

综述与专论

二价金属离子转运蛋白 1
——一个新发现的重要铁转运蛋白*

柯 亚 钱忠明**

(香港理工大学应用生物及化学科技学系, 九龙, 香港)

摘要 二价金属离子转运蛋白 1 (divalent metal transporter 1, DMT1) 的发现是近年铁代谢研究领域最重大的一项突破。DMT1 是哺乳类跨膜铁转运蛋白。这种蛋白质广泛分布于人体各组织。DMT1 mRNA 有两种形式, 一种含有 IRE (iron response element), 而另一种则不含此结构。DMT1 的功能主要是介导小肠上皮细胞的铁吸收以及参与铁从内吞小体移位到胞浆的过程。DMT1 介导的铁转运是一个主动的和 H^+ 依赖的过程。DMT1 也参与其他二价金属如 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 和 Pb^{2+} 的转运。小肠 DMT1 的表达受饮食或组织铁控制。第四跨膜区是 DMT1 的重要功能区。此区基因发生点突变 (G185R) 是导致不可逆性缺铁性贫血的原因。在帕金森氏病人的黑质发现 DMT1 表达异常增加, 因而 DMT1 可能也与某些神经退行性疾病的形成有关。

关键词 DMT1, 铁代谢, 神经退行性疾病, 贫血, 遗传性血色素沉积症

学科分类号 Q51

铁的研究历史已有一百多年。但这一领域真正出现实质性突破只是近三十余年的事。尤其最近五年里, 一些新的铁转运蛋白如二价金属离子转运蛋白 1 (divalent metal transport 1, DMT1) 等的发现, 解释了一直让人费解的铁代谢领域中两个最重要的问题, 即铁如何被小肠吸收以及如何从内吞小体 (endosome) 移位入胞浆。DMT1 首次发现于 1995 年。Gruenheid 等^[1]在研究具天然抗性的巨噬细胞蛋白 1 (nature resistance-associated macrophage protein 1, Nramp1) 的过程中发现另一种与 Nramp1 有极高同源性 (达 78%) 和相似的二级结构的蛋白质。这种新发现的蛋白质被称为具天然抗性的巨噬细胞蛋白 2 (Nramp2)。然而, 当时并不清楚它的功能。1997 年, 哈佛大学^[2]和耶鲁大学^[3]的两个研究组分别独立地报告 Nramp2 是哺乳类第一个跨膜铁转运蛋白。由于 Nramp2 具有转运二价铁及其他二价阳离子的功能, 最初曾将此蛋白质称为 DCT1 (divalent cation transporter 1)^[3], 后改称为 DMT1^[4]。今天人们已对这一跨膜铁转运蛋白有了相对较完整的认识。本文综述了近年 DMT1 研究的最新进展。总结了目前对 DMT1 的表达分布、结构及亚型, 生理功能以及 DMT1 表达异常与某些疾病关系的认识。

1 DMT1 的表达分布, 结构和类型

DMT1 在人体组织分布十分广泛^[3]。RNA 印迹分析显示 DMT1 在近端小肠表达最高, 在肾、胸腺和脑有中等度的表达, 而在睾丸、肝、结肠、心脏、脾、骨骼肌、肺、骨髓的含量相对较低^[3]。在细胞水平, DMT1 特异地表达于某些细胞。在小肠, DMT1 仅表达于小肠绒毛的肠上皮细胞, 尤其在隐窝和绒毛较低部位含量最高, 并从近端到远端表达呈逐渐减低, 这种表达方式与小肠铁吸收的解剖位置一致。在脑内, DMT1 主要发现在神经元上。然而, 大多数的神经元表达 DMT1 的水平相对较低^[3]。原位杂交确定 DMT1 mRNA 在不同组织定位的研究显示, DMT1 mRNA 存在于神经元及脉络丛上皮细胞。而同区的胶质细胞和室管膜细胞却不表达。在密集排列的细胞群, 如海马锥体和颗粒细胞、小脑颗粒细胞、视上核和梨状皮层的锥体细胞, DMT1 mRNA 的表达相对较显著。在黑

* 中国香港特别行政区政府 UGC (PolyU 5270/01M/B-Q445) 和香港理工大学研究基金 (APG-23, GV739) 资助。

** 通讯联系人。

Tel: 852-27666694, E-mail: bczmqian@polyu.edu.hk

收稿日期: 2001-07-10, 接受日期: 2001-08-23

质, DMT1 mRNA 表达中等, 在嗅核前部腹侧区, 则含有大量的 DMT1 mRNA.

DMT1 的结构与 Nramp1 相似, 也由 12 个跨膜区组成^[1] (图 1). DMT1 有高度的疏水性, 其氨基端和羧基端都嵌入胞浆内. 第四跨膜区是其重要的功能区, 如发生突变, 将会严重干扰 DMT1 的正常功能. 人类 DMT1 的基因组成已比较清楚. 它包括 17 个外显子, 由 36 kb 核苷酸组成^[1,3]. 小鼠与大鼠的 DMT1 与人类有高度同源性. DMT1 mRNA 存在两种形式, 即 “+ IRE” 和 “- IRE” 型^[4]. “+ IRE” 型的 3' 非翻译区含有与运铁蛋白受体 (transferrin receptor, TfR) mRNA 的 3' 非翻译区相

似的铁调节元件 (iron regulatory element, IRE). “- IRE” 型则不含有 IRE 结构. “+ IRE” 型和 “- IRE” 型 DMT1 编码分别为 561 个和 568 个氨基酸. DMT1 的 IRE 结构并非完全相同于 TfR 的 IRE. DMT1 mRNA 在其 3' 非翻译区仅含有单一 IRE, 而 TfR 有 5 个相似结构. DMT1 mRNA 的 5' 调控区也具有特殊的调控元件^[5]. 它包含两个 CCAAT 盒和三个 SP1 的结合位点 (但缺少普遍所有的 TATA 盒), 5 个潜在的金属反应元件 (metal response element, MRE s), 两个 Hif 结合位点, 和一个单一的 γ -干扰素调节元件.

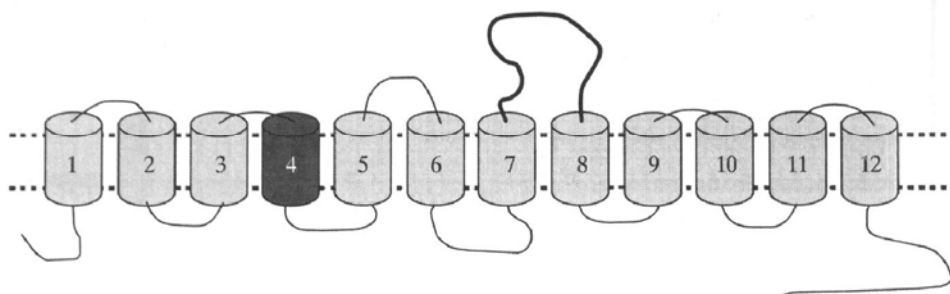


Fig. 1 Predicted cartoon structure of DMT1

图 1 DMT1 的预测结构

2 DMT1 的生理功能

2.1 DMT1 介导小肠铁吸收

近端小肠 (十二指肠和空肠) 是铁吸收的主要部位. 铁在小肠的吸收通过两个转运过程, 即粘膜吸收过程 (铁进入肠吸收上皮细胞) 和粘膜转运过程 (铁从肠上皮细胞的基底侧转运入血液循环). 其中粘膜吸收过程被认为是机体维持铁平衡的最关键一步, 但其机制一直不明. DMT1 在小肠上皮细胞上的发现, 才使这一问题的研究有了重大突破. 铁在许多组织细胞被摄取都是通过经典的运铁蛋白 (transferrin, Tf) 和 TfR 的途径^[6]. 但小肠吸收上皮细胞不存在 TfR 表达, 因此铁穿过小肠不可能通过 TfTfR 的转运途径. 现在知道, 肠腔内铁主要是以二价的形式经小肠上皮细胞膜上的 DMT1 介导, 由肠腔进入上皮细胞内^[2,7-9]. 然后, 再经新近发现的 Ferroportin 1^[10]-Hephestin^[11] 介导由细胞内进入血液循环. DMT1 介导的二价铁离子的转运是 H^+ 依赖的主动转运过程^[3,8]. 在患有严重缺铁性贫血 (microcytic anemia, mk) 的小鼠和 Bgrade 大鼠都存在相同的 DMT1 基因 G185R 位

点的突变^[2,7,12]. 均表现为小肠铁吸收障碍导致的铁严重缺乏的小细胞、低色素性贫血. 此外, 实验显示, 机体的铁状态与小肠 DMT1 的表达紧密相关. 当铁缺乏时, 十二指肠细胞上 DMT1 的表达增加, 而在高铁状态鼠的小肠, DMT1 表达则明显下降^[3]. 这些结果均显示 DMT1 是介导小肠铁吸收的重要转运蛋白.

2.2 DMT1 介导内吞小体铁移位

TfTfR 介导的细胞铁摄取是公认的细胞摄铁的主要生理途径^[6]. 在这一过程中, 内吞小体酸化使三价铁从 Tf 上释放并变为二价铁. 尔后, 二价铁穿过内吞小体膜进入胞浆. 铁穿越内吞小体膜这一步骤称为移位 (translocation), 是 TfTfR 依赖的生理铁转运过程中的一个重要环节^[13,14]. 但相关的机制一直不清楚. 这是 TfTfR 依赖的生理铁转运机制中一个长期未解决的问题. DMT1 的发现及相关研究使得这一问题有了答案. 研究证明正是内吞小体膜上的 DMT1 负责将 Tf 释放的铁转移出内吞小体. 很早已经知道, Bgrade 大鼠能够正常地通过 Tf 和 TfR 将铁吸收, 并在细胞内形成内吞小体, 但随后内吞小体内的铁却无法转运入胞

浆, 最终内吞小体的铁又全部返回到细胞表面, 释放回血液中. 造成这种铁转运异常的原因一直不清. 最近 Fleming 等^[3, 15]发现这些 Bgrade 大鼠都有 DMT1 基因的突变. 这揭示由于内吞小体 DMT1 功能失常导致内吞小体内铁不能进入胞浆. 研究也已证实 DMT1 与 TfR 在内吞小体上共同存在^[12]. 在培养的 HEP-2 细胞的内吞小体和磷脂小体上均发现有 DMT1 的表达^[16]. 此外在非洲蟾蜍卵细胞和转染的 HEK293TCHO 细胞上也均发现 H⁺ 依赖的铁转运机制的存在. 所有这些证据有力地证明二价铁穿越内吞小体膜进入胞浆是由 DMT1 介导的.

DMT1 介导的内吞小体膜铁转运的事实有力地支持了我们 1997 年首次提出的观点^[13], 即 Tf-TfR 不依赖的铁转运机制具有重要的生理功能. 这一转运机制直接参与了 Tf-TfR 依赖的铁摄取过程, 即在“移位”这一环节扮演了不可缺少的角色. 虽然众多研究早已证实 Tf-TfR 不依赖的铁转运机制的存在, 但由于生理条件下血液及细胞外液几乎不存在非 Tf 结合铁, 因此 Tf-TfR 不依赖的铁转运机制长期以来一直被认为只在病理情况下如血液铁异常增加时才有作用^[13], 而在生理铁摄取中没有作用. DMT1 的发现和它在“移位”这一步的重要作用证明 Tf-TfR 不依赖的铁转运机制是细胞生理铁摄取所必需的. 正是 Tf-TfR 依赖的和 Tf-TfR 不依赖的铁转运机制共同作用细胞才能最终完成生理铁摄取的全过程.

3 DMT1 的表达调控

迄今为止, DMT1 的表达调控机制仍不完全清楚. 然而, 许多新近的研究已提供了相当有价值的信息. Gunshin^[3]和 Han 等^[9]发现铁缺乏大鼠的小肠细胞 DMT1 表达明显增加, 这种表达的增加与否只受铁的影响, 与其他金属无关. 这说明 DMT1 表达受机体或细胞铁状态调节^[7]. 前已提及, DMT1 mRNA 存在两种形式: “+ IRE” 和 “- IRE” 型^[4]. IRE 是某些特异蛋白 mRNA 上的铁反应元件, 通过与铁调控蛋白 (iron regulatory protein, IRP) 结合来调节此特异蛋白本身的表达^[17]. IRE 可存在于某些蛋白质如 TfR mRNA 的 3' 非翻译区, 或者某些蛋白质如 Ferritin mRNA 的 5' 非翻译区. 当机体铁缺乏时, IRP 紧密地与 IRE 结合, 保护含有 3' 非翻译区域 IRE 蛋白质的 mRNA 不被降解, 蛋白质表达增加; 而相应含有 5' 非翻译区域

IRE 蛋白质的 mRNA 的翻译减少, 其蛋白质表达下降. 高铁状态时正好相反. DMT1 mRNA 的 “+ IRE” 型含有与 TfR 相似 IRE 结构, 因此被认为 DMT1 的表达调控可能与 TfR 的表达调控方式类同, 即 IRP-IRE 介导的转录后水平的表达调节. 当铁浓度过低时, “+ IRE” 型 DMT1 mRNA 的 IRE 与 IRP 紧密结合, 增加 “+ IRE” 型 DMT1 mRNA 的稳定性, DMT1 表达增加. 缺铁动物的小肠、脑等组织发现 DMT1 的表达不同程度地增加^[1, 3]. 这些都支持 “+ IRE” 型的 DMT1 表达可能是受 IRP-IRE 介导的转录后调控的观点. 然而, 由于 DMT1 的 IRE 结构并非完全与 TfR 的 IRE 相同, 因此 DMT1 的 “+ IRE” 型是否完全经 IRP-IRE 的方式调节来控制其表达量至今未有明确定论. 此外, DMT1 可能也存在转录水平上的调控. 它的 5' 调控区的 CCAAT 盒和 Sp1 因子位点可以决定启动子的转录方向和转录的效率. 同时它的 5 个金属反应元件, 可被多种金属离子或糖皮质激素激活, 进而改变基因的转录效率, 增加蛋白质的表达. DMT1 mRNA 的 5' 调控区域的类似 γ -干扰素调节元件可以与增强子形成复合, 在干扰素的作用下增强启动子的转录. 实验已证明 γ -干扰素可以增加巨噬细胞的 DMT1 mRNA 的表达, 从而增加细胞铁摄取. 虽至今尚无 DMT1 存在转录水平上的表达调控的报道, 然而, 它的这些结构特点支持这一可能性的存在.

4 DMT1 与铁紊乱和神经退行性疾病

用位点克隆方法发现 mk 小鼠和 Bgrade 大鼠都有 DMT1 的基因突变, 原有甘氨酸 (G185R) 被精氨酸替代^[2, 3]. 因此 DMT1 的基因突变被认为是导致 mk 小鼠和 Bgrade 大鼠的铁吸收障碍, 以及 Bgrade 大鼠细胞内铁释放利用障碍的原因. 遗传性血色素沉积症 (hereditary hemochromatosis, HH) 是盛行于北欧的一种常染色体隐性遗传病. 它的特征是铁广泛沉积在体内多个组织, 如肝脏、心脏等, 导致这些组织的纤维变性、坏死, 最终因器官的衰竭而死亡^[6]. 现已清楚, 这种疾病重要原因之一是由一种 HFE (hemochromatosis gene) 突变 (C282Y) 所引起. 最近的研究显示 HH 病人的十二指肠 DMT1 mRNA 表达明显增加. 在 HFE 基因敲除的小鼠, DMT1 表达显著高于对照. 在不存在 HFE 基因突变的 HH 的散发病例中, DMT1 的表达也有增加^[9, 18]. 因此认为在 HH 病人小肠

DMT1 的表达异常增加可导致铁过度吸收, 造成铁在组织细胞发生沉积^[9].

大脑需要铁. 脑铁缺乏可以导致脑发育不良和智力障碍. 铁在脑内过多沉积则可引发一系列病理反应, 进而损害神经细胞, 最终导致各种脑疾病发生, 如各种神经退行性疾病 (NDs), 包括帕金森氏综合症 (PD), 阿尔茨默综合症等等. 新近研究显示脑铁异常增高的原因可能是由于某些脑内铁转运蛋白表达失控^[17, 19, 20]. DMT1 表达失控引起的脑内铁代谢紊乱可能与某些 NDs 发生发展有关. DMT1 分布在脑内的许多区域^[12]. 含铁丰富的黑质有较高的 DMT1 存在. 需要大量铁供给生长的细胞 DMT1 也有高密度表达. 脑内也存在两种形式的 DMT1 mRNA. “+ IRE” / “- IRE” 型的比率高于除小肠以外的其他组织. Roth 等^[21]用大鼠的 PC12 细胞研究了这两种形式在神经细胞的分布和功能. 结果发现 “+ IRE” 型 DMT1 主要分布在细胞表面, 树突或轴突的运输小泡以及细胞内含 Tf 游离铁的内吞小体上. “- IRE” 型则主要分布在细胞核. 这一发现显示 “+ IRE” 可能主要发挥细胞摄取铁和胞内转运铁的功能, 而 “- IRE” 型可能起有俘获核内二价金属并转运二价金属进入细胞核以及传递信号到细胞核和保持核内金属离子稳态的作用^[21]. 已有报道在 PD 病人脑内黑质神经元 DMT1 有过高表达^[4]. 而以往的病理研究显示黑质是 PD 病人铁异常过度沉积区域. 因此一些研究者推测 DMT1 表达失控可能是引发某些 NDs 脑内铁过多沉积的众多原因之一.

5 小 结

DMT1 的研究是当前铁代谢以及 NDs 研究领域里一项十分热门的课题. 以往的研究相对较集中于 DMT1 与小肠铁吸收的机理方面. DMT1 在其他组织尤其是中枢神经系统的研究较少. 目前, 我们仍然不清楚为什么两种形式的 DMT1 在不同组织有不同的分布, 为什么不同组织 DMT1 表达对铁状态反应不同, 以及 DMT1 尤其 “- IRE” 型怎样表达调控. 此外, 我们也不知道为什么 DMT1 在 PD 病人脑部出现异常表达以及 DMT1 在中枢神经系统表达异常是否在其他 NDs 的发生发展中起作用. 这些都是亟需解答的问题. 这些问题的解答将有助于我们更好地理解某些相关疾病的病因和病理机制. 为开发新的药物, 寻找有效治疗方案, 阻断与铁相关疾病尤其是 NDs 的发生发展提供重要

基础.

参 考 文 献

- 1 Gruenheid S, Cellier M, Vidal S, *et al.* Identification and characterization of a second mouse Nramp gene. *Genomics*, 1995, **25** (2): 514~ 525
- 2 Fleming M D, Trenor C C 3rd, Su M A, *et al.* Microcytic anaemia mice have a mutation in Nramp2, a candidate iron transporter gene. *Nat Genet*, 1997, **16** (4): 383~ 386
- 3 Gunshin H, Mackenzie B, Berger U V, *et al.* Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature*, 1997, **388** (6641): 482~ 488
- 4 Andrews N C. The iron transporter DMT1. *Int J Biochem Cell Biol*, 1999, **31** (10): 991~ 994
- 5 Lee P L, Gelbart 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** (2): 199~ 215
- 6 Qian Z M, Tang P L. Mechanisms of iron uptake by mammalian cells. *Biochim Biophys Acta*, 1995, **1269**: 205~ 214
- 7 Canonne-Hergaux F, Fleming M D, Levy J E, *et al.* The Nramp2/DMT1 iron transporter is induced in the duodenum of microcytic anemia mice but is not properly targeted to the intestinal brush border. *Blood*, 2000, **96** (12): 3964~ 3970
- 8 Tandy S, Williams M, Leggett A, *et al.* Nramp2 expression is associated with pH-dependent iron uptake across the apical membrane of human intestinal Caco-2 cells. *J Biol Chem*, 2000, **275** (2): 1023~ 1029
- 9 Han O, Fleet J C, Wood R J. Reciprocal regulation of HFE and Nramp2 gene expression by iron in human intestinal cells. *J Nutr*, 1999, **129** (1): 98~ 104
- 10 Donovan A, Brownlie A, Zhou Y, *et al.* Positional cloning of zebrafish ferroportin 1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature*, 2000, **403** (6771): 776~ 781
- 11 Vulpe C D, Kuo Y M, Murphy T L, *et al.* Hephaestin, a cornuloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the sla mouse. *Nat Genet*, 1999, **21** (2): 195~ 199
- 12 Su M A, Trenor C C, Fleming J C, *et al.* The G185R mutation disrupts function of the iron transporter Nramp2. *Blood*, 1998, **92** (6): 2157~ 2163
- 13 Qian Z M, Tang P L, Wang Q. Iron crosses the endosomal membrane by a carrier-mediated process. *Prog Biophys Mol Biol*, 1997, **67** (1): 1~ 15
- 14 钱忠明, 蒲梅, 邓柏礼. 网织红细胞铁摄取机制的研究进展. *生物化学与生物物理进展*, 1997, **24** (1): 8~ 13
Qian Z M, Pu M, Tang P L. *Prog Biochem Biophys*, 1997, **24** (1): 8~ 13
- 15 Fleming M D, Romano M A, Su M A, *et al.* Nramp2 is mutated in the anemic Belgrade (b) rat: evidence of a role for Nramp2 in endosomal iron transport. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95** (3): 1148~ 1153
- 16 Tabuchi M, Yoshimori T, Yamaguchi K, *et al.* Human NRAMP2/DMT1, which mediates iron transport across endosomal membranes, is localized to late endosomes and lysosomes in HEp-2 cells. *J Biol Chem*, 2000, **275** (29): 22220~ 22228
- 17 Qian Z M, Wang Q. Expression of iron transport proteins and excessive iron accumulation of iron in the brain in neurodegenerative disorders. *Brain Res Rev*, 1998, **27** (3): 257~ 267
- 18 Levy J E, Montross L K, Andrews N C. Genes that modify the hemochromatosis phenotype in mice. *J Clin Invest*, 2000, **105** (9): 1209~ 1216

- 19 Qian Z M, Shen X. Brain iron transport and neurodegeneration. *Trend Mol Med*, 2001, **7** (3): 103~ 108
- 20 Qian Z M, Ke Y. Rethinking the role of ceruloplasmin in brain iron metabolism. *Brain Res Rev*, 2001, **35** (3): 287~ 294
- 21 Roth J A, Horbinski C, Feng L, *et al.* Differential localization of divalent metal transporter 1 with and without iron response element in rat PC12 and sympathetic neuronal cells. *J Neurosci*, 2000, **20** (20): 7595~ 7601

Divalent Metal Transporter 1: A Newly Discovered Mammalian Iron Transport Protein^{*}

KE Ya, QIAN Zhong-Ming^{**}

(Laboratory of Iron Metabolism, Department of Applied Biology & Chemical Technology,
The Hong Kong Polytechnic University, Kowloon, Hong Kong, China)

Abstract The discovery of DMT1 (divalent metal transporter 1, also named as Nramp2-nature resistance-associated macrophage protein 2, or DCT1-Divalent cation transporter 1) is the most important breakthrough in the field of mammalian iron metabolism in recent years. It was first identified on the basis of its homology to Nramp1 in 1995. In 1997, two groups independently identified DMT1 as the first mammalian transmembrane iron transporter. Since then, considerable research effort has been devoted to studying this newly discovered protein and the understanding of DMT1 has been greatly improved. The current knowledge of DMT1 is summarized, including its distribution, structure and different splice forms, expression regulation, physiological function and relationship between the disruption of its expression and the pathogenesis of some diseases.

Key words divalent metal transporter 1 (DMT1), iron metabolism, neurodegenerative diseases, anemia, hereditary hemochromatosis

^{*} The studies in this laboratory were supported by Competitive Earmarked Grants of the Hong Kong RGC (PolyU 5270/01M/B-Q445) and the Hong Kong Polytechnic University Grants (A-PC23 and GV739).

^{**} Corresponding author. Tel: 852-27666694, E-mail: bczmqian@polyu.edu.hk

Received: July 10, 2001 Accepted: August 23, 2001