



无机砷甲基化研究进展

宋晓丽^{*1} 耿志荣² 王志林^{*2}

(¹ 扬州大学化学化工学院, 扬州 225002)

(² 南京大学化学化工学院, 配位化学国家重点实验室, 南京 210093)

摘要: 砷是一种生物活性元素。长期接触砷会导致癌症、心脏病、糖尿病等疾病的发生。无机砷甲基化是砷在动物体内的主要代谢方式, 被公认为砷元素的解毒过程, 因此无机砷甲基化的研究引起了科学家们的广泛关注并取得了重要进展。本文综述了近年来国内外学者及作者研究组在“砷甲基化酶”, “无机砷甲基化机制”及“无机砷甲基化抑制”等方面的研究进展。

关键词: 无机砷; 砷甲基化酶; 无机砷甲基化机制; 硒/过渡金属离子抑制作用

中图分类号: O613.63 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-4861(2012)10-2025-11

Recent Research Progress in the Methylation of Inorganic Arsenic

SONG Xiao-Li^{*1} GENG Zhi-Rong² WANG Zhi-Lin^{*2}

(¹ School of Chemistry and Chemical Engineering, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225002, China)

(² The State Key Laboratory of Coordination Chemistry, School of Chemistry and Chemical Engineering, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

Abstract: Arsenic is a bioactive element. Throughout the world, millions of people are at risk of cancer, heart disease, and diabetes because of chronic arsenic exposure. The methylation of inorganic arsenic (iAs) attract abroad attention since it is the main metabolism pathway in mammals and has been commonly considered as a detoxification mechanism. This dissertation summarizes the recent research advancement of “arsenic (+3) methyltransferase”, “the mechanism of arsenite methylation” and “the inhibition of arsenite methylation”.

Key words: inorganic arsenic; arsenic (+3 oxidation) methyltransferase; mechanism of inorganic arsenic methylation; selenite/transition metal ions inhibition

0 引言

砷是普遍存在于自然界中的一种准金属元素, 在工农业生产中有广泛的应用^[1]。砷有黄、灰、黑褐 3 种同素异形体。自然界中主要存在于砷矿及稀有的砷铋矿和灰砷矿中。砷有不同的形态和价态分布, 主要分无机形态和有机形态。其中无机形态的砷(iAs)主要有砷氧化物、砷硫化物、亚砷酸盐、砷酸盐等, 主要存在于地壳、矿物及地下水等。有机形态的

砷主要有甲基砷化物(单甲基 MMA、双甲基 DMA、三甲基 TMA)、含硫甲基砷化物、胆碱砷、甜菜碱砷等。

砷几乎存在于人类生活的每一个环节, 图 1 描述了砷在自然界的循环过程^[2]。长期饮用暴露于 iAs 的污染水可导致心血管疾病、神经性行为障碍、皮肤癌、肝癌、肺癌、膀胱癌和肾癌等^[3-6]。流行病学对地方性砷污染的研究为慢性砷暴露引起的中毒提供了有力的证据^[7-10], 人体摄入砷后能够在体内引发

收稿日期: 2012-03-28。收修改稿日期: 2011-05-24。

国家自然科学基金(No.20535020, 21075064), 扬州大学科技创新培育基金(No.2011CXJ016)资助项目。

^{*}通讯联系人。E-mail: xlsong@yzu.edu.cn, wangzl@nju.edu.cn

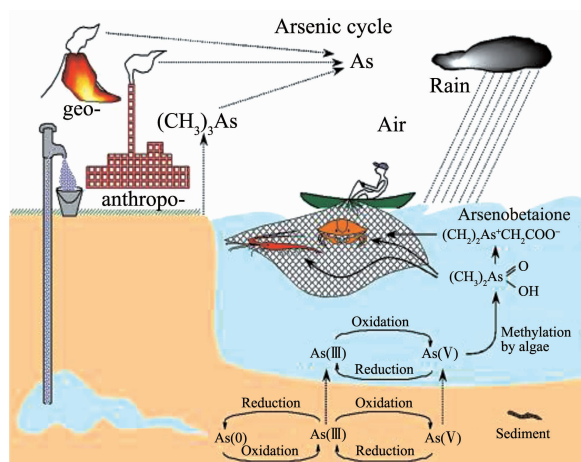


图 1 砷地理周期示意图

Fig.1 Global arsenic geocycle schematic

多种标志物(表 1)^[11],几乎涉及动物体的各个器官和组织。由于砷分布广泛及其强致癌性和毒性,已被公认为对人类健康产生重大潜在威胁的物质之一^[12],国际癌症研究机构于 1980 年将砷元素正式确认为人类致癌物。

近年来,由于人类活动对自然环境的破坏,特别是煤炭能源的大量无序开采,砷对环境的污染日趋严重,威胁着至少 22 个国家和地区的 5000 多万人口的健康。表 2 汇总了全球地下水中高砷地区的分布情况^[13],我国的台湾、新疆、山西等省区也包含在内。此外我国还有世界上独有的燃煤型砷污染。砷污染所导致的“地砷病”的发生已成为全世界共同面临的难题^[14-17]。

表 1 砷引发健康危害的易感性、效应及砷暴露的生物标志物

Table 1 Biomarkers of exposure, effect, and susceptibility of arsenic-induced health hazards

Category		Biomarkers
Exposure	Short-term (<1 year) internal dose	Arsenic in urine, blood, hair, and nail
	Long-term (many years) internal dose	Skin hyperpigmentation Palmoplantar hyperkeratosis
	Biologically effective dose	Monomethylarsonic acid in urine
Effect	Early biological effect	Reactive oxidants and anti-oxidant capability in blood
		Gene expression of inflammatory molecules in lymphocytes
		Sister chromatid exchanges in lymphocytes
		Micronuclei in lymphocytes
		Chromosome aberrations in lymphocytes
	Altered structures and functions	Carotid atherosclerosis QT prolongation and increased dispersion in EKG
		Chromosome loss and gain/Loss of heterozygosity p53 and ras gene mutations
Susceptibility	Acquired susceptibility	Serum carotene level
	Genetic susceptibility	Xenobiotic metabolism enzymes
		DNA repair enzymes
		Oxidative stress-related enzymes

表 2 地下水中砷自然水平升高的地区分布

Table 2 Regions of the world with naturally elevated levels of arsenic in groundwater

Country / region	Affected area / km ²	Potentially exposed population	Arsenic concentration / (μg·L ⁻¹)	Environmental conditions
Bangladesh	118 849	~3×10 ⁷	< 0.5~2500	Holocene alluvial/deltaic sediments; abundance of organic matter; strongly reducing, neutral pH, high alkalinity, slow ground water flow rates
India/West Bengal Viet Nam	38 865	6×10 ⁶	<10~3 200	Same as Bangladesh Pleistocene and Holocene sediments; strongly reducing conditions
China/Taiwan	4 000	~10 ⁵	10~1 820	Coastal zones, sediments, including black shales; strongly reducing, artesian conditions, some groundwaters contain humic acids
China/Xinjiang, Shanxi	38 000	~500	40~750	Holocene alluvial plain; reducing

续表 1

Thailand	100	1.5×10^4	<1~5 000	Dredge quarternary alluvium; oxidation of disseminated arsenopyrite due to mining
Mongolia/Inner Mongolia	4 300	$\sim 10^5$	<1~2 400	Holocene alluvial and lacustrine sediments; strongly reducing, neutral pH, high alkalinity, some groundwaters contain humic acids
Argentina/Chaco-Pampean Plain	1×10^6	2×10^6	<1~7 550	Holocene and earlier loess with rhyolitic volcanic ash; oxidizing, neutral to high pH, high alkalinity; groundwaters often saline
Northern Chile/Antofagasta	35 000	5×10^5	100~1000	Quaternary volcanogenic sediments; generally oxidizing, arid conditions, high salinity
Bolivia		5×10^4		Same as Argentina and Northern Chile
Mexico	32 000	4×10^5	8~620	Volcanic sediments; oxidizing, neutral to high pH
Germany/Bavaria	2 500		<10~150	Mineralized sandstone
Greece		1.5×10^5		Mineralization; thermal springs; mining
Spain		$>5 \times 10^4$	<1~100	Mineralization; alluvial sediments
Hungary, Romania/Danube Basin	110 000	4×10^5		Quaternary alluvial plain; reducing conditions, some high in humic acid
Ghana		$<1 \times 10^5$	<1~175	Sulfide mineralization, particularly arsenopyrite; gold mining
Canada/Moira Lake, Ontario	100		50~3 000	Mine tailing; ore mining
Canada/British Columbia	50		0.5~580	Sulfide mineralization in volcanic rocks; neutral to high pH groundwater
USA/Arizona	200 000		<1 300	Alluvial basins, some evaporites; oxidizing, high pH
USA/California	5 000		<1~2 600	Holocene and older basin-fill sediments; internally drained basin, mixed redox conditions, high salinity
USA/Nevada	1 300		<2 600	Holocene mixed aeolian, alluvial and lacustrine sediments; mainly reducing, some high pH, some with high salinity due to evaporation

iAs 甲基化是砷在动物体内的主要代谢方式,被公认为砷元素的解毒过程,因此 iAs 甲基化的研究引起了科学家们的广泛关注并取得了重要进展。本文结合本课题组多年来的研究工作及国内外学者在 iAs 甲基化方面的研究进展,尤其是“砷甲基化酶”,“iAs 甲基化机制”及“iAs 甲基化抑制”等方面的研究作一综述。

1 无机砷生物体代谢

iAs 甲基化的发现开始于 19 世纪关于微生物

的研究^[18]。此后,Braman 和 Foreback 等^[19]在人尿液中发现了 iAs, MMA 及 DMA;Crecelius 等^[20]第一次证实在饮用含砷(iAs^{III}或者 iAs^V)水和酒的志愿者的尿液中也发现了这些砷化物的存在,表明在人体内也存在 iAs 的甲基化代谢过程。

iAs 进入生物体后经过多步代谢与转化,最终生成多种具有生物活性的物种,其机体毒性也涉及到生物体的多个生命活动过程(图 2),如干扰信号转导,抑制酶的活性等^[21]。目前对于哺乳动物中 iAs 的甲基化代谢过程主要有以下推论(图 3)^[20,22-24]:(1) 三

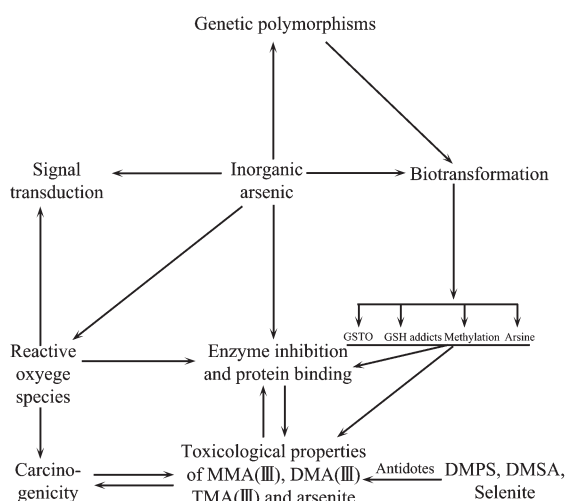
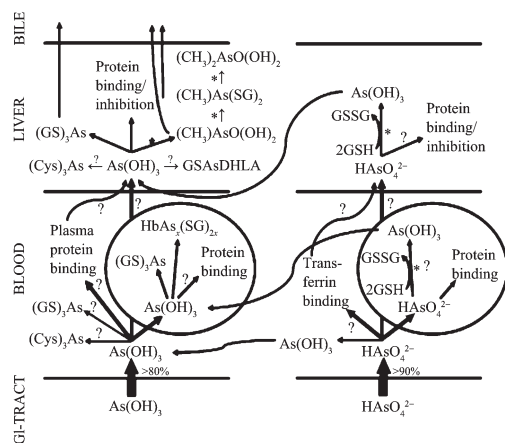


图 2 砷的生物转化及毒性

Fig.2 Arsenic biotransformation and toxicity



Oval shape: erythrocyte; CySH: L-cysteine; GSH: L-glutathione;
SSG: Oxidized L-glutathione; DHLA: dihydrolipoic acid;
Asterisk indicates enzymatically mediated biotransformation

图 3 三价砷和五价砷在哺乳动物中的代谢示意图

Fig.3 Schematic illustration of the mammalian metabolism of iAs^{III} and iAs^V

价无机砷(iAs^{III})首先经胃肠消化系统进入血液,运送至肝脏进行代谢,形成砷甲基化物;同时由于 iAs^{III} 与硫醇的高亲和力,也会与血液及肝脏中内在的谷胱甘肽(GSH)和半胱氨酸(CySH)生成化合物,如 $(GS)_3As$ ^[25-27]和 $(Cys)_3As$ ^[28],最终通过尿液排出体外。(2) 五价无机砷(iAs^V)进入哺乳动物体内之后,可能首先在 GSH/CySH^[29-30]或五价砷还原酶^[31-32]作用下转化成 iAs^{III} ,然后进行代谢;此外在肝脏内, iAs^V 也可以被亚细胞所吸收^[33]且能够破坏肝脏中氧化磷酸化作用^[34-35]从而表现出与 iAs^{III} 不同的分子毒性机制^[36]。大量充分的实验数据表明 iAs 的甲基化代谢过程包含多步反应,然而,目前关于该过程的更多细节仍

然不明确^[21],仅仅确定了参与该过程的生物酶,砷甲基化酶AS3MT。

2 砷甲基化酶

AS3MT 的基因组之间具有同源性和多形态性。表 3 列举的是几种不同物种之间 AS3MT 的多序列比对情况。如表 3 所示 AS3MT 存在同源性及多形态性。除 Chimpanzee 外,其它物种中 AS3MT 的序列长度都在 348~382 个氨基酸之间。AS3MT 都含有多个 Cys 残基,其中 5 个 Cys 残基绝对保守。以 Human (Homo sapiens)-AS3MT 375 个氨基酸为例,5 个保守 Cys 残基分别是 Cys32、Cys61、Cys85、Cys156 和 Cys206。另外,AS3MT 序列中含有 3 个与其它甲硫氨酸(SAM)依赖的甲基化酶相同的序列基元^[37],SAM 与这些保守序列基元之间的相互作用是甲基转移的关键^[38]。基元 I 为(V/I/L)(L/V)(D/I)LG(G/C)G(T/P)G,在 AS3MT 中,序列为(I/V/L)LDLGSGSG;基元 II 在离基元 I-C 端方向 65 个氨基酸处,序列为((P/G)(Q/T)(F/Y/A)DA(I/V/Y)(F/I)(C/V/L),AS3MT 中基元 II 的序列为(E/N/T)(S/A)(Y/H/M/F)DI(V/I)(I/V)S;基元 III 的序列为(LL(R/K)PGG(R/I/L)(L/I)(L/F/I/V)(I/L),AS3MT 中基元 III 在离基元 II-C 端方向 20 个氨基酸处,序列为 VL(K/N)(H/Y/E/P/D)GGE(L/M/F)YF。

由于 AS3MT 的多形态性,不同物种中 iAs 甲基化代谢的能力和类型也千差万别。如 Chimpanzee 不能进行 iAs 的甲基化代谢^[39]。这与 Chimpanzee(Pan troglodytes)-AS3MT 缺失整个 C 端序列且缺少一个保守 Cys 残基,Cys206 有关。另外,同一物种不同个体之间 AS3MT 也存在遗传多形态性。Weinshilboum 等曾经研究了 hAS3MT 的遗传药理学,同时研究了自然样本中存在的 hAS3MT 单点突变体酶的活性。结果发现突变体酶 T306I 几乎完全失去活性, R173W 的活性是野生型 (WT) hAS3MT 的 $31\% \pm 2.6\%$,而 M287T 是 WT hAS3MT 活性的 $350\% \pm 89\%$ ^[40]。Styblo 等也报道人肝细胞催化的 iAs 甲基化存在个体差异,分析不同个体的 hAS3MT 基因发现是由于 287 位蛋氨酸(Met)突变成了苏氨酸(Thr)所致^[41]。

与其他氨基酸残基相比,Cys 残基在许多蛋白中高度保守,并在蛋白的结构和活性中扮演着重要的角色,如作为酶活性位点;调节蛋白功能和确定蛋白的细胞定位;CysCys 对可以稳定蛋白的结构等^[42-44]。因此,AS3MT 中众多保守 Cys 残基,必然与其功能存在关系。Fomenko 等通过高通量筛选具有

表 3 人类 AS3MT 和 8 种动物 AS3MT 的同源性多序列比对

Table 3 Multiple-sequence alignments of human AS3MT and eight animal homologues

[illegible]

Underlined sequence is UbiE methyltransferase domain. The sequences of seven species were from NCBI GenBank (accession numbers are given in parentheses following species names): *Homo sapiens* (Q9HBK9); *Pan troglodytes* (XP_508007); *Bos taurus* (NP_001030195); *Rattus norvegicus* (NP_543166); *Mus musculus* (AAH13468); *Gallus gallus* (XP_421735); *Strongyloides* *purpuratus* (XP_784275). The partial sequences of another two species were from TIGR Gene Index Databases by querying human AS3MT cDNA with TBLASTX program: Rainbow trout (TC70487); *Ciona intestinalis* (TC65300). The missed potential residues in the N-termini are indicated with question marks (?).

氧化还原活性 Cys 残基和定点突变的方法确认 Cys157 和 Cys207 为重组 Mouse-AS3MT 的活性位点。在 Mouse-AS3MT 结构模型中, Cys157 和 Cys207 暴露在蛋白质表面且位于 β -pleated sheet 之中 (图 4), 通过模型拓扑结构推测在催化循环过程中 Cys157 和 Cys207 形成了分子内二硫键^[45]。Li 等通过定点突变的方法对 Rat-AS3MT 中 N 端几个保守 Cys 残基(Cys32、Cys61、Cys85、Cys156)的作用进行了研究, 结果发现 C156S 完全失去活性^[43]。研究发现 AS3MT-C 端对酶的结构有重要作用考虑到 AS3MT-C 端具有多个 Cys 残基且 Cys 残基具有稳定酶结构的作用, 本课题组通过定点突变的方法对 hAS3MT 中多个保守 Cys 残基(72、156、206、226、250、271、375)及其特有 Cys 残基(334、360)进行了研究。结果发现 C156S、C206S、C72S 及 C250S 都失去了活性。根据蛋白质同源性推测 Cys156 和 Cys206 是 hAS3MT 的活性位点; 通过酶二级结构研究推测 Cys250 可能与 Cys72 形成了二硫键, 在维持 hAS3MT 空间结构方面起着关键的作用; 而 Cys226、Cys271、Cys375 的突变几乎不影响酶的结构与活性, Cys334、Cys360 对于 hAS3MT 有一定的影响, 可能形成了比较重要的氢键能够在一定程度上影响酶的活性与结构^[46-47]。

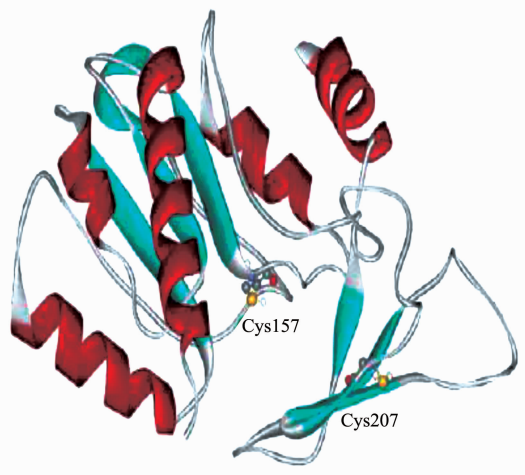


图 4 大鼠砷甲基化酶的结构模型

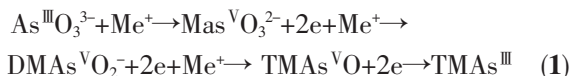
Fig.4 Structural model of Mouse-AS3MT Cys207 and Cys157 are shown as ball-and-stick models

3 无机砷甲基化机制

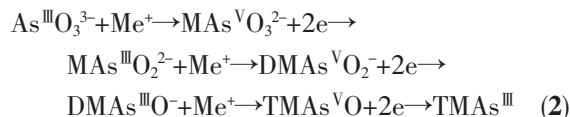
iAs 甲基化被认为是砷元素的解毒过程^[48-49]。尽管近年来研究发现+3 价砷甲基化物比 iAs 具有更高的生物活性与毒性^[50-54], 但这取决于 iAs 甲基化利害效应的平衡; iAs 甲基化过程中产生的某种代谢

物很可能是正常细胞所必需的。因此无机砷甲基化及其机制的研究具有重要的意义。

目前 AS3MT 催化 iAs 甲基化机制有两种模型。第一个模型是基于 20 世纪前半期 Frederick 课题组的研究工作而提出的^[55-56]。该模型认为: iAs 的甲基化过程是三价砷化物的氧化甲基化与五价砷化物的还原交替进行的, 三价砷甲基化物是反应的中间产物。William Cullen 将这个方案总结为(1)^[57]:

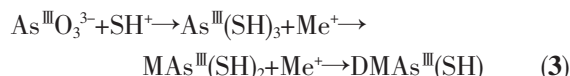


在此模型中, iAs 经过催化依次生成 MMA $\rightarrow$ DMA $\rightarrow$ TMA。然而在此模型中甲基供体(Me^+)和还原剂的来源并没有提及。随着研究的深入, 更详细的反应机制得以确定(2); 认为氧化甲基化的底物含有三价砷, 五价砷化物的还原在氧化甲基化之前:



然而在此模型中甲基供体(Me^+)与还原剂的来源仍然没有涉及。

Hayakawa 等经过研究对于 iAs 的甲基化机制提出了不同的看法^[58], 拟定了第二个模型(3):



此模型中认为, iAs 必须以含硫砷化物的形式作为底物才能进行甲基化代谢, 且进行连续的甲基转移反应, 中间不涉及价态的变化。

进一步的研究丰富了 iAs 甲基化机制(图 5)。A、B 模型分别是基于 Cullen^[57]和 Hayakawa^[58]的研究工作提出的。在两个模型中, 最终都确定内源性 SAM

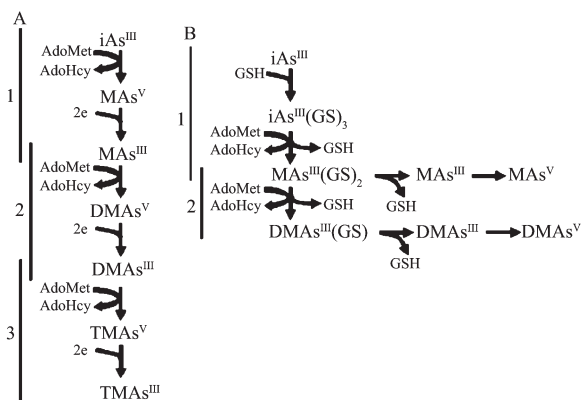


图 5 AS3MT 催化的无机砷甲基化模型

Fig.5 Conceptual models for methylation of inorganic arsenic catalyzed by AS3MT

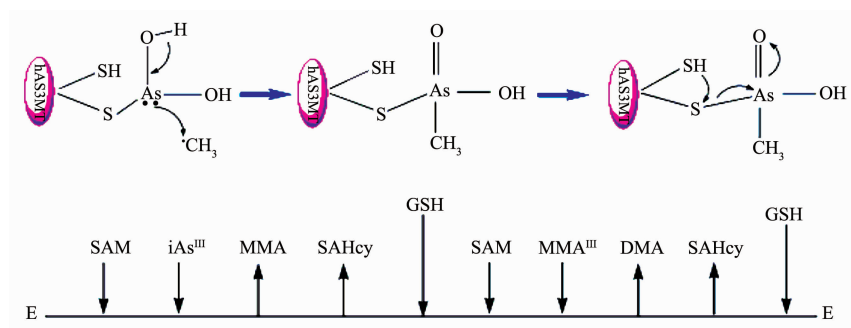


图 6 hAS3MT 催化的无机砷甲基化机制路线图

Fig.6 Scheme depicting the hypothetical mechanism for methylation of iAs^{III} by hAS3MT

是 iAs 甲基化过程中的甲基供体。A 模型中,包含 3 个连续的反应:三价砷化物氧化甲基化接连五价砷化物还原反应,然而将五价砷化物还原成三价砷化物的还原剂来源没有指定;各步反应是由共有的代谢物(MMA^{III} 和 DMA^{III})连接的,这些代谢物既是上一步反应的产物也是下一步反应的底物。B 模型中, iAs 以三谷胱甘肽三价砷化物($((GS)_3As)$ 作为底物进行连续的甲基化反应,不涉及价态变化;同样的,两步之间以前一步的产物作为后一步的底物重叠连接在一起;然而可能存在的第三步甲基化反应在 B 模型中没有提及。

Hayakawa 等提出的 iAs 甲基化机制更合理。他的创新点在于 MMA^{III} 和 DMA^{III} 来自于谷胱甘肽砷甲基化物的分解, +3 价砷化物的形成要先于 +5 价砷化物; MMA^V 和 DMA^V 是最终产物而不是中间产物,这与 DMA^V 是存在于动物尿液中的最终代谢物相一致。然而在 Cullen 所提出的模型中, MMA^V 、 DMA^V 是中间产物^[57]。虽然 Hayakawa 所提出的机制比较新颖,但仍存在以下争论:新的中间产物的结构(尤其是谷胱甘肽砷化物)没有经过可信的实验进行证实,仅用色谱保留时间并不能作为有力证据。

由于两个模型所持观点截然相反,因此不同领域的学者投入到该课题的研究中。目前关于 iAs 甲基化机制的研究主要分为动物体内实验和体外实验两大类。其中动物体外实验包括动物组织匀浆^[59]、动物细胞^[60-62]、部分纯化及完全纯化的酶^[63-64]和重组 AS3MT^[57-58,65]等。动物实验所涉及到的哺乳动物常包含 Rat、Rabbit、Hamster、Mouse 等^[66-69]。不同研究体系所涉及的研究内容也不同,比如动物体代谢动力学、细胞代谢动力学、提纯酶及重组酶催化动力学、中间产物的寻找与证实、含硫砷甲基化物的发现、不同影响因素的研究、砷形态分析测试方法的建立等。最近另有研究膜传递蛋白与 iAs 甲基化代谢关

系的报道^[70]。这些研究对于更详细地诠释 iAs 的甲基化机制起到了推动作用。然而由于各研究体系的差异,无法进行有效的比较和归纳。此外采用组织粗提物、部分提纯的酶等进行实验研究酶的机制往往会导致错误的结果。在此基础上,本课题组采用纯化的重组 hAS3MT,进一步研究了 iAs 的甲基化机制(图 6)^[71],结果表明 iAs^{III} 、SAM 与 hAS3MT 的结合是有序的机制, SAM 与 hAS3MT 的结合先于底物 iAs^{III} 。 iAs^{III} 的甲基化过程遵循连续甲基化机制,中间过程没有价态的变化,这与 Hayakawa 所提出的机制一致,不同的是 iAs 不需要以砷-硫化合物的形式作为底物。GSH 在甲基化反应结束之后与 hAS3MT 结合,还原 hAS3MT 活性位点在催化过程中形成的二硫键从而恢复 hAS3MT 的活性状态。

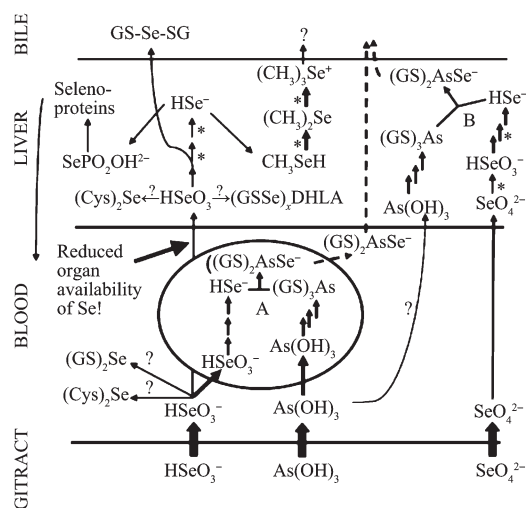
4 无机砷甲基化抑制

4.1 硒/砷拮抗作用

硒和砷具有相似的化学性质,两者的代谢过程也具有共同的特征:(1) 砷和硒都被还原成更低的氧化态^[25,32,72-74];(2) 催化两者甲基化代谢的酶都严格依赖于 SAM;(3) 两者都在酶的催化下依次转化成单甲基、双甲基及三甲基衍生物^[63-64,72,75-76]。研究发现砷和硒之间存在相互作用(图 7),两者互为拮抗剂。如在同时暴露于 iAs^{III} 和 Se^{IV} 的 Rat 肝脏细胞中, iAs 在细胞中的累积增加, iAs^{III} 的甲基化代谢受到抑制且细胞毒性增加^[77];类似地, iAs 可以抑制无机硒的毒性作用^[78-79]而增强甲基化硒的毒性作用^[80]。

4.2 硒/砷拮抗作用机制的研究

随着研究的深入,砷/硒两种元素的拮抗作用机制越来越受到关注。早期研究发现无论是口服还是皮下注射, iAs^{III} 都能够抑制 Se^{IV} 对 Rat 的毒性作用^[81],说明两者之间的拮抗作用不是源于彼此吸收的相互抑制。Levander 等报道 iAs^{III} 能够增加 Se^{IV} 从



Oval shape: erythrocyte; CySH: L-cysteine; GSH: lglutathione; DHLA: dihydrolipoic acid; Asterisk indicates enzymatically mediated biotransform

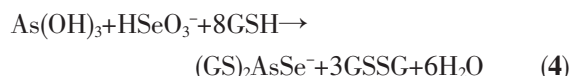
图 7 砷和硒在红细胞(A)和肝脏(B)中的相互作用

Fig.7 Interaction between As^{III} and Se^{IV} in erythrocytes

(A) and between As^{III} and Se^{IV} in the liver (B)

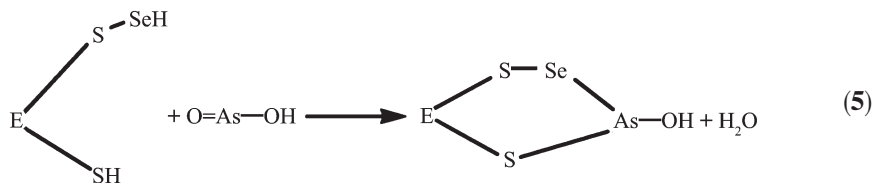
胆汁到胃肠道的排泄量^[79,82-83]。同样地,Se^{IV}也能促进 iAs^{III}从胆汁到胃肠道系统的排泄^[84-86]。由此推测在肝脏中存在 As-Se 化合物且该化合物通过胆汁进行排泄^[78-79,87]。进一步研究发现 iAs^{III}能够抑制 GSH 还原 Se^{IV}转化成 H₂Se^[88]。由此推测两者拮抗作用机制:iAs

很可能与 Se^{IV}还原反应的中间物之间按一定的化学计量比例进行反应生成了 As-Se 化合物^[89]。Gailer 等系统研究了等物质的量的 iAs^{III}、Se^{IV}在不同浓度 GSH 存在条件下溶液中的反应情况,最终推测整个反应如 Eq.(4)所示^[90]:



Jurgen 等通过排阻色谱法和放射性检测 H⁷⁵SeO₃ 和(或)⁷³As(OH)₃ 溶液,进一步证实了在 iAs^{III}、Se^{IV}及过量 GSH 同时存在情况下,会生成一种 As-Se 化合物^[89]并通过 As 及 Se 的 K-edge (EXAFS)分析确证了 As-Se 化合物为(GS)₂AsSe⁻。随后大量的动物实验表明体内能够生成(GS)₂AsSe⁻,该化合物通过胆汁排泄^[91],红细胞是形成(GS)₂AsSe⁻化合物的主要场所^[92]。

然而 Levander 课题组研究发现砷能够抑制硒对 GSH 诱导的 Rat 肝脏肿大处线粒体的刺激作用^[93]。然而在纯化学体系中,砷几乎不抑制硒催化的 GSH 对细胞色素 c 的还原作用,这说明砷与线粒体体系中特有的配体基团发生了反应,这个特殊的基团很可能是硒过硫化物与蛋白或者硫醇中的巯基形成的复合物^[94]。因此,Levander 等认为拮抗作用的机制可能是抑制复合物的生成(5):



Zakharyan 等也认为 Se^{IV}对酶活性的抑制源自 Se^{IV}与酶活性中心巯基的结合。MALDI-TOF-MS 分析表明 Se^{IV}可以结合到谷胱甘肽转移酶中 Cys 残基与 GSH 形成的二硫键之间^[95]。

4.3 抑制无机砷甲基化的其他物质

除了硒以外,另有多种物质对 iAs 的甲基化代谢具有抑制作用。如 Konings 等报道在 Rat 肝脏细胞液中,iAs^{III}甲基化能够被 SbCl₃ 完全抑制^[96];Gebel 等报道在 V79 细胞中,Sb^{III}可以抑制 iAs^{III}诱导的染色体突变^[97];此外 Sb^{III}能够完全抑制短帚霉中 iAs^{III}的甲基化^[98];Hg^{II}能够抑制 Rat 肝脏匀浆催化的 iAs^{III}甲基化^[99]。另有一些药物,如氨苄青霉素、钼酸钠、磺酸溴乙烷、莫能菌素及拉沙里菌素也都能够抑制甲烷古菌、硫酸盐还原菌和一般菌类中 iAs 甲基化^[100]。

4.4 过渡金属微量元素对无机砷甲基化的影响

人体中至少需要 9 种微量元素(Fe、Zn、Cu、Mn、I、Cr、Se、Mo、Co)维持正常生理活动的需要。这些微量元素分布在人体各个器官中起着多种作用,如催化、支撑蛋白酶的结构、调节蛋白酶的活性等。在一些动物体中,其中的一些微量元素也会被甲基化(表 4)^[101]。

Frankenberger 和 Arshad 等发现青霉菌中微量元素能够影响 iAs^{III}的甲基化代谢^[102]。在动物体内,依赖于 SAM 的甲基化过程往往受到体内矿物、维生素 B₁₂ 及叶酸等状况的影响。因此研究必需微量过渡金属对 iAs^{III}甲基化的影响有重要的意义。Kimpfe 等研究了 Rabbit 肝脏细胞液中必需过渡金属离子对 iAs^{III}甲基化的影响^[103]。推测这些微量元素对 iAs^{III}甲基化的影响可能归因于它们与 AS3MT 的

表 4 不同类型器官进行的元素甲基化
Table 4 Element biomethylation by type of organism^a

Periodic group number								
9	10	11	12	13	14	15	16	17
				Al	Si	P	S	Cl
				NR	NR	1	1-4	2,3
Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br
1-4	1	NR	NR	NR	1(?)	1-4	1-4	2,3
			Cd	In	Sn	Sb	Te	I
			1(?)	NR	1,2	1,2	1,2,4	1-3
			Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At
			1	1	1,2(?)	1	1,2	NR

^a Methylation and classes of organisms; (1) bacteria; (2) fungi/algae/yeast; (3) plants; (4) animals. NR: biomethylation not reported.

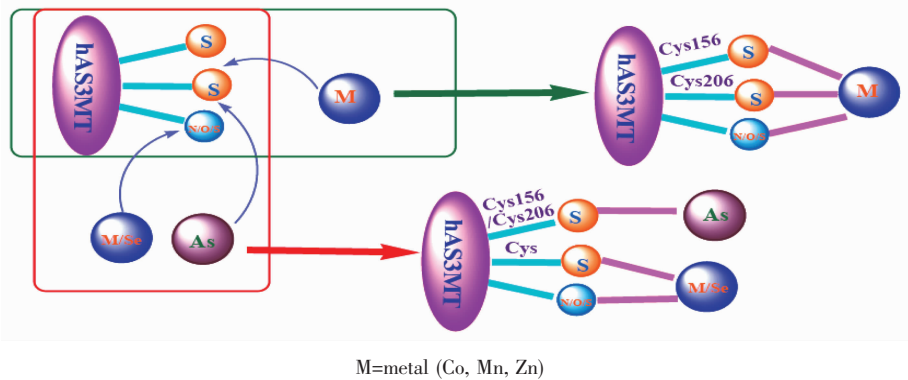


图 8 过渡金属离子及硒与 hAS3MT 的可能作用方式
Fig.8 Possible interaction modes of transition metal ions/selenite with hAS3MT

结合作用^[102]。

在此基础上,本课题组利用重组 hAS3MT 探讨 Se^{IV}对 iAs^{III}甲基化的抑制作用,发现 Se^{IV}对 iAs^{III}甲基化的抑制作用与 Se^{IV}和 hAS3MT 的结合有关^[65]。由于 iAs 能够引起肝癌、溶血、脊髓压迫、血管增厚等疾病。因此本课题组选择分别在上述器官或组织中相对含量较高的 Co、Zn、Mn、Fe 等金属元素研究其对 hAS3MT 催化的 iAs^{III}甲基化影响及作用机制。结果发现,上述金属元素都能够抑制 iAs^{III}甲基化,这种抑制作用一方面是由于金属离子与 hAS3MT 结合,另一方面金属离子很可能催化了 hAS3MT 中二硫键的生成(图 8)^[104]。

5 研究展望

长期以来,人们在砷代谢等领域做了大量的研究工作,尤其是砷的甲基化一直是科学家关注的热点。随着研究的深入,iAs 甲基化代谢过程中的一些问题逐渐得以解决和明确。然而仍有很多方面需要

探讨和研究:(1) AS3MT 已被确证为生物体内催化 iAs 甲基化的生物酶;AS3MT 如何参与这个过程需进一步探索,为更详实地研究 iAs 甲基化机制提供依据。(2) 目前关于 AS3MT 催化的 iAs 甲基化机制的模型比较笼统。捕捉重要的中间代谢物,为进一步绘制详细的机制路线图提供指导。(3) 在研究 iAs 甲基化机制的基础上,进一步探讨该过程的抑制对于了解砷中毒及砷解毒具有重要的意义。

参考文献:

[1] Bhattacharjee H, Rosen B P. *Microbiology of Heavy Metals*. Heidelberg/New York: Springer-Verlag, **2007**:371-406
[2] Mukhopadhyay R, Rosen B P, Phung L T, et al. *FEMS Microbiology Reviews*, **2002**,**26**:311-325
[3] Tchounwou P B, Centeno J A, Patlolla A K. *Mol. Cell. Biochem.*, **2004**,**25**:547-555
[4] Chen C J, Chen C W, Wu M M, et al. *Br. J. Cancer*, **1992**, **66**:888-892

- [5] Bates M N, Smith A H, Hopenhaynrich C. *Am. J. Epidemiol.*, **1992**,**135**:462-476
- [6] Smith A H, Hopenhaynrich C, Bates M N, et al. *Environ. Health Perspect.*, **1992**,**97**:259-267
- [7] National Research Council. *Arsenic in the Drinking Water*. Washington D. C.: National Academy Press, **1999**.
- [8] National Research Council. *Arsenic in the Drinking Water (Update)*. Washington D. C.: National Academy Press, **2001**.
- [9] Chen C J, Chuang Y C, Lin T M, et al. *Cancer Res.*, **1985**, **45**:5895-5899
- [10] Smith A H, Goycolea M, Haque R, et al. *Am. J. Epidemiol.*, **1998**,**147**:660-669
- [11] Chen C J, Hsu L I, Wang C H. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **2005**,**206**:198-206
- [12] Rosen B P, Liu Z J. *Environment. International*, **2008**,**35**: 512-515
- [13] International Agency for Research on Cancer. *Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk to Humans*, Lyon: IARC, **2004**,**84**:39-267
- [14] Sun G F. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **2004**,**198**:268-271
- [15] Chowdhury T R, Basu G K, Mandal B K, et al. *Nature*, **1999**,**401**:545-547
- [16] Stokstad E. *Science*, **2002**,**298**:1535-1537
- [17] Islam F S, Gault A G, Boothman C, et al. *Nature*, **2004**,**430**: 68-71
- [18] Cullen W R, Bentley R. *J. Environ. Monit.*, **2005**,**7**:11-15
- [19] Braman R S, Foreback C C. *Science*, **1973**,**182**:1247-1249
- [20] Crecelius E A. *Environ. Health Perspect.*, **1977**,**19**:147-150
- [21] Aposhian H V, Aposhian M M. *Chem. Res. Toxicol.*, **2006**, **19**:1-15
- [22] Buchet J P, Lauwerys R, Roels H. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, **1981**,**48**:71-79
- [23] Rowland I R, Davies M J. *J. Appl. Toxicol.*, **1982**,**2**:294-299
- [24] Vahter M. *Metabolism of arsenic: Vol B*. Fowler A Ed., New York: Elsevier Science Publishers, **1983**:171-198
- [25] Scott N, Hatlelid K M, MacKenzie N E, et al. *Chem. Res. Toxicol.*, **1993**,**6**:102-106
- [26] Burford N, Eelman M D, Groom K. *J. Inorg. Biochem.*, **2005**, **99**:1992-1997
- [27] Raab A, Meharg A A, Jaspars M, et al. *J. Anal. Atom. Spectrom.*, **2004**,**19**:183-190
- [28] Serves S V, Charalambidis Y C, Sotiropoulos D, et al. *Phosphorus Sulfur Silicon*, **1995**,**105**:109-116
- [29] Carter D E. *Environ. Health Perspect.*, **1995**,**103**:77-80
- [30] Uthe J F, Reinke J. *Environ. Lett.*, **1975**,**10**:83-88
- [31] Radabaugh T R, Aposhian H V. *Chem. Res. Toxicol.*, **2000**, **13**:26-30
- [32] Radabaugh T R, Sampayo-Reyes A, Zakharyan R A, et al. *Chem. Res. Toxicol.*, **2002**,**15**:692-698
- [33] Vahter M, Marafante E. *Biol. Trace Elem. Res.*, **1989**,**21**: 233-239
- [34] Chan T L, Thomas B R, Wadkins C L. *J. Biol. Chem.*, **1969**, **244**:2883-2890
- [35] Dixon H B F. *Adv. Inorg. Chem.*, **1997**,**44**:191-227
- [36] Webb J L. *Enzyme and Metabolic Inhibitors*. Webb J L Ed., London: Academic Press, **1966**:595-819
- [37] Kagan R M, Clarke S. *Arch. Biochem. Biophys.*, **1994**,**310**: 417-427
- [38] Kozbial P Z, Mushegian A R. *BMC Struct. Biol.*, **2005**,**5**:19
- [39] Vahter M, Couch R, Nermell B, et al. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **1995**,**133**:262-268
- [40] Wood T C, Salavagionne O E, Mukherjee B, et al. *J. Biol. Chem.*, **2006**,**281**:7364-7373
- [41] Drobná Z, Waters S B, Walton F S, et al. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **2004**,**20**:1166-1177
- [42] Fomenko D E, Xing W, Adair B M, et al. *Science*, **2007**, **315**:387-389
- [43] Li J X, Waters S B, Drobná Z, et al. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **2005**,**20**:4164-4169
- [44] Beeby M, O'Connor B D, Ryttersgaard C, et al. *PLoS Biol.*, **2005**,**3**:1549-1558
- [45] Fomenko D E, Xing W, Adair B M, et al. *Science*, **2007**,**31**: 5387-5389
- [46] Song X L, Geng Z R, Zhu J S, et al. *Chem.-Biol. Interact.*, **2009**,**179**:321-328
- [47] Song X L, Geng Z R, Li X L, et al. *Biochimie*, **2011**,**93**:369-375
- [48] Buchet J P, Lauwerys R, Roels H, et al. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, **1981**,**48**:71-79
- [49] Gebel T W. *Int. J. Hyg. Environ. Health*, **2002**,**205**:505-508
- [50] Mass M J, Tennant A, Roop B C, et al. *Chem. Res. Toxicol.*, **2001**,**14**:355-361
- [51] Schwerdtle T, Walter I, Mackiw I, et al. *Carcinogenesis*, **2003**,**24**:967-974
- [52] Nesnow S, Roop B C, Lambert G, et al. *Chem. Res. Toxicol.*, **2002**,**121**:627-1634
- [53] Thomas D J, Styblo M, Lin S. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **2001**,**17**:6127-6144
- [54] Styblo M, DelRazo L M, Vega L, et al. *Arch. Toxicol.*, **2000**, **74**:289-299
- [55] Challenger F. *Chem. Rev.*, **1945**,**36**:315-361
- [56] Challenger F. *Adv. Enzymol.*, **1951**,**12**:429-491
- [57] Cullen W R, McBride B C, Reglinski J. *J. Inorg. Biochem.*, **1984**,**21**:45-60
- [58] Hayakawa T, Kobayashi Y, Cui X, et al. *Arch. Toxicol.*, **2005**,**79**:183-191

- [59]Styblo M, Delnomdedieu M, Thomas D J. *Chem.-Biol. Interact.*, **1996**,**99**:147-164
- [60]Kedderis G L, Elmore A R, Crecelius E A, et al. *Chem.-Biol. Interact.*, **2006**,**16**:1139-1145
- [61]Walton F S, Waters S B, Jolley S L, et al. *Chem. Res. Toxicol.*, **2003**,**16**:261-265
- [62]Drobna Z, Walton F S, Harmon A W, et al. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **2010**,**245**:47-56
- [63]Lin S, Shi Q, Nix F B, et al. *J. Biol. Chem.*, **2002**,**27**:710795-710803
- [64]Zakharyan R, Wu Y, Bogdan G M, et al. *Chem. Res. Toxicol.*, **1995**,**8**:1029-1038
- [65]Geng Z R, Song X L, Xing Z, et al. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2009**,**14**:485-496
- [66]Naranmandura H, Suzuki N, Suzuki K T. *Chem. Res. Toxicol.*, **2006**,**19**:1010-1018
- [67]Marafante E, Vahter M, Envall J. *Chem.-Biol. Interact.*, **1985**,**56**:225-238
- [68]Hirata M, Hisanaga A, Tanaka A, et al. *Appl. Organomet. Chem.*, **1988**,**2**:315-321
- [69]Lerman S, Clarkson T W. *Fundam. Appl. Toxicol.*, **1983**,**3**:309-314
- [70]Drobna Z, Walton F S, Paul D S, et al. *Arch. Toxicol.*, **2010**,**84**:3-16
- [71]Song X L, Geng Z R, Li X L, et al. *Biochimie*, **2010**,**92**:1397-1406
- [72]Ganther H E. *Biochemistry*, **1971**,**10**:4089-4098
- [73]Delnomdedieu M, Basti M M, Otvos J D, et al. *Chem.-Biol. Interact.*, **1994**,**90**:139-155
- [74]Zakharyan R A, Sampayo-Reyes A, Healy S M, et al. *Chem. Res. Toxicol.*, **2001**,**14**:1051-1057
- [75]Mozier N M, McConnell K P, Hoffman J L, *J. Biol. Chem.*, **1988**,**263**:4527-4531
- [76]Hsieh H S, Ganther H E. *Biochim. Biophys. Acta*, **1977**, **497**:205-217
- [77]Styblo M, Thomas D J. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **2001**, **172**:52-61
- [78]Levander O A. *Environ. Health Perspect.*, **1977**,**19**:159-164
- [79]Levander O A, Baumann C A. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **1966**,**9**:106-113
- [80]Kraus R J, Ganther H E. *Biol. Trace Elem. Res.*, **1989**,**20**:105-113
- [81]Moxon A L, Paynter C R, Halverson A W. *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, **1945**,**84**:115-119
- [82]Ishizaki M, Ueno S, Okazaki T, et al. *Appl. Organomet. Chem.*, **1988**,**2**:323-331
- [83]Ganther H E, Baumann C A. *J. Nutr.*, **1962**,**77**:210-216
- [84]Gregus Z, Gyurasics A, Koszorus L. *Environ Toxicol Pharmacol.*, **1998**,**5**:89-99
- [85]Levander O A, Baumann C A. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **1966**,**9**:98-105
- [86]Csanaky I, Gregus Z. *Toxicology*, **2003**,**186**:33-50
- [87]Levander O A. *Newer Trace Elements in Nutrition*. Mertz W, Cornatzer W E Ed., New York: Marcel Dekker Inc, **1971**:57-83
- [88]Hsieh H S, Ganther H E. *Biochemistry*, **1975**,**14**:1632-1636
- [89]Jurgen G. *Coord. Chem. Rev.*, **2007**,**251**:234-254
- [90]Gailer J, George G N, Pickering I J, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**,**122**:4637-4639
- [91]Gailer J, Ruprecht L, Reitmeir P, et al. *Appl. Organometal. Chem.*, **2004**,**18**:670-675
- [92]Manley S A, George G N, Pickering I J, et al. *Chem. Res. Toxicol.*, **2006**,**19**:601-607
- [93]Levander O A, Morris V C, Higgs D J. *Biochemistry*, **1973**, **12**:4586
- [94]Levander O A, Morris V C, Higgs D J. *Biochemistry*, **1973**, **12**:4591
- [95]Zakharyan R A, Tsapraillis G, Chowdhury U K, et al. *Chem. Res. Toxicol.*, **2005**,**18**:1287-1295
- [96]Bailly R, Lauwerys R, Buchet J P, et al. *J. Ind. Med.*, **1991**, **48**:93-97
- [97]Gebel T. *Mutat. Res.*, **1998**,**412**:213-218
- [98]Andrewes P, Cullen W R, Polishchuk E. *Environ. Sci. Technol.*, **2000**,**34**:2249-2253
- [99]Buchet J P, Lauwerys R. *Arch. Toxicol.*, **1985**,**57**:125-129
- [100]Michalke K, Hensel R. *Organic Metal and Metalloid Species in the Environment: Vol.7*. Hirner A V, Emons H Ed., New York: Springer-Verlag, **2004**:137-150
- [101]Thayer J S. *Appl. Organometal. Chem.*, **2002**,**16**:677-691
- [102]Frankenberger W T, Arshad M. *Environmrntal Chemistry of Arsenic: Vol.16*. Frankenberger W T Ed., New York: Marcel Dekker Inc., **2002**:363-380
- [103]Kimpe J D, Cornelis R, Vanholder R. *Drug Chem. Toxicol.*, **1999**,**22**:613-628
- [104]Song X L, Geng Z R, Li C Y, et al. *J. Inorg. Biochem.*, **2010**,**104**:541-550