

· 论 著 ·

微量元素锌在镉性肾损伤中的作用

龙曼海 赵金垣 王世俊 刘爱萍

摘 要 为了解微量元素锌在镉性肾损伤中的作用,在给大鼠腹腔注射镉 (CdCl_2 $15\mu\text{mol/kg}$) 与巯基乙醇 (ME $300\mu\text{mol/kg}$) 混合液的同时及 2 小时后,皮下注射锌 (ZnSO_4 $15\mu\text{mol/kg}$)。结果显示:加锌可使镉所降低的线粒体锌恢复至正常水平,使被镉降低的线粒体超氧化物歧化酶 (SOD) 活力有所恢复,并使胞核内镉的转移速率加快,同时受损的肾功能及超微结构得到一定程度的改善。提示锌在镉性肾损伤的防护中可能具有一定价值。

关键词 锌 镉中毒性肾损伤 微量元素 脂质过氧化 抗氧化酶

Effect of Zinc on Toxic Renal Damage Induced by Cadmium Long Manhai, Zhao Jinyuan, Wang Shijun, et al. Research Center of Occupational Medicine, Third Hospital of Beijing Medical University. 100083

Abstract To study the effect of Zn on toxic renal damage induced by Cd, Wistar rats were injected intraperitoneally with $15\mu\text{mol/kg}$ CdCl_2 mixed with $300\mu\text{mol/kg}$ ME, at the same time and 2 hours later after injection of CdCl_2 the $15\mu\text{mol/kg}$ ZnSO_4 was given subcutaneously. The results showed that the added Zn could make mitochondria decreased Zn by Cd returned to normal level, the decreased activity of SOD was also resumed in some degree. Zn could also increase the transfer speed of Cd from nuclei, improve the injured renal function and ultrastructure caused by Cd. It was suggested that Zn might have important preventive role in toxic renal damage induced by Cd.

Key words Zinc, Cd-induced toxic renal damage, Trace element, Lipid peroxidation, Antioxidase

镉 (Cd) 所致的肾损伤已被公认为慢性镉中毒的特征性表现。锌 (Zn) 作为体内最重要的必需微量元素,参与许多基本分子机能,是 100 多种金属结合酶的组成成分,同时还是细胞结构的组成成分^[1]。国内外对于 Zn-Cd 之间作用的研究大多只限于器官组织水平,对于两者在亚细胞水平的相互作用,尤其是对 Cd 的主要靶器官肾脏中两者关系的研究甚少,由于 Cd 致肾损伤与脂质过氧化有关^[2], Zn 作为抗氧化剂超氧化物歧化酶 (SOD) 的重要成

分,究竟对 Cd 的肾脏毒性有何影响尚不清楚,本文拟对此进行探讨,以进一步澄清镉性肾损伤的具体机制,并为镉性肾损伤的防治途径提供一些新线索。

1 材料与方法

1.1 实验动物

由北京医科大学实验动物中心提供健康雄性 Wistar 大鼠,体重 220~240g,随机分为正常对照组、染 Cd 组、Zn 与 Cd 联合组 (分为 Zn-Cd 同时给予组和给 Cd 后 2h 再给 Zn 组),并设立锌对照组,共计 60 只,置不锈钢代谢笼中,自由饮食。

1.2 染毒及样本采集

正常对照组:以 $1\text{ml}/100\text{g}$ 的剂量给大鼠一次腹腔注射去离子水,12h 后处死动物。

本课题为国家自然科学基金资助项目 (项目编号 39370591)

作者单位: 100083 北京医科大学第三医院职业病研究中心 (龙曼海*、赵金垣、王世俊),包头医学院卫生系 (刘爱萍)

* 现在贵阳医学院预防医学系劳工教研室 (550004)

染 Cd 组: 给大鼠一次腹腔注射氯化镉 (CdCl₂) 与巯基乙醇 (ME) 混合液 (剂量为 15 μ mol/kg CdCl₂+ 300 μ mol/kg ME) 后, 间隔 2, 4, 12 小时后分别处死动物。

Zn 与 Cd 联合组: (1) Zn Cd 同时给予组: 于大鼠一侧一次腹腔注射 CdCl₂+ ME 混合液的同时于其另一侧一次皮下注射 15 μ mol/kg 的 ZnSO₄ 水溶液, 给药后间隔 2, 4, 12 小时分别处死动物; (2) 给 Cd 后 2 小时再给 Zn 组: 于大鼠一侧一次腹腔注射 CdCl₂+ ME 混合液后间隔 2 小时于其另一侧一次皮下注射 15 μ mol/kg 的 ZnSO₄ 水溶液, 于给 Cd 后 4, 12 小时分别处死动物。

锌对照组: 于大鼠一侧一次腹腔注射 1ml/100g 的去离子水的同时于其另一侧一次皮下注射 15 μ mol/kg 的 ZnSO₄ 水溶液, 给药后间隔 2, 4, 12 小时分别处死动物。

各受试动物于观察期内定期收集尿液, 处死后制备血浆, 分离肾皮质, 以差速离心法分离肾细胞的胞核、线粒体及胞液等亚细胞成分, 用优级纯的混合酸 (HNO₃: HClO₄= 4:

1) 消化肾皮质、血浆、尿及亚细胞成分, 去离子水定容后分析测定各指标。

1. 3 样本测定方法

肾功能指标: 常规测定尿渗透压 (直接测定法)、尿钠浓度 (直接测定法)、尿总蛋白 (改良考马斯亮蓝比色法)、内生肌酐清除率 (C_{Cr}) (碱性苦味酸比色法)。

用火焰原子吸收分光光度法测定血、尿、

表 1 实验大鼠生物材料中 Cd 含量与肾功能指标 ($\bar{x} \pm s$)

分组	Cd 含量			肾功能			
	肾皮质 μ g/g 湿重	血浆 μ g/ml	尿 μ g/mg Cr	C _{Cr} ml/min	尿渗透压 mOsm/L	尿钠浓度 mmol/L	尿蛋白 mg/mg Cr
对 照	未检出	未检出	未检出	0.9 $\pm$ 0.5	2046 $\pm$ 249	48.3 $\pm$ 13	3.02 $\pm$ 0.2
锌对照	未检出	未检出	未检出	1.60 $\pm$ 0.9	1642 $\pm$ 307	52.3 $\pm$ 34	3.24 $\pm$ 0.9
染 Cd	29.5 $\pm$ 4.7	0.28 $\pm$ 0.08	1.14 $\pm$ 0.9	0.52 $\pm$ 0.4	122 $\pm$ 189	80.0 $\pm$ 13	8.13 $\pm$ 1.6
Zn+ Cd (1)	21.1 $\pm$ 3.6	0.13 $\pm$ 0.09	0.35 $\pm$ 0.19	0.58 $\pm$ 0.2	1088 $\pm$ 154	44.7 $\pm$ 7.3	7.15 $\pm$ 4.1
Zn+ Cd (2)	25.9 $\pm$ 3.1	未检出	未检出	0.56 $\pm$ 0.2	1053 $\pm$ 92	56.0 $\pm$ 22	15.9 $\pm$ 11

* $P < 0.05$, 与染 Cd 组比较

注: Zn+ Cd (1): Zn Cd 同时给予组; Zn+ Cd (2): 给 Cd 2h 后再给 Zn 组。

肾皮质 Cd 含量 (仪器: HITACHI 180-80 型原子吸收分光光度计); 用电感耦合等离子体发射光谱法 (ICP-AES) 同时测定亚细胞成分中除硒 (Se) 以外的微量元素 (仪器: 美国产 I-CAP-9000 型等离子光谱计); 原子荧光法测定 Se 含量 (仪器: 国产 XDY-2 双道原子荧光光谱仪); 以 GBW 08551 猪肝 (商业部食品检测科学研究所提供) 作为标准参照物。

用化学比色法测定 SOD 活性及丙二醛 (MDA) 水平 (由南京建成生物工程研究所提供试剂盒), 用 DTNB 直接法测定谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 活性^[3]。

按电镜常规制作肾皮质标本, 在 HITACHI-600A 型透射电子显微镜下观察、摄像。

1. 4 数据统计分析

用 SPSS/PC 统计软件对所有结果进行方差分析, t 检验。

2 结果

2. 1 生物材料中 Cd 含量与肾功能、超微结构的改变

染 Cd 后肾皮质、尿、血 Cd 含量明显增加, 肾功能明显受损, 超微结构明显异常; 染 Cd 同时给予 Zn, 则使肾皮质 Cd 含量及血、尿中的 Cd 含量下降, 受损的肾功能有所恢复, 如使尿钠浓度降至正常水平; 超微结构的改变也比染 Cd 组轻。若给 Cd 后 2 小时再给予 Zn, 则既不能降低肾皮质 Cd 含量, 也不能使肾功能障碍有所改善 (表 1, 2)。

表 2 实验大鼠肾细胞超微结构改变

病变	染 Cd组	Cd+ Zn组
线粒体肿胀	++ +	+
线粒体结构模糊	++ +	+
溶酶体数目增多	++ +	+
溶酶体颜色变深	++ +	++
核糖体脱落	++ +	++
内质网扩张、增多	++ +	-
胞浆空泡变性	++ +	++
微绒毛脱落	++ +	-

注：“-” 无异常变化；“+” 仅少数结构有轻微改变；
“++ +” 改变较明显；“++ + +” 改变非常明显。

表 3 实验大鼠肾细胞线粒体中微量元素含量 ($\bar{x}\pm s$) $\mu\text{g/g}$ 蛋白

给 Cd/Zn 时间 (h)	Cd	Zn	微量元素				
			Cu	Zn	Mn	Se	Cd
2	-	+	29.9 $\pm$ 6.3	101 $\pm$ 57	7.97 $\pm$ 1.6	2.53 $\pm$ 1.8	0
	+	-	41.1 $\pm$ 11	63.6 $\pm$ 12 Δ	8.63 $\pm$ 2.5	3.20 $\pm$ 0.6 Δ	102 $\pm$ 45 Δ
	+	+	26.7 $\pm$ 7.0	94.3 $\pm$ 26	3.81 $\pm$ 1.2	2.11 $\pm$ 1.7	84.0 $\pm$ 50 Δ
4	-	+	39.9 $\pm$ 0.8	94.5 $\pm$ 8.7	4.98 $\pm$ 0.8	2.82 $\pm$ 0.9	0
	+	-	78.1 $\pm$ 9.1	86.5 $\pm$ 9.8 Δ	7.43 $\pm$ 0.2	1.29 $\pm$ 0.2 Δ	95.5 $\pm$ 14 Δ
	+	+	40.0 $\pm$ 19	122 $\pm$ 63	4.84 $\pm$ 3.5	2.45 $\pm$ 1.2	121 $\pm$ 43 Δ
12	-	+	38.6 $\pm$ 4.4	101 $\pm$ 14	5.26 $\pm$ 0.1	1.69 $\pm$ 0.7	0
	+	-	51.7 $\pm$ 7.6	63.4 $\pm$ 4.1 Δ	0.36 $\pm$ 0.2 Δ	1.89 $\pm$ 0.7 Δ	87.7 $\pm$ 28 Δ
	+	+	34.8 $\pm$ 9.1	127 $\pm$ 22	4.93 $\pm$ 2.6	3.32 $\pm$ 0.9	80.3 $\pm$ 44 Δ
对照组	-	-	61.8 $\pm$ 9.4	142 $\pm$ 29	9.65 $\pm$ 1.6	4.09 $\pm$ 1.6	0

* $P < 0.05$, 与染 Cd组比较； $\Delta P < 0.05$, 与对照组比较
注：“+” 加入 Cd或 Zn；“-” 不加 Cd或 Zn

单独给 Cd使胞液内 Cu Zn含量增加，Se 有所降低，对 Cd所致的其他元素的改变影响含量降低，Cd含量明显增加；若给 Cd同时给予 Zn, 则使胞液 Cu维持于正常水平，胞液 Cd不大 (表 4)

表 4 实验大鼠肾细胞胞液中微量元素含量 ($\bar{x}\pm s$) $\mu\text{g/g}$ 蛋白

给 Cd/Zn 时间 (h)	Cd	Zn	微量元素				
			Cu	Zn	Mn	Se	Cd
2	-	+	10.7 $\pm$ 6.6	75.7 $\pm$ 14	1.05 $\pm$ 0.4	0.95 $\pm$ 0.03	0
	+	-	33.7 $\pm$ 9.8 Δ	102 $\pm$ 30 Δ	2.39 $\pm$ 0.9 Δ	0.58 $\pm$ 0.22 Δ	143 $\pm$ 33 Δ
	+	+	12.5 $\pm$ 4.9	72.5 $\pm$ 41	1.98 $\pm$ 0.9	1.12 $\pm$ 0.68	85.8 $\pm$ 54
4	-	+	12.7 $\pm$ 1.6	72.9 $\pm$ 12	1.57 $\pm$ 0.4	1.81 $\pm$ 1.3	0
	+	-	37.3 $\pm$ 6.4 Δ	123 $\pm$ 32 Δ	2.39 $\pm$ 0.9 Δ	0.66 $\pm$ 0.23 Δ	136 $\pm$ 46 Δ
	+	+	14.7 $\pm$ 3.8	102 $\pm$ 26	2.47 $\pm$ 0.8	1.78 $\pm$ 0.58	123 $\pm$ 32
12	-	+	16.7 $\pm$ 4.8	79.4 $\pm$ 28	1.63 $\pm$ 1.0	0.36 $\pm$ 0.14	0
	+	-	21.5 $\pm$ 9.6 Δ	90.5 $\pm$ 19 Δ	2.30 $\pm$ 0.6 Δ	0.81 $\pm$ 0.33 Δ	82.5 $\pm$ 7.3
	+	+	13.3 $\pm$ 6.1	102 $\pm$ 39	1.41 $\pm$ 0.8	1.75 $\pm$ 0.91	54.7 $\pm$ 7.7
对 照	-	-	11.2 $\pm$ 2.5	51.6 $\pm$ 16	1.15 $\pm$ 0.7	1.62 $\pm$ 0.61	0

* $P < 0.05$, 与染 Cd组比较； $\Delta P < 0.05$, 与对照组比较
注：“+” 加入 Cd或 Zn；“-” 不加 Cd或 Zn

单独给 Cd 时，Cd 首先进入胞液和线粒体，逐渐向胞核转移；而 Zn Cd 同时给予时，

表 5 Cd在实验大鼠肾细胞内亚细胞分布

给 Cd/Zn 时间 (h)	Cd	Zn	线粒体	胞液	胞核
2	-	+	0	0	0
	+	-	102	143	80.4
	+	+	84.9	85.8	124
4	-	+	0	0	0
	+	-	95.5	136	69.4
	+	+	121	123	122
12	-	+	0	0	0
	+	-	87.7	82.5	170
	+	+	80.3	54.7	116

注：“+” 加入 Cd 或 Zn；“-” 不加 Cd 或 Zn

则加快 Cd 进入胞核的速度，且胞核内 Cd 有逐渐降低的趋势 (表 5)。

给 Cd 2 小时后再给 Zn，则对 Cd 所引起的亚细胞内微量元素的改变无大的影响

2.3 亚细胞成分中抗氧化酶活性及脂质过氧化水平

染 Cd 后，线粒体、胞液内 SOD、GSH-Px 活性均明显下降，线粒体内 MDA 水平明显升高；Zn Cd 同时给予大鼠，则使线粒体、胞液内 SOD 活性较单独给 Cd 组高，但仍低于正常对照，GSH-Px 活性、MDA 水平与单独给 Cd 组无显著差异 (表 6)。

表 6 实验大鼠亚细胞成分中抗氧化酶活性及 MDA 水平 ($\bar{x} \pm s$)

给 Cd/Zn 时间 (h)	Cd	Zn	线粒体			胞液	
			GSH-Px	SOD	MDA	GSH-Px	SOD
2	-	+	10.4 ± 3.9	111 ± 29	1.27 ± 0.13*	3.98 ± 1.2 [△]	150 ± 13
	+	-	4.99 ± 1.1 [△]	30.0 ± 1.0 [△]	1.64 ± 0.15 [△]	10.9 ± 1.9 [△]	138 ± 6.2 [△]
	+	+	4.17 ± 1.1 [△]	31.2 ± 4.8 [△]	1.16 ± 0.39 [△]	5.57 ± 0.6 [△]	99.4 ± 11 [△]
4	-	+	11.2 ± 0.5	127 ± 8.5	1.33 ± 0.09*	3.64 ± 0.6 [△]	116 ± 8.1
	+	-	14.2 ± 2.2 [△]	47.8 ± 3.2 [△]	1.54 ± 0.33 [△]	12.8 ± 2.6 [△]	105 ± 9.3 [△]
	+	+	12.4 ± 1.04	57.6 ± 7.8 [△]	1.47 ± 0.38 [△]	6.57 ± 0.9 [△]	104 ± 14 [△]
12	-	+	5.27 ± 1.1	94.0 ± 6.9	1.45 ± 0.52*	4.19 ± 0.3 [△]	202 ± 6.5
	+	-	6.54 ± 1.8 [△]	39.7 ± 3.6 [△]	2.38 ± 0.31 [△]	11.2 ± 2.4 [△]	97.8 ± 17 [△]
	+	+	8.2 ± 1.4	55.4 ± 9.4 [△]	1.92 ± 0.54 [△]	10.2 ± 2.9 [△]	120 ± 12 [△]
对照	-	-	10.3 ± 1.9	131 ± 14	0.94 ± 0.04	18.2 ± 3.2	242 ± 27

* P < 0.05, 与染 Cd 组比较; [△] P < 0.05, 与对照组比较

注：(1) “+” 加入 Cd 或 Zn；“-” 不加 Cd 或 Zn；

(2) GSH-Px 的单位 U/min/mg 蛋白，SOD 的单位 NU/mg 蛋白，MDA 的单位 nM/mg 蛋白

2.4 标准参照物 GBW08551 猪肝测定结果
为评估测定微量元素方法的准确性，用与亚细胞微量元素测定相同的方法测定了标准

参照物 GBW08551 猪肝中的相应微量元素，结果与推荐值差异无显著意义 (表 7)

表 7 标准参照物 GBW08551 猪肝中微量元素测定值

元素	测定值 ($\mu\text{g/g}$)	参考值 ($\mu\text{g/g}$)	方法	P 值
Se	0.91 ± 0.05	0.94 ± 0.05	原子荧光法	> 0.05
Cu	15.5 ± 1.30	17.2 ± 1.00	ICP-AES	> 0.05
Zn	163 ± 6.10	172 ± 8.00	ICP-AES	> 0.05
Mn	8.03 ± 0.84	8.32 ± 0.38	ICP-AES	> 0.05
Cd	0.064 ± 0.016	0.067 ± 0.004	ICP-AES	> 0.05

3 讨论

本研究所制备的镉中毒性肾损伤动物模型的实验结果与文献^[4]报道一致,表明该动物模型是成功可靠的;同时测定的标准参照物中微量元素的结果与参考值吻合,表明微量元素的测定方法与结果亦是准确可信的。

Cd与Zn的电子构型与配位空间化学性质很相似,在自然界常常是共存的,但它们的生物学作用却迥然不同,Cd是对人体有害的重金属,而Zn则是体内最重要的微量元素之一,对于维持机体的正常功能十分重要,两者在许多方面均存在相互拮抗作用。本研究结果亦表明,与Cd同时给予Zn,能降低肾皮质内Cd含量,肾功能及超微结构有一定改善。

加Zn后,可使线粒体内Cd所降低的Zn恢复至正常水平,SOD活性有一定恢复,但恢复尚不完全。在以前的研究中我们曾发现,镉中毒性肾损伤时线粒体内SOD活性的下降可能与Zn降低有关,本研究进一步提示线粒体内SOD活性下降可能与Zn降低有关。由于Zn的加入对Cd所致的线粒体Se降低无升高作用,GSH-Px活性亦未见增加,MDA水平也未见明显降低,另有研究表明,当GSH-Px活性降低时,细胞内 H_2O_2 浓度增高,这种升高会使SOD内部的金属活性基团还原,使酶失活^[5],故本研究中SOD活性恢复不完全的原因可能与GSH-Px活性恢复不全有关,同时表明Se本身在清除Cd引起的过氧化损伤方面,似比Zn更重要。

在胞液中,加Zn可使Cd所致的Cu升高降至正常水平,但对Zn、Mn影响不大,SOD活性仍降低,提示虽然Cu是SOD活性表达的必需元素^[6],但Cd所致的SOD活性降低,似乎还存在其他影响因素。

加Zn对Cd的亚细胞分布有明显影响,使Cd进入胞核的时间提前,胞核内Cd的转移速率亦有所加快。Koizum等的体外试验结

果也表明,用Zn预处理的Cd染毒睾丸间质细胞中,Cd从细胞核移至线粒体、胞液等成分的过程加快,使Cd在游离细胞的胞核内的蓄积快速减少,认为Zn对Cd的细胞毒性的防护机制可能主要是通过降低Cd在细胞核中的蓄积而实现的^[7]。但本实验见此时肾功能、超微结构改善不甚明显,考虑可能与本实验采用的硫酸锌剂量较低(与氯化镉等剂量),给药方式为与Cd同时投用,而Koizum等的研究用Zn量远高于Cd,给药方式为用Zn预处理,且本研究发现给Cd 2小时后再给Zn,既无驱Cd作用,也无改善肾功能的作用,可见投Zn剂量、给药方式对于Zn对镉性肾损伤的防护效果有重要影响。本研究采用较低剂量的硫酸锌对镉性肾损伤也显示一定的防护作用,表明Zn对于镉性肾损伤的防护可能具有一定价值,值得进一步研究。

4 参考文献

- 1 章净霞,等. Zn对细胞保护作用机理的研究. 生物化学与生物物理进展, 1994, 21 (2): 147
- 2 王克跃,等. Cd对肾脏的毒作用. 中华劳动卫生职业病杂志, 1994, 12 (3): 24
- 3 夏奕明,等. 血和组织中谷胱甘肽过氧化物酶活力的测定方法. 卫生研究, 1987, 16 (4): 29
- 4 Zhao J Y, Foulkes E C, Jones M. Delayed nephrotoxic effects of cadmium and their reversibility by chelation. Toxicology, 1990, 64: 235
- 5 丁克祥. SOD临床研究集. 第一版. 北京: 原子能出版社, 1992, 4
- 6 Harris ED. 铜是铜锌超氧化物歧化酶的辅助因子和调节因子. 国外医学医学地理分册, 1993, 14 (2): 74
- 7 Koizum T, et al. Effect of zinc on the distribution and toxicity of cadmium in isolated interstitial cells of rat testis. Toxicology, 1989, 56 (2): 137

(在本研究中得到下列同志的帮助与支持,在此一并致谢。

邵涵如、刘亚宁、阿拉塔、陈寿芳、丁丽华、谢芙蓉、马佩云、陈德福、任汉云、周步全、赵新华、阎敏)

(收稿: 1996-12-10 修回: 1997-03-31)