

# 锌离子与锌转运体 6 在 APP/PS1 转基因小鼠小脑内的分布

张丽红 于丹 王辛 郑玮 荣明 王占友<sup>△</sup>

(中国医科大学基础医学院组织胚胎学教研室 辽宁 沈阳 110001)

**【摘要】 目的** 研究游离锌离子和锌转运体 6(zinc transporter 6, ZnT6)在 APP/PS1 转基因小鼠小脑内的分布。**方法** 应用浸入式金属自显影技术(AMG)和免疫组织化学染色标记游离锌离子、ZnT6 和淀粉样前体蛋白(amyloid precursor protein, APP),通过免疫荧光染色和共聚焦激光扫描显微镜观察 ZnT6 和  $\beta$ -淀粉样蛋白( $\beta$ -amyloid,  $A\beta$ )在老年斑内的定位,并分析锌离子、ZnT6 与 APP 和  $A\beta$  分布的相关性。**结果** 游离锌离子、ZnT6 和 APP 免疫阳性反应产物均定位于老年斑内,老年斑主要分布于小脑分子层,浦肯野细胞层和颗粒层分布较少;ZnT6 和  $A\beta$  荧光双标的结果进一步证实两者共存于老年斑内。**结论** APP/PS1 转基因小鼠小脑  $A\beta$  老年斑内有大量的 ZnT6 蛋白表达,并聚集着大量的锌离子,提示锌离子可能参与小脑  $A\beta$  老年斑的形成,而 ZnT6 在老年斑内锌离子的聚集过程中起着重要的调节作用。

**【关键词】** 锌离子; 锌转运体 6(ZnT6);  $\beta$ -淀粉样蛋白( $A\beta$ );  $\beta$ -淀粉样蛋白前体蛋白(APP); APP/PS1 转基因小鼠; 小脑

**【中图分类号】** R 322.81 **【文献标志码】** A

## Distribution of zinc ions and zinc transporter-6 in the APP/PS1 transgenic mouse cerebellum

ZHANG Li-hong, YU Dan, WANG Xin, ZHENG Wei, RONG Ming, WANG Zhan-you<sup>△</sup>  
(Department of Histology and Embryology, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China)

**【Abstract】 Objective** To investigate the distribution of free zinc ions and zinc transporter-6 (ZnT6) in the APP/PS1 transgenic mouse cerebellum. **Methods** Immersion autometallography (AMG) and immunohistochemistry were used to analyze the distribution of free zinc ions, amyloid precursor protein (APP) and ZnT6 in the APP/PS1 transgenic mouse cerebellum, respectively. Immunofluorescence and confocal laser scanning microscopy were used to analyze the relation between ZnT6 and  $A\beta$  in senile plaques. **Results** Zinc ions, APP and ZnT6 were mainly located in the amyloid palques, which were predominately located in the molecular layer. The Purkinje cell layer and granular layer only contained a few plaques. Confocal microscopic results revealed a colocalization of ZnT6 and  $A\beta$  in the senile plaques. **Conclusions** The abundant expression of ZnT6 and accumulation of zinc ions in the  $\beta$ -amyloid plaques of the APP/PS1 transgenic mouse cerebellum, suggesting that zinc ions might be involved in the formation of senile plaques, while ZnT6 might play an important role in the regulation of zinc accumulation during the pathological process of Alzheimer's disease.

**【Key words】** zinc ions; zinc transporter-6 (ZnT6);  $\beta$ -amyloid( $A\beta$ ); amyloid precursor protein (APP); APP/PS1 transgenic mouse; cerebellum

$\beta$ -淀粉样蛋白( $\beta$ -amyloid, A $\beta$ )老年斑的形成是阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)最典型的神经病理改变。近年来的研究表明,在AD病人尸检大脑<sup>[1]</sup>及AD转基因模型小鼠<sup>[2]</sup>大脑内的A $\beta$ 老年斑中均存在大量的锌离子;与脑锌代谢密切相关的锌转运体(zinc transporter, ZnT)家族中,ZnT1, ZnT4和ZnT6在AD患者大脑内的表达明显增强<sup>[3,4]</sup>。提示锌离子和ZnT可能共同参与了A $\beta$ 沉积和老年斑的形成过程。在中枢神经系统内,锌离子主要分布于含锌神经元轴突终末的突触小泡内,且主要位于前脑的一定区域,如海马、杏仁体和新皮质中,小脑内游离锌的含量明显低于其他部位<sup>[5]</sup>,但在AD患者和转基因小鼠的小脑内同样有大量的老年斑形成<sup>[6]</sup>。为明确小脑内老年斑的形成是否同样与锌离子密切相关,本研究以APP/PS1( $\beta$ -淀粉样蛋白前体蛋白/早老素1)转基因小鼠为研究对象,检测了锌离子及ZnT6在小脑老年斑内的定位分布,为进一步探讨锌离子和ZnT6在AD发病和病理机制中的重要作用提供可靠的形态学依据。

## 材料和方法

**实验动物** APP/PS1转基因小鼠(B6C3-Tg85Dbo/J)和野生型小鼠(C57bl/6)各3只(美国Jackson Laboratory提供)。分笼饲养,常规饮食。

**浸入式AMG染色方法** 腹腔内注射戊巴比妥钠麻醉小鼠后,断头处死,迅速取大脑,制成约2 mm厚的冠状切片。将切片立即浸入含0.1%硫化钠和3%戊二醛的磷酸盐缓冲液(pH7.4)中。在4℃冷室内浸泡3 d,用0.1 mol/L的冷磷酸盐缓冲液清洗,再放入30%蔗糖溶液(4℃)中浸泡,直至切片沉到玻璃杯底部。用OCT包埋厚切片,再用恒冷切片内制备30  $\mu$ m厚的冰冻切片。将冰冻切片放入盛有金属自显影孵育液的染色缸内,在26℃恒温振动水浴箱内孵育60 min。将切片置于5%硫代硫酸钠溶液浸泡10 min,终止反应。切片经去离子水清洗后,用0.1%甲苯胺蓝溶液(pH4.0)复染,然后经梯度酒精、二甲苯脱水透明,DEPEX封片。显微镜下观察并照相。

**浸入式AMG染色特异性的检测** (1)将2 mm厚的切片,先放入锌螯合剂DEDTC溶液中浸泡3 h,再置入0.1%硫化钠和3%戊二醛溶液浸泡,然后进行AMG染色。(2)2 mm的厚切片不经0.1%硫化钠和3%戊二醛液处理,直接进行OCT包埋和冰冻切片,然后放入AMG液内孵育。

**免疫组织化学及免疫荧光双标染色方法** 2 mm厚的鼠脑冠状切片置入4%多聚甲醛溶液内固定

(4℃),30%蔗糖溶液浸泡(4℃),OCT包埋,恒冷箱切片机制备30  $\mu$ m厚的冰冻切片。免疫组化染色主要步骤如下:3%过氧化氢和正常血清各孵育10 min封闭内源性过氧化物酶和非特异性反应,APP抗体(1:500, Sigma公司)、ZnT6抗体(1:50, 美国Liping Huang博士提供)4℃孵育过夜(阴性对照组继续用正常血清代替一抗孵育);TBS冲洗,山羊抗兔IgG(1:200)室温孵育1 h, SABC室温孵育1 h, DAB显色。常规脱水和封片,光学显微镜下观察分析。免疫荧光染色主要步骤如下:正常驴血清室温预孵育1 h,兔多克隆ZnT6抗体(1:50)和小鼠单克隆A $\beta$ 抗体(1:400, Sigma公司)混合液内孵育,常温过夜。切片经漂洗后,用驴抗兔IgG-FITC(1:50, 标记ZnT6)和驴抗小鼠IgG-Texas Red(1:50, 标记A $\beta$ )混合液室温孵育2 h。漂洗后封片,共聚焦激光扫描显微镜下观察并拍照。

## 结 果

**锌离子在小脑内的分布** 光镜下观察APP/PS1转基因小鼠AMG染色的小脑切片,可见AMG阳性的斑块主要分布于分子层,大小不等,呈棕黑色,代表锌离子的存在部位,颗粒层也可见散在分布(图1A,C)。高倍镜下分析老年斑结构,可见大多数AMG阳性的老年斑有一个染色较深的球形中心(图1B,D),部分斑块的球形中心的外周为一层不规则的深染的花瓣状结构,可能为死亡变性的神经元突起和细胞碎片(图1B),偶而可见中央无AMG阳性反应的呈中空状的斑块。此外,在小脑分子层的部分小血管管壁也可见棕黑色的AMG阳性反应产物,表明存在着锌离子的聚集(图1B)。经过锌螯合剂DEDTC预处理和未经混合液处理的组织切片进行AMG显影染色,未见阳性反应产物。

**APP和ZnT6在老年斑内的表达** 光镜下观察免疫组织化学染色切片,APP和ZnT6免疫阳性反应产物主要定位于老年斑内,呈棕黄色,两者染色显示的老年斑形态和结构基本一致,呈大小不等的圆形或不规则形,边界较清晰(图2A1-A3, B1-B3)。

**ZnT6和A $\beta$ 在老年斑内的定位分布** 共聚焦激光扫描显微镜下观察,单通道扫描可见ZnT6和A $\beta$ 阳性反应产物分别呈绿色和红色荧光,A $\beta$ 免疫阳性反应产物主要分布在斑块的中央部分(图2C2),而ZnT6免疫阳性反应产物弥散分布于整个斑块(图2C3)。将单通道扫描的图像复合后,清晰可见两者共表达于老年斑内(图2C1)。

野生型小鼠大脑切片未见AMG染色阳性和免

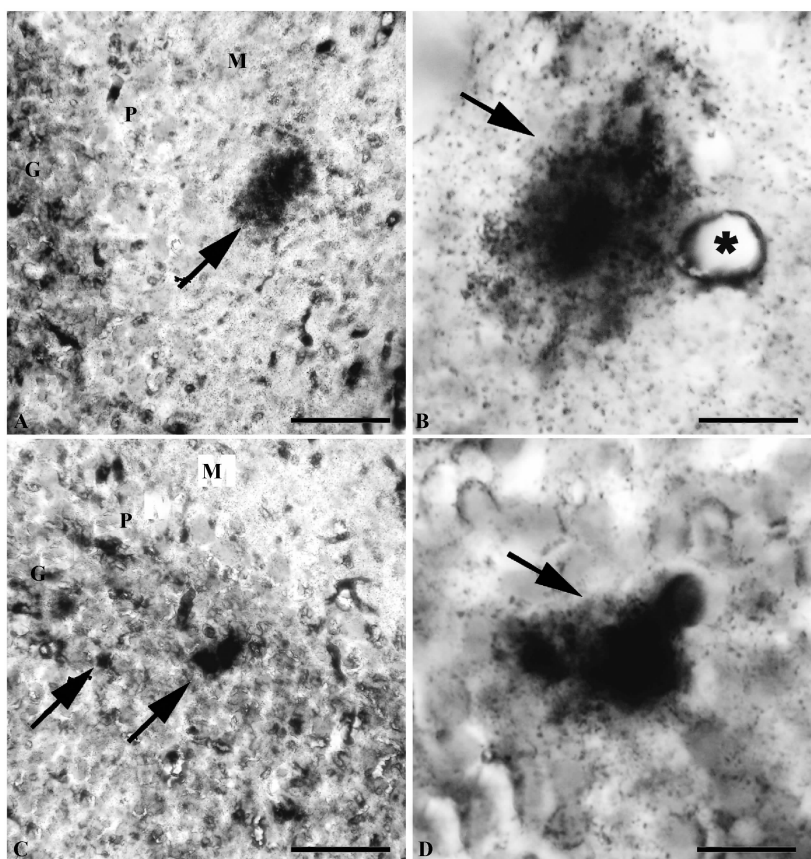


图 1 金属自显影技术显示游离锌离子在 APP/PS1 转基因小鼠小脑的分布  
Fig 1 Autometallography images showing the distribution of chelatable zinc ions in the APP/PS1 transgenic mouse cerebellum

A; Showing the distribution of zinc ions in the plaques in the molecular layer of cerebellum (↑). B; High power images showing a plaque with detectable zinc ions in the plaque core, which is surrounded by irregularly dark stained petal-shaped structure (↑). AMG products also could be seen within the blood vessel wall (\*). C; Showing the distribution of zinc ions in the plaques in the granule layer of the APP/PS1 mouse cerebellum (↑). D; High power images showing a plaque with two zinc-positive dense cores. The detectable zinc ions are diffusely distributed in the periphery portion of the plaque (↑). M; Molecular layer; P; Purkinje cell layer; G; Granular layer. Bars = 50  $\mu\text{m}$  (A, C), 10  $\mu\text{m}$  (B, D)

疫反应阳性的老年斑。

## 讨 论

锌是体内不可缺少的微量元素之一,在细胞生物中起着稳定结构、催化和调节的作用,是人体 300 多种酶和转录因子的重要组成成分,直接参与了核酸、蛋白质的合成、细胞的分化和增殖以及许多重要的代谢<sup>[7,8]</sup>。A $\beta$  沉积是各种原因诱发 AD 的主要共同通路之一,体内的 A $\beta$  由 APP 经蛋白水解而成,APP 和 A $\beta$  常用作老年斑的标记蛋白。由于 A $\beta$  沉淀中含有大量的锌离子,TSQ、Zinquin 等荧光技术常用于检测 AD 患者及 APP 转基因小鼠大脑内 A $\beta$  老年斑和淀粉样变性血管内的锌离子,但却未能成功显示小脑内的老年斑<sup>[9]</sup>。本研究采用最新改良的

浸入式硫化锌 AMG 技术,通过将组织切片浸入到硫化钠和戊二醛混合液中,通过 AMG 显影液孵育使在切片上形成的硫化锌微晶体进行银放大,直接在脑片上标记游离锌离子,证明在 APP/PS1 转基因小鼠的小脑内同样存在富含锌离子的 AMG 阳性的老年斑。而经过锌螯合剂 DEDTC 预处理和未经混合液处理的组织切片进行 AMG 显影染色,未见阳性反应产物,进一步证实浸入式硫化锌 AMG 技术对检测游离锌离子具有高度特异性和敏感性,是检测含锌老年斑的有效实验技术。

锌离子不能自由通过细胞膜,特定的转运蛋白和膜通道参与锌的转运和代谢。在维持锌稳态的蛋白家族中,锌转运蛋白 1-7(ZnT1-7)的主要作用是将锌离子转运出细胞或隐藏在细胞器内。ZnT1, ZnT 3, ZnT 4 和 ZnT 6 均在小脑内表达<sup>[10]</sup>, 其中,

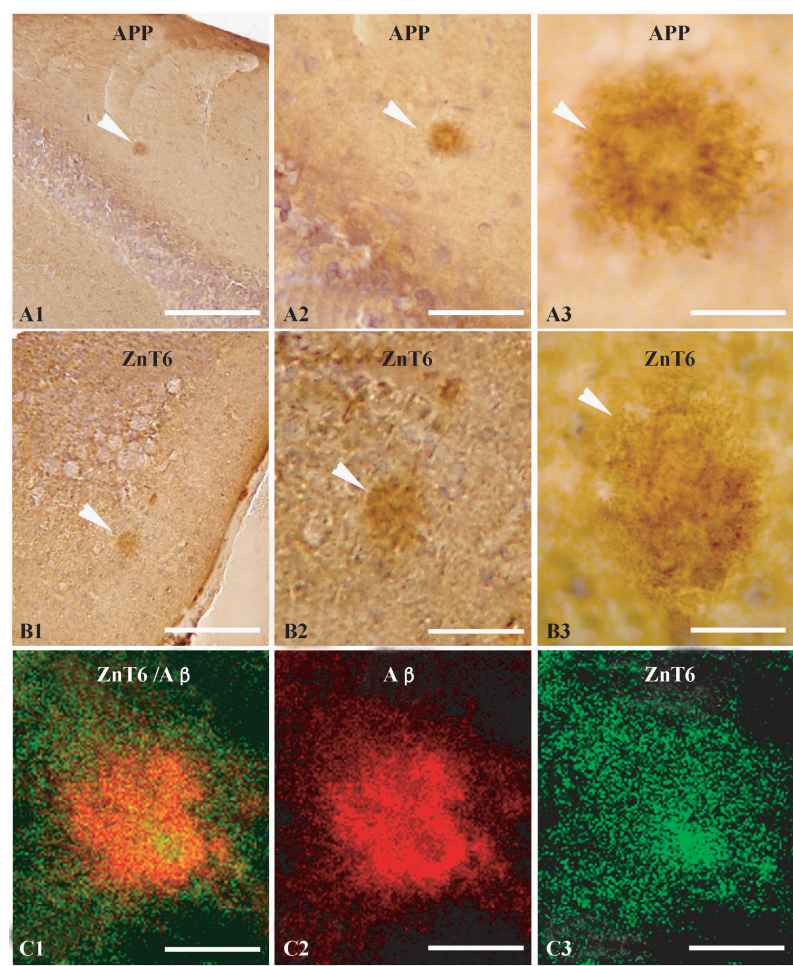


图 2 APP 和 ZnT6 免疫阳性反应在 APP/PS1 转基因小鼠小脑的分布

Fig 2 Distribution of APP and ZnT6 immunoreactivity in the APP/PS1 transgenic mouse cerebellum

A1:APP-positive plaques are predominately located in the molecular layer of cerebellum(▼). A2-A3:Successive magnification of A1, showing a APP-positive plaque with pale stained core(▼). B1: ZnT6-positive plaques are predominately located in the molecular layer of cerebellum (▼). B2-B3:Successive magnification of B1, showing a ZnT6-positive compact plaque(▼). C1:Confocal laser scanning microscopic images showing the coexpression of ZnT6 and Aβ in the senile plaque. C2:Showing Aβ immunofluorescence was mainly distributed in the core of the plaque. C3:Showing ZnT6 immunofluorescence was diffusely distributed in the all over the plaque. Bars = 100 μm (A1,B1), 50 μm (A2, B2), 20 μm (A3,B3), 15 μm (C1-C3)

ZnT6 通常位于高尔基体和小囊泡中,其主要功能是将细胞质中的锌转运到高尔基体和小囊泡中<sup>[11]</sup>,进而在锌稳态的维持中发挥重要作用。本研究结果表明 AMG 阳性、ZnT6 阳性和 APP 阳性的老年斑均主要分布于小脑分子层,颗粒层仅有少量分布;AMG 染色和 ZnT6 免疫组化染色结果显示的老年斑与 APP 免疫组化染色显示的老年斑形态和结构基本一致,证明锌离子和 ZnT6 广泛分布于 APP/PS1 转基因小鼠小脑的 Aβ 老年斑中,而 ZnT6 和 Aβ 双标的共聚焦激光扫描显微镜观察结果进一步证实 ZnT6 与 Aβ 在老年斑中的共表达。提示锌离子可能在小脑内 Aβ 老年斑的形成过程中起重要作用,而 ZnT6 在老年斑内锌离子的聚集过程中起着重要的调节作用。

参 考 文 献

[ 1 ] 张丽红,池志宏,高慧玲,等. 锌离子参与阿尔茨海默病 Aβ 老年斑形成的形态学证据[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2006,15(1):87-90.

[ 2 ] Bush AI. The metallobiology of Alzheimer's disease [J]. Trends Neurosci, 2003, 26(4): 207-214.

[ 3 ] Lovell MA, Smith JL, Xiong S, et al. Alterations in zinc transporter protein-1 (ZnT-1) in the brain of subjects with mild cognitive impairment, early, and late-stage Alzheimer's disease[J]. Neurotox Res, 2005, 7(4): 265-271.

[ 4 ] Smith JL, Xiong S, Markesbery WR, et al. Altered expression of zinc transporters-4 and -6 in mild cognitive impairment, early and late Alzheimer's disease brain[J]. Neuroscience, 2006, 140(3): 879-888.

[ 5 ] Frederickson CJ,Suh SW,Silva D,*et al.* Importance of zinc in the central nervous system: the zinc-containing neuron[J]. *J Nutr*,2000,130:1 471 - 1 483.

[ 6 ] Van GT,Kiliaan AJ,Kadish I. Deposition of mouse amyloid beta in human APP/PS1 double and single AD model transgenic mice[J]. *Neurobiol Dis*,2006,23(3):653 - 662.

[ 7 ] Venter JC,Adams MD,Myers EW,*et al.* The sequence of the human genome[J]. *Sci*,2001,291(5 507):1 304 - 1 351.

[ 8 ] Beyersmann D, Haase H. Functions of zinc in signaling, proliferation and differentiation of mammalian cells[J]. *Biom*, 2001,14(3 - 4):331 - 341.

[ 9 ] Lee JY,Mook JI, Koh JY. Histochemically reactive zinc in plaques of the Swedish mutant beta-amyloid precursor protein transgenic mice[J]. *J Neurosci*,1999,19(11),RC10:1 - 5.

[10] Wang ZY, Stoltenberg M, Huang LP, *et al.* Aboudant expression of zinc transpotrers in bergman glia of mouse cerellum[J]. *Brain Res Bull*,2005,64(5):441 - 448.

[11] Huang L, Kirschke CP, Gitschier J. Functional characterization of a novel mammalian zinc transporter, ZnT6 [J]. *J Biol Chem*,2002,277(29):26 389 - 26 395.

(收稿日期:2007 - 09 - 05;编辑:沈玲)

## 复旦大学附属儿科医院介绍

复旦大学附属儿科医院专业设置齐全,是上海市第一家小儿涉外特需医疗中心和亚洲国际救援中心。呼吸急救专业是上海市医学领先专业重点学科,小儿外科是上海市小儿外科疑难重症诊治中心,还设有上海市性早熟中医特色门诊。医院共有 39 个临床和医技科室,主要专业涉及儿内科(新生儿、呼吸、消化、血液、肾脏、神经、内分泌、免疫、遗传等)、儿外科(普外、泌尿、骨科、新生儿外科、肿瘤、神经外科)、心血管中心、传染科、急救科、麻醉科、中医科、眼耳鼻喉科、皮肤科、口腔科和儿童保健及康复科等。为适应临床发展需要,先后设立了疑难病诊治中心、癫痫中心、遗尿中心、哮喘诊疗中心、小儿微创外科中心、复旦大学小儿肾脏病和泌尿系统疾病诊治中心。医院拥有先进的医疗检测设备和检验技术,为一流的诊疗提供技术保障。

医院现有在职职工 1 000 余人,博士生导师 17 名,硕士生导师 28 名,高级职称专家 101 人。是中华医学会儿科学分会主任委员单位,有 16 人在医学会儿科相关的学组及其他全国性医学专业组织中担任领导职务。拥有全国“长江学者奖励计划”儿科学组特聘教授 1 人。

(复旦大学附属儿科医院)