DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.03.001
第26卷第3期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 3
2004年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2004


文章编号:1000-5404(2004)03-0185-04

论著

# 贫铀对人肾小管上皮细胞的毒性作用

李 蓉,艾国平,徐 辉,楼淑芬,程天民,粟永萍,郑怀恩,蒋建新,黄跃生 (第三军医大学预防医学系全军复合伤研究所,创伤烧伤复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

提 要:目的 阐明贫铀(depleted uranium, DU)对人肾小管上皮细胞(human kidney cell, HKC)的急性毒性作用及损伤部位,为救治提供依据。方法 将0.063~0.500 mg/ml的DU溶液作用于HKC,研究细胞超微结构、存活率的变化,多种酶含量的改变及HGPRT基因突变的频率。结果 0.063~0.500 mg/ml浓度的DU可引起HKC细胞结构改变,存活率显著下降;溶酶体酶NAG含量随DU浓度的增加而增加;其他酶含量也发生变化;HGPRT基因突变的发生率显著高于正常对照组,并呈二项式相关关系。加入苯乙酸、亚硒酸钠使上述指标变化不大。结论 DU可引起细胞活力降低,损伤细胞膜、线粒体、溶酶体等,使细胞抗氧化能力下降;HGPRT基因突变率与DU浓度之间呈相关关系;加入恶性转化的抑制剂亚硒酸钠和苯乙酸,不会显著增加DU的毒性作用。

关键词:贫铀;毒性;人肾小管上皮细胞
中图法分类号:R322.61;R329.24;R818.73 文献标识码:A

# Acute toxic effects of depleted uranium and/or phenyl acetate and sodium selenite on human kidney epithelial cells

LI Rong, AI Guo-ping, XU Hui, LOU Shu-fen, CHENG Tian-min, SU Yong-ping, ZHENG Huai-en, JIANG Jian-xin, HUANG Yue-sheng (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**Abstract**: **Objective** To investigate the acute toxic effect of depleted uranium (DU) on human kidney cells (HKCs). **Methods** We used a model system of *in vitro* HKCs exposed to DU (0.063—0.500 mg/ml) and phenyl acetate or sodium selenite for 24 h. Morphological changes of cellular ultrastructure, surviving fractions of cells, contents of multiple enzymes, and gene mutation frequency of hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HGPRT) were studied. **Results** A certain concentration of DU could induce the changes of cellular structure of HKCs and reduce the survival rate of cells in a dose-dependent manner. Concentrations of NAG, GCR, and LDH increased signifi-cantly, but those of SOD and GSH-PX reduced in a dose-dependent manner. Mutation frequency of HGPRT induced by DU was higher than that in the control group and that of the spontaneous mutation. **Conclusion** DU can induce reduced cellular vitality, injured cell membrane, mitochondria, and lysosome, resulting in declined antioxidation capability of cells. The mutation frequency of HGPRT increases in a dose-dependent manner. Treatment of HKCs with phenyl acetate and sodium selenite after exposure to DU does not significantly increase the toxic effect of DU.

**Key words**: depleted uranium; toxicity; human kidney cell

贫铀(depleted uranium, DU)在人体的主要蓄积器官之一是肾脏,铀对肾脏主要损伤的是近曲小管上皮细胞,急性铀中毒时可产生严重的肾脏功能衰竭,故研究DU对肾小管上皮细胞的毒性作用对探讨铀的蓄积有重要意义。由于体外细胞培养用于毒理学研究经济、省时,常用于化学物质毒性的检测。很多研究者应用不同种类的细胞株检测化合物的毒性作用,取得了较好的效果[1]。因此我们用人肾小管上皮细胞(human kidney cell, HKC)做观察对象,研究DU对细胞形态功能等的影响,对细胞内多种酶含量的变化,以及HGPRT基因突变的影响,以此研究DU对肾小管上皮细胞的毒性及指标的灵敏性,为DU的防治提供依据。同时一并研究了恶性转化的抑制剂亚硒酸钠、苯乙酸产生的细胞毒性作用。

基金项目:全军"十五"指令性课题(01L061)
Supported by the Mandatory Scientific Research Project of the "Tenth Five-year Plan" of PLA (01L061)
作者简介:李 蓉(1970—),女,四川省阆中市人,博士,讲师,主要从事辐射防护方面的研究,发表论文10篇。电话:(023)68752355
通信作者:粟永萍,电话:(023)68752009,E-mail:suyp2003@yahoo.com.cn
收稿日期:2003-06-17;修回日期:2003-09-08

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

## 1 材料和方法

### 1.1 试剂

DU溶液的配制：将DU片(铀同位素组成：$^{238}U$ 占99.75%，$^{235}U$ 占0.2%以及痕量 $^{234}U$)，加入少量浓硝酸，微热至溶解成黄色液体，用RPMI1640培养液稀释；$Na_2CO_3$ 溶液调节pH值=7.0；用激光荧光法精确测量铀浓度。

β-N-乙酰氨基葡萄糖苷酶(NAG)、谷光甘肽(GSH-PX)、超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒均购自南京建成生物工程研究所，6-硫代鸟嘌呤、细胞松弛素-B购自Sigma公司，RPMI1640、小牛血清等来自市售试剂。

### 1.2 细胞培养及处理

人肾小管上皮细胞株(HKC)由第三军医大学新桥医院肾脏病研究中心提供。培养液由RPMI1640培养基、10%的小牛血清、1%的青霉素和链霉素组成，细胞在37 ℃、5%的 $CO_2$ 中孵育培养。

参照文献[2,3]和以往的经验，选择0.500、0.250、0.125、0.063 mg/ml 4个DU浓度点诱导处于半对数生长期的细胞，作用时间24 h，维持其指数期生长。正常对照细胞同时培养和观察。

抑制剂组：先向HKC细胞中分别加入5.0、2.5、1.0 μmol/L亚硒酸钠，或5.0、2.5、1.0 μmol/L苯乙酸，作用6 d后，再加入0.250 mg/ml的DU溶液作用24 h，弃培养液，换新的培养液。

### 1.3 细胞超微结构观察

在DU和抑制剂作用24 h后收集经胰酶消化的细胞，经过1.25%戊二醛固定后，按常规制作透射电镜标本，电镜下观察细胞内部结构。

### 1.4 细胞存活率测定

0.25%胰酶消化细胞，制备细胞悬液，加入2%台盼蓝染液，染色约1 min，置一小滴悬液于血细胞计数器内，在显微镜下计数1 000个细胞中不着色细胞。

$$细胞存活率(\%)=\frac{实验组每1\,000个细胞中的活细胞数}{对照组每1\,000个细胞中的活细胞数}\times 100\%$$

### 1.5 细胞内膜损伤观察(酶含量的变化)

将加入DU和/或亚硒酸钠、苯乙酸作用后的细胞和正常HKC细胞在37 ℃、5%的 $CO_2$ 中培养24 h后，37 ℃恒温振荡(60 r/min)培养20 min，取适量培养混合物进行分析。

乳酸脱氢酶(LDH)、碱性磷酸酶(AKP)、酸性磷酸酶(ACP)和天冬氨酸氨基转移酶(AST)经临床自动生化分析仪检测。β-N-乙酰氨基葡萄糖苷酶(NAG)、谷光甘肽(GSH-PX)、超氧化物歧化酶(SOD)按比色法测定，操作步骤见试剂盒说明书，测量仪器为DU-640紫外可见光分光光度仪(Beckman公司)。

### 1.6 HGPRT基因突变的检测

将6-硫代鸟嘌呤(简称6-TG)加入培养基中，使终末浓度为1.67 μg/ml(对照组不加6-TG)。向培养物中(细胞数约 $1\times10^6$)加入DU和/或亚硒酸钠、苯乙酸溶液，使成要求的浓度，37 ℃下培养30 h，同时加入细胞松弛素-B(Cyt-B，Sigma公司)，继续培养42 h；弃培养液，用生理盐水洗两次，细胞悬液经冰乙酸甲醇(1∶3)固定，制片、Giemsa染色，显微镜下计数双核或多核细胞数，见文献[4]。

$$HGPRT基因变异系数=\frac{含6\text{-}TG培养的1\,000个细胞中双核或多核细胞数}{不含6\text{-}TG培养的1\,000个细胞中双核或多核细胞数}$$

### 1.7 统计学方法

结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示，用SPSS软件作单因素方差分析。

## 2 结果

### 2.1 细胞形态结构变化

倒置显微镜下摄影，直接观察培养中的活细胞形态。正常HKC生长良好，排列整齐，呈圆形贴壁状。受DU作用后24 h，细胞多破碎死亡，存活细胞多呈悬浮状态，贴壁率降低，排列紊乱，生长不良。

电镜观察显示：正常HKC胞质内含丰富的内质网和糖原颗粒，线粒体结构正常，核呈卵圆形，核膜下可见少量染色质。受DU作用的细胞线粒体肿胀空泡变，电子密度降低，或固缩，电子密度增高，嵴减少或消失；异染色质轻度变性，分布不均，呈团块状，常染色质疏密程度不一；胞核形状多样，有似葫芦状或其他形状，核膜内陷，核变性。

### 2.2 细胞存活率测定

见表1，当受4个不同浓度的DU作用后，细胞存活率随DU浓度升高而降低，差异显著，二者之间似无明显的量效关系。受0.250 mg/mlDU+1.0 μmol/L亚硒酸钠/苯乙酸作用的细胞，与同样浓度(0.250 mg/ml)DU作用的细胞相比，其存活率下降，但差异不显著，其中2.5 μmol/L抑制剂作用的细胞存活率比1.0 μmol/L作用的细胞高，但显著低于抑制剂单独作用时的细胞存活率，5.0 μmol/L抑制剂作用时细胞存活率很低。

表1 细胞存活率测定

**Tab 1 Survival rate of cells**

| Concentration | | Survival rate(%, $\bar{x}\pm s$) |
|---|---|---|
| Control | | 95.3±2.0 |
| DU | 0.063(mg/ml) | 36.9±4.6 * |
| | 0.125 | 35.6±3.7 * |
| | 0.250 | 24.1±6.1 * |
| | 0.500 | 10.3±1.8 * |
| DU(0.250 mg/ml)+ sodium selenite | | |
| | 1.0(μmol/L) | 20.5±6.2 ** |
| | 2.5 | 23.5±3.1 ** |
| | 5.0 | 2.1±0.4 ** |
| Sodium selenite 2.5 μmol/L | | 87.1±16.7 |
| DU(0.250 mg/ml)+ phenyl acetate | | |
| | 1.0(μmol/L) | 22.8±4.9 ** |
| | 2.5 | 22.4±3.6 ** |
| | 5.0 | 1.3±0.2 ** |
| Phenyl acetate 2.5 μmol/L | | 90.2±7.4 |

*：$P<0.01$，*vs* control；**：$P<0.05$，*vs* sodium selenite/phenyl acetate 2.5 μmol/L

### 2.3 细胞损伤

细胞内多种酶变化总的趋势是：①除ALP外，加入DU作用的实验组酶含量与对照组均差异显著($P<0.05$)，其中NAG、GCR、ACP、LDH和AST随DU浓度增加而增加，GSH-PX和SOD下降，ALP差异不显著；②与0.250 mg/ml DU+1.0 μmol/L/2.5 μmol/L苯乙酸或亚硒酸钠作用的细胞与0.250 mg/ml DU作用的细胞相比，差异不显著，但与单独受苯乙酸或亚硒酸钠作用的细胞酶含量差异显著($P<0.05$)；③单独加入2.5 μmol/L苯乙酸或亚硒酸钠作用的细胞中酶含量与正常组差异不显著，见表2。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 2　DU 作用于 HKC 后酶的变化(IU/L, $\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Changes of enzyme content in HKC induced by depleted uranium (IU/L, $\bar{x}\pm s$)

| | Agent | NAG | GCR | ACP | LDH | AST | ALP | GSH-PX | SOD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| HKC | | 8±2 | 15±4 | 12±3 | 83±45 | 5±1 | 22±3 | 233±54 | 28±3 |
| DU | 0.063 | 15±3 * | 20±2 * | 15±4 * | 204±32 * | 7±1 * | 18±4 | 202±64 * | 21±4 * |
| | 0.125 | 17±2 * | 28±4 * | 18±4 * | 389±43 * | 10±2 * | 19±3 | 183±46 * | 18±3 * |
| | 0.250 | 18±4 * | 33±5 * | 22±6 * | 426±67 * | 13±4 * | 18±4 | 156±57 * | 15±2 * |
| | 0.500 | 23±4 * | 45±8 * | 27±6 * | 454±102 * | 25±3 * | 20±5 | 130±39 * | 12±3 * |
| Sodium selenite | 2.5 μmol/L | 8±1 | 18±2 | 16±3 | 105±34 | 12±1 | 10±3 | 210±64 | 21±5 |
| DU+Se | 0.250+1.0 | 18±3 ** | 23±3 ** | 18±4 ** | 464±125 ** | 17±3 ** | 9±2 | 152±57 ** | 12±3 ** |
| | 0.250+2.5 | 19±2 ** | 33±4 ** | 20±2 ** | 540±109 ** | 26±4 ** | 10±3 | 165±68 ** | 11±3 ** |
| Phenyl acetate | 2.5 μmol/L | 8±1 | 17±2 | 17±2 | 97±13 | 10±2 | 9±2 | 202±91 | 20±6 |
| DU+ phenyl acetate | 0.250+1.0 | 17±2 ** | 27±4 | 19±3 | 279±64 ** | 6±1 | 9±3 | 148±80 ** | 12±4 ** |
| | 0.250+2.5 | 21±3 ** | 30±4 | 23±4 ** | 383±113 ** | 18±2 ** | 10±2 | 160±63 ** | 13±5 ** |

*: $P<0.05$, *vs* HKC, **: $P<0.05$, *vs* sodium selenite / phenyl acetate 2.5 μmol/L

## 2.4　HGPRT 突变的检测

受 DU 作用的细胞, HGPRT 突变的发生频率随 DU 浓度升高而增加, 且显著大于正常对照组, 二者之间呈一定的相关关系, 见图 1, 其拟合方程是 $Y=-196X^2+203.62X+1.1855$。受 0.250 mg/ml DU+1.0/2.5 μmol/L 亚硒酸钠或苯乙酸作用的细胞, 与同样浓度(0.250 mg/ml)DU 作用的细胞相比, 其突变率稍升高, 差异不显著, 但大大高于亚硒酸钠或苯乙酸单独作用的细胞 HGPRT 突变率, 见表 3。

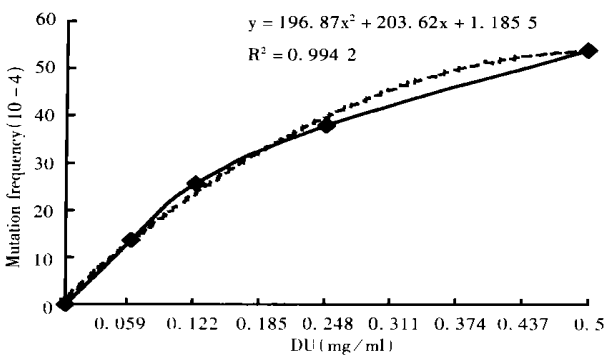



图 1　HGPRT 突变频率随 DU 浓度变化曲线

**Fig 1　The curve of mutation frequency of HGPRT concentrations of depleted uranium**

表 3　HGPRT 突变的频率($\bar{x}\pm s$, %)

Tab 3　Mutation frequency of HGPRT ($\bar{x}\pm s$, %)

| Concentration | | Mutation frequency($\times10^{-4}$) |
|---|---|---|
| Control | | 0.04±0.01 |
| DU | 0.063 mg/ml | 13.71±3.46 * |
| | 0.125 mg/ml | 25.83±6.84 * |
| | 0.250 mg/ml | 37.90±5.19 * |
| | 0.500 mg/ml | 54.14±16.79 * |
| DU+sodium selenite | 1.0 μmol/L | 38.27±9.64 ** |
| | 2.5 μmol/L | 39.33±8.43 ** |
| Sodium selenitel | 2.5 μmol/L | 0.13±0.02 |
| DU+phenyl acetate | 1.0 μmol/L | 39.81±9.70 ** |
| | 2.5 μmol/L | 41.45±10.34 ** |
| Phenylacetic acid | 2.5 μmol/L | 0.16±0.01 |

*: $P<0.01$, *vs* control, **: $P<0.05$, *vs* sodium selenite / phenyl acetate 2.5 μmol/L

## 3　讨论

肾脏是许多重金属化学毒作用的靶器官, 也是主要的贮存器官, 重金属在其中大量浓集可导致肾脏功能的急性衰竭, 引起机体的严重损伤[5]。DU 的生物效应既有重金属化学毒性的作用, 又有放射性核素的辐射作用, 故研究大剂量 DU 溶液对人肾小管上皮细胞的急性毒性作用, 对以后研究 DU 对机体的急性毒性有一定的指导意义。

本研究表明, 随 DU 浓度的增加, 细胞活力逐渐下降, 尤其是 0.250 mg/ml 以上的 DU 作用时, 细胞活力下降显著, 0.500 mg/ml DU 作用的细胞存活率仅 10.3%, 以后研究中应注意 DU 浓度的大小。单独的亚硒酸钠或苯乙酸作用于 HKC 后, 细胞活力稍下降, 为 90%左右; 受 0.250 mg/ml DU+1.0 μmol/L 亚硒酸钠作用的细胞, 与同样浓度(0.250 mg/ml)DU 作用的细胞相比, 其存活率下降, 但差异不显著, 说明了加入恶性转化的抑制剂, 会使细胞的活力下降, 但不会显著减少细胞的存活率, 可用做恶性转化的抑制剂。

肾小管细胞酶的漏出是评价重金属物质肾脏毒性的常用指标[1], 细胞内不同区域内酶的漏出反映了重金属毒性作用的性质和严重程度的差异, 细胞浆酶漏出即反映有细胞损伤, 亚细胞组分内酶也大量漏出则反映更严重的损伤。酶不仅有器官分布的特点, 而且在细胞也为区域性分布。NAG、GCR 和 ACP 为溶酶体酶, LDH 为胞浆酶, AST 主要存在于线粒体和胞浆中, ALP 是肾小管细胞刷状缘的标记酶。①溶酶体: 溶酶体的损害发生在早期并较敏感, 其受损导致 NAG 漏出, NAG 最能反映重金属的毒性。在培养液中 NAG 的含量随 DU 浓度的增加而增加, 与 0.250 mg/ml DU 组相比, DU 和苯乙酸/亚硒酸钠共同作用组的 NAG 浓度稍高, 可能与两种抑制剂在短期内有一定的毒性有关。②随 DU 浓度增加, HKC 释放的 LDH 酶含量上升, 作

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

为细胞活力的标记酶，LDH 最为敏感，也表明 DU 对细胞膜损伤作用最强；但在许多病理条件下，LDH 都可能增高，故其特异性并不如 NAG 高。③线粒体：AST 漏出对 DU 毒性的敏感性差，DU 作用后，AST 含量上升不多，说明 DU 对线粒体的作用较轻，这与我们电镜观察的线粒体肿胀或固缩、嵴突消失发生改变，但膜的变化不明显相一致。④刷状缘：尽管 ALP 随 DU 浓度增加而下降，但与正常组相比差异并不显著，可能与永生化的肾小管上皮细胞无刷状缘存在，ALP 含量多少并不反映刷状缘的损伤程度有关。⑤抗氧化能力：研究结果表明，DU 作用于细胞后，GSH-PX 随 DU 浓度增加而下降，可能是抗外源性氧化损伤消耗了 GSH-PX，也说明了细胞内部组分发生自由基反应，细胞受损，抗氧化能力下降。SOD 存在于胞浆和线粒体中，作为抗氧化酶能清除自由基，可能具有一定的辐射防护作用。在辐射对生物膜损伤中脂质过氧化是一个起决定作用的步骤，SOD 含量增减对研究 DU 对 HKC 的损伤环节有重要作用。总之，急性铀中毒对细胞微绒毛、溶酶体、线粒体和线粒体酶均有损害，并伴细胞内脂质过氧化，以及抗外源性氧化能力下降。

人类 HGPRT 基因序列长 44 kb，带有 9 个外显子和 8 个内含子，它的基因产物 HGPRT 由 2～4 个蛋白亚单位组成，是一种细胞膜酶，存在于人体所有组织，参与细胞内嘌呤核苷酸的补救合成。HGPRT 位于 X 染色体长臂末端，电离辐射引起的 HGPRT 基因突变是不可逆的，且长期存在体内；在单基因突变研究中是一个经典的基因位点，对电离辐射和化学诱变剂非常敏感，体细胞 HGPRT 基因位点突变频率的检测已广泛应用于放射毒理、遗传毒理及环境医学领域。由于 DU 既有重金属化学毒性，又有放射毒性作用，其引起的 HGPRT 基因突变可能均有两种作用同时发生。受 DU 作用的细胞，HGPRT 突变的发生频率随 DU 浓度升高而增加，且显著大于正常对照组，说明了 DU 可诱发基因突变，可能会引发畸变和癌变。

大剂量 DU 可对人肾脏细胞产生的毒性作用，到底是以重金属毒性为主，还是放射毒性为主，还存在一定分歧。最近有研究[6]表明辐射在 DU 体外诱导的生物学效应中发挥重要的作用。而我们的研究结果表明 DU 的重金属毒性对细胞的作用也不可忽视，尤其是 NAG 酶活性的升高，对研究 DU 的重金属毒性有重要的价值。

参考文献：

[1] 朱 砂，刘毓谷. 汞化合物对大鼠游离肾近曲小管细胞毒性及其指标的探讨[J]. 卫生毒理学杂志，1993，7(1)：1－4.
[2] Miller A C，Blakely W F，Livengood D，*et al*. Transformation of human osteoblast cells to the tumorigenic phenotype by depleted uranium-uranyl chloride[J]. Environ Health Perspect，1998，106(2)：465－471.
[3] 杨陟华，范保星，陆 颖，等. 贫铀诱发人支气管上皮细胞恶性转化[J]. 癌症，2002，21(9)：944－948.
[4] 刘国廉. 细胞毒理学[M]. 北京：军事医学科学出版社，2001. 373－374.
[5] 顾学箕，王移兰. 劳动卫生学[M]. 北京：人民卫生出版社，1984. 13－23.
[6] Miller A C，Xu J，Stewart M，*et al*. Observation of radiation-specific damage in human cells exposed to depleted uranium：dicentric frequency and neoplastic transformation as endpoints[J]. Radiat Prot Dosimetry，2002，99(1－4)：275－278.

（编辑 张大春）

# 个案与短篇

文章编号：1000-5404(2004)03-0188-01

## 超声诊断腹膜后平滑肌肉瘤 1 例

## Diagnosis of a case of retroperitoneal leiomyosarcoma by color Doppler ultrasonography

王 翔，杜文华 （第三军医大学大坪医院野战外科研究所超声诊断科，重庆 400042）

患者，女性，17 岁。因右下肢肿胀进行性加重入院，临床拟诊“右下肢深静脉血栓”。查体：右下肢自大腿根部以下明显增粗，伴凹陷性水肿，足背动脉搏动减弱。超声示：右侧盆腔髂血管旁及腹股沟区分别探及 3.9 cm×4.8 cm、2.6 cm×3.2 cm 的低回声为主的不均质实质性肿块，二者呈“哑铃”形相互融合，境界尚清晰，向下达大腿根部，髂动、静脉及股动、静脉均部分受压，变细（图 1）。彩色多普勒显示肿块内血流信号较丰富，脉冲多普勒可探及动、静脉血流频谱。超声诊断：右侧盆腔髂血管旁实质性占位（后腹膜恶性肿瘤可能性大）。

手术所见：肿瘤位于右侧盆壁腹膜外，表面呈结节状，与髂血管及盆壁紧密粘连，切开血管鞘见髂动、静脉被压迫变细，静脉壁变硬，弹性降低，并见肿瘤向下生长进入股管，经股管穿出后与股血管伴行，分离肿瘤及血管后见股动脉明显变细，直径约 3 mm。

病理诊断：右侧盆腔及大腿根部平滑肌肉瘤（低分化）。

（下转 192 页）

作者简介：王 翔（1976－），男，山西省太原市人，硕士研究生，医师，主要从事超声医学方面的研究。电话：(023)68757421

收稿日期：2003-09-11；修回日期：2003-11-10

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net