

# 铜负荷饲养兔肝、肾组织含铜量 和组织病理学观察\*

赖力英<sup>①</sup> 杨旭<sup>①\*\*</sup> 李代强<sup>②</sup> 贺兴鄂<sup>①</sup>

(<sup>①</sup>中南大学湘雅二院肝病研究中心 长沙 410011; <sup>②</sup>中南大学湘雅二院病理科 长沙 410011)

**摘要:** 探讨了新西兰兔在不同剂量铜负荷饮食时肝、肾组织含铜量和组织病理的改变。30只新西兰兔分为5组,对照组(第1组)给与正常饲料,每天每公斤体重120g,铜负荷组(第2、3、4、5组)给予含铜的饲料,铜剂量分别为每天每公斤体重0.1、1、10、20mg,其余饲料用正常饲料补足。每周测体重1次,每10d抽空腹静脉血1次查血清谷丙转氨酶(ALT)及血清铜,每半个月肝穿刺肝组织查铜一次,并做肝组织HE染色光镜下检查。实验结束时,耳静脉注射空气处死动物,取肝、肾组织块作病理检查及组织铜离子含量测定。5个月饲养期内,实验组血清ALT及血清铜离子含量与对照组相比差异无显著性,但组织中的铜离子含量随饲料含铜量的增加而增加。实验组肝组织铜离子含量与对照组相比差异有显著性( $P < 0.05$ ),其中最大剂量组与对照组相比差异有极显著性( $P < 0.001$ )。肾组织铜离子含量中,第4、5组与对照组相比差异有显著性( $P < 0.05$ )。病理检查中,第2、3组肝脏病理改变轻微,第4、5组有较明显的坏死病变。作者认为新西兰兔对铜的耐受性较好,较大剂量、较长时间服用有较好的安全性,可用于铜实验动物模型的建立,但进食剂量过大(含铜20mg/kg体重·d以上),短期内可引起严重的肝肾器官病变。

**关键词:** 兔;铜负荷;动物模型

**中图分类号:** Q955 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2004)06-96-03

## Copper Quantity and Pathology in Liver and Kidney of Rabbits Fed with Copper-loading Dietary

LAI Li-Ying<sup>①</sup> YANG Xu<sup>①</sup> LI Dai-Qiang<sup>②</sup> HE Xing-E<sup>①</sup>

(<sup>①</sup> Liver Disease Research Center, The Second Xiangya Hospital, Central South University, Hunan 410011;

<sup>②</sup> Department of Pathology, The Second Xiangya Hospital, Central South University, Hunan 410011, China)

**Abstract:** To investigate the effect of overloaded dietary copper on New Zealand rabbits' weight, serum alanine aminotransferase and copper concentration, as well as pathology of some organs, 30 rabbits were divided into 5 groups. The control group was fed with normal diet, and the experimental groups were given copper-loaded diet at 0.1 mg, 1 mg, 10 mg, and 20 mg per kilogram body weight per day. The rabbits were weighted every week, blood was taken every ten days to measure serum alanine aminotransferase and copper concentration, and liver biopsy was conducted for copper detection and pathological observation. At the end of experiment, all rabbits were killed by injecting air through the ear vein. The tissues of their liver and kidney were taken for pathological observation and

\* 国家自然科学基金资助项目(No. 30340016);

\*\* 通讯作者, E-mail: yangxu@vip.163.com;

第一作者介绍 赖力英,女,40岁,博士研究生,副教授;研究方向:肝功能衰竭的治疗;E-mail: lailiyong@mail.csu.edu.cn。

收稿日期:2004-04-16,修回日期:2004-09-04

copper detection. All data were analyzed by SPSS. There was no statistical significance in serum alanine aminotransferase and copper concentration between experimental groups and control group during the course of the experiment, but copper concentration in the tissue was increased with the increased diet copper loading. The copper concentrations of liver and kidney increased significantly compared to the controls. There were not distinct pathological changes in control rabbits and low copper dietary loading groups, but with the copper loading increased, the necrosis in liver was evident. The damages were obvious in kidney of rabbits that were fed with highest dosage copper. Thus, we suppose that New Zealand rabbits have a good endurance to copper loading dietary. They can be used to establish an animal model of copper dietary overload.

**Key words:** Rabbits; Copper dietary loading; Animal model

铜广泛存在于自然界,生物系统中许多涉及氧的电子传递和氧化还原反应都由含铜的酶催化,所以铜是动植物体内重要的微量元素,不可缺少,但是铜含量过多又会引起器官组织病变,诸如肝豆状核变性等病变。人体的铜供给主要来自膳食,而对人膳食中铜浓度的推荐摄入量是以对动物合适的饮食范围的最低浓度为基准的,本文作者用新西兰兔对饮食铜摄入量的安全范围作了研究,结果报道如下。

## 1 材料与方法

**1.1 动物铜负荷饮食** 新西兰兔共30只,购自本院动物实验室,分为5组,第一组为正常对照,第2~5组为实验组。年龄为6~7个月,体重168~181g,经检验各组间无显著差异。铜负荷实验组共4个组,依次喂铜量为:0.1 mg/kg 体重·d, 1 mg/kg 体重·d, 10 mg/kg 体重·d, 20 mg/kg 体重·d。含铜饲料用硫酸铜粉末与正常饲料原料混合均匀,用饲料磨机打磨而成。动物每天的其余饲料在兔进食完全含铜饲料后用正常饲料补齐。对照组喂正常饲料,每天120 g/kg 体重。共饲养5个月。

**1.2 实验方法** 每周测体重1次。每10天空腹抽血1次,查血清谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、胆红素及血清铜,血清ALT测定采用Reitman法;血清铜检测用火焰离子铜吸收光谱法,仪器为AA-680 SHIMADZU。每半个月肝穿刺肝组织测铜含量1次,并做肝组织HE染色光镜下检查。实验结束时,耳静脉注射空气处死动物,无菌解剖,取肝、肾组织块,用生理盐水清洗,然后用于净滤纸吸干,分别取肝、肾组织各500 mg,用浓硝酸加热消化,最后用去离子水定容到10 ml,火焰离子铜吸收光谱法测定铜离子含量。

**1.3 统计学方法** 采用SPSS 10.0统计软件进行t-检验。

## 2 结果

在实验期内,各组的ALT差别无显著性( $P > 0.05$ ),各组的血清铜无显著性差异( $P > 0.05$ ),各实验组的肝组织铜含量比对照组均升高,差别有显著性( $P < 0.05$ ),最高剂量组肝铜含量与对照组相比差别有极显著性( $P < 0.001$ ),第4、5组肾铜比对照组明显升高,差别有显著性( $P < 0.05$ )(表1)。

表1 血清ALT、血清铜、组织铜含量检查结果( $\bar{X} \pm S$ )

组号	ALT(U/L)	血清铜( $\mu\text{g/ml}$ )	肝铜( $\mu\text{g/g}$ )	肾铜( $\mu\text{g/g}$ )
1	65.211 1 $\pm$ 23.163 6	0.906 87 $\pm$ 0.442 6	2.625 3 $\pm$ 1.138 6	2.504 1 $\pm$ 0.237 2
2	54.371 4 $\pm$ 31.179 6	0.938 4 $\pm$ 0.409 5	6.412 0 $\pm$ 3.414 1*	2.524 5 $\pm$ 0.244 4
3	50.685 0 $\pm$ 20.939 7	0.758 7 $\pm$ 0.381 5	7.632 0 $\pm$ 5.289 3*	3.046 0 $\pm$ 0.261 0
4	55.233 3 $\pm$ 11.097 1	0.826 7 $\pm$ 0.216 7	9.068 0 $\pm$ 6.829 2*	3.076 0 $\pm$ 0.140 1*
5	55.350 0 $\pm$ 22.360 1	0.850 0 $\pm$ 0.285 2	25.850 0 $\pm$ 1.343 5**	3.695 0 $\pm$ 0.134 3*

+ 经t-检验,第2~4组与第1组比较, $P$ 值均 $< 0.05$ ; ++ 经t-检验,第5组与第1组比较, $P$ 值 $< 0.001$ ; \* 经t-检验,第4、5组与第1组比较, $P$ 值 $< 0.05$

病理切片显示第1~3组兔肝脏病变不明显,见图版I:1。第4组有广泛肝细胞浊肿,小灶性坏死,纤维轻度增生,见图版I:2。第5组可见肝细胞大灶性坏死,少量炎性细胞浸润,多处纤维增生,见图版I:3。图版I:4为正常肾组织。第5组肾组织内肾小球大量细

胞增生,肾间质纤维增生(图版I:5),有充血出血(图版I:6,见图版页)。

## 3 讨论

微量元素是生命体内含量极微的化学元素,在生

物体内的含量必须适当。铜是细胞色素氧化酶、过氧化氢酶、单氨氧化酶、超氧化物歧化酶及抗坏血酸等的活性组份。铜缺乏可以导致细胞色素氧化酶的活性下降<sup>[1]</sup>,可致 Cu/Zn SOD 酶活性下降,增加细胞膜的脆性,缩短红细胞的寿命<sup>[2-4]</sup>,可致脑组织萎缩等病变。可见铜对于机体与其它微量元素一样具有重要的意义。但是,铜过量又会引起其它疾病,那么,铜的安全范围究竟怎样呢?

本实验显示,在肝脏功能正常的情况下,适量的铜口服摄入后,血清铜很快恢复正常水平,说明在短时间内铜离子会被机体从血清中清除,这与部分学者报道的一致<sup>[5-8]</sup>。在 5 个月的饲养实验期内,不同剂量实验组的 ALT 变化无显著性差异,与王训等<sup>[11]</sup>报道的结果有不同,原因可能为兔与大鼠的种属不同而致肝脏对铜离子损伤的反应敏感性不同。

体重增加方面,试验组与对照组相比无显著性差别( $P > 0.05$ ),与 Sokol<sup>[9]</sup>等报道的一致。就本实验而言,含药物的饲料每天按每公斤体重供给,进食完毕后才补足正常的饲料,实验设计上更据科学性,这样就可以避免因动物服药不足而导致的实验误差。

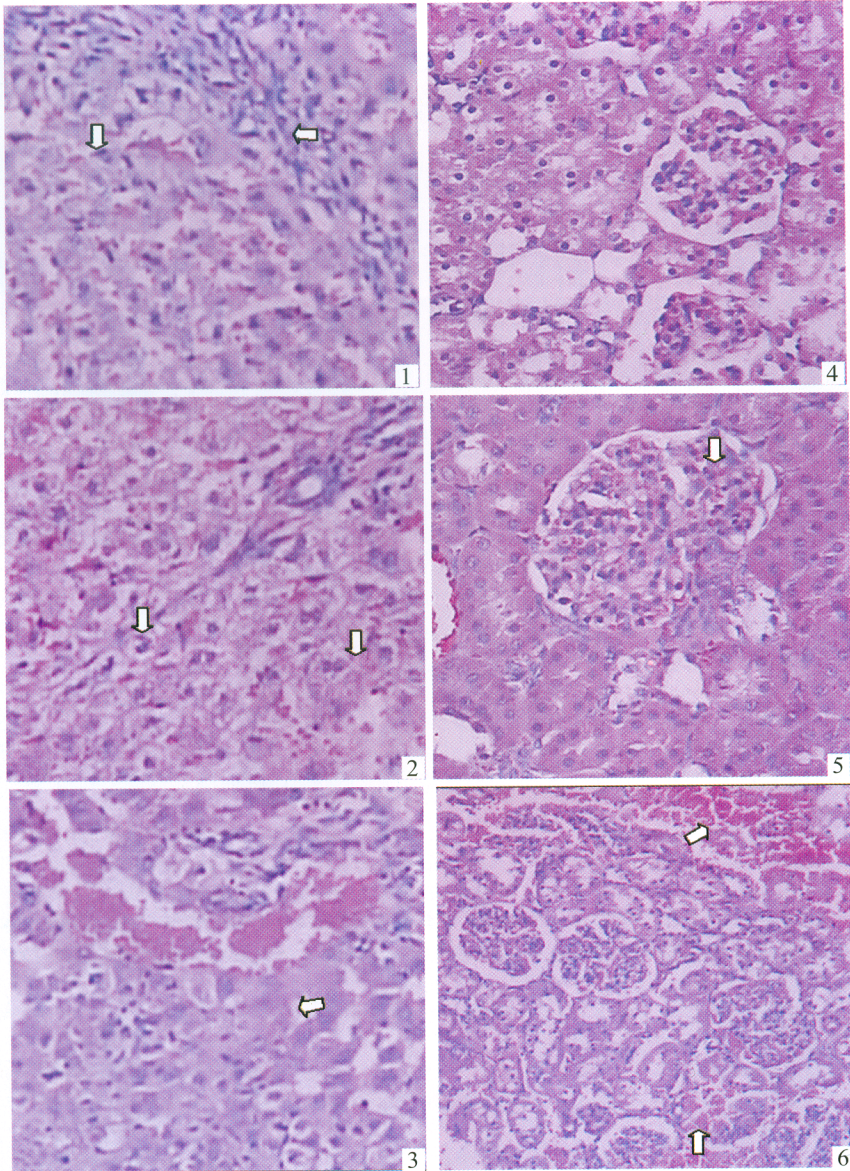
本实验发现,随饲料含铜量的增加,兔肝组织含铜量明显升高,与其他学者在大鼠与铜负荷研究中的结果类似<sup>[10,11]</sup>。低剂量含铜饲料组兔的肝、肾病变不明显,高剂量含铜饲料组的兔肝、肾组织内含铜量增加,病理损伤加重,有广泛肝细胞浊肿,小灶性坏死,纤维轻度增生。大剂量短期摄入,可迅速致严重的肝肾损害,表现为肝细胞大灶性坏死,少量炎性细胞浸润,多处纤维增生,肾小球大量细胞增生,肾间质纤维增生,有充血出血。

研究结果表明,新西兰兔口服铜饲料的耐受性较好,较大剂量、较长时间服用有较好的安全性,可用于铜实验动物模型的建立,但是过大剂量的进食含铜饲料(含铜 20 mg/kg 体重·d 及以上),短期内可以引起组

织器官严重的病理改变。

## 参 考 文 献

- [1] Paynter D I, Moir R J, Underwood E J. Changes in activity of the Cu-Zn superoxide dismutase enzyme in tissues of the rat with changes in dietary copper. *J Nutr*, 1979, **109**: 1 570 ~ 1 576.
- [2] Williams D M, Loukopoulos D, Lee G R, *et al.* Role of copper in mitochondrial iron metabolism. *Blood*, 1976, **48**: 77 ~ 85.
- [3] Hirase N, Abe Y, Sadamura S, *et al.* Anemia and neutropenia in a case of copper deficiency: role of copper in normal hematopoiesis. *Acta Haematol*, 1992, **887**: 195 ~ 197.
- [4] Futujita M, Itakura T, Takagi Y, *et al.* Copper deficiency during total parenteral nutrition: clinical analysis of three cases. *J Parent Enter Nutr*, 1989, **13**: 421 ~ 425.
- [5] Owen CA Jr. Metabolism of radiocopper (<sup>64</sup>Cu) in the rat. *Am J Physiol*, 1965, **209**: 900 ~ 904.
- [6] Weiss K S, Linder M C, Los alamos radiological medicine group. Copper transport in rats involving a new plasma protein. *Am J Physiol*, 1985, **249**: E77 ~ E88.
- [7] Walshe J M. Hudson memorial lecture: wilsons disease: genetics and biochemistry-their relevance to therapy. *J Inher Metab Dis*, 1983, **6**: 51 ~ 58.
- [8] Scott K C, Yurmlund J R. Compartment model of copper metabolism in adult men. *J Nutr Biochem*, 1994, **5**: 342 ~ 350.
- [9] Sokol R J, Devereaux M W, O' Brien K, *et al.* Abnormal hepatic mitochondrial respiration and Cytochrome C Oxidase activity in rats with long-term copper overload. *Gastroenterology*, 1993, **105**: 178 ~ 187.
- [10] Suzuki K T, Kanno S, Misawas S, *et al.* Copper metabolism leading to and following acute hepatitis in LEC rats. *Toxicology*, 1995, **97**(1 ~ 3): 89.
- [11] 王训, 杨任民. 二巯丁二钠对大鼠铜负荷模型铜代谢的影响. *中国新药杂志*, 1999, **8**(7): 458 ~ 460.



1. 可见肝细胞点状坏死、浊肿, 汇管区少量淋巴细胞(ϕ)(H.E×100); 2. 第4组兔肝, 广泛肝细胞浊肿、变性, 小灶性坏死, 纤维轻度增生(ϕ)(H.E×100); 3. 第5组兔肝, 肝细胞大灶性坏死, 少量炎性细胞浸润, 多处纤维增生(ϕ)(H.E×100); 4. 肾正常(H.E×100); 5. 第5组兔肾, 肾小球大量细胞增生, 肾间质纤维增生, 细胞变性浊肿(ϕ)(H.E×100); 6. 肾出血充血(ϕ)(H.E×100)