

纳米级铜单质对小鼠体重、血铜和血常规影响

陈贵英^{1,2}, 陈志鹃¹, 张闻杰¹, 刘浩¹, 高平^{1*}

(1. 四川大学生命科学学院, 成都 610065; 2. 四川师范大学生命科学学院, 成都 610101)

摘要:用实验室分离保存的一株细菌将二价铜转化为纳米级铜单质,然后添加到饲料喂养昆明小鼠,并与硫酸铜比较。结果显示:纳米铜组小鼠增长慢,且个体间离散度大;纳米铜组血铜普遍比较低,离散度大;纳米铜组和低浓度铜离子组嗜中性粒细胞含量普遍比对照组低,差异极显著($P < 0.01$),淋巴细胞含量比对照组高,差异显著($P < 0.05$)。推测铜单质不能被小鼠吸收,且影响小鼠的消化系统功能。

关键词: 纳米级铜单质; 硫酸铜; 昆明小鼠; 体重; 血铜; 血常规

中图分类号: Q959.8; Q95-33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7083(2012)05-0795-03

Effects of Nanometer Copper on the Weight, Concentration of Blood Copper and Blood Routines of Kunming Strain Mouse

CHEN Gui-ying^{1,2}, CHEN Zhi-juan¹, ZHANG Wen-jie¹, LIU Hao¹, GAO Ping^{1*}

(1. College of Life Science, Sichuan University, Chengdu 610065, China;

2. College of Life Science, Sichuan Normal University, Chengdu 610101, China)

Abstract: Cu^{2+} was transformed into Cu by *Pseudomonas* sp. MBR deposited in our laboratory, Cu and Cu^{2+} were added to basal diets of different group mice, then compared. The results showed that the mice fed with Cu grew more slowly, and the dispersion is large; the concentrations of blood copper of the mice fed with Cu were universally low, and the dispersion is large; the neutrophilic granulocytes of the group fed with Cu or lower Cu^{2+} was much less than that of the control group, and the difference was very significant ($P < 0.01$), the lymphocytes of the mice fed with Cu was much more than the control group, and the difference was significant ($P < 0.05$). Cu was conjectured to be not absorbed as to Kunming strain mouse and affect the digestive system function.

Key words: nanometer copper; copper sulfate; Kunming strain mouse; weight; blood copper; blood routine

铜是动植物和人类必需的微量元素,缺乏或过多都将产生不良影响。随着社会经济的发展,人类活动对环境的干扰日益加剧,工业和农业生产活动常可导致土壤和水的铜污染,铜已成为环境重金属污染的主要元素之一。铜元素的总利用率较低,但促进幼小動物生长作用明显,导致饲料中铜元素超量添加的情况比较普遍,动物粪便中铜排出量递增已经成为环境铜污染的又一重要因子(Nicholson *et al.*, 1999; Saviozzi *et al.*, 1999; 邓科敏等, 2008)。环境铜污染不但导致该地区植物、动物、微生物生长及土壤酶受到影响,而且引起生态系统失调,打破正常的食物链,影响到整个地区的生态环境(李焕江, 2008; 陈贵英, 2011),严重威胁到生态系统的稳定和人类的安全。同时,动植物体的富集作用可使铜毒

性增强,当人食用了这些超标的动植物食品后,会在人体内蓄积,产生诸多不良后果,甚至危害人体健康。因此近年来对环境中铜污染及修复的研究越来越多,寻求具有高吸收利用率的铜源成为饲料研究的热点之一。

不同铜源的生物利用效率不同(李秀霞等, 2004)。为了减少铜污染,本研究利用从污染环境中分离到的一株能将铜离子转化为铜单质的细菌,将硫酸铜转化为铜单质,再将铜单质添加到饲料中,饲喂常用的实验级昆明小鼠,以观察其相应的生物学效应。

1 实验材料与方法

1.1 菌株来源

实验前期从接触氧化器的一片生物膜中筛选的

收稿日期:2012-03-31 接受日期:2012-06-07

作者简介:陈贵英(1971~),女,讲师,博士研究生,主要从事动物学研究,E-mail:hongyingch@163.com

*通讯作者 Corresponding author,教授,E-mail:gaoping8198@sohu.com

一株具有反硝化能力的假单胞菌 *Pseudomonas* sp. MBR, 该菌株能将铜离子转化为铜单质。有关该菌株的一些生物学特性及培养条件等参照占国强(2009)。

1.2 铜单质获得

对菌株 *Pseudomonas* sp. MBR 进行培养, 在一定时间加入一定量 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 继续培养 5 d, 然后经过冷冻干燥等处理, 送中国科学院成都分析测试中心测得菌粉中含铜 19%, 其中铜单质占 55.80%, 二价铜离子占 44.20%。

1.3 配制饲料

参照美国 1993 年颁布的实验啮齿动物饲料配方(Reeves *et al.*, 1993) 和刘选珍(2007)的方法配制饲料。配制好后取 100 g, 并按比例加入菜籽油, 玻璃棒搅拌混匀, 送四川大学分析测试中心测定基础饲料中铜浓度, 结果为 1.78 mg/kg。添加分析纯级别的 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 或自制菌体粉末, 配制成如下 3 组饲料: 1 组饲料(对照组): 加入 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 使饲料中含铜 6 mg/kg(只有铜离子); 2 组饲料: 加入自制菌体粉末, 使饲料中含铜 6 mg/kg(铜离子 3.6452 mg/kg 和铜单质 2.3548 mg/kg); 3 组饲料: 加入 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 使饲料中铜离子与 2 组中铜离子等量, 即 3.6452 mg/kg。

先将无机盐混合物和维生素混合物分别放入粉碎机粉碎搅拌均匀 1 min, 再将无机盐混合物和维生素混合物混匀搅拌, 然后和其它成分一起混匀, 再按组别需要取一定量配制成各组的日粮饲料, 倒入盆里, 按要求加入菜籽油和去离子水, 用手和揉, 搓成拇指大小的饲料条, 放入烘箱 40℃ 烘干。

1.4 实验小鼠及饲养

从四川省实验动物中心(生产许可证号: 达硕. SCXK(川) 2008-24) 购买的昆明系小鼠, 全为雄性 30 只, 标准体重 18~22 g, 普通级。以实验小鼠专用生长维持饲料预饲 5 d 后随机分为 3 个组, 每组 10 只, 进行 40 d 蓄积实验。

饲养: 层流架中分笼饲养(每笼 5 只), 动物饲养室温度 24℃, 自然节律采光 12 h, 自由采食和饮用去离子水。每天记录温度、光照、饲喂时间、死亡、小鼠外形及精神状态, 每周称体重和饲料。

1.5 测定指标及方法

1.5.1 阶段体重及耗料 每周称重小鼠 1 次, 每周计算小鼠周耗料, 直到第 4 周。结果以每组 10 只小鼠计算。

1.5.2 血常规指标 饲养到 30 d 时采用眼眶静脉

采血, 制作成抗凝全血, 送四川大学华西第四医院检测血常规。仪器为全自动血细胞检测仪(编号: JC047), 检测方法为电阻抗法。最终数据统计以每组 7 只计算。

1.5.3 血液中铜浓度 实验进行到 45 d 时眼眶静脉采血, 送四川大学测试中心检测血液中铜浓度。仪器为等离子体质谱仪 VGPQE × Cell 型; 分析方法通则 JC004-2001。最终数据统计以每组 7 只计算。

1.5.4 数据处理 所得实验数据最终使用 Excel 2003、SigmaPlot 11.0 软件进行统计分析。

2 结果

2.1 临床观察

日常观察发现, 第 1 组小鼠整体精神状态比第 2 组和第 3 组好; 第 2 组第 3 周开始出现烦躁和互相打咬的现象, 有 2 只小鼠出现尾部被咬伤的情况, 到第 4 周死亡 1 只; 第 3 组小鼠第 3 周出现毛发粗糙, 精神状况不好。

2.2 不同铜离子形式和浓度对小鼠体重的影响

由表 1 可知, 开始试验时第 1 组初体重显著低于另 2 组($P < 0.05$), 而试验终止时第 1 组终体重与另 2 组差异不显著($P > 0.05$), 第 1 组总增重明显高于另 2 组, 其料重比小于另 2 组。

第 2 组与第 1 组相比, 终体重的离散度明显高于第 1 组, 总增重比第 1 组少得多, 料重比也比第 1 组高得多。

第 2 组与第 3 组相比, 初体重和终体重差异均不显著($P > 0.05$), 但第 2 组终体重离散度明显高于第 3 组, 也是三组中离散度最大的; 第 2 组总增重也小于第 3 组。

表 1 3 组小鼠增重及料重比

Table 1 The weight gain and gain feed ratios of three groups

组别	初体重(g)	终体重(g)	总增重(g)	料重比
1	26.13 ± 0.94 ^a	35.73 ± 3.44 ^a	96.0	9.99
2	28.04 ± 1.46 ^b	36.68 ± 4.65 ^a	85.4	12.21
3	28.02 ± 2.00 ^b	36.94 ± 2.67 ^a	89.2	12.67

注: n=10, 同一列带有不同字母者差异显著($P < 0.05$), 相同字母者差异不显著($P > 0.05$)

2.3 不同铜离子形式和浓度对小鼠血铜浓度的影响

由表 2 可知, 最后统计三组的血铜浓度差异不显著($P > 0.05$), 但第 2 组血铜普遍比较低, 且很不均匀, 离散度大, 第 1 组血铜浓度普遍比第 2 组和第 3 组高。

2.4 不同铜离子形式和浓度对小鼠血常规的影响

由表 3 可知, 3 个组红细胞数量在平均值和离散

表 2 3 组小鼠血铜浓度 (μg/g)

Table 2 The content of blood copper of different group (μg/g)

小鼠编号	1	2	3	4	5	6	7	血铜浓度
1 组	0.58	0.41	0.25	0.53	0.33	0.37	0.62	0.44 ± 0.13 ^a
2 组	0.20	0.17	0.32	0.43	0.27	0.27	0.55	0.32 ± 0.13 ^a
3 组	0.46	0.30	0.33	0.37	0.28	0.45	0.24	0.35 ± 0.08 ^a

注: n = 7, 同一列带有不同字母者差异显著 (P < 0.05), 相同字母者差异不显著 (P > 0.05), 下表同

度方面都比较相近, 差异不显著 (P > 0.05); 第 3 组白细胞含量严重偏少, 极显著低于第 1 组 (P < 0.01), 显著低于第 2 组 (P < 0.05); 3 个组血红蛋白含量差异不显著 (P > 0.05); 第 1 组嗜中性粒细胞含量极显著高于第 2、3 组 (P < 0.01); 第 2 组和第 3 组淋巴细胞含量差异不显著 (P > 0.05), 但都极显著高于第 1 组 (P < 0.01)。

表 3 3 组小鼠血常规
Table 3 The blood routines of three groups

指标	1 组	2 组	3 组
红细胞 (10 ¹² /L)	7.85 ± 0.88 ^a	7.96 ± 0.60 ^a	7.75 ± 0.95 ^a
白细胞 (10 ⁹ /L)	8.26 ± 2.21 ^a	8.06 ± 2.10 ^a	7.24 ± 0.72 ^b
血红蛋白 (g/L)	136 ± 13 ^a	136 ± 9 ^a	130 ± 16 ^a
嗜中性粒细胞 (%)	17 ± 8 ^a	11 ± 4 ^b	11 ± 3 ^b
淋巴细胞 (%)	83 ± 8 ^a	89 ± 4 ^b	88 ± 3 ^b

3 讨论

第 1 组小鼠生长最快, 料重比也最低, 这与以前的很多研究结果一致, 即高浓度的铜有促进生长的作用, 铜缺乏可导致动物生长抑制 (Gene *et al.*, 1996; 吴建设等, 1999; 魏磊磊等, 2004)。结合小鼠临床表现, 也印证了饲料铜浓度 6 mg/kg 为小鼠正常生长所需的浓度 (Reeves *et al.*, 1993)。

第 2 组与第 3 组铜离子浓度相同, 但第 2 组小鼠增长慢, 且离散度大, 说明铜单质影响小鼠的消化系统功能, 这与王天成等 (2006) 的研究结果一致。从其离散度分析, 低浓度纳米级铜单质对小鼠的影响程度因个体而异。从血铜浓度看, 第 2 组最低, 推测纳米级铜很可能未被吸收, 反而还影响了铜离子的吸收, 这个结果与前面的纳米级铜影响小鼠的消化系统功能相吻合。

第 3 组白细胞含量严重偏少, 与对照组比差异显著, 说明其非特异性白细胞免疫功能降低, 这与奚景贵等 (1991) 对铜对大鼠免疫功能的影响研究结果一致, 即低铜组大鼠白细胞总数显著降低。第 1 组嗜中性粒细胞含量显著高于另两组, 嗜中性粒细胞含量高是机体抵御能力强的表现, 这与以前的研究

结果一致, 即铜缺乏会引起相应免疫功能下降 (Babu & Failla, 1990; Olkowski & Gooneratne, 1990; Bae & Percival, 1993; 吴建设等, 2002)。

本研究表明, 纳米级铜单质在小鼠体内不能正常吸收; 纳米级铜单质能否作为动物饲料的有效铜源还有待进一步研究。

4 参考文献

陈贵英, 李维, 陈顺德, 等. 2011. 环境铜污染影响及修复的研究状况[J]. 绿色科技, 12: 125 ~ 128.

邓科敏, 李前勇, 张德志, 等. 2008. 高铜对畜禽养殖及其产品安全的影响[J]. 四川畜牧兽医, 35(2): 30 ~ 32.

李秀霞, 许丽, 孙协军. 2004. 不同水平铜对小鼠营养与免疫功能的影响[J]. 四川畜牧兽医, 31(6): 31 ~ 32.

刘选珍. 2007. 大鼠铜缺乏和过量敏感指标筛选和生物效应[D]. 四川大学博士学位论文: 18.

李焕江. 2008. 不同铜源对畜禽作用及对环境的影响[J]. 吉林畜牧兽医, 29(7): 11 ~ 13.

吴建设, 冯于明, 杨汉春, 等. 1999. 日粮铜水平对肉仔鸡生长性能和免疫功能影响的研究[J]. 畜牧兽医学报, 30(5): 414 ~ 420.

吴建设, 冯于明, 杨汉春, 等. 2002. 微量元素铜影响肉仔鸡免疫功能剂量效应的研究[J]. 动物营养学报, 14(1): 55 ~ 60.

魏磊磊, 冯于明, 袁建敏. 2004. 铜、铬营养及其互作对产蛋鸡脂类代谢的调节作用[J]. 中国家禽, 26(20): 13 ~ 15.

王天成, 陈真, 孟幻, 等. 2006. 纳米铜对小鼠毒性和血清常规生化指标影响的初步观察[J]. 卫生研究, 35(6): 705 ~ 706.

奚景贵, 刘铁纯, 王慧远, 等. 1991. 微量元素铁、锌及铜对大鼠免疫功能的影响[J]. 中国病理生理杂志, 7(2): 139.

占国强. 2009. 微生物好氧生长吸附还原重金属离子的研究[D]. 四川大学硕士学位论文: 16 ~ 25.

Babu U, Failla ML. 1990. Copper status and function of neutrophils are reversibly depressed in marginally and severely copper-deficient rats [J]. J Nutr, 120: 1700 ~ 1709.

Bae B, Percival SS. 1993. Retinoic acid-induced HL-60 cell differentiation is augmented by copper supplementation[J]. J Nutr, 123: 997 ~ 1002.

Gene M, Pesti I, Remzi I, *et al.* 1996. Studies on the Cupric Sulfate Pentahydrate and Cupric Citrate to Broiler chickens [J]. Poultry Science, 75: 1086 ~ 1091.

Nicholson FA, Chambers BJ, Williams JR, *et al.* 1999. Heavy metal contents of livestock feeds and animal manures in England and Wales [J]. Bioresearch and Technology, 70: 23 ~ 32.

Olkowski AA, Gooneratne S. 1990. Effects of diets of high sulfur content and varied concentrations of copper, molybdenum and thiamine on *in vitro* phagocytic and candidacidal activity of neutrophils in sheep [J]. Res Vet Sci, 48(1): 82 ~ 86.

Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. 1993. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the reformulation of the AIN-76A Rodent Diet [J]. J Nutr, 123(11): 1939 ~ 1951.

Saviozzi A, Biasci A, Riffaldi R, *et al.* 1999. Long-term effects of farmyard manure and sewage sludge on some soil biochemical characteristics [J]. Biology and Fertility of Soils, 30: 100 ~ 106.