论著

文章编号:1000-5404(2006)17-1772-03

HEPC1 和 HEPC2 基因的稳定转染促进 RAW264.7 细胞铁滞留

王元忠,陈 彬,廖荣霞,周建新 (第三军医大学基础医学部生物化学与分子生物学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 观察 HEPC1 和 HEPC2 基因稳定转染对 RAW264.7 细胞铁滞留的影响。**方法** 用脂质体将 HEPC1 和 HEPC2 基因的真核表达载体分别稳定转染 RAW264.7 细胞,以转染空载体为对照,RT-PCR 鉴定后,分别给予 $FeCl_3$ 和 $^{59}FeCl_3$ 处理,然后测定各组细胞及培养上清中 ^{59}Fe 的放射活性,分别以 10^5 细胞的 cpm 和培养上清 cpm /(细胞 cpm +培养上清 cpm)作为衡量铁贮存和铁释放的指标。**结果** RT-PCR 鉴定 HEPC1 和 HEPC2 基因的稳定转染均获得成功;稳定转染 HEPC1 和稳定转染 HEPC2 的 RAW264.7 细胞组铁贮存分别是稳定转染空载体的 RAW264.7 细胞组的 1.65 倍($P<0.01$)和 1.71 倍($P<0.01$),而铁释放率则分别是稳定转染空载体的对照组的 67.6%($P<0.01$)和 57.9%($P<0.01$)。**结论** HEPC1 和 HEPC2 基因的稳定转染具有促进 RAW264.7 细胞铁滞留的作用。

关键词: Hepcidin;巨噬细胞;铁代谢

中图法分类号: Q26; Q516; Q78 **文献标识码**: A

HEPC1 and HEPC2 gene transfection increases iron retention in RAW264.7 cells

WANG Yuan-zhong, CHEN Bin, LIAO Rong-xia, ZHOU Jian-xin (Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the effect of HEPC1 and HEPC2 gene transfection on iron retention in RAW264.7 cells. **Methods** RAW264.7 cells were transfected with pcDNA3, pcDNA3/HEPC1 or pcDNA3/HEPC2 by lipofectin reagent. The positive clones of the transfected cells were obtained by G418 screening, and were identified by RT-PCR. After identification, the positive clones (1×10^5/ml) were cultured in 12-well plates and treated with 25 μmol/L $FeCl_3$ and 1 μCi/ml $^{59}FeCl_3$ for 24 h. To evaluate the effect of HEPC1 and HEPC2 on iron store in RAW264.7 cells, all the RAW264.7 cells were washed three times with PBS and counted for radioactivity of 10^5 cells in a gamma counter. To evaluate the effect of HEPC1 and HEPC2 on iron release in RAW264.7 cells, all the treated RAW264.7 cells were washed and continued to be cultured in IMDM with 10% FCS for 8 h. Cells and their supernatants were collected and counted for radioactivity in a gamma counter. The percentage of iron release was calculated as [cpm in supernatant/(cpm in supernatant +cpm in cells)] ×100. **Results** The iron store of RAW264.7 cells stably transfected with pcDNA3/HEPC1 and pcDNA3/HEPC2 respectively increased by 1.65-fold and 1.71-fold, and the iron release reduced to 67.6% and 57.9% of RAW264.7 cells stably transfected with pcDNA3. **Conclusion** HEPC1 and HEPC2 gene transfection increases the iron retention in RAW264.7 cells.

Key words: Hepcidin; macrophage; iron metabolism

Hepcidin 是近年来发现的由肝细胞特异合成并分泌入血的小分子多肽,体外实验表明具有广谱抗菌活性,但之后的研究表明其参与铁代谢,是调节铁代谢的关键分子。越来越多的证据表明 hepcidin 参与或介导多种血色素沉着病、慢性病贫血等铁紊乱性疾病,hepcidin 因此也被不少研究者认为是调节和维持铁稳态的负激素[1]。体内 hepcidin 具有抑制小肠铁吸收和促进网状内皮系统铁滞留等作用,但其机制都还不清楚。Hepcidin 成熟肽只有 20 几个氨基酸残基(aa),在人和其他动物中只有一个基因拷贝,但小鼠 7 号染色体上有 2 个,分别称为 hepc1 和 hepc2 ,它们高度相似,但转基因小鼠实验表明,它们在调节铁代谢功能上有较大差异[2,3]。为探讨体内 hepcidin 促进网状内皮系统铁滞留的作用是否是 hepcidin 直接作用巨噬细胞的结果并为研究其作用机制奠定基础,我们以小鼠巨噬细胞系 RAW264.7 细胞作为模型,先将 HEPC1 和 HEPC2 基因稳定转染 RAW264.7 细胞,并给予一定浓度的掺有同位素铁 59 的三氯化铁处理,考察 HEPC1 和 HEPC2 基因稳定转染对 RAW264.7 细胞铁滞留的影响。

作者简介:王元忠(1978-),男,江西省乐平市人,硕士,医师,主要从事铁代谢基础方面的研究。电话:(023)68752263, E-mail: wang-yuanzhong@tom.com

通讯作者:周建新,E-mail: turbo400038@yahoo.com

收稿日期:2005-09-22;修回日期:2005-11-07

1　材料与方法

1.1　材料

pcDNA3（本教研室保存）、重组表达质粒 pcDNA3/HEPC1 和 pcDNA3/HEPC2（自行构建，参见文献[4]），RAW264.7 细胞（ATCC），IMDM（Hyclone 公司），Lipofectin（Invitrogen 公司），G418（华美公司），Tripure 试剂（Roche 公司），AMV、PCR Taque 酶（Promega 公司），$^{59}FeCl_3$（Amersham Biosciences 公司）。

1.2　方法

1.2.1　引物的设计与合成　　参考文献[2]合成检测 HEPC1 表达的特异引物 P1（5′-CCTATCTCCATCAACAGATG-3′）、P2（5′-AACAGATACCACACTGGGAA-3′）和检测 HEPC2 表达的特异引物 P3（5′-CCTATCTCCAGCAACAGATG-3′）、P4（5′-AACAGATACCACAGGAGGGT-3′），它们均为跨内含子设计，扩增的长度均为 171 bp。合成 β-actin 上游引物（5′-CATCTCTTGCTCGAAGTCCA-3′）和下游引物（5′-ATCATGTTTGAGACCTTCAACA-3′），扩增长度为 308 bp。

1.2.2　RAW264.7 细胞的稳定转染　　将对数生长期的 RAW264.7 细胞以 5×10^4/孔接种于 6 孔板，待细胞融合达 40 %～70 % 时用脂质体 lipofectin 进行转染，方法参照试剂说明书，每孔分别加 2 μg 质粒与 2 μl Lipofectin，转染 5 h 后弃去转染液，以空载体及不加质粒转染为对照，用 900 μg/ml G418 进行筛选。约 14 d 后转染 pcDNA3、pcDNA3/HEPC1 或 pcDNA3/HEPC2 的 RAW264.7 细胞可见有阳性克隆形成，重铺后进行扩大培养。

1.2.3　RT-PCR 鉴定稳定转染细胞　　用 Tripure 试剂分别提取各组稳定转染细胞总 RNA，RT-PCR 检测 HEPC1 和 HEPC2 的表达，逆转录方法按 AMV 说明书进行，PCR 扩增参数如下：94 ℃，5 min；94 ℃，45 s，55 ℃，45 s，72 ℃，45 s，30 cycles；72 ℃，5 min。

1.2.4　HEPC1 和 HEPC2 基因的稳定转染对 RAW264.7 细胞铁贮存与释放的影响　　将未转染、稳定转染 pcDNA3、pcDNA3/HEPC1 或 pcDNA3/HEPC2 的 RAW264.7 细胞分别以 1×10^5/孔接种至 12 孔板中，每种细胞接种 4 复孔，平行接种 2 组。培养 24 h 后同时给予 25 μmol/L $FeCl_3$ 和 1 μCi/ml $^{59}FeCl_3$ 处理，继续培养 24 h。其中 1 组细胞用 PBS 清洗细胞 3 次并计数，送同位素室测 γ 射线强度，计算 10^5 细胞的 cpm，比较它们之间的差异以分析 HEPC1 和 HEPC2 对 RAW264.7 细胞铁贮存的影响；另 1 组细胞用 PBS 清洗 3 次后，在不加 $FeCl_3$ 和 $^{59}FeCl_3$ 的细胞培养液中继续培养 8 h，然后收集细胞和细胞培养上清并分别测定 cpm，比较它们铁释放率[用细胞上清 cpm 值/（细胞上清 cpm 值 + 细胞 cpm 值）来表示]的差异以分析 HEPC1 和 HEPC2 对 RAW264.7 细胞铁释放的影响。

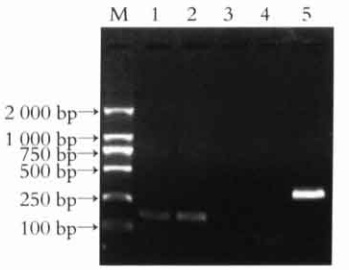
1.3　统计学处理

采用 SPSS 软件行单因素方差分析，并用 Tukey 检验进一步对组间进行两两比较。

2　结果

2.1　稳定转染 pcDNA3、pcDNA3/HEPC1 或 pcDNA3/HEPC2 的 RAW264.7 细胞的鉴定

RT-PCR 结果显示在转染 HEPC1 或 HEPC2 基因的 RAW264.7 细胞中均能扩出与预期大小 171 bp 相符的目的片段，而转染空载体的 RAW264.7 细胞则不能扩出，见图 1。此结果说明经 G418 筛选后成功获得稳定转染 HEPC1 和 HEPC2 基因的 RAW264.7 细胞。



M：DNA 标准；1：在转染 pcDNA3/HEPC1 的细胞中检测 HEPC1 转录；2：在转染 pcDNA3/HEPC2 的细胞中检测 HEPC2 转录；3：在转录空载体 pcDNA3 的细胞中检测 HEPC1 转录；4：在转录空载体 pcDNA3 的细胞中检测 HEPC2 转录；5：在转录空载体 pcDNA3 的细胞中检测 β-actin 转录

图 1　RT-PCR 检测转染细胞中 HEPC1 和 HEPC2 基因的表达

2.2　HEPC1 和 HEPC2 基因的稳定转染对小鼠巨噬细胞系 RAW264.7 细胞铁滞留的影响

2.2.1　HEPC1、HEPC2 基因的稳定转染对 RAW264.7 细胞铁贮存的影响　　RAW264.7 细胞、稳定转染 pcDNA3、pcDNA3/HEPC1 或 pcDNA3/HEPC2 的 RAW264.7 细胞在培养液中含 25 μmol/L $FeCl_3$ 和 1 μCi/ml $^{59}FeCl_3$ 条件下培养 24 h 后，测得的各组细胞的 10^5 细胞的 cpm 值，见表 1。

表 1　HEPC1 和 HEPC2 基因稳定转染对 RAW264.7 细胞铁贮存的影响（$n=4$）

组别	10^5 细胞的 cpm 值（$\bar{x}\pm s$）
RAW264.7 细胞	28 526 ± 2 225
稳定转染 pcDNA3 的 RAW264.7 细胞	36 848 ± 5 328
稳定转染 pcDNA3/HEPC1 的 RAW264.7 细胞	60 797 ± 4 636[a]
稳定转染 pcDNA3/HEPC2 的 RAW264.7 细胞	62 927 ± 4 968[a]

a：$P<0.01$，与稳定转染 pcDNA3 的 RAW264.7 细胞比较

结果显示稳定转染 pcDNA3 的细胞组与未转染的细胞组 10^5 细胞的 cpm 无显著差异（$P>0.05$），而稳定转染 pcDNA3/HEPC1 和稳定转染 pcDNA3/HEPC2 的细胞组 10^5 细胞的 cpm 值分别是稳定转染 pcDNA3 的细胞组 1.65 倍（$P<0.01$）和 1.71 倍（$P<0.01$），可见 HEPC1 和 HEPC2 基因的稳定转染具有促进 RAW264.7 细胞铁贮存的作用。

2.2.2　HEPC1、HEPC2 基因的稳定转染对 RAW264.7 细胞铁释放的影响　　各组 RAW264.7 细胞先在培养液中含 25 μmol/L $FeCl_3$ 和 1 μCi/ml $^{59}FeCl_3$ 条件下培养 24 h，然后在不含 $FeCl_3$ 和 $^{59}FeCl_3$ 普通培养液中培养 8 h，测得的各组细胞的铁释放率[细胞上清 cpm 值/（细胞上清 cpm 值 + 细胞 cpm 值）]结果，见表 2。

表 2　HEPC1 和 HEPC2 基因稳定转染对 RAW264.7 细胞铁释放率的影响（$n=4$）

组别	铁释放率（%，$\bar{x}\pm s$）
RAW264.7 细胞	37.7 ± 3.8
稳定转染 pcDNA3 的 RAW264.7 细胞	36.1 ± 4.0
稳定转染 pcDNA3/HEPC1 的 RAW264.7 细胞	24.4 ± 5.3[a]
稳定转染 pcDNA3/HEPC2 的 RAW264.7 细胞	20.9 ± 1.8[a]

a：$P<0.01$，与稳定转染 pcDNA3 的 RAW264.7 细胞比较

结果显示稳定转染 pcDNA3 的细胞组与未转染的细胞组铁的释放率无显著的差别($P>0.05$),而稳定转染 pcDNA3/HEPC1 的细胞组和稳定转染 pcDNA3/HEPC2 的细胞组铁的释放率分别是稳定转染 pcDNA3 的细胞组的67.6%($P<0.01$)和57.9%($P<0.01$),可见 HEPC1 和 HEPC2 基因的稳定转染具有抑制 RAW264.7 细胞铁释放的作用。

上述结果说明 HEPC1 和 HEPC2 具有促进铁在小鼠巨噬细胞系 RAW264.7 细胞中滞留的作用。

3 讨论

铁代谢的一个显著特点是没有可调节的排泄途径,机体铁稳态的维持主要靠调节小肠铁吸收和体内铁循环再利用而实现。近年来的研究表明 hepcidin 具有抑制小肠铁吸收和促进网状内皮系统铁滞留的作用。临床上也发现各种血色素沉着病患者血液和尿液中的 hepcidin 浓度是异常降低的,而且Ⅱ型青少年血色素沉着病就是由 hepcidin 基因纯合突变所致,hepcidin 基因杂合突变又大大加重其他型血色素沉着病铁沉积的表型[5,6]。

Hepcidin 抑制小肠铁吸收在调节维持铁稳态中的作用是不言而喻的,其机制的研究也不免成为当前研究 hepcidin 的焦点。然而 hepcidin 促进网状内皮系统铁滞留的作用在铁稳态维持过程中尤其是快速调节中可能也起着非常重要的作用,因为:当机体铁水平增高时可诱导肝细胞分泌 hepcidin 增加,分泌入血的 hepcidin 通过作用网状系统促进铁在巨噬细胞中滞留,可快速降低循环中的铁水平从而维持机体铁的相对平衡,反之亦然。然而目前 hepcidin 在体内的这种作用是它直接作用网状内皮系统的结果还是通过其他机制或蛋白然后再作用于网状内皮系统即间接作用还不是很明了,其具体作用机制更不清楚。为此,我们先以小鼠单核巨噬细胞系 RAW264.7 细胞作为网状内皮系统的体外模型,首先观察 HEPC1 和 HEPC2 基因的稳定转染对此细胞铁滞留的影响来探讨 hepcidin 能否直接作用巨噬细胞,结果显示在给予一定浓度的掺有同位素铁 59 的三氯化铁处理后,转染 HEPC1 和 HEPC2 基因的 RAW264.7 细胞的细胞内同位素铁 59 的放射活性都比转染空载体的对照组高(分别是 1.65 倍和 1.71 倍),而铁释放率都比对照组低(分别是 67.6 % 和 57.9 %),说明转染 HEPC1 和 HEPC2 基因均可促进 RAW264.7 细胞的铁滞留。因此,我们认为在体内分泌入血的 hepcidin 极有可能直接作用网状内皮系统的巨噬细胞从而促进铁在其中的滞留。最近,Nementh 等[7]发现 hepcidin 具有结合 ferroportin(位于某些细胞的细胞膜上具有将铁转移出膜外的蛋白)并诱导其内化及降解从而减少细胞铁排出的作用。因此我们推测在本实验中 hepcidin 促进 RAW264.7 细胞铁滞留可能是通过此种机制,因为巨噬细胞一般都高表达 ferroportin,不过确切机制还有待进一步的实验验证。最近 Knutson 等[8]报道,将 FPN1(ferropotin1 基因)稳定转染小鼠巨噬细胞系 J744 细胞使其过表达可大大增加 J744 细胞的铁释放,而在培养的 J744 细胞中加入 hepcidin 则可显著降低细胞 ferropotin1 的水平及降低铁从 J744 巨噬细胞中释放。

Hepcidin 是一保守的富含半胱氨酸的阳离子小肽,前体包括三部分,从 N 端到 C 端依次为信号肽、prodomain 和成熟肽,分泌出胞外的成熟肽只含 20 几个 aa,如 HEPC1 和 HEPC2 都只含 25 个 aa,但无论在那种动物,其分子内保守位置上都有 8 个半胱氨酸且形成 4 个链内二硫键。由于以上的结构特点,hepcidin 如果用原核表达的方式来获得,则不易复性形成正确构象有活性的蛋白;若化学合成由于合成后的氧化是在空气中进行的,也很难确保形成正确的二硫键。考虑到小鼠铁代谢与人极为相似,因此,我们采用构建小鼠 HEPC1 和 HEPC2 基因真核表达载体的方式,通过转染来研究 hepcidin 对巨噬细胞铁滞留影响的作用。同时由于 hepcidin 分子量很小的原因(约 3×10^3),给转染后用 western blot 从蛋白水平鉴定带来了很大的困难。

参考文献:

[1] FLEMING R E, SLY W S. Hepcidin: a putative iron-regulatory hormone relevant to hereditary hemochromatosis and the anemia of chronic disease[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98(15): 8160-8162.

[2] ILYIN G, COURSELAUD B, TROADEC M B, *et al*. Comparative analysis of mouse hepcidin 1 and 2 genes: evidence for different patterns of expression and co-inducibility during iron overload[J]. FEBS Lett, 2003, 542(1-3): 22-26.

[3] LOU D Q, NICOLAS G, LESBORDES J C, *et al*. Functional differences between hepcidin 1 and 2 in transgenic mice[J]. Blood, 2004, 103(7): 2816-2821.

[4] 王元忠,周建新,钟小林,等. HEPC1 和 HEPC2 真核表达载体的构建及其在 NIH3T3 细胞中的表达[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(9): 834-836.

[5] JACOLOT S, LE-GAC G, SCOTET V, *et al*. HAMP as a modifier gene that increases the phenotypic expression of the HFE pC282Y homozygous genotype[J]. Blood, 2004, 103(7): 2835-2840.

[6] ROETTO A, PAPANIKOLAOU G, POLITOU M, *et al*. Mutant antimicrobial peptide hepcidin is associated with severe juvenile hemochromatosis[J]. Nat Genet, 2003, 33(1): 21-22.

[7] NEMETH E, TUTTLE M S, POWELSON J, *et al*. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization[J]. Science, 2004, 306(5704): 2090-2093.

[8] KNUTSON M D, OUKKA M, KOSS L M, *et al*. Iron release from macrophages after erythrophagocytosis is up-regulated by ferroportin 1 overexpression and down-regulated by hepcidin[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(5): 1324-1328.

(编辑 陈聪连)