

几类重金属元素在人肝分离亚细胞成分中的相对分布

陈春英 章佩群 柴之芳

(中国科学院高能物理研究所核分析技术重点实验室, 北京 100039. E-mail: chenchi@mail.ihep.ac.cn)

摘要 肝脏是人体和动物的重要解毒器官, 可作为环境污染物在体内负荷的指示器, 肝脏中的元素含量及其赋存状态与人体健康和疾病密切相关. 采用差速离心分离技术将正常人肝组织分离为细胞核、线粒体、溶酶体、微粒体和胞液等 5 个亚细胞组分, 结合原子吸收和原子荧光光谱分析研究了 As, Cd, Hg, Pb 等重金属在正常人肝组织及其分离细胞器组分中的相对分布. 结果表明所测重金属总量与已报道的值基本一致. 分离亚细胞组分分布表明, Hg 在线粒体、微粒体和胞液等组分中浓度较高; Cd 在胞液中浓度最高, 其次为线粒体; As 在细胞核中浓度较高; 而 Pb 在微粒体中浓度很高, 且与 Fe 的分布模式相类似. 人肝中汞主要以无机汞形态存在, 甲基汞约占总汞的 9%~50%, 平均为 $20.9\% \pm 13.3\%$.

关键词 人体肝脏 亚细胞组分 重金属分布 甲基汞

肝脏是人体和动物的重要解毒器官, 机体有毒物在此积聚, 故其可作为污染物在体内负荷的指示器. 世界几大国家环境标本库 (National Environmental Specimen Bank) 均已将人肝列为与环境相关的人体标本之一, 作为重要研究对象, 可供实时环境监测及回顾分析之用, 并为环境监测提供可靠数据^[1]. 血液中重金属水平往往仅反映当时或近期机体从饮食和环境摄入的情况, 而肝脏更能客观反映人体长期积累的状况. 有关人肝重金属蓄积研究的报道较少, 而重金属在其亚细胞成分的分布及定位尚未见报道. 由于不同重金属或毒物在细胞内作用的靶位不同, 因此, 仅分析元素在生物体组织和体液中的总量是不够的, 需进一步测定生物样品各组成部分, 如亚细胞组分和蛋白质中的含量及分布等, 从而深入研究和揭示重金属在生物体内的分布、代谢和毒性机制.

本文对人体危害极大的几类重金属元素在人肝组织及其分离亚细胞组分的相对分布进行了分析测定和研究, 并探讨这些重金属在亚细胞器组分的蓄积、负荷水平和对人体可能造成的影响. 这将有助于认识重金属在人体中代谢和解毒的机制, 并可提供在低暴露水平环境中的人群人体中重金属含量的基础数据, 为环境有毒元素的研究提供重要信息.

1 材料与方法

() 人体肝脏样本采集及亚细胞分离. 人体肝组织样本取自天津市因意外死亡的正常成年人, 取样在死后 24 h 内进行. 采样过程按推荐的国际标准

程序进行^[2,3], 样品用经严格清洗的聚乙烯袋密封, 置于聚四氟乙烯小罐中, 密封后于 -70 °C 低温保存待用. 57 例人肝样品每例各取约 20 g, 经冷冻干燥, 研磨均匀后, 分析测定样品重金属含量.

选择其中 10 例人肝样品 (6 例男性, 4 例女性) 进行亚细胞分离^[4]. 取 70~80 g 人肝组织, 用钛刀及聚四氟乙烯镊子除去外膜和血管等, 用预冷的 10 mmol/L HEPES (含 0.25 mol/L 蔗糖, pH 7.4) 洗涤 3 次. 切成小块, 加入 3 倍体积缓冲液于玻璃匀浆器中匀浆, 得匀浆液. 100 g $\times$ 7 min 离心, 除去未破碎细胞和大细胞碎片; 采用连续差速离心法 (Beckman L7 超速离心机) 1000 g $\times$ 10 min, 9000 g $\times$ 10 min, 30000 g $\times$ 30 min 和 100000 g $\times$ 120 min 等分离获得细胞核、线粒体、溶酶体、微粒体和细胞上清液等亚细胞组分; 每一步沉淀用缓冲液洗涤、重新悬浮, 离心除去上清, 收集相应的亚细胞组分. 以上操作均在 4 °C 进行. 各组分经冷冻干燥, 研磨均匀后, 分析测定几类重金属含量. 实验采用 Milli-Q 系统 (Millipore 公司产品) 制备超纯水; 试剂及分离过程中重金属污染经实验检测可忽略. 为保证得到准确可靠的分析结果, 同时分析标准参考物质 (国际原子能机构的马肾 IAEA-H 8 和我国猪肝 GBW 08551 及人发 GBW 07601 等). 测定值与鉴定值对比见表 1, 分析结果与鉴定值相符, 分析准确度为 $\pm 10\%$.

() 痕量汞测定. 仪器为无色散原子荧光仪 (WFY-II, 北京吉大小天鹅仪器公司). 取固体样品约 200 mg 放入 25 mL 刻度试管中, 上置小漏斗, 插入带孔控温电炉, 硝酸-高氯酸低温消化至溶液变清亮, 加

表 1 几种标准参考物的分析结果^{a)}

元素	猪肝 GBW 08551		马肾 IAEA Horse kidney H-8		人发 GBW 07601	
	本文	推荐值	本文	推荐值	本文	推荐值
As	0.048 ± 0.01	0.044 ± 0.008	ND		0.25 ± 0.01	0.28 ± 0.04
Fe	1120 ± 65	1050 ± 80	303.6 ± 24.2	262.3 ± 44.9	56.4 ± 3.9	54 ± 6
Cd	0.06 ± 0.01	0.067 ± 0.004	198 ± 24	189 ± 5	ND	
Hg	ND		0.88 ± 0.03	0.91 ± 0.08	0.40 ± 0.08	0.36 ± 0.05
Pb	0.48 ± 0.08	0.54 ± 0.04	0.54 ± 0.25	0.59 ± 0.22	ND	

a) 单位 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ (干重), $n = 3 \sim 5$, $\bar{X} \pm \text{SD}$; ND 表示本研究未测

入高锰酸钾保持红色. 测定前用盐酸羟胺使高锰酸钾褪色, 硼氢化钾作还原剂, 用汞无极灯作激发光源, 在负高压 300~350 W 及炉温 850 °C 下测定样品中汞含量^[5]. 检测限为 $5 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$.

() 甲基汞测定. 仪器为冷原子荧光检测仪 (CV-AFS, Brooks Rand 公司). 溶剂萃取法提取人肝中的甲基汞^[6]. 取样品 100~200 mg, 加入 5 mL 5% H_2SO_4 和 18% KBr 以及 1 mL $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CuSO_4 溶液, 室温放置 15 min 后, 再加入 10 mL CH_2Cl_2 剧烈振荡 15 min. 3200 r/min 离心 5 min, 分离得有机相. 加入超纯水 40 mL, 通 N_2 气除 CH_2Cl_2 , 以 NaBEt_4 作乙基化试剂. 乙基化的甲基汞经 Tenax (Alltech 公司) 捕集, 800 °C 热解, 用 CV-AFS 测定. 检测限为 $0.1 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$.

() 铅、镉、铁测定. 仪器为原子吸收分光光度计 (Spectra AA-40, Varian 公司), 石墨炉 (GTA-96), 计算机 (DS-15) 全自动进样. 取固体样品 25~50 mg, 硝酸-高氯酸消解, 定容至 10 mL. 吸取部分溶液用 KI-MIBK 有机溶剂萃取分离, 石墨炉原子吸收法测定铅、镉、铁含量, 检测限分别为 $4 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ (Cd), $2 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (Pb) 和 $80 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (Fe).

2 结果与讨论

正常人肝中 As, Cd, Hg, Pb 含量如表 2 所示. 可以看出, 对不同个体, 这几种重金属含量差别较大, 存在明显个体差异. 不同地区、不同人群肝脏中元素含量差别在一定程度上与收集地环境及人群营养状况有关. 考虑肝脏干湿比为 1:3~1:4, 与其他国家

人肝样品^[7~10]相比, 本文测得重金属含量基本在同一范围.

肝脏是多种重金属靶器官及代谢重要场所, 其中重金属含量普遍高于除肾外的其他器官. 本文对人肝分离亚细胞组分中重金属 As, Cd, Hg, Pb 的相对分布研究所得结果如表 3 所示. As 在细胞核中大量聚集, Hg 在线粒体中浓度较高, Cd 在胞液中浓度最高, 而 Pb 在微粒体中浓度很高. Cd 在各分离亚细胞组分浓度分布顺序为: 胞液>>微粒体>线粒体>细胞核, 溶酶体; Pb 浓度分布顺序为: 微粒体>>胞液>溶酶体>线粒体, 细胞核; Hg 浓度分布顺序则为: 线粒体>胞液, 微粒体>细胞核>溶酶体. 这些重金属在细胞内定位不同, 蓄积靶位有显著差异, 提示其在体内代谢机制不同.

除胞液外, 其余亚细胞组分是细胞不可溶部分. 本研究表明, 约有 70% Hg 和 Pb 分布于人肝不可溶部分, 而生物必需微量元素 Fe 80% 以上分布于不可溶部分中. 上述各重金属元素在肝脏中总量计算结果表明, Cd 在胞液中大量富集, 占肝 Cd 总量一半以上. Hg 和 Pb 主要分布在细胞核、线粒体和胞液 3 个组分中. 约有 70% As 位于细胞核中, 其次位于线粒体. 低含量 As 是否为人和动物所必需, 目前尚存在较大争议. 近年来毒理病理学研究发现高浓度砷化合物是强细胞染色体断裂剂, 可引起人和哺乳动物细胞染色体畸变^[11], 砷治疗白血病研究及其机理探讨也在进行之中^[12]. 因此, As 富集于人肝细胞核的机制值得深入研究.

表 2 本文结果与不同国家和地区正常人肝脏中几种重金属含量的比较

地点 样本数(n) $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	中国天津 57 干重	加拿大 ^[7] 143 湿重	英国 ^[8] 6~11 湿重	日本 ^[9] 9 干重	新西兰 ^[7] 干重	中国上海 ^[10] 11~24 干重
As	0.53 ± 0.31		$0.46 \pm 0.04(6)$			0.16 ± 0.11
Cd	6.86 ± 5.24	0.1~9.1	$4.3 \pm 0.08(11)$	7.1 ± 4.1	4.5 ± 4.4	8.6 ± 5.3
Fe	674 ± 345	51~997	$176 \pm 28.9(9)$	1100 ± 970		1160 ± 1210
Hg	$0.25 \pm 0.21(n = 20)$	0.01~0.37				0.37 ± 0.26
Pb	$4.89 \pm 1.78(n = 10)$	≤ 0.1~1.7	$2.3 \pm 0.6(11)$	2.0 ± 1.2	4.1 ± 2.2	

表 3 几类重金属元素在人肝分离亚细胞组分的分布及与肝中总量的比值^{a)}

元素	细胞核	线粒体	溶酶体	微粒体	胞液
As/ $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$	0.69±0.35	0.27±0.18	0.18±0.27	0.15±0.07	0.08±0.03
As/%	72.1±28.2	16.3±7.4	2.7±2.9	2.9±1.3	6.0±2.1
Cd/ $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$	1.02±0.75	1.88±1.43	0.92±0.86	1.31±1.01	4.37±2.62
Cd/%	22.1±10.1	20.7±11.5	2.1±1.1	1.9±1.2	53.2±20.3
Hg/ $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$	0.043±0.012	0.070±0.025	0.037±0.022	0.065±0.050	0.065±0.009
Hg/%	34.8±11.6	28.8±12.3	3.2±1.2	3.6±2.0	29.6±5.2
Hg/ $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$	4.81±0.49	5.04±0.98	6.35±1.99	17.16±9.61	7.98±5.49
Hg/%	35.0±4.4	18.7±4.4	5.0±1.4	8.6±5.9	32.7±19.6
Fe/ $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$	516 ±304	410 ±220	428 ±240	4914±2390	291±122
Fe/%	40.1±18.5	16.2±7.8	3.6±1.5	26.3±11.2	13.7±7.4

a) 单位 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ (干重), $\bar{X} \pm \text{SD}$, $n = 10$

作者曾发现 Fe 在微粒体中浓度高于其他组分 3~7 倍^[13]. 经超速离心分离得到的微粒体并不是一种细胞器, 而是内质网变形碎片, 含有丰富的血红素铁蛋白及其他蛋白质和酶类. 文献报道结果^[14]表明, Pb 对血红素生物合成中各种含巯基酶(如 *d*-氨基-*g*-酮戊酸合成酶(ALAS)、*d*-氨基-*g*-酮戊酸脱水酶(ALAD)和血红素合成酶等)具有高亲和能力, 这有可能解释微粒体中高 Pb 现象, 而 Hg, Cd 对巯基具高亲和能力, 却无此现象. 本文结果表明铅与铁的分布有相似性, 提示铅毒性与呼吸链中氧化还原蛋白酶的失活有一定关系.

在水俣病人中, 肝 Hg 可达 2.05~70.5 $\mu\text{g/g}$ 湿重, 汞在急性汞中毒患者中器官积累顺序为: 肝>肾>脑>>血液, 慢性患者则为: 肝>肾=脑^[15]. 因此, 肝汞水平作为环境汞水平监测指标是合适的. 尽管人们对汞污染较严重地区和人群已有较多研究, 但对环境低剂量汞毒性及机理的认识还不够, 这可能低估环境低剂量汞对人体的危害. 然而, 汞污染所致日常汞接触仍在所难免, 据报道健康人每日从食物和环境中摄入约 0.02 mg 汞, 其中约有 5%~10%被吸收. 表 4 列出了人肝中甲基汞含量, 其约占总汞 9%~50%, 平均为 20.9%±13.3%. 因此, 人肝中汞主要以无机汞形态存在, 与动物研究结果相类似. 一般认为无机汞主要积存于肝和肾内. 有机汞以甲基汞为代表, 由于其亲脂性, 可沉积于神经和脊髓组织中, 并能通过血脑屏障进入大脑组织后仍以有机汞形式存在.

Cd, Hg 在大型海洋哺乳动物肝、肾组织分布的研究显示, 生活在加拿大巴芬岛的角鲸、加利福尼亚的海狮、海豚等^[16~18], 其肝、肾组织中的 Hg 主要存在于不可溶部分, 分别为 88%和 73%, 而在胞液中仅为 12%和 27%. 肝、肾组织中甲基汞含量很低, 仅占

表 4 人肝中总汞和甲基汞含量(单位: $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ (干重))

样品	总汞	甲基汞	%
1	0.229	0.030	13.1
2	0.167	0.078	46.7
3	0.246	0.023	9.35
4	0.176	0.018	10.2
5	0.391	0.060	15.3
6	0.375	0.114	30.4
7	0.241	0.051	21.2
8	0.591	0.055	9.31
9	0.320	0.047	14.7
10	0.123	0.048	39.0
平均值±标准偏差($\bar{X} \pm \text{SD}$)			
	0.286±0.139	0.052±0.028	20.9±13.3

总汞的 5.5%和 5.4%. 与 Hg 不同, 88% (肝)和 92%(肾)的 Cd 位于细胞可溶部分(即胞液). 加利福尼亚海狮胞液中 Cd 占 43%~58%(肝)和 60%~65%(肾). 这些结果与本文人肝的结果相一致. Cd 在人体内主要贮存于肝和肾中, 约占全身 Cd 总量的 1/2~1/3. 由于人肝中 Cd 在胞液中大量存在, 我们对肝胞液中 Cd 的分布及与蛋白质结合的状况, 尤其是与金属硫蛋白关系等方面正在进行深入的研究, 其结果将另文发表.

致谢 感谢斯洛文尼亚共和国 Josef Stefan 研究所环境科学研究室 Milena Horvat 教授在甲基汞测定中的帮助. 本工作为国家自然科学基金十五重大基金(批准号: 10490180)和面上基金(批准号: 20071032)资助项目及中国科学院重要方向性项目(批准号: KJCX2-N101).

参 考 文 献

1 Kemper F H. Human Organ specimen banking-15 years of experience. *Sci Total Environ*, 1993, 139/140: 13~25

2 Zeisler R, Harrison S H, Wise S A. Trace elements in Human livers using quality control in the complete analytical process. *Biol Trace Element Res*, 1984, 6: 31~49

3 章佩群, 刘年庆, 陈春英, 等. 人肝中元素含量的中子活化分析研究. *核技术*, 2001, 24(8): 711 ~ 715

4 Chen C, Zhang P, Hou X, et al. Subcellular Distribution of Selenium and Se-Containing Proteins in Human Liver. *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1427: 205~215

- 5 阎军, 徐超一, 金雨琴. 原子荧光光谱法测定食品中汞含量的不确定度初探. 现代仪器, 2003, 14: 6~9
- 6 Logar M, Horvat M, Falnoga I, et al. A methodological study of mercury speciation using Dogfish liver CRM (DOLT-2). Fresenius J Anal Chem, 2000, 366: 453~460
- 7 Subramanian K S, Meranger J C, Burnett R T. Kidney and liver levels of some major, minor, and trace elements in two Ontario communities. Sci Total Environ, 1985, 42: 223~235
- 8 Hamilton E I, Minski M J, Cleary J J. The concentration and distribution of some stable elements in healthy human tissues from United Kingdom. Sci Total Environ, 1972, 1: 341~374
- 9 Yukawa M, Amano K, Suzuki-Yasumoto M, et al. Distribution of trace elements in the human body determined by neutron activation analysis. Arch Environ Health, 1980, 35: 36~44
- 10 Wang Y S, Zhuang G S, Tan M G, et al. Distribution of some elements in human hairs and internal organs, determined by neutron activation analysis. J Radioanal Nucl Chem, 1991, 151: 301~311
- 11 Hughes M F. Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. Toxicol Lett, 2002, 133(1): 1~16
- 12 王晓波, 张治然, 袁荣刚. 雄黄等砷剂治疗白血病的机理及临床应用. 解放军药学报, 2003, 19(2): 129~132
- 13 Chen C, Lu X, Zhang P, et al. Subcellular distribution patterns of Twenty four elements in the human liver samples studied by molecular activation analysis. J Radioanal Nucl Chem, 2000, 244(1): 199~203
- 14 Gillian L. Perspectives on lead toxicity. Clin Biochem, 1993, 26(5): 371~381
- 15 康新民编译. 水俣病及汞害的防治. 北京: 人民军医出版社, 1991
- 16 Lee S S, Male B R, Von der Trench KT, et al. Metallothionein and the subcellular localization of mercury and cadmium in the California Sea lion. Comp Biochem Physiol, 1977, 57C: 45~53
- 17 Olssen P E, Hogstrand C. Subcellular distribution and binding of cadmium to metallothionein in tissues of rainbow trout after exposure to Cd in water. Environ Toxicol Chem, 1987, 6: 867~874
- 18 Storelli M M, Marcotrigiano G O. Subcellular distribution of heavy metals in livers and kidneys of Stenella Tursiops truncatus from Mediterranean. Marine Pollution Bull, 2002, 44: 71~81
- (2003-12-12 收稿, 2004-04-01 收第1次修改稿, 2004-07-23 收第2次修改稿)

《科学通报》投稿指南

在《科学通报》发表的原创性研究论文应同时具备以下条件:

- () 是自然科学基础理论或应用研究的最新成果.
- () 有重要科学意义, 属国际研究热点课题.
- () 有创新(新思路、新方法、新认识、新发现等).
- () 对本领域或/和相关领域研究有较大的促进作用.
- () 就内容和写作风格而言, 对大同行或非同行科学家都有可读性和启发性.

文章应论点明确、数据可靠、逻辑严密、结构简明; 尽量避免使用多层标题; 文字、图表要简练, 在较少的篇幅内提供较大的信息量; 论述应深入浅出、表达清楚流畅; 专业术语的运用应准确, 前后保持一致.

题目是文章的点睛之处, 要紧扣主题, 有足够的信息, 能引起读者的兴趣; 应避免使用大而空的题目, 最好不用“...的研究”、“...的意义”、“...的发现”、“...的特征”等词; 回避生僻字、符号、公式和缩略语. 一般不超过24个汉字, 英文以两行为宜. 不使用副标题.

摘要应反映文章的主要内容, 阐明研究的目的、方法、结果和结论, 尽量避免使用过于专业化的词汇、特殊符号和公式. 摘要的写作要精心构思, 随意从文章中摘出几句或只是重复一遍结论的做法是不可取的.

关键词用于对研究内容的检索. 因此, 关键词应紧扣文章主题, 尽可能使用全国科学技术名词审定委员会颁布

的主题词, 不应随意造词.

引言是文章的重要组成部分, 关系到文章对读者的吸引力. 在引言中应简要回顾本文所涉及到的科学问题的研究历史, 尤其是近2~3年内的研究成果, 需引用参考文献; 并在此基础上提出本文要解决的问题; 最后扼要交代本研究所采用的方法和技术手段等.

讨论和结论部分应该由观测和实验结果引申得出, 切忌简单地再罗列一遍实验结果. 讨论得出的结论与观点应明确, 实事求是.

致谢部分应先向对本文有帮助的有关人士表示谢意; 然后列出本工作的资助基金来源, 并注明项目批准号.

参考文献引用是否得当, 是评价论文质量的重要标准之一. 如果未能在论文中引用与本项研究有关的主要文献, 尤其是近2~3年内的文献, 或是主要引用作者自己的文献, 编辑可能会认为对这篇文章感兴趣的读者不多. 对文中所引参考文献, 作者均应认真阅读过, 对文献的作者、题目、发表的刊物、年代、卷号和起止页码等, 均应核实无误, 并按《科学通报》体例要求的顺序排列. 切忌转引二手文献的不负责任的做法.

科技论文的署名是一件十分严肃的事情, 在论文中署名的每一位作者都应对文中的论点和数据负责. 第一作者应保证每一位作者在投稿前都读过这篇文章, 并同意署名. 文章的署名在投稿后不可随意更改.