

# 可卡因对新生兔肝肾功能损害的研究\*

方成志<sup>1</sup>, 蔡宝珍<sup>1</sup>, 许敬<sup>1</sup>, 姜毅<sup>2</sup>, 舒迎春<sup>1</sup>, 陈小培<sup>1</sup>

(1. 武汉市儿童医院新生儿科, 430015; 2. 湖北省人民医院儿科, 武汉 430060)

**[摘要]** 目的 探讨妊娠期慢性使用可卡因对新生兔肝脏、肾脏的影响。方法 将 24 只怀孕的日本长耳白兔随机分为实验组和对照组, 每组 12 只。两组均于怀孕 15 d 至分娩 (30 ~ 31 d), 分别从耳缘静脉注射可卡因 (剂量为  $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) 或 0.9% 氯化钠溶液 (剂量为  $1 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ )。检测血清中天冬氨酸氨基转移酶 (AST)、丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、总蛋白 (TP)、总胆红素 (T-BiL)、直接胆红素 (D-BiL)、清蛋白 (ALB)、碱性磷酸酶 (ALP)、总胆汁酸 (TBA)、谷氨酰转肽酶 ( $\gamma$ -GT)、尿素氮 (BUN)、尿酸 (UA)、血肌酐 (Cr)、血糖 (Glu)。肝细胞中细胞色素 P<sub>450</sub> 含量。结果 实验组血清 AST、ALT、 $\gamma$ -GT、TP、ALP、BUN、Glu 均高于对照组 ( $P < 0.01$ ), 血清 ALB、D-BiL、TBA、Cr、UA 均低于对照组 ( $P < 0.01$ )。实验组 P<sub>450</sub> 含量高于对照组 ( $P < 0.01$ )。结论 妊娠期使用可卡因对新生兔肝脏、肾脏造成严重损害造成新生兔高胆红素血症。

**[关键词]** 可卡因; 肝脏; 肾脏; 妊娠

**[中图分类号]** R971.2; R965.3

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1004-0781(2007)07-0717-03

## Study on Cocaine-induced Hepatic and Renal Injury in Newborn Rabbits

FANG Cheng-zhi<sup>1</sup>, CAI Bao-zhen<sup>1</sup>, XU Jing<sup>1</sup>, JIANG Yi<sup>2</sup>, SHU Ying-chun<sup>1</sup>, CHEN Xiao-pei<sup>1</sup> (1. Department of Neonatology, Wuhan Medical and Healthy Center for Women and Children, 430015, China; 2. Department of Paediatrics, the Peoples' Hospital of Hubei Province, Wuhan, 430060, China)

**ABSTRACT Objective** To study the effects of chronic prenatal exposure to cocaine on liver and kidney in the newborn rabbits at birth. **Methods** The pregnant Japan long-eared white rabbits were divided randomly into experimental group ( $n = 12$ ) and normal control group ( $n = 12$ ). Pregnant rabbits were treated with cocaine hydrochloride  $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  or normal saline  $1 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$  intravenously, once a day from days 15 of pregnancy until days 30 or 31. Serum aspartate transaminase (AST), alanine transaminase (ALT), gamma glutamyl-transferase ( $\gamma$ -GT), total protein (TP), total bilirubin (T-BiL), alkaline phosphatase (ALP), total bile acid (TBA), direct bilirubin (D-BiL), blood urea nitrogen (BUN), creatinine (Cr), uric acid (UA), glucose (Glu) and cytochrome P<sub>450</sub> were examined. **Results** The mean levels of serum AST, ALT,  $\gamma$ -GT, TP, ALP, BUN, T-BiL, Glu were significantly higher in the experimental group than those in the control group ( $P < 0.01$ ). The mean levels of serum ALB, D-BiL, TBA, Cr, UA were significantly lower in the experimental group than those in the control group ( $P < 0.01$ ). Cytochrome P<sub>450</sub> contents were higher in experimental group than those in control group ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** Cocaine application in pregnancy period causes severe injury on liver and kidney with hyperbilirubinemia in newborn rabbits.

**KEY WORDS** Cocaine; Liver; Kidney; Pregnant

随着可卡因的广泛使用,其不良反应越来越被关注。几十年来经过全面、深入的研究。现已证实可卡因对机体各脏器均可造成损害<sup>[1]</sup>。吸毒可卡因的人群中有相当一部分是妊娠妇女(北美洲国家报道妊娠妇女占 13%)。国外资料报道妊娠期使用可卡因后,除了对孕妇本身的损害外,还能增加流产、早产、胎盘早剥、胎儿宫内发育迟缓的发生率<sup>[2]</sup>。笔者观察孕兔使用可卡因对刚出生的新生兔肝脏、肾脏的影响,结果报道如下。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验动物 日本长耳孕兔 24 只,体重 3.5 ~

4.0 kg,由武汉大学医学部实验动物中心提供。随机分为对照组和实验组,每组 12 只。动物饲养由湖北省人民医院动物房经验丰富的同一人员承担。饲养条件:温度 15 ~ 25 °C,相对湿度 30% ~ 40%,每个金属笼仅养 1 只,在整个饲养过程中,对每只孕兔都提供充足的饲料和水分。

**1.2 实验方法** 两组孕兔均从怀孕第 15 天开始进行研究<sup>[3]</sup>。实验组使用盐酸可卡因[(青海制药厂生产,批号(88)-01-183)],用 0.9% 氯化钠溶液稀释为  $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,每只孕兔使用剂量为  $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ <sup>[4]</sup>,对照组每只孕兔给予 0.9% 氯化钠溶液  $1 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。每天上午 9 时从耳缘静脉注入。每次注射药物后均观察 60 min<sup>[5]</sup>,详细记录药物反应,直到分娩为止。分娩后对所有的新生兔进行如下处理:称体重;记录新生兔数量;从心房取血分离血清置于 -30 °C 冰箱保存;动物处死后,取肝脏称重,然后放入 -70 °C 冰箱保存。

**[收稿日期]** 2007-01-02

**[基金项目]** \*湖北省教育厅科学研究计划项目(基金编号:2001C42)

**[作者简介]** 方成志(1972-),男,湖北武汉人,主治医师,硕士,从事新生儿科临床工作。电话:027-82433200, E-mail:Fc2000@126.com。

### 1.3 检测指标

**1.3.1 生化指标检测** 天冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、总蛋白(TP)、总胆红素(T-BiL)、直接胆红素(D-BiL);清蛋白(ALB)、碱性磷酸酶(ALP)、总胆汁酸(TBA)、谷氨酰转肽酶( $\gamma$ -GT)、尿素氮(BUN)、尿酸(UA)、血肌酐(Cr)、血糖(Glu)。在岛津 CL-7200 型全自动生化分析仪上检测。

**1.3.2 细胞色素 P<sub>450</sub>的测定** ①制备肝脏微粒体:从 -70 ℃冰箱取出保存的肝脏组织,放入冰冻的 0.9% 氯化钠溶液中,用眼科剪剪碎肝脏组织并漂洗两次,用滤纸吸干肝脏组织中的残留水分,然后称重,取 1.2 g 肝脏组织放入递质 4.8 mL 中匀浆(递质为 pH 值 7.4 的 0.1 mol · L<sup>-1</sup> 的磷酸盐缓冲液)。肝匀浆 2 000 g (3 500 r · min<sup>-1</sup>) 离心 10 min,弃沉淀物取上清液然后 9 000 g (10 000 r · min<sup>-1</sup>) 离心 20 min,弃沉淀物取上清液 105 000 g (40 000 r · min<sup>-1</sup>) 离心 60 min,刮起沉淀物用缓冲液(1.15% 氯化钾,10 mmol · L<sup>-1</sup> EDTA)平衡后 105 000 g 离心 40 min,所得沉淀物加入 0.25 mol · L<sup>-1</sup> 蔗糖缓冲液 0.6 mL, -70 ℃保存备用。②采用 Lowry 法测定微粒体中蛋白含量<sup>[6]</sup>。③P<sub>450</sub> 的测定<sup>[7]</sup>:取微粒体-蔗糖缓冲液 0.1 mL 加磷酸盐缓冲液(0.1 mol · L<sup>-1</sup> 磷酸氢钾,3 mmol · L<sup>-1</sup> 氯化镁,0.1 mmol · L<sup>-1</sup> EDTA)0.9 mL 放入比色皿中。往比色皿中加入少许(约几毫克)Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>(上海化工厂产品),在 UV-3000 (Shimadzu, Kyoto, Japan)400 ~ 500 nm 波长区间扫描,建立基线往比色皿中通入一氧化碳 20 s 后,再次在 400 ~ 500 nm 区间扫描,并分别记录每个样本在 450 nm 和 490 nm 处的吸光度(A)值。P<sub>450</sub> 含量 = (A<sub>450</sub> - A<sub>490</sub>) × 10<sup>3</sup> / (Δε × 微粒体中蛋白含量), Δε 氧化示差为 91 mm<sup>-1</sup> · cm<sup>-1</sup>。

**1.4 统计学方法** 数据以均数 ± 标准差表示。采用 Student's t-test 检验,在统计软件 SPSS 上完成。

## 2 结果

实验组每次用药后平均 30 s 内出现呼吸增快、四

肢抽搐、小便失禁等现象。抽搐时间个体差异较明显,持续 5 ~ 30 min。其中有两只孕兔分别在怀孕 21 和 26 d 流产。其余 10 只在怀孕 30 ~ 31 d 共分娩出 56 只活产新生兔。对照组每次使用 0.9% 氯化钠溶液后无任何异常发生,在怀孕 30 ~ 31 d 共分娩出 97 只活产新生兔,两组产下的新生兔外观均未发现有畸形。两组新生兔生化指标和细胞色素 P<sub>450</sub> 检测结果见表 1。

## 3 讨论

孕妇使用可卡因后,可卡因除在母体代谢外,还可以经母体通过胎盘屏障转运到胎儿的血循环中。尽管胎盘屏障有快速清除可卡因的功能,但由于连续使用,可卡因及其代谢产物仍可存留在胎儿血中<sup>[7,8]</sup>。因此妊娠期间使用可卡因将会对胎儿各脏器产生不同程度的影响,作为机体重要代谢器官的肝脏必然受到损伤。

笔者还发现实验组 P<sub>450</sub> 明显升高。细胞色素 P<sub>450</sub> 酶主要存在于肝脏,在外源性化合物包括药物和毒物的生物转化中起着十分重要的作用,是药物代谢的第一相酶<sup>[9]</sup>。P<sub>450</sub> 酶的活性决定药物代谢的速率,与药物消除率有直接的关系。通常情况下,如果代谢某种药物的酶活性升高时,则可表现为该药的血液浓度降低,半衰期缩短导致毒性下降<sup>[10]</sup>。但可卡因有其特殊性,当 P<sub>450</sub> 酶增高时其毒性反而增强,可卡因本身没有肝毒性,而其氧化代谢产物有很强的肝毒性。它是通过几种酶来进行氧化代谢的,最重要的一种是 P<sub>450</sub> 酶。PELLINEN 等<sup>[11]</sup> 研究表明人类使用可卡因后,细胞色素 P<sub>450</sub> I、II、III 三个家族均全部参与了可卡因的氧化代谢,且可卡因诱导它所依赖的 P<sub>450</sub> 酶增多,一方面加快肝脏对其的代谢,同时也增加了它对人体的肝脏毒性。如果使用 P<sub>450</sub> 酶的抑制药 SKF-525A,则明显减轻可卡因造成的肝脏损伤<sup>[12,13]</sup>。KLOSS 等指出 P<sub>450</sub> 酶把可卡因氧化生成去甲可卡因,还能使 N-羟去甲可卡因氧化生成硝基去甲可卡因。(去甲可卡因氧化生成 N-羟去甲可卡因需另一种氧化酶 FDA 抑制的单加氧酶)。而去甲可卡因、N-羟去甲可卡因、硝基去甲可卡

表 1 两组新生兔生化指标和细胞色素 P<sub>450</sub> 检测结果

组别	动物数/只	AST/ (U · L <sup>-1</sup> )	ALT/ (U · L <sup>-1</sup> )	$\gamma$ -GT/ (U · L <sup>-1</sup> )	TP/ (g · L <sup>-1</sup> )	ALP/ (U · L <sup>-1</sup> )	P <sub>450</sub> / (nmol · mg <sup>-1</sup> )
实验组	56	149.30 ± 21.77 <sup>*1</sup>	33.70 ± 20.95 <sup>*1</sup>	8.50 ± 4.88 <sup>*1</sup>	42.70 ± 13.54	121.60 ± 55.23 <sup>*1</sup>	0.29 ± 0.015 <sup>*1</sup>
对照组	97	29.30 ± 15.38	11.90 ± 6.16	14.20 ± 1.84	38.60 ± 9.00	81.60 ± 15.78	0.23 ± 0.015

  

组别	BUN/ (mmol · L <sup>-1</sup> )	Cr/ ( $\mu$ mol · L <sup>-1</sup> )	T-BiL/ ( $\mu$ mol · L <sup>-1</sup> )	UA/ (mmol · L <sup>-1</sup> )	Glu/ (mmol · L <sup>-1</sup> )	D-BiL/ ( $\mu$ mol · L <sup>-1</sup> )
实验组	8.30 ± 1.98 <sup>*1</sup>	78.90 ± 16.50 <sup>*1</sup>	160.58 ± 13.30 <sup>*1</sup>	10.90 ± 5.52 <sup>*1</sup>	6.60 ± 1.78 <sup>*1</sup>	4.90 ± 3.74 <sup>*1</sup>
对照组	1.90 ± 0.89	113.00 ± 9.70	92.40 ± 39.10	12.40 ± 3.26	4.20 ± 2.96	7.70 ± 5.18

与对照组比较, <sup>\*1</sup>P < 0.01

因会对肝脏造成严重损伤<sup>[14]</sup>。由于 P<sub>450</sub> 酶是一个大家族,故更多新的研究表明不同的 P<sub>450</sub> 亚型也起着不同的作用。LEDUC 等<sup>[8]</sup>发现可卡因可使小鼠 P<sub>450</sub> 总量轻度增加,而使 P<sub>450</sub>2H1/2 大量增加,即可卡因诱导 P<sub>450</sub>2H1/2 升高而加速它自身的代谢。BOELSTERLI 等<sup>[12]</sup>发现 P<sub>450</sub>2B 的抗体显著阻止大鼠肝脏微粒体 COC-N 端脱甲基化,即 P<sub>450</sub>H1/2 作为 P<sub>450</sub>2B 的异构形式能催化 COC-N 端脱甲基化作用。LORR 等<sup>[13]</sup>进一步指出 P<sub>450</sub>2H 除参与 COC-N 端脱甲基化,还参与去甲可卡因(NOR)羟化过程。POET 等<sup>[14]</sup>研究指出可卡因引起的肝损伤中,P<sub>450</sub>2A,P<sub>450</sub>2B,P<sub>450</sub>3A 酶均起着重要作用。

本研究中可卡因致新生兔肾脏的损害与药物具有拟交感神经活性,使体内儿茶酚胺活性增强,肾脏血管长期,反复收缩痉挛,血管内膜损伤,血小板聚集,肾毛细血管血栓形成和肾脏血管动脉粥样硬化损害有关<sup>[12]</sup>。

本研究中,还发现实验组血清 AST 比对照组升高 4 倍,AST 升高表明有大量肝细胞损伤。实验组的 ALB 比对照组减少,清蛋白合成的减少,表明肝细胞损害严重。研究中,总胆红素在实验组显著高于对照组。提示妊娠期使用可卡因的新生兔有一个高胆红素血症。ORO 等<sup>[15]</sup>报道使用可卡因和安非它明的母亲所生的新生儿中,15% 有高胆红素血症,而对照组仅有 8.8%。OSTREA 等报道 830 位新生儿中,药物组(可卡因或海洛因)新生儿血清 T-BiL > 170 μmol · L<sup>-1</sup> 占 12.7%。而正常新生儿组仅占 8.8%。POET 等<sup>[14]</sup>观察到妊娠期间使用过海洛因或可卡因的母亲所生的新生儿 32% 血清胆红素 > 206 μmol · L<sup>-1</sup>。也有报道可卡因氧化过程中诱导血红素降解加速引起高胆红素血症形成。而笔者通过实验初步认为,胆红素的增高可能与可卡因对肝细胞的毒性有关。既然妊娠期使用可卡因会引起缺氧缺血性脑病,那么同时引起的高胆红素血症更易诱发胆红素脑病,更应引起临床医生的重视。

本研究所得到的结果,在国内首次初步证实可卡因在妊娠期使用会给新生儿造成相对严重的肝脏、肾脏损害:可卡因造成新生兔血清 AST、ALT、TP、ALP、BUN、G、T-BiL,肝脏 P<sub>450</sub> 酶升高,血清 ALB、D-BiL、Cr、UA 降低。可卡因引起新生兔高胆红素血症。

#### [参考文献]

[1] TARR J E, MACKLIN M. Cocaine[J]. *Pediatr Clin North Am*, 1987, 34:319 - 333.  
 [2] SIMONE C, BYRNE B M, DEREWLANY L O, et al. Cocaine inhibits hcG secretion by the human term placental cotyledon perfused in vitro[J]. *Life Sci*, 1996, 58:63 - 66.

[3] FREEMAN R W, HARBISON R D. Hepatic periportal necrosis induced by chronic administration of cocaine[J]. *Biochem Pharmacol*, 1981, 30:777 - 783.  
 [4] JONES M D, SHELDON R E, PEETERS L L, et al. Regulation of cerebral blood flow in the ovine fetus[J]. *Am J Physiol*, 1978, 235: 162 - 166.  
 [5] NOVAK D A, BEVERIDGE M J, SALHAB A S, et al. Effect of chronic cocaine administration on amino acid uptake in rat placental membrane vesicles[J]. *Life Sci*, 1995, 56:1779 - 1787.  
 [6] MASINI A, GALLESINI D, GIOVANNINI F, et al. Membrane potential of hepatic mitochondrial reduced glutathione[J]. *Hepatology*, 1997, 25:385 - 390.  
 [7] LOWRY O H, ROSEBROUGH N J, TARR A L, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent[J]. *J Biol Chem*, 1951, 193:265 - 275.  
 [8] LEDUC B W, SINCLAIR P R, WALTON H S, et al. Cocaine toxicity in cultured chicken hepatocytes: role of cytochrome P450[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1994, 125: 322 - 332.  
 [9] SPATEZENEGGER M, JAEGER W. Clinical importance of hepatic cytochrome P450 in drug metabolism[J]. *Drug Metab Rev*, 1995, 27:397 - 417.  
 [10] SHEDLOFSKY S I, ISRAEL B C, MCCLINA C J, et al. Endotoxin administration to humans inhibits hepatic cytochrome P<sub>450</sub>-mediated drug metabolism[J]. *J Clin Invest*, 1994, 94:2209 - 2214.  
 [11] PELLINEN P, STENBACK F, KOJO A, et al. Regenerative changes in hepatic morphology and enhanced expression of CYP2A and CYP3A during daily administration of cocaine[J]. *Hepatology*, 1996, 23:515 - 523.  
 [12] BOELSTERLI V A, ATANASOSKI S, GOLDLIN C, et al. Ethanol-induced enhancement of cocaine bioactivation and irreversible protein binding: evidence against a role of cytochrome P450III E1[J]. *Alcoholism Clin Exp Res*, 1991, 15:779 - 784.  
 [13] LORR N A, BLOOM S E, PARK S S, et al. Evidence for a PCN- P450 enzyme in chickens and comparison of its development with that of other phenobarbital-inducible forms[J]. *Mol Pharmacol*, 1989, 35:610 - 616.  
 [14] POET T S, BRENDLE K, HALPORT R J, et al. Inactivation of cytochromes P450 2B protects against cocaine-mediated toxicity in rat liver slices[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1994, 126(1):26 - 32.  
 [15] ORO A S, DIXON S D. Perinatal cocaine and methamphetamine exposure: maternal and neonatal correlates[J]. *J Pediatr*, 1987, 111:571 - 578.