

EDTA 氟碳微球促排²¹⁰铅的作用¹

丁训诚、刘春芳、董竞武、杜 隽、王益成、黄 馨

(上海劳动卫生职业病研究所毒理研究室, 上海 200003, 中国)

Scavenging effect of EDTA-fluorocarbon microspheres on ²¹⁰lead

DING Xun-Cheng, LIU Chun-Fang, DONG Jing-Wu, DU Jun, WANG Yi-Cheng, HUANG Xin (Department of Toxicology, Shanghai Institute of Industrial Hygiene and Occupational Diseases, Shanghai 200003, China)

ABSTRACT EDTA-fluorocarbon microspheres (EDTAFM), calcium disodium ethylene diaminetetraacetate (CaNa_2EDTA), calcium- or zinc-diethylene triamine pentaacetate (Ca- or Zn-DTPA) were investigated for their ability to treat experimental lead intoxication in mice. The 48 ICR mice were divided into six groups. Group I = no treatment; The other groups were injected with single ip doses of ²¹⁰Pb (10 mg Pb^{2+} + 555 kBq/kg). After 24 h they were injected in the tail vein with the chelating agents (20 mg/kg) or an equal volume of 10% glucose (10 ml/kg). Each mouse was housed in one metabolic cage, and urine was collected daily for 3 d. After 3 d, the mice were sacrificed for comparison of lead distribution within the liver, kidney, femur and the entire carcass as measured by 0.047 Mev gamma emission from ²¹⁰Pb. The results reveal that injection of EDTAFM to lead poisoned mice pretreated with ²¹⁰Pb was more effective than Zn- or Ca-DTPA and CaNa_2EDTA in reducing the lead induced inhibition in the activity of blood ALAD, and that it increased the excretion of ²¹⁰Pb into the urine. The hepatic, renal and femur ²¹⁰Pb contents after

treatment with EDTAFM were much more decreased than Zn- or Ca-DTPA and CaNa_2EDTA . The order of effectiveness was EDTAFM > Zn-DTPA > Ca-DTPA > CaNa_2EDTA .

KEY WORDS lead poisoning; fluorocarbons; aminolevulinic acid dehydratase; lead radioisotopes; chelating agents; EDTA; DTPA

摘要 本文报道螯合剂 EDTA 氟碳微球 (EDTAFM) 对 ²¹⁰Pb 的促排作用, 并与 CaNa_2EDTA , Zn-DTPA, 和 Ca-DTPA 金属螯合剂进行比较。结果表明, 在 4 种螯合剂中, EDTAFM 对 ²¹⁰Pb 促排效果最好, EDTAFM > Zn-DTPA > Ca-DTPA > CaNa_2EDTA 。另外, 对降低肝、肾和股骨中 ²¹⁰Pb 的滞留量以及减少由铅引起的全血 ALAD 活性抑制作用 EDTAFM 亦较其它 3 种螯合剂为佳, 提示 EDTAFM 是一种有前途的铅中毒治疗药物。

关键词 铅中毒; 氟碳化合物; 氨基乙酰胺丙酸脱水酶; 铅放射性同位素; 螯合剂类; EDTA; DTPA

工业铅中毒是最常见的职业病, 目前在临床上应用的金属螯合剂如依地酸二钠钙 (CaNa_2EDTA)、二乙烯三胺五乙酸二钠钙或锌 (Ca-或 Zn-DTPA)、青霉胺和二巯基丁二酸钠等, 使铅中毒的治疗有了明显的进步。 CaNa_2EDTA 作为铅中毒临床首选驱铅药, 促排效果良好, 但它不能透入红细胞和组织的细胞内, 被驱出的是滞留于血浆和细胞外液的铅⁽¹⁾。为了弥补这一缺点, 设计用全氟碳微球

Received 1988 Jul 1 Accepted 1989 Mar 21

¹ Project supported by the Science Fund of the Chinese Academy of Sciences No 3860936

作为 EDTA 的载体, 国内外尚未见报道。这种直径在 $0.4 \mu\text{m}$ 以下的氟碳微球 (fluorocarbon microsphere, FM) 具有淋巴系统的定向性, 旨在被铅蓄积最多的肝、肾和骨的单核巨噬细胞所吞噬, 使 EDTA 进入细胞, 从而增大促排效果。本文用 ^{210}Pb 制备铅中毒动物模型, 对 EDTAFM 的促排 ^{210}Pb 效果与另外 3 种金属螯合剂进行比较研究。

MATERIALS AND METHODS

EDTAFM 的制备 将全氟三丙胺 (FIPA, 中国科学院上海有机化学研究所合成, 纯度 99.5%), CaNa_2EDTA 60 g/L (天津制药厂产品) 加于溶有环氧乙烷—环氧丙烷共聚物 (Pluornic F-68) 20 g/L 及甘油 11 g/L 的注射用水, 100°C 灭菌 30 min。冷后, 装入灭菌处理过的高压乳化泵中 $49-54 \times 10^6 \text{ Pa}$ 压力在 15°C 以下喷射 20 个循环。取出后以 $2850 \times g$ 离心 30 min。吸取乳白色上层液即 EDTAFM, 用 5% NaHCO_3 调节 pH 至 7.4, 用 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤, 每瓶分装 10 ml。EDTA 含量测值 1.8%。磷钨酸负染法, 电镜薄片测量, 98% 的 EDTAFM 直径小于 $0.2 \mu\text{m}$, 制剂符合临床试用要求。

动物实验 ICR 小鼠 48 只, 雌雄兼用, 体重 $24 \pm \text{SD} 1 \text{ g}$, 随机分 6 组, 每组 8 只。第 1 组小鼠为空白对照组, 第 2-6 组小鼠 ip 乙酸铅加 ^{210}Pb 溶液 0.2 ml 内含 (10 mg Pb^{2+} 加 555 kBq ^{210}Pb /kg, ^{210}Pb Amersham 公司) 24 h 后, 第 2 组尾 iv 10% glucose 为 PbAc_2 组; 第 3-6 组分别尾 iv EDTAFM, Zn-DTPA, Ca-DTPA 和 CaNa_2EDTA 20 mg/kg 作治疗组。

尿和组织中 ^{210}Pb 放射性测定 各组小鼠分别置于玻璃代谢笼内, 收集 24 h 尿液, 连续 3 d。收毕末次尿液后, 摘眼球取血, 肝素抗凝。处死, 迅速取出肝、肾和股骨, 用西德 1702 MP-8 型电子分析天平测量。并置于 FMJ-87 型闪烁计数器进行放射性测定, 效率

35-40%, 以 cpm/100 mg wet wt 表示。

组织和全血 ALAD 活性测定 按比色法⁽²⁾进行。

RESULTS

EDTAFM 对 PbAc_2 抑制 ALAD 活性的拮抗作用 由 Tab 1 可知, PbAc_2 对小鼠全血和肝、肾组织中的 ALAD 活性有非常明显的抑制作用, 为对照小鼠 ALAD 活性的 30-41%。当单次给予 EDTAFM, Zn-DTPA, Ca-DTPA 和 CaNa_2EDTA 这 4 种螯合剂以后, 被 PbAc_2 抑制的 ALAD 活性可以部份恢复, 依其激活作用的顺序排列: EDTAFM > Zn-DTPA > Ca-DTPA > CaNa_2EDTA 。另外, 在肾脏, 以 EDTA 类螯合剂对 ALAD 的激活作用最大, 反而超过空白对照组。

尿液 ^{210}Pb 的排出量 由 Tab 1 可见, 铅染毒小鼠分别给予 4 种金属螯合剂 20 mg/kg 连续 3 d, 观察到各种螯合剂均具有显著的促排 ^{210}Pb 的作用, 且以注后 d 1 排出 ^{210}Pb 放射性量最高, 并逐渐减少, 其中 EDTAFM 组小鼠尿中 ^{210}Pb 排出最多。在给药的 3 d 中, 发现 EDTAFM, Zn-DTPA, Ca-DTPA 和 CaNa_2EDTA 组小鼠尿中 ^{210}Pb 的含量比未给螯合剂 (10% glucose) 小鼠高 1-4 倍, 即各组小鼠由尿液排出的 ^{210}Pb 占总注入量依次为 13 ± 2 , 46 ± 10 , 24 ± 7 , 23 ± 4 和 $17 \pm 5\%$, 因而提示其促排能力 EDTAFM > Zn-DTPA > Ca-DTPA > CaNa_2EDTA 。

EDTAFM 对细胞内 ^{210}Pb 的促排效果 铅染毒小鼠单次 ip 螯合剂 3 d, 其每 100 mg 湿重的肝、肾和股骨内的 ^{210}Pb 放射性强度均比单次 ip 10% glucose 的 PbAc_2 组有非常明显的减少, 且以 EDTAFM 组小鼠的肝、肾和股骨中 ^{210}Pb 残留放射性含量最少。若以肝脏为例, EDTAFM 组 ^{210}Pb 量仅为 Zn-DTPA 的 82%; 为 Ca-DTPA 的 80%; 为 CaNa_2EDTA 的 73%; 提示 EDTAFM 对细胞内 ^{210}Pb 的促排效果最佳。

Tab 1. Effects of iv chelating agents on δ -aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) activity, urinary excretion and tissue distribution of ^{210}Pb after ip ^{210}Pb (10 mg Pb^{2+} + 555 kBq/kg), except control group. After 24 h mice were injected iv 10% glucose (10 ml/kg) or 4 chelating agents (20 mg/kg). $n=8$, $\bar{x}\pm\text{SD}$. * $P>0.05$, ** $P<0.05$, *** $P<0.01$ vs control, $^{\dagger}P>0.05$, $^{\dagger\dagger}P<0.05$, $^{\dagger\dagger\dagger}P<0.01$ vs CaNa_2EDTA .

Drugs (mmol ALA/L blood or g tissue)	ALAD activity			^{210}Pb radioactivity (cpm/d)			^{210}Pb radioactivity (cpm/100 mg)		
	Blood	Liver	Kidney	d 1	d 2	d 3	Kidney	Liver	Femur
Control	1071 \pm 176	380 \pm 73	10.4 \pm 1.2	76 \pm 5	74 \pm 3	77 \pm 6	186 \pm 26	206 \pm 37	152 \pm 23
PbAc ₂	324 \pm 72***	157 \pm 54***	4.3 \pm 0.6***	6894 \pm 1040***	4616 \pm 754***	2117 \pm 443***	3511 \pm 971***	1625 \pm 688***	2081 \pm 652***
CaNa ₂ EDTA	624 \pm 54***	360 \pm 88 ††	6.4 \pm 0.5 †	10239 \pm 1558 ††	6563 \pm 994 ††	2930 \pm 819 †	2433 \pm 1432 ††	1345 \pm 785 †	1566 \pm 594 †
EDTA-FM	845 \pm 79 †††	382 \pm 64 †††	5.7 \pm 0.7 ††	27184 \pm 1150 †††	16235 \pm 1260 †††	8127 \pm 1557 †††	1319 \pm 669 ††	987 \pm 276 ††	1009 \pm 510 ††
Zn-DTPA	518 \pm 86 †	377 \pm 35 †	14.3 \pm 0.8 †††	15016 \pm 1259 ††	8768 \pm 1605 †	3018 \pm 465 †	2045 \pm 1062 †	1290 \pm 865 †	1327 \pm 543 †
Ca-DTPA	420 \pm 62 †	338 \pm 97 †	20.4 \pm 1.3 †††	14578 \pm 1199 ††	8098 \pm 877 †	2883 \pm 898 †	2867 \pm 1152 †	1181 \pm 1067 †	1416 \pm 353 †

DISCUSSION

目前, 在铅解毒药物的研究领域内, 除研制新的金属螯合剂以外, 还十分注重递药系统的完善, 希望 EDTA 类化合物能透入细胞, 提高驱铅效果, 降低副作用。本文利用 FM 具有网状内皮系统的定向性⁽³⁾, 而本身在细胞内又不会发生代谢是生物惰性物质⁽⁴⁾, 对宿主细胞只有聚积作用而不是细胞毒作用⁽⁵⁾的特点, 设计把 FM 作为 EDTA 的新型载体, 国内外尚未见报道。实验证明, EDTAFM 注入血液循环后, 立即被网状内皮系统丰富的肝、骨髓和肾的单核巨噬细胞所吞噬, 而进入细胞内, 从而大大增加了 EDTA 对 ^{210}Pb 的促排作用, 获得了理想的效果。有学者将 CaNa_2EDTA 、Zn-DTPA 和 Ca-DTPA 包封在脂质体内, 使其具脂溶性, 发现能促进铅、铀、汞和 ^{189}Yb 的排出作用, 但未能与效应结合起来^(6,7)。本文从实验动物初步证明 EDTAFM 比目前临床驱铅药 CaNa_2EDTA 和 Zn-或 Ca-DTPA 促排铅效果更佳, 亦能最有效地激活 ALAD 活性, 进而减轻体内铅负荷, 因而认为 EDTAFM 可以成为治疗铅中毒的良好解毒药, 至于它对机体必需微量元素的螯合作用有待研究。

REFERENCES

- 1 Hammond PB. The relationship between inhibition of delta aminolevulinic acid dehydratase by lead and lead mobilization by ethylenediamine tetraacetate (EDTA). *Toxicol Appl Pharmacol* 1973; 26 : 466
- 2 Schlick E, Mengel K, Friedberg KD. The effect of low lead doses *in vitro* and *in vivo* on the δ -ala-d activity of erythrocytes, bone marrow, liver and brain of the mouse. *Arch Toxicol* 1983; 53 : 193
- 3 Nanney L, Fink LM, Virmani R. Perfluorochemical-morphologic changes in infused liver, spleen, lung and kidney of rabbits. *Arch Pathol Lab Med* 1984; 108 : 631
- 4 Ding XC, Zhang SN, Chen BW, Liu CF. The metabolism *in vivo* of fluorocarbon blood substitute. *Chin J Hematol* 1986; 7 : 459
- 5 Ding XC, Wang BS, Tang QN, Wang GF, Qin YQ, Liu YL. Long term effects of intravenous infusion of fluorocarbon blood substitute in dogs. *Acta Pharmacol Sin* 1985; 6 : 270
- 6 Mayhew E, Papahadjopoulos D. Therapeutic applications of liposomes. In: Ostro MJ, ed. *Liposomes*. NY: Marcel Dekker, 1983 : 289-341
- 7 Blank ML, Byrd BL, Cress DA, Washburn LC, Snyder F. Liposomal preparations of calcium- or zinc-DTPA have a high efficacy for removing colloidal ytterbium-169 from rat tissues. *Toxicology* 1984; 30 : 275