DOI: 10.16016/j.1000-5404.1997.04.022

锌对幼鼠脑金属硫蛋白表达的影响

刘树刚* 孔祥英 (第三军医大学附属西南医院儿科) 重庆, 630038
左连富 郭建文 (河北医科大学肿瘤研究所) 石家庄, 050011

提 要 目的: 研究不同含锌饲料对幼鼠脑金属硫蛋白(Metallothionein, MT)表达的影响。方法: 从哺乳期开始建立幼鼠低锌(Zinc Deficiency, ZD)、常锌(Zinc Normal, ZN)和高锌(Zinc Excessive, ZE)动物模型,以流式细胞仪及免疫组化的方法,定位、定量观测脑组织(皮层、海马)内 MT表达的变化。结果: 幼鼠在哺乳期末(4周)和 7周末脑组织内 MT含量: ZD组明显低于 ZN组,而 ZE组明显高于 ZN组。MT广泛分布于胶质细胞,散在分布于神经元内,在脉络膜、脑室管膜细胞及血管内皮细胞内含量丰富。结论: 饲料锌明显影响幼鼠脑 MT表达。MT可能对脑组织细胞内锌的代谢及生物学功能起重要调节作用,与脑发育有关。

关键词 锌;金属硫蛋白;脑;大鼠;免疫组化
中图法分类号 R153.2

锌参与机体300余种酶的组成,是机体内必需的微量元素之一,不同水平的含锌饲料明显影响幼脑发育[1,2]。金属硫蛋白(MT)是一种富含半胱氨酸的低分子量非酶蛋白。每一分子 MT可结合 7个锌离子(Zn^{2+})。在组织内,MT水平与锌含量相关,它可能参与锌代谢及生物学功能的调节。本实验通过幼鼠 ZD、ZN和 ZE动物模型建立,探讨不同含锌饲料对幼鼠脑 MT表达的影响。

1 材料和方法

1.1 动物模型与分组

健康 Wistar临产孕大鼠12只,随机分为 ZD组、ZN组和 ZE组,每组4只,饲养于塑料笼具内。待产仔后第一天始分别饲以低锌饲料(Flangan氏配方[3],锌含量 < 2 ppm),常锌饲料(Flangan氏配方中加入硫酸锌,使锌含量为50 ppm)、高锌饲料(锌含量为1500 ppm)。三组均自由饮用去离子水(锌含量 < 0.01 ppm)。严格控制环境中锌污染。室温 21℃~ 22℃,湿度45%~ 50%,光照12 h(8:00~ 20:00)。仔鼠食用母乳于4周末断奶,128只仔鼠留用雄鼠63只,断奶时每组随机处死10只,剩余雄鼠每笼2只继续饲以上述三种饲料,7周末全部处死。其中每组随机选3只行活体心脏灌注(2.5%多聚甲醛+ 30%饱和苦味酸),其余为股静脉放血处死,取材。

1.2 血浆锌和脑组织(皮层、海马)锌测定

采用美国 IL-AA951型原子吸收分光光度计火焰法测定,均采用质量控制。

1.2.1 血浆锌含量测定 以抗凝管收取大鼠股静脉血,经3000 r/min离心5 min分离血浆,加入4倍体积的6%正丁醇稀释后直接测定。结果以μmol/L表示。

1.2.2 脑组织锌测定 大鼠断头取脑,取部分皮层与一侧海马称湿重加入纯硝酸(GR)0.5 ml,待组织消化后加入4倍超纯水稀释后上机测定。结果以μg/g表示。

1.3 脑组织(海马、皮层)MT测定

采用 FACS-420型流式细胞仪进行间接免疫荧光法测定[4]。

取部分皮层和另一侧海马分别以毛玻璃轻挤磨碎,加入0.5~ 1 ml PBS(pH 7.30)洗脱,通过4号针头推入9 ml 70%冷乙醇(4℃)固定制成组织悬液,放4℃冰箱保存。将固定好的组织悬液中加入0.25%胰酶 37℃水浴消化20 min,吹打后放250目铜网上轻搓 PBS冲洗,收集滤液低速离心(500~ 800 r/min)去除细胞碎片,PBS洗2次。加适量 PBS得到一定含量(1×10^6/ml)的细胞悬液。加入一抗(绵羊抗大鼠 MT抗体)37℃孵育30 min,以 PBS洗2次(1000 r/min,离心5 min),加入二抗(荧光素标记的兔抗羊 IgG抗体),室温30 min, PBS洗2次(1000 r/min,离心5 min),上机前500目铜网过滤,每份样本计数1万个细胞,测定免疫荧光强度,结果以均道值(mean mode, mm)表示。

1.4 LSAB法免疫组化脑组织 MT染色

LSAB法(Labelled streptavidin biotin method)与 ABC免疫组化法基本相同,它选用分子量更小的抗生蛋白链菌素(Streptavidin, SA)代替生物素抗生物素复合物(Avidin-Biotin Complex, ABC),使之更易于进入细胞内。具体方法见 Nishimura所述[5]。

1.5 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$ 表示,采用数理统计程序 manova及 PDA-2进行方差分析。

2 结果

2.1 血浆锌、皮层锌及海马锌含量变化,见表1

---

* 刘树刚,男,30岁,现在石家庄市二六 医院儿科。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 1　铜锌饲料饲养 4周末和 7周末血浆、海马及皮层锌含量 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Contents of Zn in plasma, cortex and hippocampus at the end of four weeks and seven weeks after Zn diet feeding($\bar{x}\pm s$)

Time(w)	Group	n	Plasma Zn(μmol/L)	Cortex Zn(μg/g)	Hippocampus Zn(μg/g)
4	ZN	7	34.93± 4.70	39.04± 4.51	45.49± 6.22
	ZD	7	17.57± 2.34**	25.48± 7.60*	26.41± 7.29*
	ZE	7	53.06± 7.03**	105.73± 34.21**	181.96± 38.03**++
7	ZN	7	37.24± 2.51	42.14± 6.12	50.73± 7.86
	ZD	7	16.68± 2.51**	22.42± 4.64**	30.40± 8.14**
	ZE	7	74.47± 11.09**	351.54± 36.93**△△	474.44± 92.71**△△++

注: * : $P<0.05$,** : $P<0.01$ *vs* ZN;△△: $P<0.01$ *vs* cortex or hippocampus ZE at the end of four weeks;
++ : $P<0.01$ *vs* cortex ZE at the end of four weeks or seven weeks

2.2　脑组织免疫组化染色结果

MT主要分布于皮层和海马胶质细胞内 (胞核及胞浆) ,大多呈弱阳性 ,在皮层有散在的神经元胞浆内 MT呈弱阳性 ,见图 1~ 2 在脉络膜、脑室管膜细胞及血管内皮细胞内广泛分布 ,大多呈强阳性 ,见图 2~ 4

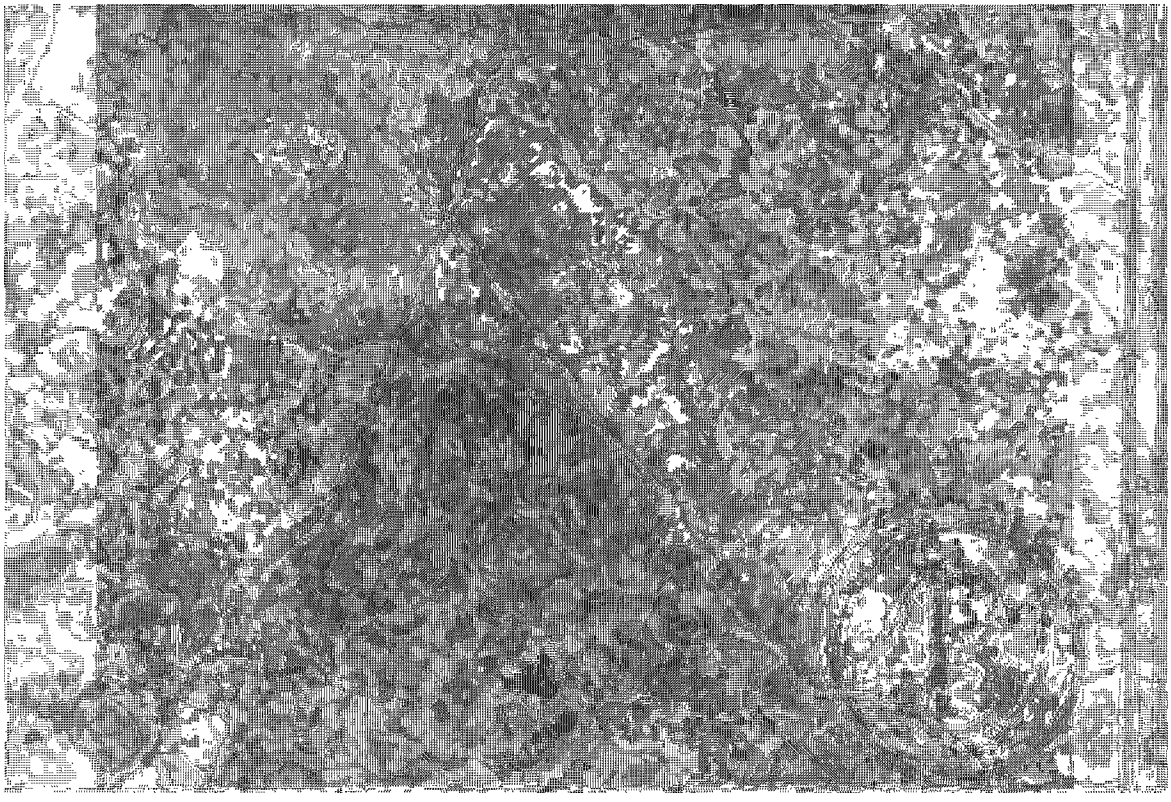


图 1　皮层中 MT弱阳性的胶质细胞和神经元　(SP× 400)

Fig 1　Weak positive of MT in glias and neurons of cortex　(SP× 400)

图 2　海马中 MT弱阳性的胶质细胞　(SP× 400)

Fig 2　Weak postive of MT in glias of hippocampus　(SP× 400)

图 3　脉络膜细胞 MT染色呈强阳性　(SP× 400)

Fig 3　Intensive positive of MT in epithelium cells of choroid plexus　(SP× 400)

图 4　脑室管膜细胞 MT染色呈强阳性　(SP× 400)

Fig 4　Intensive positive of MT in ependymal cells　(SP× 400)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

2.3 海马及皮层 MT含量变化,见表2

表2 铜锌饲料饲养4周末和7周末海马及皮层 MT含量($\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Contents of MT in cortex and hippocampus at the end of four weeks and seven weeks after Zn diet feeding($\bar{x}\pm s$)

Time(w)	Group	n	Cortex MT(mm)	Hippocampus MT(mm)
4	ZN	7	74.29± 3.45	72.29± 6.70
	ZD	7	51.71± 7.13**	54.57± 8.22**
	ZE	7	84.71± 6.47*	85.71± 6.10*
7	ZN	7	71.00± 4.69	70.00± 3.16
	ZD	7	50.43± 5.86**	52.71± 7.48**
	ZE	7	90.86± 5.82**	91.43± 5.06**

注:* : $P<0.05$,** : $P<0.01$ *vs* ZN; mm: mean mode

3 讨论

本实验从哺乳期始建立低锌(ZD)、常锌(ZN)和高锌(ZE)大鼠模型,ZD组在4周末及7周末血浆锌、海马锌和皮层锌均明显低于 ZN组,ZE组明显高于 ZN组,而 ZE组中,7周末海马及皮层锌水平明显高于4周末相应部位脑组织锌水平,且海马锌明显高于皮层锌,结果表明,不同含锌饲料明显影响脑组织中锌的水平,动物模型建立是成功的。

众多研究表明,机体300余种酶的活性与 Zn^{2+} 有关,其中几十种酶的组成成份中含有 Zn^{2+} [1]。MT作为一种低分子量非酶蛋白,其分子中含有丰富的半胱氨酸残基,它们与 Zn^{2+} 形成二个金属硫簇(cluster):一个含4个 Zn^{2+} 和11个半胱氨酸残基,另一个含3个 Zn^{2+} 和9个半胱氨酸残基,MT基因是一种较古老的基因,广泛存在于真核细胞的基因组中,其调控区内含有金属反应元件(Metal responsive elements, MRE),Zn^{2+} 可与 MRE结合启动 MT表达[6]。组织细胞中 MT水平与锌含量密切相关[7,8]。本实验结果表明,ZD组海马和皮层中 MT水平明显低于 ZN组,而 ZE组明显高于 ZN组。在 ZE组中,尽管7周末组织锌明显高于4周末锌水平,而两期相比,MT水平并无明显差异,这说明锌对 MT表达的影响有一定限度,超过这一范围,锌含量的变化便不再影响 MT水平。有研究表明,MT与 MT-mRNA的水平在胚胎形成、发育的不同时期及新生个体发育过程中是一个程序性调节过程,即胚胎期 MT水平较高,生后不久便稳定在一个较低水平,锌水平降低时 MT水平亦相应有所下降,但一般不会低于机体固有的基础水平[9],本实验中观察到 ZD组中两期 MT水平无明显差别。从 MT在神经系统分布来看,MT组化染色结果表明,MT广泛分布于皮层和海马的胶质细胞,散在分布于神经元内,且大都呈弱阳性。而在脉络膜、脑室管膜及血管内皮细胞中分布亦很广泛,且大都呈强阳性,以上结果提示,组织内锌水平影响 MT的表达,反过来 MT又通过结合释放 Zn^{2+} 调节组织细胞对 Zn^{2+} 的摄取和 Zn^{2+} 的游离水平,一方面血液中 Zn^{2+} 在进入脑组织过程中,存在于上述血脑屏障及血脑脊液屏障等部位的 MT对其进入量有一定的调节作用,另一方面神经细胞内 MT对其内的游离 Zn^{2+} 起进一步的调节作用,两方面作用的结果,使脑组织细胞内游离 Zn^{2+} 保持于正常生理水平,有利于神经细胞的正常生长发育。但这些作用是有一定限度的,超过这一调节限度,过量锌则使脑组织游离 Zn^{2+} 升高,锌过低时 MT对 Zn^{2+} 的释放便不能满足神经细胞的生理需要,两者都会影响神经细胞的正常代谢活动,导致脑发育不良。

总之,饲料锌的变化在一定程度上影响脑组织 MT表达,后者在一定范围内通过调节锌的代谢,两者互为因果,调节着脑组织细胞内游离 Zn^{2+} 水平,进而影响脑组织细胞的代谢及脑的生长发育。

(致谢:感谢英国 Ian Bremner无偿提供绵羊抗大鼠 MT抗体!)

参考文献

1 Vallee B L, Falchuk K H. The biochemical basis of zinc physiology. Physiol Rev, 1993, 73(1): 79
2 孔祥英,任榕娜,刘力建等.饲料锌对幼鼠脑发育和学习记忆的影响.营养学报,1996, 18(4): 320
3 Flangan P R. A model to produce zinc deficiency in rats and its use to demonstrate that dietary phytate increase the excretion of endogenous zinc. J Nutr, 1984, 14(3): 493
4 左连富,周道安,齐风英等.定量分析乳腺癌细胞 p53基因产物的表达.中华物理医学杂志,1994, 16(2): 78
5 Nishimura N, Nishimura H, Tohyama C. Localization of metallothionein in female reproductive organs of rat and guinea Pig. J Histochem Cytochem, 1989, 37(1): 1601
6 Hamer D H. Metallothinein. Annu Rev Biochem, 1986, 55(1): 913
7 Cousins R J, Lee-Ambrose L M. Nuclear zinc uptake and interactions and metallothionein gene expression are influenced by dietary zinc in rats. J Nutr, 1992, 122(1): 56
8 Ebazi M, Iversen P L, Hao R *et al*. Expression and regulation of brain metallothionein. Neurochem-Int, 1995, 27(1): 1
9 Kagi J H R, Schaffer A. Biochemistry of Metallothionein. Biochemistry, 1988, 27(23): 8509

(收稿: 1997-01-15;修回: 1997-04-05)
(编辑 刘 鹏)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Effects of zinc on metallothionein expression in the brain in young rats

Liu Shugang, Kong Xiangying, Zuo Lianfu, Guo Jianwen (Department of Pediatrics; Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

Abstract Objective: To investigate the effects of different zinc diets on the expression of metallothionein(MT) in the young rat brain. Methods: After the zinc-deficient (ZD), zinc-normal (ZN) and zinc-excessive (ZE) models were established in young rats, the changes of MT expression in the brain tissues (cortex and hippocrampus) were quantitatively and locationally observed with flow cytometry and immunohistochemistry. Results: At the end of 4 and 7 weeks, the content of MT was significantly lower in ZD group but significantly higher in ZE group than in ZN group. MT was widely distributed in glial cells and loosely in neurons. A large amount of MT was seen in choroid plexus epithelium, ependymal cells and endothelial cells of the blood vessels. Conclusion: Dietary zinc obviously affects MT expression in the brain of young rats. MT may exert important regulative effects on the metabolism of tissue zinc and biological function of zinc and is associated with the development of the brain of young rats.

Key words zinc; metallothionein; brain; immunohistochemistry; rat

梭曼诱发惊厥后脑内信号物质及细胞程序死亡相关基因表达变化的定位研究

Morphological mapping of changes of signal messengers and expression of genes related to programmed cell death after soman- induced seizures

景德强* 陈尔瑜 (第三军医大学基础医学部解剖学教研室) 重庆, 630038

本试验主要用形态学方法定位研究了 soman诱发惊厥后大鼠脑内信号传导物质和程序性细胞死亡相关基因的表达。首先,用 Beckman-6300型高效氨基酸分析仪定位分析了 soman诱发惊厥后不同时相谷氨酸、天门冬氨基酸和 γ-氨基丁酸的变化。结果显示,兴奋性氨基酸谷氨酸和天门冬氨酸的总体水平在惊厥相关的大脑皮质、海马、嗅球、小脑等脑区明显下降。上述结果说明: 在 soman诱发惊厥后,上述脑区兴奋性氨基酸递质活动的增加。兴奋性氨基酸通过 NMDA受体介导 Ca^{2+} 内流, $[Ca^{2+}]$升高可引起细胞内信号传导物质活动的变化。因此,本文进而用 ABC免疫组化方法对 soman惊厥大鼠脑内"第三信使" Fos的表达变化做了定位图布(mapping)研究。结果显示: Soman诱发惊厥后可引起大鼠脑内 c-fos的广泛表达。惊厥和 c-fos表达相伴出现。c-fos表达具有时相特异性和恒定的解剖学图布类型。短时表达发生在广泛的脑区包括新皮质、异型皮质、嗅脑系统、海马结构、杏仁核、丘脑、下丘脑。延时表达和延迟表达主要发生在新皮质第Ⅲ层、梨状皮质、海马 CA1-CA3区和杏仁核。上述结果说明,soman诱发的惊厥是泛发性惊厥,其起源和播散涉及广泛脑区,涉及的脑区受惊厥活动影响短时表达 c-fos 发生延时、延迟表达的脑区较为局限,c-fos表达可能涉及这些脑区的神经元损伤。c-fos的表达与 NOS的激活有共同的信号路径即 Ca^{2+} 内流、Ca^{2+}-钙调素依赖机理,因而我们进一步研究了 soman性惊厥后 c-fos表达与 NOS神经元在单个神经元中的关系。实验中,我们创用了 Fos免疫组化结合 NADPH-d组化双重染色法,取得了满意的染色效果。应用这一方法,本文研究了杏仁核簇、下丘脑视上核和室旁核中 Fos表达神经元和 NOS神经元的关系。结果显示,杏仁核中几乎所有的 NOS阳性神经均表达 c-fos;双标记神经元约是 c-fos表达神经元的1/10杏仁核内 NOS激活,过量产生 NO,可能是该区神经元损伤的路径之一。在下丘脑、视上核和室旁核内短时表达 c-fos,但几乎所有的 NOS神经元也呈现 Fos染色阳性。我们推测此区内 NO的产生可能与脑应激有关。局限发生在惊厥相关脑区内的 c-fos延时、延迟表达提示该区的兴奋毒性损伤可能循随特定的基因表达路径发生细胞程序死亡。最后,我们选择了 Bcl-2 Bax p53三个与细胞程序死亡密切相关的基因,运用 ABC免疫组化方法对它们的表达进行了图布定位研究。结果显示: 在惊厥发生 c-fos短时表达的脑区惊厥2 d后, Bcl-2 Bax 和 p53的表达增加。在发生 c-fos延时、延迟表达的脑区,特别是梨状区海马 CA1-CA3区、Bax的表达明显强于 Bcl-2 Bax与 Bcl-2的相互作用和比例决定细胞的生存。Bax-Bax 同源二聚体占优势时,细胞发生程序死亡。因此,本文结果强烈支持: 由 soman惊厥诱发的脑损伤是一种程序性细胞死亡, c-fos p53 bcl-2 bax 可能涉入其基因路径。详细的分子机理尚待进一步研究。

关键词 Soman性惊厥; 氨基酸; c-fos; p53; Bax; Bcl-2大鼠; 脑图布定位

中图法分类号 R827.171

(收稿: 1997-07-11; 修回: 1997-08-10)

(编辑 刘 鹏)

* 景德强 男, 34岁, 副教授, 博士研究生

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net