

大鼠灌服二巯基丁二酸对铜排泄的影响¹

严雪铭, 李莉, 梁猷毅, 陶正琴, 徐新华, 陈振家, 张建时
(中国科学院上海药物研究所, 上海200031, 中国)

Effects of dimercaptosuccinic acid per os on copper excretion in rat¹

YAN Xue-Ming, LI Li, LIANG You-Yi, TAO Zheng-Qin, XU Xin-Hua, CHEN Zheng-Jia, ZHANG Jian-Shi (Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

ABSTRACT After dimercaptosuccinic acid (DMSA) was given intragastrically by gavage (ig) 0, 250, or 500 mg·kg⁻¹ following im CuSO₄ 30 mg·kg⁻¹ daily×3 d in rats, the Cu contents of serum increased markedly within 1-12 h. When ig DMSA daily×3 d, the excretion of Cu in urine per 24 h in the treated group was greatly promoted *vs* the control ($P < 0.01$), that in the 250 or 500 mg·kg⁻¹ group were enhanced 2.4-3.8 and 5.8-7.8 times, respectively. That the excretion of Cu was increased in bile but not in feces suggested the plausible existence an enterohepatic circulation.

KEY WORDS dimercaptosuccinic acid; copper; enterohepatic circulation; atomic absorption spectrophotometry

摘要 大鼠铜中毒后, ig DMSA 在1-12 h内, 血清铜明显高于对照。连续给药3 d, 每次给药后24 h尿铜排出均多于对照($P < 0.01$), 250 mg·kg⁻¹组提高2.4-3.8倍, 500 mg·kg⁻¹组为5.8-7.8倍。DMSA能增加胆汁铜排泄, 但对粪铜排出没影响。比较胆汁铜和粪铜, 提示DMSA对铜有肠肝循环的可能。

关键词 二巯基丁二酸; 铜; 肠肝循环; 原子吸收分光光度测定法

铜(Cu)是维持人类生命必需的微量元素之一, 是机体内许多酶的重要组成成份。当Cu的代谢发生障碍, 如过多的Cu蓄积于体内

有关脏器, 会使相应器官功能异常^[1]。典型的即肝豆状核变性病(Wilson氏病), 对该病的主要治疗原则之一, 就是设法将体内过多的铜排出。以往常用药物是青霉胺, 长期使用, 毒副作用较大^[2]。二巯基丁二酸钠是广谱重金属解毒剂^[3], 也可用于该病的治疗^[4]。由于是注射剂型, 给需要长期用药患者带来不便。其类似物二巯基丁二酸(DMSA)^[5]是口服用药, 动物试验证明对Cu有解毒和促排作用^[6], 临床试用对肝豆状核变性病患者能促进尿Cu的排出和改善症状的作用^[7]。本实验旨在, 进一步了解口服DMSA对Cu促排的影响, 为DMSA临床应用提供参考。

MATERIALS

药品 二巯基丁二酸(dimercaptosuccinic acid, DMSA), 由上海新亚制药厂提供(批号870416), 呈白色粉末。实验前用2%羧甲基纤维素钠(CMC)混合, 配成所需浓度; 硫酸铜(CuSO₄·5H₂O), 上海试剂一厂产品。

仪器 日立Z-8000型偏振塞曼原子吸收分光光度计(HITACHI Z-8000 polarized Zeeman atomic absorption spectrophotometer)。

大鼠 ♂, 体重216±s 32 g, 由中国科学院上海实验动物中心供给。

METHODS AND RESULTS

DMSA对血清Cu含量的影响 大鼠30只, 体重234±s 16 g, 按不同的采血时间分二批, 每批15只, 分3组(对照和2组给药), 大鼠im CuSO₄ 30 mg·kg⁻¹·d⁻¹×3 d后24 h ig DMSA 250或500 mg·kg⁻¹, 对照组ig等容量2% CMC溶液。第一批在Cu中毒前, 给

Received 1991-06-12

Accepted 1992-12-01

¹ Project supported by the National Natural Science Foundation of China, No 39170855.

DMSA 前, 以及给药后1, 3, 5 h 眼眶采血; 第二批在给药后8, 12, 24 h 时采血. 取血清用重蒸馏水稀释5倍, 直接在原子吸收分光光度计上测定.

原子吸收分光光度计测量条件 Cu 空心阴极灯, 灯电流7.5 mA, 吸收线324.8 nm, 狭缝1.3 nm, 灵敏度 $<20 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 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 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 作标准曲线 $r=0.999$, 每被测样品重复2-3次, 取平均值换算成每 ml 血清中 Cu 含量.

结果, 大鼠在给药后1-12 h 内, 血清 Cu 含量均高于对照组 ($P<0.01$), 24 h 时与对照组基本一致 (Tab 1).

DMSA 对尿和粪 Cu 排泄的影响 大鼠15只, 体重 $171\pm 7\text{g}$, Cu 中毒后(剂量和方法与上述一致) 48 h, 将大鼠随机分3组(每组5鼠), 分别是 ig DMSA 0 (对照), 250或500 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 所给溶液容量相等, 每日1次, 连续3 d, 大鼠饲养在能分离尿、粪的有机玻璃代谢笼内, 每笼1鼠, 收集各阶段24 h 尿和粪(即 Cu 中毒前, 给 DMSA 前、后及停药 d 3). 尿样稀释后直接测定, 粪便烘干碾碎搅匀, 称10

mg, 加高氯酸(HClO_4)和过氧化氢(H_2O_2)消化后, 稀释测定.

结果表明, 给 DMSA 250或500 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组3 d 内, 每24 h 尿 Cu 促排分别是对照组的2.4-3.8和5.8-7.8倍, 而且后者作用比前者更显著 ($P<0.05$), 对照组尿 Cu 排出随时间的延续含量逐渐下降. 粪 Cu 排出, 除 ig DMSA 500 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组 d 3外, 其它给药组的平均值均低于对照 ($P>0.05$), 见 Tab 2.

DMSA 对胆汁 Cu 排泄的影响 大鼠9只, 体重 $232\pm 25\text{g}$, im CuSO_4 12 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}\times 3\text{d}$ 后48 h 随机分对照和给药2组, 每组3鼠, ip 戊巴比妥钠30 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 大鼠麻醉后, 仰卧固定在木板上, 剖腹用直径1 mm 塑料管作胆汁引流术. 即 ig DMSA 250或500 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 对照组 ig 等容量的 CMC 溶液. 于药后0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 24 h 收集胆汁, 稀释后测定 Cu 含量. 为保持麻醉状态, 必要时补充少许戊巴比妥钠溶液.

实验结果, 对照, 250和500 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组, 24 h 胆汁 Cu 总排出量(μg)分别为 20.9 ± 0.2 , 31 ± 12 , 35 ± 4 . 药物作用在4 h 时达高峰 (Fig 1).

Tab 1. Effect of ig DMSA on serum Cu after im CuSO_4 30 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}\times 3\text{d}$ in rats. $n=5$, $\bar{x}\pm s$. ^a $P>0.05$, ^b $P<0.05$, ^c $P<0.01$ vs control.

	Control	Copper in serum/ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	
		250 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	500 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$
Before im CuSO_4	1.56 ± 0.14	1.56 ± 0.24^a	1.52 ± 0.12^a
After im CuSO_4	2.26 ± 0.22	2.26 ± 0.19^a	2.3 ± 0.3^a
After ig DMSA			
1 h	2.18 ± 0.17	2.98 ± 0.08^c	2.8 ± 0.3^c
3 h	2.15 ± 0.13	3.06 ± 0.15^c	3.2 ± 0.5^c
5 h	2.20 ± 0.08	3.32 ± 0.18^c	3.3 ± 0.3^c
8 h	1.98 ± 0.28	3.20 ± 0.18^c	3.8 ± 0.3^c
12 h	1.9 ± 0.3	2.9 ± 0.7^b	3.4 ± 0.6^c
24 h	1.92 ± 0.26	1.90 ± 0.18^a	1.9 ± 0.5^a

Tab 2. Effect of ig DMSA daily $\times 3$ d on Cu excretion in urine and feces after im CuSO_4 $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1} \times 3$ d and stopped 2 d in rats. $n=5$, $\bar{x} \pm s$. $^a P > 0.05$, $^c P < 0.01$ vs control. $^e P < 0.05$, $^f P < 0.01$ vs $250 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$.

	Copper content (μg) in 24 hours					
	Urine			Feces		
	Control	$250 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	$500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	Control	$250 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	$500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$
Before im CuSO_4	4.6 ± 4.4	3.2 ± 0.3^a	6.2 ± 1.4^a	33 ± 22	32 ± 16^a	32 ± 12^a
Before ig DMSA	28 ± 9	23 ± 5^a	28 ± 9^a	163 ± 156	111 ± 67^a	152 ± 94^a
DMSA $\times 1$	28 ± 9	67 ± 22^c	161 ± 54^{ef}	351 ± 136	220 ± 141^a	330 ± 190^a
DMSA $\times 2$	19 ± 6	71 ± 7^c	126 ± 34^{ef}	382 ± 122	198 ± 132^a	129 ± 96^c
DMSA $\times 3$	15 ± 4	58 ± 23^c	117 ± 47^{ce}	360 ± 251	177 ± 96^a	164 ± 80^a
DMSA stopped d 3	10 ± 4	7.0 ± 2.2^a	22 ± 5^{ef}	193 ± 123	276 ± 55^a	

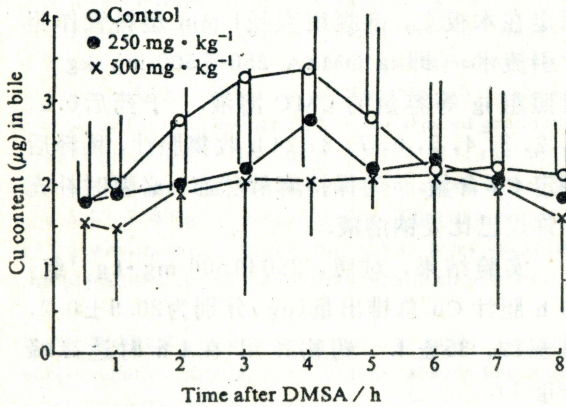


Fig 1. Effects of ig DMSA on Cu excretion in bile after im CuSO_4 $12 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1} \times 3$ d and stopped 2 d in rats. $n=3$, $\bar{x} \pm s$ all. $P > 0.05$ vs control.

DISCUSSION

本实验为了使大鼠体内 Cu 含量处于相对高而又稳定的状态, 采用小剂量多次染毒后给药. 在对血 Cu 影响的预初试验发现, ig DMSA 24 h 后给药组与对照组之间无明显差异, 结果与文献报道⁽⁷⁾相符. 于是采用 24 h 内不同时间测血清 Cu 的方法, ig DMSA 后, 1-12 h 内, 血清 Cu 明显高于对照, 而且大剂量作用时间更长, 在 8, 12 h 时血清 Cu 平均值仍比低剂量组高. 说明 DMSA 进入体内不仅与

血液游离的 Cu 结合, 而且能将体内结合在组织脏器中多余的 Cu 动员出进入血液中. 血中药物的浓度越高, 血 Cu 含量也越多. 药物本身主要是通过尿排出体外, 这样就增加了尿中 Cu 含量. 但随着时间的延长, DMSA 作用减弱, 血液中 Cu 含量又趋于相对稳定状态, 即 24 h 时无明显差异.

在生物体内 Cu 的自然排泄主要是通过胆汁由粪便排出, 经尿排出的量是很少的⁽⁸⁾, 本实验 (Tab 2) 也证实这一点, 无论是正常大鼠, 还是染毒的, 都是以粪 Cu 排出为主. 尿 Cu 排出只占总排出量的 4.0-17.2%, 当 ig DMSA 后, 虽然总排出量无明显变化, 但是每 24 h 尿 Cu 排出都明显多于对照 ($P < 0.01$), 而且, 大剂量组比低剂量组作用明显, 尿 Cu 含量分别提高到总排出量的 32.8-45.5% 和 23.4-24.7%. 从 Tab 2 看 DMSA 对粪 Cu 排出未见显著性影响, 但平均值呈现减少的迹象, 比较 Fig 1 和 24 h 胆汁 Cu 排出高于对照的结果. 推测 DMSA 对 Cu 在肠道是否有促进重吸收的可能, 还有待实验证实.

REFERENCES

1 Seymour CA. Copper toxicity in man. In: Howell JMcC, Gawthorne JM, editors. *Copper in animals and man (II)*. Boca Raton (FL): CRC Press,

1987 : 79-106.

- 2 Deiss A. Treatment of Wilson's disease. *Ann Inter Med* 1983; **99** : 398-400.
- 3 Ting KG, Liang YI, Shi JM, Chen WZ, Gu ZP, Jin YF. Detoxication of heavy metal poisoning by sodium dimercaptosuccinate. *Zhonghua Yixue Zazhi* 1965; **51** : 304-7.
- 4 Yang RM, Bao YC, Yang XT, Lou ZP, Cai YL. Comparative cupruritic study of five agents in Wilson's disease. *New Drugs Clin Remedies* 1978; **6** : 341-3.
- 5 Ding GS, Liang YY. Antidotal effects of dimercaptosuccinic acid. *J Appl Toxicol* 1991; **11** : 7-14.
- 6 Liang YY, Shi JM, Chen LX, Ding GS. Dimercaptosuccinic acid *per os* promoted the excretion of Pb, Cu, Sb, Sr, Ti and Pm. *Acta Pharm Sin* 1980; **15** : 335-40.
- 7 Zhang YD, Yang RM. Therapeutic assessment of dimercaptosuccinic acid capsule in the treatment of hepatolenticular degeneration. *New Drugs Clin Remedies* 1990; **9** : 73-6.
- 8 Gregus Z, Klaassen CD. Disposition of metals in rat: a comparative study of fecal, urinary and biliary excretion and tissue distribution of eighteen metals. *Toxicol Appl Pharmacol* 1986; **85** : 24-38.

四种药物对红内期早期和晚期约氏疟原虫的影响

陈晓红, 胡友梅 (第三军医大学药理教研室, 重庆630038, 中国)

Effects of four drugs on intraerythrocytic *Plasmodium yoelii* of early and late stages

CHEN Xiao-Hong, HU You-Mei
(Department of Pharmacology, Third Military Medical College, Chongqing 630038, China)

ABSTRACT Erythrocytes of mice infected with *Plasmodium yoelii* of early stage (ESP) were separated from those infected with late stage (LSP), by a single density-gradient centrifugation in 19% diatrizoate meglumine. After centrifugation, the differential counts of ESP and LSP were 84.9% and 87.4%, respectively. The stage-dependent effects of nitroquine (NQ), pyrimethamine (Pyr), perphenazine (Per) and metronidazole (Met) were studied with [³H]adenosine incorporation into ESP and LSP *in vitro* using chloroquine (CQ) as control. Like CQ, the 4 drugs inhibited that [³H]adenosine incorporation into LSP more remarkably than that into ESP. The IC₅₀ of CQ, Met, Pyr, Per, and NQ against ESP were 1.89, 2.11, 2.56, 2.60, and 4.65 times as high as that against LSP, respectively.

KEY WORDS nitroquine; pyrimethamine; metronidazole; perphenazine; chloroquine; diatrizoate

Received 1991-06-07 Accepted 1993-04-29

meglumine; *Plasmodium yoelii*; adenosine

摘要 用19%泛影葡胺单密度梯度离心,较好地分离了红内期约氏疟原虫的早期原虫(ESP)和晚期原虫(LSP)感染的红细胞。以体外[³H]腺苷参入疟原虫的量作指标,发现奋乃静(Per)、甲硝唑(Met)、硝喹(NQ)及乙胺嘧啶(Pyr)都类似于氯喹(CQ),对LSP的抑制作用较对ESP更强。

关键词 硝喹; 乙胺嘧啶; 甲硝唑; 奋乃静; 氯喹; 泛影葡胺; 约氏疟原虫; 腺苷

红内期疟原虫分为早期疟原虫(即环状体, early stage parasite, ESP)和晚期疟原虫(包括滋养体和裂殖体, late stage parasite, LSP)。近年来人们日益重视通过研究红内期抗疟药作用的期特异性来探明其作用机制。本实验采用泛影葡胺同步化红内期约氏疟原虫,根据体外[³H]腺苷参入疟原虫量的多少,观察硝喹(nitroquine, NQ)、乙胺嘧啶(pyrimethamine, Pyr)、甲硝唑(metronidazole, Met)、奋乃静(perphenazine, Per)抗疟作用的期特异性,为研究其抗疟机制奠定基础。并以氯喹(chloro-