

蛋白粉对大鼠肾脏全氟化合物生物利用率的影响

蔡德雷, 郑熠斌, 夏勇, 张世鑫, 宋燕华, 沈海涛, 姚进, 陈苒

浙江省疾病预防控制中心理化与毒理检验所, 浙江 杭州 310051

摘要: **目的** 探讨蛋白粉对大鼠血液和肾脏全氟化合物 (PFASs) 生物利用率的影响及肾功能的变化。**方法** 24只SPF级大鼠随机分为阴性对照组、PFASs组和蛋白粉组, 每组8只, 雌雄各半。PFASs包括13种全氟羧酸 (PFCAs) 和8种全氟磺酸 (PFSAAs), 混合后作为受试物进行干预。阴性对照组经口灌胃给予20 mL/kg体重的去离子水; PFASs组经口灌胃给予5 mL/kg体重的PFASs混合物和15 mL/kg体重的去离子水; 蛋白粉组大鼠经口灌胃给予5 mL/kg体重的PFASs混合物和15 mL/kg体重的蛋白粉溶液 (浓度为0.258 g/mL)。连续干预28 d后, 称重并计算肾体比, 采用全自动生化分析仪检测血肌酐和血尿素氮; 采用超高效液相色谱-串联质谱仪内标法测定血液和肾脏PFCAs、PFSAAs和PFASs, 计算PFASs生物利用率。**结果** 阴性对照组、PFASs组和蛋白粉组大鼠肾重、肾体比、血肌酐和血尿素氮差异无统计学意义 (均 $P>0.05$)。蛋白粉组大鼠血液PFCAs、PFSAAs和PFASs的生物利用率与PFASs组比较, 差异无统计学意义 (均 $P>0.05$)。与PFASs组相比, 蛋白粉组雄性大鼠肾脏PFCAs、PFSAAs和PFASs的生物利用率升高 (均 $P<0.05$); 雌性大鼠中差异无统计学意义 (均 $P>0.05$)。**结论** 本研究剂量的蛋白粉能提高雄性大鼠肾脏PFASs的生物利用率, 对血液PFASs的生物利用率和肾功能无明显影响。

关键词: 全氟化合物; 生物利用率; 蛋白粉; 肾功能

中图分类号: R992 文献标识码: A 文章编号: 2096-5087 (2024) 03-0268-04

Effects of protein powder on the bioavailability of perfluoroalkyl substances in rat kidney

CAI Delei, ZHENG Yibin, XIA Yong, ZHANG Shixin, SONG Yanhua, SHEN Haitao, YAO Jin, CHEN Qing

Department of Physicochemical and Toxicology, Zhejiang Provincial Center for Disease Control and Prevention, Hangzhou, Zhejiang 310051, China

Abstract: Objective To explore the effects of protein powder on the bioavailability of perfluoroalkyl substances (PFASs) in blood and kidneys of rats and renal function change. **Methods** Twenty-four rats of the SD strain were randomly divided into the negative control group, PFASs group and protein powder group, with 8 rats (half males and half females) in each group. PFASs included 13 perfluorocarboxylic acids (PFCAs) and 8 perfluorosulfonic acids (PFSAAs), and the mixture was used as a test subject for intervention. The rats in the negative control group were given deionized water at doses of 20 mL/kg · bw, in the PFASs group were given 5 mL/kg · bw of PFASs mixtures and 15 mL/kg · bw of deionized water, and in the protein powder group were given 5 mL/kg · bw of PFASs mixtures and 15 mL/kg · bw of protein powder (0.258 g/mL). After intervention for 28 successive days, body weight and kidney mass were weighed, and the kidney volume index was calculated. Serum creatinine and blood urea nitrogen were detected by an automatic biochemical analyzer. The PFCAs, PFSAAs and PFASs contents were quantified in blood and kidney using ultra-high performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry, and the bioavailability was estimated. **Results** There was no significant differences in kidney mass, kidney volume index, serum creatinine and blood urea nitrogen among the negative control group, PFASs group and protein powder group (all $P>0.05$). The bioavailability of blood PFCAs, PFSAAs and PFASs in the protein powder group was not significantly different from the PFASs group (all $P>0.05$).

DOI: 10.19485/j.cnki.issn2096-5087.2024.03.021

基金项目: 浙江省医药卫生科技计划项目 (2023KY635)

作者简介: 蔡德雷, 硕士, 副主任技师, 主要从事卫生毒理学研究工作

通信作者: 陈苒, E-mail: qingchen@cdc.zj.cn

Compared with the PFASs group, the bioavailability of PFCAs, PFSAs and PFASs were significantly increased in kidneys of male rats in the protein powder group (all $P<0.05$), while were not significant different in those of female rats (all $P>0.05$). **Conclusion** Protein powder at the dose of this study can significantly improve the bioavailability of PFASs in kidneys of male rats, while there no obvious effects on the bioavailability of blood PFASs and renal function.

Keywords: perfluoroalkyl substances; bioavailability; protein powder; renal function

全氟化合物 (perfluoroalkyl substances, PFASs) 指直链或支链中全部氢原子被氟原子取代的一系列烷基化合物, 主要包括全氟羧酸 (perfluorocarboxylic acids, PFCAs) 和全氟磺酸 (perfluorosulfonic acids, PFSAs) 等。PFASs 具有良好的化学稳定性、热稳定性和高表面活性, 被广泛用于造纸、食品包装材料、清洁剂等工业生产和生活消费领域, 可通过饮食、饮水和空气等多种途径暴露, 能在人体血液、尿液和头发等生物组织中检出, 对健康造成多种危害, 包括肝肾毒性、神经毒性、生殖毒性和免疫毒性等^[1-3]。肾脏是 PFASs 的主要排泄器官^[4], 大量的动物实验研究显示 PFASs 是肾毒物^[5-6], 流行病学研究提示肾功能减退、慢性肾病可能与 PFASs 暴露有关^[7-9]。蛋白粉作为一种重要的营养补充剂, 过量摄入可能加重肾脏负担, 影响人体代谢和排泄^[10]。本研究以符合人体实际暴露情况的低浓度 PFASs 对大鼠经口染毒, 探讨蛋白粉对大鼠血液和肾脏 PFASs 生物利用率的影响。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

Waters Xevo TQ-S 超高效液相色谱-串联质谱仪 (美国沃特世公司); WAX 净化柱 6 CC/150 mg (美国沃特世公司); EFAA-DC24 氮吹仪 (上海安谱公司); TBA-40FR 全自动生化分析仪 (日本东芝公司); PL1001-L 电子天平 (梅特勒-托利多); MIC-CRA D-9 匀浆机 (德国 ART 公司); 同位素标记浓度分别为 2 000 ng/mL 的全氟辛酸 (MPFOA) 和全氟辛烷磺酸钠 (MPFOS) 的混合标准物 (美国威灵顿实验室); 蛋白粉 (美国奥普帝蒙营养公司)。

PFCAs: 全氟丁酸 (PFBA)、全氟戊酸 (PFPeA)、全氟己酸 (PFHxA)、全氟庚酸 (PFHpA)、全氟辛酸 (PFOA)、全氟壬酸 (PFNA)、全氟癸酸 (PFDA)、全氟十一酸 (PFUDA)、全氟十二酸 (PFDoA)、全氟十三酸 (PFTrDA)、全氟十四酸 (PFTeDA)、全氟十六酸 (PFHxDA)、全氟十八酸 (PFODA); **PFSAs:** 全氟丁烷磺酸钾 (L-PFBS)、全氟戊烷磺酸钠 (L-PFPeS)、全氟己烷磺酸钠 (L-PFHxS)、全氟庚烷磺酸钠 (L-PFHpS)、全氟辛烷磺酸钠 (L-PFOS)、

全氟壬烷磺酸钠 (L-PFNS)、全氟癸烷磺酸钠 (L-PFDS)、全氟十二烷基磺酸钠 (L-PFDoS)。21 种纯品均购自 Sigma 公司。

1.2 实验动物

SPF 级 SD 大鼠 24 只, 雌雄各半, 体重 50~70 g, 由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供, 生产许可证号为 SCXK (沪) 2017-0005, 使用许可证号为 SYXK (浙) 2018-0018。实验动物饲料由江苏省协同医药生物工程有限责任公司提供, 生产许可证号为苏饲证 (2019) 01008。饲养环境为屏障环境, 温度 20~24 °C, 相对湿度 50%~70%。实验前大鼠在动物房环境中适应性饲养 4 d。本研究通过浙江省疾病预防控制中心实验动物伦理委员会审查, 审批号: 2021-004。

1.3 方法

1.3.1 动物分组与干预

大鼠随机分为阴性对照组、PFASs 组和蛋白粉组, 每组 8 只, 雌雄各半, 单笼饲养, 自由进食、饮水。采用去离子水将 21 种 PFASs 配制成浓度均为 10 ng/mL 的混合物; 采用去离子水将蛋白粉配制成溶液, 浓度为 0.258 g/mL (最大可灌胃浓度)。阴性对照组经口灌胃给予 20 mL/kg 体重的去离子水; PFASs 组经口灌胃给予 5 mL/kg 体重的 PFASs 混合物和 15 mL/kg 体重的去离子水; 蛋白粉组大鼠经口灌胃给予 5 mL/kg 体重的 PFASs 混合物和 15 mL/kg 体重的蛋白粉溶液 (蛋白粉剂量相当于人体服用量 31 g/60 kg 体重的 7.5 倍)。每周记录 1 次各组大鼠体重, 以调整灌胃体积。

1.3.2 血液、肾脏组织采集与处理

连续干预 28 d 后, 大鼠禁食过夜, 异氟烷麻醉, 腹主动脉取血约 4 mL (2 mL 抗凝血+2 mL 非抗凝血), 处死后留取肾脏, 称重并计算肾体比, 于-20 °C 冰箱中保存。将整个肾脏剪碎拌匀后取 1 g 组织, 加入 2 mL 去离子水匀浆后备用。采用离子对液液萃取法对血液和肾脏组织样品进行前处理^[11]。取匀浆后的肾脏组织或 1 g 抗凝血于 15 mL 聚丙烯管中, 加入 2 μL 同位素标记的 PFASs 混合标准物, 充分混匀后加 1 mL 0.5 mol/L 四丁基硫酸氢铵和 2 mL 碳酸钠缓冲液 (pH=10), 再加入 5 mL 甲基叔

丁基醚振荡, 250 r/min 提取 20 min, 8 000 ×g 离心 5 min 后收集上清液。按上述步骤重复萃取 3 次, 合并 3 次上清液, 氮气吹至少量液体, 加水稀释至 8 mL, 过 WAX 柱, 洗脱液用氮气吹至少量液体, 去离子水定容至 0.4 mL, 8 000×g 离心 5 min 后检测。非抗凝血室温静置 30 min, 2 000×g 离心 10 min 后取血清备用; 抗凝血不作处理。

1.3.3 肾功能、血液和肾脏 PFASs 测定

取血清 0.3 mL, 采用 TBA-40FR 全自动生化分析仪测定血肌酐和尿素氮。采用超高效液相色谱-串联质谱仪内标法测定血液和肾脏组织中 21 种 PFASs 含量。色谱条件: 色谱柱为 ACQUITY UPLCHSS T3 (1.8 μm, 2.1 mm×100 mm); 流动相 A: 2 mmol/L 乙酸铵水溶液, 流动相 B: 2 mmol/L 乙酸铵甲醇溶液; 梯度洗脱条件: 0~0.5 min, 40% B; 0.5~8 min, 100% B; 8~10 min, 100% B; 10~12 min, 40% B。流速: 0.3 mL/min, 柱温为 (45±0.5) °C。质谱条件:

ESI 源负离子模式, 多通道反应监测模式。毛细管电压: 2 000 V; 脱溶剂气温度: 500 °C; 脱溶剂流量: 1 000 L/h; 锥孔反吹气流量: 150 L/h。采用 Masslynx 4.1 软件采集和分析数据。参照文献 [12] 计算 PFASs 生物利用率。

1.4 统计分析

采用 SPSS 19.0 软件统计分析。定量资料服从正态分布的采用均数±标准差 ($\bar{x}\pm s$) 描述, 组间比较采用 *t* 检验和单因素方差分析; 雄性大鼠肾体比方差不齐, 采用 Kruskal-Wallis *H* 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 大鼠肾重、肾体比和肾功能比较

实验期间, 阴性对照组、PFASs 组和蛋白粉组大鼠均未见异常症状和体征, 无死亡。实验后, 3 组雌、雄性大鼠肾重、肾体比、血肌酐和血尿素氮差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠肾重、肾体比和肾功能

Table 1 Kidney mass, kidney volumn index and renal function in all group of rats

性别	组别	肾重/g	肾体比	血肌酐/ (μmol/L)	血尿素氮/ (mmol/L)
雌	阴性对照组	1.662±0.119	0.722±0.029	57.80±4.55	6.256±0.571
	PFASs 组	1.625±0.147	0.710±0.055	56.50±2.08	6.130±0.501
	蛋白粉组	1.625±0.057	0.702±0.036	53.50±2.89	5.960±0.404
	<i>F</i> 值	0.161	0.271	1.744	0.382
	<i>P</i> 值	0.853	0.768	0.224	0.692
雄	阴性对照组	2.748±0.280	0.740±0.050	55.40±2.30	5.344±0.523
	PFASs 组	2.504±0.196	0.702±0.013	54.80±4.82	4.958±0.549
	蛋白粉组	2.460±0.280	0.738±0.051	52.50±3.00	5.098±0.570
	<i>F/χ</i> ² 值	1.777	1.998 ^①	0.789	0.639
	<i>P</i> 值	0.214	0.368	0.479	0.546

注: ①表示 χ^2 值。

2.2 大鼠血液 PFASs 生物利用率比较

PFASs 组和蛋白粉组雌、雄性大鼠血液 PFCAs、PFASs 和 PFASs 生物利用率差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。见表 2。

2.3 大鼠肾脏 PFASs 生物利用率比较

全氟化合物组和蛋白粉组雌性大鼠肾脏 PFCAs、PFASs 和 PFASs 生物利用率差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。与 PFASs 组相比, 蛋白粉组雄性大鼠肾脏 PFCAs、PFASs 和 PFASs 的生物利用率升高 ($P<0.05$)。见表 3。

3 讨论

大多数 PFASs 在动物和人类中主要通过胆汁和

尿液的非代谢清除^[13]。在多数动物体内, PFOA、PFOS 等 PFASs 通过与蛋白质结合, 优先分布在肾脏^[14], 可能产生肾毒性。本研究中, 未见 PFASs 混合物和蛋白粉联合作用对大鼠肾重、肾体比、血肌酐和血尿素氮产生影响, 未见肾功能损害。与 PFASs 暴露有关的动物实验研究显示尿素氮和/或肌酐浓度有微小的变化^[4], 此差异可能与本研究 PFASs 的暴露剂量较小、暴露时间较短有关。

蛋白粉对大鼠血液中 PFCAs、PFASs 和 PFASs 生物利用率均无明显影响, 与前期研究发现蛋白质对肝脏 PFASs 生物利用率无明显影响的结果^[11]相似。蛋白质在小肠被消化为氨基酸吸收入血, 不能通过其疏水位点与天冬氨酸、谷氨酸侧链吸附 PFASs^[15],

表 2 大鼠血液 PFASs 生物利用率

Table 2 Bioavailability of PFASs in the blood of rats

性别	组别	PFCAs/%	PFSAs/%	PFASs/%
雌	PFASs组	3.443±0.870	4.232±1.190	3.814±1.017
	蛋白粉组	3.991±0.181	4.503±0.449	4.231±0.259
	t值	-1.233	-0.427	-0.796
	P值	0.264	0.684	0.456
雄	PFASs组	5.018±0.468	5.359±0.405	5.178±0.436
	蛋白粉组	5.386±0.457	5.506±0.438	5.442±0.445
	t值	-1.181	-0.521	-0.893
	P值	0.276	0.619	0.402

表 3 大鼠肾脏 PFASs 生物利用率

Table 3 Bioavailability of PFASs in rat kidney

性别	组别	PFCAs/%	PFSAs/%	PFASs/%
雌	PFASs组	0.810±0.165	0.812±0.135	0.811±0.150
	蛋白粉组	0.820±0.068	0.965±0.131	0.888±0.094
	t值	-0.115	-1.628	-0.872
	P值	0.912	0.155	0.417
雄	PFASs组	0.742±0.041	0.648±0.079	0.698±0.049
	蛋白粉组	0.855±0.028	0.863±0.082	0.859±0.042
	t值	-4.717	-3.978	-5.167
	P值	0.002	0.005	0.001

因此蛋白粉对 PFASs 的吸收可能没有明显影响。此外，有研究显示人体内 PFASs 的积累可能与其通过肾近端小管中的转运蛋白 URAT1 和 OAT4 从原尿中重吸收有关^[16]。由此推测蛋白粉也可能引起 PFASs 在肾小管重吸收增加，但从肾小管进入血液的 PFASs 没有相应增加，从而导致肾脏 PFASs 含量升高，而血液 PFASs 含量没有明显改变。

蛋白粉能提高雄性大鼠肾脏 PFCAs、PFSAs 和 PFASs 的生物利用率，但在雌性大鼠中未见影响，性别差异可能与内源性雌激素有关。研究表明内源性雌激素可能具有保护肾脏的效应，且肾损伤动物模型中雄性受到的影响较大^[17]。

本研究通过低浓度的 PFASs 混合暴露并与蛋白粉联合，发现雄性大鼠肾脏中 PFCAs、PFSAs 和 PFASs 的生物利用率均升高。但本研究时间较短，每组大鼠数量较少，可能影响检验效能，后续应进一步调整 PFASs 暴露剂量及染毒时间，以探索 PFASs 的肾毒性及其阈值；同时，可将蛋白粉添入饲料以增加其剂量，观察蛋白粉和 PFASs 对肾脏的联合毒性。

参考文献

[1] ANDERSSON E M, SCOTT K, XU Y, et al. High exposure to perfluorinated compounds in drinking water and thyroid disease. A cohort study from Ronneby, Sweden [J]. Environ Res, 2019, 176: 1-8.

[2] 侯沙沙, 朱会卷, 谢琳娜, 等. 人体内全氟化合物的暴露水平研究进展 [J]. 环境卫生学杂志, 2020, 10 (2): 218-225.

[3] 陈绩, 李彤, 吴限好, 等. 全氟和多氟烷基化合物暴露特征与健康效应研究进展 [J]. 环境与职业医学, 2023, 40 (8): 958-964.

[4] STANIFER J W, STAPLETON H M, TOMOKAZU S, et al. Perfluorinated chemicals as emerging environmental threats to kidney health: a scoping review [J]. Clin J Am Soc Nephrol, 2018, 13 (10): 1479-1492.

[5] 刘小燕, 屈艾, 胡方方, 等. 全氟辛烷磺酸钾对小鼠肾脏的氧化性损伤 [J]. 现代生物医学进展, 2017, 17 (20): 3842-3845.

[6] 王广胤, 孙伟强, 马新壮, 等. 芦丁对全氟辛酸所致的小鼠脂代谢紊乱及肾脏损伤的改善作用 [J]. 广西医学, 2022, 44 (17): 1998-2002.

[7] JAIN R B, DUCATMAN A. Perfluoroalkyl substances follow inverted U-shaped distributions across various stages of glomerular function: implications for future research [J]. Environ Res, 2019, 169: 476-482.

[8] WANG J, ZENG X W, BLOOM M S, et al. Renal function and isomers of perfluorooctanoate (PFOA) and perfluorooctanesulfonate (PFOS): isomers of C8 Health Project in China [J]. Chemosphere, 2019, 218: 1042-1049.

[9] DHINGRA R, LALLY C, DARROW L A, et al. Perfluorooctanoic acid and chronic kidney disease: longitudinal analysis of a Mid-Ohio Valley community [J]. Environ Res, 2016, 145: 85-92.

[10] 奚雨萌, 闫俊书, 应诗家, 等. 高蛋白高钙饲料对雏鹅内脏型痛风发生、肾脏功能及肠道微生物区系的影响 [J]. 动物营养学报, 2019, 31 (2): 612-621.

[11] 王杰明, 王丽, 冯玉静, 等. 液相色谱-质谱联用分析动物内脏和肌肉组织中的全氟化合物 [J]. 食品科学, 2010, 31 (4): 127-131.

[12] 蔡德雷, 俞莎, 郑熠斌, 等. 大鼠肝 21 种全氟化合物生物利用率及蛋白粉作用研究 [J]. 预防医学, 2022, 34 (10): 1069-1074.

[13] PIZZURRO D M, SEELEY M, KERPER L E, et al. Interspecies differences in perfluoroalkyl substances (PFAS) toxicokinetics and application to health-based criteria [J]. Regul Toxicol Pharmacol, 2019, 106: 239-250.

[14] 朱永乐, 汤家喜, 李梦雪, 等. 全氟化合物污染现状及与有机污染物联合毒性研究进展 [J]. 生态毒理学报, 2021, 16 (2): 86-99.

[15] TURNER B D, SLOAN S W, CURRELL G R. Novel remediation of per- and polyfluoroalkyl substances (PFASs) from contaminated groundwater using *Cannabis Sativa* L. (hemp) protein powder [J]. Chemosphere, 2019, 229: 22-31.

[16] LOUISSEL J, DELLAFORA L, VAN DEN HEUVEL J J M W, et al. Perfluoroalkyl substances (PFASs) are substrates of the renal human organic anion transporter 4 (OAT4) [J]. Arch Toxicol, 2023, 97: 685-696.

[17] GAROVIC V D, AUGUST P. Sex differences and renal protection: keeping in touch with your feminine side [J]. J Am Soc Nephrol, 2016, 27 (10): 2921-2924.

收稿日期: 2023-11-17 修回日期: 2024-01-18 本文编辑: 刘婧出