

锰中毒大鼠海马锌含量与锌转运蛋白的关系

粟立羽, 丁宏伟, 胡斌丽, 李红, 李岩

摘要:

[目的] 探讨锰中毒大鼠海马区锰和锌含量变化及与锌转运蛋白3(ZnT3)之间的关系。

[方法] 将40只雄性SD大鼠随机分成4组, 每组10只, 即生理盐水对照组和染锰低剂量、中剂量、高剂量组。分别给予腹腔注射生理盐水及氯化锰溶液3、6、12 mg/(kg·d)连续注射8周, 锰中毒造模成功后取大鼠海马组织, 做HE染色病理切片观察其病理改变, 石墨炉原子吸收仪测定海马锰、锌含量变化, Western blot法检测大鼠海马区ZnT3含量, 实时荧光定量PCR法测定大鼠海马区ZnT3 mRNA的表达。

[结果] 染毒后大鼠海马神经细胞均出现不同程度嗜酸性变, 胞浆凝聚、结构不清, 且出现细胞皱缩和嗜酸性小体。与对照组及低剂量组比较, 高、中剂量组大鼠海马组织中锰及锌含量均明显增高($P < 0.05$); 而高剂量组锌含量也高于中剂量组($P < 0.01$)。高、中、低剂量组大鼠海马组织中ZnT3含量分别为 1.01 ± 0.03 、 0.80 ± 0.02 、 0.65 ± 0.13 , 均高于对照组(0.51 ± 0.06)($P < 0.05$)。高、中剂量组ZnT3基因相对表达分别为 3.40 ± 0.36 、 2.88 ± 0.69 , 均高于对照组及低剂量组(1.47 ± 0.60)($P < 0.001$)。

[结论] 锰中毒可破坏大鼠海马神经元细胞结构, 且海马组织中锌含量与ZnT3同步增高。

关键词: 锰中毒; 海马; 锌转运蛋白; 大鼠; 锌

引用: 粟立羽, 丁宏伟, 胡斌丽, 等. 锰中毒大鼠海马锌含量与锌转运蛋白的关系[J]. 环境与职业医学, 2017, 34(8): 718-721. DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2017.16817

Relationship between concentrations of zinc and zinc transporter in hippocampus of manganism rat
SU Li-yu, DING Hong-wei, HU Bin-li, LI Hong, LI Yan (Department of Hygiene Toxicology, School of Public Health, Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou 563000, China). Address correspondence to LI Yan, E-mail: liyan067321@sina.com · The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract:

[Objective] To study the relationship among the concentrations of manganese, zinc, and zinc transporter 3 (ZnT3) in manganism rat hippocampus.

[Methods] Forty male SD rats were randomly divided into four groups with 10 rats in each group: high-dose group, middle-dose group, low-dose group, and control group. The four groups were given intraperitoneal injection of 3, 6, and 12 mg/(kg·d) $MnCl_2$ solutions and normal saline (NS), respectively, for eight weeks. Animals in each group were sacrificed and hippocampus tissue samples were removed for determination. We observed the pathologic changes of hippocampi of the four groups by HE staining under microscope, detected Mn^{2+} and Zn^{2+} in hippocampus tissue by graphite furnace atomic absorption spectrometry, determined the concentration of ZnT3 protein by Western blot, and examined the expression of ZnT3 mRNA by real-time fluorescent quantitative PCR in rat hippocampus.

[Results] All groups exposed to manganese were observed changes in rat hippocampal neurons with eosinophilic degeneration, condensed cytoplasm, unclear cell composition, cell shrinkage, and eosinophilic body. Compared with the control group and the low-dose group, the concentrations of manganese and zinc were significantly higher in the high-dose group and the middle-dose group ($P < 0.05$), and the concentration in the high-dose group was higher than that in the middle-dose group ($P < 0.01$). The expression levels of ZnT3 protein were 1.01 ± 0.03 , 0.80 ± 0.02 , 0.65 ± 0.13 , respectively, in the high-dose, middle-dose, and low-dose groups,

·作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

[基金项目] 贵州省科学技术厅国际科技合作项目(编号: 黔科合外G字[2014]7012号)

[作者简介] 粟立羽(1987—), 男, 硕士, 助教; 研究方向: 金属毒理学; E-mail: 147742566@qq.com

[通信作者] 李岩, E-mail: liyan067321@sina.com

[作者单位] 遵义医学院公共卫生学院卫生毒理学教研室, 贵州 遵义 563000

higher than that of the control group (0.51 ± 0.06) ($P < 0.05$). The expression levels of *ZnT3* mRNA were 3.40 ± 0.36 and 2.88 ± 0.69 , respectively, in the high-dose and middle-dose groups, higher than those in the control group and the low-dose group (1.47 ± 0.60) ($P < 0.001$).

[Conclusion] Manganese can damage the structure of rat hippocampus neurons, and the concentration of zinc in hippocampus is elevated with the increase of *ZnT3* in hippocampus.

Keywords: manganism; hippocampus; zinc transporter; rat; zinc

Citation: SU Li-yu, DING Hong-wei, HU Bin-li, et al. Relationship between concentrations of zinc and zinc transporter in hippocampus of manganism rat[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2017, 34(8): 718-721. DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2017.16817

锰是一种人体所必需的微量元素, 锰长期在体内过量蓄积会对人体的脑造成严重的危害^[1]。锌在中枢神经系统含量丰富, 锌稳态的维持对发挥脑的正常生理功能有着非常重要的作用^[2-3]。然而, 在某些病理情况下, 过量的锌明显具有神经毒性, 而细胞内锌离子含量的变化与锌转运蛋白直接相关^[4-7]。Robison等^[8]运用X线荧光测定慢性锰中毒致神经毒性大鼠中各个金属的含量, 发现在海马区有大量锰、锌聚集, 该研究表明锰的分布与锌有很大的关联, 并且推测锌的转运、储存的机制可能与锰的聚集有关。

本研究拟通过动物实验分析染锰后, 脑海马部位中锰、锌含量及与锌转运蛋白3(zinc transporter 3, *ZnT3*)表达的变化, 探讨锰所引起锌的失调是否是由于过量的锰对锌转运蛋白的影响所致。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF级健康SD大鼠, 40只, 体重110g, 购于第三军医大学大坪医院动物中心。饲养条件: 饲养室温度为18~22℃, 相对湿度为45%~65%。光照12h明暗交替, 自由饮食。饲养及实验过程中遵循实验动物管理与动物伦理保护的有关准则。

1.2 主要仪器与试剂

PCR反应扩增仪(ABI, 美国), LightCycler480实时荧光定量PCR仪(Roche, 瑞士), H6-1微型电泳槽(上海精益有机玻璃制品仪器厂, 中国), 电泳仪、电泳槽(北京市六一仪器厂, 中国), TU-1901紫外分光光度计(北京普析通用仪器有限公司, 中国), MD6型微波消解仪(北京盈安美诚仪器有限公司, 中国), EQU307转膜仪(BBI, 加拿大)。

氯化锰、Trizol提取试剂盒、溴化乙啶、第一链cDNA合成试剂盒、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG、辣根过氧化物酶标记亲和纯化驴抗山羊IgG(上

海生工生物工程有限公司, 中国), 抗SLC30A3抗体(ab102611)、抗SLC39A12抗体(Abcam, 英国), 其他试剂均为国产分析纯。

1.3 实验方法

1.3.1 实验分组及干预方法 大鼠适应性饲养1个月后, 随机分为4组, 每组10只, 每组均给予常规饲养, 低、中、高剂量组分别给予3、6、12mg/(kg·d)的氯化锰腹腔注射, 对照组注射生理盐水, 每周染毒5d, 停药2d, 连续注射8周后在水合氯醛麻醉下处死各组大鼠。取大鼠脑两侧海马组织, 分别置于EP管中并放入-80℃低温冰箱, 供检测用。

1.3.2 海马组织HE染色病理切片制作 将海马组织制作石蜡切片后进行常规HE染色, 光学显微镜下观察大鼠海马神经细胞结构。

1.3.3 石墨炉原子吸收仪测定锰、锌含量 将组织取出称重后置于消解罐中, 加入20mL浓硝酸后放于消解仪中开始消解, 待消解完成后, 将消解罐中液体倒入烧杯, 置于电热板加热, 至液体全部挥发, 向烧杯中加入2%稀硝酸10mL定容。之后分别制作锰、锌标准曲线, 将样品消化液10μL加入原子吸收仪, 分别测定锰、锌含量。

1.3.4 Western blot检测大鼠海马组织中锌转运蛋白*ZnT3* 按常规组织蛋白提取方法提取大鼠海马组织中的蛋白, 进行定量, 变性, 上样, SDS-PAGE凝胶电泳, 转膜, 封闭; 一抗孵育: *ZnT3* 1:200稀释, β -actin 1:800稀释, 4℃缓慢振荡过夜; 次日37℃复温1h; 二抗孵育: 辣根过氧化物酶标记亲和纯化驴抗山羊IgG, 1:8000稀释; 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG, 1:8000稀释; 37℃孵育2h。ECL化学发光检测后将胶片进行扫描至电脑, 用凝胶图象处理系统分析目标带的灰度值。

1.3.5 PCR检测海马组织*ZnT3*基因表达 用Trizol试剂盒提取组织总RNA, 利用RT-PCR试剂盒, 先逆转

录合成cDNA,再进行实时荧光定量PCR反应。管家基因(β -actin)上游引物:5'-CGTAAAGACCTCTATGCCAACA-3',下游引物:5'-AGCCACCAATCCACACAGAG-3',扩增产物大小:163bp; *ZnT3*上游引物:5'-GACCAAAGTGTATATGAAGGCAGTG-3',下游引物:5'-CAGGAATCGTAGAGGACAAGCA-3',扩增产物大小:144bp。

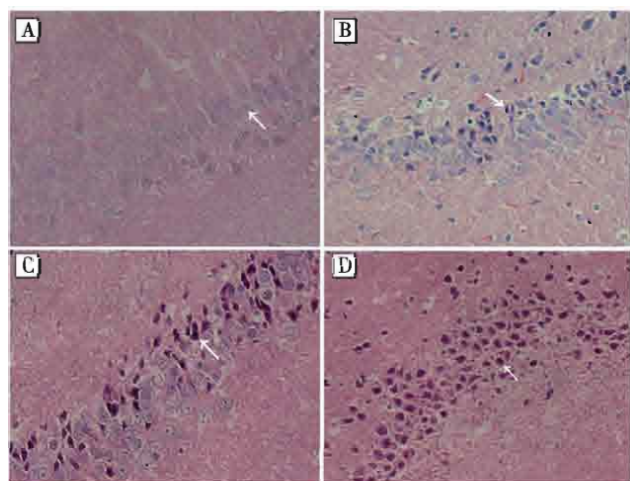
1.4 统计学分析

实验数据均为计量资料,以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用one-way ANOVA分析,组间两两比较采用LSD-*t*法,统计软件选用SPSS 18.0软件,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 海马组织病理切片

染毒8周后,显微镜下观察可见,对照组大鼠海马神经细胞结构完整、清晰,细胞核清晰可见,而不同剂量氯化锰染毒组大鼠海马神经细胞均出现不同程度嗜酸性变,细胞质凝聚、结构不清,甚至出现细胞皱缩和嗜酸性小体。见图1。



[注]箭头所示为嗜酸性变细胞。A: 正常对照组; B: 低剂量组; C: 中剂量组; D: 高剂量组。

图1 不同剂量氯化锰染毒8周后大鼠海马病理切片(HE, $\times 200$)

2.2 海马组织中锰、锌含量

经氯化锰染毒8周后,与对照组及低剂量组比较,高、中剂量组大鼠海马组织中锰及锌含量均明显增高($P<0.05$);而高剂量组锌含量也高于中剂量组($P<0.01$)。见表1。

表1 氯化锰染毒8周后各组大鼠海马组织中锰、锌含量($\bar{x}\pm s$, $\mu\text{g/g}$)

组别	n	锰	锌
对照组	10	9.33 $\pm$ 2.71	33.88 $\pm$ 5.46
低剂量组	10	11.21 $\pm$ 3.21	45.21 $\pm$ 5.14
中剂量组	10	22.54 $\pm$ 7.52 ^{ab}	66.03 $\pm$ 9.69 ^{ab}
高剂量组	10	29.44 $\pm$ 10.82 ^{ab}	91.15 $\pm$ 14.66 ^{abc}
F		9.50	34.80
P		<0.001	<0.001

[注]a: 与对照组比较, $P<0.05$; b: 与低剂量组比较, $P<0.05$; c: 与中剂量组比较, $P<0.05$ 。

2.3 海马组织中锌转运蛋白 *ZnT3* 的含量

不同剂量组大鼠海马组织 *ZnT3* 蛋白含量不同($F=7.63$, $P<0.05$)。高、中、低剂量组大鼠海马组织中 *ZnT3* 含量分别为 1.01 ± 0.03 、 0.80 ± 0.02 、 0.65 ± 0.13 , 均高于对照组(0.51 ± 0.06)($P<0.05$)。见图2。

2.4 海马组织锌转运蛋白 *ZnT3* mRNA 表达

高、中剂量组 *ZnT3* 基因相对表达分别为 3.40 ± 0.36 、 2.88 ± 0.69 , 均高于对低剂量组(1.47 ± 0.60)及对照组($P<0.001$)。

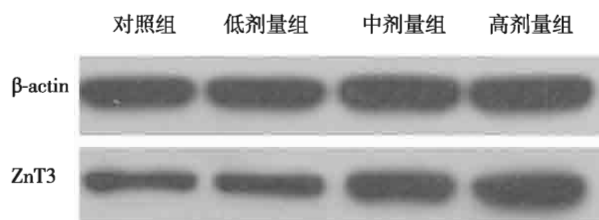


图2 大鼠海马组织中锌转运蛋白 *ZnT3* 的含量

3 讨论

大脑发挥正常功能需要锰、锌各自维持稳态,过量的锰、锌对大脑均会产生毒性,造成神经元细胞结构的破坏。本实验通过腹腔注射染锰, Mn^{2+} 在腹腔被吸收后,主要以二价形式在血中运输,游离的 Mn^{2+} 、 Mn^{3+} 可与血转铁蛋白结合,后者在红细胞的作用下,通过血脑屏障进入脑。石墨炉原子吸收仪实验结果表明,锰、锌在海马组织内有大量聚集,这些过量的锰、锌产生毒性,对海马神经细胞造成损伤,通过HE染色病理切片也观察到,不同剂量氯化锰染毒组大鼠海马神经细胞均出现不同程度嗜酸性变,细胞质凝聚,结构不清,甚至出现细胞皱缩和嗜酸性小体;而对照组大鼠海马神经细胞结构完整、清晰,细胞核清晰可见。可认为锰中毒时,大海马组织锰与锌的含量增高,使海马内锰、锌含量稳态失衡并产生毒性,造成海马神经元细胞结构的破坏,从而影响其

功能,出现一系列症状。

脑内锌稳态平衡容易受氧化应激、酸中毒、炎症等生理环境影响。实验发现细胞内环境的改变(氧化因子增多、pH改变),可以导致含锌的大分子释放锌而改变锌离子的稳态^[9]。锰中毒后,低价态锰转换到高价态锰时产生大量氧化自由基。Granzotto等^[10]研究表明,N-甲基-D-天冬氨酸受体介导神经细胞的氧化自由基增多时,在锌离子增多的中间环节中起到非常重要的作用。这强烈暗示锰中毒时,脑海马组织锌的增多与锰价态转换过程中产生的自由基有密切关系。如前文所示,锰中毒时大鼠大脑海马神经细胞均出现不同程度损害。Doering等^[11]研究证明,在大鼠大脑功能损伤时,大脑内锌含量增高。其机制可能是大脑损伤后,ZnT3通过上调大脑锌的最大储存量来使大脑锌含量增高,而Lee等^[12]另一研究观察到,在海马神经元退行性或坏死病变时,Zn²⁺在细胞外聚集,同时对大鼠注射阻断ZnT3的化学物质依地酸钙二钠后,没有在大鼠海马细胞外观察到锌的聚集,提示ZnT3在锌聚集过程中发挥了重要作用,且Zn²⁺的聚集是通过上调ZnT3蛋白的水平来实现的。本实验通过检测得到中、高剂量组大鼠海马内ZnT3 mRNA及蛋白表达水平较对照组均增高,从而印证了ZnT3与锌的增高存在密切关系。

综上,我们推测当锰中毒时,海马组织中聚集了相当数量的锰,这些锰离子在由低价态转换成高价态时释放大量的氧化自由基,造成细胞内环境的改变,破坏了脑锌稳态。在脑锌稳态被破坏,海马组织锌含量增高过程中,ZnT3可能是通过上调基因及蛋白水平来发挥作用,由此可知,在锰中毒时,大鼠海马内的锌含量增高可能是ZnT3增高所致。另外,本研究只对锰中毒时脑锌含量变化及与锌转运蛋白之间的关系进行了初步研究。锰中毒为何会引起海马ZnT3蛋白含量增加以及通过何种途径或信号通路引起海马ZnT3的增高,具体机制有待进一步研究。

参考文献

- [1] Racette BA, Aschner M, Guilarte TR, et al. Pathophysiology of manganese-associated neurotoxicity[J]. Neurotoxicology, 2012, 33(4): 881-886.
- [2] Nuttall JR, Oteiza PI. Zinc and the aging brain[J]. Genes Nutr, 2014, 9(1): 379.
- [3] 郑玮,王占友.脑锌代谢与阿尔茨海默病[J].生命科学, 2012, 24(8): 833-846.
- [4] Jeong J, Eide DJ. The SLC39 family of zinc transporters[J]. Mol Aspects Med, 2013, 34(2-3): 612-619.
- [5] Huang L, Tepasamorndech S. The SLC30 family of zinc transporters—a review of current understanding of their biological and pathophysiological roles[J]. Mol Aspects Med, 2013, 34(2/3): 548-560.
- [6] Chohanadisai W, Graham DM, Keen CL, et al. Neurulation and neurite extension require the zinc transporter ZIP12 (slc39a12)[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2013, 110(24): 9903-9908.
- [7] Perez-Becerril C, Morris AG, Mortimer A, et al. Allelic variants in the zinc transporter-3 gene, SLC30A3, a candidate gene identified from gene expression studies, show gender-specific association with schizophrenia[J]. Eur Psychiatry, 2014, 29(3): 172-178.
- [8] Robison G, Zakharova T, Fu S, et al. X-ray fluorescence imaging: a new tool for studying manganese neurotoxicity[J]. PLoS One, 2012, 7(11): e48899.
- [9] 张妮,邵延坤.锌与阿尔茨海默病研究进展[J].中国老年学杂志, 2016, 36(3): 755-757.
- [10] Granzotto A, Sensi SL. Intracellular zinc is a critical intermediate in the excitotoxic cascade[J]. Neurobiol Dis, 2015, 81: 25-37.
- [11] Doering P, Stoltenberg M, Penkowa M, et al. Chemical blocking of zinc ions in CNS increases neuronal damage following traumatic brain injury (TBI) in mice[J]. PLoS One, 2010, 5(4): e10131.
- [12] Lee JY, Cole TB, Palmiter RD, et al. Accumulation of zinc in degenerating hippocampal neurons of ZnT3-null mice after seizures: evidence against synaptic vesicle origin[J]. J Neurosci, 2000, 20(11): RC79.

(收稿日期: 2016-12-22; 录用日期: 2017-03-16)

(英文编辑: 汪源; 编辑: 王晓宇; 校对: 丁瑾瑜)