

GSH 和维生素 E 对镉毒性的影响

徐兆发¹, Zahir A Shaikh²

(1. 中国医科大学公共卫生学院 辽宁 沈阳 110001; 2. Department of Biomedical Sciences, University of Rhode Island, Kingston, Rhode Island 02881, USA)

摘要: 目的 探讨 GSH 和维生素 E 对镉毒性的影响。方法 给 4 组 Syrian 仓鼠皮下注射 0、35、60 和 70 $\mu\text{mol/kg}$ 体质量 CdCl_2 。另 2 组仓鼠用 GSH 和维生素 E 预处理后再投与 70 $\mu\text{mol/kg}$ CdCl_2 。染镉后 24 小时观察血清 LDH、ALT、尿 LDH 和尿蛋白, 肝脏和肾皮质镉含量以及肝脏和肾皮质 GSH 含量的变化。结果 随着染镉剂量的增加, 血清 LDH 和 ALT 活性有升高趋势, 70 $\mu\text{mol/kg}$ 组仓鼠血清 LDH 和 ALT 活性明显高于对照组; 尿 LDH 活性和尿蛋白含量各染镉组与对照组之间无明显差异; 各染镉组仓鼠肝和肾皮质镉浓度随染镉剂量增加而升高, 肾皮质 GSH 含量均明显高于对照组, 而肝脏 GSH 含量与对照组之间无明显差异。给仓鼠 GSH 和维生素 E 预处理后仓鼠血清 LDH 和 ALT 活性明显低于单纯染镉组; 肝和肾皮质 GSH 含量低于单纯染镉组; 维生素 E 预处理组仓鼠肾皮质镉浓度也低于单纯染镉组。结论 急性染镉主要引起仓鼠肝脏损害, GSH 和维生素 E 预处理可以拮抗镉的肝脏毒性。此种保护作用不是由于 GSH 含量的改变, 推测可能与它们的抗氧化和稳定生物膜的特性有关。

关键词: 镉; 还原型谷胱甘肽; 维生素 E; 肝脏毒性

中图分类号: R114; R994.6 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2001)06-0342-03

Experimental studies on the effects of GSH and vitamin E on toxicity caused by cadmium

XU Zhao-fa¹, Zahir A Shaikh²

(1. School of Public Health, China Medical University, Shenyang 110001, China; 2. Department of Biomedical Sciences, University of Rhode Island, Kingston, Rhode Island 02881, USA)

Abstract Objectives To study the effects of glutathione (GSH) and vitamin E on toxicity caused by cadmium. **Methods** Four groups of Syrian hamsters were injected subcutaneously with 0, 35, 60 and 70 μmol cadmium chloride (CdCl_2) per kilogram of body weight (kg), respectively. Another two groups of the hamsters were pretreated with GSH and vitamin E, respectively and then injected subcutaneously with 70 $\mu\text{mol/kg}$ CdCl_2 . Serum activities of lactic dehydrogenase (LDH) and alanine transaminase (ALT), urine activity of LDH, urine protein, cadmium level in the liver and renal cortex were determined for the animals 24 hours after treatment with cadmium. **Results** Serum activities of LDH and ALT increased with cadmium dose of exposure, and those were significantly higher in the group with 70 $\mu\text{mol/kg}$ CdCl_2 than in the controls. There was no significant difference in urine LDH and urine protein between groups with various cadmium doses and controls. Cadmium levels in the liver and renal cortex increased with cadmium dose of exposure in various groups. GSH in the renal cortex in the cadmium-exposed groups were significantly higher than in the controls, but there was no significant difference in liver GSH between various groups and the controls. Serum activities of LDH and ALT in the hamsters pretreated with GSH and vitamin E before cadmium administration were significantly lower than those with cadmium only, and GSH level in the former was also significantly lower than that in the latter. Cadmium in the renal cortex of the hamsters pretreated with vitamin E was also lower than that in those only with cadmium. **Conclusions** Acute exposure to cadmium mainly caused liver damage in the hamsters. Pretreatment with GSH and vitamin E can antagonize the liver damage caused by cadmium, which could be attributed to, as postulated, their effects on anti-oxidation and stabilization of biological membrane, rather than the changes in GSH level.

Key words: Cadmium; Glutathione peroxidase; Vitamin E; Hepatotoxicity

镉 (Cd) 到体内诱导合成金属硫蛋白需要一定的潜伏期, 但体内存在的还原型谷胱甘肽 (GSH) 含

有巯基, 可立即与进入体内的镉离子结合成复合物, 阻止镉对组织细胞的毒性作用。因此, GSH 可能是机体防止镉急性毒性的第一道防线^[1]。GSH 还是一种抗氧化物质, 也可以拮抗镉引起的氧化损伤^[2]。维生素 E 也是机体重要的脂溶性抗氧化剂, 它能与脂质过氧

收稿日期: 2001-06-26; 修回日期: 2001-07-16

作者简介: 徐兆发 (1950-), 男, 沈阳人, 教授, 博士生导师,

研究方向: 重金属毒理学。

化基反应并能淬灭单线态氧, 从而保护生物膜的完整性^[3]。本研究的主要目的是测定急性镉暴露对 Syrian 仓鼠肝、肾的毒性作用, 观察 GSH 和维生素 E 预处理对镉毒性作用的影响, 为研究镉中毒的发病机制和防治措施提供参考。

1 材料和方法

1. 1 实验动物分组与染毒

健康雌性 Syrian 仓鼠 36 只, 体质量 110 ~ 150g, 随机分成 6 组, 每组 6 只, 第 1 组为对照组, 皮下注射 0.2 ml/100g 0.9% 的氯化钠溶液, 第 2 ~ 4 组为染镉组, 分别皮下注射 35、60 和 70 $\mu\text{mol/kg}$ CdCl₂ 溶液, 注射容量也为 0.2 ml/100g。第 5 组仓鼠预先腹腔注射 3 mmol/kg GSH 水溶液, 75 分钟后皮下注射 70 $\mu\text{mol/kg}$ CdCl₂ 溶液。第 6 组仓鼠预先腹腔注射 200 mg/kg 维生素 E 花生油溶液, 20 小时后皮下注射 70 $\mu\text{mol/kg}$ CdCl₂ 溶液。

1. 2 样品收集与指标测定

各组仓鼠均于皮下注射氯化钠或氯化镉后立即转入代谢笼中饲养 24 小时, 在此期间只供给饮水, 停

止供给食物。将尿样收集管置于冰上, 连续收集尿样 24 小时。然后先用乙醚麻醉, 从眼球采血 3.0 ml 左右, 于 3 000 r/min 离心 10 分钟分离出血清。最后解剖动物, 取出肝脏和肾脏, 剥离肾脏被膜, 切开肾脏后切取肾皮质。测定指标和方法如下: (1) 血清乳酸脱氢酶 (LDH) 测定用 Hochella 和 Weinhouse 方法^[4]。(2) 血清丙氨酸转氨酶 (ALT) 测定用 Bergmeyer 等人的方法^[5]。(3) 尿 LDH 测定方法与血清相同。(4) 尿蛋白含量测定用 Bradford 方法^[6]。(5) 尿肌酐测定用 Heinegard 和 Tiderstrom 的方法^[7]。(6) 肝脏和肾皮质 GSH 含量测定用 Anderson 方法^[8]。(7) 肝脏和肾皮质镉含量测定用原子吸收分光光度计火焰法。

1. 3 统计分析

所有数据用平均数 \pm 标准误表示, 用方差分析进行组间差异的显著性检验。

2 结果

2. 1 血清酶、尿酶和尿蛋白

各组仓鼠血清 LDH、ALT 和尿 LDH, 尿蛋白测定结果见表 1。

表 1 仓鼠血清 LDH、ALT 和尿 LDH, 尿蛋白的含量 ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

组别	血清 LDH (mIU/ml)	血清 ALT (mIU/ml)	尿 LDH (mIU/mgCr)	尿蛋白 (mg/mgCr)
0.9%Saline	257.81 \pm 12.39	30.79 \pm 0.79	83.45 \pm 12.39	1.61 \pm 0.14
35 μmol CdCl ₂	530.16 \pm 69.80	44.57 \pm 5.15	164.56 \pm 30.56	1.50 \pm 0.25
60 μmol CdCl ₂	752.64 \pm 132.01	44.95 \pm 8.90	—	—
70 μmol CdCl ₂	1 383.33 \pm 386.49 *	146.93 \pm 39.10 *	142.63 \pm 31.79	1.83 \pm 0.26 *
GSH+70 μmol CdCl ₂	850.79 \pm 174.04 Δ	76.47 \pm 18.71 Δ	152.82 \pm 15.70	1.65 \pm 0.23
维生素 E+70 μmol CdCl ₂	615.61 \pm 70.44 Δ	40.88 \pm 3.40 Δ	151.30 \pm 27.11	1.90 \pm 0.16

* 与对照组比较 $P < 0.05$ 。

Δ 与 70 μmol CdCl₂ 组比较 $P < 0.05$ 。

从表 1 可见随着染镉剂量增加, 血清 LDH 和 ALT 活性有升高趋势, 在 70 μmol CdCl₂ 组, 血清 LDH 和 ALT 活性明显高于对照组, 但各染镉组尿 LDH 和尿蛋白含量与对照组比较差异不明显。仓鼠经 GSH 和维生素 E 预处理后再注射 70 μmol CdCl₂, 血清 LDH

和 ALT 活性均维持于较低水平并明显低于单纯染镉组, 差异显著 ($P < 0.05$); 而尿 LDH 活性和尿蛋白含量与单纯染镉组比较差异不明显。

2. 2 肝肾镉含量和 GSH 浓度

表 2 仓鼠肝、肾皮质镉和 GSH 含量 ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

组别	肝 Cd ($\mu\text{mol/g}$)	肾皮质 Cd ($\mu\text{mol/g}$)	肝 GSH ($\mu\text{mol/g}$)	肾皮质 GSH ($\mu\text{mol/g}$)
0.9%Saline	未检出	未检出	6.66 \pm 0.28	1.65 \pm 0.13
35 μmol CdCl ₂	0.489 \pm 0.038 *	0.156 \pm 0.013 *	5.70 \pm 0.41	2.78 \pm 0.14 *
60 μmol CdCl ₂	0.539 \pm 0.067 *	0.238 \pm 0.043 *	6.12 \pm 0.35	3.19 \pm 0.06 *
70 μmol CdCl ₂	0.676 \pm 0.052 *	0.213 \pm 0.014 *	6.06 \pm 0.63	3.00 \pm 0.20 *
GSH+70 μmol CdCl ₂	0.603 \pm 0.049 *	0.245 \pm 0.030 *	4.11 \pm 0.19 Δ	1.98 \pm 0.15 Δ
维生素 E+70 μmol CdCl ₂	0.605 \pm 0.032 *	0.134 \pm 0.011 * Δ	4.82 \pm 0.31 Δ	2.15 \pm 0.10 Δ

* 与对照组比较 $P < 0.05$ 。

Δ 与 70 μmol CdCl₂ 组比较 $P < 0.05$ 。

实验结果表明,随着染镉剂量增加,肝、肾皮质镉浓度逐渐增加,于 $70 \mu\text{mol CdCl}_2$ 组达到高峰。各组仓鼠肝 GSH 含量无明显差异,但肾皮质 GSH 含量各染镉组均高于对照组,差异显著 ($P < 0.05$)。GSH 预处理组仓鼠肝、肾镉浓度和维生素 E 预处理组肝镉浓度与单纯染镉组差异无显著意义,而维生素 E 预处理组仓鼠肾镉浓度低于单纯染镉组。GSH 和维生素 E 预处理组仓鼠肝和肾皮质 GSH 含量均明显低于单纯染镉组。

3 讨论

3.1 不同染镉剂量对仓鼠肝肾损害

本研究用测定血清中 LDH 和 ALT 活性来判定镉所致的肝脏损害程度,用尿 LDH 活性和尿蛋白含量来判定镉的肾毒性。实验结果表明 $70 \mu\text{mol/kg}$ 染镉组,血清 LDH 和 ALT 活性升高最为明显,分别是对照组的 5.4 倍和 4.8 倍,提示仓鼠急性染镉 24 小时后可引起明显的肝脏损害。仓鼠尿 LDH 活性和尿蛋白含量各染镉组与对照组之间无明显差异,提示急性 1 次皮下注射氯化镉 24 小时后,仓鼠没有发生明显的肾脏损害。Rhem 和 Waalkes 用大鼠、小鼠和仓鼠进行镉的急性肾毒性研究,发现仓鼠对镉的肾脏毒性更为敏感^[9]。Shibasaki 等人报道镉对 Syrian 仓鼠所致的肾脏损害比大鼠和小鼠更为严重^[10]。然而,本研究没有发现急性 $70 \mu\text{mol/kg}$ 引起仓鼠明显的肾脏损害,但随着染镉剂量的增加,仓鼠肝脏和肾皮质中镉含量不断增加,这和 Shibasaki 等人报道的结果一致^[11]。

3.2 GSH 预处理对镉毒性的影响

谷胱甘肽是体内重要的抗氧化物质,可以清除氧化产物和自由基,同时,谷胱甘肽分子中的巯基可以与镉结合。Singhal 等^[1]提出谷胱甘肽可以封闭镉,减少镉与细胞内必需的配位体发生结合反应,从而保护组织细胞免于镉的毒性。本研究结果表明,GSH 预处理可以使血清 LDH 和 ALT 活性下降,减少镉对肝脏的毒性,由于本实验未出现肾损作用,因此 GSH 预处理对肾脏无明显影响。Meister^[12]报道给实验动物腹腔注射大量 GSH 后虽然使血液中 GSH 含量很高,但不能保护 2-氨基-(S-丁基磺酰亚氨基)丁酸 (Buthionine Sulfoximine, BSO) 预处理使 GSH 合成抑制引起的机体损害。这一结果提示只有细胞内的 GSH 才对镉毒性有保护作用。由于外源性投与 GSH,可以通过反馈抑制 GSH 的生物合成,使体内肝脏和肾脏的 GSH 含量下降。投与 GSH,还可使 Cd 和 GSH 形成结合物,通过血流运到肾脏,而使体内 GSH 含量下降。

3.3 维生素 E 预处理对镉毒性的影响

维生素 E 预处理仓鼠血清 LDH 和 ALT 活性明显低于单纯染镉组,表明维生素 E 对镉的肝脏毒性有保护作用。维生素 E 预处理对尿 LDH 和尿蛋白含量无明显影响。维生素 E 可通过磷脂的不饱和脂肪酸的范德华作用来稳定脂质层和稳定镶嵌蛋白质的多肽链来实现脂膜的稳定性^[3],达到保护生物膜的目的。本研究发现维生素 E 预处理后仓鼠肾皮质的 GSH 含量明显低于单纯染镉组,与对照组比无差异。这一结果与 Tandon 报道的维生素 E 能抑制镉的毒性的结果相一致^[13]。维生素 E 对镉毒性的保护作用可能不是由于 GSH 含量的变化,而是它的抗氧化作用和生物膜的稳定作用所致。

参考文献:

- [1] Singhal R K, Anderson M E, Meister A. Glutathione, a first line of defense against cadmium toxicity [J]. *FASEB J*, 1987, 1 (3): 220-223.
- [2] Reed D J. Glutathione: toxicological implications [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1990, 30: 603-631.
- [3] Erin A N, Spirin M M, Tabidze L V, et al. Formation of α -tocopherol complexes with fatty acids: A hypothetical mechanism of stabilization of biomembranes by vitamin E [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1984, 774 (1): 96-102.
- [4] Hochella N J, Weinhouse S. Automated assay for lactate dehydrogenase in urine [J]. *Anal Biochem*, 1965, 13 (2): 322-335.
- [5] Bergmeyer H U, Scheibe P, Wahlefeld A W. Optimization of methods for aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase [J]. *Clin Chem*, 1978, 24 (1): 58-73.
- [6] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248-254.
- [7] Heinegard D, Tiderstrom G. Determination of serum creatinine by a direct colorimetric method [J]. *Clinica Chimica Acta*, 1973, 43 (3): 305-310.
- [8] Anderson M E. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological sample [J]. *Methods in Enzymology*, 1985, 113: 548-555.
- [9] Rehm S, Waalkes M P. Acute cadmium chloride-induced renal toxicity in the syrian hamster [J]. *Toxico Appl Pharmacol*, 1990, 104 (1): 94-105.
- [10] Shibasaki T, Ohno I, Ishimoto F. Characteristics of cadmium-induced nephrotoxicity in Syrian hamsters [J]. *Nippon Jinzo Gakkai Shi*, 1993, 35 (8): 913-917.
- [11] Shibasaki T. Effect of triethylenepentaminehexaacetic acid on the renal damage in cadmium-treated Syrian hamsters [J]. *Biol Trace Elem Res*, 1995, 50 (2): 157-165.
- [12] Meister A. On the antioxidant effects of ascorbic acid and glutathione [J]. *Biochem Pharmacol*, 1992, 44 (10): 1905-1915.
- [13] Tandon S K. Preventive effect of vitamin E in cadmium intoxication [J]. *Biomed Environ Sci*, 1992, 5 (1): 39-45.