· 论　著 ·

硒对急性镉中毒性肾损伤保护作用的研究

刘爱萍　赵金垣　刘亚宁　赵新华　邵涵如　龙曼海

摘　要　研究硒对急性镉中毒性肾损伤的保护作用。给大鼠腹腔注射镉 ($CdCl_2$ 15μmol/kg)与巯基乙醇 (mercaptoethal, ME 300μmol/kg) 混合液的同时，皮下注射硒 (Na_2SeO_3 15μmol/kg)。结果显示: 加硒能明显降低肾皮质镉含量，降低肾线粒体、胞浆氧自由基含量，并可拮抗镉所致大鼠线粒体的脂质过氧化物含量，使 GSH-Px活性在 12小时后显著升高; 同时使镉所致肾功能及超微结构损伤得到改善。提示硒可能通过抗氧化作用来防治镉所致肾损伤。

关键词　硒　镉中毒性肾损伤　氧自由基脂质过氧化　拮抗作用

A Study on the Protective Effects of Selenium on Acute Toxic Renal Damage Caused by Cadmium *Liu Aiping*[*], *Zhao Jinyuan*, *Liu Yaning*, *et al*. [*] *Research Center of Occupational Medicine*, *Third Teaching Hospital of Beijing Medical University*. 100083

Abstract　Protective effect of selenium on acute toxic renal damage caused by cadmium was studied. Rats were injected simultaneously with a mixture of cadmium chloride 15μmol/kg and mercaptoethanol 15μmol/kg intraperitoneally and sodium selenite 15μmol/kg subcutaneously. Results showed that selenium could reduce the level of cadmium in renal cortex, decrease that of oxygen free radicals in mitochondria and cytoplasm, antagonize the effect of cadmium on the content of lipid peroxide in rat mitochondria, and increase the activity of GSH-Px significantly. Also, selenium could improve the damage in renal function and ultra-structure caused by cadmium.

Key words　Selenium,　Toxic renal damage caused by cadmium,　Oxygen free radical,　Lipid peroxidation,　Antagonism

镉是环境和工业污染的重要毒物之一[1]。镉污染环境可对人体健康造成严重损害。肾脏是镉最重要的蓄积部位和靶器官，因此对镉毒性肾损伤致病机制及防治方法的研究有重要的临床意义。硒对镉在多种组织中的毒性表现出防护作用[2-4]，其中硒对抗镉睾丸毒性的机制是通过抗氧化作用[5]。有关硒对镉毒性肾损伤的保护作用研究不多。本文研究了硒在清除氧自由基，降低脂质过氧化物，防治镉肾毒性中的作用，为镉肾毒性的临床防治提供科学依据。

1　材料与方法

1.1　材料

氯化镉 ($CdCl_2$，北京化工厂，优级纯)、巯基乙醇 (ME, Sigma产品，100%)、亚硒酸钠 (Na_2SeO_3，北京中联化工试剂厂，分析纯)。

1.2　动物分组

健康雄性 Wistar大鼠，体重 200~240g (北京医科大学实验动物部提供)。

1.2.1　正常对照组　5只，腹腔注射去离子水 1ml/100kg bw (预试结果表明正常对照各时间点各指标波动范围不大，所以只设 12小时正常对照组)。

1.2.2　染镉组　共 3小组，15只，腹腔注射氯

本课题为国家自然科学基金资助项目 (课题编号 39370591)

作者单位: 100083　北京医科大学第三医院职业病研究中心 (刘爱萍*、赵金垣)，空军总医院临床检验科发光室 (刘亚宁、赵新华)，中国科学院高能物理研究所 (邵涵如)，贵阳医学院毒理学教研室 (龙曼海)

* 现在包头医学院预防医学教研室工作

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnk

化镉 15μmol/kg加巯基乙醇 300μmol/kg混合液。

1.2.3 硒保护组　共 3小组，15只，先给大鼠一侧腹腔注射 $CdCl_2$ (15μmol/kg) + ME (300μmol/kg)混合液，同时在另一侧皮下注射 Na_2SeO_3 15μmol/kg。

1.3 观察指标及测定方法

各组动物注射后置于不锈钢代谢笼收集 2、4、12小时尿，测定尿镉、尿总蛋白、尿渗透压、尿肌酐。对照组于注射后 12小时断头处死，其余各组分别于 2、4、12小时断头处死后将左侧肾组织固定于冰冷的 2.5%戊二醛中，常规电镜标本制作，HITACHI-600A型透射电镜检查；并取抗凝血及右侧肾组织按文献[6]分离亚细胞测定下列指标。

1.3.1 大鼠肾皮质镉及血镉和尿镉含量采用原子吸收 (日立 180-80) 火焰法测定，灵敏度检测限 10^{-9}，测定时间 5秒。

1.3.2 尿总蛋白含量采用考马斯亮蓝比色法[7]。

1.3.3 尿渗透压采用 ERMA Clncal折射计测定尿液折光率，换算成尿液渗透压。

1.3.4 血、尿肌酐测定采用碱性苦味酸比色法[8]。

1.3.5 肾线粒体、胞浆氧自由基水平采用 KZL-1型超微弱发光测定仪 (空军总医院临床检验科发光室自制) 测定脂质过氧化发光强度以评价氧自由基水平；具体方法为取分离出的胞浆线粒体 1ml放入 1cm光程石英杯中，置样品池中测光强，每个样品测读 10个数，取其平均值。

1.3.6 肾线粒体 MDA含量采用南京建成生物工程研究所 MDA试剂盒测定。

1.3.7 肾亚细胞 SOD活性采用南京建成生物工程研究所 SOD试剂盒测定。

1.3.8 肾亚细胞 GSH-Px活性采用 DTNB法[9]。

1.4 分析方法

全部资料输入微机，用 Foxbase软件建立数据库，用 SAS软件进行统计处理。

2 结果

2.1 肾皮质镉、尿镉和血镉含量的变化，见表 1。

如表 1所示硒保护组各时间点肾镉水平显著低于染镉组 ($P < 0.01$)，约下降 12%～52%；加硒未使尿镉排出增加 (未列出)；加硒明显增加血浆镉含量。

表 1　实验大鼠肾皮质镉和血镉含量

		处理时间 (小时) 2	4	12
肾皮质镉含量 (μg/g湿重)	染镉组	38.470±5.986	25.918±3.060	24.187±4.999
	硒保护组	3.745±1.038**	11.679±5.058**	12.646±4.951*
血镉含量 (μg/ml)	染镉组	0.294±0.091	0.259±0.087	0.289±0.056
	硒保护组	4.250±1.870**	7.689±3.080**	6.048±2.890**

注：正常对照组均未检出镉，结果未列出；与相应染镉组比较** $P < 0.001$，* $P < 0.01$

2.2 肾功能改变见表 2。

如表 2所示，硒保护组各时间点尿总蛋白排出量维持在正常水平，至 12小时肾小球滤过率 (GFR) 显著高于相应染镉组，并使尿渗透压在观察期内呈升高趋势，4、12小时均显著高于相应染镉组。

2.3 肾线粒体、胞浆氧自由基生成的变化

硒保护组可使镉染毒后 2、4小时本应增加的线粒体氧自由基生成基本保持不变，但对 12小时线粒体氧自由基生成增加无影响；硒

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnk

表 2　实验大鼠肾功能的变化 ($\bar{x} \pm s$)

指标	组别	处理时间(小时) 2	4	12
尿总蛋白 (mg/mgCr)	正常对照组	3.02±0.15	3.02±0.15	3.02±0.15
	染镉组	4.09±2.15	5.89±0.72△△	14.41±1.86△
	硒保护组	3.81±0.54	2.92±0.88**	4.13±1.48**
GFR (ml/min)	正常对照组	0.91±0.59	0.91±0.59	0.91±0.59
	染镉组	0.77±0.53	0.57±0.36	0.21±0.17
	硒保护组	0.48±0.35	0.45±0.29	0.55±0.22*
尿渗透压 (mosm/kg H_2O)	正常对照组	2046±249	2046±249	2046±249
	染镉组	1339±151△	1280±244△	1045±174△
	硒保护组	1550±150	2217±580	1857±314**

与对照组比较△ $P<0.05$,△△ $P<0.001$; 与相应染镉组比较* $P<0.05$,** $P<0.001$

对胞浆氧自由基生成的影响不大,仅见 4小时时氧自由基生成稍有抑制 (表 3、4)。

2.4　肾线粒体 MDA含量的变化

染镉组各时间点线粒体 MDA含量显著高于对照组。硒保护组各时间点线粒体 MDA含量均显著低于相应染镉组,与对照组相近 (表 3)。

2.5　肾线粒体、胞浆 SOD活性的变化

染镉使各时间点肾线粒体、胞浆 SOD活性较正常对照组均有非常显著性下降;硒保护组不能使线粒体 SOD活性有明显恢复,可使胞浆 SOD活性在 4小时后较相应染镉组有所升高,但仍显著低于对照组 (表 3、4)。

2.6　肾线粒体、胞浆 GSH-Px活性的变化

染镉使肾线粒体、胞浆 GSH-Px活性显著低于对照组;硒保护组可使线粒体 GSH-Px活性在 4小时后基本恢复至正常水平;但对胞浆 GSH-Px活性无明显影响,与相应染镉组相比差异无显著意义 (表 3、4)。

2.7　超微结构的变化

染镉 2小时即见肾小管上皮细胞线粒体肿胀、结构不清,至 12小时可见大量线粒体肿胀、破损,内、外膜裂开,线粒体腔部分空泡化,嵴减少或消失,个别线粒体发生崩解、坏

表 3　实验大鼠肾线粒体氧自由基、MDA、SOD、GSH-Px的变化 ($\bar{x} \pm s$)

	处理时间(小时) 2	4	12
氧自由基〔发光计数/(10S·mgpr)〕			
正常对照组	9.88±0.05	9.88±0.05	9.88±0.05
染镉组	13.70±1.18△△△	10.39±0.55	14.99±2.40△△△
硒保护组	8.51±0.29**	9.92±2.41	14.71±2.39△△△
MDA (nM/mgpr)			
正常对照组	0.94±0.04	0.94±0.04	0.94±0.04
染镉组	1.64±0.15△△△	1.54±0.33△△△	2.38±0.31△△△
硒保护组	0.87±0.18**	0.89±0.15**	0.93±0.29**
SOD (NU/mgpr)			
正常对照组	131.45±14.26	131.45±14.26	131.45±14.26
染镉组	30.02±1.04△△△	47.80±3.18△△△	39.65±3.61△△△
硒保护组	34.26±3.95△△△	32.27±7.92△△△	37.72±6.09△△△
GSH-Px〔U/(min·mgpr)〕			
正常对照组	10.35±1.91	10.35±1.91	10.35±1.91
染镉组	5.00±1.08△△△	14.16±2.23△△	6.54±1.77△
硒保护组	6.28±0.87△△△	7.94±2.16	9.03±1.81

与正常对照组比△ $P<0.05$,△△ $P<0.01$,△△△ $P<0.001$; 与相应染镉组比** $P<0.001$

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnk

表 4　实验大鼠胞浆氧自由基、SOD、GSH-Px的变化（$\bar{x} \pm s$）

	处理时间（小时）		
	2	4	12
氧自由基〔发光计数/（10S·mgpr）〕			
正常对照组	7.58±0.63	7.58±0.63	7.58±0.63
染镉组	13.63±3.10△△	12.92±3.45△△	12.70±1.77△△△
硒保护组	14.32±1.26△△△	6.13±0.95△△	8.95±0.34△△
SOD（NU/mgpr）			
正常对照组	241.87±26.51	241.87±26.51	241.87±26.51
染镉组	138.73±6.15△△△	104.99±9.26△△△	97.81±16.78△△△
硒保护组	148.73±5.82△△△	135.86±9.73△△△**	151.87±14.24△△△**
GSH-Px〔U/（min·mgpr）〕			
正常对照组	18.22±3.22	18.22±3.22	18.22±3.22
染镉组	10.93±1.89△△	12.84±2.60△△	11.18±2.41△△
硒保护组	10.07±1.63△△	8.99±1.13△△△	12.89±1.05△△

与正常对照组比△ $P<0.05$，△△ $P<0.01$，△△△ $P<0.001$；与相应染镉组比** $P<0.001$

死；溶酶体增多增大，致密度增高，内有空泡；细胞内粗面内质网破损、扩张伴有核糖体脱失；并可见游离面微绒毛肿胀、脱失。硒保护组使上述病变减轻，表现为线粒体肿胀减轻，且结构完整，溶酶体数量和体积均较染镉组明显减少和减小；粗面内质网扩张减轻，核糖体脱失明显减少，未见上皮细胞游离面微绒毛的脱失。

3　讨论

同时腹腔注射氯化镉和巯基乙醇混合液可明显增加肾脏对镉的摄取而形成镉中毒性急性肾损伤。本研究即用此法制备镉中毒性肾损伤的动物模型。结果显示，染镉后 2小时肾皮质镉负荷即达高峰（38μg/g湿重），电镜观察证实染镉后 2小时肾小管上皮细胞已有超微结构改变。而中毒性肾损害的表现如尿总蛋白排出增多等，在 4小时方出现，至 12小时 GFR亦明显下降，出现肾功能不全。同时可见肾线粒体、胞浆氧自由基生成增多，SOD、GSH-Px活性下降，线粒体 MDA含量增高，说明镉中毒性肾损伤可能与肾组织氧自由基生成增多、过氧化作用增强有关。

有关硒对镉毒性的作用尚不十分清楚。有研究提出硒可拮抗镉的毒性，原因是硒与镉可在体内形成 Se-Cd复合物[10]，硒还是一种抗氧化剂，其抗氧化机制也被认为是对抗镉毒性的一种可能机理[5,11]。本研究观察到，投硒可拮抗镉引起的大鼠肾线粒体的脂质过氧化反应，此时肾功能损害亦得以减轻，表现为尿总蛋白、尿渗透压均可维持于正常水平，GFR亦较镉组显著升高；电镜下可见超微结构改变明显减轻，证实了氧自由基反应在镉所致的肾损伤中具有重要作用；硒对氧自由基反应的清除可能是其拮抗镉的肾脏毒性的重要机制。

本研究还观察到染镉同时注射硒化合物使肾皮质镉含量降低 12%～52%，而血镉明显升高，与 Wahha研究结果一致[12]，但尿中镉排出并无明显增加，与何瑞结果一致[13]，推测硒可能促使蓄积在肾中的镉进入血循环，进行再分配或通过其他途径排出[12]。提示硒拮抗镉引起的大鼠肾脏的脂质过氧化反应可能并非通过在肾脏形成 Se-Cd复合物的途径，而是由硒直接拮抗过氧化作用而实现的。

GSH-Px是催化过氧化物分解的一个重

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnk

要的酶，Rotruck[14]等人证实硒是 GSH-Px的必需组分，其活性中心为硒半胱氨酸，硒半胱氨酸残基易被自由基链反应产生的多种有机过氧化物所氧化，通过补硒可增加 GSH-Px的活性。综合本次研究结果可以看出，染镉同时给予硒，肾线粒体脂质过氧化作用可被拮抗，并使染镉 2小时的氧自由基水平降至正常范围，提示氧自由基被基本清除，与硒清除超氧阴离子（O_2^-）、羟自由基（·OH）抑制脂类自由基产生的功能相吻合[15,16]，但此时 SOD、GSH-Px活性并无明显增强。Shinazu等[17]曾指出 GSH-Px中的硒仅占人体总硒量的 1/3，其余的硒则在体内形成非蛋白硒化物；由于投硒后体内 GSH-Px活性并无明显增强，因此推测在给硒早期，硒在体内并非通过提高 GSH-Px活性发挥其抗氧化作用，而是可能通过非蛋白硒化物的中心自由基（Rse·或 Rse-Se）发挥其直接清除脂氧自由基作用[18]。染镉 4小时后肾线粒体 GSH-Px活性甚至高于对照组，推测可能属于机体对镉毒性的代偿作用，此种代偿可使过多的氧自由基被及时清除，脂质过氧化程度有所抑制。投硒后 12小时，线粒体 SOD活性仍未恢复，但氧自由基生成又见增加，提示此时非蛋白硒并不能完全清除镉引起生成过程达顶峰阶段的大量氧自由基，由于此时 GSH-Px活性已恢复至正常水平，同时 MDA含量亦降至正常水平，表明通过补硒可代偿性增高的 GSH-Px主要功能在于清除氧自由基引起的脂质过氧化产物。可见随着氧自由基产生的增多和脂质过氧化反应的加剧，硒一方面通过其非蛋白化合物发挥直接清除氧自由基的作用，另一方面还可通过 GSH-Px合成增加提高其活性以清除脂质过氧化产物如 MDA，进一步加强其抗氧化能力。

上述结果表明，氧自由基生成增多及肾脏抗氧化能力下降是镉性肾损伤的主要机制之一。硒主要通过抗氧化能力起到保护作用。

4　参考文献

1　Shukla GS, et al. The present status of biological effects of toxic metals in the environment: lead cadmium and man-ganese. Can J physiol pharmacol, 1984; 62: 1015

2　Chen RW, et al. Affinity labelling studies with cadmium induced testicular injury in the rats. J Reprod Fertility, 1974, 38: 293

3　Whanger PD. Selenium versus metal toxicity in animals, in "proc symposium selenium, Tellurium in the environ-ment." Industrial Health Foundation: pittsburgh PA, 1976, 234.

4　Stove HD. Biliary excretion of cadmium by rats, effects of zinc, cadmium and selenium pretreatments. J Toxicol Env-iron Health, 1976, 2: 45.

5　Sugawara N, et al. selenium protection against testicular Lipid proxidation from cadmium. J Appl Biochem, 1984, 6: 199

6　蒋左庶，主编. 医学细胞生物学实验指导，上海：上海科学技术出版社，1990.

7　Macar M, et al. An improvement of the coomassie Blue dye binding method allwoing and equal sensitivity to vari-ous proteins: application to cerebrospinal fluid. Clinica Chemica Acta, 1982, 122: 93

8　武汉医学院第二附属医院检验科，主编. 实用临床医学检验，武汉：湖北人民出版社，1980.

9　夏亦明，等. 血和组织中谷胱甘肽过氧化物酶活力的测定. 卫生研究，1987, 16 (4): 29

10　杨成峰，等. 硒镉相互作用的研究进展. 国外医学卫生学分册，1992, 19 (2): 76

11　杨成峰，等. 硒对镉在大鼠肝脏亚细胞分布及脂质过氧化作用的影响. 卫生研究，1996, 25 (1): 32

12　Wahha ZZ, et al. Protective effects of selenium on cadmi-um toxicity in rats: role of altered toxicokinetics and metallothionein. J Toxicol Environ Health, 1993, 38 (2): 171

13　何瑞，等. 硒与二乙烯三胺五乙酸钙钠对大鼠体内镉排泄的影响，中华预防医学杂志，1994, 28 (2): 97

14　Rotruck JT, et al. Selenium: biochemical role as a compo-nent of glutathione peroxidase. Science, 1973, 179: 588

15　杨志伟，等. 硒拮抗 O_2^- 导致的心肌线粒体膜损伤，生物物理学报，1994, 10 (1): 63

16　杨志伟，等. 羟自由基对心肌线粒体膜的影响及硒的效应. 生物物理学报，1994, 10 (2): 305

17　Shinazu F, et al. Selenamino acids as radiation protectors in vitro. Radiation Res, 1964, 23: 210

18　范华汉，等. 硒化合物对生物膜中脂质过氧自由基的清除作用. 华中理工大学学报，1987, 2: 59

(收稿：1996-10-10　修回：1997-02-27)

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnk