

# 小肠铁吸收机制及相关疾病研究进展

蒋达和 钱忠明

铁是人体内最丰富的微量元素之一。它广泛参与机体内的代谢过程,如氧的运输、DNA 的合成以及电子的传递等。缺铁可引起严重贫血等疾病,过多的铁将会损伤机体组织,导致神经退行性疾病,包括帕金森氏症和老年痴呆症等。因此,体内具有严格的调节机制,以保持铁平衡。近端小肠(十二指肠和空肠)是铁吸收的主要部位,也是调节铁平衡的一个关键环节。虽然过去的几十年已经投入了相当大的努力,各种假说,如载体转运、离子通道等机制已相继提出,但小肠黏膜铁吸收的机制一直是不清楚的。一般认为,铁在许多组织细胞被吸收(或摄取)都是通过经典的转铁蛋白(transferrin, Tf)和转铁蛋白受体(transferrin receptor, TfR)的途径<sup>[1]</sup>。即三价铁首先与 Tf 结合,两者的结合物再与细胞表面的 TfR 结合,之后经过内吞、酸化、释放和移位等步骤,铁进入胞浆,最终被细胞利用,合成血红蛋白及其他物质。但小肠肠腔表面的吸收上皮细胞不存在 TfR 表达,因此,铁穿过小肠进入机体不可能通过 Tf-TfR 的经典转运途径实现。近年来,在小肠黏膜细胞相继发现了 DMT1(divalent metal transporter 1)、Dcb(duodenal cytochrome b)、Fp1(ferroportin 1)和 Hp(hephaestin)等 4 种铁转运相关的蛋白质。这些蛋白的发现是铁代谢领域中近年取得的最大突破,也使小肠如何吸收铁这一重要问题有了基本答案。新的研究证实,DMT1 和 Dcb 两种蛋白质参与黏膜铁吸收过程(铁穿过肠吸收上皮细胞的顶端进入细胞),而 Fp1 和 Hp 则参与黏膜转运过程(从肠上皮细胞的基底侧转运入血液循环)。我们在此主要介绍这 4 种新发现的蛋白质和小肠铁吸收机制及相关疾病研究的最新进展。

## 一、DMT1(二价金属离子转运蛋白)

1995 年,Grueheid 等<sup>[2]</sup>在研究自然抗性相关巨噬细胞蛋白 1(nature resistance-associated macrophage protein 1, Nramp1)的过程中发现另一种与 Nramp1 有极高的同源性(达 78%)、并有相似二级结构的新蛋白质。这种当时并不完全清楚其功能的新蛋白质被命名为自然抗性相关巨噬细胞蛋白 2(Nramp2)。1997 年,哈佛大学和耶鲁大学的两个研究组分别独立地报道 Nramp2 是哺乳类第一个跨膜铁转运蛋白<sup>[3,4]</sup>。由于 Nramp2 具有转运二价铁及其他二价阳离子的功能,最初曾将此蛋白称为二价阳离子转运蛋白 1(divalent cation transporter 1)<sup>[4]</sup>,后改称为 DMT1<sup>[5]</sup>。人的 DMT1 基因含有 17 个外显子,定位于 12 号染色体上。其 mRNA 存在两种形式:即“+IRE”和“-IRE”型。“+IRE”型 DMT1 mRNA 的 3' 非翻

译区含有一个铁调节元件(iron regulatory element, IRE),“-IRE”型则不含此元件。这两种类型 DMT1 mRNA 可分别编码 561 和 568 个氨基酸的蛋白质<sup>[6]</sup>。该蛋白质含有 12 个跨膜结构域(transmembrane domain),在第 7 和第 8 跨膜结构域之间的天门冬氨酸残基是一个糖基化位点。第四跨膜结构域是一个重要的功能区,若此域发生突变将会严重影响 DMT1 功能的正常发挥。

大量的研究证实,小肠铁吸收是一个 DMT1 介导的过程。为了研究 DMT1 的功能,Conrad 等<sup>[7]</sup>将野生型 DMT1 DNA 转染人肾细胞 HEK293 进行摄取铁的实验,发现转染了 DMT1 DNA 的 HEK293 细胞所摄取<sup>59</sup>Fe 的量比未转染 DMT1 DNA 的细胞要高 30%。用含<sup>59</sup>Fe 的培养基培养 K562 细胞,然后分离提取 DMT1 蛋白质,发现含有二价铁的蛋白质主要是 DMT1,当用 DMT1 抗体处理 K562 细胞时,DMT1 蛋白质几乎不结合<sup>59</sup>Fe。这一实验结果表明,DMT1 是细胞吸收二价铁的泵蛋白质。研究也已证实 DMT1 在人体组织和细胞的分布十分广泛<sup>[4]</sup>,分子杂交结果显示,DMT1 在小肠和十二指肠表达最高,在肾、胸腺和脑有中等程度的表达,而在睾丸、肝、结肠、心脏、脾、骨骼肌、肺、骨髓的含量相对较低。在细胞水平,DMT1 特异地表达于某些需要发挥其功能的细胞。在小肠中,DMT1 主要在小肠肠腔的肠上皮细胞中表达,该蛋白质主要定位于该细胞的绒毛面细胞膜上,这与小肠铁吸收的解剖位置相一致。此外,来自小细胞性贫血(microcytic anaemia, mk)小鼠和 Bgrade 大鼠的研究结果也说明 DMT1 在小肠铁吸收过程中的重要性。这二种鼠都具有典型的由于小肠铁吸收障碍而导致的缺铁性贫血。现在知道这两种鼠的 DMT1 基因都有突变,这种突变发生在 DMT1 的第四功能区,原有的甘氨酸(G185R)被精氨酸取代<sup>[3]</sup>。正是 DMT1 的基因突变导致了 mk 小鼠和 Bgrade 大鼠的铁吸收障碍,因此形成贫血。再则,Gunshin 等<sup>[4]</sup>和 Han 等<sup>[8]</sup>在他们最近的实验中发现 DMT1 表达受机体铁状态调节。他们的结果显示,在铁缺乏大鼠的小肠细胞 DMT1 表达明显增加,并且这种表达的增加与否只受铁多少的影响,与其他金属无关。所有以上结果都证实小肠黏膜细胞铁吸收是 DMT1 的主要功能。

## 二、Dcb(肠细胞色素 B)

由于 DMT1 主要摄取二价铁,而食物中的铁为三价,所以需要一种高铁还原酶将三价铁转化为二价铁,铁才能经 DMT1 介导的过程被细胞摄取。酵母<sup>[9]</sup>、植物<sup>[10]</sup>和细菌中编码质膜高铁还原酶的基因都已经被克隆和鉴定,在动物的十二指肠黏膜和培养的小肠细胞中都证实存在一种高铁还原酶活性。最近,McKie 等<sup>[11]</sup>在使用消减杂交法鉴定和分离了

膜铁转运蛋白 1(IRT1)基因的同时,又从该消减库中鉴定和克隆了一个具有高铁还原酶活性的基因,命名为十二指肠细胞色素 b(DCb)。人的 DCb 基因由 4 个外显子组成,定位于 2 号染色体上,其 cDNA 全长约 1.2 kb,具有编码一个 286 氨基酸的开放阅读框(ORF)。小鼠的 DCb 蛋白质的氨基酸序列与羊的细胞色素 b561 具有 51% 同源性,而且有相似的膜拓扑学性质,都含有 6 个跨膜区域,但与植物和酵母的还原酶之间无同源性。现在认为,DCb 的作用是将肠腔内三价铁还原成二价铁,后者经 DMT1 被小肠细胞吸收。也就是说铁的黏膜吸收过程是由 DCb 和 DMT1 合力完成的。

将 DCb cRNA 注入非洲爪蛙卵母细胞和培养的小肠细胞(HuTur 80 和 CaCo-2),发现铁还原酶活性提高了 6 倍<sup>[11]</sup>。当用 DCb 蛋白质的抗体处理后,铁还原酶的活性则被抑制,证明 DCb 蛋白质是一个铁还原酶。原位杂交结果显示,DCb 的 mRNA 和蛋白质主要定位于十二指肠刷状绒毛尖部的细胞膜上<sup>[5]</sup>,该部位是食物铁被摄入肠细胞的主要部位。DCb 基因在十二指肠的表达受铁的状况影响<sup>[11]</sup>。不能将铁转运到红细胞系而发展成慢性贫血的 hpx 小鼠(缺乏循环性运铁蛋白)纯合子,其 DCb mRNA 和蛋白质表达水平比杂合子 hpx 小鼠要高得多,说明慢性贫血可以提高 DCb 的表达水平。通过饲喂缺铁饲料造成缺铁性小鼠,其十二指肠中 DCb mRNA 和蛋白质的合成也大为提高。表明缺铁可上调 DCb 基因的表达。这些功能、定位和调节的研究结果均显示 DCb 在黏膜吸收铁过程中起有重要作用。

### 三、Fp1(膜铁转运蛋白 1)

DMT1 和 DCb 合力将铁摄入细胞,那么铁又如何从肠细胞释放入肠毛细血管进入血液循环呢?最近的研究解开了这个迷。Donovan 等<sup>[12]</sup>采用定位克隆的方法从斑马鱼(zebrafish)中分离出一个能使铁从细胞内释放出来的蛋白质编码基因,并命名为 ferroportin1 (Fp1)。随后,通过 RT-PCR 方法克隆了小鼠和人的 Fp1 cDNA。与此同时,英国和美国的另外两个研究小组也分别从小鼠和人细胞中鉴定和克隆了这个基因,并分别命名为 IRT1 (iron-regulated transporter 1)<sup>[13]</sup>和 Mtp1(metal transporter protein 1)<sup>[14]</sup>。

研究表明,人的 Fp1 含 8 个外显子,定位于 2 号染色体上,其 mRNA 能编码一个 571 个氨基酸的开放阅读框,在 Fp1 mRNA 5' 端非翻译区含有一个典型的铁调节蛋白(Iron regulatory protein, IRP)的结合域——铁反应元件(Iron responsive element, IRE)。根据 mRNA 推测出的蛋白质序列,Fp1 含有至少 10 个跨膜结构域,是一种细胞膜结合的蛋白质。Western blot 分析表明,该基因的表达产物为一个相对分子质量约 62 000 的蛋白质<sup>[13]</sup>,与根据 mRNA 序列推测的相对分子质量完全相符。在该蛋白质的 C-末端含有一个 T/S-X-V/L 的序列结构,此序列可以被含有 PDZ 结构域的蛋白质所识别<sup>[15]</sup>,而 PDZ 蛋白质能够通过 PDZ 的作用,将靶蛋白聚集到极化上皮细胞的基底膜上<sup>[16]</sup>。免疫组化分析和原位杂交已证实这种蛋白质在组织细胞内的分布主要存在于十二指肠细胞的基底膜上<sup>[12,13]</sup>。该蛋白质还具有一个推测

的 NADP/腺嘌呤结合位点序列 IFVGGP,该结构域在 NADH 和 NADPH 还原酶家族包括酵母铁还原酶和嗜中性白细胞氧化还原酶中都存在<sup>[17]</sup>,提示着 Fp1 蛋白质可能本身就具有铁还原酶活性。

将非洲爪蛙卵母细胞预先负载<sup>55</sup>Fe 然后注射 IRT1 的 cRNA 和/或 DMT1 cRNA,在铜蓝蛋白(ceruloplasmin, Cp)和转铁蛋白(Tf)的存在下,注射了 IRT1 cRNA 的卵母细胞将 80% 的<sup>55</sup>Fe 释放出来,而注射 DMT1 cRNA 的卵母细胞则极少释放<sup>55</sup>Fe<sup>[13]</sup>。Donovan 等也证实表达 Fp1 的卵母细胞释放铁的量比不表达 Fp1 的至少要高 5 倍<sup>[4,12]</sup>。结果证明 Fp1 蛋白质具有使铁从细胞内释放出来的功能。Northern blot 杂交显示 Fp1 基因在小鼠的大肠和小肠组织都有表达,而十二指肠表达最强<sup>[4,9]</sup>。在人的心、脾、胃、小肠、胎盘、肺、卵巢、睾丸、前列腺、胰腺等组织也都有 Fp1 mRNA 合成,但在脑和胸腺组织则极少或不表达<sup>[18]</sup>。Fp1 的表达受多种因素的调控,如铁、缺氧、不同发育阶段等都会影响该基因的表达。饲喂缺铁食物 4 周的小鼠十二指肠的 Fp1 mRNA 表达水平比饲喂富铁食物组要高 2.4 倍<sup>[12]</sup>,在缺氧 24 h 时,小鼠十二指肠 Fp1 的 mRNA 的水平是对照组的 3 倍<sup>[13]</sup>。在新生小鼠的十二指肠 Fp1 mRNA 的合成很低,在生长发育过程中逐渐增加,至 23 天时,可达到成年小鼠的水平,说明 Fp1 基因的表达受发育因素调控。对遗传性血色素沉着症(hereditary hemochromatosis, HH)患者的十二指肠活本进行检查,发现患者的 Fp1 的 mRNA 表达量平均比正常人高 3 倍<sup>[13]</sup>。有报道<sup>[19]</sup>,HH 患者 DMT1 和 Fp1 的 mRNA 和蛋白质表达量均比正常人高 2~3 倍。Njajou 等<sup>[20]</sup>对一个 HH 大家族进行全基因组扫描,发现在第 2 号染色体上 SLCA3 基因(人的 Fp1 基因)的第 5 个外显子内 734 位核苷酸由 A 突变为 C(A734C),所编码的蛋白质也发生改变(N144H),由组氨酸取代天门冬氨酸。这是 HH 疾病中发现的第 4 种基因突变位点,称为 HFE4,说明 Fp1 基因的突变可导致血色素沉着症的发生。

### 四、Hp(膜铁转运辅助蛋白)

过去认为,铁从肠上皮细胞被转运至血液循环的时候需要将二价铁转化为三价铁,这种氧化过程可能是铜蓝蛋白(Cp)在起主要作用。然而新的研究发现,Cp 基因敲除的小鼠肠铁摄取和释放入血液中以及黏膜中的铁含量与正常小鼠相比均无差异<sup>[21]</sup>,说明 Cp 在铁从小肠上皮细胞转运入血液的过程中不起主要作用,另有其他酶存在。最近,Vulpe 等<sup>[22]</sup>使用遗传图谱结合候选基因的方法发现了一个新的基因。他们将这一新基因进行了分离和克隆,并将该基因以一个锻造铁的希腊神 Hephaestus 的名字命名为 Hephaestin(Hp)。他们的工作显示 Hp 蛋白具有将二价铁转化为三价铁的功能,可能具有辅助 Fp1 参与肠上皮细胞铁释放的生理作用。

现已清楚,人的 Hp 基因由 20 个外显子组成,定位于 Xq11-q12 能编码一个 1 158 个氨基酸的蛋白质。小鼠 Hp 基因编码的蛋白质序列与具有氧化酶活性的 Cp 有 50% 是相同的。Cp 中结合铜的 I、II、III 型结合铜的位置以及参与形成二硫键的所有半胱氨酸在 Hp 蛋白质中都存在,说明该蛋

白质也是一种铁氧化酶。在 Hp 蛋白质的 C-末端含有一个跨膜结构域,表明该蛋白质的定位是在细胞膜上。原位杂交结果分析表明, Hp 的表达在小鼠小肠中仅限于肠绒毛(Villi)细胞,在隐窝细胞(crypt cell)几乎观察不到杂交信号<sup>[22]</sup>。由于小肠吸收铁的过程主要发生在绒毛细胞,因此, Hp 在该细胞的定位是与铁的摄取位置一致的。性连贫血(sex-linked anaemia, SLA)性小鼠可以发展成严重的小细胞低色素性贫血(microcytic hypochromic anaemia)。虽然 SLA 小鼠小肠黏膜上皮细胞可以正常地摄取铁,但是铁从细胞释入血液循环的能力大为降低/或受阻。研究发现, SLA 小鼠的 Hp 基因与正常小鼠相比,缺失了一段 582 个核苷酸<sup>[20]</sup>。这表明造成性连贫血小鼠的原因是 Hp 基因功能缺陷。也就是说 Hp 蛋白质参与铁从小肠上皮细胞转运到血液循环的过程。

### 五、小结

以往几年的突破性进展已使我们对铁由肠腔进入血液的过程有了基本的了解。是 DCB 将肠腔内三价铁还原成二价铁,再由 DMT1 将二价铁由肠腔转运入绒毛膜上皮细胞内,细胞内二价铁由于 Hp 的作用成为三价铁,后者经 Fp1 介导由上皮细胞释出进入血液循环,完成整个铁吸收过程。然而,应该指出,有关这一过程的许多问题还不清楚,彻底阐明小肠铁吸收机制还需要时间和努力。我们尚不知道这些蛋白表达的调控机制。对蛋白质与蛋白质之间相互作用的分子事件也了解甚少。此外,最近的研究已显示这些蛋白质的表达异常可导致铁吸收异常增加,以致脑内铁积聚过多,后者可能是某些神经退行性疾病的病因<sup>[23,24]</sup>。因此,进一步深入研究这些蛋白的表达调控及相关的问题是十分必要的。这些问题的理解将不仅有助于我们更彻底的认识铁吸收的生理机制,而且可以大大增加我们对铁吸收异常及相关疾病机理和发展过程的了解。

### 参 考 文 献

- 1 Qian ZM, Tang PL. Mechanisms of iron uptake by mammalian cells. *Biochem Biophys Acta*, 1995, 1269: 205-214.
- 2 Gruenheid S, Cellier M, Vidal S. Identification and characterization of a second mouse Nramp gene. *Genomics*, 1995, 25: 514-525.
- 3 Fleming MD, Trenor CC 3rd, Su MA, et al. Microcytic anaemia mice have a mutation in Nramp2 a candidate iron transporter gene. *Nat Genet*, 1997, 16: 383-386.
- 4 Gunshin H, MacKenzie B, Berger UV, et al. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature*, 1997, 388: 482-488.
- 5 Andrews NC. The iron transporter DMT1. *Int J Biochem Cell Biol*, 1999, 31: 991-994.
- 6 Lee PL, Gelhart T, West C, et al. The human Nramp2 gene: characterization of the gene structure, alternative splicing, promoter region and polymorphisms. *Blood Cells Mol Dis*, 1998, 24: 199-215.
- 7 Conrad ME, Umbreit JN, Moore EG, et al. Separate pathways for cellular uptake of ferric and ferrous iron. *Am J Physiol*, 2000, 279: G767-774.
- 8 Han O, Fleet JC, Wood RJ. Reciprocal regulation of HFE and Nnamp2 gene expression by iron in human intestinal cells. *J Nutr*, 1999, 129: 98-104.
- 9 Dancis A, Roman DG, Anderson GJ, et al. Ferric reductase of *Saccharomyces cerevisiae*: molecular characterization, role in iron uptake, and transcriptional control by iron. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 3869-3873.
- 10 Robinson NJ, Procter CM, Connolly EL, et al. A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils. *Nature*, 1999, 397: 694-697.
- 11 McKie AT, Barrow D, Latunde-Dada GO, et al. An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. *Science*, 2001, 291: 1755-1759.
- 12 Donovan A, Brownline A, Zhuo Y, et al. Positional cloning of zebraish ferroportin 1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature*, 2000, 403: 776-781.
- 13 McKie AT, Marciani P, Rolfs A, et al. A novel duodenal iron-regulated transporter IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Mol Cell*, 2000, 5: 299-309.
- 14 Abbound S, Haile DJ. A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism. *J Biol Chem*, 2000, 275: 19906-19912.
- 15 Saras J, Heldin CH. PDZ domains bind carboxy-terminal sequences of target proteins. *Trend Biochem Sci*, 1996, 21: 455-458.
- 16 Perego C, Vanoni C, Villa A, et al. PDZ-mediated interactions retain the epithelial GABA transporter on the basolateral surface of polarized epithelial cells. *EMBO J*, 1999, 18: 2388-2393.
- 17 Segal AW, Abo A. The biochemical basis of the NADPH oxidase of phagocytes. *Trend Biochem Sci*, 1993, 18: 43-47.
- 18 Rotig A, Chantrel-Groussard K, Munnich A, et al. Expression study of genes involved in iron metabolism in human tissues. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 281: 804-809.
- 19 Zoller H, Koch RO, Theurl I, et al. Expression of the duodenal iron transporters divalent-metal transporter 1 and ferroportin 1 in iron deficiency and iron overload. *Gastroenterology*, 2001, 120: 1412-1419.
- 20 Njajou OT, Vaessen N, Jooze M, et al. A mutation in SLC11A3 is associated with autosomal dominant hemochromatosis. *Nat Genet*, 2001, 28: 213-214.
- 21 Harris ZL, Durley AP, Man TK, et al. Targeted gene disruption reveals an essential role for ceruloplasmin in cellular iron efflux. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 10812-10817.
- 22 Vulpe CD, Kuo YM, Murphy TL, et al. Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the sla mouse. *Nat Genet*, 1999, 21: 195-199.
- 23 Qian ZM, Wang Q. Expression of iron transport proteins and excessive iron accumulation of iron in the brain in neurodegenerative disorders. *Brain Res Rev*, 1998; 257-267.
- 24 Qian ZM, Ke Y. Brain iron transport and neurodegeneration. *Trend Mol Med*, 2001, 7: 103-108.

(收稿日期: 2001-08-09)

(本文编辑: 徐弘道)