

凯西莱联合青霉胺治疗肝豆状核变性模型鼠的研究

徐磊, 蔡永亮, 徐志树, 陈怀珍, 王艳昕, 徐国存

【摘要】 目的 探讨凯西莱(MPO)联合青霉胺(PCA)对肝豆状核变性(HLD)模型鼠铜代谢及肝功能的影响。方法 采用铜负荷饮食法喂养大鼠制作 HLD 模型,并分为 HLD 对照组、MPO 组、PCA 组及 MPO + PCA 组,予以相应的药物干预。观察各组大鼠肝铜、24 h 尿铜及谷氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)水平变化情况。结果 HLD 对照组、各药物干预组肝铜、24 h 尿铜水平较正常对照组显著增高(均 $P < 0.01$);MPO + PCA 组、PCA 组肝铜水平较 HLD 对照组、MPO 组显著降低(均 $P < 0.01$),24 h 尿铜各药物干预组较 HLD 对照组显著增高($P < 0.05 \sim 0.01$)。ALB 水平各药物干预组较 HLD 对照组显著增高($P < 0.05 \sim 0.01$),各药物干预组间差异无统计学意义。MPO + PCA 组 ALT、AST 水平较 HLD 对照组、PCA 组、MPO 组显著降低(均 $P < 0.05$),与正常对照组相比差异无统计学意义。结论 MPO 联合 PCA 能显著降低 HLD 模型鼠肝铜水平,促进尿铜排泄,升高血清 ALB 水平,保护肝功能,效果优于 PCA 或 MPO 单用。

【关键词】 肝豆状核变性; 凯西莱; 青霉胺; 铜负荷饮食

【中图分类号】 R742.4 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1004-1648(2007)06-0450-03

Study of Tiopronin combine Penicillamine to treated in rat model with hepatolenticular degeneration

XU Lei, CAI Yong-liang, XU Zhi-shu, et al. Department of Neurology, the First Hospital Affiliated to Anhui Traditional Chinese Medical College, Heifei 230031, China

Abstract: Objective To study the effects of Tiopronin (MPO) combine Penicillamine (PCA) on the copper metabolism and function of liver in rats model with hepatolenticular degeneration. **Methods** To copy hepatolenticular degeneration model rats with copper overloaded diet. Divide the models into groups HLD control, MPO, PCA and MPO + PCA, and interfere with the propotional drugs. To investigate the concentration changes of the lalanine aminotransferase (ALT), spartate amino transferase (AST), total protein (TP), albumin (ALB), liver copper and 24 h urine copper in each group. **Results** The concentrations of liver copper and 24 h urine copper in HLD control group and each group with drugs intervention were significantly higher than those in normal control group (all $P < 0.01$), the concentrations of liver copper in groups MPO + PCA and PCA were significantly lower than those in groups HLD control and MPO (all $P < 0.01$), the concentrations of the 24 h urine copper in each group with drugs intervention were significantly higher than that in HLD control group ($P < 0.05 \sim 0.01$). The concentrations of ALB in each group with drug intervention were significantly higher than that in HLD control group ($P < 0.05 \sim 0.01$), but no significant change among them. The concentrations of ALT、AST in MPO + PCA group were significantly lower than those in groups HLD control, PCA and MPO (all $P < 0.05$), and no significantly diffenrent compared with normal control group. **Conclusions** The effects of MPO combine PCA can reduce the concentrations of liver copper in HLD rats, and promote the excretion of the 24 h urine copper, increases serum ALB level, protect the function of liver, it is better than use the MPO or PCA individually.

Key words: hepatolenticular degeneration; Tiopronin; Penicillamine; copper overloaded diet

凯西莱又名硫普罗宁(MPO),是一种新型的含巯基甘氨酸类药物,其化学名为 N-(2-巯基丙酰基)甘氨酸,除具有改善肝功能的作用外,还具有络合重金属的作用。为此,本实验利用 MPO 联合青霉胺(PCA)治疗肝豆状核变性(HLD)模型鼠,观察其对

HLD 大鼠的铜代谢和肝功能的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物及分组 纯系健康雄性 Wistar 大鼠 60 只,质量 220 ~ 280 g,购于安徽医学科学研究所实验动物中心。实验前先适应性饲养 1 周,随机分为正常

作者单位: 230031 合肥,安徽中医学院第一附属医院神经内科
通讯作者: 蔡永亮

对照组(10 只)及 HLD 组(50 只),HLD 组再随机分为 HLD 对照组、MPO 组、PCA 组和 MPO + PCA 组。

1.1.2 主要试剂与仪器 MPO(新谊药业股份有限公司);PCA、谷氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所);WFX-1A 型原子吸收分光光度计(北京);721 型分光光度计(上海第三分析仪器厂)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型制作及药物干预 将 HLD 组大鼠喂饲铜负荷饮食(含硫酸铜 1 g/kg 的粉状饲料和 0.185% 硫酸铜的去离子水)8 周;第 5 周开始,将存活的 42 只模型大鼠随机分为 4 组,HLD 对照组:12 只;PCA 组:10 只,予以 PCA 100 mg/kg 每日 1 次灌胃;MPO 组:10 只,予以 MPO 100 mg/kg 每日 1 次灌胃;MPO + PCA 组:10 只,予以 MPO 100 mg/kg + PCA 100 mg/kg 每日 1 次灌胃;均为 4 周。正常对照组喂饲普通饲料 8 周。

1.2.2 标本采集及检测 铜负荷饮食 8 周结束后禁食 18 h 并麻醉动物,从眼内眦取血 2 ml 置于抗凝管,全自动生化仪检测血 ALT、AST、TP、ALB,测定按试剂盒说明书操作。剖腹取肝组织,标本先用 0.9% NaCl 反复洗净,干净滤纸吸干并秤取湿重 500 mg,用浓硝酸(分析纯)10 ml 低温加热进行消化,等组织完全溶解至黄色澄清透明后,采用原子吸收分光光度计测量、火焰法测定 Cu⁺³含量。24 h 尿 Cu⁺³测定:处死前 5 d 单只置于代谢笼连续留取 3 d(72 h 尿液),摇匀后准确量出尿液体积,测定时取 2 ml 尿液加 0.1 ml H₂SO₄ 混匀待测,采用原子吸收分光光度计测量、火焰法测定。

1.2.3 统计学方法 计量数据均以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 13.0 软件包,两样本均数比较采用 *t* 检验;多样本均数比较采用单因素 *F* 分析。

2 结果

实验结束时,HLD 对照组大鼠存活 7 只,各药物干预组各存活 8 只。

2.1 各组大鼠肝铜、24 h 尿铜水平的比较 见表 1。

(1)肝铜水平:HLD 对照组、各药物干预组较正常对照组显著增高(均 $P < 0.01$),各药物干预组较 HLD 对照组有不同程度的降低,差异有统计学意义($P < 0.05 \sim 0.01$),MPO 组显著高于 PCA 组及 MPO + PCA 组(均 $P < 0.01$),MPO + PCA 组较 PCA 组显著降低($P < 0.05$);(2)24 h 尿铜水平:HLD 对照组、各药物干预组较正常对照组显著增高($P < 0.05 \sim 0.01$),各药物干预组较 HLD 对照组显著增高($P < 0.05 \sim 0.01$),MPO 组显著低于 PCA 组($P < 0.05$),MPO + PCA 组与 PCA 组间差异无统计学意义。

表 1 各组大鼠肝铜、24 h 尿铜的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	肝铜(μg/g)	24h 尿铜(μg/24 h)
PCA 组 (n=8)	33.73 ± 9.97 ^{△***}	7268.77 ± 1242.82 ^{△**}
MPO 组 (n=8)	65.26 ± 8.37 ^{△**}	5643.95 ± 1517.17 ^{△**}
MPO + PCA 组 (n=8)	24.56 ± 6.28 ^{△****}	6183.67 ± 1161.67 ^{△**}
正常对照组 (n=10)	5.80 ± 0.29	2012.95 ± 860.11
HLD 对照组 (n=7)	77.63 ± 10.03 [△]	3604.54 ± 1696.91 [△]

注:与正常对照组比较[△] $P < 0.05$,[△] $P < 0.01$;与 HLD 对照组比较* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与 PCA 组比较* $P < 0.05$,* $P < 0.01$;与 MPO 组比较* $P < 0.01$

2.2 各组大鼠肝功能的比较 见表 2。(1)TP 水平:各组间差异无统计学意义;(2)ALB 水平:HLD 对照组较正常对照组显著降低($P < 0.05$),各药物干预组较 HLD 对照组显著增高($P < 0.05 \sim 0.01$),且 3 个药物干预组间差异无统计学意义;(3)ALT 水平:HLD 对照组、PCA 组、MPO 组均较正常对照组显著增高($P < 0.05 \sim 0.01$),PCA 组和 MPO + PCA 组较 HLD 对照组显著降低($P < 0.05 \sim 0.01$),MPO + PCA 组较 PCA 组、MPO 组显著降低(均 $P < 0.05$),与正常对照组相比差异无统计学意义;(4)AST 水平:HLD 对照组和 MPO 组较正常对照组显著增高(均 $P < 0.01$),各药物干预组较 HLD 对照组显著降低($P < 0.05 \sim 0.01$),且 MPO + PCA 组较 MPO 组降低更为显著($P < 0.01$),与正常对照组及 PCA 组相比差异无统计学意义。

表 2 各组大鼠肝功能指标的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TP(g/L)	ALB(g/L)	ALT(IU/L)	AST(IU/L)
PCA 组	8	92.80 ± 2.15	59.20 ± 12.86 ^{**}	25.24 ± 6.80 ^{△*}	32.65 ± 5.83 ^{**}
MPO 组	8	94.73 ± 1.90	53.23 ± 20.16 [*]	27.82 ± 10.94 [△]	41.19 ± 12.21 ^{△**}
MPO + PCA 组	8	92.60 ± 1.42	59.70 ± 23.01 ^{**}	17.78 ± 6.61 ^{****}	24.08 ± 7.90 ^{****}
正常对照组	10	94.86 ± 2.61	49.54 ± 17.71	17.14 ± 5.42	27.57 ± 6.19
HLD 对照组	7	93.44 ± 2.02	31.91 ± 12.40 [△]	32.45 ± 8.51 [△]	55.81 ± 13.52 [△]

注:与正常对照组比较[△] $P < 0.05$,[△] $P < 0.01$;与 HLD 对照组比较* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与 PCA 组比较* $P < 0.05$;与 MPO 组比较* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

3 讨论

HLD 是一种常染色体隐性遗传性铜代谢障碍疾病,由于转运铜的 WD 基因发生突变,其编码产物 P 型 ATP 酶(ATP7B)部分或全部丧失,导致铜过量沉积于脑、肝、肾等脏器^[1,2]。蓄积在组织中的铜作为氧化物前体促进氧自由基和有害的脂质蛋白氧化物形成引起细胞损伤^[3]。目前还没有一种动物模型可以完全复制 HLD 的全部临床特征,但可以确定的是铜负荷饮食可在大鼠肝、肾组织产生类似于 HLD 的铜沉积^[4,5]。本实验中 HLD 对照组肝铜、24 h 尿铜水平显著高于正常对照组,证明 HLD 模型具有类似于 HLD 的铜沉积。

肝铜及 24 h 尿铜水平是观察 HLD 疗效的客观指标^[6]。在本实验中,各药物干预组肝铜水平较 HLD 对照组显著降低,24 h 尿铜水平显著升高,说明各药物干预组均有减少肝铜沉积、促进尿铜排泄的作用。在 3 个药物干预组间,肝铜水平 MPO + PCA 组显著低于 PCA 组及 MPO 组,PCA 组显著低于 MPO 组;24 h 尿铜水平 MPO + PCA 组与 PCA 组间差异无统计学意义,但均显著高于 MPO 组。表明 MPO 的巯基(-SH)具有一定的络合重金属作用^[7,8],能够作为重金属中毒的解毒剂,促进铜、汞、铅等重金属从胆汁、尿、粪便排除,降低肝、肾蓄积量,保护肝功能和多种物质酶代谢;但是 MPO 络合作用仍较 PCA 弱,当 MPO 联合 PCA 时排铜效果优于单用 PCA 或 MPO。

HLD 患者由于蓄积于肝脏的铜产生大量的氧自由基,刺激过氧化产物形成,造成不同程度的靶细胞损害^[3,9]。陈长寅等^[10]的研究发现,MPO 携带的游离巯基具有还原性,能化解体内过多氧自由基对细胞膜及细胞器膜的氧化破坏,同时能激活超氧化物歧化酶(SOD)的活性,加速氧自由基的清除。本实验发现 HLD 对照组 ALT、AST 水平较正常对照组显著升高,而各药物干预组 ALT、AST 水平较 HLD 对照组有不同程度的改善,证明了 MPO 能够对抗铜沉积造成的肝细胞氧化损害、改善肝功能;PCA 能够络合肝铜而促进肝铜排泄,以减轻肝损害。由于 MPO 排铜能力较 PCA 弱,故 MPO 组肝功能改善程度较 PCA 组差,未能明显减少沉积铜对肝脏损害达到理想保肝效果。MPO + PCA 组具有 MPO 抗氧化、改善肝功能和 PCA

排铜的双重作用,ALT、AST 水平与正常对照组相比差异无统计学意义,达到理想的保肝效果。本实验中各组 TP 水平差异无统计学意义。各药物干预组 ALB 水平显著高于 HLD 对照组,与正常对照组差异无统计学意义。这是因为 MPO 具有促进肝细胞再生,促进蛋白合成,提高血清 ALB 水平的作用^[10];PCA 通过对肝功能的保护而使 ALB 水平保持在正常水平。

综上所述,MPO 联合 PCA 治疗 HLD 时排铜作用和改善肝功能效果最佳,优于 PCA 或 MPO 单用。此外,MPO 还具有对抗 HLD 及 PCA 造成白细胞减少的不良反应^[11]。因此,本研究结果为临床应用 MPO 联合 PCA 治疗 HLD 提供了实验依据。

[参考文献]

- [1] 吕达平,韩咏竹,王训,等.肝豆状核变性患者肝细胞中 P 型 ATP7B 酶水平及功能的研究[J].临床神经病学杂志,2005,18:173.
- [2] Das SK, Ray K. Wilson's disease: an update[J]. Nat Clin Pract Neurol, 2006, 2:482.
- [3] Nagasaka H, Inoue I, Inui A, et al. Relationship between oxidative stress and antioxidant systems in the liver of patients with Wilson's disease: hepatic manifestation in Wilson's disease as a consequence of augmented oxidative stress[J]. Pediatr Res, 2006, 60:472.
- [4] Gitlin N. Wilson's disease: the scourge of copper [J]. Hepatol, 1998, 28:734.
- [5] 王训,杨任民.二巯丁二钠对大鼠铜负荷模型铜代谢的影响[J].中国新药杂志,1999,8:458.
- [6] 陈红英,林广云,郑文晖.肝豆状核变性病人 24 小时尿铜含量的测定[J].广东微量元素科学,2000,7:32.
- [7] 段志,周锦英,陈惠琴,等.凯西莱治疗铅吸收疗效观察[J].现代医药卫生,2002,18:1002.
- [8] 刘月花.凯西莱的药理及临床应用[J].国际医药卫生导报,2005,11:77.
- [9] Dominik H, Purnat TD, Jason L, et al. High copper selectively alters lipid metabolism and cell cycle machinery in the mouse model of Wilson's disease[J]. J Biol Chem, 2007, 282:8343.
- [10] 陈长寅,覃宗坦,邱绍勤,等.硫普罗宁活化慢性乙型肝炎超氧化物歧化酶的初步研究[J].中华实验和临床病毒学杂志,2000,14:355.
- [11] 孙杰,季杰,董萍,等.凯西莱防治恶性肿瘤化疗时粒细胞减少的疗效评价[J].淮海医药,2004,22:243.

(收稿日期 2007-02-13 修回日期 2007-05-18)