

有机阴离子转运多肽 3 参与全氟辛烷磺酸诱导支持细胞损伤

仇梁林¹, 钱颖贇^{1,2}, 瞿建华¹, 张旭辉³, 王守林^{3*}

(¹南通大学公共卫生学院, ²研究生处, 江苏 南通 226019; ³南京医科大学公共卫生学院, 江苏 南京 211166)

[摘要] 目的:探讨 Oatp3 在 PFOS 诱导的支持细胞毒性中的作用。方法:体外分离纯化原代大鼠支持细胞,通过细胞毒性实验,观察 PFOS 对原代支持细胞生长的影响;利用 Oatp3 siRNA 构建 Oatp3 基因敲减模型,观察 Oatp3 在 PFOS 诱导的支持细胞毒性中的作用,并采用 Western blot 法检测 PFOS 对 Oatp3 蛋白表达的影响。结果:0~30 $\mu\text{mol/L}$ 剂量的 PFOS 对大鼠支持细胞生长无明显影响($P > 0.05$);当 PFOS 剂量增至 40 $\mu\text{mol/L}$ 时,对支持细胞毒性作用明显($P < 0.01$),PFOS 毒作用的 IC_{50} 值约为 45.6 $\mu\text{mol/L}$ 。40 $\mu\text{mol/L}$ 的 PFOS 可明显诱导 Oatp3 蛋白的表达($P < 0.01$),联合 Oatp3 siRNA 处理后,其诱导作用明显抑制($P < 0.01$)。与转染试剂对照组(Mock)相比,加入 40 $\mu\text{mol/L}$ 的 PFOS 后,支持细胞存活率明显降低($P < 0.01$),联合 Oatp3 siRNA 处理后,PFOS 诱导的支持细胞毒性明显被抑制($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论:Oatp3 很可能参与 PFOS 诱导支持细胞损伤。

[关键词] 全氟辛烷磺酸;支持细胞;有机阴离子转运多肽 3

[中图分类号] R114

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)12-1774-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20141246

Organic anion transporting polypeptides 3 is involved in perfluorooctane sulfonate -induced Sertoli cell injury

Qiu Lianglin¹, Qian Yingyun^{1,2}, Qu Jianhua¹, Zhang Xuhui³, Wang Shoulin^{3*}

(¹School of Public Health; ²Graduate Student Office, Nantong University, Nantong, 226019; ³School of Public Health of NJMU, Nanjing 211166, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the role of Oatp3 on the PFOS-induced Sertoli cell injury. **Methods:** The primary Sertoli cell was isolated from 20 day old male SD rat. Cytotoxicity assay, RNAi experiments and immunoblotting analysis were conducted to explore the role of Oatp3 on the PFOS-induced Sertoli cell injury. **Results:** There is no significant toxic effects observed after PFOS treatment with the dose range from 0~30 μM for 24 hrs ($P > 0.05$). In addition, compared with the control group, 40 $\mu\text{mol/L}$ of PFOS significantly decreased the survival rate of Sertoli cells ($P < 0.01$). The IC_{50} of PFOS on Sertoli cell is 45.6 $\mu\text{mol/L}$. Further more, 40 $\mu\text{mol/L}$ of PFOS significantly increased the expressions of Oatp3 on cells, which was inhibited by Oatp3 siRNA ($P < 0.01$). Compared with Mock group, 40 $\mu\text{mol/L}$ of PFOS significantly decreased the survival rate of Sertoli cells ($P < 0.01$), which was inhibited by Oatp3 siRNA ($P < 0.01$). **Conclusion:** Oatp3 is involved in PFOS-induced Sertoli cell injury.

[Key words] perfluorooctane sulfonate; sertoli cell; organic anion transporting polypeptides 3

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(12): 1774-1778]

全氟辛烷磺酸(perfluorooctane sulfonate, PFOS)属环境持久性有机污染物,是全氟碳化合物重要的终产物^[1]。我国自 2000 年来开始生产该类化学物,因稳定性和蓄积性强,后期监测数据显示,在我国东部及中部地区的饮水、食物及其他环境介质均存在不同程

度的污染^[2]。机体经饮水或食物摄入 PFOS 后,可导致其在体内蓄积,且清除缓慢,人体 PFOS 的半数清除率可达 8 年^[3]。近年来,PFOS 导致机体神经、内分泌、免疫和生殖等多个系统的损伤已有陆续报道。最近, Qiu 及 Wan 等^[4-5]研究发现,PFOS 可通过影响支持细胞的形态及功能从而导致雄性生殖损伤,但机制目前仍不十分清楚。

有机阴离子转运多肽 (organic anion transporting polypeptides, Oatps) 属溶质载体转运超家族(so-

[基金项目] 国家自然科学基金(81302452);江苏省高校自然科学基金(12KJB330004)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: wangshl@njmu.edu.cn

lute carrier, SLC), 在胃、肝脏、肾脏和血睾屏障等处均有分布, 在调控内外源性化学物跨细胞膜转运方面有重要作用^[6]。Oatp3(也称 Slco1a5)早期报道在小鼠脑中, 参与转运甲状腺素和前列腺激素, 是细胞内外源性化学物重要的流入通道(influx pump)^[7]。近期研究发现, Oatp3 不仅表达于睾丸, 而且参与外源性化学物跨血睾屏障转运, 在诱导睾丸损伤中具有重要意义^[6]。在 PFOS 诱导的支持细胞损伤是否与其相关, 目前还没有研究报道。

本次研究拟利用体外培养的原代大鼠支持细胞, 构建 Oatp3 基因敲减模型, 观察 Oatp3 在 PFOS 诱导的支持细胞损伤中的作用, 为深入研究 PFOS 的雄性生殖损伤机制提供重要参考。

1 材料和方法

1.1 材料

PFOS(分析纯, Sigma 公司, 美国); 基质胶(BD 公司, 美国); 表皮生长因子(EGF)、胰蛋白酶、胶原酶(IV 型)和透明质酸酶(Sigma 公司, 美国); Oatp3 抗体(羊抗, Santa Cruz 公司, 美国); GAPDH 抗体(鼠抗, CST 公司, 美国); AR 抗体(兔抗, Invitrogen 公司, 美国); siRNA 转染试剂(Novagen 公司, 美国); Oatp3 siRNA(序列 1: 正义链 5'-GCAUUGGAUUAUUACUUAUtt-3', 反义链 5'-AUAAGUAAAUAUCCAAUGCat-3'; 序列 2: 正义链 5'-GUAUCAAGCCUGAAGAGAAtt-3', 反义链, '-UUCUCUUCAGGCUUGAUACac-3'; 序列 3: 正义链 5'-CAGCAGAGUGUAUAA-AAGAtt-3', 反义链 5'-UCUUUUAUACACUCUGCUG-gg-3)及对照 siRNA(无序列, 货号 4390843, Ambion 公司, 美国); CO₂ 培养箱(Thermo 公司, 美国); 酶标仪(Tecan Group 公司, 瑞士); 倒置生物显微镜及数字照相设备(Nikon 公司, 日本)。

1.2 方法

1.2.1 原代支持细胞的分离、培养和转染

原代支持细胞的分离、培养、纯化和鉴定方法在参考前期报道的基础上作适当改良^[6]。20 d 龄的雄性 SD 大鼠(上海斯莱特公司), 无菌取出双侧睾丸。清洗表面血渍后, 浸入新鲜的 PBS 中, 小心除去睾丸包膜及血管, 将睾丸剪成 1 mm³ 大小的组织块, 并离心移入三角瓶中。加入复合消化酶 I(含 IV 型胶原酶 2 g/L, DNA 酶 200 ng/L)37℃水浴消化 15 min, 待组织块完全转变为线索状后离心除去消化酶。加入复合消化酶 II(含透明质酸酶 2g/L, DNA 酶 200 ng/L)37℃水浴继续消化约 10 min, 使

其完全形成细胞悬液后终止消化。离心去除上清液, 加入 DMEM/F12 培养液(含 EGF 2.5 ng/ml, 转铁蛋白 5 μg/ml, 胰岛素 10 μg/ml)重新悬浮细胞, 再经 100 目细胞筛过滤。用支持细胞特异性 Marker 雄激素抗体(AR)通过细胞免疫化学法以及 Feuglen 染色鉴定细胞, 通过差速贴壁法去除生殖细胞, 确保支持细胞纯度达到 90%后备用。将新分离的原代支持细胞预培养 24 h 后, 按照转染试剂说明书推荐步骤, 加入 100 nmol/L 的对照 siRNA 或 Oatp3 siRNA 进行转染, 再培养 24 h 后, 更换新鲜的 DMEM/F12 培养液。通过 RT-PCR(根据 Gene bank 数据库, 设计 Oatp3 的上游引物为: 5'-GCTG-GCTTAACCTACTCTTATG-3', 下游引物为: 5'-CCAT-TCCAACAGACTTCTCAC-3', 退火温度 58℃; 内参 GAPDH 上游引物为: 5'-GTTCCAGTAGGTACT-GTTGA-3', 下游引物为 5'-CTGTTGAAGTCACAGG-AGAC-3', 退火温度 54℃)及 Western blot 的方法检测转染后基因表达的干扰效果。

1.2.2 细胞毒性试验

调整原代支持细胞密度约为 2×10⁴ 个/孔种于 96 孔板, 设置培养箱条件为 32℃、85%湿度和 5% CO₂ 培养 12 h。各孔用新鲜 DMEM/F12 培养液小心洗涤细胞 2 次后, 分别加入 0、10、20、30、40 和 50 μmol/L 的 PFOS 处理 24 h。取出培养板, 各孔加入 CCK8 试剂 10 μl, 轻轻混匀后再放入培养箱孵育 2 h, 设定酶标仪检测波长为 450 nm, 检测各孔的吸光度值并计算各组细胞相对生存率及 IC₅₀ 值。将细胞预培养 72 h, 通过 CCK8 法确定细胞状态良好后, 根据前面的结果, 选择出现明显细胞毒性的 PFOS 剂量(40 μmol/L), 再分别设立 Mock 组(仅加转染试剂)、Oatp3 siRNA 组(含转染试剂和 100 nmol/L 的 Oatp3 siRNA)、PFOS 组(含 40 μmol/L 的 PFOS)、Mock+PFOS 组(含转染试剂和 40 μmol/L 的 PFOS)和 Oatp3 siRNA+PFOS 组(含转染试剂、100 nmol/L 的 Oatp3 siRNA 和 40 μmol/L 的 PFOS)继续处理 48 h, 通过 CCK8 法监测上述各组细胞的存活率。

1.2.3 支持细胞 Oatp3 蛋白表达的检测

适当密度的支持细胞种于培养皿, 培养 24 h, 用新鲜的 DMEM/F12 培养液小心洗涤细胞 2 次后, 观察各皿细胞状态, 再将其分为 Mock 组、Oatp3 siRNA 组、PFOS 组、Mock+PFOS 组和 Oatp3 siRNA+PFOS 组(同 1.2.2)。上述各组处理 24 h 后, 提取总蛋白, 经定量后采用 Western blot 法检测 Oatp3 的表达。蛋白曝光胶片扫描后, 采用 Image-J

软件继续处理采集数据并定量。

1.3 统计学方法

实验数据采用 SPSS17.0 软件进行统计分析,各组数据的组间差异采用单因素方差分析(ANOVA),并用 Tukey 多重比较法进行两两比较, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 原代支持细胞的分离和鉴定

分离后的原代支持细胞呈圆形(图 1A),生长 24 h

后细胞明显铺展开呈不规则形(图 2B),Feuglen 染色显示细胞核呈紫色,而胞浆呈淡绿色(图 2C),此外,支持细胞特异性的标记蛋白 AR 强烈表达于细胞浆(图 2D),由此显示该细胞确为支持细胞。

2.2 PFOS 对 Sertoli 细胞存活率的影响

与对照组相比,0~30 $\mu\text{mol/L}$ 的 PFOS 对原代支持细胞无明显毒作用,细胞存活良好($P > 0.05$)。当剂量增加至 40 $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞存活率降低($P < 0.01$),当剂量增加至 50 $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞存活率降至 40% 以下($P < 0.01$), IC_{50} 值约为 45.6 $\mu\text{mol/L}$ (图 2)。

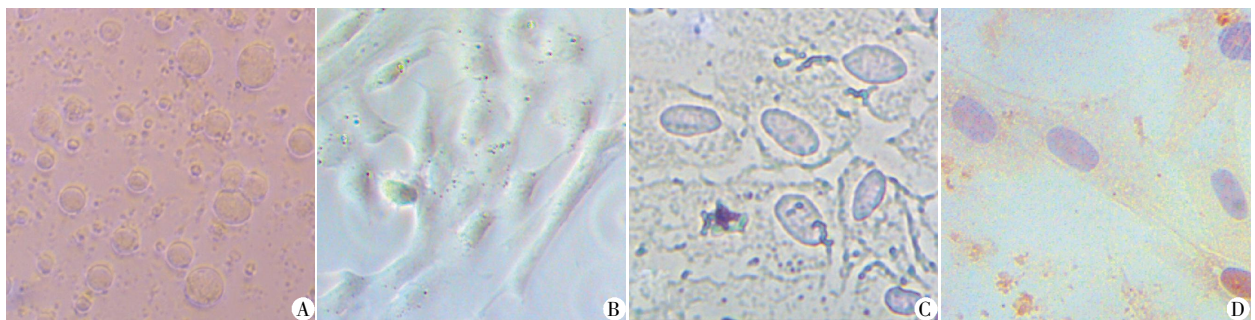
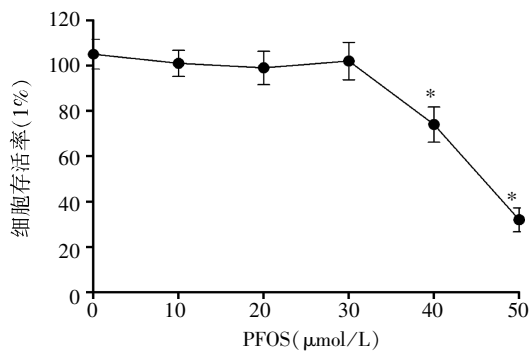


图 1 原代支持细胞的形态
A:分离后的原代支持细胞($\times 200$);B:培养 24 h 后的支持细胞($\times 200$);C:Feuglen 染色(细胞核:紫色;细胞浆:淡绿色, $\times 400$);D:支持细胞特异性标记蛋白 AR 的表达(棕色, $\times 400$)。

图 1 原代支持细胞的形态

Figure 1 The morphology of primary Sertoli cells



与对照组比, * $P < 0.01$ ($n=6$)。

图 2 PFOS 对支持细胞存活率的影响

Figure 2 The Sertoli cell survival rate after PFOS exposure

2.3 Oatp3 siRNA 对原代支持细胞 Oatp3 表达的干扰

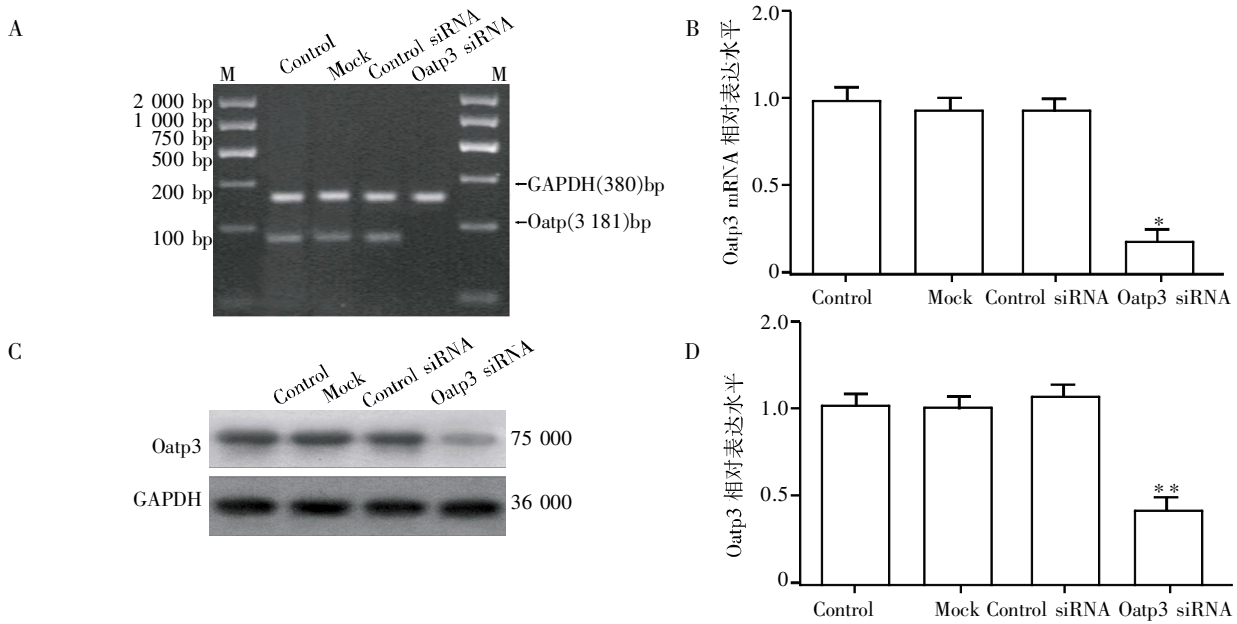
与对照组相比,Mock 组、对照 siRNA 组均对支持细胞 Oatp3 的 mRNA 表达无明显影响($P > 0.05$),而转染 Oatp3 siRNA 后,支持细胞 Oatp3 的表达明显降低($P < 0.01$,图 3A、B)。在蛋白水平,Mock 组、对照 siRNA 组均对支持细胞 Oatp3 蛋白表达均无明显影响($P > 0.05$),而 Oatp3 siRNA 组表达则明显降低($P < 0.01$,图 3C、D),抑制率约 50%~60%,提示模型构建成功。

2.4 干扰支持细胞 Oatp3 表达后对 PFOS 的细胞毒性影响

与 Mock 组相比,Oatp3 siRNA 可显著降低 Oatp3 的表达($P < 0.01$),而加入 40 $\mu\text{mol/L}$ 的 PFOS 后,Oatp3 的表达明显增加($P < 0.01$)。与 Mock+PFOS 组相比,联合 Oatp3 siRNA 和 PFOS 处理后,Oatp3 的表达明显降低($P < 0.01$,图 4A)。上述结果提示,Oatp3 siRNA 能逆转 PFOS 对支持细胞 Oatp3 表达的诱导。与 Mock 组相比,Oatp3 siRNA 单独处理并未导致明显的细胞毒性($P > 0.05$),而加入 40 $\mu\text{mol/L}$ 的 PFOS 后,细胞存活率明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与 Mock+PFOS 组相比,联合 Oatp3 siRNA 和 PFOS 处理后,Oatp3 siRNA 能明显减轻 PFOS 对支持细胞的毒性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$,图 4B)。

3 讨论

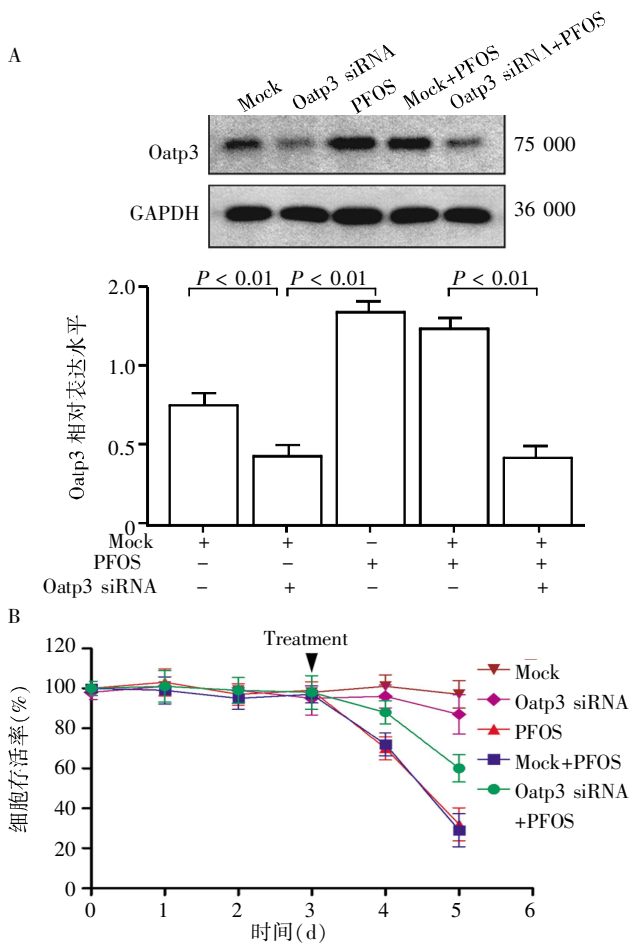
PFOS 性质稳定、蓄积性强,使用广泛,是食物、饮水等环境介质中较为常见的污染物,联合国环境署 2001 年颁布通过的《斯德哥尔摩公约》中将其列为需在全球范围内严格控制的环境持久性有机污染物^[1]。PFOS 主要由碳-氟键构成,键能极高,在生



Control: 细胞对照; Mock: 转染试剂对照; Control siRNA: 对照 siRNA; Oatp3 siRNA: 转染 Oatp3 siRNA 细胞; M: DNA Marker。与对照组比较, * $P < 0.01$ ($n=6$)。

图 3 Oatp3 siRNA 对原代支持细胞 Oatp3 表达的干扰

Figure 3 The effects of Oatp3 siRNA on the expression of Oatp3 in Sertoli cells



Mock: 转染试剂对照; Control siRNA: 对照 siRNA。

图 4 干扰支持细胞 Oatp3 表达后对 PFOS 的细胞毒性影响

Figure 4 The effects of PFOS on the survival of Sertoli cell after Oatp3 knockdown

物体不代谢,经口摄入后以原型进入各靶器官发挥作用^[8]。近年来,研究发现 PFOS 可导致雄性生殖损伤,而支持细胞是其重要的毒作用靶点^[4],但相关机制目前仍不十分清楚。

外源性化学物的吸收、分布、代谢及排泄与其靶器官毒性密切相关,而这些进程取决于化学物各自的转运通道或转运体在机体内的分布^[9]。一般情况下,外源化学物需到达靶器官,并到达足够的浓度才能诱导靶器官的毒性损伤^[10]。Oatp 家族成员在机体分布广泛,主要参与各种内外源性化学物跨细胞膜转运,是细胞上化学物重要的流入通道^[11]。研究报道 Oatp3 在睾丸血睾屏障处表达,参与外源性化学物的跨屏障转运^[6,12]。本研究发现原代支持细胞上表达有 Oatp3,而支持细胞是血睾屏障的重要组成部分,与其报道一致。此外,本研究发现在 PFOS 处理后,支持细胞 Oatp3 表达有所增强,提示 PFOS 对 Oatp3 可能具有诱导作用。相似的是, Yu 等^[13]发现 PFOS 可显著诱导肝脏 Oatp2 的表达,作为同一家族成员, Oatp2 是肝细胞甲状腺素(T4)的重要进入通道,其表达增强而导致肝细胞摄取 T4 增加,与结果基本相符。Oatps 家族及有机阴离子转运体(organic anion transporters, OAT)家族,参与介导全氟碳类化合物(如全氟辛酸、PFOA 等)进入细胞,而 PFOS 结构与 PFOA 非常相似^[3,14],本文推测 PFOS 很可能经此途径进入细胞,并发挥毒性作用。 Qiu 等^[4]报导,小鼠经口暴露 PFOS 后,可到达睾丸

组织,并导致支持细胞破坏,且具有剂量效应关系,由此提示支持细胞损伤很可能与PFOS的含量有关。因此,考虑到外源化学物生物转运在靶器官毒性中的重要作用,从PFOS跨支持细胞膜的转运途径进行探讨,将有助于进一步解释其毒性。本次结果显示,当下调Oatp3表达后,PFOS的细胞毒性明显减轻,提示Oatp3与PFOS诱导的支持细胞损伤相关。Oatp3表达下调,相应的PFOS进入通道减少,因而进入细胞的PFOS可能也相应减少。同样,Su等^[15]在整体水平发现,Oatp3与CdCl₂诱导的生殖损伤相关,前者表达于支持细胞,作为Cd进入支持细胞的通道与其毒性密切相关。综上所述,虽然整体水平尚需探讨,但本次体外结果提示Oatp3很可能参与介导PFOS诱导的支持细胞毒性。

[参考文献]

- [1] Lindstrom AB, Strynar MJ, Libelo EL. Polyfluorinated compounds: past, present, and future [J]. *Environ Sci Technol*, 2011, 45(15): 7954-7961
- [2] Bao LJ, Maruya KA, Snyder SA, et al. China's water pollution by persistent organic pollutants [J]. *Environ Pollut*, 2012, 163: 100-108
- [3] Harada K, Inoue K, Morikawa A, et al. Renal clearance of perfluorooctane sulfonate and perfluorooctanoate in humans and their species-specific excretion [J]. *Environmental Research*, 2005, 99(2): 253-261
- [4] Qiu L, Zhang X, Zhang X, et al. Sertoli cell is a potential target for perfluorooctane sulfonate-induced reproductive dysfunction in male mice [J]. *Toxicol Sci*, 2013, 135(1): 229-240
- [5] Wan HT, Mruk DD, Wong CK, et al. Perfluorooctanesulfonate (PFOS) perturbs male rat Sertoli cell blood-testis barrier function by affecting F-actin organization via p-FAK-Tyr (407): an *in vitro* study [J]. *Endocrinology*, 2014, 155(1): 249-262
- [6] Su L, Mruk DD, Lee WM, et al. Drug transporters and blood-testis barrier function [J]. *J Endocrinol*, 2011, 209(3): 337-351
- [7] Ueno M, Nakagawa T, Wu B, et al. Transporters in the brain endothelial barrier [J]. *Curr Med Chem*, 2010, 17(12): 1125-1138
- [8] Rahman MF, Peldszus S, Anderson WB. Behaviour and fate of perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances (PFASs) in drinking water treatment: a review [J]. *Water Res*, 2014, 50: 318-340
- [9] König J, Müller F, Fromm MF. Transporters and drug-drug interactions: important determinants of drug disposition and effects [J]. *Pharmacol Rev*, 2013, 65(3): 944-66
- [10] Augustine LM, Markelewicz RJ Jr, Boekelheide K, et al. Xenobiotic and endobiotic transporter mRNA expression in the blood-testis barrier [J]. *Drug Metab Dispos*, 2005, 33(1): 182-189
- [11] Stieger B, Hagenbuch B. Organic anion-transporting polypeptides [J]. *Curr Top Membr*, 2014, 73: 205-232
- [12] Lowes S, Sykes D, Breen CM, et al. Multiple components of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid uptake by rat choroid plexus [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2005, 315(1): 136-143
- [13] Yu WG, Liu W, Liu L, et al. Perfluorooctane sulfonate increased hepatic expression of OAPT2 and MRP2 in rats [J]. *Arch Toxicol*, 2011, 85(6): 613-621
- [14] Yang CH, Glover KP, Han X. Organic anion transporting polypeptide (Oatp)1a1-mediated perfluorooctanoate transport and evidence for a renal reabsorption mechanism of Oatp1a1 in renal elimination of perfluorocarboxylates in rats [J]. *Toxicol Lett*, 2009, 190(2): 163-171
- [15] Su L, Mruk DD, Cheng CY. Regulation of drug transporters in the testis by environmental toxicant cadmium, steroids and cytokines [J]. *Spermatogenesis*, 2012, 2(4): 285-293

[收稿日期] 2014-06-17