

· 论 著 ·

锌对原代培养海马神经元锌转运体 1 和金属硫蛋白 mRNA 表达的影响

秦海宏*, 沈 慧, 王福娣, 郭俊生

(第二军医大学海军医学系军队卫生学教研室, 上海 200433)

[摘要] **目的:**观察不同浓度锌对锌转运体 1(zinc transporter 1, ZnT-1)mRNA 和金属硫蛋白(metallothionein, MT)1、2 mRNA 表达的影响,旨在探讨神经元锌内稳态的可能机制。**方法:**采用锥虫蓝染色法检测不同浓度锌(0、50、100、125、150、175、200 $\mu\text{mol/L}$)对原代培养海马神经元存活率的影响;用实时荧光定量 RT-PCR 法分别检测不同浓度锌(0、50、75、100、125、150 $\mu\text{mol/L}$)对 ZnT-1、MT1、MT2 的 mRNA 表达的影响,检测 100 $\mu\text{mol/L}$ 锌暴露不同时间点(0、2、4、6、8 h)对 ZnT-1、MT1、MT2 的 mRNA 表达的影响。**结果:**培养基锌浓度大于 125 $\mu\text{mol/L}$ 时,海马神经元存活率明显下降;锌浓度大于 75 $\mu\text{mol/L}$ 时,ZnT-1 mRNA 表达成线性上升($P < 0.05$),MT mRNA 表达同样明显上升($P < 0.05$),但在 100 $\mu\text{mol/L}$ 后进入平台期;在 100 $\mu\text{mol/L}$ 锌浓度条件下,ZnT-1 mRNA 表达在 2 h 内达到峰值,MT mRNA 在 6 h 达到其峰值。**结论:**虽然神经元可通过增加 ZnT-1 和 MT 的表达来应对高锌冲击,但两者的保护作用不同,ZnT-1 外排作用发生在前且具有持续性,MT 的络合作用发生在后且会饱和。

[关键词] 锌;海马;锌转运体 1;金属硫蛋白**[中图分类号]** R 153.2**[文献标识码]** A**[文章编号]** 0258-879X(2004)01-0068-04**Effect of zinc on expression of zinc transporter 1 and metallothionein mRNA in primary cultured hippocampal neurons**

QIN Hai-Hong*, SHEN Hui, WANG Fu-Di, GUO Jun-Sheng (Department of Military Hygiene, Faculty of Navy Medicine, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To study the concentration-response and time course of zinc transporter 1 (ZnT-1) and metallothionein (MT1/MT2) mRNA, as well as the cell viability to zinc exposure in primary cultured new-born rats hippocampal neurons. **Methods:** The cell viability were determined by trypan blue staining at various concentrations of Zn^{2+} (0, 50, 100, 125, 150, 175, 200 $\mu\text{mol/L}$). The expression of ZnT-1, MT1 and MT2 mRNA to various concentrations of zinc exposure (0, 50, 75, 100, 125, 150 $\mu\text{mol/L}$) and to 100 $\mu\text{mol/L}$ zinc exposure for different times (0, 2, 4, 6, 8 h) were determined by real time fluorescent quantitative PCR. **Results:** The viability of the neurons decreased significantly after 48 h once the concentration of Zn^{2+} exceeded 125 $\mu\text{mol/L}$, and the expression of ZnT-1 mRNA was in proportion to the increment of zinc. The expression of MT1/MT2 mRNA reached a plateau when the zinc concentration exceeding 75 $\mu\text{mol/L}$. The expression of ZnT-1 mRNA peaked on about 2 h. However, the expression of MT1/MT2 mRNA reached its maximal around 6 h at the concentration of 100 $\mu\text{mol/L}$. **Conclusion:** These results imply that although both MTs and ZnT-1 can attenuate the zinc toxicity, they may play different roles at different phases. ZnT-1 enhance the efflux of zinc prior to the sequestration by MTs. The action of ZnT-1 may be durable, but the role of MTs may be satiable.

[KEY WORDS] zinc; hippocampus; zinc transporter 1; metallothioneins

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(1): 68-71]

在哺乳动物中枢神经系统,锌除了在多种金属酶、转录因子及其他蛋白中起着催化或构建作用外,还以神经递质或调质样的形式调节脑功能。然而,锌过度堆积又是脑缺血、癫痫、脑外伤、阿尔茨海默病、肌萎缩侧索硬化等^[1,2]发生时神经元死亡的重要因素,因此,神经系统锌的内稳态应受到严格调控。以往的研究表明,脑内细胞外锌浓度较高时,锌可由 NMDA 受体、AMPA 受体、电压门控钙通道等进入神经元;进入神经元的过量锌随后被金属硫蛋白(metallothionein, MT)^[3]所隔离以减轻其对细胞的

损伤,也可由细胞器所摄取,或由锌转运体 1 (zinc transporter 1, ZnT-1)^[4]转运出细胞外。由于突触间隙或一些神经系统退行性疾病发生时锌浓度急剧波动^[5],神经元常面临高锌损伤的威胁,神经元锌内稳态调控就显得十分重要。由于神经胶质细胞有较高 MT 的表达,故认为其在保护神经元免受锌损伤方

[基金项目] 国家自然科学基金(30170805, 39970641)。**[作者简介]** 秦海宏(1966-),男(汉族),博士,讲师。

* Corresponding author. E-mail: qinhaihong@hotmail.com

面有重要作用。因此,以往的神经细胞锌内稳态机制多以神经胶质细胞或其细胞株为研究模型。近来发现,神经元同样有 ZnT-1、MT 等锌内稳态基因的表达,故本研究以原代培养海马神经元为模型,观察不同浓度锌对 ZnT-1 和 MT mRNA 表达的影响,探讨神经元锌内稳态的可能机制。

1 材料和方法

1.1 细胞培养 新生大鼠海马神经元的培养方法参考 Sunanda 等^[6]的报道。调整细胞密度为 5×10^6 /ml,然后接种在预先涂有多聚赖氨酸的六孔培养板上,每孔 1.5 ml。用含灭活 10%胎牛血清和 10%马血清的 DMEM (Gibco, USA) 在 37℃、5% CO₂ 条件培养 1 d 后,将培养基换成 B-27 (Gibco, USA),以后每 3 d 换液 1 次。

1.2 锌对原代培养海马神经元存活率的影响 海马神经元培养 6 d 后,将细胞培养基更换成分别含 0、50、100、125、150、175、200 $\mu\text{mol/L}$ 锌的培养基,每浓度组 3 孔,而所添加的锌液体积控制为每孔总

培养基体积的 1%,48 h 后根据锥虫蓝法并结合形态学计数各浓度组平均细胞存活率。

1.3 锌对原代培养海马神经元 ZnT-1 和 MT mRNA 表达的剂量效应 分别检测在 0、50、75、100、125、150 $\mu\text{mol/L}$ 锌诱导 4 h 后,各组 ZnT-1 mRNA, MT1/MT2 mRNA 的表达(以 β -actin mRNA 为外标), $n=3$ 。以 150 $\mu\text{mol/L}$ 为锌暴露上限浓度是因为,一旦超过此浓度,神经元的存活率显著下降;而选择 4 h 这一时间点是因为此时点锌对 ZnT-1 mRNA 和 MT1/MT2 mRNA 的表达有较好诱导性。

1.3.1 RNA 的抽提及 cDNA 的合成 总 RNA 的抽提根据试剂盒说明操作。反转录体系包括:2 μg 总 mRNA,4 μl Mg²⁺ (25 mmol/L),1 μl RNA 酶抑制剂(40 U/ μl),1 μl AMV 逆转录酶(5 U/ μl),1 μl 随机引物,45℃ 反应 60 min,99℃ 5 min 灭活逆转录酶,然后迅速冰浴冷却。

1.3.2 引物和探针 引物和探针用 Primer ExpressTM 1.5 (Applied Biosystems)设计,表 1。

表 1 各基因扩增所用引物和探针序列

Tab 1 Oligonucleotide primer and probe sequences

Gene	Oligonucleotide	Location	Sequence
β -actin (Accession No. 13592132)	Upper primer	333	CCC TAA GGC CAA CCG TGA A
	Lower primer	433	GCC TGG ATG GCT ACG TAC ATG
	TaqMan probe	351	TGA CCC AGA TCA TGT TTG A
ZnT-1 (Accession No. 577842)	Upper primer	1 414	CCA CCA TCC AGC CTG AAT TC
	Lower primer	1 473	GCT CAC ACG GGA CGA CAC TT
	TaqMan probe	1 435	CTA GCG TAG GCT CTA AAT
MT1 (Accession No. 205531)	Upper primer	7 245	AAC TGC TCC TGC TCC ACC G
	Lower primer	7 772	ATT TGC AGT TCT TGC AGC CG
	TaqMan probe	7 731	CCT GCA CCT GCT CCA
MT2 (Accession No. 205531)	Upper primer	1 899	CAA CTG CTC CTG TGC CAC AG
	Lower primer	2 231	GCA TTT GCA TTG TTT GCA TTT G
	TaqMan probe	2 188	CCT GCT CCT GCG CTG

1.3.3 PCR 扩增 常规 PCR 和实时荧光定量 RT-PCR 在 ABI Prism 7700 Sequence Detection System (Perkin-Elmer) 进行;反应条件为:总体积 10 μl ,其中 TaqMan Universal PCR Master Mix 5 μl ,样品 2 μl (常规 PCR 以逆转录产物为模板,实时荧光定量 RT-PCR 以常规 PCR 扩增产物稀释后作为模板),引物浓度为 900 nmol/L,探针浓度 250 nmol/L (5'端以 FAM 标记,3'端以 Quencher + MGB 标记,常规 PCR 不加探针);热循环条件:94℃ 预变性 10 min;然后 94℃ 变性 30 s,60℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 1 min。每次进行实时荧光定量 RT-PCR 检测均包括:5 个点的标准曲线样品(即每

个被测基因先经 40 个循环得到常规 PCR 的产物,然后稀释 10 倍得到 5 个样品,由此 5 个样品得到被测基因相对量的 1 条标准曲线),1 个不加模板空白对照,各样品 cDNA。根据各基因的标准曲线得到各样品的相对量,以此各样品的相对量除以对应的 β -actin 的量,即最后的各基因的相对量。

1.4 锌对原代培养海马神经元 ZnT-1 和 MT mRNA 表达的时间效应 采用实时荧光定量 RT-PCR(实验条件和方法同 1.3.3)检测 100 $\mu\text{mol/L}$ 锌浓度诱导下,0、2、4、6 和 8 h 时点 ZnT-1 mRNA 和 MT1/MT2 mRNA 的表达动态。

1.5 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,对测定结果

以 Excel 97 数据分析工具包进行 *t*-test。

2 结果

2.1 锌对原代培养海马神经元的存活率的影响 当锌浓度低于 100 $\mu\text{mol/L}$ 时,海马神经元生长

状况良好,存活率受影响较小;而锌浓度达到 125 $\mu\text{mol/L}$,海马神经元形态有所改变,轴突上出现念珠状结节,存活率显著下降($P < 0.05$);当锌浓度达 200 $\mu\text{mol/L}$ 时,海马神经元大部分肿胀死亡,结果详见图 1。



图 1 锌对海马神经元的毒性作用

Fig 1 Toxic effect of zinc on hippocampal neurons

A: Control group; B: 125 $\mu\text{mol/L}$ Zn^{2+} group; C: 200 $\mu\text{mol/L}$ Zn^{2+} group

2.2 锌对原代培养海马神经元 ZnT-1 和 MT mRNA 诱导的剂量效应 ZnT-1 mRNA 的表达随锌浓度增加而增加(图 2A);当锌浓度在 0~100 $\mu\text{mol/L}$ 范围内,MT1、MT2 mRNA 的表达随锌浓度增加而增加,锌浓度进一步增加时,MT1、MT2 mRNA 的表达进入平台期(图 2B)。比较 ZnT-1、MT1 和 MT2 mRNA 表达可见,MT1 的基础表达比 MT2 高,MT1 的表达约为 ZnT-1 的 5 倍。

2.3 锌对原代培养海马神经元 ZnT-1 和 MT mRNA 诱导的时间效应 在 100 $\mu\text{mol/L}$ 锌暴露时,ZnT-1 mRNA 的表达在 2 h 达到其表达峰值,MT1/MT2 mRNA 达到表达峰值需 6 h(图 3)。

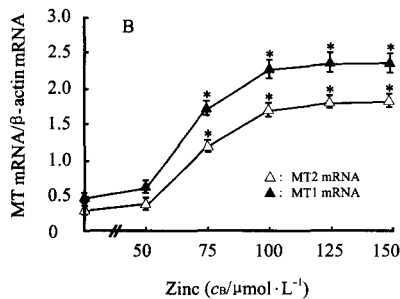
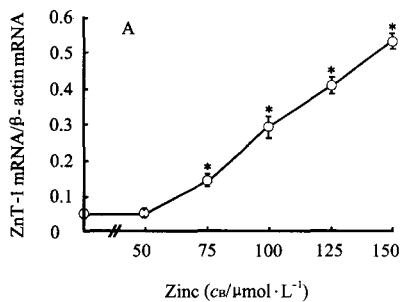


图 2 锌对 ZnT-1 mRNA(A)和 MT mRNA(B)诱导的剂量效应

Fig 2 Concentration-response of ZnT-1 mRNA(A) and MT mRNA(B) to zinc

* $P < 0.05$ vs 0 $\mu\text{mol/L}$; $n = 3$

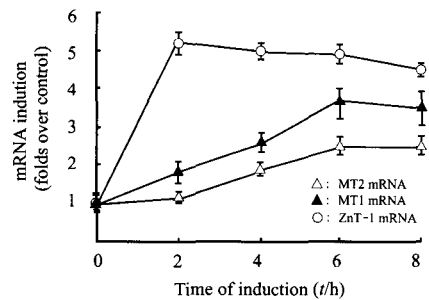


图 3 锌对 ZnT-1 和 MT1/MT2 mRNA 诱导表达的时间效应

Fig 3 Time course for induction of ZnT-1 and MT1/MT2 mRNA to zinc

3 讨论

锌内稳态紊乱被认为是神经退行性疾病的一个重要原因,如阿尔茨海默病,锌可加速具有神经毒性的 β 淀粉样蛋白的聚集^[7,8]。在哺乳动物脑中,8%~15% 锌与谷氨酸一起隔离于突触囊泡中,脑脊液锌浓度约为 0.15 $\mu\text{mol/L}$ ^[5],神经元内锌峰值估计在 35~45 nmol/L,然而在神经兴奋状态下突触间隙锌浓度可达 300 $\mu\text{mol/L}$,而锌浓度超过 125 $\mu\text{mol/L}$ 就将对神经元产生神经毒作用,造成突触后脆弱神经元的损伤。研究认为,囊泡内锌的释放及其随后的神经元摄取是神经退行性疾病发生的原因之一。

面对不断的锌浓度急剧波动,细胞是如何减轻锌的损害呢?首先通过增强锌的外排,这一本能可通过在许多组织都有表达的 ZnT-1^[4]来实现。ZnT-1 属于锌转运体家族,国外学者已对 7 个家族成员的组织特异性、细胞定位等进行了一定研究^[9,10], ZnT-1 分布广泛,主要功能是将锌转出细胞。高锌状态下,神经元除了增强 ZnT-1 的表达,还可像其他组织一样,通过增加 MTs 的表达以减轻锌的毒性。高水平的 MTs 及其 mRNA 表达多见于高的镉、锌暴露。

然而,ZnT-1 mRNA、MT mRNA 的表达是有差异的。通过比较发现,尽管它们在高锌暴露时均可发挥减轻锌损伤的作用,但它们的作用特点不同。首先,ZnT-1 mRNA 的表达随锌浓度增加而增加;MT1 和 MT2 mRNA 的表达只是在锌浓度 0~100 $\mu\text{mol/L}$ 范围内随锌浓度增加而增加,锌浓度继续增加时,MT1 和 MT2 mRNA 的表达进入平台期。说明 ZnT-1 的作用可能是可持续的,而 MT 的结合作用可能是有一定限度的。其次,ZnT-1 mRNA 的诱导速度比 MT1/MT2 mRNA 快,这一现象提示高锌状态下,细胞锌内稳态的机制可能先加强锌的外排,然后发挥 MT 的络合作用,也可能是 MT mRNA 的基础表达比 ZnT-1 mRNA 高,因此它的诱导较慢。

本研究采用目前最为精确且重复性好的实时荧光定量 RT-PCR 方法观察了原代培养海马神经元锌暴露时 ZnT-1 和 MT1/MT2 mRNA 表达的特点,对高锌状态下海马神经元锌内稳态的机制进行了初步探讨,但要彻底了解锌进出神经元的通路还有许多工作要做,如其他锌转运蛋白、各离子通道在锌内稳态中的作用、神经元和神经胶质细胞间的协

同作用、兴奋和静息时神经元锌内稳态的特点等等。只有对神经元锌内稳态有了全面的认识,才能对由锌紊乱而引起的疾病提出相应的诊断、预防及治疗措施。

[参考文献]

- [1] Koh JY. Zinc and disease of the brain [J]. *Mol Neurobiol*, 2001,24(1-3):99-106.
- [2] Kim EY, Chang SY, Chung JM, et al. Attenuation of Zn²⁺ neurotoxicity by aspirin: role of N-type Ca²⁺ channel and the carboxyl acid group [J]. *Neurobiol Dis*, 2001, 8(5):774-783.
- [3] Aschner M. Metallothionein (MT) isoforms in the central nervous system (CNS): regional and cell-specific distribution and potential functions as an antioxidant [J]. *Neurotoxicology*, 1998, 19(4-5):653-660.
- [4] Sekler I, Moran A, Hershfinkel M, et al. Distribution of the zinc transporter ZnT-1 in comparison with chelatable zinc in the mouse brain [J]. *J Comp Neurol*, 2002, 447(3):201-209.
- [5] Colvin RA. Characterization of a plasma membrane zinc transporter in rat brain [J]. *Neurosci Lett*, 1998, 247(2-3):147-150.
- [6] Sunanda, Rao BS, Raju TR. Corticosterone attenuates zinc-induced neurotoxicity in primary hippocampal cultures [J]. *Brain Res*, 1998, 791(1-2):295-298.
- [7] Huang X, Cuajungco MP, Atwood CS, et al. Alzheimer's disease, beta-amyloid protein and zinc [J]. *J Nutr*, 2000, 130 (5 Suppl):1488S-1492S.
- [8] Cuajungco MP, Goldstein LE, Nunomura A, et al. Evidence that the beta-amyloid plaques of Alzheimer's disease represent the redox-silencing and entombment of abeta by zinc [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(26):19439-19442.
- [9] Huang L, Kirschke CP, Gitschier J. Functional characterization of a novel mammalian zinc transporter, ZnT6 [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(29):26389-26395.
- [10] Kirschke CP, Huang L. ZnT7, a novel mammalian zinc transporter, accumulates zinc in the Golgi apparatus [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(6):4096-4102.

[收稿日期] 2003-05-20

[修回日期] 2003-12-10

[本文编辑] 尹 茶

(上接第 54 页)

心衰时 β 受体下调^[3], 皮质醇可提高 β 受体的敏感性, 与体内儿茶酚胺发挥协同作用, 可增强心肌收缩力, 提高左心室心排指数, 升高血压等改善心血管功能。但当出现昼夜节律异常时, 可能预示病情严重, 应引起重视。皮质醇水平与病情程度有一定关系, 故我们认为, 皮质醇水平的昼夜节律性可作为心衰波动的内分泌学指标。

[参考文献]

- [1] 王树人. 应激 [A]. 见: 金惠铭 主编, 病理生理学 [M]. 北京: 人

民卫生出版社, 1997. 102-115.

- [2] 郭爱丽. 肾上腺皮质激素的生化生理 [A]. 见: 陈敏章 主编, 中华内科学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1999. 3058-3063.
- [3] 张子彬, 刘炳德, 张玉传. 心力衰竭 [A]. 见: 陈国伟, 郑宗得 主编. 现代心脏内科学 [M]. 湖南: 湖南科学技术出版社, 1994. 519.

[收稿日期] 2003-05-08

[修回日期] 2003-10-28

[本文编辑] 孙 岩