

锌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 龙曼海

摘要 目的 研究锌对急性镉中毒性肾损伤的保护作用。方法 给大鼠腹腔注射 CdCl_2 ($15\mu\text{mol/kg}$) 与巯基乙醇 ($300\mu\text{mol/kg}$, mercaptoethanol, ME) 混合染毒液的同时, 皮下注射锌 (ZnSO_4 $15\mu\text{mol/kg}$)。结果 加锌能明显降低肾皮质镉含量, 同时亦使肾线粒体、胞浆中铁含量下降, 锌含量升高, 并可使染镉后 2 小时本应增加的脂质过氧化反应有所抑制, 但在 4 小时后作用消失, 使 SOD 活性显著升高; 但对肾功能及超微结构的改善则不明显。结论 氧自由基损伤可能是镉中毒性肾损伤的主要机制, 锌对镉中毒性肾损伤的拮抗作用不明显, 是否与剂量等因素有关, 尚待进一步研究。

关键词 锌 镉中毒性肾损伤 氧自由基 脂质过氧化 拮抗作用

Studies on Protective Effects of Zinc on Renal Damage in Acute Cadmium Poisoning Liu Aiping*, Zhao Jinyuan, Liu Yaning, et al.* Research Center for Occupational Disease, The Third Clinical Hospital, Beijing Medical University, Beijing 100083

Abstract **Objective** To study the protective effects of zinc on renal damage in acute cadmium poisoning. **Methods** Rats were injected with zinc sulfate $15\mu\text{mol/kg}$ subcutaneously after they were intoxicated with a mixture of cadmium chloride $15\mu\text{mol/kg}$ and mercaptoethanol $300\mu\text{mol/kg}$. **Results** Zinc could significantly reduce cadmium content in the renal cortex and iron in the mitochondria and cytoplasm of intoxicated rats and increase zinc in them. Zinc could inhibit lipid peroxidation, which usually increased two hours after treatment with cadmium, but such inhibition would disappear in four hours, and activity of superoxide dismutase increased significantly as well. But, no obvious changes in renal function and ultrastructure could be observed. **Conclusion** Production of oxygen free radicals could be the main mechanism for renal damage in acute cadmium poisoning and no obviously antagonistic effect of zinc on renal damage in acute cadmium poisoning could be observed, which should be further studied.

Key words Zinc, Renal damage, Cadmium poisoning, Oxygen free radical, Lipid peroxidation

镉是污染环境的重要毒物之一, 并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, 因此对镉中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。锌是体内最重要的微量元素之一, 其本身有抗脂质过氧化作用^[1,2]。本文研究了锌对大鼠肾线粒体、胞浆中铁、锌含量的影响, 及锌在降低脂质过氧化物, 防治镉中毒性肾损伤中的作用, 对镉中毒性肾损伤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%)、硫酸锌 ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 北京化工厂, 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/100g (预试验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 15 只分为 3 小组, 均腹腔注射氯化镉 $15\mu\text{mol/kg}$ 加巯基乙醇 $300\mu\text{mol/kg}$ 混合液。

1.2.3 锌保护组: 共 15 只分为 3 小组, 先给大鼠一侧腹腔内注射 CdCl_2 ($15\mu\text{mol/kg}$) 加 ME ($300\mu\text{mol/kg}$) 混合液, 同时在另一侧皮下注射 ZnSO_4 $15\mu\text{mol/kg}$ 。

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体积分数为 2.5% 戊二醛中, 常规电镜标本制作, hitach-600A 型透射电镜检查; 并取抗凝血及右侧肾组织按文献方法分离线粒体、胞浆^[3], 测定有关指标。

本课题受国家自然科学基金资助 (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 (现在包头医学院预防医学教研室工作)、赵金垣], 空军总医院临床检验科发光室 (刘亚宁、赵新华), 贵阳医学院预防医学系 (龙曼海)

大鼠肾皮质镉含量采用原子吸收（日立 180-80）火焰法测定，检测限 10^{-7} 。尿总蛋白含量采用考马斯亮蓝比色法。尿渗透压采用 ERMA Clinical 折射计测定尿液折光率，换算成尿液渗透压。血、尿肌酐测定采用碱性苦味酸比色法。肾线粒体、胞浆中铁、锌含量用电感耦合等离子体发射光谱法（ICP-AES）测定。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。肾线粒体、胞浆中 SOD 活性采用南京建成生物工程研究所 SOD 试剂盒测定。肾线粒体、胞浆 GSH-Px 活性采用 DTNB 法^[7]。

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 肾皮质镉含量的变化

如表 1 所示，加锌早期（2 小时）即可降低肾皮

质镉含量。

表 1 实验大鼠肾皮质镉含量 ($\bar{x} \pm s$) $\mu\text{g/g}$ 湿重

	处 理 时 间 (小时)		
	2	4	12
对照组	未检出	未检出	未检出
染镉组	38 470±5 986	25. 918±3. 060	24 187±4 999
锌保护组	20. 276±2. 375 * *	25. 785±5. 532	17. 122±2 730 *

与相应染镉组比较 * $P < 0. 05$ * * $P < 0. 01$

2. 2 肾线粒体、胞浆中铁、锌含量的变化

如表 2 所示，染镉组各时间点线粒体铁含量显著高于对照组，锌含量显著低于对照组；锌保护组各时间点铁含量均显著低于相应染镉组，锌含量在 4 小时后显著高于相应染镉组。染镉使胞浆铁含量仅在 12 小时有明显增高，而使锌含量甚至显著高于对照组；锌保护组可使胞浆铁含量显著降低，但并未使锌含量升高。

表 2 实验大鼠肾线粒体、胞浆中铁、锌含量 ($\bar{x} \pm s$)

		处 理 时 间 (小时)		
		2	4	12
线粒体	铁含量 ($\mu\text{g/mgPr}$)			
	正常对照组	1 237±0 168	1. 237±0. 168	1. 237±0. 168
	染镉组	2 718±1 167 Δ	2 683±0. 811 $\Delta\Delta$	2 658±0. 622 $\Delta\Delta$
	锌保护组	0 865±0 165 * *	1. 250±0. 212 * *	1. 547±0. 242 * *
	锌含量 ($\mu\text{g/gPr}$)			
	正照对照组	142. 1±29. 3	142. 1±29. 3	142. 1±29. 3
胞浆	染镉组	63. 6±12 2 $\Delta\Delta$	86 5±9. 8 $\Delta\Delta$	63. 4±4 1 $\Delta\Delta$
	锌保护组	94. 3±25 8	121. 5±23 0 *	127 0±21. 5 * *
	铁含量 ($\mu\text{g/mgPr}$)			
胞浆	正常对照组	0 962±0 220	0. 962±0. 220	0. 962±0. 220
	染镉组	0 908±0 263	1. 007±0. 014	2 658±0. 622 $\Delta\Delta$
	锌保护组	0 323±0 076 * *	0. 364±0. 068 * *	0. 418±0. 154 * *
胞浆	锌含量 ($\mu\text{g/gPr}$)			
	正常对照组	51. 6±15 8	51 6±15. 8	51. 6±15. 8
	染镉组	101. 9±30. 0 Δ	122. 5±32 0 $\Delta\Delta$	90. 5±19. 1 $\Delta\Delta$
	锌保护组	72. 5±40 9	101. 8±25 6	102 3±39. 0

与正常对照组比 $\Delta P < 0. 05$ $\Delta\Delta P < 0. 01$ ；与相应染镉组比 * $P < 0. 05$, * * $P < 0. 01$

2. 3 肾功能改变

如表 3 所示，锌保护组尿总蛋白排出量在 12 小时较相应染镉组有所降低，同时亦使肾小球滤过率（GFR）显著高于相应染镉组，但对镉所致尿渗透压降低无明显改善作用。

2. 4 肾线粒体 MDA 含量的变化

如表 4 所示，染镉组各时间点线粒体 MDA 含量显著高于对照组。锌保护组可使线粒体 MDA 在 2 小时无明显升高，但 4 小时后又见升高。

表 3 实验大鼠肾功能的变化 ($\bar{x} \pm s$)

		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 $\triangle\triangle$	14.41±1.86 $\triangle\triangle$
	锌保护组	6.27±1.24	5.17±0.30	10.01±2.59 [*]
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 $\triangle$
	锌保护组	0.82±0.36	0.36±0.11	0.57±0.15 ^{**}
尿渗透压 (mOsm/kgH ₂ O)	正常对照组	2046±249	2046±249	2046±249
	染镉组	1339±151 $\triangle\triangle$	1280±244 $\triangle\triangle$	1045±174 $\triangle\triangle$
	锌保护组	966±136	1128±282	1170±45

与正常对照组比较 $\triangle P<0.05$ $\triangle\triangle P<0.01$, 与相应染镉组比较 $^* P<0.05$ $^{**} P<0.01$

2. 5 肾线粒体、胞浆中SOD活性的变化

如表 4 所示, 染镉使各时间点肾线粒体、胞浆 SOD 活性较正常对照组均有显著性下降; 锌保护组使线粒体 SOD 活性在 4 小时后较相应染镉组明显升高, 使胞浆 SOD 活性在 12 小时后较相应染镉组明显升

高, 但仍均显著低于对照组。

2. 6 肾线粒体、胞浆中GSH-Px活性的变化

如表 4 所示, 染镉使肾线粒体、胞浆 GSH-Px 活性显著低于对照组; 锌保护组线粒体及胞浆 GSH-Px 活性与相应染镉组比并未见增高。

表 4 实验大鼠肾线粒体、胞浆中MDA、SOD、GSH-Px的变化 ($\bar{x} \pm s$)

		处 理 时 间 (小时)		
		2	4	12
线粒体	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 $\triangle\triangle$	1.54±0.33 $\triangle\triangle$	2.38±0.31 $\triangle\triangle$
	锌保护组	1.16±0.39 [*]	1.47±0.38	1.92±0.54
	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 $\triangle\triangle$	47.80±3.18 $\triangle\triangle$	39.65±3.61 $\triangle\triangle$
	锌保护组	31.16±4.81	57.55±7.77 [*]	55.45±9.38 ^{**}
	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 $\triangle\triangle$	14.16±2.23 $\triangle\triangle$	6.54±1.77 $\triangle$
	锌保护组	4.17±1.06	12.37±1.04	8.21±1.35
胞浆	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 $\triangle\triangle$	104.99±9.26 $\triangle\triangle$	97.81±16.78 $\triangle\triangle$
	锌保护组	99.36±10.94	103.71±14.33	119.57±11.78 [*]
	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 $\triangle\triangle$	12.84±2.60 $\triangle$	11.18±2.41 $\triangle\triangle$
	锌保护组	5.57±0.63	6.57±0.85	10.22±2.90

与正常对照组比较 $\triangle P<0.05$ $\triangle\triangle P<0.01$; 与染镉组比较 $^{**} P<0.05$ $^{**} P<0.01$

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。锌保护组 2 小时可见肾小管上皮细胞线粒体结构仍不清晰, 溶酶体仍多, 但较染镉组减轻; 至 12 小时仍可见线粒体肿胀, 结构模糊, 溶酶体颜色加深, 胞浆空泡变性, 较染镉组改善不明显, 但核糖体脱失减少, 并未见上皮细胞游离面微绒毛的脱失。

3 讨论

正常情况下,肾脏并不是急性镉中毒的靶器官,但同时给予CdCl₂加巯基乙醇(1:20)混合液可明显增加肾脏对镉的摄取,形成急性镉中毒性肾损伤^[5]。我们用此法制备了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(38 μ g/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。而中毒性肾损伤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MDA含量增高,SOD、GSH-Px亦明显下降,线粒体、胞浆中氧自由基生成增多,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。

锌是人体必需微量元素之一,亦是机体内几百种酶的重要组成部分,它能稳定细胞膜,也是维持自由基平衡的重要酶CuZn-SOD的组成成分。锌与金属蛋白的复合物能清除氧自由基^[6],其本身也有抗脂质过氧化作用^[1,2],锌还能稳定溶酶体、线粒体、微粒体的膜结构,对脂质过氧化有阻抑作用^[7]。铁能够催化自由基链式反应中的Fenton反应,即 $H_2O_2 + Fe^{2+} + H^+ \rightarrow OH^{\cdot} + H_2O + Fe^{3+}$,从而产生大量的OH $^{\cdot}$ (羟自由基),引发剧烈的脂质过氧化作用,OH $^{\cdot}$ 具有攻击目前已知所有生物膜的能力,是造成微粒体膜、线粒体膜和细胞膜等脂膜受损的最大致损因子,锌则可防护铁的催化作用^[8]。本研究结果表明:染镉后在使O₂ $^{\cdot-}$ 产生增多,诱发明显脂质过氧化反应的同时,铁含量亦显著增高,而锌含量下降。这可能是由于O₂ $^{\cdot-}$ 是一种还原剂可促使铁蛋白释放出铁之故^[9]。锌抑制过氧化作用的机理是锌离子和含S的配体有高度亲和力,可与膜蛋白的巯基形成稳定的硫醇盐,并可与铁、铜等过渡金属元素竞争性地与巯基结合,保护它不被氧化成二硫键^[10]。本研究观察到染镉后铁含量的增加,有助于它与锌竞争膜上的SH基,最终将其氧化为二硫化物,并使锌从线粒体膜结合部位脱落,导致线粒体内锌含量下降,胞浆锌含量增高;这也表明,镉使氧自由基产生增多的同时亦引起细胞内微量元素分布的改变。染镉同时投予锌,2小时后肾皮质镉含量即明显下降,且脂质过氧化作用未见发生;之后肾皮质镉含量未见进一步的降低,尽管投锌可降低铁含量,提高线粒体中锌含量,但抑制脂质过氧化作用仍不完全,如4小时后仍可见脂质过氧化反应有增强表现,肾功能损害也仅见轻度好转,如12小时后

尿总蛋白排出量较染镉组有所降低,GFR有所恢复,但尿渗透压与染镉组相比无显著差异;超微结构仍可见明显的线粒体肿胀和空泡变性。这提示:(1)Zn-SO₄剂量可能偏小,因有研究表明10倍于镉剂量的锌可拮抗镉对睾丸细胞的毒性^[11];(2)锌对脂质过氧化的拮抗作用可能与锌降低肾镉含量有关。

综合MDA含量变化和SOD、GSH-Px活性的变化可看出,染镉同时投锌在早期(2小时),肾线粒体SOD、GSH-Px活性虽未见恢复,但MDA含量却无增高,提示此时锌可能通过自身的直接作用,拮抗脂质过氧化^[1,2],至投锌后4小时,SOD活性虽显著高于染镉组,但仍显著低于对照组,此时O₂ $^{\cdot-}$ 生成及MDA水平均高,考虑可能与投锌量不足,不能诱导更多的SOD生成有关。在观察期内,锌对GSH-Px的活性未见明显影响。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。

综上,氧自由基生成增多及肾脏抗氧化能力下降是镉中毒性肾损伤的主要机制之一。锌对镉毒性的拮抗作用不明显,是否存在剂量依赖性,尚待研究。

4 参考文献

- 1 Girotti AW, et al. Inhibitory effect of zinc (II) on free radic lipid peroxidation in erythrocyte membranes. *J Free Radicals Biol Med*, 1985, 1 (5 ~ 6): 395 ~ 401
- 2 Bray TM, et al. The physiological role of zinc as an antioxidant. *J Free Radic Biol Med* 1990, 8 (3): 281 ~ 291
- 3 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. 55 ~ 59
- 4 夏亦明, 朱莲珍. 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
- 5 Foulkes EC, et al. Mechanism of inhibition of renal amino acid reabsorption in rabbits by heavy metals. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1982, 64: 103 ~ 107
- 6 James P, et al. Inhibition of cell membrane lipid peroxidation by cadmium- and zinc-metalllothioneins. *Biochem Biophys Acta*, 1986, 884: 448 ~ 461
- 7 Szymanska JA, et al. Protective effect of zinc in the hepatotoxicity of bromobenzene and acetaminophen. *Toxicology*, 1991, 66 (1): 81 ~ 91
- 8 程极济. 活性氧在生物学和医学中的作用. *大自然探索*, 1983, (3): 30
- 9 Biemond P, et al. Superoxide dependent iron release from ferritin in inflammatory diseases. *Free Radic Biol Med*, 1988, 4 (3): 185 ~ 198
- 10 Boyd L, et al. In: Grawthome JM et al. eds. Trace element metabolism in man and animals. Australia: Griffin Press 1981. 319
- 11 王丙云. 镉和锌对在体和离体睾丸细胞分泌睾酮的影响. *环境与健康杂志*, 1993, 10 (1): 30

(收稿: 1998-09-11 修回: 1998-11-02)