

新型络合剂对肾镉促排作用 及对微量元素影响的观察

马东星 赵金垣 王 超 陈寿芳 刘年庆 邵涵茹 刘 宏 张亨山

摘 要 为观察新型络合剂 G-Cys-DTC G-Thr-DTC对染毒大鼠肾内蓄积镉的络合促排作用及对肾皮质元素分布的影响,比较促排治疗对肾皮质铁、铜、锌等含量的影响,利用北京正负电子对撞机提供的硬 X射线对肾皮质冰冻切片扫描及原子吸收分光光度法、X射线荧光测定染毒鼠肾皮质镉及其他元素含量。结果,新型络合剂 G-Cys-DTC G-Thr-DTC能大幅度降低肾内镉负荷。染毒肾皮质中 Cd 与 Se密切相关,而 Zn和 Se的相关性下降。提示新型络合剂对肾内蓄积镉有较好驱排效果;硒和锌在镉中毒作用机制中可能起一定的保护作用。

关键词 镉 络合剂 二硫代羧酸盐

Effects of Two New Chelating Agents on Renal Excretion of Cadmium and on Trace Elements Ma Dongxing*, Zhao Jinyuan, Wang Chao, et al.* *Research Center of Occupational Medicine, Third Teaching Hospital of Beijing Medical University. 100083*

Abstract Effects of two new chelating agents, Dglucosamine-N-cysteine-dithiocarbamate (G-Cys-DTC) and Dglucosamine-threonine-dithiocarbamate (G-Thr-DTC), on the excretion of accumulated cadmium (Cd) in kidney and on the distribution of elements in renal cortex in exposed rats were observed to study comparative influences of the therapy to promote elimination of them on levels of iron, copper, zinc, etc. Contents of Cd and other elements in renal cortex of exposed rats were determined by hard x-ray, Produced by Positron and Negatron Collision Machine in Beijing, scanning over frozen section and atomic absorption spectrometry and synchrotron x-ray fluorescence. Results showed Cd burden in kidney could be reduced by G-Cys-DTC and G-Thr-DTC. Level of Cd correlated closely with that of selenium (Se) in the renal cortex of exposed rats, and relationship between Zn and Se disappeared. The new chelating agents were much effective in eliminating Cd accumulated in the kidney, and Se and Zn could play a protective role in pathogenesis of cadmium poisoning.

key words Chelating agents, Cadmium, Dithiocarbamate

防治镉中毒性肾损伤,安全、有效地驱排肾内蓄积镉,因缺乏合适的络合药物,使之成为职业病临床的难题之一。近年的许多研究表明^[1-5],二硫代氨基甲酸酯类(DTC)络合剂

具有较好的促排效能,如N-苯甲基-D-葡萄糖胺二硫代甲酸钠(NaB)等,但其对体内Cu、Zn等元素的影响,限制了其应用。本研究观察了最新合成的DTC类络合剂N-半胱氨酸-D-葡萄糖胺二硫代甲酸钠(G-Cys-DTC)、N-苏氨酸-D-葡萄糖胺二硫代甲酸钠(G-Thr-DTC)络合驱排肾镉的能力,同时,利用X射线荧光分析技术观察其对肾皮质必需微量元素相关性及其含量的影响。报告如下。

1. 材料与方法

本课题由国家自然科学基金(39370591——化学中毒性急性肾损伤的细胞生物学基础)资助

作者单位: 100083 北京医科大学第三医院职业病研究中心(马东星*、赵金垣、陈寿芳、刘宏、张亨山),中国科学院高能物理所(刘年庆、邵涵茹),北京医科大学药学院(王超)

* 现在武警总医院肾科工作

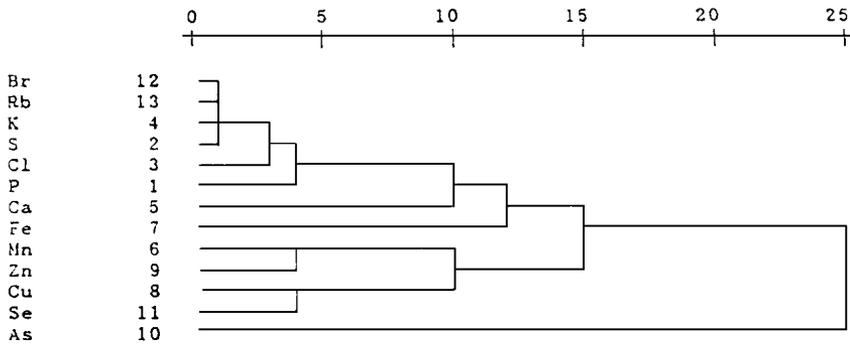


图 1 正常大鼠肾元素树型聚类图

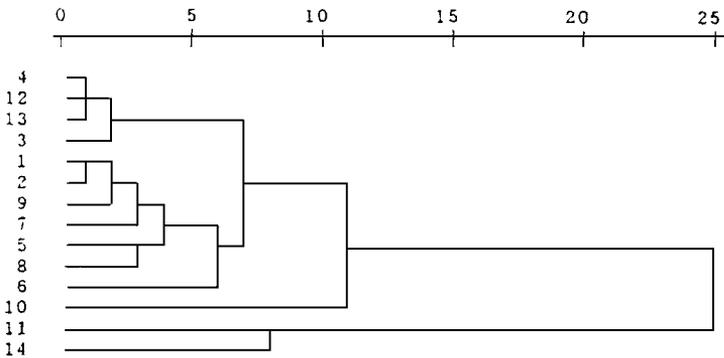


图 2 染 Cd4h 后, 大鼠肾皮质元素树型聚类图

计,正常大鼠肾皮质元素基本分成两大类,其中 Cu Zn Mn Se为一类,其他元素为一类。染毒大鼠肾皮质中,Cu Zn Fe Se之间相关系统不同于正常大鼠,Zn Cu Se与 Cd表现出较好的相关性,相关系数 0.47~ 0.65;同时 Se与 Cu Zn的相关关系受到干扰,相关系数则分别由 0.83 0.83降至 0.61 0.34(见表 2)。

2.3 促排治疗对肾皮质 Zn Cu Fe含量的影响

X射线荧光扫描技术分析 Cu Zn Fe等元

素在大鼠肾皮质中含量的变化,由于用浓硝酸消化,Se等类金属元素未测出。染毒后 4小时,Zn Cu含量正常,而 Fe含量显著下降;24小时后 Zn Cu含量下降而 Fe含量恢复正常;投用络合剂治疗,染毒后 4小时肾皮质 Cd含量下降的同时,G-Cys-DTC组肾皮质 Zn Cu较对照组为低 ($P < 0.05$);24小时各治疗组 Fe含量均高于染毒组,而与对照组无区别 ($P > 0.05$);24小时 G-Thr-DTC治疗组大鼠肾皮质 Zn Cu含量低于对照组而与染毒组无差别(见表 3)。

表 3 促排治疗对肾皮质 Zn Cu Fe含量的影响 ($\bar{x} \pm s_x$) ($\mu\text{g/g}$)

组别	Zn		Cu		Fe	
	4h	24h	4h	24h	4h	24h
对照组	26.75± 3.49		8.75± 0.66		50.66± 6.02	
染毒组	26.0± 4.71	21.8± 3.27	10.32± 1.87	6.60± 1.14*	42.1± 5.04*	45.2± 8.04
MeO组	22.0± 0.71	28.4± 2.30	5.50± 1.29	7.00± 2.16	45.5± 11.3	54.4± 13.1
G-Cys-DTC组	19.8± 1.31*△	23.8± 1.10	5.40± 0.55*△	5.20± 0.84*	51.4± 12.4	61.4± 6.84
G-Thr-DTC组	22.0± 1.23	19.0± 1.87	10.4± 0.89	5.40± 0.55*	37.8± 0.84	56.0± 3.24

* 示显著不同于对照组 ($P < 0.05$)

3 讨论

DTC类络合剂的开发、研制是当前镉中毒性肾损伤防治研究的热点之一^[1-5]。新开发合成的DTC类络合剂,多是改变二硫代氨基甲酸的侧链结构;其中,一侧为D-葡萄糖胺基者,其毒性降低,络合能力提高如MeO-NaB等,且以MeO络合促排能力为佳^[6]。本实验中心与北医大药学院合作,在D-葡萄糖胺基的对侧链上引入半胱氨酸、苏氨酸等而合成G-Cys-DTG、G-Thr-DTC。半胱氨酸、苏氨酸及葡萄糖的内源性结构特征,有利于络合剂在细胞间的主动转运;且半胱氨酸、苏氨酸的侧链官能团均含有电负性较大的氧原子、硫原子,通常这些含孤对电子或不定域电子的基团与重金属具有一定的络合能力,也可参与Cd的络合作用,从而与Cd形成更加稳定的络合物。基于此,新型络合剂可能具有更强的细胞膜透过能力,对于细胞内蓄积Cd具有更强的促排能力。本次实验结果有力地证明了这一点。新型络合剂的投用,可有效降低体内尤其肾内镉负荷;同时,增加尿Cd含量,提示新型络合剂的使用利于Cd从尿中排出。这可能与新型络合剂为二钠盐,与Cd生成的络合物水溶性更高所致。

肾皮质元素分布树型聚类图分析及元素相关性分析表明,在正常大鼠肾中,Cu、Zn、Fe、Se具有良好的共位性、相关性,处于一种平衡状态;Cd元素的进入,这种平衡被打破。Cd含量高时,Zn、Cu含量均降低;Cd含量下降,Cu、Zn又可恢复正常。G-Thr-DTC治疗组24小时Zn、Cu含量仍显著低于正常对照组,提示在强力驱排Cd的同时,也可能影响到肾皮质内Zn、Cu含量;进一步表明,在络合促排蓄积Cd的同时,补充Zn、Cu等元素,可能有利于促排治疗及减轻肾损害。Se与Cd有

较强的相关关系,过去的研究观察到^[7]Se的补充,有助于提高机体对镉中毒损害的耐受性,减缓镉向肾脏蓄积。本次实验利用X射线扫描技术,直观地证实Se与Cd在肾皮质内具有较好的相关性和共位性。

综上所述,DTC类络合剂的促排能力,与其本身结构及理化性质及其在体内的作用机制关系密切,驱排络合剂辅助基团的形式变化和选择是发现具有细胞内蓄积Cd驱排功效药物的重要手段。G-Thr-DTG、G-Cys-DTC具有良好的驱排体内蓄积Cd的能力,有待进一步研究;与Zn、Se等微量元素制剂联合应用,对镉中毒性肾损伤的防治作用,尚需进一步探讨。

4 参考文献

- 1 Shimada H, et al. Comparative effects of N, N-disubstituted dithiocarbamates on excretion and distribution of cadmium in mice. *Toxicol*, 1991, 68: 157
- 2 Kojima S, et al. Comparative effects of three chelating agents on distribution and excretion of Cd in rats. *Toxicol Appl pharmacol*, 1986, 83: 516
- 3 Kargacin B, et al. Effect of cadmium-mobilizing dithiocarbamates on essential trace metal metabolism in rats. *Bull Environ Contam Toxicol*, 1991, 47: 160
- 4 Jones S G, et al. Structure-acute Cd chloride intoxication. *Environ Health Perspect*, 1984, 54: 285
- 5 Singh P K, et al. Structural factors in the in vivo chelate mobilization of aged Cd deposits. *Environ Health Perspect* 1990, 85: 361
- 6 Zhao J Y, et al. Delayed nephrotoxic effects of Cd and their reversibility by chelation. *Toxicol*, 1990, 64: 235
- 7 Wahba Z Z, et al. Protective effects of selenium on cadmium toxicity in rats: role of altered toxicokinetics and metallothionein. *J Toxicol Environ Health*, 1993, 38: 171

(收稿: 1996-12-16 修回: 1997-02-17)

1. 1 实验动物及试剂

雄性成年健康 Wistar大鼠, 体重 250±50g, 共 45只, 随机分组, 每组 5只, 自由饮食。

G-Cys-DTC G-Thr-DTC N-4-甲氧苄基-D-葡萄糖胺二硫代甲酸钠 (MeO)^[6]等由北医大药学院天然及仿生药物国家重点实验室多肽研究室提供, 纯度 99.99%以上。临用前生理盐水溶解, 腹腔注射给药, 体积 1ml/100gbw, 络合剂剂量 0.5mmol/kg bw

1. 2 样品采集及分析

实验大鼠分为对照组 (1组)、染毒组 (2组)、治疗组 (6组); 对照组予 1ml/100g bw 生理盐水腹腔注射, 24小时后处死; 染毒及治疗组予 CdCl₂ 15^μ mol/kg+ 巯基乙醇 (ME) 300^μ mol/kg bw 混合染毒液腹腔注射, 注射体积 1ml/100g bw; 染毒后即置不锈钢代谢笼, 收集尿液; 染毒后 2小时, 治疗组分别予 G-Cys-DTC G-Thr-DTC MeO 0.5mmol/kg bw 腹腔注射 (各 2组); 染毒后 4小时、24小时各处死染毒及治疗组 1组, 留取肾皮质、肝、血, 分离制备血浆。

表 1 4h 时肾、肝、血、尿镉含量分析 ($\bar{x} \pm s_x$)

样 品	染毒组	MeO组	G-Cys-DTC组	G-Thr-DTC组
肾皮质 ($\mu\text{g/g}$)	25.53± 1.47	16.04± 1.56 [△]	16.97± 2.39 [△]	1.15± 0.35 [△]
肝 ($\mu\text{g/g}$)	24.37± 1.54	24.40± 8.54	16.32± 3.31 [△]	1.20± 0.15 [△]
全 血 ($\mu\text{g/ml}$)	0.26± 0.01	0.18± 0.06	0.43± 0.16	0.00± 0.00
血 浆 ($\mu\text{g/ml}$)	0.20± 0.01	0.13± 0.04	0.30± 0.02	0.00± 0.00
尿 ($\mu\text{g/mgcr}$)	0.32± 0.05	0.54± 0.05	1.20± 0.05 [△]	2.00± 0.35 [△]

[△]示与染毒组显著不同 (P < 0.05) (下同)

肾内镉负荷: 染毒后 2小时予络合剂, 4小时治疗组肾 Cd含量均显著降低 (P < 0.05); G-Thr-DTC组肾 Cd含量降低约 93%。

肝、血、尿中镉含量: G-Cys-DTC G-Thr-DTC治疗组尿 Cd含量显著升高, 肝 Cd含量显著降低 (P < 0.05) G-Thr-DTC组血 Cd含量大幅度下降。

2. 2 肾皮质元素分布及相关性分析

大鼠肾皮质冰冻切片元素扫描测定, 均能测到 P S Cl K Ca Mn Fe Cu Zn As Se Br和 Rb, 染毒组尚可测到 Cd (见图 1

1. 2. 1 样品镉含量分析 肾皮质、肝、血及尿经低温消化后, 利用 HITACH180-80型原子吸收分光光度计火焰法测定 Cd含量

1. 2. 2 肾皮质元素分布及相关性分析 肾皮质用液氮冷冻后, 冰冻切片, 切片厚度 200^μ m, 切片直接放在 4^μ m厚聚碳酯膜上, 空气中干燥, 利用北京正负电子对撞机 (中科院高能所同步辐射站) 的 4WIA同步辐射束提供的硬 X射线进行扫描, 收集每个扫描点元素能量谱, 测算元素含量。然后用多元统计 SPSS/PC作聚类分析和元素间相关性分析。

1. 2. 3 络合剂对大鼠肾皮质 Zn Cu Fe含量的影响 肾皮质 0.1-0.2g, 冷冻干燥后, 低温灰化, 加入 8M HNO₃ 溶解样品, 再加入钇 (Y)内标溶液, 混匀后吸取溶液在 7^μ m厚 Mylar膜上点样, 点样直径 5mm, 干燥后, 在钼旋转靶 X光机上进行 X射线荧光分析测定

2 结果

2. 1 新型络合剂促排作用

见表 1

2) 根据肾皮质中的元素分布相关性聚类统

表 2 正常及染毒大鼠肾皮质 Cu Zn Fe Se Cd之相关性分析

元 素		Fe	Cu	Zn	Se	Cd
Fe	I	1.0				
	II	1.0				
Cu	I	0.45	1.0			
	II	0.38	1.0			
Zn	I	0.74	0.69	1.0		
	II	0.78	0.55	1.0		
Se	I	0.53	0.83	0.83	1.0	
	II	0.41	0.61	0.34	1.0	
Cd	I	—	—	—	—	—
	II	0.27	0.52	0.47	0.65	1.0

I 指正常对照组, II 指染毒组