

江梦丽,陆战豪,陆思远,等.槲皮素对镉致大鼠肾脏损伤的保护作用[J].黑龙江农业科学,2021(12):47-52.

槲皮素对镉致大鼠肾脏损伤的保护作用

江梦丽,陆战豪,陆思远,高萌萌,李红霞,朱帅气,汪纪仓

(河南科技大学 动物科技学院,河南 洛阳 471023)

摘要:为探讨镉对大鼠肾脏损伤以及槲皮素对其的保护作用。将24只雄性SD大鼠随机分为4组,每组6只。每天分别按如下处理:对照组(生理盐水灌服)、镉处理组(按体重 $1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 腹腔注射 CdCl_2)、槲皮素组(按体重 $100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌服)、镉+槲皮素组(按体重 $1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 腹腔注射 CdCl_2 ,同时按体重 $100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌服槲皮素)。试验周期28 d,而后处死大鼠。收集大鼠血清并检测血清中尿酸(UA)、肌酐(CRE)和尿素氮(BUN)含量;收集肾脏并制备组织匀浆,检测组织匀浆中还原型谷胱甘肽(GSH)、丙二醛(MDA)的含量、超氧化物歧化酶(SOD)以及过氧化氢酶(CAT)活性;取大鼠肾脏组织制备组织切片,并观察组织病理变化。结果表明:镉可显著提高血清中UA、CRE的含量($P<0.05$),以及肾组织中GSH和MDA的含量,显著降低肾脏中SOD和CAT的活性。与镉组相比,槲皮素可以显著降低血清中UA、CRE含量,显著降低肾脏组织中GSH和MDA的含量,显著升高肾脏中CAT的活性,槲皮素可升高SOD活性但差异不显著。肾脏的组织学切片表明,镉会引起肾皮质中毛细血管充血;细胞有不同程度的坏死等变化,而镉+槲皮素可以明显减轻损伤。由此可知,镉致大鼠的肾组织产生脂质过氧化损伤和组织损伤,而槲皮素对镉导致的这种损伤具有一定 的保护效应。

关键词:镉;槲皮素;大鼠;肾脏;氧化损伤

镉(Cadmium)是一种有毒的重金属,是自然界中主要的污染物之一。它的毒性具有累积性、

不可逆转性和隐蔽性等特点。其半衰期可达到6~18年,很容易在人和动物体中蓄积^[1]。镉是联合国环境保护部门指出的12种危害较大的物质之一,毒性仅仅排在黄曲霉素、砷之后。镉在自然界中的存在比较普遍且毒性强,所以现在镉污染对环境和人类的危害引起了广泛关注,镉毒性问题也成为研究的热点^[2]。当环境受到镉污染后,可在生物体内富集并通过食物链进入机体引

收稿日期:2021-09-08

基金项目:国家大学生创新创业训练计划(202010464068);国家自然科学基金(31972753)。

第一作者:江梦丽(2000—),女,在读硕士,从事动物中毒病研究。E-mail:1515060386@qq.com。

通信作者:汪纪仓(1977—),男,博士,副教授,从事动物中毒病研究。E-mail:wangjicang@126.com。

Evaluation of the Control Effects of Different Agents on Broomcorn Millet Smut

YAN Feng

(Qiqihar Branch, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Qiqihar 161006, China)

Abstract: In order to screen the effective fungicides for preventing and controlling the smut of broomcorn millet in production and improve the production efficiency of broomcorn millet, this experiment adopted the method of dressing seeds with fungicides first, and then inoculating bacteria soil after sowing to study the control effects of different fungicides on the smut of broomcorn millet. The results showed that different chemicals had different inhibitory effects on seed germination and seedling growth of millet, and 12.5% diniconazole and 30% anisole were more effective than other chemicals, which were not suitable for controlling millet smut. Under the treatment of other chemicals, the control effect of millet smut was 63.8%-94.4%, and the yield increased by 13.4%-39.2%. 70% thiophanate-methyl and 43% tebuconazole were significantly higher than other treatments in disease control effect and yield. It is suggested that 70% thiophanate-methyl and 43% tebuconazole should be used for seed dressing to control smut of broomcorn millet in the western region of Heilongjiang Province.

Keywords: broomcorn millet; smut; seed dressing with agents; control effect

起慢性中毒。镉能直接或间接引起细胞活性氧(ROS)过量产生,同时镉持续消耗金属硫蛋白(MT)、还原型谷胱甘肽(GSH)、超氧化物歧化酶(SOD)等细胞重要的抗氧化酶,最终造成ROS在细胞内短暂或持续性的累积。随后细胞发生脂质过氧化物反应,导致氧化损伤^[3]。镉进入机体后通过血液循环系统到达各个靶器官,其中肾脏吸收的量最多,可达机体中全镉量的1/3。有研究发现,镉对肾脏的损伤与脂质过氧化作用有一定关系^[4]。

槲皮素(Quercetin)是黄酮醇类化合物,分布较为广泛,也具有多种生物活性。槲皮素具有抗氧化、清除自由基、抗肿瘤、抗炎症的作用^[5]。槲皮素分子中有两个羟基,同时2,3位间有双键。因此其具有金属螯合剂或油脂等氧化过程中所产生的游离基团接受体的功能^[6]。槲皮素与铂等抗癌金属发生螯合,可以明显抑制游离金属的毒害作用,以此增强药品的安全性^[7]。槲皮素可充当电子供体并在其内部形成稳定的氢键,使电子发生迁移,消除机体中的一些游离基,对不饱和脂肪酸等发生过氧化反应产生一定的抑制,从而能够减轻对生物膜的损伤^[8]。

镉的毒性与氧化损伤具有十分密切的关系,而槲皮素具有抗氧化的作用。所以槲皮素对镉的毒性所造成氧化损伤可以发挥一定程度的保护作用。本试验以大鼠作为镉中毒模型,检测镉对大鼠血清中尿酸(UA)、肌酐(CRE)和尿素氮(BUN)的影响,以及肾脏内谷胱甘肽(GSH)和丙二醛(MDA)含量的影响,以及超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)活性的影响,并制作组织切片,显微镜下观察各组肾脏组织的损伤程度,观察槲皮素对镉致大鼠肾脏氧化损伤的影响,为临幊上使用槲皮素预防镉中毒提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试动物 试验动物为24只8周龄雄性SD大鼠,购自郑州大学实验动物中心。

1.1.2 主要试剂及仪器 蛋白定量试剂盒、UA、CRE、BUN、GSH、MDA、SOD、CAT检测试剂盒(南京建成生物工程研究所);槲皮素、氯化镉

(阿拉丁公司);无水乙醇(天津市北辰方正试剂厂);二甲苯(天津市德恩化学试剂有限公司);苏木素-伊红染色剂(上海蓝季科技发展有限公司);福尔马林溶液(天津市凤船化学试剂科技有限公司)。

切片机(湖北安立信医疗实业有限公司);离心机(湖南可成仪器设备有限公司);分光光度计(上海美谱达UV-3100);显微镜(上海舜宇恒平科学仪器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 试验设计 24只8周龄SD大鼠,饲喂标准鼠料,自由饮水采食,适应性饲养7d后,将大鼠分为4组,每组6只。对照组:每天灌服生理盐水;槲皮素组:每天按体重100mg·kg⁻¹灌服槲皮素;镉处理组:每天按体重1mg·kg⁻¹腹腔注射CdCl₂;镉+槲皮素组:每天按体重1mg·kg⁻¹腹腔注射CdCl₂和按体重100mg·kg⁻¹灌服槲皮素。实验周期28d,最后一次处理之后24h采集血液制备血清,并处死大鼠,取出肾脏,将其浸泡在10%福尔马林溶液中进行固定,制作病理切片。将已经解剖的肾脏部分洗涤并切成小块,准确称量大鼠组织的质量,按照质量(g):体积(mL)=1:9的比例,将9倍体积的氯化钠溶液加到组织中,并在低温下研磨以制备10%肾脏组织匀浆。

1.2.2 测定项目及方法 血清中UA、CRE、BUN的测定:根据UA、CRE和BUN试剂盒说明书操作,检测血清中UA、CRE和BUN的含量。

肾脏组织蛋白的测定:制成的10%的组织匀浆用0.9%NaCl溶液按1:9比例稀释成1%浓度。按照蛋白检测说明书(考马斯亮蓝法)操作检测组织中蛋白的浓度。

GSH、MDA、SOD和CAT的测定:取待测组织匀浆液样品,分别按照GSH、MDA、SOD、和CAT检测试剂盒说明进行操作,然后测出OD的数值,按照说明书方法计算GSH和MDA的含量,SOD和CAT的活性。

肾脏组织显微病变观察:对采集并用福尔马林溶液固定好的肾脏样品,按常规方法制作石蜡切片,H.E染色,在显微镜下观察其组织病理学变化。

1.2.3 数据分析 将试验中获得数据进行整理用“平均值±标准差”表示,通过 SPSS 15.0 数据分析软件来对数据进行单因素方差分析。

2 结果与分析

2.1 镉和槲皮素对大鼠血清中 UA、CRE 和 BUN 含量的影响

由图 1 可知,与对照组相比,槲皮素对血清中

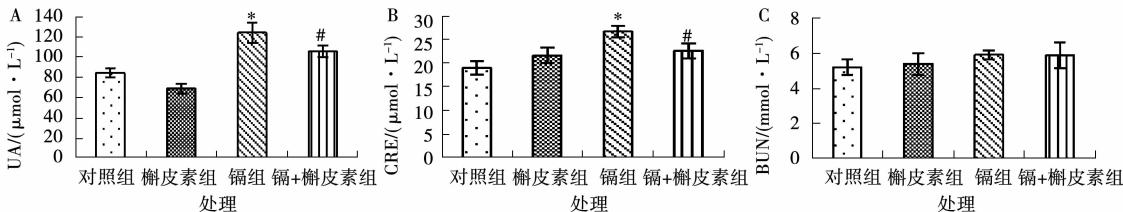


图 1 血清中 UA(A)、CRE(B) 和 BUN(C) 含量

注: * 表示 Cd 组与对照组相比, 在 $P < 0.05$ 水平差异显著; # 表示与 Cd 组相比, 在 $P < 0.05$ 差异显著。下同。

2.2 镉和槲皮素对大鼠肾脏 GSH 和 MDA 含量的影响

由图 2 可知,与对照组相比,槲皮素组 GSH、MDA 含量无显著性差异,镉处理组的 GSH 和 MDA 含量显著上升($P < 0.05$);与镉组相比,镉+槲皮素组 GSH 和 MDA 含量显著下降。表明镉进入肾脏后,使肾脏发生过氧化反应,造成氧化损伤。槲皮素可以增强组织的抗氧化能力,减轻肾脏中的脂质过氧化损伤程度。

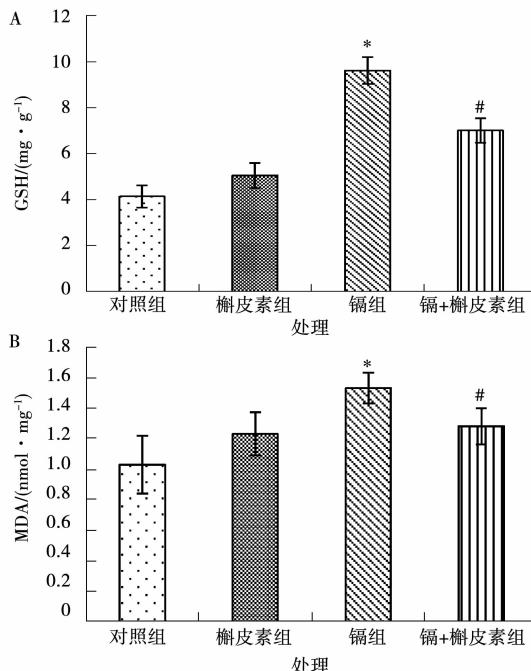


图 2 肾脏组织中 GSH(A) 和 MDA(B) 含量

UA、CRE 和 BUN 含量无显著影响,但镉可显著提高血清中 UA 和 CRE 含量($P < 0.05$),与镉组相比,镉+槲皮素组 UA 和 CRE 含量显著下降。与对照组和槲皮素组相比,镉可以增加血清中 BUN 的含量,但无显著差异。表明镉可导致肾脏功能损伤,而槲皮素可减轻镉对肾脏的损伤。

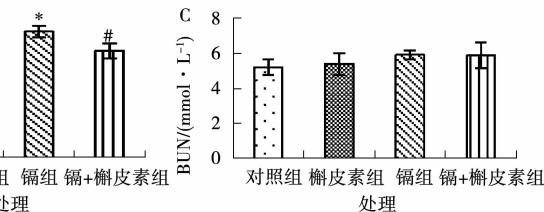
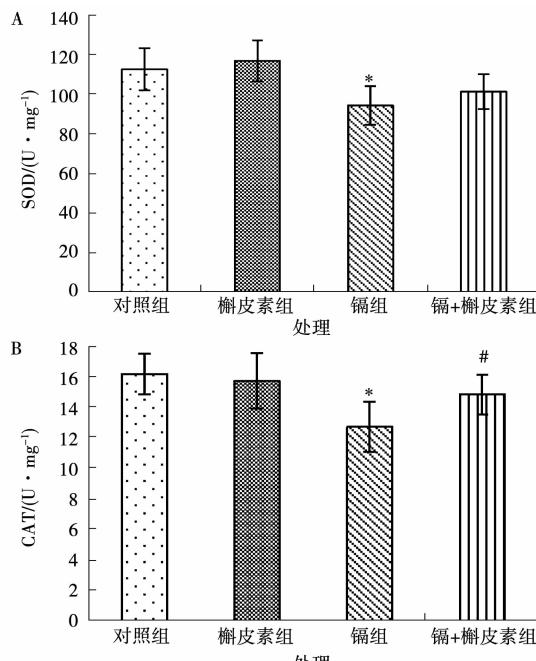


图 3 肾脏组织中 SOD(A) 和 CAT(B) 活性

2.3 镉与槲皮素对大鼠肾脏中 SOD 和 CAT 活性的影响

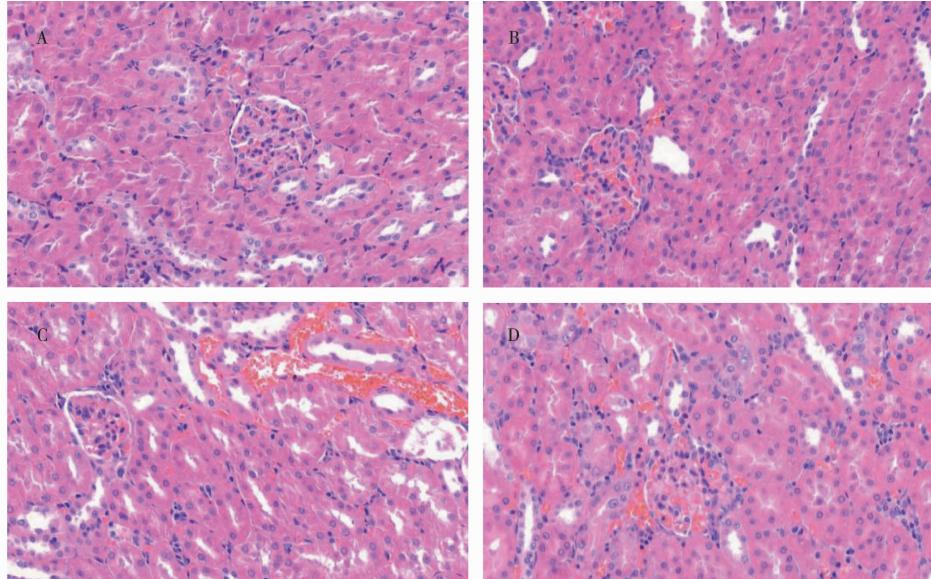
由图 3 可知,与对照组相比,槲皮素组 SOD 和 CAT 活性无显著变化,镉组肾脏中 SOD 和 CAT 活性显著下降($P < 0.05$);槲皮素+镉组与镉组相比,肾脏中 CAT 活性升高且差异显著。说明镉可降低肾脏中抗氧化酶 SOD 和 CAT 的活性,槲皮素可抵抗抗氧化酶活性的降低。



2.4 镉和槲皮素对大鼠肾脏的组织病理学影响

与对照组(图 4A)相比,槲皮素组(图 4B)处理的大鼠肾脏组织结构比较完整,肾小球边界清晰,血管球规则,肾小囊腔清晰可见,肾小管管腔规则。镉进入肾脏后会造成组织在不同程度上的

损伤,肾细胞出现破裂,毛细血管发生溶血;并且还有细胞不同程度的脱落,肾小球体积变小,球囊变宽等病理变化(图 4C)。镉+槲皮素组(图 4D)的大鼠肾脏组织结构与镉组(图 4C)相比,损伤程度明显降低,相对较小。



A.对照组;B.槲皮素组;C.镉组;D.镉+槲皮素组。

图 4 大鼠肾脏病理切片图(400×)

3 讨论

研究表明,镉毒损伤与氧化损伤密切相关^[9]。本次试验从镉致氧化损伤的方面进行的研究,进而探究槲皮素对镉毒损伤与氧化损伤的保护作用。

3.1 镉和槲皮素对 UA、CRE 和 BUN 含量的影响

UA、CRE 和 BUN 是临幊上常用于评价肾功能的常用指标,这些指标的变化反映镉对肾小球的损伤情况,肾小球滤过率降低时,机体内的代谢废物不能排出,就会出现 UA、CRE 和 BUN 的升高。UA 是嘌呤代谢的终产物,肾功能不全时,CRE 在体内蓄积,BUN 水平与哺乳动物蛋白质分解代谢增加和/或氨转化为尿素有关,这是由于精氨酸酶合成增加的结果,精氨酸酶参与尿素生成。在之前的一项研究中,血清肌酐升高反映了肾功能衰竭的诊断。服用柚皮素可显著恢复血清尿素、尿酸和肌酐,从而保护肾功能免受铅中毒^[10]。本研究发现,镉组血清中 UA 和 CRE 含量显著升高,表明镉可导致肾脏功能损伤,可能与

肾小球过滤率下降,导致肾功能受损有关。这与 Wang 等^[11]研究结果一致。与镉组相比,镉+槲皮素组 UA 和 CRE 含量显著下降,表明槲皮素可减轻镉对肾脏的损伤。

3.2 镉和槲皮素对 GSH 和 MDA 含量的影响

GSH 是含 γ -酰胺键和巯基的三肽,由谷氨酸、半胱氨酸及甘氨酸组成^[12]。GSH 具有抗氧化和清除自由基的作用,作为重要的还原剂,参与体内多种氧化还原反应,使巯基酶的活性基团-SH 维持还原状态。GSH 可以降低机体过氧化物及脂质过氧化物产物,增强抗氧化酶活性,改善机体的抗氧化状态^[13]。MDA 是脂质过氧化降解的中间产物,会造成细胞成分、结构和功能的严重破坏。脂质过氧化的程度与 MDA 的水平呈正相关^[14]。镉导致脂质过氧化物的产生,破坏细胞结构,造成线粒体等细胞器功能损害,最终导致细胞发生不可逆损伤,甚至凋亡^[15]。

本研究结果表明,与对照组相比,镉组肾脏中 GSH 和 MDA 含量显著高于对照组。研究结果与王莉等^[1]的研究相似,用 5 和 25 mg·L⁻¹ 不同浓

度氯化镉自由饮水染毒约 480 d, 导致大脑组织内 MDA、GSH 含量极显著升高($P<0.01$)。GSH 的增加是因为镉进入机体后, 体内的自由基的量会增加, 机体为了防御氧化损伤, 机体需要更多 GSH, 代偿性地引起 GSH 含量增加有关。MDA 含量的增加表明镉进入肾脏后, 使肾脏发生氧化损伤。与镉组相比, 镉+槲皮素组 GSH 含量显著降低, 说明槲皮素降低机体过氧化物及脂质过氧化物产物, 增强抗氧化酶活性, 对镉导致的细胞氧化损伤具有保护作用。镉+槲皮素组肾脏中的 MDA 含量明显降低, 说明槲皮素可以清除体内的自由基, 增强组织的抗氧化能力, 减轻肾脏中的脂质过氧化损伤, 但具体分子机制需要进一步研究。

3.3 镉和槲皮素对 CAT 和 SOD 活性的影响

肾脏是镉损伤的主要靶器官。SOD 是生物体内存在的一种抗氧化金属酶, 它能催化超氧阴离子自由基歧化生成 O_2 和 H_2O_2 , 在机体氧化与抗氧化平衡中起到关键作用^[15]。CAT 是生物氧化过程中重要的抗氧化酶之一, 可有效分解 SOD 催化副产物 H_2O_2 形成 H_2O 和 O_2 , 从而降低体内 H_2O_2 浓度起到保护作用, 抑制氧基团对细胞膜系统的损害^[16-17]。

本研究结果表明, 与对照组相比, 镉组肾脏中 SOD 活性出现了显著降低。说明镉会导致肾脏组织脂质过氧化反应增强对肾脏组织造成氧化损伤, 镉+槲皮素组与镉组相比 SOD 活性升高, 表明槲皮素可以改善镉对大鼠肾脏的氧化损伤。但对 SOD 的活性影响不显著, 可能与作用时间和机制有关。

与对照组相比, 镉组肾脏中的 CAT 的活性明显降低, 是因为镉造成肾脏细胞氧化损伤, 导致 CAT 活性降低。镉+槲皮素组与镉组相比, 镉+槲皮素组肾脏中 CAT 活性显著高于镉组, 说明槲皮素能清除氧基团, 提高 CAT 的抗氧化能力, 对镉导致的肾脏氧化损伤具有保护作用, Yang 等^[8]研究表明, 槲皮素也具有抗氧化功能。

3.4 镉和槲皮素对大鼠肾脏组织结构的病理学影响

镉会对不同组织器官造成不同程度的毒性损伤^[18-21]。镉从消化道进入机体, 会出现呕吐、胃

肠痉挛、腹疼、腹泻等症状, 甚至可因肝肾综合症死亡^[22]。镉组存在肾脏细胞坏死, 肾小球形状不规则, 体积变小, 且毛细血管出现溶血现象。镉进入肾脏后会造成组织在不同程度上的损伤。大鼠肾脏切片显示: 对照组, 肾小球边界清晰, 血管球规则, 肾小囊腔清晰可见, 肾小管管腔规则, 与对照组相比, 镉组肾细胞出现破裂, 毛细血管发生溶血; 并且还有细胞不同程度的脱落, 肾小球体积变小, 球囊变宽等病理变化。镉+槲皮素组与镉组相比, 毛细血管溶血现象有所改善; 细胞结构相对完整; 肾小球形状比较清晰; 球囊相对变窄。结果表明, 镉会导致肾脏组织脂质过氧化, 槲皮素能减轻镉对肾脏的毒性作用对脂质过氧化有保护作用。

4 结论

试验结果表明镉对肾脏组织具有显著的毒性, 镉可显著提高血清中 UA、CRE 的含量, 以及肾组织中 GSH 和 MDA 的含量, 显著降低肾脏中 SOD 和 CAT 的活性, 造成肾脏明显病理损伤, 而槲皮素可以有效减轻氧化损伤的程度, 从而改善镉对肾脏造成的损伤, 本研究为应用槲皮素预防镉中毒提供了理论依据。

参考文献:

- 王莉,闻双全,贺双江,等.慢性镉暴露对小鼠大脑皮质的毒性损伤作用[J].畜牧与兽医,2021,53(2):50-55.
- GENCHI G, SINICROPI M S, LAURIA G, et al. The effects of cadmium toxicity[J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2020, 17(11): 3782.
- 张鼎.镉中毒及锌对镉中毒的作用机理研究[D].武汉:华中农业大学,2015.
- 徐明畅,闻双全,王莉,等.葛根素对镉致大鼠肾脏病理变化和皮质氧化损伤的保护效应[J].畜牧与兽医,2021,53(7):47-51.
- XU D, HU M J, WANG Y Q, et al. Antioxidant activities of quercetin and its complexes for medicinal application[J]. Molecules, 2019, 24(6):1123.
- 渠文涛.槲皮素酰胺类衍生物的合成与生物活性研究[D].郑州:郑州大学,2013.
- 谭君,王伯初,祝连彩.槲皮素金属配合物的药理作用研究进展[J].中国药学杂志,2006,41(22):1688-1691.
- YANG H, YANG T, HENG C, et al. Quercetin improves nonalcoholic fatty liver by ameliorating inflammation, oxidative stress, and lipid metabolism in db/db mice[J]. Phytotherapy Research, 2019, 33(12):3140-3152.

- [9] 岳亚,高明爽,刘璠娜.脂质过氧化在慢性肾脏病、急性肾损伤、肾细胞癌中的作用[J].现代临床医学,2021,47(6):447-450.
- [10] KIM M Y, SHON W J, PARK M N, et al. Protective effect of dietary chitosan on cadmium accumulation in rats[J]. Nutrition Research and Practice, 2016, 10(1): 19-25.
- [11] WANG J, YANG Z, LIN L, et al. Protective effect of naringenin against lead-induced oxidative stress in rats[J]. Biological Trace Element Research, 2012, 146(3): 354-359.
- [12] 丛峰松.神奇的小分子活性肽[M].上海:上海交通大学出版社,2015:18.
- [13] 龚频,杨倩,何蓉蓉,等.四甲基尿酸对镉致小鼠肾脏损伤的保护作用[J].现代食品科技,2019,35(11):1-6,24.
- [14] 宫健伟,孙喜灵,王超云,等.四君子汤对脾气虚模型大鼠血清SOD,CAT和GSH-Px及MDA的影响[J].时珍国医国药,2017,28(1):46-47.
- [15] ZHENG J, ZHUO L, RAN D, et al. Cadmium induces apoptosis via generating reactive oxygen species to activate mitochondrial p53 pathway in primary rat osteoblasts[J]. Toxicology, 2020, 446: 152-611.
- [16] FANG Y Z, YANG S, WU G. Free radicals, antioxidants, and nutrition[J]. Nutritio, 2002, 18(10): 872-879.
- [17] 李晔,蔺怀,张倩茹,等.矢车菊素-3-葡萄糖苷对重金属镉胁迫后大鼠氧化损伤的缓解作用[J].生态学杂志,2016,35(5):1358-1363.
- [18] 龚频,白晓换,陈福欣,等.镉的肝脏毒性研究进展[J].工业卫生与职业病,2016,42(4):318-320.
- [19] KLAASSEN C D, LIU J, CHOUDHURI S. Metallothionein: An intracellular protein to protect against cadmium toxicity[J]. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 2003, 39(1): 267-294.
- [20] CHENG C Y, MRUK D D. The blood-testis barrier and its implications for male contraception[J]. Pharmacological Reviews, 2012, 64(1): 16-64.
- [21] JI Y L, WANG H, LIU P, et al. Pubertal cadmium exposure impairs testicular development and spermatogenesis via disrupting testicular testosterone synthesis in adult mice[J]. Reproductive Toxicology, 2010, 29(2): 176-183.
- [22] 环境保护部自然生态保护司.土壤污染与人体健康[M].北京:中国环境科学出版社,2013.

Cadmium Induced Kidney Injury in Rats and the Protective Effect of Quercetin

JIANG Meng-li, LU Zhan-hao, LU Si-yuan, GAO Meng-meng, LI Hong-xia, ZHU Shuai-qi, WANG Ji-cang

(College of Animal Science and Technology, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471023, China)

Abstract: To investigate the renal injury of cadmium in rats and the protective effect of quercetin, twenty-four male SD rats were randomly divided into 4 groups with 6 rats in each group. Each day was treated as follows: control group (intragastric administration of normal saline), cadmium treatment group ($1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ intraperitoneal injection of CdCl_2), quercetin group ($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ gavage of quercetin), and cadmium + quercetin group ($1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ intraperitoneal injection of CdCl_2 and $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ gavage of quercetin). The test period was 28 days, and then the rats were killed. The serum of rats was collected and the contents of uric acid(UA), creatinine (CRE) and urea nitrogen (BUN) were detected; The contents of reduced glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA) and the activities of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) were detected; The renal tissue of rats was taken to prepare tissue sections, and the histopathological changes were observed. The results showed that cadmium could significantly increased the contents of UA and CRE in serum ($P < 0.05$), GSH and MDA in renal tissue, and significantly reduced the activities of SOD and CAT in kidney. Compared with cadmium group, quercetin could significantly reduced the contents of UA and CRE in serum, significantly reduced the contents of GSH and MDA in kidney tissue, and significantly increased the activity of CAT in kidney, beside quercetin could increase SOD activity, but the difference was not significant. Histological sections of kidney showed that cadmium could cause capillary congestion in renal cortex; The cells had different degrees of necrosis, and cadmium + quercetin could significantly reduced the damage. Therefore, cadmium induced lipid peroxidation injury and tissue injury in rat kidney, and quercetin had a certain protective effect on the injury caused by cadmium.

Keywords: cadmium; quercetin; rats; the kidneys; oxidative damage