

# 肝豆状核变性患者肝细胞中 P 型 ATP7B 酶水平及功能的研究

吕达平, 韩咏竹, 王训, 胡纪源, 洪铭范, 李凯, 胡文彬, 杨任民

**【摘要】** 目的 探讨肝豆状核变性(HLD)患者肝细胞中 P 型 ATP7B 酶水平及功能。方法 采用细胞培养技术,将 9 例 HLD 患者和 5 例非 HLD 脾破裂或胆囊疾病患者(对照组)的肝细胞行体外培养。采用 SDS-PAGE 电泳及 Western-blot 蛋白印迹技术,测定两组肝细胞中 P 型 ATP7B 酶水平并进行比较。结果 与对照组相比,9 例 HLD 患者均出现电泳条带的改变,其中 3 例于  $155 \times 10^3$  处的条带接近正常,1 例未见明显条带,5 例该条带有不同程度稀薄、色淡;6 例出现异常的特异性反应条带。结论 HLD 患者肝细胞内存在 ATP7B 基因各种形式的变异,程度不等的 P 型 ATP7B 酶量和/或质的异常是导致铜代谢障碍的原因。

**【关键词】** 肝豆状核变性; 肝细胞; P 型 ATP7B 酶

**【中图分类号】** R742.4 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1004-1648(2005)03-0173-03

**Study of level and functions of P-type ATPase7B in hepatic cells of patients with hepatolenticular degeneration**

LÜ Da-ping, HAN Yong-zhu, WANG Xun, et al. Institute of Neurology, Affiliated Hospital, Anhui College of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230031, China

**Abstract: Objective** To explore the level and main functions of P-type ATPase7B in hepatic cells of patients with hepatolenticular degeneration(HLD). **Methods** The hepatic cells from 5 normal controls and 9 patients with HLD were cultured in vitro. P-type ATPase7B levels in hepatic cells were examined and compared by SDS-PAGE and Western-blot techniques. **Results** Compared with the controls, 9 patients displayed various changes of electrophoresis strip. Almost normal strips at  $155 \times 10^3$  were found in 3 cases, no strip was found in 1 case, and thinner and lighter strips were showed in the remain 5 cases. 6 cases presented abnormal specific reaction strips. **Conclusion** Mutations of gene ATPase7B in HLD patients cause change of P-type ATPase7B in quantity and quality, thus leads to dysmetabolism of copper.

**Key words:** hepatolenticular degeneration; hepatic cell; P-type ATPase7B

肝豆状核变性(HLD)是一种常染色体隐性遗传性铜代谢障碍性疾病,是 ATP7B 基因(13q14.3)变异,使 P 型 ATP7B 酶水平及功能异常引发的铜代谢障碍所致<sup>[1,2]</sup>。本实验采用体外细胞培养技术及 Western-blot 蛋白印迹技术,定量分析并比较 HLD 患者与对照者之间的差异。

## 1 对象与方法

**1.1 对象** (1)HLD 组:2003 年 10 月~2004 年 2 月在我院确诊住院的 9 例 HLD 患者,符合杨任民等的诊断标准<sup>[3,4]</sup>。其中男 5 例,女 4 例;年龄 11~42 岁,平均  $(25.2 \pm 5.9)$  岁;病程 1.2~12.6 年,平均  $(8.3 \pm 4.6)$  年。(2)对照组:男 2 例,女 3 例;年龄 17~46 岁,平均  $(34.6 \pm 10.3)$  岁。其中 2 例为外伤性脾破裂,3 例为胆囊炎和/或胆囊结石,均需行外科手术治疗,并排除 HLD。

## 1.2 方法

**1.2.1 肝细胞标本采集** HLD 组肝组织标本来自肝活检,对照组取自医院外科无菌手术台。标本从人体分离后,立即放入 5 ml 含双抗液的细胞生长培养液的青霉素瓶中,30 min 内送实验室无菌操作台。所采集的标本 HLD 患者依次为 P<sub>1~9</sub> 及对照组为 N<sub>1~5</sub>,分别进行培养。

**1.2.2 肝细胞培养** 4℃ 的 D-Hanks 液清洗肝标本,在生长培养液中剪切至  $1.0 \text{ mm}^3$  大小并去除包膜等,肝组织碎屑以 0.02% IV 型胶原酶温育消化成单个肝细胞,通过 200 目细胞筛,500 r/min 离心 5 min。0.4% 的台盼兰染色计数肝细胞密度及成活率,最终调至  $1.0 \times 10^6$  个/ml。接种于 6 孔培养板,置 37℃、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中进行细胞培养。4~8 d 细胞约占底面积 80%,倾尽生长培养液,待行电泳检测。

**1.2.3 SDS-PAGE 电泳** 6 孔培养板置于 0℃ 平台上,加入单去污剂裂解缓冲液 0.05 ml/孔,静置 20 min。收集肝细胞裂解的产物,以 3100 r/min 离心 5

min, 获取上清液并以 100℃、3 min 处理(蛋白样品); 对照组 5 份上清液混匀、合并。先后灌注 6% 分离胶及 3% 浓缩胶于垂直电泳槽, 待聚合后依次加样(左侧第 1 列为蛋白 Marker), 接通电源, 稳压在 8 V/cm (150 V), 当染料进入分离胶时, 将电压提高至 15 V/cm (270 V), 继续电泳直至染料达到分离胶底部, 关闭电源。取下凝胶, 采用考马斯亮蓝染色 1 h, 取出凝胶并脱色处理至凝胶近乎完全脱色, 而蛋白色带仍保留为止。

1.2.4 Western-blot 印迹分析 电转槽中进行电转膜, 将蛋白从 SDS 聚丙烯酰胺凝胶转移至硝酸纤维素滤膜上, 切去滤膜左下角, 以作标记。室温条件下, 氨基黑染色滤膜。于脱色摇床上 PBS 液漂洗滤膜至滤膜近乎完全脱色, 而蛋白色带仍保留为止。按二抗试剂盒要求, 用封闭液封闭滤膜上非特异性蛋白结合位点, 继以免抗人多克隆抗体应用液[一抗应用液、ATP 结合位点多克隆抗体应用液(抗 ABD)]温育滤膜 2 h, 0.1 mol/L PBST 振荡洗涤滤膜, 再以山羊抗兔多克隆抗体应用液(二抗应用液)温育滤膜 20 min, 0.1 mol/L PBST 振荡洗涤滤膜, 取出并 DAB 显色。

1.2.5 结果分析 采用 Bio-Rad Gel 2000 凝胶成像系统, 观察特异性条带数目, 并自动分析相对分子质量, 计算每一条带密度的深浅(取两次的均值), 加以分析、处理。对第 1 条带(P 型 ATP7B 酶)密度深浅的比较, 反映对照组和 9 例 HLD 患者间 P 型 ATP7B 酶含量及/或性质的差异。

## 2 结果

对照组及患者肝细胞 P 型 PTP7B 酶 Western-blot 印迹图 见图 1。

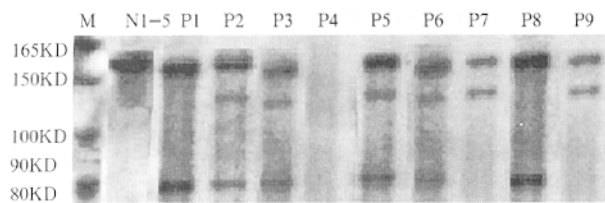


图 1 对照组及患者肝细胞 P 型 ATP7B 酶 Western-blot 印迹图  
1: M 为标准蛋白 Marker, N<sub>1-5</sub> 为对照组, P<sub>1-9</sub> 分别为 9 例 HLD 患者。2: M 处相对分子质量为 165×10<sup>3</sup>、150×10<sup>3</sup>、100×10<sup>3</sup>、90×10<sup>3</sup>、80×10<sup>3</sup> 5 种蛋白

对照组 N<sub>1-5</sub> 出现 1 条带, 相对分子质量约为 155×10<sup>3</sup>, 密度为 237.5±6.4。HLD 患者中, 除 P<sub>4</sub> 未见明显条带外, P<sub>1</sub> 和 P<sub>8</sub> 见两条带, 第 1 条带相对分子质量和密度分别为 153×10<sup>3</sup>、221.3±6.5 和 155×10<sup>3</sup>、224.6±5.9, 第 2 条带为 80×10<sup>3</sup>; P<sub>7</sub>、P<sub>9</sub> 也见两

条带, 第 1 条带相对分子质量均为 155×10<sup>3</sup>, 密度分别为 196.4±9.8 和 195.9±11.2, 第 2 条带相对分子质量为 140×10<sup>3</sup>; P<sub>2</sub>、P<sub>3</sub>、P<sub>5</sub>、P<sub>6</sub> 各 3 条带, 每患者第 1 条带依次: 相对分子质量 155×10<sup>3</sup>、密度为 215.7±9.5, 153×10<sup>3</sup>、209.1±8.4, 155×10<sup>3</sup>、225.9±6.2, 153×10<sup>3</sup>、207.8±10.5; 第 2 及第 3 条带位于 140×10<sup>3</sup> 及 (80~85)×10<sup>3</sup> 处。与对照组相比, 在相对分子质量为 155×10<sup>3</sup> 条带处, P<sub>2</sub>、P<sub>3</sub>、P<sub>6</sub> 的密度差异有显著性(均 P<0.05), P<sub>7</sub>、P<sub>9</sub> 差异有极显著性(均 P<0.01), P<sub>4</sub> 密度为 0, P<sub>1</sub>、P<sub>5</sub>、P<sub>8</sub> 无明显差异。

## 3 讨论

通过 Western-blot 蛋白印迹分析技术, 配合免疫组化法对 9 例 HLD 患者及 5 例对照者的 P 型 ATP7B 酶进行定量分析, 发现 HLD 患者的铜转运酶除 1 例(P<sub>4</sub>) 未见明显条带外, 其他 8 例患者均于 (150~165)×10<sup>3</sup> 间存在对一抗、二抗特异性反应条带, 相对分子质量为 (153~155)×10<sup>3</sup> 的条带是 P 型 ATP7B 酶。经过密度对比, 除 P<sub>1</sub>、P<sub>5</sub> 和 P<sub>8</sub> 与对照组无明显差异外, P<sub>2</sub>、P<sub>3</sub> 和 P<sub>6</sub> 与对照组差异有显著性(均 P<0.05), 而 P<sub>7</sub>、P<sub>9</sub> 差异有极显著性(均 P<0.01)。说明 HLD 患者多数存在 P 型 ATP7B 酶合成量的不足; 或虽然该酶合成充足, 但可能于 ATP 结合功能区存在某些突变(即 ABD 区性质的改变), 致使抗 ABD 抗体(一抗)结合于 ABD 区障碍。

就 P<sub>2</sub>、P<sub>3</sub>、P<sub>5</sub>、P<sub>6</sub>、P<sub>7</sub>、P<sub>9</sub> 尚于 140×10<sup>3</sup> 附近出现的第 2 条特异性反应条带, 有 3 种可能: (1) 是全长为 155×10<sup>3</sup> 的 P 型 ATP7B 酶的降解产物。Lutsenko 等<sup>[5]</sup> 也曾应用 P 型 ATP7B 酶的 ATP 结合位点多克隆抗体(抗 ABD)在肝癌细胞株 HepG2 中检测出除了 160×10<sup>3</sup> (P 型 ATP7B 酶) 外, 尚发现 140×10<sup>3</sup> 的第 2 条特异性反应条带, 并认为系该酶的降解产物。(2) 可能因为 ATP7B 基因的改变, 致使该酶不能完全合成。Schaefer 等<sup>[6,7]</sup> 发现部分 HLD 患者尚存在 1 条较短的 P 型 ATP7B 酶 mRNA, 可能因为 ATP7B 基因的某些突变, 致使转录提前终止所致, 最终表达产物约含有 1258 个氨基酸残基, 相对分子质量约为 140×10<sup>3</sup>, 该 mRNA 主要出现在脑组织中, 肝脏中较少, 符合于本实验 140×10<sup>3</sup> 的条带相对较窄且暗淡的结果。(3) 可能是体外培养条件下的细胞不能完全等同于体内细胞, 因此, 亦可能是某些蛋白有一部分合成不完全。

P<sub>1</sub>、P<sub>2</sub>、P<sub>3</sub>、P<sub>5</sub>、P<sub>6</sub>、P<sub>8</sub> 6 例患者尚于 (80~85)×10<sup>3</sup> 处存在 1 条特异性反应条带。有文献报道<sup>[6,7]</sup>, 如果在单去污剂裂解缓冲液中不加入裂解酶抑制剂(即苯甲基磺酰氟化物、抑酞酶等), 或肝细胞裂解后

放置较长时间,则  $155 \times 10^3$  处特异性反应条带变淡甚至消失,然而  $90 \times 10^3$  处可出现特异性反应条带或更加明显,甚至可以出现更小相对分子质量的特异性反应条带。因此,本实验中  $(80 \sim 85) \times 10^3$  处的条带可认为系 P 型 ATP7B 全酶在单去污剂裂解缓冲液中降解所致。

检测 P 型 ATP7B 酶的结果中,  $P_4$  未见明显条带。该患者男性,14 岁,病程 1.5 年;临床虽以言语不清、流涎、行走不稳等锥体外系为主要表现,但肝功能异常及肝纤维化指标显著升高,角膜 K-F 环(卅);腹部 B 超示肝脏回声增粗、增强,分布不均匀,呈岩层征;脾肿大,前缘达腹正中线,明显重于其他患者。该患者于  $(155 \sim 165) \times 10^3$  处未见明显特异性反应条带,严重缺乏 P 型 ATP7B 酶,故可解释其严重铜代谢异常的临床表现。

总之,本实验发现, HLD 患者出现铜排泄障碍可能是其体内存在多种形式的 ATP7B 基因突变,肝细胞内 P 型 ATP7B 酶发生了不同程度的功能异常,最终导致铜在体内蓄积,引发不同的临床表现形式。

## [参考文献]

- [1] Tanzi RE, Petrukhin K, Chernov I, et al. The Wilson disease gene is a copper transporting ATPase with homology to the Menkes disease gene[J]. Nat Genet, 1993,5: 344.
- [2] Masaru Harada. Wilson disease[J]. Med Electron Microsc, 2002, 35:61.
- [3] 杨任民主编. 肝豆状核变性[M]. 第 1 版. 合肥:安徽科技出版社,1995. 167~189.
- [4] 孙怡, 杨任民主编. 实用中西医神经病学[M]. 第 1 版. 北京:人民卫生出版社,1999. 531~546.
- [5] Lutsenko S, Cooper MJ. Localization of the Wilson's disease protein product to mitochondria[J]. Proc Nat Acad Sci USA, 1998, 95: 6004.
- [6] Schaefer M, Hopkins RG, Failla ML, et al. Hepatocyte-specific localization and copper-dependent trafficking of the Wilson's disease protein in the liver[J]. Am J Physiol, 1999, 276: G639.
- [7] Nagano K, Nakamura K, Urakami KI, et al. Intracellular distribution of the Wilson disease gene product (ATPase7B) after in vitro and in vivo exogenous expression in hepatocytes from the LEC rat, an animal model of Wilson's disease[J]. Hepatology, 1998, 27:799.

(收稿日期 2004-08-16 修回日期 2004-11-18)

## • 病例报告 •

## POEMS 综合征被误诊为慢性 Guillain-Barre 综合征 1 例报告

邱金华, 罗伟良

【中图分类号】R741

【文献标识码】D

【文章编号】1004-1648(2005)03-0175-01

POEMS 综合征是进行性多神经病变、脏器肿大、内分泌病变、M 蛋白血症、皮肤改变以及浆细胞恶性增生为特征的一种较罕见的系统性疾病。现报告 1 例曾被误诊为慢性 Guillain-Barre 综合征 (GBS) 的患者如下。

1 病例 女,50 岁。进行性四肢麻木、无力 2 年于 2004 年 5 月 3 日入院。患者 2 年前因四肢麻木、无力,并逐渐加重分别在 2 所医院就诊,2002 年及 2003 年分别腰穿行脑脊液 (CSF) 检查,均示总蛋白、IgG、IgM、IgA 升高,两次肌电图检查分别示运动神经传导速度明显小于正常 50% 及多发性周围神经损害,诊断为慢性 GBS。曾用糖皮质激素及血浆置换治疗,病情不能控制;CSF 及肌电图复查无改变。查体:全身皮肤明显着色,双下肢凹陷性水肿,浅表淋巴结未触及,双上肢肌力 IV 级,下肢 III 级,全身深感觉明显减退,病理征(-)。腹部 B 超示肝、胆、脾、胰未见异常;胸部 X 线片示左胸腔少量积液;骨髓穿刺显示浆细胞系占 7.5%,其中原浆占 1%、幼浆占 1%,余为成熟浆细胞,诊断为 POEMS 综合征。患者因经济困难放弃治疗,自动出院。

2 讨论 POEMS 于 1968 年首先由日本学者 Shimpo 等作为一个独立的综合征报道。临床表现各异,可累及多个系统, Nakuishi 提出 7 个方面表现:(1)慢性进行性多发性周围神经病;(2)脏器肿大;(3)内分泌紊乱;(4)M 蛋白血症,浆细胞增生;(5)皮肤改变;(6)全身性水肿;(7)视盘水肿,CSF 蛋白增高。其他可有低热、多汗、肺动脉高压、缺血性心肌病等,其中 (1)和(4)为诊断的必备条件,加其余 5 项中的 1 项便可诊断为本综合征。本例有慢性进行性多发性周围神经病,浆细胞增生,全身皮肤色素沉着,胸腔积液,CSF 蛋白增高,故诊断为 POEMS 综合征。误诊的主要原因为:(1)POEMS 少见不为临床医师熟悉;(2)病史长,有全身感觉障碍、渐进性肌无力、CSF 蛋白-细胞分离,易误诊为慢性 GBS。通过此例提醒临床医师,对具有感觉障碍、肌无力、CSF 蛋白细胞分离、酷似慢性 GBS 的患者,长期糖皮质激素治疗无效,应详细追问病史,详细体格检查;完善腹部 B 超、骨髓等检查,以免误诊。

(收稿日期 2004-09-23 修回日期 2004-12-13)