论著

文章编号:1000-5404(2007)05-0402-04

铅对幼年大鼠钙的吸收和骨骼生长的影响

胡雪琴,糜漫天 (第三军医大学军事预防医学院营养与食品卫生学教研室,重庆市营养与食品安全重点实验室,重庆 400038)

提 要:目的 研究铅对大鼠钙的吸收和骨骼生长的影响。**方法** 分别以纯净水和1.0 g/L醋酸铅水饲喂Wistar大鼠,其中醋酸铅饲喂大鼠又分别以正常饲料、高钙饲料和低钙饲料饲养,对应分组为对照组、单铅染毒组、高钙铅染毒组和低钙铅染毒组。观察大鼠生长发育,测定大鼠血清中骨钙素和甲状旁腺激素的含量,检测骨骼中铅和钙的含量,石蜡切片HE染色比较大鼠股骨显微结构变化。另饲养10只Wistar大鼠,以$^{45}CaCl_2$示踪研究铅对钙吸收的影响。**结果** 铅和低钙处理明显抑制大鼠生长发育,使大鼠股骨的长度和直径减小,且低钙加剧了铅对骨骼的抑制作用,而高钙则拮抗铅对骨骼的抑制作用。示踪结果显示铅可显著抑制大鼠体内钙的吸收。**结论** 铅可能通过抑制大鼠体内钙的吸收而使骨骼生长受限,补充适量钙有助于减轻铅对骨骼生长的抑制。

关键词:钙;铅;股骨;骨钙素;甲状旁腺激素;$^{45}CaCl_2$示踪

中图法分类号:R151.3;R336;R339.31 **文献标识码**:A

Effect of lead on calcium absorption and bone development in weanling rats

HU Xue-qin, MI Man-tian (Department of Nutrition and Food Hygiene, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the effect of lead on the calcium absorption and bone development in weanling rats. Methods Totally 80 weanling Wistar rats were equally divided into normal control (given with pure water and standard feed, including 1.15% calcium), lead group (given 1.0 g/L lead acetate water and standard feed), lead + low calcium group (1.0 g/L lead acetate water and feed including 0.69% calcium), and lead + high calcium group (1.0 g/L lead acetate water and feed including 1.72 % calcium). The development of rats was observed. Serum contents of osteocalcin and parathormone, and bone levels of lead and calcium in the femur were determined. The femur was examined with histological method. Another 5 Wistar rats received gastric irrigation of 10% lead acetate for 5 d, 5 more rats served as control, and then their absorption of calcium was detected with $^{45}CaCl_2$. Results Lead and low calcium inhibited the development of rat remarkably, with the content of osteocalcin, the length and diameter of the femur decreased. High calcium antagonized these effects of lead. The absorption of calcium in rats was repressed by lead. Conclusion Bone depression by lead may be due to that lead inhibits the absorption of calcium in rats, and the supplement of calcium is helpful to minimize the repression.

Key words: calcium; lead; femur; osteocalcin; parathormone; $^{45}CaCl_2$ tracing

铅污染是世界性的环境污染问题,而钙的缺乏在发展中国家也尤其突出。铅污染和钙缺乏对机体的危害已经有不少报道,铅染毒可降低体内钙的含量,而低钙反过来又是铅易染的原因之一[1]。通过补钙一方面可以避免钙缺乏的危害,另一方面其驱铅作用也日益得到人们的认可[2]。近年来报道,铅对骨骼的作用可直接伤害成骨细胞的功能,包括合成分泌骨钙素,从而抑制骨形成,调节骨形成的影响因子等[3]。但对于钙与铅共同作用下骨骼的发育情况目前少见报道。本研究将检测染铅大鼠对钙的吸收情况,并观察不同钙浓度饲料饲养下,染铅大鼠骨骼的发育情况。

基金项目:中国营养学会营养科研基金(2003)
Supported by the Nutrition Research Foundation of Chinese Nutrition Society (2003)

作者简介:胡雪琴(1973-),女,四川省南充市人,博士研究生,工程师,主要从事矿物营养方面的研究。电话:(023)68752291
通讯作者:糜漫天,电话:(023)68752292

收稿日期:2006-06-14;修回日期:2006-09-06

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

SPF级Wistar断乳大鼠80只由本校实验动物中心提供,雌

雄各半，21 d 龄，平均体质量 100 g，饲养 7 d 后分 4 组饲养，每组 20 只。对照组：正常饮用纯净水，标准大鼠饲养饲料，含钙量为 1.15%（正常值为 1.0% ~ 1.8%）；单铅染毒组（简称单铅组）：1.0 g/L 醋酸铅饮用水，标准大鼠饲养饲料，含钙量为 1.15%；低钙铅染毒组（简称低钙组）：1.0 g/L 醋酸铅饮用水，饲料中钙含量为 0.69%，为对照组钙的 60%，其余同标准饲料；高钙铅染毒组（简称高钙组）：1.0 g/L 醋酸铅饮用水，饲料中钙含量 1.72%，为对照组钙的 150%，其余同标准饲料。各组大鼠饲养到 40 d，采样用于大鼠生长发育分析和股骨结构观察。另饲养雄性 Wistar 大鼠（本校实验动物中心提供）2 组 10 只于代谢笼中，每组 5 只，正常喂养 7 d 后，其中 5 只给予 10% 醋酸铅灌胃，连续 5 d 直至出现明显的铅染毒症状，用于 $^{45}CaCl_2$ 示踪研究。

1.2　方法

1.2.1　生长观察　　饲养过程中观察大鼠生长情况，并每周测量其身长、体质量、尾长。

1.2.2　骨组织形态学观察　　取雄性大鼠左侧股骨上端关节结合部骨干，PBS 冲洗干净，入 4% 多聚甲醛中固定 24 h 后，PBS 冲洗，入 10% EDTA 液中进行脱钙，直至骨组织变软，可用普通手术刀片轻易切割。常规制作石蜡切片，厚度 5 μm，径向切片，HE 染色，于光镜下观察骨组织结构的变化并照相。

1.2.3　$^{45}CaCl_2$ 示踪检测铅对钙吸收的影响　　给予相同剂量的 $^{45}CaCl_2$ 灌胃。$^{45}CaCl_2$ 购自 Amercia 公司，总放射强度 3.7×10^7 Bq。分别收集各组大鼠 36 h 粪便，称质量并用高氯酸/过氧化氢法（1∶2）消化至澄清。采用液体闪烁计数仪测量消化液中 ^{45}Ca 的强度。

1.2.4　骨钙素测定　　取各组大鼠血清，采用放射免疫法，按北京博大泰克公司试剂盒说明测定。

1.2.5　甲状旁腺激素测定　　取各组大鼠血清，采用放射免疫法，按北京博大泰克公司试剂盒说明测定。

1.2.6　骨铅/钙的测定　　大鼠胸骨入 120 ℃烘箱烘干，称质量后用高氯酸/过氧化氢消化，采用火焰原子吸收法测定，北京海光仪器，标准物质购于国家标准物质中心。

1.3　统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SAS 8.2 统计软件，行单因素方差分析和相关性分析。

2　结果

2.1　大鼠生长发育

铅染毒 40 d，大鼠体质量、身长和尾长的增长呈现如下变化：低钙组 < 单铅组 < 高钙组 < 对照组。对照组大鼠体质量增长显著，明显大于高钙组（$P < 0.05$），单铅和低钙组增长量则依次低于高钙组（$P < 0.05$）。雌性的趋势表现没有雄性明显。见表 1。

表 1　各组大鼠体质量、身长及尾长的增长情况（$\bar{x} \pm s$）

组别	尾长增长(*l*/cm)		身长增长(*l*/cm)		体质量增长(*m*/g)	
	雌性	雄性	雌性	雄性	雌性	雄性
对照	6.30 ± 1.30	7.90 ± 0.65	5.50 ± 0.79	8.50 ± 0.87	143.93 ± 31.41	252.12 ± 11.53
单铅	5.50 ± 0.79	6.70 ± 1.15^{ab}	4.90 ± 0.89	6.30 ± 1.68^{ab}	133.86 ± 10.65^{ab}	179.79 ± 27.29^{ab}
低钙	4.60 ± 0.82^{ab}	5.54 ± 0.58^{ab}	4.90 ± 1.29	5.80 ± 1.68^{ab}	120.95 ± 9.90^{ab}	167.64 ± 37.25^{ab}
高钙	6.02 ± 1.16	7.20 ± 1.20	5.40 ± 0.42	6.90 ± 0.65^{a}	136.97 ± 14.77	225.42 ± 64.22^{a}

a：$P < 0.05$，与对照组比较；b：$P < 0.05$，与高钙组比较

相关性分析显示，雄性大鼠尾长、身长与体质量增长量之间均呈正相关，相关系数 $r_{尾长:身长} = 0.918$（$P < 0.05$），$r_{身长:质量} = 0.868$（$P < 0.05$），$r_{尾长:质量} = 0.983$（$P < 0.05$）。

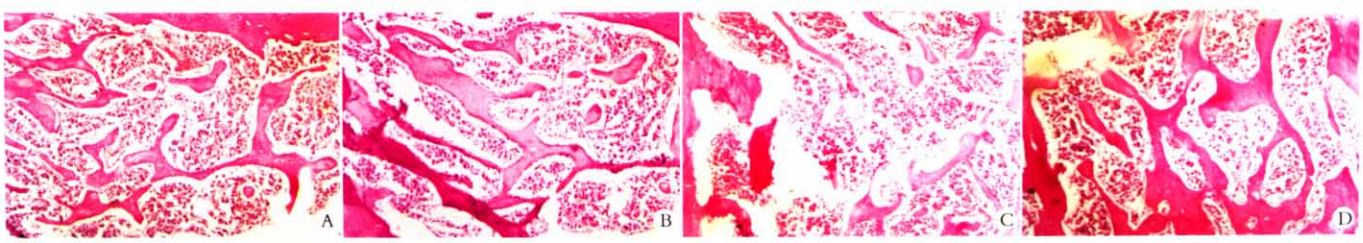
2.2　大鼠股骨形态

不同处理的大鼠股骨外形有着显著的差异。与对照和高钙组相比，低钙组的股骨短小，实验中观察到其可轻易折断。单铅组股骨比低钙组长，但不如对照组和高钙组；且其股骨干体直径比对照和高钙组均大。肉眼观察对照组和高钙组股骨外形未见明显差异。

2.3　大鼠股骨显微镜观察结果

骨干厚度在不同组别大鼠中有显著的差异。低钙和单铅组骨干厚度明显小于对照和高钙组，且低钙组最小（$P < 0.01$）。对照组稍大于高钙组，但差异无统计学意义（$P > 0.05$）。

低钙组中骨小梁数目少且散在，骨小梁间的初级骨髓腔大而形状不规则。而对照组中骨小梁数目多并相互连接，初级骨髓腔被骨小梁分开并具一定形状。单铅组股骨骨小梁数较对照和高钙组少，有部分连接在一起，但比低钙组骨小梁多（图 1）。高倍镜下可明显看出，单铅和低钙组密质骨没有对照和高钙组致密。



A：对照组；B：单铅组；C：低钙组；D：高钙组

图 1　大鼠股骨切片观察　（HE × 40）

2.4　^{45}Ca 示踪法检测铅对钙吸收的影响

急性铅染毒的第 4、5 天，各有 1 只大鼠由于灌胃受伤而死亡，故受试大鼠减为 8 只，对照和铅染毒组各 4 只。液闪计数值表示 ^{45}Ca 的强弱，可间接反映 ^{45}Ca 的浓度。

结果显示，铅处理组的粪便 ^{45}Ca 液闪计数值为（156 832.3 ± 24 460.1），远远大于对照组（5 342.2 ± 320.4）（$P < 0.01$）。故对照和单铅组大鼠粪便中 ^{45}Ca 的浓度有显著性差异，提示单铅组大鼠体内 ^{45}Ca 的浓度远低于对照组。

2.5　骨铅和骨钙

各组大鼠骨钙含量比较结果为：对照组 > 高钙组 > 单铅组

>低钙组;而大鼠骨骼中铅含量比较结果如下:低钙组>单铅组>高钙组>对照组,雌雄均呈类似趋势。除单铅和低钙组间没有显著差异外($P>0.05$),其余组间骨钙和骨铅均有显著性差异($P<0.05$)。见表2。

骨钙与骨铅的相关性分析结果显示,$r=-0.944\ 92$,截距(a)=3 924.27,经统计检验 $t=-4.082\ 9$,$P=0.027\ 5$,表明二者呈直线负相关。

表2 大鼠骨骼中钙和铅的含量($\bar{x}\pm s$)

组别	骨钙(g/g)		骨铅(mg/g)	
	雌性	雄性	雌性	雄性
对照	95.01±3.19	99.32±1.17	89.26±2.14	106.64±6.75
单铅	69.04±1.45[a]	64.59±1.53[a]	868.38±42.47[a]	1 134.52±156.87[a]
低钙	64.61±1.19[a]	56.64±1.01[a]	1 504.66±96.92[a]	1 137.91±96.92[a]
高钙	77.22±1.19[abc]	78.09±0.96[abc]	717.83±21.28[abc]	563.90±21.28[abc]

a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与单铅组比较;c:$P<0.05$,与低钙组比较

2.6 骨钙素和甲状旁腺激素

大鼠血清骨钙素值在对照组中最大,其次为高钙组,单铅组列第三,均高于低钙组。雌雄大鼠体内血清骨钙素趋势相似,但雄性中尤其明显。方差检验表明各组间骨钙素均存在显著性差异($P<0.05$)。与之相反的是,大鼠血清甲状旁腺激素含量则表现为低钙组中最高,其次为单铅组、高钙组和对照组。除雄性大鼠单铅和高钙组无显著差异外,其余大鼠各组间甲状旁腺激素含量差异极显著($P<0.05$)(表3)。

表3 大鼠血清中骨钙素和甲状旁腺激素的含量($\rho_B/\mu g\cdot L^{-1}$,$\bar{x}\pm s$)

组别	骨钙素		甲状旁腺激素	
	雄性	雌性	雄性	雌性
对照	10.64±2.50	5.76±0.70	5.77±0.05	2.67±0.49
单铅	5.49±0.19[a]	3.73±0.06[a]	7.97±1.02[a]	11.13±2.81[a]
低钙	3.21±0.20[ab]	3.59±0.31[ab]	29.17±16.63[ab]	24.85±5.61[ab]
高钙	6.42±0.36[abc]	3.92±0.04[abc]	7.70±0.34[ac]	8.18±0.11[abc]

a:$P<0.05$,与对照组相比;b:$P<0.05$,与单铅组比较;c:$P<0.05$,与低钙组比较

统计分析结果显示,大鼠骨钙素和甲状旁腺激素的相关系数 $r=-0.787\ 624\ 97$,$t=-1.807\ 8$,$P=0.106\ 2$,故大鼠骨钙素和甲状旁腺激素之间并不存在直线负相关;作散点图分析结果显示,骨钙素和甲状旁腺激素之间存在负相关的趋势。

3 讨论

3.1 铅对钙吸收的抑制作用

钙是骨骼的重要组成成分,铅污染常常导致儿童生长发育受阻,包括骨骼发育异常[4]。探讨钙和铅以及其相互作用对骨骼发育产生的可能影响和机制,也是非常必要的。

骨骼是铅和钙的主要靶器官,超过90%以上的铅和钙均沉积在骨骼。铅可阻止钙释放性钙内流(CRAC)[5,6],因此打乱体内的钙平衡。钙通过与铅竞争肠道结合蛋白上的共同结合位点而抑制铅的吸收。降低饮食中的钙含量能增加肠道铅的吸收和骨铅沉积[7]。

本实验采用剩余量法检测了铅对钙吸收的影响。外源性标记钙经口腔摄入动物体内后,一部分通过吸收入血液而进行正常的代谢,或沉积在骨骼或经过肾脏代谢后以尿液的形式排出体外;而剩余未被吸收入血的钙则以粪便的形式排出。通过检测粪便中标记钙的含量可以预测动物体内标记钙的吸收情况。本实验中铅染毒组粪便中的^{45}Ca含量显著高于对照组,推测由于是急性铅染毒造成大鼠体内铅含量过高而抑制了钙的吸收,所以导致两者相差约30倍。结果表明,铅确实是抑制了机体外源性钙的吸收。

3.2 铅对骨骼生长的影响

骨骼的生长引起骨外周钙化组织层数的增加,Seltzer等[8]利用激光销蚀ICP-MS方法分析鳄鱼股骨中铅的径向分布发现,鳄鱼股骨中的铅的浓度及分布与其所具有的临床表现是一致的:即鳄鱼股骨中的铅浓度越高,其临床铅中毒的症状愈明显。长骨宽度的生长主要是由于骨干表面膜下新的骨沉积的结果,骨干的增粗是以成骨细胞在骨干表面添加哈佛系统的方式来实现的[9]。骨钙素是反映骨形成的有效指标,钙可诱导骨钙素α螺旋构象的形成且促进骨钙素正常的羟磷基化。低水平的铅可以取代骨钙素上的钙,且铅与骨钙素的亲和力远高于钙。铅可以在浓度远低于钙时诱导出比例相当的具有α螺旋构象的骨钙素,且抑制骨钙素与羟磷灰石的结合,从而降低了钙沉积和骨形成[10]。铅抑制骨钙素的表达,骨钙素表达的降低则直接导致了骨量的减少,骨量的减少必然令骨骼的生长(增长增粗)受阻。甲状旁腺激素是甲状旁腺主细胞分泌的肽类激素,其主要靶器官是骨、肾和小肠,调节钙和磷的代谢。甲状旁腺激素作用于骨时,促进骨质吸收,使骨钙释放入血,血钙升高,从而促进成骨细胞的消失和破骨细胞的增殖[11]。洪燕等[12]报道,钙缺乏使大鼠血清甲状旁腺激素显著增加。而铅也可以干扰甲状旁腺激素对于体内钙稳态的调节[7]。而本实验结果显示,铅和低钙处理均会造成大鼠密质骨疏松,成骨区骨小梁形成减少,妨碍软骨内成骨作用。补充适量的钙后,大鼠股骨致密,骨小梁和初级骨髓腔的形成较完整。而其效应在机体的整体表现为:铅染毒大鼠的体质量、身长和尾长的增长均受到不同程度的抑制,骨骼增长增粗均被抑制。补充适量的钙有助于减轻铅的这种抑制作用,而低钙摄入将加剧铅对大鼠生长发育的抑制作用。表明钙和铅可能通过相互作用(竞争或取代)影响了骨骼的生长发育,铅对骨骼生长的抑制作用可能是通过干扰骨钙素和甲状旁腺激素的合成和分泌来实现的。

参考文献：

[1] 唐剑波，张新春，邢建明，等. 齿铅负荷量对儿童生长发育影响的研究[J]. 中国实用儿科杂志，2006，21(3)：194－196.

[2] Cortina-Ramirez G E, Cerbon-Solorzano J, Calderon-Salinas J V. Effects of 1,25-dihydroxicolecalciferol and dietary calcium-phosphate on distribution of lead to tissues during growth[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2006, 210(1－2)：123－127.

[3] 石凯丽，王文英. 铅对儿童骨代谢的影响机制[J]. 国外医学：儿科学分册，2002，29(6)：289－291.

[4] 石凯丽，马 宏，王文英，等. 铅对儿童骨代谢的影响[J]. 中国儿童保健杂志，2004，12(2)：109－111.

[5] Rogers J T, Wood C M. Characterization of branchial lead-calcium interaction in the freshwater rainbow trout Oncorhynchus mykiss[J]. J Exp Biol, 2004, 207(Pt 5)：813－825.

[6] Wiemann M, Schirrmacher K, Busselberg D. Interference of lead with the calcium release activated calcium flux of osteoblast-like cells[J]. Calcif Tissue Int, 1999, 65(6)：479－485.

[7] Long G J, Pounds J G, Rosen J F. Lead intoxication alters basal and parathyroid hormone-regulated cellular calcium homeostasis in rat osteosarcoma (ROS 17/2.8) cells[J]. Calcif Tissue Int, 1992, 50(5)：451－458.

[8] Seltzer M D, Lance V A, Elsey R M. Laser ablation ICP-MS analysis of the radial distribution of lead in the femur of Alligator mississippiensis[J]. Sci Total Environ, 2006, 363(1－3)：245－252.

[9] 屈丽华，李秀芝，刘月顺，等. 人胚胎长骨的组织学观察[J]. 衡阳医学院学报，2000，28(6)：555－558.

[10] Dowd T L, Rosen J F, Mints L, *et al*. The effect of Pb(2+) on the structure and hydroxyapatite binding properties of osteocalcin[J]. Biochim Biophys Acta, 2001, 1535(2)：153－163.

[11] 张 艳，李成文，赵丹慧. 人甲状旁腺激素结构与功能研究进展[J]. 生物技术通讯，2001，12(3)：S24－S26.

[12] 洪 燕，程义勇，张月红，等. 钙缺乏对大鼠骨骼发育的影响及其机制探讨[J]. 卫生研究，2002，31(1)：41－43.

（编辑 王小寒）

文章编号：1000-5404(2007)05-0405-01

个案与短篇

海洛因依赖者接受戒毒手术后心电图变化分析

程敬民[1]，顾建文[1]，殷 慧[2]，匡永勤[1]，周虎田[1]，李 汛[1]，贺伟旗[1]，程 林[1]，许 波[3]（成都军区总医院：[1]神经外科，[2]心电图室，成都 610083；[3]成都军区浆洗街干休所，成都 610036）

滥用药物对心血管系统产生的毒害作用已经被广泛认识，心电图异常往往是其直接表现。我们于2004年8－11月对70例海洛因依赖者施行立体定向手术，发现术后心电图有明显的好转，现报告如下。

1 对象与方法

选取本院收治的70例海洛因依赖者，男性60例，女性10例。年龄17～40岁，平均29.3岁，全部经历烫吸并最终静脉注射海洛因，吸毒时间3～15年，平均4.3年，具有手术指征，实施立体定向手术：预先在头颅上标出姚氏线及手术切口线，局麻下安装Leksell多功能脑立体定向仪头环，在CT下行1.5 mm薄层扫描。参照Schaltenbrand-Wahren大脑图谱，通过计算机确定伏隔核、杏仁核、扣带回等相关靶点坐标，采用射频温控热凝毁损法置入微电极针行射频毁损。

所有病例分别于手术戒毒前3 d，术后1周、6个月、1年行常规心电图检查，采用美国GE公司SOLAR 8000心电监护仪进行心电动态监护，出现心律失常进行全导联记录。

统计学方法：采用PEMS 3.1统计软件行χ^2检验。

2 结果

70例患者中术前心电图异常有27例占38.6%，其中14例有2次心电图异常共计41次。以S-T段改变及窦性心动过速为主，分别为13、12次，窦性心动过缓4次，房室传导阻滞3次，频发室性早搏1次，电轴偏移及电压变化各4次。术后1周24例，术后6个月9例，术后1年8例，S-T段改变分别为10、6、2次，窦性心动过速分别为13、1、2次，而窦性心动过缓、房室传导阻滞、电轴偏移及电压变化在术后1年时各1次，无频发室性早搏。

3 讨论

本组术前心电图异常占38.6%，与国内报道的43.4%～50%接近。心电图异常的27例中，S-T段改变者12例，占44.4%，说明药物滥用对心肌供血的影响最为突出。Lester等[1]发现药物对心脑血管的毒性作用主要继发于药物滥用导致的血管炎，Somne等[2]认为静注药物不纯，稀释液和针具不洁造成心血管系统感染，血管内皮损伤，微小血管小血栓形成引起心脏供血不足，以及静注药物血液浓度高对心脏刺激较大等原因造成的损害直接、间接地体现在心电图上。

（下转409页）

基金项目：吴阶平基金会临床科研专项资助基金(2005-510-8)；国家卫生部指令课题(2005)
Supported by the Clinical Scientific Research Project of Wu Jieping Foundation(2005-510-8) and the Mandatory Program from Ministry of Health of China(2005)

作者简介：程敬民(1975－)，男，四川省自贡市人，主治医师，主要从事功能神经外科方面的研究。电话：13008191841，E-mail：doctor_cjm@163.com
通讯作者：顾建文，E-mail：gujianwen2000@yahoo.com.cn

收稿日期：2006-05-10；修回日期：2006-07-11