

EDTA-壳聚糖对小鼠模型中 Cd(II) 脱除作用

杨锡洪¹, 辛荣玉¹, 宋琳¹, 李银平¹, 赵誉焜¹, 石百媚¹, 张俊逸², 李钰金^{3,4}, 解万翠¹

(1. 青岛科技大学海洋科学与生物工程学院, 山东青岛 266042) (2. 青岛信和源生物科技有限公司, 山东青岛 266002) (3. 荣成泰祥食品股份有限公司, 山东荣成 264303) (4. 山东省冷冻调理食品加工技术企业重点实验室, 山东荣成 264309)

摘要: 镉污染通过食物链传递严重威胁人类健康, 因而探索安全、有效脱除生物体内镉的方法具有重要意义。本文制备得到乙二胺四乙酸(EDTA)酰化改性的壳聚糖衍生物(ETC), 并采用热分析技术表征了其稳定性。通过连续和不连续两种染毒方法, 腹腔注射 1 mg/kg CdCl₂, 建立 Cd²⁺污染的小鼠模型。然后以 ETC 与 EDTA 和壳聚糖(CTS)等进行染毒小鼠脱镉, 取小鼠眼球血、心、肝及肾脏器等, 计算脏器系数及检测眼球中血、肝脏、肾脏、及心的镉含量。结果表明, 不同染毒方式对小鼠体重及急性毒性作用存在显著差异。EDTA、ETC、CTS 对血镉脱除率分别达 58.94%、51.68%、37.43%; 但 ETC 对小鼠各脏器镉的脱除率远高于其他脱镉剂, 其中对心、肾脏脱除率分别高达 63.90%、45.00%。相关研究结果为壳聚糖衍生物脱除重金属提供了一种参考方法。

关键词: EDTA-壳聚糖; 小鼠模型; 吸附; 脱除

文章篇号: 1673-9078(2018)08-8-15

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.8.002

Removal of Cd (II) from mouse model by EDTA-chitosan

YANG Xi-hong¹, XIN Rong-yu¹, SONG Lin¹, LI Yin-ping¹, ZHAO Yu-kun¹, SHI Bai-mei¹, ZHANG Jun-yi²,
LI Yu-jin^{3,4}, XIE Wan-cui¹

(1.College of Mairine Science and Biological Engineering, Qingdao University of Science & Technology, Qingdao 266042, China)(2.Qingdao Xinheyuan Biotechnology Co., Ltd, Qingdao 266002, China)(3.Rongcheng Taixiang Food Co., Ltd, Rongcheng 264303, China)(4.Key laboratory of shandong refrigeration conditioning food processing technology enterprise, Rongcheng 264309, China)

Abstract: Cadmium pollution through the food chain is a serious threat to human health, and it is thus of great significance to explore safe and effective ways to remove cadmium from organisms. In this paper, chitosan derivatives (ETC) were prepared via acylation with EDTA. The stability of ETC was characterized using TG-DSC technique. A mouse model of Cd contamination was established by intraperitoneal injection of 1 mg/kg CdCl₂, according to two continuous and discontinuous exposure processes. The removal of cadmium in mice was determined when exposed to ETC, EDTA, and chitosan (CTS). The eyeballs were excised from living body. Heart, liver and kidney were excised by sacrificed mice. To track the cadmium in mice, the cadmium contents in blood, eyeball, liver, kidney, and heart were determined. The results showed that there were significant differences in the body weight and acute toxicity effects of different exposure methods on mice. The cadmium removal rates on the blood of EDTA, ETC, and CTS were 58.94%, 51.68%, and 37.43%, respectively. The removal rate of cadmium in mouse organs by ETC was much higher than that by other cadmium removal agents. The removal rates of cadmium in hearts and kidneys by ETC were 63.90% and 45.00%, respectively. The results provide a reference for the removal of heavy metals using chitosan derivatives.

Key words: EDTA-chitosan; mouse model; adsorption; removal

镉是人体非必需的有害微量元素, 广泛存在于自然环境中, 具有生物富集性, 所以易在某些植物和动物体内富集, 最终通过食物链进入人体。镉在人体内
收稿日期: 2018-03-26

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31772089); 国家自然科学基金项目 (31271938); 山东省重点研发计划项目 (2017GHY15127)

作者简介: 杨锡洪 (1963-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品生物化学
通讯作者: 解万翠 (1969-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品风味和食品质量与安全

的半衰期为 10~35 年^[1], 长期接触镉会导致慢性中毒。研究证明镉会引发肾、肝和肺等多个人体器官的损伤, 并具有致癌和致畸作用^[2], 日本著名的“骨痛病”事件便是由镉中毒引起。竞争吸附法、酶-微生物分解法及亚临界水处理法等^[3]方法都无法用于活体脱镉, EDTA 吸附法是目前较为有效的活体脱镉方法。EDTA 结构中含有 2 个氨基氮原子和 4 个羧基氧原子, 而这些原子都有孤对电子, 根据有机结构的张力学理论, 五元环或六元环的张力最小, 结构最稳定^[4], 在 pH 值

合适时, EDTA 螯合树脂对镉离子的吸附性能可达到最佳。但 EDTA 用于驱镉时, 会促使血液中 Cd^{2+} 向肝脏、肾脏等脏器转移, 对机体无保护作用, 加之本身具有一定的毒副作用, 在慢性镉中毒时, 不宜采用 EDTA 治疗^[5]。

壳聚糖(Chitosan, CTS)是一种阳离子多糖, 具有化学和机械修饰的结构可能性^[6]。因为 CTS 分子链上富含游离羟基及氨基, 具有提供电子对的 O 和 N, 所以能有效与重金属离子形成稳定螯合物, 可有效用于含重金属离子工业废水的处理、重金属离子富集与回收等领域^[7,8]。但是 CTS 只能溶于一些稀的无机酸或有机酸中, 不能直接溶于水中; 且 CTS 在注射入体内后能快速到达肾脏和尿液中, 但几乎不分布到肝、脾和血液等肾以外的组织, 各种低分子量的 CTS 中, 仅有壳二糖和壳三糖能被胃肠道略微吸收^[9], 这在很大程度上限制了它的应用。

将 EDTA 接枝到 CTS 分子上, 既可以改变 CTS 的溶解性差的缺点, 又可以提高衍生物对重金属的吸附性能, 同时又能避免 EDTA 的毒副作用, 提高了脱镉剂的安全性。因此对 CTS 改性以制备一种水溶性及吸附性较好的吸附剂是近年研究的热点^[10]。Ren 等^[11]开发了一种新型磁性 EDTA 修饰 $\text{CTS}/\text{SiO}_2/\text{Fe}_3\text{O}_4$ 吸附剂 (EDCMS), 在 pH 5.0 (25 °C) 下, $\text{CTS}/\text{SiO}_2/\text{Fe}_3\text{O}_4$ (CMS) 对 Cu^{2+} 、 Pb^{2+} 和 Cd^{2+} 最大吸附容量分别为 31.680、9.324 和 4.496 mg/g, 而在相同条件下 EDCMS 分别为 44.736、123.491 和 63.281 mg/g, 比较发现 EDCMS 对 Cu^{2+} 、 Pb^{2+} 和 Cd^{2+} 的吸附性能比 CMS 强。REPO 等^[12]将 EDTA 或二亚乙基三胺五乙酸 (DTPA) 的配体固定在 CTS 的聚合物基质上, 发现制备的吸附剂对 Co^{2+} 和 Ni^{2+} 的吸附效率在 93.6%~99.5% 之间, 吸附性能加强。REPO 等^[13]研究了 EDTA 配体对 CTS 与杂化材料进行功能化合合成新型吸附剂, 发现合成的吸附剂结合了硅胶和 CTS 的优点。

实验动物的脏器重量和脏器系数是动物主要的生物学特性之一^[14]。在药物安全评价的长期毒性试验中, 动物脏器的重量常会出现一些变化。为了减小动物体重对脏器重量的影响, 通常要计算实验动物的脏器系数, 比较不同剂量给药组的脏器系数与对照组的差别, 根据差别的显著性检验动物的脏器是否受到不良影响^[15]。小白鼠的基因序列和人类相似, 它的全基因组和人类的相似度极高, 很多人类难以治愈的疾病可以在小白鼠身上找到相似性状, 从而加以实验发现致病基因。因此本文采用小鼠模型进行脱镉实验, 从而为人类脱镉提供试验基础。

本文采用 EDTA- Na_2 对 CTS 进行酰化改性, 通过

引入羧基以制备一种溶解性及吸附性均较 CTS 好的壳聚糖衍生物, 同时, 小分子的 EDTA 盐与 CTS 螯合后增加了安全性。通过蓄积及脱除实验, 从生物学水平研究 ETC 对镉模型小鼠中 Cd^{2+} 的吸附情况。为该衍生物作用于人体以脱除重金属提供了实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

昆明种小鼠由湛江 422 医院动物中心提供 (许可证号 SYXK(粤)2014-0053), 体重 20~28 g; 小鼠饲养温度控制在 20~26 °C, 自由采食、饮水; 小鼠饲料、垫料由广东医学院提供。

壳聚糖(脱乙酰度 $\geq 90\%$, 分子量 50~60 ku, 食品级), 江苏南通绿神生物工程有限公司; EDTA- Na_2 、1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDAC), 上海源聚生物科技有限公司; 羧甲基壳聚糖 (CMCS), 浙江金壳生物化学有限公司。

1.2 仪器与设备

Thermo M6 原子吸收分光光度计, 赛默飞世尔科技公司; NEXUS-670 红外光谱仪, 美国 Nicolet 公司; FDU-1100 真空冷冻干燥机, 埃朗科技国际贸易(上海)有限公司; YL300 杯式超滤器, 上海羽令过滤器材有限公司; mW800 微波消解仪, 加拿大 aurora 仪器(中国)有限公司。

1.3 方法

1.3.1 ETC 制备

0.5 g CTS 加入到 50 mL 0.1%(V/V)醋酸溶液中, 搅拌至完全溶解。加入 1 g EDTA- Na_2 ^[16], 并用 5 mol/L NaOH 和 1 mol/L HCl 调 pH 至 5.5, 再加入 EDAC 并使其终浓度为 40 mmol/L; 混合物室温搅拌反应 16 h, 反应结束后透析, 冷冻干燥即为成品^[17]EDTA-CTS(ETC)。

1.3.2 ETC 的 FT-IR 表征

ETC 经真空干燥后, 用 KBr 混合压片法, 利用红外光谱仪进行表征。

1.3.3 ETC 取代度(DS)的测定

准确称量 0.2 g 在 105 °C 烘干的 ETC 样品, 加入 30 mL 0.1 mol/L HCl 标准溶液, 充分搅拌使其完全溶解, 用 0.1 mol/L NaOH 标准溶液滴定, 记录 pH 值变化^[18]。

$$\text{DS} = 0.157 \Delta \text{VM/W} \quad (1)$$

注: DS 为 EDTA 在 CTS 上取代度^[19]; 0.157 为 EDTA 取

代占衍生物比值; ΔV 为两个突变点之间消耗 NaOH 标准溶液的体积 (mL); M 为氢氧化钠溶液的浓度 (mol/L); W 为样品的净重 (g)。

1.3.4 ETC 的热分析

通过热重、差示量热扫描(TG-DSC)分析研究 ETC 衍生物的热稳定性^[20]。

1.3.5 小鼠体内重金属镉的蓄积

1.3.5.1 连续染毒方法

对照组: 腹腔注射生理盐水 (10 mL/kg), 每 1 d 注射一次, 共注射 6 次。

染毒组: 将小鼠腹腔注射 CdCl₂ 溶液 (镉 1 mg/kg), 每 1 d 染毒一次, 共染毒 6 次, 染毒结束 1 d 后, 活体摘除眼球取血, 处死小鼠取各脏器, 消化检测 Cd²⁺ 含量。

1.3.5.2 间隔染毒方法

对照组: 腹腔注射生理盐水(10 mL/kg), 隔 2 d 注射一次, 共注射 3 次。

染毒组: 将小鼠腹腔注射 CdCl₂ 溶液(镉 1 mg/kg), 隔 2 d 染毒一次, 共染毒三次, 染毒结束 1 d 后处死小鼠, 其他同 1.3.5.1^[21,22]。

1.3.6 小鼠脱毒实验

将上述染毒组小鼠随机分成 8 组, 分别为空白对照组、染毒对照组、EDTA 治疗组、ETC 低剂量治疗组(0.0731 g/kg)、ETC 中剂量治疗组(0.1461 g/kg)、ETC 高剂量治疗组(0.2922 g/kg)、CTS 治疗组(0.2922 g/kg)、羧甲基壳聚糖治疗组(CMCS 0.2922 g/kg)^[23]。以灌胃的方式脱毒处理 6 d, 治疗结束后 1 d 处死小鼠。

1.3.7 小鼠处理及体内重金属含量的检测

1.3.7.1 小鼠血样中镉含量

小白鼠进行活体摘除眼球取血 0.5 mL, 血样用石墨炉原子吸收光谱仪测定血镉含量。同时做试剂空白^[24,25]。

1.3.7.2 染毒小鼠脏器中的镉含量

末次给药治疗后 1 d 处死小鼠, 取心, 肝, 肾脏器。

用生理盐水清洗表面血污, 滤纸吸干表面水分, 称重。计算实验动物脏器的重量与其体重之比, 即脏器系数^[26], 计算公式如下:

$$\text{脏器系数} = \frac{\text{脏器重量(g)}}{\text{体重(g)}} \times 100 \quad (2)$$

然后进行消化后, 采用原子吸收分光光度法^[27]检测肝脏、肾脏、及心的镉含量。

1.3.8 统计学处理

每组小白鼠分成 2 小组平行。实验数据均以 $\bar{X} \pm s$ 进行表示。采用 DPS9.5 软件进行统计学分析。采用单因素方差分析 (One Way ANOVA)。以 $p < 0.05$ 为差

异有统计学意义^[28]。

2 结果与分析

2.1 ETC 的红外表征及热分析

2.1.1 衍生前后的 FT-IR 表征

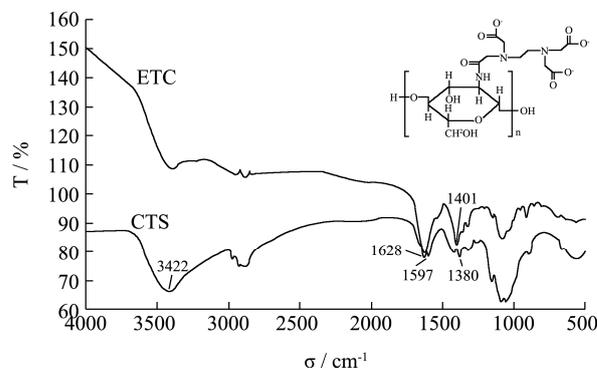


图 1 CTS 及 ETC 的 FT-IR 图谱

Fig.1 FT-IR spectra of chitosan and ETC

经酸碱滴定法计算, 本实验合成的 ETC 的取代度为 0.4, 即 2.5 个糖单体上酰化一个 EDTA 分子。CTS 及其衍生物 ETC 的 FT-IR 图谱如图 1 所示。CTS 的红外光谱中 3422 cm⁻¹ 是 -OH 和 -NH₂ 的伸缩振动峰, 1597 cm⁻¹ 为 N-H 的面内弯曲振动(酰胺 II), 1380 cm⁻¹ 为 N-H 的面外弯曲振动(酰胺 III)^[29-31]。与 CTS 不同的是, ETC 在 1401 cm⁻¹ 处较强的特征峰为羧基的对称伸缩振动峰, 说明产物结构中羧基含量较多, 1628 cm⁻¹ 处为酰胺基中的 C=O 特征峰, 同时在 1597 cm⁻¹ 处游离氨基的吸收峰消失, 证明 EDTA 在 CTS 的 C₂ 位上的伯氨基发生酰化反应; 而从 ETC 的红外光谱图中观察不到 C₆ 位上的伯羟基酰化生成的酯的特征峰, 证明 CTS C₂ 位的氨基上发生酰化反应^[32]。图中结构式为 EDTA-CTS 结合物的推定结构, 络合剂的共价连接通过构成聚合物的伯氨基与 EDTA 的羧酸基团的酰胺结合来实现^[33]。

2.1.2 CTS 及 ETC 的 TG-DSC 分析

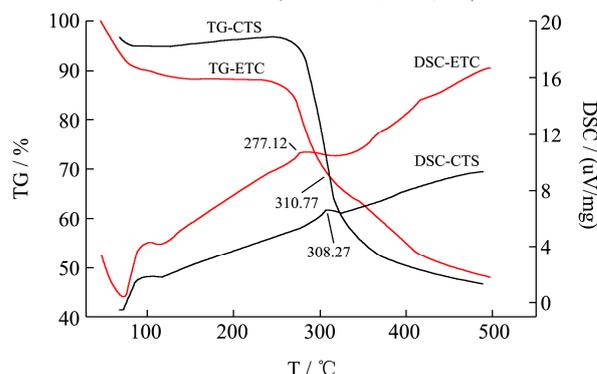


图 2 CTS 与 EDTA-CTS 的 TG-DSC 图谱

Fig.2 TG-DSC curves of chitosan and ETC

CTS 与 ETC 的 TG-DSC 图谱如图 2 所示。由图 2 可知, 在 DSC 图谱中, CTS 和 ETC 在升温受热情况下有两个吸热峰, 前面的是其失去吸附水后产生的吸热峰, 而 308.27 °C 和 277.12 °C 为主链断裂所产生, ETC 中该峰向低温移动约 20 °C, 说明衍生化后糖链断裂所需能量降低^[34]。从热重图谱可知, 随着温度的升高, ETC 和 CTS 都有 2 个热失重阶段, 第一阶段发生在 100 °C 之前, 此阶段失重较小, 主要是样品中的结合水与结晶水的蒸发。第二个阶段发生在 250~350 °C 之间, 此阶段失重较大, 说明此时 CTS 及壳聚糖衍生物都热降解剧烈。两者不同之处是, ETC 在 100 °C 之前热失重率较大, 约为 10%, 表明产物含水较高; 第二热失重阶段, ETC 降解温度范围较宽, 且热失重率较小, 表明具有比 CTS 较高的热稳定性。

2.2 小鼠体内重金属镉的蓄积

通过对小鼠连续染毒及间接染毒两种方式染毒, 结束后 1 d 处死小鼠, 测定小鼠血、心、肝和肾的镉含量见表 1。从表 1 可以看出, 小鼠经染毒后, 在小鼠的四部位镉含量都发生明显的变化($p<0.01$), 都明显的增加, 其中连续染毒的血镉含量甚至到达 202.50 $\mu\text{g/L}$, 是空白组的 200 倍以上, 连续染毒与间接染毒的小鼠血液中的含量最高, 分别为 202.50 $\mu\text{g/L}$, 108.21 $\mu\text{g/L}$; 其次为肝, 分别为 72.26 $\mu\text{g/g}$, 25.70 $\mu\text{g/g}$, 证明染毒成功。从数据中可判断出连续染毒中各部分的镉含量都比间接染毒要多, 说明连续染毒对小鼠的毒害作用比间接染毒强, 其原因在于连续注射 (6 次) 的总剂量远高于间隔注射 (3 次), 连续染毒小鼠体内富集的镉含量明显高于间接染毒; 连续染毒中肝的镉含量是间接染毒中铬含量的 3 倍, 增大倍数明显大于其他器官, 这可能是由于小鼠的肝解毒功能, 使间接染毒的小鼠中镉含量在一定程度上明显降低。

表 1 染毒小鼠镉含量

Table 1 The cadmium contents in toxic mice($\bar{x}\pm s$)

组别	检测部位			
	连续染毒			
	血	心	肝	肾
空白组	1.420±0.080	0.041±0.003	0.017±0.004	0.040±0.006
染毒组	202.50±6.620 ^{###}	1.720±0.008 ^{###}	72.260±3.910 ^{###}	19.980±0.280 ^{###}

组别	检测部位			
	间接染毒			
	血	心	肝	肾
空白组	1.395±0.110	0.038±0.001	0.041±0.003	0.035±0.008
染毒组	108.210±4.500 ^{###}	0.830±0.008 ^{###}	25.700±0.330 ^{###}	6.592±0.040 ^{###}

注: 血镉含量单位为($\mu\text{g/L}$), 脏器镉含量单位($\mu\text{g/g}$), 湿重计。与空白组相比, ^{###} $p<0.01$ 。

表 2 两种染毒方式对小鼠体重的影响

Table 2 The effect of two exposure ways on body weight of mice($\bar{x}\pm s$)

组别	连续染毒		间隔染毒	
	染毒前 1 d	染毒开始后第 8 d	染毒前 1 d	染毒开始后第 8 d
空白对照组	21.81±1.67	24.25±3.19	24.50±3.08	28.00±1.55 ^{#*}
镉对照组	21.69±2.25	22.68±1.44	23.67±2.58	27.20±1.30 ^{###**}
EDTA 治疗组	22.07±2.01	23.73±1.56	21.83±2.85	26.50±3.33 ^{**}
ETC 低剂量治疗组	20.73±2.17	23.33±1.91	23.33±2.58	27.33±3.01 ^{#*}
ETC 中剂量治疗组	21.59±2.22	23.53±2.54	21.33±1.03	26.33±2.16 ^{###**}
ETC 高剂量治疗组	21.34±4.84	22.55±3.55	22.83±2.48	26.50±1.22
CTS 治疗组	23.65±2.68	23.94±4.36	23.00±2.68	26.33±1.75
CMCS 治疗组	21.58±2.81	21.61±4.29	22.17±2.22	26.33±2.58 ^{#*}

注: 间接染毒与相应的连续染毒组比较, [#] $p<0.05$, ^{###} $p<0.01$; 相同染毒方式与染毒前 1 天比较, ^{*} $p<0.05$, ^{**} $p<0.01$; 单位(g)。

2.3 不同给药及剂量对小鼠体重的影响

组, 虽然无显著性差异, 也可说明连续染毒对小鼠体

两种染毒方式对小鼠体重的影响见表 2 数据。从表 2 可知, 连续染毒法处理组体重都低于空白对照重的增长起到了一定的抑制作用, 在间隔染毒法中,

染毒开始后第8 d 的小鼠体重均增加, 且 EDTA 治疗组、ETC 低、中剂量治疗组、CMCS 治疗组具有显著性差异($p<0.05$ 或 $p<0.01$)。在连续染毒 8 d 后, CMCS 治疗组小鼠体重明显降低, 具有显著性差异($p<0.05$)。间隔染毒各组之间与相应的连续染毒组相比, 大都具有显著性, 说明两种染毒方式对动物产生的急性毒性作用有一定的差别, 这与朱圣陶等^[35]的研究结果相似, 他认为小鼠对隔日染毒具有较大的耐受性, 动物可在短时间内对重金属代谢, 使其生长不出现抑制。

2.4 驱镉剂治疗后小鼠脏器系数的变化

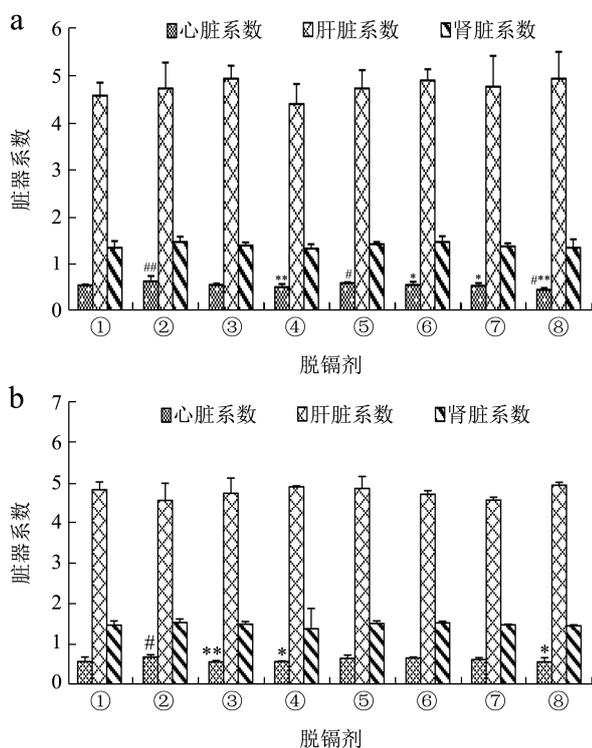


图3 不同染毒方式对小鼠脏器系数的影响

Fig.3 Effects of different exposure modes on organ coefficient in mice

注: a、连续染毒; b、间隔染毒; ①空白对照组, ②镉对照组, ③EDTA 治疗组, ④ETC 低剂量治疗组, ⑤ETC 中剂量治疗组, ⑥ETC 高剂量治疗组, ⑦CTS 治疗组, ⑧CMCS 治疗组; 与空白组相比, $^{\#}p<0.05$; 与镉对照组相比, $^*p<0.05$, $^{**}p<0.01$ 。

以连续和间隔染毒的不同染毒方式对小鼠脏器系数的影响, 如图3所示。从图3可以看出两种染毒方式对小鼠脏器系数的影响相似, 小鼠经镉染毒并解毒后, 镉对照组与空白对照组相比, 注射金属镉可导致小鼠心脏系数增大, 而对肝脏及肾脏系数影响不大。连续染毒方式中, ETC 低剂量、ETC 高剂量治疗组、CTS 治疗组、CMCS 治疗组与镉对照组相比, 心脏系数均降低且具有显著差异性($p<0.05$ 或 $p<0.01$); 间隔

染毒中, EDTA 治疗组、ETC 低剂量组、CMCS 治疗组较镉对照组心脏系数显著降低, 说明驱镉剂的加入能使镉中毒引起升高的心脏系数降低。两种染毒方式对小鼠肝脏、肾脏系数的影响相似, 表明本实验所用金属镉溶液染毒剂量对动物心脏系数有影响, 而对肝脏和肾脏系数无明显影响。这可能与肝脏与肾脏是排毒器官有关。

2.5 脱镉剂治疗后小鼠血镉含量检测

以不同类型及剂量的脱镉剂进行脱除后, 测得各组小鼠的血镉含量如表3所示。从表3可以看出, 在对小鼠先进行染毒后进行脱除后发现, 各治疗组与镉对照组相比血镉含量均降低, 差异具有显著性($p<0.01$), 说明驱镉剂的加入, 对小鼠体内镉的脱除起到了一定作用, 从而使血液中的镉含量降低。尤其是在加入 EDTA 脱镉剂后, 与镉对照组血样中的镉含量相比, 血样中的镉含量浓度差距最大, 但在血样中的含量也是最少的, 这可能由于在确定 ETC 的计量组时, 并没有使用最佳脱镉浓度, 而 EDTA 治疗组正好处于最佳脱镉浓度, 导致最终在加入 EDTA 后血样中镉含量最少。

表3 各组小鼠血镉含量

Table 3 The concentration of the blood cadmium of every group mice($\bar{x}\pm s$)

组别	连续染毒	间隔染毒
	血样/ $\mu\text{g/L}$	血样/ $\mu\text{g/L}$
空白组	1.498 \pm 0.509	1.387 \pm 0.098
镉对照组	186.500 \pm 28.770 ^{###}	89.700 \pm 6.410 ^{##}
EDTA 治疗组	83.140 \pm 23.350 ^{###**}	48.960 \pm 2.381 ^{##**}
ETC 低剂量治疗组	103.400 \pm 29.680 ^{###**}	66.100 \pm 1.203 ^{###**}
ETC 中剂量治疗组	97.850 \pm 2.731 ^{###**}	50.320 \pm 0.850 ^{##**}
ETC 高剂量治疗组	97.860 \pm 15.830 ^{###**}	53.010 \pm 1.205 ^{##**}
CTS 治疗组	126.700 \pm 14.460 ^{###**}	66.980 \pm 0.296 ^{###**}
CMCS 治疗组	127.130 \pm 4.180 ^{###**}	77.320 \pm 3.108 ^{###**}

注: 与空白组相比, $^{\#}p<0.05$, $^{##}p<0.01$; 与镉对照组相比, $^*p<0.05$ 。

2.6 脱镉剂治疗后小鼠各脏器镉含量变化

通过对动物小鼠的镉建模实验, 染毒组的小鼠各脏器中镉的含量与空白对照组相比均升高, 且均具有显著性差异($p<0.01$)。以不同脱镉剂对小鼠各脏器进行脱毒, 脱毒后镉含量的变化如图4所示。从图4可知, 连续染毒方式中, EDTA 与 CTS 治疗组除外, 其余各治疗组各脏器镉含量与镉对照组相比均减少, 并具有显著性差异($p<0.01$), CTS 治疗组与镉对照组相比,

心、肝镉含量均降低, 并有显著性差异($p < 0.01$), EDTA 治疗组虽然对各脏器镉含量有降低作用, 但是无显著性差异。间隔染毒方式中, 除 CTS 治疗组外, 其余各治疗组与镉对照组相比小鼠各脏器镉含量均较少, 并有显著性差异($p < 0.01$)。

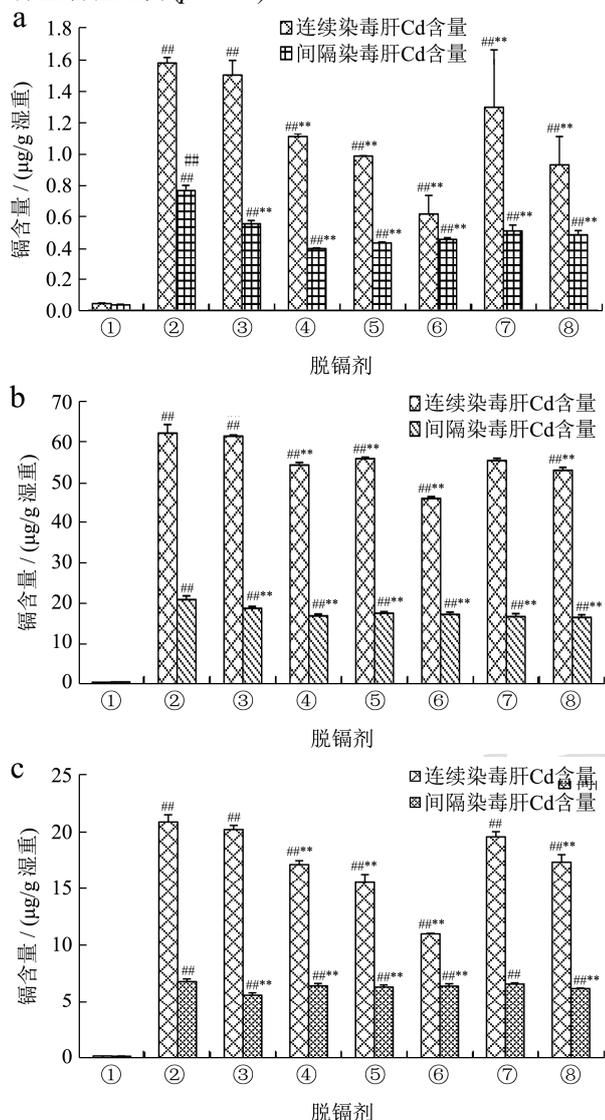


图4 不同脱镉剂对小鼠脏器镉含量的影响

Fig.4 Effect of Different Cadmium Removal Agents on Cadmium Contents in Mice

注: a、b、c 分别表示心、肝、肾; 与空白对照组相比, $^{\#}p < 0.05$, $^{\#\#}p < 0.01$, 与镉对照组相比, $^*p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$; ①空白对照组, ②镉对照组, ③EDTA 治疗组, ④ETC 低剂量治疗组, ⑤ETC 中剂量治疗组, ⑥ETC 高剂量治疗组, ⑦CTS 治疗组, ⑧CMCS 治疗组。

4 种脱除方法中, ETC 衍生物高剂量组相对于 ETC 中剂量组、ETC 低剂量组对镉脱除动物小鼠体内的脏器镉含量效果更好。CTS 脱重金属能力增强的原因在于, 壳聚糖通过在 O-位引入外来基团, 不仅保留了氨基, 使 N 的孤对电子能更多重金属离子形成配位

键, 且引入的基团又可进一步增强壳聚糖的吸附能力^[36]。

3 结论

3.1 通过 EDTA 对 CTS 改性, 制得壳聚糖衍生物 ETC。然后以不同的染毒方式进行 Cd^{2+} 的蓄积及脱除。两种染毒方式都会使镉对照组心脏系数均增大, 并有显著差异性。ETC 低、高剂量组、CTS 治疗组、CMCS 治疗组与镉染毒组相比, 心脏系数均降低, 脱镉剂对重金属有一定的驱除作用。

3.2 EDTA、ETC、CTS 对血镉脱除率分别达 58.94%、51.68%、37.43%; 而 ETC 对小鼠脏器镉的脱除率远高于其他脱镉剂, 其中对心、肾镉脱除率分别高达 63.90%、45.00%, 得出 ETC 对小鼠体内重金属 Cd^{2+} 有较好的吸附作用。

3.3 目前镉污染已经越来越严重, 无论是陆地、海洋还是人体的重金属超标现象也越来越严重。就现在来看, 大多数重金属脱除剂会对人体、海洋动物等产生各种副作用, 导致人体、动物的脏器受损严重, 因此人类、动物急需一种天然、无毒、高效的脱镉剂来脱除其身体中的重金属镉。而本文所制备的改性壳聚糖, 能在一定程度上克服了 CTS 的难溶于水的缺点, 而且高效、无毒, 为以后人类去除水中的重金属 Cd^{2+} 及其他有毒、有害的离子提供了一条新思路。

参考文献

- [1] Satarug S, Baker J R, Reilly P E B, et al. Evidence for a synergistic interaction between cadmium and endotoxin toxicity and for nitric oxide and cadmium displacement of metals in the kidney [J]. Nitric Oxide, 2000, 4(4): 431-440
- [2] 张建辉,王芳斌,汪霞丽,等.湖南稻米镉和土壤镉锌的关系分析[J].食品科学,2015,36(22):156-160
ZHANG Jian-hui, WANG Fang-bin, WANG Xia-li, et al. Analysis of Cadmium and cadmium in soil of Hunan [J]. Food Science, 2015, 36(22): 156-160
- [3] 毛伟杰,任惠峰,樊佳欢,等.日本扇贝加工废弃物中镉的脱除技术研究现状[J].安徽农业科学,2017,45(7):73-75
MAO Wei-jie, REN Hui-feng, FAN Jia-huan, et al. Research status of cadmium removal technology in processing waste of scallops in Japan [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2017, 45(7): 73-75
- [4] 吴佳林,鲍纬,程云雷,等.EDTA 螯合树脂对镉离子的吸附性能探究[J].安徽化工,2017,43(4):28-30
WU Jia-lin, BAO Wei, CHENG Yun-lei, et al. Study on adsorption performance of cadmium ion on EDTA chelating

- resin [J]. *Anhui Chemical Industry*, 2017, 43(4): 28-30
- [5] 李光先, 钟志勇, 陈嘉兴, 等. 乙二胺四乙酸驱镉对慢性镉、中毒大鼠、小鼠的肾毒性[J]. *实验动物与比较医学*, 2015, 31(1): 56-60
LI Guang-xian, ZHONG Zhi-yong, CHEN Jia-xing, et al. Nephrotoxicity of ethylenediaminetetraacetic acid as a repellent to chronic cadmium poisoning in rats and mice [J]. *Laboratory Animal and Comparative Medicine*, 2015, 31(1): 56-60
- [6] Shukla S K, Mishra A K, Arotiba O A, et al. Chitosan-based nanomaterials: a state-of-the-art review [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2013, 59(4): 46
- [7] Juang R S, Wu F C, Tseng R L. Solute adsorption and enzyme immobilization on chitosan beads prepared from shrimp shell wastes [J]. *Bioresource Technology*, 2001, 80(3): 187-193
- [8] Liu X L, Xie W C, Yang X H, et al. Optimization of adsorption technology of chitosan with *Paralytic shellfish poisoning* (PSP) by response surface methodology (RSM)[J]. *Advanced Materials Research*, 2011, 236-238: 2673-2678
- [9] 吕丹娜, 许丽, 刘正伟. 壳聚糖的生物学作用及在体内代谢的研究进展[J]. *中国畜牧兽医*, 2006, 33(8): 15-18
LV Dan-na, XU Li, LIU Zheng-wei. Biological effects of chitosan and its research progress in vivo metabolism [J]. *China Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2006, 33(8): 15-18
- [10] 王林. EDTA-壳聚糖的制备及对 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 的吸附研究[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2013
WANG Lin. Preparation of EDTA-chitosan and its adsorption for Cd^{2+} and Pb^{2+} [D]. Zhanjiang: Ocean University of Guangdong, 2013
- [11] Ren Y, Abbood H A, He F, et al. Magnetic EDTA-modified chitosan/ $\text{SiO}_2/\text{Fe}_3\text{O}_4$ adsorbent: Preparation, characterization, and application in heavy metal adsorption [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2013, 226(12): 300-311
- [12] Repo E, Warchol J K, Kurniawan T A, et al. Adsorption of Co(II) and Ni(II) by EDTA- and/or DTPA-modified chitosan: Kinetic and equilibrium modeling [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2010, 161(1-2): 73-82
- [13] Repo E, Warchol J K, Bhatnagar A, et al. Heavy metals adsorption by novel EDTA-modified chitosan-silica hybrid materials [J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2011, 358(1): 261-267
- [14] Tian X, Yun S, Zhou S, et al. The weight of main organs and organ coefficient in db/db and +/-db mice [J]. *Chinese Journal of Comparative Medicine*, 2006, 4: 220-222
- [15] 袁本利. 药物安全评价中脏器系数的意义及不足[J]. *中国新药杂志*, 2003, 12(11): 960-963
YUAN Ben-li. Significance and deficiency of organ coefficient in drug safety evaluation [J]. *Chinese Journal of New Drugs*, 2003, 12(11): 960-963
- [16] El-Sharif A A, Hussain M H M. Chitosan-EDTA new combination is a promising candidate for treatment of bacterial and fungal infections [J]. *Current Microbiology*, 2011, 62(3): 739-745
- [17] Loretz B, Bernkopschnürch A. In vitro evaluation of chitosan-EDTA conjugate polyplexes as a nanoparticulate gene delivery system [J]. *Aaps Journal*, 2006, 8(4): 756-764
- [18] 贾之慎, 李奇彪. 双突跃电位滴定法测定壳聚糖脱乙酰度[J]. *化学世界*, 2001, 5: 240-241
JIA Zhi-Shen, LI Qi-biao. Determination of the degree of deacetylation of chitosan by double jump potential titration [J]. *Chemical World*, 2001, 5: 240-241
- [19] 郑丝柳, 徐阳, 周颖梅. 羧甲基壳聚糖制备的反应条件对最优取代度的影响研究[J]. *化工技术与开发*, 2016, 44(6): 31-35
ZHENG Si-liu, XU Yang, ZHOU Ying-mei. Effect of reaction conditions on the optimal degree of substitution for preparation of carboxymethyl chitosan [J]. *Chemical Technology & Development*, 2016, 44(6): 31-35
- [20] Pawlak A, Mucha M. Thermogravimetric and FTIR studies of chitosan blends [J]. *Thermochimica Acta*, 2003, 396(1-2): 153-166
- [21] 吴永琴, 关存杰, 刘洪茂, 等. 镉诱导小鼠急性肝损伤模型的研究[J]. *安徽医科大学学报*, 2015, 50(10): 1443-1447
WU Yong-qin, GUAN Cun-jie, LIU Hong-mao, et al. Study on the model of acute liver injury induced by cadmium in mice [J]. *Journal of Anhui Medical University*, 2015, 50(10): 1443-1447
- [22] 房传栋, 张宾, 徐君辉, 等. 紫贻贝金属硫蛋白对小鼠体内镉富集的拮抗及排出功效研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2017, 8(7): 2723-2728
FANG Chuan-dong, ZHANG Bin, XU Jun-hui, et al. Antagonism and efficacy of metallothionein in mice in Vivo [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2017, 8(7): 2723-2728
- [23] 王志华, 江阳阳, 余晓华, 等. 壳聚糖及其水溶性衍生物对小鼠免疫功能的影响[J]. *食品科学*, 2016, 37(1): 198-202
WANG Zhi-hua, JIANG Yang-yang, YU Xiao-hua, et al. Effects of chitosan and its water-soluble derivatives on immune function in mice [J]. *Food Science*, 2016, 37(1): 198-202

- [24] Liu J, Liu Y, Habeebu S M, et al. Chronic combined exposure to cadmium and arsenic exacerbates nephrotoxicity, particularly in metallothionein-I/II null mice [J]. *Toxicology*, 2000, 147(3): 157-166
- [25] 王海健,万久琴,韩毓,等. 锌对镉致小鼠肝肾睾丸病理损伤的保护作用[J]. *毒理学杂志*, 2009, 23(4): 296-299
WANG Hai-jian, WAN Jiu-qin, HAN Yu, et al. Protective effects of zinc on pathological damage of liver and kidney testis in mice induced by cadmium [J]. *Toxicology*, 2009, 23(4): 296-299
- [26] 林霖,杨国栋,汪纪仓. 虎杖苷对镉致小鼠睾丸氧化应激损伤的保护作用[J]. *食品科学*, 2015, 36(23): 275-278
LIN Lin, YANG Guo-dong, WANG Ji-cang. Protective effect of polydatin on oxidative stress induced by cadmium in mice testis [J]. *Food Science*, 2015, 36(23): 275-278
- [27] Caldas N M, Oliveira S R D, Neto J A G, et al. Direct and simultaneous determination of Cd, Cu, and Se in blood samples by graphite furnace atomic absorption spectrometry [J]. *Atomic Spectroscopy -Norwalk Connecticut*, 2009, 30(4): 115-119
- [28] Anitha A, Rani V V D, Krishna R, et al. Synthesis, characterization, cytotoxicity and antibacterial studies of chitosan, -carboxymethyl and, -carboxymethyl chitosan nanoparticles [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2009, 78(4): 672-677
- [29] Bernkop-Schnürch A, Paikl C, Valenta C. Novel bioadhesive chitosan-EDTA conjugate protects leucine enkephalin from degradation by aminopeptidase N [J]. *Pharmaceutical Research*, 1997, 14(7): 917-922
- [30] Tachi M, Katagiri Y. Determination of cadmium in organs by atomic absorption spectrophotometry [J]. *Igaku to Seibutsugaku Medicine and Biology*, 1970, 81(3): 131-137
- [31] Iavicoli I, Carelli G, Castellino N, et al. The determination of low lead levels in the bone of lead-depleted mice by graphite furnace atomic absorption spectrometry [J]. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 2001, 370(8): 1100
- [32] Sabaa M W, Mohamed N A, Mohamed R R, et al. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of poly (-vinyl imidazole) grafted carboxymethyl chitosan [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2010, 79(4): 998-1005
- [33] Bernkop-Schnürch A, Paikl C, Valenta C. Novel bioadhesive chitosan-EDTA conjugate protects leucine enkephalin from degradation by aminopeptidase N [J]. *Pharmaceutical Research*, 1997, 14(7): 917-922
- [34] 田金花,杨华,迟光伟,等. 壳聚糖和壳寡糖的磷酸化研究[J]. *化学研究与应用*, 2010, 22(5): 554-558
TIAN Jin-hua, YANG Hua, CHI Guang-wei, et al. Phosphorylation of chitosan and chitoooligosaccharides [J]. *Chemical Research and Application*, 2010, 22(5): 554-558
- [35] 朱圣陶,傅春玲,江伟威,等. 某些营养素对短期染毒铅镉汞在 小鼠体内分布的影响[J]. *工业卫生与职业病*, 2005, 31(5): 305-309
ZHU Sheng-tao, FU Chun-ling, JIANG Wei-wei, et al. Effects of certain nutrients on short-term exposure to lead, cadmium, mercury in mice [J]. *Industrial Health and Occupational Diseases*, 2005, 31(5): 305-309
- [36] 李子琪,孟倩,孙凤清,等. 壳聚糖及其衍生物脱除贝类中重金属的机理及应用研究进展[J]. *食品与机械*, 2016, 2: 188-192
LI Zi-qi, MENG Qian, SUN Feng-qing, et al. Research progress on the mechanism and application of removal of heavy metals from shellfish by chitosan and its derivatives [J]. *Food and Machinery*, 2016, 2: 188-192