

# 脑铁代谢与急性脑缺血损伤

温仲民 钱忠明

脑血管疾病是人类三大死亡原因之一。缺血性脑血管疾病的发病率、死亡率、致残率均相当高,严重威胁人类的健康。急性脑缺血再灌注损伤是非常复杂的病理生理过程,主要有缺血后能量代谢障碍、兴奋性氨基酸(EAA)毒性作用、自由基损伤和炎性因子等的相互影响。所以,通过抗EAA、抗炎和清除自由基抑制脂质过氧化等措施等可以减轻脑损伤<sup>[1-4]</sup>。其中铁介导产生的自由基在缺血脑损伤中起着重要作用。本文就脑内铁代谢的特点、缺血后铁代谢的变化、与铁有关的损伤机制及有关临床研究作一综述。

## 一、铁在脑组织中的分布、存在方式和功能

正常脑组织中平均铁含量约为 $(63 \pm 24) \mu\text{mol/g}$ ,脑铁含量相当于肝脏的1/5。铁广泛存在于脑的各个部位,但分布是不均匀的<sup>[5]</sup>,大脑皮层和小脑铁相对较少,黑质、红核和齿状核浓度较高。在基底神经节铁的浓度最高,与肝脏中铁的浓度相当。铁存在于神经系统的许多细胞中,如神经元、小胶质细胞、少突胶质细胞和一部分星形胶质细胞,而以少突触神经细胞中的铁含量最多。细胞内铁主要存在于铁蛋白中,仅含有大约 $1 \times 10^{-17} \text{mol/L}$ 的游离铁。结合在铁蛋白上的铁为氧化态,无活性作用。如果从大分子上游离出来,变成游离铁或与低分子物质如二磷酸腺苷(ADP)结合成低分子量铁复合物,则有活性。脑内铁起着重要的生理作用,它是电子传递者,是线粒体氧化反应和氧运输的重要物质,并参与DNA、RNA、蛋白质合成和髓磷脂的合成,以及神经髓鞘的发生与发展,同时在多巴胺等神经递质的合成中发挥必不可少的功能<sup>[6]</sup>。

## 二、脑铁代谢的特点

在体内,铁代谢是十分精细的平衡过程。铁在脑外的许多组织细胞的被吸收是通过经典的转铁蛋白(transferrin, Tf)和转铁蛋白受体(transferrin receptor, TfR)途径。这两种蛋白的表达受细胞内铁浓度变化的调节。Tf结合的三价铁首先与细胞膜上的TfR结合,经过细胞内吞、酸化、释放和移位等步骤,铁进入细胞浆而被细胞用于合成血红蛋白和其它物质。目前仍不完全清楚铁通过血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)的确切机制。一般认为TfTfR途径是铁进入BBB毛细

血管内皮细胞的主要途径<sup>[7]</sup>,但铁是如何从脑毛细血管内皮细胞进入脑组织,目前所知甚少。近年的研究显示,脑细胞的摄铁机制要比外周复杂的多,可能有比外周更多的铁代谢蛋白参与。铁通过血脑屏障后,部分铁与少突胶质细胞和脉络丛上皮细胞分泌的内源性Tf结合,另外一部分铁与其它转运物质包括柠檬酸、白蛋白等结合,被转运到需要铁的脑细胞。

二价金属转运体(divalent metal transporter 1, DMT1)是近几年新发现的跨膜铁转运蛋白。在人体组织中DMT1分布十分广泛,在近端小肠表达最高。研究表明,DMT1是细胞吸收二价铁的泵蛋白,小肠铁吸收是一个DMT1介导的过程<sup>[8]</sup>。正常大鼠的纹状体、小脑、丘脑和第三脑室室管膜细胞及整个大脑的血管内皮细胞的DMT1的表达最为明显,但是在大脑皮层最少。在纹状体DMT1阳性细胞主要是胶质细胞和血管内皮细胞,在丘脑DMT1阳性细胞主要是神经元,阳性血管内皮和胶质细胞的数量要比纹状体少。第三脑室旁室管膜细胞阳性细胞数比脑其它部位多。在皮层主要的DMT1阳性细胞是血管内皮。在海马、乳头体等DMT1的表达较少。在小脑主要是Purkinje细胞,颗粒细胞也有中等程度的表达<sup>[9]</sup>。金属转运蛋白(mental transporter protein1, MTP1,又名ferroportin1 FP1)被认为具有使铁从细胞内释放出来的功能。在正常的大鼠MTP1主要分布在海马、皮层、小脑、丘脑和纹状体,而基底节和白质分布较少。在皮层主要是锥体细胞,在丘脑和纹状体主要分布在神经元,在白质少突触胶质细胞也有MTP1表达。在小脑主要是Purkinje细胞,颗粒细胞也有中等程度的表达<sup>[9]</sup>。研究也已证实乳铁蛋白受体、肠细胞色素B(DCb)、膜铁转运辅助蛋白(Hp)在脑内的存在,这些结果说明这些蛋白均有可能参与脑铁代谢的平衡<sup>[10]</sup>,但是具体作用尚待进一步研究。

## 三、急性脑缺血后脑铁代谢的变化及氧化应激

全脑缺血后,皮质大部 and 皮质下区域的总铁含量升高。沙土鼠的研究证实大脑短暂缺血5 min后再灌注,4 d后海马CA<sub>1</sub>区处出现Tf阳性神经元和许多铁蛋白阳性胶质细胞,7 d后纹状体上出现许多铁蛋白阳性的巨噬细胞(活化的小胶质细胞),说明Tf和铁蛋白阳性巨噬细胞的动员与缺血后神经元的变性有关<sup>[11]</sup>。大鼠大脑中动脉阻塞60 min后,Northern印迹分析发现缺血皮层区L-铁蛋白和H-铁蛋白mRNA出现迟发的长时间的合成。在再灌注后12 h出现明显升高,并且持续336 h,高峰期定量分析H-铁蛋白和L-铁蛋白分别升高2.5倍和6倍,原位杂交结果显示再灌注后72 h,同侧梗死皮层周围、尾壳核中部和海马CA<sub>1</sub>区H-铁蛋白

基金项目:香港政府RGC基金资助(A/C: PolyU5270/01M/B-Q445)和香港理工大学研究基金资助(A/C: G-T616 A-PC98 A-PD92和A-PC23)

作者单位:香港理工大学应用生物和化学科技学系铁代谢实验室

通讯作者:钱忠明

mRNA 出现明显的表达, 而 L-铁蛋白则在梗死皮层、尾壳核外侧区表达。缺血后 336 h H-铁蛋白 mRNA 梗死周边和同侧丘脑的表达增加, 而 L-铁蛋白则仅仅局限在坏死边缘表达。免疫组化进一步显示, 60 min 脑缺血可以引起铁在脑的沉积, 同铁蛋白的表达有关, 特别是在巨噬细胞或小胶质细胞阳性明显的组织或细胞坏死区域<sup>[12]</sup>。

生物体内的有氧代谢会产生各种活性物质, 如超氧自由基  $O_2^{\cdot-}$ 、羟自由基 OH $\cdot$ , 同时机体可以持续不断地清除这些物质, 达到氧化和抗氧化的平衡。当氧化超过抗氧化时, 就会出现“氧化应激”现象, 导致组织的损伤。脑缺血后线粒体不能提供足够的电子, 使自由基大量产生, 导致细胞膜  $Ca^{2+}$  离子通透性升高, 激活蛋白酶使细胞死亡, 胞浆中的不稳定低分子“催化性的铁”释放出来, 同时缺血期葡萄糖无氧代谢产生大量的 NADPH (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate), 使  $Fe^{3+}$  还原为  $Fe^{2+}$  而从铁蛋白上释放出来, 即铁离子的脱位, 脱位的铁离子与 ADP 等小分子物质结合具有活性作用, 在整个缺血期和再灌注期都有铁的移位, 催化自由基产生<sup>[3, 13]</sup>。大量证据表明, 铁离子是生物分子氧化损伤的催化剂, 是引起氧化应激的一个重要因素。体内正常代谢和非正常代谢产生的超氧阴离子 ( $O_2^{\cdot-}$ ) 是反应性低的物质, 经过酶促反应转化成  $H_2O_2$ , 二者所能产生的损伤作用相对较弱, 但是在铁离子的参与下通过 Fenton 反应, 转化成反应性强得多的羟自由基 ( $\cdot OH$ ), 这些自由基攻击细胞膜上的不饱和脂链, 造成脂质过氧化 (lipid peroxidation, LP)。铁离子除了参与体内活性氧的产生外, 自身在氧化还原过程中所形成的与氧结合的复合物也能引起脂质过氧化。脂质过氧化不仅在脑缺血-再灌注后立即发生, 而且在缺血-再灌注后很长一段时间内继续促使神经元死亡。缺血后脑组织细胞内非血红素铁发生再分布, 集中到微粒体内, 使微粒体的铁浓度明显增加, 造成细胞结构和功能发生改变。除了催化自由基产生、促进 LP 以外, 铁还有直接毒性作用, 能与细胞内的有机化合物结合, 产生高反应铁或高铁离子, 损伤溶酶体膜和线粒体膜,  $Fe^{3+}$  还原成  $Fe^{2+}$  被释放出来, 可以直接导致 DNA 变性。自由基与脂质过氧化产物氧合血红蛋白和一氧化氮可以使脑血管发生痉挛, 进一步导致脑的缺血损伤。

一般认为脑缺血后葡萄糖无氧代谢产生大量乳酸, 低 pH 值环境有利于铁的动员, 加强铁的催化氧化作用从而加重脑组织的损伤<sup>[14]</sup>。老年动物脑的 pH 值由于线粒体功能下降而较低, 所以脑缺血后神经功能损伤相对年轻动物为重。但是犬 30 min 全脑缺血模型研究中发现<sup>[15]</sup>, 全脑缺血后皮层和皮层下组织铁和低分子铁 (LWM) 的含量增加, 但是, 通过注射葡萄糖加重缺血酸中毒并不使全部脑区的 LWM 含量都增加, 而仅仅使皮层下灰质的 LWM 增加, 提示在该模型中, 高血糖时脑损伤的加重并非是由于铁离子的释放增加所致。脑缺血后铁稳态的调节还没有完全阐明, 铁蛋白、转铁蛋白等的表达受到铁反应组件结合蛋白 (iron response element-binding protein IRE-BP) 的调节, 脑缺血和/或高血糖对这些蛋白表达的影响有待于进一步的研究。

#### 四、实验与临床研究

由于铁在脑缺血再灌注的自由基产生和介导损伤中起到重要作用, 进一步研究其损伤机制、通过去铁治疗急性脑梗死引起了广泛的兴趣。沙土鼠低铁饮食 8 周, 结扎一侧颈总动脉再灌注后发现, 低铁饮食沙土鼠神经功能缺损和脑水肿的程度都比正常饮食沙土鼠明显低<sup>[16]</sup>。在 Wistar 大鼠食物中添加 2.5% 碳酸亚铁喂养 9 周后, 永久性大脑中动脉闭塞模型中研究发现, 高铁饮食大鼠比一般饮食的大鼠梗死体积平均大 66%, 同时测定血样中的谷氨酸、白介素 6 (IL-6)、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 的浓度, 发现高铁饮食组明显要高于一般饮食组, 与自由基相关的指标硫代巴比妥酸反应物 (TBARS) 的浓度也明显增高。经过原子光谱吸收法测定, 高铁饮食组大鼠肝脏铁比一般饮食组高, 两组脑铁的含量没有差别, 说明脑梗死体积增大并不是脑组织中铁的含量直接引起, 而是脑梗死后血脑屏障破坏, 通透性增加, 高浓度的血浆铁蛋白或其它非运铁蛋白铁通过破坏的血脑屏障进入到富含脂质的神经元的周围环境中, 加剧了炎症反应和氧化应激; 同时由内皮、平滑肌细胞产生的羟自由基能促进血脑屏障破坏和加重脑水肿。高铁饮食导致的高氧化应激也与高浓度的兴奋性氨基酸和炎症因子产生有关<sup>[17]</sup>。

临床观察 100 例发病在 24 h 内的急性脑梗死患者, 测定血浆、脑脊液 (CSF) 中的铁蛋白、总铁含量和谷氨酸浓度, 发现入院后 48 h 内神经功能恶化 (加拿大中风指数下降 1 分或更多) 的 45 例患者, 血浆铁蛋白浓度 (119 ~ 500  $\mu g/L$ , 平均 391  $\mu g/L$  比 21 ~ 399  $\mu g/L$ , 平均 148  $\mu g/L$ ) 和 CSF 铁蛋白浓度 (6.8 ~ 82.0  $\mu g/L$ , 平均 17.4  $\mu g/L$  比 0.6 ~ 14.0  $\mu g/L$ , 平均 4.8  $\mu g/L$ ) 明显高于神经功能无进展恶化患者。这些患者血浆中铁蛋白浓度与血浆和 CSF 中谷氨酸浓度呈正相关, 血浆铁蛋白浓度 > 275  $\mu g/L$  和 CSF 铁蛋白浓度 > 11  $\mu g/L$  是早期神经功能恶化的主要指针<sup>[18]</sup>。

脑梗死后清除自由基治疗能起到很好的作用, 脑缺血后铁相关蛋白被激活, 高浓度铁蛋白能加重脑缺血再灌注损伤, 所以通过使用铁螯合剂, 降低血中铁浓度从而保护脑组织得到了广泛的研究, 研究发现铁螯合剂通过不同机制保护脑组织。在羊脑缺血模型上给以去铁敏 (DFO) 2.5 mg/kg 和别嘌呤醇 20 mg/kg 治疗, DFO 组血浆中非蛋白结合铁 (NPBI) 明显低于安慰剂治疗组, 去铁敏和别嘌呤醇都可以使皮层中 NPBI 明显降低<sup>[19]</sup>。DFO 是缺氧诱导转录因子 1 (HIF-1) 和促红细胞生成素转录的激活剂, 在脑内 HIF-1 是缺氧后转录反应的关键步骤, 而促红细胞生成素是强效神经元保护剂。在体外实验中, DFO 对于培养神经元缺氧损伤有保护作用, 同时 DFO 对大鼠和小鼠能诱导脑缺血耐受<sup>[20]</sup>。DFO 对培养胚胎皮层神经元的氧化应激损伤有保护作用, 在缺氧后增加 DNA 同 HIF-1 和活化转录因子-1/camp 反应组件结合蛋白 (CREB) 的结合, 由 HIF-1 调节的蛋白等包括糖分解蛋白、p21 和促红细胞生成素等经过 DFO 处理后在培养神经元中都增高<sup>[21]</sup>。新生羊缺血再灌注后, DFO 治疗后皮层  $Na^+K^+$ -ATP 酶活性明显高于安慰剂治疗组, 提示铁螯合剂 (DFO) 可以减

少自由基的产生,对 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATP}$ 酶活性和缺血脑损伤有保护作用<sup>[2]</sup>。一些以铁螯合剂中和铁作为治疗脑缺血再灌注损伤的措施被证实有效,DFO可以防止再灌注时自由基的损伤作用,减小损伤面积,促进神经功能恢复,在缺血再灌注前使用能明显降低脑内IP水平,提高生存率<sup>[23]</sup>。

综上所述,急性脑缺血后,铁代谢发生变化,由铁介导的自由基损伤在缺血损伤中起着很重要作用,铁螯合剂通过多种机制保护脑组织。进一步研究其损伤机制,选择适当的铁螯合剂在治疗时间窗内减轻缺血脑损害,将会是治疗急性脑缺血的一种新方法。

### 参 考 文 献

- Bhardwaj A, Alkayed NJ, Kirsch JR, et al. Mechanisms of ischemic brain damage. *Curr Cadiiol Rep*, 2003, 5: 160-167.
- Ginsberg MD. Adventures in the pathophysiology of brain ischemia; penumbra gene expression, neuroprotection; the 2002 Thomas willis lecture. *Stroke*, 2003, 34: 214-223.
- Kontos HA. Oxygen radicals in cerebral ischemia. *Stroke*, 2001, 32: 2712-2716.
- White BC, Sullivan JM, DeGracia DJ, et al. Brain ischemia and reperfusion; molecular mechanisms of neuronal injury. *J Neurol Sci*, 2000, 179(S1-2): 1-33.
- Qian ZM, Pu YM, Wang Q, et al. Iron Metabolism and CNS disease. In: Qian ZM, ed. *Iron Metabolism*. Beijing: Science Press, 2000. 329-352.
- Qian ZM, Wang Q. Express of iron transport proteins and excessive iron accumulation in the brain in neurodegenerative disorders. *Brain Res Rev*, 1998, 7: 157-267.
- Ke Y, Qian ZM. Iron misregulation in the brain: a primary cause of neurodegenerative disorders. *Lancet Neurol*, 2003, 2: 246-253.
- Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, et al. Cloning and characterization of mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature*, 1997, 16: 383-386.
- Burdo JR, Menzies SL, Simpson IA, et al. Distribution of divalent metal transporter 1 and metal transport protein 1 in the normal and Belgrade rat. *J Neurosci Res*, 2001, 66: 1198-1207.
- Qian ZM, Shen X. Brain iron transport and neurodegeneration. *Trends Mol Med*, 2001, 7: 103-108.
- Ishimaru H, Ishikawa K, Ohe Y, et al. Activation of iron handling

- system within the gerbil hippocampus after cerebral ischemia. *Brain Res*, 1996, 726: 23-30.
- Chi SL, Wang CK, Chen LY, et al. Different regulation of H- and L-ferritin messenger RNA subunits, ferritin protein and iron following focal cerebral ischemia-reperfusion. *Neuroscience*, 2000, 100: 475-484.
- Gutteridge JMC. Hydroxyl radicals, iron, oxidative stress, and neurodegeneration. *Am N Y Acad Sci*, 1994, 739: 201-213.
- Lubdgren J, Zhang H, Agradh CD, et al. Acidosis-induced ischemic brain damage: are free radicals involved? *J Cereb blood Flow Metab*, 1991, 11: 587-596.
- Lipscomb DC, Goman IG, Traystman RJ, et al. Low molecular weight iron in cerebral ischemic acidosis in vivo. *Stroke*, 1998, 29: 487-492.
- Patt A, Horesh IR, Berger EM, et al. Iron depletion or chelation reduces ischemia/reperfusion-induced edema in gerbil brains. *J Pediatr Surg*, 1990, 25: 224-227.
- Castellanos M, Puig N, Carbonell T, et al. Iron intake increases infarct volume after permanent middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Res*, 2002, 952: 1-6.
- Davalos A, Castillo J, Marrugat J, et al. Body iron stores and early neurologic deterioration in acute cerebral infarction. *Neurology*, 2000, 54: 1568-1574.
- Shadid M, Bunocore G, Groenendaal F, et al. Effect of deferoxamine and allopurinol on non-protein-bound iron concentration in plasma and cortical brain tissue of newborn lambs following hypoxia-ischemia. *Neurosci Lett*, 1998, 248: 5-8.
- Prass K, Ruscher K, Karsch M, et al. Desferrioxamine induces delayed tolerance against cerebral ischemia in vivo and in vitro. *J Cerebral Blood Flow Metab*, 2002, 22: 520-525.
- Zaman K, Ryu H, Hall D, et al. Protection from oxidative stress-induced apoptosis in cortical neuronal cultures by iron chelators is associated with enhanced DNA binding of hypoxia-inducible factors-1 and ATF-1/CREB and increased expression of glycolytic enzymes, p21(waf1/cip1), and erythropoietin. *J Neurosci*, 1999, 19: 9821-9830.
- Groenendaal G, Shadid M, McGowan JE, et al. Effects of deferoxamine, a chelator of free iron, on  $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$  activity of cortical brain cell membrane during early reperfusion after hypoxia-ischemia in newborn lambs. *Ped Res*, 2000, 48: 560-564.
- Hadhinski V, Graffagnino, Beaudry M, et al. Lipids and stroke: a paradox resolved. *Arch Neurol*, 1996, 53: 303-308.

(收稿日期: 2003-03-11)

(本文编辑: 徐弘道)

## 《血清学诊断肝癌和肝炎方法》影碟出版

《血清学诊断肝癌和肝炎方法》系中华医学电子音像出版社新出版的影碟。影碟介绍的“甲胎蛋白酶标对流电泳测定法”、“甲胎蛋白分子变异体交叉亲和酶联免疫电泳分析法”能快速、简便、高灵敏度地诊断原发性肝癌,以及用于肝癌与其他肝病鉴别诊断。这两项检测法适用于各级医院(包括基层医院)的检验诊断,也适用于发现早期肝癌的大规模普查工作。该研究成果先后荣获国家卫生部重大科技成果

奖、国家科技进步奖等7次奖励。另外还介绍了“乙型肝炎病毒聚合酶链反应(PCR)检测法”。3种方法均由熟练的专业人员进行真实、准确、规范的操作演示。适用于医学本科生和研究生的实验教学。联系地址:北京东四西大街42号(100710),联系人:郝秀萍,电话:(010) 65133608,传真:65133609, Email: cmavo@public.bta.net.cn.