

DOI:10.16369/j.oher.issn.1007-1326.2016.03.002

·论 著·

停止暴露后铅染毒小鼠铅负荷的恢复状况研究

熊伟,吴晓燕,惠长野*,郭妍,陈剑辉,高朝贤,王佃鹏,陈钰婷

深圳市职业病防治院,广东 深圳 518019

摘要:目的 观察终止染铅对铅中毒小鼠各项生物学指标的影响。方法 将4~6周龄清结级雄性昆明种小鼠随机分为对照组、染铅15 d A组、染铅30 d B组、染铅15 d排铅15 d C组,染铅途径为自由饮用经酸化处理的1.0 g/L三水合乙酸铅水溶液。限制小鼠日粮,分别在15 d和30 d检测小鼠血铅、骨铅及锌原卟啉水平。结果 在各时间节点,各组小鼠体质量差异均无统计学意义($P > 0.05$);实验结束后,各组锌原卟啉水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。A组小鼠血铅水平为(435.73 ± 89.46) $\mu\text{g/L}$,B组为(445.82 ± 138.49) $\mu\text{g/L}$,两者差异无统计学意义($P > 0.05$),但两组均显著高于经排铅的C组血铅水平(149.34 ± 27.66) $\mu\text{g/L}$ 。A组小鼠骨铅水平为(71.34 ± 18.72) $\mu\text{g/g}$,B组小鼠持续染铅30 d后,骨铅上升至(114.72 ± 31.52) $\mu\text{g/g}$,经排铅的C组骨铅水平为(80.63 ± 21.39) $\mu\text{g/g}$,后者与A组比较差异无统计学意义($P > 0.05$),B组和A、C组比较,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。结论 持续30 d染铅未导致小鼠血铅进一步升高。血铅是铅中毒小鼠脱离铅暴露环境的敏感指标。

关键词:铅中毒;排铅;小鼠;动物模型;血铅;骨铅;敏感指标

中图分类号: R135.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1007-1326(2016)03-0183-04

Recovery of biological effects induced by lead exposure in mice after cessation of exposure

XIONG wei, WU xiaoyan, HUI Changye*, GUO yan, CHEN Jianhui, GAO Chaoxian, WANG Dianpeng, CHEN Yuting (Shenzhen Prevention and Treatment Center for Occupational Disease, Shenzhen, Guangdong 518019, China)

Abstract: Objective To observe the recovery of biological indicators caused by lead exposure in mice after 15-day cessation of exposure. **Methods** Male KM mice (cleaning grade, 4-6 weeks of age) were randomly divided into 5 groups, namely, the control for 15 d, the control for 30 d, the Pb-exposed for 15 d (group A), the Pb-exposed for 30 d (group B), and the Pb-exposed for 15 d which would recover for 15 d (group C). The lead was exposed by drinking solution of Lead acetate trihydrate and a restricted diet was adopted. The level of blood Pb, bone Pb and ZPP was measured at the end of the test. **Results** Compared with the control group, blood Pb and bone Pb of the Pb-exposed groups significantly increased. But there was no difference in weight growth rate and ZPP value among these groups ($P > 0.05$). There was no significant difference in blood Pb between group A (435.73 ± 89.46 $\mu\text{g/L}$) and group B (445.82 ± 138.49 $\mu\text{g/L}$) ($P > 0.05$), while blood Pb in group C was relatively lower (149.34 ± 27.66 $\mu\text{g/L}$) ($P < 0.05$). Bone Pb in groups A, B and C was (71.34 ± 18.72) $\mu\text{g/g}$, (114.72 ± 31.52) $\mu\text{g/g}$ and (80.63 ± 21.39) $\mu\text{g/g}$, respectively. Bone Pb of the group B was significantly higher compared with that of the group A and C ($P < 0.01$). **Conclusion** These results indicated that blood lead would be stable after long lead exposure while bone Pb would continue to increase. Blood Pb is a sensitive index for the recovery of lead-exposed mice.

Key words: lead poisoning; lead eliminating; mice; animal model; blood Pb; bone Pb; sensitive index

铅是天然存在于地壳中的高毒重金属,随着工业化进程加速,地壳中大量的铅被释放,导致人类血铅水平较工业化前显著升高^[1]。为此,欧美发达国家自20世纪90年代开始实施一系列针对性措施,包括推广无铅汽油、限制生产和使用含铅涂料、清除室内外油漆铅污染、使用清洁能源、转移铅污染严重的工矿企业、规范化处理含铅垃圾等等,使人类血铅水平大幅降低^[2]。

铅中毒防治工作重在预防,以减少高血铅对人体健康产生的潜在危害。在大量的临床试验中观察到,脱离铅暴露环境,采取综合干预措施后,血铅水平短期内可逐步降低^[3]。在灵长类动物铅染毒模型中,终止染铅后,采取整合治疗可缓慢降低血铅水平,但停止给药后,血铅可快速反弹至非治疗组水平^[4]。鉴于高血铅对人体的危害,必要的排铅治疗仍是中、重度铅中毒患者临床治疗所必需的。研究铅中毒实验动物终止染铅后体内铅暴露生物学标志的变化规律,有利于指导临床排铅治疗,对整合治疗的规范化有重要指导意义。本文旨在建立小鼠饮水染铅动物模型,考察脱离铅暴露后,实验动物的排铅能力及相关检测指标的变化,以便为铅中毒

基金项目:广东省自然科学基金自由申请项目(编号:2015A030313838);

广东省医学科研基金面上项目(编号:A2015307);深圳市科技研发资金项目(编号:JCYJ20150403091305481)

作者简介:熊伟(1976—),男,大学本科,主治医师

* **通信作者:**惠长野,副主任技师, E-mail: hey_sypu@163.com

的临床诊疗提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 选用4~6周龄清洁级雄性昆明种小鼠45只,体质量18~22g,由广东省医学实验动物中心提供,合格证号为SCXK(粤)2013-0002。

1.1.2 试剂与仪器 试剂包括:AR级三水乙酸铅(上海生工生物工程有限公司产品),AR级浓硝酸、过氧化氢(广州化学试剂厂产品),冻干血铅标准物质(国家标准物质中心产品);仪器包括:Perkin Elmer 600型石墨炉原子吸收光谱仪,ZPP 3800血液锌原卟啉测定仪(广东省康达发展公司产品)。

1.2 方法

1.2.1 染毒与分组 将小鼠适应性饲养7d,期间自由饮水及进食,再随机分为对照15d组、对照30d组、染铅A组、染铅B组、排铅C组,每组各9只小鼠。分组及采样时间节点信息见图1。铅暴露途径为自由饮用经乙酸酸化处理的1.0g/L三水合乙酸铅水溶液(按铅计为546.2mg/L),脱离铅暴露后即将醋酸铅水溶液换为纯化水。实验过程中,每2d换水1次,记录饮水总量。染铅过程中,每笼9只小鼠,日粮限制50g,每周末称量体质量1次。

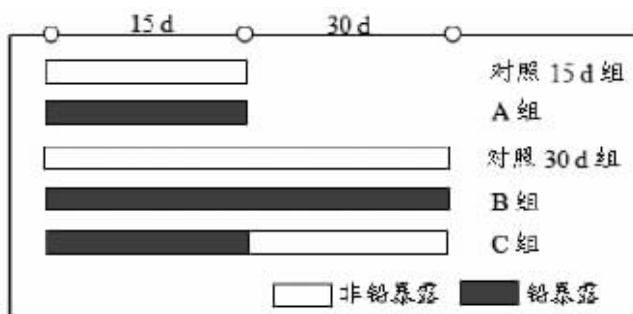


图1 实验动物分组及铅暴露起始节点

1.2.2 取材及生物样本检测 实验进行15d后,采集对照15d组及A组小鼠生物样本;其余组别小鼠继续饲喂至30d后,采集对照30d组、B组及C组生物样本。实验动物处置及采样过程如下:眼科镊摘除小鼠眼球,采集1mL左右全血置于肝素钠抗凝处理过的微量离心管中。小鼠经脱颈处死后,迅速解剖,分离左侧股骨置于微量离心管中。取肝素抗凝血200μL滴至盖玻片中央,置于血液锌原卟啉测定仪测定锌原卟啉(ZPP)值。小鼠股骨经80℃烘干后,研磨粉碎并转移至消化管,减质量法计算骨粉质量。加入3mL硝酸、2mL过氧化氢,以140℃微波消化2.5h,双蒸水定容至50mL。血样及骨水解液均用基质改良剂20倍稀释后,石墨炉

原子吸收分光光度法测定全血及骨组织铅水平,检测过程使用血铅标准品进行质量控制。

1.2.3 统计学分析 采用SPSS 19.0统计学软件进行统计学分析,均数用 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组小鼠体质量变化采用重复测量方差分析,血铅与骨铅水平变化采用单因素方差分析及t检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 4组实验动物一般情况

对照组每只小鼠日平均饮水量为6.24mL,铅暴露过程中,各染铅组每只小鼠日平均饮水量为5.25mL,饮水量为对照组的84.1%。整个染铅过程中,各组小鼠无明显异常情况及中毒迹象。随着小鼠饲喂时间的延长,各组小鼠体质量均增加。对组间资料进行重复测量方差分析,各组间资料满足协方差阵的球形性($P > 0.05$),在饲喂前、饲喂15d及30d后的三个时间点,染铅组与对照组小鼠体质量差异均无统计学意义($F = 0.860, P > 0.05$),处理和时间的交互效应亦无统计学意义($F = 0.034, P > 0.05$)。见表1。

表1 各组小鼠的体质量增长情况 ($\bar{x} \pm s, g$)

组别	样本数	饲喂前	15 d	30 d
对照组	9	34.62 ± 0.94	40.43 ± 3.89	49.58 ± 4.19
A 组	9	33.54 ± 1.46	38.53 ± 3.24	
B 组	9	33.78 ± 1.94	39.69 ± 2.91	48.11 ± 4.43
C 组	9	34.70 ± 1.59	42.22 ± 3.03	49.32 ± 4.95

2.2 小鼠ZPP值变化

与两个对照组比较,染铅15d及30d小鼠ZPP值未呈现升高趋势。经单因素方差分析,各组ZPP测定值差异无统计学意义($F = 0.204, P > 0.05$)。见表2。

表2 对照组与染铅组ZPP值测定结果比较 ($\bar{x} \pm s, \mu\text{mol/L}$)

组别	样本数	ZPP	
		15 d	30 d
对照 15 d 组	9	0.34 ± 0.09	
对照 30 d 组	9		0.33 ± 0.11
A 组	9	0.32 ± 0.09	
B 组	9		0.31 ± 0.12
C 组	9		0.30 ± 0.11

2.3 小鼠血铅测定结果比较

与未染铅对照组血铅水平(均值30.2μg/L)相比,各染铅组血铅水平均显著升高。染铅15d的A组小鼠血铅水平为(435.73 ± 89.46)μg/L, B组持续染铅30d后血铅水平为(445.82 ± 138.49)μg/L,排铅C组30d

后血铅水平为 $(149.34 \pm 27.66) \mu\text{g/L}$ 。A、B、C 三组血铅水平比较,差异有统计学意义($F = 28.085, P < 0.01$);进一步以 SNK 法两两比较,A、B 组血铅水平差异无统计学意义($P > 0.05$);但两组血铅水平均高于 C 组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。见图 2。

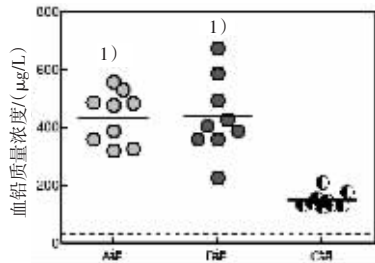


图 2 各组小鼠血铅测定结果

[注]每个圆圈代表一个动物样本血铅测定值,横线代表各染铅组血铅水平平均值,虚线代表对照未染铅组血铅平均值;1)与 C 组比较, $P < 0.01$

2.4 小鼠骨铅水平测定结果比较

染铅组小鼠骨铅水平较对照组(均值 $0.43 \mu\text{g/g}$)显著升高,见图 3。A 组小鼠骨铅水平为 $(71.34 \pm 18.72) \mu\text{g/g}$;染铅持续至 30 d 后,B 组小鼠骨铅水平上升至 $(114.72 \pm 31.52) \mu\text{g/g}$,显著高于 A 组。C 组小鼠先经 15 d 染铅再经 15 d 排铅后,骨铅水平依然达 $(80.63 \pm 21.39) \mu\text{g/g}$ 。A、B、C 三组骨铅水平比较,差异有统计学意义($F = 7.442, P < 0.01$);进一步以 SNK 法两两比较,C 组与 A 组骨铅水平差异无统计学意义($P > 0.05$),B 组骨铅水平与 A、C 组比较,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。

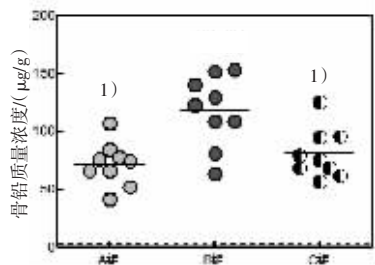


图 3 各组小鼠骨铅测定结果

[注]每个圆圈代表一个动物样本骨铅测定值,横线代表各染铅组骨铅平均值,虚线代表对照组骨铅平均值;1)与 B 组比较, $P < 0.01$

3 讨论

铅中毒已成为一个全球性的公共安全问题,引起社会广泛关注。铅主要经过消化系统、呼吸系统、皮肤接触这三种途径进入人体,而消化道是生活性铅暴露时铅吸收的主要途径。给动物自由饮水染铅模拟铅消

化道吸收途径,具有简便易行、可控性强的优点,是目前普遍采用的造模方式。慢性染铅降低小鼠食物利用率,可导致实验动物体质量增长受抑制^[5]。本研究通过限制饲喂的方式,排除了染铅过程中体质量增长差异对实验的影响。控制小鼠日粮摄入,在抑制小鼠体质量过度增长的同时,可减少组间体质量差异。

早期的随机临床对照研究表明,对血铅水平在 $100 \mu\text{g/L}$ 以上的儿童采取健康教育进行干预,减少铅暴露高危行为,可有效降低中度铅中毒儿童血铅水平^[5]。饮食、行为及环境干预对降低儿童血铅水平的重要性得到学者的公认,排查并脱离铅污染源更是被作为处置铅中毒患者的首要原则^[6]。本研究建立了小鼠饮水染铅动物模型,重点考察脱离铅暴露后,实验动物的排铅能力,进一步明确排铅过程中的敏感生物学标志。本研究发现,C 组小鼠脱离铅暴露环境 15 d 后,血铅水平显著低于 A、B 组,差异有统计学意义($P < 0.01$),但 C 组骨铅水平在染毒 15 d 又脱离 15 d 后,同 A 组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。铅中毒能引起卟啉代谢障碍,导致 ZPP 含量升高,ZPP 多用于辅助诊断铅中毒^[7]。但在本研究 30 d 的染铅过程中,未检测到 ZPP 水平变化,可能与铅暴露持续时间过短有关。全血铅作为最重要的铅暴露生物学标志,是铅中毒诊断分级及治疗的主要依据^[8],本研究也证实血铅是小鼠脱离铅暴露的敏感生物学标志。全血铅生物半衰期仅 25 ~ 30 d,只能反映近期铅暴露情况,骨铅半衰期则长达数年,是机体铅负荷的理想指标^[8]。鉴于骨铅检测的可动员性,实验动物排铅过程应综合考虑血铅及骨铅水平的变化。但限于本研究仅 15 d 的排铅时间,并未观察到骨铅水平的变化。延长排铅时间,动态监测循环池血铅、储存池骨铅及 ZPP 等指标的变化需进一步深入研究。

非职业暴露的铅主要通过消化道和呼吸道进入人体,随血液分布到全身各器官和组织(交换池),交换池中的铅大部分在 25 ~ 35 d 内沉积于骨骼(储存池),交换池与储存池中的铅维系着动态平衡。持续的铅暴露导致血铅升高到一定水平后,循环池血铅更倾向于在骨组织中蓄积。因而本研究中,B 组小鼠持续 30 d 铅暴露,骨铅水平与 A 组相比显著升高($P < 0.01$)。铅在体内的代谢过程中,一方面,血铅可经泌尿系统排出,铅与金属络合剂结合后可加速这一过程,这就是螯合治疗排铅的理论基础;另一方面血铅进入肝肠循环途径,少量以粪铅形式排出。螯合法驱铅疗效确切,但络合特异性差导致副作用大的缺点难以克服,故环境保护及健康教育在减少铅暴露风险方面的重要性逐渐得到国内外学者的公认^[9]。在规范驱铅治疗的同时,一方

(下转第 195 页)

MVV 较干预前明显改善($P < 0.05$)。患者因缺氧导致呼吸困难症状改善较为明显,主观感觉良好,治疗依从性高。

随着尘肺病患者肺组织纤维化程度的加重,有效呼吸面积的减少,通气/血流比例的失调,缺氧导致的呼吸困难逐渐加重^[10],使之很快发生心肺功能失代偿而导致心功能衰竭和呼吸功能衰竭,这是尘肺病人死亡的主要原因。为提高患者运动耐力,改善生活质量和健康状况,本研究将运动训练结合无创通气用于治疗稳定期尘肺病,不仅使患者呼吸肌得到了有效的锻炼,也避免或缓解了因运动带来的呼吸困难,干预前后肺功能及动脉血气比较,D组患者FVC、MVV、DLCO、PaO₂、SpO₂均较干预前有所改善($P < 0.05$),而在A、B、C、D 4组间比较,仅D组DLCO测得值优于A、B组($P < 0.05$),说明D组对DLCO的改善明显优于C组及A、B组。另外,干预后C、D组MVV测得值优于A、B组,PaO₂、SpO₂测得值优于A、B组。以上结果说明无创通气治疗对尘肺病患者的康复效果好于单纯的运动训练,而两者联合治疗的效果更为明显。无创通气作为一个为慢性肺疾病患者建立的长期有效的、非侵入性的康复手段,值得推广。但由于无创通气在使用过程中涉及的技术依赖性强,患者购买仪器经费困难,目前仅限

于院内康复。

参考文献

- [1] 李洪美. 50例尘肺患者康复疗养与护理实践[J]. 中国医学创新, 2011, 8(3): 134.
- [2] 殷佩君, 陈旦敏. 尘肺患者的康复护理观察[J]. 上海预防医学杂志, 2007, 19(11): 567.
- [3] 孟申. 肺康复[M]. 北京:人民卫生出版社, 2007: 2.
- [4] RIES A L, BAULDOFF G S, CARLIN B W, et al. Pulmonary rehabilitation: joint ACCP/AACVPR evidence based clinical practice guidelines[J]. Chest, 2007, 131(5 Suppl): 4S-42S.
- [5] ERGUN P, KAYMAZ D, GUNAY E, et al. Comprehensive out-patient pulmonary rehabilitation: treat outcomes in early and late stages of chronic obstructive pulmonary disease[J]. Ann Thorac Med, 2011, 6(2): 70-76.
- [6] 中华人民共和国卫生部. 尘肺诊断标准: GBZ 70-2009[S]. 北京:人民卫生出版社, 2009: 2-11.
- [7] 杜素芝. 负荷呼吸训练对尘肺患者肺功能及生存质量的影响[J]. 中华护理杂志, 2010, 45(3): 237-239.
- [8] 刘健, 王建元, 李冬红. 健康教育与运动训练在改善尘肺患者肺功能中的应用[J]. 中华现代护理杂志, 2015, 21(11): 1241-1244.
- [9] 陈荣昌, 罗群. 无创正压通气技术的临床应用及其进展[J]. 中国实用内科杂志, 2007, 27(5): 1331-1332.
- [10] 李德鸿. 尘肺病[M]. 北京:化工工业出版社, 2010: 122.

收稿日期: 2016-02-11

(上接第185页)

面,新型低毒、高特异性螯合剂的研发从未止步;另一方面,围绕排铅新途径的探索是近年来的研究热点。阻断铅的肠道吸收及血铅的肝肠循环,通过口服特异性的铅离子吸附剂,如金属硫蛋白^[10]、果胶及不溶性海藻酸盐^[11]可加速粪铅的排出。补充金属微量元素,竞争性结合肠道上皮细胞二价铅离子运载蛋白,可有效减少肠道对铅吸收^[12]。本研究并未监测小鼠尿铅及粪铅水平。但在筛选新型促排铅措施时,尿铅及粪铅水平的对比研究将显得尤为重要。如何降低铅在消化道的吸收,加大粪铅排出,使其作为铅中毒防治的新途径是我们下一步的研究重点。

参考文献

- [1] FLEGAL A R, SMITH D R. Lead levels in preindustrial humans[J]. N Engl J Med, 1992, 326(19): 1293-1294.
- [2] LIU J, LEWIS G. Environmental toxicity and poor cognitive outcomes in children and adults[J]. J Environ Health, 2014, 76(6): 130-138.
- [3] 沈晓明, 颜崇淮, 吴胜虎, 等. 健康教育对轻中度铅中毒儿童干预作用的随机临床对照研究[J]. 中华儿科杂志, 2004, 12(24): 892-897.

- [4] SMITH D, STRUPP B J. The scientific basis for chelation: animal studies and lead chelation[J]. J Med Toxicol, 2013, 9(4): 326-338.
- [5] 刘秀英, 胡怡秀, 丘丰, 等. 保健食品促进排铅模型小鼠饮水染铅剂量及检测指标的探讨[J]. 中国食品卫生杂志, 2003, 15(4): 291-294.
- [6] 中华人民共和国卫生部. 儿童高铅血症和铅中毒分级和处理原则[J]. 中国生育健康杂志, 2006, 17(4): 197-198.
- [7] 陆新华. 血液锌原卟啉测定对铅中毒的诊断价值及临床意义[J]. 职业卫生与应急救援, 1998, 16(1): 41-43.
- [8] 沈晓明, 颜崇淮. 正确认识儿童铅中毒[J]. 中华儿科杂志, 2006, 44(1): 1-2.
- [9] 戴勤, 陈梅榕, 冯佩琳. 健康教育在儿童铅中毒防治中的作用[J]. 职业卫生与应急救援, 2011, 29(3): 42-43.
- [10] COBBETT C, GOLDSBROUGH P. Phytochelatin and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis[J]. Annu Rev Plant Biol, 2002(53): 159-182.
- [11] KHOTIMCHENKO M, SERGUSCHENKO I, KHOTIMCHENKO Y. Lead absorption and excretion in rats given insoluble salts of pectin and alginate[J]. Int J Toxicol, 2006, 25(3): 195-203.
- [12] HEATH L M, SOOLE K L, MCLAUGHLIN M L, et al. Toxicity of environmental lead and the influence of intestinal absorption in children[J]. Rev Environ Health, 2003, 18(4): 231-250.

收稿日期: 2016-01-14