

氯丙嗪和异搏定对镉致大鼠肝肾毒性的影响

徐斌, 徐兆发, 杨敬华

(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 研究氯丙嗪和异搏定对镉致大鼠肝肾毒性的影响, 重点观察 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ 和 $\text{Ca}^{2+}-\text{ATPase}$ 活性的改变。方法 大鼠按体重随机分成4组, 第1组为对照组, 皮下注射0.9%氯化钠; 第2组为单纯染镉组, 皮下注射 $7 \mu\text{mol/kg}$ 的氯化镉溶液; 第3、4组分别腹腔注射氯丙嗪 5 mg/kg (CPZ 干预组) 或异搏定 4 mg/kg (Ver 干预组), 1 h 后皮下注射 $7 \mu\text{mol/kg}$ 的氯化镉。各组处理6周后, 测定尿乳酸脱氢酶 (LDH)、尿蛋白、尿镉以及肝肾组织中 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ 和 $\text{Ca}^{2+}-\text{ATPase}$ 的活性。结果 单纯染镉组与对照组比较, 尿 LDH、尿蛋白和尿镉含量明显升高; 肝肾组织中 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ 和 $\text{Ca}^{2+}-\text{ATPase}$ 活性和镉含量也明显升高, 统计学差异非常显著 ($P < 0.01$); CPZ 干预组与单纯染镉组比较, 尿 LDH、尿蛋白和尿镉含量及肝肾组织中 $\text{Ca}^{2+}-\text{ATPase}$ 活性明显下降 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); Ver 干预组尿蛋白、尿镉和肝肾组织中的 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ 和 $\text{Ca}^{2+}-\text{ATPase}$ 活性明显低于单纯染镉组, 统计学差异显著 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 肝、肾、尿中镉含量均明显降低, 说明 Ver 可抑制镉的吸收。结论 氯丙嗪和异搏定均对镉毒性有不同程度的拮抗作用。

关键词: 镉; 氯丙嗪; 异搏定; $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$; $\text{Ca}^{2+}-\text{ATPase}$

中图分类号: O614.242; R99 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2005)01-0005-03

Effects of chlorpromazine and verapamil on cadmium-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity in rats

XU Bin, XU Zhao-fa, YANG Jing-hua

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

Abstract: Objective The purpose of this study was to determine whether chlorpromazine (CPZ) and verapamil (Ver) can prevent toxic effects of cadmium (Cd) on the liver and kidney of rats, focusing on the changes in activities of $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ and $\text{Ca}^{2+}-\text{ATPase}$ in the critical organs. **Method** Wistar rats were divided into four groups by weight at random. 0.9% sodium chloride was injected subcutaneously in the first group as control. $7 \mu\text{mol/kg}$ of cadmium chloride was injected subcutaneously in the second group. In the third and fourth groups, at first, 5 mg/kg of CPZ and 4 mg/kg of Ver were injected intraperitoneally, respectively, and 1 hour later, $7 \mu\text{mol/kg}$ of cadmium chloride were injected subcutaneously. Six weeks after treatment, urine specimens were collected from the rats and urine activity of lactate dehydrogenase (LDH), levels of total protein and cadmium were measured and then, the rats were killed and their liver and renal cortex specimens were obtained to analyze contents of cadmium and activities of $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ and $\text{Ca}^{2+}-\text{ATPase}$ in the liver and kidney. **Result** Urinary LDH and total protein and activities of $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ and $\text{Ca}^{2+}-\text{ATPase}$ in the liver and renal cortex in the rats treated with Cd only were significantly higher than those in the control group ($P < 0.01$). As compared with the rats with Cd only, urinary LDH and total protein and content of cadmium and activities of $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ and $\text{Ca}^{2+}-\text{ATPase}$ decreased significantly in the rats with CPZ or Ver plus Cd ($P < 0.05$), and urinary total protein, contents of Cd in the urine, liver and kidney, and activities of $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ and $\text{Ca}^{2+}-\text{ATPase}$ in the liver and renal cortex in the rats treated with Ver plus Cd were significantly lower than those in the rats with Cd only ($P < 0.05$), indicating the absorption of Cd was inhibited by Ver.

Conclusion CPZ and Ver, to varied extents, can antagonize the Cd-induced toxic effects.

Key words: Cadmium; Chlorpromazine; Verapamil; $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$; $\text{Ca}^{2+}-\text{ATPase}$

镉 (cadmium, Cd) 是一种重要的环境污染物。镉中毒的分子机制尚未完全清楚。钙调蛋白 (calmodulin, CaM) 与镉中毒之间存在着密切关系^[1], 钙调蛋白拮抗剂通过与 CaM 高亲和力结合, 抑制

CaM 与靶蛋白作用, 从而阻断酶的活化, 对镉中毒具有防护作用; 钙离子通道阻断剂选择性地阻断钙离子内流, 抑制胞内储存钙离子的释放, 对镉中毒也存在一定防护作用^[2]。本实验通过观察钙调蛋白拮抗剂氯丙嗪 (chlorpromazine, CPZ) 和钙离子通道阻断剂异搏定 (verapamil, Ver) 对镉引起的肾损伤和肝肾组织中 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ 、 $\text{Ca}^{2+}-\text{ATPase}$ 活性改变的影响, 为深入探讨镉中毒机制提供依据。

收稿日期: 2004-07-14; 修回日期: 2004-08-20

基金项目: 国家自然科学基金资助 (编号: 30371200)

作者简介: 徐斌 (1979-), 男, 汉族, 辽宁沈阳人, 硕士研究生, 主要从事毒理学研究。

1 材料与方法

1.1 动物分组及染毒

由中国医科大学实验动物中心提供的实验用 Wistar 大鼠 32 只, 体重 (150±10) g, 雌雄各半。正式实验前饲养 7 d, 然后按体重随机分成 4 组, 每组 8 只。第 1 组为对照组, 皮下注射 0.9% 氯化钠; 第 2 组为单纯染镉组, 皮下注射 7 μmol/kg 的氯化镉溶液; 第 3、4 组分别腹腔注射氯丙嗪 5 mg/kg (CPZ 干预组) 或异搏定 4 mg/kg (Ver 干预组), 1 h 后皮下注射 7 μmol/kg 的氯化镉, 注射容量均为 2 ml/kg。每周 5 次, 共 6 周。

1.2 样品采集及处理

最后一次注射后 24 h, 收集大鼠 24 h 尿液, 测定尿乳酸脱氢酶活性、尿蛋白和尿镉含量; 然后用乙醚麻醉大鼠, 解剖切取肝肾组织, 将肾脏被膜剖开、分离, 切取肾皮质样品。将肝组织和肾皮质均制成 5% 的组织匀浆, 测定肝肾组织 Na⁺-K⁺-ATPase、Ca²⁺-ATPase 的活性和组织镉。

1.3 测定指标及方法

尿乳酸脱氢酶 (LDH) 用以乳酸为基质的比色法测定^[3], 尿蛋白含量用考马斯亮蓝法测定^[4], 尿肌酐用苦味酸比色法测定^[5], ATP 酶活性用硫酸亚铁钼磷蓝定磷法测定^[6,7], 组织及尿镉测定用原子吸收分光光度火焰法。

1.4 统计分析

实验所得数据以平均值 ± 标准误表示, 用 SPSS 11.0 软件进行单因素方差分析, 组间差异的显著性检验, 组间比较用 *q* 检验。

2 结果

2.1 尿镉及肝肾组织中镉含量变化

大鼠染毒 6 周后, 尿及肝肾组织中镉含量变化见表 1。各染镉组大鼠肝、肾、尿中镉含量均明显高于对照组, 且差异有显著意义 (*P*<0.01)。CPZ 干预组与单纯染镉组比较, 肝、肾中镉含量无明显差异, 而尿镉含量却明显降低; Ver 干预组肝和尿镉含量低于单纯染镉组, 差异有显著意义 (*P*<0.05)。

表 1 各组大鼠尿镉和肝肾组织镉含量 ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

分 组	肝镉 (μg/g 组织湿重)	肾镉 (μg/g 组织湿重)	尿镉 (mg/g Cr)
对照组	0.256±0.103	0.246±0.079	0.031±0.011
单纯染镉组	148.492±5.927**	145.846±4.695**	1.183±0.223**
CPZ+ CdCl ₂ 组	136.552±12.751**	148.913±7.702**	0.258±0.084***▲▲
Ver+ CdCl ₂ 组	124.186±10.890**▲	132.474±7.116**	0.739±0.159**▲▲

与对照组比较 ***P*<0.01; 与单纯染镉组比较 ▲*P*<0.05, ▲▲*P*<0.01; 与 CPZ 干预组比较 △*P*<0.05

2.2 尿 LDH 和尿蛋白

从表 2 可见, 大鼠皮下单纯染镉 6 周后, 与对照组比较尿 LDH 和蛋白含量明显升高, 差异有非常显著意义 (*P*<0.01); CPZ 干预组尿 LDH 和蛋白含量明显低于单纯染镉组, 且差异有显著意义 (*P*<0.05); Ver 干预组与单纯染镉组比较, 尿蛋白含量明显下降, 差异有显著意义 (*P*<0.05)。

表 2 各组大鼠尿 LDH 和尿蛋白含量 ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

分 组	尿 LDH (U/gCr)	尿蛋白 (g/gCr)
对照组	1.266±0.500	0.564±0.033
单纯染镉组	13.383±3.015**	2.157±0.239**
CPZ+ CdCl ₂ 组	7.672±1.107**▲	1.724±0.118**▲
Ver+ CdCl ₂ 组	9.129±1.067**	1.654±0.058**▲

与对照组比较 **P*<0.05 ***P*<0.01; 与单纯染镉组比较 ▲*P*<0.05

2.3 肝肾组织中的 Na⁺-K⁺-ATPase 及 Ca²⁺-ATPase 活性

从表 3 可见, 大鼠染毒 6 周后, 各实验组与对照组比较肝肾组织中 Na⁺-K⁺-ATPase 的活性均明显升高, 且差异有非常显著意义 (*P*<0.01); CPZ 干预组与单纯染镉组比较差异无显著意义; Ver 干预组此酶在肝肾组织中的活性均明显低于单纯染镉组, 差异有非常显著意义 (*P*<0.01)。单纯染镉组与对照组比较肝肾组织中 Ca²⁺-ATPase 的活性明显升高, 差异有非常显著意义 (*P*<0.01); CPZ 干预组肝肾组织中 Ca²⁺-ATPase 的活性明显低于单纯染镉组, Ver 干预组与单纯染镉组比较, 此酶在肝肾组织中的活性也有不同程度的下降。两种酶活性在肾皮质中, Ver 干预组比 CPZ 干预组下降更明显, 且差异有显著意义 (*P*<0.05)。

表 3 各组大鼠肝肾组织 Na⁺-K⁺-ATPase 和 Ca²⁺-ATPase 活性变化 ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

分 组	Na ⁺ -K ⁺ -ATPase (μmol·mg ⁻¹ ·h ⁻¹)		Ca ²⁺ -ATPase (μmol·mg ⁻¹ ·h ⁻¹)	
	肝	肾	肝	肾
对照组	2.281±0.212	3.245±0.268	1.180±0.105	1.492±0.119
单纯染镉组	4.921±0.312**	8.253±0.486**	2.210±0.088**	3.430±0.264**
CPZ+ CdCl ₂ 组	3.35±0.232**	7.364±0.647**	1.699±0.135**▲	2.457±0.290**▲▲
Ver+ CdCl ₂ 组	4.019±0.203**▲	5.767±0.530**▲▲	1.646±0.209**▲	1.663±0.219▲▲

与对照组比较 **P*<0.05 ***P*<0.01; 与单纯染镉组比较 ▲*P*<0.05 ▲▲*P*<0.01; 与 CPZ 干预组比较 △*P*<0.05

3 讨论

钙稳态在维持细胞进行正常的生理、生化过程中起着极为重要的作用。ATPase 是普遍存在于组织细胞及细胞器膜上的一种蛋白酶, 它在维持细胞内钙稳态、能量

转换以及信息传递方面具有重要的作用。钙稳态的维持主要受生物膜上依赖钙调蛋白的 Ca^{2+} -ATPase 活性的调节。 Ca^{2+} 可激活 CaM, 由此导致 Ca^{2+} -ATPase 活性增加^[8]。 Ca^{2+} -ATP 酶可将胞浆内 Ca^{2+} 泵出细胞外或泵入内质网, 是胞浆 Ca^{2+} 流出的主要通道; 另外膜上还有 Na^+ 、 Ca^{2+} 交换器, 可将膜外 3 个 Na^+ 顺浓度差流入胞内, 胞内一个 Ca^{2+} 逆浓度差泵出, 使胞浆 Ca^{2+} 浓度不至于过高, 保证细胞内钙稳态, Na^+ - K^+ -ATP 酶的功能与 Na^+ / Ca^{2+} 交换有着密切的关系^[9]。本研究对大鼠单纯染镉 6 周后, 肝肾组织中 Na^+ - K^+ -ATP 酶和 Ca^{2+} -ATP 酶活性均明显升高, 此与 Carageorgiou^[10] 等人的研究结果一致, 可能原因是氧自由基造成细胞膜通透性增强, 镉离子和钙离子内流, 细胞内钙稳态被破坏, 异常活化钙调蛋白导致 ATP 酶活性升高。此时, 尿 LDH 和蛋白含量明显高于对照组, 分别是对照组的 10.6 和 3.8 倍, 尿 LDH 是检测肾脏损伤的重要尿酶之一^[11], 本研究用尿 LDH 活性和尿蛋白含量来判定镉的肾毒性, 两指标升高提示大鼠肾脏损害严重。

氯丙嗪是一种钙调蛋白拮抗剂, 在 Ca^{2+} 存在下, 与 CaM 以高亲和力结合, 阻止活化的 CaM 对 CaM 依赖酶的激活, 抑制 CaM 的某些调节过程而发挥其药理作用。Tang^[12] 等研究表明, 氯丙嗪能明显降低血镉, 降低尿中 γ -谷氨酰转移酶 (γ -GT) 及 N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶 (NAG) 活性, 使肝、肾组织中镉金属硫蛋白含量提高, 提示其对小鼠镉中毒肝、肾毒效应有一定的保护作用。CPZ 与被异常激活的 CaM 结合, 减轻镉对 CaM 依赖酶的影响, 进而对 Na^+ - K^+ -ATP 酶和 Ca^{2+} -ATP 酶起到保护作用。本研究 CPZ 干预组与单纯染镉组比较, 此两种酶在肝肾组织中的活性均有降低趋势, 但 Ca^{2+} -ATP 酶降低更明显。CPZ 不但可以拮抗 ATP 酶活性, 而且使尿 LDH 活性和尿蛋白含量有所降低, 对镉致肾损伤有保护作用; 肝肾镉含量与单纯染镉组无差异, 尿镉排泄未见升高, 说明 CPZ 无促排镉作用。

钙离子通道阻断剂异搏定可以选择性地阻断细胞外 Ca^{2+} 经钙通道进入细胞内, 加大剂量还可以抑制细胞内储存的 Ca^{2+} 释放, 防止因 Ca^{2+} 过量所致的平滑肌痉挛和细胞损伤。Ver 作用于 Ca^{2+} 通道, 阻止 Ca^{2+} 进入细胞的同时, 也有阻碍 Cd^{2+} 进入细胞的作用, 因此 Ver 可以维护细胞内钙稳态, 对 Na^+ - K^+ -ATP 酶和 Ca^{2+} -ATP 酶起到保护作用。本研究 Ver 干预组与单纯染镉组比较, 肝、肾、尿中镉含量降低了 8.9%~37.5%, 说明 Ver 抑制了镉的吸收。 Na^+ - K^+ -ATP 酶和 Ca^{2+} -ATP 酶在肝肾组织中的活性均明显降低, 而且 Ca^{2+} -ATP 酶活性明显低

于 CPZ 干预组, 说明异搏定对 Ca^{2+} -ATP 酶的保护作用更强。Ver 可使尿蛋白明显低于单纯染镉组, 且差异有显著意义 ($P < 0.05$)。虽然尿 LDH 也有下降趋势, 但差异无显著意义, 说明 Ver 对镉造成的肾损伤有一定的保护作用。

镉通过膜脂质的过氧化或改变机体的抗氧化系统来诱发不同组织的氧化性损伤^[13], 同时也造成细胞内钙超载。有研究表明, 钙超载和氧化损伤机制共同参与了镉致组织损伤, 两者之间可能相互影响, 相互促进, 形成恶性循环^[14]。

参考文献:

- [1] Yuan T, Gomes AV, Bames JA, et al. Spectroscopic characterization of the calmodulin-binding and autoinhibitory domains of calcium/calmodulin-dependent protein kinase I [J]. Arch Biochem Biophys, 2004, 421 (2): 192-206.
- [2] Baker TK, VanVooren HB, Smith WC, et al. Involvement of calcium channels in the sexual dimorphism of cadmium-induced hepatotoxicity [J]. Toxicol Lett, 2003, 137 (3): 185-192.
- [3] 王庸晋. 现代临床检验学 [M]. 北京: 人民军医出版社, 2000. 269-270.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 孙应彪, 朱玉真. 硫酸镍对大鼠心肝肾 ATP 酶毒性的实验研究 [J]. 中国职业医学, 2001, 28 (3): 27-28.
- [7] 沈洪兴, 王光毅, 于宝军, 等. 严重烫伤大鼠心、肝、肾组织 Na^+ - K^+ -ATP 酶、 Ca^{2+} -ATP 酶活性的变化 [J]. 第二军医大学学报, 1998, 19 (3): 247-249.
- [8] 张辉, 安飞云, 高泽宣. 慢性肾损害与钙稳态的关系 [J]. 柳州医学高等专科学校学报, 2001, 3 (3): 145-148.
- [9] 徐斌, 徐兆发. 镉对细胞钙稳态与相关酶活性影响的研究进展 [J]. 中国工业医学杂志, 2003, 16 (6): 351-354.
- [10] Carageorgiou H, Tatzes V, Pantos G, et al. In vivo and in vitro effects of cadmium on adult rat brain total antioxidant status, acetylcholinesterase, (Na^+ K^+)-ATPase and Mg-ATPase activities: protection by L-cysteine [J]. Pharmacol Toxicol, 2004, 94 (3): 112-118.
- [11] 温峰, 吴惠毅, 陈晋. 尿 LDH 及其同工酶对上尿路梗阻病人肾功能的估价 [J]. 中华泌尿外科杂志, 1996, 17 (8): 469-471.
- [12] Tang IF, Yang YN, Chen YN. Influences of chlorpromazine, nimodipine and their combination on the toxic effects of cadmium in liver and kidney of mice [J]. Biomed Environ Sci, 1999, 12 (3): 214-221.
- [13] Tandon SK, Singh S, Prasad S, et al. Reversal of cadmium induced oxidative stress by chelating agent, antioxidant or their combination in rat [J]. Toxicol Lett, 2003, 145 (3): 211-217.
- [14] 姜悦, 董秀涛, 关伟明, 等. 钙超载与氧自由基: 镉致离体肾小管上皮细胞损伤中的作用及联系 [J]. 中华肾脏病杂志, 1995, 11 (2): 72-76.