

TX小鼠的铜代谢特点和肝脏病理学特征

石铸, 王莹, 任廷文, 梁秀龄, 徐评议, 李洵桦, 邱国光
(中山大学附属第一医院神经科, 广东广州 510080)

摘要:【目的】对TX小鼠的铜代谢特征和肝脏的组织病理学及超微结构进行研究。【方法】TX小鼠16只以及同系DL小鼠16只分别作为病例组和对照组,测定各自的血清铜、铜蓝蛋白等铜生化指标,用光学显微镜常规HE染色及电镜观察肝脏病理学特点。【结果】按干体质量的肝铜含量成年TX小鼠显著高于对照小鼠, [(701.9 ± 23.4)mg/g vs. (15.6 ± 3.8)mg/g, $P < 0.01$]。光镜下肝细胞排列紊乱,细胞肿胀,部分胞核增大呈空泡状,伴有大量的炎性细胞浸润,同时可见活跃增生的卵圆细胞。电镜下可见多数肝细胞的溶酶体结构有较多的颗粒状电子致密物沉积,伴有线粒体增多肿胀。【结论】TX小鼠铜代谢特点和肝铜沉积的组织病理学特征与Wilson病相符,是Wilson病研究较理想的动物模型。

关键词: 小鼠; 肝/超微结构; 铜; 肝豆状核变性; 疾病模型, 动物

中图分类号: R742.4

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2003)03-0211-03

Copper Metablism and Histopathology of Liver Secondary to Copper Accumulation of TX Mouse

SHI Zhu, WANG Ying, REN Ting-wen, LIANG Xiu-ling, XU Ping-yi, LI Xun-hua, QIU Guo-guang
(Department of Neurology, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】 To investigate the histopathology and ultrastructure of TX mice liver secondary to copper accumulation. 【Methods】 Two groups of mice which were respectively consisted of 16 TX mice and 16 inbred control, DL mice were used in this research. Pathologic histology HE staining and electron microscope were adopted together with some copper biochemistry indexes determined. 【Results】 The copper content of TX mouse liver was significantly higher than that of the control [(701.9 ± 23.4)mg/g vs. (15.6 ± 3.8)mg/g, $P < 0.01$] according to its dry body mass. Under optical microscope, the hepatocytes arranges in chaotic pattern with swelling cytoplasm and big, vacuoles-like nuclei. Active proliferating oval cells were also available. Under electron microscope, dense electron depositions in the lamina structure of lysosomes were common, with increased and swelling mitochondria. 【Conclusions】 The histopathology of TX mouse liver is coincident with that in Wilson disease, and TX mouse is a valid animal model of Wilson disease.

Key words: mouse; liver/ultrastructure; copper; hepatolenticular degeneration; disease model, animal

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2003, 24(3): 211 ~ 213]

Wilson病是一种以遗传性铜代谢障碍为特征的全身性疾病。受限于合适的动物模型,国内Wilson病研究一直未能深入。TX(toxic milk)小鼠的致病基因与人Wilson病的致病基因——ATP7B基因

同源,但目前国内外尚没有对TX小鼠肝组织铜沉积的生化、病理学系统研究的报告。因此,作者从澳大利亚引进了TX小鼠,对其铜生化特征和肝组织病理学及超微结构的特点进行研究,评价其作为

收稿日期:2002-11-15

基金项目:广东省自然科学基金资助项目(010705);中山医科大学“211工程”重点建设基金资助项目

作者简介:石铸(1974-),男,回族,江苏南京人,博士生;梁秀龄,教授,博士生导师,课题主持人;邱国光,本校北校区实验动物中心。

Wilson 病动物模型的可行性。

1 材料和方法

1.1 实验动物

TX 小鼠雌雄各 8 只 ($n=16$), 36 周龄, 作为病例组; 对照组 DL 小鼠雌雄各 8 只 ($n=16$), 36 周龄。上述实验动物由澳大利亚 Deakin 大学 Julian Mercer 教授惠赠。

1.2 血清铜蓝蛋白测定

100 g/L 水合氯醛 (400 mg/kg) 麻醉动物后, 开胸心脏穿刺取血 0.5 mL, 4 000 r/min ($r=0.16$ m) 离心 10 min 取血清。对苯二胺法检测铜蓝蛋白活性, 高温石墨炉原子吸收法测定血清铜含量。各组数据取均数和标准差后行 t 检验。

1.3 组织学检查

取上述实验动物的肝脏组织以 40 g/L 多聚甲醛固定, 常规脱水、包埋、切片, 切片厚度 0.5 μ m,

行 HE 染色, 光学显微镜检查。

1.4 组织铜含量测定

取实验动物的新鲜肝、脑、脾、肾、心脏、肺、骨骼肌以及皮肤组织等, 置于 80 $^{\circ}$ C 烤箱中灰化 8~12 h 至反复称量质量恒定, 用浓硝酸和高氯酸混合溶解至澄清, 高温石墨炉法测定溶液中铜含量, 并相应计算各组织中铜含量。

1.5 电镜检查

新鲜肝组织 25 g/L 戊二醛前固定, 10 g/L 锇酸后固定, 常规电镜切片, 观察。

2 结果

2.1 TX 小鼠的各项铜生化指标

与正常对照组比, TX 小鼠的血清铜与血清铜蓝蛋白活性显著降低, 而各组织的铜含量显著增高, 其中肝组织铜含量甚至是正常的 40~50 倍(见表 1)。

2.2 大体解剖

表 1 TX 小鼠与对照 DL 小鼠的各项铜生化指标的比较

Table 1 Comparison of copper biochemical indexes between TX mice and control DL mice

	Ceruloplasmin activity (U/L)	Serum copper (mg/L)	Hepatic copper (mg/g)	Kidney copper (mg/g)	Brain copper (mg/g)	Heart copper (mg/g)	Spleen copper (mg/g)	Lung copper (mg/g)	Muscle copper (mg/g)	Skin copper (mg/g)
TX mice	8.7 \pm 1.3 ¹⁾	0.3 \pm 0.1 ¹⁾	701.9 \pm 23.4 ²⁾	46.3 \pm 6.5 ¹⁾	37.1 \pm 7.4 ¹⁾	18.2 \pm 4.6 ¹⁾	21.9 \pm 5.7 ²⁾	15.5 \pm 5.2 ²⁾	5.8 \pm 1.5	18.4 \pm 4.7 ²⁾
DL mice	25.5 \pm 3.4	0.9 \pm 0.1	15.6 \pm 4.8	10.6 \pm 2.7	16.8 \pm 3.2	5.3 \pm 1.1	1.6 \pm 0.3	undetected	3.9 \pm 0.8	0.9 \pm 0.1

t test showed significant differences, 1) $P < 0.05$; 2) $P < 0.01$; Relative tissue copper (mg/g): ration to its dry tissue mass

TX 小鼠的肝脏包括左叶、右叶、中叶和尾叶与正常对照相比, 颜色灰黄, 质地较韧, 但大小正常, 约 1.5 cm \times 1.0 cm, 表面光滑, 无结节状增生。

2.3 组织学观察

肝细胞排列紊乱, 丧失了正常的肝索结构, 部分肝实质细胞肿胀呈玻璃样改变, 胞浆内含有较多脂滴, 细胞核肿大甚至表现空泡状, 另有部分肝细胞为双核。同时可见肝血窦或肝索内有增生活跃的卵圆细胞, 胞核较小, 细胞体积约为正常肝细胞的 1/4 左右。肝血窦内有较多的淋巴细胞浸润(图 1)。

2.4 超微结构观察

电镜下(图 2)见肝细胞排列紧密, 可见桥粒。细胞大小不均一, 粗面内质网有断裂现象, 线粒体增多肿胀, 溶酶体可见典型的板层结构并有大量的电子致密物沉积; 细胞核大且大小不等, 核形不规则, 异染色质边集浓染。

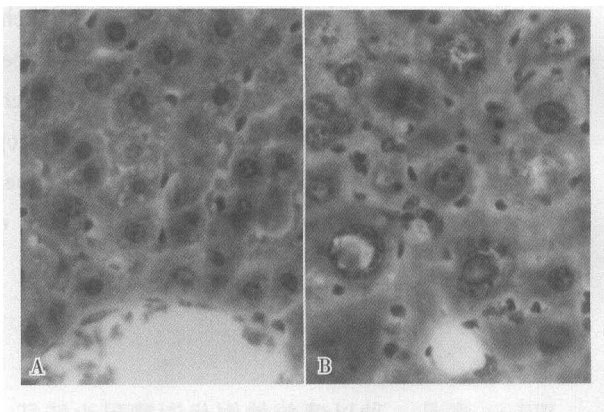


图 1 TX 小鼠肝脏的组织病理学特征

Fig. 1 Liver histopathology of TX mice ($\times 200$)

A: Showing the HE staining of the control DL mice liver ($\times 200$). Hepatocytes arranged in hepatic cords with coincident size and form; B: showing HE staining of TX mice liver ($\times 200$). Some hepatocytes swelled with vacuoles in nucleus and there were many lymphocytes infiltrating in the hepatic sinusoid

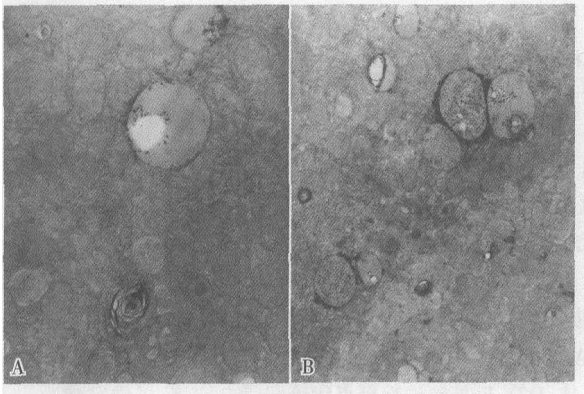


图2 TX小鼠肝组织的超微结构

Fig. 2 Ultrastructure features of TX mice liver

A: showing massive high-electro-dense accumulation in lysosome and malformation of the swollen mitochondrions ($\times 6\ 000$); B: showing copper accumulation in lysosome and plasma ($\times 12\ 000$)

3 讨论

3.1 TX小鼠的临床生化特征

TX小鼠最早出现于1974年,是由同系繁殖到F68的DL小鼠所产生的自然突变品系,其突变形式为et1386Val^[1]。

本研究是国内首次引进TX小鼠,并进行了系统的铜生化指标的分析。结果显示, TX小鼠的铜生化特征与临床所见的Wilson病的铜生化改变基本一致,表现为血清铜蓝蛋白和血清铜含量显著降低,仅为正常的1/3左右;而其器官尤其是肝组织表现为大量铜沉积,32周龄时甚至高达正常的40~50倍,具有非常显著的差异。ATP7B是一种仅在肝细胞中大量表达的铜离子转运ATP酶,当肝细胞内铜浓度较低时,定位于高尔基体并协助合成全铜蓝蛋白;当肝细胞内铜含量升高时,ATP7B发生重定位,携带铜离子经胆汁排出体外。ATP7B基因突变造成编码产物的功能缺陷,合成铜蓝蛋白和经胆汁排铜的主要功能丧失,相应引起全铜蓝蛋白低下,肝铜含量增高^[2,3];另外,血清中约95%左右的铜离子是结合在全铜蓝蛋白上的,全铜蓝蛋白的降低也会造成血清铜含量的降低^[4],故而TX小鼠同时也表现为血清铜低下;由于机体铜排出障碍大量沉积,因而各个脏器表现为显著的铜含量增加,这些均与临床Wilson病人的铜生化特征完全一致。

3.2 TX小鼠的肝脏病理表现

TX小鼠肝组织光镜下表现为小结节样肝细胞增生,细胞排列紊乱。这些增生肝细胞多成对附

着于肝板结构,有的为双核;原有肝实质细胞则表现为肿胀、胞浆内含有较多脂滴,混杂生长以至肝组织的正常肝板结构丧失,血窦中有大量的炎性细胞浸润,与人Wilson病的肝组织病理改变相似。究其原因,可能是因为铜离子是一种具有活跃的氧化还原能力的金属离子,具有类似Fenton反应的重金属毒性作用。当胞内铜离子含量增高时,产生大量的羟自由基,直接损害胞浆内的各种细胞器如线粒体、内质网出现相应的形态学改变,引起肝细胞发生肿胀、甚至玻璃样改变^[5]。另外,羟自由基还可以直接穿过核膜,损害DNA结构,可导致肝细胞核形态变化并呈现空泡样。本研究中,病变肝组织的超微结构研究也证实了这一点。另外的一个显著特征是由于铜离子被溶酶体反复吞噬所表现出的电镜下溶酶体板层结构间的电子致密物沉积。

另外值得注意的是,本研究的病理切片显示,在血窦附近可以见到活跃增生的肝卵圆细胞,近年来肝卵圆细胞作为一种可能的肝前体细胞而受到极大的重视^[6]。是否肝铜沉积引起的慢性肝损害微环境会促进卵圆细胞的增生还未有定论,但毫无疑问,这提示通过肝前体细胞移植来治疗Wilson病有着广阔的前景。

TX小鼠的遗传背景、铜生化特征以及病理特点与Wilson病相似。因此, TX小鼠是Wilson病研究较理想的动物模型。

参考文献:

- [1] Theophilos M B, Cox D W, Mercer J F. The toxic milk mouse is a murine model of Wilson disease[J]. *Hum Mol Genet*, 1996, 5 (10): 1619.
- [2] Roelofsen H, Wolters H, Vanluyn M, *et al.* Copper-induced apical trafficking of ATP7B in polarized hepatoma cells provides a mechanism for biliary copper excretion[J]. *Gastroenterology*, 2000, 119(3): 782.
- [3] Schaefer M, Roelofsen H, Wolters H, *et al.* Localization of the Wilson's disease protein in human liver[J]. *Gastroenterology*, 1999, 117(6): 1380.
- [4] Mercer J F. The molecular basis of copper-transport diseases[J]. *Trends Mol Med*, 2001, 7(2): 64.
- [5] 侯国庆,梁秀龄,陈嵘,等. 体外培养Wilson病患者肝细胞铜转运研究[J]. *中山医科大学学报*, 2000, 21(5): 330.
- [6] Strain A J, Crosby H A. Hepatic stem cells[J]. *Gut*, 2000, 46(6): 743.

(编辑 刘清海)