

· 成果综述 ·

肝豆状核变性的系列研究^①

梁秀龄^② 刘焯霖 陈 嵘 徐评议
胡学强 张影如 徐东升 张柏莘

(中山医科大学附属第一医院神经内科;广州,510080)

提 要 肝豆状核变性(WD)是一种较为常见的常染色体隐性遗传、铜代谢障碍性疾病。作者从80年代初开展WD的研究,至今已对WD的临床表现、发病机理、病理改变、遗传学、诊断、治疗等各方面进行了系统研究,研究手段从临床总结开始,接着开展生化、病理、影像学研究,进而采用细胞培养、分子生物学等新技术,紧紧围绕患者早期诊断和杂合子检测这个中心,层层深入,取得了很大进展,尤其是在WD离体培养皮肤成纤维细胞模型和分子生物学研究方面已达到国际先进水平。

主题词 肝豆状核变性/诊断;肝豆状核变性/代谢;肝豆状核变性/病理学;成纤维细胞;分子生物学

中图分类号 R 742.4

肝豆状核变性又称Wilson病(WD),是一种表现为铜代谢障碍的常染色体隐性遗传性疾病,其患病率国外报道为(0.05~0.5)/万^[1],国内尚无大资料流行病学调查报道。根据我科1981~1992年神经系统遗传病专科门诊955例统计^[2],WD占神经系统遗传病的10.14%,仅次于假肥大型肌营养不良症,可见本病并不少见。

我科自80年代初始开展WD的研究,至今已对WD的临床表现、病理改变、遗传学、诊断、治疗等各方面进行了系统研究,尤其是在离体培养皮肤成纤维细胞模型和分子遗传学研究方面取得了较大的进展,现将本研究的主要结果总结如下。

1 临床研究

1985年作者总结了WD患者的临床表现,发现其基本特征为:(1)肝脏病史或/及肝脏病征(占79%);(2)锥体外系病征(占97.6%);(3)角膜K-F环阳性(占93%)。全组43例中,具有以上2项病征者占97.6%,3项均具备者占72%。锥体外系病征中,常见者依次为:震颤、言语障碍、肌张力增高、行走障碍、吞咽障碍。首发症状中,肝损害最多见,神经损害次之,少数为肝和神经损害同时出现,偶见以鼻衄、肾损害、关节痛、精神症状首发^[3]。

对18例WD患者进行各种眼部检查,发现除了全部均有角膜K-F环外,还有晶体混浊(2例)、暗适应机能下降(8例)、外斜视(9例)、集合力不足(8例)、瞳孔反应迟钝(4例)、调节减弱(6例),说明患者可有多种眼

^① 国家教委博士点基金、国家自然科学基金、卫生部重点科研基金资助,该成果获1995年国家教委科技成果二等奖,部分内容获1994年卫生部科技成果三等奖、广东省科技成果三等奖、广东省卫生厅和高教局联合科技进步二等奖,1993年度WHO/中国精神卫生、神经病学青年优秀论著二等奖及1992年全国中青年医学学术交流会(神经精神)一等奖和三等奖各一项;^② 第一作者,1931年出生,女,教授,博士生导师

部功能和检查异常^[4]。

作者还研究了 WD 患者的智商改变、骨关节异常以及皮肤损害,发现 71% 患者有不同程度的智商下降,其中以语言智商下降最明显;96% 患者有骨关节 X 线异常,以膝关节、腕关节、手部关节最常见和最严重,可表现为骨质溶解、吸收或增生、肥大等多种病理改变;另外还发现 73% 患者可出现皮肤颜色变黑,以小腿伸侧明显,可随着病情好转而逐渐转白。上述结果提示,智商下降、骨关节损害和皮肤色素沉着也是 WD 的主要临床表现,对 WD 的诊断和鉴别诊断有一定的参考价值^[5]。

另外,在研究 WD 患者在头颅 CT 异常表现时发现,WD 的阳性率可达 85.7%,主要表现为脑萎缩、豆状核区低密度灶、脑干萎缩、脑室扩大等。特别值得一提的是,发现肝型与脑型患者头颅 CT 的阳性率无显著差异,提示临床上没有脑症状的患者,CT 检查对诊断也可能有帮助。本研究还发现 1 例患者的无症状同胞,头颅 CT 示一侧豆状核低密度灶,结合血清铜蓝蛋白降低,从而诊断为症状前患者^[6]。

WD 是一种累及多系统、多器官的全身代谢性疾病,其临床表现变异较大,误诊率相当高。我们分析 WD 患者的误诊时间(指出现本病的基本病征至确诊所需时间),最短 1 个月,最长达 15 年,约 1/3 患者需 4 年以上才获确诊,误诊病种多达 32 种。分析误诊的原因,主要有:(1)对本病的基本病征未能掌握;(2)对于以肢体震颤为神经系统首发症状的年青患者警惕不够;(3)对本病的多式多样神经症状认识不足;(4)对精神症状明显的患者往往误诊为功能性精神病;(5)对本病少见类型不了解等等^[3,7]。

在总结本院及国内 WD 患者的临床遗传学状况时发现:(1)WD 的遗传方式基本符合常染色体隐性遗传;(2)在罹患家族中,同胞发病数约为 1/3 而不是理论上的 1/4;(3)在极少数 WD 家系中,有连续两代发病的现

象;(4)本院及国内病例家族史的阳性率(30%~41%)低于国外报道;(5)WD 患者比较集中于华北、华中、东北、华南地区和台湾省^[8]。

2 病理研究

对 1 例死于肝昏迷的 WD 患者进行国内首例多器官病理和超微病理学研究,肉眼观察时可见结节性肝硬化、脾肿大、脑萎缩和豆状核软化灶;光镜显示有坏死后性肝硬化,并可见铜离子在肝细胞及其周围沉积,在基底节可见散在的神经细胞变性及继发性神经胶质增生,并可找到 Alzheimer 型细胞;同时,对肝、肾、脑、脾和皮肤等器官组织进行电镜观察,发现脑豆状核神经细胞有变性、坏死、核膜撕裂、核破碎、尼氏体溶解成空泡状,在其毛细血管基底膜可见高电子密度物质(铜颗粒)沉积,似乎提示铜离子系经血液循环沉积于基底节而引起后者的损害。在肝、肾、皮肤组织内也可见这种铜颗粒的沉着,从超微结构的改变支持了作者于临床上发现患者的皮肤变黑现象,说明皮肤组织也是 WD 的常见铜沉积部位^[9]。

3 生化研究

WD 的诊断主要根据阳性家族史、临床特点以及实验室检查,其中实验室是必不可少的佐证。通过测定 32 例 WD 患者及 212 例正常对照组的血清铜蓝蛋白(CP)、血清铜、血清锌、血清铜锌比值、尿铜(包括青霉胺负荷试验)、尿锌等含量的变化,发现患者血清 CP 全部显著低于正常值,其中 2 例先证者的同胞是无症状的纯合子(后经眼科裂隙灯检查有角膜 K-F 环),血清铜仅 1 例在正常范围内,尿铜全部显著增高,其平均值为对照组的 10 倍以上,表明铜的代谢异常是 WD 患者生化异常的显著特征,是本病诊断和鉴别

诊断的主要依据。另外,还发现 WD 患者的血清锌降低、血清铜锌比值降低、尿锌增高、青霉胺负荷试验尿铜大幅度增高等的生化异常,在 WD 的诊断中也有一定的意义^[10]。

杂合子的检出是 WD 预防中的一个重要方面。准确地进行杂合子检出,阻止杂合子之间的婚配,对有效地防止纯合子患者的出生具有决定性的意义。我们研究发现,WD 杂合子也可有血清 CP、血清铜、血清锌的降低及尿锌的增高,其中血清 CP 低于正常范围的占 37.2%,尿铜超过正常值范围的占 37.2%,青霉胺负荷试验高于正常最高限的占 51.7%。可见 WD 的生化检查对杂合子与正常人之间的鉴别诊断具有一定意义。在鉴别杂合子与患者时,也有类似情况,更需依赖综合判断^[11,12]。

4 皮肤成纤维细胞模型研究

近年我们进行 WD 的离体培养皮肤成纤维细胞内铜含量的测定,虽然对不同样本一般培养条件下 WD 患者和杂合子培养细胞内的铜含量变化有不同的结果^[13,14],但发现,经过高浓度铜孵育,尤其是经过 0.020 g/L 铜孵育 12 h 或 24 h 后,WD 患者胞浆内铜/蛋白比值远远高于杂合子组和对照组,且与后二组完成无重叠。因此我们首先提出,对于早期、临床表现不典型以及症状前患者进行诊断时,如果经常规铜生化检查(包括血清 CP、血清铜、尿铜)尚不能作出明确诊断,可采用该指标测定以明确诊断^[15]。

我们还开展了一般培养条件下以及不同时间、不同浓度铜孵育后,WD 患者、杂合子及对照组皮肤成纤维细胞内铜、锌、金属硫蛋白(MT)代谢的系统研究,发现:(1)WD 患者培养细胞内的铜沉积部位主要在细胞浆和溶酶体;(2)高浓度铜孵育后,WD 患者细胞浆内的铜含量增高幅度明显大于杂合子和对照组;(3)一般培养条件下患者 MT 上的铜含量明显高于另二组细胞,经更浓度铜孵育

后患者 MT 上的铜含量进一步增高;(4)经高浓度铜孵育后,同一孵育时间患者的 MT 含量均比另二组高;(5)WD 患者的培养细胞进行铜孵育后,大分子蛋白上的铜含量在 24 h 即开始升高,36 h 达高峰,以后逐渐下降至正常,而低分子蛋白 MT 的铜含量在 36 h 才开始增高,以后随孵育时间的延长进一步增高;(6)高浓度铜孵育后,WD 患者胞浆内的锌含量早期即有升高,以后保持在较高水平不下降,同时 MT 上的锌含量迅速降低,大分子蛋白上的锌含量增高^[16~19]。

根据上述结果,我们认为:(1)WD 细胞内的铜沉积与 MT 密切相关;(2)WD 中的 MT 可能具有原发高铜亲和力和对铜的高诱导性两种异常,可能是 WD 铜沉积的主要原因;(3)MT 异常可能是 WD 的原发缺陷;(4)WD 的培养细胞内可能存在铜进入细胞后从大分子蛋白向低分子蛋白 MT 转移,再经溶酶体排出细胞外的过程;(5)随着 WD 中 MT 与铜结合,MT 上原有的锌被铜置换,新合成的 MT 基本不与锌结合等^[20~22]。

我们又研究 WD 皮肤成纤维细胞内的锌代谢变化时发现:(1)培养细胞胞浆内的锌/蛋白比值与杂合子组及对照组无显著性差别;(2)差速离心发现患者细胞浆内锌分布比例降低;(3)将细胞浆液进行 Sephadex G-75 层析时,发现患者大分子蛋白和 MT 上锌结合量增加。因此对 WD 中的锌代谢情况目前尚难肯定,有待今后的进一步研究^[23,24]。

锌剂治疗本病的作用机理目前尚不清楚,我们利用 WD 的离体培养皮肤成纤维细胞模型,研究了不同时间、不同浓度锌孵育对 WD 患者、杂合子及对照组培养细胞内铜、锌、MT 代谢的影响,发现经锌孵育后,WD 患者胞浆内的铜含量逐渐增加,细胞内增高的铜主要结合在 MT 上,这些结果似乎支持锌剂是通过 MT 结合大量铜离子而起作用^[25]。

5 分子生物学研究

我们利用 Southern 印迹分子杂交技术研究了中国人人群中 5 个 WD 基因位点附近的 DNA 标记在 BamH1、Taq1、Rsa1、Ban I、Apa1 切点的等位基因频率及杂合子频率,其中 P^{123M1.8}/BamH1、P^{68RS2.0}/Rsa1、D₁₃S₅₉/Ban I、ESD-cDNA/Apa1 属国内首次报道。发现 P^{68RS2.0}/Rsa1 切点的杂合子频率仅为 43%,与国外文献报道有较大差异,比较了 5 个切点 DNA 多态性,认为 P^{123M1.8}、P^{68RS2.0}、D₁₃S₃₁ 标记多态信息含量较高,适于作 WD 基因连锁分析的遗传路标。另外,发现 D₁₃S₅₉ 标记 PR1-4/Ban I 多态信息值较大与国外报道不一致,提出该切点多态性在中国人人群与白种人群存在差异。

应用 P^{123M1.8}/BamH1、D₁₃S₃₁/Taq1 切点,开展配对连锁分析,研究了其多态性在 WD 家系中的限制性片段长度多态性(RFLP)连锁情况,首次确定了中国人 WD 基因在 13 号染色体的较精确定位及其遗传图谱(着丝点-Rb₁-D₁₃S₃₁-WND,Rb₁ 为视网膜母细胞瘤易感基因),计算了 Rb₁ 位点、D₁₃S₃₁ 位点与 WD 基因位点的重组 θ 值(分别为 0.05 和 0.00)和 Lods 值(分别为 3.846 和 5.74)。

最近,我们联合应用 P^{123M1.8}、P^{68RS2.0} 及 D₁₃S₃₁ 位点对 18 个 WD 家系 99 名成员进行 RFLP 连锁分析,在 45 个未罹患同胞中获得连锁分析信息 33 名,占 73.3%,其中确定为 WD 症状前患者 6 名,正常纯合子 10 合,WD 杂合子 17 名^[26~28]。

参 考 文 献

- 1 刘焯霖,梁秀龄.神经遗传病学.北京:人民卫生出版社,1988.81~96
- 2 李洵桦,梁秀龄,刘焯霖,等.957 例神经遗传病病例分析.中华医学遗传学杂志,1994,11(6):372
- 3 梁秀龄.肝豆状核变性误诊的探讨.广东医学,1985,6(3):5
- 4 马巧云,梁秀龄,刘焯霖,等.肝豆状核变性的眼

- 部表现(附 18 例分析).中国眼科杂志,1985,21(6):385
- 5 张柏苹,梁秀龄,刘焯霖,等.肝豆状核变性患者的骨关节 X 线改变.见:第七届全国中青年医学学术交流会(神经精神)论文汇编,北京:中华医学会,1992.64
- 6 张柏苹,梁秀龄,刘焯霖,等.42 例 Wilson 病的头颅 CT 分析及其临床意义.中国神经精神疾病杂志,1993,19(2):105
- 7 梁秀龄.肝豆状核变性.新医学,1989,20(10):545
- 8 梁秀龄,刘焯霖.肝豆状核变性的某些遗传学问题.中国神经精神疾病杂志,1982,8(1):4
- 9 张柏苹,梁秀龄,刘焯霖,等.Wilson 病多器官的病理和超微病理学研究.中国神经精神疾病杂志,1992,18(1):18
- 10 胡学强,梁秀龄,刘焯霖,等.肝豆状核变性纯合子及杂合子的临床生化研究.中国神经精神疾病杂志,1986,12(4):210
- 11 胡学强,梁秀龄,刘焯霖,等.肝豆状核变性纯合子及杂合子的临床生化研究.中山医科大学学报,1986,7(3):31
- 12 梁秀龄,胡学强,刘焯霖,等.肝豆状核变性携带者的初步研究.中华医学杂志,1988,68(2):90
- 13 徐东升,梁秀龄,刘焯霖,等.肝豆状核变性患者和杂合子离体培养皮肤成纤维细胞内铜含量测定.中国神经精神疾病杂志,1989,15(1):1
- 14 陈 嵘,梁秀龄,刘焯霖,等.肝豆状核变性患者和杂合子离体培养皮肤成纤维细胞内铜代谢的综合研究.见:中国科协首届青年学术年会论文集(医科分册).北京:中国科技出版社,1992.324
- 15 梁秀龄,陈 嵘,刘焯霖,等.高铜孵育后皮肤成纤维细胞内铜含量测定诊断肝豆状核变性.中华医学杂志,1994,74(2):111
- 16 张影如,梁秀龄,刘焯霖,等.肝豆状核变性患者离体培养皮肤成纤维细胞系的建立和生物学鉴定.中山医科大学学报,1993,14(1):31
- 17 陈 嵘,梁秀龄,刘焯霖,等.不同浓度铜孵育对肝豆状核变性离体培养细胞内铜含量的影响.中国神经精神疾病杂志,1993,19(4):200
- 18 陈 嵘,梁秀龄,刘焯霖,等.肝豆状核变性离体培养细胞内金属硫蛋白代谢的研究.中华神经精神科杂志,1993,36(6):372

- 19 陈 嵘,梁秀龄,刘焯霖,等.铜孵育对肝豆状核变性培养细胞内铜在不同分子量蛋白上分布的影响.中华神经精神科杂志,1994,27(1):70
- 20 陈 嵘,梁秀龄,刘焯霖,等.肝豆状核变性离体皮肤成纤维细胞模型的研究.中山医科大学学报,1995,16(2):48
- 21 Chen R, Liang XL, Liu ZL, *et al.* Copper metabolism studies in cultured skin fibroblasts from patients and heterozygotes with Wilson's disease. In: Proceedings of the International Conference on Improving Birth Quality and Child Upbringing. Peiking: International Academic Publishers, 1992. 5
- 22 Liang XL, Chen R, Liu ZL, *et al.* Studies of diagnosis and pathogenesis of Wilson's disease. Adv Exp Med Biol, 1995, 363: 197
- 23 徐东升,梁秀龄,刘焯霖,等.肝豆状核变性患者和杂合子离体培养皮肤成纤维细胞内锌代谢的研究.中国神经精神疾病杂志,1989,15(2):76
- 24 陈 嵘,梁秀龄,刘焯霖,等.肝豆状核变性离体培养皮肤成纤维细胞代谢的研究.医药信息论坛,1993,19(2):3
- 25 陈 嵘,梁秀龄,刘焯霖,等.锌孵育对肝豆状核变性培养细胞内铜、锌和金属硫蛋白代谢的影响.中国神经精神疾病杂志,1996,22(1):35
- 26 徐评议,梁秀龄,刘焯霖,等.肝豆状核变性 RFLP 连锁分析的建立及症状前诊断和杂合子检出的研究.中国神经精神疾病杂志,1994,20(6):325
- 27 徐评议,梁秀龄,刘焯霖,等.中国人 $D_{13}S_{31}$ 位点多态性及 Wilson 病的连锁关系.中山医科大学学报,1995,16(2):17
- 28 徐评议,梁秀龄,刘焯霖,等.中国人 Wilson 病基因定位及遗传图谱的研究.中山医科大学学报,1995,16(增刊):15

(1996-03-21 收稿 1996-05-13 修回)

SERIES STUDIES OF HEPATOLENTICULAR DEGENERATION

Liang Xiuling Liu Zhuolin Chen Rong Xu Pingyi
Hu Xueqiang Zhang Yingru Xu Dongsheng Zhang Baiping

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

Hepatolenticular degeneration Wilson disease is an autosomal recessively inherited disorder of copper metabolism. Its clinical features, multiple-organ pathological changes, pathogenesis, clinical and molecular genetics, diagnostic methods and treatment have been studied by authors since early 1980's. The central topics of the research were the early diagnosis of patients and detection of heterozygotes with Wilson's disease. Much progress has been achieved, especially in the cultured skin fibroblast model study and gene linkage analysis, and are described in this review collected from our published articles.

Subject headings hepatolenticular degeneration/diagnosis; hepatolenticular degeneration/pathology; hepatolenticular degeneration/metabolism; cultured skin fibroblasts; molecular biology