

[文章编号] 1000-4718(2006)09-1784-04

## 小鼠脑中 Zn 元素和 ZnT3 mRNA 表达的研究\*

张元勋<sup>1</sup>, 龙建纲<sup>2</sup>, 王荫淞<sup>1</sup>, 李德禄<sup>1</sup>, 王福倬<sup>2</sup>,  
沈慧<sup>2</sup>, 李爱国<sup>1</sup>, 张桂林<sup>1</sup>, 黄宇营<sup>3</sup>, 何玮<sup>3</sup>

(<sup>1</sup> 中科院上海应用物理研究所, 上海 201800; <sup>2</sup> 第二军医大学军队卫生教研室, 上海 200433;

<sup>3</sup> 中科院北京高能物理研究所, 北京 100039)

**[摘要]** 目的: 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。方法: 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: 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, 而其它组织中未检出 ZnT3 mRNA。结论: 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]** 脑; 锌; 锌转运体; 基因表达

**[中图分类号]** R363 **[文献标识码]** A

### Study of zinc element and ZnT3 mRNA expression in mouse brain

ZHANG Yuan-xun<sup>1</sup>, LONG Jian-gang<sup>2</sup>, WANG Yin-song<sup>1</sup>, LI De-lu<sup>1</sup>, WANG Fu-di<sup>2</sup>, SHEN Hui<sup>2</sup>, LI Ai-guo<sup>1</sup>, ZHANG Gui-lin<sup>1</sup>, HUANG Yu-ying<sup>3</sup>, HE Wei<sup>3</sup>

(<sup>1</sup> Shanghai Institute of Applied Physics, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800, China; <sup>2</sup> Department of Military Hygiene, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; <sup>3</sup> Institute of High Energy Physics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

**[ABSTRACT]** **AIM:** To explore the interaction and function between ZnT3 mRNA expression and zinc elemental distribution in brain slice of mouse. **METHODS:** Zinc distribution was determined by SRXRF and ZnT3 mRNA expression in tissue was examined by RT-PCR method. **RESULTS:** Zinc content in cerebral cortex and hippocampus was significantly higher than that 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. **CONCLUSION:** ZnT3 facilitates the accumulation of zinc in synaptic vesicles and may play important roles in structuring of vesicular zinc pool.

**[KEY WORDS]** Brain; Zinc; Zinc transporter; Gene expression

锌是人体必需微量元素, 几乎参与机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<sup>[1]</sup>。锌在脑组织中的转运过程是锌营养的重要研究内容, 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<sup>[2]</sup> 及 Huang 等<sup>[3]</sup> 连续克隆到 4 种直接参与锌转运的基因, 被称为锌转运体(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<sup>[4]</sup>, 例如 ZnT3 可能参与锌摄入神经元囊泡及睾丸中的过程<sup>[5]</sup>。

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

[收稿日期] 2004-12-10 [修回日期] 2005-04-06

\* [基金项目] 国家自然科学基金项目(No. 10175085); 北京正负电子对撞机国家实验室项目(No. 03025)资助

Tel: 021-59554767; E-mail: yxzhang@sinap.ac.cn

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。

## 材 料 和 方 法

### 1 材料

**1.1 动物模型** 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<sup>[6]</sup>,饲料含锌量分别为 <1、30 和 180 mg/kg。动物饲养在塑料笼具内,自由饮用蒸馏水,照明周期为 12 h/d,室温控制在 21-25 °C,动物饲养实验室符合国标清洁级。

**1.2 脑切片** 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 10-20 μm,切片随即平铺在 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。

### 2 方法

**2.1 使用 SRXRF 宽束技术测定微量元素含量** 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 6 mm 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<sup>[7]</sup>。

### 2.2 使用 SRXRF 微探针扫描锌元素的精细分布

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 0.2 mm × 0.2 mm 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,详细实验装置可参阅文献<sup>[8]</sup>。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。

**2.3 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 100 ng 小鼠海马总 RNA 为模板,RT-PCR 克隆 ZnT3 片段。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-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。

## 结 果

### 1 小鼠脑组织中的微量元素含量

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 d 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。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,图 1 是一个典型的同步辐射 X 射线微束激发脑样品的能谱图,使用 AXIL 解谱软件<sup>[9]</sup>,可定量得到 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。

表 1 小鼠脑组织中元素的干重含量

Tab 1 Results of elemental contents in mouse brain ( $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$  of dry matter.  $\bar{x} \pm s$ .  $n = 6$ )

Group	Zn	Cu	Fe	K	Ca
Zinc deficiency	24.1 ± 3.2	9.6 ± 1.3	198 ± 24	8 814 ± 930	286 ± 30
Control	37.6 ± 6.7	10.8 ± 3.0	240 ± 35	9 423 ± 847	302 ± 41
High zinc	42.0 ± 5.0*	13.2 ± 2.7	256 ± 28	9 632 ± 879	302 ± 29

\*  $P < 0.05$  vs zinc deficiency group.

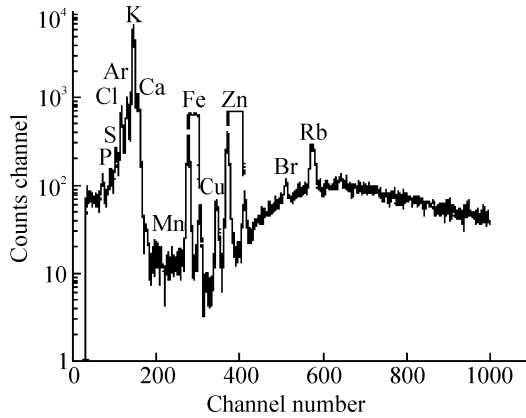


Fig 1 A typical SRXRF spectrum of mouse brain.

图1 鼠脑样品的同步辐射 X 荧光能谱图

### 2 脑切片中锌元素的分布

使用 SRXRF 微探针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 2 是脑切片示意图,图 3 是对应于切片组织的 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,而其它脑区未见显著性变化。

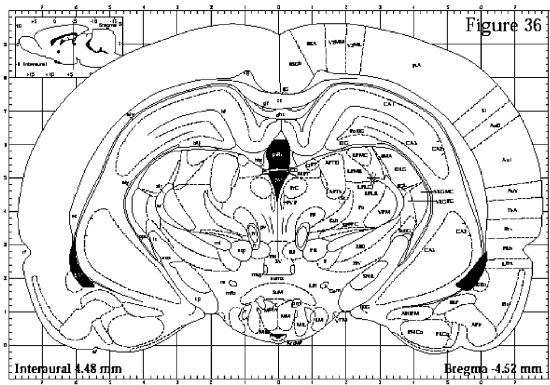


Fig 2 A slice diagram of mouse brain.

图2 小鼠脑切片示意图

### 3 小鼠各组织中的 ZnT3 mRNA 的表达量

使用 RT-PCR 方法,以  $\beta$ -actin 作内对照,对小鼠各组织总 RNA 中所含的 ZnT3 mRNA 进行检测。结果表明,在睾丸和脑组织中的 ZnT3 mRNA 有较高丰度,而在心、肝、脾、肺、肾、小肠等组织中未检出 ZnT3 mRNA 的表达。为了进一步详细了解脑的各部分组织中 ZnT3 mRNA 的表达情况,又将小鼠嗅球、大脑皮层、小脑皮层、海马等各部分组织检测 ZnT3 mRNA,从图 4 的检测结果可发现大脑皮层、海

马中 ZnT3 mRNA 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 表达没有显著差异,而它们两者与大脑皮层相比有显著差异( $P < 0.05$ )。

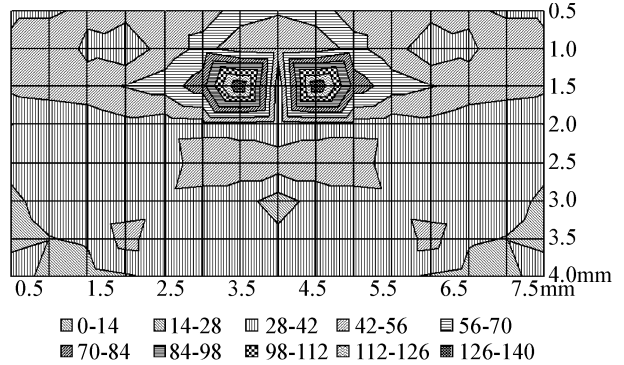


Fig 3 Zinc concentration distribution in brain slice of mouse ( $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ).

图3 锌元素在小鼠脑切片中的含量分布

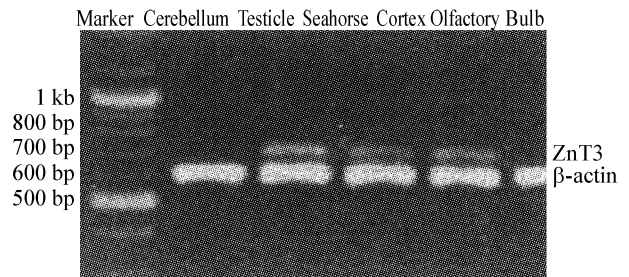


Fig 4 ZnT3 mRNA expressions in mouse tissues by RT-PCR.

图4 RT-PCR 法检测小鼠各组织中的 ZnT3 mRNA

## 讨 论

脑是生物体结构复杂,功能高超的器官,锌离子是脑内含量最丰富的元素之一,在脑发育和功能中发挥重要作用。脑内锌和其它必需微量元素如铜、铁、镁、钙等存在着相互影响彼此协调的关系,其中之一含量反常必然会影响其它元素的浓度,从而导致相应的功能异常。脑内锌有其严格的调控方式<sup>[5]</sup>,锌在蛋白质中与巯基结合比较稳定,很难从蛋白质中置换出来。锌离子在神经元突触囊泡中富集,锌转运体包括 ZnT1、ZnT2 和 ZnT3 的跨膜转运有利于 Zn 在囊泡中的聚集。Zn 通过调节神经递质的释放,通过电压门控和配体门控通道影响神经兴奋性,提示 Zn 是神经系统的内源性神经兴奋性调节物。

由图 3 可见,海马中的锌含量可高达  $100 \mu\text{g}/\text{g}$ ,是锌含量低的道束区(胼胝体、半卵圆中心、穹窿脚)部位 5-10 倍。提示海马是中枢神经系统对锌摄入较敏感的区域<sup>[11,12]</sup>,营养性缺乏和过量都会导致脑元素的变化,造成严重的行为及神经学后果。例如缺锌会改变神经结构和突触发生,影响大脑中锌的

动态平衡,导致记忆损伤和大脑机能障碍等。

锌是1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1种内源性神经调质起作用。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。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”。与 Palmiter 等<sup>[5]</sup>认为脑中存在“锌池”的推断结果一致,这些部位的锌离子高度浓集,表明锌对神经元信号转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]

- [1] Takeda A. Movement of zinc and its functional significance in the brain[J]. *Brain Res Rev*, 2000, 34(3): 137-148.
- [2] Palmiter RD, Cole TB, Findley SD. ZnT-2, a mammalian protein that confers resistance to zinc by facilitating vesicular sequestration[J]. *EMBO J*, 1996, 15(5): 1784-1791.
- [3] Huang L, Gitschier J. A novel gene involved in zinc transport is deficient in the lethal milk mouse[J]. *Nat Genet*, 1997, 17(2): 292-297.
- [4] McMahon RT, Cousins RJ. Regulation of the zinc transporter ZnT-1 by dietary zinc[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(9): 4841-4846.
- [5] Palmiter RD, Cole TB, Quaipe CJ. ZnT-3, a putative transporter of zinc into synaptic vesicles[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(25): 14934-14939.
- [6] Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet[J]. *J Nutr*, 1993, 123(11): 1939-1951.
- [7] Wu YR, Cao ZY, Xiao YA, et al. XRF experiments at BSRF[J]. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*, 1995, A359(1,2): 291-294.
- [8] Zhang YX, Cheng F, Li DY, et al. Synchrotron radiation XRF microprobe investigation of elemental distribution in femoral head slice with osteoporosis[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2001, 46(13): 1138-1141.
- [9] Zhang YX, Li DY, Zhang YP, et al. Study of metallic element distribution in cancellous bone of femoral head both youth and old people by PIXE[J]. *International Journal of PIXE*, 1999, 9(3,4): 291-296.
- [10] Smith QR. Regulation of metal uptake and distribution within brain[J]. *Nutrition and the Brain*, 1990, 8(1): 25-74.
- [11] Itoh T, Saito T. Effect of zinc deficiency on the response of immobilization stress for the adult rat[J]. *Trace Elements Electrolytes*, 2000, 17(2): 76-81.
- [12] Atsushi T, Sachiyo TS. Transient learning impairment of adult rats fed zinc deficient diet[J]. *Brain Res*, 2000, 859(2): 352-357.