

N-乙酰半胱氨酸和 α -硫辛酸对汞急性肾功能损伤的影响

贺安宁, 徐兆发*, 王家骏, 徐斌, 杨敬华, 李晶

(中国医科大学公共卫生学院环境卫生学教研室, 辽宁 沈阳 110001)

摘要: 为探讨 N-乙酰半胱氨酸 (NAC) 和 α -硫辛酸 (LA) 对汞急性肾功能损伤的影响, 将 32 只 Wistar 大鼠随机分成 4 组: 对照组、单纯染汞组、NAC 干预组、LA 干预组。单纯染汞组先腹腔注射生理盐水, 2 h 后, 皮下注射 HgCl_2 溶液 $9.2 \mu\text{mol/kg}$ 。NAC 和 LA 干预组先分别腹腔注射 NAC 溶液 2 mmol/kg 及 LA 溶液 0.35 mmol/kg , 2 h 后, 皮下注射 HgCl_2 溶液。对照组在相应时间内注射生理盐水。染毒后 12 h 将鼠移至代谢笼中收集 12 h 尿样, 染毒后 48 h 腹主动脉取血并切取肾脏, 测定尿碱性磷酸酶 (ALP)、乳酸脱氢酶 (LDH)、N-乙酰 β -D-氨基葡萄糖苷酶 (NAG) 活性, 尿蛋白、血清尿素氮 (BUN) 含量及尿和肾皮质中汞含量。与对照组比较, 单纯染汞组尿汞、肾皮质汞含量, 尿 ALP、LDH、NAG 活性, 尿蛋白、BUN 含量显著升高; NAC 干预组尿汞、肾皮质汞含量及 LA 干预组肾皮质汞含量明显升高。与单纯染汞组比较, LA 干预组尿汞含量显著降低, 肾皮质汞含量明显升高; 两干预组尿 ALP、LDH、NAG 活性及尿蛋白、BUN 含量显著降低。说明 NAC 和 LA 预处理对汞急性肾功损伤有一定的保护作用, 但对 LA 改变汞组织分布应进一步研究。

关键词: 汞; N-乙酰半胱氨酸; α -硫辛酸; 肾损伤

中图分类号: R135.13 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2006)02-0101-03

Experimental study on the effects of N-Acetyl-L-Cysteine and α -lipoic acid on acute injury of renal function caused by mercury

HE An-ning, XU Zhao-fa*, WANG Jia-jun, XU Bin, YANG Jing-hua, LI Jing

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

Abstract Thirty-two Wistar rats were randomly divided into four groups: control group, Hg group, N-Acetyl-L-Cysteine (NAC) pretreated group and α -lipoic acid (LA) pretreated group. The control rats were only subcutaneously injected of 0.9% sodium chloride; rats in Hg group were injected with HgCl_2 $9.2 \mu\text{mol/kg}$ subcutaneously. Other two groups' rats were pretreated with NAC 2 mmol/kg or LA 0.35 mmol/kg intraperitoneally respectively two hours before subcutaneous injection with HgCl_2 $9.2 \mu\text{mol/kg}$. 12 hour after the injection of HgCl_2 , the rats were moved to the metabolic cages for 12 hour urine collection. At the 48th hour after injection of HgCl_2 , the rats were sacrificed and collected the blood and renal cortex for the measurement of the urinary activities of alkaline phosphatase (ALP), lactatedehydrogenase (LDH), N-Acetyl α -D-Glucosaminidase (NAG), the urinary level of protein, the serum level of urea nitrogen (BUN) and the Hg content in urine and renal cortex. Result showed that compared with the controls, the contents of Hg in urine and renal cortex, the activities of urinary ALP, LDH, NAG, the contents of urinary protein and BUN in Hg group were all increased significantly; the contents of Hg in urine and renal cortex in NAC pretreated group were also obviously rose as well as the renal Hg level in LA pretreated group. While compared with Hg group, the Hg level of renal cortex in rats of LA pretreated group was significantly increased and the urinary Hg obviously decreased; and the activities of urinary ALP, LDH, NAG, the contents of urinary protein and BUN were all declined evidently in both groups pretreated with NAC or LA. Both pretreatment with NAC or LA all have some protective effect against the acute nephrotoxicity of mercury.

Key words: Mercury (Hg); N-Acetyl-L-Cysteine (NAC); α -Lipoic acid (LA); Renal damage

目前, 无机汞的肾损伤分子机制尚未完全阐明, 有人认为无机汞所致肾损伤与氧化应激有关。N-乙酰半胱氨酸 (N-acetyl-L-cysteine, NAC) 具有抗氧化作用, 通过与 ROS (如 $\text{OH}^\cdot$ 和 H_2O_2) 的相互作用作为自由基的清除剂^[1], 还可以协助肝细胞合成谷胱甘肽, 增加细胞内谷胱甘肽浓度。 α -硫辛酸 (α -lipoic acid, LA) 是代谢性抗氧化剂, 与其代谢产物二氢硫辛酸联合可清除生物体内多种活性氧^[2], 并能够吸收进入细胞内与重金属结合。本研究旨在观察 NAC 和 LA 两种抗氧化物质对氯化汞所致急性肾损伤的干预作用。

1 材料与方法

1.1 动物分组及染毒

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 $(190 \pm 10) \text{ g}$, 雌雄各半。正式实验前适应性喂饲 1 周, 按体重随机分成 4 组, 每组 8 只。第 1 组为对照组, 第 2 组为单纯染汞组, 第 3、4 组为 NAC 和 LA 干预组。第 1、2 组腹腔注射生理盐水, 第 3、4 组分别腹腔注射 NAC 溶液 2 mmol/kg 、LA 溶液 0.35 mmol/kg , 2 h 后, 第 1 组皮下注射生理盐水, 其余 3 组皮下注射 HgCl_2 溶液 $9.2 \mu\text{mol/kg}$ 。注射容量均为 5 ml/kg 。染毒后 12 h 将大鼠移至代谢笼中收集尿样, 染毒后 48 h 乙醚麻醉, 腹主动脉取血, 切取肾脏, 剥离肾皮质, 制备 10% 的组织匀浆。

1.2 测定指标和方法

尿汞、肾皮质汞的测定用冷原子吸收法^[3], 测定尿 ALP

收稿日期: 2005-07-05; 修回日期: 2005-10-10

作者简介: 贺安宁 (1978-), 女, 博士, 研究方向: 重金属中毒与防治机制。

*: 通讯作者, 教授, 博士生导师。

用金氏法^[4], 尿 LDH 用 2,4-二硝基苯肼比色法^[5], 尿 NAG 用发色底物法 (上海太阳生物技术公司、上海太阳医疗器械有限公司), 尿总蛋白用考马斯亮蓝法^[6], 尿肌酐用苦味酸比色法^[7], 血清尿素氮的测定用二乙酰-胍法^[8]。

1.3 统计分析

实验所得数据以平均值±标准差表示。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 (Student-Newman-Keuls)。

2 结果

2.1 尿、肾皮质汞含量变化

单纯染汞组尿汞、肾皮质汞含量显著高于对照组 ($P<0.01$), NAC 干预组尿汞、肾皮质汞含量与染汞组差异无显著性; LA 干预组尿汞含量显著低于单纯染汞组和 NAC 干预组 ($P<0.01$), 肾皮质汞含量显著高于单纯染汞组和 NAC 干预组 ($P<0.05$, $P<0.01$)。见表 1。

2.2 尿 ALP、LDH、NAG 活性和尿蛋白、BUN 含量变化

单纯染汞组尿 ALP、LDH、NAG 活性和尿蛋白、BUN 含量均显著高于对照组 ($P<0.01$), NAC 和 LA 干预组尿 ALP、LDH、NAG 活性和尿蛋白、BUN 含量显著低于单纯染汞组 ($P<0.01$)。见表 1。

表 1 4 组各项实验指标测定结果 ($\bar{x}\pm s$)

组别	尿汞 ($\mu\text{mol/g Cr}$)	肾皮质汞 ($\mu\text{g/g tissue}$)	尿 ALP (U/g Cr)	尿 LDH (U/g Cr)	尿 NAG (U/g Cr)	尿蛋白 (mg/g Cr)	BUN (mmol/L)
对照组	2.42±1.77	2.04±0.27	31.35±10.17	0.74±0.34	11.19±3.71	0.40±0.20	6.69±0.91
单纯染汞组	32.51±12.70▲▲	106.23±24.30▲▲	507.00±149.55▲▲	123.14±52.20▲▲	143.27±47.40▲▲	4.86±1.76▲▲	32.23±14.32▲▲
NAC 干预组	33.81±14.96▲▲	94.92±24.04▲▲	75.87±32.04**	11.41±4.22**	23.54±6.37**	1.34±0.41**	7.09±1.62**
LA 干预组	13.23±9.77***##	134.49±29.22▲▲*##	63.36±20.45**	7.56±2.33**	26.12±12.83**	0.93±0.28**	7.23±1.83**

与对照组比较, ▲ $P<0.05$ ▲▲ $P<0.01$; 与单纯染汞组比较, * $P<0.05$ ** $P<0.01$; 与 NAC 干预组比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$

3 讨论

汞及其化合物进入体内初期, 在体内各组织的分布大致平衡, 组织中的含量仅与该组织的血流量有关, 数小时后即开始向肾脏集中。尿汞量在低毒性剂量无机汞致急性肾期间与近曲小管乳头部损伤水平有关。本研究给大鼠皮下注射氯化汞溶液, 使汞的体负荷增加, 主要表现为尿汞、肾皮质汞含量明显增加。给予 NAC 2 mmol/kg 干预后, 尿汞、肾皮质汞含量显著高于对照组, 与单纯染汞组比较差异无显著性。可以看出, NAC 不影响肾皮质汞的蓄积量及尿汞排泄量。给予 LA 0.35 mmol/kg 干预后, 尿汞含量显著低于单纯染汞组, 肾皮质汞含量显著高于单纯染汞组。可以看出, LA 增加了肾皮质汞的蓄积量, 减少尿汞排泄量, 改变了汞的组织分布。其原因有待进一步探讨。

氯化汞暴露引起肾损伤, 早期主要是肾小管上皮细胞受损, 以致细胞内各种酶随尿排出。近端肾小管的刷状缘最先受到肾毒物损伤, Stoo 等指出刷状缘酶可作为敏感酶^[9]。肾损伤严重时, 细胞内乳酸脱氢酶的尿排出量和尿蛋白含量增加, 表明肾小管功能有明显障碍。尿酶中的 NAG 是细胞内酸性水解酶之一, 广泛存在于全身各组织器官, 而于肾皮质近曲小管上皮细胞的溶酶体内活性最高。当肾脏受到损害时, 特别是肾近曲小管受到损害时, 尿 NAG 活性可以明显升高^[10]。通过检测尿 NAG 活性可判断肾损害程度及治疗后恢复情况^[11]。研究显示尿酶中 NAG 在反映慢性职业性肾脏过量汞接触方面较其他指标更为敏感。目前用于检测汞造成的肾小管损伤的常用方法是测量尿酶的排出量^[12], 选择适当的尿酶谱有助于判断早期肾损伤的部位和程度。本实验显示, 单纯染汞组大鼠尿 ALP、LDH、NAG 活性均显著高于对照组, 给予 NAC 和 LA 干预后, 尿 ALP、LDH、NAG 活性显著低于单纯染汞组。两干预组比较尿酶活性差异无显著性。可见 NAC 和 LA 干预可显著减轻肾小管的损害, 从而减少尿酶的排出量。

大部分肾脏近曲小管功能性损害后, 肾近曲小管重吸收能力降低, 尿蛋白含量增加。BUN 高于正常时说明有效肾单位的 60%~70% 已受到损害。BUN 作为肾脏疾病晚期诊断指标有价值, 其增高程度与病情严重性成正比。本实验显示, 单纯染汞使大鼠尿蛋白、BUN 含量均显著高于对照组, 分别为对照组的 12.15 及 4.82 倍。给予 NAC 干预后, 尿蛋白、BUN 含量显著低于单纯染汞组, 分别为单纯染汞组的 0.28 及 0.22 倍。LA 干预后, 尿蛋白、BUN 含量分别为单纯染汞组的 0.19 及 0.22 倍。两干预组比较尿蛋白含量及 BUN 含量差异无显著性。由此可以看出, NAC 和 LA 干预显著减轻了氯化汞对肾脏近曲小管的损害, 对汞所致急性肾功能损伤有一定的保护作用。

参考文献:

[1] Aruoma OI, Halliwell B, Hoey BM, et al. The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide and hypochlorous acid [J]. Free Radic Biol Med, 1989, 6: 593-597.
[2] 黄涛, 黄开勋. α -硫辛酸的生物医学功能 [J]. 生命的化学, 2004, 24 (1): 58-60.
[3] 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.
[4] 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: 308-312.
[5] 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]. 南京: 江苏科学技术出版社, 1980. 237-239.
[6] 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.
[7] 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.

(下转第 118 页)

1.2 方法

1.2.1 现场调查与采样 从事混苯作业女工混苯接触水平(PC-STEL)采用GBZ/T160 42-2004方法在接触混苯车间分不同工种进行采样,以100 ml/min流量在劳动者工作时的呼吸带使用热解吸型活性炭管采样15 min,样品经热解吸后气相色谱仪测定。

1.2.2 彗星实验检测方法 单细胞凝胶电泳参照Singh等^[1]方法略加改进后进行,主要有以下步骤:(1)分离细胞,取静脉血10 ml,肝素抗凝,离心,分离出白细胞,用淋巴细胞分离液分离出淋巴细胞,用PBS调整细胞浓度为 $10^6 \sim 10^7$ 个/ml。(2)制片,在磨毛玻片两端(一端做平行对照)各铺200 μ l正常熔点琼脂糖(MPA),分别加上盖玻片,4℃冷凝,10 min后揭去盖玻片,取30 μ l细胞悬液与45 μ l低熔点琼脂糖(LMPA)混匀后铺于第一层琼脂上,加上盖玻片,4℃冷凝10 min^[2]。(3)裂解,揭去盖玻片,将胶板轻轻放入预冷的(用前加入体积分数为1%的Triton X-100)裂解液中,裂解至少1 h。(4)电泳,将胶板放入新配制的电泳缓冲液中,静置20 min,使DNA双链解螺旋,然后在25 V、300 mA条件下电泳20 min。(5)中和及染色,以0.4 mol/L Tris中和后,用碘化丙啶染色。(6)彗星图像分析,荧光显微镜(400倍)下观察,每片计数100个细胞。DNA损伤选用彗星尾部长度占总长的比例判断,阴性<5%,阳性5%~95%。以50~200 μ mol/L H₂O₂室温(12℃)培养正常人淋巴细胞1 h作为阳性对照。

1.2.3 统计学分析方法 淋巴细胞DNA损伤率的比较均采用 χ^2 检验,取 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 现场调查采样检测表明,该皮鞋厂接触混苯车间空气中主要以苯、甲苯、二甲苯为主,所有样品的浓度远低于国家卫生标准。见表1。

表1 混苯车间三苯浓度检测结果 mg/m³

毒物	样本数	$\bar{x} \pm s$	卫生标准
苯	10	0.56±0.27	10
甲苯	10	11.21±3.60	100
二甲苯	10	0.59±0.33	100

2.2 接触组与对照组淋巴细胞DNA损伤率的差异存在显著性($P<0.05$),见表2。

表2 接触组与对照组DNA损伤的检测结果

组别	人数	细胞数	DNA损伤细胞数	DNA损伤率(%)
接触组	35	3 500	206	5.89
对照组	20	2 000	86	4.30

$\chi^2=6.37, P<0.025$

3 讨论

工作场所和环境中的遗传毒物对人群健康的影响已经引起人们的广泛关注。职业苯暴露能够引起显著的DNA损伤(链断裂)^[3,4]。本次研究发现低于短间接接触容许浓度的苯暴露亦可引起显著的DNA损伤,说明目前的短间接接触容许水平和阈值可能并不是预防遗传毒性作用的安全剂量。

苯代谢物的遗传毒性可能是由于细胞色素P450 2E1和髓过氧化物酶将苯代谢为相关的毒性代谢产物所致。苯的毒性代谢物酚和对苯二酚首先通过CYP 2E1的催化作用被激活而引起骨髓毒性。甲苯可以减少血液和骨髓细胞中苯的毒性^[5],可能是抑制了CYP 2E1的代谢作用从而减少苯的代谢作用。但也有报道,苯与甲苯混合暴露的工人外周血淋巴细胞DNA损伤明显增加^[6],说明甲苯的损伤作用不可低估,甲苯的遗传毒性机制还有待进一步研究。苯及其代谢物不象电离辐射、氧化剂那样直接诱导DNA损伤,而是与DNA共价结合形成加合物^[7],在核酸内切酶的作用下进行切除修复,增加DNA的不稳定性,导致基因突变和染色体畸变^[8]。DNA损伤与肿瘤发生有一定的关系,由于单细胞凝胶电泳实验对低水平DNA损伤的分析极其敏感,所以可作为职业有害因素对健康影响的一项早期生物标志物加以开发利用。

参考文献

- [1] Singh NP, Meeoy MT, Tice RR, et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells [J]. Exp Cell Res 1988, 175: 184-191.
- [2] Visvardis EE, Tassiou AM, Piperakis SM, et al. Study of DNA damage induction and repair capacity of fresh and cryopreserved lymphocytes exposed to H₂O₂ and γ -irradiation with the alkaline comet assay [J]. Mut Res 1997, 383: 71-80.
- [3] Lam TH, Zhu CQ, Jiang CQ, et al. Lymphocyte DNA damage in elevator manufacturing workers in Guangzhou, China [J]. Mutat Res 2002, 515 (1-2): 147-157.
- [4] Zhu CQ, Lam TH, Jiang CQ, et al. Lymphocyte DNA damage in bus manufacturing workers [J]. Mutat Res 2001, 491 (1-2): 173-181.
- [5] Jingsheng T, Steffen L, Mikael S, et al. Benzene-induced genotoxicity in mice in vivo detected by alkaline comet assay: reduction by CYP2E1 inhibition [J]. Mut Res 1996, 368: 213-219.
- [6] 倪祖尧, 逢兵, 孟建峰, 等. 单细胞电泳检测接触苯、甲苯和二甲苯工人外周血细胞DNA损伤[J]. 卫生毒理学杂志, 1996, 10: 267-268.
- [7] 王登忠. 苯DNA加合物结构研究进展[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 1997, 15: 186-189.
- [8] 张建平. 单细胞凝胶电泳技术及应用[J]. 国外医学遗传学分册, 1997, 20: 231-234.

duced by industrial pollutants[J]. Br Ind Med, 1993, 50: 17-21.

- [11] 郭卫星, 王翔朴. 尿酶与重金属中毒性肾损害[J]. 职业医学, 1985, 12 (5): 39.

- [12] Zalups RK. Method for studying the in vivo accumulation of inorganic mercury in segments of the nephron in the kidneys of rats treated with mercuric chloride [J]. J Pharm Meth, 1991, 26: 89-104.

(上接第102页)

- [8] 王庸晋. 现代临床检验学[M]. 北京: 人民军医出版社, 2000. 324-325.

- [9] Stroo WE, Hook JB. Enzymes of renal origin in urine as indicators of nephrotoxicity [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 1977, 39: 423.

- [10] Cardenas A, Roels H, Bernard AM, et al. Markers of early renal change in-