

金属硫蛋白作为重金属污染生物标志物的研究进展

陈 春¹, 周启星^{1,2}

(1.南开大学环境科学与工程学院环境污染过程与基准教育部重点实验室, 天津 300071; 2.中国科学院沈阳应用生态研究所陆地生态过程重点实验室, 辽宁 沈阳 110016)

摘 要:金属硫蛋白(MT)是一类普遍存在于生物体内的低分子量、富含半胱氨酸、热稳定性、可诱导型非酶蛋白,具有维持生物体内金属含量动态平衡和重金属解毒作用双重机制。大量研究表明,MT可作为重金属污染的生物标志物,用来预测生物体受重金属暴露的状况和重金属污染的压力,且对制定预防性的管理措施、及时监控环境污染皆具有重要的现实意义。本文根据国内外文献资料查阅及综合分析,主要阐述了金属硫蛋白的基本结构、多态性、生理功能及其作为生物标志物在环境污染检测与诊断方面的研究与应用,并展望其今后研究方向。

关键词:金属硫蛋白;重金属;动态平衡;解毒;生物标志物

中图分类号:X835 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2009)03-0425-08

Researching Advance in Metallothionein and Its Biomarker of Heavy Metal Contamination

CHEN Chun¹, ZHOU Qi-xing^{1,2}

(1.Key Laboratory of Environmental Pollution Process and Criteria, Ministry of Education, College of Environmental Science and Engineering, Nankai University, Tianjin 300071, China; 2.Key Laboratory of Terrestrial Ecological Process, Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110016, China)

Abstract: Metallothioneins(MT) are ubiquitous, non-enzymatic proteins characterized by low molecular weight, cysteine-rich, heat stability, metal-induced. MT plays the double biologically mechanisms, mainly implicated in essential metals homeostasis and toxic trace metal detoxification. In recent years, it was researched to indicate that MT was used as a suitable biomarker of metal toxicity or exposure, it could evaluate the quality of heavy metal exposure and pollution stress. Furthermore, the application of MT biomarker would enable environmental agencies or legislators to take precautionary measures and real-time monitor the environment pollution. In this review, the structure, isoforms and biological role of MT would be mentioned. Moreover, a brief overview of the use of MT as a biomarker was included the soil ecotoxicology, aquatic ecotoxicology and environmental health. Finally, the prospect and future of the development of MT biomarker were discussed.

Keywords: metallothioneins; heavy metal; homeostasis; detoxification; biomarker

金属硫蛋白(metallothionein, MT)的化学名称为金属硫组氨酸三甲基内盐,是一类普遍存在于生物体内的低分子量(6~7 kDa)、富含半胱氨酸、热稳定性、可诱导型非酶蛋白^[1]。自从 Margoshes 1957 年首次从马的肾皮质中发现 MT 以来^[2],大量研究表明,MT 普遍存在于各种生物体中,包括各种微生物(光滑球拟酵母、酿酒酵母、粗糙脉胞菌等)、植物(猕猴桃、水稻等)、所有的无脊椎动物(昆虫、软体动物、棘皮动物、

环节动物等)、有脊椎动物及人类各种器官和组织^[3],尤其以肝脏和肾脏中含量最为丰富,它能广泛地被重金属、电离辐射、化学药品、激素、应激激素等多种因素诱导表达合成。

重金属作为环境中一类主要污染物,所造成的环境破坏以及对人体的健康危害在环境科学研究领域中一直备受关注。MT 的一个主要特点是在转录水平上易被环境中的重金属所诱导,而且这种诱导与重金属浓度具有相关性,可以反映环境中的重金属含量水平。因此,通过监测生物体内 MT 含量变化,可预测生物体受重金属暴露的状况和重金属的污染压力。目前,MT 作为重金属污染生物标志物的研究已逐渐成为环境科学、生物医学等研究领域的热点。

收稿日期:2008-06-13

基金项目:高等学校科技创新工程重大培育资金项目(707011)

作者简介:陈 春(1980—),男,安徽宿县人,博士,主要从事分子生态毒理学研究。E-mail:chenchun@mail.nankai.edu.cn

通讯作者:周启星 E-mail:zhouqx@nankai.edu.cn

MT 可作为重金属污染物、潜在重金属污染暴露和毒性效应早期预警的主要生物标志物,以及作为环境中重金属污染胁迫与风险评价以及监测的分子生态毒理学诊断指标,对制定预防性的管理措施,及时监控环境污染具有重要的现实意义。为了促进金属硫蛋白相关的环境科学研究,有必要对作为生物标志物的金属硫蛋白在环境检测方面的研究进展与应用现状进行评述,并展望其今后的研究方向。

1 MT 的基本结构与生理功能

1.1 MT 的基本结构

大多数生物体内 MT 分子结构呈哑铃型,由 α 和 β 两个大小相近、近似球形的结构域构成,两个结构域通过第 30、31 位的 Lys 残基相连,MT 铰链区的存在使两个结构域具有较大的柔性和可变性,从而使 MT 中金属离子与溶液中金属离子易于交换,为调节体内金属离子的代谢提供了结构基础。MT 分子是生物进化上比较保守的蛋白,约由 60 个左右的氨基酸残基组成,其中含有 18~23 个半胱氨酸(约占 1/3)、较多的赖氨酸和丝氨酸,但缺乏组氨酸和芳香族氨基酸。氨基末端皆为 N-乙酰甲硫氨酸,羧基末端为丙氨酸。已知所有物种的 MT 都有大量半胱氨酸,而且这些半胱氨酸的位置在绝大多数种属 MT 中都是完全保守的,多数排列为 Cys-Cys, Cys-X-Cys, Cys-X-Y-Cys(X, Y 是非半胱氨酸)的重复结构, X、Y 较多为 Ser, Thr, 其次为 Arg, Lys。其 Cys 的巯基都能够与金属离子结合,分子内部不含二硫键和游离的巯基^[4]。由于同一物种中 MT 分子内半胱氨酸的数目和位置及碱性氨基酸残基都有一定的保守性,因此大多数种内生物体 MT 皆具有相似基本的生物功能。

1.2 MT 的生理功能

MT 在生物细胞体内与必需的微量重金属(Zn、Cu 等)的结合起着调节这些金属离子在细胞内浓度的作用,而非必需有毒金属(Cd、Hg 等)的结合则可以保护细胞器免受损伤,故 MT 具有维持生物体内金属含量动态平衡和重金属解毒作用的双重机制。

1.2.1 MT 的重金属解毒作用

MT 具有高度保守性及普遍存在于生物体内的特点,它是惟一一种在金属代谢中起明确作用的低分子蛋白。MT 分子中的大量巯基对二价金属离子尤其重金属离子具有极高的亲和力,与重金属结合能力顺序依次为: $\text{Hg}^{2+} > \text{Cu}^{2+}, \text{Ag}^+, \text{Bi}^{3+} \gg \text{Cd}^{2+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Co}^{2+}$ ^[5]。同时,MT 诱导效应对暴露于环境中的重金属具有高度

的生物化学响应,重金属诱导生物体内 MT 在 mRNA、蛋白质等不同水平上的表达已经被许多研究所证实^[6]。

MT 与重金属离子的结合能力及其被重金属离子诱导的能力,使其在重金属解毒与生理代谢方面具有重要作用。目前众多学者比较认同 MT 可控制生物体内必需元素的离子稳态,其功能已能满足生物酶与生理代谢的需求。当非必需重金属 Cd、Hg、Ag 进入细胞内,它们将与细胞内配位体结合的必需金属元素 Cu、Zn 产生不可避免的竞争作用,从而 MT 将发挥其生物解毒机制。Mason 等^[7]研究发现,MT 具有双重功能:其一,与必需重金属 Zn、Cu 结合的 MT 有助于生物体内金属酶的合成,调节这些金属离子在细胞内浓度的作用,从而维持生物体内许多细胞反应进程的动态平衡;其二,重金属进入机体引起 MT 表达,而后 MT 与非必需有毒重金属的结合,可以减少细胞与这类重金属的非特异性结合,从而避免有害重金属对生物体的潜在毒性。

此外还有研究报道,金属硫蛋白具有保护细胞免受离子辐射^[8]和抵御抗氧化物损伤^[9]的作用。当生物体暴露于重金属环境中,重金属诱导合成的 MT 可清除 $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{O}_2\cdot$ 等自由基,从而使生物体耐受一定的氧化压力。

1.2.2 MT 的重金属生物代谢

MT 如同其他蛋白质一样,它有其自身的生命代谢周期。在细胞生理循环周期中,MT 与有毒重金属结合通过溶酶体从细胞质中排出^[10]。重金属与 MT 结合后进入溶酶体中的机制,相对而言容易被忽视。然而,个别学者研究观察到硫与重金属等伴随物出现在溶酶体中,这可能是 MT 与硫、重金属等结合形成的螯合物进入细胞器的结果^[11]。

MT 在细胞内降解的速率取决于 MT 与金属离子的结合能力。不同种类动物体内的 MT 降解速率不尽相同,同时组织中金属离子的分布与 MT 异构体种类对 MT 降解也有一定的影响。Zn-MT 结合物降解过程中释放出的 Zn 将行使其细胞生物功能,并且进一步诱导 MT 的合成。而 Cu 由于与硫蛋白具有较强结合力,则 Cu-MT 将被氧化为难溶性的多聚体复合物而蓄积于溶酶体中,它或许以无毒聚合物的形态存在并通过胆汁分泌、排泄。国外早期有研究发现,通过体外实验发现,老鼠体内溶酶体提取物可降解 Zn-MT、Cd-MT,而 Cu-MT 结合物很难被降解,这说明重金属生物代谢过程中,不同的 MT 异构体进入溶酶体后,其结合

的重金属降解、分离等生物学特性均有差异。这种现象的原因可能是由于不同种类的 MT 结合物分子内部结构中二硫键稳定性不同所造成的^[12]。此外,通过体外实验已证明,处于酸性 pH 下的组织蛋白酶 B,它可降解被去除金属离子的金属硫蛋白(apoMT)^[13]。

2 MT 基因的表达调控与诱导

在金属离子、细胞因子、应激激素等因素影响下,生物体间接地通过应激或炎症应答等方式皆可诱导肝脏金属硫蛋白的表达合成。其中重金属对 MT 的诱导作用发生在转录水平,它通过金属结合蛋白与 MT 基因上游序列中的金属应答元件(MRE)结合,从而启动 MT 的 mRNA 转录,其途径主要可分为以下 4 种,如图 1 所示^[14]。第一种途径主要为,生物体在重金属污染环境中将会出现感染/炎症等现象,此时白介素-1(IL-1)、白介素-6(IL-6)与肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 皆由活化的 T 细胞、巨噬细胞释放出。首先,外界应激压力与 IL-6、IL-1、TNF- α 等细胞因子刺激调节垂体-甲状腺轴分泌大量的糖皮质激素。然后糖皮质激素进入细胞后,与胞液中的特异受体结合后形成糖皮质激素-受体复合物(GRF),后者进入细胞,与糖皮

质激素受体反应元件(GRE)结合,最终引起 MT 基因的表达;第二种途径是,糖皮质激素可通过诱导 MT 基因大量表达的方式启动血浆中 Zn 与 MT 的螯合进程,增加细胞内 Zn 库的容量,从而在正反馈循环过程中通过金属转录因子(MTF-1)激活金属应答元件(MREs),达到诱导体内 MT 基因表达的目的;第三种途径为,不同组织中 IL-1、TNF- α 和儿茶酚氨可能诱导白介素-6 的分泌表达。白介素-6 刺激产生后,信号转导和转录激活因子(STATs)引起酪氨酸的磷酸化,诱导大量急性时相蛋白的表达,并使 STATs 结合于金属硫蛋白 MT 基因启动子上,促进 MT 基因表达调控。调控过程中,白血病抑制因子、IL-6、IL-11、抑瘤素 M、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)以及上皮生长因子(EGF)等因素的应答响应皆可诱导影响 STATs 的合成。另外,炎症应答产生的活性氧簇(ROS)可能与抗氧化反应元件(ARE)或金属反应转录因子(MRE)相互作用,从而激活 MT 基因表达。此外,与细胞膜受体结合的炎症介质诱导产生的儿茶酚胺、胰高血糖素,可通过第二信使系统激活反式作用核因子的方式实现 MT 基因调控表达的目的。诸上这些诱导因子的联合作用皆可能影响转录后进程及细胞内 MT 表达

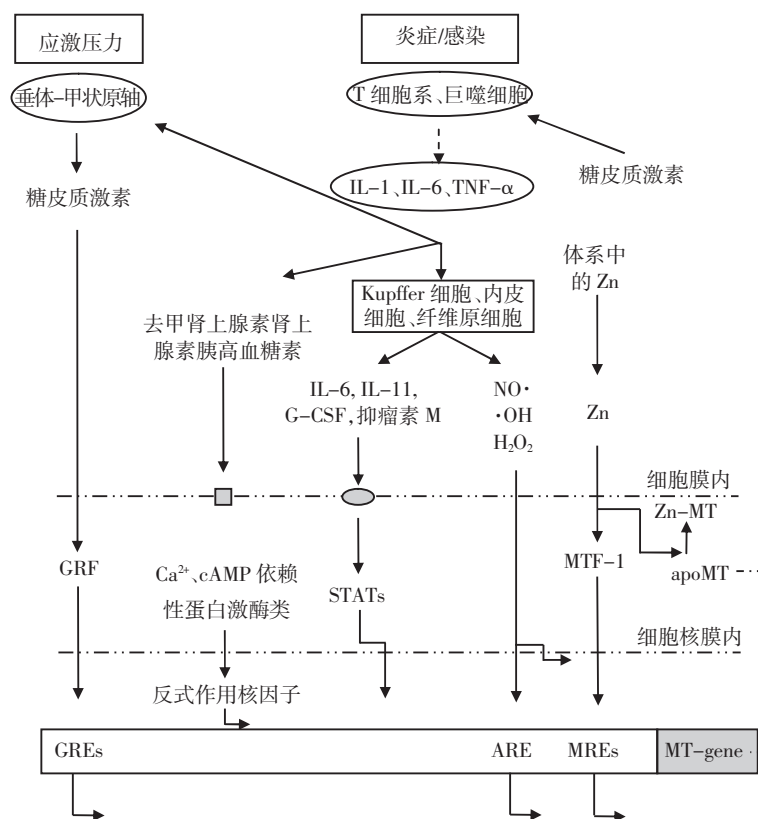


图 1 肝脏金属硫蛋白的基因调控主要过程

Figure 1 The main process of hepatic MT gene regulation

调控水平。

3 MT 的多态性

MT 多态性最早由 Mackay 等^[15]提出,指一个物种在自然状态下发生的 MT 多种形态,是因为 MT 基因的多态性决定了不同亚型的 MT 异构体的存在。不同的纲、目、属、种生物之间 MT 在分子量、金属含量、氨基酸组成等方面不尽相同。在哺乳动物中,根据等电点和氨基酸组成的不同可分为 4 种亚型,即 MT-I、MT-II、MT-III、MT-IV。其中 MT-I、MT-II 几乎存在于哺乳动物的所有器官或组织中,尤以肝、肾细胞为主,而且参加其功能调节;MT-III 是一种神经生长抑制因子,分布限于中枢神经系统,主要分布于星形胶质细胞,其次为神经元细胞;MT-IV 分布于皮肤、舌、消化道等器官的角质细胞和复层鳞状上皮细胞中^[16]。根据半胱氨酸在 MT 中排列方式的不同,Cobbett 等^[17]将植物 MT 也分为 4 种类型。植物 MT 表达具有组织器官特异性和发育阶段性。通常情况下 MT-I 主要在植物根、叶部表达合成,MT-II 基本在叶片中表达,MT-III 多在叶片及成熟的果肉中表达,MT-IV 在植物发育的种子中表达^[18]。

随着分子生物学检测技术的发展,通过 MT 基因扩增和拷贝也已经证实在一种特定的动物或植物中,通常含有多种类型的金属硫蛋白异构体,不同 MT 异构体其生理功能也各有差异。其中有些 MT 起到维持金属体内稳态作用,另外一些 MT 则发挥着对不必要重金属的解毒作用。Dallinger 等^[19]研究指出,陆生软体动物蜗牛体内存在着生物功能不同的 MT 异构体,其中一种 MT 异构体在有毒重金属 Cd 解毒机制中发挥作用,另外一种 MT 调整体内必要重金属 Cu 稳态平衡。Lemoine 等^[20]认为 MT-10 是一种基础蛋白,参与生物体内必需金属元素的调节,而 MT-20 则是一种诱导蛋白,对非必需金属元素发挥解毒功能,通过检测贻贝类生物 *Mytilus edulis* 的 MT 异构体 MT-10、MT-20 mRNA 表达水平,研究发现 MT-10 和 MT-20 皆可由重金属 Cd 诱导表达,特别是 MT-20 仅能由 Cd 单一诱导;而 MT-10 则也可由 Zn 诱导表达。Laura 等^[21]的研究也得到类似的结果,认为紫色贻贝(*Mytilus galloprovincialis*)体内 MT-10 是普遍存在的活性异构体,而 MT-20 主要由 Cd 诱导表达。两者生理功能方面差异主要表现在 MT-10 较 MT-20 具有紧密的结构和很高的热稳定性,且 MT-10 对氧化损伤更加敏感。此外,Dondero 等^[22]通过实时定量荧光

PCR 检测发现不同种类的重金属对 MT 同源基因调控是各不相同的。紫色贻贝原代细胞培养阶段(*Mytilus galloprovincialis*),Zn、Cu、Cd 等重金属明显诱导 MT-10 mRNA 表达合成,Hg 诱导其低水平表达;而 Cu、Zn 对 MT-20 诱导作用较弱,但 Cu 和 H₂O₂ 的联合作用可加速诱导 MT-20 mRNA 表达,说明羟自由基对 MT-20 表达具有激活作用。Morgan 等^[23]研究发现,蚯蚓(*Lumbricus rubellus*)体内也存在两种不同的 MT 异构体(wMT-1,wMT-2),它们具有各自不同的生理机能,wMT2 异构体不仅与 Cd 的结合能力要强于 wMT-1,而且两者对于重金属解毒功能也各有差异。

4 MT 作为重金属污染的生物标志物研究

生物标志物,是指通过测定体液、组织或整个生物体,能够表征对一种或多种化学污染物的暴露和其效应的生化、细胞、生理、行为以及能量上的变化^[24]。即生物标志物是衡量环境污染物的暴露及效应的生物反应。

重金属污染所造成的环境破坏以及对人类构成的危害越来越引起国际上的重视。金属硫蛋白在重金属与生物体交互作用的过程中被诱导合成,在细胞损伤和机体防御中具有重要意义。MT 基因的表达可作为生物体损伤与防御相关的效应标志物,已经被公认为是评价重金属污染状况的一种关键性生物标志物。目前,国内外关于 MT 作为生物标志物在土壤、水生生态毒理学以及环境健康学中的应用与研究,已经取得了一定的研究成果。

4.1 在土壤生态毒理学中的研究

无脊椎动物代表着土壤所有动物种类中一个主要成员,它具有直接与土壤或重金属等污染物暴露相接触的优越性。因此,土壤生态毒理学研究领域中,通常选取无脊椎动物等生物体作为主要指示物种,用来评定环境中重金属含量水平是否安全,同时土壤中重金属可诱导指示物种体内 MT 基因的特异性表达。而目前主要选用土壤环节动物蚯蚓作为指示物种,通过研究其 MT 表达水平与重金属含量间内在关系,从而证实 MT 可作为重金属生物标志物用来评价重金属对土壤生态系统的生物效应^[25]。

Brulle^[26]采用人工土壤法,将成熟赤子爱胜蚓(*Eisenia fetida*)暴露于 80,800 mg·kg⁻¹ 重金属镉中,通过克隆金属硫蛋白(MT)、过氧化氢酶(CAT)、钙调蛋白(Calm)、热休克蛋白(Hsp60、Hsp70)、丙酮酸羧

化酶(Pyc)等14个cDNA基因片段,应用荧光定量PCR技术在mRNA表达水平上筛选生物标志物,研究证实蚯蚓体内MT可作为环境重金属污染评估的主要生物标志物之一。Svendsen^[27]也通过研究发现,暴露于复合重金属污染外界环境下蚯蚓体内MT-2基因表达水平和蚯蚓个体繁殖数目存在很好地线性关系,强调指出蚯蚓体内MT-2转录表达水平作为生物标志物可很好的监控重金属污染(尤其是Cd)的状况。Homa^[28]采用滤纸接触试验,将赤子爱胜蚓分别暴露于一定浓度Zn、Cu、Pb、Cd等重金属处理条件下,采用免疫细胞化学技术检测蚯蚓体腔组织中wMT-2的表达水平,研究表明除了暴露于Pb处理外,其他处理中wMT-2表达水平均有不同程度的上调。另外国内也有报道用陆地生态中昆虫类等体内MT作为环境重金属污染评估生物标志物的研究^[29]。

4.2 在水生生态毒理学中的研究

20世纪70年代末就有学者提出水生生物MT可作为一种指示水环境污染物暴露和毒性效应早期预警的主要生物标志物,以及作为水生环境自然种群金属污染压力评价和监测的分子生态毒理学诊断指标^[30],用以指示重金属对生物体和环境的污染程度。在联合国环境规划署开展的“地中海行动计划”中,MT已被选择作为海洋环境监测生物标志物之一^[31]。欧共体及其他国际组织也已经把MT作为水生环境重金属污染评估的生物标志物,并将MT作为关键性生物标志物列入欧洲BEQUALM计划框架中^[32]。

生长于河口、海岸等生态系统中的无脊椎动物,由于对外界环境的变化非常敏感且容易富集重金属离子,因此通常被选择作为指示生物用于重金属污染的水生态毒理学检测。这些软体生物内金属硫蛋白在基因水平上通常由Cu、Hg、Cd、Pb、Zn等金属离子诱导合成,可作为重金属暴露和毒性效应早期预警的主要生物标志物^[33],使在生物尚未发生生理、病理和生态变化之前进行早期监测、评估。

柯翎等^[34]通过紫外可见分光光度计测定了菲律宾花蛤体内金属硫蛋白的吸收值,研究发现镉污染诱导可使花蛤的内脏团和外套膜的金属硫蛋白含量明显增加,且金属硫蛋白的吸收值与菲律宾花蛤重量、壳长、壳宽均有较大的相关性,从而认为MT作为花蛤镉污染的检测指标是可行的。Bebianno等^[35]研究发现,双壳类贻贝的腮、消化腺和整体软组织等器官中的Cd浓度与MT诱导水平相关。因此,贻贝MT作为重金属污染的一种早期生物响应中已得到广泛认可,

研究证实其MT可作为环境中Cd、Hg、Ag及Cu等重金属污染的生物标志物。Ivanković^[36]通过检测亚得里亚海中东部若干海岸或河口水域中贻贝消化腺组织MT发现,MT表达水平随着贻贝生长季节的不同和生长环境的改变而发生变化,且生长季节的不同对于MT合成的影响更大,冬季-春季时期内贻贝MT的表达水平要明显高于夏-秋两季。除了秋季其他时期生长的贻贝,其MT可作为生物标志物指示海岸或河口重金属Cd污染状况。Amiard^[37]研究认为,重金属钒可诱导贻贝体内MT合成,且MT水平与重金属钒含量存在着显著正相关关系,MT可作为海洋中钒污染有效生物标志物,这是目前国内外首次关于重金属钒可诱导MT表达的报道。

河口生态系统中软体动物牡蛎由于其软组织中累积高浓度的重金属和有机污染物,通常选作重金属污染的指示物种,对于牡蛎体内MT的研究正方兴未艾^[38]。Yong Ki Choi等^[39]研究认为,牡蛎(*Crassostrea gigas*)暴露于浓度为0.01、0.05、0.1 mg·L⁻¹ Cd中11 d后,其腮、消化腺等器官中的MT mRNA表达量显著增加,且与血清中谷草转氨酶、谷丙转氨酶等酶活水平存在着时间-剂量效应关系,因此MT被认为可指示牡蛎在重金属污染环境其自身新陈代谢、细胞防御等生理机能变化。Gautier Damiens等^[40]研究认为,牡蛎幼虫对重金属等污染物高度敏感,当其受精卵暴露于重金属Cu、Cd环境中孵化后,幼虫体内MT含量显著增加,尤其是Cd诱导MT表达水平要高于Cu。

另外,Erkuden Pérez等^[41]研究西班牙西南部一些海岸污染状况时,发现栖息于海陆交错带的环节动物沙蚕属(*Nereis diversicolor*)其体内MT水平可作为沿海地区重金属污染的主要生物标志物之一。

4.3 在环境健康学中的研究

随着科学技术的不断发展,重金属污染物的排放和扩散造成了日益严重的环境污染。由于人和环境的关系密切,重金属污染区中人群体内的金属含量必定异常。鉴于MT在重金属损伤的不同组织中的表达上调或下调,因此MT通常被选作为重金属特别是对镉毒性敏感的主要的生物标志物^[42]。

目前,国内外皆有镉接触者中MT测定的报道,认为组织MT水平反映镉暴露情况并在一定程度上与机体镉的反应性有关。常秀丽等^[43]运用半定量RT-PCR方法测定了人外周血淋巴细胞(HPBLs)中MT基因亚型的表达水平,发现MT基因亚型的表达可作为镉接触性生物标志物,其中MT-1A还可作为镉致

肾毒性的效应性生物标志物。Yamada 等^[44]研究,用 $0.1\sim 0.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ CdSO}_4$ 诱导外周淋巴细胞(PBL), MT mRNA 水平与镉浓度呈剂量-效应关系,表明可用 PBL 的 MT mRNA 可作为反映镉暴露的敏感的生物标志物。Lu 等^[45]通过 RT-PCR 检测生活在镉污染环境下的居民血液内外周淋巴细胞中 MT,发现 MT mRNA 表达水平的上调与体内尿镉(UCd)、血镉(BCd)含量的增加有关,而且 MT mRNA 水平与 UCd、BCd 含量对数值成明显的正相关关系,同时发现体外诱导 MT mRNA 表达量与尿 N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶(UNAG)成负相关关系。研究表明 PBL 中 MT mRNA 表达水平可作为评估镉体内、外暴露剂量的生物标志物,也可作为镉引起肾损伤的易感性生物标志物。另外,有关 MT 及其功能亚型在肿瘤组织中的诱导表达的生物学意义,在肿瘤防治中的作用以及作为肿瘤生物标志物的研究也尤为活跃^[46]。

因此通过检测人群中生物标志物 MT 的浓度来反映重金属中毒或重金属污染环境的状况,进而能够早期预测环境和职业有害因素对人体健康的影响,及早采取干预措施,保证人类的健康和环境的安全。

5 存在的问题与展望

MT 是一种与抗逆有关的多功能蛋白,具有很强的金属结合能力和氧化还原能力,在生物体内参与细胞内必要金属水平的稳态调节、非必要重金属解毒、清除自由基、抵抗电离辐射等,甚至参与激素和发育调节,增强机体应激反应。MT 作为生物标志物对于重金属环境污染评价具有极其重要的意义。

由于在不同生物种类、不同的组织器官、不同的细胞甚至不同的生理时期内,MT 的种类组成、诱导表达水平以及在重金属代谢功能各有差异,从而使 MT 研究中经常出现试验结果不一致性^[47]。此外,目前 MT 的检测技术主要包括金属亲和分析法、电化学法、免疫法、色谱分析法和 MT-mRNA 半定量及定量分析法等^[48]。

鉴于 MT 检测方法各不相同,检测精确度也就各有差异,导致检测结果之间往往很难直接进行比较^[49]。因此,如何选择合适的物种用于环境监测,如何选择哪一部分生物器官、组织用于检测 MT 含量,以及如何通过有限的数据进行风险评价,这些问题将是今后研究的重点。为了使 MT 更好的作为生物标志物及时有效的监控重金属污染,采取合理控制措施,今后的研究工作还需从以下几个方面开展:

(1)完善 MT 分离纯化、定量检测方法手段,使其更适用于大量样品和野外样品的监测;选择灵敏度高、特异性强、检出量小的 MT 检测方法,同时建立一套标准精密的检测方法体系,且体系中 MT mRNA、蛋白质等不同水平上的检测方法可相互校准,例如实时荧光定量 PCR (Real-Time PCR)-蛋白质印迹(Western blot)体系检测技术。

(2)MT 生物标志物具有种群特异性,某一特定物种的 MT 生物标志物不一定适用于另一物种。因此合理应用 MT 作为生物标志物还需尽可能彻底了解这一物种的 MT 家族以及决定它们反应模式的因子。以已知生物功能较为明确的物种 MT 为参照,继续完善存在于不同环境中的指示生物 MT 基因文库、蛋白质文库,深入研究 MT 家族进化,为开展 MT 基因组芯片及蛋白质组芯片检测技术奠定基础。

(3)进一步研究 MT 对 Zn 等必要微量重金属元素的转运机理、MT 结合重金属的承载能力及库容量、MT 在重金属代谢失调过程中的作用、MT 在机体内的降解过程与最终代谢途径以及生物体内 MT 的周转率等生物机制。

(4)阐明 MT 各亚型异构体的具体功能及其存在差异的原因。

(5)结合其他有效生物标志物综合、准确的评价重金属污染物对生物及环境的早期作用和潜在影响。

参考文献:

- [1] Kägi J H R. Overview of metallothionein[J]. *Methods Enzymol*, 1991, 205:613-626.
- [2] Margoshes M, Vallee B L. A cadmium protein from equine kidney cortex[J]. *J Am Chem Soc*, 1957, 79(17):4813-4814.
- [3] Cobbett C, Goldsbrough P. Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2002, 3: 159-182.
- [4] Amiard J C, Amiard-Trignet C, Barka S, et al. Metallothioneins in aquatic invertebrates: their role in metal detoxification and their use as biomarkers[J]. *Aquatic Toxicology*, 2006, 76: 160-202.
- [5] Vasak M. Metal removal and substitution in vertebrate and invertebrate metallothioneins[M]//Riordan J F, Vallee B L, (Eds.). *Methods in Enzymology Metallochemistry*, Part B, 1991, 205:452-458.
- [6] Brulle F, Mitta G, Cocquerelle C, et al. Cloning and real-time PCR testing of 14 potential biomarkers in *Eisenia fetida* following cadmium exposure[J]. *Environ Sci Technol*, 2006, 40:2844-2850.
- [7] Mason A Z, Jenkins K D. Metal detoxification in aquatic organisms[M]// Tessier A, Turner D R, (Eds.). *Metal speciation and bioavailability in aquatic systems*. John Wiley and Sons Ltd., London, 1995:479-608.
- [8] Cai L, Satoh M, Tohyama C, et al. Metallothionein in radiation exposure:

- its induction and protective role [J]. *Toxicology*, 1999, 132 (2-3):85-98.
- [9] Cavaletto M, Ghezzi A, Burlando B, et al. Effect of hydrogen peroxide on antioxidant enzymes and metallothionein level in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis*[J]. *Comp Biochem Physiol, Part C*, 2002, 131 (4):447-455Z.
- [10] Isani G, Andreani G, Kindt M, et al. Metallothioneins (MTs) in marine mollusks[J]. *Cell Mol Biol*, 2000, 46(2):311-330.
- [11] Marigomez I, Soto M, Carajaville M P, et al. Cellular and subcellular distribution of metals in mollusks[J]. *Microsc Res Technol*, 2002(56):358-392.
- [12] Bremner I. Metallothionein and copper metabolism in liver[M]//Riordan J F, Vallee B L, (Eds.). *Methods in enzymology. Metallobiochemistry, Part B: Metallothionein and related molecules*. Academic Press Inc., San Diego, 1991, 205:584-591.
- [13] Klaassen C D, Choudhuri S, Mc Kim J M, et al. In vitro and in vivo studies on the degradation of metallothionein[J]. *Environ Health Perspect*, 1994, 102:141-146.
- [14] Coyle P, Philcox J C, Carey L C, et al. Metallothionein: the multipurpose protein[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2002, 59:627-647.
- [15] Mackay E A, Overnell J L, Dunbar B, et al. Complete amino acid sequence of five dimeric and four monomeric forms of metallothionein from the edible mussel *Mytilus edulis*[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1993, 218:183-194.
- [16] 叶属峰, 陆健健. 无脊椎动物金属硫蛋白(MTs)多样性及其生态服务功能[J]. *生物多样性*, 2000, 8(3):317-324.
- YE Shu-feng, LU Jian-jian. Metallothionein diversity and its ecological service functions of invertebrates: an overview[J]. *Chinese Biodiversity*, 2000, 8(3):317-324.
- [17] Cobbett C, Goldsbrough P. Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis[J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2002, 53:159-182.
- [18] 全先庆, 张洪涛, 单雷, 等. 植物金属硫蛋白及其重金属解毒机制研究进展[J]. *遗传*, 2006, 28(3):375-382.
- QUAN Xian-qing, ZHANG Hong-tao, SHAN Lei, et al. Advances in plant metallothionein and its heavy metal detoxification mechanism[J]. *Heredity*, 2006, 28(3):375-382.
- [19] Dallinger R, Berger B, Hunziker P, et al. Metallothionein in snail Cd and Cu metabolism[J]. *Nature*, 1997, 388:237-238.
- [20] Lemoine S, Bigot Y, Sellos D, et al. Metallothionein isoforms in *Mytilus edulis* (Mollusca, Bivalvia): complementary DNA characterization and quantification of expression in different organs after exposure to cadmium, zinc, and copper[J]. *Mar Biotechnol*, 2000, 2:195-203.
- [21] Laura Vergani, Myriam Grattarola, Elena Grasselli, et al. Molecular characterization and function analysis of MT-10 and MT-20 metallothionein isoforms from *Mytilus galloprovincialis*[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2007, 465(1):247-253.
- [22] Francesco Dondero, Luciana Piacentini, Mohamed Banni, et al. Quantitative PCR analysis of two molluscan metallothionein genes unveils differential expression and regulation[J]. *Gene*, 2005, 345(2):259-270.
- [23] Morgan A J, Stürzenbaum S R, Winters C, et al. Differential metallothionein expression in earthworm (*Lumbricus rubellus*) tissues[J]. *Eco-toxicol Environ Saf*, 2004, 57:11-19.
- [24] Depledge M H. The rational basis for the use of biomarkers as ecotoxicological tools[M]//Fossi M C, Loeoncio C, (Eds.). *Nondestructive biomarkers in vertebrates*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA, 1993:261-285.
- [25] Dallinger R, Berger B, Gruber C, et al. Metallothioneins in terrestrial invertebrates: structural aspects, biological significance and implications for their use as biomarkers[J]. *Cell Mol Biol*, 2000, 46:331-346.
- [26] Brulle F, Mitta G, Cocquerelle C, et al. Cloning and real-time PCR testing of 14 potential biomarkers in *Eisenia fetida* following cadmium exposure[J]. *Environ Sci Technol*, 2006, 40:2844-2850.
- [28] Homa J, Olchawa E, Stürzenbaum S R, et al. Early-phase immunodetection of metallothionein and heat shock proteins in extruded earthworm coelomocytes after dermal exposure to metal ions[J]. *Environmental Pollution*, 2005, 135:275-280.
- [29] 孙红霞, 周强, 唐文成, 等. Ni^{2+} 在斜纹夜蛾幼虫中肠的积累并诱导金属硫蛋白表达[J]. *科学通报*, 2007, 52(22):2613-2617.
- SUN Hong-xia, ZHOU Qiang, TANG Wen-cheng, et al. Metallothionein expression induced by nickel accumulation in the midgut of *Spodoptera litura Fabricius* larvae exposed to nickel[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2007, 52(22):2613-2617.
- [30] Ridlington J W, Fowler B A. Isolation and partial characterization of a cadmium-binding protein from the American oyster (*Crassostrea virginica*) [J]. *Chemico-Biological Interactions*, 1979, 5(25):127-138.
- [31] UNEP/RAMOG. Manual on the biomarkers recommended for the MED POL biomonitoring programme[R]. UNEP, Athens, 1999. 92.
- [32] Mathiessen P. Biological effects quality assurance in monitoring programs (BELQUALM). Centre for Environment, Fisheries and Aquaculture Science (CEFAS), Remembrance Avenue, Burham-on-Crouch, Essex CMO 8HA, UK, 2000. 24.
- [33] Domouhtsidou G P, Dailianis S, Kaloyianni M, et al. Lysosomal membrane stability and metallothionein content in *Mytilus galloprovincialis* (L.), as biomarkers: combination with trace metal concentrations[J]. *Mar Pollut Bull*, 2004, 48:572-586.
- [34] 柯翎, 骆庭伟, 林志超. 利用菲律宾花蛤的金属硫蛋白作为镉污染的检测指标[J]. *漳州师范学院学报(自然科学版)*, 2004, 17(1):60-64.
- KE Ling, LUO Ting-wei, LIN Zhi-chao. Monitoring the cadmium in the ocean by using MT as the marker[J]. *Journal of Zhangzhou Teachers College (Nat. Sci.)*, 2004, 17(1):60-64.
- [35] Bebianno M J, Langston W J. Cadmium induction of metallothionein synthesis in *Mytilus Galloprovincialis* [J]. *Comp Biochem Physiol, Part C*, 1992, 103(1):79-85.
- [36] Ivanković D, Pavičić J, Erk M, et al. Evaluation of the *Mytilus galloprovincialis* Lam. digestive gland metallothionein as a biomarker in a long-term field study: seasonal and spatial variability[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2005, 50(11):1303-1313.
- [37] Amiard J C, Journel R, Bacheley H. Influence of field and experimental exposure of mussels (*Mytilus* sp.) to nickel and vanadium on metallothionein concentration[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part*

- C; *Toxicology & Pharmacology*, 2008, 147(3):378-385.
- [38] Maud Achard-Joris, Jean-Luc Moreau, Megumi Lucas, et al. Role of metallothioneins in superoxide radical generation during copper redox cycling; defining the fundamental function of metallothioneins[J]. *Biochimie*, 2007, 89(12):1474-1488.
- [39] Yong Ki Choi, Pil Gue Jo, Cheol Young Choi. Cadmium affects the expression of heat shock protein 90 and metallothionein mRNA in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2008, 147(3):286-292.
- [40] Gautier Damiens, Catherine Mouneyrac, Françoise Quiniou, et al. Metal bioaccumulation and metallothionein concentrations in larvae of *Crassostrea gigas*[J]. *Environmental Pollution*, 2006, 140(3):492-499.
- [41] Erkuden Pérez, Julian Blasco, Montserrat Solé. Biomarker responses to pollution in two invertebrate species: *Scrobicularia plana* and *Nereis diversicolor* from the Cádiz bay (SW Spain)[J]. *Marine Environmental Research*, 2004, 58(2-5):275-279.
- [42] Chen Liang, Jin Taiyi, Huang Bo, et al. Critical exposure level of cadmium for elevated urinary metallothionein—An occupational population study in China[J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2006, 215(1):93-99.
- [43] 常秀丽, 金泰虞, 陈 亮, 等. 金属硫蛋白基因亚型表达在镉接触中作为生物标志物的研究 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2006, 24(1):12-15.
- CHANG Xiu-li, JIN Tai-yi, CHEN Liang, et al. Application of metallothionein gene isoforms expression as biomarkers in cadmium exposure[J]. *Chin J Ind Hyg Occup Dis*, 2006, 24(1):12-15.
- [44] Yamada H, Koizumi S. Lymphocyte metallothionein-mRNA as a sensitive biomarker of cadmium exposure[J]. *Ind Health*, 2001, 39:29-32.
- [45] Lu H, Jin T Y, Nordberg G, et al. Metallothionein gene expression in peripheral lymphocytes and renal dysfunction in a population environmentally exposed to cadmium[J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2005, 206(2):150-156.
- [46] Sergio Melo Alves, Vitorino Cardoso, Vanessa, et al. Metallothionein immunostaining in adenoid cystic carcinomas of the salivary glands[J]. *Oral Oncology*, 2007, 43(3):252-256.
- [47] Zorita I, Bilbao E, Schad A, et al. Tissue- and cell-specific expression of metallothionein genes in cadmium- and copper-exposed mussels analyzed by in situ hybridization and RT-PCR[J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2007, 220(2):186-196.
- [48] 王 达, 葛 刚, 吴 兰, 等. 金属硫蛋白(MT)的分离纯化与检测技术[J]. 江西科学, 2004, 22(1):61-65.
- WANG Da, GE Gang, WU Lan, et al. Purification and analysis of metallothionein(MT)[J]. *Jiangxi Science*, 2004, 22(1):61-65.
- [49] Dabrio M, Rodriguez A R, Bordin G, et al. Recent developments in quantification methods for metallothionein[J]. *J Inorg Biochem*, 2002, 88:123-134.

《农业环境科学学报》获 2008 年度 “中国精品科技期刊”称号

经中国精品科技期刊遴选指标体系综合评价,《农业环境科学学报》被评选为 2008 年度中国精品科技期刊。此次评选是国家为加强我国科技期刊资源建设,提高我国科技期刊总体水平,根据目前我国科技期刊的发展状况以及国家精品科技期刊的总体目标,由科技部经过公开征集社会各界意见和多次专家研讨及中国精品科技期刊遴选指标体系综合评价,从 6000 多种科技期刊中评选出的首批中国精品科技期刊,共 300 种。

