

肝豆汤对 Wilson 病模型 TX 小鼠脾脏免疫功能调节的作用

周晟¹, 王翼洁¹, 胡文彬^{2*}, 喻绪恩², 程楠², 吴君霞²

(1. 安徽中医药大学 研究生院, 合肥 230038;

2. 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:探讨肝豆汤对 Wilson 病模型 TX 小鼠脾脏免疫功能的调节作用,并探讨相关的作用机制。方法:将小鼠分为正常组、模型组、四硫钼酸铵组、肝豆汤低、中、高剂量组,每组 20 只。正常组选取 DL 小鼠常规饲养 30 d;模型组和肝豆汤低、中、高剂量组选取 TX 小鼠分别予生理盐水、肝豆汤(22,44,66 g·kg⁻¹)各 2 mL·kg⁻¹·d⁻¹灌胃,四硫钼酸铵组予四硫钼酸铵 2 mg·kg⁻¹·d⁻¹灌胃,每日 2 次,连续 30 d。上述 4 组采用电感耦合等离子体-质谱法(ICP-MS)测脾组织微量元素,流式细胞术检测小鼠脾组织 T 淋巴细胞亚群 CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺/CD8⁺;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测白细胞介素-2(interleukin-2, IL-2),白细胞介素-8(interleukin-8, IL-8),白细胞介素-17(interleukin-17, IL-17),白细胞介素-18(interleukin-18, IL-18), γ -干扰素(interferon- γ , IFN- γ),肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)的蛋白表达量。结果:ICP-MS 结果显示:与模型组比较,肝豆汤可以降低 TX 小鼠脾组织铜含量($P < 0.01$),流式细胞术检测显示,与正常组比较,模型组脾组织内 CD4⁺, CD8⁺增高($P < 0.01$),CD4⁺/CD8⁺降低($P < 0.01$),与模型组比较,肝豆汤中、高剂量组脾组织内 CD4⁺, CD8⁺降低($P < 0.05$),CD4⁺/CD8⁺增高,但差异无统计学意义,肝豆汤低剂量组与模型组比较 CD4⁺, CD8⁺降低,CD4⁺/CD8⁺增高,但差异均无统计学意义;Western blot 检测显示,与正常组比较,模型组脾组织内 IL-2, IL-8, IL-17, IL-18, TNF- α , IFN- γ 的蛋白表达量增高($P < 0.01$),与模型组比较,肝豆汤中、高剂量组及四硫钼酸铵组 IL-2, IL-8, IL-17, IL-18, TNF- α , IFN- γ 蛋白表达量均降低($P < 0.05$, $P < 0.01$);与模型组比较,低剂量肝豆汤组 IL-2, IL-8, IL-17, TNF- α 相对表达量降低($P < 0.05$)。结论:TX 小鼠脾脏存在免疫功能紊乱,且以负向免疫调节为主。肝豆汤对 TX 小鼠脾脏免疫功能紊乱具有一定的改善作用。

【关键词】 肝豆汤; Wilson 病; TX 小鼠; 脾脏; 免疫功能紊乱

【中图分类号】 R2-0;R22;R285.5;R289 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-9903(2019)07-0068-07

【doi】 10.13422/j.cnki.syfx.20190703

【网络出版地址】 <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20181217.1432.009.html>

【网络出版时间】 2018-12-19 11:25

Effect of Gandou Decoction on Immune Function of Spleen in TX Mice of Wilson's Disease Model

ZHOU Sheng¹, WANG Yi-jie¹, HU Wen-bin^{2*}, YU Xu-en², CHENG Nan², WU Jun-xia²

(1. Graduate School, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230038, China;

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

【Abstract】 **Objective:** To discuss the effect of Gandou decoction (GDD) on the immune index of spleen in TX mice of Wilson's disease model. **Method:** The mice were divided into normal group, model group and GDD or tetrathiomolybdate (TM) treatment group, with 20 mice in each group. Each group was fed in various ways for 30 successive days. Normal group: 10 normal DL mice were randomly selected and feed normally. Model group: 20 TX mice were randomly selected and feed with 2 mL·kg⁻¹·d⁻¹ ig saline by gavage twice per day. GDD or TM treatment group: 80 TX mice were randomly selected and feed with 2 mL·kg⁻¹·d⁻¹ ig Gandou decoction 22, 44,

【收稿日期】 20181009(015)

【基金项目】 国家自然科学基金项目(81473535,81603596)

【第一作者】 周晟,在读硕士,从事神经系统疾病研究,E-mail:907573813@qq.com

【通信作者】 *胡文彬,从事神经系统疾病研究,E-mail:hwbzhx@163.com

66 g · kg⁻¹ or tetrathiomolybdate by gavage twice per day. ICP-MS was used to compare the expressions of trace elements inside the mice's spleens, flow cytometry was applied to detect the mice T lymphocyte subsets of splenic tissue CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺/CD8⁺, and Western blot was used to detect the expressions of interferon- γ (IFN- γ), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-2 (IL-2), interleukin-8 (IL-8), interleukin-17 (IL-17) and interleukin-18 (IL-18). **Result:** Flow ICP-MS results showed that GDD can reduce Cu of mice's spleen, flow cytometry results showed that CD4⁺ and CD8⁺ in model group were increased than those in normal group ($P < 0.01$), and CD4⁺/CD8⁺ was decreased ($P < 0.01$); compared with model group, CD4⁺ and CD8⁺ in middle and high-dose GDD groups were decreased ($P < 0.01$), and CD4⁺/CD8⁺ was increased. According to Western blot detection, compared with normal group, the expressions of IL-2, IL-8, IL-17, IL-18, TNF- α and IFN- γ in the model group were increased ($P < 0.01$); compared with model group, the expressions of TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-8, IL-17 and IL-18 in the GDD middle and high or TM group were decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with model group, the expressions of IL-2, IL-8, IL-17 and TNF- α in the GDD low were decreased ($P < 0.05$). **Conclusion:** Spleen of TX mice shows the cellular immunity hyperfunction, which is mainly dominated by the negative immunoregulation. GDD has a certain effect in regulating cellular immunity hyperfunctional state of TX mice, but it's difficult to thoroughly change the negative immune regulation.

[**Key words**] Gandou decoction; Wilson's disease; TX mice; spleen; immune dysfunction

Wilson 病 (Wilson's disease, WD) 是一种以铜代谢障碍为特征的神经系统遗传性疾病^[1]。其病因为体内的 *ATP7B* 基因突变而引起铜蓝蛋白和铜结合障碍,继而导致过量的铜沉积于体内肝、脑、角膜、肾等处,引发相应的组织器官病变^[2]。常规西药如青霉胺、二巯基丙磺酸钠等治疗 WD,虽驱铜情况良好,但不良反应大,可能会进一步加重患者免疫功能的异常^[3]。本课题单位多年研究 WD,发现其虽没有对应的中医病名,但因其患者多有口臭、便干、舌红、苔黄腻、脉数等证候,故认为本病病机为湿热壅盛、铜毒内蕴,方选清热解毒、利湿退黄之肝豆汤。除传统中医疗效之外,近年药理研究发现,肝豆汤还具有加强细胞排铜^[4],促进肝组织自愈^[5],修复神经元损伤^[6],改善患者认知水平^[7]等多重功效,使患者临床症状得到显著改善,且其片剂已被《肝豆状核变性》^[8]推荐为 WD 常规用药。除肝硬化、运动障碍等主要临床表现外,WD 患者的免疫功能异常也受到了越来越多学者的关注,但对其免疫紊乱的发生机制及相关治疗目前仍缺少相应的文献研究。WD 患者常会出现脾大、脾亢等病理现象,而脾脏作为人体最大的免疫器官,与机体免疫状况关系密切,故探究脾脏的免疫变化与治疗结果,可以帮助进一步了解 WD 患者的免疫功能异常的原因和治疗措施,因单纯的人体实验难以接受且成本较高,故选取与 WD 的致病基因同源性颇高,主要病理变化与 WD 的病理变化基本一致的 TX 小鼠作为 WD 模型小鼠进行实验^[9-10]。因此本实验旨在了解 WD 模型

TX 小鼠脾脏免疫功能的改变并探讨肝豆汤对其调节的作用,以期为 WD 的免疫紊乱状态提供更加良好的治疗方案。

1 材料

1.1 动物 8 对 TX 种鼠和 DL 乳鼠从美国 Jackson 动物实验中心引进,饲养于安徽医科大学动物实验中心 (SPF 级) 进行传代繁殖,环境温度控制在 22 ~ 26 °C,相对湿度 55% 左右,正常光照,常规鼠类饲料喂养,自由饮水。入组前随机选取 5 只 TX 小鼠行铜生化相关指标检测及基因检测以确定其具有 WD 模型应具有的特性。本实验遵守国家有关实验动物保护和使用准则 (批准号 20170911023)。

1.2 药物和试剂 肝豆汤组方药物及剂量,大黄 20 g,黄连 20 g,金钱草 24 g,姜黄 20 g,泽泻 24 g,三七 3 g (均由北京同仁堂药店合肥分店采购,经安徽中医药大学药学院金传山教授鉴定,符合 2015 年《中国药典》标准);按照中药常规煎法煎煮浓缩至生药量分别为 1.1, 2.2, 3.3 g · mL⁻¹, 4 °C 冰箱冷藏备用;RIPA 组织/细胞裂解液 (北京索莱宝科技有限公司,批号 20161130);CD4-FITC, CD8-PE (美国 BD Biosciences 公司,批号分别为 131211, 140326);兔多克隆免疫球蛋白 (Ig) G 抗白介素 (IL)-2, IL-8, IL-17, IL-18, 肿瘤坏死因子- α (TNF- α), 干扰素- γ (IFN- γ), β -肌动蛋白 (β -actin) 抗体 (英国 Abcam 公司,批号分别为 20140509, 20140612, 20140828, 20140715, 20140624, 20140916, GR265012-1);辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的山羊

抗兔抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号 GR231489-1);四硫钼酸铵(美国 New Jecay 公司,批号 A0300503)。

1.3 仪器 NexION350D 型电感耦合等离子体质谱仪(珀金埃尔默有限公司);Fine-dox6 型凝胶成像系统(上海天能科技有限公司);BX60 型光学显微镜,CK2 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司);BD FACSCalibur 型流式细胞分析仪(美国 BD Biosciences 公司);HC-I60R 型高速冷冻离心机(科大创新有限公司);Mini-PROTEAN Tetra 型小型垂直电泳槽,Power Pac 型电泳仪及转膜仪(美国伯乐公司);1810B 型双重自动纯水蒸馏机(上海亚太技术玻璃公司);SW-CJ-1F 型洁净工作台(苏净集团安泰公司);78HW-1 型恒温磁力搅拌器(金坛市金城国胜实验仪器厂)。

2 方法

2.1 动物分组及治疗方法 随机选取 2 月龄 DL 小鼠 20 只,2 月龄 TX 小鼠 100 只,前者归为正常组,后者随机分为肝豆汤低、中、高剂量组,模型组和四硫钼酸铵组,每组 20 只。正常组常规饲养 30 d,肝豆汤低、中、高剂量组、模型组分别每日 2 次予以肝豆汤(生药量分别为 1.1,2.2,3.3 g·mL⁻¹,给药体积为 20 mL·kg⁻¹·d⁻¹),生理盐水 20 mL·kg⁻¹·d⁻¹灌胃,四硫钼酸铵组予以四硫钼酸铵 2 mg·kg⁻¹·d⁻¹灌胃,连续灌胃 30 d,所有小鼠均常规饲养。30 d 后将所有小鼠处死并取材,转移到 -80 °C 冰箱保存。

2.2 检测指标及方法

2.2.1 ICP-MS 测小鼠脾脏组织内微量元素含量 裂解脾组织至匀浆后加入稀释液,离心取上清得超滤液,根据样品绘制标准曲线,超滤液上机检测后得到相应的信号响应值,通过标准曲线的得出微量元素浓度。

2.2.2 流式细胞术法检测脾脏组织 T 细胞亚群 CD4⁺,CD8⁺ 及 CD4⁺/CD8⁺ 的表达 制取脾组织细胞悬液后加入红细胞裂解液,离心取上清(脾细胞悬液)并吹打均匀,滴一滴上清液于细胞计数板上并计数。分别取 2 × 10⁶ 细胞重悬于的 5% FCS/PBS 200 μL 中,各加入 CD4-FITC/CD8-PE 1 μL,混匀后避光静置 30 min 离心,PBS 洗 2 遍,重悬于 PBS 500 μL 中避光静置 30 min;通过流式细胞仪检测各个标记细胞的百分率。

2.2.3 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测脾脏组织内 IL-2,IL-8 蛋白表达 研磨裂解脾组织至匀浆,

离心后取上清行 BCA 法测定蛋白浓度,样品上样,行 SDS-PAGE 凝胶电泳,然后转移至 NC 膜上。将膜用 5% 脱脂奶粉封闭 4 h,封闭结束后 PBST 冲洗 3 次,每次 10 min,分别加入兔多克隆 IgG 抗 IL-2,IL-8,IL-17,IL-18,TNF-α,IFN-γ,β-actin(稀释倍数分别为 1:1 万,1:2 万,1:1 000,1:500,1:1 000,1:1 000),4 °C 过夜,第 2 天取出洗膜 3 次,分别加入 HRP 标记的二抗(稀释倍数分别为 1:1 万,1:2 万,1:3 000,1:5 000,1:5 000,1:3 000),脱色摇床中震荡脱色 90 min,PBST 漂洗 3 次,每次 10 min。凝胶成像系统拍摄,Image J 分析各个条带灰度值,以 β-actin 为内参,其表达量为正常计算各组 IL-2,IL-8,IL-17,IL-18,TNF-α,IFN-γ 的相对表达量。

2.3 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计软件进行相关分析,实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,若资料符合正态分布且方差齐者,则组间比较采用单因素方差 ANVOA 分析,组间两两比较采用 S-N-K 检验;若不符合者,组间比较采用 Kruskal-Wallis 秩和检验,组间两两比较采用 Nemenyi 法,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 肝豆汤对 TX 小鼠脾脏组织中微量元素含量的影响 与正常组比较,模型组 Cu,Fe 含量明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$),而 Zn 含量下降,但差异无统计学意义;与模型组比较,肝豆汤低、中、高剂量组及四硫钼酸铵组 Cu 含量均明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),而 Fe,Zn 含量虽降低,但差异无统计学意义;与肝豆汤组比较,四硫钼酸铵组 Cu,Zn 增高,Fe 降低,但差异均无统计学意义。见表 1。

3.2 肝豆汤对 TX 小鼠脾脏组织中 CD4⁺,CD8⁺ 和 CD4⁺/CD8⁺ 表达水平的影响 与正常组相比,模型组的 CD4⁺,CD8⁺ 均显著增高($P < 0.01$),CD4⁺/CD8⁺ 显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,肝豆汤中、高剂量组及四硫钼酸铵组 CD4⁺,CD8⁺ 均降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),而 CD4⁺/CD8⁺ 虽增高,但差异无统计学意义;肝豆汤低剂量组 CD4⁺,CD8⁺ 均有一定的降低,CD4⁺/CD8⁺ 有一定的增高,但与模型组相比,差异均无统计学意义。见表 2。

3.3 肝豆汤对 TX 小鼠脾脏组织中 IL-2,IL-8,IL-17,IL-18,TNF-α,IFN-γ 蛋白相对表达的影响 与正常组比较,模型组 IL-2,IL-8,IL-17,IL-18,TNF-α,IFN-γ 蛋白表达量均显著增高($P < 0.01$);与模型组比较,肝豆汤中、高剂量组及四硫钼酸铵组 IL-2,IL-8,IL-17,IL-18,TNF-α,IFN-γ 蛋白表达量均

表 1 肝豆汤对 TX 小鼠脾脏组织中微量元素含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 20$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	Cu	Fe	Zn
正常	-	1.671 ± 0.168	593.909 ± 521.981	18.619 ± 9.283
模型	-	3.314 ± 1.733 ²⁾	773.404 ± 231.267 ¹⁾	18.201 ± 5.131
肝豆汤	22	2.389 ± 0.665 ³⁾	748.386 ± 258.862	17.932 ± 6.473
	44	1.978 ± 0.755 ⁴⁾	744.007 ± 241.483	17.171 ± 5.117
	66	2.026 ± 0.827 ⁴⁾	741.774 ± 271.916	16.971 ± 5.849
四硫钼酸铵	2×10^{-3}	2.162 ± 1.238 ³⁾	705.002 ± 200.626	18.184 ± 6.374

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ 。

表 2 肝豆汤对 TX 小鼠脾脏组织中 CD4⁺, CD8⁺ 和 CD4⁺/CD8⁺ 表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 20$)

Table 2 Effect of GDD on comparison of expression of CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺/CD8⁺ in TX mice's spleens ($\bar{x} \pm s, n = 20$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	CD4 ⁺ /%	CD8 ⁺ /%	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
正常	-	28.99 ± 1.77	12.58 ± 1.51	2.34 ± 0.35
模型	-	33.01 ± 2.46 ¹⁾	15.89 ± 1.47 ¹⁾	2.09 ± 0.25 ¹⁾
肝豆汤	22	31.93 ± 2.43	15.21 ± 1.22	2.10 ± 0.22
	44	30.54 ± 1.95 ³⁾	14.38 ± 1.19 ³⁾	2.14 ± 0.22
	66	31.21 ± 1.72 ²⁾	14.81 ± 1.15 ²⁾	2.11 ± 0.21
四硫钼酸铵	2×10^{-3}	29.68 ± 2.78 ³⁾	13.49 ± 1.49 ³⁾	2.20 ± 0.36

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ (表 3 同)。

表 3 肝豆汤对 TX 小鼠脾脏组织中 IL-2, IL-8, IL-17, IL-18, TNF- α , IFN- γ 蛋白相对表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of GDD on relative expression of IL-2, IL-8, IL-17, IL-18, TNF- α and IFN- γ protein in TX mice's spleens ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	IL-2/ β -actin	IL-8/ β -actin	IL-17/ β -actin	IL-18/ β -actin	TNF- α / β -actin	IFN- γ / β -actin
正常	-	0.296 ± 0.043	0.242 ± 0.057	0.506 ± 0.062	0.235 ± 0.039	0.283 ± 0.060	0.238 ± 0.046
模型	-	0.498 ± 0.064 ¹⁾	0.417 ± 0.071 ¹⁾	0.709 ± 0.066 ¹⁾	0.454 ± 0.038 ¹⁾	0.488 ± 0.067 ¹⁾	0.376 ± 0.084 ¹⁾
肝豆汤	22	0.422 ± 0.070 ²⁾	0.373 ± 0.089 ²⁾	0.657 ± 0.087 ²⁾	0.414 ± 0.066	0.422 ± 0.016 ²⁾	0.303 ± 0.073
	44	0.356 ± 0.052 ³⁾	0.356 ± 0.057 ²⁾	0.636 ± 0.062 ²⁾	0.360 ± 0.070 ³⁾	0.358 ± 0.026 ³⁾	0.282 ± 0.039 ³⁾
	66	0.408 ± 0.078 ²⁾	0.333 ± 0.052 ³⁾	0.606 ± 0.064 ³⁾	0.360 ± 0.067 ³⁾	0.352 ± 0.170 ³⁾	0.261 ± 0.042 ³⁾
四硫钼酸铵	2×10^{-3}	0.337 ± 0.037 ³⁾	0.296 ± 0.050 ³⁾	0.565 ± 0.053 ³⁾	0.279 ± 0.044 ³⁾	0.347 ± 0.026 ³⁾	0.285 ± 0.076 ²⁾

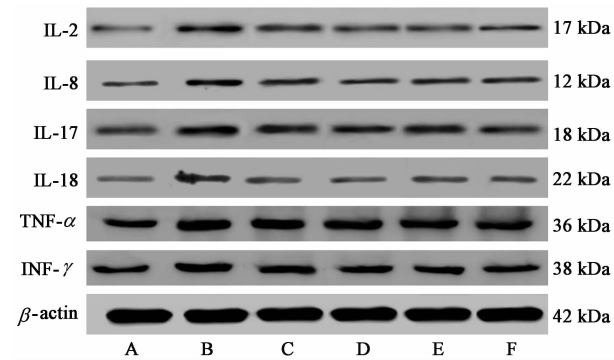
免疫指标中 CD4⁺ 比例, CD4⁺/CD8⁺ 低于正常人, 证明 WD 患者存在一系列的免疫功能紊乱现象。脾脏是人体最大的外周免疫器官, 维护并调节着机体的免疫功能。过量的铜沉积于肝脏导致肝细胞受损而出现肝脏病变, 继发脾脏病变, 如脾肿大、脾功能亢进等^[13]。而超声检查发现 WD 患者脾动脉血流速度加快, 肝动脉血流速度减慢^[14], 这进一步验证了 WD 患者的脾脏存在一定的病变。但是 WD 患者免疫功能的异常是否主要就是由脾脏病变所导致的目前仍不得而知, 包括肝脏损害处理抗原能力的减弱、细胞因子的紊乱^[15]、肝硬化合并脾功能亢进^[16]

降低 ($P < 0.01, P < 0.05$); 肝豆汤低剂量组与模型组比较, IL-2, IL-8, IL-17, TNF- α 蛋白表达量均有一定的降低 ($P < 0.05$), IL-18, IFN- γ 虽略有降低, 但差异无统计学意义。见表 3, 图 1。

4 讨论

WD 是一种以铜代谢障碍为特征的常染色体隐性遗传病, 临床症状以肝硬化, 神经精神症状, K-F 环等为主。除上述症状外, WD 患者免疫功能紊乱的症状也受到越来越多的学者的关注, 谢文光等^[11] 观察发现 WD 患儿的 IgG, IgM, 血清 C-1 抑制物均显著高于正常儿童, 而血清 C4, C5, C9 均显著低于正常儿童; 许力等^[12] 研究发现 WD 患者的体液免疫指标中 CD19⁺ 比例, IgG, IgM 高于正常人, 细胞

等原因均有可能导致 WD 患者出现免疫功能紊乱。WD 作为为数不多的可以通过治疗延缓甚至控制病情发展的神经遗传性疾病, 其治疗措施主要分为饮食控制、药物治疗和肝脏移植三大类, 其中内科药物治疗仍是大部分患者首选的治疗方案^[8]。传统西药如二巯基丙磺酸钠、青霉胺等治疗 WD, 虽排铜效果较好, 但有着诸如过敏反应、中性粒细胞减少^[17]、骨髓抑制^[18-19]、肾病综合症^[20]、系统性红斑狼疮^[21] 等不良反应。肝豆汤具有清热解毒、通腑利尿的功效, 其驱铜效果良好且不良反应较少, 是治疗 WD 的常规中药。其对于改善肝功能^[22]、肾



A. 正常组; B. 模型组; C. 肝豆汤低剂量组; D. 肝豆汤中剂量组; E. 肝豆汤高剂量组; F. 四硫钼酸铵组

图 1 各组小鼠脾脏组织中 IL-2, IL-8, IL-17, IL-18, TNF- α , INF- γ 蛋白表达电泳

Fig. 1 Electrophoresis of expression results of IL-2, IL-8, IL-17, IL-18, TNF- α and INF- γ protein in TX mice's spleens

损伤^[23]、认知障碍^[7]等有较佳疗效,但其对于 WD 患者免疫功能的改善,尤其是脾脏免疫状态的改善,仍缺少相关文献的研究。四硫钼酸铵是一种铜螯合剂,可用于治疗 WD,该药在排铜的同时,还对细胞因子的产生有着一定的抑制作用^[24],因此选为阳性药。因医学实验的特殊性,直接进行人体实验是难以被接受的,故寻找合适的动物模型是进行深一步研究的必备条件。虽然目前没有任何一种动物模型能完全复制 WD 的所有特征,但 Theophilos 等^[9]发现 TX 小鼠的致病基因与 WD 的致病基因同源性颇高,ATP7B 蛋白功能部分保留^[25],主要病理变化与 WD 的病理变化基本一致,均表现为铜在肝、脑、肾等多脏器沉积,血清铜和铜蓝蛋白显著降低、肝细胞变性坏死等^[10],故为 WD 较理想的动物模型之一。

WD 是铜代谢障碍疾病,大量的铜沉积于身体各个脏器,而动物、影像学、脑脊液等多种研究发现 WD 患者除了铜沉积以外还有铁等其他众多金属元素的沉积,这些金属元素的沉积影响着患者的病情进展^[26]。实验表明 TX 小鼠相较于普通小鼠,脾脏中 Cu, Fe 含量明显增高,证明有过量金属元素沉积于脾脏,而经肝豆汤治疗后, Cu 的含量明显下降,证明肝豆汤具有一定的排铜作用,但对于 Fe, Zn 等金属元素的改变并不明显。

在小鼠脾脏中, T 淋巴细胞约占细胞总数的 30%, 在免疫调控中发挥着至关重要的作用, 当机体受到感染、创伤等因素影响时, T 淋巴细胞亚群都会发生改变^[27]。CD4⁺ 与 CD8⁺ 均是 T 细胞亚群之一, 是机体重要的免疫细胞。CD4⁺ 与主要组织相容性复合体 II (major histocompatibility complex II,

MHC-II) 相结合活化后主要分化为 Th 细胞, 协助体液免疫和细胞免疫。CD8⁺ 与主要组织相容性复合体 I (major histocompatibility complex I, MHC-I) 相结合活化后主要分化为细胞毒性 T 细胞 (CTL), 参与杀伤病毒感染细胞和肿瘤细胞等免疫过程。CD4⁺/CD8⁺ 是反映体内免疫状态的重要指标, 其比值降低说明机体处于负向免疫调节状态^[28]。通过实验笔者发现 TX 小鼠较正常 DL 小鼠 CD4⁺, CD8⁺ 上升, 而经肝豆汤治疗后 CD4⁺, CD8⁺ 有所降低, 此现象表明 TX 小鼠脾脏存在免疫功能的亢进, 且经肝豆汤后免疫亢进有所缓解, 但仍存在。这与临床上 WD 患者外周血 CD4⁺, CD8⁺ 的研究结果是有所不同的^[12], 其原因可能是一方面免疫系统是个复杂的功能性系统, 受多种因素影响, 脾脏虽然是重要的免疫器官, 但与机体的整体免疫情况仍有众多不同, 如脾亢时, 虽外周血检测人体淋巴细胞计数下降, 但因为脾内阻留和脾脏质量增加等原因, 造成脾内淋巴细胞总数反而增加^[29-30], WD 患者常伴有脾大、脾亢等症状, 故 TX 小鼠可能也出现了类似脾大脾亢现象; 另一方面, TX 小鼠虽然是 WD 的模型小鼠, 但其突变位点与 WD 患者仍有所不同, 并可能有着与人体不相同的免疫应答机制, 具体是何种原因造成的免疫功能的不同, 仍需要进一步的研究探索。但 TX 小鼠的 CD4⁺/CD8⁺ 显著低于正常 DL 小鼠, 说明 TX 小鼠脾脏虽然存在免疫亢进, 但是整体却处于负向免疫调节状态, 这与临床上 WD 患者的免疫情况是相符的^[12]。而经肝豆汤治疗后的 TX 小鼠, 其 CD4⁺/CD8⁺ 有所增高, 但仍明显低于正常 DL 小鼠, 说明肝豆汤具有一定的改善免疫状态作用, 使机体负向免疫调节状态得到缓解。

细胞因子是一种具有广泛生物学活性的小分子蛋白质, 其具有调节免疫、促进细胞生长、修复损伤组织等多种功能, 是判断机体免疫功能的重要指标^[31]。众多不同种类的细胞因子如白细胞介素 (interleukines, ILs), 生长因子 (growth factor, GF), 干扰素 (interferon, IFN), TNF 和趋化因子 (chemokine) 等共同搭建起具有保护机体、调控免疫应答的细胞因子网络^[32]。IL-2, IL-8, IL-17 与 IL-18 均是 ILs 的亚型之一, 均有一定的促炎性作用。IL-2 是一种主要由 Th1 细胞产生的特征性细胞因子, 具有调节免疫活性的作用^[33]。IL-2 除了可以激活 T 细胞并使其增值分化外, 还可以通过作用与靶细胞表面的 IL-2 受体对各种亚型免疫细胞产生影响, 特别是 IL-2 能刺激 NK 细胞和细胞毒性 T 细胞增殖、

分化,产生 TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-6 等多种细胞因子,并发挥协同作用^[34]。IL-8 是一种中性粒细胞趋化因子,当免疫系统处于稳态时仅少量表达,而受到感染,异物等刺激时会大量分泌,继而趋化中性粒细胞到达炎症部位,激发机体产生免疫反应^[35]。IL-17 主要由 Th17 细胞分泌,是一种前炎症细胞因子,在 T 细胞诱导的炎症反应早期便会出现并对炎症细胞产生趋化作用,促进多种细胞产生炎症因子,在感染免疫,自身免疫性疾病中均具有重要意义^[36-37]。实验数据表明, TX 小鼠 IL-2, IL-8, IL-17 表达水平较正常 DL 小鼠高,经肝豆汤治疗后 IL-2, IL-8, IL-17 有所下降。说明 TX 小鼠脾脏存在免疫功能的紊乱,肝豆汤中短期疗程可以调节 IL-2, IL-8, IL-17 细胞因子的分泌,改善机体免疫紊乱。IL-18 是一种至关重要的免疫调节因子^[38],其调节免疫紊乱的作用可分为两个方面。一方面 IL-18 可通过 NK, CTL 等炎性细胞趋化,诱导 FasL 途径细胞凋亡^[39-40];另一方面 IL-18 还可作为内源性抗原,当抗体浓度过高时可通过负反馈机制促进 IL-18 的分泌并与其结合,从而降低抗体浓度,抑制机体免疫损伤。实验数据表明 TX 小鼠脾内 IL-18 的相对表达量较正常 DL 小鼠明显增高,表明 TX 小鼠体内存在免疫功能的紊乱,但这是否同时也是 TX 小鼠体内免疫紊乱的一种负反馈机制,尚无法明确,仍有待进一步研究。INF- γ 是由 Th1 细胞分泌的重要的促炎细胞因子,其不仅可以促进 T 细胞的增殖、分化和成熟,还可以增强巨噬细胞和 NK 细胞的活性,对免疫系统起着重要的调节作用^[41]。经肝豆汤中、高剂量组治疗后, TX 小鼠体内 IL-18, INF- γ 有所下降,免疫紊乱状态有所缓解,但肝豆汤低剂量组对其的改善却并不明显,说明肝豆汤对于 IL-18 与 INF- γ 的改善作用与其浓度可能有一定的关系。TNF- α 是一种主要由单核细胞和巨噬细胞所产生的促炎细胞因子,除了抗肿瘤活性以外它还参加正常炎症反应和病理性损伤,并且其浓度变化与炎性的严重程度和迁延不愈呈正相关^[42]。实验数据表明肝豆汤可以有效下调 TX 小鼠脾脏 TNF- α 的表达,抑制机体炎症的发展。

研究结果表明,肝豆汤对于 TX 小鼠脾脏有着一定的排铜作用。而从免疫学上看, CD4⁺, CD8⁺ 增高, CD4⁺/CD8⁺ 降低, INF- γ , TNF- α , IL-2, IL-8, IL-17 与 IL-18 的高表达表明 TX 小鼠脾脏免疫功能处于紊乱状态,且整体以负向免疫调节为主。经肝豆汤中短期治疗后, TX 小鼠脾脏的 CD4⁺, CD8⁺,

CD4⁺/CD8⁺ 及 INF- γ , TNF- α , IL-2, IL-8, IL-17, IL-18 的表达均有一定的改善,其免疫紊乱状态有所缓解,故可考虑肝豆汤作为调节 WD 患者免疫功能紊乱的辅助用药。

[参考文献]

- [1] France W, Pascal C, Aurélie P. *Wilson's disease* [M]. Berlin: Springer International Publishing, 2018: 147.
- [2] Bandmann O, Weiss K H, Kaler S G. Wilson's disease and other neurological copper disorders [J]. *Lancet Neurol*, 2015, 14(1): 103-113.
- [3] Seessle J, Gotthardt D N, Schäfer M, et al. Concomitant immune-related events in Wilson disease: implications for monitoring chelator therapy [J]. *J Inherit Metab Dis*, 2016, 39(1): 125-130.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 徐陈陈, 董健健, 陈雪燕, 等. 肝豆汤改良方对 TX 小鼠脑组织 ASM, Cer 及 p38 MAPK mRNA 和蛋白表达的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2017, 32(11): 5049-5055.
- [7] 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.
- [8] 杨任民. 肝豆状核变性 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2015: 371-372, 404-406.
- [9] Theophilos M B, Cox D W, Mercer J F, et al. The toxic milk mouse is a murine model of Wilson disease [J]. *Hum Mol Genet*, 1996, 5(10): 1619-1624.
- [10] 陈曦, 王楚怀, 丰岩清, 等. TX 小鼠铜代谢和肝损害的实验研究 [J]. *中华肝脏病杂志*, 2009, 17(9): 688-690.
- [11] 谢文光, 魏钰书, 周良玉. 儿童肝豆状核变性的体液免疫和急性期反应蛋白变化 [J]. *四川医学*, 2000, 21(2): 15-16.
- [12] 许力, 杨任民, 洪铭范. 肝豆状核变性患者的免疫功能监测 [J]. *蚌埠医学院学报*, 2006, 23(5): 456-458.
- [13] 张春海, 杨文明. 肝豆状核变性合并脾功能亢进治疗进展 [J]. *安徽医药*, 2010, 14(4): 380-382.
- [14] 常丽娜, 王金萍, 王佳佳, 等. 超声监测肝豆状核变性患者肝脾动脉血流动力学指标及其临床意义 [J]. *中国中西医结合影像学杂志*, 2015, 13(1): 29-33.
- [15] ZHANG L H, PAN J P, YAO H P, et al. Intrasplenic transplantation of IL-18 gene-modified hepatocytes: an effective approach to reverse hepatic fibrosis in schistosomiasis through induction of dominant Th1

- response[J]. *Gene Ther*, 2001, 8(17):1333-1342.
- [16] Bahr M J, Manns M P. Function of the immune system in liver cirrhosis [J]. *Z Gastroenterol*, 2001, 39(8):601-607.
- [17] 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.
- [18] CHEN D, ZHOU X, HOU H, et al. Clinical efficacy of combined sodium dimercaptopropanesulfonate and zinc treatment in neurological Wilson's disease with D-penicillamine treatment failure [J]. *Ther Adv Neurol Disord*, 2016, 9(4):310-316.
- [19] Maeda S, Matsubara H, Hiejima E, et al. Acute lymphoblastic leukemia in a girl with Wilson's disease [J]. *Pediatr Int*, 2014, 56(4):626-629.
- [20] Farallo M, Amoruso C, Frattini C, et al. Nephrotic syndrome after treatment with d-penicillamine in a pediatric patient with Wilson's disease[J]. *Pediatr Med Chir*, 2012, 34(5):234-236.
- [21] Dell'era L, Boati E, Nebbia G, et al. Wilson's disease treated with penicillamine and lupus erythematosus: related or distinct entities? [J]. *Minerva Pediatr*, 2012, 64(1):55-57.
- [22] 汪美霞, 詹宇婷, 杨文明. 肝豆汤加减治疗湿热内蕴型肝豆状核变性的临床疗效研究[J]. *中国全科医学*, 2017, 20(28):3573-3578.
- [23] 汪美霞, 陶庄, 李祥, 等. 加味肝豆汤治疗 Wilson 病湿热内蕴证早期肾损伤的临床分析[J]. *贵州医药*, 2017, 41(7):695-697.
- [24] Hsu P Y, Yen H H, YANG T H, et al. Tetrathiomolybdate, a copper chelator inhibited imiquimod-induced skin inflammation in mice [J]. *J Dermatol Sci*, 2018, 92(1):30-37.
- [25] Przybylkowski A, Gromadzka G, Wawer A, et al. Neurochemical and behavioral characteristics of toxic milk mice; an animal model of Wilson's disease [J]. *Neurochem Res*, 2013, 38(10):2037-2045.
- [26] 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.
- [27] 更藏达杰, 毛海明. 分泌性中耳炎患者炎症因子、细胞免疫及体液免疫功能分析[J]. *海南医学院学报*, 2018, 24(16):1529-1531.
- [28] 荆凡辉, 吕玮, 李太生. HIV 感染者免疫功能重建新视角: CD4/CD8 比值[J]. *中国艾滋病性病*, 2018, 24(6):643-646.
- [29] 孙旺, 高博, 薛东波, 等. 肝硬化并发血细胞减少的机制和治疗进展[J]. *肝胆胰外科杂志*, 2014, 26(1):83-85.
- [30] LI Z F, ZHANG S, LV G B, et al. Changes in count and function of splenic lymphocytes from patients with portal hypertension[J]. *World J Gastroenterol*, 2008, 14(15):2377-2382.
- [31] Cho C W, HAN C J, Young K R, et al. Cheonggukjang polysaccharides enhance immune activities and prevent cyclophosphamide-induced immunosuppression[J]. *Int J Biol Macromol*, 2015, 72(1):519-525.
- [32] Nasibullin T R, Timasheva Y R, Tuktarova I A, et al. Combinations of cytokine gene network polymorphic markers as potential predictors of myocardial infarction [J]. *Genetika*, 2014, 50(9):987-993.
- [33] 岳文杰, 刘懿, 徐薇, 等. 溃疡性结肠炎肠黏膜中 IL-2、IL-4、IL-17 和 IL-10 的表达特点及其与疾病活动度的关系 [J]. *复旦学报:医学版*, 2012, 39(5):454-459.
- [34] 翟志敏. IL-2 对免疫激活和免疫耐受的双向调节作用[J]. *中国药理学通报*, 2013, 29(3):319-322.
- [35] Matthew W K, Timothy J M, Haruo U, et al. Outside-in acute fetal systemic inflammation in very preterm chronically catheterized sheep fetuses is not driven by cells in the fetal blood[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2016, 214(2):e1-e10.
- [36] 张晓玲, 邢荣格懿, 韩国达, 等. 西黄胶囊辅助化疗治疗结肠癌术后肝转移疗效及对患者外周血 IL-17 和 IL-6 的影响[J]. *中草药*, 2015, 46(6):871-874.
- [37] Muranski P, Restifo N P. Essentials of Th17 cell commitment and plasticity [J]. *Blood*, 2013, 121(13):2402-2414.
- [38] 李慕聪, 邢东明. 白细胞介素-18 在部分自身免疫性疾病中的作用[J]. *微生物学免疫学进展*, 2017, 45(6):85-88.
- [39] Koch K N, Müller A. Helicobacter pylori activates the TLR2/NLRP3/caspase-1/IL-18 axis to induce regulatory T-cells, establish persistent infection and promote tolerance to allergens [J]. *Gut Microbes*, 2015, 6(6):382-387.
- [40] Hand T W. Interleukin-18: the bouncer at the mucosal bar[J]. *Cell*, 2015, 163(6):1310-1312.
- [41] 单增天, 田岳凤, 李雷勇, 等. 不同灸法对免疫抑制兔脾脏指数及细胞因子的影响[J]. *湖南中医药大学学报*, 2016, 36(11):83-86.
- [42] Siregar G A I, Halim S, Sitepu V R. Serum TNF- α , IL-8, VEGF levels in Helicobacter pylori infection and their association with degree of gastritis [J]. *Acta Med Indones*, 2015, 47(2):120-126.

[责任编辑 周冰冰]