食物慢性砷暴露对小鼠脑组织中砷形态的影响

王琛绯¹,石明¹,王佳婷¹,张贵伟²,邱嘉怡¹,李银菲¹,窦昕皓¹,邹堂斌¹,郭莲仙¹

(1.广东医科大学公共卫生学院,广东东莞 523808)(2.深圳市计量质量检测研究院,广东深圳 518000) 摘要:为探索食物慢性砷暴露对生物体脑组织的影响,本研究以水稻中的砷形态和比例为参考,设计了三个含砷剂量组:模拟 组(S): 0.91 mg/kg;低剂量组(L): 9.10 mg/kg;高剂量组(H): 30 mg/kg,对C57BL/6小鼠进行为期三个月的染毒研究,并测定 小鼠血和脑组织中总砷和各种砷形态(iAs^{III}、iAs^V、MMA、DMA和AsB)的含量。结果显示,在C、S、L和H中,血的总砷含量 分别为0.022、0.023、0.068和0.132 mg/kg;大脑的总砷含量分别为0、0.006、0.075和0.172 mg/kg;其中,五种砷形态均可在血液 中检测到,在L、H组小鼠大脑中仅检测到DMA和未知形态的砷(uAs)。因此,小鼠血液和大脑中的总砷含量随暴露剂量增大而升 高,砷在体内的解毒过程也随暴露剂量增大而加速;血液中有机砷与无机砷之比可反映机体砷暴露水平;尽管食物中无机砷不能通过 血脑屏障,但由于大脑中仍能检测到低毒的DMA和毒性未知的uAs,因此,食物的砷毒特别是大米的砷毒性仍应引起关注。

关键词: 砷; 大米; 饮食暴露; 脑; 慢性砷暴露 文章篇号: 1673-9078(2020)07-289-297

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.7.1262

Arsenic Species Analyses of Mice Brain under Chronic Arsenic Exposure

through Food

WANG Chen-fei¹, SHI Ming¹, WANG Jia-ting¹, ZHANG Gui-wei², QIU Jia-yi¹, LI Yin-fei¹, DOU Xin-hao¹, ZOU Tang-bin¹, GUO Lian-xian¹

(1. Guangdong Medical University, School of public health, Dongguan 523808, China)

(2.Shenzhen Academy of Metrology and Quality Inspection, Shenzhen 518000, China)

Abstract: In order to explore the effects of chronic arsenic (As) exposure in food on organisms, in this study, As-treated feeds with the proportion of the arsenic composition in rice were prepared and three arsenic-containing dose groups (Simulate dose group: 0.91 mg/kg, Low dose group: 9.10 mg/kg, High dose group: 30 mg/kg) were designed according to the dose gradient, which were used to feed C57BL/6 mice over three months and the contents of total arsenic and five arsenic species (iAs^{III}, iAs^V, MMA, DMA and AsB) in blood and brain tissues of mice were determined. In groups of C, S, L and H, the total arsenic (tAs) contents in blood were 0.022, 0.023, 0.068 and 0.132 mg/kg, respectively, and the total arsenic contents in brain were 0, 0.006, 0.075 and 0.172 mg/kg, respectively. While the five arsenic species can be detected both in blood, and only DMA and some unknown As species (uAs) were detected in the brain in groups of L and H. The results presented a clear dose-related accumulations of total arsenic (tAs) reflected both in blood and brain, the detoxification process of arsenic in vivo also accelerated with the increase of exposure dose, and the ratio of organic arsenic/inorganic arsenic (oAs/iAs) can reflect the dose of arsenic exposure. Thus, the current study indicated that although the toxic iAs in food could not transfer across the blood-brain barrier and the toxicity of As in food especially for the staple should be concerned.

Key words: arsenic; rice; food exposure; brain; chronic arsenic exposure

引文格式:

王琛绯,石明,王佳婷,等.食物慢性砷暴露对小鼠脑组织中砷形态的影响[J].现代食品科技,2020,36(7):289-297

WANG Chen-fei, SHI Ming, WANG Jia-ting, et al. Arsenic species analyses of mice brain under chronic arsenic exposure through food [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(7): 289-297

收稿日期: 2019-12-22

基金项目:广东省自然科学基金项目(2018A030313094; 2020A1515010457);东莞市社会发展项目(20185071521641)

作者简介:王琛绯(1994–),女,在读研究生,研究方向:营养与食品卫生;共同第一作者:石明(1982–) ,男,博士,教授,研究方向:免疫毒物学 通讯作者:郭莲仙(1984–),女,博士,教授,研究方向:卫生检验学、食品安全学 类金属元素砷 (As) 被认为是岩石圈中最广泛存 在的矿物质之一^[1]。水稻作为一种禾本科植物,由于 稻田厌氧的特殊化学性质和水稻髓腔中空的特殊解剖 结构^[24],对土壤中砷具有特殊的积累能力^[5],其砷含 量远高于旱作农作物,可以富集包括亚砷酸盐 (Arsenite, iAs^{III}),砷酸盐(Arsenate, iAs^V),一甲 基砷酸(Methylarsonic acid, MMA)和二甲基砷酸 (Dimethylarsulate acid, DMA)等多种砷形态^[6-8]。在 水稻中,除主要的无机砷(iAs^{III}和iAs^V)外,有机砷 (MMA 和 DMA)的含量为 20%^[8,9]。砷化物的代谢 和分布因具体化合物形态、摄入途径和暴露程度而异 ^[10,11],因此,这些因素在确定不同砷化合物之间的毒 性差异和不同器官产生的毒性效应具有重要意义。

砷的毒性与其形态密切相关。不同砷形态的毒性 大小为 iAs^{II}>iAs^V>MMA>DMA,而 AsB 基本无毒 ^[1,12]。一些流行病学研究已经报道了人类健康损害与 无机砷 (iAs^{III}和 iAs^V)暴露之间的关系^[13,14],砷可诱 发多种疾病,包括癌症^[15],糖尿病^[16]和心血管疾病^[17]。 近年来,有研究表明砷暴露与神经退行性疾病发病率 增加有关^[18-21],然而其致病机理尚不清楚。此外,目 前有关砷毒性的影响研究主要集中在饮用水(iAs^{III}) 中,而食物慢性砷暴露对生物体,尤其是对大脑的影 响研究极其缺乏。因此,对于终生将大米作为主食的 人群来说(全球约数十亿人),应通过食用模拟大米的 砷形态及含量进行长期砷暴露的研究,并严格评估大 米来源的砷对神经系统如脑的影响和毒性,特别是对 神经退行性疾病的诱发^[22]。



图1 本文的研究方法及主要研究结果概览

Fig.1 The overview of the method and the major results

本课题组前期研究发现,给予小鼠为期1个月的 食物砷暴露后,砷能在血液和肠肝肾脏器中蓄积^[23]。 为进一步研究慢性砷暴露对机体的影响,本研究将染 毒时间延长至3个月,通过ICP-MS和HPLC-ICP-MS 对血液和脑中砷形态和含量进行测定,评估食物砷暴 露的健康风险,以进一步了解大米砷暴露对机体不同 砷形态积累的影响。

1 材料与方法

1.1 试剂

用 Milli-O 水净化系统 (Millipore, Bedford, MA, USA)获得的去离子水用于制备所有溶液。以碳酸铵 (Ammonium carbonate, (NH₄)₂CO₃)为流动相。用浓 HNO3(69%)进行样品消化,稀HNO3(1%)进行样 品提取。通过国家计量研究所(北京,中国)提供的 标准库存溶液稀释或混合制备成标准溶液来测定总砷 含量和砷形态:前者从储备溶液(iAs^V)中稀释至10 mg As/L, 经认证的浓度为 1000 mg As/L; 后者由 iAs^{III} (1.011 µmol/g), iAs^V (0.233 µmol/g), MMA 制备 (0.355 µmol/g), DMA (0.706 µmol/g) 和 AsB (0.518 umol/g),混合制备所有储备液于4℃保存。国家标准 参考材料: GBW10049(大葱, 中国地质科学院地球 物理地球化学勘查研究所,廊坊,中国),GBW10051 (猪肝,中国地质科学院地球物理地球化学勘查研究 所, 廊坊, 中国), GBW08573 (黄鳍金枪鱼, 第二海 洋研究所,杭州,中国),GBW(E)100358(水稻,国 家钢铁材料测试中心,北京,中国)和 NRC TORT-3 (龙虾肝,加拿大国家研究委员会,渥太华,加拿大) 被用作认证的参考物质(Certified reference material, CRM)。

1.2 动物的分组及处理

6 周龄 SPF 级 C57BL/6 雄性小鼠 (n=24, 平均体 重: 18g)(小鼠许可证号: SCXK (粤) 2016-0041), 广东省实验动物中心),于实验前进行1周的适应性喂 养(不添加砷)。实验期动物饲养环境为屏障系统,温 度保持在 20±2 ℃,相对湿度为 50%~60%, 12 h 昼夜 循环。在整个研究过程中,所有小鼠可自由摄食、饮 水。正式染毒实验:将小鼠分为四组:对照组(C组), 模拟大米的砷剂量组(S组),低砷剂量组(L组)和 高砷剂量组(H组)。按照在1.3中准备的相应剂量饲 料对各剂量组喂食3个月。研究过程中记录饲料消耗 量,每周对小鼠进行称重。暴露3个月后,通过脊椎 脱臼法处死小鼠。从眼眶后神经丛中收集血液样本, 并迅速取出脑样本,在预冷后的等渗盐溶液中冲洗, 匀浆后保存在聚丙烯试管中,分别进行总砷和砷形态 的检测。本次实验所有动物实验操作经南方医科大学 实验动物福利和伦理管理委员会(项目编号: 44002100016988) 批准。

2020, Vol.36, No.7

1.3 含砷饲料的设计与制备

为评估摄入食物砷暴露对机体健康的影响,在本次实验中,设计了一种小鼠饲料来模拟大米中砷的组成和含量。根据 Meeh-Rubner 方程(公式1)计算人与小鼠之间的等效剂量转换系数 K 值,以及根据健康风险评估模型中大米砷的每日估计摄入量(公式2)(Environment Protection Agency, EPA)设计模

机剂量组 (S):

$$\mathbf{A} = \mathbf{K} \times \mathbf{B} \mathbf{W}^{\overline{3}} \tag{1}$$

$$EDI = \frac{C \times IR}{BW}$$
(2)

公式(1)和(2)中,K为常数,随动物种类的不同而不同;而2/3是皮肤表面积(A)与体重(BW)相关联的质量指数;*EDI*[mg/(kg·day)]是估计的每日砷摄入量,C(mg/kg)是饮食中总砷的浓度;*IR*是食物的每日摄入量。

在这项研究中,人与小鼠之间的 K 值为 9.1, C_{rice} 为 1.6 mg/kg(高砷地区大米中砷的平均含量 C_{rice} 可达 1.6 mg/kg^[24])、IR $_{\wedge}$ 、IR $_{\wedge g}$ 、BW $_{\wedge}$ 和 BW $_{\wedge g}$ 分别为 0.5 mg/kg、0.004 mg/kg、60 kg 和 0.03 kg。最后计算的 S 组中饲料总砷含量(C_{feed})为 0.91 mg/kg。

此外,本次实验中还设计了低砷暴露组(L组, tAs: 9.1 mg/kg,为S组的10倍)和高砷暴露组(H 组,tAs: 30 mg/kg,其中 *C*_{iAs}m为小鼠口服亚砷酸钠 半数致死量的三分之一),按水稻中主要砷形态的比例 iAs^v:iAs^m:MMA:DMA=7.3%:72.7%:1.0%:19.0% 添加 四种砷化合物^[25-29]。同时,对照组(C组)的小鼠给 予标准小鼠饲料(不添加砷)。

为确保饲料中砷的稳定性,根据小鼠的摄食量约为4至8g/d,本研究将所有饲料按每包25g分成小包装,以便每天更换。

1.4 总砷及砷形态测定

根据本课题组前期研究^[30],通过 ICP-MS (Agilent 7800, Santa Clara, A, USA)测定组织中的总砷浓度 (*C*tAs)。首先在微波消解系统中使用浓 HNO₃ 消化 研磨好的样品,其次,将样品冷却至室温并过滤。将 离心后的上清液作为样本注入 ICP-MS 进行检测。设 备运行参数:射频功率 1550 W,载气 1.05 L/min,碰 撞模式为 He 4.2 mL/min,等离子体气体流量 15 L/min,辅助气体流量 0.1 L/min,选择同位素=m/z 75。样品使用 iAs^V标准品进行外标法定量(校准点: 5、10、50、100 和 200 nL/L)。每个样本进行三次平行测定,并测定相应的空白样(每个样品系列一个)。

通过 Agilent1260 高效液相色谱系统 (HPLC-ICP-MS, Agilent, USA) 分离和测定五种砷 形态(iAs^{III}, iAs^V, MMA, DMA, AsB)。利用稀 HNO₃将样品置于 90 ℃恒温箱中热浸提后,冷却至室 温,取上清过滤后进样测定。该色谱仪配备了标准自 动进样器, IonPac AG19 保护柱(4×50 mm)和 IonPacAS19 分离柱 (4×250 mm)。用于 HPLC 的主要 色谱条件如下:流动相为 25 mmol/L 碳酸铵, PH=9.5; 流速为 1.0 mL/min; 柱温为室温, 进样量为 50 µL。 通过 ICP-MS 分离出的砷形态检测,并将保留时间与 标准品进行比较。根据相应的标准,使用外部校准曲 线(校准点: 0、2.5、5、10、50 和 100 nL/L)来对 iAs^{III}, iAs^V, MMA, DMA 和 AsB 进行定量。每个样品进行 三次重复分析。在每个工作阶段中,均通过 HPLC-ICP-MS 分析提取空白。对于同一样品,通过 CtAs 与 5 种砷形态之和之间的 δ 值计算其他未检出的 有机砷(uAs)。质量控制参照本课题组前期研究进 行^[30],包括回收率的测定,提取和消化效率的确定, 以及认证的标准物质的验证。

1.5 统计学分析

利用 SPSS (V25.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 进行数据统计分析。采用 Student-t 检验或 ANOVA 检 验或 Kruskal-Wallis 检验方法对不同组织,不同组之间 的总砷和砷形态含量进行统计分析并比较。*p*<0.05 被 认为具有统计学意义。

2 结果与讨论

本研究中,饲料,血液和大脑中四个不同处理组 (C,S,L和H)中砷形态的总离子流如图2所示。 各剂量组小鼠饲料、血液和大脑中总砷和各种砷形态 含量测定结果见表1。

2.1 总砷和砷形态仪器分析性能验证

本研究通过线性度(R=0.9999~1.000),检测限 (LODs<2 µg/kg),定量限(LOQs<7 µg/kg),相对标 准偏差(RSDs<7%),回收率(86.8%~110.2%),CRM 物质对总砷和砷形态的质量控制进行了验证,见表 2、 表 3 和表 4。

2.2 小鼠饲料的制备

水稻中的砷大部分集中在种子(大米)里,并且 形态也会改变(与土壤及灌溉水中不同)^[7]。为了模 拟人类进食大米导致的砷暴露,本研究制备模拟受污 染的大米饲料对小鼠进行喂养。根据 1.3 所述,本次 研究按照 iAs^v, iAs^{III}, MMA 和 DMA 的配比含量分 别为 7.3%, 72.7%, 1%, 19%为各实验组制备了相应 剂量的含砷饲料。为确保所制备饲料中的砷形态比例 与大米相同,本研究同时对饲料中的总砷和砷形态的 含量进行了检测。结果表明,尽管对照组(C组)的 饲料是标准的小鼠饲料,未添加砷,但是由于环境中 普遍存在砷,仍能检测到微量的砷^[31]。减去基底水平 (标准小鼠饲料中的砷)后,结果显示,饲料中不同 砷形态比例几乎接近大米的砷含量比例(图3和表5)。 因此,本课题组精准制备了能稳定存储且能模拟大米 中砷形态及含量的饲料(即在制备期间没有砷形态的 转化)。





HPLC-ICP-MS

注: a: 以 100 μg/L 的 AsB, DMA, iAs^{III}, MMA 和 iAs^V 混合标准样品; b: 对照组饲料样品; c: S 组饲料样品; d: L 组血液样品; e: H 组大脑样品。

表1 饲料、血液和大脑中总砷和砷形态的含量

Table 1 Concentrations of total As and As species in Feeds, Blood and Brain

| | 组别 | iAs ^{V1} (mg/kg ²)/% ³ | iAs ^{III} (mg/kg) /% | MMA (mg/kg) /% | DMA (mg/kg) /% | AsB (mg/kg) /% | uAs (mg/kg) /% | Total As /(mg/kg) |
|-------|----|---|----------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|----------------------|
| | С | 0.307 (80.79) | 0.069 (18.16) | BDL^4 | 0.004 (1.05) | BDL | BDL | 0.38 |
| 石圳 | S | 0.471 (36.34) | 0.699 (53.94) | 0.003 (0.23) | 0.123 (9.49) | BDL | BDL | 1.296 |
| 19141 | L | 2.585 (25.34) | 6.279 (61.55) | 0.107 (1.05) | 1.23 (12.06) | BDL | BDL | 10.201 |
| | Н | 4.473 (15.10) | 21.286 (71.86) | 0.27 (0.91) | 3.593 (12.13) | BDL | BDL | 29.622 |
| | C | 0.010 (45.45) | 0.012 (54.55) | BDL | BDL | BDL | BDL | 0.022 |
| 血液 | S | 0.011 (47.83) | 0.012 (52.17) | BDL | BDL | BDL | BDL | 0.023 |
| | L | 0.019 (27.94) | 0.023 (33.82) | BDL | 0.027 (39.71) | BDL | BDL | 0.068 |
| | Н | 0.011 (8.33) | 0.038 (28.79) | 0.006 (4.55) | 0.061 (46.21) | 0.005 (3.79) | 0.011 (8.33) | 0.132 |
| 大脑 | С | BDL | BDL | BDL | BDL | BDL | BDL | BDL |
| | S | BDL | BDL | BDL | 0.006 (100.00) | BDL | BDL | 0.006 |
| | L | BDL | BDL | BDL | 0.048 (64.00) | BDL | 0.027 (36.00) | 0.075 |
| | Н | BDL | BDL | BDL | 0.099 (57.56) | BDL | 0.073 (42.44) | 0.172 |

注: 1.iAs^V, iAs^{III}, MMA, DMA, AsB, uAs 和总砷分别是砷酸盐, 亚砷酸盐, 一甲基亚砷酸, 二甲基砷酸, 砷酸甜菜碱, 未 知砷和总砷的缩写; 2.浓度以每组的平均值表示, 相对标准偏差(RSD) 小于 7%。3.每种砷的相对丰度; 4.BDL 表示低于检测限的值。

| 表 2 ICP-MS 对总砷的分析性能和 HPLC-ICP-MS 对各砷形态的分析性能 | | | | | | | | |
|--|---------------------------|-------------|--------------------|---------------------|-----------------|-----------------|--|--|
| Table 2 Analytical performances for total Arsenic by ICP-MS and Arsenic species by HPLC-ICP-MS | | | | | | | | |
| 分析 | 市物 线 | .性范围/(µg/L) | 线性方程 | 相关系数R | 检出限 LOD/(µg/kg) | 定量限 LOQ/(µg/kg) | | |
| Tota | As | 0.5-500 | y=804.166x+5.55 | 1.0000 | 2.3 | 6.9 | | |
| iAs | зш | 0.2-300 y | z=2690.89x+280.53 | 0.9999 | 1.0 | 3.0 | | |
| iAs | \mathbf{s}^{V} | 0.2-300 y | z=2682.78x+1279.2 | 1.0000 | 1.1 | 3.3 | | |
| DM | IA | 0.2-300 | y=3891.14x+0 | 1.0000 | 1.3 | 4.0 | | |
| MN | ſA | 0.5-300 | y=2792.50x+40.12 | 1.0000 | 2.2 | 6.6 | | |
| As | В | 0.2-300 | y=2972.19x+85.02 | 1.0000 | 1.1 | 3.3 | | |
| | | | 表 3 检测方法 | 法的回收率和精密 | 度 | Xx | | |
| | | | Table 3 Recovery a | nd precision of the | e method | | | |
| - | 分析物 | 背景值/(mg/kg) | 添加量/(µg/L) | 测定值/(µg/L |) 回收率/% | RSD/%(n=6) | | |
| _ | | | 5.00 | 8.03~8.56 | 92.1~102.8 | 4.1 | | |
| | Total As | 0.17 | 10.0 | 12.2~14.1 | 87.3~105.7 | 4.7 | | |
| | | | 50.0 | 51.9~54.7 | 96.1~103.3 | 1.8 | | |
| | | | 2.00 | 1.98~2.22 | 91.3~104.3 | 4.2 | | |
| | AsB | 0.0026 | 10.0 | 9.03~9.82 | 88.4~95.8 | 2.6 | | |
| | | | 50.0 | 45.6~54.6 | 89.3~108.1 | 5.3 | | |
| | | | 2.00 | 7.83~8.21 | 90.8~110.1 | 4.4 | | |
| | DMA | 0.12 | 10.0 | 15.2~17.1 | 91.4~108.8 | 3.6 | | |
| | | | 50.0 | 56.7~59.9 | 101.1~107.2 | 1.4 | | |
| - | | | 2.00 | 3.28~3.37 | 89.2~95.6 | 5.1 | | |
| | iAs ^{III} | 0.029 | 10.0 | 10.3~12.3 | 86.8~106.9 | 5.9 | | |
| | | | 50.0 | 48.6~55.2 | 93.5~106.6 | 3.3 | | |
| | | | 2.00 | 2.29~2.36 | 95.0~98.3 | 2.1 | | |
| | MMA | 0.0077 | 10.0 | 10.5~11.2 | 100.7~107.6 | 1.5 | | |
| | | | 50.0 | 46.3~49.9 | 91.2~98.2 | 2.0 | | |
| • | | | 2.00 | 2.19~2.44 | 96.4~110.1 | 6.3 | | |
| | iAsv | 0.0047 | 10.0 | 10.4~11.1 | 101.1~108.0 | 3.8 | | |
| | | | 50.0 | 47.6~55.6 | 93.1~110.2 | 4.6 | | |

表4 国家标准参考物质值(mg/kg,平均值±标准偏差)以及总砷和无机砷的测定值

Table 4 National Standard Reference Materials values (mg/kg, mean ± standard deviation) and determined values for total and inorganic

| | | arsenic (n=5). | | |
|---------|--------------|--|---------------------|-----------|
| 样品类型 | 参考标准 | 标准值/(mg/kg) | 测定值/(mg/kg) | 回收率/% |
| 大葱 | GBW10049 | 0.52±0.11 | 0.513±0.10 | 98.7 |
| 猪肝 | GBW10051 | 1.4±0.3 | 1.43±0.17 | 102.1 |
| 黄鳍金枪鱼 | GBW08573 | 5.08±0.39 | 5.02±0.20 | 98.8 |
| | CDW/E)100250 | 0.16±0.02 (total As) | 0.166±0.012 | 103.8 |
| 小柏 | GBW(E)100358 | 0.13±0.02 (iAs) | 0.141 ± 0.010 | 108.5 |
| 龙虾肝 | NRC TORT-3 | 59500±3800 (total As) 54900±2500 (AsB) | 63422±26452496±4352 | 106.695.6 |

2.3 砷在血液中代谢的过程

小鼠(包括人体)经由口服暴露砷后,先经由胃 肠道吸收,再转运至各器官代谢。且大多数砷直接由 尿液和粪便排出,一小部分砷通过各种甲基化和还原 作用达到"减毒"的效果^[32]。本研究中, C, S, L和H 组的血液中总砷(tAs)的含量范围分别为 0.004~0.0051 mg/kg, 0.0069~0.0091 mg/kg, 0.0465~ 0.0584 mg/kg, 0.1158~0.1432 mg/kg, 经统计学分析, L 组和H 组中砷含量显著高于C 组(C&L: *p*<0.01;

Modern Food Science and Technology

C&H: *p*<0.001)。同时,观察到小鼠给与慢性食物砷 暴露后,血液中的总砷含量随着暴露剂量的增加而明 显升高,表现出高度的剂量相关性(图 2c)。该结果 与 Juarez-Reyes 等的研究一致^[33]。

此外,各组饲料中总砷浓度的比例为1:3:18:54, 而在血液中其比例为1:1:3:6,与饲料相比,有明显的 降低趋势(图3d)。这种失配表明,小鼠可能存在某种 代谢机制从而限制甚至负反馈调控高浓度暴露下砷从 胃肠道向血液的吸收。这可能有以下两种原因:①由 于砷可与红细胞中的血红蛋白、血浆蛋白结合^[34,35], 当暴露剂量达到某个阈值时,蛋白结合砷的能力即达 到饱和,使得血液中的砷代谢到其他器官中;②由于 食物砷暴露导致对肠屏障造成损伤,肠道组织的功能 损伤障碍又可能反向导致对食物砷的吸收不足^[36]。

表 5 饲料中总砷和砷形态的浓度(减去基底水平后)

| Table 5 Concentrations of total As and As species in Feed(after subtracting the base level) | | | | | | | | |
|---|---------------------------|------------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|------------------|--|
| 组别 | $iAs^{V^1}(mg/kg^2)/\%^3$ | iAs ^{III} (mg/kg)/% | MMA (mg/kg)/% | DMA (mg/kg)/% | AsB (mg/kg)/% | uAs (mg/kg)/% | Total As/(mg/kg) | |
| rice ⁵ | (7.30) | (72.70) | (1.00) | (19.00) | - | | | |
| S | 0.164 (17.90) | 0.63 (68.78) | 0.003 (0.33) | 0.119 (12.99) | BDL^4 | BDL | 0.916 | |
| L | 2.278 (23.20) | 6.21 (63.23) | 0.107 (1.09) | 1.226 (12.48) | BDL 👞 | BDL | 9.821 | |
| Н | 4.166 (14.25) | 21.217 (72.56) | 0.27 (0.92) | 3.589 (12.27) | BDL | BDL | 29.242 | |

注: 1.iAs^V, iAs^{III}, MMA, DMA, AsB, uAs 和总砷分别是砷酸盐, 亚砷酸盐, 一甲基砷酸, 二甲基砷酸, 砷砷甜菜碱, 未知 有机砷和总砷的缩写; 2.浓度以每组的平均值表示, 相对标准偏差(RSD)小于 7%。3.每种砷的相对丰度; 4.BDL 表示低于检测极 限的值; 5.中国水稻中不同砷物种的比率。

另一方面,就血液中的砷形态(多样性)的种类 而言,尽管所有小鼠暴露于五种砷形态下,但只有高 剂量组的小鼠血液中能检测到这五种砷形态,在C和 S组中仅检测到2种砷形态(iAs^V和iAs^{III}),在L组 中仅检测到3种砷形态(iAs^V,iAs^{III}和DMA)。简言 之,砷形态种类的数量随着暴露剂量的增加而增加。 这表明,对于生物而言,生物转化可能会因砷暴露的 程度不同而发生变化,甲基化过程可能会因高剂量砷 暴露而受到刺激(例如L和H组)^[37]。当暴露剂量达 到某个阈值时,机体会启动某种调节机制来加速砷的 代谢。亚砷酸盐-3-甲基转移酶(AS3MT)是一种特异的 砷抗性酶,可氧化甲基化所有三价砷化合物(iAs^{III}、 MMA^{III}和DMA^{III}),在高砷暴露下,AS3MT mRNA 的表达会被激活^[38,39]。

此外,尽管饲料中添加的 iAs^v 成比例增加,但在 不同的暴露剂量下,血液中的 iAs^v 含量保持稳定(含 量范围在 10~19 ng/g 内),经统计学分析,各组间 iAs^v 含量无统计学差异(p>0.05),表明小鼠体内存在 iAs^v 的代谢转化阈值。该推论与 A.Juárez-Reyes 等人的观 点一致,他们推论甲基化能力可能因高无机砷负荷而 饱和^[33]。

除 iAs^V外,血液中其他形态的砷(iAs^{III},DMA, MMA 和 AsB)在不同的实验剂量下均表现出明显上 升趋势(图 3c)。iAs^{III}是C和S组血液中的主要砷形 态,分别占砷总量的54.55%和52.17%。在L和H组 中,iAs^{III}的比例显著下降,而DMA的含量百分比则 上升,分别占39.71%和46.21%。随着剂量的增加,iAs^V 的百分比含量下降。这可能是由于当暴露剂量逐渐增 高时,血液中对砷减毒的甲基化过程才逐渐启动,而 血液中砷的减毒过程又以 iAs^{III} 的甲基化为主^[40],同 时谷胱甘肽可动员结合 DMA^{III},并转化为较稳定的 DMA^{V[34]}。由于 MMA 与血浆蛋白的结合不明显,并 可进一步转化为 DMA,因此血液中 MMA 含量较低。 L、H 组中高含量 DMA 与低含量 MMA 的结果与 Twaddle 等人结果一致^[40]。即,有机砷与无机砷的比 例 (oAs/iAs)随暴露剂量增大而相应增加(图 3b), 表明体内发生剂量级配的砷解毒过程,小鼠的甲基化 能力随高剂量砷暴露而增加,即血液中有机砷与无机 砷之比可反映机体砷暴露的剂量。

2.4 砷沿血液向大脑的转移过程

已有文献报道,食物中的砷可以沿血液运输,穿 过血脑屏障并进入脑组织^[41]。本次研究发现,DMA 是脑中的主要砷形态,即使在H组中也无法在血液中 检测到血液中的其他暴露形态(iAs^{III},iAs^V,MMA, AsB)。这表明,DMA 可能是唯一可以穿过血脑屏障 进入大脑的砷形态,而其他砷形态,尤其是高毒性的 无机砷(iAs^{III}和iAs^V)则被血脑屏障所阻断。另一项 研究报道,只有当血脑屏障尚未成熟时,iAs(iAs^V 和iAs^{III})才能轻易地穿越血脑屏障^[42]。

因此,对于小鼠而言,为了保护大脑的生理功能, 在慢性饮食砷暴露下只能允许毒性最低的 DMA 穿过 成熟的血脑屏障从而进入大脑,这些 DMA 与 iAs 相 比对大脑代谢的影响可能比较小。K. Yamanaka 等研 究发现 DMA 可诱导活性氧,目前认为其可致染色体 改变和 DNA 损伤,并具有致癌性^[42]。康朝胜等研究 表明大脑中蓄积的砷对成年大鼠海马神经元、神经胶 质细胞及突触具有损伤作用^[43]。Kibum K. H.通过对 78 名长期砷暴露对象和117 名对照组受试对象神经心 理学和神经生理学测试,发现砷暴露组出现外周神经 病,表现为对称性的感觉和运动障碍,并且通过神经 组织活检发现其轴突发生退行性病变^[44]。因此,大米 的终生食用和 DMA 在大脑中的蓄积有着明确的联 系,不容忽视。这些蓄积在大脑中的 DMA 是否与神 经退行性疾病的发生尚需进一步深入研究。



Fig. 3 Concentrations of total As and As species in Feed, Blood and

Brain

注:a.饲料,血液和大脑中各组中每种砷形态的比例(%);

b.饲料和血液中的 oAs/iAs 比(左Y轴)和大脑中的 uAs/DMA 比(右Y轴); c.不同组之间血液和大脑中总砷和砷形态的含 量; d.饲料,血液和大脑中总砷的浓度。

值得注意的是,本研究在L和H组的小鼠大脑中 检测到一些未知的砷形态(uAs),分别占总砷含量的 36%和42.44%。这些未知的砷形态(uAs)可能是DMA 在大脑中的次级代谢产物^[45]。有研究指出,大脑可能 具有代谢DMA的机制^[46]。此外,未知砷形态的比例 随着实验剂量的增加而显著增加,这可以推断出砷在 大脑中可能发生了进一步的"减毒"。这对于了解砷对 大脑的毒性作用和解毒机理是至关重要的,应进一步 研究确定这些未知砷形态的详细信息,这些信息可能 有助于阐明砷对神经退行性疾病的作用机理,并更准 确地评估食用大米的风险。

3 结论

在这项研究中,我们通过模拟大米砷形态设计含 砷饲料,明确了通过食物长期暴露于多种砷形态 (iAs^{III},iAs^V,DMA和MMA)的小鼠血液和大脑中 总砷和砷形态的水平。结果表明血液和大脑中总砷 (tAs)含量与砷暴露剂量呈明显相关性,机体有机砷 与无机砷之比可反映机体砷暴露的剂量,而血脑屏障 可有效阻隔高毒的无机砷进入大脑。但大脑中蓄积的 DMA 和某些未知的砷形态(uAs),仍有待进一步研 究。

参考文献

- Abernathy C, Chakraborti D, Edmonds J S. Arsenic and Arsenic Compound. Monographs on Evaluation of Carcinogenic Risks to Man [M]. IPCS, 1987
- [2] Y Jia, H Huang, M Zhong, et al. Microbial arsenic methylation in soil and rice rhizosphere [J]. Environ Sci Technol, 2013, 47(7): 3141-3148
- [3] M Kuramata, F Sakakibara, R Kataoka, et al. Arsenic biotransformation by *Streptomyces* sp. isolated from rice rhizosphere [J]. Environ Microbiol, 2015, 17(6): 1897-1909
- Y Jia, H Huang, Z Chen. Arsenic uptake by rice is influenced by microbe-mediated arsenic redox changes in the rhizosphere
 [J]. Environmental Science & Technology: ES&T, 2014, 48(2): 1001-1007
- [5] T Llorente-Mirandes, J Calderón, JF López-Sánchez. A fully validated method for the determination of arsenic species in rice and infant cereal products [J]. Pure and Applied Chemistry, 2012, 84(2): 225-238
- [6] B O'Shea, M Stransky, S Leitheiser, et al. Heterogeneous

Modern Food Science and Technology

arsenic enrichment in meta-sedimentary rocks in central Maine, United States [J]. Sci Total Environ, 2015, 505: 1308-1319

- [7] 谢科.中国主要粮食产区的大米中总砷和砷形态物质的检测及其暴露评估[D].武汉:武汉轻工大学,2013
 XIE Ke. Arsenic and arsenic speciation detection and exposure assessment for rice from Chinese major rice-producing areas
 [D]. Wuhan: Wuhan Polytechnic University, 2013
- [8] Y Huang, M Wang, X Mao, et al. Concentrations of inorganic arsenic in milled rice from china and associated dietary exposure assessment [J]. Agric Food Chem, 2015, 63(50): 10838-10845
- [9] Liang Feng, Li Yu-Lan, Zhang Gui-lin, et al. Total and speciated arsenic levels in rice from China [J]. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess, 2010, 27(6): 810-816
- [10] Marie Vahter. Species differences in the metabolism of arsenic compounds [J]. Applied Organometallic Chemistry, 1994, 8(3): 175-182
- [11] Ni Dhubhghaill O M, Sadler P J. The Structure and Reactivity of Arsenic Compounds: Biological Activity and Drug Design [M]. Springer Berlin Heidelberg, 1991
- [12] Zhu Yong-guan, Yoshinaga M, ZHAO Fang-jie, et al. Earth abides arsenic biotransformations [J]. Annu Rev Earth Planet Sci, 2014, 42: 443-467
- [13] Cubadda F, Jackson B P, Cottingham K L, et al. Human exposure to dietary inorganic arsenic and other arsenic species: state of knowledge, gaps and uncertainties [J]. Sci Total Environ, 2017, 579: 1228-1239
- [14] Jia Chao-Nan, Wei Ya-Ping, Lan Yuan, et al. Comprehensive analysis of the metabolomic characteristics on the health lesions induced by chronic arsenic exposure: a metabolomics study [J]. Int J Hyg Environ Health, 2019, 222(3): 434-445
- [15] Smith A H, Hopenhayn-Rich C, Bates M N, et al. Cancer risks from arsenic in drinking water [J]. Environ Health Perspect, 1992, 97: 259-267
- [16] Lai M S, Hsueh Y M, Chen C J, et al. Ingested inorganic arsenic and prevalence of diabetes mellitus [J]. Am J Epidemiol, 1994, 139(5): 484-492
- [17] Naujokas M F, Anderson B, Ahsan H, et al. The broad scope of health effects from chronic arsenic exposure: update on a worldwide public health problem [J]. Environ Health Perspect, 2013, 121(3): 295-302
- [18] Escudero-Lourdes, Claudia. Toxicity mechanisms of arsenic that are shared with neurodegenerative diseases and cognitive impairment: role of oxidative stress and inflammatory

responses [J]. Neurotoxicology, 2016, 53: 223-235

- [19] Rosado J L, Ronquillo D, Kordas K, et al. Arsenic exposure and cognitive performance in Mexican schoolchildren [J]. Environ Health Perspect, 2007, 115(9): 1371-1375
- [20] Nino S A, Morales-Martinez A, Chi-Ahumada E, et al. Arsenic exposure contributes to the bioenergetic damage in an Alzheimer's disease model [J]. ACS Chemical Neuroscience, 2019, 10(1): 323-336
- [21] Tyler C R, Allan A M. Adult hippocampal neurogenesis and mRNA expression are altered by perinatal arsenic exposure in mice and restored by brief exposure to enrichment [J]. Plos One, 2013, 8(9): 73720
- [22] Schoof R A, Yost L J, Eickhoff J, et al. A market basket survey of inorganic arsenic in food [J]. Food Chem Toxicol, 1999, 37(8): 839-846
- [23] 王佳婷,方衡,杨林洁,等.大米中的砷形态对小鼠各组织中砷 代谢分布及其病理特征的影响[J].现代食品科技,2020,36(4): 9-17
 - WANG Jia-ting, FANG Heng, YANG Lin-jie, et al. Effects of arsenic species in rice on arsenic metabolism distribution and pathological feature in mouse tissues [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(4): 9-17
- [24] Shrivastava A, Barla A, Singh S, et al. Arsenic contamination in agricultural soils of bengal deltaic region of west bengal and its higher assimilation in monsoon rice [J]. Hazard Mater, 2017, 324(Pt B): 526-534
- [25] Althobiti R, Sadiq N, Beauchemin D. Realistic risk assessment of arsenic in rice [J]. Food Chem, 2018, 257: 230-236
- [26] Huang Y, Mao X, Wang M, et al. Concentrations of inorganic arsenic in milled rice from China and associated dietary exposure assessment [J]. Agric Food Chem., 2015, 63: 10838-10845
- [27] Kumarathilaka P, Seneweera S, Meharg A, et al. Arsenic accumulation in rice (*Oryza sativa* L) is influenced by environment and genetic factors [J]. Sci Total Environ, 2018, 642: 485-496
- [28] Lewchalermvong K, Rangkadilok N, Nookabkaew S, et al. Arsenic speciation and accumulation in selected organs after oral administration of rice extracts in wistar rats [J]. Agric Food Chem, 2018, 66: 3199-3209
- [29] Nookabkaew S, Rangkadilok N, Mahidol C, et al. Determination of arsenic species in rice from Thailand and other Asian countries using simple extraction and HPLC-ICP-MS analysis [J]. Agric Food Chem, 2013, 61:

现代食品科技

6991-6998

- [30] GUO Lian-xian, ZHANG Gui-wei, Wang Jia-ting, et al. Determination of arsenic species in ophiocordycepssinensis from major habitats in China by HPLC-ICP-MS and the
- [31] Ravenscroft P, Brammer H, Richards K. Arsenic Pollution: A Global Synthesis [M]. North America and Europe: Ravenscroft P, 2009

edible hazard assessment [J]. Molecules, 2018, 23(5): 1012

- [32] Wang J, Hu W, Yang H, et al. Arsenic concentrations, diversity and co-occurrence patterns of bacterial and fungal communities in the feces of mice under sub-chronic arsenic exposure through food [J]. Environ Int, 2020, 138: 105600
- [33] Juarez-Reyes A, Jimenez-Capdeville M E, Delgado J M, et al. Time course of arsenic species in the brain and liver of mice after oral administration of arsenate [J]. Arch Toxicol, 2009, 83(6): 557-563
- [34] Twaddle N C, Vanlandingham M, Churchwell M I, et al. Metabolism and disposition of arsenic species from controlled oral dosing with sodium arsenite in adult female CD-1 mice. I. Pilot study to determine dosing, analytical measurements, and sampling strategies [J]. Food Chem Toxicol, 2018, 111: 482-493
- [35] Shen S, Li X F, Cullen W R, et al. Arsenic binding to proteins[J]. Chem Rev, 2013, 113(10): 7769-7792
- [36] Wang J, Zhang G, Lin Z, et al. Determination of arsenicals in mouse tissues after simulated exposure to arsenic from rice for sixteen weeks and the effects on histopathological features [J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2020, 200: 110742
- [37] Csanaky I, Nemeti B, Gregus Z. Dose-dependent biotransformation of arsenite in rats-not S-adenosylmethionine depletion impairs arsenic methylation at high dose [J]. Toxicology, 2003, 183(1-3): 77-91
- [38] LI J, Packianathan C, Rossman T G, et al. Nonsynonymous polymorphisms in the human AS3MT arsenic methylation gene: Implications for arsenic toxicity [J]. Chem Res Toxicol, 2017, 30(7): 1481-1491
- [39] 吴军,师喆,郑玉建,等.不同价态砷对 DNA 和砷甲基转移酶

(上接第 183 页)

[30] 苏现波,王更先.响应面法优化鱼尾鳍抗氧化肽酶解工艺[J]. 邯郸职业技术学院学报,2016,29(1):53-59

SU Xian-bo, WANG Geng-xian. Response surface method to optimize the enzymatic hydrolysis process of fish tail fin antioxidant peptidase [J]. Journal of Handan Vocational and Technical College, 2016, 29(1): 53-59

的影响[J].环境与健康杂志,2012,29(1):20-25

WU Jun, SHI Zhe, ZHENG Yu-jian, et al. Effects of sodium arsenite and sodium arsenate on expression of DNA and arsenic methyltransferases in rats [J]. Journal of Environment and Health, 2012, 29(1): 20-25

- [40] Twaddle N C, Vanlandingham M, Fisher J W, et al. Metabolism and disposition of arsenic species from controlled dosing with sodium arsenite in adult female CD-1 mice. III. Toxicokinetic studies following oral and intravenous administration [J]. Food Chem Toxicol, 2018, 121: 676-686
- [41] JIN Ya-ping, XI Shu-hua, LI Xin, et al. Arsenic speciation transported through the placenta from mother mice to their newborn pups [J]. Environ Res, 2006, 101(3): 349-355
- [42] Yamanaka K, Kato K, Mizoi M, et al. The role of active arsenic species produced by metabolic reduction of dimethylarsinic acid in genotoxicity and tumorigenesis [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2004, 198(3): 385-393
- [43] 李玉飞,康朝胜,藏贵勇,等.慢性砷中毒对大鼠海马 CA3 超 微结构的影响[J].环境与健康杂志,2008,6:517-519
 LI Yu-fei, KANG Chao-sheng, ZANG Gui-yong, et al. Effects of chronic arsenism on ultra-structure of rats hippocampus CA3 [J]. Journal of Environment and Health, 2008, 6: 517-519
- [44] Kiburn K H. Arsenic exposure and health effects [J].Neurosci, 1997, 14: 159-176
- [45] Kalia M. Brain development: anatomy, connectivity, adaptive plasticity, and toxicity [J]. Metabolism, 2008, 57 Suppl 2: S2-5
- [46] 赵凤红,钟媛,于霄云,等.外源性蛋氨酸对饮水砷暴露雌性 小鼠体内砷形态分布的影响[J].环境与健康杂志,2009, 26(12):1061-1063

ZHAO Feng-hong, ZHONG Yuan, YU Xiao-yun, et al. Effects of exogenous methionine on arsenical distribution in female mice exposed to sodium arsenite through drinking water [J]. Journal of Environment and Health, 2009, 26(12): 1061-1063

[31] 杨杰,谷新晰,李晨,等.响应面法优化植物乳杆菌绿豆乳增值培养基[J].中国食品学报,2015,15(12):83-90
 YANG Jie, GU Xin-xi, LI Chen, et al. Response surface method for optimization of the value-added culture medium of lactobacillus plant-based gram milk [J]. Chinese Journal of Food Science, 2015, 15(12): 83-90