

建立促进排铅功能小鼠动物实验模型的初步研究

徐海滨¹ 耿桂英¹ 刘秀英² 李新兰³ 刘海波¹
支 媛¹ 张立实⁴ 王永芳¹ 王竹天¹ 严卫星¹

(1. 中国疾病预防控制中心营养与食品安全所,北京 100021;2. 湖南省疾病预防控制中心,湖南 长沙 410011;3. 湖北省疾病预防控制中心,湖北 武汉 430079;4. 四川大学医学院,四川 成都 610041)

摘 要:为研究促进排铅功能动物实验适宜模型条件,利用三水醋酸铅作为造模物质,使用清洁级昆明种健康小鼠 209 只,其中雄性小鼠 179 只,雌性 30 只,饮水(164 mg Pb²⁺/L、546 mg Pb²⁺/L、1638 mg Pb²⁺/L)或饲料喂饲(224 mg/kg、728 mg/kg、2 240 mg/kg)给予小鼠染毒,分别观察 10 d 和 20 d 后测定肝、脑、股骨和血中的铅含量。观察小鼠性别、染毒方式、染毒剂量、造模时间对促进排铅功能小鼠模型建立的影响。结果表明小鼠性别对铅负荷小鼠模型无影响。(164 mg Pb²⁺/L、546 mg Pb²⁺/L、1 638 mg Pb²⁺/L 三水醋酸铅水溶液饮水和 224 mg/kg、728 mg/kg、2 240 mg/kg 三水醋酸铅饲料喂饲,均可建立稳定的铅负荷小鼠模型。546 mg Pb²⁺/L 三水醋酸铅水溶液饮水染毒 10 d 即可达到小鼠模型成立的效果,该方法可以作为建立铅负荷小鼠模型的方法。

关键词:铅;动物;实验;铅中毒

Preliminary study on establishment of a lead poisoning mouse model

Xu Haibin, et al.

(National Institute for Nutrition and Food Safety, China CDC, Beijing 100021)

Abstract: In order to establish a lead poisoning mouse model for evaluating the lead expelling function of a health food, a total of 209 KunMing mice (male 179, female 30) and lead acetate (PbAC) as a poisoning agent were used for study. The animals were randomly divided into 7 groups. Experimental lead overload was produced by drinking water (164 mg Pb²⁺/L, 546 mg Pb²⁺/L, 1 638 mg Pb²⁺/L) and feeding diet (224 mg/kg, 728 mg/kg, 2 240 mg/kg). At the 10th day and 20th day, the concentrations of lead in liver, brain, femur and blood were measured. The results showed that sex had no effect on the loading of lead, both female and male mice could be used for experiment. The mouse model could be established by drinking water containing PbAC 164 mg Pb²⁺/L, 546 mg Pb²⁺/L, 1 638 mg Pb²⁺/L, or feeding diet containing PbAC 224 mg/kg, 728 mg/kg, 2 240 mg/kg. The water containing PbAC 546 mg Pb/L could produce stable mouse model in 10 days. This method can be used for establishing a lead poisoning mouse model.

Key Words: Lead; Animals, Laboratory; Lead Poisoning

环境和生活的铅污染已经成为一个令人关注的公共卫生问题。铅进入人体主要储存在骨骼中,成年人骨铅的半衰期 10~20 年。铅对机体毒作用的大小主要取决于体内铅的水平,尤其是靶器官的水平。铅在体内不能被破坏,消除体内铅负荷唯一的途径是排出体外。^[1,2]职业铅中毒可以通过螯合剂的治疗。服用促进排铅的食品是对生活接触铅污染的非职业人群和职业人群进行保护,贯彻预防为主方

针的首选方法。基础医学理论和营养研究也证明在食品中存在促进排铅的物质。^[3,4]评价促进排铅保健食品功能的技术关键是建立适合的小鼠模型,小鼠模型的建立包括染毒造模条件的选择,其中最主要的是造模方式、造模剂量和造模时间。本研究利用三水醋酸铅作为造模物质,对促进排铅功能小鼠模型的适宜模型条件进行了初步探讨。

基金项目:卫生部保健食品专项基金课题(BJ-02-56)

作者简介:徐海滨 男 副研究员 博士

This work was supported by the Special Funds for Health Food of Ministry of Health, China (BJZ-02-56)

1 材料与方法

1.1 实验小鼠 清洁级昆明种健康小鼠 209 只,其中雄性小鼠 179 只,雌性 30 只,体重 18~22 g,分别购自中国军事医学科学院实验小鼠中心(批准号为京动字 99-001 号),中南大学湘雅医学院实验动物学部(批准号为湖南省医动字 20-011 号),湖北医学科学院实验动物中心(批准号为湖北省医动字 20-014 号)。

1.2 试剂和仪器 三水醋酸铅(分析纯,广州新巷化工厂)、浓硝酸(分析纯)、高氯酸(分析纯);平板电炉。

石墨炉法原子吸收分光光度计。

1.3 实验设计 保健食品的中毒小鼠模型需符合慢性中毒实验剂量设计要求,即染毒剂量使小鼠在染毒期间体内出现明显的铅负荷增加,但并未引起明显的中毒表现和症状。造模剂量要适中。剂量过低,模型不能成立;剂量过高,效应指标超过了食品保健作用所可能达到的保护能力,检测不出受试物的作用,达不到评价的要求。本实验研究了小鼠性别、铅负荷染毒方式、铅负荷染毒剂量、造模时间等因素对建立促进排铅功能小鼠模型的影响。

为了提高研究的效率和验证模型条件,卫生部食品卫生监督检验所牵头成立了协作组,进行了整体设计方案的实验研究,湖北省疾病预防控制中心就小鼠性别对模型的影响进行了实验研究、湖南省疾病预防控制中心验证了部分模型条件。实验结果采用 stats 软件的方差分析方法进行统计处理。

1.3.1 铅负荷染毒条件对促进排铅功能小鼠模型的影响 将清洁级昆明种雄性小鼠 105 只随机分为 7 组,从中任选 3 组为饮水染毒组,再任选 3 组为饲料染毒组,每组 15 只。饮水染毒组中的 3 组自由饮用 0.3 g/L、1.0 g/L、3.0 g/L 三水醋酸铅水溶液(相当于 164 mg Pb^{2+} /L、546 mg Pb^{2+} /L、1 638 mg Pb^{2+} /L),饲料染毒组中的 3 组自由摄食 224 mg/kg、728 mg/kg、2 240 mg/kg 的三水醋酸铅饲料,剩余 1 组为共同对照组,饮用去离子水和摄食基础饲料。饮水染毒和饲料喂饲染毒组在第十天和第二十天分别处死 8 只或 7 只小鼠进行研究。

1.3.2 小鼠性别对促进排铅功能小鼠模型的影响 将清洁级昆明种小鼠 60 只随机分为 6 组,雄性 3 组,雌性 3 组,每组 10 只,雌雄各有两组分别自由饮用 0.3 g/L、1.0 g/L 三水醋酸铅水溶液(相当于 164 mg Pb^{2+} /L、546 mg Pb^{2+} /L)和摄食基础饲料,雌、雄各有一对照组分别自由饮用去离子水和基础饲料,实验期限 20 d。

1.3.3 促进排铅功能小鼠模型的验证实验 将清

洁级昆明种雄性小鼠 44 只随机分为 4 组,每组 11 只,任选 3 组自由饮用 0.3 g/L、1.0 g/L、3.0 g/L 三水醋酸铅水溶液(相当于 164 mg Pb^{2+} /L、546 mg Pb^{2+} /L、1 638 mg Pb^{2+} /L),1 组饮用去离子水,实验期限 30 d。

2.4 三水醋酸铅受试物的配制 分别精确称取 0.9 g、3.0 g、9.0 g 三水醋酸铅,溶于 3 000 mL 去离子水溶液中,配制成 0.3 g/L、1.0 g/L、3.0 g/L 三水醋酸铅 [$Pb(CH_3COO)_2 \cdot 3H_2O$] 水溶液,三水醋酸铅的分子量为 379.21,按 Pb^{2+} 计, Pb^{2+} 含量占三水醋酸铅的 54.6%。(按 Pb^{2+} 计,分别为相当于 164 mg Pb^{2+} /L、546 mg Pb^{2+} /L、1 638 mg Pb^{2+} /L)。按实验设计,经饲料摄入的 Pb^{2+} 量要与饮水摄入的 Pb^{2+} 量相同,根据文献和预实验结果,成年小鼠平均饮水量为 4~9 mL/d,平均饲料的摄入量为 2.8~7.0 g/d,^[15] 饲料的摄入量按饮水量的 75%计,故配制 1 kg 饲料的 Pb^{2+} 分别为 224 mg、728 mg、2 240 mg。精确称取 410 mg、1 300 mg、4 100 mg 三水醋酸铅,与 1 kg 基础饲料混匀,制成块料供实验用。

2.5 实验方法和指标 实验前,饮水瓶和不锈钢笼盖均经酸浸泡处理。饮水染毒小鼠,每日观察各笼小鼠的表现,每周换三水醋酸铅水溶液 1 次,换前量取、记录每笼小鼠饮入三水醋酸铅水溶液量。饲料染毒小鼠,每周添加三水醋酸铅饲料 1 次,换前量取、记录每笼小鼠摄入三水醋酸铅饲料量,实验未计算各组小鼠的食物利用率。实验期间,每周称体重 1 次。实验结束,摘眼球采血,用分析天平称取 1 g 血样,断颈处死小鼠,分别称取 1 g 肝、0.2 g 脑、1 g 肾、0.2 g 股骨置入经酸浸泡过的 150 mL 三角烧瓶中,加入混合酸,湿式消化。用石墨炉原子吸收分光光度法测定组织铅含量。^[16]

2 结果与讨论

2.1 造模条件对促进排铅小鼠实验模型的影响

选择小鼠的染毒方式是造模成功与否的关键技术之一,染毒方式既要符合保健食品的食用方法,又要使小鼠体内铅负荷达到一定的水平,饮水和饲料喂饲染毒是比较可行的方式。要在较短的时间内到达造模的效果,染毒时间不能太长,染毒剂量要合适。本实验用一组实验探讨了造模条件对促进排铅小鼠实验模型的影响,结果见表 1~4。

实验期间,分别取饮水和饲料染毒 10 d 和 20 d 的小鼠全血、肝脏、脑组织、股骨,研究不同染毒方式各组织中的铅含量。由于在配制饮水和饲料中的 Pb^{2+} 含量已考虑了小鼠饮水和喂饲摄入量的不同,因此表 1~4 的结果是同样 Pb^{2+} 摄入量时各脏器的

Pb²⁺ 水平。由表 1~2 可见,造模时间对不同造模方式的影响是相同的,饮水和饲料造模 10 d,除 0.3 g/L 剂量组脑组织铅含量与对照组差异无显著性外,其余各剂量组的全血和组织中铅含量均高于对照组 ($P<0.01$)。较低剂量染毒条件下脑组织铅含量蓄积较慢,可能与血脑屏障有关,符合 Pb²⁺ 吸收分布规律。从表 3~4 可见,饮水染毒或饲料染毒 20 d,饮水染毒 0.3 g/L、1.0 g/L、3.0 g/L 剂量组,饲料染毒 224 mg/kg、728 mg/kg、2 240 mg/kg 剂量组的各组织铅

含量明显高于对照组,且差异有显著性 ($P<0.01$)。造模 20 d,所有剂量组的全血和组织中铅含量均高于对照组(表 1~2)。饮水染毒造模 10 d 组织铅含量与饲料染毒造模 10 d 比较,饮水染毒组中除了 3.0 g/L 剂量组的全血、肝脏和脑组织铅含量低于同 Pb²⁺ 浓度的饲料染毒组外,其它剂量组的铅含量均高于饲料染毒组。造模 20 d 后,饮水染毒的全血和组织各剂量组铅含量均高于饲料染毒的同 Pb²⁺ 浓度的全血和组织。提示饮水染毒造模在较低剂量可

表 1 饮水造模 10 d 对模型小鼠组织铅含量的影响 $\bar{x} \pm s \mu\text{g/g}^{(2)}$

剂量 g/L	例数	全血	肝脏	脑组织	股骨
0.0	8	0.05 \pm 0.00	0.06 \pm 0.03	0.05 \pm 0.00	1.38 \pm 0.96
0.3	8	0.52 \pm 0.15 ⁽¹⁾	1.36 \pm 0.38 ⁽¹⁾	0.17 \pm 0.29	18.60 \pm 7.70 ⁽¹⁾
1.0	8	1.23 \pm 0.39 ⁽¹⁾	3.53 \pm 0.51 ⁽¹⁾	0.59 \pm 0.52 ⁽¹⁾	78.96 \pm 27.94 ⁽¹⁾
3.0	8	1.69 \pm 0.81 ⁽¹⁾	4.71 \pm 2.32 ⁽¹⁾	0.55 \pm 0.26 ⁽¹⁾	149.20 \pm 51.60 ⁽¹⁾

注:(1) 与空白对照组比较 $P<0.01$;(2)“g”表示组织重量,为湿重。

表 2 饲料造模 10 d 对模型小鼠组织铅含量的影响 $\bar{x} \pm s \mu\text{g/g}^{(2)}$

剂量 mg/kg	例数	全血	肝脏	脑组织	股骨
0	8	0.05 \pm 0.00	0.06 \pm 0.03	0.05 \pm 0.00	1.38 \pm 0.96
224	8	0.34 \pm 0.16 ⁽¹⁾	1.52 \pm 2.13 ⁽¹⁾	0.05 \pm 0.01	11.54 \pm 3.53 ⁽¹⁾
728	8	0.64 \pm 0.22 ⁽¹⁾	3.03 \pm 1.09 ⁽¹⁾	0.42 \pm 0.43 ⁽¹⁾	43.18 \pm 10.59 ⁽¹⁾
2240	8	2.44 \pm 0.35 ⁽¹⁾	6.42 \pm 0.92 ⁽¹⁾	0.77 \pm 0.52 ⁽¹⁾	120.90 \pm 18.95 ⁽¹⁾

注:(1) 与空白对照组比较 $P<0.01$;(2)“g”组织重量,为湿重。

表 3 饮水染毒造模 20 d 对模型小鼠组织铅含量的影响 $\bar{x} \pm s \mu\text{g/g}^{(2)}$

剂量 g/L	例数	全血	肝脏	脑组织	股骨
0.0	7	0.13 \pm 0.06	0.09 \pm 0.11	0.11 \pm 0.14	1.23 \pm 0.58
0.3	7	0.55 \pm 0.43 ⁽¹⁾	2.65 \pm 0.87 ⁽¹⁾	0.85 \pm 0.79 ⁽¹⁾	79.50 \pm 22.39 ⁽¹⁾
1.0	7	0.68 \pm 0.29 ⁽¹⁾	3.03 \pm 0.59 ⁽¹⁾	0.91 \pm 0.20 ⁽¹⁾	161.70 \pm 26.9 ⁽¹⁾
3.0	7	3.53 \pm 1.68 ⁽¹⁾	5.97 \pm 3.82 ⁽¹⁾	1.96 \pm 1.31 ⁽¹⁾	219.80 \pm 93.8 ⁽¹⁾

注:(1) 与空白对照组比较 $P<0.01$;(2)“g”组织重量,为湿重。

表 4 饲料染毒造模 20 d 对模型小鼠组织铅含量的影响 $\bar{x} \pm s \mu\text{g/g}^{(2)}$

剂量 mg/kg	例数	全血	肝脏	脑组织	股骨
0	7	0.13 \pm 0.06	0.09 \pm 0.11	0.11 \pm 0.14	1.23 \pm 0.58
224	7	0.31 \pm 0.06 ⁽¹⁾	1.92 \pm 2.94 ⁽¹⁾	0.60 \pm 0.67 ⁽¹⁾	65.67 \pm 73.23 ⁽¹⁾
728	7	0.59 \pm 0.22 ⁽¹⁾	1.95 \pm 0.53 ⁽¹⁾	0.49 \pm 0.19 ⁽¹⁾	56.73 \pm 28.10 ⁽¹⁾
2240	7	2.99 \pm 1.98 ⁽¹⁾	4.71 \pm 1.16 ⁽¹⁾	1.06 \pm 0.84 ⁽¹⁾	149.20 \pm 51.60 ⁽¹⁾

注:(1) 与空白对照组比较 $P<0.01$;(2)“g”组织重量,为湿重。

表 5 不同性别对模型小鼠组织铅含量的影响 $\bar{x} \pm s \mu\text{g/g}^{(1)}$

剂量 g/L	例数	全血		肝脏		脑组织		股骨		肾脏	
		雌性	雄性	雌性	雄性	雌性	雄性	雌性	雄性	雌性	雄性
0.0	10	1.24 \pm 0.98	1.13 \pm 0.3	2.19 \pm 0.55	2.54 \pm 1.27	0.48 \pm 0.09	0.62 \pm 0.19	3.14 \pm 2.81	2.64 \pm 1.03	0.73 \pm 0.29	0.81 \pm 0.24
0.3	10	1.68 \pm 0.85	2.60 \pm 1.96	6.42 \pm 3.25	7.14 \pm 2.81	1.12 \pm 0.68	1.34 \pm 0.35	28.1 \pm 38.8	23.9 \pm 21.2	0.76 \pm 0.28	1.49 \pm 1.43
3.0	9	1.87 \pm 0.85	2.39 \pm 1.60	8.31 \pm 3.59	7.72 \pm 2.56	8.10 \pm 0.81	8.21 \pm 0.73	162.3 \pm 44.6	162.4 \pm 36.5	1.78 \pm 0.54	2.17 \pm 0.86

注:(1)“g”表示组织重量为湿重。

以在较短时间内达到造模效果,效率高于饲料染毒造模。

2.2 小鼠性别对促进排铅小鼠实验模型的影响

从表 5 可见,分别给予小鼠自由饮用 0.3 g/L、

3.0 g/L 三水醋酸铅水溶液和去离子水 20 d,雌、雄小鼠各剂量组全血、肝脏、脑组织、股骨和肾脏的铅含量差异均无显著性。提示在此染毒剂量下,各脏器铅含量与小鼠性别无差异。



2.3 促进排铅实验模型的验证

在明确造模条件的基础上,进一步观察和验证实验染毒方式、染毒剂量对模型小鼠各脏器 Pb²⁺ 负荷的影响,结果见表 6,全血、肾脏、肝脏和股骨组织各剂量组铅含量明显高于对照组,且组织铅含量随着饮水中的铅浓度的增加而增加,证明通过 0.3 ~ 3.0 g/L 剂量饮水染毒、可以建立稳定的小鼠体内高铅负荷模型。

3 饲料染毒对促进排铅实验模型小鼠体重及食物利用率的影响

不同剂量饲料染毒造模对模型小鼠体重及食物利用率的影响见表 7。由表 7 可见,饲料染毒造模 20 d,各剂量组的体重、体重增量与对照组比较差异无显著性。说明各剂量饲料染毒对造模小鼠的体重影响不大。各剂量饲料染毒造模小鼠的食物利用率与对照组比较,变化不明显,说明实验设计各剂量饲料染毒对造模小鼠的体重和食物利用率影响不大,体重和食物利用率的变化是化学物引起动物毒性反应的指标之一,各组剂量未造成小鼠的体重和食物利用率明显变化,提示造模的剂量选择是合适的。

表 6 不同剂量铅溶液对促进排铅实验模型小鼠组织铅含量的影响 $\bar{x} \pm s \mu\text{g/g}^{(2)}$

剂量 g/L	例数	全血	肝脏	脑组织	股骨	肾脏
0.0	11	0.04 ±0.03	0.07 ±0.05	0.05 ±0.08	0.55 ±0.56	0.14 ±0.09
0.3	11	0.20 ±0.09 ⁽¹⁾	1.33 ±0.39 ⁽¹⁾	0.35 ±0.47	58.90 ±24.10 ⁽¹⁾	3.44 ±0.52 ⁽¹⁾
1.0	11	0.52 ±0.39 ⁽¹⁾	3.23 ±1.18 ⁽¹⁾	0.53 ±0.26 ⁽¹⁾	106.20 ±53.60 ⁽¹⁾	10.30 ±1.73 ⁽¹⁾
3.0	11	2.31 ±0.75 ⁽¹⁾	5.19 ±1.50 ⁽¹⁾	1.56 ±0.68 ⁽¹⁾	163.30 ±102.70 ⁽¹⁾	21.40 ±14.3 ⁽¹⁾

注:(1)与空白对照组比较 $P < 0.01$;(2)“g”表示组织重量,为湿重。

表 7 不同剂量饲料造模 20 d 对模型小鼠体重及食物利用率的影响 $\bar{x} \pm s \text{ g}$

剂量 mg/kg	例数	初重	20 d 体重	增量	进食量	食物利用率 %
0	7	20.7 ±1.0	38.2 ±2.2	17.4 ±2.2	340.9	5.1
224	7	20.7 ±1.2	40.1 ±2.1	19.4 ±1.7	380.8	5.1
728	7	21.3 ±0.8	38.6 ±2.5	17.3 ±2.1	344.4	5.0
2240	7	21.3 ±0.9	38.6 ±2.3	17.4 ±2.5	341.6	5.1

4 小结 经肠道吸收的铅首先进入血液参与血液循环,在循环中铅迅速被组织吸收,主要与细胞内的蛋白结合,分布肝、肾、脾、肺、脑中,体内 90 % ~ 95 %的铅最后储存在骨骼中。铅在体内吸收 - 蓄积 - 排泄之间维持着动态平衡^[7]。本文针对促进排铅实验小鼠模型造模条件这一基本问题,从造模方式、染毒剂量、造模时间等造模条件对小鼠组织铅水平、体重和食物利用率的影响几方面进行了初步研究,得到以下结论。

4.1 通过饮水和饲料喂养小鼠,不同性别小鼠对促进排铅小鼠模型无影响,说明雌、雄小鼠均可作为实验模型小鼠进入实验。

4.2 饮水和饲料染毒造模均能增加模型小鼠体内被测脏器的铅负荷,各脏器的铅负荷的增加与染毒剂量递增成量效关系。本实验设计了 0.3 g/L、1.0 g/L、3.0 g/L 3 个剂量的三水醋酸铅水溶液染毒组,其中 1.0 ~ 3.0 g/L 剂量不造成实验小鼠的体重增长明显下降、不降低其食物利用率,符合保健食品模型小鼠设计的要求。

4.3 饮水和饲料染毒造模比较,饮水染毒造模所需

时间短一些,效率高一些。

4.4 无论何种途径,染毒 10 d,组织中铅含量均高于对照组 ($P < 0.01$),说明染毒 10 d 能达到模型成立的效果。

参考文献:

[1] 马宝艳,张学林.环境中铅中毒的研究[J].微量元素与健康,1999,16(1):78—80.
[2] 沈晓明,郭迪,许积德,等.铅对儿童心理发育的中、远期影响[J].临产儿科杂志,1992,10(2):187—188.
[3] 李秀珍,高清欣,高琦,等.补锌抑制铅吸收的动物实验研究[J].中华微量元素科学,1997,4(1-2):27,45.
[4] 栗建林,张丽帼,王顺珍,等.珍珠钙驱铅实验研究[J].广东微量元素科学,1998,5(6):36—39.
[5] 施新猷,编著.医学动物实验方法[M].北京:人民卫生出版社,1986,415页.
[6] GB 5009.12—1996.食品中铅的测定方法[S].
[7] 廖自基,编著.环境中重金属微量元素的污染危害与迁移转化[M].北京:科学出版社,1989,80.

[收稿日期:2002 - 09 - 15]

中图分类号:R15;TS218 文献标识码:A 文章编号:1004 - 8456(2003)01 - 0023 - 04