

无脊椎动物金属硫蛋白的研究*

牛长缨^① 姜勇^① 雷朝亮^① 胡萃^②

(^①华中农业大学昆虫资源研究所 武汉 430070; ^②浙江大学华家池校区应用昆虫研究所 杭州 310029)

摘要: 综述了近几十年来有关无脊椎动物金属硫蛋白(MT)的研究,包括软体动物 MT、棘皮动物 MT、环节动物 MT、节肢动物 MT(甲壳纲和昆虫纲),分析了无脊椎动物 MT 与哺乳动物 MT 的异同,在此基础上,提出以下观点:即从无脊椎动物 MT 到哺乳动物 MT 的进化来看,动物 MT 的进化可能是一种趋同进化的模式。

关键词: 无脊椎动物;金属硫蛋白

中图分类号: Q591 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2002)01-72-05

Studies of Invertebrate Metallothionein

NIU Chang-Ying^① JIANG Yong^① LEI Chao-Liang^① HU Cui^②

(^① Institute of Insect Resources, Huazhong Agricultural University Wuhan 430070;

^② Institute of Applied Entomology, Zhejiang University, Huajiachi Campus Hangzhou 310029, China)

Abstract: The studies of metallothionein(MT) in invertebrates including mollusca MT, echinoderm MT, annelida MT and arthropod MT(crustacea and insecta) are introduced in this review. The similarities and differences for invertebrate MT and mammalian MT are also analyzed. We suggest that the evolution of animal metallothionein may be a pattern of convergent evolution.

Key words: Invertebrate; Metallothionein

金属硫蛋白(metallothionein, MT)是一类低分子量、高金属含量、富含半胱氨酸、诱导性很强的金属结合蛋白。自从 1957 年 Margoshes 和 Vallee^[1] 在蓄积镉的马肾中发现 MT 以来,人们对 MT 的结构、性质、功能等方面进行了大量深入的研究,但这些研究多集中在哺乳动物。由于 MT 存在的广泛性和进化上的保守性,MT 的研究领域被拓宽到无脊椎动物、植物、细菌、真菌,研究者们做了不少有意义的探索,同时也遇到许多意想不到的问题。这些问题主要表现在:不同物种中存在的 MT 在氨基酸组成、金属离子含量等方面有一定差异,有些甚至相差很远^[2]。此外,某些无脊椎动物 MT 无法从蛋白水平提纯,例如果蝇 Mtn 已通过分子生物学手段得到它的序列,而很难用生化的手段提纯^[3]。鉴于上述原因,MT 的定义被一再拓宽,人们将类似于哺乳动物 MT 的金属结合蛋白往往称为 MT 或类 MT。无论是 MT 还是类 MT,都是根据 MT 的基本性质即低分子

质量(约 6~12 ku)、热稳定性、254 nm 处紫外吸收峰高而 280 nm 处紫外吸收峰低、以及特定的氨基酸组成。

在整个动物界中,无脊椎动物占绝大多数。从变形虫等单细胞动物的起源,到较高等节肢动物昆虫纲的崛起,无脊椎动物在动物进化史上起着举足轻重的作用。近几十年来,无脊椎动物 MT 的研究引起了国内外学者的注意,在美国的北卡罗来纳州大学曾经召开了无脊椎动物 MT 的国际会议。但相对而言,无脊椎动物 MT 的研究十分有限,而且这些研究大多是与无脊椎动物体内重金属的蓄积相关联。本文就无脊椎动

* 湖北省自然科学基金(No. 2000J085)和华中农业大学科技创新基金资助;

第一作者介绍 牛长缨,女,30 岁,博士;研究方向:昆虫生理生化;E-mail: dhhsblpo@public.wh.hb.cn.

收稿日期:2001-06-05,修回日期:2001-09-25

物 MT 的研究做一介绍。

1 软体动物 MT

由于软体动物的消化系统和呼吸系统相当简单,因此它们对周围环境(海水)特别敏感。有关海洋软体动物体内能够聚集高浓度 Cd 水平的研究已有很多报道,大多数研究涉及到双壳纲类软体动物,如贝类(*Mytilus edulis*)^[4,5]和(*M. galloprovincialis*)^[6],牡蛎(*Ostrea edulis*)、(*Crassostrea gigas*)^[7]、(*O. lutaria*)、(*C. glomerata*)^[8]和(*C. virginica*)^[9,10],扇贝(*Pecten maximus*)^[11]。这些软体动物的粘液层直接受到所吸进的海水的影响,因此很容易摄取重金属, Cd 大多吸附在它们的粘液层。Cd 的浓度在软体动物不同器官中的分布如下:肾 > 内脏(除肾外,包括消化腺) > 鳃 > 外套膜 > 肌肉。

Cd 在软体动物体内的生物化学研究表明:(1)在未污染的海域, Cd 主要和一种高分子量的蛋白质结合,以不溶状态分布在体内,这种蛋白和 MT 毫无关系;(2)从被污染的环境以及实验室处理的软体动物, Cd 和一种低分子量的蛋白结合,这种蛋白质十分类似于 MT。这种情况不同于哺乳类动物,在哺乳动物体内,无论 Cd 进入的途径如何, Cd 总是和 MT 结合。

在贝类软体动物中给予 CuSO_4 处理,结果发现 Cu^{2+} 主要累积在消化腺和鳃。在消化腺细胞里, Cu 分布在细胞质中和 MT 结合,以一种不溶状态贮存在二级和三级溶酶体中,这些研究表明 Cu 在贝类中的排泄机制为:首先在细胞质中和 MT 结合,然后转移到溶酶体中,最后通过胞吐作用以不溶物形式排出体外^[12]。至于 Cu-MT 是如何进入溶酶体的,还仍然不清楚。

虽然上述研究并不是很深入,但这些研究证明了在海洋软体动物体内,这种 Cd 硫蛋白、Cu 硫蛋白的性质十分类似于 MT, 尽管有些种类半胱氨酸含量较低。

2 棘皮动物 MT

Ohtake 等^[13]报道了在海胆(*Anthocidaris crassispina*)的未受精卵中发现一种小分子量 Zn 结合蛋白,含量十分丰富,包含 36 个氨基酸,而且氨基酸组成与典型的哺乳类 MT 十分相似。这种蛋白每摩尔结合 4 g Zn 原子,以每 3 个半胱氨酸残基结合 1 个 Zn^{2+} , 结合效率也和哺乳动物类似。Nemer 等^[14,15]发现在海胆(*Strongylocentrotus purpuratus*)的胚胎里 MT RNA 的存在。他们观察了这种 MT RNA 在特定时段和特定组织内的调控:在胚胎发育期间, MT RNA 水平在前 9 个小时保持平衡(7~8 个细胞分裂期);然后上升达到高峰(大约在 20 小时即

间充质囊胚期),在以后的 20 小时下降(原肠胚形成),然后又开始增加。值得一提的是,在发育的初期, MT RNA 水平保持平衡, MT 很难被金属诱导,但在后期(间充质囊胚期) MT 被大量诱导。可能的解释为,在发育过程中, MT 表达是被细胞内重金属离子的浓度所控制。在海胆(*S. purpuratus*)中,有两个 MT cDNA, Mta 和 Mtb, 它们分别编码 64 和 65 个氨基酸的蛋白质。这两个蛋白有 53 个氨基酸残基是相同的(82%),其中包括 20 个半胱氨酸。这两个 cDNA 基因的表达在诱导性、诱导时间、方位等方面显示出高度的统一,也许这正是 Mta 和 Mtb 对于 Zn^{2+} 的反应产生同样阈值的原因。

3 环节动物 MT

对环节动物 MT 的研究十分零散。一种生活在污泥中的寡毛纲环节动物蚯蚓(*Eisenia foetida*),发现其体内能够积累大量的 Cd,而且体内聚集的 Cd 与环境中的 Cd 浓度成正相关。大多数 Cd 分布在细胞质里,与三种高、中、低分子量的蛋白结合。其中,低分子量的蛋白过阴离子交换柱后被分成 3 个亚型,其中 1 个亚型纯化后分析其氨基酸组成,发现具有类似于 MT 的特征^[16]。

在一种海洋多毛纲动物(*Neanthes arenaceodentata*)体内, Cd 也是主要分布在细胞质里,大多数 Cd 和类似于 MT 的蛋白结合。更有意思的是,随着环境中 Cd 浓度的增加,这种特征性的 Cd 吸收峰在处理的第一周就达到了高峰,在以后的三周时间内,即使持续的给予 Cd 处理, Cd 吸收峰仍然维持原状^[17]。

李令媛等^[18]研究了威廉环毛蚓(*Pheretima guillelmi*)的 MT,对 Cd 诱导下的蚯蚓 6 个 Cd 结合蛋白组份全部进行了分离纯化,经层析特征、光谱学特征、氨基酸组成、结合金属情况等分析比较,从而确定经阴离子交换柱分离所得的三个组份为 MT 的三个亚型。

4 节肢动物 MT

4.1 甲壳纲 自从 Reynolds^[19]首次建立食用蟹(*Cancer pagurus*)体内 Cd^{2+} 浓度应低于 10 mg/L 的标准以后,有关高水平的 Cd 在甲壳动物体内的聚集陆续有了大量报道。Overmell^[20]观察了北大西洋水域 63 种食用蟹体内 Cd 的浓度,发现 Cd 主要积累在肝胰脏,浓度从 5~50 mg/L 不等。大约 90% 的 Cd 沉积在肝胰脏,其余的分布在鳃,少量分布在肌肉组织。室内研究证明,甲壳动物能从含 Cd 的溶液或食物(指取食含 Cd 的牡蛎、贝类)中获得 Cd。Cd 的累积是一个十分缓慢的过程,但是对于 Cd 的吸收、动力学和吸收效率仍然不清楚。在蟹体内,大多数摄食的 Cd 要在体内滞留大约 6 个月的

时间。

在生物体内,重金属的毒性往往体现在游离重金属离子的毒性,当重金属结合在蛋白质等配体上后,毒性作用即消失。例如,在蟹(*Rhithropanopeus harrisii*)体内,Cu的毒性体现在游离 Cu^{2+} 的浓度,而不是被配体螯合的 Cu^{2+} 。在低浓度的 Cu^{2+} ($10^{-13} \sim 10^{-12}$ mol/L)水平时,细胞内的Cu保持恒定,大约 $5 \mu\text{g/g}$ 湿重,大多数 Cu^{2+} 和一种低分子量、类似MT的蛋白结合;当 Cu^{2+} 浓度达到 10^{-11} 至 10^{-10} mol/L时,这时Cu结合的小分子蛋白含量大大增加;当细胞内的 Cu^{2+} 水平达到 $10 \mu\text{g/g}$ 湿重或更高时,蟹的生长就会受到抑制^[21]。上述结果说明,蟹体内的这种类似MT的蛋白有着与MT相同的功能,在 Cu^{2+} 低浓度时可以解毒,其含量随着 Cu^{2+} 浓度的增加而增加,但当 Cu^{2+} 达到一定量时,超过MT所能螯合的量, Cu^{2+} 便游离出来,蟹表现出中毒症状。

在蟹(*Cancer pagurus*和*Callinectes sapidus*)中,大多数Cd、Cu与一种低分子量蛋白结合,而Zn和一种高分子量的蛋白结合,当环境中Zn浓度增高时,Zn也和上述小分子量的蛋白结合,基于对这种蛋白分子量、光谱特征、氨基酸组成的认识,这种蛋白被认为是MT^[20]。

从蟹(*Scylla serrata*)中提纯的两种MT的一级结构已经测定出来^[22],这两种MT分别包含57和58个氨基酸(哺乳类MT一般含61个氨基酸),它们的序列非常类似于哺乳类MT,尤其是半胱氨酸(Cys)的分布。两者相比较,47%的位置是相同的。这两种MT也折叠成两个结构域(α 和 β 结构域),每摩尔MT结合6 g金属,每个结构域结合3个金属簇,而且每个金属离子都是在四个Cys S原子所构成的四面体中心。

甲壳动物MT的功能也许牵涉到Cu、Zn的贮存和转运,而Cu、Zn是甲壳动物合成血蓝蛋白时所必需的。这一结论是基于对体内Cu、Zn、MT、血蓝蛋白的水平观察:结合在MT上的Cu和Zn随着季节的不同而发生周期性的改变。另外,体外实验证明,纯化的Cu-MT能转运 Cu^{2+} 到缺Cu的血蓝蛋白上^[23-25]。

4.2 昆虫纲 昆虫是无脊椎动物中最繁盛和生命力最强的一类,到目前为止,有关昆虫MT的研究仅限于少数种类,除果蝇MT和一种弹尾目昆虫MT外,其它种类的研究都十分薄弱。

Hensbergen^[26]用凝胶过滤和反相快速蛋白质液层析(FPLC)的方法自弹尾目昆虫中分离出两个半胱氨酸丰富的Cd结合多肽,质谱法分析表明,这两个多肽的分子量分别为2989 u和4139 u。其中,分子量为2989 u的多肽氨基酸序列为:Thr-Ala-Ser-Cys-Cys-Thr-Cys-Cys-Gly-Pro-Asp-Cys-Val-Cys-Lys-Asp-Gly-Ala-Ser-Leu-Pro-

Cys-Cys-Ala-Asn-Lys,26个氨基酸中包含8个Cys,半胱氨酸残基的排列表现为Cys-Cys或Cys-X-Cys(X为除Cys以外的其它氨基酸残基),这也是哺乳类MT典型的Cys排列构型。分子量为4139 u的多肽的氨基酸测序却未能获得成功,可能是由于N端封闭。基于上述测定的多肽氨基酸序列,用PCR扩增得到弹尾目昆虫MT的全长cDNA克隆。这个cDNA序列编码一个包含77个氨基酸的蛋白质。2989 u多肽相对应这个蛋白的C端,4139 u多肽可能编码N端,这些研究结果表明弹尾目昆虫MT基因在翻译后加工,形成两个多肽,即这两个多肽来源于同一个基因。

果蝇MT的两个基因Mtn和Mto分别编码40和43个氨基酸的蛋白质^[3,27-32]。Mtn和Mto是两个绝然不同的基因,仅11个氨基酸残基是相同的,只有25%的同源性^[3],这显然不同于哺乳动物的MT(同源性高达75%)^[2]。Silar^[33]认为Mto和Mtn基因调控果蝇发育的不同阶段,即Mto的转录发生在胚胎发育的早期(0~3 h),并持续到第3日龄幼虫;而Mtn的表达在胚胎发育的后期(12~15 h)才开始,而且一直延伸到果蝇的整个幼虫期和成虫期。这两种基因结构和调控的差异决定它们功能的不同:Mtn主要是与重金属解毒过程相联系,Mto则涉及到重金属的内环境稳定。奇怪的是,用生化的手段只能提纯出一种MT,这种MT的部分测序结果和Mto cDNA所推测的蛋白质的序列十分吻合。可能的解释是:Mtn在果蝇体内合成后,立即进入细胞溶酶体,以高度不溶物的形式存在,因此很难用生化的手段将Mtn的可溶形式提纯。

5 无脊椎动物MT与动物MT的进化

MT是一种小分子量蛋白,在自然界中存在得十分广泛,几乎可见于所有已查检过的无脊椎动物、脊椎动物体内,其一级结构具有很高的保守性。MT结构保守的这种程度导致这样的结论,即MT的大多数结构基序早在脊椎动物出现之前就已固定,几百万年来的选择压力使这种氨基酸序列一直完整地保持了下来。

鉴于目前无脊椎动物MT的研究比较薄弱,已经阐明的无脊椎动物MT的一级结构仅十余种,因此我们很难将无脊椎动物MT放在动物MT的进化背景中去考虑。就目前的研究来看,无脊椎动物MT和哺乳动物MT相比,在MT的氨基酸组成、一级结构等方面均具有基本相似的特性。相似性表现在:(1)两者MT的Cys含量都很高;(2)均具有典型的Cys排列构型,即Cys-X-Cys;(3)MT的功能十分相似,即调控体内 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 等必需重金属的内稳态平衡和重金属解毒。但

是, 两者的差异也是十分明显的: 其一, 无脊椎动物某些种类 MT 含有芳香族氨基酸, 而哺乳动物 MT 一般不含芳香族氨基酸; 其二, 哺乳动物 MT 各亚型序列相似性很高, 而无脊椎动物 MT 各亚型序列相似性较低。

综上所述, 我们认为, 从无脊椎动物 MT 到哺乳动物 MT 的进化来看, MT 的进化可能是一种趋同进化 (convergent evolution) 的模式, 即越到高等动物, MT 的结构、特性就越趋于稳定。当然, 这一结论还需要更多有关无脊椎动物 MT、哺乳动物 MT 的研究来验证和支持。无脊椎动物作为动物类群中最大的一类, 研究无脊椎动物 MT 对于最终完成动物 MT 的进化系统树具有很重要的意义。

参 考 文 献

- [1] Margoshes M, Vallee B L. A cadmium binding protein from equine renal cortex. *J Am Chem Soc*, 1957, **79**:4 813.
- [2] Hamer D H. Metallothionein. *Ann Rev Biochem*, 1986, **55**:913 ~ 951.
- [3] Silar P, Theodore L, Mokdad R *et al*. Metallothionein Mto gene of *Drosophila melanogaster*: structure and regulation. *J Mol Biol*, 1990, **215**:217 ~ 224.
- [4] Frazier J M, George S G, Overnell J *et al*. Characterization of two molecular weight classes of cadmium binding proteins from the mussels, *Mytilus edulis*. *Comp Biochem Physiol*, 1985, **80C**:257 ~ 266.
- [5] Mackay E A, Overnell J, Dunbar B *et al*. Complete amino acid sequences of five dimeric and four monomeric forms of metallothionein from the edible mussel *Mytilus edulis*. *Eur J Biochem*, 1993, **218**:183 ~ 194.
- [6] Carpine E, Cattani O, Hakim G *et al*. Metallothionein from foot and posterior adductor muscle of *Mytilus galloprovincialis*. *Comp Biochem Physiol*, 1983, **74C**:331 ~ 336.
- [7] Frazier J M, George S G. Cadmium kinetics in oysters a comparative study of *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. *Mar Biol*, 1983, **76**:55 ~ 61.
- [8] Nordberg M., Nuottaniemi I, Cherian G M *et al*. Characterization studies on the cadmium-binding proteins from two species of New Zealand oysters. *Environ Health Perspect*, 1986, **65**:57 ~ 62.
- [9] Roesijadi G, Kielland S, Klerks P. Purification and properties of novel molluscan metallothioneins. *Arch Biochem Biophys*, 1989, **273**:403 ~ 413.
- [10] Unger M E, Chen T T, Murphy C M *et al*. Primary structure of molluscan metallothioneins deduced from PCR-amplified cDNA and mass spectrometry of purified proteins. *Biochem Biophys Acta*, 1991, **1 074**:371 ~ 377.
- [11] Stone H C, Wilson S B, Overnell J. Cadmium-binding components of scallop (*Pecten maximus*) digestive gland. Partial purification and characterization. *Comp Biochem Physiol*, 1986, **85C**:259 ~ 268.
- [12] Viarengo A, Moore M N, Mancinelli G *et al*. Metallothioneins and lysosomes in metal toxicity and accumulation in marine mussels: the effect of cadmium in the presence and absence of phenanthrene. *Mar Biol*, 1987, **94**:251 ~ 257.
- [13] Ohtake H, Suyemitsu M, Koga M. Sea-urchin *Anthocidaris crassispina* egg zinc-binding protein: Cellular localization, purification and characterization. *Biochem J*, 1983, **211**:109 ~ 118.
- [14] Nemer M, Travaglini E C, Moody J. Metallothionein gene expression is inductively and developmentally regulated in the sea-urchin embryo. *J Cell Biol*, 1983, **97**:328 ~ 334.
- [15] Nemer M, Travaglini E C, Rondinelli E. Developmental regulation induction and embryonic tissue specificity of sea-urchin *Strongylocentrotus purpuratus* metallothionein gene expression. *Dev Biol*, 1984, **102**:471 ~ 482.
- [16] Yamamura M, Suzuki K T. Metallothionein induced in the earthworm. *Experientia*, 1981, **37**:1 187 ~ 1 189.
- [17] Jenkins K D, Sanders B M. Relationships between free cadmium ion activity in sea water, cadmium accumulation, and sub-cellular distribution and growth in polychaetes. *Environ Health Perspect*, 1986, **65**:205 ~ 210.
- [18] 李令媛, 马宏宝, 吕迎春等. 镉诱导威廉环毛蚓金属硫蛋白的分离纯化及特性研究. 生物化学杂志. 1994, **10** (4):444 ~ 450.
- [19] Reynolds C V. Cadmium in crabs and crab-meat. *J Assoc Publ Health Anal*, 1971, **9**:112 ~ 114.
- [20] Overnell J. The occurrence of cadmium in crabs (*Cancer pagurus*) and the isolation and properties of cadmium metallothionein. *Environ Health Perspect*, 1986, **65**:101 ~ 105.
- [21] Sanders B M, Jenkins K D, Sunda W G. Free cupric ion activity in sea water effects on metallothionein and growth in crab *Rhithropanopeus harrissii* Larvae. *Science*, 1983, **222**:53 ~ 55.
- [22] Lerch K, Ammer D, Olafson R W. Crab metallothionein. Primary structures of metallothioneins 1 and 2. *J Biol Chem*, 1982, **257**:2 420 ~ 2 426.
- [23] Brouwer M, Whaling P, Engel D W. Copper-metallothioneins in the American lobster, *Homarus americanus*: potential role as Cu(I) donors to apohemocyanin. *Environ Health Perspect*, 1986, **65**:93 ~ 100.
- [24] Engel D W. Metal regulation and molting in the blue crab *Callinectes sapidus*. Copper zinc and metallothionein. *Biol Bull*, 1986, **172**:69 ~ 82.

- [25] Engel D W, Brouwer M. Metal regulation and molting in the blue crab *Callinectes sapidus*: metallothionein function in metal metabolism. *Biol Bull*, 1987, **173**:239 ~ 251.
- [26] Hensbergen P J, Donker M H, Velzen van M J M *et al*. Primary structure of a cadmium-induced metallothionein from the insect *Orchesella cincta* (Collembola). *Eur J Biochem*, 1999, **259**:197 ~ 203.
- [27] Lastowski-Perry D, Otto E, Maroni G. Nucleotide sequence and expression of a *Drosophila* metallothionein. *J Biol Chem*, 1985, **260**:1 527 ~ 1 530.
- [28] Otto E, Young J E, Maroni G. Structure and expression of a tandem duplication of the *Drosophila* metallothionein gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, **83**:6 025 ~ 6 029.
- [29] Mokdad R, Debec A, Wegnez M. Metallothionein genes in *Drosophila melanogaster* constitute a dual system. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, **84**:2 658 ~ 2 662.
- [30] Lange B W, Langley C H, Stephan W. Molecular evolution of *Drosophila* metallothionein genes. *Genetics*, 1990, **126**:921 ~ 932.
- [31] Silar P, Wegnez M. Expression of the *Drosophila melanogaster* metallothionein genes in yeast. *FEBS Lett*, 1990, **269**:273 ~ 276.
- [32] Maroni G, Ho A S, Theodore L. Genetic control of cadmium tolerance in *Drosophila melanogaster*. *Environ Health Perspect*, 1995, **103**:1 116 ~ 1 118.