

重组人金属硫蛋白-III对细胞和秀丽隐杆线虫 毒性效应的研究

孙左义¹ 原海亮² 秦建新² 李强³ 薛玉英^{1*}

(¹东南大学公共卫生学院, 环境医学工程教育部重点实验室, 南京 210009;

²苏州汇涵医用科技发展有限公司, 常熟 215500; ³常熟市市场监督管理局, 常熟 215500)

摘要 该文探索机体可能暴露剂量的重组人金属硫蛋白III(rh-MT-III)对人永生化角质形成细胞(human keratinocytes, HaCaT)、小鼠成纤维细胞(L929)和秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*, *C. elegans*)的毒性效应, 并探究其安全剂量范围, 为安全应用提供实验依据。以0、12.5、25、50、100和200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ rh-MT-III对HaCaT细胞和L929细胞暴露24 h, 检测其对细胞存活率、形态学变化、细胞膜损伤程度和细胞凋亡水平的影响; 以0、5、50、500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ rh-MT-III对L1期线虫暴露72 h, 考察其对线虫存活率、运动行为(头部摆动和身体弯曲频率)、生长发育(体长和体宽)、摄食和排便行为的影响。结果显示, 与对照组相比, 两种细胞的存活率、细胞形态、乳酸脱氢酶释放率及凋亡水平以及线虫各项检测指标, 在研究剂量下均无统计学差异。这表明rh-MT-III在0~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 剂量时对HaCaT细胞和L929细胞无明显毒性效应; 0~500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 对线虫无明显毒性效应。

关键词 金属硫蛋白; 人永生化角质形成细胞; L929; 秀丽隐杆线虫; 毒性效应; 安全性评价

Toxic Effects of Genetically Engineered Recombinant Human Metallothionein-III on Cells and *Caenorhabditis elegans*

SUN Zuoyi¹, YUAN Hailiang², QIN Jianxin², LI Qiang³, XUE Yuying^{1*}

(¹Key Laboratory of Environmental Medicine and Engineering, Ministry of Education, School of Public Health, Southeast University, Nanjing 210009, China; ²Suzhou Hvh Medical Technology Development Co., Ltd., Changshu 215500, China;

³Changshu Municipal Market Supervision Administration, Changshu 215500, China)

Abstract This study aimed to investigate the toxic effects of different concentrations of rh-MT-III (recombinant human metallothionein III) on HaCaT (human keratinocytes) and L929 cells as well as on *C. elegans* (*Caenorhabditis elegans*). The functional data of safety and toxicity, including cell viabilities, cell morphology, cell membrane damages, apoptosis levels of HaCaT and L929 cells, and nematode survival, head swinging and body bending frequency, body length and width, pharyngeal pumping frequency and defecation interval of *C. elegans* were observed, respectively. For the cell experiments, cells were exposed to rh-MT-III solution at concentrations ranging from 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 24 h. For the nematode experiments, 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ rh-MT-III were used to treat L1 phase nematodes for 72 h. The results showed that there was no significant difference of the functional data between the rh-MT-III treatment and the control groups. These results indicated that rh-MT-III at doses of 0~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 0~500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ had no obvious toxicity to both two cells and *C. elegans*, respectively.

收稿日期: 2022-02-09 接受日期: 2022-04-17

*通讯作者。Tel: 13701580694, E-mail: yyxue@seu.edu.cn

Received: February 9, 2022 Accepted: April 17, 2022

*Corresponding author. Tel: +86-13701580694, E-mail: yyxue@seu.edu.cn

Keywords metallothionein; HaCaT; L929; *C. elegans*; toxic effects; safety evaluation

金属硫蛋白(metallothionein, MT)是一种广泛存在于生物体内并具有金属结合特性的低分子量蛋白质,其相对分子质量为6~7 kDa^[1],其中半胱氨酸的含量占总蛋白分子的20%~30%。MT因氨基酸组成和所带电荷差异,可分为MT-I、MT-II、MT-III和MT-IV四种类型^[2],MT-I和MT-II广泛存在于哺乳动物内脏组织中,尤其以肝、肾组织为主,并参与组织功能的调节;MT-III仅在少数植物和哺乳动物的中枢神经系统中表达,具有神经抑制及参与神经损伤的修复作用,并可能与某些神经系统疾病相关^[3]。MT-IV多分布于胃肠道和上呼吸道表皮细胞,可帮助调节胃酸pH^[4]。完整MT蛋白结构主要由独立的 α 结构域和 β 结构域组成,两个结构域呈大小相同的球形,通过赖氨酸相连使MT分子的三级结构呈现哑铃状^[5]。 α 结构域具有四个金属离子结合位点,域中包含的11个半胱氨酸可与多个重金属离子产生螯合作用, β 结构域则含有三个金属结合位点,两种结构域有机结合可极大增强完整MT分子对不同种类的金属的反应性和亲和力^[6],从而使MT具备调节机体内金属离子的代谢功能。

MT于1957年首次从马的肾脏外皮细胞中提取发现^[7],目前主要通过家兔、牛等动物肝脏进行提取。MT结构中的硫醇键可以结合重金属离子,因而具有重金属解毒效应^[8];且MT能够在体内发挥抗氧化作用,通过有效调控体内活性氧的猝灭,阻断活性氧生成链,保护机体免受超氧化物的侵袭,进而延缓细胞衰老^[9],防止细胞因氧化造成的炎性浸润,发挥清除自由基的效力^[10]。但哺乳动物MT提取过程繁杂且价格昂贵^[11],难以满足市场需求。近年来,通过基因工程获取的人源金属硫蛋白在基因序列上与人体MT更加相似,使其具有良好的生物相容性。采用大肠杆菌发酵工艺,制备程序相对简单且原料来源不受限制,可以实现高密度生产,无需伤害实验动物。

MT由于具有对重金属解毒和修复重金属对机体造成的氧化损伤的功能,非常适于开发为化妆品的添加剂,以作为体表抗氧化的防护屏障,延缓细胞衰老。常用的化妆品添加剂超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)相对分子质量为32 kDa^[12],MT与其相比不仅具有分子量小、利于皮肤吸收、清

除羟基自由基能力强、热稳定性高、半衰期长等优点,同时兼具拮抗紫外线损伤的作用。本课题组前期已对重组人金属硫蛋白-III α (recombinant human metallothionein-III α , rh-MT-III α)短肽毒性进行了初评^[13],鉴于完整结构的MT-III更加稳定且具有更好的重金属结合和抗氧化能力,但基因工程技术制备的重组人金属硫蛋白-III(recombinant human metallothionein-III, rh-MT-III)毒性评价结果尚未可知,是否可以作为新型化妆品添加剂仍需严格的安全性评价。

目前,实验室研究化妆品中金属硫蛋白添加剂的检出限为2.5 mg/L^[14],考虑到未来实际应用需求,本次实验剂量选择远高于检出限值5~80倍,以确保对rh-MT-III进行全面的安全效应评价。因此,本研究基于课题组前期实验剂量和暴露时间,进一步利用rh-MT-III对人永生角质形成细胞(human keratinocytes, HaCaT)和小鼠成纤维细胞(L929)进行体外毒性评估,并结合秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*, *C. elegans*, 下文简称线虫)的体内毒性实验以达到对基因工程制备的rh-MT-III毒性效应的体外和体内综合评估,为安全应用MT以及开拓MT的应用领域提供相关参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料 重组人金属硫蛋白III来源于苏州汇涵医用科技发展有限公司,考虑到MT-III动植物来源的限制以及在化妆品领域的应用前景和可能对神经系统疾病的应用潜力,该公司通过基因工程技术构建重组人金属硫蛋白-III工程菌株,并利用大肠杆菌高密度发酵技术以及蛋白分离纯化技术,最终获得高质量高纯度的rh-MT-III蛋白产品。该蛋白分子量约为7 kDa,每分子含有20个半胱氨酸,巯基含量丰富,蛋白SDS-PAGE纯度 $\geq 98\%$; HaCaT和L929细胞株均购自上海名劲生物科技有限公司;秀丽隐杆线虫采自美国明尼苏达大学线虫遗传中心。

1.1.2 主要试剂 DMEM高糖培养基、胰蛋白酶购自美国Gibco公司;胎牛血清购自美国Genial Biological公司;磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)购自中国博士德生物工程有限公司;噻唑蓝

(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)购自美国Sigma-Aldricn公司; 乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)检测试剂盒(C0017)购自上海碧云天生物技术有限公司; 细胞凋亡检测试剂盒(A211-02)购自南京诺维赞生物科技有限公司; 磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、氯化钠、蛋白胨、琼脂、磷酸钾、硫酸镁、胆固醇、氢氧化钠、次氯酸钠等购自国药集团化学试剂有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养及动物培养 HaCaT和L929细胞株用完全培养基(含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素和100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素)于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 进行常规传代培养, 线虫培养于覆有大肠杆菌OP50的线虫生长培养基(NGM), 置于20 $^{\circ}\text{C}$ 生化培养箱进行培养。

1.2.2 染毒液配制 染毒液浓度选择基于课题组之前对于重组人金属硫蛋白-III α 片段(rh-MT-III α , 商品名为重组人巯基短肽)展开的初步探索实验^[13]。细胞毒性实验中: 利用完全培养基, 将rh-MT-III混匀配成浓度为2 mg/mL的原溶液, 充分涡旋1 min, 进行细胞染毒时利用完全培养基分别稀释至浓度为12.5、25、50、100和200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的rh-MT-III染毒液。

线虫实验: 利用高压灭菌后的M9溶液将rh-MT-III配成浓度为1 mg/mL的母液, 并涡旋1 min, 染毒时利用M9将其稀释至5、50、500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的rh-MT-III染毒液。

1.2.3 细胞活力测定 选取对数生长期且状态良好的HaCaT细胞和L929细胞, 以 1×10^5 个/mL的浓度接种于96孔板中, 每孔200 μL , 于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 恒温培养箱继续培养24 h, 待细胞融合至80%时, 弃去原液; 以完全培养基作为对照组, 12.5~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ rh-MT-III溶液为染毒组, 每组设置三个复孔, 经24 h培养后吸去染毒液; 向各组内分别加入200 μL 含0.5 mg/mL MTT培养基(不含血清), 继续培养4 h, 吸出MTT; 再向每孔加入150 μL DMSO, 置于摇床上轻摇10 min, 通过酶标仪测量各孔在490 nm处的吸光度(D)值, 并计算细胞活力。

1.2.4 细胞形态测定 将HaCaT及L929细胞分别以 1×10^5 个/mL的浓度接种于6孔板, 每孔2 mL, 培养箱培养24 h后, 吸出原液, PBS清洗后, 分别加入12.5、25、50、100和200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ rh-MT-III溶液培养24 h后, 进行拍照记录。

1.2.5 细胞膜损伤测定 配制LDH检测工作液待用,

细胞以浓度为 1×10^5 个/mL接种至96孔板, 每孔200 μL , MTT实验染毒结束后, 将96孔板培养液吸出, 加入检测试剂, 同时每个剂量浓度设置三个复孔, 操作按照试剂盒步骤进行。

1.2.6 细胞凋亡测定 将HaCaT细胞和L929细胞以浓度为 1×10^5 个/mL接种至6孔板, 每孔2 mL, 不同梯度剂量浓度组设置三个复孔, 操作按照试剂盒步骤进行, 处理完成后, 利用流式细胞仪检测HaCaT细胞、L929细胞凋亡率。

1.2.7 线虫同步化处理 传代转板后约48 h, 在体式显微镜下观察成虫体内虫卵数目, 依据实验需要选取适量线虫进行同步化, 使用高压后的M9溶液将带卵的秀丽线虫从培养皿中洗出, 洗出的线虫转移至1.5 mL离心管中, 自然沉降后, 用M9溶液继续清洗3次, 直至上清液澄清, 并保证线虫体外菌液及杂质基本去除。以830 μL 的水、50 μL 的氢氧化钠和120 μL 的次氯酸钠配制成1 mL体系的裂解液, 加入1 mL的线虫裂解液, 反复晃动约5 min, 待线虫裂解后, 放置于离心机中, 5 000 r/min离心2 min, 弃上清, 将虫卵留在离心管底部, 用M9溶液继续清洗3次, 去除多余的裂解液以保证虫卵的孵出率。将裂解后的虫卵放入M9溶液覆盖后的无菌培养皿中, 转移至20 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中过夜孵化便可获得处于同一生长时期的L1期线虫, 并在涂有OP50的NGM培养皿中培养备用。

1.2.8 线虫存活率测定 利用高压灭菌的M9溶液将rh-MT-III充分混匀, 配成不同浓度(5、50、500 $\mu\text{g}/\text{mL}$)染毒液, 向直径3.5 cm的NGM培养基中各加入200 μL rh-MT-III溶液, 对照组为等体积的M9溶液, 自然晾干后加入同步化后的L1期线虫, 放至20 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养72 h, 观察各剂量组线虫死亡情况。线虫死亡判断标准为: 在体视显微镜下用铂丝挑针刺激线虫, 若10 s内线虫无反应即判定为死亡。每剂量组选取30条线虫, 实验重复三次。

1.2.9 线虫运动行为指标测定 染毒同线虫存活率实验, 染毒结束后, 挑取1条线虫于未加OP50的新培养基上, 待其恢复1 min, 在显微镜下计数线虫20 s内头部摆动的次数和60 s内身体弯曲次数。当线虫头部摆动从身体一端至另一端, 且角度超过90 $^{\circ}$ 定义为一次头部摆动; 线虫相对于咽泵方向做正弦式移动定义为一次身体弯曲。每剂量组选取30条线虫, 实验重复三次。

1.2.10 线虫生长发育指标测定 染毒同线虫存活

率实验,利用高压后M9溶液将线虫清洗至1.5 mL EP管中,待洗去OP50菌液及其他杂质后,向各剂量组EP管内加入200 μL 左旋咪唑(0.025 mmol/L)麻醉线虫。各剂量组吸取20 μL 麻醉后的线虫至新载玻片上,盖上盖玻片后,在ZEN软件下观察并拍摄完整线虫,后利用ImageJ软件对每只线虫进行体长和体宽的测量。各剂量组选取30条线虫,实验重复三次。

1.2.11 线虫摄食和排便指标测定 线虫染毒72 h后,利用铂丝挑针挑取1条线虫于涂有OP50的新培养基上,待其恢复1 min,将线虫放大到适宜倍数进行观察,ZEN软件对每条线虫进行30 s和60 s运动视频录制,然后以8 fps的速度慢放,记录每条线虫咽泵和排便时间间隔数据。各剂量组计数30条线虫,实验重复三次。

1.3 统计学方法

实验数据以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用SPSS Statistics 23.0软件进行统计分析,多组间的比较采用方差齐性检验和单因素方差分析(One-Way ANOVA),组间比较,若两组方差齐,采用LSD-*t*检验,若方差不齐,则采用Games-Howell检验方法,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。线虫体长体宽用ImageJ软件进行测量。

2 结果

2.1 细胞活性检测结果

不同浓度rh-MT-III处理HaCaT细胞和L929细

胞24 h后的相对细胞活力的变化如图1所示,与对照组相比,染毒24 h后,随着剂量的增大,细胞相对存活率出现一定程度的下降趋势,但经统计学分析,12.5~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ rh-MT-III实验组的HaCaT细胞和L929细胞相对细胞活力与对照组相比无显著差异。

2.2 细胞膜损伤检测结果

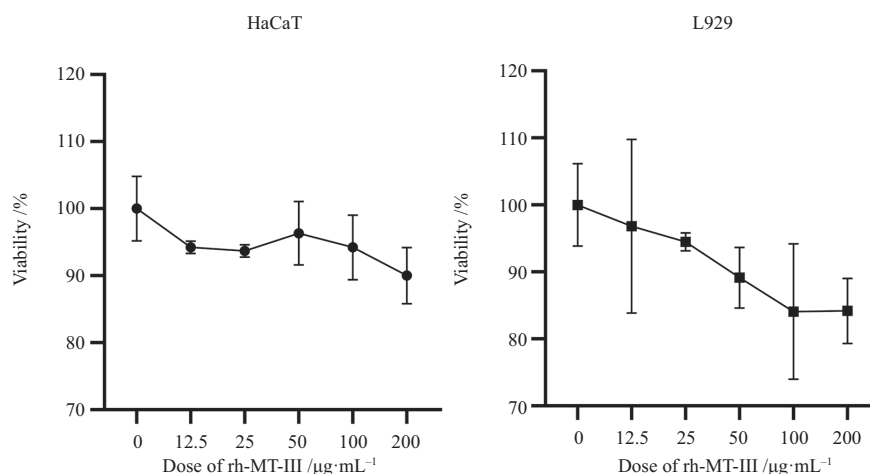
不同浓度rh-MT-III暴露24 h后两种细胞相对LDH水平如图2所示,在12.5~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的实验剂量下,HaCaT细胞与L929细胞LDH释放率随着rh-MT-III浓度升高而增高,两者释放率总体趋势基本一致,但与对照组相比均未显示出明显差异。这表明rh-MT-III对两种细胞膜结构无损伤效应。

2.3 细胞形态检测结果

LDH结果显示,两种细胞均未出现明显的膜损伤效应,进一步进行细胞形态鉴定以验证rh-MT-III在12.5~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时对细胞的毒性效应。在染毒组中观察到HaCaT细胞呈现多边形;L929细胞呈现梭形,连接紧密且悬浮细胞较少,均无明显形态学改变(图3)。

2.4 细胞凋亡检测结果

进一步测量了不同浓度rh-MT-III对两种细胞凋亡的影响。结果如图4所示,与对照组相比,各染毒组随着染毒浓度的升高,两种细胞凋亡率在12.5~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 剂量下虽具有上升趋势,但这种升高趋势不具有统计学差异,结合乳酸脱氢酶释放结果分析,在凋亡早期时,细胞会应对外界产生应激反应,早凋细胞增多,但细胞膜结构并未出现显著损伤。

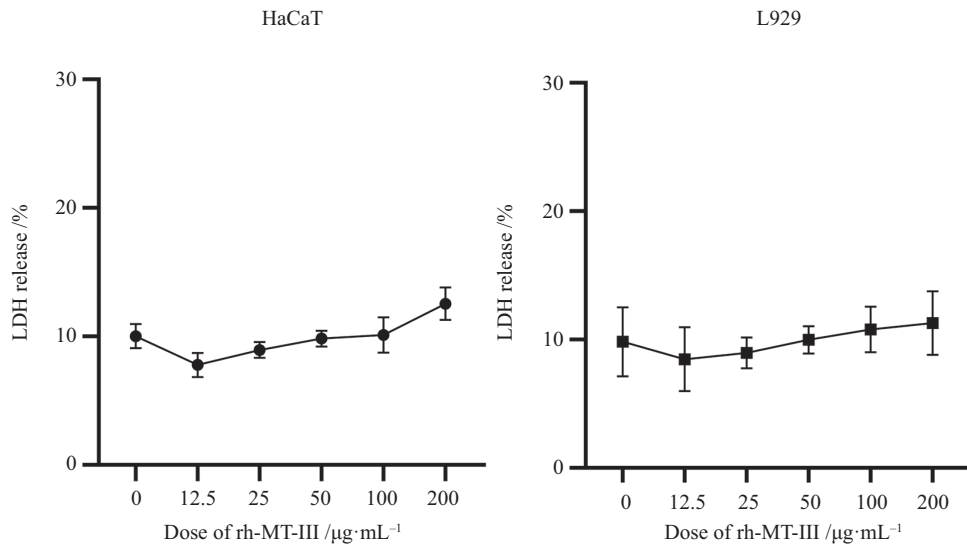


$n=3$; 0为对照组。

$n=3$; 0 is the control.

图1 rh-MT-III对HaCaT及L929细胞活力影响

Fig.1 Effects of rh-MT-III on the viability of HaCaT and L929 cells

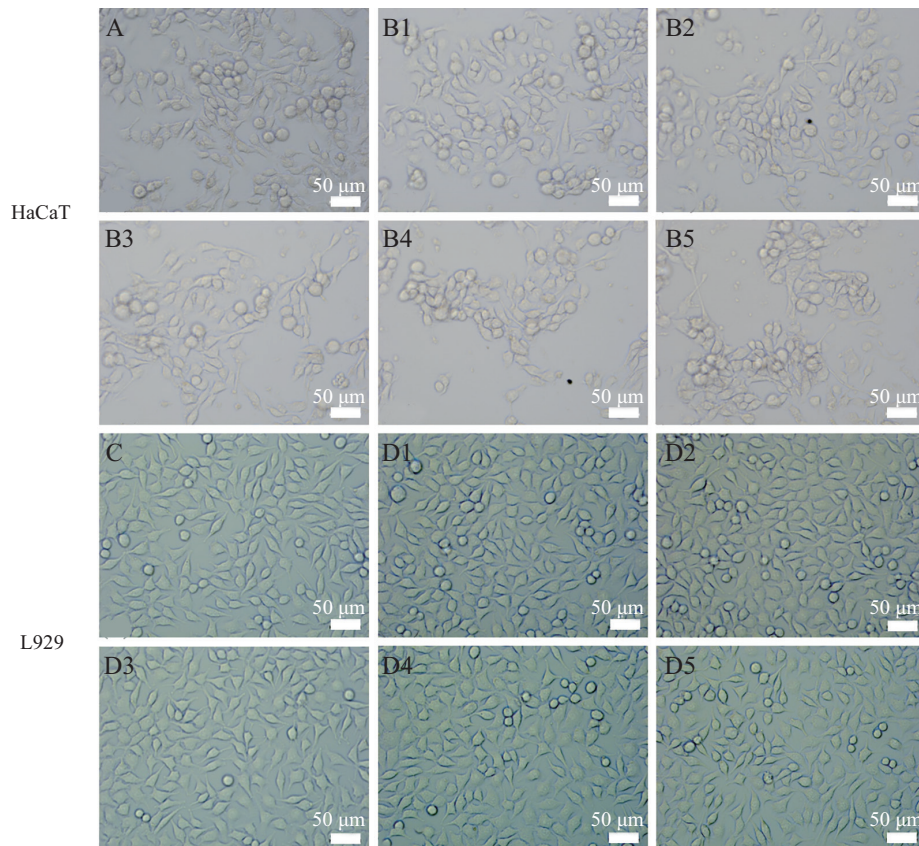


$n=3$; 0为对照组。

$n=3$; 0 is the control.

图2 rh-MT-III对HaCaT及L929细胞乳酸脱氢酶释放率影响

Fig.2 Effects of rh-MT-III on the rate of lactate dehydrogenase release from HaCaT and L929 cells



A、C: 对照组, 用完全培养基处理HaCaT和L929细胞24 h; B1~B5和D1~D5: 染毒组, 用rh-MT-III(剂量分别为12.5、25、50、100、200 μg/mL)处理HaCaT和L929细胞24 h。

A,C: control group, HaCaT and L929 cells were treated with complete medium for 24 h; B1-B5 and D1-D5: HaCaT and L929 cells were transfected with rh-MT-III (doses of 12.5, 25, 50, 100 and 200 μg/mL) for 24 h.

图3 rh-MT-III对HaCaT及L929细胞形态影响

Fig.3 Effects of rh-MT-III on the morphology of HaCaT and L929 cells

2.5 线虫存活率测定

经5、50、500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ rh-MT-III染毒72 h后,在体视显微镜下观察,各剂量组线虫死亡情况如图5所示,与未染毒组相比,各剂量组线虫存活率未出现明显差异。这表明rh-MT-III对线虫无显著致死效应。

2.6 线虫运动行为测定

将同步化后的L1期线虫加入涂有大肠杆菌的NGM内,经rh-MT-III染毒72 h后,测定线虫头部摆动频率、身体弯曲频率来评价线虫运动行为能力,研究结果如图6所示,与对照相比,染毒组中线虫头部摆动频率(20 s)和身体弯曲频率(60 s)无明显差异。

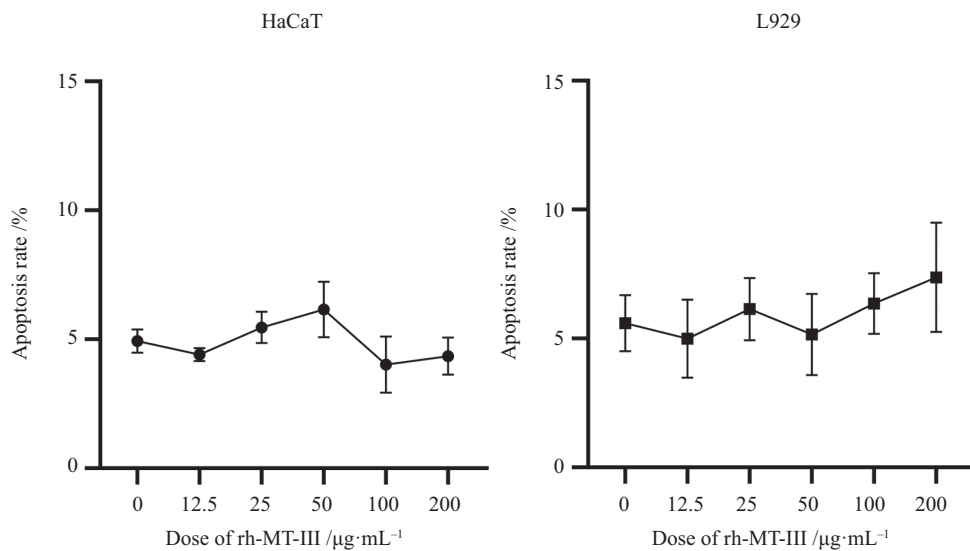
这表明rh-MT-III在实验剂量下对线虫运动行为指标无明显毒性作用。

2.7 线虫生长发育测定

线虫生长发育多以体长和体宽为测定指标,经72 h染毒后,对线虫体长体宽进行测量。结果如图7所示,对照组线虫平均体长、体宽分别为 $(743.46 \pm 50.26) \mu\text{m}$ 、 $(52.41 \pm 3.25) \mu\text{m}$,5、50和500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 染毒组线虫体长体宽与其相比均未出现明显改变。这表明rh-MT-III对于线虫的生长发育无明显毒性效应。

2.8 线虫摄食和排便行为测定

不同浓度rh-MT-III暴露后,测量线虫咽泵运动

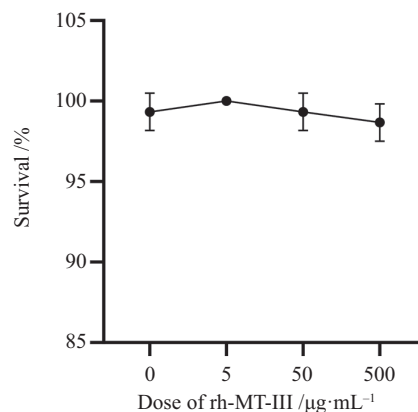


$n=3$; 0为对照组。

$n=3$; 0 is the control.

图4 rh-MT-III对HaCaT及L929细胞凋亡率的影响

Fig.4 Effects of rh-MT-III on apoptosis rate of HaCaT and L929 cells

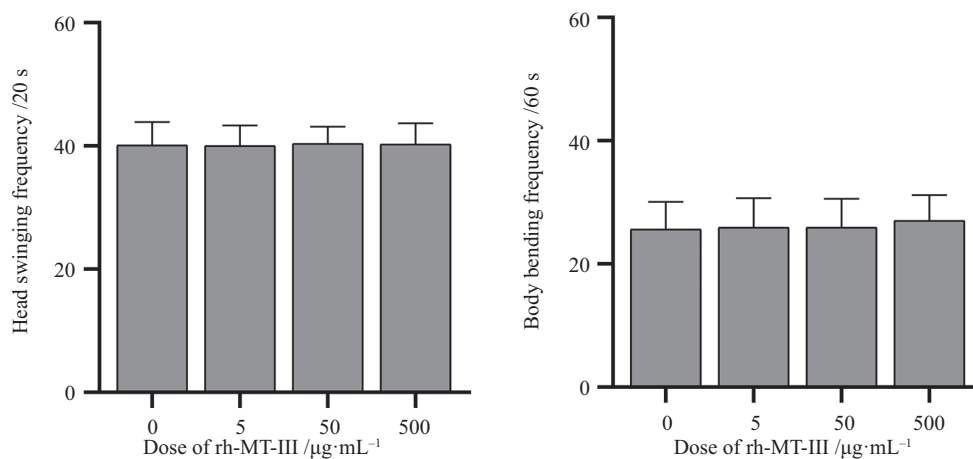


$n=3$; 0为对照组。

$n=3$; 0 is the control.

图5 rh-MT-III对线虫存活率的影响

Fig.5 Effects of rh-MT-III on the survival rate of *C. elegans*

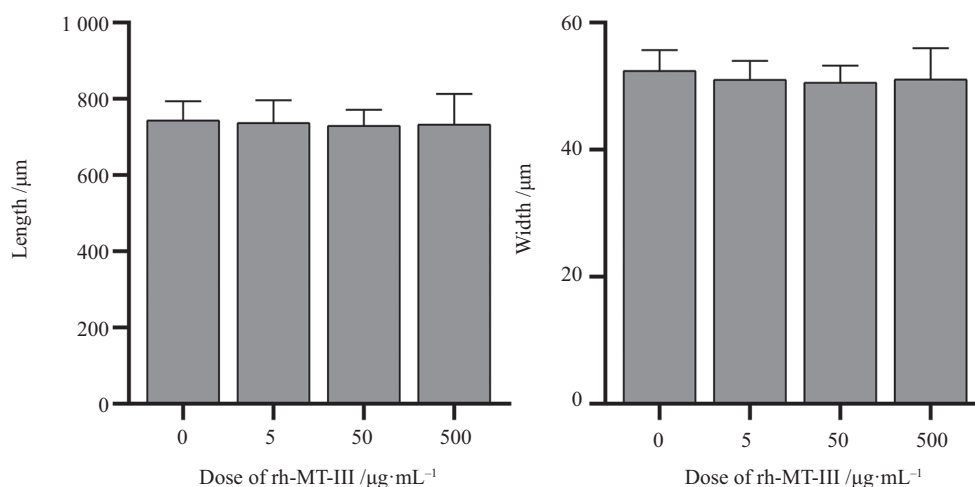


$n=3$; 0为对照组。

$n=3$; 0 is the control.

图6 rh-MT-III对线虫头部摆动及身体弯曲频率的影响

Fig.6 Effects of rh-MT-III on head swinging and body bending frequency of *C. elegans*



$n=3$; 0为对照组。

$n=3$; 0 is the control.

图7 rh-MT-III对线虫体长体宽的影响

Fig.7 Effects of rh-MT-III on body length and width of *C. elegans*

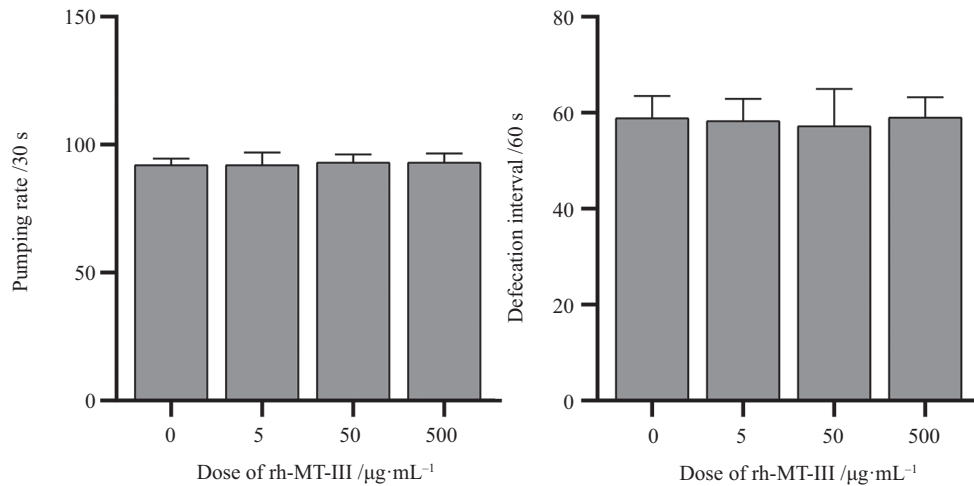
频率和排便时间间隔, 结果如图8所示, 对照组线虫的咽泵运动频率为 (92.07 ± 2.55) 次/min, 排便循环周期为 (58.87 ± 4.61) s, 与对照组相比, 染毒组线虫咽泵频率和排便时间间隔变化无统计学意义。这表明rh-MT-III对线虫的摄食和排便行为无显著影响。

3 讨论

目前市场中广泛研究的MT多是从动物肝脏、植物组织等中提取的, 研究内容从分子结构到生理活性再到机理层面, 但是从动植物组织中提取的MT蛋白, 其纯度较低, 且多为多种MT家族蛋白的混合

物, 蛋白均一性不高, 也限制了研究者对其进行更深入的研究。而利用基因工程技术, 采用大肠杆菌高密度发酵并分离纯化获得的MT蛋白产品, 产品单一性好、纯度高, 可以极大地推动MT在生物学、毒理学和临床医学等多领域的研究及应用。

rh-MT-III具有高效的抗氧化、结合重金属能力, 也是一种潜力巨大的功能化妆品添加剂, 皮肤是其直接作用的靶器官。本实验选取的HaCaT细胞和L929细胞的生理特性与正常人角质形成细胞高度相似, L929细胞是用于皮肤毒性评测的细胞模型^[15], 且已有研究选用细胞活力、细胞形态和LDH测定等毒



$n=3$; 0为对照组。

$n=3$; 0 is the control.

图8 rh-MT-III对线虫咽泵频率和排便间隔的影响

Fig.8 Effects of rh-MT-III on pharyngeal pumping frequency and defecation interval of *C. elegans*

性指标来评估外源化学物对机体的影响^[16]。线虫与人类基因高度同源,具有易培养、成长周期短、成本经济等特点,线虫对毒性刺激产生的行为学特征可以很好地为毒理学早期评价提供理论支持^[17-19],因此本实验可为rh-MT-III初期毒性探索提供数据参考。然而使用秀丽隐杆线虫仍存在一定的局限性,在对于皮肤毒性评估的实验中,线虫对外界刺激敏感性比大鼠模型和小鼠模型弱,且线虫的组织结构和细胞功能与人类相似度不高,研究者不易将实验结果外推。因此,后续将继续构建大、小鼠模型对rh-MT-III进行更为深入的体内毒性评价,以充分完善安全性评价的数据。

本研究以体外实验和体内实验相结合进行rh-MT-III毒性效应的初步探索,由于实验室研究化妆品中金属硫蛋白添加剂的检出限为2.5 mg/L,本研究评估12.5~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ rh-MT-III对于两种细胞存活率、形态学及LDH释放率的影响,均未发现两种细胞在染毒剂量下出现明显的毒性效应,LDH释放率和细胞凋亡率随着剂量增加都有升高趋势,虽然本实验研究剂量范围未达到统计学差异,但提示我们进一步增加rh-MT-III的剂量可能会导致细胞膜结构的损伤。在细胞毒性评估基础上进一步选择0~500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ rh-MT-III,经暴露后对线虫存活率、运动行为、生长发育及摄食和排便行为无明显影响,说明rh-MT-III在实验剂量下对实验选取的生物模型未产生毒性效应。但研究观察周期较短,未来需在长期暴露的

基础上,选取更多的生物进行rh-MT-III的安全效应评价。

本研究初步探讨了完整结构rh-MT-III的细胞及线虫毒性效应,以拓展MT功能探索的前景。MT在生物体内表达具有普遍性,而蛋白内部的巯基含量决定了其与重金属结合能力的强弱,MT对不同种类的重金属亲和力不同^[20],结合最为紧密的是 Cu^{2+} ,其次是 Cd^{2+} 和 Zn^{2+} ^[21],利用这一解毒特性可有效缓解机体急性毒性病变^[22]。HWANG等^[23]探究汞等重金属运用到化妆品中的危险性,研究了不同浓度的 HgCl_2 对HaCaT细胞的细胞毒性,在添加MT后,实验组细胞存活率显著提高,结果表明,MT对 HgCl_2 所诱导的HaCaT细胞具有保护作用。于立博等^[24]从细胞水平研究了外源性植物MT拮抗铅毒性的效应,将MT与骨髓干细胞进行体外共培养并结合酶联免疫法发现,经干预处理后的高剂量组细胞损伤程度较对照组得到有效缓解,表明MT对外源金属离子具有良好的解毒效应。本课题组之前的研究显示,不同浓度rh-MT-III α 与纳米银(AgNPs)共同暴露于线虫后,rh-MT-III α 对AgNPs诱导所致线虫运动行为能力降低、生长发育毒性和活性氧(reactive oxygen species, ROS)表达量增高具有显著的缓解效应,有效确证了rh-MT-III α 的抗氧化损伤及重金属解毒功能^[25-26]。

有关验证MT未来是否可以作为安全的化妆品添加剂已有部分研究,于东宁等^[27]利用Wistar大鼠,构建皮肤II度烧伤模型,以金属硫蛋白作为保护剂

用于烫伤表面, 测定8 h、24 h、48 h各项皮肤活性指标的变化情况, 实验组创面愈合时间较对照组平均提前两天。赵辛艳等^[28]用艾地苯联合金属硫蛋白对皮肤老化、毛孔粗大、面部色斑患者进行联合修复实验, 历经数月治疗后, 患者毛孔和色斑得到有效缓解, 实验期间出现若干不良反应的患者经治疗后症状消失, 但是该实验由于研究样本数目较小, 很难完整评估其安全效应, 对于金属硫蛋白未来是否可以安全地作为化妆品添加剂, 仍然缺乏充足的理论和实验基础。因此本研究旨在探讨基因工程重组人金属硫蛋白作为化妆品添加剂的安全性, 从而为保障MT应用的安全性和开发MT的新功能提供更加有效的实验数据支持。

参考文献 (References)

- [1] SI M, LANG J. The roles of metallothioneins in carcinogenesis [J]. *J Hematol Oncol*, 2018, 11(1): 107.
- [2] COYLE P, PHILCOX J C, CAREY L C, et al. Metallothionein: the multipurpose protein [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2002, 59(4): 627-47.
- [3] YOU H J, LEE K J, JEONG H G. Overexpression of human metallothionein-III prevents hydrogen peroxide-induced oxidative stress in human fibroblasts [J]. *Febs Lett*, 2002, 521(1/2/3): 175-9.
- [4] 徐炳政. 酵母源金属硫蛋白排铅及对铅致氧化损伤修复作用的研究[D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2015.
- [5] 孔晶晶. I型玉米金属硫蛋白(Zea mays Metallothionein 1)在大肠杆菌中的表达、纯化及金属结合特性[D]. 太原: 太原理工大学, 2018.
- [6] SHREOSI C, SUPRIYA K, SONALIN R, et al. Diversity, structure and regulation of microbial metallothionein: metal resistance and possible applications in sequestration of toxic metals [J]. *Metallomics*, 2020, 12(11): 1637-55.
- [7] PANEMANGALORE M, BANERJEE D, ONOSAKA S, et al. Changes in the intracellular accumulation and distribution of metallothionein in rat liver and kidney during postnatal development [J]. *Dev Biol*, 1983, 97(1): 95-102.
- [8] 徐炳政, 张东杰, 王颖, 等. 金属硫蛋白及其重金属解毒功能研究进展[J]. *中国食品添加剂*(XU B Z, ZHANG D J, WANG Y, et al. Research advance on metallothionein and its heavy metal detoxification [J]. *China Food Additives*), 2014, 5: 171-5.
- [9] EIBL J K, ABDALLAH Z, ROSS G M. Zinc-metallothionein: a potential mediator of antioxidant defence mechanisms in response to dopamine-induced stress [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2010, 88(3): 305-12.
- [10] 薛燕, 李大铁. 金属硫蛋白在皮肤疾病中的研究进展[J]. *中国美容医学*(XUE Y, LI D T. Advances of metallothionein in skin diseases [J]. *Chinese Journal of Aesthetic Medicine*), 2013, 22(17): 1823-6.
- [11] PULA B, TAZBIERSKI T, ZAMIRSKA A, et al. Metallothionein 3 expression in normal skin and malignant skin lesions [J]. *Pathol Oncol Res*, 2015, 21(1): 187-93.
- [12] PERERA N C N, GODAHEWA G I, LEE J. Copper-zinc-superoxide dismutase (CuZnSOD), an antioxidant gene from seahorse (*Hippocampus abdominalis*); molecular cloning, sequence characterization, antioxidant activity and potential peroxidation function of its recombinant protein [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2016, 57: 386-99.
- [13] 甘俊英, 秦建新, 原海亮, 等. 重组人金属硫蛋白-III α 短肽毒性效应的初步研究[J]. *生态毒理学报*(GAN J Y, QIN J X, YUAN H L, et al. Preliminary study on toxic effects of recombinant human metallothionein III- α peptide [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*), 2021, 16(2): 227-34.
- [14] 邓川, 张玮玮, 燕艳, 等. 毛细管电泳法测定化妆品中的金属硫蛋白[J]. *实验技术与管理*(DENG C, ZHANG Y W, YAN Y, et al. Determination of metallothionein in cosmetics by capillary electrophoresis [J]. *Experimental Technology and Management*), 2012, 29(11): 41-3,9.
- [15] JIANG B W, ZHANG W J, WANG Y, et al. Convallatoxin induces HaCaT cell necroptosis and ameliorates skin lesions in psoriasis-like mouse models [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 121: 109615.
- [16] XU M, HALIMU G, ZHANG Q, et al. Internalization and toxicity: a preliminary study of effects of nanoplastic particles on human lung epithelial cell [J]. *Sci Total Environ*, 2019, 694: 133794.
- [17] HUNT P R. The *C. elegans* model in toxicity testing [J]. *J Appl Toxicol*, 2016, 37(1): 50-9.
- [18] 路颖慧, 康念欣, 袁炎炎, 等. 黄连-吴茱萸不同比例配伍水提物对线虫的毒性效应评价[J]. *世界中医药*(LU Y H, KANG N X, YUAN Y Y, et al. Evaluation of the toxic effects of different proportions of coptidis rhizoma and tetradium ruticarpum extracts on caenorhabditis elegans [J]. *World Chinese Medicine*), 2021, 16(24): 1-14.
- [19] 苗祥贞, 张潇, 袁炎炎, 等. 黄连水提物对秀丽隐杆线虫毒性效应评价[J]. *中草药*(MIAO X Z, ZHANG X, YUAN Y Y, et al. Toxicity evaluation of water extracts of Coptidis Rhizoma on Caenorhabditis elegans [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*), 2018, 49(4): 874-8.
- [20] 樊威, 焦晓磊, 苏建, 等. 金属硫蛋白调控及重金属解毒功能研究进展[J]. *农业与技术*(FAN W, JIAO X L, SU J, et al. Advances of metallothionein regulation and heavy metal detoxification functions [J]. *Agriculture and Technology*), 2020, 40(1): 7-9.
- [21] RAUDENSKA M, DVORAKOVA V, PA CA L L, et al. Levels of heavy metals and their binding protein metallothionein in type 2 diabetics with kidney disease [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2017, doi: 10.1002/jbt.21891.
- [22] LI X, REN Z, CRABBE M J C, et al. Genetic modifications of metallothionein enhance the tolerance and bioaccumulation of heavy metals in *Escherichia coli* [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2021, 222: 112512.
- [23] TSANN-LONG H, HSIAO-YING C, TZU-TSUNG C, et al. The cytotoxicity of mercury chloride to the keratinocytes is associated with metallothionein expression [J]. *Biomed Rep*, 2013, 1(3): 379-82.
- [24] 于立博, 刘继文. 鹰嘴豆-金属硫蛋白拮抗小鼠骨髓干细胞铅毒性的机制[J]. *中国老年学杂志*(YU L B, LIU J W. Mechanism of chickpea metallothionein antagonizing lead toxicity of mouse bone marrow stem cells [J]. *Chinese Journal of Gerontology*),

- 2013, 33(23): 5930-1.
- [25] 甘俊英, 孙左义, 秦建新, 等. 重组人金属硫蛋白-III α 短肽对UVB致HaCaT细胞氧化损伤的缓解作用[J]. 生态毒理学报 (GAN J Y, SUN Z Y, QIN J X, et al. Allievation effects of recombinant human metallothionein III α peptide on oxidative damage of HaCaT cells induced by UVB [J]. Asian Journal of Ecotoxicology), 2021, 16(4): 240-9.
- [26] 甘俊英. 重组人金属硫蛋白III α 短肽一般毒性评价及功能研究[D]. 南京: 东南大学, 2020.
- [27] 于东宁, 覃凤均, 孙永华, 等. 锌-金属硫蛋白对大鼠皮肤烫伤创面的影响[J]. 中华整形烧伤外科杂志(YU F N, QIN F J, SUN Y H, et, al. Effects of metallothionein (MT) on burned skin of rats [J]. Chinese Journal of Burns), 1999, 2: 92-4.
- [28] 赵辛艳, 辛东玲, 李立, 等. 艾地苯联合金属硫蛋白美容效果的观察[J]. 现代养生(ZHAO X Y, XIN D L, LI L, et al. Observation on the cosmetic effect of aldebane combined with metallothionein [J]. Health Protection and Promotion), 2016, 12: 53.