

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.04.002  
文章编号: 1005-8982(2019)04-0009-05

## 低含量含砷水暴露对子代鼠生长和发育的影响\*

万君<sup>1</sup>, 柯红<sup>2</sup>, 王磊<sup>3</sup>, 洪小平<sup>1</sup>, 吴莉<sup>2</sup>, 崔洁<sup>1</sup>

[1. 三峡大学第三临床医学院(葛洲坝集团中心医院)药学部, 湖北宜昌 443002; 2. 三峡大学第三临床医学院(葛洲坝集团中心医院)肿瘤科, 湖北宜昌 443002; 3. 三峡大学医学院病原生物学部, 湖北宜昌 443002]

**摘要: 目的** 探讨饮水中低含量砷对小鼠生长和发育的影响。**方法** 小鼠交配受孕后, 给予纯净水(对照组)或 10 μg/L 砷水(砷暴露组)饲养小鼠, 评价母鼠生产结果、第1代幼鼠生长及健康状况。**结果** 对照组和砷暴露组产仔数、孕龄及幼崽(包括存活和死亡)出生重量比较, 差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。出生后 10 和 22 天砷暴露组子代鼠体重低于对照组( $P < 0.05$ ), 表明出生后砷暴露组子代鼠生长发育减缓。妊娠第 15.5 天时, 砷暴露组母鼠脂肪肝发生率为 55.5% (5/9) 高于对照组的 0.0% (0/9) ( $P < 0.05$ )。**结论** 母鼠及其第1代子鼠暴露于低含量含砷水(含量符合我国当前饮用水标准)对第1代子鼠的关键生长发育期产生不良影响。

**关键词:** 砷; 环境暴露; 小鼠; 生长和发育; 健康状况

**中图分类号:** R174

**文献标识码:** A

## Effects of treatment of low arsenic-containing on growth and development of offspring mice\*

Jun Wan<sup>1</sup>, Hong Ke<sup>2</sup>, Lei Wang<sup>3</sup>, Xiao-ping Hong<sup>1</sup>, Li Wu<sup>2</sup>, Jie Cui<sup>1</sup>

(1. Department of Pharmacy, Gezhouba Group Central Hospital of the Third Clinical Medical College of China Three Gorges University, Yichang, Hubei 443002, China; 2. Department of Oncology, Gezhouba Group Central Hospital of the Third Clinical Medical College of China Three Gorges University, Yichang, Hubei 443002, China; 3. Department of Pathogenic Biology, Medical College of China Three Gorges University, Yichang, Hubei 443002, China)

**Abstract: Objective** To study the effect of low arsenic-containing in drinking water on growth and development of mice. **Methods** Clean water (control group) or 10 μg/L arsenic water (arsenic exposure group) was fed to pregnant mice to evaluate the maternal results, growth and health of the first generation. **Results** There were no statistically significant difference in litter size, gestational age, and birth weight (including survival and death) between the control group and the arsenic exposure group ( $P > 0.05$ ). The weight of the offspring after the 10 days and 22 days in arsenic exposure group was lower than that in the control group ( $P < 0.05$ ), indicating that the growth and development of the offspring of the arsenic exposure group significantly were slowed down after birth. On the 15.5 day of gestation, the incidence of fatty liver was 55.5% (5/9) in maternal mice in arsenic exposure group, and that was 0% (0/9) in the control group. The incidence of fatty liver in the arsenic exposed group was higher than that in the control group ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** Exposure to low arsenic content (in accordance with current drinking water standards in China) produces adverse outcomes in the critical growth and development period of the first generation mice.

**Keywords:** arsenic; environmental exposure; mice; growth and development; health

收稿日期: 2018-08-04

\* 基金项目: 湖北省卫生计生科研基金(No: WJ2017F085); 三峡大学青年科学基金项目(No: KJ2016A018)

[通信作者] 崔洁, E-mail: cuijie6758@163.com

流行病学研究表明, 砷暴露与不良生殖 / 发育结果有关<sup>[1]</sup>。此外, 妊娠时砷暴露引起胎鼠出生体重、存活率降低, 自发性流产等发病率升高, 但是砷暴露引起人类疾病发生的机制尚不清楚<sup>[1-2]</sup>。由于存在致癌风险, 目前我国《生活饮用水卫生标准》(GB 5749-2006) 已将砷限值提高至  $\leq 10 \mu\text{g/L}$  (10 ppb)<sup>[3]</sup>。但目前 GB 5749-2006 标准中的低剂量砷对孕妇和婴儿等易感人群的影响尚无共识<sup>[4]</sup>。本研究复制早期砷暴露小鼠模型, 旨在观察发育关键期低水平砷暴露对小鼠生长、发育的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物与分组

C57BL/6J 小鼠购自广州赛业生物科技有限公司, 交配前 2 周采用 AIN-76A 饲料喂养小鼠。检测到小鼠交配受孕后, 给予洁净水 (对照组) 或 10 ppb 砷水 (砷暴露组) 饲养小鼠, 直至其完成妊娠和哺乳, 雄性小鼠交配前未暴露于砷。分娩后, 砷暴露组母鼠进一步分为 3 组: ① 出生后砷暴露组 (A 组, 子代鼠出生后 1 ~ 30 d 暴露于 10 ppb 砷饮用水); ② 子宫内砷暴露组 (B 组, 子代鼠出生前暴露于 10 ppb 砷饮用水); ③ 子宫内和出生后砷暴露组 (C 组, 子代鼠出生前至出生后 30 d 内暴露于 10 ppb 砷饮用水)。从妊娠第 18 天开始, 监测 2 次 / d, 密切观察母鼠分娩情况。子代鼠出生后第 22 天断奶, 并根据分组饮用洁净水或  $10 \mu\text{g/L}$  砷水。妊娠期第 15.5 天或哺乳期间不同时间点处死部分母鼠, 进行尸检; 产后第 10、22 和 42 天处死部分子代鼠, 进行尸检。将各组部分 (3 ~ 6 只) 小鼠置于代谢笼饲养 24 h, 在指定时间点收集尿液, 并测定饮用水摄入量。

### 1.2 砷暴露

将亚砷酸钠溶于灭菌双蒸水配制成 10 ppb 浓度的饮用水。采用高效液相色谱仪检测最终溶液中的砷浓度, 饮用水更换 2 次 / 周。

### 1.3 记录子代鼠生长情况

母鼠分娩时, 记录幼崽长度、幼崽数量、平均幼崽重量 (平均幼崽重量 = 所有幼崽总重 / 幼崽数)、死亡幼崽数和畸形幼崽数。产后记录子代鼠重量 (g) 至 28 d。

### 1.4 肝脏组织 HE 染色

不同时间点处死母鼠和子代鼠后, 游离肝脏, 用甲醛 (上海国药集团化学有限公司) 固定后, 石蜡包

埋切片, 行 HE 染色 (武汉博士得公司)。

### 1.5 蛋白质浓度测定

产后 10 ~ 12 d, 将母鼠与幼鼠分离 6 h 使母乳积聚。按照 0.1 ml/30 g 体重的比例, 肌内注射氯胺酮 - 甲苯噻嗪混合物 (9 : 1) 麻醉母鼠, 同时注射 1 ml 催产素。通过手刺激小鼠乳头挤奶, 用移液管收集。母乳储存于  $-20^\circ\text{C}$  冰箱备用。母乳用 PBS 稀释, 采用二喹啉甲酸蛋白含量测定试剂盒 (上海生工生物工程股份有限公司) 测定母乳中蛋白质浓度。

### 1.6 三酰甘油的检测

采用自动生化仪 (日本奥林巴斯公司) 测定母鼠母乳 (1 : 160 稀释)、肝组织匀浆 (1 : 20 稀释) 和血清 (1 : 2 稀释) 中甘油三酯 (Triglyceride, TG) 的浓度。

### 1.7 电感耦合等离子体质谱分析

采用电感耦合等离子体质谱 (ICP-MS) (德国西门子公司) 测量母乳 (5 只)、幼崽胃部 (6 只)、母鼠尿 (3 只) 和胎盘 (3 只) 中微量元素总浓度。胎盘、胃和母乳样品在  $70^\circ\text{C}$  条件下用 0.3 ~ 0.5 ml 最适  $\text{HNO}_3$  消化, 然后加入 0.05 ~ 0.10 ml 双氧水  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 并将消化样品稀释至 3 ml (胃和母乳) 或 5 ml (胎盘) 终体积。

### 1.8 统计学方法

数据分析采用 SPSS 20.0 统计软件, 计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 比较用单因素方差分析, 进一步两两比较用 LSD- $t$  检验; 计数资料以率表示, 比较用 Fisher 确切概率法,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 分娩结果

对照组产仔数 ( $7.5 \pm 0.3$ ) 只, 砷暴露组 ( $7.4 \pm 0.3$ ) 只, 经  $t$  检验, 差异无统计学意义 ( $t = 1.341$ ,  $P = 0.336$ )。对照组孕龄 ( $20.2 \pm 0.3$ ) d, 砷暴露组 ( $19.6 \pm 0.4$ ) d, 经  $t$  检验, 差异无统计学意义 ( $t = 0.942$ ,  $P = 0.573$ )。对照组幼崽 (包括存活和死亡) 平均重量 ( $1.28 \pm 0.01$ ) g, 砷暴露组 ( $1.26 \pm 0.02$ ) g, 经  $t$  检验, 差异无统计学意义 ( $t = 0.963$ ,  $P = 0.566$ )。以上研究结果提示, 对照组和砷暴露组分娩结果差异无统计学意义。

### 2.2 子代鼠生长情况

出生后第 10 天对照组及 A、B、C 组小鼠体重

分别为  $(5.33 \pm 1.82)$ 、 $(3.54 \pm 0.93)$ 、 $(3.82 \pm 1.04)$  和  $(4.01 \pm 1.16)$  g, 经方差分析, 差异有统计学意义 ( $F=58.782, P=0.000$ )。进一步两两比较经 LSD-*t* 检验, A、B、C 组子代鼠体重均低于对照组 ( $P<0.05$ ); 而 A、B、C 组间子代鼠体重比较, 差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ), 表明出生后第 10 天砷暴露组 (A、B、C 组) 子代鼠生长减缓。见图 1。

出生后第 22 天 (断奶时) 对照组及 A、B、C 组小鼠体重分别为  $(10.84 \pm 1.32)$ 、 $(7.01 \pm 1.14)$ 、 $(8.23 \pm 1.35)$  和  $(7.28 \pm 1.17)$  g, 经方差分析, 差异有统计学意义 ( $F=973.614, P=0.000$ )。进一步两两比较经 LSD-*t* 检验, A、B、C 组子代鼠体重均低于对照组 ( $P<0.05$ ), 而 A、B、C 组间子代鼠体重比较, 差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ), 表明出生后 22 天砷暴露组 (A、B、C 组) 子代鼠生长减缓。见图 1。

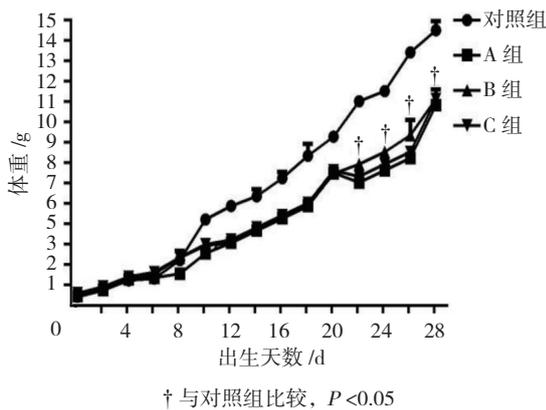


图 1 砷暴露对子代鼠生长发育的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

### 2.3 胎盘、母乳、幼崽胃和尿砷浓度比较

砷暴露组胎盘、母乳和幼崽胃砷含量接近检出限值。对照组未受孕小鼠尿砷含量  $(11.5 \pm 5.2)$   $\mu\text{g/L}$ , 暴露组  $(56.0 \pm 13.1)$   $\mu\text{g/L}$ , 经 *t* 检验, 差异有统计学意义 ( $t=9.913, P=0.000$ ) (见图 2)。

受孕第 15.5 天时, B 组胎盘砷含量  $(1.2 \pm 0.4)$  ng/g, 对照组  $(1.0 \pm 0.5)$  ng/g, 经 *t* 检验, 差异无统计学意义 ( $t=0.974, P=0.351$ ) (见图 3A)。受孕第 15.5 天时, B 组母乳尿砷含量  $(26.7 \pm 6.9)$   $\mu\text{g/L}$ , 对照组  $(6.9 \pm 2.5)$   $\mu\text{g/L}$ , 经 *t* 检验, 差异有统计学意义 ( $t=12.715, P=0.000$ ), B 组母乳尿砷含量高于对照组 (见图 3B)。

出生后第 10 天, 对照组及 A、B、C 组幼崽胃砷含量分别为  $(0.6 \pm 0.3)$ 、 $(2.1 \pm 0.5)$ 、 $(0.9 \pm 0.4)$

及  $(2.7 \pm 1.0)$  ng/g, 经方差分析, 差异有统计学意义 ( $F=15.412, P=0.000$ )。进一步两两比较经 LSD-*t* 检验, A、C 组幼崽胃砷含量高于对照组 ( $P<0.05$ ) (见图 4A)。对照组及 A、B、C 组母乳砷含量分别为  $(1.66 \pm 0.7)$ 、 $(1.72 \pm 0.43)$ 、 $(1.58 \pm 0.34)$  及  $(1.62 \pm 0.57)$  ng/g, 经方差分析, 差异无统计学意义 ( $F=0.444, P=0.971$ ) (见图 4B)。出生后第 10 天, 对照组及 A、B、C 组母乳尿砷含量分别为  $(4.83 \pm 1.12)$ 、 $(6.13 \pm 1.37)$ 、 $(18.24 \pm 2.82)$ 、 $(19.33 \pm 1.97)$   $\mu\text{g/L}$ , 经方差分析, 差异有统计学意义 ( $F=137.641, P=0.000$ )。进一步两两比较经 LSD-*t* 检验, B、C 组母乳尿砷含量高于对照组 ( $P<0.05$ ) (见图 4C)。出生后第 22 天, 对照组及 A、B、C 组幼崽胃砷含量分别为  $(4.72 \pm 1.34)$ 、 $(5.14 \pm 1.28)$ 、 $(4.83 \pm 1.08)$ 、 $(4.58 \pm 0.94)$  ng/g, 经方差分析, 差异无统计学意义 ( $F=0.197, P=0.882$ ) (见图 4D)。

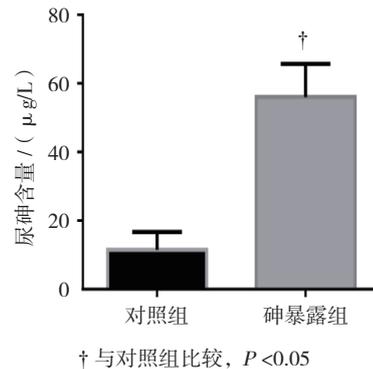


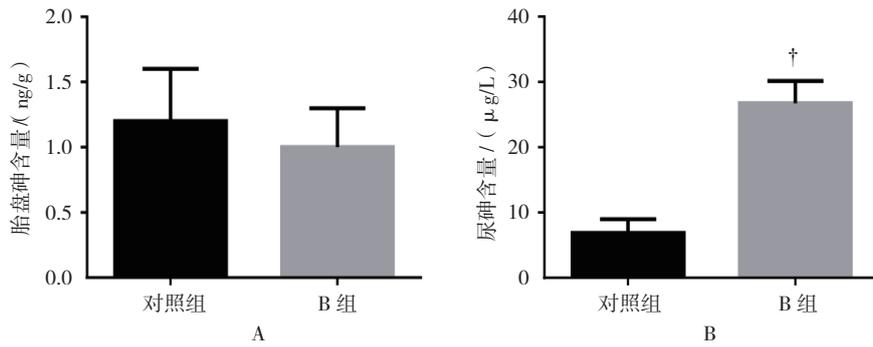
图 2 对照组与砷暴露组未受孕小鼠尿砷含量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

### 2.4 母乳营养物质改变

母乳喂养的砷暴露组幼崽体重在出生后早期 (出生后前 10 天) 增加不明显, 出现生长缺陷, 可能与母乳成分改变有关。4 组母乳总蛋白含量比较, 经方差分析, 差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。4 组母乳 TG 比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ); 进一步两两比较经 LSD-*t* 检验, 砷暴露组母乳 TG 浓度低于对照组 ( $P<0.05$ )。见附表。

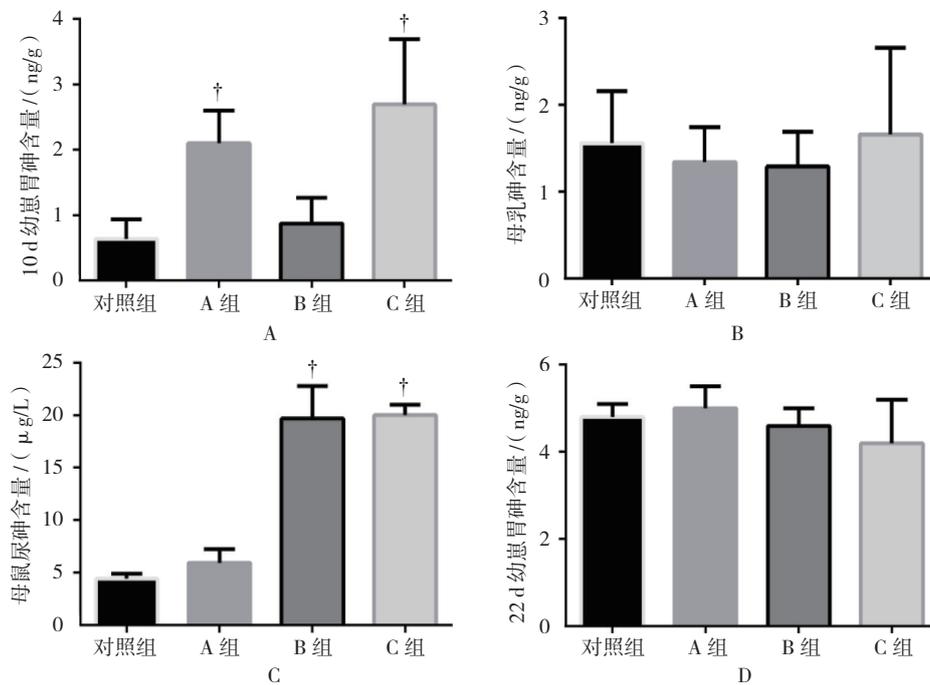
### 2.5 砷对母鼠和子代鼠肝脏脂肪变性的影响

妊娠第 15.5 天时, 砷暴露组母鼠脂肪肝发生率为 55.5% (5/9), 对照组母鼠为 0.0% (0/9), 经 Fisher 确切概率法, 差异有统计学意义 ( $P=0.029$ ), 砷暴露组脂肪肝发生率高于对照组。肝脂肪变性经病理组织学检查确诊 (见图 5A、B)。所有暴露组小鼠出生后第 22 天时未观察到肝脂肪变性, 表明砷对肝的影响是暂时的 (见图 5C、D)。



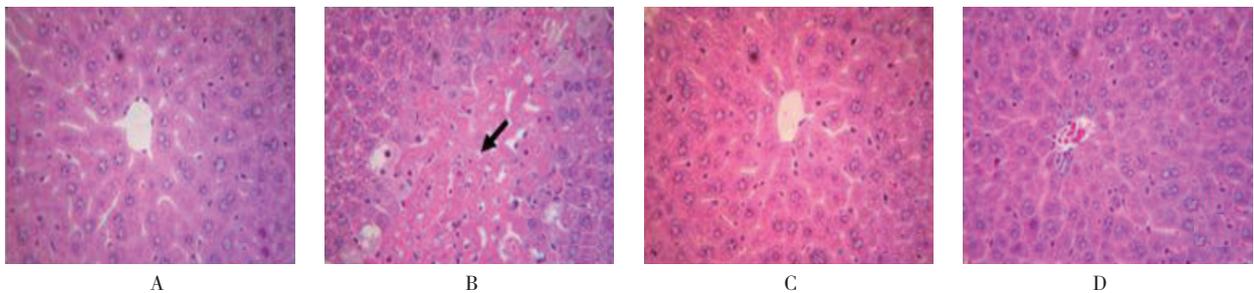
A: 对照组与 B 组小鼠受孕第 15.5 天胎盘砷含量比较; B: 对照组与 B 组小鼠受孕第 15.5 天尿砷含量比较。† 与对照组比较,  $P < 0.05$

图 3 对照组与 B 组小鼠受孕第 15.5 天砷含量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )



A: 出生后第 10 天 4 组幼崽胃砷含量比较; B: 出生后第 10 天 4 组母乳砷含量比较; C: 出生后第 10 天 4 组母鼠尿砷含量比较; D: 出生后第 22 天 4 组幼崽胃砷含量比较。† 与对照组比较,  $P < 0.05$

图 4 母鼠和子代鼠不同组织样本的砷含量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )



A: 对照组母鼠妊娠第 15.5 天; B: 砷暴露组母鼠妊娠第 15.5 天, 可见肝脏脂肪变性颗粒; C: 对照组子代鼠出生后第 22 天; D: 砷暴露组子代鼠出生后第 22 天, 未见肝脏脂肪变性。箭头示脂肪变性。

图 5 孕期砷暴露对母鼠肝脏脂肪变性的影响 (HE × 200)

附表 低水平砷暴露对母乳营养成分的影响

 $(n=5, \text{mg/ml}, \bar{x} \pm s)$ 

组别	总蛋白	TG
对照组	203.4 ± 16.7	6 247 ± 118
A组	218.3 ± 12.6	2 893 ± 109 <sup>†</sup>
B组	209.8 ± 11.3	3 047 ± 114 <sup>†</sup>
C组	216.4 ± 13.4	2 678 ± 273 <sup>†</sup>
F值	2.475	24.928
P值	0.077	0.000

注: † 与对照组比较,  $P < 0.05$ 

### 3 讨论

本研究表明, 宫内接触我国饮用水最高标准量的砷暴露对母鼠和子代鼠的影响时间极为短暂, 主要影响包括子代鼠生长减缓、母鼠 TG 水平和成分改变、母乳营养物质降低 (特别是 TGs) 等。与对照组相比, 砷暴露组胎盘砷水平未增加, 可能是因为砷暴露组的砷可大量通过胎盘转移, 但该动物模型使用砷水平较低, ICP-MS 的检出范围有限, 影响了砷的检测值。人体暴露模型和高剂量砷暴露小鼠模型研究证实砷通过胎盘转移<sup>[5]</sup>。本研究还观察到所有砷暴露组中, 摄入相同水平的砷, 母体在妊娠期和产后期排泄的砷较未受孕小鼠减少。最近流行病学数据表明, 妊娠可以显著改变砷代谢, 因为小鼠对砷的新陈代谢非常高效<sup>[6-8]</sup>。本研究结果显示, 妊娠期小鼠尿中砷含量可能不是饮用水砷暴露水平的准确标志。

与预期不同的是, 本研究发现低剂量砷暴露影响子代鼠生长发育。既往研究表明, 高剂量砷暴露大鼠模型 [10、50 和 100 mg/L] 影响子代鼠生长发育, 而 ppb 和 ppm 级砷水平暴露并未影响子代鼠早期体重变化<sup>[9-11]</sup>。本研究还发现这些影响是暂时的, 可以通过干预加以改善, 表明本实验和其他研究相似的模型暴露时间和实验终点的不同会影响观察结果。此外, 本研究并未发现合并暴露期 (即宫内 + 产后) 比单一暴露期 (宫内或产后) 的影响更大, 因此, 本研究结果并不能排除小鼠对低剂量砷暴露可能存在一定的适应能力。根据本研究结果, 砷能够引起子代鼠生长发育缺陷, 其原因可能与母乳乳汁营养成分改变有关。然而, 本实验不能明确排除母体一些行为的改变在幼崽培育过程中不会引起生长缺陷。本研究结果表明, 砷暴露会对母乳成分和质量产生影响, 即使砷没有直接通过母乳分泌和转移。既往研究报道, 成年小鼠在亚致死性流感和砷综合暴露下, 可增加呼吸道感染的严

重程度<sup>[12]</sup>。此外, 本研究还发现砷暴露母乳有脂蛋白的改变和肝脏的脂肪变性。

总之, 本研究表明, 宫内或产后低水平砷暴露会产生许多直接的不利影响, 包括 TG 和脂质水平改变, 子代鼠生长缺陷, 提示影响砷暴露易感人群的砷水平可能低于目前饮用水最高标准 (10 ppb)。

### 参 考 文 献:

- [1] BLOOM M S, NEAMTIU I A., SURDU S, et al. Low level arsenic contaminated water consumption and birth outcomes in romania-An exploratory study[J]. *Reproductive Toxicology*, 2016, 59(10): 8-16.
- [2] GD D A L, SERTORIO M N, ACF S, et al. Fertility in male rats: disentangling adverse effects of arsenic compounds[J]. *Reproductive Toxicology*, 2018, 78: 130-140.
- [3] 付昆明. 《GB5749-2006 生活饮用水卫生标准》总硬度限值的探讨[J]. *卫生研究*, 2017, 46(1): 165-168.
- [4] 王宜凤, 郝慧蕾, 王勇, 等. 2014~2015 年哈尔滨地区生活饮用水水质监测分析[J]. *微量元素与健康研究*, 2018, 35(1): 50-51.
- [5] 林元, 庄凌梓, 马宏, 等. 孕前 / 孕期砷暴露致胎鼠先天性心脏异常的研究[J]. *卫生研究*, 2016, 45(1): 93-97.
- [6] RAHMAN A, PERSSON L A, NERMELL B, et al. Arsenic exposure and risk of spontaneous abortion, stillbirth, and infant mortality[J]. *Epidemiology*, 2010, 21(6): 797-804.
- [7] PRENTICE A M, WAGATSUMA Y, FULFORD A J C, et al. Early-life nutritional and environmental determinants of thymic size in infants born in rural bangladesh[J]. *Acta paediatrica: International Journal of Paediatrics*, 2009, 98(7): 1168-1175.
- [8] AHMED S, AHSAN K B, KIPPLER M, et al. In utero arsenic exposure is associated with impaired thymic function in newborns possibly via oxidative stress and apoptosis[J]. *Toxicological Sciences: an Official Journal of the Society of Toxicology*, 2012, 129(2): 305-314.
- [9] RAHMAN A, VAHTER M, EKSTROM E C, et al. Arsenic exposure in pregnancy increases the risk of lower respiratory tract infection and diarrhea during infancy in bangladesh[J]. *Environmental Health Perspectives*, 2011, 119(5): 719-724.
- [10] RAHMAN A, VAHTER M, EKSTROM E C, et al. Arsenic exposure in pregnancy increases the risk of lower respiratory tract infection and diarrhea during infancy in Bangladesh. (Children's Health) (Report)[J]. *Environmental Health Perspectives*, 2010, 119(5): 719-724.
- [11] BODWELL J E, GOSSE J A, NOMIKOS A P. Arsenic disruption of steroid receptor gene activation: complex dose-Response effects are shared by several steroid receptors[J]. *Chemical Research in Toxicology*, 2006, 19(12): 1619-1629.
- [12] GOSSE J A, TAYLOR V F, JACKSON B P, et al. Monomethylated trivalent arsenic species disrupt steroid receptor interactions with their DNA response elements at non-cytotoxic cellular concentrations[J]. *Journal of Applied Toxicology*, 2014, 34(5): 498-505.

(童颖丹 编辑)