

肌萎缩侧索硬化症病程中骨骼肌内铁沉积及其调节

王绍晔^{1,2}, 李昊^{1,2}, 张皓云^{1,3*}, 张雅雯^{1,3}, 陈燕春^{1,3}, 蒋欣^{1,3}, 孙菡聪^{1,3}, 周彩霞^{1,3}, 高莹^{1,2}

(潍坊医学院¹山东省神经疾病与再生修复重点实验室,²生物科学与技术学院,³临床医学院, 潍坊 261053)

〔摘要〕目的 研究肌萎缩侧索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 小鼠模型骨骼肌中铁沉积及相关转运蛋白的表达变化, 探讨铁调节蛋白 1 (IRP1) 的可能调节作用。方法 选取携带人源 *SOD1*^{G93A} 突变基因小鼠 (ALS 鼠) 和同窝野生型小鼠 (WT 鼠) 为动物模型, 分别收集发病前期 (70d)、发病早期 (95d)、发病期 (108d)、发病后期 (122d) 模型鼠腓肠肌, 以普鲁士蓝染色法检测骨骼肌内铁沉积; Western blot 技术检测铁转入蛋白二价金属离子转运蛋白 1 (DMT1)、铁转出蛋白 ferroportin1 (FPN1) 和 IRP1 的表达变化。结果 在 ALS 鼠发病期及发病后期腓肠肌内检测到铁沉积。与同窝 WT 小鼠相比, 随病程进展 ALS 鼠腓肠肌中 DMT1 表达增高; FPN1 水平除 70d 有增高趋势外, 其他时间点 ALS 组均较 WT 组呈现降低趋势, 但差异无统计学意义。IRP1 在 70d 和 95d 表达显著降低, 随病程进展较 WT 组呈现上升趋势。结论 ALS 病程中腓肠肌内铁转运调节失衡可导致腓肠肌内铁沉积。IRP1 部分参与铁转运蛋白的表达调节。

〔关键词〕肌萎缩侧索硬化症; 铁代谢; 骨骼肌; 铁调节蛋白 1

〔中图分类号〕R741

〔文献标识码〕A

DOI: 10.16705/j.cnki.1004-1850.2019.05.004

Iron deposition in skeletal muscle during the progression of amyotrophic lateral sclerosis and its related regulation

Wang Shaoye^{1,2}, Li Hao^{1,2}, Zhang Haoyun^{1,3*}, Zhang Yawen^{1,3}, Chen Yanchun^{1,3}, Jiang Xin^{1,3}, Sun Hancong^{1,3}, Zhou Caixia^{1,3}, Gao Ying^{1,2}

(¹Shandong Provincial Key Laboratory of Neurological Diseases and Regenerative Repair; ²School of Biology Science and Technology; ³School of Clinical Medicine, Weifang Medical University, Weifang 261053, China)

〔Abstract〕Objective To detect the iron deposition and the expression changes of its related transporter proteins in the skeletal muscles of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) mouse model. And to explore the role of iron regulatory protein 1 (IRP1) in these processes. Methods The transgenic mice bearing *G93A hSOD1* gene mutation (ALS mice) and wild-type litter mates (WT mice) were selected as animal models and their gastrocnemius muscle samples were collected at the pre-onset stage (70 d), early stage (95 d), middle stage (108 d) and the late stage of onset (122 days). Iron deposition was detected by *Perls Prussian Blue Staining*. The expression changes of iron importer divalent metal transporter 1 (DMT1), iron exporter ferroportin 1 (FPN1) and IRP1 in the gastrocnemius muscle at 70, 95, 108 and 122 days after birth were measured by Western blot. Results Iron deposition was observed from 108 d to 122 d in the gastrocnemius muscle of ALS mice. Compared with WT mice, the expression of DMT1 was increased in gastrocnemius muscle of ALS with the progression of the disease. Except for the increase of FPN1 at 70-day time point, the ALS group showed a decreasing trend of FPN1 compared with the WT group at other time points, but there was no statistically significant difference. IRP1 was significantly decreased at 70 d and 95d time points while there was an upward trend with the progression of the disease compared to WT group. Conclusions This study showed that dysregulation of iron transport can cause iron deposition in the gastrocnemius muscle of ALS. IRP1 is partly involved in the regulation of iron transporter expression.

〔Keywords〕Amyotrophic lateral sclerosis; iron metabolism; skeletal muscle; iron regulatory protein 1

〔收稿日期〕2019-07-10 〔修回日期〕2019-10-08

〔基金项目〕潍坊医学院博士启动基金 (2017BSQD22; 2017BSQD25); 山东省大学生创新创业训练计划项目 (S201910438003); 山东省高校科研计划项目重点项目 (J18KZ013); 国家自然科学基金 (81871006)

〔作者简介〕王绍晔, 男 (1999 年), 汉族, 本科生

* 通讯作者 (To whom correspondence should be addressed): haoyunzh@wfmuc.edu.cn

肌萎缩侧索硬化 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 是一种选择性累及上、下运动神经元的致死性神经退行性疾病, 主要病理改变为进行性大脑皮层、脑干、脊髓上下运动神经元选择性丢失, 临床表现为进行性全身骨骼肌萎缩、从而影响患者运动、语言及呼吸功能, 最终因呼吸肌麻痹而亡, 发病后生存期约为 3-5 年^[1], 目前该病发病机制不清。

散发性 ALS (sporadic amyotrophic lateral sclerosis, SALS) 及家族遗传性 ALS (familial amyotrophic lateral sclerosis, FALS) 均检测到铁异常沉积, ALS 患者血浆中铁蛋白 ferritin 水平升高, 而转铁蛋白 transferrin 水平降低, 提示 ALS 病理进程中存在铁代谢异常^[2]。ALS 动物模型的脑脊液及运动皮层也观察到铁积聚^[3,4]。铁是我们生命中的重要微量元素, 参与机体基因表达、酶促反应、电子传递等多种生理活动。但铁具有氧化还原的化学性质, 体内游离铁, 既非血红素结合铁 (non-heme iron, NHI) 增多, 可以通过 Fenton 反应形成包括羟自由基 (hydroxyl radical, OH·) 等在内的多种活性氧 (reactive oxygen radical species, ROS) 物质, 造成组织细胞氧化应激损伤, 因此铁的转运、储存、利用受到严格控制^[5-8]。

随研究深入, 骨骼肌内铁代谢与 ALS 神经退行性变间的关联受到普遍关注。骨骼肌是机体重要器官, 约占体重 40%, 在机体能量代谢、蛋白储存、肢体运动等方面发挥重要作用。Halon 等人^[9]在 ALS 转基因大鼠模型中观察到骨骼肌铁代谢异常早于运动功能异常, 发病前期可在骨骼肌中检测到铁积聚及脂质、蛋白质过氧化。并且研究者指出, 铁沉积可能与血中 hepcidin 表达改变及骨骼肌内铁转出蛋白 ferroportin1 (FPN1)、铁存储蛋白 ferritin H 等表达变化有关。

本研究利用 ALS 转基因小鼠模型检测其骨骼肌中参与铁代谢的相关转运蛋白, 如铁转入蛋白二价金属离子转运蛋白 1 (divalent metal transporter-1, DMT1) 及铁转出蛋白 FPN1 随 ALS 疾病进展的表达变化、与骨骼肌铁沉积的关系及其可能调控机制。

材料与方 法

1 动物模型

表达人源突变 *SOD1*^{G93A} 基因的转基因小鼠 (B6SJL-Tg SOD*G93A-1Gur/J, ALS 鼠) 购自美国

Jackson Laboratory (ME, USA)。雌雄不限, 以同窝野生型鼠 (wild type, WT 鼠) 作为对照鼠。实验动物置于室温 23±2℃, 50%~60% 相对湿度, 12h 明暗交替环境条件下饲养。动物处置均获得潍坊医学院动物伦理委员会批准。

2 主要试剂

普鲁士蓝染色试剂盒 (Perl's stain, 核固红法) 购自索莱宝生物技术有限公司, GAPDH 兔源多克隆抗体、辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠及山羊抗兔 IgG 抗体均购自 Cell Signaling 公司, 小鼠抗 DMT1、兔抗 FPN1、兔抗铁调节蛋白 1 (iron regulatory protein1, IRP1) 抗体购自 Abcam 公司, ECL 化学发光试剂盒购自 Thermo Fisher Scientific 公司。

3 铁染色

模型鼠分别于生后 70d (发病前期)、95d (发病早期)、108d (发病期)、122d (发病后期) 以 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉, 4% 多聚甲醛灌注固定, 分离后肢腓肠肌组织, 4% 多聚甲醛后固定过夜, 梯度蔗糖沉淀后制作冰冻切片。切片 (7μm) 经去离子水漂洗后, 应用普鲁士蓝染色试剂盒进行染色, 参照说明完成。脱水、透明、封片后, 油镜 (100×) 下观察、拍照。

4 Western blot

模型鼠分别于生后 70d、95d、108d、122d 以 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉后, 断颈处死, 剥取腓肠肌组织并剪碎, 加入 RIPA 裂解液, 超声破碎提取总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度。取 60μg 蛋白样品 SDS-PAGE 凝胶电泳, 并转移至醋酸纤维素膜, 10% 脱脂奶粉/TBST 封闭液室温封闭 1h, 分别加入小鼠抗 DMT1 (1:1000)、兔抗 FPN1 (1:500)、IRP1 (1:1000)、GAPDH (1:2000) 一抗, 4℃ 孵育过夜。TBST 漂洗后, 以辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠或山羊抗兔二抗 (1:5000) 室温孵育 1h, 加入 ECL 进行发光反应, 凝胶成像系统成像 (美国 ProteinSimple 公司), 使用 Image J 软件进行条带灰度分析。

5 统计学处理

实验结果采用均数 ± 标准误表示, 应用 GraphPad Prism 5 统计软件采用 *t*-test 分析蛋白表达差异, *P*<0.05 表明差异有统计学意义。

结 果

1 ALS 鼠骨骼肌内铁沉积

铁染色结果显示, 95d、108d、122d ALS 鼠腓

肠肌萎缩逐渐加重, 肌纤维排列不规则。各时间点 WT 鼠腓肠肌切片中少见铁染色阳性细胞; 108d、122d ALS 鼠切片中见铁染色阳性细胞显著增多, 沉积物呈蓝色颗粒状, 位于胞质内 (图 1)。

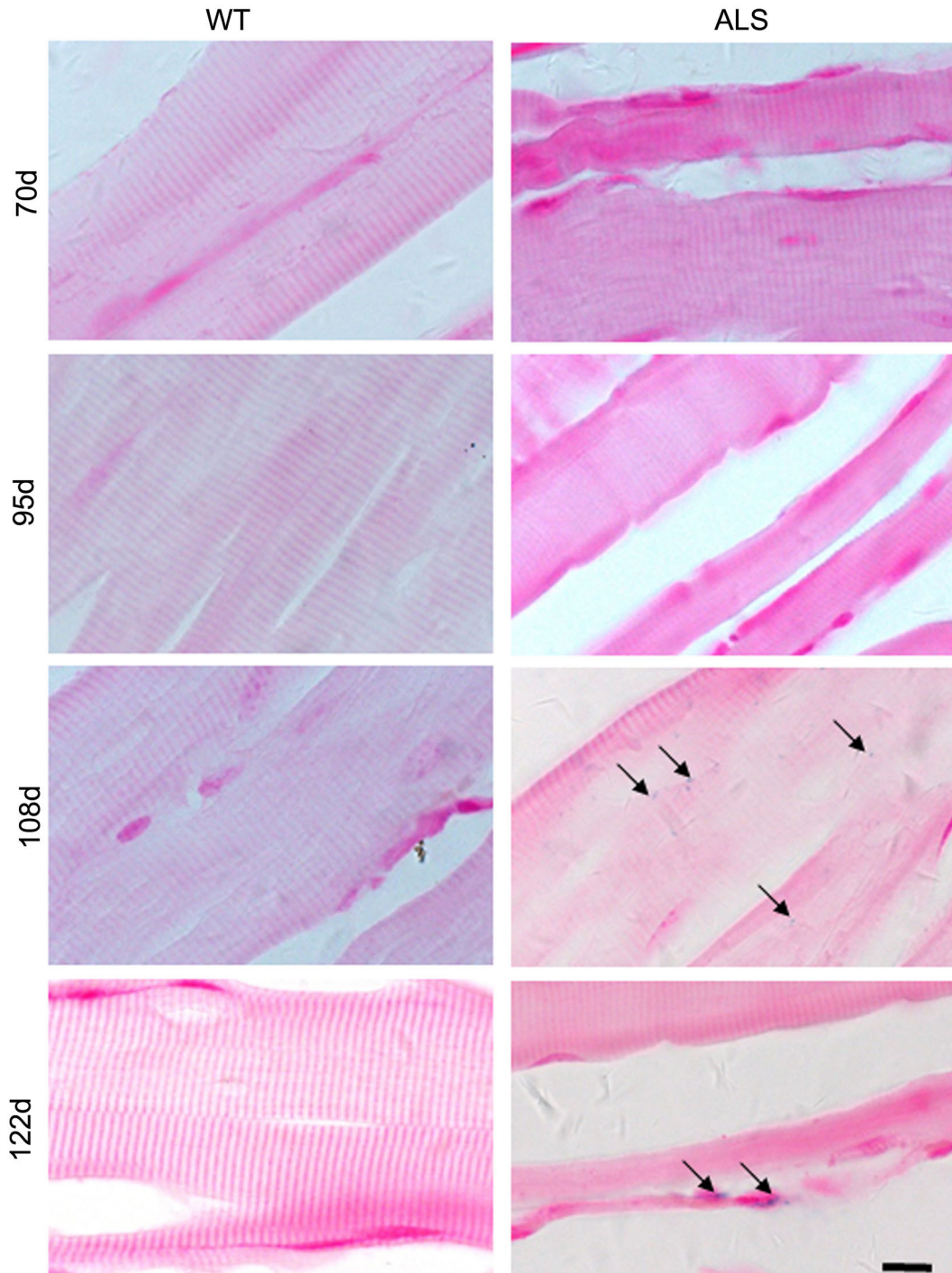


图 1 普鲁士蓝染色检测 WT 及 ALS 鼠腓肠肌内铁沉积。箭示细胞内铁沉积物呈蓝色颗粒状。比例尺, 10 μm

Fig.1 Iron deposition in the gastrocnemius muscle of WT mice and ALS mice detected by *Perls Prussian Blue Staining*. The arrows showed blue granules of iron deposition inside cells. Scale bar, 10μm

2 骨骼肌内铁转运相关蛋白表达动态改变

Western blot 结果显示, 随疾病进展, ALS 鼠骨骼肌中铁转入蛋白 DMT1 较同时间点 WT 鼠呈现增高

趋势, 且在 70d、122d 差异有统计学意义 ($P < 0.01$) (图 2A、2B)。铁转出蛋白 FPN1 在 70d ALS 组表达略高于 WT 组, 随后呈现降低趋势, 但由于个体

差异较大, 无统计学意义 (图 2C、2D)。以上结果提示, 随病程进展 ALS 鼠骨骼肌内铁转入较转出增多, 导致骨骼肌内铁负载。

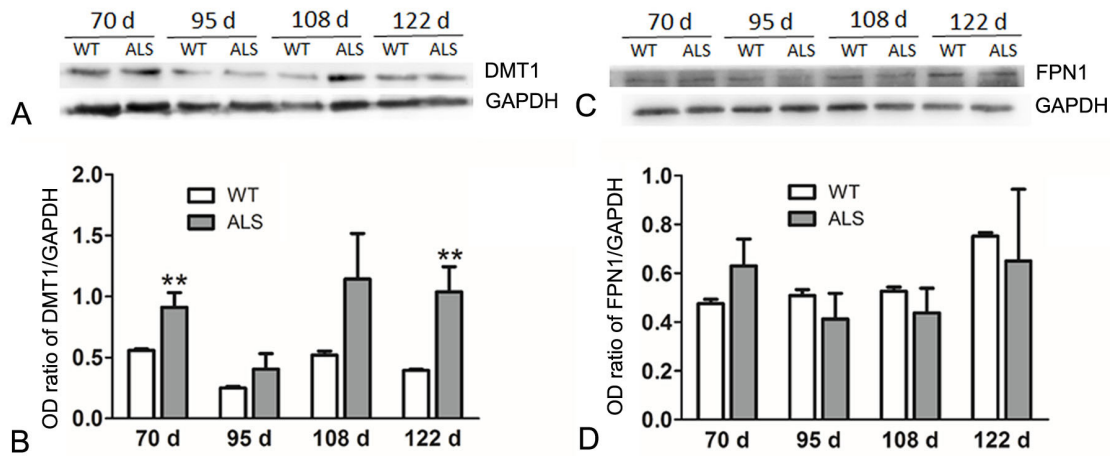


图 2 WT 及 ALS 鼠腓肠肌内 DMT1 (A、B)、FPN1 (C、D) 蛋白动态表达变化。**, 与同时时间点 WT 鼠相比, $P < 0.01$

Fig. 2 Dynamic expression changes of DMT1(A, B), FPN1(C, D) in the gastrocnemius muscle of WT mice and ALS mice detected by Western blot. **, $P < 0.01$, compared with WT mice of the same time point

3 铁调节蛋白 IRP1 表达动态改变

Western blot 结果显示, 与 WT 鼠相比, ALS 鼠骨骼肌中铁调节蛋白 IRP1 在 70d、95d 表达降低, 而 108d、122d 表达有升高趋势, 但仅 108d 时升高有统计学意义。

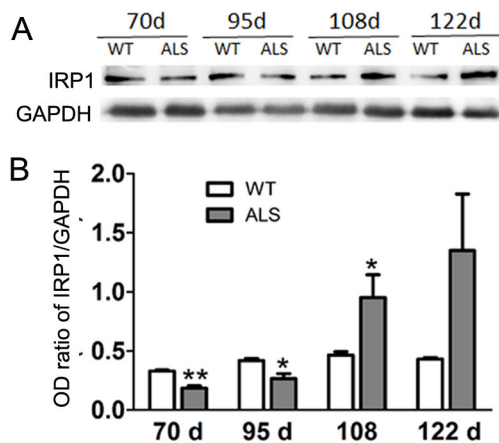


图 3 WT 及 ALS 鼠腓肠肌内 IRP1 蛋白动态表达变化。与同时时间点 WT 鼠相比: *, $0.01 < P < 0.05$; **, $P < 0.01$

Fig.3 Dynamic expression changes of IRP1 in the gastrocnemius muscle of WT mice and ALS mice detected by Western blot. *, $0.01 < P < 0.05$; **, $P < 0.01$, compared with WT mice of the same time point

讨论

ALS 的发病机制不清, 研究显示与氧化应激、神经炎症等密切相关。并且有研究者提出, ALS 属于远端轴突变性疾病, 由源于所支配骨骼肌的“dying back”信号导致运动神经元进行性退变^[10]。骨骼肌是

机体内的重要器官, 除完成躯体运动功能, 还是体内重要的铁储库, 储存机体 10%~15% 的铁^[11], 且以 NHI 为主^[12]。规律运动锻炼可提高机体对胰岛素的敏感性, 影响体内铁代谢, 加强骨骼肌锻炼可减少机体铁储存。骨骼肌内铁过载不仅直接影响骨骼肌收缩功能, 同时也会间接影响其支配神经元, 从而影响神经退行性疾病的结局^[13]。

本研究中我们观察到, 在发病期及发病后期 (108d、122d) SOD1^{G93A} 转基因小鼠腓肠肌内有显著铁沉积。Halon 等应用 ALS 大鼠模型同样观察到发病期及发病后期骨骼肌内 NHI 增加^[9]。铁的跨细胞转运由细胞膜上铁转运相关蛋白完成, 铁转入蛋白包括转铁蛋白受体 1、DMT1 等; 而 FPN1 是目前已知唯一参与细胞内铁转出的转运蛋白^[14]。我们在 ALS 小鼠模型检测到, 从发病前期开始随疾病进展, ALS 鼠骨骼肌中 DMT1 表达均较 WT 鼠增高, 而 FPN1 表达呈现降低趋势, 因此推测 ALS 病程早期由于骨骼肌铁转运异常, 可出现细胞内铁过载, 参与骨骼肌氧化应激损伤, 推进 ALS 进程, 与前人的研究结果一致^[9]。

DMT1、FPN1 mRNA 的 3' 或 5' 端存在铁反应原件 (iron responsive element, IRE), 可与 IRPs 相互作用发生转录后调节。IRPs 与 DMT1 3' 端 IRE 结合, 稳定 mRNA, 促进 DMT1 翻译, 实现对 DMT1 的正调控; 与 FPN1 mRNA 5' 端 IRE 结合导致 mRNA 降解, 抑制其翻译, 表现出对 FPN1 表达的负调效

应^[15]。IRPs包括IRP1和IRP2,机体内IRP1表达量高,且与IRE亲和力强,因此本研究检测ALS模型鼠腓肠肌内IRP1的动态表达变化。我们观察到ALS鼠腓肠肌内IRP1表达随疾病进展先降低,后增高的趋势。IRP1表达变化除受细胞内铁含量的影响,还受机体氧化应激状态的调节,过氧化氢及NO可诱导IRP1激活^[16,17],从而形成恶性循环促进细胞内铁沉积,本研究中IRP1的动态变化可能与此有关。实验中我们观察到FPN1表达的动态变化趋势符合其受IRP1转录后负调控的变化。但70d、95d DMT1表达变化未体现IRP1的转录后调节。DMT1的蛋白表达调控较为复杂,DMT1 mRNA存在四种剪接体,分别DMT1A、DMT1B、DMT1无IRE型(DMT1-IRE)、DMT1有IRE型(DMT1+IRE),除IRPs-IRE调节系统外,还可受到其它的一些信号机制,如NFκB、Nrf2等核转录因子的调节^[15,18],需要在后续研究中深入探讨。

本研究结果揭示,在ALS病程早期骨骼肌内铁转运相关蛋白受IRP1等调节发生异常改变,参与局部铁过载,或推动ALS疾病进展。

参 考 文 献

- [1] Zarei S, Carr K, Reiley L, et al. A comprehensive review of amyotrophic lateral sclerosis. *Surg Neurol Int*, 2015, 6: 171.
- [2] Ikeda K, Hirayama T, Takazawa T, et al. Relationships between disease progression and serum levels of lipid, urate, creatinine and ferritin in Japanese patients with amyotrophic lateral sclerosis: a cross-sectional study. *Intern Med*, 2012, 51(12): 1501-1508.
- [3] Winkler EA, Sengillo JD, Sagare AP, et al. Blood-spinal cord barrier disruption contributes to early motor-neuron degeneration in ALS-model mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(11): E1035-1042.
- [4] Jeong SY, Rathore KI, Schulz K, et al. Dysregulation of iron homeostasis in the CNS contributes to disease progression in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci*, 2009, 29(3): 610-619.
- [5] Daglas M, Adlard PA. The Involvement of Iron in Traumatic Brain Injury and Neurodegenerative Disease. *Front Neurosci*, 2018, 12: 981.
- [6] Ward RJ, Zucca FA, Duyn JH, et al. The role of iron in brain ageing and neurodegenerative disorders. *Lancet Neurol*, 2014, 13(10): 1045-1060.
- [7] Becker G, Osterloh K, Schafer S, et al. Influence of fucoidan on the intestinal absorption of iron, cobalt, manganese and zinc in rats. *Digestion*, 1981, 21(1): 6-12.
- [8] Altun M, Edstrom E, Spooner E, et al. Iron load and redox stress in skeletal muscle of aged rats. *Muscle Nerve*, 2007, 36(2): 223-233.
- [9] Halon M, Kaczor JJ, Ziolkowski W, et al. Changes in skeletal muscle iron metabolism outpace amyotrophic lateral sclerosis onset in transgenic rats bearing the G93A hmSOD1 gene mutation. *Free Radic Res*, 2014, 48(11): 1363-1370.
- [10] Campanari ML, Bouefis AR, Kabashi E. Diagnostic Challenge and Neuromuscular Junction Contribution to ALS Pathogenesis. *Front Neurol*, 2019, 10: 68.
- [11] Barbieri E, Sestili P. Reactive oxygen species in skeletal muscle signaling. *J Signal Transduct*, 2012, 2012: 982794.
- [12] Chen LH, Thacker RR. Effects of dietary vitamin E and high level of ascorbic acid on iron distribution in rat tissues. *Int J Vitam Nutr Res*, 1986, 56(3): 253-258.
- [13] Halon-Golabek M, Borkowska A, Herman-Antosiewicz A, et al. Iron Metabolism of the Skeletal Muscle and Neurodegeneration. *Front Neurosci*, 2019, 13: 165.
- [14] De Domenico I, Vaughn MB, Li L, et al. Ferroportin-mediated mobilization of ferritin iron precedes ferritin degradation by the proteasome. *EMBO J*, 2006, 25(22): 5396-5404.
- [15] Garrick MD. Human iron transporters. *Genes Nutr*, 2011, 6(1): 45-54.
- [16] Fillebeen C, Pantopoulos K. Redox control of iron regulatory proteins. *Redox Rep*, 2002, 7(1): 15-22.
- [17] Mutze S, Hebling U, Stremmel W, et al. Myeloperoxidase-derived hypochlorous acid antagonizes the oxidative stress-mediated activation of iron regulatory protein 1. *J Biol Chem*, 2003, 278(42): 40542-40549.
- [18] Zhang HY, Wang ND, Song N, et al. 6-Hydroxydopamine promotes iron traffic in primary cultured astrocytes. *Biometals*, 2013, 26(5): 705-714.