

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

王佳婷¹, 方衡¹, 杨林洁¹, 张贵伟², 刘云岗³, 郭莲仙¹, 李华文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)

(3. 南方医科大学公共卫生学院毒理学系, 广东广州 510515)

摘要: 旨在探讨经口暴露的大米砷形态引起的砷毒性及其生物转化。实验以四个砷含量剂量组(C、S: 0.91 mg/kg, M: 9.1 mg/kg 和 H: 30 mg/kg) 喂养模拟大米砷形态饲料 30 d, 通过 ICP-MS 和 HPLC-ICP-MS 测定小鼠肠、血、肝脏和肾脏中的砷含量及砷形态(iAs^{III} 、 iAs^V 、MMA、DMA 和 AsB) 分布; H&E 染色后光学显微镜下观察小鼠肠组织、肝脏和肾脏的组织学变化。结果显示, 在 C、S、M 和 H 中, 血的总砷浓度分别为 5.33、8.24、55.75 和 196.49 $\mu\text{g/kg}$; 肝的总砷浓度分别为 14.34、32.70、237.10 和 708.74 $\mu\text{g/kg}$; 肠中五种砷形态浓度之和分别为 27.97、163.12、892.78、3085.325 $\mu\text{g/kg}$; 肾中五种砷形态浓度之和分别 10.38、25.79、245.85、1656.14 $\mu\text{g/kg}$ 。肠中主要的砷形态为 iAs^{III} 和 DMA, 血液中有有机砷与无机砷的比值随暴露剂量升高而增加, 肝脏和肾脏中主要的砷形态为 DMA。与对照组比较, 各实验组小鼠肠组织、肝脏和肾脏出现的病理损伤程度随砷暴露剂量的增加而深化, 在 H 组中最明显。本研究表明, 短期的大米砷暴露对机体代谢组织无明显损伤, 且砷在组织中的累积较少; 而高剂量的大米砷暴露将对机体病理结构造成严重损伤; 提示长期低剂量的大米砷暴露也可能对机体产生损害。

关键词: 大米砷形态; 食物暴露; 形态转化; 组织损伤

文章编号: 1673-9078(2020)04-9-17

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.4.002

Effects of Arsenic Species in Rice on Arsenic Metabolism Distribution and Pathological Feature in Mouse Tissues

WANG Jia-ting¹, FANG Heng¹, YANG Lin-jie¹, ZHANG Gui-wei², LIU Yun-gang³, GUO Lian-xian¹, LI Hua-wen¹

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

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

(3.Department of Toxicology, School of Public Health, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

Abstract: This work was designed to investigate the toxicity of arsenic caused by oral exposure to rice-simulated arsenic species in four dose groups (C, S: 0.91 mg/kg, M: 9.1 mg/kg and H: 30 mg/kg) and its biotransformation. The arsenic content and arsenic species (iAs^{III} , iAs^V , MMA^V, DMA^V and AsB) distribution in the bowel, blood, liver and kidney of mice were determined by ICP-MS and HPLC-ICP-MS, respectively. The histological changes of bowel tissue, liver and kidney were observed by light microscope after H&E staining. The results showed that in the group of C, S, M and H, the total arsenic concentrations in the blood were 5.33, 8.24, 55.75 and 196.49 $\mu\text{g/kg}$, respectively; and in the liver were 14.34, 32.70, 237.10 and 708.74 $\mu\text{g/kg}$, respectively; The sum of the five arsenic species concentrations in the bowel were 27.97, 163.12, 892.78 and 3085.325 $\mu\text{g/kg}$, respectively; and in the kidney were 10.38, 25.79, 245.85, and 1654.14 $\mu\text{g/kg}$, respectively. The dominant arsenic species in the bowel were iAs^{III} and DMA. The ratio of organic arsenic to inorganic arsenic in the blood increased with the

引文格式:

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

收稿日期: 2019-10-21

基金项目: 广东省自然科学基金项目(2018A030313094, 2020A151501457); 东莞市社会发展项目(20185071521641); 高校教育人才“组团式”帮扶专项(4SG190466)

作者简介: 王佳婷(1994-), 女, 在读研究生, 研究方向: 营养与食品卫生学

通讯作者: 李华文(1966-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 营养与食品卫生学; 共同通讯作者: 郭莲仙(1984-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 卫生检验学、食品安全学

exposure dose. The main arsenic species in the liver and kidney is DMA. Compared with the control group, the degree of pathological damage in the bowel, liver and kidney of test group was deepened with the increase of arsenic exposure dose. This study shows that the short-term arsenic exposure in rice has no obvious damage to the metabolic tissues of the body, and the accumulation of arsenic in the tissues is less; the high-dose arsenic exposure in rice will cause serious damage to the pathological structure of the body; it suggests that the long-term low-dose arsenic exposure in rice might also cause damage to the body.

Key words: rice arsenic species; food exposure; arsenic bio-transformation; tissue damages

砷是一种广泛存在的环境污染物, 砷元素存在于水资源及食物链中。砷在机体中的几种常见的存在形态有: 亚砷酸盐 (iAs^{III})、砷酸盐 (iAs^V)、一甲基砷 (MMA)、二甲基砷 (DMA) 和砷甜菜碱 (AsB)。不同砷代谢产物的毒性相差迥异, 几种常见砷形态的毒性依次为 $iAs^{III} > iAs^V > MMA > DMA$, 而 AsB 基本无毒^[1,2]。据 WHO2001 年推测, 在全球范围内受砷污染危害人数约有 140 万人, 如今全球大约有 2 亿人的饮用水中砷含量超标^[3]。由于含砷农药、化肥的过度使用, 土壤、水源受到不同程度的污染, 一些地区的粮食作物砷含量也超标^[4-7]。水稻对砷有特殊的偏好, 在生长过程中会对砷进行密集吸收, 再加上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, 使得砷在稻米中的含量要远高于旱作农作物^[8]。在水稻中, 除了 iAs^{III} 和 iAs^V 外, MMA 和 DMA 也可能对身体产生危害, 或进一步转化为其他砷形态^[9,10]。因此, 对于生活在高砷本底值地区, 并以水稻为主食的人群来说, 长期的砷暴露可能使其健康状态受到不同程度的威胁。

研究显示, 砷中毒可引起人行为异常和智力减退, 以及使皮肤色素高度沉着、皮肤高度角化; 严重时可致癌, 包括皮肤癌、膀胱癌等癌症^[11]。但对经口暴露的大米砷形态引起的砷中毒以及其生物转化的研究还不完善。因此, 弄清砷在机体中的代谢形式以及砷形态分布以应对砷中毒治疗的研究, 尤为重要。为了探讨长期经口暴露的大米砷形态对机体的病理效应和体内的砷形态转化, 在本研究中, 在给予小鼠模拟大米砷形态的饲料喂养 30 d 后, 收集小鼠组织 (肠、血、肝脏和肾脏), 通过 H&E 染色的石蜡切片观察其病理损伤状况, 同时通过 ICP-MS 和 HPLC-ICP-MS 测定这各组织中的砷浓度及砷形态分布。

1 材料与方法

1.1 含砷饲料的设计与制备

染毒剂量的设计: 对人类来说, 通过大米摄入砷是一个贯穿一生的持久过程, 长期暴露的砷可能会在人体内逐渐积累, 最终导致机体的病理变化。为了全

面评估砷在小鼠体内的蓄积并观察亚慢性砷暴露引起的组织病理学损害程度, 应根据毒理学中的剂量-反应关系设计用于该研究的饲料中砷的浓度, 使其覆盖多个剂量组^[12,13]。我们首先根据标准的 Meeh-Rubner 方程 (公式 1) 中人与小鼠之间的等效剂量转换系数 K 值和健康风险评估模型 (环境保护署, EPA) 中大米砷的每日估计摄入量 (公式 2) 设计了模拟剂量组 (S):

$$A = K \times BW^{2/3} \quad (1)$$

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

注: 在公式(1)和(2)中, K 为常数, 随动物种类而不同; 而 $2/3$ 是皮肤表面积 (A) 与体重 (BW) 相关联的质量指数, $EDI(\text{mg/kg} \times \text{day})$ 是估计的每日砷摄入量, $C(\text{mg/kg})$ 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, 人与小鼠间的 K 值为 9.1, $C_{\text{大米}}$ 为 1.6 mg/kg (大米中的最高砷含量^[14]), $IR_{\text{人}}$, $IR_{\text{小鼠}}$, $BW_{\text{人}}$ 和 $BW_{\text{小鼠}}$ 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 $C_{\text{饲料}}$ 为 0.91 mg/kg 。

相应地, 设计了另外两个剂量梯度, 分别为中间剂量组 (M: 9.1 mg/kg) 和高剂量组 (H: 30 mg/kg)。根据大米中主要砷形态的平均比例^[15,16], 饲料中的砷形态由 iAs^V (砷酸钠)、 iAs^{III} (亚砷酸钠)、MMA (单甲基砷酸钠) 和 DMA (二甲基砷酸钠) 分别以 7.3%、72.7%、1.0% 和 19.0% 的比例添加, H 组中 iAs^{III} 的浓度相当于 1/3 小鼠的半数致死量 (LD_{50})。对照组 (C) 饲料中不额外添加砷。

饲料的制备与储存: 有研究发现, 不同于生菜、甜菜等蔬菜中多与不溶性多糖缔合的较低生物可及性的砷 (生物可及性约为 50%), 在消化道中, 煮熟的大米在淀粉酶的作用下可完全水解, 其中砷的生物可及性可高达 80%^[17-20]。在本实验中, 为模拟相同的生物利用度, 直接将各种游离态的砷形态的纯化合物均匀添加至小鼠饲料原材料中 (GB 2762-2017), 将各种砷形态按比例与饲料原材料均匀混合, 再制成颗粒状。为了确保饲料中每种砷形态的稳定性, 将新制成的饲料用密封袋 (约 25 g 饲料密封在一个袋子中) 真空包装并于 -20°C 保存。

1.2 动物分组及处理

6 周龄 SPF 级 C57BL/6 雄性小鼠（平均初始体重 18 g）24 只，许可证号：SCXK（粤）2013-0002，购于广东省实验动物中心，喂养适应 1 周后用于实验，饲养环境为屏障系统，温度 22 ℃，湿度 40%~70%，每天光照 12 h（8:00~20:00），动物可以自由进食和饮水。所有动物实验操作经东莞松山湖明珠实验动物科技有限公司实验动物管理和使用委员会批准。

在整个实验中，按每个试验组的含砷饲料和对照组的正常饲料给予各组小鼠（6 只/组），动物可以自由饮食和饮水。采集饲料和饮用水，分别进行砷测定。每周记录小鼠的进食量和体重，每天记录小鼠的健康状况（腹泻、脱发、震颤和活动）。实验 30 d 后，在乙醚麻醉下取血后处死，及时取肝、肾、小肠组织，用生理盐水去除组织表面血迹和肠内容物，滤纸吸干。每个组织分为三部分，分别进行 H&E 染色、总砷和砷形态测定。

1.3 组织病理学检测

将取下的组织立即固定在 4%多聚甲醛溶液中，经过脱水、透明、浸蜡、包埋、切片，经苏木精和伊红（H&E）染色后在光学显微镜下观察组织学的变化。

1.4 总砷及砷形态的测定

根据前期研究^[21]，通过 ICP-MS 测定组织中的总砷浓度（ C_{IAs} ）。大致如下，组织经过研磨、消化（加浓 HNO_3 ，置于微波消化系统）并过滤，将过滤后的上清液稀释至 25 mL，注入 ICP-MS。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 $\mu\text{g/L}$ ）。

每个样本进行三次平行测定。

采用 HPLC-ICP-MS（Agilent 1260 Infinity II，Agilent 7800，USA）对 5 种砷形态（ iAs^{III} 、 iAs^{V} 、MMA、DMA 和 AsB）进行分离和测定。采用美国 Agilent 1260 高效液相色谱系统（Agilent 1260）、IonPac AG 19 保护柱（4×50 mm）和 IonPacAS 19 分离柱（4×250 mm）对 5 种砷形态进行分离。色谱条件为：流动相为 25 mmol/L 碳酸铵，pH=9.5，流速为 1.0 mL/min，柱温为 25 ℃。外标法定量，标准品由 iAs^{III} （0.233 mol/g）、 iAs^{V} （1.011 mol/g）、MMA（0.355 mol/g）、DMA（0.706 mol/g）和 AsB（0.518 mol/g）配制而成，校准点分别为 0、2.5、5、10、50 和 100 $\mu\text{g/L}$ 。对每个样本平行测定三次。

其他未检出的砷（uAs）由 C_{IAs} 与 5 种砷形态之和之间的 δ 值计算得来。为了保证检测的准确性，将样品量较少的肠组织和肾脏全部用于检测砷形态，因此缺少这两者的 tAs 的数据。质量控制根据我们的前期研究进行^[21]，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

所有数据计算为均值±标准差（ $\bar{x}\pm\text{SD}$ ）。应用 SPSS 统计分析软件（V 25.0，SPSS Inc，Chicago，IL，USA）对各组间进行单因素方差分析及事后检验，评估组间差异，以 $p<0.05$ 表示有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 总砷和砷形态仪器分析性能验证

各砷形态及总砷在 0.2~500 $\mu\text{g/L}$ 范围内，线性关系良好。线性方程、决定系数（ R^2 ）、检出限（LOD），定量限（LOQ），回收率和相对标准偏差（RSD）见表 1 和表 2。

表 1 ICP-MS 的总砷分析性能和 HPLC-ICP-MS 的砷形态分析性能

Table 1 Analytical performances for total arsenic by ICP-MS and arsenic species by HPLC-ICP-MS

分析物	线性范围/ $(\mu\text{g/L})$	线性方程	决定系数 R^2	检出限 LOD/ $(\mu\text{g/kg})$	定量限 LOQ/ $(\mu\text{g/kg})$
Total As	0.5~500	$y=804.166x+5.55$	1.00	2.3	6.9
AsB	0.2~300	$y=2972.19x+85.02$	1.00	1.1	3.3
DMA	0.2~300	$y=3891.14x+0$	1.00	1.3	4.0
iAs^{III}	0.2~300	$y=2690.89x+280.53$	0.99	1.0	3.0
MMA	0.5~300	$y=2792.50x+40.12$	1.00	2.2	6.6
iAs^{V}	0.2~300	$y=2682.78x+1279.2$	1.00	1.1	3.3

表2 检测方法的回收率和精密度

Table 2 Recovery and precision of the method

分析物	背景值/($\mu\text{g/kg}$)	添加量/($\mu\text{g/L}$)	测得值/($\mu\text{g/L}$)	回收率/%	RSD/(%, n=6)
Total As	170.00	5.00	8.03~8.56	92.1~102.8	4.1
		10.0	12.2~14.1	87.3~105.7	4.7
		50.0	51.9~54.7	96.1~103.3	1.8
AsB	2.60	2.00	1.98~2.22	91.3~104.3	4.2
		10.0	9.03~9.82	88.4~95.8	2.6
		50.0	45.6~54.6	89.3~108.1	5.3
DMA	120.00	2.00	7.83~8.21	90.8~110.1	4.4
		10.0	15.2~17.1	91.4~108.8	3.6
		50.0	56.7~59.9	101.1~107.2	1.4
iAs ^{III}	29.00	2.00	3.28~3.37	89.2~95.6	5.1
		10.0	10.3~12.3	86.8~106.9	5.9
		50.0	48.6~55.2	93.5~106.6	3.3
MMA	7.70	2.00	2.29~2.36	95.0~98.3	2.1
		10.0	10.5~11.2	100.7~107.6	1.5
		50.0	46.3~49.9	91.2~98.2	2.0
iAs ^V	4.70	2.00	2.19~2.44	96.4~110.1	6.3
		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3 国家标准参考物质值 (mg/kg, 平均值 $\pm$ 标准偏差) 以及总砷和无机砷的测定值Table 3 National standard reference materials values (mg/kg, mean $\pm$ standard deviation) and determined values for total and inorganic arsenic (n=5)

样本	国标	认定值(mg/kg)	测量值(mg/kg)	回收率/%
Green Chinese onion	GBW10049	0.52 $\pm$ 0.11	0.513 $\pm$ 0.10	98.7
Pork liver	GBW10051	1.40 $\pm$ 0.30	1.43 $\pm$ 0.168	102.1
Yellow- fin tuna	GBW08573	5.08 $\pm$ 0.39	5.02 $\pm$ 0.202	98.8
Rice	GBW100358	0.16 $\pm$ 0.02 (total As)	0.166 $\pm$ 0.012	103.8
		0.13 $\pm$ 0.02 (iAs)	0.141 $\pm$ 0.01	108.5

以相同方法检测的标准参考物质 (CRM) 分析结果与认证值吻合良好, 总砷检测的回收率为 98.7%~103.8%, iAs 检测的回收率为 108.5%, 如表 3 所示。

2.2 肠组织中总砷含量与砷形态分布和组织

病理

小鼠暴露砷后, 口服的砷先经过肠道, 被肠道广泛吸收。当砷进入血液循环, 进一步被其他脏器代谢转化之后, 其代谢产物可再回到肠道, 并通过粪便排出, 因此, 肠道是砷经口进入机体后的主要滞留地之一。相对于检测的其他组织, 肠道中含砷水平最高 (图 1), 这与 Watanabe 等人文章叙述一致, 至少 90% 的摄取的 iAs^V 和 iAs^{III} 从肠道被吸收^[22]。从病理切片染

色结果可观察到当砷暴露剂量较高时 (M 和 H 组), 肠粘膜上皮细胞出现增生及细胞排列不规则的病理变化 (图 2)。

由图 1 可得随着砷暴露剂量的增加, 小鼠肠组织中所吸收的砷含量呈升高趋势, C、S、M 和 H 组中五种砷形态加和分别为 27.97、163.12、892.78 和 3085.32 $\mu\text{g/kg}$, 经统计学分析, M 组和 H 组中砷含量显著高于 C 组 (C&M: $p<0.01$; C&H: $p<0.001$) (图 1)。由图 3 可得, 五种砷形态 (iAs^{III}、iAs^V、MMA、DMA 和 AsB) 均能在小肠中检出, 其中 iAs^{III} 的所占比例最高, 在 C、S、M 和 H 组中分别为 53.64%、51.49%、47.27% 和 57.47%; 其次为 DMA, 在 C、S、M 和 H 组中分别为 30.60%、35.19%、42.84% 和 29.05%。

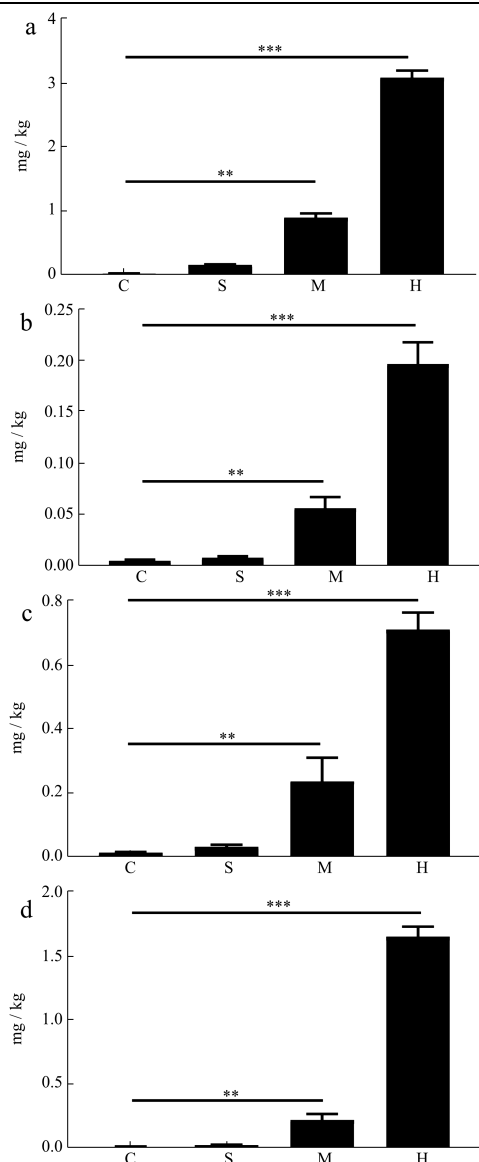


图1 小鼠砷暴露30 d后肠道(a)和肾脏(d)中五种砷形态浓度加和、血液(b)和肝脏(c)中的总砷浓度

Fig.1 The concentration of sum of five arsenic species in the bowel (a) and kidney (d), and the total arsenic concentration in the blood (b) and liver (c) after 1 month of exposure to arsenic in mice

注: C、S、M和H分别为对照组,模拟组,中剂量和高剂量组。统计学差异**: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ 。

肠道是砷代谢的初始部位。在肠道中观察到的主要砷形态为 iAs^{III} , 这与本研究中模拟大米砷形态设计的饲料中含有的 iAs^{III} 比例最高(72.7%)相符。然而,甲基化砷(MMA和DMA)在肠道砷形态中的比例远高于所设计的饲料(图3),其来源有:①肠道中的砷代谢,②进入血循环的砷经过机体代谢后通过胆汁排入肠道。亚砷酸盐-3-甲基转移酶(AS3MT)可氧化甲基化所有三价砷化合物(iAs^{III} 、 MMA^{III} 和 DMA^{III})^[23],有证据表明,肠上皮具有AS3MT活性^[24]。

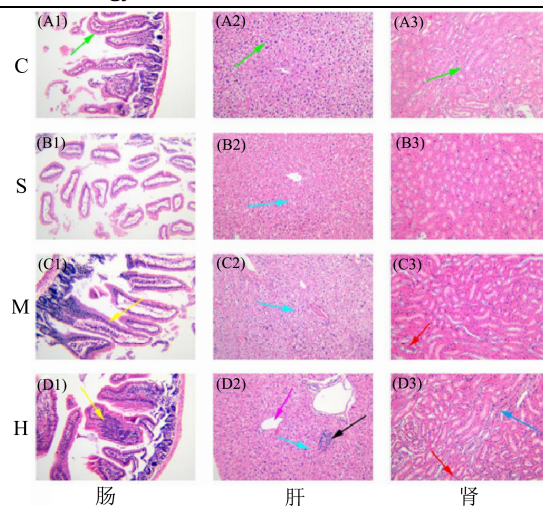


图2 砷暴露后小鼠组织(肠、肝、肾)切片的形态学特征(200倍放大率)

Fig.2 The histomorphological features of mouse tissue (intestinal, liver, kidney) after exposure to arsenic (200-fold magnification)

注: (A1)~(A3)、(B1)~(B3)、(C1)~(C3)和(D1)~(D3)分别是对照组,模拟组,中剂量组和高剂量组。箭头颜色指示:绿色: A1中呈单细胞整齐有序排列的肠粘膜上皮组织、A2中正常的肝脏细胞和A3中正常的肾脏组织;黄色:增生及不规则的肠粘膜上皮细胞;蓝色:细胞水样变性;粉色:肝血窦扩张;黑色:坏死;红色:炎性细胞浸润;深蓝: D3肾小管萎缩。

另外, iAs^V 的还原是砷代谢的第一步,可在还原型谷胱甘肽(GSH)的作用下进行,同时,部分 iAs^V 也可在肠道菌群的作用下通过GSH还原成 iAs^{III} ^[25],另外,一些细菌可在厌氧环境中利用硝酸盐作为电子受体和无机碳作为碳源将 iAs^{III} 转化为 iAs^V ^[26]。

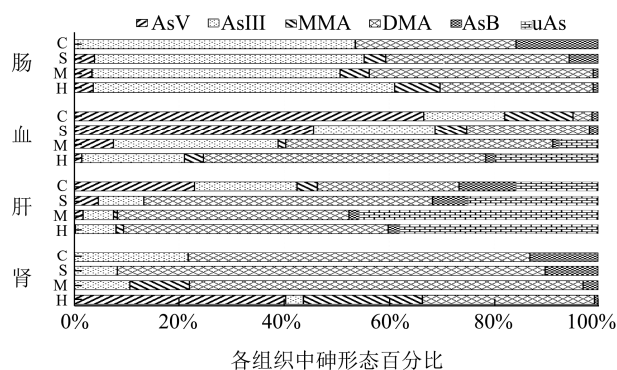


图3 各组织中各砷形态的占比

Fig.3 The proportion of arsenic species in tissues

注: C、S、M和H分别为对照组,模拟组,中剂量和高剂量组。

2.3 血液中总砷含量与砷形态分布

经过肠组织吸收的砷在细胞水平上被吸收到血液

中, 进入血液循环。C、S、M 和 H 组的血液中 C_{IAs} 分别为 5.33、8.24、55.74 和 196.49 $\mu\text{g/kg}$, 经统计学分析, M 组和 H 组中砷含量显著高于 C 组 (C&M: $p<0.01$; C&H: $p<0.001$), 同 Souza 等人实验结果一致, 与对照组相比, 含砷大米喂养小鼠的血液中 C_{IAs} 浓度均较对照组明显升高, 差异有显著性 ($p<0.05$)^[27]。五种砷形态均能在血液中检出, 其中 iAs^{V} 含量在 C、S 中最高, 分别为 26.07 和 7.821 $\mu\text{g/kg}$; DMA 含量在 M、H 中最高, 分别为 29.63 和 105.9 $\mu\text{g/kg}$ 。除此之外, 我们还在 M、H 组中检测出其他未知的有机砷形态, 即 uAs (未知有机砷), 在 M、H 中的量分别为 4.34 和 39.02 $\mu\text{g/kg}$ 。

砷可与血液中的血浆蛋白、血红蛋白结合^[28,29], 且血液中的富含的 GSH 可促进砷的累积^[30]。因此, 随着砷暴露剂量的升高, 血液中的砷含量显著升高。

砷暴露可刺激机体的砷代谢活动, 随着暴露剂量的升高, 机体将无机砷转化为有机砷的比例升高, 表现为血液中无机砷的占比逐渐减少, 而有机砷的比例逐渐增高, C、S、M 和 H 组中有机砷与无机砷之比分别为 0.24、0.49、1.56 和 2.90, 即, 血液中有有机砷与无机砷之比可反映机体砷暴露的剂量。当小鼠暴露的砷剂量较低时, 红细胞中清除三价砷的速度通常快于五价砷, 并且 iAs^{III} 以甲基化作用为主^[31], 因此 iAs^{V} 比例较高。血浆中 DMA 清除速度最慢, 谷胱甘肽可动员结合 DMA^{III} , 并转化为较稳定的 DMA^{V} ^[28]。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。M、H 组中高含量 DMA 与低含量 MMA 的结果与 Twaddle 等人结果一致^[31]。

2.4 肝脏中总砷含量与砷形态分布和组织病理

肝脏是人体重要的解毒器官, 也是进行砷代谢的主要场所之一。无机砷可在肝脏中进行一系列的氧化还原和甲基化反应, 最终代谢为毒性较小的甲基化砷, 再通过结合其他的有机化合物如蛋白质等生成其他甲基化砷的衍生物, 此过程即无机砷在肝脏中的降毒过程^[32]。从图 1 可知, 随着砷暴露剂量的升高, 肝脏中砷含量升高, C、S、M 和 H 组的肝脏中 C_{IAs} 分别为 14.34、32.70、237.10 和 708.74 $\mu\text{g/kg}$; 经统计学分析, M 组和 H 组中砷含量显著高于 C 组 (C&M: $p<0.01$; C&H: $p<0.001$)。五种砷形态均能在肝脏中检出, 其中 DMA 含量最高, 在 C、S、M、H 中分别为 4.19、17.94、104.76 和 357.54 $\mu\text{g/kg}$, 而在 Kengen 等人的小鼠口服 iAs^{V} 的实验结果中显示, 实验后期 DMA 是小鼠肝脏的主要代谢物, 其 DMA 比例占 iAs^{V} 、MMA

和 DMA 三者总和的 62.63%^[33]; 其次, M 和 H 组肝脏中的 uAs 大幅增加, 占比分别达到 43.50% 和 48.86%, 而相对于检测的其他组织, 砷暴露后小鼠肝脏中所含无机砷 ($\text{iAs}^{\text{III}}+\text{iAs}^{\text{V}}$) 比例最低, 在实验组中均小于 10% (M 和 H 组)。

由病理切片染色结果可观察到正常对照组肝小叶结构完整, 肝索结构正常, 肝细胞结构完好, 形态基本正常, 而各实验组中均出现肝细胞水样变, 尤其 H 组中发现肝血窦扩张及部分肝组织坏死。而各实验组肝脏中 DMA 和 uAs 的增加及无机砷的相应减少, 提示其砷代谢反应代偿性增多。

研究发现, 肝细胞表面的葡萄糖载体 2 (GLUT 2)、水通道蛋白 (AQP 9) 和一种有机阴离子转运蛋白 (OATP) 参与了肝细胞对 iAs^{III} 的摄取; 肝特异性 OATP-C (OATP-2 或 LST-1) 的表达已被证明能介导人胚肾 (HEK-293) 细胞摄取 iAs^{III} 和 iAs^{V} ^[34]。因此, 机体中的砷可通过这些蛋白通道进入肝脏, 以完成后续的代谢活动。肝脏中富含 AS3MT, 且 iAs^{III} 的暴露会刺激 AS3MT mRNA 的表达^[35], 因此, 肝脏中的砷形态分布以甲基化的代谢产物为主。

2.5 肾脏中总砷含量与砷形态分布和组织病理

肾脏是砷及其代谢产物的主要排泄器官, 因而其结构和功能易受到砷累积的损伤。砷在肾脏中能通过引起氧化应激、诱导肾细胞凋亡、调节其相关基因表达以及干扰肾细胞 DNA 的修复等方式造成对肾的损伤, 如各种肾病、肾癌等^[36]。图 2 中正常对照组可见肾小球和肾小管结构正常, 细胞核圆形, 胞排列整齐, 无明显病变; 随着砷暴露剂量的增加, 肾脏组织中开始出现炎性细胞浸润, 在 H 组中可观察到肾小管萎缩。有研究表明, 高砷环境下肾脏中的砷可以通过与多种酶蛋白的巯基结合^[37], 或干扰负责有害物质的代谢和排泄的抗氧化剂 GSH 的形成^[37], 促进炎症因子的增加, 导致活性氧自由基 ROS 在细胞内堆积。ROS 的积聚可引起肾脏细胞包括肾小球血管内皮细胞和肾小管上皮细胞的损伤^[38]。

通过图 1 可发现当饲料砷含量增加时, 小鼠肾脏内砷代谢产物 (五种砷形态加和) 的浓度呈升高趋势, 其在 C、S、M 和 H 组中分别为 10.38、25.79、245.85 和 1656.14 $\mu\text{g/kg}$; 与 C 组相比, M 组和 H 组中砷含量显著升高 (C&M: $p<0.01$; C&H: $p<0.001$)。

在 S 组中, 肾脏中主要的砷形态为 DMA, 其次为 iAs^{III} 和 AsB, 其含量分别为 21.04、2.13 和 2.62 $\mu\text{g/kg}$, C 组和 S 组均未检出 iAs^{V} 和 MMA; 在 H 组中, DMA 仍为肾脏中主要的砷形态, 其含量为 543.57

μg/kg, 且其他四种砷形态均能检出, 尤其 iAs^V 和 MMA 的占比均分别超过 iAs^{III} 和 AsB (图 3)。同样在 Kengen 等人的小鼠口服 iAs^V 的实验结果中显示, 实验后期 DMA 是小鼠肾脏脏的主要代谢物, 其 DMA 比例占 iAs^V 、MMA 和 DMA 三者总和的 41.40%^[33]。

有研究指出, 暴露于 iAs^{III} 的大鼠肾脏内出现高比例的 DMA, 而 MMA 含量显著低于 iAs^V 暴露组^[39]; 同样地, 本研究中设计的含砷饲料中含有高比例的 iAs^{III} , 暴露 30 d 后 S 组小鼠肾脏主要砷形态为 DMA, 这与前人研究相似。然而, 在 H 组中, 出现大量的 iAs^V 和 MMA, 所占比例分别达到 41% 和 22%, 我们发现, 在 Hughes 等人的研究中, 砷暴露环境下培养小鼠第 9 d 后, 肾脏中的 iAs^V 、MMA 和 DMA 所占三者总和比例分别达到 56.54% 和 12.49%, 其 iAs 是肾脏中占优势的砷形态, 而 MMA 是也呈增多的趋势, 这与我们的实验结果相一致^[40]。提示机体对砷的代谢作用达饱和状态, 甲基化水平降低; 有两个原因可能导致大量的 iAs^V 累积: ①机体砷代谢活动处于动态平衡, 高剂量砷暴露下甲基转移酶和谷胱甘肽硫转移酶活力降低, 其中的 iAs^V 部分无法进一步代谢, 逐渐累积到肾脏中; ②甲基化砷在肠道微生物的作用下, 发生去甲基化和氧化还原反应, 最终生成 $iAs^{V[41]}$ 。MMA 浓度的升高也可能归因于甲基转移酶活性降低导致的次级甲基化程度下降。因此, 当机体肾脏中 iAs^V 和 MMA 浓度逐渐升高时, 可提示机体砷代谢活动受到抑制, 可诱发肾脏病理损伤。

3 结论

3.1 本研究通过模拟大米砷形态设计含砷饲料, 测定小鼠肠、血、肝脏和肾脏中的砷形态分布和组织学变化, 说明在经食物暴露砷的过程中各组织的砷形态分布特异性, 同时也指出机体内的砷累积可能对组织器官造成得病理学损伤, 为应对长期砷中毒治疗提供了一定的理论依据。

3.2 此外, 在本研究中, 小鼠的饲料依据 GB 2762-2017, 以肉粉, 豆粕, 麸皮和各种营养元素为原材料制作而成, 其物质组成与大米存在差异, 进而可能在砷的生物可及性方面存在一定差异。在今后的实验中, 为保证更为客观地模拟染毒实验, 可预先对两者的生物可及性进行评估, 然后再调整饲料中各种砷形态的比例。

参考文献

[1] Zhu Y G, Xue X M, Kappler A, et al. Linking genes to microbial biogeochemical cycling: Lessons from arsenic [J].

Environmental Science & Technology, 2017, 51(13): 7326-7339

[2] Islam K, Qian W Q, Han J Y, et al. Metabolism, toxicity and anticancer activities of arsenic compounds [J]. Oncotarget, 2017, 8(14): 23905-23926

[3] 曾磊, 汪永萍. 全球两亿人饮用水砷超标 [J]. 生态经济 (中文版), 2018, 34(11): 6-9

ZENG Lei, WANG Yong-ping. 200 Million people in the world drink arsenic exceeding the standard [J]. Ecological Economy, 2018, 34(11): 6-9

[4] 汪花, 刘秀明, 刘方, 等. 喀斯特地区小尺度农业土壤砷的空间分布及污染评价 [J]. 环境科学, 2019, 40(6): 405-413

WANG Hua, LIU Xiu-ming, LIU Fang, et al. Spatial distribution and pollution assessment of as at a small scale in agricultural soils of the karst region [J]. Environmental Science, 2019, 40(6): 405-413

[5] 吴川, 安文慧, 薛生国, 等. 土壤-水稻系统砷的生物地球化学过程研究进展 [J]. 农业环境科学学报, 2019, 38(7): 1429-1439

WU Chuan, AN Wen-hui, XUE Sheng-guo, et al. Arsenic biogeochemical processing in the soil-rice system journal of agro-environment science [J]. Journal of Agro-Environment Science, 2019, 38(7): 1429-1439

[6] 张宏祥. 棘孢木霉菌及与水铁矿联合施用调控作物生长及砷吸收的应用研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2018

ZHANG Hong-xiang. Application of *Trichoderma asperellum* SM12-F1 and combination with ferrihydrite to regulate the growth and arsenic uptake of crop in contaminated soils [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences Dissertation, 2018

[7] 李真理, 张彪, 焦玉宇, 等. 土壤砷的形态与粮食作物品质安全相关性研究 [J]. 中国农学通报, 2015, 31(20): 148-152

LI Zhen-li, ZHANG Biao, JIAO Yu-zi, et al. Studies on correlation between arsenic forms in soil and safety of crop quality [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2015, 31(20): 148-152

[8] Punshon T, Jackson B P, Meharg A A, et al. Understanding arsenic dynamics in agronomic systems to predict and prevent uptake by crop plants [J]. Science of the Total Environment, 2017, 581-582: 209-220

[9] Hughes M F, Devesa V, Adair B M, et al. Tissue dosimetry, metabolism and excretion of pentavalent and trivalent monomethylated arsenic in mice after oral administration [J]. Toxicology & Applied Pharmacology, 2005, 208(2): 186-197

[10] Rubin S S C D, Alava P, Zekker I, et al. Arsenic thiolation

- and the role of sulfate-reducing bacteria from the human intestinal tract [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2014, 122(8): 817-822
- [11] 刘嘉鸣,王茜,夏荣香,等.砷暴露大鼠脑中砷形态及代谢酶活力的性别差异[J].*环境与健康杂志*,2013,30(9):763-767
LIU Jia-ming, WANG Qian, XIA Rong-xiang, et al. Gender differences in arsenic species and metabolic enzymes activity in brain of rats exposed to arsenic [J]. *Journal of Environment and Health*, 2013, 30(9): 763-767
- [12] Swenberg, J A, Fryar-Tita E, Jeong Y C, et al. Biomarkers in toxicology and risk assessment: Informing critical dose-response relationships [J]. *Chem Res Toxicol*, 2008, 21(1): 253-65
- [13] Bouhifd, M, Hartung T, Hogberg H T, et al. Review: Toxicometabolomics [J]. *J Appl Toxicol*, 2013, 33(12): 1365-83
- [14] 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]. *J Hazard Mater*, 2017, 324(Pt B): 526-534
- [15] 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
- [16] 黄亚涛.我国稻米中无机砷的污染分布研究及风险评估[D].北京:中国农业科学院,2014
HUANG Ya-tao. Study on contamination distribution of inorganic arsenic in rice from China and the associated risk assessment [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2014
- [17] Chavez-Capilla, T, Barla A, Singh S, et al. Bioaccessibility and degradation of naturally occurring arsenic species from food in the human gastrointestinal tract [J]. *Food Chem*, 2016, 212: 189-97
- [18] Juhasz, A L, Smith E, Weber J, et al. *In vivo* assessment of arsenic bioavailability in rice and its significance for human health risk assessment [J]. *Environ Health Perspect*, 2006, 114(12): 1826-1831
- [19] Juhasz, A L, Smith E, Weber J, et al. Application of an *in vivo* swine model for the determination of arsenic bioavailability in contaminated vegetables [J]. *Chemosphere*, 2008, 71(10): 1963-1969
- [20] Lee, S G, Kim J, Park H, et al. Assessment of the effect of cooking on speciation and bioaccessibility/cellular uptake of arsenic in rice, using *in vitro* digestion and Caco-2 and PSI cells as model [J]. *Food Chem Toxicol*, 2018, 111: 597-604
- [21] Guo L X, Zhang G W, Wang J T, et al. Determination of arsenic species in *Ophiocordyceps sinensis* from major habitats in China by HPLC-ICP-MS and the edible hazard assessment [J]. *Molecules*, 2018, 23(5): 1012
- [22] Watanabe T and S Hirano. Metabolism of arsenic and its toxicological relevance [J]. *Arch Toxicol*, 2013, 87(6): 969-979
- [23] Li J, Packianathan C, Rossman T G, et al. Nonsynonymous polymorphisms in the human AS3MT arsenic methylation gene: Implications for arsenic toxicity [J]. *Chemical Research in Toxicology*, 2017, 30(7): 1481-1491
- [24] Calatayud M, Vélez D, Devesa V. Metabolism of inorganic arsenic in intestinal epithelial cell lines [J]. *Chemical Research in Toxicology*, 2012, 25(11): 2402-2411
- [25] 罗世林.雄黄在肠道菌群内的砷形态分析及砷代谢初步研究[D].北京:北京中医药大学,2018
LUO Shi-lin. Speciation analysis and arsenic metabolism of realgar in the intestinal flora [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2018
- [26] Kumari N, Jagadevan S. Genetic identification of arsenate reductase and arsenite oxidase in redox transformations carried out by arsenic metabolising prokaryotes - A comprehensive review [J]. *Chemosphere*, 2016, 163: 400-412
- [27] Souza, J, Grotto D, Batista B L, et al. Distribution of arsenic and oxidative stress in mice after rice ingestion [J]. *J Trace Elem Med Biol*, 2017, 44: 192-200
- [28] 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 and Chemical Toxicology*, 2017, 111: 482-493
- [29] Shen S, Li X F, Cullen W R, et al. Arsenic binding to proteins [J]. *Chemical Reviews*, 2013, 113(10): 7769-7792
- [30] Wei S, Ma L Q, Saha U, et al. Sulfate and glutathione enhanced arsenic accumulation by arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L. [J]. *Environmental Pollution*, 2010, 158(5): 1530-1535
- [31] 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 and Chemical Toxicology, 2018, 121: 676-686
- [32] York S N. Arsenic Metabolic Pathway [M]. Springer New York: York S N, 2013
- [33] Kenyon, E M, R L Del, et al. Tissue distribution and urinary excretion of inorganic arsenic and its methylated metabolites in mice following acute oral administration of arsenate [J]. Toxicol Sci, 2005, 85(1): 468-75
- [34] Zuzana Drobná, Walton F S, Paul D S, et al. Metabolism of arsenic in human liver: The role of membrane transporters [J]. Archives of Toxicology, 2010, 84(1): 3-16
- [35] 吴军,师喆,郑玉建,等.不同价态砷对DNA和砷甲基转移酶的影响[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
- [36] 郑君丽,龚学忠.砷剂致肾损伤发病机制的研究进展[J].南昌大学学报(医学版),2018,58(1):88-90
ZHENG Jun-li, GONG Xue-zhong. Advances in pathogenesis of renal injury induced by arsenic [J]. Journal of Nanchang University Medical Science, 2018, 58(1): 88-90
- [37] 陈保卫,那仁满都拉,吕美玲,等.砷的代谢机制、毒性和生物监测[J].化学进展,2009,21(Z1):474-482
CHEN Bao-wei, Naramandura Hua, LYU Mei-ling, et al. Metabolism, toxicity, and biomonitoring of arsenic species [J]. Progress in Chemistry Prog Chem, 2009, 21(Z1): 474-482
- [38] Kumar A. Emblica officinalis protects against sodium arsenite induced hepatotoxicity & nephrotoxicity in rats [J]. International Journal of Sciences, 2015, 47-55(3): 1203-1208
- [39] 于慧敏,王茜,夏荣香,等.不同价态砷染毒大鼠肾脏砷代谢产物与相关代谢酶的关联性[J].中华地方病学杂志,2014, 33(2):150-154
YU Hui-min, WANG Qian, XIA Rong-xiang, et al. A relationship between arsenite sodium, arsenate sodium metabolites and related metabolic enzymes in rat kidney [J]. Chinese Journal of Endemiology, 2014, 33(2): 150-154
- [40] Hughes, M F, Kenyon E M, Edwards B C, et al. Accumulation and metabolism of arsenic in mice after repeated oral administration of arsenate [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2003, 191(3): 202-210
- [41] Chávez-Capilla, Teresa, Beshai M, et al. Bioaccessibility and degradation of naturally occurring arsenic species from food in the human gastrointestinal tract [J]. Food Chemistry, 2016, 212: 189-197

(上接第 259 页)

- [20] 刘青广,曾凡枝,田丽萍.苜蓿叶蛋白的营养及其功能特性研究[J].石河子大学学报(自然科学版),2007,6:753-756
LIU Qing-guang, ZENG Fan-zhi, TIAN Li-ping. Study on nutrition and functional characteristics of alfalfa leaf protein [J]. Journal of Shihezi University (Natural Science Edition), 2007, 6: 753-756
- [21] 田春丽,李斌,刘芳,等.硒、锌元素配施对紫花苜蓿产量、植株体内硒锌积累和氨基酸含量的影响[J].草业学报,2019, 28(3):142-153
TIAN Chun-li, LI Bin, LIU Fang, et al. Effects of selenium and zinc application on alfalfa yield, selenium and zinc accumulation and amino acid content in plants [J]. Acta Pratica Sinica, 2019, 28(3): 142-153
- [22] 王帆.夏玉米不同叶位叶片含水量及其与光合作用的关系[D].北京:中国气象科学研究院,2018
WANG Fan. Leaf water content in different leaf positions of summer maize and its relationship with photosynthesis [D]. Beijing: China Academy of Meteorological Sciences, 2018
- [23] 杨沫,薛媛,任璐,等.不同粒度花椒籽黑种皮粉理化特性[J].食品科学,2018,39(9):47-52
YANG Mo, XUE Yuan, REN Lu, et al. Physical and chemical properties of black pepper seed peel powder with different particle sizes [J]. Food Science, 2018, 39(9): 47-52
- [24] 杨天意,吴鹏,许志诚,等.发芽大麦山楂营养咀嚼片制备工艺优化与质量评价[J].食品工业,2018,39(6):95-100
YANG Tian-yi, WU Peng, XU Zhi-cheng, et al. Preparation process optimization and quality evaluation of germinated barley hawthorn nutrition chewing tablets [J]. Food Industry, 2018, 39(6): 95-100
- [25] 何英蒙,皮超,魏郁梦.粉体粒子的物理性质对片剂压缩成型性的影响[J].中国医药工业杂志,2019,50(5):478-489
HE Ying-meng, PI Chao, WEI Yu-meng. Effect of physical properties of powder particles on compression molding of tablets [J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Industry, 2019, 50(5): 478-489
- [26] 孙训方,方孝淑,关来泰,等.材料力学[M].高等教育出版社,1979:9-46
SUN Xun-fang, FANG Xiao-shu, GUAN Lai-tai, et al. Mechanics of Materials [M]. Higher Education Press, 1979: 9-46