

[文章编号] 1000-4718(2000)12-1317-03

# 黑素转铁蛋白在家兔网织红细胞非转铁蛋白结合铁摄取中的作用

陈文芳<sup>1</sup>, 钱忠明<sup>2</sup>( <sup>1</sup> 青岛大学医学院生理教研室, 山东 青岛 266021; <sup>2</sup> 香港理工大学应用生物及化学技术系)

[摘要] 目的: 研究黑素转铁蛋白(P97)在家兔网织红细胞非转铁蛋白结合铁摄取中的作用。方法: 放射性同位素法(<sup>59</sup>Fe)。结果: (1)单纯用磷脂酰肌醇磷脂酶 C(PI-PLC)作用网织红细胞, 其铁摄取无明显变化 ( $P > 0.05$ ); (2)经蛋白酶 pronase 预处理后, 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单纯用蛋白酶处理的网织红细胞明显降低。结论: 在家兔网织红细胞膜上可能存在有 P97, 且 P97 在其摄取非转铁蛋白结合铁的过程中可能发挥作用。

[关键词] 转铁蛋白; 铁; 网状细胞

[中图分类号] R331.1<sup>+</sup>41 [文献标识码] A

黑素转铁蛋白(melanotransferrin, P97)首先是由于它在人的黑色素瘤细胞上的高表达而被发现的<sup>1,2</sup>, 随后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都含有 P97, 且许多研究结果提示 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。我们以前的聚丙烯酰胺凝胶电泳结果提示在家兔网织红细胞膜表面可能存在有 P97(未发表), 为证实此推测, 我们拟对其进行功能实验, 研究 P97 在非转铁蛋白结合铁摄取途径中的作用。

## 材 料 和 方 法

### 一、药品与试剂

[<sup>59</sup>Fe] (FeCl<sub>3</sub>)为 Amersham 公司产品, 比活性为  $1.92 \times 10^{13}$  Bq/mol; pronase 为 Calbiochem-Nova-biochem Corp 公司产品; PI-PLC 为 Sigma 公司产品。

### 二、家兔贫血模型的制备

健康日本大耳家兔 2 只, 雌雄不拘, 体重(2.5 ± 0.3) kg, 按照 Morgan 等方法复制贫血模型<sup>3</sup>。网织红细胞是从苯胂诱发的贫血家兔模型中获得, 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 2 000 × g 离心 30 min, 收集上层 1/4 的细胞并悬浮于

PBS 缓冲液, 使网织红细胞比容维持在 11%—17%。

### 三、细胞铁摄取的测定

实验中应用的枸橼酸铁溶液是由<sup>59</sup>FeCl<sub>3</sub>与枸橼酸钠按 1:100 的摩尔比混合, 使铁的最终浓度为  $31.25 \mu\text{mol/L}$ 。

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℃水浴摇床中孵育 30 min, 网织红细胞用冰冷的 PBS 液洗 3 次, 每次洗涤后在 4℃条件下以 2 000 × g 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℃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<sup>4</sup>。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  $3 \times 10^5$  mU/L 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。

蛋白酶 pronase 实验组中, 将 1 g/L 的 pronase 预先加入孵育液中孵育 30 min, 随后加入枸橼酸铁重复上述实验。

pronase 与 PI-PLC 组, 预先将 1 g/L 的 pronase 加入孵育液中孵育 30 min 制备受体失活模型, 再将  $3 \times 10^5$  mU/L PI-PLC 加入孵育液中孵育 30 min, 随后重复上述实验。

## 结 果

一、不同浓度的铁对网织红细胞摄铁的影响  
为测定是否铁的摄取是饱和的, 实验中应用

[收稿日期] 1999-08-05 [修回日期] 1999-12-09

0.1—5.0  $\mu\text{mol/L}$  的浓度铁, 观察网织红细胞用 1 g/L 的 pronase 处理 60 min 后, 铁的摄取情况, 结果表明大约在 2.5  $\mu\text{mol/L}$  浓度, 铁的摄取达到饱和, 胞浆内摄取的铁为 3.92  $\text{pmol}/10^8$  cell (图 1)。

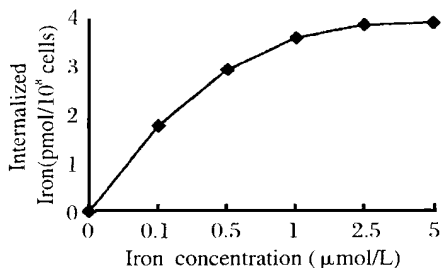


Fig 1 Internalized Fe as a function of medium Fe concentration by reticulocytes after 1h at 37°C. Results are the mean of two determination.

图 1 培养基内铁浓度对网织红细胞铁摄取的影响

### 二、单纯应用 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 ( $3 \times 10^5$  mU/L) 预处理网织红细胞, 对照组用等量 PBS 代替, 结果单纯用 PI-PLC 组胞浆内摄取的铁为 23.64  $\text{pmol}/10^8$  cell, 对照 PBS 组为 23.16  $\text{pmol}/10^8$  cell, 二者相比, 无显著性差异 ( $P > 0.05$ ); 单纯用 PI-PLC 组被网织红细胞摄取整合到血红素上的铁为 6.256  $\text{pmol}/10^8$  cell, 对照 PBS 组为 6.458  $\text{pmol}/10^8$  cell, 二者相比亦无显著性差异 ( $P > 0.05$ ) (图 2)。表明单纯用 PI-PLC 作用于网织红细胞对其铁摄取没有影响。

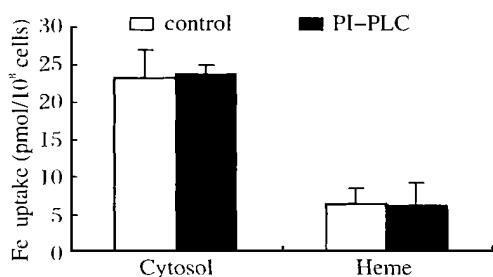


Fig 2 Effect of pre-treating reticulocytes with PI-PLC (300 U/L) on Fe uptake.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 5$ .

$P > 0.05$  vs control group.

图 2 单纯应用 PI-PLC 对网织红细胞铁摄取的影响

### 三、应用 pronase 之后, 再应用 PI-PLC 对网织红细胞铁摄取的影响

为去除网织红细胞表面的转铁蛋白受体, 实验中应用 pronase 使受体失活, 随后在孵育液中加入 PI-PLC, 结果应用 pronase 后, 再应用 PI-PLC 组胞浆内摄取的铁为 0.87  $\text{pmol}/10^8$  cell, 单纯用 pronase

组为 1.22  $\text{pmol}/10^8$  cell, 前者明显低于后者  $P < 0.01$ ; 同时被网织红细胞摄取整合到血红素上的铁, pronase + PI-PLC 组为 0.49  $\text{pmol}/10^8$  cell, 单纯用 pronase 组为 0.598  $\text{pmol}/10^8$  cell, 前者亦明显低于后者 (图 3)。

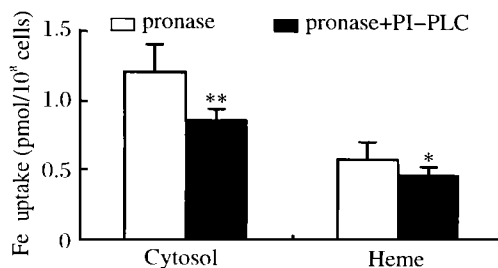


Fig 3 Effect of pre-treating reticulocytes with pronase (1 g/L) and PI-PLC (300 U/L) on Fe uptake.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 5$ .

\*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$  vs control group.

图 3 应用 pronase 后, 再用 PI-PLC 对网织红细胞铁摄取的影响

## 讨 论

P97 是运铁蛋白家族中一个相对较新的成员。虽然 P97 与转铁蛋白结构相似, 但它的功能尚不十分清楚, 与转铁蛋白和人乳铁蛋白一样, 它的基因位于第三对染色体。最近证实 P97 可以有两种不同的存在形式, 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。在所有已经检查的具有表达经 GPI 与膜结合的 P97 的细胞都有产生可溶性 P97 的能力, 目前尚不清楚二种不同形式的 P97 之间的功能关系。加拿大 BCUS Jefferies 教授领导的一个研究组最近证明, 除了转铁蛋白/转铁蛋白受体外, 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<sup>[5,6]</sup>。

网织红细胞的摄铁十分活跃, 大量研究结果提示其铁摄取有两条途径, 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<sup>[7-10]</sup>, 本实验旨在探讨在网织红细胞膜非转铁蛋白依赖铁摄取通路中是否有 P97 的存在, 其在铁摄取中的作用如何。我们以前的研究发现, 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 97Kda 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, 其电泳 OD 值高于对照组, 而成熟的网织红

细胞则没有此蛋白质,提示在家兔网织红细胞表面可能存在有 P97(未发表)。为证实此推测,本实验对 P97 进行了摄铁功能实验。

从图 2 可见,单纯用 300 U/L PI-PLC 处理网织红细胞,其铁的摄取几乎不受影响,这与早先的研究结果是一致的。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<sup>[6]</sup>。

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。所以我们采用蛋白酶使转铁蛋白受体失活的模型来研究网织红细胞非转铁蛋白依赖铁摄取途径。图 3 可见,首先我们证实用 1 g/L pronase 预处理的网织红细胞,其铁摄取饱和度大约在 2.5 μmol/L,摄取率约为 7.86×10<sup>2</sup> 原子铁/细胞/分钟。网织红细胞与 pronase 共同孵育后,使转铁蛋白受体失活,则网织红细胞铁摄取可减少 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。

在此受体失活模型系统中,应用 300 U/L PI-PLC,结果网织红细胞胞浆内摄取铁减少 28%,整合到血红素中的铁减少 18%。

实验结果提示在家兔网织红细胞膜上存在有非转铁蛋白依赖摄铁途径,P97 可能参与了此过程。

[参 考 文 献]

[ 1 ] Brown JP, Woodbury RG, Hart CH, et al Quantitative

analysis of melanoma-associated antigen P97 in normal and neoplastic tissues[ J ] . Proc Natl Acad Sci USA, 1981, 78(1): 539-543.

[ 2 ] Food MR, 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 ZM, Morgan EH. Effect of metabolic inhibitors on uptake of non-transferrin-bound iron by reticulocytes[ J ] . Biochim Biophys Acta, 1991, 1073: 456-462.

[ 4 ] Bottomley SS, Wolfe LC, Bridges KR. Iron metabolism in K562 erythroleukemic cells[ J ] . J Biol Chem, 1985, 260(11): 6811-6815.

[ 5 ] Jefferies WA, Food MR, Gabathuler R, et al. Reactive microglia specifically associated with amyloid plaques in Alzheimers disease brain tissue express melanotransferrin [ J ] . Brain Research, 1996, 712: 122-126.

[ 6 ] Kennard ML, Feldmax H, Yamada T, et al. Serum level of the iron binding protein P97 are elevated in Alzheimer disease[ J ] . Nature Medicine, 1996, 2(11): 1230-1235.

[ 7 ] Hodgson LL, Quail EA, Morgan EH. Iron transport mechanism in reticulocytes and mature erythrocytes[ J ] . J Cell Physiol, 1995, 162: 181-190.

[ 8 ] Qian ZM, Tang PL. 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 ] Quail EA, Morgan EH. Role of membrane surface potential and other factors in the uptake of non-transferrin-bound iron by reticulocytes[ J ] . J Cell Physiol, 1994, 159: 238-244.

## Role of P97 in non-transferrin bound iron uptake by rabbit reticulocytes

CHEN Wen-fang<sup>1</sup>, QIAN Zhong-ming<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Physiology, The Medical College of Qingdao University, Qingdao 266021, China;

<sup>2</sup>Department of Applied Biology and Chemical Technology, Hong Kong Polytechnic University, China)

[ Abstract] AIM: To investigate the possible role of P97 in non-transferrin bound iron uptake by rabbit reticulocytes. METHODS: The iron uptake were measured by the method of radioisotope (<sup>59</sup>Fe). RESULTS: (1) Only PI-PLC treatment had no apparent effect on iron uptake by reticulocytes (P>0.05); (2) Reticulocytes, pre-treated by pronase and then by PI-PLC, give a significant decrease in iron uptake in cytosol and in heme (P<0.01). 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 the rabbit.

[ MeSH] Transferrin; Iron; Reticulocytes