

锌对铅抑制 δ -氨基- γ -酮戊酸脱水酶的拮抗作用¹

丁训诚、刘春芳、董克武 (上海劳动卫生职业病研究所毒理研究室, 上海 200003)

提要 用⁶⁵Zn示踪, 观察整体或离体条件下PbAc₂与⁶⁵Zn的相互作用。PbAc₂能使器官中的⁶⁵Zn重分布; PbAc₂能减少⁶⁵Zn渗透入rbc的数量。ZnAc₂可显著对抗PbAc₂诱发新生大鼠及人rbc中ALAD的抑制作用, 提示可用锌制剂或含锌螯合剂来防止Pb²⁺对机体血色素生物合成的损害。

关键词 ⁶⁵锌核素; δ -氨基- γ -酮戊酸脱水酶; 铅中毒; 人红细胞; 新生大鼠

方法和结果

醋酸锌(ZnAc₂)和醋酸铅(PbAc₂)均为上海试剂厂产品(GR)。无载体⁶⁵ZnCl₂英国Amersham产品, 37 GBq/mg Zn。ALA系Sigma产品。

ZnAc₂对PbAc₂抑制ALAD活性的拮抗作用

1. 离体试验 取聚乙烯试管加入全血0.4 ml, 于37℃振荡15 min后向空白对照管(A)加生理盐水0.2 ml, 向锌对照管(B)加0.1 ml ZnAc₂溶液(最终含ZnAc₂ 0.1 mmol/L)另外, C, D, E, 和F管各加PbAc₂溶液0.1 ml并继续振荡30 min后, 于铅对照管(C)加生理盐水0.1 ml以及锌激活管D, E和F加ZnAc₂溶液, 使每管含PbAc₂ 3.75 μ mol/L和ZnAc₂ 100-500 μ mol/L各管均做8次重复, 结果见表1。实验表明, PbAc₂对人rbc中的ALAD有明显的抑制作用。当PbAc₂ 3.75 μ mol/L时, 酶活性仅为对照管(A)的1%。相反, ZnAc₂对人rbc的ALAD有明显的激活作用, 被PbAc₂抑制的酶在加入ZnAc₂后其活性可以部份恢复, 以铅对照管的酶活性为

锌(Zn²⁺)是人体必需的微量元素, 它参与多种酶的合成, 有重要的生理功能和营养作用⁽¹⁾。Zn²⁺为Pb²⁺的拮抗剂, 体内外试验表明, Zn²⁺可恢复 δ -氨基- γ -酮戊酸(δ -amino-levulinic acid, ALA), 其脱水酶(ALAD)的活性, 在一定程度上改善Pb²⁺对机体肝脏和造血系统血色素及其卟啉生物合成障碍的影响^(2,3)。但Zn²⁺能否拮抗Pb²⁺对新生大鼠ALAD的抑制作用尚未见报道。本文研究ZnAc₂对PbAc₂抑制新生大鼠血液和脏器中ALAD的拮抗作用, 采用无载体⁶⁵Zn示踪法, 探讨⁶⁵Zn与PbAc₂在体内外的相互作用, 以便为职业病临床应用锌制剂提供依据。

1986年8月12日收稿 1987年6月11日接受

¹中国科学院科学基金资助的课题 No 501

Tab 1. Effects of $PbAc_2$ and $ZnAc_2$ *in vitro* on human erythrocytes δ -aminolevulinic acid dehydratase. $n = 10$, $\bar{x} \pm SD$. ** $p < 0.05$, *** $p < 0.01$

$PbAc_2$ ($\mu mol/L$)	$ZnAc_2$ ($\mu mol/L$)	ALAD activity mmol ALA/(L rbc·min)	%
Saline	Saline	3318 ± 333	100
3.75	0	33 ± 4***	
0	100	4418 ± 141**	136
3.75	100	675 ± 66***	20
3.75	250	722 ± 77***	22
3.75	500	881 ± 68***	27

100%来比较, Zn^{2+} 100-500 $\mu mol/L$ 使 ALAD 活性增加 19-26 倍, 若以 A 管比较, 其锌激活比为 20-27%。

2. 大鼠试验 Sprague-Dawley ♀ 大鼠分娩后, 每窝取 8 只新生大鼠, 实验组给予 $PbAc_2$ 625 ppm 的饮用水, 每隔 3 d 对新生大鼠 ip 5 mg $ZnAc_2/kg$ 给 $PbAc_2$ 组与实验组相同, ip 等量生理盐水; 对照组饮用无离子水, ip 等量生理盐水。生后 d 21, 摘眼球取血, 肝素抗凝, 然后处死, 取出肝、肾和脑。在 0-4°C 制备匀浆, 测定全血和组织中 ALAD 活性, 结果见表 2。实验表明, 当新生大鼠吮饮含 $PbAc_2$ 水的母鼠乳汁 21 d 后, 其全血、肝、肾和脑组织中的 ALAD 活性均有抑制, 最大抑制在全血, 为对照组的 59%, 其次为肝脏 69%; 肾 75%; 脑的 ALAD 活性为 90%。实验组新生大鼠全血和肝的 ALAD 活性出现恢复, 肝脏酶活性的锌激活比为对照的 153%。

Tab 2. Effects of $PbAc_2$ and $ZnAc_2$ *in vivo* on δ -aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) mmol/(L blood or g tissue) per minute in suckling rats. $n = 8$, $\bar{x} \pm SD$. * $p > 0.05$, ** $p < 0.05$

	Saline	$PbAc_2$	$PbAc_2 + ZnAc_2$
Blood	903 ± 16	530 ± 27**	798 ± 22*
Liver	259 ± 74	195 ± 6**	397 ± 9**
Kidney	7.0 ± 0.3	4.8 ± 0.1*	4.3 ± 0.9*
Brain	2.0 ± 0.1	1.8 ± 0.9*	1.2 ± 0.4*

^{65}Zn 与 $PbAc_2$ 的相互作用

1. 离体试验 取正常人肝素抗凝血, 分

装于 32 个闪烁测定管内, 每管 0.8 ml。A(对照)组, 加无载体 $^{65}ZnCl_2$ 0.074 kBq/0.1 ml 于 37°C 振荡 30 min, 再加 0.1 ml 生理盐水, 使成 1.0 ml, 再振荡培育 30 min; B 组按 A 步骤以 $PbAc_2$ 溶液代替生理盐水, 最终 $PbAc_2$ 浓度为 3.75 $\mu mol/L$; C 组按 B 组步骤加 ^{65}Zn 和 $PbAc_2$; D 组按 C 步骤先加 $PbAc_2$ 后加 ^{65}Zn 。各组培育结束后, 在 4°C 下 1500 × g 离心 10 min, rbc 用冰冷生理盐水反复洗涤, 直至上清液放射强度接近本底, γ -闪烁计数器测定 rbc 中 ^{65}Zn 放射强度(效率 20-25%)。在有血浆时, rbc 内的 ^{65}Zn 结合量可达 20 ± 2%。B, C, 和 D 组的 ^{65}Zn 与 rbc 的结合量均明显降低, 分别为 9.9, 9.7, 和 8.6%, 与对照比较 $p < 0.05$, 显示 ^{65}Zn 透过 rbc 膜的过程可以被 $PbAc_2$ 所阻断。进一步对 B, C, 和 D 三组进行比较, 先加 $PbAc_2$ 的 D 组 ^{65}Zn 与 rbc 的结合量最小; 先加 ^{65}Zn 的 B 组其结合量最大, 两者间 $p < 0.05$ 。

2. 小鼠试验 ICR 种小鼠 12 只, 体重 24 ± SD 2 g. ip ^{65}Zn 1.11 MBq 注后 24 h 分 2 组, A 实验组 ip $PbAc_2$ 25 mg/kg; B 对照组 ip 等量生理盐水。注后 24 h 处死取全血、肝、肾和脑, 在 γ -闪烁计数器测定放射强度, 结果见图 1。给予 $PbAc_2$ 后能改变机体组织内 ^{65}Zn 的分布而起了对 $PbAc_2$ 拮抗的作用。在

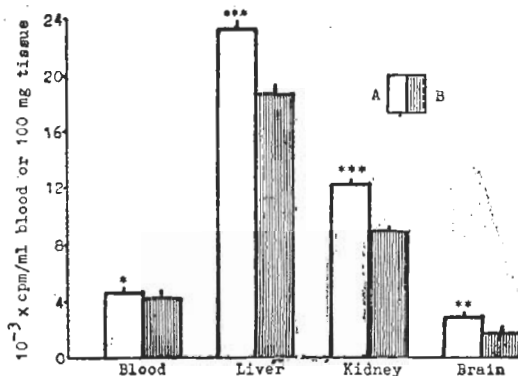


Fig 1. Tissue distribution of ^{65}Zn after ip $^{65}ZnCl_2$ 1.11 MBq/kg in mice with (A) or without (B) subsequent ip $PbAc_2$ 25 mg/kg. * $p > 0.05$, ** $p < 0.05$, *** $p < 0.01$

PbAc₂ 注后 24 h, 全血、肝、肾和脑中的 ⁶⁵Zn 含量增加, 若以对照小鼠相应脏器中 ⁶⁵Zn 放射性强度为 100%。在注 PbAc₂ 后 24 h 看到 ⁶⁵Zn 在这些脏器内重分布, 全血(118%), 肝(124%), 肾(138%), 和脑(169%), 提示 ⁶⁵Zn 发生由其它脏器转移到这些器官中。见图 1。

讨 论

实验表明, PbAc₂ 对人 rbc 和新生大鼠全血和肝中的 ALA 活性有明显的抑制作用。PbAc₂ 容易从母体传递给胎鼠和新生鼠, 结果引起血液或组织 ALAD 活性抑制⁽⁴⁾, ZnAc₂ 能使被 PbAc₂ 抑制的 ALAD 活性恢复, 说明 ZnAc₂ 对 PbAc₂ 具有拮抗作用, 可以用锌制剂或含锌螯合剂防止铅对机体血色素合成的损害^(5,6)。已知许多重金属(包括铅)在一定条件下可取代 Zn²⁺⁽⁷⁾, 形成三元复合物使酶活性降低⁽⁸⁾, 反之, Zn²⁺ 也能把 ALAD 内的 Pb²⁺ 再置换出来, 恢复酶的构象⁽⁹⁾。Zn²⁺ 和 Pb²⁺ 在酶的活性部位相互置换, 先决条件是必需渗透过细胞膜。整体实验表明, 注入 PbAc₂ 后能使组织细胞外 ⁶⁵Zn 重分布, 细胞外 ⁶⁵Zn 浓度增加, 推测 ⁶⁵Zn 透入细胞内增加。另一方面, 离体条件下发现, ⁶⁵Zn 与 PbAc₂ 在透入 rbc 过程中发生相互竞争, PbAc₂ 能阻止 ⁶⁵Zn 与 rbc 的结合量。我们推测, ZnAc₂ 对 PbAc₂ 引起 ALAD 活性抑制作用的拮抗效应强弱可能取决于这两种金属离子到达靶细胞内的 ALAD 活性部位的浓度比值, Zn²⁺ 比值高, 则 ALAD 活性升高, 反之, 酶活性就降低, 细胞外或细胞内 Zn²⁺ 与 Pb²⁺ 含量的比值是有方法

可以精确测定的, 然而, 目前尚不能在稳定条件下用动力学方法在酶的活性部位检测到两者的比值与效应的关系。

参 考 文 献

- 1 Bettger WJ, O'Dell BL. A critical physiological role of zinc in the structure and function of biomembranes. *Life Sci* 1981; 28:1425
- 2 Dresner DL, Ibrahim NG, Mascarenhas BR, Levere RD. Modulation of bone marrow heme and protein synthesis by trace elements. *Environ Res* 1982; 28 : 55
- 3 Lutton JD, Ibrahim NG, Friedland M, Levere RD. The toxic effects of heavy metals on rat bone marrow *in vitro* erythropoiesis: protective role of hemin and zinc. *Ibid* 1984; 35 : 97
- 4 Schlick E, Mengel K, Friedberg KD. The effect of low lead doses *in vitro* and *in vivo* on the d-ala-d activity of erythrocytes, bone marrow cells, liver and brain of the mouse. *Arch Toxicol* 1983; 53 : 193
- 5 Chiba M, Kikuchi M. The *in vivo* effects of manganese and zinc on δ-aminolevulinic acid dehydratase activity inhibited by lead. *Toxicol Lett* 1984; 20 : 143
- 6 Fujita H, Yamamoto R, Sato K, Ikeda M. *In vivo* regulation of δ-aminolevulinic acid dehydratase activity. *Toxicol Appl Pharmacol* 1985; 77 : 66
- 7 Kajimoto M, Kondo M, Niwa M, Suzuki T, Kimura H, Sasaki A, Urata G. Increase of δ-aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) in rat erythrocytes in lead poisoning. *Arch Toxicol* 1983; 52 : 1
- 8 Sakai T, Yanagihara S, Ushio K. Erythrocyte factors concerned in the inhibition of ALAD by lead. *Br J Ind Med* 1981; 38 : 268
- 9 Sakai T, Yanagihara S, Kunugi Y, Ushio K. Relationships between distribution of lead in erythrocytes *in vivo* and *in vitro* and inhibition of ALA-D. *Ibid* 1982; 39 : 382

Antagonistic effects of zinc on inhibition of δ -aminolevulinic acid dehydratase by lead

DING Xun-Cheng, LIU Chun-Fang, DONG Jin-Wu

(Shanghai Institute of Industrial Hygiene and Occupational Diseases, Shanghai 200003)

ABSTRACT Pb^{2+} blocked the entrance of ^{65}Zn into the red blood cells when $PbAc_2$ was added *in vitro* to human whole blood, but when $PbAc_2$ was given ip 25 mg/kg to mice pretreated with ip $^{65}ZnCl_2$ 1.11 MBq/kg, the amount of ^{65}Zn retention in the whole blood, liver, kidneys, and brain were increased. The addition of $PbCl_2$ 3.75 μ mol/L to human whole blood *in vitro* caused a significant decrease in ALAD activity. When $PbAc_2$ 3.75 μ mol/L and $ZnAc_2$ (0.1-0.5 μ mol/L) were added to human whole blood *in vitro* the inhibitory effect of ALAD activity was reduced by $PbAc_2$. Suckling rats were exposed to $PbAc_2$ through the milk of

their dams which were given $PbAc_2$ 625 ppm in deionized drinking water for 21 d after birth, and were ip $ZnAc_2$ 5 mg/kg in 0.1 ml saline every 3 d. The whole blood and hepatic ALAD activity of $ZnAc_2$ -treated suckling rats did not change as compared with the controls. These observations suggest that Pb^{2+} may influence the redistribution of Zn^{2+} in some organs and that Zn^{2+} may play a role in the prevention of the damage of heme biosynthesis by Pb^{2+} .

KEY WORDS zinc isotope (^{65}Zn); δ -aminolevulinic acid dehydratase; lead poisoning human erythrocytes; newborn rats