

24p3-24p3 受体系统：一种新的铁转运途径*

赵颂民 石振华 段相林 常彦忠**

(河北师范大学, 河北省动物生理生化与分子生物学重点实验室, 石家庄 050016)

摘要 小鼠 24p3 是脂质运载蛋白 lipocalin 家族的成员之一, 可在白介素 3 (interleukin-3, IL-3) 缺乏时诱导细胞发生凋亡, 并参与细胞的铁转运过程. 最近, Devireddy 等又成功克隆到了 24p3 的细胞表面受体 (24p3 receptor, 24p3R), 进一步确定了 24p3-24p3R 这一新的铁转运途径. 该途径的发现不仅增加了对铁转运理论新的认识, 更重要的是, 这一发现为铁代谢调控细胞凋亡理论的建立奠定了基础.

关键词 24p3-24p3 受体系统, 铁转运, 细胞凋亡
学科分类号 Q493.7

铁是生物体内一种必需的营养元素, 是细胞执行生理功能重要的辅助因子. 转铁蛋白-转铁蛋白受体 (transferrin-transferrin receptor, Tf-TfR) 介导的铁转运途径广泛参与了生物体内的生理过程, 越来越多的基础研究和临床观察提示, 生物体内还可能还存在其他铁转运途径. 近 10 年来, 随着非 Tf-TfR 途径的铁代谢相关蛋白, 包括二价金属离子转运体 (divalent-metal transporter 1, DMT1)^[1]、转铁蛋白受体 2 (transferrin receptor 2, TfR2)^[2]、膜铁转运蛋白 (ferroportin 1, FP1)^[3]、膜铁转运蛋白辅助蛋白 (hephaestin, HP)^[4]、肠细胞色素 b (duodenal cytochrome b, Dcytb)^[5]、HFE 基因家族^[6]、铁调素 hepcidin^[7]以及 HJV^[8]等的发现, 使得我们对于铁代谢机制的认识提高到了新的层次水平.

最近, 对于 lipocalin 24p3 的研究受到了人们的普遍关注. 24p3 又称 lipocalin 2, 是用生长因子刺激 Balb/c 小鼠成纤维细胞后分离纯化得到的一种约 24 ku 的蛋白质, 并从 SV240 转化的小鼠肾细胞 cDNA 文库克隆得到了它的 cDNA^[9]. 24p3 属脂质运载蛋白 lipocalin 家族, 是一类分泌型蛋白, 可以结合小分子配基, 在嗅觉、V_A 的运输、信息素传递以及前列腺素合成等多种生理过程中发挥重要作用^[10, 11]. 2001 年, 《科学》杂志 (Science) 报道了在 IL-3 缺乏的情况下, 24p3 能特异地介导白细胞的凋亡^[12], 提示 24p3 特异介导白细胞的凋亡可能是其抑制局部炎症反应、参与调节子宫和乳腺组织

复原过程的机制之一. 2002 年 Yang 等^[13] 研究发现, 24p3 能介导铁向细胞内转运, 并调节铁反应基因的表达. 最近 Devireddy 等^[14] 又克隆到了小鼠 24p3 的细胞表面受体 (24p3 receptor, 24p3R), 确定了 24p3-24p3R 系统是一条新的铁转运途径, 而且通过这一途径, 引起细胞内铁水平的变化, 并调节了细胞的凋亡过程, 为铁代谢的研究开辟了新的方向.

1 24p3/24p3R 及其表达分布

24p3 蛋白是由小鼠 *Lcn2* 基因 (又称 24p3 基因) 编码, 其 cDNA 长度为 853 bp, 编码 200 个氨基酸残基, 分子质量约为 24 ku, 在其 N 端具有一个由 15 个氨基酸构成的疏水信号肽. Liu 等^[9] 利用 RNA 杂交检测了小鼠 24p3 mRNA 的表达情况, 发现, 注射了松节油的实验组小鼠肝脏 24p3 mRNA 表达与对照组相比显著增加, 在脑组织及雌性小鼠子宫中也有少量的表达, 而在心脏、肾脏、肺及肌肉组织中未检测到 24p3 mRNA 的表达.

2005 年底, Devireddy 等^[14] 通过对鼠科 FL5.12 细胞系 cDNA 文库进行筛选, 成功克隆到了 24p3

* 国家自然科学基金 (30570957) 和河北省自然科学基金 (C2006000152) 资助项目.

** 通讯联系人. Tel: 0311-86267215, Fax: 0311-87881815

E-mail: chang7676@163.com

收稿日期: 2006-11-23, 接受日期: 2006-12-01

的细胞表面受体——24p3R. 利用免疫杂交分析发现 24p3R 编码 2 种形式的蛋白质: 一种是长的 24p3R (long 24p3R, 24p3R-L), 由全长 cDNA 编码, 包含 520 个氨基酸, 分子质量约为 60 ku, 具有 12 个跨膜区域; 还有一种通过选择性剪接, 造成 24p3R 缺失了 N 端 154 个氨基酸残基, 生成一种约 30 ku 的短 24p3R (short 24p3R, 24p3R-S). 24p3R-L 分布广泛, 在心脏、肺、肝脏、脾、肾脏、胃、卵巢、胸腺、睾丸、子宫及胎盘等多种器官组织中都有分布, 而 24p3R-S 只在肝脏、脾、睾丸中有少量表达. 此外还检测到了 24p3R 在小鼠早期胚胎阶段也有表达.

2 24p3-24p3R 转运系统的功能

2.1 24p3-24p3R 介导的铁转运途径

Yang 等^[13]研究了原始肾上皮细胞分化后, 证实哺乳动物细胞可以表达 24p3, 并能与铁结合. 他们先用 ⁵⁹Fe 标记小鼠 UB 细胞, 利用免疫沉淀等方法从其培养基中分离出了纯化沉淀物, 分析后发现其中含有 24p3 和 ⁵⁹Fe, 而对照组中没有特异的蛋白质沉淀物. 同时, 他们也发现自 UB 细胞中分离纯化的 24p3 结合了含铁的红黄色团样小分子物质, 类似于能与铁高亲和力结合的肠菌素 (enterobacterin, EnB), 当细菌或真菌处于缺铁时肠菌素的合成分泌增加.

24p3 能与铁高亲和结合现象的发现, 使 Yang 等推测 24p3 可能是一种新的铁转运蛋白. 进一步的研究结果证实了他们的猜测. 在 UB 细胞、WT 细胞等多种细胞的培养基中加入 24p3-⁵⁹Fe 后, 所有细胞均以时间依赖的方式摄取 ⁵⁹Fe, 且在 4°C 或加入过量含未结合铁的 24p3 的情况下铁摄取被抑制, 提示细胞对 ⁵⁹Fe-24p3 的摄取是受体介导的入胞过程. 用 ³⁵S- 甲硫氨酸标记的 24p3 与 Tf 加入到不同发育时期的胚肾组织中, 发现 24p3 主要被早期的原始肾上皮细胞摄取, Tf 仅介导铁参与原始肾上皮细胞的晚期分化, 因为 Tf 转铁途径在分化早期的原始肾上皮细胞中尚未建立. 这些结果表明, 24p3 具有类似于 Tf 的铁转运功能, 同时又有其独特性质.

最近发现的 24p3R 完善了对 24p3 参与铁转运途径的认识, 如图 1 所示. Devireddy 等^[14, 15]最新的研究认为: holo-24p3 是结合了 Fe 的 24p3, apo-24p3 为没有与 Fe 结合的 24p3, 24p3R 可以与这 2 种形式的 24p3 结合并通过内吞作用将其内化. holo-24p3 进入细胞后将所携带的 Fe 从内吞小泡释放到胞质, 使细胞内 Fe 的浓度升高, holo-24p3 转变为 apo-24p3, 与 24p3R 一起通过胞吐作用排出细胞外, 并可循环使用, 而 apo-24p3 结合 24p3R 内吞进入细胞后, 与胞内的 Fe 结合, 再通过胞吐作用将其转运出细胞外, 造成细胞内 Fe 浓度下降.

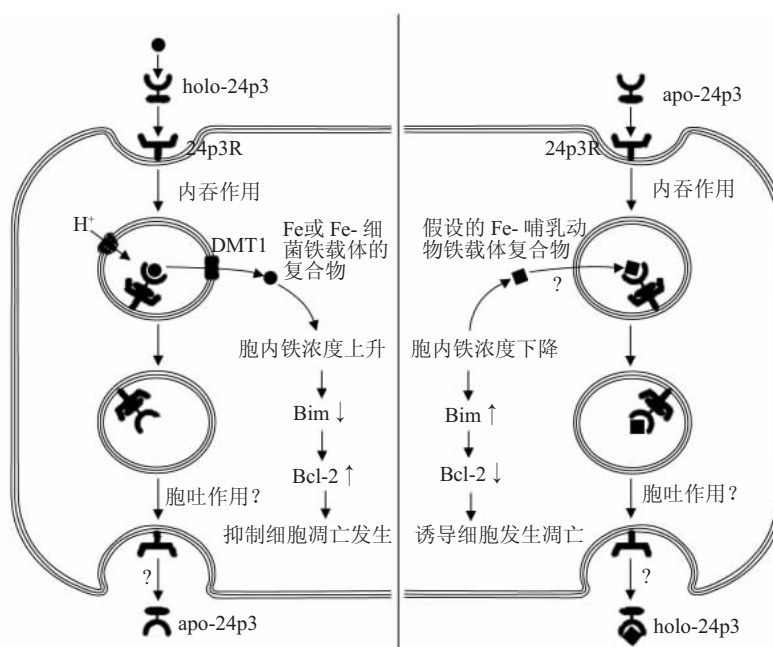


Fig. 1 The 24p3-24p3R-mediated intracellular iron transport pathway

图 1 24p3-24p3R 铁转运途径示意图

尽管 24p3-24p3R 途径与 Tf-TfR 途径相似但仍有差别: TfR 与 Tf 的亲合力在很大程度上依赖于 Tf 结合铁的状态, 即 TfR 与 holo-Tf 的亲合力远高于 apo-Tf. 尽管未对 apo-24p3 和 holo-24p3 与 24p3R 的亲合力进行测定, 但 Devireddy 等认为, apo-24p3 和 holo-24p3 均可与 24p3R 结合, 被细胞内吞后产生差别极大的生物学效应, 因此二者之间是否存在竞争, 它们在结合 24p3R 后是否存在相同的胞内运输途径等仍需进一步研究.

2.2 24p3-24p3R 铁转运途径对细胞凋亡的调控

细胞凋亡是细胞死亡的一种生理形式, 广泛存在于不同的生物学过程中, 一些营养因子的缺乏是引起细胞凋亡的重要因素. 例如, 许多造血细胞在缺乏某种特殊的细胞因子如 IL-3 时会发生细胞凋亡. 细胞凋亡受许多基因调节, 包括多种癌基因和抑癌基因, 其中 Bcl-2 家族是与细胞凋亡关系最为密切, 被研究得最为深入的蛋白质之一. 前人研究认为, IL-3 缺乏所引发的凋亡通路主要有该家族的 Bcl-2、Bim 和 Bid、Bad 等蛋白质, 其中 Bcl-2 的表达产物位于线粒体内膜、核膜及内质网膜, 在人体多种肿瘤中高表达, 可抑制多种因素诱导的细胞凋亡. Bim 和 Bid 位于 Bcl-2 信号通路上游, 可以抑制 Bcl-2 的表达, 属于抑癌基因. Bad 能与 Bcl-2 形成异源二聚体, 在哺乳动物细胞已证明了 Bad 与 Bcl-2 的相互作用, 但不能逆转 Bcl-2 对凋亡的抑制.

值得注意的是, IL-3 缺乏所引发的凋亡可用转录阻断剂放线菌素 D 或放线菌酮阻断, 提示在此过程中需要重新合成 RNA/蛋白质. 2001 年, Devireddy 等^[12]利用 DNA 微阵列对 IL-3 依赖的鼠科 FL5.12 pro B 淋巴细胞系进行基因表达分析时发现: 当培养基中缺乏细胞因子 IL-3 时, FL5.12 细胞中 lipocalin 24p3 的表达量增加最多(12.6 倍). 在含有 IL-3 培养基中添加 24p3 蛋白后, 24p3 可以诱导 FL5.12 细胞发生凋亡, 接下来在培养基中再加入 24p3 的抗体进行孵育后, FL5.12 细胞的凋亡过程受到了抑制. 因而 Devireddy 等认为 IL-3 的缺乏在转录水平激活了 24p3 基因的转录, 导致 24p3 的合成和分泌迅速增加, 最终导致凋亡过程的发生.

在 24p3R 被克隆之后, Devireddy 等^[14]研究了铁通过 24p3-24p3R 转运途径调节细胞凋亡发生的机制: 24p3R 可以结合 holo-24p3 和 apo-24p3, 使其内化进入细胞, 从而调节胞内铁浓度. holo-24p3

增加了胞内铁的浓度, 胞内铁水平的增加抑制了 Bim 蛋白的产生, 进而使得 Bcl-2 合成增加, 最终由 Bcl-2 抑制了细胞的凋亡信号通路. 反之, apo-24p3 降低胞内铁浓度, 诱导 Bim 蛋白的表达, Bim 又可以抑制 Bcl-2 的活性, 破坏了 Bcl-2 抑制凋亡的功能. 在发生凋亡的细胞中加入 holo-Tf 可以抑制此种凋亡, 证明铁水平的变化确实可以调控凋亡. 目前有关 24p3-Fe 调控细胞凋亡的信号机制存在不同的看法, 尚未定论.

3 24p3-24p3R 铁转运途径的临床意义

24p3-24p3R 这一新的铁转运途径的发现, 揭示了铁代谢状态的改变与细胞凋亡之间的密切联系, 丰富了对某些铁代谢紊乱相关疾病及肿瘤的发病机制的认识.

当机体受到细菌感染时, 肝脏表达大量 24p3, 并通过血液运输至感染部位, 24p3 通过与结合铁的肠菌素等细菌铁载体相作用, 一方面可防止铁被细菌利用, 达到抑制细菌生长的目的, 另一方面通过与细胞表面的 24p3R 结合, 调控感染部位细胞的凋亡, 达到抑制炎症反应的目的.

BCR-ABL 是一种致癌基因, 同其他酪氨酸激酶一样, 它可使细胞对 IL-3 缺乏引发的凋亡产生抵抗作用, 引发慢性骨髓性白血病(chronic myeloid leukaemia, CML). Devireddy 等^[14]对 24p3 的人类同源蛋白 NGAL (neutrophil gelatinase-associated lipocalin) 进行了研究, 结果显示, BCR-ABL 蛋白提高了 apo-NGAL 的表达量, 但同时抑制其受体 NGALR 的表达, 致使细胞对过多的 apo-NGAL 无反应, 细胞的凋亡过程受到抑制. 用 BCR-ABL 的抑制剂——imatinib 处理细胞, 引起 NGALR 特异性表达上调, 细胞表现出对 apo-NGAL 调控的凋亡敏感, 进而癌变的细胞逐步恢复正常的凋亡过程. 这些结果为使用 imatinib 治疗 CML 以及找寻其他有效治疗药物提供了理论依据.

4 研究展望

尽管人们对铁代谢的研究已经有近百年的历史, 直至近 10 年来, 随着对铁转运相关蛋白及其调控机制的了解, 才使得我们对于机体铁稳态调控的认识上升到了新的水平, 最近对 24p3-24p3R 铁转运途径的发现, 使得我们对铁在生命活动中的重要作用有了更深刻的了解, 但同时又给我们提出了许多有待解决的问题, 主要包括以下几点: a.

Devireddy等报道的 apo-24p3 与细胞内铁结合后, 导致胞内铁外流, 可能是通过某种铁载体完成, 但这种载体还未被分离, 因此还需对这一过程进行更加深入的研究. b. 24p3 基因敲除小鼠可以成活, 证实 24p3-24p3R 铁吸收途径对于器官形成或发育并不是必需的, 在其过程中是否存在其他途径还有待进一步探索^[16]. 现有的报道仅仅证实了 24p3 可以结合细菌铁载体 - 肠菌素, 尽管这一复合物与菌血症的病理状态相关, 但早期胚胎发育过程中并不存在肠菌素, 因此 24p3-24p3R 介导的铁转运是否与正常细胞生理相关还需要更深层次的研究. c. 24p3 在供铁后可以循环利用, 但其具体循环途径还未知, 进一步的研究需要证明 holo-24p3 和 apo-24p3 是否竞争结合 24p3R, 它们是否遵从相同或不同的胞内运输路线. d. 同样作为一种抗菌多肽, 24p3 与铁调素 hepcidin 在铁代谢中是否以类似的转录后调节机制参与铁稳态的调节? 同样是一种受体介导的铁转运, 24p3-24p3R 途径与 Tf-TfR 途径是否相互关联? 24p3-24p3R 能否在受体与非受体介导的铁转运途径之间建立起内在的联系. 这些问题都需要我们对 24p3-24p3R 铁转运途径进行更深入的探讨.

近年来, 随着社会老龄化日益严重, 对各种神经退行性疾病(neurodegenerative disease, NDs)发病机理的研究逐渐成为热点. 已有研究表明, 脑(细胞)内过量铁聚积则会产生大量的活性氧自由基, 进而损伤神经细胞和组织. 帕金森氏病、阿尔茨海默病、亨廷顿病病人某些脑区内铁水平异常增高, 并出现氧化应激反应增强的现象. 脑部铁代谢主要依赖 Tf-TfR 途径, 同时也存在非 Tf-TfR 途径的铁代谢相关蛋白. 我们及其他研究室的研究成果已初步证明, FP1^[17,18]、DMT1^[19]、hepcidin^[20]在脑部均有表达并在脑铁代谢中发挥重要作用. 已有实验证明脑部有少量 24p3 的表达, 因此, 我们推测 24p3-24p3R 铁转运途径可能存在于脑铁代谢过程之中, 而且该途径所调控的细胞凋亡过程可能参与了神经退行性疾病的形成, 其具体的机制还有待实验验证.

综上所述, 24p3-24p3R 铁转运途径已证实参与了早期胚胎发育、急性应激反应以及肿瘤发生过程中的铁转运, 由此引起的细胞铁浓度的变化可以进一步地调控细胞凋亡的发生, 因此 24p3-24p3R 铁转运途径的发现为铁代谢的研究开辟了新的方向, 对铁代谢机制和相关细胞凋亡机制的深入研究具有极其深远的意义.

参 考 文 献

- 1 Gunshin H, Mackenzie B, Berger U V, *et al.* Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature*, 1997, **388** (6639): 482~488
- 2 常彦忠, 段相林, 钱志明. 转铁蛋白受体 2 及其功能与相关疾病. *生物化学与生物物理进展*, 2003, **30** (4): 533~536
Chang Y Z, Duan X L, Qian Z M. *Prog Biochem Biophys*, 2003, **30** (4): 533~536
- 3 Donovan A, Brownlie A, Zhou Y, *et al.* Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature*, 2000, **403** (6771): 776~781
- 4 Vulpe C D, Kuo Y M, Murphy T L, *et al.* Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the *sla* mouse. *Nat Genet*, 1999, **21** (2): 195~199
- 5 McKie A T, Marciani P, Rolfs A, *et al.* An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. *Science*, 2001, **291** (5509): 1755~1759
- 6 Pietrangelo A. Hereditary hemochromatosis—a new look at an old disease. *N Engl J Med*, 2004, **350** (23): 2383~2397
- 7 Nicolas G, Bennoun M, Devaux I, *et al.* Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (*USF2*) knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98** (15): 8780~8785
- 8 Papanikolaou G. Mutations in HFE2 cause iron overload in chromosome 1q linked juvenile hemochromatosis. *Nat Genet*, 2004, **36** (1): 77~82
- 9 Liu Q, Nilsen-Hamilton M. Identification of a new acute phase protein. *J Biol Chem*, 1995, **70** (38): 22565~22570
- 10 Flower D R. The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem J*, 1996, **318** (1): 1~14
- 11 Akerstrom B, Flower D R, Salier J P. Lipocalins: unity in diversity. *Biochim Biophys Acta*, 2000, **1482** (1~2): 1~8
- 12 Devireddy L R, Teodoro J G, Richard F A, *et al.* Induction of apoptosis by a secreted lipocalin that is transcriptionally regulated by IL-3 deprivation. *Science*, 2001, **293** (5531): 829~834
- 13 Yang J, Goetz D, Li J Y, *et al.* An Iron delivery pathway mediated by a lipocalin. *Mol Cell*, 2002, **10** (5): 1045~1056
- 14 Devireddy L R, Gazin C, Zhu X, *et al.* A cell- surface receptor for lipocalin 24p3 selectively mediates apoptosis and iron uptake. *Cell*, 2005, **123** (7): 1293~1305
- 15 Richardson D R. 24p3 and its receptor: dawn of a new iron age? *Cell*, 2005, **123** (7): 1175~1177
- 16 Berger T, Togawa A, Duncan G S, *et al.* Lipocalin 2 -deficient mice exhibit increased sensitivity to *Escherichia coli* infection but not to ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103** (6): 1834~1839
- 17 Jiang D H, Ke Y, Chang Y Z, *et al.* Distribution of ferroportin1 protein in different regions of developing rat brain. *Dev Neurosci*, 2002, **24** (2~3): 94~98
- 18 Burdo J R, Menzies S L, Simpson I A, *et al.* Distribution of divalent metal transporter 1 and metal transport protein 1 in the normal and Belgrade rat. *J Neurosci Res*, 2001, **66** (6): 1198~1207

19 Ke Y, Chang Y Z, Duan X L, *et al.* Age-dependent and iron-independent expression of two mRNA isoforms of divalent metal transporter 1 in rat brain. *Neurobiol Aging*, 2005, **26** (5): 739~748

20 Zechel S, Huber-Wittmer K, Oliver von Bohlen und Halbach. Distribution of the iron-regulating protein hepcidin in the murine central nervous system. *J Neurosci Res*, 2006, **84** (4): 790~800

24p3-24p3 Receptor System: A New Pathway of Iron Transport*

ZHAO Song-Min, SHI Zhen-Hua, DUAN Xiang-Lin, CHANG Yan-Zhong**

(The Key Laboratory of Animal Physiology, Biochemistry and Molecular Biology of Hebei Province,
Hebei Normal University, Shijiazhuang 050016, China)

Abstract The 24p3 of mouse is a member of lipocalin family and it has been implicated in iron transport and apoptosis due to interleukin-3(IL-3) deprivation. Devireddy and colleagues cloned the receptor of 24p3 and further confirmed that the pathway of 24p3-24p3R is a new iron transport approach in Dec 2005. A link between iron internalization mediated by 24p3R and regulation of apoptosis was suggested.

Key words 24p3-24p3R pathway, iron transport, cell apoptosis

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30570957) and The Provincial Natural Sciences Foundation of Hebei Province (C2006000152).

**Corresponding author. Tel: 86-311-86267215, Fax: 86-311-87881815, E-mail: chang7676@163.com

Received: November 23, 2006 Accepted: December 1, 2006