

· 肝豆汤治疗 Wilson 病的实验研究专题 ·

[编者按] Wilson 病(Wilson disease, WD)是一种多于青少年期起病的常染色体隐性遗传铜代谢障碍性疾病,是目前少数可以治疗的神经系统遗传疾病之一。在我国,WD 的患病率明显高于欧美人群,因而备受临床神经科医师的高度关注。目前以青霉胺(pencillamine, PCA)为代表的重金属离子络合剂驱铜治疗虽显示了较好的疗效并明显改善了 WD 的预后,但有相当一部分患者不能耐受 PCA 等的不良反应,使其治疗范围和效果受限。安徽中医药大学神经病学研究所附属医院杨任民教授团队独辟蹊径,根据对 WD 中医病机、证候学、中药方剂治疗学等方面的研究结果,创用中药组方肝豆汤治疗 WD 患者,获得了良好的临床疗效,为中医药防治神经遗传病提供了成功的范例。在此基础上,本团队基于 WD 研究的最新进展,从铜代谢的分子通路,分泌型糖蛋白(Wnt)/ β -连环蛋白(β -catenin)通路和丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)通路等调控肝损伤的细胞信号通路,细胞外信号调节激酶(ERK)通路和肝激酶 B₁(LKB₁)/腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)通路等调控神经元损伤的细胞信号通路等角度对肝豆汤治疗 WD 的疗效机制进行了系列研究,结果发现中药组方肝豆汤能多层次、多靶点调控铜代谢障碍所致的 WD 肝细胞和神经元细胞的凋亡、自噬等细胞程序性死亡过程,从而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,并为肝豆汤组分的进一步优化提供了依据,这些研究成果对于进一步揭示中药复方的作用机制,提高 WD 的临床疗效具有重要意义。

中药肝豆汤治疗 Wilson 病疗效机制的研究进展

程楠, 韩咏竹, 杨任民*

(安徽中医药大学神经病学研究所附属医院, 合肥 230061)

[摘要] Wilson 病(WD)是一种以铜代谢障碍为生化特征的可治性神经遗传病,目前以青霉胺(PCA)为代表的金属络合剂驱铜治疗等治疗方法存在一定的局限性,使其治疗范围和效果受到限制,基因治疗尚处于实验室研究阶段,走向临床尚需时日。笔者等在现代医学对 WD 认识的基础上,根据对 WD 中医病机、证候学、中药方剂治疗学等方面的研究结果,创用中药组方肝豆汤治疗 WD 患者,获得了良好的临床疗效。基于此,笔者等在多个国家自然科学基金项目的资助下,从铜代谢的分子通路,Wnt/ β -catenin 通路和丝裂原激活的蛋白激酶(MAPK)通路等调控肝损伤的细胞信号通路,细胞外信号调节激酶(ERK)通路和肝激酶 B₁(LKB₁)/腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)通路等调控神经元损伤的细胞信号通路等角度对肝豆汤治疗 WD 的疗效机制进行了系列研究,结果发现中药组方肝豆汤能多层次、多靶点调控铜代谢障碍所致的 WD 肝细胞和神经元细胞的凋亡、自噬等细胞程序性死亡过程,并通过 TX 小鼠等 WD 的动物模型验证了上述实验结果,从而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,并为肝豆汤组分的进一步优化提供了依据。文章最后对肝豆汤治疗 WD 疗效机制的未来研究方向提出了一些设想和可行性建议。

[关键词] Wilson 病; 铜代谢; 肝豆汤; 细胞信号通路; 细胞程序性死亡

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2019)07-0049-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20190707

Research Progress of Therapeutic Mechanism of Gandou Decoction in Treatment of Wilson's Disease

CHENG Nan, HAN Yong-zhu, YANG Ren-min*

(Hospital Affiliated to Neurological Institute, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230061, China)

[Abstract] Wilson disease (WD) is a treatable neurological inherited disorder characterized by copper

[收稿日期] 20181022(019)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81072738, 81173212, 81573954, 81673948)

[第一作者] 程楠, 博士, 副教授, 副主任医师, 从事神经遗传病研究, E-mail: azychengnan@163.com

[通信作者] * 杨任民, 教授, 主任医师, 从事神经遗传病研究, Tel: 0551-62816159, E-mail: yrm724120@sina.com

metabolism impairment. Metal chelating drugs, such as penicillamine, have been used to treat WD for decades, is exposing its limitations of effect and utilize sphere. Genetic therapy was considered as the most potential way of curing WD, is still can only be achieved in the laboratory, which have massive problems to solve before its clinical utilization. Based on this, we started to research the curative mechanism of traditional Chinese medicine (TCM) donated by national natural science fund project funding, found that TCM formula Gandou decoction regulate the metabolic disorders caused by liver cells and neurons apoptosis, autophagy, such as programmed cell death, from the molecular pathways of copper metabolism, Wnt/ β -catenin pathway and mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways regulating liver damage such as cell signaling pathways, extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway and liver kinase B₁ (LKB₁) /adenosine monophosphate activated protein kinase (AMPK) pathway and the cell signaling pathway of neuronal damage. The above experimental results were verified by TX mice, a reliable WD animal models. This paper aimed to systematically review the research of GDD therapeutic mechanisms from the sight of programmed cell death, including apoptosis and autophagy, and provided theoretical for formula optimization. In addition, we elaborated some assumptions and feasible advice for the further research of GDD therapeutic mechanism.

[**Key words**] Wilson's disease (WD); copper metabolism; Gandou decoction; cellular signal pathway; programmed cell death (PCD)

肝豆状核变性(HLD)又称 Wilson 病(WD),因英国神经病学家 Kinnier Wilson 于 1912 年首次详细描述而得名^[1]。WD 是位于人染色体 13q14.3 的 P 型铜转运 ATP 酶(ATP7B)基因突变所致的常染色体隐性遗传铜代谢障碍性疾病^[2-4],由于 ATP7B 蛋白的功能缺陷导致铜离子的跨膜转运障碍,过量的铜蓄积于肝脏、大脑和角膜等部位并引起相应组织脏器的损伤,WD 患者可出现急慢性肝炎、肝硬化、神经/精神症状和角膜 K-F 环等临床症状和体征,大多于 5~35 岁起病^[5-6]。

WD 在全球各地区、各种族人群中均有报道,其中欧美白种人 WD 的患病率约 1/3 万,基因频率约 1/90^[7]。在我国,笔者等进行的 WD 流行病学研究结果表明,中国人 WD 的患病率约为 5.87/10 万,明显高于欧美人群^[8]。随着分子诊断技术的飞速发展,众多 WD 患者在发病早期甚至症状前期获得确诊^[9],WD 的防治正逐渐成为我国人口与健康领域被受关注的重要科学问题和社会问题^[10]。

由于青霉胺(PCA)等重金属离子络合剂和硫酸锌/葡萄糖酸锌等锌剂的临床应用,WD 的预后已得到根本性改善,是人类孟德尔遗传在线(OMIM)数据库收录的数千种单基因遗传病中少数可以取得较好疗效的疾病病种^[11]。但这些方法均为对症治疗,且有相当一部分患者不能耐受 PCA 等的不良反应,使其治疗范围和效果受到限制^[12-14]。以基因工程改造的含人 ATP7B 基因的病毒载体在 WD 动物模型中进行的基因治疗研究虽然显示了较好的应用

前景^[15-16],但走向临床尚需时日。因此,寻找更加高效、经济和安全的 WD 治疗方法的努力从未停歇^[6]。

自 20 世纪 70 年代以来,笔者等基于现代医学对 WD 的认识基础,从祖国医学角度出发,对 WD 的中医病机、证候学、中药方剂治疗学等方面进行了较为系统的研究: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^[17];根据 WD 患者多有口臭、流涎、舌红、苔黄腻、脉数、便干、溲赤等表现,结合《黄帝内经》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、经脉瘀滞,出现肝、脑损害等症状,创用采取清热解毒、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%^[18];依据肝豆汤组分,应用现代中医药制剂技术制成的肝豆片,经长期临床观察,取得了与肝豆汤同等的疗效^[19-20];临床研究发现,肝豆汤(片)对 WD 患者有较为显著的尿排铜和胆汁排铜作用^[21-23]。在此基础上,笔者等在多个国家自然科学基金项目的资助下,对肝豆汤(片)治疗 WD 的疗效机制进行了系列研究,取得了一定的成果,现小结如下。

1 基于铜代谢通路的肝豆汤疗效的分子机制研究

虽然铜代谢的具体机制尚未完全阐明,但随着 WD 基因的克隆以及对 ATP7B 蛋白等多种铜代谢相关蛋白功能的深入研究,人们对铜代谢机制的了

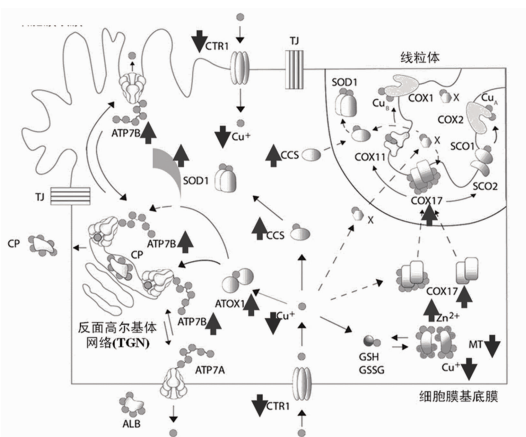
解有了长足进步。研究发现,食物中的铜在肠黏膜经高亲和力铜转运体 1(hCTR1)等载体蛋白介导进入肠上皮细胞,然后在另一种铜转运 ATP 酶(ATP7A)的作用下转运至门静脉系统,大部分被肝细胞摄取^[24]。在肝细胞内,位于反面高尔基网络(TGN)的 ATP7B 蛋白则将摄入的铜离子与铜蓝蛋白前体蛋白结合,形成具有活性的全铜蓝蛋白释放入血,为组织细胞提供可利用的铜^[25-26],而位于胆管膜侧的 ATP7B 蛋白可将肝细胞中的铜离子跨膜转运出细胞并随胆汁排出^[27]。研究还发现,细胞内的铜离子可与细胞色素氧化酶 17(COX17)和超氧化物歧化酶铜伴侣蛋白(CCS)等铜伴侣蛋白结合,并被分别转运至线粒体和细胞浆,参与能量代谢和氧化还原反应等生物体必需的生理活动^[28-29]。此外,细胞内的铜离子还可与一种名为抗氧化蛋白 1(ATOX1)的铜伴侣蛋白结合,在 TGN 由 ATP7B 蛋白转运出细胞^[30]。由此可知,细胞内存在着以 ATP7B 蛋白为核心,由 hCTR1, ATP7A, ATP7B, COX17, CCS 和 ATOX1 等铜转运蛋白和铜伴侣蛋白组成的铜代谢通路,调节并维持铜的稳态平衡(图 1)。ATP7B 基因突变可导致 WD 患者铜蓝蛋白的合成缺陷以及胆汁铜的排泄障碍,引起细胞内铜稳态的失衡,过量的铜离子在肝、脑等脏器中沉积而发病,而 ATP7A 基因突变导致的 Menkes 病(MNK)则可出现肠道中铜的吸收障碍而发病^[31]。

铜含量较对照组(DL 小鼠原代培养的肝细胞)显著升高、锌含量显著降低,ATP7B, ATOX1, CCS 和 COX17 的表达水平明显降低,而 CTR1, MT 的表达水平显著升高;与模型组比较,含肝豆汤兔血清培养的 TX 小鼠肝细胞内铜含量显著降低、锌含量显著增高,ATP7B, ATOX1, CCS 和 COX17 的表达水平增高,而 CTR1, MT 的表达水平降低^[32]。该研究证实了 TX 小鼠由于 ATP7B 基因突变导致肝细胞 ATP7B 蛋白功能障碍和铜代谢紊乱,引起 ATOX1, CCS 和 COX17 等与能量代谢相关的铜伴侣蛋白的异常表达,而肝豆汤能通过调控铜代谢通路的相关蛋白,在一定程度上纠正铜代谢的异常(图 1),因此具有改善 WD 患者症状的疗效。以肝豆汤灌服治疗 TX 小鼠的体内实验研究则进一步证实了上述研究结果^[33-34]。

对 ATP7B 蛋白细胞内定位的研究发现^[35],在低铜环境下,肝细胞内的野生型 ATP7B 蛋白主要定位于 TGN;增加细胞内铜离子的浓度可使 ATP7B 蛋白逐渐迁移至细胞质囊泡;降低细胞内铜离子的浓度,位于细胞质囊泡的 ATP7B 蛋白又重新迁移回 TGN。Forbes 等^[36]对 ATP7B 突变蛋白的研究则发现,ATP7B 突变蛋白存在亚细胞水平的功能定位障碍,或不能定位于 TGN,或出现 TGN-细胞质囊泡的迁移障碍,由此导致铜离子的细胞跨膜转运功能障碍。

笔者等前期采用蛋白免疫印迹技术检测到 WD 患者肝细胞内的 ATP7B 蛋白表达异常,并发现 WD 患者肝细胞各亚细胞组分中的铜含量均显著高于正常对照者,推测可能系 ATP7B 突变蛋白的亚细胞功能定位障碍所致^[37-38]。笔者等进一步的研究发现^[39],DL 小鼠肝细胞的 ATP7B 蛋白位于 TGN,高铜环境下则转运至顶端膜区,去除高铜环境则重新迁移至 TGN;TX 小鼠肝细胞内的 ATP7B 突变蛋白不能定位于 TGN 及顶端膜区,去除高铜环境后,ATP7B 蛋白也不能迁移至 TGN;以含肝豆汤兔血清培养的 TX 小鼠肝细胞内 ATP7B 蛋白能部分定位于 TGN。该研究证实了 ATP7B 突变蛋白可出现亚细胞水平的功能定位障碍,肝豆汤可有效改善 TX 小鼠肝细胞内 ATP7B 蛋白的亚细胞功能定位障碍,进而发挥细胞内排铜作用,改善 WD 的临床症状。

笔者的研究初步表明,肝豆汤可多靶点、多途径调控细胞内铜代谢通路的铜转运相关蛋白,从而达到降低肝细胞内铜含量的治疗效果。但肝豆汤调控细胞内铜代谢通路的具体机制(尤其是对 ATP7B



↑ 表达上调; ↓ 表达下调(图 2,3 同)
图 1 细胞的铜代谢通路和肝豆汤对铜代谢通路的调控环节(修改自 Llanos et al^[28])
Fig.1 Regulation of copper metabolism pathway by cell and GDD (Llanos et al^[28])

笔者等基于目前铜代谢的研究进展,以 WD 动物模型 TX 小鼠(DL 小鼠 ATP7B 基因自然突变品系)为研究对象,发现原代培养的 TX 小鼠肝细胞内

蛋白亚细胞功能定位的影响机制)尚需进一步的研究。

2 基于 Wnt/ β -连环蛋白(β -catenin)通路和丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)通路的肝豆汤对 WD 肝损伤的疗效机制研究

由于 ATP7B 蛋白主要在肝组织中表达,其功能障碍导致铜离子首先在肝细胞内异常蓄积,因此肝脏既是 WD 的原始缺陷器官,又是 WD 病理损伤的主要靶器官^[5-6]。胡纪源等^[40]观察了 1 200 例 WD 患者的腹部肝脏超声检查结果,发现无论是以肝损害为主的肝型患者还是以神经系统症状为主的脑型患者均存在肝脏声像图的异常改变,即使无临床表现的 WD 症状前期患者也不例外。因此,明确铜对肝损伤的机制及其治疗靶点,是 WD 治疗所面临的重要问题。

2.1 基于 Wnt/ β -catenin 通路的肝豆汤对 WD 肝细胞模型的疗效机制研究

近年来的研究证明,Wnt/ β -catenin 信号通路在肝细胞的生长、发育和代谢等方面发挥重要作用,各种原因导致该通路的异常激活与多种肝脏疾病的发病密切相关^[41-42]。基于此,笔者等以高铜孵育的 BRL-3A(大鼠肝细胞株)作为 WD 的肝损害细胞模型,发现肝豆汤含药兔血清可使高铜孵育的 BRL-3A 细胞乳酸脱氢酶(LDH)漏出率和活性氧(ROS)水平显著降低、线粒体膜电位(MMP)显著上升,并可上调 Wnt 通路 β -catenin,磷酸化糖原合成激酶 3β (p-GSK3 β),原癌基因(c-Myc)等蛋白的表达水平,而 GSK3 β ,蓬乱蛋白 3(Dshvelled3),DKK1 蛋白的表达水平明显降低,提示肝豆汤可激活 Wnt 通路,调控 Wnt 通路相关蛋白的表达,降低细胞内氧化应激水平,从而减轻铜对 WD 肝细胞的损害^[43-45]。

2.2 基于 MAPK 通路的肝豆汤对 TX 小鼠肝损伤的疗效机制研究

研究发现,高铜可激活肝细胞的 MAPK 细胞转导信号通路,引起细胞外调节蛋白激酶(ERK)和 MAPK 等蛋白的异常表达,参与炎症反应和细胞凋亡等病理过程,促进肝纤维化的形成^[46-47]。陈林等^[48]则以 TX 小鼠为研究对象,以肝豆汤 0.02 mL·g⁻¹·d⁻¹灌胃给药治疗,30 d 后取肝组织行蛋白免疫印迹法检测,结果发现肝豆汤能降低 p38 MAPK,ERK,B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)相关 X 蛋白(Bax)等蛋白表达水平,而 Bcl-2 的表达水平明显增高,提示肝豆汤可通过调控引起细胞程序性死亡(PCD)的 ERK 通路和 MAPK 通路相关蛋白的表达,降低 WD 肝纤维化的病理损害过程,减轻铜对

肝脏的损伤过程。通过均匀设计拆方研究发现,肝豆汤组分中姜黄、大黄、泽泻、三七这 4 味药在修复肝损害过程中发挥主要作用,而三七的作用尤为明显。因此,这些体外和体内研究实验充分证明了肝豆汤能通过调控与 PCD 相关的细胞信号通路,阻断 WD 的肝损害病理过程,并为肝豆汤组分的进一步优化提供了依据。

3 基于 ERK 通路和肝激酶 B₁(LKB₁)/腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)通路的肝豆汤对 WD 脑损伤的疗效机制研究

脑损伤症状是 WD 的主要临床表现之一,杨任民等^[49]对 1903 例 WD 患者的临床分析中发现,脑型 WD 患者占全部患者的 60.66% 以上。部分病程较长的脑型病例可出现运动迟缓、构音障碍、吞咽困难甚至肢体扭转、卧床不起,且其症状往往难以逆转,严重影响了患者的社会学习工作能力。因此,对脑型 WD(尤其病程较长、病情严重的脑型患者)的治疗是临床 WD 治疗常面对的难题。杨任民等^[50]对以肝豆汤(片)结合重金属络合剂驱铜治疗的 WD 患者进行的长达 24 年的随访观察发现,肝豆汤(片)结合重金属络合剂驱铜治疗的中西医结合方法可使包括脑型 WD 患者在内的大多数 WD 患者生活质量明显提高并能长期存活。

3.1 基于 ERK 通路的肝豆汤对 TX 小鼠乳鼠神经元的疗效机制研究

相关研究发现,铜对大脑皮质神经元的损伤可能与以 ERK 通路为核心的相关信号转导通路有关,首先,铜离子可导致神经元细胞内 ROS 的升高,线粒体功能失调,激活 c-jun 氨基末端激酶(JNK)和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)信号传导通路^[51];其次,由于蛋白激酶 p38 MAPK 通路的激活和 ERK 通路的抑制^[52];此外,铜离子可诱导激活神经元酸性鞘磷脂水解酶(ASM)的分泌和神经酰胺(CER)的释放^[53]。CER 可激活 p38 MAPK/SAPK 通路,导致转录因子 CERD 和 ATF-1 的磷酸化,而 CER 激活的蛋白激酶(CAPK)使 PKC- δ 磷酸化,激活 JNK 通路。同时 CER 可激活 PP1/PP2,抑制 ERK1/2 信号通路,促进线粒体释放细胞色素 C(Cyt C),与凋亡蛋白酶活化因子-1(Apaf-1)结合,导致 Caspase-9 活化而激活 Caspase-3, 6, 7, 导致神经元凋亡(图 2)。

基于上述理论基础,徐陈陈等^[54-55]以 TX 小鼠乳鼠神经元原代培养的方法建立 WD 神经元损伤模型,与模型组比较,含肝豆汤兔血清可显著降低 TX 乳鼠神经元内的铜含量和 ROS 的释放,并可显著降

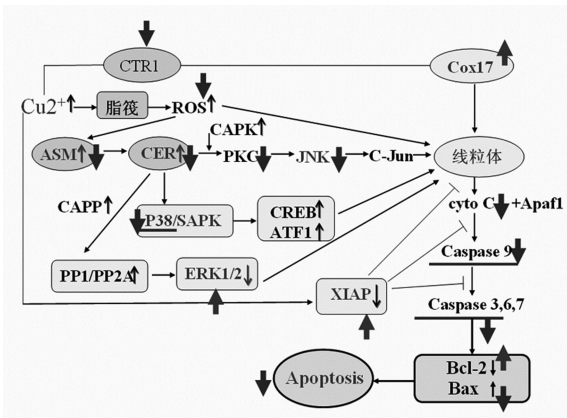


图 2 基于 ERK 通路的肝豆汤调控 WD 神经元损伤的信号通路和作用环节

Fig. 2 Signal pathway of neuronal damage and regulation of GDD by copper

低 TX 乳鼠神经元细胞内 ASM, CER, PKC, JNK, p38 MAPK, Caspase-3, Caspase-9 及 Cyt C 等蛋白及 mRNA 的表达水平,而 ERK1/2, XIAP 蛋白和 mRNA 的表达水平增高,表明肝豆汤可通过减少脑内铜含量,进而调控 Cyt C/Caspase 信号通路,达到减轻铜蓄积对神经元的损伤(图 3)。以 TX 小鼠为动物模型的体内实验也验证了上述研究结果^[56-57],赵雯等^[58]通过均匀设计拆方研究发现,肝豆汤可下调 TX 小鼠脑组织 p38 和 Bax 的表达水平、上调 ERK 和 Bcl-2 的表达水平,抑制神经元的凋亡,促进神经元细胞的修复,其效应中药为黄连、姜黄、泽泻和金钱草。

3.2 基于 LKB₁/AMPK 自噬调控通路的肝豆汤对铜诱导的多巴胺能神经元损伤的疗效机制研究 近年来研究发现,神经元细胞的自噬与多种神经变性疾病的发生存在着密切的联系。Trejo-Solis 等^[59]的研究发现,铜可通过诱导自噬和凋亡而引起细胞死亡,Paris 等^[60]则发现铜-多巴胺络合物可诱导大鼠多巴胺能神经元发生线粒体自噬,进而导致自噬性细胞凋亡。黄雅楠等^[61]以高铜孵育的 SH-SY5Y 细胞株作为 WD 基底节多巴胺能神经元损伤的细胞模型,结果发现,高铜可通过诱导细胞内线粒体氧化应激,激活 LKB₁/AMPK 信号通路,LKB₁,腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK),磷酸化 AMPK(p-AMPK),结节硬化复合物 2(TSC2),p-TSC2,p27,unc-51 样激酶(ULK)等自噬相关蛋白的表达水平显著升高,导致 SH-SY5Y 细胞发生自噬性凋亡,肝豆汤含药血清培养的 SH-SY5Y 细胞自噬相关蛋白的表达水平明显下降,自噬的发生率明显降低,证明肝豆汤可通过调控自噬相关通路,阻断高铜诱导的神经元损伤,从

而发挥神经保护作用。见图 3。

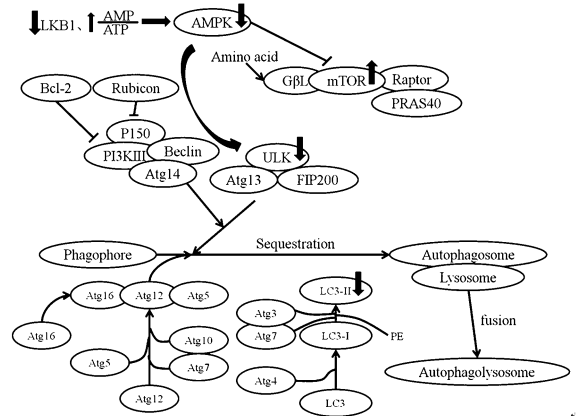


图 3 基于 LKB₁-AMPK 自噬调控通路的肝豆汤调控 WD 神经元损伤的信号通路和作用环节

Fig. 3 Neuron injury regulation effect of GDD based on LKB₁-AMPK signal pathway and its functional targets

4 小结

综上所述,笔者等以肝豆汤结合重金属络合了剂驱铜治疗的中西医结合治疗 WD 取得了良好的临床疗效,为中医药治疗神经遗传病提供了成功的范例。已进行的系列实验研究表明,肝豆汤及其组分能在一定程度上纠正 WD 的铜“正平衡”的病理状态,并通过调控与 PCD 相关的细胞信号通路,阻断铜对肝脏和神经元的损伤。在下一步研究中,笔者将根据铜代谢研究的最新进展,设计相关实验(用抑制剂阻断铜代谢通路相关蛋白的表达、设置不同的铜离子浓度梯度和观察时间点等),进一步研究肝豆汤对铜代谢通路的分子调控机制;在研究铜损伤所致细胞 PCD 机制的基础上,研究铜损伤所致的 ferroptosis 等细胞非程序性死亡(non-PCD)机制,进一步研究肝豆汤对 WD 组织脏器损伤的疗效机制。

[参考文献]

[1] Wilson S A K. Progressive lenticular degeneration: a familial disease associated with Cirrhosis of the liver [J]. Lancet, 1912, 179(4626): 1115-1119.
[2] Bull P C, Thomas G R, Rommens J M, et al. The Wilson disease gene is a putative copper transporting P-type ATPase similar to the Menkes gene [J]. Nat Genet, 1993, 5(4): 327-337.
[3] Petrukhin K, Fischer S G, Pirastu M, et al. Mapping, cloning and genetic characterization of the region containing the Wilson disease gene [J]. Nat Genet, 1993, 5(4): 338-343.
[4] Tanzi R E, Petrukhin K, Chernov I, et al. The Wilson

- disease gene is a copper transporting ATPase with homology to the Menkes disease gene [J]. *Nat Genet*, 1993, 5(4):344-350.
- [5] 杨任民. 肝豆状核变性[M]. 北京:人民卫生出版社, 2015:3-49.
- [6] Członkowska A, Litwin T, Dusek P, et al. Wilson disease [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2018, 4(1):21.
- [7] Scheinberg I, Sternlieb I. Wilson's disease [J]. *Major Probl Intern Med*, 1984, 23:1-24.
- [8] CHENG N, WANG K, HU W, et al. Wilson disease in the South chinese han population [J]. *Can J Neurol Sci*, 2014, 41(3):363-367.
- [9] 程楠, 韩咏竹. 肝豆状核变性的分子诊断与治疗 [J]. *分子诊断与治疗*, 2018, 10(4):217-221, 227.
- [10] 蒋雨平. 要提高我国肝豆状核变性病的诊断水平 [J]. *中华医学杂志*, 2001, 81(11):641.
- [11] Amberger J S, Bocchini C A, Schiettecatte F, et al. OMIM. org; online mendelian inheritance in man (OMIM®), an online catalog of human genes and genetic disorders [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43:789-798.
- [12] Roberts E A, Schilsky M L. Diagnosis and treatment of Wilson disease: an update [J]. *Hepatology*, 2008, 47(6):2089-2111.
- [13] Ferenci P, Roberts E A. Defining Wilson disease phenotypes; from the patient to the bench and back again [J]. *Gastroenterology*, 2012, 142(4):692-696.
- [14] Schilsky M L. Long-term outcome for Wilson disease: 85% good [J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2014, 12(4):690-691.
- [15] Roybal J L, Endo M, Radu A, et al. Early gestational gene transfer with targeted ATP7B expression in the liver improves phenotype in a murine model of Wilson's disease [J]. *Gene Ther*, 2012, 19(11):1085-1094.
- [16] Murillo O, Luqui D M, Gazquez C, et al. Long-term metabolic correction of Wilson's disease in a murine model by gene therapy [J]. *J Hepatol*, 2016, 64(2):419-426.
- [17] 洪铭范, 胡纪原, 胡文彬, 等. 肝豆状核变性的中医辨证分型 [J]. *安徽中医学院学报*, 1998, 17(1):10-11.
- [18] 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.
- [19] 张静, 陈怀珍, 艾文龙, 等. 肝豆汤联合 DMPS 驱铜治疗对 Wilson 病湿热内蕴型认知功能障碍的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(15):210-215.
- [20] 张静, 方媛, 崔圣伟, 等. 肝豆汤联合二巯基丙磺酸钠对湿热内蕴型肝豆状核变性患者的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(17):190-194.
- [21] 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.
- [22] 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.
- [23] 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.
- [24] Maryon E B, Molloy S A, Kaplan J H. Cellular glutathione plays a key role in copper uptake mediated by human copper transporter 1 [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2013, 304(8):768-779.
- [25] Harris Z L, Gitlin J D. Genetic and molecular basis for copper toxicity [J]. *Am J Clin Nutr*, 1996, 63(5):836-841.
- [26] Hellman N E, Kono S, Mancini G M, et al. Mechanisms of copper incorporation into human ceruloplasmin [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(48):46632-46638.
- [27] Lutsenko S, LeShane E S, Shinde U. Biochemical basis of regulation of human copper-transporting ATPases [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2007, 463(2):134-148.
- [28] Heaton D N, George G N, Garrison G, et al. The mitochondrial copper metallochaperone Cox17 exists as an oligomeric, polycopper complex [J]. *Biochemistry*, 2001, 40(3):743-751.
- [29] Carroll M C, Girouard J B, Ulloa J L, et al. Mechanisms for activating Cu- and Zn- containing superoxide dismutase in the absence of the CCS Cu chaperone [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(16):5964-5969.
- [30] Walker J M, Huster D, Ralle M, et al. The N-terminal metal-binding site 2 of the Wilson's disease protein plays a key role in the transfer of copper from Atox1 [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(15):15376-15384.
- [31] Larin D, Mekios C, Das K, et al. Characterization of the interaction between the Wilson and Menkes disease proteins and the cytoplasmic copper chaperone, HAH1p [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(40):28497-28504.
- [32] 董健健, 韩咏竹, 程楠. 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 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(24):128-133.
- [33] 王超旻, 韩咏竹. 中药肝豆汤对 Wilson 病模型 TX 小鼠铜代谢通路的分子调控机制研究 [D]. 合肥:安徽中医药大学, 2013.
- [34] 艾文龙, 韩咏竹. 中药肝豆汤对 Wilson 病动物模型 TX 小鼠肝细胞铜稳态调控的研究 [D]. 合肥:安徽中医药大学, 2013.
- [35] Schaeffer M, Hopkins R G, Failla M L, et al. Hepatocyte-

- specific localization and copper-dependent trafficking of the Wilson's disease protein in the liver [J]. *Am J Physiol*, 1999, 276 (3 Pt 1): 639-646.
- [36] Forbes J R, Cox D W. Copper-independent trafficking of Wilson disease mutant ATP7B proteins [J]. *Hum Mol Genet*, 2000, 9(13): 1927-1935.
- [37] 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(3): 173-175.
- [38] 吕达平, 韩咏竹, 王训等. 肝豆状核变性患者肝细胞铜代谢的研究 [J]. *中华神经科杂志*, 2005, 38(7): 464.
- [39] 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 ATP7b 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.
- [40] 胡纪源, 洪铭范, 苏增锋等. 1200 例肝豆状核变性的肝脾胆肾声像图表现及临床研究 [J]. *中国临床神经科学*, 2003, 11(2): 161-165.
- [41] Wickström M, Dyberg C, Milosevic J, et al. Wnt/ β -catenin pathway regulates MGMT gene expression in cancer and inhibition of Wnt signalling prevents chemoresistance [J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 8904.
- [42] HU X Y, HOU P F, LI T T, et al. The roles of Wnt/ β -catenin signaling pathway related lncRNAs in cancer [J]. *Int J Biol Sci*, 2018, 14(14): 2003-2011.
- [43] 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.
- [44] 徐陈陈, 董健健, 王训, 等. 基于 Cer 通路探讨肝豆汤对 Wilson 病模型高铜诱导海马神经元细胞损伤的保护作用 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(7): 56-60.
- [45] 周晟, 王翼洁, 胡文彬, 等. 肝豆汤对 Wilson 病模型 TX 小鼠脾脏免疫功能调节的作用 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(7): 68-74.
- [46] 潘勤, 谢渭芬, 张忠兵, 等. 肝纤维化逆转中 MAPK/ERK 信号转导通路的活化及其特征 [J]. *中国现代医学杂志*, 2006, 16(15): 2253-2256.
- [47] 杨清高, 刘绍能. P38MAPK 信号通路与肝纤维化 [J]. *世界华人消化杂志*, 2012, 20(24): 2231-2236.
- [48] 陈林, 韩咏竹. 肝豆汤治疗 Wilson 病 TX 小鼠肝损害的效应中药筛选及其机制研究 [D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2015.
- [49] 杨任民, 喻绪恩, 徐银. 1903 例临床分析对肝豆状核变性诊断的再检讨 [C]// 第十一届全国神经病学学术会议论文汇编, 长春, 2008: 628.
- [50] 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.
- [51] CHEN X H, LAN X J, MO S L, et al. p38 and ERK, but not JNK, are involved in copper-induced apoptosis in cultured cerebellar granule neurons [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 379(4): 944-948.
- [52] CHEN S H, LIN J K, LIU S H, et al. Apoptosis of cultured astrocytes induced by the copper and neocuproine complex through oxidative stress and JNK activation [J]. *Toxicol Sci*, 2008, 102(1): 138-149.
- [53] Brewer G J. A brand new mechanism for Cu toxicity [J]. *J Hepatol*, 2007, 47(4): 621-622.
- [54] 徐陈陈, 王训. Wilson 病炎症因子表达谱及肝豆汤改良方对 TX 小鼠神经元 Cer 信号通路调控机制的研究 [D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2017.
- [55] 徐陈陈, 董健健, 程楠, 等. 肝豆汤改良方对 Wilson's 病模型 TX 小鼠神经元内 Cyt C /Caspase 信号通路的分子调控机制 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(6): 143-148.
- [56] 丁超, 王训. 肝豆汤改良方调节高铜诱导神经元损伤的信号调控机制的研究 [D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2014.
- [57] 马艳红, 王训. 中药通腑养髓法保护 tx 小鼠铜诱导神经元损伤的细胞凋亡机制的研究 [D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2014.
- [58] 赵雯, 韩咏竹. 中药肝豆汤对 Wilson 病模型 TX 小鼠模型脑神经元保护效应中药筛选及疗效机制研究 [D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2015.
- [59] Trejo-Solis C, Jimenez-Farfan D, Rodriguez-Enriquez S, et al. Copper compound induces autophagy and apoptosis of glioma cells by reactive oxygen species and JNK activation [J]. *BMC Cancer*, 2012, 12: 156.
- [60] Paris I, Perez-Pastene C, Couve E, et al. Copper dopamine complex induces mitochondrial autophagy preceding caspase-independent apoptotic cell death [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(20): 13306-13315.
- [61] 黄雅楠, 董健健, 徐陈陈, 等. 肝豆汤对 Wilson 病模型高铜诱导的 SH-SY5Y 细胞自噬效应的影响及其作用机制 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(7): 61-67.

[责任编辑 周冰冰]