

硒对镉中毒小鼠肝细胞线粒体超微结构影响的体视学研究

马卓¹ 陈万芳² 刘宗平¹

(1. 甘肃农业大学动物医学系, 兰州 730070;

2. 南京农业大学动物医学院, 210095)

摘要 用电镜定性观察和体视学定量相结合的方法研究镉中毒小鼠肝细胞线粒体超微结构的变化及硒的保护作用。电镜定性观察发现, 镉中毒小鼠肝细胞线粒体极度肿胀, 嵴消失乃至空泡化。硒镉联合处理小鼠也有类似的变化, 但程度较轻。体视学计量发现 Cd 处理小鼠肝细胞线粒体平均体积(\bar{V})、体密度(V_v)、平均外径(\bar{D})、面密度(S_v)、平均截面积(\bar{A}_x)和平均截面周长(\bar{B}_x)显著高于硒镉联合处理小鼠和正常小鼠($P < 0.01$), 面数密度(N_A)、比表面(δ_x)和数密度(N_v)显著低于硒镉联合处理小鼠和对照小鼠($P < 0.01$); 硒镉联合处理小鼠 \bar{A}_x 、 N_A 和 \bar{V} 显著低于对照组($P < 0.05$, $P < 0.01$), 而 S_v 和 N_v 极显著高于对照组($P < 0.01$), 其余参数均与对照组无显著差异。因而认为, 镉毒会引起肝细胞线粒体的严重损害, 其特点为肿胀、数量减少和异形。硒对这种损伤具有明显的保护作用。

关键词 硒, 镉, 肝实质细胞, 线粒体, 体视学, 小鼠

镉是一种典型的亲肝毒物, 在急性和慢性状态下均会在肝组织蓄积并引起坏死^[1]。一般认为, 急性镉中毒时, 最常受损伤的是肝、睾丸和心脏, 而在慢性状态下, 毒性损伤则主要集中在肾脏, 且单纯 CdCl₂ 往往是肝毒性的, 而 Cd 与金属硫蛋白(MT)的复合物 CdMT 则具有明显的肾毒性^[2,3]。多年来, 人们对镉中毒引起的肝损伤进行了大量的研究。Dudley 等(1982, 1984)先后研究了急性镉中毒大鼠的病理形态学和超微结构变化, 发现主要的组织学特点为肝细胞肿胀, 嗜伊红性增强和坏死, 同时肝细胞内分裂相也增加。电镜下见肝细胞内线粒体极度肿胀, 粗面内质网扩张、脱颗粒和细胞核内周边染色质颗粒增多^[2,4]。Stowe 等(1972)在家兔观察了慢性镉中毒的肝损伤变化, 主要表现小叶间和汇管区纤维化、胆管增生和局灶性炎症细胞浸润^[5]。硒是镉的一种有效颉颃剂, 对镉引起的损伤具有一定的保护作用。但目前有关硒对镉引起的肝损伤特别是对超微结构变化的影响报道甚少, 特别是缺乏体视学方面的研究, 而常规的定性观察很难客观而准确地反映镉中毒及硒解毒状态下细胞损伤的程度。因此, 本研究利用定性观察和计量相结合的方法系统研究镉对小鼠肝细胞线粒体超微结构的损伤及硒的保护作用, 便于进一步揭示镉损伤和硒保护的机制。

1 材料和方法

* 甘肃省自然科学基金资助项目。

** 收稿日期 1996-06-26。

1.1 实验动物及处理 采用平均体重为 30g 的昆明种雄性小鼠 9 只(南京农业大学实验动物场提供),随机分为 Cd 组、Se+Cd 组和对照组。Cd 组按 3mg CdCl₂/kg 体重的量腹腔注射 Cd-Cl₂ 溶液;Se+Cd 组除接受与 Cd 组同样的处理外,按 2mg Na₂SeO₄/kg 体重的量腹腔注射 Na₂SeO₄ 溶液,以上处理每天一次,连续 5d。对照组不作任何处理。于处理后一周脱颈椎致死,采集肝脏样本。

1.2 电镜样本的制作 小鼠处死后,迅速从小鼠肝右叶切取 1mm³ 的肝组织 10 余块,2.5% 戊二醛预固定,4℃ 保存。随机选取预固定的组织 3 块,漂洗后用 1% 四氧化锇固定 2h,梯度丙酮脱水,Epon812 包埋、聚合。LKB—V 型超薄切片机切片,醋酸铀和柠檬酸铅双重染色。每个包埋块取制备良好的切片,在日立—600 型电镜下放大至 10000 倍,每只动物随机拍摄互不重叠的视野 10 个,每组 3 只动物共拍摄 30 个视野,全部 9 只小鼠共拍摄视野 90 个,每个视野的底片经光学放大 2.1666 倍,此片供形态定量分析。

1.3 电镜定性观察及体视学定量分析 用日立电镜系统观察各组肝细胞的形态变化性质及程度。采用 P_T=P_r=140 的短线测试格(图 1),根据 Weibel 的点计数法^[6]在电镜照片上计数参照系(胞质视野)内线粒体的数目(N)、线粒体内测试点数(P)和线粒体的边界与测试线的交点数(I)。按体视学公式测算线粒体的平均截面积(\bar{A}_x)、平均外切直径(\bar{D})、平均截面周长(\bar{B}_x)、面数密度(N_A)、体密度(V_V)、面积密度(S_V)、比表面(δ_x)、平均体积(\bar{V})和数密度(N_V),所得结果经统计学处理,分析组间差异^[7]。

2 结 果

定性观察发现,Cd 组小鼠肝细胞有广泛的损伤变化(另文报告),其中线粒体极度肿胀,嵴变淡,消失甚至呈苍白区(图 2),有时空泡化。Se+Cd 组也有类似的变化,但程度较轻且增生明显(图 3)。

各组小鼠肝细胞线粒体各项参数测算结果见表 1。

表 1 小鼠肝细胞线粒体的形态计量结果($\bar{X} \pm SE$)

Table 1 The morphometric data of hepatocellular mitochondria in mice

	Cd 组(n=30) Cd treated	Se+Cd 组(n=30) Se and Cd treated	对照组(n=30) Control
\bar{A}_x	0.2679±0.0855 $\Delta\Delta$ *	0.1873±0.0291*	0.2118±0.0566
\bar{D}	1.6791±0.2679 $\Delta\Delta$ *	0.6855±0.0533	0.7014±0.0937
\bar{B}_x	1.9177±0.0761 $\Delta\Delta$ *	1.5161±0.0333	1.6028±0.0653
N _A	0.8131±0.0093 $\Delta\Delta$ *	0.8969±0.0003**	1.0028±0.0091
V _V	0.2179±0.0132 $\Delta\Delta$ *	0.1897±0.0108	0.1900±0.0004
S _V	1.9848±0.0014 $\Delta\Delta$ *	1.9353±0.0355**	1.8301±0.0094
δ_x	9.1106±0.0263 $\Delta\Delta$ *	10.3020±0.0355**	9.6320±0.0257
\bar{V}	0.4229±0.0037 $\Delta\Delta$ *	0.1197±0.0010**	0.1254±0.0013
N _V	0.5002±0.0174 $\Delta\Delta$ *	2.6352±0.0855**	1.4845±0.0047

** P<0.01 vs control; * P<0.05 vs control

$\Delta\Delta$ P<0.01 vs Cd and Se treated; Δ P<0.05 vs Cd and Se treated

表1显示,Cd组 \bar{A}_x 、 \bar{D} 、 \bar{B}_x 、 V_v 、 S_v 和 \bar{V} 均极显著高于对照组和Se+Cd组($P < 0.01$), N_A 、 δ_x 和 N_v 极显著低于对照组和Se+Cd组($P < 0.01$);Se+Cd组 \bar{A}_x 显著低于对照组($P < 0.05$), N_A 和 \bar{V} 极显著低于对照组($P < 0.01$), S_v 和 N_v 极显著高于对照组($P < 0.01$),其余各项参数未显示出明显的组间差异。

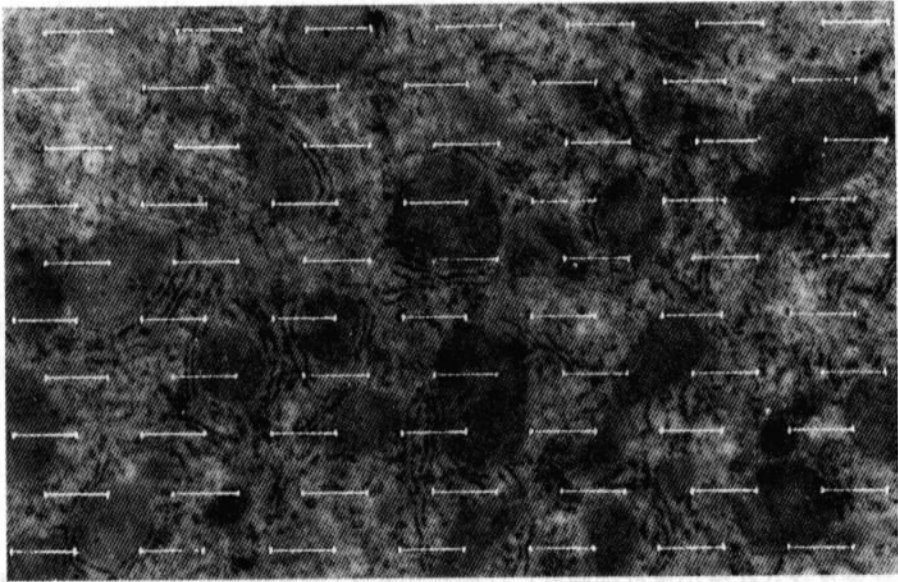


图1 对照小鼠肝细胞超微结构电镜照片($\times 21666$),其上覆盖一短线测试格($P_T=140$)

Fig. 1 Electron micrograph of a hepatic cell in a control mouse (Magnification 21666) overlaid with a short line test grid ($P_T=140$)

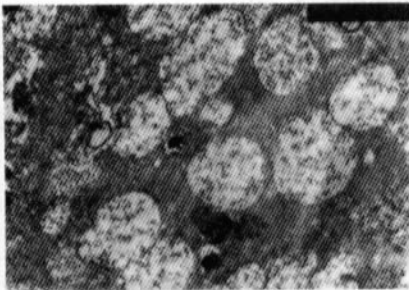


图2 镉中毒小鼠肝线粒体极度肿胀、嵴消失, $\times 6600$

Fig. 2 Severe swelling of hepatic mitochondria with lysis of cristae in Cd-treated mice (Magnification 6600)

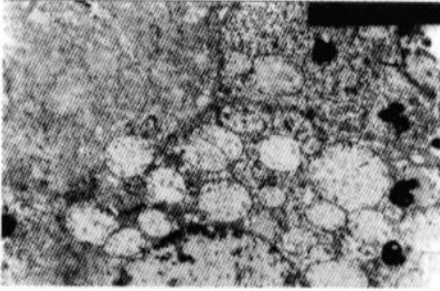


图 3 Se+Cd 组小鼠肝线粒体轻度肿胀、增生, $\times 5000$

Fig. 3 Slight swelling and proliferation of hepatic mitochondria in selenium and cadmium untreated mice (Magnification $\times 5000$)

3 讨论

普遍认为,线粒体是镉损伤的主要细胞器^[10],因此本研究重点对线粒体的变化进行了详细的形态定量研究。结果发现,Cd 中毒组反映体积变化的 \bar{V} 及 V_v 和大小的 \bar{A}_x 、 \bar{B}_x 和 \bar{D} 极显著高于对照组和 Se+Cd 组,意味着 Cd 中毒组肝细胞内线粒体的总体积增大,这种体积增大有可能是由线粒体的肿胀或增生或者共同作用所致,但由于反映数量变化的两项参数 N_A 和 N_v 不仅在 Cd 组未见明显升高,反而极显著低于对照组和 Se+Cd 组,说明 Cd 组细胞内线粒体体积增大是由于线粒体的肿胀所致,与定性观察结果相一致。线粒体数量不仅未见增生,而且低于正常。线粒体数量的减少可能是由于线粒体本身的崩解所造成的。 δ_x 是反映线粒体肿胀或固缩的另外一个参数,线粒体固缩时 δ_x 值增大,肿胀时 δ_x 值减小^[7],本研究结果显示,Cd 组 δ_x 值亦极显著低于 Se+Cd 组和对照组,从另一角度表明 Cd 组线粒体发生了明显肿胀。线粒体的体积变化与功能有密切关系,体积小时功能强,体积大时功能较弱^[11]。本研究结果提示,Cd 组线粒体的功能已发生了严重障碍。

S_v 代表单位体积肝细胞中所具有的表面积^[7]。本研究发现,Cd 组线粒体 S_v 极显著高于对照组和 Se+Cd 组,意味着细胞胞浆中所具有的线粒体的表面积增加。线粒体表面积增加显然不是由于增生所引起的,考虑到反映形状变化的 δ_x 明显降低,因此线粒体表面积的增加很可能是线粒体的畸形所致。

有关镉致线粒体膜损伤的机制尚不清楚。实际上,镉会抑制线粒体的酶活性和呼吸功能而改变乳酸/丙酮酸和 ATP/ADP 之比^[8]。这种抑制可能是由 Cd 与线粒体膜组成成分直接作用所致^[13,14]。镉诱导的细胞酸化,亦即 pH 值下降也会引起线粒体功能紊乱,在线粒体损伤过程中发挥作用^[8]。笔者认为,Cd 在细胞内会诱发自由基产生,引起膜脂质过氧化,进而使膜物理状态改变,同时诱发膜结合酶活性下降,致使呼吸功能障碍,氧化磷酸化偶联受阻(另文报道),而进一步引起线粒体损伤。

硒本身具有抗氧化、稳膜作用,并对镉毒具有颞颥作用^[14]。在亚细胞水平上,硒对镉毒性损伤的保护作用报道甚少。本研究定性观察发现,Se+Cd 组肝细胞也呈现与 Cd 组相似的损伤变化,但程度较轻。体视学研究表明,反映线粒体大小和体积变化的各项参数均低于 Cd 组,反映数量变化的参数及 δ_x 又极显著高于 Cd 组,表明 Se+Cd 组线粒体肿胀变化较 Cd 组轻,

而线粒体数量又相对增加。在 Se+Cd 和对照组之间,反映体积变化和大小参数仅 \bar{A}_x 和 \bar{V} 出现极显著差异,表明 Se+Cd 组肝细胞线粒体虽有一定的肿胀,但与正常组总的差异不太明显,显示了 Se 对 Cd 毒性的显著保护作用。另外,Se+Cd 组 N_v 和 S_v 极显著高于对照组,表明该组线粒体数量明显增多,出现了增生现象。

参 考 文 献

- [1] 唐伟峰,黄安辉,王翔朴. 镉在肝细胞内的吸收过程及其对肝细胞内钙稳态的影响. 中国公共卫生学报, 1995,14(1):4~5
- [2] Dudley R E,Svoboda D J,Klaassen C D. Acute exposure to cadmium causes severe liver injury in rats, Toxicol. Appl. Pharmacol,1982,65,302~313
- [3] Mckim J M,Jr Li J,Liu Y P,Klaassen C D. Distribution of cadmium chloride and cadmium-metallothionein to liver parenchymal,Kupffer,and endothelial cells; Their relative ability to express metallothionein. Toxicol. Appl. Pharmacol,1992,113,324~330
- [4] Dudley R E,Svoboda D J,Klaassen C D. Time course of cadmium-induced ultrastructural changes in rat liver. Toxicol. Appl. Pharmacol,1984,76,150~160
- [5] Stow H D,Wilson M,Goyer R A. Clinical and morphological effects of oral cadmium toxicity in rabbits. Arch. Pathol,1972,94,389~405
- [6] Weible E R. Correlated morphometric and biochemical studies on the liver cell. J. Cell Biology,1969,42:68
- [7] 郑富盛. 细胞形态立体计量学. 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社. 1990
- [8] Toshiaki Koizumi Toshiki Yokota,Hiroaki Shirakura et al. Potential mechanism of cadmium-induced cytotoxicity in rat hepatocytes;inhibitory action of cadmium on mitochondrial respiratory activity. Toxicology,1994,92,115~125
- [9] Trump B F,Berezsky I K,Q-Vargas A R. Cell death and the disease process. The role of calcium. In: I. D. Bowen and R. A. Locjshin Eds, Cell Death in Biology and Pathology, Chapman and Hall, New York, 1981, PP. 209~224
- [10] Muller L,Ohnesorge F K. Different response of liver parenchymal cells from starved and fed rats to cadmium. Toxicology,25,1982,141~150
- [11] Boquist L. Pancreatic islets subjected to different concentrations of glucose *in vitro*: a study with special regard to mitochondrial changes. Virchows. Arch. B cell path,1977,23:219~226
- [12] Brierley G P. Ion transport by heart mitochondria. VII. Activation of the energy-linked accumulation of Mg by Zn and other cations. J. Biol. Chem,1967,242,1115~1122
- [13] Brierley G P,Jacobus W E,Hunter G R. Ion transport by heart mitochondria, VIII. Activation of adenosine triphosphate-supported accumulation of Mg by Zn and by p-chloromercuri-phenylsulfonate. J. Biol. Chem,1967,242,2192~2198
- [14] Bozkurt A,Smith J C. The interaction between cadmium and selenium in the rat. In Selenium in biology and medicine. (J. E. Spallholz, J. L. ,Martin, and H. E. ,Ganther, eds), 1981, 331~335. AVI. Westport, Conn

EFFECT OF SELENIUM ON HEPATOCELLULAR ULTRASTRUCTURE IN MICE TREATED WITH CADMIUM—A STEREOLOGICAL STUDY

Ma Zhuo¹, Chen Wanfang², Liu Zongping¹

(1. *Veterinary Department, Gansu Agricultural University,*

Lanzhou, 730070; 2. College of Veterinary

Medicine, Nanjing Agricultural University, 210095)

Abstract

A stereological analysis with qualitative observation of electron microscope was employed to study the cadmium-induced injury of hepatic mitochondria in mice and protective effects of selenium. Electronmicroscopic observation showed the severe mitochondrial swelling with lysis of cristae. Similar changes in the hepatocytes of Se and Cd unitedly-treated mice existed but were milder. The morphometric determination of mitochondria indicated that mean volume (\bar{V}), volume density (V_V), mean caliper diameter (\bar{D}), surface density (S_V), mean profile area (\bar{A}_X) and mean perimeter (\bar{B}_X) in Cd-treated mice were significantly higher than those in Se and Cd treated as well as normal mice ($P < 0.01$). Numerical density, (N_V), specific surface (δ_X) and numerical density on area (N_A) were significantly decreased ($P < 0.01$); N_A and \bar{V} were significantly lower but S_V and N_V were significantly higher in Se and Cd treated mice than in control mice ($P < 0.05, P < 0.01$); other values didn't show any significant differences between Se and Cd treated and normal mice. It follows that cadmium caused the severe mitochondrial injury characterized by severe swelling, reduced number and deformation; Se effectively abated the Cd-induced mitochondrial injury in mice.

Key words Selenium, Cadmium, Hepatic parenchymatous cell, Mitochondria, Stereology, Mouse