

[文章编号] 1000-4718(2008)06-1138-05

## 乳腺癌细胞株 MCF-7 中锌和 锌转运体表达的关系\*

孙道旭<sup>1</sup>, 王晓蕾<sup>2</sup>, 徐同福<sup>1</sup>, 崔福爱<sup>1</sup>, 胡晓燕<sup>1</sup>, 康鲁东<sup>1</sup>, 张莲英<sup>1△</sup><sup>1</sup> 山东大学医学院生物化学与分子生物学研究所, 山东 济南 250012;<sup>2</sup> 山东省胸科医院, 汉光国际感染性疾病研究中心, 山东 济南 250013)

**[摘要]** 目的: 通过 ZnCl<sub>2</sub> 和 TPEN 处理培养人乳腺癌细胞株 MCF-7, 观察高锌和低锌两种状态下锌转运体 mRNA 的表达情况。方法: 0、50、100、150 和 200 μmol/L 的 ZnCl<sub>2</sub> 以及 0、5、10 和 15 μmol/L 的 TPEN 分别处理培养 MCF-7 细胞 12 h, 细胞存活率用噻唑蓝(MTT)方法检测; 荧光锌离子探针 Zinquin 检测细胞内锌离子含量; RT-PCR 方法检测锌转运体(ZnT)mRNA 的表达。结果: ZnCl<sub>2</sub> (浓度为 150 μmol/L 和 200 μmol/L 时) 以及 TPEN 对 MCF-7 细胞均有生长抑制作用。ZnCl<sub>2</sub> 处理后的 MCF-7 细胞内锌离子含量显著升高, TPEN 处理后的 MCF-7 细胞内锌离子含量显著降低。与对照细胞相比, ZnCl<sub>2</sub> 处理的细胞 ZnT-1 mRNA 的表达水平随着 ZnCl<sub>2</sub> 浓度增加而依次升高; TPEN 处理的细胞 ZnT-1 mRNA 表达水平则普遍降低; ZIP2 和 ZIP10 mRNA 的表达水平随 TPEN 浓度的增加而依次升高。结论: 高锌促进人乳腺癌 MCF-7 细胞 ZnT-1 mRNA 的表达; 低锌抑制人乳腺癌 MCF-7 细胞 ZnT-1 mRNA 表达, 促进 ZIP2 和 ZIP10 mRNA 的表达。

**[关键词]** 锌; 乳腺肿瘤; 锌转运体; 基因表达**[中图分类号]** R737.9 **[文献标识码]** A

### Relationship between zinc and zinc transporter expression in breast cancer MCF-7 cells

SUN Dao-xu<sup>1</sup>, WANG Xiao-lei<sup>2</sup>, XU Tong-fu<sup>1</sup>, CUI Fu-ai<sup>1</sup>, HU Xiao-yan<sup>1</sup>, KANG Lu-dong<sup>1</sup>, ZHANG Lian-ying<sup>1</sup><sup>1</sup>Institute of Biochemistry and Molecular Biology, School of Medicine, Shandong University, Jinan 250012, China;<sup>2</sup>Shandong Provincial Chest Hospital, Katharine Hsu International Research Center of Human Infections Diseases, Jinan 250013, China. E-mail: zhanglianying@sdu.edu.cn)

**[ABSTRACT]** **AIM:** To study the changes of zinc transporter gene expression in MCF-7 cell line exposed to ZnCl<sub>2</sub> and TPEN. **METHODS:** Human breast cancer cell line MCF-7 was exposed to different concentrations of ZnCl<sub>2</sub> (0, 50, 100, 150, 200 μmol/L) and TPEN (0, 5, 10, 15 μmol/L), respectively. Twelve hours later, the cell viability was measured by MTT and levels of zinc transporter mRNA by RT-PCR. Zinquin was used to estimate the intracellular zinc concentrations. **RESULTS:** MCF-7 cells viability rate was significantly decreased when exposed to ZnCl<sub>2</sub> (with 150 μmol/L and 200 μmol/L) and TPEN. The intracellular zinc concentration was significantly increased when exposed to ZnCl<sub>2</sub> and decreased when exposed to TPEN. ZnT-1 mRNA level was increased along with the increasing concentration of ZnCl<sub>2</sub> but decreased when exposed to TPEN. The expressions of ZIP2 and ZIP10 were increased along with the increasing concentration of TPEN. **CONCLUSION:** ZnT-1 gene expression is induced by zinc supplement and repressed by zinc deficiency. ZIP2 and ZIP10 gene expressions are induced by zinc deficiency.

**[KEY WORDS]** Zinc; Breast neoplasms; Zinc transporter; Gene expression

锌是生物体所必须的一种生命元素, 在许多生物化学过程中起着非常重要的作用。它作为 50 余种酶类约 300 种酶的辅助因子, 参与了蛋白质、核苷

酸、糖以及脂类的代谢, 同时在基因转录、细胞生长、成熟和分化的过程也扮演了重要的角色<sup>[1,2]</sup>。细胞内锌的再分布是维持生物体锌水平稳定的基本环

[收稿日期] 2008-01-16 [修回日期] 2008-04-02

\* [基金项目] 山东省卫生厅资助项目

△通讯作者 Tel: 0531-88382092-6; E-mail: zhanglianying@sdu.edu.cn

孙道旭、王晓蕾同为第一作者

节。然而锌不能自由通过生物膜,只有在特殊的膜蛋白协助下才能完成<sup>[1]</sup>。其在哺乳动物体内的转运是由两类锌转运体家族完成的。一类是阳离子扩散促进因子(cation diffusion facilitator, CDF)家族,因最初发现和锌的转运有关而被称为锌转运体(zinc transporter, ZnT);另一类是锌铁调控样蛋白(Zrt- and Irt-like proteins, ZIP)家族,这两类锌转运体在细胞内外锌转运的方向上起着相反的作用<sup>[3]</sup>。

在前列腺这个富锌组织,锌转运体表达受到锌水平的影响,而且在正常组织和肿瘤组织的表达也存在着差异<sup>[4]</sup>。同样,乳腺组织也有很强的锌聚集能力,有研究表明在乳腺癌组织中锌的水平也高于正常乳腺组织<sup>[5]</sup>。因此对锌转运体及其和乳腺癌关系的研究就很有必要。本研究使用 ZnCl<sub>2</sub> 和 TPEN [N,N,N',N'-tetrakis(2-pyridylmethyl) ethylenediamine]对乳腺癌 MCF-7 细胞进行高锌和低锌干预,观察部分锌转运体成员在不同锌水平状态下 mRNA 表达的情况,为乳腺肿瘤中锌转运体调控的研究寻找突破。

## 材 料 和 方 法

### 1 材料

**1.1 主要试剂** RPMI-1640 培养基(HyClone); Trizol 总 RNA 抽提试剂盒(BBI); cDNA 逆转录合成试剂盒(Promega); PCR 扩增试剂盒(TaKaRa); PCR 引物由上海生工生物技术有限公司合成; TPEN 购于 Sigma; Zinquin 购于 Alexis 公司;其余试剂均为国产分析纯。

**1.2 细胞培养** 人乳腺癌细胞株 MCF-7 为本实验室液氮保存,细胞复苏后于 T-75 细胞培养瓶内加入 5 mL 含有 10% 新生牛血清的 RPMI-1640 培养基(含青霉素 1 × 10<sup>5</sup> U/L,链霉素 1 mg/L),5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度、37 °C 恒温培养。

### 2 方法

**2.1 MTT 检测细胞存活率** 取处于对数生长期的 MCF-7 细胞调整浓度为 1 × 10<sup>8</sup> cells/L,接种于 96 孔培养板中,每孔 100 μL 继续培养。按照浓度不同,ZnCl<sub>2</sub> 处理分 0、50、100、150、200 μmol/L 组,TPEN 处理分 0、5、10、15 μmol/L 组,各设 6 个复孔。处理 12 h 后每孔加入 10 μL MTT 继续 37 °C 孵育 4 h,然后弃培养液,加入 100 μL DMSO,脱色摇床上充分振摇 10 min,全自动酶标仪于波长 570 nm 处测定各孔吸光度值,各平行孔取均值后计算细胞存活率。

**2.2 细胞内锌离子含量的检测** 新鲜配制荧光锌离子探针反应溶液:pH = 7.4 的 PBS 溶液,内含 1 g/L 卵清白蛋白和 10 μmol/L Zinquin。24 孔板培养 MCF-7 细胞,不同浓度 ZnCl<sub>2</sub> 和 TPEN 处理细胞 12 h 后,每孔

加入 1 mL 反应溶液,37 °C 温育 30 min。吸尽反应液,1 × PBS 冲洗细胞 2 次,于倒置荧光显微镜下 UV 滤片拍照。细胞内锌离子含量用结合了荧光锌离子探针后细胞的荧光强度来表示:取 1 × 10<sup>6</sup> 个细胞于 1 mL 反应液中 37 °C 温育 30 min,1 000 r/min 离心 5 min,1 × PBS 洗涤细胞 2 次,转入荧光级比色杯,用荧光分光光度计在激发波长为 365/490 nm 下检测荧光强度<sup>[6]</sup>。

**2.3 RT-PCR 方法分析 ZnT-1、ZIP1、ZIP2、ZIP6 和 ZIP10 基因表达** 不同浓度 ZnCl<sub>2</sub> 和 TPEN 干预培养 MCF-7 细胞 12 h 后,PBS 清洗细胞 2 次,按照 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒步骤一步法抽提细胞总 RNA,DEPC 处理水溶解,紫外分光光度计测定其浓度和纯度。2 μg 总 RNA 作为模板,按照 cDNA 合成试剂盒(Promega)步骤,37 °C 10 min,42 °C 60 min 逆转录合成 cDNA,70 °C 10 min 灭活逆转录酶终止反应。2 μL cDNA 作为模板,Taq DNA 聚合酶(TaKaRa)进行 PCR 扩增,引物序列以及反应条件见表 1。PCR 扩增产物在 1% 的琼脂糖凝胶电泳后溴化乙啶染色,紫外光下观察,AlphaImager™ 凝胶成像系统进行电泳条带以及灰度扫描。mRNA 相对表达量用特异 PCR 产物和 β-actin 的灰度密度比来表示。

### 3 统计学处理

使用 SAS 软件进行统计分析,各组数据均以均值 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。各组间两两比较采用单因素方差分析和 *t* 检验。

## 结 果

### 1 ZnCl<sub>2</sub> 和 TPEN 对 MCF-7 细胞存活率的影响

从图 1 可以看出,MCF-7 细胞与不同浓度 ZnCl<sub>2</sub> 共同孵育,随着 ZnCl<sub>2</sub> 浓度的升高,MCF-7 细胞的存活率逐渐下降,200 μmol/L 条件下细胞存活最低,为对照组的 35%。低浓度 ZnCl<sub>2</sub> (50、100 μmol/L)几乎没有毒性,当其浓度大于 150 μmol/L 时细胞存活率显著下降( $P < 0.01$ )。TPEN 对 MCF-7 细胞的生长抑制也有浓度依赖趋势,而且在低浓度 5 μmol/L 时即明显抑制其生长( $P < 0.05$ )。

### 2 ZnCl<sub>2</sub> 和 TPEN 对 MCF-7 细胞内锌离子含量的改变

图 3 显示 ZnCl<sub>2</sub> 和 TPEN 处理后的 MCF-7 细胞内 Zinquin 荧光探针染色情况。可以观察到 ZnCl<sub>2</sub> 处理后的细胞内荧光亮度明显增加,经过荧光分光光度计检测其荧光强度也表明 ZnCl<sub>2</sub> 处理后细胞内可结合的锌离子含量明显增加( $P < 0.01$ );尽管 TPEN 处理后细胞荧光亮度改变不大,但荧光强度的检测显示 TPEN (10 μmol/L 和 15 μmol/L) 处理后细胞内可结合的锌离子含量较对照组降低( $P < 0.05$ )。

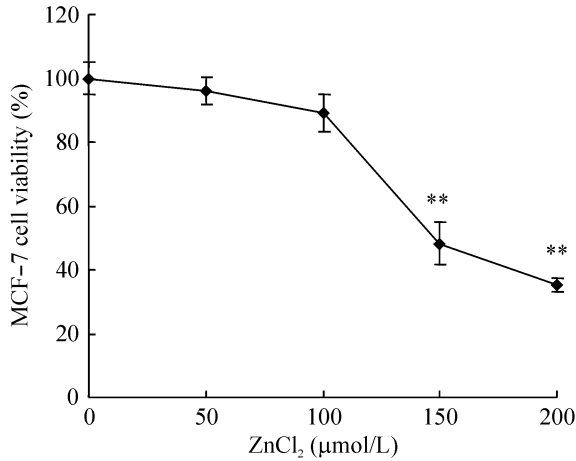


Fig 1 Viability of MCF - 7 cells treated with ZnCl<sub>2</sub>.  $\bar{x} \pm s$ .  $n = 6$ . \*\*  $P < 0.01$  vs 0  $\mu\text{mol/L}$  ZnCl<sub>2</sub>.

图1 ZnCl<sub>2</sub>对MCF-7细胞存活率影响

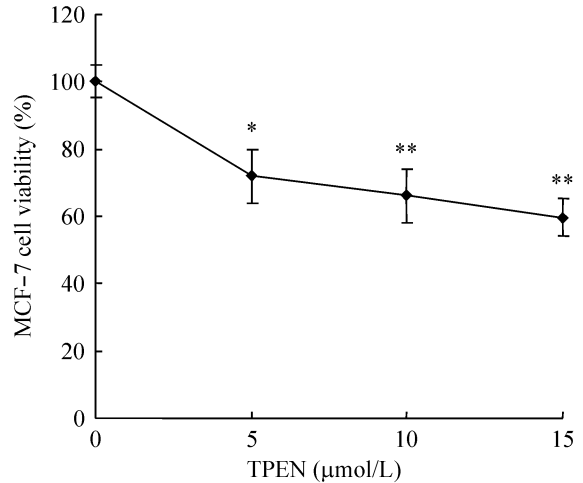


Fig 2 Viability of MCF - 7 cells treated with TPEN.  $\bar{x} \pm s$ .  $n = 6$ . \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs 0  $\mu\text{mol/L}$  TPEN.

图2 TPEN对MCF-7细胞存活率影响

表1 PCR引物序列

Tab 1 PCR primers used for amplification of cDNAs

mRNA	Forward and reverse	Sequences	PCR product size	Number of cycles
ZnT - 1	Forward	5' - CCTGGGCTTCTTCTCTAGATTG - 3'	634 bp	32
	Reverse	5' - TTGCTCTGCAAAGCTTCTTCTG - 3'		
ZIP1	Forward	5' - CCTGGCTTTGCTGCTCCACAAGGGCAT - 3'	426 bp	32
	Reverse	5' - TCCTATTCCCCACAACCTGGGGGAGGGA - 3'		
ZIP2	Forward	5' - GGCTTCTTTCTTGTCTTCTTT - 3'	431 bp	32
	Reverse	5' - CCCC GCCCTCCTTCAGAGTCC - 3'		
ZIP6	Forward	5' - AATCCTCAGGAGTGTTTC - 3'	277 bp	32
	Reverse	5' - CCGATTCATGAGAGGCAC - 3'		
ZIP10	Forward	5' - CCTGGTTCCTGAAGATGAGG - 3'	1 042 bp	32
	Reverse	5' - CATGGCAGAGAGGAGTTCT - 3'		
$\beta$ - actin	Forward	5' - CTGGGGCGCCCCAGGCACCA - 3'	540 bp	32
	Reverse	5' - CTCCTTAATGTCACGCACGATTT - 3'		

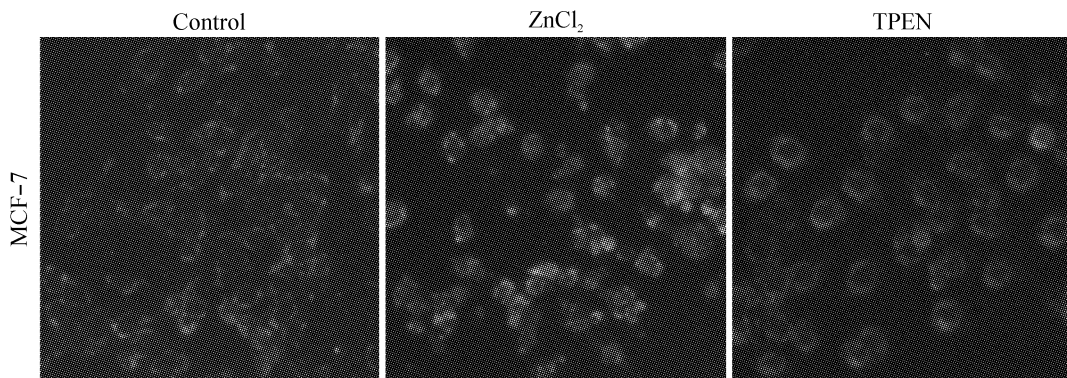


Fig 3 The effect of ZnCl<sub>2</sub> and TPEN on the intracellular level of zinc in MCF - 7 cell line. Cells were incubated with Zinquin (10  $\mu\text{mol/L}$ ) in 24 wells for 30min, washed with PBS and viewed on an inverted fluorescence microscopy. Zinquin detectable zinc is localized in the cytoplasm around the nuclei.

图3 MCF-7细胞内荧光锌离子探针染色

### 3 ZnCl<sub>2</sub> 和 TPEN 对 MCF - 7 细胞锌转运体 mRNA 表达的影响

图5显示 ZnCl<sub>2</sub> 对 ZnT - 1 mRNA 表达的影响，

图6显示 TPEN 对 ZnT - 1、ZIP2 和 ZIP10 mRNA 表达的影响。 $\beta$  - actin 作为内参照，以特异 PCR 产物和  $\beta$  - actin 的灰度密度比来表示锌转运体的相对表

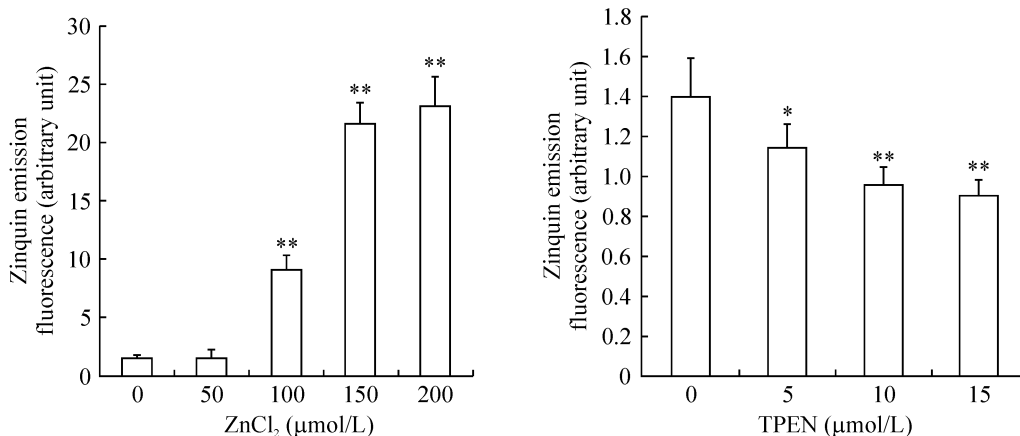


Fig 4 The effect of ZnCl<sub>2</sub> and TPEN on the intracellular level of zinc in MCF-7 cell lines.  $\bar{x} \pm s$ .  $n = 3$ . \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs 0  $\mu\text{mol/L}$ .

图4 MCF-7 细胞内锌离子含量的检测

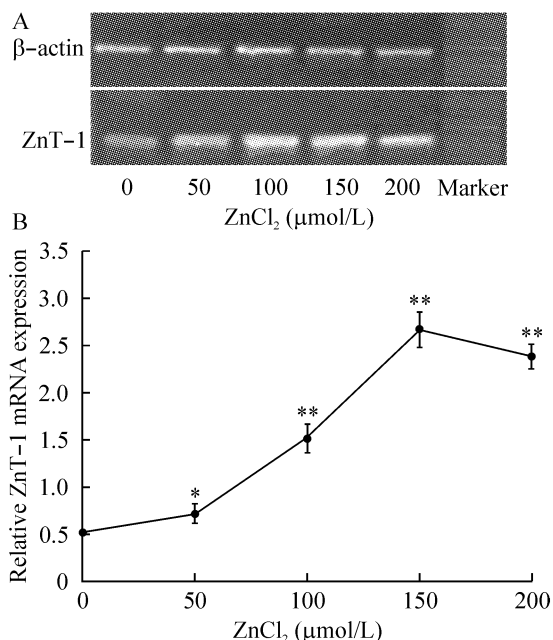


Fig 5 RT-PCR analysis of ZnT-1 mRNA level in MCF-7 when exposed to ZnCl<sub>2</sub>. A: ethidium bromide-stained agarose gel showing representative ZnT-1 mRNA levels (32 cycle); B: relative ZnT-1 mRNA level was evaluated by examining the ratio of the band intensity of the specific PCR product to that of  $\beta$ -actin in each sample.  $\bar{x} \pm s$ .  $n = 3$ . \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs 0  $\mu\text{mol/L}$  ZnCl<sub>2</sub>.

图5 ZnCl<sub>2</sub> 对 MCF-7 细胞 ZnT-1 mRNA 表达的影响

达量。由图5可见,随着 ZnCl<sub>2</sub> 浓度的增加,ZnT-1 mRNA 相对表达量逐渐升高,在 ZnCl<sub>2</sub> 为 150  $\mu\text{mol/L}$  时为最高。TPEN 在 5  $\mu\text{mol/L}$  最小浓度即可使 ZnT-1 表达明显降低,浓度继续增加较之最小浓度时改变不明显。ZIP2 和 ZIP10 mRNA 的表达随着 TPEN 浓度的增加而升高,且在 TPEN 为 15  $\mu\text{mol/L}$  时表达最高。另外,与对照相比,无论 ZnCl<sub>2</sub> 还是 TPEN 干预,MCF-7 细胞的 ZIP1 和 ZIP6 mRNA 表达均没有明显改变(数据未列出)。

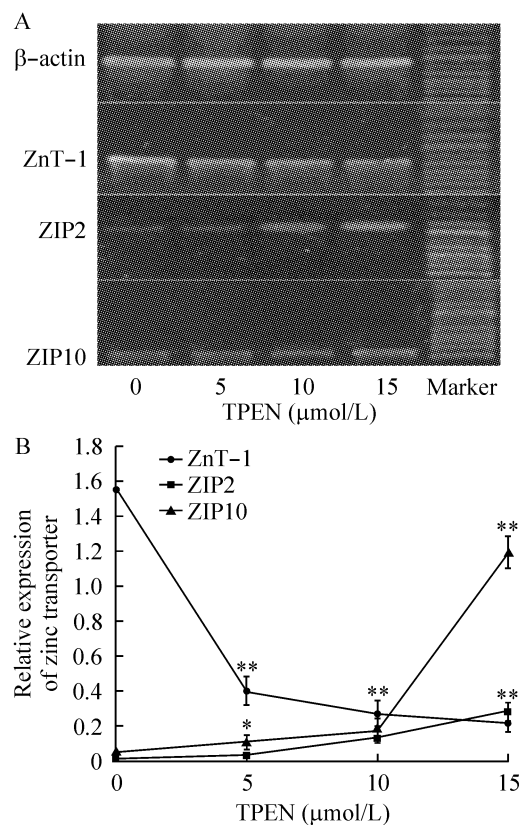


Fig 6 RT-PCR analysis of zinc transporters mRNA level in MCF-7 when exposed to TPEN. A: Ethidium bromide-stained agarose gel showed representative zinc transporters mRNA levels (32 cycle); B: Relative zinc transporters mRNA level was evaluated by examining the ratio of the band intensity of the specific PCR product to that of  $\beta$ -actin in each sample.  $\bar{x} \pm s$ .  $n = 3$ . \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs 0  $\mu\text{mol/L}$  TPEN.

图6 TPEN 对 MCF-7 细胞锌转运体 mRNA 表达的影响

## 讨论

锌作为一种生物体生命活动的重要元素,其在生物体内的转运是由两类大的锌转运体家族 ZnT 家

族和 ZIP 家族完成的<sup>[7]</sup>。ZnT 蛋白能够促进细胞质锌的外流以及锌在各细胞器区室化分布,从而降低胞浆内锌的含量;与之相反,ZIP 则能够增加细胞对锌的摄取或者促进细胞器内锌的释放,从而增加胞浆内锌的含量。乳腺组织有聚集和分泌锌的能力,而且研究发现乳腺癌组织锌浓度明显高于正常组织<sup>[5]</sup>。除了和乳腺癌的发生发展密切相关的基质金属蛋白酶外,和锌代谢密切相关的就是锌转运体了<sup>[8]</sup>。而基质金属蛋白酶和锌转运体许多成员又有着相同的模序,可能锌的代谢以及锌转运体和乳腺癌的发生发展有一定的关联。

Zinquin (Zinquin ethyl ester) 是被广泛使用的 TSQ 指示剂的类似物,像其它乙酰甲酯类的钙离子指示剂一样,可以通过细胞膜。它结构中的氮原子能和锌离子形成荧光复合物,因此 Zinquin 可以被用来检测细胞内的锌离子的情况<sup>[9]</sup>。在细胞给与高锌干预时( $ZnCl_2 \geq 100 \mu mol/L$ ),可以观察到细胞内锌离子含量增加。同样,在膜渗透性特异锌螯合剂 TPEN 存在的条件下细胞内锌离子含量降低。这样,通过  $ZnCl_2$  和 TPEN 的干预就形成了细胞高锌和低锌两种状态。

ZnT-1 mRNA 在组织中有着广泛的表达,它通过增加细胞内锌的外流从而使组织细胞抵御高锌环境带来的伤害。尽管在乳腺肿瘤组织发现了 ZnT-1 表达比正常组织有所降低,然而本课题组在给予高锌干预乳腺肿瘤组织时 ZnT-1 表达升高<sup>[10]</sup>,本研究在 MCF-7 乳腺癌细胞系,也可观察到高锌干预使 ZnT-1 表达的升高。由此可见,在乳腺肿瘤,ZnT-1 在稳定细胞内锌水平的调节中起到非常重要作用。其它锌转运体没有观察到高锌干预条件下表达的改变,这也提示在高锌条件时,ZnT-1 对锌代谢的调节起主导作用。

TPEN 作为一种膜渗透性特异锌螯合剂,能够降低细胞内锌的水平。TPEN 缺锌培养人单核细胞株 THP-1 的 ZIP-2 表达激增 30 倍<sup>[11]</sup>,这种增加是由于转录激活还是由于 mRNA 的稳定表达所致不得而知。ZIP10 是近来研究发现可能与乳腺癌转移相关的蛋白<sup>[12]</sup>,其在雌激素受体阴性乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 中表达水平高于 MCF-7,而且 TPEN 可提高 MDA-MB-231 细胞的侵袭能力。另一方面,ZIP 家族的其它多个成员 mRNA 水平和锌的相关性并不高<sup>[13]</sup>,这也印证了 ZIP 的表达调节在翻译后水平的可能性。在我们的研究中,只有 ZIP2 和 ZIP10 mRNA 表达水平在缺锌状态下升高,而且存在浓度依赖,而 ZIP1 和 ZIP6 改变不大。这表明在乳腺癌细胞,ZIP2 和 ZIP10 在对细胞锌水平的调节中可能比其它 ZIP 成员起着更为重要的作用。另外,TPEN 能抑制 ZnT-1 表达,但是其抑制程度不如高锌诱导其

表达程度明显。当细胞内锌浓度降低时,一方面,缺锌 MCF-7 细胞通过提高 ZIP2 和 ZIP10 mRNA 的表达,来增加锌的内流和细胞内锌池对锌的释放,另一方面降低 ZnT-1 mRNA 的表达,减少锌的外流,从而使细胞内锌的水平保持在一个相对稳定的状态。而且,低锌条件下 ZIP2、ZIP10 在对锌的调节上可能起着更为关键的作用。

#### [参 考 文 献]

- [1] Krebs NF. Overview of zinc absorption and excretion in the human gastrointestinal tract [J]. *J Nutr*, 2000, 130 (5S Suppl):1374S-1377S.
- [2] 王华仁,李积胜,杨芳. 牛磺酸和锌对急性缺氧小鼠脑组织 HIF-1 $\alpha$  mRNA 表达的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2007, 23(1):160-162.
- [3] Gaither LA, Eide DJ. Eukaryotic zinc transporters and their regulation [J]. *Biomaterials*, 2001, 14(3-4):251-270.
- [4] Franklin RB, Feng P, Milon B, et al. hZIP1 zinc uptake transporter down regulation and zinc depletion in prostate cancer [J]. *Mol Cancer*, 2005, 4:32.
- [5] Santoliquido PM, Southwick HW, Olwin JH. Trace metal levels in cancer of the breast [J]. *Surg Gynecol Obstet*, 1976, 142(1):65-70.
- [6] Snitsarev V, Budde T, Stricker TP, et al. Fluorescent detection of Zn<sup>2+</sup>-rich vesicles with zinquin: mechanism of action in lipid environments [J]. *Biophys J*, 2001, 80(3):1538-1546.
- [7] Liuzzi JP, Cousins RJ. Mammalian zinc transporters [J]. *Annu Rev Nutr*, 2004, 24:151-172.
- [8] Duffy MJ, Maguire TM, Hill A, et al. Metalloproteinase: role in breast carcinogenesis, invasion and metastasis [J]. *Breast Cancer Res*, 2000, 2(4):252-257.
- [9] Coyle P, Zalewski PD, Philcox JC, et al. Measurement of zinc in hepatocytes by using a fluorescent probe, zinquin: relationship to metallothionein and intracellular zinc [J]. *Biochem J*, 1994, 303 (Pt 3):781-786.
- [10] Sun DX, Zhang LY, Wang YS, et al. Regulation of zinc transporters by dietary zinc supplement in breast cancer [J]. *Mol Biol Rep*, 2007, 34(4):241-247.
- [11] Cousins RJ, Blanchard RK, Popp MP, et al. A global view of the selectivity of zinc deprivation and excess on genes expressed in human THP-1 mononuclear cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(12):6952-6957.
- [12] Kagara N, Tanaka N, Noguchi S, et al. Zinc and its transporter ZIP10 are involved in invasive behavior of breast cancer cells [J]. *Cancer Sci*, 2007, 98(5):692-697.
- [13] Kelleher SL, Lonnerdal B. Zn transporter levels and localization change throughout lactation in rat mammary gland and are regulated by Zn in mammary cells [J]. *J Nutr*, 2003, 133(11):3378-3385.