

口服二巯基丁二酸对大鼠肝脏铜代谢的影响*

张 婷 严雪铭¹ 陶正琴¹(杭州 310014 杭州市第六人民医院药检室;¹上海 200031 中国科学院上海药物研究所)

摘要 目的:利用凝胶层析法进一步了解 DMSA 对肝脏内铜的解毒及增加排泄的作用机理。方法:大鼠 ip CuSO₄ 10mg/kg/d × 7d 后 24h, ig DMSA 500mg/kg/d × 3d, 于 2, 3, 8 和 24h 处死取肝脏和 24h 尿液, 凝胶层析。结果:层析分离出一个大分子的 Cu-蛋白复合物, 一个低分子的 Cu-DMSA 复合物。结论:DMSA 能减少 Cu 与蛋白结合量, 与 Cu 形成低分子量易扩散络合物, 增加尿铜排泄。

关键词 二巯基丁二酸;铜;凝胶层析;原子吸收分光光度测定法

The effect of oral dimercaptosuccinic acid on copper metabolism in rat liver

Zhang Ting(Zhang T), Yan Xueming(Yan XM), Tao Zhenqin(Tao ZQ)(Hangzhou Sixth Hospital, Hangzhou 310014)

ABSTRACT OBJECTIVE: Using gel chromatography to further understand the mechanism of detoxifying and increasing excretion to the copper in the liver by taking DMSA. **METHOD:** In rats given ig dimercaptosuccinic acid(DMSA) 500mg/kg daily × 3d after ip CuSO₄ 10mg/kg/d × 7d, killed the rats in 2, 3, 8, 24h and took the liver and the urines of 24h to performed gel chromatography. **RESULTS:** A high-molecular weight copper-protein complex appeared in the gel chromatograms and a low-molecular weight copper-DMSA complex appeared, too. **CONCLUSION:** DMSA reduced the contents of protein-bound Cu in liver, formed a low-molecular weight, diffusible Cu-DMSA complex, increased the excretion of Cu in urine.

KEY WORDS dimercaptosuccinic acid, copper, gel chromatography, atomic absorption spectrophotometry

二巯基丁二酸钠(Na-DMS)是广谱重金属解毒剂^[1],用于治疗铜的急性中毒和肝豆状核变性病(Wilson's病),具有不良反应小、驱铜作用强而快的优点^[2],但由于它在水溶液中不稳定,久置毒性增大,需临时溶解供静脉注射用,给长期用药患者带来不便。其同类物二巯基丁二酸^[3](Dimercaptosuccinic acid, DMSA)同样用于重金属解毒,但因是口服用药,克服了二巯基丁二酸钠的上述缺点。实验证明对铜有解毒和促排作用^[4,5],临床试用对肝豆状核变性病患者能促进尿铜排出和改善症状^[6]。本文旨在用凝胶层析法进一步了解 DMSA 对肝脏内铜的解毒及增加排泄的作用机理。

1 材料

1.1 药品

二巯基丁二酸(DMSA)胶囊(上海新亚制药厂)实验前用 2%羧甲基纤维素钠(CMC)混合,配成所需浓度的混悬液供灌胃(ig);CuSO₄·5H₂O(AR,上海试剂一厂);葡聚糖凝胶(Sephadex G-75,瑞典 Pharmacia);三羟甲基氨基甲烷(tris)(上海生物化学试剂商店)。

1.2 仪器

日立 Z-8000 型偏振塞曼原子吸收分光光度计;752 型紫外分光栅分光光度计;ZS83-1 型内切式组织匀浆器;80-1 型离心沉淀机;ZBS-1 型自动部分收集

* 中国自然科学基金支持项目,NO.39170855,并在中国科学院上海药物研究所完成

器。

1.3 实验动物

♂SD大鼠,体重250~300g(中国科学院上海实验动物中心)。

2 方法和结果

2.1 样品的制备

取SD♂大鼠12只,体重 260 ± 15 g,分两组,中毒组4只,给药组8只。两组均ip CuSO_4 10mg/kg/d × 7d后,将大鼠分别置有机玻璃代谢笼内,收集24h尿液。中毒组ig 2% CMC溶液500mg/kg/d × 3d,平均分配,分别于第3次灌胃后8和24h处死,取肝脏及中毒7d后的24h尿液。给药组ig DMSA 500mg/kg/d × 3d后,一只于第3次给药后2h处死,3只3h处死,2只8h处死,2只24h处死,取肝脏及给药1d后24h尿液,所得样品经离心(4000r/min × 10min)(肝脏2g加10ml pH7.8 Tris缓冲液匀浆、离心),取上清液2ml上柱层析^[7],分离蛋白、Cu。

2.2 样品测定

2.2.1 蛋白的含量测定:752紫外分光光度计于波长(λ)280nm处,以pH7.8的Tris buffer为空白,测蛋白吸光度。根据公式 $\text{Protein (mg/ml)} = \text{OD}_{280\text{nm}}/14.3 \times 10$,求经层析后得到的收集管每管的蛋白含量(mg/ml)(14.3是肝脏中蛋白的 $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ 消光系数^[8])。

2.2.2 铜的测定:日立Z-8000型原子吸收分光光度计,Cu空心阴极灯,灯电流7.5mA,吸收线324.8nm,狭缝1.3nm,灵敏度 $< 20\mu\text{g/L}$,将上海测试技术研究所提供的铜标准液,配成200,400,600,800和1000 $\mu\text{g/L}$,作标准曲线 $r = 0.999$,测收集管每管中的Cu含量(mg/ml)。

2.3 结果

肝脏24h组:层析4个样本,结果见图1。对照组和给药组均有2个蛋白峰,出现在当洗脱液收集到50~55ml和165~175ml处。从洗脱位置来看,前者是高分子量蛋白,后者则是低分子量蛋白,对照组和给药组在50~55ml处均有一铜峰,说明Cu主要结合于大分子蛋白上。给药组的Cu峰含量较对照组低,说明DMSA减少了Cu与蛋白的结合。此外,给药组在140ml处还有一铜峰,推测这就是DMSA竞争与Cu络合形成的复合物。这个Cu峰也可说明DMSA与Cu结合,减少了Cu与蛋白的结合。

8h组:层析4个样本。结果见图2,此层析结果与24h组基本相同。

3h组:层析3个样本。结果见图3,各样本均在50和150ml处各有一蛋白峰,在50和100ml处各有一铜

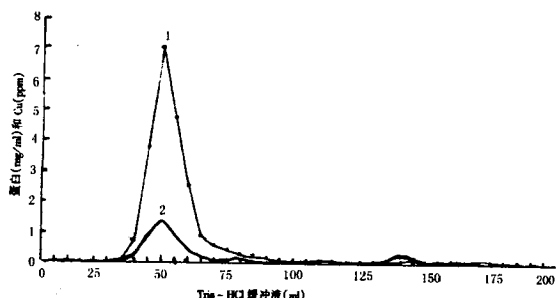


图1a 肝脏的蛋白和铜含量-给药组24h

1-蛋白;2-Cu;大鼠ip CuSO_4 10mg/kg/d × 7d后,ig DMSA 500mg/kg/d × 3d后24h处死取肝脏,经葡聚糖凝胶层析分离蛋白和铜,层析柱 $60 \times 2\text{cm}$,流速12.5ml/h,Tris-HCl缓冲液pH=7.8

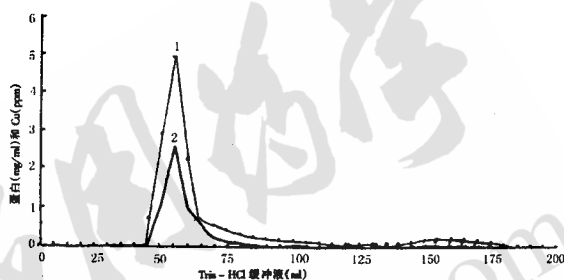


图1b 肝脏的蛋白和铜含量-中毒组24h

1-蛋白;2-Cu;大鼠ip CuSO_4 10mg/kg/d × 7d后,ig 2% CMC 500mg/kg/d × 3d后24h处死取肝脏,上柱层析

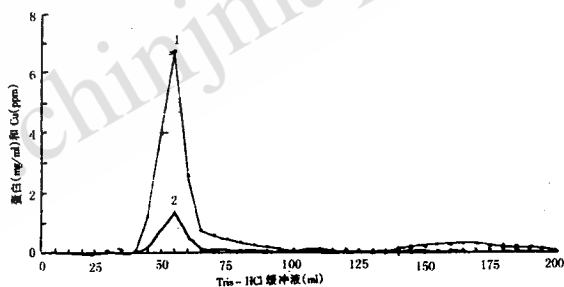


图2a 肝脏的蛋白和铜含量-中毒组8h

1-蛋白;2-Cu;大鼠ip CuSO_4 10mg/kg/d × 7d后,ig 2% CMC 500mg/kg/d × 3d后8h处死取肝脏,上柱层析

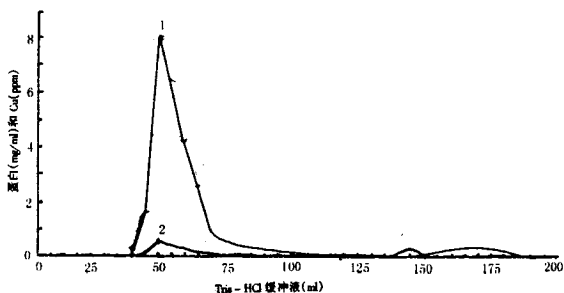


图2b 肝脏的蛋白和铜含量-给药组8h

1-蛋白;2-Cu;大鼠ip CuSO_4 10mg/kg/d × 7d后,ig DMSA 500mg/kg/d × 3d后8h处死取肝脏,上柱层析

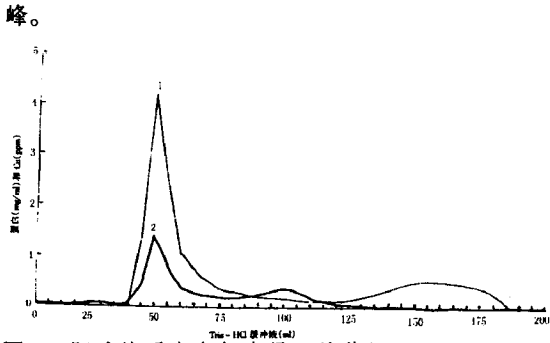


图3 肝脏的蛋白和铜含量 - 给药组 3h

1 - 蛋白; 2 - Cu; 大鼠 ip CuSO_4 10mg/kg/d × 7d 后, ig DMSA 500mg/kg/d × 3d 后 3h 处死取肝脏, 上柱层析

2h 组: 层析 1 个样本, 重复 2 次。两次层析结果均在 50 和 100ml 处各有一铜峰, 在 50 和 155ml 处各有一蛋白峰, 结果见图 4。

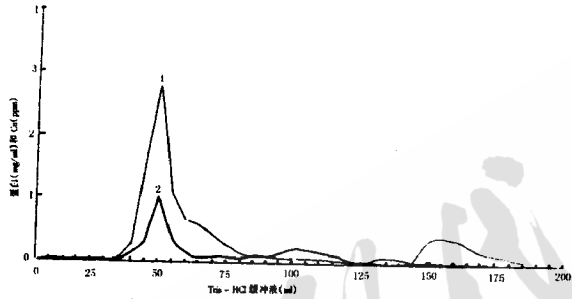


图4 肝脏的蛋白和铜含量 - 给药组 2h

1 - 蛋白; 2 - Cu; 大鼠 ip CuSO_4 10mg/kg/d × 7d 后, ig DMSA 500mg/kg/d × 3d 后 2h 处死取肝脏, 上柱层析

尿: 层析 4 个样本。1 个对照, 3 个给药。4 样本均在 140ml 处有一铜峰, 结果见图 5。

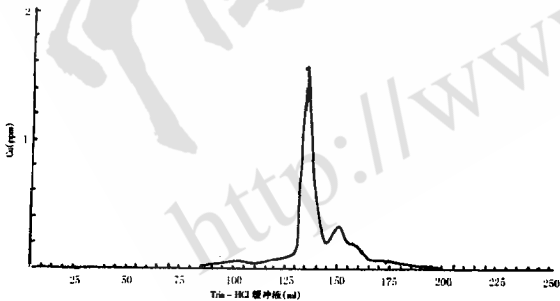


图5a 尿中的铜含量 - 中毒组 24h

大鼠 ip CuSO_4 10mg/kg/d × 7d 后, 取 24h 尿液, 上柱层析

3 讨论

动物体内高于正常水平的铜负荷会导致在组织中铜蓄积水平的提高, 在一段时间内可耐受, 但达到特定浓度时, 体内平衡机制被破坏, 细胞受损, 就会出现中毒症状。铜在组织中的蓄积有广泛差异性, 大多数铜蓄积于肝, 其次是肾^[9], 因而本实验主要进行对肝的凝胶层析以分离铜。为了使大鼠体内 Cu 含量处于相对

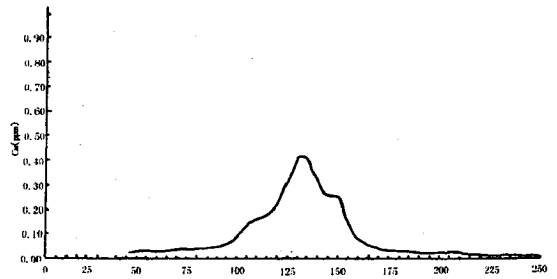


图5b 尿中的铜含量 - 给药组 24h

大鼠 ip CuSO_4 10mg/kg/d × 7d 后, ig DMSA 500mg/kg/d × 1d 取 24h 尿液, 上柱层析

高而又稳定的状态, 本实验采用小剂量多次染毒后给药。ip CuSO_4 染毒大鼠肝脏经凝胶层析分离得到大分子蛋白质与 Cu 的复合物, 给药组大鼠肝脏 24, 8, 3 和 2h 样本在 100 ~ 150ml 处都又出现一个对照组在此处没有的 Cu 峰, 相应尿层析结果则无论是给药组和对照组在 140ml 处均有一 Cu 峰。说明给药后, DMSA 有效地减少了 Cu 与脏器组织中大分子蛋白质的结合, 并竞争性地与 Cu 络合形成 DMSA - Cu 络合物。此络合物毒性低, 易扩散, 易于从尿中排出。这样, 就达到通过促进尿 Cu 排泄, 减少体内蛋白与 Cu 的结合而解毒的目的。另外, 实验中层析了多个样本, 所得结果大致相同, 故文中只列出最典型图形以说明情况。

参考文献

- 1 丁光生, 梁猷毅, 施觉民, 等. 二巯基丁二酸钠对多种金属中毒的解毒作用. 中华医学杂志, 1965, 51(5): 304.
- 2 杨任民, 鲍远程, 杨兴涛, 等. 5 种驱铜药对肝豆状核变性病患者排铜效果的比较. 新药与临床, 1987, 6(6): 341.
- 3 Ding GS, Liang YY. Antidotal effects of dimercaptosuccinic acid. Journal of Applied Toxicology, 1991, 11(1): 7.
- 4 梁猷毅, 施觉民, 陈立信, 等. 口服二巯基丁二酸的毒性和对铅, 铜, 镉, 铊, 铈, 铀的促排作用. 药学学报, 1980, 15(6): 335.
- 5 严雪铭, 李莉, 梁猷毅, 等. 大鼠灌服二巯基丁二酸对铜排泄的影响. 中国药理学报, 1993, 14(Suppl): 34.
- 6 张颖冬, 杨任民. 二巯基丁二酸胶囊对肝豆状核变性的治疗评价. 新药与临床, 1990, 9(2): 73.
- 7 袁静明. 凝胶层法及其应用. 科学出版社, 1975: 26.
- 8 上海市免疫学研究所. 免疫学技术. 上海第二医学院, 1984.
- 9 Seymour CA. Copper toxicity in man. In: Howell JMcC, Gawthorne JM, editors, Copper in animals and man (II). Boca Raton (FL): CRC Press, 1987: 54, 79.