

文章编号:1001-0580(2002)01-0042-03

【实验研究】

小鼠肾脏中金属硫蛋白基因诱导表达的时程变化*

复旦大学公共卫生学院劳动卫生学教研室(上海 200032) 逢兵 金泰¹ 蒋学之

摘要:目的 探讨重复性注射 CdMT 诱导小鼠肾脏 MT 基因表达的时程变化。方法 采用 RT-PCR 方法半定量检测重复性短时间间隔皮下注射镉金属硫蛋白(CdMT)染毒后小鼠肾皮质金属硫蛋白(MT1、MT2)基因表达的时程变化。结果 自 CdMT 染毒后 12h,与对照组相比肾皮质 MT1 基因表达有增强的趋势,染毒后 12h 及 24h,肾皮质 MT2 基因表达明显增强,其表达高峰均出现在 CdMT 染毒后 24h,至 168h MT1 与 MT2 基因表达均恢复到基准水平。结论 重复性短时间间隔皮下注射 CdMT 能够诱导小鼠肾皮质 MT1 及 MT2 基因的表达,并且 MT1 及 MT2 基因表达的时程变化基本一致。

关键词:镉金属硫蛋白;MT 基因表达;RT-PCR

中图分类号:R135.1 文献标识码:A

Time - Course Changes of Metallothionein Gene Expression Induced by Cadmium Metallothionein in Mice's Kidney

PANG Bing, et al. Department of Occupational Health, School of Public Health, Fudan University (Shanghai 200032, China)

Abstract: Objective Time - course of gene expression of metallothionein (MT1 and MT2) in kidney conex from mice were measured. **Methods** Following an initial high CdMT dose and four subsequent low doses (50 + 4 × 25μg/kg) administered subcutaneously at an interval of 2h, with semi - quantitative RT - PCR. **Results** The MT1 gene expression level was higher at 12 h and returned its basal level at 168h after first injection. The MT2 gene expression level was significantly higher at 12 and 24h and also returned its basal level at 168h. The MT1 and MT2 gene expression level reached to the maximum at 24h. **Conclusion** MT1 and MT2 genes in mice's kidney cortex from mice could be induced by multiple short - interval CdMT injections. Time course of MT1 and MT2 gene expression was parallel.

Key words: cadmium metallothionein; MT gene expression; RT - PCR

镉是环境与职业污染的主要金属之一,并可对人体健康造成严重危害。肾脏是镉毒性作用的主要靶器官。金属硫蛋白(metallothionein, MT),是镉在体内运输、储存的主要蛋白,在镉的毒性作用中起着关键作用。在哺乳类动物中,MT1 和 MT2 是 MT 基因家族的两种主要类型,可在包括肾脏在内的组织中表达^[1,2]。本研究利用已建立的重复性、短时间间隔注射 CdMT 诱导的小鼠肾脏损伤动物模型来探讨重复性注射 CdMT 诱导小鼠肾脏 MT 基因表达的时程变化。

1 材料与方法

1.1 试剂 镉标准品购于德国 Merck 公司, CdMT(Cd/Zn > 1:1; 不含 Ca)由瑞典 Umea 大学环境医学系提供^[3]。1kb DNA ladder 由 Life Technologies 公司提供,总 RNA 分离试剂盒购自 Biotex Technologies 公司,1st Strand cDNA Synthesis kit for RT-PCR 试剂盒购自 Boehringer Mannheim 公司,寡核苷酸引物由瑞典 Cybergen AB 公司合成,碱基顺序如下^[3,4]: - actin sense primer: 5' - ATGGATGACGATATCGCT - 3', - actin antisense primer: 5' ATGAGGTA GTCTGTCA GGT - 3', 产物长度为 569bp; MT1 sense primer: 5' - ATGGACCCCAACT-GCTCCTGCTCCACC - 3', MT1 antisense primer: 5' - GGGTGAAGTGTATA GGAA GACGCTCC - 3', 产物长度为 259bp; MT2 sense primer: 5' - ATGGACCCCAACTGCTCCTGTGCCTCC - 3', MT2 antisense primer: 5' - GGTCATTACACAGATGTGGGACCC - 3' 产物长度为 225bp。其它试剂均购自 Sigma 公司。

1.2 实验动物 22 只雌性 Umea 小鼠,体重 20~24g,由瑞典 Umea 大学组织医学系提供。随机分成 6 组,每组 3~4 只动物。染毒前适应饲养 2w,采用背部皮下注射的方式染毒,

整个实验过程均喂 EWOSR34 饲料(Ca 0.9%, Mg 0.2%, Zn 39ppm)。根据预实验的结果,实验组小鼠分别给予首次 50μg/kg 和随后重复 4 次相同 25μg/kg 剂量的 CdMT,每次间隔时间为 2h,对照组按体重注射相应体积的生理盐水。分别在首次染毒后 12、24、72、168 和 336h 处死动物,并迅速分离肾皮质。

1.3 肾皮质及肝组织中镉的测定 取肾皮质及肝组织 30~50mg 用浓硝酸消化过夜,缓慢加热蒸发近干,用去离子水稀释后,火焰原子吸收法测定^[4](仪器型号: Varian AA - 875)。镉、钙标准品购于 Merck 公司。

1.4 尿总蛋白测定 缩二脲法测定^[5],小牛血清蛋白(BSA)作为标准,购于 Sigma 公司。

1.5 总 RNA 提取 总 RNA 的提取根据 Biotex 公司 RNA 分离试剂盒方法进行。紫外分光法测定 RNA 纯度和含量。

1.6 RT-PCR 反应 cDNA 合成: 使用 Boehringer Mannheim 公司 1st Strand cDNA Synthesis kit for RT-PCR 试剂盒方法,操作如下:在 0.5ml Eppendorf 管中加入逆转录缓冲液 2.0μl (10 ×), 4.0μl MgCl₂ (25mmol/L), 2.0μl dNTP 混合物 (10mmol/L), 2.0μl Primer oligo - p (dT)₁₅ (0.8μg/μl), 1.0μl RNA 酶抑制剂 (50 单位/μl), 0.8μl AMW 逆转录酶, 1μg 总 RNA, 用无 RNA 酶消毒水调整到总体积为 20μl, 充分混匀,在 PCR 仪中合成 cDNA,合成条件: 25 10min, 42 60min, 99 终止反应 5min。

PCR 反应: 经对 PCR 条件(循环次数等,图 1)优化选择后,PCR 反应条件如下: 设立 50μl 的反应体系,内含 4μl cDNA, 1μl dNTP 混合物 (10mmol/L), 2μl MgCl₂ (25mmol/L), 1μl Taq 多聚酶, MT 及 - actin 上、下游引物各 1μl, 10 × 缓冲液 5μl, 用 DEPC 水调整到总体积 50μl。以 - actin 为内参照,在同一反应体系中分别对 MT1 和 - actin 及 MT2 和 -

*欧共体科学研究基金(ERB 3514PL971430)和瑞典 STINT 基金(STINT - UMEA1998)资助项目

actin 进行扩增。扩增条件:MT1 和 β -actin:95 °C 灭活逆转录酶 2min,然后扩增 27 个循环,每个循环包括:95 °C 变性 1min,52 °C 退火 1min,72 °C 延伸 1min。27 个循环后 72 °C 终末延伸 7min。MT2 和 β -actin:95 °C 灭活逆转录酶 2min,然后扩增 28 个循环,每个循环包括:95 °C 变性 1min,54 °C 退火 1min,72 °C 延伸 1min。28 个循环后 72 °C 终末延伸 7min。

PCR 产物半定量:反应结束后取 10 μ l PCR 产物于含 0.5 μ g/ml 溴乙啶的 1.5%琼脂糖凝胶中电泳,Gelfoto 图象分析系统进行扫描,GFS1500-A 软件分析,分别计算 MT1 与 β -actin 及 MT2 与 β -actin 吸收峰比值,比较各组间吸收峰面积比值的大小。

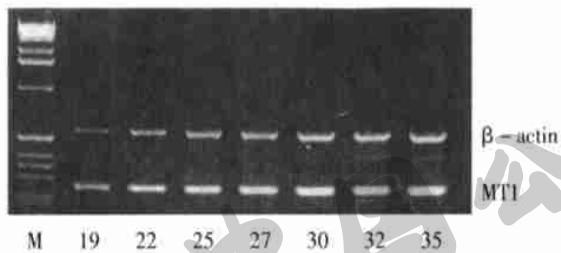


图 1 扩增循环次数对 MT1 与 β -actin RT-PCR 扩增结果的影响
 在同一个反应体系中,用同一 cDNA 模板,设置不同的循环次数(19 - 35)的 MT1 与 β -actin RT-PCR 产物,M: Marker(1kb), β -actin:569bp,MT1:259bp。

1.7 统计方法 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS9.0 for Windows 进行方差分析及 Post Hoc 组间比较。

2 结果

2.1 重复性 CdMT 染毒后不同时间肾皮质镉含量的变化(表 1) 表 1 显示,CdMT 染毒后 12h 直至 336h,肾皮质中镉的含量均明显升高,而肝脏中全程均未测出镉,说明皮下重复性、短时间间隔皮下注射 CdMT 后,CdMT 主要经血液直接进入肾脏。

表 1 重复性 CdMT 染毒后不同时间肾皮质中镉含量的变化($\bar{x} \pm s$)

时间(h)	动物数(只)	肾皮质镉含量(μ g g^{-1})
0	3	NS
12	4	7.28 \pm 2.56
24	4	8.09 \pm 2.86
72	4	10.31 \pm 2.42
168	4	9.41 \pm 3.28
336	3	7.49 \pm 0.84

表 2 CdMT 染毒后不同时间肾皮质 MT1 及 MT2 基因的表达($\bar{x} \pm s$)

时间(h)	动物数(只)	MT1/ β -actin (OD/OD)	MT2/ β -actin (OD/OD)
0	3	1.07 \pm 0.08	1.17 \pm 0.17
12	4	1.18 \pm 0.07	1.63 \pm 0.10 *
24	4	1.23 \pm 0.19	1.64 \pm 0.14 *
72	4	1.21 \pm 0.20	1.34 \pm 0.13
168	4	1.09 \pm 0.22	1.00 \pm 0.17
336	3	1.10 \pm 0.17	1.15 \pm 0.31

注:与对照组比较 * $P < 0.05$

2.2 CdMT 染毒后不同时间肾皮质 MT1 及 MT2 基因的表达 利用 RT-PCR 技术和设定的引物,在上述选定的实验条件下,每个实验动物的肾皮质组织分别得到 MT1(259bp)及 MT2(225bp)和 β -actin(569bp) 两对扩增产物。结果表明,自首次 CdMT 染毒后 12h,与对照组相比肾皮质 MT1 基因表达有增强的趋势,至 168h MT1 基因表达恢复到基准水平。CdMT 染毒后 12h 及 24h,肾皮质 MT2 基因表达明显增强,至 168h MT2 基因表达恢复到基准水平。MT1 与 MT2 基因的表达在 CdMT 染毒后 24h 出现高峰(表 1)。

2.3 CdMT 染毒后不同时间尿蛋白的变化(图 2) 图 2 可见,CdMT 染毒后,随着时间的增加尿蛋白有升高的趋势,染毒后 24h 及 168h 尿蛋白含量显著高于对照组,尿蛋白的高峰均出现在染毒后 168h,并且直至染 CdMT 后 336h 尿蛋白含量也高于相应的对照组。

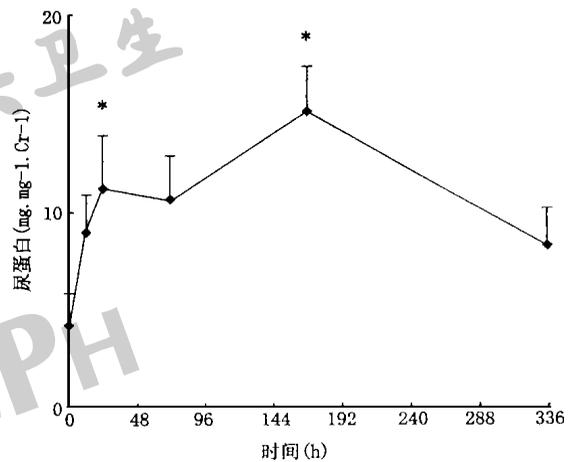


图 2 CdMT 染毒后不同时间尿蛋白的变化

3 讨论

MT 基因家族主要包括 4 大类,MT1 和 MT2 是两种主要的类型,其在多数组织中均可表达^[1,6]。金属硫蛋白是镉在体内运输、储存的主要蛋白,在镉的毒性作用中起着关键的作用。金属镉具有调控肾脏 MT 基因表达的能力,经血液循环进入肾皮质外源性的 CdMT 在肾小管溶酶体中降解分离并释放出游离的镉,同样能够诱导内源性 MT 基因表达。本结果显示,自 CdMT 染毒后 12h,与对照组相比,肾皮质 MT1 基因表达有增强的趋势,至 168h MT1 基因表达恢复到基准水平。CdMT 染毒后 12h 及 24h,肾皮质 MT2 基因表达明显增强,至 168h MT2 基因表达也恢复到基准水平。MT1 与 MT2 基因表达的高峰均出现在 CdMT 染毒后 24h。说明:重复性短时间间隔皮下注射 CdMT 能够诱导小鼠肾皮质 MT1 及 MT2 基因的表达,并且 MT1 及 MT2 基因表达的时程变化基本一致。

尿蛋白是反映肾脏损伤的指标。本研究发现,在 CdMT 染毒后尿蛋白含量增加并在 24h 出现第一个峰值,可能与 CdMT 的重吸收过程中造成肾小管上皮细胞膜的损伤有关^[7]。在染毒后 168h 尿蛋白出现第二个峰值,可能与大量镉进入肾脏后,虽然镉对 MT 具有很强的诱导能力,并且新合成的 MT 通过与镉结合形成 CdMT 拮抗镉的肾脏毒性作用,然而肾小管细胞 MT 基因的诱导表达及新合成 MT 能力的不足,导致游离的镉在肾小管细胞中蓄积,造成细胞内钙稳态失调等因素有关。

作者简介:逢兵(1965-),男,山东人,副教授,博士,从事劳动卫生、毒理学、金属毒理与分子毒理学研究。

参 考 文 献

- [1] Vallee BL. The function of metallothionein[J]. Neurochem Int, 1995,28.
- [2] Searle PF, et al. Regulation, linkage, and sequence of mouse metallothionein and genes[J]. Mol Cell Biol, 1984,4:1221.
- [3] Leffler PE, et al. Nephrotoxic impact of multiple short - interval cadmium - metallothionein injections in the rat [J]. Toxicology,

- 1996,112:151.
 - [4] Susanne S. Determination of cadmium, lead, zinc, copper and calcium in human placenta by atomic absorption spectrophotometry [M]MSweden: Miljomedicin, 1996:1.
 - [5] Pisca M. Proteinuria in chronic cadmium poisoning[J]. Arch Environ Health, 1962,5:325.
 - [6] Kagi JH, Schaffer A. Biochemistry of metallothionein[J]. Biochemistry, 1988,27:8509.
 - [7] Cherian MG. Rat kidney epithelial cell culture for metal toxicity studies[J]. In vitro Cell Dev Biol, 1985,21:505.
- (2000-11-13 收稿 2000-12-10 修回 李溪莹编校)

文章编号:1001-0580(2002)01-0044-01

【实验研究】

磷脂酰胆碱对小鼠过氧化损伤的保护作用*

山东曲阜师范大学生物系(273165) 张祥沛

中图分类号:R545.1

文献标识码:A

有研究表明,脂类物质对生物体多种代谢活动具有积极的影响^[1-3],其中磷脂酰胆碱(phosphatidyl choline, PC)在延缓衰老、延长寿命方面的作用日益为人们所认识。我们利用本实验室提取精制的 PC^[4],以小鼠为试验动物,对其影响心、脑组织中超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性、过氧化脂质(lipid peroxide, LPO)和脂褐素(lipofuscin)含量进行了分析比较。结果表明:PC能有效提高心、脑组织 SOD 活性,降低 LPO 和 lipofuscin 含量,具有明显地抗氧化、抗自由基、拮抗过氧化损伤作用。

材料与方 法 (1)实验动物:采用健康昆明种小鼠,年龄 60 天左右,体重 24 ± 2.7g,雌雄不限,共 40 只,由济南北园实验动物养殖场提供。(2)饲料喂养:设立对照组和实验组,每组 10 只。对照组饲养采用标准基础饲料(符合 AOAC 动物营养标准)。实验组采用基础饲料添加 PC, PC 终含量为 200mg/kg。对照组和实验组饲养环境条件一致,温度(25 ± 1),相对湿度 70%。(3)指标测定:实验 6 周后采用断头法处死动物,分别取心肌组织和脑组织。SOD 采用邻苯三酚法;LPO 采用硫代巴比妥酸(TBA)比色法;脂褐素采用 Sohal 法^[5]。对所有测量数据进行统计学处理^[6],以 $\bar{x} \pm s$ 表示,差异显示性以 *t* 检验判定。

结 果 (1)PC 对小鼠心、脑组织 SOD 活性的影响:实验组小鼠心肌组织和脑组织的 SOD 活性均高于对照组,相比之下,心肌组织 SOD 活性提高幅度较大(9.2%, $P < 0.01$)。(2)PC 对小鼠心、脑组织 LPO 水平的影响:实验组小鼠心肌组织和脑组织 LPO 含量均低于对照组,但同样表现出心肌组织 LPO 含量显著降低(28.03%, $P < 0.01$),脑组织 LPO 含量降低也较显著(19.3%, $P < 0.05$)。(3)PC 对小鼠心、脑组织脂褐素含量的影响:小鼠心、脑组织脂褐素含量实验组比对照组显著降低($P < 0.01$),平均降低 30.93%和 33.79%。

讨 论 氧自由基导致衰老是目前解释衰老机理颇受重视的一种理论。PC 延缓衰老、延长寿命的作用途径,很重要的一方面就在于它可有效的清除自由基,减少脂质过氧化物的形成。实验结果表明,饲喂添加 PC 饲料的小鼠,心、脑组织

SOD 活性显著提高(心组织提高 9.2%, 脑组织提高 5.3%),而 SOD 则是体内直接清除自由基的主要成分之一,其含量和活性与其寿命有明显的相关性^[7]。脂质过氧化物在实验组小鼠的心、脑组织中的显著降低也充分说明了 PC 可有效清除自由基、减少脂质过氧化物的形成,具有拮抗过氧化损伤的作用。

脂褐素(老年色素或老年斑)是生物体内过氧化作用形成的脂质过氧化物,进而产生丙二醛,再与磷酸、蛋白质等作用而成为不溶性色素沉积。脂褐素一方面在大脑等组织细胞内大量积累,给神经系统带来较大损害,另一方面,可引起机体各种组织、细胞、脏器的损伤,带来多种疾病,从而导致生物体的衰老与死亡。因此,脂褐素含量的多少是体现体内脂质过氧化程度的重要直观指标。实验表明,PC 可有效降低心、脑组织中脂褐素的含量,从而进一步说明 PC 对过氧化损伤具有保护作用。

作者简介:张祥沛(1960-),男,山东曲阜人,副教授,学士,主要从事细胞生理学研究。

参 考 文 献

- [1] 徐承水,张向峰.脂类混合物对人体皮肤的生物学效应[J]. 皮肤病与性病,1997,19(3):1.
 - [2] 徐承水,党本元.神经醇磷脂的细胞病理[J]. 中国病理生理杂志,1999,15(1):87.
 - [3] 徐承水.神经醇磷脂对皮肤角质层水分含量的影响[J]. 环境与健康杂志,1999,16(4):215.
 - [4] 徐承水,党本元,李亚.猪脑组织中磷脂的综合提取研究[J]. 曲阜师范大学学报,1998,24(1):98.
 - [5] Sohal RS, Donato H. Effect experimentally altered lifespans spans on the accumulation of fluorescent age pigment in the housefly[J]. Musca domestica. Experimental Gerontology, 1978,13:335.
 - [6] 杜荣寿.生物统计学[M].北京:高等教育出版社,1985:10.
 - [7] 马春力,崔凤起.西洋参茎叶皂甙对老龄大鼠血清和组织中超氧化物歧化酶的作用[J]. 老年学杂志,1993,13(5):304.
- (2000-11-06 收稿 2000-12-10 修回 李溪莹编辑 赵淑艳校对)

*山东省教委资助项目