

中國協和醫科大學

中國醫藥科學院

博士研究生畢業論文

中國協和醫科大學研究生院

中国协和医科大学、中国医学科学院博士学位论文

金属硫蛋白与铜抗肿瘤作用 相互关系的实验研究

博士生姓名：黄国健

导师姓名：周舒教授

学科专业：中西医结合基础专业

入学时间：1994年9月

所在院所：中日友好临床医学研究所

1997年5月

目录

中文摘要

英文摘要

前言

第一部分 铜抗癌机理研究

引言.....	1
一、实验材料与方法.....	1
[一]实验材料.....	1
[二]实验方法.....	2
1 体内抑瘤实验.....	2
2 体外细胞生长曲线及铜对细胞毒性实验.....	3
3 流式细胞分光光度计测量分析癌细胞细胞周期.....	3
4 激光共聚焦显微镜观测核酸形态的变化.....	3
5 DNA “ Ladder ”	4
二、实验结果.....	4
[一]铜对荷瘤实验动物的抑瘤效应.....	4
[二]铜对肿瘤细胞的生长抑制.....	7
[三]铜对肿瘤细胞的直接损伤.....	8
[四]铜对腹水癌细胞 H ₂₂ HepA 细胞周期的影响.....	13
[五]铜对 DNA、RNA 损伤的形态学观察（AO 染色）.....	15
[六]铜诱导癌细胞发生凋亡.....	19
三、讨论.....	20
[一]铜的抗肿瘤作用.....	20
[二]铜抗肿瘤作用的机理.....	20
参考文献.....	24
第二部分 铜与金属硫蛋白的分布、转运研究	

引言.....	26
一、实验材料与方法.....	26
[一]实验材料.....	26
[二]实验方法.....	27
1 肝肾功能、外周血的测定.....	27
2 原子吸收分光光度计测定微量元素（火焰法）.....	27
3 铜的化学染色（Rhodanine 法）.....	28
4 MT 的免疫组织化学染色.....	28
5 银饱和法测定金属硫蛋白.....	29
6 金属硫蛋白的分离.....	29
7 锌-MT 的制备.....	29
8 ^{64}Cu 和 ^{135}I -MT 的转运和代谢.....	30
9 铜和 H_2O_2 对质粒 DNA 的损伤及锌-MT 保护作用.....	30
二、实验结果.....	31
[一]铜对实验动物肝肾功能、外周血的影响.....	31
[二]肿瘤生长对铜分布的影响.....	32
[三]口服醋酸铜后铜在不同组织动态分布规律.....	33
[四] ^{64}Cu 在腹水型肝癌小鼠中的转运特点.....	36
[五]铜诱导金属硫蛋白在组织脏器中的分布特点.....	43
[六]铜与 MT 在细胞中的分布特点.....	47
[七]肝脏、肿瘤组织中 MT 金属组成特点.....	50
[八]腹腔注射 MT 的分布转运特点.....	54
[九]铜与过氧化氢对质粒 DNA 的损伤及 MT 的保护作用.....	55
三、讨论.....	60
[一]铜治疗实验性肿瘤过程中的毒性.....	60
[二]血清铜的升高在肿瘤生长过程中的意义.....	60
[三]铜在荷瘤动物组织细胞中的分布规律.....	61
[四]铜抗肿瘤过程中 MT 的组织细胞分布.....	62
[五]MT 在肝肾、肿瘤组织中的意义.....	63

参考文献.....	64
第三部分 MT 基因表达与铜抗癌作用	
引言.....	67
一、实验材料与方法.....	67
[一]实验材料.....	67
[二]实验方法.....	68
1 质粒的扩增与制备	68
2 MT-IIA 质粒 DNA 片段的回收（透析袋法）	69
3 脂质体 Lipofectamine Reagent 介导的 MT-IIA 基因转染.....	69
4 新霉素筛选转染细胞.....	70
5 标记探针	70
6 Southern Blot.....	71
7 Northern Blot.....	72
8 软琼脂生长实验	73
9 DNA “ Ladder ”	73
二、实验结果.....	73
[一]pBACNeoMT-IIA 的限制性酶切鉴定.....	73
[二]脂质体 Lipofectamine Reagent 介导的 MT-IIA 基因转染人 7402 细胞.....	74
[三]转染细胞 MT 的表达和形态、生长特点.....	75
[四]MT 对人 7402 肝癌细胞恶性表达的影响.....	77
[五]MT 对铜抗癌作用的影响.....	78
[六]MT 对诱导细胞凋亡的影响.....	81
三、讨论.....	81
[一]上调 MT 基因表达水平方法的评价.....	81
[二]肿瘤细胞内 MT 高表达可增加细胞的铜毒性.....	82
[三]MT 对铜离子诱导肿瘤细胞凋亡的影响.....	83
参考文献	84
第四部分 文献综述	

4

一、祖国医学对微量元素铜的认识.....	85
二、微量元素铜的病理生理.....	92
三、铜、自由基与抗肿瘤.....	97
四、铜金属硫蛋白的研究.....	103
五、金属硫蛋白基因研究.....	110
致谢	

中文摘要

铜是人体必需的微量元素，对机体的生理病理过程有着重要的影响，同时也可以作为药物治疗许多疾病。祖国医学应用含铜药物治疗包括肿瘤在内的疾病已有数千年的历史，近年来，含铜中药复方治疗肿瘤在国内外临床实践或动物实验中已取得初步进展，而且在一定程度上体现了中医“驱邪不伤正”的特点，但对其作用机理的研究尚不够深入。

本文从不同层次，不同角度对铜抗实验性肝癌作用和金属硫蛋白在其中的诱导合成、分布代谢特点进行了较为深入的研究，初步明确了金属硫蛋白在铜抗癌作用及对机体保护作用的调控机制，研究结果表明：

1 铜具有一定程度的抗肝癌作用

本文对体内单独使用醋酸铜抗实验性肝癌作用进行了反复摸索，证实了铜的抗癌作用是存在的，在口服剂量为 150mg/kg 时，能明显地抑制肿瘤的生长，抑瘤率达到 55% 左右，效果稳定，重复性好，实验动物的状态也比较好，对肝肾功能和外周血没有损害；腹腔注射给铜，能在一定程度延长荷瘤动物的生命时间，尤其在一次性注射剂量达 100mg/kg 时，实验动物的生命延长率可达到 89.98%，但小鼠的状态比较差，体重明显减轻，体毛稀疏。体外细胞实验研究也证明一定剂量的铜对 H₂₂ 小鼠肝癌细胞及人 7402 肝癌细胞均有强烈的生长抑制作用和直接的杀伤作用。体内外实验结果均证实中医认为铜具有“破坚积，散微瘕积聚”的作用是存在的，同时也提示在体内应用铜抗癌时必须掌握适当的剂

量和时间，剂量过大或时间过长就会发生铜的毒副作用。

2 铜的抗癌作用是从影响肿瘤细胞 DNA 的合成和直接损伤 DNA 这一根本环节上发生的。

研究结果证实铜抗癌作用包括下面三个环节：

[1]对肿瘤细胞 DNA 合成的影响 流式细胞分光光度计检测结果发现，随着腹水癌小鼠腹腔给铜浓度的增大，G1 期细胞在细胞周期中的比例由对照组的 22.1%，上升到 34.4%(2.5M)和 73.61%(5.0M)，S 期细胞由对照组的 60.9%下降到 40.46%(2.5M)和 14.8%(5.0M)。铜对癌细胞的影响主要作用在 G1 期和 S 期，由于大部分的细胞被阻断在 G1 期，因而进入 DNA 合成 S 期细胞明显减少。

[2]对肿瘤细胞核酸大分子的直接损伤 应用激光共聚焦显微镜观察铜对 H₂₂ 细胞 DNA、RNA 损伤的情况，发现在 200 μ M 铜作用 48 小时后，细胞核酸大分子受到明显的损伤，其形态结构和染色质的均质性发生了显著的变化，由正常形态结构比较完整，边缘光滑变为染色质向周边浓缩、出芽或成不规则的锯齿样，菜花状，最后形成许多染色质的小碎片；另外，在体外铜和过氧化氢反应体系中同样发现对质粒 DNA 的强烈损伤作用，铜的浓度、反应温度与 DNA 损伤强度之间有明显的正相关，铜的浓度越大、反应温度越高，对质粒 DNA 的损伤也就越大。

[3]诱导肿瘤细胞发生凋亡 将人 7402 和 MT-7402 肝癌细胞在去血清培养液中培养，加入 200 μ M 铜离子，第三天收集细胞，提取 DNA，电泳出现凋亡细胞特征性“梯形”条带，说明铜离子也可以在去血清培养液的条件下，诱导细胞凋亡的发生。

3 铜和金属硫蛋白在组织细胞中的分布、代谢特点显示出 MT 保护正常组织，增强铜抗癌作用这一“驱邪而不伤正”的双向调节机制。

肿瘤的发生发展对实验小鼠组织铜水平的影响以及负铜治疗后铜在组织细胞中转运分布的研究结果显示：

[1]荷瘤鼠与正常鼠比较，血清铜水平明显升高，肝、胃肠组织铜的明显减少；铜治疗后，血清铜明显下降，肝、胃肠组织铜的明显升高。同样 Cu^{64} 示踪实验发现荷腹水癌小鼠组织器官的 Cu^{64} 含量与对照小鼠比较均有不同程度的下降，腹水中的 Cu^{64} 水平逐渐升高，其中的 88.9% 的 Cu^{64} 集中在癌细胞中。提示荷瘤机体血清铜升高是在肿瘤发生发展过程中组织器官间铜重新分布的一种过渡反映，并不代表体内总铜的过剩，而肝脏等重要组织铜的减少可能是导致机体衰竭的重要因素之一。

[2]小鼠给铜后，肝脏是机体最主要的铜富集器官，其含铜量约占机体总量的 50% 左右。肝脏也是负铜后机体诱导合成 MT 的最主要的场所。研究表明，正常对照小鼠肝组织中的 MT 量非常少，MT 中以锌为主，其锌铜比值为 8.5:1；经口给铜治疗后，肝脏中诱导合成了大量的 MT，MT 中以铜为主，锌铜比值正常对照小鼠为 1:62.5，荷瘤小鼠为 1:175，提示荷瘤鼠肝脏 MT 中一部分锌被铜取代。

[3]铜治疗实验性肝癌过程中，治疗组肝组织中 MT 含量明显高于对照组 ($p < 0.001$)，而肿瘤组织 MT 含量治疗组明显低于对照组 ($p < 0.05$)；与此同时，治疗组肝组织和肿瘤组织铜水平均高于对照组 ($p < 0.001$ ， $p < 0.05$)。进一步分析发现在肝组织铜

与诱导合成的 MT 比值为 1:2.78, 而肿瘤组织铜与 MT 的比值为 1:-408。提示铜在肝组织可以诱导合成 MT, 而铜在肿瘤组织则大量消耗荷瘤应激诱导合成的 MT, 使肿瘤组织中自由铜的含量相对增加, 有利于发挥铜的抗癌作用。治疗小鼠正常的肝肾功能佐证了 MT 的保护作用; 体外铜与过氧化氢反应体系证明 MT 具有良好的保护 DNA 作用, MT 浓度与 DNA 损伤成负相关, 即 MT 浓度越高, 清除自由基的能力越强, 对 DNA 的保护效果也越好。

[4]应用免疫组织化学方法 E9MT 单克隆抗体 DAB 显色检测 MT 在组织细胞中的分布, 发现铜离子可以诱导肝脏组织合成大量的铜-MT; 而肿瘤组织, MT 染色为弱阳性或阴性, 结果与银饱和法测定的结果相一致; 同时用 Rhodanine 化学染色检测铜的分布发现, 铜同样存在于肝细胞浆和细胞核中, 与 MT 的分布完全一致, 而且细胞的形态结构完好无损; 在肿瘤组织, 铜也同样存在于细胞浆和核中, 但在肿瘤的坏死组织区铜的颗粒相对更加集中, 从组织学上证明了铜的抗癌作用与 MT 对肝细胞保护作用之间的关系。

4 金属硫蛋白基因的高表达增强肿瘤细胞对铜毒性的敏感性

将 pBACNeoMT II-A 质粒转染人肝癌 7402 细胞, 构建 MT 高表达的 MT-7402 细胞, Northern blot 分析证明 MT-7402 细胞 MTmRNA 的水平是 7402 细胞的 20 倍。比较 7402 和 MT-7402 细胞在不同浓度铜离子 (50 μ M、100 μ M、200 μ M) 中的生长曲线, 发现转染 MT 基因的 MT-7402 细胞对铜毒性的耐受能力较 7402 细胞明显下降, 尤其在用药的前三天更为显著。而且随着铜浓度的

增加,对细胞的杀伤作用也增强,说明 MT 基因的高表达使细胞对铜毒性敏感性增强,有利于铜抗癌作用的发挥。另外我们发现,金属硫蛋白的高表达也有利于铜诱导肿瘤细胞发生凋亡。

综上所述,本研究明确了铜抗实验性肝癌作用的机理和作用环节,指出金属硫蛋白的诱导合成及特殊的分布转运特点在铜离子抗癌和机体自我保护方面发挥了“驱邪而不伤正”的积极作用,为今后进一步开发含铜的抗癌药物奠定了理论基础,同时对通过 MT 基因调控治疗肿瘤作了有益的探索。

ABSTRACT

Copper is an essential trace element playing important role in both the physiological and pathological processes. In traditional Chinese medicine, it has been used in treatment for many kinds of diseases including cancer for thousands years. Copper was considered as an agent for "eliminating evilness but not harmful to the body vitality". In recent years, more and more attention has been paid on its anticancer effect, mechanism and toxicity. With the discovery of metallothionein (MT), more progress has been made in understanding the relationship between the effect of Cu and MT, but not yet known clearly about the key mechanism of the coexistence in the definite anticancer effect of copper and its less even none invasion to the normal tissue, especially to the liver.

In this paper, the anticancer effect of copper was studied from different levels. The production, distribution of metallothionein induced by copper and the biological sense of the coexistence of copper and MT were studied.

1. Anticancer effect of copper.

There was a certain degree of anticancer effect for solid tumor by oral administration in dosage of 150 mg/kg of copper acetate, the average inhibitory rate of tumor growth was about 55%, which was stable and well repeated. Meanwhile, the mice were in such satisfactory condition as good liver and kidney function and normal WBC count. When copper acetate in 100mg/kg injected intraperitoneously to ascites HepA mice, though the prolonging rate of survival time attained to 89.98%, but the conditions of the mice were so poor that the body weight reduced markedly and hairs looked sparsely. Strong growth inhibition and direct killing for HepA H₂₂

mouse hepatoma cells and human 7402 hepatoma cells were also proved in vitro .Dosage and duration in utilizing copper were very important for getting the effectiveness and avoiding the side effect..

2 The mechanism of copper's anticancer effect involved the following three aspects:

[1]Blocking DNA synthesis of the tumor cells By Flow Cytometry (FCM) it was indicated that in cell cycle the ratio of G1 stage cell was gradually up with the increased concentration of copper acetate (CA),from 22.1% in control group to 34.4% (2.5M CA) and 73.61%, (5.0M CA). Contemporarily, the ratio of S stage cell in cell cycle was gradually down ,from 60.9% in control decreased to 40.46%(2.5M CA) and 14.8% (5.0M CA). Due to most cells were blocked in G1 stage, less cells entered into S stage so as to make the DNA synthesis decreased obviously.

[2]Directly damaging DNA of the tumor cells When H₂₂ cells were exposed to 200μM Cu²⁺ for 48 hours, the cells were collected and stained by AO, then observed by Laser Co-focus Microscope .The results showed that DNA and RNA were damaged markedly. The homogeneity and structure integrity became indistinct. Smooth edge became irregular sawtooth-like, well homogenize chromatin condensed around, or stretched as buds, or dispersed as rape flower and lastly many small pigments of chromatin appeared. In addition ,the similar results were also found in the reaction system in vitro. The hydroxyl radical derived from Cu²⁺ plus H₂O₂ damaged plasmid DNA , the damage degree of DNA was related to the concentration of copper and the reaction temperature, the higher concentration of copper and temperature, the higher damage degree of DNA.

[3] Inducing apoptosis of tumor cells Cultured human 7402 and MT-7402 hepatoma cells in free serum medium containing 200μM

Cu^{2+} for three days, then collected the cells and extracted DNA , followed with electrophoresis in 1.5% agars , the ideal 'DNA ladder' of apoptosis could be seen. The result indicated that copper can also induce cancer cell apoptosis in free serum medium.

3 The copper level in blood and different organ tissues was affected by the development of cancer or copper loading:

[1] The serum copper level increased($p<0.05$) and the liver, stomach intestine copper level decreased markedly($p<0.05$) in tumor bearing mice than those in normal control mice. After treatment by copper, the serum copper level decreased and the liver, stomach, intestine copper returned to normal level. Tracer Cu^{64} determination also showed that the contents of Cu^{64} in organ tissues of HepA ascites mice was decreased than that of normal control mice ,but in ascites Cu^{64} was gradually increased and 88.9% of the Cu^{64} was gathering in H_{22} cells . The higher level of serum copper in bearing tumor mice reflected a copper redistribution among various tissues in the course of tumor development, but not represented the surplus of copper within the whole body. On the contrary, there might be some deficiency of copper in the body ,The decreased copper level in liver, stomach intestine tissues might be one of the important factor involving the body dysfunction.

[2]When the mice were loaded copper, liver was the most important organ for gathering copper, and about 50% of the total copper in the body was accumulated in the liver. Liver was also the most important organ in which MT was induced by copper. In normal condition there was less MT in liver and zinc was the main metal ion of MT, the ratio of Zn/Cu was 8.5:1. When the mice were treated orally by copper acetate (150mg/kg) for 10 days , MT was induced greatly in liver ,and Cu was the major metal ion in the synthesized MT. The ratio

of Zn/Cu in liver MT was 1:62.5 in normal mice ,but 1:175 in copper treated tumor bearing mice .This result might represent that some of Zn in liver MT were replaced by Cu in tumor bearing mice.

[3]In comparison of MT and Cu in liver and cancer tissue, it was shown MT was greatly induced in copper treated mice liver than that in control mice, whereas in tumor tissue of the copper treated mice ,MT level was significantly lower than that in untreated control tumor tissue MT was measured by silver saturation method. Meanwhile, the copper level in liver and tumor of the copper treated mice was higher than that in untreated control liver and tumor tissues. Further studies showed that the ratio of Cu/ MT in liver of the copper treated mice was 1:2.78, but 1:- 408 in tumor tissue, suggested that copper induced MT in liver , but depleted MT in tumor ,thus the contents of free copper in tumor tissue was relatively increased and might contribute to the copper anticancer effect. MT in normal liver and kidney might play the role in preventing liver and kidney from copper toxicity. In vitro studies, the evidence of MT protected plasmid DNA from the damage of hydroxyl free radical produced in the system of copper and H_2O_2 had been found ,and there was a negative relationship between the concentration of MT and DNA damage. The more MT, the more DNA protection and the less DNA damage.

[4]By immunohistochemical methods using E9 monoclonal MT antibody stained by DAB , the study of cellular distribution of MT showed that a great numbers of MT signals appeared in copper locaded liver cells, not only located in plasma, but also in nuclear, whereas no MT could be seen in copper treated tumor cells, this result was consistent in the MT content measured by silver saturation method. The histochemical method of copper stained by rhodanine copper particles widely distributed in the liver and tumor cells treated

by copper, but the liver cells containing copper particles were well in structure, while in tumor tissue, the tumor cells were destroyed and copper was more focused in the necrotic parts.

4 The high expression of MT gene in tumor cells enhanced the sensitivity to copper toxicity.

In order to study the MT effect on copper toxicity to cancer cells, pBACNeoMT II-A plasmid DNA had been transfected to human hepatoma 7402 cells to constructed MT-7402 cells with high expression of MT gene. The transcription of MTmRNA in MT-7402 cells was 20times higher than that of control 7402 cells. When MT-7402 and 7402 cells were exposed to 50 μ M, 100 μ M and 200 μ M of copper acetate. The results indicated that MT-7402 cells were more sensitive to copper toxicity, especially in the first three days. The killing effect on both cells were increased with higher copper. We concluded that MT high expression in tumor cells were advantageous to antitumor effect of copper in vitro, and was also favorable to induce apoptosis of tumor cells.

前言

铜是人体必需的微量元素，对人的生理病理过程有着重要的影响。一千多年前，勤劳智慧的中国人就已经发现了铜的药理作用，如成书于秦汉时期的《神农本草经》中就记载了许多含铜药物的性味和功效，并且基本上将它们归于“上品”，其中也阐述了铜的抗肿瘤作用。

中西医结合防治肿瘤是具有中国特色的有效治疗方法，尤其对延长晚期肿瘤患者的生存期，改善生活质量有着良好的效果。含铜中药复方在动物试验和临床实践中所表现出来的“驱邪而不伤正”的抗肿瘤效果使人们对此寄予希望。

人们早就注意到金属硫蛋白（Metallothionein MT）对金属离子在体内的代谢与转运以及对羟自由基的清除起着重要的作用。研究铜的抗癌作用，探讨 MT 在其中的调控机制是必需的，因为肿瘤细胞与人体正常细胞的本质差异使得 MT 在其中起的作用可能有别。目前 MT 与肿瘤相关研究表明，MT 的表达能够改变多种致癌因素的体外毒性，并影响着不同种属不同组织器官对致癌因素的毒性。一些肿瘤组织 MT 表达异常增高，深刻影响肿瘤的治疗与预后。MT 与肿瘤的研究不仅丰富而且更新了人们对 MT 的认识，也为肿瘤的预防、治疗和预后评估提供新的思路 and 手段。本文从不同的水平和角度深入系统地研究了金属硫蛋白与铜抗癌作用的相互关系，以期从现代病理生理角度了解铜的抗癌机理和铜的毒性，为进一步开发含铜抗癌药物奠定现代医学理论基础，同时也希望通过该工作积累的经验为其他金石类中药的深入研究提供新的思路和方法。

第一部分 铜抗癌机理研究

引言

应用含铜药物防治疾病在我国已有数千年的历史，现存最早的药物专著《神农本草经》[1]（简称《本经》）中就记载有“空青”、“曾青”、“绿青”、“扁青”、“白青”、“胆矾”等六种含铜药物，而且对其性味、功效作了详细论述，《本草别录》[2]（简称《别录》）对此又作了补充。其中具有抗肿瘤作用的有：空青“通关节，破坚积”《别录》；曾青“利关节，通九窍，破微瘕积聚”《本经》；扁青“破积聚，解毒气”《本经》；“散微积，咳逆上气及鼠痿恶疮”《别录》，等。可见在当时的条件下，人们对含铜矿物药的应用已有相当深入的了解，而且已经认识到“空青”、“曾青”、“扁青”“胆矾”具有“破积聚”治疗肿瘤的作用。

近年来，应用含铜药物铜绿治疗肿瘤受到人们的重视，而且在临床取得了较好的效果。铜绿是祖国医学以毒攻毒，用于治疗肿瘤的代表药之一。铜绿自然形成的方式是将铜制器皿置于潮湿环境中，或人工用醋喷在铜器上，其表面产生的青绿色的铜锈，主要成分是含水的碱式碳酸铜或醋酸铜[3]。由于自然铜绿的产量较低，不能满足用药需求，遂以人工醋制铜生产铜绿，如在明代李时珍《本草纲目》中就已有“近时人以醋制铜生绿，收取晒干货之”的记载[4]。为了更好地控制药物的质量和更加精确的计量，在所有的实验中，我们以优质的醋酸铜化学试剂代替铜绿，应用现代实验方法和手段，从不同的层次和角度研究铜抗癌的机理，为更加充分认识和了解铜的抗癌作用奠定现代医学理论基础。

一、实验材料与方法

【一】实验材料

1 细胞

小鼠肝癌 HepA H₂₂ 细胞：中日友好医院临床医学研究所病理生理室传代保存，培养液 RPMI1640 含 10%胎牛血清，青霉素 100U/ml,链霉素 100mg/ml,5%CO₂，37℃培养；7402 人肝癌细胞：中日友好医院临床医

学研究所细胞室赵天德教授惠赠，培养液 RPMI1640 含 20%胎牛血清，青霉素 100U/ml，链霉素 100mg/ml，5%CO₂，37℃培养。

2 动物

BALB/C 雄性小鼠，由本所动物室提供；NIH 雄性小鼠，购自中国中医研究院动物中心。体重为 20±0.5g。家兔，3000 克左右，由本所动物室提供。

3 主要试剂

醋酸铜	河北省沧州化工厂
Tris-base	Serva
Sephadex G-75，G-50，G-25	Sigma

4 主要仪器

激光共聚焦显微镜	Meridian-ACAS570 美国
水平电泳系统	北京六一仪器厂
显微摄影系统	Olympas 日本
倒置显微镜	Olympas CK 日本
二氧化碳孵箱	Foma Scientific 美国
高速台式离心机	上海安亭科学仪器厂
流式细胞分光光度计	Becton Dickinson FACS 420 美国

[二] 实验方法

1 体内抑瘤实验[5]

在严格无菌的条件下，抽取接种 HepA-H₂₂ 小鼠肝癌细胞 7-10 天的腹水于 4℃ 1000 转/分离心 5 分钟，用消毒的 1×PBS 轻轻吹散沉淀的细胞，混匀，先取 100μl 以 1×PBS 稀释 100 倍，加 1:4 稀释的台盼蓝染色，光镜下计数活细胞三次，取其均值，根据实验要求调整细胞终浓度，在无菌条件下将一定数量的细胞皮下接种于小鼠右腋下 1cm，造成移植性肝癌实体瘤模型；或接种于小鼠腹腔中形成腹水癌模型。随机分组，分治疗组与对照组，每组 10 只，于荷瘤次日给药。根据不同实验要求，配制成不同浓度，灌胃或腹腔注射给药。对照组则用无菌生理盐水灌胃或腹腔注射。观察抑瘤率时，实体瘤模型连续给药 10 天，第 11 天引颈处死小鼠，剥取瘤组织称重；腹水癌模型，根据给药途径决定给药天数，记录每只动物死亡时间。

$$\text{抑瘤率} = \frac{\text{对照组瘤重} - \text{给药组瘤重}}{\text{对照组瘤重}} \times 100\%$$

$$\text{存活延长率 (T/C)} = \frac{\text{给药组生存时间} - \text{对照组生存时间}}{\text{对照组生存时间}} \times 100\%$$

2 体外细胞生长曲线及铜对细胞毒性实验[6]

细胞消化后，以一定数量的细胞接种于 24 孔板，接种后第一天至第六天，每日消化记数，平行两孔，然后绘制细胞生长曲线。铜对细胞毒性实验即于接种第一天加入不同浓度的铜，至第六天，每日消化记数，平行两孔，加 1:4 稀释的台盼蓝染色，光镜下计数死活细胞三次，取其均值，然后绘制活细胞生长曲线及计算死活细胞比例。

3 流式细胞分光光度计测量分析癌细胞细胞周期[7]

荷腹水 H₂₂ 细胞小鼠，腹腔给醋酸铜一定时间后，抽取腹水，1000rpm/min，5min，用 1×PBS 洗细胞数次，固定于冰冷的 70%乙醇中，4℃保存。测定前，细胞用 1×PBS 洗细胞三次，然后悬浮于 1×PBS 中，加 RNA 酶（20μg/ml）、PI（10μg/ml）染色，过滤，室温 30 分钟后上机测定细胞 DNA 含量，分析细胞周期的变化。

4 激光共聚焦显微镜观测核酸形态的变化(AO 染色)[8]

将 1×10⁴/ml H₂₂ 细胞接种于含 200μM 的 Cu²⁺ 含血清的 1640 培养液中 48 小时，1000rpm/min 离心收集细胞，涂片，速入 95%冰冷乙醇固定 10 ~ 15 分钟，然后凉干；1%醋酸酸化 30 秒；0.01%γ 吡啶橙染色 5 ~ 10 分钟；1×PBS 洗 1 分钟；0.1M CaCl₂ 分化 30 秒或数分钟，水洗；随时在荧光显微镜下观测，鉴别 DNA 和 RNA 到清楚为止；1×PBS 分三个染色缸洗三次，每次数秒钟；盖玻片封固，激光共聚焦显微镜观测。结果：细胞核 DNA 呈亮绿色或黄绿色荧光；细胞质和核仁 RNA 呈橘红色荧光；癌细胞的 DNA 呈亮绿色荧光，RNA 呈火红色荧光。

缓冲液的配制：

0.01%γ 吡啶橙：γ 吡啶橙 0.1g 加入双蒸水 1000ml，作为原液保存 4℃冰箱，

临用前 1ml 原液加 1×PBS 9ml (pH 4.8); 1×PBS (pH 4.8): KH_2PO_4 9.08g 加双蒸水 1000ml ; 0.1M CaCl_2 : CaCl_2 11.1g 加双蒸水 1000ml ; 1%醋酸。

5 DNA “ Ladder ” [9]

人肝癌 7402 、 MT-7402 细胞传代贴壁汇合至 80-90% 后, 更换不含血清的 1640 培养液, 加入 Cu^{2+} 至浓度为 $200\mu\text{M}$, 继续培养一段时间后, 收集所有细胞, 离心, 用 1×PBS 洗两次, 加 DNA 裂解液 $380\mu\text{l}$, $10\%\text{SDS}$ $10\mu\text{l}$, $0.1\%\text{RNase}$ $10\mu\text{l}$, 37°C 温育 2 小时, 加 PK (1mg/ml) $10\mu\text{l}$, 37°C 温育 2 小时。酚氯仿抽提, 乙醇沉淀, 加 $50\mu\text{l}$ 三蒸水溶解, $20\mu\text{l}$ 电泳。胶浓度 1.5%, 电压 50V , 电泳 3 小时, EB 染色, 紫外灯下观察照相。

二、实验结果

[一] 铜对荷瘤实验动物的抑瘤效应

我们分别应用 BABL/C 、 NIH 小鼠在右腋皮下接种不同数量的 H_{22} 细胞造成实体瘤模型, 观察醋酸铜对抑制移植性实体瘤的抑制效果, 实验结果显示, 在剂量为 55mg/kg/d 和 110mg/kg/d 时其抑瘤率分别为 9.70% 和 10.89%, 当铜的剂量增加到 150mg/kg/d 时, 其抑瘤率可以达到 43.05%、66.47% 及 51.97%, 且抑瘤效果稳定, 平均瘤重在各治疗组与对照组之间均有统计学意义 ($p < 0.05$, 0.001), 具有较好的重复性, 而且实验小鼠的状态良好。组间统计也表明 150mg/kg/d 组抑瘤率与 55mg/kg/d 和 110mg/kg/d 组比较也有显著的统计学差异 ($p < 0.05$, 0.001) (表 1 、图 1)。

同样, 在 BABL/C 和 NIH 小鼠腹腔中接种不同数量的 H_{22} 细胞造成腹水癌模型以观察铜对实验小鼠生命延长的影响, 连续 10 天口服 150mg/kg/d 时的生命延长率分别仅为 11.67% 和 20.17%, 但后者平均生命延长时间与对照组相比仍有统计学意义 ($p < 0.05$), 说明口服给药对小鼠生命延长仍有一定的价值。腹腔给药 10mg/kg/d 、 20mg/kg/d , 连续 5 天, 小鼠的生命延长率分别为 13.10% 和 26.96%, 与对照组相比均有统计学意义

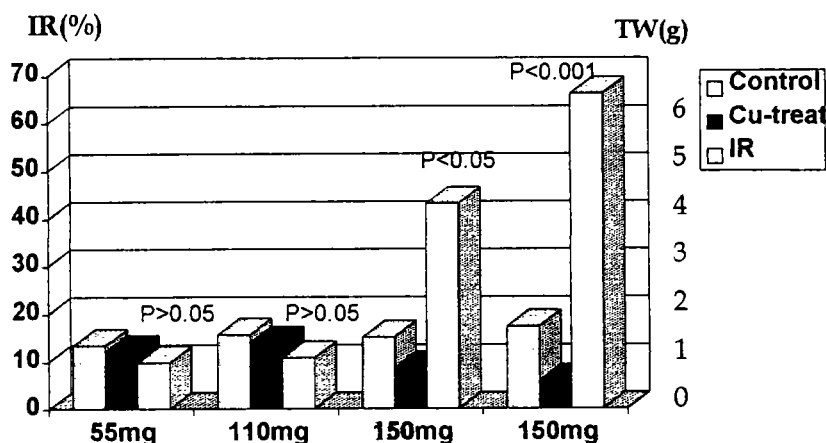
($p < 0.05$); 当一次给予 100mg/kg/d 时, 小鼠的生命时间延长率可达到 89.98%, 与对照组相比有非常显著统计学意义 ($p < 0.001$), 但小鼠的状态较差, 体重明显减轻, 体毛稀疏缺少光泽(表 2、图 2)。

实验结果显示给铜的途径对实体瘤的抑瘤率及生命时间延长率有较大的影响, 如口服给铜对实体瘤的抑瘤效果较好, 腹腔注射对小鼠生命时间延长率则优于口服给铜。

**Tab. 1-1 The inhibitory effect of Cu-acetate(per. os.)
on mouse solid Hep-A (n=10)**

Exp No.	Mouse strain	Inoculated number/0.2ml	Dosage mg/kg/d × d	Tumor weight(g)	Inhibitory rate(%)	P value
1	NIH	5.0 × 10 ⁵	Control 0	1.3 ± 0.43	9.70	>0.05
			Treat 55 × 10	1.21 ± 0.39		
2	NIH	5.0 × 10 ⁵	Control 0	1.56 ± 0.37	10.89	>0.05
			Treat 110 × 10	1.39 ± 0.28		
3	NIH	5.0 × 10 ⁵	Control 0	1.51 ± 0.29	43.05	<0.05
			Treat 150 × 10	0.86 ± 0.23		
4	BALB/C	5.0 × 10 ⁶	Control 0	1.73 ± 0.36	66.47	<0.001
			Treat 150 × 10	0.58 ± 0.47		
5	BALB/C	5.0 × 10 ⁶	Control 0	1.27 ± 0.31	51.97	<0.001
			Treat 150 × 10	0.61 ± 0.24		
组间 X ² 检验		p<0.05 3:1,5:1,3:2,5:2				
		p<0.005 4:1,4:2				

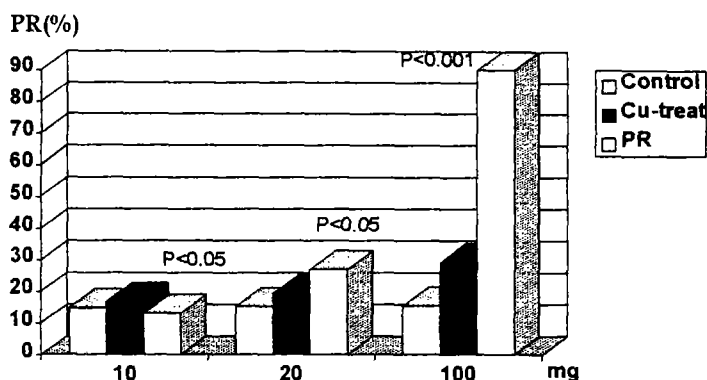
Fig 1-1 The inhibitory effect of Cu-acetate
(p.o. mg/kg × 10d) on mouse solid Hep-A



Tab.1- 2 The survival duration of mice treated with Cu-acetate (n=10)

Exp	Mouse	Inoculated	Dosage		Survival	Prolonged	P
No	strain	number/0.2ml	mg/kg/d × d		duration(d)	rate(%)	value
1	BALB/C	2.0×10^6	Control	0	15.08 ± 0.92	11.67	>0.05
			Treat	150×10 p.o	16.84 ± 2.31		
2	BALB/C	2.0×10^6	Control	0	13.24 ± 2.19	20.17	<0.05
			Treat	150×10 p.o	15.91 ± 2.23		
3	NIH	2.0×10^6	Control	0	14.89 ± 1.31	13.10	<0.05
			Treat	10×5 i.p.	16.84 ± 1.09		
4	NIH	2.0×10^6	Control	0	15.21 ± 2.82	26.96	<0.05
			Treat	20×5 i.p	19.31 ± 2.29		
5	NIH	2.0×10^6	Control	0	15.37 ± 2.22	89.98	<0.001
			Treat	100×1 i.p	29.20 ± 3.21		
组间 X2 检验		p<0.05				4:1,4:3	
		p<0.005				5:1,5:2,5:3,5:4	

Fig.1-2 The prongling survival duration of mice with Cu-acetate (mg/kg i.p.)



[二] 铜对肿瘤细胞的生长抑制

体外细胞培养实验发现在给予不同浓度的醋酸铜时，H₂₂ 细胞的生长曲线发生了明显的变化，随着时间的延长对照组细胞数量不断增长，第三

Tab. 1-3 The growth inhibitory effect of Cu-acetate on HepA cells in vitro

Exp No.	Cu dosage in medium (mM)	HepA cells (× 10 ⁴ /ml) count in different days							
		0	1	2	3	4	5	6	7
1	Control	4.0	4.13 ± 0.23	6.88 ± 1.31	9.63 ± 2.38	13.5 ± 3.12	16.3 ± 6.12	26.3 ± 7.14	23.4 ± 6.90
2	0.3	4.0	4.90 ± 1.08	4.50 ± 0.79	4.38 ± 0.45*	5.00 ± 0.79*	4.00 ± 0.91**	5.50 ± 0.78**	5.88 ± 0.99**
3	0.6	4.0	4.13 ± 0.51	4.50 ± 0.32	4.75 ± 0.64*	5.75 ± 0.65*	5.50 ± 0.89**	4.63 ± 0.29**	5.13 ± 0.89**
4	0.9	4.0	5.35 ± 0.13	4.13 ± 0.25	3.88 ± 0.19*	3.50 ± 0.31*	2.75 ± 0.19**	3.75 ± 0.30**	4.55 ± 0.47**
5	1.2	4.0	5.50 ± 0.23	6.25 ± 0.89	5.38 ± 0.72*	5.00 ± 0.29*	4.50 ± 0.37**	4.88 ± 0.69**	5.88 ± 0.81**
6	1.5	4.0	4.90 ± 0.67	5.38 ± 1.12	4.13 ± 0.23*	3.50 ± 0.28*	3.88 ± 0.46**	5.63 ± 0.75**	6.13 ± 1.52**

和对照组相比，*P<0.05， **P<0.001

天增至 9.63 ± 2.38 ($\times 10^4/\text{ml}$, 下略), 与其他各组相比有明显统计学差异 ($P < 0.05$), 到第五天增至 16.3 ± 6.12 , 与其他各组相比差异性非常显著 ($P < 0.001$), 至第七天进入平台期; 与此同时给铜的各组细胞生长受到明显的抑制, 细胞数量一直在 5.0 上下波动, 几乎处于“静止”状态(表 1-3, 图 1-3)。由此证明铜对肿瘤细胞的生长有明显的抑制作用。

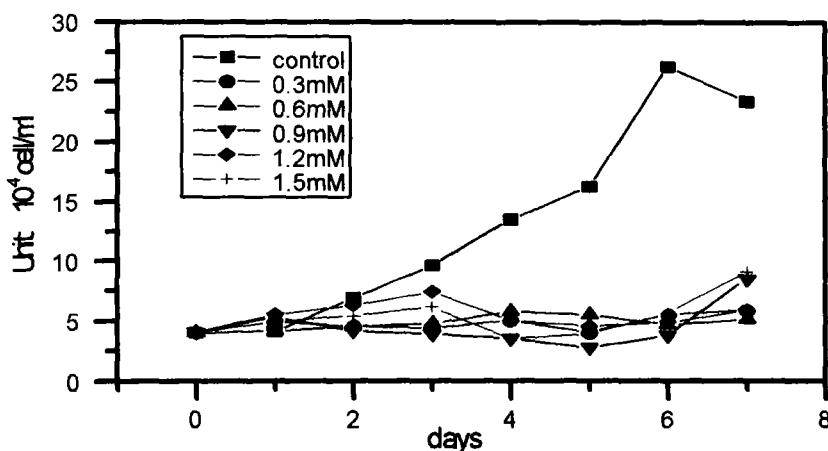


Fig 1-3 The growth curve of HepA cell in different concentrations of copper acetate in vitro

[三] 铜对肿瘤细胞的直接损伤

体外培养细胞比较不同浓度醋酸铜对 H_{22} 细胞存活率的影响, 发现在给铜后第二天, 高浓度铜 (1.5mM) 已将 50% 左右的细胞杀死, 细胞存活率仅为 $51.30 \pm 19.8\%$, 第三天细胞存活率降到 $23.30 \pm 8.24\%$, 与对照组相比有显著性差异 ($p < 0.05$); 低浓度铜 (0.3mM), 在给铜后第五天细胞存活率才降为 $35.00 \pm 10.21\%$, 与对照组相比有显著性差异 ($p < 0.05$), 至第七天约将 80% 的细胞杀死, 细胞存活率为 $24.80 \pm 6.78\%$; 而对照组细胞的存活率则始终在 80% 左右(表 1-4, 图 1-4)。同样, 铜对人肝癌 7402 细胞的损伤也随着铜浓度的增加而增强 (见图 1-4 ~ 10), 实验结果证实铜对肿瘤细胞存在着直接的杀伤作用。

**Tab.1-4 The Killing Effect of Cu-acetate on
HepA Cells in vitro**

Exp .No.	Cu ²⁺ (mM)	Survival Rate of HepA cells in different days (%)						
		1	2	3	4	5	6	7
1	Control	100	90.9 ±	84.4 ±	86.1 ±	85.4 ±	77.6 ±	78.1 ±
			32.1	30.66	22.34	20.86	23.86	20.88
2	0.3	100	71.8 ±	50.0 ±	62.8 ±	35.0 ±	32.7 ±	24.8 ±
			21.9	29.46	24.18 [#]	10.21*	12.21*	6.78*
3	1.5	100	51.3 ±	23.3 ±	24.5 ±	29.3 ±	28.2 ±	18.3 ±
			19.8	8.24*	6.64 [#]	8.82*	9.86*	5.37*

* compared with control P<0.05, # compared between 2 & 3 P<0.05

**Fig. 1-4 The Killing Effect of Cu-acetate on HepA Cells
in vitro (survival rate in different days)**

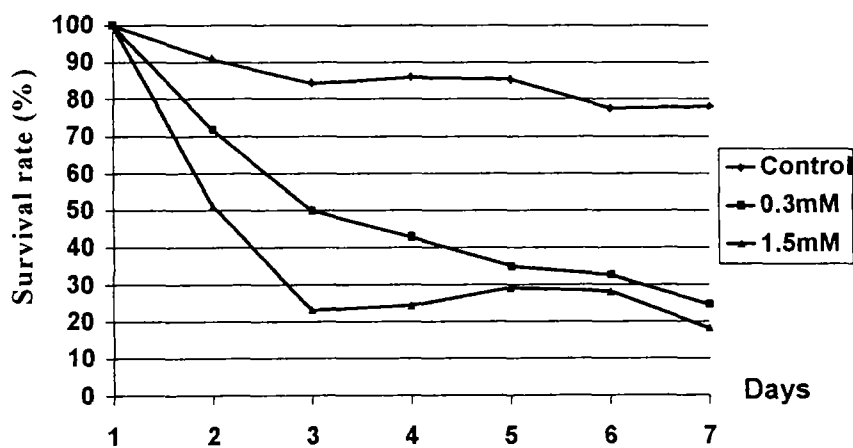
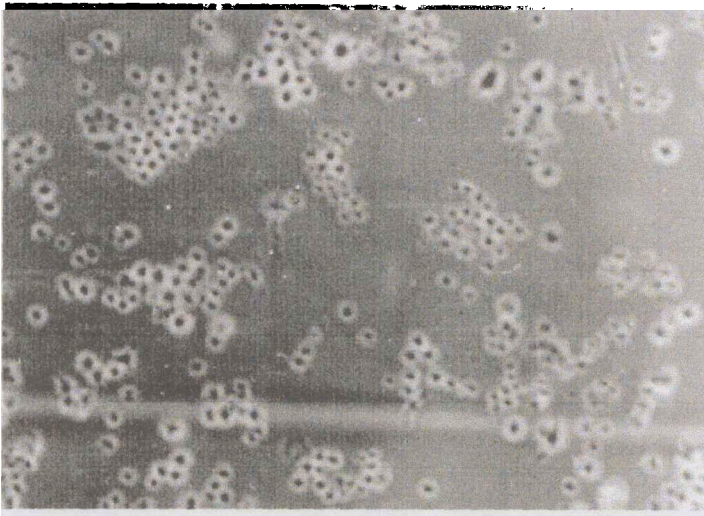


Fig.1-5 The normal control H₂₂ HepA cell.(×100)



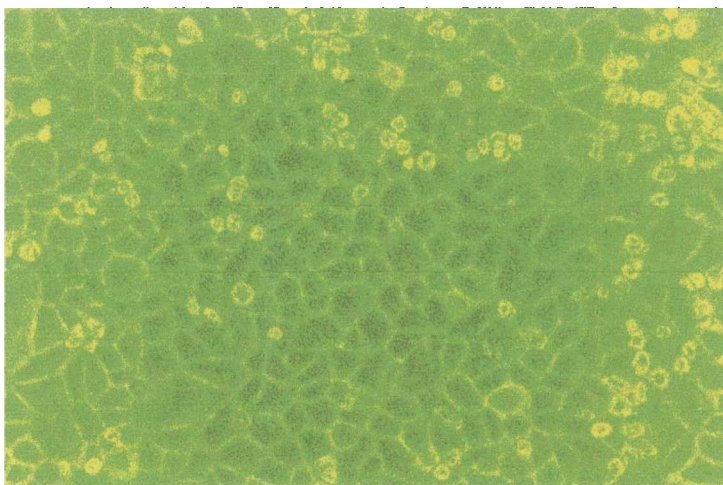
The normal control H₂₂ HepA cell. cultured in complete growth medium 1640 with bovine serum, cells were in bright and plump condition. (×100)

Fig.1-6. H₂₂ HepA cells were exposed to 100μM Cu²⁺



H₂₂ HepA cells were exposed to 100μM Cu²⁺ of complete growth medium 1640 for 3 days, the cell shape became irregular and even broken, the brightness markedly decreased. Some of them were died.(×200)

Fig1-7 The normal control human hepatoma 7402 cells



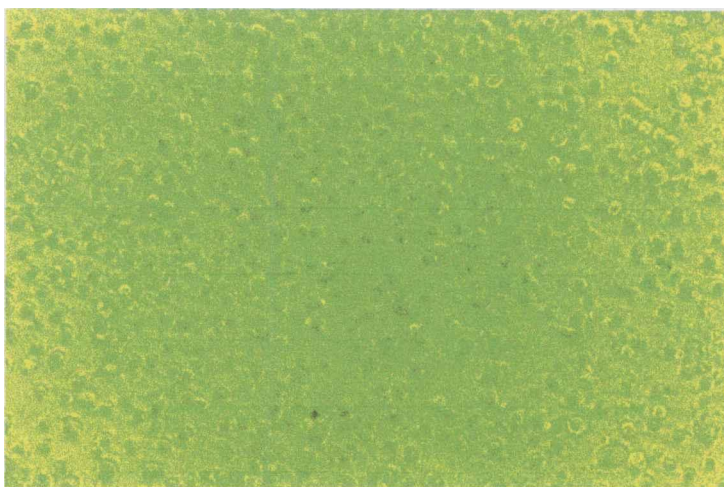
The normal control human hepatoma 7402 cells cultured in complete growth medium 1640 with bovine serum. The adherent cells were bright and plump. ($\times 100$)

Fig.1-8 7402 cells were exposed to $50\mu\text{M Cu}^{2+}$



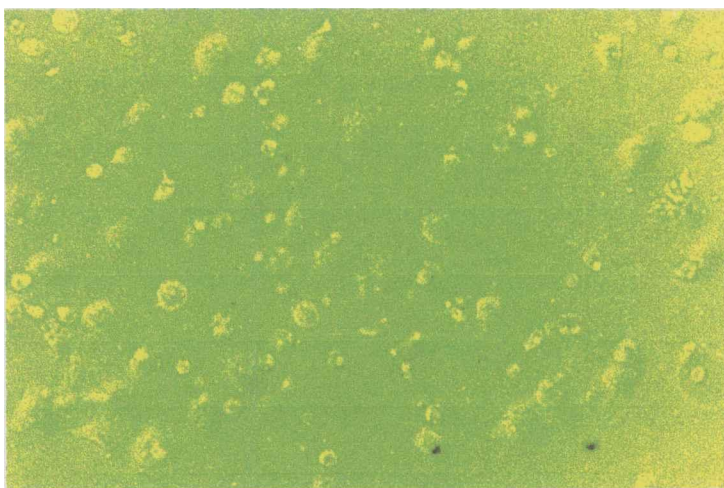
7402 cells were exposed to $50\mu\text{M Cu}^{2+}$ of complete growth medium 1640 for 3 days, some cells were escaped from the wall of culture bottle , the brightness were decreased. ($\times 100$)

Fig.1-9 7402 cells were exposed to 100 μM Cu^{2+}



7402 cells were exposed to 100 μM Cu^{2+} of complete growth medium 1640 for 3 days, most of them were damaged and got out of the wall. of culture bottle . Many died cells appeared in culture medium. The cell size became smaller than that of normal 7402 cell. ($\times 100$)

Fig.1-10.7402 cells were exposed to 200 μM Cu^{2+}



7402 cells were exposed to 200 μM Cu^{2+} of complete growth medium 1640 for 3 days, the numbers and size as well as brightness of the cells were decreased markedly ,all of them were in suspension condition and most of them were died. ($\times 100$)

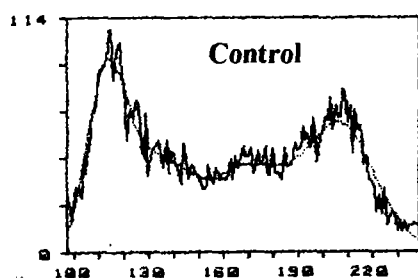
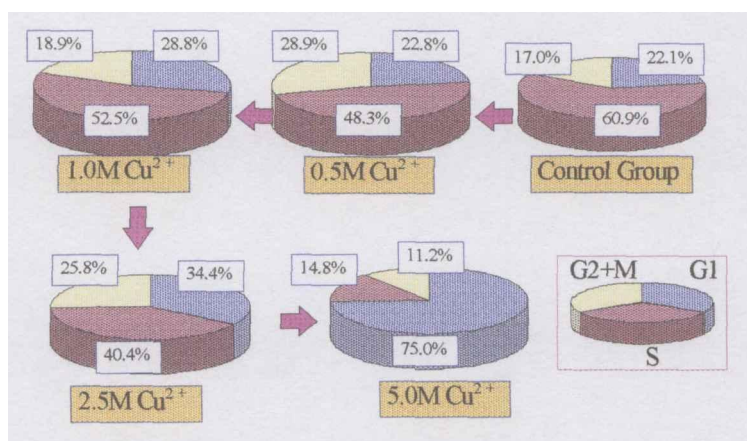
[四] 铜对腹水癌细胞 H₂₂HepA 细胞周期的影响

对细胞周期的调控是目前抗癌的战略措施之一，我们应用 BABL/C 小鼠腹腔无菌接种 H₂₂HepA 细胞 $1 \times 10^7/\text{ml}$ 造成小鼠腹水癌模型，接种第二天开始腹腔给铜，对照组腹腔注射生理盐水，每天一次，第十天抽取腹水，观察铜对肿瘤细胞生长周期的影响。经流式细胞分光光度计检测发现，铜对腹水 H₂₂ 细胞的细胞周期产生较大的影响，随着铜剂量的增大，G₁ 期细胞占细胞周期的比例由对照组的 22.1% 上升到 34.4% ($P < 0.05$)，和 73.61% ($P < 0.05$)，S 期细胞占细胞周期的比例则由对照 60.9%，下降为 40.46% ($P < 0.05$)，直至 14.8% ($P < 0.05$)。由此可以看出铜在体内对 H₂₂ 细胞周期的影响主要作用在 G₁ 期和 S 期。由于大部分的细胞被阻断在 G₁ 期，因而进入 DNA 合成的 S 期细胞明显减少。高剂量铜 (5.0M) 组 G₁ 期细胞所占比例是小剂量 (0.5M) 的 3.5 倍。而 S 期细胞在高剂量铜 (5.0M) 组也仅是小剂量 (0.5M) 铜组的 3.5 倍左右(表 1-5,图 1-11)，表明高剂量铜更加有利于抗癌作用的发挥。本实验证实铜也可以通过对细胞周期影响，抑制 DNA 合成而发挥其抗癌作用。

Tab. 1-5 The Effect of Cu-acetate on Cell cycle
of ascites HepA cells

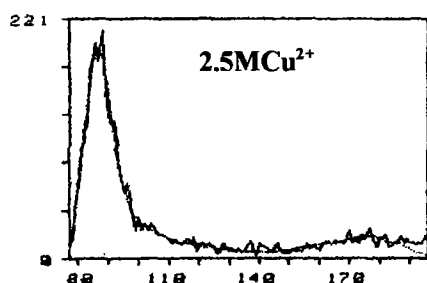
Exp No.	n	Cu dosage M/0.2ml × 10d i.p	Percentage in cell cycle (%)		
			G ₁	S	G ₂ +M
1	3	0	22.14 ± 2.37	60.93 ± 4.56	16.93 ± 2.59
2	3	0.5	22.82 ± 3.12	48.33 ± 3.98	28.85 ± 2.77
3	3	1.0	28.82 ± 4.23	52.55 ± 6.14	18.63 ± 3.22
4	3	2.5	34.44 ± 4.25	40.46 ± 3.68	25.10 ± 2.09
5	3	5.0	73.61 ± 8.86	14.82 ± 1.13	11.66 ± 2.18
P value between groups <0.05			1:4, 1:5, 2:4, 2:5, 3:5, 4:5	1:5, 1:2, 1:4, 2:4, 3:4, 3:5	1:2, 1:4, 2:5, 2:3, 3:4, 4:5

Fig.1-11 The cell cycle stage changes of H₂₂ cell treated by different concentrations of copper acetate(ip)



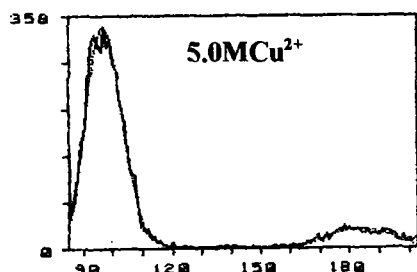
Cell Cycle Statistics

Phase	Events	Percent	% SD
G1 :	1318	20	5.0
S :	3354	50	1.0
G2+M :	1997	30	4.7
Total:	6669	100	



Cell Cycle Statistic

Phase	Events	Percent	% SD
G1 :	1753	47	4.5
S :	1716	46	1.1
G2+M :	300	8	10.2
Total:	3769	100	



Cell Cycle Statistics

Phase	Events	Percent	% SD
G1 :	4720	76	5.5
S :	651	10	8.1
G2+M :	853	14	7.2
Total:	6224	100	

Fig. 1-12 H₂₂ cells treated by different concentration copper tested with FCM

[五] 铜对 DNA、RNA 损伤的形态学观察

我们应用激光共聚焦显微镜观察了体外 H_{22} 细胞在 $200\mu M$ 铜作用 48 小时后细胞 DNA、RNA 损伤的情况。正常对照细胞的 DNA 形态结构比较完整 (Fig.1-13 、 1-14), 荧光强度由中心向周边均匀减弱, 层次分明, 边缘光滑, Fig.1-14 左侧绿色代表细胞 DNA, 右侧橘红色代表 RNA; 而铜作用过的细胞 DNA 损伤程度有轻重之别, 形态各异。 (Fig.1-15) 显示在铜作用后 DNA 荧光强度分布不均匀, 中间有一圆形空洞, 染色质向周边浓缩, 外形不规则, 边缘凹凸不平; (Fig.1-16) 显示 DNA 向上方集中, 并且在右上方形成两个芽苞状结构, DNA 的形态结构发生了显著的变化; (Fig.1-17) 则不仅表现为细胞核染色质均质性的改变, 而且由于细胞核膜的损伤使 DNA 从核中泄漏形成一长的 DNA “尾巴”; (Fig.1-18) 利用激光共聚焦显微镜所具备的细胞断层扫描功能, 发现外形似乎正常的 DNA 在其结构中心部位均质性变化很大, 其矢状面象锯齿样; (Fig.1-19) 显示 DNA 在铜的作用下其形态结构变为菜花状, 是 DNA 受到重度损害的一种表现; (Fig.1-20) 则显示出 DNA 在铜的作用下其形态结构完全被破坏, 形成 DNA 的许多小碎片, 说明铜的抗癌作用是从对 DNA 这一根本环节上发生的。

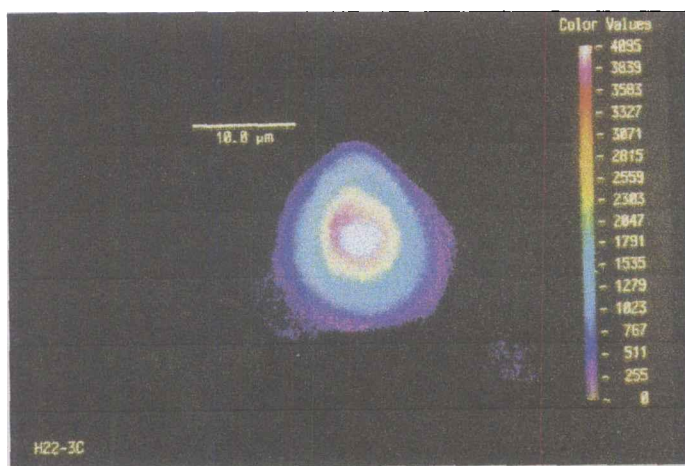


Fig. 1-13 The normal H_{22} DNA stained by AO. The shape and structure was integrity ,the edge was smooth.

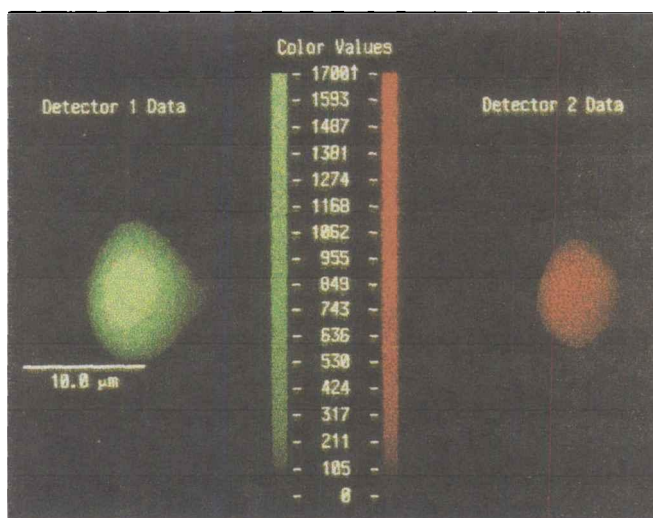


Fig. 1-14 The normal H22 DNA(left) and RNA(right)

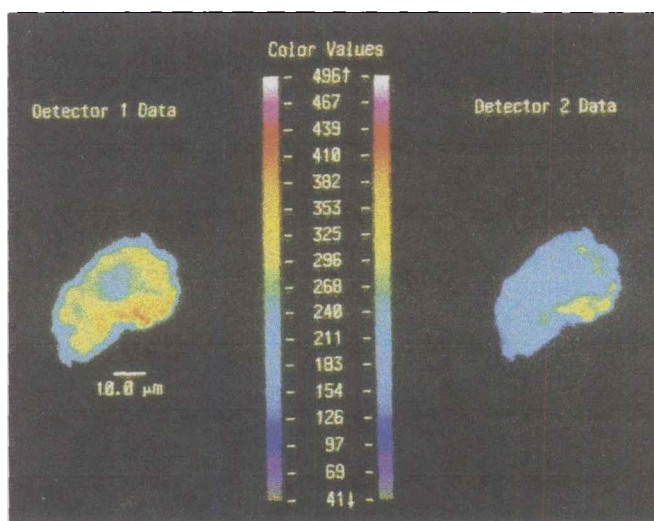


Fig. 1-15 The chromatin condensed around and the edge was irregular

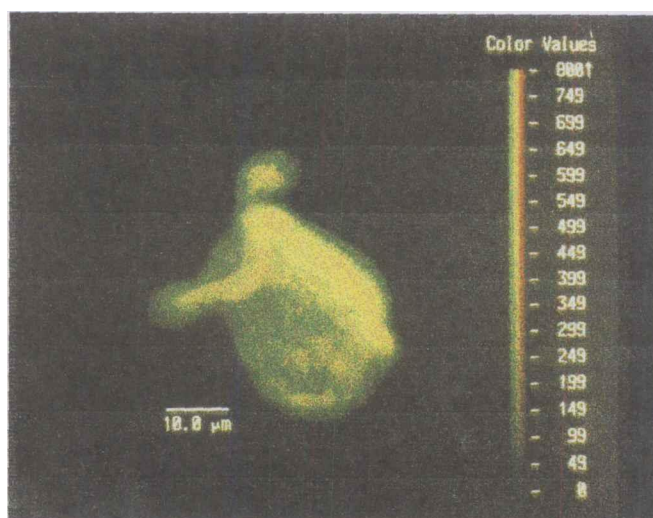


Fig. 1-16 The chromatin condensed up and some of them became DNA buds

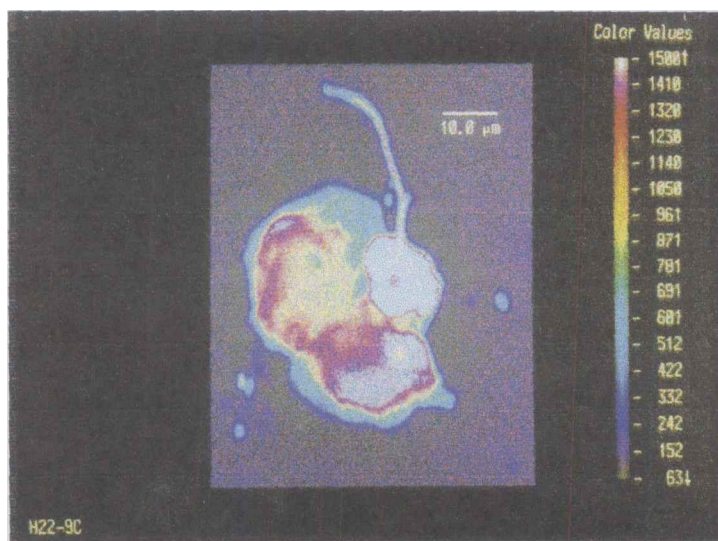


Fig.1-17 The chromatin was damaged by copper and some of them leaked and became DNA tail

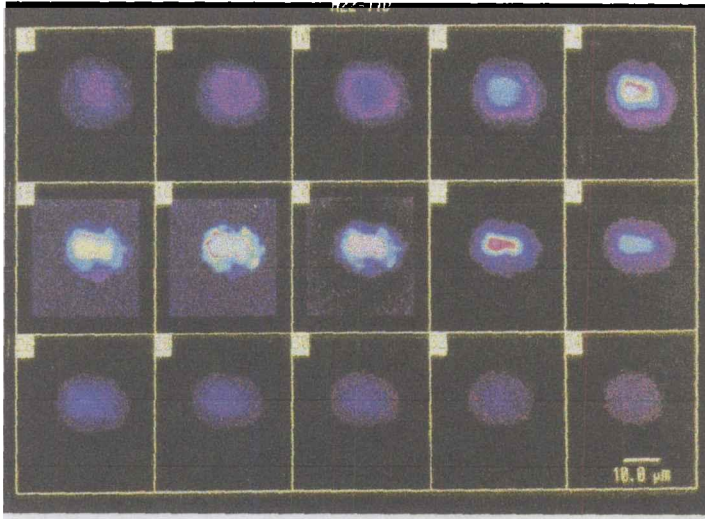


Fig.1-18 The chromatin was damaged by copper and the shape was like sawtooth

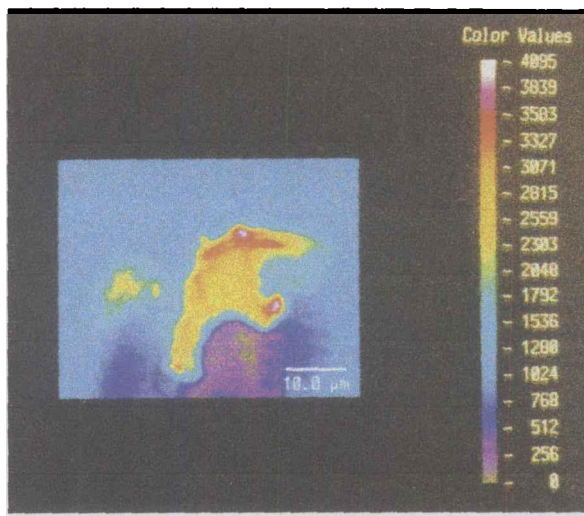


Fig. 1-19 The chromatin was damaged by copper and the shape was like rapeflower

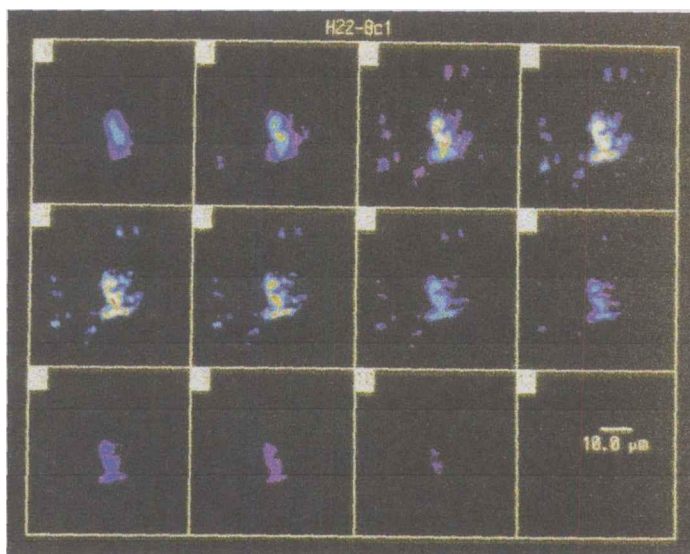


Fig. 1-20 The chromatin was damaged seriously by copper and was taken into many small fragments

[六] 铜诱导癌细胞发生凋亡

将人 7402 及 MT-7402 肝癌细胞在含有 $200\mu\text{M}$ Cu^{2+} 去血清培养液中培养，第三天收集细胞，提取 DNA，电泳出现凋亡细胞特征性“梯形”条带（图 1-21），说明铜离子也可以在去血清培养的条件下，诱导细胞发生凋亡。至于铜离子的浓度、温度及 pH 值对铜离子诱导细胞凋亡的影响尚有待于进一步研究。

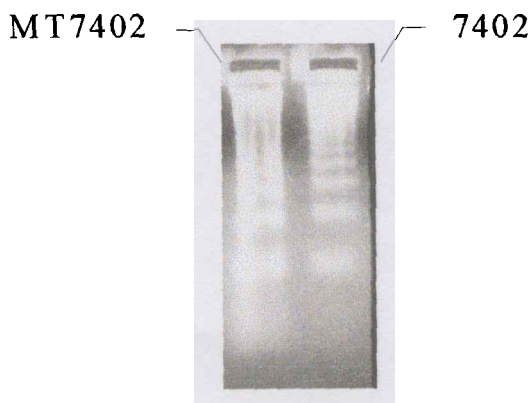


Fig.1-21 Apoptosis ladder of 7402 cell and MT-7402 cell induced by $200\mu\text{M}$ copper in free serum culture medium at third day.

三、讨论

[一] 铜的抗肿瘤作用

应用含铜制剂防治肿瘤的临床实验研究，国内外均有较多报道。1973年，日本学者 Kamamoto 报道醋酸铜能预防致癌诱变剂 DL-乙硫胺酸在大鼠诱发的肝癌，而本身没有致突变性[10]； Rainess 报道铜能对抗 Urethane 实验性诱发皮肤腺癌的作用[11]； Knncheria 发现 $10\mu\text{g/ml}$ 的 $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ IMP 和 CuCl_2 IMHP 对艾氏腹水癌细胞能产生 100% 的细胞毒性，同时使荷瘤小鼠生命延长 80% 以上，体外培养发现该药对中华仓鼠卵巢细胞生长抑制达 50~70%[12]； Smarajit 等报道 $\text{Cu-ATP}[\text{Cu}_3(\text{ATP})_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}]$ 不但有明显的抑瘤率，延长动物的生命时间，而且能显著升高荷瘤动物的血细胞和血红蛋白水平[13]。Dabancens[14] 报道用阿的平和硫酸铜口服治疗荷 TA3MTXR 肿瘤细胞的小鼠，一个月后阿的平组有 50% 的抑瘤率，阿+铜组的抑瘤率为 80%。作者认为阿的平与硫酸铜有协同的抗癌作用。另外，还有许多研究者发现多种具有抗癌作用的含铜物质，如 CuDIPS ， CuATP ，铜氨基酸及小分子的硫酸铜等[15-18]。

临床研究方面，刘同庆用含铜铁中药复方“克癌 7851”治疗肝癌、肺癌、胃癌、前列腺癌骨转移等取得了较好的疗效[19]；孙秉严用含铜绿的“消瘤丸”（铜绿，蜈蚣，黄药子，巴豆仁，雄黄）治疗多种癌症也取得了良好的效果[20]。日本人白水俱弘应用“克癌 7851”配合扶正中成药治疗肝癌、大肠癌、胆囊癌、胃癌、乳腺癌等与单纯的放化疗对照组相比有明显的优越性，认为该药特异性强，副作用少，对患者的生存质量有帮助[21]。

[二] 铜抗肿瘤作用的机理

我们对醋酸铜的抗肝癌作用进行了反复摸索，证实了铜的抗癌作用是存在的，不但能明显地抑制肿瘤的生长，而且能延长荷瘤动物的生命时间。通过我们的工作发现铜的抗癌机理至少包括以下几个环节：

1 直接抑制癌细胞 DNA 的合成 体外细胞实验证实当铜的浓度达到 $50\mu\text{M}$ 时就对肝癌细胞的生长有强烈的抑制作用。众所周知，肿瘤细胞的恶性增生与 DNA 快速合成复制是分不开的，许多抗肿瘤药的作用环节就在于抑制 DNA 的合成[22]。流式细胞分光光度计的检测结果表明，随着给铜浓度的增加，G1 期细胞由对照组的 22.1% 逐渐增加至 75.0% 左右，S

期细胞则由对照组的 60.9% 逐渐减少至 14.8%，说明肿瘤细胞的 DNA 合成受到强烈抑制，细胞分裂基本被阻断在 G1 期。迟永春[23]等研究也发现给铜组腹水癌细胞的 DNA 含量明显低于对照组，给铜组 G1 期细胞明显增多，癌细胞分裂增殖指数显著降低。同时他还认为铜离子可能有利于诱导癌细胞的分化。Kim[24]也认为铜离子损害 LEC 大鼠肝细胞 DNA 的合成。用 LEC 大鼠原位肝细胞在培养基中加入 EGF 和胰岛素生长刺激因子，观察铜毒性对 DNA 合成及蛋白磷酸化的影响，发现处于 DNA 合成的 S 期细胞数量明显少于对照的正常肝细胞，而与核蛋白磷酸化有关的指标没有明显的区别，认为铜毒性影响了 DNA 的合成，但不是通过影响启动 DNA 合成所需的蛋白磷酸化的环节来损害细胞 DNA 合成的。

2 对肿瘤细胞核酸大分子的直接破坏 体外实验发现 1500 μ M 铜在第二天可以杀死 50% 左右的 H₂₂ 肝癌细胞，而在第三天可以杀死 80% 左右的肝癌细胞，表明了铜对肿瘤细胞的直接杀伤作用。通过激光共聚焦显微镜我们发现铜对细胞核 DNA 和 RNA 造成了强烈的破坏作用，使 DNA 和 RNA 发生凝聚，出芽或者形成锯齿样，最终形成碎片。我们的实验结果与 Fuentealba[25]用 X 线电子探针分析法研究铜对肝细胞毒性的报告相似。他指出铜并不存在对肝细胞溶酶体的降解或破坏作用，铜的毒性与细胞核的不可逆损害有关。核中的铜直接使细胞核受损，进而导致细胞的死亡。他给大鼠饲用含有 1500ppm 铜的饮食 16 周，发现在第二周肝细胞核染色质凝固，到三周末细胞核出现明显的锯齿形，至第四周细胞核出现不可逆的断裂。至于铜对核酸大分子的破坏作用机理，主要是通过自由基发生作用的[26]。我们的实验也证实（见第二部分），单独铜或过氧化氢在体外并不会导致质粒 DNA 的损伤，但两者一起反应则导致 DNA 的损伤，而且 DNA 损伤的程度与铜的浓度呈正相关，在过氧化氢浓度、温度及反应时间一定的条件下，随着铜离子浓度的增加，DNA 被氧化形成的片段也越小，说明铜与过氧化氢反应生成羟自由基对 DNA 的破坏作用是非常强烈的。铜在体内生成羟自由基必须有过氧化氢的参与，而体内生成过氧化氢的条件很多，一方面通过酶促反应，如氨基酸氧化酶、半乳糖氧化酶、单胺氧化酶、二胺氧化酶、乳酸氧化酶及葡萄糖氧化酶等使氧分子发生二电子还原，直接变为过氧化氢；另外许多可以产生超氧阴离子的酶，如黄嘌呤氧化酶、醛氧化酶、NADPH 氧化酶、谷胱甘肽还原酶、二胺氧化酶、

二氢乳清酸脱氢酶、NADPH-细胞色素氧化酶、铁氧还蛋白-NADP 还原酶等与超氧化物歧化酶协同,也可以使超氧阴离子变为过氧化氢。还可以通过超氧化物阴离子自动歧化的非酶促反应生成过氧化氢[27]。至于羟自由基与细胞核相互反应导致细胞死亡的机理见《文献综述》有关章节。

铜对肿瘤细胞的直接杀伤,可能还与铜介导的细胞膜脂质过氧化反应引致膜的损害有关。有人发现,当肝组织匀浆或肝细胞与铜反应时,肝脏中的戊烷和丙二醛(malodialdehyde)以及硫巴比妥酸反应物质(TBARS)的增多就证实发生了脂质过氧化反应。而且,当大鼠服用过多的铜时,可以引起线粒体脂质的过氧化反应使聚二烯和TBARS含量增高。还可见肝细胞线粒体内囊状脊的扩大以及肝脏损伤引起的其他生化和组织学的变化,这些表现尤其在缺乏维生素E大鼠负铜的情况下更容易出现,提示铜介导了对肝细胞的氧化损伤。而且与缺VE、硒大鼠负铜的情况下胆汁中检测到的自由基产物相符。这些结果都证明铜的毒性与脂质的过氧化反应也有关系[28]。我们在体外实验中也发现,当肝癌细胞与铜相互作用一段时间后,细胞膜有皱缩现象,同时细胞的折光性下降,细胞内出现许多空泡,还可见到细胞膜破裂后胞浆内容物从细胞中漏出,及至后期可以见到许多细胞碎片。这些都说明细胞膜的脆性增强,韧性下降,细胞膜受到了损伤。目前关于铜对细胞线粒体和溶酶体损伤的认识还有争论。

3 铜诱导肿瘤细胞凋亡 细胞凋亡(程序性细胞死亡)目前已成为细胞生物学的热点之一,作为一种特异的细胞死亡方式,凋亡的表现与细胞坏死呈现完全不同的形态及生化特征。关于肿瘤与程序性细胞死亡之间的关系,正在成为人们关注的热点。研究表明程序性死亡不但与肿瘤的发生发展有关,而且与肿瘤的治疗及耐药性也有关。在肿瘤的发生过程中,有关癌基因如c-fos、c-myc似乎可以引起肿瘤细胞程序化死亡的敏感性,而抑癌基因bcl-2、P53等参与了拮抗或阻碍程序性细胞死亡的过程;在肿瘤治疗方面,研究发现大多数抗癌药物如拓扑异构酶抑制剂、烷化剂、抗代谢剂和激素拮抗剂,都在不同类型的敏感肿瘤细胞中诱导程序化细胞死亡,抗癌药物的疗效不仅取决于这些药物与各自特异的靶细胞的相互作用,而且也取决于这些药物诱导程序化细胞死亡的能力,能否诱导程序化细胞死亡已成为筛选抗癌药物的新标准[29]。我们研究结果证实,铜在血清饥饿条件下也能诱导细胞的程序化死亡,至于其作用机理,一般

认为程序性细胞死亡过程中核 DNA 的降解是由于一种 $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ 依赖的核酸内切酶活化引起的[30]。但有许多研究结果表明自由基也可以诱导细胞程序化死亡(programmed cell death PCD),在化学试剂刺激引起细胞内活性氧(reactive oxygen species ROS)代谢过程中,完全可以通过诱导细胞凋亡来清除肿瘤细胞[31-33]。

Shimizu 等[34]报道 Bcl-2 基因的表达及其相关蛋白 Bcl-xL 可以阻止低氧引起的细胞 PCD,他们认为 ROS 与低氧引起的 PCD 无关, Bcl-2 和 Bcl-xL 并不能通过调节细胞内 ROS 水平以阻止这种细胞死亡。可能是由这些蛋白直接调节蛋白酶活性或蛋白激酶反应起作用的。Jacobson 和 Raff[35]也报道,虽然近乏氧环境和抗氧化剂可以阻断由 ROS 剂诱导的 PCD,但是如此条件并不能阻断通过其他途径诱导的 PCD, Bcl-2 可以阻断有氧或无氧状态下的细胞死亡,所以尽管 ROS 能够导致细胞 PCD,但并不是绝对的, Bcl-2 保护细胞免于死亡就不是通过调节细胞内的 ROS 活性达到的。Cantoni[36]认为羟自由基也可以激活核酸内切酶活性, DNA 片段形成可能是通过此途径实现的。

细胞核内出现微小 DNA 片段被公认为是细胞程序性死亡的特征[37]。Tsang[38]等人用 HepG2 人肝癌细胞在铜化合物 1,10-phenanthroline (o-phenanthroline, OP), $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{OP})_2$ 作用下形成典型的具有凋亡特征核内 DNA 的片段。在低温条件下, DNA 片段被加入的抗坏血酸所抑制,认为 DNA 的片段形成是羟自由基作用的直接结果。已有的研究结果证实在常温条件下 $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{OP})_2$ 可以通过细胞内氧分子的氧化还原反应生成羟自由基。在低温下,抗坏血酸形成了还原反应环境,从而阻断了羟自由基的形成。他们最后指出细胞凋亡所形成的核内 DNA 片段化并非一定是 ROS 作用于内源性核酸酶后的间接结果,羟自由基也可以直接作用于 DNA 形成凋亡 DNA 片段化。

综上所述,我们通过一系列动物实验和体外实验从不同层次研究了铜的抗癌作用、探讨了抗癌机理,证实铜在一定的剂量下具有一定的抗实验性肝癌作用,包括抑制肿瘤细胞的生长、诱导细胞的程序性死亡和直接杀灭肿瘤细胞。其抗癌作用的发挥可能是通过铜介导的自由基反应实现的。

〔参考文献〕

- [1] 曹元宁 辑注 <<本草经>>。上海科学技术出版社出版,1987年11月第一版。26-29页。
- [2] <<本草别录>> 见:曹元宁 辑注 <<本草经>>。上海科学技术出版社出版,1987年11月第一版。26-29页。
- [3] 江苏新医学院 中药大辞典(缩印本),上海科技出版社,1986年5月第一版,1992年第五次印刷P 2162
- [4] 李时珍(明) 本草纲目(校点本)第一册。人民卫生出版社出版,1987年4月第一版第三次印刷。P 597
- [5] 李仪奎 中药药理实验方法学 上海科学技术出版社1991年6月第一版, P512。
- [6] 鄂征 组织培养和分子细胞学技术 北京出版社1995年8月第一版, P151。
- [7] 宋平根 李素文 流式细胞术的原理和应用 北京师范大学出版社1992年3月第一版 P88。
- [8] 鄂征 组织培养和分子细胞学技术 北京出版社1995年8月第一版, P142-143。
- [9] 方敏 张鸿卿 薛绍白 等 药学报 *Acta Pharmaceutica Sinica* 1994; 29(12):891-898.
- [10] Kamanoto Y,Makiura S,Sugihara S,et al. *Cancer Res.* 1973,33,1129-1135.
- [11] Reiness J.J. *Carcinogenesis* 1988,9(4): 629-32.
- [12] Knncheria J. *Indian J. Pharm. Sci.* 1994, 56(2):37-40.
- [13] Pal. Smarajit. *Anti-Cancer Drugs.* 1993, 4(4):505-510
- [14] Dabancens, A, Zipper, J, and Guerrero, A. 1994, *Contraception* 50. 243-251.)
- [15] Crispens C. G. *Anticancer Res.* 1989, 9(20):357-359.
- [16] Nayak K. K.. *Pharmacoligy.* 1990, 41(6):350-356.
- [17] Treshchlia E. M. *Dokl Akad. Nauk. SSSR.* 1979, 248(5): 1273-1276.
- [18] Syrkin A. B. *Biull. Eksp. Biol. Med.* 1988, 105(4):477-479.
- [19] 刘同庆 著 揭开癌症之迷。国际文化出版公司出版,1996年4月第一版,9-50页
- [20] 孙秉严 治癌秘方-我治癌34年医案。华龄出版社(北京)。1992年第1版,96页。
- [21] 白水俱宏 对矿物药治疗复发癌效果的评价。第9回和汉医药学会大会。August 15-16,1992,Tokyo.P107-109。
- [22] 韩锐 主编 肿瘤的化学预防与治疗。北京医科大学中国协和医科大学联合出版社出版,1994年6月第二版。 页
- [23] 迟永春 周舒 万方 等 微量元素铜的抗肿瘤作用的流式细胞光度计的分析研究 第四届医学微量元素、全国第二届锗的研究及应用学术论文集,1993年8月 秦皇岛 P 88。

- [24] Kim, J. K. Yamada T. and Matsumoto K. *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology*.1994,84, 363-366.
- [25] Fuentealba I., Hawood, F. S. and Foster, J. *Experimental and Molecular Pathology*. 1989, 50, 26-37.
- [26] Goldsteun, S. and Czapski. *G J.Free Radicals Biol. & Med*.1986; 2: 3-11
- [27] 莫简 医用自由基生物学导论 人民卫生出版社 1989 年 2 月第 1 版, P14-24 .
- [28] Kasiiska M. B., Hanna P. M. and Jordan S. J. et al. *Mol. Pharmacol*. 1993; 44:222-227.
- [29] 方敏, 薛绍白 *基础医学与临床*,1994;14:165-169
- [30] Gohen J. J. and Duke R. C. *J. Immunol*.1984; 132:38
- [31] Arends, M. J. ,Morris, R. G. and Wyllie, A. H. *Am. J. Pathol*.1990 136, 593-608.
- [32] McConkey, D. J., Hartzell,P. and Wyllie, A. H. et al .*Toxicol. Lett*. 1988;42:123-130.
- [33] Dypbukt, J.M., Ankarcona, M. and Sjöholm, A. et al *J.Biol. Chem*.1994; 269:30553-30560.
- [34] Shimizu , S., Eguchi, Y. and Kosaka, H. et al *Nature (London)* 1995;374: 811-813.
- [35] Jacobson, M. D., and Raff, M.C. *Nature (London)* 1995;374:814-816.
- [36] Cantoni, O., Sestili,P. and Cattabeni, F. et al *Eur.J.Biochem*.1989; 182:209-212.
- [37] Zhivotovsky, B., Wade, D. and Gahm, A. et al *FEBS lett*.1994;351:150-154.
- [38] Tsang,S. Y., TAM, S. C. and Bremner I. et al *Bio J*. 1996;317:13-18.

第二部分 铜与金属硫蛋白的分布、转运研究

引言

在研究铜的抗癌过程中,有关铜毒性问题是人们普遍关注的焦点。《神农本草经》[1]认为下列含铜药物如:绿青“寒酸无毒”、扁青“小寒无毒”、白青“甘酸咸平,无毒”、胆矾“酸平寒,有毒”。至于铜绿,《嘉佑本草》[2]认为属“平,微毒”;《本草经疏》[3]认为属“酸苦涩,微毒”,《中药大辞典》[4]认为属“酸涩,平,有毒”。实际上,铜的有毒、无毒问题,涉及到铜在生物体内不同组织器官中的分布代谢状态、铜在组织细胞中的分布及机体的自身反应方式等诸多环节。其中,金属硫蛋白的诱导合成及分布是最为重要的因素之一。本篇将主要研究铜治疗实验性肝癌过程中对肝肾功能的影响、铜和金属硫蛋白在组织器官中的分布转运过程及在组织细胞中的分布特点,从而阐明金属硫蛋白在保护机体解铜毒及铜抗癌过程中所发挥的重要作用。

一、实验材料与方法

[一] 实验材料

1 主要试剂

E9MT 单克隆抗体,能识别 MT- I , MT- II 蛋白,由英国 University of Wales College of Medicine B. Jasani 教授惠赠。

MT 多克隆抗体,由英国 Rowett 营养研究所 Ian Bremner 教授惠赠。

5-(4-Dimethyl-aminobenzylidene)rhodanine Fluka

生物素化羊抗兔 IgG , ABC 复合物 中山公司

Ag 、 Cu 、 Zn 元素测试标准液 中国标准测量中心

^{64}Cu 和 ^{135}I -MT 中国原子能科学研究院惠增

C-myc 质粒 北京医科大学病理系惠赠

30%过氧化氢 北京化工厂

Sephadex G-75 , G-50 , G-25

Sigma

牛血红蛋白

北京华美生物工程公司

2 主要实验仪器

HITACHI180-80 型原子吸收分光光度计 日本

核辐射监测器

Digilert TM 美国

水平电泳系统

北京六一仪器厂

[二] 实验方法

1 肝肾功能、外周血的测定

荷实体瘤 NIH 小鼠口服醋酸铜 150mg/kg/d, 共十天, 在抑瘤率为 42.8% 的情况下, 按常规方法检测正常对照组、荷瘤对照组、正常给铜组、荷瘤给铜组的肝功能 (SGPT)、肾功能 (BUN)、血红蛋白 (Hb) 和外周血白细胞 (WBC)

2 原子吸收分光光度计测定微量元素 (火焰法) [5]

BALB/C 雄性小鼠, 分正常对照组和荷实体瘤组。荷瘤后第七天, 灌胃给醋酸铜 3mg/0.4ml/只。每批对照小鼠和荷瘤小鼠各 6 只, 分别在给药前及给药后 0.5、2、5、8、12 小时摘眼球采血后处死, 取出心、肝、肺、肾、胃肠(含胃及 2cm 长的十二指肠)组织, 荷瘤小鼠同时取出瘤组织。

组织处理: 分离血清, 用三蒸水配制的 0.9% 的 NaCl 洗涤凝血细胞三次; 切开胃肠, 去除内容物, 洗净胃肠粘膜; 肝、瘤组织各称重 0.5g 左右。所有组织均用三蒸水反复清洗干净, 用吸水纸吸干, 电子天平称重。

组织消化: 所有玻璃器皿均泡酸, 用三蒸水冲洗干净。根据文献方法, 消化液用硝酸、高氯酸、三蒸水按 3:3:3:1(v/v/v/g 组织) 配制, 加热消化至无色, 用 10ml 容量瓶三蒸水定容。

铜、锌、银的测定: 用 HITACHI180-80 型原子吸收分光光度计(火焰法)测定。

测锌的条件: Lamp Current: 10.0mA; Wave Length: 213.8nm; Slit: 1.3nm; Burner: Standard Type; Burner Height 7.5cm; Oxidant: Air, 1.6kg/cm² (9.4L/min); Fuel: C₂H₂, 0.2 kg/cm² (2.0L/min)

测铜的条件: Lamp Current: 7.5mA; Wave Length: 324.8nm; Slit: 1.3nm;
Burner: Standard Type; Burner Height: 7.5cm; Oxidant: Air, 1.6kg/cm²
(9.4L/min); Fuel: C₂H₂, 0.3 kg/cm² (2.3L/min)

测银的条件: Lamp Current: 7.5mA; Wave Length: 328.1nm; Slit: 2.6nm;
Burner: Standard Type; Burner Height 7.5cm; Oxidant: Air, 1.6kg/cm²
(9.4L/min); Fuel: C₂H₂, 0.3 kg/cm² (2.3L/min)

3 铜的化学染色 (Rohdanmine 法) [6]

配制原液: 100mg Rohdanmine/ml 无水乙醇。取原液 6ml 加三蒸水至 100ml 成染色液; 切片常规脱蜡 (二甲苯[1]→[2]→[3], 各 2 小时)、水化 (100%乙醇→95%乙醇→80%乙醇, 各半小时); 将切片置染色液中 37℃温育 6 ~ 18 小时; 至少用蒸馏水洗切片 5 次, 以去除过量的染料; 苏木素快速复染; 快速脱水 (80%乙醇→95%乙醇→100%乙醇, 各 1 分钟), 亮化 (二甲苯[1]→[2]→[3], 各 1 分钟), 中性树胶固定封片; ×1000 倍显微镜下观察, 在细胞浆或核中可见红色的铜颗粒。

4 MT 的免疫组织化学染色[7]

常规石蜡切片 (4μm), 烤片 60℃, 60min; 石蜡切片脱蜡, 脱水: 二甲苯 2 小时×3 次; 乙醇 100%, 95%, 80%各 3min; 去离子水洗, 2 次, 2min/次; 1×PBS 洗, 3 次, 2min/次; 0.3%H₂O₂, 甲醇封闭内源性过氧化物酶 (50ml 甲醇+0.5ml 30% H₂O₂), 1×PBS 洗, 3 次, 2min/次; 0.1%胰蛋白酶 37℃消化 20 分钟; 1×PBS 洗, 3 次; 正常小牛血清 1:100 稀释封闭, 37℃20min; 加一抗, 4℃过夜, 或 37℃1 小时; 1×PBS 洗, 3 次, 2min/次; 加生物素化二抗 1:100 稀释, 37℃40min; 1×PBS 洗, 3 次; 加 1:100 稀释的 AB 复合液, 37℃40min; 1×PBS 洗, 3 次; DAB-H₂O₂ 染色, 5~10min, (1ml PBS+10μg DAB+7μl H₂O₂); 自来水冲洗; 苏木素复染, 自来水冲洗, 返蓝, 分化, 乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树脂封闭。

5 银饱和法测定金属硫蛋白[8]

醋酸铜用去离子水配成 150mg/kg, 荷瘤小鼠第二天灌胃给药, 0.4ml/

只/天，对照组给自来水，共 10 天。停药第二天，断颈处死小鼠，摘眼球采血，分离血清及血细胞，取出瘤组织及心、肝、脾、肺、肾、胃肠等组织称重，计算抑瘤率。

组织 MT 的制备及测定：(1)用三蒸水反复冲洗组织，吸水纸吸尽水分；(2)称重 0.2-0.5g，加 1ml 0.25M 蔗糖溶液，匀浆；(3)倒出匀浆液，加 1ml 醇仿液，洗净匀浆器，与原匀浆液充分混和；(4)4℃，1000rpm/min，30min；(5)取上清 50 μ l 升置 1.5ml Eppendorf 管中，加 D 缓冲液 750 μ l，硝酸银缓冲液 500 μ l，20℃混匀 5min；(6)加 2%的牛血红蛋白 100 μ l，20℃混匀 5min；(7)100℃加热 3-4min，立即置冰水中 5-10min；(8)1000rpm/min，10 分钟，取上清；(9)重复步骤(6)-(8)两次；(10)取上清 1ml，原子吸收分光光度计(火焰法)；设立空白对照(不加组织匀浆液，余相同)测定银含量，根据一个 MT 分子结合 17 个银原子，计算 MT 浓度。

缓冲液的配制：D 缓冲液--0.5M 甘氨酸-氢氧化钠，pH 8.5，硝酸银缓冲液--D 缓冲液 100ml 加硝酸银 3.2mg；乙醇-绿仿液--100ml 无水乙醇加 8ml 氯仿

实验所有液体均用超声去气，用纯氮气充分饱和，置 4℃冰箱存放。离心时离心管中也充满氮气。所有玻璃仪器均需泡酸，三蒸水冲洗干净。

6 金属硫蛋白的分离[9]

将 0.5-1.0g 的肝组织和癌细胞置于洁净的玻璃匀浆器中，加 2.0ml Tris-HCl 缓冲液(pH 7.5，0.01mol/L)，加入 100 μ l 巯基乙醇，匀浆。倒出匀浆液，加入 1.0ml 上述缓冲液洗涤匀浆器，4000rpm/min 离心匀浆液 5min，上清液置沸水中煮沸 3min，冰水中冷却，4000rpm/min 离心 30min，取上清液过柱 Sephadex G-75 (1.6 $\times$ 50cm)。测定收集样品中的金属元素及蛋白含量。

7 锌-MT 的制备[10]

(1)挑选 3000g 左右的健康家兔，皮下注射无菌的 0.2g/ml 硫酸锌溶液(第一天 0.5ml，第二天 1.0ml，第四天 1.5ml，第六天 2.0ml)，第七天处死兔；(2)取出肝脏，去除胆囊，洗净称重，切碎，按 1:1 (w/v) 加入 0.01M Tris 缓冲液，匀浆；倒出匀浆液，按 1:1 (w/v) 缓慢加入乙

醇-氯仿萃取液, 搅拌 10 分钟; (3) 5000-6000rpm/min, 离心 20 分钟, 收集上清液; (4) 加入两倍体积冰冷的无水乙醇, 轻轻搅拌, 出现淡黄色的沉淀; (5) 4℃ 保存过夜, 弃上清, 收集沉淀, 5000-6000rpm/min, 30min; (6) 弃上清, 收集沉淀, 加入 20ml 0.01M Tris 缓冲液, 细心搅拌, 使沉淀物充分溶解; (7) 5000-6000rpm/min, 30min, 收集上清液; (8) 重复步骤 (6)、(7), 合并所得上清液; (9) 上清液加入已填充平衡好的 G-50 柱中, 调节流速, 用 0.01M Tris 缓冲液淋洗, 收集中间段 MT 液; (10) 将 MT 溶液加入已填充平衡好的 DEAE 柱中, 调节流速, 用 0.01M Tris 缓冲液淋洗 2 个柱体积, 然后用 0.33M NaCl 淋洗 DEAE 柱, 用紫外检测器 (波长置于 220nm 或 254nm) 检测, 吸附在凝胶上的 MT-1、MT-2 被同时洗脱下来, 检测曲线只出现一个洗脱峰, 收集此峰; (11) 分离 MT-1 和 MT-2, 先用 0.011M NaCl 淋洗, 用紫外检测器 (波长置于 220nm 或 254nm) 检测, 收集洗脱峰, 得到 MT-1; 再用 0.033M NaCl 淋洗, 用紫外检测器 (波长置于 220nm 或 254nm) 检测, 收集洗脱峰, 得到 MT-2。 (12) 冷冻干燥 MT-1、MT-2 液, 再用尽量少的蒸馏水溶解后, 分别将样品液上到 0.01M 碳酸铵平衡好的 G-25 脱盐柱上, 用 0.01M 碳酸铵淋洗, 紫外检测器 (波长置于 220nm 或 254nm) 检测, 收集第一个洗脱峰, 得到 MT 溶液。 (13) 冷冻干燥, 碳酸铵和水一起被除去, 得到白色絮状 MT, 装入棕色瓶中, 冷冻储存。 (14) 根据巯基含量、锌含量检测 MT 的质量和纯度。

8 ^{64}Cu 和 ^{135}I -MT 的转运和代谢[11]

荷腹水瘤及正常 BALB/C 小鼠, 7 天后尾静脉注射 $^{64}\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 0.2ml/只 (约 1 μCi , 0.1 μg Cu/只, 其放化纯度达 99.5%); ^{135}I -MT 用 Bolton-Hunter 试剂标记 MT, 腹腔注射 0.2ml/只。在注射后, 每隔一定时间, 用乙醚麻醉小鼠, 取出血、腹水、心、肝、脾、肺、肾、胃肠等组织。离心分离腹水及癌细胞; 用去离子水反复冲洗实质脏器, 分别称其重量, 测其放射性强度, 以单位质量所占放射性总强度的百分数进行比较。

9 铜和 H_2O_2 对质粒 DNA 的损伤及锌-MT 保护[12]

调整醋酸铜溶液的 pH 为 7.0-7.4, 配制成不同浓度, 过滤灭菌; 锌-

MT-II配制成不同浓度。反应体系为：5 μ l C-myc DNA 质粒（200ng/ μ l）+2 μ l 醋酸铜+2 μ l30% H_2O_2 +4 μ l 锌-MT-II，加三蒸水至总体积 26 μ l。反应在不同条件下（浓度、温度和时间）进行，反应结束时，加 2 μ l 0.5MEDTA，2 μ l Loading Buffer，1%的琼脂糖凝胶电泳，拍照，以对照质粒 DNA 的泳动距离为参照零点，测量其他 DNA 的相对迁移距离。

二、实验结果

〔一〕铜对实验动物肝肾功能、外周血的影响

一般认为铜对肝肾功能有较大的影响，LEC 大鼠由于先天性胆道系统发育不完善，铜不能从胆汁中排出而大量积聚在肝脏中，最后发生爆发性肝炎而死亡。我们用荷实体瘤 NIH 小鼠口服醋酸铜 150mg/kg/d $\times$ 10d，在抑瘤率为 42.8%的情况下，发现 SGPT 水平在荷瘤对照组为 85 ± 31 （U/L，下略）、正常给铜组 89 ± 38 、荷瘤给铜组 74 ± 25 ，均低于正常对照组的 100 ± 54 。尤其令人感兴趣的是给铜两组 SGPT 水平不但没有升高，反而低于对照组，似乎表明大量铜的摄入并没有损害肝功能，相反可能有某种保护机制起了作用。尽管统计学显示 4 组之间 SGPT 水平没有显著性差别，但这一趋势值得重视。同样在 BUN 水平上也反映了与 SGPT 相同的趋势，即肾功能没有受到摄入大量铜的损害，可能由于铜的摄入调动了体内某种机制起到了一定的保护作用（表 2-1）。检测结果说明铜的摄入

Tab.2-1 Effect of Cu-acetate on SGPT, BUN, Hb, and WBC

Exp. group	SGPT u/l	BUN mmol/L	Hb g/L	WBC $\times 10^9$
normal control	100 ± 54	19.1 ± 2.1	14.5 ± 0.9	5.6 ± 2.0
cancer control	$85 \pm 31^*$	$20.3 \pm 2.0^*$	$13.7 \pm 0.8^*$	$9.1 \pm 3.2^*$
Cu-acetate to normal mice	$89 \pm 38^*$	$18.2 \pm 2.5^*$	$13.9 \pm 0.9^*$	$5.5 \pm 2.8^*$
Cu-acetate to cancer mice	$74 \pm 25^*$	$17.6 \pm 1.5^*$	$13.5 \pm 0.9^*$	$7.2 \pm 2.1^*$
组间 t 检验	$P > 0.05$	$P > 0.05$	$P > 0.05$	$P > 0.05$

对机体的影响是多方面的，复杂的，就肝肾功能而言，实验剂量铜的摄入没有损害作用。因此，在一定的时间、适当的剂量下应用含铜制剂是相对

安全的。至于在负铜时机体的自我保护机制将在下文中探讨。

[二] 肿瘤生长对铜分布的影响

在肿瘤的发生发展过程中，某些器官组织中微量元素铜水平发生了显著的变化。检测结果显示（表 2-2），铜含量在肝脏由正常对照的 $4.15 \pm 0.58 \text{ ppm}$ (下同，略)降低为 3.70 ± 0.16 ，有显著性差异（ $p < 0.001$ ），胃肠铜水平由对照的 6.13 ± 0.67 下降为 2.43 ± 0.55 （ $p < 0.001$ ）；而脾脏铜水平由对照的 1.10 ± 0.19 升高到 1.79 ± 0.64 （ $p < 0.05$ ），血清铜水平则由 0.87 ± 0.03 升高到 1.06 ± 0.09 （ $p < 0.001$ ）。正常对照鼠组织铜含量的高低次序是心脏、胃肠、肝脏、肾脏、血细胞、肺脏、脾脏、血清；而荷瘤鼠组织铜含量的高低次序是心脏、肾脏、肝脏、血细胞、肺脏、胃肠、脾脏、肿瘤、血清。可见在正常情况下，实验小鼠所有组织中以心脏的铜含量最高，肝脏、肾脏铜的

Tab. 2-2 The effect of tumor development on the Cu(ppm)level in the various tissues of mice

Tissues n=6		Cu		p value
		Bearing tumor group	Control group	
1	heart	6.14±0.67	6.69±0.51	>0.05
2	liver	3.70±0.16	4.15± 0.58	<0.001
3	spleen	1.79±0.64	1.10± 0.19	<0.05
4	lung	2.45±0.97	2.45 ±0.10	>0.05
5	kidney	4.35±0.94	3.99 ±0.22	>0.05
6	stomach	2.43±0.55	6.13± 0.67	<0.001
7	tumor	1.22±0.04	-	-
8	serum	1,06±0.09	0.87± 0.03	<0.001
9	blood cell	2.49±0.64	2.49±0.26	>0.05
p value <0.05		2:1,3:1,4:1,5:1,6:1, 7:1,8:1,9:1,3:2,4:2, 6:2,7:2,8:2,9:2,5:3, 8:3,5:4,7:4,8:4,6:5, 7:5,8:5,9:5,7:6,8:6, 9:7,9:8	2:1,3:1,4:1,5:1,8:1, 9:1,3:2,4:2,6:2,8:2, 9:2,4:3,5:3,6:3,9:3, 5:4,6:4,8:4,6:5,8:5, 9:5,8:6,9:6,9:8	

水平明显低于心脏 ($p<0.05$), 同样也低于胃肠组织 ($p<0.05$)。由于肿瘤的生长, 荷瘤鼠肝脏、胃肠组织中的铜含量明显下降, 而脾脏、血清中的铜水平显著地升高, 体内原有组织器官间铜的相互关系被打破, 发生了重新分布, 使各组织的次序有所变化, 肝脏、胃肠铜水平明显低于心、肾 ($p<0.05$)。另外, 由于肿瘤的生长, 体内总铜水平由正常对照的 27.87 ± 2.06 下降为 25.63 ± 4.70 (表 2-2)。可见, 血清铜升高仅是肿瘤生长过程中体内铜重新分布的一个中间环节, 并不代表体内总体铜水平的过剩, 而有可能是机体铜匮乏时, 代偿的一种表现。

[三] 口服醋酸铜后铜在不同组织动态分布规律

为了解负铜过程对荷实体瘤小鼠不同组织铜水平的影响, 我们观察荷 H_{22} 实体瘤 10 天的小鼠在醋酸铜灌胃 12 小时内各组织铜的动态分布规律, 结果如下 (表 2-3, 图 2-1 ~ 3) :

Tab. 2-3 The kinetic distribution of copper(ppm) in the tissues of mice after oral administration of copper acetate (n=6)

hours tissue	0.5	2	5	8	12
heart	7.33 ± 0.94	7.36 ± 0.55	6.03 ± 0.45	7.34 ± 0.37	5.59 ± 0.79
liver	14.90 ± 7.16	14.59 ± 3.35	15.59 ± 3.35	17.62 ± 5.18	23.29 ± 8.33
spleen	5.13 ± 0.99	5.98 ± 2.41	4.41 ± 2.56	2.94 ± 0.85	2.60 ± 0.87
lung	6.51 ± 1.73	9.23 ± 1.10	4.41 ± 1.02	4.55 ± 0.92	3.81 ± 0.88
kidney	8.34 ± 1.81	9.51 ± 2.73	4.99 ± 0.32	5.13 ± 1.12	3.83 ± 0.90
stomach	282.14 ± 45.99	284.07 ± 55.78	194.48 ± 27.70	108.06 ± 9.71	24.00 ± 12.90
tumor	2.91 ± 1.54	4.75 ± 1.00	2.45 ± 1.12	2.40 ± 0.29	1.97 ± 0.46
serum	1.08 ± 0.03	1.12 ± 0.27	1.18 ± 0.22	0.96 ± 0.26	0.88 ± 0.09
blood cell	3.22 ± 0.19	1.84 ± 0.86	1.32 ± 0.13	2.11 ± 0.29	2.40 ± 0.73

心脏: 在负铜后半小时即到高值, 8 小时铜含量仍处于高水平, 但在 5 小时有一低谷, 12 小时心脏铜已降至本底水平;

肝脏: 是铜富集的主要器官, 在负铜后半小时内铜含量迅速升高, 然后平缓富集, 12 小时铜的含量仍然在升高;

脾脏: 在给铜后半小时, 铜即迅速升高, 2 小时到达最高值, 然后下

降;

肺脏: 在负铜后 2 小时铜升至最高值, 然后渐降;

肾脏: 负铜后, 在 2 小时至最高值, 然后下降;

胃肠: 口服负铜时, 胃肠道是主要的负铜器官, 因此在给铜半小时其铜水平已达高值, 随着时间的推移, 转运入血的铜不断增加, 胃肠道粘膜细胞累积的铜很快下降;

肿瘤: 负铜后, 肿瘤组织铜含量在 2 小时到达高值, 然后下降;

血细胞: 在负铜后半小时, 铜含量已达高值, 然后迅速下降至正常水平的一半左右, 再缓缓上升至正常水平;

血清: 负铜后, 铜水平缓缓上升, 在 5 小时升至高值, 然后渐降, 8 小时至正常水平。

结果显示, 心脏、脾脏、肺脏、肾脏、胃肠等组织在半小时到 2 小时出现铜高值, 血细胞在半小时出现最高值, 肿瘤组织在 2 小时为最高值, 血清在 5 小时出现最高值, 而肝脏在 12 小时仍然在富集铜。可见, 荷瘤小鼠口服醋酸铜后铜的动态分布规律因组织不同而异, 肝脏是富集铜的最主要组织器官。

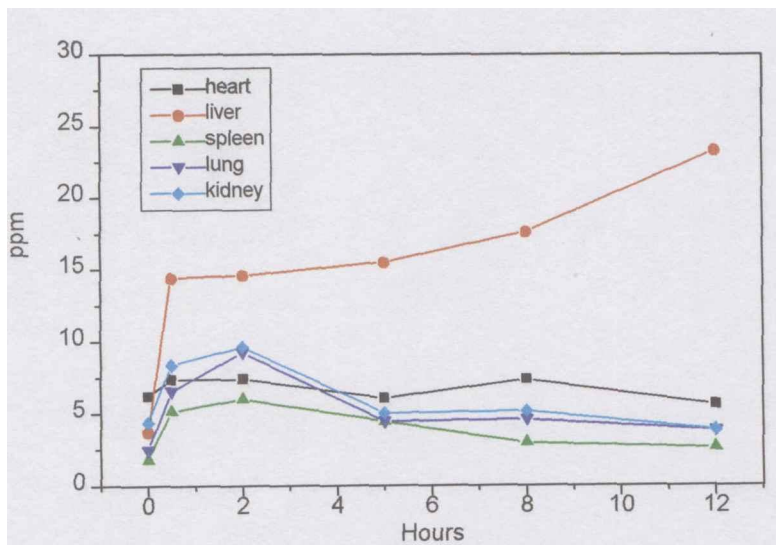


Fig. 2-1 The distribution of copper in heart, liver, spleen, lung, and kidney tissue of the bearing tumor mice after oral administration of copper acetate in 12 hours

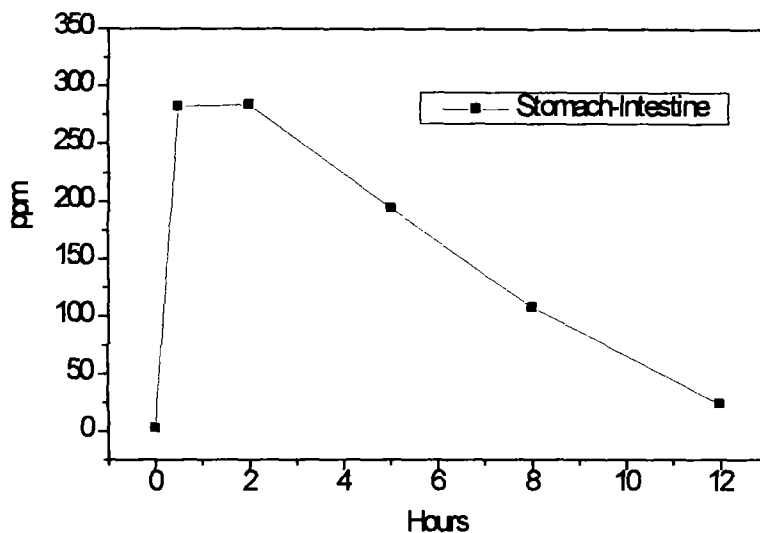


Fig.2-2 The distrubition of copper in stomach-intestine tissue of bearing tumor mice after oral administration of copper acetate in 12 hours

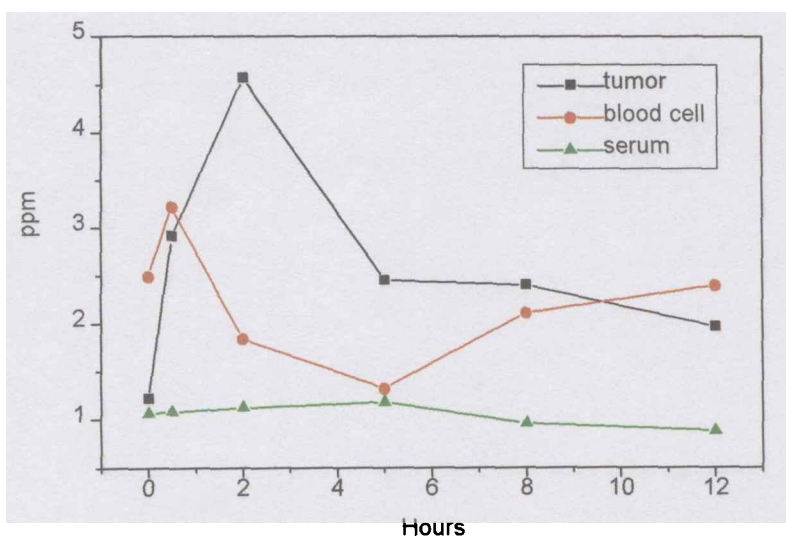


Fig. 2-3 The distrubiton of copper in tumor, blood cell and serum of bearing tumor mice after oral administration of copper acetate in 12 huors

[四] ^{64}Cu 在腹水型肝癌小鼠中的转运特点

通过在肝腹水癌模型小鼠尾静脉注射 ^{64}Cu ($\% \mu\text{Ci/g wet wt.}$), 以了解 ^{64}Cu 在不同组织中的转运与代谢特点。发现 ^{64}Cu 在荷瘤小鼠的血液、心脏、肝脏、肾脏及胃肠中的变化规律与正常对照小鼠基本一致, 但在量上, 正常对照小鼠比荷瘤小鼠要高, 其原因可能是随着时间的推移, ^{64}Cu 逐渐集中在腹水中。各组织的变化规律如下(表 2-4 ~ 5):

心脏: 正常对照组在注射 ^{64}Cu 后 0~30 分钟内, ^{64}Cu 的量从 2.77 降至 1.79, 30 分钟后又渐升高, 至 48 小时达 4.68; 腹水癌组与正常对照组相比其变化趋势基本相同, 36 小时 ^{64}Cu 总量较对照组有所降低, 但没有统计学意义 ($p>0.05$) (图 2-3)。

肝脏: 正常对照组在注射 ^{64}Cu 后很快在肝脏富集, 在 15 分钟其 ^{64}Cu 是其他脏器的 10-15 倍, 在 2 小时达到峰值, 然后逐渐降低; 腹水癌组与正常对照组相比其变化趋势基本相同, 但 36 小时 ^{64}Cu 总量较对照组明显降低, 有统计学意义 ($p<0.05$), 说明在 36 小时内腹水癌鼠肝脏中近 40% (13.39/33.96) 的 ^{64}Cu 转移到腹水或其他组织中(如脾脏)。另外正常对照小鼠肝脏中集中了近 66% 的铜, 而 53.07% 的铜集中在腹水癌小鼠的肝脏中, 表明肝脏确实是小鼠负铜后铜储存转运的主要器官(图 2-4)。

Tab.2-4 The distribution of $^{64}\text{Cu}(\text{iv})$ ($\% \mu\text{Ci/g wet. Wt}$) in various tissues of control mice(c.m.) and ascites mice(a.m.) (n=3)

Time	Heart		Liver		Spleen		Lung	
	c.m.	a.m.	c.m.	a.m.	c.m.	a.m.	c.m.	a.m.
0.25	2.77	3.56	35.8	25.93	2.09	2.16	3.47	4.31
0.5	1.79	0.96	44.15	30.86	1.87	1.50	2.49	1.47
1	1.87	1.62	44.80	29.90	0.89	1.00	2.39	2.08
2	2.01	1.42	51.97	28.18	0.95	1.70	2.91	2.10
4	2.21	1.73	42.35	21.15	2.09	1.68	3.02	2.77
8	2.23	1.64	39.64	19.73	1.80	2.01	4.17	2.61
12	2.15	1.95	25.77	19.47	1.12	2.19	4.29	2.17
24	2.64	2.17	12.17	5.00	1.55	2.74	3.74	1.75
36	3.28	2.37	9.05	4.91	1.05	2.02	3.25	2.99
48	4.68	-	6.52	-	2.71	-	2.67	-

Time	Kidney		Stomach		Blood		Ascites
	c.m.	a.m.	c.m.	a.m.	c.m.	a.m.	
0.25	8.11	5.08	3.54	3.86	3.7	2.94	2.21
0.5	7.91	4.04	3.88	2.38	1.41	1.02	1.91
1	3.67	4.18	3.36	2.52	1.05	0.71	2.29
2	4.4	3.28	5.00	3.71	0.87	0.65	1.01
4	3.43	3.26	3.60	4.01	1.13	1.16	1.99
8	4.21	2.56	4.07	3.29	1.13	1.08	1.70
12	3.85	3.03	3.70	3.76	1.24	0.92	3.79
24	4.63	2.84	4.48	2.33	1.41	1.36	2.86
36	4.70	4.19	3.15	2.56	1.59	1.22	2.69
48	5.75	-	2.31	-	1.56	-	-

脾脏：腹水鼠和对照鼠脾脏中 ^{64}Cu 的变化程度较平缓，但在所有组织中惟有腹水鼠脾脏 36 小时 ^{64}Cu 的平均水平较正常对照有所升高，尽管没有统计学意义，但提示脾脏作为机体主要的免疫反应器官，在荷瘤应激情况下对铜的需求有所增加（图 2-5）。

肺脏：腹水鼠在注射 30 分钟后，肺脏 ^{64}Cu 降至最低点，随后逐渐上升，在 4 小时即达到极大值。正常对照小鼠 12 小时达到极值。腹水鼠肺 36 小时 ^{64}Cu 的平均水平较正常对照明显降低，显示出统计学差异（ $p < 0.05$ ），提示腹水癌鼠肺中的铜有部分向腹水或脾脏中转移（图 2-6）。

肾脏：相对肝脏而言， ^{64}Cu 在肾脏中的富集程度较低，除开始有一高值，一小时后变化趋于平缓。腹水鼠肾中的 36 小时 ^{64}Cu 的平均水平较正常对照略低，但无统计学意义（ $p > 0.05$ ）（图 2-7）。

胃肠：注射 ^{64}Cu 后，在胃肠组织中的变化平缓，但腹水鼠胃肠组织 36 小时 ^{64}Cu 的平均水平较正常对照降低，尽管无统计学意义（ $p > 0.05$ ），但也提示胃肠组织中的铜有向腹水转移的倾向（图 2-8）。

腹水：随着时间的延长，腹水中的 ^{64}Cu 含量逐渐增加，其占总放射剂量的比例由第 12 小时的 2.9% 升至第 36 小时的 11.72%，说明机体组织（除脾脏）中的铜在缓慢地向腹水中转移。将第 4 小时的腹水离心收集癌细胞，经过数次洗涤，至 ^{64}Cu 放射性记数稳定，发现腹水中 88.9% 的 ^{64}Cu 集中在癌细胞中（图 2-9）。

血液：在注射后 15 分钟内， ^{64}Cu 明显处于高值，随后一直处于低水平波动。腹水鼠血液 36 小时 ^{64}Cu 的平均水平较正常对照略低，但无统计学意义（ $p>0.05$ ）（图 2-10）。

通过静脉注射 ^{64}Cu 观察其在正常鼠和荷腹水癌鼠中的转运代谢特点，同样发现肝脏是铜富集的主要器官，按照 36 小时 ^{64}Cu 在组织脏器中的平均富集程度，在正常对照鼠，其次序是肝脏、肾脏、胃肠、肺脏、心脏、血液、脾脏；在腹水鼠，其次序是肝脏、肾脏、胃肠、肺脏、心脏、脾脏、腹水、血液。显示 ^{64}Cu 水平在腹水鼠脾脏中有所上升，腹水中的含量超过血液。

Tab. 2-5 The average ^{64}Cu (iv) (% dose/g wet. Wt) in various tissues of control mice and ascites mice within 36 hours (9 points)

Tissues		control mice	ascites mice	p Value
1	Heart	2.32±0.48	1.93±0.73	>0.05
2	Liver	33.96±10.06	20.57±9.80	<0.05
3	Spleen	1.49±0.49	1.88±0.49	>0.05
4	Lung	3.30±0.68	2.47±0.84	<0.05
5	Kidney	4.99±1.76	3.60±0.81	>0.05
6	Stomach	3.68±0.58	3.15±0.70	>0.05
7	Ascites		2.27±0.79	
8	Blood	1.50±0.85	1.23±0.68	>0.05
p Value		2:1,4:1,5:1,6:1, 7:1,3:2,4:2,5:2, <0.05	2:1,6:1,3:2, 4:2,5:2,6:2, 7:2,8:2,6:3, 6:3,5:4,7:47:5,7:6	

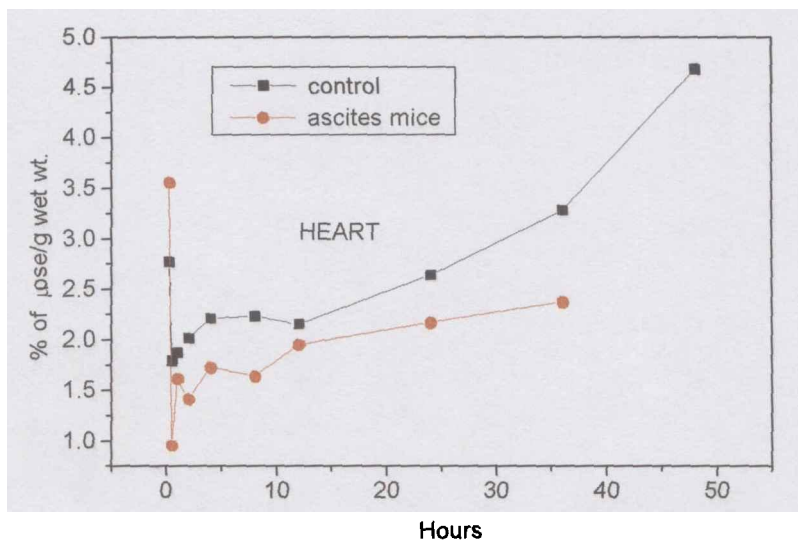


Fig. 2-4 Cu^{64} in heart tissue of normal mice and ascites mice after iv. injection.

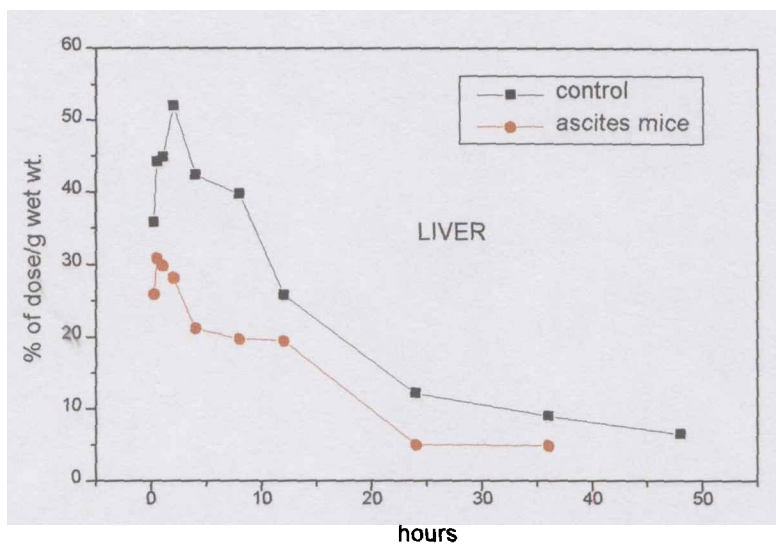


Fig. 2-5 Cu^{64} in liver tissue of normal mice and ascites tumor mice after iv. inject.

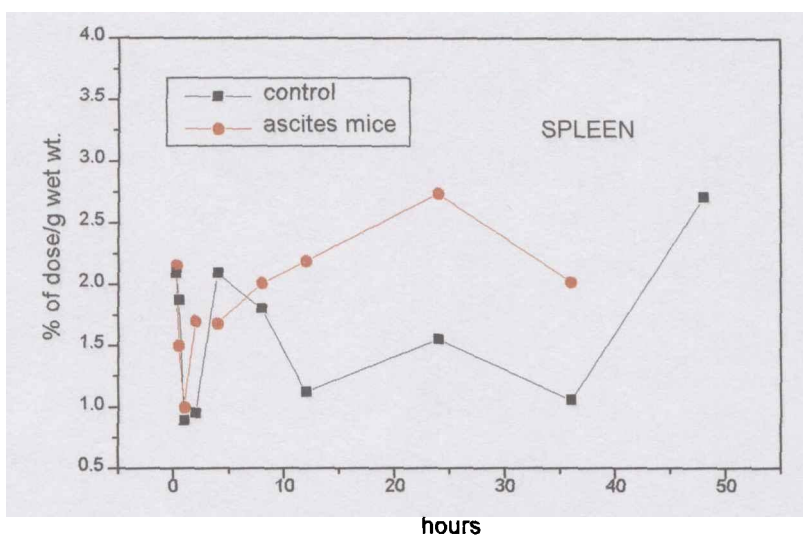


Fig. 2-6 Cu^{64} in spleen tissue of noormal mice and ascites tumor mice after iv. injection.

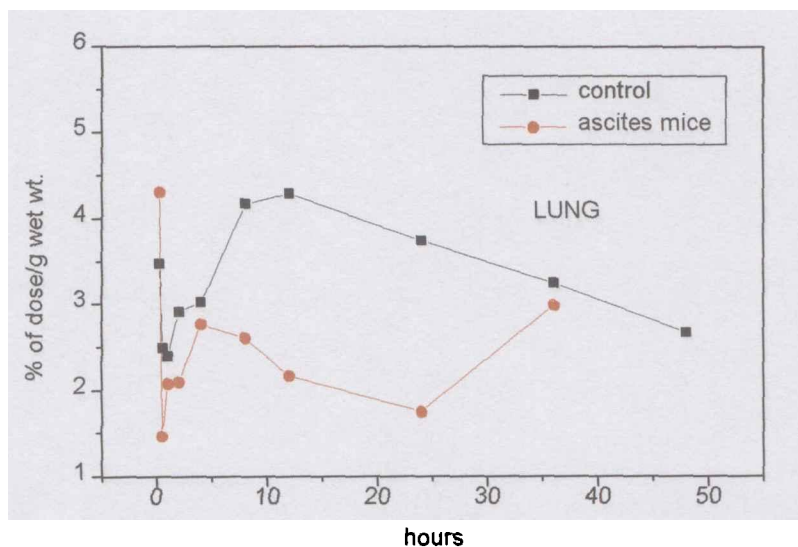


Fig. 2-7 Cu^{64} in lung tissue of normal and ascites tumor mice after iv. injection.

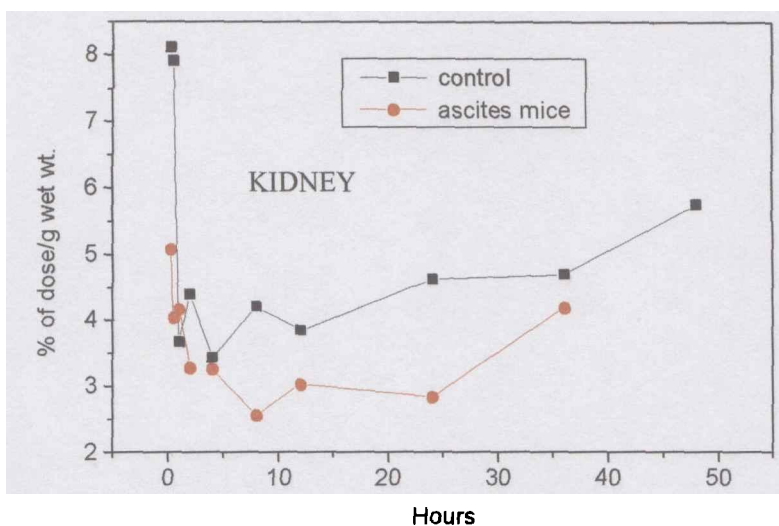


Fig. 2-8 Cu^{64} in kidney of normal mice and ascites tumor mice after iv. injection.

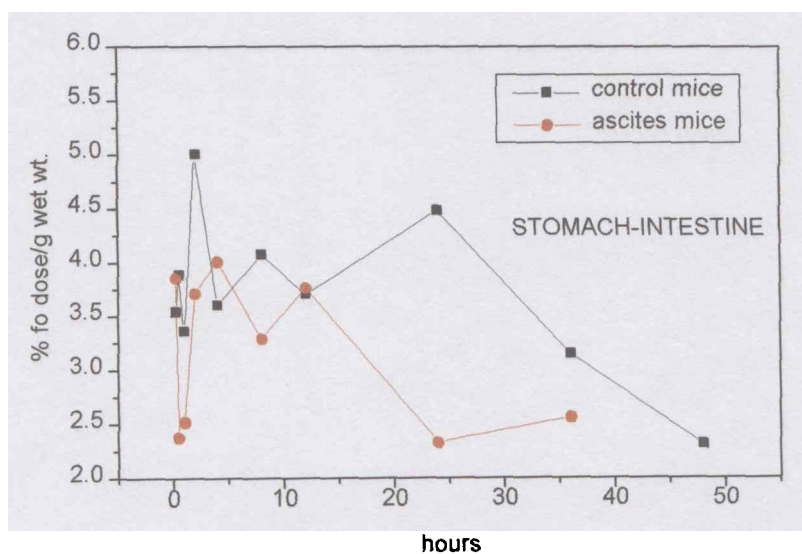


Fig. 2-9 Cu^{64} in stomach-intestine of normal mice and ascites tumor mice after iv. injection.

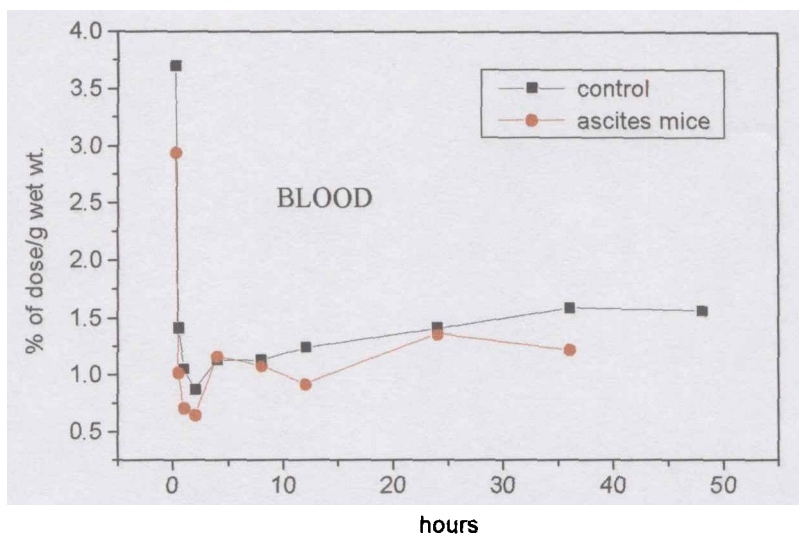


Fig. 2-10. Cu^{64} in blood of normal mice and ascites tumor mice after iv. injection.

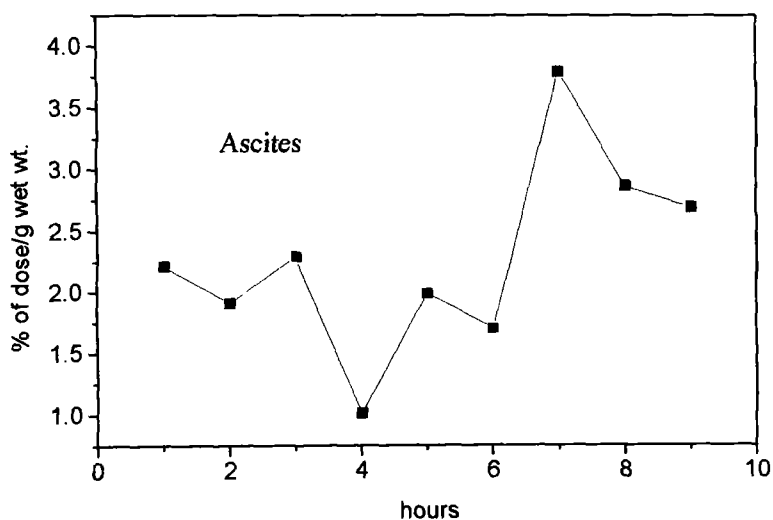


Fig. 2-11 Cu^{64} in ascites of ascites tumor mice after iv. injection.

[五] 铜诱导金属硫蛋白在组织脏器中的分布特点

在铜治疗实验性肝癌的过程中,必然伴随着肝组织金属硫蛋白的诱导合成。我们应用银饱和法测定 MT 的含量,观察了正常对照小鼠、荷瘤对照小鼠、正常小鼠口服给铜、荷瘤小鼠口服铜等四种条件下肝脏合成 MT 的情况,以了解荷瘤过程对肝脏诱导合成 MT 能力的影响,发现在不负铜的情况下,正常对照和荷瘤对照小鼠铜和 MT 的比值均约为 0.01 左右,负铜 10 天后(醋酸铜 150mg/kg/d),正常对照和荷瘤对照小鼠铜与 MT 的比值升至 0.13-0.14 左右(表 2-6,图 2-11)。结果提示荷瘤小鼠肝组织对由铜诱导合成 MT 的能力并没有受到肿瘤生长的影响。

当铜治疗组实体瘤的抑瘤率为 48.3%时,肝组织中的 MT 含量为 $426.70 \pm 16.2 (\mu\text{g/g})$,下同),明显高于对照组 380.10 ± 22.6 ($p < 0.001$) 水平,而治疗组肿瘤组织中的 MT 含量仅为 155.6 ± 16.5 ,明显低于对照组的 191.3 ± 19.3 水平 ($p < 0.05$) (表 2-7,图 2-12)。同时测定组织中的铜含量,发现治疗组肝脏和肿瘤组织中的铜分别为 64.3 ± 16.7 (ppm,下同)和 4.70 ± 0.4 ,均高于对照组 6.18 ± 0.20 和 3.30 ± 0.40 (p 均 < 0.001) (表 2-8)。计算治疗前后肝脏与肿瘤组织中的 MT 水平发现,在肝组织,每一个 Cu^{2+} 可以诱导合成 2.78 个 MT;而在肿瘤组织则不仅未见有 MT 的诱导合成,反而每一个 Cu^{2+} 消耗 408 个 MT,致使铜与 MT 形成负比值(表 2-9,图 2-13)。结果提示,肝脏组织由于铜的聚集诱导了 MT 的大量合成,而肿瘤组织则由于铜的存在不但不能诱导 MT 的合成,相反破坏了因荷瘤应激而产生的 MT,使肿瘤组织中自由的铜离子相对增多,使铜的抗癌作用得以实现。其它组织尽管在治疗前后铜的含量发生了变化,MT 的水平也有所波动但均没有统计学意义的差别。

另外,治疗组和荷瘤对照组血清铜的变化(表 2-8)很有意义,尽管其他组织在铜治疗后铜水平有所上升,但治疗组的血清铜低于荷瘤对照组铜,进一步证明荷瘤鼠血清铜升高并不是体内铜含量的过剩,相反提示是机体铜匮乏的一种征兆。

Tab. 2-6 Relationship between the changes of Cu and MT in liver(n=10)

Exp. No.	group	Cu $\mu\text{g/g tissue}$	MT $\mu\text{g/g tissue}$	Ratio (Cu/MT)
1	normal	4.08 ± 0.17	316.3 ± 4.81	0.013(1/77.5)
2	Cu to normal	58.9 ± 8.18	469.0 ± 68.7	0.13(1/7.96)
3	HepA	3.51 ± 0.22	374.6 ± 12.7	0.009(1/106.7)
4	Cu to HepA	62.1 ± 6.68	439.4 ± 21.9	0.14(1/7.08)
p				
value	<0.001	3:1,4:1, 3:2,4:2	2:1,3:1,4:1, 3:2,4:2	

Tab.2-7 Metallothionein (MT) distribution in different tissues

Organ	MT content (Ag $\mu\text{g/g tissue}$) ($\bar{x} \pm \text{SD}$)		P value
	Control	Treat	
Heart	129.6 ± 22.7	177.8 ± 28.3	<0.001
Liver	380.1 ± 22.6	426.7 ± 16.2	
Spleen	233.3 ± 53.7	157.0 ± 27.9	
Lung	183.8 ± 28.7	135.4 ± 24.2	
Kidney	195.8 ± 29.5	162.9 ± 28.4	
Stomach	108.3 ± 24.6	107.1 ± 5.6	<0.05
Tumor	191.3 ± 19.3	155.6 ± 16.5	

Tab. 2-8 Copper content(ppm) in different organ tissues (n=10)

Organ	Copper content (X ± SD)		P value
	Control	Treat	
Heart	5.20 ± 3.83	9.73 ± 4.12	
Liver	6.18 ± 0.22	64.39 ± 16.74	<0.001
Spleen	6.43 ± 1.15	7.76 ± 2.15	
Lung	3.10 ± 1.79	6.92 ± 2.57	
Kidney	5.30 ± 2.83	7.36 ± 3.31	
Stomach	2.30 ± 0.66	4.58 ± 1.23	<0.001
Tumor	3.30 ± 0.42	4.79 ± 0.42	<0.001
Serum	2.28 ± 0.01	1.91 ± 0.14	<0.05
Blood cell	0.73 ± 0.11	1.06 ± 0.22	

Tab. 2-9 Effectiveness of MT synthesis induced by copper in liver and cancer(n=10)

Exp. count	Cu	MT	Cu : MT
	μg/g tissue	μg/g tissue	
Normal	4.0±0.17	316.3±4.8	1:2.78
Cu to Normal	58.9±8.18	469.0±68.7	
HepA	1.9±0.25	316.4±46.2	1:-408
Cu to HepA	2.3±0.31	152.2±22.4	

Fig. 2-12 Relationship between the changes of Cu and MT in liver (n=10)

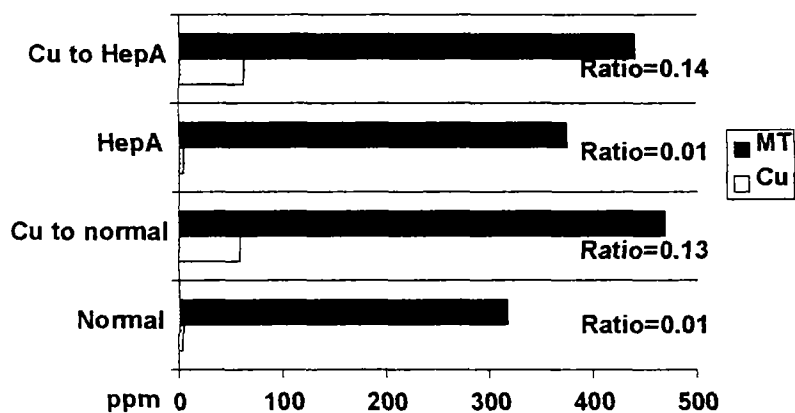


Fig. 2-13 Metallothionein(MT) in different tissues(n=10)

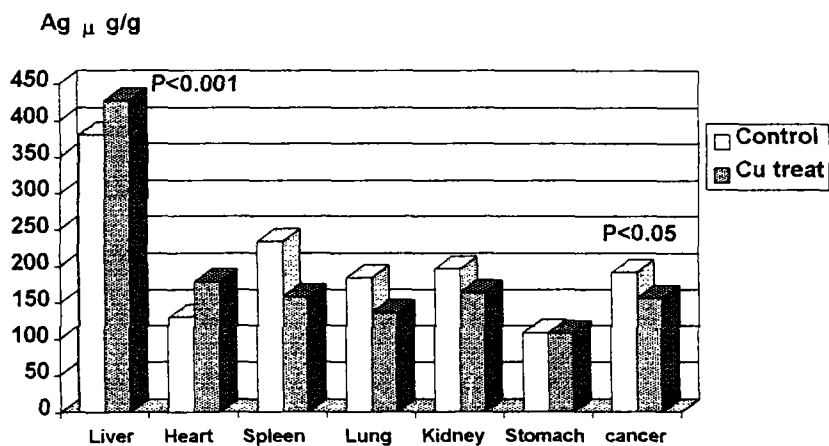
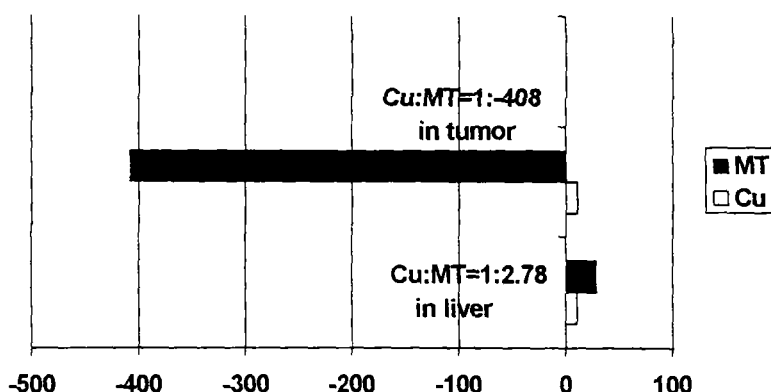


Fig.2-14 Difference effect on Cu:MT ratio in liver and cancer tissues induced by copper



[六] 铜与 MT 在细胞中的分布特点

用 Rhodanine 化学染色检测肝组织中铜的分布，结果发现铜治疗组肝组织内出现大量铜的红色颗粒，不但分布于细胞浆中，而且在细胞核中也大量出现，但肝细胞的胞膜与核膜形态结构均完好无损(图 2-15)；在铜治疗组肿瘤组织，铜颗粒也同样存在于细胞浆和核中，而且在坏死的肿瘤组织区铜的颗粒更加集中(图 2-16)；正常对照肝组织和肿瘤组织均没有检测出铜的颗粒。与此同时我们应用免疫组织化学 DAB 染色法检测了肝组织中 MT 的分布，发现在铜治疗组，铜诱导合成的 MT 棕色信号相当广泛地分布于肝组织内，尤其在汇管区和中央静脉区更加明显(图 2-17)，这一结果反映了在铜的转运通道中高浓度铜诱导合成 MT 的剂量效应。在肝细胞中，MT 不但出现在细胞浆中，细胞核中也有大量 MT 信号出现(图 2-18)，与铜颗粒分布规律相一致，证明 MT 是由铜诱导合成的。而在铜治疗组肿瘤组织，MT 染色为弱阳性或阴性，同样在正常对照肝组织和肿瘤组织 MT 也为阴性，其结果与用银饱和法测定的结果相一致。

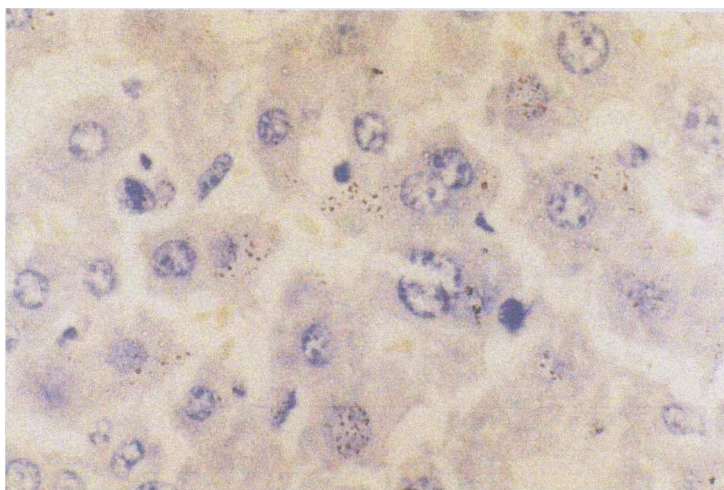


Fig. 2-15 Many copper particles stained by rhodanine appeared in liver cells(× 1000)

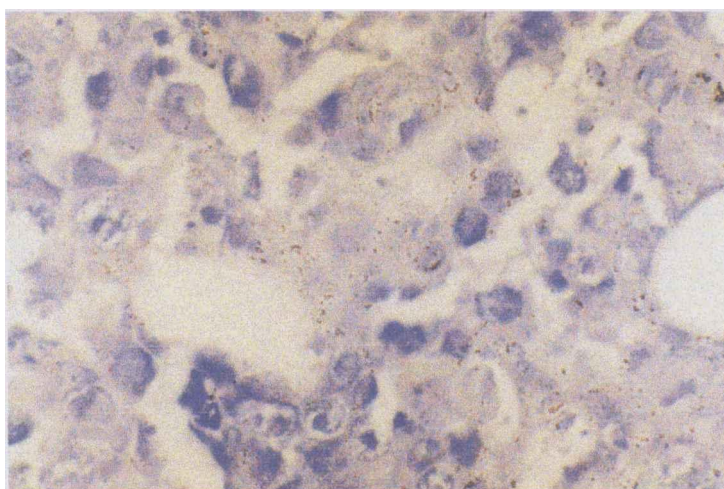


Fig. 2-16 Many copper particles stained by rhodanine appeared in tumor cells(× 1000)

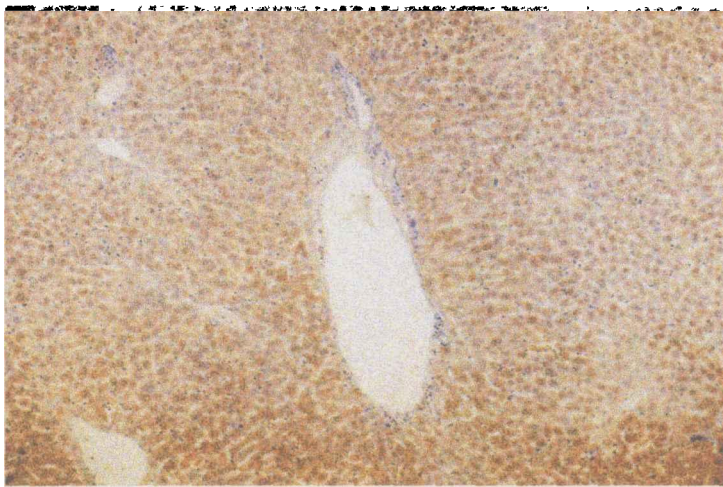


Fig. 2-17 MT appeared in liver tissue treated by copper .MT was tested by E9 monoclonal antibody stained by DAB(× 100)

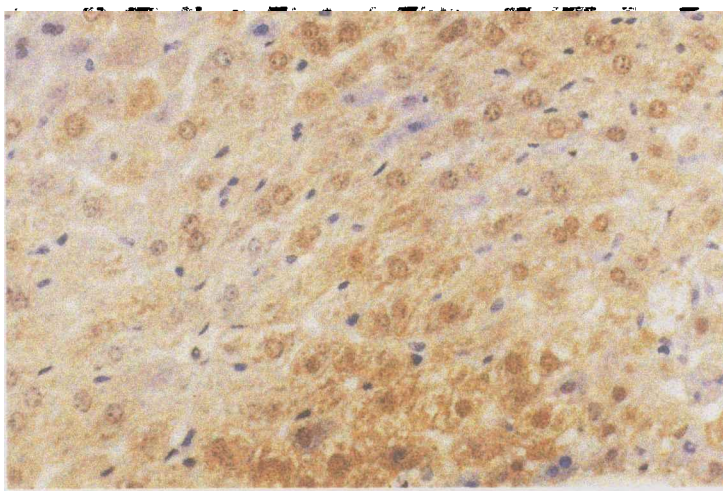


Fig. 2-18 MT located not only in plasma, but also in nuclear of liver cells treated by copper .MT was tested by E9 monoclonal antibody stained by DAB(× 400)

[七] 肝脏、肿瘤组织中 MT 金属组成特点

我们应用 G-75 柱洗脱结合原子吸收分光光度法检测了肝脏组织和肿瘤组织中的 MT 的金属组成, 发现正常对照小鼠和荷瘤小鼠肝脏 MT 的量较低, 金属离子主要以锌为主, 正常对照小鼠肝脏 MT 峰值中的锌铜比例约为 8.5: 1(图 2-19); 荷瘤小鼠肝脏 MT 峰值中的锌铜比例约为 5.75: 1(图 2-20), 提示荷瘤鼠肝脏 MT 中锌比例有所减少。在口服负铜(醋酸铜 150mg/kg/d)情况下肝脏 MT 峰的金属成分主要是铜, 正常给铜对照小鼠肝脏 MT 峰值中的锌铜比例约为 1: 62.5(图 2-21); 荷瘤给铜治疗小鼠肝脏 MT 峰值中的锌铜比例约为 1: 175(图 2-22), 是前者的 2.8 倍, 提示在荷瘤的情况下, 肝脏 MT 组成中的一部分锌被铜取代, 以适应机体荷瘤应激反应, 提供对肿瘤治疗所需的足够铜源。

小鼠尾静脉注射 ^{64}Cu 后肝脏很快有 MT 的诱导合成。我们分别选取注射 ^{64}Cu 后 4 小时的正常对照小鼠(图 2-23)和腹水癌小鼠(图 2-24), 检测结果发现, ^{64}Cu 峰与 MT 峰 Cu 的位置相吻合, 证明所形成的 MT 是由静脉注射 ^{64}Cu 诱导合成的。其肝脏 MT 峰值的铜锌比例分别为 2.27:1 和 2.12:1, 说明静脉给铜对其 MT 金属元素的组成影响不大。静脉给铜对诱导腹水癌细胞合成 MT 的能力非常有限, 几乎检测不到 MT(图 2-25)。

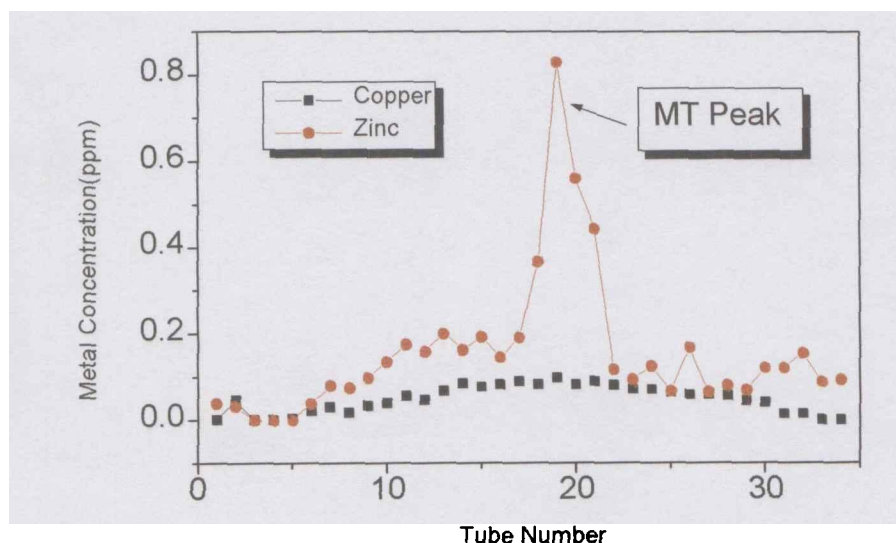


Fig.2-19 Distribution of copper and zinc in the G-75column (1.6x50cm) separated fractions of the liver in the control normal mice. Each tube was 3.5ml.

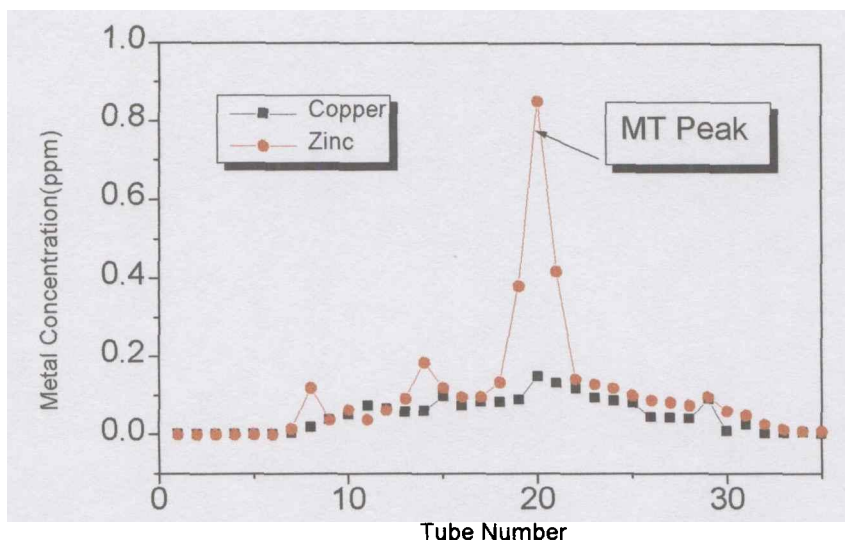


Fig. 2-20 Distribution of copper and zinc in the G-75 column (1.6x0.5cm) separated fractions of the liver in the control tumor bearing mice. Each tube was 4.0ml.

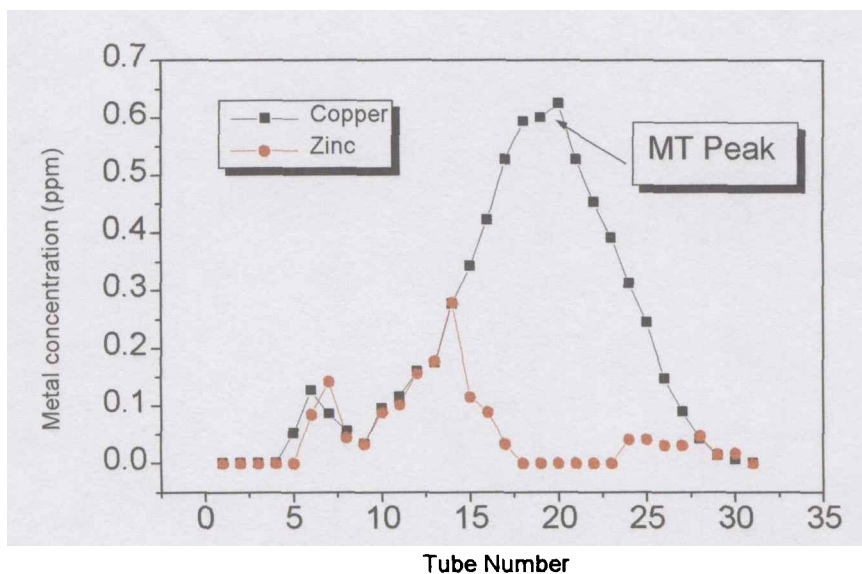


Fig.2-21 Distrubition of copper and zinc in the G-75 column (1.6x50cm) separated fractions of the liver in the normal control mice given Cu^{2+} (50mg/kg/d)for ten days .Each tube was 4.0ml.

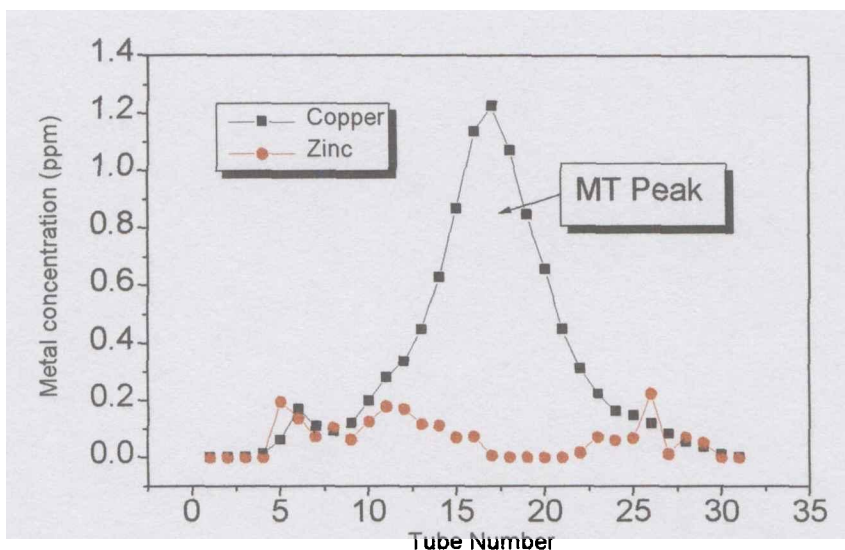


Fig. 2-22 Distribution of copper and zinc in the G-75 column (1.6x50cm) separated fractions of the liver in the tumor bearing mice given Cu^{2+} (50mg/kg/d) for ten days. Each tube was 4.0ml.

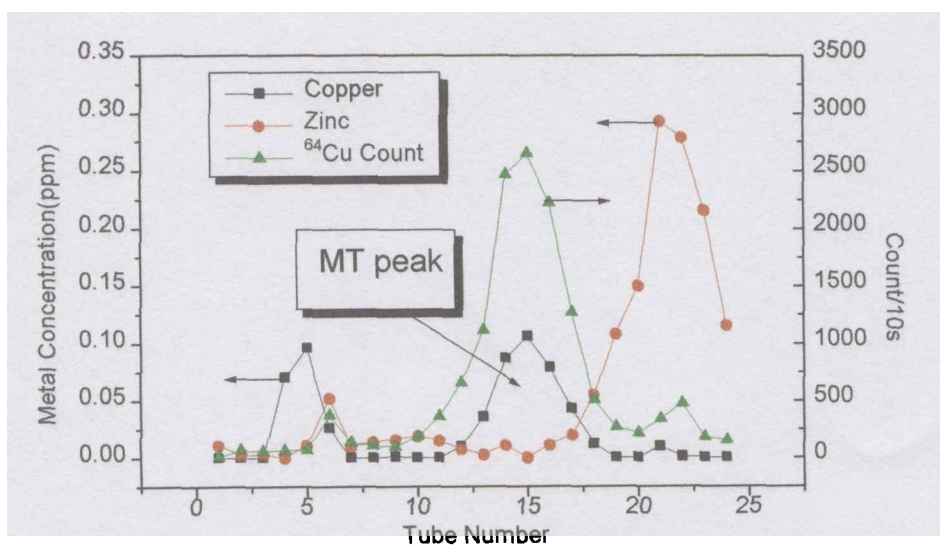


Fig.2-23 Distribution of copper, zinc and ^{64}Cu in the G-75 column (1.6x60cm) separated fractions of the liver in the normal mice killed 4 hours after given $^{64}\text{Cu}(\text{iv})$. Each tube was 3.5ml.

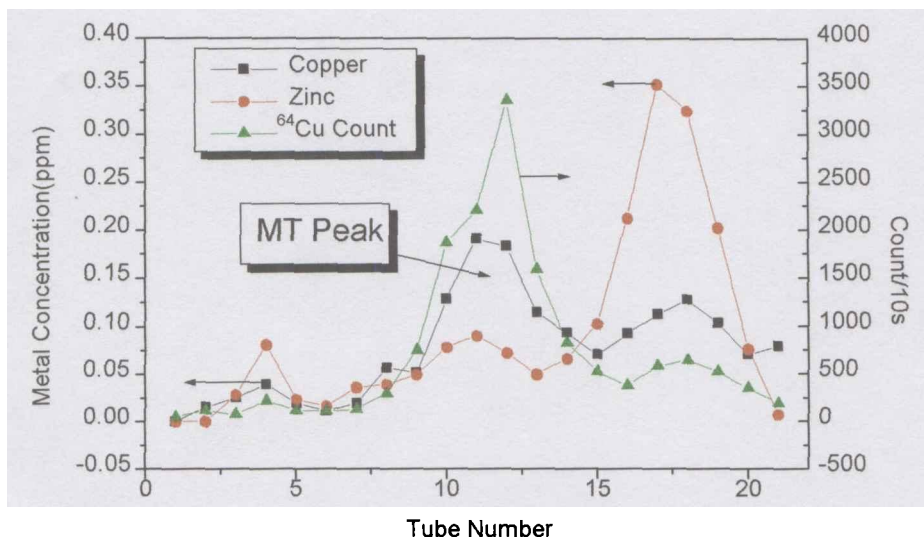


Fig. 2-24 Distribution of copper, zinc and ^{64}Cu in the G-75 column (1.6x60cm) separated fractions of the liver in the tumor bearing mice killed 4 hours after given $^{64}\text{Cu}(\text{iv})$. Each tube was 3.5ml.

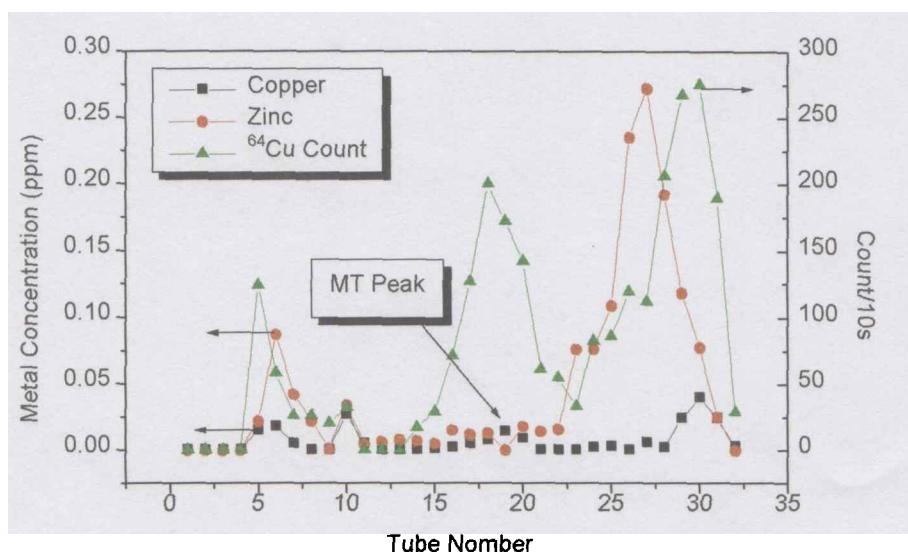


Fig.2-25 Distribution of copper, zinc and ^{64}Cu in the G-75 column (1.6x60cm) separated fractions of the acesite H22 cells in the mice given $^{64}\text{Cu}(\text{iv})$. Each tube was 4.0 ml

[八] 腹腔注射 MT 的分布转运特点

为了探讨 MT 在体内的分布代谢特点, 我们应用 ^{125}I 标记的 MT 注射到腹水癌小鼠的腹腔中, 发现 ^{125}I -MT 极其优先地富集在肾脏 (图 2-26), 而在肝脏中的水平是意外的低, 低于在腹水及癌细胞中的 MT 量, 也低于进入血中的水平 (图 2-27)。在注射后 1 小时, 肾脏中的 ^{125}I -MT 为 7.22 (单位: % of $\mu\text{Ci/g. tissue}$, 下同), 肝脏为 0.45, 胃肠为 1.27, 腹水为 5.07, 癌细胞为 2.18, 血清为 0.82; 注射后 4 小时, 肾脏为 8.18, 肝脏为 1.01, 胃肠为 3.18, 腹水为 3.21, 癌细胞为 1.28, 血清为 1.14; 注射后 12 小时, 肾脏为 2.42, 肝脏为 0.06, 胃肠为 0.30, 腹水为 0.43, 癌细胞为 0.33, 血清为 0.41。MT 这种脏器分布特点似乎反映了肝脏仅是 MT 的诱导合成器官, 肝脏对外源完整的 MT 的亲和能力是低下的, 而肾脏则是 MT 代谢转运的主要器官, 具有较高的亲和能力。

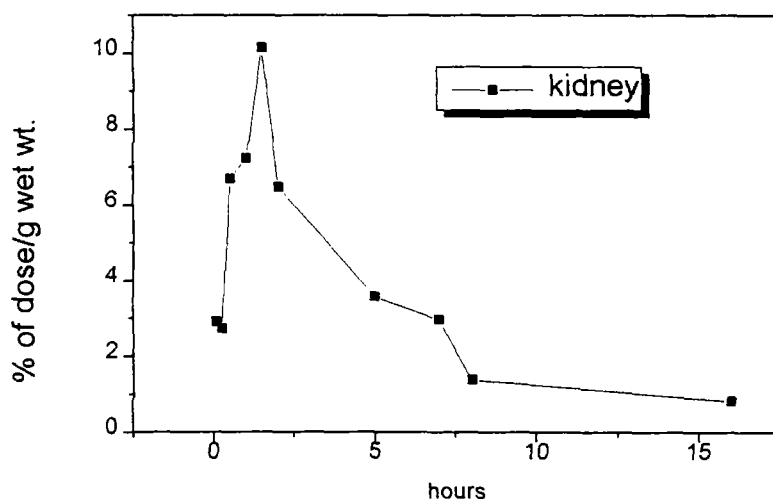


Fig. 2-26 Kinetic distribution of ^{125}I -MT in kidney of ascites mice

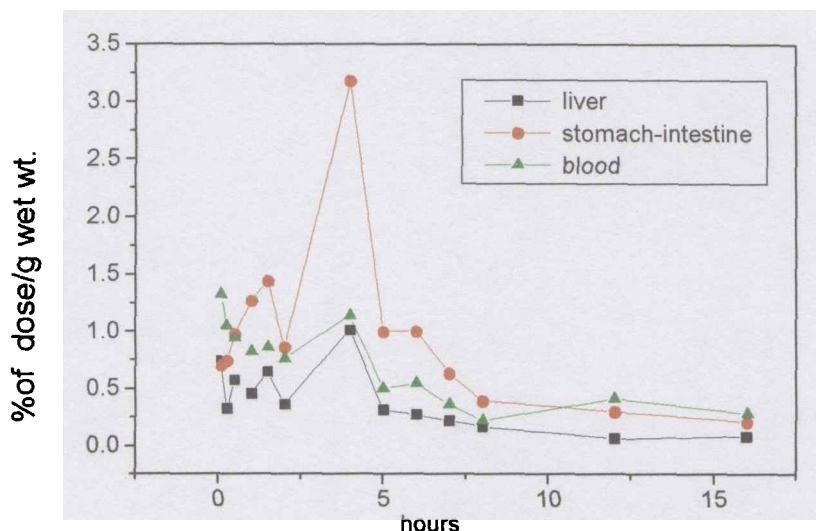
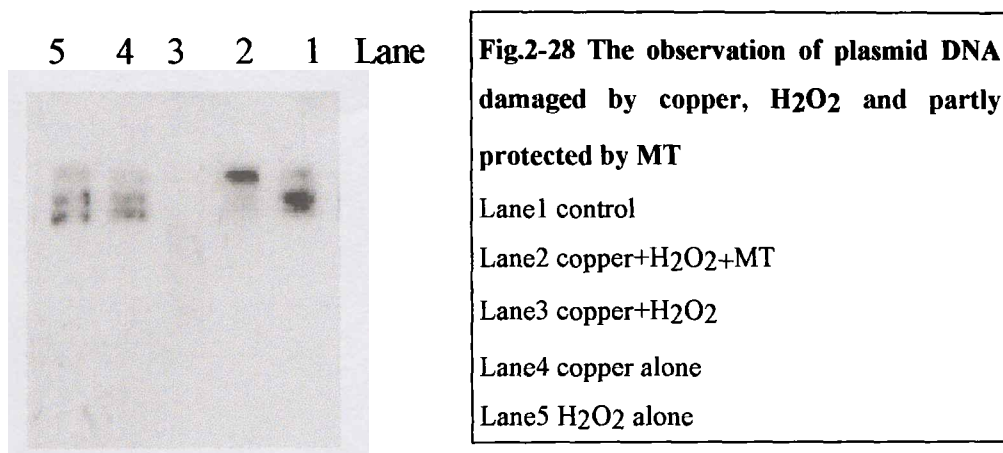


Fig. 2-27. Kinetic distribution of ^{125}I -MT in liver, stomach-intestine and blood of ascites mice

[九] 铜与过氧化氢对质粒 DNA 的损伤及 MT 的保护作用

铜的细胞毒作用一般认为是通过铜在体内由 $\text{Cu}^{2+} \leftrightarrow \text{Cu}^{1+}$ 价位转换过程中产生的羟自由基实现的。我们应用 C-myc 质粒 DNA 作为靶 DNA，通过铜与过氧化氢体系生成羟自由基对 DNA 产生的损害了解体内铜对 DNA 的损伤情况，并同时观察 Zn-MT-II 清除羟自由基，保护 DNA 的能力。通过测量 DNA 电泳的相对迁移距离的大小来反映 DNA 损伤的轻重程度，DNA 损伤越重，质粒 DNA 被分解的片断越小，分子量也越小，相对迁移距离越大，甚至于弥散为连续的小片段。



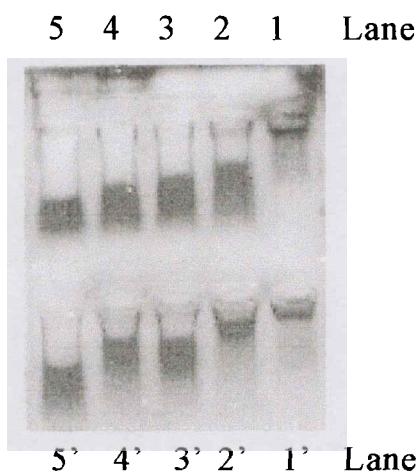


Fig.2-29 Plasmid DNA were damaged by different concentration copper (C)

Lane 1,Lane1'control plasmid DNA

Lane 2 C3.125 μ M

Lane 3 C6.25 μ M

Lane 4 C12.5 μ M

Lane 5 C25 μ M

Lane 2',3',4',5'+MT(5 μ M)

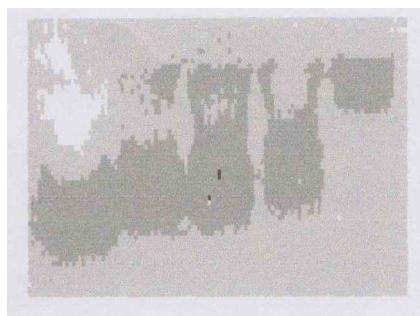


Fig. 2-30.The relationship between temperature and DNA damage in Cu plus H₂O₂ system.

Lane 1 control; Lane 2 0 °C;

Lane 3 4 °C; Lane 4 15 °C;

Lane 5 37 °C

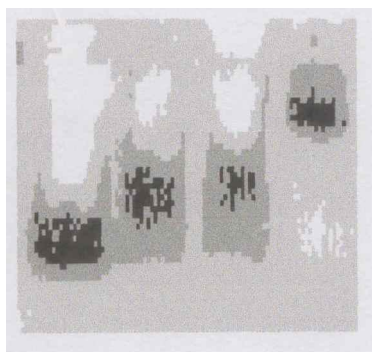


Fig. 2-31 The protective effect of MT to DNA damage caused by Cu (25 μ M) plus H₂O₂ in vitro

Lane 1 control; Lane2 M10; Lane 3 M5; Lane 4 2.5M

Fig 2-28 显示在室温 30min, 单独铜 ($\text{Cu } 3.125\mu\text{M}/2\mu\text{l}$) 和单独过氧化氢(30%/2 μl)都没有造成对 C-myc 质粒 DNA 损伤, 仍电泳为三个条带; 但铜和过氧化氢联合作用时, DNA 被全部分解为弥散的小片段; 反应体系加入 MT ($2.5\mu\text{M}/2\mu\text{l}$), 则 DNA 的损伤得到部分的保护, 仍有部分被分解为弥散的小片段。Fig. 2-29 显示在 4 °C、30 分钟相同的反应体系中, 不同浓度铜对 DNA 的损伤情况。通过测量 DNA 电泳的相对迁移距离, 发现小浓度的铜 ($3.125\mu\text{M}/2\mu\text{l}$) DNA 的相对迁移距离为 7mm , 而 $25\mu\text{M}/2\mu\text{l}$ 铜 DNA 的相对迁移距离为 11mm , 平均迁移距离为 $8.0\pm 2.58\text{mm}$, 铜浓度与 DNA 的相对迁移距离之间存在线性正相关 ($r=0.98, p<0.005$) , 提示随着铜浓度的增加, DNA 被损伤的程度也越大。而在相同反应体系中加入 $5\mu\text{M}/2\mu\text{l}$ MT 后, DNA 电泳的相对迁移距离减少为 $4.75 \pm 2.50 \text{ mm}$, 说明 MT 在体外确有一定的保护 DNA 免受自由基损伤的作用, 但铜浓度与 DNA 的相对迁移距离之间仍然存在线性正相关 ($r=0.96, p<0.01$) (表 2-10 , 图 2-32) 。 Fig.2-30 反映在相同的反应体系中, 不同浓度 MT 保护 DNA 免受自由基损伤的剂量效应。结果发现随着 MT 浓度的成倍增加, DNA 的相对迁移距离相应缩短, MT 浓度与相对迁移距离之间存在线性负相关 ($r=-0.98, p<0.05$) (表 2-11 , 图 2-33) 。提示在体外, 随着 MT 浓度的增加, MT 对 DNA 有更好的保护作用。另外, 我们还观察了温度对该反应体系的影响 (图 2-31) , 实验结果发现随着温度的逐渐升高, 反应强度增加, 对 DNA 的破坏作用也逐渐加大, 温度与 DNA 电泳距离呈线性正相关 ($r=0.995, p<0.005$) (表 2-12 , 图 2-34) 。

实验结果提示, 铜对 DNA 的损伤强度随着温度的升高、铜离子的浓度增加而逐渐加强。 Zn-MT-II 具有一定程度的抗自由基对 DNA 的损伤作用, 随着 MT 浓度的逐渐加大, 保护作用也相应增加, 但这种保护作用是有限的, 不能完全避免铜与过氧化氢对质粒 DNA 的损伤。

Tab.2-10 The effect of copper concentration on DNA damage and metallothionine protect to DNA in vitro

Cu ²⁺ +MT (μM)	Electrophoresis gap(mm)	average gap (mm)	t test	related test	
control	0	8.0±2.58	p>0.05	r=0.98 p<0.005 y=2.763+0.388x	
C3.125	5				
C6.25	7				
C12.5	9				
C25	11				
control	0	4.75±2.50			r=0.965 p<0.01 y=1.025+0.296x
C3.125+M5	2				
C6.25+M5	4				
C12.5+M5	5				
C25+M5	8				

Tab.2-11 The protective effect of MT concentration to DNA damage caused by Cu²⁺ and H₂O₂ in vitro

MT+Cu ²⁺ (μM)	Electrophoresis gap(mm)	average gap (mm)	related test
control	0		r=-0.98
M10+C25	5	7.0±2.0	p<0.05
M5+C25	7		y=9.998-0.514x
M2.5+C25	9		

Tab. 2-12 The effect of temperature on DNA damaged by Cu²⁺ and H₂O₂ in vitro

temperature ℃	Electrophoresis gap(mm)	average gap(mm)	related test
control	0		
0	4	6.0±2.16	r=0.995
4	5		p<0.005
15	6		y=4.18+0.13x
37	9		

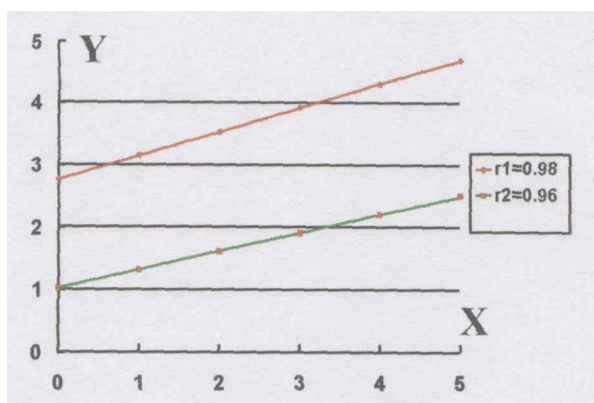


Fig.2-32 The relationship between DNA electrophoresis gap and Cu^{2+} concentration in Cu^{2+} and H_2O_2 system

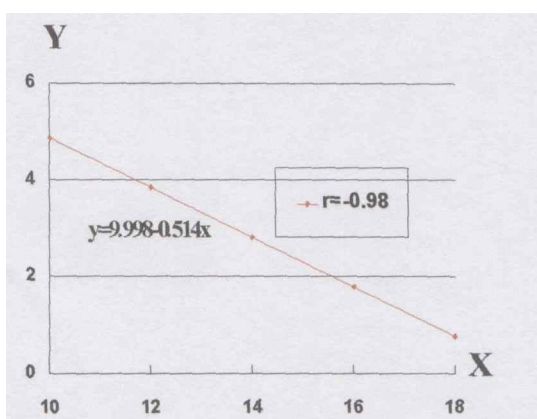


Fig.2-33 The relationship between MT concentration and DNA electrophoresis gap in Cu^{2+} and H_2O_2 system

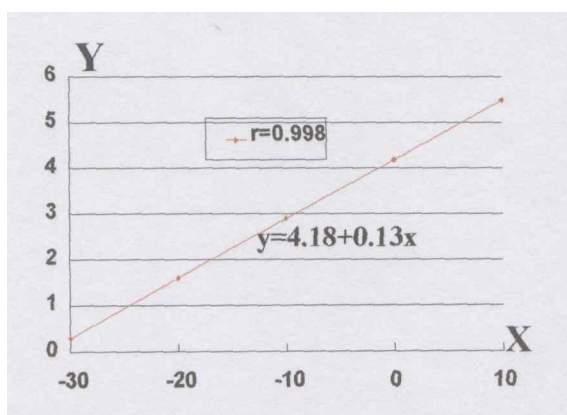


Fig. 2-34 The relationship between temperature and DNA electrophoresis gap in the Cu^{2+} and H_2O_2 system

三、讨论

【一】铜治疗实验性肿瘤过程中的毒性

铜作为机体必需的微量元素之一与机体的许多生理生化功能密切关联,但用铜作为药物治疗肿瘤显然超越了其生理意义的范畴,伴随而来的毒副作用一直是人们所关心的。首先,我们认为铜作为抗肿瘤物质与其他抗肿瘤的化疗药物一样是有一定毒性的,因为只有通过细胞毒性作用才能抑制肿瘤细胞的生长,直接杀死肿瘤细胞,也才能诱导细胞的程序性死亡。第二,铜的毒性也是有限的,尤其在肝脏,通过诱导 MT 的合成而发挥解铜毒的作用,这与放化疗过程有根本的不同,这也就是中医所认为“微毒”的机理。我们的实验已经说明在一定的时间、一定的剂量下铜对肝功能、肾功能、外周血没有影响,该结果与 Sukanwara 对 LEC 大鼠研究的结果相似。他们发现,尽管 LEC 大鼠中肝细胞中铜含量高达 $227.5 \pm 21.6 \mu\text{g/g}$ 组织,比正常对照 Fischer 大鼠肝细胞中铜 $5.2 \pm 0.1 \mu\text{g/g}$ 高出 43 倍,其 SGPT、SGOT 及 BUN、CRE 等肝肾功能指标仍然没有受到影响[13],可见机体对铜的耐受能力是非常强大的。但不同的是,对正常人而言,通过胆道系统排除铜是主要的途径,和 LEC 大鼠先天性胆道系统发育不完善,以至铜在肝脏中大量累积有本质的区别。尽管这样,在考虑用铜作为治疗肿瘤的药物时,掌握使用的时间和剂量仍然是必须的。

【二】血清铜的升高在肿瘤生长过程中的意义

国内外大量资料证实,消化、呼吸及神经系统的恶性肿瘤患者血清铜、铜锌比值增高[14]。Miatto 等研究了 36 例原发性肝癌(4 例胆管细胞癌,32 例肝细胞癌其中 10 例伴有肝硬化)和 47 例肝硬化患者,发现肝癌患者血清铜为 $47.17 \mu\text{g/dl}$,显著高于肝硬化的 $25.90 \mu\text{g/dl}$ ($p < 0.001$),9 例肝癌患者肿瘤切除后,血清铜下降;但另 5 例病情发展,血清铜水平升高。存活期长的病人血清铜水平低,提示血清铜水平可作为早期肿瘤监测的一种筛选方法。作者认为血清铜水平 $160 \mu\text{g/dl}$ 可作为监测肝癌的阈值[15]。

本实验的结果表明,小鼠荷瘤 10 天后,血清铜水平明显比正常对照组高,与有关报道相符。但肝脏,胃肠组织的铜含量明显降低,而脾脏、肾脏铜含量有所升高,可见荷瘤小鼠随着时间的推移,体内铜的分布发生了变化,血清铜的升高仅是整体变化的一部分。铜的重新分布显然是荷瘤的

结果,可能是一种有利于肿瘤生长的继发性病理变化,对正常机体则可能会造成伤害,尤其肝脏组织铜的降低,显然会引起诸多需铜酶合成的减少或酶活性的降低,从而影响机体正常生理功能的发挥。张宏印[16]等人研究证实,荷瘤鼠肝细胞含铜细胞色素 C 氧化酶比活性明显低于正常对照组。Harris[17]等研究认为,铜锌 SOD 的功能活性是由铜决定的,限制食物铜能迅速地损害许多组织铜锌 SOD 的催化活性。可见正常组织器官铜亏耗对需铜酶功能活性影响非常大。我们的实验发现,血清铜的含量在铜治疗组明显低于荷瘤对照组 ($p<0.05$)。我们认为血清铜的升高只是体内铜重新分布、转运过程中的过渡性变化,既是肿瘤生长所必需,又是以肝脏、胃肠等重要组织铜不断耗竭为代价的虚假的“铜过剩”表现,可能是肿瘤后期导致机体衰竭的重要原因之一。血清铜的升高并非意味机体总铜的增多,相反表明机体处于相对的铜饥饿状态,动物负铜治疗后血清铜不但不升高反而降至正常水平即是很好的佐证。

【三】铜在荷瘤动物组织细胞中的分布规律

荷瘤小鼠口服醋酸铜后铜的动态分布规律因组织不同而异。铜高值出现在半小时到 2 小时的组织有心脏、脾脏、肺脏、肾脏、胃肠等,血细胞在半小时出现最高值,肿瘤组织在 2 小时为最高值,血清在 5 小时出现最高值,而肝脏在 12 小时仍然在富集铜。

肿瘤组织基础的铜水平与其他组织相比处于明显的低值,而且给铜后组织铜的变化表现相对的平稳,说明在组织生长过程中需要铜,但非常有限,属微量元素范畴。另外,在出现铜的高值时同时出现特别高水平的锌值(51.33/13.94,相当正常水平的 4 倍),表明肿瘤组织对高铜有较强的敏感性,较低的存储和耐受能力,这可能就是含铜药物治疗肿瘤需要长期用药的病理生理根据。关于锌铜比值变化的机制和意义有待进一步研究。

^{64}Cu 尾静脉注射到腹水癌小鼠后各个组织脏器的分布规律证明了给药方式的差异可以引起不同的变化,但均表明肝脏是铜的主要富集器官。不同的是,口服负铜时实体瘤组织富集的铜较少,2 小时即达到极值,随后下降;而静脉负铜时,腹水中的铜含量随着时间的推移不断升高,最后大部分铜均聚集在癌细胞中。表明不同的给铜途径,使铜在机体组织中分布代谢出现不同的特点,因此尚需要进一步研究最佳的给铜途径以取得最佳的治疗效果。

关于铜在肿瘤细胞中的分布,我们应用组织化学方法发现,铜的颗粒不但分布在胞浆中,而且在细胞核中也出现铜的积聚,尤其在坏死的部位更为集中,这一变化可作为铜对癌细胞起直接杀伤作用的佐证。有意思的是,铜的颗粒也分布在肝细胞的胞浆和核中,但是肝细胞的形态结构均是完整的,说明了正常肝细胞和肝癌细胞对铜的不同反应状况和耐受能力,从细胞形态学方面更明确地了解铜的抗癌作用与机体自我保护作用的相对统一性。

[四] 铜抗肿瘤过程中 MT 的组织细胞分布

在铜的抗癌过程中, MT 的诱导合成及其作用是非常重要的。MT 是一种小分子蛋白质,含有 61 个氨基酸,其中约三分之一是半胱氨酸,缺少赖氨酸和其他的芳香族氨基酸,由于其特殊的组成结构, MT 具有(1)螯合金属离子,调节金属离子在体内的平衡、代谢、及转运作用[18]; (2)具有较强的清除自由基作用,尤且对羟自由基的清除作用是 SOD 的 675 倍[19]; (3)有良好的热稳定性, 85℃ 存在 10 分钟不被破坏,因此常应用加热法和其他蛋白进行分离[20]; (4)在各种应激条件下(如物理、化学应激、重金属中毒)易于被诱导合成,因此 MT 又被称为“应激蛋白”[21]。

我们应用银饱和法测定了铜治疗后荷瘤小鼠组织中的 MT 水平。银饱和法是 Scheuhammer 和 Cherian 在 1986 年建立[22], Bienengraber 等 1995 改进的,比镉饱和法灵敏可靠[23]。实验结果显示,在铜有效的抗癌情况下,口服醋酸铜可以诱导肝脏组织合成大量的 MT,而荷瘤对照组则明显低于治疗组。令人感兴趣的是肿瘤组织中的 MT 水平,荷瘤治疗组比荷瘤对照组低。但 AAS 测定微量元素铜的结果显示,无论肝脏组织还是肿瘤组织,治疗组铜都比对照组高。进一步研究发现在肝组织每一个 Cu^{2+} 可以诱导合成 2.78 个 MT,而肿瘤组织每一个 Cu^{2+} 可以消耗 408 个 MT,使肿瘤组织中自由的铜离子相对增多。这样,尽管治疗组肝脏中含有大量的铜,但通过 MT 的合成,有效地防止铜的毒性。肿瘤组织由于相对升高的铜水平和较低的 MT 水平,发挥了铜的抗癌作用。

关于肿瘤组织中 MT 诱导合成的报道很多,在甲状腺癌、精原细胞癌、唾液腺癌、膀胱癌、乳腺和大肠腺癌都有 MT 的表达,而且认为 MT 的高表达与肿瘤组织的抗药性有关[24]。但诱导肿瘤组织 MT 表达的因素目前

还不清楚,可能与各种物理或化学应激有关,尤其与肿瘤发生发展过程中各种细胞因子的刺激有关。因为有报道白细胞介素 1, 6、肿瘤坏死因子[25-26]等都可以诱导 MT 的合成,而且 MT 中的金属主要以锌为主。我们应用 ^{64}Cu 示踪法结合 G-75 柱洗脱和原子吸收分光光度法检测了 MT 的金属组成,发现正常对照小鼠肝脏 MT 中 Zn/Cu 比例约为 8.5: 1, MT 的量很低;在负铜情况下肝脏 MT 峰值的金属成分主要是铜, Zn/Cu 比约为 1: 62.5;在荷瘤的情况下,小鼠肝脏 MT 中 Zn/Cu 比例约为 5.75: 1。通过 ^{64}Cu 示踪法同样发现,在注射 ^{64}Cu 4 小时后的肝脏淋洗图中,荷瘤小鼠肝脏中 MT 的 Zn/Cu 比约为 2: 1,与正常对照小鼠相似。

应用免疫组织化学 E9-MT1 单克隆抗体 DAB 显色,我们检测了 MT 在肝细胞中的分布,发现治疗组肝细胞中 MT 的分布与铜的分布基本一致,不但胞浆中有 MT 颗粒,细胞核中也分布有大量的 MT,与 Panemangalore (1983)Elemer (1987)报道在胎儿或新生大鼠的肝细胞核中有铜 MT、负铜大鼠的肝细胞核中有铜 MT 的阳性染色颗粒的结果一致[27-28]。对照组肝细胞和肿瘤细胞中 MT 的阳性颗粒较少或呈阴性。有研究指出[29],给铜的途径也影响着 MT 的合成。肌肉注射铜能够很容易诱导合成 MT,而且肝脏中差不多一半的铜以 MT 的方式存在;如果经口给铜,只有肝脏中的铜的浓度达到 $600\mu\text{g/g}$ 才能诱导合成 MT,而且也只有少量的铜与 MT 结合。肝脏如此,对于肿瘤细胞而言,通过口服铜诱导 MT 的能力必然显得更弱。

[五] MT 在肝肾、肿瘤组织中的意义

肝脏中 MT 的高表达对保护肝脏是非常重要的。大量的资料证实 MT 有很强的清除自由基作用,尤其对羟自由基的清除能力是 SOD 的 675 倍。我们的实验结果也证实 Zn-MTII 能有效地保护质粒 DNA 免受铜和过氧化氢生成的羟自由基的损害,而且其保护能力与 MT 的浓度呈正相关,MT 浓度越大,对自由基的清除能力也越强。Suganwara, N 发现即使 LEC 大鼠中肝细胞中铜含量达 $227.5\pm 21.6\mu\text{g/g}$ 组织,比正常对照 Fischer 大鼠肝细胞中铜 $5.2\pm 0.1\mu\text{g/g}$ 高出 43 倍时,SGPT、SGOT 及 BUN、CRE 等肝肾功能指标均没有受到影响,在 LEC 大鼠肝细胞浆中,96%的铜、66%的锌是与 MT 结合的,MT 的铜锌比值在 LEC 大鼠中是 $5.9\pm 0.1/1$,而正常

Fischer 大鼠仅为 $2/7.1 \pm 0.8$ ，说明 LEC 大鼠通过 MT 的合成在一定程度上保护了肝脏[28]。在体外实验研究中，Wallace[29]等用高表达的 MT 载体转染到中国仓鼠卵巢细胞中，分别比较了 MT 与铜和铁对细胞 DNA 的损伤情况，发现在有 MT 高表达的细胞中 DNA 损伤非常少，而几乎没有 MT 表达的野生型细胞株 DNA 受到铜的损伤非常严重，铁对各种细胞（无论是否有 MT 的表达）的损伤情况基本一致。他们认为大量的 MT 的表达稳定了铜（一价）的状态，阻止了铜参与氧化还原反应及 Fenton's 反应，因而避免了羟自由基的形成，保护了 DNA。铁则不存在这种机制。结果证明机体尤其是肝脏通过诱导合成 MT 减低了铜对机体的损伤，阐发了铜“微毒”的现代生理病理学特性。

关于对肾功能的保护作用，可能是通过两方面的机制实现的。我们的实验结果表明，在口服给铜过程中，给铜组铜水平与对照组相比尽管略有升高，但并没有统计学差异，证明肾脏累积的铜较少；另一方面，也可能是通过 MT 实现的。很早就有人证实通过皮下注射铜可以诱导肾脏 MT 的合成[30]，而且 Piscator 在六十年代就发现肝脏合成的铜 MT 可以通过血液循环转移到肾脏[31]。Bremner 也认为铜 MT 可以象铜 MT 一样通过血液循环转移到肾脏[32]，而且，在大鼠皮下注射铜 MT 后，MT 也极其优先地转移到肾脏[33]。我们应用 ^{125}I -MT 注射到腹水癌小鼠的腹腔中，发现 MT 极其优先地富集在肾脏，而到肝脏的 MT 水平最低。反映了肝脏仅是 MT 的诱导合成器官，肝脏对外源完整的 MT 的亲和能力是低下的，而 MT 确实可以通过血液循环转移到肾脏，肾脏则是 MT 代谢转运的主要器官，具有较高的亲和能力。所以，铜离子和 MT 分布代谢的特异性，使 MT 对肾脏的保护作用得以充分发挥。

对于铜治疗的肿瘤组织，我们已经知道，铜的进入不但不能诱导 MT 的合成，反而一个 Cu^{2+} 消耗 408 个 MT，明显降低了肿瘤组织原有的 MT 水平，而铜离子的含量相对明显升高，使铜的抗癌作用得以发挥。但肿瘤细胞中 MT 的表达与铜抗癌之间的关系尚需进一步研究。

【参考文献】

- [1]曹元宁 辑注 <<本草经>>。上海科学技术出版社出版,1987 年 11 月第一版。26-29 页。
- [2]江苏新医学院 中药大辞典（缩印本），上海科技出版社，1986 年 5 月第一版，1992 年第

五次印刷 P 2162

[3]江苏新医学院 中药大辞典 (缩印本), 上海科技出版社, 1986 年 5 月第一版, 1992 年第五次印刷 P 2162

[4]江苏新医学院 中药大辞典 (缩印本), 上海科技出版社, 1986 年 5 月第一版, 1992 年第五次印刷 P 2162

[5]孙汉文 原子吸收光谱分析技术. 中国科学技术出版社, 1992 年 1 月第 1 版, P286-294

[6]Lindquist, R. R. *Arch. Path.* 1969;87: 370-379.

[7]Fuller C. E., Elmes M.E. and Jasani B. *J. of Pathology* 1990;161:167-172.

[8]Bienengraber M, Fordekunz S, Klein D, et al. *Analytical Biochemistry*, 1995; 228:69-73.

[9]Bremner I., and Marshall, R. B.. *Br. J. Nutr.* 1974; 32:283-291.

[10]Kimura, M, Otsu, N. and Imano, M 1979 in *Metallothionein* (Kagi, J. H. R. & Nordberg, M. eds) P163-168, Birkhauser. Basel.

[11]Poe, N. D., Robinson G. D. and Zielinski F. I. W. *J. Nucl. Med.* 1976; 535:17-13.

[12]Sagripanti J. and Kraemer K. H. *The J. Biol. Chem.* 1989; 264:1729-1734.

[13]Suganwara, N, Suganwara, C. and Kataura, M. et al. *Experientia* 1991; 1060-1063.

[14]顾公望 国外医学医学地理分册. 1991;12(3):97-99 .

[15]Miatto, O. Casaril M, Gabrielli GB. et al *Cancer*. 1987; 60 (60): 1269-1273.

[16]张宏印,等. 中日友好医院学报. 1995;9(3):128-130.

[17]Harris, E.D. 孔令洪译. 国外医学医学地理分册. 1993;14(2):74-75.

[18]Hoh D, Magor J., Webb M. *Chem. Biol. Interact.* 1980; 32: 125-135.

[19]Thornalley P. J, Vasak M.. *Biochem. Biophys. Acta.* 1985;827:36-44.

[20]Webb M. *Biochem. Pharmacol.* 1972;21:2751-2765.

[21]McCormick C. C, Golenboski K.A, Fleet, J.C. et al. *FASEB J.* 1988;2:A865.

[22]Scheuhammer A.M, Cherian M.G.. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1986;82:417-425.

[23]黄国健,周舒 中日友好医院学报. 1996;10(2):180-182 .

[24]Cousins, R.J., and Leinart, A.S. T. *FASEB J.* 1988; 2:2844-2890.

[25]Sato M. and Sasaki M. *Int. J. Immunopharmac.* 1994;16(2):187-195

[26]Panemangalore E. M. , Banerjee D. and Onosaka. S. et al. *Dev. Biol.* 1983; 97:95-102.

[27]Elmes M., Haywood , S. and Clarkson, J. P. et al (1987) *Proceedings , TEMA-6 Conference, California*"

[28]Wake, S.A. Mercer, J.F.B. *Biochem. J.* 1985;228:425-432

- [29]Wallace S.M., Arthur, J. R. and Bremner I. et al *Biochemical Society Transactions* (1996) 24,539S, 4th IUBUM Conference (abstracts) ,U. K.
- [30]Bremner, I., Hoekstra, W. G. and Davies, N. T. *Biochem. J.* 1978;174: 883-892.
- [31]Piscator, M. Piscator, M. *Nord. Hyg. Tidskr.* 1964;45: 76-82
- [32]Bremner I.& Young B. W. *Br. J. Nutr.* 1977;36: 551-561
- [33]Bremner I. Hoekstra, W. G. and Davies, N. T. et al *Chem-Biol. Interact.* 1978; 23: 355-367.

第三部分 MT 基因表达与铜抗癌作用

引言

MT 的表达对于肿瘤治疗的利弊已经引起人们广泛争论和关注, 许多人认为肿瘤细胞中 MT 的高表达不利于肿瘤的放化疗, 将其归入耐药基因范畴[1]。我们的实验发现在铜有效治疗实验性肝癌过程中, 肝组织中 MT 含量明显升高, 而肿瘤组织中 MT 含量却显著下降, MT 与铜之间的关系耐人寻味, 为此我们将人 MT-II 基因转入人 7402 肝癌细胞, 以了解肿瘤细胞内高表达的 MT 对铜抗癌作用的影响。

一、实验材料与方法

[一] 实验材料

1 细菌

E.Coli H B 101, 北京医科大学病理系肿瘤研究室提供。

2 质粒

pBacNeo: 含有部分 PBR322 片断, 可在 E.Coli 中复制, 并具有 Amp 抗性。由早期 SV40 启动子驱动的 E.ColiNeo 基因使得该质粒转染的细胞能在 G-418 选择培养基中生长。pBacNeoMT II -A: 由 β -Actin 启动子驱动的全常人 MT II -AcDNA 克隆在 pBacNeo 质粒上。

上述质粒由美国纽约医学院 Dr. Prter J. Sciavolino 惠赠, 第四军医大学邓欣珠博士转赠。

3 酶

限制性内切酶 (BamH- I ,EcoR- I) Promega

RNase, 蛋白酶 Merck

4 同位素

α -³²P d CTP 亚辉公司

5 探针

β -actin 2.0kp 天象人生物工程公司

6 其它重要试剂

DMEM , RPMI-1640 , Lpofectamine, G-418	Gibco
DEPC	日本化学工业株式会社
Tris-base, SDS	Serva
低熔点琼脂糖, 小牛血清白蛋白,	
MOPS , DAB , 甲酰胺	Sigma
Ethidium Bromide (EB)	Fluka
Yeast Extract	英国 OXOID
X 光片	FUJI 日本
胎牛血清	天津奶牛研究所

[二] 实验方法

1 质粒的扩增与制备[2]

1.1 质粒转染细菌:

洗净配套的玻璃平皿 2~3 个及 500~1000 毫升的三角烧瓶一个, 空干; 称取 AGAR (琼脂) 3 克, LB200 毫升, 倒入三角烧瓶中, 混匀; 玻璃平皿及 LB 置高压锅中高压消毒 30~40 分钟; 在超净台中, 待 LB 凉达 50 ℃, 加氨苄青霉素 (1 μ g/ml) 200 μ l, 混匀, 每个平皿中倒入 LB20 毫升。冷却后置 4 ℃ 冰箱保存。从液氮罐中取出制备好的感受态菌 100 μ l 置 1.5ml 的 EP 管冰中; 稀释质粒: 1 μ l (550ng/ml) 加 50 μ l 三蒸水; 将稀释质粒加入 1.5ml 的 EP 管中与感受态菌混匀, 立即置冰水中 30 分钟左右; 取出, 42 ℃ 水浴 1 分钟; 加入 LB 液 500 μ l 混匀, 37 ℃ 水浴 1 小时; 在超净台中铺板, 将上 LB 液倒入上平皿中, 用推手将平皿铺平, 平皿倒置, 放入 37 ℃ 孵箱中 15 ~ 24 小时; 在出现菌落后, 挑其中 1 个放入含有 1ml LB 液和 1 μ l 氨苄青霉素消毒好的 10ml 试管中, 用封口膜封好瓶口, 37 ℃ 摇床 15 ~ 24 小时; 取一只 1000ml 消毒好的三角烧瓶, 加 LB 液 200 ~ 300ml, 菌液 200 ~ 300 μ l, 氨苄青霉素 200 ~ 300 μ l, 混匀, 37 ℃ 摇床 10 ~ 12 小时, 速度 120 ~ 140 次/分; 测 OD600 值=0.06。

1.2 质粒的提取

收集转染菌, 3000rpm/min 离心 15 分钟, 倒置离心管, 用吸水纸吸干液体; 离心管放冰水中; 加 2ml 溶液 I (Tris-HCl pH 8.0 25m M, EDTA pH 7.0 10m M, Glucose 50m M), 用枪吹打悬浮细菌, 冰水中 10 分钟;

加 4ml 溶液 II (1% SDS, 0.16N NaOH), 冰水中 10 分钟, 反复混匀, 形成粘稠状液体; 加 3ml 溶液 III (5M 醋酸钾), 冰水中 15 分钟, 轻轻地反复混匀, 形成豆腐渣状混浊液; 3000rpm/min 离心 20 分钟, 弃去致密沉淀, 收集上清; 加 9ml 等体积的用 Tis-HCl 饱和的重蒸酚, 混匀, 3000rpm/min 离心 10 分钟, 收集上清; 加 4.5ml 用 Tis-HCl 饱和的重蒸酚及 4.5ml 氯仿: 异戊醇 (24 : 1), 混匀, 3000rpm/min 离心 10 分钟, 收集上清; 加 9ml 等体积的氯仿: 异戊醇 (24 : 1), 混匀, 3000rpm/min 离心 10 分钟, 收集上清; 加 18ml 两倍体积的冰冷无水乙醇, 混匀, -20℃ 冰箱中置 1 小时; 3000rpm/min 离心 20 分钟, 去上清, 在乳白色的沉淀中加三蒸水 2ml, 溶解后, 加 10 μ l 的 RNase, 37℃ 水浴 2 小时消化 RNA; 将液体分装至 3 个 EP 管中, 加等体积的 PEG, 混匀, 置 0℃ 1 小时; 10,000rpm/min 离心 10 分钟, 去上清; 加 70% 的乙醇 500 μ l, 10,000rpm/min 离心 5 分钟, 去上清, 洗 2 次; 每管加三蒸水 50 μ l, 混匀溶解 DNA, 取 2 μ l 电泳, 检查提取质粒 DNA 的量, 余者 -20℃ 保存

2 MT-IIA 质粒 DNA 片段的回收 (透析袋法) [3]

MT-IIA 质粒 DNA 经限制性内切酶 BamH-I 消化后, 在 1.0% 的琼脂糖胶中电泳, 待目的片段与载体 DNA 分开后, 切下目的片段 DNA, 置于处理后的透析袋中, 在 0.5 $\times$ TBE 电泳缓冲液中 100V 电压电泳 1 小时, 回收袋中的液体, 经酚氯仿抽提, 乙醇沉淀和漂洗, 溶于三蒸水中, 电泳定量, 用做 DNA 和 RNA 杂交。

3 脂质体 Lipofectamine Reagent 介导的 MT-IIA 基因转染 [4]

3.1 MT-IIA 质粒 DNA 的纯化与无菌处理

高压消毒 EP 管和三蒸水备用; 提取的质粒 DNA 用无菌三蒸水扩大体积至 200 μ l, 再次用酚-氯仿抽提, 离心 10000 转/分, 10 分钟, 回收上层水相; 水相加 2 倍体积 -20℃ 储藏的冰冷无水乙醇及 1/10 体积的 3M 的醋酸钠, 混匀置 -20℃ 1 小时, 10000 转/分离心 10 分钟; 冰冷 70% 乙醇洗 2 次, 除盐; 无水乙醇洗一次, 置超净台中晾干; 无菌三蒸水 40 μ l 溶解质粒 DNA, -20℃ 储藏备用。

3.2 MT-IIA 质粒 DNA 的基因转染

在 37 ℃, 5% CO₂ 孵箱中, 待 7402 细胞贴壁生长至 50 ~ 80% 密度时 (60mm 培养瓶), 去除含血清的 1640 培养液, 用无血清的 1640 培养液洗细胞 2 次, 备 A、B 液:

A 液: 含无血清的 1640 培养液 100μl 及质粒 DNA 1 ~ 2μg

B 液: 含无血清的 1640 培养液 90μl 及脂质体 Lipofectamine Reagent 10μl。

将 AB 两管溶液合并一起, 轻轻混匀, 在室温下放置 30 分钟, 以形成脂质体 DNA 的复合物; 在培养瓶中, 加入 1ml 无血清的 1640 培养液, 同时将 AB 复合液加入其中, 轻轻混匀; 在 37 ℃, 5% CO₂ 孵箱中培养转染细胞 12 小时, 去除培养液, 加入含血清的 1640 培养液, 继续培养 24 ~ 72 小时; 待细胞基本长满, 按 1 : 3 传细胞, 细胞贴壁后, 进行下一步骤

4 新霉素筛选转染细胞[5]

7402 细胞消化后, 以 5000 个/孔接种 24 孔板, 培养基不加抗生素。待细胞贴壁后, 按不同浓度加入 G418, 每个浓度平行两孔, 细胞培养 14 天时显微镜下观察细胞存活情况, 确定杀死细胞的最低浓度; 待细胞贴壁生长密度达 50-70% 左右汇合时, 去掉培养液, 更换入浓度为 800μg/ml G418 培养液中进行筛选 (伴有未加转染液的细胞作为对照), 当作为对照的细胞大部分死亡时 (约 3-5 天), 再更换一次浓度为 200μg/ml G418 培养液, 以维持筛选作用, 直至有细胞克隆出现。

倒置显微镜下观察细胞克隆的大小, 在平皿底做标记。一般选 5 ~ 6 个; 在超静台里, 将含 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 消化液小心加入标记好的细胞克隆上, 5 ~ 10 分钟后, 小心谨慎地吹打细胞, 将不同克隆的细胞分别移入不同的培养瓶中, 加入完全培养液继续培养, 至下一步作转染基因鉴定。

5 标记探针[6]

采用随机引物法标记。取 DNA 探针 50μg, 100 ℃ 水浴变性 5 分钟, 冰浴冷却后加入反应体系 (含 d TTP, d ATP, d GTP, 50μCi α-³²P-dCTP, BSA), 最后加入 1μl Klenow Enzyme, 使反应体积为 20μl, 37 ℃ 温育 12-18 小时, 加三蒸水至体积为 100μl, 应用酚氯仿抽提, 乙醇沉淀

回收探针。

6 Southern Blot[7]

6.1 提取细胞大分子 DNA

细胞生长满瓶，用 $1 \times \text{PBS}$ 洗 2 次；细胞刷刮下细胞，EP 管收集离心，1000 转/分，2 分钟。两瓶细胞收集为一管；加 SE 细胞裂解液 380 μl ，10%SDS 10 μl ，RNA 酶 10 μl ，悬浮细胞；37℃ 孵育 1 小时；用等体积 400 μl Tris-HCl 饱和重蒸酚抽提一次，1 : 1 的酚和氯仿（氯仿：异戊醇 = 24 : 1）抽提一次，再用等体积 400 μl 氯仿（氯仿：异戊醇 = 24 : 1）抽提一次，以彻底去除蛋白；（注意：在加液混匀时，不可剧烈，以免机械剪力破坏大分子 DNA）；加入 2 倍体积的冰冷无水乙醇，1/10 体积的 3M 醋酸钠，沉淀 DNA；挑出沉淀的大分子 DNA，70%乙醇洗两次；加 175 μl 三蒸水溶解 DNA，4℃ 保存。

6.2 大分子 DNA 的酶切、电泳及转膜

待 DNA 完全溶解，加限制性内切酶 Eco-I 5 μl ，10 $\times$ Buffer 20 μl ，37℃ 孵育过夜，1%琼脂糖凝胶电泳；电泳完毕，分别用酸性液（0.2mol/L HCl，10 分钟，2 次），碱性液（0.5mol/L NaOH, 1.5mol/L NaCl，20 分钟，2 次），中性液（1mol/L Tris-base, 1.5mol/L NaCl，20 分钟，2 次）处理胶，使 DNA 变性；采用毛细管法将变性 DNA 转移到硝酸纤维素膜上，20 $\times$ SSC 作为转移缓冲液，转移 24 小时，将膜浸在 6 $\times$ SSC 中 5 分钟，然后室温晾干，80℃ 烤箱干烤 2 小时，备用。

6.3 预杂交及杂交

将硝酸纤维素膜放进杂交袋中，加入预杂交液（6 $\times$ SSC，5 $\times$ Denhardt 试剂，0.5%SDS，100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 变性并断裂成片段的鲑精 DNA）；68℃ 水浴中温育 4 小时。

倒出预杂交液，重新加入预杂交液 3ml，变性鲑精 DNA 及 α -32P 探针，赶走气泡，封口，68℃ 水浴 24 小时。

6.4 洗膜

迅速将杂交袋沿三边剪开，取出硝酸纤维素膜放入溶液 I（6 $\times$ SSC，0.5%SDS，10 分钟 $\times$ 1 次，68℃），溶液 II（2 $\times$ SSC，0.1%SDS，20 分钟 $\times$ 4 次，68℃）中。若本底太高，可用洗液（0.5 $\times$ SSC，0.1%SDS，10 分钟 $\times$ 2 次）再处理一次。

6.5 放射自显影

取出硝酸纤维素膜在吸水纸上稍晾干,用封口膜将硝酸纤维素膜上下包好, -70 ℃放射自显影。时间视标记探针的放射强度而定。

7 Northern Blot[8]

7.1 RNA 的提取

用冰冷的 1×PBS 洗细胞,2 次,细胞刷收集细胞(以下操作尽可能在 0 ~ 4 ℃或在冰水中进行,所有试剂均由 DEPC 水配制,所有玻璃器皿均干烤 180 ℃, 6 小时。);再用冰冷的 1×PBS 洗细胞,2 次;加冰冷的溶液 D500μl (4M 异硫氰酸胍,25mM 柠檬酸钠,0.5%N-Sarkoeyl,0.1M β-巯基乙醇),用枪混匀,使细胞裂解;加 β-巯基乙醇 3.5μl;加 50μl 2M 醋酸钠 (0.1 体积) 500μl 水饱和酚 (1 体积) 100μl 氯仿:异戊醇 (49:1) (0.2 体积)混匀 10 秒钟,置冰水 15 分钟; 12 000rpm/min,离心 20 分钟,取水相;加异丙醇 600μl, -20 ℃放置 1 小时; 12 000rpm/min,离心 20 分钟,弃上清;加 300μl 溶液 D 及 β-巯基乙醇 2.1μl,混匀;加 300μl 异丙醇, -20 ℃放置 1 小时; 12 000rpm/min,离心 20 分钟,弃上清; 75%的乙醇洗沉淀 2 次;室温晾干去除残存的乙醇, -20 ~ -70 ℃保存。

7.2 RNA 电泳及转膜

RNA 经 65 ℃变性 15 分钟,冰浴冷却,在胶浓度 1.2%的甲醛变性胶上进行电泳,电压 70 伏,电泳 4 小时,将胶取下后用 DEPC 水冲洗, 0.05M NaOH 浸泡 20 分钟, 20×SSC 冲洗,采用毛细管法将变性的 RNA 转移到硝酸纤维素膜上, 20×SSC 作为转移缓冲液,转移 24 小时,将膜浸泡在 6×SSC 中 5 分钟,室温晾干, 80 ℃烤箱干烤 2 小时,备用。

7.3 杂交及洗膜

将转移上 RNA 的硝酸纤维素膜在 42 ℃甲酰胺体系进行预杂交 (5×SSC, 50%甲酰胺, 5×Denhardt); 5 小时后,赶出预杂交液,重新加入预杂交液 3ml, 探针及鲑精 DNA 7 μl, 42 ℃水浴杂交 24 小时。

从杂交袋中取出硝酸纤维素膜放在洗液 1 (5×SSC) 中, 42 ℃, 15 分钟×2 次;洗液 2 (1×SSC, 0.1%SDS) 15 分钟×2 次;洗液 3 (0.1×SSC, 0.1%SDS) 15 分钟×2 次,将膜用滤纸吸干,用保鲜膜包好,置暗盒-70 ℃放射自显影,时间视标记探针的放射性强度而定。

8 软琼脂生长实验[9]

底层琼脂：1.2%的软琼脂灭菌后与等体积的 2×DMEM（含 20%的胎牛血清，200U/ml 青霉素，200μg/ml 链霉素）混合均匀，以 5ml 分装于 7×4cm 培养瓶中，冷却凝固。

顶层琼脂制备及培养：0.6%软琼脂灭菌后与等体积 2×DMEM（含 20%的胎牛血清，200U/ml 青霉素，200μg/ml 链霉素）混合均匀以 3ml 分装于试管，冷却至 37℃时，分别加入转染和未转染 MT 质粒的 7402 细胞 1000-2000 个，混匀后倒在底层琼脂上，37℃密闭培养 3 周，镜下查找生长集落。

9 DNA “Ladder” [10]

细胞传代贴壁汇合至 80-90%后，更换不含血清的 1640 培养液，继续培养一段时间后，收集所有细胞，离心，用 1×PBS 洗两次，加 DNA 裂解液 380μl，10%SDS10μl，0.1%RNase10μl，37℃温育 2 小时，加 PK（1mg/ml）10μl，37℃温育 2 小时。酚氯仿抽提，乙醇沉淀，加 50μl 三蒸水溶解，20μl 电泳。胶浓度 1.5%，电压 50V，电泳 3 小时，EB 染色，紫外灯下观察照相。

二、实验结果

[一] pBacNeoMT-IIA 的限制性酶切鉴定

载体 pBac 长约 9kb，含有 3 个 BamHI 酶切位点（图 3-1），酶切后电泳可见 6.3、2.2、0.6kb 三个片段，将人 MT-IIAcDNA（0.4 kb）克隆到 pBacNeo 载体上经酶切，电泳可见 6.3、2.2、0.6kb 三个片段（图 3-2）。

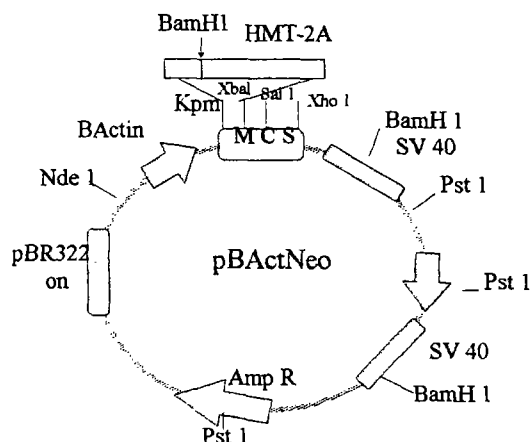


Fig.3-1 Vector map of pBActNEO

1 2 3 Lane

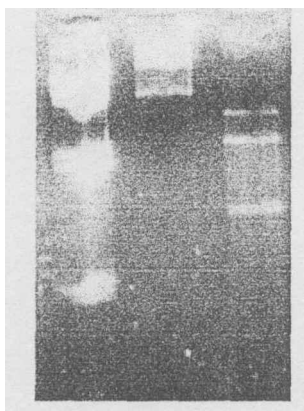


Fig.3-2 质粒 DNA 酶切电泳图，
MT 质粒被切成三个条带，其长度
分别为 6.3、2.2、0.6kb

lane 1 Marker

lane.2 MT plasmid

lane 3 MT plasmid digested by
BamHI

[二] 脂质体 Lipofectamine Reagent 介导的 MT-IIA 基因转染人 7402 细胞

7402 细胞在含 G-418 50、100、150、200、300、400 及 500 μ g/ml 的 1640 培养液中培养 14 天，G-418 杀死全部细胞的最低浓度为 200 μ g/ml，本实验以 800 μ g/ml 的 G-418 加入到转染细胞的选择培养基中进行筛选（伴有未加转染液的细胞作为对照），当作为对照的细胞大部分死亡时（约 3-5 天），再更换一次浓度为 200 μ g/ml G418 培养液，以维持筛选作用，直至有细胞克隆出现。分别挑选多个细胞克隆，扩大培养，命名为 MT-7402 系列细胞。

[三] 转染细胞 MT 的表达和形态、生长特点

分别用 **Southern Blot** 及 **Northern Blot** 检测 MT-DNA 的水平和转录活性。Southern Blot 结果显示 MT-7402 细胞的 DNA 拷贝有 5 个, 对照 7402 细胞的 DNA 拷贝有 3 个(图 3-3); 在 RNA 上样量基本相同时(图 3-4), Northern Blot 结果显示 MT-7402 细胞的 MT-mRNA 是对照 7402 细胞的 20 倍(图 3-5)。

7402 细胞与 MT-7402 细胞相比, 在形态上 7402 细胞大多以梯形为主, 折光性强, 轮廓清晰, 贴壁生长的有序性较好, 细胞生长失去接触抑制(图 3-6); MT-7402 细胞以梭型为主, 细胞形态更加饱满, 体积较大, 折光性较弱, 轮廓欠清晰, 贴壁生长的有序性较差, 细胞生长也失去接触抑制(图 3-7)。

两种细胞的生长曲线显示 7402 与 MT-7402 细胞的生长速度基本一致, 均在第六天细胞增殖至平台期(图 3-8)。

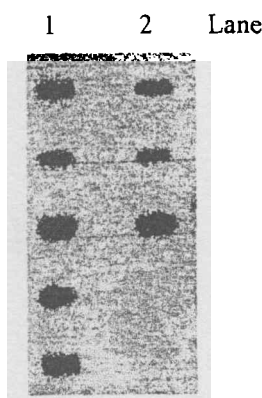


Fig.3-3 Southern blot

Lane 1 7402 cells

Lane 2 MT-IIA gene transfectant MT-7402 cells

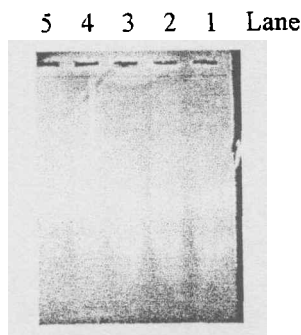


Fig. 3-4 7402 cells picture

RNA electrophoresis agros
stained by EB.

Lane1 MT-7402 a

Lane2 MT-7402b

Lane3 M7-7402c

Lane 4 7402 a

Lane 5 7402 b

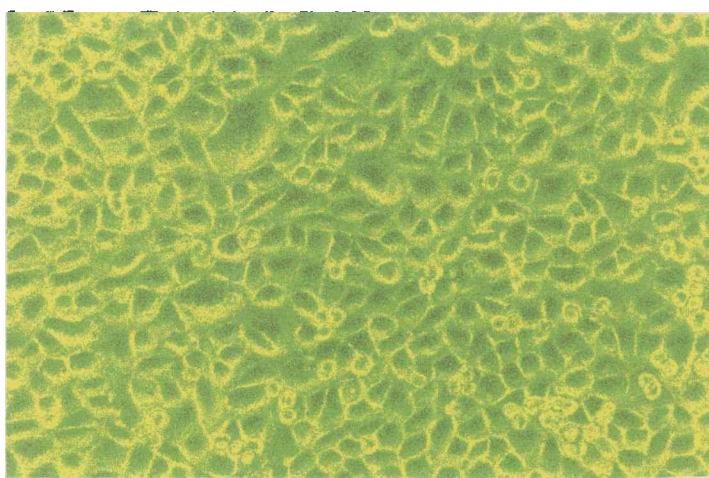
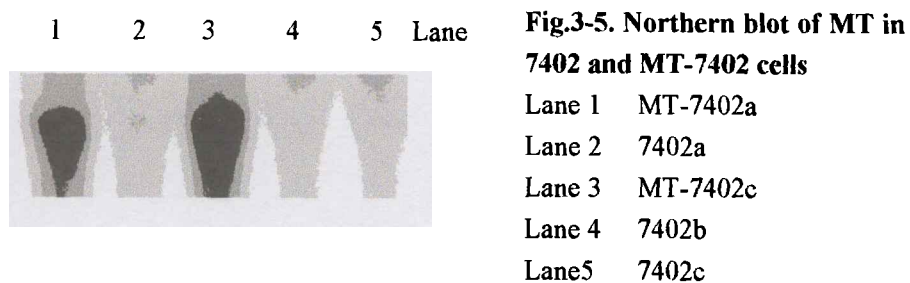


Fig. 3-6 MT7402 cells picture

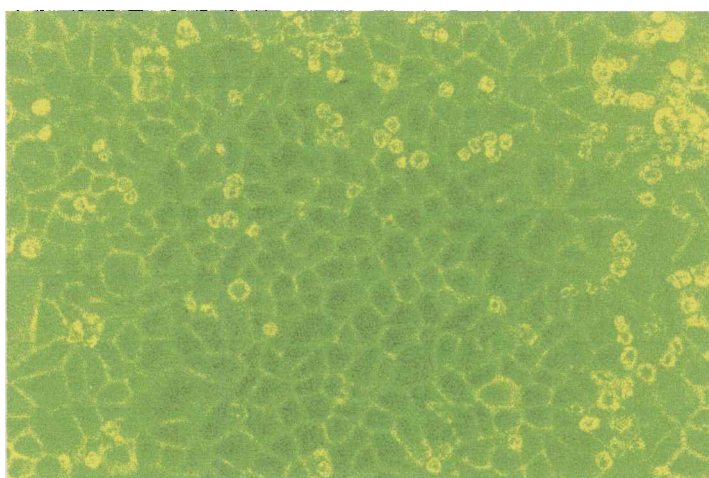


Fig. 3-7 7402 cells picture

Tab.3-1 The growth curve of 7402 cell and MT-7402 cell.

Cell	1	2	3	4	5	6	7
7402	8.88±	14.30±	21.19±	50.38±	109.25±	211.88±	185.3±
	2.23	4.29	6.36	21.57	35.89	40.64	32.72
MT-7402	9.88±	17.5±	50.75±	75.25±	144.50±	253.13±	182.5±
	3.18	3.31	10.26	30.22	45.58	50.44	28.66
p value	>0.05	>0.05	<0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05

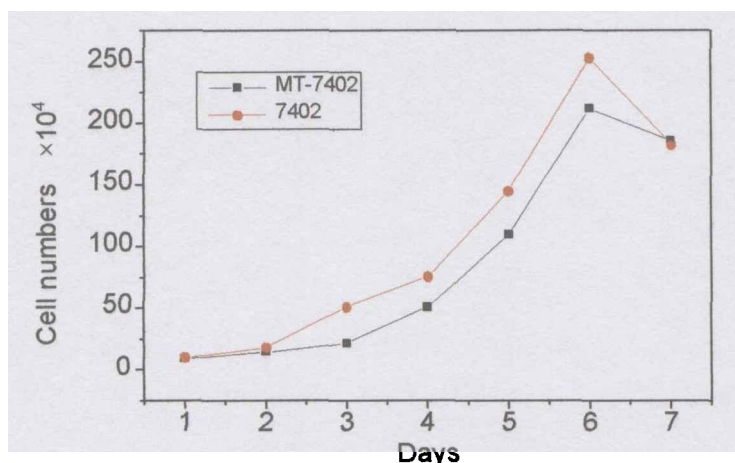


Fig. 3-8 The growth curve of 7402 cells and MT-7402 cells in vitro

[四] MT 对人 7402 肝癌细胞恶性表达的影响

用 MT-7402 细胞与 7402 细胞进行软琼脂培养,发现两种细胞皆有细胞集落形成(图 3-9 , 3-10),说明转染 MT 基因后 MT-7402 细胞的恶性程

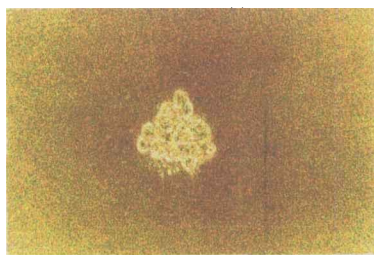


Fig. 3-9 MT-7402 cell clone formed in soft agar medium.

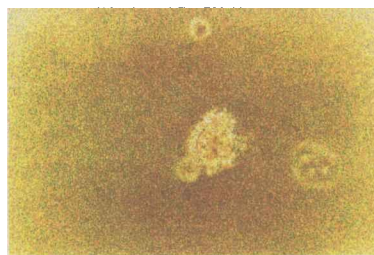


Fig. 3-10 7402 cell clone formed in soft agar medium.

度, 均丧失了正常细胞的停泊依赖性。

[五] MT 对铜抗癌作用的影响

为了研究细胞内高表达 MT 对细胞耐受铜毒性的影响, 我们在含有不同浓度的铜 (50 μ M、100 μ M、200 μ M) 培养基中平行观察 7402 细胞和 MT-7402 细胞的生长曲线, 发现转染 MT 基因的 MT-7402 细胞对铜毒性的耐受能力较 7402 细胞明显下降(表 3-2)。实验第 2 天 50 μ M 组 MT-7402 细胞从 84.00 $\pm$ 11.28 下降到 39.26 $\pm$ 5.30, 显著减少($p<0.001$), 而 7402 细胞的细胞数却略有上升, MT-7402 组与 7402 组细胞数相比有显著性差异($p<0.05$) (图 3-11); 同样, 100 μ M 组 MT-7402 细胞也从 84.00 $\pm$ 11.28 下降到 56.25 $\pm$ 4.24 ($p<0.05$), 7402 组细胞却从 84.04 $\pm$ 10.22 上升到 100.87 $\pm$ 11.23($p>0.05$) (图 3-12), MT-7402 组与 7402 组细胞数相比, 有显著性差异($p<0.05$); 200 μ M 组 MT-7402 细胞也从 84.00 $\pm$ 11.28 下降到 35.25 $\pm$ 3.92 ($p<0.001$), 7402 组细胞却从 84.04 $\pm$ 10.22 上升到 90.75 $\pm$ 6.48 ($p>0.05$), MT-7402 组与 7402 组细胞数相比, 有显著性差异($p<0.05$) (图 3-13)。第 3~4 天, 50、100、200 μ M 组的 MT-7402 与 7402 细胞数相比均有统计学差异 ($p<0.001$ 或 $p<0.05$), 到第五天 200 μ M 组的 MT-7402 组与 7402 组细胞数相比无统计学差异; 到第六天 100 μ M 组的 MT-7402 细胞与 7402 细胞相比无统计学差异($p>0.05$)。

Tab. 3-2 The survival cell growth curve of 7402 cell and MT-7402 cell($\times 10^4$ /ml) when exposed to different concentration of copper acetate.(μ M)

D	50			100			200		
	7402	MT-7402	p	7402	MT-7402	p	7402	MT-7402	p
1	84.04 $\pm$ 10.22	84.00 $\pm$ 11.28		84.04 $\pm$ 10.22	84.00 $\pm$ 11.28		84.04 $\pm$ 10.22	84.00 $\pm$ 11.28	
2	84.56 $\pm$ 15.42	39.26 $\pm$ 5.30	*	100.87 $\pm$ 11.23	56.25 $\pm$ 4.24	**	90.75 $\pm$ 6.48	35.25 $\pm$ 3.92	**
3	109.88 $\pm$ 20.36	24.57 $\pm$ 4.28	**	85.88 $\pm$ 9.68	23.25 $\pm$ 3.16	**	72.36 $\pm$ 4.42	16.55 $\pm$ 4.81	**
4	128.38 $\pm$ 21.69	42.33 $\pm$ 4.38	**	83.25 $\pm$ 10.66	37.58 $\pm$ 3.85	**	48.58 $\pm$ 4.01	34.25 $\pm$ 2.96	**
5	137.63 $\pm$ 18.68	80.25 $\pm$ 3.16	**	87.38 $\pm$ 6.98	50.25 $\pm$ 5.25	*	38.75 $\pm$ 2.09	30.75 $\pm$ 3.70	*
6	96.21 $\pm$ 12.44	68.25 $\pm$ 2.87	*	62.75 $\pm$ 5.68	60.39 $\pm$ 4.88		71.75 $\pm$ 4.65	58.75 $\pm$ 4.21	*

* $p<0.05$, ** $p<0.001$

从整个生长趋势看，MT-7402 细胞无论是在 50、100、200 μ M 组均在给铜第二天出现明显的生长抑制效果，到第三天出现级小值，第四天又逐渐上升，但均不超过第一天的细胞数（图 3-14）。而 7402 细胞生长趋势显示出明显的剂量效应，50 μ M 组细胞不但没有减少，反而有所升高，在第五天出现极大值，与第一天相比有非常显著性差异（ $p<0.001$ ），100 μ M 组细胞在前五天内基本处于“静止”状态，至第六天明显降低（ $p<0.05$ ）；而 200 μ M 组细胞在前五天内逐渐下降，第五天出现级小值，第六天回升（图 3-15）。可见高 MT 表达的 MT-7402 细胞与 7402 细胞相比对铜毒性的敏感性明显加强，耐受性降低，发挥细胞毒作用所需铜剂量也明显减少。所以细胞内固有的高表达的 MT 更加有利于铜抗癌作用的发挥

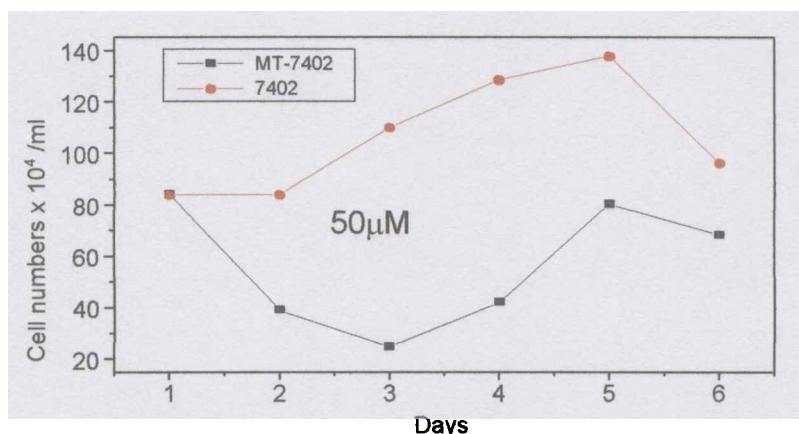


Fig. 3-11 The survival cell growth curve of 7402 and MT-7402 cell in 50 μ M copper culture medium in 6 days

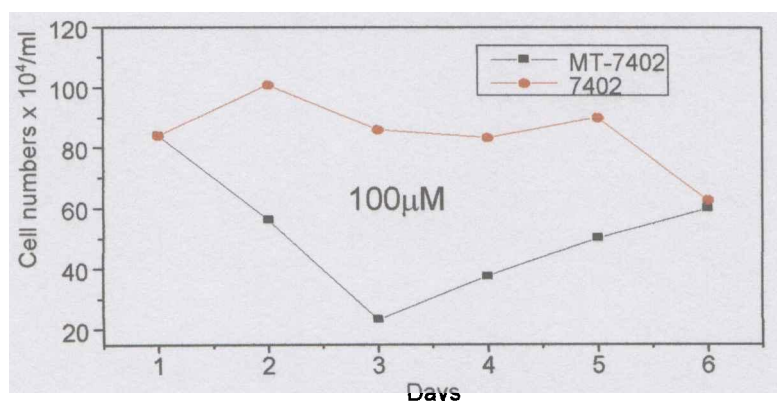


Fig.3-12 The survival cell growth curve of 7402 and MT-7402 cell in 100 μ M copper culture medium in 6 days

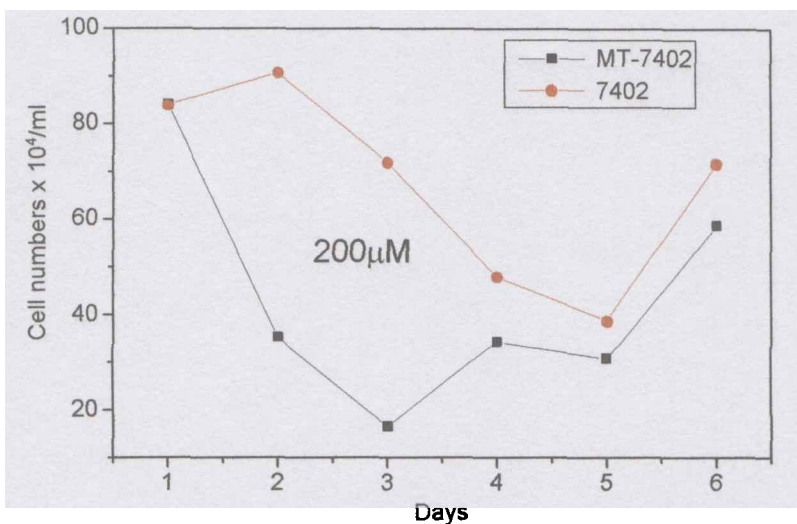


Fig. 3-13 The survival cell growth curve of 7402 and MT-7402 cell in 200 μ M copper culture medium in 6 days

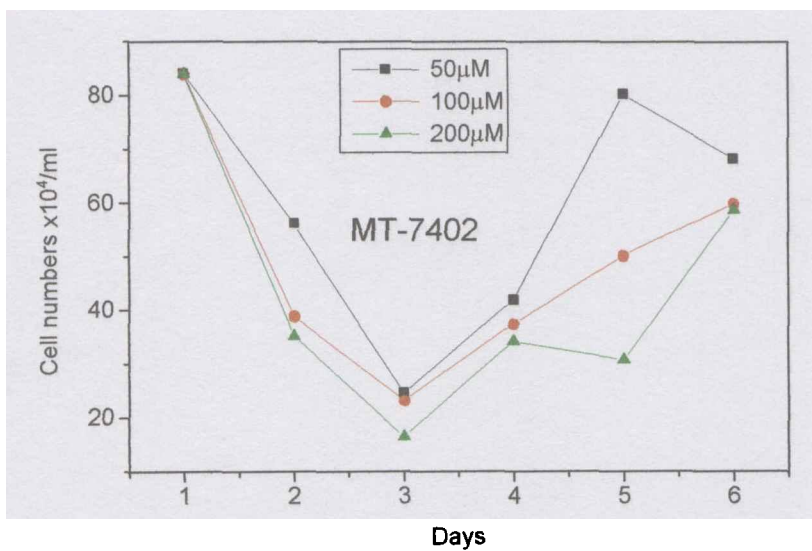


Fig. 3-14 The survival cell growth curve of MT-7402 cell in different copper concentrations of culture medium in 6 days.

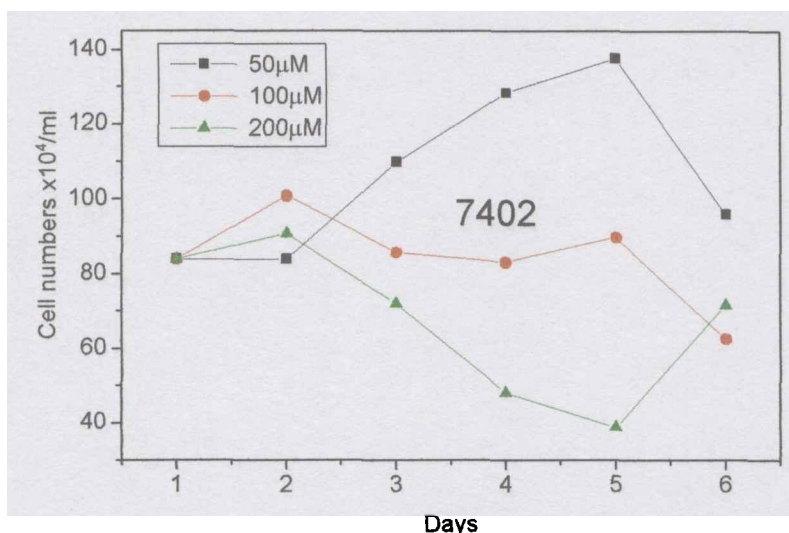


Fig. 3-15 The survival cell growth curve of 7402 cell in different copper concentrations of culture medium in 6 days.

[六] MT 对诱导细胞凋亡的影响

在 7402 和 MT-7402 细胞的去血清培养液中，加入 200μM 铜，第三天两种细胞均开始发生凋亡，表现为：细胞脱壁，细胞皱缩，核染色质断裂成小片段向周边聚集，或为出芽状，但 MT-7402 细胞凋亡数量多，而 7402 细胞则变化较轻，凋亡细胞数量少。收集细胞，提取 DNA，电泳出现凋亡细胞特征性“梯形”条带(图 1-21)，但 MT-7402 DNA 含量较 7402 高。说明 MT 使细胞对去血清诱导凋亡的敏感性增强，有利于铜离子诱导细胞凋亡的发生。

三、讨论

[一] 上调 MT 基因表达水平方法的评价

为了研究 MT 在微量元素铜抗癌过程中的作用，我们用上调 MT 基因表达方式进行了评价。上调 MT 基因表达的方法有三种：

- 1 诱导剂诱导：根据 MT 基因启动子区存在着金属和激素的反应元件，常用锌、镉、铜等金属元素及糖皮质激素作为诱导物与之结合，加速 MT 在转录水平的合成；

2 脱甲基作用: 某些组织细胞如小鼠胸腺细胞、大鼠睾丸细胞等的 MT 基因会因高度甲基化而沉默不表达, 用 5-氮杂胞苷可使基因脱甲基而被激活;

3 基因转染: 以脂质体为载体, 将 MT 及其亚型基因的表达载体转入受体细胞, 并使之表达; 下调 MT 基因的表达可将 MT 反义基因表达载体导入细胞, 封闭 MT 基因的活性。

我们将含人全长 MT-IIAcDNA 的质粒以脂质体为介导转入人肝癌 7402 细胞, 因被转染的 DNA 在 7402 细胞的基因组是随机插入, 各个细胞株 MT 的表达水平和在细胞内的分布不尽相同, 经筛选得到的转基因细胞株 MT-7402 的 MTmRNA 水平是对照细胞 7402 的 20 倍。在整个实验过程的多次传代培养中, 上调 MT 基因表达的 MT7402 细胞生长速度与 7402 细胞基本一致, 而且软琼脂实验也证明这转染的 MT7402 细胞的恶性表达与 7402 相同, 状态稳定, 为研究 MT 的生物学功能奠定了良好的基础。

[二] 肿瘤细胞内 MT 高表达可增加细胞的铜毒性

转染的 MT-7402 细胞 MTmRNA 水平是对照细胞 7402 的 20 倍, 其蛋白表达也是稳定的。邓氏用相同的 MT 质粒转染 NIH 3T3 小鼠成纤维细胞, 其 MTmRNA 水平是对照细胞的 17、14 倍, 免疫组织化学染色证明 MT 基因转染细胞显示了不同程度的 MT 蛋白表达[11]。

我们用不同浓度的铜 (50 μ M、100 μ M、200 μ M) 观察肿瘤细胞内高表达 MT 对铜细胞毒性耐受影响时发现, 转染 MT 基因的 MT-7402 细胞对铜毒性的耐受能力较 7402 细胞明显下降, 尤其在用药的前三天更为显著。随着铜浓度的增加, 对细胞的杀伤作用也增强, 说明转染的 MT-7402 细胞对铜毒性的敏感性较 7402 细胞明显增强, 有利于铜的抗癌作用。我们推测由于肿瘤细胞 MT 的高表达, 使得铜更早更快更多地进入细胞内与 MT 结合, 在由 Cu^{2+} 转换为 Cu^{1+} 过程中产生的自由基不断消耗 MT 中的不饱和的巯基形成双硫键, 破坏 MT 的结构, 释放大量的 Cu^{1+} , 再通过 Fenton's 反应, 产生毒性更强的羟自由基, 不但在细胞浆中, 而且进入细胞核后与 DNA 结合损伤 DNA。这可能就是铜离子不但能够抗癌, 而且一个铜离子消耗 408 个 MT 的机理所在。

既然 MT 作为金属离子的整合剂和羟自由基的清除剂, 为什么在肿瘤

细胞中的高表达又促进铜对肿瘤细胞的损伤呢？我们知道，MT 基因是高度保守的基因，在一般情况下是不表达的，当机体受到各种应激反应和金属离子的诱导时，MT 才大量表达以清除理化应激产生的自由基和螯合金属离子，保护机体的正常生理功能[12]。但是，当肿瘤细胞转染上调的 MT 基因大量表达时，即在固有的高表达的 MT 存在时，再给予铜离子，与未转染 MT 基因的细胞相比，可以使肿瘤细胞在更短的时间内结合更多的铜离子进入胞浆和胞核中，通过细胞内代谢所产生的过氧化氢生成羟自由基直接损伤 DNA，引起细胞死亡或程序化死亡[13]，或者通过脂质过氧化反应损伤细胞的膜结构导致细胞的损害[14]。作为羟自由基的清除剂，铜 MT 的作用是有限的。我们的实验已经证实锌 MT-2 对由过氧化氢和铜一起应用造成的质粒 DNA 的损伤起一定的保护作用，但随着铜离子浓度的增加，产生的羟自由基增多，铜 MT 对 DNA 的保护作用逐渐下降，他们之间存在线性正相关。正如 Bremner 指出铜 MT 在 LEC 大鼠中的表现一样，“这种认为 MT 起到拮抗铜毒性的认识在 LEC 大鼠对铜毒性的极端敏感性方面是难以解释清楚的。LEC 大鼠可以在肝脏中迅速积累大量的铜，4 个月龄时发展为爆发性肝炎。相同含量的铜对 LEC 大鼠肝脏的损伤程度较正常大鼠要严重的多，而在 LEC 大鼠中的铜大部分是与 MT 结合的，即以铜 MT 的方式存在的”[15]。正常肝脏有完善的胆道系统以排泄过剩的铜，而 LEC 大鼠先天性胆道系统发育异常，不能从胆汁排泄过剩的铜，所以尽管绝大部分的铜与 MT 结合，但不能防止铜对肝细胞的损害。MT-7402 肿瘤细胞对铜的极端敏感性的情况也与此类似。因而 MT-7402 细胞在给铜（ $50\mu\text{M}$ ）的第二天细胞数仅为第一天细胞数的 46.8%，（ $p<0.001$ ）而 7402 细胞数非但不降低，反而略有增加；第二天，MT-7402 细胞数仅为第一天细胞数的 29.25%（ $p<0.001$ ），相反 7402 细胞总数却增加了 30.75%。所以我们认为肿瘤细胞内固有的高水平 MT 基因的表达对铜毒性发生了积极影响，有利于铜的抗癌效果。

[三] MT 对铜离子诱导肿瘤细胞凋亡的影响

在铜的抗癌作用研究中，已经分析了 Cu^{2+} 引起细胞凋亡的机理，但我们发现在浓度为 $200\mu\text{M}$ 铜离子去血清诱导 MT-7402 细胞及 7402 细胞凋亡的过程中，MT-7402 细胞比 7402 细胞更早、更多地诱导细胞发生凋亡而

且 MT-7402 细胞“DNA Ladder”含量比 7402 细胞高,由此看出在铜离子诱导细胞凋亡的过程中,MT 的表达起到了敏化促进作用。究其原因,关键仍然在于 MT 的高表达,使细胞内在短期内聚集了大量的铜离子,通过生成羟自由基直接引起细胞的程序性死亡。MT 本身与细胞凋亡关系的研究目前还不清楚,有人推测 MT 可能是一可诱导的凋亡基因[16],由于细胞凋亡所涉及到的复杂因素和作用机制,MT 对其他在生理、病理、药理等因素作用下细胞凋亡过程的影响尚难确定,但对由铜离子介导的细胞凋亡起到的敏化促进作用是肯定的。

【参考文献】

- [1]黄国健,周舒 金属硫蛋白与肿瘤治疗. *中日友好医院学报*. 1996;10(2):180-182.
- [2]Sambrook, J., Fritsch E. F. and Maniatis T. *Molecular Cloning -A Laboratory Manual* 2nd ed. Cold Spring Laboratory Press. 1989.金冬雁 黎孟枫 等译 科学出版社 1995 年 9 月第二次印刷, P 24.
- [3]姜泊,张亚历,周殿元. *分子生物学常用实验方法*. 人民军医出版社, 1996 年 2 月第一版, P53.
- [4]姜泊,张亚历,周殿元. *分子生物学常用实验方法*. 人民军医出版社, 1996 年 2 月第一版, P157.
- [5]鄂征 *组织培养和分子细胞学技术* 北京出版社 1995 年 8 月第一版, P242.
- [6]Sambrook, J., Fritsch E. F. and Maniatis T. *Molecular Cloning -A Laboratory Manual* 2nd ed. Cold Spring Laboratory Press. 1989.金冬雁 黎孟枫 等译 科学出版社 1995 年 9 月第二次印刷, P495.
- [7]Sambrook, J., Fritsch E. F. and Maniatis T. *Molecular Cloning -A Laboratory Manual* 2nd ed. Cold Spring Laboratory Press. 1989.金冬雁 黎孟枫 等译 科学出版社 1995 年 9 月第二次印刷, P474
- [8]Sambrook, J., Fritsch E. F. and Maniatis T. *Molecular Cloning -A Laboratory Manual* 2nd ed. Cold Spring Laboratory Press. 1989.金冬雁 黎孟枫 等译 科学出版社 1995 年 9 月第二次印刷, P363.
- [9]鄂征 *组织培养和分子细胞学技术* 北京出版社 1995 年 8 月第一版, P157.
- [10]方敏 张鸿卿 薛绍白 等 *药学报 Acta Pharmaceutica Sinica* 1994; 29(12):891-898.
- [11]邓欣珠, *第二军医大学博士学位论文*, P 26 页, 1996 年 4 月
- [12]Hager, L. J. and Palmiter, R. D. *Nature* 1981;291, 340-342.
- [13]Dypbukt, J.M., Ankarcona, M. and Sjöholm, A. et al *J. Biol. Chem.* 1994; 269:30553-30560.
- [14]Kasiiska M. B., Hanna P. M. and Jordan S. J. et al. *Mol. Pharmacol.* 1993; 44:222-227
- [15]Sugawara N, Sugawara C and Sato M. et al. *Pharmacol Toxicol* 1992;71:321-324
- [16]Murphy, B. J. et al. *Cancer Res.* 1994;54:5808-5810.

文献综述

一、祖国医学对微量元素铜的认识

【一】 历史回顾

在中华民族悠久的历史中，勤劳智慧的中国人民在远古时代就利用自然界的矿物和岩石（含有丰富的微量元素）直接入药用以防治疾病，可以说中医药很早就和微量元素紧密联系在一起，在发现微量元素和疾病的关系以及在使用含微量元素的药物进行治疗方面在世界上都是最早的。如在公元前 3000 年《庄子》一书中，就已有有关碘、汞与疾病关系的知识；在长沙马王堆出土文物中公元前 1000 年西周时代的《五十二病方》是我国现在发现的最早的古医方，其中就记载有 21 种矿物药及其组成的方剂；在秦汉时代成书的《神农本草经》是我国目前已知最早的药理学专著，就收载包括含铜的矿物药 46 种，分列为上、中、下三品，该书详述了药物的性味和功效[1]。随着时代的进步，人们对矿物药的认识更加深入，如唐代医家孙思邈的《千金要方》[2]、南北朝时期的炼丹大家葛洪《抱朴子》、陶弘景《神农本草经集注》[3]、北齐人徐之才《雷公药对》[4]、明代李时珍的《本草纲目》[5]等等对矿物药的炮制、剂型、用法及相互之间的配伍都有深刻精辟的阐述。

在对含铜矿物药研究方面，《神农本草经》[1]（简称《本经》）就记载有“空青”、“曾青”、“绿青”、“扁青”、“白青”、“胆矾”等六种药物，而且对其性味、功效作了详细论述，《本草别录》[6]（简称《别录》）对此又作了补充，分述如下：

空青（杨梅青）：《本经》“味甘寒，主治青盲、耳聋。明目，利九窍，通血脉，养精神，久服轻身延年不老”；《别录》“疗目赤痛，去肤翳，止泪出，利水道，下乳汁，通关节，破坚积，令人不忘，志高神仙”。

曾青：《本经》“味酸小寒。主治目痛，止泪出，风痹，利关节，通九窍，破微瘕积聚。久服轻身不老”；《别录》“养肝胆，除寒热，杀百虫，疗头风脑中寒，止烦渴，补不足，盛阴气”。

绿青（石绿、大绿）：《本经》“寒酸无毒。益气，止泄痢，疗鼻，

吐风痰甚效”。

扁青（石青、大青）：《本经》“小寒无毒。主治目痛。明目，折跌，痈肿，金疮不瘳，破积聚，解毒气，利精神。久服轻身不老”；《别录》“去寒热风痹，及丈夫茎中百病，益精”。

白青（碧青、鱼目青）：《本经》“甘酸咸平，无毒。明目，利九窍，耳聋，心下邪气，令人吐，杀诸毒三虫。久服通神明轻身”。

胆矾（石胆、铜勒、君石、毕石）：《本经》“酸平寒，有毒。明目，目痛，金疮诸痢瘕，女子阴蚀痛，石淋寒热，崩中下血，诸邪毒气，令人有子。炼饵服之，不老。久服，增寿神仙”；《别录》“散微积，咳逆上气及鼠痿恶疮”。

可见在当时的条件下，人们对含铜矿物药的应用已有相当深入的了解和认识，而且已经认识到“空青”、“曾青”、“扁青”具有“破积聚”治疗肿瘤的作用。在唐代陈藏器《本草拾遗》[7]中还有用含铜药物治疗骨折的记载：“赤铜屑主折疡，能焊入骨，及六畜有损者，细研酒服，直入骨伤处，六畜死后取骨视之，犹如焊痕，可验”，说明通过动物实验可以证实铜的疗效。又如在《本草纲目》[8]中记载了铜和乌梅配伍以“去青黑痣，蚀恶肉，治噎膈”的具体服用方法：“乌梅二七枚，水五升，煮一沸，纳大钱二七枚，煮至二升半，顿服之。”铜与乌梅在酸性条件下，将会有所溶解，显然铜是参与了治疗作用。

后世医家对含铜药物应用，主要代表药物为“铜绿”。“铜绿”又名“铜青”，最早见于《抱朴子》，李时珍《本草纲目》[5]称为“铜绿”。《本草拾遗》[7]谓：“生熟铜皆有青，即是铜之精华，大者即空绿，以次空青也。铜绿独在铜器上，绿色者是。”指出铜绿的生成部位是在铜器上。自然铜绿的生成方式是“取铜器久置潮湿处，或用醋喷在铜器上，其表面产生青绿色的铜锈，刮取后，干燥之”[9]。用醋制铜绿的方法在李时珍《本草纲目》[5]中就有记载：“近时人以醋制铜生绿，收取晒干货之。”说明当时以这种方法生产铜绿已成为商业行为。

铜绿的性味，《药对》[4]认为属“寒”；《嘉佑本草》[10]认为属“平，微毒”；《本草经疏》[11]认为属“酸苦涩，微毒”，现在一般认为属“酸涩，平，有毒。”[9]

铜绿的归经，主要“入肝、胆经”，但《玉楸药解》[11]认为“入手

太阴肺、足厥阴肝经”。

铜绿的功用，有“退翳，去腐，敛疮，杀虫，吐风痰”的作用，治疗“目翳，烂弦风眼，疽、痔恶疮……”等[9]。但《嘉佑本草》[11]认为可以“治妇人血气心痛”，有疏肝活血的作用；《本草纲目》则认为可以“治恶疮，疔疮，吐风痰，杀虫”，有解毒敛疮之功[5]。

铜绿的宜忌，一般认为“体弱血虚者忌服。”《本草经疏》[12]认为“目痛肤翳不由风热外侵而因于肝血虚少者非所宜用”；而《本草汇言》[13]则指出“多服、常服，有燥耗津液，枯损血气之患。”故在过去铜绿常作为外用药使用，以防内服之患。

[二] 现代研究

现代中医中药对微量元素的认识是随着时代的进步、科技的发展而逐渐深入的，以至目前发展成为“中医药微量元素学”，是“从微量元素角度来探讨中医药理论和实践有关问题的相关性及其规律性的一门学科”[14]。目前这门学科所研究的已涉及到下面一系列问题，包括：中医理论和微量元素的关系；中医病因、症候、临床诊断及治疗微量元素的关系；中药理论、中药有效化学成分、中药制剂、炮制、鉴定、栽培、中药生产、中药质量与微量元素的关系；中医针灸、气功及其它中医药方面的问题与微量元素的关系；生物地球化学及环境科学与中医药微量元素学的关系；等等[14]。可见目前无论从广度还是深度中医药对微量元素的认识都远远超出过去单纯从临床治疗去认识微量元素的水平，而且在这一领域我国还处在世界领先地位。在这样的大环境中，对微量元素铜的认识水平也较过去有较大提高，主要表现之一为突破了单一因子研究模式，将多种元素的变化结合起来综合研究，如铜和锌的关系，两者之间的动态变化在中医药研究的许多领域引起人们广泛的关注。

1 在中医基础理论方面，王秀萍等[15]研究了血淤证与血浆锌铜的关系，发现血淤模型组锌值明显低于对照组，而铜却明显高于对照组，锌铜比值差异非常显著。陈友香[16]探讨了女性更年期阴虚阳亢和肝郁气滞患者与微量元素的关系，发现阴虚阳亢者锌明显降低，铜镁水平上升；肝郁气滞患者锰镁含量降低，锌铁铜升高。张育轩[17]研究报道阴虚患者血清铜水平明显升高，锌铜比值显著降低。

2 在中医临床诊断方面, 陆组才[18]等研究了 37 例原发性肝癌的舌象与微量元素的关系, 血淤舌与淡红舌比较, 前者发铜含量升高有显著性差异; 黄腻苔与薄白苔比较, 前者发铜、锌含量稍有升高, 但无统计学意义, 铁的含量显著下降; 异常舌脉与正常舌脉比较, 发铜及铜锌比值均显著升高。; 张世平[19]等观察了重症肌无力-脾虚证型的头发微量元素, 结果证实患者的铜水平明显低于正常对照 ($P < 0.05$), 发现患者的锌铜比值升高, 提示应考虑该型患者可能存在铜的代谢障碍。

3 在中医治疗方面, 有人报道[20], 气虚病人淋巴细胞刺激指数明显降低, 血清中的铜锌处于低水平, 但铜锌比值接近正常水平; 用温补中药淫羊藿治疗后, 气虚症状明显改善, 同时血清锌镁水平降低, 但铜锌比值显著升高。尤泊海[21]观察了脑栓塞患者的血清中的微量元素和抗栓中药中的微量元素之间的关系, 发现脑栓塞患者的血清中的铜锌均低于正常对照水平, 而血清镉水平高于正常对照水平, 而抗栓中药维脑路通、蝮蛇抗栓酶含有较高的铜和锌, 似乎之间存在着互补的关系, 认为这可能是药物治疗机理之一。孙恩亭等[22]用动物大鼠脾虚模型研究了微量元素与中医“脾主肌肉”的关系, 发现脾虚组大鼠骨骼肌中的铜、钾、钠的含量显著减少, 经黄芪四君子汤治疗后, 上述变化得到了矫正而逐步趋于正常。证明微量元素与脾虚证的发生、发展有密切的关系。同样, 赵光[23]等也用脾虚大鼠模型研究了脾虚与微量元素之间的关系, 证实脾虚证大鼠血清锌含量降低, 铜锌比值明显升高, 四君子汤对脾虚证引起的铜锌变化有明显的调整恢复作用。

4 在中药微量元素的研究方面, 近年来取得了突飞猛进的进展, 研究的领域涉及到中药的各个方面, 如性味、归经、升降沉浮、十八反十九畏、中药的炮制、地道药材、药效以及若干方法、技术等与现代科技相结合的前沿性问题, 呈现百家争鸣的热烈局面。秦俊法等[24]根据药物性味归经探讨了药物阴阳与微量元素的关系。其中四气与微量元素的关系: 热药中锰的含量最高, 铁、铜、锌的含量最低; 寒凉药中铁高锰低; 在四类药中 (热温寒凉) 铜与铅呈负相关。五味与微量元素的关系: 辛药锰高钴低; 酸药锰低镉高; 酸药与咸药中铁、铜、锌趋势相反, 前者最低, 后者最高。药物归经与微量元素关系: 肺经药锰最高; 肝经药铁铜最高; 肾经药镍最高。将归经药中的微量元素、含量分布与相应脏器中的分布相比较, 则发

现：肝脏与归肝经药中都是锌锰铜含量最高；脾脏铁含量最高但脾经药中铁含量最低；所有元素中，铜在各脏器中的分布模式与各归经药中的分布模式最为一致。补益药与微量元素的关系：补血药中钾、锌含量高；补阳药中锰锌较高；补阴药中铁铜较低而钴较高。龚跃新[25]等人统计了五年国内期刊发表的一百八十多种中药中微量元素的分析结果后发现，归肝肾二经的明目中药中，铁、锌、铜、锰的含量最高，这与肝脏内富含这些元素相符，也与“肝藏血，开窍于目”的中医理论相符。张志民[26]检测了七十种抗癌中药微量元素水平，发现龙葵、全蝎、花生红衣等中药含铜最高，蜈蚣、全蝎、地龙含锌量最高；蝉衣、青黛、蒲公英中含铁最高。

另外，管竞环等人[27-30]研究了“微量元素在植物类中药中的总体分布规律”、“稀土元素与中药药性阴阳属性关系”、并制订了“植物类中药微量元素含量区间尺”，探讨了用微量元素确定“植物类中药四性的客观定量指标”的可能性，并在上述研究中取得了一定成果。他们选择了 105 味常用的植物类中药，通过精确检测 42 中微量元素的含量，绘制出每个元素的“含量离散概率密度”的直方图和曲线图，发现他们的图形只存在对数曲线和山形曲线两种情况，证明这 42 种元素在植物类中药总体中均服从于威布尔分布规律，对确定各种元素在植物类中药中含量的相对水平和计算各种微量元素在植物类中药中的理论含量均值有很大意义。对于稀土元素与中药药性之间的相对关系，他们发现，在一定的限度内，随着药物中稀土元素含量的逐步上升，药性随之由阴转阳；反之，随着药物中稀土元素含量的逐步下降，药性随之由阳转阴；当超过上限时，药性又逐渐由阳转阴；当超过下限时，药性又逐渐由阴转阳。这种中药中稀土元素含量的升高和降低，伴随着药性寒凉和温热不同属性的消长和转换过程，揭示出中医阴阳学说确实具有其客观的物质基础。

在微量元素与中药复方研究中，孙陪桐等[31]检测了四君子汤、四物汤、八珍汤及十全大补汤中的微量元素，发现各药溶出液中熟地黄的含量最高，肉桂锰的含量最高、白术中高锌、黄芪中高铜；方剂中微量元素的溶出量不是各单味药中元素的简单相加；首煎药的元素溶出率显著高于二煎；四君子汤中以铁、锰、锌、铜、钙、钴的含量较为丰富；十全大补汤中锰的含量最高，优于其他方剂；汤清国[32]等在研究中医辨证治疗肝炎与微量元素的关系时发现单味中药茵陈中的铜含量为 $134\mu\text{g/g}$ ，而复方茵

陈蒿汤中的铜含量仅为 $0.10\mu\text{g/g}$ ，折换每克计算仅为单味茵陈生药的 250 分之一，尽管急性肝炎的血铜明显升高，用茵陈蒿汤清热利湿不仅不会加重病情反而有良好的治疗效果，指出中药治疗肝炎决不是单纯的微量元素的补充。

综上所述，尽管微量元素铜与中医药研究的各个方面都有联系，但由于资料的零散和研究方法上的差异，发现其中的规律性还是比较困难。要想在中医药与微量元素这个研究领域有所突破，曹治权教授[33]认为：

（1）必须正确认识中医药的宏观化和微观化的辨证关系，既保持中医宏观特色，又能在在此基础上进行微观研究，相互促进；（2）多学科研究中医药是中医药微观化研究必由之路，微量元素研究仅是其中的一部分，不能以偏盖全；（3）中医药微观化研究不应该过分简单化，在微量元素研究方面，反对过分强调微量元素作用的“微量元素对号入座论”；（4）摆正中医药微量元素研究在中医药微观化研究中的地位，并不是在中医药研究的所有领域微量元素研究都很重要，有的可能很重要，有的可能一般，而有的可能是不重要的；（5）要正确评价中医药微量元素研究在中医药微观化研究中的作用，要大胆创新，用先进的理论和方法、科技手段开创中医药微量元素研究新局面，促进中医药微观化研究的不断深入。

【参考文献】

- [1]曹元宁 辑注 <<本草经>>。上海科学技术出版社出版,1987 年 11 月第一版。26-29 页。
- [2]唐·孙思邈《千金要方》刘更生 张瑞贤 等点校 华夏出版社 1993 年 6 月第一版，1996 年 1 月第三次印刷
- [3]唐·陶弘景《神农本草经集注》尚志钧 尚元胜 辑校 人民卫生出版社出版，1994 年 2 月第一版。
- [4]北齐·徐之才《雷公药对》尚志钧 尚元胜 辑校 安徽科技出版社 1994 年 12 月第一版
- [5]李时珍（明）本草纲目（校点本）第一册。人民卫生出版社出版，1987 年 4 月第一版第三次印刷。P 597。
- [6]《本草别录》见：曹元宁 辑注 <<本草经>>。上海科学技术出版社出版,1987 年 11 月第一版。26-29 页。
- [7] 唐·陈藏器《本草拾遗》见：李时珍（明）本草纲目（校点本）第一册。人民卫生出版社出版，1987 年 4 月第一版第三次印刷。P 597。
- [8] 李时珍（明）本草纲目（校点本）第三册。人民卫生出版社出版，1987 年 4 月第一版第三次印刷。P 1736
- [9] 江苏新医学院 中药大辞典（缩印本），上海科技出版社，1986 年 5 月第一版，1992 年

第五次印刷 P 2162

- [10] 《嘉佑本草》见:江苏新医学院 中药大辞典(缩印本),上海科技出版社,1986年5月第一版,1992年第五次印刷 P 2162
- [11] 明·缪希雍《本草经疏》见:江苏新医学院 中药大辞典(缩印本),上海科技出版社,1986年5月第一版,1992年第五次印刷 P 2162
- [12] 清·黄元御《玉楸药解》见:江苏新医学院 中药大辞典(缩印本),上海科技出版社,1986年5月第一版,1992年第五次印刷 P 2162
- [13] 明·倪朱谟《本草汇言》见:江苏新医学院 中药大辞典(缩印本),上海科技出版社,1986年5月第一版,1992年第五次印刷 P 2163
- [14] 曹治权 微量元素与中医药 中国中医药出版社 1993年5月第一版,1996年3月第二次印刷, P1.
- [15] 王秀萍、赵明生、曹治全 血淤证与血浆锌铜的关系, 全国第四届医学微量元素、全国第二届锗的研究及应用学术会议论文集 中华医学会微量元素学会 1993年8月 秦皇岛 P193
- [16] 陈友香、程士奇、熊舜华 等 中医杂志 1993; (6): 362
- [17] 张育轩 中西医结合杂志 1987; 7: 252
- [18] 陆组才、韦金育、张丽生 微量元素与健康研究 1992; 3: 26-28
- [19] 张世平、梁美容、张银卿 微量元素 1991; 4: 24-25
- [20] 刘福春、瞿善英 周松华 微量元素 1992, 1: 32.
- [21] 尤泊海 微量元素与脑栓塞和抗栓中药 全国第四届医学微量元素、全国第二届锗的研究及应用学术会议论文集 中华医学会微量元素学会 1993年8月 秦皇岛 P192
- [22] 孙恩亭、李乐红、薛庆海 微量元素与中医“脾主肌肉”的关系的研究微量元素与脑栓塞和抗栓中药 全国第四届医学微量元素、全国第二届锗的研究及应用学术会议论文集 中华医学会微量元素学会 1993年8月 秦皇岛 P166
- [23] 赵光、张玉珍、刘永利 等实验性脾虚证大鼠血清中微量元素的研究 全国第四届医学微量元素、全国第二届锗的研究及应用学术会议论文集 中华医学会微量元素学会 1993年8月 秦皇岛 P86
- [24] 秦俊法、李得义、戴有兵等 微量元素与健康研究 1992, 2: 27-31.
- [25] 龚跃新、张根海 中医药研究 1990; 36: 23
- [26] 张志民、郭荣兰、张桂兰 微量元素 1987; 4: 44-48
- [27] 管竞环、李恩宽、代行信等 微量元素在植物类中药中的总体分布规律 首届微量元素与肿瘤国际学术会议论文摘要 1996年9月北京 P 94
- [28] 管竞环、李恩宽、汤学军等 稀土元素与中药药性阴阳属性关系的研究 首届微量元素与肿瘤国际学术会议论文摘要 1996年9月北京 P 94.
- [29] 管竞环、汤学军、薛莎等 植物类中药微量元素含量区间尺的制定及意义 首届微量元素与肿瘤国际学术会议论文摘要 1996年9月北京 P 83-98.
- [30] 管竞环、李恩宽、江宝林等 微量元素—植物类中药四性的客观定量指标 首届微量元素与肿瘤国际学术会议论文摘要 1996年9月北京 P 83-98
- [31] 孙陪桐、姚惠娟、朱宏元. 微量元素 1988; 1: 44
- [32] 汤清国、陈国林、谢云龙 微量元素 1988; 3: 20

二、微量元素铜的生理病理研究

【一】 微量元素铜的生理功能

微量元素铜在古代即有所发现, 1807 年 Vauguelin 从动物中检出铜, 1847 年 Harless 提出动物体内的铜具有重要作用, 1878 年 Frederick 首先报道血蓝蛋白中含有铜, 1921 年 Brodansky 在人脑中发现铜, 直到 1928 年 Hart 确认铜是动物体内必需的营养素 (essential nutrient) [1]。目前已

表 1 铜蛋白与铜酶 (根据 Ochiai, 1977 表修改)

铜蛋白 (酶)	铜原子数	分子量	来源	功能
血蓝蛋白	2	7~8×10 ⁶	头足类腹足类甲壳类	运送 O ₂ -
超氧化物歧化酶	2	35 000	哺乳动物红血球	O ₂ -歧化
血浆铜蓝蛋白	8	151 000	人血浆等	氧化 Fe ²⁺
细胞色素 c 氧化酶	2		线粒体	氧化细胞色素 c
酪氨酸酶	4	119 000	哺乳动物组织	氧化有机底物、 单氧合作用
漆酶	4-6	120 000-141 000	漆树	氧化有机底物
	4	60 000	变色多空菌	
抗坏血酸氧化酶	8	140 000	新鲜水果、瓜类	氧化有机底物
单胺氧化酶	1	170 000	牛血浆	氧化有机底物
	1	96 000	豌豆苗	氧化有机底物
双胺氧化酶	2	185 000	猪肾	
D-半乳糖氧化酶	1	75 000	Dactylium dendroides	氧化有机底物
多巴胺β-羟化酶	2	290 000	牛肾上腺髓质	单氧合作用
天青色素	1	14 600-17 000	绿脓杆菌	电子传递
质体蓝素	1	10 500	菠菜、小球藻	电子传递
Stellacyanin	1	16 800	漆树	电子传递
金属硫蛋白	12	12 000	大部分生物体内 微生物、哺乳动物	螯合金属离 清除自由基

知微量元素铜具有重要的生理功能, 包括循环、排泄、呼吸、消化、神经、内分泌以及新陈代谢和生殖过程都与铜相联系, 铜的生理功能主要是通过铜蛋白 (酶) 实现的, 这些铜蛋白 (酶) 包括血蓝蛋白、超养

化物歧化酶、血浆铜蓝蛋白、细胞色素 C 氧化酶、酪氨酸酶、漆酶、抗坏血酸氧化酶、单胺氧化酶、双胺氧化酶、D-半乳糖氧化酶、多巴胺 β -氧化酶、天青色素、质体蓝素, Stelacyanin 以及铜金属硫蛋白等 15 种, 它们的有关概况见表 1[2]

[二] 微量元素铜的吸收与转运

微量元素铜的吸收与转运目前基本清楚。图 1 显示经口给铜, 铜由胃-小肠吸收进入血液与血浆中的白蛋白、氨基酸结合, 进入肝脏, 形成铜蓝蛋白再分泌入血, 以血铜蓝蛋白(Ceruloplasmin, Cp)的形式转运铜进入机体组织; 此外过剩的铜由肝脏以 Cp、MT 等形式通过胆汁分泌进入小肠, 由粪便排出体外, 一部分血浆 Cp 也可以经肾脏由小便排出[3]。

图 2 显示了小肠粘膜细胞吸收铜锌的过程, 口服或内源性的铜锌进入小肠粘膜细胞后, 首先进入铜锌池中, 其中大部分铜锌刺激 MT 基因启动其表达形成 mRNA, 进一步翻译生成 apo-MT 蛋白, 在与铜锌结合后形成 holo-MT。其中的铜锌可以相互交换, 锌是 MT 结构稳定所必须的, 而铜与 MT 的亲和力比锌强, 如果大量的铜进入机体, 生成的 MT 就是以 Cu-MT 为主。MT 作为铜锌储存的仓库, 不断释放铜锌进入血液, 形成白蛋白铜和白蛋白锌进一步转运至肝脏[4]。

图 3 显示在血浆铜进入肝脏后, 肝脏中有关铜蛋白之间的相互转运关系。首先与还原型的谷胱甘肽结合形成谷胱甘肽铜, Cu^{2+} 被还原为 Cu^{1+} 并被释放出来, 一部分 Cu^{1+} 与 apo-MT 结合形成 Cu-MT, 一部分 Cu^{1+} 与内织网中 apo-SOD 结合形成 holo-SOD, 还有一部分 Cu^{1+} 则与 1040apo-Cp 结合形成 holo-Cp, 在肝细胞的高尔基体进一步加工以 apo-Cp 和 holo-Cp 两种形式进入血液; 同时 Cu-MT 中的 Cu^{1+} 也可以转移到内织网中与 apo-SOD 结合形成 holo-SOD 释放入血[5]。

Fig. 1 The sketch for copper absorption in tissues

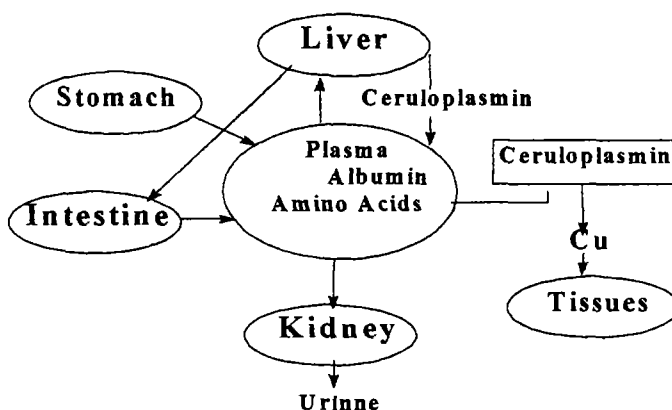
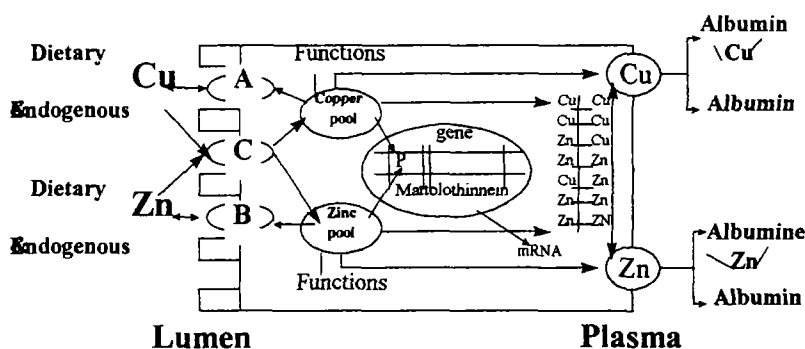


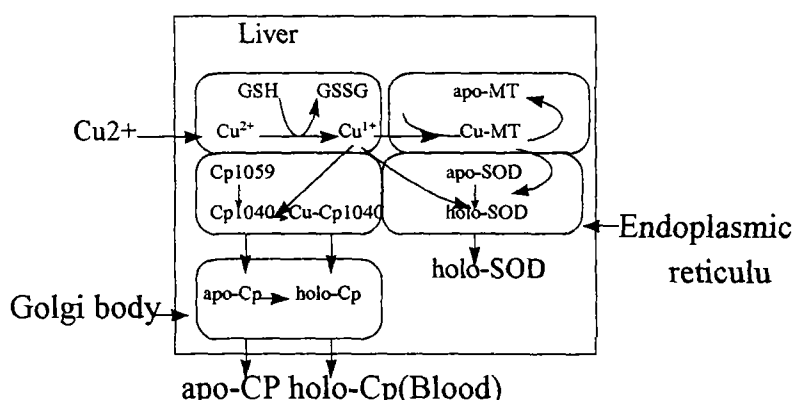
Fig. 2 Schematic representation of intestinal mucosal cell and probable sites of dietary copper and zinc interaction



Davidson[6]用 Cu^{67} -铜蓝蛋白研究了 K562 细胞的铜颗粒通道的特性，发现大部分的铜从铜蓝蛋白进入 K562 细胞时先被膜样筛孔的囊胞包裹和封闭，离心分析该囊胞的密度为 1.051g/dl，认为这就是绝大部分铜进入细胞的颗粒通道。目前已知[7]，在铜从小肠到肝脏的转运方面铜的结合位点在 N-端的组氨酸残基上。在体内实验中发现小量的铜和锌还可以与金属硫蛋白结合，而且铜可以替换锌导致肾脏中的铜吸收增加，以铜—MT 的方式从小便中排出。Freedman[5]用野生型肝癌细胞 HAC 及耐铜毒性、有大量铜累积和金属硫蛋白高表达的 HAC₆₀₀ 细胞研究了细胞内铜的代谢机制。结果发现，在耐铜毒细胞中与活性氧代谢有关的酶中只有谷胱甘肽过氧化物酶的活性升高了 3-4 倍，提示细胞内过氧化氢的水平是增加的。从

这两种细胞浆中分离的铜复合物超过 60%是 GSH 铜, Cu^{67} 的动态转运结果表明在与 MT 结合以前 Cu^{67} 是与 GSH 结合的, 用 bithionine sulfoximine 消耗细胞内的 GSH 后, 阻断了 50%以上的 Cu^{67} 与 MT 结合, 推测铜在进入细胞后首先与 GSH 结合, 然后转运到 MT 中储存。HAC₆₀₀ 细胞耐铜毒的机制可能与细胞内高水平的 GSH、MT 有关。

Fig.3 The relationship between ceruloplasmin ,Cu-Zn-SOD and metallothionein in liver cell



[三] 微量元素铜代谢异常疾病研究

有关铜代谢异常的研究非常多, 最常见的有 Menk's 病和 Wilson's 病, 是与人类相关的先天性铜代谢疾病。Wilson's 病的基本表现就是铜在肝脏中的大量积累导致肝脏的损害, 血浆中的铜蓝蛋白水平和胆汁中的铜含量显著地减少, 提示存在铜在肝脏中的排泄障碍[8, 9]。相反, Menk's 病则主要是肝铜的缺乏, 表现为铜的吸收减少, 肝脏铜水平及铜依赖酶活力的降低[10], 然而, 铜在其他组织中如肾脏、肠中的水平是升高的, 反映出铜在某些组织中的转运存在障碍。奇怪的是锌的水平在这两种疾病中是基本正常的。1993 年, Mercer[11]等人成功地克隆出了 Menk's 基因, 虽然 Menk's 基因的表达产物还没有分离出来, 但其结构通过 cDNA 已经推导出来, 基因的表达产物含有 1500 个氨基酸, 有 6 个伸展的疏水氨基酸结构, 典型的跨膜蛋白的转膜区域, 这种跨膜蛋白在 N-端含有 5-6 个重复的金属

结合序列, 类似于抗 Cd 和 Hg 细菌系统中 P 型 ATP 酶结构以调节金属离子的流动。另外, 在单个氨基酸序列 1044-1050 中含有一个天门冬氨酸残基可以作为启动 ATP 离子泵磷酸化的重要位点。据信可以调节金属离子的流动, 就象 Na-K-ATP 泵调节钠、钾离子一样调节细胞内钠离子浓度。Menk's 基因可以在肠中、肾脏、胰腺、心脏、肺脏、大脑及肌肉中表达, 但有意思的是在肝脏中没有表达[12]。缺少转运铜离子的 ATP 酶必然会影晌铜从肝细胞内流出, 这可能就是 Menk's 病的发病的分子机制。

对 Wilson's 病基因结构研究表明, 该病也与编码转运铜的 ATP 酶有关[13]。该基因与 Menk's 基因非常相似, 同源性达 50%, 而且 79% 与转导、通道、磷酸化和 ATP 结合部位有关。有意义的是 Wilson's 病基因主要在肝脏和肾脏中表达, 和临床发病相一致。令人感性趣的是该基因在它的每个金属结合部位都含有 cysXXcys 结构, 而且在基因转导区也含有一个 cysXXcys 结构。相似的结构在许多微量金属结合蛋白中都可以发现, 尤其在金属硫蛋白中大量存在, 使结合铜保持还原状态。这种还原铜的能力, 是使铜能与裸铜蓝蛋白结合形成完整蛋白以及从胆汁中分泌所必须的, 而 Wilson's 病在这方面的机制却有缺陷。

对于所谓的转铜 ATP 酶在不同组织中的分布差异, Wilson's 病基因与 Menk's 基因的发现为我们研究铜在正常组织和病理状态下铜的转运提供了新的认识。细菌、动物和人类中所发生相应的高水平金属转运能力说明这些对于它们是非常重要的, 而更加复杂的蛋白结构仍有待进一步研究。

【参考文献】

- [1]Kie C. Induction of copper *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1989;258:1-2
- [2]周井炎 铜 见王夔主编 *生命科学中的微量元素* (第二版), 中国计量出版社 1997 年 2 月第二版. P 519 .
- [3]Cousins R. J. *Physiological Reviews* 1985;65:239.
- [4]Cousins R. J. *Physiological Reviews* 1985;65:241.
- [5]Freedman J.H, Ciruolo M. R. and Peidach J *The Journal of Biological Chemistry.* 1989;264: 5598-5605
- [6]Davidson, L. A., McOrmond, S. L. and Harris, E. D. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1994;221:1-6.
- [7]Bremner I In: *Metallothionein II: Proceedings of the 2nd international symposium on Metallothionein and other low molecular weight metal-binding proteins*,1987 pp.81-107[J. H. R.

Kagi and Y. Kojima, editors]. Basel: Birkhauser Verlag.

[8] Gibbs, K and Walshe, J. M. *Lancet* ii, 1980; 538-539.

[9] Sugawara, N., Li, D., and Sugawara, C. et al *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology* 1993; 81: 45-52

[10] Danks, D. M. In: The metabolic basis of inherited diseases, 1989; pp. 1411-1431 [C. R. Scriver, A. Beaudet and W. J. Sly et al. Editors]. New York McGraw-Hill.

[11] Mercer J. F. B., Livingston, J. and Hall, B. et al *Nature Genetics* 1993; 3: 20-25

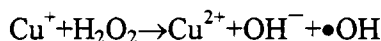
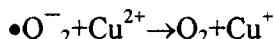
[12] Vulpe, C., Levinson, B. and Whitney S, et al. *Nature Genetics* 1993; 3: 7-13

[13] Bull, P. C., Thomas G.R. and Rommens, J. M. et al *Nature Genetics* 1993; 5: 327-337.

三、铜、自由基与抗肿瘤

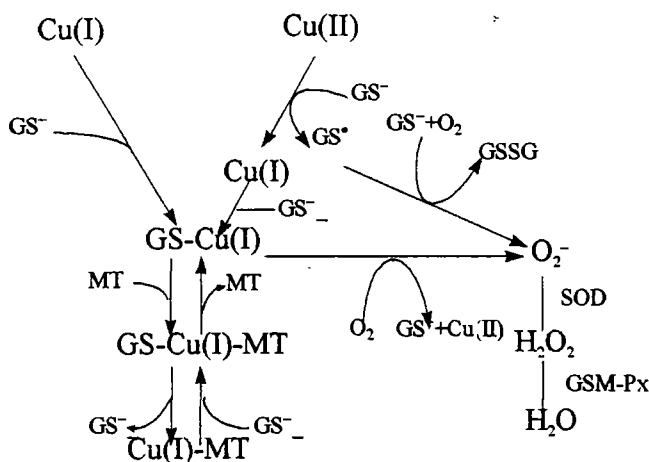
[一] 铜与自由基生成

铜的抗肿瘤作用往往与细胞膜、细胞核的氧化损害有关。铜离子作为活跃氧化还原反应的金属离子，通过催化 Haber-Weiss 反应生成羟自由基



通过分析 DNA 损伤的产物，芳香族化合物的羟化反应、特殊的 ESR 检测手段等都可以证实羟自由基的形成。ESR 技术已经可以直接用来检测大鼠体内由铜与抗坏血酸反应形成的羟自由基[1]。此外，铜也可以通过谷胱甘肽和 MT 的氧化还原反应产生超氧阴离子[2] (图 4)

Fig.4 Schematic diagram of cellular copper metabolism



[二] 铜与脂质过氧化反应

由铜介导形成的活性氧也可以引起脂质过氧化反应。当肝组织匀浆或肝细胞与铜反应时,肝脏中的戊烷和丙二醛(malodialdehyde)以及硫巴比妥酸反应物质(TBARS)的增多就证实发生了脂质过氧化反应。而且,当大鼠服用过多的铜时,可以引起线粒体脂质的过氧化反应使聚二烯和TBARS含量增高[2]。还可见肝细胞线粒体内囊状脊的扩大以及肝脏损伤引起的其他生化和组织学的变化,这些表现尤其在缺乏维生素E的大鼠负铜的情况下更容易出现,提示铜介导了对肝细胞的氧化损伤。而且与缺VE、硒大鼠负铜的情况下胆汁中检测到的自由基产物相符[3]。如果大鼠给予VE和硒,则在大鼠胆汁中不能检测到自由基产物,这些结果都证明铜的毒性与脂质的过氧化反应也有关系。

一般认为线粒体是铜介导的肝损害最先作用的靶器官,负铜大鼠线粒体功能受到损害,当有几个电子体作用于线粒体时,其呼吸功能和呼吸调控率减弱[4]。分析线粒体电子转移蛋白复合物氧化还原酶活性发现细胞色素C氧化酶的活性降低,线粒体功能发生的如此变化使细胞能量供应减少,线粒体中的钙离子流入胞浆增多,细胞受到高水平的过氧化物作用,从而使肝细胞功能发生障碍。

铜介导的脂质过氧化作用也可以发生在负铜大鼠肝细胞溶酶体中。测定分离的肝细胞溶酶体膜中的TBARS浓度是正常水平的两倍,膜脆性明显升高,膜韧性降低,而且膜中脂肪成分发生了变化,即多链不饱和脂肪酸增加。由于溶酶体中的pH值增加,溶酶体膜的变化必然会影响离子泵ATP酶功能的正常工作[5]。

[三] 铜与DNA损伤

1 铜-DNA理化研究

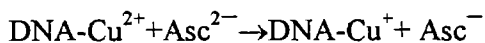
1968年,Eichhorn和Shin[6]探讨了二价金属离子与DNA稳定性的关系,他们发现 Mg^{2+} 能够稳定DNA的结构,而与核酸碱基结合紧密的其它金属离子如 Cd^{2+} 、 Cu^{2+} 则使DNA的双螺旋结构的稳定性下降。1987年,Stoewe[7]发现铜离子与DNA的亲合力比最强,而且认定这正是铜离子通过过氧化氢氧化DNA的能力比铁离子强50倍的主要原因。1991年

Kagawa[8]等人将双螺旋DNA溶于CuCl₂溶液中测定了二价铜离子与双螺旋结构DNA结合的晶体结构,发现Cu²⁺与DNA形成了规则的八面体,在中纬线平面有4个水的配体,在轴心位置鸟嘌呤的N-7连接着第五个水分子。还有人[9]研究了Cu²⁺-GMP复合物的结构发现邻近的GMP5'端磷酸中的氧原子也能够与铜形成平面配体,这种情况在双螺旋结构DNA中却还没有发现。腺嘌呤残端与铜的结构中也不存在八面体结构,但在鸟嘌呤与腺嘌呤两个残端可以与铜相互作用形成以铜为轴心的三角形的双嘧啶复合物[10]

虽然二价铜与DNA结合后可以使其双螺旋结构稳定性下降,但一价铜却有稳定作用[11]可能涉及到使某些DNA区域由B形转变为Z形[12]。实际上,Minchenkova和Ivanov[13]认识到铜的氧化态在控制DNA形成双螺旋结构过程中形态变化起着重要的作用。

2 DNA 损伤机理

铜作为活跃的氧化还原金属离子,在体内通过产生羟自由基损伤DNA已经受到越来越多的重视。如Li[14]发现铜通过Cu(II)/Cu(I)的氧化还原机制强烈地氧化苯代谢产物-氢醌生成过氧化氢和苯醌,同时引起质粒φX-174RFI DNA的损伤;Jun-ichi[15]证实寡聚肽-Cu(II)复合物与过氧化氢反应也可以引起DNA的损伤。通过检测DNA与Cu(II)、H₂O₂、还原剂温育时产生的羟基产物,可以证实DNA-Cu(II)能够促进羟自由基的形成[16]。Yamamoto和Kawanishi[17]认为,在DNA-Cu(II)与过氧化氢相互作用形成氧化产物时,相邻DNA鸟嘌呤碱基残端与铜中心之间形成的过氧化桥(peroxide bridge)比形成电子转移更重要。运用ESR自旋捕获技术可以检测到DNA与Cu(II)、H₂O₂、抗坏血酸(ascorbate, Asc)温育时产生的羟自由基,反应如下[18]:



Bhat[19]等研究发现,在Cu(II)与鞣酸体系中,不需要其他还原剂或巯基就可以通过产生羟自由基导致嗜菌体的失活和DNA的损伤,并认为Cu(I)在这个反应体系中是剪断DNA的必需中间产物;他还发现[20],鞣酸在有氧分子及Cu(II)存在的情况下损伤DNA的序列和部位都是特异的,优先结合于DNA的A-T碱基序列。每个鞣酸分子可以还原6个Cu

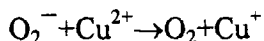
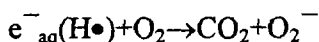
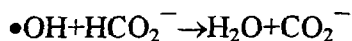
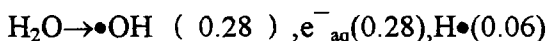
(II) $\rightarrow$ Cu (I), 并通过 Harber-Weiss 反应和 Fenton 反应生成羟自由基。在 DNA 附近产生的羟自由基是导致 DNA 断裂的主要原因。

Joshi.[21]用高效液相和 ^{31}P -NMR 方法研究了 Cu (II)-desferal (desferal / desferrioxamine, DFO)对 CT DNA 的损伤,发现生成的羟自由基最先攻击的是 DAN 小槽中的糖分子 C1', 氧化形成 5-亚甲基呋喃酮(5-methylene furanone), C4'位的过程较轻,而 C5'则没有这种反应发生。

Feldlberg[22]指出 H_2O_2 与 Cu(II)反应可以引起多个 (dG-C) 的损害而非 (dA-T)。1989 年, Sagnipanti[23]在体外实验中发现单独铜 (10^{-2}M) 或过氧化氢 (10^{-2}M) 不能引起质粒 DNA(Pz189)的断裂,而 10^{-6}M 的铜与 10^{-5}M 过氧化氢一起反应时可以导致 DNA 的断裂,抑制其转化活性。链的断裂与反应温度、铜与过氧化氢的浓度等有关。金属离子的螯合剂、过氧化氢酶以及自由基的清除剂均能抑制 DNA 的断裂。但 SOD 对此反应没有影响,说明过氧化物自由基没有参与 DNA 的损伤。DNA 序列分析表明,在鸟嘌呤的 2 个或多个位点中最容易形成六氢吡啶热敏感型的 DNA 片段,鸟嘌呤核苷是最易受铜与过氧化氢反应生成的羟自由基攻击的部位:

3'-TA⁴⁰ AACTATACTA CGCGGGGCGA AGGGCAATTC CCTCGTCCGG TCATTTCGT AATGGACACC ACCCCAAGGG CTCGCCGGTT¹²⁰-5', 同时也证实其特异性损伤的部位在 G-C 而非 A-T。

Sagnipanti[23]还发现单独的一价铜也可以造成 DNA 的损伤,但不存在鸟嘌呤多位点特异性损伤现象。Prutz W. A.[24] 等人通过加入还原剂或者通过 γ 射线还原二价铜可以很快得到还原型的超氧化自由基,以研究一价铜与 DNA 相互作用关系。



应用这种方法,他们测定 DNA-Cu (I) 紫外吸收的波谱特征,发现 Cu (I) 优先结合于鸟嘌呤和胞嘧啶碱基中,同时伴随着烯醇化 (enolization), 质子从 N-1-鸟嘌呤转移到 N-3-胞嘧啶以及 DNA 形态的

改变。Gunther[25]证实一价铜与过氧化氢反应也可以生成羟自由基。

Chiu S.M.[26]研究发现铁和 γ 射线对 V79 核染色体的损伤是无规律的,铁离子非特异地结合于 DNA 的某些区域。而铜离子介导产生的 DNA 片段,大小约为 100-200kbp.,铜离子则结合于 DNA 双链基质的非组蛋白区域,说明金属离子对 DNA 的损伤与它们在 DNA 的结合位点有关。DNA 中的组蛋白对铁(II)介导的 DNA 损伤有保护作用,但对 Cu(II)则否,与铜结合位点远离组蛋白有关。该研究阐明了铜和铁对 DNA 损伤的不同特点。

至于铜与过氧化氢损伤 DNA 的机理, Sagnipanti[23]推测认为包括下面几个步骤:首先, DNA 损伤形成碱基序列的特异性提示铜结合的负电子区至少含有 2 个鸟嘌呤核苷。鸟嘌呤核苷是极性负电子碱基,有关铜离子与鸟嘌呤核苷结合的证据[27,28]提示在 DNA 分子中相邻的鸟嘌呤核苷之间也一样是极性负电子部位[29];第二, Cu(II)与 DNA 反应。通过质子转移到鸟嘌呤,与铜和其他物质的方式一样, Cu(II)通过还原反应生成鸟嘌呤的氧化产物,这种产物是六氢吡啶热敏感型的而不是碱敏感型,在体外不能阻断 DNA 的聚合作用;最后, H_2O_2 与处于 DNA 结合状态的 Cu(I)反应或在 DNA 附近与 Cu(I)反应,生成羟自由基和 Cu(II),反过来羟自由基引起六氢吡啶热敏感型碱基损害,或者在 Cu(II)与 DNA 结合原始部位引起小范围链的断裂。

3 铜引起细胞凋亡

在氧化应激条件下引起 DNA 的损伤既可以通过活性氧的直接作用,也可以通过内源性核酸酶引起细胞凋亡。将 HepG2 人肝癌细胞与邻二氮杂菲铜化合物共同温育,可以形成典型的核酸内源性 DNA 凋亡片段[30]。然而,在低温或在培养液中加入抗坏血酸, DNA 片段就不再出现,说明羟自由基可以攻击 DNA 形成 DNA 片段。在低温时抗坏血酸形成一种还原环境,因而可以阻断羟自由基的产生。当分离的肝细胞核酸与 1,10-邻二氮杂菲温育时也可以导致内源性核酸断裂,如果再加入抗坏血酸盐和过氧化氢,则更加重核酸损伤[31]。DNA 中含有 8-羟基去氧鸟嘌呤,证实是羟自由基的氧化作用。上述结果和正常染色体中存在 1,10-邻二氮杂菲铜结合物引起羟自由基依赖的 DNA 损伤的观点相吻合。有人已经在体内实验中检

测到长时间负铜的大鼠的肝脏和肾脏中 8-羟基去氧鸟嘌呤浓度升高, 直接支持了铜可以介导对 DNA 碱基的氧化损伤[32]。

【参考文献】

- [1]Kasiiska M. B., Hanna P. M. and Hwenandez L. et al. *Mol. Pharmacol.* 1992;42:723-729 .
- [2]Freedman, J.H., Ciriolo, M.R. and Peisach, J. *Biol. Chem.*1989; 264: 5598-5605
- [3]Kasiiska M. B., Hanna P. M. and Jordan S. J. et al. *Mol. Pharmacol.* 1993; 44:222-227.
- [4]Sokol R. J., Devereaux M. W. and O'Brien K. et al. *Gastroenter- ology* 1993; 105:178-187.
- [5]Myers B. M., Prendergast F. G. and Holman R. et al. *Gastroenter- ology* 1993;105: 1814-1823.
- [6]Eichhorn G. L. and Shin. Y. *Ac J. Am. Chem. Soc.*1968; 90:7323
- [7]Stoewe R.and Pr tz, W. *Free Radical Biol. Med* 1987; 3: 97.
- [8]Kagaea, T.F. Geierstanger, B.H. and Wang A. H. J., et al. *J. Biol. Chem.* 1991; 266: 20175
- [9]Aoki, K., Clark G. R. and Orbell. J. D. *Biolchim. Biophys. Acta* 1976; 425: 369
- [10]Geierstanger, B. H. Kagawa. T. F. and Chen S. L. et al. *J. Biol. Chem.*1991; 266: 20185
- [11]Atherton, S. J. in "Free Radicals, Metal Ions and Biopolymers" (P. C. Beaumont. D. J. Deeble, B. J. Parsons, et al eds.)p93 Richelien Press. London, 1989 .
- [12]Prutz, W. A. Butter, J. and Land. E. J. *Int. Radial Biol* 1990; 58: 215
- [13]Minchenkova L. E. and Ivanov, V. I. *Bioputymers* 1967; 5: 615
- [14]Li ,Y.B. et al *Chem-Biol. Interact.* 1995; 94: 101-120
- [15]Jun-ichi, V. et al. *Biochem Mol. Biol. Int.* 1994;34: 801-808.
- [16]King T. P., Bremner I. J. *Comp. Path.* 1979; 89:515-529
- [17]Yamamoto K. and Kaenishi, S. *J. Biol. Chem.*1989; 264: 15435
- [18]Milne, L., Nicotera, P. and Orrenius, S, et al. *Arch. Biochem. Biophys.* 1993;304: 102
- [19]Bhat ,R. and Hadi, S, M. *Mutation Research.* 1994; 313: 49-55.
- [20]Bhat, R. and Hadi, S, M. *Mutation Research.* 1994; 313: 39-48 .
- [21]Joshi, R.R., Likhite, S.M. and Kumar, R.K. et al. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1994;285:292.
- [22]Feldberg, R., S, Carew , J.A. and Paradise, R. J. *Free Radicals Biol* 1985; 459-466.
- [23]Sagnipanti , J. L. and Kraemer, K. H. *The Journal of Biological Chemistry.* 1989;264:1729-1734
- [24] Butter, P J. and Land. E. J. *Int. Radial Biol.* 1990; 58: 215
- [25]Gunther ,M.R. et al *Arch. Biochem. Biophy.* 1995;316: 515-22.
- [26]Chiu S.M. et al *Biochemistry* 1995;34: 2653-2661.
- [27]Zimmer, C. and Venner, H. *Eur. J. Biochem.* 1970;15:40-47.
- [28]Minchenkova, L.E. and Ivanov, V. I. *Biopolymers* 1967;5:615-625.
- [29]Mattes W.B., Hartley, J.A, and Kohn, K. *Nucleic Acid Res.*1986; 14:2971-2987
- [30]Tsang S. Y. Tam. S. C. and Bremner I. et al. *Biochem J.* 1996;317:13-16
- [31]Burkitt M. J., Milne L. and Nicotera P. et al. *Biochem J.* 1996;313:163-169
- [32]Toyokuni, S. Sagnipanti, J.L. *Toxicol. Appl. Pharnacol.* 1994; 126:91-97.

四、铜金属硫蛋白研究

1957年 Margoshes 和 Vallee[1]在研究镉的生物学作用时,从蓄积镉的马肾中分离出(Cd, Zn)-MT。1962年, Porter[2]从新生牛和新生儿的肝脏中分离出一种富含铜的蛋白质,称为“线粒体铜蛋白 (Mitochondrocyprin)”是一种分子量高、含有大量半胱氨酸残基 (Cys)、不溶于水的蛋白,后被证明是一种 Cu-MT 的多聚体[3-5]。1976年, Bremner[6]通过给小鼠注射铜,在低温无氧的条件下分离肝脏的铜蛋白取得了成功(含有30%左右的Cys,不超过1%的亮氨酸),而 Winge[15][7]在常规条件下分离 Cu-MT 得到的则是含有少量的 (5%) 半胱氨酸残基和高比例 6-9% 的亮氨酸 (Leu) 和异亮氨酸 (Isoleu),证明在常温有氧的条件下, MT 易发生降解聚合生成 Cu-MT 的多聚体。

[-] Cu-MT 的诱导合成

铜 MT 具有很强的可诱导性[8-9],一般在动物生长的早期 (如胚胎期、新生儿期)、患有影响铜代谢的疾病 (如 Wilson's Disease, Menk's Disease) 及给动物喂食或注射含铜物质,均可以诱导生成 Cu-MT[10-12]。但它的诱导能力受许多因素的影响,例如生物的种类、性别、组织内锌的含量和摄入铜盐的方式等。Richards[13]等人发现,与锌镉相比,铜缺少对 MTmRNA 诱导的能力,铜比等量的锌和镉对肝脏和肾脏 MT 合成能力都要弱。对于这种现象的解释提出了 apo-MT 抑制转录 (Repression of transcription) 理论[14]: 即 apo-MT 结合金属离子后,其构象发生了改变减少了对转录的抑制作用,转录一直在进行直到过量的 apo-MT 被合成,此时 apo-MT 与基因启动子相结合,中止反应进行。金属诱导的不同机理可能在于金属离子与染色质上 apo-MT 结合的不同。如果 MT 的 α -domain 是与 DNA 的主要结合部位,锌铜与 MT 的两个 domain 的结合顺序的不同可能是锌更适合诱导 MT 的原因。

Cu-MT 在肝脏的合成与同在肝脏中的聚集程度有关。给小鼠注射一次铜后,鼠肝铜量在 18 小时后到达最大,在第四天降低到原始水平[15]。给铜的途径也影响着 MT 的合成,肌肉注射铜能够很容易诱导合成 MT, 而且肝脏中差不多一半的铜以 MT 的方式存在;如果经口给铜,只有肝脏中

铜的浓度达到 500 μ g/g 才能诱导合成 MT，而且也只有少量的铜与 MT 结合[16]，而当肝浓度高于此值时，肝 MT 浓度的增加与肝铜含量的增加成正比。说明不同的给药途径诱导合成 MT 的效率是不一样的[17]。

MT 中的铜往往是以一价的方式存在的[18-19]，体外实验发现，apo-MT 只与 Cu (I) 发生重组反应，因此细胞内的 Cu (II) 必须还原为 Cu (I) 才与 apo-MT 结合。Cu (I) 在细胞内的潜在来源是 GSH/GSSG 还原体系[20]。GSH 被认为是在诱导 MT 之前防御镉和铜的第一道防线，Cu (I)-GSH 可能是 Cu (I) 与 apo-MT 结合的 Cu (I) 给予体。

[三] 锌对 Cu-MT 的影响

在动物体内生成的铜 MT 往往含有锌原子，即为 Cu-Zn-MT，。至于锌在铜 MT 中的作用，Ian Bremner[21]等强调锌对铜 MT 的稳定性非常重要，给缺锌鼠诱导的高浓度 MT 存在的生命期要比给锌鼠诱导的 MT 短，而且富含锌的 MT 降解时间和速度要慢的多。他们还证实铜 MT 的降解速度要比其他蛋白降解速度快，含锌的 Cu-MT 的半生命期为 16.9 ± 1.0 小时，缺锌的 Cu-MT 的半生命期为 12.3 ± 0.5 小时，胞浆中蛋白的半生命期为 90 小时。Cu-MT 的降解代谢是与金属离子脱离蛋白同时发生的。在组织中 MT 浓度主要取决于锌而几乎很少依赖铜，这和锌、铜诱导合成 MT 的能力是一致的。几乎不变的是，当肝脏中的锌浓度超过阈值时，绝大部分锌与 MT 结合，而肝脏中的铜与 MT 结合的情况是很不同的，与许多因素如物种、摄入铜的途径以及锌的状态有关[22]。一般情况下 MT 中含有一个锌原子，但在极端负铜情况下，可以是铜出现而没有锌原子。但是，在缺锌的动物中往往不可能合成铜 MT，尽管铜的浓度很高或者在一般情况下铜能诱导这种动物合成 MT，这种现象可以部分地通过缺锌动物 MT 的生物学半生命时间明显减少反映出来。

肝脏中 MT 与铜结合的范围非常大，可以低于 5% 或者超过 80%。铜与 MT 结合后常常分布在胞浆或细胞器中（如溶酶体），但是如果缺锌，则几乎没有铜能与 MT 结合，说明在肝脏中锌的含量和铜锌比影响着结合到 MT 中的铜的数量。在正常情况下结合到 MT 中的铜是非常少的[23]。

[四] Cu-MT 的生物学功能

Cu-MT 的生物学功能是多方面的,它关系到微量元素铜的生理生化功能的各个方面。

1 对胃肠道铜吸收的影响

在肠道对铜的吸收过程中,口服 ^{64}Cu 发现, ^{64}Cu 和小鼠和牛的十二指肠 MT 相结合[24]。Fischer 等人[25-28]发现,给小鼠喂含镉或锌的饲料,放射性铜转移到血浆的量减少,但是以 Cu-MT 形式存在于粘膜的量增加。由于铜与 MT 结合的比锌或镉要强,所以铜可以置换 MT 上的锌或镉,铜与粘膜 MT 的集合作用阻碍了铜的血液转移,因此它被认为在调节铜的吸收过程中有重要的作用。Felix 等[29]认为,MT 除了参与吸收过程,它还在铜或锌的粘膜-浆膜流动过程中起着重要的作用,当它与 Cu (I) 以稳定的 Cu (I) -S 簇结合时,MT 被认为是粘膜-浆膜流动过程中相当好的一种蛋白。其次 MT 在铜的血清转运中的作用,似乎还不明确,在血浆中 MT 的含量极低,实验发现[30],给成年鼠血管注射的 Cu-MT 会很快消失,其半衰期只有几分钟。

2 肝脏中的 Cu-MT

肝脏是铜的主要代谢储存器官,也是 Cu-MT 的主要生成场所。目前已知在肝脏中的主要含铜蛋白有铜蓝蛋白 (Ceruloplasmin, CP)、Cu-Zn-SOD、Cu-Zn-MT,实际上还有许多未确定的高分子量的铜结合蛋白,它们之间存在着密切的相互依存、转运关系[31]。Webb[32]研究发现 Cu-MT 可以向其他的需铜蛋白如 SOD、细胞色素 C 氧化酶及铜蓝蛋白提供铜。给动物过量的铜,在其肝细胞质中会发现铜存在于高分子量的蛋白中(包括 MT),其中 50%以上是与 MT 集合在一起的,这说明 MT 在肝脏中铜的代谢中起着重要的作用。

MT 参与肝脏铜代谢是很复杂的,因为肝脏中铜与 MT 的结合受多种因素的影响。已经知道在肝脏的细胞浆中铜主要与 MT 结合,以减少金属的毒性[33-35],铜 MT 在肝脏中的合成可以通过铜诱导 MT 基因转录增加而实现[36]。MaCarter 等人[37]已经得到鲑鱼中肝 MT 含量与铜毒性耐受性的关系,对铜的细胞解毒是 MT 的一个重要功能,铜的吸收与温度、能量和-SH 含量有关[38]。Suganwara [39]研究发现,当 LEC 大鼠肝细胞中铜含量达 $227.5 \pm 21.6 \mu\text{g/g}$ 组织,比正常对照 Fischer 大鼠肝细胞中铜

5.2±0.1μg/g 高出 43 倍时, SGPT、SGOT 及 BUN、CRE 等肝肾功能指标均没有受到影响, 但 LEC 大鼠的铜蓝蛋白活力明显下降, 胆汁、血清中铜含量也降低。在 LEC 大鼠肝细胞浆中, 96% 的铜、66% 的锌是与 MT 结合的, MT 的铜锌比值在 LEC 大鼠中是 5.9±0.1/1, 而正常 Fischer 大鼠仅为 2/7.1±0.8, 说明 LEC 大鼠肝脏中铜替代了锌与 MT 结合, MT-Cu 浓度是 Fischer 大鼠的 130 倍, 锌是 6 倍。Liu[40]等人发现 MT 裸鼠的肝细胞对铜毒性的敏感性较正常肝细胞要高。但有人[41]发现赖受铜毒性肝癌细胞株中, 由于 MT 基因的拷贝数增加及转录速度加快使其 MT 含量非常丰富, 认为 MT 的高表达是细胞耐铜毒性的重要原因。有人[42]认为负铜动物对铜的适应能力, 不但与铜从肝脏中转移到肾脏有关, 也与铜结合到 MT 中的数量不断增加有关。

然而, 这种认为 MT 起到拮抗铜毒性的认识在 LEC 大鼠对铜毒性的极端敏感性方面是难以解释清楚的[43]。LEC 大鼠可以在肝脏中迅速积累大量的铜, 4 个月龄时发展为爆发性肝炎。相同含量的铜对 LEC 大鼠肝脏的损伤程度较正常大鼠要严重的多, 而在 LEC 大鼠中的铜大部分是与 MT 结合的, 即以铜 MT 的方式存在的

Evering[44]认为组织化学法染铜和组织中铜浓度之间的相关性不太好, 通过免疫组织化学方法测定铜 MT 来反映组织中的铜含量则有更好的相关性。因为组织中锌的含量是相对恒定的, MT 染色的密度加深可以反映铜 MT 的增加, 而且免疫组织化学方法测定铜含量要比组织化学法更加敏感, 更可靠。在肝脏的门静脉和中央区是铜染色和 MT 集中的区域。

MT 常常被认为是胞浆中的蛋白, 如在负铜肝细胞的溶酶体中也可以见到 MT 蛋白的积聚[45] (Bremner I 1987)。但免疫组织化学技术证明在细胞核中也存在 MT, Panemangalore [46]已发现在胎儿或新生大鼠的肝细胞核中有铜 MT。Elemer [47]应用免疫组织化学法证实负铜大鼠的肝细胞核中有铜 MT 的阳性染色颗粒。但胞浆和核中的 MT 的意义是不同的。核中的 MT 一般出现在细胞增殖期, 如在上皮生长刺激因子作用下处于增殖 S 期的肝细胞核中[48]、在肝切除后再生肝细胞的细胞核中[49]、在胎儿生长期的肝细胞中都可见核 MT[50]。Evering[44]认为核中出现 MT, 可能具有病理性的意义。已经认识到的是 MT 蛋白过多可以导致肝细胞的坏死, 也可以说高表达的 MT 是一个细胞致死因子。

Cu-MT 同样参与肝脏铜的排出[51]。肝铜的释放主要是通过胆汁从粪便排出体外。MT 通过胞吐方式从肝脏溶酶体释放到胆汁，甚至在未给金属的动物中 MT 释放高胆汁中的量比到血液的 10 倍还多。进一步实验证明，给小鼠喂铜含量很高的食物，几个星期后发现，胆汁 MT 浓度的增加与肝 MT 的增加成正比，但在注射铜的小鼠实验中发现，胆汁清除的速度为肝脏合成 MT 速度的 1-2%，说明在肝脏中还存在着另外机理清除 MT。如果胆汁的排泄通道发生障碍，则必然会导致铜在肝脏中的大量累积，发生疾病如 Wilson's 病[52]，这种病的特征是血浆中的铜蓝蛋白缺少而肝脏中的铜出奇的高，在此病的早期阶段，肝脏能够结合正常铜浓度的 30-50 倍而没有临床症状，这可能是因为肝脏中大量的铜 MT 结合，发挥其解毒作用。

[五] Cu-MT 与自由基

关于铜 MT 与自由基的关系，Miesel 等人[53]实验发现，与 Cu-MT 结合的 $18\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ 铜可以抑制活跃的人血吞噬细胞 50% 的过氧化生成物，而且发现 Cu-MT 可以清除 $\bullet\text{OH}$ 自由基和单线态氧，与白蛋白和 CP 相比，Cu-MT 清除 $\bullet\text{OH}$ 自由基约强一倍。但 Sakura[54]等人用 LEC (Long-Evans Cinnamon) 大鼠观察到，在 LEC 大鼠肝脏中产生的 Cu-MT 在 H_2O_2 存在时可以产生 $\bullet\text{OH}$ ，但正常鼠 Cu-MT 或兔肝 MT-1，MT-2 在有 H_2O_2 存在时几乎不产生 $\bullet\text{OH}$ ，其原因可能与 LEC 大鼠肝脏过量铜的存在有关，实际上是 Cu-MT 不能充分清除铜与 H_2O_2 产生的自由基。

另外铜 MT 在介导脂质过氧化反应方面也发挥重要作用。由氧代谢形成的自由基常常引起细胞膜不饱和脂肪酸的氧化[55]，细胞内许多反应体系，包括超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、过氧化物酶、谷胱甘肽 (GSH) 和 V-E 都可以防止这种损害[56]。在体内金属硫蛋白也可以与羟自由基、超氧自由基反应，羟自由基、超氧自由基都是引起脂质过氧化反应的重要物质[57]。Arthur J. R. 等人[58]用猪肝 Cu-Zn-MT-1 和大鼠肝脏 Zn-MT-2 研究它们对脂质过氧化反应的影响，发现在黄嘌呤/黄嘌呤氧化酶反应体系中 Cu-Zn-MT-1 可以引发脂质过氧化反应，而 Zn-MT-2 则没有作用，Sephadex G-75 柱色谱分析表明 Cu-Zn-MT-1 与黄嘌呤/黄嘌呤氧化酶发生了聚合作用，证明铜参与了脂质过氧化反应。黄嘌呤/黄嘌呤氧化酶一般启

动生成过氧化氢和超氧阴离子的过氧化反应,进而生成羟自由基,尽管在体内 MT 能清除该体系生成的过氧化氢和超氧阴离子,但不能阻止脂质过氧化反应,表明 MT 这种作用间接的依赖于铜离子的存在状态,如果铜离子以 Cu-Zn-MT-1 状态存在,就有利于细胞内的脂质过氧化反应。

[六] Cu-MT 与肿瘤

Cu-MT 与肿瘤的关系,目前研究的较少,主要是由于铜与肿瘤的关系引起人们的兴趣。已有大量的资料证实[59],血清铜浓度的升高与癌症病情的发生发展呈正相关,而当病情缓解或好转时,血清铜浓度下降。同样在许多种类的肿瘤组织中存在着铜的积累。Kontozoglou 等人[60-61]报道,在肝肿瘤病人中 Cu-MT 含量升高,可以作为诊断治疗的依据。他们认为 Cu-MT 类似甲胎球蛋白,通常在胎儿生长期合成,在后天生长阶段逐渐消失,但可以在肿瘤生长发展阶段重新出现。还有许多报道[62]证实,在甲状腺癌、睾丸胚胎癌、卵巢癌、肝癌、胃癌、膀胱癌、乳腺癌等癌组织中发现 MT,但这些 MT 是否为铜 MT,尚不清楚,MT 对肿瘤治疗的影响也还存在争论。

总之,铜金属硫蛋白在维持体内铜的平衡,调节铜的代谢与转运等方面起着重要的作用,尤且在肿瘤的诊断治疗方面的作用尚须认真探讨,因而有必要从分子生物学角度深入研究。

【参考文献】

- [1]Margoshes, M., Vallee, B. L. *J. Am. Chem. Soc.* 1957; 79: 4813
- [2]Porter, H., Jonston, J., and Porter, E. M. *Biochim. Biophys. Acta.* 1974; 65: 661-668
- [3]Porter, H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1974; 56: 661-668.
- [4]Irons, R. D. Smith, J. C. *Chem. Biol. Interact.* 1977; 18: 83-89.
- [5]Bremner, I. Young, B. W. *Biochem. J.* 1976; 157: 517-520.
- [6]Bremner, I. Young, B. W. *Biochem. J.* 1976; 155: 631-635.
- [7]Winge, D. R. Premakumar, R., and Wiley, R. D. et al. *Arch. Biochem.* 1975; 170: 267-288.
- [8]Durnan, D. M., Palmiter, R. D. *J. Biol. Chem.* 1981; 256: 5712-5716
- [9]Mercer, J. F. B. Lazdins, I. and Stevenson, T. et al. *Biosci. Rep.* 1981; 1: 793-800
- [10]Bremner, I. *Exper. Suppl.* 1987; 52: 81
- [11]Bremner, I. *J. Natr* 1987; 117: 19
- [12]Sternlieb, I. *Gastroenterology* 1980; 78: 1615
- [13]Richards, R. L., Hegug, R. and Karin, M. *Cell* 1984; 37: 263-272

- [14]Vasak, M., Kaji JHR. In Metal ions in Biological System. .Sigel. H (ed). 1985;15:213-273
- [15]Suzuki, K T. Yamammra, M. *Toxic. Lett.* 1980; 6:301.
- [16]Wake, S A. Mercer, J F B. *Biochem. J.*1985;228:425-432
- [17]Bremner I, Mehra RK, and Morrison J N. et al. *Biochem J.* 1986; 235:735-739.
- [18]Bordsa, J., Koch, M H J and Hartmann, H J. et al. *FEBS Lett.* 1982; 140:19-21
- [19]Freedman, J H. Powers, L. and Peisach, J. *Biochem.*1986;25: 2342-2349.
- [20]Freedman, J H., Ciriolo, M R. and Peisach, J. *Biol. Chem.*1989; 264: 5598-5605
- [21]Bremner I ,Hoekstra, W G and Davies N. T. *Biochem. J.* 1978; 174:883-892.
- [22]Beattie JH., Black, DJ and Bremner I.(1993) In :Trace elements in man and animals –TEMA 8 pp 159 -163 [M Anke , D. Meissner and C. F. Mills editors]Gersdorf: Verlag Media Touristik.]
- [23]Bremner I, Mehra RK, and Morrison JN. et al. *Biochem.J.*1986; 235:735-739
- [24]Evans, G.W., Majors, P. F. and Croonatzter, W.E. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1970;40:1142-1148.
- [25]Fischer, PWF., Cieoux, A. and L'Abbe, MR., *Am J. Chin. Nutr.* 1981;34:1670-1675.
- [26]Hall, AC., Young, BW., and Bremner I. *J. Inorg. Biochem.* 1979; 11:57-66.
- [27]Davies, NT., Campbell, J.K. *Life Sci.*1977; 20:958-960
- [28]Fischer, PWF., Cieoux, A. and L'Abbe, MR. *J. Natr.* 1983; 113: 462-469
- [29]Felix, K., Hartmann, HJ, and Weser ,U., *Biol. Metal,* 1989;2:50-54.
- [30]Bremner, I., Hoekstra, WG. and Davies ,NT. et al. *Biochem. J.* 1978;174:883-892
- [31]Norton, DS., Heaton, F.W. J. *Inorg. Biochem.*1980;13:1-9
- [32]Webb, M. *Experientia.* 1987;521(suppl.): 109-134.
- [33]Mehra, RK., Bremner, I., *Biochem. J.* 1984; 219:539-546.
- [34]Bremner, I, Mehra, RK, and Morrison, JN. et al. *Biochem. J.*1986; 235:735-739.
- [35]Bremner, I., In "Biological Roles of Copper" *Excerpta Medica, Amsterdam,* 1980,p 23-48.
- [36]Bremner I *Natr.* 1987;117:19-29.
- [37]McCarter, J. A., Roch, M. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1983;74c: 133-137
- [38]Weiner, A. L., Cousins, R J., *Biochim. Biophys. Acta.*1980;629: 113-125.
- [39]Suganwara, N, et al. *Experientia* 1991;1060-1063.
- [40]Liu J, Kershaw WC, and Klaassen CD. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1991;107:27-34.
- [41]Freedman, JH., Ciriolo, MR. and Peisach, J.J. *Biol. Chem.*1989; 264:5598-5605
- [42]Evering WEND, Haywood S and Bremner I. et al. *Chem-Biol Interact* 1991;78:283-295
- [43]Sugawara N, Sugawara C and Sato M. et al. *Pharmacol Toxicol* 1992;71:321-324 .
- [44]Evering WEND, Haywood S and Bremner I. et al. *Chem-Biol Interact* 1991;78:283-295
- [45]Bremner I.(1987) In Metallothionein II:Proceedings of the 2nd International Symposium on Metallothionein and Other Low Molecular Weight Metal-Binding Proteins pp-81-107[J.H. R Kagi and Y. Kojima, editors]Basel: Birkhauser Verlag.
- [46]Panemangalore E. M. , Banerjee D. and Onosaka. S. et al. *Dev. Biol.*1983;97:95-102.
- [47]Elmes M., Haywood , S. and Clarkson, J. P. et al (1987) Proceedings , TEMA-6 Conference, California".

- [48]Tsujikawa K. , Imai, T and Kayamori, Y. *FEBS Letters* 1991;283: 239-242.
- [49]Tohyama C, Suzuki, J.S, and Hemelraad, J. *Hepatology* 1993;18: 1193-1201
- [50]Nartey N. O. Banerjee , D and Cherian, M. G. *Pathology* 1987; 19: 233-238
- [51].Sato, M., Bremner, I., *Biochem. J.*1984;223: 475-479
- [52]Gibbs, K and Walshe, J. M. *Lancet* ii, 1980; 538-539.
- [53]Miesel, R., Hartmann, HJ, and Weser, U. *Inflammation* 1990;14: 471-483.
- [54]Sakurai, H., Satoh ,H., and Hatanaka, A. et al . *Biochim. Biophys. Res. Commun.*1994;199:313-318.
- [55]Slater, T. F. *Biochem. J.*1984;222:1-15
- [56]Arthur,J. R.. *Rep. Rowett Inst.*1983;38:124-135
- [57]Thornalley, P. J., Vasak, M. *Biochim. Biophys. Acta* 1985; 827: 36-44
- [58]Arthur, J. R, Bremner, I., Morrice, P. C. et al *Free Rad. Res. Comms.* 1987; 4:15-20
- [59]顾公望 国外医学医学地理分册. 1991;12(3):97-99
- [60]Kontozoglou, TE., Banerjee, D, and Cherian, M.G., *Vir. Archiv. Pathol. Anat.* 1989; 415:545-549.
- [61]Hart, B.A., Voss, G.W. and Vacek, P.M. *Cancer lett.*, 1993;75: 121-128.
- [62]黄国健,周舒 . *中日友好医院学报.* 1996;10(2):180-182 .

五、金属硫蛋白基因研究

金属硫蛋白 (Metallothionein MT) 是一群小分子量的、富含半胱氨酸与重金属结合的蛋白质, 几乎所有脊椎动物 MT 长度为 61 或 62 个氨基酸, 其中约 1/3 为高度保守的半胱氨酸残端。在七十年代人们知道 MT 家族中主要有 MT-1 和 MT-2[1]。以后又发现了其他不同的亚型[2]。人类 MT 基因家族含有 10-12 个成员, 其中仅有一半基因能够在蛋白水平上表达。1982 年 Karin 和 Richards [3]分离了 MT 基因中的大部分, 并确定了具有独特功能的 hMT-II_A 基因核苷酸序列; 1984 年由 Richards[4]从人 DNA 中鉴定出 4 个串联的类 hMT-1 基因, 分别为 hMT-1_A、hMT-1_B、hMT-1_C 和 hMT-1_D, 其中 hMT-1_A 基因可以编码抗重金属的功能性蛋白质, 这种基因可以在培养的人细胞株中表达, 但其表达的基础水平低于 hMT-II_A 基因。与 hMT-II_A 基因相比, hMT-1_A 基因对重金属和糖皮质激素诱导的反应性有所不同, 是因为基因中调节部位和反应性的启动子不同, 如 Cd⁺⁺, Zn⁺⁺ 和糖皮质激素是 hMT-II_A 基因启动子的活化因子, 而 hMT-1_A 基因启动子的活化因子仅是 Cd⁺⁺。以后又陆续分离鉴定出 MT1-E[5]、MT1-F[6]和 MT1-G[7]。所有 MT 基因都位于人第 16 条染色体上, 包括三个外含子和

两个内含子的三重结构。成熟的 MTmRNA 在 3'端和 5'端分别有 75 和 142 个不能翻译的核苷酸[8]。另外除了普遍存在的 MT-I 和 MT-II 基因表达外,又在 大脑和鳞状上皮细胞中分别发现了 MT-III 和 MT-IV[9]。

【一】MT 基因的诱导和表达

许多金属离子如 Zn、Cu、Cd 等以及许多病理生理因子都可以直接启动 MT 基因转录或间接通过细胞因子的变化以诱导 MT 的合成[10]。Durnam[11]发现 MT-1 基因几乎在所有的细胞中都能够表达,然而组织之间的表达水平是不同的,肝组织有高水平的表达,而脑组织的 MT-I 基因表达是最低下的,通过外源性的不同刺激如重金属、糖皮质激素、肿瘤生长因子、离子射线、蛋白质抑制剂、DNA 的合成等都可以诱导转录水平的 MT 基因表达[12],MT 基因含有多个与金属诱导有关的金属调节因子,Seguin[13]研究发现小鼠 MT-1 基因的金属调节因子特异性的与分子量为 10800 的核蛋白相互作用,而这种蛋白与转录因子 Sp1 完全不同。Garg[14]从大鼠的肝脏和脑组织中提取片段化的和非片段化的核酸,研究克隆小鼠 MT-1 基因在组织中的转录变化,发现在肝细胞核酸提取物中的 MT-1 基因转录水平是脑组织的 10 倍,而两者组蛋白 H4 基因的转录水平基本相同。在肝脏,与 MT-1 基因高表达相关的转录起始位点位于 5'端上游序列 -148 到-42bp 之间的 106bp。进一步研究证实仅限于肝脏中存在这 106bp 的正调控因子才使得 MT-1 基因在肝脏中的转录水平高于脑组织。

Blalock [15]研究发现锌和铜对诱导金属硫蛋白表达的差异性与物种、组织和细胞的不同有关,与金属离子的摄取方法也有很大的影响。例如给大鼠高铜饮食 (36mg/kg), MTmRNA 在肾脏中的表达非常高,而在小肠中几乎没有表达;然而,给大鼠高锌饮食 (180mg/kg)则 MTmRNA 在肾脏和小肠中都有高表达。

Lehman-McKeeman[16]认为在相同染色体中存在的不同基因所表达的 MT 异构体之间也有相互影响,MT 异构体基因的不同表达以及对不同诱导物的反应差异性值得注意。例如 Peterson[17]发现羊中至少存在 4 种具有功能性的 MT 基因。比较铜和铁对培养的羊纤维母细胞这几种基因的诱导情况, Peterson 和 Mercer[18]发现铜对 MT-1c 基因的诱导能力很弱。进一步研究发现[19, 20],异构体基因在翻译控制方面有许多差异性。目前对 MT 异构体在功能方面的差异性了解方面还不多,值得注意的是, MT

中的半胱氨酸残基在异构体之间是高度保守的, 各个 MT 异构体的特性是由其他 2-25% 的氨基酸决定的。

[二]MT 的解毒作用

MT 蛋白已经显示出对重金属的解毒、平衡、和清除自由基作用。金属的解毒作用是非常明确的[21, 22], 因为通过敲除目的基因的方法破坏 MT-I 和 MT-II 基因, 可使小鼠对镉的敏感性增强。Abshire 等[23]研究发现镉可以诱导大鼠 L6 成肌细胞 C-myc、C-jun 原癌基因的活性表达, 而用锌预先治疗大鼠 L6 成肌细胞可以降低由 Cd 诱导的 C-myc、C-jun 原癌基因的活性, 他们认为可能是通过锌诱导细胞内 MT 基因的高表达, 然后在镉的诱导下, 在转录水平上产生的 MT 蛋白增多, MT 与镉结合减低细胞内自由的镉水平, 从而降低其毒性和致癌作用。Coogan[24]等研究发现 500 μ M 的 CdCl₂ 在两小时内有单链 DNA 损伤的累积, 如果先在低浓度的 CdCl₂ 10 μ M 中培养 24 小时, 就可以防止在两小时内 500 μ M 的 CdCl₂ 对 DNA 的损伤。低浓度的镉可以诱导大鼠肝细胞 TRL-1215 MT-1 基因的表达。在 24-28 小时 MT 可以增加 3.3-6.4 倍, 同时发现细胞内的镉浓度也增加了 2.6 倍。证实可以通过诱导 MT 的表达防止镉毒性。Czaja[25]等人研究了体外培养的耐铜毒性细胞的 MT-1 和 MT-2 基因的表达水平, 发现在含有 600 μ M 铜离子培养液中传代生长的 HAC₆₀₀ 耐铜毒细胞, MT-1 和 MT-2 基因 mRNA 水平均有明显的提高, 其中 MT1-mRNA 水平提高了 11 倍, MT-2mRNA 水平提高了 15 倍, 而在正常铜浓度培养一年的 HAC₆₀₀NM 耐铜毒细胞中的 MT-1mRNA 和 MT-2mRNA 水平分别提高了 8 到 10 倍。提示在这些细胞中存在着 MT 基因调控的后转录机制。

[四]MT 基因表达与细胞顺铂抗性的关系

MT 基因表达与化疗药物顺铂[cis-dichlorodiammine platinum (II), CDDP]细胞抗性之间的关系引起争论。Kraker[26]等人发现一些长期培养在镉培养液中的哺乳细胞含有高表达 MT, 同时对镉产生抗性; Kasahara[27]也发现一些对 CDDP 有抗性的肿瘤细胞也可以有高表达的 MT。1988 年 Kelly[28]将 MT-11A 基因转入 C127 细胞, 发现其对 CDDP 的抗性提高了 4.4 倍, 但这些细胞一直是在镉存在的条件下生长的, 这样

可能对细胞有无法预期的改变；1990年，Schilder[29]将培养液中的镉换成锌后，发现这些细胞并不具有对CDDP的抗性。Kaina[30]用CHO细胞转染相似的质粒后发现对CDDP的抗性与对照组比较并不显著。同样其他的实验也证明高表达的MT与CDDP的抗性之间并不存在相关性。1990年，Schilder[29]检测了对CDDP有抗性的卵巢癌细胞，发现这些细胞并没有高表达的MT，但却存在对镉的抗性，显然提示可能有其他的对CDDP产生抗性的机制。

至于具有CDDP抗性的肿瘤细胞中MT表达机制，Angel[31]研究发现在快速分裂的细胞或在胚胎细胞的特殊阶段MT基因的表达是非常活跃的；另外他[32]还发现肿瘤促进剂或致癌剂也可以诱导MT基因的转录，Schroeder[33]认为与肿瘤生长相关的细胞因子如IL-6等能够促进MT的合成；而且Schmidt[34]发现ras癌基因与MT的合成也有相关性。Morton[35]将小鼠的MT-1基因转入NIH/3T3细胞同样发现高表达的MT并没有对NIH/3T3细胞产生对CDDP的抗性，即对细胞的保护作用。因此，CDDP抗性的肿瘤细胞含有高表达的MT可能是肿瘤细胞生长过程中自发产生的，而不是CDDP作用的结果。

[五] MTF-1 研究概况

Palmiter 首先注意到在所有的MT基因启动子中存在着一段保守的DNA序列，以后被命名为金属反应子(metal-responsive element MRE)[36]。[37]通过它向异源性目的基因提供具有可诱导性的重金属。Serfling[38]将MT基因的上游序列插入到SV-40基因组中，构建了金属依赖性的病毒，发现这段上游基因序列作为金属反应的增强子能够远距离地发挥作用。然后，有许多研究者发现了能与金属反应性DNA相结合的蛋白，即转录因子MTF-1，它能够特异性地与MT基因启动子的MRE结合[39]，1993年MTF-1被克隆出来[40]，应用染色体缺失法分析MTF-1cDNA，发现了锌指DNA结合区域和转录活性区域。在转染细胞的表达中，MTF-1可以通过金属反应启动子激活转录过程，但这种转录主要表现为基础水平的提高而不是锌诱导的转录活性提高，似乎表明内源性的金属反应体系已经处于饱和状态而不能对额外的MTF-1发生响应。进一步研究证实MTF-1是一个分子量为72.5kDa的蛋白质，它有6个“锌指”结构和多个转录活性区

域。1994年Heuchel[41]等在小鼠ES细胞中应用敲除目的基因的方法去除MTF-1的表达,发现在失去MTF-1基因的表达后,无论是由天然的还是合成的金属反应启动子都不能激活基础水平的或锌诱导的MT转录过程;如果共转染含有MTF-1基因的载体则原有的转录过程基本全部得以恢复。结果表明MTF-1是诱导MT基因表达的关键性的转录因子,同样MTF-1也是正常生理条件下MT-1和MT-2基因基础水平表达所必须的转录因子。至于锌诱导MT基因的表达,Palmiter[42]推测:可能有一种抑制蛋白在正常情况下与锌指或MTF-1结合因而阻止MRE与它们的反应,在锌离子存在时,抑制蛋白从锌指或MTF-1中分离,使转录过程得以进行。将含有MT-MRE- β -半乳糖苷酶基因载体及含有病毒启动子的MTF-1载体转染至BHK细胞研究MT基因的转录,结果发现由铜诱导的 β -半乳糖苷酶的表达高度依赖与培养基中锌的存在,而Cd的诱导对锌的依赖性不明显,他推测MTF-1是由一种被称为MTI的锌敏感抑制因子所调控的基本因子,理解金属调节的关键在于鉴别这样的抑制因子、确认它是怎样和MTF-1起作用以及对金属的反应。但至目前金属离子激活MTF-1因子的确切过程还不清楚。

【参考文献】

- [1]Kagi J. H. R. and Nordberg M. eds. 1979 *Metallothionein Basel: Birkhauser Berlag*
- [2]Klauser S. Kagi J. H. R. and Wilson K. J.. *Biochem. J.* 1983; 209:71-80.
- [3]Karin M. and Richards R. I.. *Nature.* 1982; 299:797-802.
- [4]Richards R. I., Heguy, A. and Krain M. *Cell* 1984; 37:263-272.
- [5]Heguy, A., West. A. and Richards, R. I. et al . *Mol. Cell. Biol.*1986;6:2149-2157.
- [6]Schmidt. C. J., Jubier, M. F. and Hamer D. H. et al . *J. Biol. Chem.*1985; 260:7731-7737.
- [7]Varshney, u., Jahroudi, N. and Foster. R. et al. *Mol. Cell. Biol.*1986; 6:26-37.
- [8]Humer, D. H.Metallothionein. *Annu. Rev. Biochem.* 1986; 55:913-951.
- [9]Uchida , Y, Takio, K, and Palmiter, R. D. et al. *Neuron*, 1991;7:337-347.
- [10]Palmiter, Palmiter, R. D. (1987) In *Metallothionein II:Proceedings of the 2nd International Symposium on Metallothionein and Other Low Molecular Weight Metal-Binding Proteins* pp-81-107[J.H. R Kagi and Y. Kojima, editors]Basel: Birkhauser Verlag.
- [11]Durnam , D. M. and Plamiter, R. D. *J. Biol. Chem.* 1981;256:5712-5716.
- [12]Hager, L. J. and Palmiter, R. D. *Nature* 1981;291, 340-342.
- [13]Seguin C. and Prevost. J. *Nucleic Acids Res.* 1988; 16:10547-10560.
- [14]Garg, L. G., Dixit A, and Webb. M. L. et al . *J. Biological Chemistry* 1989; 264:2134-2138.
- [15]Blalock T. L. Dunn. M.A. and Cousins R. J. *Journal of Nutrition* 1988;118: 222-228.
- [16]Lehman-McKeeman , L. D. ,Kershaw, W. C. and Klaassen C.D.(1991) In: *Metallothionein in*

Biology and Medicine, pp.121-131[C. D. Klaassen, and K. T. Suzuki, editors] Boca Raton: CRC Press Inc.

- [17]Peterson M. G. Hannan, F. and Mercer, J.F.B. *European Journal of Biochemistry* 1988;174: 417-424.
- [18]Peterson M. G and Mercer J.F.B. *European Journal of Biochemistry* 1988;174 : 425-429.
- [19]Lehman-McKeeman L. D. , Andrews, GK and Klaassen C. D. *Toxicology and Applied Pharmacology*.1988;92: 1-9.
- [20]Paynter J. A., Camakarism J, and Mercer, J.F.B. *European Journal of Biochemistry* 1990 ;190:149-154.
- [21]Michalska, A. E. and Choo. K. H. A. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A*.1993; 90: 8088-8092.
- [22]Masters. B. A., Kelly, E. J. and Quaife, et al *Proc. Natl Acad. Sci. USA*.1994; 91:584-558.
- [23]Abshire M. K., Buzard , G. S. and Shiraishi, N. S, et al . *J. Toxicology and Environmental Health*, 1996;48:359-377.
- [24]Coogan T. P., Bare, C. R. and Bjornson, E. J. et al. *J. Toxicology and Environmental Health* , 41:233-245, 1994.
- [25]Czaja M.J., Weiner, F. R. and Freedman J. H. *J. Cellular Physiology* 1991;147: 434-438.
- [26]Kraker A. Schmidt, J., and Krezoski.et al *Biochem. Biophys. Res.* 1985;130:786-792.
- [27]Kasahara K. Fujiwara , Y., Nisshio, K. et al .*Cancer Res.* 1991;51:3237-3242.
- [28]Kelly, S. L.,Basu, A. and Teicher. B. A. et al .*Science(Washington D.C.)*1988;241;1813-1815.
- [29]Schilder, R.J, Hall, L. and Handel. L.M et al . *Int. Cancer* 1990;45:416-422.
- [30]Kaina B. Lohree, H. and Karin M. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1990; 87: 2710-2714.
- [31]Angel P, Rahmsdorf, H.J. and Poting., A. et al C-fos mRNA levels in primary human fibroblasts after arrest in various stages of the cell cycle. In cancer Cells/3,growth factors and transformation , ed, by J. Feramisco, B. Ozanne and C , Sties, pp. 315-319.Cold Springs Harbor Labortatory NY. 1985
- [32]Angel P, Poting., A.and Rahmsdorf, H.J et al. *Mol. Cell Biol.*1986; 6:1760-1766.
- [33]Schroeder J.J. and Cousins R. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1990;87,3137-3141.
- [34]Schmidt C J. and Hamer D. H.. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1986;83,3337-3350.
- [35]Morton K. A, Jones B. J. and Sohn. M. et al. *The Journal of Pharmacological and Experimental Therapeutics*.1993;267:697-702.
- [36]Stuart, G. W., Searle, P.F. and Chen. H. Y. et al *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1984; 81, 7318-7322.
- [37]Stuart G. W., Searle, P.F and Plmiter, R. D. *Nature*1985; 317:828-831.
- [38]Serfling E., Luebbe, E., and Dorsch-Haesler, K. *EMBO J.*1985; 4:3851-3859.
- [39]Westin, G. and Schaffner, W. *EMBO J.*1988;7: 3763-3770.
- [40]Radtke, F. , Heuchel, R., and Georgiev, O. et al .*EMBO J.* 1993;12:1355-1362.
- [41]Heuchel, R. Radtke, O. G. and Georgiev, O. et al *EMBO J*, 1994;13:2870-2875.
- [42]Palmiter R. D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1994; 91:1219-1223.

致谢

三年的光阴在时间的长河中是微不足道的，对于人的一生而言同样是短暂的，但它的意义和价值，每个人的理解和感受各不相同。对我而言，1994年到1997年是极其不平常的三年，其中经历的各种体验使我永难忘怀，终生受益。

我是幸运的，因为我是周舒教授的学生！去年，美国的 Busch 博士曾对我说 “**Dr. Huang, you are lucky enough for you have Prof. Zhou as your director**”。她的话千真万确！1994年，我从江苏南京中医药大学考入中国协和医科大学攻读博士学位，开始时惴惴不安的心情，高处不胜寒的感觉，曾经使我迷惘和颓丧，怀疑我自己是否有能力按期完成所要求的博士生课题。我的导师，全国著名的中西医结合专家，周舒教授及时地安慰我，鼓励我，全力支持我的工作，关心我的生活，使我很快适应了新的工作生活环境。三年来，周舒教授独特的人格力量深深地影响着我，她的吃苦耐劳、坚韧不拔、永远向前的生活态度，平等待人、善于思考、严谨细致的科研作风，使我相信，这就是她成功的奥秘。可以说，没有周舒教授的栽培，就没有我的今天，也就没有我的未来。衷心地感谢您---周舒教授！

三年来，在科研上，我还幸运地得到了北京大学技术物理系吴济南教授、王文清教授的悉心指导，和他们的学生方兴旺博士、淮清博士、余美祥博士进行了愉快的合作，在有关 MT 的制备、铜的转运和代谢研究等方面得到了有意义的结果，并且彼此之间结下了深厚的友谊。同样幸运的是在有关体外细胞实验、组织学检测以及分子生物学研究方面，北京医科大学分子病理系博士-张波教授、中日友好医院病理科李婷教授始终给予了热情的支持和帮助，使这些方面的工作取得了重要进展。如果没有他们的帮助，独立完成是难以想象的，在此向他们表示深深的敬意。此外，我忘不了北京大学分校生化教研室的文静教授在 MT 测定、中国

中医研究院针灸研究所的李瑞午教授在激光共聚焦显微镜观察DNA形态学变化方面给予的帮助；北京市公安交通研究所达庆东博士在论文的编辑印刷中所给予的大力支持以及科教处鲍新潮处长在我三年的学习生涯中所给予的许多关照。

同时，衷心感谢中日友好临床医学研究所的叶智文教授、赵天得教授、杜皓萍老师和徐梅老师在我实验的各个阶段始终给予的关心和帮助；另外，向未曾谋面的英国 B. Jasani 教授（University of Wales College of Medicine）、世界著名的 MT 专家，英国 Rowett 营养研究所 Ian Bremner 教授表示感谢，他们不但惠赠了 MT 单克隆和多克隆抗体，Ian Bremner 教授还提供了大量的有关 MT 最新研究的资料，他们所给予的支持体现了科学无国界的国际主义精神。

我要感谢我的父母，他们不但给予了我血肉之躯和无私的爱，他们的节俭、质朴和勤劳使我懂得奢侈和懒惰就是犯罪，不思进取定将一事无成。

衷心感谢我的爱妻---温柔善良、美丽大方的胡小洁！结婚一年多来，她在生活上的悉心照顾、工作上的全力支持为我按期完成实验提供了保障，同时为照料我们可爱的小宝宝付出了巨大心血。我要对她说：I LOVE YOU FOREVER！向所有关心我的家人、朋友、同事一并致以谢意！

最后，向参加今天答辩的各位专家表示最崇高的敬意！作为年轻的科学工作者，我要学习您们老一代科学家为科学而献身的高尚情操，为祖国中西医结合事业的不断发展贡献自己全部力量。

谢谢！

黄国健

1997 年 5 月 15 日