

母鼠孕前低水平铅暴露对子代骨骼钙代谢的影响

宋波¹, 武柏林², 刘士鹏¹, 高天阳¹, 张荣¹, 牛玉杰¹

摘要: [目的] 研究母鼠孕前低水平铅暴露是否对子代骨骼钙代谢有影响。[方法] 12只雌性昆明小鼠随机分为铅暴露组、对照组, 每组6只。铅暴露组小鼠通过饮水暴露于醋酸铅(含铅元素10.0 mol/L)4周后怀孕。在仔鼠出生后的第21天和第60天, 两组每窝随机选取3只仔鼠处死, 取股骨、全血和血清, 用石墨炉原子吸收法测定铅含量, 用火焰原子吸收法测定钙含量, 用放射免疫法测定血清总甲状旁腺激素(PTH)含量。[结果] 在出生后第21天, 与对照组仔鼠相比, 铅暴露组仔鼠血钙水平[(1.75±0.24) mmol/L]、骨钙水平[(10.17±1.03) mmol/g]均明显降低, 血铅水平[(0.31±0.03) μmol/L]、骨铅水平[(57.24±4.65) nmol/g]及血清总PTH水平[(3.40±0.74) μg/L]均明显升高($P<0.05$)。到出生后第60天, 与出生后第21天相比, 铅暴露组仔鼠血钙水平[(2.11±0.17) mmol/L]明显上升($P<0.05$), 且与对照组仔鼠无明显差异($P>0.05$); 骨钙水平[(13.65±2.11) mmol/g]、血清总PTH水平[(5.91±0.85) μg/L]均明显上升($P<0.05$), 且与对照组仔鼠有明显差异($P<0.05$); 骨铅水平[(45.04±7.62) nmol/g]明显下降($P<0.05$), 但仍明显高于对照组仔鼠($P<0.05$); 血铅水平[(0.29±0.02) μmol/L]无明显改变, 仍明显高于对照组仔鼠($P<0.05$)。[结论] 母鼠孕前低水平铅暴露影响导致了子代小鼠骨骼钙代谢。

关键词: 低水平铅; 小鼠子代; 钙; 甲状旁腺激素; 骨骼; 血铅

Effects of Maternal Preconceptional Low-Level Lead Exposure on Skeletal Calcium Metabolism in Newborn Mice SONG Bo¹, WU Bai-lin², LIU Shi-peng¹, GAO Tian-yang¹, ZHANG Rong¹, NIU Yu-jie¹ (1. Department of Occupational and Environmental Health, School of Public Health, Hebei Medical University, Hebei 050017, China; 2. Department of Radiology, The Second Hospital of Hebei Medical University, Hebei 050000, China). Address correspondence to NIU Yu-jie, E-mail: yjniu@hebmh.edu.cn • The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract: [Objective] To study whether maternal pre-pregnant low-level lead exposure could affect skeletal calcium metabolism in newborn mice. [Methods] A group of six female Kunming mice were exposed to lead acetate in drinking water (10.0 mol/L, pure lead) for four weeks before pregnancy. Another six female Kunming mice were set as controls. At the postnatal day 21 and 60, three newborn mice from each group were neutralized to detect the levels of lead, calcium, and parathyroid hormone (PTH) in samples of femur, blood, and serum by graphite furnace atomic absorption spectrometry, flame atomic absorption spectrometry, and radioimmunoassay, respectively. [Results] On postnatal day 21, compared with the control offspring, the levels of blood calcium and femur calcium were significantly lower [(1.75±0.24) mmol/L and (10.17±1.03) mmol/g, respectively, $P<0.05$], the levels of blood lead, femur lead, and serum PTH were significantly elevated in the lead-treated newborn mice [(0.31±0.03) μmol/L, (57.24±4.65) nmol/g, and (3.40±0.74) μg/L respectively, $P<0.05$]. On postnatal day 60, compared with the postnatal day 21 results, the levels of blood calcium in the preconceptional-lead-exposed newborn mice were increased to (2.11±0.17) mmol/L, and there were no significant differences when compared with the control offspring ($P>0.05$); the levels of femur calcium and PTH were increased to (13.65±2.11) mmol/g and (5.91±0.85) μg/L, respectively, and there were significant differences compared with the corresponding indicators of the controls ($P<0.05$); the levels of femur lead were decreased to (45.04±7.62) nmol/g, and significantly higher than those of control offspring ($P<0.05$); the levels of blood lead [(0.29±0.02) μmol/L] were significantly higher than those of the control offspring ($P<0.05$) though little change was found versus the postnatal day 21 results. [Conclusion] Maternal preconceptional low-level lead exposure could affect skeletal calcium metabolism in newborn mice.

Key Words: low-level lead; newborn mouse; calcium; parathyroid hormone; skeleton; blood lead

DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2015.14347

[基金项目] 河北省科技厅科技支撑计划(编号: 132777140); 河北省计划生育委员会研究基金(编号: 2013-A09)

[作者简介] 宋波(1973—), 男, 硕士, 副教授; 研究方向: 神经毒理学; E-mail: songbootc@sohu.com

[通信作者] 牛玉杰, E-mail: yjniu@hebmh.edu.cn

[作者单位] 1. 河北医科大学公共卫生学院劳动卫生与环境卫生教研室, 河北 050017; 2. 河北医科大学附属第二医院放射科, 河北 050000

重金属铅对人体各系统的代谢均有一定影响,其进入人体后主要蓄积部位是骨骼,已有大量的研究证实其对骨骼的代谢具有破坏作用。本研究重点关注铅对母体、子代骨骼代谢的影响。本课题组以前的研究显示,孕前经低水平铅暴露的母鼠,其孕期、哺乳期的骨骼铅、钙含量、血钙水平明显下降,血铅水平明显上升,并且经进一步研究发现,这种改变可能与血清中的甲状旁腺激素(PTH)水平改变有关联^[1-3]。本次研究拟选取出生第21、60天的仔鼠作为观察对象,重点测定其骨组织的钙、铅水平,旨在探索经孕前低水平铅暴露母鼠的孕期及哺乳期的铅、钙代谢异常是否会影响子代骨骼钙代谢,并进一步探索其可能机制。孕前低水平铅暴露现象在我国较为普遍,本次研究将对预防孕期(宫内)重金属污染提供理论依据,对保护子代骨骼健康具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 主要仪器及试剂

TAS-990AFG型原子吸收分光光度计(北京普析通用仪器设备有限公司),CFH-986型石墨炉电加热器(北京普析通用仪器设备有限公司),SN-695A型智能放免 γ 测量仪(上海原子核研究所日环仪10-J),HY-105型PTH试剂盒(上海瑞齐生物科技有限公司),MDF-382F型超低温冰箱(青岛海尔集团公司),MDS型微波消解仪(上海新仪微波化学科技有限公司)。硝酸、过氧化氢、醋酸铅(优级纯,天津永大化学试剂有限公司),钙、铅标准储备液(1000 mg/mL)(北京标准物质研究所),三重蒸馏去离子水(自制)。

1.2 动物分组和处理

清洁级4周龄昆明小鼠24只,体重18~22 g,雄雌各半,来自于河北医科大学实验动物中心,动物合格证号为医动字1103025号。动物饲养于清洁的塑料笼内,木质垫料每日更换,通过塑料水瓶自由饮水。室温22~25℃,相对湿度50%~65%。所有小鼠在研究过程中均自由取食饲料。饲料来自于河北医科大学实验动物中心,含碳水化合物62%,蛋白质17%,脂肪12%,粗纤维3%,复合维生素2%,钙1.2%和2.8%其他复合矿物质。动物经1周的适应性饲养,12只雌鼠按随机数字表法随机分入铅暴露组和对照组。6只铅暴露组雌鼠饮用含10.36 mol/L醋酸铅 $[\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}]$ (铅元素含量为10.0 mol/L)的饮水,观察到每只小鼠平均每日饮水量为10~20 mL,故推算每只小鼠平均铅

暴露量为0.1~0.2 mol/d。本次研究中的铅暴露剂量基于本课题组以前的研究^[4],为低水平铅暴露范围。对照组6只雌鼠自由饮用去离子水。隔离饲养28 d后,雌鼠与雄鼠1:1同笼交配,同笼后均自由饮用去离子水至研究结束。通过检查阴栓、阴道涂片确定雌鼠是否受孕,观察到阴栓视为受孕第1天。母鼠受孕后立即单笼隔离饲养,仔鼠出生后由母鼠喂养至断乳。

1.3 铅、钙含量的测定

分别在仔鼠出生后第21、60天,即小鼠的断乳期、成熟期,自每窝中随机选取3只仔鼠处死取材,每组共18只仔鼠,日期分别记作D21, D60。对仔鼠进行称重,戊巴比妥腹腔注射麻醉(40 mg/kg),开腹经股动脉取全血约1.0 mL经抗凝处理备用。完整截取其左侧股骨,立即去除附属软组织, -70℃冰冻。约0.1 mL血液、0.3 g股骨(100℃烘干后称重)放入聚四氟乙烯管中,加入硝酸,过夜,加入0.5 mL过氧化氢,用微波消解仪消解对该混合液进行消解,后加热到120℃以去除残余的硝酸,至溶液无色透明为止,用2%硝酸定容至5.0 mL。使用石墨炉电加热-原子吸收分光光度计法测定铅含量,在283.3 nm波长处测定读数。方法同本课题组的前期研究^[5]。使用火焰原子吸收法在422.7 nm波长处测定钙含量。各阶段每组测定结果均采用每组18只鼠的算术均数。

1.4 测定血清中总PTH含量

动物麻醉后抽取0.7 mL全血,静置30 min,经3000 r/min离心10 min制备成血清, -70℃冰冻后待测。血清中总PTH含量测定采用放射免疫法,按上海瑞齐生物科技有限公司试剂盒说明,采用C末端测定法对184氨基酸序列的总PTH含量进行测定。

1.5 统计学分析

用SPSS for Windows, Version 13.0处理。本研究为成组设计的实验研究,两组间差异分析采用 t 检验,组内差异分析采用单因素方差分析,数值均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 一般情况

在不同阶段铅暴露组和对照组母鼠体重无明显差异($P>0.05$),每窝新生鼠6~11只,新生鼠的数量、重量、性别无明显差异($P>0.05$),无肉眼可见畸形出现,证实母鼠孕前期低水平铅暴露及怀孕模型建立成功。

2.2 仔鼠血钙、血铅含量的变化

在D21阶段,铅暴露组仔鼠的血钙水平明显低于对照组($P<0.05$),到D60阶段有所上升,达到(2.11 ± 0.17)mmol/L,但两组之间的差异无统计学意义($P>0.05$)。在D21阶段,铅暴露组仔鼠的血铅水平明显高于对照组($P<0.05$),到D60阶段为(0.29 ± 0.02) μ mol/L,与前期相比无明显改变($P>0.05$),仍然高于对照组($P<0.05$)。对照组仔鼠D60阶段的血钙、血铅水平与D21阶段相比无明显改变($P>0.05$)。见表1。

2.3 仔鼠骨钙、骨铅含量的变化

在D21阶段,铅暴露组仔鼠的骨钙水平明显低于对照组仔鼠($P<0.05$)。到D60阶段,两组仔鼠的骨钙水平均有所上升,铅暴露组达到(13.65 ± 2.11)mmol/g,仍明显低于对照组仔鼠($P<0.05$)。铅暴露组仔鼠的骨铅水平在D21阶段高于对照组仔鼠,到D60阶段有所下降,达到(45.04 ± 7.62)nmol/g,但仍明显高于对照组仔鼠($P<0.05$)。见表1。

2.4 仔鼠血清总PTH水平的变化

在D21阶段,铅暴露组仔鼠的血清总PTH水平为(3.40 ± 0.74) μ g/L,高于对照组仔鼠($P<0.05$)。在D60阶段,两组仔鼠的血清总PTH水平均有所上升,铅暴露组仔鼠达到(5.91 ± 0.85) μ g/L,仍明显高于对照组仔鼠($P<0.05$)。见表1。

表1 母鼠低水平铅暴露后仔鼠血钙、血铅水平变化情况

指标	<i>n</i>	对照组	铅暴露组
血钙 (mmol/L)			
D21	18	2.21 $\pm$ 0.21	1.75 $\pm$ 0.24*
D60	18	2.17 $\pm$ 0.15	2.11 $\pm$ 0.17 Δ
血铅 (μ mol/L)			
D21	18	0.14 $\pm$ 0.01	0.31 $\pm$ 0.03*
D60	18	0.12 $\pm$ 0.02	0.29 $\pm$ 0.02*
骨钙 (mmol/g)			
D21	18	13.21 $\pm$ 1.52	10.17 $\pm$ 1.03*
D60	18	17.54 $\pm$ 1.19 Δ	13.65 $\pm$ 2.11* Δ
骨铅 (nmol/g)			
D21	18	10.21 $\pm$ 1.02	57.24 $\pm$ 4.65*
D60	18	11.24 $\pm$ 1.58	45.04 $\pm$ 7.62* Δ
血清PTH (μ g/L)			
D21	18	2.25 $\pm$ 0.51	3.40 $\pm$ 0.74*
D60	18	4.17 $\pm$ 0.62 Δ	5.91 $\pm$ 0.85* Δ

[注]*: 与对照组比较, $P<0.05$ 。 Δ : 与同组D21比较, $P<0.05$ 。

3 讨论

2000年以后,中国禁止在汽油中添加四乙基铅,人群生活性铅接触水平大为降低。据流行病学调查表

明,我国妇女主要是通过化妆品、饮食等环节接触重金属铅,接触水平多属于低水平铅暴露^[6]。大多数妇女在孕期及哺乳期十分注重自我保护,孕期及哺乳期重金属暴露水平进一步降低。本课题组前期的研究显示,母鼠的血铅水平在哺乳期末大幅上升,较孕初期升高了65.22%,并且通过进一步实验推测,血铅水平的升高主要来自其自身骨骼的铅释放。本次试验进一步证实了母体血铅在孕期及哺乳期可以转移给子代,并且证实了母体孕前低水平铅暴露,即可影响子代的骨骼钙代谢。

本次研究通过孕前连续4周醋酸铅饮水,建立了母体孕前低水平铅暴露模型,观察了子代断乳期、成熟期的骨骼钙代谢规律,并且进一步探索了其可能机制。本研究中发现母体孕前低水平铅暴露,其子代血钙、骨钙水平在断乳期明显低于对照组,在成熟期血钙水平升高至对照组水平,但骨钙水平仍明显低于对照组水平,证实了子代骨骼钙代谢异常。同时研究中发现断乳期,铅暴露组仔鼠的骨铅水平明显高于对照组仔鼠,虽至成熟期有所下降,但仍明显高于对照组仔鼠,而其血铅水平一直明显高于对照组仔鼠,且在观察期内没有明显改变。显示母体血浆中的铅可以穿越胎盘屏障,也可以通过哺乳进入子代体内。推测本研究中子代骨骼钙代谢异常、铅水平上升,是由母体孕前低水平铅暴露造成的。已有研究显示,95%的铅进入人体后会在数周之内以磷酸铅的形式沉积在骨骼上,并在骨骼中长期贮存^[7-10]。在本研究中也观察到了相同的现象,铅在子代骨骼中的沉积,造成子代骨铅水平明显升高的同时,也造成了子代骨钙水平明显降低。

研究显示,骨铅在骨骼重建、骨代谢发生重大变化的过程中会重新释放入血^[11-13]。也有较为充分的研究资料显示,母体孕期、哺乳期会发生明显的骨骼铅动员入血的现象,较为一致的解释是母体为了弥补钙缺乏,动员骨骼钙入血,由于钙、铅有相似的代谢原理,骨骼铅同样被释放入血^[14-16]。本次研究结果证实,母体孕前低水平铅暴露,可加重母体在孕期、哺乳期骨骼铅释放入血的现象,从而加速了母代体内的铅进入到了子代体内,并沉积在子代骨骼中,引起了子代骨骼钙代谢异常。

断乳期后子代有了独立的钙代谢方式,为了维持正常的生理功能,通过释放骨骼钙来提高其血钙水平,所以本研究中观察到了其血钙水平上升的现象。

由于新生鼠的骨钙沉积过程快于其骨钙溶解过程,无法通过现有的方法观察到其骨钙溶解的现象,但观察到了其骨铅水平降低的现象,从而印证了骨钙入血的可能性。为了进一步证实断乳期后确实发生了骨钙溶解入血的现象。本研究中测定了血清PTH的水平。PTH是甲状旁腺主细胞合成和分泌的单链多肽激素,基因定位在11号染色体短臂,人体内源性PTH由84个氨基酸残基缩合而成,在甲状旁腺的内质网中合成。PTH的分泌主要受血钙浓度变化的调节:血钙浓度下降时,PTH分泌增加,动员体内骨骼钙入血^[17]。实验结果显示,母体孕前低水平铅暴露组、对照组仔鼠的血清PTH水平从断乳期到成熟期均明显升高,且铅暴露组明显高于对照组水平。推测PTH水平的上升反映了两组仔鼠断乳期后都处于骨骼钙代谢的活跃阶段,而两组之间的差异反映了母体孕前低水平铅暴露组仔鼠的骨钙溶解现象更为明显,显然这是血钙水平修复的需要。

本实验研究采用的研究方法和规模仍有局限性,本课题组将进一步深入工作,进行组织学、人群等方面的研究。

孕前低水平铅暴露并不是少见的现象,我们应该关注孕龄妇女低水平铅暴露问题,采取措施降低环境及饮食铅接触水平,并且保证孕期及哺乳期充足的钙摄入,以保护孕妇、胎儿及新生儿的骨骼健康。

·作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

参考文献

- [1] 宋波, 武柏林, 孙素菊, 等. 孕前低水平铅暴露对母鼠孕期及哺乳期骨转化的影响[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2012, 30(7): 493-496.
- [2] 宋波, 武柏林, 张荣, 等. 母鼠孕期及哺乳期骨骼铅及其甲状旁腺激素水平的关系[J]. 环境与职业医学, 2012, 29(3): 139-143.
- [3] 宋波, 武柏林, 孙素菊, 等. 孕期及哺乳期钙及维生素D3干预对骨骼铅动员影响的析因设计研究[J]. 环境与健康杂志, 2011, 10(10): 877-880.
- [4] 宋波, 韩长城, 孙侠, 等. 妊娠期母体低水平铅暴露对大鼠子代学习记忆能力的影响[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2006, 24(7): 399-402.
- [5] ZhANG R, LU H, TIAN S, et al. Protective effects of pregerminated brown rice diet on low levels of Pb-induced learning and memory deficits in developing rat[J]. Chemico-Biological Interactions, 2010, 184(3): 484-491.
- [6] 赖建强, 荫士安, 马冠生, 等. 孕期妇女营养与健康状况调查[J]. 营养学报, 2007, 29(1): 4-8.
- [7] Symanski E, Hertz-Picciotto I. Blood lead levels in relation to menopause, smoking, and pregnancy history[J]. Am J Epidemiol, 1995, 141(11): 1047-1058.
- [8] Harville EW, Schramm M, Watt-Morse M, et al. Calcium intake during pregnancy among white and African-American pregnant women in the United States [J]. J Am Coll Nutr, 2004, 23(1): 43-50.
- [9] King JC. Physiology of pregnancy and nutrient metabolism[J]. Am J Clin Nutr, 2000, 71(5 suppl): 1218-1225.
- [10] Sowers MF, Scholl T, Harris L, et al. Bone loss in adolescent and adult pregnant women[J]. Obstet Gynecol, 2000, 96(2): 189-193.
- [11] Dowd TL, Rosen JF, Gunderg CM, et al. The displacement of calcium from osteocalcin at submicromolar concentrations of free lead[J]. Biochim Biophys Acta, 1994, 1226(2): 131-37.
- [12] O'Flaherty EJ. Physiologically based models for bone-seeking elements. Rat skeletal and bone growth[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 1995, 131(2): 297-308.
- [13] Bergdahl IA, Stromberg U, Gerhardsson L, et al. Lead concentrations in tibial and calcaneal bone in relation to the history of occupational lead exposure[J]. Scand J Work Environ Health, 1998, 24(1): 38-45.
- [14] Campagna D, Huel G, Hellier G, et al. Negative relationships between erythrocyte Ca-pump activity and lead levels in mothers and newborns[J]. Life Sciences, 2000, 68(2): 203-215.
- [15] Zentner LE, Rondo PH, Duran MC, et al. Relationships of blood lead to calcium, iron, and vitamin C intakes in Brazilian pregnant women[J]. Clinical Nutrition, 2008, 27(1): 100-104.
- [16] Takser L, Mergler D, Lafond J. Very low level environmental exposure to lead and prolactin levels during pregnancy[J]. Neurotoxicol Teratol, 2005, 27(3): 505-508.
- [17] Zeni SN, Ortola Soler CR, Lazzari A, et al. Interrelationship between bone turnover markers and dietary calcium intake in pregnant women: a longitudinal study[J]. Bone, 2003, 33(4): 606-613.

(收稿日期: 2014-05-12)

(英文编辑: 汪源; 编辑: 王晓宇; 校对: 郑轻舟)