

• 论 著 •

发育早期阶段砷暴露小鼠肝和脑组织中砷形态的检测分析

陆春伟¹, 金冬岩², 李革新¹, 吕秀强¹, 孙贵范¹, 金亚平¹

(1. 中国医科大学公共卫生学院劳动卫生教研室, 辽宁 沈阳 110001; 2. 中国医科大学附属盛京医院检验科, 辽宁 沈阳 110004)

摘要: 目的 探索小鼠在其早期发育阶段暴露不同浓度亚砷酸钠后, 各砷形态在肝和脑组织中的代谢与分布情况。方法 母鼠在妊娠和哺乳期以自由饮水方式暴露 0、10 和 30 mg/L iAs^{III} 水溶液, 仔鼠在哺乳期后继续摄入与母鼠相同浓度的含砷水溶液。分别在仔鼠出生后第 0、10、15、21 和 35 天, 采用氢化物发生-超低温捕集-原子吸收分光光度法测定肝和脑组织中无机砷 (iAs)、一甲基砷 (MMA) 和二甲基砷 (DMA) 水平。结果 从出生后 15 d 起, 肝组织中 iAs 含量开始逐步增加; 从出生后 21 d 起, 肝组织中 MMA 含量开始逐步增加; 肝组织中 DMA 含量在出生后 10 ~ 15 d 最低, 以后逐步增高。脑组织中 iAs 含量, 在出生后 15 d 开始升高, 在出生后 21 d 时达最高水平; MMA 含量在早期发育阶段的脑组织中没有检测到; DMA 含量在出生后 10 ~ 15 d 最低。结论 母鼠体内各形态砷化物可通过胎盘屏障进入胎鼠体内, 但其基本不能通过乳房屏障进入母鼠乳汁, 进而进入仔鼠体内, 成熟的血脑屏障对 iAs 具有一定的阻挡作用, 但可允许部分 DMA 进入脑组织。

关键词: 三价砷; 砷形态; 砷甲基化; 早期砷暴露; 小鼠

中图分类号: R599.9 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2011)05-0323-04

Determination on speciation of arsenic in liver and brain of baby-mice exposed to arsenite during early developmental stages

LU Chun-wei*, JIN Dong-yan, LI Ge-xin, LV Xiu-qiang, SUN Gui-fan, JIN Ya-ping

(*: Department of Environmental and Occupational Health, School of Public Health, China Medical University, Shenyang 110001, China)

Abstract: Objective To explore the metabolism and distribution of different speciations of arsenic in liver and brain of baby-mice exposed to arsenite during early developmental stage. **Methods** Mother mice were exposed to iAs^{III} through drinking water during gestation and lactation, the concentrations of iAs^{III} in the water were 0, 10 and 30 mg/L. After birth, the baby-mice were also given same water. At the 0, 10, 15, 21 and 35 postnatal days (PND), the level of inorganic arsenic (iAs), monomethylarsenic acid (MMA) and dimethylarsinic acid (DMA) in both liver and brain of the baby-mice were determined by hydride generation-atomic absorption spectrometry (HG-AAS). **Results** In liver, level of iAs increased from PND 15, and level of MMA increased from PND 21, however, level of DMA showed some lower between PND 10 and 15. In brain, level of iAs increased from PND 15, the peak was on PND 21; level of MMA was undetected during the early developmental stages; level of DMA was also showed a valley between PND 10 and 15. **Conclusion** It was suggested that various speciations of arsenicals might enter into the body of pregnant mice and permeate through transplacental barrier, basically they could not permeate through lactational barrier then get into the body of baby-mice via milk of mother mice; additionally, well-developed blood-brain barrier has certain hindrance to iAs , but some DMA could still enter into brain.

Key words: arsenious; speciation of arsenic; methylation of arsenical; early life arsenic exposure; mouse

慢性饮水型砷暴露是无机砷 (inorganic arsenic, iAs) 进入人体并危害人类健康的主要途径。近期研究表明, 人类早期的砷暴露会引起潜在的健康危害并在以后的生活中逐渐显现出来^[1-3]。饮水中的 iAs 进入人体后, 主要在肝脏进行甲基化代谢, 通过连续的

还原反应和氧化甲基化过程生成一甲基砷 (monomethylarsenic acid, MMA) 和二甲基砷 (dimethylarsinic acid, DMA)^[4]。然而, 这一代谢过程并不彻底, 一些 iAs 和 MMA 仍可在尿中被检测到, 通常以尿中各砷形态的水平作为评价人体砷甲基化代谢的能力。近年来, 砷的甲基化代谢被认为是一种活化过程^[5,6], 主要原因是 iAs 的三价中间代谢产物 (MMA^{III}, DMA^{III}) 具有更强的毒性。然而, iAs 的五价代谢终产物的毒性明显减弱, 且更容易随尿排出, 尽管体内的砷甲基化代谢过程是活化还是解毒仍有争论, 但研究结果显示, 砷甲基化能力差的个体更容易引起皮肤

收稿日期: 2011-04-26; 修回日期: 2011-07-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No: 30571590): 砷对海马 AC 的毒性及其在智力损伤机制中作用的研究

作者简介: 陆春伟 (1967—), 男, 主管技师, 研究方向: 地方病学。

通讯作者: 金亚平, 博士生导师, 教授, E-mail: jinyp@mail.cmu.edu.cn。

损害^[7]，表明人体的砷甲基化代谢能力可以影响砷对人体的毒性作用。

婴幼儿的脑组织正处于快速发育时期，对环境中污染物非常敏感，易于受到环境中有毒因子的作用产生永久性损害。血脑屏障的主要功能是限制一些有毒因子进入脑组织，由于早期发育阶段血脑屏障发育还不成熟，有毒因子较容易进入脑组织，进而产生长久危害。本研究通过探讨早期不同发育阶段仔鼠肝和脑组织中 iAs 及其代谢产物的含量，分析各砷形态能否自由通过胎盘屏障、乳房屏障和未成熟与成熟的血脑屏障，从而为评价各发育阶段的砷神经毒性提供实验参考数据。

1 材料和方法

1.1 材料

主要试剂亚砷酸钠 (NaAsO₂)、硫酸 (H₂SO₄)、氢氧化钠 (NaOH) 和硼氢化钠 (NaBH₄) 购于上海化学试剂上海分析试剂厂；MMA、DMA 的标准品购于日本山梨 Tri 化学试剂有限公司，iAs 的标准品购于国家标准品中心 (中国，北京)。

1.2 实验动物分组与染毒

选用健康昆明种小鼠，体重 (26 ± 2) g，由中国医科大学实验动物中心提供。正式实验前适应性喂养一周后，按雌:雄 = 2:1 于每晚合笼。以查到阴栓之日为受孕第 0 天，随机分成 3 组，每组 6 只，从怀孕第 1 天起单笼饲养，并分别自由饮用砷含量为 0、10 和 30 mg/L 的亚砷酸钠水溶液直到哺乳期结束，哺乳期后仔鼠继续饮用相同砷含量的水，对照组的孕鼠和仔鼠饮用蒸馏水。每 24 h 新鲜配制含砷水溶液，以保证亚砷酸盐处于三价态。所采用的砷浓度在正常耐受范围内，不影响母鼠及仔鼠的体重增长。

1.3 样品采集

断头处死生后 0、10、15、21、35 d 的仔鼠，每窝 1 只。立即取出肝和脑组织于 -40 °C 冷冻保存，用于肝和脑组织中砷形态的检测分析。

1.4 砷形态检测

采用氢化物发生-超低温捕集-原子吸收分光光度仪 (ASA-2SP-AA6800，岛津，日本)。取新鲜肝和脑组织各 50 mg，加入 2 ml 双蒸水制备组织匀浆，然后与 1.0 ml 1.5 mol/L H₂SO₄ 混合，并在 10 ml 聚甲基戊烯试管内，经超声消化 10 min。测定时分别进样 1.0 ml 或 1.5 ml，与 10% 的 NaBH₄ 溶液混合，生成砷氢化物，在 193.3 nm 处原子吸收分光光度法测定 iAs、MMA 和 DMA 含量。三种砷形态的加标回收率分别为 85% ~ 90%、90% ~ 95% 和 95% ~ 106%。将含 1 000 μg/L iAs、MMA 和 DMA 的标准液 0.1 ml 加入 9.9 ml 对照组脑或肝组织匀浆液中，作为标准样，按与组织样品同样方法测定，该方法对三种砷形态的检测阈值都是 1 ng。总砷含量 (TAs) = iAs + MMA + DMA。

1.5 统计分析

实验数据输入计算机，用 SPSS 13.0 进行实验数据的统计分析。肝和脑组织中各砷形态含量为非正态分布，因此，采用秩和检验 (Kruskal-Wallis test) 进行分析，组间比较采用秩次代替原变量进行 ANOVA 及 SNK 参数分析。

2 结果

2.1 不同发育阶段仔鼠肝组织中各砷形态含量

低和高砷暴露组的 iAs 含量在出生后 0 ~ 10 d 最低，15 d 开始显著增加，35 d 时达最高水平；高砷暴露组，生后 35 d 与生后 21 d 比较差异有统计学意义；低砷暴露组，生后 21 d 与 35 d 比较差异无统计学意义。低和高砷暴露组的 MMA 含量直到生后 21 d 才开始检测到并逐步升高，且生后 35 d 与生后 21 d 比较差异有统计学意义。低和高砷暴露组的 DMA 含量在出生后 10 ~ 15 d 最低，与生后 0、21、35 d 比较差异有统计学意义；高砷暴露组中，新生仔鼠的 DMA 含量显著低于生后 21、35 d。对照组肝组织的各砷形态含量均低于砷暴露组，且 MMA 和 DMA 含量均没有检测到。详见表 1、表 2。

表 1 低砷暴露组小鼠出生后肝脏砷形态水平 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

μg/g

砷化物形态	新生仔鼠	生后 10 d	生后 15 d	生后 21 d	生后 35 d
iAs	0.014 ± 0.012	0.013 ± 0.003	0.050 ± 0.015 ^{ab}	0.080 ± 0.012 ^{abc}	0.104 ± 0.051 ^{abc}
MMA	0	0	0	0.040 ± 0.062 ^{abc}	0.128 ± 0.080 ^{abcd}
DMA	0.090 ± 0.008	0.009 ± 0.004 ^a	0 ^a	0.116 ± 0.048 ^{bc}	0.138 ± 0.073 ^{bc}
TAs	0.104 ± 0.010	0.022 ± 0.006 ^a	0.050 ± 0.020 ^{ab}	0.236 ± 0.105 ^{abc}	0.370 ± 0.200 ^{abcd}

注: a, 与新生仔鼠比较, P < 0.05; b, 与生后 10 d 比较, P < 0.05; c, 与生后 15 d 比较, P < 0.05; d, 与生后 21 d 比较, P < 0.05。表 2、3、4 同。

2.2 不同发育阶段仔鼠脑组织中各砷形态含量

低和高砷暴露组的 iAs 含量在生后 21 d 时达最高

值，与生后 15 d 和 35 d 比较差异有统计学意义；高砷暴露组中，生后 35 d 的 iAs 含量显著低于生后 15

表 2 高砷暴露组小鼠出生后肝脏砷形态水平 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

μg/g

砷化物形态	新生仔鼠	生后 10 d	生后 15 d	生后 21 d	生后 35 d
iAs	0.016 ± 0.005	0.015 ± 0.003	0.074 ± 0.010 ^{ab}	0.111 ± 0.030 ^{abc}	0.218 ± 0.046 ^{abcd}
MMA	0	0	0	0.203 ± 0.056 ^{abc}	0.281 ± 0.080 ^{abcd}
DMA	0.118 ± 0.031	0.028 ± 0.004 ^a	0.042 ± 0.014 ^a	0.249 ± 0.128 ^{abc}	0.290 ± 0.056 ^{abc}
TAs	0.134 ± 0.035	0.043 ± 0.006 ^a	0.116 ± 0.051 ^{ab}	0.563 ± 0.150 ^{abc}	0.789 ± 0.161 ^{abcd}

d. MMA 在各早期发育阶段的脑组织中均没有检测到。低和高砷暴露组的 DMA 含量在生后 10、15 d 时最低, 与生后 0、21、35 d 相比差异有统计学意义; 在低砷暴露组, 生后 21 d 的 DMA 含量显著低于生后

0、35 d。对照组脑组织的各砷形态含量均明显低于砷暴露组, 且脑组织中 MMA 和 DMA 含量均没有检测到。详见表 3、表 4。

表 3 低砷组脑组织砷形态的含量 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

μg/g

砷化物形态	新生仔鼠	生后 10 d	生后 15 d	生后 21 d	生后 35 d
iAs	0.015 ± 0.005	0.013 ± 0.005	0.028 ± 0.011	0.068 ± 0.010 ^{abc}	0.012 ± 0.003 ^d
MMA	0	0	0	0	0
DMA	0.072 ± 0.017	0 ^a	0 ^a	0.050 ± 0.014 ^{abc}	0.080 ± 0.025 ^{bcd}
TAs	0.087 ± 0.030	0.013 ± 0.008 ^a	0.028 ± 0.005 ^a	0.118 ± 0.014 ^{bc}	0.092 ± 0.028 ^{bc}

表 4 高砷组脑组织砷形态的含量 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

μg/g

砷化物形态	新生仔鼠	生后 10 d	生后 15 d	生后 21 d	生后 35 d
iAs	0.014 ± 0.005	0.012 ± 0.004	0.043 ± 0.007 ^{ab}	0.103 ± 0.021 ^{bc}	0.023 ± 0.003 ^{abcd}
MMA	0	0	0	0	0
DMA	0.106 ± 0.030	0.023 ± 0.013 ^a	0.021 ± 0.009 ^a	0.131 ± 0.035 ^{bc}	0.132 ± 0.032 ^{bc}
TAs	0.120 ± 0.034	0.035 ± 0.015 ^a	0.064 ± 0.014 ^{ab}	0.234 ± 0.025 ^{abc}	0.155 ± 0.036 ^{abcd}

3 讨论

尽管人们已经关注慢性饮水型砷暴露对人体健康产生的潜在危害, 但在生命发育早期 iAs 暴露后, 其在肝和脑组织中的代谢与分布情况还了解的很少。本研究拟探讨小鼠在早期发育阶段砷暴露后的肝和脑组织中各形态砷化物的含量。研究结果显示, 生后 10 d 的仔鼠肝和脑组织中各形态砷含量的水平是最低的。生后 10 d 仔鼠的食物来源主要是母体的乳汁, 这表明母体乳汁中的各形态砷化物含量可能极低, 提示母体的乳房屏障可能有效地限制了砷化物从血液进入乳汁中。Concha 等人^[8]的研究数据显示, 人乳汁中砷的含量为 3 μg/kg, 在出生后 4 个月内婴儿尿中砷的含量从 80 μg/L 降到 30 μg/L。Fangstrom 等人^[9]的研究也表明高砷饮水地区的妇女乳汁中 iAs 水平很低, 这与我们的研究数据相一致。因此, 母乳喂养婴儿可有效地防止砷化物对婴儿的危害。据报道孕期母体暴露砷, 砷化物可通过胎盘屏障进入胎儿体内, 并产生损害作用^[10, 11]。有研究表明, 脐血中砷含量为 9 μg/L, 和其母体血液中砷含量一样高 (11 μg/L), 且新生小鼠及其母鼠血液中主要的砷形态均是 DMA^[12]。本研究表明, 新生小鼠肝和脑组织中 DMA 含量明显高于生后的 10、15 d, 且 DMA 是新生仔鼠肝和脑组织中主

要的砷形态, 提示胎盘屏障不能有效阻挡母鼠血液中砷进入胎儿体内。

本研究中, 生后 13、14 d 的小鼠开始睁开眼睛, 并开始进食和饮水, 生后 15 d 的肝和脑组织中 iAs 含量明显升高, 但 DMA 含量却没有明显升高, 而肝组织中 MMA 含量没有检出, 这表明生后 15 d 仔鼠开始通过饮水直接暴露 iAs, 由于此时肝组织的甲基化代谢能力较弱, 因此, 生后 15 d 仔鼠肝和脑组织的砷形态以 iAs 为主。流行病学调查结果揭示, 儿童对砷的甲基化代谢能力比成人差, 儿童和成年妇女尿中 iAs 所占的比例分别为 50% 和 32%^[8, 13]。基于上述研究结果, 提示生命早期的 iAs 暴露可增加其对人体的毒性作用。

仔鼠的哺乳期通常为 21 d, 生后 21、35 d 的仔鼠通过饮水直接暴露 iAs。生后 21 d 仔鼠的肝组织中各形态砷含量提示, 此时仔鼠的肝组织已具备甲基化代谢能力。生后 21 d 仔鼠的肝组织中 iAs 含量比生后 35 d 的低, 但生后 21 d 仔鼠的脑组织中 iAs 含量却比生后 35 d 的高。这表明在哺乳期末, 仔鼠的血脑屏障还没有发育成熟, 不能有效限制 iAs 进入脑组织。生后 35 d 仔鼠的脑组织中 DMA 含量很高, 但 MMA 却没有检出, 其具体原因尚不清楚, 但推测可能与砷在脑组织中进行甲基化代谢有关。有研究显示,

MMA 和 DMA 可在 iAs 暴露的脑切片中被检测到^[14,15]。此外, 研究显示脑和肝组织中 MMA^V 还原酶的活性分别为 91.4、29.8 nmol MMA^{III} / (mgPro · h)^[16], 表明脑组织中砷的二次甲基化代谢能力远比肝组织强大。因此, 脑组织中 MMA 可迅速被代谢转化为 DMA。

综上所述, 本研究发现, 胎盘屏障对砷化物从母体进入胎鼠体内不具有阻挡作用, 但乳房屏障可有效阻挡母体血液中的砷化物进入乳汁。发育成熟的血脑屏障可有效阻挡 iAs 进入脑组织, 提示生命早期的砷暴露, 可增加 iAs 进入脑组织的量, 使砷对个体更容易产生神经毒性危害。

参考文献:

[1] Shen J, Liu J, Xie Y, *et al.* Fetal onset of aberrant gene expression relevant to pulmonary carcinogenesis in lung adenocarcinoma development induced by in utero arsenic exposure [J]. *Toxicol Sci*, 2007, 95 (2): 313-320.

[2] Liaw J, Marshall G, Yuan Y, *et al.* Increased childhood liver cancer mortality and arsenic in drinking water in northern Chile [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2008, 17 (8): 1982-1987.

[3] Vahter M. Health effects of early life exposure to arsenic [J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2008, 102 (2): 204-211.

[4] Thomas D J, Waters S B, Styblo M. Elucidating the pathway for arsenic methylation [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2004, 198 (3): 319-326.

[5] Petrick J S, Ayala-Fierro F, Cullen W R, *et al.* Monomethylarsonous acid (MMA^{III}) is more toxic than arsenite in Chang human hepatocytes [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2000, 163 (2): 203-207.

[6] Thomas D J, Styblo M, Lin S. The cellular metabolism and systemic toxicity of arsenic [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2001, 176 (2):

127-144.

[7] Lindberg A L, Rahman M, Persson L A, *et al.* The risk of arsenic induced skin lesions in Bangladeshi men and women is affected by arsenic metabolism and the age at first exposure [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2008, 230 (1): 9-16.

[8] Concha G, Nermell B, Vahter M V. Metabolism of inorganic arsenic in children with chronic high arsenic exposure in northern Argentina [J]. *Environ Health Perspect*, 1998, 106 (6): 355-359.

[9] Fångström B, Moore S, Nermell B, *et al.* Breast-feeding protects against arsenic exposure in Bangladeshi infants [J]. *Environ Health Perspect*, 2008, 116 (7): 963-969.

[10] Waalkes M P, Liu J, Ward J M, *et al.* Animal models for arsenic carcinogenesis: inorganic arsenic is a transplacental carcinogen in mice [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2004, 198 (3): 377-384.

[11] Devesa V, Adair B M, Liu J, *et al.* Arsenicals in maternal and fetal mouse tissues after gestational exposure to arsenite [J]. *Toxicology*, 2006, 224 (1-2): 147-155.

[12] Concha G, Nermell B, Vahter M V. Metabolism of inorganic arsenic in children with chronic high arsenic exposure in northern Argentina [J]. *Environ Health Perspect*, 1998, 106 (6): 355-359.

[13] Vahter M. Methylation of inorganic arsenic in different mammalian species and population groups [J]. *Sci Prog*, 1999, 82 (1): 69-88.

[14] Georis B, Cardenas A, Buchet J P, *et al.* Inorganic arsenic methylation by rat tissue slices [J]. *Toxicology*, 1990, 63 (1): 73-84.

[15] Rodríguez V M, Del Razo L M, Limón-Pacheco J H, *et al.* Glutathione reductase inhibition and methylated arsenic distribution in Cd1 mice brain and liver [J]. *Toxicol Sci*, 2005, 84 (1): 157-166.

[16] Sampayo-Reyes A, Zakharyan R A, Healy S M, *et al.* Monomethylarsonic acid reductase and monomethylarsonous acid in hamster tissue [J]. *Chem Res Toxicol*, 2000, 13 (11): 1181-1186.

作者须知

正文中参考文献的标注: 采用顺序编码制, 即按文献出现的先后顺序用阿拉伯数字连续编码, 并将序号置于方括号中。可根据具体情况分别按下述 3 种格式之一标注。

- a. 薛社普等^[1] 指出棉酚从体内排泄缓慢。
- b. 麦胶敏感性肠病的发病有 3 种机制参与^[2,4-6]。
- c. 间质细胞 cAMP 含量测定方法见文献 [7]。

正文指明原始文献作者姓名时, 序号标注于作者姓名右上角 (如例 a); 正文未指明作者或非原始文献作者时, 序号标注于句末 (如例 b); 正文直接述及文献序号将之作为语句的组成部分时, 不用角码标注 (如例 c)。

量和单位: 表示离心加速作用时, 应以重力加速度 (g) 的倍数的形式表达, 例如: 600 × g 离心 10min; 或者在给出离心机转速的同时给出离心半径, 例如: 离心半径 8 cm、1 200 r/min 离心 10 min。

标点符号: 撰写英文摘要时应遵循其习惯使用标点符号。例如: 英文无顿号 “,”, 应使用逗号 “;”; 无波纹连接号 “~”, 应使用连字符 “-”, 无书名号 “《》”, 书名、刊名用斜体排印。