

黑素转铁蛋白在家兔网织红细胞膜上的表达 及其在铁摄取中的作用*

陈文芳¹, 钱忠明², 谢俊霞¹

(1. 青岛大学医学院生理教研室, 山东 青岛 266021; 2 香港理工大学应用生物及化学技术系, 香港)

摘要 目的: 研究黑素转铁蛋白(p97)在家兔网织红细胞膜上的表达及其在非转铁蛋白结合铁摄取中的作用。**方法:** 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和放射性同位素法(⁵⁹Fe)。**结果:** ①网织红细胞孵育液浓缩后, 经 SDS-PAGE 测定, 在分子量 97kD 位置上可见一条明显的蛋白带; 用磷脂酰肌醇磷脂酶 C(PI-PLC) 300 mu/ml 预处理网织红细胞后, 孵育液浓缩再经 SDS-PAGE 测定, 在分子量 97kD 处仍有一条明显的蛋白带, 且其平均 OD 值高于未经处理的网织红细胞; 而成熟的红细胞在此处却没有明显的蛋白带。②单纯用 PI-PLC 作用于网织红细胞, 其铁摄取无明显变化($P > 0.05$)。③去除内源性转铁蛋白后, 再用 PI-PLC 作用网织红细胞, 则胞浆内铁及整合到血红素中的铁均较未经处理的网织红细胞明显降低($P < 0.05$)。**结论:** p97 可能存在于家兔网织红细胞膜上, 且在摄取非转铁蛋白结合铁的过程中可能发挥作用。

关键词: 黑素转铁蛋白; 聚丙烯酰胺凝胶电泳; 非转铁蛋白结合铁; 网织红细胞

中图分类号: Q26

文献标识码: A

文章编号: 1000-6834(2001)04-0356-04

黑素转铁蛋白(melanotransferrin)又名 p97, 应用单克隆抗体首先在黑色素瘤细胞表面发现^[1,2], 是人类黑色素瘤相关抗原。研究提示 p97 属于运铁蛋白家族中的成员。可以有两种不同的形式存在, 一种是经糖基-磷脂酰肌醇(GPI)与细胞膜结合; 另一种 p97 是可溶性的, 存在于脑脊液和血液中, 且不含 GPI。大量研究提示在许多体外培养的细胞如肝细胞、胎儿小肠细胞、脐带、胎盘、汗腺导管及人脑毛细血管内皮细胞表面都含有 p97, 均有产生可溶性 p97 的能力, 且 p97 能够将枸橼酸铁内化进入细胞, 而对转铁蛋白结合铁却没有作用。但有关网织红细胞膜上是否有 p97 存在以及 p97 在其铁摄取中的作用却未见报道。本实验采用聚丙烯酰胺凝胶电泳法研究 p97 在家兔网织红细胞膜上的表达, 并对其进行功能实验, 研究 p97 在非转铁蛋白结合铁摄取途径中的作用。

1 材料和方法

1.1 药品与试剂

⁵⁹Fe(FeCl₃)为 Amersham 公司产品, 比活性为 518.13mCi/mmol; PI-PLC 为 Sigma 公司产品; 电泳所用试剂为 Bio-Rad 公司产品; 常规试剂均为分析纯级。

1.2 家兔贫血模型和网织红细胞的制备

健康日本大耳家兔 2 只, 雌雄不拘, 体重分别为 2.3 和 2.7 kg, 按照 Morgan 等方法复制贫血模型^[3]。网织红细胞是从苯胂诱发的贫血家兔模型中获得, 在最后一次注射苯胂后 3~5 d 从耳缘静脉取血 15

ml, 血细胞用冷 0.15 mol/L NaCl 溶液洗 3 次, 每次洗涤后离心将上清液去除, 接着在 4℃条件下以 2000 g 离心力离心 30 min, 收集上层 1/4 的细胞, 网织红细胞浓度为 78%~84.5%, 将其悬浮于 PBS 缓冲液, 使网织红细胞比容维持在 11%~17%。

成熟的红细胞从正常家兔中获得。洗涤方法同前, 最后一次离心后, 取试管底部 1/4 的细胞并悬浮于 PBS 缓冲液, 使红细胞比容维持在 11%~17%。

1.3 聚丙烯酰胺凝胶电泳

大约 2×10^8 网织红细胞在 PI 0.5 ml 的磷酸盐缓冲液(pH 7.4)中或 0.5 ml 含 PI-PLC (300 mu/ml)的磷酸盐缓冲液(pH 7.4)中, 30℃孵育 30 min, 摇床震荡。细胞以 2 000 g 离心 30 min, 收集上清液, 用 0.2 μm 的膜过滤, 随后用 Centricon-10 浓缩 7 倍做 SDS-PAGE 分析。约 2×10^8 成熟红细胞在 0.5 ml 的磷酸盐缓冲液(pH 7.4)中孵育, 用同样的方法浓缩分析。

将上清液浓缩 7 倍后等量加样在 10%的聚丙烯酰胺凝胶中垂直电泳(夹心式电泳槽), 凝胶以 0.1%的考马斯亮蓝 R250 室温下固定染色 30~40 min, 随后用含 40%甲醇和 10%冰醋酸的蒸馏水脱色 1~3 h, 直至背景清晰。

1.4 细胞铁摄取的测定

实验中应用的枸橼酸铁溶液是由 ⁵⁹FeCl₃ 与枸橼酸钠按 1:100 的摩尔比混合, 使铁的最终浓度为 31.25 μmol/L。

*收稿日期: 2000-01-10 修回日期: 2000-12-18

作者简介: 陈文芳(1968-), 女, 讲师, 硕士, 从事铁代谢研究。

2 只动物共取血 5 次。对照组孵育时将 0.1 ml 网织红细胞与枸橼酸铁混合使铁的最终浓度为 2.5 $\mu\text{mol/L}$ ，在 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴摇床中孵育 30 min，随后网织红细胞用冰冷的 PBS 液洗 3 次，每次洗涤后在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下以 2 000g 离心 10 min，最终网织红细胞以 1.0 ml 20 mmol/L Hepes(pH7.4)溶解，其中一半在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下以 19 000 g 离心 10 min 分离出胞浆，另一半用来抽提血红素^[4]。胞浆内及血红素内摄取铁以 γ -闪烁计数器(Packard 公司产品)来测定。

磷脂酰肌醇磷脂酶 C (PI-PLC) 实验组中，将 300 mu/ml PI-PLC 预先加入孵育液中孵育 30 min，随后将枸橼酸铁加入混匀重复上述实验。

为去除内源性转铁蛋白，部分网织红细胞用 PBS 缓冲液在 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min，离心后去除上清液，重复 3 次，离心后将网织红细胞悬浮于 PBS 中，使网织红细胞比容维持在 11% ~ 17%。实验组将 300 mu/ml PI-PLC 加入孵育液中孵育 30 min，随后加入枸橼酸铁重复上述实验；对照组中加入等量 PBS 孵育 30 min，重复上述实验。

2 结果

2.1 SDS-PAGE 蛋白电泳结果

在 SDS-PAGE 电泳分析图(图 1)中，成熟红细胞孵育上清液，在分子量 97 kD 位置上没有明显的蛋白带；而网织红细胞孵育上清液在此位置上有一条明显的蛋白带，同样的结果在 PI-PLC 预处理过的网

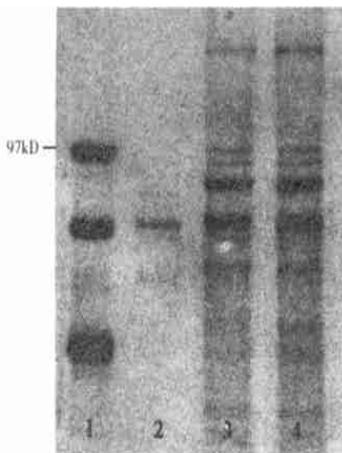


Fig. 1 Coomassie brilliant blue R250 staining profiles of SDS-PAGE of protein isolated from supernatant of cultured cells

- 1; marker; 2; Supernatant of red blood cells;
- 3; Supernatant of reticulocytes;
- 4; Supernatant of PI-PLC + reticulocytes

织红细胞上清液也有，且经 Model GS-670(图象分析系统)进行电泳带扫描分析，得出两条电泳带的光密

度(OD)值分别为 0.315 和 0.350，后者高于前者，提示家兔网织红细胞表面可能存在 p97。

2.2 PI-PLC 对网织红细胞铁摄取的影响

在铁摄取实验以前，预先用 PI-PLC (300 mu/ml) 预处理网织红细胞，对照组用等量 PBS 代替，结果单纯用 PI-PLC 组胞浆内摄取的铁与对照 PBS 组相比，无显著性差异 ($P > 0.05$)；被网织红细胞摄取整合到血红素上的铁，两组相比亦无显著性差异 ($P > 0.05$) (表 1)。表明单纯用 PI-PLC 作用于网织红细胞对其铁摄取没有影响。

Tab. 1 Effect of pre-treating reticulocytes with PI-PLC on Fe^{3+} uptake ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Group	Iron uptake ($\mu\text{mol}/10^8$)	
	Cytosol	Heme
Control	23.16 \pm 3.78	6.46 \pm 1.27
PI-PLC	23.64 \pm 2.03	6.26 \pm 3.15

2.3 去除内源性转铁蛋白后，PI-PLC 对网织红细胞铁摄取的影响

去除内源性转铁蛋白后，在孵育液中加入 PI-PLC，胞浆内摄取的铁与对照 PBS 组相比，前者明显低于后者 ($P < 0.05$)；同时被网织红细胞摄取整合到血红素上的铁，前者亦明显低于后者 ($P < 0.05$) (表 2)。

Tab. 2 Effect of PI-PLC on Fe^{3+} uptake of reticulocytes depleted endogenous transferrin ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Group	Iron uptake ($\mu\text{mol}/10^8$)	
	Cytosol	Heme
Control	2.35 \pm 0.37	1.47 \pm 0.11
PI-PLC	1.82 \pm 0.23 *	1.31 \pm 0.06 *

* $P < 0.05$, compared with control

3 讨论

p97 是属于运铁蛋白家族(包括血清转铁蛋白，人乳铁蛋白等)中的一员，是一种糖蛋白。虽然 p97 与转铁蛋白、人乳铁蛋白有明显的结构相似性，但它是唯一通过糖基，磷脂酰肌醇(GPI)与细胞膜相连的蛋白，且有一种可溶形式，目前尚不清楚两种不同形式的 p97 之间的功能关系^[5]。Jefferies 等的研究证明，p97 可能也参与了正常的脑铁代谢，而且很可能 p97 的过度表达是老年痴呆病人脑部铁过度增加的原因，进而导致大量的自由基产生以至某些脑细胞死亡^[6]。

网织红细胞的摄铁十分活跃，大量研究结果提

示其摄取铁有两条途径, 一条为转铁蛋白依赖铁摄取途径, 另一条为非转铁蛋白依赖铁摄取途径^[7-10]。本实验旨在探讨在网织红细胞膜是否有 p97 存在及其在非转铁蛋白依赖铁摄取通路中的作用。研究发现, 孵育网织红细胞后, 其孵育液浓缩 7 倍后, 用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质, 发现在分子量 97kD 附近有一条蛋白质带, 且用 PI-PLC (能特异性将 GPI 连接的 p97 从细胞表面裂解下来的细菌酶) 处理后的上清液, 在分子量 97kD 处仍有一条明显的蛋白质带, 且其电泳 OD 值高于对照组, 而成熟的红细胞则没有此蛋白质, 这与对转铁蛋白受体的研究结果非常相似, 转铁蛋白在摄铁活跃的网织红细胞膜表面含量非常丰富, 但随着细胞的成熟, 它在红细胞膜上的表达就会消失。上述结果提示在家兔网织红细胞表面可能存在有 p97。为证实此推测, 本实验对 p97 进行了摄铁功能实验。

从表 2 可见, 单纯用 300 mU/ml PI-PLC 处理网织红细胞, 其铁的摄取几乎不受影响, 这与以往的研究结果是一致的^[9]。因为对于细胞摄铁, 转铁蛋白介导的铁摄取是细胞铁积累的主要途径, 体内 p97 在正常铁循环中几乎不起作用。p97 具有在铁负载的情况下, 做为铁的屏蔽剂来减少铁的毒性作用。

虽然转铁蛋白是细胞铁的主要来源, 但许多配体可以向细胞供铁。当内源性的转铁蛋白存在时, 网织红细胞摄取利用低分子量整合剂结合的铁, 是通过整合剂与转铁蛋白之间的交换, 由转铁蛋白受体中介来完成的, 所以为研究网织红细胞非转铁蛋白依赖铁摄取途径, 通常采用两种模型, 一种是通过蛋白酶使转铁蛋白受体失活, 另一种是通过孵育去除细胞内源性转铁蛋白, 本实验采用去除内源性转铁蛋白的模型。由表 2 可见, 首先我们证实去除胞内转铁蛋白后的网织红细胞, 其铁摄取可减少 90%, 进一步证实由转铁蛋白受体介导的摄铁途径是网织红细胞铁摄取的主要途径, 而去除转铁蛋白受体后, 网织红细胞仍可内化低水平的枸橼酸铁。

在此模型系统中, 应用 300 mU/ml PI-PLC 预处

理网织红细胞, 结果网织红细胞胞浆内摄取铁减少 23%, 整合到血红素中的铁减少 11%。

实验结果提示在家兔网织红细胞膜上可能存在有 p97, 并且在非转铁蛋白依赖摄铁途径, p97 可能参与了此过程。

4 参考文献

- [1] Dippold W G, Lloyd K O, Li L T, *et al.* Cell surface antigens of human melanoma: Definition of six antigenic systems with monoclonal antibodies [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980, 77: 6114-6118.
- [2] Food M R, Rothenberger S, Gabathuler R, *et al.* Transport and expression in human melanomas of a transferrin-like glycosylphosphatidylinositol anchored protein [J]. *J Biol Chem*, 1994, 269(4): 3034-3040.
- [3] Qian Z M, Morgan E H. Effect of metabolic inhibitors on uptake of non-transferrin-bound iron by reticulocytes [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1991, 1073: 456-462.
- [4] Bottomley S S, Wolfe L C, Bridges K R. Iron metabolism in K562 erythroleukemic cells [J]. *J Biol Chem*, 1985, 260(11): 6811-6815.
- [5] Brown J P, Hewick R M, Hellstrom I. *et al.* Human melanoma-associated antigen p97 is structurally and functionally related to transferrin [J]. *Nature*, 1982, 296: 171-173.
- [6] Jeffenes W A, Food M R, Gabathuler R, *et al.* Reactive microglia specifically associated with amyloid plaques in Alzheimer's disease brain tissue express melanotransferrin [J]. *Brain Research*, 1996, 712: 122-126.
- [7] Hodgson L L, Quail E A, Morgan E H. Iron transport mechanism in reticulocytes and mature erythrocytes [J]. *J Cell Physiol*, 1995, 162: 181-190.
- [8] Qian Z M, Tang P L. Mechanisms of iron uptake by mammalian cells [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1995, 1269: 205-214.
- [9] 钱忠明, 蒲咏梅, 邓伯礼. 网织红细胞铁摄取机制的研究进展 [J]. *生物化学及生物物理进展*, 1997, 24(1): 20-25.
- [10] Kennard M L, Feldman H, Yamada T, *et al.* Serum level of the iron binding protein P97 are elevated in Alzheimer's disease [J]. *Nature Medicine*, 1996, 2(11): 1230-1235.

THE EXPRESSION OF P97 ON THE MEMBRANE OF THE RETICULOCYTE AND THE ROLE IN IRON UPTAKE IN RABBIT

CHEN Wen-fang¹, QIAN Zhong-ming², XIE Jun-xia¹

(1. Department of physiology, The Medical College of Qingdao University, Qingdao 266021, China;

2. Department of Applied Biology and Chemical Technology, Hong Kong Polytechnic University, China)

ABSTRACT

Aim: To investigate the expression of p97 on the membrane of the reticulocyte and the possible role in non-transferrin bound iron uptake. **Methods:** The SDS-PAGE and the radioisotope (^{59}Fe) was used in this investigation. **Results:** ①The protein of the supernatant of reticulocytes was separated on SDS-PAGE. There was one band near 97kDa. The same result was obtained with reticulocytes treated with PF-PLC and the Mean OD of the band was higher than that of untreated reticulocytes. But for the mature erythrocytes there wasn't apparent band near 97kD. ②No apparent effect of only PF-PLC treatment on iron uptake by reticulocytes ($P > 0.05$). ③ Reticulocytes, depleted endogenous-transferrin and then treated by PF-PLC, gave a significant decrease in iron uptake in cytosol and in heme ($P < 0.05$). **Conclusion:** The results support the possibility that p97 might be able to be expressed on the membrane of reticulocytes and plays a role in non-transferrin bound iron uptake by this type of cells in rabbit.

KEY WORDS: melanotransferrin(p97); SDS-PAGE; non-transferrin bound iron; reticulocyte

人骨髓细胞长期低温保存的研究

黄友章, 汪声恒, 杨平地, 向丹, 沈建良, 岑坚, 唐亚辉

(海军总医院血液科, 北京 100037)

细胞保存有重要价值, 骨髓细胞保存的价值主要在于为骨髓细胞移植提供可靠保证。传统的骨髓细胞低温保存是采用二甲基亚砜为保护剂, 以慢速率“二步”法降温至 -80°C , 直接投入液氮。理论上讲, 细胞在这种温度下, 一切代谢停止, 可以永远保存。本文对 20 例人骨髓细胞持续低温保存 15 年的情况进行分析。

1 材料与与方法

(1) 材料 ①骨髓冻存与复温 在局麻下采集骨髓(恶性淋巴瘤骨髓象正常 12 例, 急性白血病完全缓解 8 例), 肝素抗凝(40 u/ml), 采集平均量 620(385~880)ml, 4°C 下, 自然沉降 60 min, 除去血浆及部分红细胞, 浓集至 220(130~400)ml。 4°C 下, 缓慢滴加等体积含二甲基亚砜(DMSO)、自身血浆(终浓度均 10%, V/V)的 TC-199(GIBCO)液。分装 2 ml/管(NUNC), 每例平均用管 190(120~390)个。置自控程序降温机(1010B CRYOMED)中, 以 $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的降温率自 4°C 降至 -30°C (为减少释放热对细胞损伤, 当温度降至 -4°C 时, 给以超速降温), 再以 $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 降至 -80°C , 置液氮液相中保存。保存期间液氮储器仅在添加液氮(以保证标本浸泡于液氮液态中)与放入或取出标本时开放。检测时, 取出小管, 投入 40°C 水浴中, 待融化后, 用含 10% 马血清(HS)的 RPMI1640(GIBCO)液缓慢稀释至 10 ml 左右, 洗涤 3 次, 制备骨髓单个核细胞悬液(BMMNC)。②对照骨髓 取胸外科手术无血液病病人的肋骨骨髓, 制备 BMMNC。

(2) 方法 ①降温曲线分析 根据给定降温率, 分析细胞标本实际降温速率。②有核细胞计数(NC)。③台盼蓝拒染计数(TC)。④造血细胞培养 取 BMMNC 按 $1 \times 10^5/\text{ml} \cdot \text{well}$ 浓度, 进行粒单系造血祖细胞(CFU-GM)培养: 体系为 1640、10% HS、10% 胎牛血清(FCS)、0.3% 琼脂(GIBCO), 所用集落刺激活性为本室按标准制备的胎肌条件培养液(15%, V/V)或经效价对照测定的 GM-CSF(100 ng/ml, 麒麟公司); 红系造血祖细胞(BFU-E)和混合造血祖细胞(CFU-GEMM)培养: 体系为 IMDM(GIBCO)、20% HS、Epo2U/ml(安进公司)、10% PHA-LCM(V/V, 本室制备)、0.25% 甲基纤维素(GIBCO)、 10^{-5} mol/L α -巯基乙醇(GIBCO)。计集落(CFU)数, 取均值。长期培养起始细胞(LTC-IC): IMDM 内含 10% HS、10% FCS、 5×10^{-7} mol/L 氢化考的松(Sigma, 改良 Dexter 培养液), 加入 BMMNC $1 \times 10^6/\text{ml} \cdot \text{well}$, 置于 24 孔板(Costar)上, 33°C , 5% CO_2 孵箱内, 每周半量换液一次, 至 14 d 孔底形成基质细胞层, 行 X 线照射(15 Gy)。取 BMMNC 按 $1 \times 10^6/\text{ml} \cdot \text{well}$ 的浓度加入改良 Dexter 培养液内, 接种到经 X 线照射的基底细胞层上, 33°C , 5% CO_2 孵箱内连续培养, 每周半量换液一次。于第 5 周, 分别移出孔中的上清及漂浮细胞, 每孔用胰酶消化 30 s, 加入 IMDM 血清培养液, 充分混匀, 不再细胞计数, 进行琼脂半固体培养, 1 ml/well, 内含 0.3% 琼脂, 10% HS, 10% FCS GM-CSF 100 ng, 以 IMDM 补充体积。14 d 后计 CFU。

(3) 计算 ①降温曲线计算 计降温速率、释放热、融合热坪期。②有核细胞回收率 $\text{RR-NC}(\%) = (\text{冻后数} \div \text{冻前数}) \times 100$ 。③台盼蓝拒染回收率 $\text{RR-TC}(\%) = (\text{冻后数} \div \text{冻前数}) \times \text{RR-NC}$ 。④CFU 回收率 $\text{RR-CFU}(\%) = (\text{冻前 CFU 值} \div \text{冻后 CFU 值}) \times \text{RR-NC}$ 。⑤统计 结果用均值数士标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 组间差异用 t 检验。

(下转第 378 页)