

# 锌的生物学功能及高浓度锌对铁硫蛋白的影响

任孝军 刘若兰 牛欢 李艳纯 谭国强\* 吕建新\*

(温州医科大学检验医学院、生命科学学院, 浙江省医学遗传学重点实验室, 温州 325035)

**摘要** 锌是生物体中最重要的微量元素之一, 是众多蛋白酶、转录因子和其他调控蛋白的辅助因子, 对维持蛋白质结构和功能起着关键作用。锌指结构是最为常见的核酸结合模体(motif)之一, 含有锌指结构的蛋白质大多具有和基因调控有关的功能。此外, 锌在促进机体的生长发育、免疫成熟和创伤愈合以及维持血糖稳定等方面发挥着无可替代的作用。然而, 体内锌的调节异常、供应过量或不足均会导致疾病发生(如儿童脑肿瘤和免疫缺陷)。细胞内锌的累积将会严重影响一系列铁硫蛋白酶的活性。该文旨在对近十几年来锌的生物学功能的研究进展进行综述, 并重点阐述高浓度锌对铁硫蛋白的影响及其作用机制。

**关键词** 锌; 辅助因子; 锌指结构; 基因调控; 铁硫蛋白

## Biological Functions of Zinc and the Impact of High Zinc Levels on Iron-Sulfur Proteins

Ren Xiaojun, Liu Ruolan, Niu Huan, Li Yanchun, Tan Guoqiang\*, Lü Jianxin\*

(School of Laboratory Medicine and Life Sciences, Zhejiang Provincial Key Laboratory of Medical Genetics, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China)

**Abstract** Zinc is one of the most essential metallic elements for all organisms, which serves as a cofactor of a large range of proteases, transcription factors and other regulatory proteins, and plays a key role in maintaining the structures and functions of proteins. Zinc finger is one of the most common nucleic acid binding units, with participating in majority gene regulation. Moreover, zinc plays an irreplaceable role in many aspects involving in the growth and development, the body's immune maturation, wound healing and also glucostasis. However, zinc dysregulation, excessive or insufficient supply can contribute various diseases including childhood brain tumors and immunodeficiency. The accumulation of intracellular zinc will severely affect series of iron-sulfur protease activities. In this review, we focused on current progress of zinc biological function and put emphases on the influence of high zinc levels on iron-sulfur proteins and related mechanisms.

**Keywords** zinc; cofactor; zinc finger; gene regulation; iron-sulfur protein

锌(Zn)是生物体必需的微量元素, 对维持机体生理功能和正常代谢十分重要。至少300种酶以锌为辅助因子参与糖类、脂质、蛋白质和核酸代谢。因此, 锌是动植物生长发育必不可少的金属元

素<sup>[1]</sup>。据统计, 在低收入国家约1/3的人(尤其是儿童和妇女)由于长期饥饿、传染病等原因导致锌供应不足<sup>[2]</sup>。锌缺陷可引起许多健康问题, 例如生长迟缓、食欲不振、免疫功能受损、伤口愈合迟缓和精

收稿日期: 2016-11-28 接受日期: 2017-02-08

国家高技术研究发展计划(863计划)(批准号: 2014AA06A514)和国家自然科学基金(批准号: 81671124)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0571-87692820, E-mail: tgq@wmu.edu.cn; E-mail: jxlu313@163.com

Received: November 28, 2016 Accepted: February 8, 2017

This work was supported by the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (Grant No.2014AA06A514) and the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81671124)

\*Corresponding authors. Tel: +86-571-87692820, E-mail: tgq@wmu.edu.cn; E-mail: jxlu313@163.com

网络出版时间: 2017-04-18 15:25:43

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170418.1525.014.html>

神不振等。正常情况下, 机体锌的平衡稳态受到精密调控, 一方面要维持细胞代谢所需的最低锌离子浓度, 另一方面要避免锌的过度累积造成毒性效应。人体内主要有两种类型的蛋白质参与锌离子稳态的维持: 一是锌结合蛋白, 作为缓冲物质或充当细胞内锌的供体; 二是锌转运蛋白, 主要参与细胞或生物体内锌的摄入和排出。锌作为微量元素, 其功能广泛。依赖锌的酶和含锌蛋白质的检测可作为一些疾病诊断及预后判断的依据<sup>[3]</sup>。

细胞内锌与大分子物质结合参与众多生理过程。然而, 锌在细胞内的过量累积会产生毒性作用。许多研究发现, 细胞内过量的锌会影响铁硫蛋白中铁硫簇(iron-sulfur cluster)的组装, 破坏活性中心从而导致酶的活性丧失。例如, 含有铁硫簇的顺乌头酸酶(aconitase)是三羧酸循环中重要的酶, 在高锌浓度下其活性显著下降<sup>[4]</sup>。铁硫簇是一种古老的蛋白质辅基(cofactor), 其组装是由许多蛋白质共同参与的复杂的过程。生物体内许多重要的铁硫蛋白一般都依赖铁硫簇, 如呼吸链复合体(I~III)、延胡索酸酶(fumarase)以及DNA修复的解螺旋酶XPD(xeroderma pigmentosum group D)<sup>[5]</sup>等。有研究认为, 锌对细胞产生的毒性机理主要是因为过量的锌竞争结合铁硫蛋白(Fe-S protein)中铁硫簇的结合位点, 致使铁硫蛋白酶的功能受损。本文主要从基因表达调控、含锌金属酶的结构和功能、生长代谢及相关疾病几个方面对锌的生物学功能进行阐述, 并进一步探讨锌对铁硫蛋白的影响。

## 1 锌指结构与基因表达

锌指(zinc finger, ZNF)结构是一种普遍存在的核酸结合模体(motif), 其特点是结合一个或多个锌原子并以此来稳定折叠后的蛋白质构象。锌指结构由一个 $\alpha$ -螺旋和两个反向平行的 $\beta$ -折叠组成, 形成 $\beta\alpha$ 样的“锌指”结构。在锌指结构上, N-端有一对半胱氨酸残基, C-端有一对组氨酸残基, 在空间上形成“口袋”与锌离子配位。对于富含半胱氨酸残基的C6锌指结构(C6 zinc finger), 锌原子仅与半胱氨酸残基配位结合<sup>[6]</sup>。由于锌可稳定模体中 $\alpha$ -螺旋结构, 使得 $\alpha$ -螺旋能镶嵌于DNA的大沟中, 因此, 含锌指结构的蛋白质能与DNA或RNA结合。含锌指蛋白质上的DNA结合域通常由锌指结构和邻近的氨基酸残基组成<sup>[7]</sup>。

锌指蛋白是人类基因组最大的转录因子家族, 调控基因表达, 在分化发育、代谢、细胞凋亡和自噬等生物过程中发挥重要作用<sup>[8]</sup>。经典锌指蛋白(classical zinc finger proteins)具有序列特异性的DNA结合活性, 在所有锌指结构分类中C2H2(Cys2 His2)-型结构是最常见的锌指类型。许多含有经典锌指结构的蛋白质与基因表达调控有关。锌指结构主要通过识别和结合靶基因的启动子或增强子区域特定的DNA序列来发挥作用。通常单一的锌指很难与DNA结合, 除非该DNA序列足够长(具有很高的特异性)从而有特定的转录结合位点。拥有两个或连续三个C2H2-型锌指域的锌指蛋白与DNA结合得更加牢固, 是最合适的DNA结合单元。富含GC或GT的碱基序列通常作为C2H2-型ZNF(C2H2-type zinc finger motif)的顺式调控元件。例如, CTGGCAGCGC序列是转录因子SP1(specificity protein 1)的结合元件, 从而转录激活BRK1(BRICK1, SCAR/WAVE actin nucleating complex subunit)的表达, 然而(T/A)(G/A)CAGAA(T/G/C)是ZNF217的结合位点, 抑制E-钙黏蛋白的表达<sup>[9-10]</sup>。不同类型的锌指结构所表现的生物学功能也千差万别。近几十年的研究发现, 除了DNA之外, RNA和一些蛋白质及脂质物质也能与锌指结构相互作用<sup>[11]</sup>。

经典的锌指结构能与RNA甚至DNA/RNA杂交双链结合, 同样具有很高的亲和力。锌指蛋白与异源双链相互作用是否存在生物学意义目前尚未有定论。然而, 其中一个例子是Wilms肿瘤蛋白1(Wilms' tumour protein 1, WT1), 这种锌指蛋白能结合DNA和RNA, 在mRNA成熟的过程中发挥作用<sup>[12]</sup>。将WT1基因突变或敲除, 容易引起肾脏恶性肿瘤的发生, 这种疾病常发生在儿童中。除了与核酸结合, 锌指蛋白还能通过锌指结构与其他蛋白质结合。例如, 转录因子中的Ikaros家族, 蛋白质中包含有两个锌指簇: 一个是在N-端拥有四个锌指结构, 是DNA结合部位; 另一个是在C-端拥有两个锌指结构, 参与蛋白质二聚体的形成。锌指结构介导的同源或异源二聚体的形成和解聚, 可导致锌指蛋白的DNA结合活性和转录活性相应的发生改变。Ikaros家族蛋白质是淋巴细胞生长重要的调节因子<sup>[13]</sup>。仅保留C-端锌指簇突变型Ikaros不能发挥其正常的功能, 会引起特殊性的儿童期白血病。

锌指蛋白在基因转录水平具有激活和抑制的双

重功能。例如, 参与红细胞和巨核细胞分化的锌指蛋白GATA-1(GATA binding protein-1)能与多种生物分子结合, 其中, 当GATA-1与Ets(erythroblast transformation specific)家族成员Fli-1(Friend leukemia integration-1)结合时能够协同激活巨核细胞特异性基因*GPIX*(for glycoprotein IX)和*GPIb $\alpha$* (for platelet glycoprotein Ib  $\alpha$  chain)的表达; 然而当GATA-1与另一个Ets家族成员PU.1结合时能够阻碍自身与DNA的结合并以此来抑制红系细胞分化<sup>[14]</sup>。又如, 与细胞分化相关的转录抑制因子ZEB1(zinc finger E-box binding homeobox 1)与Hippo信号通路效应器YAP(Yes-associated protein)结合后, 可转录共激活“*ZEB1/YAP*靶基因”, 从而导致高侵袭性的癌细胞表型<sup>[15]</sup>。除了识别和调节目基因表达之外, 一些锌指蛋白还能通过“招募”染色质编辑器(chromatin modifiers)对下游基因进行调节。例如, ZNF217被发现能与共抑制因子包括赖氨酸脱甲基酶1(lysine demethylase 1)、脱乙酰化酶2(histone deacetylase 2)等相互作用进而抑制下游基因的表达<sup>[16]</sup>。这些结果从另一方面表明, 锌指蛋白是否发挥转录激活或抑制作用取决于与之结合的协同因子。

## 2 锌与金属酶

锌的生物化学研究始于1939年, 当时Keilin等<sup>[17]</sup>发现, 红细胞中碳酸酐酶(carbonic anhydrase)含有一定化学计量的锌, 随后证实了锌是碳酸酐酶活性的重要组成部分。仅仅15年后, 第2个含锌酶——牛胰腺羧肽酶(carboxypeptidase)被确认<sup>[18]</sup>。随着蛋白质分析技术和金属离子的检测手段不断更新, 越来越多的含锌金属酶被发现。几乎三分之一的蛋白质和一半的酶依赖金属离子, 其中40%的金属酶(metalloenzymes)需要以金属离子作为催化中心<sup>[19]</sup>。据统计, 金属酶在6大类酶中均占有很大比例: 44%的氧化还原酶、40%的转移酶、39%的水解酶、36%的裂解酶、36%的异构酶和59%的连接酶<sup>[20]</sup>。10%左右的人类金属酶是以锌作为辅因子参与包括增殖、分化和细胞凋亡等在内的生理过程。

各种金属离子和含金属的蛋白质在生物过程中的作用正不断被人们认识。锌是除铁之外与蛋白质结合最多的过渡金属, 加之锌的氧化还原惰性, 使锌对蛋白质结构和功能影响的相关研究得到快速发展。就锌在金属酶中的结合位点(zinc-binding sites)

而言, 蛋白质侧链多种氨基酸残基的无机原子或基团可与锌配位, 包括组氨酸的氮、天冬氨酸或谷氨酸的氧和半胱氨酸的硫, 其中, 半胱氨酸和组氨酸是最常见的锌结合配体<sup>[21]</sup>, 其他比较少见的锌配体还有酪氨酸的羟基、蛋白质主链的羰基氧和天冬酰胺或谷氨酰胺的羰基氧。锌的配体和配位构型的多样性使得锌结合位点表现出多种不同的特征, 诸如稳定系数、生物学功能和反应特性等, 最终反映出众多含锌金属酶的结构和功能的多样化。

锌结合在蛋白质分子上可直接参与化学催化或者维持蛋白质的结构和稳定。因此, 含锌金属酶中锌主要表现出三种特性: 催化性、辅助催化性和结构性。在催化性锌位点(catalytic zinc sites), 锌直接参与化学键的形成和断裂, 锌的丢失会直接导致酶的活性丧失。在辅助催化性锌位点(cocatalytic zinc sites), 锌主要是增强酶的功能而对酶的活性并不起决定性作用。一些金属酶含有多种金属离子, 它们的结合位点十分靠近, 其中一种金属离子位点具有催化作用, 其他的金属离子则可增强该位点的催化活性<sup>[22]</sup>。在结构性锌位点(structural zinc sites), 锌主要是维持和稳定蛋白酶的三级结构, 某种意义上与二硫键相似。

二聚体的乙醇脱氢酶(alcohol dehydrogenase, ADH)是迄今为止仅知的既含有催化性锌位点又含有结构性锌位点的酶。该酶以NAD(nicotinamide adenine dinucleotide)为辅酶, 催化短链醇和醛之间的可逆反应, 大量存在于人和动物肝脏、植物及微生物中。乙醇脱氢酶由两个亚基组成, 每个亚基有两个锌原子。其中, 催化性锌的配体是Cys-46、Cys-174、His-67和一个水分子, 催化过程中底物与锌和乙醇脱氢酶结合; 结构性锌对蛋白质的稳定起着关键作用, 与定位于锌离子周围近似对称的四面体上四个关系紧密的半胱氨酸(Cys-97、Cys-100、Cys-103和Cys-111)共同组成结构性锌位点<sup>[23]</sup>。早期的研究已证实, 结构锌的丢失容易致使锌配体(四个半胱氨酸)被氧化, 即硫醇与二硫化物之间的氧化还原。通过透析的方法将锌移除或将半胱氨酸配体突变成丙氨酸同样会影响蛋白酶功能或导致结构不稳定。

在生物体中含锌金属酶是普遍存在的。研究金属酶中锌的结合活性、结合配体、几何结构以及锌离子的反应活性对提高认识酶的功能和催化过程十分重要。

### 3 锌的转运及调节

从核酸合成与分解代谢到基因表达与调控,从细胞内稳态调节到生物分子的新陈代谢以及从细胞的增殖到凋亡,锌几乎伴随着整个生命过程。因此,锌的重要性不言而喻。

人体内的锌主要来源于食物,吸收进入血液的锌离子主要与血清白蛋白结合并通过血液循环被分配到各组织和器官。细胞中锌离子的转运依赖于锌转运蛋白的协助。现已确认的体内锌转运蛋白有24种,大多数都定位在细胞膜或细胞器膜上,控制着细胞内外锌的转移。但是,并非每个蛋白质的功能都已研究清楚。其中,锌转运蛋白(zinc transporter, ZnT)家族(SLC30A)包括10种蛋白质成员(ZnT-1~10),主要作用是将胞质中的锌排出胞外;另外,属于ZRT/IRT样蛋白(ZRT/IRT-like protein, ZIP)家族(SLC39A)的14种蛋白成员(ZIP1~14),主要负责将外环境中的锌转运至细胞内(图1)<sup>[24-25]</sup>。锌转运蛋白的表达受细胞因子、激素以及锌自身调节<sup>[26]</sup>。在下文讲述锌与糖尿病的关系中将进一步阐述锌转运蛋白ZnT8在抗糖尿病中的作用。

细胞内调节锌离子浓度的关键因子——金属调节转录因子1(metal regulatory transcription factor 1, MTF1),又称MRE结合因子,是真核细胞内仅知的锌离子传感器<sup>[27]</sup>。MTF1的直接作用是对高浓度的锌产生应答反应,促进金属硫蛋白(metallothioneins, MTs)和ZnT-1的表达,从而发挥重要的调节功能,使

锌维持在一定范围内。人类有十多种不同的MTs,每一种金属硫蛋白由60~68个氨基酸组成,其中含有20或21个半胱氨酸。MTs能够提高细胞内锌的结合能力,在锌的储存和供应方面起着动态调控作用。当MTs和ZnT-1表达增加时,更多的锌离子会结合到MTs上或通过膜载体被排出胞外。MTF1对机体的发育至关重要,在小鼠中消除该基因会导致胚胎致死<sup>[28]</sup>。除了锌的稳态和生物相关性研究外,锌离子和不稳定锌结合物在细胞生理反应中所产生的生物学和化学作用也日益受到研究者的关注,尤其是它们在突触囊泡中所表现出来的神经递质活性。大脑中锌水平的动态变化与生理经验和长期记忆相关<sup>[29]</sup>,说明锌具有神经递质功能。实际上,很多证据显示,锌不仅能作为神经递质参与细胞间的信息传递,还能作为细胞内的信号分子,这与Ca<sup>2+</sup>十分相似<sup>[30]</sup>。

细胞内锌的平衡机制十分复杂,其中,锌在各细胞器中的分配是锌稳态调节的重要环节。除了锌转运蛋白ZnTs和ZIPs外,核内体(endosome)上的二价金属转运体1(divalent metal transporter 1, DMT1)也参与锌离子的转运。生理条件下,DMT1对亚铁离子的亲和力较高,在维持铁稳态中发挥重要作用<sup>[31]</sup>。Illing等<sup>[32]</sup>通过在非洲爪蟾卵细胞中表达人的DMT1,研究其所介导的金属离子转运功能,证实DMT1对金属离子的转运具有选择性(Cd<sup>2+</sup>>Fe<sup>2+</sup>>Co<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>>>Zn<sup>2+</sup>、Ni<sup>2+</sup>),并且锌离子与

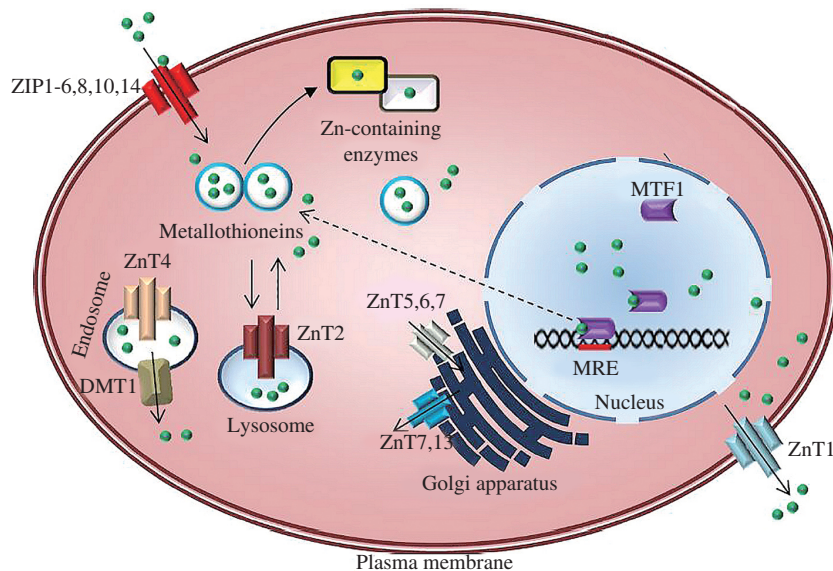


图1 细胞中锌的转运及稳态调节

Fig.1 Cellular zinc transport and its regulation

其他金属离子存在竞争关系。值得一提的是, 分布于鼻黏膜、肠道或肾脏等组织的DMT1能够高效地转运毒性重金属镉(Cd), 并且对镉的亲合力要远高于亚铁离子, 这一现象可用于解释为什么缺铁性贫血与镉中毒有关。

细胞内锌的正常转运及动态平衡是生长发育必不可少的条件。成人血液中正常的锌离子浓度为12~20  $\mu\text{mol/L}$ <sup>[33]</sup>。适量锌的供给对人的健康和生命的维持是十分重要的。锌离子具有广泛的生物学功能, 主要以离子状态或结合形式存在于机体内, 是许多酶的功能组成部分或激活剂, 参与物质代谢和生长发育等过程。锌促进生长发育主要表现在以下几个方面: (1) 锌是蛋白质分子中锌指结构重要的组成部分, 介导蛋白质与核酸的相互作用, 许多转录因子和核受体蛋白含有锌指结构; (2) 锌参与蛋白质的成熟过程, 并能稳定蛋白质的结构, 从而维持机体正常的物质代谢; (3) 锌是众多蛋白酶的辅助因子, 参与酶的活化和酶促反应过程; (4) 某些免疫细胞的发育和活化依赖锌离子介导的信号转导, 例如含锌金属硫蛋白(metallothionein, MT)能经氧化反应将结合的 $\text{Zn}^{2+}$ 释放出来, 这一生理过程正是 $\text{CD4}^+$ T细胞受刺激后能快速提高胞内锌离子浓度的基础。免疫细胞中MT的表达和细胞激活后锌信号的增强是机体免疫调节机制中的重要组成部分<sup>[34]</sup>。此外, 对于生长迟缓的婴幼儿可通过适当补给锌来缓解体重不足和发育不良等问题。

#### 4 锌与糖尿病

糖尿病(diabetes)是一种病因复杂、并发症多样、累及多种器官且治疗困难的常见疾病, 主要的特征是血糖异常增高。目前主要有2种类型的糖尿病最常见: 1型糖尿病(type 1 diabetes, T1D)和2型糖尿病(type 2 diabetes, T2D)。1型糖尿病主要是由于自身免疫导致胰腺细胞损害, 常发生在儿童和青少年。2型糖尿病常与肥胖相关, 在早期主要表现出对胰岛素抵抗, 后期 $\beta$ 细胞逐渐消失殆尽。2型糖尿病是发病最多的一种糖尿病类型, 占90%~95%, 而1型糖尿病占5%~10%或更少<sup>[35]</sup>。

近十年来, 锌在胰岛素分泌和生理活动中发挥作用的研究进展备受人们关注。最引人注目的是锌的转运蛋白ZnT-8, 它是 $\beta$ 细胞功能中关键的调节因子, 主要在 $\beta$ 细胞中表达, 能够有效促进锌在 $\beta$ 细胞中

的累积<sup>[36]</sup>。此外, 全基因组关联分析发现, ZnT-8的基因突变是糖尿病发病的危险因素之一<sup>[37]</sup>。本文主要根据最近相关领域的研究成果阐述锌与2型糖尿病发生、发展的关联。

锌是维持机体正常血糖浓度的关键因子, 甚至被认为可以作为2型糖尿病治疗的药物佐剂<sup>[38]</sup>。许多文献报道了锌在血糖调控过程中的重要作用: (1) 锌参与 $\beta$ 细胞中胰岛素的加工(胰岛素六聚体形成)、储存和分泌。胰岛素以六聚体晶体形式储存在分泌囊泡中, 每个六聚体包含2个锌离子<sup>[39]</sup>; (2) 锌与胰岛素一同被分泌到外周血, 并且以旁分泌调节的方式作用于 $\alpha$ 细胞从而参与调控胰高血糖素的分泌<sup>[40]</sup>; (3) 此外, 锌能减少胰岛素在肝的降解, 促进胰岛素进入外周靶组织<sup>[41]</sup>。Chimienti等<sup>[36]</sup>对其相关研究做出了突出贡献, 他们首次确认了ZnT8具有胰腺特异性, 该蛋白质属于ZnT家族成员, 由SLC30A8[for solute carrier family 30 (zinc transporter), member 8]基因编码表达。ZnT-8定位在分泌囊泡上, 主要作用是将锌转运至胰岛素颗粒并调节胰岛素的分泌。通过对细胞和动物模型的研究发现, 高表达ZnT-8可导致细胞内锌离子的浓度增加, 然而敲除该基因后外周血中胰岛素的浓度明显下降<sup>[42]</sup>。通过分析C-肽/胰岛素比率发现, 敲除或突变SLC30A8能导致胰岛素在肝中的清除率增高。以上表明, 锌的代谢异常或SLC30A8的基因缺陷促进了2型糖尿病的发生、发展。

低锌血症是糖尿病患者的常见症状, 锌的缺乏是造成 $\beta$ 细胞减少的原因之一。糖尿病小鼠模型试验中, 锌的补给不仅能显著抑制1型糖尿病的发展, 还能改善由药物诱导的高糖血症<sup>[43]</sup>。ZnT-8既能防止 $\beta$ 细胞锌的缺乏, 在高血糖状态下还能促进胰岛素的分泌。因此, 锌在糖尿病中的重要作用以及ZnT-8的相关调节为糖尿病的机制研究和治疗等提供了新的研究思路和方向, 可考虑针对锌及锌转运蛋白辅助治疗糖尿病。

#### 5 锌与肿瘤

肿瘤(tumor)是人体正常细胞在各种致癌因子的作用下导致癌基因激活, 或与之相对应的抑癌基因发生突变, 使细胞在基因水平上的调控发生异常, 细胞异常生长形成新生物。锌离子的稳态和含锌蛋白质对正常大脑功能十分重要, 儿童脑肿瘤的发生与锌之间的关系十分复杂<sup>[44]</sup>。其他部位如肺、乳腺、

前列腺和肝的肿瘤也与锌离子水平有一定关联。锌与肿瘤的关系一方面表现为血清和肿瘤组织中锌浓度的变化,另一方面则表现为含锌蛋白质或酶在肿瘤的发生、发展以及肿瘤细胞增殖、转移、侵袭和凋亡过程中发挥的作用。

许多锌指蛋白的表达水平的改变与肿瘤的发生密切相关,甚至充当着“双刃剑”的作用。例如,ZNF395在许多肿瘤(包括Ewing肉瘤、骨肉瘤和肾母细胞瘤)中的表达量是增高的,甚至在恶性胶质瘤、成神经细胞瘤和皮肤癌的低氧应激条件下也能被诱导表达。表达量增高的ZNF395能通过激活固有免疫应答和肿瘤相关的基因,从而促进炎症和肿瘤过程<sup>[45]</sup>。然而,近期的研究发现,ZNF395还具有抑制肿瘤的作用。文献报道,肝癌细胞中高表达的miR-525-3P能促进癌细胞的转移和侵袭,而高表达ZNF395则可以逆转这一过程,发挥抗肿瘤作用<sup>[46]</sup>。

ZIPs是一类锌的转运蛋白家族,高表达后能显著增加细胞内锌离子的浓度,引起锌介导的生长信号延长。ZIPs的过度表达能促进肿瘤的病理过程,主要作用是参与肿瘤细胞的上皮-基质转换(epithelial-mesenchymal transition, EMT)、凋亡抑制和侵袭<sup>[47]</sup>。在恶性胶质瘤中,大多数ZIPs的mRNA表达水平都是上调的。其中,ZIP4与该肿瘤的恶性程度相关性最大,基于ZIP4的表达水平和某些蛋白/细胞因子[如基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)、血管内皮生长因子-A(vascular endothelial growth factor-A, VEGF-A)、血小板衍生生长因子A亚基(platelet-derived growth factor subunit A, PDGF-A)、白介素-6、白介素-8和类胰岛素生长因子结合蛋白-2(insulin-like growth factor binding protein-2, IGFBP-2)]的关联性,ZIP4能够间接参与细胞增殖和血管生成,从而介导肿瘤的病理过程<sup>[48]</sup>。此外,ZIP4还与肿瘤预后不良相关。

抑癌基因TP53的突变易诱发癌变,几乎在一半的肿瘤中发现该基因失活<sup>[49]</sup>。野生型P53(wild type cellular tumor antigen p53)是锌结合蛋白,需要结合1个锌离子以维持正确的构象和功能<sup>[50]</sup>。此外,P53的重新激活及其负调控因子MDM2(mouse double minute 2)的下调主要依赖锌离子<sup>[51]</sup>。一旦TP53基因发生突变,P53蛋白失活,细胞分裂失去节制,易导致多种肿瘤发生。而P53的活性很大程度上可能与锌的结合有关。

MTs的所有亚型均广泛存在于中枢神经系统中。其中,MT-3具有特异性并且是含量最多的亚型,存在于神经元,大脑皮层的星形胶质细胞和海马中<sup>[52]</sup>。MT-3具有锌结合位点,可作为锌的供体以提高神经细胞中锌离子浓度,进而增强细胞反应信号。MTs被认为可以促进癌细胞增殖和转移,并抑制凋亡。文献报道,MT-3的表达量增高提示恶性胶质瘤预后较差<sup>[53]</sup>。Florjanczyk等<sup>[54]</sup>通过分析比较II级星形细胞瘤和恶性胶质瘤组织中锌、铜和MTs的水平,发现MTs和锌离子水平在恶性胶质瘤中是升高的,含铜量却没有差异,进一步证实MTs和锌与脑肿瘤的发生有着密切关系。

MMPs是锌依赖的内肽酶家族,以酶原的形式由癌细胞和/或基质细胞分泌<sup>[55]</sup>。这类酶能降解细胞外基质从而促进肿瘤细胞的转移和侵袭。虽然MMPs与癌症的发生和发展密切相关,MMPs的表达谱被作为脑肿瘤分类依据被提出<sup>[56]</sup>,但是MMPs在恶性肿瘤生物学活动中发挥的作用依然不完全清楚。

锌的转运调节异常或含锌蛋白功能缺陷与许多肿瘤相关,其结果是锌的稳态失衡。许多因素如应激、感染和慢性疾病也伴随着血清或组织中的锌离子浓度的改变。锌稳态的改变是促使肿瘤发生的原因还是在肿瘤活动(如应激)中所导致的结果这一问题仍未得到解答,但是与锌转运、调节或直接结合的蛋白质与某些肿瘤的发生也存在必然联系。

## 6 锌对铁硫蛋白的影响

生物体中含有铁硫簇的蛋白质一般称为铁硫蛋白,而铁硫蛋白的正常功能依赖于铁硫簇。在生物体内铁硫蛋白普遍存在,有着十分广泛的功能,包括电子传递、催化反应、DNA修复和基因调节等<sup>[57]</sup>。近年来的研究发现,某些铁硫蛋白还与肿瘤的发展有关,如[2Fe-2S]型铁硫蛋白NAF-1(nutrient-deprivation autophagy factor-1)的过表达能够增强肿瘤细胞对氧化应激的耐受能力,从而促进肿瘤细胞的生长<sup>[58]</sup>;又如与NAF-1同属于NEET蛋白家族(CDGSH iron-sulfur domain-containing protein NEET)的[2Fe-2S]型铁硫蛋白mitoNEET在调节线粒体铁和活性氧稳态中发挥作用。由于该蛋白质与线粒体的损伤和细胞死亡有关,因而可作为癌症药物的靶标<sup>[59]</sup>。铁硫蛋白涉及许多重要的生理过程,因此,铁硫蛋白的功能遭到破坏或铁硫簇的合成受阻

对于生物体来说都是致命的。铁硫蛋白容易受到许多金属离子的影响,这一现象为研究金属毒性的机制提供了依据。

### 6.1 过量锌对铁硫蛋白的影响及其与锌的毒性机理

长期以来,细胞中过量金属的毒性机制研究一直受到微生物学者的关注。很早以前,人们就将金属试剂用于杀菌,例如,银和汞作为抗菌物质应用于人类各种感染疾病的预防和治疗;汞还用于疫苗和植物种子的防腐;银制品的抗生物膜作用也应用于导尿管上。此外,物品表面上的镀银或铜被广泛用于院内感染的防护。然而这些软金属对细菌毒性的分子机理仍然不够清晰。传统的金属毒性理论包括以下三点。(1)金属离子竞争理论,二价阳离子竞争蛋白质(如锌指蛋白)上的金属结合位点,使功能蛋白失去作用。但是这一理论无法解释一价阳离子如 $\text{Ag}^+$ 和 $\text{Cu}^+$ 的毒性机理,因为一价的金属离子几乎不结合蛋白质上二价金属的结合位点。(2)金属的亲硫性理论,由于许多金属具有十分活跃的硫原子结合活性,使得以硫醇作为活性位点的酶受到抑制。但是这一观点仅来源于分子间的相互作用的研究和体外实验,在细胞内的作用方式依然缺乏证据。(3)氧化损伤理论,许多研究将金属的超负荷效应与氧化应激信号联系起来,如被氧化的DNA和脂质的累积。但是有些金属(如 $\text{Hg}$ 、 $\text{Ag}$ 和 $\text{Zn}$ )并没有氧化活性,因而这一理论并不能充分解释金属对细胞的毒性机理。

近几年通过将铜和锌的细菌毒性机制与铁硫蛋白特性相关联的研究提出了一个新的理论,即不稳定铁硫蛋白铁硫中心受攻击学说。铜、锌等直接

破坏一类 $[\text{4Fe-4S}]$ 蛋白酶(脱水酶)中不稳定的铁硫中心,导致酶活性丧失而致细胞毒性。例如,在体外纯化的延胡索酸酶A在高锌环境中其活性完全丧失;体内高锌状态也能显著影响6-磷酸葡萄糖脱氢酶(6-phosphogluconate dehydrogenase)的活性<sup>[60]</sup>。此外,在酵母菌中发现,细胞的高锌状态不仅能破坏铁的稳态还能影响铁硫酶(如顺乌头酸酶)的功能<sup>[4]</sup>。我们课题组前期的研究也得到了相似的结论,通过构建质粒在细菌体内表达人线粒体膜蛋白mitoNEET,证实锌可通过竞争铁硫簇的结合位点从而对其产生显著影响。在该铁硫蛋白上,锌与 $[\text{2Fe-2S}]$ 簇共享结合位点(Cys-72、Cys-74、Cys-83、His-87),以至于在高锌条件下mitoNEET不能正确组装铁硫中心。mitoNEET作为糖尿病治疗药物吡格列酮的作用靶点,其锌的结合特性是否与药物疗效相关尚无报道<sup>[61]</sup>。实际上,锌对铁硫簇的影响是十分广泛的,对以 $[\text{4Fe-4S}]$ 和 $[\text{2Fe-2S}]$ 作为辅基的蛋白质均有影响。我们在大肠杆菌(*Escherichia coli*)的生长环境中添加过量锌离子,通过检测菌体内铁硫簇依赖的NADH脱氢酶I(NADH dehydrogenase I)的活性,进一步证实了高浓度锌能显著抑制铁硫酶的活性(图2)。

针对过渡金属毒理学领域研究的热点,我们进一步从铁硫蛋白受影响的角度去研究锌的毒性机理。与前面的结论一致,体外构建载体表达和纯化的铁硫蛋白[铁氧还蛋白(ferredoxin)和二羧酸脱水酶(dihydroxy-acid dehydratase, IlvD)]在高浓度锌(200  $\mu\text{mol/L}$ )的影响下它们的铁硫簇丢失(本实验室数据),并且锌能通过铁硫簇的结合位点与铁硫蛋白稳定结合。由此可见,锌能破坏铁硫蛋白的活性中

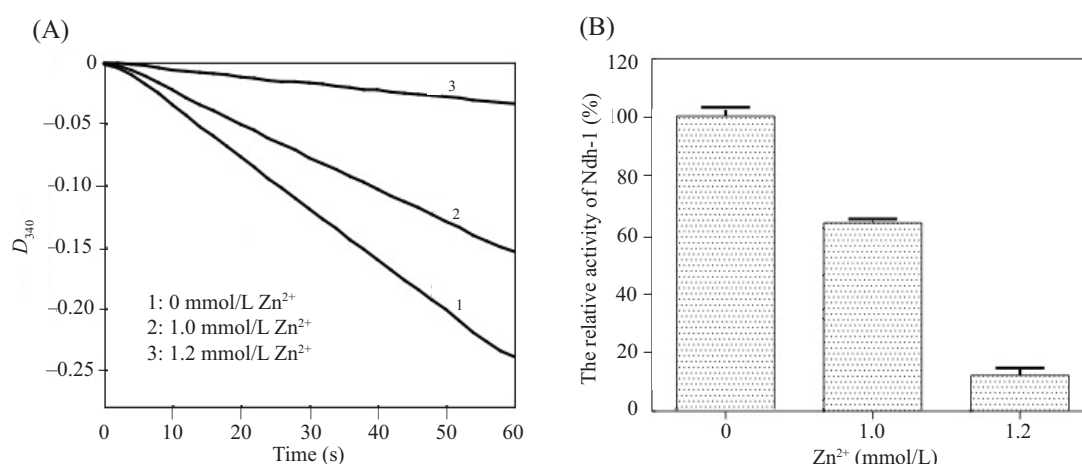


图2 高浓度锌对大肠杆菌NADH脱氢酶I的活性具有显著影响

Fig.2 Effect of high zinc levels on NADH dehydrogenase I activity in the *E. coli* cells

心,从而使一系列铁硫蛋白或酶的功能受损,这也部分解释了锌对细菌的毒性机制。

## 6.2 锌抑制铁硫簇的组装过程

锌对铁硫蛋白或酶产生广泛影响,而铁硫簇的组装又是一个复杂的过程。ISC(iron-sulfur cluster assembly machinery)和SUF(mobilization of sulfur)系统是原核细胞铁硫簇组装的2个主要途径,其组装蛋白分别由基因簇*iscSUA-hscBA-fdx-iscX*和*sufABCDSE*编码。此外,NIF(nitrogen fixation)系统主要为固氮菌中固氮酶提供铁硫簇。菱形的[2Fe-2S]簇和立方体形的[4Fe-4S]簇是最常见的铁硫簇形式。铁硫簇的组装机制在模式生物酵母菌和大肠杆菌中研究得相对较清楚。以大肠杆菌为例,以高度保守的IscU(iron-sulfur cluster assembly scaffold protein,人类中为ISCU1)为支架蛋白为铁硫簇的组装提供平台和瞬时的结合位点。硫的来源主要依赖于半胱氨酸脱硫酶(cysteine desulfurases, IscS)(人类中为NFS1-ISD11复合体)对半胱氨酸的脱硫作用。铁的来源目前仍有争议,国际主流观点认为,IscA能募集细胞内的游离铁并将其传递至支架蛋白IscU上,其他被认为是铁供体的还有IscX和CyaY<sup>[62]</sup>。而真核细胞中铁的传递过程目前还处于推测阶段。此外,铁氧还蛋白(ferredoxin)在铁硫簇组装过程中充当电子供体。组装的铁硫簇在ATP依赖的伴侣蛋白HscA、HscB和转运蛋白的协同作用下被转运至未成熟的靶蛋白<sup>[63]</sup>。铁硫簇的组装是多种蛋白质参与的有序的过程,由此我们不难想到,锌可能是通过阻碍铁硫簇的组装过程,使铁硫蛋白在合成之初就失去铁硫簇。这一猜想与前面的不稳定铁硫中心受攻击理论相悖。我们前期实验利用大肠杆菌铜稳态缺陷模型研究铜对原核细胞的毒性机理发现,在有氧条件下铜离子能够特异性结合铁硫簇组装蛋白IscA,进而影响IscA所介导的[4Fe-4S]簇的组装<sup>[64]</sup>。这一成果提示,过渡金属通过阻碍铁硫簇的组装过程从而间接影响铁硫蛋白,这也可能是金属毒性效应的主要机制。

铁硫簇组装蛋白(如IscA和IscU)容易成为过渡金属离子的靶点,进而影响铁硫簇的组装,并对铁硫蛋白产生广泛的影响(本课题组的观点,暂未发表)。联合前期铁硫簇组装机制的研究我们提出假设:过量锌通过结合铁硫簇组装蛋白IscU和IscA,进而阻碍它们所介导的[4Fe-4S]簇和[2Fe-2S]簇的组装,即

从铁硫簇的组装机制的角度去分析锌对细胞的毒性机理。真核细胞中铁硫簇的组装主要在线粒体中进行,其过程较原核复杂,过量锌是否能进入线粒体并影响铁硫簇的组装目前还没有报道。由于过量锌能够影响机体内铜、铁的代谢,这被认为是人体锌中毒反应的原因之一<sup>[65]</sup>。

## 7 讨论

关于锌的生物学功能的研究由来已久,机体内正常浓度的锌是生命发展与延续必不可少的条件。不同细胞或组织所含锌的量也不尽相同,在胰腺细胞中需要较多的锌以维持正常的细胞功能(胰岛素的合成和分泌)。锌的稳态异常通常伴随着疾病的发生。通过研究锌与铁硫簇组装的关系,发现锌对铁硫蛋白的影响是十分广泛的,对[2Fe-2S]和[4Fe-4S]铁硫蛋白均有影响,其结果是一系列以铁硫簇为辅基的蛋白质或酶的功能受到抑制。因此,我们可以从铁硫簇的组装和铁硫蛋白的合成角度去分析锌的毒性机制。

铁硫簇的组装受阻或铁硫蛋白的功能异常均会导致严重的后果,我们将铁硫簇或铁硫蛋白相关的疾病称为铁硫蛋白病(iron-sulfur protein diseases),例如,ISC系统中*FXN(frataxin)*基因第1个外显子中GAA重复序列过渡扩增所致的Friedreich共济失调疾病<sup>[66]</sup>。通过锌影响铁硫蛋白的研究可以进一步探索铁硫簇的组装机制并为锌紊乱性疾病和铁硫蛋白病的研究提供相关证据。锌的生物学功能涉及到生命活动的各个方面,尤其是参与细胞凋亡和抗增殖的作用,这对肿瘤辅助治疗具有重要意义。当然,关于锌对某些疾病(如糖尿病和肿瘤)的发生、发展的影响机制仍然缺乏足够证据,依旧需要进一步的研究和探索。

## 参考文献 (References)

- 1 Roohani N, Hurrell R, Kelishadi R, Schulin R. Zinc and its importance for human health: An integrative review. *J Res Med Sci* 2013; 18(2): 144-57.
- 2 Brown KH, Rivera JA, Bhutta Z, Gibson RS, King JC, Lonnerdal B, *et al.* International zinc nutrition consultative group (IZiNCG) technical document #1. Assessment of the risk of zinc deficiency in populations and options for its control. *Food Nutr Bull* 2004; 25(1 Suppl 2): S99-203.
- 3 Qi ZX, Cai JJ, Chen LC, Yue Q, Gong Y, Yao Y, *et al.* TRIM28 as an independent prognostic marker plays critical roles in glioma progression. *J Neurooncol* 2016; 126(1): 19-26.



- 4 Pagani MA, Casamayor A, Serrano R, Atrian S, Arino J. Disruption of iron homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae* by high zinc levels: A genome-wide study. *Mol Microbiol* 2007; 65(2): 521-37.
- 5 Constantinescu-Aruxandei D, Petrovic-Stojanovska B, Penedo JC, White MF, Naismith JH. Mechanism of DNA loading by the DNA repair helicase XPD. *Nucleic Acids Res* 2016; 44(6): 2806-15.
- 6 Chang PK, Ehrlich KC. Genome-wide analysis of the Zn(II)(2) Cys(6) zinc cluster-encoding gene family in *Aspergillus flavus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2013; 97(10): 4289-300.
- 7 Witte MM, Dickson RC. The C6 zinc finger and adjacent amino acids determine DNA-binding specificity and affinity in the yeast activator proteins LAC9 and PPR1. *Mol Cell Biol* 1990; 10(10): 5128-37.
- 8 Ma X, Huang M, Wang Z, Liu B, Zhu Z, Li C. ZHX1 Inhibits gastric cancer cell growth through inducing cell-cycle arrest and apoptosis. *J Cancer* 2016; 7(1): 60-8.
- 9 Li M, Ling B, Xiao T, Tan J, An N, Han N, *et al.* Sp1 transcriptionally regulates BRK1 expression in non-small cell lung cancer cells. *Gene* 2014; 542(2): 134-40.
- 10 Nunez N, Clifton MM, Funnell AP, Artuz C, Hallal S, Quinlan KG, *et al.* The multi-zinc finger protein ZNF217 contacts DNA through a two-finger domain. *J Biol Chem* 2011; 286(44): 38190-201.
- 11 Konieczny P, Stepniak-Konieczna E, Sobczak K. MBNL proteins and their target RNAs, interaction and splicing regulation. *Nucleic Acids Res* 2014; 42(17): 10873-87.
- 12 Little M, Holmes G, Walsh P. WT1: What has the last decade told us? *Bioessays* 1999; 21(3): 191-202.
- 13 Georgopoulos K. Haematopoietic cell-fate decisions, chromatin regulation and ikaros. *Nat Rev Immunol* 2002; 2(3): 162-74.
- 14 Eisbacher M, Holmes ML, Newton A, Hogg PJ, Khachigian LM, Crossley M, *et al.* Protein-protein interaction between Fli-1 and GATA-1 mediates synergistic expression of megakaryocyte-specific genes through cooperative DNA binding. *Mol Cell Biol* 2003; 23(10): 3427-41.
- 15 Lehmann W, Mossmann D, Kleemann J, Mock K, Meisinger C, Brummer T, *et al.* ZEB1 turns into a transcriptional activator by interacting with YAP1 in aggressive cancer types. *Nat Commun* 2016; 7: 10498.
- 16 Frieze S, O'Geen H, Blahnik KR, Jin VX, Farnham PJ. ZNF274 recruits the histone methyltransferase SETDB1 to the 3' ends of ZNF genes. *PLoS One* 2010; 5(12): e15082.
- 17 Keilin D, Mann T. Carbonic anhydrase. Purification and nature of the enzyme. *Biochem J* 1940; 34(8/9): 1163-76.
- 18 Vallee BL, Neurath H. Carboxypeptidase, a zinc metalloenzyme. *J Biol Chem* 1955; 217(1): 253-61.
- 19 Andreini C, Bertini I, Cavallaro G, Holliday GL, Thornton JM. Metal ions in biological catalysis: From enzyme databases to general principles. *J Biol Inorg Chem* 2008; 13(8): 1205-18.
- 20 Waldron KJ, Rutherford JC, Ford D, Robinson NJ. Metalloproteins and metal sensing. *Nature* 2009; 460(7257): 823-30.
- 21 Gregory DS, Martin AC, Cheetham JC, Rees AR. The prediction and characterization of metal binding sites in proteins. *Protein Eng* 1993; 6(1): 29-35.
- 22 Vallee BL, Auld DS. Cocatalytic zinc motifs in enzyme catalysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90(7): 2715-8.
- 23 Vallee BL, Auld DS. Zinc coordination, function, and structure of zinc enzymes and other proteins. *Biochemistry* 1990; 29(24): 5647-59.
- 24 Fukada T, Yamasaki S, Nishida K, Murakami M, Hirano T. Zinc homeostasis and signaling in health and diseases: Zinc signaling. *J Biol Inorg Chem* 2011; 16(7): 1123-34.
- 25 Lichten LA, Cousins RJ. Mammalian zinc transporters: Nutritional and physiologic regulation. *Annu Rev Nutr* 2009; 29: 153-76.
- 26 Kelleher SL, McCormick NH, Velasquez V, Lopez V. Zinc in specialized secretory tissues: Roles in the pancreas, prostate, and mammary gland. *Adv Nutr* 2011; 2(2): 101-11.
- 27 Maret W. Zinc biochemistry: From a single zinc enzyme to a key element of life. *Adv Nutr* 2013; 4(1): 82-91.
- 28 Gunes C, Heuchel R, Georgiev O, Muller KH, Lichtlen P, Bluthmann H, *et al.* Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the metal-responsive transcriptional activator MTF-1. *EMBO J* 1998; 17(10): 2846-54.
- 29 Takeda A, Tamano H, Imano S, Oku N. Increases in extracellular zinc in the amygdala in acquisition and recall of fear experience and their roles in response to fear. *Neuroscience* 2010; 168(3): 715-22.
- 30 Hirano T, Murakami M, Fukada T, Nishida K, Yamasaki S, Suzuki T. Roles of zinc and zinc signaling in immunity: Zinc as an intracellular signaling molecule. *Adv Immunol* 2008; 97: 149-76.
- 31 Du X, Xu H, Shi L, Jiang Z, Song N, Jiang H, *et al.* Activation of ATP-sensitive potassium channels enhances DMT1-mediated iron uptake in SK-N-SH cells *in vitro*. *Sci Rep* 2016; 6: 33674.
- 32 Illing AC, Shawki A, Cunningham CL, Mackenzie B. Substrate profile and metal-ion selectivity of human divalent metal-ion transporter-1. *J Biol Chem* 2012; 287(36): 30485-96.
- 33 Arslan M, Demir H, Arslan H, Gokalp AS, Demir C. Trace elements, heavy metals and other biochemical parameters in malignant glioma patients. *Asian Pac J Cancer Prev* 2011; 12(2): 447-51.
- 34 Rice JM, Zweifach A, Lynes MA. Metallothionein regulates intracellular zinc signaling during CD4<sup>+</sup> T cell activation. *BMC Immunol* 2016; 17(1): 13.
- 35 Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2014; 37(Supplement 1): S81-90.
- 36 Chimienti F, Devergnas S, Favier A, Seve M. Identification and cloning of a beta-cell-specific zinc transporter, ZnT-8, localized into insulin secretory granules. *Diabetes* 2004; 53(9): 2330-7.
- 37 Sladek R, Rocheleau G, Rung J, Dina C, Shen L, Serre D, *et al.* A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature* 2007; 445(7130): 881-5.
- 38 Ruz M, Carrasco F, Rojas P, Codoceo J, Inostroza J, Basfi-fer K, *et al.* Zinc as a potential coadjuvant in therapy for type 2 diabetes. *Food Nutr Bull* 2013; 34(2): 215-21.
- 39 Gold G, Grodsky GM. Kinetic aspects of compartmental storage and secretion of insulin and zinc. *Experientia* 1984; 40(10): 1105-14.
- 40 Zhou H, Zhang T, Harmon JS, Bryan J, Robertson RP. Zinc, not insulin, regulates the rat alpha-cell response to hypoglycemia *in*

- vivo*. Diabetes 2007; 56(4): 1107-12.
- 41 Tamaki M, Fujitani Y, Hara A, Uchida T, Tamura Y, Takeno K, *et al*. The diabetes-susceptible gene SLC30A8/ZnT8 regulates hepatic insulin clearance. J Clin Invest 2013; 123(10): 4513-24.
- 42 Wijesekara N, Dai FF, Hardy AB, Giglou PR, Bhattacharjee A, Koshkin V, *et al*. Beta cell-specific Znt8 deletion in mice causes marked defects in insulin processing, crystallisation and secretion. Diabetologia 2010; 53(8): 1656-68.
- 43 Chen MD, Song YM, Lin PY. Zinc effects on hyperglycemia and hypoleptinemia in streptozotocin-induced diabetic mice. Horm Metab Res 2000; 32(3): 107-9.
- 44 Kensova R, Hynek D, Kynicky J, Konecna M, Eckschlager T, Adam V, *et al*. Determination of metal ions in the plasma of children with tumour diseases by differential pulse voltammetry. Int J Electrochem Sci 2014; 9(8): 4675-91.
- 45 Jordanovski D, Herwartz C, Pawlowski A, Taute S, Frommolt P, Steger G. The hypoxia-inducible transcription factor ZNF395 is controlled by I $\kappa$ B kinase-signaling and activates genes involved in the innate immune response and cancer. PLoS One 2013; 8(9): e74911.
- 46 Pang F, Zha R, Zhao Y, Wang Q, Chen D, Zhang Z, *et al*. MiR-525-3p enhances the migration and invasion of liver cancer cells by downregulating ZNF395. PLoS One 2014; 9(3): e90867.
- 47 Kambe T, Hashimoto A, Fujimoto S. Current understanding of ZIP and ZnT zinc transporters in human health and diseases. Cell Mol Life Sci 2014; 71(17): 3281-95.
- 48 Lin Y, Chen Y, Wang Y, Yang J, Zhu VF, Liu Y, *et al*. ZIP4 is a novel molecular marker for glioma. Neuro Oncol 2013; 15(8): 1008-16.
- 49 Suzuki K, Matsubara H. Recent advances in p53 research and cancer treatment. J Biomed Biotechnol 2011; 2011: 978312.
- 50 Loh SN. The missing zinc: p53 misfolding and cancer. Metallomics 2010; 2(7): 442-9.
- 51 Trino S, De Luca L, Laurenzana I, Caivano A, Del Vecchio L, Martinelli G, *et al*. P53-MDM2 pathway: Evidences for a new targeted therapeutic approach in B-acute lymphoblastic leukemia. Front Pharmacol 2016; 7: 491.
- 52 Artells E, Palacios O, Capdevila M, Atrian S. *In vivo*-folded metal-metallothionein 3 complexes reveal the Cu-thionein rather than Zn-thionein character of this brain-specific mammalian metallothionein. Febs J 2014; 281(6): 1659-78.
- 53 Mehrian-Shai R, Yalon M, Simon AJ, Eyal E, Pismenyuk T, Moshe I, *et al*. High metallothionein predicts poor survival in glioblastoma multiforme. BMC Med Genomics 2015; 8: 68.
- 54 Florianczyk B, Osuchowski J, Kaczmarczyk R, Trojanowski T, Stryjecka-Zimmer M. Influence of metallothioneins on zinc and copper distribution in brain tumours. Folia Neuropathol 2003; 41(1): 11-4.
- 55 Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. Nat Med 2013; 19(11): 1423-37.
- 56 Bodey B, Bodey B Jr, Siegel SE, Kaiser HE. Matrix metalloproteinase expression in childhood astrocytomas. Anticancer Res 2000; 20(5A): 3287-92.
- 57 Zhang C. Essential functions of iron-requiring proteins in DNA replication, repair and cell cycle control. Protein Cell 2014; 5(10): 750-60.
- 58 Darash-Yahana M, Pozniak Y, Lu M, Sohn YS, Karmi O, Tamir S, *et al*. Breast cancer tumorigenicity is dependent on high expression levels of NAF-1 and the lability of its Fe-S clusters. Proc Natl Acad Sci USA 2016; 113(39): 10890-5.
- 59 Sohn YS, Tamir S, Song L, Michaeli D, Matouk I, Conlan AR, *et al*. NAF-1 and mitoNEET are central to human breast cancer proliferation by maintaining mitochondrial homeostasis and promoting tumor growth. Proc Natl Acad Sci USA 2013; 110(36): 14676-81.
- 60 Xu FF, Imlay JA. Silver (I), mercury (II), cadmium (II), and zinc (II) target exposed enzymic iron-sulfur clusters when they toxify Escherichia coli. Appl Environ Microbiol 2012; 78(10): 3614-21.
- 61 Tan G, Landry AP, Dai R, Wang L, Lu J, Ding H. Competition of zinc ion for the [2Fe-2S] cluster binding site in the diabetes drug target protein mitoNEET. Biometals 2012; 25(6): 1177-84.
- 62 Roche B, Huguenot A, Barras F, Py B. The iron-binding CyaY and IscX proteins assist the ISC-catalyzed Fe-S biogenesis in Escherichia coli. Mol Microbiol 2015; 95(4): 605-23.
- 63 Barupala DP, Dzul SP, Riggs-Gelasco PJ, Stemmler TL. Synthesis, delivery and regulation of eukaryotic heme and Fe-S cluster cofactors. Arch Biochem Biophys 2016; 592: 60-75.
- 64 Tan G, Cheng Z, Pang Y, Landry AP, Li J, Lu J, *et al*. Copper binding in IscA inhibits iron-sulphur cluster assembly in Escherichia coli. Mol Microbiol 2014; 93(4): 629-44.
- 65 Duncan A, Talwar D, Morrison I. The predictive value of low plasma copper and high plasma zinc in detecting zinc-induced copper deficiency. Ann Clin Biochem 2016; 53(Pt 5): 575-9.
- 66 Martelli A, Napierala M, Puccio H. Understanding the genetic and molecular pathogenesis of Friedreich's ataxia through animal and cellular models. Dis Model Mech 2012; 5(2): 165-76.