

# 肝豆状核变性皮肤成纤维细胞模型的研究<sup>①</sup>

陈 嵘<sup>②</sup> 梁秀龄 刘焯霖 张影如

(中山医科大学第一附属医院神经内科,广州,510080)

**提 要** 通过比较不同浓度铜孵育肝豆状核变性患者皮肤成纤维细胞内铜、金属硫蛋白代谢的改变,发现经高浓度铜孵育后,患者成纤维细胞胞浆内铜含量、金属硫蛋白含量及其铜结合量均明显增高,表明高铜孵育能促进本病遗传缺陷在皮肤成纤维细胞内进一步表达。认为,肝豆状核变性的离体培养皮肤成纤维细胞模型是一种较为理想的研究模型。

**主题词** 肝豆状核变性/细胞学; 纤维母细胞/化学; 铜/代谢; 金属蛋白类; 模型,遗传

**中图分类号** R742.4

自从1980年Chan等<sup>[1]</sup>首次应用皮肤成纤维细胞模型进行肝豆状核变性(HLD)研究以来,该模型已成为研究HLD发病机理,诊断等方面的有效方法。作为一种体外研究模型,成纤维细胞内HLD遗传缺陷的表达程度及其促进因素的确定,是认识该模型价值以及进一步采用的前提。本研究比较不同浓度铜孵育对HLD患者皮肤成纤维细胞内铜、金属硫蛋白(MT)代谢的影响,以了解HLD遗传缺陷表达的合适条件。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验对象

5例HLD患者,男3例,女2例,年龄8~25岁,均有锥体外系症状、角膜K-F环以及铜生化检查异常;5例对照组,男3例,女2例,年龄9~55岁,均经询问病史、神经系统检查和铜生化检查,排除HLD和其他遗传病可能。

### 1.2 皮肤成纤维细胞的离体培养

见文献[2]文。

### 1.3 铜孵育的条件

将刚融合的培养细胞分别采用C<sub>1</sub>: 15.74 μmol/L、C<sub>2</sub>: 78.70 μmol/L、C<sub>3</sub>: 157.

37 μmol/L、C<sub>4</sub>: 314.76 μmol/L 4种铜浓度的培养液分别重新培养3、6、12、24、36、48、60、72h,然后收集细胞、粉碎、离心,分离细胞浆液。经多批测定,基础培养液中铜离子含量为1.89~3.15 μmol/L。

### 1.4 铜和蛋白含量测定

分别采用原子吸收分光光度法和Bradford法<sup>[3]</sup>测定。

### 1.5 胞浆层析的条件

采用Sephadex G-75凝胶分子筛层析,每次加入总蛋白含量为1.5mg的细胞浆液。柱80cm×1.5cm,洗脱液为0.05mol/L Tris-HCl(pH8.6),流速0.5ml/min,4℃冷冻柜中进行,收集100管,每管1.5ml,紫外检测波长为280nm,测定各收集管中铜含量。层析前用分子量标准蛋白校正层析柱。

### 1.6 MT含量的测定

取待测细胞浆液0.25ml,加入0.5mol/L甘氨酸缓冲液(pH8.5)1.5ml和1ml AgNO<sub>3</sub>溶液(20×10<sup>6</sup>g),室温下放置5min,加入大鼠血细胞溶解物<sup>[4]</sup>0.2ml,100℃水浴5min后,室温下1000g离心5min,取上清液再加入大鼠血细胞溶解物2次,均再水浴、离心,最后取上清液采用原子吸收分光光度法测定银含量(CAg),按下列公式计算MT

① 卫生部科研基金资助课题;

② 第一作者,1965年出生,男,博士,副教授

含量:

$$MT(\mu\text{mol/L}) = \frac{CAg(\mu\text{g/L}) \times 3(\text{ml})}{107.8 \times 17 \times 0.25(\text{ml})}$$

注:107.8为银的原子量;17为MT与银的结合比例。

## 2 结 果

### 2.1 不同浓度铜孵育后胞浆内铜/蛋白比值的变化

一般培养条件下患者组胞浆内的铜/蛋白比值(Cu/P)与对照组无显著性差异;患者组和对照组(各2例)培养细胞经C<sub>1</sub>、C<sub>2</sub>浓度铜孵育后,各时间细胞浆内的Cu/P均无明显变化;C<sub>3</sub>浓度铜孵育时,两组细胞的Cu/P均随孵育时间的延长而逐渐增高,但两组间无明显差异;C<sub>4</sub>浓度铜孵育时,两组细胞的Cu/P也都随时间的延长而逐渐增高,但患者组的增高幅度比对照组明显大。

### 2.2 不同浓度铜孵育后MT上铜含量的变化

一般培养条件下患者组胞浆内MT上的铜含量明显比对照组高;C<sub>1</sub>、C<sub>4</sub>浓度铜孵育后对照组胞浆内MT上的铜含量均无明显变化;HLD患者组在C<sub>1</sub>铜孵育36h后逐渐升高,以后随孵育时间的延长继续升高,C<sub>4</sub>浓度时,24h后开始升高,72h最高,且24~72h各点含量均比C<sub>1</sub>浓度时高。

### 2.3 不同浓度铜孵育后MT含量的变化

一般培养条件下患者组胞浆内MT含量与对照组无显著性差异;C<sub>1</sub>、C<sub>2</sub>、C<sub>3</sub>浓度铜孵育后患者组和对照组MT含量均无明显变化;但C<sub>4</sub>浓度铜孵育时,两组细胞MT含量均有逐渐增高,患者组增高幅度明显大于对照组。

## 3 讨 论

建立某疾病研究模型的前提是该模型与某病要具有一定的相似性。1980年Chan等<sup>[1]</sup>首次发现HLD患者皮肤成纤维细胞内的铜含量明显高于对照组,提出HLD的皮

肤成纤维细胞能表达HLD的遗传缺陷,可以成为HLD研究的体外模型。虽然后来的研究对HLD患者成纤维细胞内铜含量测定结果有较大的争论<sup>[5-6]</sup>,但由于其他的研究发现HLD患者的培养细胞还可以出现酶组化染色<sup>[7]</sup>。铜摄取<sup>[8]</sup>等异常,至今尚无人对该模型的有效性提出争议。本研究也证实即使在一般培养条件下(低铜培养),HLD患者皮肤成纤维细胞胞浆内MT上的铜结合量明显高于对照组,与HLD患者肝细胞内MT上铜含量增高的结果<sup>[9]</sup>一致,提示一般培养条件下,HLD患者皮肤成纤维细胞确实能表达HLD的遗传缺陷。

多年的研究已完全肯定,HLD是一种铜代谢障碍性疾病,HLD患者肝、脑、肾等多种组织器官内铜含量明显增高,佐藤充等<sup>[9]</sup>还发现HLD患者肝细胞内MT含量明显高于对照组,但本实验中发现一般在培养条件下患者皮肤成纤维细胞胞浆内铜含量与对照组无明显区别,其胞浆内的MT含量也无增高,与在体研究的结果不一致,表明一般培养条件下HLD患者皮肤成纤维细胞对HLD遗传缺陷的表达是相当有限的,即低铜培养并非HLD遗传缺陷表达的最佳条件。

进一步采用不同浓度铜孵育,本实验发现:①HLD患者和对照组培养细胞在C<sub>4</sub>浓度铜孵育后,胞浆内铜含量均随着孵育时间的延长逐渐增高,但患者的增高幅度明显高于对照组;②C<sub>4</sub>浓度铜孵育48h后,HLD患者胞浆内MT上铜含量明显高于对照组;③C<sub>4</sub>浓度铜孵育后患者胞浆内MT含量的增高幅度也明显大于对照组;④我们还发现一般培养条件下HLD患者成纤维细胞的超微结构无明显改变,但经过高铜孵育,患者胞浆内一种电子密度高、与肝细胞富铜颗粒大小类似的颗粒明显增加<sup>[2]</sup>。以上从HLD患者离体培养皮肤成纤维细胞内获得的结果与HLD患者在体研究的结果类似,即高铜孵育后HLD患者培养细胞内的铜、MT代谢异常比一般培养条件时更为明显,更加接近于患

者的在体研究。因此,我们提出,高铜孵育能促进 HLD 的遗传缺陷在离体培养皮肤成纤维细胞内进一步表达。我们相信,利用 HLD 遗传缺陷表达的差异性,即低铜培养时的局限性和高铜培养的促进作用,将对今后 HLD 发病机理的动态研究起到重要的作用。另外, HLD 的离体培养皮肤成纤维细胞模型,与 HLD 的其他模型(如 Bedlington Terrier 等)相比,具有来源广泛,操作容易,材料丰富,较易控制及改变实验条件,结论更为直接、可靠等优点,是一种较为理想的研究方法。

### 参 考 文 献

- 1 Chan WY, Cushing W, Coffman MA, et al. Genetic expression of Wilson's disease in cell culture; a diagnostic marker. *Science*, 1980, 208 : 299
- 2 陈 嵘, 梁秀龄, 刘焯霖, 等. 铜孵育对肝豆状核变性离体培养皮肤成纤维细胞超微结构的影响. *中国神经精神疾病杂志*, 1993, 19(5) : 278
- 3 Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72 : 248
- 4 陈 剑. 金属硫蛋白的测定. *铁道劳动安全卫生与环保*, 1987, (1) : 52
- 5 Van Den Berg GJ, Van Den Hamer CJA, Meijer RJ, et al. Cultured skin fibroblasts: useful for diagnosis of Wilson's disease? *J Inher Metab Dis*, 1989, 12 : 64
- 6 陈秀珍, 杨永范, 李采娟, 等. 体外培养皮肤成纤维细胞中铜含量的测定—肝豆状核变性研究的新途径. *上海第一医学院学报*, 1983, 10(6) : 469
- 7 Liu HC, Chan WY, Rennert DM. Histochemical studies of fibroblasts from patients with Menkes' kinky hair disease and Wilson's disease. *Histochemical J*, 1982, 14 : 781
- 8 Chan WY, Rennert DM. Prenatal and postnatal diagnosis of disease of copper metabolism. *Ann Clin Lab Sci*, 1982, 12(5) : 372
- 9 佐藤充, 有马正高. 肝豆状核变性患者肝、肾、脑组织内的铜结合蛋白. *脑神经*, 1986, 38 : 933

(1994-04-15 收稿 1995-02-20 修回)

## RESEARCH OF CULTURED SKIN FIBROBLAST MODEL IN WILSON'S DISEASE

Chen Rong      Liang Xiuling      Liu Zhuolin      Chang Yingru

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

Copper and metallothionein metabolisms in cultured skin fibroblasts of Wilson's disease patients and controls were studied. It is found that when cultured in standard medium, the copper/protein ratio and metallothionein content in cytosol of patients showed no significant difference from controls. But after incubation in copper-rich medium, both copper/protein ratio and metallothionein content in patients were much higher than those of controls. The copper content binding in metallothionein in patients is higher than that in controls when cultured in standard medium, and is even higher when incubated in copper-rich medium. The author's conclusion is that the cultured skin fibroblasts is an ideal model for study of Wilson's disease.

**Subject headings** hepatolenticular degeneration/cytology; fibroblasts/chemistry; copper/metabolism; metalloproteins/metabolism; models, genetic