cessation of silica inhalation [J]. Toxicological Sciences March 2006 90 (1): 188-197.

[2] Aufricht C. Heat shock protein 70 molecular superfamily [J]. Pediatr Nephrol 2005 20 (6): 707-713

[3] Massa C, Melani C, Colombo MP, Chiaperon and adjuvant activity of HSP 70 different natural killer requirement for cross priming of chaperoned and bystander antigens [J]. Cancer Res 2005 65 (17): 7942-7949

[4] Ito H, Sekimura K, Sasaki N, et al. Cytoprotective effects of heat shock protein 70 in bronchial epithelium against neurophil elastase induced cell injury [J]. Aterugi 2006 55 (7): 820-826

汞对大鼠肾线粒体膜流动性的影响

Effect of mercury exposure on membrane fluidity of renal mitochondria in rats

高健, 徐兆发*, 田智, 刘海军, 田雅文, 徐斌

GAO Jian, XU Zhao-fa*, TIAN Zhi, LIU Hai-jun, TIAN Ya-wen, XU Bin

(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: 将 24 只大鼠随机分成对照组、染汞组、N-乙酰半胱氨酸 (NAC) 预处理组。对照组、染汞组大鼠腹腔注射生理盐水, NAC 预处理组腹腔注射 4 mmol/kg NaCl 2 h 后对照组皮下注射生理盐水, 染汞组、NAC 预处理组皮下注射 18.4 μmol/kg HgCl₂。注射 24 h 后处死大鼠, 测定丙二醛 (MDA) 含量, Ca²⁺-ATP 酶、磷脂酶 A₂ (PLA₂) 活力和线粒体膜流动性。与对照组相比, 染汞组 MDA 含量和 PLA₂ 活力显著升高 (P < 0.05, P < 0.01), Ca²⁺-ATP 酶活力和线粒体膜流动性显著降低 (P < 0.05); 与染汞组相比, NAC 预处理组 MDA 含量和 PLA₂ 活力显著降低 (P < 0.05, P < 0.01), 线粒体膜流动性显著升高 (P < 0.01)。NAC 预处理在某种程度上能预防汞导致的大鼠肾线粒体膜流动性的降低。

关键词: 汞; N-乙酰半胱氨酸 (NAC); 膜流动性

中图分类号: R135.13 **文献标识码:** B

文章编号: 1002-221X(2010)02-0118-02

汞是一种以多种形式广泛分布于环境中的有毒重金属, 对人和动物健康有极大的危害^[1]。目前已有研究表明汞可引起肾、肝、脑、睾丸及血液等系统的毒性, 并且具有致癌、致畸、致突变作用。肾脏是氯化汞 (HgCl₂) 排泄、蓄积和毒性作用的主要器官。汞的毒理学机制至今还未完全阐明, 研究表明其很可能与线粒体的结构和功能异常有关。汞具有极强的与巯基分子结合的能力和亲电性, 可抑制线粒体的呼吸功能, 引起细胞凋亡。N-乙酰半胱氨酸 (N-acetylcysteine, NAC) 极易进入细胞内, 为一种巯基供给剂。同时, 它还具有抗氧化作用, 通过与自由基的相互作用清除自由基^[2]。本实验通过大鼠急性汞染毒并用 NAC 预处理, 研究汞对大鼠肾皮质线粒体的影响, 为阐明汞的毒性机制和汞中毒的治疗提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 动物分组、染毒及线粒体分离

收稿日期: 2009-07-22 修回日期: 2009-12-28

作者简介: 高健 (1983-) 女, 在读硕士研究生, 主要从事环境毒理学研究。

* 通讯作者, 教授, 博士生导师。

中国医科大学实验动物中心提供的实验用 Wistar 大鼠 24 只, 体重 (200 ± 10) g, 雌雄各半。正式实验前饲养 1 周, 按体重随机分成 3 组, 对照组、染汞组、NAC 预处理组。对照组、染汞组大鼠腹腔注射生理盐水, NAC 预处理组腹腔注射 4 mmol/kg NaCl 2 h 后对照组皮下注射生理盐水, 染汞组、NAC 预处理组皮下注射 18.4 μmol/kg HgCl₂ 溶液; 注射容量均为 5 ml/kg。注射 24 h 后, 剪心脏放血处死大鼠, 取肾皮质, 梯度离心得线粒体^[3], 以上操作均在 4℃ 下进行。

1.2 测定指标及方法

丙二醛 (MDA) 含量用硫代巴比妥酸比色法^[4], Ca²⁺-ATP 酶活力、磷脂酶 A₂ (PLA₂) 活力、线粒体膜流动性分别采用文献 [5~7] 介绍的方法进行测定, 蛋白含量用 Lowry 法^[8]测定。

1.3 统计学分析

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, 两两间比较用 Q 检验 (Student-Newman-Keuls, SNK)。

2 结果

2.1 大鼠肾皮质线粒体 MDA 含量、Ca²⁺-ATP 酶和 PLA₂ 活力

从表 1 可见, 与对照组相比, 染汞组 MDA 含量显著升高 (P < 0.05), Ca²⁺-ATP 酶活力显著降低 (P < 0.05), PLA₂ 酶活力显著升高 (P < 0.01); 与染汞组相比, NAC 预处理组 MDA 含量显著降低 (P < 0.05), Ca²⁺-ATP 酶活力没有明显改变, PLA₂ 活力显著降低 (P < 0.01)。

表 1 各组大鼠肾皮质线粒体 MDA 含量、Ca²⁺-ATP 酶和 PLA₂ 活力 (n = 8, $\bar{x} \pm s$)

分组	MDA 含量 (nmol/mg Pro)	Ca ²⁺ -ATP 酶活力 [μmol/(mg·h)]	PLA ₂ 活力 (U)
对照组	12.89 ± 1.77	0.60 ± 0.11	35.42 ± 3.86
染汞组	15.18 ± 2.05*	0.46 ± 0.14*	43.75 ± 6.68**
NAC 预处理组	12.95 ± 1.75 [△]	0.47 ± 0.14	35.94 ± 4.95 ^{△△}

注: 与对照组相比, * P < 0.05, ** P < 0.01; 与染汞组比较, [△] P < 0.05, ^{△△} P < 0.01, 表 2 同。

2.2 大鼠肾皮质线粒体膜偏振度 P 值和膜粘滞系数 (η)

从表 2 可见, 与对照组比, 染汞组偏振度 P 值显著升高

($P < 0.05$)，膜粘滞系数 (η) 显著升高 ($P < 0.01$)；与染汞组比，NAC预处理组偏振度 P 值显著降低 ($P < 0.01$)，膜粘滞系数 (η) 显著降低 ($P < 0.01$)。 P 值、 η 值升高，提示线粒体膜流动性降低。

表 2 各组大鼠肾皮质线粒体偏振度 P 值和膜粘滞系数 η 值 ($n=8$ $\bar{x} \pm s$)

分组	P 值	$\bar{\eta}$ 值
对照组	0.27 ± 0.02	2.86 ± 0.48
染汞组	0.29 ± 0.01*	3.39 ± 0.33**
NAC预处理组	0.27 ± 0.01 ^{△△}	2.79 ± 0.24**

3 讨论

脂质过氧化是机体接触毒物后最早出现的直接损害之一，是毒物作用于机体所启动的初级作用。本研究发现， $HgCl_2$ 导致 MDA 含量显著升高。这可能是因为 $HgCl_2$ 进入体内后，经过一系列的反应损伤体内自由基清除系统^[9]，并产生大量的自由基^[10]；同时，由于线粒体膜富含多不饱和脂肪酸，对氧自由基损害高度敏感，极易发生脂质过氧化链式反应，从而使膜脂质氧化形成大量 MDA，破坏膜的稳定性和完整性。

Ca^{2+} -ATPase 可主动地将 Ca^{2+} 从胞浆摄入线粒体基质内。本研究发现， $HgCl_2$ 导致 Ca^{2+} -ATPase 活力显著降低，这使线粒体对胞浆内 Ca^{2+} 的摄取能力降低，细胞内游离 Ca^{2+} 水平增多^[11]，使胞内多种酶降解，破坏细胞骨架^[2]，还可激活 PLA_2 。 PLA_2 位于线粒体内外膜之间，参与线粒体磷脂的脱酰化和再酰化过程，以维持线粒体磷脂构成和含量的动态平衡。本研究发现， $HgCl_2$ 导致 PLA_2 活力显著升高，这可能是因为 $HgCl_2$ 进入体内后产生大量的自由基和发生的脂质过氧化作用激活了 PLA_2 ^[13-14]，导致膜磷脂降解，磷脂含量降低，多不饱和脂肪酸丢失，膜上脂肪酸链缩短，线粒体膜流动性下降，僵硬度上升。

线粒体膜的流动性是膜组分（膜脂、膜酶、膜蛋白等）分子运动和分子间相互作用的综合效应，线粒体膜的功能与膜的流动性密切相关。本研究表明， $HgCl_2$ 可造成线粒体膜流动性显著降低。一方面，增加的自由基破坏膜脂质，减少了多不饱和脂肪酸链的长度，导致线粒体膜流动性降低；另一方面，MDA 的两个功能基可与线粒体的脂膜、膜蛋白交联，形成希夫氏碱，从而增加膜的刚性；同时，膜脂质过氧化程度增加会导致膜结构紊乱，膜有序性下降，这会影响到膜蛋白构象的改变，而这种变化也会对膜的流动性产生影响。另外， PLA_2 活力升高也可导致线粒体膜流动性下降。因为线粒体的内膜上镶嵌着各种功能的酶，所以膜流动性降低将抑制膜酶系统，损害膜受体功能，使其不能正常发挥作用，进而抑制了线粒体的呼吸功能^[15]，影响能量代谢。

NAC 常常被用来辅助研究自由基在体内外的生物化学作用，具有较强的抗氧化损伤的作用^[16]。本实验用 NAC 预处理后，MDA 含量和 PLA_2 活力降低，线粒体膜流动性升高，这可能是因为 NAC 通过清除自由基，减轻 $HgCl_2$ 对线粒体的氧化损伤，也可能是因为它与 $HgCl_2$ 整合而降低汞的毒性，但主要原因还需进一步探究。NAC 预处理后， Ca^{2+} -ATPase 活力

没有显著升高，这可能是因为经过体内代谢，进入机体内的汞与 NAC 整合形成复合物，而这种复合物有可能会对 Ca^{2+} -ATPase 的活力产生影响。综上所述，NAC 对汞所致大鼠肾皮质线粒体膜流动性的降低有一定的保护作用。

参考文献:

- [1] Bhan A, Sarkar N N. Mercury in the environment: effect on health and reproduction [J]. Rev Environ Health, 2005, 20 (1): 39-56
- [2] Koba A B, Horvat M, Prezelj M, et al. The impact of long-term past exposure to elemental mercury on antioxidant capacity and lipid peroxidation in mercury miners [J]. J Trace Elem Med Biol, 2004, 17 (4): 261-274.
- [3] Santos A C, Uyemura S A, Santos N A. Hg (II) - induced renal cytotoxicity: in vitro and in vivo implications for the bioenergetic and oxidative status of mitochondria [J]. Mol Cell Biochem, 1997, 177 (1-2): 53-59
- [4] Zhang S, Fu J, Zhou Z. In vitro effect of manganese chloride exposure on reactive oxygen species generation and respiratory chain complexes activities of mitochondria isolated from rat brain [J]. Toxicol In Vitro, 2004, 18 (1): 71-77.
- [5] 陈传义, 彭仁, 王秀, 等. 七氟醚麻醉对大鼠脑 ATP 酶的动态影响 [J]. 中华实验外科杂志, 2004, 8: 972-974
- [6] 陈思锋, 吴中立. 体液和组织磷脂酶 A_2 简便快速测定法 [J]. 第二军医大学学报, 1989, 10 (3): 254-256
- [7] 聂松青, 薄惠卿, 林克椿. 蜂王精对大鼠红细胞膜流动性的影响 [J]. 北京医学院学报, 1983, 15 (4): 249-252
- [8] Lowry O H, Rosenbrough N J, Farr A L, et al. Protein measurement with the Folin Phenol reagent [J]. Biol Chem, 1951, 193 (1): 265.
- [9] Ghosh A, Sil P C. A protein from *Cajanus indicus* Spreng protects liver and kidney against mercuric chloride-induced oxidative stress [J]. Biol Pharm Bull, 2008, 31 (9): 1651-1658.
- [10] Lasarvia M, Zeffirino R, Piccoli C, et al. Promoter effect induced by $HgCl_2$ by studying the intercellular communication [J]. G Ital Med Lav Ergon, 2007, 29 (3): 542-544
- [11] Trump B F, Beresford I K. Calcium-mediated cell injury and cell death [J]. FASEB J, 1995, 9 (2): 212-228.
- [12] Boya P, Roques B, Kroemer G. New EMBO members' review: viral and bacterial proteins regulating apoptosis at the mitochondrial level [J]. EMBO J, 2001, 20 (16): 4325-4331
- [13] Mathisen G H, Thorkildsen I H, Paulsen R E. Secretory PLA_2 -IIA and ROS generation in peripheral mitochondria are critical for neuronal death [J]. Brain Res, 2007, 1153: 43-51
- [14] Caro A A, Cedeñam A J. Role of intracellular calcium and phospholipase A_2 in arachidonic acid-induced toxicity in liver cells overexpressing CYP2E1 [J]. Arch Biochem Biophys, 2007, 457 (2): 252-263
- [15] Sun D, Gilboe D D. Ischemia-induced changes in cerebral mitochondrial free fatty acids, phospholipids and respiration in the rat [J]. J Neurochem, 1994, 62 (5): 1921-1928.
- [16] Hildebrandt W, Hamann A, Krakowski R H, et al. Effect of thiol antioxidant on body fat and insulin reactivity [J]. J Mol Med, 2004, 82 (5): 336-344