

65-70

11

兽类学报1995, 15 (1): 65—70

Acta Theriologica Sinica

金属诱导条件下刺猬各组织器官 金属硫蛋白含量的比较分析

5865.3/1

李令媛 马宏宝 吕迎春 茹炳根

(北京大学生命科学学院生物化学及分子生物学系, 北京, 100871)

A

摘 要

本文采用 Ag-Hb (血红蛋白) 饱和法、Cd-Hb 饱和法、Cu-Hb 饱和法及酶联吸附免疫法定量分析刺猬各组织器官中金属硫蛋白含量。结果表明, 肌肉注射三种金属盐均有明显的诱导金属硫蛋白合成的作用, 诱导强度为 $Cd^{2+} > Zn^{2+} > Cu^{2+}$, 诱导后金属硫蛋白含量分布规律一致, 即肝 > 肾 > 睾丸 > 脾 > 心、肺、胃、膀胱、胆汁、大肠、小肠、肌肉、血液, 其中铜诱导肝的金属硫蛋白含量每克湿组织约 1.84mg, 为肾的1倍、睾丸的3倍、脾的5倍、其余组织器官的7—15倍。对肌肉注射金属盐的抗性为 $Zn^{2+} > Cd^{2+} > Cu^{2+}$, 每公斤体重注射 Zn^{2+} 80mg、 Cd^{2+} 40mg、 Cu^{2+} 20mg 时, 出现明显的中毒反应, 并开始死亡。金属硫蛋白对四种金属离子的结合能力为 $Ag^{+} > Cu^{2+} > Cd^{2+} > Zn^{2+}$ 。

关键词 刺猬, 组织器官, 金属硫蛋白

金属硫蛋白 (Metallothionein, MT) 是一类低分子量、富含半胱氨酸的金属结合蛋白, 普遍存在于生物界中, 其生物合成受重金属、冷、热、饥饿、辐射、疾病等多种因素诱导, 具有参与机体微量元素储存、运输和代谢、拮抗电离辐射、清除羟自由基和重金属解毒等多种作用, 已成为当前生物化学研究中的一个热点。MT 分子结构具有高度的保守性。哺乳动物 MT 分子一般由60—61个氨基酸组成, 分子量6 000—7 000道尔顿, 半胱氨酸含量占30%左右, 不含芳香族氨基酸及组氨酸, 每分子 MT 可结合7—12个金属离子, 具有金属-硫结合所特有的特征吸收光谱 (Vallee, 1991)。测定生物体内的 MT 含量, 可间接了解生物健康营养状况及环境污染情况等。对物种间 MT 分子组成的比较, 在生物进化研究方面也有重要意义。大多数逆境因素均可诱导 MT 的生物合成。冬眠是生物抵抗逆境的极端反应, 刺猬 (*Erinaceus europaeus*) 作为具有冬眠习性的哺乳动物, 其各组织器官中 MT 含量的分析比较至今尚未见报道。本文通过对刺猬 MT 的分析, 比较三种金属-Hb (血红蛋白) 饱和法及酶联吸附免疫 (ELISA) 法, 旨在了解哺乳动物在金属诱导条件下, 各组织器官中 MT 分布情况, 并为选择简便可行的 MT 定量测定方法提供参考。

材料与方法

所用仪器: 高速冷冻离心机 (美国 Sigma 产品), 原子吸收分光光度计 (Philips PU 9200, 英国), 紫外分光光度计 (岛津 UV-240, 日本), 极谱仪 (山东电讯七厂产品, JP

• 本文于1993年11月2日收到, 1994年10月31日收到修改稿

3-1), 酶标仪 (Minireader I, 美国)。

所用一抗为小鼠抗兔 MT 单克隆抗体 (本实验室制备), 二抗为羊抗小鼠 IgG 与碱性磷酸酯酶复合物 (美国 Sigma 产品)。

1. 样品处理

(1) 刺猬 24 只, 捕自北京西郊, 雌雄各半, 每只体重 500—900g, 分 3 组, 每组 8 只, 分别肌肉注射 CdCl_2 、 CuSO_4 、 ZnSO_4 , 乙醚麻醉后处死, 取器官组织。

(2) 金属-血红蛋白饱和法 (Eaton 等, 1982): 湿组织 1g, 加 0.1mol/L Gly-NaOH 2ml, pH8.5 (Ag^+ -Hb 饱和法) 或 0.1mol/L Tris-HCl 2ml, pH8.5 (Cd^{2+} -Hb 饱和法与 Cu^{2+} -Hb 饱和法), 匀浆后于 10 000g, 4℃ 离心 5 分钟, 取上清液 0.2ml, 加金属盐 0.1ml (Ag^+ 800ppm 或 Cd^{2+} 400ppm, Cu^{2+} 200ppm), 室温放置 5 分钟, 加牛 Hb (2%, V/V) 0.1ml, 100℃ 加热 1.5 分钟, 冰水浴速冷, 10 000g, 4℃ 离心 15 分钟, 取上清液, 再加牛 Hb (2%, V/V) 0.1ml, 100℃ 加热 1.5 分钟, 冰水浴速冷, 10 000g, 4℃ 离心 15 分钟, 取上清液, 测金属含量 (原子吸收法或极谱法) 及蛋白含量。

对哺乳动物 MT 按分子量 7 000 道尔顿计算, 并假定每摩尔 MT 分子可结合 18mol 的一价金属 Ag^+ 或 7mol 的 2 价金属 Cd^{2+} 或 Cu^{2+} , 则 1mg Ag^+ 表示有 3.6 mg 的 MT ($7\,000/18/108 \approx 3.6$); 1mg 的 Cd^{2+} 表示有 8.9mg 的 MT ($7\,000/7/112 \approx 8.9$); 1mg 的 Cu^{2+} 表示有 15.7mg 的 MT ($7\,000/7/63.55 \approx 15.7$)。

2. 分析

(1) 原子吸收光谱法测银、镉、铜、锌 (采用火焰法)

- A. 银: 2ml, 银灯吸收波长 328.1nm, 带宽 0.4nm, 灯电流 3mA。
- B. 镉: 2ml, 镉灯吸收波长 228.8nm, 带宽 0.3nm, 灯电流 6mA。
- C. 铜: 2ml, 铜灯吸收波长 324.8nm, 带宽 0.3nm, 灯电流 4mA。
- D. 锌: 2ml, 锌灯吸收波长 213.9nm, 带宽 0.3nm, 灯电流 7mA。

(2) 极谱法测金属含量 (铁峰, 1993)

A. Cu^{2+} : 介质为 0.15mol/L H_2SO_4 + 0.04% KSCN, 2ml, 线扫 -0.10V—-0.70V, 峰电压 -0.46V。

B. Cd^{2+} : 介质为 0.02mol/L HCl + 0.02mol/L KI, 2ml, 线扫 -0.40V—-1.00V, 峰电压 -0.70V。

C. Zn^{2+} : 介质为 0.1mol/L HNO_3 + 0.3mol/L NaAc + 0.04mol/L α, α' -联吡啶, 2ml, 线扫 -0.80V—-1.40V, 峰电压 -1.10V。

(3) 酶联吸附免疫法 (Ghaffar 等, 1989)

每孔加 100 μl 样品 (预先溶于 0.02 mol/L Tris-HCl, pH8.6), 4℃ 包被过夜, 用 PBS (0.1mol/L, pH6.8, 含 0.5% Tween-20) 洗 3 次, 每次 3 分钟, 加小鼠抗兔 MT 单克隆抗体 100 μl , 37℃ 保温 1.5 小时, 用 PBS (0.1mol/L, pH8.6, 含 0.5% Tween-20) 洗 3 次, 每次 3 分钟, 加羊抗小鼠 IgG 二抗 (预先溶于 0.1mol/L PBS, pH8.6, 含 0.5% Tween-20) 100 μl , 37℃ 保温 1.5 小时, 用 PBS (0.1 mol/L, pH6.8) 洗 3 次, 每次 5 分钟, 加对-硝基酚磷酸酯 (PNPP) (4mg/ml, 于 10% 乙醇 + 0.05 mol/L MgCl_2) 100 μl , 室温避光 15—30 分钟, 加 1mol/L NaOH 50 μl , 于紫外光 420nm 处酶标仪上检测。

结果与讨论

1. 各组织器官 MT 分布

在三种金属盐 CdCl_2 、 ZnSO_4 、 CuSO_4 肌肉注射诱导下, 刺猬各组织器官中 MT 分布规律基本一致 (表1), 即肝>肾>睾丸>脾>心、肺、胃、膀胱、胆汁、大肠、小肠, 肌肉、血液 ($P<0.01$), 其中相对含量大约是肝为肾的2倍、睾丸的3倍、脾的5倍、其余组织器官的7—15倍。

表1 刺猬各组织器官金属硫蛋白含量分析 (单位: 毫克/湿组织·克)
Table 1 Metallothionein analysis on hedgehog (Unit: mg/wet tissue·g)

测定方法 Method	诱导 Ind.	肝 Liv.	肾 Kid.	睾丸 Tes.	脾 Spl.	心 Hea.	肺 Lun.	胃 Sto.	膀胱 Bla.	胆汁 Bil.	大肠 Int.	小肠 Int.	肌肉 Mus.	血液 Blo.
Ag-Hb 饱和法 Ag-Hb Saturation	Cd	0.77	0.56	0.26	0.12	0.06	0.05	0.04	0.03	0.04	0.04	0.05	0.03	0.03
	Cu	0.60	0.41	0.21	0.10	0.05	0.04	0.04	0.03	0.03	0.03	0.04	0.02	0.02
	Zn	0.70	0.52	0.24	0.11	0.05	0.04	0.03	0.03	0.03	0.04	0.04	0.03	0.02
	对照 Con.	0.11	0.10	0.10	0.08	0.06	0.06	0.06	0.04	0.03	0.03	0.04	0.03	0.04
酶联吸 附免疫 ELISA	Cd	1.84	1.02	0.64	0.38	0.20	0.18	0.19	0.21	0.16	0.30	0.25	0.14	0.15
	Cu	0.82	0.58	0.41	0.24	0.15	0.12	0.13	0.17	0.20	0.11	0.24	0.10	0.13
	Zn	1.15	0.74	0.55	0.28	0.18	0.14	0.15	0.16	0.21	0.18	0.34	0.14	0.20
	对照 Con.	0.15	0.08	0.05	0.03	0.02	0.02	0.01	0.02	0.02	0.01	0.22	0.01	0.02

肝是动物重金属解毒的主要器官, 当动物受到重金属注射时, MT 在肝中被大量诱导合成, 其它组织器官中诱导合成的 MT 携带金属离子可能也被运至并储存于肝中, 所以肝中 MT 含量最高。另有一部分 MT 又运至肾中, 而肾中 MT 排出较慢, 因而蓄积。MT 在睾丸中积累, 则提示我们考虑其在生殖过程中可能有重要意义, 如参与生命个体发生过程。

MT 在肝中含量最高, 而且动物如刺猬个体中肝的重量相对较大 (大约是肾的3倍、睾丸的10倍、脾的9倍), 所以在实际制备 MT 样品时, 首选器官是肝, 其次是肾。

2. 三种金属盐诱导 MT 合成效果比较

注射重金属盐是诱导动物 MT 合成的最好方法, 也是 MT 制备中最常用的手段。由图1和表1可见, 以严重中毒剂量 Zn^{2+} 70mg、 Cd^{2+} 35mg、 Cu^{2+} 17mg 为标准相比较, 三种金属盐对刺猬 MT 合成的诱导效果为 $\text{Cd}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Cu}^{2+}$ ($P<0.01$), 根据酶联吸附免疫法测得结果, 其中肝 MT Cd^{2+} 诱导约为 Zn^{2+} 诱导的1.6倍、 Cu^{2+} 诱导的2.3倍, 即每克湿肝组织 Cd^{2+} 诱导含 MT1.84mg、 Zn^{2+} 诱导含 MT1.15mg、 Cu^{2+} 诱导含 MT0.82mg。金属诱导后肝中 MT 含量可占组织匀浆粗提液中蛋白含量的1/10—1/6, 占组织匀浆液热沉淀后离心清液的1/3—1/2 (ELISA 法测定)。金属注射量与肝中 MT 积累量关系如图1所示, 每公斤体重 Cd^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 剂量分别在 35 mg、70 mg 和17 mg 左右时肝 MT 含量达到最大值。与对照组比较, 肌肉注射三种金属盐诱导刺猬 MT 合成的效果是良好的 ($P<0.01$)。

动物在受到金属离子侵害时其体内 MT 含量显著升高, 直接表明 MT 在动物金属代谢及重金属解毒中具有重要意义。

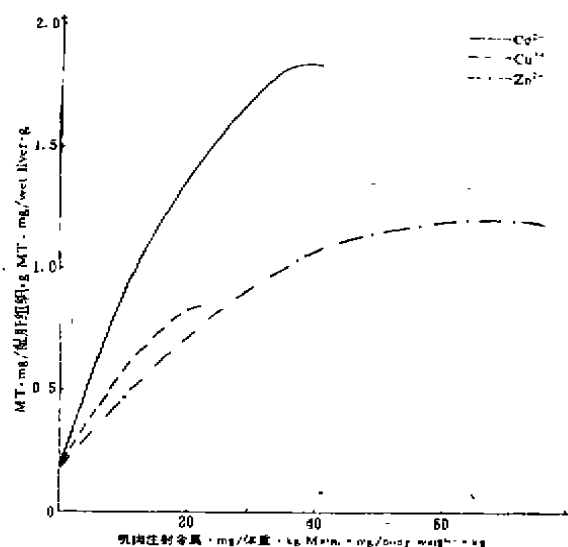


图1 刺猬肝脏金属硫蛋白(MT)含量与肌肉注射金属量的关系
Fig. 1 The relationship of the MT content in hedgehog liver with the amount of metal injected into hedgehog muscle

3. 组织中 MT 含量测定分析

MT 是至今所知的结合金属离子最多的蛋白质分子,一个哺乳动物 MT 分子可结合 7 个二价金属离子(如 Cd^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Co^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Pt^{2+} 、 Sn^{2+} 等)及 10—20 个一价金属离子(如 Ag^+ 、 Au^+ 、 Cu^+ 等)。在一个 MT 分子中,可结合有多种金属离子,不同金属离子对于 MT 分子具有不同的亲和能力,并可根据亲和能力强弱进行金属离子间对 MT 分子的置换。Hb 可与大多数的金属离子结合,包括生物组织匀浆液中游离的金属离子及很多生物分子上结合的金属离子,但不能夺取 MT 分子上的金属离子。根据这些性质,在组织匀浆液中加入过量的与 MT 有较强结合力的金属离子,置换出其它金属离子,使 MT 为所加的过量离子饱和。通过加入过量的 Hb 结合游离的及结合于其它分子上的金属离子,加热离心后 Hb 被沉淀除去,从而清液中存在的金属离子即定量代表了 MT 含量,金属浓度则可用原子吸收法或极谱法确定。ELISA 方法则是根据 MT 分子与其单克隆抗体的特异性酶联吸附免疫反应,通过标记性二抗在 420nm 处吸收值确定 MT 含量。不同物种间 MT 一级结构保守,哺乳动物 MT 免疫交叉反应普遍,其免疫决定簇为保守的 N-端 1-7 位氨基酸残基 (MDPNCSC),经实验证明,刺猬 MT 与鼠抗兔 MT 单克隆抗体具有明显而量化的免疫交叉反应。

结果表明,四种金属离子对刺猬 MT 的结合力为 $\text{Zn}^{2+} < \text{Cd}^{2+} < \text{Cu}^{2+} < \text{Ag}^+$,即 Ag^+ 可以置换 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Zn^{2+} , Cu^{2+} 可以置换 Cd^{2+} 、 Zn^{2+} , Cd^{2+} 可以置换 Zn^{2+} ,与文献报道中兔肝 MT 情况一致 (Kagi, 1987)。 Ag^+ 具有最强的与 MT 结合能力,可以从 MT 分子上置换其它金属,所以 Ag^+ -Hb 饱和法有较广的实用性。但是,由于 Ag^+ 见光不稳定,且易与多种离子(如 Cl^-)络合形成沉淀,对其应用带来不便。 Cu^{2+} -Hb 及 Cd^{2+} -Hb 饱和法是较为方便的方法。 Hg^{2+} 与 MT 也有较强的结合力,文献中报道 (Piotrowski 等,

1973) 有用 Hg^{2+} -Hb 饱和法的成功例子。本文以 Ag-Hb 饱和法为例, 并结合 ELISA 方法, 测定了刺猬各脏器中 MT 含量分布, 得到一致的分布结果, 它们对诱导条件下动物组织中 MT 定量测定具有重要价值。实验中对血红蛋白的加热沉淀一定要彻底, 即至清液无色, 否则会得到偏高的结果。

由表 1 结果可见, MT 含量测定中 ELISA 方法所得值高于金属-Hb 饱和法所得值。究其原因, 可能是: 1) 金属-Hb 饱和法操作中两次加热沉淀带来损失; 2) 金属置换反应不彻底; 3) ELISA 操作中有非特异性反应。

ELISA 方法方便实用, 结果准确, 但由于 MT 单克隆抗体的制备具有一定难度, 其应用受到限制。若用 MT 多克隆抗体, 则因非特异性反应使结果偏高。

关于 MT 定量分析, 成功的例子还有放射免疫法 (RIA) (Nilan 等, 1986) 及荧光酶联吸附免疫法 (F-ELISA) (Thomas 等, 1986) 等, 但最为方便的还是金属-Hb 饱和法。

参 考 文 献

- 快锋, 潘爱华, 王文清, 茹炳根, 李令媛. 1993. 单抗板谱法在金属硫蛋白研究中的应用. 北京大学学报 (自然科学版), 29 (4): 400—406.
- Eaton D L, Toal B F. 1982. Evaluation of the Cd/hemoglobin affinity assay for the rapid determination of metallothionein in biological tissues. *Toxicol Appl. Pharmacol*, 66: 270—274.
- Gheffar A, Aggett P J, Bremner, L. 1989. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for metallothionein. *Spec Publ - R Soc Chem*, 72: 74—76.
- Kagi J H R, Kojima Y. 1987. Chemistry and Biochemistry of Metallothionein. *Experientia Supplementum*, 52: 25—61.
- Nilan C V, Shaikh Z A. 1986. Determination of metallothionein in tissues by radioimmuno assay and by cadmium saturation method. *Anal Biochem*, 154 (1): 213—223.
- Piotrowski J K, Bolanowska W, Sapota A. 1973. *Acta Biochem Pol*, 20: 207—215.
- Thomas D G, Linton H J, Garvey J S. 1986. Fluorometric ELISA for the detection and quantitation of metallothionein. *J Immunol Methods*, 89 (2): 239—247.
- Vallee B L. 1991. Introduction to metallothionein. *Methods in Enzymology* 205: 3—7.

ANALYSIS ON METALLOTHIONEIN CONTENT OF ORGANS AND TISSUES OF HEDGEHOG UNDER THE CONDITION OF METAL INDUCEMENT

LI Lingyuan MA Hongbao LU Yingchun RU Binggen

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Life Sciences, Peking University, Beijing, 100871)

Abstract

Muscle injecting metal salts CdCl_2 , CuSO_4 and ZnSO_4 into hedgehog bodies, the comparative resistance to metals for hedgehogs were $\text{Zn}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Cu}^{2+}$, and the serious toxicity of metals on hedgehogs appeared when the injecting amount reached $\text{Zn}^{2+} \cdot 80 \text{ mg}$, $\text{Cd}^{2+} \cdot 40 \text{ mg}$ or $\text{Cu}^{2+} \cdot 20 \text{ mg/body} \cdot \text{kg}$. According to metal-hemoglobin saturation (Ag, Cd, Cu) assay and enzyme-linked immunosorbent assay, Cd^{2+} , Zn^{2+} and Cu^{2+} all had obvious effect of inducing the synthesis of MT, and the inducing potency by metals

was $\text{Cd}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Cu}^{2+}$. In the three kinds of inducing conditions, the comparative MT concentrations in different organ tissues of hedgehog were the same order as liver > kidney > testis > spleen > heart, lung, stomach, bladder, bile, intestine, muscle, and blood. In Cd^{2+} inducing condition, the MT content in liver was 1.84mg/g·wet tissue, about two times as in kidney, three times as in testis, five times as in spleen, and 7—15 times as in other organs. The potent order of hedgehog MT binding with metals were $\text{Ag}^+ > \text{Cu}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$.

Key words Hedgehog (*Erinaceus europaeus*); Organ and tissue; Metallothionein



介绍《人类活动影响下兽类的演变》

由夏武平和张洁教授主编的《人类活动影响下兽类的演变》一书于1993年由中国科学技术出版社出版。在保护生物多样性的重要性正被国际社会密切关注的今天,本文集的面世既是及时的,同时也是很有学术与参考价值的。

该文集主要分作三部分。第一部分为濒危和主要资源兽的演变及现状,收录论文24篇,从物种的角度阐述了45种兽类的演变与现状,其中涉及的珍稀物种或主要资源兽有猕猴、叶猴、长臂猿、诸种鲸、海豚、海豹、大熊猫、小熊猫、虎、豹、麝、马鹿、坡鹿、羚牛、岩羊和河狸等;第二部分为区域性兽类演变历史的论述,辑录综合性论文10篇,研究区域包括东北、华北、华东、西北、西南及华南等14个省区,作者分别从区域的角度探讨了资源兽类的区系组成及资源数量消长与原因;第三部分为论述兽类多样性研究的论文2篇,以及有关家鼠类在内陆干旱区的入侵和市郊鼠类种群数量变化的论文2篇。

该论文集的最大特色可归纳为以下几点:

1. 自50年代开始,我国兽类学工作者曾长期进行过兽类区系、动物资源和珍稀濒危兽类的现状等学科领域的调查研究,积累了丰富的第一手资料,多数论文正是在这样的基础上撰写而成的,因而可以说,本文集是近阶段科研成果的初步总结。

2. 不少作者把地方志对野生动物的记载资料与现代分布状况相结合,从而揭示了一些濒危物种在地理分布上的历史演变,反映出近几十年间,由于人类活动的不断加剧而导致物种濒危或绝迹的速度大大加快了。例如,人们最为关心的东北虎,在历史上曾广泛分布在东北各林区,但近50—60年间,其分布区明显退缩,种群数量锐减(仅残存约20余只)。

3. 部分论文结合人口发展资料,论述了人口压力与兽类种群数量之间的关系。指出在动物分布区内,若人口平均密度达到30人/ km^2 以上时(森林覆盖率也往往少于70%),则属人为干扰强度较大的地区,因此,致使中、大型兽的种群数量与人口密度呈负相关。

4. 读者能从文集中了解到我国兽类演变的总趋势,即:随着人类活动越来越严重的干扰和影响,中、大型珍贵兽类的分布区退缩,资源数量下降或种群绝迹;小型经济动物尚有一定的数量,且资源数量较稳定;小型害兽却数量增多甚至危害严重。

总之,该论文集的信息丰富,资料翔实,分析客观,具有较大的实用参考价值,可供从事保护生物学、生态学、林学、环境科学等工作及政府有关部门领导干部参考。

冯祚建(中国科学院动物研究所)