

· 论 著 ·

肝豆汤对 tx 小鼠肝脏微量元素含量及 ATP7B 蛋白表达的影响

陈林¹, 艾文龙², 程楠², 吴君霞², 胡文彬², 韩咏竹²

1. 安徽中医药大学研究生部, 安徽 合肥 230038; 2. 安徽中医药大学神经病学研究所附属医院, 安徽 合肥 230061

摘要: **目的** 探讨中药肝豆汤对肝豆状核变性(WD)动物模型 tx 小鼠肝脏微量元素铜、锌、铁代谢及 ATP7B 蛋白表达水平的影响。**方法** 选择 60 只 tx 小鼠随机分为肝豆汤治疗组($n=25$)和模型组($n=35$), 24 只正常野生型 DL 小鼠为对照组。治疗组给予肝豆汤灌胃, 模型组给予生理盐水灌胃, 对照组仅常规饲养。检测各组小鼠不同月龄肝脏铜、锌、铁微量元素含量及肝组织 ATP7B 蛋白表达水平。微量元素检测采用原子吸收分光光度法; ATP7B 蛋白表达水平分别采用免疫组化、Western blot 法。**结果** 模型组和治疗组较同月龄对照组肝脏铜含量明显升高(P 均 < 0.01), 但治疗组铜含量显著低于同月龄模型组(P 均 < 0.01), 模型组和治疗组在 5 月龄内均表现出随月龄增加铜含量增加(P 均 < 0.01)。模型组锌含量较同月龄对照组升高, 但与治疗组差异无统计学意义, 同时治疗组较模型组锌含量升高与铜含量降低表现方向一致性, 但并不呈现线性相关。模型组铁含量较对照组偏高, 治疗组较同月龄模型组铁含量下降($P < 0.01, P < 0.05$)。ATP7B 蛋白主要表达在细胞质。模型组 ATP7B 蛋白表达水平随月龄增加而上调, 治疗组较同月龄模型组表达上调(P 均 < 0.05)。**结论** 肝豆汤可以降低 tx 小鼠肝脏细胞内铜含量, 同时升高锌含量, 降低铁含量; 肝豆汤可上调 ATP7B 蛋白的表达, 从而促进过量铜离子从胆汁中排出, 减少铜的蓄积。

关键词: 肝豆汤; tx 小鼠; 肝豆状核变性; 微量元素; 铜; 铁; 锌; ATP7B 蛋白

中图分类号: R-33 R 589.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2015)02-0137-04

Effects of Gandou decoction on contents of hepatic microelements and ATP7B protein expression in tx mice

CHEN Lin*, AI Wen-long, CHENG Nan, WU Jun-xia, HU Wen-bin, HAN Yong-zhu

* Graduate Division, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei, Anhui 230038, China

Corresponding author: HAN Yong-zhu, E-mail: hanyongzhutcm@aliyun.com

Abstract: Objective To explore the impacts of Gandou decoction on hepatic copper, zinc and iron metabolism and ATP7B protein expression levels in toxic milk (tx) mice with Wilson's disease (WD). **Methods** Sixty tx mice were randomly divided into model group($n=25$) and treatment group($n=35$), and 24 normal wild-type DL mice were selected as control group. Gandou decoction was gavaged in treatment group, and normal saline was gavaged in model group, while the regular feeding was given in control group. The contents of hepatic microelements including copper, zinc and iron and ATP7B protein expression level were detected in the mice with different months of age. The atomic absorption spectrometry was used for detecting the microelements, and the immunohistochemical method and Western blot method were respectively used for detecting ATP7B protein expression. **Results** Compared with control group, the copper contents in model group and treatment group of corresponding months of age increased significantly (all $P < 0.01$) but decreased significantly in treatment group compared with model group ($P < 0.01$). Within the five months of age, the copper contents in model group and treatment group increased with the increase of ages (all $P < 0.01$). The zinc content in model group was higher than that in control group but was similar with treatment group. Compared with model group, the elevation of zinc content and the reduction of copper content in treatment group presented the directional consistency, but without linear correlation. The iron content in model group increased slightly, while the iron content in treatment group decreased compared with model group of corresponding months of age. ATP7B protein expression was seen mainly in the cytoplasm. ATP7B protein expression in mod-

el group increased with the increase of the months of age, and its expression in treatment group was up-regulated compared with model group of corresponding months of age (all $P < 0.05$). **Conclusion** Gandou decoction can reduce the copper and iron contents and increase the zinc content in the liver cells of tx mice. Gandou decoction can up-regulate ATP7B protein expression, thus promote the discharge of excessive amounts of cupric ion from the bile and reduce the accumulation of copper.

Key words: Gandou decoction; Toxic milk mice; Wilson's disease; Microelement; Copper, Iron; Zinc; ATP7B protein

肝豆状核变性(Wilson's disease, WD)是 ATP7B 基因病变导致 ATP7B 蛋白功能障碍,不能将细胞内多余铜有效转移,从而形成细胞内铜过度蓄积,引起细胞损伤或凋亡,引发组织器官功能障碍和损害,产生相应临床症状。WD 患者因 ATP7B 基因发生突变,导致铜离子跨膜转运障碍,引起肝细胞内铜蓝蛋白合成障碍及铜在胆汁中的排泄障碍,过量的铜在肝脏等脏器中沉积而发病^[1-2]。tx (toxic milk)小鼠是由同系繁殖到 F68 代的 DL(wild-type)小鼠的自然突变品系,与 WD 有相同的遗传背景(ATP7B 基因 Met1356Val 点突变)和生化改变,不易发展为肝癌,是用于 WD 实验研究的理想动物模型^[3]。自上世纪 70 年代以来,本单位采用肝豆汤治疗 WD 患者,使患者临床症状明显改善^[4]。本实验通过对中药肝豆汤干预后 tx 小鼠肝脏微量元素铜、锌、铁含量的检测,研究肝豆汤对 WD 动物模型 tx 小鼠肝脏铜、锌、铁代谢的影响,以及对 ATP7B 的调控。

1 材料与方法

1.1 实验动物 随机选择 1 月龄 tx 小鼠(WD 动物模型)60 只(由中山大学实验动物中心提供,tx 小鼠原种鼠从澳大利亚 Deakin 大学实验动物中心引进)和正常 DL 小鼠 24 只,饲养于本单位实验动物中心。实验分组如下:(1)治疗组:随机选择 1 月龄的 tx 小鼠 25 只;(2)模型组:随机选择 1 月龄的 tx 小鼠 35 只;(3)对照组:正常 DL 小鼠 24 只。

1.2 中药肝豆汤制备 中药肝豆汤组方及剂量:大黄 20 g,黄连 20 g,姜黄 20 g,金钱草 24 g,泽泻 24 g,三七 3 g。准确称取相应中药(由安徽中医药大学神经病学研究所附属医院中药房提供),高火煎煮至沸后加入大黄,再以文火煎煮 30 min,浓缩至 150 ml,放入棕色瓶内置 4℃ 冷藏箱中备用。

1.3 给药方案 治疗组:每日分两个时间点(7:00, 19:00)给予中药肝豆汤,按 $0.2 \text{ ml} \cdot 10 \text{ g}^{-1} \cdot \text{次}^{-1}$ 灌胃给药,连续 2 月(治疗 3 月龄组)、连续 4 月(治疗 5 月龄组);模型组:每日分两次给予生理盐水,按 $0.2 \text{ ml} \cdot 10 \text{ g}^{-1} \cdot \text{次}^{-1}$ 灌胃,连续 2 月(模型 3 月龄组)、连续 4 月(模型 5 月龄组);对照组:仅常规饲养

观察,不做药物处理。

1.4 微量元素的检测 组织处理采用硝酸消融,配制铜、锌、铁标准液,微量元素检测采用原子吸收分光光度法。称取 tx 小鼠肝组织 200 mg,剪碎成糊状,放入 10 ml 玻璃消融比色管中,加浓硝酸 5 ml 密闭避光消解过夜,至组织完全消解,溶液呈黄色澄清透明,加纯净水定容至 10 ml,过滤除去消解残渣,滤液 3 000 转/min 离心 5 min 送检,检测结果换算为湿重比例。

1.5 ATP7B 蛋白的检测 模型组分别在入组时(治疗前对照)、3 月龄(入组 2 月)和 5 月龄(入组 4 月)随机取 10 只,2 只行免疫组化检查,8 只行 Western blot 检测。治疗组在 3 月龄(入组 2 月)和 5 月龄(入组 4 月)参照模型组同样分配和取材。Western blot 一抗为兔抗 ATP7B 多克隆抗体(美国 Novus 公司),二抗为辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(英国 Abcam 公司);兔超敏二步法免疫组化检测试剂(PV-9001)(中杉金桥)。

1.6 统计学方法 采用 SPSS 20.0 统计软件。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,方差符合齐性的整体比较采用方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验;方差不齐组间比较采用 Kruskal-Wallis 非参数检验。检验水准取 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 各组小鼠肝脏铜、锌、铁含量检测结果 正常对照 DL 小鼠肝铜含量水平在 $4.79 \sim 6.10 \mu\text{g/g}$ 之间,与月龄等因素未表现出相关性。tx 小鼠模型组铜含量较对照组高出约 30 倍,模型组和治疗组铜含量在 5 月龄以内随月龄增加而逐渐升高(P 均 < 0.01)。治疗组铜含量较同月龄对照组亦明显升高(P 均 < 0.01),但较同月龄模型组下降(P 均 < 0.01)。同样,模型组和治疗组锌的含量在 5 月龄以内随月龄增加有逐渐升高趋势。模型组锌含量较正常对照组升高,但与治疗组差异无统计学意义,同时治疗组较模型组锌含量升高与铜含量降低表现出方向一致性,但并不呈现线性相关。模型组铁含量较对照组偏高,治疗组较同月龄模型组铁含量下降($P < 0.01$, $P <$

0.05)。见表 1。

2.2 各组 tx 小鼠肝脏 ATP7B 蛋白免疫组化检测结果 tx 小鼠肝脏免疫组化检测可见 ATP7B 蛋白在各组中均有少量黄褐色表达,部位主要位于细胞质(图 1 箭头所示为表达较明显处),但各组表达数量不多,色泽较淡。其中模型 3 月龄组、治疗 3 月龄、治疗 5 月龄组表达相对明显。

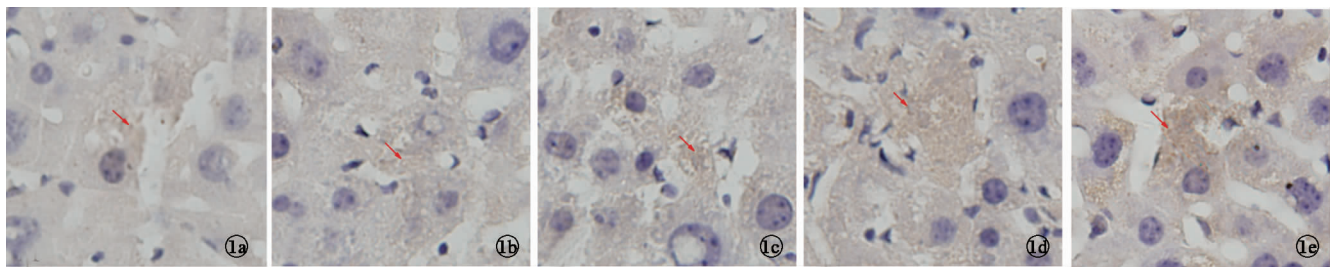
2.3 各组 tx 小鼠肝脏 ATP7B 蛋白 Western blot 实验结果 Western blot 摄片所得图像通过 ImageJ2x 图像分析软件分析,得出各组指标表达灰度值,再以各目的指标灰度值除以对应标本的 β -Actin(内参)灰度值,获得各指标的校正值。结果显示,治疗组 3 月、5 月龄的 ATP7B 蛋白表达水平明显高于模型组同月龄,且均高于模型组 1 月龄(P 均 < 0.05),见图 2、表 2。

表 1 各组 tx 小鼠肝脏铜、锌、铁含量检测结果

($\mu\text{g/g}$, $\bar{x} \pm s$)(湿重)

组别	只数	铜	锌	铁
对照组				
1 月	8	4.79 \pm 0.93	41.67 \pm 10.73	76.23 \pm 10.32
3 月	8	6.10 \pm 0.88	46.80 \pm 16.61	57.96 \pm 2.83
5 月	8	4.78 \pm 0.66	38.12 \pm 1.90	66.10 \pm 10.53
模型组				
1 月	8	109.32 \pm 12.50 ^{aa}	44.98 \pm 3.52	76.75 \pm 14.81
3 月	8	145.93 \pm 20.50 ^{aa}	53.02 \pm 12.26	104.33 \pm 42.58 ^{aa}
5 月	8	158.88 \pm 20.88 ^{aa}	54.33 \pm 5.73 ^a	74.10 \pm 14.56
治疗组				
3 月	8	115.87 \pm 20.74 ^{aabb}	57.85 \pm 8.20 ^a	56.48 \pm 4.79 ^{bb}
5 月	8	127.01 \pm 22.28 ^{aabb}	58.37 \pm 10.37 ^a	66.06 \pm 16.43 ^b

注:与对照组同月龄比较,^a $P < 0.05$,^{aa} $P < 0.01$;与模型组同月龄比较,^b $P < 0.05$,^{bb} $P < 0.01$ 。



注:1a:模型 1 月龄组;1b:模型 3 月龄组;1c:模型 5 月龄组;1d:肝豆汤治疗 3 月龄组;1e:肝豆汤治疗 5 月龄组。

图 1 各组 tx 小鼠肝脏 ATP7B 蛋白表达(免疫组化, $\times 400$)

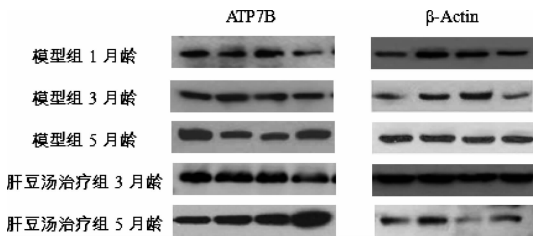


图 2 Western blot 方法检测各组 tx 小鼠肝脏 ATP7B 蛋白表达情况

表 2 模型组和治疗组 tx 小鼠肝脏 ATP7B 蛋白表达灰度值 ($\bar{x} \pm s$)

时间	只数	模型组	治疗组
1 月	8	0.57 \pm 0.12	-
3 月	8	0.61 \pm 0.16	0.77 \pm 0.11 ^{ab}
5 月	8	0.62 \pm 0.12	0.76 \pm 0.08 ^{ab}

注:与模型 1 月龄组比较,^a $P < 0.05$;与同月龄模型组比较,^b $P < 0.05$ 。

3 讨论

本研究以 tx 小鼠为 WD 模型,发现模型 1 月组、模型 3 月组、模型 5 月组与同月龄对照组比较铜含量明显升高,相差约 30 倍,5 月龄差异最明显。模型组间肝铜水平随月龄增加逐渐升高。本模型组中未进

行 4 月龄 tx 小鼠检测,但模型组铜含量最高值出现在 5 月龄,正常组铜最高值出现在 3 月龄,与陈曦等^[5]研究发现 tx 小鼠肝铜在 4 月龄时达到高峰相一致。模型组间肝锌水平随月龄增加而逐渐升高,与铜升高表现出一致性,说明 tx 小鼠在铜升高同时继发锌升高,但升高幅度差异不如铜明显。原因可能与组织细胞内富铜状态下部分铜伴侣蛋白表达增强,可能在结合更多铜的同时,也增加对锌等其他元素的结合,导致锌等元素含量继发升高^[6-7]。模型组锌含量的升高,可能作为铜升高的继发结果,但治疗组铜含量较模型组明显下降的情况下,锌含量较模型组有所升高,但无统计学差异。提示肝豆汤在显著降低肝细胞内铜含量的同时可能有益于提升锌含量,有待进一步研究证实。锌含量的提高可以竞争性降低铜含量,但治疗组锌含量提高与铜含量降低不成线性关系,可见肝豆汤提高细胞锌含量可能是其调控铜水平的机制之一,但同时应该存在其他更为有效的铜调控途径。

本研究发现模型组肝铁水平较同月龄对照组升高,在模型 3 月龄时最显著,说明 tx 小鼠和 WD 患者一样,在铜代谢异常同时存在铁代谢异常。既往研究

发现,WD 患者在铜代谢障碍同时,由于铜蓝蛋白合成障碍,导致由铜蓝蛋白动员的铁代谢障碍,表现出组织铁沉积,而可利用的外周血铁含量下降^[8-10]。近年研究发现,WD 患者铁代谢的异常可能也与临床表现相关^[11]。肝豆汤在一定程度上可以降低 tx 小鼠肝细胞铁含量,参与纠正 tx 小鼠铁代谢的异常。

细胞内铜排泄是将细胞内多余的铜排出细胞外,这是细胞内铜稳态调控的重要环节。ATP7B 蛋白是肝细胞铜排泄的主要途径,其结合细胞内多余的铜,通过囊泡形式转移至细胞膜,然后释放至细胞外,达到排泄铜的作用^[12-13]。WD 患者病变原因也是 ATP7B 基因病变导致 ATP7B 蛋白功能障碍,不能将细胞内多余铜有效转移,从而形成铜细胞内过度蓄积,引起细胞损伤或凋亡,导致组织器官功能障碍和损害,产生相应临床症状^[14-15]。如果肝豆汤能够调整 ATP7B 蛋白的表达或功能,将可以通过此途径调控铜的排泄,而达到调控细胞内铜稳态的目的。本研究结果显示,模型组中 ATP7B 随月龄增加而 ATP7B 蛋白表达呈逐渐上升趋势,这与肝铜含量检测结果一致,说明 ATP7B 蛋白可能感应细胞铜变化,随铜含量升高而表达增强。同时肝豆汤治疗组 tx 小鼠肝组织中 ATP7B 蛋白含量较同月龄模型组小鼠表达上升,差异均有统计学意义,提示肝豆汤可影响肝组织中 ATP7B 的表达。

综上所述,本研究显示肝豆汤可以降低 tx 小鼠肝脏细胞内铜含量,同时升高锌含量,降低铁含量;肝豆汤可上调肝组织中 ATP7B 蛋白表达,从而促进过量铜离子从胆汁中排出,减少铜的蓄积,降低肝细胞内铜的含量。

参考文献

[1] de Bie P, Muller P, Wijmenga C, et al. Molecular pathogenesis of Wilson and Menkes disease: correlation of mutations with molecular defects and disease phenotypes [J]. *J Med Genet*, 2007, 44(11): 673-688.

- [2] Das SK, Ray K. Wilson's disease: an update [J]. *Nat Clin Pract Neurol*, 2006, 2(9): 482-493.
- [3] Theophilos MB, Cox DW, Mercer JF. The toxic milk mouse is a murine model of Wilson disease [J]. *Human Mol Genet*, 1996, 5(10): 1619-1624.
- [4] 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.
- [5] 陈曦, 梁秀龄, 汤其强, 等. 1~6 月龄 TX 小鼠铜代谢和肝损害情况研究 [J]. *中山大学学报 (医学科学版)*, 2005, 26(3): 253-256.
- [6] Chandhok G, Schmitt N, Sauer V, et al. The effect of zinc and D-penicillamine in a stable human hepatoma ATP7B knockout cell line [J]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e98809.
- [7] Brewer GJ, Askari FK. Wilson's disease: clinical management and therapy [J]. *J Hepatol*, 2005, 42 Suppl(1): S13-21.
- [8] Litwin T, Gromadzka G, Czlonkowska A. Wilson's disease: does iron metabolism impact phenotypic presentation? [J]. *Liver Int*, 2012, 32(5): 869-870.
- [9] Pfeiffenberger J, Gotthardt DN, Herrmann T, et al. Iron metabolism and the role of HFE gene polymorphisms in Wilson disease [J]. *Liver Int*, 2012, 32(1): 165-170.
- [10] Litwin T, Gromadzka G, Czlonkowska A. Gender differences in Wilson's disease [J]. *J Neurol Sci*, 2012, 312(1-2): 31-35.
- [11] 徐文, 杨任民. 肝豆状核变性的铁代谢研究 [J]. *安徽中医学院学报*, 2009, 28(1): 62-64.
- [12] La Fontaine S, Ackland ML, Mercer JF. Mammalian copper-transporting P-type ATPases, ATP7A and ATP7B; emerging roles [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2010, 42(2): 206-209.
- [13] La Fontaine S, Mercer JF. Trafficking of the copper-ATPases, ATP7A and ATP7B; role in copper homeostasis [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2007, 463(2): 149-167.
- [14] Braiterman LT, Murthy A, Jaya-Ranthan S, et al. Distinct phenotype of a Wilson disease mutation reveals a novel trafficking determinant in the copper transporter ATP7B [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(14): E1364-E1373.
- [15] Lutsenko S, Gupta A, Burkhead JL, et al. Cellular multitasking: the dual role of human Cu-ATPases in cofactor delivery and intracellular copper balance [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2008, 476(1): 22-32.

收稿日期: 2014-11-20 修回日期: 2015-01-04 编辑: 王国品