

慢性铁过载鼠模型的研究概况

温晓文 吴迪炯 叶宝东 罗赞飞 吴逢选 周郁鸿

摘要 铁过载是临床常见疾病,为了进一步明确其发病机制以及对器官组织影响,不少研究通过动物模型加以论证研究。本文综述了目前研究工作中较为常用的 3 种模型法,包括有注射铁剂法、羰基铁法、基因剔除法。上 3 种方法各有其适用范围,在实验操作、造模周期、模型稳定及病死率等方面 3 者有各自的优势及不足之处,建议根据具体情况选择性采用。

关键词 慢性铁过载 注射铁剂法 羰基铁法 基因剔除法 模型评价

[中图分类号] R331

[文献标识码] A

铁过载是由于机体内铁供给超过铁的需要、铁利用障碍、相关基因突变等原因而导致铁在某些组织器官中贮存增加的病理现象。研究发现,铁过载不仅常见于一些血液系统疾病,如原发性血色病、地中海贫血、再生障碍性贫血、骨髓增生异常综合征、阵发性睡眠性血红蛋白尿症、原发性骨髓纤维化等疾病因长期输血或疾病本身原因造成铁过载,还广泛涉及内分泌系统、消化系统、心血管系统等诸多方面疾病,如糖尿病、阿尔茨海默病、病毒性肝炎等^[1]。过量的铁不仅影响心、肝、胰腺等脏器功能和结构,而且与血液系统造血紊乱密切相关,对机体有着十分重要的危害。而随着铁过载的研究深入,构建铁过载鼠模型,已经是研究工作中不可缺少的一个重要环节。现将慢性铁过载鼠模型的研究作一综述。

一、模型的复制方法

1. 注射铁剂法:采用皮下或腹腔给鼠注射右旋糖酐铁或蔗糖铁,超过机体对铁所需,导致铁在体内沉积。动物出现精神萎靡,生长速率减慢,皮毛粗糙等变化。实验室检查可见铁含量指标(如血清铁、铁蛋白、组织铁等)增高,抗氧化应激指标(如超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶、维生素 E 等)降低。该法是目前慢性铁过载鼠模型造模中应用最多的,其经典模型是 Bartfay 等^[2]在 20 世纪末所建立。该实验为以后的研究奠定了基础,为其他研究者提供了借鉴。

基金项目:浙江省中医药重大疾病科技创新平台科研专项基金资助项目(2009ZDJB01)

作者单位:310053 杭州,浙江中医药大学第一临床医学院(温晓文、罗赞飞、吴逢选);310006 杭州,浙江省中医院血液科(吴迪炯、叶宝东、周郁鸿)

通讯作者:吴迪炯,电子邮箱:wdj850@163.com

在实验用鼠的选择上,学者们尚未达到共识,故当前造模所涉及的鼠品系较为杂乱,但大鼠以沙土鼠多见,小鼠以 Balb/c 鼠为主。现阶段尚无公认的注射铁剂法铁过载鼠模型的报道,造模过程中,铁剂剂量、注射频率、注射时间等选择上仍有差异^[3]。文献报道右旋糖酐铁有“100mg/kg 隔天 1 次 × 5 次”或“60mg/kg 隔天 1 次 × 5 次”或“200mg/kg 每周 1 次 × 10 次”等用法^[4-7]。进一步研究表明组织铁浓度与注射铁剂剂量呈正相关,血清铁(serum iron, SI)含量主要受注射总时间影响^[3]。在研究铁剂剂量与肝内氧自由基和维生素 E 浓度的实验中, Karey 等^[8]予小鼠腹腔注射不同总剂量的右旋糖酐铁(100、200、400mg/kg)。实验结束后发现,注射总剂量与肝脏铁浓度、丙二醛(malondialdehyde, MDA)呈正相关,而与血中维生素 E 含量呈负相关。

2. 羰基铁法:羰基铁法见于大量的原发性血色病慢性铁过载模型中。该方法予鼠长期进食富含羰基铁的饲料,最终导致铁在肝细胞内质网系统沉积,达到建模目的。Christelle 等^[9]将 Balb/cJ 小鼠分成 4 组,分别喂以含有 0%、0.5%、1.5%、3% 的羰基铁的饲料,并在实验第 2、4、8、12 个月处死每组部分小鼠,以观察造模情况。研究发现:肝脏铁浓度随着饲料中羰基铁含量以及喂养时间的增加而增加;而肝细胞异常有丝分裂、肝纤维化只现于 3% 组。同样, Beatrice 等^[10]实验表明,喂有含 3% 羰基铁的饲料小鼠 8 周后与正常组(喂以普通饲料)相比,肝脏铁浓度($2078 \pm 810/139 \pm 12 \mu\text{g/g}$)、丙氨酸氨基转移酶($24 \pm 5/18 \pm 2 \text{U/L}$)、肝脏与体重之比($6.7\% \pm 0.4\%/4.8\% \pm 0.4\%$)均有明显差异。基于以上认识,目前研究者在羰基铁含量的选择上以 3% 为主,根据实验的需要,喂养时间上有 4、8、12 周等区别^[11]。由于喂养时

间、鼠的品系、鼠龄等差异,故实验终点时铁过载程度亦有所不同。

3. 基因剔除法:铁代谢相关基因 HFE、TfR2、HAMP 等变异,是导致原发性血色病发生的根本原因。HFE 基因 C282Y 突变可以使 HFE 分子不能与 β_2 微球蛋白 (β_2 -microglobulin, β_2m) 结合,不能转运到细胞表面,从而失去对转铁蛋白和转铁蛋白受体的调节功能。过去研究显示,缺乏 β_2m 的小鼠与原发性血色病类似的肝脏存在铁过载。Santos 等^[12]给 β_2m 基因敲除小鼠和正常小鼠喂以普通饲料或含有 2.5% 的羰基铁的饲料,2 或 4 个月后, β_2m 基因敲除小鼠肝脏铁浓度显著高于正常组, β_2m 基因敲除小鼠喂以羰基铁饲料后其铁过载程度明显大于单纯基因敲除小鼠。他们的实验同时为两种方法联合的研究提供了可能。骨形态形成蛋白 6 (bone morpho - genetic protein 6, Bmp6) 通过调节 hepcidin 水平,影响机体的铁代谢^[13]。Bmp6 基因剔除小鼠,其信号转导分子 Smad1、Smad5、Smad8 水平明显降低,hepcidin 合成减少,铁在肝脏、胰腺、心脏、肾快速且大规模沉积^[14]。而 Majda 等^[15]研究则进一步表明,Bmp6 基因剔除小鼠存在视网膜铁过载。

二、模型的评价方法

基于当前缺乏诊断鼠铁过载的金标准,当上述方案达到造模目的时,评价模型的终点指标的选择及其

范围(表 1)有所不同。在指标选择上除肝铁浓度、血清铁蛋白 (serum ferritin, SF)、组织铁染色即能直接反应体内铁沉积程度的指标外,还选择能反应氧化应激的指标如:超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽、谷胱甘肽 S 转移酶等,以及肝功能的指标。后两者的改变可继发于铁过载,故可间接反应铁过载。此外,从病理上看,铁过载时肝细胞呈广泛变性、点状液化性坏死,或伴有轻微纤维化^[11];小鼠心外膜及心肌间质均可见大量浆细胞、中性粒细胞、淋巴细胞等炎性细胞浸润,心肌间质可见出血、水肿等病理变化^[16];脾脏可出现小体萎缩,周围及脾窦纤维组织增生,且随着铁过载含量增加,纤维化更加明显;肾脏肾小球变小,肾小管扩张内见红染无结构物质。

虽然前述的模型方法在造模过程中各有特点(或增加铁负荷或导致铁代谢紊乱),但它们均以铁在组织过量沉积为最终效应。故在模型评价上均应以直接反应体内铁浓度的指标为基础(如 SI、SF、肝铁浓度、组织铁染色等),辅以氧化应激指标(MDA、SOD、谷胱甘肽等)。笔者认为肝是体内铁沉积的首要器官,肝铁浓度能很好反应体内铁沉积程度,是诊断人类铁过载的金标准,其应亦是诊断鼠铁过载的金标准。然而各鼠有品系之别,鼠铁过载时肝铁浓度的数值确定还需进一步探讨。

表 1 注射铁剂法^[4-7]和羰基铁法^[9]达到造模目的的相关指标范围

造模方法	铁含量指标		肝氧化应激指标		
	SI($\mu\text{mol/L}$)	SF($\mu\text{g/L}$)	湿肝铁浓度($\mu\text{g/g}$)	MDA	SOD
注射铁剂法	24.0 ~ 66.0	45.0 ~ 201.0	276.0 ~ 239743	0.9 ~ 4.8 *	0.0 ~ 0.4 #
羰基铁法	13.0 ~ 45.0	-	1268.0 ~ 2878.0	37.5 ~ 45.0 Δ	-

*. 单位为纳摩尔/毫克蛋白;#. 单位为摩尔/毫克蛋白; Δ . 单位为纳摩尔/克

三、小 结

长期从胃肠摄入羰基铁,不能很好模仿临床继发性铁过载铁在肝、脾、心等贮铁器官的沉积及其毒性作用,故羰基铁法主要用于原发性铁过载模型的建立,优点是操作简单、病死率低,而缺点是造模周期长。注射铁剂法被许多学者用于建立继发性铁过载模型,其具有复制周期短,成功率高,稳定性好等优势;基因剔除法只限于特异的基因研究,实验操作复杂,条件要求高。

笔者认为以上 3 种造模方法各有其适用范围,然而具体到铁过载肝、心、胰腺等脏器研究则缺少针对性,至今尚无铁过载鼠模型关于血液系统的研究。注

射铁剂法、羰基铁法的应用上,采用大剂量可以加深组织铁沉积,而延长注射或喂养铁的时间可使 SI、SF 维持高的浓度。铁代谢相关基因如 HFE、TfR2、HAMP 的剔除,从基因水平上验证该基因在铁过载发生发展过程中的作用,为铁过载的研究提供新的思路。

参考文献

1 中华医学会血液学分会/中国医师协会血液科医师分会. 铁过载诊断与治疗的中国专家共识[J]. 中华血液杂,2011,32(8):572 - 574

2 Bartfay WJ, Hou D, Brittenham GM, et al. The synergistic effects of vitamin E and selenium in iron - overloaded mouse Hearts[J]. Can J Cardiol,1998,14(7):937 - 941

- 3 Bá Vu'o'ng Lê, Hafida KC, Anne - Sophie V, *et al.* New rat models of iron sucrose - induced iron overload[J]. *Experimental Biology and Medicine*,2011,236:790 - 799
- 4 Rhitajit S, Bibhabasu H, Nripendranath M. Hepatoprotective potential of caesalpinia crista against iron - overload - induced liver toxicity in mice[J]. *Evidence - Based Complementary and Alternative Medicine*,2012,2012:896341
- 5 Zhang Y, Huang Y, Deng XR, *et al.* Iron overload - induced rat liver injury: Involvement of protein tyrosine nitration and the effect of baicalin[J]. *European Journal of Pharmacology*,2012,680(2012) 95 - 101
- 6 Lu NH, Li XL, L JY, *et al.* Nitrate and oxidative modifications of enolase are associated with iron in iron - overload rats and in vitro [J]. *J Biol Inorg Chem*,2011,16:481 - 490
- 7 Maya OD, Casey B, Ignacio G, *et al.* Safety and efficacy of combined chelation therapy with deferasirox and deferoxamine in a gerbil model of iron overload[J]. *Acta Haematol*,2008,120(2):123 - 128
- 8 Karey D, McCullough, MScN, *et al.* The dose - dependent effects of chronic iron overload on the production of oxygen free radicals and vitamin E concentrations in the liver of a murine model[J]. *Biol Res Nurs*,2007,8(4):300 - 303
- 9 Christelle P, Bruno T, Theodore CI, *et al.* Carbonyl - iron supplementation induces hepatocyte nuclear changes in BALBKJ male mice[J]. *Journal of Hepatology*,1999,30: 926 - 934
- 10 Beatrice A, Benedetta L, Giuseppe L, *et al.* Iron overload enhances the development of experimental liver cirrhosis in mice[J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*,2003,35 (2003) :486 - 495
- 11 Emilie C, Emmanuelle A, Nadia F, *et al.* Hephidin induction limits mobilisation of splenic iron in a mouse model of secondary iron overload[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*,2010,1802 (2010) :339 - 346
- 12 Santos M, Schilham MW, Rademakers LHPM, *et al.*, Clevers H: Defective iron homeostasis in $\beta 2$ - microglobulin knockout mice recapitulates hereditary hemochromatosis in man[J]. *J Exp Med* 1996, 184: 1975 - 1985
- 13 Andriopoulos BJ, Corradini E, Xia Y, *et al.* BMP6 is a key endogenous regulator of hepcidin expression and iron metabolism [J]. *Nat Genet*,2009,41:482 - 487
- 14 Meynard D, Kautz L, Darnaud V, *et al.* Lack of the bone morphogenetic protein BMP6 induces massive iron overload [J]. *Nat Genet*. 2009,41(4) :478 - 481
- 15 Majda H, Song, Natalie W, *et al.* Bmp6 regulates retinal iron homeostasis and has altered expression in age - related macular degeneration [J]. *The American Journal of Pathology*, 2011,179(1) :335 - 347
- 16 姜晨辉,何欢,王飞,等. 阿魏酸钠对小鼠铁过载性心脏损伤的作用[J]. *南昌大学学报*,2012,52(9) :14 - 18
- 17 Cathew P, Dorman BM, Edward RE, *et al.* A unique rodent model for both cardiotoxic and hepatotoxic effects of prolonged iron overload[J]. *Laboratory Investigations*,1993,69,217 - 222

(收稿日期:2013 - 10 - 31)

(修回日期:2013 - 11 - 25)

内质网氨肽酶与银屑病研究进展

冯燕艳 普雄明

[中图分类号] R751

[文献标识码] A

内质网氨肽酶 1 (ERAP1) 及其异构体内质网氨肽酶 2 (ERAP2) 都属于锌指金属基质肽酶 M1 家族中的“缩宫素酶亚家族”,在人类细胞均由 IFN - γ 和 TNF - α 诱导表达^[1,2]。参与许多生化过程:在细胞内质网中参与内源性抗原肽的修饰及递呈,被认为是内质网中参与内源性抗原肽修饰的关键酶^[3]。ERAP1 还参与细胞因子受体(如促进肿瘤坏死因子受体 1(TNFR1),IL - 6 α 受体和 IL - 1 β 受体胞外结构域)的脱落,使之成为可溶性受体。基于多功能的特性,

ERAP1 又被称为:内质网相关的氨肽酶抗原处理 (ERAAP),脂肪细胞源性的亮氨酸 aminopeptidase (A - LAP),氨肽酶调节 TNFR1 脱落 (ARTS - 1) 和嘌呤霉素不敏感的亮氨酸氨肽酶 (PILS - AP),而 ERAP2 特定被称为白细胞衍生的精氨酸氨肽酶 (LRAP)。

一、ERAPs 结构及功能

1. ERAP1 和 ERAP2 基因:ERAP1 基因位于 5q15,序列全长约 47kb,共有 20 个外显子。ERAP2 基因位于染色体 5q15 上 ERAP1 和亮氨酸 - 胱氨酸氨肽酶基因之间,包含 19 个外显子,约 43kb。ERAP1 基因和 ERAP2 基因结构相似,6 号外显子都包括特

基金项目:新疆维吾尔自治区人民医院内科科研项目(20130111)

作者单位:830001 乌鲁木齐,新疆维吾尔自治区人民医院皮肤科

通讯作者:冯燕艳,电子信箱:fyyued@163.com