

不同膳食鐵量補充對缺鐵貧血 大鼠肝臟鐵調節蛋白活性之影響

何素珍* 蕭寧馨

Different Degrees of Dietary Iron Repletion on the Hepatic Iron Activities and Regulatory Proteins in Iron Deficiency Anemic Rats

Su-Chen He^{1*} and Ning-Sing Shaw²

¹ Department of Cosmetic Science, Chia-Nan College of Pharmacy and Science

² Department of Agricultural Chemistry, National Taiwan University

(Accepted for publication on March 20, 2000)

ABSTRACT Iron regulatory proteins (IRPs) are the key regulators in cellular iron homeostasis. Dietary iron deficiency rapidly increases the spontaneous activity of IRPs and reduces hepatic content of ferritin and mitochondrial aconitase (m-Acon). We evaluated the interrelationship between hemoglobin, hepatic IRPs activity and ferritin and m-Acon content during recovery from iron deficiency anemia using a series of dietary iron supplementation in a rat model. Among 24 weanling Wistar rats, four were fed a control diet (35 mg Fe/kg diet) through out the study. The rest were rendered anemic by feeding an iron-free diet for about 2 weeks and randomly assigned into four iron repletion groups: 6R, 12R, 18R and 36R, into which iron was added at 6, 12, 18 and 35 mg per kg of diet. Rats were sacrificed for tissue sampling and analysis after two weeks of iron repletion. Ferritin and m-Acon protein content was measured by immunoblotting. IRPs and total IRP1 activity was measured using gel retardation assay with an IRE probe. As dietary iron increased, hemoglobin concentration, liver weight and m-Acon content also increased, and IRP1 and IRP2 spontaneous-activity decreased. A dose-response relationship was found in this experiment. Growth, iron status and liver enzyme parameters reached the control levels only in the 36R group. The dietary iron level required for maximal hemoglobin repletion was similar to that for the recovery of hepatic m-Acon. Spontaneous IRPs activity was negatively correlated with hemoglobin concentration, and exerted a differential regulation on the expression of hepatic ferritin and m-Acon.

Keywords : iron deficiency anemia, dietary iron repletion, iron regulatory proteins, ferritin, mitochondrial aconitase, rats

* To whom correspondence should be addressed.



前 言

鐵是動物體的必需營養素，除了參與氧氣運送外，在細胞內可組成 heme、Fe-S 或 Fe-O-Fe cluster 等型式與蛋白質聯結，參與粒線體能量代謝、電子傳遞及解毒作用，但是過多的“游離鐵 (free iron)”則會催化自由基的生成，破壞蛋白質及 DNA⁽¹⁾。細胞鐵的平衡主要調控在轉錄後階段，藉由細胞質中的鐵調節蛋白 IRPs (iron regulatory proteins) 與鐵蛋白 (ferritin) 或轉鐵蛋白受體 (transferrin receptor) mRNA 上的 IRE (iron responsive element) 結合，影響其表現，進而調控鐵的貯存及獲取^(2, 3)。IRE 為一特殊核苷酸序列，在鐵蛋白 mRNA 的 5'UTR (untranslated region) 及運鐵蛋白受體 mRNA 的 3'UTR 分別含有一個及五個單位的 IRE。IRPs 與 IRE 結合時，會降低鐵蛋白 mRNA 的轉譯作用及增加運鐵蛋白受體 mRNA 的穩定性^(4, 5)。細胞可用鐵量會影響 IRPs 與 IRE 的結合活性：鐵螯合劑處理時，細胞出現缺鐵狀況，會增加 IRPs 活性，使鐵蛋白減少，同時增加運鐵蛋白受體的表現；反之，細胞以鐵鹽處理時，IRPs 活性降低，鐵蛋白合成增加，運鐵蛋白受體表現減少⁽⁶⁾。哺乳動物細胞除了鐵蛋白及運鐵蛋白受體之外，紅血球細胞之 δ -ALA dehydrogenase^(7, 8) 與粒線體 aconitase (m-Acon)⁽⁹⁾ 的 mRNA 5'UTR 端均有 IRE 序列，可受 IRPs 調控。嚙齒類及人類細胞中有二種 IRPs，依其發現順序分別命名為 IRP1 及 IRP2。IRP1 由 889 個胺基酸組成，分子量為 98 kDa，IRP2 由 963 個胺基酸組成，分子量為 105 kDa。二者對於 wild type IRE 皆具很高之親和性及專一性，體外實驗顯示兩者抑制鐵蛋白合成之能力相當⁽¹¹⁾。

鐵調節 IRP1 及 IRP2 鍵結活性的機制並不相同。IRP1 為一雙功能蛋白，當其含 Fe_4S_4 cluster 時，具有細胞質 aconitase (c-Acon) 酵素活性，若失去 Fe_4S_4 cluster 時，則具有 IRE 結合活性⁽¹²⁾。兩型之間的轉換可受鐵調節，高鐵時為 c-Acon；缺鐵時可轉變為 IRP1⁽¹³⁾。在細胞培養模式下發現：不同的鐵營養狀態只是透過轉譯後 Fe_4S_4 cluster 的插入或移除作用調節 IRP1 自發活性 (spontaneous activity)，並不改變 IRP1 的蛋白質含量。在體外系統加入還原劑 2-mercaptoethanol (2-ME) 可移除 Fe_4S_4 clus-

ter 而將 c-Acon 轉換為 IRP1，分析上用於測量既存的 IRP1 總量；對比於 IRP1，鐵則會影響 IRP2 蛋白質的含量，低鐵時增加其生合成，高鐵時則促進其降解⁽¹⁴⁾。

已知膳食缺鐵使大鼠血紅素下降，同時肝臟 IRP1 與 IRP2 活性快速而顯著增高，導致鐵蛋白與 m-Acon 大幅減少^(15, 16)。對缺鐵貧血動物施予鐵補充時，血紅素通常會快速上升⁽¹⁷⁾，但是其他含鐵蛋白質的恢復狀況則不明。本實驗乃是給予貧血大鼠接受不同鐵量的補充時，比對其血紅素值與肝臟 IRPs 活性、鐵蛋白與 m-Acon 的變化，以了解恢復期的分子與生化改變。

材料與方法

一、飼料配製及動物飼養

缺鐵飼料以 AIN-76 為基本配方⁽¹⁸⁾，但不添加鐵，經灰化測定其鐵含量為 2.6 mg/kg。鐵補充用含鐵飼料乃於缺鐵飼料中添加檸檬酸鐵 (ferric citrate)，依添加鐵量分為 6R, 12R, 18R, 36R 四組，鐵濃度分別為 6、12、18 及 35 mg/kg。實驗動物為 Wistar 離乳雄鼠 24 隻，購自台大醫學院動物中心，個別飼養於不鏽鋼籠中；動物室溫度維持在 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ，光暗週期各為 12 小時。隨機取其中 4 隻作為鐵正常之對照組 (C)，於實驗期全程餵飼 35 mg/kg 含鐵飼料。其餘 20 隻首先餵予缺鐵飼料約二週，使其血紅素濃度低於 60 g/L 後，再隨機分為 4 組，每組 5 隻，分別餵予四組含鐵飼料 2 週。飼料及去離子水均為自由攝取。每週記錄攝食量及體重二次。

二、組織取樣及分析樣品的製備

飼養期結束，老鼠以二氧化碳窒息犧牲，以含凝血活化因子的採血管 (SARSTEDT) 抽取腹腔大靜脈血並離心 ($1,200 \times g$, 10 min) 製備血清。快速取出肝臟，以生理食鹽水灌流、瀝乾後秤重、分裝、 -20°C 凍存或均質以待各項分析。供均質的肝臟組織先以剪刀剪碎，加入均質緩衝液 (50 mM Hepes, pH 7.4, 0.25 M sucrose, 2 mM citrate, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 0.5 mg/L leupeptin)，以玻璃均質機 (Electric stirrer, Her Cheng Machinery Co., Taiwan) 均質，定量體積使成為 20% (w/v) 的均質液，以 $600 \times g$ 離心 10 分鐘 (KUBOTA

1900) 去除細胞核及未被打破之細胞, 再以 $15,000 \times g$ 離心 30 分鐘 (Beckman XL-90, rotor type 50.4 Ti), 分離細胞質及粒線體, 上清液為細胞質部份。分裝細胞質液並凍存於 -70°C 以待酵素或 IRPs 活性分析。

三、血液分析和酵素活性測定

血球比容採毛細管離心法。血紅素以 cyanomethemoglobin 法定量⁽¹⁹⁾, 全血與 Drabkin's 試劑反應後, 測得 540 nm 之吸光值, 乘以係數 368 換算濃度 (g/L)。血清鐵濃度以市售試劑套組 (Randox Laboratory Ltd., UK.) 測定。組織鐵定量是取 0.5 g 組織以濃硝酸分解後, 利用原子吸收光譜儀 (PERKIN ELMER 3100) 測定, 並比對標準劑量曲線計算鐵含量。

細胞質 aconitase (EC 4.2.1.3) 活性分析採用 Rose 等人⁽²⁰⁾的方法。利用其與 isocitrate dehydrogenase (EC 1.1.1.42) 之偶合反應, 同時將 NADP^{+} 還原為 NADPH, 以 NADP^{+} 還原速率計算酵素比活性。蛋白質以 Lowry 法測定⁽²¹⁾。

四、m-Acon 及鐵蛋白之 Western blotting 免疫分析定量

分析 m-Acon 時, 肝臟均質液的蛋白質濃度稀釋為 20 mg/mL; 分析鐵蛋白時, 肝臟均質液的蛋白質濃度稀釋為 25 mg/mL, 並先以 70°C 加熱 10 分鐘後, 經 $12,000 \times g$ 離心 10 分鐘去除對熱不穩定的蛋白質, 取上清液分析。

蛋白質電泳時, 取 10 μL 稀釋均質液, 加入等量緩衝液 (250 mM Tris, 4% SDS, 10% 2-ME), 以水浴煮沸 10 分鐘將蛋白質變性處理後, 加入適量追蹤染料。分析 m-Acon 採用 10% SDS-PAGE, 分析鐵蛋白採用 15% SDS-PAGE。電泳膠片製備及電泳分離條件乃採用莊⁽²²⁾之方法。所採用的蛋白質分子量標準品為 Pre-stained Marker (SeeBlue™, Prestained standard, Novex, USA), 如下列: myosin 250 kDa, bovine serum albumin 98 kDa, glutamic dehydrogenase 64 kDa, carbonic anhydrase 36 kDa, myoglobin 30 kDa, lysozyme 16 kDa, aprotinin 6 kDa, insulin β chain 4 kDa。

電泳完成的 SDS 膠片經轉印至 PVDF (Millipore Ltd.) 後進行免疫分析。分析 m-Acon 之一級

抗體為 rabbit anti-bovine m-Acon 抗體 (以 NET 溶液稀釋 2000 倍使用, 長庚大學莊宏亨博士贈與); 分析鐵蛋白之一級抗體為 rabbit anti-rat ferritin antibody (本實驗室自行製備)⁽²³⁾; 二級抗體皆用 biotinylated goat anti-rabbit IgG (Vectastain, 以 NET 溶液稀釋 2000 倍); 最後連接 avidin + biotinylated horseradish peroxidase (Vectastain, 以 NET 溶液稀釋 2000 倍) 以 ECL (Amersham) 冷光試劑組進行壓片顯影 (Biomax light, Kodak)。顯影結果以 MCID 影像處理系統 (Microcomputer Image Device-M4 Ver 3.0, Canada) 定量, 比較組間差異。

五、IRPs 活性之 gel shift assay 定量

含有 IRE 序列的質體 p16Bgl (Wisconsin 大學 Dr. Eisenstein 贈與), 經限制酶圖譜確認後, 以 SmaI 將質體切為直線型, 供體外轉錄系統合成 IRE。轉錄合成 IRE 探針時, 在微量離心管中加入一系列試劑: 10 μL linearized IRE-containing plasmid (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), 20 μL transcription buffer (5 $\times$), 10 μL DTT (100 mM), 5 μL T7 RNA polymerase (10~20 units/ μL), 3 μL RNasin, GTP、UTP、ATP (10 mM) 各 3 μL , 16 μL CTP (100 μM), 25 μL ^{32}P -CTP (3,000 Ci/mmol, NEN Research), 混合均勻後, 於 37°C 水浴反應 2 小時以合成 IRE 探針, 其後加入 0.6 μL DNase (10~20 units/ μL) 於 37°C 反應半小時以去除 DNA 模板。反應產物分別以 phenol/chloroform 與 chloroform/isoamyl alcohol 萃取一次, 將水溶液層移至乾淨之離心管中, 加入一倍體積的絕對酒精及 0.5 倍體積的 7.5 M ammonium acetate, 混勻後置於 -70°C 二小時。再以 $12,000 \times g$ 離心 15 分鐘, 沉澱物以 70% 酒精清洗, 離心後除去上清液, 置於室溫風乾, 加入 30 μL DEPC- H_2O 將沉澱物完全溶解, 並加入等量的 formamide 混勻, 於 100°C 水浴 10 分鐘後, 迅速置於冰上冷卻, 防止回復二級結構。

純化 IRE 用 10% denaturing polyacrylamide 電泳, 電泳緩衝液為 $1 \times \text{TBE}$ (89 mM Tris, 89 mM borate, 2 mM EDTA, pH=8.0), 電壓 300 伏特, 電泳約進行 2.5 小時。電泳結束後, 膠片進行感光顯影, 以刀片切取 IRE 所在膠體置於微量離心管中搗碎, 以 1 mL MGE (0.5 M ammonium acetate, pH=8.0, 10 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA, 0.1%

表一 餵飼不同含鐵量飼料對缺鐵貧血鼠體重、肝重、血紅素及血比容的影響¹

Table 1. Effect of different degrees of dietary iron repletion on the body and liver weights, hemoglobin and hematocrit in iron deficient anemic rats

	Dietary groups for Fe repletion				
	6R	12R	18R	36R	Control
No. of rats	5	5	5	5	4
Fe added (mg/kg diet)	6	12	18	35	35
Body weight (g)	279±11 ^b	292±6 ^b	296±12 ^b	294±12 ^b	333±23 ^a
Hemoglobin (g/L)	55±6 ^d	78±13 ^c	100±8 ^b	126±7 ^a	131±3 ^a
Hematocrit (%)	20.3±2.8 ^d	27.9±3.7 ^c	34.6±2.3 ^b	41.8±1.5 ^a	41.4±0.8 ^a
Serum iron (μmol/L)	11.5±1.7 ^b	18.5±4.7 ^b	33.7±13.0 ^b	63.6±24.4 ^a	63.2±25.2 ^a
Liver weight (g)	13.4±0.5 ^c	14.6±0.8 ^{bc}	15.8±1.2 ^b	16.3±3.0 ^b	19.3±1.3 ^a
Relative liver weight (%)	4.81±0.14 ^c	5.00±0.34 ^{bc}	5.36±0.45 ^{abc}	5.51±0.79 ^{ab}	5.78±0.16 ^a
Liver iron (μg/g liver)	12.3±1.4 ^b	12.2±0.9 ^b	12.0±1.4 ^b	25.3±9.2 ^a	28.3±8.9 ^a

1. Values are mean ± SD. Means in the same row with different superscript letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

SDS) 緩衝液溶離，經 $12,000 \times g$ ，5 分鐘離心去除膠體，下層水溶液經濃縮，以 95% 酒精及 5 M NaCl 沉澱，沉澱物以 70% 酒精清洗，室溫風乾，以 80 μL DEPC-H₂O 溶解，取 1 μL 測定 ³²P 放射活性，計算濃度及總合成量。經此程序所得的 IRE 探針放射比活性約為 4,700 dpm/fmol。

IRPs 活性以 gel shift assay 測定，步驟主要參考 Chen 等⁽¹⁵⁾ 的方法。將肝臟細胞質液以反應緩衝液 (10 mM Hepes, pH=7.6, 3 mM MgCl₂, 40 mM KCl, 1 mM DTT, 5% glycerol) 稀釋，使其蛋白質濃度為 0.25 mg/mL，故取 20 μL 稀釋樣品液時，蛋白質總量即為 5 μg。加入 1 μL IRE (約 10⁵ dpm/μL) 混勻，於室溫下靜置反應 10 分鐘，再加入 2 μL heparin (5 mg/mL) 混勻，於室溫下靜置反應 10 分鐘，降低非專一性結合，之後再加入 3 μL loading dye 混勻，並全數注入 4% non-denaturing polyacrylamide gel 電泳樣品槽中，以 0.5 X TBE 為電泳液，電壓 300 伏特，進行電泳 1.5 小時後，將膠體取出以膠體乾燥機 (BioRad) 乾燥，並以 X-O-MAT AR 底片感光顯影，剪下對應於底片上感光帶之膠片區，以液態閃爍計數器 (LS5000CE, Beckman) 測定 ³²P 放射活性，根據探針比活性計算出每個樣品的 IRP1 與 IRP2 活性。分析 IRP1 總量則是取 0.5 μg 之蛋白質溶於 20 μL 反應緩衝液，並於加入 IRE 探針前，先以 5% 2-ME 室溫處理 5 分鐘，用以將 c-Acon 完全轉換為 IRP1 以供定量。

統計分析

實驗結果以單因子變方分析 (one way ANOVA) 檢定組間差異之顯著性，再以鄧肯氏多變域測驗 (Duncan's multiple range test) 檢定各組間的差異性，並將顯著性差異設定為 $p < 0.05$ 。兩項變數之間的相關性以 Pearson's correlation test 檢定。統計分析係以 SAS 軟體 (SAS Ver 6.0, SAS Institute, USA) 分析。

結 果

一、動物生長及鐵營養狀況

離乳大鼠平均體重為 63 g。補充鐵之前，缺鐵貧血大鼠平均體重為 188 g，對照組則為 220 g。補充鐵兩週後，除了對照組體重較鐵補充各組顯著為高之外，各鐵補充組之間體重並無差異。肝重及其相對重量隨著飼料鐵濃度增高而逐漸增加，以 6R 組最低，36R 組最高，但 36R 之肝重仍顯著較對照組為低 (表一)。血紅素及血球比容隨著飼料鐵濃度的增加而逐漸上升，以 6R 組最低，36R 組最高，且 36R 組之值與對照組相當。血清鐵濃度以 36R 組與對照組顯著高於 6R、12R 與 18R 三組 (表二)。肝臟鐵含量可明顯區分為高、低兩大群：對照組及 36R 組為 28~25 μg/g liver，而 6R、12R 及 18R 三

表二 餵飼不同含鐵量飼料對貧血鼠肝臟細胞質酵素 Aconitase 活性及 IRPs 活性的影響

Table 2. Effect of different degrees of dietary iron repletion on the hepatic cytosolic aconitase and IRPs activity in iron deficient anemia rats¹

	Dietary groups for Fe repletion				
	6R	12R	18R	36R	control
No. of rats	5	5	5	5	4
Fe added (mg/kg diet)	6	12	18	35	35
Cytosolic aconitase activity ² (unit/mg cytosolic protein)	0.043±0.003 ^a	0.045±0.005 ^a	0.043±0.004 ^a	0.036±0.004 ^b	0.033±0.006 ^{ab}
Spontaneous IRP1 activity (pmol/mg cytosolic protein)	0.131±0.020 ^a	0.099±0.021 ^b	0.094±0.028 ^b	0.076±0.009 ^{bc}	0.065±0.010 ^c
Spontaneous IRP2 activity (pmol/mg cytosolic protein)	0.080±0.011 ^a	0.059±0.012 ^b	0.056±0.017 ^{bc}	0.043±0.005 ^{cd}	0.040±0.005 ^d
Total inducible IRP1 activity (pmol/mg cytosolic protein)	2.29±0.42 ^a	2.17±0.35 ^a	1.73±0.26 ^b	1.66±0.32 ^b	1.43±0.18 ^b

1. Values are mean ±SD. Means in the same row with different superscript letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

2. One unit of enzyme activity = 1 $\mu\text{mol NADP}^+$ reduced per minute.

組約為 12 $\mu\text{g/g}$ liver。

二、鐵蛋白及 m-Acon 蛋白質含量

肝臟鐵蛋白與鐵含量在各組間的變化情況相同，除了對照組及 36R 外，其餘三組之鐵蛋白均低於免疫偵測的含量（圖一）。粒線體酵素 m-Acon 蛋白質含量隨著飼料鐵濃度的增加有逐漸增多的現象（圖一），定量後可見 6R、12R、18R 及 36R 分別為對照組的 62%、73%、81% 及 94%。

三、細胞質酵素 c-Acon 活性

肝臟 c-Acon 活性可明顯區分為高、低兩大群：6R、12R 及 18R 三組顯著高於對照組及 36R 組，可達對照組的 1.3 倍（表二）。

四、肝臟 IRP1 與 IRP2 自發活性及 IRP1 總量

各組的肝臟 IRP1 自發活性均較 IRP2 自發活性為高（圖二），IRP1 自發活性約為 IRP2 自發活性的 1.6 倍。IRP1 與 IRP2 自發活性的變化趨勢相同，兩者之間相關性顯著，相關係數高達 0.99；兩者都隨著飼料鐵濃度的增加而呈下降的現象，活性由高而低依序為 6R、12R、18R、36R 及對照組（表二），6R 組的 IRP1 及 IRP2 自發活性約是對照組的 2 倍。IRP1 總量以 6R 及 12R 二組顯著較

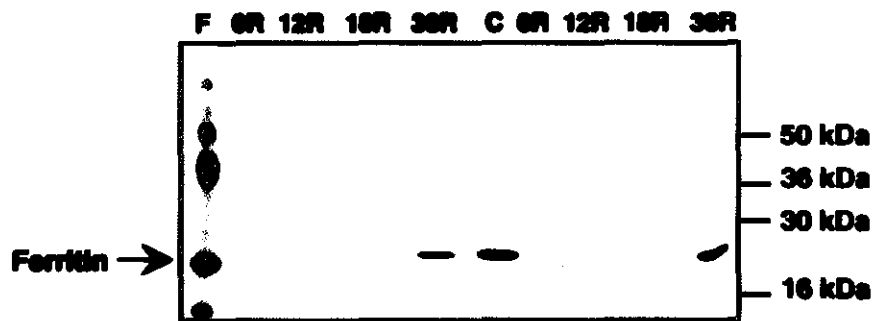
18R、36R 及對照組三組為高（表二），而且 IRP1 總量與 c-Acon 活性具有高度的正相關（ $r = 0.60$, $p = 0.0026$ ）。IRP1 自發活性、IRP2 自發活性或 IRP1 總量皆與血紅素濃度呈高度負相關，相關係數分別為 -0.74、-0.78、-0.73（圖三）。

討 論

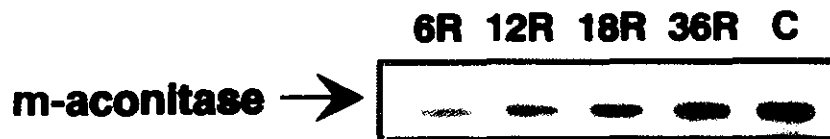
一、鐵營養與生長

當膳食供應的鐵量不足生理所需之時，組織間鐵的利用次序便有所分別：缺鐵時優先消耗儲存之鐵，最後才限制造血作用而發生貧血症狀，很少考慮肌肉生長對鐵的需求⁽²⁴⁾。離乳鼠因為生長快速而對鐵的需求較大，飼以含鐵 2.6 mg/kg 之缺鐵飼料，不僅引發貧血，同時有生長遲滯的現象，體重僅為對照組之 88%。但若飼料含鐵達 7 mg/kg 時，離乳大鼠的體重增長即足以接近正常；不過鐵量少於 25 mg/kg 時仍不足以維持正常的血紅素濃度，而且肝臟的非血原素鐵（non-heme iron）含量也會降至最低⁽²⁵⁾。若飼料鐵量達 25 mg/kg 時，血紅素值可接近正常，肝臟非血原素鐵量也會隨著飼料鐵量而增加⁽²⁵⁾。離乳大鼠缺鐵時，生長遲滯的現象通常發生於貧血之後，肌肉中 cytochrome c 約減少一半，肝臟的反應更為敏感，其降幅大於體重的延滯，

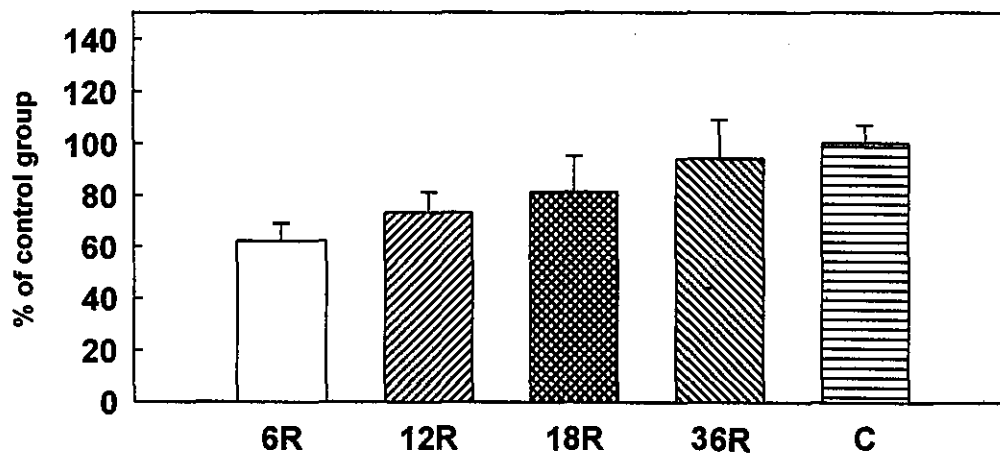
A



B

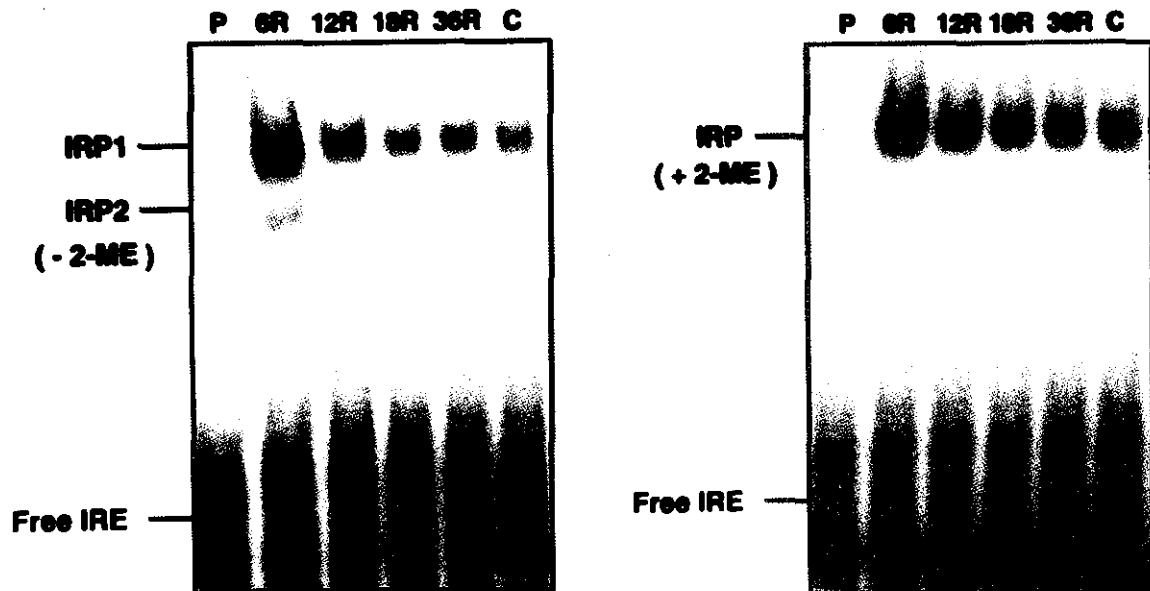


C



圖一 一系列膳食鐵補充對缺鐵貧血大鼠肝臟鐵蛋白與粒線體酵素 aconitase (m-Acon) 含量的影響

Fig. 1 Effect of a series of dietary iron repletion on hepatic content of ferritin and mitochondrial aconitase (m-Acon) in iron deficient anemic rats. Ferritin and m-Acon were determined by immunoblotting. Panel A: a representative autoradiogram of ferritin. Panel B: a representative autoradiogram of m-Acon protein. Panel C: Relative quantitative data of mitochondrial aconitase. Each lane in the autoradiogram represents one rat from control (C) or anemic groups fed iron-repleted diet containing 6 (6R), 12 (12R), 18 (18R) and 35 ppm (36R) of iron. F represents purified ferritin purchased from Sigma Co.



圖二 一系列膳食鐵補充對缺鐵貧血大鼠肝臟 IRP1 與 IRP2 自發活性及 IRP1 總量的影響

Fig. 2 Effect of a series of dietary iron repletion on spontaneous activities of hepatic IRP1 and IRP2 and total hepatic IRP1 activity in iron deficient anemic rats. Panel A: a representative autoradiogram of gel shift assay of IRP1 and IRP2 activities (-2-ME: without 2-mercaptoethanol). Panel B: a representative autoradiogram of total IRP1 activity determined by gel shift analysis (+2-ME: 2-mercaptoethanol treated). Each lane represents one rat from control (C) or anemic groups fed iron-repleted diet containing 6 (6R), 12 (12R), 18 (18R) and 35 ppm (36R) of iron. P represents free IRE probe.

且會降低 DNA 合成⁽²⁶⁾，被認為與缺鐵降低 ribonucleotide reductase 活性有關⁽²⁷⁾。

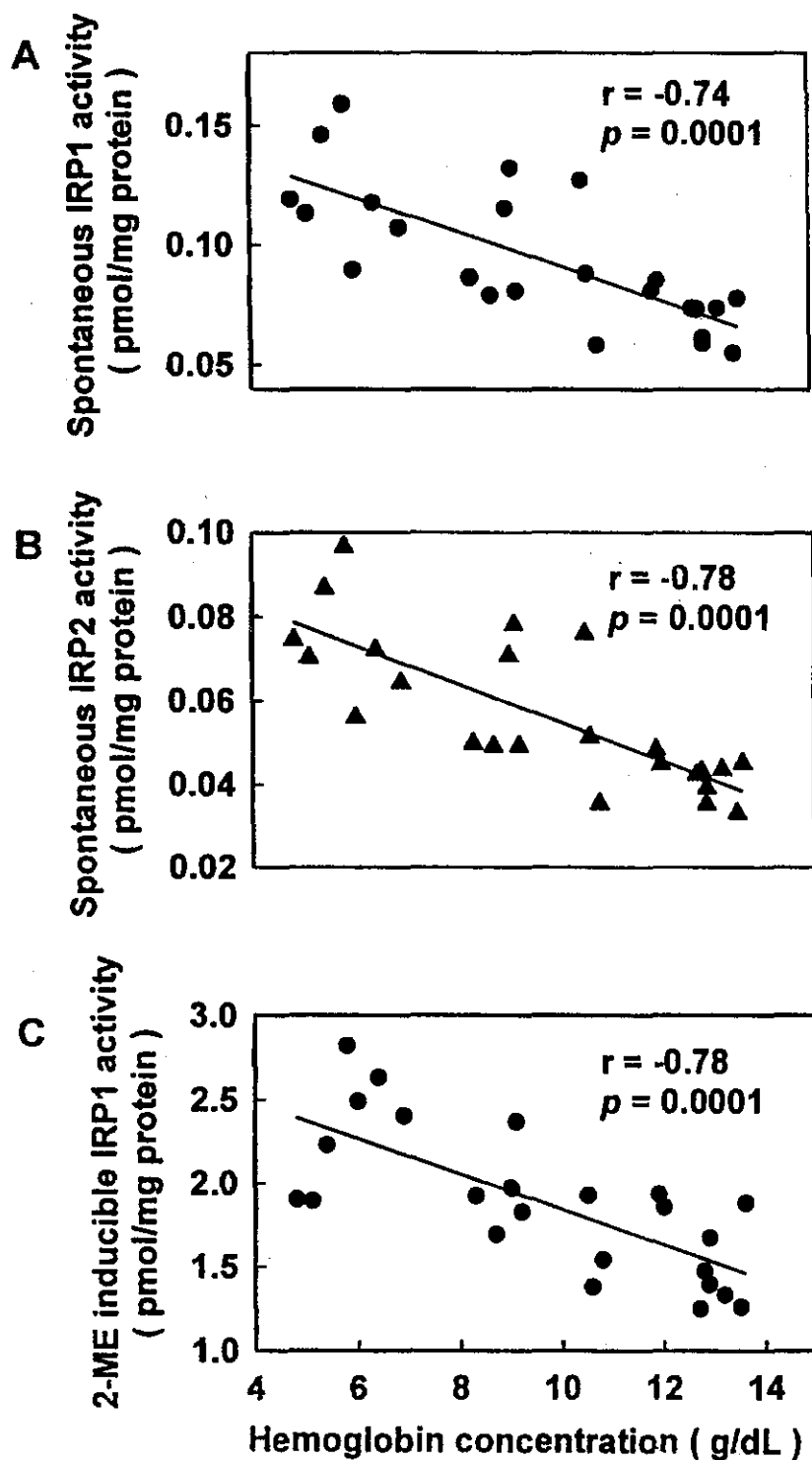
將對照組各項指標數值設為 100%，並將其他各組換算為相對變化以作比較，補充不同鐵量對體重、肝重、IRPs 活性、鐵蛋白及 m-Acon 含量的影響（圖四）具有選別效應（differential effect），只有飼料鐵量達到大鼠需要量之 36R 組可以使各項指標均達到正常水準，唯一的例外是鐵蛋白。

各項指標中以體重的恢復程度最大，添加鐵量最低的 6R 組和最高的 36R 組已經沒有明顯的差異，但是肝重仍然偏低，此種現象與前人之觀察相似⁽²⁶⁾，須待飼料鐵量達 12 mg/kg 方可增加大鼠肝臟重量。體重的恢復程度優於肝臟和血紅素濃度，推測肌肉成長所需的鐵量不多，而且在嚴重缺鐵狀況下應可優先獲鐵之故。血紅素濃度與肝臟粒線體酵素 m-Acon 的變化趨勢非常相近，以 m-Acon 的恢復程度略高，表示血紅素值的回升程度足以代表肝臟酵素的恢復情況。

肝重與 m-Acon 量的變化趨勢非常相近，表示 m-Acon 與肝臟的組成或增生有關。重量可能代表組成的改變，因為肝臟蛋白質的半衰期很短，又參與

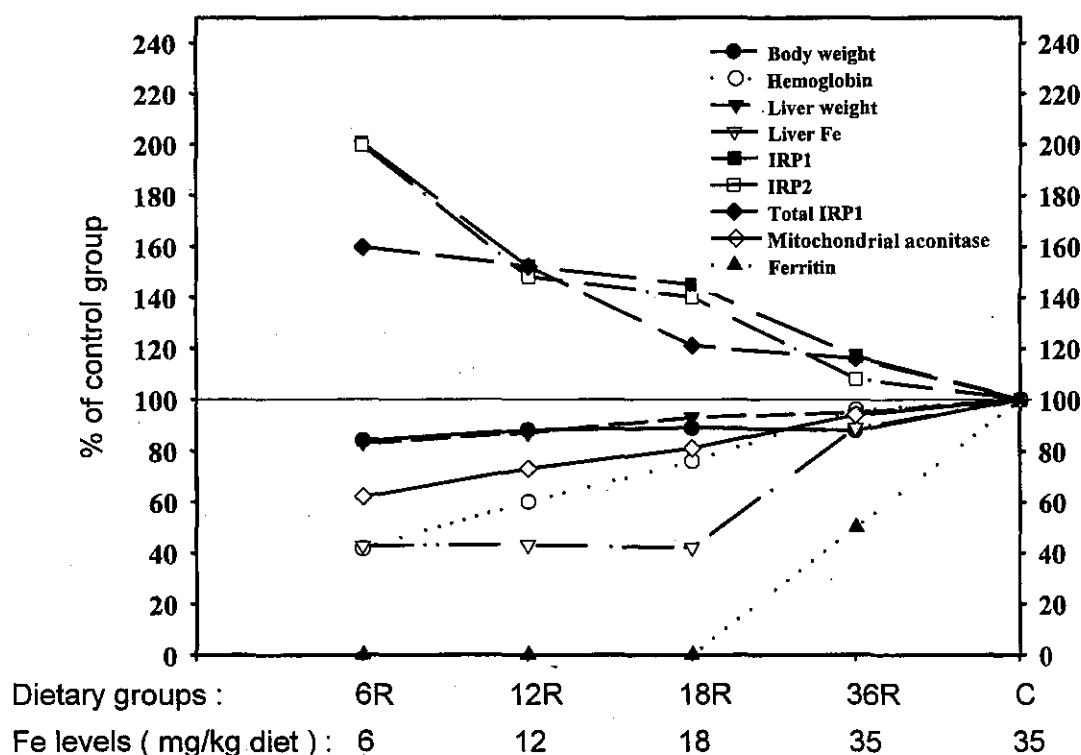
脂肪與肝糖的儲存和代謝。正常或缺鐵大鼠同樣進食 4 小時後不再給予食物，追蹤 24 小時內肝重的變化，進食後正常鼠肝重增加比例平均 80%，缺鐵鼠只有 40%⁽²⁶⁾。重量也可能代表肝細胞增生受抑制，因為缺鐵鼠肝臟利用 [³H]thymidine 合成 DNA 的速率正常，可是利用 ³²P 合成 DNA 的速率明顯較低⁽²⁶⁾。由於 m-Acon 為 TCA 循環的酵素，而 TCA 循環為能量代謝與 ATP 生成的核心，因此缺鐵導致肝臟的變化可能與 m-Acon 活性密切相關。

肝臟鐵量與鐵蛋白量的變化趨勢平行，當鐵蛋白無法偵測之時，肝鐵量保持最低，表示此時所含之鐵以滿足肝臟功能為主；然而在 6R、12R 與 18R 三組中肝鐵濃度雖然沒有差異，但是 m-Acon 量並不相當，乃是隨著鐵量而變，可見肝臟鐵量並無法靈敏地反映肝臟酵素的變化。鐵蛋白可於 36R 組測得，此時其他指標均接近正常對照組的水準，比對血紅素值與鐵蛋白量可見血紅素值還稍低於對照組時，肝臟已經有鐵蛋白之存留；推測在缺鐵貧血之改善復原過程，必須達到肝鐵有儲存才足以保障肝臟功能與血液指標之正常。過去的研究指出缺鐵貧血對肌肉的影響最大，以膳食補充鐵時，血紅素值



圖三 血紅素值與肝臟 IRP1 與 IRP2 自發活性及 IRP1 總量的相關性

Fig. 3 Correlation between hemoglobin concentration and spontaneous activities of hepatic IRP1 and IRP2, and total hepatic IRP1 activity in rats. Each point represents one rat, and values from all dietary groups were included in the assay.



圖四 膳食鐵量對大鼠體重、肝重、肝臟 IRPs 自發活性、IRP1 總量、鐵蛋白以及粒線體酵素 m-Aconitase 量等之選別性影響

Fig. 4 Differential effects of dietary iron levels on body weight, liver weight, spontaneous activity of hepatic IRPs, total IRP1, hepatic iron content, ferritin and mitochondrial aconitase in rats.

的恢復先於肌肉粒線體之 cytochrome oxidase、NADH dehydrogenase、succinate dehydrogenase 等氧化酵素的恢復⁽²⁸⁾。因此，在缺鐵性貧血的治療過程，除了偵測血紅素值之外，有必要配合其他功能性指標以確保各組織的復原成效。

二、鐵補充對鐵蛋白及 m-Acon 含量的影響

鐵蛋白與 m-Acon 相同，兩者的 mRNA 在 5'UTR 均含有一個 IRE 序列而受 IRPs 調控⁽⁹⁾，但是兩者受調節的程度不同。細胞株 HL60 經加鐵處理可使鐵蛋白量增加 20~100 倍，但是 m-Acon 只會增加一倍⁽²⁸⁾。大鼠飼以缺鐵飼料時，肝臟鐵蛋白減少的速率與幅度大於 m-Acon：當飼料鐵量為 20 mg/kg 時，前者可降低 90%，後者則只降低 15%；當嚴重缺鐵貧血時，鐵蛋白已經降至無法偵測時，m-Acon 仍可維持於正常值的 50%^(15,16)。本實驗中

貧血大鼠的 m-Acon 量有隨著補充鐵量而增加的劑量效應，但是飼料鐵量少於 18 mg/kg 時並無法偵測出鐵蛋白的存在，與缺鐵時的表現相同^(15,16)。推測此種選別性調節 (differential regulation) 有助於控制細胞利用鐵的優先次序，在缺鐵或鐵補充之時，均先滿足功能性的需求，有餘時方用在儲存。此種選別性的調節確有其分子基礎，因為 IRP1 與 IRP2 對鐵蛋白 IRE 的親和力強於對 m-Acon 的 IRE⁽⁹⁾，因此當 IRPs 活性增高時可能優先抑制鐵蛋白之合成，而 IRPs 活性降低時則可能優先解除對 m-Acon 的抑制。

三、鐵補充對 IRPs 自發活性與含量的影響

缺鐵大鼠血紅素平均在 48 g/L 時，肝臟 IRP1 與 IRP2 自發活性分別增高為對照組的 2.3 倍與 2.6 倍^(15,16)。本實驗中補充鐵量最低的 6R 組之 IRP1 與

IRP2 自發活性高達對照組的 2 倍，兩者的變化幅度相當。以不同膳食鐵量補充兩週，肝臟 IRPs 自發活性的下降與膳食鐵含量具有反向的劑量效應，相較之下，在膳食鐵量為 18 mg/kg 以內，肝臟鐵量不受其影響，表示 IRPs 活性對膳食鐵量的反應相當靈敏。已知細胞中 IRPs 自發活性受其中可游離鐵量 (free iron) 的調節⁽⁹⁾，可知膳食鐵量足以快速改變肝臟細胞中之游離鐵量，而對總鐵量的影響較為延緩。不同補鐵程度之下，血紅素濃度與 IRP1 或 IRP2 自發活性均有高度的負相關性，表示缺鐵貧血的恢復過程中血紅素值足以反映肝臟鐵利用的變化。

細胞模式的研究通常指出，鐵量改變 IRP1 之 Fe-S cluster 的組合和去除，機制尚未明瞭，但是 IRP1 總量或 c-Acon 量則不因鐵量而改變，而是維持不變⁽²⁹⁾。但是動物實驗則可見缺鐵動物血紅素降到 87 g/L 或以下時，肝臟 IRP1 總量比正常組增高 22%⁽¹⁵⁾；本實驗中補充鐵量較低的 6R 與 12R 組平均血紅素值分別是 55 與 78 g/L，IRP1 總量則為對照組的 1.6 與 1.5 倍。推測動物生體內的表現與細胞株可能不盡相同。IRP1 是雙功能的蛋白質，在細胞中以酵素 c-Acon 形式為大宗，缺鐵時最大的活化量也只佔 IRP1 總量的 10% 以內。酵素 c-Acon 是細胞質中唯一已知的含 Fe-S cluster 蛋白質，其生成有賴蛋白質 NifS 的作用⁽³⁰⁾。NifS 具有 cysteine desulfurase 的活性，以 cysteine 為基質，生成 alanine 與元素態硫，而供合成 Fe-S 蛋白質之用。缺鐵時 c-Acon 增加表示細胞質 NifS 活性不受缺鐵之抑制，或者可因缺鐵而增加；相對而言，補鐵時 IRP1 總量與 c-Acon 均減少，可能是 NifS 活性下降，減緩 c-Acon 的合成或是蛋白質降解之故。推測在動物體內鐵影響 IRP1 含量的機制可能較細胞模式複雜。

本實驗可見缺鐵貧血大鼠補充不同膳食鐵量時，對血紅素濃度、肝臟鐵調節蛋白質 IRP1 與 IRP2 之自發活性、肝臟粒線體酵素 m-Acon 量有快速的影響，並且呈現劑量關係，血紅素濃度與肝臟酵素 m-Acon 復原所需要的膳食鐵量相當一致；肝臟 IRPs 自發活性與血紅素值呈顯著負相關性，對肝臟鐵蛋白及 m-Acon 的表現有選別性的調節效應。

謝 誌

感謝 Eisenstein 博士 (University of Wisconsin,

WI, U. S. A.) 慷慨贈與 IRE 質體及長庚大學莊宏亨博士贈與抗體。本研究承蒙國科會專題研究編號 NSC85-2321-B002-034 經費補助。

參考文獻

1. Stadtman ER and Oliver CN (1991) Metal-catalyzed oxidation of proteins. Physiological consequences. *J Biol Chem* 266: 2005-2008.
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. Hentze 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.
4. Hentze MW, Rouault TA, Caughman SW, Dancis A, Harford JB and Klausner RD (1987) A cis-acting element is necessary and sufficient for the translational regulation of human ferritin expression in response to iron. *Proc Natl Acad Sci* 86:5768-5772.
5. Casey JL, Koeller DM, Ramin VC, Klausner RD and Harford JB (1989) Iron regulation of transferrin receptor mRNA levels requires iron-responsive elements and a rapid turnover determinant in the 3'-untranslated region of the mRNA. *EMBO J* 8: 3693-3699.
6. Theil EC (1990) Regulation of ferritin and transferrin receptor mRNAs. *J Biol Chem* 265:4771-4774.
7. Cox TC, Bawden MJ, Martins A and May BK (1991) Human erythroid 5'-aminolevulinic synthase: promoter analysis and identification of an iron responsive element in the mRNA. *EMBO J* 10:1892-1902.
8. Dandekar T, Striebeck R, Gray NK, Gossen B, Constable A, Johansson HE and Hentze MW (1991) Identification of a novel iron-responsive element in murine and human erythroid δ -amino-levulinic acid synthase mRNA. *EMBO J* 10:1903-1909.
9. Kim HY, La Vaute T, Iwai K, Klausner RD and Rouault TA (1996) Identification of a conserved and functional iron-responsive element in the 5'-untranslated region of mammalian mitochondrial aconitase. *J Biol Chem* 271:24226-24230.
10. Guo B, Phillips JD, Yu Y and Leibold EA (1995) Characterization and expression of iron regulatory protein 2 (IRP2). *J Biol Chem* 270:16529-16535.
11. Kim HY, Klausner RD and Rouault TA (1995) Translational repressor activity is equivalent and is quantitatively predicted by in vitro RNA binding for two iron responsive element binding protein, IRP1 and IRP2. *J Biol Chem* 270:4983-4986.
12. Halle DJ, Rouault TA, Tang CK, Chin J, Harford JB and Klausner RD (1992) Reciprocal control of RNA-binding and aconitase activity in the regulation of the iron responsive element binding

- protein: role of the iron sulfur cluster. *Proc Natl Acad Sci* 89: 7536-7540.
13. Haile DJ, Rouault TA, Harford JB, Kennedy MC, Blondin GA, Beinert H and Klausner RD (1992) Cellular regulation of the iron responsive element binding protein: disassembly of the cubane iron sulfur cluster results in high affinity RNA binding. *Proc Natl Acad Sci* 89:11735-11739.
 14. Henderson BR and Kuhn LC (1995) Differential modulation of the RNA-binding proteins IRP-1 and IRP-2 in response to iron. *J Biol Chem* 270:20509-20515.
 15. Chen OS, Schalinske KL and Eisenstein RS (1997) Dietary iron intake modulates the activity of iron regulatory proteins and the abundance of ferritin and mitochondrial aconitase in rat liver. *J Nutr* 127:238-248.
 16. 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.
 17. 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.
 18. 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.
 19. Oser BL (1965) *Hawk's Physiological Chemistry*. 14th ed. p. 1096. McGraw-Hill, New York.
 20. Rose IA and O'Connel EL (1967) Mechanism of aconitase action. *J Biol Chem* 242:1870-1879.
 21. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.
 22. 莊榮輝 (1985) 水稻蔗糖合成酶之研究。博士論文。國立台灣大學農業化學所。
 23. 羅靜華 (1990) 不同礦物質營養下鼠腸肝鐵及鐵蛋白的組織定位。碩士論文。國立台灣大學農業化學所。
 24. Cook JD (1982) Clinical evaluation of iron deficiency. *Sem Hematol* 19:8-18.
 25. Siimes MA, Refino C and Dallman PR (1980) Manifestation of iron deficiency at various levels of dietary iron intake. *Am J Clin Nutr* 33:570-574.
 26. Siimes MA and Dallman PR (1974) Iron deficiency: impaired liver growth and DNA synthesis in the rat. *Br J Haematol* 28: 453-462.
 27. Hoffbrand AV, Ganeshaguru K, Hooton JWL and Tattersall MNH (1976) Effect of iron deficiency and desferrioxamine on DNA synthesis in human cells. *Br J Haematol* 33:517-526.
 28. 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.
 29. Tang CK, Chin J, Harford JB, Klausner RD and Rouault TA (1992) Iron regulates the activity of the iron-responsive element binding protein without changing its rate of synthesis or degradation. *J Biol Chem* 267:24466-24470.
 30. 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.



不同膳食鐵量補充對缺鐵貧血 大鼠肝臟鐵調節蛋白活性之影響

何素珍¹ 蕭寧馨²

¹ 嘉南藥理學院化妝品應用與管理系

² 臺灣大學農業化學系

摘要 鐵調節蛋白 (iron regulatory proteins, IRPs) 是維持細胞鐵恆定的調控因子。已知膳食缺鐵使肝臟 IRPs 活性快速升高，導致鐵蛋白與粒線體酵素 aconitase (m-Acon) 減少。本實驗乃對缺鐵貧血大鼠施予一系列膳食鐵補充，以觀察貧血改善過程，肝臟 IRPs 自發活性、鐵蛋白與 m-Acon 含量的變化及其與血紅素濃度的關係。採用 24 隻 Wistar 品系離乳雄鼠為實驗動物，其中 4 隻係對照組，全程餵予鐵正常飼料；其餘先餵予缺鐵飼料約二週，使血紅素值低於 60 g/L 後，隨機分為四組：6R、12R、18R、36R，分別餵予添加鐵量 6、12、18 及 35 mg/kg 的含鐵飼料二週後，犧牲並取樣進行分析。隨著飼料鐵量之增高，血紅素濃度、肝重與 m-Acon 量隨之升高，以 6R 組最低，36R 組最高且與對照組相當；肝臟鐵調節蛋白質 IRP1 與 IRP2 之自發活性與 IRP1 總量則隨之下降，以 6R 組最高，36R 組則與對照組相當，且與血紅素值呈顯著負相關性。膳食鐵量達大鼠需要量之 36R 組其各項指標均可恢復正常水準，各組的血紅素濃度與 m-Acon 含量的復原程度相近。隨鐵營養狀況的改變，肝臟 IRPs 自發活性能適當應變，並選別性調控鐵蛋白及 m-Acon 等標的蛋白質的表現。

關鍵詞：缺鐵貧血，鐵補充，鐵調節蛋白，鐵蛋白，粒線體 aconitase，大鼠

