

不同浓度铁离子对成骨细胞铁离子通道蛋白的影响

何银锋 徐又佳 赵国阳 张增利 肖莉 王爱东

中图分类号: R580 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2012)08-0700-04

摘要: **目的** 铁过载与骨代谢相关,在人成骨细胞(hFOB1.19)中,膜转铁蛋白(FPN1)、转铁蛋白受体(TfR)和二价金属转运蛋白1(DMT1)是细胞内铁离子进入和排除的重要通道蛋白;本研究用不同浓度铁离子干预成骨细胞培养,观察成骨细胞铁离子通道蛋白基因表达变化和相互联系,了解铁过载对相关通道蛋白的影响意义。**方法** 人成骨细胞在34℃下进行体外培养,以不同浓度枸橼酸铁铵FAC(50 μmol/L、100 μmol/L、200 μmol/L)干预成骨细胞培养,48小时后收集细胞,按不同干预组抽提总RNA,采用半定量RT-PCR法检测成骨细胞中TfR、DMT1、FPN1 mRNA的表达。**结果** ①RT-PCR检测显示不同浓度FAC干预成骨细胞后,各组FPN1、TfR、DMT1 mRNA均有表达;②不同浓度组FPN1、TfR、DMT1 mRNA表达光密度比值不同,组间密度比值比较存在统计学意义($P < 0.05$);③培养环境铁离子浓度增高可以使得FPN1的mRNA表达上调,而TfR、DMT1的mRNA表达下调。**结论** 成骨细胞的铁通道蛋白受环境铁离子影响,在一定范围内随着细胞外铁离子浓度增加,细胞膜铁离子进入通道功能下调、排除通道功能上调,说明铁过载对成骨细胞内铁离子水平有明显影响。**关键词:** 人成骨细胞; 铁离子; 膜转铁蛋白; 转铁蛋白受体; 二价金属转运蛋白

The effect of iron with different concentrations on the iron channel protein in osteoblasts HE Yinfeng, XU Youjia, ZHAO Guoyang, et al. Department of Orthopedics, Soochow University, Suzhou 215000, China

Corresponding author: XU Youjia, Email: xuyoujia@medmail.com.cn

Abstract: Objective Iron overload was associated with osteoporosis. The ferroportin (FPN1), transferring receptor (TfR), and divalent metal transporter 1 (DMT1) were the important channel proteins of the iron ions in osteoblasts (hFOB1.19). This study aimed to culture osteoblast with different doses of iron ions, and to observe gene expression variation of iron ion channel proteins, and to acknowledge the effect of iron overload on the relevant channel proteins. **Methods** The osteoblasts were cultured at 34℃ in vitro with different concentrations of FAC (50 μmol/L, 100 μmol/L, and 200 μmol/L, respectively) for 48 hours. The total RNA in different intervention groups was isolated and extracted. Expressions of TfR, DMT1 and FPN1 mRNA were detected with semi-quantitative RT-PCR. **Results** The result of RT-PCR showed that the mRNA of TfR, DMT1, and FPN1 was expressed after the intervention of FAC with different concentrations. The density ratios of TfR, DMT1, and FPN1 mRNA were different among the different FAC concentration groups, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). The expression of FPN1 mRNA increased with the increasing of iron concentration. However the expression of TfR and DMT1 mRNA decreased with the increasing of iron concentration. **Conclusion** The iron channel proteins of osteoblasts can be affected by the iron ions. Along with the increasing of iron ions concentration in a certain range, the function of iron into channel can be down-regulated and the function of iron out the channel can be up regulated. The effect of iron overload on the level of iron in osteoblasts is significant.

Key words: Osteoblasts; Iron ion; Ferroportin; Transferring receptor; Divalent metal transporter 1

基金项目: 教育部博士学科点专项科研基金(3201110020)、江苏省领军人才基金

作者单位: 215000 苏州, 苏州大学附属第二医院骨科(何银锋、徐又佳、赵国阳); 中心实验室(肖莉、王爱东); 苏州大学公共卫生学院维生素D研究室(张增利)

通讯作者: 徐又佳, Email: xuyoujia@medmail.com.cn

铁离子是人体必须的微量元素之一,参与人体内多种代谢活动。正常机体内存在系统的铁稳态调节机制,维持细胞和组织中铁离子水平的相对稳定^[1],哺乳动物细胞可通过多种调节机制维持细胞铁代谢的动态平衡。近些年许多研究提示:铁过载与骨质疏松相关^[2,3];高铁环境下,成骨细胞骨代谢指标存在显著变化^[4,5]。体内铁过载可以通过全身系统途径影响成骨细胞功能,也可对破骨细胞有直接影响^[6]。在铁代谢研究中,目前观点认为转铁蛋白受体(transferrin receptor, TfR)、二价金属离子转运蛋白 1(divalent metal transporter 1, DMT1)和膜铁转运蛋白(ferroportin, FPN1)等铁转运相关蛋白是细胞内外铁离子转移、细胞铁稳态调节的重要通道和载体^[7];本实验通过枸橼酸铁铵(铁离子)干预成骨细胞培养,检测成骨细胞铁代谢相关基因的变化,以进一步了解铁离子对成骨细胞铁离子通道蛋白指标的影响。

1 材料和方法

1.1 主要材料、仪器

枸橼酸铁铵(FAC,诺华制药公司)、人成骨细胞(hFOB1.19)(购于中国科学院上海细胞库),DMEM (高糖)/F12(Gibco 公司),新生胎牛血清(Gibco 公司),Trizol(美国 Invitrogen 公司),CO₂培养箱(瑞士 Heraeus 公司),UV-2000 紫外分光光度仪(UNICO 公司),高速冷冻离心机(美国 Thermo 公司),Gene Amp PCR System 9700 PCR 仪(美国 ABI 公司),电泳仪(Bio-RadPowerPPAC200, 美国),Champ Gel 5000 凝胶成像系统(北京赛智创业科技有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 成骨细胞培养

将 hFOB1.19 置于 5% CO₂、34℃ 培养箱内,细胞培养基为 DMEM(高糖):F12 = 1:1,添加终浓度为 10% 的胎牛血清和终浓度为 0.3% 的 G418。

1.2.2 枸橼酸铁铵干预

将不同终浓度的 FAC(50 μmol/L、100 μmol/L、200 μmol/L)加入成骨细胞培养基内,对照组加入不含 FAC 的培养基,继续培养 48 h 后,收集细胞,抽提总 RNA。

1.2.3 总 RNA 抽提、RT-PCR

总 RNA 抽提:接种于培养瓶内的成骨细胞于 FAC 干预 48 h 后,PBS 缓冲液冲洗 2 遍,然后加入胰蛋白酶消化、离心,收集细胞于 1.5 ml 的 EP 管内,加入 1 ml 的 Trizol,室温放置 5 ~ 10 min。加入氯仿

0.2 ml,剧烈震荡混匀后室温放置 5 ~ 10 min,4℃ 12000 r/min 离心 15 min,离心后分层。取上层水相约 500 μl 至新 1.5 ml EP 管中,加入等体积冰冷异丙醇,混匀后室温放置 15 min。4℃ 12000 r/min 离心 10 min,弃上清并用滤纸吸干,加入 1 ml 的 75% 乙醇漂洗沉淀,4℃ 8000 r/min 离心 5 min,弃上清,室温晾干,加入 DEPC 水 50 μl 溶解 RNA,用紫外分光光度计检测 RNA 浓度,-80℃ 保存。

逆转录:逆转录前将 RNA 的浓度调为 1 μg/μl。每个逆转录反应体积为 20 μl:含模板总 RNA 1 μg, Oligo(dT)18 primer 1 μl,5 × Reaction Buffer 4 μl, 10mM dNTP Mix 2 μl,Ribolock™ RNase Inhibitor(20 U/μl) 1 μl, RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase(200 U/μl)1 μl,补加 DEPC 水至 20 μl。于热循环仪中 65℃ 5 min 预变性,42℃ 60 min 逆转录,70℃ 5 min 终止反应,-20℃ 保存。

聚合酶链反应:总反应体积 20 μl:内含 2 × Taq PCR mix 10 μl,Water(nuclease-free)7 μl,上下游引物各 1 μl,逆转录产物 1 μl。于 PCR 仪中 94℃ 3 min,94℃ 30 s,50℃ 30 s,72℃ 30 s,共 30 个循环,最后 72℃ 延伸 10 min,-20℃ 保存。

1.2.4 PCR 扩增产物结果分析

取 PCR 产物 6 μl 点样于 1.2% 琼脂糖凝胶,110 V 电泳 40 min,于紫外线箱凝胶成像系统进行扫描并照相记录,实验重复 3 次,并用 Image J 图像分析软件对目的基因和参数基因条带光密度值进行分析。引物序列:β-actin,转铁蛋白受体(transferrin receptor, TfR),二价金属离子转运蛋白 1(divalent metal transporter 1, DMT1),膜铁转运蛋白(ferroportin, FPN1)。引物根据 Genbank 与 Primer3 设计,由上海生工合成。引物序列及分子大小如下(表 1)。

表 1 β-actin、TfR、DMT1、FPN1 基因的引物序列及分子大小(bp)		
基因	引物序列	bp
β-actin	上游 5-TCCTGTGGCATCCACGAAACT-3	306bp
	下游 5-GAAGCATTTCGGGTGCACGAT-3	
TfR	上游 5-CTTGACTGACATTTAGCGTAGC-3	95bp
	下游 5-GCCACATGCTTTCATTTAAGTACG-3	
DMT1	上游 5-TTGACTAAGGCAGAATGCAG-3	276bp
	下游 5-CGTCTCATCACCATTGCA-3	
FPN1	上游 5-CAATGACGCCTGCAAACAGCAG-3	283bp
	下游 5-TTCGGACAGGTCTGATCTCAGG-3	

1.2.5 统计学处理

所得实验数据用均数 ± 标准差表示,用

SPEE17.0 统计分析软件进行单因素方差分析,后采用 SNK-q 检验对组组之间进行两两比较, $P < 0.05$ 表示差异存在统计学意义。

2 结果

2.1 PCR 产物分析

不同浓度组枸橼酸铁铵(FAC)及对照组作用于人成骨细胞(hFOB1.19)48 h 后,提取细胞 RNA 后进行 RT-PCR,FPN1 和 TfR、DMT1 均有条带显示(见图 1),TfR、DMT1 mRNA 基因的光密度值随枸橼酸铁铵浓度的升高而呈剂量依赖性降低,提示细胞外铁离子可抑制 TfR、DMT1 mRNA 的表达;FPN1 基因的光密度值随枸橼酸铁铵浓度的升高而呈剂量依赖性升高,提示细胞外铁离子可促进 FPN1 mRNA 的表达。

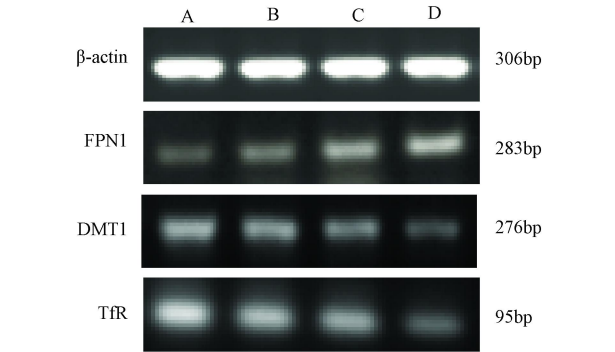


图 1 RT-PCR 检测不同浓度枸橼酸铁铵干预后成骨细胞 β-actin、TfR、DMT1、FPN1 基因表达
A:对照组; B:FAC 50 μmol/L; C:FAC 100 μmol/L; D:FAC 200 μmol/L

2.2 铁离子通道蛋白基因表达变化趋势

通过凝胶成像系统分析仪对 β-actin、TfR、DMT1、FPN1 基因条带进行像素值测定,测得各扩增条带的光密度值,与 β-actin 基因扩增条带的光密度值比较(表 2)。光密度比值统计学比较:①三组实验组与对照组数值比较存在显著差异($P < 0.05$);②TfR、DMT1 各浓度组,随铁离子浓度增加蛋白基因条带光密度比值逐渐降低,不同浓度组间比较有

表 2 不同浓度 FAC 作用下 DMT1、TfR 和 FPN1 与 β-actin 的光密度比值			
组别	DMT1/β-actin	TfR/β-actin	FPN1/β-actin
对照组	0.504 ± 0.015	0.617 ± 0.013	0.065 ± 0.005
50μmol/L	0.442 ± 0.027	0.497 ± 0.031	0.091 ± 0.005
100μmol/L	0.343 ± 0.029 *	0.433 ± 0.025 *	0.136 ± 0.025 *
200μmol/L	0.211 ± 0.015 *	0.299 ± 0.065 *	0.193 ± 0.013 *

注: * 表示:与前组比较 $P < 0.05$
万方数据

差异显著($P < 0.05$);③FPN1 各浓度组,随铁离子浓度增加蛋白基因条带光密度比值逐渐增加,不同浓度组间比较有差异显著($P < 0.05$),见图 2。

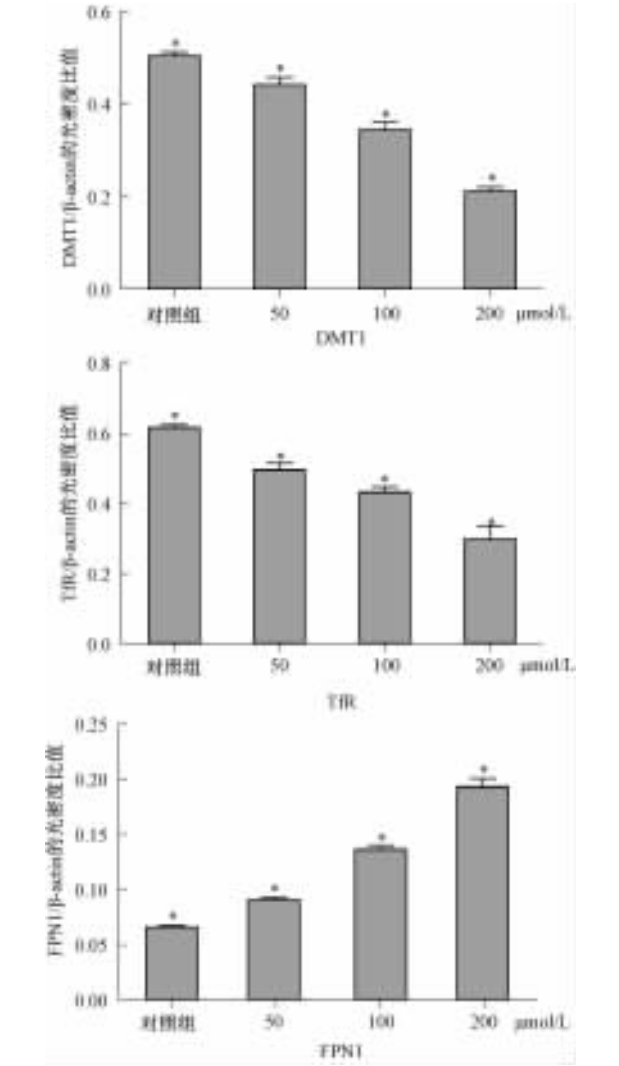


图 2 不同浓度 FAC 对 TfR、DMT1、FPN1 基因表达变化的趋势

3 讨论

铁离子是人体内必需的微量元素,已有研究证明血红蛋白、细胞色素、氧化还原酶的组成成分中都有铁离子存在,铁离子还参与体内许多生化反应,铁代谢的动态平衡对维持细胞功能至关重要。那么,铁过载与骨质疏松相关^[8],成骨细胞与铁离子关系如何? 了解这一问题重点要了解成骨细胞上铁离子通道蛋白与铁离子关系,如果成骨细胞外铁离子增加(过载),成骨细胞膜上通道蛋白存在剂量依赖变化(非一过性),那可以初步提示成骨细胞与细胞外铁离子存在功能影响,进而提示铁离子浓度变化后成骨细胞功能指标变化,可能与细胞内不同水平铁

离子作用相关。

TfR(进入通道蛋白): 机体组织细胞可通过多种机制摄取铁, 其中最重要的是转铁蛋白受体(transferrin receptor, TfR)介导的铁摄取。细胞表面的转铁蛋白受体通过与转铁蛋白结合, 将转铁蛋白携带的铁转入细胞内。转铁蛋白受体是一种跨膜糖蛋白, 存在于哺乳动物细胞的浆膜上。一般认为, 许多组织细胞中铁离子的吸收或摄取是通过经典的转铁蛋白(Tf)和转铁蛋白受体(TfR)途径来介导的, TfR 基因表达受细胞内铁浓度的控制, 文献报道: 细胞内铁离子水平与 TfR 的表达呈负相关性。TfR mRNA 的 3'端含有一个 5 个高度相关的回文序列元件——铁反应元件(IRE), IRE 能结合胞质的一个铁调节蛋白(IRP), 从而增加 TfR mRNA 的稳定性。当机体内铁离子过多时, 铁离子可灭活 IRP 的活性, 从而导致 IRP 与 IRE 的结合能力丧失, 降低了 TfR mRNA 的稳定性, 导致 TfR 的 mRNA 被核糖核酸酶降解, 其表达下降^[9]。本实验结果显示, 在高铁环境下, 成骨细胞随着铁离子浓度增加, 成骨细胞对铁离子的摄取也逐渐减少; TfR mRNA 表达则呈剂量依赖性降低, 可能提示成骨细胞内对铁离子有明显反应, 且反应能力在一定范围内是动态的、可逆的, 胞外铁离子浓度变化对成骨细胞功能构成明显影响。

DMT1(进入通道蛋白): 二价金属转运蛋白 1 (divalent metal transporter 1, DMT1)又称为具天然抗性的巨噬细胞蛋白 2 (nature resistance-associated macrophage protein 2, Nramp2), 是哺乳动物体内质子偶联的跨膜金属离子转运体。Gunshin 等^[10]研究发现 DMT1 基因的表达与机体铁状态密切相关: 机体铁缺乏时, 十二指肠细胞的 DMT1mRNA 的表达明显增加, 而当高铁状态时十二指肠细胞 DMT1mRNA 的表达则明显下降, 且这种表达的增加与否受到对铁需求程度的影响。本实验研究结果与此结论相符, 即随着胞外铁离子浓度的增加, 细胞对铁离子的需求降低, DMT1 mRNA 的表达也随之下降; 这也说明成骨细胞对胞外铁离子水平变化存在反应性变化。

FPN1(排出通道蛋白): Ganz 等^[11]于 2004 年研究发现, 膜转铁蛋白(ferroportin 1, FPN1)是一种跨膜的铁输出蛋白, 是细胞铁排出的唯一通路。FPN1 是目前已知的唯一的与组织细胞铁释放有关的蛋白质, 在与铁释放有关的组织或细胞上存在高度表达。

万方数据

Yang 等^[12]研究发现: 高铁环境下原位杂交的人肺泡巨噬细胞 FPN1 的 mRNA 表达水平显著升高, Delaby 等^[13]发现巨噬细胞在高铁环境或吞噬红细胞后, FPN1 在细胞膜上的表达增加尤为显著。本研究将成骨细胞置于高铁环境下培养, 随着铁离子浓度增加, FPN1 mRNA 的表达也增加, 呈剂量依赖性, 提示铁过载后成骨细胞内铁离子排出功能增加, 这可能与胞外铁离子增加导致胞内铁离子增多, 细胞功能启动, 为了达到新水平的铁离子平衡, 排出释放铁离子功能增加。

综上所述, 人 hFOB1.19 成骨细胞在铁离子增多环境下培养, 细胞膜的铁离子通道蛋白存在剂量依赖性变化, 总的变化趋势是细胞外铁离子浓度增加, 细胞铁离子进入通道蛋白表达下降, 进入细胞铁离子减少; 细胞排出铁离子通道蛋白表达增加, 细胞排出铁离子增多。

【 参 考 文 献 】

- [1] 何银锋, 徐又佳. 铁螯合剂在铁过载骨质疏松症中的应用前景. 国际骨科学杂志, 2011, 32(4): 226-227.
- [2] 徐又佳, 林华. 重视铁代谢在骨质疏松症诊治中的意义. 中华医学杂志, 2011, 91(31): 2223-2225.
- [3] 李光飞, 徐又佳, 钱忠明. 铁过载与骨质疏松关系的研究进展. 中国骨质疏松杂志, 2010, 16(10): 88-91.
- [4] 赵理平, 徐又佳, 林华, 等. 高铁环境对成骨细胞生物活性的影响. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2010, 3(4): 249-256.
- [5] 贾鹏, 徐又佳, 钱忠明. BMP-6 和铁超载骨质疏松关系的最新进展. 中华内分泌代谢杂志, 2011, 27(2): 82-84.
- [6] 贾鹏, 张增利, 徐又佳, 等. 铁超载对小鼠单核细胞 RAW264.7 向破骨细胞分化的影响. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2011, 3(4): 44-49.
- [7] 孔卫娜, 段相林, 常彦忠. 单核巨噬细胞系统铁代谢调控机制. 自然科学进展, 2008, 18(6): 615-621.
- [8] Youjia Xu, Pierre Sirois, Kai Li. Iron overload plays a unique role in osteoporosis. Blood, 2010, Sept9, e-letter.
- [9] Kuhn LC. Iron and gene expression: Molecular mechanisms regulating cellular iron homeostasis. Nutr Rev, 1998, 56: 54-75.
- [10] Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, et al. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. Nature, 1997, 129: 482-488.
- [11] Ganz T. Cellular iron: Ferroportin is the only way out. Cell Metabolism, 2004, 1: 155-157.
- [12] Yang F, Wang X, Haile DJ, et al. Iron increases expression of iron-export protein MTP1 in lung cells. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2002, 283(5): L932-9.
- [13] Delaby C, Pilard N, Goncalves AS. Presence of the iron exporter ferroportin at the plasma membrane of macrophages is enhanced by iron loading and down-regulated by hepcidin. Blood, 2005, 100: 3979-3984.

(收稿日期: 收稿日期: 2012-01-19)

不同浓度铁离子对成骨细胞铁离子通道蛋白的影响

作者：[何银锋](#)，[徐又佳](#)，[赵国阳](#)，[张增利](#)，[肖莉](#)，[王爱东](#)
作者单位：[何银锋, 徐又佳, 赵国阳 \(苏州大学附属第二医院骨科, 苏州, 215000\)](#)，[张增利 \(苏州大学公共卫生学院维生素D研究室\)](#)，[肖莉, 王爱东 \(苏州大学附属第二医院中心实验室, 苏州, 215000\)](#)
刊名：[中国骨质疏松杂志](#) 
英文刊名：[CHINESE JOURNAL OF OSTEOPOROSIS](#)
年，卷(期)：2012, 18(8)

参考文献(13条)

1. [何银锋;徐又佳 铁螯合剂在铁过载骨质疏松症中的应用前景](#)[期刊论文]-[国际骨科学杂志](#) 2011(04)
2. [徐又佳;林华 重视铁代谢在骨质疏松症诊治中的意义](#)[期刊论文]-[中华医学杂志](#) 2011(31)
3. [李光飞;徐又佳;钱忠明 铁过载与骨质疏松关系的研究进展](#) 2010(10)
4. [赵理平;徐又佳;林华 高铁环境对成骨细胞生物活性的影响](#) 2010(04)
5. [贾鹏;徐又佳;钱忠明 BMP-6和铁超载骨质疏松关系的最新进展](#) 2011(02)
6. [贾鹏;张增利;徐又佳 铁超载对小鼠单核细胞RAW264. 7向破骨细胞分化的影响](#) 2011(04)
7. [孔卫娜;段相林;常彦忠 单核巨噬细胞系统铁代谢调控机制](#)[期刊论文]-[自然科学进展](#) 2008(06)
8. [Youjia Xu;Pierre Sirois;Kai Li Iron overload plays a unique role in osteoporosis](#) 2010
9. [Kuhn LC Iron and gene expression:Molecular mechanisms regulating cellular iron homeostasis](#)[外文期刊] 1998
10. [Gunshin H;Mackenzie B;Berger UV Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter](#) 1997
11. [Ganz T Cellular iron:Ferroportin is the only way out](#) 2004
12. [Yang F;Wang X;Haile DJ Iron increases expression of iron-export protein MTP1 in lung cells](#) 2002(05)
13. [Delaby C;Pilard N;Goncalves AS Presence of the iron exporter ferroportin at the plasma membrane of macrophages is enhanced by iron loading and down-regulated by hepcidin](#) 2005

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zggzsszz201208004.aspx