

cigarette and cigar manufacturing: an evaluation of health hazards [J] .

妊娠期铅暴露对新生仔鼠脑组织 MDA、SOD 的影响及金属硫蛋白的诱导

张敬旭¹, 符绍莲¹, 江河¹, 阮明², 张宝旭²

(1. 北京大学公共卫生学院妇幼卫生学系, 北京 100083; 2. 北京大学公共卫生学院卫生毒理学系)

摘要: 目的 探讨妊娠期铅暴露对新生仔鼠脑组织丙二醛 (MDA)、超氧化物歧化酶 (SOD) 的影响及对金属硫蛋白 (MT) 的诱导。方法 采用灌胃方式于 C₅₇ 小鼠孕第 0 d 至妊娠结束进行醋酸铅染毒, 仔鼠出生后第 1 d 处死, 取脑组织测定 MDA 含量及 SOD 活性, 同时测定脑组织中 MT 的含量。结果 妊娠期铅暴露使新生仔鼠脑组织 MDA 及 MT 含量升高, SOD 活性降低, 均呈明显的剂量-效应关系 ($P < 0.01$)。结论 铅的脑发育毒性与其引起脑组织脂质过氧化产物 MDA 增高及抗氧化酶 SOD 活性降低有关; 金属铅可诱导发育中脑组织 MT 的产生, 提示 MT 在体内铅的转运、代谢乃至解毒方面可能具有一定作用。

关键词: 铅; 仔鼠; 丙二醛; 超氧化物歧化酶; 金属硫蛋白

中图分类号: R135. 11 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2003)01-0015-03

Effect of lead exposure during pregnancy on MDA, SOD and MT in the brain of newborn mice

ZHANG Jing-xu¹, FU Shao-lian¹, JIANG He¹, RUAN Ming², ZHANG Bao-xu²

(1. Department of Maternal and Child Health, School of Public Health, Peking University, Beijing 100083, China;

2. Department of Toxicology, School of Public Health, Peking University, Beijing 100083, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of lead exposure during pregnancy on the levels of malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) and metallothionein (MT) in the brain of newborn mice. **Method** The mice of C₅₇ from the day 0 to end of gestation were treated with lead acetate through gastric feeding. The newborn mice were killed at the first day after birth. The levels of MDA, the SOD activity and the content of MT in the newborn mice brain were determined. **Result** Lead exposure of pregnant mice might enhance the level of MDA and MT in the brain of newborn mice, but the SOD activity in the brain was decreased. The changes were also dose-dependent on lead ($P < 0.01$). **Conclusion** The brain developmental toxicity of lead is related to the increasing of MDA level and the decreasing of SOD activity in brain. In addition, lead can also induce the production of MT in the developing brain, that suggests that MT may play a certain role in the transportation, metabolism and detoxification of lead.

Key words: Lead; Newborn mice; MDA; SOD; Metallothionein

中枢神经系统是铅毒性作用的重要靶器官。研究显示铅对成年及幼年动物的神经毒性与其引起脑细胞脂质过氧化作用有关^[1,2]。有关铅与金属硫蛋白 (MT) 的关系很早就引起人们的关注, MT 作为一类富含半胱氨酸的低分子质量蛋白质, 具有重金属解毒及清除自由基的功能^[3]。本研究于小鼠妊娠期进行醋酸铅染毒, 探讨了宫内铅暴露对新生仔鼠脑组织脂质过氧化及超氧化物歧化酶活性的影响, 同时测定脑组织中 MT 的诱导, 为阐明铅的神经发育毒性机制及预防对策提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

醋酸铅 (国产分析纯), MDA、SOD 测定试剂盒,

均由南京建成生物工程研究所提供, 牛血红蛋白 (国产), Cd¹⁰⁹ (Sigma 公司)。

1.2 实验动物及处理

由北京大学医学部实验动物中心提供成年健康 C₅₇ 小鼠, 体质量 19.2~21.6 g, 每晚 8:00 雌雄 2:1 合笼, 次日早晨 8:00 检查雌鼠阴栓, 见阴栓日定为妊娠第 0 d。

1.3 染毒方法

将 20 只孕鼠随机分为对照组、低剂量醋酸铅 (10 mg/kg) 染毒组、中剂量醋酸铅 (30 mg/kg) 染毒组和高剂量醋酸铅 (90 mg/kg) 染毒组。采用灌胃方式, 于受孕第 0 d 染毒至妊娠结束, 对照组孕鼠同时给予去离子水灌胃。

1.4 仔鼠脑样品处理

仔鼠自然分娩, 从每窝仔鼠中随机抽取 2 只出生 1 d 仔鼠, 雌雄各半, 断头处死, 迅速剥离全脑, 称

收稿日期: 2002-08-02; 修回日期: 2002-08-25

作者简介: 张敬旭 (1967-), 女, 讲师, 主要从事发育毒理学方面的研究。

湿重并制成 10% 组织匀浆, 用于 MDA、SOD 的测定, 另取每窝雌雄各 2 只仔鼠称重后制成 10% 组织匀浆, 用于金属硫蛋白含量的测定^[4]。

1.5 母鼠血铅测定

母鼠分娩后, 于清洁条件下取其全血, 肝素抗凝, 由北京大学公共卫生学院中心仪器室采用原子吸收石墨炉法测定血铅含量。

1.6 统计分析方法

采用 SPSS 软件对数据进行 *t* 检验及相关分析。

2 结果

2.1 各染铅组母鼠血铅水平

由表 1 可见, 染毒结束后, 各剂量组母鼠血铅显著高于未染铅母鼠, 差异有非常显著性 ($P < 0.01$); 染铅剂量与血铅含量间存在显著正相关关系, $r = 0.962$, $P < 0.01$ 。

表 1 不同剂量组母鼠血铅含量 ($\bar{x} \pm s$)

染毒剂量 (mg/kg)	母鼠数 (只)	血铅 ($\mu\text{mol/L}$)
0	5	0.12 ± 0.03
10	5	0.49 ± 0.08 **
30	5	0.84 ± 0.12 **
90	5	1.54 ± 0.21 **

与对照组比较, ** $P < 0.01$

2.2 孕鼠醋酸铅染毒对新生仔鼠脑组织 MDA 含量及 SOD 活性的影响

由表 2 可见, 孕鼠醋酸铅染毒, 新生仔鼠脑组织 MDA 升高, SOD 活性逐渐降低, 除低剂量组 SOD 活性外, 其他剂量组 MDA 含量、SOD 活性与对照组比较差异有显著性 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 且染铅剂量与上述指标均呈剂量-效应关系 (相关系数分别为 $r_{\text{MDA}} = 0.817$, $r_{\text{SOD}} = -0.649$, $P < 0.01$)。

表 2 孕鼠铅染毒对仔鼠脑组织 MDA 及 SOD 的影响 ($\bar{x} \pm s$)

染毒剂量 (mg/kg)	仔鼠数 (只)	MDA 含量 (nmol/mg 蛋白)	SOD 活性 (NU/mg 蛋白)
0	10	0.22 ± 0.03	5.58 ± 0.74
10	10	0.31 ± 0.05 **	5.24 ± 0.67
30	10	0.38 ± 0.06 **	4.98 ± 0.44 *
90	10	0.51 ± 0.13 **	3.98 ± 0.43 **

与对照组比较, * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

2.3 孕鼠醋酸铅染毒对新生仔鼠脑组织 MT 诱导影响

由表 3 可见, 当染铅剂量达到 90 mg/kg 时, 脑组织 MT 含量显著升高, 与对照组比较差异有非常显著性 ($P < 0.01$), 醋酸铅染毒剂量与仔鼠脑组织 MT

间存在明显正相关关系, $r = 0.519$, $P < 0.01$ 。

表 3 孕鼠醋酸铅染毒对仔鼠脑组织 MT 诱导的影响 ($\bar{x} \pm s$)

染毒剂量 (mg/kg)	仔鼠数 (只)	MT 含量 ($\mu\text{g/g brain}$)
0	10	14.41 ± 1.97
10	10	14.51 ± 2.59
30	10	14.16 ± 2.04
90	10	18.85 ± 2.41 **

与对照组比较, ** $P < 0.01$

3 讨论

研究显示, 随着孕鼠染铅剂量的增加, 新生仔鼠脑组织脂质过氧化产物 MDA 含量增加, 抗氧化酶 SOD 活性降低, 且具有明显的剂量-效应关系, 与以往对成年及幼年动物的研究结果一致。表明胎儿期铅暴露与出生后铅暴露对脑组织的氧化损伤机理是一致的, 其分子机制可能与铅诱发组织细胞氧自由基的产生有关。孕期铅暴露可能使胎儿脑组织氧自由基蓄积, 导致脑细胞膜发生脂质过氧化反应, 生成大量的 MDA。本研究低剂量铅染毒即引起脑组织 MDA 含量升高, 显示脂质过氧化是铅毒性损伤的早期表现。SOD 是机体脂质过氧化防御系统中的一个重要酶, 它能有效地清除生物氧化产生的超氧阴离子自由基 (O_2^-), 并有终止自由基连锁反应的作用^[5]。铅通过抑制 SOD 活性, 使其对氧自由基的清除率降低, 加重脂质过氧化反应。

MT 是惟一一种在金属代谢中起明确作用的低分子质量蛋白质, 可被重金属等多种因素诱导。有报道认为无机铅离子能够诱导 CHO 细胞系 MTmRNA 水平的提高^[6]; 铅暴露的工人血样分析证明血铅浓度与 MT 水平呈正相关性^[7], 与本研究妊娠期铅暴露对新生仔鼠脑组织 MT 诱导的结果基本一致, 可见在发育中的脑组织, 金属铅同样可诱导 MT 的产生, 但在低及中剂量铅染毒组并未观察到 MT 的显著增加, 可能由于低浓度醋酸铅诱导产生少量的 MT, 参与体内自由基的清除或代谢而消耗, 研究中 SOD 活性在中剂量以上染铅组才开始降低是否与此有关, 有待进一步深入探讨。MT 在正常动物脑内广泛存在, 特别对发育中的脑组织具有重要作用, 可能与其维持脑内锌的内稳态, 以利于神经细胞的正常生长发育有关。铅诱导发育中脑组织产生的 MT 在脑发育中具有何种作用以及铅诱导产生的 MT 在体内铅的转运、代谢及至解毒方面的作用, 尚须进一步研究。

(下转第 19 页)

由表 3 可见, 血清中 MDA、ROS 含量随工龄增加、车间中 ACN 浓度升高而明显升高, 而且在 1996~2001 年组就与对照组 (见表 2) 差异有高度显著性 ($P < 0.01$), 而 GSH 随工龄增加、ACN 浓度升高而下降, 1996~2001 年组与对照组比较, 差异无显著性 ($P > 0.05$)。

血清中 SOD、GSH-Px、GST、CAT 酶活性亦随工龄增加和 ACN 浓度升高而下降, 其中以 SOD 下降最明显, 反应最敏感。1996~2001 年时段工龄组就明显低于对照组, 差异有高度显著性 ($P < 0.01$), 而 GSH-Px 和 GST 在此时段工龄组与对照组比较, 差异无显著性 ($P > 0.05$)。

3 讨论

丙烯腈在细胞色素 P4502E1 (CYP2E1) 的催化下, 代谢为 2-氰环氧乙烷 (cyanothyleneoxide, CEO), 引发自由基反应, 生成活性氧 (ROS), 发生脂质过氧化作用产生 MDA 等活性中间产物^[1,2]。因而, 接触工人血清中 MDA、ROS 含量明显增高。为清除自由基及活性中间产物, 促进 CEO 与 GSH 的结合, 加速代谢产物排除体外, SOD、GSH-Px、GST 和 GSH 发挥抗氧化作用而被消耗, 因而, 酶活力下降, GSH 含量减少。接触工人血清中 CAT 与对照组比较差异无显著性 ($P > 0.05$)。这与其他研究者的报道相近^[1-6]。

接触工人按车间浓度变化的时间段划分工龄后, 工龄间比较结果发现, MDA、ROS 随工龄增加和车间空气中 ACN 浓度升高而升高, 呈正相关关系, 相关系数依次为 0.732 和 0.793 ($P < 0.01$), 并且在接近或低于国家标准浓度的 1996~2001 年工龄组 MDA、ROS 含量均明显高于对照组, 差异有非常显著性 ($P < 0.01$), 说明血清中 MDA、ROS 是反应 ACN 致脂质过氧化损伤的早期敏感的损害效应标志物。

本研究结果表明, 接触工人血清中 SOD、GSH-

Px、GST 酶活力和 GSH 含量明显低于对照组 ($P < 0.01$), 且均随工龄增加和车间空气中 ACN 浓度升高而降低, 存在明显的负相关关系, 相关系数依次为 0.814、0.773、0.712 和 0.747 ($P < 0.01$), 说明这种降低确由 ACN 及其代谢产物产生的脂质过氧化作用所致。在低于和接近国家标准的 1996~2001 年时间段的工龄组仅 SOD 酶活力仍明显低于对照组 ($P < 0.01$), 而 GSH-Px、GST、GSH 均与对照组差异无显著性 ($P > 0.05$), 说明 SOD 在反应机体脂质过氧化损伤效应方面也是一个早期较敏感的损害效应指标。在该时段年龄组的 GSH-Px、GST、GSH 与对照组差异无显著性, 说明机体处于代偿阶段, GSH-Px、GST、GSH 在促进 GSH 与 CEO 结合方面发挥着重要作用, 并存在较大的潜能, 以维持机体脂质过氧化作用处于稳态。当 ACN 及其代谢产物对机体损伤进一步加重, 其代偿能力耗竭, 则表现为 GSH-Px、GST 和 GSH 均显著下降, 机体受到脂质过氧化损伤。

综上所述, 血清中 MDA、ROS、SOD 可作为监测 ACN 较早期损害效应的生物标志物。同时提示, 现行的 ACN 车间空气最高容许浓度为 $1\text{mg}/\text{m}^3$ 的标准是否安全, 还须进一步观察。

参考文献:

- [1] Woutersen R A. Toxicological profile of acrylonitrile [J]. Scand J Work Environ Health, 1998, 24 (Suppl2): 5.
- [2] Kanthasamy A G, Ardele B, Malave A, et al. Reactive oxygen species generated by mediate Toxicity in rat pheochromocytoma cell [J]. Toxicol Lett, 1997, 93: 47.
- [3] Liang J, Xu Y, Klauing J E. Induction of oxidative stress in rat brain by acrylonitrile [J]. Toxicol Sci, 1998, 41: 334.
- [4] 马明月, 张玉敏, 李海山, 等. 丙烯腈对雄性大鼠脂质过氧化作用研究 [J]. 中国工业医学杂志, 2000, 13 (3): 138.
- [5] 张贵利, 戴修道. 丙烯腈的毒作用研究进展 [J]. 中国公共卫生学报, 1998, 17 (3): 190.
- [6] 唐钧, 范卫, 朱瑞娉, 等. 丙烯腈作业人群的脂质过氧化与抗氧化能力观察 [J]. 工业卫生与职业病, 2001, 27 (1): 11.
- [7] Woutersen R A. Cadmium-hemoglobin affinity assay [J]. Method Enzymol, 1991, 205: 83-88.
- [8] Minami M, Koshi K, Homma K, et al. Changes of the activities of superoxide dismutase after exposure to the fume of heavy metals and significance of zinc in the tissue [J]. Arch Toxicol, 1982, 49: 215.
- [9] Rhee S J, Huang P C. Metallothionein accumulation in CHO Cd²⁺ cell in response to lead treatment [J]. Chem Biol Interact, 1989, 72: 347-361.
- [10] Church H J, Day J P, Braithwaite R A, et al. The speciation of lead in erythrocytes in relation to lead toxicity: Case studies of two lead-exposed workers [J]. Neurotoxicology, 1993, 14 (2-3): 359-364.

(上接第 16 页)

参考文献:

- [1] 王桂兰, 刘双军, 侯玉春, 等. 铅对大鼠脑细胞膜脂质过氧化及超氧化物歧化酶活性的影响 [J]. 卫生毒理学杂志, 1995, 9 (3): 175-176.
- [2] 丁训诚, 刘春芳, 董竟武, 等. 铅对发育中的脑脂质过氧化作用的影响 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 1988, 2 (4): 293-296.
- [3] 柯浩. 金属硫蛋白与人类健康 [J]. 生物学通报, 1995, 30 (7): 9-10.
- [4] James F R, Bent I V. Determination of metallothionein in tissues by