

## \* 学术论文 \*

促红细胞生成素对大鼠机体铁状态及  
腹腔巨噬细胞铁代谢的影响\*

孔卫娜 段相林 常彦忠\*\*

河北师范大学, 动物生理生化河北省重点实验室, 生命科学学院铁代谢分子生物学研究室, 石家庄 050016

**摘要** 网状内皮系统(reticuloendothelial system, RES)在维持机体铁稳态方面起着重要作用, 但其调控机制尚不十分清楚. 通过皮下注射重组人促红细胞生成素(recombinant human erythropoietin, rHuEPO)引起大鼠红细胞的生成显著增加, 改变了血清转铁蛋白饱和度以及机体铁储存状态. 利用 RT-PCR 及 Western blot 检测发现腹腔巨噬细胞二价金属离子转运蛋白(duodenal divalent metal transporter 1, DMT1)的表达显著下降, 膜铁转运蛋白 1(ferroportin 1, FPN1)的表达显著上升. 同时采用  $^{55}\text{Fe}$  同位素标记示踪法显示腹腔巨噬细胞的铁摄取减少, 铁释放量显著增加. 研究结果表明在红细胞生成过程中, 巨噬细胞摄铁的降低, 可能是由于 DMT1 表达减少所致, 巨噬细胞铁释放的增加, 可能是由于 FPN1 表达上升引起, 肝脏 hepcidin 在这一调控过程中可能起着重要作用.

**关键词** 促红细胞生成素 巨噬细胞 DMT1 FPN1 hepcidin

铁是人体内含量最丰富的必需微量元素. 许多重要的生命过程均有铁的参与. 铁缺乏或铁超载都会对机体产生严重的伤害. 因此, 机体铁代谢平衡是众多生理过程的保证. 网状内皮系统是维持机体铁稳态的重要部位, 但其调控机制尚不十分清楚<sup>[1]</sup>.

以往的研究显示巨噬细胞通过吞噬衰老的红细胞而获得铁, 也可以由细胞表面的转铁蛋白受体 1(transferrin receptor 1, TfR 1)通过受体介导的途径获取铁. 近年来人们又发现了一个新的哺乳动物跨膜铁转运体——二价金属离子转运蛋白(divalent metal transporter 1, DMT1, 又称为 DCT1/Nramp2)<sup>[2]</sup>参与细胞的铁摄取. 人的 DMT1 存在两种形式, 一种 DMT1 mRNA 3'末端非翻译区(un-

translated region, UTR)含有一个典型的铁调节蛋白(iron-regulatory protein, IRP)的结合域——铁反应元件(iron-responsive element, IRE), 称为“+IRE”型 DMT1, “-IRE”型则不含此元件. DMT1 在机体各组织广泛分布, 分布于十二指肠绒毛刷状缘的 DMT1, 在十二指肠的铁摄取中起着重要的作用<sup>[3]</sup>. 在巨噬细胞中, DMT1 定位于吞噬小体和溶酶体膜上, 可将吞噬小体内游离的  $\text{Fe}^{2+}$  转运至胞浆<sup>[4]</sup>. 研究又发现 LPS(lipopolysaccharide)或 IFN- $\gamma$ (Interferon-gamma)和 LPS 联合使用均可以使巨噬细胞株 RAW264.7, J774 和鼠的腹腔巨噬细胞 DMT1 mRNA 的表达产生变化, 并促进了  $^{59}\text{Fe}$ -nitrilotriacetic acid 的摄取<sup>[5]</sup>. 但 J774 细胞吞噬完红细胞后, DMT1 的水平并没有显著变化<sup>[6]</sup>. 这些

2006-11-01 收稿, 2006-12-07 收修改稿

\* 国家自然科学基金(批准号: 30570957)、河北省自然科学基金(批准号: C2006000155)和河北师范大学科研基金(批准号: L2003B15)资助项目

\*\* 通信作者, E-mail: chang7676@163.com

结果提示 DMT1 在巨噬细胞的铁摄取方面可能起着一定的作用。

膜铁转运蛋白(ferroportin 1, FPN1, 又称为 IREG1/ MTP1) 是一种跨膜的铁输出蛋白<sup>[7]</sup>。FPN1 广泛分布于机体各组织中, 在网状内皮系统(脾的巨噬细胞、肝的枯否氏细胞以及巨核细胞) FPN1 表达也很丰富。研究表明巨噬细胞在吞噬红细胞之后, FPN1 的表达在短时间内就会显著地增加。过表达 FPN1 的巨噬细胞株 J774 细胞, 吞噬<sup>59</sup>Fe 标记的红细胞后, 铁释放量比对照多出 70%<sup>[6, 8]</sup>。FPN1 主要表达于巨噬细胞的细胞质内, 而高铁或吞噬红细胞后, FPN1 在细胞膜上的表达增加得尤为显著<sup>[9]</sup>。这些都说明 FPN1 在巨噬细胞吞噬红细胞后铁的释放过程中起着重要的作用。而 FPN1 基因突变引起遗传性血色沉着症(hereditary hemochromatosis, HH), 造成巨噬细胞储铁增加, 铁释放减少, 循环铁降低<sup>[10]</sup>。

Hepcidin 是肝脏分泌的富含半胱氨酸的抗菌多肽, 在铁代谢方面主要的生物学功能为抑制肠道铁吸收和抑制单核巨噬细胞系统铁释放<sup>[11]</sup>。Hepcidin 高表达可能是多种贫血包括炎症和慢性疾病性贫血的根本原因, 而 hepcidin 基因发生突变, 可引起严重的青少年血色沉着病(juvenile hemochromatosis, JHH)<sup>[12, 13]</sup>。

为了研究机体铁状态改变, 对巨噬细胞铁代谢产生的影响和机制, 我们利用腹腔注射重组人促红细胞生成素(recombinant human erythropoietin, rHuEPO)<sup>[14]</sup>进而检测血常规, 血清铁及机体铁储存的变化, 采用<sup>55</sup>Fe 同位素标记示踪法检测巨噬细胞铁吸收和铁释放的改变, 并在 mRNA 及蛋白水平观察巨噬细胞的铁转运相关蛋白 DMT1 及 FPN1 的表达变化, 分析了巨噬细胞铁调控的机制, 为深入了解铁代谢过程以及为铁相关疾病的临床治疗提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物处理

本实验选用 250 g 雄性 SD(Sprague-Dawley)大鼠(购自河北医科大学实验动物中心), 随机平分两组: 对照组(control group, CG), 皮下注射

0.9%生理盐水; 实验组(EPO group, EG), 皮下注射 rHuEPO(2000 IU/kg), 连续注射 3 d, 最后一次注射 24 h 后取材。取适量血用于红细胞数量、血红蛋白含量、红细胞压积等血常规测定( $\text{Na}_2\text{EDTA}$  作为抗凝剂), 取血清用于检测转铁蛋白饱和度。取腹腔巨噬细胞用于摄铁、放铁以及 RT-PCR、Western blot 实验。0.9%的生理盐水灌流后, 取肝脏、脾、骨髓、心脏、肾脏和肌肉进行组织非血红素铁含量的测量以及提取肝脏总 RNA 用于 RT-PCR。

### 1.2 大鼠腹腔巨噬细胞的提取

用 75%乙醇浸湿已昏迷的大鼠全身, 仰卧放置于超净台内, 切开腹部皮肤以完全暴露腹壁, 用注射器先将预冷至 4℃的 1640 培养液注入腹腔, 按揉腹壁 3 min, 促使巨噬细胞从腹腔的浆膜表面释放。另取一支注射器, 从腹部右侧进针吸取腹腔液入离心管, 2500 r/min 离心 10 min 后, 将沉淀加入含 10%胎牛血清的 1640 培养液, 混匀后接种到培养皿中, 放入 37℃, 5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 2—3 h。轻摇培养皿, 倾弃瓶中液体, 用 PBS 液清洗 3 次, 除去未贴壁的细胞, 巨噬细胞的纯度可达 95%。

### 1.3 血常规测定

红细胞计数(red blood cell, RBC): 将抗凝血稀释 200 倍, 采用血球计数板常规计数。

红细胞压积(hematocrit, HCT): 将抗凝血吸入毛细管内, 3000 r/min 离心 30 min, 红细胞层高度占红细胞层和血清层的总高度的比例即为 HCT, 数值用%表示。

血红蛋白(hemoglobin, Hb)含量: 采用氰化高铁血红蛋白试剂进行测定(购于上海伊华医学科技有限公司)。利用血红蛋白被铁氰化钾氧化成高铁血红蛋白, 再与氰离子结合成氰化高铁血红蛋白 HiCN, 在波长 540 nm 测定吸光度。在常规测定前用 HiCN 标准液制备标准曲线。

### 1.4 转铁蛋白饱和度的测定

将取得的非抗凝血静置后离心, 取血清。采用 Iron and iron-binding Capacity 试剂盒(565-B, Sigma Diagnostics, USA)测定血清铁(serum iron, SI)的浓度, 血清未饱和铁结合力(serum unsaturat-

ed iron-binding capacity, UIBC), UIBC 与 SI 之和为血清总铁结合力 (total iron binding capacity, TIBC), SI 与 TIBC 的比值代表转铁蛋白饱和度 (transferrin saturation, TS).

### 1.5 组织非血红素铁含量的测定

将新鲜组织 110℃ 烘烤 4 h. 称取 0.1—0.2 g 组织, 碾碎称重后加入 12.5 倍体积的混合酸, 空白与实验管置 65℃ 烘箱内 20 h. 冷却到室温, 取 0.025 mL 上清液 (12000 g, 离心 10 min) 加 1.25 mL 显色液 (bathophemathroline reagent: 饱和醋酸钠: 水 = 1: 20: 20), 反应 10 min 后, 540 nm 对空白比色. 用标准铁配置浓度梯度用于绘制标准曲线. 具体步骤参照文献 [15].

### 1.6 大鼠腹腔巨噬细胞非转铁蛋白铁吸收及铁释放的测定

非转铁蛋白铁吸收的测定: 在 1000 μL 蔗糖孵育液 (pH 6.5) 中加入 16 μL 含铁量为 62.5 μmol/L 的铁贮存液 (其中 FeSO<sub>4</sub>: <sup>55</sup>FeCl<sub>3</sub> 为 10: 1, <sup>55</sup>FeCl<sub>3</sub> 购自 Perkin Elmer 公司), 使铁的终浓度为 1 μmol/L, 37℃ 下孵育腹腔巨噬细胞 30 min. 用冷 PBS 洗 3 次, 加入 500 μL 1% SDS 室温作用 10 min, 300 μL 加入到 2 mL 闪烁液 (17.5 mL 乙二醇 + 70 mL 无水乙醇 + 287.5 mL 二甲苯 + 125 mL Triton X-100 + 1.5 g PPO + 0.1 g POPOP) 中, 液体闪烁计数器 (liquid scintillation analyzer, Cambewa Company) 测定. 剩下的 200 μL 用于测定蛋白含量 (Lowry 法).

非转铁蛋白铁释放的测定: 同样在 1000 μL 蔗

糖孵育液中加入 16 μL 铁贮存液, 37℃ 下孵育 30 min. 用冷 PBS 洗 3 次, 再加入 1000 μL PBS 37℃ 孵育 30 min. 取 300 μL PBS 加入到 2 mL 闪烁液中进行液闪测定, 弃剩余 PBS. 再用 PBS 洗培养皿 3 次, 加入 500 μL 1% SDS 室温作用 10 min, 取 300 μL 加入到 2 mL 闪烁液中进行液闪测定, 剩下的 200 μL 用于测定蛋白含量. 具体步骤参照文献 [16].

### 1.7 大鼠腹腔巨噬细胞 DMT1、FPN1 以及肝脏 hepcidin mRNA 水平的测定

加 1 mL Trizol Reagent (Invitrogen (Carlabad, CA), USA) 于适量腹腔巨噬细胞或肝组织中 (肝组织需匀浆器匀浆). 再加入 0.2 mL 氯仿并上下摇动, 使核蛋白复合物彻底分离. 4℃ 12000g 离心 15 min 后, 加 0.5 mL 异丙醇于上清液中, 并上下摇动使 RNA 沉淀下来. 用 0.5 mL 75% 乙醇洗涤 RNA 沉淀 2 次, 晾干后用 nuclease free water 溶解 RNA, 并测定 RNA 浓度. 用反转录试剂盒 (购于 Promega, USA) 进行反转录, PCR (reverse transcriptase-polymerase chain reaction) 采用 TaKaRa Taq DNA Polymerase Kit, Chemiluminescence Imaging system (Ω MEGA12ic, USA) 凝胶成像系统扫描图像, 用软件 (Gel-Pro Analyzer analysis software, MEDIA CYBERNETICS, USA) 进行统计分析, β-actin 作为内对照. DMT1, FPN1, hepcidin, β-actin 的引物设计参照文献 [17—19], 由上海生工生物工程公司合成.

基因	引物	5'→3'	位置	大小/bp	序列号
β-actin	上游引物	GGTCACCCACACTGTGCCATCTA	2268—2291	263	V01217
	下游引物	GACCGTCAGGCAGCTCACATAGCTCT	2507—2530		
DMT1	上游引物	TATCTAGATGACCAACAGCC	1697—1716	335	AF029757
	下游引物	ATCTTACCCAAACTGGCAGC	2012—2031		
DMT1	上游引物	CTGAGCGAAGATACCAGCG	1755—1773	838	AF008439
	下游引物	GGAGCCATCACTTGACCACAC	2572—2592		
FPN1	上游引物	AATGGGAACCTGTGGCCTTCA	1298—1317	436	AF394785
	下游引物	AGTTCATGGAGTTCTGCACAC	1714—1733		
Hepcidin	上游引物	CAAGATGGCACTAAGCACTCG	21—41	337	AF344185
	下游引物	AATAAGGA CAGGATGGGGTTCG	337—357		

## 1.8 大鼠腹腔巨噬细胞 DMT1、FPN1 蛋白表达的测定

在腹腔巨噬细胞中加入适量裂解液(裂解液配制: 1 mL TBS 中加入 10  $\mu$ L NP-40, 1  $\mu$ L 1 mg/mL Pepstatin, 1  $\mu$ L 1 mg/mL Leupeptin, 1  $\mu$ L 1 mg/mL Aprotinin, 5  $\mu$ L 20 mg/mL PMSF), 冰浴超声破碎, 离心(4 $^{\circ}$ C, 12000g, 20 min)取上清于-70 $^{\circ}$ C 保存. Bradford 法测定蛋白浓度. 电泳、转膜及免疫印迹的具体步骤参照文献[19]. 利用化学发光法检测蛋白条带亮度, 用 Chemiluminescence Imaging System 扫描图像, 用软件 Gel-Pro Analyzer analysis software 进行分析, 相关各条带与  $\beta$ -actin 的比值进行统计.

## 1.9 数据分析

所得数据采用 SPSS11.0 进行独立样本 *t* 检验.  $p < 0.05$  为差异具有显著性,  $p < 0.01$  为差异具有高度显著性.

## 2 结果

### 2.1 注射 rHuEPO 对大鼠血常规及血清铁状态的影响(表 1)

结果显示, 注射 rHuEPO 后大鼠红细胞数量(RBC)、血红蛋白含量(Hb)、红细胞压积(HCT)与对照组相比均显著上升( $p < 0.01$ ), 这说明本实验选定的剂量及作用时间已经显著地刺激了大鼠红细胞的合成, 同时也反映出了机体对铁利用程度的增加.

表 1 大鼠血常规及血清铁状态的测定<sup>a)</sup>

	RBC/ ( $10^6 \cdot \text{mm}^{-3}$ )	Hb/( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )	HCT/%	
CG	7.85 $\pm$ 0.34	142.30 $\pm$ 6.46	44.19 $\pm$ 1.48	
EG	9.08 $\pm$ 0.64**	161.09 $\pm$ 10.67**	54.23 $\pm$ 2.52**	
	SI/ ( $\mu\text{g} \cdot \text{dL}^{-1}$ )	UIBC/ ( $\mu\text{g} \cdot \text{dL}^{-1}$ )	TIBC/ ( $\mu\text{g} \cdot \text{dL}^{-1}$ )	TS/%
CG	169.21 $\pm$ 26.65	236.87 $\pm$ 63.92	406.08 $\pm$ 48.03	42.55 $\pm$ 10.55
EG	69.44 $\pm$ 23.32**	403.80 $\pm$ 23.18**	473.25 $\pm$ 29.38*	14.57 $\pm$ 4.34**

a) CG(对照组), EG(实验组),  $\bar{x} \pm SD$ ,  $n=6$ , 对照组与 rHuEPO 注射组间差异, \*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$

注射 rHuEPO 后, 大鼠血清铁(SI)水平显著降低( $p < 0.01$ ), 血清未饱和铁结合力(UIBC)显著升高( $p < 0.01$ ), 转铁蛋白饱和度(TS)显著降低( $p < 0.01$ ), 血清总铁结合力(TIBC)显著升高( $p < 0.05$ ). 这说明已经铁饱和的转铁蛋白(transferrin, Tf)的百分比降低, 血液运载的铁量减少.

### 2.2 注射 rHuEPO 对大鼠不同组织器官非血红素铁含量的影响(表 2)

注射 rHuEPO 后大鼠肝脏、脾、骨髓的非血红素铁含量均显著降低( $p < 0.01$ ). 而心脏、肌肉、肾的非血红素铁含量与对照组相比没有显著性差异( $p > 0.05$ ). 由此可以看出, 注射 rHuEPO 在促进红细胞大量生成的同时造成了储铁器官铁贮存量的显著下降. 而在贮铁器官铁耗竭之前, 心脏、肌肉、肾这些器官的铁含量还不会受到明显影响.

表 2 大鼠肝脏、骨髓、脾、心脏、肌肉、肾非血红素铁含量的测定<sup>a)</sup>

	肝/ ( $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 干重)	脾/ ( $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 干重)	骨髓/ ( $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 干重)	腹腔巨噬细胞/ ( $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 湿重)
CG	295.16 $\pm$ 38.56	581.49 $\pm$ 108.51	378.50 $\pm$ 63.90	50.23 $\pm$ 8.10
EG	176.39 $\pm$ 24.34**	338.66 $\pm$ 42.22**	195.64 $\pm$ 33.18**	33.16 $\pm$ 5.78**
	心肌/ ( $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 干重)	肾/ ( $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 干重)	腓肠肌/ ( $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 干重)	
CG	208.14 $\pm$ 23.08	88.23 $\pm$ 18.31	52.33 $\pm$ 5.19	
EG	215.19 $\pm$ 16.24	79.28 $\pm$ 13.65	51.74 $\pm$ 2.88	

a) CG(对照组), EG(实验组),  $\bar{x} \pm SD$ ,  $n=6$ , 对照组与 rHuEPO 注射组间差异, \*\*  $p < 0.01$

### 2.3 注射 rHuEPO 对大鼠腹腔巨噬细胞非转铁蛋白铁吸收及铁释放的影响(图 1)

用 1  $\mu\text{mol/L}$  的铁溶液在 37 $^{\circ}$ C 孵育腹腔巨噬细胞 30 min,  $^{55}\text{Fe}$  进行同位素标记示踪; 液体闪烁计数器测定结果显示, 注射 rHuEPO 组铁摄取量达到 (1.86  $\pm$  0.40) pmol /g 蛋白, 显著低于对照组 (5.21  $\pm$  1.43) pmol /g 蛋白 ( $n=6$ ,  $p < 0.01$ ). 虽然 rHuEPO 注射组的腹腔巨噬细胞对铁的摄取量减少了, 但对铁的释放量却有所升高, 达到 (31.72  $\pm$  1.31)% (对照组: (27.75  $\pm$  2.82)%,  $n=6$ ,  $p < 0.05$ ).

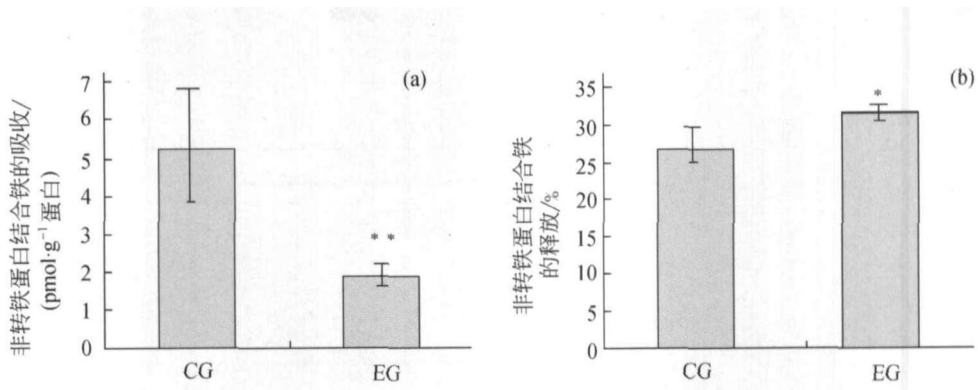


图1 注射 rHuEPO 后, 大鼠腹腔巨噬细胞非转铁蛋白铁吸收以及铁释放的变化

(a) 注射 rHuEPO 对大鼠腹腔巨噬细胞非转铁蛋白铁吸收的影响; (b) 注射 rHuEPO 对大鼠腹腔巨噬细胞非转铁蛋白铁释放的影响. CG(对照组), EG(实验组),  $\bar{x} \pm SD$ ,  $n=6$ , 对照组与 rHuEPO 注射组间差异, \*\*  $p < 0.01$

#### 2.4 注射 rHuEPO 对大鼠腹腔巨噬细胞 DMT1, FPN1 mRNA 及蛋白的影响

RT-PCR 检测大鼠腹腔巨噬细胞 DMT1, FPN1 mRNA 的变化, 1.5% 琼脂糖凝胶, 100 V 电泳, EB 染色. 注射 rHuEPO 后, 大鼠腹腔巨噬细胞 DMT1(+IRE) mRNA 的水平显著降低(图2(a),

$n=5$ ,  $p < 0.05$ ), DMT1(-IRE) mRNA 无显著变化(图 2(b),  $n=5$ ,  $p > 0.05$ ), FPN1 mRNA 的水平比对照组显著增加(图 2(c),  $n=5$ ,  $p < 0.01$ ). Western blot 检测大鼠腹腔巨噬细胞 DMT1, FPN1 蛋白的表达, 结果显示蛋白的表达变化与 mRNA 具有相同的趋势(图 3).

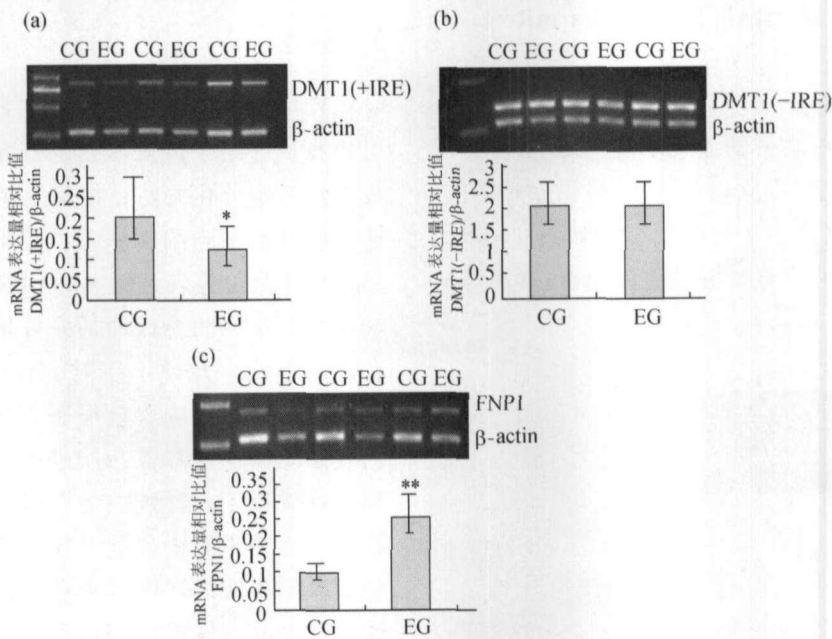


图2 注射 rHuEPO 后, 腹腔巨噬细胞 DMT1, FPN1 mRNA 的变化

(a) 注射 rHuEPO 对腹腔巨噬细胞 DMT1(+IRE)mRNA 的影响; (b) 注射 rHuEPO 对腹腔巨噬细胞 DMT1(-IRE)mRNA 的影响; (c) 注射 rHuEPO 对腹腔巨噬细胞 FPN1 mRNA 的影响. CG(对照组), EG(实验组),  $\bar{x} \pm SD$ ,  $n=5$ , 对照组与 rHuEPO 注射组间差异, \*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$

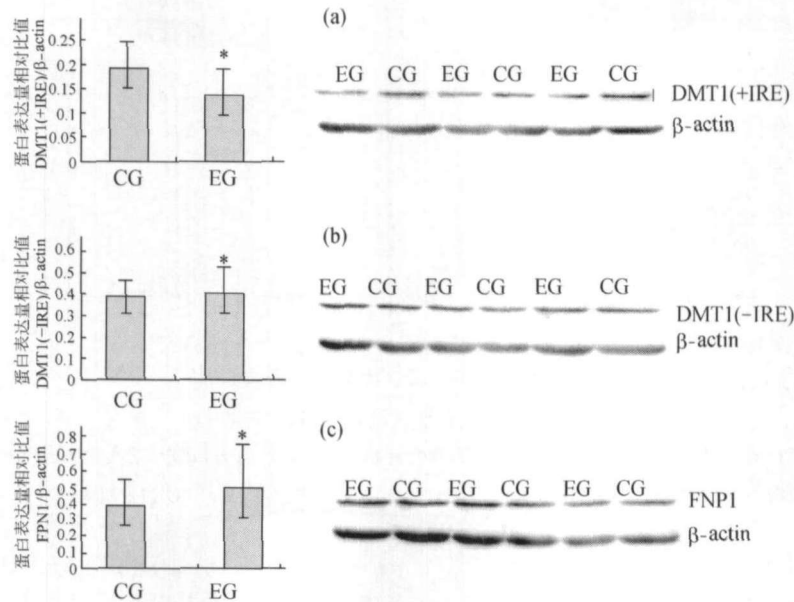


图3 注射 rHuEPO 后, 腹腔巨噬细胞 DMT1, FPN1 蛋白的表达变化

(a) 注射 rHuEPO 对腹腔巨噬细胞 DMT1(+IRE) 蛋白的影响; (b) 注射 rHuEPO 对腹腔巨噬细胞 DMT1(-IRE) 蛋白的影响; (c) 注射 rHuEPO 对腹腔巨噬细胞 FPN1 蛋白的影响. 各蛋白的分子质量分别为 DMT1~56 ku, FPN1~60 ku,  $\beta$ -actin~42 ku. CG(对照组), EG(实验组),  $\bar{x} \pm SD$ ,  $n=6$ , 对照组与 rHuEPO 注射组间差异, \*  $p < 0.05$

## 2.5 注射 rHuEPO 对大鼠肝脏 hepcidin mRNA 水平的影响(图4)

RT-PCR 结果显示, 注射 rHuEPO 造成了大鼠肝脏 hepcidin mRNA 水平的显著下降(如图4(b)). 用 hepcidin 的积分光密度除以  $\beta$ -actin 的积分光密度所得的比值进行独立样本  $t$  检验, 结果如图4(a)所示, 注射 rHuEPO 组与对照组相比 hepcidin mRNA 的水平下降了约 76.36% ( $p < 0.01$ ).

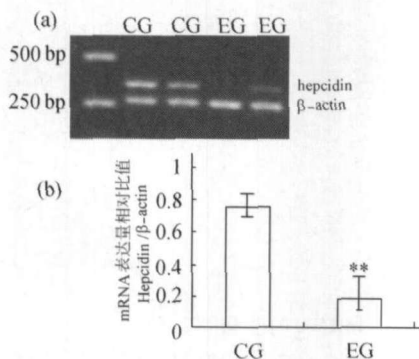


图4 注射 rHuEPO 后, 大鼠肝脏 hepcidin mRNA 的变化

CG(对照组), EG(实验组), 对照组与 rHuEPO

注射组间差异, \*\*  $p < 0.01$

## 3 讨论

EPO 在红细胞发生过程中起着重要作用. EPO 可以直接作用于造血器官的红系祖细胞, 促进其向成熟红细胞分化并防止细胞发生凋亡. EPO 还可以使骨髓幼红细胞的转铁蛋白受体(transferrin receptor 1, TfR1)的表达增多, 细胞摄铁能力增强, 红细胞血红蛋白的合成增加, 并造成血清转铁蛋白饱和度的降低. 此外, 注射 rHuEPO 后, 肝脏、脾、骨髓非血红素铁的含量显著下降, 说明肝脏及网状内皮系统储铁量降低, 铁进行了重新分配, 从贮存部位释放用于血红蛋白的合成, 造成机体处于低铁状态. 骨髓中的铁含量下降还说明血红蛋白合成部位的铁同样缺乏, 铁需求还在增加. 但在贮铁器官铁耗竭之前, 低铁状态还没有对心脏、肌肉、肾的非血红素铁含量产生显著的影响.

由以上结果可以看出, 注射 rHuEPO 促使大鼠的机体处于低铁状态, 表现为血清铁及储存铁的降低. 在这种低铁状态下, 红细胞生成依然呈增高趋势, 铁需求的增加势必会促使贮铁器官(如巨噬细胞)铁吸收的降低和铁释放量的增加. 研究结果证

实了我们上述的推测,注射 rHuEPO 后,大鼠腹腔巨噬细胞 DMT1(+IRE)的表达显著降低,对非转铁蛋白结合铁的摄取量也相应减少;FPN1 的表达显著增强,对铁的释放量也显著增多.这就促使巨噬细胞本身的铁储存量减少,铁转运相关蛋白 DMT1(+IRE)和 FPN1 可能起着关键作用.

那么, rHuEPO 诱导的机体低铁状态又是通过什么机制引起腹腔巨噬细胞 DMT1(+IRE)蛋白表达的减少和 FPN1 蛋白表达的增加呢? Heparin 作为铁调节激素,可溶于血液并在组织器官例如肝脏、小肠、网织红细胞和网状内皮系统之间传递有关铁调节的信号,抑制肠道铁吸收和单核巨噬细胞系统铁的释放<sup>[11]</sup>. 研究发现放射性标记的 hepcidin 积聚于 FPN1 大量表达的器官,如肝脏、脾和十二指肠<sup>[20]</sup>. Heparin 缺陷小鼠肝脏枯否氏细胞 FPN1 的表达显著上升<sup>[21]</sup>. 用 hepcidin 孵育 J774 细胞,细胞吞噬 <sup>59</sup>Fe 标记的红细胞后, <sup>59</sup>Fe 的释放量显著降低<sup>[8]</sup>. 进一步的研究显示, hepcidin 可与体外培养的细胞的 FPN1 结合,结合后 FPN1 会内化并降解,减少细胞内铁的输出<sup>[22,23]</sup>. 这些实验都间接或直接地证实了 hepcidin 与 FPN1 之间的直接作用. 我们的结果与以上的研究结果相一致. 在本实验中,我们应用 RT-PCR 技术检测到注射 rHuEPO 可以显著抑制肝脏 hepcidin mRNA 的水平,同时腹腔巨噬细胞 FPN1 蛋白的水平显著高于对照组,细胞铁释放量增加. 此外,细胞内铁水平的改变也可以直接调节 FPN1 的表达. 在 J774 细胞中,高铁使 FPN1 的水平增加,铁缺乏使 FPN1 的水平下降<sup>[6]</sup>. 但是在本实验中,尽管注射 rHuEPO 后血清铁和腹腔巨噬细胞内的非血红素铁含量均显著降低, FPN1 的表达量依然上升. 这其中的机制还不是十分清楚,也许细胞品系的不同会产生不同的结果,或者在本实验中 hepcidin 下降对 FPN1 的上调作用超出了细胞内铁缺乏对 FPN1 的下调作用.

那么, DMT1 是否受 hepcidin 的直接调控呢? 以往的研究显示,用 hepcidin 孵育人的结肠癌细胞系 Caco-2 细胞, DMT1(+IRE)的 mRNA 及蛋白水平均显著下降,铁摄取量也相应下调<sup>[24]</sup>. 在本实验中 hepcidin 的水平显著下降,但 DMT1(+IRE)的表达也有所下降. 产生这种相反现象的原因还不知道,也许在不同的细胞中 hepcidin 对 DMT1 的作用

不同,或者在离体的细胞实验药物是否处于正常的生理水平、 hepcidin 的生物活性有无变化等方面都与动物的在体实验有所差异,又或者是其他因素调节了 DMT1 的表达,因而造成了不同的结果. 但是尽管注射 rHuEPO 使 hepcidin mRNA 的水平发生了变化,我们还不能确定它对腹腔巨噬细胞 DMT1 的表达有直接的调控作用. 此外, DMT1 的表达还直接受铁的调控,并具有细胞特异性. 据推断在十二指肠上皮细胞,细胞内铁水平主要通过 IRE 和 IRP 介导的转录后水平的调控来调节 DMT1(+IRE)的表达,对“-IRE”型 DMT1 没有作用<sup>[25]</sup>. 但是在 RAW264.7 细胞,铁螯合剂(desferrioxamine, DFO)虽然使 TfR1 mRNA 的水平显著升高,却不影响 DMT1 mRNA 的水平;铁剂(ferric ammonium citrate, FAC)促使 TfR1 mRNA 的表达显著降低,却造成 DMT1 mRNA 水平的显著升高<sup>[5]</sup>. 在本实验中,注射 rHuEPO 后,大鼠腹腔巨噬细胞的铁水平显著下降,但 DMT1(+IRE)的表达也显著降低. 由此可以看出,铁状态的改变对 DMT1 的调控是非常复杂的,在不同的组织细胞中也许存在着不同的调节机制,因而会产生不同的结果.

总之,注射 rHuEPO 促进了红细胞的大量生成,造成了机体的低铁状态,导致肝脏 hepcidin 的低表达. 巨噬细胞通过降低 DMT1 的表达来降低铁的吸收,通过增加 FPN1 的表达来提高铁的释放,网状内皮系统的铁储存量降低,尽可能多的铁被运输到骨髓用于生成红细胞. 注射 rHuEPO 引起腹腔巨噬细胞摄取铁及释放铁的改变可能有三方面的原因: rHuEPO 引起的机体铁水平的下降; rHuEPO 引起的 hepcidin 表达的降低; rHuEPO 或许也可以通过活化 IRP 来直接对 DMT1, FPN1 产生作用. 究竟是哪一方面在起着关键的作用呢? 这还待于进一步的探索. 此外,随着对铁代谢研究的日渐深入和广泛, DMT1, FPN1 以及 hepcidin 的表达调控也显得越来越复杂,这里面还有很多难以解决的问题,需要更为广泛和深入的研究.

## 参 考 文 献

- 1 Knutson M, Wessling-Resnick M. Iron metabolism in the reticuloendothelial system. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2003, 38(1);

- 61—88
- 2 Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, et al. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature*, 1997, 388(6641): 482—488
  - 3 Lee PL, Gelbart T, West C, et al. The human Nramp2 gene; Characterization of the gene structure, alternative splicing, promoter region and polymorphisms. *Blood Cells Mol Dis*, 1998, 24(2): 199—215
  - 4 Jabado N, Canonne-Hergaux F, Gruenheid S, et al. Iron transporter Nramp2/DMT-1 is associated with the membrane of phagosomes in macrophages and Sertoli cells. *Blood*, 2002, 100(7): 2617—2622
  - 5 Wardrop SL, Richardson DR. Interferon-gamma and lipopolysaccharide regulate the expression of Nramp2 and increase the uptake of iron from low relative molecular mass complexes by macrophages. *Eur J Biochem*, 2000, 267(22): 6586—6593
  - 6 Knutson MD, Vafa MR, Haile DJ, et al. Iron loading and erythrophagocytosis increase ferroportin 1(FPN1) expression in J774 macrophages. *Blood*, 2003, 102(12): 4191—4197
  - 7 Donovan A, Brownlie A, Zhou Y, et al. Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature*. 2000, 403(6771): 776—781
  - 8 Knutson MD, Oukka M, Koss LM, et al. Iron release from macrophages after erythrophagocytosis is up-regulated by ferroportin 1 overexpression and down-regulated by hepcidin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(5): 1324—1328
  - 9 Delaby C, Pilard N, Goncalves AS, et al. Presence of the iron exporter ferroportin at the plasma membrane of macrophages is enhanced by iron loading and down-regulated by hepcidin. *Blood*, 2005, 106(12): 3979—3984
  - 10 Wallace DF, Pedersen P, Dixon JL, et al. Novel mutation in ferroportin1 is associated with autosomal dominant hemochromatosis. *Blood*, 2002, 100(2): 692—694
  - 11 常彦忠, 段相林, 钱忠明. Hepcidin 和铁稳态. *中华内分泌代谢杂志*, 2003, 19(6): 501—504
  - 12 Roetto A, Papanikolaou G, Politou M, et al. Mutant antimicrobial peptide hepcidin is associated with severe juvenile hemochromatosis. *Nat Genet*, 2003, 33(1): 21—22
  - 13 Nicolas G, Chauvet C, Viatte L, et al. The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *J Clin Invest*. 2002, 110(7): 1037—1044
  - 14 Weiss G, Houston T, Kastner S, et al. Regulation of cellular iron metabolism by erythropoietin; Activation of iron-regulatory protein and upregulation of transferrin receptor expression in erythroid cells. *Blood*, 1997, 89(2): 680—687
  - 15 Torrance JD, Bothwell TH. A simple technique for measuring storage iron concentrations in formalinised liver samples. *S Afr J Med Sci*, 1968, 33(1): 9—11
  - 16 Chen Y, Qian ZM, Du J, et al. Iron loading inhibits ferroportin1 expression in PC12 cells. *Neurochem Int*, 2005, 47(7): 507—513
  - 17 Chang YZ, Ke Y, Du JR, et al. Increased divalent metal transporter 1 expression might be associated with the neurotoxicity of L-DOPA. *Mol Pharmacol*, 2006, 69(3): 968—974
  - 18 Ke Y, Chang YZ, Duan XL, et al. Age-dependent and iron-independent expression of two mRNA isoforms of divalent metal transporter 1 in rat brain. *Neurobiol Aging*, 2005, 26(5): 739—748
  - 19 Liu YQ, Duan XL, Chang YZ, et al. Molecular analysis of increased iron status in moderately exercised rats. *Mol Cell Biochem*, 2006, 282(1—2): 117—123
  - 20 Rivera S, Nemeth E, Gabayan V, et al. Synthetic hepcidin causes rapid dose-dependent hypoferrremia and is concentrated in ferroportin-containing organs. *Blood*, 2005, 106(6): 2196—2199
  - 21 Viatte L, Lesbordes-Brion JC, Lou DQ, et al. Deregulation of proteins involved in iron metabolism in hepcidin-deficient mice. *Blood*, 2005, 105(12): 4861—4864
  - 22 Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, et al. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science*, 2004, 306(5704): 2090—2093
  - 23 Delaby C, Pilard N, Goncalves AS, et al. Presence of the iron exporter ferroportin at the plasma membrane of macrophages is enhanced by iron loading and down-regulated by hepcidin. *Blood*, 2005, 106(12): 3979—3984
  - 24 Yamaji S, Sharp P, Ramesh B, et al. Inhibition of iron transport across human intestinal epithelial cells by hepcidin. *Blood*, 2004, 104(7): 2178—2180
  - 25 Canonne-Hergaux F, Gruenheid S, Ponka P, et al. Cellular and subcellular localization of the Nramp2 iron transporter in the intestinal brush border and regulation by dietary iron. *Blood*, 1999, 93(12): 4406—4417