

# 肝豆汤对 Wilson 病模型铜负荷大鼠肝脏 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的调控作用

耿昊<sup>1,2</sup>, 李海<sup>3</sup>, 徐陈陈<sup>2</sup>, 董健健<sup>2</sup>, 陈燕<sup>4</sup>, 韩咏竹<sup>2</sup>, 韩永升<sup>2</sup>, 杨任民<sup>2</sup>, 程楠<sup>2\*</sup>

(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;

3. 武警安徽总队医院, 合肥 230041; 4. 中国科技大学医院, 合肥 230000)

**[摘要]** 目的:探讨肝豆汤对铜负荷大鼠肝脏中分泌型糖蛋白(Wnt)/ $\beta$ -连环蛋白( $\beta$ -catenin)信号通路的调控作用及机制。方法:SD大鼠115只随机分为正常组(20只)、造模组。造模组予以 $1\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 的硫酸铜饲料及 $0.02\text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 的0.185%硫酸铜溶液连续喂养12周;造模成功大鼠随机分为模型组(45只),肝豆汤组(25只)和青霉胺(PCA)组(25只);模型组、肝豆汤组和PCA组分别予以 $0.02\text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 生理盐水, $0.4\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 的中药肝豆汤和 $0.09\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 青霉胺灌胃,连续4周,末次灌胃后取各组大鼠肝脏组织检测;电感耦合等离子体原子发射光谱法(ICP-AES)检测各组大鼠肝铜含量;苏木素-伊红(HE)染色观察各组大鼠肝脏组织病理改变,免疫组织化学法检测肝脏组织氧化应激相关蛋白的表达,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测肝组织中Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路相关蛋白的表达水平。结果:ICP-AES法结果显示,与正常组比较,模型组大鼠肝脏铜含量显著升高( $P < 0.01$ );肝豆汤可降低铜负荷大鼠肝脏铜含量( $P < 0.05$ ),PCA可显著降低模型组大鼠肝脏铜含量( $P < 0.01$ );HE染色结果显示,与正常组比较,模型组大鼠肝脏组织镜下可见肝细胞大小不一、排列紊乱,部分肝索丧失;肝豆汤组和PCA组细胞损伤程度较模型组明显降低;免疫组化结果显示:肝豆汤和PCA可显著降低模型组8-羟基脱氧鸟苷(8-Hydroxyguanosine),硝基酪氨酸(Nitrotyrosine)蛋白表达量( $P < 0.01$ );Western blot结果显示,肝豆汤和PCA可使铜负荷大鼠肝脏内Wnt通路相关蛋白 $\beta$ -连环蛋白( $\beta$ -catenin),磷酸化糖原合成激酶 $3\beta$ (glycogen synthase kinase-3, p-GSK3 $\beta$ ),原癌基因(cellular myelocytomatosis oncogene, c-Myc)蛋白表达量显著增加( $P < 0.01$ )。结论:肝豆汤可通过促进过量铜排出减轻高铜诱导的肝脏损伤,并通过激活肝脏Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路促进损伤的肝组织代偿性自愈以达到减轻高铜诱导氧化应激损伤的治疗效果。

**[关键词]** Wilson病;肝豆汤;分泌型糖蛋白(Wnt)/ $\beta$ -连环蛋白( $\beta$ -catenin)信号通路;肝脏损伤

**[中图分类号]** R2-0;R22;R285.5;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)07-0075-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20190403

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20181101.1708.020.html>

**[网络出版时间]** 2018-11-06 10:10

## Regulatory Effect of Gandou Decoction on Wnt/ $\beta$ -catenin Signaling Pathway in Liver of Wilson Model Copper-loaded Rats

GENG Hao<sup>1,2</sup>, LI Hai<sup>3</sup>, XU Chen-chen<sup>2</sup>, DONG Jian-jian<sup>2</sup>, CHEN Yan<sup>4</sup>, HAN Yong-zhu<sup>2</sup>,  
HAN Yong-sheng<sup>2</sup>, YANG Ren-min<sup>2</sup>, CHENG Nan<sup>2\*</sup>

(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;

3. Hospital of Armed Police Force of Anhui Province, Hefei 230041, China;

4. Hospital of University of Science and Technology of China, Hefei 230000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the regulatory effect of Gandou decoction (GDD) on Wnt/ $\beta$ -catenin

**[收稿日期]** 20180705(007)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81673948,81603596);安徽省自然科学基金项目(1608085MH171)

**[第一作者]** 耿昊,在读硕士,医师,从事神经系统疾病研究, E-mail:1466755694@qq.com

**[通信作者]** \*程楠,副教授,从事神经系统疾病研究, E-mail:neurodoc120@163.com

signaling pathway in hepatic tissue of Wilson disease model copper-loaded rats and its potential mechanism. **Method:** One hundred and fifteen SD rats were randomly divided into the normal group ( $n = 20$ ) and modeling group. Modeling group was given copper sulfate feed ( $1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) and 0.185% copper sulfate solution ( $0.02 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) for 12 weeks after one week's adaptive feeding, so as to build the copper loaded rats model. After modeling, 95 model rats were randomly divided into model group ( $n = 45$ ), which were fed by modeling method for continuously four weeks; GDD group and penicillamine (PCA) group ( $n = 25$  per group). GDD group and PCA group were given GDD ( $0.4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) and PCA ( $0.09 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) by gavage for four weeks. The hepatic tissues of rats in each group were removed after final medication for further research; inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry (ICP-AES) was used to detect the content of Cu element in rat livers. Htoxylin eosin (HE) staining was used to detect the pathological changes of rat liver. Immunohistochemistry was used to detect expression of oxidative stress. Western blot was used to detect protein expressions in Wnt/ $\beta$ -catenin of rat livers. **Result:** Compared with model group, content of Cu element in GDD group was less ( $P < 0.05$ ); compared with model group, content of Cu element in PCA group was less ( $P < 0.01$ ). The hepatic cells of model group showed different sizes, disordered arrangement and partial loss of hepatic cord compared with normal group; the hepatic injuries of GDD and PCA group were significantly lower than model group. Compared with model group, 8-Hydroxyguanosine, Nitrotyrosine protein positive expression in GDD and PCA group were significantly less ( $P < 0.01$ ). Compared with model group, the expression quantities of  $\beta$ -catenin, p-glycogen synthase kinase-3 $\beta$  (p-GSK3 $\beta$ ), cellular myelocytomatosis oncogene (c-Myc) in GDD and PCA group increased, while p- $\beta$ -catenin, Dishevelled3, GSK3 $\beta$  protein expressions reduced ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** GDD can relieve liver damage by promoting excessive copper discharge. GDD decoction can promote the compensatory self-healing of the injured liver tissue by activating Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in the hepatic tissue of Wilson disease model copper-loaded rats, so as to reduce the therapeutic effect of hepatocellular injury induced by high copper.

[**Key words**] Wilson disease; Gandou decoction; Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway; hepatic injury

Wilson 病 (Wilson disease, WD) 又称肝豆状核变性 (HLD), 是一种可治性的常染色体隐性遗传铜代谢障碍性疾病。ATP7b 基因主要在肝脏中表达, 其突变导致 WD 患者铜代谢障碍, 引发过量的铜在肝脏、脑、肾脏中沉积, 出现肝损伤、神经精神症状、角膜 K-F 环等多种临床表现。由于铜首先在肝脏内沉积, 因此肝脏既是本病原始缺陷器官, 也是最主要受累器官, 肝损伤贯穿病程始终也是患者主要死亡原因之一<sup>[1]</sup>。因此治疗肝损伤是 WD 治疗的主要任务, 对改善患者预后意义重大。以青霉胺为代表的金属离子螯合剂是治疗该病的首选药物, 但其不良反应严重、患者依从性差, 因此获取不良反应少、治疗靶点精准的药物成为治疗 WD 肝损伤的重要突破点。

中医药以多层次、多环节、多靶点作用特点及不良反应少等巨大优势在防治肝脏疾病中日益受到重视。本单位自 20 世纪 70 年代以来开始研究 WD 的中西医结合辨证论治, 认为本病主要是由于铜毒内聚、肝胆湿热内蕴所致<sup>[2]</sup>, 并基于该病机理论法以清热解毒、利尿通腑<sup>[3]</sup>组方肝豆汤, 不良反应少, 治

疗好转率达到 84.1%<sup>[4]</sup>, 并在对肝豆汤作用于凋亡、自噬相关信号通路的研究中发现肝豆汤对铜诱导的细胞损伤具有调控作用<sup>[5-6]</sup>。分泌型糖蛋白 (Wnt)/ $\beta$ -连环蛋白 ( $\beta$ -catenin) 信号通路影响肝脏生长、发育、新陈代谢等生理过程, 参与肝纤维化、肝癌等肝脏疾病的病理过程<sup>[7]</sup>, 同时与氧化应激和 DNA 损伤反应 (DDR) 等细胞损伤密切相关<sup>[8]</sup>。研究发现高铜能诱导肝细胞氧化应激并且引起 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路失活, 从而诱导肝细胞损伤的发生<sup>[9]</sup>。为了进一步明确肝豆汤治疗 WD 肝损伤的疗效机制, 假设 WD 肝损伤的病理生理过程可能与 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路有关, 而肝豆汤可通过激活 Wnt/ $\beta$ -catenin 达到治疗 WD 肝损害的疗效。以期 WD 肝损害的损伤机制和肝豆汤对 WD 肝损伤的保护作用提供分子学实验依据, 为进一步开发治疗 WD 的药物提供具体治疗靶点。

## 1 材料

**1.1 动物** 实验动物实验用 SPF 级雄性 SD 大鼠, 115 只, 3 月龄, 体质量 ( $210 \pm 25$ ) g, 购买于安徽医科大学, 合格证号 SCXK (皖) 2017-0001。严格按照

《实验动物管理条例》要求在安徽中医药大学神经病学研究所动物房(清洁级饲养室)饲养实验大鼠。本研究获得安徽中医药大学实验动物伦理委员会批准。

**1.2 药物及试剂** 中药肝豆汤组方由大黄 20 g, 泽泻 24 g, 黄连 20 g, 金钱草 24 g, 姜黄 20 g, 三七 3 g 组成(组方药物均购自北京同仁堂药店安徽合肥分店, 经安徽中医药大学药学院金传山教授鉴定, 符合 2015 年版《中国药典》标准), 准确称取对应中药, 加入蒸馏水 200 mL, 浸泡 30 min, 大火煮沸后加入大黄, 再以文火煎煮 30 min, 经纱布过滤后置药液于玻璃烧杯中, 药渣再加入蒸馏水 200 mL, 重复上法煎煮过滤。最后将 2 次药液合并, 使用文火煎煮浓缩药液至 150 mL, 冷却后置于棕色瓶内密封保存, 放入 4 ℃ 冰箱中备用, 每次制备肝豆汤使用期限不超过 1 周。青霉胺(上海信谊药业有限公司, 批号 0520170602); 蓬乱蛋白 3 (Dishevelled3), 磷酸化糖原合成激酶 3β (p-GSK3β), GSK3β, β-连环蛋白 (β-catenin), Dickkopf1 (DKK1), 原癌基因 (c-Myc), p-β-catenin, 8-羟基脱氧鸟苷 (8-Hydroxyguanosine), 硝基酪氨酸 (Nitrotyrosine), β-肌动蛋白 (β-actin) 抗体, 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔免疫球蛋白 (Ig) G 二抗 (英国 Abcam 公司, 批号分别为 ab92567, ab107166, ab32391, ab6302, ab93017, ab39688, ab53050, ab26842, ab183391, ab8226, ab102458); 磷酸盐缓冲液 (PBS, 无锡傲锐东源生物科技有限公司, 批号 17070901); CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (大连美仑生物技术有限公司, 批号 20160414); 苏木素-伊红 (HE) 染色试剂盒 (北京索莱宝生物技术有限公司, 批号 20171011); 二甲苯 (上海苏懿化学试剂有限公司, 批号 131225)。

**1.3 仪器** CM1900 型自动脱水机, RM2135 型石蜡切片机 (德国 Leica 公司); EG1160 型包埋机 (上海仪电科学仪器有限公司); CX41-12C02 型光学显微镜 (日本 Olympus 公司); 188105 型粘附载玻片 (江苏世泰实验器材有限公司); 1810B 型自动双重纯水蒸馏器 (上海亚太技术玻璃公司); QT-2A 型涡旋混合器 (上海琪特分析仪器有限公司); PowerPac 型电泳仪及转膜仪 (美国伯乐公司)。

## 2 方法

**2.1 模型制备与给药方法** 115 只 SPF 级雄性 SD 大鼠随机分为正常组 (20 只), 造模组。开始给药前先适应性饲养 1 周。本研究采用的模型制备和给药方法基于前期实验研究<sup>[10]</sup>, 正常组予以普通饲料正

常喂养、生理盐水 0.02 mL·g<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> 灌胃, 连续 16 周; 造模组予以 1 g·kg<sup>-1</sup> 的 CuSO<sub>4</sub> 饲料喂养, 每日按照 0.02 mL·g<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> 给予 0.185% CuSO<sub>4</sub> 水喂养, 连续 12 周建立铜负荷大鼠模型。造模成功后随机分为模型组 (45 只), 肝豆汤组 (25 只) 和青霉胺组 (25 只), 3 组继续按造模方法给药; 模型组予以生理盐水 0.02 mL·g<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> 灌胃, 连续 4 周; 肝豆汤组和青霉胺组从第 13 周开始分别予以 0.4 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> 中药肝豆汤和 0.09 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> 青霉胺灌胃给药, 连续 4 周。各组大鼠自由饮水, 每天进食相等, 均在相同环境下饲养。末次给药后处死大鼠取肝组织进行检测。

**2.2 电感耦合等离子体原子发射光谱法 (ICP-AES) 检测铜元素含量** 每组各 15 只大鼠取肝脏组织标本采用微波消解法预处理: 用反应管称量肝组织 0.5 g 加入硝酸消解液 6 mL, 放入 130 ℃ 预消解仪器中消解约 30 min。预消解完成后, 将参比罐放在 1 号位, 其他按序放置, 顺时针旋转保护盖至锁定位置放入微波炉腔内, 开始微波消解。将消解完的澄清液体送检安徽中医药大学神经病学研究所附属医院化验室, 通过 ICP-AES 法检测铜元素的含量。

**2.3 HE 染色检测肝组织病理学变化** 每组各 15 只大鼠取肝脏, HE 染色法处理后脱蜡染色封片后镜下观察各组肝组织损伤程度, 包括肝细胞形态学、结构和排列分布。

**2.4 免疫组化检测大鼠肝脏组织 8-Hydroxyguanosine, Nitrotyrosine 蛋白表达** 每组各 15 只大鼠选取肝脏组织脱水、浸蜡、包埋、切片后采用一抗孵育 4 ℃ 过夜。二抗孵育室温孵育 30 min; DAB 显色、复染、脱水、封片。每组图片选取 3 个视野应用 Image J 软件计数阳性细胞数, 进行阳性率检测, 分析各组大鼠肝脏组织 8-Hydroxyguanosine, Nitrotyrosine 蛋白的影响。

**2.5 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测大鼠肝脏组织 Wnt/β-catenin 信号通路相关蛋白的表达水平** 分别提取正常组、模型组、青霉胺和肝豆汤组肝组织细胞蛋白, BCA 法检测蛋白浓度。制胶并按照检测结果上样, 电泳, 转膜, 封闭 2 h, 用 PBST 清洗 3 次, 分别放入 Dishevelled 3, p-GSK3β, GSK3β, 抗 β-catenin, DKK1, c-Myc, p-β-catenin (phospho S33 + S37) 抗体稀释液 (1:2 000), 4 ℃ 冰箱过夜。PBST 清洗后孵二抗 (1:1 万), 常温下 2 h, 清洗后对目的条带进行拍照, 然后使用 Image J 软件对图像进行数据分析, 计算灰度值。

**2.6 统计学分析** 数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析,两组间数据采用两独立样本 *t* 检验,多组数据采用单因素方差分析进行比较,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 肝豆汤对铜负荷大鼠肝脏铜元素含量的影响** 与正常组比较,模型组肝脏铜含量显著升高 ( $P < 0.01$ );与模型组大鼠比较,肝豆汤组肝铜含量明显降低 ( $P < 0.05$ ),青霉胺组肝脏铜含量显著降低 ( $P < 0.01$ )。见表 1。

表 1 肝豆汤对铜负荷大鼠肝脏铜元素含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 15$ )

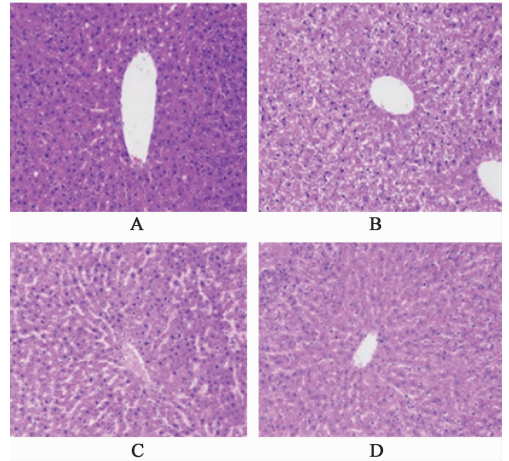
Table 1 Effect of Gandou decoction on Cu element content of hepatic tissue from copper-loaded rats ( $\bar{x} \pm s, n = 15$ )

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	Cu/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
正常	-	2.284 ± 0.207
模型	-	3.588 ± 0.128 <sup>2)</sup>
肝豆汤	0.4	3.004 ± 0.166 <sup>3)</sup>
青霉胺	0.09	3.048 ± 0.096 <sup>4)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>4)</sup>  $P < 0.01$ (表 2,3 同)。

**3.2 肝豆汤对铜负荷大鼠肝脏病理的影响** 正常组大鼠肝组织细胞分布正常,排列整齐,少量肝细胞可见颗粒变性,胞浆可见细小红色颗粒黑色。模型组肝细胞排列紊乱,大部分肝细胞广泛重度水泡变性,胞浆空泡化。肝豆汤组肝细胞广泛颗粒变性,胞浆与胞核淡染,胞浆内可见细小红色颗粒,可见肝窦扩张,并可见红色血浆。青霉胺组织中肝细胞广泛颗粒变性,胞浆与胞核淡染,胞浆内可见细小的红色颗粒。各治疗组与模型组相比较肝细胞变性坏死减

少,病理变化较轻,细胞结构较完整。见图 1。



A. 正常组;B. 模型组;C. 肝豆汤组;D. 青霉胺组(图 2,3 同)

图 1 肝豆汤对铜负荷大鼠肝脏病理的影响(HE, ×200)

Fig. 1 Effect of Gandou decoction on hepatic pathological changes from copper-loaded rats(HE, ×200)

**3.3 肝豆汤对铜负荷大鼠肝脏氧化应激相关蛋白表达的影响** 与正常组比较,模型组大鼠肝组织 8-Hydroxyguanosine, Nitrotyrosine 蛋白的阳性表达率显著增加 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,肝豆汤组和青霉胺组 8-Hydroxyguanosine, Nitrotyrosine 蛋白阳性表达率显著降低 ( $P < 0.01$ )。见图 2,表 2。

**3.4 对铜负荷大鼠肝脏 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路相关蛋白的表达影响** 与正常组比较,模型组  $\beta$ -catenin, p-GSK3 $\beta$ , c-Myc 蛋白表达量显著降低 ( $P < 0.01$ ), p- $\beta$ -catenin, GSK3 $\beta$ , DKK1, Dishevelled3 表达量显著增加 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,肝豆汤组和青霉胺组肝脏内  $\beta$ -catenin, p-GSK3 $\beta$ , c-Myc 蛋白表达量显著增加 ( $P < 0.01$ ), p- $\beta$ -catenin,

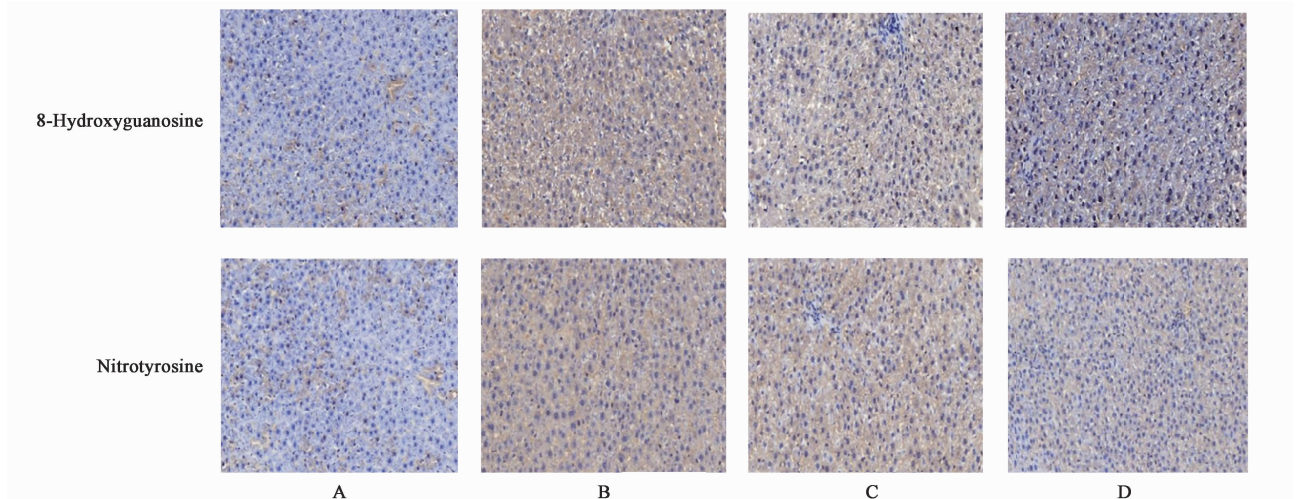


图 2 肝豆汤对铜负荷大鼠肝脏氧化应激相关蛋白表达的影响(免疫组化, ×200)

Fig. 2 Effect of Gandou decoction on expression of oxidative stress related proteins in liver of copper-loaded rats(IHC, ×200)

表 2 肝豆汤对铜负荷大鼠肝脏 8-Hydroxyguanosine, Nitrotyrosine 蛋白阳性率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 15$ )

Table 2 Effect of Gandou decoction on positive expression of 8-Hydroxyguanosine, Nitrotyrosine in liver of copper-loaded rats ( $\bar{x} \pm s, n = 15$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	8-Hydroxyguanosine	Nitrotyrosine
正常	-	9.49 ± 0.91	12.92 ± 0.73
模型	-	40.69 ± 2.18 <sup>2)</sup>	45.11 ± 1.37 <sup>2)</sup>
肝豆汤	0.4	31.08 ± 2.39 <sup>4)</sup>	34.63 ± 1.00 <sup>4)</sup>
青霉胺	0.09	29.28 ± 3.05 <sup>4)</sup>	32.24 ± 3.11 <sup>4)</sup>

Dishevelled3 蛋白表达量显著降低 ( $P < 0.01$ ), GSK3 $\beta$ , DKK1 蛋白表达量明显降低 ( $P < 0.05$ )。见图 3, 表 3。

表 3 肝豆汤对铜负荷大鼠肝脏 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路相关蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 3 Effect of Gandou decoction on expression of protein related to signaling pathway of Wnt/ $\beta$ -catenin in liver of copper-loaded rat ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	$\beta$ -catenin / $\beta$ -actin	p- $\beta$ -catenin / $\beta$ -actin	GSK3 $\beta$ / $\beta$ -actin	p-GSK3 $\beta$ / $\beta$ -actin	DKK1 / $\beta$ -actin	Dishevelled3 / $\beta$ -actin	c-Myc / $\beta$ -actin
正常	-	1.013 ± 0.085	0.998 ± 0.106	1.005 ± 0.185	1.009 ± 0.039	0.992 ± 0.145	1.012 ± 0.058	1.002 ± 0.170
模型	-	0.392 ± 0.058 <sup>2)</sup>	3.384 ± 0.125 <sup>2)</sup>	3.438 ± 0.198 <sup>2)</sup>	0.397 ± 0.096 <sup>2)</sup>	2.998 ± 0.177 <sup>2)</sup>	1.812 ± 0.188 <sup>2)</sup>	0.057 ± 0.002 <sup>2)</sup>
肝豆汤	0.4	0.628 ± 0.141 <sup>4)</sup>	1.558 ± 0.149 <sup>4)</sup>	2.389 ± 0.162 <sup>4)</sup>	0.819 ± 0.011 <sup>4)</sup>	1.587 ± 0.073 <sup>4)</sup>	1.176 ± 0.078 <sup>4)</sup>	0.751 ± 0.164 <sup>4)</sup>
青霉胺	0.09	0.776 ± 0.061 <sup>4)</sup>	2.198 ± 0.051 <sup>4)</sup>	2.620 ± 0.059 <sup>3)</sup>	0.702 ± 0.095 <sup>4)</sup>	2.175 ± 0.187 <sup>3)</sup>	1.152 ± 0.102 <sup>4)</sup>	0.613 ± 0.168 <sup>4)</sup>

#### 4 讨论

WD 是一种遗传性的铜代谢障碍性疾病,致病基因 ATP7b 主要在肝脏表达,其功能缺陷导致铜蓝蛋白与铜无法结合排出体外以致大量铜首先在肝脏内蓄积,因此肝脏是该病的原始缺陷器官和主要靶器官。有研究表明 WD 是非病毒性肝病患者的主要病因,约占 48.92%<sup>[11]</sup>。王训等<sup>[10]</sup>应用硫酸铜灌胃建立的铜负荷大鼠模型与 WD 患者具有类似的铜代谢障碍和肝损害表现,因此铜负荷大鼠模型可作为 WD 病因病机和疗效机制的理想研究对象。针对 WD 铜毒内聚,肝胆湿热内蕴的病机,法以清热解毒、利尿通腑,临床应用肝豆汤疗效满意<sup>[12-14]</sup>。但肝豆汤治疗 WD 的疗效机制尚处在研究阶段。陈林等<sup>[15]</sup>通过研究 WD 模型 Tx 小鼠肝脏铜、铁微量元素变化发现肝豆汤可以明显降低 Tx 小鼠铜、铁含量。董健健等<sup>[16]</sup>认为肝豆汤参与调控肝细胞内 ATP7b, ATOX1, CCS, COX17 等铜代谢相关蛋白的表达以发挥细胞排铜、肝细胞保护作用。徐陈陈等<sup>[17]</sup>发现肝豆汤可以通过调控细胞内 Cyt C/Caspase 信号通路保护神经元。

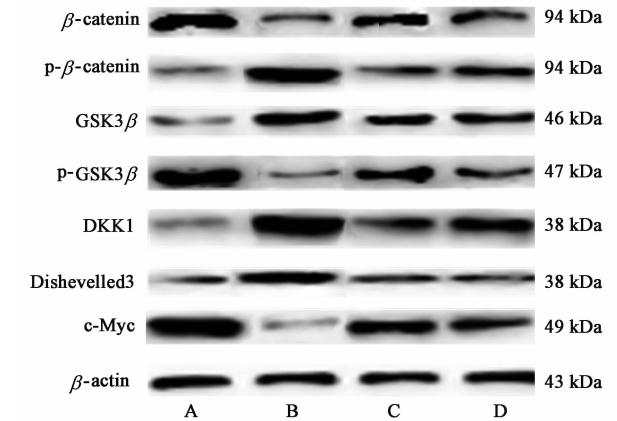


图 3 各组大鼠肝脏 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路相关蛋白表达电泳  
Fig. 3 Electrophoresis of expression of protein related to signaling pathway of Wnt/ $\beta$ -catenin from each group

铜是人体必不可少的微量元素之一,但却是 WD 肝损伤的重要因素。实验结果显示,肝豆汤组大鼠肝脏内铜含量较模型组大鼠降低。模型组大鼠肝脏病理学检查显示肝细胞排列紊乱,大部分肝细胞广泛重度水泡变性,胞浆空泡化,部分肝索丧失,肝豆汤组大鼠肝脏损伤较模型组程度轻。表明肝豆汤具有肝脏排铜作用,可以减轻铜负荷大鼠的肝脏损伤。

8-Hydroxyguanosine 是氧化应激或者含氧代谢过程中的产生的羟基自由基<sup>[18]</sup>。自由基异常增多与动脉粥样硬化、大脑和心脏缺血再灌注损伤等多种衰老和神经退行性疾病相关<sup>[19]</sup>。Nitrotyrosine 是由体内过氧亚硝基阴离子 (peroxynitrite, ONOO-) 以及一氧化氮 (NO) 形成,其含量可以反映组织细胞中氧化应激的程度<sup>[20]</sup>。细胞内的 Cu, Fe 等金属元素含量异常以及自由基可以导致氧化应激的发生<sup>[21]</sup>。实验结果显示肝豆汤灌胃后,铜负荷大鼠肝细胞内 8-Hydroxyguanosine 和 Nitrotyrosine 蛋白的含量较模型组显著降低,表明肝豆汤可降低氧化性损伤对肝细胞的损害。

$\beta$ -catenin 和 p- $\beta$ -catenin 蛋白是 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路下游重要环节, p- $\beta$ -catenin 是  $\beta$ -catenin 的磷酸化形式<sup>[22]</sup>。Wnt 信号未激活时,  $\beta$ -catenin 和 GSK3 $\beta$  结合使  $\beta$ -catenin 蛋白磷酸化形成 p- $\beta$ -catenin<sup>[23]</sup>。 $\beta$ -catenin 蛋白磷酸化受到抑制使  $\beta$ -catenin 蛋白水平上升<sup>[24]</sup>。GSK3 $\beta$  能够维持目的蛋白的磷酸化, p-GSK3 $\beta$  是 GSK3 $\beta$  的磷酸化形式, 可使目的蛋白去磷酸化, Wnt 信号激活时表达量上升<sup>[25]</sup>。C-Myc 蛋白是细胞核内重要的 DNA 结合蛋白<sup>[26]</sup>, 其过量表达会导致细胞凋亡<sup>[27]</sup>。DKK1 是 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的抑制因子<sup>[28]</sup>, 通过抑制细胞膜上受体的激活、抑制 Wnt 信号配体与受体的相互作用以抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路<sup>[29]</sup>。Dishevelled 3 可以作用于受体蛋白、磷酸酶以及激酶<sup>[30]</sup>, 激活时可抑制 GSK3 $\beta$ , 增加  $\beta$ -catenin 蛋白表达, 激活 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路<sup>[31]</sup>。实验结果显示, 模型组大鼠肝脏  $\beta$ -catenin, p-GSK3 $\beta$ , c-Myc 蛋白较正常大鼠显著降低, p- $\beta$ -catenin, GSK3 $\beta$ , DKK1, Dishevelled3 表达量显著增加; 肝豆汤组大鼠肝脏内  $\beta$ -catenin, p-GSK3 $\beta$ , c-Myc 蛋白表达较模型组显著上调, p- $\beta$ -catenin, Dishevelled3 蛋白表达量显著下调, GSK3 $\beta$ , DKK1 蛋白表达量降低。表明在高铜环境下, 肝细胞内 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路受到抑制, 而肝豆汤可以上调  $\beta$ -catenin, p-GSK3 $\beta$ , c-Myc 等蛋白, 重新激活该通路。

Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路与氧化应激损伤密切相关。冯珂<sup>[32]</sup>认为 Eaf2 mRNA 可通过激活 Wnt 通路保护氧化应激诱导的人 HLE 细胞凋亡; 罗欣等<sup>[33]</sup>认为氯化锂可通过激活 Wnt 信号通路对人滋养细胞氧化应激性损伤具有保护作用; 李静<sup>[34]</sup>认为人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 可激活 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路、阻遏氧化应激介导的 DNA 损伤反应。本研究结果证实, 高铜环境可抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路, 诱导大鼠肝脏氧化应激性损伤。肝豆汤可降低铜负荷大鼠肝脏铜的含量, 并激活 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路使肝脏代偿性自修复, 达到减轻高铜诱导的大鼠肝细胞氧化应激性损伤、促进肝脏自理性修复的治疗效果。实验结果显示, 青霉胺驱铜效果强于肝豆汤, 但其对 GSK3 $\beta$  和 DKK1 蛋白的调控作用不及肝豆汤显著, 这种趋势异质也提示肝豆汤并非简单直接通过驱铜调控该通路, 契合了中药复方多靶点的特征, 这对肝豆汤治疗 WD 肝损伤的作用机制和具体靶点研究有重要的意义, 有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Illis L S. Handbook of clinical neurology [J]. Spinal Cord, 2013, 51(10): 797-799.
- [2] 叶群荣, 胡纪源, 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): 34-37.
- [3] 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.
- [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] 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.
- [6] 董健健. 中药肝豆汤对 Wilson 病模型 TX 小鼠肝细胞内铜转运通路的分子调控机制研究 [D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2015.
- [7] 尹定子, 宋海云. Wnt 信号通路: 调控机理和生物学意义 [J]. 中国细胞生物学学报, 2011, 33(2): 103-111.
- [8] ZHANG D Y, PAN Y, ZHANG C, et al. Wnt/beta-catenin signaling induces the aging of mesenchymal stem cells through promoting the ROS production [J]. Mol Cell Biochem, 2013, 374(12): 13-20.
- [9] 黄雅楠, 李海, 董健健, 等. 高铜对于肝细胞 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的影响 [J]. 中国神经精神疾病杂志, 2017, 45(11): 646-650.
- [10] 王训, 杨任民. 二巯丁二钠对大鼠铜负荷模型铜代谢的影响 [J]. 中国新药杂志, 1999, 8(7): 458-460.
- [11] 朱世殊, 董漪, 徐志强, 等. 2001—2010 年儿童非病毒性肝病谱分析 [J]. 传染病信息, 2011, 24(5): 279-281, 285.
- [12] 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.
- [13] 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(11): 676-677, 644.
- [14] 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.
- [15] 陈林, 艾文龙, 程楠, 等. 肝豆汤对 tx 小鼠肝脏微量元素含量及 ATP7B 蛋白表达的影响 [J]. 中国临床研究, 2015, 28(2): 137-140.
- [16] 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.
- [17] 徐陈陈, 董健健, 程楠, 等. 肝豆汤改良方对 Wilson's 病模型 TX 乳鼠神经元内 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.
- [18] Riveiro-Naveira R R, Valeórcel-Ares M N, Almonte-Becerril M, et al. Resveratrol lowers synovial hyperplasia, inflammatory markers and oxidative damage in an acute antigen-induced arthritis model [J]. *Rheumatology*, 2016, 55(10): 1889-1900.
- [19] Stanicka J, Russell E G, Woolley J F, et al. NADPH oxidase-generated hydrogen peroxide induces DNA damage in mutant FLT3-expressing leukemia cells[J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(15): 9348-9361.
- [20] Tabak O, Gelisgen R, Erman H, et al. Oxidative lipid, protein, and DNA damage as oxidative stress markers in vascular complications of diabetes mellitus [J]. *Clin Invest Med*, 2011, 34(3): 163-171.
- [21] Uversky V N, Li J, Fink A L. Metal-triggered structural transformations, aggregation, and fibrillation of human alpha-synuclein. a possible molecular NK between Parkinson's disease and heavy metal exposure [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(47): 44284-44296.
- [22] Willert K, Nusse R.  $\beta$ -catenin: a key mediator of Wnt signaling [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 1998, 8(1): 95-102.
- [23] Stamos J L, Weis W I. The  $\beta$ -catenin destruction complex [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2013, 5(1): a007898.
- [24] Li V S, Ng S S, Boersema P J, et al. Wnt signaling through inhibition of beta-catenin degradation in an intact Axin1 complex [J]. *Cell*, 2012, 149(6): 1245-1256.
- [25] Hur E M, ZHOU F Q. GSK3 signalling in neural development [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2010, 11(8): 539-551.
- [26] Gardner L B, Com P G. Hypoxic regulation of mRNA expression [J]. *Cell Cycle*, 2008, 7(13): 1916-1924.
- [27] Schmidt E V. The role of c-myc in regulation of translation initiation [J]. *Oncogene*, 2004, 23(18): 3217-3221.
- [28] MAO B, WU W, Davidson G, et al. Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/ $\beta$ -catenin signalling [J]. *Nature*, 2002, 417(6889): 664-667.
- [29] Niida A, Hiroko T, Kasai M, et al. DKK1, a negative regulator of Wnt signaling, is a target of the beta-catenin/TCF pathway [J]. *Oncogene*, 2004, 23(52): 8520-8526.
- [30] De Marco P, Merello E, Consales A, et al. Genetic analysis of disheveled 2 and disheveled 3 in human neural tube defects [J]. *J Mol Neurosci*, 2013, 49(3): 582-588.
- [31] Petersen C P, Reddien P W. Wnt signaling and the polarity of the primary body axis [J]. *Cell*, 2009, 139(6): 1056-1068.
- [32] 冯柯. Eaf2 通过 Wnt 信号通路抑制氧化应激诱导的人晶状体上皮细胞凋亡的研究 [D]. 广州: 南方医科大学, 2016.
- [33] 罗欣, 庄白妹, 饶海英, 等. 经典 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路介导子痫前期滋养细胞氧化应激损伤的机制研究 [J]. *重庆医科大学学报*, 2015, 40(6): 801-805.
- [34] 李静. 人参皂苷 Rg<sub>3</sub> 调控经典 Wnt 信号通路延缓造血干/祖细胞衰老的机制研究 [D]. 重庆: 重庆医科大学, 2017.

[责任编辑 周冰冰]