

SPIO 标记影响干细胞内 IRPs/IREs 系统的研究进展

颜丽芬 综述 梁长虹 审核

【中图分类号】R445.2 【文献标识码】A 【文章编号】1000-0313(2011)03-0354-03

铁是人体内含量最多的一种必须微量元素,它广泛参与机体内的代谢过程,在细胞生命活动中起着至关重要的作用。人体内的铁主要用于血红蛋白及非血红素蛋白的合成,包括血红蛋白、肌红蛋白、呼吸链的主要复合体、细胞色素酶和过氧化物酶等,在人体内参与氧的运输、细胞内电子传递及能量代谢等过程^[1]。

铁的平衡对于维持细胞生命活动具有至关重要的作用,当人体内铁不足或铁过剩时均可引起相应的病变。红细胞内缺铁可致血红素合成障碍,血红蛋白生成减少而发生小细胞低色素性贫血。其它组织细胞内缺铁可使含铁酶和铁依赖性酶的活性降低,进而影响生物氧化反应、能量代谢等过程,使患者出现精神、行为、体力和免疫功能异常,并可影响儿童的生长发育和智力。铁过剩时可破坏细胞中的蛋白质、核酸及脂质成分^[2]。铁能催化单电子氧化还原反应,当细胞内铁过剩时,可使细胞内的活性氧化物和羟自由基产生增多,这些活性氧化物对细胞有毒性作用,能破坏细胞结构^[2-4]。同时,有研究表明铁与肿瘤如结肠癌等有密切关系,认为铁可能是一种致癌物,它催化产生的活性氧化物可使 DNA 链降解并调节基因的表达,使基因突变,加速突变细胞的形成^[1,5-8]。

人体内的铁分为两部分:一是功能状态铁,包括血红蛋白铁、肌红蛋白铁、转铁蛋白铁、乳铁蛋白铁、酶和辅因子结合的铁;二是贮存铁,包括铁蛋白和含铁血黄素。进入人体血液中的铁以三价铁的形式与转铁蛋白结合,并被转运到组织细胞中,转铁蛋白与细胞膜上的转铁蛋白受体结合后通过胞饮作用进入细胞,三价铁与转铁蛋白分离并还原成二价铁,用于血红素等的合成,而多余的铁则以铁蛋白和含铁血黄素的形式贮存于单核-巨噬细胞系统中,待需要时再被利用。

细胞内 IRPs/IREs 系统组成及作用

维持细胞内铁稳态对于细胞正常机能活动非常重要,生物体也因此进化出精确复杂的系统用以维持细胞内铁的平衡,其中最重要的是铁调节蛋白/铁反应元件(iron regulatory proteins, IRPs; iron response elements, IREs)系统。

1. IRPs/IREs 系统组成

IRPs/IREs 系统包括转铁蛋白受体(transferrin receptor, TfR)、铁蛋白(ferritin, Fn)和铁调节蛋白(IRPs),它们共同参与细胞内铁稳态的维持,其中 TfR 和 Fn 的表达均受 IRPs 在转录后水平上的调控^[9-12]。IRPs 通过与 TfR 和 Fn mRNA 上的高度保守的非翻译区(untranslated region, UTR)作用得以实现调控功能。

铁调节蛋白(IRP)包括 IRP1 和 IRP2,属于细胞内的同源

性多肽物质,能调节哺乳动物细胞内铁浓度及铁代谢基因的转录后表达,从而优化细胞内铁的利用^[11,13,14]。IRP1 和 IRP2 同属于顺乌头酸酶基因家族,在哺乳动物成员中普遍表达,但仅仅是 IRP1 保持了顺乌头酸酶的功能,而 IRP2 在进化过程中已经丢失了顺乌头酸酶的活性。研究也发现,在细胞内铁稳态的调节中,IRP2 起了主要作用,而 IRP1 的作用相对较低,主要起顺乌头酸酶的作用^[15-17]。

IRP1 是一种双功能蛋白,即序列特异性 RNA 结合蛋白和顺乌头酸酶^[18]。目前“铁-硫簇开关”被广泛认为是 IRP1 具有顺乌头酸酶活性还是具有 IRE 结合活性的关键^[11]。当 IRP1 丢失一个铁-硫簇,携带(3Fe-4S)簇时,IRP1 成为 IRE 结合蛋白,获得结合 IREs 的能力,与 IREs 结合而起到稳定 TfR mRNA 和抑制铁蛋白合成的作用;当 IRP1 携带一个(4Fe-4S)簇结合 IREs 的活性点,此时不能结合 IREs,而是作为一种顺乌头酸酶,在细胞质中催化柠檬酸盐生成异柠檬酸盐^[2,12,16-19]。

IRP2 广泛存在于人体组织细胞中,是主要的铁感受器,在哺乳动物的铁代谢中起到主要的调节作用。IRP2 与 IRP1 最大的不同是其近氨基端插入了一个由 73 个氨基酸构成的特异性序列,此为铁依赖性降解位点^[1,2,12,13,20]。IRP2 活性主要通过富铁细胞内的泛肽-蛋白酶系统,由铁依赖降解过程调节^[2,12,13]。在富铁细胞中,IRP2 可被蛋白酶体降解,使 IRP2 含量降低,不能与 IREs 结合或结合减少,使铁蛋白合成增加,TfR mRNA 不稳定而被降解。不过,IRP2 的降解机制尚不清楚^[13]。

转铁蛋白受体是细胞膜上的一种糖蛋白,由两个相同的跨膜亚基构成,每个亚基可与一个转铁蛋白分子结合,通过胞饮作用将转铁蛋白转运入细胞内,转铁蛋白释放出铁供应细胞生命活动^[1]。转铁蛋白受体高表达于不成熟红细胞、胎盘组织、快速分裂细胞中,其表达受细胞内铁浓度、细胞增殖、分化及分裂状态影响^[4]。转铁蛋白的主要作用是调节细胞从转铁蛋白中摄取铁,但也有认为它可能还与细胞增殖相关。

铁蛋白是去铁蛋白和三价铁形成的复合物,是铁的贮存形式,其中的三价铁具有强大的结合铁和贮备铁的能力,以维持体内铁的供应和血红蛋白相对稳定性。铁蛋白包括铁蛋白重链(Fn-H)和轻链(Fn-L)^[11,12,21],前者高表达于心脏,后者高表达于肝脏^[11]。

铁反应元件(IRE):TfR 和 Fn mRNA 的非翻译区上与 IRPs 相结合的位点被称为铁反应元件(IREs)。它是由 26~30 个核苷酸构成的发夹样结构,其中含有 1 个保守的茎环结构,环的前 5 个碱基通常是 CAGUG^[21]。铁反应元件广泛存在于转铁蛋白受体、铁蛋白及其他铁代谢物的 mRNA 上^[12,21],其中以 TfR 和 Fn mRNA 上的 IREs 最重要,TfR mRNA 上含有 5 个 IRE,位于 3'端 UTR;Fn mRNA 含有一个 IRE,位于 5'端 UTR^[22]。IRPs 与 5'端 UTR IREs 结合可抑制 mRNA 的翻译,而 IRPs 与 3'端 UTR IREs 结合时能增加 mRNA 稳定性,保护

mRNA 免受内切酶的降解^[2]。5'端含 IREs 的 mRNAs 编码 5'-氨基乙酰丙酸合酶特定亚型,这种酶用以催化血红素、铁蛋白的 H 和 L 链、转铁蛋白及线粒体顺乌头酸酶的合成^[14]。

2. IRPs/IREs 系统的基本调控机制

当细胞内铁超载时,①IRPs 与 Fn mRNA 5'端 UTR 的 IRE (Fn 有一个 IRE)不结合或者结合活力下降,导致 Fn mRNA 翻译增加,铁蛋白含量增多,螯合细胞质中的游离铁,细胞内过多的铁被转化为铁蛋白而被封闭起来,细胞内铁稳态从而得以维持,保护细胞免受游离铁的毒性作用;②IRPs 与 TfR mRNA 3'端 UTR 的 IREs(TfR 有 5 个 IRE)不结合或者结合活力下降,导致 TfR mRNA 不稳定,易受核酸酶的攻击而发生降解,从而导致转铁蛋白受体翻译水平下降,细胞摄取铁减少^[1,10,11,13,18,21,22]。

当细胞内铁浓度过低时,则执行相反的调控过程。IRPs 具有高亲和力,它与 Fn mRNA 5'端 UTR 的 IRE 结合,从而阻止铁蛋白合成;IRPs 与 TfR mRNA 3'端 UTR 的 IREs 结合,起到稳定 TfR mRNA 的作用,使其免受内切酶的降解,转铁蛋白受体翻译增加。

SPIO 标记干细胞

SPIO 标记干细胞后移植入活体器官内,利用磁共振成像活体了解移植细胞在靶器官的情况,是一种无创、活体、动态监测移植细胞的方法。在干细胞治疗研究中,SPIO 作为一种示踪剂被广泛应用。

1. SPIO 在干细胞治疗中的可行性

目前,SPIO 已被广泛用于干细胞治疗的研究中。这主要是因为:①SPIO 是一种新型的 MRI 对比剂。SPIO 标记干细胞移植入活体器官后,可利用磁共振成像活体、动态的了解移植后细胞的归巢、分布、迁徙和分化等生物学行为;②目前普遍认为 SPIO 纳米颗粒是一种惰性的、生物兼容性的纳米材料,它能被生物降解和再利用^[23,24]。SPIO 微粒进入细胞内后将被转移到溶酶体中,并被降解释放出游离铁^[25]。这些铁可通过铁蛋白的形式贮存以供细胞再利用。虽然 SPIO 的潜在毒性作用尚不清楚,但很多研究表明其并不影响干细胞的活力、增殖能力和分化潜能;③SPIO 已经被商品化,可通过商业途径供给,来源渠道广泛。目前,SPIO 主要分为 2 种:一种为 Ferumoxides,化学成分为 $(\text{Fe}_2\text{O}_3)_m(\text{FeO})_n$,商品名称为 Resovist 或 Fefidex;另一种为 Ferumoxtran,是 USPIO,商品名为 Sinerem。

2. SPIO 标记干细胞的生物安全性

很多研究认为 SPIO 标记干细胞后并不影响干细胞的活力、增殖能力及分化潜能^[24,26-30],SPIO 对标记干细胞没有短期的及长期的毒性作用^[31]。甚至,有研究发现 SPIO 能促进干细胞增殖^[32,33]。他们认为 SPIO 作为一种磁性微粒,具有内在过氧化酶样活性,能减少细胞内的过氧化氢含量,减少其对细胞的危害,从而有利于促进细胞生长。不过,也有研究认为这可能与铁介导的 Wnt 信号通路激活相关^[32]。

不过,Kostura 等^[34]研究发现,SPIO 影响标记干细胞向软骨细胞诱导分化,其原因可能与细胞内 SPIO 微粒或离子型铁影响细胞间的信号交流有关,从而导致向软骨细胞分化障碍。Ying-Chun Chen 等^[23]也发现 SPIO 标记干细胞后经溶酶体降解形成的游离铁可抑制干细胞向骨样细胞分化。综上所述,

SPIO 的细胞毒性仍是一个未解决的问题,可能与细胞内铁含量的变化密切相关。

3. SPIO 在细胞内的代谢

当培养基中含有 SPIO 时,细胞可通过吞噬作用、胞饮作用及受体介导的内吞作用摄取培养液中的 SPIO,从而起到标记细胞的作用。进入细胞内的 SPIO 可被细胞代谢,其被转移至溶酶体内,并被降解形成游离铁,游离铁再进入胞浆内铁池中以供细胞生命活动所用。铁池内铁含量增多可激活铁调节蛋白/铁反应元件系统,使铁蛋白合成增加用以贮存多余的铁,维持细胞内铁平衡,降低游离铁对细胞的毒性作用。

SPIO 标记干细胞后在细胞内的停留时间与 SPIO 的半衰期相关。Huang 等^[33]发现用磁共振观察 Ferucarbotran 标记的骨髓间充质干细胞的时间长达 21 天。SPIO 在细胞内停留时间越长,越有利于观察细胞活动,但对细胞潜在的毒性作用也越大。

4. SPIO 对标记干细胞内铁平衡的影响

SPIO 对细胞潜在的毒性尚不清楚,但 SPIO 引起细胞内铁含量变化确是毋庸置疑。已有研究证实,SPIO 标记干细胞时细胞内的铁浓度较正常增加数十至百倍^[26-28,35]。不过,Sun 等^[28]也发现 SPIO 标记干细胞 15 天后,标记细胞内铁的含量较未标记时更低,提示细胞内可能存在主动的铁清除机制。所以,SPIO 标记后细胞内铁的浓度的动态变化情况有待于解决。

细胞内铁负荷超载时可启动 IRPs/IREs 系统调节。Pawelczyk 等^[36]研究发现,使用转染剂硫酸鱼精蛋白介导 SPIO 标记干细胞时,细胞的 TfR mRNA 和蛋白表达水平暂时性减低,而 Fn 的 mRNA 和蛋白表达水平保持不变。Schafer 等^[15]研究发现使用转染剂介导 SPIO 标记干细胞对细胞的基因表达无影响,但如果不用转染剂直接对干细胞进行 SPIO 标记,则会导致细胞的 TfR 表达上调。目前,关于 SPIO 标记干细胞后细胞内 IRPs/IREs 系统的研究很少,也颇不全面,仅有涉及铁蛋白和转铁蛋白受体方面的少许研究报道。所以,有必要系统研究 SPIO 标记后细胞内铁调节蛋白/铁反应元件系统的变化。

展望

铁平衡的维持对细胞生命活动至关重要。虽然 SPIO 对标记干细胞的潜在毒性作用仍不清楚,但可确定的是 SPIO 会引起标记细胞内铁含量的变化。要了解 SPIO 对标记干细胞的毒性作用,首先应了解标记干细胞内铁及其调节系统的变化,但目前国内外对这方面的研究很少,也很不全面。所以,以后的研究有待于系统阐明 SPIO 标记干细胞和经诱导分化细胞铁含量及 IRPs/IREs 系统的动态变化、剂量-效应关系以及维持细胞内铁稳态的分子调控机制,为 SPIO 标记干细胞时细胞内铁稳态的维持提供理论依据。

参考文献:

- [1] Tapiero H, Gale L, Tew KD. Iron: deficiencies and requirements [J]. Biomech Pharmacother, 2001, 55(6): 324-332.
- [2] Dos Santos CO, Dore LC, Valentine E, et al. An iron responsive element-like stem-loop regulates alpha-hemoglobin-stabilizing protein mRNA [J]. J Biol Chem, 2008, 283(40): 26956-26964.
- [3] Henderson BR. Iron regulatory proteins 1 and 2 [J]. Bioessays, 1996, 18(9): 739-746.

- [4] Ponka P, Lok CN. The transferrin receptor: role in health and disease[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 1999, 31(10): 1111-1137.
- [5] Toyokuni S. Iron-induced carcinogenesis; the role of redox regulation[J]. *Free Radic Biol Med*, 1996, 20(4): 553-566.
- [6] Younes M, Trepkau HD, Siegers CP. Enhancement by dietary iron of lipid peroxidation in mouse colon[J]. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*, 1990, 70(3): 349-354.
- [7] Nelson RL, Davis FG, Sutter E, et al. Body iron stores and risk of colonic neoplasia[J]. *J Natl Cancer Inst*, 1994, 86(6): 455-460.
- [8] Emerit J, Beaumont C, Trivin F. Iron metabolism, free radicals and oxidative injury[J]. *Biomed Pharmacother*, 2001, 55(6): 333-339.
- [9] Pantopoulos K. Iron metabolism and the IRE/IRP regulatory system: an update[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2004, 1012(1): 1-13.
- [10] Wang W, Di X, D'Agostino RB, et al. Excess capacity of the iron regulatory protein system[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(34): 24650-24659.
- [11] Rouault TA. The role of iron regulatory proteins in mammalian iron homeostasis and disease[J]. *Nat Chem Biol*, 2006, 2(8): 406-414.
- [12] Maffettone C, Chen G, Drozdov I, et al. Tumorigenic properties of iron regulatory protein 2 (IRP2) mediated by its specific 73-amino acids insert[J]. *PLoS One*, 2010, 5(4): 10163.
- [13] Wang J, Chen G, Lee J, et al. Iron-dependent degradation of IRP2 requires its C-terminal region and IRP structural integrity[J]. *BMC Mol Biol*, 2008, 9(1): 15.
- [14] Goforth JB, Anderson SA, Nizzi CP, et al. Multiple determinants within iron-responsive elements dictate iron regulatory protein binding and regulatory hierarchy[J]. *RNA*, 2010, 16(1): 154-169.
- [15] Schafer R, Kehlback R, Viskirchen J, et al. Transferrin receptor upregulation; in vitro labeling of rat mesenchymal stem cells with superparamagnetic iron oxide[J]. *Radiology*, 2007, 244(2): 514-523.
- [16] Ghosh MC, Tong WH, Zhang D, et al. Tempol-mediated activation of latent iron regulatory protein activity prevents symptoms of neurodegenerative disease in IRP2 knockout mice[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(33): 12028-12033.
- [17] Meyron-Holtz EG, Ghosh MC, Iwai K, et al. Genetic ablations of iron regulatory proteins 1 and 2 reveal why iron regulatory protein 2 dominates iron homeostasis[J]. *Embo J*, 2004, 23(2): 386-395.
- [18] Arnaud N, Ravet K, Borlotti A, et al. The iron-responsive element (IRE)/iron-regulatory protein 1 (IRP1)-cytosolic aconitase iron-regulatory switch does not operate in plants[J]. *Biochem J*, 2007, 405(3): 523-531.
- [19] Banerjee S, Nandyala AK, Raviprasad P, et al. Iron-dependent RNA-binding activity of *Mycobacterium tuberculosis* aconitase[J]. *J Bacteriol*, 2007, 189(11): 4046-4052.
- [20] Eisenstein RS, Blemings KP. Iron regulatory proteins, iron responsive elements and iron homeostasis[J]. *J Nutr*, 1998, 128(12): 2295-2298.
- [21] Piccinelli P, Samuelsson T. Evolution of the iron-responsive element[J]. *RNA*, 2007, 13(7): 952-966.
- [22] Li JY. Detection of intracellular iron by its regulatory effect[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004, 287(6): C1547-1559.
- [23] Chen YC, Hsiao JK, Liu HM, et al. The inhibitory effect of superparamagnetic iron oxide nanoparticle (Ferucarbotran) on osteogenic differentiation and its signaling mechanism in human mesenchymal stem cells[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2010, 245(2): 272-279.
- [24] Arbab AS, Yocum GJ, Rad AM, et al. Labeling of cells with ferumoxides-protamine sulfate complexes does not inhibit function or differentiation capacity of hematopoietic or mesenchymal stem cells[J]. *NMR Biomed*, 2005, 18(8): 553-559.
- [25] Arbab AS, Wilson LB, Ashari P, et al. A model of lysosomal metabolism of dextran coated superparamagnetic iron oxide (SPIO) nanoparticles; implications for cellular magnetic resonance imaging[J]. *NMR Biomed*, 2005, 18(6): 383-389.
- [26] Wang L, Deng J, Wang J, et al. Superparamagnetic iron oxide does not affect the viability and function of adipose-derived stem cells, and superparamagnetic iron oxide-enhanced magnetic resonance imaging identifies viable cells[J]. *Magn Reson Imaging*, 2009, 27(1): 108-119.
- [27] Ju S, Teng GJ, Lu H, et al. In vivo MR tracking of mesenchymal stem cells in rat liver after intrasplenic transplantation [J]. *Radiology*, 2007, 245(1): 206-215.
- [28] Sun R, Dittrich J, Le-Huu M, et al. Physical and biological characterization of superparamagnetic iron oxide- and ultrasmall superparamagnetic iron oxide-labeled cells: a comparison[J]. *Invest Radiol*, 2005, 40(8): 504-513.
- [29] Wang HH, Wang YX, Leung KC, et al. Durable mesenchymal stem cell labelling by using polyhedral superparamagnetic iron oxide nanoparticles[J]. *Chemistry*, 2009, 15(45): 12417-12425.
- [30] Au KW, Liao SY, Lee YK, et al. Effects of iron oxide nanoparticles on cardiac differentiation of embryonic stem cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 379(4): 898-903.
- [31] Arbab AS, Bashaw LA, Miller BR, et al. Characterization of biophysical and metabolic properties of cells labeled with superparamagnetic iron oxide nanoparticles and transfection agent for cellular MR imaging[J]. *Radiology*, 2003, 229(3): 838-846.
- [32] Brookes MJ, Boulton J, Roberts K, et al. A role for iron in Wnt signalling[J]. *Oncogene*, 2008, 27(7): 966-975.
- [33] Huang DM, Hsiao JK, Chen YC, et al. The promotion of human mesenchymal stem cell proliferation by superparamagnetic iron oxide nanoparticles[J]. *Biomaterials*, 2009, 30(22): 3645-3651.
- [34] Kostura L, Kraichman DL, Mackay AM, et al. Feridex labeling of mesenchymal stem cells inhibits chondrogenesis but not adipogenesis or osteogenesis[J]. *NMR Biomed*, 2004, 17(7): 513-517.
- [35] Sun JH, Teng GJ, Ju SH, et al. MR tracking of magnetically labeled mesenchymal stem cells in rat kidneys with acute renal failure[J]. *Cell Transplant*, 2008, 17(3): 279-290.
- [36] Pawelczyk E, Arbab AS, Pardit S, et al. Expression of transferrin receptor and ferritin following ferumoxides-protamine sulfate labeling of cells; implications for cellular magnetic resonance imaging[J]. *NMR Biomed*, 2006, 19(5): 581-592.