

镧在 Wistar 大鼠肝脏中的物种分布

卢 然 朱严楣^a 陈杭亭¹ 赵大庆* 倪嘉缙
(中国科学院长春应用化学研究所, 稀土化学物理开放实验室,

¹ 国家电分析和光谱研究测试中心, 长春 130022)

陈 东 聂毓秀 刘 颖
(白求恩医科大学组胚教研室, 长春 130021)

采用 ICP-MS、凝胶过滤层析及超滤技术, 通过动物实验研究了长时间、低剂量镧作用后, 镧在 Wistar 大鼠肝脏中的代谢累积及其物种分布。结果表明, 随着给药剂量的增加及作用时间的增长, 镧在肝脏中的累积量有规律地增大; 停止给药一段时间后, 积累在肝脏中的镧有不同程度的代谢, 其代谢速度很慢; 积累在肝脏中的镧主要分布于分子量大于 60000 的水溶性蛋白中; 经 Sephacryl S-200 层析分离得到的六个蛋白洗脱峰中均含有稀土, 在第一个洗脱峰中含量最大, 约占肝脏含镧大分子蛋白(分子量大于 60000)总量的 88%。

关键词: 稀土 肝脏 物种 ICP-MS

分类号: O614.33

随着稀土在我国农业、畜牧业及医药领域的广泛应用, 痕量稀土不可避免地经食物链进入人体, 因此, 稀土在生物体内的代谢积累情况及其生物学效应, 引起了人们普遍关注。一般稀土进入血液后, 轻稀土主要累积在肝脏, 重稀土则多沉积于骨骼^[1~4]。已有实验表明, 经消化道摄入的稀土首先经血液输送到肝脏并大量积累, 然后再向其它脏器转移^[5,6], 可见肝脏是稀土代谢最重要的器官之一, 研究肝脏中稀土物种分布是揭示生物体内稀土代谢的关键。由于肝脏中蛋白种类极其繁多, 有关稀土进入肝脏中结合蛋白方面的研究工作仅有唐任寰的报道, 并获得一种结合稀土的鼠肝蛋白^[7,8], 但未见到详细的结果。我们希望进一步了解稀土进入肝脏后, 是否存在与其特异结合的蛋白及其分布状态, 本文报道突出长时间、低剂量稀土对动物的影响, 采用 ICP-MS、凝胶过滤层析及超滤技术, 对 Wistar 大鼠肝脏中镧的代谢累积及其物种分布进行了研究。

1 实验部分

1.1 实验材料与仪器

Wistar 大鼠, 由白求恩医科大学实验动物部提供; $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ 溶液: 由北京农用稀土中心提供; $\text{In}(\text{NO}_3)_3$ 溶液: 由光谱纯金属铟经硝酸溶解, 制备成浓度为 $200\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的溶液; 缓冲溶液: 将 6.05g Tris 溶于去离子水中, 定容至 990mL 左右, 用优级纯浓 HCl 调至 pH 为 7.50, 定容至 1000mL; Sephacryl S-200 购于 Pharmacia 公司; 浓硝酸为优级纯。

T-124 高速冷冻离心机, UV-922 紫外-可见分光光度计(瑞士 Contron 公司), Cole Parmer

收稿日期: 1999-12-06。

国家自然科学基金重大项目资助课题(No. 298902804), 国家博士后科学基金资助。

* 通讯联系人。

^a 哈尔滨工程大学化工系。

第一作者: 卢 然, 女, 30 岁, 博士后, 现任教于吉林大学化学系; 研究方向: 生物无机化学及有机化学。

酸度计, POEMS 型 ICP-光谱质谱仪(美国 TJA 公司), SL-2 数控层析冷柜(北京四环科学仪器厂), 超滤膜(Spectrum 公司, C 型)。

1.2 实验方法

动物实验: 采用 Wistar 大鼠, 体重 $80 \pm 2\text{g}$, 以 $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ 溶液灌胃, 剂量分别为: $20\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, $10\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, $2\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, $0.2\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 及 $0.1\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 对照组大鼠以生理盐水灌胃, 给药周期为每星期六次, 连续给药分为一个月, 六个月及六个月停止给药一个月三种情况。乙醚麻醉, 断头, 处死动物, 取血液及肝脏, 将血液在 37°C 温育 1hr 后, 离心取血清, 将血清及肝脏在液氮中速冻后, 于 -20°C 冰柜中保存。

肝脏的处理: 将肝脏在 Tris-HCl 缓冲溶液中解冻, 洗净, 剪碎, 于组织研磨器中研磨, 4°C 下 $10000\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 30min, 分别取沉淀和上层液体, 上层液体继续在 4°C 下 $12000\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 1hr, 待用; 将所有沉淀合并, 用浓硝酸消化, 待用。

超滤实验: 将一定量(20mL) 上述上清液移入超滤器中, 用截留分子量为 1000 的超滤膜进行超滤, 收集超滤液, 并添加缓冲溶液, 反复超滤四次, 合并超滤液, 将剩余液体取出, 用缓冲溶液补加至 15mL, 换上截留分子量为 10000 的超滤膜, 再次进行超滤, 收集超滤液, 重复如上操作, 按分子量由低至高更换超滤膜, 收集各超滤液组分, 以上操作在 4°C 层析柜中进行, 然后分别除盐、冻干各组分, 待用。

非水溶性组分的消化: 取一定量非水溶性组分在凯氏烧瓶中用浓硝酸消化^[9]。

凝胶过滤层析: 将 Sephacryl S-200 装入 $1.8 \times 100\text{cm}$ 层析柱, 用 Tris-HCl 缓冲溶液平衡 24hr, 取 3mL 离心后上清液上样, 用上述缓冲溶液以 $0.3\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$, $3\text{mL} \cdot \text{tube}^{-1}$ 洗脱, 收集各洗脱组分, 以上操作在 4°C 层析柜中进行, 分别除盐、冻干各组分, 待用。

蛋白含量测定: 按 Follin 酚法测定, 以牛血清白蛋白为标准^[10]。

血清中稀土含量测定: 取 1.0mL 血清溶于 2mL 1% HNO_3 , 并加入 10mL 容量瓶, 然后加入 1.00mL $200\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{In}(\text{NO}_3)_3$ 溶液作为内标, 用 1% HNO_3 定容, ICP-MS 测定稀土含量。

肝脏中稀土含量测定: 取非水溶性组分的消化溶液 2.0mL, 或取冻干后的超滤、柱层析分离各组分溶于 2mL 1% HNO_3 , 加入 10mL 容量瓶中, 然后加入 1.00mL $200\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{In}(\text{NO}_3)_3$ 溶液作为内标, 用 1% HNO_3 定容, ICP-MS 测定稀土含量。

2 结果与讨论

2.1 肝脏中稀土的代谢累积及其物种分布

2.2.1 肝脏水溶性及非水溶性组分中稀土含量

Wistar 大鼠经灌胃 $10\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ 六个月停止给药一个月后, 其肝脏中水溶性组分(离心上清液)及非水溶性组分(离心沉淀的消化液)中镧的含量测定结果表明, 水溶性组分中镧含量为 $88.8\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 肝脏, 非水溶性组分中镧含量为 $7.2\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 肝脏, 可见累积在肝脏中的镧主要分布于水溶性组分中, 占肝脏总镧含量的 90% 以上, 故我们重点研究了稀土在肝脏水溶性组分中的分布。

表 1 给出了以 $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ 灌胃 Wistar 大鼠一个月、六个月及六个月后停止给药一个月肝脏的水溶性组分中镧的含量, 结果表明: 即使在过去提出的日允许摄入稀土剂量 $0.6\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ^[11](以硝酸稀土计) 以下, 即以 $0.1\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ 灌胃饲养一个月及六个月的大鼠, 在肝脏水溶性组分中镧的含量达到对照组镧含量的二倍以上, 可见长时间、较低剂量镧作用

下, 大鼠肝脏中稀土会逐渐积累, 因此, 我们认为过去提出的日允许摄入量稀土剂量值得商榷。随给药剂量的增加, 鼠肝水溶性组分中镧的含量有规律地增大, 当灌胃剂量达 $20\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 一个月后, 其镧的含量约是对照组的二十几倍, 当给药时间延长至六个月时, 其镧的含量增大至本底的一百倍以上, 说明外源稀土在肝脏中的积累几乎与时间成线性关系, 因此长时间稀土的累积对肝脏的影响不容忽视。当灌胃 $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ 六个月停止给药一个月后, 鼠肝水溶性组分中镧的含量与灌胃六个月的相比均有不同程度的降低, 可见累积在肝脏中的部分稀土经过一段时间以后能被代谢掉, 但代谢速度很慢, 经过一个月, 镧的代谢率约在 $25\% \sim 65\%$ 之间, 并未恢复到本底状态, 说明长时间给大鼠喂以不同剂量的稀土, 在肝脏中均有积累, 而其代谢却是一个较慢的过程。值得提出的是, 在过去认为允许摄入量稀土剂量下, 经长时间作用稀土仍在肝内有积累, 故应研究其后续的生物效应。

表 1 Wistar 大鼠肝脏水溶性组分中镧的含量

Table 1 Lanthanum Content of Soluble Fractions in Wistar Rat Liver ($\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$ protein)

	control	$20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	$10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	$2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	$0.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	$0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$
drug delivery for one month	12 ^a	350	253	113	36	26
	18	378	284	139	52	41
average	15 ^b	364	269	126	39	34
drug delivery for six months	29	4029	1905	139	274	86
	30	3750	1765	541	338	113
average	30	3890	1835	340	306	100
drug delivery for six months and stop for one month	29	3056	807	80	66	124
	30	2805	676	175	142	72
average	30	2931	742	128	104	98

a: mean value of two data for one sample, standard deviation between 0.01 - 4.00%

b: average is mean value of above data

2.1.2 稀土在肝脏中的物种分布

首先利用超滤技术, 分析了灌胃一个月 $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ 后 Wistar 大鼠肝脏中不同分子量分布组分中镧的含量, 结果列于表 2, 由此可以看出: 在分子量小于 50000 的组分中, 灌胃稀土各组与对照组的镧含量没有明显差异, 而分子量大于 50000 的蛋白组分中镧含量随给药剂量的增加明显增大, 说明外源性稀土进入肝脏后主要分布于分子量较大的蛋白中, 因此, 进一步分析肝脏中分子量大于 50000 的蛋白组分中稀土含量显得更有意义。

表 2 Wistar 大鼠水溶性超滤组分中镧的含量

Table 2 Lanthanum Content of Ultrafiltration Fractions in Wistar Rat Liver ($\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$ protein)

	$M_w > 5 \times 10^4$	$1 \times 10^4 < M_w < 5 \times 10^4$	$1 \times 10^3 < M_w < 1 \times 10^4$	$M_w < 1 \times 10^3$
$20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	905 ^a	36	69	27
$10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	278	69	35	56
$2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	139	41	28	15
control	99	47	39	46

a: mean value of two data for one sample, standard deviation between 0.01 ~ 4.00%

我们进一步利用 Sephacryl S-200 凝胶过滤层析法, 分离肝脏中分子量大于 50000 组分的蛋白质, 分析其稀土含量及其物种分布。由于肝脏独特的形态结构和丰富的血液供应使其代谢功能极为活跃, 它不仅在糖、脂、蛋白质、维生素和激素等的代谢方面与全身各组织器官密切相关, 而且还具有分泌、排泄和生物转化等重要功能, 肝脏除了能合成其自身重要的蛋白外, 还能合成大部分血浆蛋白, 在肝脏中还存在着数以百种的酶, 因而, 其蛋白组成的复杂性使研究

稀土进入肝脏后的物种分布难度较大。我们经 Sephacryl S-200 凝胶过滤层析分离得到六个蛋白洗脱峰(洗脱曲线如图 1 所示),各蛋白洗脱峰中镧含量的测定结果列于表 3,为获得各蛋白洗脱组分中是否存在与稀土特异结合蛋白的信息,所列数据为各峰稀土含量与各峰蛋白含量的比值($\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 蛋白),故根据镧及蛋白的分子量可以计算出镧与蛋白的摩尔比,从而分析稀土与蛋白的作用情况。从表中可以看出:以 $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ 灌胃大鼠六个月及六个月停止给药一个月,各洗脱峰中镧含量远高于对照组,且第一个洗脱峰(P1)中稀土含量最高。同时,经聚丙烯酰胺凝胶电泳(Native PAGE)分析:P6 的电泳谱图中只有一条蛋白谱带,证明为纯蛋白,其分子量为 62000,经计算其镧与蛋白的摩尔比在 10^{-3} 数量级上,说明此蛋白为稀土非特异结合蛋白,P1、P2、P5 中分别含多种蛋白(由于 P3、P4 蛋白含量极低,未得到电泳图谱),其分子量均大于 60000,经计算可知,均未发现与稀土特异结合的蛋白。若将灌胃 $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ $20\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 六个月大鼠的肝脏经 Sephacryl S-200 分离的各洗脱峰中镧含量与洗脱出镧的总含量相比,可知各峰中镧含量所占的比率,P1 至 P6 所占的百分比分别为 88.0%, 4.0%, 2.8%, 1.7%, 1.7% 和 1.8%,故镧主要积累在第一个蛋白洗脱峰中。与此同时,我们计算了经 Sephacryl S-200 分离后稀土的回收率(各洗脱峰镧含量之和与上样前镧含量相比)为 86%,说明剩余的镧分布于分子量小于 60000 的组分中,并由此证明较大分子量蛋白所结合的稀土在分离过程中比较稳定,没有出现大量丢失的现象。

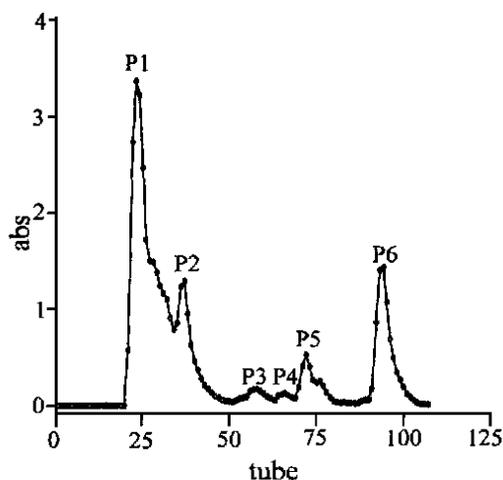


图 1 Wistar 大鼠肝脏水溶性组分经 Sephacryl S-200 分离的洗脱曲线
Fig.1 Elution curve of soluble fractions separated on Sephacryl S-200

表 3 Wistar 大鼠肝脏水溶性组分经 Sephacryl S-200 分离各洗脱峰中镧的含量

Table 3 Lanthanum Content of Chromatography Fractions in Wistar Rat Liver ($\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$ protein)

		P1	P2	P3	P4	P5	P6
drug delivery for six months	$20\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	4134 ^a	840	1765	1303	1073	1410
	$10\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	2979	762	1129	405	878	948
drug delivery for six months and stop for one month	$20\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	4950	755	2001	1086	1673	1220
	$10\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	4478	1120	1526	861	641	981
control		51	37	120	80	154	127

a: mean value of two data for one sample, standard deviation between 0.01 - 4.00%

2.2 低剂量长期饲喂硝酸镧后大鼠血清中镧含量

为了了解肝脏如何从血液中摄取稀土并积累稀土,我们测定了以 $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ 灌胃大鼠六个月及六个月停止给药一个月,其血清中镧的含量,结果列于表 4,从表中可以看出:当给药剂量小于 $0.2\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,给药时间为六个月或六个月后停止给药一个月时,血清中镧含量与对照组没有明显差别,说明此时外源稀土尚未在血清中累积;当给药剂量在 $2\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 至 $20\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 之间,灌胃六个月以后,血清中镧含量约增加至本底的三倍,镧的累积量与给药剂量非线性关系,说明进入血清中的镧不断地输送到身体其它脏器,并达到一动态平衡,在连续给药情

况下, 外源稀土不易完全代谢掉。停止给药一个月, 血清中镧含量稍有降低, 说明部分外源稀土已经代谢掉, $10\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $2\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量组镧的代谢率约为 30%。我们过去的实验指出^[12], 经给兔腹腔或静脉注射 $\text{La}(\text{NO}_3)_3$, 兔血浆中稀土含量在注射 30min 后达到最大值, 而后快速下降, 24hr 后即可降到本底状态, 说明稀土在动物血液中代谢速度较快, 所以长时间、低剂量稀土作用后, 血清中大量稀土已被代谢, 表 4 数据进一步证实了我们过去的结果。

表 4 经长时间、低剂量饲喂 $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ 后大鼠血清中镧的含量Table 4 Lanthanum Content of Serum in Rat Fed by Lower dose of $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ for a Long Time ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)

	control	$20\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	$10\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	$2\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	$0.2\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	$0.1\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$
drug delivery for	0.40*	0.78	1.23	2.17	0.82	0.31
six months	0.47	1.10	2.12	2.40	0.81	0.80
	1.17	4.01	2.62	1.18	0.85	0.99
average	0.68 ^b	1.96	1.99	1.94	0.83	0.70
	0.49	1.75	0.94	3.39*	0.72	1.21
	1.03	1.79	1.34	0.76	0.34	1.41
drug delivery for	0.69	1.52	1.08	0.63	1.06	0.59
six months and	0.81	1.68	1.89	2.84	0.61	0.21
stop for one month	0.15	2.52	2.24	1.55	0.38	1.10
	0.35	1.85	1.49	0.29	0.42	0.78
	1.13					
average	0.66	1.92	1.46	1.21	0.59	0.88

*: abnormal data is due to individual differences of rat and corresponding average does not consist of this data

a: mean value of two data for one sample, standard deviation between 0.01 - 4.00%

b: average is mean value of above data

综上所述, 低剂量 $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ 长期饲喂 Wistar 大鼠后, 镧在肝脏中有明显的累积, 且大部分存在于分子量大于 60000 的水溶性蛋白中, 并随着给药剂量的增大而增大。值得指出的是: 即使在低于允许摄入剂量的情况下, 经六个月饲喂, 大鼠肝脏中仍发现有稀土的积累, 累积在肝脏中的稀土虽能被代谢, 但速度较慢。而稀土在血清中的含量测定表明, 只有给药剂量超过 $2\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时, 镧的含量略有增大, 在 $2 \sim 20\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 范围内, 镧的积累与给药剂量关系不大, 由于稀土在血液中的代谢速度快, 故进入血液中的镧很快转移至肝脏、骨骼等处, 较易达到一动态平衡, 因此, 我们认为即使在低剂量情况下, 如长期摄入稀土, 稀土在肝中积累所引起的后续生理病理变化值得进行深入的研究。

参 考 文 献

- [1] ZENG Zheng Zhi(曾正志), WU Jr Gui(吴集贵), DENG Ru Wen(邓汝温) *Huaxue Tongbao (Chemistry)*, **1986**, **1**, 28.
- [2] YANG Pin(杨频), WEI Chun Ying(魏春英) *Huaxue Tongbao (Chemistry)*, **1996**, **7**, 14.
- [3] GUO Zhan Yong(郭站勇), ZHANG Yu Sheng(张宇生), ZHANG Hong Jiang(张宏江) *Xitu (Chinese Rare Earth)*, **1997**, **18**(1), 61.
- [4] NI Jia Zuan(倪嘉缙) *Bioinorganic Chemistry of Rare Earth Elements(稀土生物无机化学)*, Beijing: Science Press, **1995**, p285.
- [5] CUI Li(崔丽), LIU Xiao Ling(刘晓玲), NIE Yu Xiu(聂毓秀), LI Yan(李岩) *BETH UNM Yike Daxue Xuebao (J. BETHUNE Medical University)*, **1994**, **20**(4), 348.

- [6] CHEN Dong (陈东), ZOU Zhong Zhi (邹仲之), ZHU Xiu Xiong (朱秀雄), CHEN Ai Jun (陈爱军) *BETH UNM Yike Daxue Xuebao (J. BETHUNE Medical University)*, **1993**, **19**(5), 438.
- [7] TANG Rer Huan (唐任寰), HUANG Wen (黄文), LUO Feng (罗峰) et al *Zhongguo Huanjing Kexue (China Environmental Science)*, **1992**, **12**(1), 215.
- [8] TANG Rer Huan (唐任寰), HUANG Wen (黄文), XIAO Guang-Qing (肖广庆), LIU Yuan Fang (刘元方) *Tongweisu (J. Isotopes)*, **1991**, **4**, 71.
- [9] ZHANG Long Xiang (张龙翔), ZHANG Ting Fang (张庭芳), LI Ling Ai (李令媛) et al *Experimental Method and Technology of Biochemistry (生物实验方法与技术)*, Beijing: People Education Press, **1982**, p48.
- [10] ZHANG Long Xiang (张龙翔), ZHANG Ting Fang (张庭芳), LI Ling Ai (李令媛) Ed. *Experimental Method and Technology of Biochemistry (生物实验方法与技术)*, Beijing: People Education Press, **1982**, p137.
- [11] JI Yun Jin (纪云晶), CAO YAN (曹岩) *Zhongguo Xitu Xuebao: Xitu Weisheng Dulixue Zhuanji (J. Chinese Rare Earth Society: Special Issue on Hygiene and Toxicology of Rare Earths)*, **1985**, 11.
- [12] MENG Lu (孟路) *Postdoctoral Thesis, Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences (中科院长春应用化学研究所, 博士后出站报告)*, **1997**, p45.

Species of Lanthanum in Wistar Rat Liver

LU Ran ZHU Yuan Mei CHEN Hang Ting¹ ZHAO Da Qing* NI Jia Zuan

(Key Laboratory of Rare Earth Chemistry and Physics, ¹National Analytical Research Center of Electrochemistry and Spectroscopy, Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130022)

CHEN Dong NIE Yun Xiu LIU Ying

(Department and Histology and Embryology, Norman Bethune University of Medical Sciences, Changchun 130021)

The metabolic accumulation and species of lanthanum in Wistar rat liver were investigated by ICP-MS, gel exclusion chromatography and ultrafiltration after the rats were fed by low dose of lanthanum for a long time. It was found that the content of La in the liver increased regularly with arise of dose and time of drug delivery. After the administration was stopped for a certain time a part of lanthanum in the liver was metabolized, but the metabolic rate was very slow. The lanthanum in rat liver was distributed in the soluble protein with molecular weight of more than 60000 mostly. Rare Earth existed in the six elution peaks separated by Sephacryl S-200. The amount of lanthanum in the first elution fraction is the largest, which was 88 percent in the whole content of lanthanum in proteins with molecular weight more than 60000.

Keywords: rare earth liver species ICP MS