

铜蓝蛋白与脑铁代谢

常彦忠 钱忠明 (香港理工大学应用生物及化学科技系, 香港)

摘要 铜蓝蛋白 (Ceruloplasmin, CP) 是人体重要的亚铁氧化酶。它的主要作用是催化二价铁成为三价铁, 从而促进铁与转铁蛋白结合。由于它的这一功能, 过去三十年来, CP 一直被认为参与细胞(包括脑细胞)铁释放。然而, 最近的研究显示, 这个传统的看法可能是错误的或者至少是不完全的。新的发现显示, 脑内 CP 既有促进脑细胞铁释放也有铁摄取的作用。而且它对铁摄取作用可能比对铁释放的作用更为重要。本文讨论了这方面研究的最新进展, 以及脑内 CP 表达异常在某些神经退行性疾病发生发展过程中的作用机制的新认识。

关键词 铜蓝蛋白; 脑铁代谢; 无铜蓝蛋白血症; 细胞铁摄取; 细胞铁释放

学科分类号 Q42; R338

Ceruloplasmin and Brain Iron Metabolism CHANG Yan-Zhong, QIAN Zhong-Ming (*Laboratory of Brain Iron Metabolism, Department of Applied Biology & Chemical Technology, The Hong Kong Polytechnic University, Kowloon, Hong Kong*)

Abstract Ceruloplasmin (CP) is a critical ferroxidase in humans. During the past three decades, it was widely believed that this protein has a role in iron release from cells, including brain cells. However, recent studies show that this view might not be completely right or accurate. New findings imply that CP might play a role both in iron release and iron uptake in brain cells. The involvement of CP in iron uptake might be a more important physiological role of CP than its role in iron release. In this short article we discussed recent advances in this aspect as well as the relationship between dysregulation of CP and neurodegeneration.

Key words Ceruloplasmin; Brain iron metabolism; Aceruloplasminemia; Cell iron release; Cell iron uptake

1948年, Holmberg 和 Laurell 首先从猪血清中分离出铜蓝蛋白 (Ceruloplasmin, CP)。CP 是一种丰富的血清 α_2 -糖蛋白, 人的 CP 是由 1046 个氨基酸组成的单一多肽链, 分子量约为 132kD, 属多铜氧化酶家族。人 CP 的基因位于第 8 号染色体, 大鼠的 CP 位于第 2 号染色体上。人血清 CP 的 X 射线衍射结构分析证明 CP 由 6 个杆状花青甙形区域 (plastocyanin-type domains) 组成, 含有 6 个铜原子, 其中三个铜原子形成一个三核簇, 位于 1 区和 6 区的交界面上, 另外三个铜原子则以单核形式定位于 2、4、6 区^[1]。尽管每一个 CP 分子结合 6 个铜原子, 但 CP 的主要作用并不是铜的转运而是参与铁代谢^[2,3]。CP 是一个重要的亚铁氧化酶。在生理状态下 CP 可以催化二价铁离子氧化为三价, 帮助铁

与转铁蛋白相结合。因为只有三价铁可与转铁蛋白结合, 而 CP 在三价铁形成过程中是必不可少的, 因而 CP 对机体铁转运和铁平衡起着重要作用。近年, 由于无 CP 血症 (Aceruloplasmin)^[3] 以及 CP 表达异常与神经退行性病变关系^[2] 的发现, 使得 CP 与铁转运的研究成为脑神经病理和神经化学以及脑铁代谢领域里一个新的热点。本文主要总结了近年关于 CP 在脑铁代谢中作用研究方面的最新进展。

一、铜蓝蛋白在脑内的分布、表达和调控

在外周, CP 主要由肝脏合成, 然后分泌到血液并循环至身体各处发挥作用。正常情况下, CP 不能通过血脑屏障进入脑内^[4]。新的研究发现, 脑部有自身合成 CP 的能力。Klomp 等^[4,5] 系统地研究了 CP 基因在人和鼠类的中枢神经系统中表达的情况,

他们发现在大脑皮层、基底神经节、黑质、海马、小脑、胼胝体等部位都有 CP mRNA 的表达。免疫沉淀实验证实小脑、大脑皮层、基底神经节、黑质、胼胝体等处有 CP 的合成。原位杂交方法的研究发现,人脑尾状核旁的室管膜细胞、胶质膜的胶质细胞、苍白球微血管周围的星形胶质细胞、髓鞘纤维束周围的少突胶质细胞,以及黑质多巴胺能神经元周围的胶质细胞,都有丰富的 CP mRNA 表达。在鼠类,他们也发现在大脑皮层、中脑、小脑和新生鼠脑都有 CP 基因的表达。原位杂交也显示在蛛网膜下腔的上皮细胞、脑室内衬的室管膜细胞、脉络丛细胞有丰富的 CP 基因表达。在大脑皮层、海马、基底神经节、小脑等实质组织,CP 基因的明显表达一般仅局限在大脑微血管周围的星形胶质细胞。原代培养的神经元和神经胶质细胞的实验结果也表明神经胶质细胞有 CP 的合成,而神经元则没有。这些结果导致他们得到下述结论,即脑内 CP 主要来源于位于脑毛细血管床周边的胶质细胞。Patel 和 David^[9] 及 Patel 等^[7] 进一步研究了大鼠脑内 CP 的结构,他们发现大鼠脑内 CP 除少量是分泌形式外,主要为磷酸肌醇锚定形式 (glycosylphosphatidylinositol-anchored CP, GPI-CP)。结合在星形胶质细胞膜上。其组成与外周分泌形式的 CP 极为相似,共有 1065 个氨基酸。仅在 C-末端有所不同,它用 30 个氨基酸替代了分泌型的 5 个氨基酸,组成一疏水性的尾部并具备 GPI 锚定结构。这种 CP 同样具有氧化酶活性。

目前 CP 在脑内表达调控的机制还不明了。过往的研究相对集中于 CP 在外周组织的表达调控。HepG2 的研究^[8] 发现铁螯合剂和缺氧因素能够增加这种细胞的 CP mRNA 的表达。白细胞介素 1 β (IL-1 β) 亦有同样作用。研究也发现炎症可诱导肺和肝脏 CP 的表达。视神经损伤可使视网膜 CP 表达增加。微量的干扰素 (interferon, IFN- γ) 即可诱导单核细胞 CP mRNA 和蛋白的合成。目前尚不清楚以上这些调控因素是否在脑内对 CP 也具有同样的作用。本实验室的初步研究显示,CP 在脑内的表达具有区域性和细胞特异性。饲喂高铁和低铁食物的大鼠,大脑皮层、海马、纹状体和黑质 CP mRNA 的表达有不同程度的变化。高铁食物使得 CP mRNA 的表达降低,反之升高。这一实验结果与

Mukhopadhyay 等^[9] 在 HepG2 细胞的观察相一致。这种外周和中枢的一致性显示中枢 CP 的调控可能与外周的调控机制类似,这种可能性有待研究证实。

二、铜蓝蛋白在脑铁代谢中的作用

根据 CP 的亚铁氧化酶的性质以及转铁蛋白只能与三价铁结合的特点, Oskai 等在 1966 年首先提出 CP 在铁代谢中的作用是帮助细胞铁释放的观点。三十多年来,这种观点一直广为普遍接受。这种观点认为,细胞内二价铁首先被转运到细胞膜上,然后经 CP 的作用氧化成三价铁,进而与细胞外的转铁蛋白结合离开细胞膜^[2]。无 CP 血症的发现使人们进一步相信这种传统的观点是正确的^[3]。无 CP 血症的主要特点是由于 CP 基因突变,使体内不能产生完整的 CP,同时在多种组织和器官中过量铁积聚^[3],在中枢神经系统中,MDA (malondialdehyde) 和 4-HNE (4-hydroxy nonenals) 水平升高^[10],大脑皮层神经元线粒体呼吸链上复合物 I 和 IV 的酶活性降低,脑脊液中铁浓度比正常增高三倍,铁介导的脂质过氧化反应增加。在视网膜、基底神经节、丘脑、齿状核等部位铁异常增高,以及神经元进行性变性坏死^[2,3]。最近建立的无 CP 血症动物模型的研究也得到类似的结果^[11]。这使得人们更认为,脑内 CP 的主要作用与外周细胞相似,帮助铁从神经元或其它脑细胞铁释放,如果 CP 减少或缺失,造成细胞铁释放减少,细胞铁会过量积聚而导致细胞变性坏死。

然而,虽然临床观察和动物模型支持 Oskai 的观点,但这些均是间接的证据。最近的研究显示这种传统的观点需要重新考虑。在脑内 CP 的主要作用可能是参与细胞铁摄取而不是传统认为的铁释放^[12]。新的观点认为,CP 通过它的亚铁氧化酶活性不仅能够影响细胞铁摄取也能影响细胞的铁释放,或许在生理条件下,CP 的铁摄取的作用远比铁释放的作用重要。在二价铁离子(铁通过血脑屏障基底膜的主要形式)通过血脑屏障血管基底膜后,大部分可能必须通过 CP 的作用将其氧化为三价铁(少量的则可能通过自发氧化反应被氧化)。形成的三价铁才能与脑脊液和细胞间液中的转铁蛋白(由少突胶质细胞和脉络丛内皮细胞合成分泌)结合通过转铁蛋白受体介导的内吞途径被神经元(或小胶质细胞和其他相关的脑细胞)所摄取^[12](图 1)。

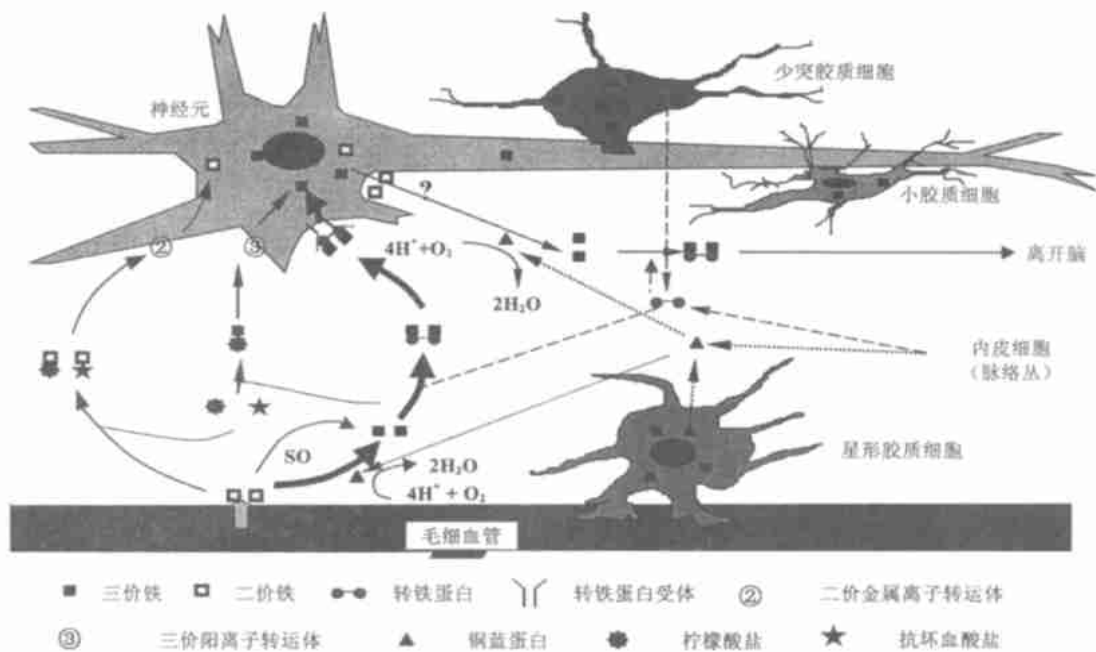


图1 铜蓝蛋白(CP)在脑神经细胞铁摄取中可能的作用

几方面的证据都支持这种新观点。第一个证据是 CP 在脑内分布位置及铁跨过血脑屏障的转运形式。前已述及,并非脑内所有星形胶质细胞都有能力表达 CP,而只有那些分布在脑毛细血管床周边的胶质细胞有能力合成 CP。CP 的这一特殊位置意味着 CP 能有效且迅速地将跨越血脑屏障基底膜的二价铁氧化成为三价铁,使之能够结合到转铁蛋白(或其他转载体)上。通过转铁蛋白受体等途径为脑细胞所吸收^[12]。第二,离体实验显示,CP 有明显的促进细胞铁摄取作用而不是铁释放^[8,13]。我们用神经胶质瘤细胞的研究也得到了相同的结果^[14]。如同 Attieh 等^[13]和 Mukhopadhyay 等^[8]一样,我们当初进行这项研究的目的是为了探讨 CP 介导的脑细胞铁释放的机制,然而却发现了它有促进铁摄取的作用。不管是缺铁细胞还是铁饱和细胞,低浓度(30 μ g/ml)或高浓度(300 μ g/ml,血浆的生理浓度)CP 都能促进神经胶质瘤细胞对转铁蛋白结合铁和柠檬酸铁的摄取。第三,酵母细胞的研究证实,酵母细胞铁摄取主要由 Fet3p 介导,Fet3p 是多铜氧化酶,与 CP 同源,都属铜蓝蛋白家族。这种 Fet3p 与 CP 的相似性提示在哺乳类动物细胞铁摄取方面 CP 可能有 Fet3p 相似的功能,即帮助细胞铁摄取^[16]。第四,脑内存在着自发氧化反应,这一氧化反应足于将从细胞缓慢释放的少量二价铁进行氧化($Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} +$ 高活性自由基)。只有在以较高速

度释放二价铁的时候,才需要亚铁氧化酶(如 CP)来催化这一反应。最近的研究也支持只有当铁快速释放或供氧不足时 CP 的氧化酶活性才变得重要起来^[12]。换言之,生理条件下,CP 对铁的释放并不重要,只要少量的 CP 即可保持正常的脑细胞铁释放水平。根据这些新近的发现,比较合理的结论应该是:CP 的主要作用是通过它的亚铁氧化酶活性实现的。它既能够影响细胞铁释放也能影响细胞的铁摄取。在脑细胞铁转运过程中,后者比前者重要^[12]。

三、为什么低铜蓝蛋白血症患者会出现脑铁沉积?

如果 CP 的重要作用是细胞铁摄取,那么首先需要回答的问题是为什么无 CP 血症的患者在没有 CP 基因表达情况下会造成脑内某些区域铁的过度积累。以往文献多数根据传统的观点,即 CP 是铁释放蛋白,因此认为是由于缺少 CP 造成了该区域细胞不能将铁释放出来。这种解释存在很多问题。如果说由于缺少 CP 铁不能释放而造成了神经细胞中铁的过度积累,那么同样的道理,二价铁将不能从组成血脑屏障的脑毛细血管内皮细胞质中释放进入脑脊液和脑细胞外液中。更谈不上在神经退行性疾病包括无 CP 血症的病人脑内出现的铁的过度积累。进一步讲,CP 并不可能仅对神经细胞起铁释放作用而对血脑屏障微血管内皮细胞的铁释放没有作用。因此,可能最好的解释是 CP 在脑细胞铁平

衡中起的主要作用是促进铁摄取,而对铁释放的作用很小。在无 CP 血症病人的脑内,神经细胞铁的过度积累主要不是由于细胞减少了铁释放而是细胞非转铁蛋白铁摄取过度增加,同时细胞铁的释放可能也有所减少。生理条件下,脑细胞获得铁主要是通过转铁蛋白途径^[15],二价铁跨过血脑屏障后即被 CP 氧化为三价铁,然后结合到转铁蛋白上运送至相应的脑细胞而被摄取。然而在病理情况下,由于缺少 CP,不能将大量的二价铁进行氧化,使三价铁和转铁蛋白结合铁含量大大降低,非转铁蛋白结合铁如柠檬酸铁(二价或三价)、抗坏血酸铁(二价)及自由的二价铁离子将增加。这可造成脑细胞对这些非转铁蛋白铁(主要为二价形式)的吸收异常增加。此外,尽管细胞内二价铁离子浓度增高,但由于细胞外的二价铁离子浓度也增加,造成脑细胞内外二价铁离子浓度差减小,细胞内二价铁顺浓度差向细胞外释放的量下降。这些因素导致细胞内铁的过渡积累,诱导氧化应激反应形成自由基,引发一连串病理反应导致神经元死亡(图 2)。在这一过程中,细胞膜上的二价金属离子转运体(divalent metal transporter, DMT1)和其他的非转铁蛋白结合铁的转运体(如三价阳离子转运体)^[8]表达可能会增加。作为一种代偿机制,二价铁离子自发氧化反应速度可能增加以达到形成更多三价铁的目的。然而,自发氧化反应的增加只能增加少量的三价铁同时却产生了大量的活性氧。这些活性氧自由基的大量增加,可能是导致无 CP 血症神经元受损死亡的重要原因之一。

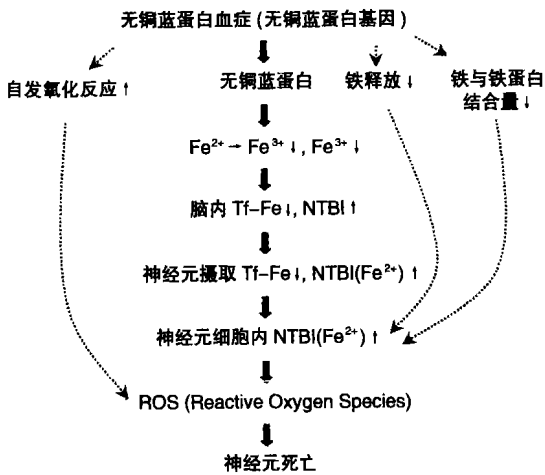


图 2 铜蓝蛋白缺乏(无铜蓝蛋白血症病人)导致铁在脑内神经元过度沉积的可能机制(Tf-Fe: 转铁蛋白结合铁, NTBI: 非转铁蛋白结合铁)

四、结语与展望

尽管近年关于 CP 的研究已取得了很大进展,对 CP 在脑铁代谢中的作用有了新的认识,然而许多重要问题尚未完全解答,例如,脑内 CP 的表达调控机制等,CP 具有铁摄取作用的论点也需更多的实验证实。此外,近年的研究显示,脑内 CP 表达异常可能与某些其它神经退行性疾病相关^[2, 15]。已有报道帕金森病(Parkinson's disease, PD)病人脑脊液中 CP 的活性明显低于对照组^[16]。而阿尔采末病(Alzheimer's disease, AD)病人的海马和大脑皮质铁的水平 CP 高于正常人^[17],而且脑脊液中的 CP 浓度亦有明显增加^[18]。对亨廷顿病(Huntington's disease, HD)病人的研究发现,这些病人的海马、皮质顶叶、黑质 CP 含量都明显超出正常水平^[17]。这些临床观察显示了进一步深入研究 CP 在脑铁代谢中作用的重要性。这方面的研究不仅可以增加脑铁代谢的生理知识,也可帮助正确理解 CP 表达异常所引起的脑铁代谢紊乱在神经退行性疾病发生发展过程中的作用,对这些疾病的防预和临床治疗将起到巨大的作用。

参 考 文 献

- Zaitseva I, Zaitsev V, Card G, et al. The X-ray structure of human serum ceruloplasmin at 3.1 Å: copper centers. *J Biol Inorg Chem*, 1996, 1: 15~23.
- Qian ZM, Wang Q. Expression of iron transport protein and excessive iron accumulation in the brain in neurodegenerative disorders. *Brain Res Rev*, 1998, 27: 257~267.
- Gitlin JD. Aceruloplasminemia. *Pediatric Res*, 1998, 44: 271~276.
- Klomp LW, Farhangrazi ZS, Dugan LL, et al. Ceruloplasmin gene expression in the murine central nervous system. *J Clin Invest*, 1996, 98: 207~215.
- Klomp LW, Gitlin JD. Expression of the ceruloplasmin gene in the human retina and brain: implications for a pathogenic model in aceruloplasmin. *Hum Mol Genet*, 1996, 5: 989~1996.
- Patel BN, David S. A novel glycosylphosphatidylinositol-anchored form of ceruloplasmin is expressed by mammalian astrocytes. *J Biol Chem*, 1997, 272: 20185~20190.
- Patel BN, Dunn RJ, David S. Alternative RNA splicing generates a glycosylphosphatidylinositol-anchored form of ceruloplasmin in mammalian brain. *J Biol Chem*, 2000, 275: 4305~4310.
- Mukhopadhyay CK, Mazumder B, Fox PL. Role of hypo-

- ia-inducible factor-1 in transcriptional activation of ceruloplasmin by iron deficiency. *J Biol Chem*, 2000, 275:21048 ~ 21054.
- 9 Mukhopadhyay CK, Attieh ZK, Fox PL. Role of ceruloplasmin in cellular iron uptake. *Science*, 1998, 279:714 ~ 717.
 - 10 Yoshida K, Kaneko K, Miyajima H, et al. Increased lipid peroxidation in the brains of aceruloplasminemia patients. *J Neurol Sci*, 2000, 175:91 ~ 95.
 - 11 Harris ZL, Durley AP, Man TK, et al. Targeted gene disruption reveals an essential role for ceruloplasmin in cellular iron efflux. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96:10812 ~ 10817.
 - 12 Qian ZM, Ke Y. Rethinking the role of ceruloplasmin in brain iron metabolism. *Brain Res Rev*, 2001, 35:287 ~ 294.
 - 13 Attieh ZK, Mukhopadhyay CK, Seshadri V, et al. Ceruloplasmin ferroxidase activity stimulates cellular iron uptake by a trivalent cation-specific transport mechanism. *J Biol Chem*, 1999, 274:1116 ~ 1123.
 - 14 Qian ZM, Tosi YK, Ke Y, et al. Ceruloplasmin promotes iron uptake rather than release in BT325 cell. *Exp Brain Res*, 2001, 140:369 ~ 347.
 - 15 Qian ZM, Shen S. Brain iron transport and neurodegeneration. *Trends Mol Med*, 2001, 7:103 ~ 108.
 - 16 Boll MC, Sotelo J, Otero E, et al. Reduced ferroxidase activity in the cerebrospinal fluid from patients with Parkinson's disease. *Neurosci Lett*, 1999, 265:155 ~ 158.
 - 17 Loeffler DA, LeWitt PA, Juneau PL, et al. Increased regional brain concentrations of ceruloplasmin in neurodegenerative disorders. *Brain Res*, 1996, 738:265 ~ 274.
 - 18 Loeffler DA, DeMaggio AJ, Juneau PL, et al. Ceruloplasmin is increased in cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease but not Parkinson's disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord*, 1994, 8:190 ~ 197.

中颞视区神经元信息整合功能更易于受到麻醉影响

视皮层的功能是将局部感受野获得的信息进行整合,从而获得对外部世界的整体认知。但是包括初级视皮层(V1)在内及其之前的各阶段,由于神经元的感受野非常小,在获取运动信息时相当于通过一个个小孔来观察物体的实际运动,这样就出现了一个小孔问题(aperture problem),即对于一个运动的边缘来说,通过放在该边缘上的一个小孔能直接检测出来的唯一运动,就是垂直于该边缘朝向的运动。小孔问题使得对实际运动信息的获取存在偏差,这样V1区以外的视皮层就需要对运动信息进行整合,来校正这种偏差。中颞视区(middle temporal visual area, MT)是处理运动视觉信息的重要区域,哈佛医学院的Pack等记录了MT区单个神经元的活动,对这个信息整合过程进行了研究,并对动物清醒及麻醉状态下的整合功能进行了比较。

他们在清醒恒河猴的MT区记录到一个对向左运动具有最佳反应的神经元,于是他们采用格栅来刺激这个神经元。格栅状刺激是两个光栅以不同朝向叠加形成的,其中一个光栅向左运动。如果这个神经元能够区分出两个不同的运动方向,那么它就应该在两个方向上出现放电高峰,即它可以进行成分预测(component prediction);如果当整个格栅向左运动时,它的放电反应最强,就说明它也可以进行模式预测(pattern prediction)。实验结果表明,在接受刺激62ms时神经元放电果然在两个方向出现放电高峰,但在刺激出现的最后1500ms中,神经元只有一个对向左运动的放电高峰。这表明神经元通过对光栅运动分析进行整合最终得到了格栅这个整体的运动方向。作者又在麻醉的猴子上重复了这个实验,结果表明MT神经元只能进行成分预测,但不能进行模式预测。对麻醉猴子中42个MT神经元和清醒猴子中35个MT神经元的进一步分析表明,清醒时有60%的神经元可以进行模式预测,有6%的神经元进行成分预测;而在麻醉时这个比例分别为7%和45%。从另一个模式指数(pattern index)的变化也可以看到,随刺激时间延长,清醒时神经元对成分进行反应逐渐变成对模式进行反应,而在麻醉时神经元只停留在对成分进行反应。

作者的研究结果表明,麻醉可以显著削弱视觉系统对局部信息进行的整合过程。

(*Nature*, 2001, 414:905 ~ 908) (王颖 罗非)