

实验研究·

肝豆汤对肝豆状核变性皮肤成纤维细胞
模型铜代谢的影响*汤其强¹ 杨任民² 韩咏竹² 任明山² 洪铭范²王小平² 蔡永亮² 胡纪原² 李俊³ 丁莉丽⁴

内容提要 目的:在细胞水平探讨中药复方肝豆汤治疗肝豆状核变性的机理。方法:通过建立 23 例肝豆状核变性皮肤成纤维细胞模型,观察加入含肝豆汤兔血清前后细胞内 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 等微量元素含量的变化。结果:加入含肝豆汤兔血清前与加入 24h 后相比较,细胞内铜含量从 $(80.94 \pm 34.76) \text{ ng/mg}$, 减少到 $(46.90 \pm 22.14) \text{ ng/mg}$ ($P < 0.01$), 细胞内锌含量从 $(140.43 \pm 33.81) \text{ ng/mg}$, 增加到 $(151.43 \pm 37.83) \text{ ng/mg}$ ($P < 0.01$)。结论:肝豆汤具有显著的细胞内排铜作用和使细胞内锌含量增加的作用。

关键词 肝豆状核变性 肝豆汤 肝豆状核变性皮肤成纤维细胞模型 含肝豆汤兔血清 细胞内铜锌含量

Effect of Gandou Decoction on Copper Metabolism of Skin Fibroblast of Hepatolenticular Degeneration Model
TANG Qiqiang, YANG Renmin, HAN Yongzhu, et al Department of Neurology, Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Anhui (233004)

Objective: To explore the cytological mechanism of Gandou Decoction (GDD) in treating hepatolenticular degeneration (HLD). **Methods:** Twenty-three in vitro models of cultured skin fibroblast of HLD were established to observe the intracellular change of microelements (Cu^{2+} , Zn^{2+} , etc.) content before and after adding rabbit's serum containing GDD. **Results:** After being treated with GDD contained serum for 24 hours, the intracellular content of Cu^{2+} decreased from $(80.94 \pm 34.76) \text{ ng/mg}$ to $(46.90 \pm 22.14) \text{ ng/mg}$, $P < 0.01$, while that of Zn^{2+} increased from $(140.43 \pm 33.81) \text{ ng/mg}$ to $(151.43 \pm 37.83) \text{ ng/mg}$, $P < 0.01$. **Conclusion:** GDD is quite effective in removing the intracellular copper and increasing the intracellular zinc.

Key words hepatolenticular degeneration, Gandou decoction, model of cultured skin fibroblasts of hepatolenticular degeneration, rabbit serum containing Gandou decoction, intracellular contents of copper and zinc

肝豆状核变性(HLD)又称 Wilson 病,是一种常染色体隐性遗传性铜代谢障碍疾病。本病由于铜离子缓慢地在肝、脑、肾等全身各器官广泛沉积,出现锥体外系及肝症状等复杂多样的临床表现。因此 HLD 患者须终身使用驱铜药物以纠正体内 Cu^{2+} 离子的正平衡。目前国内外使用的青霉胺等驱铜药物虽可获得一定疗效,但有较多的近期或远期毒副作用,使部分患者被迫放弃长期维持治疗。杨任民等于 70 年代首创中药复方肝豆汤治疗 HLD,初步获得了较好的排铜效果,且在 20 余年的临床应用中不断合理调整组方,取得了较为满意的临床疗效^[1,2]。本研究通过以 HLD 患者皮肤

制备的 HLD 皮肤成纤维细胞模型(以下简称细胞模型)中加入含肝豆汤兔血清(以下简称含药血清),观察加入含药血清前后细胞模型中铜、锌等微量元素含量的变化,以探讨肝豆汤在细胞水平的排铜效果,进一步阐明肝豆汤的排铜机理。

材料与方法

1 材料 随机选取临床表现及铜代谢检查全部符合诊断标准^[3]的 23 例 HLD 住院患者。其中男 18 例,女 5 例;年龄 8~40 岁,平均 (22.43 ± 9.19) 岁。随机选取雄性成年新西兰白兔 10 只,体重 $(3.0 \pm 0.1) \text{ kg}$ 。实验动物由安徽医科大学实验动物中心提供。

2 方法

2.1 含药血清制备 按肝豆汤组方(大黄 8g 黄连 10g 黄芩 10g 半枝莲 15g 泽泻 15g 鱼腥草 15g)分别准确称取大黄等 6 味中药煎煮,制备成不含

* 国家自然科学基金资助项目(No. 39570878)

1. 蚌埠医学院附属医院神经内科(安徽 233004); 2. 安徽中医学院神经病学研究所; 3. 安徽医科大学临床药理研究所; 4. 中国科技大学生物系

大黄或仅含大黄或含大黄的肝豆汤分别用真空冷冻干燥系统浓缩至各约 150ml。以肝豆汤中的君药大黄的有效成分之一大黄酚为代表成分判断肝豆汤血药浓度⁽⁴⁾。随机选取 5 只新西兰白兔, 每只兔先灌服不含大黄的肝豆汤浓缩液 30ml, 24h 后再灌服等量仅含大黄的肝豆汤浓缩液, 24h 后再灌服等量含大黄的肝豆汤浓缩液。每隔 30min 采血 2ml 以 HPLC(Beckman 公司)检测⁽⁵⁾。求取兔一次灌服肝豆汤后血药浓度及达峰时间。次日开始逐日每只灌服肝豆汤浓缩液 30ml, 每日首次灌药后于达峰时间采血 2ml 检测。达稳态浓度后于第 10 日在首次灌药后达峰时间采血制备含药血清⁽⁶⁾。随机选取 5 只新西兰白兔, 实验前禁食 1 天, 按上法制备空白血清。

2.2 肝豆汤细胞药理学实验 从 HLD 患者取皮肤进行离体皮肤成纤维培养制备 HLD 细胞模型。细胞培养参照陈秀珍等方法⁽⁷⁾。待细胞总数达 $10^5 \sim 10^6$ 个, 可检测出细胞内 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 含量, 此即构成 1 个细胞模型。通过连续传代培养, 可同时建立多个相同的细胞模型。采用改良 Lowy 法⁽⁷⁾计算细胞模型总蛋白含量及 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 含量。以细胞模型 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。从 23 例细胞模型中随机选取 5 例, 每例含 6 个相同的细胞模型。分别加入含药血清及空白血清各 0.04、0.4、4.0ml(分别含大黄酚 0.04、0.4、4.0 μg), 重新培养 24h 后检测 Cu^{2+} 含量, 根据结果确定最适加药剂量。仍取上述 5 例细胞模型, 每例含 14 个相同细胞模型。每 7 个相同细胞模型为 1 组。分别加入等量含药血清及空白血清(加入量取上述最适加药剂量)。重新培养 4、8、16、24、32、40、48h 测定 Cu^{2+} 含量, 根据结果确定加入含药血清后最佳收集细胞时间。肝豆汤对 23 例细胞模型的疗效: 每例 3 个相同细胞模型, 将 23 例细胞模型平行分为 3 组, 每组含 23 个细胞模型, 一组未加血清, 另两组分别加入等量含药血清及空白血清, 重新培养后测定其 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 含量。

结 果

1 含药血清血药浓度 兔一次灌服肝豆汤血药浓度检测结果显示, 大黄酚的吸收峰与其他成分吸收峰分离良好, 表明肝豆汤中非大黄的其他成分, 空白血清中的成分及大黄中非大黄酚的成分对大黄酚的检测均无干扰。将血药浓度测定值与对应时间数据按中国药学会数学药理专业委员会的实用药代动力学计算程序 3P87 进行处理, 得到如下药代动力学参数: 半衰期

$T_{1/2}(\text{ke}) = 6.3596\text{h}$, 达峰时间 $T(\text{peak}) = 2.7816\text{h}$, 最大血药浓度 $C_{\text{max}} = 0.9489\mu\text{g}/\text{ml}$ 。次日开始逐日灌服肝豆汤浓缩液, 理论上达稳态血药浓度时间为 $5T_{1/2}(\text{ke}) \approx 32.8\text{h}$ 。根据药代动力学参数进行推算稳态血药浓度 $\bar{C} = \text{FX}/\text{vkt} \approx 1.01\mu\text{g}/\text{ml}$ 。5 只兔血药浓度测定均值第 1~9 天分别为 1.0213、1.0065、1.0702、1.0800、1.1005、1.1026、1.0907、1.1036、1.1042 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。测定值与理论值接近。为尽量使肝豆汤中其他有效成分达稳态血药浓度, 故延长灌药时间到 10 天。第 10 日首次灌药后 2.7h 取血制备含药血清, 血药浓度测定值分别为 1.1073、1.0802、1.0604、1.0538、1.1023 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。对含药血清和空白血清的 Cu^{2+} 含量进行测定表明二者无显著性差异。

2 肝豆汤细胞药理学实验 23 例细胞模型随机选取 5 例, 以 ΔCu^{2+} 比值(加空白血清 Cu^{2+} 比值 - 加含药血清 Cu^{2+} 比值)为疗效指标, 分别加入含药血清及空白血清各 0.04、0.4、4.0ml 重新培养 24h, 其 ΔCu^{2+} 比值分别为 1.376、44.206、48.270 ng/mg , 表明加入 0.4ml 含药血清时疗效增加已较明显, 故取此量为最适加药剂量。仍取上述 5 例细胞模型, 分别加入 0.4ml 含药血清及等量空白血清重新培养 4、8、16、24、32、40、48h, 其 ΔCu^{2+} 比值分别为 1.86、8.93、15.80、49.05、54.22、56.90、56.94 ng/mg , 表明加含药血清重新培养 24h 疗效已近最大。故取其为加含药血清后最佳收集细胞时间。23 例细胞模型平行分成 3 组, 一组未加血清, 另两组分别加入 0.4ml 含药血清及等量空白血清, 重新培养 24h, Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 含量测定结果通过配对 t 检验统计学处理表明: 23 例细胞模型加入肝豆汤后细胞内 Cu^{2+} 含量较加药前显著减少($t = 9.736, P < 0.01$); 细胞内 Zn^{2+} 含量较加药前显著增加($t = 2.827, P < 0.01$); $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ 比值较加药前显著下降($t = 9.11, P < 0.01$), 见表 1。

表 1 23 例细胞模型肝豆汤治疗前后细胞内 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	Cu^{2+} 比值(ng/mg)	Zn^{2+} 比值(ng/mg)	$\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$
未加血清	$80.94 \pm 34.76^*$	$140.43 \pm 33.81^*$	$0.61 \pm 0.29^*$
加空白血清	$78.71 \pm 33.59^*$	$143.71 \pm 36.88^*$	$0.59 \pm 0.28^*$
加含药血清	46.90 ± 22.14	151.43 ± 37.83	0.34 ± 0.20

注: 与加含药血清组比较, $^* P < 0.01$

讨 论

HLD 虽已确定为常染色体隐性遗传性铜代谢障碍疾病, 但其确切的发病机制尚未完全阐明。Uzman 推测 HLD 患者肝细胞内可能存在一种与铜有特殊亲和力的异常蛋白⁽⁸⁾。Shapiro 和 Erans 先后用凝胶柱层

析法在 HLD 患者肝细胞中分离出含铜较健康人高 10 倍以上的金属硫蛋白(MT)^(9,10)。近年在 HLD 离体培养的皮肤成纤维细胞中也发现了大量 MT, 其含铜量较正常对照组高数倍⁽¹¹⁾。因细胞内铜沉积部位在细胞浆和溶酶体⁽¹²⁾, 更有人推测细胞内铜传递链为: 铜→大分子蛋白→金属硫蛋白→溶酶体→排出细胞⁽¹³⁾。现已确认, HLD 基因位于 13 号染色体长臂上(13q14.3), 编码一种 P 型铜转运 ATP 酶(ATPTB)^(14,15), 称 ATPTB 基因。故推测 HLD 患者是由于基因缺陷造成 HLD 细胞内 MT 含量异常增高, 因细胞内 MT 具有原发性高铜亲和力和对铜的高诱导性两种异常⁽¹⁶⁾, 使细胞内铜离子蓄积, 同时也引致掌管金属代谢功能的细胞内溶酶体障碍⁽¹⁷⁾。

安徽中医学院肝豆研究组根据大多数患者具有眼黄、口苦口臭、尿黄便秘、舌质红、苔黄或黄腻、脉弦数或弦滑等症候, 依中医辨证推断: 铜毒内聚、肝胆湿热内蕴为其主要病机, 故立清热解毒、利胆燥湿, 通腑利尿之法, 同时结合现代 HLD 病理生理机制而取兼具利胆、高锌低铜的中药组成肝豆汤复方^(1,2)。胡文彬等对 34 例 HLD 患者服肝豆片 2 号(与肝豆汤组方同)的临床观察表明⁽¹⁸⁾, 肝豆汤确有显著的向胆汁、大便及尿中排铜效果。临床症状也获得了改善。

本实验结果进一步表明, 肝豆汤确有显著的细胞内排铜和使细胞内锌含量增加的作用, 细胞内 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 比值也显著降低, 从而在细胞水平进一步证明了肝豆汤的确切疗效, 同时证明在肝豆汤的治疗作用下, 细胞内呈现低铜高锌的改善。有作者证明, HLD 细胞模型在含药血清作用下, 细胞内 MT 含量及 MT 结合铜的能力显著下降。Menard 等研究表明, 食物中的铜和口服锌剂诱导小肠粘膜细胞合成 MT, 通过锌和铜与 MT 竞争性地结合, 锌剂可对组织中已沉积的铜具有间接的清除作用⁽¹⁹⁾。故推测除富含锌的肝豆汤中的锌离子可能通过载体蛋白转运到细胞内, 竞争与 MT 的结合而阻止铜在细胞水平的沉积, 并促进铜从细胞内排出外, 肝豆汤尚有降低细胞内 MT 含量的作用, 但其排铜的确切机制尚待进一步探讨。

参 考 文 献

1. 杨任民. 中西医结合治疗肝豆状核变性初步临床观察. 新医

学附刊(神经系统疾病) 1976;4:209.

2. 杨任民. 中药治疗肝豆状核变性 107 例疗效观察. 中医杂志 1993;34(11):676—677.
3. 杨任民主编. 肝豆状核变性. 合肥:安徽科技出版社, 1995: 167—168.
4. 王浴生主编. 中药药理与应用. 北京:人民卫生出版社, 1983:73.
5. 罗文毓. 大黄中五种蒽醌衍生物的 HPLC 测定. 药物分析杂志 1989;9(5):259—262.
6. 庞志功. 大黄素大黄酚在兔体内药代动力学研究. 西安医科大学学报 1993;14(4):346—349.
7. 陈秀珍编著. 体细胞培养技术. 上海:上海医科大学出版社, 1989:56—57.
8. Bremner I. Metallothionein: Some aspect of its structure and function metabolism. Chem Sci 1983;21:17.
9. Shapiro J, Morell AG, Scheinberg IH. A Copper protein of human liver. J Clin Invest 1961;40:1081.
10. Elmes ME, Jasan B. Metallothionein and liver disease. Lancet 1987;2:866.
11. 陈 嵘. 肝豆状核变性离体培养细胞内金属硫蛋白代谢的研究. 中华神经精神科杂志 1993;26(6):327—330.
12. 陈 嵘, 梁秀龄, 刘焯霖, 等. 肝豆状核变性离体皮肤成纤维细胞模型研究. 中山医科大学学报 1995;16(2):48—50.
13. 陈 嵘, 梁秀龄, 刘焯霖, 等. 铜孵育对肝豆状核变性离体培养细胞内铜在不同分子量蛋白上分布的影响. 中华神经精神科杂志 1994;27(2):70—72.
14. Bull PC, Thomas GR, Rommens JM, et al. The wilson disease gene is a putative Copper transporting p-type TP ase similar to the menkes gene. Nature Genet 1993;5:327.
15. 杨任民, 范玉新, 余 龙, 等. 肝豆状核变性基因的一种新型错义突变. 中华医学杂志 1997;77(5):344—347.
16. 陈 嵘. 不同浓度铜孵育对肝豆状核变性离体培养细胞内铜含量的影响. 中国神经精神疾病杂志 1994;19(4):200—203.
17. 张影如. 肝豆状核变性患者离体培养成纤维细胞系的建立和生物学鉴定. 中山医科大学学报 1993;14(1):200.
18. 胡文彬, 杨任民. 肝豆片 2 号对肝豆状核变性微量元素的影响及临床疗效的研究. 中国实用内科杂志 1997;17(5):582.
19. 杨任民, 鲍元程, 蒋永亮, 等. 口服硫酸锌对 60 例肝豆状核变性患者尿排铜及血微量元素的研究. 中华医学杂志 1986;66(4):211—213.

(收稿:1998-08-24 修回:1999-06-30)