

损伤的严重程度有关,其有可能作为反映 VCI 患者白质损伤严重程度的较特异性指标。

(收稿日期 2004-11-24)

(本文编辑 陈秀华)

肝豆状核变性患者肝细胞铜代谢的研究

吕达平 韩咏竹 王训 洪铭范 胡纪源 杨任民

肝豆状核变性(HLD)系常染色体隐性遗传性铜蓄积性疾病,是以肝脏和其他组织细胞内渐进性铜蓄积为发病基础。患者因肝铜蓄积,致急、慢性肝炎,肝硬化和暴发性肝功能衰竭等。在中枢神经系统,铜可致相应的损害,表现为多种神经、精神异常。此外,尚可致肾脏、心脏损害及多种内分泌紊乱等。

资料和方法

我们于 2003 年 9 月至 2004 年 2 月安徽中医学院神经病学研究所附属医院外科手术获取 9 例 HLD 患者和 5 例正常对照肝组织块,清洗、剪切并去除包膜、胶原酶温育消化、过筛、离心 5 min。接种于 6 孔培养板,37℃ 5% CO₂ 培养箱中行细胞培养。定时换液,4~8 d 后,倾尽生长培养液(SP)随机编号,7 孔依次加入 SP、氯化铜(C)、C + ATP(CA)、C + 硫酸铜(CV)、CV + ATP(CVA)、C + 长春新碱(CO)、CO + ATP(COA)培养液,继培养 24 h。吸尽培养液, D-Hanks 液洗涤,每孔加入 0.05 mol/L Tris-HCl 2 ml (pH8.6),分离肝细胞,80W 60 s 粉碎,细胞匀浆 4 次差速离心,依次获取溶酶体、线粒体、微粒体和细胞浆。采用火焰原子吸收分光光度法及 Bradford 法,检测各标本中实际铜含量 (ng/ml) 及实际蛋白含量 (mg/ml)。以实际铜/实际蛋白 (ng/mg) 代表各亚细胞器铜含量。

结 果

1. HLD 组和正常组经 SP 培养后肝细胞铜含量结果:见表 1。
2. 经 6 种铜培养后 HLD 患者肝细胞铜含量测定结果:见表 2。

讨 论

铜是人体必需微量元素,但铜又具有一定的毒性,当细胞内铜含量过高时,则可引起铜代谢障碍性疾病,如 HLD。HLD 蛋白(P 型 ATP7B 酶)转运铜依赖于 ATP 供能,其活性可被长春新碱激动及被硫酸铜抑制。HLD 基因发生突变时,

表 1 SP 培养正常及患者组肝细胞各亚细胞器铜含量 ($\bar{x} \pm s$, ng/mg)

分组	例数	溶酶体 ^[1]	线粒体 ^[2]	微粒体 ^[3]	细胞浆 ^[4]
正常	5	36.5 ± 2.7	31.2 ± 4.7	31.1 ± 4.2	348.0 ± 24.2
患者	9	77.7 ± 8.2	63.1 ± 6.4	55.0 ± 7.5	796.3 ± 32.6

注:* 正常组[4]与其他 3 亚细胞器铜含量均 $P < 0.01$,而[1],[2],[3]相互间均 $P > 0.05$ 。# 患者组[1],[2],[3],[4]各亚细胞器铜含量均 $P < 0.01$,患者组和正常组各对应亚细胞器铜含量均 $P < 0.01$

表 2 6 种铜培养后患者组肝细胞各亚细胞器铜含量 ($n = 9, \bar{x} \pm s$, ng/mg)

亚细胞器	分组	C	CV	CO
溶酶体	无 ATP	417.6 ± 26.8	438.5 ± 35.4	424.3 ± 28.6
	含 ATP	404.7 ± 27.7	429.9 ± 33.7	377.6 ± 33.4
线粒体	无 ATP	448.3 ± 36.7	450.5 ± 38.9	447.0 ± 41.6
	含 ATP	437.6 ± 49.7	438.7 ± 55.7	439.1 ± 56.2
微粒体	无 ATP	388.8 ± 19.6	404.3 ± 19.4	379.0 ± 27.0
	含 ATP	366.5 ± 27.0	389.2 ± 27.6	329.4 ± 38.7
细胞浆	无 ATP	1561.1 ± 28.3	1623.2 ± 44.1	1493.6 ± 41.2
	含 ATP	1436.2 ± 61.3	1485.7 ± 59.2	1302.0 ± 111.6

注:含 ATP 组两两比较和 C/CA、CV/CVA、CO/COA 比较,均 $P < 0.05$

可引起 P 型 ATP7B 酶功能或含量异常,发生铜代谢的紊乱。

本实验中,当采用 SP 培养时,正常肝细胞内铜主要分布于细胞浆,余亚细胞器无明显差异,而 HLD 患者除以细胞浆为主外,其次以溶酶体较多,而线粒体和微粒体含量较少(表 1),说明后者确实存在不同程度的铜代谢障碍。

HLD 患者肝细胞除线粒体内的铜含量相对稳定外,余三细胞器在 6 组铜培养中,仅当培养液中不含 ATP 时,铜含量差异无统计学意义,而含 ATP 三组铜含量差异均有统计学意义,且均较不含有 ATP 的相应组明显减少,提示线粒体膜不存在依赖于 ATP 的铜转运酶,即 P 型 ATP7B 酶,余三细胞器膜上含有 ATP(表 2)。

另外,细胞质各组铜含量都极大高于其他细胞器。此结果一方面提示细胞质膜上存在依赖于 ATP 的铜转运酶,另一方面,治疗 HLD 患者时,在一定的方案指导下,应用长春新碱及 ATP 应有利于肝细胞向胆汁排铜。

(收稿日期 2004-09-06)

(本文编辑 陈秀华)

基金项目 安徽省自然科学基金资助项目(01043713)

作者单位 230031 合肥,安徽中医学院神经病学研究所附属医院
Email: lydaping@163.com

万方数据