

· 综 述 ·

金属硫蛋白作为镉接触、效应和易感性生物标志物

黄 波, 金泰虞

(上海医科大学劳卫教研室, 上海 200032)

摘要: 对金属硫蛋白作为镉接触、效应和易感性生物标志物的可能性从理论基础、优越性以及存在问题等几个方面作了探讨, 但要付之应用, 尚需作深入研究。

关键词: 金属硫蛋白; 镉; 生物标志物

中图分类号: O614. 242 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X (2000)05-0304-03

Metallothionein as a biomarker for the exposure, effect and susceptibility of cadmium

HUANG Bo, JIN Tai-yi

(Department of Occupational Health, Shanghai Medical University, Shanghai 200032, China)

Abstract: The possibility to use urinary metallothionein as a biomarker for the exposure, effect and susceptibility biomarker of cadmium was discussed by reviewing the theoretic basis advantage and problems. The data suggested that further studies on using this biomarker should be considered.

Key words: Metallothionein; Cadmium; Biomarker

金属硫蛋白 (metallothionein, MT) 是一种小分子量应激蛋白, 富含金属和巯基, 其生物合成在基因转录水平上受金属、激素及其他理化应激因素的调节^[1]; 体液、组织和器官 MT 含量的增加, 是机体与上述因素相互作用的结果, 因此, 许多学者认为 MT 可作为金属, 尤其是镉 (Cd) 接触的生物标志物 (biomarker)^[2,3]。但由于 MT 家族的复杂性和 MT 对多种因素的反应性, 使得在对 MT 作为生物标志物 (尤其针对某一因素) 的解释时面临一定的困难。本文拟就 MT 作为 Cd 接触、效应和易感性生物标志物的可能性作一综述。

1 MT 作为 Cd 接触、效应和易感性生物标志物的理论基础

进入机体的 Cd 在肝细胞中诱导 MT 合成并释放入血, CdMT 随血液到达肾脏, 由于分子量小, 故很容易通过肾小球基底膜到达肾小管腔, 被肾小管上皮细胞摄取, 在溶酶体的作用下 CdMT 降解, Cd 重新游离出来, 并在肾细胞内诱导 MT 的合成。当 MT 的量不足以结合细胞内游离的 Cd 时, 肾小管上皮细胞即受到损害, 导致肾小管重吸收功能的障碍, 从而出现小分子量蛋白 (MT、 β_2 -微球蛋白、视黄醇结合蛋白等) 尿^[1]。上述过程中, (1) 在一定范围内, 机体接触 Cd 的剂量越大, MT 受诱导的作用越强, 血、尿中的 MT 含量也会随之增加; 血液中 Cd 含量越高, 对血中的淋巴细胞和单核细胞 MTmRNA 的表达影响越甚, 这是 MT 作为 Cd 接触生物标志物的理论依据; (2) 尿 MT 含量随肾小管重吸收功能受损加剧而升

高, 这是 MT 作为 Cd 效应生物标志物的理论依据; (3) 个体可能存在合成 MT 能力的差异, 从而使 MT 保护细胞免遭或减轻损害的能力不同, 是 MT 作为 Cd 易感性生物标志物的理论依据。

2 MT 与机体 Cd 接触、效应和易感性的关系

研究表明, MT 可反映机体 Cd 接触和 Cd 致肾损害的效应^[3], 但对于 MT 是否也能反映机体对 Cd 易感性的问题则仍无定论。这可能与对 MT 在 Cd 毒作用的发生和发展过程中所起的作用尚未完全了解有关, 其次还涉及一个问题: MT 作为 Cd 易感性生物标志物能否被检测出来或者在实际上如何应用。在实验中, 事先经锌或亚致死剂量 Cd 处理的动物或细胞, 再接触更高剂量的 Cd, 动物和细胞的损伤程度或死亡率均明显低于对照, 作者的解释是预先接触 Cd 诱导了动物 (细胞) MT 的合成增加, MT 通过与 Cd 结合隔离了 Cd 对细胞的毒作用, 从而表现对 Cd 毒性的拮抗; MT 高表达型转基因小鼠可明显耐受镉的急、慢性毒性, 而在无 MT-I 表达的小鼠则对 Cd 毒性较敏感^[4,5], 似乎也支持上述观点。而有学者观察到, 淋巴细胞 MT 的基础 mRNA 水平和经 Cd 诱导后的 mRNA 水平有很大的个体差异^[3], 这是否可用来表示个体对 Cd 毒作用的易感性, 尚有待深入研究。

3 MT 作为生物标志物的优越性

目前所用的镉接触指标尿镉和血镉在测定过程中易受外界污染; 效应指标尿 β_2 -微球蛋白、视黄醇结合蛋白等低分子量蛋白仅反映肾小管重吸收功能, 任何引起肾小管重吸收功能损害的疾病如 Fanconic 综合征、糖尿病性肾病等, 均可见尿中的含量升高, 其特异性较差^[3]; 而尿中的 MT 含量的增加,

收稿日期: 2000-03-30; 修回日期: 2000-06-06

作者简介: 黄波 (1965—), 男, 劳动卫生与职业病、毒理学专业博士, 副教授。

是Cd等应激因素与机体相互作用的结果,而且,与其他低分子量蛋白质一样,MT也能通过肾小球滤过到达肾小管腔,当肾小管重吸收功能不良时尿中含量会进一步升高,故其特异性较高。

4 MT作为生物标志物所存在的一些问题

4.1 MT的检测

欲将MT作为生物标志物,首先要能对MT进行准确的定量检测。常用的检测方法有金属结合法、高效液相色谱层析法、蛋白印迹法、电化学法和免疫法等^[9]。理论上,免疫法的灵敏度和特异性均较好,但迄今为止尚无商品化的试剂盒可供使用。现有报道检测MT的抗体(一抗)均为自备,这使得MT测定的标准化难以实现,来自不同实验室的数据其可比性也受到影响,以至今日尚无公认的人体液MT正常参考值,可能与此有关,而且免疫法不能判别所检测的MT所结合的金属种类,因而不能直观地识别MT是受到那种金属离子的诱导,使得在解释MT作为生物标志物的特异性方面存在一定的缺陷,必须全面了解受检者接触影响MT合成因素的背景,或检测体液中各种金属离子的含量。

尽管普遍认为检测血液中淋巴细胞和单核细胞MTmRNA的表达要较体液的MT能更早期地反映应激因素的接触^[7],但由于mRNA的定量方法所要求的条件和费用,限制了它在现场工作的大规模应用,现有的报道也证明了这一点。

4.2 灵敏度和特异性

有资料证明,尿Cd、MT较 β_2 -微球蛋白更灵敏地反映镉致肾损害^[8],但由于MT易受多种应激因素的影响,使得许多学者更关心其特异性。对于这一问题,针对Cd来说,MT能否仅反映Cd而不是其他因素的接触并对机体产生不良效应。其理论基础应该包括: Cd通过直接的途径诱导MT的合成; Cd与其他应激因素对MT的影响(诱导能力)存在差异; Cd对机体的生物学效应与其他因素不同并因此而导致MT有不同的表现。

在分子水平上,应激因素对MT的诱导表现在转录过程,位于MT基因启动子(promoter)的一些特异元素对某一应激因素有特异的反应。如人MT-IIA基因上有7个金属反应元素(metal-responsive element, MRE),其中4个与人的金属反应转录因子I(metal-responsive transcription factor-I, MTF-I)结合,而后者只被锌(Zn)而不是其他金属离子所激活,从而启动MT的合成^[9]。而在鼠MT-I的基因中,可能存在一个与抗氧化剂反应因素(antioxidant responsive element, ARE)重叠的上游刺激因子(upstream stimulatory factor, USF),在通过USF/ARE混合元素(composite element)参与MT-I基因启动子的激活时,是Cd而不是Zn在起作用^[10]。虽然人的MT基因中是否也存在这一激活机制尚未见报道,但Chu等在人神经瘤细胞中观察到, Cd通过MRE依赖机制激活虫荧光素酶报告基因(luciferase reporter gene),从而激活MT-I基因的启动子,而Zn则无此作用,提示Cd介导MRE的激活似乎是Cd特异而不依赖于MTF-I和Zn的作用^[11]。其他的应激因素如白介素-6

(interleukin-6 IL-6)对MT的诱导需要通过糖皮质激素反应元素(glucocorticoid responsive element, GRE)才得以实现^[12]。而仿生理性应激物质地塞米松(dexamethasone, Dex)在不能诱导MT合成的剂量下可增加IL-6的诱导能力^[13],而且IL-6和Dex的诱导作用均依赖Zn的存在^[14],这似乎提示它们是通过间接的途径(金属离子)来实现对MT的诱导。因此,阐明不同金属对MT影响的差异至关重要,而在一些研究中确实也观察到了这一差异。

4.2.1 不同种类金属对MT的诱导时相有所不同 实验动物经静脉一次分别给予Cd、Zn和铜(Cu)、Cd在10分钟内即从血浆中清除,并迅速进入肝脏,而Zn和Cu则在2小时后才在血浆中消失,缓慢地转移到肝脏,而且,MT在肝中的诱导也表现相似的时相^[15]。Garte等观察了Cd诱导人外周血淋巴细胞MTmRNA的动力学,取自3个自愿者的淋巴细胞mRNA对Cd的诱导作用都表现同一模式,即在0.5mM CdCl₂剂量下mRNA与时间的关系呈现拖尾S型曲线,在1.0mM CdCl₂剂量下表现平台S型曲线^[16]。但尚未见到有关其他金属诱导MTmRNA动力学的报道,因而无从进行比较。然而,基于不同金属对MT的诱导显示不同的时相来看,其动力学也可能存在差异。

4.2.2 不同种类金属对MT的亚型可有不同的影响 体外实验表明,人外周血淋巴细胞和单核细胞经Zn和Cd接触后,通过离子交换层析可分离出4种形式的MT,而Dex诱导的MT则无^[17];在另一个实验观察到Cd²⁺、Zn²⁺和Cu²⁺可诱导人肾近曲小管细胞MT-I E和MT-I A mRNA的表达,但不影响MT-I X或MT-I F mRNA,而Hg²⁺、Ag²⁺(二价银离子)和Pb²⁺则对MT-I mRNA无作用^[18]。

4.2.3 不同种类金属对MT的诱导能力不同 分别给予爪蟾(xenopus laevis)胚胎Zn²⁺ 300mmol/L、Cd²⁺ 18mmol/L、Ni²⁺(二价镍离子) 56mmol/L、Co²⁺(二价钴离子) 1800mmol/L和Cu²⁺ 5.6mmol/L,结果显示Cd²⁺对MT的诱导能力较Zn²⁺强3~5倍,另外的几种金属离子诱导MT的作用则与对照无明显差异^[19];在肝脏, Cd和Zn对MT的诱导能力较强,而Cu在大剂量时才是一种好的诱导剂, Hg的诱导作用则更弱;而在肾脏, Cd对MT的诱导能力最强, Zn只在大剂量时才是好的诱导剂, Hg次之, Cu只有很弱的诱导作用。但目前尚不知道这种差异是否会表现在尿MT含量或淋巴细胞MTmRNA表达的差异上。

4.2.4 不同种类金属表现不同的生物学效应,从而影响了MT在体液的量 尿MT的量主要取决于肾小管上皮细胞的脱落和肾脏的排泄,而后者又受到MT在血中浓度、肾小球的滤过率和肾小管的重吸收等因素的影响^[20]。因此,不同种类的金属对肾脏损害的不同表现有可能影响到MT在尿中的水平。

综上所述,要恰当地解释MT作为Cd接触、效应和易感性的生物标志物,尚需要在综合分析体液和细胞(如淋巴细胞)的金属含量、MT(亚型)mRNA的表达(动力学)以及蛋白水平等方面,积累更多的资料。

参考文献:

- [1] Nordberg M. Metallothioneins: Historical Review and State of Knowledge [J]. *Talanta*, 1998, 46: 243-254.
- [2] Dallinger T. Invertebrate Organisms as Biological Indicators of Heavy Metal Pollution [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 1994, 48 (1): 27-31.
- [3] 卢坚, 金泰康. 金属硫蛋白在镉接触评价中的应用 [J]. *劳动医学*, 1998, 15 (2): 113-115.
- [4] Leber AP, Miya TS. A Mechanism for Cadmium- and Zinc-Induced Tolerance of Cadmium Toxicity: Involvement of Metallothionein [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1976, 37: 404-410.
- [5] 刘杰. 用转基因动物研究金属硫蛋白对镉毒性的作用 [J]. *中华劳动卫生职业病杂志*, 1998, 16 (1): 57-60.
- [6] 黄波, 金泰康. 金属硫蛋白检测方法的适用性和局限性 [J]. *劳动医学*, 1999, 16 (2): 114-115.
- [7] Hildebrand CE, Cram IS. Distribution of Cadmium in Human Blood Cultured in Low Level of CdCl₂: Accumulation of Cd in Lymphocytes and Preferential Binding to Metallothionein Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 1979 161: 438-443.
- [8] 刘占旗, 高增林, 罗福堂. 环境镉污染暴露人群尿 NAG 和尿 Cd-MT 的变化 [J]. *中国公共卫生*, 2000, 16 (2): 130-131.
- [9] Koizumi S, Suzuki K, Ogra Y, et al. Transcriptional Activity and Regulatory Protein Binding of Metal-Responsive Elements of the Human Metallothionein-II A Gene [J]. *Eur J Biochem*, 1998, 259 (30): 635-642.
- [10] Li Q, Hu N, Daggett MA, et al. Participation of Upstream Stimulator Factor (USF) in Cadmium-Induction of the Mouse Metallothionein-I Gene [J]. *Nucleic Acids Res*, 1998, 26 (22): 5182-5189.
- [11] Chu WA, Moehlenkamp JD, Bittel D, et al. Cadmium Mediated Activation of the Metal Response Element in Human Neuroblastoma Cell Lacking Functional Promoters Metal Response Element-Binding Transcription Factor-1 [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274 (9): 5279-5284.
- [12] Kasutani K, Itoh N, Kanekiyo M, et al. Requirement for Cooperative Interaction of Interleukin-6 Responsive Element Type 2 and Glucocorticoid Responsive Element in the Synergistic Activation of Mouse Metallothionein I Gene by Interleukin-6 and Glucocorticoid [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1998, 151 (1): 143-151.
- [13] Sato M, Yamaki J, Hamaya M, et al. Synergistic Induction of Metallothionein Synthesis by Interleukin-6, Dexamethasone and Zinc in the Rat [J]. *Int J Immunopharmacol*, 1996, 18 (2): 167-172.
- [14] Coyle P, Philcox JC, Role AM. Corticosterone Enhances the Zinc and Interleukin-6-Mediated Induction of Metallothionein in Cultured Rat Hepatocytes [J]. *J Nutr*, 1993, 123 (9): 1464-1470.
- [15] Suzuki KT, Kawahara S, Sunaga H, et al. Discriminative Uptake of Metals by the Liver and Its Relation to Induction of Metallothionein Synthesis by Interleukin-6, Dexamethasone and Zinc in the Rat [J]. *Int J Immunopharmacol*, 1996, 18 (12): 167-172.
- [16] Garte S J, Fulton H, Kim M, et al. Kinetics of Metallothionein Gene Induction by Cadmium in Human Lymphocytes [J]. *Biochem and Molecular Biol Internat*, 1995, 37 (3): 459-465.
- [17] Mesna OF, Steffensen ZL, Hjertholm H, et al. Accumulation of Metallothionein and Its Multiple Forms by Zinc, Cadmium and Dexamethasone in Human Peripheral T and B Lymphocytes and Monocytes [J]. *Chem Biol Interact*, 1995, 94 (3): 225-242.
- [18] Garrett SH, Sonji S, Todd JH, et al. Differential Expression of Human Metallothionein Isoform I mRNA in Human Proximal Tubule Cells Exposed to Metals [J]. *Environ Health Perspect*, 1998, 106 (12): 825-832.
- [19] Sundeman FW Jr, Plowman MC, Kroftova OS, et al. Effects of Teratogenic Exposures to Zn²⁺, Cd²⁺, Ni²⁺, Co²⁺, and Cu²⁺ on Metallothionein and Metallothionein-mRNA Contents of Xenopus Embryos [J]. *Pharmacol Toxicol*, 1995, 76 (3): 178-184.
- [20] Tohyama C, Shaikh ZA, Ellis JK, et al. Metallothionein Excretion in Urine upon Cadmium Exposure: Its Relationship with Liver and Kidney Cadmium [J]. *Toxicology*, 1981, 22: 181-191.

(上接第 303 页) T_H 为辅助性 T 细胞, 具有协助 B 细胞产生抗体增强 T 细胞的杀伤作用, 促进巨噬细胞的功能。T_H 减少必将造成体液免疫能力降低, 但实际情况是矽肺发病过程中体液免疫功能增强, 因此推测 T_H/I 亚群减少及 CD₄/CD₈ 比值降低均由 T_I 细胞减少所致。T_I 为诱导性 T 细胞, 具有诱导抑制 T 细胞 (T_s) 和诱导白介素 I (IL₂) 介导的抑制作用来间接抑制 B 细胞抗体合成的功能。因此, T_I 减少必将导致体液免疫增强和自身抗体产生。CD₈ 两组间差异无显著性。

本研究还发现, 不同期别矽肺病人之间 CD₃、CD₄、CD₈

百分率及 CD₄/CD₈ 比值虽有改变, 但差异无显著性。以上结果与国外有关研究报道基本一致^[2]。

本研究结果提示, 临床上调整好矽肺病人免疫功能状态, 设法抑制其体液免疫而增强其细胞免疫能力, 可提高抗矽疗效, 促进患者康复。

参考文献:

- [1] 李玉瑞. 矽肺发病机理 [A]. 见: 王蓁兰, 刚葆琪. 现代劳动卫生学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1994. 60.
- [2] Ulrich Costabel. Lung and blood lymphocyte subsets in asbestosis and in mixed dust pneumoconiosis [J]. *Chest*, 1987, 91 (1): 110.