

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

刘秀英 胡怡秀 丘 丰 刘富强 王春娥 臧雪冰
(湖南省疾病预防控制中心,湖南 长沙 410005)

摘 要:为探讨保健食品促进排铅作用动物模型饮水染毒的适宜剂量,给小鼠自由饮用 Pb^{2+} 浓度为 163.9、546.2、1 638.7 mg/L 的醋酸铅溶液 30 d,每周记录饮用量,周末称重,估算实际铅摄入量。实验末取血、肝、脑、肾、股骨,石墨炉原子吸收分光光度法测定全血和组织铅含量。结果显示,163.9、546.2、1 638.7 mg Pb^{2+} /L 剂量组小鼠实际铅摄入量分别为 27.9、86.6、169.4 mg/kg BW,546.2、1 638.7 mg Pb^{2+} /L 剂量组小鼠体重增长较对照组显著减少,食物利用率也明显降低;各剂量组小鼠全血、肝、肾、股骨铅及 546.2、1 638.7 mg Pb^{2+} /L 剂量组小鼠脑铅含量显著升高。建议以 546.2 mg Pb^{2+} /L 作为保健食品促进排铅作用饮水染毒的造模剂量;除骨铅外,建议增测肾脏、脑组织内的铅、锌、铜含量及骨骼内的钙含量。

关键词:模型;生物学;铅;小鼠;评价研究

Exploration of water lead exposure for mouse model and suitable for assessing lead-eliminating effect of health foods

Liu Xiuying, et al.

(Hunan Provincial center for Disease Control and Prevention, Hunan Changsha 410005, China)

Abstract: To explore the suitable exposure dose via drinking water for animal model to be used in the assessment of lead-eliminating effect of health food, 3 groups of mice were given drinking water containing 163.9, 546.2 and 1 638.7 mg Pb^{2+} /L as lead acetate ($Pb(CH_3COO)_2 \cdot 3H_2O$) respectively for 30 days. The control group received Pb^{2+} -free water. The amount of water drunk by all the mice in each group during a week was recorded, and the body weight of each mouse was weekly weighed, on the basis of which the Pb^{2+} intake were evaluated. On the 31st day, specimens of blood, liver, kidney, brain and femur from each mouse were collected. Pb^{2+} levels in blood and tissues were analyzed using an atomic absorption spectrophotometer equipped with a graphite turnace. The results showed that the average Pb^{2+} intake for the three groups of mice were 27.9, 86.6, 196.4 mg/kg BW $\cdot d^{-1}$ respectively. The average body weight and food utilization ratio of mice with 546.2, 1 638.7 mg Pb^{2+} /L exposure were markedly lower than those of controls. Pb^{2+} levels in whole blood, liver, kidney and femur were significantly increased in the three experimental groups, while the average Pb^{2+} content in brain was significantly higher only in 546.2 mg Pb^{2+} /L and 1 638.7 mg Pb^{2+} /L treated mice. We recommend 546.2 mg Pb^{2+} /L as the suitable exposure via drinking water for the establishment of mice model to be used in the assessment of lead-eliminating effect of health foods. Besides the lead content in bone, we suggest the lead, zinc and copper levels in kidney and brain and the calcium content in bone be detected in the assessment of the lead-eliminating effect of an agent.

Key Words: Models; Biological; Lead; Mice; Evaluation Studies

铅是一种重要的工业毒物 and 环境污染物,在环境中广泛存在,难以降解,可通过食物、水、土壤和空气进入人体。铅进入人体后排泄极慢,骨铅的生物

半衰期约 20 年,皮质骨内铅生物半衰期更长。^[1]即使环境铅浓度降至允许值以下,长期少量铅吸收所引起的累积性损害也难以避免,故单纯靠降低环境

基金项目:卫生部保健食品专项基金课题(BJ-02-56)
作者简介:刘秀英 女 主管医师 硕士

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

铅预防铅对人体的损害尚嫌不足。经典的螯合剂治疗,虽然排铅作用强,但需长期静脉给药,且排铅的同时排出了锌、铜等必需微量元素,用量大时还可损害肾脏。^[2]随着人们对铅污染的广泛关注,维生素B1、锌、铜、钙、硒等必需金属,^[3]金属硫蛋白、饮食及中药^[4]等排铅作用的研究逐步深入,不同配伍的驱铅保健食品应运而生,建立统一的促进排铅动物模型以对此类保健食品进行功能评价已势在必行。虽然人类摄入铅量的80%~90%来自食物,但动物饲料成分复杂,其中许多成分能与铅发生反应而使铅的吸收复杂化,因此通过饮水途径染毒比较理想。本文旨在摸索小鼠经饮水染毒造模的适宜剂量。

1 材料和方法

1.1 实验动物 中南大学湘雅医学院实验动物学部提供的清洁级昆明种雄性小鼠(合格证号为湖南省医动字20—011号)48只,体重18~22 g。

1.2 试剂和仪器 醋酸铅(Pb(CH₃COO)₂·3H₂O)分析纯,广州新港化工厂;浓硝酸、高氯酸 分析纯,河南信阳市化学试剂厂;冻干血铅标准物质 国家标准物质中心出品;平板电炉,原子吸收分光光度计AA-670 日本岛津;石墨炉。

1.3 实验方法 将小鼠随机分为对照组和3个剂量组,每组12只小鼠,分两笼饲养。低、中、高剂量组分

别饮用0.3、1.0、3.0 g/L 浓度的醋酸铅溶液(相当于163.9、546.2、1 638.7 mg Pb²⁺/L),溶液中加入12.5 μL/L 醋酸酸化^[5]以防止铅盐、铅氢氧化物凝聚。对照组自由饮用含12.5 μL/L 醋酸的去离子水。实验中,记录每周每笼小鼠饮用液总量及进食量,每周末称重,据此估算每周各笼小鼠的实际铅摄入量,实验未计算各组小鼠的铅摄入量,计算食物利用率。实验第三十一天,摘眼球采血,取肝、脑、肾、股骨,以3:1(体积分数)的浓硝酸:高氯酸加热消化,用石墨炉原子吸收分光光度法测定全血和组织铅含量。测定全程使用冻干血铅标准物质进行质量控制,每间隔十二个样间测定标准物1次,结果合格。

1.4 统计分析 实验数据采用SPSS10.0 进行处理。

2 实验结果

2.1 染毒组小鼠饮水量及铅摄入量

由表1可见,实验期间,低、中、高剂量组小鼠平均每周饮用铅水量分别为262、221、129 mL,分别相当于对照组饮水量(301 mL)的87.0%、73.4%、42.9%,摄入铅量分别为27.9、86.6、169.4 mg Pb²⁺/kg BW。

2.3 小鼠的一般情况

试验期间,高剂量组小鼠饮水量明显减少,形体明显消瘦,其它各组小鼠无明显异常。由表2可见,

表1 各笼小鼠每周饮用去离子水或铅溶液总量 mL

周次	对照组		低剂量组		中剂量组		高剂量组	
	第一笼	第二笼	第一笼	第二笼	第一笼	第二笼	第一笼	第二笼
第一周	245	215	208	255	140	250	105	95
第二周	380	225	255	205	175	240	115	120
第三周	340	270	269	253	180	200	135	140
第四周	342	389	345	305	265	315	165	160
平均每笼每周	327	275	269	254	190	251	130	129
平均每组每周	301		262		221		129	

表2 各组小鼠的体重增长情况 $\bar{x} \pm s$ g

组 别	初 重	第一周	第二周	第三周	末 重
对 照 组	21.6 ±2.1	28.6 ±4.4	35.9 ±4.5	39.4 ±3.4	42.6 ±3.3
低剂量组	21.7 ±2.0	28.3 ±3.5	36.2 ±4.6	38.5 ±3.1	43.3 ±3.1
中剂量组	21.8 ±1.9	26.0 ±3.4	31.5 ±2.8	34.8 ±2.3 ⁽²⁾	37.7 ±2.2 ⁽²⁾
高剂量组	21.8 ±2.0	24.0 ±3.2 ⁽¹⁾	29.2 ±4.1 ⁽²⁾	31.8 ±4.1 ⁽³⁾	32.4 ±3.1 ⁽³⁾

注:(1)与对照组比较 P<0.05;(2)与对照组比较 P<0.01;(3)与对照组比较 P<0.001。

第一周开始高剂量组小鼠体重增长即显著受抑(P<0.05),第三周开始中剂量组小鼠体重增长也显著减缓(P<0.01),中、高剂量组小鼠试验末期体重及增重均显著低于对照组(分别 P<0.01、P<0.001)。3个剂量组小鼠进食量明显高于对照组(表3),中、高剂量组食物利用率较对照组显著降低(分别 P

表3 各组小鼠的食物利用率

组 别	体重增重 g	进食量 g	食物利用率 %
对 照	20.76 ±3.28	235.96 ±25.02	8.85 ±0.17
低剂量	21.51 ±3.63	273.81 ±4.84	7.86 ±0.13
中剂量	16.04 ±2.48 ⁽¹⁾	271.09 ±29.50	5.92 ±0.44 ⁽¹⁾
高剂量	10.82 ±2.42 ⁽²⁾	278.30 ±21.49	3.89 ±0.15 ⁽²⁾

注:(1)与对照组比较 P<0.01;(2)与对照组比较 P<0.001。



<0.01、 $P<0.001$)。低剂量组小鼠体重增长、食物利用率与对照组比较差异无显著性($P<0.05$)。

2.3 血铅和组织铅测定结果

染毒各组小鼠全血、肝、肾、股骨铅含量都显著高于对照组($P<0.001$),脑铅含量仅中、高剂量组显著升高($P<0.001$),见表4。

表4 血铅和组织铅测定结果($\bar{x} \pm s$) μg/g

组 别	全血铅	肝铅 (湿重)	肾铅 (湿重)	脑铅 (湿重)	股骨铅 (干重)
对 照 组	0.035 ±0.034	0.067 ±0.046	0.139 ±0.096	0.052 ±0.079	0.551 ±0.556
低剂量组	0.199 ±0.095 ⁽¹⁾	1.325 ±0.399 ⁽¹⁾	3.444 ±0.515 ⁽¹⁾	0.348 ±0.468	58.850 ±24.060 ⁽¹⁾
中剂量组	0.517 ±0.389 ⁽¹⁾	3.232 ±1.175 ⁽¹⁾	10.299 ±1.726 ⁽¹⁾	0.528 ±0.264 ⁽¹⁾	106.400 ±53.570 ⁽¹⁾
高剂量组	2.310 ±0.751 ⁽¹⁾	5.187 ±1.500 ⁽¹⁾	21.433 ±14.280 ⁽¹⁾	1.564 ±0.677 ⁽¹⁾	163.220 ±102.730 ⁽¹⁾

注:(1)与对照组比较 $P<0.001$ 。

3 讨论

据以上实验结果,建议以 546.2 mg Pb²⁺/L 铅水溶液给小鼠饮用进行预防性排铅造模,根据如下:
(1) 546.2 mg Pb²⁺/L 剂量组小鼠实验期间饮用铅水的量虽然低于对照组,但铅摄入量基本上达到了 163.9 mg Pb²⁺/L 剂量组的 3.3 倍,符合剂量设置的初衷;该组小鼠体重增长受抑,食物利用率显著降低,符合毒理学亚慢性毒性试验剂量设计的要求,即染毒剂量使动物在染毒期间出现了明显的中毒症状,但未引起动物死亡;^[6]该组小鼠全血铅和肝、肾、脑、股骨内铅含量均显著高于对照组,全血铅浓度达到美国 CDC 制定的儿童铅中毒 5 级标准中的一级水平(此时建议住院进行驱铅治疗)。^[7]
(2) 163.9 mg Pb²⁺/L 并未引起小鼠脑组织内铅含量显著升高,而脑是儿童铅中毒的主要靶器官,^[7]以此剂量造模,对儿童脑组织有驱铅作用的保健食品难以显示驱铅作用;此剂量下血铅浓度为 199 μg/g,接近分级标准中一级(轻、中度中毒)的分界值。^[7]
(3) 1638.7 mg Pb²⁺/L 溶液放置后,易出现絮状飘浮物,估计是铅浓度过高形成铅氢氧化物沉淀所致,絮状物易粘附在饮水瓶壁上而影响小鼠对铅的摄入;且此组小鼠形体明显消瘦,体重增长重度受抑,食物利用率大大降低。若以此剂量造模,小鼠严重的不良状态可能会影响保健食品的吸收,进而影响其真实的驱铅效果,故不主张选用。

《促进排铅作用检验方法》草案中,规定了血、肝、股骨内铅含量为必测项目。全血铅一直是铅中毒研究中最重要生物学监测指标,美国 CDC 制定的儿童铅中毒标准^[7]也以全血铅浓度为依据。全血铅易测定,有标准方法,一直为各实验室采用,便于相互比较,但血铅的生物半衰期仅 30 d,血铅水平仅代表正在进行的或近期内的铅暴露情况,也可反映骨铅动员时释放入血循环的铅量。^[8]从动态观点看,骨骼是机体内最重要的铅贮存库,进入机体的铅最终有 90%~95%在骨骼沉积,骨铅最能反映机体的铅负荷情况,而影响骨代谢的因素都可促使骨骼内

铅动员到血液,再分布至其他组织、脏器,产生毒性作用,由此造成内源性铅中毒。^[9]因此,血铅和骨铅作为必测项目是有充分依据的。

肝脏是代谢外源性毒物的重要器官,但在铅解毒中的作用尚不清楚。肝内有許多可与铅结合的蛋白质(包括金属硫蛋白),使肝脏不象脑、肾等器官那样对铅毒性敏感,肝内铅升高不会导致明显的毒效应,而体内敏感器官内铅转移至肝,反倒可以降低其内铅含量而减弱铅对这些靶器官的毒性,^[5]因此,笔者认为肝铅的测定并不重要。相反,铅对肾脏有毒性作用,^[10]脑是儿童铅中毒的主要靶器官,^[7]骨铅动员可再分布入脑,故认为肾铅、脑铅的测定非常必要。

由上可见,由于骨铅的可动员性,铅在体内的动态分布是相当复杂的,假如一种保健食品使骨铅动员,在骨铅降低的同时,有可能使血铅、脑铅升高,此时如何评判该保健食品的驱铅效果?笔者认为应综合各项铅含量测定结果,只有在无一项升高的情况下,才能判为有驱铅作用。

此外,为了防止保健食品类似螯合剂一样,排铅的同时导致锌、铜等必需元素的丢失,建议同时测定血、肾、脑组织内的锌、铜含量及骨骼内的钙含量,以保证保健食品相对于螯合剂驱铅治疗的优越性,使之有更广泛的适宜人群。

总之,关于驱铅作用观察指标的选择及标准判定,尚存在许多亟待商榷、解决的问题。

参考文献:

[1] Nordberg GF, Mahaffey KR, Fowler BA. Introduction and summary. International workshop on lead in bone: implications for dosimetry and toxicology[J]. Environ Health Perspect, 1991, 91: 3—7.
[2] Aposhian H V, Maiorino R M, Ramirez D G, et al. Mobilization of heavy metals by newer, therapeutically useful chelating agents[J]. Toxicology, 1995, 97: 23—38.
[3] 刘永泉, 樊晶光, 编译. 常元勋, 审校. 驱铅治疗辅助药

物的研究进展[J]. 国外医学卫生学分册,1997,24(4):10—11,19.

[4] 王芳,刘毅,管竞环. 铅中毒防治的研究进展[J]. 微量元素与健康研究,2000,17(3):69—70.

[5] Han S G,Li W J,Jamil U ,et al. Effects of weight loss and exercise on the distribution of lead and essential trace elements in rats with prior lead exposure[J]. Environ Health Perspect ,1999 ,107 :657 —662.

[6] 刘毓谷,主编. 卫生毒理学基础[M]. 第2版. 北京:人民卫生出版社,1994.

[7] CDC. Preventing lead poisoning in young children:A statement by the Centers for Disease Control[Z]. Atlanta :CDC ,1991.

[8] Rabinowitz W B. Toxicokinetics of bone lead[J]. Environ Health Perspect ,1990 ,91 :33 —37.

[9] Nordberg G F,Mahaffey K R,Fowler B A. Introduction and summary. International workshop on lead in bone :implications for dosimetry and toxicology[J]. Environ Health Perspect ,1991 ,93 :3 —7.

[10] Vyskocil A ,Cizkova M ,Tejnorova I. Effect of prenatal and postnatal exposure to lead on kidney function in male and female rats[J]. J Appl Toxicol ,1995 ,15 (4) :327 —328.

[收稿日期:2003 - 01 - 11]

中图分类号:R15;TS218 文献标识码:A 文章编号:1004 - 8456(2003)04 - 0291 - 04

中华人民共和国卫生部公告
2003 年 第 15 号

根据《中华人民共和国食品卫生法》和《食品添加剂卫生管理办法》的规定,批准以下食品添加剂品种扩大使用范围、使用量。现予以公告,自公告之日起实施。

中华人民共和国卫生部
二 三年六月三日

食品添加剂扩大使用范围、使用量品种

种类(代码)	名称	使用范围	使用量(g/kg)
着色剂 (08)	叶绿素铜钠盐	果蔬汁、果肉饮料 果汁(味)饮料、碳酸饮料	按生产需要适量使用 0.3
	红曲红	果蔬汁、果肉饮料 果汁(味)饮料、碳酸饮料	按生产需要适量使用
	焦糖色 (亚硫酸铵法)	茶饮料、糖果、饼干 汤料 冰棍 雪糕、冰淇淋	按生产需要适量使用 1.5 1 2
营养强化剂 (16)	甘氨酸亚铁	免淘米	24~48 mg/kg (以 Fe 元素计)
	枸橼酸苹果酸钙	免淘米	1600~3200 mg/kg (以 Ca 元素计)