

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.15.003

文章编号: 1005-8982(2017)15-0011-04

## 纳米碳酸钙驱铅效果研究\*

朱轩仪<sup>1</sup>, 黄彦凝<sup>2</sup>, 巫放明<sup>1</sup>, 潘一峰<sup>1</sup>, 何翦太<sup>3</sup>, 肖平<sup>2</sup>

(1. 中南大学湘雅医院 卫生部纳米生物技术重点实验室, 湖南 长沙 410008;  
中南大学湘雅医院 2. 肾内科, 3. 普外科, 湖南 长沙 410008)

**摘要:目的** 探讨纳米碳酸钙的驱铅效果。**方法** 实验药物纳米碳酸钙(40~80 nm), 采用超重力反应沉淀法复制。4 周龄大鼠连续 14 d 饮用醋酸铅溶液被复制成重度铅中毒模型(血铅浓度达到 >500  $\mu\text{g/L}$ )。原子吸收光谱法检测大鼠血铅浓度。**结果** 给药 22 d 后, 纳米碳酸钙 40~80 nm 组的血铅平均浓度为(117 $\pm$ 7)  $\mu\text{g/L}$ , 接近正常血铅水平, 低于对照组的平均血铅浓度(297 $\pm$ 33)  $\mu\text{g/L}$ ( $P<0.05$ )。**结论** 纳米碳酸钙(40~80 nm)具有较好的驱铅效果, 优于自然排铅。

**关键词:** 铅中毒; 纳米碳酸钙; 驱铅效果; 自然排铅

**中图分类号:** R135.11

**文献标识码:** A

## Therapeutic effect of calcium carbonate nanoparticle on lead poisoning\*

Xuan-yi Zhu<sup>1</sup>, Yan-ning Huang<sup>2</sup>, Fang-ming Mo<sup>1</sup>, Yi-feng Pan<sup>1</sup>, Jian-tai He<sup>3</sup>, Ping Xiao<sup>2</sup>  
(1. Key Laboratory of Nanobiotechnology of Ministry of Health, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha, Hunan 410008, China; 2. Department of Nephrology,  
3. Department of General Surgery, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha, Hunan 410008, China)

**Abstract: Objective** To evaluate the therapeutic effects of calcium carbonate nanoparticle. **Methods** Calcium carbonate nanoparticle with 40~80 nanometers was prepared by high gravity reaction precipitation. The severe level of lead-poisoning model (estimated blood lead concentration of 500  $\mu\text{g/L}$  or above) was made in 4 weeks old rats through 14 days consecutively drinking lead acetate solution. The drug efficacy was estimated by the concentration of blood lead. **Results** After three weeks of drug administration, the average concentration of blood lead in calcium carbonate nanoparticle group was (117 $\pm$ 7)  $\mu\text{g/L}$ , which was closed to the normal blood lead, and was lower than that of the untreated group ( $P<0.05$ ). The mean level of blood lead concentration of untreated group was (297 $\pm$ 33)  $\mu\text{g/L}$ , which was a moderate lead poisoning level. **Conclusions** Calcium carbonate nanoparticle with size from 40 to 80 nm displays high efficiency of lead-out effect and is better than natural lead removal.

**Keywords:** lead poisoning; nano calcium carbonate; flooding lead effect; natural lead removal

铅中毒是一种严重损害神经系统、造血系统及生殖系统并累及多种重要器官的重金属中毒疾病<sup>[1-3]</sup>。铅在日常生活中广泛存在, 并能通过消化系统、呼吸

系统甚至皮肤等多种途径进入人体<sup>[4]</sup>, 极易成为一种常见疾病。常用驱铅药物的主要成分是络合剂, 在临床使用中证明有良好的驱铅效果, 其机制是络合

收稿日期: 2017-05-08

\* 基金项目: 卫生部国际科技合作项目(No: 2013DFA31440)

[通信作者] 肖平, E-mail: xiaoping@163.com; Tel: 13786121955

剂经血液循环分布到各个器官,通过络合反应与铅元素形成重金属络合物,并通过肾脏经由尿液排铅,但其副作用也十分明显,除头晕、恶心等症状,还会对肾脏造成额外负担,长期使用损伤肾脏功能<sup>6</sup>。自然排铅有两种途径:①通过肾脏排铅,这也是主要的排铅方式;②通过肝脏(胆汁)排铅,由于肝细胞对铅元素有通透作用,能从血浆摄入铅并排入胆汁中,所以胆汁的铅含量是全血的 40~100 倍<sup>6</sup>,然而该方式排铅量较少,其原因是肝肠循环将由胆汁排入肠的铅在肠道重吸收,通过门静脉再次返回肝脏<sup>7</sup>。

游离态的铅元素在肠道中主要以磷酸氢铅(lead hydrogen phosphate,  $\text{PbHPO}_4$ )形式存在,其沉淀平衡常数(solubility product,  $K_{sp}$ )为  $1.3 \times 10^{-10}$ , 碳酸钙(calcium carbonate,  $\text{CaCO}_3$ )的  $K_{sp}$  为  $4.5 \times 10^{-9}$ , 碳酸铅(lead carbonate,  $\text{PbCO}_3$ )的  $K_{sp}$  为  $3.3 \times 10^{-14}$ , 实验证明,  $\text{PbHPO}_4$  能与  $\text{CaCO}_3$  发生复分解反应,产生沉淀平衡常数更小的  $\text{PbCO}_3$ <sup>8</sup>。本实验利用纳米碳酸钙在肠道与铅离子结合产生沉淀,阻断肝肠循环中铅元素在肠道的重吸收,从而增加肠道中铅通过粪便排出的量,达到驱铅效果。

## 1 材料与方法

### 1.1 药品

纳米碳酸钙 40~80 nm (购自山西省运城新泰恒信纳米材料有限公司)。

### 1.2 试剂和耗材

三水合醋酸铅(乙酸铅)分析纯(analytical reagent, AR)(购自上海国药集团化学试剂有限公司),肝素锂管(购自广东省深圳卫丽宝商贸有限公司)。

### 1.3 仪器

BH2101S 型原子吸收光谱仪(购自北京博晖创新光电技术股份有限公司),EM SCD 500 高真空镀膜仪(购自上海 Leica 公司),Nova Nano SEM 230 扫描电子显微镜(购自美国 FEI 公司),HYQ-3111 涡旋混匀器(购自 Crystal 美国精骐有限公司)。

### 1.4 动物模型驱铅实验

**1.4.1 复制铅中毒模型** 用超纯水配制 0.6%醋酸铅溶液,高温灭菌并冷却后,代替饮用水,喂养动物 14 d,测量血铅浓度确认  $>500 \mu\text{g/L}$ 。复制成功后,停止喂铅,实验组开始给药。

**1.4.2 动物分组** 实验动物选用 SD(sprague-dawley)大鼠,无特定病原体级(specific pathogen free,

SPF),雄性,4 周龄,购于湖南长沙斯莱克实验动物有限公司,于中南大学动物实验部屏障环境中饲养。动物总数 23 只,分为两组,分别是纳米碳酸钙组(实验组  $n=11$ )和(铅中毒+不给药组)(对照组  $n=12$ )。

**1.4.3 给药剂量** 实验组给药剂量:每天灌胃给药,1 次/d,剂量:500 mg/kg(药量/大鼠体重,下同)。

### 1.5 全血样品采集和保存

铅中毒 14 d 后,给药前(第 0 天),从大鼠尾静脉中抽取 0.3 ml 血样,立刻加入肝素锂管中,震荡摇匀,确保血样不会凝固,置入 4℃ 冰箱保存,作为铅中毒治疗前的全血样本。之后,开始每天喂药治疗,在下列时间点取血样本 0.3 ml,治疗的第 2、4、6、8、10、12、14、18 及 22 天,在喂药前取血样本。

### 1.6 血铅指标的测定和铅中毒水平判断标准

通过原子吸收光谱法检测血液中的铅浓度。用毛细管吸取 40  $\mu\text{l}$  大鼠尾静脉血,加入原子吸收光谱仪人体元素专用检测试剂(体积 =0.36 ml),充分震荡混匀,在 BH2101S 型原子吸收光谱仪的标准工作状态下,在钨舟片上滴加 50  $\mu\text{l}$  稀释液,测定吸光度值。根据标准曲线计算得到稀释液铅浓度,再乘以 10 倍的稀释倍数,得到血铅含量。

铅中毒程度分为轻、中和重等级,以血铅浓度作为判断标准。轻度铅中毒水平为 100~200  $\mu\text{g/L}$ ,中度为 200~500  $\mu\text{g/L}$ ,重度为  $>500 \mu\text{g/L}$ 。

### 1.7 统计学方法

数据分析采用 SPSS 22.0 统计软件,计量资料以均值  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,比较用秩和检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

给药实验前,测量两组的血铅含量均达到重度铅中毒水平。给药 6 d 后,对照组的血铅浓度为  $(526 \pm 97) \mu\text{g/L}$ ,同第 0 天比较,下降约 41%,属于重度铅中毒水平。而实验组的血铅浓度分别为  $(315 \pm 55) \mu\text{g/L}$ ,同第 0 天比较,下降约 65%,达到中度铅中毒水平,并低于对照组 ( $P < 0.05$ )。在给药第 8~10 天,虽然各组均表现出血铅升高的趋势,但在第 10 天,对照组血铅浓度为  $(503 \pm 116) \mu\text{g/L}$ ,属于重度铅中毒水平,实验组的血铅浓度为  $(284 \pm 48) \mu\text{g/L}$ ,属于中度铅中毒水平,低于对照组。在给药 22 d 后,对照组的血铅浓度下降到  $(297 \pm 33) \mu\text{g/L}$ ,约减小 70%的血铅含量,仍属中度铅中毒水平。而实验组的血铅浓度为  $(117 \pm 7) \mu\text{g/L}$ ,接近正常水平( $\approx 100 \mu\text{g/L}$ ),相对

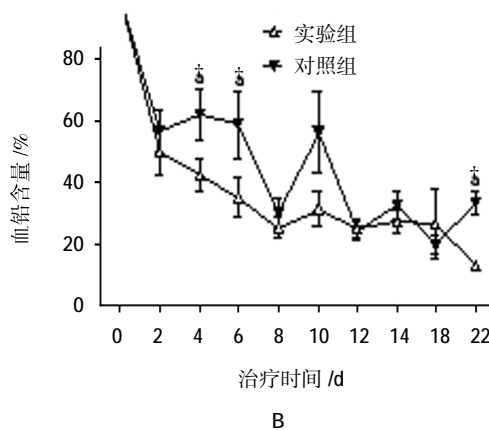
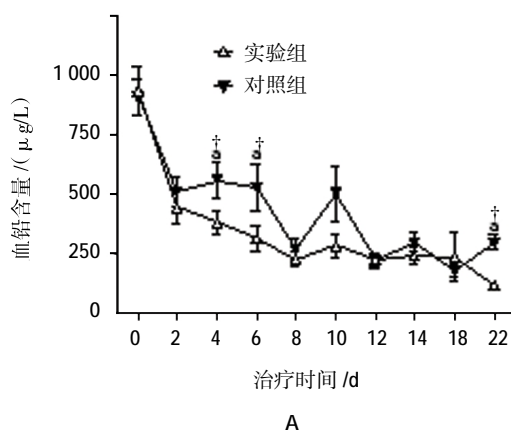
于治疗前,血铅含量分别下降约 87%,低于对照组 ( $P<0.05$ )。在给药过程中,相对于对照组,实验组血铅回升情况较弱,且血铅浓度下降趋势更为稳定快速。

治疗第 4 天,对照组的血铅浓度为( $556 \pm 74$ )  $\mu\text{g/L}$ ,下降 38%,实验组的血铅浓度为( $381 \pm 49$ )  $\mu\text{g/L}$ ,降低约 58%,低于对照组 ( $P<0.05$ ),见附表和附图。

附表 两组不同时间给药后血铅含量比较 ( $\mu\text{g/L}, \bar{x} \pm s$ )

组别	第 0 天	第 2 天	第 4 天	第 6 天	第 8 天	第 10 天	第 12 天	第 14 天	第 18 天	第 22 天
实验组 ( $n=11$ )	930 $\pm$ 101	444 $\pm$ 65	381 $\pm$ 49 <sup>†</sup>	315 $\pm$ 55 <sup>†</sup>	228 $\pm$ 33	284 $\pm$ 48	224 $\pm$ 28	245 $\pm$ 35	237 $\pm$ 100	117 $\pm$ 7 <sup>†</sup>
对照组 ( $n=12$ )	905 $\pm$ 73	510 $\pm$ 60	556 $\pm$ 74	526 $\pm$ 97	269 $\pm$ 45	503 $\pm$ 116	220 $\pm$ 29	296 $\pm$ 40	177 $\pm$ 28	297 $\pm$ 33
Z 值	-0.369	-0.646	-2.063	-1.929	-0.739	-1.260	-0.369	-0.571	-0.149	-2.236
P 值	0.370	0.268	0.040	0.027	0.238	0.117	0.370	0.314	0.500	0.018

注:† 与对照组比较,  $P<0.05$



A: 血铅含量随治疗时间变化; B: 血铅含量百分比(以给药前血铅含量为 100%, 将各天血铅含量与之比较)随治疗时间变化。† 与对照组比较,  $P<0.05$

附图 两组血铅变化情况

### 3 讨论

根据国际统一使用 1991 年美国国家疾控控制中心制定的儿童铅中毒诊断标准,当血铅含量达到重度铅中毒水平( $>500 \mu\text{g/L}$ )时,必须进行铅中毒药物治疗,否则仅需要通过驱铅食物进行驱铅治疗。

2015 年 LEE 证明纳米碳酸钙悬浊液在经过 SD 大鼠胃部时仅有 4% 反应,并具备良好的生物安全性<sup>[9]</sup>,所以本实验将纳米碳酸钙制成悬浊液灌胃给药。其主要晶体形态为球霏石型,具有较大的比表面积、较高的溶解性和分散性以及较小的比重<sup>[9]</sup>,有利于其在肠道中与铅有更快的反应速度。

给药 22 d 后,实验组的血铅含量低于对照组。在给药过程中,两组血铅均有不同程度的回升,其中对照组血铅下降趋势较弱,且血铅回升情况更为明显,其主要原因是在无外源性铅摄入时,骨骼由于铅中毒过程中的铅沉积成为主要的内源性铅来源,当血液铅

含量减少时,骨骼铅含量随之降低,导致血样的铅含量再次升高<sup>[12-13]</sup>。实验组血铅浓度回升较弱说明其能有效地降低机体内的铅总量和骨骼中的铅含量。

2014 年, SUNG 通过病理观察和生化指标检测证明大鼠连续 90 d 每天口服摄入 1 000 mg/kg 纳米碳酸钙(剂量/大鼠体重),无毒副作用<sup>[14]</sup>。本实验所用碳酸钙剂量和给药周期均小于该实验,且已具有良好的驱铅效果,另外碳酸钙与  $\text{Pb}^{2+}$  反应产生的  $\text{Ca}^{2+}$  还可以作为铅中毒患者的补钙剂,补充其因铅中毒造成的血钙浓度下降<sup>[9]</sup>。虽然临床证明络合剂药物有稳定的驱铅效果,但是长期服用会伴随不同程度的副作用,例如:①恶心、呕吐及肌肉痛等症状;②特异性差,导致体内的其他微量元素流失<sup>[16]</sup>;③长期服用增加肾脏负担,引发肾脏疾病<sup>[17-18]</sup>。

综上所述,纳米碳酸钙(40 ~ 80 nm)具有高效的驱铅能力,靶向明确,可以作为新型驱铅药物的模型。

## 参 考 文 献:

- [1] KARRI V, SCHUHMACHER M, KUMAR V. Heavy metals (Pb, Cd, As and MeHg) as risk factors for cognitive dysfunction: A general review of metal mixture mechanism in brain[J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2016(48): 203-213.
- [2] MEIMAN J, THIBOLDEAUX R, ANDERSON H. Lead poisoning and anemia associated with use of ayurvedic medications purchased on the internet-wisconsin, 2015 [J]. *Mmwr Morbidity & Mortality Weekly Report*, 2015, 64(32): 883.
- [3] CHEN W W, ZHANG X, HUANG W J. Neural stem cells in lead toxicity[J]. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 2016, 20(24): 5174-5177.
- [4] ADEYEMI J A, ADEDIRE C O, PAULELLI A C, et al. Levels and daily intake of lead (Pb) and six essential elements in gari samples from ondo state, southwest nigeria: a potential risk factor of health status[J]. *Journal of Food Composition & Analysis*, 2016(45): 34-38.
- [5] FLORA G, GUPTA D, TIWARI A. Toxicity of lead: a review with recent updates [J]. *Interdisciplinary Toxicology*, 2012, 5(2): 47-58.
- [6] 刘琳琳, 马融, 张喜莲, 等. 肝肾双排法对染铅大鼠驱铅作用的实验观察[J]. *中国中西医结合儿科学*, 2009, 1(3): 210-213.
- [7] TAYLOR A, HAGAN P, ALAZRAKI N, et al. Tissue distribution of <sup>203</sup>Pb-acetate: comparison with <sup>67</sup>Ga-citrate as an abscess-localizing agent[J]. *J Nucl Med*, 1976, 17(9): 800-804.
- [8] 徐幸民, 徐虹, 魏科达, 等. 不同粒径的碳酸钙在体外模拟胃肠道环境中的除铅效果比较[J]. *微量元素与健康研究*, 2009, 26(5): 12-14.
- [9] 朱清义. 儿童铅中毒诊治进展[J]. *微量元素与健康研究*, 2006, 23(2): 10-13.
- [10] LEE J A, KIM M K, KIM H M, et al. The fate of calcium carbonate nanoparticles administered by oral route: absorption and their interaction with biological matrices[J]. *International Journal of Nanomedicine*, 2015(10): 2273-2293.
- [11] 雷云. 球霏石型碳酸钙的研究进展[J]. *长江大学学报(自科版)*, 2014, 11(34): 35-43.
- [12] LEE C M, TERRIZZI A R, BOZZINI C, et al. Chronic lead poisoning magnifies bone detrimental effects in an ovariectomized rat model of postmenopausal osteoporosis[J]. *Experimental & Toxicologic Pathology*, 2016, 68(1): 47-53.
- [13] VEGA M M, SOLORZANO J C, ALBORES-MEDINA A, et al. Lead: intestinal absorption and bone mobilization during lactation[J]. *Human & Experimental Toxicology*, 1996(15): 872-877.
- [14] SUNG J H, PARK S J, MIN S J, et al. Physicochemical analysis and repeated-dose 90-days oral toxicity study of nanocalcium carbonate in sprague-dawley rats[J]. *Nanotoxicology*, 2015, 9(5): 603.
- [15] HARIDY M, AL-AMGAD Z, SAKAI H, et al. Ameliorating effects of garlic, calcium, and vitamin C on chronic lead toxicity in albino rats[J]. *Comparative Clinical Pathology*, 2014, 23(5): 1215-1223.
- [16] 于飞. 二巯基丁二酸与多种营养素联合应用对铅中毒儿童的干预研究[D]. 沈阳: 中国医科大学, 2006.
- [17] LIAO Y, YU F, JIN Y, et al. Selection of micronutrients used along with DMSA in the treatment of moderately lead intoxicated mice[J]. *Archives of Toxicology*, 2008, 82(1): 37-43.
- [18] 李颖, 肖雄斌, 张晓华, 等. 依地酸钠钙治疗儿童铅中毒的临床疗效观察[J]. *环境与职业医学*, 2013, 30(1): 61-62.