

从细胞无机化学的角度看镧系元素化合物 作为诊疗药物的安全性问题^{*}

王 夔^{**} 杨晓改^{**}

(北京大学医学部药学院化学生物学系 北京 100191)

摘 要 近几年来,在稀土农用安全性的争议尚未彻底解决之际,其作为诊疗药物使用的安全性问题又成为研究的焦点。本文从细胞无机化学的角度,提出了其中几个关键问题,并从下面几方面进行了分析讨论。第一,生物体系中的固相形成和沉积的作用。因为在研究稀土的生物效应以及解释其有关临床病理表现时,均会涉及到难溶化合物的形成、转化以及分布和调控;第二,在正常和病理条件下,稀土化合物的吸收、排出与积累问题,尤其是稀土跨血-组织屏障的问题,这也是关于稀土是否产生毒性的争论焦点;第三,从相似/相异性规律出发,探讨了稀土元素引起生物效应的共性和特性;第四,讨论了稀土化合物促进细胞增殖凋亡的信号转导机制以及所引发的问题。并在此基础上,提出了在细胞层次研究金属离子及配合物的生物效应时所面临的关键问题。

关键词 稀土 细胞无机化学 相似/相异性规律 增殖 细胞信号转导 安全性

中图分类号: Q519 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-281X(2009)05-0803-16

Safety Issues of Lanthanide-Based Compounds as Diagnostic and Therapeutic Agents as Viewed from Cellular Inorganic Chemistry

Wang Kui^{**} Yang Xiaogai^{**}

(Department of Chemical Biology, School of Pharmaceutical Sciences,
Peking University Health Science Center, Beijing 100191, China)

Abstract The controversy about the safety issue concerning the agricultural application of lanthanides(Ln) has not yet been completely resolved. In recent years, the scientific basis of the safety in relation to their uses as diagnostic agents and potential drugs has become the research focus. This review proposed several related critical problems in view of the cellular inorganic chemistry and discussed them from the following aspects. First, the role of the solid-phase formation and deposition in biological systems, as in the study of the biological effects of Ln, as well as elucidation of their performance on the clinical pathology, the formation, transformation, distribution and modulation of insoluble compounds have always been involved. Second, issues on the absorption, excretion and accumulation of Ln, especially on whether Ln cross the blood-tissue barriers, it is one of the foci of debate over their toxicity. Third, in the light of the similarity/dissimilarity principle, the common and specific characteristics of biological effects induced by Ln elements have been discussed. Fourth, the signaling pathways involved in the Ln-promoted cell proliferation and apoptosis, as well as the arising problems have been discussed. Based on the above discussions, the key issues faced by the cellular and biological studies on the metal ions or metal-based compounds have been proposed.

Key words lanthanides; cellular inorganic chemistry; similarity/dissimilarity principle; proliferation; cell signaling pathway; safety

收稿: 2009 年 2 月(特约)

*国家自然科学基金项目(No. 20637010)资助

**通讯联系人 e-mail: wangkui@bjmu.edu.cn; yxg@bjmu.edu.cn

Contents

- 1 Safety issues of lanthanides-based compounds as diagnostic and therapeutic agents
 - 1.1 Gd-based compounds may cause nephrogenic systemic fibrosis (NSF)
 - 1.2 Cerium levels has been related to endomyocardial fibrosis (EMF)
 - 1.3 Debate on the safety of lanthanum carbonate (Fosrenol^R)
 - 1.4 About anticancer drug Gd-Motexafin
- 2 Formation and deposition of solid phases of lanthanide compounds in biological systems
 - 2.1 Precipitation is an inevitable problem in studies on biological effects of lanthanides
 - 2.2 Chemical species of metal compounds under biological conditions
 - 2.3 Chemical essence of transmetallation
- 3 Absorption, transport and accumulation of lanthanide compounds
 - 3.1 Absorption, transport and accumulation of lanthanide compounds under pathological conditions
 - 3.2 Whether Ln can cross blood-tissue barriers under pathological conditions?
- 4 How to explain the differential biological effects among lanthanides?
 - 4.1 Similarity/dissimilarity principle for lanthanides induced biological effects
 - 4.2 Diversity among lanthanides
- 5 Mechanism underlying lanthanides-promoted proliferation and apoptosis, as well as the arising problems
 - 5.1 Is lanthanides' action a hormetic effect?
 - 5.2 Whether lanthanides-induced apoptosis effect can be used for cancer treatment?
 - 5.3 Possible signal transduction pathways involved in lanthanides-induced cell proliferation and apoptosis
 - 5.4 May lanthanides-promoted proliferation trigger carcinogenic or mutagenic effects?
- 6 Concluding remarks

1 Ln 作为诊疗药物的安全性问题

近年来,镧系元素(lanthanides, Ln)化合物的药用正在成为普遍关注的研究方向。在这方面已有多篇综述发表^[1-5]。除近 20 年来钆(gadolinium, Gd)

配合物在核磁诊断中广泛用作成像剂以外,2001 年,美国 911 事件期间硝酸铈-磺胺嘧啶银在救治烧伤患者方面也起到了重要作用;2004 年,碳酸镧作为治疗肾功能衰竭高磷酸血症的药物被 FDA 批准上市(商品名 Fosrenol^R);2006 年, *Chemical Society Reviews* 出版了 Ln 作为药用诊疗试剂的专刊;目前, Gd-Motexafin 正在进行作为抗癌药物的 I 期临床实验^[6-8];在中国,早在 20 世纪后期就报告过 Ln 化合物的抗癌、免疫调节、抗炎等药理作用,显示了一系列潜在的药用价值。这些都提升了大家对稀土药物的期望。但是,也发现了它们的一些毒性表现^[9]。尤其是最近几年,因发现 Gd 核磁成像剂所引起的严重毒性反应引起了大家对 Ln 药用安全性问题的关注。但无论是稀土的药理作用还是毒理作用都涉及到几个有待解决的问题。本文尝试从细胞无机化学的角度来分析解决这些问题的线索,为稀土化合物作为诊疗试剂的合理使用提供理论依据和实践指导。

先从最近出现的几个稀土化合物的药用安全性问题说起。

1.1 Gd 配合物有可能引起肾源性系统纤维化(nephrogenic systemic fibrosis, NSF)

20 世纪 80 年代 Gd-DTPA 开始在临床上试用于作核磁诊断成像剂,并取得成功^[10],其后,几种 Gd-成像剂相继问世,广泛应用至今,但对其安全性却未充分注意。2000 年, Cowper 等发现了一种以全身纤维化为特征的从未报道过的疾病^[11],开始患者四肢皮肤出现丘疹和桔黄色融合的斑块,呈“木质样”,病理切片可见皮肤下纤维化,而后可能发展到全身其它部位,包括心肌纤维化、心包纤维化和胸膜纤维化,严重时需截肢,甚至因心肌梗塞、血管意外而致死亡。由于该病只在肾功能衰竭患者中出现,所以最初称为肾源性系统纤维化(nephrogenic systemic fibrosis, NSF)^[12]。到 2006 年, Grobner 才发现 NSF 的发病与肾衰患者在核磁诊断时注射的 Gd 成像剂有关^[13]。在这之后,陆续有很多临床报告支持这种观点^[14-16]。于是,在关于稀土农用安全性的争议尚未彻底解决之际,其药用安全性问题又成为研究的焦点。同时值得注意的是, NSF 的关键病理环节和稀土农用安全性问题的疑点有相似之处,即稀土促进细胞增殖(包括农用)的负面作用。

1.2 心内膜心肌纤维化(endomyocardial fibrosis, EMF)与铈的关系

心内膜心肌纤维化是一种特殊的地方性心肌

病。1947年首次由 Davies 在乌干达发现^[17]。其后陆续在南非、南印度、南美等热带条形地区发现,最近在我国广西也有个案发现^[18]。这种病表现为心脏扩大,心力衰竭、一侧或两侧心室纤维化、心内膜型胶原纤维增多、腹水、嗜酸性细胞增多等,是一个预后不佳、病因不明、防治无方,似乎已被遗忘的疾病。去年, Bukhman 以“Endomyocardial fibrosis: still a mystery after 60 years”为题撰写了一篇评述^[19]。他认为现有的各病因说都未得到证实。不过,在这些病因说中,引起我们注意的是印度科学家发现南印 EMF 高发地区的独居石矿藏丰富,因此食物中的含 Ce 量显著高于非病区^[20,21]。因此,他们提出 EMF 与摄入过多的 Ce 有关,认为 EMF 是 Ce 的体内积累诱导造成的。虽然英国地质调查报告并不认同此说^[22],但是 Preeta 等和 Nair 等分别证明铈具有刺激成纤维细胞增殖的性质^[23,24],而纤维细胞增殖正是组织纤维化的关键病理环节,这也又一次涉及到与 Ln 诱导细胞增殖有关的病理纤维化问题。

1.3 围绕碳酸镧(Fosrenol^R)的安全性的攻防战

慢性肾衰患者(注意:又是肾衰!)进行透析时因磷酸盐排出受阻,普遍表现高磷酸血症。血液中磷酸盐浓度持续处于高水平会促进心肌钙化和血管钙化,诱导心脏病变,导致死亡^[4]。碳酸镧用作磷酸盐结合剂(phosphate-binder)的药理作用是把消化道中的磷酸盐转化成为难溶的磷酸镧,从而阻止磷酸盐吸收,降低血磷浓度^[4]。自从 Fosrenol^R 投入临床使用以来,有人从两个方面质疑它的安全性。第一,在发现 Gd 配合物引起病理纤维化以后,人们质疑 La 是否也和 Gd 一样能够引起病理纤维化。Aime 等^[25]主张可以由 Gd 的毒性外推到 La,因此不可忽视 La 的促进纤维化问题。一个间接证据是,皮下注射(人)确可引起局部非炎性纤维化^[26]。但是辩方以口服碳酸镧不能被吸收为由,认为不能由静脉注射的 Gd 外推到口服的 La^[27,28]。质疑的第二方面是 La 的行为毒性。实际上,很早以前国内研究者就报告 Ln 的行为毒性^[29-31]。2000年, Briner 等根据动物实验结果提出镧具有行为致畸作用^[32]。由于当时 Fosrenol^R 尚未通过批准,况且他们用的剂量较高,所以并未引起反响。2006年, Feng 等对大鼠长时间经口给与低剂量碳酸镧以检测神经毒性。他们用与 Briner 相同层次的指标,也得出镧具有行为致畸作用的结论^[33]。其后章子贵等^[34]又报告 Sm, 吴敏仪等^[35]报告 Y 的神经毒性。由于此时 Fosrenol^R 已经上市,于是引起有关碳酸镧有没有神经毒性的攻防

战。Damment 等以碳酸镧不吸收,不穿过血脑屏障为依据论证碳酸镧的安全性^[36]。Altman 等则认为虽有神经损伤,但是与镧无关^[37]。对于口服的 Ln 化合物能否吸收和跨过血脑屏障以及有无毒性这两个问题至今没有解决。

1.4 抗癌药 Gd-Motexafin 问题

除以上三种问题外,普遍关心的另外一个问题是 Ln 化合物(包括 Gd-Motexafin 和柠檬酸镧等)用作抗癌药的安全性。

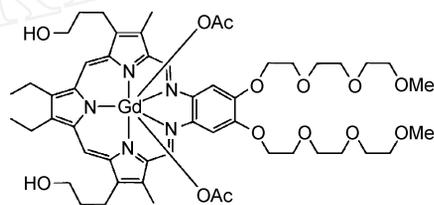
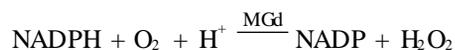


图1 Gd-Motexafin 的结构^[38]

Fig. 1 Structure of Gd-Motexafin^[38]

按照目前的认识, Gd-Motexafin 促进癌细胞凋亡并非 Gd 的作用,主要是配体的两方面作用。一是通过下列反应产生活性氧物种(reactive oxygen species, ROS)进攻癌细胞:



二是它通过抑制硫氧还蛋白还原酶(thioredoxin reductase)抑制血红素氧合酶1(HO-1),从而增强 ROS 对癌细胞的促凋亡作用^[39]。由于配体参与上述反应可导致配合物解离而释放 Gd^{3+} ^[40],游离 Gd^{3+} 又可能结合磷酸根,导致病人发生低磷酸血症,这一点在 Amato 等的报告中得到证实^[6]。

从细胞无机化学的角度来看 Ln 的药用安全性,有如下几个有待解决的问题。

2 Ln 化合物在生物体系中的固相形成和沉积问题

2.1 Ln 生物效应研究中难以回避的沉淀问题

有两方面的问题再次提醒我们要研究 Ln 在生物体系中的物种问题,特别是难溶 Ln 化合物的“沉淀”问题。

首先从实验条件来看。多少年来在研究 Ln^{3+} 离子与细胞的作用时,常常被在细胞培养液中生成“细微沉淀(microprecipitation)”的问题所困惑^[41]。从溶液化学来讲, Ln 的氢氧化物、碳酸盐和磷酸盐都难溶于水。因此在生理 pH 值下容易水解生成氢氧化配合物,并聚合生成可溶性的寡聚物,进一步产生氢

氧化物(水合氧化物)沉淀^[42]。在一定条件下, Ln^{3+} 离子在含有碳酸盐的溶液中也会生成可溶于水的碳酸配合物以至碳酸盐沉淀^[43]。 Ln^{3+} 还会在含有磷酸盐的溶液中, 生成非常难溶的磷酸盐沉淀^[44]。这些性质给我们在以细胞为体系研究镧系金属离子的生物效应带来了困惑。在含碳酸盐和磷酸盐的 $\text{pH} = 7.4$ 的培养液中(如 DMEM), 加入 Ln 的可溶盐溶液时, 会生成沉淀。令人困惑的是沉淀是什么? 该如何处理^[45, 46]?

对于目的就是为了解游离的镧系离子(Ln^{3+})的生物效应的研究者来说, 沉淀问题更成为难题。如果任凭沉淀存在, 实验结果是否能说明是 Ln^{3+} 离子的作用? 怎样确定游离 Ln^{3+} 浓度? 据计算^[46], 在磷酸盐存在下 Gd^{3+} 的浓度仅有约 $2 \times 10^{-20} \text{ M}$; 在含碳酸氢钠的缓冲溶液中, 约为 $6 \times 10^{-13} \text{ M}$ 。因此所得结果未必是 Ln^{3+} 的生物效应, 也有可能得到假阴性结果^[46]。

另外有些研究者虽然目的不在于研究游离离子的作用, 也要考虑问题的复杂性: 微粒会不会被吞噬, 并因此产生应激反应? 微粒会不会妨碍 Ln^{3+} 与细胞的作用? 微粒有没有活性? 所以研究者采用各种方法避免沉淀: 或滤掉沉淀, 或用不含磷酸盐的缓冲溶液和培养液, 或加入柠檬酸盐等螯合剂防止沉淀, 或降低浓度等。

这些方法表面上似乎避免了沉淀的形成, 但是没有解决问题, 甚至会得到与事实不符的结论。不加磷酸盐会生成氢氧化物沉淀。加入螯合剂虽然“看不出”沉淀, 实际上仍有微粒生成, 况且螯合物的转运途径、作用位点与游离金属离子不同, 表现的活性也可能有差别。至于把浓度降低到不生成沉淀的水平, 往往又观察不到效应。有时这些措施还因偏离生理条件太远使得结果不能反映实际情况。这不仅是 Ln 的问题, 很多重金属和容易水解聚合的高价金属离子都出现这类问题。那么如何对待沉淀问题?

从临床方面看, Ln 的固相沉积物也不能忽视, 但是也难以解决和解释。NSF 患者的皮下组织和血管内壁上的含 Gd 沉积物(可能是磷酸钆)是怎样生成的? 它们是如何“沉积”在生物组织(或细胞)表面上的? 它们是 NSF 病理过程中的结果还是原因? 是惰性的, 还是活性的? 这些沉积物在病理过程中充当什么角色? 另外, 在用氯化镧溶液进行检测血脑屏障完整性试验时, 所注入的实际上也不是溶液, 而是含有水解聚合产物的胶体溶液。与之类似, 在

调查乌干达 EMF 多发区与饮食摄入的铈是否有关系时, 发现天然水中的铈也是以难溶氢氧化物胶体微粒(截流分子量 100 000 Dalton)存在的^[22]。

实际上, 各种体液以及细胞培养基中含有多种能够与金属离子作用的成分, 包括蛋白质大分子和各种无机、有机小分子和离子。Ln 化合物解离生成的金属离子将通过各种反应转化成不同物种, 其中包括难溶物。已知在近中性的生理条件下, Ln^{3+} 离子水解生成氢氧配合物和水合氧化物沉淀。因此 GdCl_3 溶液注入静脉后, Gd^{3+} 离子就会在血循环中生成因水解聚合而生成的含 Gd 的栓子^[47]。目前对它的组成和结构还不清楚, 但推测它们很可能是水合氧化物微粒与蛋白结合的产物。在一些器官的毛细血管床也有这种栓子存在^[48, 49]。由于这些栓子的微粒性质, 所以可被细胞吞噬或通过非吞噬作用进入无吞噬功能的细胞^[50, 51]。电镜下, 在 Kupffer 细胞、肝细胞、毛细胆管、肝多形核白细胞、肾小球膜细胞以及肺、脾、骨髓的巨噬细胞中都曾看到含 Gd 和 P 的沉积物^[52-54]。给大鼠气管滴注的氯化钆溶液中大部分 Gd 以不溶物形式沉积在肺组织内, 在肺内停留半衰期长达 136 天^[55]。

总之, 在细胞培养液或是在生物体液中, Ln^{3+} 的存在形式可能有通过水解、聚合生成的氢氧化物、碱式盐、难溶磷酸或碳酸盐、溶液中的小分子配体(L), 还可能与蛋白质的结合物以及与细胞分泌的大分子生成的配合物(见图 2)。

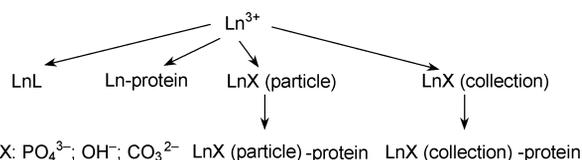


图 2 Ln 在含蛋白质和磷酸盐的生物体液中可能生成的化学物种

Fig. 2 Presumed chemical species formed by Ln in biological fluids containing proteins and phosphates

这时不能认为难溶盐和蛋白质配合物一定不能跨细胞膜转运, 也不能认为它们就没有活性。另外, 可以解离的难溶盐和配合物还可以通过电离和配体交换产生可以跨膜转运的新物种。不论原始化合物是什么, 它总要在细胞外转化生成各种新的物种, 这些物种通过不同途径进入细胞。它们各自的贡献取决于物种分布。因此, 在研究 Ln 的生物效应以及解释有关临床表现时, 不能回避难溶化合物的形成与转化。关键问题是要阐明这些生物微粒是否有活性

以及这些微粒与其他化学物种的关系。

2.2 生物条件下的金属化学物种问题

固相沉淀问题实际上是化学物种问题的一部分。因为稀土难溶盐和氢氧化物与可溶性物种之间存在互相转化的关系,这些关系由热力学和动力学做化学调控,由细胞进行生物学调控,实际上是一个特殊的生物矿化问题。

2.2.1 Ln 在血液或其他体液里的物种分布

20世纪生物无机化学的诞生,其支柱之一就是化学物种分析——用配位化学原理分析金属-配体溶液系统中存在的物种。

目前还无法用实验测定 Ln 或其他金属化合物在具有复杂组成且是开放系统的体液或细胞内的物种分布,更无法测定物种的动态变化。由于体液组成复杂,物种难以预料,而且缺少相关热力学常数,所以目前所采用的办法是基于热力学的计算机模型计算 Ln 在简化的模拟体液中的物种分布。

如简化的模拟血浆系统是仅含一种金属离子和个别小分子配体的 pH 值为 7.4 的溶液系统。计算得到 Sm 在简化血浆模型中的主要物种是柠檬酸配合物。

如果另外加入螯合剂 EDTMP,则有部分 Sm 成为 EDTMP 配合物,包括 $[Sm(EDTMP)]$, $[Sm(HEDTMP)]$ 和 $[Sm(H_2EDTMP)]$ ^[56]。用同样模型也计算了 Hb 物种分布,包括 $[Hb(Cit)(OH)]$ 和 $[Hb(Cit)(OH)_2]$ 以及 $[Hb(Cit)]$ ^[57]。显然在这些计算中忽略了三类重要组分。一是忽略了难溶氢氧化物和难溶盐。二是忽略了大分子配体(主要是蛋白质)的存在。实际上蛋白质会结合很多金属离子、小分子配合物以至固体颗粒。三是忽略了混合配体配合物,特别是结合大、小分子配体形成的三元配合物。虽然 Kiss 等^[58]曾尝试把三元配合物考虑进去计算物种分布,但是仍然仅限于小分子配体配合物。

Jackson 等^[59]用 Eccles 程序计算了模拟血浆体系中的 Gd 物种。他们的结果说明如果体系中不含有转铁蛋白(transferrin, Tf),Gd 的主要物种为 $[Gd(Cit)(OH)]$ 和 $[Gd(Cit)(OH)_2]$ 以及 $[Gd(Cit)]$ 等柠檬酸配合物。如在计算系统中加入 Tf,计算结果显示,在 Gd 浓度为 $10^{-5} M$ 时,主要物种为 $[Gd(Tf)(HCO_3)]$;小分子物种仍有 $[Gd(Cit)(OH)]$ 和 $[Gd(Cit)(OH)_2]$ 以及 $[Gd(Cit)]$,但是都不是主要物种。当 Gd 浓度增加为 $10^{-4} M$ 时, $[Gd(Cit)(OH)]$ 最多, $[Gd(Tf)(HCO_3)]$ 和 $[Gd(Cit)(OH)_2]$ 其次^[60]。这一

结果说明不能忽略蛋白质。实际上除了转铁蛋白以外,血浆中还有能与 Ln 离子结合的其他蛋白。孟路等^[61]用色谱-MS 法研究了血浆中 Tb 的可溶物种,结果说明 Tb 可结合多种蛋白质(如转铁蛋白、白蛋白和免疫球蛋白)。

从计算结果还可以看出不能忽略难溶电解质。在用仅含有小分子配体的血浆模拟模型计算 Gd 的物种分布时,注意到可能生成难溶盐沉淀问题^[62]。当 Tb 的总浓度为 $10^{-5} M$ 时,计算所得的主要物种是难溶盐 $TbPO_4$ (96.1%),而可溶物种仅占 3.9%^[63]。但是,他们大都忽视了蛋白质和难溶电解质,特别是它们的相互作用,而实际上蛋白质能结合成矿离子并可在晶核表面吸附,从而影响难溶电解质的形成以及固相的组成和结构。

细胞外液和细胞间液都存在大量蛋白质,在这个条件下会不会生成难溶盐微粒?生成的微粒的组成和结构是什么?显然,无论理论计算和实验研究都很困难。Zhang 等^[64]曾试图对 Pr 在细胞间液中的物种分布进行计算。他们考虑了生成难溶的磷酸盐和碳酸盐的可能性,所以在系统的组成中包括了磷酸根和碳酸根,还包含了主要的蛋白质。用这种多相物种平衡模型计算得到的结果也说明有难溶盐沉淀生成,也有蛋白质结合物种存在。在 Pr 总浓度达到 $10^{-9} M$ 时,就会有 50% 的 Pr 形成 $PrPO_4$;在 $10^{-8} M$ 时,约 90% 的 Pr 形成 $PrPO_4$ 。可溶部分中包括 $[Pr(Cit)]$, $[Pr(Cit)(Lac)]$, $[Pr(Cit)(Leu)]$ 等小分子配合物和 $[Pr(HAS)]$ 等蛋白质结合物,其中 $[Pr(Cit)]$ 占主要部分,也存在自由 Pr^{3+} ,但是极少。那么在体液中和细胞内究竟有没有难溶电解质的微粒存在?或者,会不会因为蛋白质的存在而阻止了沉淀的形成或有助于微粒的聚沉?但把大分子配体、多元配合物和难溶电解质都考虑进去的实验研究和理论计算目前还无法进行。

2.2.2 Ln 在细胞存在下的物种状态——一个迄今难以解决的问题

上面讨论的都是没有细胞存在的体系,虽然计算困难,但是原理还算清楚,结果也比较容易预计。如果考虑到在活细胞存在的情形下,物种的计算会变得异常复杂。活细胞将对金属配体体系产生本质的影响:(1)细胞表面结合金属物种,从而改变物种间的分布;(2)活细胞内吞和外排某些金属物种,从而改变物种间的分布;(3)活细胞向细胞内外分泌或释放大分子或小分子,会改变金属离子结合状态;(4)细胞成为异相成核和固相成长的基质,从而

改变固相-溶液间的平衡。

事实上,用平衡模型处理活细胞参与的动态系统不符合实际情况。不过在一定程度上可以反映起始短时间内细胞外液的大体趋势,因为无机离子的反应大都是快速达到平衡的,而细胞在这样短的时间内还没有产生显著的影响。难以解决的是在较长时间段的物种变化。Bell等在解释亲硫的软酸金属毒性与物种和物种变化的关系时,比较了两个模型^[65]。一个是没有考虑细胞的生物源配体计算机模型(biotic ligand model, BLM);另一个是有细胞介入的概念模型。BLM有三个假设:第一,假设金属与所有配体已经达到平衡;第二,认定游离金属离子是毒性(或活性)物种;第三,认定金属离子所结合的生物分子就是靶分子。按此模型计算游离离子浓度,并与实验测定的毒性指标比较。结果发现BLM模型虽然能够反映天然水系中的物种,但是不能反映有细胞参与的物种分布和转化的作用机理,不能反映远离平衡的状态。因此在一些情况中,与实际测定的毒性不符。为了与这个模型比较,他们提出细胞模型,除仍考虑金属在细胞外的配位化学外,还注意金属物种通过离子通道和离子泵、同向转运体、异向转运体(symporter/antiporter)、扩散和内吞进入细胞的可能性,以及金属在细胞内的物种分布。但是它还仅仅是个概念模型,只限于定性地讨论简单问题。

关于金属化学物种与金属毒性动力学和动态表现的关系请参考Yokel等撰写的全面的综述^[66]。

近年来采用实验全面测定金属物种的方法学研究颇为吸引人们注意。特别是分离-测定联机研究方法。这些方法在文献中有很多报告,但与生物活性缺少联系,难以评价其可行性和有效性。值得注意的是Bresson等^[67]建立的综合测定方法(见图3),用其研究了钴与细胞的作用。他们的结果包括从物种分布、转化到毒性研究等多项指标,得到与实验测定比较一致的结果,是迄今为止最全面的研究。

用金属组学、金属蛋白组学以及蛋白组学结合金属测定等方法测定金属物种分布尚属试探阶段。孙红哲等^[68]概述的针对金属药物结合蛋白的蛋白组学研究方法可供参考,不过它还不能给出全面的物种分布。由于 Ln^{3+} 与蛋白形成的配合物在分离时可能易于解离,因而这些基于分离的方法如何运用在稀土的研究中还需要进一步研究。

关于Ln难溶盐与细胞相互作用的研究并不多。预计不外两种可能。一是已经生成的微粒沉积在细胞表面;一是在细胞表面逐渐形成。从细菌来源的

生物质(biomass)清除 Ln^{3+} 的研究结果可以看出其中的特点。研究 La^{3+} 在细菌生物质上的吸附、沉积和与细胞的相互作用的结果说明^[69],开始是 La^{3+} 的快速吸附,主要通过取代细胞的磷酸基和羧基上的 K^+ 和 Ca^{2+} 而配位结合。然后一部分结合的 La^{3+} 在细胞表面发展成为沉积物,另一部分可以进入细胞。对细菌结合La的研究除得到类似结果外,还注意到细菌分泌的高分子物质也与La结合形成沉积物的反应^[70]。高等动物细胞也有可能经过金属离子结合-表面微粒形成-细胞外基质结合发展成沉积物。这还需要证明。

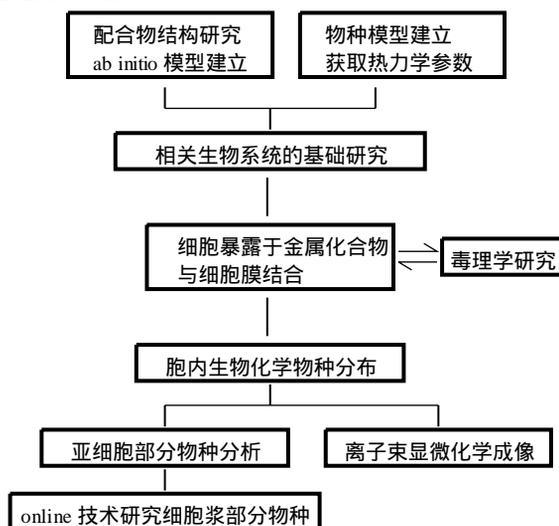


图3 Bresson的研究物种分布方案^[67]

Fig. 3 Strategy on the studies of species distribution by Bresson^[67]

Nilsson^[71]研究了 La^{3+} 与四膜虫的作用。结果显示 La^{3+} 能抑制四膜虫增殖。但是假如镧是在蛋白酶蛋白胨(protease peptone, PP)培养液中作用于细胞,会因与蛋白结合生成可被细胞内吞的微粒。他们注意到在增殖期的细胞暴露于这些微粒并吞食它们的过程中,有一个停滞期,这期间细胞停止运动,细胞变形,但吞食微粒。一过停滞期细胞就自动恢复运动和增殖。他们把这一现象归诸镧所造成的钙内稳态失衡后的自动恢复。根据锌离子与四膜虫的作用研究结果他们认为这种钙内稳态失衡与含Zn微粒的形成与排出有关(见图4)^[72]。

与锌不同,Ln不是必需金属元素,没有特定的转运机制,所以它们进入细胞的途径复杂,现在能够确定的是细胞外Ln的微粒可以被有吞噬功能的细胞内吞;但是不能排除通过非吞噬的过程进入无吞噬功能的细胞。这些都有待于进一步的研究。

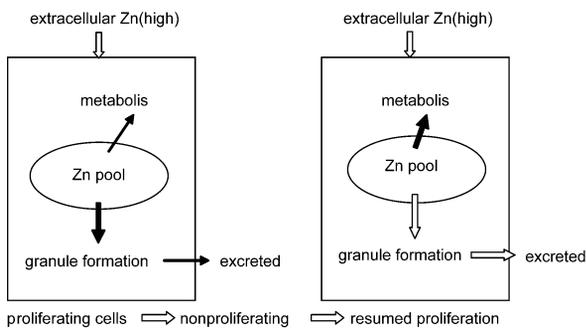


图 4 Zn^{2+} 与四膜虫作用中微粒的形成与排出和细胞代谢与增殖的关系(根据[72]改画)

Fig. 4 The relationship between the formation and excretion of granules and the cellular metabolism and proliferation in *Tetrahymena* exposed to Zn^{2+} (adapted from [72])

2.2.3 病理模型中 Ln 的物种问题

仍以 NSF 为例,病理学家把注射含 Gd 的核磁成像剂后导致 NSF 的病理过程中含 Gd 化学物种的变化与发病机理的关系概括如图 5 所示^[49,73,74]。在肾功能衰竭的患者血液中,Gd 配合物的停留时间延长(正常情况下廓清半衰期为 90—120min;肾功能衰竭时可延长到 30—120h),加以血液 pH 值下降和磷酸根浓度增加,因此在另一种金属离子作用下发生所谓转金属反应(transmetallation),即释放 Gd^{3+} 离子,再生成“磷酸钆”沉淀^[49,74]。

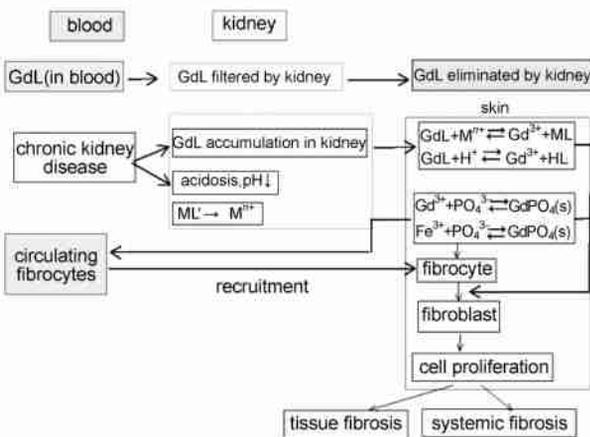


图 5 Gd 参与的肾源性系统纤维化病理过程(根据[49,73,74]改画)

Fig. 5 Gd is involved in the pathological process of NSF (adapted from [49,73,74])

这种病理学解释需要回答几个原则性问题:

(1) GdDTPA 进入血液后以什么物种存在? 如果像尿毒症患者的血液那样,酸中毒(pH 值较低)、

磷酸盐浓度高、停留时间长,会不会在血液里就已经生成磷酸钆或氢氧化钆沉淀(微粒)? 前面讲过注射氯化钆会在血循环中形成栓子。那么注射一种 Gd 的配合物,会不会形成类似微粒? 体外实验结果说明不同配合物与蛋白的结合能力有很大不同,是不是因此形成微粒的可能性也有所不同?

(2) “磷酸钆”是怎样在组织内形成的? 是原来存在的微粒被吞噬,还是释放出来的 Gd^{3+} 进入组织,在组织内形成的? Gd^{3+} 是怎样释放的? 它的释放受什么因素影响?

(3) 难溶的钆沉积物是病理学原因还是结果? 它是生物学惰性的吗?

2.3 所谓转金属反应的化学本质问题

病理学和毒理学家在解释进入血液的 Gd 配合物引发 NSF 病理过程时预设了一个前提,就是起作用的是游离的 Gd^{3+} 。为了解释稳定的 Gd 配合物为什么会释放 Gd^{3+} ,他们又提出转金属反应这个概念。按照化学概念,转金属反应的本质就是在细胞参与下配合物间的金属交换(metal exchange)。不同于金属交换的化学概念,参与交换的金属离子是内源性的,与该金属离子在细胞的内稳态有关。如 Sarka 等^[75]所讲的 $[Gd(DTPA)]^{2-}$ 与内源性 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 之间的反应。而且,反应会受体液中的其它组分的影响,在细胞体系的研究中,自然也与细胞的状态有关。

3 Ln 化合物的吸收转运和积累问题

3.1 病理条件下 Ln 的吸收、排出与积累问题

20 世纪 70 年代曾争论 Ln 是否可以经消化道吸收,现在这个问题似乎已经明朗。尽管实验结果之间有相当大的差别,但是从经口给药后在各个脏器中 Ln 的分布和含量来看^[69],它们是可以吸收的,只是吸收极少而已。于是,在探讨 Ln 毒理和药理作用时,长时间低吸收下的积累便成为关键问题了。粗略地讲,积累 = (肠吸收 - 尿排 - 粪排) × 停留时间。显然某些其他影响肠吸收的因素也可能成为造成蓄积的因素。大鼠腹腔注射 Gd 后 6h,以吞噬体形式出现在肝细胞和 K_öpfer 细胞内;但是口服给药 6h 后只在十二指肠细胞中出现,肝细胞内没有发现 Gd^[69],可见肠吸收对 Ln 的吸收起重要作用。另外,一次给大鼠碳酸镧 1 500mg/kg, 8h 后,血 La 浓度达到峰值(1.04 ± 0.31ng/ml),而且 La 几乎全部结合在血浆蛋白上(>99.7%)。24h 后,97.8 ± 2.84% 的 La 经粪便排出。生物有效性仅有 0.0007%,这说明

La 的肠吸收极少,但是不是不能吸收。尽管 24h 吸收极少,但是在排出功能降低的情况下,体内积累便成为重要问题。上面讨论 Gd 与 NSF 的关系和碳酸镧毒性问题时,我们注意到它们都涉及肾功能衰竭的病理特征。这类现象提出了两个以前缺少考虑和研究的问题。一个是 Ln 积累的来源和积累方式的问题;另一个是在特定病理情况下的吸收和积累问题。第一点提示,以前常说的“因为 Ln 吸收极少所以毒性很低”不是完全正确的。

慢性毒性(也有活性)的表现程度和特点关键在于低剂量长时间暴露(low-dose-long-exposure, LDLE)的效应;而 LDLE 效应在很大程度上取决于积累。现在知道,从血液中的 Ln 含量评价吸收和效应不能反映实际情况,必须用在脏器和组织的分布作为指标,从而分析积累 Ln 的原因是吸收增加还是排出减少造成的,并在此基础上探索抑制积累的手段。

上面说的第二点表明,不能将正常动物(或人)的吸收转运和积累实验结果扩大到所有情况。特别是在病理条件下,生物体的吸收、转运和排出功能都不正常的情况。例如,在 NSF 患者的组织中,由于肾功能下降,不能把血液中的 Gd 有效地排除,从而增加了 Gd 在血液循环中的停留时间。加以此时酸中毒的关系,使得体内 pH 值降低,有利于 Gd 的解离和磷酸钆沉淀的形成。

由此可以推断,这不应该是 Gd 特有的表现,肾功能衰竭一定会造成经肾排出的各种金属的积累。Lacour 等^[76]发现在晚期肾功能衰竭动物口服氯化镧后,的确也可以看到镧的积累。但是他们认为这不是由于排出减少而是因为肠吸收增加造成的。据 Canavese 等^[77]报道,尿毒症患者短期接触镧后,血液中的镧为正常值的 10 倍,骨中的镧增加了 5 倍。Lacour 等证实慢性肾衰大鼠模型服用碳酸镧 28 天后可见镧在各组织中的沉积,特别是肝组织^[76]。尽管有人质疑该研究方法学上的问题^[78,79],Slatopolsky 等仍证明尿毒症大鼠镧的渐进性积累增加,特别是肝脏^[80]。虽然又遭到 Damment 的质疑^[81],争论并未平息。

从这两个例子我们看到在肾脏功能部分丧失的情况下,因为延长了 Ln 的停留时间所造成的过度积累,这说明 Ln 的积累是不容忽视的。因此不能不考虑在其他病理条件下 Ln 的积累和毒性问题。由于绝大多数有毒金属都经过肾小球过滤后经尿排出,因此可以推测肾功能衰竭对其他重金属积累也有不同程度的影响。

3.2 病理条件下 Ln 跨血-组织屏障的问题

Ln 能否跨过血-脑屏障、血-睾丸屏障等各种血与组织之间的屏障,是更有争议的问题。尤其对于能否跨血-脑屏障更是辩论 Ln 的脑神经毒性的焦点之一。通常认为, Ln 不能通过无损伤的血脑屏障,并且长期以来就用氯化镧或硝酸镧作为标志物检查血脑屏障的完整性,跟踪病理条件下的血脑屏障损伤^[82]。不过由于诊断用的氯化镧溶液浓度较高,本身已经是胶体溶液,加上与血液中蛋白的作用,它们不能通过血脑屏障应在预期之中。但氯化镧胶体溶液不能通过并不能证明 Ln 离子或小分子配合物也不能跨过血-组织屏障,特别是在病理条件下, Ln 不能跨过血-组织屏障。

在脑缺血情况下,血脑屏障通透性增加,镧离子能通过血脑屏障进入脑组织已有报道^[83]。但是据 Feng 等报道^[84], La 和 Yb 在长期低剂量暴露的条件下,可以跨过血脑屏障,放射性同位素示踪法还证明尾静脉注射¹⁵³Sm 和¹⁶⁹Yb 能够通过孕鼠血脑屏障^[85]。在血-睾丸屏障方面的研究结果显示^[86], 亚慢性经口给与高剂量 Ln 可使小鼠睾丸内 Ln 积累明显增高。陈祖义等^[87]用核素¹⁴⁷Pm 饲喂小鼠 15 天,其睾丸内蓄积相对比竟高达 1519%。或许 Ln 在高浓度或长时间作用下破坏了屏障,使 Ln 漏入。这方面的可能性可以从程驿等报道的结果得到佐证。他们发现稀土使红细胞膜产生畴结构和“打洞”,增加膜通透性^[88,89],使 Ln 漏入细胞^[90]。但也有可能是 Ln 影响细胞间紧密连接所引起。

事实上,已经有大量报道说明,在病理条件下造成的血脑屏障损伤或暂时性的打开,会使较高浓度下的镧进入脑组织。但是在低浓度长时间作用的条件下, Ln 在脑内的积累还需要研究,特别是需要比较正常情况和病理条件下的结果。

4 怎样解释不同镧系元素生物效应间的差异

上面提到关于能否由 Gd 引起 NSF 外推到 La 的可能性辩论,这其实涉及到引起生物效应的稀土元素之间的共性和特性这个基本问题。

4.1 元素生物效应的相似性/相异性规律

我们曾经提出了一个总结和推测不同无机离子生物效应关系的规律——相似性/相异性(similarity/dissimilarity)规律^[91]。其基本点在于:

(1) 以必需无机离子(或分子)为参照物,一种非必需离子或小分子的生物效应是它们相对于参照离子(分子)的相似性和相异性的综合表现。可以把

Ca^{2+} , PO_4^{3-} , Fe^{3+} 和 $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ 电对作为参照离子。

(2) 相似性和相异性不可分割。一种非必需金属离子与作为参照的必需离子相比,二者之间有共性,但是也因偏离参照离子的基本性质而表现差异,也就是相异性包含在相似性之中。这接近于在类聚分析中,用‘距离’所表示的相似性/相异性。

(3) 两种非必需离子与同一参照离子比较,因偏离程度不同表现的生物效应不同。

(4) 有时一种非必需金属离子的生物效应需要以两种必需金属离子作为参照考察。该离子在与两种参照离子比较时,对一种参照离子的距离增加可能是对另一参照离子距离的减少。

按照这样的考虑,以 Ca^{2+} , PO_4^{3-} , Fe^{3+} 和 $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ 电对为参照离子,可以把非必需离子归于以下各类分组:

Ca^{2+} 类似物:包括 Be^{2+} , Mg^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} 以及 Ln^{3+} ;

PO_4^{3-} 类似物:包括 As, V, Mo, W 的含氧酸根以及 $[\text{AlF}_4]^-$, $[\text{BeF}_3]^-$ 等配合物;

Fe^{3+} 类似物:包括 Cr^{3+} , Al^{3+} 等高价离子;

$\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ 电对类似物:包括 $\text{Ce}^{4+}/\text{Ce}^{3+}$, $\text{VO}_4^{3-}/\text{VO}^{2+}$ 等单电子转移电对。

在这里面, Ln^{3+} 的各个成员之间也有差异。可以 Ca^{2+} 为参照,比较各个成员对 Ca^{2+} 的距离;也可以以 Ln^{3+} 的某一成员为参照,比较各个成员对它的距离。

4.2 镧系元素间的差异

4.2.1 镧系元素离子与钙离子的相似性和相异性

长期以来公认 Ln^{3+} 离子与 Ca^{2+} 在生物效应方面的相似性和化学性质的相似性有关。简单地说,是因为 Ln^{3+} 和 Ca^{2+} 的离子半径相近,都是硬酸离子。延伸来讲可以认为与它们形成配合物的趋势和强度相近。Pletnev 等通过对 24 种金属离子(包括 La^{3+} 、 Ce^{3+} 以及与其相似的 Al^{3+} 和 Y^{3+})和 H^+ 与 3 960 种配体形成的配合物的 15 606 个一级形成常数进行因素分析、类聚分析和自组织图分析,得到不同金属离子间的相似性/相异性关系^[92]。所得出的以 Ca^{2+} 和 Fe^{3+} 为参照离子的相似性距离顺序如下:

Ca^{2+}
 $\text{Sr}^{2+} > \text{La}^{3+} > \text{Ce}^{3+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Ba}^{2+} > \text{Y}^{3+} >$
 $\text{Mg}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Fe}^{3+} > \text{Zn}^{2+} >$
 $\text{Ni}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{VO}^{2+} > \text{UO}_2^{2+} > \text{Fe}^{2+} > \text{Al}^{3+} >$
 $\text{Be}^{2+} > \text{Hg}^{2+} > \text{Na}^+ > \text{H}^+ > \text{Ag}^+ > \text{K}^+$

Fe^{3+}

$\text{Y}^{3+} > \text{UO}_2^{2+} > \text{Ce}^{3+} > \text{Mn}^{2+} > \text{La}^{3+} > \text{Cu}^{2+} >$
 $(\text{VO}^{2+}) > \text{Fe}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Al}^{3+} > \text{Zn}^{2+} >$
 $\text{Ni}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Hg}^{2+} > \text{Ba}^{2+} > \text{Mg}^{2+} >$
 $\text{Ca}^{2+} > \text{Na}^+ > \text{Ag}^+ > (\text{Be}^{2+}) > \text{K}^+ > \text{H}^+$

根据配合物形成常数可得到 Kohonen 金属离子化学性质自组织图(图 6)^[92]。图 6 表示距离越近相似性越高;相同灰度的离子属于同一簇(cluster),用白色区域表示的离子代表可以在不同簇间移动。来自组织图也可见 La^{3+} 和 Ce^{3+} 与 Ca^{2+} 的相似性程度很高,而 $\text{La}^{3+} > \text{Ce}^{3+} > \text{Y}^{3+}$ 。

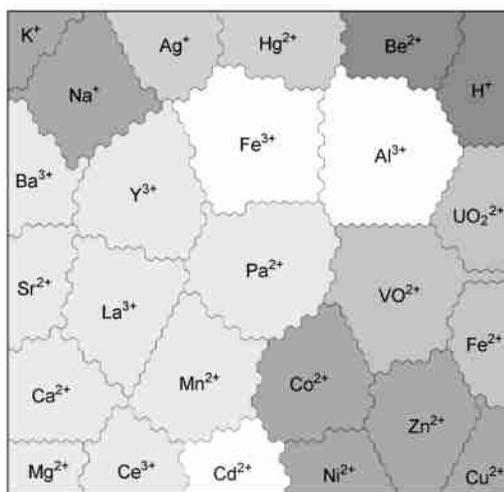


图 6 根据配合物形成常数得到的 Kohonen 金属离子化学性质自组织图^[92]

Fig. 6 Kohonen self organizing map based on the chemical properties of metal ions in accordance with the formation constants of complexes^[92]

这样的分析仅能反映化学相似性的表现,显然,还需要把化学相似性与生物效应的相似性联系起来,并且在金属离子基本参数的基础上找出规律。最近, Kinraide 等^[93] 尝试把金属离子对植物的毒性与它们在浆膜上的结合强度(用结合常数表示)联系起来,并且把实际测定的结合常数与从金属离子的 Pauling 电负性、离子半径、水合离子半径、一级水解常数、硬度指数等参数计算出的理论结合常数相比较,验证理论计算结果的可靠性。从计算结果中,可以总结出以下序列:

$\text{Zr}^{4+} (5.94) > \text{U}^{4+} (5.86) > \text{Th}^{3+} (5.32) > \text{Fe}^{3+}$
 $(5.04) > \text{Sc}^{3+} (4.74) > \text{Hg}^{2+}, \text{Al}^{3+} (4.36) > \text{Gd}^{3+},$
 $\text{Cr}^{3+} (3.84) > \text{Lu}^{3+} (3.72) > \text{Eu}^{3+} (3.70) > \text{Er}^{3+},$
 $\text{Dy}^{3+} (3.69) > \text{Tm}^{3+} (3.67) > \text{Yb}^{3+} (3.61) > \text{H}^+$
 $(3.54) > \text{Sm}^{3+}, \text{Nd}^{3+} (3.53) > \text{Y}^{3+} (3.50) > \text{Tb}^{3+}$

(3.48) > Pr³⁺ (3.44) > Pm³⁺ (3.34) > Ce³⁺ (3.26) > La³⁺ (3.21) > Pb²⁺ (2.68) > Cu²⁺ (2.66) > Fe²⁺, Ni²⁺ (2.21) > Zn²⁺ (2.20) > Cd²⁺ (2.15) > Co²⁺ (2.14) > Be²⁺ (2.13) > Mn²⁺ (2.00) > Mg²⁺ (1.51) > Ca²⁺ (1.44) > Sr²⁺ (1.30) > Ba²⁺ (1.17) > Ag⁺ (0.82) > Tl⁺ (0.46) > Na⁺ (0.02) > K⁺ (0.00)

结果显示,尽管 Ln³⁺ 离子类似钙离子,但是在与细胞表面结合以及随后发生的效应(细胞膜的去极化)上,它们在距离上更接近 Al³⁺ 和 Fe³⁺ 离子,显示高价硬酸离子的性质,而偏离钙离子(见图 7)。所以,稀土离子一方面与很多钙结合蛋白和依赖钙离子的蛋白上的钙离子结合位点结合;另一方面和 Cr³⁺、Fe³⁺ 离子一样,有可能与转铁蛋白结合,通过转铁蛋白受体机制转运进入细胞^[58]。尽管有大量

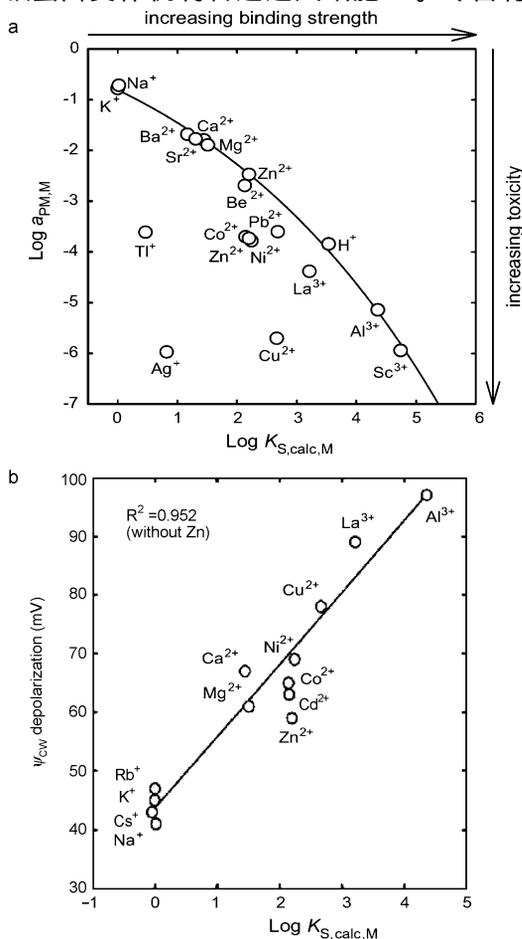


图 7 计算不同金属离子结合常数 ($K_{s,calc}$) 与表面结合量 (a) 和膜的去极化 (b) 的关系, 显示结合强度越大毒性越大^[89]

Fig. 7 Relationships between calculated binding constant ($K_{s,calc}$) with surface-binding amount (a) and membrane depolarization (b). The increasing binding strength is related to increasing toxicity^[89]

论文利用 Ln³⁺ 离子能够代替 Ca²⁺ 来研究钙结合蛋白与钙离子的结合方式和功能,也有一些研究利用 Ln³⁺ 离子能够代替 Fe³⁺ 来研究铁转运蛋白,但是由于动物细胞的复杂性,目前还没有人对包括稀土离子在内的不同金属离子于细胞的作用以考察相似性/相异性规律。

4.2.2 Ln 离子间的相似性和相异性

一般认为, Ln³⁺ 离子的化学性质和生物效应基本相同。虽然由于镧系收缩,它们的离子半径从 La³⁺ (1.17 Å) 到 Lu³⁺ (1.00 Å) 依次降低,但是差别很小,所以不同 Ln³⁺ 离子都可以结合在同一个蛋白同一部位(主要是钙离子结合位点)。亲和力相近,但有差别^[94,95]。实际上,它们的生物效应常常表现显著差别。这种差别往往是源于基本性质的微小差异被放大的结果,也是量变引起质变的表现。至于化学性质的差别与生物效应的差别间的关系还缺少规律性的认识。

在 Ln³⁺ 离子中, Ce³⁺ 和 Gd³⁺ 是两个独特的成员。在生理条件下,铈可以发生氧化还原。因 Ce(Ⅱ)/Ce(Ⅲ) 电对类似 Fe(Ⅱ)/Fe(Ⅲ),既可以通过单电子氧化还原介入 ROS 的产生,也可以参与 ROS 的清除。例如,按照 Schubert 等报道用 CeO₂ 和 Y₂O₃ 纳米微粒预处理的 HT22 神经细胞有抵制氧化应激下造成的细胞损伤和死亡的作用^[96]。Niu 等也发现氧化铈纳米微粒能够保护心肌细胞对抗氧化应激、内质网应激^[97]。上述作用被认为是氧化铈微粒直接清除活性氧物种的结果,而且通过 Ce(Ⅱ)/Ce(Ⅲ) 循环再生所以表现强抗氧化能力;但是, Ce(Ⅱ)/Ce(Ⅲ) 转换也可能成为 ROS 生成的原因^[98]。Ce(Ⅱ)/Ce(Ⅲ) 转换的上述两面性表现有待研究。另外一个特殊的稀土离子是 Gd³⁺。Gd 的生物效应有很多特点^[2]。它的电子结构决定了它的顺磁弛豫增强 (paramagnetic relaxation enhancement) 和对核磁化学位移没有显著影响,因而它的稳定配合物可以用作成像剂。除此以外, Gd 有几个其他稀土没有的特性。最主要的也是容易解释的是由于它的类钙性会影响某些钙依赖蛋白的功能。例如,它是牵张激活离子通道的选择性抑制剂;是电压门钙通道和 Na/K 通道的阻断剂;它是钙敏感受体的激动剂等。但是还有一些在稀土离子中突出的表现还无法解释。例如,是不是在稀土离子中 Gd³⁺ 促进细胞增殖的能力最强? 差别何来? 是不是在稀土离子中 Gd³⁺ 是最明显的钙敏感受体的激动剂? 为什么? 其实更多的问题涉及从 La³⁺ 到 Yb³⁺ 它们的生物效

应如何递变,由什么决定?不同 Ln^{3+} 离子对 SMC7721 细胞^[99]、肝细胞 7701 和宫颈癌 Hela 细胞^[100]、兔成熟破骨细胞^[101] 等的比较研究结果显示有不同程度的差异,但是无法总结规律。

不同稀土在体内的分布也有差别,而且这种差别可能对不同靶器官产生不同的生物效应。Shinohara 等曾对静脉注射 25mg/kg 不同稀土的脏器分布总结出下列规律:肺 > 脾:Eu, Gd, Tb, Dy, Y; 脾: Nd, Sm, Ho, Er; 肺 < 脾: La, Ce, Yb^[102]。其后他们进一步比较低剂量 Tb, Sm 和 Yb 的脏器分布和廓清速度。得出几点有趣的结果:(1) 低剂量下的分布与高剂量的不同,与脏器有关;(2) 低剂量(1mg/kg)下的肝和脾积累反而高于较高剂量(10mg/kg);(3) 廓清速度: Yb >> Tb > Sm^[103]。前面讨论过稀土磷酸盐的沉淀问题。这些微粒可能被细胞内吞,也可能沉积在细胞表面。它们有可能发挥干预细胞生长和功能的作用。因此,不同稀土形成磷酸盐沉淀的趋势可能是另外一个决定它们之间生物效应差别的因素。Ding 等^[104]用等浓度稀土混合溶液与磷酸盐作用,测定 19h 后溶液中稀土浓度(C_1)。 C_1 与原来的浓度(C_0)之比代表不同稀土在磷酸盐存在下的游离离子浓度。结果如图 8 所示,它们之间有很大差别(图 8A),但加入柠檬酸会改变这个顺序(图 8B)。

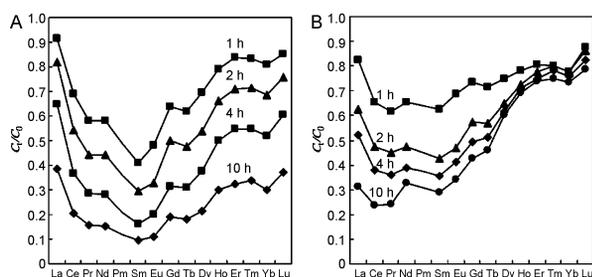


图 8 不同稀土在磷酸盐存在下的游离离子浓度(A)及柠檬酸的影响(B)^[100]

Fig. 8 Free ion concentrations of different lanthanides in the presence of phosphate (A) and the influence of citrate (B)^[100]

5 Ln 促进细胞增殖凋亡的机制以及所引发的问题

5.1 Ln 的作用是细胞对毒物刺激的 hormesis 效应吗?

近几十年来,关于不同 Ln 促进各种动植物细胞增殖和凋亡的研究有许多报道^[105-113]。大量的研究结果表明,在较低浓度时(通常小于 100 μM),Ln 几

乎可以不分种属地促进细胞增殖,而在较高浓度下(通常大于 500 μM)可促进细胞凋亡。

表面上看, Ln 似乎和许多有毒物质一样,能够在低浓度(剂量)下刺激生物生长,而在高浓度下表现抑制。以往我们常常把这一现象简单地归于 hormesis 效应。对于这个有争议的概念, Celabrese 等^[114]近年来把它修订成为生物体(细胞)对低水平应激和损伤的适应性反应(或者说是诱导“温和的过补偿(modest overcompensation)”)增强了生物体对高水平刺激物的适应能力。Ln 所表现的低浓度促进增殖和高浓度促进凋亡是否也可归于毒物的刺激作用? 或者是不是细胞对稀土的应激反应? 回答这样的问题,不妨先考虑以下情况:

(1) 能否因为 Ln^{3+} 在低浓度下促进增殖,高浓度下诱导凋亡这一表现现象就把它归结于对毒物的应激反应? 在多数情况下,任何化学物质的生物效应都表现低浓度有利于生物生长(细胞活动),高浓度转为不利(毒性)。即使是必需元素也是如此。只不过高低的阈值因物质不同而异。从这个角度来说,不能以低浓度促进生长为唯一证据反过来证明该化合物的表现是毒物的刺激作用。

(2) Ln 的作用是不是外来物质低水平刺激下的温和过补偿? 按照温和过补偿的概念,用低浓度(即低强度)的刺激(包括放射性)做预处理(preconditioning),可以使细胞产生一种抵抗高浓度(高强度)刺激的能力。例如有毒金属 Cd(10^{-5}M)能够使 RWPE-1 细胞转化;但是先用极低浓度 Cd 预处理,再用 10^{-5}M Cd 处理时细胞的转化率便大大降低。提示低剂量镉的保护效应可以抵制高剂量镉的致癌作用^[115]。他们的预处理所指的是所用的刺激物与所抵御的刺激物相同,只是剂量不同。这样预处理之所以保护细胞,是因为弱处理启动或增强细胞内防护系统。例如 Gaddipati 等^[115]解释低浓度 Cd 预处理所产生的保护作用与诱导金属硫蛋白表达有关,而高表达的金属硫蛋白有助于结合更高浓度的镉。但是也有实验结果说明低浓度 La^{3+} ($1\mu\text{M}$) 预处理钙化平滑肌细胞 2h 能使细胞抵御过氧化氢引起的细胞损伤和钙化^[112]。与之相似,如果低浓度 Cd 是因为诱导金属硫蛋白表达而使细胞抵御高浓度 Cd 的能力增强的,那么,我们也可以预期低浓度 Cd 预处理的细胞也能够抵御另一种亲硫重金属的毒性。如此说来,可以设想某种刺激物弱处理可以诱导细胞产生抵抗另外一种刺激物的能力,但是两种刺激物要在解毒机理上有某种共性。近年来的研究

还表明,亲硫的金属如铜、锌、汞、镍以及砷等在低浓度下可以直接和特定蛋白如胞浆蛋白伴侣分子 Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1, Keap1) 的巯基结合,使 Keap1 与转录因子 Nrf2 (NF-E2-related factor2) 的复合物解离,进而激活 Nrf2, 相代谢酶表达量增加,从而激活细胞的保护机制。那么,是否低浓度 Ln^{3+} 离子能够诱导应激反应保护细胞抵抗高浓度 Ln^{3+} 离子的诱导凋亡的作用,尚有待观察。

(3) 是否低浓度 Ln^{3+} 离子诱导氧化应激反应从而保护细胞? 重金属引起氧化应激反应已有很多报道。所谓氧化应激反应,用化学的概念来说,其本质是指体内(或细胞内)氧化还原平衡状态向更氧化的方向移动。由于细胞不能耐受更氧化的环境,所以便增加内在抗氧化蛋白和酶的表达,以抵抗氧化性损伤,并推移平衡。

研究显示,某些毒物的低浓度下刺激细胞增殖作用与细胞内 ROS 增加以及 NF- κ B 的激活有关^[116]。例如一种亲硫金属可通过产生适当的低浓度 ROS 使细胞获得对抗高浓度 ROS 损伤和改变细胞的能力^[117]。Damelin 等^[118]的研究结果显示,低剂量的过渡金属离子可诱导 ROS 形成,增加葡萄糖摄入和降低线粒体的呼吸功能,使细胞内氧化还原状态向还原方向发展,从而表现抵制 ROS 损伤的能力。但稀土化合物直接诱导细胞内 ROS 形成的可能性较小,尽管间接的作用仍有可能^[119,120],但又大多与造成的损伤有关。

总之,从以上三个方面考虑,将 Ln 的作用认为是细胞对毒物刺激的 hormesis 效应比较牵强。

5.2 能否利用 Ln 促进癌细胞凋亡作为抗癌的手段?

在细胞层次和整体动物层次研究 Ln 对肿瘤细胞的作用有不少报道。多数认为 Ln 有抑制肿瘤发生和生长作用^[121-128];另一方面,也有人报道在低浓度下的 Ln 有促进癌细胞增殖的作用^[107]。

我们研究组曾就此以人宫颈癌 HeLa 细胞为模型,研究了三种稀土氯化物 (LaCl_3 、 GdCl_3 和 YbCl_3) 在较低浓度(小于 $100\mu\text{M}$)下对细胞生长的影响,结果说明低浓度稀土没有引起细胞凋亡,反而促进细胞增殖,且可提高细胞在血清耗竭造成的损伤中的存活能力^[129],但在较高浓度时(大于 $500\mu\text{M}$)会造成细胞活性明显下降。因此,造成增殖与凋亡两种结论矛盾的一个原因应是浓度问题。但也不能排除另外一个可能原因,即可能存在细胞的选择性,有某些癌细胞对 Ln 的作用不敏感,但是为什么不敏感是一

个值得研究的问题。

如此看来,除非找到对稀土作用非常敏感的癌细胞类型,否则,从目前的结果看来,利用 Ln 的简单化合物作为抗癌药的可能性不大。

5.3 Ln 化合物促进细胞增殖凋亡的信号转导机制

稀土如何促进细胞增殖是一个长期没有解决的问题。它是解释稀土为何促进动植物生长的基本问题,是其农用的基础,更是它药用安全性必须考虑的核心问题,例如它可能是钆配合物核磁成像剂造成病理纤维化的关键环节。

我们研究组的结果说明通过信号转导机制,稀土即使不进入胞内,也可将胞外信号内传^[130,131]。例如最近我们报道了 La (10^{-6} — 10^{-5}M) 可通过百日咳毒素 (pertussis toxin, PTx) 敏感的 G 蛋白偶联受体引起的 ERK 磷酸化,从而导致成骨细胞的增殖和分化^[132]。另外,在以小鼠胚胎成纤维细胞 NIH3T3 为模型的研究表明^[130,131], La 、 Gd 均可通过激活 MAPK/ERK 以及 PI3K/Akt 信号路径,促进细胞通过 G/S 检查点,推动细胞周期的进行,从而引起细胞增殖(如图 9)。

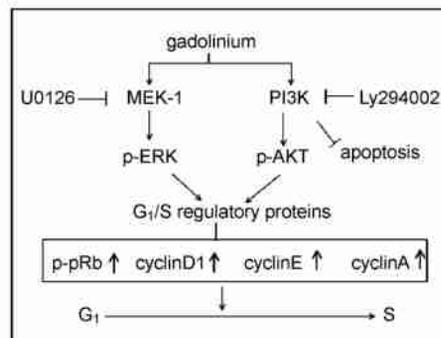


图 9 Gd 推动 NIH3T3 细胞周期的可能路径^[130]

Fig. 9 Possible signalling pathways involved in Gd-promoted cell cycle progression in NIH3T3 cells^[130]

本研究结果说明 Gd 促进成纤维细胞增殖的能力,这为阐明钆配合物在晚期肾衰竭患者接受核磁诊断中的应用导致 NSF 的机制提供了线索,并为设计针对 NSF 的疗法和稀土配合物在医疗中合理使用提供了一定的理论依据和实践指导,例如可通过应用适当的信号路径阻断剂,抑制 Gd 导致的增殖活性。

但胞外 Ln 物种如何将细胞信号内传,目前还不清楚。鉴于 Ln^{3+} 与 Ca^{2+} 在化学性质和生物效应方面的相似性,有理由设想 Ln^{3+} 通过干预 Ca^{2+} 参与的途径而介入 MEK/ERK 和 PI3K/Akt 信号途径。从

上游事件来看,细胞膜表面有依赖钙离子调节的蛋白或受体如整合素(integrin)、某些 G 蛋白偶联受体(GPCR)、钙通道等作为 Ln^{3+} 潜在的靶分子, Ln^{3+} 与这些 Ca^{2+} 依赖的蛋白的结合可能启动 MEK/ERK 和 PI3K/Akt 及有关途径。另外, Ln^{3+} 也可以直接或间接干预 Ca^{2+} 信号转导的复杂网络系统中的某个环节,导致细胞的增殖或凋亡。

稀土物种也有可能以各种方式进入胞内,例如曾经证明 Ln 可以以络阴离子形式通过阴离子通道进入细胞^[133,134];也可能通过与转铁蛋白结合通过转铁蛋白介导途径进入细胞^[135];或以内吞的方式进入细胞^[52-54]等;但它们如何在细胞内发挥作用,尚难确定。进入细胞的稀土物种若是以颗粒的形式,一定会刺激活性氧物种(ROS)的生成吗? ROS 作为第二信使,可以激活多种与增殖凋亡相关的路径如 MAPK 路径、NF- κ B 路径等等;这些信号如何整合到一个具体的生物学效应?另外,进入细胞的稀土物种会解离吗?解离程度有多大?解离后倾向于结合在什么功能分子上?可能是钙调蛋白(CaM)吗?在无细胞体系中,测得 La^{3+} 可以结合在 CaM 的 Ca^{2+} 结合位点上,而在有 Ca^{2+} 存在下则形成 $\text{Ca}_2\text{La}_2\text{CaM}$ 等混合金属配合物^[136]。化学体系的研究表明 $\text{Ca}_2\text{La}_2\text{CaM}$ 与 CaM 受体的结合跟 Ca_4CaM 与 CaM 受体的结合基本相似^[137,138],且 La^{3+} 这样的结合形式也可直接激活与增殖有关的 CaM 的靶酶,如与细胞增殖和凋亡有关的钙调神经磷酸酶(calcineurin)^[139]。但这些都是化学体系中作用的结果,是否能外推到细胞体系以及这种作用结果又如何体现在生物学效应上,依然不清楚。

总结各方面研究所得结果,将稀土引起的细胞增殖、凋亡以及细胞保护中的可能信号转导机制归纳为图 10。

5.4 Ln 的促增殖作用会引发促癌、致癌或致突变效应吗?

由于细胞增殖是肿瘤发生发展的一个重要环节,而所有致癌/促癌有毒元素的作用过程中都包含有促细胞增殖这个环节。那么 Ln 的促增殖作用会不会也导致肿瘤发生?而且,如果 Ln 促进细胞增殖,会不会反而促进癌的发展呢?

关于 Ln 是否致畸、致突变的研究,所得结论可能与所试物质、所用剂量、观测指标等实验方法有关。如 Pr_6O_{11} 和 Nd_2O_3 可以增加小鼠骨髓染色体畸变^[140];农用混合氨基酸稀土也有一定致畸作用^[141]。但是低剂量长时间给与稀土未见有致癌作用^[142,143]。

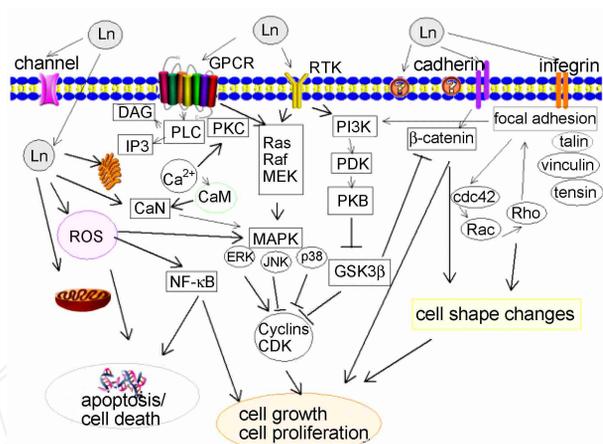


图 10 Ln 对细胞增殖凋亡的可能信号转导路径示意图

Fig. 10 Possible signal transduction pathways involved in Ln-induced cell proliferation and apoptosis

实际上,从肿瘤发生发展机理来看,促进细胞增殖并不是金属致癌作用的充分条件。癌症的发生发展是一个复杂过程,一般经历三个阶段:起始(initiation)、促成(promotion)和进展(progression)三个阶段。在起始阶段,常以 *c-myc* 等癌基因的突变为使细胞获得不死性;在促成阶段,常以 *ras* 等核外作用的基因突变为使细胞获得成瘤性;在进展阶段,一些抑癌基因如 E-cadherin 失活,细胞获得侵袭转移性。换句话说,癌变过程是一个多基因参与的复杂的渐进过程。致癌物需要在一定剂量下长时间的作用引起基因组 DNA 损伤的积累而导致癌变。对于金属而言,有致突变作用的主要是能够产生和促进产生 ROS 的过渡金属^[116],特别是亲硫金属。镧系元素并不具有这些金属的特性,所以从这个角度看,它作为致突变物的可能性很小。但是还需要从类钙性来分析,因为 Ca^{2+} 在癌发生发展中也起到关键作用^[144]。类似钙离子的金属离子如果诱导细胞内钙释放,抑制钙泵,引起细胞内 Ca^{2+} 离子浓度增加,则高 Ca^{2+} 和高 ROS 水平有时可以协同诱导原癌基因(如 *c-fos*, *c-jun*) 过表达^[144]。不过镧系元素还有阻断钙离子通道的作用,可能引起细胞内钙离子浓度降低。

总之,目前并没有证据显示由 Ln 的促增殖作用会引发细胞的促癌、致癌或致突变作用。明确的结论还需要基于对稀土促进增殖的信号转导途径的阐明。

6 结束语

虽然上面讨论的都是有关镧系元素的问题,但

是当我们在细胞层次研究任何金属离子及配合物的生物效应时都会遇到类似的问题。也可以说这是细胞无机化学中的一部分基本问题。其中关键问题是：

(1) 如何测定和估计在细胞参与的体系中金属的物种分布；

(2) 如何研究生物体内难溶无机物微粒的形成和表现生物效应的化学基础；

(3) 如何研究决定无机物种生物效应的基本因素,以及决定相关物种间生物效应差异的基本因素；

(4) 探讨金属物种对细胞生命过程(细胞周期)和功能的干预规律。

现在看来,在细胞生物学发展到今天的全系统(global)水平,在分子生物学发展到网络(network)水平时,并不是和生物无机化学距离越来越远,而是越来越需要生物无机化学去解决其中的关键问题。

参 考 文 献

- [1] Wang K, Li R, Cheng Y, et al. *Coord. Chem. Rev.*, 1999, 190/192: 297—308
- [2] Adding L C, Bannenberg G L, Gustafsson L E. *Cardiovasc Drug Rev.*, 2001, 19: 41—56
- [3] Wang K, Cheng Y, Yang X D, et al. *Cell Responses to Lanthanides and Potential Pharmacological Actions of Lanthanides*. New York: Marcel Dekker, Inc., 2003
- [4] Fricker S P. *Chem. Soc. Rev.*, 2006, 35: 524—533
- [5] 杨晓改(Yang X G), 杨晓达(Yang X D), 王夔(Wang K). *化学进展(Progress in Chemistry)*, 2007, 19: 201—204
- [6] Amato R J, Jac J, Hernandez-McClain J. *Clin. Genitourin Cancer*, 2008, 6: 73—78
- [7] William W N, Zinner R G, Karp D D, et al. *J. Thorac. Oncol.*, 2007, 2: 745—750
- [8] Thomas S R, Khuntia D. *Int. J. Nanomedicine*, 2007, 2: 79—87
- [9] 倪嘉缙(Ni J Z). *稀土生物无机化学(第二版)*(*Bioinorganic Chemistry of Rare Earths*). 北京: 科学出版社(Beijing: Science Press), 2002
- [10] Sze G, Berry I, Brant-Zawadzki M, et al. *Acta Radiol. Suppl.*, 1986, 369: 568—571
- [11] Cowper S E, Robin H S, Steinberg S M, et al. *Lancet*, 2000, 356: 1000—1001
- [12] Cowper S E, Bucala R. *Am. J. Dermatopathol.*, 2003, 25: 358
- [13] Grobner T. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2006, 21: 1104—1108
- [14] Thomsen H S, Marckmann P, Logager V B. *Cancer Imaging*, 2007, 7: 130—137
- [15] Michaely H J, Thomsen H S, Reiser M F, et al. *Radiologe*, 2007, 47: 785—793
- [16] Thomsen H S, Marcos S K, Dawson P. *Clin. Radiol.*, 2006, 61: 905—906
- [17] Davies J N P. *East Afr. Med. J.*, 1948, 25: 10—16
- [18] Yin R. *Chin. Med. Sci. J.*, 2000, 15: 55—60
- [19] Bukhman G, Ziegler J, Parry E. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2008, 2: art. no. e97
- [20] Eapen J T. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 1998, 60: 168—170
- [21] Andy J J. *West Afr. J. Med.*, 2001, 20: 199—207
- [22] Smith B. *British Geology Survey Technical Report WC/98/26*, 1998, Natural Environment Research Council
- [23] Preeta R, Nair R R. *J. Mol. Cell Cardiol.*, 1999, 31: 1573—1580
- [24] Nair R R, Preeta R, Smitha G, et al. *Biol. Trace Elem. Res.*, 2003, 94: 237—246
- [25] Aime S, Canavese C, Stratta P. *Kidney Int.*, 2007, 72: 1162—1163
- [26] Shelley W B, Hurley H J, Mayock R L, et al. *J. Invest. Dermatol.*, 1958, 31: 301—303
- [27] Brambilla S, Valaperta S, Graziani G, et al. *Clin. Biochem.*, 2008, 41: 1029—1033
- [28] De Broe M E. *Semin. Dial.*, 2008, 21: 142—144
- [29] 朱为方(Zhu W F), 徐素琴(Xu S Q). *科学通报(Science Bulletin)*, 1996, 41: 914—916
- [30] 王瑜(Wang Y), 赵晓宁(Zhao X N). *中华劳动卫生职业病杂志(Chinese Journal of Industrial Hygiene and Occupational Diseases)*, 1999, 17: 85—87
- [31] 章子贵(Zhang Z G), 申秀英(Shen X Y), 许晓路(Xu X L)等. *浙江师范大学学报(自然科学版)(Journal of Zhejiang Normal University(Natural Sciences))*, 2004, 27: 167—170
- [32] Briner W, Rycek R F, Moellenberndt A, et al. *Neurotoxicol. Teratol.*, 2000, 22: 573—581
- [33] Feng L, Xiao H, He X, et al. *Neurotoxicol. Teratol.*, 2006, 28: 119—124
- [34] 章子贵(Zhang Z G), 陈燕珍(Chen Y Z), 申秀英(Shen X Y)等. *环境与职业医学(Journal of Environmental and Occupational Medicine)*, 2007, 24: 193—195
- [35] 吴敏仪(Wu M Y), 张萍(Zhang P), 杨维东(Yang W D)等. *卫生研究(Journal of Hygiene Research)*, 2006, 3: 310—312
- [36] Damment S J, de Broe M E, D'Haese P C, et al. *Toxicol. Lett.*, 2007, 168: 186—189
- [37] Altmann P, Barnett M E, Finn W F. *Kidney Int.*, 2007, 71: 252—259
- [38] Magda D, Miller R A. *Semin. Cancer Biol.*, 2006, 16: 466—476
- [39] Evans J P, Xu F, Sirisawad M, et al. *Mol. Pharmacol.*, 2007, 71: 193—200
- [40] Mani C, Upadhyay S, Lacy S, et al. *J. Pharm. Sci.*, 2005, 94: 559—570
- [41] Bingham D, Dobrota M. *J. Inorg. Biochem.*, 1995, 59: 39—52
- [42] López-González H, Solache-Ríos M, Jiménez-Reyes M, et al. *Journal of Solution Chemistry*, 2005, 34: 427—441
- [43] Luo Y R, Byrne R H. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2004, 68: 691—699
- [44] Cetiner Z S, Wood S A, Gammons C H. *Chemical Geology*, 2005, 217: 147—169
- [45] Boland L M, Brown T A, Dingleline R. *Brain Res.*, 1991, 563: 142—150

- [46] Caldwell R A, Clemo H F, Baumgarten C M. *Am. J. Physiol.*, 1998, 275: C619—C621
- [47] Barnhart J L, Kuhnert N, Bakan D A, et al. *Magn. Reson. Imaging*, 1987, 5: 221—231
- [48] Spencer A, Wilson S, Harpur E. *Hum. Exp. Toxicol.*, 1998, 17: 633—637
- [49] Spencer A J, Wilson S A, Batchelor J, et al. *Toxicol. Pathol.*, 1997, 25: 245—255
- [50] Mizgerd J P, Molina R M, Stearns R C, et al. *J. Leukoc. Biol.*, 1996, 59: 189—195
- [51] Geiser M, Rother-Rutishauser B, Kapp N, et al. *Environ. Health Perspect.*, 2005, 113: 1555—1560
- [52] Hocine N, Berry J P, Jaafoura H, et al. *Cell Mbl. Biol.*, 1995, 41: 271—278
- [53] Lazar G. J. *Reticuloendothel. Soc.*, 1973, 13: 231—237
- [54] Wasserman A J, Monticello T M, Feldman R S, et al. *Toxicol. Pathol.*, 1996, 24: 588—594
- [55] Yoneda S, Eni N, Fujita Y, et al. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 1995, 28: 65—70
- [56] Witt G C, May P M, Webb J, et al. *Biometals*, 1996, 9: 351—361
- [57] Jarvis N V, Wagener J M, Jackson G E. *Journal of the Chemical Society Dalton Transactions*, 1995, 1411—1415
- [58] Kiss T, Odani A. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 2007, 80: 1691—1702
- [59] Jackson G, Wynchank M, Woudenberg M. *Magn. Reson. Med.*, 1990, 16: 57—66
- [60] Jackson G, Byrne M. J. *Nucl. Med.*, 1996, 37: 379—386
- [61] 孟路(Meng L), 陈杭亭(Chen H T). *高等学校化学学报* (*Chemical Journal of Chinese Universities*), 1999, 20: 5—8
- [62] Wang Y, Lu X, Wang S Y, et al. *Chin. Chem. Lett.*, 2001, 12: 161—162
- [63] Lu X, Wang Y, Zhang H. *Chin. Chem. Lett.*, 2001, 12: 809—812
- [64] Zhang H Y, Lu X, Niu C J, et al. *Chinese Chemical Letters*, 2002, 13: 658—659
- [65] Bell R A, Ogden N, Kramer J R. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.*, 2002, 133: 175—188
- [66] Yokel R A, Lasley S M, Dorman D C. *J. Toxicol. Environ. Health. B Crit. Rev.*, 2006, 9: 63—85
- [67] Bresson C, Lamouroux C, Sandre C, et al. *Biochimie*, 2006, 88: 1619—1629
- [68] Sun X, Tsang C N, Sun H. *Metallomics*, 2009, 1: 25—31
- [69] Kazy S K, Das S K, Sar P. J. *Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2006, 33: 773—783
- [70] Merroun M L, Chekroun K B, Arias J M, et al. *Chemosphere*, 2003, 52: 113—120
- [71] Nilsson J R. *European Journal of Protistology*, 2003, 39: 468—474
- [72] Nilsson J R. *Acta Protozool.*, 2003, 42: 19—30
- [73] Bucala R. J. *Am. Coll. Radiol.*, 2008, 5: 36—39
- [74] Behr-Miellet J, Gressier B, Brunet C, et al. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, 1996, 18: 437—442
- [75] Sarka L, Burai L, Brucher E. *Chemistry*, 2000, 6: 719—724
- [76] Lacour B, Lucas A, Auchere D, et al. *Kidney Int.*, 2005, 67: 1062—1069
- [77] Canavese C, Mereu C, Nordio M, et al. *Curr. Med. Chem.*, 2005, 12: 1631—1636
- [78] McLeod C, Cox A, Bramall N. *Kidney Int.*, 2005, 68: 2906. author reply 2906—2907
- [79] Rambeck W. *Kidney Int.*, 2005, 68: 2909. author reply 2909—2910
- [80] Slatopolsky E, Liapis H, Finch J. *Kidney Int.*, 2005, 68: 2809—2813
- [81] Damment S J. *Kidney Int.*, 2006, 70: 1372—1373. author reply 1373
- [82] Dorovini-Zis K, Sato M, Coping G, et al. *Acta Neuropathol.*, 1983, 60: 49—60
- [83] 周晓波(Zhou X B), 魏幼璋(Wei Y Z). *生命科学研究* (*Life Science Research*), 1999, 3: 30—35
- [84] Feng L, Xiao H, He X, et al. *Toxicol. Lett.*, 2006, 165: 112—120
- [85] Feng L, He X, Xiao H, et al. *Biol. Trace Elem. Res.*, 2007, 117: 89—104
- [86] 胡珊珊(Hu S S), 申秀英(Shen X Y), 许晓路(Xu X L)等. *中国公共卫生* (*Chinese Journal of Public Health*), 2008, 34—35
- [87] 陈祖义(Chen Z Y), 刘玉(Liu Y). *农村生态环境* (*Journal of Ecology and Rural Environment*), 2002, 18: 52—55
- [88] Cheng Y, Yao H, Lin H, et al. *Chem. Biol. Interact.*, 1999, 121: 267—289
- [89] Cheng Y, Liu M, Li R, et al. *Biochim. Biophys. Acta*, 1999, 1421: 249—260
- [90] Cheng Y, Chen B, Lu J, et al. *J. Inorg. Biochem.*, 1998, 69: 1—7
- [91] Adding L C, Bannenberg G L, Gustafsson L E. *Pharmacol. Toxicol.*, 1998, 83: 8—15
- [92] Pletnev I V, Zernov V V. *Analytica Chimica Acta*, 2002, 455: 131—142
- [93] Kinraide T B, Yermiyahu U. *J. Inorg. Biochem.*, 2007, 101: 1201—1213
- [94] Corson D C, Williams T C, Sykes B D. *Biochemistry*, 1983, 22: 5882—5889
- [95] Nitz M, Sherawat M, Franz K J, et al. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2004, 43: 3682—3685
- [96] Schubert D, Dargusch R, Raitano J, et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2006, 342: 86—91
- [97] Niu J, Azfer A, Rogers L M, et al. *Cardiovasc. Res.*, 2007, 73: 549—559
- [98] Heckert E G, Seal S, Self W T. *Environ. Sci. Technol.*, 2008, 42: 5014—5019
- [99] 安宜(An Y), 李荣昌(Li R C), 王夔(Wang K). *中国稀土学报* (*J. of Rare Earths*), 2005, 23: 105
- [100] 刘会雪(Liu H X), 杨晓达(Yang X D), 王夔(Wang K). *中国稀土学报* (*J. of Rare Earths*), 2006, 24: 484—488
- [101] 张金超(Zhang J C), 许善锦(Xu S J), 王夔(Wang K)等. *科学通报* (*Chinese Science Bulletin*), 2003, 48: 1767—1771

- [102] Shinohara A, Chiba M, Inaba Y. *Mater. Sci. Forum.*, 1999, 315/317: 368—372
- [103] Shinohara A, Chiba M, Inaba Y. *Journal of Alloys and Compounds*, 2006, 408: 405—408
- [104] Ding S, Liang T, Zhang C, et al. *J. Exp. Bot.*, 2005, 56: 2765—2775
- [105] Praeger F C, Gilchrest B A. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1989, 190: 28—34
- [106] 程水娥 (Cheng S E), 陈兴安 (Chen X A). *卫生毒理学杂志 (Journal of Toxicology)*, 1995, 9: 51—51
- [107] 聂毓秀 (Nie Y X), 张树功 (Zhang S G). *中国稀土学报 (J. of Rare Earths)*, 1989, 7: 58—64
- [108] 聂毓秀 (Nie Y X), 张树功 (Zhang S G). *中国稀土学报 (J. of Rare Earths)*, 1990, 8: 350—353
- [109] 王玺 (Wang X), 安丽芝 (An L Z). *中国稀土学报 (J. of Rare Earths)*, 1998, 16: 252—256
- [110] Zhang J C, Xu S J, Wang K. *Prog. Nat. Sci.*, 2003, 13: 266
- [111] Zhang D W, Zhang J C, Chen Y, et al. *Progress in Natural Science*, 2007, 17: 618—623
- [112] Shi Y, Gu B D, Shi Y L, et al. *Biometals*, 2008, doi: 10. 1007/s10534—008-9168-1
- [113] 刘会雪 (Liu H X), 杨晓达 (Yang X D), 王夔 (Wang K). *中国稀土学报 (J. of Rare Earths)*, 2004, 22: 434
- [114] Calabrese EJ, Baldwin L A. *Crit. Rev. Toxicol.*, 2001, 31: 353—424
- [115] Caddipati J P, Rajeshkumar N V, Grove J C, et al. *Nonlinearity in Biology, Toxicology, and Medicine*, 2003, 1: 199—212
- [116] Valko M, Rhodes C J, Moncol J, et al. *Chem. Biol. Interact.*, 2006, 160: 1—40
- [117] Lehnert B E, Iyer R. *Hum. Exp. Toxicol.*, 2002, 21: 65—69
- [118] Damelin L H, Alexander J J. *Hum. Exp. Toxicol.*, 2001, 20: 347—358
- [119] Liu H, Yuan L, Yang X, et al. *Chem. Biol. Interact.*, 2003, 146: 27—37
- [120] Shimada H, Nagano M, Funakoshi T, et al. *J. Toxicol. Environ. Health*, 1996, 48: 81—92
- [121] 栗建林 (Su J L), 张丽帼 (Zhang L G), 刘建中 (Liu J Z) 等. *中国稀土学报 (J. of Rare Earths)*, 1998, 16: 184—187
- [122] 庞新民 (Pang X M), 苏英 (Su Y). *卫生毒理学杂志 (Journal of Toxicology)*, 1995, 9: 120—120
- [123] 刘玉荣 (Liu Y R), 陈东 (Chen D), 姜文华 (Jiang W H) 等. *吉林大学学报: 医学版 (Journal of Jilin University (Medicine Edition))*, 2006, 32: 1029—1033
- [124] Ji Y J, Xiao B, Wang Z H, et al. *Biomed. Environ. Sci.*, 2000, 13: 287—292
- [125] 吴春利 (Wu C L), 刘洁生 (Liu J S), 杨维东 (Yang W D) 等. *中国稀土学报 (J. of Rare Earths)*, 2003, 21: 323—327
- [126] 李晓滨 (Li X B), 陈兴安 (Chen X A). *中国稀土学报 (J. of Rare Earths)*, 2000, 18: 156—159
- [127] 曾先捷 (Zeng X J), 邝晓聪 (Kuang X C), 温冠媚 (Wen G M) 等. *广西医科大学学报 (Journal of Guangxi Medical University)*, 2001, 18: 776—777
- [128] 李剑 (Li J), 李洁 (Li J), 戴革 (Dai G) 等. *中华血液学杂志 (Chinese Journal of Hematology)*, 2006, 27: 60—62
- [129] Zhang Y, Fu L J, Li J X, et al. *Biometals*, 2009, doi: 10. 1007/s10534—009-9208-5
- [130] Fu L J, Li J X, Yang X G, et al. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2009, 14: 219—227
- [131] Yu S, Hu J, Yang X, et al. *Biochemistry*, 2006, 45: 11217—11225
- [132] Wang X, Yuan L, Huang J, et al. *J. Cell. Biochem.*, 2008, 105: 1307—1315
- [133] 程驿 (Cheng Y), 李友 (Li Y). *中国稀土学报 (J. of Rare Earths)*, 1999, 17: 54—59
- [134] 劳凤云 (Lao F Y), 李荣昌 (Li R C). *中国稀土学报 (J. of Rare Earths)*, 2002, 20: 342—347
- [135] Du X L, Zhang T L, Yuan L, et al. *Eur. J. Biochem.*, 2002, 269: 6082—6090
- [136] Hu J, Jia X, Li Q, et al. *Biochemistry*, 2004, 43: 2688—2698
- [137] Yang Q, Hu J, Yang X, et al. *J. Inorg. Biochem.*, 2008, 102: 278—284
- [138] 徐崑 (Xu K). *北京大学博士论文 (Doctoral Dissertation of Peking University)*, 2008
- [139] Hu J, Yang X, Wang K. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2005, 10: 704—711
- [140] Jha A M, Singh A C. *Mutat. Res.*, 1995, 341: 193—197
- [141] 卢晓翠 (Lu X C), 王登高 (Wang D G). *癌变. 畸变. 突变 (Carcinogenesis, Teratogenesis & Mutagenesis)*, 1995, 7: 93—95
- [142] 王信隆 (Wang X L), 芦燕青 (Lu Y Q). *癌变. 畸变. 突变 (Carcinogenesis, Teratogenesis & Mutagenesis)*, 1996, 8: 38—40
- [143] 纪云晶 (Ji Y J). *中国稀土学报 (稀土卫生毒理学专辑) (J. of Rare Earths)*, 1985, 1—10
- [144] Joseph P, Muchnok T K, Klisish M L, et al. *Toxicol. Sci.*, 2001, 61: 295—303