

studies in F344/N rats and B6C3F1 mice [J]. *Natl Toxicol Program Tech Rep Ser*, 2001, 493: 1-278.

[2] 由田, 杨骥, 吕晶玉. 过量大黄对小鼠肝脏细胞的毒性作用 [J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2008, 17(3): 303-307.

[3] 雷湘, 陈刚, 陈科力, 等. 大黄素对小鼠的急性毒性研究 [J]. 中药药理与临床, 2008, 24(1): 29.

[4] 许英. 中药的药物性肝损害 30 例临床分析 [J]. 现代中西医结合杂志, 2005, 14(5): 600-601.

[5] 管红远, 江振洲, 王翠芳, 等. 大黄酸和大黄素在体外对人肾小管上皮细胞的毒性作用研究 [J]. 中草药, 2009, 40(1): 102-105.

[6] 王青秀, 吴纯启, 杨红莲, 等. 大黄中游离蒽醌对 HK-2 细胞系的毒性作用研究 [J]. 中国新药杂志, 2007, 16(3): 189-192.

[7] 王青秀, 吴纯启, 杨红莲, 等. 大黄素对 HK-2 细胞周期增殖的影响 [J]. 毒理学杂志, 2007, 21(6): 440-443.

[8] 王翠芬, 陈敏, 吴旭东, 等. 溶酶体 cathepsin B 参与大黄素诱导 HK-2 细胞凋亡 [J]. 东南大学学报: 医学版, 2008, 27(6): 404-408.

[9] 王青秀, 吴纯启, 廖明阳. 大黄及其主要成分的毒性毒理研究 [J]. 毒理学杂志, 2007, 21(4): 301-302.

[10] 张陆勇, 江振洲, 濮存海, 等. 大黄总蒽醌对 SD 大鼠灌胃给药的长期毒性研究 [J]. 中国生化药物杂志, 2004, 25(4): 206-209.

[11] Yan M, Zhang L Y, Sun L X, et al. Nephrotoxicity study of total *Rhubarb anthraquinones* on Sprague Dawley rats using DNA microarrays [J]. *Ethnopharmacology*, 2006, 107: 308-311.

[12] 严明, 张陆勇, 孙丽新, 等. SD 大鼠经口给予大黄总蒽醌的基因表达差异和肾脏毒性靶点研究 [J]. 中国药理学杂志, 2008, 43(1): 7-11.

[13] 谭正怀, 沈映君, 赵军宁, 等. 大黄酸对人肾小球系膜细胞功能的影响 [J]. 药学报, 2004, 39(11): 881-886.

[14] 邱赛红, 汤淮波, 李飞艳, 等. 常用苦寒药的急性毒性实验研究 [J]. 中南药学, 2004, 2(1): 37-38.

[15] 邱赛红, 李飞艳, 尹健康, 等. 9 味苦寒药对小鼠胃肠运动与肝肾功能影响的实验研究 [J]. 湖南中医学院学报, 2004, 24(5): 1-6.

[16] 王梅, 吕宾, 范一宏, 等. 刺激性泻剂对大鼠肠道传输功能的影响 [J]. 浙江医学, 2005, 27(4): 261-262.

[17] 张燕, 李红岩. 便秘大鼠结肠超微结构的改变 [J]. 北京中医药大学学报, 2005, 28(2): 63-65.

[18] 朱元民. 蒽醌类泻药与大肠黑变病 [J]. 中华消化杂志, 2004, 24(5): 314-315.

[19] 赵平, 罗金燕, 董蕾, 等. 大黄致豚鼠结肠黑变动物模型的建立 [J]. 中国中西医结合消化杂志, 2006, 14(5): 308-311.

[20] 饶晓黎, 常青, 廖永强. 大黄对妊娠早期小鼠子宫内膜影响的形态学观察 [J]. 解剖学杂志, 2000, 22(1): 31.

[21] 管红远, 曾文, 江振洲, 等. 大黄酸对小鼠淋巴瘤 L5178 Y 细胞 TK 基因的致突变作用 [J]. 中草药, 2008, 39(12): 1858-1860.

[22] 姬春好. 大黄炮制及临床应用 [J]. 甘肃中医学院学报, 2008, 25(1): 41-43.

[23] 邢小燕, 任汉阳. 基于肝损伤动物模型的大黄毒性观测与合理制用研究 [D]. 郑州: 河南中医学院, 2007.

[24] 张苇航, 何新慧. 试论《伤寒论》对《神农本草经》药物学的继承和发展 [J]. 时珍国医国药, 2006, 17(7): 1149-1151.

[25] 肖炜, 马云, 魏连波, 等. 黄芪、大黄复方制剂对培养大鼠系膜细胞增殖和细胞外基质分泌的影响 [J]. 中国临床康复, 2006, 10(11): 173-176.

[26] 魏群利, 陆晓和, 汤溥, 等. 中药复方制剂消可宁对高糖诱导大鼠肾小球系膜细胞增殖的影响 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(12): 2371-2374.

[27] 郭志伟, 刘琳娜. 大黄及其有效成分的药理研究概况 [J]. 中国药房, 2006, 17(22): 1741-1743.

[28] 丁艳, 黄志华. 大黄素药理作用研究进展 [J]. 中药药理与临床, 2007, 23(5): 236-238.

## 重金属污染环境动物的解毒策略和机制的研究进展

李 薇, 吴文如, 喻良文, 吴 波, 林小桦\*

(广州中医药大学, 广东 广州 510405)

摘 要: 随着对重金属污染环境的研究不断深入, 生活在重金属污染环境动物的生物学特性和机体内所采用的解毒机制也不断地被发现。为了更清晰地了解国内外相关研究, 重点概述了近年来在重金属污染环境动物的解毒策略以及动物富集重金属机制的相关研究, 综合分析了研究存在的问题及发展趋势, 旨在为今后相关的研究提供参考依据。

关键词: 重金属污染; 解毒策略; 富集机制

中图分类号: R282.3 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2009)10-1674-03

### Advances in studies on detoxification and its mechanism for animals living in environment polluted by heavy metals

LI Wei, WU Wen-ru, YU Liang-wen, WU Bo, LIN Xiao-hua

(Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

Key words: pollution by heavy metals; detoxification tactics; enrichment mechanism

随着工业和农业生产过程中人们对高效率的不断追求, 导致生活环境因工业的“三废”、农业的化肥和农药的大量使用以及城市的污水和垃圾处理不当而造成的重金属污染急剧

加重。因此, 近年来各国学者对治理和改善环境污染倾注了大量的人力和物力。研究者们除了关注污染环境对低耐受重金属动植物生活的影响外, 也发现了一些高耐受重金属污染

\* 收稿日期: 2009-04-09

基金项目: 国家自然科学基金项目(30772741); 广东省科技计划项目(2007B020701004)

作者简介: 李 薇, 教授, 博士生导师, 从事中药品种鉴定和品质评价方面的研究。 E-mail: liwei-li@163.com

甚至具有超富集特性的动植物。关于动植物富集重金属的利与弊前文曾有概述<sup>[1]</sup>。而不同学科领域的研究者利用动植物富集重金属的这一生物特性,来达到不同目的,如生态环境学者着重研究如何筛选和利用那些具有重金属超富集作用的植物和动物对污染土壤和水体进行生物修复<sup>[2]</sup>,而药学工作者则重点研究如何解除其富集作用,以免这些重金属超富集作用的动植物通过食物链或药物对人体生命和健康造成危害。无论最终目的如何,都必须对重金属污染环境下的动植物解毒策略及其富集机制有深入地了解。关于植物的相关研究已有系统总结<sup>[3]</sup>,但至今未发现有关动物类似的报道。为此,本文查阅了国内外相关文献,重点概述近年来在重金属污染环境中的动植物的解毒策略以及富集重金属机制的相关研究进展,一方面为完成本课题组实验研究进行必要的前期准备,另一方面也为其他相关研究者提供参考依据。

### 1 动物在重金属污染环境下的解毒策略

在重金属污染环境中生活的动物通常可以利用自身的特点来避免重金属对身体的伤害。其解毒策略主要表现为以下 3 种。

1.1 体外释放以解除重金属毒性:国内外学者在研究水中鱼和虾对水域环境中的重金属反应时发现,鱼虾一方面通过饲料或水体摄入重金属污染物,表现为重金属的富集;另一方面发挥自身的解毒功能,将重金属向体外释放,以维持其体内环境的稳定<sup>[4]</sup>。董元华等<sup>[5]</sup>在调查无锡鼋头渚地区太湖湿地中生活的夜鹭 *Nycticorax nycticorax* (Linn.) 时也证实,羽毛和肝脏是重金属富集的主要目标器官,但是因为夜鹭等鸟类可以通过定期更换羽毛而将羽毛中富集的大量重金属排出体外,所以重金属在体内的残留量尚不会对动物产生明显的毒害作用。Braune 等<sup>[6]</sup>研究表明,某些重金属如 Hg 在鸟类羽毛中的富集量可以占到体内总量的 90% 以上。

1.2 体内转移以减少重金属毒性:一般而言,生物如果大量从污染环境中吸收重金属,往往对身体产生直接或间接的伤害作用,有的甚至会抑制生长或导致死亡。但也有些动物如粉正蚓 *Lumbricus rubellus* Hoffmeister 和赤子爱胜蚓 *Eisenia foetida* (Savigny) 不仅可以耐受重金属污染<sup>[7]</sup>,而且还因其具有超浓度富集重金属作用,而用作已污染土壤环境的生物修复的手段。白颈环毛蚓 *Pheretima californica* (Kinb.) 对重金属有极强的耐受力,其体内  $Cd^{2+}$  的富集量可达到  $47.30 \mu\text{g}/\text{kg}$ ,为土壤量的 5 倍左右<sup>[8]</sup>,并与土壤重金属量呈线性正相关。通过大量的不同器官组织中重金属累积量的研究<sup>[9]</sup>,发现动物富集重金属主要器官为食管、中肠、肝脏、肾脏。另有研究还证实鲫幼鱼<sup>[10]</sup> *Cyprinus acutidorsalis* Wang、螯虾<sup>[11]</sup> *Cambarus clarkii* (Girard) 内脏重金属的富集能力明显高于肌肉部位,其肝脏的富集量是肌肉十几倍之多。这是因为动物的肝、胰、肾是其主要解毒和排泄器官。研究者们还发现重金属在动物体内分布规律是重金属吸收首先进入肝脏和肾脏,随着生长时间的延长,生物体内重金属富集速度缓慢,一旦肝、肾部位重金属积累过度,才会加快重金属向肌肉转移的速度<sup>[12]</sup>。

1.3 生理调节以化解重金属毒性:近来许多学者将注意力集中到某些动物能够调节体内酶的活性水平,来化解体内重金属的毒性。Wilczek 等<sup>[13]</sup>研究发现,重金属污染土壤中的雌性蜘蛛 *Agelena labyrinthica* Clerck 的谷胱甘肽过氧化物酶 (GPOX、GSTPx) 活性和雄性蜘蛛 *Pardosa lugubris* Walckenaer 的谷胱甘肽 S-转移酶 (GST) 活性显著增高。董元华等<sup>[5]</sup>发现夜鹭肝脏中富集的重金属还会因为同时富集的 Se 元素的存在而降低其他有害元素 Hg 和 Cd 对肝脏的伤害,研究中虽未提出直接与酶活性相关的数据支撑,但 Se 元素与有害重金属元素之间肯定存在着某种生理调节活动。此外,郭永灿等的研究结果也表明,中轻度污染区中生活的蚯蚓胃肠上皮细胞会出现溶酶体增生,溶酶体中含有多种酸性水解酶,具有消灭异质,参与代谢和解毒作用。说明有毒重金属被消化道吸收扩散后,使细胞产生一种应急防御反应——溶酶体增生,将有毒物进一步浓缩以达到解毒的目的<sup>[8]</sup>。

### 2 动物重金属解毒机制的研究

近年来,人们在重金属吸收、累积和转运金属离子的生理和分子机制方面取得了丰硕的成果,特别是与重金属螯合作用相关的研究最为深入和透彻。研究发现诸如有机酸、氨基酸、金属转运蛋白及金属硫蛋白等金属离子络合剂对重金属离子的螯合作用能够缓冲胞质金属离子浓度、增加其溶解性,从而不同程度地提高了动物对重金属的抗性及其在体内的运输效率。在这些众多的螯合剂中,金属硫蛋白 (metallothioneins, MTs) 的作用机制研究最为全面。

MT 广泛存在于细菌、真菌、动物和植物中,富含半胱氨酸,能被金属诱导产生,具有独特的金属硫四面体的络合结构,并通过螯合方式结合有毒游离重金属离子(如  $Cd^{2+}$ 、 $Pb^{2+}$ 、 $Hg^{2+}$ ) ,是唯一一组在金属代谢中作用明确的低分子(6 000 ~ 7 000) 蛋白多肽类物质<sup>[14]</sup>。该类物质由 MT 基因家族编码合成。人类、鼠、鱼、果蝇、蚯蚓、线虫等<sup>[15~20]</sup>生物体内编码 MTs 的功能基因也都随后相继被克隆和鉴定。迄今已发现 MTs 是以各种结构基因编码的多种异构体的形式存在。在哺乳类动物中已发现 MT 家族的 4 种亚型<sup>[21]</sup>,MT- 仅发现在脑组织中,MT- 仅发现在皮肤组织中;MT<sup>+</sup> 和 MT<sup>-</sup> 则几乎存在于所有组织和器官中。它们的基因均定位于第 16 条染色体上,由 3 个外显子和 2 个内含子所组成,编码含有 20 个半胱氨酸的 61 个氨基酸肽键。其链内半胱氨酸的数目和位置及碱性氨基酸残基在绝大多数种属 MTs 中都是完全保守的。在正常生理状态下,生物体内存在一定水平的 MT 以调节必需金属元素,当周围环境和生物体内的金属含量达到一定的浓度时,能诱导合成新的 MT。

近年来在不同真核生物、高等植物、原核生物中关于重金属吸收调控的模式主要有两种假说:一种是“金属硫蛋白合成说”;另一种是“谷胱甘肽再生说”。前者通过上调金属响应(wMTs) 编码基因,诱导性产生大量的、能与重金属离子结合的 MT;后者是使已与金属结合过的谷胱甘肽迅速恢复其结合能力。

英国学者 Stürzenhaum 率先研究了蚯蚓种系的 wMTs。

在粉正蚯蚓上皮和胚胎等组织中成功分离出了 3 个随重金属浓度诱导性上调的 wMTs 编码基因:wMT-1、wMT-2 和 wMT-3<sup>[7]</sup>。研究表明,蚯蚓种系的 wMTs 是单链蛋白质,具备其他种系动物所含 MT 的共同特征。不同金属离子的诱导效率是不同的,肠黏膜组织中,各金属的诱导效率为  $Cd^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$  >  $Cu^{2+}$  >  $Hg^{2+}$ <sup>[22]</sup>。金属离子对 MT 的诱导表达作用一般发生在转录水平,其中 Zn 和 Cd 是最强的转录活化诱导物。金属离子对 MT 的转录调控是通过启动子区的金属响应元件(metal responsive element, MREs)来实现的<sup>[23]</sup>。MREs 是已知调控元件中最具特异性的介导重金属对 MT 基因转录诱导的顺式作用元件,该元件以多拷贝的形式存在,并具有高度保守的 7 bp 核心序列(5'-TGRCNC-3';R=A 或 G,N=任意碱基)。据报道生物体内预先存在一种或多种金属效应转录因子(metal-responsive transcription factors, MTFs),当其与金属离子结合后便诱导产生变构,进而与 MREs 结合,对效应基因进行调控,促发 MT 的 mRNA 转录。且 MREs 是唯一能与 MTF 靶向结合的基因调控元件<sup>[24]</sup>。近年来研究者们已分别鉴定或克隆到人类 hMTF-1<sup>[25]</sup>、鼠 mMTF-1<sup>[26]</sup>、果蝇 dMTF-1<sup>[27]</sup>、鱼 fMTF-1<sup>[28]</sup>,并利用 MREs 与 MTF 的特异性,对小鼠<sup>[29]</sup>L-细胞金属响应机制研究进行了成功的尝试。

### 3 结语与展望

基于对重金属污染环境中动物的生物学特性的深入调查和研究,使人们更加了解动物体内对重金属吸收、分布和代谢的特点,同时也进一步探明了不同的动物利用自身特点所采用的不同的解毒策略。虽然对重金属富集后机体所产生的解毒作用机制有一定的认识,但除了螯合作用中金属硫蛋白的分子机制外,其他很多的分子机制仍不是很清楚。既使对已有的结果,研究者的结论也存在着较大的差异。此外,与超富集重金属相关的许多生理生化问题尚待进一步研究,如重金属高耐受动物或者是具有重金属超富集特性动物的生理基础与非耐受动物相比有何不同;体内不同的重金属富集相关的生理反应之间有何种联系等。

动物类中药作为中药的重要组成部分具有应用范围广、作用强等特点。但随着动物类中药资源的不合理开发利用和生态环境的破坏,使药用动物资源日益减少,而药用动物规范化养殖则是保障动物药可持续发展的关键课题<sup>[30]</sup>。重金属的有效监控是动物药规范化养殖的关键技术之一,而目前尚缺乏这方面的研究。希望在今后的研究中逐步解决这些问题,为从源头上真正消除动物类中药材重金属超标的困扰开辟新的途径。

### 参考文献:

- [1] 李薇,肖翔林,吴文如. 药用动植物重金属富集作用的利与弊[J]. 中国药房, 2007, 18(12): 954-957.
- [2] 周启星,孔繁翔,朱琳. 生态毒理学[M]. 北京:科学出版社, 2004.
- [3] 周守标,李思亮. 重金属污染下植物生理生态反应及富集机制的研究进展[J]. 安徽师范大学学报:自然科学版, 2007, 30(3): 331-337.
- [4] Rashed M N. Monitoring of environmental heavy metals in fish from Nasser Lake [J]. *Envir Int*, 2001, 27(1): 27-33.
- [5] 董元华,龚钟明,王辉. 无锡鼋头渚夜鹭体内重金属残留与分布特征[J]. 应用生态学报, 2002, 13(2): 213-216.

- [6] Braune B M, Gaskin D E. Mercury levels in Bonapartes Gull (*Larus phaladelphia*) during autumn molt in the Quoddy region. New Brunswick, Canada [J]. *Arch Environm Toxicol*, 1987, 16: 539-549.
- [7] Stürzenbaum S R, Kille P, Morgan A J. The identification, cloning and characterization of earthworm metallothionein [J]. *FEBS Lett*, 1998, 24: 431(3): 437-442.
- [8] 郭永灿,王振中,张友梅,等. 重金属对蚯蚓胃肠道上皮细胞超微结构损伤的研究[J]. 生态学报, 1997, 17(3): 282-287.
- [9] 杨旭,向昌国,刘志霄. 重金属污染对土壤动物的影响[J]. 中国农学通报, 2008, 24(12): 454-457.
- [10] 方展强,杨丽华. 重金属在鲫鱼组织中的积累与分布[J]. 水利渔业, 2004, 24(6): 23-26.
- [11] 孙振中. 重金属等若干污染因子对克氏螯虾的影响[J]. 水产科技情报, 1995, 22(3): 107-110.
- [12] 李来好,杨贤庆,郝淑贤,等. 罗非鱼、南美白对虾对重金属富集的研究[J]. 热带海洋学报, 2006, 25(4): 61-65.
- [13] Wilczek G, Babczynska A, Augustyniak M, et al. Relations between metals (Zn, Pb, Cd and Cu) and glutathione-dependent detoxifying enzymes in spiders from a heavy metal pollution gradient [J]. *Envir Poll*, 2004, 132(3): 453-461.
- [14] 牛长缨,姜勇,雷朝亮,等. 无脊椎动物金属硫蛋白的研究[J]. 动物学杂志, 2002, 37(1): 72-76.
- [15] West A K, Stallings R, Hildebrand C E, et al. Human metallothionein genes-structure of the functional locus at 16q13 [J]. *Genomics*, 1990, 8: 513-518.
- [16] Quafe C J, Findley S D, Erickson J C, et al. Induction of a new metallothionein isoform (MT<sup>-</sup>) occurs during differentiation of stratified squamous epithelia [J]. *Biochemistry*, 1994, 33: 7250-7259.
- [17] Auf der Maur A, Belser T, Elgar G, et al. Characterization of the transcription factor MTF-1 from the Japanese puffer fish (*Fugu rubripes*) reveals evolutionary conservation of the heavy metal stress response [J]. *Biol Chem*, 1999, 380: 175-180.
- [18] Egli D, Selvaraj A, Yepiskoposyan H, et al. Konchout of 'metal-responsive transcription factor' MTF-1 in drosophila by homologous recombination reveals its central role in heavy metal homeostasis [J]. *EMBO J*, 2003, 22(1): 100-108.
- [19] Svendsen C, Spurgeon D J, Hankard P K, et al. A review of lysosomal membrane stability measured by neutral red retention: is it a workable earthworm biomarker? [J]. *Ecotoxicol Envir Safe*, 2004, 57(1): 20-29.
- [20] Swain S C, Keusekotten K, Baumeister R, et al. *Caenorhabditis elegans* metallothioneins: new insights into the phenotypic effects of cadmium toxicosis [J]. *J Mol Biol*, 2004, 341(4): 951-959.
- [21] 任宏伟,茹炳根. 金属硫蛋白(Metallothionein, MT)基因在转基因领域的应用[J]. 生物工程进展, 2000, 20(4): 35-39.
- [22] Stürzenbaum S R, Georgiev O, Morgan A J, et al. Cadmium detoxification in earthworms: from genes of cells [J]. *Envir Sci Technol*, 2004, 38(23): 6283-6289.
- [23] Wimmer U, Wang Y, Georgiev O, et al. Two major branches of anti-cadmium defense in the mouse: mTF-1/metallothioneins and glutathione [J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(18): 5715-5727.
- [24] Gedroc D P, Chen X, Apuy J L. Metal response element (MRE)-binding transcription factor-1 (MTF-1): structure, function, and regulation [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2001, 3: 577-596.
- [25] Brugnera E, Georgiev O, Radtke F, et al. Cloning, chromosomal mapping and characterization of the human metal-regulatory transcription factor MTF-1 [J]. *Nucleic Acids Res*, 1994, 22: 3167-3173.
- [26] Radtke F, Heuchel R, Georgiev O, et al. Cloned transcription factor MTF-1 activates the mouse metallothionein I promoter [J]. *EMBO J*, 1993, 12: 1355-1362.
- [27] Selvaraj A, Balamurugan K, Yepiskoposyan H, et al. Metal-responsive transcription factor (MTF-1) handles both extremes, copper load and copper starvation, by activating different genes [J]. *Genes Dev*, 2005, 19: 891-896.
- [28] Chen W Y, John J A, Lin C H, et al. Molecular cloning and developmental expression of zinc finger transcription factor MTF-1 gene in zebrafish, *Danio rerio* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 291: 798-805.
- [29] Wimmer U, Wang Y, Georgiev O, et al. Two major branches of anti-cadmium defense in the mouse: MTF-1/Metallothioneins and glutathione [J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(18): 5715-5727.
- [30] 李薇,梁倩影,喻良文,等. 药用动物规范化养殖研究中的关键问题[J]. 中草药, 2008, 39(12): 1899-1901.