

# 镉中毒肝脏过氧化氢( $H_2O_2$ ) 定位及抗氧化系统的变化

南京军区军事医学研究所(南京 210002) 金慧英 李法卿 谭维国 陈华标 房德兴 李素芹

**提要** 为探讨急性镉中毒后自由基产生和损伤的部位及机理,给予大鼠尾静脉注射氯化镉建立急性镉中毒模型,电镜观察自由基过氧化氢( $H_2O_2$ )的定位及细胞损伤,并测定抗氧化酶和氧化剂的变化。结果表明: $H_2O_2$ - $CeCl_3$ 的阳性颗粒沉积在肝细胞膜上,最早出现在中毒后 1h,3h 最严重,24h 消失;抗氧化酶活力受抑,以 3h 最严重( $p < 0.01$ ),6h 后渐渐恢复;而 GSH 的含量在 3h 前均高于正常( $p < 0.05$ ),以后逐步减少。提示自由基是急性镉中毒所致肝脏损伤的重要因素。

**关键词** 镉中毒 自由基 抗氧化系统

## Study on Hydrogen Peroxide( $H_2O_2$ ) Localization and Antioxidative System Changes of Hepatocytes After Cadmium-exposure

Jin Huiying, et al. Institute of Military Medicine of Nanjing Command (Nanjing 210002)

To study the localization and mechanism of free radical production and injury by cadmium, we set up the toxic model by intravenous injecting cadmium chloride into rats. Then injury of hepatocytes and free radical( $H_2O_2$ ) localization were studied by electron microscopy, and contents of antioxidation were determined. Results Showed  $H_2O_2$ - $CeCl_3$  positive precipitation on outer plasma membrane of hepatocytes first appeared at 1h after cadmium-exposure, increased obviously at 3h and disappeared at 24h. Activities of antioxidase decreased clearly and with the serious in 3h ( $p < 0.01$ ), recovered progressively in 6h. But GSH content increased obviously before 3h ( $p < 0.05$ ), and decreased step by step. Conclusion: Free radical production is the important factor on injury of hepatocytes after cadmium-exposure.

**Key words** Cadmium toxication Free radical Antioxidative system

镉是环境中普遍存在的有毒重金属,它在工业产品的生产和使用中环境的污染日见严重,因而有关镉中毒的机理研究正受到广泛关注。有研究表明自由基是镉导致的组织损伤的关键因素<sup>[1]</sup>,但对自由基的产生和作用的部位尚无明确结论。过氧化氢( $H_2O_2$ )和超氧阴离子及羟自由基等均为体内起主要损害作用的自由基。为了解急性镉中毒后肝脏自由基损伤的机理,本文以大鼠为实验对象,采用电镜技术探讨镉中毒时 $H_2O_2$ 的定位;以及与 $H_2O_2$ 产生和清除有关的过氧化酶(超氧化物歧化酶-SOD、谷胱甘肽过氧化物酶-GSHpx、过氧化氢酶-CAT)及抗氧化剂谷胱甘肽(GSH)的变化,为镉中毒的自由基损伤机制提供依据。

### 1 材料和方法

1.1 动物 雄性健康 Sprague-Dawley(SD)大鼠,240~300g,上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供。

1.2 试剂和仪器 三羟甲基氨基甲烷、胆酸钠(E. M. K 公司,德国);二硫二硝基苯甲酸(DTNB)、还原型谷胱甘肽(GSH)

(Fluka 公司,德国);其余试剂均为国产分析纯。Hiachi himic CR21 低温高速离心机、Hitachi 800 透射电镜(日立公司,日本);721 分光光度计(上海第三分析仪器厂)。

### 1.3 方法

1.3.1 大鼠镉中毒模型的建立和取材 40 只 SD 大鼠随机分为 5 组,实验前自由进食和水。1 组为对照组,尾静脉注射生理盐水。其余 4 组为实验组,按 2.5mg  $Cd^{2+}$ /kg 体重剂量尾静脉注射氯化镉( $CdCl_2$ ),于注射后 1h、3h、6h、24h 处死,取无血肝组织匀浆,离心,取上清测定 SOD、GSHpx、CAT 和 GSH。

1.3.2  $H_2O_2$  的电镜细胞化学定位(氯化亚铈  $CeCl_3$  法) 大鼠肝门静脉灌注  $CeCl_3$  平衡液及戊二醛固定液,取肝细胞切成  $1mm^3$  小块,经常规固定、脱水包埋后切片,铅铀染色,电镜观察。

1.3.3 各项指标的测定 SOD 活力测定用邻苯三酚自氧化反应终止法<sup>[2]</sup>,结果以酶活力单位 u/mg 蛋白表示。GSHpx 活力测定用催化 GSH 氧化法<sup>[3]</sup>,以 37℃ 每分钟催化  $1\mu mol/L$  GSH 氧化所需的酶量为 1 个 GSHpx 活力单位,结果以 GSHpx 活力单位 u/g 蛋白表示。CAT 活力测定用比色法<sup>[4]</sup>,结果以 CAT 活力 K/mg 蛋白表示。GSH 测定采用 DTNB 法<sup>[5]</sup>。蛋白含量测定用染料法。

1.4 统计学方法 结果以  $\bar{X} \pm S$  表示,采用 t 检验比较组与组间的差异。

### 2 结果

2.1 镉中毒后自由基( $H_2O_2$ )电镜细胞化学定位  $CeCl_3$ - $H_2O_2$  阳性沉积物在中毒后 1h 开始出现,分布在内皮细胞、Kupffer's 细胞膜上,少见直接暴露于血窦的肝细胞膜上,沉淀呈点状分布(图 1)。在中毒后 3h,可见大量  $CeCl_3$ - $H_2O_2$  阳性沉淀沿肝细胞游离端细胞膜和内皮细胞膜连续分布(图 2)。中毒后 6h,仍可见肝细胞膜表面有  $CeCl_3$ - $H_2O_2$  沉淀,但已大为减少(图 3)。中毒后 24h,虽然细胞已大量破碎,但未见  $CeCl_3$ - $H_2O_2$  沉淀颗粒(图 4)。

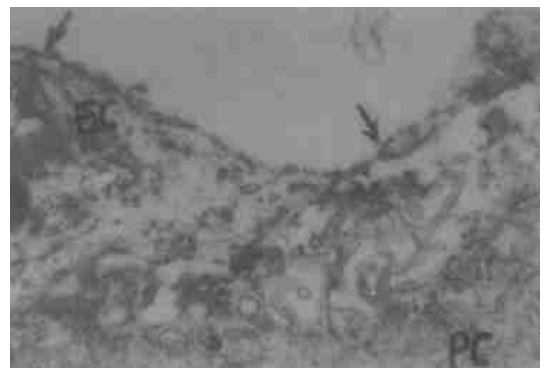


图 1 镉中毒后 1h

ER 扩张,核糖体已大部脱落,线粒体轻度肿胀;可见少量  $Ce$  呈点状沉积在肝实质细胞(PC)、内皮细胞(EC)膜上  $\times 12000$

表 1 急性镉中毒后大鼠肝脏各项指标的变化

	SOD (u/mg prot.)	GSHpx (u/g prot.)	CAT (K/mg prot.)	GSH (μmol/mg prot.)
对照组	225.70±18.37	140.10±21.50	291.73±11.99	0.911±0.103
1h	165.71±12.23*	42.10±16.87**	182.32±38.06**	1.438±0.201**
3h	152.44±19.07*	43.14±11.67**	105.30±14.82**	1.056±0.118
6h	216.53±23.47	90.36±21.05*	163.05±14.00**	0.860±0.153
24h	211.17±13.99	106.53±21.86*	164.56±22.54**	0.747±0.121

\* P &lt; 0.05, \*\* P &lt; 0.01, n = 8

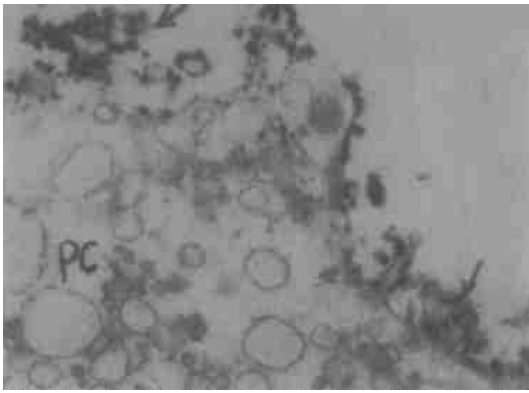


图 2 镉中毒后 3h

ER 扩张, 线粒体膨胀, 内外膜模糊不清; 见大量 Ce 沉积在肝实质细胞(PC)、内皮细胞(EC)和 Kupffer's 细胞膜上 × 15000

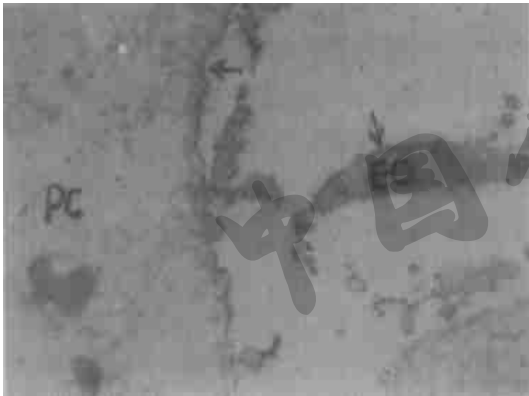


图 3 镉中毒后 6h

处于不可逆改变状态的肝细胞胞浆清亮, 少有细胞器; 仍可见少量 Ce 沉淀在肝细胞和内皮细胞膜上 × 5500

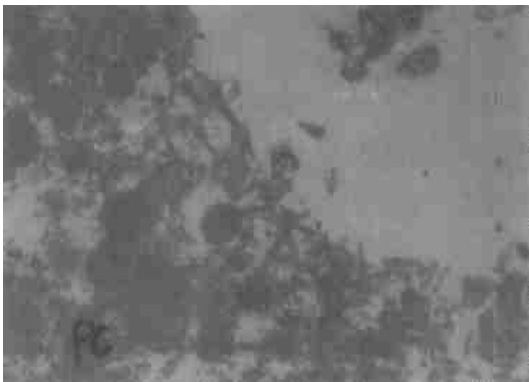


图 4 镉中毒后 24h

可见破碎的肝细胞, 胞内膜结构大多已不清晰; 未见 Ce 的沉积 × 7000

2.2 镉中毒后大鼠肝脏抗氧化酶和 GSH 水平的变化 在所有观察时间内, 中毒组的 GSHpx 和 CAT 的活力均显著低于正常对照组 ( $p < 0.05$ ), 3h 活力最低, 6h 后有所恢复; SOD 活力在 3h 内显著低于对照组 ( $p < 0.05$ ), 6h 时已恢复至正常的 96%, 24h 恢复正常。而 GSH 在 3h 前明显高于正常组, 3h 后逐步下降(表 1)。

### 3 讨论

上述结果提示, 急性镉中毒严重抑制抗氧化酶(SOD、GSHpx、CAT)的活力, 镉造成抗氧化酶活力抑制的机理可能是镉与这些金属依赖酶中的金属发生竞争性替代作用, 改变了酶的活力。Hussain<sup>[6]</sup>曾报道, 镉可通过竞争置换 SOD 中的金属锌而影响 SOD 的活力, Weisiger 通过凝胶层析发现有 5% 的镉与分子量 34000Da 的蛋白结合, 而这些与铜/锌 SOD 的分子量相符。镉还可与硒、铁等金属作用, 影响含硒的 GSHpx 和含铁的 CAT 的活力。抗氧化酶是体内主要清除自由基的酶, 抗氧化酶活力降低提示肝脏清除自由基的能力减低, 即 SOD 对超氧阴离子的清除、CAT 清除 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、GSHpx 清除 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 及脂质过氧化物能力均明显受抑, 同时实验结果显示, 自由基 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 主要定位和作用于肝脏内皮细胞膜、肝细胞膜及 Kupffer's 细胞上, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用于膜的不饱和脂肪酸, 造成脂质过氧化, 引起细胞损伤。而 GSH 的含量变化与酶活力变化正相反, 说明在中毒最初的 3h GSH 主要起保护细胞和减轻氧化损伤的作用, 与文献报道一致<sup>[7]</sup>。

综上所述, 急性镉中毒后, 氧自由基的产生和消失与抗氧化酶的活力变化和抗氧化剂的变化彼此有着密切的消长时相关系, 非致死剂量的镉中毒早期即可造成肝细胞的损伤, 这种损伤表现在肝组织的抗氧化酶活力受抑, 自由基 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度升高, 膜破碎和细胞溶解。

### 参 考 文 献

1. 王夔. 生命科学中的微量元素. 北京: 中国计量出版社, 1992: 191
2. 静天玉, 赵晓瑜. 用终止剂改进超氧化物歧化酶邻苯三酚测活法. 生物化学与生物物理进展 1995; 22: 84
3. 唐琴华, 等. 血清谷胱甘肽过氧化物酶比色测定法. 临床检验杂志 1993; 11: 124
4. 雷柏平, 等. 过氧化氢酶活性的比色测定法. 临床检验杂志 1993; 11: 73
5. Ellman G L. Tissue sulphhydryl groups. Arch. Biochem. Biophys 1959; 82: 70
6. Hussain T, et al. Effect of cadmium on superoxide dismutase and lipid peroxidation in liver and kidney of grow rats: In vivo and in vitro studies. Pharmacology and Toxicology 1987; 60: 355
7. Chin TA and Templeton DM. Protective elevations of glutathione and metallothionein in cadmium-exposed mesangial cells. Toxicology 1993; 77: 145

(1999-01-16 收稿 1999-03-01 修回 李溪莹编辑 宋艳萍校对)