

## 膳食缺鐵與補鐵影響大鼠肝臟 和肌肉 IRPs 與 Aconitase 活性

黃惠玲 康碩芬 蕭寧馨\*

### Dietary Iron Depletion and Repletion on the IRPs and Aconitase Activity in the Liver and Muscles of Rats

Hui-Ling Huang, Shuo-Fen Kang and Ning-Sing Shaw\*

Department of Agricultural Chemistry,  
National Taiwan University,  
Taipei, Taiwan, ROC

(Accepted for publication on March 1, 2000)

**ABSTRACT** It is known that hepatic IRP spontaneous activity increases rapidly and ferritin and mitochondrial aconitase concentrations decrease differentially in iron deficient rats. Since there is limited information concerning the molecular response of the liver and muscles to iron repletion *in vivo*, this study was designed to compare the time-course IRPs, mitochondrial and cytosolic aconitases response in the liver and muscles to iron depletion and repletion using a rat model. Among thirty weanling male Wistar rats, five were assigned as control group feeding on an AIN-76 diet, and the rest were rendered anemic by feeding an iron-free AIN-76 diet for 17 days. Then the 5 control rats and 5 anemic rats were killed for analysis. The remaining 20 anemic rats were randomly assigned into two groups: a depletion group continuing on the iron-free diet, and a repletion diet switching to the normal AIN-76 diet. Five rats from each group were killed at the second and the ninth days after iron repletion, and blood, liver and muscle from hind limb were collected. Cytosol and mitochondria were fractionated and used for analysis. Iron depletion resulted in increased spontaneous activity of IRP1 and IRP2 (1.47 to 1.9 times of the control) and reduced specific activity of mitochondrial aconitase (60% to 72% of the control) from both liver and muscle. IRP1 and IRP2 activities were differentially affected by iron repletion, and liver and muscle had different patterns of time-course response. Activity of mitochondrial aconitase increased during iron repletion in both liver and muscle. During iron depletion, the activity of cytosolic aconitase increased in liver, while it decreased in muscle, which implied impaired assembly of iron-sulfur proteins due to lactic acidosis in the muscle.

**Keywords:** IRPs, aconitase, liver, muscle, dietary iron, rats

\* The correspondence should be addressed.



## 前 言

鐵營養狀況不良是極常見的礦物質營養問題。根據民國 82~86 年「國民營養健康狀況變遷調查」結果顯示：四歲以上國人總缺鐵率在男性為 2.1%，女性為 10.7%<sup>(1)</sup>；國人缺鐵以無貧血症狀之潛伏性缺鐵為主，而且四歲以上女性各年齡層均有缺鐵的現象，可見在此富足且重視優質生活的現代社會裡，缺鐵仍然是個值得重視且極待解決的問題。鐵是生物必需之微量礦物質，是許多重要蛋白質的成份或輔因子，負責並維持氧氣的供輸、ATP 產生、能量代謝及 DNA 合成等生理與生化代謝功能的正常；然而水能載舟亦能覆舟，過多的游離鐵存在會催化自由基生成，造成細胞損傷。

正因鐵在生物體內有如雙刃的刀，生物體對它的恆定有嚴密的調節，細胞內鐵的恆定取決於鐵的獲取、儲存及利用之間的協調。調節的機轉包含兩個要素：細胞質中的蛋白質 IRPs (iron regulatory proteins) 與 ferritin、紅血球 5-amino levulinate synthase (eALAS)、transferrin receptor 和粒線體 aconitase (m-ACO) mRNA 序列 IRE (iron responsive element)<sup>(2)</sup>。IRE 具有 stem-loop 的構造，對 ferritin、eALAS 與 m-ACO，IRE 存在其 mRNA 的 5'UTR (untranslated region) 端，與 IRP 結合時會抑制該蛋白質的轉譯生成；對 transferrin receptor，IRE 存在其 mRNA 的 3'UTR 端，與 IRP 結合會增加該 mRNA 的安定性，進而增加其蛋白質轉譯量。IRPs 與 IRE 的結合受細胞內游離鐵量的影響而對 ferritin 與 transferrin receptor 有反向的調節：游離鐵量低時結合力增強，ferritin 量減少，而 transferrin receptor 數目增加；游離鐵量高時則 ferritin 量增加，而 transferrin receptor 數目減少<sup>(3)</sup>。此外，細胞游離鐵量對 ferritin 與 m-ACO 有同向的影響，低鐵時兩者皆有不等程度的減少，高鐵時兩者則有不等程度的增加<sup>(4,5)</sup>。

目前已知 IRPs 有兩型，依發現先後命名為 IRP1 與 IRP2，分子量分別為 98 kDa 與 105 kDa，兩者的差別在於 IRP2 比 IRP1 多了 79 個氨基酸殘基，而且 IRP2 的自發活性 (spontaneous activity) 不因 2-mercaptoethanol (2-ME) 處理而增加<sup>(6)</sup>。IRP1 是一種雙功能的蛋白質，可以轉變成為具有酵素

活性的 aconitase，前者不含鐵-硫複合體 [4Fe-4S] cluster，後者具有 [4Fe-4S] cluster，且因存在細胞質中而稱為 c-ACO (cytosolic aconitase)<sup>(7)</sup>。缺鐵時，細胞的 IRP1 與 IRP2 的自發活性都會顯著上升，但是機制不同：細胞中原就存有大量的 c-ACO，其中一部份 (2~4%) 在缺鐵時失去 [4Fe-4S] cluster 而活化成 IRP1<sup>(7)</sup>；細胞中 IRP2 表現很少，缺鐵時才誘發其表現，鐵增加時則促進其降解<sup>(8)</sup>。

大鼠的研究發現，膳食鐵量確實會影響肝臟 IRPs 活性，隨著鐵量減少，IRP1 與 IRP2 的自發活性上升，且與血紅素濃度呈明顯負相關，同時 ferritin 量與 m-ACO 活性有不同程度的減少，以 ferritin 的變化幅度較大<sup>(4)</sup>。探究缺鐵時間長短的影響發現，餵飼缺鐵飼料第 2 天起，肝臟 IRPs 活性就顯著升高，其中以 IRP2 增加倍數較 IRP1 為高；ferritin 與 m-ACO 的減少也有快慢之別，以 ferritin 對缺鐵的反應較為快速，表示 IRPs 對 5'-IRE 的調節具有選擇性<sup>(9)</sup>。

除了肝臟之外，骨骼肌也是對缺鐵敏感的器官，因為骨骼肌的粒線體中富含參與能量代謝的含鐵酵素和蛋白質。早期研究證實缺鐵會降低骨骼肌的肌紅素，細胞色素 cytochrome c，以及粒線體含鐵酵素 cytochrome oxidase 與 succinate dehydrogenase 等的活性，減少粒線體的氧化能力，可能是導致缺鐵動物最大耗氧量 (VO<sub>2</sub> max) 減少以及能量代謝改變的主因<sup>(9,10)</sup>。然而最近研究指出，肌紅素基因剔除小鼠有正常的生長與生育功能，在高氧 (95% O<sub>2</sub>) 與無氧環境下的運動能力與正常無異，肌肉功能也無異常，可見肌紅素的影響有限<sup>(11)</sup>。

已知肝臟 IRPs 對缺鐵的反應敏感而快速，但其對鐵補充的反應則尚無資料可查，加以缺鐵對肌肉鐵代謝調節的分子機制所知有限，乃以大鼠缺鐵-補鐵實驗探討並比較肝臟與肌肉中 IRPs、ferritin、c-ACO 與 m-ACO 的變化，以瞭解改善鐵營養狀況時的生化與分子機制，可作為營養改善成效的參考。

## 材料與方法

### 一、實驗設計

以大鼠模式，進行缺鐵 (Fe depletion) - 補鐵 (Fe repletion) 實驗。採用離乳，體重 50 g 之 Wis-

tar 雄鼠 30 隻，隨機選取 25 隻飼以缺鐵飼料，其餘 5 隻大鼠為正常控制組 (Control, C,  $n = 5$ )，控制組飼以鐵量正常之 AIN-76 配方<sup>(12)</sup>，含鐵 37 ppm；缺鐵飼料為不加鐵之 AIN-76 飼料，含鐵 3.0 ppm。飼養期間以尾巴採血，分析其血紅素值以偵測缺鐵程度，第 17 天時自缺鐵組 (Depletion, D) 犧牲 5 隻與控制組的 5 隻。其餘缺鐵大鼠分為兩組使平均體重和血紅素濃度相當：補鐵組 (Repletion, R,  $n = 10$ ) 改飼以鐵量正常之 AIN-76 飼料，缺鐵組 (Depletion, D,  $n = 10$ ) 繼續飼以缺鐵飼料。於補鐵後第 2 和第 9 天，每組各犧牲 5 隻。犧牲時均收集血液，取出肝臟與後肢肌肉，並分離其細胞質及粒線體以供分析。

## 二、動物飼養及飼料配製

實驗動物購自國立台灣大學醫學院附設動物中心。大鼠個別飼養於不銹鋼籠中，動物室溫度維持在  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ，光照及黑暗各 12 小時 (06:00~18:00 為光照期，其餘為黑暗期)，飼料與去離子水均自由攝食，每兩天記錄大鼠體重和飼料攝取量，並觀察其外觀。飼料的基本組成採用 AIN-76 配方<sup>(12)</sup>，缺鐵飼料成份如下所示：20% 酪蛋白 (Sigma, USA)、65% 玉米澱粉 (Samyang genex, Korea)、5% 纖維素 (JRS, Germany)、5% 黃豆油 (統一公司，台灣)、3.5% AIN-76 礦物質混合物 (不含鐵)、1% AIN-76 維生素混合物、0.3% 甲硫胺酸 (Sigma, USA) 和 0.2% 膽鹼 (Sigma, USA)；鐵正常飼料乃於缺鐵飼料中加入 35 ppm 鐵 (ferric citrate)，維生素與礦物質均採用試藥級藥品購自 ICN、Merck 與 Sigma 等公司。

## 三、動物犧牲及樣品收集

動物秤量體重後以二氧化碳窒息，先以含肝素抗凝血劑之抽血管 (Sarstedt, Germany) 自下腔大靜脈抽血後，迅速取下肝臟，以  $4^\circ\text{C}$  生理食鹽水 (0.85% NaCl) 灌流，沖去肝臟內殘存的血液後以濾紙瀝乾秤重，接著再取下左右兩後肢肌肉，以生理食鹽水清洗瀝乾秤重，進行胞器分離。

(-) 分離肝臟之細胞質與粒線體<sup>(4)</sup>：用冰冷的含 0.25 M 蔗糖的 HDSC 緩衝液 (50 mM Hepes, 1 mM dithiothreitol, 0.25 M sucrose, 2 mM citrate, 0.5 mg/L leupeptin, 0.2 mM phenylmethylsulfonyl

fluoride, pH 7.4)，將肝臟均質成 20% (w/v) 勻漿 (homogenate)，以  $600 \times g$  (KUBOTA 1900, RA80 rotor) 於  $4^\circ\text{C}$  下離心 10 分鐘，得到去核上清液，再以  $15,000 \times g$  (Beckman XL-900, 50.4 Ti rotor) 於  $4^\circ\text{C}$  下離心 30 分鐘得到粒線體沈澱和細胞質微粒體混合之上層液，其中粒線體沈澱部份，用 HDSC 緩衝液打散，再以  $10,000 \times g$  (KUBOTA 1900) 於  $4^\circ\text{C}$  下離心 10 分鐘，如此清洗三次，而細胞質微粒體混合之上層液部份以  $105,000 \times g$  (Beckman XL-900) 於  $4^\circ\text{C}$  下離心 60 分鐘 (Beckman)，上層液即為細胞質液。分別將勻漿、粒線體及細胞質少量分裝後凍於  $-70^\circ\text{C}$  以便日後酵素分析。

(-) 肌肉之胞器分離<sup>(13,14)</sup>：取 1 g 肌肉以剪刀剪碎，加入 10 倍體積之冰冷的 HDSC 緩衝液，於冰浴下攪拌進行萃取 45 分鐘，再以  $105,000 \times g$  (Beckman XL-900) 於  $4^\circ\text{C}$  下離心 60 分鐘，得到上層液即為細胞質液，沈澱部份以不含 leupeptin、DTT、PMSF 之 HDSC 緩衝液沖提懸浮，再於  $700 \times g$  (KUBOTA 1900)  $4^\circ\text{C}$  下離心 10 分鐘，如此進行清洗一次，倒除上層液，沈澱部份再以 polytron 打碎，並以 HDSC 緩衝液配成 10% 溶液，置入小燒杯中加入 trypsin (type II: crude from porcine pancreas; Sigma, USA) 0.35 mg/g muscle，反應 30 分鐘以輕微分解肌蛋白，加入 leupeptin、DTT、PMSF 以中止反應，接著以  $700 \times g$ ， $4^\circ\text{C}$  下離心 10 分鐘二次，去除細胞核等殘骸之沈澱部份，上層液以  $10,000 \times g$  於  $4^\circ\text{C}$  離心 10 分鐘 (KUBOTA 1900)，便得到粒線體沈澱，以 HDSC 緩衝液衝提懸浮後，再以  $10,000 \times g$  (KUBOTA 1900) 離心 10 分鐘，如此清洗粒線體沈澱一次。所得之細胞質液與粒線體液均凍於  $-70^\circ\text{C}$  以便日後酵素分析。

## 四、分析項目

(-) 血紅素濃度 (hemoglobin, Hb)：採用 cyano-methemoglobin 法，以 Drabkin's 試劑呈色<sup>(15)</sup>，以分光光譜儀 (Hitachi U-3400) 在波長 540 nm 測得吸光值，乘以 36.8 而得血紅素濃度 (g/dL)。

(-) 鐵含量：飼料與組織先用足量濃  $\text{HNO}_3$  加  $\text{H}_2\text{O}_2$  於微波消化器 (Milestone 2000 digestion/dry-

ing module) 分解成澄清液體，經適當稀釋以原子吸收光譜儀 (Hitachi 180-30) 測定波長 284 nm 之讀值，由標準曲線換算樣品鐵濃度。

(三) 肝臟和肌肉 Aconitase (EC 4.2.1.3) 活性<sup>(16)</sup>: 利用 aconitase 與 isocitrate dehydrogenase (EC 1.1.1.42) 酵素偶合反應生成 NADPH, aconitase 活性單位為 1 unit = 每分鐘減少 1  $\mu\text{mol}$  NADP<sup>+</sup>。於 1 mL 石英管中加入下列反應物: 0.5 M Tris-buffer (pH 8.0) 0.2 mL、10 mM MgCl<sub>2</sub> 0.1 mL、10 mM citrate 0.1 mL、10 mM NADP<sup>+</sup>、10 units/mL isocitrate dehydrogenase、一次水 0.4 mL 及樣品 20  $\mu\text{L}$ ，混勻後於 37°C 水浴反應 5 分鐘，迨酵素反應平衡，產物生成速率穩定呈直線型後，於 37°C 溫控下開始偵測 OD<sub>340 nm</sub> 變化速率，每隔 1 分鐘紀錄一次，總計 5 分鐘；m-ACO 與 c-ACO 活性分析均採用此法。

(四) 組織鐵蛋白含量: 採用西方轉漬法<sup>(17)</sup> (Western blot)。把肝臟細胞質液稀釋至蛋白質量為 9 mg/mL (以 Lowry 法定量)，將樣品置於 70°C 水浴中 10 分鐘，以 10,000  $\times g$  (KUBOTA 1900) 離心 10 分鐘而去除受熱沉澱之蛋白質，取上清液進行蛋白質電泳，各槽之蛋白質量為 54  $\mu\text{g}$ ，電泳條件為 150 伏特電壓，15% SDS-PAGE 膠體，1 小時。然後進行蛋白質轉印於 PVDF 膜，條件為 380 毫安培電流，約 30~40 分鐘完成，取出 PVDF 膜以 PBST 洗三次，每次 10 分鐘，於 NET 溶液中室溫進行填塞反應 (blocking)，最後進行免疫檢定，一級抗體為實驗室自行製備之 rabbit anti-rat ferritin IgG，二級抗體為 anti-rabbit IgG (biotinylated Ab, VECTASTAIN)，avidine-alkaline phosphatase (VECTASTAIN)，2 mL 的冷光基質液 (ECL, Amersham)，以 BioMax film (Kodak, USA) 壓片 10~30 秒後顯影、定量之。

(五) 肝臟與肌肉 IRPs 自發活性與總量<sup>(18)</sup>: 利用 rat L-ferritin cDNA (由 University of Wisconsin-Madison 之 Dr. Eisenstein 贈)，以 SmaI (Promega) 切成直線型，由體外轉錄作用製備 <sup>32</sup>P-標識之 RNA 探針，再以 10% acrylamide/8 M urea 變性膠體純化 IRE 探針，最後取 1  $\mu\text{L}$  測定 <sup>32</sup>P 放射活性，據以計算 IRE 探針之比活性與濃度。細胞質液以 Lowry 法測定蛋白質濃度<sup>(19)</sup>，以反應緩衝液 (10 mM Hepes, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 40 mM KCl, 1 mM DTT, pH 7.6)

稀釋，使其蛋白質濃度為 0.375 mg/mL，每個分析取稀釋後樣品 20  $\mu\text{L}$ ，即含總蛋白質量為 7.5  $\mu\text{g}$ ，加入 20 fmol IRE 探針混勻 (由劑量反應曲線得知，所加的探針量遠超過 IRP 量，故於電泳圖下方均有大量未結合的游離探針，此圖未顯示於內文中)，於室溫下靜置反應 10 分鐘後，加入 2  $\mu\text{L}$  heparin (5 mg/mL) 混勻，於室溫下靜置反應 10 分鐘，用以降低非專一性結合，之後進行電泳，以 4% non-denaturing polyacrylamide gel, 0.5 倍 TBE 電泳液 (89 mM Tris, 89 mM boric acid, 2 mM EDTA, pH 8.0)，於 300 伏特之電壓下，低溫 (約 5°C) 進行 1.5 小時 (Hoefer SE-600 雙槽低溫直立式電泳槽)，將膠體以等大之濾紙黏起後，以膠體乾燥器 (Gel dryer, Bio-Rad) 於 80°C 乾燥 1 小時，再以 X-OMAT AR 底片 (Kodak, USA) 感光，剪下相對於底片上 IRE-IRPs 結合位置之濾紙，以液體閃爍記數器 (Beckman LS5000 CE) 測定 <sup>32</sup>P 放射活性，即可換算出每個樣品之 IRP 自發活性。細胞 IRP1 總量分析則是取 1  $\mu\text{g}$  之蛋白質於 20  $\mu\text{L}$  反應緩衝液，並於加入 IRE 前，先以 5% 之 2-ME 室溫處理 2 分鐘以完全還原活化不具 IRE 結合活性之 IRP1 後，再執行 gel retardation 分析定量，所用酵素、基質與藥品均購自 Merck 及 Sigma 公司。

## 五、統計分析

同一時間點缺鐵與補鐵兩組之間的差異以 Student's t test 檢定。缺鐵和補鐵第 2 與第 9 天之五組間各項指標的差異以單因子變方檢定 (generalized linear model) 後，再以 Duncan's multiple range test 分析，將顯著性水準設定為  $p < 0.05$ ；相關性採 Pearson correlation 分析。各項統計分析係用 SAS 軟體 (SAS 6.11, Cary, NC, USA) 以電腦執行。

## 結 果

### 一、缺鐵與補鐵對生長、攝食與鐵營養的影響

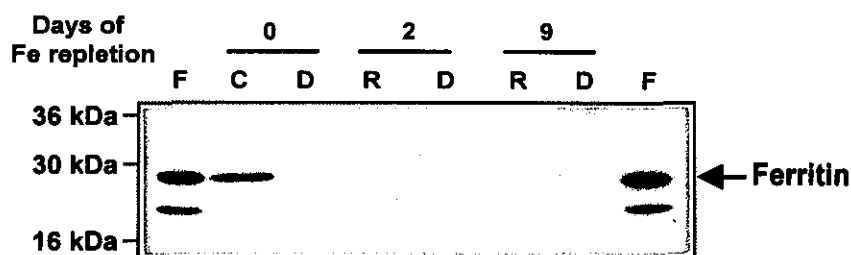
缺鐵貧血時大鼠四肢及耳朵蒼白無血色，眼睛呈淡棕色，D 組之平均體重、體重增加速率、飼料攝取量及飼料利用效率皆顯著低於 C 組 (表一)。肝臟重量與相對比例也以 D 組顯著為低，分別為 C 組之 67% 及 86%。補鐵時，R 組大鼠體重隨著補鐵時間的增長而增加：補鐵 2 天時，R 組平均體重

表一 膳食缺鐵與補鐵對大鼠生長、攝食狀況、組織鐵量及血紅素值<sup>1</sup>的影響Table 1. Dietary iron depletion and repletion affected growth, food consumption, tissue iron content and hemoglobin concentration in rats<sup>1</sup>.

	Fe depletion		2-day Fe repletion		9-day Fe repletion	
	Control (C)	Depletion (D)	Repleted (R)	Depletion (D)	Repleted (R)	Depletion (D)
Rat number (n)	5	5	5	5	5	5
Initial body weight (g/rat)	51 ± 5	51 ± 6 <sup>b</sup>	128 ± 11 <sup>a</sup>	130 ± 16 <sup>a</sup>	129 ± 9 <sup>a</sup>	129 ± 11 <sup>a</sup>
Final body weight (g/rat)	152 ± 8	119 ± 15 <sup>a,c</sup>	140 ± 12 <sup>c</sup>	138 ± 17 <sup>c</sup>	187 ± 12 <sup>a</sup>	162 ± 20 <sup>a,b</sup>
Body weight gain (g/day/rat)	6.0 ± 0.4	4.0 ± 0.6 <sup>a,b</sup>	6.2 ± 1.0 <sup>a</sup>	4.4 ± 0.4 <sup>a,b</sup>	6.5 ± 0.4 <sup>a</sup>	3.6 ± 1.3 <sup>a,b</sup>
Food intake (g/day/rat)	13.1 ± 0.8	10.0 ± 1.2 <sup>a,c</sup>	9.8 ± 1.3 <sup>c</sup>	8.9 ± 1.4 <sup>c</sup>	15.8 ± 0.9 <sup>a</sup>	12.0 ± 1.7 <sup>a,b</sup>
Feed efficiency <sup>2</sup> (%)	0.46 ± 0.04	0.40 ± 0.02 <sup>a,c</sup>	0.63 ± 0.06 <sup>c</sup>	0.49 ± 0.05 <sup>a,b</sup>	0.41 ± 0.01 <sup>c</sup>	0.30 ± 0.07 <sup>a,d</sup>
Liver weight (g)	7.2 ± 0.9	4.9 ± 0.8 <sup>a,c</sup>	6.2 ± 0.4 <sup>b</sup>	5.8 ± 1 <sup>bc</sup>	8.3 ± 0.7 <sup>a</sup>	6.8 ± 1.1 <sup>a,b</sup>
Relative liver weight (%)	4.7 ± 0.5	4.1 ± 0.3 <sup>a</sup>	4.4 ± 0.2	4.2 ± 0.3	4.4 ± 0.2	4.2 ± 0.5
Hemoglobin (g/dL)	13.2 ± 0.8	4.8 ± 0.5 <sup>a,b,c</sup>	5.6 ± 0.5 <sup>b</sup>	4.9 ± 0.7 <sup>bc</sup>	11.5 ± 1.2 <sup>a</sup>	4.3 ± 0.3 <sup>a,c</sup>
Hepatic iron (μg/g liver)	33.5 ± 8.4	9.8 ± 1.1 <sup>a</sup>	9.1 ± 2.1	8.8 ± 0.6	8.9 ± 2.1	9.8 ± 2.2
Hepatic iron (μg/liver)	242 ± 72	48 ± 12 <sup>a,b</sup>	56 ± 14 <sup>ab</sup>	52 ± 11 <sup>b</sup>	74 ± 20 <sup>a</sup>	64 ± 17 <sup>b</sup>
Muscular iron (μg/g muscle)	14.9 ± 2.5	11.7 ± 2.7 <sup>a</sup>	9.0 ± 1.4 <sup>b</sup>	9.8 ± 0.5 <sup>b</sup>	9.0 ± 1.8 <sup>b</sup>	8.6 ± 1.0 <sup>b</sup>

<sup>1</sup> Values are mean ± SD. \* Represents significant difference between the two groups of the same day by Student's t test at  $p < 0.05$ . Means in the same row except C group with different superscript letters are significantly different by Duncan's multiple range test at  $p < 0.05$ .

<sup>2</sup> Feed efficiency = (body weight gain / food intake) × 100%



圖一 膳食缺鐵與補鐵對大鼠肝臟鐵蛋白含量的影響

Fig. 1 The effect of dietary iron depletion and repletion on the hepatic ferritin content in rats. Ferritin was determined by Western blotting. C: control, D: Fe deficient, R: Fe repletion, F: rat ferritin purchased from Sigma Co.. Each lane represents one rat.

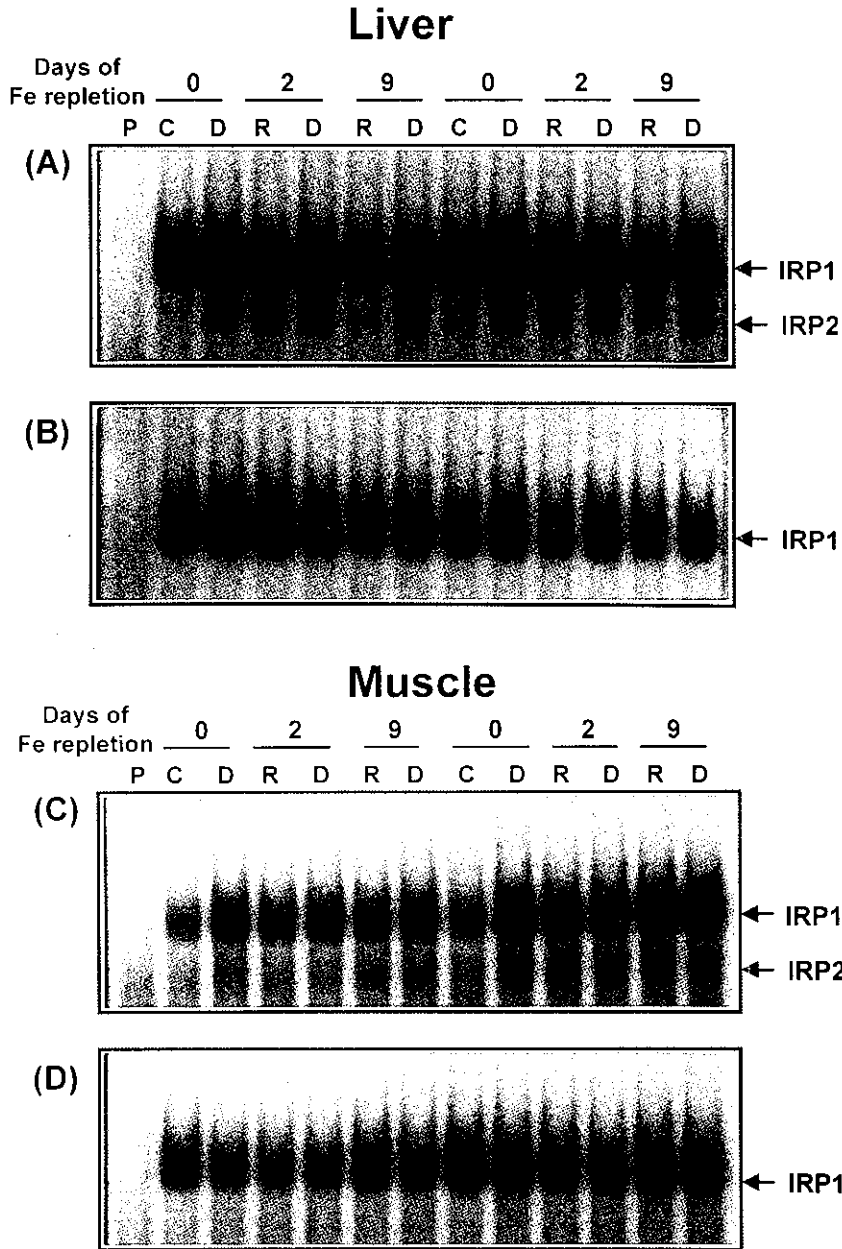
與飼料攝取量雖尚未有顯著增加，但體重增加速率及飼料利用效率已經明顯高於 D 組；補鐵 9 天時，R 組平均體重、攝食量及肝臟重量皆顯著上升，體重增加速率則不再繼續升高。缺鐵 D 組達嚴重缺鐵貧血，血紅素平均值降至 4.8 g/dL，為 C 組的 36%。經補鐵後，R 組大鼠血紅素值逐漸回升，於第 9 天時，增加為 D 組的 2.65 倍，接近大鼠之正常血紅素值。缺鐵貧血時期，D 組肝鐵濃度及肝鐵總量皆顯著下降，其中肝鐵濃度降為 C 組 30%，肝鐵總量降為 20%（表一）。補鐵 2 天或 9 天時，皆未見 R 組肝鐵濃度上升，但肝鐵總量有隨著補鐵時間增

長而緩慢上升的趨勢。相對地，缺鐵貧血時之 C 與 D 組，或補鐵期間的 R 與 D 組，其肌肉鐵濃度均無明顯差異。

缺鐵貧血時 D 組肝鐵蛋白量已降低至未能偵測，經過 9 天之補鐵期仍不足以讓肝臟鐵蛋白量增加至可測範圍（圖一）。肌肉方面，控制組、缺鐵組或補鐵組均偵測不到鐵蛋白（電泳圖未列出）。

## 二、缺鐵與補鐵對肝臟與肌肉 IRP1 與 IRP2 之自發活性及 IRP1 總活性的影響

缺鐵時大鼠肝臟 IRP1 及 IRP2 的自發活性有同

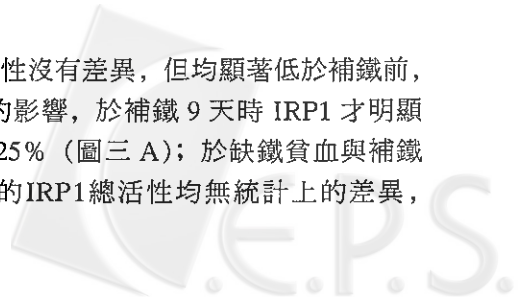


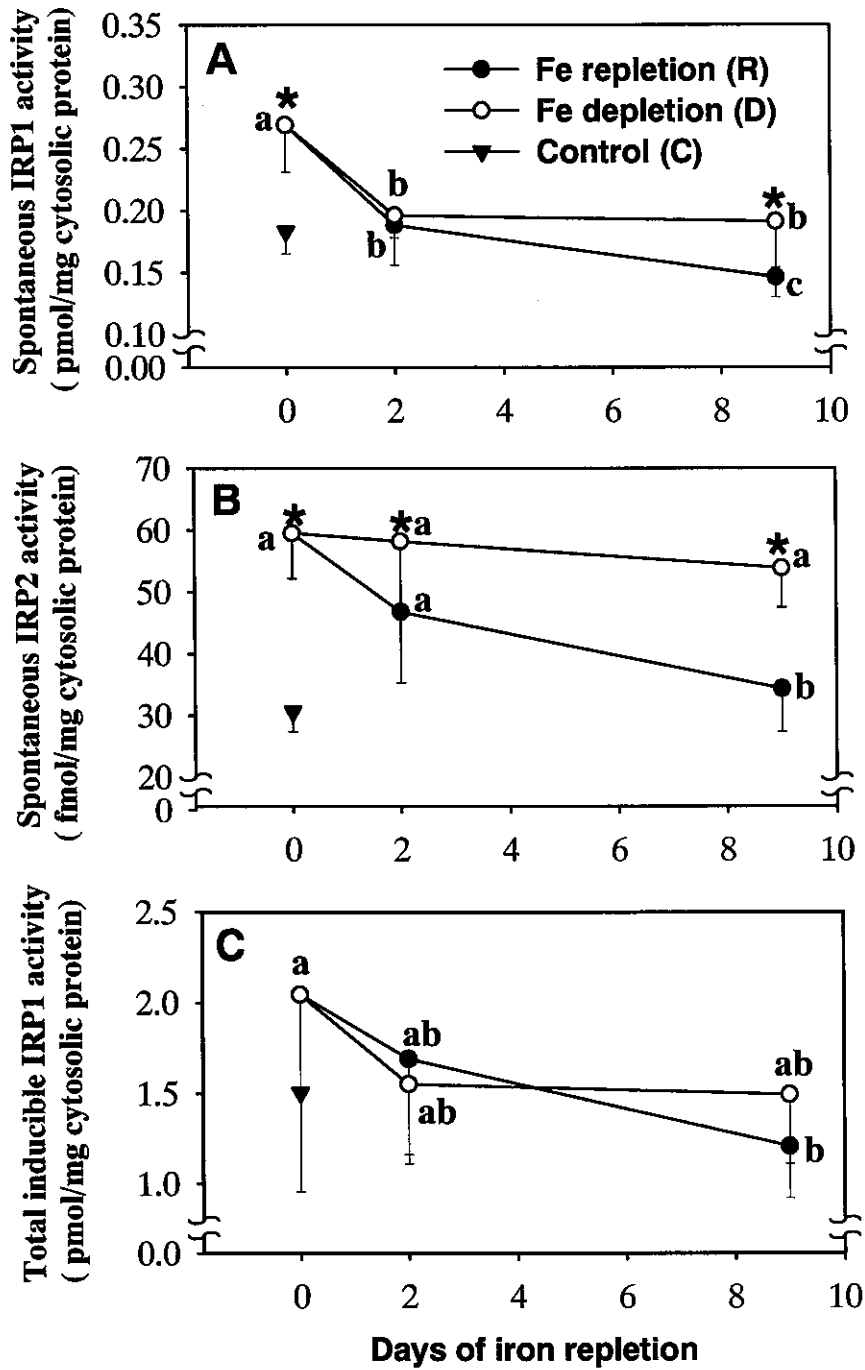
圖二 膳食缺鐵與補鐵對大鼠肝臟與肌肉之細胞質 IRP1 與 IRP2 自發活性和 IRP1 總活性影響之 gel retardation 電泳圖

Fig. 2 The effect of dietary iron depletion and repletion on the spontaneous activity of IRP1 and IRP2, and total IRP1 activity in rat liver and muscle. Panel A: spontaneous activity of IRP1 and IRP2 in liver, panel B: total inducible IRP1 in liver, panel C: spontaneous activity of IRP1 and IRP2 in muscle, and panel D: total inducible IRP1 in muscle, all were determined by gel retardation assay. In panel A and C, letters above lanes are: C, control; D, Fe depletion; R, Fe repletion; and P, IRE probe only. Each lane represents one rat.

向的變化趨勢，兩者均顯著增加（圖二 A），分別為 C 組的 1.47 倍及 1.94 倍。補鐵 2 天時，R 組 IRP2 活性即比 D 組顯著下降了 20%，補鐵 9 天時比補鐵前降低了 50%（圖三 B）；而補鐵 2 天時，R 與 D 組

之間的 IRP1 活性沒有差異，但均顯著低於補鐵前，可能反映成長的影響，於補鐵 9 天時 IRP1 才明顯比 D 組降低了 25%（圖三 A）；於缺鐵貧血與補鐵期之每兩組間的 IRP1 總活性均無統計上的差異，

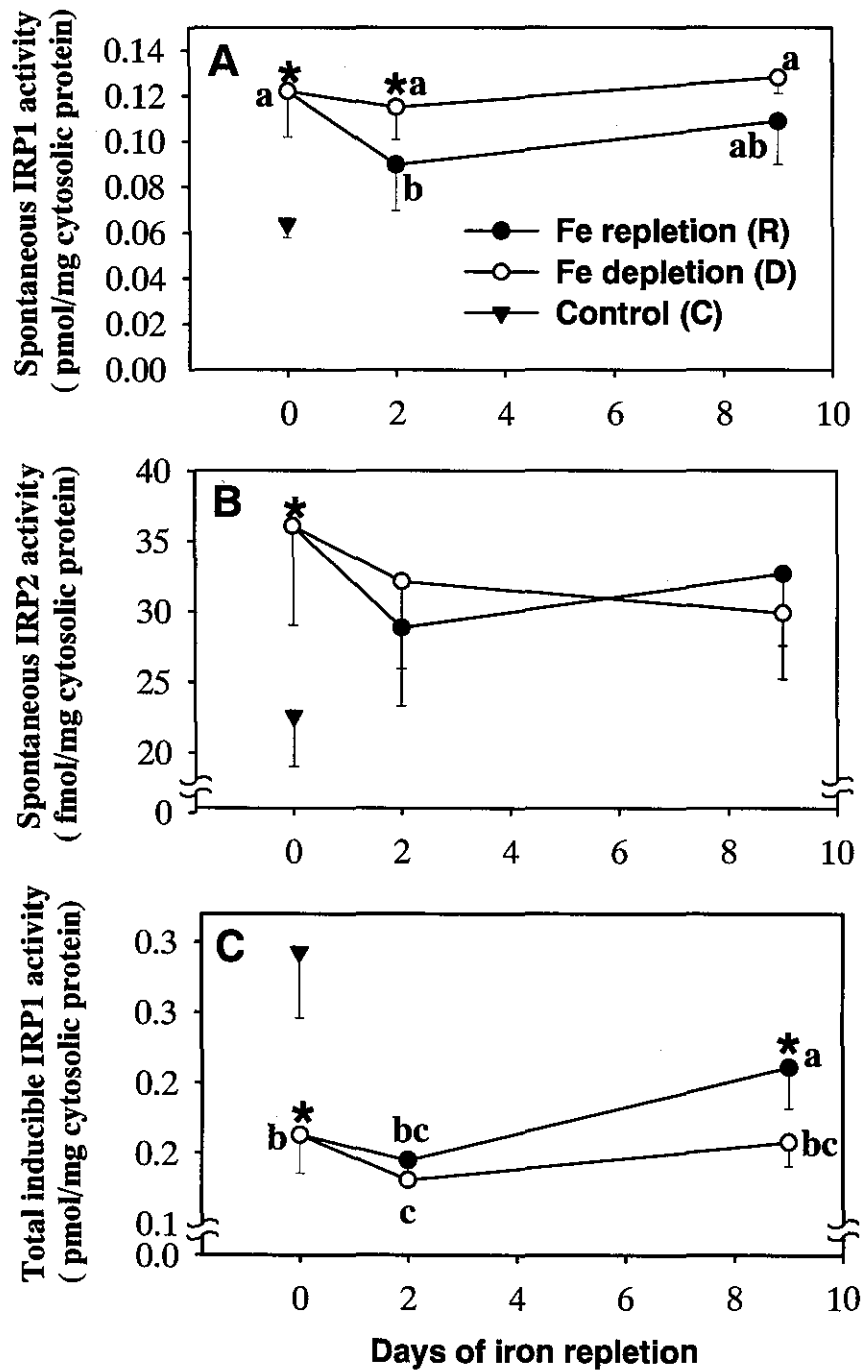




圖三 膳食缺鐵與補鐵對大鼠肝臟 IRP1 與 IRP2 活性的影響。

\* 代表同一時間點兩組之間有顯著差異，缺鐵與補鐵之 5 組間以英文字母不同表示有顯著差異

Fig. 3 The effect of dietary iron depletion and repletion on the hepatic IRPs activity in rats. Panel A: spontaneous IRP1, panel B: spontaneous IRP2, and panel C: total inducible IRP1. \* Represents significantly different between the two groups on the same day by Student's t test at  $p < 0.05$ . The different letters represent significant difference among Fe-depletion and Fe-repletion groups by Duncan's multiple range test at  $p < 0.05$ .



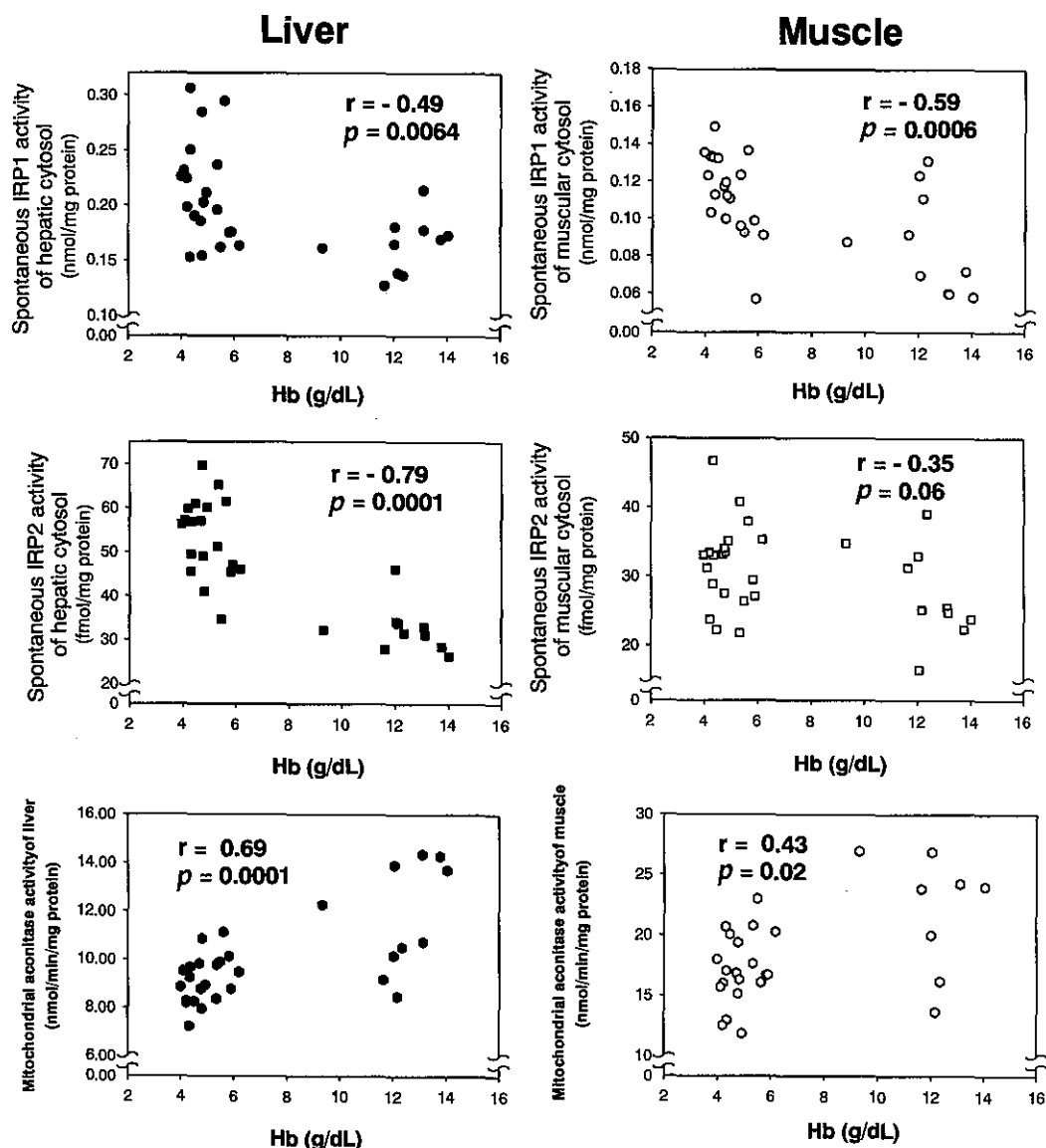
圖四 膳食缺鐵與補鐵對大鼠肌肉 IRP1 與 IRP2 活性的影響。

\* 代表同一時間點兩組間有差異，缺鐵與補鐵之 5 組間以英文字母不同表示有顯著差異

Fig. 4 The effect of dietary iron and depletion repletion on the muscular IRPs activity in rats. Panel A: spontaneous IRP1, panel B: spontaneous IRP2, and panel C: total inducible IRP1. \* Represents significantly different between the two groups on the same day by Student's t test at  $p < 0.05$ . The different letters represent significant difference among Fe-depletion and Fe-repletion groups by Duncan's multiple range test at  $p < 0.05$ .







圖五 肝臟與肌肉之 IRPs 活性、粒線體 aconitase 活性和血紅素值之相關分析

Fig. 5 Correlation between IRPs activities and mitochondrial aconitase activity and hemoglobin concentration in liver and muscle, respectively. Black symbols represent liver and white symbols represents muscle.

但見補鐵 9 天的總活性顯著低於補鐵前，降低了 40% (圖三 C)。

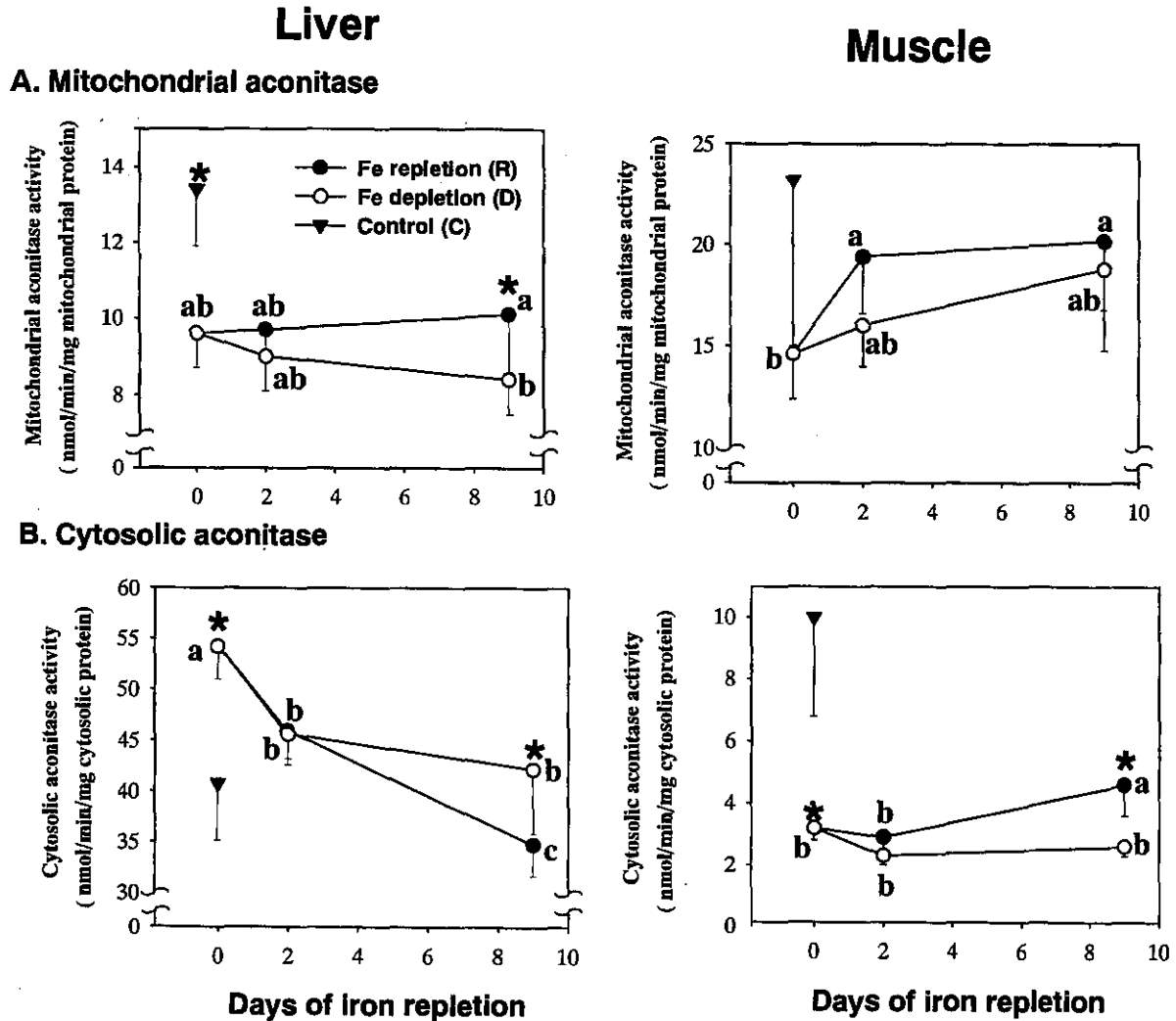
在肌肉方面，缺鐵貧血時 D 組 IRP1 及 IRP2 的自發活性均顯著較高 (圖二 C)，分別上升為 C 組的 1.9 倍及 1.6 倍。補鐵時，R 組 IRP1 活性只在第二天呈明顯降低，比補鐵前減少 30% (圖四 A)；而 IRP2 活性於 R 組與 D 組間均無顯著差異 (圖四 B)；缺鐵貧血時 D 組 IRP1 總活性明顯下降為 C 組的 55%，補鐵 9 天時 R 組顯著高於 D 組，也顯著高於補鐵之前 (圖四 C)。肌肉中總 IRP1 活性與 c-ACO 活性表現結果相符，具有顯著之正相關 (r =

0.90,  $p = 0.0001$ )。

(一) 血紅素與 aconitase 及 IRPs 的相關性 (圖五)

肝臟與肌肉之 IRP1 與 IRP2 自發活性分別和血紅素值均有顯著負相關性，粒線體 aconitase 活性與血紅素值則有顯著正相關性 (圖五)；肝臟 IRP2 自發活性與其 m-ACO 活性呈負相關 ( $r = -0.58$ ,  $p = 0.0008$ )，肌肉 IRP1 自發活性與其 m-ACO 活性呈負相關 ( $r = -0.36$ ,  $p = 0.05$ )。





圖六 膳食缺鐵與補鐵影響大鼠肝臟與肌肉粒線體 (A) 和細胞質 (B) 之 aconitase 活性。  
 \* 代表同一時間點兩組間有顯著差異 (Student's t test at  $p < 0.05$ ), 缺鐵與補鐵之 5 組間以英文字母不同表示顯著差異 (Duncan's multiple range test at  $p < 0.05$ )  
 Fig. 6 The effect of dietary iron depletion and repletion on the specific activity of mitochondrial and cytosolic aconitase in the liver and skeletal muscle of rats. Panel A: mitochondrial aconitase, panel B: cytosolic aconitase. \* Represents significant difference between the two groups on the same day by Student's t test at  $p < 0.05$ . The different letters represent significant difference among Fe-depletion and Fe-repletion groups by Duncan's multiple range test at  $p < 0.05$ .

(二) 缺鐵與補鐵對肝臟與肌肉之粒線體與細胞質 aconitase 比活性的影響

肝臟粒線體酵素 m-ACO 活性於缺鐵貧血時以 D 組顯著低於 C 組, 為 C 組之 72%; 補鐵 2 天尚無顯著上升, 至補鐵 9 天始明顯較 D 組升高 20% (圖六 A)。肌肉粒線體 m-ACO 活性受缺鐵或補鐵的影響似乎並不明顯, 但其變化趨勢與肝臟相似, 缺鐵組的平均活性為正常的 60%; 此外, 自補鐵 2 天起

R 組活性顯著高於補鐵前 (圖六 A)。

缺鐵貧血時, D 組肝臟 c-ACO 比活性明顯增加為 C 組的 1.33 倍, 補鐵 9 天後始明顯下降 (圖六 B); 同時, D 組肌肉 c-ACO 活性卻顯著降低, 為 C 組之 32%, 補鐵 9 天時 R 組顯著高於 D 組, 也高於補鐵前 (圖六 B)。缺鐵時肌肉 c-ACO 活性的變化與肝臟相反。



## 討 論

### 一、鐵營養調節肝臟與肌肉 IRPs 的自發活性並具有選別性 (differential regulation)

肝臟是儲存鐵的主要器官，對膳食鐵量的改變反應敏銳，IRPs 位於細胞質中感應細胞內的鐵濃度而調控鐵代謝相關蛋白質的表現。前人證實，隨著飼料鐵濃度的下降，大鼠肝中 IRP1 與 IRP2 的自發活性逐漸增高，兩者有相同的變化趨勢，都在 7 天內達到最高，以 IRP1 稍先於 IRP2，但以 IRP2 增加的倍數高於 IRP1<sup>(4,5)</sup>。本研究則證實對缺鐵貧血大鼠補鐵時，肝臟中 IRP1 與 IRP2 自發活性均有下降現象，而且以 IRP2 先於 IRP1。另外，本研究亦證實肌肉中 IRP1 與 IRP2 的自發活性受鐵營養的調節，缺鐵貧血時兩者均明顯上升，與肝臟之變化相同；但是肌肉中以 IRP1 的倍數高於 IRP2，且於補鐵 9 天內僅 IRP1 活性有下降的反應，而 IRP2 則無，此等變化趨勢與肝臟不盡相同。

雖然兩種 IRPs 對鐵營養的反應方向大致相同，但是仍存有細部的差異，包括表現程度、時間趨勢與組織差異，可能表示兩型 IRP 對鐵的靈敏度不盡相同，而且配合組織獨特的生理功能，對目標蛋白質的調控具有選別性。已有研究指出體外培養的細胞所含的 IRP2 對鐵量的反應比 IRP1 為敏感，其 IRP2 含量比動物組織為多，同時所含的鐵蛋白則比組織為少；IRP2 似乎與細胞增生有關，由於增生需要鐵而造成細胞內相對的缺鐵狀態，可被 IRP2 所偵測<sup>(20)</sup>。當嚴重缺鐵時，肝臟的鐵蛋白耗盡，造血組織的血紅素無法合成而貧血，肝臟與肌肉粒線體 aconitase 合成量也大幅減少而限制了氧化代謝效率與成長。補鐵時血紅素值迅速上升，表示造血組織有最快速的獲鐵能力；動物生長速率增快表示氧化代謝效率提高，與肝臟與肌肉的 m-ACO 活性的逐漸增加應有關聯；此時肌肉的 IRPs 自發活性的下降不像肝臟那麼明顯，可能有助於維持較多的運鐵蛋白受器或其他獲鐵蛋白，可保障肌肉獲得充足的鐵以供含鐵酵素和蛋白質的合成之用；相對地，肝臟 IRPs 自發活性因補鐵而減少，推測此有助於阻止鐵流向肝臟，而讓吸收之鐵優先供應造血組織

與肌肉之需要。動物體內此等鐵利用的先後次序與前人之觀測一致<sup>(14)</sup>，其分子機制或可以 IRPs 之選別性調控來解釋。若依此優先次序，則血紅素的恢復未必反映肌肉的完全恢復，在缺鐵貧血的治療上有重要的意義，認識組織間鐵的利用有次序先後之別，並釐清其控制機轉，將有助於鐵營養的正確評估與診斷。

IRPs 對細胞中具 IRE 之蛋白質的調控具有選別性亦有動物實驗與細胞實驗的證據，並且可用分子機制解釋<sup>(5,21)</sup>。大鼠肝臟中鐵蛋白與粒線體 aconitase 隨飼料鐵含量而改變，當鐵含量為 20 g/kg 時，鐵蛋白濃度已經降低了 90%，可是 aconitase 只降低約 15%；當鐵含量為 2 g/kg 時，鐵蛋白在 5 天時已經低於偵測極限，aconitase 則最低仍維持在正常的 50%<sup>(4,5)</sup>。HL-60 細胞經 hemin 處理 5 小時，hemin 濃度在 10~50  $\mu$ M 範圍可使 aconitase 增加約一倍，而鐵蛋白則隨著 hemin 濃度增加而有 20 至 100 倍的變化<sup>(21)</sup>。此種選別差異與目標 RNA 所含的 IRE 序列與構型不盡相同，因而與 IRPs 的親和力不同有關<sup>(22)</sup>。鐵蛋白的 IRE 結構含有 internal loop/bulge，m-ACO 的 IRE 結構有 C-bulge，若將鐵蛋白 IRE 修改成 C-bulge，則導致其與 IRP1 的結合減少 13%，但與 IRP2 的結合會減少達 95% 之多<sup>(22)</sup>。依此推測，IRP1 對於 m-ACO 轉譯的抑制較強，減少 IRP1 自發活性或總量有利於解除對 m-ACO 的抑制，本研究所見補鐵 2 天對肌肉的影響以 IRP1 為主，並伴隨有 m-ACO 活性的上升，而補鐵 9 天亦見肝臟 IRP1 與 m-ACO 同時的變化，與前述論點相當一致。

### 二、鐵營養影響肌肉粒線體 aconitase 活性及生化代謝意義

動物的鐵營養狀況與組織的氧化代謝有密切的關連。貧血大鼠的血漿與肌肉乳酸濃度升高<sup>(23-25)</sup>，乳酸生成量增加而清除速率沒有改變<sup>(24)</sup>，葡萄糖的代謝速率為正常的五倍<sup>(26)</sup>，表示肌肉利用能量的途徑傾向糖解作用以減輕對電子傳遞鏈的倚賴；相對地，肝臟有脂肪堆積的現象，以三酸甘油酯為主<sup>(27)</sup>，糖質新生作用增加，參與胺基酸轉胺反應的酵素 glutamate dehydrogenase 與 alanine aminotransferase 的活性分別增加達正常的 174% 與 134%<sup>(28)</sup>。以注射補充鐵時，肌肉的 ketoglutarate dehydrogenase 與

succinate dehydrogenase 活性上升之同時，肝臟中胺基酸代謝酵素的活性則降低<sup>(28)</sup>。缺鐵貧血動物肌肉機能減弱，即使以輸血法把血紅素調整至正常，缺鐵大鼠跑步的能力仍然低於正常<sup>(29)</sup>；對後肢肌肉的灌流實驗確證缺鐵肌肉接受 10 min 刺激的收縮力只達正常肌肉的 60%<sup>(25)</sup>。追究其機制可見，缺鐵貧血動物其肌肉粒線體的整體氧化代謝速率大幅下降，丙酮酸與 ketoglutarate 的氧化速率降幅可達 55%<sup>(30)</sup>，嚴重時更達 90%<sup>(23,25)</sup>。

許多研究早已證實，缺鐵會使肌肉粒線體內膜上的細胞色素 cytochrome c 濃度下降 50%，含鐵酵素 cytochrome c oxidase 活性下降 50%，含鐵-硫複合體的 succinate dehydrogenase 與 NADH dehydrogenase 活性下降高達 78%<sup>(13,14,28)</sup>。不過，粒線體的 ADP/O ratio 與 respiratory control ratio 均不因缺鐵而改變，表示氧化磷酸化效率正常<sup>(14)</sup>。由於細胞色素與 cytochrome c oxidase 含鐵，succinate dehydrogenase 與 NADH dehydrogenase 含鐵-硫複合體，都是丙酮酸、脂肪酸、胺基酸與酮酸的氧化代謝所必經之途徑，因此缺鐵導致氧化酵素與細胞色素的減少被視為限制氧化代謝的主因<sup>(9)</sup>。然而，追蹤補鐵影響耗氧量與氧化代謝酵素活性的過程中，耗氧量於補鐵 3 天即顯著增加，可是氧化酵素於補鐵 5 天時才顯著上升，氧化酵素與耗氧量的變化趨勢並不完全相符<sup>(14)</sup>，可見氧化酵素未必是媒介缺鐵與代謝限制的因素。

粒線體的 m-ACO 為檸檬酸循環之一員，為一含鐵-硫複合體的蛋白質，其催化中心含有 [4Fe-4S]，負責在檸檬酸循環中將 citrate 轉化為 isocitrate；其 mRNA 5' 端具有 IRE<sup>(7)</sup>，可受細胞鐵量的調節<sup>(21)</sup>，也受飼料鐵濃度的調節。飼料鐵濃度低於正常時，大鼠肝中 m-ACO 的活性與蛋白質量均隨之下降，最低時為正常的 50%<sup>(4)</sup>，顯著的變化大約開始於缺鐵第 4 天，或是血紅素值低於 8 g/dL<sup>(4,5)</sup>。本研究首度證實缺鐵大鼠肌肉中 m-ACO 的活性有低於正常的趨勢，平均約為正常的 60%，此等降幅與肝臟相近，更是與肌肉氧化代謝酵素的降幅相當，高於 cytochrome c 和 cytochrome c oxidase 的降幅，而小於 succinate dehydrogenase 和 NADH dehydrogenase 的降幅。因此，肌肉 m-ACO 應該是缺鐵時間接限制氧化代謝的一環。

大鼠飼以缺鐵飼料 (2 mg Fe/kg) 以誘發缺鐵

的過程，肝臟鐵與血漿運鐵蛋白飽和度下降最先也最快，3 天即有顯著的差異；其次是血球比容，7 天達顯著差異；而肌肉 cytochrome c 含量的下降速率明顯較緩慢，需要 20 天以上才達到顯著差異<sup>(31)</sup>。缺鐵貧血大鼠補充膳食鐵質時，不同的組織反應靈敏度有別，血紅素值在三天時即有明顯的反應，一週時即可接近正常；可是肌肉的粒線體量，粒線體氧化代謝 pyruvate 配合 malate、succinate、glycerophosphate 的速率，以及氧化酵素 cytochrome oxidase、NADH dehydrogenase、succinate dehydrogenase 的活性則恢復較為緩慢，必須在補鐵 5 天之後才有明顯的增升<sup>(14)</sup>。若以注射方式補充鐵時，肌肉與肝臟均恢復氧化代謝的能力，已知肌肉粒線體最先升高的酵素是 glycerophosphate dehydrogenase<sup>(28)</sup>。本研究可見肌肉 m-ACO 活性於缺鐵 17 天時亦顯著降低，補鐵第 2 天即明顯升高，同時伴隨有體重增加速率與飼料利用效率的顯著增加，時間趨勢先於耗氧量的變化。在缺鐵與補鐵時 m-ACO 活性變化與氧化代謝速率變化的時程相符，亦支持肌肉 m-ACO 受鐵營養調節而影響氧化代謝之假說。

### 三、缺鐵時肌肉細胞質 aconitase 活性下降反映鐵-硫複合體合成受限

前人利用電子共振儀 (EPR) 分析代表鐵硫蛋白的訊號 ( $g = 1.88、1.93、2.01、2.03$  與  $2.05$  等)，可見缺鐵貧血時大鼠肌肉粒線體內膜上參與電子傳遞的多種鐵硫蛋白量只有正常的 27%~62%，補鐵 7 天的過程可見鐵硫蛋白相關的訊號逐漸穩定上升，反映鐵硫蛋白量的回升，其中更以  $g = 2.03$  時的回升幅度最大<sup>(14)</sup>，然而肝臟粒線體的氧化速率並沒有顯著降低，Complex I 也沒有改變<sup>(9)</sup>；表示缺鐵對肌肉的影響不同於肝臟，在前者使多種鐵硫蛋白的含量減少，在後者則以 m-ACO 為主，並不影響到其他鐵硫蛋白。推測肌肉鐵硫蛋白的合成機轉可能對缺鐵有獨特的敏感性而容易受損。

動物細胞之鐵硫蛋白質主要存在粒線體中，主司電子的傳遞的 complex I (NADH-ubiquinone reductase) 和 complex II (succinate-ubiquinone reductase) 存在內膜上，參與檸檬酸循環的 m-ACO 存在間質 (matrix) 中。細胞質 c-ACO 沒有 IRP1 活性，是細胞質中已知唯一的鐵硫蛋白。IRP1 與 c-ACO 是同一蛋白質而具有兩種可以互相轉換的功能，其

功能之變換與鐵-硫複合體有關；前者不含鐵-硫複合體而與 IRE 有高親和力，用於調節細胞鐵的利用，但沒有酵素活性；後者具有鐵-硫複合體而失去結合 IRE 的能力，但是具有酵素活性，不過生理功能不明<sup>(7)</sup>。缺鐵貧血大鼠肌肉中 c-ACO 活性顯著下降可能反映細胞質中鐵硫蛋白的合成受損，與粒線體之鐵硫蛋白有雷同的現象。

最近的研究發現動物細胞中鐵硫蛋白的合成需要蛋白質 NifS，此蛋白質具有 cysteine desulfurase 的作用，以 cysteine 為基質，生成 alanine 與元素態硫，以供鐵-硫複合體組合之需<sup>(32)</sup>。細胞中之 NifS 來自單一基因與單一 mRNA，但是轉譯表現的蛋白質有兩型，分子量較大者為粒線體型，分子量較小者為細胞質型，兩型蛋白質的表現受細胞內部 pH 值的影響，當 pH 從 7.2 降至 6.9 時，細胞質型 NifS 蛋白質質量會減少，而且 NifS 的組織分佈以心肌和骨骼肌含量特別高於其他組織<sup>(32)</sup>。缺鐵時肌肉乳酸的生成與濃度幾乎比正常時增加一倍，足以導致肌肉 pH 降低，可能因此減少細胞質 NifS 含量，生成鐵-硫複合體之速率減少，故導致 c-ACO 活性降低；補鐵時乳酸量漸減少，NifS 表現可能逐漸恢復，故而 c-ACO 活性上升；如此足以解釋肌肉與肝臟之 c-ACO 變化之不同，因為肝細胞沒有劇烈的酸度變化，故 c-ACO 活性沒有下降的現象。

整體而言，本研究主要發現肝臟與肌肉對膳食鐵量的反應略有不同：雖然缺鐵使肝臟和肌肉的 IRP1 與 IRP2 自發活性上升，同時粒線體酵素 m-ACO 較正常為低，補鐵時肝臟與肌肉之 m-ACO 均有上升之趨勢，但是 IRP1 與 IRP2 自發活性之下降則以肝臟較肌肉為先；另外 c-ACO 活性隨鐵量之變化則肝臟與肌肉呈相反之趨勢；推測此等差異可能與維護肌肉功能和成長有關。

## 致 謝

本研究承蒙國科會計劃 NSC 88-2815-C-002-138B 經費補助，特此致謝。

## 參考文獻

1. 蕭寧馨、葉文婷、潘文涵 (1999) 國人鐵營養狀況與缺鐵盛行率。中華醫誌 24:119-138。
2. Klausner RD, Rouault TA and Harford JB (1993) Regulating the

- fate of mRNA: the control of cellular iron metabolism. *Cell* 72: 19-28.
3. Theil EC (1990) Regulation of ferritin and transferrin receptor mRNAs. *J Biol Chem* 265:4771-4774.
  4. Chen OS, Schalinske KL and Eisenstein RS (1997) Dietary iron intake modulates the activity of iron regulatory proteins and abundance of ferritin and mitochondrial aconitase in rat liver. *J Nutr* 127:238-248.
  5. Chen OS, Blemings KP, Schalinske KL and Eisenstein RS (1998) Dietary iron intake rapidly influences iron regulatory proteins, ferritin subunits and mitochondrial aconitase in rat liver. *J Nutr* 128:525-535.
  6. Hentz MW and Kuhn LC (1996) Molecular control of vertebrate iron metabolism: mRNA-based regulatory circuits operated by iron, nitric oxide, and oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci* 93:8175-8182.
  7. Beinert H and Kennedy MC (1993) Aconitase, a two-faced protein: enzyme and iron regulatory factor. *FASEB J* 7:1442-1449.
  8. Iwai K, Klausner RD and Rouault TA (1995) Requirements for iron-regulated degradation of the RNA binding protein, iron regulatory protein 2. *EMBO J* 21:5350-5357.
  9. Dallman PR (1986) Biochemical basis for the manifestations of iron deficiency. *Ann Rev Nutr* 6:13-40.
  10. Cartier LJ, Ohira Y, Chen M, Cuddihue RW and Holloszy JO (1986) Perturbation of mitochondrial composition in muscle by iron deficiency. *J Biol Chem* 261:13827-13832.
  11. Garry D, Drdway GA, Lorenz JN, Radford NB, Chin ER, Grange RW, Bassel-Duby R and Williams RS (1998) Mice without myoglobin. *Nature* 395:905-908.
  12. American Institute of Nutrition (1977) Report of the American Institute of Nutrition ad hoc committee on standards for nutritional studies. *J Nutr* 107:1340-1348.
  13. Ackrell BAC, Maguire JJ, Dallman PR and Kearney EB (1984) Effect of iron deficiency on succinate and NADH-ubiquinone oxidoreductases in skeletal muscle mitochondria. *J Biol Chem* 259:10053-10059.
  14. Davies KJA, Maguire JJ, Brooks GA, Dallman PR and Packer L (1982) Muscle mitochondrial bioenergetics, oxygen supply and work capacity during dietary iron deficiency and repletion. *Am J Physiol* 242:E418-E427.
  15. Oser BL (1965) *Hawk's Physiological Chemistry*. 14th ed. pp. 1096. McGraw-Hill, New York.
  16. Rose IA and O'Connell EL (1967) Mechanism of aconitase action. I. The hydrogen transfer reaction. *J Biol Chem* 242:1870-1879.
  17. 莊榮輝 (1985) 水稻蔗糖合成酶之研究。台大農化所博士論文。
  18. Barton HA, Eisenstein RS, Bomford AB and Munro HN (1990) Determinants of the interaction of the iron-responsive element-binding protein and its binding site in rat L-ferritin mRNA. *J Biol*

- Chem 265:7000-7008.
19. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RT (1951) Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265.
  20. Recalcati S, Conte D and Cairo G (1999) Preferential activation of iron regulatory protein-2 in cell lines as a result of higher sensitivity to iron. *Eur J Biochem* 259:304-309.
  21. Schalinske KLM, Chen OS and Eisenstein RS (1998) Iron differentially stimulates translation of mitochondrial aconitase and ferritin mRNAs in mammalian cells. *J Biol Chem* 273:3740-3746.
  22. Ke Y, Wu J, Leibold EA, Walden WE and Theil EC (1998) Loops and bulge/loops in iron-responsive element isoforms influence iron regulatory protein binding. *J Biol Chem* 273:23637-23640.
  23. Finch CA, Miller LR, Inamdar AR, Person R, Seiler K and Mackler B (1976) Iron deficiency in the rat, physiological and biochemical studies of muscle dysfunction. *J Clin Invest* 58:447-453.
  24. Finch CA, Gollnick PD, Hlastala MP and Miller LR (1979) Lactic acidosis as a result of iron deficiency. *J Clin Invest* 64:129-137.
  25. McLane JA, Fell RD, McKay RH, Winder WW, Brown EB and Holloszy JO (1981) Physiological and biochemical effects of iron deficiency on rat skeletal muscle. *Am J Physiol* 241:C47-C54.
  26. Henderson SA, Dallman PR and Brooks GA (1986) Glucose turnover and oxidation are increased in the iron-deficient anemic rat. *Am J Physiol* 250:E414-E421.
  27. Masini A, Salvioli G, Cremonesi P, Botti B, Gallesi D and Ceccarelli D (1994) Dietary iron deficiency in the rat. I. Abnormalities in energy metabolism of the hepatic tissue. *Biochim Biophys Acta* 1188:46-52.
  28. Azevedo JL Jr, Willis WT, Turcotte LP, Rovner AS, Dallman PR and Brooks GA (1989) Reciprocal changes of muscle oxidases and liver enzymes with recovery from iron deficiency. *Am J Physiol* 256:E401-E405.
  29. Davies KJA, Donovan CM, Refino CJ, Brooks GA, Packer L and Dallman PR (1984) Distinguishing effects of anemia and muscle iron deficiency on exercise bioenergetics in the rat. *Am J Physiol* 246:E535-543.
  30. Cartier L-J, Ohira Y, Chen M, Cuddihee RW and Holloszy JO (1986) Perturbation of mitochondrial composition in muscle by iron deficiency. *J Biol Chem* 261:13827-13832.
  31. Dallman PR, Refino C and Yland MJ (1982) Sequence of development of iron deficiency in the rat. *Am J Clin Nutr* 35:671-677.
  32. Land T and Rouault TA (1998) Targeting of a human iron-sulfur cluster assembly enzyme, *nifs*, to different subcellular compartments is regulated through alternative AUG utilization. *Mol Cell* 2:807-815.



## 膳食缺鐵與補鐵影響大鼠肝臟 和肌肉 IRPs 與 Aconitase 活性

黃惠玲 康碩芬 蕭寧馨

國立台灣大學農業化學系

**摘要** 已知膳食缺鐵快速增加大鼠肝臟的 IRPs (iron regulatory proteins) 自發活性 (spontaneous activity), 同時經由對 IRE (iron responsive element) 的結合而減少鐵蛋白 (ferritin) 與粒線體 aconitase (m-ACO) 活性, 但是鐵補充對其影響的分子機制則尚無資料, 加以肌肉鐵利用調節受膳食鐵營養影響的分子機制亦所知有限, 故以大鼠缺鐵—補鐵實驗探討肝臟與肌肉中 IRPs、鐵蛋白、粒線體與細胞質 aconitase 活性等隨時間之變化, 並做兩組織間的比較。離乳 Wistar 雄鼠 30 隻, 任取 5 隻為正常控制組, 飼以 AIN-76 飼料, 其餘 25 隻先飼以缺鐵 AIN-76 飼料 17 天使缺鐵貧血後, 隨機取 5 隻與控制組 5 隻同時犧牲。其餘大鼠隨機分為兩組, 其中一組改飼以鐵正常飼料而為補鐵組, 於補鐵第 2 與 9 天各組取 5 隻大鼠犧牲。犧牲時收集血液與血清, 取出肝臟和後肢肌肉, 分離其細胞質與粒線體以供分析。結果可見, 缺鐵時肝臟與肌肉中 IRP1 與 IRP2 自發活性顯著高於正常 (1.47~1.9 倍), 補充鐵對肝臟與肌肉兩型 IRP1 與 IRP2 有選別性的影響 (differential regulation); 缺鐵時肝臟和肌肉 m-ACO 活性有下降的趨勢 (60%~72%), 補充鐵則有明顯的增高; 缺鐵使肝臟細胞質 c-ACO 增加, 卻使肌肉 c-ACO 減少, 可能反映肌肉鐵硫蛋白之生合成有所變化。

**關鍵詞:** IRPs, Aconitase, 肝臟, 肌肉, 鐵營養, 大鼠

