DOI:10.16016/j.1000-5404.1992.01.014

慢性镉中毒肾功能损伤的研究

吴治芬 金晓琳 刘盛华（第三军医大学检验系 临床生化教研室）630038

提 要 本实验用0.8%$CdCl_2$生理盐水按1 mgCd/kg体重，隔日1次皮下注射3个月，建立兔中毒模型。测定了血尿素氮、肌酐含量及肾皮质的Na^+/K^+-ATPase、Ca^{2+}-ATPase、γ-GT的活性。结果表明，在肾中毒早期，尿素氮、肌酐无明显变化，几种酶活性明显下降，P值分别<0.05及<0.001。提示，这些酶活性下降，可能是镉中毒所致肾功能紊乱和病理改变的启动环节之一和进一步导致肾衰的机理之一。

关键词 镉中毒；肾/损伤；兔；酶抑制

镉是高毒性微量元素，体内作用的主要靶器官及排泄器官都是肾脏。慢性镉中毒所致肾功能不全，渐发肾功能衰竭，早为临床证实。对镉的研究很多，但对肾脏损害的机理报道尚少。本文测定了镉中毒的兔尿素氮、肌酐含量及Na^+/K^+-ATPase、Ca^{2+}-ATPase、γ-GT活性变化，以探讨镉中毒时肾功能障碍的机理。

1 材料和方法

1.1 动物模型

日本雌性长耳兔，4月龄。用0.8%氯化镉（$CdCl_2$）生理盐水按1 mgCd/kg体重皮下注射，隔日一次连续3个月，建立中毒动物模型。3月后处死动物，心脏取血分离血清，测尿素氮、肌酐含量。取肾皮质观察形态学变化及测酶活性。对照组除以生理盐水代替$CdCl_2$外，其余处理与用药组完全相同。

1.2 Na^+/K^+-ATPase、Ca^{2+}-ATPase活性测定

主要按Finotti法[1]稍加变动，同步测定两酶活性。

实验设A、B、C、D4管。D管为无酶活性的对照管。各管总体积200μl。反应液成份(mmol/L)为，A管：Na^+150，K^+20，ATP0.5，EDTA 0.1，Mg^{2+}5，哇巴因0.1，组织匀浆50μl。B管：去Na^+和EDTA，加入Ca^{2+}0.1，余同A管。C管：加Ca^{2+}0.1，去EDTA和哇巴因，余同A管。反应从加入ATP开始，37℃水溶保温10min，立即置冰浴中并向各管加入15%三氯醋酸中止反应。再向D管加入50μl组织匀浆。用Muszbek法[2]稍加变动测Pi，改良Lowry法测蛋白。酶活性以μmol pi/per mg protein表示。每例标本均作复管，结果取平均值。A管为Mg^{2+}-ATPase活性。B管为Mg^{2+}-ATPase加Ca^{2+}-ATPase活性。B-A管为Ca^{2+}-ATPase活性。C管为总ATPase活性。C-B管为Na^+/K^+-ATPase活性。

1.3 γ-GT活性测定

按Szasz法测定肾皮质γ-GT活性，本法酶单位为mIU/mg蛋白。

1.4 血尿素（BUN）、肌酐(Cr)含量测定

在Beckman-700机上，用脲酶速率法测BUN，用饱和苦味酸两点法测血Cr含量。

2 结 果

镉处理组光镜下见肾小球结构无异常改变，近曲小管上皮细胞肿胀变性。肾皮质Na^+/K^+-ATPase、Ca^{2+}-ATPase活性镉处理组明显低于正常组（$P<0.05$）（表1）。γ-GT活性隔处理非常明显低于正常组（$P<0.001$）（表2）。BUN、Cr两组差异不显著（$P<0.05$）（表3）。

表1 肾皮质Na^+/K^+-ATPase及Ca^{2+}-ATPase活性(μmol pi/h per mg protein)

组别	例数 (n)	酶活性（$\bar{x}\pm s$） Mg^{2+}-ATPase	Ca^{2+}-ATPase	Na^+/K^+-ATPase
对照组	5	26.49 ±5.70	22.20 ±5.60	135.40 ±34.14
用药组	6	21.67 ±4.17	14.79 ±3.69	90.36 ±24.18

与对照组比 * $P<0.05$

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

表2 肾皮质γ-GT活性 (mIU/mg protein)

组别	例数 (n)	酶活性 ($\bar{x}\pm s$)	P
对照组	5	712.34±31.03	<0.001
用药组	6	495.14±44.88	

表3 血清尿素氮 (BUN)、肌酐 (Cr) 含量 (mmol/L, μmol/L)

组别	例数 (n)	BUN ($\bar{x}\pm s$)	Cr
对照组	5	5.22±0.08	106.83±14.95
用药组	6	6.22±1.32	104.60±12.28
P		>0.05	>0.05

3 讨 论

Na^+/K^+-ATPase及Ca^{2+}-ATPase是广泛分布在动物及人体的膜结合酶。它们有共同的基因起源、类似的功能结构及效应方式，因此在许多病理情况下两酶同时受影响。Na^+/K^+-ATPase的主要功能是水解ATP，释放能量，完成对Na^+、K^+的主动转运。随着Na^+进入细胞内，葡萄糖、氨基酸、Pi也协同转运入胞内，并伴有H^+、Ca^{2+}等交换到细胞外。因此，肾小管细胞的Na^+/K^+-ATPase直接或间接影响肾脏对Na^+、K^+、H^+、Ca^{2+}、Pi及糖、氨基酸等的重吸收与排泄[3][4][5]，对维持细胞的正常生理功能有重要作用。早在1968年就有人用哇巴因广泛抑制肾细胞的Na^+/K^+-ATPase，引起肾小管细胞电解质紊乱，继而发生细胞肿胀，坏死。文献报道[6]，镉在体内主要的靶器官是肾脏，并蓄积在皮质部，镉中毒最早期的损伤部位在肾小管，游离Cd抑制Na^+/K^+-ATPase等多种酶活性。本实验的结果表明，光镜下见肾小球结构无异常。肾小管上皮细胞肿胀、变性，BUN、Cr无明显改变，而Na^+/K^+-ATPase活性明显降低，与文献报道一致。推测，镉中毒引起的Na^+/K^+-ATPase活性降低，可能是肾功能障碍和病理改变的启动环节之一。

质膜上的Ca^{2+}-ATPase的基本功能是将细胞内钙主动转运至细胞外，维持细胞内低钙，是调节细胞内钙稳态的诸因素之一。体内镉负荷增加也抑制Ca^{2+}-ATPase活性，引起细胞内Ca^{2+}潴留，导致钙稳态失调。细胞内Ca^{2+}增加可引起代谢、电荷及膜结构的变化；中性蛋白酶、磷酸酶、核酸酶等被激活；Na^+/K^+-ATPase、cAMP代谢有关的酶等被抑制，引起糖元降解及脂解增加，ATP生成减少，激活Ca^{2+}-依赖机制，增加细胞通透性，以及引起线粒体和胞浆的钙盐、蛋白质、核酸沉着等[7][8]，这些改变必然加重细胞损害。本实验镉中毒所致肾皮质Ca^{2+}-ATPase活性下降，可能是引起细胞内Ca^{2+}增加，钙稳态失调，导致肾小管细胞中毒损伤的机理之一。

此外，细胞内钙稳态还有赖于Na-Ca交换系统的调节。生理状态下，Na-Ca交换是排出细胞内Ca^{2+}的又一有效途径。在Na^+/K^+-ATPase作用下维持细胞内高Na^+，Ca^{2+}则逆浓度梯度移向细胞外[3][9][10]，镉中毒引起Na^+/K^+-ATPase活性下降，势必影响胞内Na^+浓度，使Na-Ca交换下降，加重细胞内Ca^{2+}滞溜而致细胞中毒损害。

γ-GT (γ-谷氨酰转移酶) 是另一个重要的质膜结合酶，在肾脏主要分布在近曲小管刷状缘，其功能与完成L-氨基酸的跨膜转运及某些毒物的解毒有关[11]。本实验兔镉中毒后，肾皮质γ-GT活性非常明显下降，可能影响肾小管的氨基酸供给及解毒能力，造成其正常生理功能紊乱。

由此推测，慢性镉中毒时Na^+/K^+-ATPase、Ca^{2+}-ATPase、γ-GT活性下降，可能直接或间接影响肾小管细胞的能量供应、膜内外离子分布失调、糖、氨基酸等的供给和重吸收，这很可能是慢性镉中毒发展成肾功能紊乱、肾衰以致尿毒症的机理之一。

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

参 考 文 献

1. Finotti P, Facchinetti A, Palatini P. Mechanism of Na^+K^+-ATPase activation by trypsin and kallikrein. BBA 1990; 1039:123
2. Muszbek L, Szabo′ T, Fesüs L. A highly sensitive mothod for the measurement of ATPase activity. Analytical Biochemistry 1977; 77: 286
3. 多田道彦, 门马正明, 木村佳弘。Ca-ATPase调节の分子机序。代谢 1989; 26:13
4. Kinji K, Kazuo H, Akiko K, et al. A new electrophoretic vaviant of α subunit of Na^+/K^+-ATPase from the submandibular gland of rats. BBA 1990; 1039:234
5. 谷口和弥。Na^+/K^+-ATPaseの分子构造と反应样式。代谢 1989; 26: 3
6. 紺井一郎, 东福要平。カドミウムと肾损害。肾と透析 1988; 25:71
7. 今井昭一。血管平滑肌 Ca-pump ATPase の活性制御。医学のあゆみ。1990; 153: 1
8. 郑广华, 主编。细胞内信使系统。广东: 广东高等教育出版社, 1988:171
9. Willia JR, Cooper RH, Hoek JB. Role of calcium in the hormonal regulation of liver metabolism; BBA 1981; 639:243
10. Nacheshem DA, Sergio SA, Weinstein AM. The regulation of cytosolic calcium in rat brain synaptosomes by sodium-dependent calcium efflux. J Physiol 1986; 381:17
11. Feuer G. Melecular biochemistry of human disease. Roca Raton, Florida: CRC Press, Inc, 1985:73

(收稿: 1991-04-15; 修回: 1991-09-10)

A study of renal functional damages due to chronic cadmium intoxication in rabbits

Wu Zhifen, Jin Xiaolin, Liu Shenghua (Department of Clinical Biochemistry, Third Military Medical College, Chongqing, 630038.)

Abstract Rabbits were intoxicated with hypodermic injection of 0.8% $CdCl_2$ in normal saline every other day for 3 months, and the blood level of urea nitrogen (BUN) and creatinine (Cr) and the activities of Na/K-ATPase, Ca-ATPase, and γ-GT in the renal cortex were determined. It was found that there were no remarkable changes of BUN and Cr level but significant reduction of the activities of the 3 enzymes. It is believed that the reduction of the enzyme activities is one of the factors to initiate the functional disturbances and morphological damages of the kidneys and plays an important role in the mechanism of renal failure if it is not promptly corrected.

Key words cadmium poisoning; kidneys/IN; rabbits; enzyme repression

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