和食品包装材料的耐高温涂层中,如微波炉爆玉米花袋、快餐食品包装材料、防油纸张、一次性餐盒等^[4]。研究证明,PFOA易在生物体内蓄积,引起各脏器不同程度的毒性损伤^[1-2,5]。雄性和雌性SD大鼠的半数致死量(LD50)分别为>500和250~500 mg/kg^[6-7]。PFOA还是啮齿动物的致癌剂,有中等毒性的致肝癌作用^[8]。此外,PFOA染毒24 h可在原代培养的罗非鱼(*Tilapia*)肝细胞中诱导氧化应激和细胞凋亡^[9],灌胃14 d可使昆明小鼠肝组织中活性氧(ROS)及脂质氧化产物丙二醛(MDA)含量升高,谷胱甘肽(GSH)含量及超氧化物歧化酶(SOD)活性降低^[10],但目前尚无PFOA低剂量作用下对SD大

收稿日期:2013-08-02

基金项目:北京市属高等学校高层次人才引进与培养计划项目(11350905);首都医科大学自然科学基金(2012ZR17)

作者简介:甄亚平 女 实验师 研究方向为医学检验学

E-mail: zhenyaping@sina.com

通讯作者:李鹏高 男 副教授 研究方向为营养与食品卫生学

E-mail: penggao@ccmu.edu.cn

鼠血清抗氧化指标影响方面的研究,因此本研究观察了经口给予SD大鼠低剂量PFOA后对其血液抗氧化等指标的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

考虑到SD大鼠雄性较雌性对PFOA的耐受性稍高,所以本试验选择雄性SD大鼠,SPF级,8周龄,体重200~220 g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司[生产许可证号:SCXK(京)2006-0009]。动物(批号:2013021625539)购入后经5 d隔离检疫后饲养于首都医科大学动物部SPF级动物房[饲养动物许可证号:SYXK(京)2010-0020],温度20~25℃,相对湿度40%~70%。每笼5只大鼠饲养于不锈钢笼具中,喂以标准颗粒饲料,自由进食和饮水。

1.1.2 主要试剂与仪器

PFOA(CAS号:335-67-1,上海笛柏实验设备有限公司),羧甲基纤维素钠(CAS号:9004-32-4,国药集团化学试剂有限公司),总抗氧化能力试剂盒(FRAP法)、总抗氧化能力试剂盒(ABTS法)、总SOD活性检测试剂盒(NBT法)、GSH检测试剂盒、脂质氧化(MDA),检测试剂盒均购自碧云天生物技术有限公司。低温高速离心机、酶标仪、96孔板、恒温培养箱、分析天平(感量:0.000 1 g)、恒温金属浴、可调微量移液枪(1 000、100、20 μ l)。

受试品的配制:先配制0.5%羧甲基纤维素钠水溶液作为溶媒,然后称取相应重量的PFOA,用溶媒进行混悬得到浓度分别为1和20 mg/ml的供试品溶液。

表1 PFOA经口暴露7 d对雄性SD大鼠体重的影响

Table 1 Effect of oral exposure to PFOA for 7 days on body weight in male SD rats

| 组别 | 染毒不同时间的体重/g | | |
|----------------|----------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| | 1 d | 4 d | 7 d |
| 对照组($n=10$) | 241.971 \pm 6.938 | 265.310 \pm 9.185 [#] | 286.843 \pm 10.126 [#] |
| 低剂量组($n=10$) | 240.210 \pm 12.089 | 259.052 \pm 19.013 [#] | 279.903 \pm 19.771 [#] |
| 高剂量组($n=8$) | 238.605 \pm 8.798 | 190.712 \pm 12.705 ^{*#} | 201.187 \pm 29.076 ^{*#} |

注:*表示与对照组比较 $P<0.05$;#表示与第1天比较 $P<0.05$

2.3 肝脏脏器系数

由表2可知,低剂量PFOA染毒即可造成动物肝脏重量增大($P<0.05$),且随染毒剂量的升高脏器系数呈增大趋势,提示PFOA经口染毒对肝脏具有较强的毒性。

2.4 血清总抗氧化能力

分别采用2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑啉-6-磺酸)(ABTS)法和血浆铁还原能力(FRAP)法,两种方法平行测定经PFOA染毒后大鼠血清的总抗氧

1.2 动物分组及处理

试验前根据动物体重随机分组,设溶媒对照组、低剂量组(每天5 mg/kg BW)、高剂量组(每天100 mg/kg BW)共3组,10只/组。试验开始后,灌胃给予PFOA,1次/d,连续7 d。每只大鼠的灌胃量为0.5 ml/100 g BW。每次灌胃前后观察动物的表现,定期称量体重。灌胃结束后,动物禁食过夜,在试验第8天早上用0.3%戊巴比妥钠生理盐水溶液按1 ml/100 g体重的剂量经腹腔注射麻醉,腹主动脉采血1 ml备用,颈椎脱臼处死动物,取肝脏观察、称重、计算脏器系数(肝脏重量/体重 \times 100%)。

1.3 统计学分析

使用SPSS 17.0统计软件分析数据,所有计量资料均表示为 $\bar{x} \pm s$,数据符合正态分布者组间比较采用单因素方差分析;不符合正态分布者采用非参数检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠一般状况

试验期间,溶媒对照组及低剂量组大鼠饮食、活动均正常,无明显中毒表现,高剂量组均不同程度地出现身体瘦弱、摄食量减少、毛色灰暗、毛发直竖、行动迟缓、蜷缩俯卧等现象,并有2只大鼠在染毒第6天死亡。

2.2 对大鼠体重影响

如表1所示,试验期间对照组与低剂量组大鼠体重均有不同程度的增加,且差异无统计学意义($P>0.05$),但高剂量组动物体重随染毒时间的延长降低($P<0.05$),表明高剂量PFOA染毒对大鼠的生长造成了严重的不利影响。

表2 PFOA经口暴露7 d对雄性SD大鼠肝脏重量的影响

Table 2 Effect of oral exposure to PFOA for 7 days on liver

weight in male SD rats

| 组别 | 肝脏重量/g | 脏器系数/% |
|----------------|---------------------------------|------------------------------|
| 对照组($n=10$) | 7.385 \pm 0.573 | 2.58 \pm 0.19 |
| 低剂量组($n=10$) | 11.998 \pm 1.021 [*] | 4.29 \pm 0.31 [*] |
| 高剂量组($n=8$) | 11.940 \pm 1.814 [*] | 5.94 \pm 0.55 [*] |

注:*表示与对照组比较 $P<0.05$

化能力,结果见表3。与对照组相比,低剂量PFOA染毒对血清总抗氧化能力差异无统计学意义,但高剂量染毒则使血清总抗氧化能力降低,低于对照组

和低剂量组 ($P < 0.05$); FRAP 法测定结果显示, 与对照组相比, 低剂量组血清总抗氧化能力略微升高, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 高剂量组则降低 ($P < 0.05$)。两种方法的测定结果均提示高剂量染毒使动物血清中总抗氧化能力降低。

表 3 PFOA 经口暴露 7 d 对雄性 SD 大鼠血清总抗氧化能力的影响 (mmol/L)

Table 3 Effect of oral exposure to PFOA for 7 days on serum total antioxidative capacity in male SD rats

| 组别 | Trolox 当量 | FeSO ₄ 当量 |
|-------------------|------------------|----------------------|
| 对照组 ($n = 10$) | 1.181 ± 0.157 | 0.301 ± 0.03 |
| 低剂量组 ($n = 10$) | 1.183 ± 0.167 | 0.320 ± 0.081 |
| 高剂量组 ($n = 8$) | 0.941 ± 0.425 ** | 0.284 ± 0.045 ** |

注: * 表示与对照组比较 $P < 0.05$; ** 表示与低剂量组比较 $P < 0.05$

2.5 反映血清抗氧化的其他指标

与对照组相比, 脂质氧化产物 MDA 的含量随着染毒剂量的增加而升高 ($P < 0.05$), 表明 PFOA 染毒已造成了组织细胞的氧化损伤; 与对照组相比, 低剂量组与高剂量组血清 GSH 含量仅略微降低, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。PFOA 染毒后动物血清中 SOD 的活性不但没有降低, 反而升高 ($P < 0.05$), 见表 4。

表 4 PFOA 经口染毒 7 d 对雄性 SD 大鼠血清抗氧化指标的影响

Table 4 Effect of oral exposure to PFOA for 7 days on serum antioxidative parameters in male SD rats

| 组别 | MDA 含量 /($\mu\text{mol}/\text{mg}$) | GSH 含量 /($\mu\text{mol}/\text{L}$) | SOD 活性 /U |
|-------------------|--|---|-----------------|
| 对照组 ($n = 10$) | 30.981 ± 13.750 | 5.064 ± 0.547 | 1.862 ± 0.605 |
| 低剂量组 ($n = 10$) | 36.071 ± 16.053 * | 4.603 ± 1.234 | 2.803 ± 1.469 * |
| 高剂量组 ($n = 8$) | 38.770 ± 13.061 * | 4.853 ± 0.992 | 2.521 ± 1.148 * |

注: * 表示与对照组比较 $P < 0.05$

3 讨论

已有研究表明, PFOA 经口染毒对大鼠具有一般毒性, 对雄性大鼠的半数致死量 $> 500 \text{ mg}/\text{kg}$ ^[7], 对各个系统有不同的毒作用表现, 靶器官主要为肝脏和肺, 且具有中等的致肝癌作用^[6,8,10]。也有研究认为 PFOA 对 Fisher 大鼠经口急性毒性作用较弱, 可能为低毒物质^[11]。本试验采用较低的 PFOA 浓度, 以探索摄入低浓度 PFOA 对机体抗氧化系统可能造成的影响。结果发现, 经口摄入 $100 \text{ mg}/\text{kg}$ PFOA 即可对雄性 SD 大鼠产生明显的毒作用, 并对实验动物的抗氧化系统产生影响, 造成氧化损伤。

本试验中, 高剂量组动物均出现不同程度的急性毒性表现, 可能与染毒导致动物食欲减退、营养不良有关, 也可能由 PFOA 的毒性引起。染毒 3 d 后对照组和低剂量组体重均呈上升趋势, 但高剂量组体重呈下降趋势, 与对照组相比降低、肝脏肿大、脏器系数升

高、呈剂量-效应关系, 第 6 天有 2 只大鼠死亡, 表明 PFOA 对 SD 雄性大鼠产生了毒作用, 肝脏是其主要的靶器官, 这与以往的研究结果相一致。

肝脏是外来化学物生物转化的重要器官, 从消化道吸收的 PFOA 等化学毒物在进入全身血循环之前先经过肝脏, 使肝脏易受到损害^[12-13]。有研究显示, PFOA 能诱导原代培养的罗非鱼肝细胞^[9]和肝癌细胞 HepG2 产生活性氧, 导致氧化损伤从而诱导肿瘤发生^[14]。本试验结果也显示, 高剂量 PFOA 染毒使雄性 SD 大鼠血清总抗氧化能力降低, 且低剂量组与高剂量组脂质氧化产物 MDA 的含量均升高, 似有剂量-效应关系, 表明 PFOA 能够造成机体总抗氧化能力下降和组织细胞的氧化损伤。

机体在受到毒物刺激等特殊情况下, 会产生过量的自由基, 生成 MDA 等脂质过氧化产物和新的自由基, 并可进一步通过链式反应放大损害作用, 引起细胞代谢、功能障碍和死亡^[15]。机体的抗氧化系统包括抗氧化大分子、抗氧化小分子和酶等, 其总体水平即体现了机体的总抗氧化能力。

本试验中 SOD 酶活性提高 ($P < 0.05$), 这与在罗非鱼肝细胞中的研究结果一致^[9]。由于 SOD 主要清除体内的超氧阴离子自由基^[16], 这提示 PFOA 染毒可能造成动物体内超氧阴离子的产生增多, 因此机体需要相应地提高 SOD 的活性来清除这些自由基。这可能与低剂量染毒产生的兴奋作用有关^[17]。但随着染毒剂量的加大, SOD 活性不能继续增加, 出现下降趋势, 提示此时机体抗氧化系统与氧化系统之间的平衡已被打破, 机体转化超氧化物的能力开始受损。

还原型谷胱甘肽 (GSH) 是细胞内主要的非蛋白质巯基抗氧化剂, 可以消除 O_2^- 、 H_2O_2 、 $\cdot\text{OH}$ 等自由基, 并促进 SOD 合成, 在维持细胞蛋白质结构和功能、抑制细胞凋亡等方面起重要作用^[18]。当机体氧化反应亢进时, GSH 不断被消耗。但本试验中, GSH 并未降低, 这可能与染毒剂量远低于文献报道的半数致死量 $500 \text{ mg}/\text{kg}$ 有关^[6-7], 也可能与染毒时间短及 PFOA 独特的氧化损伤机制有关。

总之, PFOA 经口染毒对 SD 大鼠的抗氧化系统有影响, 可造成血清总抗氧化能力降低和脂质过氧化损伤。郎朗等^[10]认为 PFOA 能使机体抗氧化能力降低, 自由基清除不足, 脂质过氧化物在体内蓄积, 破坏了细胞膜和线粒体膜的通透性, 导致小鼠肝损伤。但是, 由于目前关于 PFOA 导致氧化损伤的研究还比较少, 其分子作用机制还需要通过进一步的研究阐明。