

肝豆汤对 Wilson 病模型 TX 小鼠肝细胞内铜代谢通路的分子调控机制

董健健, 韩咏竹, 程楠*

(安徽中医药大学神经病学研究所附属医院, 合肥 230061)

[摘要] **目的:**探讨肝豆汤调控毒牛奶(TX)小鼠肝细胞内铜转运通路的分子靶点并观察其相应的调控机制。**方法:**20 只家兔适应性喂养 3 d 后,随机分为空白组(生理盐水)和肝豆汤组($4.5 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$),每日 2 次 *ig*,连续 10 d,制得含药血清;采用 2 步灌注法分离提取 DL, TX 小鼠肝细胞,采用原子吸收法检测加含不同百分含量(5%, 10%, 15%, 20%)含肝豆汤兔血清作用 24 h 后,对 TX 小鼠肝细胞内微量元素的影响,另设空白组;蛋白质免疫印迹(Western blot)法检测经含肝豆汤兔血清作用后腺嘌呤核苷三磷酸 7b(adenosine triphosphate7b, ATP7b),抗氧化蛋白 1(anti-oxidant1, ATOX1),铜转运体 1(copper transporter1, CTR1),金属硫蛋白(metallothionein, MT),超氧化物歧化酶铜伴侣蛋白(copper chaperone of superoxide dismutase, CCS),细胞色素氧化酶 17(cytochrome-coxidase17, COX17)蛋白的表达。**结果:**与空白组比较,模型组 TX 小鼠肝细胞内铜含量升高,锌含量降低,铁含量升高,ATP7b, ATOX1, CCS, COX17 蛋白表达明显降低,CTR1, MT 蛋白表达显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,含肝豆汤兔血清可显著降低 TX 小鼠肝细胞内铜含量,增加锌含量,降低铁含量($P < 0.05$, $P < 0.01$);Western blot 检测结果显示,含肝豆汤兔血清可明显增加 ATP7b, ATOX1, CCS, COX17 蛋白表达($P < 0.05$, $P < 0.01$),降低 CTR1, MT 蛋白表达($P < 0.01$)。**结论:**肝豆汤可能是通过调控细胞内铜代谢相关蛋白,上调 ATP7b, ATOX1, CCS, COX17 蛋白表达,抑制 CTR1, MT 表达,从而发挥细胞内排铜作用。肝豆汤可通过多靶点、多途径调控铜代谢通路达到降低肝细胞内铜含量的治疗效果。

[关键词] Wilson 病; 肝豆汤; TX 小鼠; 铜代谢通路

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)24-0128-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016240128

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160929.0929.028.html>

[网络出版时间] 2016-09-29 9:29

Molecular Regulatory Mechanism of Gandou Decoction on Copper Metabolism Pathway in Hepatocytes of Wilson's Disease Model-TX Mice

DONG Jian-jian, HAN Yong-zhu, CHENG Nan*

(Department of Neurology, Neurological Research Hospital, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230061, China)

[Abstract] **Objective:** To detect the molecular target of copper transport pathway in hepatocytes of TX mice with Gandou decoction (GDD) treatment, and explore its corresponding regulatory metabolism. **Method:** Totally 20 rabbits were randomly divided into normal group (normal saline) and GDD group ($4.5 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) after adaptive feeding for 3 days. Treatment was given by *ig*, *bid*, for 10 days to obtain drug serum. Hepatocytes of DL and TX mice were isolated and extracted by 2 step perfusion method; atomic absorption method was used to detect the concentration of microelement in the hepatocytes of TX mice after treatment with rabbit serum containing different concentrations of GDD; and another blank group was set up. Western blot was used to detect the

[收稿日期] 20151105(022)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81473535, 81173212)

[第一作者] 董健健, 硕士, 医师, 从事神经系统遗传性疾病研究, Tel:13739261546, E-mail:592156801@qq.com

[通讯作者] *程楠, 博士, 副教授, 从事神经系统遗传性疾病研究, Tel:13865907810, E-mail:neurodoc120@163.com

expression levels of adenosine triphosphate7b (ATP7b), anti-oxidant1 (ATOX1), copper transporter1 (CTR1), metallothionein (MT), copper chaperone of superoxide dismutase (CCS), and cytochrome-coxidase17 (COX17) in the hepatocytes of TX mice after being treated with rabbit serum containing GDD. **Result:** As compared with blank group, the contents of copper and iron were increased; the content of zinc was reduced; the protein expression levels of ATP7b, ATOX1 CCS, COX17 were significantly reduced, and the protein expression levels of MT, CTR1 were significantly increased in hepatocytes of model group TX mice ($P < 0.01$). As compared with the model group, GDD could reduce the contents of copper and iron in the hepatocytes of TX mice, and increase the content of zinc in a dose-dependent manner ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Western blot results indicated that GDD could significantly increases the protein expression levels of ATP7b, ATOX1 CCS, COX17 ($P < 0.05$, $P < 0.01$) and decrease the protein expression levels of MT, CTR1 in the hepatocytes of TX mice ($P < 0.01$). **Conclusion:** GDD may increases the copper excretion in hepatocytes of TX mice by up-regulating the protein expression levels of ATP7b, ATOX1, CCS, COX17 and down-regulating the expression levels of CTR1 and MT. GDD could reduce copper contents in hepatocytes through a multi-target and multi-channel regulation of copper metabolism pathway.

[**Key words**] Wilson's disease; Gandou decoction; TX mice; copper metabolism pathway

肝豆状核变性又称 Wilson 病(Wilson's disease, WD),是一种常染色体隐性遗传铜代谢障碍性疾病^[1]。WD 患者因位于 13q14.3 的腺嘌呤核苷三磷酸 7b (ATP7b) 基因发生突变,出现铜蓝蛋白(ceruloplasmin, CP)合成障碍及铜在胆汁中的排泄障碍,并导致过量的铜在肝脏、脑、肾脏、角膜等组织脏器中沉积,患者可出现肝硬化、神经/精神症状、角膜 K-F 环等临床表现,严重者可危及生命^[2]。

WD 是少数可以治疗的神经遗传病之一,但以金属络合剂为主的治疗方法因毒副作用使许多患者不能耐受,严重影响本病患者的病情和预后^[3]。上世纪 70 年代以来,本课题单位独辟蹊径,从中医医学角度出发,对 WD 的中医病机、证候学、中药方剂治疗学等方面进行了系统研究:应用传统中医理论对 WD 患者进行辨证分型,将本病患者分为湿热内蕴、肝肾阴虚、气血两亏、痰蒙清窍、痰火扰心等证型^[4];根据 WD 患者多有口臭、流涎、舌红、苔黄腻、脉数、便干、溲赤等症,结合《内经》所云:“诸逆冲上,皆属于火”,“诸痉项强,皆属于湿”,认为本病系铜毒在体内积聚化热产湿,引起肝胆湿热、经脉淤滞,出现肝、脑损害等症状,创用清热解毒、通腑利湿治法以大黄、黄连、泽泻等组方肝豆汤治疗 WD 患者,使患者临床症状明显改善,好转率达到 84.1%^[5]。

为了明确肝豆汤产生临床疗效的原因,曾对肝豆汤治疗 WD 的疗效机制进行了初步研究,发现肝豆汤对 WD 患者有较为显著的尿排铜和胆汁排铜作用^[6-8],并发现含肝豆汤兔血清对培养的 WD 皮肤成纤维细胞模型和 WD 肝细胞模型有显著的细胞内

排铜和使细胞内锌含量增加作用^[9-10]。根据肝豆汤组分进行的拆方研究则发现各拆方组虽然可使 WD 肝细胞模型铜含量减低和锌含量增加,但其效果均明显低于全方组,且各组锌含量的增加程度与铜含量的减低程度并不成比例^[11]。这些研究虽然证明了肝豆汤组方的合理性、配伍的必要性和用药的准确性,但同时提示肝豆汤的排铜机制并非锌含量的增加所致。本课题在前期研究基础上进一步探讨肝豆汤对 WD 模型-TX 小鼠肝细胞内铜转运通路相关蛋白的调控作用,在分子水平初步阐明肝豆汤改善 WD 患者临床症状的疗效机制。

1 材料

1.1 细胞 7 对 TX 小鼠种鼠从美国 Jackson 实验中心引进,小鼠肝细胞通过原代方法分离培养所得。

1.2 药物及试剂 大黄、黄连、姜黄、金钱草、泽泻、三七均购自北京同仁堂药店安徽合肥分店,并经安徽中医药大学药学院金传山教授鉴定,均符合 2010 年版《中国药典》项下标准。按原方比例(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)称取药材,由安徽中医药大学神经病学研究所附属医院基础实验室采用水煎法制备中药液,放于 4 ℃ 保存。DMEM (美国 Gibco 公司,批号 1542677),胎牛血清(杭州四季青公司,141018);兔抗 ATP7b 多克隆抗体,小鼠抗抗氧化蛋白 1 (ATOX1)单克隆抗体,辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG (英国 Abcam 公司,批号分别为 GR97491-4, GR84288-2, GR15870-12);兔抗铜转运体 1 (CTR1)多克隆抗体,兔抗超氧化物歧化酶铜伴侣蛋白 (CCS)多克隆抗体(北京博奥森公司,批号分别为

20010185, YE0911W); 小鼠抗金属硫蛋白(MT) 单克隆抗体, 兔抗细胞色素氧化酶 17(COX17) 多克隆抗体(美国 Novus 公司, 批号分别为 06011020, 360884); 辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG(中杉金桥公司, 批号 96996); β -肌动蛋白(β -actin) 抗体(美国 Cell Signaling 公司, 批号 #4967); 胰岛素, 胶原母液, 四碘甲酸原氨酸及 IV 型胶原酶(美国 Sigma 公司, 批号分别为 15500, C9791, T1775, C-5138)。

1.3 仪器 MCO-175 型 CO₂ 培养箱(日本 Sanyo 公司), DHP-9602 型培养/干燥箱(上海一恒科技有限公司), CK2 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司), LD4-8 型水平低速离心机(北京医用离心机厂), SW-CJ-1F 型洁净工作台(苏净集团安泰公司), EIX50 型自动洗板机(美国 Bio-Tek 公司), 培养瓶、培养皿及 96 孔培养板(美国 Corning 公司)。

2 方法

2.1 含药血清制备及保存 20 只家兔适应性喂养 3 d 后, 随机分为 2 组, 分别为空白组和肝豆汤组, 每组各 10 只。空白组给以生理盐水 4.5 g·kg⁻¹·d⁻¹ ig, 肝豆汤组给予中药浓煎液 4.5 g·kg⁻¹·d⁻¹ ig(含生药量 2.2 g·mL⁻¹), ig, 每日 2 次, 连续 10 d。末次 ig 禁食 12 h 后, 25% 乌拉坦(5 mL·kg⁻¹) 麻醉, 无菌条件下腹主动脉采血, 室温静置 2 h, 让血清充分析出, 3 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 吸取上层血清以 4 °C, 5 000 ×g 离心 30 min 后再取上清液, 然后 0.22 μm 滤器过滤除菌后置 -20 °C 下保存备用。

2.2 细胞培养 运用两步灌注法分离提取 DL, TX 小鼠肝细胞, 培养基为 DMEM(含 10% 胎牛血清、青霉素 100 U·mL⁻¹ 和链霉素 100 U·mL⁻¹, 2.0 g 的 NaHCO₃), 置于 37 °C 5% CO₂ 培养箱, 相对饱和湿度的条件下培养, 细胞呈单纯贴壁生长, 4 h 后给细胞更换培养基。

2.3 含药血清处理浓度、时间筛选 取对数生长期的 DL 小鼠及 TX 小鼠肝细胞, 弃原培养基, 磷酸盐缓冲液(PBS) 洗 2 遍, 加含不同百分含量(5%, 10%, 15%, 20%) 肝豆汤兔血清的 DMEM 作用 TX 小鼠肝细胞 3, 6, 12, 24, 48 h。弃 DMEM, PBS 洗 2 遍, 0.25% 胰酶 37 °C 消化 50 s, 加含 10% FBS 的 DMEM 终止消化, 1 800 r·min⁻¹ 离心 5 min。加 PBS 重悬, 置冰浴内, 超声细胞粉碎仪粉碎细胞, 得到细胞混悬液, 原子分光光度法检测细胞内铜含量, 实验重复 3 次。

相对铜含量 = 实验组铜含量 / 空白组铜含量

2.4 分组及药物处理 实验分别设空白组、模型组、肝豆汤给药组; 空白组为空白 DL 小鼠肝细胞, 用完全培养基培养, 模型组为 TX 小鼠肝细胞, 用 10% 空白兔血清培养, 肝豆汤给药组为 TX 小鼠肝细胞, 加含不同百分含量(5%, 10%, 15%, 20%) 肝豆汤兔血清的培养基继续培养。

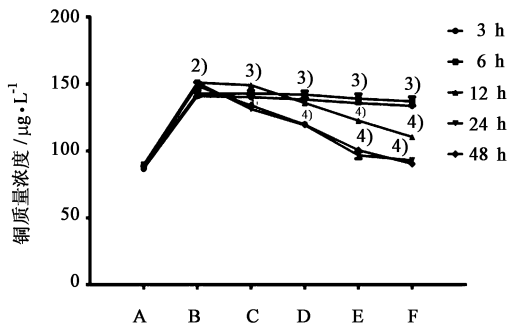
2.5 肝细胞内微量元素含量测定 取对数生长期的 DL 小鼠及 TX 小鼠肝细胞, 弃原培养基, PBS 洗 2 遍。空白组加含空白兔血清的培养基继续培养, 模型组加完全培养基继续培养, 肝豆汤加药组加含不同百分含量(5%, 10%, 15%, 20%) 肝豆汤兔血清的培养基继续培养, 24 h 后按 2.3 项方法采用原子吸收分光光度法检测肝细胞内铜、锌、铁含量。

2.6 蛋白质免疫印迹(Western blot)法检测细胞中 ATP7b, CTR1, ATOX1, MT 蛋白表达的变化 取对数生长期的 DL 小鼠及 TX 小鼠肝细胞, 按 2.4 项实验分组分别加含不同药物血清的培养基于 37 °C 培养箱中继续培养 24 h, 弃去原培养液, PBS 洗 2 遍, 消化收集细胞后裂解, 提取总蛋白, Bradford 法测定蛋白含量。取蛋白 20 μg 作电泳, 将蛋白样本转移至 NC 膜上。膜用 5% 脱脂奶粉封闭 4 h, TBST 洗 3 次, 每次 10 min 分别加入抗 ATP7b, CTR1 多克隆抗体, 抗 CTR1, MT 单克隆抗体, 4 °C 过夜。分别加入辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 或辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG, 脱色摇床摇 1.5 h 或 1 h, TBST 洗 3 次, 每次 10 min。以 β -肌动蛋白(β -actin) 作为内参。凝胶成像系统拍照, 并扫描分析各条带的光密度, 以 β -actin 的表达量为对照计算各组 ATP7b, CTR1, ATOX1, MT 的相对表达量。

2.7 统计学分析 采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间采用 *t* 检验, 以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 TX 小鼠肝细胞不同时间铜含量的影响 本实验采用原子分光光度法检测不同百分含量含肝豆汤兔血清作用于 TX 小鼠肝细胞不同时间点对肝细胞内铜含量的影响。结果表明, 含肝豆汤兔血清对 TX 小鼠肝细胞内铜含量的影响呈现一定的量效和时效关系。随着含肝豆汤兔血清作用剂量及作用时间的增加, TX 小鼠肝细胞内铜含量呈现显著下降的趋势。见图 1。15%, 20% 含肝豆汤兔血清作用 24 h 后 TX 小鼠肝细胞内铜含量下降至接近 DL 小鼠肝细胞内铜含量。因此, 选择 24 h 作为含肝豆汤



A. 空白组; B. 模型组; C. 5% 含肝豆汤兔血清组; D. 10% 含肝豆汤兔血清组; E. 15% 含肝豆汤兔血清组; F. 20% 含肝豆汤兔血清组 (图 2~4 同)。与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较³⁾ $P < 0.01$, ⁴⁾ $P < 0.05$ (表 1, 图 2~4 同)

图 1 含肝豆汤兔血清对 TX 小鼠肝细胞不同时间铜含量的影响
Fig. 1 Effect of rabbit serum with Gandou decoction on concentration of copper in hepatocytes of TX mice for different times

表 1 肝豆汤含药兔血清对 TX 小鼠肝细胞 24 h 后铜、锌、铁含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	含药血清/%	Cu	Zn	Fe
空白	-	85.33 ± 2.59	87.47 ± 2.13	73.66 ± 3.30
模型	-	152.07 ± 2.25 ²⁾	74.41 ± 3.60 ²⁾	127.89 ± 3.25 ²⁾
肝豆汤	5	132.42 ± 2.21 ⁴⁾	79.30 ± 1.03	113.92 ± 5.52 ³⁾
	10	112.47 ± 2.26 ⁴⁾	82.18 ± 1.37 ³⁾	101.74 ± 2.36 ⁴⁾
	15	97.04 ± 1.59 ⁴⁾	84.45 ± 1.08 ⁴⁾	86.59 ± 3.18 ⁴⁾
	20	88.01 ± 1.02 ⁴⁾	85.16 ± 0.92 ⁴⁾	79.51 ± 1.13 ⁴⁾

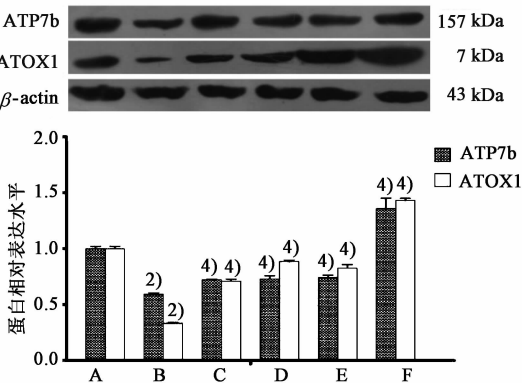


图 2 含肝豆汤兔血清对 TX 小鼠肝细胞内 ATP7b 及 ATOX1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 2 Effect of rabbit serum with Gandou decoction on expression of ATP7b and ATOX1 in hepatocytes of TX mouse ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

4 讨论

Ctr1 是由位于 9q31-q32 的 hCtr1 基因编码的含 190 个氨基酸残基的蛋白质,可特异性地将细胞外的 Cu⁺ 转运进入细胞内,是铜转运过程中最重要的运输工具,是铜进入细胞内进行代谢的前提条件。Ctr1 的表达受细胞内的铜离子浓度的影响,低浓度下 Ctr1

兔血清作用时间,并选取 5%,10%,15%,20% 的含肝豆汤兔血清作为实验药物浓度。

3.2 对 DL, TX 小鼠肝细胞内微量元素含量的影响

与空白组比较,模型组铜、铁含量显著升高、锌含量显著降低 ($P < 0.01$);与模型组比较,含肝豆汤兔血清作用于 TX 小鼠肝细胞 24 h 后,细胞内铜、铁含量明显降低,锌含量明显增加 ($P < 0.05, P < 0.01$),并呈浓度依赖性。见表 1。

3.4 对 TX 小鼠肝细胞内 ATP7b 及 ATOX1 蛋白表达的影响

与空白组比较,模型组 ATP7b, ATOX1, CCS, COX17 蛋白表达显著降低,CTR1, MT 蛋白表达显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,不同百分含量的含肝豆汤兔血清组 ATP7b, ATOX1, CCS, COX17 蛋白表达明显升高,CTR1, MT 蛋白表达明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见图 2~4。

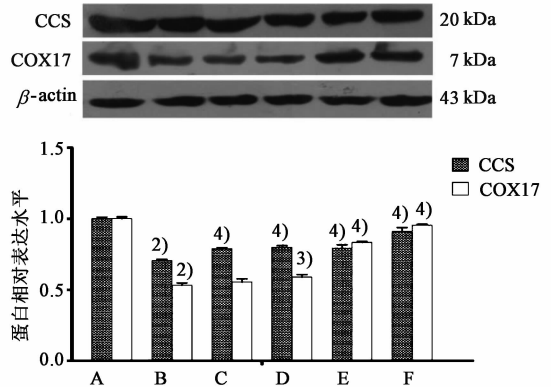


图 3 含肝豆汤兔血清对 TX 小鼠肝细胞内 CCS 及 COX17 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 3 Effect of rabbit serum with Gandou decoction on expression of CCS and COX17 in hepatocytes of TX mouse ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

的表达水平明显增高,在高浓度下其表达则受到抑制^[12-13]。实验中发现,含肝豆汤兔血清作用 TX 小鼠肝细胞 24 h 后, TX 小鼠肝细胞中 Ctr1 蛋白含量显著低于模型组,由此表明,肝豆汤可下调 TX 小鼠肝细胞中 Ctr1 蛋白表达水平,从而减少细胞对 Cu 的摄入,降低细胞内 Cu 水平,减少 Cu 对细胞的损害。

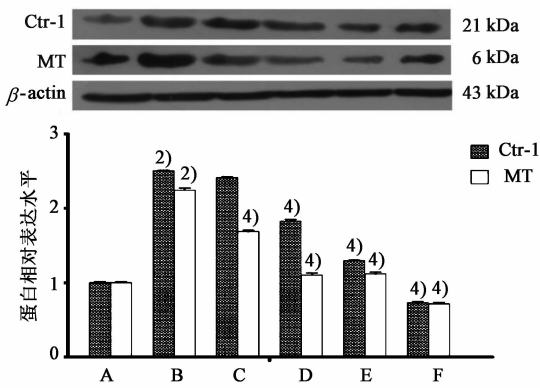


图 4 含肝豆汤兔血清对 TX 小鼠肝细胞内 Ctr1 及 MT 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 4 Effect of rabbit serum with Gandou decoction on expression of Ctr1 and MT in hepatocytes of TX mouse ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

2 个 ATOX1 单体与铜离子结合形成同源二聚体,利用 ATP 水解提供能量,以剂量依赖和可饱和的方式将铜转运到 ATP7A 或 ATP7b 的氨基末端^[14]。研究发现,Atx1 基因敲除的小鼠细胞中铜含量增加,铜依赖酶活性明显减低,同时研究发现 ATOX1 不仅作为铜伴侣蛋白转运铜离子,也在细胞水平上调节铜的合理分布起着关键作用^[15]。还有研究指出,ATOX1 可能是哺乳动物一种新的铜应答转录因子,提示 ATOX1 可能以一种新的方式参与体内铜含量的调节^[16]。通过实验笔者发现,模型组 TX 小鼠肝细胞内 ATOX1 蛋白表达较空白组显著降低,含肝豆汤兔血清作用 TX 小鼠肝细胞 24 h 后,细胞内 ATOX1 蛋白表达显著增加,并呈浓度依赖性。说明肝豆汤可增加肝细胞内 ATOX1 蛋白表达,以促进细胞内铜转运,增加铜的排除,并抵抗铜负荷引起的氧化损伤。

ATP7b 主要有 2 个功能,一是接受 ATOX1 传递而来的 Cu^+ 合成全铜蓝蛋白,一是在高铜环境的诱导下重新定位,促使所结合的 Cu^+ 从胆道排出^[17]。WD 患者则由于 ATP7b 基因突变导致 ATP7b 酶功能缺陷,肝细胞内 CP 合成和胆汁铜排泄障碍,引起血清 CP 水平减低和铜在肝脏、大脑基底节、角膜等组织脏器中的蓄积^[18]。由实验结果可知,含肝豆汤兔血清作用 TX 小鼠肝细胞 24 h 后,细胞中 ATP7b 含量较模型组小鼠明显上升,提示肝豆汤可上调 TX 小鼠肝细胞中 ATP7b 表达,从而促进过量铜离子的排出,减少铜的蓄积,降低肝细胞内铜的含量。

CCS 含 270 ~ 300 个氨基酸残基,以同源二聚体的形式将铜离子特异性地传递给 SOD1,能促进 SOD1 的歧化作用,保护细胞免遭氧化自由基损

害^[19]。CCS 有 3 个不同的铜结合、转运和结合 SOD1 功能的区域: N 端结构域 I,含有一个 MTCXXC 的金属结合模体,与 ATX1 高度同源,这个区域能结合铜并传递给 SOD1。II 区是 CCS 的核心区域,与 SOD1 的序列 50% 相似,是与 SOD1 发生作用的关键部位。III 区位于 C 端,是 CCS 的特异部位和功能必需基团,含有一个高度保守的 CXC (2 个 Cys 残基) 序列,在不同物种之间有高度的同源性。CXC 重复序列是 Cu^+ 的传递位点^[20]。CCS 对于维持细胞内铜稳态非常重要,细胞可根据环境铜量在转录和转录后水平调节 CCS 表达^[21]。

研究结果显示,含肝豆汤兔血清作用 TX 小鼠肝细胞 24 h 后,肝细胞内 CCS 表达水平较模型组小鼠均显著增高,表明了肝豆汤可上调 TX 小鼠肝细胞内 CCS 表达水平,从而降低 TX 小鼠肝内铜离子浓度,维持细胞内铜稳态,减少铜过量造成的氧化损伤,保护组织细胞。

COX17 对维持线粒体铜稳态有重要作用^[22]。线粒体进行氧化磷酸化和保护氧化应激反应时需要铜维持在一个稳定水平。线粒体呼吸电子传递链的 IV 中心酶复合体-细胞色素 C 氧化酶 (COX) 是一种铜依赖酶,需要铜作为辅助因子进行呼吸电子传递,它的两个亚基单位 COX1 和 COX2 分别有一个铜结合区,把铜传递给它们需要 COX17^[23]。COX17 缺失可以导致小鼠胚胎时死亡,COX17 基因敲除后细胞增殖下降,COX2 缺失,伴随 COX 参与呼吸链的活动下降^[24-25]。

由实验结果可知,模型组 TX 小鼠肝细胞内 COX17 蛋白表达显著低于空白组,含肝豆汤兔血清作用 TX 小鼠肝细胞 24 h 后,细胞内 COX17 蛋白表达显著增加,并呈浓度依赖性。说明肝豆汤可增加肝细胞内 COX17 蛋白表达,从而促进细胞内铜转运,维持线粒体内铜稳态,以进行氧化磷酸化和保护氧化应激反应。

MT 在铜代谢及铜毒性过程中起到重要作用。MT 不直接参与铜的摄取,而是起铜的储存和隔离游离铜毒性的作用。当胞质铜质量浓度上升时,MT 与其结合,以使胞质内铜质量浓度维持在合适水平,但 MT 只是起暂时储存作用^[26]。实验发现,模型组 TX 小鼠肝细胞内 MT 表达较空白组显著增加,含肝豆汤兔血清作用 TX 小鼠肝细胞 24 h 后,肝细胞内 MT 表达较模型组显著下降,说明肝豆汤可下调 TX 小鼠肝细胞内 MT 表达,降低肝细胞内铜含量,从而减轻 Cu-MT 复合物带来的氧化损伤。

研究结果证实,肝豆汤有显著的减低 TX 小鼠肝细胞铜含量作用,并有提升肝细胞锌含量,减低铁含量作用。其可能机制为上调 TX 小鼠肝细胞内 ATP7b, ATOX1, CCS, COX17 的表达,促进铜排出细胞外,并由胆汁排出,降低肝细胞内的铜含量,减轻铜负荷导致的氧化损伤。同时肝豆汤可下调 TX 小鼠肝细胞内 Ctr1, MT 的表达,从而减少铜摄入、降低细胞内铜沉积,降低肝细胞内铜含量。可见肝豆汤可通过多靶点、多途径调控铜代谢通路达到降低肝细胞内铜含量的治疗效果。肝豆汤可以作为治疗性药物应用于肝豆状核变性患者的治疗。

[参考文献]

[1] Ala A, Walker A P, Ashkan K, et al. Wilson's disease [J]. *Lancet*, 2007, 369(9559): 397-408.

[2] Schilsky M L. A century for progress in the diagnosis of Wilson disease [J]. *J Trace Elem Med Biol*, 2014, 28(4): 492-494.

[3] Walshe J M. Penicillamine, a new oral therapy for Wilson's disease [J]. *Am J Med*, 1956, 21(4): 487-495.

[4] 叶群荣,胡纪原,王共强,等. Wilson 病临床症状特征和中医证型分析 [J]. *安徽中医学院学报*, 2013, 32(4): 34-38.

[5] 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): 72-73.

[6] 胡文彬,杨任民. 肝豆片 I 号对肝豆状核变性患者铜生化及肝肾功能的影响 [J]. *中医杂志*, 1997, 38(7): 414-416.

[7] 胡文彬,杨任民. 肝豆片 I 号对肝豆状核变性患者胆汁微量元素的影响的前瞻性研究 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2001, 21(7): 507-509.

[8] 胡文彬,杨任民. 肝豆片 I 号对肝豆状核变性患者微量元素排泄的影响 [J]. *中国临床康复杂志*, 2003, 7(30): 4165.

[9] 汤其强,杨任民,韩咏竹,等. 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 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2000, 20(1): 37-39.

[10] 刘康永,韩咏竹,杨任民. 中药肝豆汤对遗传性肝豆状核变性患者铜锌代谢的影响 [J]. *现代康复*, 2001, 5(7): 49-50.

[11] 石元洪,洪永春,杨任民,等. 肝细胞体外培养对肝豆汤排铜作用的拆方研究 [J]. *陕西中医*, 2006, 26(9): 1145-1147.

[12] Ohrvik H, Thiele D J. How copper traverses cellular membranes through the mammalian copper transporter 1? [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2014, 1314(1): 32-41.

[13] Tsai C Y, Larson C A, Safaei R, et al. Molecular modulation of the copper and cisplatin transport function of CTR1 and its interaction with IRS-4 [J]. *Biochem*

Pharmacol, 2014, 90(4): 379-387.

[14] Xi Z, Guo W, Tian C, et al. Copper binding promotes the interaction of cisplatin with human copper chaperone Atox1 [J]. *Chem Commun (Camb)*, 2013, 49(95): 11197-11199.

[15] McRae R, Lai B, Fahrni C J. Copper redistribution in Atox1-deficient mouse fibroblast cells [J]. *J Biol Inorg Chem*, 2010, 15: 99-105.

[16] Muller P A, Klomp L W. ATOX1: A novel copper-responsive transcription factor in mammals? [J]. *Int J Biochem Cell B*, 2009, 41(6): 1233-1236.

[17] Inesi G, Pilankatta R, Tadini-Buoninsegni F. Biochemical characterization of P-type copper ATPases [J]. *Biochem J*, 2014, 463(2): 167-176.

[18] Nyasae L K, Schell M J, Hubbard A L. Copper directs ATP7b to the apical domain of Hepatic cells via basolateral endosomes [J]. *Traffic*, 2014, 15(12): 1344-1365.

[19] Huppke P, Brendel C, Korenke G C, et al. Molecular and biochemical characterization of a unique mutation in CCS, the human copper chaperone to superoxide dismutase [J]. *Hum Mutat*, 2012, 33(8): 1207-1215.

[20] Araya M, Andrews M, Pizarro F, et al. Chaperones CCS, ATOX and COXIV responses to copper supplementation in healthy adults [J]. *Biomaterials*, 2012, 25(2): 383-391.

[21] Araya M, Gutiérrez R, Arredondo M. CCS mRNA transcripts and serum CCS protein as copper marker in adults suffering inflammatory processes [J]. *Biomaterials*, 2014, 27(4): 645-652.

[22] Banci L, Bertini I, Cefaro C, et al. Functional role of two interhelical disulfide bonds in human Cox17 protein from a structural perspective [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(39): 34382-34390.

[23] Palumaa P. Copper chaperones: The concept of conformational control in the metabolism of copper [J]. *FEBS Lett*, 2013, 587(13): 1902-1910.

[24] Oswald C, Krause-Buchholz U, Rödel G. Knockdown of human COX17 affects assembly and supramolecular organization of cytochrome c oxidase [J]. *J Mol Biol*, 2009, 389(3): 470-479.

[25] Remacle C, Coosemans N, Jans F, et al. Knock-down of the COX3 and COX17 gene expression of cytochrome c oxidase in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Plant Mol Biol*, 2010, 74(3): 223-233.

[26] Zhang J, Wang J, Gui T, et al. A copper-induced metallothionein gene from *Exopalaemon carinicauda* and its response to heavy metal ions [J]. *Int J Biol Macromol*, 2014, 70(8): 246-250.

[责任编辑 周冰冰]