

铅染毒大鼠血、毛发及组织脏器铅指纹差异现象

曾静^{①②}, 闫赖赖^①, 欧阳荔^①, 吴晶^①, 王京宇^{①②*}

① 北京大学公共卫生学院, 北京 100191;

② 北京大学医药卫生分析中心, 北京 100191

* 联系人, E-mail: wjy@bjmu.edu.cn

2011-03-30 收稿, 2011-11-22 接受

国家自然科学基金(30972434)和科技部重大新药创制专项(2009ZX09502-027-4)资助

摘要 铅同位素比值可被作为“铅指纹”而由体内生物样品追溯外在铅污染源, 然其可靠性未见文献报告. 以往研究曾发现同一个体生物样品间铅同位素比值存在差异, 为确证此现象, 了解铅暴露后体内血、发及各组织脏器铅指纹与受试物铅指纹的一致性及染毒剂量对其的影响, 研究选取 32 只 SD 雄性大鼠分为 4 组分别按 0, 30.0, 60.0, 120.0 mg/kg 体重每天经消化道醋酸铅染毒 4 周, 用电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)测定其血、毛、肝、肾、股骨中的铅同位素比值. 结果显示: 血、发及各组织器官的铅指纹之间存在显著性差异($P < 0.05$). 血铅指纹与受试物原始铅指纹差异程度与染毒剂量有关, 而其他组织脏器铅指纹基本上不受染毒剂量影响. 发铅不适宜作为铅溯源的生物标志物, 而血铅相对更适于用来追溯外在铅污染源, 尤其在高铅浓度暴露下更为准确可靠. 该结果为铅同位素比值法进行生物样品铅溯源的研究提供了科学依据.

关键词

铅指纹
同位素比值
血
毛发
脏器
大鼠

铅污染及其防治是影响我国人口素质的重大课题, 其根本任务是查明铅污染源继而有效阻断污染. 铅因其 4 个同位素(^{204}Pb , ^{206}Pb , ^{207}Pb , ^{208}Pb)在次生过程中不易受温度、压力、pH 等作用而发生变化, 故其构成的 3 个同位素比值认为具有“指纹”特征, 据此可由体内“铅指纹”定性地追溯其外来铅污染源. 相比于传统流行病学方法, 通过质谱技术根据铅同位素比值进行铅溯源的方法因其定向性、准确、快速、低成本, 而具有巨大的发展潜力. 国外利用血、发、牙齿、骨等的铅同位素比值进行环境铅污染溯源的研究已有不少报道^[1-4], 国内尽管已有一些利用环境样品如 $\text{PM}_{2.5}$ 和植物样品如丹参进行的铅同位素溯源研究^[5-8], 但利用人体或动物样品进行铅溯源研究的报道仍很罕见.

在我们利用人体样品进行铅同位素指纹溯源的研究中, 曾观察到正常人群同一个体的血、尿、发及各脏器的铅指纹存在差异^[9,10], 这种指纹差异现象是否源于不同组织器官对铅同位素的选择性蓄积或分

流作用, 该作用是否与摄入剂量有关, 血铅与发铅作为铅溯源的生物标志物能否忠实地反映外源铅的原始同位素比值, 国内外均未见相关文献报道. 本研究拟通过对大鼠经消化道铅染毒, 测定其血、毛发及各组织器官中铅同位素比值, 来进一步证实动物是否也和人体一样在各组织间存在铅指纹差异现象, 并就其成因做初步探讨. 该研究将为铅同位素比值方法开展人体生物样品铅溯源研究提供科学依据.

1 材料与方法

(i) 试剂. 分析纯醋酸铅($\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), 美国国家标准局铅同位素标准物质 SRM-981, 电子纯级硝酸(71%)及双氧水(30%), 优级纯高氯酸(70%~72%), 18 M Ω cm 超纯水.

(ii) 分析方法. 4 周龄的健康 SD 雄性大鼠(80~100 g, 北京大学医学部动物实验中心提供, 饲养于 2 级环境, SPF 级基础低铅饲料), 适应性喂养一周, 剃除背毛后, 根据体重随机按每组 8 只分为 4 组:

英文版见: Zeng J, Yan L L, Ouyang L, et al. Differences in lead isotopic fingerprints between blood, hair and organs in lead-poisoned rats. Chin Sci Bull, 2012, 57, doi: 10.1007/s11434-011-4953-6

对照组、低剂量组、中剂量组、高剂量组。空白对照组饲以去离子水，其他各实验组采用醋酸铅去离子水溶液按 1.0 mL/100 g 体重经口灌胃染毒，每日一次，连续 4 周。低、中、高剂量组染毒剂量分别为 30.0, 60.0, 120.0 mg/kg 体重，根据体重同步调整灌胃量。

4 周后剃取大鼠背毛，乙醚麻醉，股动脉放血处死。取股动脉血约 4 mL 于低铅肝素锂抗凝管；摘取肝、肾、股骨等脏器，剔出结缔及脂肪组织，吸干血污，称重，置于聚乙烯袋中；所有样品于-20℃冰箱中保存。

(iii) 样品前处理。准确称取适量样品，置于消化杯中，加入消解用混合酸(HNO₃:HClO₄)适量，放置 12 h 后，于电热板逐步加热为 100℃~120℃~140℃~160℃~180℃，过程中适量补加 H₂O₂，达消解终点(冒白色烟雾)后，加入高纯水赶酸，冷却，去离子水转移，定容为消化液，测定前适度稀释。

(iv) 仪器测定。采用美国 Perkin Elmer 仪器有限公司(上海)Elan DRCII 型电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)在优化条件下对样品进行同位素 ²⁰⁴Pb, ²⁰⁶Pb, ²⁰⁷Pb 和 ²⁰⁸Pb 逐一扫描，以获得铅同位素比值。仪器条件：射频功率 1100 W，等离子气体流量 15 L/min，辅助气流量 1.85 L/min，雾化气流量 0.95 L/min，离子镜电压 6.1 V，脉冲电压 1100 V，跳峰扫描模式，扫描点数 150/reading，驻留时间 30 ms，重复次数 9。在优化条件下，10 ng/mL 铅标准溶液的同

位素比值 ²⁰⁴Pb/²⁰⁶Pb, ²⁰⁷Pb/²⁰⁶Pb, ²⁰⁸Pb/²⁰⁶Pb 测定 RSD 分别达到 0.27%, 0.12%, 0.13%。

通过 ²⁰¹Hg 校正分析过程中的同量异位素干扰和质量偏移，测定中每 5 个样品插入同位素标准物质 NISTSRM981 溶液监控仪器状态，采用 CAIS 内标校正法^[11,12]对基体效应和仪器漂移进行校正。

(v) 统计分析。应用 SPSS14.0 软件进行统计学分析，分别选用 One-way ANOVA 和 Paired *t* test 方法对不同剂量组间和不同组织器官铅同位素结果进行比较。

2 结果及讨论

2.1 不同剂量组铅指纹比较

表 1~3 给出了各剂量组大鼠组织脏器铅同位素比值测试分析结果，采用 One-way ANOVA 统计分析在显著性水平 $\alpha = 0.05$ 条件下比较同一脏器组织在剂量组间的差异。

由表 1 可知，对于同位素比值 ²⁰⁸Pb/²⁰⁶Pb，各样品在剂量组间存在显著性差异的有：全血的低剂量组与中剂量组($P < 0.01$)，低剂量组与高剂量组($P < 0.05$)；肝的低剂量组与中剂量组($P < 0.05$)，中剂量组与高剂量组($P < 0.01$)。染毒剂量对肾、股骨、毛的铅指纹 ²⁰⁸Pb/²⁰⁶Pb 均无显著影响($P > 0.05$)。

由表 2 可知，对于同位素比值 ²⁰⁷Pb/²⁰⁶Pb，各脏

表 1 各剂量组 ²⁰⁸Pb/²⁰⁶Pb 比较($n=8$)^{a)}

样品	分组	铅同位素比值		多重检验的 <i>P</i> 值		整体 <i>P</i> 值
		平均值	标准偏差	中剂量组	高剂量组	
全血	低剂量组	2.1032	0.0039	0.001**	0.026*	0.005**
	中剂量组	2.0955	0.0051			
	高剂量组	2.0981	0.0022			
肝	低剂量组	2.1038	0.0028	0.019*	0.079	0.001**
	中剂量组	2.0970	0.0075			
	高剂量组	2.1089	0.0046			
肾	低剂量组	2.1051	0.0032	0.400	0.266	0.158
	中剂量组	2.1069	0.0053			
	高剂量组	2.1027	0.0037			
股骨	低剂量组	2.1112	0.0052	0.364	0.149	0.156
	中剂量组	2.1080	0.0027			
	高剂量组	2.1065	0.0034			
毛	低剂量组	2.0926	0.0298	0.732	0.330	0.606
	中剂量组	2.0958	0.0095			
	高剂量组	2.1018	0.0053			

a) **表示 $P < 0.01$, *表示 $P < 0.05$

表2 各剂量组 $^{207}\text{Pb}/^{206}\text{Pb}$ 比较($n=8$)^{a)}

样品	分组	铅同位素比值		多重检验的 P 值		整体 P 值
		平均值	标准偏差	中剂量组	高剂量组	
全血	低剂量组	0.8593	0.0020	0.135	0.044*	0.112
	中剂量组	0.8581	0.0018		0.513	
	高剂量组	0.8575	0.0005			
肝	低剂量组	0.8571	0.0016	0.041*	0.305	0.117
	中剂量组	0.8555	0.0010		0.301	
	高剂量组	0.8563	0.0015			
肾	低剂量组	0.8564	0.0018	0.934	0.542	0.501
	中剂量组	0.8568	0.0009		0.677	
	高剂量组	0.8577	0.0023			
股骨	低剂量组	0.8571	0.0013	0.515	0.692	0.374
	中剂量组	0.8581	0.0018		0.989	
	高剂量组	0.8585	0.0038			
毛	低剂量组	0.8860	0.0430	0.460	0.304	0.146
	中剂量组	0.8647	0.0025		0.002**	
	高剂量组	0.8596	0.0019			

a) **表示 $P < 0.01$, *表示 $P < 0.05$

表3 各剂量组 $^{204}\text{Pb}/^{206}\text{Pb}$ 比较($n=8$)^{a)}

样品	分组	铅同位素比值		多重检验的 P 值		整体 P 值
		平均值	标准偏差	中剂量组	高剂量组	
全血	低剂量组	0.0548	0.0004	0.999	0.997	0.872
	中剂量组	0.0548	0.0002		0.930	
	高剂量组	0.0548	0.0001			
肝	低剂量组	0.0548	0.0002	0.461	0.470	0.693
	中剂量组	0.0548	0.0001		0.991	
	高剂量组	0.0548	0.0001			
肾	低剂量组	0.0544	0.0002	0.006**	0.109	0.0203*
	中剂量组	0.0546	0.0002		0.177	
	高剂量组	0.0545	0.0001			
股骨	低剂量组	0.0545	0.0001	0.299	0.203	0.394
	中剂量组	0.0545	0.0001		0.806	
	高剂量组	0.0545	0.0002			
毛	低剂量组	0.0541	0.0014	0.425	0.455	0.665
	中剂量组	0.0544	0.0002		0.959	
	高剂量组	0.0544	0.0002			

a) **表示 $P < 0.01$, *表示 $P < 0.05$

器剂量组间检验后整体 $P > 0.05$, 说明各剂量组间均无显著性差异.

由表3可知, 对于同位素比值 $^{204}\text{Pb}/^{206}\text{Pb}$, 仅肾的低剂量组与中剂量组之间存在显著性差异 ($P < 0.05$).

综合以上结果, 所测5种脏器组织3个剂量组在3个同位素比值方向上共45对比较中, 仅血、肝、肾剂量组的5对比较存在显著性差异 ($P < 0.05$), 其余各

组织脏器各铅同位素比值均不存在剂量组间的显著差异, 说明总体上体内铅指纹保持稳定, 3个同位素比值中 $^{207}\text{Pb}/^{206}\text{Pb}$ 最为稳定, 所有脏器组织在此比值上随剂量均无显著差异 ($P > 0.05$); 而各脏器中股骨的铅同位素比值最为稳定, 在所有铅同位素比值上均不随染毒剂量组发生显著变化.

结果显示, 不同剂量组的血铅同位素比值会随着受试物铅浓度的变化而变化, 而其他大部分被测

组织脏器的铅指纹则与染毒剂量无关. 由表 1~3 可见, 在低剂量组, 大鼠血铅同位素比值与受试物血铅同位素比值相差较远, 而随着剂量加大, 两者之间的差异越来越小, 几乎消失. 上述结果使我们得出如下假设: (a) 血液作为经消化道染毒进入大鼠体内的铅的第一道屏障, 对于摄入的铅具有一定的选择性蓄积或者分流作用, 而同时又存在一个“选择性蓄积能力或分流能力阈值”. 而当受试物剂量逐步增加, 突破了血液的分流能力阈值之后, 血液与受试物同位素比值之间的差距逐步缩小; (b) 血液将外源性铅输送到各个组织器官, 经过血液缓冲的铅抵达各个组织器官后将不会对相对应的“阈值”产生冲击, 故所蓄积的铅同位素比值相对稳定, 不受受试物剂量的影响. 上述假设有待进一步实验证实.

2.2 不同组织脏器铅指纹比较

血、毛发及各组织脏器铅指纹的差异比较采用配对 *t* 检验进行分析. 对于铅指纹在剂量组间无显著差异的生物样品, 合并各剂量组数据后进行分析, 表 4~6 分别给出了样品在 $^{208}\text{Pb}/^{206}\text{Pb}$, $^{207}\text{Pb}/^{206}\text{Pb}$ 和 $^{204}\text{Pb}/^{206}\text{Pb}$ 上的比较结果.

由表 4 可知, 对于铅同位素比值 $^{208}\text{Pb}/^{206}\text{Pb}$, 血-肝、血-肾、血-骨间均存在显著差异, 毛-血、毛-肝在任何一个剂量组均不存在显著差异, 肾、股骨、毛任意两者之间均存在显著性差异.

由表 5 可知, 对于铅同位素比值 $^{207}\text{Pb}/^{206}\text{Pb}$, 各组织脏器合并剂量组后进行比较发现, 除血-股骨、血-毛、肝-肾外, 其余任两组织脏器间均有显著性差异 ($P < 0.05$).

由表 6 可知, 各组织脏器剂量组合并后对铅同位素比值 $^{204}\text{Pb}/^{206}\text{Pb}$ 比较发现: 除血-肝、肾-股骨、肾-毛、股骨-毛外, 其他各组织脏器间铅同位素比值均存在显著性差异 ($P < 0.05$). 综合以上结果, 各组织脏器铅指纹在 10 对两两比较中, 在 3 个同位素比值上均存在显著性差异有两对: 血-肾、肝-股骨; 在两个同位素比值上存在显著性差异的有 6 对: 血-肝、血-股骨、肝-毛、肾-股骨、肾-毛、股骨-毛; 在一个铅同位素比值方向上存在显著差异的有两对: 血-毛、肝-肾. 说明各组织脏器铅指纹差异普遍存在, 至少有一个铅同位素比值可将其两两区分. 与以往发现的同一人体指纹差异现象相类似, 大鼠血、毛发及各组织器官之间的铅同位素比值也具有显著性差异.

表 4 血、毛发及各组织脏器 $^{208}\text{Pb}/^{206}\text{Pb}$ 比较^{a)}

样品对	配对 <i>t</i> 检验 <i>P</i> 值			
	总实验组	低剂量组	中剂量组	高剂量组
血-肝	0.050*	0.609	0.721	0.002**
血-肾	0.001**	0.384	0.011*	0.031*
血-股骨	0.000**	0.037*	0.000**	0.004**
血-毛	0.440	0.274	0.939	0.211
肝-肾	0.349	0.303	0.003**	0.019*
肝-股骨	0.007**	0.011*	0.007**	0.374
肝-毛	0.112	0.313	0.720	0.072
肾-股骨	0.005**	-	-	-
肾-毛	0.033*	-	-	-
股骨-毛	0.007**	-	-	-

a) **表示 $P < 0.01$, *表示 $P < 0.05$, “-”表示在该脏器此铅同位素比值不受剂量影响, 合并各剂量

表 5 血、毛发及各组织脏器 $^{207}\text{Pb}/^{206}\text{Pb}$ 比较^{a)}

样品对	配对 <i>t</i> 检验 <i>P</i> 值			
	总实验组	低剂量组	中剂量组	高剂量组
血-肝	0.000**	-	-	-
血-肾	0.009**	-	-	-
血-股骨	0.490	-	-	-
血-毛	0.050	-	-	-
肝-肾	0.279	-	-	-
肝-股骨	0.034*	-	-	-
肝-毛	0.019*	-	-	-
肾-股骨	0.048*	-	-	-
肾-毛	0.025*	-	-	-
股骨-毛	0.038*	-	-	-

a) **表示 $P < 0.01$, *表示 $P < 0.05$, “-”表示在该脏器此铅同位素比值不受剂量影响, 合并各剂量组

表 6 血、毛发及各组织脏器 $^{204}\text{Pb}/^{206}\text{Pb}$ 比较^{a)}

样品对	配对 <i>t</i> 检验 <i>P</i> 值			
	总实验组	低剂量组	中剂量组	高剂量组
血-肝	0.774	-	-	-
血-肾	0.000**	0.041*	0.137	0.002**
血-股骨	0.000**	-	-	-
血-毛	0.023*	-	-	-
肝-肾	0.000**	0.014*	0.002**	0.004**
肝-股骨	0.000**	-	-	-
肝-毛	0.005**	-	-	-
肾-股骨	0.853	0.298	0.264	0.642
肾-毛	0.289	0.618	0.026*	0.180
股骨-毛	0.242	-	-	-

a) **表示 $P < 0.01$, *表示 $P < 0.05$, “-”表示在该脏器此铅同位素比值不受剂量影响, 合并各剂量组

而此现象的相关报道极为罕见,其产生机理更不知晓.以下仅仅为初步假设:不同的组织器官有着各自不同的物理、化学和生物学特性,诸如不同的膜电位、通透性和离子通道等等,故而可能对铅的某一同位素产生选择性蓄积或滤过,进而导致各组织器官铅指纹差异现象.在动物体内发现不同组织器官间的铅同位素比值差异为首次报道,目前尚缺少国内外可参考资料,以上假设还有待进一步的研究工作加以证实.

2.3 血、毛发及各组织脏器与受试物铅指纹比较

分别以 $^{207}\text{Pb}/^{206}\text{Pb}$, $^{204}\text{Pb}/^{206}\text{Pb}$, $^{208}\text{Pb}/^{206}\text{Pb}$ 中任两个比值为 X 和 Y 坐标轴,可以绘制出 3 个血、毛发及

组织脏器铅指纹分布图,将其与受试物原始铅指纹(平均值, $n=5$)进行比较.以 $^{207}\text{Pb}/^{206}\text{Pb}$, $^{204}\text{Pb}/^{206}\text{Pb}$ 作 X, Y 轴的分布图为例,说明总实验组(图 1)、低剂量组、中剂量组、高剂量组中(图 2)各组织脏器和受试物铅指纹比较的情况.

由图 1 可见,血、毛发及各组织脏器铅同位素比值分布在以受试物原始铅指纹为中心的椭圆形范围内,并有各种特征区域,例如:肝脏中铅同位素比值大都分布在受试物左上方;肾脏中铅同位素比值则分布在受试物左下方;股骨中铅同位素比值分布在受试物右下方;而毛发中铅同位素比值分布在距离受试物较远的右下方;全血中铅同位素比值基本上分布在以受试物为中心的椭圆区域内.从不同剂量

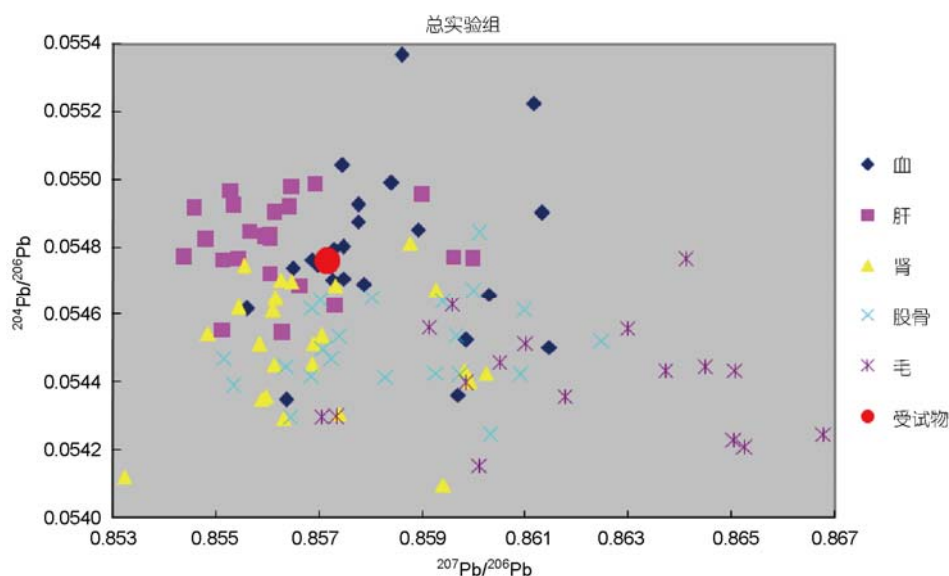


图 1 总实验组大鼠血、毛发及组织脏器 $^{204}\text{Pb}/^{206}\text{Pb}$ vs. $^{207}\text{Pb}/^{206}\text{Pb}$ 分布图

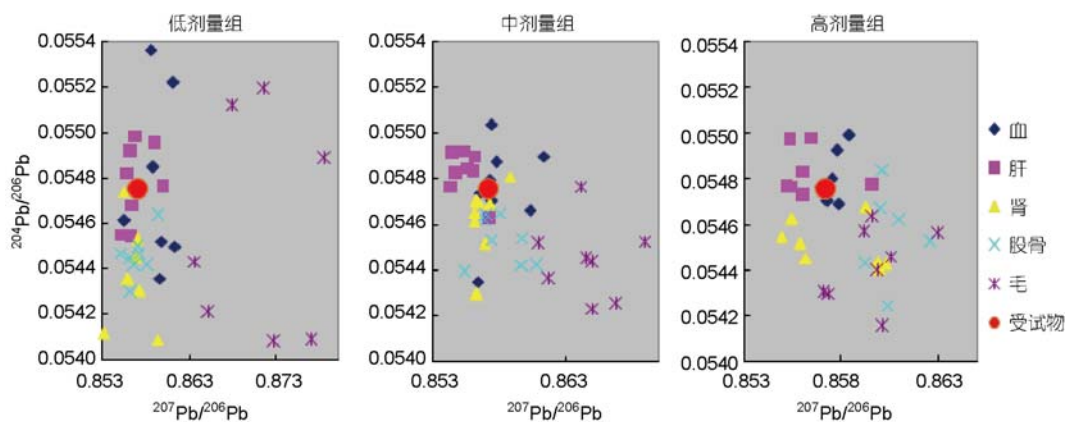


图 2 低、中、高剂量组大鼠血、毛发及组织脏器 $^{204}\text{Pb}/^{206}\text{Pb}$ vs. $^{207}\text{Pb}/^{206}\text{Pb}$ 分布图

组的分布图中(图 2)更清晰地看到,随着染毒剂量的增加,全血中铅同位素比值分布点由分散逐渐集中,在高剂量组,全血的同位素比值非常集中地分布受试物周围,且相对于其他组织脏器与受试物原始铅指纹最为接近。

以上现象进一步提示,铅进入大鼠体内后有可能会在不同的组织器官间产生一定的分流,从而通过动物实验进一步证实了曾经在人群实验中观察到的同体血、尿、发、组织器官铅指纹的差异现象。各个组织器官的铅指纹在反映外源性铅指纹时符合程度不同,发铅指纹因其与受试物原始铅指纹差异较大而不适宜作为铅溯源的生物标志物,而血铅因其可靠性和易得性更适于用作体内铅指纹代表来追溯外在铅污染源,

且在高剂量铅暴露下,更为准确可靠。

3 结论

(i) 经消化道染毒大鼠血、毛发及组织器官之间存在铅指纹差异现象。

(ii) 血铅指纹与受试物的铅指纹的差异程度与染毒剂量有关;而其他组织脏器铅指纹基本上不受染毒剂量影响。

(iii) 毛发铅不适宜作为铅溯源的生物标志物,而血铅同位素比值则相对更适于用来追溯外在铅污染源,在高铅浓度暴露条件下更是如此。

(iv) 大鼠血、毛发及组织器官间的铅同位素比值差异现象为首次报道,且有待进一步证实。

参考文献

- 1 Onishchuk N A, Khodzher T V, Chebykin E P, et al. Lead and its isotopic ratios in atmospheric precipitation in the Baikal region and Primorski Krai. *Geogr Nat Resour*, 2009, 30: 345-349
- 2 Deconinck E, Nederkassel A M, Stanimirova I, et al. Isotopic ratios to detect infringements of patents or proprietary processes of pharmaceuticals: Two case studies. *J Pharm Biomed Anal*, 2008, 48: 27-41
- 3 Gulson B, Mizon K, Korsch M, et al. Changes in the lead isotopic composition of blood, diet and air in Australia over a decade: Globalization and implications for future isotopic studies. *Environ Res*, 2006, 100: 130-138
- 4 Leonard J S T, Bruce C W, Ian D M, et al. The identification of lead ammunition as a source of lead exposure in First Nations: The use of lead isotope ratios. *Sci Total Environ*, 2008, 393: 291-298
- 5 Cheng H, Hu Y A. Lead (Pb) isotopic fingerprinting and its applications in lead pollution studies in China: A review. *Environ Pollut*, 2010, 158: 1134-1146
- 6 Li X, Zhu J, Guo P, et al. Preliminary study on the source of PM10 aerosol particles in the atmosphere of Shanghai City by analyzing single aerosol particles. *Nucl Instrm Methods Phys Res, Sect B*, 2003, 210: 412-417
- 7 黄志勇, 杨妙峰, 庄峙厦, 等. 利用铅同位素比值判断丹参不同产地来源. *分析化学*, 2003, 31: 1036-1039
- 8 陈曦, 刘景秀, 王小燕, 等. ICP-MS 用于北京市 PM2.5 中铅及其同位素的形态分析. *光谱学与光谱分析*, 2009, 29: 515-518
- 9 刘景秀, 王小燕, 曾静, 等. 同体儿童血发铅浓度及同位素比值分析. *卫生研究*, 2009, 38: 375-377
- 10 刘景秀, 曾静, 王小燕, 等. 成人血和尿铅浓度和同位素比值的分析及地域影响研究. *中国食品卫生杂志*, 2007, (40): 297-299
- 11 曾静, 王小燕, 欧阳荔, 等. CAIS 法校正 ICP MS 测定血铅浓度及同位素比值基体效应的研究. *光谱学与光谱分析*, 2007, 27: 374-377
- 12 杨乐, 曾静, 王小燕, 等. ICP-MS 测定血中镁、铜、铅浓度时的基体效应单一内标校正方法研究. *光谱学与光谱分析*, 2010, 30: 518-522