

肝癌腹水 H₂₂ 小鼠中⁶⁴Cu 代谢 和¹²⁵IMT 转运的研究*

淮 清 方兴旺 王文清

(北京大学技术物理系, 北京 100871)

黄国健 周 舒

(中日友好医院临床研究所, 北京 100029)

用⁶⁴Cu 研究了铜在肝癌腹水小鼠中的代谢。研究结果表明, 尾静脉注射的⁶⁴Cu 在正常和肝癌小鼠中都先聚集在肝脏, 在癌腹水小鼠肝脏中聚集的⁶⁴Cu 要比正常小鼠的少, 其它组织中⁶⁴Cu 的分布也有一定的改变; 癌细胞中的⁶⁴Cu 占癌中的 85% 以上。用 Sephadex G-75 柱分离小鼠肝脏匀浆物时, 发现⁶⁴Cu 主要与金属硫蛋白结合。在研究腹腔注射¹²⁵I-(Cd, Zn)MT 的转运时发现, 在所观测的组织中, 肝癌和肾脏中聚集的¹²⁵IMT 最多。当腹腔注射后, ¹²⁵IMT 很快到达肝癌细胞中, 并当腹水中¹²⁵IMT 达到最大时, 癌细胞中的¹²⁵IMT 也最多。由此可见, ¹²⁵IMT 可以穿过癌细胞膜到达癌细胞。

关键词 铜的代谢 金属硫蛋白 ¹²⁵IMT

中图分类号: Q 502, Q 51

近年来, 随着医学微量元素研究的日益深入, 发现微量元素与各种疾病的关系非常密切。作为机体必需的微量元素铜, 在肿瘤的发生、发展和防治中的作用逐步引起研究者的重视。但是, 铜的吸收和代谢的化学机理尚不清楚^[1], 特别是在荷瘤动物中。一些研究报告说明^[2, 3], 在肿瘤的发生和发展过程中, 生物体内铜代谢发生改变。在肿瘤病人中血清铜水平的升高可以作为诊断患恶性肿瘤的依据, 在一些种类的肿瘤中, 铜聚集在癌组织中, 例如在大肠癌组织中铜比正常值高 20%, 胃癌组织高 45%, 卵巢、子宫及宫颈癌组织高 72%。近 20 多年来, 刘同庆^[4, 5]将铜和铁配以清热解毒等中草药组成的铜铁复方在临床上治疗肿瘤取得了一定的效果。铜铁复方中的铜具有显著的抑瘤效果, 而且无明显的毒副作用。然而, 正常人长期服用铜会发生中毒,

* 国家自然科学基金和 JOLANT 部分资助项目

收稿日期: 1996-12-03 收到修改稿日期: 1997-03-04

淮清: 女, 27 岁, 放射化学专业, 博士

为什么肿瘤患者长期服用铜未发现肝脏等器官的中毒现象呢? 因此有必要进一步研究荷瘤动物中铜的代谢。

金属硫蛋白(MT)是一种低分子量蛋白,它的氨基酸组成的三分之一都是半胱氨酸,每分子MT可以结合12个Cu(I)。由于MT与Cu(I)具有很高的亲和性,当生物体内铜过量时,已经存在和新诱导的MT可以有效地抑制铜毒,因此MT被认为在调节铜的代谢中起着重要的作用^[6]。

1 实验部分

1.1 动物模型

雄性昆明小鼠,体重18—22g,每只小鼠腹腔皮下接种肝癌(H₂₂)细胞 7×10^6 (0.2 mL),作为小鼠肝腹水模型。

1.2 放射性⁶⁴Cu代谢实验

⁶⁴Cu由中国原子能科学研究院提供,配成硝酸铜溶液,用NaOH调其pH为3—4。给接种肝癌10天的小鼠和同年龄正常小鼠每只尾静脉注射0.2 mL ⁶⁴Cu (3.7×10^4 Bq, 放化纯度达99.5%)。每组随机取4只小鼠。注射后,每隔一定时间用乙醚麻醉,剪断其颈动脉取血,然后脱颈椎处死小鼠,取其心、肝、脾、肺、肾、胃肠和肝癌,各组织均用三次重蒸水反复冲洗,并用滤纸吸去水后,称重,用阱形闪烁计数器测量⁶⁴Cu的放射性活度。测完腹水癌中⁶⁴Cu放射性活度后,离心分离腹水与癌细胞,并用三次重蒸水清洗癌细胞3次,离心后称重并测癌细胞中⁶⁴Cu放射性活度。

1.3 用凝胶色谱法分离正常和荷瘤小鼠肝脏中的MT

小鼠肝脏称重后,在含有1% 2-巯基乙醇的 0.01 mol/dm^3 Tris-HCl(pH 8.6)缓冲液中匀浆,在20℃下放置3 h(巯基乙醇可以将部分聚合的Cu-MT还原)。匀浆物在3000 r/min离心15 min,若上清液不很澄清,可在100℃下加热2—3 min。上清液通过预先用 0.01 mol/dm^3 Tris-HCl缓冲溶液平衡好的Sephadex G-75柱(Φ 6 cm × 50 cm)分离,用相同的缓冲液洗脱,测量流出液中⁶⁴Cu的放射性活度,过4—5天(⁶⁴Cu的10个半衰期)后,用原子吸收法测量Cu和Zn的含量。

1.4 腹腔注射¹²⁵I-(Zn, Cd)MT后的MT动态分布

本实验所用¹²⁵I-(Zn, Cd)-MT由北京大学余美祥博士提供。给荷瘤小鼠腹腔注射0.2 mL ¹²⁵I-(Zn, Cd)-MT。其它步骤同实验1.2。

2 实验结果

2.1 ⁶⁴Cu在正常和荷瘤小鼠中的动态分布

正常和荷瘤小鼠组织中⁶⁴Cu的摄取率随时间的变化示于图1。由图1看出,在血液、心、肝、肾和胃肠中,荷瘤小鼠⁶⁴Cu变化规律与正常小鼠中的相似,只有脾和肺中的变化规律略有不同。除脾脏外,荷瘤小鼠⁶⁴Cu的摄取率均比正常小鼠中的低。

表1列出了正常小鼠尾静脉注射⁶⁴Cu后,⁶⁴Cu在组织中的分布。由于实验只测量了心、肝、脾、肺、肾、胃肠和血液中的⁶⁴Cu放射性活度,小鼠中其它组织和排泄物的放射性活度没有测量,因此所观测到的放射性活度之和只占总放射性的50%—60%。据Owen^[7,8]报道,静脉注射⁶⁴Cu后0—1 h间,骨骼肌、骨和皮肤中放射性活度约占总放射性活度的20%—30%,1 h后排

泄物中放射性活度占 10% 以上, 24 h 以后约占 25%, 2—3 d 后占 50% 以上。本文的实验结果与文献[7, 8]吻合。表 2 列出了荷瘤小鼠静脉注射⁶⁴Cu 后,⁶⁴Cu 在组织中的分布。从表 2 可知,⁶⁴Cu 在荷瘤小鼠的各个组织(除肿瘤外)中滞留均比正常小鼠的低, 这可能是由于肿瘤组织也吸收了一部分⁶⁴Cu, 而且随注射后时间的增加, 绝大多数组织中⁶⁴Cu 越来越少, 而肿瘤组织中的⁶⁴Cu 不断增加。这说明肿瘤组织中铜要从其它组织中转移以满足需要。比较表 1 和表 2 数据可知, 荷瘤小鼠所测组织中的放射性活度与总活度之比比正常小鼠的约低 10%, 这可能是由于在荷瘤小鼠中还存在比正常小鼠更易吸收铜的组织。在临床上发现, 铜铁复方对那些发生广泛骨转移的癌症患者有明显的疗效, 服药数次后发现骨转移病灶消失^[4]。由此可推测, 这部分铜可能是被骨所吸收, 这还有待进一步证实。

将肝癌中的腹水与癌细胞分离, 测得肝癌中 85% 以上的⁶⁴Cu 聚集在癌细胞中。

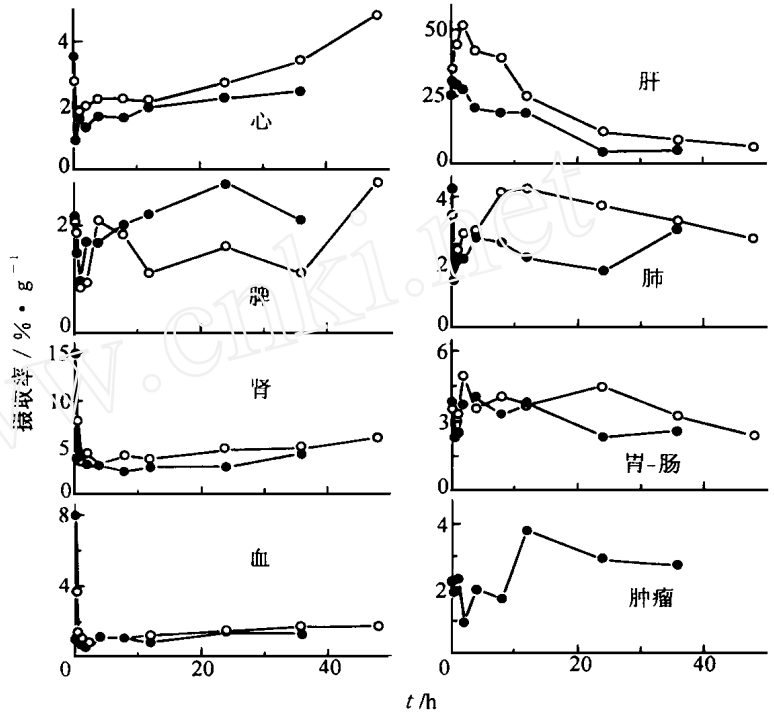


图 1 正常和荷瘤小鼠注射⁶⁴Cu 后铜的代谢

Fig 1 Metabolism of copper in the organ of mice after i.v. injection of ⁶⁴Cu

—正常小鼠, —荷瘤小鼠

表 1 正常小鼠肝脏及其它被测组织中的⁶⁴Cu

Table 1 The percent of ⁶⁴Cu in liver and other tested organs of normal mice

t/h	l 肝	l 其它	l 所测组织
0.25	0.41	0.17	0.58
0.5	0.46	0.09	0.55
1	0.51	0.06	0.57
2	0.54	0.06	0.60
4	0.49	0.07	0.56
8	0.42	0.08	0.50
12	0.26	0.08	0.34
24	0.11	0.14	0.25
36	0.09	0.09	0.18
48	0.06	0.09	0.15

注: l 为组织中⁶⁴Cu 占注射⁶⁴Cu 总量的百分数。

表 2 荷瘤小鼠肝脏、肿瘤及其它被测组织中的⁶⁴CuTable 2 The percent of ⁶⁴Cu in liver and other tested organ of tumor bearing mice %

t/h	l/肝	l/肿瘤	l/其它	l/所测组织
0.25	0.29	0.02	0.31	0.62
0.5	0.41	0.02	0.07	0.50
1	0.41	0.02	0.05	0.48
2	0.34	0.03	0.05	0.42
4	0.30	0.03	0.07	0.40
8	0.28	0.03	0.06	0.37
12	0.18	0.04	0.07	0.29
24	0.06	0.08	0.07	0.21
36	0.07	0.09	0.07	0.23

注: l 为组织中⁶⁴Cu 占注射⁶⁴Cu 总量的百分数。

正常和荷瘤小鼠的肝脏优先聚集注射的铜, 在 0—4 h 间约一半的⁶⁴Cu 聚集在肝脏。但是, 铜在荷瘤小鼠肝脏滞留的比正常小鼠的要少, 在其它组织中也发生了不同程度的改变, 因此我们认为肿瘤的存在影响了铜在荷瘤小鼠中的吸收和代谢。

2.2 分离肝脏中 MT

正常和荷瘤小鼠, 以及正常小鼠注射前口服醋酸铜(以含铜 $5 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{kg}^{-1}$ 体重计), 尾静脉注射⁶⁴Cu 后 1、4、12 h, 小鼠肝脏匀浆物通过 Sephadex G-75 柱的淋洗图分别示于图 2(a)、(b)和(c)。从图 2(a)和(b)看出, MT 峰中⁶⁴Cu 的放射性活度与第三峰之比大于原子吸收法测得的两峰中铜含量之比, 因此可以认为注射后在肝脏中的⁶⁴Cu 主要以 MT 的形式结合。在图 2(c)中, MT 峰中⁶⁴Cu 放射性活度与第三峰之比与两峰间铜含量

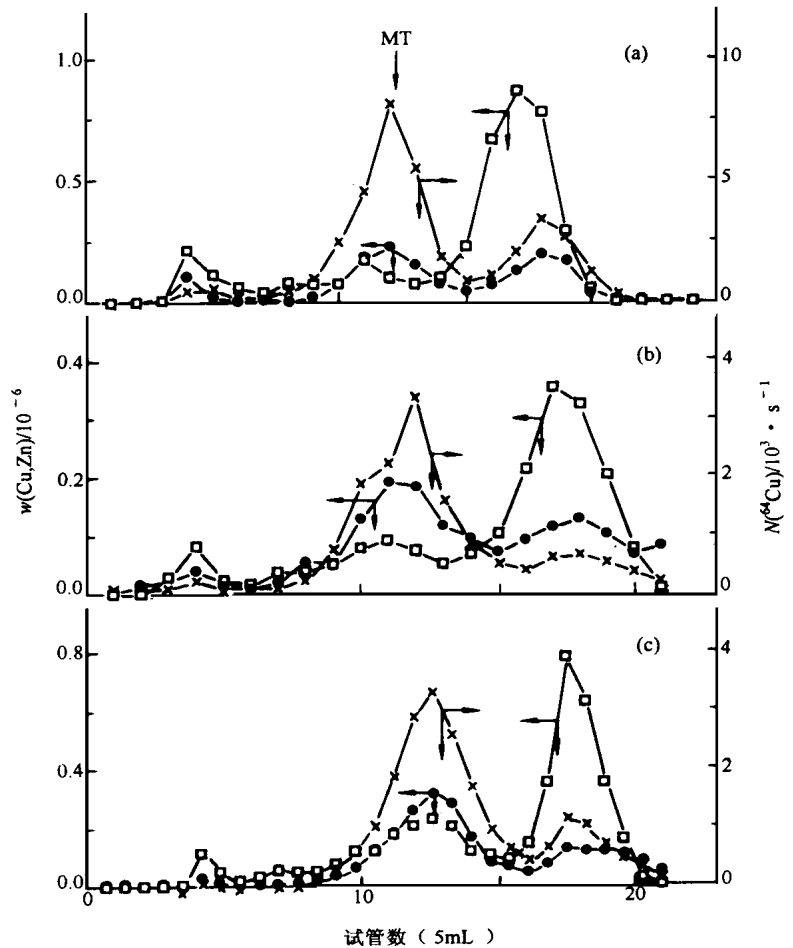


图 2 小鼠肝脏匀浆物通过 Sephadex G-75 柱的淋洗

Fig 2 Elution curves of ⁶⁴Cu, Cu, Zn in the liver homogenate on Sephadex G-75 column

x — ⁶⁴Cu, — Cu, — Zn

(a) — 注射后 1 h, (b) — 注射后 4 h, (c) — 注射后 12 h

之比近似一致, 这可能是由于⁶⁴Cu在肝脏中与以前存在的铜发生了同位素交换反应。另外, 从图 2(a), (b)和(c)MT 峰中金属含量的多少可以得知, (c)中金属含量大于(a)和(b), 因此(c)中MT 含量比其它的高, 这是由于事先口服醋酸铜的原因。

2.3 ¹²⁵I-标记的(Cd, Zn)MT 在组织中的动态分布

为了检测¹²⁵I-MT 是否可以通过癌细胞膜进入癌细胞中, 用¹²⁵I-(Cd, Zn)MT 腹腔注射肝癌腹水小鼠。Bolton-Hunter 试剂是以肽键与MT 结合, 难以断裂, 除非有能使肽键断裂的其它因素存在。¹²⁵I是以共价键结合到 Bolton-Hunter 试剂上的, 在腹水的 pH 为中性的情况下, 一定时间是稳定的。

肝癌腹水、癌细胞及部分组织对¹²⁵I-(Cd, Zn)MT 的摄取率示于图 3。由图 3 可知, 这几种组织在注射后 2 h, ¹²⁵I-MT 达到最大, 特别是血液, 几分钟后就达到最大值。在所观测的组织中, 肝癌和肾脏聚集了大约 20% 以上的¹²⁵I-MT。另外, ¹²⁵I-MT 可以很快进入肝癌细胞中, 并且随着腹水中¹²⁵I-MT 达到最大值时, 癌细胞中的放射性活度也到达最大值。因而可以认为, ¹²⁵I-MT 可以通过癌细胞膜到达癌细胞中。

3 讨 论

在生物体中铜含量增加会使超氧阴离子自由基(O₂⁻)和H₂O₂的生物毒性急剧增加^[9], 例如, 失去各种酶活性, DNA 的单链和双链断裂以及使蛋白质变性等^[10], 因此肿瘤组织中铜离子的聚集可以带来细胞的损伤, 最终表现为抗癌性。但是, 在正常组织中铜的聚集仍然可以引起组织损伤。从实验结果可知, 荷瘤小鼠几乎所有的组织中的⁶⁴Cu 都少于正常小鼠。对荷瘤动物来说, 由于肿瘤组织的存在, 影响了体内正常组织的铜吸收, 这也可能是肿瘤病人长期服用铜复方未出现副作用的原因之一。

肝脏是铜离子的主要储存器官, 铜中毒的症状主要出现在肝脏。本实验结果表明, 注射后肝脏中的⁶⁴Cu 主要是以MT 的形式存在。由于MT 与铜离子的结合是非特异性的, 而且结合得非常紧密, 使细胞中游离的铜离子不存在, 从而防止了铜离子与其它蛋白质、酶或DNA、RNA 结合, 破坏了它们的结构^[11], 因此, MT 具有可解铜毒的作用。据文献^[12]报道, 进入肝脏中的铜在与其它蛋白, 例如超氧化物歧化酶, 线粒体和核酸等结合之前, 先与MT 结合。另

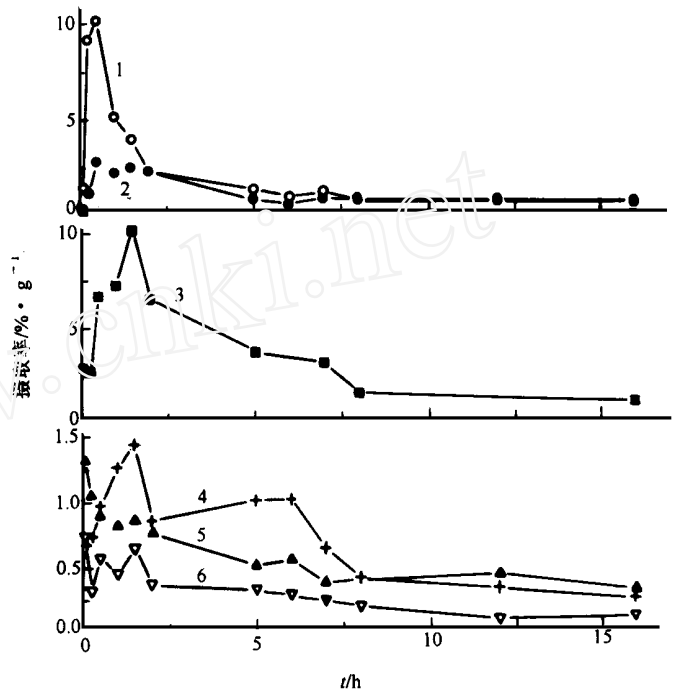


图 3 荷瘤小鼠腹腔注射¹²⁵I-MT 后的代谢

Fig 3 Metabolism of ¹²⁵I of tumor bearing mice after i.v. injection of ¹²⁵I-MT

1——腹水, 2——癌细胞, 3——肾, 4——胃-肠, 5——血, 6——肝

外,当机体内铜不足时, $M T$ 又可以降解,释放出铜离子以供其它蛋白或酶的需要,因此 $M T$ 具有参与铜储存和转运的作用。

由于 $Cu-M T$ 的代谢与 $Cd-M T$ 的近似^[13],但 $Cu-M T$ 极易被氧化,因此我们用¹²⁵I标记的 $(Cd, Zn)-M T$ 来研究 $Cu-M T$ 是否可以通过癌细胞膜到达癌细胞中。实验结果表明,¹²⁵I $M T$ 可以通过癌细胞膜进入癌细胞。但是尽管如此, $Cu-M T$ 也不能作为药物来应用,其原因是:(1) $Cu-M T$ 极易被氧化,氧化后的蛋白会发生聚合而不溶于水,同时铜离子从蛋白质上解离下来;(2)文献[14]报道,给动物血液中注射 $Cu-M T$,其生物半衰期只有几分钟,因此 $Cu-M T$ 不能通过血液到达全身。

感谢中国原子能科学院贺佑丰研究员提供⁶⁴Cu,感谢北京大学余美祥博士提供¹²⁵I $M T$ 。

参 考 文 献

- 1 Freedman JH, Weiner RJ, Peisach J. Resistance to Copper Toxicity of Cultured Hepatoma Cells *J Biol Chem*, 1986, 261: 11840—11848
- 2 Regulijc A, Roth A, Kolaric K, et al. Iron, Copper and Zinc Liver Tissue Levels in Patients With Malignant Lymphoid Cancer, 1980, 46: 565—569
- 3 Hart BA, Voss GW, Vacek PM. Metallothionein in Human Lung Carcinoma *Cancer Lett*, 1993, 75: 121—128
- 4 刘同庆. 揭开癌症之谜. 北京: 国际文化出版公司, 1996
- 5 高 锦. 铜铁复方的实验研究[博士论文]. 北京: 中日友好医院, 1994
- 6 Bremner I. Nutritional and Physiological Significance of Metallothionein. In: Kagi JHR, Nordberg M, eds. *Metallothionein (II)*. Basel: Birkhäuser Verlag, 1987. 81—108
- 7 Owen CA. Metabolism of Radiocopper (Cu^{64}) in the Rat *Am J Physiol*, 1965, 209(5): 900—904
- 8 Owen CA. Metabolism of Copper 67 by the Copper-deficient Rat *Am J Physiol*, 1971, 221: 1722—1727
- 9 Samuni A, Chevion M, Czapski G. Unusual Copper Induced Sensitization of the Biological Damage Due to Superoxide Radical *J Biol Chem*, 1981, 256: 12632—12635
- 10 Margalioth EJ, Schenker JG, Chevion M. Copper and Zinc Levels in Normal and Malignant Tissues *Cancer*, 1983, 52: 868—872
- 11 Hartmann H-J, Felix K, Nagel W, et al. Intestinal Administration of Copper and Its Transient Release into Venous Rat Blood Serum Concomitantly With Metallothionein *Biom Metals*, 1993, 6: 115—118
- 12 Palida FA, Mas A, Arola L, et al. Cytosolic Copper-binding Proteins in Rat and Mouse Hepatocytes Incubated Continuously With $Cu(II)$. *Biochem J*, 1990, 268: 359—366
- 13 Cherian MG. Metabolism and Potential Toxic Effects of Metallothionein. In: Kagi JHR, Nordberg M, eds. *Metallothionein*. Basel: Birkhäuser Verlag, 1979, 337—345
- 14 Bremner I. Metallothionein and Copper Metabolism in Liver *Methods Enzymol*, 1991, 205: 584—591

METABOLISM OF ⁶⁴Cu AND TRANSFER OF ¹²⁵IM T IN THE BEARING LIVER ASCITES TUMOR (H₂₂) MICE

Huai Qing Fang Xingwang Wang Wenqing

(Technical Physics Department of Peking University, Beijing 100871)

Huang Guojian Zhou Shu

(The China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029)

ABSTRACT

The metabolism of ⁶⁴Cu in some tissues of the bearing liver ascites tumor mice has been studied. The liver in normal and tumor bearing mice preferentially accumulates intravenous injection copper, however, the liver in the later mice accumulates much less copper than that of the former. It suggests that in the bearing ascites tumor mice, ascites tumor influences the metabolism of copper. It is found that the content of ⁶⁴Cu in the tumor cell is more than 85% in ascites tumor. Gel filtration profile of mice liver homogenate on Sephadex G-75 shows that injected ⁶⁴Cu is mainly bound with metallothionein. The tissues uptake of ¹²⁵I-labelled (Cd, Zn) IM T which is given in abdominal cavity are also reported. Of the tissues studied, the ascites tumor and kidney accumulate the highest concentration of given ¹²⁵IM T, since over 20% of entire dose accumulated in them. After ¹²⁵IM T is given, it soon goes into ascites tumor, and reaches the maximum in ascites as well as in tumor cell. Therefore, ¹²⁵IM T can go through the membrane of tumor cell and reaches in the tumor cell.

Key words Metabolism of copper Metallothionein ¹²⁵IM T