

研究简报

镉中毒大鼠睾丸与肝脏金属硫蛋白
表达的时相研究*

任绪义 周 雍 张建鹏 冯伟华**

(第二军医大学基础医学部生物化学与分子生物学教研室, 上海 200433)

摘要 啮齿目动物睾丸对镉毒性较肝脏更敏感. 为阐明睾丸的镉毒性分子机制, 比较了肝脏与睾丸金属硫蛋白 (MT) 表达的时相变化. mRNA 采用 RT-PCR 技术分析并用光密度扫描定量; 蛋白质定量用 ELISA 方法. 结果显示, 睾丸中存在 MT, 镉中毒后 MT1 与 MT2 mRNA 明显升高, 但 MT 没有相应增加; 肝脏镉中毒后 MTmRNA 与 MT 均明显升高. 结果提示: 镉虽然能诱导睾丸 MTmRNA 的转录, 但没有促进其 MT 的合成, 这可能是睾丸对镉毒性与致癌作用较肝脏更敏感的重要原因.

关键词 镉, 金属硫蛋白, 睾丸, 肝脏

学科分类号 R595.202

镉毒性及致癌作用具有组织特异性. 文献报道^[1]前列腺、睾丸组织较其他组织对镉具有更高的敏感性. 但详细机理目前仍不清楚. 有学者认为^[2]睾丸对镉敏感的主要原因是由于睾丸中缺乏金属硫蛋白 (metallothionein, MT). Suzuki 等^[3]认为睾丸组织的 MT 难以被镉诱导表达的原因可能与 MT 基因呈高度甲基化有关. Zhou 等^[4]报道睾丸组织 MT mRNA 的转录与镉不存在剂量依赖关系, 即在高剂量镉条件下也无明显的诱导作用. 但也有文献报道^[5]镉对睾丸 MTmRNA 的转录具有明显的诱导作用. Iida 等^[6]发现镉能够明显诱导睾丸间质细胞 MTmRNA 的转录, 但 MT 并没有增加. mRNA 作为生物体内代谢最活跃的生物大分子, 镉到达组织后可立即诱导 MTmRNA 的转录^[7]. 目前国内外尚未见镉中毒早期大鼠睾丸组织 MT 表达的系统研究报道. 本文旨在对镉中毒早期大鼠睾丸组织 MT 的转录水平与翻译水平的时相变化进行研究, 同时以被确证镉可引起 MT 积累的肝脏组织为阳性对照^[8], 探讨睾丸组织的镉损伤机理, 为防治对策提供理论依据.

1 材料和方法

1.1 实验动物

SD 成年雄性大鼠 40 只, 200~250 g, 由第二军医大学实验动物中心提供.

1.2 镉损伤模型

大鼠随机分成五组, 按 20 mg/kg 腹腔注射, 分别在 0 h、1 h、3 h、6 h、24 h 脱臼处死取睾丸组织用于总 mRNA 抽提.

1.3 总 mRNA 抽提

取上述新鲜睾丸湿组织 50 mg 液氮冷冻, 捣碎后加 0.6 ml Trizol (GibcoBRL) 匀浆后补加 0.4 ml, 室温静置 5 min, 氯仿抽提蛋白质, 异丙醇沉淀 mRNA, 75% 乙醇洗涤 2 次后用焦碳酸二乙酯 (diethyl pyrocarbonate, DEPC) 处理水 30~50 μ l 溶解. A₂₆₀/A₂₈₀ 鉴定 mRNA 的纯度, 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳鉴定 mRNA 的完整性.

* 国家自然科学基金资助项目 (39970631).

** 通讯联系人.

Tel: 021-25070881-8002, E-mail: fw8002@Hotmail.com

收稿日期: 2002-03-11, 接受日期: 2002-04-28

1.4 cDNA 的合成

Oligo (dT) 18 为引物, 用逆转录试剂盒 (TaKaRa) 合成 cDNA.

1.5 PCR 引物的设计

大鼠 MT1 上游引物与下游引物序列分别为 5'-ACTGCCTTCTTGTGCTTA-3' 和 5'-TGGAGGTGTACGGCAAGACT-3', 跨越 310 bp 的片段; 大鼠 MT2 上游引物与下游引物序列分别为 5'-CCAACTGCCGCTCCATTGCG-3' 和 5'-GAAAAA-GTGTGGAGAACCG-3', 跨越 300 bp 的片段; 内参照三磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH) 上游引物与下游引物序列分别为 5'-TTCATTGACCTCACTACATG-3' 和 5'-GTGGCAGTGATGGCATGGAG-3', 跨越 443 bp 的片段.

1.6 PCR

用 PCR 试剂盒 (TaKaRa) 扩增逆转录产物. 94 °C 5 min, 94 °C 40 s, 55 °C 40 s 和 72 °C 40 s 27 个循环, 最后 72 °C 延伸 5 min. 产物用 2% 琼脂糖

凝胶电泳分离.

1.7 转化

PCR 产物用胶回收试剂盒 (北京鼎国生物公司) 进行胶回收, 装入 pUCm-T 载体, 转化 pGEmr 109 菌株, 然后进行 DNA 测序 (上海申友生物公司).

1.8 分析方法

RT-PCR 产物光密度扫描定量, 用 MT1 或 MT2 与 GAPDH 的比值 (%) 分析镉损伤大鼠肝脏与睾丸 MTs mRNA 水平的时相变化 (*t* 检验).

1.9 MT 定量

采用 ELISA 方法.

2 结 果

2.1 大鼠睾丸组织 MT1 与 MT2 cDNA 测序结果

MT1 与文献报道的肝脏 MT1 完全一致; MT2 有一个碱基的不同 (G53 → A53).

MT1

ACTGCCTTCTTGTGCTTACACCGTTGCTCCAGATTCACCAGATCTCGGAATGGACCCCAACTGCTCGTGCTCCACCGGCGGCTCCTGCACCTGCTCCAGCTCCTGCGGCTGCAAGAACTGCAAAATGCACCTCCTGCAAGAAGAGCTGCTGCTCCTGCTGCCCCGTGGGCTGCTCCAAATGTGCCAGGGCTGTGTCTGCAAAAGGTGCCTCGGACAAGTGCACGTGCTGTGCCTGAAGTGACGAACAGTGCTGCTGCCCTCAGGTGTAAATAATTTCCGGACCAACTCAGAGTCTTGCCGTACACCTCCA

MT2

CCAACTGCCGCTCCATTGCGCATGGACCCCAACTGCTCCTGTGCCACAGAT ^A_G GATCCTGCTCCTGGCTGGCTCCTGCAAAATGCAAACAATGCAAATGCACCTCCTGCAAGAAAAGCTGCTGTTCTGCTGCCCGGTGGGCTGTGCCAAGTCTCCAGGGCTGCATCTGCAAGAGGCTTCGGACAAGTGCAGCTGCTGCGCTGAAGTGGGGCGTCTCACAATGGTGTAATAAAACAACGTAAGGAACCTAGCCTTTTTTTGTACAACCCTGACCGGTTCTCCACACTTTTTTC

2.2 镉诱导后肝脏与睾丸 MT1 的时相变化

镉中毒 1 h 后大鼠肝脏 MT1mRNA 即有明显的诱导转录, 3 h 达高峰; 睾丸镉中毒 1 h 后 MT1mRNA 也有明显的诱导转录, 6 h 达高峰. 虽然睾丸与肝脏转录水平的峰值之间没有明显的差异, 但 24 h 的睾丸 MT1mRNA 却明显低于肝脏 MT1mRNA. 表明睾丸 MT1mRNA 的降解率高于肝脏. 镉中毒后肝脏 MT2mRNA 的变化趋势与

MT1mRNA 类似; 睾丸 MT2mRNA 虽有类似 MT1mRNA 的变化趋势, 但却明显低于肝脏的变化幅度. 说明镉诱导 MT2mRNA 的转录可能存在组织特异性 (图 1 和图 2).

2.3 镉损伤大鼠 MT 的时相变化

肝脏与睾丸 MT 基础表达水平无明显差异, 但镉损伤后肝脏 MT 呈持续积累, 而睾丸 MT 不但没有相应升高, 而且还稍有下降 (图 3).

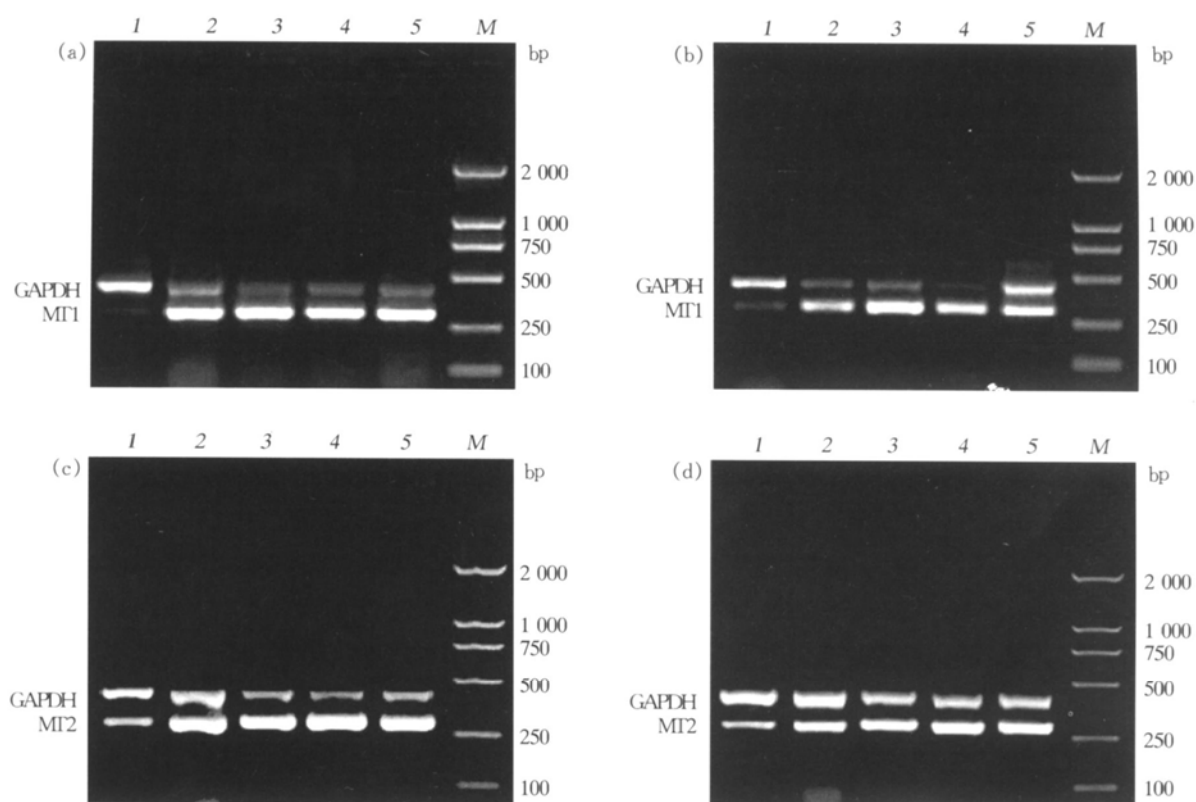


Fig. 1 Electrophoresis pattern of metallothionein gene transcription under different time in testis and liver of rats treated with cadmium by semi-quantitative RT-PCR

(a) MT1 in liver; (b) MT1 in testis; (c) MT2 in liver; (d) MT2 in testis. M: molecular mass marker; 1: 0 h; 2: 1 h; 3: 3 h; 4: 6 h; 5: 24 h.

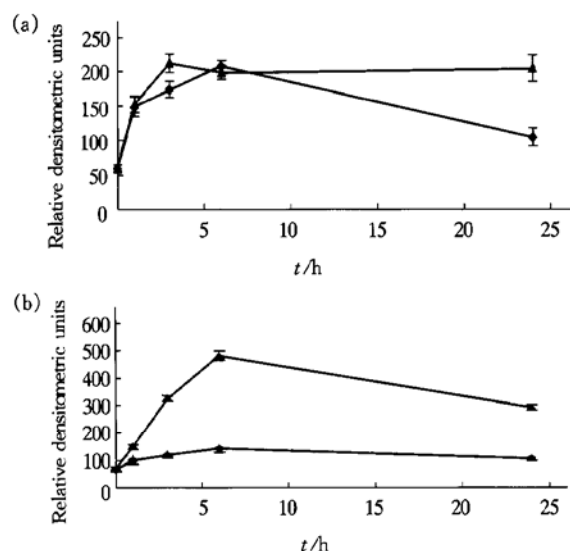


Fig. 2 Densitometric analysis of metallothionein gene transcription under different time in testis and liver of rats treated with cadmium by semi-quantitative RT-PCR

(a) MT1 in liver and testis; (b) MT2 in liver and testis. $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$: liver; $\blacklozenge$ — $\blacklozenge$: testis.

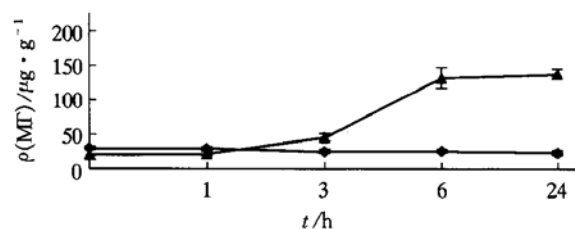


Fig. 3 Metallothionein under different time in testis and liver of rats treated with cadmium

$\blacktriangle$ — $\blacktriangle$: liver; $\blacklozenge$ — $\blacklozenge$: testis.

3 讨 论

睾丸组织是否存在 MT, 长期以来一直存有争议. 我们现在通过 RT-PCR 分析和 DNA 测序表明睾丸组织确有 MT1 与 MT2 mRNA 的转录; 并同时证明睾丸与肝脏 MT 在正常生理条件下转录与翻译的基础水平没有明显差异. 说明睾丸组织并不缺乏 MT. MT 是一类低分子质量、富含半胱氨酸的金属结合蛋白. 已经知道 MT 在金属解毒、清

除自由基以及金属离子运输等方面发挥着重要作用。镉在体内与生物大分子形成金属螯合物的能力很强。核酸中的糖、磷酸、各种碱基,尤其是嘌呤碱基的 N、—OH 或 —NH₂ 极易与镉结合,从而改变核酸的立体结构,导致碱基错误配对或链断裂。有文献报道^[9] 一次性镉吸入即可导致全身 DNA 损伤,尤其是睾丸、肺等组织表现出更高的敏感性,但长期镉暴露情况下 DNA 的损伤并没有增加,相反还有减少的趋势,这可能与镉诱导 MT 等驱镉毒性物质的合成有关。MT 是镉吸收、转运、蓄积、排泄等代谢过程的焦点,MT 与镉有强大的亲和力,通过与镉结合或夺取与其他功能蛋白结合的镉而降低关键靶部位的镉浓度。另外, Zheng 等^[10] 发现敲除 MT1 与 MT2 基因的小鼠对镉诱发的 P53、c-jun 基因表达更敏感。证明 MT 在镉致肿瘤发生中具有保护作用。

从本文结果看,镉中毒 1 h 后大鼠肝脏 MT1mRNA 即有明显的诱导转录,3 h 达高峰;睾丸镉中毒 1 h 后 MT1mRNA 也有明显的诱导转录,6 h 达高峰。虽然睾丸与肝脏转录水平的峰值之间没有明显的差异,但 24 h 的睾丸 MT1mRNA 却明显低于肝脏 MT1mRNA。提示睾丸 MT1mRNA 的降解率可能高于肝脏。镉中毒后肝脏 MT2mRNA 的变化趋势与 MT1mRNA 类似;睾丸 MT2mRNA 虽有类似 MT1mRNA 的变化趋势,但却明显低于肝脏的变化幅度。说明镉诱导 MT2mRNA 的转录可能存在组织特异性。镉损伤后肝脏 MT 呈持续积累,而睾丸 MT 不但没有相应升高,而且还稍有下降。表明镉虽然能够诱导大鼠睾丸组织 MTmRNA 的转录,但在镉损伤的情况下并未见相应的 MT 表达,从而提示 MT 不能相应表达可能与睾丸组织对镉损伤高度敏感密切相关。

何以睾丸 MT 难以被诱导表达?从本文的结果看,睾丸 MT1mRNA 的降解率高于肝脏,可能影响睾丸 MT 的合成效率;也许镉损伤后睾丸组织细胞在合成 MT 之前已有死亡;另外还可能与 MT 的降解速率有关。

综上所述,镉虽然能够诱导睾丸 MTmRNA 的转录,但 MT 不能相应表达,可能是睾丸组织对镉毒性及致癌作用较肝脏更敏感的一个重要原因。Liu 等^[11] 证明对镉毒性抵抗的 C57 系小鼠镉暴露后睾丸组织中除了 MT 增加外,还有谷胱甘肽过氧化物酶与其他抗氧化物质的明显增加,说明镉对睾丸的损伤机制可能是多方面的,详细机理有待进一步深入探讨。

参 考 文 献

- 1 Waalkes M P, Rehm S. Cadmium and prostatic cancer. *J Toxicol Environ Health*, 1994, **43** (3): 251~ 269
- 2 Lee K F, Lau K M, Ho S M. Effects of cadmium on metallothionein I and metallothionein II mRNA expression in rat ventral, lateral, and dorsal prostatic lobes: quantification by competitive RT-PCR. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1999, **154** (1): 20~ 27
- 3 Suzuki J S, Kodama N, Molotkov A, *et al.* Isolation and identification of metallothionein isoforms (MT-1 and MT-2) in the rat testis. *Biochem J*, 1998, **334** (3): 695~ 701
- 4 Zhou T, Zhou G, Song W, *et al.* Cadmium-induced apoptosis and changes in expression of P53, c-jun and MT-1 genes in testes and ventral prostate of rats. *Toxicology*, 1999, **142** (1): 1~ 13
- 5 Abel J, Ruiter N, Kuhr Velten W N. Comparative study on metallothionein induction in whole testicular tissue and isolated Leyding cells. *Arch Toxicol*, 1991, **65** (3): 228~ 234
- 6 Iida M M, Robert M B, Michael P W. Metallothionein gene expression in testicular interstitial cells and liver of rats treated with cadmium. *Toxicology*, 1996, **107** (2): 121~ 130
- 7 Sogawa C A, Sogawa N, Yamamoto T, *et al.* Localization of metallothionein (MT) and expression of MT isoforms induced by cadmium in rat dental pulp. *Jpn J Pharmacol*, 2001, **86** (1): 65 ~ 72
- 8 Masters B A, Kely E J, Quaife C J, *et al.* Targeted disruption of metallothionein I and II genes increases sensitivity to cadmium. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91** (2): 584~ 588
- 9 Valverde M, Fortoul T I, Diaz-Barriga F, *et al.* Induction of genotoxicity by cadmium chloride inhalation in several organs of CD-1 mice. *Mutagenesis*, 2000, **15** (2): 109~ 114
- 10 Zheng H, Liu J, Choo K H, *et al.* Metallothionein I and -II knock-out mice are sensitive to cadmium-induced liver mRNA expression of c-jun and p53. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1996, **136** (2): 229~ 235
- 11 Liu J, Corton C, Dix D J, *et al.* Genetic background but not metallothionein phenotype dictates sensitivity to cadmium-induced testicular injury in mice. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2001, **176** (1): 1~ 9

Metallothionein Gene Expression under Different Time in Testis and Liver of Rats Treated With Cadmium*

REN Xu-Yi, ZHOU Yong, ZHANG Jian-Peng, FENG Wei-Hua**

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medicine,
Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract The rodent testis is generally more susceptible to cadmium (Cd)-induced toxicity than the liver. In order to clarify the molecular mechanism of Cd-induced toxicity in testis, Cd-induced metallothionein (MT) gene expression and MT protein accumulation under different time in testis and liver were compared. MT1 and MT2 mRNA levels were determined by reverse transcription-PCR analysis followed by densitometry scanning, and MT was quantitated by the ELISA method. Both MT mRNA and MT were constitutively present in testis as well as the liver. Testis had higher levels of MT1 and MT2 mRNAs in 1 h, 3 h, 6 h and 24 h over control, but MT protein did not increase. Cd exposure increased hepatic MTs mRNA and MT protein. Thus, it is indicated that, although Cd exposure results in increases of MT mRNA in testis, it does not enhance MT synthesis. The inability to induce the metal-detoxifying MT-protein in response to Cd, might account for higher susceptibility of testis to Cd toxicity and carcinogenesis relative to liver.

Key words cadmium, metallothionein, testicle, liver

* This work was supported by a grant from The National Natural Sciences Foundation of China (39970631).

** Corresponding author. Tel: 86-21-25070881-8002, E-mail: fwh8002@Hotmail.com

Received: March 11, 2002 Accepted: April 28, 2002

欢迎订阅 欢迎投稿

《生物化学与生物物理进展》2003 年征订启事

《生物化学与生物物理进展》是国内外公开发行的全国性学术期刊,由中国科学院生物物理研究所和中国生物物理学会共同主办。主要报道生物化学、分子生物学、生物物理学及神经科学等领域的国内外最新进展,设有微型述评、综述与专论、研究报告、技术与方法、研究快报等十几个栏目。本刊自 1974 年创刊以来,始终以推动生命科学发展和促进国家经济建设为宗旨,不断提高学术、编辑和出版质量。经过二十余年的不懈努力,已成为一个在我国生命科学、基础医学及其他相关领域具有一定影响、深受广大读者欢迎及专家好评的学术期刊。1999 年荣获首届中国期刊奖提名奖,被 SCIE、CA 等国际权威检索系统收录。ISI 最新出版的期刊引征报告表明,本刊 2001 年影响因子(即 SCI 影响因子) 0.112。

本刊国际连续出版物号: ISSN 1000-3282, 国内统一刊号: CN 11-2161/Q, 邮发代号: 2-816。目前为双月刊(逢双月 20 日发行),国际标准开本(210 mm × 297 mm),164 页,每本订价 ¥25.00 元(全年 150.00 元)。若错过邮局订阅,请直接与编辑部联系。

编辑部地址:北京朝阳区大屯路 15 号中国科学院生物物理研究所

邮政编码:100101

电话:(010) 64888459

E-mail: prog@sun5.ibp.ac.cn

网址: http://www.pibb.ac.cn