

# 高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱研究 Medaka 体内水溶性汞结合蛋白

李璐 何滨\* 江桂斌

(中国科学院生态环境研究中心环境化学与生态毒理学重点实验室, 北京 100085)

**摘要** 采用高效液相色谱与电感耦合等离子体质谱联用技术, 对不同形态汞暴露后的 Medaka 肝脏和脑组织中水溶性蛋白进行研究, 以体积排阻柱为液相分离柱, 流动相为 0.15 mol/L NH<sub>4</sub>Ac, 流速为 0.5 mL/min。利用电感耦合等离子体质谱对 Medaka 肝脏和脑组织提取液中铜、锌和汞的含量进行了分析, 检出限为 0.01~0.05 μg/L, 元素的加标回收率为 93.1%~97.0%。通过与空白组对比发现, 汞暴露后的 Medaka 鱼体肝脏和脑组织对水体中的汞有一定程度的富集; 不同形态汞暴露后, 在 Medaka 肝脏和脑组织中的分布明显不同, 并且都会在一定程度上降低 Medaka 肝脏和脑组织中铜与锌的含量, 有利于进一步研究汞在生物体内的毒性机理。

**关键词** 高效液相色谱; 电感耦合等离子体质谱; 汞结合蛋白

## 1 引言

汞因其特殊的物理化学性质, 一直被广泛应用。但汞具有较高的生物毒性, 如神经毒性和肾脏毒性<sup>[1,2]</sup>。自 20 世纪 50 年代日本水俣病爆发后, 对于汞毒性的研究备受关注, 汞污染已经成为一个全球性污染问题<sup>[3,4]</sup>。汞的主要存在形式是单质汞、无机汞和有机汞。不同形态的汞在环境中和生物体中可以相互转化, 并且对生物体的毒性也不相同<sup>[5]</sup>。环境中的汞污染物被动植物吸收后在生物链中逐渐富集传递进入人体, 在被人体肠道吸收后, 富集在肝、胃、脑组织等部位, 对中枢神经造成危害<sup>[6]</sup>, 严重的可导致死亡。目前, 对于汞的研究主要集中在对环境和生物体中总汞的测定<sup>[7,8]</sup>, 以及小分子的有机汞和无机汞的形态分析<sup>[9,10]</sup>, 但是汞在生物体内吸收、迁移、转化和代谢的途径以及与生物活性分子结合后对生物活性影响的机理尚不十分清楚。

随着金属组学概念的提出, 人们对于金属的研究重点已经从总量测定和小分子的形态分析, 转移到金属与生物大分子的相互作用<sup>[11]</sup>。在金属结合蛋白的研究中, 保证目标蛋白在分离过程中的稳定性十分关键。高效液相色谱与电感耦合等离子体质谱(HPLC-ICP-MS)联用的技术具有接口简单, 高效分离, 灵敏度高, 前处理简单等特点, 被广泛应用于生物样品中金属结合蛋白的分析<sup>[12~14]</sup>。

动物暴露实验是外源性有毒化合物毒理学研究的常用手段。鱼是人类食物摄入汞的主要来源, 水体中的汞可通过食物链在鱼体高度富集, 富集倍数高达数十万倍<sup>[15]</sup>。本研究选用鱼类模型作为研究汞化合物毒性机制的简单有效的实验动物。日本 Medaka (*Oryzias latipes*) 自 20 世纪 80 年代被国际标准化组织列为毒性实验受试种之一, 其具有体形小、饲养方便、繁殖周期短、繁殖能力强、对化学毒物敏感等优点, 可很好地应用于多种环境污染物的毒理学实验中, 已作为一种国际通用的鱼类模型被广泛使用<sup>[16~18]</sup>。

本实验用不同形态的汞对 Medaka 进行暴露, 利用 HPLC-ICP-MS 联用技术对甲基汞和无机汞暴露后的 Medaka 肝脏和脑组织中水溶性汞结合蛋白进行研究, 同时还对肝脏和脑组织蛋白提取液中铜、锌和汞的含量进行了测定, 有助于进一步研究不同形态汞在生物体中吸收、迁移、累积、生物转化及代谢的机制。

## 2 实验部分

### 2.1 仪器与试剂

1200 型高效液相色谱仪, 7500ce 型电感耦合等离子体质谱仪(美国 Agilent 公司)。

HgCl<sub>2</sub>(≥99.5, 北京化工厂); 氯化甲基汞(≥98%, 德国 Merck 公司); HNO<sub>3</sub>(GR, 65%。德国 Merck 公司); 甲醇(HPLC 纯, 美国 Baker 公司); 乙酸铵(GR, 北京化工厂); Tris(超纯级, 美国 Solon 公司)。除特别指明外, 其它试剂均为分析纯。去离子水(18.3 MΩ cm)来自超纯水系统(Barnstead International, Dubuque, IA, USA)。

取适量 HgCl<sub>2</sub> 和氯化甲基汞, 分别溶于 5% (V/V) HNO<sub>3</sub>-甲醇混合溶液中, 配制成含 1000 mg/L Hg 的标准储备液, 密封于棕色容量瓶中, 于 4 °C 冰箱中保存。

## 2.2 动物汞染毒实验

实验用鱼养殖在与实验用水的水质、温度和光照一致的循环流动水系统中, 在标准无病害环境下, 每天投喂市售丰年虫 2 次。循环水为自来水经活性炭多层过滤纯化, 预先至少曝气 24 h 以上, 其水质参数如下: pH 6.9~7.9; 溶解氧浓度为 5~7 mg/L; 硬度为 CaCO<sub>3</sub> 200 mg/L; 电导率为 650 μS/cm; 水温保持在 22.5~25.5 °C 范围内。白天/黑夜循环时间是 12 h/12 h。养殖密度为每升水 1 g 鱼。实验用鱼均健康并适于常规毒理学暴露实验。

氯化甲基汞和 HgCl<sub>2</sub> 染毒实验均为静水暴露方式。选取 8 月龄 Medaka (*Oryzias latipes*) 成鱼, 平均体长 3.59 cm, 平均体重 0.52 g, 随机分为空白对照组、HgCl<sub>2</sub> 暴露组和氯化甲基汞暴露组, 每组 20 条, 暴露组的 Hg 暴露浓度为 20 μg/L。为了保证合适的水质和稳定的暴露浓度, 每日更换暴露溶液。

## 2.3 样品制备

暴露 1 周后, 解剖取鱼肝脏和脑组织, 用 0.05 mol/L Tris-HAc 缓冲溶液(1:50, w/w, pH 7.4)匀浆, 在 4 °C 以 12000 r/min 离心 30 min, 取上清液用 0.45 μm 的水性滤膜进行过滤, 用于实验分析。

## 2.4 HPLC-UV-ICP-MS 分析

蛋白提取液用高效液相色谱进行分离, 色谱柱为 Nanofilm SEC150 体积排阻色谱柱 (Sepax Technologies), 流动相为 0.15 mol/L NH<sub>4</sub>Ac, 流速为 0.5 mL/min, 进样量 20 μL, 紫外检测波长为 254 nm。HPLC 的流出液用 PEEK 管直接接入 ICP-MS, 进行<sup>202</sup>Hg 在线监测。ICP-MS 的参数: 石英双通道雾室, 同心雾化器, RF 功率 1550 W, 载气流速 0.85 L/min, 辅气流速 0.37 L/min, 雾室温度 2 °C, 测定同位素<sup>202</sup>Hg。

## 2.5 提取液中金属总量的测定

配制浓度为 1.0, 5.0, 10.0, 20.0 和 50.0 μg/L 的系列 Cu, Zn 和 Hg 混合标准溶液, 用 ICP-MS 测量同位素<sup>63</sup>Cu, <sup>66</sup>Zn 和<sup>202</sup>Hg, 绘制标准曲线。肝脏和脑组织的蛋白提取液用 5% HNO<sub>3</sub> 稀释 20 倍, 用 ICP-MS 直接测定提取液中 Cu, Zn 和 Hg 的含量。以 Ge 和 In 为内标, 每个样品平行测定 3 次。

# 3 结果与讨论

## 3.1 不同形态汞暴露后 Medaka 肝脏提取液的 HPLC-ICP-MS 分析

用 HPLC-ICP-MS 对 Medaka 肝脏提取液进行分析, 如图 1 所示。通过与空白组对比可见, 经过无机汞和甲基汞暴露后的 Medaka 肝脏中均有一定量的汞富集。对比 HPLC 紫外谱图和 ICP-MS 质谱图的保留时间发现, 汞暴露组 Medaka 肝脏提取液中均含有 3 个汞结合蛋白/多肽, 保留时间分别为 4.5, 5.4 和 6.7 min, 通过标准蛋白计算其相对应的分子量分别为 199, 70 和 14 kDa。在监测 Hg 的同时, 还对 Medaka 肝脏提取液中的 Cu 和 Zn 进行了监测, 结果发现, 目标蛋白在结合了 Hg 的同时, 还结合了大量 Cu<sup>2+</sup> 和 Zn<sup>2+</sup>。金属硫蛋白(MT)是一种富含半胱氨酸的金属结合蛋白, 分子量为 6~7 kDa, 有 4 种异构体 MT-I, MT-II, MT-III 和 MT-IV, 其中 MT-I 和 MT-II 主要分布在肝脏和肾脏中<sup>[19]</sup>。根据分子量推测, 保留时间为 6.7 min 的汞结合蛋白可能是金属硫蛋白的聚合物, 或者是金属硫蛋白与其它蛋白相互作用后形成的蛋白复合物。但是对于 Medaka 肝脏提取液中汞结合蛋白的准确结构的确定尚有待深入研究。

对比无机汞暴露组和甲基汞暴露组 Medaka 肝脏提取液的 ICP-MS 质谱图还可以发现, 不同形态汞暴露后, 汞在 Medaka 肝脏中的分布模式存在一定差异。甲基汞暴露后, Hg 主要结合在保留时间 6.7 min 的蛋白片段上, 而无机汞暴露组的汞主要结合在保留时间 4.5 min 的蛋白片段上。

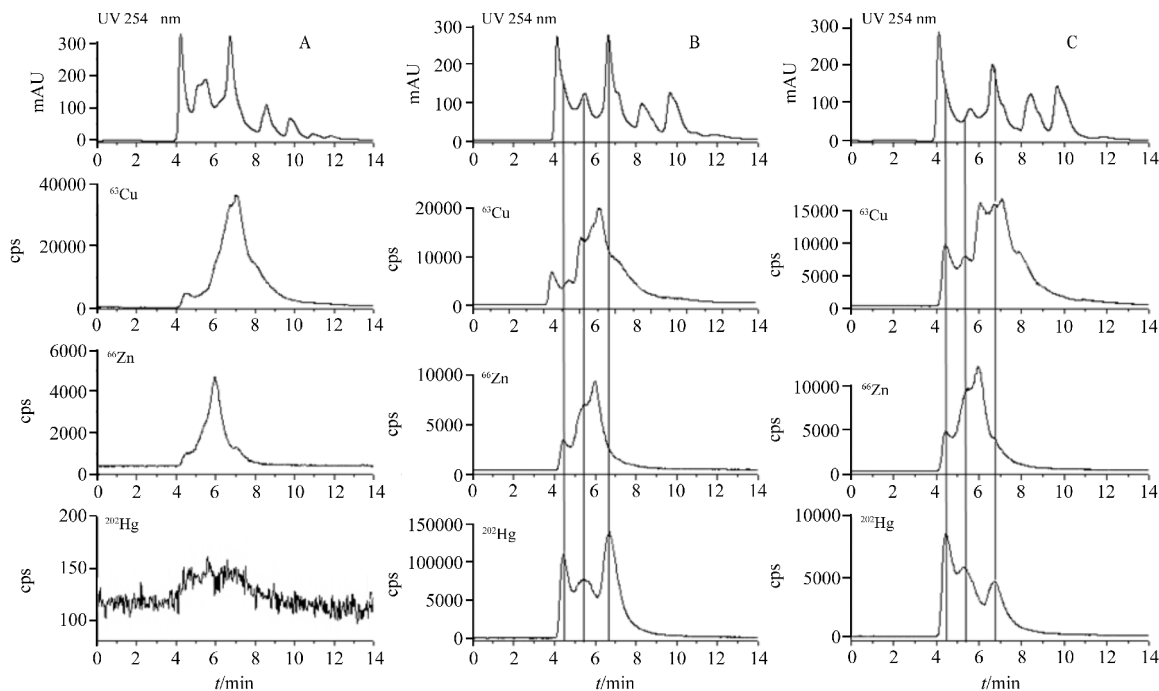


图1 肝脏提取液的 HPLC-ICP-MS 谱图

Fig. 1 HPLC-ICP-MS spectra of liver extract

A. 空白组 (Control group); B. 甲基汞暴露组 (Exposure group of MeHgCl<sub>2</sub>); C. 无机汞暴露组 (Exposure group of HgCl<sub>2</sub>)。

### 3.2 不同形态汞暴露后 Medaka 脑组织提取液的 HPLC-ICP-MS 分析

Medaka 脑组织提取液的 HPLC-ICP-MS 分析结果如图 2 所示。不同形态汞暴露后 Medaka 脑组织中均富集了一定量的汞, 并且含有 3 个汞结合蛋白/多肽片段, 保留时间分别为 4.4、5.5 和 7.1 min, 相对应的分子量为 209、70 和 6 kDa。通过对 Cu 和 Zn 的监测发现, Medaka 脑组织提取液中的汞结合蛋白片段上也含有大量的 Cu 和 Zn。保留时间为 6.7 min 的汞结合蛋白与金属硫蛋白的分子量大小相符, 推断其可能为金属硫蛋白。Aschner 等<sup>[20]</sup>研究发现, 甲基汞会富集星形胶质细胞中, 并且诱发星形胶质细胞合成金属硫蛋白。

无机汞和甲基汞暴露组中的 Medaka 脑组织提取液中汞元素的分布存在较大差异。无机汞暴露组 Medaka 脑组织提取液中汞主要分布在保留时间为 4.4 min 的蛋白片段上, 而甲基汞暴露组中 Medaka 脑组织提取液中的汞主要分布在保留时间为 5.5 min 的蛋白片段上。

### 3.3 不同形态汞暴露后 Medaka 肝脏和脑组织中 Cu, Zn 和 Hg 的总量测定

应用 ICP-MS 测定 Medaka 肝脏和脑组织提取液中的 Cu, Zn 和 Hg 的干扰主要来源于质谱干扰及生物样品的基体效应。本实验通过优化仪器条件、稀释样品、内标矫正、标准加入等方法消除干扰。同时在总量的测量过程中在线加入 1 mg/L Ge 和 In 内标溶液, 可以有效克服仪器漂移, 保证实验测定的准确性。

Cu, Zn 和 Hg 的标准工作曲线线性相关系数均大于 0.9995; 检出限分别为 0.02、0.05 和 0.01 μg/L。由于缺少 Medaka 生物组织提取液的标准参考物质, 本实验采取加标回收法验证方法的准确性。向空白组 Medaka 肝脏蛋白提取液中加入 1 mg/L 的 3 种金属的混合标准溶液, 测定加标回收率。Cu, Zn 和 Hg 的回收率分别为 95.2%、93.1% 和 97.0%。

用 ICP-MS 对 Medaka 肝脏和脑组织提取液中的 Cu, Zn 和 Hg 含量进行测定, 结果如表 1 所示。与空白组相比, 无机汞暴露组和有机汞暴露组 Medaka 肝脏提取液和脑组织提取液中的常量元素 Cu 和 Zn 的含量都有所下降。结合 HPLC-ICP-MS 的分析结果, 肝脏提取液和脑组织提取液中的 Hg 结合蛋白上也同时含有 Cu 和 Zn, 可以推断 Hg 通过暴露进入鱼体后, 与 Cu 和 Zn 结合蛋白或者运输蛋白上的活性点位或者非活性点位相结合, 取代了活性位点上的 Cu 和 Zn, 或者改变了生物大分子的正常代谢功能, 从而抑制了鱼体对 Cu 和 Zn 的吸收, 导致 Medaka 脑组织和肝脏组织中 Cu 和 Zn 的含量下降。

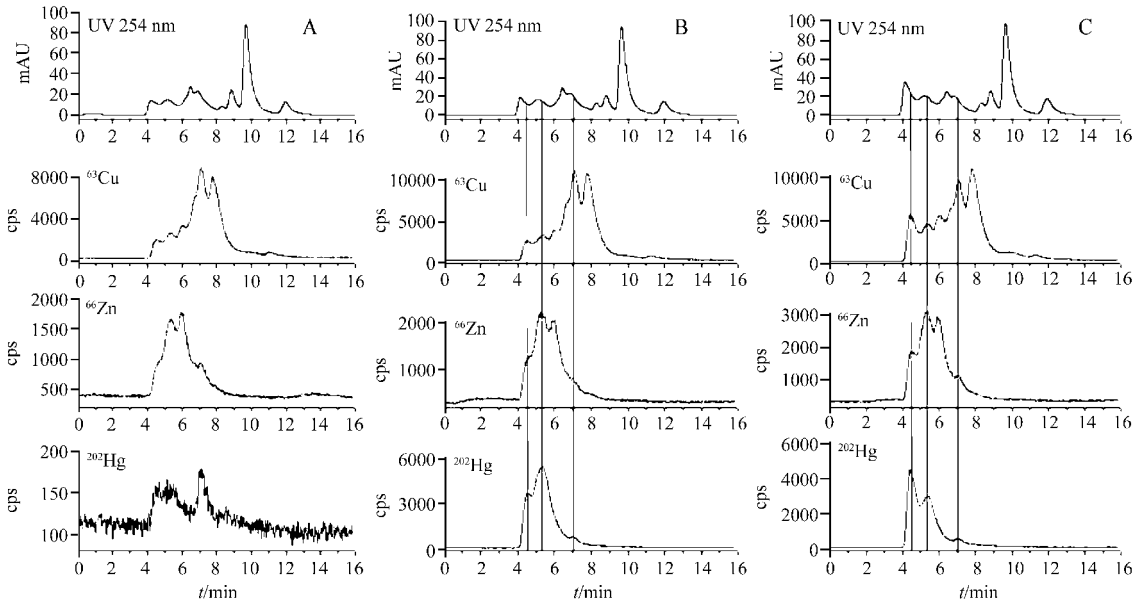


图 2 脑组织提取液的 HPLC-ICP-MS 谱图

Fig. 2 Analysis of brain extraction by HPLC-ICP-MS

A. 空白组 (control group); B. 甲基汞暴露组 (Exposure group of MeHgCl<sub>2</sub>); C. 无机汞暴露组 (Exposure group of HgCl<sub>2</sub>).

对比甲基汞暴露组和无机汞暴露组可见,甲基汞暴露组 Medaka 肝脏提取液和脑组织提取液中的 Hg 的含量明显高于无机汞暴露组,这是因为无机汞在消化道内的吸收率小于 10%,而甲基汞的吸收率大于 90%<sup>[1]</sup>。

表 1 Medaka 肝脏脑组织提取液中 Cu, Zn 和 Hg 的浓度

Table 1 Copper, zinc and mercury concentrations in liver and brain extraction of Medaka

样品 Sample		Cu ( $\mu\text{g/L}$ , $n=3$ )	Zn ( $\mu\text{g/L}$ , $n=3$ )	Hg ( $\mu\text{g/L}$ , $n=3$ )
肝脏提取液 Liver extract	空白组 Control group	13149 $\pm$ 421	13751 $\pm$ 992	Not Detected
	甲基汞暴露组 Exposure group of MeHgCl <sub>2</sub>	7864 $\pm$ 35	10483 $\pm$ 273	8746 $\pm$ 73
	氯化汞暴露组 Exposure group of HgCl <sub>2</sub>	8689 $\pm$ 25	12196 $\pm$ 436	2753 $\pm$ 199
脑组织提取液 Brain extract	空白组 Control group	2470 $\pm$ 79	8221 $\pm$ 605	Not detected
	甲基汞暴露组 Exposure group of MeHgCl <sub>2</sub>	1300 $\pm$ 31	5505 $\pm$ 196	4395 $\pm$ 7.7
	氯化汞暴露组 Exposure group of HgCl <sub>2</sub>	1805 $\pm$ 23	7703 $\pm$ 361	1480 $\pm$ 58

## References

- Clarkson T W. *Environ. Health Persp.*, **1992**, 100: 31~38
- Magos L, Clarkson T W. *Ann. Clin. Biochem.*, **2006**, 43(4): 257~268
- Clarkson T W. *Environ. Health Persp.*, **2002**, 110(Suppl 1): 11~23
- HUANG Zhi-Yong, HUANG Zhi-Tao, ZHANG Qiang, ZHUANG Zhi-Xia(黄志勇, 黄智陶, 张强, 庄峙厦). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, **2007**, 27(11): 2361~2366
- Clarkson T W, Magos L, Myers G J. *New Engl. J. Med.*, **2003**, 349(18): 1731~1737
- Philbert M A, Billingsley M L, Reuhl K R. *Toxicol. Pathol.*, **2000**, 28(1): 43~53
- WANG Geng, JING Miao, CAO Xuan, HAO Chun-Li, YANG Huang-Hao, YANG Guo-Sheng, WANG Xiao-Ru(王庚, 荆淼, 曹焯, 郝春莉, 杨黄浩, 杨国生, 王小如). *Chinese J. Anal. Chem. (分析化学)*, **2006**, 34(9): 1182~1186
- Shi J B, Liang L N, Yuan C G, He B, Jiang G B. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **2005**, 74(5): 980~987
- Logar M, Horvat M, Falnoga I, Stibilj V. *Fresenius J. Anal. Chem.*, **2000**, 366(5): 453~460
- LI Yan, LIU Shu-Juan, JIANG Dong-Qing, JIANG Yan, YAN Xiu-Ping(李妍, 刘书娟, 江冬青, 江焱, 严秀平). *Chinese J. Anal. Chem. (分析化学)*, **2008**, 36(6): 793~798

- 11 Gómez-Ariza J L, García-Barrera T, Lorenzo F, Bernal V, Villegas M J, Oliveira V. *Anal. Chim. Acta*, **2004**, 524 (1-2): 15~22
- 12 Casal S G, Far J, Bierla K, Ouerdane L, Szpunar J. *Metallomics*, **2010**, 2(8): 535~548
- 13 Montes-Bayón M, DeNicola K, Caruso J. *J. Chromatogr. A*, **2003**, 1000(1-2): 457~476
- 14 SHI Jun-Wen, FENG Wei-Yue, WANG Meng, ZHANG Fang, LI Bai, WANG Bing, ZHU Mo-Tao, CHAI Zhi-Fang (史俊稳, 丰伟悦, 王萌, 张芳, 李柏, 汪冰, 朱墨桃, 柴之芳). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2007**, 35(6): 803~808
- 15 Clarkson T W, Magos L. *Crit. Rev. Toxicol.*, **2006**, 36(8): 609~662
- 16 ZHOU Qun-Fang, JIANG Gui-Bin (周群芳, 江桂斌). *Acta Sci. Circumst.* (环境科学学报), **2005**, 25(11): 1550~1554
- 17 Matsumoto T, Terai S, Oishi T, Kuwashiro S, Fujisawa K, Yamamoto N, Fujita Y, Hamamoto Y, Furutani-Seiki M, Nishina H, Isao S. *Dis. Model. Mech.*, **2010**, 3(7-8): 431~440
- 18 Wu Y, Zhou Q F, Li H C, Liu W, Wang T, Jiang G B. *Aquat. Toxicol.*, **2010**, 100(2): 160~167
- 19 Petrlova J, Krizkova S, Zitka O, Hubalek J, Prusa R, Adam V, Wang J, Beklova M, Sures B, Kizek R. *Sensor. Actuat. B*, **2007**, 127(1): 112~119
- 20 Aschner M. *Neurotoxicology*, **1996**, 17(3-4): 663~669

## Analysis of Hydrophilic Mercury-Binding Proteins in Medaka (*Oryzias latipes*) Using High Performance Liquid Chromatography Coupled with Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry

LI Lu, HE Bin\*, JIANG Gui-Bin

(Key Laboratory of Environmental Chemistry and Ecotoxicology, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085)

**Abstract** The hydrophilic mercury-binding proteins in the brain and liver extractions of Medaka after methylmercury and inorganic mercury exposure were analyzed by high performance liquid chromatography coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry. Size exclusion chromatography was selected in the experiment with a mobile phase of 0.15 mol/L NH<sub>4</sub>Ac, running at a 0.5 mL/min flow rate. Concentrations of total copper, zinc and mercury in the brain and liver extracts of Medaka were determined by ICP-MS. Detection limits for these three elements were in the range of 0.01 µg/L to 0.05 µg/L, and the spike recoveries ranged from 93.1%–97.0%. Compared with the control group, high level of mercury is accumulated in the brain and liver of exposure groups. The distribution patterns of mercury-containing proteins in the brain and liver extracts of Medaka between methylmercury and inorganic mercury exposure group were different. The concentrations of copper and zinc in the brain and liver extractions of both exposure groups were decreased. The studies of the mercury-containing protein fractions in Medaka are helpful for the understanding of the mechanisms of mercury toxicity.

**Keywords** High performance liquid chromatography; Inductively coupled plasma mass spectrometry; Mercury-containing proteins

(Received 7 December 2010; accepted 4 January 2011)