

自发性癫痫大鼠脑海马两种锌转运体表达的研究

杨丹 王清华 孙凤 王占友 王玥 高慧玲 蔡际群

【摘要】 目的 探讨反复癫痫发作后的自发性癫痫大鼠(SER)与正常 Wistar 大鼠脑海马锌转运体 1 和 3 的表达与癫痫的相关性, 以及癫痫发作后脑海马内含锌神经元内锌稳态的改变情况。方法 应用 Western blot 和 RT-PCR 方法分析反复癫痫发作后的 SER 与正常 Wistar 大鼠脑海马锌转运体 1 和 3 表达情况。结果 SER 反复癫痫发作后脑海马锌转运体 1 蛋白及 mRNA 表达均明显高于正常 Wistar 大鼠, 差异有统计学意义($P<0.05$); 锌转运体 3 蛋白表达与正常 Wistar 大鼠相比无明显改变, 差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 反复癫痫发作后 SER 脑海马可能在神经元尤其突触后神经元内出现锌浓度增高现象, 锌转运体 1 表达上调可通过降低神经元内 Zn^{2+} 水平对抗癫痫发作引起的神经元损伤, 从而起到保护神经元的作用。

【关键词】 癫痫; 锌; 锌转运体

【中图分类号】 R742.1 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-8925(2009)08-0802-04

Expression of two zinc transporters in the hippocampus of spontaneously epileptic rats YANG Dan*, WANG Qing-hua*, SUN Feng*, WANG Zhan-you, WANG Yue, GAO Hui-ling, CAI Ji-qun*. *Department of Pharmaceutical Toxicology, School of Pharmaceutical Science, China Medical University, Shenyang 110001, China

Corresponding author: Cai Ji-qun, Email: jiqun586@vip.sina.com

【Abstract】 Objective To explore the correlation between hippocampal zinc transporter 1 and 3 expressions and epilepsy in spontaneously epileptic rats (ESRs) and normal rats, and observe the alternations of zinc homeostasis in zinc-containing neurons after seizure. **Methods** Western blot and RT-PCR were used to detect zinc transporter 1 and 3 expressions in the hippocampus of both ESRs with recurrent seizures and normal Wistar rats. **Results** At both the mRNA and protein levels, hippocampal zinc transporter 1 expression in ESRs with recurrent seizures was significantly higher than that in normal Wistar rats, while hippocampal zinc transporter 3 protein expression was comparable between the two groups. **Conclusion** Hippocampal zinc transporter 1 expression is up-regulated and Zn^{2+} in the hippocampal neurons, especially the post-synaptic neurons, can be elevated in ESRs after recurrent seizure. Up-regulated zinc transporter 1 expression in the hippocampus may protect the neurons against seizure-induced injuries by decreasing Zn^{2+} levels in the neurons.

【Key words】 Epilepsy; Zinc; Zinc transporter

锌是人体内重要的微量元素,其代谢紊乱可引起神经系统多种疾病。目前关于锌在癫痫中的作用已进行了多方面的研究,但目前尚无定论。对脑内癫痫易感部位组织细胞内锌水平改变的研究将为揭

示这些部位锌与癫痫的关系指明方向。

细胞锌转运途径由锌铁调控转运体(zrt, irt-like protein, ZIP) 和助阳离子扩散体(cation diffusion failitator, CDF)两大锌转运体家族来完成。

锌转运体 1(zinc transporter 1, ZnT-1)为 CDF 家族中的一员。ZnT-1 是哺乳动物锌转运体家族中首先被发现的,1995 年由 Palmiter 及 Findley^[1]提出并定名。ZnT-1 分布广泛,目前已证明其定位于胞浆膜上^[2]。脑内 ZnT-1 在脑皮质和小脑的表达最高,其次为海马、下丘脑、嗅球处,在纹状体和脑干处的表达最少^[3]。体内体外实验均证明细胞锌水平与 ZnT-1

DOI:10.3760/cma.j.issn.1671-8925.2009.08.012

基金项目:国家自然科学基金(30270535);教育部博士点基金(200601590030)

作者单位:110001 沈阳,中国医科大学药学院药物毒理学教研室[杨丹(现在沈阳医学院药理学教研室工作)、王清华、孙凤、蔡际群],组胚教研室(王占友、王玥、高慧玲)

通信作者:蔡际群,Email:jiquan586@vip.sina.com

表达间存在密切关系^[48]。另外,除 Zn^{2+} 以外的其他离子成分的改变,如 Cu^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- 等,对 ZnT-1 的锌外排作用几乎无影响,说明 ZnT-1 对锌的外排不受这些离子的干扰,是专一性的锌转运体^[9]。

锌转运体 3(zinc transporter 3, ZnT-3)是锌离子的专一性转运体。其在脑内主要分布于谷氨酸能神经元的突触及轴突上,现已证实 ZnT-3 蛋白在海马苔藓纤维与锌的分布一致,由此可见 ZnT-3 可能对这些部位的锌转运有重要作用。ZnT-3 蛋白被证实定位于突触前的囊泡膜上,提示其可能参与将锌转入突触囊泡。敲除 ZnT-3 基因的小鼠在其囊泡中不出现组化反应^[10]。

近年研究发现许多癫痫患者均有脑内海马结构异常,且癫痫的发作常来自海马,因此海马已成为癫痫研究的热点^[11]。

本研究对一种理想的研究癫痫的动物模型—自发性癫痫大鼠(spontaneously epileptic rat, SER)进行了海马 ZnT-1 和 ZnT-3 表达的癫痫相关差异的实验分析,以期揭示锌与癫痫的关系提供更多的实验依据。

材料和方法

一、实验动物、试剂与仪器

SER 16 只,正常 Wistar 大鼠 16 只,均 10 周龄,雌雄各半,由中国医科大学实验动物部提供。

TRIzol (美国 Invitrogen 公司), TaKaRa RNA PCR Kit(AMV)试剂盒(日本 TaKaRa 公司),ZnT-1 及 β -actin 特异性引物由日本 TaKaRa 公司设计合成,ZnT-1 抗体及 ZnT-3 抗体由中国医科大学组胚教研室王占友教授惠赠,辣根过氧化物酶标记二抗(北京中杉公司),ECL 发光显色液(美国 PIERCE 公司),阿拉伯胶、甲苯氨蓝、硫代硫酸钠、对苯二酚、乳化银等其余试剂均为国产分析纯。

PCR 扩增仪(美国 Biometra 公司),DYY-5 型稳压稳流电泳仪(北京六一仪器厂),Tanon Eps300 电泳仪,5810R 低温高速离心机(德国 Eppendorf 公司),胶片(柯达 MXG-1)。

二、Western blot 半定量检测 ZnT-1、ZnT-3 蛋白表达

取 SER 8 只、正常 Wistar 大鼠 8 只进行 Western blot 半定量检测海马 ZnT-1 和 ZnT-3 蛋白表达。大鼠用 200 g/L 乌拉坦腹腔麻醉后迅速冰上取海马,提取每只大鼠海马组织膜蛋白。Lowry 法进行蛋白定量。每个样品取 30 μ g 蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,浓缩胶浓度 5%,分离胶浓度

10%,电压 110 V。电泳后将蛋白以 50 V 电压稳流转印至 PVDF 膜上。

膜在 5%脱脂奶粉溶液中室温孵育 1 h 后加入抗体,一抗及其二抗孵育条件:ZnT-1 一抗(以 TBST 按 1:500 稀释),37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h,ZnT-1 二抗为辣根过氧化物酶标记兔抗山羊 IgG (以 TBST 按 1:5000 稀释),室温孵育 2 h;ZnT-3 一抗(以 TBST 按 1:1000 稀释)4 $^{\circ}$ C 过夜孵育,ZnT-3 二抗为辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG (以 TBST 按 1:5000 稀释),室温孵育 2 h;以 GAPDH 为内参,GAPDH 一抗(以 TBST 按 1:20 000 稀释)4 $^{\circ}$ C 过夜孵育,GAPDH 二抗为辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG (以 TBST 按 1:5000 稀释),室温孵育 2 h。ECL 化学发光法检测,X 胶片曝光显影,分析软件分析特异性条带灰度值。

三、RT-PCR 半定量检测 ZnT-1 mRNA 表达

取 SER 8 只,正常 Wistar 大鼠 8 只,进行 RT-PCR 半定量检测海马 ZnT-1 mRNA 表达。大鼠以 200 g/L 乌拉坦腹腔麻醉后迅速冰上取海马。海马组织置于经去 RNA 酶处理的 1.5 mL 离心管中,加入 800 μ L TRIzol,按说明书操作,提取海马总 RNA。取 1 μ g 总 RNA,参照日本 Takara 公司 RT-PCR 试剂盒说明书进行,RT 反应条件:42 $^{\circ}$ C 30 min、99 $^{\circ}$ C 5 min,反应体积为 10 μ L。PCR 反应体积为 50 μ L,除 RNA 样本外加所有试剂的反应管作为空白对照,以等量的 DEPC 水代替 RNA 样本。PCR:以 β -actin 为内参照,上游引物:5'-GTGTTGTCCCTGTATGCCTCTG-3',下游引物:5'-TGTCACCGCACGATTTCCCT-3',片段长度 220 bp。另设计一组引物专门分析 ZnT-1 mRNA 的表达,上游引物:5'-GATGTTGAAGGAGTGGAGGAAGT-3',下游引物:5'-GATTCGGGCTGTTTGTGTTGG-3',片段长度 434 bp。反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min 后,94 $^{\circ}$ C 变性 30 s、56 $^{\circ}$ C 退火 30 s、72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,共扩增 30 个循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物用 2%琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像分析仪分析结果。

四、统计学分析

采用 SPSS11.0 软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较用 t 检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

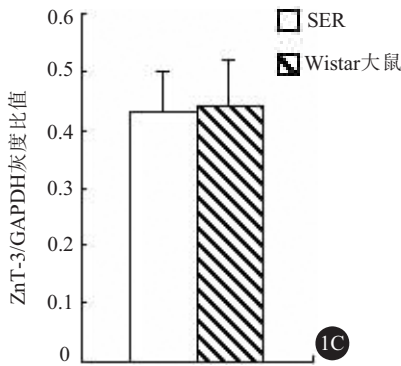
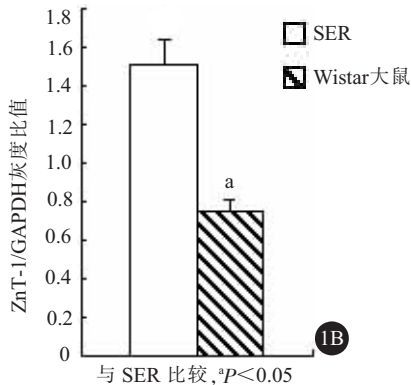
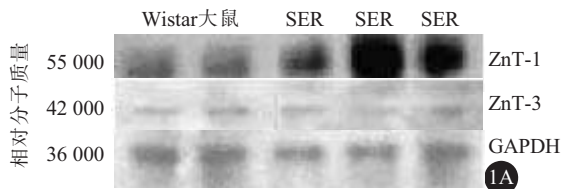
一、Western blot 半定量检测海马 ZnT-1 和 ZnT-3 蛋白表达结果

Western blot 分析发现,SER 海马 ZnT-1 蛋白灰度值与内参 GAPDH 灰度值的比值高于 Wistar 大鼠海马 ZnT-1 蛋白灰度值与内参 GAPDH 灰度值的

比值,差异有统计学意义($t=15.024, P=0.000$),即 SER 海马 ZnT-1 蛋白表达上调;SER 海马 ZnT-3 蛋白灰度值与内参 GAPDH 灰度值的比值与 Wistar 大鼠海马 ZnT-3 蛋白灰度值与内参 GAPDH 灰度值的比值相比无明显变化,差异无统计学意义($t=0.255, P=0.802$),即 SER 海马 ZnT-3 蛋白表达无改变。(图 1)

二、RT-PCR 半定量检测海马 ZnT-1 mRNA 表达结果

RT-PCR 分析发现, SER 海马 ZnT-1 mRNA 灰度值与内参 β -actin 灰度值的比值高于正常 Wistar 大鼠海马 ZnT-1 mRNA 灰度值与内参 β -actin 灰度值的比值 ($t=8.860, P=0.000$),即 SER 海马 ZnT-1 mRNA 表达上调。(图 2)



1A: Western blot 分析海马 ZnT-1 和 ZnT-3 蛋白表达显影图; 1B: ZnT-1 蛋白相对表达分析; 1C: ZnT-3 蛋白相对表达分析

图 1 Western blot 分析海马 ZnT-1 和 ZnT-3 蛋白表达

Fig.1 Zinc transporter 1 and 3 protein expressions in the hippocampus of spontaneously epileptic rats and normal Wistar rats detected by Western blot

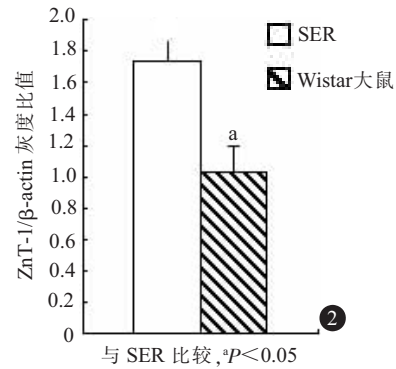


图 2 ZnT-1 mRNA 相对表达分析

Fig.2 Relative Zinc transporter 3 mRNA expression in the hippocampus of spontaneously epileptic rats and normal Wistar rats

讨 论

癫痫动物模型在癫痫的病因学、发病机制、药理学等研究中具有重要的实用价值。既往研究表明有 30%~40% 的癫痫病因与遗传因素有关,因此遗传性癫痫动物模型在癫痫的研究中占有重要地位。本研究选用癫痫动物模型—SER 为双基因突变大鼠,由 tremor 大鼠杂合子 (tm/+) 和 zitter 大鼠纯合子 (zi/zi) 杂交得到。出生 8 周后 SER 自发性地出现癫痫大发作和小发作,对于抗癫痫药物的反应同癫痫患者类似,因此是研究遗传性癫痫的理想动物模型^[12,13]。本实验所用大鼠为 10 周龄。此周龄 SER 均可自发性地每日多次反复出现癫痫大发作和小发作,因此可通过其与正常大鼠的对照实验研究癫痫发作后大鼠脑内基因及蛋白变化的情况。

本研究通过 Western blot 技术发现 SER 反复癫痫发作后脑内海马 ZnT-1 蛋白表达上调。用 RT-PCR 技术半定量分析出 SER 脑内海马 ZnT-1 mRNA 的表达亦上调,故表明 SER 脑内海马 ZnT-1 在蛋白和基因两个层面表达均升高,显示了很好的相关性。

ZnT-1 被认为在减弱细胞内锌毒性方面具有重要作用。细胞膜上的 ZnT-1 在细胞处于高锌环境时,可促使胞内锌外排且外排作用具有持续性;ZnT-1 的存在能应对胞内游离锌的增高,长期胞内游离锌增多则 ZnT-1 的表达增多。反复癫痫发作的 SER 海马内的 ZnT-1 表达增多说明在其海马神经元胞体内及突触间隙可能存在游离锌浓度增高现象。这可能是由于反复癫痫发作引起突触前神经末梢释放大量锌离子,引起突触间隙游离锌浓度增高,进而引起海马神经元尤其是突触后神经元胞体内游离锌离子浓度增高。神经元胞体内游离锌浓度增高能引起神经元损伤甚至死亡^[14],而 ZnT-1 表达增多是对于

反复癫痫发作引起神经元损伤的一种防御反应。

本研究对 ZnT-3 应用 Western blot 技术进行表达分析,结果显示反复癫痫发作的 SER 海马 ZnT-3 蛋白表达与正常 Wistar 大鼠相比没有改变。ZnT-3 蛋白在海马苔藓纤维突触囊泡的囊泡膜上有高表达,ZnT-3 具有将胞内锌转运入囊泡的作用,苔藓纤维突触囊泡锌水平由其膜上 ZnT-3 的表达量决定,ZnT-3 对锌具有高度专一性。因此我们的结果说明海马苔藓纤维突触囊泡中锌水平没有发生持续性改变。

综上所述,笔者认为反复癫痫发作的 SER 脑海马神经元尤其是突触后神经元内可能存在锌离子浓度增高现象,而海马苔藓纤维突触囊泡中锌水平没有发生持续性改变;SER 脑海马 ZnT-1 表达上调在癫痫的反复发作中起到保护神经元的作用。本研究的意义在于为揭示锌与癫痫的关系提供了一种新的思路。

参 考 文 献

- [1] Palmiter RD, Findley SD. Cloning and functional characterization of a mammalian zinc transporter that confers resistance to zinc [J]. EMBO J, 1995, 14(4): 639-649.
- [2] McNamara JO. Emerging insights into the genesis of epilepsy[J]. Nature, 1999, 399(6738 Suppl): A15-21.
- [3] Sekler I, Moran A, Hershinkel M. et al. Distribution of the zinc transporter ZnT-1 in comparison with chelatable zinc in the mouse brain[J]. J Comp Neurol, 2002, 447(3): 201-209.
- [4] Palmiter RD. Protection against zinc toxicity by metallothionein and zinc transporter 1[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(14): 4918-4923.
- [5] Tsuda M, Imaizumi K, Katayama T, et al. Expression of zinc transporter gene, ZnT-1, is induced after transient forebrain ischemia in the gerbil[J]. J Neurosci, 1997, 17(17): 6678-6684.
- [6] Segal D, Ohana E, Besser L, et al. A role for ZnT-1 in regulating cellular cation influx [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 323(4): 1145-1150.
- [7] 秦海宏,沈慧,王福铤,等. 锌对原代培养海马神经元锌转运体 1 和金属硫蛋白 mRNA 表达的影响[J]. 第二军医大学学报, 2004, 25(1): 68-71.
- [8] Ohana E, Sekler I, Kaisman T, et al. Silencing of ZnT-1 expression enhances heavy metal influx and toxicity[J]. Mol Med, 2006, 84(9): 753-763.
- [9] Cousins RJ, McMahon RJ. Integrative aspects of zinc transporters [J]. Nutr, 2000, 5(130): 1384-1387.
- [10] Wenzel HJ, Cole TB, Born DE, et al. Ultrastructural localization of zinc transporter-3 (ZnT-3) to synaptic vesicle membranes within mossy fiber boutons in the hippocampus of mouse and monkey [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94(23): 12676-12681.
- [11] Imamura S, Tanaka S, Akaike K, et al. Hippocampal transection attenuates kainic acid-induced amygdalar seizures in rats[J]. Brain Res, 2001, 897(1-2): 93-103.
- [12] Sasa M, Ohno Y, Ujihara H, et al. Effects of antiepileptic drugs on absence-like and tonic seizures in the spontaneously epileptic rat, a double mutant rat[J]. Epilepsia, 1988, 29(5): 505-513.
- [13] Hanaya R, Sasa M, Ujihara H, et al. Effect of antiepileptic drugs on absence-like seizures in the tremor rat[J]. Epilepsia, 1995, 36(9): 938-942.
- [14] Hashemi M, Ghavami S, Eshraghi M, et al. Cytotoxic effects of intra and extracellular zinc chelation on human breast cancer cells [J]. Eur J Pharmacol, 2007, 557(1): 9-19.

(收稿日期:2009-01-28)

(本文编辑:卢丽玉)

第九届世界神经调控大会

目前神经调控治疗(皮刺激治疗或化学泵的植入)在医学临床领域中的应用日益广泛,已经涉及到神经内、外科,疼痛科,麻醉科,生物工程,中医针灸等多种相关学科。为加快世界各国神经调控技术发展,由世界神经调控学会(INS)主办的第九届世界神经调控大会(9th World Congress of the INS)将于 2009 年 9 月 12 日至 18 日在韩国首尔市召开,会上将由各领域带头人及创新学者作学术报告,为大家提供交流前沿信息的机会,欢迎各学科医生积极参加。详情可登陆 <http://neuromodulation.com/conference.html> 查询。

注:INS 会员可享受会议注册费优惠,会员加入事宜可通过邮件咨询,邮箱地址:phoebeliu3@yahoo.com.cn

· 消息 ·