

同步辐射 X 荧光方法用于鼠脑锌元素分布的研究

张元勋 王荫淞 李德禄 李爱国 张桂林

(中国科学院上海应用物理研究所 上海 201800)

龙建纲 王福倬 沈慧 秦海宏

(第二军医大学军队卫生教研室 上海 200433)

黄宇营 何玮

(中国科学院高能物理研究所 北京 100039)

摘要 为了探索锌等金属元素在脑中的精细分布与 ZnT3 mRNA 表达之间的相互作用和功能, 本研究使用同步辐射 X 射线荧光技术 (SRXRF) 测定小鼠全脑和脑切片中锌等金属元素的分布, 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。分析结果表明, 脑中锌元素不是均匀分布的, 主要分布在皮层、海马和齿状回部位, 它们的锌浓度比道束区高出 5—10 倍。与此结果相对应的是大脑皮层、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。进一步的推断提示 ZnT3 能促进胞浆内的锌富集于神经元囊泡中, 通过介导胞浆锌的跨膜转运过程构造囊泡的“锌池”。

关键词 同步辐射 X 荧光, 脑, 锌元素, 锌转运体, 基因表达

中图分类号 R151.2, O59

锌是人体必需的微量元素, 几乎参与机体内所有的生理代谢过程, 尤其是与脑的发育和功能具有密切联系^[1]。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理具有重要意义。

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。1995 年至 1997 年, Palmiter 和 Huang 等^[2, 3]连续克隆到 4 种直接参与锌转运的基因, 这些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 蛋白具有多个跨膜域, 富含组氨酸和脑内环等结构特征。可以推断 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 的发现使锌的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。本研究使用同步辐射 X 荧光微探针 (SRXRF) 微区扫描分析技术, 获取锌等多种金属微量元素在脑组织中的含量和分布, 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, 有助于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, 对于解释锌在脑系统的重要作用, 进一步阐明锌转运体及锌等元素在脑功能中的作用机理提供理论依据。

1 实验方法

1.1 实验动物模型

选用成年雄性 ICR 小鼠 18 只, 体重 17—20 g, 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 180 mg · kg⁻¹。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 ℃, 动物饲养实验室符合国标清洁级。

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

第一作者: 张元勋, 男, 1949 年出生, 1982 年于中科院上海应用物理研究所获硕士学位, 主要从事核分析技术在生物医学和环境科学中的应用研究, 研究员, E-mail: yxzhang@sinr.ac.cn

收稿日期: 2004-04-29, 修回日期: 2004-06-22

1.2 脑切片制备

分组饲养小鼠 4 周后断头处死,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,切片时将脑组织置于切片架平台,快速冷冻固定后,作冠状连续冷冻切片,切片厚度为 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。

1.3 SRXRF 宽束技术测定鼠全脑中微量元素含量

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 1 mm \times 3 mm 的宽束白光直接照射样品,在束流的引出端放置 13.6 $\text{mg} \cdot \text{cm}^{-2}$ 的铝吸收片,目的是改变激发源的能谱,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 射线的产生,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 射线由硅(锂)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,最后由计算机系统解谱和数据处理^[7]。

1.4 SRXRF 微探针技术测定脑切片中锌元素的精细分布

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 射线束流的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 \times 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,详细实验装置见文献[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。

1.5 RT-PCR 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,使用 RT-PCR 方法克隆 ZnT3 片段。RT-PCR 扩增反应的体积为 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,将 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,最后将获取的 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。

2 结果和讨论

2.1 小鼠脑组织中的微量元素含量

采用硝酸溶解法,在装有鼠脑样品的石英坩埚中滴入 3 mL 浓度为 65% 的硝酸溶液,放在电热板上微加热到 70 $^{\circ}\text{C}$ 左右,约 2 min 后鼠脑已完全溶解。冷却后加入 200 μL 含钪 0.5 mg 的溶液作为内标,充分混合后用移液管吸取 100 μL 溶液,滴于干净的 6 μm 厚涤纶薄膜上,每个样品滴 3 个平行样品,在真空中干燥后就成为 PIXE 分析用的靶片。运用 AXIL 软件对 SRXRF 能谱进行解析^[9],可定量得到 Zn、Cu、Fe、Ca、K 等微量元素浓度结果,部分结果列于表 1。由表 1 可见,高锌组和正常组的脑锌含量显著高于缺锌组 ($P < 0.05$)。对于铜、铁、钾等元素含量,高锌组虽有增加,但 3 组间无显著差异。锌离子是脑内含量最丰富的阳离子之一,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相互作用的关系,其中之一含量反常必然会影响到其它元素的浓度,从而导致相应的功能异常。脑内锌有其严格的调控方式^[10],锌与铁、钴、锰等元素的化学性质有相似之处,铅和镉与蛋白质巯基结合比锌还要稳定,因此铅和镉能置换锌,形成拮抗作用。饮食

表 1 鼠脑组织中元素含量的平均结果

Table 1 The elemental contents in mouse brain ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ of dry matter)

分组 Groups	缺锌 Zinc deficiency	正常 Control group	高锌 High zinc
样本数 Number of samples	6	6	6
锌 Zn	24.1 \pm 3.2	37.6 \pm 6.7	42.0 \pm 5.0
铜 Cu	9.6 \pm 1.3	10.8 \pm 3.0	13.2 \pm 2.7
铁 Fe	198 \pm 24	240 \pm 35	256 \pm 28
钾 K	8814 \pm 930	9423 \pm 847	9632 \pm 879
钙 Ca	286 \pm 30	302 \pm 41	302 \pm 29