

电感耦合等离子体-质谱法测定不同时期秀丽隐杆线虫中26种无机元素

柳志诚¹, 潘纪红², 叶婉婷¹, 沈 蒙¹, 王文琪¹, 王嘉慧¹, 陶 欧^{1*}, 刘永刚^{1*}

1. 北京中医药大学 中药学院, 北京 102401

2. 日照市中医医院 肿瘤二科, 山东 日照 276800

摘要: 目的 通过电感耦合等离子体-质谱 (ICP-MS) 法建立同时测定秀丽隐杆线虫体内26种元素含量的方法, 同时分析线虫生长发育不同阶段体内元素的含量变化。方法 以65%~68% HNO₃作为消解液, 采用湿法消解处理线虫, 利用ICP-MS同时测定线虫中26种元素Al、As、B、Ba、Bi、Ca、Cd、Co、Cr、Cu、Fe、Ga、In、K、Mg、Mn、Mo、Na、Ni、Pb、Sc、Se、Te、V、Zn、Zr。将线虫同步化后获得的卵均匀分成5组, 分别培养至L1期、L2期、L3期、L4期以及Adult期, 应用建立的ICP-MS法测定26种元素含量。结果 26种元素在0~500 μg·L⁻¹线性关系良好, $R^2 \geq 0.999\ 3$; 仪器检出限为0.000 1~0.090 3 μg·L⁻¹; 仪器精密度 (RSD) 为0.4%~1.8%; 重复性 (RSD) 为0.0%~2.5%; 稳定性 (RSD) 为0.8%~4.6%; 平均加标回收率为80.8%~118.5%, RSD为0.2%~1.5%。L4期线虫中总体元素含量最高, 其次是L2期, L1期线虫中总体元素含量最低。结论 通过ICP-MS测定了线虫生长发育过程中体内元素的含量, 该方法快捷灵敏、简便高效, 适用于对线虫中元素的分布情况进行分析, 为进一步研究单一元素或多种元素对秀丽隐杆线虫的潜在影响提供参考。

关键词: 秀丽隐杆线虫; 电感耦合等离子体-质谱法; 无机元素; 相关性分析

中图分类号: R917 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2024) 03-0547-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.03.012

Simultaneous determination of 26 inorganic elements by inductively coupled plasma-mass spectrometry in *Caenorhabditis elegans* at different periods of timeLIU Zhicheng¹, PAN Jihong², YE Wanting¹, SHEN Meng¹, WANG Wenqi¹, WANG Jiahui¹, TAO Ou¹, LIU Yonggang¹

1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102401, China

2. Oncology Department 2, Rizhao City Hospital of Traditional Chinese Medicine, Rizhao 276800, China

Abstract: **Objective** A method was established to simultaneously determine the content of 26 elements in *C. elegans* by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS), and to analyze the content changes of elements in different stages of *C. elegans* growth and development. **Methods** The nematodes were treated by wet digestion using 65%—68% HNO₃ as the digestion solution, and 26 elements (Al, As, B, Ba, Bi, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Ga, In, K, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Pb, Sc, Se, Te, V, Zn, and Zr) in the nematodes were determined simultaneously using ICP-MS. The eggs obtained after synchronization of nematodes were evenly divided into five groups and cultured to L1, L2, L3, L4, and Adult stages, respectively. The content of 26 elements was determined using the established ICP-MS method. **Results** The results showed that the linearity of the 26 elements was good in the range of 0—500 μg·L⁻¹ with $R^2 \geq 0.999\ 3$, the instrumental limits of detection were 0.000 1—0.090 3 μg·L⁻¹, the instrumental precision RSD was 0.4%—1.8%, the reproducibility RSD was 0.0%—2.5%, the stability RSD was 0.8%—4.6%, the average spiked recoveries were 80.8%—118.5%, and the RSD was 0.2%—1.5%. The L4 stage nematodes have the highest overall element content, followed by the L2 stage, with the L1 stage nematodes having the lowest overall element content. **Conclusion** The content of elements in nematodes during growth and development was determined by ICP-MS, which is a fast, sensitive, simple and efficient method suitable for analyzing the distribution of elements in nematodes, and provides a certain theoretical basis for the further study of the potential

收稿日期: 2023-10-08

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFC1706500)

第一作者: 柳志诚,男,研究方向为中药化学。E-mail: zhicheng1921@163.com

*共同通信作者: 陶 欧,女,副教授,研究方向为信息技术在中药质量控制中的应用研究。E-mail: taoou1978@163.com

刘永刚,男,教授,研究方向为基于秀丽隐杆线虫的药物筛选研究。E-mail: liuyg0228@163.com

effects of a single element or a variety of elements on *Caenorhabditis elegans*.

Key words: *Caenorhabditis elegans*; inductively coupled plasma mass spectrometry; inorganic elements; correlation analysis

生物体是由各种化学元素组成的一个有机整体,其生长发育、繁殖后代、新陈代谢以及能量转换等生理功能的实质是生物体本身与外界环境进行多种元素的交换,各元素在生物体内部进行合成和分解代谢等生物学过程。根据元素在机体内含量水平的高低,通常将元素分为两大类,分别是常量元素和微量元素^[1]。随着痕量分析技术的提高,人们对于无机元素的研究取得了迅速的发展,无机元素对于维持机体健康起着基础性的作用,生物体的生长发育是与生物分子如蛋白质、多糖、核酸等紧密联系在一起的,而无机元素对这些生物分子关键步骤的调控也起着一定的作用^[2]。无机元素主要来源于空气、食物和各类外源性物质,容易导致缺乏或过度蓄积,影响生物体的有机平衡。一般来讲,不同的无机元素具有不同的生理功能,部分无机元素之间也会呈现相似的生理作用。另外,无机元素的生理功能也与其在机体组织中的浓度息息相关,在某一浓度范围内能够维持机体组织结构的完整性,对机体的生长发育、健康状态和生殖功能等都是必不可少的,但当元素浓度低于或高于机体需要的浓度时,就会影响机体正常的生理功能,甚至会出现无机元素的缺乏、中毒或引起机体死亡^[3]。无机元素的种类和含量与人体健康密切相关,其对人体生长发育各个阶段都有着非常重要的作用。

此外,随着健康中国战略的提出,研究无机元素与中药的关系对中医药现代化也具有实际意义,无机元素与中药共同维护人体健康,研究表明,无机元素与中药的质量、四气、五味、归经、功效、毒性等密切相关且关系复杂,目前有关中药与无机元素的关系缺乏相关作用机制的研究^[4]。以秀丽隐杆线虫作为模式生物可以更好地研究无机元素与中药的关系,阐明中药治疗人类疾病的病理机制^[5]。秀丽隐杆线虫在环境中广泛分布,其对环境污染有着敏感的毒性反应,线虫的生命周期短、繁殖数量多、虫体透明清澈、有机组成简单、基因背景清晰^[6-9],而且目前线虫已有多种突变型株系,因此以线虫作为生物模型来研究元素具有非常显著的优势。此外,秀丽隐杆线虫基因组中有着60%~80%的人类同源基因,具有高度保守性^[10-11],在毒理效应研究以及金属元素的吸收和蓄积研究中应用广泛^[12-13]。目前,线虫已经被广泛应用在单一元素或多种元素联合

毒性的研究中^[14-15],利用秀丽隐杆线虫进行环境毒性研究时,评价结果常与暴露时期、暴露时间及评价终点等因素有关^[16]。不同发育阶段的线虫体内元素种类和含量可能与评价结果存在关系。测定线虫体内的元素含量需要用到灵敏度高的分析技术,电感耦合等离子体-质谱(ICP-MS)法是以等离子体作为离子源,可以同时快速检测多种元素,进行元素形态及其价态分析,具有简便快捷、消耗样品量少、灵敏度高等优点^[17-18]。本研究采用ICP-MS法对秀丽隐杆线虫中的无机元素进行测定,旨在建立一种测定线虫体内元素含量的简便快捷的方法,同时以线虫作为模式生物研究其不同生长发育阶段元素的种类和含量变化,为进一步研究无机元素与机体生长发育的关系、单一元素或多种元素对线虫的作用、化合物及中药对线虫的生理作用与无机元素之间的关系等提供参考,也为线虫的进一步开发及应用提供一定的理论基础。

1 材料

1.1 主要仪器

BT125D 型十万分之一电子天平(德国 Satorious 公司);SPX-250 型生化培养箱(北京科伟永兴仪器有限公司);VORTEX-7 型涡旋振荡器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司);KH-250 型双频数控超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司);D1008 型迷你离心机(大龙兴创实验仪器股份公司);YXQ-LS-100SII 型立式压力蒸汽灭菌器(上海博迅实业有限公司医疗设备厂);D-LH/LC 型荧光倒置显微镜(尼康映像仪器销售中国有限公司);LGJ-10 型真空冷冻干燥机(北京松源华兴科技发展有限公司);电感耦合等离子体质谱仪(iCAP Q ICPMS, Thermo Fisher Scientific)。

1.2 主要试剂

HNO₃(优级纯,65.0%~68.0%,北京化工厂有限责任公司);自动调谐液 iCAP Q/RQ TUNE solution: Ba、Bi、Ce、Co、In、Li、U, 1.0 μg·L⁻¹ in 2% HNO₃+0.5% HCl、质量调谐液 iCAP Q/Qnova Calibration solution: in 2% HNO₃(Thermo Fisher Scientific);纯净水(Watsons water, 屈臣氏饮用水);氩气(Ar≥99.999 2%,北京氦普北分气体工业有限公司);高纯氦气(He≥99.999%,北京北氧利来科技发展有限公司);内标溶液:

铑(Rh , $1\ 000\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、铼(Re , $1\ 000\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 国家有色金属及电子材料分析测试中心; 多元素混合标准溶液($100\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 上海麦克林生化科技有限公司); 60 mm 培养皿(南通市海锐实验器材有限公司); 胰蛋白胨、酵母提取物、蛋白胨(赛默飞世尔Oxoid公司); 琼脂粉(北京索莱宝科技有限公司); 胆固醇(北京博奥拓达科技有限公司); 氯化钠(分析纯, 上海麦克林生化科技有限公司); 无水氯化钙、无水硫酸镁、氢氧化钠(分析纯, 北京化工厂有限责任公司); 磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、磷酸氢二钠(分析纯, 天津大茂化学试剂有限公司); 次氯酸钠溶液(分析纯, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司)。

1.3 线虫及菌株

野生型秀丽隐杆线虫 N2 (*Caenorhabditis Elegans* wild-type) 线虫株、尿嘧啶渗漏突变型大肠埃希菌 (*Escherichia coli* OP50), 均购自 CGC(Caenorhabditis Genetics Center)。

2 方法与结果

2.1 NGM培养基的配制

分别称取 1.2 g 氯化钠、1.0 g 蛋白胨、6.8 g 琼脂, 置于 500 mL 锥形瓶中, 加入 $5\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的胆固醇乙醇液 400 μL , 用 389 mL 去离子水溶解, 将瓶口覆以组织封口膜, $121\ ^\circ\text{C}$ 高压灭菌 20 min, 灭菌结束后, 分别加入 $1\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的氯化钙溶液 400 μL 、 $1\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的硫酸镁溶液 400 μL 以及 $1\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的磷酸钾缓冲液 10 mL, 充分混匀, 趁热将其倒入培养皿中, 待冷却晾干后即可使用。

2.2 M9缓冲液的配制

分别称取 1.16 g 磷酸氢二钠、0.60 g 磷酸二氢钾和 0.10 g 氯化钠, 置于 500 mL 锥形瓶中, 加入 200 mL 去离子水溶解, 将瓶口覆以组织封口膜, $121\ ^\circ\text{C}$ 高压灭菌 20 min, 灭菌结束后, 在 $4\ ^\circ\text{C}$ 下冷藏保存备用。

2.3 线虫培养

野生型秀丽隐杆线虫 N2 在 NGM 培养基上培养, 以大肠埃希菌 OP50 作为食物来源, 放在 $20\ ^\circ\text{C}$ 生化培养箱中进行培养。为保证线虫生长发育同步, 实验前采用裂解法对线虫进行同步化, 以获得同期化的卵, 将卵转移至干净的 NGM 培养基上, 孵化后 $20\ ^\circ\text{C}$ 下饥饿培养过夜得到 L1 期幼虫, 进一步培养获得 L2、L3、L4 以及 Adult 时期的线虫。

2.4 元素对照品溶液的配制

首先精密移取浓硝酸适量, 用纯净水进行稀释, 配制成 2% HNO_3 溶液作为稀释储备液。精密移

取铑(^{103}Rh)和铼(^{185}Re)元素标准溶液适量, 用 2% HNO_3 溶液进行稀释, 配制成质量浓度为 $10\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的内标溶液。另精密移取 $100\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 多元素混合对照品溶液适量, 用 2% HNO_3 溶液依次稀释, 配制质量浓度分别为 0、0.5、1.0、5.0、10.0、50.0、100.0、500.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的多元素混合对照品溶液。

2.5 线虫供试品溶液的配制

将线虫样本用 M9 缓冲液从 NGM 培养基冲洗下, 转移至 1.5 mL 的离心管内, 静置 15 min, 弃去上清液, 以除去残余 OP50, 加入 1 mL M9 缓冲液, 涡旋 30 s, 离心 2 min, 弃去上清液, 如此重复清洗 3 次, 再加入 1 mL 纯净水, 涡旋 30 s, 离心 2 min, 最后弃去上清液。将剩余线虫放入液氮中进行速冻, 冷冻干燥 24 h, 冻干结束后, 对线虫样品进行精密称重, 加入 300 μL 的浓硝酸, $90\ ^\circ\text{C}$ 消解 4 h, 消解结束后, 将离心管内液体用 0.45 μm 滤膜滤过, 转移至 10 mL 量瓶中, 并用纯净水冲洗离心管 3 次, 冲洗液一并转移至量瓶内, 最后用纯净水定容至刻度, 混匀后即得供试品溶液。溶液配制所用到的器具均用 2% HNO_3 溶液浸泡 24 h。

2.6 空白对照溶液的配制

空白对照溶液的配制即除不加秀丽隐杆线虫样品外, 配制方法与供试品溶液相同。

2.7 ICP-MS工作条件优化

本实验在设备点火成功后, 在 STD 模式下依次进行自动调谐 (Autotune)、质量校正 (Mass Calibration) 和检测器校正 (Detector Setup), 优化设备工作参数, 同时采用在线加入内标溶液的方式对基体效应干扰和仪器的漂移干扰进行校正, 以提高仪器检测分析样品的灵敏度。测定时选取的同位素为 ^{11}B 、 ^{23}Na 、 ^{24}Mg 、 ^{27}Al 、 ^{39}K 、 ^{44}Ca 、 ^{45}Sc 、 ^{51}V 、 ^{52}Cr 、 ^{55}Mn 、 ^{57}Fe 、 ^{59}Co 、 ^{60}Ni 、 ^{63}Cu 、 ^{66}Zn 、 ^{71}Ga 、 ^{75}As 、 ^{77}Se 、 ^{90}Zr 、 ^{95}Mo 、 ^{111}Cd 、 ^{115}In 、 ^{125}Te 、 ^{137}Ba 、 ^{208}Pb 、 ^{209}Bi , 以 ^{103}Rh 和 ^{185}Re 作为内标, 依次将标准溶液、空白对照溶液和供试品溶液进行测定

2.8 ICP-MS工作参数

氩气压力 0.60~0.65 MPa, 氦气压力 0.1~0.2 MPa, 冷却气体积流量 $14.000\ \text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, 辅助气体积流量 $0.800\ 0\ \text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, 雾化气体积流量 $0.996\ 4\ \text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, 射频功率 1 550 W, 雾化室温度 $2.5\ ^\circ\text{C}$, 采样深度 5 mm, 扫描次数 30 次, 蠕动泵速率 $40\ \text{rmin}^{-1}$, 驻留时间 0.05 s, 运行次数 3 次, 元素分析模式为 KED 模式。

2.9 标准曲线

取制备好的各浓度多元素混合对照品溶液, 在

ICP-MS工作条件下依次进行测定,以标准溶液的质量浓度为横坐标、分析信号与内标信号的比值为纵坐标,建立各元素的标准曲线,计算得到各元素的线性回归方程和相关系数,将配制的空白对照溶液连续测定11次,计算测定值的标准偏差的3倍作为检出限,测定值的标准偏差的10倍作为定量限。

26种元素在0~500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 线性关系良好, $R^2 \geq 0.9993$ 。结果见表1。

2.10 仪器精密度试验

取配制的质量浓度为100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的多元素混合标准溶液,在最佳ICP-MS工作条件下连续进样6次,根据测定结果计算RSD值。仪器精密度RSD值均在0.4%~1.8%,结果表明仪器精密度良好。

2.11 重复性试验

收集Adult期的线虫干燥样品6份,按“2.5”项

方法对样品进行前处理,在最佳ICP-MS工作条件下平行测定3次,根据测定结果计算RSD值。26种元素的重复性RSD值均在0~2.5%,结果表明重复性良好。

2.12 稳定性试验

收集Adult期的线虫干燥样品1份,按“2.5”项方法对样品进行前处理,在最佳ICP-MS工作条件下分别于0、2、4、8、12、24 h时取样进行测定,根据测定结果计算RSD值。26种元素的稳定性RSD值均在0.8%~4.6%,结果表明稳定性良好。

2.13 加标回收率试验

准确称取已知各元素含量的Adult期干燥线虫样品3份,加入与线虫样品中各无机元素含量相当的对照品溶液,按照“2.5”项方法配制加标溶液,在最佳ICP-MS工作条件下平行测定3次,根据测定结

表1 26种无机元素线性回归方程、线性关系、线性范围、检测限、定量限

Table 1 Regression equations, correlation coefficients, linear ranges, detection limits and quantification limits of 26 inorganic elements

序号	元素	线性方程	R^2	线性范围/ $(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	检测限/ $(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	定量限/ $(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$
1	Al	$Y=439.2157X+1711.0079$	1.0000	0~500	0.0013	0.0043
2	As	$Y=3978.5701X+1088.2719$	0.9989	0~500	0.0188	0.0627
3	B	$Y=205.7695X+571.5707$	1.0000	0~500	0.0026	0.0087
4	Ba	$Y=14994.8290X+12438.4302$	1.0000	0~500	0.0268	0.0893
5	Bi	$Y=425090.9540X+1905.4803$	0.9995	0~500	0.0003	0.0010
6	Ca	$Y=151.8375X+2604.9396$	1.0000	0~500	0.0188	0.0627
7	Cd	$Y=18061.1079X+65.3336$	0.9999	0~500	0.0010	0.0033
8	Co	$Y=78225.6945X+649.3508$	0.9998	0~500	0.0004	0.0013
9	Cr	$Y=39436.1149X+88533.1845$	0.9998	0~500	0.0260	0.0867
10	Cu	$Y=58286.2125X+28282.8901$	0.9993	0~500	0.0057	0.0190
11	Fe	$Y=931.4713X+2345.3331$	1.0000	0~500	0.0003	0.0001
12	Ga	$Y=11002.0197X+83.3337$	0.9998	0~500	0.0018	0.0060
13	In	$Y=102574.1946X+38.8890$	0.9997	0~500	0.0003	0.0001
14	K	$Y=1566.1459X+21356.4771$	1.0000	0~500	0.0013	0.0043
15	Mg	$Y=1891.4908X+9702.2172$	1.0000	0~500	0.0002	0.0007
16	Mn	$Y=20406.1508X+2272.8755$	0.9999	0~500	0.0094	0.0313
17	Mo	$Y=28865.4525X+219.1132$	0.9999	0~500	0.0013	0.0043
18	Na	$Y=20636.7688X+412987.1584$	1.0000	0~500	0.0001	0.0003
19	Ni	$Y=20217.1010X+3808.1392$	0.9999	0~500	0.0096	0.0320
20	Pb	$Y=304153.9244X+131200.3096$	0.9996	0~500	0.0055	0.0183
21	Sc	$Y=7716.6374X+54.8891$	0.9999	0~500	0.0027	0.0090
22	Se	$Y=92.6370X+0.6667$	0.9997	0~500	0.0216	0.0720
23	Te	$Y=852.8834X+0.8889$	0.9997	0~500	0.0036	0.0120
24	V	$Y=24216.7426X+109.7784$	0.9999	0~500	0.0012	0.0040
25	Zn	$Y=9017.1776X+20686.9057$	0.9995	0~500	0.0903	0.3010
26	Zr	$Y=52964.5026X+2398.4547$	0.9999	0~500	0.0027	0.0090

果计算各元素平均加标回收率。线虫样品中各元素的平均加标回收率为80.8%~118.5%，RSD为0.2%~1.5%。

2.14 不同时期线虫元素含量测定

将线虫同步化后获得的卵均匀分成5组，分别

培养至L1期、L2期、L3期、L4期和Adult期，然后按照“2.5”项方法，将各组样品制成待测溶液，在最佳ICP-MS工作条件下进行测定，相同条件下重复3次，以获得线虫不同生长发育阶段线虫元素的含量变化情况。Adult期线虫体内26种元素含量结果见表2。

表2 Adult期线虫体内26种元素含量结果($\bar{x}\pm s, n=3$)
Table 2 Results of mass fractions of 26 elements in adult *C. elegans* ($\bar{x}\pm s, n=3$)

序号	元素	质量浓度/($\text{pg}\cdot\mu\text{g}^{-1}$)	序号	元素	质量浓度/($\text{pg}\cdot\mu\text{g}^{-1}$)
1	Al	724.016±1.344	14	K	1 519.824±7.822
2	As	0.012±0.003	15	Mg	47.037±0.708
3	B	8.733±0.007	16	Mn	0.481±0.023
4	Ba	3.383±0.036	17	Mo	0.002±0.000
5	Bi	1.228×10 ⁻⁴ ±0.000	18	Na	371.931±0.672
6	Ca	250.971±2.315	19	Ni	—
7	Cd	5.509×10 ⁻⁴ ±0.000	20	Pb	—
8	Co	3.579×10 ⁻⁴ ±0.000	21	Sc	0.068±0.000
9	Cr	0.178±0.004	22	Se	0.260±0.004
10	Cu	—	23	Te	5.546×10 ⁻⁴ ±0.000
11	Fe	3.283±0.034	24	V	0.010±0.000
12	Ga	0.004±0.000	25	Zn	0.392±0.006
13	In	0.002±0.000	26	Zr	0.004±0.000

“—”表示未检出。

"-" indicated not detected.

L1、L2、L3、L4以Adult期线虫元素含量及不同生长发育阶段的线虫元素含量变化趋势，见图1。

2.15 元素相关性分析

通过Origin 2022绘制26种元素之间的相关性热图(图2)，采用Spearman等级相关系数进行数据检验，分析发现有46对元素之间具有显著相关性($P<0.05$)。其中，Cu、Pb与K呈负相关，As、Zr与Mn呈负相关，Te、In与Pb呈负相关，其余具有显著相关性的元素之间均呈正相关。

2.16 元素含量主成分分析

通过SPSS 25.0软件对L1~Adult期5个时期的秀丽隐杆线虫中元素含量进行主成分分析，分析不同发育阶段线虫中的元素含量差异。将数据进行标准化处理后，有4个主成分的特征值大于1，见表3，4个主成分的累积方差贡献率分别为48.715%、75.874%、92.505%、100.000%，能够反映大部分元素的主要信息，所以选择前4个成分进行主成分分析。

由表4可知，Cr、Ga、Mg、Pb、Ca、Te、Al、V、Cd、As、Sc、Fe、Se、Mn、B和Cu元素在第1主成分上具有较高的载荷，B、Ba、Zn、Ni、Co、Zr、Cu、K、In和Mo元素在第2主成分上具有较高的载荷，Se、Na、Bi、K

和In元素在第3主成分上具有较高载荷，Mn和Mo元素在第4主成分上具有较高的载荷。因此，选取这4个主成分能够基本反映本实验测量的线虫中26种元素的信息。

通过前4个主成分对L1~Adult期5个时期线虫中的元素含量进行综合评价，计算4个主成分的单独得分，以各个主成分因子相对应的方差相对贡献率为权重计算得到每组样品的综合得分，结果见表5。综合得分数值越大，表示样品中总体元素含量越高，由表6可得，L4期线虫中总体元素含量最高，其次是L2期，L1期线虫中总体元素含量最低。

3 讨论

本研究基于ICP-MS法建立了一种快速测定秀丽隐杆线虫体内26种元素的含量测定方法。测得线虫体内Na、K、Ca、Mg、B、Al等元素含量相对较大，其次Se、Ba、Sc、Cr、Zr、Mn、V、Ga等元素含量相对较低；B、Co、Zn、Ba、Cu、Mo等元素在L2期的线虫体内含量最高；Ca和Mn元素在L3期线虫体内的含量最高；Al、Sc、Se、Te、Fe、Mg、Ca、V、Ga、Cr等元素在L4期的线虫体内含量最高；在L1~L4期生长发育过程中，Al、Se、Te、Cr、等元素含量整体呈逐渐

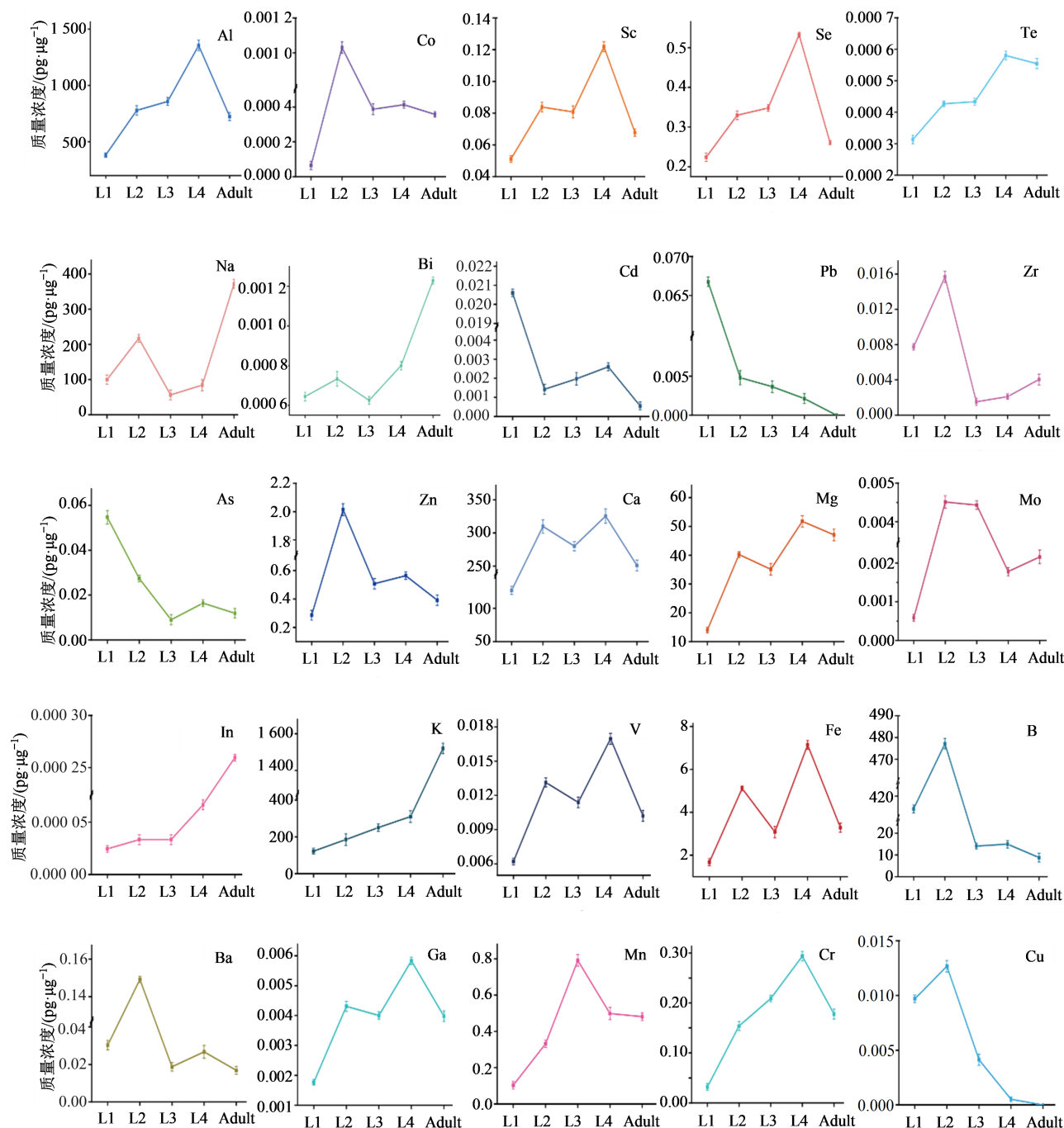


图1 L1~Adult期的线虫中元素含量水平

Fig. 1 Levels of elements in nematodes of L1—Adult stages

上升趋势;K和In元素在L1~Adult期的线虫体内含量逐渐增加;Co、Bi、Mo、Te、In等元素含量较低,其中Bi、Te、In元素随着线虫生长发育含量呈现增加的趋势;Cu、As、Pb、Cd在线虫不同发育阶段也有分布,其中Cu和Pb随着线虫生长发育含量呈现逐渐降低的趋势,Adult期的线虫中未检测到Cu和Pb;此外,在L1~Adult期的线虫体内均未检测到Ni元素。线虫生长发育过程中,无机元素含量发生了

变化,为了分析线虫发育过程中无机元素之间的变化关系,采用Spearman等级相关系数进行相关性分析,分析结果显示有46对元素之间具有显著相关性($P<0.05$)。通过主成分分析得出L4期线虫中总体元素含量最高,其次是L2期,L1期线虫中总体元素含量最低。由此可见,线虫生命所需的多种元素在线虫生长发育过程中分布不同。

多数元素都能够对线虫的咽泵频率、趋化性、

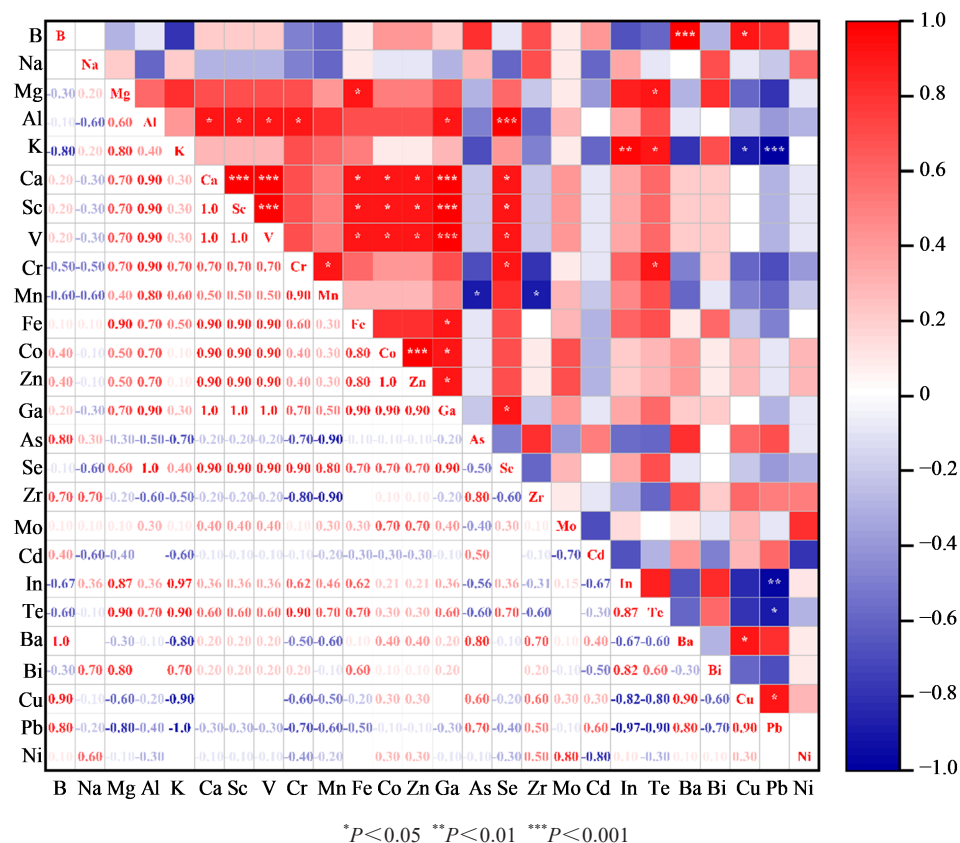


图 2 秀丽隐杆线虫中 26 种元素之间相关性($n=3$)
Fig. 2 Correlation among 26 elements in *C. elegans* ($n=3$)

表 3 各主成分特征值、贡献率及累积贡献

Table 3 Characteristic value, contribution rate and cumulative contribution rate of each principal component			
主成分	特征值	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%
1	12.666	48.715	48.715
2	7.061	27.159	75.874
3	4.324	16.631	92.505
4	1.949	7.495	100.000

身体弯曲频率、头尾摆动频率以及运动姿态等行为产生一定程度的影响。研究发现,过量Cu元素处理线虫后会引起慢性和急性毒理效应,致使线虫表皮褶皱、发育延迟、生殖腺萎缩、产卵孔畸形、体内渗透压异常、产卵量降低、寿命缩短,而且出现虫卵在母体内孵化的袋线虫(bags-of-worms)表型的比例增加,高浓度Cu元素还能够显著诱导线虫肠道脂肪的蓄积^[19];线虫对Al元素也表现出敏感的毒性反应,Al暴露对线虫的体长、体宽、身体弯曲频率、头尾摆动频率均有一定的抑制作用,并且显著诱导了线虫氧化应激,活性氧(ROS)的产生与Al元素浓度呈现一定的剂量相关性^[20],Al暴露能够引起秀丽隐杆线虫体内整体元素水平改变^[21];在线虫L1期暴露

于Ti元素中,会导致线虫生长发育迟缓、成活率显著降低、运动行为发生改变、繁殖能力受到损伤,可能诱导了线虫氧化应激,而且Ti元素会在线虫体内聚积,对线虫造成不可逆转的损害^[22];高浓度的La元素暴露会明显缩短线虫寿命,引发线虫的代谢紊乱,且La元素会在线虫体内蓄积,蓄积程度与外界环境中的La元素浓度呈现一定的剂量相关性^[23];野生型秀丽隐杆线虫暴露于500~1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的Mn元素中时,Mn元素能够促进线虫的生长发育和繁殖,能使线虫的繁殖能力提高16%,增强线虫的耐热性和氧化应激水平^[24];富硒纳豆芽孢杆菌对线虫因衰老而产生的神经及肌肉损伤有一定的保护作用,能够提高线虫的产卵量、延长线虫寿命、提高线虫抗氧化应激和热应激能力、提高线虫体内SOD及CAT酶活性^[25];适当补充钙离子能够缓解线虫由微重力引起的钙离子损失、降低微重力引起的运动能力影响^[26]。

生物体所需的多种元素之间存在着各种协同和拮抗作用,在机体内处于一种精细的平衡状态。除了单一元素对线虫会产生影响外,2种或多种元素共同暴露也会产生协同或拮抗效果。无毒浓度

表4 主成分载荷矩阵
Table 4 Principal component load matrix

元素	成分载荷				元素	成分载荷			
	1	2	3	4		1	2	3	4
Cr	0.975	-0.042	-0.218	0.000	Mn	0.706	-0.196	-0.129	-0.667
Ga	0.967	0.173	-0.110	0.150	B	-0.688	0.686	0.105	0.212
Mg	0.961	0.017	0.228	0.156	Ba	-0.047	0.953	0.289	0.082
Pb	-0.925	-0.124	-0.274	0.234	Zn	0.136	0.948	0.286	0.001
Ca	0.919	0.386	0.003	-0.082	Ni	0.001	0.937	0.349	0.023
Te	0.911	-0.268	0.182	0.256	Co	0.389	0.854	0.339	-0.070
Al	0.906	0.062	-0.370	0.194	Zr	-0.375	0.820	0.389	0.187
V	0.894	0.318	-0.239	0.207	Cu	-0.639	0.767	0.021	-0.059
Cd	-0.890	-0.162	-0.335	0.263	Na	0.118	-0.131	0.968	0.181
As	-0.887	0.166	-0.165	0.398	Bi	0.358	-0.467	0.761	0.273
Sc	0.844	0.212	-0.420	0.259	K	0.293	-0.581	0.757	0.068
Fe	0.796	0.367	-0.216	0.430	In	0.311	-0.579	0.740	0.146
Se	0.781	0.152	-0.551	0.252	Mo	0.394	0.583	0.167	-0.690

表5 主成分表达式
Table 5 Principal component expression

主成分	表达式
1	$Y_1 = -0.193 X_1 + 0.033 X_2 + 0.270 X_3 + 0.255 X_4 + 0.082 X_5 + 0.258 X_6 + 0.237 X_7 + 0.251 X_8 + 0.274 X_9 + 0.198 X_{10} + 0.224 X_{11} + 0.109 X_{12} + 0.038 X_{13} + 0.272 X_{14} - 0.249 X_{15} + 0.219 X_{16} - 0.105 X_{17} + 0.111 X_{18} - 0.250 X_{19} + 0.087 X_{20} + 0.256 X_{21} - 0.013 X_{22} + 0.101 X_{23} - 0.180 X_{24} - 0.260 X_{25}$
2	$Y_2 = 0.258 X_1 - 0.049 X_2 + 0.006 X_3 + 0.023 X_4 - 0.219 X_5 + 0.145 X_6 + 0.080 X_7 + 0.120 X_8 - 0.016 X_9 - 0.074 X_{10} + 0.138 X_{11} + 0.321 X_{12} + 0.357 X_{13} + 0.065 X_{14} + 0.062 X_{15} + 0.057 X_{16} + 0.309 X_{17} + 0.219 X_{18} - 0.061 X_{19} - 0.218 X_{20} - 0.101 X_{21} + 0.359 X_{22} - 0.176 X_{23} + 0.289 X_{24} - 0.047 X_{25} + 0.353 X_{26}$
3	$Y_3 = 0.050 X_1 + 0.466 X_2 + 0.110 X_3 - 0.178 X_4 + 0.364 X_5 + 0.001 X_6 - 0.202 X_7 - 0.115 X_8 - 0.105 X_9 - 0.062 X_{10} - 0.104 X_{11} + 0.163 X_{12} + 0.138 X_{13} - 0.053 X_{14} - 0.079 X_{15} - 0.265 X_{16} + 0.187 X_{17} + 0.080 X_{18} - 0.161 X_{19} + 0.356 X_{20} + 0.088 X_{21} + 0.139 X_{22} + 0.366 X_{23} + 0.010 X_{24} - 0.132 X_{25} + 0.168 X_{26}$
4	$Y_4 = 0.152 X_1 + 0.130 X_2 + 0.112 X_3 + 0.139 X_4 + 0.049 X_5 - 0.059 X_6 + 0.186 X_7 + 0.148 X_8 - 0.478 X_{10} + 0.308 X_{11} - 0.050 X_{12} + 0.001 X_{13} + 0.107 X_{14} + 0.285 X_{15} + 0.181 X_{16} + 0.134 X_{17} - 0.494 X_{18} + 0.188 X_{19} + 0.105 X_{20} + 0.183 X_{21} + 0.059 X_{22} + 0.196 X_{23} - 0.042 X_{24} + 0.168 X_{25} + 0.016 X_{26}$

$Y_1 \sim Y_4$ 为4个主成分因子; $X_1 \sim X_{26}$ 为26种元素含量经标准化后的数据。
 Y_1 to Y_4 were four principal component factors; X_1 to X_{26} were standardized data for the content of 26 elements.

表6 主成分得分、综合得分和排序
Table 6 Principal component score, composite score and ranking

时期	主成分因子				综合得分	综合排序
	Y1	Y2	Y3	Y4		
L1	-5.83	-0.85	-0.94	0.64	-3.18	5
L2	0.01	4.46	1.30	0.06	1.43	2
L3	0.85	-0.55	-1.28	-2.30	-0.12	4
L4	3.82	-0.36	-2.06	1.43	1.53	1
Adult	1.16	-2.70	2.98	0.18	0.34	3

下As和Cd 2种元素共同暴露对秀丽隐杆线虫的发育和繁殖毒性具有协同效果,Cd元素还能够促进秀丽隐杆线虫对As元素的吸收,增加As元素在线虫性腺和肠道中的积累^[27]。Mn和Pb元素、Pb和As元素共同暴露对线虫产生毒性协同作用,而补充Zn元素后,能够拮抗元素共同暴露引起的神经毒性,改善线虫的运动行为和神经元,其机制是补充Zn元素后恢复了线虫体内的锌稳态,降低了线虫体内ROS、谷胱甘肽S-转移酶4α(Gsta4)和丙二醛(MDA),激活了SOD、谷胱甘肽(GSH)和GSH-Px,

上调了 *sod-4*、*sod-3*、*gst-7*、*zip10*、*mtl-1* 和 *mtl-2* 基因, 从而抑制了线虫的氧化损伤^[28]。因此, 不仅要注意单一元素的影响, 还要关注多种元素可能具有的协同或拮抗作用对生物体的影响。以秀丽隐杆线虫作为模式生物, 研究元素对线虫的影响, 能够为进一步揭示元素与人体健康的关系提供有价值的参考。

本研究基于 ICP-MS 测定秀丽隐杆线虫 L1~Adult 期生长发育过程中多种元素的含量并研究其分布变化情况, 为进一步研究单一元素或多种元素对线虫的作用、化合物及中药对线虫的生理作用与无机元素之间的关系提供参考, 对线虫的进一步开发、应用及研究提供了理论基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 熊婵, 黎庆, 马庆伟. 人体微量元素检测方法及其临床应用的研究进展 [J]. 中国全科医学, 2018, 4(8): 888-895.
Xiong C, Li Q, Ma Q W. Recent advances in human trace element determination methods and clinical application [J]. Chin Gen Pract, 2018, 4(8): 888-895.
- [2] Fáblová L, Vandentorren S, Vuillermoz C, et al. Hair concentration of trace elements and growth in homeless children aged < 6 years: Results from the ENFAMS study [J]. Environ Int, 2018, 114: 318-325.
- [3] Bermúdez L, García-Vicent C, López J, et al. Assessment of ten trace elements in umbilical cord blood and maternal blood: Association with birth weight [J]. J Transl Med, 2015, 13: 291.
- [4] 魏小成, 李成义, 周瑞娟, 等. 无机元素与中药关系研究进展 [J]. 中国中医药信息杂志, 2022, 29(7): 140-144.
Wei X C, Li C Y, Zhou R J, et al. Research progress in relationship between inorganic elements and Chinese materia medica [J]. Chin J Inf Tradit Chin Med, 2022, 29(7): 140-144.
- [5] 张宇航, 邱智东, 刁元元, 等. 秀丽隐杆线虫在中药药效物质筛选中的应用 [J]. 时珍国医国药, 2022, 33(3): 663-668.
Zhang Y H, Qiu Z D, Diao Y Y, et al. Application of *Caenorhabditis elegans* in screening of effective substances in traditional Chinese medicine [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2022, 33(3): 663-668.
- [6] Corsi A K, Wightman B, Chalfie M. A transparent window into biology: A primer on *Caenorhabditis elegans* [J]. Genetics, 2015, 200(2): 387-407.
- [7] 周玉枝, 闫明亮, 高丽, 等. 衰老动物模型的研究及其在抗衰老药物活性筛选中的应用 [J]. 中草药, 2017, 48(6): 1061-1071.
Zhou Y Z, Yan M L, Gao L, et al. Study on aging animal models and its application in activity screening of anti-aging drugs [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2017, 48(6): 1061-1071.
- [8] Jacques M T, Bornhorst J, Soares M V, et al. Reprotoxicity of glyphosate-based formulation in *Caenorhabditis elegans* is not due to the active ingredient only [J]. Environ Pollut, 2019, 252(Pt B): 1854-1862.
- [9] Taylor C A, Tuschl K, Nicolai M M, et al. Maintaining translational relevance in animal models of manganese neurotoxicity [J]. J Nutr, 2020, 150(6): 1360-1369.
- [10] Hunt P R. The *C. elegans* model in toxicity testing [J]. J Appl Toxicol, 2017, 37(1): 50-59.
- [11] Shen P Y, Yue Y R, Park Y. A living model for obesity and aging research: *Caenorhabditis elegans* [J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2018, 58(5): 741-754.
- [12] Angeli S, Barhydt T, Jacobs R, et al. Manganese disturbs metal and protein homeostasis in *Caenorhabditis elegans* [J]. Metallomics, 2014, 6(10): 1816-1823.
- [13] Wang J J, Dai H, Nie Y G, et al. TiO₂ nanoparticles enhance bioaccumulation and toxicity of heavy metals in *Caenorhabditis elegans* via modification of local concentrations during the sedimentation process [J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2018, 162: 160-169.
- [14] Jiang Y, Chen J D, Wu Y, et al. Sublethal toxicity endpoints of heavy metals to the nematode *Caenorhabditis elegans* [J]. PLoS One, 2016, 11(1): e0148014.
- [15] Bloom M S, Parsons P J, Steuerwald A J, et al. Toxic trace metals and human oocytes during in vitro fertilization (IVF) [J]. Reprod Toxicol, 2010, 29(3): 298-305.
- [16] 赵悦, 卞倩. 秀丽隐杆线虫在环境毒理学中的应用研究进展 [J]. 癌变·畸变·突变, 2022, 34(1): 79-81.
Zhao Y, Bian Q. Research progress on the application of *Caenorhabditis elegans* in environmental toxicology [J]. Carcinog Teratog Mutagen, 2022, 34(1): 79-81.
- [17] Jiang D F, Huang C, Shao L J, et al. Magneto-controlled aptasensor for simultaneous detection of ochratoxin A and fumonisin B1 using inductively coupled plasma mass spectrometry with multiple metal nanoparticles as element labels [J]. Anal Chim Acta, 2020, 1127: 182-189.
- [18] Yin X, Chen B B, He M, et al. A multifunctional platform for the capture, release, and enumeration of circulating tumor cells based on aptamer binding, nicking endonuclease-assisted amplification, and inductively coupled plasma mass spectrometry detection [J]. Anal

- Chem, 2020, 92(15): 10308-10315.
- [19] 宋少娟. 秀丽隐杆线虫对铜的解毒代谢机制研究 [D]. 太原: 山西大学, 2014: 19-67.
- Song S J. Study on detoxification and metabolic mechanism of copper by *Caenorhabditis elegans* [D]. Taiyuan: Shanxi University, 2014: 19-67.
- [20] 付虎恒, 赵晟, 李飞. 铝暴露对秀丽线虫的毒理效应研究 [J]. 新疆医科大学学报, 2022, 45(6): 672-678.
- Fu H H, Zhao S, Li F. Toxicological effects of aluminum exposure on *Caenorhabditis elegans* [J]. J Xinjiang Med Univ, 2022, 45(6): 672-678.
- [21] Page K E, White K N, McCrohan C R, et al. Aluminium exposure disrupts elemental homeostasis in *Caenorhabditis elegans* [J]. Metallomics, 2012, 4(5): 512-522.
- [22] Varão A M, Silva J D S, Amaral L O, et al. Toxic effects of thallium acetate by acute exposure to the nematode *C. elegans* [J]. J Trace Elem Med Biol, 2021, 68: 126848.
- [23] 蓝文宁, 肖晓莲, 张芳榕, 等. 高浓度镧对秀丽隐杆线虫的代谢调控研究 [J/OL]. 中国稀土学报 [2023-07-11]. <https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?urlId=11.2365.TG.20230526.1435.002&uniplatform=NZKPT>.
- Lan W N, Xiao X L, Zhang F R, et al. The regulation of metabolism by high concentration of lanthanum in *Caenorhabditis elegans* [J/OL]. J Chin Rare Earth Societ, [2023-07-11]. <https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?urlId=11.2365.TG.20230526.1435.002&uniplatform=NZKPT>.
- [24] Lin Y T, Hoang H, Hsieh S I, et al. Manganous ion supplementation accelerates wild type development, enhances stress resistance, and rescues the life span of a short-lived *Caenorhabditis elegans* mutant [J]. Free Radic Biol Med, 2006, 40(7): 1185-1193.
- [25] 纪雅飞. 富硒纳豆芽孢杆菌的制备及对秀丽隐杆线虫的作用研究 [D]. 太原: 山西大学, 2020.
- Ji Y F. Preparation of selenium-riched *Bacillus natto* and its effect on *Caenorhabditis elegans* [D]. Taiyuan: Shanxi University, 2020.
- [26] 赵苒. 钙补充对模拟微重力下秀丽线虫运动能力及蛋白质组作用研究 [D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2016.
- Zhao R. The protective on athletic ability and proteome of *Caenorhabditis elegans* in microgravity environment by calcium supplement [D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2016.
- [27] Pei C C, Sun L Y, Zhao Y N, et al. Enhanced uptake of arsenic induces increased toxicity with cadmium at non-toxic concentrations on *Caenorhabditis elegans* [J]. Toxics, 2022, 10(3): 133.
- [28] Cai H Q, Bao Y, Cheng H, et al. Zinc homeostasis may reverse the synergistic neurotoxicity of heavy metal mixtures in *Caenorhabditis elegans* [J]. Sci Total Environ, 2023, 868: 161699.

[责任编辑 兰新新]