

• 论 著 •

Wilson 病患者血清氧化物和抗氧化物水平与内脏损伤的关系

张尊胜 杨任民

【摘要】 目的 探讨 Wilson 病(WD)患者血清氧化物和抗氧化物水平与内脏损伤的关系。方法 应用化学比色法和反相高效液相色谱法(RP-HPLC)测定 29 例 WD 患者和 21 名正常人血清丙二醛(MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)、谷胱甘肽(GSH)和维生素 E(VitE)的水平。结果 WD 组与对照组相比 MDA 显著增高($P<0.01$),GSH-PX 显著下降($P<0.01$),且两者呈负相关;血清 VitE 和 GSH 在肝型 WD 患者显著减少(分别 $P<0.01$ 和 $P<0.05$),非肝型患者与对照组比,差别无显著性($P>0.05$)。结论 WD 患者血清中存在着自由基系统的代谢紊乱,氧化物水平升高,抗氧化物水平下降,这可能是该病患者内脏损伤的重要原因之一。

【关键词】 Wilson 病 自由基 发病机理

The relationship between the levels of serum oxide and antioxidant in patients with Wilson disease and its visceral injury Zhang Zunsheng, Yang Renmin. Institute of Neurology, Anhui Traditional Chinese Medical College, Hefei 230031

【Abstract】 Objective To study the relationship between the levels of serum oxide and antioxidant in patients with Wilson disease (WD) and its visceral injury. **Methods** We determined the serum levels of MDA, GSH-PX, GSH and VitE in 29 patients with WD and 21 normal controls by the method of reversephase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) and the chemo-colorimetric method. **Results** The serum levels of MDA in all patients with WD were significantly higher than those of controls ($P<0.01$), while the serum levels of GSH-PX in all patients with WD were significantly lower than those of controls ($P<0.01$); the relationship between MDA and GSH-PX was negative correlation. As compared with the controls the serum levels of GSH and VitE were significantly lower in the hepatic type patients with WD ($P<0.01$, $P<0.05$), however there was no significant difference between the non-hepatic type patients and the controls ($P>0.05$). **Conclusion** There was metabolism disorder of free radicals (FRs) in the serum of patients with WD. As compared with normal controls the serum levels of oxides increased and the levels of antioxidants decreased in patients with WD, it might be one of important factors for the patients with visceral injury.

【Key words】 Wilson disease Free radicals Pathogenesis

Wilson 病(WD)是以铜代谢障碍为特征的常染色体隐性遗传性疾病。目前分子生物学研究已经确定 WD 基因位于 13q14.3, 编码一种 P 型铜转运 ATP 酶, 取名 ATP7B 基因, 它通过保持金属离子正常的氧化-还原状态, 在铜与铜蓝蛋白的结合及铜的分泌方面可起到直接作用, 该基因的突变使 P

型 ATP 酶丧失功能而致病^[1]。为此, 我们检测了 29 例未经治疗的 WD 患者血清中氧化物及抗氧化物的浓度, 并和正常人作对照, 以对 WD 患者内脏

作者单位: 230031 安徽中医学院神经病学研究所[张尊胜(研究生 现在徐州医学院附属医院神经内科)]
本课题为国家自然科学基金资助项目, 课题号: 39570807

损伤机理进行初步探讨。

1 对象与方法

1.1 对象 病例组 WD 患者 29 例,男 22 例,女 7 例,发病年龄 7~34 岁,平均 16.7 ± 6.98 岁。均来自安徽中医学院神经病学研究所 1998 年 6 月 29 日至 1998 年 11 月 18 日期间住院经临床及铜代谢检查确诊未经治疗的 WD 病人。本组 29 例病情分级,参照改良的 Goldstein 临床分级^[2]分为:1 级 5 例,2 级 10 例,3~4 级 14 例。按杨任民等^[3]的分型法,又分成肝型 11 例,非肝型 18 例。正常对照组 21 名健康志愿者,均为本院大学生和本所工作人员。男 17 名,女 4 名,年龄 16~21 岁,平均 18.5 ± 3.5 岁。

1.2 方法

1.2.1 标本收集 病例组与对照组均于早晨空腹取静脉血 5 ml,立即离心,血清充氮气后密封放入超低温冰箱中保存以备测。

1.2.2 标本测定 用化学比色法测定 MDA、GSH-PX、GSH,试剂盒由南京建成生物工程研究所提供。上述指标 MDA、GSH-PX、GSH 采用化学比色法,按南京建成生物工程研究所试剂盒说明步骤进行测试。采用反相高效液相色谱法(RP-HPLC)测定 Vit E 的浓度,其标准液的配制、标本的预处理、色谱分析的条件参考王光亚和郑素芳^[4,5]的方法。测

定结果由 Gold System 数据处理站自动分析计算。

1.2.3 统计学处理 各组数据均以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用成组资料、配对资料的 *t* 检验方法及直线相关分析。

2 结 果

从表 1 所见,非肝型组与对照组相比 MDA 增加了 55.3%,GSH-PX 降低了 23.46%,均有极显著性差异($P < 0.01$); VitE、GSH 与对照组比无显著性差异($P > 0.05$),但 VitE、GSH 有明显下降趋势。

肝型组与对照组相比 MDA 增加达 114%,GSH-PX 下降 52%,Vit E 下降 50%,差异均非常显著($P < 0.01$);GSH 下降了 32.7%,差异显著($P < 0.05$)。

肝型与非肝型比较,MDA 增高了 27.4%,差异非常显著($P < 0.01$);GSH-PX、GSH 分别下降了 37.4%、23.5%,差异显著($P < 0.05$);VitE 下降了 44%,差异极显著($P < 0.01$)。

3 组间 MDA 的升高与 GSH-PX 下降成负相关($r = 0.7, P < 0.05$)。提示未治疗的 WD 患者血清中过氧化物增高,抗氧化物中 GSH-PX 酶活性受到抑制,VitE、GSH 水平降低,且肝型病人比非肝型病人变化更显著。

表 1 3 组血清 MDA、GSH-PX、VitE、GSH 的比较($\bar{x} \pm s$)

组 别	例 数	MDA(nmol/ml)	GSH-PX(NU/0.1ml)	Vit E(μ g/ml)	GSH (mg/L)
肝型组	11	$11.3 \pm 2.75^{**\Delta\Delta}$	$56.5 \pm 33.4^{**\Delta}$	$3.1 \pm 1.65^{**\Delta\Delta}$	$142.5 \pm 52.1^{*\Delta}$
非肝型组	18	$8.2 \pm 2.82^{**}$	$90.3 \pm 34.1^{**}$	5.53 ± 1.82	186.3 ± 56.3
对照组	21	5.28 ± 3.19	117.98 ± 32.17	6.19 ± 1.71	211.78 ± 73.6

与对照组相比 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与非肝型组相比 $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

3 讨 论

为了研究 WD 患者血清中氧化物和抗氧化物水平,我们选择 MDA 来衡量氧化物水平,GSH-PX、GSH 及 VitE 来衡量抗氧化物水平。MDA 是过氧化脂质(LPO)的降解产物,它的血清水平可以衡量 LPO 的量,而 LPO 是自由基(FRs)与脂质作用的产物,故 MDA 也间接反映了 FRs 的水平;GSH-PX 是体内广泛存在的能特异地催化 GSH 对过氧化氢(H₂O₂)的还原反应,从而起到保护细胞结构和功能完整的作用;GSH 是一种低分子 FRs 清除剂,它也参与使 VitE 恢复到还原状态的作用;VitE 是

一天然脂溶性抗氧化剂,它的重要性在于善于捕捉生物膜内产生的活性氧,FRs 的升高能消耗体内大量的 VitE,使之降低。从我们的研究结果可以看出,未经治疗的 29 例 WD 患者,无论是肝型组还是非肝型组,与对照组相比,血清 MDA 水平显著增高,GSH-PX 酶活力显著下降,两者呈负相关;肝型组与对照组相比较,血清 VitE 和 GSH 水平显著下降;非肝型组与对照组比血清 VitE 及 GSH 水平下降,虽无统计学意义,但呈明显下降趋势。上述结果表明,WD 病患者血清氧化物水平明显升高,抗氧化物水平明显下降。11 例肝型患者和 18 例非肝型患者相比,血清 MDA 浓度增加非常显著,GSH-PX、Vit E

和 GSH 浓度显著下降,提示:肝型组病人和非肝型组相比血清氧化物水平更高,抗氧化物水平更低;FRs 水平愈高,脏器(尤其肝脏)损害愈重。Sokol^[6]和 Britton 等^[7]研究发现 WD 患者肝脏中线粒体存在脂质过氧化证据,线粒体内 LPO 和铜含量显著增加,且铜与 LPO 浓度呈显著相关,部分 WD 患者肝及血浆中 VitE 水平降低。本组 29 例 WD 患者血清中,氧化物水平增高,抗氧化物水平下降,表明 WD 患者无论是肝脏还是血清中均有氧化物水平增高,抗氧化物水平降低的改变。WD 的病因目前已明确是一种编码铜转移 ATP 酶的核基因多种形式突变使胆汁内排铜下降,引起铜在肝脏内沉积,造成肝脏损害,当铜蓄积在肝内饱和后,大量向血中释放,从而引起脑、角膜、肾等全身脏器铜沉积,造成肾脏、脑等脏器受损,其机理可能有两方面因素:一方面体内过量的铜与各脏器的细胞、巯基分子、羧基或胺基结合,产生分子水平的结构和功能障碍^[8];另一方面,可能是因为铜是强有力的氧化剂,血中游离铜增高,产生大量的 FRs,内源性的抗氧化作用减弱,进一步加重了铜对细胞的损害。我们的研究也提示:11 例肝型组病人,血中 FRs 水平较非肝型组病人升高,也就是说肝脏损害愈重,FRs 水平愈高,或 FRs 水平愈高,肝脏损害越重,表明 FRs 水平与肝脏损害有密切相关性。FRs 攻击组织细胞的主要靶位是生物膜的不饱和脂肪酸,发生脂质过氧化反应,破坏细胞膜的完整性,改变酶的空间结构,损伤线粒体膜上

的呼吸链,最终造成细胞结构的改变,导致组织死亡,使脏器受损。

总之,本研究结果提示:WD 患者与正常对照组比,血清中氧化物水平增高,抗氧化物水平下降,且氧化物水平与脏器受损有相关性。这可能是脏器损伤的重要原因之一。因此对 WD 患者除积极排铜治疗外,有必要同时行抗氧化物治疗。

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. *Nat Genet*, 1993, 5: 327
- 2 任明山, 杨任民. DMSA 治疗肝豆状核变性的临床及胆汁微量元素变化研究. *中国神经精神疾病杂志*, 1990, 16: 32
- 3 杨任民. 肝豆状核变性. 第 1 版. 合肥: 安徽科学技术出版社, 1995. 183~188
- 4 王光亚, 叶晓敏, 陈群石. 高效液相色谱法测定人血浆中视黄醇和 α -生育酚. *营养学报*, 1988, 10: 272
- 5 郑素芳, 李辉, 孙玉海. 高效液相色谱法同时测定人血浆中视黄醇和 α -生育酚. *营养学报*, 1985, 7: 61
- 6 Sokol RJ, Twedt D, Mckim JM, et al. Oxidant injury to hepatic mitochondria in patients with Wilson's disease and Bedlington terriers with copper toxicosis. *Gastroenterology*, 1994, 107: 1788
- 7 Britton RS. Metal-induced hepatotoxicity. *Semin Liver Dis*, 1996, 16: 3
- 8 杨任民. 肝豆状核变性. 第 1 版. 合肥: 安徽科学技术出版社, 1995. 22~23

(收稿 2000-01-31 修回 2000-07-24)