

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.19.011

铁过载对大鼠骨髓及肝脾组织的影响*

王亚锦 胡迎芬[△] 王 洋 姜 颖 马爱国

(青岛大学医学院营养研究所 山东 青岛 266021)

摘要 目的:通过腹腔注射右旋糖酐铁建立铁过载大鼠模型,观察过量补铁对大鼠骨髓及肝脾组织的影响。**方法:**雄性 Wistar 大鼠 40 只随机分为:正常对照组、低剂量铁组、中剂量铁组和高剂量铁组。经隔日腹腔注射每次分别给予右旋糖酐铁 0.9 mg、0.3 mg、9 mg、18 mg,共干预 6 周。观察各组大鼠的生长发育状况并检测相关指标。**结果:**四组大鼠白细胞计数、红细胞计数、血红蛋白浓度以及血小板计数差异均无统计学意义($P > 0.05$)。骨髓外铁含量分析,中、高剂量铁组大鼠骨髓基质中均出现不同程度的铁蓄积,骨髓细胞外铁含量均显著高于正常对照组($P < 0.05$)。与正常对照组比较,中、高剂量铁组大鼠肝脏系数分别升高 52% 和 148% ($P < 0.05$),脾脏系数分别升高 56% 和 100% ($P < 0.05$)。与正常对照组比较,中、高剂量铁组大鼠肝组织铁分别升高 154% 和 303% ($P < 0.05$),脾组织铁分别升高 40% 和 127% ($P < 0.05$),血清铁含量分别升高 35% 和 165% ($P < 0.05$)。**结论:**过量补铁(腹腔给药)可使大鼠骨髓基质出现铁沉积,肝脏和脾脏脏系数及其组织铁含量显著增加,导致铁在机体内过量蓄积。因此临床铁补充应防止过量长期用药。

关键词:右旋糖酐铁;铁过载;血清铁

中图分类号:Q58;Q593;R151.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2015)19-3641-04

Effect of Iron Overload on Bone Marrow, Liver and Spleen in Rats*

WANG Ya-jin, HU Ying-fen[△], WANG Yang, JIANG Ying, MA Ai-guo

(Institute of Human Nutrition Medical College of Qingdao University, Qingdao, Shandong, 266021, China)

ABSTRACT Objective: To explore the effects of the iron dextran on bone marrow, liver and spleen in iron overload rats. **Methods:** Forty Wistar male rats were randomly divided into four groups including control group (0.9 mg), low-dose iron group (0.3 mg), middle-dose iron group (9 mg) and high-dose iron group (18 mg), then were injected with intraperitoneal iron dextran every other day for six weeks. The general situation and the related indicators were detected. **Results:** There was no significant difference in white blood cells, red blood cells, hemoglobin and platelets among these groups ($P > 0.05$). Compared with the control group, the iron content of bone marrow in the middle-dose iron group and the high-dose iron group were significantly higher than that of the control group ($P < 0.05$). Compared with the control group, the liver coefficient and the spleen coefficient of the middle-dose iron group and high-dose iron group was increased by 52%, 148%, 56% and 100% respectively (all $P < 0.05$). Compared with control group, the iron concentration of the liver and spleen in the middle-dose iron group and high-dose iron group was increased by 52%, 148%, 40% and 127% (all $P < 0.05$), and the serum iron was increased by 35% and 165% ($P < 0.05$). **Conclusions:** Even the iron overload doesn't impact on peripheral blood of rats, but inhibits the function of rat bone marrow, liver and spleen significantly.

Key words: Iron dextran; Iron overload; Serum iron

Chinese Library Classification(CLC): Q58; Q593; R151.3 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2015)19-3641-04

前言

长期以来,相关研究多集中于铁过载对胰腺、肝脏、心脏、大脑等实质器官的损伤,以及内分泌系统、消化系统、心血管系统等方面的影响^[1]。近年研究发现,铁过载对骨髓造血及血液系统疾病的影响不容忽视。临床研究中发现,在原发性血色病、地中海贫血、再生障碍性贫血、骨髓增生异常综合征等血液系统疾病中,长期输血治疗和疾病本身因素导致了患者发生铁过载

^[2]。一些研究通过建立铁过载体外造血细胞模型发现,铁过载可致活性氧(ROS)生成增加,而 ROS 能够显著影响骨髓造血功能^[3-5]。铁过载对造血器官影响的相关动物研究较少,本研究通过对大鼠腹腔注射右旋糖酐铁,探讨过量铁补充对大鼠骨髓、肝脏、脾脏等主要造血器官的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81373000)

作者简介:王亚锦(1987-),女,硕士研究生,主要研究方向:公共营养,电话:18354200829,E-mail:yajin5282@sina.com

[△] 通讯作者:胡迎芬,女,博士,教授,主要研究方向:应用营养学,E-mail:qingdahyf2006@163.com

(收稿日期:2014-12-05 接受日期:2014-12-31)

雄性 Wistar 大鼠(SPF 级)40 只,购自青岛派特福德白鼠养殖专业合作社,6~7 周龄,体重 160 ± 20 g,适应性喂养一周后按随机数字表法分为四组:正常对照组(CG)、低剂量铁组(LIG)、中剂量铁组(MIG)、高剂量铁组(HIG),每组各 10 只。隔日经腹腔注射分别给予 0.9 mg、0.3 mg、9 mg 及 18 mg 右旋糖苷铁,连续干预 6 周。大鼠进行分笼饲养,每笼 5 只,按照 AIN-93G 配方^[6],制备无铁基础饲料。动物房温度 $22 \sim 24$ °C,湿度(50-60)%,严格控制环境中铁污染。观察大鼠的一般状况,每周称量大鼠体重。6 周后,大鼠禁食 8 小时,10%水合氯醛腹腔麻醉,腹主动脉采血,取脏器待测。

1.2 主要试剂与仪器

右旋糖酐铁注射液(25 mg/mL)购自浙江瑞安市制药厂,普鲁士蓝染色试剂盒(北京雷根生技术有限公司),血清铁测试盒(南京建成生物工程研究所),722 s 分光光度计(上海精密科学仪器有限公司),全自动血液分析仪(Sysmex XS-800i),荧光成像显微镜(Olympus)。

1.3 观察指标及方法

1.3.1 外周血象 全自动血液分析仪检测白细胞计数(WBC)、红细胞计数(RBC)、血红蛋白浓度(Hb)、血小板计数(PLT)。

1.3.2 骨髓铁染色 腹主动脉取血后,立即剔除大鼠右腿股骨肌肉与筋膜,用 10 μ L 胎牛血清清洗骨髓腔,迅速推片。采用普鲁士蓝染色法半定量定性计数骨髓细胞外铁:低倍镜下观察全部骨髓膜,找到骨髓小粒中蓝绿色颗粒、小珠或小块,再换油镜

鉴别阳性程度。进行分级与计数^[7]。

1.3.3 肝、脾脏器系数 生理盐水洗涤肝、脾,滤纸沾干水分后称重,计算脏器系数:脏器系数 = 脏器质量(g)/ 动物体质量(g) $\times 100\%$ 。

1.3.4 肝、脾组织铁、血清铁 剪取适量肝、脾组织,加生理盐水制备成 10%的组织匀浆液,比色法测肝、脾组织铁含量;新鲜抗凝血静置半小时,4 °C 3000 r/min 离心 10 min,分离血清,测血清铁含量。(严格按照组织铁、血清铁试剂盒说明书操作)。

1.4 统计学方法

利用 SPSS 19.0 软件对结果进行统计分析。计量资料均以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,统计学方法采用单因素方差分析及 LSD-t 检验。等级资料采用非参数 Kruskal-Wallis 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 动物一般情况

与 CG 组相比,MIG、HIG 组大鼠生长缓慢,进食量减少,皮毛稀疏无光泽,活动减少,粪便呈深黑色,并随着干预时间的延长上述体征更加明显;DIG 组粪便颜色较正常对照组大鼠呈深黄褐色,相关体征变化不明显。

2.2 外周血象

四组大鼠白细胞计数、红细胞计数、血红蛋白浓度以及血小板计数差异均无统计学意义(P 均 > 0.05)。见表 1。

表 1 各组大鼠外周血象检测结果($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Results of peripheral blood of rats in different groups ($\bar{x} \pm s$)

Groups	Amount	WBC ($\times 10^9/L$)	RBC ($\times 10^{12}/L$)	Hb (g/L)	PLT ($\times 10^9/L$)
CG	10	9.36 ± 4.80	7.56 ± 0.87	142.20 ± 4.92	1020.90 ± 162.50
LIG	10	8.21 ± 3.94	7.29 ± 0.27	141.60 ± 11.48	862.40 ± 148.40
MIG	10	11.06 ± 4.52	7.03 ± 0.38	143.40 ± 6.57	1275.00 ± 181.64
HIG	10	11.33 ± 3.22	7.02 ± 0.82	142.70 ± 7.51	1014.50 ± 183.64

2.3 骨髓铁染色

油镜下可见 CG、LIG 组骨髓基质无或有少量浅蓝色铁颗粒和小珠,呈阴性或弱阳性;MIG 组骨髓基质中有较多蓝色铁颗粒、小珠和团块,呈阳性;HIG 组骨髓基质中有大量不规则蓝

黑色团块,呈强阳性(图 1)。大鼠骨髓细胞外铁含量分级结果见表 2。与 CG 组相比,MIG 组和 HIG 组骨髓细胞外铁含量显著增多($P < 0.05$),DIG 组骨髓细胞外铁含量差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 2 各组大鼠骨髓细胞外铁含量分级结果
Table 2 Grading of extracellular iron content of bone marrow of rats in different groups

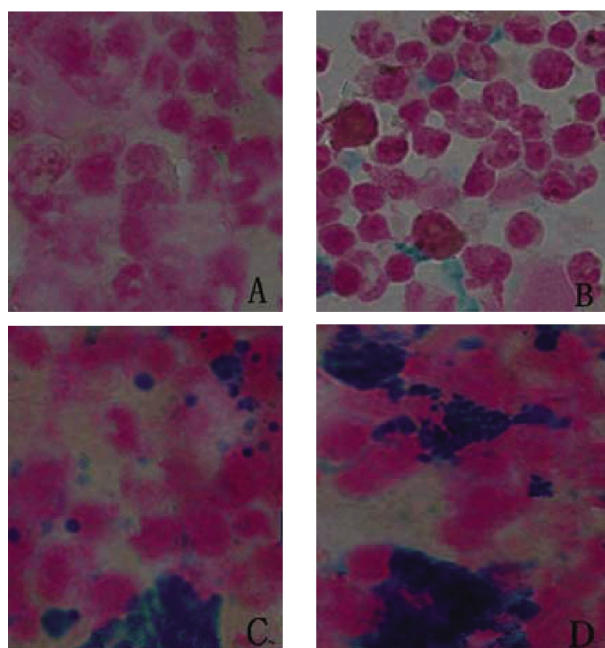
Groups	Amount	Iron grading of bone marrow cells				
		-	+	++	+++	++++
CG	10	4	3	3	0	0
LIG	10	7	3	0	0	0
MIG	10	0	1	4	3*	2*
HIG	10	0	1	2	3*	4*

Note: The iron content of bone marrow in the MIG, HIG group were significantly higher than that of the CG group, * $P < 0.05$.

2.4 肝、脾脏器系数

与 LIG 组相比,MIG、HIG 组大鼠肝、脾脏系数均显著性升高($P < 0.05$)。与 CG 组比较,MIG、HIG 组大鼠肝脾系数分别升

高了 52%和 148%($P < 0.05$),脾脏系数分别升高了 56%和 100%($P < 0.05$)。与 MIG 组相比,HIG 组大鼠肝脾系数升高了 63%($P < 0.05$)。见表 3。

图1 骨髓普鲁士蓝铁染色($\times 1000$)Fig. 1 Prussian blue iron staining of bone marrow ($\times 1000$)

Note: A.deficiency iron group; B.control group; C.middle-dose iron group; D. high-dose iron group.

表3 各组大鼠肝、脾脏脏器系数检测结果($\bar{x} \pm s$)Table 3 Results of coefficient of liver and spleen of rats in different groups($\bar{x} \pm s$)

Groups	Amount	The coefficient of liver (%)	The coefficient of liver (%)
CG	10	2.30 $\pm$ 0.29	0.18 $\pm$ 0.03
LIG	10	2.19 $\pm$ 0.35	0.14 $\pm$ 0.03
MIG	10	3.50 $\pm$ 0.59 ^{ab}	0.28 $\pm$ 0.06 ^{ab}
HIG	10	5.70 $\pm$ 1.55 ^{abc}	0.36 $\pm$ 0.14 ^{ab}

Note: ^aP<0.05, compared with LIG group; ^bP<0.05, compared with CG group; ^cP<0.05, compared with MIG group.

2.5 肝、脾组织铁及血清铁

与 LIG 相比, MIG, HIG 组肝、脾组织铁, 血清铁均显著性升高($P < 0.05$)。与 CG 组比较, MIG, HIG 组肝组织铁分别升高 154%和 303%($P < 0.05$), 脾组织铁分别升高 40%和 127%($P < 0.05$), 血清铁含量分别升高 35%和 165%($P < 0.05$)。与 MIG 组相比, HIG 组肝、脾组织铁、血清铁分别升高了 59%、63%和 96%($P < 0.05$)。见表 4。

3 讨论

铁过载主要通过 Fenton 反应, 产生大量的 ROS, 引起细胞组织的氧化应激损伤^[8]。右旋糖酐铁(iron-dextran)是右旋糖酐和铁螯合的一种可溶性铁剂, 广泛应用于缺铁性贫血的临床治疗, 其主要活性成分为二价铁离子^[9,10]。本实验中, 通过腹腔注射不同剂量右旋糖酐铁, 构建铁过载大鼠模型; 探讨铁过载对大鼠外周血象、骨髓造血功能及肝脏与脾脏的影响。

肝铁浓度(LIC)是最主要的反映全身铁负荷的参数, 通过

表4 各组大鼠肝、脾组织铁和血清铁检测结果($\bar{x} \pm s$)Table 4 Iron content of liver and spleen and serum iron of rats in different groups ($\bar{x} \pm s$)

Groups	Amount	Iron Concentration ($\mu\text{mol/g Prot}$)		Serum Iron ($\mu\text{mol/L}$)
		Liver	Spleen	
CG	10	44.87 $\pm$ 9.73	31.70 $\pm$ 5.49	77.62 $\pm$ 10.84
LIG	10	30.35 $\pm$ 6.08	29.00 $\pm$ 5.71	53.54 $\pm$ 10.97
MIG	10	114.18 $\pm$ 11.80 ^{ab}	44.24 $\pm$ 7.99 ^{ab}	104.77 $\pm$ 8.91 ^{ab}
HIG	10	180.99 $\pm$ 42.65 ^{abc}	72.03 $\pm$ 19.39 ^{abc}	205.30 $\pm$ 7.52 ^{abc}

Note: ^aP<0.05, compared with LIG group; ^bP<0.05, compared with CG group; ^cP<0.05, compared with MIG group.

肝活检标本测定 LIC, 是目前评估铁过载程度的金标准^[11]。本研究中, 通过化学比色法测定肝铁浓度, 发现 MIG, HIG 组 LIC 均显著高于 CG 组, 结合动物体征改变表明经腹腔注射过量右旋糖酐铁能够成功构建铁过载 Wistar 大鼠模型。进一步观察外周血象, 四组大鼠外周血白细胞计数、红细胞计数、血红蛋白浓度及血小板计数差异均无统计学意义, 这与柴笑等^[12]的研究结果基本一致。可能由于铁干预对象为成年 Wistar 大鼠, 造血系统代偿性机制及红细胞寿命较长, 导致铁负荷在短期不足以改变外周血象。Motohashi 等^[13]认为, ROS 升高增强血小板基因表达, 促使巨核细胞成熟。本研究中、高剂量铁组血小板计数轻度升高可能与以上机制有关。由于外周血象受多种复杂生理机制影响, 本实验大鼠血象变化不明显的具体原因有待进一步研究。

骨髓铁染色是反映机体铁的储存与利用水平以及铁过多或铁代谢障碍时铁异常分布的敏感指标。骨髓铁染色包括骨髓细胞外铁和骨髓细胞内铁, 前者是反映骨髓贮存铁的金标准^[14]。骨髓基质是造血微环境的重要组成部分, Hosokawa^[15]等研究发现 ROS 可通过影响骨髓微环境结构因子进而影响骨髓的造血功能。骨髓外铁染色结果可见 MIG, HIG 组中骨髓细胞外铁含量均显著高于 CG 组, 表明随着外源铁量增加, 大鼠骨髓贮存铁增加, 骨髓基质中出现铁沉积, 进而破坏骨髓造血微环境并影响骨髓造血细胞增殖分化, 而相关骨髓细胞形态学及功能学变化及具体分子机制等有待于进一步研究。

机体铁吸收能力有限, 过量的铁主要以铁蛋白和含铁血黄素等形式沉积于肝、脾和骨髓内。肝实质细胞与网状内皮组织的巨噬细胞起储存库的作用^[16]。巨噬细胞可吞噬衰老的红细胞, 吸收血红素分解释放出铁, 这部分铁大部分储存在脾脏中, 并可以释放入血浆进行重复利用^[17]。肝、脾脏器系数是评价肝脏、脾脏物质毒性的常用指标^[18]。本实验观察到 MIG, HIG 组的肝、脾脏器系数显著高于 CG 组, 提示过量右旋糖酐铁能够诱导大鼠肝、脾损伤。具体损伤需做病理组织切片进一步验证。通过化学比色法测定肝脾组织铁以及血清铁浓度, 我们发现肝脾脏组织铁与血清铁变化一致, 提示铁过载不仅能够提高血清铁浓度, 而且可使体内过量的铁沉积于肝脾组织内。后者是铁过载导致肝脾脏系数升高的原因之一, 进而影响肝脏及脾脏正常的组织结构及生理功能, 这与文献报道一致^[19,20]。

综上所述,过量右旋糖酐铁短期干预未能影响 Wistar 大鼠外周血红细胞计数、白细胞计数、血红蛋白浓度及血小板计数,但过量铁沉积于骨髓基质、肝脏和脾脏组织将导致骨髓微环境改变和肝脾脏器系数增高,影响相应器官的正常功能。随着对铁过载认识的不断深入,其对重要器官影响及相关分子机制有待于进一步研究,进而为临床治疗血液系统疾病以及合理应用铁剂提高理论依据。

参考文献(References)

- [1] Gattermann N, Rachmilewitz EA. Iron overload in MDS-pathophysiology diagnosis and complications [J]. Ann Hematol, 2011, 90(1): 1-10
- [2] 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]. 中华血液杂志, 2011, 32(8): 572-574
Hematology branch of Chinese Medical Association Physicians/Hematology Department branch of Chinese Medical Doctor Association. Chinese experts consensus on diagnosis and treatment of iron overload [J]. Chinese Journal of Hematology, 2011, 32(8): 572-574
- [3] 谢芳, 赵明峰. 活性氧物质对骨髓造血功能的影响 [J]. 中华血液学杂志, 2011, 32(2): 139-141
Xie Fang, Zhao Ming-feng. Effect of reactive oxygen species on bone marrow hematopoietic function [J]. Chinese Journal of Hematology, 2011, 32(2): 139-141
- [4] Ito K, Hirao A, Arai F, et al. Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells [J]. Nat Med, 2010, 16(1): 129
- [5] Naka K, Muraguchi T, Hoshii T, et al. Regulation of reactive oxygen species and genomic stability in hemapoietic stem cells [J]. Antioxid Redox Signa, 2008, 10(11): 1883-1894
- [6] Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet[J]. J Nutr, 1993, 123(11): 1939-1951
- [7] 侯振汀. 新编临床检验医学 [M]. 北京: 军事医学科学出版社, 2003, 12: 92-112
Hou Zhen-ting. New Clinical Laboratory Medicine [M]. Beijing: Military Medical Science Press, 2003, 12: 92-112
- [8] 黄蕾, 付蓉, 邵宗鸿. 铁过载组织损伤特点及机制研究进展[J]. 中华血液学杂志, 2012, 33(10): 884-886
Huang Lei, Fu Rong, Shao Zong-hong. Research progress of iron overloading tissue damage characteristics and its mechanism [J]. Chinese Journal of Hematology, 2012, 33(10): 884-886
- [9] 冷慧敏, 骆新民, 朱航. 小鼠铁过量模型建立及相关指标的观察研究[J]. 齐鲁医学杂志, 2008, 23(4): 331-334
Leng Hui-min, Luo Xin-min, Zhu Hang. The establishment of iron-overload mouse model and observation of the related indexes[J]. Medical Journal of Qilu, 2008, 23(4): 331-334
- [10] 汪晓霞, 肖绪武. 右旋糖酐铁口服液治疗小儿营养性缺铁性贫血的效果分析[J]. 中国医药科学, 2013, 3(24): 68-69
Wang Xiao-xia, Xiao Xu-wu. Analysis of the effect of iron dextran oral liquid on pediatric nutritional iron deficiency anemia[J]. Chinese Medicine and Pharmacy, 2013, 3(24): 68-69
- [11] 龙黎玲, 彭鹏, 黄仲奎, 等. 铁超负荷兔模型 3.0T MRI 定量肝铁沉积可行性研究[J]. 磁共振成像, 2012, 3(6): 451-455
Long Li-ling, Peng Peng, Huang Zhong-kui, et al. Liver iron quantification by 3.0 T MRI: calibration on a rabbit model[J]. Chinese Journal of Magnetic Resonance Imaging, 2012, 3(6): 451-455
- [12] 柴笑, 赵明峰, 李德冠, 等. 小鼠铁过载模型的建立及其对骨髓造血功能的影响[J]. 中国医学科学院学报, 2013, 35(5): 547-552
Chai Xiao, Zhao Ming-feng, Li De-guan, et al. Establishment of An mouse model of iron-over load and its impact on bone marrow hematopoiesis [J]. Acta Academiae medicine Science, 2013, 35(5): 547-552
- [13] Motohashi H, Kimura M, Fujita R, et al. NF-E2 domination over Nrf2 promotes ROS accumulation and megakaryocytic maturation[J]. Blood, 2010, 115(3): 677-686
- [14] 周永列. D - 二聚体的测定及其临床意义 [J]. 国外医学: 临床生物化学与检验分册, 1996, 17(1): 4-6
Zhou Yong-lie. Study and clinical significance of D-Dimer [J]. Foreign medical: Clinical Biochemistry and Test Booklet, 1996, 17(1): 4-6
- [15] Hosokawa K, Arai F, Yoshihara H, et al. Function of oxidative stress in the regulation of hematopoietic stem cell-niche interaction [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 363(3): 578-583
- [16] 孟昭升, 贾红英, 吴学琼, 等. 铁代谢及铁过载[J]. 医学综述, 2012, 18(1): 43-46
Meng Zhao-sheng, Jia Hong-ying, Wu Xue-qiong, et al. Iron metabolism and overload[J]. Medical Recapitulate, 2012, 18(1): 43-46
- [17] Ramm GA, Ruddell RG. Iron homeostasis, hepatocellular injury, and fibrogenesis in hemochromatosis: the role of inflammation in a noninflammatory liver disease[J]. Semin Liver Dis, 2010, 30(3): 271-287
- [18] 王天成, 贾光, 沈惠麒, 等. 纳米纯铁粉对小鼠的毒性和血清生化指标的影响[J]. 工业卫生与职业病, 2005, 31(6): 373-375
Wang Tian-cheng, Jia Guang, Chen Hui-qi, et al. Study of toxicity of nano-iron particulates and their effect on serum biochemical indexes in mice[J]. Industrial Health and Occupational Diseases, 2005, 31(6): 373-375
- [19] 朱航, 罗海吉, 邓红, 等. 高铁小鼠模型的构建及铁代谢相关指标的观察[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(8): 1593-1597
Zhu Hang, Luo Hai-ji, Deng Hong, et al. Establishing a high iron model and observing indexes related to iron metabolism in mice[J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2007, 11(8): 1593-1597
- [20] 魏春岚. 心理应激对大鼠造血系统铁代谢的影响[D]. 第二军医大学, 2007, 5, 1
Wei Chun-lan. Effect of psychological stress on iron metabolism of hematopoietic system in rats[D]. Second Military Medical University, 2007, 5, 1