

- [9] 生物化学及生物化学检验技术编写组. 生物化学及生物化学检验技术 [M]. 江苏: 江苏科学技术出版社, 1980. 237-239.
- [10] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. [J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72: 248-254.
- [11] 湖南医学院第二附属医院检验科. 临床生化检验 [M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1981. 417.
- [12] 王庸晋. 现代临床检验学 [M]. 北京: 人民军医出版社, 2000. 324-325.
- [13] 赵达维, 高京敏, 李庭俊, 等. 冷原子吸收光谱法测定尿汞规范研究——酸性氯化亚锡还原法 [J]. 工业卫生与职业病, 1990, 16 (4): 237-238.
- [14] 何凤生. 中华职业医学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1999. 230.
- [15] 覃国杰, 陈月华, 周心丽, 等. $HgCl_2$ 对大鼠肾肝睾丸的急性损伤 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 1992, 10 (4): 273-275.
- [16] 邓海. 尿酶与肾脏毒性研究 [J]. 国外医学卫生学分册, 1984, 11 (4): 193.
- [17] Price RG. Urinary enzymes, nephrotoxicity and renal diseases [J]. Toxicology, 1982, 23: 99-101.
- [18] Zakups RK, Lash LH. Depletion of glutathione in the kidney and the renal disposition of administered inorganic mercury [J]. Drug Metab Dispos, 1997, 25 (4): 516-523.
- [19] Verzola D, Bertolotto MB, Villaggio B, et al. Taurine prevents apoptosis induced by high ambient glucose in human tubule renal cells [J]. J Invest Med, 2002, 50 (6): 443-451.
- [20] 张国军, 邹雅斌, 苗春生. 纤溶酶原激活物抑制物-1 在糖尿病大鼠肾皮的表达和牛磺酸的调节作用 [J]. 中华内科杂志, 2000, 39 (4): 239-241.

维生素 C、E 对汞急性肾毒作用影响的实验研究

杨敬华, 徐兆发, 尹忠伟, 于佳明, 孙 炜, 李 晶

(中国医科大学公共卫生学院环境卫生教研室, 辽宁 沈阳 110001)

摘要: 目的 探讨 Vit C 和 Vit E 对汞急性肾毒作用的影响。方法 Wistar 大鼠随机分成 6 组: 对照组, 低、中、高剂量染汞组, Vit C、Vit E 预处理组。染毒 12 h 后收集 12 h 尿样, 采集血液, 分离血清, 切取肝脏、肾皮质样品。测定肝、肾皮质和尿中汞含量, 尿 *N*-乙酰- β -D 氨基葡萄糖苷酶 (NAG)、碱性磷酸酶 (ALP)、乳酸脱氢酶 (LDH) 活性和尿蛋白、血清尿素氮 (BUN) 含量。结果 高剂量染汞组肝、肾皮质和尿中汞含量显著高于对照组, 且肾皮质中汞含量显著高于肝汞, 高剂量染汞组尿 NAG、ALP、LDH 活性和尿蛋白、BUN 含量显著高于对照组。Vit C 和 Vit E 预处理组肝、肾皮质和尿中汞含量显著高于对照组, 尿 NAG、ALP 活性和尿蛋白含量显著低于高剂量染汞组, LDH 活性和 BUN 含量也低于高剂量染汞组, 且 Vit C 预处理组与高剂量染汞组差异有显著性。结论 Vit C 和 Vit E 对汞急性肾毒作用有一定的拮抗作用。

关键词: 维生素 C; 维生素 E; 汞; 肾毒作用

中图分类号: R135.13 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2004)02-0091-03

Experimental study on effects of vitamin C and vitamin E on the acute nephrotoxicity of mercury

YANG Jing-hua, XU Zhao-fa, YIN Zhong-wei, YU Jia-ming, SUN Wei, LI Jing

(Department of Environmental Health, School of Public Health, China Medical University, Shenyang 110001, China)

Abstract: **Objective** To study the effects of Vit C and Vit E on the acute nephrotoxicity caused by mercury. **Method** Wistar rats were divided into four groups randomly, i. e., control group, Hg exposed group (including mild exposure, middle exposure and high exposure three subgroups), Vit C treatment group and Vit E treatment group. At 12th hour after last mercury exposure, the animals were held in metabolic cages for 12 hours, collected the urine, liver, renal cortex and blood samples for the measurement of Hg contents in liver, renal cortex and urine; the urinary activities of *N*-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG), alkaline phosphatase (ALP), lactic dehydrogenase (LDH); the urinary levels of protein and the blood urea nitrogen (BUN). **Result** The Hg contents of liver, renal cortex and urine, the urinary activities of NAG, ALP, LDH, the urinary level of protein and BUN content in high exposure subgroup were all significantly higher than that of control group, and the Hg content in renal cortex was higher than that in liver. The results also showed that the Hg contents in liver, renal cortex and urine in Vit C group and Vit E group were all significantly increased as comparing with those of control, while the urinary activities of NAG, ALP and LDH, the urinary protein level and BUN in Vit C and Vit E groups were also significantly lower than that of high exposure subgroup. **Conclusion** Vit C and Vit E have an antagonistic effect on the acute nephrotoxicity of mercury.

Key words: Vitamin C; Vitamin E; mercury (Hg); Nephrotoxicity

收稿日期: 2003-07-23; 修回日期: 2003-08-15

作者简介: 杨敬华 (1977-), 女, 沈阳人, 硕士研究生, 主要从事汞毒理学研究。

汞是一种广泛存在的有毒金属^[1], 已有实验表明肾脏是无机汞最主要的蓄积部分和靶器官, 且一般认为汞所致的肾损伤是不可逆的^[2]。汞致肾损伤的机制目前没有完全阐明, 有人认为与汞致氧化损伤有关^[3]。因此有人提出应用抗氧化物质可能拮抗汞所致肾损伤。

维生素 C (Vit C) 是一种很好的细胞内外化学反应的还原剂, 也是一个良好的电子供体, 具有较强的抗氧化作用。它是一种水溶性低分子抗氧化物质, 也是胞液中重要的活性氧清除剂之一^[4]。维生素 E (Vit E) 是一种脂溶性抗氧化物质, 它能清除活性氧自由基以及脂质过氧化自由基, 具有强大的抗氧化作用^[5]。本研究授予 3 种不同剂量的汞, 观察其对肾脏的毒作用; 同时给 Vit C 和 Vit E 预处理, 观察这两种物质对汞急性肾毒作用的影响, 为汞中毒的防治提供依据。

1 材料与方法

1.1 动物分组与染毒

由中国医科大学实验动物中心提供的 Wistar 大鼠 48 只, 体重 (150±10) g, 雌雄各半。正式实验前饲养 7 d, 随机分成 6 组。第 1 组为对照组; 第 2~4 组为低、中、高剂量染汞组, 分别皮下注射 0.75、1.5、2.5 mg/kg 的氯化汞溶液; 第 5 组为 Vit C 预处理组, 先腹腔注射 4 mmol/kg 的 Vit C, 再于 2 h 后皮下注射 2.5 mg/kg 的氯化汞溶液; 第 6 组为 Vit E 预处理组, 先腹腔注射 200 mg/kg 的 Vit E, 再于 20 h 后皮下注射 2.5 mg/kg 的氯化汞溶液。对照组相应皮下注射质量分数 0.9% 的生理盐水。注射 12 h 后将大鼠置于代谢笼中, 收集 12 h 尿液, 然后处死大鼠。从腹主动脉采血 3.0 ml, 分离血清, 切取肝脏和肾脏样品, 剥离肾皮质。

1.2 测定指标及方法

1.2.1 汞体负荷指标 肝、肾皮质和尿中汞含量测定采用冷原子吸收法^[6]。肝脏、肾皮质和尿液经浓硝酸消化后, 置于汞蒸气发生瓶中, 通过冷原子吸收仪测定其汞含量。

1.2.2 肾损伤指标 尿 NAG 测定用对硝基酚比色法^[7], 尿 ALP 测定用金氏法^[8], 尿 LDH 测定用以乳酸为基质的比色法^[8], 尿蛋白测定用考马斯亮蓝法^[9], 尿肌酐测定用苦味酸

比色法^[10], BUN 测定用二乙酰肟法^[11]。

1.3 统计分析

实验数据以均值±标准误表示, 用 SPSS 软件单因素方差分析方法 (ANOVA) 进行组间差异的显著性检验, 两组间比较用 Q 检验 (Newman-Keuls 法)。

2 结果

2.1 肝、肾皮质和尿汞含量

给大鼠皮下注射 0.75、1.5、2.5 mg/kg 的氯化汞溶液或经 Vit C、Vit E 处理后再皮下注射 2.5 mg/kg 氯化汞溶液, 肝、肾皮质和尿中汞含量变化见表 1。

表 1 肝、肾皮质和尿中汞含量 ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

组别	肝汞 ($\mu\text{g/g tissue}$)	肾皮质汞 ($\mu\text{g/g tissue}$)	尿汞 ($\mu\text{mol/g Cr}$)
对照	0.06±0.03 ^Δ	0.88±0.04 ^Δ	3.33±0.70 ^{Δ☆}
0.75 mgHgCl ₂	0.74±0.12 ^Δ	46.25±2.86 ^{*Δ☆}	13.32±3.43 ^{Δ☆}
1.5 mgHgCl ₂	1.11±0.07 ^Δ	64.97±6.05 ^{*Δ☆}	38.41±9.66 ^{*☆}
2.5 mgHgCl ₂	5.27±1.29 [*]	83.51±4.79 ^{*☆}	57.99±16.17 ^{*☆}
Vit C+2.5mgHgCl ₂	2.06±0.51 ^{*Δ}	80.90±8.87 ^{*☆}	51.07±22.62 ^{*☆}
Vit E+2.5mgHgCl ₂	2.37±0.61 ^{*Δ}	82.26±8.54 ^{*☆}	66.23±8.77 ^{*☆}

*与对照组比, $P<0.05$; Δ 与 2.5 mgHgCl₂ 组比, $P<0.05$; ☆组内与肝中汞含量比, $P<0.05$

如表 1 所示, 肝、肾皮质和尿中汞含量随染汞剂量加大而升高, 高剂量染汞组肝、肾皮质和尿中汞含量显著高于对照组, 且肾皮质中汞含量显著高于肝汞。Vit C 和 Vit E 预处理组肝、肾皮质和尿中汞含量显著高于对照组, 其中肝中汞含量显著低于高剂量染汞组, 而肾皮质和尿中汞含量与高剂量染汞组差异无显著性。

2.2 尿酶活性和尿蛋白、BUN 含量

给大鼠皮下注射 0.75、1.5、2.5 mg/kg 的氯化汞溶液或经 Vit C、Vit E 处理后再皮下注射 2.5 mg/kg 氯化汞溶液, 尿酶活性和尿蛋白、BUN 含量变化见表 2。

表 2 尿酶活性和尿蛋白、BUN 含量 ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

组别	Urinary NAG (U/g Cr)	Urinary ALP (U/g Cr)	Urinary LDH (U/g Cr)	Urinary Protein(mg/g Cr)	BUN (mmol/L)
对照	43.65±3.26 ^Δ	24.52±5.28 ^Δ	0.85±0.44 ^Δ	0.77±0.14 ^Δ	15.48±0.88 ^Δ
0.75 mgHgCl ₂	61.06±14.93 ^Δ	62.98±13.05 ^{*Δ}	6.50±3.95 ^Δ	1.21±0.32 ^Δ	12.36±1.20 ^Δ
1.5 mgHgCl ₂	89.27±10.78 ^{*Δ}	93.05±16.76 ^{*Δ}	18.17±5.55 [*]	2.29±0.58 ^{*Δ}	20.07±3.30 ^Δ
2.5 mgHgCl ₂	674.52±205.95 [*]	1117.63±388.12 [*]	47.07±12.54 [*]	16.40±6.34 [*]	35.78±5.42 [*]
Vit C+2.5mgHgCl ₂	55.79±5.89 ^Δ	39.64±6.00 ^Δ	9.50±4.21 ^Δ	1.00±0.10 ^Δ	23.71±4.81 ^Δ
Vit E+2.5mgHgCl ₂	95.57±21.15 ^Δ	138.61±31.95 ^Δ	73.32±41.03	3.44±1.21 ^Δ	25.29±4.99

*与对照组比, $P<0.05$; Δ 与 2.5 mgHgCl₂ 组比, $P<0.05$

如表 2 所示, 尿 NAG、ALP、LDH 活性和尿蛋白、BUN 含量随染汞剂量加大而升高, 且高剂量染汞组尿 NAG、ALP、LDH 活性和尿蛋白、BUN 含量显著高于对照组。Vit C 和 Vit E 预处理组尿 NAG、ALP 活性和尿蛋白含量显著低于高剂量染汞

组, 与对照组差异无显著性; LDH 活性和 BUN 含量也低于高剂量染汞组, 与对照组差异无显著性, 且 Vit C 预处理与高剂量染汞组差异有显著性。

3 讨论

汞是一种重要的工业毒物 and 环境污染物, 对许多组织器官都有毒作用, 其中肾脏是无机汞最主要的蓄积部位和靶器官^[2]。研究表明, 无机汞造成肾细胞损伤的重要机制之一是氧化损伤^[3]。Lund 研究发现, 汞诱导脂质过氧化一旦发生, 会产生链锁反应, 导致自由基和脂质过氧化物生成增加^[2], 继而在肾细胞内蛋白质、核酸等生物大分子的局部引起自由基反应, 造成 DNA 链断裂、蛋白质交联等多种类型损伤, 导致肾细胞氧化损伤^[3], 严重时导致细胞死亡。正是由于氧化损伤在汞产生肾毒作用时具有重要作用, 因此本实验研究两种抗氧化物质对汞急性肾毒作用的影响。

本实验中, 肝、肾皮质和尿中汞含量随染汞剂量加大而升高, 高剂量染汞组肝、肾皮质和尿中汞含量显著高于对照组, 且肾皮质中汞含量显著高于肝汞。可见肾皮质是无机汞毒作用的主要蓄积部位。Cardenas 等人研究显示汞在肾脏内分布不均匀, 近曲小管上皮细胞内最高, 而且汞主要损伤肾近曲小管上皮细胞^[4]。其损伤后细胞膜通透性增加, 其内容物(包括细胞内酶)排入肾小管管腔而进入尿液^[5]。且肾脏发生损伤时, 尿酶(如 NAG、ALP 和 LDH)活性的变化比其他肾功能指标出现更早, 其中 NAG 是更为敏感的指标^[16], 同时近曲小管功能障碍后, 对已滤过的某些物质及水的重吸收能力明显下降, 水和大量血浆中的物质(如葡萄糖、氨基酸、白蛋白和其他血浆蛋白)的尿排出量也增加^[5]。本实验大鼠染汞后, 尿 NAG、ALP、LDH 活性和尿蛋白、BUN 含量随染汞剂量加大而升高, 且高剂量染汞组尿 NAG、ALP、LDH 活性和尿蛋白、BUN 含量显著高于对照组。可见随染汞剂量加大, 尿酶和尿蛋白排出量逐渐增大, BUN 含量逐渐增加, 肾损伤的程度加重。

Vit C 又称抗坏血酸, 是一种水溶性低分子抗氧化物质, 具有较强的抗氧化作用, 是细胞内、外液中重要的活性氧清除剂之一^[4], 可很快地与 $\cdot\text{O}_2$ 和 H_2O_2 反应, 能更快地与 $\cdot\text{OH}$ 反应, 生成半脱氢抗坏血酸, 清除或减少这些自由基以防止细胞发生氧化损伤。Vit C 可使氧化型谷胱甘肽还原成谷胱甘肽, 后者可与重金属离子结合以拮抗重金属对巯基酶的抑制作用, 间接地影响重金属的肾毒作用。Vit C 亦可与 Vit E 偶联, 恢复 Vit E 的抗氧化作用。Vit E 又称 α -生育酚, 是一种脂溶性抗氧化物质, 它能清除活性氧自由基以及脂质过氧化自由基, 因而具有强大的抗氧化作用^[5]。此外, α -生育酚可以稳定生物膜结构。在本实验中 Vit C 和 Vit E 预处理组肝、肾皮质和尿中汞含量显著高于对照组, 肝中汞含量显著低于高剂量染汞组, 说明 Vit C 和 Vit E 在肝脏具有一定的驱汞作用, 但肾皮质和尿中汞含量与高剂量染汞组差异无显著性, 可见 Vit C 和 Vit E 在汞主要蓄积部位肾脏并没有驱汞作用。Vit C 和 Vit E 预处理组尿 NAG、ALP 活性和尿蛋白含量显著低于高剂量染汞组, 与对照组差异无显著性。LDH 活性和 BUN 含量也低于高剂量染汞组, 与对照组差异无显著性, 且 Vit C 预处理与高剂

量染汞组差异有显著性。可见 Vit C 和 Vit E 发挥了抗氧化作用, 拮抗了汞对肾脏的损伤作用, 肾功能基本恢复正常状态。由此可知 Vit C 和 Vit E 对汞急性肾毒作用具有一定的拮抗作用, 对机体有保护作用。

综上所述, 本研究结果表明 Vit C 和 Vit E 对汞急性肾毒作用具有一定的拮抗作用, 这对于治疗急性汞中毒有重要意义。但关于抗氧化物质对汞毒作用影响的准确机制仍需要进一步探讨。

参考文献:

- [1] Munro IC, Nera EA. Chronic toxicity of methylmercury in the rat [J]. *Environ Pathol Toxicol*, 1980, 3 (5-6): 437-447.
- [2] Zalups RK, Lash IH. Advances in understanding the renal transport and toxicity of mercury [J]. *Toxicol Environ Health*, 1994, 42: 41-44.
- [3] Zalups RK. Molecular interactions with mercury in the kidney [J]. *Pharmacol Rev*, 2001, 52 (1): 126-131.
- [4] Buettenr GR. The pecking order of free radicals and antioxidant: lipid peroxidation, alpha-tocopherol [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1993, 300: 535-543.
- [5] Andersen H R, Andersen O. Effects of dietary alpha-tocopherol and beta-carotene on lipid peroxidation induced by methyl mercuric chloride in mice [J]. *Pharmacol Toxicol*, 1993, 73 (4): 192-201.
- [6] 赵达维, 高京敏, 李庭俊, 等. 冷原子吸收光谱法测定尿汞规范研究——酸性氯化亚锡还原法 [J]. *工业卫生与职业病*, 1990, 16 (4): 237-238.
- [7] 杨振修. 唾液和尿液 N-乙酰 β -D-氨基葡萄糖苷酶测定方法 [J]. *上海医学*, 1983, 6: 28.
- [8] 黄晔君. 尿液中 γ -谷氨酰基转换酶、乳酸脱氢酶、碱性磷酸酶、亮氨酸氨基肽酶的测定方法 [J]. *天津医药*, 1982, 5: 308.
- [9] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding [J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72: 248-254.
- [10] 湖南医学院第二附属医院检验科. 临床生化检验 [M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1981. 417.
- [11] 王庸晋. 现代临床检验学 [M]. 北京: 人民军医出版社, 2000. 324-325.
- [12] Lund BO, Miller DM, Woods JS. Mercury-induced H_2O_2 production and lipid peroxidation in vitro in rat kidney mitochondria [J]. *Biochem Pharmacol*, 1991, 42 (Suppl): 181-187.
- [13] Fukino H, Hirai M. Effect of zinc pretreatment on mercuric chloride-induced lipid peroxidation in the rat kidney [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1994, 73: 395-401.
- [14] 覃国杰, 陈月华, 周心丽, 等. 氯化汞对大鼠肾肝睾丸的急性损伤 [J]. *中华劳动卫生职业病杂志*, 1992, 10 (4): 237.
- [15] Zalups RK, Barfuss DW. Nephrotoxicity of inorganic mercury co-administrated with L-cysteine [J]. *Toxicology*, 1996, 109: 15-29.
- [16] Cardenas A, Roels H, Bernard AM, et al. Markers of early renal change induced by industrial pollutants [J]. *Br Ind Med*, 1993, 50: 17-21.