

[文章编号] 1000-4718(2003)07-0902-03

# 转铁蛋白结合镱跨膜转运及镱对 U-87 MG 细胞增殖的影响<sup>\*</sup>

王 夔<sup>1</sup>, 杜秀莲<sup>1,2</sup>, 常彦忠<sup>2</sup>, 李荣昌<sup>1</sup>, 司徒加怡<sup>3</sup>, 孙红哲<sup>3</sup>, 钱忠明<sup>2</sup>( <sup>1</sup>北京大学药学院化学生物系, 北京 100083; <sup>2</sup>香港理工大学应用生物与化学科技学系铁代谢实验室, 香港; <sup>3</sup>香港大学化学系, 香港)

[摘要] 目的: 研究转铁蛋白/转铁蛋白受体转运系统对转铁蛋白结合镱(Yb<sub>2</sub>Tf)跨膜转运进入神经胶质瘤 U-87 MG 细胞, 以及转铁蛋白结合镱和非转铁蛋白结合镱对 U-87 MG 细胞增殖的影响。方法: 细胞培养及 ICP-MS 镱测定法。结果: 随 Yb<sub>2</sub>Tf 浓度增加, 细胞镱摄入量增加。当浓度达 2 μmol/L 时, 细胞摄取镱基本达到饱和状态。细胞摄入镱量也随 apo Tf 摩尔比增大而增加, 当摩尔比达到 1.5 时, 摄入量达到最高水平。0.4 μmol/L Yb<sub>2</sub>Tf 可显著抑制 U-87 MG 细胞增殖, 而 Yb<sup>3+</sup> 浓度高达 10 μmol 对细胞增殖仅有轻微影响。结论: 转铁蛋白/转铁蛋白受体介导的膜转运可能是镱跨越 U-87 MG 细胞的机制之一。转铁蛋白结合 Yb<sup>3+</sup> 可以有效地抑制 U-87 MG 细胞的增殖。

[关键词] Yb<sup>3+</sup>/Yb<sub>2</sub>Tf; 转铁蛋白/转铁蛋白受体; 神经胶质瘤; U-87 MG 细胞

[中图分类号] R363 [文献标识码] A

转铁蛋白(transferrin, Tf)是铁离子(Fe<sup>3+</sup>)的转运蛋白。转铁蛋白受体(transferrin receptor, TfR)介导的内吞(endocytosis)是 Tf 结合铁进入细胞或脑内的主要途径<sup>[1,2]</sup>。因为某些三价非必需金属离子也能够通过 Tf/TfR 系统介导进入细胞<sup>[3,4]</sup>, 因此近年已有人利用 Tf/TfR 系统作为载体将某些金属药物及基因运送到细胞或脑内<sup>[3]</sup>。经 Tf/TfR 介导的铁或其它金属离子转运入细胞的量取决于细胞表面 TfR 的表达量。TfR 表达增加, 转入量也增加<sup>[1,2]</sup>。处于高度增殖状态的细胞, 如肿瘤细胞的表面富含 TfR<sup>[5]</sup>。因此利用能够与 Fe<sup>3+</sup> 竞争 Tf 和 TfR 的离子或药物便有可能进入细胞从而抑制肿瘤细胞增殖。已证明某些稀土离子可以延迟细胞由 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期向 S 期过渡, 从而抑制 B16 黑色素瘤细胞增殖<sup>[6]</sup>。由于稀土离子与铁离子的相似性, 推测稀土可能是由 Tf/TfR 介导进入细胞, 达到抑制细胞增殖的效果。为验证这些可能性, 我们拟研究 Tf/TfR 对稀土转运入神经胶质瘤 U-87 MG 细胞以及稀土对瘤细胞增殖的影响。

## 材 料 和 方 法

### 1 材料

神经胶质瘤细胞株(U-87MG 细胞)购自 ATCC 公司。人载铁蛋白, MEM 培养基, 青霉素和链霉素, 10% 胎牛血清(Gibco)和 Yb<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 均为 Sigma 产品。75 cm<sup>2</sup> 培养瓶和 pronase 分别购自 IWAKI 和 Roche 公

司。其它试剂均为分析纯。450 酶标仪和直接电感耦合等离子质谱仪(ICP-MS)分别为 PE 公司(ELAN5000)与 Bio-Rad 产品。

### 2 转铁蛋白与转铁蛋白受体对 U-87 MG 细胞 Yb<sup>3+</sup> 摄取的影响

U-87 MG 细胞培养在含 10×10<sup>4</sup> U/L 青霉素和链霉素, 10% 胎牛血清(Gibco)的 MEM 培养基中。1:3 传代, 每 3 d 传 1 次。细胞密度达 80 % 时, 开始实验。收集细胞。计数分瓶, 使之贴壁 24 h。用 0.1 mol/L Hepes (含 0.1 mol/L NaCl, pH=7.4) 缓冲液洗两次去除培养基。尔后, 加入 MEM 无血清培养基, 在 37℃ 保温 2 h, 再用 0.1 mol/L Hepes 缓冲液洗两次, 去除细胞内的转铁蛋白<sup>[7,8]</sup>。随后加入 Yb<sub>2</sub>Tf 和 0.1 mol/L Hepes 的溶液, 使之终浓度分别为 0.5, 1, 2, 5 及 10 μmol/L, 置于 37℃ 水浴 30 min 并不断振荡。用 0.1 mol/L Hepes 溶液漂洗 3-4 次后, 加入 2 mL (1 g/L) pronase, 并置于冰浴(4℃) 1 h, 然后离心收集细胞。用 Pronase 处理的目的是除去细胞膜上与 TfR 结合的转铁蛋白, 也就是除去细胞膜结合而尚未进入细胞的 Yb<sub>2</sub>Tf<sup>[9,10]</sup>。冷冻干燥 24 h 后, 加入浓硝酸, 使细胞全部溶解。用 ICP-MS 测定细胞内 Yb<sup>3+</sup> 量<sup>[11]</sup>。每一点测定 5 个平行样品。在某些实验中, 将蛋白酶 pronase (1 g/L) 预先加入孵育液中孵育 30 min, 随后加入 Yb<sub>2</sub>Tf<sup>[12]</sup>, 其它实验步骤同上。我们也观察了 Yb<sup>3+</sup> 与脱铁转铁蛋白(apotransferrin, apo-Tf)不同配比对细胞镱摄取的影响。此时整个反应体系中转铁蛋白的浓度为 1 μmol/L, 按 0, 0.5:1, 1:1, 1.5:1, 2:1 摩尔比(the mole ratio)加入不同浓度的

[收稿日期] 2002-04-23 [修回日期] 2002-07-07

\* [基金项目] 香港理工大学研究基金(A-PC23, A-PC98), 香港理工大学与北京大学联合培养博士生基金资助项目(2000-1)

Yb<sup>3+</sup>, 37 °C温育 30 min 后, 其它操作同上。

### 3 Yb<sup>3+</sup>, Yb<sub>2</sub>Tf 对 U-87 MG 细胞增殖的影响

接种 U-87 MG 细胞于 96 孔培养板, 每孔 2 × 10<sup>4</sup> 个细胞。24 h 后, 加入 Yb<sup>3+</sup> 及 Yb<sub>2</sub>Tf 使它们的终浓度均为 0, 0.5, 2.5, 5, 10 μmol/L。按 MTT 试剂盒 (Roche 公司) 说明书进行操作。在 450 型酶标仪, 595 nm 处读数。每一样品点有 8 个平行样。用其平均值 ( $\bar{x} \pm s$ ) 作图。

## 结果与讨论

### 1 转铁蛋白与转铁蛋白受体对 U-87MG 细胞 Yb<sup>3+</sup> 摄取的影响

图 1 结果可见, 随 Yb<sub>2</sub>Tf 浓度的增大, 细胞摄入镱的量增加。当浓度为 2 μmol/L 时, 细胞镱摄取基本达到饱和状态, 随后随浓度增加镱摄取呈线性增加。因此, 存在特异性和非特异性摄取的证据。图 2 为 apoTf 浓度固定且细胞数目也固定的情况下, 不同镱与 apoTf 摩尔比对细胞摄入镱的影响。随摩尔比增大, 细胞摄入镱的量增加。呈现出开始增加较大而后趋于平缓的曲线关系。在摩尔比为 0.5, 1.0 和 1.5 时, 摄入镱量分别是 (3.76 ± 0.80) ng/10<sup>6</sup> cells, (6.37 ± 1.10) ng/10<sup>6</sup> cells 和 (9.67 ± 2.10) ng/10<sup>6</sup> cells。而在摩尔比为 2.0 时摄入镱量为 (9.61 ± 1.00) ng/10<sup>6</sup> cells 与摩尔比 1.5 时相当。摩尔比越小, 镱与 Tf 结合的百分比越高, 进入细胞内的镱占溶液中总镱量的百分比也高。而摩尔比较大时, 非 Tf 结合镱的百分比比较大, 而 Tf 结合镱的百分比比较小, 因此被细胞摄取的镱占溶液中总镱量的百分比也相对较少。这一结果加上摄取镱的饱和特征以及 pronase 预处理 30 min 明显抑制细胞摄取 Yb<sub>2</sub>Tf 的结果提示 Tf/TfR 系统在 U-87 MG 细胞摄取镱的过程中可能具有一定作用。

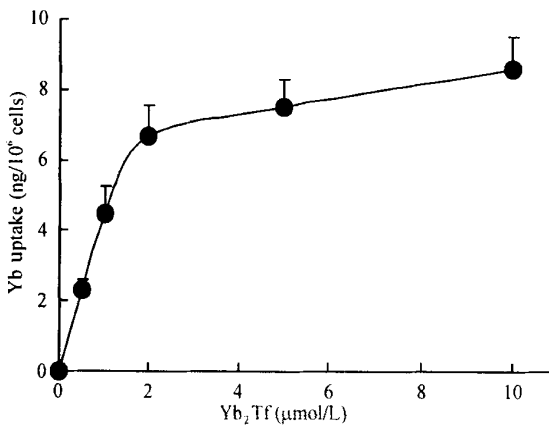


Fig 1 Effect of different concentrations of Yb<sub>2</sub>Tf on Yb<sup>3+</sup> uptake by U-87 MG cells.  $\bar{x} \pm s$ . n = 5.

### 图 1 Yb<sub>2</sub>Tf 浓度对 U-87 MG 细胞镱摄取的影响

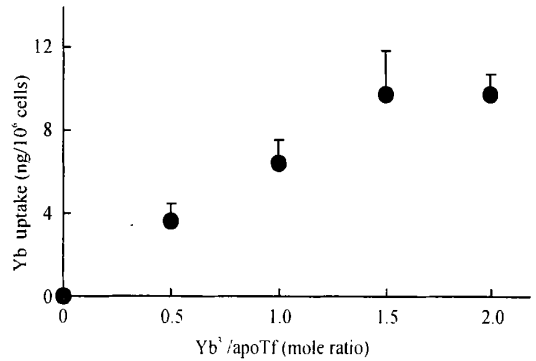


Fig 2 Effect of the mole ratio of Yb<sup>3+</sup> to apoTf on Yb<sup>3+</sup> uptake by U-87 MG cells.  $\bar{x} \pm s$ . n = 5.

### 图 2 Yb<sup>3+</sup> 和 Tf 不同摩尔比对 U-87 MG 细胞镱摄取的影响

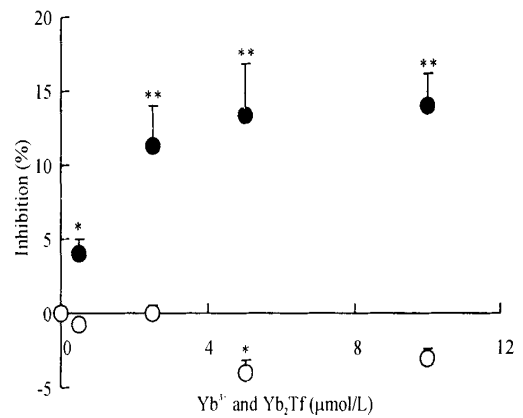


Fig 3 Inhibition of Yb<sup>3+</sup> (○) and Yb<sub>2</sub>Tf (●) on the proliferation of U-87 MG cells.  $\bar{x} \pm s$ . n = 8. \* P < 0.05. \*\* P < 0.01 vs the control (0 μmol/L).

### 图 3 Yb<sup>3+</sup> (○) 和 Yb<sub>2</sub>Tf (●) 浓度对 U-87 MG 细胞增殖的影响

### 2 Yb<sup>3+</sup> 和 Yb<sub>2</sub>Tf 对神经胶质瘤细胞增殖的影响

Yb<sup>3+</sup> 和 Yb<sub>2</sub>Tf 对 U-87 MG 细胞增殖影响的实验结果显示 (图 3), Yb<sup>3+</sup> 浓度 5 μmol/L 时对细胞增殖作用有明显影响 (P < 0.05), 而 10 μmol/L Yb<sup>3+</sup> 的影响未达显著差异 (P > 0.05)。然而, Yb<sub>2</sub>Tf 即使浓度仅为 0.4 μmol/L 时, 对细胞增殖已显现出抑制作用 (P < 0.05), 这种抑制作用随 Yb<sub>2</sub>Tf 浓度增加而呈递增趋势。而在浓度 2.5 μmol/L 时达到最大抑制率。这一结果与 Ga<sup>3+</sup> 及 In<sup>3+</sup> 的表现极为相似<sup>[12]</sup>。Ga<sup>3+</sup> 抑制细胞增殖的机理被认为是 Ga<sub>2</sub>Tf 可被转铁蛋白受体识别进而与转铁蛋白受体结合而干预铁摄取, 使细胞不能获得所需要的铁<sup>[13]</sup>。这可能也是 Yb<sub>2</sub>Tf 具有明显抑制细胞增殖的原因之一。此外, 与 Ga<sup>3+</sup> 不同, 稀土离子本身对细胞的增殖和凋亡有影响。我们注意到不同浓度 Yb<sub>2</sub>Tf 对 U-87 MG 细胞镱摄取量的影响以及对 U-87 MG 细胞增殖的抑制程度十分相像, 这提示细胞摄入 Yb<sub>2</sub>Tf 量和抑制细胞增殖程度可能相关。说明进入细胞的稀土离子可能

具有发挥抑制细胞增长的作用。然而,非转铁蛋白结合的  $Yb^{3+}$  也可以进入细胞,但相对  $Yb_2Tf$  而言,  $Yb^{3+}$  抑制细胞增殖的作用较弱。可能的解释是,细胞内与 Tf 结合形式的稀土具有抑制 U-87 MG 的作用,而非 Tf 结合的 Yb 则作用相对可能较小。这种可能性以及  $Yb_2Tf$  明显抑制肿瘤细胞增殖的原因需作进一步研究。

以上结果提示转铁蛋白/转铁蛋白受体介导的膜转运可能是镱跨越 U-87 MG 细胞膜的机制之一。转铁蛋白结合  $Yb^{3+}$  可以有效地抑制 U-87 MG 细胞的增殖。其机制尚待进一步研究。

[参 考 文 献]

[ 1 ] Qian ZM, Tang PL. Mechanisms of iron uptake by mammalian cells[ J ]. *Biochim Biophys Acta*, 1995, 1269(3): 205-214.  
 [ 2 ] Qian ZM, Wang Q. Expression of iron transport proteins and excessive iron accumulation in the brain in neurodegenerative disorders[ J ]. *Brain Res Rev*, 1998, 27(3): 257-267.  
 [ 3 ] Li HY, Sun HZ, Qian ZM. The role of transferrin/ transferrin receptor system in drug delivery and targeting[ J ]. *Trend Pharmacol Sci*, 2001, 23(5): 206-209.  
 [ 4 ] Roskams AJ, Connor JR. Aluminum access to the brain: a role for transferrin and its receptor[ J ]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87(22): 9024-9027.  
 [ 5 ] Testa EP, Testa U, Samoggia P, et al. Expression of transferrin receptors in human erythroleukemic lines: regulation in the plateau and exponential phase of growth[ J ]. *Cancer Res*

1986, 46(10): 5330-5334.  
 [ 6 ] Sato T, Hashizume M, Hotta Y, et al. Morphology and proliferation of B16 melanoma cells in the presence of lanthanoid and  $Al^{3+}$  ions[ J ]. *Biomaterials*, 1998, 11(2): 107-112.  
 [ 7 ] Qian ZM, Morgan EH. Changes in transferrin-free and transferrin-bound iron uptake by cells during reticulocyte maturation *in vivo* and *in vitro*[ J ]. *Biochim Biophys Acta*, 1992, 1135(1): 35-43.  
 [ 8 ] Qian ZM, Xiao DS, Tang PL, et al. The increased expression of transferrin receptor on the membrane of erythroblast in strenuous exercised rats[ J ]. *J Appl Physiol*, 1999, 87(2): 523-529.  
 [ 9 ] Qian ZM, Pu YM, Wang Q, et al. Cerebellar granule cells acquire transferrin-free iron by a carrier-mediated process [ J ]. *Neuroscience*, 1999, 92(2): 577-582.  
 [ 10 ] Xie JX, Tsoi YK, Chang YZ, et al. Effects of ferroxidase activity and species on ceruloplasmin mediated-iron uptake by BT325 cells[ J ]. *Mol Brain Res*, 2001, 99(1): 12-16.  
 [ 11 ] 陈文芳, 钱志明. 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[ J ]. *中国病理生理杂志*, 2000, 16(12): 1317-1319.  
 [ 12 ] Tallkvist J, Bowlus CL, Lonnerdal B. Functional and molecular responses of human intestinal Caco-2 cells to iron treatment[ J ]. *Am J Clin Nutr*, 2000, 72(3): 770-775.  
 [ 13 ] Moran PL, Seligman PA. Effects of transferrin-indium on cellular proliferation of a human leukemia cell line[ J ]. *Cancer Res*, 1989, 49(15): 4237-4241.  
 [ 14 ] Harris AW, Sephton RG. Transferrin promotion of  $^{67}Ga$  and  $^{59}Fe$  uptake by cultured mouse myeloma cells[ J ]. *Cancer Res*, 1977, 37(10): 3634-3638.

## Transferrin-bound $Yb_2$ uptake by U-87 MG cells and effect of $Yb$ on proliferation of the cells

WANG Kui<sup>1</sup>, DU Xiu-lian<sup>1,2</sup>, CHANG Yan-zhong<sup>2</sup>, LI Rong-chang<sup>1</sup>, SZETO Ke Yee Katie<sup>3</sup>, SUN Hong-zhe<sup>3</sup>, QIAN Zhong-ming<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Department of Chem-biology, Institute of Pharmaceutics, Beijing University, Beijing 100083, China;

<sup>2</sup>Laboratory of Iron Metabolism, Department of Applied Biology & Chemical Technology, The Hong Kong Polytechnic University, Kowloon, Hong Kong, China;

<sup>3</sup>Department of Chemistry, The University of Hong Kong, Hong Kong, China)

[ ABSTRACT ] **AIM:** To investigate the role of transferrin/ transferrin receptor system in transferrin-bound  $Yb_2$  ( $Yb_2Tf$ ) uptake by U-87 MG cells and the effect of transferrin-bound and -free  $Yb_2$  on proliferation of U-87 MG cells. **METHODS:** Cell culture and ICP-MS measurement of  $Yb_2$ . **RESULTS:**  $Yb_2Tf$  uptake by U-87 MG cells increased with the concentrations of  $Yb_2Tf$ , and reached saturation as the concentration in the incubation medium was raised to about  $2 \mu mol/L$ . Also,  $Yb_2$  uptake by the cells increased with increase of the mole ratio ( $Yb_2$ : apoTf), reaching a maximum at 1.5 mole ratio.  $Yb_2Tf$  in  $0.4 \mu mol/L$  significantly inhibited proliferation of U-87 MG cells, however,  $10 \mu mol/L Yb^{3+}$  had no significant effect on proliferation of the cells. **CONCLUSION:** The uptake of  $Yb_2$  by U-87 MG cells might be mediated by transferrin/ transferrin receptor system. Transferrin-bound but not transferrin-free  $Yb_2$  could significantly inhibit proliferation of U-87 MG cells.

[ KEY WORDS ]  $Yb^{3+}$  /  $Yb_2Tf$ ; Transferrin/ transferrin receptor; Glioma; U-87 MG cells