

中药肝豆汤对遗传性肝豆状核变性患者铜锌代谢的影响

刘康永¹ 韩咏竹² 杨任民² (1. 复旦大学医学院附属华山医院, 上海 200233 2. 安徽中医学院神经病学研究所)

摘要:目的 在细胞水平探讨中药复方肝豆汤治疗肝豆状核变性(HLD)的机制。方法 在以HLD患者的肝脏制备的肝细胞模型中加入含肝豆汤兔血清,观察加入前后细胞模型中铜锌等微量元素含量的变化。结果 加入含肝豆汤兔血清24h后细胞内铜含量明显减少,锌含量明显增加。结论 肝豆汤具有显著的细胞内排铜作用,同时可使细胞内锌含量显著增加。

关键词:肝豆状核变性;肝豆汤;含肝豆汤兔血清;肝豆状核变性肝细胞模型;细胞内铜锌含量

中图分类号:R742.4 文献标识码:A 文章编号:1007-5496(2001)07-0049-02

The effect of Gandou decoction on intracellular contents change of copper - zinc in vitro model of cultured hepatocell of hepatolenticular degeneration LIU Kang - yong, HAN Yong - zhu, YANG Ren - min. Huashan Hospital, Shanghai Medical University, Shanghai 200233, China

Abstract: Objective To explore the cytological mechanism of Gandou decoction(GDD) treating HLD(hepatolenticular degeneration). **Method** We established the vitro models of cultured hepatocell of HLD, fourteen in vitro models of cultured hepatocell of HLD were established to observe the intracellular change of micoelements(Cu^{2+} , Zn^{2+} , etc) contents before and after adding rabbit serum containing GDD. **Result** After treatment with GDD containing serum for 24 hours, the intracellular content of Cu^{2+} decrease Zn^{2+} increased. **Conclusion** GDD is quite effective in removing the intracellular copper and increasing the intracellular zinc.

Key words: hepatolenticular degeneration(HLD); Gandou decoction(GDD); vitro model of cultured hepatocell of HLD; rabbit serum containing Gandou decoction; intracellular contents of copper and zinc

· 本文重点 ·

- HLD 作为少数几种可以有效治疗的遗传性疾病之一,其效果与治疗早晚、能否长期维持治疗密切相关。
- 本实验在国内首次建立了 HLD 离体培养肝细胞模型,消除了由于不同个体内环境的差异对细胞的影响,铜代谢障碍的缺陷在细胞水平得以表达,纯化了研究过程,提高了实验精确度,为 HLD 发病机制的研究提供了新的途径。

肝豆状核变性(hepatolenticular degeneration, HLD)又称 Wilson 病,是一种常染色体隐性遗传铜代谢障碍疾病,其基因定位于 13q14.3, cDNA 全长编码一种 P 型铜转运 ATP 酶(ATP7B),故又称 ATP7B 基因,其含 22 个外显子^[1]。杨任民等^[2]于 70 年代首创中药复方肝豆汤治疗 HLD,初步取得了较好临床疗效。肝脏是 HLD 最主要受累的靶器官之一,建立 HLD 患者离体培养肝细胞模型对研究 HLD 发病机制及评价药物疗效具有重要意义。本研究通过以 HLD 患者肝脏制备肝细胞模型中加入含肝豆汤的兔血清,观察加入前后细胞模型中铜、锌等微量元素含量的变化,以探讨 HLD 的发病机制和肝豆汤在细胞水平的排铜作用。

1 对象与方法

1.1 对象 实验组:随机选取临床表现及铜代谢检查均符合诊断标准^[3]的 HLD 患者 14 例,其中男 9 例,女 5 例;年龄 10~35 岁,平均(18.75±10.9)岁。对照组:13 例患者均经病理学明确诊断为原发性肝癌,其中男 9 例,女 4 例;年龄 28~45 岁,平均(30.45±9.87)岁。随机选取雄性成年新西兰白兔 10 只,体重(2.5±0.1)kg,由安徽医科大学实验动物中心提供。

1.2 方法

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39570878)

作者简介:刘康永(1970-),男,安徽泗县人,主治医师,硕士,研究方向:运动障碍性疾病的综合治疗。

1.2.1 含药血清的制备 肝豆汤组方:大黄 6g,泽泻 15g,姜黄 6g,黄连 6g,金钱草 15g,生三七 1g,按文献[4]制备肝豆汤浓缩液 150ml 移入棕色试剂瓶内,置 4℃冷藏箱中备用。随机选取 5 只新西兰白兔为一组,其余 5 只为另一组,实验前禁食 1d。随后逐日灌服肝豆汤浓缩液 30ml/只,2 次/d,间隔 12h,共给药 10d。达到稳态血浓度后^[5],常规消毒下不经麻醉直接从兔心脏进针取血(为避免麻醉药物对肝细胞生长产生不良影响),取血瓶斜放 2h,待血清析出后,置冷藏箱中过夜,次日吸取上层血清离心、抽滤、除菌后,置 -20℃下保存备用。按同样方法取血制备空白血清。

1.2.2 肝细胞模型的制备 采用外科手术留取肝组织 1~2cm³进行离体肝细胞培养,制备肝细胞模型,细胞培养参照汪谦、王小军等^[6]方法。将培养板置于倒置显微镜下观察,当细胞融合成片占据整个视野的 80%左右,细胞数量绝对值 > 10⁵ 个时,即可检测出细胞内铜、锌含量,构成一个细胞模型。每例均由 3 组相同的细胞模型构成,一组未加血清,另两组分别加入 0.5ml 空白血清和等量的含药血清,分别编号为培养液组、空白血清组和含药血清组,重新培养 24h 后以 0.25% 的胰蛋白酶消化吹打均匀,收获备用。

1.2.3 细胞模型中 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 和总蛋白含量测定。采用改良 Loway 法^[7]计算细胞模型中 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 和总蛋白的含量,以细胞模型中 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 含量与总蛋白含量的比值 (ng/mg) 作为细胞模型 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 含量测定值。

1.3 统计学处理方法 各组数据均以 ($\bar{x} \pm s$) 表示,配对资料分析采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 HLD 患者肝细胞的存活率及附壁时间 本组 HLD 患者即时存活率可达 95%,培养存活率可达 90%,肝细胞纯度可达 90%,5h 肝细胞开始附壁,24h 约 50% 存活细胞贴壁,36h 存活细胞可完全贴壁,约有 5%~10% 左右的受损伤细胞贴壁后会再次脱落。

2.2 13 例非 HLD 患者 3 组肝细胞模型细胞内 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 含量和

Cu²⁺/Zn²⁺ 比值的变化 见表 1。

表 1 13 例非 HLD 患者 3 组肝细胞内 Cu²⁺、Zn²⁺ 含量和 Cu²⁺/Zn²⁺ 比值的变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Cu ²⁺ (ng/mg)	Zn ²⁺ (ng/mg)	Cu ²⁺ /Zn ²⁺
培养液组	56.52 ± 10.36	69.45 ± 9.56	0.81 ± 0.27
空白血清组	52.68 ± 9.87	67.39 ± 10.28	0.78 ± 0.28
含药血清组	50.92 ± 11.04	67.92 ± 9.03	0.79 ± 0.31

由表 1 可见, 13 例非 HLD 患者肝细胞模型加入含肝豆汤的免血清培养后, 细胞内 Cu²⁺、Zn²⁺ 含量和 Cu²⁺/Zn²⁺ 比值与培养液组和空白血清组比较均无显著变化 ($P > 0.05$)。说明肝豆汤对非 HLD 患者肝细胞模型无显著的细胞内排铜作用。

2.3 14 例 HLD 患者 3 组肝细胞模型细胞内 Cu²⁺、Zn²⁺ 含量和 Cu²⁺/Zn²⁺ 比值的变化 见表 2。

表 2 14 例 HLD 患者 3 组肝细胞模型细胞内 Cu²⁺、Zn²⁺ 含量和 Cu²⁺/Zn²⁺ 比值的变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Cu ²⁺ (ng/mg)	Zn ²⁺ (ng/mg)	Cu ²⁺ /Zn ²⁺
培养液组	169.97 ± 30.84*	63.82 ± 11.40*	2.68 ± 0.79*
空白血清组	159.04 ± 29.38*	61.37 ± 9.14*	2.61 ± 0.82*
含药血清组	94.61 ± 23.16	74.23 ± 10.36	1.27 ± 0.63

注: 与加含药血清比较, * $P < 0.01$

从表 2 可见, 14 例 HLD 患者肝细胞模型加入含肝豆汤的免血清培养后, 细胞内 Cu²⁺ 含量较培养液和空白血清组显著减少 ($P < 0.01$) 细胞内 Zn²⁺ 含量显著增加 ($P < 0.01$) ,Cu²⁺/Zn²⁺ 比值显著下降 ($P < 0.01$)。说明肝豆汤对 HLD 患者肝细胞模型具有显著的细胞内排铜作用, 并能增加细胞内的锌含量。

3 讨论

对 HLD 治疗方法大体包括 3 个部分(1)代谢方法: 饮食控制, 即高锌低铜为先, 螯合促进排泄, 亲合结合, 产物替代; (2) 基因和基因产物治疗: 基因替代、酶替代、同种移植; (3) 预防性治疗: 杂合子筛选、产前诊断。目前仍以排铜治疗为主导。近年来, 国内外大都采用青霉胺促进尿排铜治疗, 虽然在临床上取得了较好疗效, 但因其毒副作用较多, 而且尿排铜作用有随用药时间延长而逐渐减弱的倾向。杨任民等根据大多数患者具有眼黄肤黑、口苦口臭、尿黄便秘、舌质红、苔黄或黄腻、脉弦数或弦滑等征候, 推断 HLD 的主要病因病机为: 铜毒内聚, 肝胆湿热内蕴。故立清热躁湿

解毒, 保肝利胆通淋之法结合现代研究取高锌低铜的中药组成复方肝豆汤^[8]。临床观察证明 肝豆汤确有明显的向胆汁、大便及尿中排铜作用, 同时改善 HLD 患者的临床症状。本实验结果表明, 肝豆汤对 HLD 肝细胞模型确有显著的细胞内排铜作用和增加细胞内锌的含量 ($P < 0.01$), 细胞内铜锌比值显著降低 ($P < 0.01$) 在细胞水平证明了肝豆汤的确切疗效。但肝豆汤对非 HLD 患者肝细胞模型并无明显的细胞内排铜作用 ($P > 0.01$), 细胞内锌含量和铜锌比值均无明显变化 ($P > 0.01$), 表明肝豆汤对正常铜代谢的 HLD 患者并无排铜作用。

离体培养细胞模型直接取材于患者及正常人, 每一个离体培养的细胞内均含有供体的所有遗传信息, 对 HLD 这一遗传性疾病的研究、诊断及药理分析具有其它模型不可替代的优点。自 1980 年 Chan 等^[9] 首次将离体培养皮肤成纤维细胞用于 HLD 遗传缺陷的研究以来, 此模型被广泛用于该病的研究, 目前已进入较为成熟的阶段。HLD 是由于铜离子代谢障碍而引起的铜中毒性疾病, 肝脏是最主要的受累器官之一, 离体培养肝细胞进行研究应为最理想的模型。但由于培养条件复杂, 另外与皮肤成纤维细胞相比取材困难, 目前国内尚未见报道。

参考文献:

[1] Bull PC, Thomas GR, Rommens JM, et al. The wilson disease gene is a putative copper transporting P-type ATPase similar to the Menkes gene [J]. Nature Genet, 1993, 5(12): 327

[2] 胡文彬, 杨任民. 肝豆片 1 号治疗肝豆状核变性临床疗效观察[J]. 中国中西医结合杂志, 1998, 18(1): 12-14

[3] 杨任民. 肝豆状核变性[M]. 合肥: 安徽科技出版社, 1995. 167-168

[4] 庞志功. 大黄素大黄酚在兔体内药代动力学研究[J]. 西安医科大学学报, 1993, 14(4): 346-349

[5] 汤其强, 杨任民, 韩咏竹, 等. 肝豆汤对肝豆状核变性皮肤成纤维模型铜代谢的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2000, 20(1): 37-39

[6] 王小军, 罗向东, 丁健, 等. 人肝细胞、窦状间隙内皮细胞的分离和培养[J]. 第三军医大学学报, 1996, 18(5): 379-380

[7] 陈秀珍. 体细胞培养技术[M]. 上海: 上海医科大学出版社, 1989. 56-57

[8] 杨任民, 韩咏竹, 任明山, 等. 中药治疗肝豆状核变性 107 例疗效观察[J]. 中医杂志, 1993, 34(10): 676

[9] Chan WY, Cushing W, Coffman, et al. Genetic expression of wilson disease in cell culture: a diagnostic marker[J]. Science, 1980, 208(4): 299-300

(收稿日期 2000-10-11) (编辑 蒋朝利)

(上接第 48 页)

峰日为 8 月 31 日, 高峰期为 6 月 2 日~11 月 27 日, 而且发病季节性规律与年龄没有关系, 与华北地区发病基本类似, 但本研究更具体。我国 GB 发病集中在夏秋季, 可能与夏秋季节较高的胃肠道感染率有关。空肠弯曲菌作为人类急性胃肠炎的常见致病菌之一, 业已发现其与 GB 发病有重要的关系。Ho Tw 等^[2] 在华北地区研究发现, 38 例 GB 患者中 66% 病前有空肠弯曲菌感染史。许庆成等^[7] 对南京及周围地区 40 例 GB 患者研究发现, 50% 近期有空肠弯曲菌感染。在陕西地区, GB 患者中空肠弯曲菌感染率如何无疑也是一个值得探讨的问题。

在陕西地区, 通过应用圆形分布法研究发现 GB 发病具有明显的季节性规律, 可以促进我们对其病因进行进一步探讨^[8], 同时也可以有意识的在夏秋季节进行预防。

参考文献:

[1] England JD. Guillain-Barré syndrome[J]. Annu Rev Med, 1990, 41:

1-6

[2] Ho TW, Mishu B, Li CY, et al. Guillain-Barré syndrome in northern China: relationship to *Compylobacter jejuni* infection and anti-glycol-*ipid* antibodies[J]. Brain, 1995, 118: 597-605

[3] Ho TW, Li CY, Cornblath DR, et al. Patterns of recovery in the Guillain-Barré syndromes[J]. Neurology, 1997, 48: 695-700

[4] Asbury AK, Cornblath DR. Assessment of current diagnostic criteria for Guillain-Barré syndrome[J]. Ann Neurol, 1990, 27(s): s21-24

[5] 王文初. 应用圆形分布探讨流行性脑脊髓膜炎发病季节性[J]. 中华流行病学杂志, 1994, 15(4): 286-287

[6] 郭祖超. 医用数理统计方法[M]. 第 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 1988. 122-138

[7] 许庆成, 侯熙德, 金庆文, 等. 空肠弯曲菌感染与 Guillain-Barré 综合征[J]. 中华神经科杂志, 1998, 31(1): 72-73

[8] Jiang W, Wang HB, Huang YG, et al. Guillain-Barré syndrome in northwestern China[J]. Modern Rehabilitation, 2001, 5(1): 156-157

(收稿日期 2001-02-18) (编辑 申卫平)