

铁过负荷对大鼠眼、泪腺中铁血黄素的沉积及转铁蛋白表达的影响

刘重斌^① 肖敏^② 叶光华^①

(^①温州医学院基础医学院生理教研室 温州 325035; ^②温州医学院实验动物中心 温州 325035)

摘要:通过饲喂高铁饲料、腹腔注射或静脉注射多糖铁复合物的方法复制 SD (Sprague Dawley) 大鼠 (*Rattus norvegicus*) 的铁过负荷模型。取动物的眼和泪腺组织染色显微观察发现,静脉注射多糖铁复合物大鼠眼巩膜、虹膜、睫状体、脉络膜间质细胞及泪腺小叶间结缔组织中巨噬细胞铁血黄素沉积明显;而腹腔注射多糖铁复合物或饲喂高铁饲料大鼠的眼和泪腺中铁血黄素沉积较少或未见沉积。不同方法造成的铁过负荷大鼠眼和泪腺组织中均未见转铁蛋白的表达。结果表明,铁血黄素在眼及泪腺的沉着很可能是眼晶状体混浊和眼底血管样条纹产生的主要原因。

关键词:眼;泪腺;铁血黄素;转铁蛋白;大鼠

中图分类号:Q493.99 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2010)05-149-05

Iron Deposition and Transferrin Expression in the Eye and Lacrimal Glands in Iron Overload Rats

LIU Chong-Bin^① XIAO Min^② YE Guang-Hua^①

(^①Department of Physiology, School of Basic Medicine, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035;

^②Center of Experimental Animals, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China)

Abstract: In order to achieve hemosiderosis, the rats were fed with iron-supplemented diet or injected with iron polysaccharide complex intraperitoneally (i. p.) or intravenously (i. v.). Hemosiderin deposit was detected in the sclera, iris, ciliary body, and interstitial connective tissue of the choroid and macrophages lying in the interlobular connective tissue of lacrimal glands in all animals that received iron i. v. Also, little or no iron deposit was detected in the eye and lacrimal glands in animals that received iron i. p. and in individuals that were fed with an iron-enriched diet and the control rats. No transferrin was detected in the eye and lacrimal glands, either in the control rats or in the rats received iron. Therefore, iron deposition may be responsible for the ophthalmologic abnormalities in hemosiderosis syndromes, such as lens opacities and angioid streaks.

Key words: Eye; Lacrimal glands; Hemosiderosis; Transferrin; Rat

近年来,有关铁过负荷(iron overload)的发生及其负性效应越来越引起人们的注意^[1-2]。过多的铁会产生有毒性的自由基,继而损伤细胞,造成原发性遗传血色病(hemochromatosis, HC),同时伴随视色素合成降低、视敏性和色觉下降、视野缺损、视觉神经元功能障碍等,严重可能导致视觉功能的丧失和失明^[3-4]。临床研

究发现,原发性遗传血色病患者反复输血后往往造成机体铁的过负荷,同时伴有眼晶状体混

基金项目 浙江省教育厅基金项目(No. 20070993),浙江省自然科学基金项目(No. Y2080613);

第一作者介绍 刘重斌,男,博士,副教授;研究方向:营养代谢生理和公共卫生;E-mail: liuchongbin1972@126.com。

收稿日期:2010-02-23,修回日期:2010-04-30

浊 (lens opacities) 和眼底血管样条纹 (angioid streaks, AS) 等特征表现^[5-7], 但其病理机制目前尚不清楚。转铁蛋白及其受体也是机体铁吸收转运过程中的关键蛋白。但铁过负荷对眼、泪腺铁血黄素沉积及转铁蛋白表达的影响未见文献报道。本实验以不同方法建立铁过负荷大鼠模型, 探究大鼠眼及泪腺组织细胞中铁和转铁蛋白的定位分布、储存与表达, 为铁过负荷引起的眼和泪腺损伤机制研究提供形态学上的证据。

1 材料与方 法

1.1 试剂和药品 硫酸亚铁 ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (分析纯, 福建莆田市高屿贸易有限公司), 多糖铁复合物胶囊 (iron polysaccharide complex capsules) (美国许瓦兹制药有限公司)。含铁血黄素染色试剂盒 (福建迈新生物技术开发有限公司)。鼠转铁蛋白多克隆抗体 (transferrin polyclonal antibody in rat, 美国 Biogenex 公司), 免疫组织化学 ABC 试剂盒 (北京中杉生物技术有限公司)。AEC 染色试剂 (上海西唐生物技术有限公司)。

1.2 动物和分组 40 只 28 日龄, 体重为 110 ~ 150 g 的清洁级雄性 SD 大鼠, 由温州医学院实验动物中心提供。大鼠按体重随机分为 4 组, 每组 10 只。A 组动物饲料参考 AIN-93G 实验动物合成饲料配方并对其进行适当调整, 去除原饲料无机盐中的铁, 按 1 000 mg/kg 量添加硫酸亚铁, 喂饲 8 周。B 组大鼠隔 2 ~ 3 d 腹腔注射多糖铁复合物 (用 0.9% 生理盐水溶解), 连续 8 周, 每只大鼠注射铁的总量为 0.35 g。C 组大鼠隔 2 ~ 3 d 静脉注射多糖铁复合物, 连续 8 周, 每只大鼠注射铁的总量也为 0.35 g。D 组为正常喂饲基础饲料对照组。各组动物分笼饲养, 自由饮水进食。实验室温度 21 ~ 25℃, 相对湿度 40% ~ 60%。

1.3 组织学和免疫组织化学 实验结束后, 以戊巴比妥钠麻醉, 分别取眼器官、泪腺组织、肝实质、肾实质和脑组织 4% 多聚甲醛固定后, 常规石蜡包埋切片, 采用含铁血黄素染色试剂

盒普鲁士兰染色 (Perls' reaction) 对照分析。免疫组织化学方法采用常规的 ABC 法。在进行 ABC 染色前应预先以 0.01% 的抗生素和 0.01% 的生物素溶液分别作用 20 min, 以消除其内源性抗生物素结合活性, 每次作用后用 PBS 洗 5 min。转铁蛋白多克隆抗体参考的稀释比例为 1:40, 在室温孵育 1 h, AEC 染色, 显微观察和摄影。

2 结 果

2.1 眼和泪腺组织中铁血黄素的沉积 显微观察发现, A 组大鼠泪腺 (图版 I:1) 和 D 组眼组织中 (图版 I:2) 没有明显的血铁质沉着; B 组大鼠脉络膜和睫状体结缔组织间质巨噬细胞有少量血铁质沉着 (图版 I:3); 而 C 组大鼠脉络膜结缔组织间质巨噬细胞和血管膜有大量血铁质沉着, 巩膜也有铁血黄素沉着 (图版 I:4); 睫状体和虹膜结缔组织间质巨噬细胞有大量血铁质沉着 (图版 I:5)。在各组动物的角膜、晶状体和视网膜未见血铁质沉着。同时, 显微观察发现 C 组大鼠泪腺腺泡间质巨噬细胞有大量血铁质沉着 (图版 I:6); B 组大鼠泪腺腺泡间质巨噬细胞有少量血铁质沉着 (图版 I:7); 但在各组动物泪腺腺泡上皮细胞均未发现血铁质沉着。实验中还发现, 在铁过负荷大鼠各组的肝细胞和巨噬细胞中都有铁血黄素沉积, 其中 C 组最明显, 而 A 组和 B 组铁血黄素沉积较少。

2.2 眼和泪腺组织中转铁蛋白的表达及阳性对照 免疫组化实验和显微观察发现, 在各组动物的眼和泪腺组织中均没有转铁蛋白的阳性表达, 但在肝细胞 (图版 I:8)、脑组织中少突胶质细胞和血管膜上皮细胞 (图版 I:9) 及肾远曲小管上皮细胞 (图版 I:10) 中转铁蛋白有较强的表达。

3 讨 论

铁过负荷是一种铁代谢紊乱导致过量的铁在血液及组织 (如肝、胰、心、关节、脑垂体等) 中积聚, 引起肝硬化、内分泌疾病、心力衰竭、心

率失常、关节病和皮肤色素沉着等临床表现^[8-9],但铁过负荷对机体眼和泪腺组织中铁血黄素沉着的作用目前没有相关的报道。在临床上,尽管“放血”疗法对治疗某些铁过负荷疾病患者起到一定的缓解作用,但过多和重复的“输血”往往又会引发患者机体继发性的铁过负荷,而且往往伴有眼晶状体混浊和眼底血管样条纹等特征。

本实验研究发现,静脉注射多糖铁复合物大鼠眼巩膜、虹膜、睫状体、脉络膜间质细胞、泪腺小叶间结缔组织中巨噬细胞铁血黄素沉积明显,而在上皮细胞很少沉积(图版 I:3~6),这与铁负荷导致铁血黄素在淋巴结、心、肺、肠、胰腺、垂体、睾丸和骨髓等组织中沉积分布类似^[10]。而且过量的铁在肝内沉积可导致肝纤维化、肝硬化的发生。铁还可以作用于肾间质引起肾间质性肾炎,引起肾前性、肾性及肾后性肾功能衰竭,并诱发结石形成。眼底血管样条纹是一种特殊的具有特征性的眼底改变,其实质为全身性弹力纤维组织广泛变性在眼底的表现^[7]。血管样条纹本身对视功能的影响很少,但如并发黄斑病变则可严重损害视力。本研究认为,血管样条纹有可能是铁代谢障碍,导致钙、铁等金属盐类沉淀于眼底 Bruchs 膜,使其脆性增加,发生龟裂所致。有实验研究显示,铁在机体组织中的超负荷会影响锌和锰等微量元素的代谢,从而导致细胞的功能下降和损伤^[11]。泪腺分泌泪液有湿润角膜,清除异物、杀菌、免疫及营养、代谢等功能,铁过负荷也同样引起其功能的下降和损伤^[12]。在各组动物的角膜、晶状体和视网膜未见血铁质沉着,表明铁血黄素在眼的沉积分布是不均一的。本实验研究发现,腹腔注射多糖铁或饲喂高铁饲料大鼠眼和泪腺组织中铁血黄素沉积较少或未见沉积,而静脉注射多糖铁复合物大鼠沉积明显,主要是腹腔注射的药物要在腹腔中经过肠系膜静脉吸收后进入体循环的结果。这也可能是原发性遗传血色病患者反复输血后更容易发生眼晶状体混浊和眼底血管样条纹的原因。本实验研究还发现,在各组动物的眼和泪腺组织中均没

有转铁蛋白的阳性表达,但在阳性对照的肝细胞、脑组织和肾远曲小管上皮细胞中转铁蛋白有较强的表达(图版 I:8~10),这表明转铁蛋白在眼和泪腺组织中可能还有其他的作用^[13]。

参 考 文 献

- [1] Lok C Y, Merryweather-clarke A T, Viprakasit V, et al. Iron overload in the Asian community. *Blood*, 2009, 114: 20-25.
- [2] Mills E, Dong X P, Wang F, et al. Mechanisms of brain iron transport: insight into neurodegeneration and CNS disorders. *Future Medical Chemistry* 2010 2: 51-64.
- [3] Repanti M, Gartaganis S P, Nikolakopoulou N M, et al. Study of the eye and lacrimal glands in experimental iron overload in rats *in vivo*. *Anatomical Science International*, 2008 83: 11-16.
- [4] Olivieri N F, Boucic R B, Chew E, et al. Visual and auditory neurotoxicity in patients receiving subcutaneous deferoxamine infusions. *New England Journal of Medicine*, 1986 314: 869-873.
- [5] McGahan M C, Fleisher L N. Inflammation-induced changes in the iron concentration and total iron-binding capacity of the intraocular fluids of rabbits. *Graefes Archive Ophthalmology*, 1988 226: 27-30.
- [6] Hidajat R R, McLay J L, Goode D H, et al. EOG as a monitor of desferrioxamine retinal toxicity. *Documenta Ophthalmologica* 2004 109: 273-278.
- [7] 高云霞, 蒋秀琴, 张迎秋, 等. 眼底血管样条纹 13 例眼底荧光造影特征与临床表现. *国际眼科杂志*, 2009, 9(4): 722-724.
- [8] Balusikova K, Neubauerova J, Dostalikova-Cimburova M, et al. Differing expression of genes involved in non-transferrin iron transport across plasma membrane in various cell types under iron deficiency and excess. *Molecule Cell Biochemistry* 2009 2(321): 123-133.
- [9] Hentze M W. Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell* 2004 117: 285-297.
- [10] Papanastasiou D A, Vayenas D V, Vassilopoulos A, et al. Concentration and distribution of iron and transferrin after experimental iron overload in rat tissues *in vivo*: Study of the liver, the spleen and the central nervous system. *Pathological Research Practice* 2000 196: 47-54.
- [11] Vayenas D V, Repanti M, Vassilopoulos A, et al. Influence of iron overload on manganese, zinc, and copper concentration in rats tissues *in vivo*: Study of liver, spleen and brain. *International Journal of Clinical Lab Research*,

1998 28: 183 - 186.

[12] 陈瑛,刘阳,康福星,等. 正己烷染毒大鼠结膜及泪腺损伤的组织病理学和超微结构观察. *眼科研究* 2007 25 (9): 659 - 662.

[13] Yefimova M G, Jeanny J C, Courtois Y. Distribution of

transferrin and transferrin receptor of the eye 1 in the process of formation of the rat eye retina in early postnatal ontogenesis. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology* 2008 12: 666 - 673.

图 版 说 明

1: A 组大鼠泪腺组织中没有明显的血铁质沉着; 2: D 组大鼠眼组织中没有明显的血铁质沉着; 3: B 组脉络膜和睫状体血铁质沉着(↑); 4: C 组脉络膜和巩膜血铁质沉着(▲和↑所示); 5: C 组睫状体和虹膜血铁质沉着(↑); 6: C 组泪腺结缔组织间质巨噬细胞血铁质沉着(↑); 7: B 组泪腺结缔组织间质巨噬细胞血铁质沉着(↑); 8: 肝细胞中转铁蛋白的表达(↑); 9: 脑组织中少突胶质细胞和血管膜上皮细胞转铁蛋白的表达(▲和↑所示); 10: 肾远曲小管上皮细胞转铁蛋白的表达(↑)。放大倍数 40 × 40, 图 2 为 10 × 10; 标尺 = 20 μm。

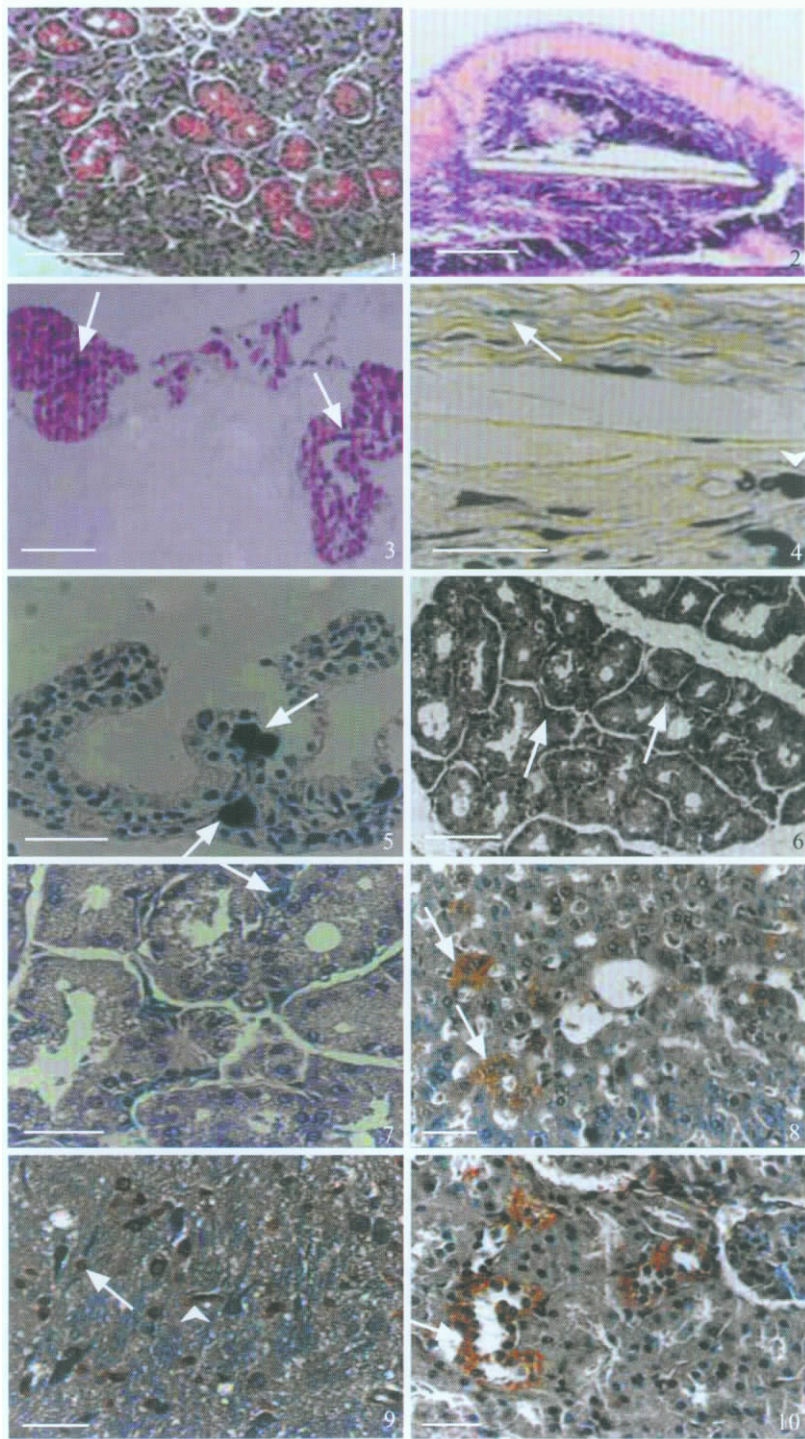
Explanation of Plate

1: Little or no iron deposit was detected in the lacrimal glands that received iron enriched diet; 2: Little or no iron deposit was detected in the eye of the control rats (10 × 10); 3: Hemosiderin laden macrophages in the interstitial connective tissue of the choroid and ciliary body of the eye in group B rats (arrows); 4: Hemosiderin laden macrophages (arrowhead) and hemosiderin deposit in the vascular layer of the choroids in group C rats. Extracellular hemosiderin deposit in the sclera (arrows) of the eye in group C rats; 5: Extracellular hemosiderin deposit in the interstitial connective tissue of the ciliary in group C rats (arrows); 6: Coarse hemosiderin deposits in macrophages of interlobular connective tissue (arrows); 7: Hemosiderin deposit in macrophages of interlobular connective tissue (arrows); 8: Transferrin-positive hepatocytes in the liver (arrows); 9: Positive transferrin staining of oligodendrocytes (arrow) and blood vessel endothelium in cerebellum (arrowhead); 10: Positive transferrin staining of epithelial cells lining distal convoluted tubules of the kidney (arrow). 40 × 40; Bar = 20 μm.

刘重斌等:铁过负荷对大鼠眼、泪腺中铁血黄素的沉积及转铁蛋白表达的影响
LIU Chong-Bin *et al.*: Iron Deposition and Transferrin Expression in the Eye and
Lacrimal Glands in Iron Overload Rats

图版 I

Plate I



图版说明见文后