

锌或铜诱导肝脏金属硫蛋白结合锌镉比值与铜镉比值的研究

梁艺怀, 金泰虞*

摘要: [目的] 观察镉(Cd)染毒后锌(Zn)或铜(Cu)诱导肝脏金属硫蛋白(MT)结合锌镉比值(Zn/Cd)与铜镉比值(Cu/Cd)的关系及其意义。[方法] 将28只雄性Wistar大鼠随机分为7组, 每组4只, 分别为: 空白对照组(0), 不做任何处理; 非预处理组(A1、A2), 皮下注射生理盐水; Zn处理组(B1、B2), 皮下注射ZnCl₂(每千克体重染Zn 25 mg); Cu处理组(C1、C2), 皮下注射CuSO₄(每千克体重染Cu 12.5 mg)。预处理24 h后, 为实验组动物皮下注射镉-金属硫蛋白(CdMT, Cd-metallothionein), 造成Cd急性中毒, 其中A1、B1、C1组每千克体重染Cd 0.1 mg, A2、B2、C2组每千克体重染Cd 0.4 mg。24 h后处死, 取肝脏, 制备匀浆。离心后取上清液, 加入Sephadex G-75色谱层析柱。[结果] 空白对照组动物肝脏中与MT结合的最主要金属元素是Zn, 而Cd、Cu含量在检测限以下; 与前者相比, A1、A2组动物肝脏MT和Cd含量随染毒剂量增加而升高, 且A1、A2组肝脏MT中Zn/Cd值分别为20.0和10.0; B1、B2组肝脏MT中Zn/Cd值分别为20.8和20.3, Cu离子未检出; C1、C2组肝脏MT的Cu/Cd值分别为80.0和36.5, Zn含量下降明显。[结论] 不同剂量Cd染毒后, Zn或Cu诱导动物肝脏MT中金属含量比例存在差异, Cu/Cd值高于Zn/Cd值, 即与MT结合的Cd相比, Cu更易取代与MT结合的Zn。另外, 肝脏中非MT结合Zn也是影响与MT结合的金属离子稳态的重要因素。

关键词: 金属硫蛋白; 镉; 锌; 铜

Ratios of Zinc/Cadmium, Copper/Cadmium in Liver Metallothionein Induced by Zinc or Copper LIANG Yi-huai, JIN Tai-yi* (Department of Occupational Health and Toxicology, School of Public Health, Fudan University, Shanghai 200032, China). *Address correspondence to JIN Tai-yi; E-mail: tyjin@shmu.edu.cn

Abstract: [Objective] To observe the ratios of Zn/Cd, Cu/Cd in liver metallothionein induced by zinc or copper, under exposure to Cd in rats. [Methods] Wistar male rats were divided into 7 groups, 4 animals for each group. Group 0 was left non-treated as blank control. Group A1 and A2 were subcutaneously injected with normal saline, Group B1 and B2 were injected with ZnCl₂ in the dose of 25 mg Zn/kg Body Mass and Group C1 and C2 with CuSO₄ in the dose of 12.5 mg Cu/kg Body Mass. Twenty four hours after Zn or Cu pre-treatment, Group A1, B1 and C1 and Group A2, B2 and C2 were administered cadmium-metallothionein (CdMT) in the dose of 0.1 or 0.4 mg Cd/kg Body Mass, respectively. After 24 hours of CdMT injection, liver was taken and homogenized. Cytosol gained after centrifugation (105 000 g) was applied to gel chromatography on Sephadex G-75. [Results] Among animals in Group 0, Zn was the dominant metallic element bound to MT in liver, but neither Cd nor Cu could be detected. In the non-pretreated group, there was a dose related increase of MT and Cd concentration, with 20.0 and 10.0 of Zn/Cd ratio for A1 and A2, respectively. The ratios of Zn/Cd in MT were 20.8 in Group B1 and 20.3 in Group B2, and Cu was below the detection limit for both. The ratios of Cu/Cd were 80.0 in Group C1 and 36.5 in Group C2, and however, the level of Zn decreased considerably. [Conclusion] The results showed in this *in vivo* experiment that Zn bound to MT was more easily replaced by Cu than Cd bound to MT. The non-MT-bound Zn in liver tissues may be one of the explanations for the difference.

Key Words: metallothionein; cadmium; zinc; copper

金属硫蛋白(metallothionein, MT)是富含巯基的低分子量蛋白(相对分子质量6000~7000), 与金属阳离子有极高的亲和力。某些二价金属[如镉(Cd)、汞(Hg)、锌(Zn)、铜(Cu)]能有效诱导体内MT的合成^[1], 而MT又参与调节这些金属离子在体内的稳态。它与不同金属的亲和力依次为: Cu、Hg>Cd>铅(Pb)>Zn^[2], 一种金属离子能取代另一种与MT亲和力相对较低的金属离子。在MT的调节下, Cd对动物组织中

Zn和Cu的分布有不同影响, 反之也影响Cd毒性的产生。本研究旨在观察Cd染毒情况下Zn或Cu诱导大鼠肝脏MT结合锌镉比值(Zn/Cd)与铜镉比值(Cu/Cd)的关系及其意义。

1 材料与方法

1.1 仪器及试剂

Wistar大鼠购自瑞典ALAB公司, CdMT(Cd: Zn: Cu为1: 0.4: 0.03)由瑞典Umea大学环境医学系提供, Sephadex G-75色谱层析柱购自Amersham Biosciences(Pharmacia)公司, 原子吸收光谱仪(Perkin Elmer 403)为Perkin Elmer公司产品, 镉、锌、铜标准品购于Merck公司, 其他试剂购自Sigma公司。

[作者简介] 梁艺怀(1981-), 男, 博士生; 研究方向: 金属毒理学

[*通信作者] 金泰虞教授; E-mail: tyjin@shmu.edu.cn

[作者单位] 复旦大学公共卫生学院劳动卫生与毒理教研室, 上海 200032

1.2 分组及染毒

28 只雄性 Wistar 大鼠, 体重 100~120 g, 随机分为 7 组, 每组 4 只, 给药前分笼作适应性饲养一周。给药剂量、处理时间的选择均基于过去相关的研究结果^[3], 均以缓慢吸收的皮下注射方式。空白对照组 (0), 不作任何处理; 非预处理组 (A1、A2), 皮下注射生理盐水; Zn 处理组 (B1、B2), 皮下注射 ZnCl₂ (每千克体重 25 mg Zn); Cu 处理组 (C1、C2), 皮下注射 CuSO₄ (每千克体重 12.5 mg Cu)。预处理 24 h 后, 为实验组动物皮下注射 CdMT; A1、B1、C1 组每千克体重 0.1 mg Cd, A2、B2、C2 组每千克体重 0.4 mg Cd。24 h 后处死, 取肝脏组织备用。

1.3 MT 的分离与测定

按 NORDBERG 等^[4]的方法略作修改, 将上述肝组织用 0.05 mol/L NaCl 配制的 0.01 mol/L Tris 缓冲溶液 (pH8.0) 制备匀浆 (质量分数 35%), 以 105 000 × g 离心 60 min; 取上清液加入经上述缓冲溶液平衡后的 Sephadex G-75 色谱层析柱 (26 mm × 360 mm), 然后以同样缓冲溶液洗脱, 流速为 60 mL/h, 每管收集 3.5 mL, 在 254 nm 波长处检测各组洗脱液的光密度。上述过程均在 4 °C 下进行。采用酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 测定 MT 含量。

1.4 金属测定

以火焰原子吸收分光光度法 (flame atomic absorption spectrophotometry, FAAS) 分别测定各组洗脱液中 Cd、Zn、Cu 的含量。样品收集、分析所用容器均经 3% 硝酸浸泡、去离子水清洗, 以避免金属污染。为便于比较, 采用物质的量 (mole) 计算金属离子含量, 即 Cd: 1 μmol = 112.4 μg; Zn: 1 μmol = 65.4 μg; Cu: 1 μmol = 63.5 μg。

2 结果

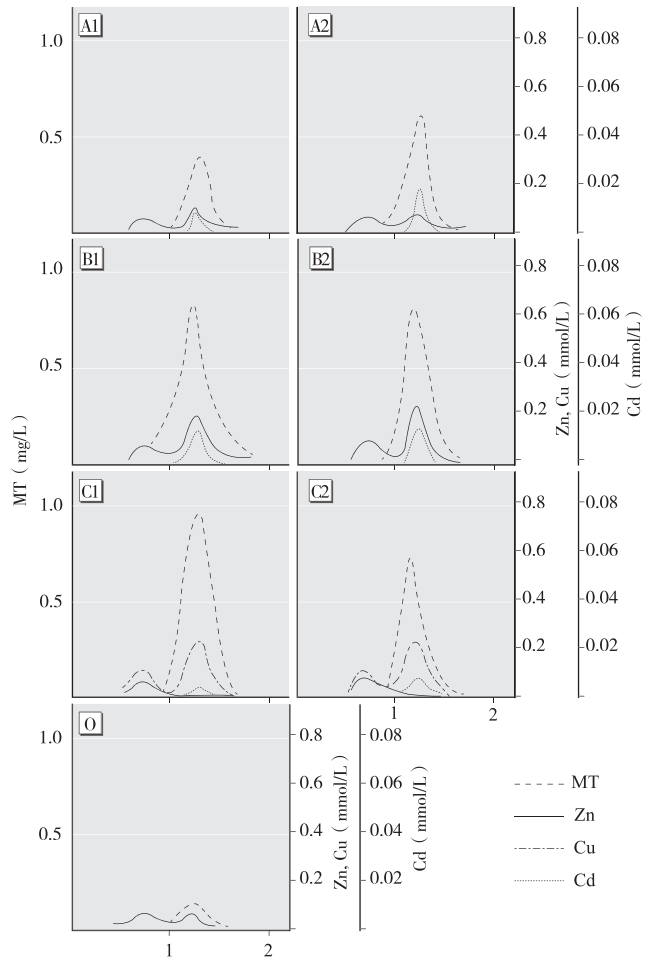
Cd 染毒后, A1、A2 组肝脏 MT 中 Zn/Cd 值分别为 20.0 和 10.0, 而 B1、B2 组肝脏 MT 中 Zn/Cd 值与 A1 组较为接近, 分别为 20.8 和 20.3; C1、C2 组肝脏 MT 的 Cu/Cd 值分别为 80.0 和 36.5, 见表 1。总之, 经 0.4 mg/kg CdMT 处理, 各组动物的 Zn/Cd 值或 Cu/Cd 值较 0.1 mg/kg 体重 CdMT 处理的低。而对于相同 CdMT 剂量的各组, Cu/Cd 值远高于 Zn/Cd 值。

表 1 各实验组大鼠肝脏金属硫蛋白中 Zn/Cd 或 Cu/Cd 结合比例

Table 1 The ratios of Zn/Cd or Cu/Cd in liver metallothionein from rats with and without Zn or Cu pretreatment

组别 Group	预处理 24 h 后染 Cd 剂量 (mg/kg)	
	0.1	0.4
A1、A2 组 (非预处理, non-pretreated)	Zn/Cd=20.0	Zn/Cd=10.0
B1、B2 组 (锌处理, Zn-treated)	Zn/Cd=20.8	Zn/Cd=20.3
C1、C2 组 (铜处理, Cu-treated)	Cu/Cd=80.0	Cu/Cd=36.5

图 1 可见, 对照组动物肝脏中与 MT 结合的最主要金属元素是 Zn, 而 Cd、Cu 含量在检测限以下。注射 CdMT 后, 所有实验组 MT 含量均高于对照组, 其中 B1、C1 组 MT 含量高于 A1 组。与对照组相比, A1、A2 组 MT 的 Cd 含量随染毒剂量增加而升高; B1、B2 组 MT 中 Zn、Cd 含量较对照组均有上升, Cu 离子未检出; C1、C2 组 MT 中 Cu 含量明显上升, Cd 含量较对应的 B1、B2 组低, Zn 含量均明显下降。



[注] 凝胶层析法中, Vo 表示外水体积 (固定值), Ve 表示分离物本身的洗脱体积; 横坐标为两者之比: Ve/Vo, 反映相对洗脱时间

图 1 Sephadex G-75 色谱层析柱分离各组大鼠肝脏金属硫蛋白及对洗脱液 MT、Zn、Cu 和 Cd 的测定

Figure 1 Gel chromatography on Sephadex G-75 of cytosol from liver of rats and assays for MT, Zn, Cu, Cd in each fraction

3 讨论

普遍认为, 肝脏是体内 MT 合成的主要部位, 因而也引起了较多的关注。MT 富含半胱氨酸 (Cysteine), 缺乏芳香氨基酸。半胱氨酸的巯基 (SH) 与金属结合, 每 3 个巯基可结合 1 个金属离子, 1 个 MT 分子可结合 7 个金属离子^[5]。MT 在微量元素储存、运输和代谢过程中发挥着重要作用, 调节体内微量元素平衡^[6]。本研究中, B、C 两组动物肝组织中 MT 含量高于空白对照组, 表明 Zn 和 Cu 能有效诱导肝 MT 的生成。

各种金属与 MT 结合的亲和力不同, 正常情况下, 动物体内 MT 主要与锌结合, 其他高亲和度的金属一旦进入体内组织便可替代 Zn 而与 MT 结合。而体外实验也证实, 受试的金属离子可将 MT 结合的金属离子直接置换或酸化、重构后取代^[7]。NORDBERG 等^[8]认为, Cd-Zn 相互作用在 Cd 毒性中有特殊意义。小剂量的 Zn 预处理能减轻 Cd 的急性毒性, 被认为是 Zn 诱导体内 MT 合成并以 ZnMT 的形式同 Cd 发生置换的结果。本研究显示注射 CdMT 后, A1、B1 和 B2 组动物肝脏 MT 的 Zn/Cd 值为 20 左右, 而 A2 组即非预处理且是高剂量 Cd 染毒组动物的 Zn/Cd 值仅为前者的 1/2。这意味着存在某种细胞内机制, 促使

与MT结合的Zn/Cd比趋于平衡,以降低Cd的毒性。而这种平衡,一方面可能通过Zn预处理诱导MT合成来实现,如B1和B2组;另一方面可能由组织内其他形式的Zn与MT结合产生,如A1组。SATARUG等^[9]研究发现人体肝脏中存在至少两种形式的Zn库(Zn pool)——MT结合的(MT-bound)和非MT结合的(non-MT-bound)。A2组动物注射较高剂量CdMT后,不同形式Zn的转化可能已超出机体的调节能力,致使与MT结合的Zn/Cd值远小于其他3组。

相对于Cd和Zn, Cu与MT的亲密度更高^[2]。本研究中,铜处理组(C1、C2)肝脏MT中的高Cu/Cd值、低Zn含量,再次证实不同金属离子与MT亲密度之间的差异。另外, C2组Cu/Cd值低于C1组,显示了Cd与Cu之间对于MT结合位点的竞争关系,且存在着不同于Zn的稳态调节机制,这为解释Zn和Cu对Cd毒性的保护效应之间的差异提供了一定依据。

总之,不同剂量Cd染毒后,Zn或Cu诱导动物肝脏MT中金属离子含量比例发生的不同变化,表明MT与不同金属离子的亲和力大小各异,Cu/Cd值高于Zn/Cd值,即比起Cd,Cu更易将与MT结合的Zn取代。另外,肝脏中非MT结合Zn被认为是影响MT结合的金属离子稳态的重要因素。

参考文献:

- [1] NORDBERG M. Metallothioneins: historical review and state of knowledge[J]. Talanta, 1998, 46(2): 243-254.
[2] KÄGI JH, KOJIMA Y. Chemistry and biochemistry of metallothionein

[J]. Experientia Suppl, 1987, 52: 25-61.

- [3] LIU X, JIN T, NORDBERG GF, SJÖSTRÖM M, ZHOU Y. Influence of zinc and copper administration on metal disposition in rats with cadmium-metallothionein-induced nephrotoxicity[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 1994, 126(1): 84-90.
[4] NORDBERG M, NORDBERG GF, PISCATOR M. Isolation and characterization of a hepatic metallothionein from mice[J]. Environ Physiol Biochem. 1975, 5(6): 396-403.
[5] NORDBERG GF. Modulation of metal toxicity by metallothionein[J]. Biol Trace Elem Res, 1989, 21: 131-135.
[6] BREMNER I. Nutritional and physiological significance of metallothionein[J]. Experientia Suppl, 1987, 52: 81-107.
[7] KÄGI JH, VALLEE BL. Metallothionein: a cadmium and zinc-containing protein from equine renal cortex.II. Physico-chemical properties[J]. J Biol Chem, 1961, 236: 2435-2442.
[8] NORDBERG GF, NOGAWA K, NORDBERG M, et al. Cadmium [M]. Handbook on the toxicology of metals-third edition. Burlington: Academic Press, 2007: 445-486.
[9] SATARUG S, BAKER JR, REILLY PE, et al. Changes in zinc and copper homeostasis in human livers and kidneys associated with exposure to environmental cadmium[J]. Hum Exp Toxicol, 2001, 20(4): 205-213.

(收稿日期: 2008-12-29)

(编辑: 郭薇薇, 洪琪; 校对: 徐新春)

【告知栏】

欢迎订阅 2010 年《环境与职业医学》杂志

《环境与职业医学》杂志(ISSN 1006-3617, CN 31-1879/R, CODEN HYZYAZ)为中华预防医学会系列杂志优秀期刊,系由上海市疾病预防控制中心、中华预防医学会主办的学术期刊,已连续3次被评为中国预防医学、卫生学类中文核心期刊,2001年被评为中国生物医学核心期刊,2004年被评为中国科技论文源期刊和中国科技核心期刊,也是美国化学文摘(CA)、美国乌利希国际期刊指南(UIPD)、英国国际农业与生物科学研究中心(CABI)、波兰哥白尼索引(IC)、美国剑桥科学文摘(自然科学)[CSA(NS)]及国内六大科技数据库的源期刊。

本刊内容主要介绍国内外劳动卫生与职业病防治工作、环境危害因素和治理研究等方面的科研成果和实践经验以及有关环境卫生学研究的学术动态。可供广大劳动安全卫生与职业病防治、环境保护、卫生监督、卫生防疫及疾病控制相关单位及医学院校教学科研等专业人员参考。

本刊自2010年起由双月刊改为月刊,大16开,64页,每月25日出版,每本订价10元,全年定价120.00元(含包装及平寄邮资;需挂号,费用另计)。由邮局及自办结合发行,本刊也接受广告刊载业务。邮发代号:4-568。

联系人: 忻霞萍

电话: (021)62758710-1326分机

传真: (021)62084529

E-mail: zazhi2@sdc.sh.cn