

二巯基丁二酸对大鼠体内²⁰³Hg与蛋白结合的影响

梁猷毅 茅百勇 张建时 陶正琴 丁先生 (中国科学院上海药物研究所, 上海 200031)

提要 大鼠 im 10 μCi ²⁰³HgCl₂ 后, 血清 Hg 大部结合在 高分子蛋白, 肝和肾 Hg 主要形成 2 种 Hg 蛋白复合物, 尿含有一些分子量较高的 Hg 复合物。二巯基丁二酸(DMSA)可明显减少血清、肝和肾蛋白结合 Hg 量, 显著增加尿 Hg 排出, Hg 以“可扩散的”低分子量 Hg 复合物大量出现在尿中。DMSA 排 Hg 可能是改变 Hg 与蛋白结合模式, 将 Hg 蛋白复合物转变为小分子“可扩散的”汞与 DMSA 螯合物有关。

关键词 二巯基丁二酸; 凝胶层析; 汞结合蛋白; “可扩散的”汞复合物

Hg 与体内蛋白质中巯(SH)基结合, 改变蛋白结构, 抑制一些酶系统的活性是造成 Hg 中毒的机理之一。二巯基丁二酸(DMSA)是我所首先发现对多种金属有显著促排作用的解毒药⁽¹⁻⁴⁾, 整体自显影定位表明 [¹⁴C]DMSA 广泛分布在动物体内⁽⁵⁾。国外研究也证明 DMSA 是一广谱金属解毒药⁽⁶⁻⁷⁾。为阐明 DMSA 的促排机制, 本文用凝胶层析(gel chromatograph)技术探讨 DMSA 对大鼠体内 Hg 与蛋白结合模式及尿 Hg 排出的影响。

材料与 方法

大白鼠♂18只, 体重 206 ± (SD) 24 g。

²⁰³HgCl₂ 系英国 Amersham 放化中心出品。大鼠 im ²⁰³HgCl₂ 0.13-1.4 mg Hg/kg, 放射性强度 10.3 ± 0.6 μCi /鼠。DMSA 系上海第八制药厂生产的钠盐安瓿制剂, 大鼠 ip 1 g/kg。

大鼠 im ²⁰³HgCl₂ 为对照组, im ²⁰³HgCl₂ 后立即 ip DMSA 的为 DMSA 组。每鼠置代谢笼中收集尿。尿以 1500 × g 离心 10 min, 取上清液进行层析。

大鼠 ip DMSA 后 2 h(下称 2 h 组)和 24 h(下称 24 h 组)断头取样, 肝和肾加 5 倍量水制成匀浆, 1500 × g 离心 10 min 取上清液及血清进行层析。

Sephadex 系瑞典 Pharmacia 出品。凝胶层析柱用玻璃制。Sephadex G-75(40-120 μm)的层析柱 85 × 1.6 cm, G-25(50-150 μm)层析柱 52 × 1.9 cm, 流速均为 10 ml/h, 每管收样 5 ml。Sephadex G-200(40-120 μm)层析柱 40 × 3.8 cm, 流速 20 ml/h, 每管收样 10 ml。

层析样本的容量为 2-4 ml, 样本上柱后立

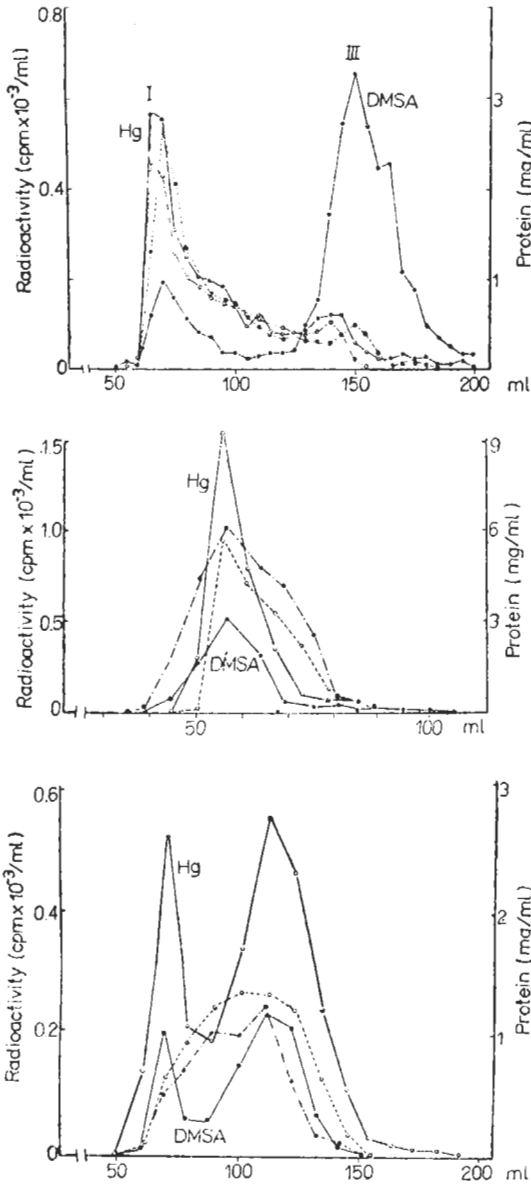


Fig 1. Rat serum chromatograph after im $^{203}\text{HgCl}_2$ 10 μCi ($\circ\text{---}\circ$) and ip sodium dimercaptosuccinate (DMSA) 1 g/kg ($\bullet\text{---}\bullet$). A) after 2 h, Sephadex G-75. B) after 24 h, Sephadex G-75. C) after 24 h, Sephadex G-200. Hg $\circ\text{---}\circ$ and DMSA $\bullet\text{---}\bullet$ indicate protein content.

即用甲酸胺缓冲液(pH 8.0, 0.1 M)洗脱, 用部分收集器定量收样。

将收集的每管洗脱部分用 FT-603 井型 γ 闪烁计数器测定 ^{203}Hg 的放射性强度 (cpm) 并用比色法⁽⁸⁾测定蛋白质,

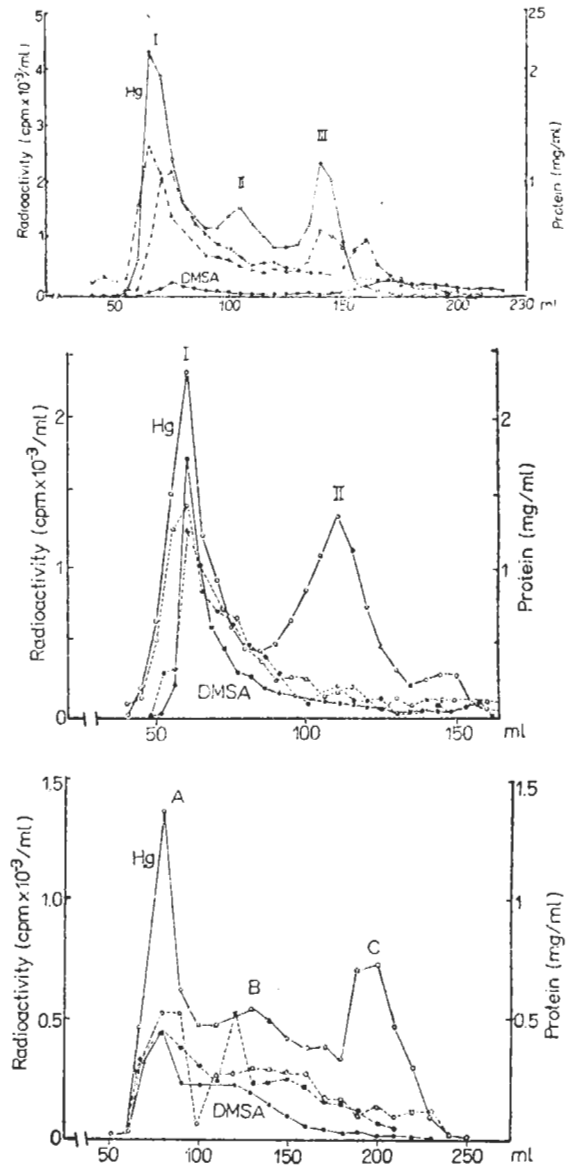


Fig 2. Rat kidney chromatograph after im $^{203}\text{HgCl}_2$ 10 μCi ($\circ\text{---}\circ$) and ip DMSA 1 g/kg ($\bullet\text{---}\bullet$). A) after 2 h, Sephadex G-75. B) after 24 h, Sephadex G-75. C) after 24 h, Sephadex G-200. Hg $\circ\text{---}\circ$ and DMSA $\bullet\text{---}\bullet$ indicate protein content.

结 果

血清 Sephadex G-75 层析 16 个样本, G-200 层析 12 个样本, Hg 回收率分别为 $78 \pm 19\%$ 和 $72 \pm 10\%$ 。

1. 2 h 组: Sephadex G-75 层析 2 h 组结果见图 1 A, 对照样本中, 在洗脱容量 60 ml

左右有 1 个 ^{203}Hg 放射性峰，同时有 1 个相应的蛋白峰。它的洗脱位置表明是 1 个分子量相对高的 Hg 结合蛋白。DMSA 组层析结果则明显不同，出现 2 个 Hg 化合物组分 I 和 III，而且 ^{203}Hg 主要结合在组分 III 上。从洗脱位置来看，组分 III 的分子量较低，相应有一个低的蛋白峰，表明它是 1 个低分子量的 Hg 蛋白复合物。

比较对照和 DMSA 样本中 ^{203}Hg 放射性强度，相差不显著 ($p > 0.05$)。

2. 24 h 组：Sephadex G-75 层析 24 h 组的结果见图 1 B。无论是对照或 DMSA 的样本层析，在洗脱容量 55 ml 左右都有一个 ^{203}Hg 放射性峰，同时有一个相应的蛋白峰，表明它是 Hg 结合蛋白。但在 DMSA 样本中， ^{203}Hg 放射性强度明显地 ($p < 0.01$) 低于对照样本，而蛋白峰高度与对照相似，说明 DMSA 显著减少 ^{203}Hg 与蛋白结合的量。

样本用 Sephadex G-200 层析，进一步分离到 2 个分子量不同的 Hg 组分，平行的蛋白峰表明它们是 Hg 结合蛋白，与 Sephadex G-75 层析结果相似，DMSA 也明显减少 ^{203}Hg 与蛋白结合的量(图 1 C)。

肾脏 用 Sephadex G-75 和 Sephadex G-200 各层析 17 个样本和 15 个样本，Hg 回收率分别为 $83 \pm 6\%$ 和 $85 \pm 4\%$ 。

1. 2 h 组：肾脏 2 h 组 Sephadex G-75 层析结果(图 2 A)显示对照样本有 3 个 Hg 复合物，组分 I 是分子量相对高的 Hg 结合蛋白，有相应的蛋白峰；组分 II 是中等分子量的 Hg 蛋白复合物，这部分 ^{203}Hg 所占比例较低，个别样本中缺少这一组分；组分 III 则是 1 个分子量相对低的 Hg 复合物(洗脱容量 150 ml 左右)并有相应的蛋白峰。给予 DMSA 的样本基本上只有组分 I 和 III 2 个 Hg 复合物，相应的蛋白峰表明它们是 Hg 结合蛋白。DMSA 样本中的 ^{203}Hg 放射性强度明显地 ($p < 0.05$) 低于对照样本。样本还用 Sephadex G-200 进行层析，结果与 G-75 层析是一致的。

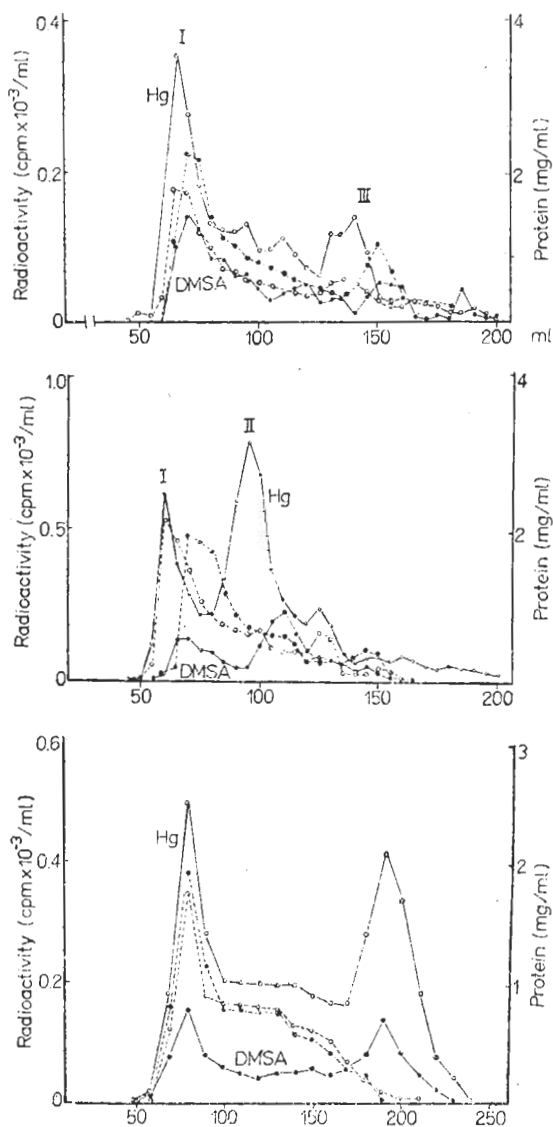


Fig 3. Rat liver chromatograph after im $^{203}\text{HgCl}_2$ $10 \mu\text{Ci}$ ($\circ-\circ$) and ip DMSA 1g/kg ($\bullet-\bullet$). A) after 2 h, Sephadex G-75. B) after 24 h, Sephadex G-75. C) after 24 h, Sephadex G-200. Hg $\circ-\circ$ and DMSA $\bullet-\bullet$ indicate protein content.

2. 24 h 组：Sephadex G-75 层析结果的典型图见图 2 B 对照样本显示有 2 个 Hg 复合物，即组分 I 和 II。组分 II 出现的位置(洗脱容量约 110 ml)与文献⁽⁹⁾相似。DMSA 样本的层析结果则明显不同，大多数样本只分离到组分 I，且 ^{203}Hg 放射性强度显著 ($p < 0.05$) 低于对照样本。

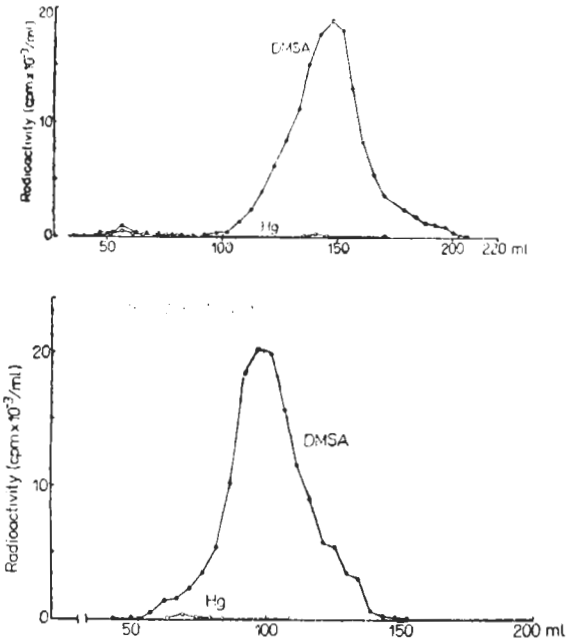


Fig 4. Raturine chromatograph 24 h after im $^{203}\text{HgCl}_2$ 10 μCi (○—○) and ip DMSA 1 g/kg (●—●). A) Sephadex G-75. B) Sephadex G-25.

用 Sephadex G-200 平行层析, 结果 (图 2 C) 显示对照样本可分离到 3 个 Hg 复合物 (A, B, C), 其中组分 A 和 B 相当于 Sephadex G-75 层析的组分 I, 组分 C 相当于 G-75 层析的组分 II. DMSA 样本层析结果则不同, 未分离到组分 C (即用 G-75 层析的组分 II).

肝脏 用 Sephadex G-75 作 15 个样本层析, Hg 回收率为 $94 \pm 20\%$, 用 Sephadex G-200 作 13 个样本层析, Hg 回收率为 $94 \pm 12\%$.

1. 2 h 组: Sephadex G-75 层析结果 (图 3 A) 显示, 对照样本中, ^{203}Hg 主要结合在组分 I 上, 相应的蛋白峰表明它是 Hg 结合蛋白. 组分 II 不明显, 此外也有 1 个分子量较低的 Hg 复合物组分 III, 平行有 1 个低的蛋白峰. 给予 DMSA 的样本中, ^{203}Hg 主要结合在组分 I 上, 其它组分不明显, 但是 DMSA 显著减少 Hg 与蛋白结合的量, ^{203}Hg 放射性强度明显低于对照组.

2. 24 h 组: Sephadex G-75 层析结果 (图 3 B) 表明, 对照样本中 Hg 与蛋白结合的模式

与肾脏相似, 有 2 个 Hg 复合物, 即分子量较高的组分 I 和中等分子量的组分 II. DMSA 组的层析结果有所不同, 多数样本只有分子量较高的组分 I, 个别样本有组分 II, 但是样本中 ^{203}Hg 的放射性强度明显地 ($p < 0.05$) 低于对照, 蛋白峰的高度则与对照相似, 表明 DMSA 能显著减少 Hg 与蛋白结合的量.

样本平行地用 Sephadex G-200 进行层析 (图 3 C), 结果显示无论对照或 DMSA 样本, 都分离到 2 个 Hg 复合物, 即组分 I 和 II, 但给予 DMSA 样本的 ^{203}Hg 放射性强度明显地 ($p < 0.05$) 低于对照样本.

尿 样本均收集自 24 h 组尿. Sephadex G-75 层析 10 个样本, Hg 回收率为 $77 \pm 12\%$. Sephadex G-25 层析 6 个样本, Hg 回收率为 $76 \pm 15\%$.

Sephadex G-75 层析对照样本结果表明, 大多数样本有 2 个 Hg 组分, 主要为分子量较高的 Hg 复合物组分 I (相当于肝、肾组织中的组分 I) 和部分分子量较低的 Hg 复合物组分 III (图 4 A), 只是组分 III 的比例各不相同, 个别样本则只有组分 I. 所有样本都没有分离到相当于肝、肾组织中的组分 II.

Sephadex G-75 层析 DMSA 组结果则明显不同. 尿中的 Hg 几乎全部结合在低分子量“可扩散的” Hg 组分 III 上, 没有其它组分 (图 4 A).

比较尿中 ^{203}Hg 放射性强度, DMSA 组明显高于对照组 ($p < 0.001$), 约为对照组的 50 倍.

Sephadex G-25 的层析结果 (图 4 B) 显示, 对照样本 ^{203}Hg 放射性峰在洗脱容量 70 ml 左右, 而 DMSA 样本中 Hg 复合物出现的位置在洗脱容量约 100 ml 处.

讨 论

机体接触 Cd, Hg, Zn 等金属离子能增加金属硫蛋白 (metallothionein) 的合成⁽¹¹⁾, 金属硫蛋白能保护机体对抗有毒金属的损害⁽¹²⁾.

在本实验中,大鼠 im ^{203}Hg 后肝、肾组织中的组分 II 与文献⁽⁹⁾ 报道中等分子量的金属硫蛋白(分子量约 11000)的层析洗脱位置相似,因此推测组分 II 属于相似的金 属硫蛋白。在 DMSA 组样本中,大多组织及尿中没有组分 II,大量 ^{203}Hg 结合在低分子量的组分 III 上,可能与 DMSA 促排 Hg 有关。

低分子量“可扩散”Hg 复合物是分子量介于半胱氨酸和谷胱苷肽之间的 Hg 复合物,分子量约为 100-300⁽⁹⁾。本实验中用 Sephadex G-25 层析的 DMSA 尿样本中的 Hg 复合物出现的位置与它接近,因此推测组分 III 也是类似的低分子量可扩散可透析的 Hg 复合物,这种复合物对金属从组织转移、分布和排泄起着重要作用^(13,14)。在 DMSA 组 2 h 的血清样本中大量出现这个组分,以及 DMSA 组尿中几乎全部是这个组分,表明 DMSA 与体内 Hg 结合蛋白中 Hg 形成络合平衡,加速 Hg 的排出。这一低分子 Hg 络合物的形成是由于 DMSA 对 Hg 有强大的螯合力,促使结合在较高分子的结合蛋白 Hg 转变为低分子量 DMSA 的 Hg 复合物从尿中排泄。注射 DMSA 后主要以原形药从尿中排出,它促使组织结合蛋白 Hg 降解为小分子 Hg 复合物,或是作用于 Hg 复合物

的代谢产物以及其螯合形式,有待探讨。

参 考 文 献

- 1 梁猷毅、朱巧贞、曾衍森、丁光生. 生理学报 1957; 21:24
- 2 丁光生、梁猷毅、施觉民、陈维洲、顾芝萍、金筠芳. 中华医学杂志 1965; 51:304
- 3 Shi JM, Ting KS, Chen LX, Yu YG, Liang YI, Chen YJ. *Kexue Tongbao* 1966; 17:409
- 4 梁猷毅、施觉民、陈立信、丁光生. 药理学报 1980; 15:335
- 5 Liang YY (梁猷毅), Marlowe C, Waddell WJ. *The Pharmacologist* 1982; 24:217
- 6 Robert PJ. *Drugs Future* 1980; 5:25
- 7 Aposhian HV. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1983; 23:193-215
- 8 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. *J Biol Chem* 1951; 193:265
- 9 Jakubowski M, Piotrowski J, Trojanowska B. *Toxicol Appl Pharmacol* 1970; 16:743
- 10 Wisniewska JM, Trojanowska B, Piotrowski J, Jakubowski M. *ibid* 1970; 16:754
- 11 Clarkson TW. *Annu Rev Pharmacol* 1972; 12: 375-406
- 12 Suzuki T. Metabolism of mercurial compounds. In: Goyer RA, Mehlman MA, eds. *Advances in modern toxicology*; vol 2. 1st ed. Washington: Hemisphere Publ Corp, 1977:1-39
- 13 Magos L, Webb M. *Arch Toxicol* 1976; 36:53
- 14 Webb M, Magos L. *Chem Biol Interact* 1978; 21:215

Acta Pharmacologica Sinica 1984 Dec; 5 (4): 273-278

EFFECTS OF DIMERCAPTOSUCCINIC ACID ON BINDING OF MERCURY WITH PROTEIN IN RATS

LIANG You-yi, MAO Bai-yong, ZHANG Jian-shi, TAO Zheng-qin, DING Guang-sheng
(Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031)

ABSTRACT After the rats were injected im 10 μCi $^{203}\text{HgCl}_2$ (0.13-1.4 mg Hg/kg), the Hg in serum was almost entirely bound to the protein of high mol wt. In liver and kidneys, the Hg was mainly bound to the proteins of both high and medium mol wt forming 2 different types of Hg-protein complexes. Some high mol wt complexes appeared in urine.

If the rats were treated with dimercaptosuccinic acid(DMSA), the contents of bound Hg with the proteins in serum, liver and kidneys were markedly reduced. The urinary excretion of Hg was greatly augmented in the form of "diffusible" complexes. The tissue-bound Hg was transferred into low mol wt diffusible Hg-complexes which were found chiefly in urine.

Hence the transfer of Hg from the complex with proteins of high mol wt to low mol wt Hg-complexes by competitive binding of DMSA is the essential mechanism of DMSA detoxication in treatment of Hg poisoning.

KEY WORDS dimercaptosuccinic acid(DMSA); gel chromatography; mercury-binding protein; "diffusible" mercury complex

* * * * *