

线粒体铁蛋白和年龄相关性黄斑变性的研究进展

许致玉,董晶,张璐

引用:许致玉,董晶,张璐. 线粒体铁蛋白和年龄相关性黄斑变性的研究进展. 国际眼科杂志 2020;20(12):2083-2086

基金项目:黑龙江省留学回国人员科学基金(No.LC2017036)

作者单位:(150001)中国黑龙江省哈尔滨市,哈尔滨医科大学附属第一医院眼科医院

作者简介:许致玉,在读硕士研究生,研究方向:白内障、青光眼、各种遗传性眼病的发病机制。

通讯作者:张璐,毕业于哈尔滨医科大学,医学博士,主任医师,教授,硕士研究生导师,研究方向:白内障、青光眼、各种遗传性眼病的发病机制. 13796089809@163.com

收稿日期:2020-02-24 修回日期:2020-10-30

摘要

年龄相关性黄斑变性(ARMD)是发达国家老年人不可逆性视力损害的主要原因。近几年研究发现,线粒体铁蛋白(FTMT)被认为通过铁调节起到抗氧化作用。因此,本文通过论述 FTMT 影响 HIF-1 α 、FTMT 基因突变、FTMT 保护 ARMD 免受氧化应激等方面对 ARMD 进展过程的影响,能够更好地了解疾病的发病机制,为预防或者评价疾病做出贡献。

关键词:年龄相关性黄斑变性;线粒体铁蛋白;氧化应激

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2020.12.14

Research progress of mitochondrial ferritin and age-related macular degeneration

Zhi-Yu Xu, Jing Dong, Lu Zhang

Foundation item: Science Foundation for Returned Students from Heilongjiang Province (No.LC2017036)

Eye Hospital, the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China

Correspondence to: Lu Zhang. Eye Hospital, the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China. 13796089809@163.com

Received:2020-02-24 Accepted:2020-10-30

Abstract

• Age-related macular degeneration (ARMD) is a major cause of irreversible visual impairment in the elderly in developed countries. Recent studies have shown that mitochondrial ferritin (FTMT) is thought to have an antioxidant effect through iron regulation. Therefore, this paper discusses the effects of FTMT on HIF-1 α , FTMT

gene mutation, and FTMT protection against oxidative stress on the progression of ARMD, so as to better understand the pathogenesis of the disease and contribute to the prevention or evaluation of the disease.

• KEYWORDS: age - related macular degeneration; mitochondrial ferritin; oxidative stress

Citation: Xu ZY, Dong J, Zhang L. Research progress of mitochondrial ferritin and age-related macular degeneration. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2020;20(12):2083-2086

0 引言

年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration, ARMD)又称老年性黄斑变性,是一种与年龄相关的致盲性退行性眼底病变。欧盟 2015 年大约有 6700 万人受到任何 ARMD 的影响,并且由于人口老龄化,这一数字预计到 2050 年将增加 15%^[1]。随着我国人口老龄化社会的到来,发病人数将逐年增加。由于 ARMD 的发病机制复杂,目前对于 ARMD 的治疗发展并不完善,因此 ARMD 的治疗效果并不能让广大患者感到满意。线粒体铁蛋白(mitochondrial ferritin, FTMT)是一个组织表达受限蛋白,仅表达于心脏、睾丸、脑和呼吸活动活跃的组织。进一步研究发现,FTMT 同样具有铁离子平衡和抗氧化功能。目前,已有越来越多的学者开始关注 FTMT 在 ARMD 中的发生、发展及作用机制。

1 FTMT

FTMT 是一种新近发现的位于线粒体内的铁储存蛋白。在体内铁代谢及调节中,FTMT 起着重要作用。它是一种前体,以线粒体为目标,然后加工成一种功能蛋白,其结构类似于细胞质中的铁蛋白。与胞质性铁蛋白一样,FTMT 在体内和体外都含有铁,这与其保守的铁氧化酶中心一致。与其不同的是,FTMT 的成熟功能形式只分布于线粒体内,并且 FTMT 的分布局限于特定的组织或者器官中;主要分布于睾丸、脊髓神经炎、视网膜、心脏和胸腺等,不存在于肝脏或者脾脏等主要的铁储存器官中。FTMT 可以将细胞外和胞浆内的铁离子以三价铁的形式储存在线粒体中,由此可以减少由二价铁离子引起的氧化应激产物,但是 FTMT 的 mRNA 序列中,不含铁调控元件序列,这意味着其表达不受铁的调控。由于对铁的获取作用,体内的氧化应激水平进一步被 FTMT 所抑制,在退行性神经疾病中起到保护作用^[2]。在一些免疫组化中显示,FTMT 表达于视网膜,并且表达量会随着铁的水平变化而改变(呈正相关)^[3]。

FTMT 是一种铁螯合蛋白,在具有高代谢活性和氧消耗的细胞类型(包括人类视网膜)中表达,提示其在保护

线粒体免受铁依赖性氧化损伤中起作用。此外,在一些 ARMD 患者中发现了 FTMT 基因的突变,这可能导致 FTMT 基因的缺失^[4]。然而,FTMT 已显示出保护线粒体免受铁细胞介导的毒性作用,从而延迟 ARMD 的进程。

2 ARMD

ARMD 是黄斑区的退行性病变。主要表现为视物变形、中心暗点以及对光度下降等,患者多为 50 岁以上,随着年龄增长发病率增加。一般表现为双眼先后发病或同时发病,并且进行性损害视力,严重影响老年人的生活质量。有学者研究表明,在全球 50 岁以上的中国人群中,早期和晚期 ARMD 的总合并患病率分别为 4.9% 和 0.7%^[5]。

ARMD 根据临床表现和病理改变的不同分为两型:(1) 萎缩型 ARMD,或称为非渗出型 ARMD,或干性 ARMD;(2) 渗出型 ARMD,或称为湿性 ARMD。其中最常见的是干性 ARMD,占 ARMD 患者中的 80%~90%。临床上,两型病变的病程、眼底表现、治疗和预后各异。干性 ARMD 患者一般起病缓慢,患者视力渐进性减退,视网膜外层、色素上皮层、Bruch 膜、脉络膜毛细血管等各层逐步萎缩、变性,眼底可见大小不一的玻璃膜疣,晚期可见到裸露的脉络膜大血管。湿性 ARMD 患者临床表现为突然单眼的视力下降,部分可见典型的新生血管或者黄斑区盘状瘢痕^[6]。目前临床上公认的用于治疗湿性 ARMD 的方法为抗 VEGF 治疗,通常采用将可结合 VEGF 的特异性抗体通过球内注射的方式给药,临床效果显著。但是该药药物效果难以持续,并且费用昂贵,大大增加了治疗的成本,使绝大多数中低收入患者群体难以维系治疗。

由于 ARMD 的发病机制和进展机制复杂,因此很难找到病因,并且难以运用干预手段来治疗疾病。它可能与遗传因素、环境影响、慢性视网膜光损伤、营养不良、代谢紊乱等有关。但是氧化应激和自由基损伤已被确定为 ARMD 的危险因素。下面将探讨 FTMT 对 ARMD 的影响。

3 FTMT 通过稳定低氧诱导因子-1 α 影响 ARMD

低氧诱导因子(hypoxia-inducible factor, HIF)是 20 世纪 90 年代发现的一种依赖于氧的转录因子。HIF 最初是在人肝癌细胞培养中发现并表征的,其影响促红细胞生成素基因的转录。后有研究表明,HIF 亚型 HIF-1 在 ARMD 患者脉络膜新生血管膜中同样存在。由于人视网膜色素上皮细胞培养中血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的产生受 HIF 调控,任何对 HIF 和 PAS 蛋白结构域抑制功能的干扰都会影响眼睛的氧化应激、炎症和脉络膜新生血管(choroidal neovascularization, CNV)的生成^[7]。

CNV 的发展是对 ARMD 患者快速永久性视力丧失的最重要威胁。各种研究表明,随着年龄的增长,视网膜色素上皮细胞(retinal pigment epithelial cells, RPE), Bruch 膜和绒毛膜的变化会导致氧向神经视网膜中的视杆和视锥的扩散减少。因此,通过刺激 RPE 细胞中 VEGF 的过表达导致外部视网膜缺氧被认为是 CNV 形成的最重要驱动因素之一^[8]。一旦扰乱了血管生成刺激剂和抑制剂之间的局部平衡,便可能发生 CNV。VEGF 是 CNV 的主要刺激因子,Zhao 等^[9]研究表明 RPE 细胞过度表达

VEGF 可诱导 CNV 的发生,而抑制 RPE 细胞中 VEGF 的表达则抑制新生血管的形成。HIF-1 α 的转录激活可上调 RPE 细胞和一般 RPE 细胞中 VEGF 的表达。因此,它是触发 CNV 形成的中心分子^[10]。因此,HIF 是治疗渗出性 ARMD 的一个有趣的治疗靶点。

Wang 等^[11]发现小鼠 RPE 中的 FTMT 和 HIF-1 α 与年龄相关性是有联系的。他们通过 Western blotting 和免疫荧光法比较了幼龄和老年小鼠 RPE 和脉络膜中 FTMT 蛋白的水平。控制研究进行了评估的特异性 FTMT 抗体。结果显示,与 3mo 大的小鼠相比,使用 RPE 和脉络膜匀浆的 Western 印迹显示 20mo 大的小鼠的 FTMT 和 HIF-1 α 蛋白水平显著升高。免疫组织化学显示,20mo 大小鼠的神经节细胞(ganglion cells, GCS),外神经丛层(outer plexiform layer, OPL)和内部节段(inner segment, IS)主要被 FTMT 染色。在 20mo 时,染色强度增加。特别是,RPE 和外部脉络膜节段被强烈染色。所以,小鼠 RPE 中 FTMT 和 HIF-1 α 水平随着年龄的增长而升高。

与此同时,该实验还证明 FTMT 稳定了 HIF-1 α 并上调了 VEGF 的表达。研究者在人视网膜上皮细胞(ARPE-19 细胞)中过表达 FTMT。Western 印迹结果显示,在正常缺氧条件下,FTMT 过表达的 ARPE-19 细胞中的 HIF-1 α 蛋白水平显著增加。在低氧条件下(1%O₂)HIF-1 α 蛋白水平高于未处理的细胞。FTMT 过表达显著增加了 VEGF 的分泌,而这种增加被 HIF-1 α 修饰因子所消除,表明 FTMT 过表达时 VEGF 的上调是依赖于 HIF-1 α 的^[8]。因此,增高的氧化应激水平影响着 FTMT 在 ARMD 患者中的表达,并且 HIF-1 α 调节 FTMT 来控制 ARMD 的发展。

4 FTMT 基因突变影响 ARMD

胞质铁主要完成了铁在细胞中的储存,是一条 24 亚基(重-h 和轻-l 链)的杂合聚蛋白。有学者发现,哺乳动物的功能性铁蛋白基因有三个,分别是:11 号染色体上 183 个氨基酸编码的胞质重链(h 链);19 号染色体上 175 个氨基酸编码的胞质轻链(l 链)和 5 号染色体上的无内含子基因编码的 FTMT,并表达为前体,在转移到线粒体基质后被加工成成熟蛋白^[7]。

在人类中,FTMT 在睾丸、大脑和视网膜光感受器内表达,FTMT 的表达影响细胞内铁稳态,使铁进入线粒体,FTMT 通过氧化潜在的有毒亚铁并且消耗活性氧(reactive oxygen species, ROS),保护 HeLa 细胞免受氧化损伤^[12]。这些数据表明,FTMT 的主要功能是通过调节线粒体不稳定铁池和 ROS 的产生,以防止氧化损伤^[12],并提示 FTMT 在线粒体中对铁依赖性具有保护作用。FTMT 功能在以细胞铁超载和线粒体衰退引起的铁代谢紊乱为特征的病理中可能特别重要^[13]。最近,在一些 ARMD 患者体内发现 FTMT 的基因突变,而该突变可造成 FTMT 功能的缺失^[14]。

Stefania 等^[4]对一组 ARMD 患者的 FTMT 基因进行了突变扫描,以评估其可能对 ARMD 表型的发病机制或调节的研究贡献。到目前为止,FTMT 基因中的一些杂合取代物已经在与细胞或 FTMT 表达或脑铁水平改变相关的疾病患者中被发现^[15]。他们从一个被发现携带一个之前

从未报道的 FTMT 基因突变的老年白人女性的血液中进行 FTMT 基因的采集及提取,从 EDTA 抗凝血中提取 DNA 中通过变性高效液相色谱和自动测序进行分析,短扩增产生的缺失片段经电泳分离后洗脱,通过神经网络程序对剪接位点进行预测,通过铁蛋白重组、变性复性实验以获得共组装的 24 序列碱基,通过免疫学方法将 FTMT 抗体孵育,进行基因结果的分析。结果显示,50 例意大利 ARMD 患者的 FTMT 基因扫描显示,只有 1 例 ARMD 患者的 FTMT2 基因洗脱谱发生了改变。该突变包括一个 14bp 的缺失和一个 2bp 的插入。研究者评估了变异 FTMT 是否会通过干扰野生型 FTMT 的组装而产生主导的负面影响。并进行了变性-再变性实验,将恒定量的变性野生型 FTMT 与不同量的变性变体混合并再变性。通过蛋白质带密度定量分析发现,不断增加的变异亚基并不影响野生型 FTMT 的重新折叠特性。因此,该变体的显性负面效应的缺失使得野生型 FTMT 的正确组装成为可能。这些结果表明,突变可能导致 FTMT 的功能改变,而该功能改变可能是 ARMD 的病因之一。

因此,可以假设铁蛋白基因的野生型等位基因的存在可能足以补偿功能蛋白的量。然而,在视网膜这个特别暴露于氧化应激的组织中,FTMT 的减少可能增强了线粒体对铁介导的氧化损伤,从长远来看可能与 ARMD 病理的发展有关。因此,该患者的 FTMT 基因突变的发现,不仅为临床治疗提供新的思路,它们还为探索 ARMD 的发展机制提供了新的线索,并可能成为研究结构-功能关系和阐明相应蛋白中尚不明确的功能的有趣实验试剂。

5 FTMT 保护 ARMD 免受氧化应激

在 ARMD 中,铁可能作为自由基损伤的来源发挥作用。对于许多参与细胞代谢的许多蛋白质和酶来说(包括氧气运输、呼吸链电子转移、DNA 合成和膜生物发生),铁是一种必要的辅助因子。在视网膜中,铁被脂肪酸去饱和酶所利用,该酶参与膜的生物发生。RPE 和神经视网膜脉管系统是参与铁运输的独立血液视网膜屏障。循环铁转铁蛋白复合物结合细胞表面转铁蛋白受体(transferrin receptor, TFR),铁被吸收到细胞中,然后通过血-视网膜屏障转运到视网膜^[16-17]。在与年龄有关的眼疾研究中,一项大型的多中心,随机对照的临床试验发现,饮食中添加抗氧化剂和锌可显著降低进展为晚期 ARMD 的进程。尽管研究表明 ARMD 的发病机制可能与氧化应激相关,但是自由基的来源还需进一步研究^[18]。

Gao 等^[19]实验证明 FTMT 的水平不会因外源性铁而升高。但是当转染增加时,FTMT 保留了高比例的铁,细胞显示出缺铁的迹象。所以研究者得出结论:铁对 FTMT 的潜在易得性与对胞质铁蛋白的易得性相同,而对 FTMT 水平的控制可能为调节细胞铁稳态提供了一种强有力的方法。所以 FTMT 被证明可以显著调节细胞铁代谢,进而进一步影响着 ARMD 的发生与发展。FTMT 保护线粒体免受氧化损伤的研究已经在其他疾病中取得了一些成就。FTMT 过表达可以保护 6-羟多巴胺诱导的多巴胺能损伤,可能在帕金森病中发挥重要的神经保护作用。Shi 等^[20]发现了 FTMT 对过氧化氢诱导的神经元细胞损伤的作用,

FTMT 的过表达显著保护了神经母细胞瘤免受过氧化氢诱导的凋亡,这是由于 FTMT 对细胞内 ROS 的增加和 MMP 的降低的限制作用,从而保护了细胞免受氧化应激介导的细胞凋亡。

对于 FTMT 保护线粒体免受氧化应激与 ARMD 相关的研究中,我们发现 FTMT 的抗氧化应激作用可能是由于铁离子的调节以及通过芬顿反应减少超氧自由基的产物所致,从而减少氧化应激的损害。最近,研究了一些 FTMT 基因被敲除的小鼠,但是,关于视网膜中缺乏 FTMT 的影响还需进一步研究。

6 小结

ARMD 是一种复杂的多因素疾病,具有人口、环境和遗传方面的危险因素;然而,即使近年来进行了大量的研究,其发病机制仍大部分未知。对于 FTMT 的研究,从分子生物学的角度探究 FTMT 在 RPE 细胞的蛋白质功能,阐释其在 ARMD 发病和疾病进展中的作用。借此增进对该疾病的病理生理机制的认识,以求更有效的治疗 ARMD 的方法。FTMT 作为一种储存性铁蛋白,目前的研究主要集中在神经功能退行性疾病中,对于眼科相关研究处于起步阶段。现今以及未来的研究将从根本上回归疾病的本质,寻求疾病的致病原因,以期从根本上找到治疗和干预 ARMD 发生的靶点。尽管目前对于 ARMD 与 FTMT 关系的研究较少,但是它已经展示出了广阔的应用前景。我们希望未来能够探索出更多的发展机制,为预防甚至降低 ARMD 的发生率做出更大的贡献。

参考文献

- 1 Li JQ, Welchowski T, Schmid M, *et al.* Prevalence and incidence of age-related macular degeneration in Europe: a systematic review and meta-analysis. *Br J Ophthalmol* 2020;104(8):1077-1084
- 2 Yang H, Yang M, Guan H, *et al.* Mitochondrial ferritin in neurodegenerative diseases. *Neurosci Res* 2013;77(1-2):1-7
- 3 Hahn P, Dentchev T, Qian Y, *et al.* Immunolocalization and regulation of iron handling proteins ferritin and ferroportin in the retina. *Mol Vis* 2004;10:598-607
- 4 Stenirri S, Santambrogio P, Setaccioli M, *et al.* Study of FTMT and ABCA4 genes in a patient affected by age-related macular degeneration: identification and analysis of new mutations. *Clin Chem Lab Med* 2012;50(6):1021-1029
- 5 Jin G, Zou M, Chen A, *et al.* Prevalence of age-related macular degeneration in Chinese populations worldwide: A systematic review and meta-analysis. *Clin Exp Ophthalmol* 2019;47(8):1019-1027
- 6 Newman AM, Gallo NB, Hancox LS, *et al.* Systems-level analysis of age-related macular degeneration reveals global biomarkers and phenotype-specific functional networks. *Genome Med* 2012;4(2):16
- 7 Levi S, Arosio P. Mitochondrial ferritin. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36(10):1887-1889
- 8 Arjamaa O, Nikinmaa M, Salminen A, *et al.* Regulatory role of HIF-1alpha in the pathogenesis of age-related macular degeneration (AMD). *Ageing Res Rev* 2009;8(4):349-358
- 9 Zhao W, Wang YS, Hui YN, *et al.* Inhibition of proliferation, migration and tube formation of choroidal microvascular endothelial cells by targeting HIF-1alpha with short hairpin RNA-expressing plasmid DNA in human RPE cells in a coculture system. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2008;24(6):1413-1422

- 10 Martin G, Schlunck G, Hansen LL, *et al.* Differential expression of angioregulatory factors in normal and CNV - derived human retinal pigment epithelium. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2004; 242(4): 321-326
- 11 Wang X, Yang H, Yanagisawa D, *et al.* Mitochondrial ferritin affects mitochondria by stabilizing HIF - 1 α in retinal pigment epithelium; implications for the pathophysiology of age-related macular degeneration. *Neurobiol Aging* 2016; 47:168-179
- 12 Campanella A, Rovelli E, Santambrogio P, *et al.* Mitochondrial ferritin limits oxidative damage regulating mitochondrial iron availability; hypothesis for a protective role in Friedreich ataxia. *Hum Mol Genet* 2009; 18(1):1-11
- 13 Campanella A, Isaya G, O'Neill HA, *et al.* The expression of human mitochondrial ferritin rescues respiratory function in frataxin - deficient yeast. *Hum Mol Genet* 2004; 13(19):2279-2288
- 14 Bartnikas TB, Campagna DR, Antiochos B, *et al.* Characterization of mitochondrial ferritin - deficient mice. *Am J Hematol* 2010; 85(12): 958-960
- 15 Castiglioni E, Finazzi D, Goldwurm S, *et al.* Sequence variations in mitochondrial ferritin; distribution in healthy controls and different types of patients. *Genet Test Mol Biomarkers* 2010; 14(6):793-796
- 16 Zarbin MA. Current concepts in the pathogenesis of age - related macular degeneration. *Arch Ophthalmol* 2004; 122(4):598-614
- 17 Beatty S, Koh H, Phil M, *et al.* The role of oxidative stress in the pathogenesis of age - related macular degeneration. *Surv Ophthalmol* 2000; 45(2):115-134
- 18 Age - Related Eye Disease Study Research Group. A randomized, placebo - controlled, clinical trial of high - dose supplementation with vitamins C and E, beta carotene, and zinc for age - related macular degeneration and vision loss: AREDS report no. 8. *Arch Ophthalmol* 2001; 119(10):1417-1436
- 19 Gao G, Zhang N, Wang YQ, *et al.* Mitochondrial Ferritin Protects Hydrogen Peroxide - Induced Neuronal Cell Damage. *Aging Dis* 2017; 8(4):458-470
- 20 Shi ZH, Nie G, Duan XL, *et al.* Neuroprotective mechanism of mitochondrial ferritin on 6-hydroxydopamine - induced dopaminergic cell damage; implication for neuroprotection in Parkinson's disease. *Antioxid Redox Signal* 2010; 13(6):783-796