

体外培养 Wilson 病患者肝细胞铜转运研究

侯国庆¹, 梁秀龄¹, 陈 嵘¹, Liwen Tang², 欧翠华¹, 黄 帆¹, 王 莹¹

(1. 中山医科大学附属第一医院神经科, 广东 广州 510080;

2. Department of Pharmacology, University of Kentucky, Lexington, KY 40506 U.S.A.)

摘要:【目的】探讨铜转运 P 型 ATP 酶在离体肝细胞铜代谢及 Wilson 病(WD)发病机制中的作用。【方法】WD 患者和对照者离体培养肝细胞模型, 经单用铜(15 mg/L)及铜加 P 型 ATP 酶阻滞剂硫酸钠(18.39 mg/L)、铜加 P 型 ATP 酶激动剂长春新碱(0.5 mg/L)孵育, 差速离心分离肝细胞胞浆、溶酶体、线粒体和微粒体, 在不同孵育条件下 WD 患者及对照组各亚细胞组分的铜含量分别对照分析。【结果】WD 患者肝细胞各组分的铜含量均显著高于对照组, P 型 ATP 酶阻滞剂与激动剂对 WD 患者肝细胞微粒体、质膜铜转运的作用均出现异常。【结论】WD 患者肝细胞亚组分的铜转运 P 型 ATP 酶的功能障碍, 在 WD 的发病机制中有重要作用。

关键词: 肝豆状核变性/代谢; 铜转运 ATP 酶; 铜/代谢

中图分类号: R742.4 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2000)05-0330-04

Cu²⁺-transporting in Cultured Hepatocytes of Wilson Disease Patients

HOU Guo-qing¹, LIANG Xiu-ling¹, CHEN Rong¹, TANG Liwen²,

OU Cui-hua¹, HUANG Fan¹, WANG Ying¹

(1. Department of Neurology, First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510080,

China; 2. Department of Pharmacology, University of Kentucky, Lexington, KY 40506 U.S.A.)

Abstract: 【Objective】To evaluate the effect of copper transporting P-type ATPase on hepatocyte's copper metabolism and pathogenesis of Wilson disease (WD). 【Methods】Human cultured hepatocytes from WD patients and controls were incubated in media of copper 15 mg/L only, copper 15 mg/L with vincristine (agonist of P-type ATPase) 0.5 mg/L, or copper 15 mg/L with vanadate (antagonist of P-type ATPase) 18.39 mg/L. Microsome (endoplasmic reticulum), lysosome, mitochondria, and cytosol were isolated by differential centrifugation. The influence on copper transport of these organelles by vanadate and vincristine were comparatively analyzed between WD patients and controls under different culturing conditions. 【Results】Significant disorders of copper transport in these organelles of WD patients were found comparing with controls in each group. The antagonist and agonist of P-type ATPase obviously changed copper transporting of microsomes and plasma membranes. 【Conclusion】Copper transporting P-type ATPase plays an important role in hepatocytic copper metabolism. Dysfunction of hepatocytic copper transporting P-type ATPase might be one of the most important pathogenesis of WD.

Key words: hepatolenticular degeneration/metabolism; Cu²⁺-ATPase; copper/metabolism

Wilson 病(Wilson disease, WD)又称肝豆状核变性(hepatolenticular degeneration)是一种铜代谢

障碍常染色体隐性遗传病。该病好发于青少年, 以慢性肝脏病变、神经精神障碍以及肾脏功能损害等

收稿日期: 1999-11-25

基金项目: 由国家自然科学基金(39670270)、广东省自然科学基金(960128)、卫生部临床学科重大项目(37091)、中山医科大学“211工程”重点建设项目、广东省科委攻关项目(9827830)资助课题

作者简介: 侯国庆(1967-), 男, 湖北枣阳人, 博士, 主治医师, 现在广州市第一人民医院, 邮编: 510180. <http://www.cnki.net>

症状为主。各国报道的发病率从 5/百万 ~ 50/百万不等^[1]。WD 致残性高,但又是神经遗传病中为数不多的可治性疾病之一。1993 年 WD 基因(ATP7B)被克隆,定位于 13q14.3。序列分析表明,该基因编码一铜转运 P-型 ATP 酶^[1~3]。该酶存在于肝、肾、脑、眼等器官,以肝脏为主。而它在肝细胞内的细胞器具体定位及在细胞铜代谢中的作用尚不清楚,国外研究结果不一^[4~7]。我们首次采用人离体培养肝细胞模型,分离并培养 WD 患者及对照组肝细胞,经 P 型 ATP 酶阻滞剂(钼酸钠)或激动剂(长春新碱)孵育后,对肝细胞内铜代谢情况进行分析,初步探讨 P 型 ATP 酶在人肝细胞中的定位及 WD 发病机制中的作用。

1 材料和方法

1.1 实验对象

3 例由我院神经遗传专科确诊的 WD 患者,男 2 例、女 1 例,年龄 13 ~ 27 岁,平均 20.7 岁,通过外科手术获得肝活检标本;对照组 5 例,男 3 例、女 2 例,年龄 35 ~ 49 岁,平均 43.9 岁,为肝血管瘤或肝结石行手术切除患者,体检及铜生化检查排除了 WD 的可能。肝标本于术后立即浸于 4 °C 培养液中保存,24 h 内行细胞分离及培养。

1.2 实验方法

1.2.1 肝细胞的分离和原代培养 按已建立的方法进行^[10]。肝细胞分离采用体外消化离心法,以冰冷 D-Hanks 缓冲液冲洗肝组织标本,用 IV 型胶原酶 37 °C 消化 30 min,筛网过滤、离心,获取肝细胞。显微镜下观察肝细胞形态,台盼蓝染色计算成活率。肝细胞原代培养:用 DMEM/F12 条件培养基(含胰高血糖素、胰岛素、二性霉素、细胞上皮生长因子、转铁蛋白、10% 胎牛血清等),37 °C 5% CO₂ 条件下培养。动态观察细胞生长情况。根据实验设计加入不同浓度的长春新碱、钼酸钠、Cu²⁺ 等。

1.2.2 细胞孵育及收获 当细胞生长刚融合时,倾去培养液,分组加入下述孵育条件的培养液。① 单用铜孵育:培养液内含氯化铜 15 mg/L;② 铜加钼酸钠孵育:培养液内含氯化铜 15 mg/L、钼酸钠 18.39 mg/L;③ 铜加长春新碱孵育:培养液内含氯化铜 15 mg/L、长春新碱 0.5 mg/L。每组培养液中均加入 ATP 至 30 mmol/L。各组原代培养细胞均于孵育 24 h 后,倾去培养液,D-Hanks 液冲洗,加

入 0.05 mol/L Tris-HCl(pH 8.6) 2 mL,机械收获,超声粉碎细胞(80 W × 60 s)。

1.2.3 肝细胞器的分离及铜含量测定 细胞匀浆经差速离心(8 000 × g, 10 min; 9 000 × g, 10 min; 30 000 × g, 15 min; 108 000 × g, 60 min)分离细胞核、溶酶体、线粒体、微粒体及胞浆,将各亚细胞组分经浓硝酸处理后,用火焰管式原子化法测定铜含量,以铜/蛋白质比值表示($\mu\text{g/g}$),蛋白质浓度按 Broadford 法检测。

1.2.4 细胞器标志酶测定及分离纯度分析 每一细胞器标本,均检测溶酶体标志酶(酸性磷酸酶)、微粒体标志酶(葡萄糖-6-磷酸酶)及胞浆标志酶(乳酸脱氢酶)的活力,通过计算每一样品中各细胞器标志酶活性的比例,确定其分离纯度。

1.2.5 数据分析 采用 SPSS 统计学软件进行,每份样本均同时检测 3 次,取均值。

2 结果

2.1 铜孵育前 WD 患者及对照组肝细胞各组分铜含量的比较

孵育前,WD 患者及对照组肝细胞线粒体铜含量分别为(96 ± 12) $\mu\text{g/g}$ 、(84 ± 11) $\mu\text{g/g}$,经 *t* 检验,两组之间无显著性差异($P > 0.05$),微粒体铜含量分别为(66 ± 9) $\mu\text{g/g}$ 、(74 ± 13) $\mu\text{g/g}$,溶酶体铜含量分别为(76 ± 12) $\mu\text{g/g}$ 、(69 ± 10) $\mu\text{g/g}$,胞浆铜含量分别为(478 ± 53) $\mu\text{g/g}$ 、(526 ± 63) $\mu\text{g/g}$,各两组之间分别比较均无显著性差异($P > 0.05$)。

2.2 P 型 ATP 酶阻滞剂、激动剂对微粒体、溶酶体铜的影响

患者组微粒体(microsome)铜、溶酶体(lysosome)铜、线粒体(mitochondria)铜和胞浆(cytosol)铜含量在各种孵育条件下均显著高于对照组。各孵育条件之间比较,铜加钼酸钠(vandate)孵育,两组微粒体铜及胞浆铜含量均显著高于单用铜及铜加长春新碱(vincristine)孵育,而两组溶酶体铜及线粒体铜含量无显著变化;铜加长春新碱孵育,两组微粒体铜及胞浆铜含量均显著低于单用铜及铜加钼酸钠孵育,但仍显著高于对照组,溶酶体内铜和线粒体内铜变化则无统计学意义,见表 1。

3 讨论

表1 各种条件孵育24 h肝细胞内铜含量变化比较

Table 1 Concentrations of copper in hepatocytic organelles after 24 h culturing ($\bar{x} \pm s, \mu\text{g/g}$)

Groups	Organelles	Cu ²⁺	Cu ²⁺ +	Cu ²⁺ +	P values		
		only (A)	vincristine (B)	vanadate (C)	A vs B	B vs C	A vs C
WD (n = 3)	microsome	343 ± 52 ¹⁾	264 ± 37 ¹⁾	458 ± 64 ²⁾	< 0.05	< 0.01	< 0.05
	lysosome	394 ± 58 ¹⁾	357 ± 40 ²⁾	445 ± 51 ¹⁾			
	mitochondria	389 ± 49 ¹⁾	364 ± 375 ²⁾	426 ± 55 ¹⁾			
	cytosol	1 635 ± 127 ¹⁾	1 489 ± 106 ¹⁾	1 748 ± 1 309 ²⁾	< 0.05	< 0.01	< 0.05
Control (n = 5)	microsome	297 ± 54	209 ± 46	346 ± 73	< 0.01	< 0.01	< 0.05
	lysosome	321 ± 40	304 ± 38	356 ± 58			
	mitochondria	328 ± 46	309 ± 49	342 ± 52			
	cytosol	1 365 ± 110	1 173 ± 107	1 493 ± 126	< 0.05	< 0.05	< 0.05

WD Group vs Control Group, 1) $P < 0.05$; 2) $P < 0.01$. Un-noted P values > 0.05

3.1 Cu²⁺-ATP 酶的亚细胞定位

WD 基因(ATP7B)的成功克隆为揭示 WD 的发病机制提供了帮助。对于 ATP7B 基因产物 Cu²⁺-ATP 酶在肝细胞亚细胞结构的定位及与铜代谢障碍的关系,目前有些初步的报告。Dijkstra 等⁶⁾采用差速离心法对人肝细胞质膜进行分离,同时检测其转运铜离子情况,发现肝内胆小管膜上有一 ATP 依赖的铜转运体。如果该铜转运体的功能异常则会导致因胆小管泌铜减少而肝内铜淤积;这刚好能解释 WD 的排铜障碍,但是对于 WD 的铜蓝蛋白的合成障碍却不能解释,因为后者是在内质网由铜与前铜蓝蛋白结合而形成的。Bingham 等¹⁵⁾的结果则提示内质网有该酶存在。目前,多个实验室通过使用抗 WD Cu²⁺-ATP 酶阳离子结合区或其它功能区的抗体,进行免疫组化研究,也发现在转染的细胞株内存在抗 Cu²⁺-ATP 酶抗体特异反应的物质,即 WD Cu²⁺-ATP 酶。只是结果尚不一致,在内质网、高尔基器^{7,8)}或线粒体⁴⁾上都有报道。另外由于这些试验都是在异常细胞株上进行的,它们与人肝细胞的成分、代谢特点都存在差异。

3.2 P 型 ATP 酶调节物对铜转运的影响

本文首次建立了人离体培养肝细胞研究模型,我们加用 P 型 ATP 酶阻滞剂(硫酸钠)或激动剂(长春新碱)孵育肝细胞,发现在正常人及 WD 患者的离体肝细胞,经铜加硫酸钠孵育后,微粒体和胞浆铜含量均显著高于单用铜孵育,而铜加长春新碱孵育,微粒体和胞浆铜含量显著低于单用铜孵育的含量。此结果说明 P 型 ATP 酶阻滞剂和激动剂,通过抑制或增强 P 型 ATP 酶的活性,分别对这些亚细胞组分铜离子的排泄产生了显著的影响,提示

在人肝细胞的微粒体和质膜上存在有铜转运 P 型 ATP 酶。而在 WD 肝细胞线粒体和溶酶体上的铜含量变化在加用硫酸钠、长春新碱前后变化均无显著性意义,提示在这些亚细胞上可能不存在铜转运 P 型 ATP 酶活性。这与 Lustenko 等的结果不一致⁴⁾,是否与 WD 患者由于基因突变,致使 Cu²⁺-ATP 酶的活性降低,硫酸钠或长春新碱对肝细胞线粒体和溶酶体的影响未被观察到有关?这尚有待于采用更敏感的方法如同位素法或抗原抗体免疫法来研究。

微粒体主要由内质网和高尔基器组成,其中内质网不仅对细胞的物质转运有重要作用,在肝细胞中它还是铜蓝蛋白合成的部位,而质膜与铜排泄入胆小管有关。本研究发现,微粒体、质膜的铜转运明显异常,提示这些部位铜转运 P 型 ATP 酶异常可能是肝豆状核变性细胞铜代谢障碍的关键所在。

3.3 WD 患者肝细胞铜含量升高

我们发现 WD 患者肝细胞各亚组分的铜离子含量均显著高于相同孵育条件下的对照组,说明 WD 患者铜排泄存在障碍,这与肝活检、尿铜检查以及我们以前的研究结果一致,证实了 WD 患者肝细胞存在有肝细胞铜转运障碍。而铜加硫酸钠孵育条件下,患者铜含量显著高于单用铜孵育;铜加长春新碱孵育后,患者微粒体和胞浆铜含量显著低于单用铜孵育,但仍高于对照组,说明患者肝细胞内铜转运 P 型 ATP 酶活性的低下,虽经长春新碱的刺激有所增强,但仍不能恢复到正常水平。该结果启示,调节或纠正患者 P 型 ATP 酶的活性可能是治疗 WD 的一种临床途径。

3.4 结论

我们认为在肝细胞的微粒体、质膜上存在有 Cu^{2+} -ATP 酶, WD 患者这两个部位铜代谢的异常提示 Cu^{2+} -ATP 酶功能障碍, 这可能是 WD 发病的关键所在。但由于 WD 肝标本来源受限, 我们目前仅完成了 3 例患者的实验, 因此 Cu^{2+} -ATP 酶的具体定位和作用仍有待讨论, 我们进一步的研究结果将于不久后公布。

(本文实验部分得到了本院神经科张影如主管技师、徐评议副教授的指导和帮助, 在此深表感谢)

参考文献:

- [1] 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.
- [2] Bull P C, Thomas G R, Rommens J M, *et al.* The Wilson disease gene is a putative copper transporting P-ATPase similar to the Menkes gene [J]. *Nat Genet*, 1993, 5(4): 327.
- [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): 336.
- [4] Lutsenko S, Cooper M J. Localization of the Wilson's disease protein product to mitochondria [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(11): 6004.
- [5] Bingham M J, Burchell A, Mcardle H J. Identification of a ATP-dependent copper transport system in endoplasmic reticulum vesicles isolated from rat liver [J]. *J Physiol*, 1995, 482(pt 3): 583.
- [6] Dijkstra M, Berg G J, Wolters H, *et al.* Adenosine triphosphate-dependent copper transporter in human liver [J]. *J Hepatology*, 1996, 25(1): 37.
- [7] Nagano K, Nakamura K, Urekami K I, *et al.* Intracellular distribution of the Wilson disease gene product (ATP7B) after in vitro and in vivo exogenous expression in hepatocytes from the LEC rat, an animal model of Wilson disease [J]. *Hepatology*, 1998, 27(3): 799.
- [8] Payne A S, Kelly E J, Gitlin J D. Functional expression of the Wilson disease protein reveals mislocalization and impaired copper-dependent trafficking of the common H1069Q mutation. *Proc Natl Acad Sci USA* [J], 1998, 95(18): 10854.
- [9] 尹景岗, 梁秀龄, 陈 嵘, 等. P 型 ATP 酶阻滞剂和激动剂对肝豆状核变性成纤维细胞胞浆铜的影响 [J]. *实用临床儿科杂志*, 1998, 13(1): 33.
- [10] McGowan J A, Strain A J, Bucher N L R. DNA synthesis in primary cultures of adult rat hepatocytes in a designed medium: effects of epidermal growth factor, insulin, glucagon, and cyclic AMP [J]. *J Cell Physiol*, 1981, 108(3): 353.
- [11] 梁秀龄, 陈 嵘, 刘焯霖, 等. 高铜孵育后皮肤成纤维细胞内铜的测定诊断肝豆状核变性 [J]. *中华医学杂志*, 1994, 74(2): 111.
- [12] 陈 嵘, 梁秀龄, 刘焯霖, 等. 肝豆状核变性离体培养细胞内铜分布的研究 [J]. *中华神经科杂志*, 1997, 30(1): 12.

(编辑 刘清海)

· 简 讯 ·

吴一龙教授赴韩讲学

2000 年 6 月 24 日, 中山医科大学肺癌研究中心主任、中国抗癌协会肺癌专业委员会主任委员、附属三院院长吴一龙教授应韩国庆北大学医学院的邀请, 在韩国大邱举行的“肺癌外科 2000”的国际论坛上作题为“非小细胞肺癌系统性纵隔淋巴结清扫的前瞻性研究”的学术讲演, 受到韩国、日本同行的热烈欢迎。吴一龙教授是唯一受到邀请的中国学者, 也是会议唯一的口头讲演者。

吴一龙教授自 1989 年从德国学习归来, 便开始“非小细胞肺癌系统性纵隔淋巴结清扫”的临床研究, 经过近 10 年的艰苦随机研究和细致的追踪随访, 充分论证了肺癌手术中系统性纵隔淋巴结清扫的重要性, 确定了肺癌手术的规范性程式, 提高了可手术非小细胞肺癌的长期生存率。在国际文献中, 采用随机对照研究来确定肺癌纵隔淋巴结清扫手术有效性的研究极少, 因此中山医科大学这一临床研究结果, 具有很高的学术可信度。

(陈建华)