

· 综 述 ·

# Hepcidin-25 在肾脏疾病中的研究进展

陈 姣<sup>1</sup>, 钟 凌<sup>2</sup>综述, 贾永前<sup>1</sup>审校

(1. 四川大学华西医院血液科, 成都 610041; 2. 四川省医学科学院/四川省人民医院检验科, 成都 610072)

**关键词:** Hepcidin-25; 抗菌肽; 肾脏疾病

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.15.061

**中图分类号:** R692.02**文献标识码:** A**文章编号:** 1671-8348(2010)15-2071-03

Hepcidin 是一种由肝脏细胞产生的具有广谱杀菌抑菌作用的抗菌肽, 属于防御性蛋白家族。它有 3 种形式, 分别由 20、22、25 个氨基酸组成, 其中以 25 个氨基酸为其主要形式和主要活性部分, 称作 Hepcidin-25。有研究表明, Hepcidin 是铁代谢的关键调节因子, 积极参与贫血、组织缺氧和炎症反应, 与肾病发生发展及预后有着密切的关系<sup>[1]</sup>。现将 Hepcidin 与肾病的关系综述如下。

## 1 Hepcidin 的结构

Hepcidin 是一种富含半胱氨酸的小分子肽, 为炎症急性期反应蛋白。2000 年 Krause 等<sup>[2]</sup>首先从人类血浆的超滤液中分离出一种小分子肽, 命名为肝脏表达的抗微生物多肽 (liver-expressed antimicrobial peptide, LEAP-1)。2001 年 Park 等<sup>[3]</sup>从人类的尿液中分离出同一种多肽, 并命名为 Hepcidin。Hepcidin 在肝脏特异表达, 而在其他器官, 如心脏、脊髓、肺表达很少<sup>[4]</sup>。Hepcidin 在肝脏合成, 首先产生一种早期多肽, 由 84 个氨基酸残基组成<sup>[5]</sup>。在其 Gly24 和 Ser25 之间存在一个酶切位点, 当酶切去除其 24 个氨基酸残基的信号肽后, 形成由 60 个氨基酸残基组成的前体肽 (pro-Hepcidin), 并通过转运进入血液循环, 最后由前肽转化酶 (propeptide convertase) 在 N 端的不同位点剪接生成 3 种不同的成熟小肽 (Hepcidin20、22、25)。它们相对分子质量分别为 2 192、2 436、2 789 D。由于富含碱性氨基酸残基, 在正常 pH 值情况下它们带有 3<sup>+</sup> 电荷。20、25 个氨基酸多肽是 Hepcidin 的主要存在形式。Hepcidin-20 通常以单体形式存在于溶液中, 而 Hepcidin-25 则是以多聚体的形式存在, 这一性质说明这两种小分子肽有着不同的生物活性, Hepcidin-25 为 Hepcidin 主要的活性形式<sup>[6]</sup>。而其前体无生物学活性, 在剪接成 Hepcidin-25 后才能参与至铁代谢中<sup>[7]</sup>。编码 Hepcidin 基因定位于 19 号染色体上, 它由 3 个外显子和 2 个内含子组成, 其中第 3 个外显子编码了 Hepcidin 的氨基酸序列。Hepcidin 基因序列和结构及其蛋白结构在物种间高度保守。Hunter 等<sup>[8]</sup>利用核磁共振光谱测定法分析 Hepcidin 的结构, 发现 Hepcidin 是一个发夹状结构, 其 2 个臂由 4 个分子内二硫键连接形成一个梯样构型。Hepcidin 蛋白结构上具有重要意义的特点就在于其结构中第 4、5 个半胱氨酸残基在发夹结构的拐角处形成了一个二硫键, 使局部呈现出一个扭曲的  $\beta$  转角结构。这种二硫键与通常情况下其他二硫键相比, 具有更高的化学反应活性, 其代表一类新的抗生物多肽。

## 2 Hepcidin 与铁代谢

铁元素是机体诸多代谢途径所不可缺少的。铁参与血红

蛋白形成, 调节免疫受体机制, 其在线粒体呼吸和 DNA 合成中的作用直接影响肿瘤细胞的增殖。缺铁可导致贫血和生长缺陷; 铁过量则会导致器官损伤。人体内存在着严格的铁代谢机制调节, 保持机体铁稳态 (iron homeostasis)。

Hepcidin 是维持铁稳态极其重要的负激素, 参与对贫血、组织缺氧及炎症的机体反应, 并被认为具有抑制小肠对铁的吸收和胎盘对铁的转运以及促进铁在网状内皮细胞中滞留的作用。其靶分子是分布在肠黏膜上皮细胞、单核巨噬细胞表面的膜铁转运蛋白 Ferroportin (Fp1)。Fp1 是目前惟一已知的细胞铁输出者, 是一种跨膜蛋白, 并且在所有组织细胞膜表达, 掌控肝细胞、网状内皮、巨噬细胞及十二指肠细胞中大部分铁的流动。其通过控制小肠铁吸收达到调节机体铁稳态<sup>[8]</sup>。机体铁水平调节主要表现在 Hepcidin 与 Fp1 的相互作用上<sup>[9]</sup>。Hepcidin 通过与 Fp1 的直接作用, 调控 Fp1 的表达量而控制铁吸收、循环、再利用等。当铁负荷增加时, 诱导肝脏 Hepcidin 表达增加, 当 Fp1 与 Hepcidin 结合后, Fp1 酪氨酸残基会在质膜上发生短暂的磷酸化, 二者突变后会阻止 Hepcidin 所介导的 Fp1 的内化。一旦发生内化, Fp1 会因去磷酸化而出现泛素化。泛素化的 Fp1 以小囊泡的形式运输最终在溶酶体降解<sup>[10]</sup>, 从而使铁的转出受到阻断, 从而使肠细胞铁输出量降低, 铁在细胞内积累, 由此导致铁的吸收以及肝细胞和巨噬细胞内储存铁的动员减少, 进入血浆中的铁含量降低, 可利用铁下降。相反, 铁缺乏时, Hepcidin 表达受抑, 而 Fp1 的表达不变, 以允许大部分铁通过 Fp1 流出来维持细胞外正常的铁浓度<sup>[11]</sup>。研究证实, Hepcidin 基因一旦被敲除, 血清中 Hepcidin 过低, 铁吸收过多, 小鼠即可出现血清铁蛋白明显上升、铁在肝脏中异常沉积<sup>[12]</sup>。总之, 铁负荷抑制 Hepcidin 的表达, 而其他如贫血、缺氧、炎症则可促进其表达<sup>[13]</sup>。

在发生免疫反应时, 炎症因子, 如 IL-6 有强烈的诱导作用<sup>[14]</sup>, 其作用于肝细胞, 使 Hepcidin mRNA 合成增多而肝脏和小肠 Fp1 表达量下降。Hepcidin 通过血液到达小肠, 与 Fp1 结合并内化降解, 抑制了小肠铁的吸收。在肝脏和巨噬细胞中 Hepcidin 也发挥同样的作用, 抑制细胞中的铁释放。于是, 血清铁减少, 转铁蛋白饱和度下降, 机体可利用的铁减少, 对抑制炎症发展起到积极作用。研究表明, 当外源性 Hepcidin 注入小鼠体内时, 十二指肠黏膜对铁的吸收和转运会明显降低, 而铁向血循环转运的比例则不受影响, 进一步证实 Hepcidin 是影响肠道铁吸收的关键因素<sup>[15]</sup>。Nicolas 等<sup>[16]</sup>也发现 Hepcidin 基因过度表达会造成转基因小鼠出现铁离子缺乏的特殊表型, 而肝脏缺乏 Hepcidin 基因表达的小鼠形成了严重

的组织铁超负荷。因此 Heparin 是维持铁稳态的关键因素。

### 3 Heparin 与肾脏疾病

众多研究表明,在肾脏疾病中,铁代谢、贫血、炎症均与肾脏疾病的发生有密切的关系。Heparin 不仅作为调节铁代谢的重要因素,维持机体铁稳态的平衡,而且还参与炎症反应,抑制某些细菌和真菌生长繁殖,同时炎症、贫血等很多反应都会对 Heparin 的表达产生影响。所以,Heparin 对研究肾脏疾病具有十分重要的临床意义。

**3.1 Heparin 与肾性贫血** 贫血一直被认为是慢性肾功能衰竭(CRF)的标志之一,可以引起 CRF 患者死亡率升高。CRF 时,肾脏贫血的主要原因为肾脏促红细胞生成素(Erythropoietin 或 EPO)产生相对不足或不能分泌。由于 EPO 主要是由肾小管上皮细胞产生,在红系发生过程中起重要作用。EPO 是治疗肾性贫血引起的主选药物。绝大部分 CRF 患者应用 EPO 治疗可以获得满意疗效,但仍有约 5%~10% 尿毒症患者应用 EPO 常规治疗剂量治疗后疗效不佳。对 EPO 治疗反应低被称之为“EPO 抵抗”。其最常见的原因是铁缺乏。其中包括了铁的绝对不足以及功能性铁缺乏。功能性铁缺乏是指体内铁储备充分,而铁不能被充分利用。而 Heparin 是调节机体铁的吸收和储存以维持铁稳态的重要物质。目前研究证实其在终末期肾病中明显升高,与铁代谢的改变和终末期肾病引起的贫血有关<sup>[17]</sup>。吴晓亮和戴世学<sup>[18]</sup>采用腺嘌呤建立肾性贫血大鼠模型,并依据析因设计方差分析进行实验分组和数据处理,以评估治疗前后肾性贫血大鼠红细胞数目、血红蛋白、网织红细胞的变化,结果发现,注射人重组 EPO(rHuEPO)后,肝脏、脾、骨髓非血红素铁的含量明显下降,说明肝脏及网状内皮系统储铁量降低,将贮存铁释放以用于血红蛋白的合成,从而使机体处于低铁状态。当红细胞生成活跃需要增加铁供应时,Heparin 受抑,以配合红细胞生成的要求。但是 Heparin-25 对 rHuEPO 促进肾性贫血大鼠的 Ret 生成起抑制作用,提示注射 Heparin 衍生物可能抑制 EPO 对大鼠肾性贫血的治疗作用。Heparin 可能是引起 EPO 抵抗的原因之一。

Ashby 等<sup>[19]</sup>研究 Heparin 与肾脏疾病关系时提出:(1) Heparin 的一般昼夜变化在铁供应降低的人群中是减少的,而在肾脏损害的患者中是升高的;(2)即使在肾功能中度损害的患者中,Heparin 也与铁供应密切相关,并随着铁的水平而变化,而与炎性介质没有明显的关系;(3)虽然 Heparin 高水平与血色素降低有关,但是,其与 EPO 低浓度有很强的相关性。Heparin 水平在肾脏疾病患者中升高并不预测红细胞生成素需要增加,而可能是 EPO 抵抗潜在的标志。Heparin 水平在肾脏疾病患者中是升高的,其既反应肾脏损伤程度,又反应了铁储藏。

也有研究表明,EPO 也可抑制 Heparin 水平。Nicolas 等<sup>[6]</sup>给小鼠注射 EPO 时,发现肝细胞 Heparin 表达水平在注射后 24、48 h 几乎完全受抑。Ashby 等<sup>[19]</sup>也观察到 Heparin 水平在一般肾脏病患者使用 EPO 治疗时下降。且在动物模型中,当开始静脉注射 EPO 以刺激红细胞生成时,Heparin mRNA 水平被充分抑制。Heparin 的表达调控是与体内红系造血对铁代谢的需求密切相关的,当造血旺盛时,Heparin 呈低表达,一方面可提高肠道铁的吸收,另一方面可动员网状内皮

系统中的铁,以保证造血对铁的需要。而肾脏疾病患者铁代谢是紊乱的。CRE 患者使用 EPO 能抑制 Heparin,改善混乱的铁运输和治疗 EPO 缺乏。但对 Heparin 引起 EPO 抵抗机制尚需进一步研究。

此外,随着肾功能的减退,Heparin 可在体内蓄积,不同透析方式对残余肾功能的影响可使 Heparin 的清除受到不同程度的影响<sup>[17]</sup>。对此引起的原因尚需深入研究。

**3.2 Heparin 与肾细胞癌** Ashby 等<sup>[19]</sup>在 32 例患者中用液相色谱仪(LC-MS)测定 Heparin-25 水平及 Heparin mRNA 在配对肿瘤及非肿瘤患者中的表达。来源于 53 例手术患者的组织样本,经实时逆转录多聚酶链反应证实存在肾细胞癌。在这个研究中有 3 个发现:(1)有转移的肾细胞癌患者血浆 Heparin-25 水平高于无转移者;(2)Heparin mRNA 的表达在有转移的肾细胞癌的患者中高于无转移者;(3)肿瘤患者中 Heparin mRNA 的高表达对肾细胞癌总的生存率是不利的。文中提出:血浆中 Heparin 水平在炎症、CRP 水平升高、多发性骨髓瘤及慢性肾脏疾病患者中升高,这预示 Heparin 改变是受生理、病理及遗传因素的影响而造成铁代谢紊乱所致。Heparin-25 浓度在有肾细胞癌(RCC)转移的患者中明显增高。肿瘤组织中 Heparin mRNA 表达低于非肿瘤组织,但是当 RCC 出现转移时,其表达也增加。Heparin mRNA 表达水平在肿瘤组织转移是一致的,但是与组织分化和肿瘤的发展阶段不一致。引起患者 Heparin 改变与铁调控有关。铁为 HPHs 催化活性的辅助因子,并为细胞生长及细胞周期提供营养。据报道铁在肾细胞癌组织中的含量比在非肿瘤细胞中丰富。Heparin mRNA 表达在有转移的肾细胞癌中明显高于无转移者。这预示着 Heparin mRNA 表达的增加可能与肿瘤组织中铁含量增加有关。Heparin 在不同的肿瘤中扮演的角色是不同的。但是,铁的增加是建立在 Heparin mRNA 表达增加的基础上,可能对肾细胞癌的转移是必须的。如前所述,Heparin 通过引起肠细胞、肝细胞和巨噬细胞中膜铁转运蛋白的内陷和降解来调节血浆中铁的代谢。另外,Heparin 在炎症时水平升高,其是一种炎症急性期反应物,表现其抗菌活性。因而,其在有转移的肾细胞癌患者中升高可能是通过上调肿瘤细胞 Heparin 的水平来预防肿瘤细胞利用铁。Heparin-25 可以作为 RCC 的预后指标之一。这项研究通过 Kaplan-Meier 分析显示 Heparin mRNA 过度表达与 RCC 患者总体生存率缩短有关。提出 Heparin mRNA 的水平对该类患者总体生存率是独立的预后因素。

**3.3 Heparin 与急性肾损伤(AKI)** AKI 是冠状动脉旁路移植术严重的并发症,一旦发生,无特殊有效的治疗手段,超过 60% 患者会死亡。AKI 在早期阶段难以用非侵袭的手段获得诊断。Julie 等<sup>[20]</sup>用前瞻性巢氏研究的方法对比了冠状动脉旁路移植术中心肺旁路手术中、术后发生 AKI 22 例患者和未发生 AKI 22 例患者一系列的尿蛋白的指标,发现相对于 AKI 患者,非 AKI 患者 Heparin-25 明显升高。也有研究表明,在被庆大霉素诱导的 AKI 的小鼠模型中,自由基引起的损伤可以被去铁胺(一种铁的螯合剂)所改善。而 Heparin 是维持铁稳态至关重要的因素。其通过结合肠细胞、肝细胞、巨噬细胞上的膜铁转运蛋白受体间接将胞内的铁锁定,使膜铁蛋白内化、

降解。Hepcidin 在肾脏的远端直管、皮质集合管、集合小管的管状上皮细胞顶端表达。hepcidin-25 是对 AKI 的适应性反应,其可以将细胞内的铁锁定,而细胞内的铁锁定有助于局限肾脏缺血-再灌注损伤。其可能起到类似外源性去铁胺的作用而改善 AKI。Hepcidin-25 可以作为预测早期 AKI 的一个指标,同时也对 AKI 的治疗提供了新的思路。

#### 4 结 语

Hepcidin 作为一种新发现的炎症急性期反应蛋白,参与对贫血、组织缺氧和炎症的机体反应,是铁代谢重要的负性调节素,对固有免疫、慢性炎症性贫血等与铁代谢相关性疾病有重要作用。近年来,其在炎症反应中的作用正逐渐被重视,对 Hepcidin 活性分子学的机制研究可改变对铁转运的理解,并可能找到一种治疗血色病和炎症性贫血的新途径。由此,Hepcidin 在肾脏疾病中的作用将会更加明确,从而为治疗提供新的途径。

#### 参考文献:

- [1] Martin GB, Mansion F, Servais AC, et al. CE-MS method development for peptides analysis, especially hepcidin, an iron metabolism marker [J]. *Electrophoresis*, 2009, 30(15):2624.
- [2] Krause A, Neitz S, Magert HJ, et al. LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity[J]. *PEBS Lett*, 2000, 480(2/3):147.
- [3] Park CH, Valore EV, Warning AJ, et al. Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(11):7806.
- [4] Pigeon C, Ilyin G, Coursaud B, et al. A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(11):7811.
- [5] Hunter hn, Fulton DB, Ganz T, et al. The solution structure of human hepcidin, a peptide hormone with antimicrobial activity that is involved in iron uptake and hereditary hemochromatosis [J]. *Biol Chem*, 2002, 277(40):37597.
- [6] Nicolas G, Viatte L, Bennoun M, et al. Hepcidin, a new iron regulatory peptide [J]. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 2002, 29(3):327.
- [7] Gagliardo B, Kubat N, Gaye A, et al. Pro-hepcidin is unable to degrade the iron exporter ferroportin unless matured by a furin-dependent process[J]. *J Hepatol*, 2009, 50(2):394.
- [8] 李娜,郭俊生,秦海宏. Hepcidin 与铁代谢[J]. *国外医学卫生学分册*, 2007, 34(3):162.
- [9] Nemet HE, Tuttle MS, Powelson J, et al. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization[J]. *science*, 2004, 306(5704):2090.
- [10] Domenico I, Ward DM, Langelier C, et al. The molecular mechanism of hepcidin-mediated ferroportin down-regulation[J]. *Mol Biol Cell*, 2007, 18(7):2569.
- [11] Ganz T. Hepcidin: A Regulator of intestinal iron absorption and iron recycling by macrophages [J]. *Best Pract Clin Haematol*, 2005, 18(2):171.
- [12] Lesbordes-Brion JC, Viatte L, Bennoun M, et al. Targeted disruption of the hepcidin 1 gene results in severe hemochromatosis[J]. *Blood*, 2006, 108(4):1402.
- [13] Erwin HJM, Kemna-April ER, Lambertus JH, et al. Regulation of hepcidin: Insights from biochemical analyses on human serum samples[J]. *Blood Cell Mol Dis*, 2008, 40(3):339.
- [14] Pauline L, Hongan P, Terri G, et al. The IL-6 and lipopolysaccharide-induced transcription of hepcidin in HFE-transferrin receptor and  $\beta_2$ -microglobulin-deficient hepatocytes[J]. *Proc Acad Sci USA*, 2004, 101(25):9263.
- [15] Laftah AH, Ramesh B, Simpson RJ, et al. Effect of hepcidin on intestinal iron absorption in mice[J]. *Blood*, 2004, 103(10):3940.
- [16] Nicolas G, Chauvet C, Viatte L, et al. The gene that codes for hepcidin, an iron regulatory hormone, is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation[J]. *Clin Invest*, 2002, 110:1037.
- [17] Valenti L, Girelli D, Valenti GF, et al. HFE mutations modulate the effect of iron on serum hepcidin-25 in chronic hemodialysis patients[J]. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2009, 4(8):1331.
- [18] 吴晓亮,戴世学. Hepcidin-25 配合促红细胞生成素治疗大鼠肾性贫血的疗效分析[J]. *实用医技杂志*, 2008, 15(16):2055.
- [19] Ashby DR, Gale DP, Busbridge M, et al. Plasma hepcidin levels are elevated but responsive to erythropoietin therapy in renal disease[J]. *Kidney Int*, 2009, 75(9):976.
- [20] Julie H, Lucy M, Krokhn O, et al. Mass spectrometry-based proteomic analysis of urine in acute kidney injury following cardiopulmonary bypass: a nested case-control study[J]. *Am J Kidney Dis*, 2009, 53(4):584.

(收稿日期:2009-11-24 修回日期:2010-01-22)

## 《重庆医学》关于论文字数规定

论著、临床研究、调查报告、综述栏目的论文正文字数以 4 000~5 000 字为宜,版面控制在 2~2.5 页左右(7 000 版面字);经交流、医学教育、医疗卫生管理以 3 000 字为宜,版面控制在 1.5 页左右;其他栏目以 2 500 字为宜,版面控制在 1 页左右。