文章编号:1000-5404(2010)04-0311-04

论著

金属硫蛋白和锌对急性贫铀中毒大鼠的解毒效果研究

任 洞,李 蓉,刘 晶,陈世国,邹德兴,郝玉徽,粟永萍 (400038 重庆,第三军医大学军事预防医学院全军复合伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室)

[摘要] **目的** 探索金属硫蛋白和锌对急性贫铀中毒的解毒效果。**方法** 给予 Wistar 大鼠贫铀溶液造成急性贫铀中毒的动物模型,利用 $ZnSO_4$ 和金属硫蛋白(metallothionein,MT)解毒。Wistar 大鼠 70 只,随机分为 7 组,每组 10 只:①正常组(N);②贫铀组(DU);③$ZnSO_4$ 预防组(Zn-P);④MT 预防组(MT-P);⑤$ZnSO_4$ 治疗组(Zn-T);⑥MT 治疗组(MT-T);⑦$ZnSO_4$ 预防 + MT 治疗组(Zn + MT)。测定血、尿和肾脏标本的铀含量。观察内/外源性的 MT 作用对大鼠急性贫铀中毒的解毒效果,同时观察不同解毒措施对血常规和肝、肾功能的影响以及肾脏病理学变化。**结果** Zn 预防组、MT 预防组和 MT 治疗组均有明显的解毒效果[肾脏和尿液中贫铀含量明显增高($P<0.05$)],其中又以 Zn 预防组的解毒效果最好,病理变化较轻。同时发现在使用 MT 或 Zn 进行干预的各个干预组中,没有表现出明显的血常规和肝、肾功能指标的改变。**结论** 预防性给予 $ZnSO_4$ 诱导产生内源性金属硫蛋白,能更好发挥对贫铀中毒的解毒效果。

[关键词] 金属硫蛋白;锌;贫铀;解毒
[中图法分类号] R818.03;R818.05;R979.6 **[文献标志码]** A

Detoxifying effect of metallothionein and zinc on acute depleted uranium poisoning in rats

Ren Jiong, Li Rong, Liu Jing, Chen Shi-guo, Zou De-xing, Hao Yu-hui, Su Yong-ping (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Combined Injury, College of Military Preventive Medicine, Third Military Medical University; Chongqing, 400038, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of the metallothionein (MT) and zinc, as chelating antidotes on depleted uranium acute poisoning. **Methods** Totally 70 healthy adult Wistar rats were divided into 7 groups: ① Normal group (N); ②Depleted uranium (DU); ③ $ZnSO_4$ prevention group (Zn-P); ④ MT prevention group (MT-P); ⑤ $ZnSO_4$ treatment group (Zn-T); ⑥ MT treatment group (MT-T); ⑦ $ZnSO_4$ prevention + MT treatment group (Zn + MT). Rat model of acute depleted uranium poisoning was induced by a depleted uranium solution. In prevention group, $ZnSO_4$ solution at 20 mg · kg^{-1} · d^{-1} or MT solution at 5 mg · kg^{-1} · d^{-1} was injected intraperitoneally to correponding rats for 2 d, and then those rats were established to model of model of acute depleted uranium poisoning. While for the rats of treatment groups, $ZnSO_4$ solution or MT solution at above doses were given to depleted uranium acute poisoning rats for 3 d. All the animals were sacrificed to take blood, kidney and liver samples on the 5th day after injection of DU. The effects of detoxication of MT and Zn to DU were observed by testing blood routine, liver and kidney function and renal pathological changes. **Results** Different intervention measures had a certain detoxifying effect, especially $ZnSO_4$-induced generation of MT *in vivo*, resulting in some slight pathological changes in kidney. No significant change was observed in parameters of blood routine tests and renal function in different intervention groups. **Conclusion** MT plays a role in detoxification of acute depleted uranium poisoning with no obvious side effects on liver and kidney.

[Key words] metallothionein; zinc; depleted uranium; detoxification

Supported by the Autonomic Research Program of State Key Lab oratory (SKLZZ200809). Corresponding author: Li Rong, Tel: 86-23-68771721, E-mail: lirongyl@sina.com

自 20 世纪 90 年代海湾战争以来,贫铀武器在战争中大量使用。战场上,贫铀(depleted uranium, DU)可通过呼吸道吸入、弹片嵌入、伤口污染等多种途径大量进入人体内[1];而铀等核燃料在国民经济中的大量

[基金项目] 国家重点实验室自主研究课题(SKLZZ200809)
[通信作者] 李 蓉,电话:(023)68771721,E-mail:lirongyl@sina.com

应用,也会产生大量贫铀废料,使贫铀环境污染的威胁增大,最终可能影响到普通居民的身体健康动物实验显示低剂量长期抵触也对机体的生殖功能具有毒性[2]。目前针对贫铀的常用促排剂效果有限,而且有造成机体酸碱平衡紊乱,形成低钾血症或加重铀对肾脏损伤[3,4]的危险。贫铀急性损伤早期主要是重金属毒性发挥作用,可以从重金属解毒方面考虑消除贫铀的急性损伤。金属硫蛋白(metallothionein,MT)是一类低分子量、高金属含量、富含半胱氨酸、功能独特的小分子蛋白质,广泛存在于生物界中[5]。本研究重点观察了MT和锌对急性贫铀中毒大鼠的解毒效果,为研究一种高效低毒的解毒剂提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 各类试剂的配备

贫铀溶液:将贫铀片(^{238}U占99.75%,^{235}U占0.2%及痕量^{234}U)用浓硝酸微热溶解,双蒸水稀释至2 mg/ml,小滤器过滤灭菌,4 ℃保存备用。$ZnSO_4$溶液:$ZnSO_4$购于Sigma公司,分析纯,用蒸馏水配制成2 mg/ml的溶液,小滤器过滤灭菌,4 ℃保存备用。MT溶液:MT粉剂购于湖南麓谷生物技术有限公司,用蒸馏水配制成1 mg/ml的溶液,使用时现配。

1.2 动物分组

取健康成年Wistar大鼠70只(由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供,SCXK 2002003),雌雄各半,体质量180~200 g,数字法分为7组,每组10只(含雄性5只和雌性5只)。①正常组(N):按5 ml/kg腹腔注射生理盐水,5 d后处死取标本;②贫铀组(DU):按10 mg/kg腹腔注射贫铀溶液,5 d后处死取标本;③$ZnSO_4$预防组(Zn-P),按20 mg/(kg·d)腹腔注射$ZnSO_4$溶液,给药2 d,后同DU组处理;④MT预防组(MT-P):按5 mg(kg·d)腹腔注射MT溶液,给药2 d,后同DU组处理;⑤$ZnSO_4$治疗组(Zn-T):注射贫铀溶液后立即按20 mg/(kg·d)腹腔注射$ZnSO_4$溶液,给药3 d后停止注射,第5天处死取标本;⑥MT治疗组(MT-T):注射贫铀溶液后立即按5 mg/(kg·d)腹腔注射MT溶液,给药3 d后停药,第5天处死取标本;⑦$ZnSO_4$预防+MT治疗组(Zn+MT):按20 mg/(kg·d)腹腔注射$ZnSO_4$溶液,给药1 d后注射DU溶液,随后立即按5 mg/(kg·d)腹腔注射MT溶液,注射DU溶液后第5天处死取标本。

1.3 样本收集和观察指标

1.3.1 样本收集 将大鼠置于代谢笼,每笼1只,自由饮水和进食,收集贫铀中毒后72 h尿液。贫铀中毒后5 d处死大鼠时从股静脉放血,收集血液样本,同时取肾脏样本。各类样本均按文献[5]的方法测定贫铀含量。血液样本测量血常规,并由临床生化自动检测仪(Hitachi-7150, Hitachi Inc, 上海)检测肝肾功能取肾脏作为贫铀敏感器官,做病理切片,HE染色显微镜下观察。

1.3.2 铀含量测定 将大鼠置于代谢笼,每笼1只,自由摄水和饮食,收集贫铀中毒后24、48、72 h尿液。贫铀中毒后5 d处死大鼠,同时取肾脏样本。各类样本均按文献[6]的方法测定贫铀含量。

1.3.3 肾功能检查 在贫铀中毒后5 d,从股静脉放血,由临床生化自动检测仪(Hitachi-7150, Hitachi Inc, 上海)检测肾功能,指标包括血清肌酐、尿素氮、Na^+、K^+、Cl^-浓度。

1.3.4 肝功能检查 在贫铀中毒后5 d,从股静脉放血,由临床生化自动检测仪(Hitachi-7150, Hitachi Inc, 上海)检测肝功能,指标包括总蛋白、白蛋白、球蛋白、白球比值、谷草转氨酶、谷丙转氨酶、谷氨酰转肽酶、总胆汁酸等。

1.3.5 血常规 在贫铀中毒后5 d,从股静脉放血,检测血常规。

1.3.6 病理形态学观察 取肾脏作为贫铀敏感器官,做病理切片,HE染色,显微镜下观察。

1.4 统计学分析

数据以$\bar{x} \pm s$表示,采用SPSS 12.0统计软件行单因素方差分析。

2 结果

2.1 铀含量测定

肾脏中,Zn-P组和MT-P组的铀含量较DU组显著增高$P<0.05$,Zn-T组、MT-T组和Zn+MT组的铀含量较DU组显著降低$P<0.05$。血液中,除Zn-T组外,其余经MT或Zn干预的各组的铀含量均较DU组有显著降低$P<0.05$。尿液中,Zn-P组、MT-P组、MT-T组的铀含量均较DU组有明显增高,Zn-P组增加的尤其明显$P<0.05$。提示在经MT或Zn干预的各组中,Zn-P组对贫铀的促排效果最好。见表1。

表1 各组大鼠肾脏、血液和尿液贫铀含量测定结果(ng/g,$\bar{x} \pm s$)

组别	肾脏	血液	尿液
N组	145.3±15.7	4.0±1.4	5.9±1.7
DU组	20 381.5±391.8	355.5±212.6	201.6±52.6
Zn-P组	26 347.3±3 244.9[a]	229.0±74.9[a]	325.1±65.5[a]
MT-P组	24 374.9±5 731.3[a]	231.8±86.1[a]	241.4±79.2[a]
Zn-T组	9 767.5±1 897.0[a]	452.7±11.7	216.7±3.0
MT-T组	18 632.5±2 346.7[a]	138.5±34.6[a]	264.3±57.0[a]
Zn+MT组	7 828.7±236.3[a]	148.6±30.4[a]	196.2±47.1

a:$P<0.05$,与DU组比较

2.2 血常规检测

注射了DU的各组外周血白细胞数量均显著高于正常对照组$P<0.05$,经MT或Zn干预的各组中仅有MT-T组高于DU组$P<0.05$,其余组无显著性差异$P<0.05$。外周血红细胞数量和血红蛋白浓度各组之间没有显著性差异$P<0.05$。注射了DU的各组血小板数量均低于正常对照组,但经MT或Zn干预的各组与DU组之间无显著性差异$P>0.05$。见表2。

表2 各组大鼠血常规检测结果($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

组别	WBC($\times10^9$/L)	RBC($\times10^{12}$/L)	HGB(g/L)	PLT($\times10^9$)
N组	5.28±2.05	7.72±0.7	139.30±40.53	2 053.90±680.50
DU组	8.64±3.29[b]	7.45±0.54	148.60±7.64	878.40±482.45[b]
Zn-P组	8.50±2.21[b]	7.23±1.12	151.80±22.62	669.60±312.44[b]
MT-P组	9.29±4.12[b]	7.59±0.54	151.56±10.21	1 063.11±395.97[b]
Zn-T组	10.12±2.66[b]	7.16±0.49	145.74±6.52	813.50±285.81[b]
MT-T组	12.28±4.02[ab]	7.46±0.50	155.57±10.85	888.29±181.28[b]
Zn+MT组	8.28±3.41[b]	7.06±1.14	141.75±22.41	1 085.88±393.44[b]

a:$P<0.05$,与DU组比较;b:$P<0.05$,与N组比较

表3 各组大鼠肾功能检测结果（$n=10$，$\bar{x}\pm s$）

组别	K^+(mmol/L)	Na^+(mmol/L)	Cl^-(mmol/L)	Creatinine (μmol/L)	BUN(mmol/L)
N组	6.41±0.80	143.91±1.36	108.21± 2.08	17.20± 5.61	7.71±1.38
DU组	7.55±1.35[b]	142.04±5.33	97.98±10.43[b]	257.20±130.03[b]	38.15±8.30[b]
Zn-P组	6.35±1.13	141.01±5.66	94.03±6.62[b]	24.51±3.20[ab]	7.14±1.23[ab]
MT-P组	6.08±1.74	141.78±2.35	93.63±6.18[b]	240.70±124.27[b]	47.26±14.44[b]
Zn-T组	6.32±1.54	137.44±4.84	96.29±4.27[b]	210.50±207.08[b]	34.16±21.59[b]
MT-T组	7.21±2.54	139.46±3.24	97.94±6.59[b]	201.00±129.31[b]	30.67±15.93[b]
Zn+MT组	6.94±0.34	143.67±2.60	95.00±3.49[b]	291.25±122.73[b]	48.49±16.72[b]

a：$P<0.05$，与DU组比较；b：$P<0.05$，与N组比较

表4 各组的大鼠肝功能检测结果（$n=10$，$\bar{x}\pm s$）

组别	总蛋白(g/L)	白蛋白/球蛋白比值	白蛋白(g/L)	AST(U/L)	ALT(U/L)	总胆汁酸(μmol/L)
N组	75.40±4.37	0.87±0.05	35.29±1.60	171.40±60.12	52.3±15.87	22.32±9.68
DU组	58.32±6.35[b]	0.82±0.05[b]	26.36±3.25[b]	210.20±37.09	61.60±11.15	19.12±11.27
Zn-P组	60.62±5.07[b]	0.94±0.13[a]	29.29±3.11[ab]	149.70±51.18[a]	48.50±15.84	27.67±5.14[a]
MT-P组	66.80±3.30[ab]	0.91±0.06[a]	31.35±1.87[ab]	182.60±147.68	42.50±17.97	29.32±9.06[a]
Zn-T组	65.11±5.55[ab]	0.78±0.08[b]	28.73±3.35[b]	144.50±35.77[a]	40.30±4.42	22.65±5.55
MT-T组	59.3±4.67[b]	0.72±0.04[ab]	30.67±6.68[b]	168.29±66.75	54.00±16.29	36.67±8.30[ab]
Zn+MT组	67.40±4.50[ab]	0.79±0.06[b]	29.26±1.95[ab]	141.00±32.73[a]	41.00±10.78	48.78±7.09[ab]

a：$P<0.05$，与DU组比较；b：$P<0.05$，与N组比较

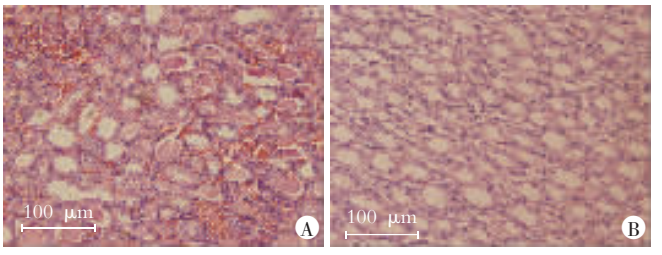
2.3 肝、肾功能检测

DU组血钾浓度较正常对照组显著增高$P<0.05$，其余各组与正常对照组之间无显著性差异$P>0.05$。各组间血钠浓度比较均无显著性差异$P>0.05$。注射了DU的各组血氯浓度均较正常对照组下降，但各组之间无显著性差异$P>0.05$。注射了DU的各组血肌酐和血尿素氮普遍增高，但Zn-P组显著下降至接近正常组，其余各组较贫铀组无明显改变$P>0.05$。见表3。

注射3DU的各组在总蛋白含量和白蛋白含量上均较正常组出现了显著的下降，经MT或Zn干预后，有Zn-P、MT-P和ZntmT组的白蛋白含量出现显著回升。在谷草转氨酶和谷丙转氨酶的浓度上，DU急性中毒的各组与正常对照组无显著性差异，仅在谷草转氨酶浓度上，经Zn干预的3组较DU组出现了明显降低。在总胆汁酸含量上，除Zn-T组以外，其余干预组均较DU组出现明显增高，但仅有MT-T组和Zn+MT组较正常对照组增高。见表4。

2.4 病理学观察

贫铀组肾脏近曲小管多数凝固性坏死，髓质小管管型普遍，致密颗粒多见，有单个核细胞浸润（图1A）。使用了MT或Zn的各干预组中，Zn-T组和Zn-P组的肾脏等发生病理形态改变较少，甚至无异常改变，其余组则发生明显病理改变。Zn-T组肾脏肾小管多无明显异常改变，管型少见。Zn-P组肾脏仅部分近曲小管上皮变性，管型少见，多无明显异常，仅个别有轻度坏死（图1B）。提示采用MT和Zn对急性贫铀进行促排和解毒，Zn-P组的效果最好，在促进贫铀的排除，对肝肾功能的影响等方面，均在一定程度上表现出对急性贫铀中毒的解毒效果。



A：DU组；B：Zn-P组

图1 大鼠肾脏的病理学观察（HE）

3 讨论

铀中毒早期，重金属（化学）毒性起着非常重要作用。急性贫铀中毒时，铀主要蓄积于肾脏、肝脏、脾脏和骨髓等器官，临床表现主要为急性肾功能衰竭，严重时可出现中毒性肝炎和全身反应。MT可与体内重金属离子，尤其与二价金属离子的结合能力更强，形成稳定的无毒或低毒配合物，通过代谢排出体外，避免重金属在体内积蓄，减轻对细胞的毒害作用。此外，MT还具有抗电离辐射作用，以及抗突变、修复DNA损伤和保护细胞膜等方面的生物学效应[7]。贫铀进入血液后，主要以二价铀酰离子的形式存在，故本研究探索了将MT用于贫铀急性中毒的解毒。

本实验结果表明，Zn-P组大鼠血液中的铀含量相对于DU组显著降低，而在肾脏和尿液中铀含量明显增高。这说明通过提前注射$ZnSO_4$溶液，对急性贫铀中毒起到了良好的解毒效果，体内的贫铀通过肾脏的代谢由尿液排出体外。我们也观察到MT-P组与Zn-P

组类似的解毒现象,但从铀含量的变化程度上,表明其解毒效果不如 Zn-P 组显著。Zn-T 组与 DU 组相比肾脏的铀含量较低,但血液和尿液的铀含量不具有显著差异。肾脏和血液中的铀含量 MT-T 组较 DU 组降低,但尿液中的铀含量增高。Zn + MT 组在肾脏和血液中的铀含量均较 DU 组有显著降低,尿液中铀含量无明显差异,这说明该组也具有良好的解毒效果。综上,在本实验中所采取的不同干预措施,均对铀起到了一定的解毒效果。

MT 在生物体内广泛分布。在动物体内主要分布于肝脏和肾脏等实质组织中,具有稳定细胞内环境和对重金属的解毒作用[8],也具有一定的抗辐射作用[9]。本实验对急性贫铀中毒的大鼠用外源性(兔来源)的 MT 进行干预的时候,发现该方式具有一定的解毒效果,但相对而言不如通过注射 $ZnSO_4$ 来诱导而产生的解毒效果明显。推测原因可能是由于 MT 制剂的制备是通过给家兔注射锌,利用锌诱导家兔产生 Zn - MT,再提取家兔体内的 Zn - MT 蛋白,制成 MT 制剂,当将这些 MT 制剂用于重金属解毒时,因其本身已经连接了锌离子,导致其再连接二价铀酰离子的活性有限;且 MT 在血液中具有一定的半衰期,不同动物 MT 的半衰期不同,而一般哺乳动物在 24 h 以内[10],所以导致直接给予 MT 的解毒效果不及锌预防组。预防性给予硫酸锌,可以诱导动物体内产生内源性的 MT 蛋白,这些内源性的 MT 可以提供更多的位点来结合二价的铀酰离子,且起效时间较快[11]。因此,在实验中不论是使用 $ZnSO_4$ 进行预防还是治疗,都观察到了良好的解毒效果。

血常规结果示,急性贫铀中毒可使大鼠的白细胞数增高、血小板数降低,但对于红细胞数和血红蛋白含量没有影响。此现象与本单位以前在大鼠体内植入贫铀片的情况下观察到的结果类似[12]。而经过 MT 或 Zn 干预的各组中,除 MT-T 组较 DU 组可造成白细胞数进一步增高以外,其余各项数据与 DU 组相比没有显著差异。本实验中采用的 MT 来源于家兔肝脏,当外源性的蛋白在注射入大鼠体内时,有可能产生一定程度的免疫反应而导致白细胞数量增高。因此,在本实验中所采取的各项干预措施,几乎不会对急性贫铀中毒大鼠的血常规指标产生影响。

肝肾功结果示,急性贫铀中毒可造成大鼠的肾脏功能损伤,表现为血肌酐和血尿素氮增高,但对肝脏功能影响较小,主要表现为白蛋白和总蛋白含量降低。铀在体内能引起明显的肾脏毒性[13],伴发肝脏损伤者甚少;肝功能的改变主要还是继发于肾脏功能障碍的结果[14]。由于本实验中各组动物取材时间在急性贫铀中毒后 5 d,因此在短时间内,肾脏功能障碍还不足以造成肝功能的显著改变,且经过干预后,部分组别的动物在白蛋白和总蛋白含量上还有所回升。在血液生化指标上,血氯含量在注射 DU 后明显下降,各干预组对血氯指标无影响;血钾在注射 DU 后上升,但各干预组均恢复至正常水平。因此,在本实验中所采取的干预措施,均不会对急性贫铀中毒的大鼠肝肾功能造成进一步影响。相对于目前常用的贫铀促排剂 $NaHCO_3$ 可能引起的酸碱平衡紊乱和低钾血症[3],以及 DTPA 可能引起的肾脏损伤[4],MT 在发挥促排效果的同时能有效的降低对肝肾功能的毒副作用。

总之,MT 可对急性贫铀中毒的大鼠起到较好的铀解毒效果。因此,利用 $ZnSO_4$ 诱导 MT 产生这一措施,有可能为寻求一种高效低毒的贫铀解毒剂找到新的途径。

参考文献:

[1] Dang H S, Pullat V R, Sharma R C. Distribution of uranium in human organs of an urban Indian population and its relationship with clearance half-lives[J]. Health Phys, 1995, 68(3): 328 - 331.

[2] 冷言冰, 李蓉, 艾国平, 等. 长期接触、贫铀对大鼠遗传毒性的初步研究[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(9): 869 - 871.

[3] 李蓉, 任洞, 杨峥嵘, 等. 含邻苯二酚基团的黄酮化合物促排急性贫铀中毒效果的研究[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(24): 2251 - 2253.

[4] Ramounet-Le-Gall B, Grillon G, Rateau G, *et al*. Comparative decorporation efficacy of 3, 4, 3-LIHOPO, 4, 4, 4-LIHOPO and DTPA after contamination of rats with soluble forms of 238Pu and 233U [J]. Radiat Prot Dosimetry, 2003, 105 (1 - 4): 535 - 538.

[5] 姚朝阳, 朱文文, 牛敬媛, 等. 金属硫蛋白医学研究进展[J]. 微量元素与健康研究, 2007, 24(3): 53 - 55, 63.

[6] 李蓉, 艾国平, 徐辉, 等. 吸入贫铀粉尘和/或嵌入贫铀片大鼠体内铀的分布[J]. 第四军医大学学报, 2004, 25(6): 503 - 506.

[7] Dziegiel P, Jelen M, Muszczynska B, *et al*. Role of metallothionein expression in non-small cell lung carcinomas[J]. Rocz Akad Med Bialymst, 2004, 49(Suppl 1): 43 - 45.

[8] 邢树礼, 王洪光, 赵帅. 金属硫蛋白的功能及应用前景[J]. 生物技术通报, 2008, (2): 45 - 47.

[9] 周湘艳, 蔡露, 高卫民. 金属硫蛋白与辐射关系的研究现状及展望[J]. 中华放射医学与防护杂志, 1999, 19(1): 60 - 63.

[10] 李丽立, 张彬, 印遇龙, 等. 金属硫蛋白在仔猪体内代谢动力学研究[J]. 核农学报, 2004, 18(6): 480 - 484.

[11] 赵新民, 雷存喜, 李丽立. 诱导后家兔组织中金属硫蛋白含量的变化[J]. 畜牧兽医杂志, 2006, 25(6): 27 - 28.

[12] 李蓉, 艾国平, 徐辉, 等. 植入贫铀片大鼠血液和肝肾功能的变化[J]. 第四军医大学学报, 2004, 25(2): 182 - 185.

[13] 冷言冰, 李蓉, 艾国平, 等. 贫铀长期摄入对大鼠肾脏损伤效应的研究[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(18): 1686 - 1689.

[14] 刘树铮. 铀毒理学[M]. 北京: 原子能出版社, 1995: 304 - 310.

(**收稿**:2009-09-01;**修回**:2009-11-19)

(编辑 龙 亮)