

SRXRF 研究鼠脑中 Zn 和 ZnT3 mRNA 的表达*

张元勋^{1,1)} 王荫淞¹ 李德禄¹ 张桂林¹ 黄宇萱² 何玮² 龙建纲³ 沈慧³

1 (中国科学院上海应用物理研究所 上海 201800)

2 (中国科学院高能物理研究所 北京 100049)

3 (第二军医大学军队卫生教研室 上海 200433)

摘要 为了研究 ZnT3 mRNA 的表达与 Zn 等金属元素在脑中精细分布的相互作用和功能. 使用同步辐射 X 射线荧光法 (SRXRF) 测定小鼠全脑和脑切片中 Zn 等金属元素分布, 同时使用反转录多聚酶链式反应 (RT-PCR) 检测小鼠各组织中的 ZnT3 mRNA 的表达量. 结果发现脑中 Zn 元素不是均匀分布的, 主要分布在皮层、海马和齿状回部位. 大脑皮层、海马和睾丸中的 ZnT3 mRNA 有较高丰度, 而其他组织中未检出 ZnT3 mRNA. 进一步的推断表明 ZnT3 能促进胞浆内 Zn 富集于囊泡中, 通过介导胞浆锌的跨膜转运过程, 构造囊泡‘锌池’.

关键词 同步辐射 X 荧光微探针 脑 锌元素 锌转运体 基因表达

1 引言

研究表明, 锌是人体必需微量元素, 几乎参与体内所有的生理代谢过程, 尤其与脑发育及功能有密切联系^[1]. 锌在脑组织中的转运过程是锌营养的重要内容, 研究锌在脑组织中的转运过程对深入理解锌影响脑发育及功能机制具有重要意义.

在 1995 年以前, 国际上许多学者对锌转运过程进行了大量研究, 但是进展缓慢, 没有发现任何一个直接参与锌转运的蛋白质. 直到 1995 年至 1997 年, Palmiter 等^[2] 及 Huang 等^[3] 连续克隆到 4 种直接参与锌转运的基因, 被称为锌转运体 (在 zinc transporter, ZnT). 目前的一些研究结果表明, 这些 ZnT 蛋白都具有多个跨膜域, 富含组氨酸, 脑内环等结构特征. 推断 ZnT 在机体中具有一定的生理功能, 参与锌通过细胞膜的流出和流进过程, 可能是介导锌离子进出细胞的“膜受体”, 并可能在脑中发挥重要的生理功能^[4], 例如 ZnT3 可能参与锌摄入神经元囊泡及睾丸中的过程^[5].

ZnT 的发现使锌研究有了突破性进展, 为锌在细胞和分子水平的更深刻认识奠定了重要基础. 随着研究的深入, 对于锌元素与锌转运体之间的调节机制, 锌转运体在锌内稳态中的功能作用以及锌转运体和锌

的特异分布与相应细胞间相互作用的认识还有待深化. 本项研究使用同步辐射 X 荧光微探针 (SRXRF) 微区扫描分析技术, 结合使用反转录聚合酶链式反应 (RT-PCR) 等分子生物学新技术, 研究锌等元素在脑切片中的分布与锌转运体表达模式之间的相互关系, 为阐明锌转运体及锌等元素在脑功能中作用机理提供理论依据.

2 材料和方法

选用成年雄性 ICR 小鼠 18 只, 体重 17—20g, 由上海西普尔-必凯公司提供. 随机分成 3 组: 缺锌组、对照组和高锌组, 每组 6 只, 分笼饲养. 含锌饲料购自美国 DYETS 公司, 参照美国营养协会报告的 AIN-93G 配方配制纯化饲料^[6], 饲料含锌量分别为 < 1, 30 和 180mg·kg⁻¹. 动物饲养在塑料笼具内, 自由饮用蒸馏水, 照明周期为 12h·d⁻¹, 室温控制在 21—25°C, 动物饲养实验室符合国标清洁级.

将分组饲养 4 周后的小鼠断头处死, 全脑、心、肝、肺、肾、小肠、睾丸等组织器官快速分离后置于液氮内保存. 使用冰冻切片机制备脑组织切片, 将全脑组织置于切片机支架, 快速冷冻固定后, 作冠状连续冷冻切片, 切片厚度 10—20μm, 切片随即平铺在

* 国家自然科学基金(10175085)和北京正负电子对撞机国家实验室项目(03025)资助

1) E-mail: yxzhang@sinap.ac.cn

6 μm 厚度的聚乙烯薄膜上,并用尼龙框架固定后置于干燥器内自然干燥,以备扫描分析时使用。

在北京正负电子对撞机的4W1B同步辐射X射线荧光分析站上进行鼠脑中微量元素的测定。实验时将同步辐射产生的直径为6mm的宽束白光直接照射样品,在束流的引出端放置合适的铝吸收片,目的是降低来自较高原子序数元素的LX射线和较低原子序数元素的KX射线,使感兴趣元素的特征X射线以适当的强度进入探测器,防止脉冲堆积、死时间过大和出现相加峰。束流轰击样品时产生的元素特征X射线由Si(Li)半导体探测器接受,信号经过前置放大器、主放大器和堆积排除器后进入多道能谱仪,最后由计算机系统能谱解析和数据处理^[7]。小鼠脑切片微区元素扫描测定需要对上述的同步辐射X射线荧光分析实验装置进行变动升级。首先是在X射线束流引出端安装从日本引进的电子4刀狭缝仪,调整狭缝宽度,使入射光束成为0.2mm \times 0.2mm微束。然后安装由微机程控的三维移动样品平台,并在微机上设置全自动扫描能谱获取系统,扫描分析时的步长为0.15mm,每个能谱收集时间为200s,详细实验装置可参阅文献^[8]。实验测定时将脑切片样品置于三维移动平台上,使入射的X射线微束沿着设定的范围逐点(point by point)进行扫描分析测定。

使用RT-PCR方法检测小鼠各组织中ZnT3 mRNA的表达,首先取小鼠脑、心、肝、肺、肾、小肠、睾丸等组织适量,一步法抽取组织总RNA,然后设计ZnT3引物,以100ng小鼠海马总RNA为模板,RT-PCR克隆ZnT3片断。RT-PCR扩增反应体积为20 μl ,通过模板量、退火温度和循环数的调整用于确定各组织RNA的反应参数,实验时以小鼠 β -c肌动蛋白(β -actin)作内对照。RT-PCR反应产物作琼脂糖凝胶电泳分析,使用SX-IMAGE凝胶成像系统,对电泳图作灰度扫描,将获取的ZnT3/ β -actin灰度扫描比值进行方差分析和不同组织间的相互比较。

3 结果和讨论

3.1 小鼠脑组织中的微量元素含量

使用常规同步辐射X荧光法,对实验培育的缺锌组、正常组和高锌组小鼠的全脑组织进行了多元素测定,使用AXIL软件解谱^[9],内标法计算后就得到Zn, Cu, Fe, Ca, K等微量元素浓度结果。由表1可见,高锌组和对照组的脑锌含量显著高于缺锌组($P < 0.05$)。对于铜、铁、钾和钙等元素含量,高锌组

虽有增加,但3组间无显著差异。脑内锌和其他必需微量元素如铜、铁、镁、钙等存在着相互影响相互作用的关系,饮食中缺乏锌会影响脑中锌的动态平衡,导致大脑机能障碍^[10]。在实验动物喂养过程中,对于缺锌组小鼠在使用缺锌饲料喂养10天后,小鼠开始出现皮毛失去光泽并逐渐开始变黄脱落,足爪脱屑,嘴角毛发脱落并有局部出血等缺锌症状表现。

表1 小鼠脑组织中元素的含量($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 干重, $x \pm s$, $n = 6$)

元素	Zn	Cu	Fe	K	Ca
缺锌组	24.1 \pm 3.2	9.6 \pm 1.3	198 \pm 24	8814 \pm 930	286 \pm 30
对照组	37.6 \pm 6.7	10.8 \pm 3.0	240 \pm 35	9423 \pm 847	302 \pm 41
高锌组	42.0 \pm 5.0*	13.2 \pm 2.7	256 \pm 28	9632 \pm 879	302 \pm 29

* $P < 0.05$ vs zinc deficiency group.

3.2 脑切片中锌元素的分布

使用SRXRF微探针扫描对脑切片进行扫描分析,可得到锌等微量元素在脑微区组织中的精细分布。图1是脑切片组织的Zn元素分布。使用美国Micromatter公司提供的一套薄膜标准样品作为分析系统的微区定量标准,可得到脑切片中Zn元素的浓度分布。由图可见,锌元素在脑中不是均匀分布的,以皮质和海马等组织中含量较多,尤其是喂养高锌饲料的小鼠海马和皮质的锌浓度明显高于对照组和低锌组,而在其他脑区未见显著性变化。

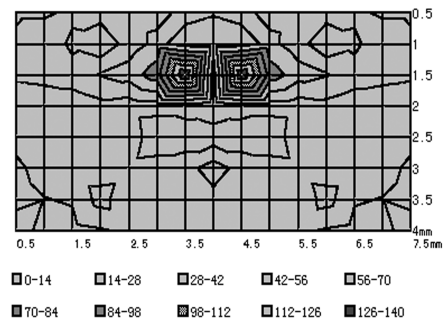


图1 Zn元素在脑切片中的含量分布($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)

3.3 小鼠各组织中的ZnT3 mRNA的表达量

使用RT-PCR方法,以 β -actin作内对照,对小鼠各组织总RNA中所含的ZnT3mRNA进行检测。结果表明,在睾丸和脑组织中的ZnT3mRNA有较高丰度,而在心、肝、脾、肺、肾、小肠等组织中未检出ZnT3mRNA的表达。为了进一步详细了解脑的各部分组织中ZnT3mRNA的表达情况,又检测了小鼠嗅球、大脑皮层、小脑皮层、海马等各部分组织的ZnT3mRNA,从图2的检测结果可发现大脑皮层、海马中ZnT3mRNA易于检出,而小脑和嗅球中未检

出 ZnT3 mRNA. 统计表明, 海马和睾丸之间的 ZnT3 mRNA 表达没有显著性差异, 而它们两者与大脑皮层相比有显著性差异 ($p < 0.05$).

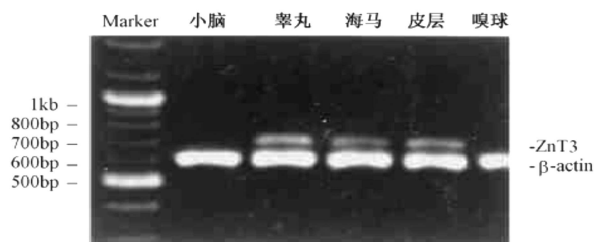


图 2 RT-PCR 法检测小鼠各组织中的 ZnT3 mRNA

4 结论

SRXRF 扫描微探针获取的脑切片 Zn 元素的精细分布与 RT-PCR 法对大脑皮层和海马结构中 ZnT3 mRNA 表达量有特异性分布的结果相对应, 表明大脑

皮层和海马结构中 ZnT3 mRNA 分布区域与这两部分组织中的锌分布相一致, 既含有转运蛋白 ZnT3, 也含有高浓度的锌, 说明这两种标志物质共同存在. 锌是一种基本的营养元素, 大部分锌在神经元和神经胶质细胞的锌金属蛋白中发挥作用. 锌能在这些囊泡中聚集是因为存在着锌特异性泵, 即锌转运体蛋白 ZnT3, 在神经传递突触中作为一种内源性神经调质起作用. 初步结果可以推断, 大脑皮层和海马中聚集了高浓度锌元素. ZnT3 参与突触囊泡中锌的摄取转运过程, 突触囊泡锌水平由其膜上 ZnT3 的表达量决定, 其相互依存关系是调节细胞锌稳态的一个基础. ZnT3 对锌具有高度专一性, ZnT3 通过介导胞浆锌的跨囊泡膜转运, 构造囊泡‘锌池’. 这些部位的锌离子高度密集, 表明锌对神经元信号传导发挥调控作用的关键环节是锌离子的跨膜转运过程. ZnT3 伴随某些神经递质(如谷氨酸、GABA 等)的释放, 调控神经元的信号转导, 进而参与脑功能的调节.

参考文献(References)

- 1 Takeda A. Brain Res Rev., 2000, **34**(3): 137—148
- 2 Palmiter R D, Cole T B, Findley S D. EMBO J, 1996, **15**(5): 1784—1791
- 3 HUANG L, Gitschier J. Nat Genet, 1997, **17**(2): 292—297
- 4 McMahon R T, Cousins R J. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, **95**(9): 4841—4846
- 5 Palmiter R D, Cole T B. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, **93**(25): 14934—14939
- 6 Reeves P G, Nielsen F H, Fahey G C. J Nutr, 1993, **123**(11): 1939—1951
- 7 WU Y R, CAO Z Y, XIAO Y A et al. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, 1995, **A359**(1,2): 291—294
- 8 ZHANG Y X, CHENG F, LI D Y et al. Chinese Science Bulletin, 2001, **46**(13): 1138—1141
- 9 ZHANG Y X, LI D Y, ZHANG Y P et al. International Journal of PIXE, 1999, **9**(3,4): 291—296
- 10 Itoh T, Saito T. Trace Elements Electrolytes, 2000, **17**(2): 76—81

Zinc and ZnT3 mRNA Expression in Mouse Brain by SRXRF*

ZHANG Yuan-Xun^{1;1)} WANG Ying-Song¹ LI De-Lu¹ ZHANG Gui-Lin¹ HUANG Yu-Ying²
HE Wei² LONG Jian-Gang³ SHEN Hui³

1 (Shanghai Institute of Applied Physics, CAS, Shanghai 201800, China)

2 (Institute of High Energy Physics, CAS, Beijing 100049, China)

3 (Department of Military Hygiene, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract In order to explore the interaction and function between the ZnT3 mRNA expression and zinc elemental distribution in brain slice of mouse, zinc concentration and its distribution were determined by SRXRF and ZnT3 mRNA expression in tissue was examined by RT-PCR method. The results show that the zinc content in cerebral cortex and hippocampus was significantly higher than in other positions. The highest expression of ZnT3 mRNA was observed in cerebrum, hippocampus and testis. However, the ZnT3 mRNA was not detected in heart, liver, lung, spleen, kidney, intestine, olfactory bulb and cerebellum. Furthermore, the results suggest that ZnT3 facilitates the accumulation of zinc in synaptic vesicles and may play important roles in structuring of vesicular zinc pool.

Key words SRXRF, brain, zinc element, zinc transporter, gene expression

*Supported by National Natural Science Foundation of China (10175085) and BSRF (03025)

1) E-mail: yxzhang@sinap.ac.cn