

研究论文

MPTP 诱导小鼠黑质区铁摄取和 DMT1 表达增加

姜 宏^{1,2}, 钱忠明², 谢俊霞^{1,*}

¹青岛大学医学院生理教研室; 山东省神经科学研究中心, 青岛 266021; ²香港理工大学应用生物与化学科技学系, 香港九龙

摘要: 铁在帕金森病(Parkinson's disease, PD)的发病机制中起着非常关键的作用, 为了探讨 PD 中铁升高的机制, 本实验观察了 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP)处理小鼠黑质(substantia nigra, SN)内铁摄取及新的铁转运蛋白二价金属离子转运蛋白 1(DMT1)的表达变化。结果表明: (1) MPTP 处理组小鼠 SN 内铁染色增高, 注射 MPTP 7 d 组明显高于 3 d 组。(2) MPTP 处理组小鼠, 酪氨酸羟化酶(TH)免疫阳性细胞数目显著减少。(3) MPTP 处理组小鼠, “-IRE”型 DMT1 表达在各组中均增加, 而“+IRE”型 DMT1 仅在 MPTP 处理后 7 d 才出现变化。上述结果提示, 这种新发现的哺乳动物跨膜铁转运蛋白表达增加可能是引起 MPTP 处理小鼠 SN 中铁升高的关键因素, 铁的升高进一步导致 DA 神经元的死亡。

关键词: 铁; 帕金森病; 二价金属离子转运蛋白 1; 黑质
中图分类号: Q42; R592

Increased DMT1 expression and iron content in MPTP-treated C57BL/6 mice

JIANG Hong^{1,2}, QIAN Zhong-Ming², XIE Jun-Xia^{1,*}

¹Department of Physiology, Medical College of Qingdao University; Neuroscience Center of Shandong Province, Qingdao 266021; ²Department of Applied Biology and Chemical Technology, Polytechnic University of Hong Kong

Abstract: Iron plays a key role in Parkinson's disease (PD). To illustrate the mechanism underlying the increase of iron in substantia nigra (SN) in PD, changes of the expression of divalent metal transporter 1 (DMT1) and iron content were examined in SN in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) treated mice using immunohistochemistry and histochemistry respectively. Following MPTP treatment for 3 d, elevated iron staining was found in SN. A further increase in iron content was observed after 7 d. In these lesioned animals, tyrosine hydroxylase-immunoreactive DA neurons exhibited a decrease in number and morphological changes as well. There were two isoforms of DMT1 expressed in SN of mice. After MPTP treatment, the expression of DMT1 without IRE form increased in either group, whereas DMT1 with IRE form increased only after 7 d of MPTP treatment. These observations suggest that DMT1 is possibly involved in the process of iron accumulation in SN of MPTP-treated mice, which might be responsible for the subsequent death of DA neurons.

Key words: iron; Parkinson's disease; divalent metal transporter 1; substantia nigra

Received 2002-12-30 Accepted 2003-04-11

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30271441), Key Project of Shandong Educational Committee (J01K03) and Qingdao Municipal Science & Technology Commission (02-1-KJ-YJ-49).

* Corresponding author. Tel: +86-532-2991037; Fax: +86-532-3801449; E-mail: jxixie@publuic.qd.sd.cn

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是一种常见的多发的神经系统退行性疾病,其病理学特征为黑质(substantia nigra, SN)多巴胺(dopamine, DA)能神经元渐进坏死及伴发纹状体轴突末梢DA的耗竭。早在1924年就发现PD病人SN中铁含量明显高于正常人,随着研究的深入,人们逐渐认识到铁在PD的发病机制中起着关键作用^[1],而导致铁增高的原因目前仍不清楚,有可能是某些铁转运蛋白表达失控^[2,3]。1995年,Gruneid等^[4]在研究具有天然抗性的巨噬细胞蛋白1(nature resistance-associated macrophage protein 1, Nramp1)的过程中发现了另一种与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^[5]和耶鲁大学^[6]的两个研究组分别报告了Nramp2是哺乳类第一个跨膜铁转运蛋白。由于它具有转运二价阳离子的功能,因此称之为二价金属离子转运蛋白1(divalent metal transporter 1, DMT1)。它的发现解释了铁代谢领域中一直让人费解的两个最重要的问题,即铁如何被小肠吸收以及如何从内吞小体移位入胞浆。DMT1的mRNA存在两种形式,即“+IRE”(DMT1+IRE)和“-IRE”型(DMT1-IRE)。“+IRE”型的3'非翻译区含有与转铁蛋白受体(transferrin receptor, TfR)mRNA的3'非翻译区相似的铁调节元件(iron regulatory element, IRE)。“-IRE”型则不包含有IRE结构。在脑内,免疫印记实验发现DMT1的mRNA同时在脉络丛的神经元和上皮细胞表达,在黑质中等程度表达。DMT1的表达部位和它的功能特性均说明它在脑内生理性铁转运中可能起到非常重要的作用。DMT1的表达异常很可能是导致神经退行性疾病的重要原因。在PD病人中,已发现黑质内受损的神经元中DMT1表达增高。这可能是导致铁含量增高的原因,继而导致ROS的产生增多,最终导致神经元的死亡。我们的实验目的就是阐明PD黑质内铁水平增高的原因是否与DMT1有关。

本实验采用1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, MPTP)制备PD模型小鼠,观察其SN内铁摄取及DMT1表达的改变,以阐明PD SN内铁增高的原因,为PD的病因学和治疗学提供新的实验依据。

1 材料和方法

1.1 动物准备 C57BL/6 雄性小鼠,体重20-40g,室温20℃,24h昼夜循环光照,自由饮水、取食。

1.2 PD模型小鼠的制备 MPTP(MPTP-HCl, Sigma,溶于0.9%生理盐水),腹腔注射,30mg/kg,制备PD模型。动物被随机分成3组:对照组(腹腔注射生理盐水组),MPTP注射3d组,MPTP注射7d组。动物在分别腹腔注射MPTP3d和7d后断头取脑行组织切片。

1.3 组织准备 动物用8%水合氯醛腹腔注射麻醉,400mg/kg,心室内灌注0.9%生理盐水5min,然后灌注4%多聚甲醛20min。断头取脑后在4%多聚甲醛中固定5h,然后转移到25%的蔗糖溶液中直至脑组织下沉。在恒冷切片机中切片,厚度为10μm,载玻片预先用明胶处理,空气中干燥,-20℃保存备用。

1.4 免疫组织化学方法 切片在空气中放置至室温,在0.1mol/L磷酸盐缓冲液(PBS)中浸泡10min,然后转移至1%过氧化氢(99%甲醇)溶液中30min,以去除内源性过氧化物酶。PBS冲洗3次后,于1.5%正常山羊血清37℃孵育1h。兔抗DMT1+IRE和DMT1-IRE单克隆抗体(1:500稀释,Alpha Diagnostic公司)在湿盒中4℃过夜。酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)抗体是小鼠抗TH单克隆抗体(1:200稀释,Novo Castra公司)。PBS冲洗3次后,生物素标记二抗(1:200)37℃孵育1h。然后用亲和素/过氧化物酶复合物放大(Vectastain ABC kit, Vector, Burlingame, USA),用Vector DAB试剂盒显色5min,观察反应。不加一抗的切片不显色。

1.5 铁染色组织化学法 上述切片同样用于Fe³⁺的染色(非血红素铁)。切片在含有2%亚铁氰化钾的2%盐酸溶液中孵育30min。PBS冲洗后浸泡在1% H₂O₂中去除内源性过氧化物酶,在含有0.25mg/ml DAB和0.02%v/v H₂O₂的PBS溶液中显色10min。

1.6 统计学处理 结果以显微镜(Nikon, Japan)40倍物镜下阳性细胞所占的面积百分数来表示,用Imaging System GmbH软件分析(德国)。实验结果以mean ± SE表示,采用t检验统计学处理,P < 0.05表明结果有统计学意义。

2 结果

2.1 MPTP组小鼠SN内Fe³⁺染色的变化

在正常小鼠脑内,Fe³⁺主要存在于SN少突胶质细胞的胞体和突起中。MPTP腹腔注射3d后,SN内Fe³⁺(图1B)明显高于对照组(图1A),MPTP腹腔注射7d后,也观察到同样的结果(图1C)。统计学分析见图1D。

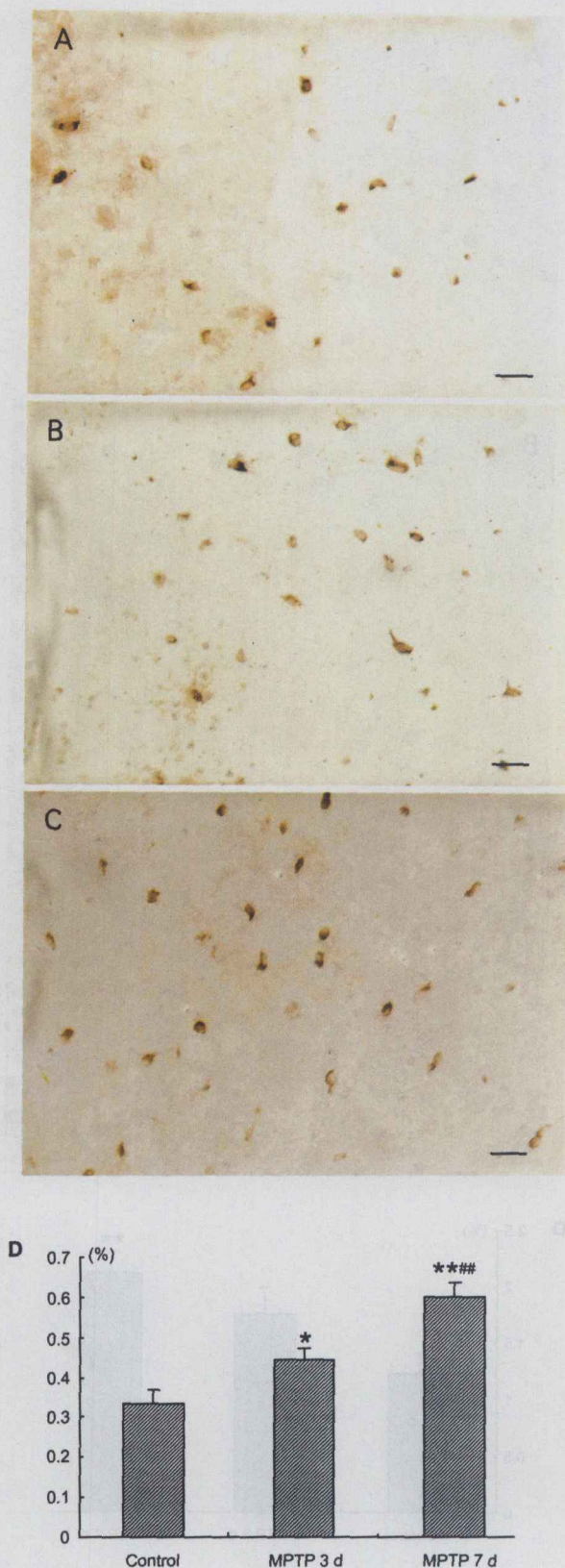


图 1. MPTP 组小鼠 SN 内 Fe^{3+} 染色的变化

Fig. 1. Changes of ferric iron in SN of MPTP treated mice. A: Control. B: 3 d after MPTP treatment. C: 7 d after MPTP treatment. D: Quantitative analysis. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with control; *** $P < 0.01$ compared with MPTP 3 d. Scale bar: 25 μm .

2.2 MPTP 组小鼠 SN 内 TH 免疫阳性 DA 神经元的变化

正常小鼠的 SN 内存在大量的 TH 免疫阳性 DA 神经元。免疫阳性的 TH 主要存在于细胞浆和细胞突起中, 在细胞核中没有表达。MPTP 腹腔注射后, SN 内 TH 免疫阳性 DA 神经元数目大大降低, 细胞变小, 失去正常形态(图 2)。

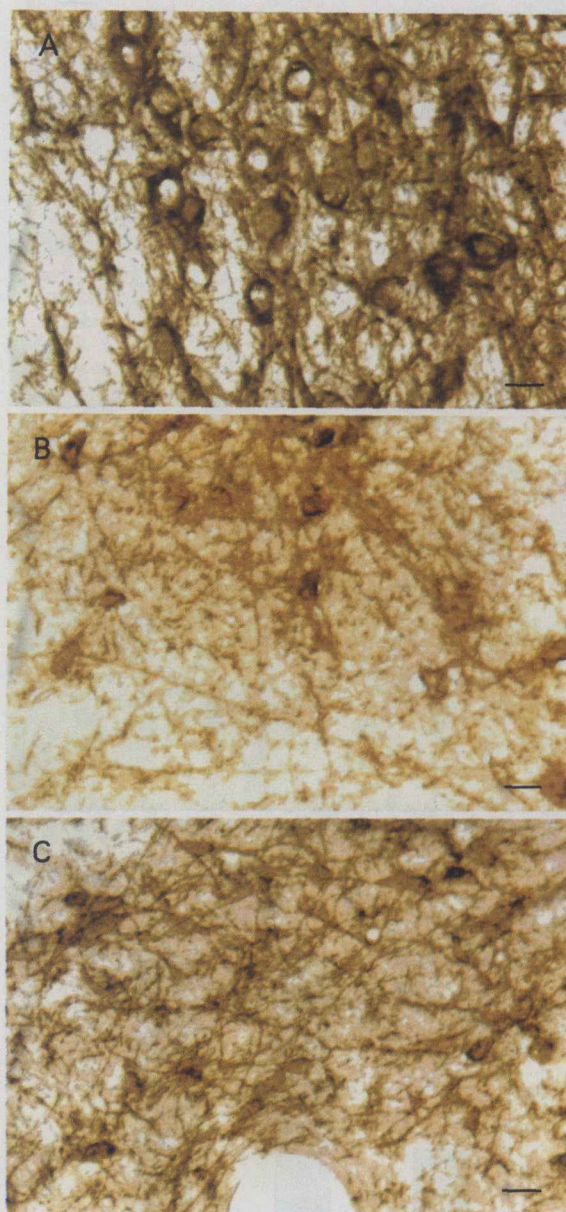


图 2. MPTP 组小鼠 SN 内 TH 免疫阳性 DA 神经元的变化

Fig. 2. TH immunoreactive dopamine neurons in SN of MPTP treated mice. A: Control. B: 3 d after MPTP treatment. C: 7 d after MPTP treatment. Scale bar, 25 μm .

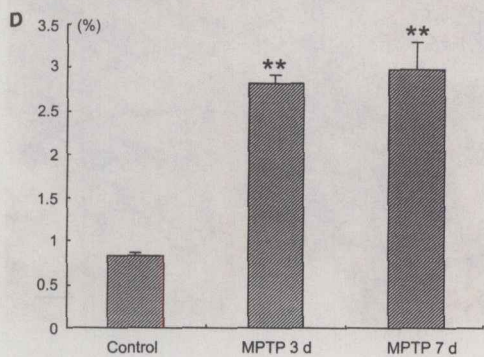
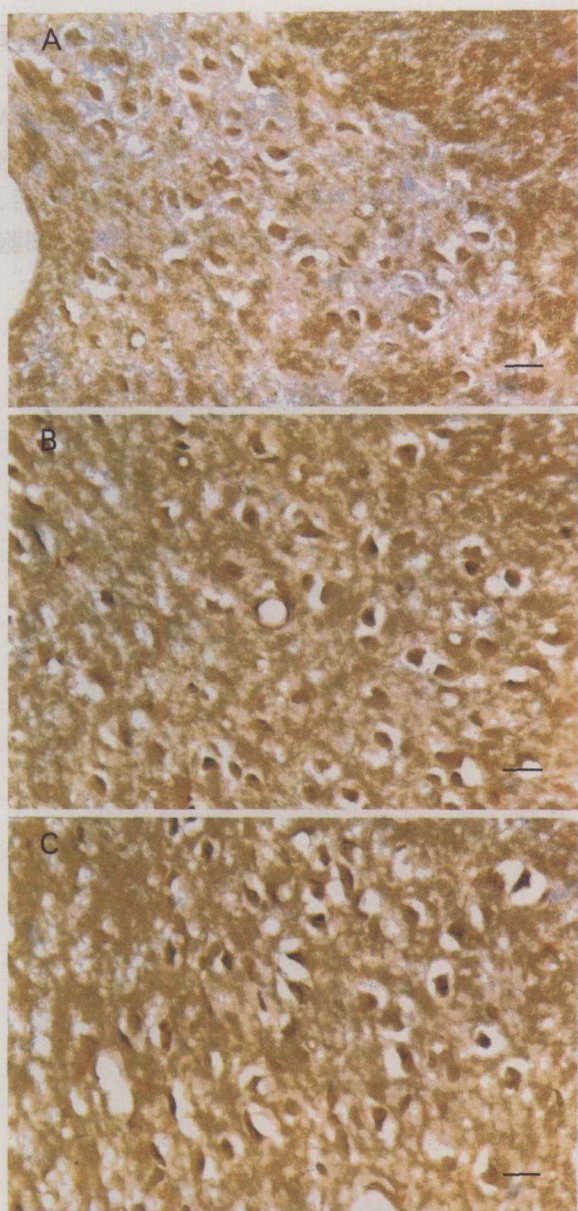


图 3. MPTP 组小鼠 SN 内 DMT1-IRE 免疫阳性细胞的变化

Fig. 3. Changes of DMT1-IRE immunoreactive cells in SN of MPTP treated mice. A: Control. B: 3 d after MPTP treatment. C: 7 d after MPTP treatment. D: Quantitative analysis. ** $P < 0.01$ compared with control. Scale bar, 25 μm .

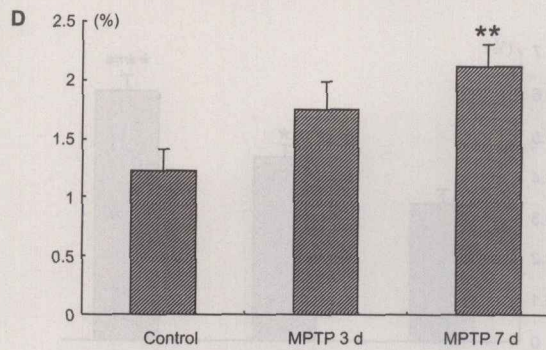
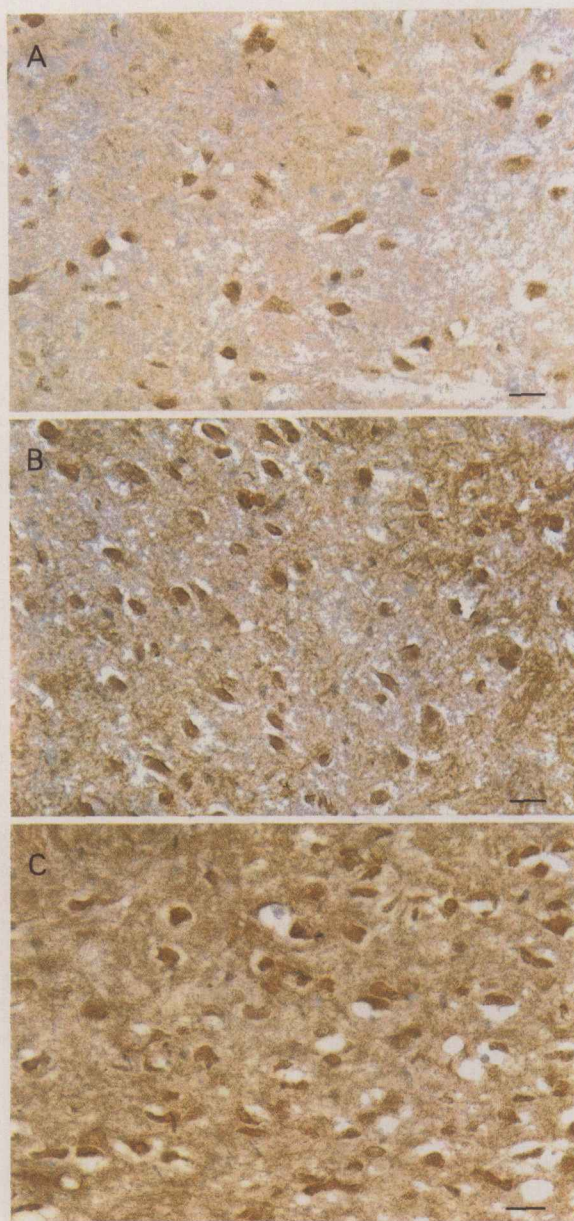


图 4. MPTP 组小鼠 SN 内 DMT1+IRE 免疫阳性细胞的变化

Fig. 4. Changes of DMT1-IRE immunoreactive cells in SN of MPTP treated mice. A: Control. B: 3 d after MPTP treatment. C: 7 d after MPTP treatment. D: Quantitative analysis. ** $P < 0.01$ compared with control. Scale bar, 25 μm .

2.3 MPTP 组小鼠 SN 内 DMT1 - IRE 免疫阳性细胞的变化

正常 SN 内的细胞可以表达 DMT1 - IRE (图 3A), 腹腔注射 MPTP 后, DMT1 - IRE 免疫阳性细胞数目明显增多, 而且染色深度增加(图 3B 和 C)。MPTP 注射 3 d 和 7 d 组之间没有差异。统计学分析见图 3D。

2.4 MPTP 组小鼠 SN 内 DMT1 + IRE 免疫阳性细胞的变化

正常 SN 内的细胞可以表达 DMT1 + IRE (图 4A), 腹腔注射 MPTP 3 d 后, DMT1 + IRE 免疫阳性细胞数目没有明显增加(图 4B)。而 MPTP 注射 7 d 后, SN 内 DMT1 + IRE 阳性细胞数目及染色深度明显增加(图 4C)。统计学分析见图 4D。

3 讨论

我们前期工作表明, 6-羟基多巴胺制备的 PD 模型大鼠 SN 内铁含量明显高于正常大鼠, SN 内高铁不仅影响纹状体 DA 的释放, 而且还影响 SN-纹状体系统 DA 及其代谢产物的含量^[7]。在前期工作的基础上, 为了阐明导致 SN 内铁升高的原因, 本工作采用 MPTP 处理小鼠, 观察 DMT1 是否是 PD SN 铁升高的原因, 分析如下。

3.1 MPTP 制备的 PD 模型小鼠 SN 内铁增高的原因

MPTP 是一种神经毒素, 它可以在许多动物身上引起 PD 的症状, 如大鼠、小鼠、狗、猫、猴子和人。MPTP 虽然可通过血脑屏障, 这种药物本身对脑组织没有毒性作用, 但其经过两步生物转化后形成它的代谢物 MPP⁺, 则具有神经毒性作用, 但是 MPP⁺ 不能通过血脑屏障^[8]。腹腔注射后 MPTP 后, 在脑内单胺氧化酶 B(monoamine oxidase, MAO-B)的作用下形成 MPDP⁺。MAO-B 主要存在于星形胶质细胞中, 也存在于 5-羟色胺能神经元中, 但不存在于 DA 能神经元。MPDP⁺ 可自发氧化成为 MPP⁺。胶质细胞通过神经元外的单胺转运体将 MPP⁺ 主动分泌到细胞外液^[9]。随后, DA 能神经末梢可通过膜上的多巴胺转运体(dopamine transporter, DAT)特异性摄取 MPP⁺。DAT 不仅存在于神经末梢, 在神经元的树突上也有表达, 因此, MPTP 的毒性作用不仅作用于纹状体, 而且还作用于 SN。细胞内游离的 MPP⁺ 最终通过耗能的主动转运方式进入线粒体。它与呼吸链的复合物 I 结合, 阻断线粒体电子传递系统, 通过耗竭 ATP 从而导致能量代谢障碍, 自由基的生成增加。线

粒体功能的损伤最终导致细胞死亡, 如同我们在实验中所观察到的 TH 免疫阳性 DA 能神经元数目在腹腔注射 MPTP 后显著降低。

据报道 MPTP 导致的神经毒性作用中有 ROS (reactive oxygen species) 的参与^[10]。在 PD 病人中观察到氧化应激反应增强, 以及发生变性 SN 的神经元的特点(即铁水平升高和抗氧化水平降低)均说明它能够导致 ROS 的生成增加。业已表明 MPTP 可以促进 ROS 的生成^[10], 而铁在 MPTP 的毒性作用中起着关键的作用, 它可以在 DA 能神经元中诱发 Fenton 反应。我们的实验证实 MPTP 可导致 SN 内铁增高, 这与其他研究者的工作是一致的^[11]。SN 内 Fe²⁺ 浓度增高能够增强 MPTP 的毒性作用, 而 MPTP 又可以增加 SN 铁的摄取。体外实验已证实 Fe²⁺ 可以使 MPTP 转化成 MPP⁺, 结果使 Fe³⁺ 增高。MPTP 的神经毒性作用是由 DA 导致的氧化应激反应介导的, 尤其是 SN 致密带神经元的铁含量很高^[12]。MPTP 引起 SN 内铁聚积的原因现在还不清楚。有报道称轴突切断术后细胞由转铁蛋白介导的铁摄取增加, 而且这种作用对于创伤后神经的再生和修复起到非常关键的作用。这一机制同样适用于 PD 模型小鼠 SN 的 DA 神经元, 因为 MPTP 会损伤 SN 神经元的末梢。

3.2 MPTP 制备的 PD 模型小鼠 SN 内 DMT1 表达增加的可能机制

我们的结果表明 MPTP 制备的 PD 模型小鼠 SN 内两种形式的 DMT1 表达都增加。我们观察到“-IRE”型 DMT1 比“+IRE”型 DMT1 反应灵敏。在 MPTP 注射 3 d 后就可观察到“-IRE”型 DMT1 表达增加, 而“+IRE”型 DMT1 表达则没有变化。直到注射后 7 d 才能够观察到“+IRE”型 DMT1 表达增加。

在实验中, 我们没有发现 MPTP 注射后 SN 内 TfR 的变化(结果待发表)。其他研究者的实验也证实 6-羟基多巴胺所致的 PD 模型脑内 TfR 没有改变, 说明转铁蛋白依赖途径在这些细胞的铁摄取增加中并不起作用^[13]。由于在这一过程中, TfR 的表达没有变化, 因此 SN 内铁含量的增加不是转铁蛋白依赖性的铁转运增加。在这一过程中必然有其他蛋白的参与。已有证据表明 DMT1 参与脑内铁转运, 在一些神经变性疾病中 DMT1 表达失控可能是导致铁聚积的原因之一, 但是, DMT1 表达的生理调控机制目前还不清楚。业已报道在小鼠、大鼠和人, DMT1 可能参与非转铁蛋白依赖的铁摄取^[6]。最新研究表明 DMT1 不能转运 Fe³⁺, Fe³⁺ 必须还原 Fe²⁺ 为后才能被 DMT1 转运^[14]。DMT1 表达增加可能是导致这一部位

铁摄取增加的原因, 然后通过生成 ROS, 最终导致细胞的死亡^[3]。尽管 DMT1 在中枢神经系统的其他功能尚需进一步研究, 但是由于它的表达失控会使 ROS 的生成增加, 很可能是导致神经退行性疾病的原因之一^[6]。本研究通过对于两种形式 DMT1 表达变化的观察使我们更进一步地了解 PD SN 内铁聚积的原因, 至少部分是通过 DMT1 铁转运体表达异常所致。本研究结果可进一步阐明铁参与 PD 的发病机制, 提供新的实验依据。

参 考 文 献

- [1] Rouault TA. Iron on the brain. *Nature Genetics* 2001;28(4): 299 - 300.
- [2] Qian ZM, 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.
- [3] Qian ZM, Shen X. Brain iron transport and neurodegeneration. *Trends Mol Med* 2001;7(3): 103 - 108.
- [4] Gruenheid S, Cellier M, Vidal S, Gros P. Identification and characterization of a second mouse Nramp gene. *Genomics* 1995;25(2): 514 - 525.
- [5] Fleming MD, Trenor CC 3rd, Su MA, Foerzler D, Beier DR, Dietrich WF, Andrews NC. Microcytic anaemia mice have a mutation in Nramp2, a candidate iron transporter gene. *Nature Genetics* 1997;16(4): 383 - 386.
- [6] Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, Gunshin Y, Romero MF, Boron WF, Nussberger S, Gollan JL, Hediger MA. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* 1997; 388 (6641): 482 - 488.
- [7] Jiang H (姜宏), Chen WF, Xie JX. Relationship between dopamine and iron contents in the brain of Parkinsonian rats. *Acta Physiol Sin* (生理学报) 2001;53(5): 334 - 338 (Chinese, English abstract).
- [8] Schmidt N, Feger B. Neurochemical findings in the MPTP model of Parkinson's disease. *J Neural Transm* 2001;108:1263 - 1282.
- [9] Russ H, Staust K, Martel F, Gliese M, Schomig E. The extraneuronal transporter for monoamine transmitters exists in cells derived from human central nervous system glia. *Eur J Neurosci* 1996;8:1256 - 1264.
- [10] Blum D, Torch S, Lambeng N, Nissou MF, Benabid AL, Sadoul R, Verna JM. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 2001;65:135 - 172.
- [11] Mochizuki H, Imai H, Endo K, Yokomizo K, Murata Y, Hattori N, Mizuno Y. Iron accumulation in the substantia nigra of 1-methy-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced hemiparkinsonian monkeys. *Neurosci Lett* 1994;68:251 - 253.
- [12] Yantiri F, Andersen JK. The role of iron in Parkinson's disease and 1-methy-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine toxicity. *IUBMB Life* 1999;8:139 - 141.
- [13] He Y, Lee T, Leong SK. Time-course and localization of transferring receptor expression in the substantia nigra of 6-hydroxydopamine-induced Parkinsonian rats. *Neuroscience* 1999;91(2): 579 - 585.
- [14] hang L, Lee T, Wang Y, Soong TW. Heterologous expression, functional characterization and localization of two isoforms of the monkey iron transporter Nramp2. *J Biochem* 2000;349:289 - 297.