

肝豆状核变性纯合子及杂合子的临床生化研究

胡学强* 梁秀龄** 刘焯霖**

(神经病学教研室)

提要 本文测定、比较分析了肝豆状核变性纯合子32例、杂合子36例及正常对照组212例的血清铜蓝蛋白、血清铜、血清锌、铜锌比值、尿铜(包括青霉胺负荷试验)、尿锌、尿氨基酸及其衍生物,讨论了上述生化指标在纯合子诊断和杂合子检测中的意义和临床应用价值,认为测定血清铜蓝蛋白、尿铜(包括青霉胺负荷试验)、铜锌比值、氨基酸及其衍生物在确定纯合子,检测杂合子中有一定的实用价值。

肝豆状核变性(hepatolenticular degeneration HLD)亦称Wilson氏病,是一种由于铜代谢紊乱而引起的常染色体隐性遗传病^[1]。自从应用络合剂如青霉胺等治疗以来,预后大为改观,使本病成为药物治疗有效的先天性代谢缺陷病之一。但是本病的临床表现各种各样,涉及到临床各科,极易造成误诊。同时本病的早期患者往往无自觉症状及明显体征,常常延误诊断,然而这些患者的治疗效果和预后显著地优于已有症状的患者。无庸置疑,HLD的早期诊断和鉴别诊断具有重大意义。另一方面,本病的杂合子频率在人群中是较高的,对其有害基因的携带者(杂合子)状态进行普查,加以检出,以避免二个杂合子结婚而生出纯合子和杂合子是重要的优生措施之一,是预防本病的最好手段。迄今国内对检测杂合子缺乏有效方法,杂合子频率未见报道。本文通过对肝豆状核变性的纯合子、杂合子及正常对照组的血清铜蓝蛋白、血清铜、血清锌、铜锌比值、尿铜(包括青霉胺负荷试验)、尿锌、尿氨基酸及其衍生物进行测定、对比分析,结合HLD家系调查,以探讨上述生化指标在HLD早期诊断,鉴别诊断及杂合子检测中的意义和临床应用价值。

材料和方法

1.血清铜蓝蛋白的测定^[2] 用盐酸对苯二

胺作基质,班德罗斯基碱(Bandrowski base Bb)作标定的酶学法,结果用毫克数表示。

2.血清铜、锌与尿铜、锌的测定^[3,4] 采用阳极溶出伏安法(Anodic Stripping Voltammetry, ASV)。铜锌比值即用铜测定值除以锌测定值。

3.尿氨基酸及其衍生物的测定^[5] 收集24小时尿液经处理后取样,然后用美国Beckman 121型氨基酸分析仪测定。

4.青霉胺负荷试验方法 被试者先做青霉素皮试,结果阴性者于试验当天口服国产青霉胺1克(儿童按每公斤体重20毫克计算),然后收集当天24小时尿液测定尿铜。

5.研究对象 HLD纯合子(为确诊的患者)32例;杂合子36例(为已确诊纯合子其表型正常的父母例,配偶正常者所生的子女例);正常对照组212例。

结 果

测定结果与比较见表1~3,图1~6。由表1~3,图1~6归纳为以下几点:

1.纯合子、杂合子及对照组三组的血清铜蓝蛋白、血清铜、锌,尿铜、锌男女间差异不显著(P均大于0.05),故统计学处理及讨论中

*研究生

**导师

表 1 三组血清铜蓝蛋白、铜、锌及铜锌比值测定结果($\bar{x} \pm SD$)

		铜蓝蛋白 mg/dl	血清铜 μg/dl	血清锌 μg/dl	铜/锌比值
纯合子组	男 (19)	2.8 ± 1.4	30.1 ± 9.3	77.7 ± 15.0	0.39 ± 0.13
	女 (13)	2.5 ± 1.0	32.8 ± 16.3	77.5 ± 15.8	0.42 ± 0.18
	合计(32)	2.7 ± 1.2	31.2 ± 12.4	77.6 ± 15.1	0.40 ± 0.15
杂合子组	男 (16)	21.3 ± 5.8	83.7 ± 16.6	85.9 ± 9.8	0.98 ± 0.19
	女 (20)	23.4 ± 3.9	83.6 ± 12.9	90.1 ± 10.7	0.93 ± 0.15
	合计(36)	22.4 ± 4.9	83.7 ± 14.5	88.2 ± 10.4	0.95 ± 0.17
对照组	男 (109)	33.2 ± 5.8	104.3 ± 25.0	104.8 ± 23.8	1.00 ± 0.09
	女 (103)	33.0 ± 6.5	102.0 ± 23.2	100.7 ± 24.4	1.01 ± 0.07
	合计(212)	33.1 ± 6.1	103.2 ± 24.1	102.8 ± 24.0	1.00 ± 0.08
t		t* = 28.063	t* = 16.531	t* = 5.764	t* = 34.392
		t** = 9.986	t** = 4.707	t** = 3.588	t** = 0.580
P		P* < 0.001	P* < 0.001	P* < 0.001	P* < 0.001
		P** < 0.001	P** < 0.001	P** < 0.001	P** > 0.5

注: t*: 纯合子与对照组比较 t**: 杂合子与对照组比较
 P*: 纯合子与对照组比较 P**: 杂合子与对照组比较。表 2 相同

表 2 三组尿铜、尿锌及青霉胺负荷试验测定结果($\bar{x} \pm SD$)

		尿铜 μg/24h	尿锌 μg/24h	青霉胺负荷试验 μg/24h
纯合子组	男 (19)	212.1 ± 107.1	481.9 ± 80.1	
	女 (13)	242.9 ± 121.6	482.3 ± 105.3	
	合计 (32)	224.6 ± 112.3	482.1 ± 89.6	(29) 3145.9 ± 1160.0
杂合子组	男 (17)	36.5 ± 15.1	459.1 ± 66.8	
	女 (20)	34.1 ± 12.4	432.2 ± 77.1	
	合计 (37)	35.2 ± 13.5	444.5 ± 72.8	(25) 1371.5 ± 239.2
对照组	男 (66)	22.7 ± 6.8	403.7 ± 76.5	
	女 (62)	24.7 ± 7.3	418.0 ± 73.7	
	合计 (128)	23.7 ± 7.1	410.6 ± 75.2	(20) 978.2 ± 171.3
t		t* = 20.269	t* = 4.624	t* = 8.234
		t** = 6.909	t** = 2.432	t** = 6.045
P		P* < 0.001	P* < 0.001	P* < 0.001
		P** < 0.001	P** < 0.02	P** < 0.001

表 3 三组尿氨基酸及其衍生物的测定结果*($\mu\text{mol}/24\text{h}$)

氨基酸名称	对照组(30)	纯合子组(28)	杂合子组(28)	F/F 检验	P		
	1	2	3		1/2	1/3	2/3
磷酸丝氨酸	4.78±0.03	4.73±0.05	4.85±0.05	>0.05	—	—	—
牛磺酸	5.81±0.05	5.77±0.08	5.92±0.07	>0.05	—	—	—
磷酸胆胺	5.45±0.03	5.27±0.20	5.60±0.04	<0.05	>0.05	<0.01	>0.05
天门冬氨酸	4.53±0.05	4.55±0.05	4.57±0.07	>0.05	—	—	—
羟脯氨酸	4.73±0.06	5.00±0.10	4.97±0.09	<0.05	>0.05	<0.05	>0.05
苏氨酸	4.90±0.04	5.39±0.06	4.94±0.07	<0.01	<0.01	>0.05	<0.01
丝氨酸	5.30±0.06	5.56±0.06	5.31±0.06	<0.01	<0.01	>0.05	<0.01
天冬酰胺	5.53±0.06	5.81±0.09	5.51±0.06	<0.01	<0.01	>0.05	<0.05
谷氨酸	4.77±0.09	4.49±0.08	4.43±0.07	<0.01	<0.05	<0.05	>0.05
谷氨酰胺	4.21±0.10	4.84±0.06	4.03±0.07	<0.01	<0.01	>0.05	<0.01
N-甲基甘氨酸	5.31±0.05	5.40±0.06	5.41±0.07	>0.05	—	—	—
α -氨基己二酸	4.73±0.06	5.04±0.09	4.86±0.07	<0.05	<0.01	>0.05	>0.05
甘氨酸	5.87±0.04	5.99±0.06	5.85±0.06	>0.05	—	—	—
丙氨酸	5.14±0.05	5.35±0.06	5.14±0.09	<0.05	<0.01	>0.05	>0.05
瓜氨酸	3.57±0.07	4.35±0.10	4.01±0.09	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
氨基丁酸	4.32±0.10	4.21±0.12	4.57±0.06	<0.05	>0.05	>0.05	<0.05
缬氨酸	4.32±0.04	4.50±0.12	4.38±0.05	>0.05	—	—	—
胱氨酸	4.94±0.04	5.21±0.08	5.03±0.06	<0.05	<0.01	>0.05	>0.05
甲硫氨酸	4.17±0.06	4.53±0.08	4.27±0.07	<0.01	<0.01	>0.05	<0.01
胱硫醚	3.83±0.06	4.22±0.08	4.22±0.05	<0.01	<0.01	<0.01	>0.05
异亮氨酸	3.66±0.07	3.79±0.16	3.91±0.17	<0.01	<0.01	<0.01	>0.05
亮氨酸	4.29±0.66	4.47±0.05	4.47±0.06	<0.05	<0.05	>0.05	>0.05
酪氨酸	4.60±0.07	4.92±0.06	4.75±0.06	<0.01	<0.01	>0.05	>0.05
苯丙氨酸	4.49±0.06	4.65±0.06	4.60±0.13	>0.05	—	—	—
β -丙氨酸	4.45±0.06	4.06±0.23	4.46±0.11	>0.05	—	—	—
β -氨基异丁酸	5.19±0.14	4.86±0.10	4.88±0.14	>0.05	—	—	—
γ -氨基丁酸	3.51±0.06	4.10±0.10	4.04±0.08	<0.01	<0.01	<0.01	>0.05
乙醇胺	5.44±0.05	5.46±0.06	5.37±0.06	>0.05	—	—	—
DL 别羟赖氨酸	4.88±0.04	4.95±0.05	5.00±0.08	>0.05	—	—	—
鸟氨酸	4.58±0.03	4.59±0.04	4.64±0.06	>0.05	—	—	—
赖氨酸	4.94±0.07	5.18±0.06	5.12±0.08	<0.05	<0.05	>0.05	>0.05
1-甲基组氨酸	4.69±0.08	4.73±0.09	4.93±0.09	>0.05	—	—	—
组氨酸	5.61±0.03	5.71±0.04	5.57±0.04	<0.05	>0.05	>0.05	<0.05
3-甲基组氨酸	5.16±0.03	5.13±0.03	5.18±0.04	>0.05	—	—	—
鹅肌肽	5.46±0.04	5.52±0.06	5.60±0.09	>0.05	—	—	—
肌肽	4.49±0.17	3.89±0.28	4.13±0.22	>0.05	—	—	—
精氨酸	3.96±0.07	4.17±0.05	4.20±0.08	<0.05	<0.05	<0.05	>0.05

* 表中数据为对数转换后的平均值与标准误($\lg \bar{x} \pm \lg SE$)

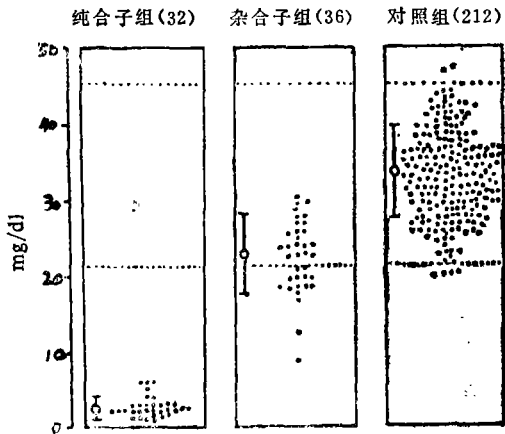


图1 三组血清铜蓝蛋白测定结果比较

注: \bar{x} 表示 $\bar{x} \pm SD$, \bullet 表示测定值, \cdots 表示95%正常范围, 以下相同

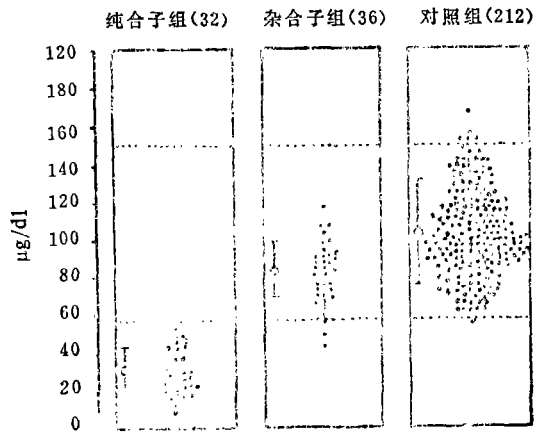


图2 三组血清铜测定结果比较

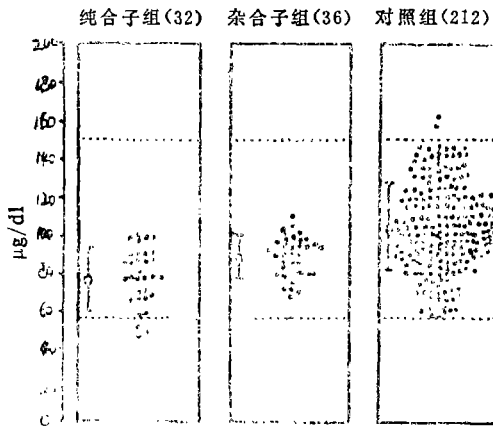


图3 三组血清锌测定结果比较

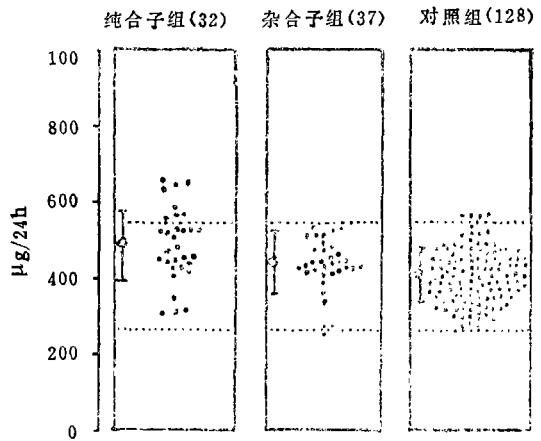


图4 三组尿锌测定结果比较

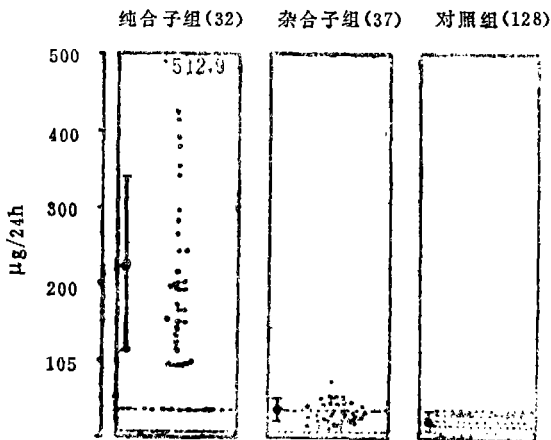


图5 三组尿铜测定结果比较

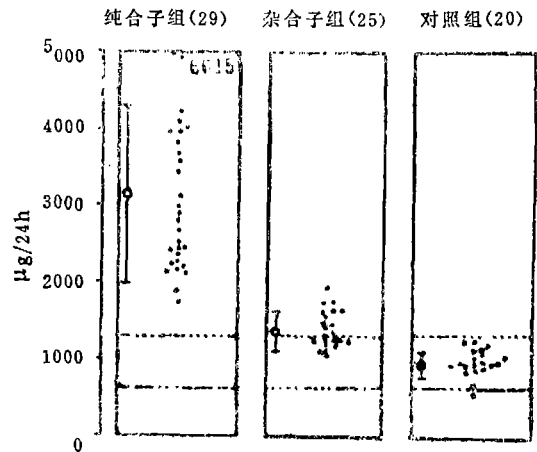


图6 三组青霉胺负荷试验测定结果比较

不作性别区分。纯合子组血清铜蓝蛋白,血清铜、锌,铜锌比值,尿铜(包括青霉素胺负荷试验)、锌与对照组相比,差异极其显著($P < 0.001$)。杂合子组血清铜蓝蛋白,血清铜、锌,尿铜(包括青霉素胺负荷试验)差异极其显著($P < 0.001$),尿锌差异显著($P < 0.02$),铜锌比值差异不显著($P > 0.5$)。

2.杂合子组上述指标测定结果处于纯合子组与对照组之间,与二组间有一定程度的重叠。

3.纯合子组中胱硫醚、瓜氨酸、 γ -氨基丁酸、苏氨酸、丝氨酸、甲硫氨酸、谷氨酰胺、天门冬酰胺、酪氨酸、胱氨酸、 α -氨基己二酸、丙氨酸、异亮氨酸与对照组比较差异极其显著($P < 0.01$),谷氨酸、精氨酸、亮氨酸、赖氨酸差异显著($P < 0.05$)。杂合子组中胱硫醚、瓜氨酸、 γ -氨基丁酸、磷酸胆胺、异亮氨酸与对照组比较差异极其显著($P < 0.01$),谷氨酸、精氨酸、羟脯氨酸差异显著($P < 0.05$)。

讨 论

本文32例纯合子分属29个家系,未发现近亲婚配。其中有2个或2个以上纯合子的有4个家系,占13.8%(4/29)。纯合子的同胞总数为122人,已确诊为HLD纯合子的35人(包括已死亡及在外院确诊者),其中男19例,女16例,占同胞总数的28.7%(35/122)。未发现连续二代纯合子的情况。上述资料符合常染色体隐性遗传的规律。

32例纯合子血清铜蓝蛋白($0.9 \sim 5.7 \text{mg/dl}$)全部显著低于正常值,其中2例系先证者的同胞,他们是无症状的纯合子(后经裂隙灯检查有角膜K-F氏环);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。这些结果与国内外报道一致^[6],表明铜的代谢异常为HLD纯合子生化异常的显著特征,是本病诊断和鉴别诊断的主要依据。

锌是人体内必需的微量元素之一。近年来

有报道用锌治疗HLD取得较好疗效,并认为锌可拮抗铜的吸收。HLD纯合子血清锌平均值降低,尿锌平均值增高,这可能与本病的肝脏病变导致锌和蛋白结合率及亲和力下降,蛋白尿和氨基酸尿有关。锌直接参与核酸及蛋白质的合成代谢,与体内多种酶的活性有关,具有重要的生理生化效能。锌治疗HLD的效果到底是减少铜的吸收、促进铜的排泄,抑或是纠正了锌的缺乏,导致损伤功能的恢复,或者二方面共同作用,有待进一步探讨。

血清铜锌之间有一定的比例关系,其比值受铜锌二种元素的影响,反映了二者间的关系,显然优于单一的测定。32例纯合子铜锌比值全部降低,因而也可视为诊断HLD的有效指标之一。

从同胞中检出杂合子对于遗传咨询和指导优生极为重要。36例杂合子血清铜蓝蛋白、血清铜、血清锌平均值降低,尿铜(37例)、尿锌(37例)平均值增高。其中铜蓝蛋白低于95%正常值范围的有15例,占41.7%(15/36),这结果明显高于欧美文献报道,与国内和日本的报道相接近,究其原因可能与种族有关。14例杂合子的尿铜超过了95%正常值范围,占38%(14/37)。不难看出杂合子也存在着铜、锌代谢异常,只不过程度不同而已。故认为对有先证者的同胞进行普查中,对于具有血清铜蓝蛋白、血清铜、血清锌均较低,而尿铜较高者,如能排除HLD纯合子的诊断,则基本上可视为杂合子。在其选择配偶时,应对被选择者进行上述铜锌生化测定,以避免产生纯合子及新的杂合子。

青霉素胺负荷试验结果显示纯合子(29例)尿铜全部大幅度增高,杂合子(25例)平均值也显著增高,高于对照组最高值者14例,占56%(14/25)。可以看出纯合子及杂合子体内均有过多铜的积聚。青霉素胺负荷试验反映了国产青霉素胺有较好的排铜作用,可用来观察对纯合子治疗的敏感性,对于可疑杂合子,进行该项试验有助于进一步明确,因而是检测杂合子有效的手段之一。

尿中许多不同的氨基酸及其衍生物含量增多也是纯合子异常的生化特征之一。氨基酸在肾脏的转运是由特异的转运系统完成的, 这些转运方式称为主动转运, 是一个依赖于钠离子浓度和代谢能量供给的过程, 其特征是膜上有载体。本研究显示了中性氨基酸、二碱基氨基酸转运系统受累。HLD 纯合子由于过量铜沉积于肾脏, 造成了肾近曲小管对氨基酸重吸收功能降低, 使原尿中氨基酸的重吸收减少, 导致终尿中许多不同氨基酸含量升高, 而出现了“全”氨基酸尿。Foulker^[7]曾指出: 抑制氨基酸重吸收作用的特异性和抑制程度取决于金属的剂量, 剂量越大, 抑制越严重。HLD 纯合子由于其所处病期不同, 铜在肾脏沉积的程度也不同, 因而抑制氨基酸重吸收作用和抑制程度也就相应的不同。氨基酸尿是 HLD 纯合子肾功能障碍的主要表现之一。但肾功能障碍不能完全解释高尿氨基酸衍生物, 由于 HLD 均存在不同程度的肝损害, 推测与肝内氨基酸代谢缺陷有关。临床上有条件的话, 进行尿氨基酸及其衍生物测定, 有助于 HLD 纯合子的鉴别以及了解肾功能状况, 在治疗上应给予高蛋白、高氨基酸饮食。

杂合子组除了异亮氨酸、精氨酸、羟脯氨酸增多, 谷氨酸减少外, 主要表现为氨基酸衍生物胱硫醚、 γ -氨基丁酸、瓜氨酸、磷酸胆胺增多。Leu 等^[8]曾指出肝豆状核变性杂合子有包括氨基酸尿在内的肾功能障碍, 但 Scheinberg^[9]认为以肾功能障碍解释 HLD 家族成员的氨基酸尿尚需进一步验证。与纯合子不同, 杂合子中肾小管具有特异转运系统的很多种氨基

酸均很少增多, 而几种氨基酸衍生物却明显增多, 尤值得注意的是磷酸胆胺仅仅在杂合子组中明显增多, 测定磷酸胆胺是否能作为杂合子检测的主要指标, 其确切的临床价值尚待进一步验证。杂合子的这些变化, 推测与氨基酸代谢缺陷有关, 肝脏是蛋白质和氨基酸代谢的主要器官, 故我们认为氨基酸代谢缺陷的原发器官也许就在肝脏。

参 考 文 献

- [1] 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; 8:4.
- [2] Bauer JD, et al. *Clinical Laboratory Methods*. 8ed, p477, The CV Mosby Company Saint 1974.
- [3] 林义祥, 等. 一滴血清中铜的测定. 化学世界 1981; 1:10.
- [4] 沈文英. 阳极溶出伏安法测定尿中痕量锌、镉、铅、铜. 福建医学院学报 1984; 18:35.
- [5] Beckman. *Instruction Manual for the Model 121 M Microcolumn Amino Acid Analyzer*. Section 1977; 3:1.
- [6] Sternlieb I. *Diagnosis of wilson's disease*. *Gastroenterology* 1978; 74:787.
- [7] Foulkes EC. Tubular sites of action of heavy metals and the nature of their inhibition of amino acid reabsorption. *Fed Proc* 1983; 42:2695.
- [8] Leu M, et al. Renal function in heterozygotes for wilson's disease. *Am J Med Sci* 1972; 263:19.
- [9] Scheinberg IH. *Perspective*. *Am J Med Sci* 1972; 263:25.

Studies on Clinical Biochemistry in Homozygotes and Heterozygotes of Hepatolenticular Degeneration

Hu Xueqiang Liang Xiuling Liu Zhoulin

(Department of Neurology, First Affiliated Hospital)

Abstract

This paper presents the clinical biochemical changes in 32 homozygotes and 37 heterozygotes of hepatolenticular degeneration (HLD), with 212 normal subjects as a control. The contents of copper and zinc in serum as well as in the urine (including penicillamine loading test) were determined by anodic stripping voltammetry (ASV) and the concentration of ceruloplasmin in serum by enzymatic method. 37 urinary amino acids and their derivatives were measured with automatic amino acid analyzer. The results showed that low concentrations of ceruloplasmin, serum copper, serum zinc and copper/zinc ratio were the biochemical characteristics of homozygotes of HLD.

These results were significantly different as compared with those of control group. All values mentioned above were slightly lowered in heterozygotic HLD and they lay between the values of homozygotes and normal subjects, showing an overlapping phenomenon. The abnormality of ceruloplasmin concentration, 24 hours urinary copper before and after penicillamine loading test were 41.7% (15/36), 38% (14/37), 56% (14/25) in heterozygotes respectively. The excretion of 16 out of 37 amino acids and their derivatives in the urine of homozygotes was much higher than those of the controls, while only 7 amino acids (cystathionine, citrulline, γ -aminobutyric acid, arginine, phosphory lethanalamine, hydroxyproline and isoleucine) increased in heterozygotes. It is worthy of note that the cystathionine was only present in urine of heterozygotes. The increased excretion of amino acids urine may due to the damaged renal tubules, besides, the authors postulate that there might have a defect in the metabolism of amino acid.

On the basis of this studies, the authors indicate that a low serum-copper concentration, and copper/zinc ratio, high urinary copper concentration, marked increased urinary copper after penicillamine loading test, especially marked low concentration of ceruloplasmin are the main points for confirming the diagnosis of homozygotes and they could play a role in the detection of heterozygotes. Furthermore, the measurement of urinary amino acids and their derivatives might also be helpful for the same purposes, but its significance still needs to be studied further.