

· 基础研究 ·

肝豆汤联合青霉胺对 Wilson 病模型
肝脏铜死亡抑制作用徐乐文^{1, 2} 董健健^{1, 2} 高曼莉² 徐陈陈² 李 波² 程 楠^{1, 2}

摘要 目的 观察肝豆汤联合青霉胺对 Wilson 病 (WD) 模型肝脏铜死亡的抑制作用。方法 以淡化致死基因 (DL) 小鼠为正常组, 将毒牛奶 (TX) 小鼠随机分为模型组、肝豆汤组、青霉胺组和肝豆汤联合青霉胺组, 每组 8 只。正常组及模型组予以 0.9% 氯化钠溶液 0.2 mL/ (10 g·d), 肝豆汤组、青霉胺组和肝豆汤联合青霉胺组分别予以肝豆汤浓缩液 0.2 mL/ (10 g·d), 青霉胺 0.1 g/ (kg·d), 肝豆汤浓缩液 0.2 mL/ (10 g·d) 联合青霉胺 0.1 g/ (kg·d), 连续灌胃 30 天。采用生化法、电感耦合等离子体-质谱法 (ICP-MS)、HE 染色、透射电镜、实时荧光定量 PCR、Western Blot 法和免疫组织化学法检测各组小鼠血清学指标和肝脏铜含量、病理改变、线粒体超微结构、铜死亡相关基因和蛋白以及硫辛酸 (LA) 的表达水平。结果 与正常组比较, 模型组血清丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (AST) 水平, 乳酸脱氢酶 (LDH)、超氧化物歧化酶 (SOD) 活性和肝组织铜含量升高 ($P<0.05$), 肝脏局部碎片状坏死, 炎性细胞数升高 ($P<0.01$), 线粒体损伤显著, 铜死亡相关基因 mRNA, 铁硫簇蛋白、硫辛酰化蛋白、LA 表达水平下降 ($P<0.05$), 二氢硫辛酸转乙酰基酶 (DLAT) 二聚体和热休克蛋白 70 (HSP70) 表达水平升高 ($P<0.01$)。与模型组比较, 各治疗组血清 ALT、AST 水平, LDH、SOD 活性及肝组织铜含量下降 ($P<0.05$), 肝脏病理损伤减轻, 炎性细胞数降低 ($P<0.01$), 线粒体结构恢复, 铜死亡相关基因 mRNA、铁硫簇蛋白、lipDLAT、lipDBT、lipDLST、LA 表达水平升高 ($P<0.05$), DLAT 二聚体下降 ($P<0.05$)。与青霉胺组比较, 肝豆汤联合青霉胺组 ALT、AST 水平下降 ($P<0.05$), 肝组织铜含量降低 ($P<0.01$), PDHB mRNA 表达、铁硫簇蛋白、硫辛酰化蛋白表达升高 ($P<0.01$, $P<0.05$), DLAT 二聚体、HSP70 表达下降 ($P<0.01$)。结论 肝豆汤联合青霉胺可促进铜排出并上调 LA 途径相关蛋白的表达, 减轻 WD 模型肝脏铜死亡。肝豆汤对青霉胺治疗 WD 具有辅助增效作用。

关键词 Wilson 病; 铜死亡; 肝豆汤; 青霉胺; 中西医结合; 中药复方

Inhibitory Effect of Gandou Decoction Combined with Penicillamine on Liver Cuproptosis in Wilson Disease Model

XU Le-wen^{1, 2}, DONG Jian-jian^{1, 2}, GAO Man-li², XU Chen-chen², LI Bo², and CHENG Nan^{1, 2} 1 Graduate School of Anhui University of Chinese Medicine, Hefei (230012); 2 Institute of Neurology of Anhui University of Chinese Medicine, Hefei (230038)

ABSTRACT Objective To investigate the inhibitory effect of Gandou Decoction combined with penicillamine on cuproptosis in the liver of toxic milk (TX) mice, which serve as a model for Wilson's disease (WD). **Methods** Using dilute lethal (DL) mice as the normal control group, and TX mice were randomly divided into the model group, Gandou Decoction group, penicillamine group, and Gandou Decoction combined with penicillamine group, with 8 mice in each group. The normal control group and the model group were given 0.2 mL/10 g⁻¹·d⁻¹ of 0.9% NaCl solution, while the Gandou Decoction group, penicillamine group and Gandou Decoction combined with penicillamine group were separately given 0.2 mL·10 g⁻¹·d⁻¹ of Gandou Decoction, penicillamine

基金项目: 安徽省自然科学基金面上项目 (No. 2208085 MH226); 2021 年度安徽高校自然科学研究重点项目 (No.KJ2021 A0564)

作者单位: 1. 安徽中医药大学研究生院 (合肥 230012); 2. 安徽中医药大学神经病学研究所 (合肥 230038)

通讯作者: 程 楠, Tel: 0551-62816159, E-mail: neurodoc120@163.com

DOI:10.7661/j.cjim.20240205.012

0.1 g · kg⁻¹ · d⁻¹ and Gandou Decoction 0.2 mL · 10 g⁻¹ · d⁻¹ combined with penicillamine 0.1 g · kg⁻¹ · d⁻¹ by gavage for 30 consecutive days. Biochemical methods, inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), HE staining, transmission electron microscopy, real-time quantitative PCR, Western Blot and immunohistochemistry were used to determine the serological indexes and hepatic copper content, pathological changes, mitochondrial ultrastructure, cuproptosis-related genes and proteins, and the expression level of lipoic acid (LA) in each group of mice. **Results** Compared with the control group, the model group exhibited elevated serum ALT and AST levels, LDH and SOD activities, and hepatic tissue copper content ($P<0.05$). Additionally, the model group showed localized fragmentary necrosis of the liver, an increased number of inflammatory cells ($P<0.01$), significant mitochondrial damage, decreased expression levels of cuproptosis-related genes mRNA, iron-sulfur cluster proteins, thiocyanoylated proteins, and LA ($P<0.05$). Furthermore, the expression levels of dihydrolipoic acid transacetylase (DLAT) dimer and heat shock protein 70 (HSP70) increased ($P<0.01$). Compared with the model group, the treatment groups exhibited a decrease in serum alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) levels, lactate dehydrogenase (LDH) and superoxide dismutase (SOD) activities, as well as hepatic tissue copper content ($P<0.05$). Additionally, there was a reduction in hepatic pathological injury and a decrease in the number of inflammatory cells ($P<0.01$). Moreover, the mitochondrial structure was restored, and there was an elevation in the expression levels of cuproptosis-related genes, lipDLAT, lipDBT, lipDLST, thioredoxin, and LA mRNA ($P<0.05$). Conversely, the expression levels of DLAT dimer decreased ($P<0.05$). Compared with the penicillamine group, the levels of ALT and AST decreased in the Gandou Decoction combined with penicillamine group ($P<0.05$), the copper content in liver tissue decreased ($P<0.01$), the mRNA expression of PDHB, iron-sulfur cluster protein and lipoylated protein increased ($P<0.01$, $P<0.05$), and the expressions of DLAT dimer and HSP70 decreased ($P<0.01$). **Conclusions** The combination of Gandou Decoction and penicillamine demonstrates enhanced copper excretion and increased expression of LA pathway-related proteins, leading to the mitigation of hepatic cuproptosis in a WD model. Furthermore, Gandou Decoction exhibits an auxiliary potentiating effect when used in conjunction with penicillamine for the treatment of WD.

KEYWORDS Wilson disease; Cuproptosis; Gandou Decoction; penicillamine; integrative medicine; Chinese herbal compound

Wilson 病 (Wilson disease, WD) 又称肝豆状核变性 (hepatolenticular degeneration, HLD), 是铜转运 ATP7B 基因突变导致的常染色体隐性遗传性铜代谢疾病, 其主要临床特征为肝损伤、神经精神症状、角膜 K-F 环等^[1]。肝脏是铜的中央储存场所, ATP7B 主要在肝脏中表达, 介导过量的铜通过胆汁排泄至体外, 在维持全身铜稳态中起着核心作用^[2]。研究发现, 细胞内过量的铜可与三羧酸循环中的硫辛酰化蛋白靶向结合并致其寡聚, 与铁硫簇蛋白缺失共同引发蛋白毒性应激导致细胞死亡, 这种新的细胞死亡方式被命名为铜死亡^[3]。铜死亡可能是 WD 铜沉积诱导肝损伤的主要病理机制。

WD 是少数的可治性神经遗传病之一, 以青霉胺为代表的金属络合剂驱铜治疗是本病最主要的治疗方法, 然而约 30% 的患者因出现严重不良反应而停药^[4-7]。20 世纪 70 年代, 杨任民教授经过系统的中医辨证, 创用清热解郁、通腑利湿之治法组方肝豆汤, 该方不良反应小, 不仅能促进患者体内过量

铜排出, 还具有活血通腑、促进肝肾功能恢复的作用^[8]。临床研究表明, 肝豆汤联合铜络合剂治疗效果优于单用西药治疗, 能有效降低 WD 患者的病残率^[9]。基于此, 本研究期望通过观察肝豆汤联合青霉胺对铜死亡的干预效应, 探讨中西医结合治疗对 WD 模型毒牛奶 (toxic milk, TX) 小鼠肝脏的保护效应和机制, 为建立疗效好、不良反应低的诊疗方案提供理论依据。

材料与方法

1 实验动物 清洁级健康淡化致死基因 (dilute lethal, DL) 小鼠 8 只, 纯合型 TX 小鼠 32 只, 雄性, 2~3 月龄, 体重 20~25 g。DL 小鼠和 TX 种鼠由美国 Jackson 实验室中心引进, 繁殖培育于安徽中医药大学实验动物中心, 环境温度 24~26 °C, 相对湿度 45%~55%, 保持通风, 12 h 光照, 自由摄食、饮水。实验动物使用许可证号: SYXK (皖) 2018-005, 合格证号: 3198342; 研究经安徽中医药大学实验动物伦理委员会批准 (No.AHUCM-mouse-2022025)。

2 药物 肝豆汤组成: 大黄(四川) 20 g 泽泻(福建) 24 g 黄连(四川) 20 g 金钱草(广东) 24 g 姜黄(四川) 20 g 三七(云南) 3 g(组方药物均购自安徽中医药大学神经病研究所, 由安徽中医药大学药学院金传山教授鉴定)。中药为安徽中医药大学神经病研究所煎制, 加入蒸馏水 1 000 mL, 浸泡 30 min 后, 大火煮沸后, 转用文火煎煮 30 min, 经纱布过滤后得到药液, 药渣中再次加入蒸馏水 1 000 mL, 重复上法煎煮过滤。最后将两次煎煮所得药液合并, 以文火浓缩至 150 mL, 并于最后 10 min 下入大黄(总生药浓度 0.1875 g/mL)。最终过滤药液, 冷却后保存于 4 °C 冰箱。青霉胺(上海药睿尔药品有限公司, 批号 601220802)。

3 主要试剂及仪器 抗热休克蛋白 70(heat shock protein 70, HSP70) 抗体(武汉塞维尔生物科技有限公司, 批号: GB11241); 抗硫辛酸(lipoic acid, LA) 抗体、抗铁氧还蛋白 1(ferredoxin1, FDX1) 抗体(英国 Abcam 公司, 批号分别为 ab58724, ab108257); 抗二氢硫辛酸转乙酰基酶(dihydrolipoyl S-acetyltransferase, DLAT) 抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司, 批号: 12362); 硫辛酸合成酶(lipoic acid synthetase, LIAS) 抗体(美国 Proteintech 公司, 批号: 11577-1-AP); 7020 全自动生化分析仪: 日本日立公司; NexION 350 D 型电感耦合等离子体质谱(inductively coupled plasma mass spectrometry, ICP-MS) 仪: 美国 PerkinElmer 公司; Power Pac Basic 型电泳仪: 美国伯乐公司; Fine Do X6 型全自动化学发光图像分析系统: 上海天能科技有限公司; CFX Connect 荧光定量 PCR 仪: 美国伯乐公司。

4 分组及给药方法 以 DL 小鼠为正常组, 以纯合型 TX 小鼠作为 Wilson 病模型动物, 随机分为模型组、肝豆汤组、青霉胺组、肝豆汤联合青霉胺组。动物入组前均经基因检测, 模型动物随机抽取 5 只检测铜生化和肝脏病理改变, 以保证其特性符合研究需要。参考前期研究, 根据中药肝豆汤与青霉胺的临床常用剂量以及小鼠与人体的每公斤体重剂量折算系数换算, 设置各治疗组的灌胃剂量^[10], 正常组及模型组予以 0.9% 氯化钠溶液 0.2 mL/(10 g·d), 肝豆汤组、青霉胺组和肝豆汤联合青霉胺组分别予以肝豆汤浓缩液 0.2 mL/(10 g·d), 青霉胺 0.1 g/(kg·d), 肝豆汤浓缩液 0.2 mL/(10 g·d) 联合青霉胺 0.1 g/(kg·d), 相当于临床人用剂量的 9 倍, 于每日 15:00 连续灌胃 30 天。末次灌胃后, 1% 戊巴比

妥钠麻醉小鼠, 腹主动脉取血、取肝组织进行检测。

5 检测指标及方法

5.1 血清生化法检测小鼠肝功能及氧化应激指标 腹主动脉取血 300~400 μL, 全血于室温下静置 2 h, 高速离心机 3 500 r/min 离心 15 min 后取上清。通过 7020 全自动生化分析仪检测血清肝功能指标丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST) 和氧化应激指标超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)。

5.2 ICP-MS 法检测小鼠肝组织铜元素含量 样品微波消解: 每组各 8 只小鼠取 60 mg 左右肝脏组织, 并对其进行精确称量。加入 6 mL 浓硝酸, 按说明书安装压力罐、装载转子、设置反应参数后开始微波消解。消解结束后, 金属浴 130 °C 加热赶酸 20 min。待样本冷却后进行 20 倍稀释, 上机检测。根据所得数值, 样品质量, 稀释倍数计算样品所含铜元素的含量。

5.3 HE 染色检测小鼠肝脏病理学改变 每组各取 3 只小鼠肝脏固定, 石蜡包埋切片, 厚度为 6~8 μm, 脱蜡至水后, 依次进行苏木素染色、伊红染色, 脱水封片后镜下 ×200 观察肝小叶形态是否完整、肝细胞形态结构与排列, 并采集图像。每一样本均随机选择 5 个视野应用 Image J 软件进行炎性细胞计数。

5.4 透射电子显微镜观察肝组织线粒体超微结构 取 1 mm³ 左右大小肝脏组织, 置于透射电镜固定液中固定 12 h 后, 脱水, 丙酮: 812 包埋剂 = 1:1 包埋, 固化, 超薄切片机 60~80 nm 超薄切片, 3% 醋酸铀-枸橼酸铅双染色, 透射电镜 ×1 500、×600 和 ×12 000 倍数下观察, 拍片。

5.5 实时荧光定量 PCR 法检测各组小鼠肝组织铜死亡相关基因 LIAS、FDX1、DLAT、二氢硫辛酸脱氢酶(dihydrolipoic acid dehydrogenase, DAD)、丙酮酸脱氢酶 E1 亚基 β(pyruvate dehydrogenase E1 subunit beta, PDHB)、丙酮酸脱氢酶 α1(pyruvate dehydrogenase α1, PDHA1) 的表达水平 总 RNA 提取后检测 RNA 浓度及纯度, 将浓度过高的 RNA 稀释至 200 ng/μL。通过反转录试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA, 反应体系: 20 μL, 反应条件: 25 °C, 5 min, 42 °C, 30 min, 85 °C, 5 s。于荧光定量 PCR 仪上完成扩增。结果处理: 以 GAPDH 作为内参, 按 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

基因名称	引物序列 (5' -3')	扩增片段 (bp)
LIAS	上游 CGTTAAGACCGCAAGAAATCC	122
	下游 CCACATCATCTCGATCCACC	
FDX1	上游 ACAGACAGGAACCTGGAAGACC	132
	下游 GAGACAATCTGTATGGGGTGGTT	
DLAT	上游 TCACAGACATCCCCATCAGCA	136
	下游 TTAAGTTCCTTCCGTACCAACAG	
DLD	上游 TAGAGAAGATGATGGAGCAGAAGCA	173
	下游 TTTGGTATCAATAACCTGAGTGCTG	
PDHB	上游 AAGAAGTTGCCAGTATGACGGT	184
	下游 GCTTGCATAGAGAAATTGAAGGTCA	
PDHA1	上游 ACCAGAGAGGATGGGCTCAAGT	173
	下游 AGTGGTCCGTAGGGTTTATGC	
GAPDH	上游 CCTCGTCCCGTAGACAAAATG	133
	下游 TGAGGTCAATGAAGGGGTCGT	

5.6 Western Blot 法检测各组小鼠肝组织铜死亡相关蛋白的表达水平 称取肝脏组织 50 mg, 加入 495 μ L RIPA 裂解液和 5 μ L PMSF 溶液, 充分研磨后, 冰上摇床细裂解 30 min。4 $^{\circ}$ C 13 000 r/min, 离心 30 min 后取上清, 加入蛋白上样缓冲液, 100 $^{\circ}$ C 金属浴 8 min, 样本存放于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱。制备 12% 聚丙烯酰胺凝胶, 电泳, 转膜, 封闭, 分别加入兔抗 GAPDH、LIAS、FDX1、SDHB、LA 多克隆抗体和鼠抗 DLAT 多克隆抗体, 过夜后洗膜, 分别加入辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 和辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG 孵育 1.5 h, 洗膜, 显影曝光。使用 Image J 软件分析图像, 计算灰度值。

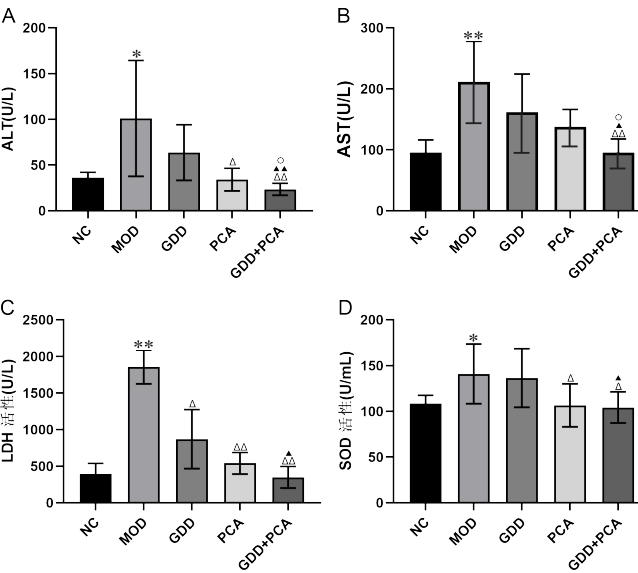
5.7 免疫组织化学法检测各组小鼠肝组织 LA 的表达水平 每组各选择 3 只小鼠肝脏组织, 进行脱水、固定、包埋、切片、制片后对其进行脱蜡至水, 热抗原修复, 滴加 3% 过氧化氢室温孵育 10 min, PBS 洗 3 次, 山羊血清封闭液室温封闭 10 min。一抗 4 $^{\circ}$ C 过夜后, PBS 洗 3 次, 二抗室温孵育 30 min, PBS 洗 3 次, DBA 显色后镜下观察 3~10 min, 终止染色, 水洗后苏木素复染, 脱水封片, 显微镜下拍照采集图像。每一样本均随机选择 5 个视野应用 Image J 软件计算平均光密度值, 分析各组小鼠肝脏组织 LA 的表达水平。

6 统计学方法 采用 SPSS 23.0 统计软件进行统计学分析, 实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 当实验数据符合正态分布时, 多个样本间均数比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 Bonferroni 检验, 若不符合正态分布, 多样本数值变量资料则采用 Kruskal-Wallis H 秩和检验, 采用 Nemenyi 进行事后分析。

以 $\alpha=0.05$ 作为检验水准。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组小鼠肝功能及氧化应激指标比较 (图 1) 与正常组比较, 模型组血清 ALT、AST 水平, LDH、SOD 活性升高 ($P<0.01$, $P<0.05$)。与模型组比较, 肝豆汤组 LDH 活性下降 ($P<0.05$), 青霉胺组 ALT 水平以及 LDH、SOD 活性下降 ($P<0.01$, $P<0.05$), 肝豆汤联合青霉胺组 ALT、AST 水平和 LDH、SOD 活性下降 ($P<0.01$, $P<0.05$)。与肝豆汤组比较, 肝豆汤联合青霉胺组 ALT、AST 水平和 LDH、SOD 活性均有不同程度的降低 ($P<0.01$, $P<0.05$)。与青霉胺组比较, 联合治疗组 ALT、AST 水平下降 ($P<0.05$)。

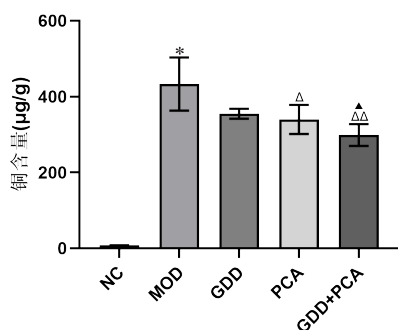


注: A 为各组小鼠血清 ALT 水平比较; B 为各组小鼠血清 AST 水平比较; C 为各组小鼠血清 LDH 活性比较; D 为各组小鼠血清 SOD 活性比较; NC 为正常组, MOD 为模型组, GDD 为肝豆汤组, PCA 为青霉胺组, GDD+PCA 为肝豆汤联合青霉胺组, 图 2~6 同; 与正常组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与模型组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$; 与肝豆汤组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$; 与青霉胺组比较, $\circ P<0.05$; $n=8$

图 1 各组小鼠肝功能及氧化应激指标比较

2 各组小鼠肝组织铜元素含量比较 (图 2) 与正常组比较, 模型组小鼠肝组织铜含量升高 ($P<0.01$)。与模型组比较, 青霉胺组小鼠肝组织铜含量降低 ($P<0.05$), 肝豆汤联合青霉胺组小鼠肝组织铜含量降低 ($P<0.01$)。与肝豆汤组比较, 肝豆汤联合青霉胺组小鼠肝组织铜含量降低 ($P<0.05$)。

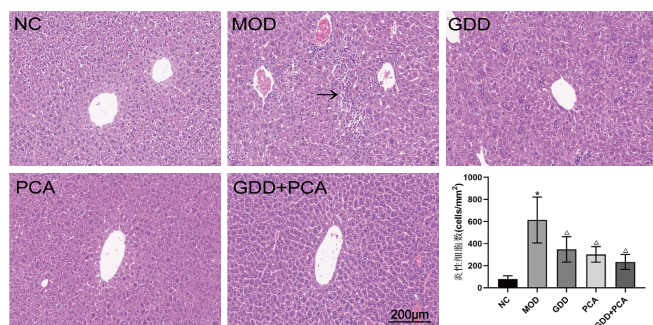
3 各组小鼠肝脏病理结果比较 (图 3) 正常组小鼠肝小叶结构完整, 肝细胞形态正常, 胞核无增大, 以中央静脉为中心向周围放射状有序排列。模型组局



注: 与正常组比较, * $P<0.01$; 与模型组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$; 与肝豆汤组比较, $\blacktriangle P<0.05$; $n=8$

图2 各组小鼠肝组织铜含量比较

部可见碎片状坏死, 大量炎性细胞浸润, 坏死处可见无核的肝细胞残体, 与正常组比较, 炎性细胞数升高 ($P<0.01$)。肝豆汤组与青霉胺组肝细胞排列紊乱, 胞核增大, 与模型组比较, 肝小叶结构部分恢复, 炎性细胞数降低 ($P<0.01$), 病理损伤有明显改善。肝豆汤联合青霉胺组肝细胞与肝小叶形态结构完整, 排列有序, 病理损伤较肝豆汤组和青霉胺组有进一步改善。



注: 黑色箭头示肝细胞碎片状坏死; 与正常组比较, * $P<0.01$; 与模型组比较, $\Delta P<0.01$

图3 各组小鼠肝脏病理结果比较 (HE, $\times 200$)

4 各组小鼠肝脏线粒体超微结构比较 (图4) 正常组小鼠肝脏线粒体形态正常; 模型组线粒体形态不规则, 膜皱缩, 嵴减少, 出现大量空泡。与模型组

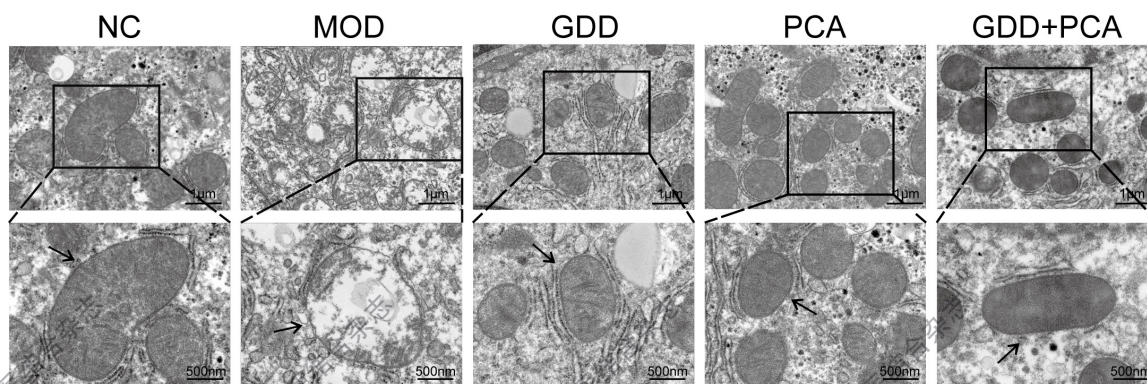
比较, 各治疗组线粒体损伤减轻, 且肝豆汤联合青霉胺组损伤减轻最为明显。

5 各组小鼠肝脏铜死亡相关基因表达比较 (图5) 与正常组比较, 模型组 LIAS、FDX1、DLAT、DLD、PDHB、PDHA1 mRNA 表达下降 ($P<0.05$, $P<0.01$)。与模型组比较, 肝豆汤组 LIAS、FDX1、PDHA1、PDHB mRNA 表达升高 ($P<0.05$), 青霉胺组及肝豆汤联合青霉胺组 LIAS、FDX1、DLAT、DLD、PDHA1 mRNA 表达升高 ($P<0.01$, $P<0.05$)。与肝豆汤组比较, 肝豆汤联合青霉胺组 FDX1、DLD mRNA 表达升高 ($P<0.05$)。与青霉胺组比较, 肝豆汤联合青霉胺组 PDHB mRNA 表达升高 ($P<0.05$)。

6 各组小鼠铜死亡相关蛋白表达比较 (图6) 与正常组比较, 模型组铁硫簇蛋白 LIAS、FDX1、SDHB, 硫辛酰化蛋白 lipDLAT、lipDBT、lipDLST、lipGCSH、LA 表达下降 ($P<0.01$, $P<0.05$), DLAT 二聚体和热休克蛋白 HSP70 表达升高 ($P<0.01$)。与模型组比较, 各治疗组铁硫簇蛋白、lipDLAT、lipDBT、lipDLST、LA 表达升高 ($P<0.01$), DLAT 二聚体下降 ($P<0.05$)。与肝豆汤组比较, 肝豆汤联合青霉胺组 LIAS、SDHB、lipDBT、lipDLST、lipGCSH 表达升高 ($P<0.01$), DLAT 二聚体表达下降 ($P<0.01$)。与青霉胺组比较, 肝豆汤联合青霉胺组铁硫簇蛋白、硫辛酰化蛋白表达升高 ($P<0.01$), DLAT 二聚体、HSP70 表达下降 ($P<0.01$)。

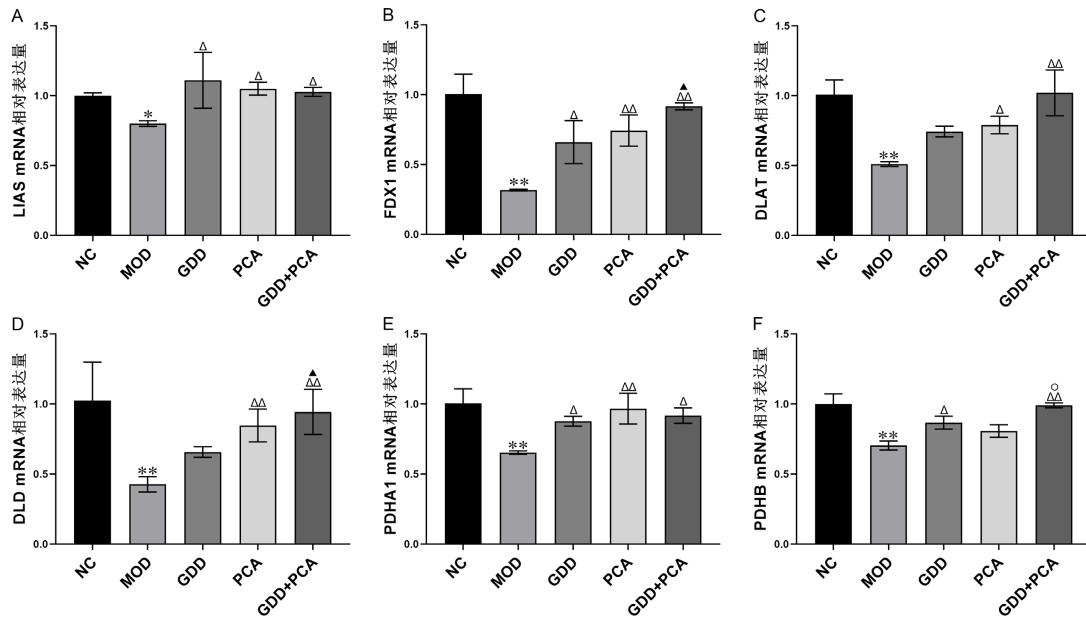
讨论

铜是许多关键酶的辅助因子, 如 SOD、细胞色素氧化酶 (cytochrome c oxidase, CCO)、铜蓝蛋白 (ceruloplasmin, CP)、赖氨酰氧化酶 (lysyl oxidase, LOX) 等, 参与能量代谢、抗氧化、铁代



注: 上行图片放大倍数为 $\times 6000$, 下行图片放大倍数为 $\times 12000$, 下行图片为上行图片的原位 2 倍放大图; 黑色箭头示线粒体

图4 各组小鼠肝脏线粒体超微结构比较



注: A 为各组小鼠 LIAS mRNA 表达比较; B 为各组小鼠 FDX1 mRNA 表达比较; C 为各组小鼠 DLAT mRNA 表达比较; D 为各组小鼠 DLA mRNA 表达比较; E 为各组小鼠 PDHA1 mRNA 表达比较; F 为各组小鼠 PDHB mRNA 表达比较;与正常组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与模型组比较, Δ $P<0.05$, $\Delta\Delta$ $P<0.01$;与肝豆汤组比较, $\blacktriangle$ $P<0.05$;与青霉胺组比较, $\circ$ $P<0.05$; $n=3$

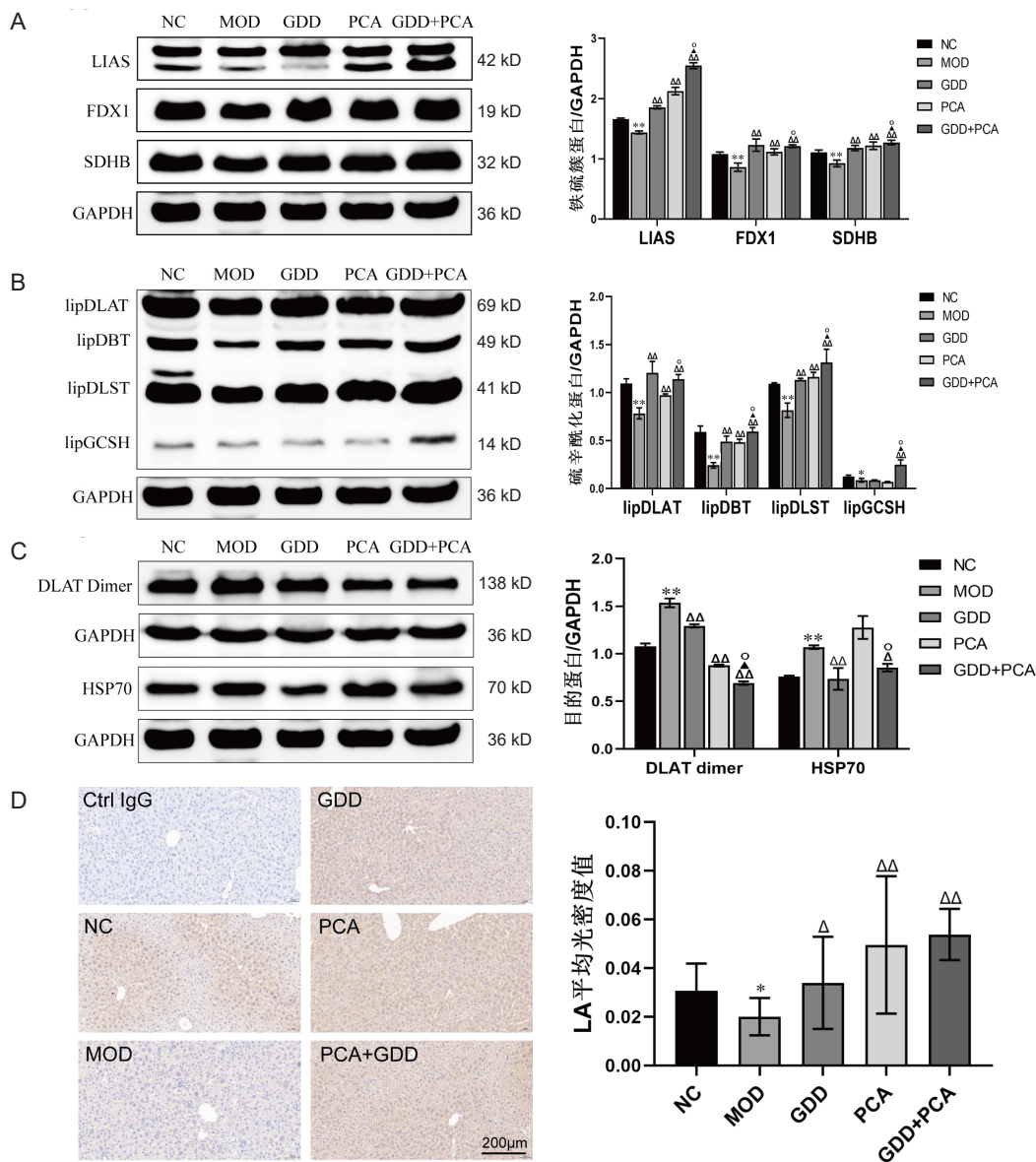
图 5 各组小鼠肝组织铜死亡相关基因 mRNA 表达比较

谢等生理活动^[11]。铜作为生物体内不可缺少的元素,但同时过量的铜又具有潜在毒性^[12],关于铜过载导致细胞死亡的机制,曾有过以下几种假说,包括诱导细胞凋亡、caspase 非依赖性细胞死亡、诱导活性氧的生成和抑制泛素-蛋白酶体系统^[13]。近来 Tsvetkov P 等^[3]提出了铜死亡这一新的死亡方式,且初步的质谱分析结果显示在 WD 的天然疾病模型 TX 小鼠的肝脏中,铁硫簇蛋白与硫辛酰化相关蛋白的表达降低,与铜死亡细胞中的蛋白表达特征相吻合,但尚未对 TX 小鼠肝损伤与铜死亡之间的联系进行系统性研究。本实验结果显示,WD 模型 TX 小鼠肝脏中过量的铜可与线粒体中的硫辛酰化蛋白结合并致其寡聚,同时细胞内铁硫簇蛋白缺失,以上两种因素可能协同诱导线粒体损伤,从而导致肝细胞铜死亡的发生。在使用具有一定排铜作用的肝豆汤和铜螯合剂青霉胺治疗后, TX 小鼠肝脏铜死亡被抑制,肝损伤减轻,提示铜死亡有可能是 WD 肝损伤的核心病理机制。

蛋白硫辛酰化是一种高度保守的赖氨酸翻译后修饰,其通过酰胺键将硫辛酸修饰在底物蛋白赖氨酸的氨基上,目前已知会进行此种修饰的蛋白只有 DLAT、DBT、DLST 和 GCSH,并且都是丙酮酸脱氢酶复合体的重要组成部分,这四种蛋白只有在完成硫辛酰化修饰后才具有酶活性^[14]。LIAS 属于生物素和 LIAS 家族,催化从头途径合成硫辛酸的最后一步^[15],当敲除 LIAS 或其上游调节因子 FDX1 时,可

阻断 LA 的合成,从而使硫辛酰化蛋白缺失^[3]。本研究发发现,模型组小鼠 LA 途径相关的基因以及 PDH 复合体相关基因 mRNA 表达下调,硫辛酰化上游调节因子 LIAS、FDX1 蛋白表达缺失,LA 及硫辛酰化蛋白表达水平下降。因此,笔者推测铜死亡的损伤机制除硫辛酰化蛋白寡聚体造成的蛋白毒性应激和细胞内铜过载造成的氧化应激损伤之外,LA 合成途径被抑制会导致硫辛酰化蛋白缺失,使得 PDH 复合体无法发挥正常的生理功能,引起线粒体能量代谢障碍导致的细胞损伤也可能是 WD 肝细胞铜死亡的重要机制之一。

自 20 世纪 70 年代以来,杨任民等经过长期的临床观察,发现多数 WD 患者出现口苦口臭、目黄肤黑、尿黄便秘、舌红苔黄腻等表现,结合《黄帝内经》所云:“诸邪冲上,皆属于火”“诸颈强直,皆属于湿”,认为 WD 病机为铜毒内聚,肝胆湿热内蕴,并创用清热利湿治法组方肝豆汤^[16],其临床有效率达 84.2%^[17]。中药肝豆汤联合铜螯合剂二巯基丁二钠、硫辛酸、青霉胺等西药治疗,总有效率达 93.06%,能促进 WD 患者肝硬化和肝脏功能的改善,提高患者的生活质量^[18-20]。徐陈陈等^[21]研究发现肝豆汤可通过诱导 ATP7 B 重新定位于反面高尔基体管网状结构并发挥细胞排铜作用,以达到治疗 WD 的效果。李东昇等^[22]研究发现,肝豆汤之改良方一通腑养髓方可调控核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor



注: A 为各组小鼠铁硫簇蛋白表达水平比较; B 为各组小鼠硫辛酰化蛋白表达水平比较; C 为各组小鼠 DLAT 二聚体和 HSP70 表达水平比较; D 免疫组化检测各组小鼠 LA 表达水平比较; 与正常组比较, $*P<0.05$, $**P<0.01$; 与模型组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$; 与肝豆汤组比较, $\blacktriangle P<0.01$; 与青霉胺组比较, $\circ P<0.01$

图 6 各组小鼠肝脏铜死亡相关蛋白表达比较

erythroid 2 related factor 2, Nrf2) 信号通路, 抑制 WD 模型 TX 小鼠神经细胞铁死亡, 从金属依赖性细胞死亡的角度阐述了中药治疗 WD 的神经元损伤机制。此外, 耿昊等^[23]研究发现中药肝豆汤可以通过调控 Wnt/ β -连环蛋白 (β -catenin) 信号通路相关蛋白的表达, 促进 WD 模型铜负荷 SD 大鼠损伤的肝组织代偿性自愈。本实验结果表明中药肝豆汤驱铜能力较青霉胺弱, 但在提高 LIAS、PDHB mRNA, 蛋白 FDX1、lipDLAT、lipDBT 的表达以及降低反应蛋白毒性应激的 HSP70 的表达水平方面优于青霉胺组。这种趋势异质性提示中药肝豆汤并非只具有单纯的

驱铜作用, 契合了中药复方多层次、多靶点的特征。综上所述, 肝豆汤联合青霉胺可促进铜排出, 减轻 Wilson 病模型 TX 小鼠肝脏铜死亡, 并通过上调 LA 途径相关蛋白的表达, 从而减轻肝组织损伤。中西医结合治疗效果优于单用中药肝豆汤或青霉胺, 表明肝豆汤联合青霉胺对 Wilson 病模型 TX 小鼠肝脏具有协同保护作用。

铜死亡作为一种新发现的、与经典和非经典明显不同的细胞死亡方式, 目前与之相关的研究仍处于初级阶段。本研究首次从铜死亡的角度探讨 WD 肝损伤的核心机制, 并基于此研究肝豆汤联合青霉胺对 WD

的治疗效应。然而本研究仍具有局限性,尚未对 LA 途径在铜死亡中的调控作用进行深入研究。后续将通过抑制 LA 途径,明确中西医结合治疗 WD 的具体作用靶点,为建立疗效好、副作用低的中西医结合治疗方案提供理论依据。

利益冲突:无。

参 考 文 献

- [1] Guindi M. Wilson disease[J]. Semin Diagn Pathol, 2019, 36 (6): 415-422.
- [2] Czlonkowska A, Schilsky ML, Editors. Handbook of clinical neurology[M]. United States: Elsevier, 2017, 142: 43-55.
- [3] Tsvetkov P, Coy S, Petrova B, et al. Copper induces cell death by targeting lipoylated TCA cycle proteins[J]. Science, 2022, 375 (6586): 1254-1261.
- [4] Czlonkowska A, Litwin T, Dusek P, et al. Wilson disease[J]. Nat Rev Dis Primers, 2018, 4 (1): 21.
- [5] 中华医学会神经病学分会神经遗传学组. 中国肝豆状核变性诊治指南 2021 [J]. 中华神经科杂志, 2021, 54 (4): 310-319.
- [6] Mulligan C, Bronstein JM. Wilson disease: An overview and approach to management[J]. Neurol Clin, 2020, 38 (2): 417-432.
- [7] Padovani D, Galardon E. Molecular basis for the interaction of catalase with d-penicillamine: Rationalization of some of its deleterious effects[J]. Chem Res Toxicol, 2022, 35 (3): 412-421.
- [8] 杨任民, 鲍远程, 杨兴涛, 等. 肝豆汤对 37 例肝豆状核变性驱铜的观察 [J]. 中西医结合杂志, 1984, 4 (8): 462-464, 450.
- [9] 张杰, 胡纪源, 马心锋, 等. 肝豆汤合驱铜疗法对肝豆状核变性患者生活质量影响的前瞻性研究 [J]. 安徽中医药大学学报, 2015, 34 (1): 14-16.
- [10] 杨瑞楠, 程楠, 董健健, 等. 肝豆汤调控 NLRP3 炎症小体抑制 Wilson 病模型神经炎症的机制研究 [J]. 安徽中医药大学学报, 2023, 42 (5): 60-67.
- [11] Astrid S, Helmut S, Eva F, Editors. Metal ions in life sciences[M]. Berlin: De Gruyter, 2018: 469-506.
- [12] Kahlson MA, Dixon SJ. Copper-induced cell death[J]. Science, 2022, 375 (6586): 1231-1232.
- [13] Li SR, Bu LL, Cai L. Cuproptosis: Lipoylated TCA cycle proteins-mediated novel cell death pathway[J]. Signal Transduct Target Ther, 2022, 7 (1): 158.
- [14] Rowland EA, Snowden CK, Cristea IM. Protein lipoylation: An evolutionarily conserved metabolic regulator of health and disease[J]. Curr Opin Chem Biol, 2018, 42: 76-85.
- [15] Solmonson A, DeBerardinis RJ. Lipoic acid metabolism and mitochondrial redox regulation[J]. J Biol Chem, 2018, 293 (20): 7522-7530.
- [16] 李宗亮, 胡纪源, 杜益刚. 中医药治疗 Wilson 病的研究进展 [J]. 中国医学创新, 2014, 11 (4): 141-144.
- [17] 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 (11): 676-677.
- [18] 杨任民, 杨兴涛, 鲍远程, 等. 中西医结合治疗肝豆状核变性 418 例分析 [J]. 中西医结合杂志, 1990, 10 (3): 140, 130, 134-136.
- [19] 洪铭范, 王共强, 杨任民, 等. 中西医结合治疗对肝豆状核变性患者肝硬化及肝脏功能的改善作用 [J]. 中国中西医结合杂志, 2000, 20 (12): 890-892.
- [20] 杨任民, 程楠. 中西医结合治疗 198 例肝豆状核变性患者的近期疗效及随访观察 [J]. 中国中西医结合杂志, 2002, 22 (9): 657-659.
- [21] 徐陈陈, 董健健, 程楠, 等. 中药肝豆汤含药血清对 Wilson 病模型 TX 小鼠肝细胞内 ATP7 b 蛋白亚细胞定位和功能表达的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2017, 32 (1): 250-253.
- [22] 李东昇, 程楠, 董健健, 等. 基于 Nrf2 通路研究通腑养髓方调控 Wilson 病模型 TX 小鼠神经细胞铁死亡的机制 [J]. 安徽中医药大学学报, 2022, 41 (5): 95-101.
- [23] 耿昊, 李海, 徐陈陈, 等. 肝豆汤对 Wilson 病模型铜负荷大鼠肝脏 Wnt/ β -catenin 信号通路的调控作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25 (7): 75-81.

(收稿: 2023-09-11 在线: 2024-03-04)

责任编辑: 赵芳芳