

· 实验研究 ·

铜过量负荷导致肝细胞凋亡及其对 Bax Bcl-2 基因表达的影响

李毓雯¹, 万小华¹, 宁琴², 罗小平¹

(华中科技大学同济医学院附属同济医院 1. 儿科, 2. 感染科, 湖北 武汉 430030)

[摘要] **目的** 建立肝豆状核变性铜过量负荷大鼠模型, 并研究肝铜沉积对肝细胞凋亡及 Bax, Bcl-2 基因表达的影响。**方法** 建立铜过量负荷大鼠模型, 检测肝脏和血清铜以及血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)含量; 用末端脱氧核苷酸转移酶介导生物素标记(TUNEL)技术、RT-PCR 和免疫组织化学方法分别检测铜过量负荷大鼠肝细胞凋亡、凋亡相关基因 Bax, Bcl-2 的 mRNA 和蛋白表达水平, 并利用图像分析系统观察阳性细胞的变化规律。**结果** 随着铜负荷时间的延长, 铜过量负荷大鼠肝组织铜含量、血清 ALT 水平逐渐升高, 同时肝细胞的凋亡也逐渐增多, 凋亡指数(AI)逐步升高。铜过量负荷大鼠肝组织 Bax 基因的表达水平明显高于对照组, 且随着铜负荷时间的延长有升高趋势; Bcl-2 基因的表达水平高于对照组, 且随着铜负荷时间的延长也有升高趋势, 但升高幅度低于 Bax, 故 Bcl-2 与 Bax 的比值(Bcl-2/Bax)随着铜负荷时间的延长而降低。**结论** 成功建立肝豆状核变性铜过量负荷大鼠模型, 铜过量负荷通过相对上调促凋亡基因 Bax 表达水平来诱导肝细胞的凋亡。

[中国当代儿科杂志, 2008, 10(1): 42-46]

[关键词] 肝豆状核变性; 肝细胞凋亡; Bax; Bcl-2; 大鼠
[中图分类号] R-33; R742.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2008)01-0042-05

Excessive copper induces hepatocyte apoptosis and affects Bax and Bcl-2 expression in rat liver

LI Yu-Wen, WAN Xiao-Hua, NING Qin, LUO Xiao-Ping. Department of Pediatrics, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China (Luo X-P, Email: xpluo@tjh.tjmu.edu.cn)

Abstract: Objective To establish a hepatolenticular degeneration rat model with excessive copper, and investigate the effects of excessive copper deposits in the liver on hepatocyte apoptosis and Bax and Bcl-2 expression. **Methods** Rat model of hepatolenticular degeneration was established by administering forages containing 1g/kg of copper sulfate and drinking water containing 0.185% copper sulfate. Copper level in the liver and serum and alanine aminotransferase (ALT) level in serum were measured using an atomic absorption spectrophotometer. The terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine 5-triphosphate nick-end labeling (TUNEL) method was used to detect hepatocyte apoptosis. Bax and Bcl-2 expression was observed by RT-PCR and immunohistochemistry staining. Quantification of positive cells was performed by image analyzer. **Results** With more prolonged excessive copper ingestion, copper level in the liver and serum as well as ALT level in serum rose, and more apoptosis cells appeared in the liver. Bax and Bcl-2 expression increased significantly compared with controls fed a normal diet and progressively increased with more prolonged excessive copper ingestion. The progressively increased extent of Bcl-2 expression was lower than that of Bax expression, so the ratio of Bcl-2/Bax decreased with increasing excessive copper ingestion time. **Conclusions** Excessive copper deposits in the liver can induce hepatocyte apoptosis through an up-regulation of Bax expression.

[Chin J Contemp Pediatr, 2008, 10(1): 42-46]

Key words: Hepatolenticular degeneration; Hepatocyte apoptosis; Bax; Bcl-2; Rats

肝豆状核变性(hepatolenticular degeneration, HLD)又称 Wilson 病(Wilson's disease, WD), 是一种由常染色体单基因隐性遗传所致的先天性铜代谢障碍性疾病, 其特征为铜在肝、肾、脑、角膜等组织的过量蓄积, 引起一系列临床症状^[1-3]。肝脏是 WD 最先受累的脏器之一, 发病年龄越小, 以肝病为

唯一临床表现的可能性越大, 肝病临床表现似急或慢性肝炎反复发作, 甚至出现肝硬化表现。目前用于该病研究的模型主要有 LEC 大鼠, TX 小鼠以及 ATP7B 基因敲除小鼠, 但各模型与 WD 的病理生理改变并不完全一致, 且不易得到, 使其进一步研究受限^[4]。有研究显示, 在 WD 患者及其动物模型 LEC

[收稿日期] 2007-05-24; [修回日期] 2007-07-03
[基金项目] 国家重点基础发展计划 973 项目(2005CB522507)。
[作者简介] 李毓雯, 女, 硕士, 医师。主攻方向: 儿科遗传代谢病的防治研究。现在安徽省立医院儿科工作, 邮编: 230001。
[通讯作者] 罗小平, 教授, 博士生导师, 华中科技大学同济医学院附属同济医院儿科, 邮编: 430030。

大鼠中,肝炎的发生可能与铜在肝内的过量蓄积有关^[5,6]。本研究首次提出通过饮食过量铜离子建立WD铜过量负荷大鼠模型。该模型可以较好地模拟肝铜沉积诱导肝脏损伤的过程,且具有简单实用,重复性好等特点,为WD肝脏损伤发病机制的研究提供了一个良好的平台。我们在建立该模型的基础上,观察肝损伤指标、肝细胞凋亡以及凋亡相关蛋白的表达情况,初步探讨肝铜沉积在肝损伤发病机制中的作用。

1 材料与方法

1.1 铜负荷大鼠模型

清洁级 Wistar 大鼠,雄性,月龄均为 3 个月,平均体重 177 ± 25 g,购自华中科技大学同济医学院动物实验中心。

将大鼠随机分 4 组,每组各 8 只。对照组(CON 组),铜负荷 4 周组(Cu-4 组),铜负荷 8 周组(Cu-8 组),铜负荷 12 周组(Cu-12 组)。所有大鼠均按标准饲养 12 周,Cu-4 组、Cu-8 组、Cu-12 组分别从第 8 周、第 4 周和第 1 周起给予含硫酸铜(天津巴斯夫化工公司)1 g/kg 的饲料和 0.185% 硫酸铜(天津巴斯夫化工公司)的水。

1.2 方法

1.2.1 标本取材 第 12 周结束,在 2% 的戊巴比妥钠腹腔麻醉下,分别留取血清、肝组织标本。肝组织液氮速冻后存于 -80°C 冰箱,用于铜离子测定和 RNA 提取。另将部分肝组织置于 4% 多聚甲醛中 4°C 固定 12 h,常规石蜡包埋切片,连续切片, $5\text{ }\mu\text{m}$ /片,用于免疫组化和细胞凋亡的检测。

1.2.2 血清、肝组织铜(Cu)测定 血清铜检测以待测血清用去离子水 1:10 稀释后混匀,采用原子吸收分光光度计测量。肝组织 300~500 mg,先用 0.9% NaCl 反复洗净,再用干净滤纸吸干,用浓硝酸(分析纯)10 mL 低温加热进行消化,等组织完全溶解至黄色澄清透明后,用原子吸收法(原子吸收分光光度计,361MC,上海精密仪器有限公司)测铜含量。

1.2.3 TUNEL 法检测细胞凋亡 实验步骤按试剂盒(武汉博士德公司)说明进行。结果判定:肝细胞核呈棕黄色为阳性细胞,即凋亡细胞。每例标本随机取 10 个高倍视野(400 倍),至少记数 1 000 个细胞中凋亡细胞所占的百分比,即凋亡指数(apoptosis index, AI)。

1.2.4 RT-PCR 利用 Trizol 试剂(上海生工生

物工程技术服务有限公司)提取肝组织总 RNA, DU530DNA/Protein 分析仪(Beckman)测定 RNA 浓度,逆转录反应体系为 2 μg 总 RNA,1 μL Oligo(dT)15,1 μL dNTP Mix(10 mmol/L),0.5 μL Rnasein Ribonuclease Inhibitor(40 U/ μL),1 μL M-MuLV Reverse Transcriptase (Promega, 200 U/ μL),共 20 μL 。以 GAPDH 做内参照,引物及其反应步骤见表 1。PCR 反应体系包括 2 μL cDNA,上下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 1 μL ,3 μL MgCl_2 (25 mmol/L),1 μL dNTP Mix(10 mmol/L),1 μL Taq 聚合酶(1 U/ μL),共 50 μL 。各取 10 μL 目的基因和内参照 PCR 产物 2.5% 琼脂糖凝胶(含 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 溴化乙锭)电泳(60 V,25 min,美国 BIO-RAD 公司电泳仪)。

利用凝胶成像分析系统(美国 UVP 公司),测定目的基因 PCR 产物条带与 GAPDH PCR 产物条带的吸光度(A),计算两者比值作为目的基因的相对表达量。

1.2.5 免疫组化 采用 SP9001 试剂盒(北京中山生物技术公司)检测。切片脱蜡至水(二甲苯 10 min $\times$ 2,无水乙醇 5 min $\times$ 2,90%、80%、70% 乙醇各 5 min),高压抗原修复,0.3% H_2O_2 甲醇封闭 30 min,正常羊血清封闭 30 min,分别加入 1:100 稀释的兔抗鼠 Bax 一抗及 1:100 兔抗鼠 Bcl-2 一抗(武汉博士德公司), 4°C 过夜,0.01 M PBS 充分洗涤后加入生物素标记的羊抗兔 IgG, 37°C 孵育 30 min,加入辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素 37°C 30 min,DAB(北京中山生物技术公司)显色约 1 min。结果判定以细胞浆有棕黄色颗粒沉着为阳性细胞。苏木素轻度复染,脱水,透明,封片,镜下观察。阴性对照为 0.01 MPBS 替代一抗。每例随机抽取染色清晰的切片 5 张,每张切片于光镜下($\times 400$)随机选取 10 个视野,固定窗口面积,利用 HMIAS-2000 高清晰度彩色医学图文分析系统,测定平均吸光度(A)以表示阳性产物的强度。

1.3 统计学分析

数据用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 t 检验进行统计学处理, $P < 0.05$ 认为有统计学意义。

2 结果

2.1 铜负荷大鼠血清和肝组织的铜含量以及血清 ALT 的变化

表 2 显示,肝组织的铜含量 Cu-4 组显著高于 CON 组($t = 3.31$, $P < 0.05$),Cu-8 组显著高于 Cu-4 组($t = 9.04$, $P < 0.01$),Cu-12 组显著高于 Cu-8 组

表 1 GAPDH、Bax 和 Bcl-2 引物序列及 PCR 反应条件

引物	产物大小(bp)	引物序列	PCR 反应条件
GAPDH	571 bp	上游 5'- ATCACCATCTTCCAGGAG-3'	95℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 45 s,56℃ 退火 45 s,72℃ 延伸 1 min,30 个循环;72℃ 终末延伸 10 min
		下游 5'- TGCTTCACCACCTTCTTG-3'	
Bax	185 bp	上游 5'-GAGCTGCAGAGGATGATTG-3'	95℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 45 s,55℃ 退火 45 s,72℃ 延伸 1 min,30 个循环;72℃ 终末延伸 10 min
		下游 5'-GATGGTTCTGATCAGCTCG-3'	
Bcl-2	398 bp	上游 5'- AGCCGGGAGAAACAGGTA-3'	95℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 45 s,52℃ 退火 45 s,72℃ 延伸 1 min,30 个循环;72℃ 终末延伸 10 min
		下游 5'-CCACCACCTCTTGAGAAGT-3'	

表 2 铜负荷大鼠血清和肝组织的铜含量以及 ALT 的测定结果

组别	肝组织 Cu (mg/kg)	血清 Cu (mg/mL)	血清 ALT(U/L)
CON	0.43 ± 0.29	2.02 ± 0.33	38.17 ± 1.15
Cu-4	0.91 ± 0.35 ^b	2.24 ± 0.48	75.37 ± 7.75 ^a
Cu-8	4.16 ± 0.59	3.65 ± 0.58	117.25 ± 14.35
Cu-12	16.43 ± 4.51 ^a	4.53 ± 0.44 ^a	200.50 ± 16.15 ^a

注:a:与 CON 组比较 $P < 0.01$; b: $P < 0.05$ 。

($t = 10.01, P < 0.01$),血清铜含量 Cu-4 组与 CON 组差异不显著,Cu-8 组显著高于 Cu-4 组($t = 4.22, P < 0.01$),Cu-12 组显著高于 Cu-8 组($t = 3.98, P < 0.01$),说明随着铜负荷时间的延长,肝组织和血清铜含量逐渐升高,但肝组织的铜含量升高现象出现的更早,且升高幅度也更高。血清 ALT 水平 Cu-4 组显著高于 CON 组($t = 13.71, P < 0.01$),Cu-8 组显著高于 Cu-4 组($t = 7.04, P < 0.01$),Cu-12 组显著高于 Cu-8 组($t = 9.91, P < 0.01$),说明随铜负荷时间的延长,血清 ALT 水平也逐渐升高。

2.2 肝细胞凋亡的发生

大鼠肝组织石蜡切片,凋亡检测 TUNEL 法 DAB 染色。显微镜下显示凋亡细胞的胞核呈棕黄色颗粒状,散在分布,也可见少量呈阳性染色的血管内皮细胞及浸润淋巴细胞(图 1)。肝细胞凋亡指数 Cu-4 组显著高于 CON 组($t = 6.28, P < 0.01$),Cu-8 组显著高于 Cu-4 组($t = 5.85, P < 0.01$),Cu-12 组显著高于 Cu-8 组($t = 12.99, P < 0.01$),说明随着铜负荷时间的延长,Cu-4,Cu-8,Cu-12 组的肝细胞凋亡逐渐增多(图 2)。

2.3 肝组织 Bax,Bcl-2 mRNA 水平的表达

各组大鼠肝组织提取总 RNA,RT-PCR 后电泳结果显示,Bax mRNA 表达水平 Cu-4 组显著高于 CON 组($t = 4.14, P < 0.01$),Cu-8 组显著高于 Cu-4 组($t = 3.95, P < 0.01$),Cu-12 组显著高于 Cu-8 组($t = 4.71, P < 0.01$),说明随着铜负荷时间的延长,Bax mRNA 表达水平逐渐升高;Bcl-2 mRNA 表达水平 Cu-4 组与 CON 组差异不显著,Cu-8 组显著高于 Cu-4 组($t = 4.43, P < 0.01$),Cu-12 组显著高于 Cu-8 组($t = 6.27, P < 0.01$),说明随着铜负荷时间的延长,Bcl-2 mRNA 表达水平也逐渐升高,但上升幅度

均低于同组 Bax 的表达水平,因此随着铜负荷时间的延长,mRNA 表达水平 Bcl-2/Bax 有逐渐减小的趋势(图 3)。

2.4 肝组织 Bax、Bcl-2 蛋白水平的表达

Bax 与 Bcl-2 阳性染色主要位于肝细胞胞浆,呈棕黄色,略呈细颗粒状,成片状或簇状分布(图 4)。经 HMIAS-2000 图文分析系统处理后结果显示,Bax 蛋白表达水平 Cu-4 组显著高于 CON 组($t = 16.21, P < 0.01$),Cu-8 组显著高于 Cu-4 组($t = 4.05, P < 0.01$),Cu-12 组显著高于 Cu-8 组($t = 11.51, P < 0.01$),说明随着铜负荷时间的延长,Bax 蛋白表达水平逐渐升高;Bcl-2 蛋白表达水平 Cu-4 组显著高于 CON 组($t = 4.96, P < 0.01$),Cu-8 组与 Cu-4 组差异不显著,Cu-12 组显著高于 Cu-8 组($t = 2.82, P < 0.05$),说明随着铜负荷时间的延长,Bcl-2 蛋白表达水平大体上也逐渐升高,但上升幅度均低于同组 Bax 的表达水平,因此随着铜负荷时间的延长,蛋白表达水平 Bcl-2/Bax 有逐渐减小的趋势,与图 3 B 中 mRNA 表达水平 Bcl-2/Bax 变化基本一致(图 5)。

3 讨论

文献报道 WD 的发病率为 30/1 000 000,遗传率为 1/180,基因频率约为 0.56%,杂合子频率估计为 1/100 ~ 1/200^[7]。由于铜转运失调导致患者体内肝脏和大脑铜蓄积,肝上皮实质细胞胞浆中铜蓄积会导致肝坏死,同时释放大量的铜进入血液,使红细胞膜破裂,引发溶血性贫血^[8],铜也可在大脑、肾脏和角膜等组织脏器中沉积。临床特征有好发于青少年、肝硬变、脑部尤其是基底节变性、角膜 K-F 环、肾损害等^[9,10]。WD 的具体发病机制至今仍不清楚。其发病年龄从 2 岁到 40 岁不等,患者可表现为肝脏或神经系统方面的症状,也可表现为溶血性贫血、关节炎等。临床表现形式多种多样,大部分患者的血浆铜兰蛋白低于正常,但部分病人可正常^[11,12]。

铜是人体的必需微量元素之一,它可以和蛋白质结合形成铜蛋白,具有保护细胞的功能,铜还是许

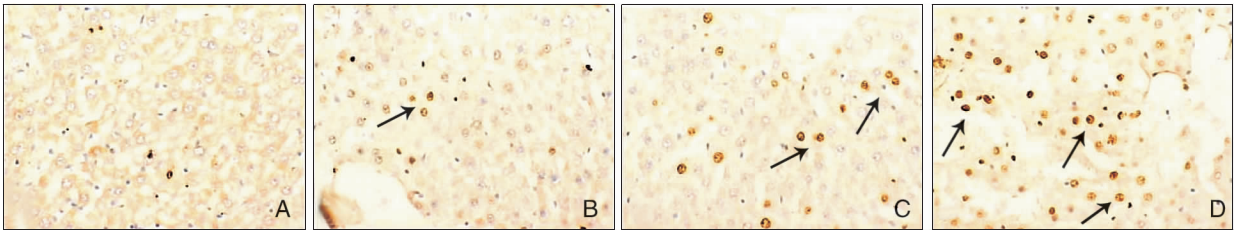


图1 铜过量负荷导致大鼠肝细胞凋亡的情况(TUNEL 法,400 ×)。A:CON 组可见个别凋亡细胞;B:Cu-4 组可见少量凋亡细胞; C:Cu-8 组可见较多凋亡细胞;D:Cu-12 组可见大量凋亡细胞。箭头所指为阳性细胞,胞核呈棕黄色颗粒状,散在分布。

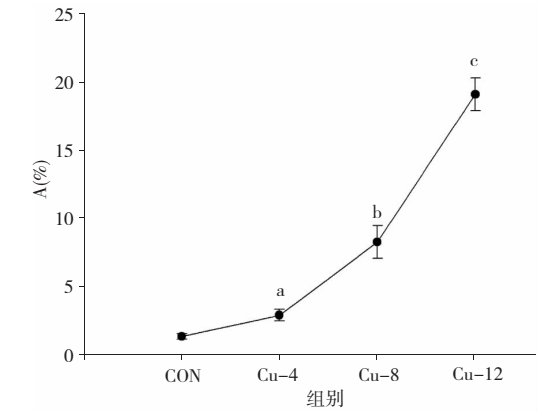


图2 铜过量负荷大鼠肝细胞凋亡指数变化。a: Cu-4 组与 CON 组相比; b: Cu-8 组与 Cu-4 组相比; c: Cu-12 组与 Cu-8 组相比,均 $P < 0.01$ 。

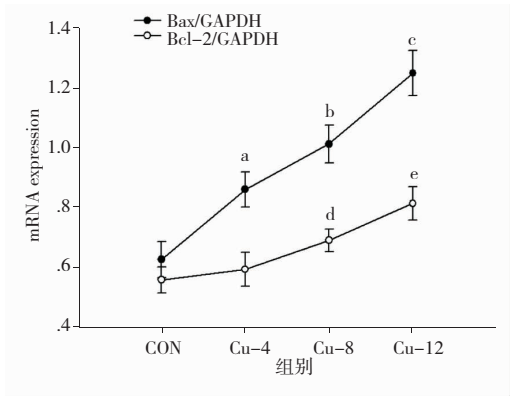


图3 铜过量负荷导致大鼠肝细胞 Bcl-2 类基因 mRNA 表达水平的变化。a: Cu-4 组与 CON 组相比; b: Cu-8 组与 Cu-4 组相比; c: Cu-12 组与 Cu-8 组相比,均 $P < 0.01$; d: Cu-8 组与 Cu-4 组相比; e: Cu-12 组与 Cu-8 组相比,均 $P < 0.05$ 。

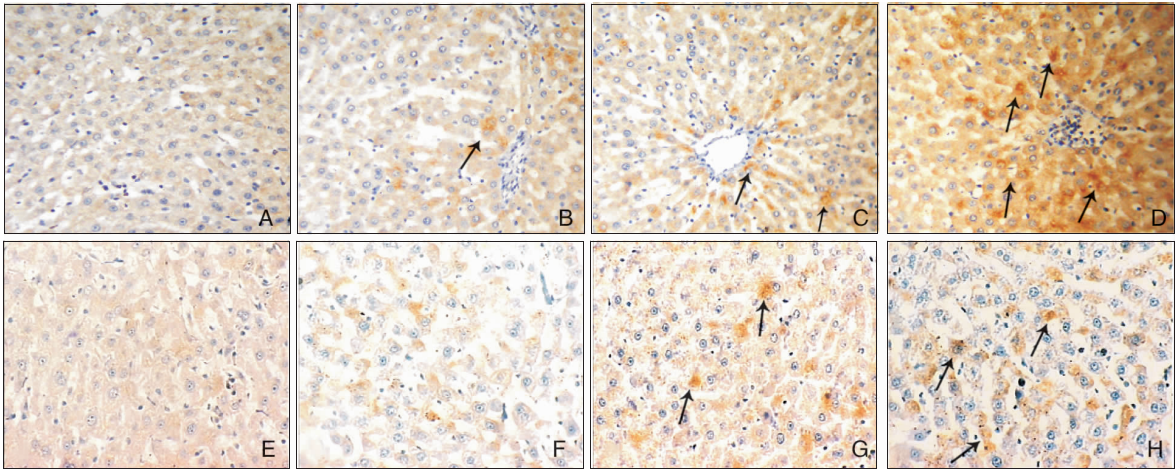


图4 铜过量负荷导致大鼠肝细胞 Bcl-2 类基因蛋白表达水平的变化 A、B、C、D 分别为 CON 组、Cu-4 组、Cu-8 组和 Cu-12 组大鼠肝细胞 Bax 蛋白表达水平;E、F、G、H 分别为 CON 组、Cu-4 组、Cu-8 组和 Cu-12 组大鼠肝细胞 Bcl-2 蛋白表达水平。箭头所指为阳性细胞,胞浆呈棕黄色,胞核呈深蓝色。

多重要酶的组成部分或激活剂。血浆中的铜 95 % 与 α 球蛋白结合形成铜蓝蛋白,5% 与白蛋白结合,极少量游离。WD 由于铜蓝蛋白减少,结合铜生成减少,游离铜沉积于脏器内,故血清铜含量下降,尿铜排出增加。铜离子具有较强的产生自由基的能力,所以过量的铜又具有潜在的毒性,Aston 等^[13]报道用不同浓度的铜观察 HepG2 细胞株发的现铜中毒可以影响肝细胞的增殖和复制,促进细胞的凋亡。但在 WD 中铜是如何导致肝脏的一系列变化的体内

研究并不多见。本实验通过饮食添加硫酸铜制造铜负荷 Wistar 大鼠模型,我们在铜负荷 6,8,12 周后可以观察到肝组织的大量铜离子沉积,最高达到正常组数十倍,同时也发现铜负荷后大鼠血清转氨酶也随之升高,说明了铜离子在肝脏的过量沉积可以导致肝细胞的破坏。另外发现除肝组织的铜离子水平的增高以外,血清铜离子在铜负荷后也有一定的升高,最高可达到正常的 2 倍,可能由于铜离子的过量摄入后导致铜兰蛋白代偿性的升高而所致,与 WD

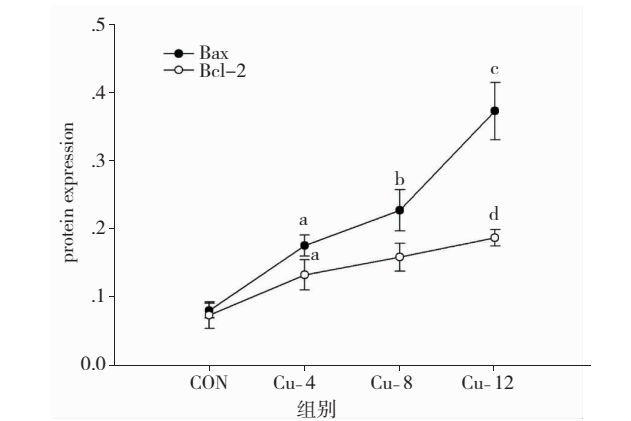


图5 铜过量负荷导致大鼠肝细胞 Bcl-2 类基因蛋白的表达水平变化规律 a: Cu-4 组与 CON 组相比; b: Cu-8 组与 Cu-4 组相比; c: Cu-12 组与 Cu-8 组相比,均 $P < 0.01$; d: Cu-12 组与 Cu-8 组相比, $P < 0.05$ 。

患者血清铜降低的表现并不一致。虽然该动物模型与 WD 有较多的差异,但在疾病的最终阶段具有一致性,且具有价格低廉,重复性好,以及便于饲养等优点,因此可用于 WD 肝铜沉积导致的肝损伤发病机制的研究。

在众多肝病发病机制的研究中,肝细胞凋亡往往发生在肝损伤的早期阶段,凋亡信号的增强,持续性的肝细胞凋亡进一步促进肝细胞不可逆性坏死。细胞凋亡是受多个基因调控的,细胞凋亡调控基因中最受关注的就是 Bcl-2 家族,其中 Bcl-2 和 Bax 都是 Bcl-2 家族成员,Bcl-2 的生理功能主要是抑制细胞凋亡,延长细胞寿命^[14~16]。Bax 的功能与 Bcl-2 相反,主要是促进细胞凋亡,Bax 和 Bcl-2 分别可以以同源二聚体形式存在,他们之间也可形成异源二聚体,Bax-Bcl-2 异源二聚体较稳定,无诱导凋亡的作用,而当 Bax 较 Bcl-2 绝对或相对增高,即细胞内二者之比 (Bcl-2/Bax 值)下降时,Bax-Bax 同源二聚体形成,便诱导凋亡^[17,18]。本研究通过铜负荷大鼠模型发现随铜负荷时间的延长,大鼠肝铜沉积的程度也越高,同时肝细胞的凋亡指数也越大,说明铜离子在肝脏的过量沉积是导致肝细胞凋亡的直接原因。同时我们也在 mRNA 和蛋白水平检测了肝组织凋亡相关基因 Bax 和 Bcl-2 的表达情况,发现随铜负荷时间的延长,Bax 和 Bcl-2 基因的表达都有上调的趋势,但促凋亡基因 Bax 表达上调程度要远高于抑凋亡基因 Bcl-2,因此 Bax 表达相对量增高,即细胞内 Bcl-2/Bax 下降,Bax-Bax 同源二聚体形成,最终诱导大量肝细胞凋亡。

目前对于肝铜沉积所致的肝细胞凋亡上下游通路仍待进一步研究,例如 Bcl-2 蛋白家族如何活化,

caspase 非依赖途径具体机制。对细胞凋亡机制的研究仍局限于动物实验,临床 WD 的肝细胞凋亡极其发生机制的研究需要进一步证实,动物模型的这些研究结果将为临床研究提供一定的参考。

[参 考 文 献]

[1] Sternlieb I. Copper and the liver [J]. Gastroenterology, 1980, 78 (6):1615-1628.

[2] Brewer GJ, Yuzbasiyan-Gurkan V. Wilson disease[J]. Medicine, 1992, 71(3):139-164.

[3] Taly AB, Meenakshi-Sundaram S, Sinha S, Swamy HS, Arunodaya GR. Wilson disease: description of 282 patients evaluated over 3 decades[J]. Medicine (Baltimore), 2007, 86(2):112-121.

[4] 石铸,梁秀龄. Wilson 病的动物模型[J]. 中国临床神经科学, 2003, 11(1):88-91.

[5] Li Y, Togashi Y, Sato S, Emoto T, Kang JH, Takeichi N, et al. Spontaneous hepatic copper accumulation in long-evans cinnamon rats with hereditary hepatitis. A model of Wilson's disease[J]. J Clin Invest, 1991, 87(5):1858-1861.

[6] Sugawara N, Li D, Sugawara C, Miyake H. Decrease in biliary excretion of copper in long-evans cinnamon (LEC) rats causing spontaneous hepatitis due to a gross accumulation of hepatic copper[J]. Res Commun Chemi Patholo Pharmacol, 1993, 81(1):45-52.

[7] Danks DM. Hereditary disorders of copper metabolism in Wilson disease and Menkes disease[M]. //Stanbury JR. The Metabolic Basis of Inherited Disease. New York: McGraw-Hill, 1983, 1251-1261.

[8] 周艳,黄杰,吴中匡. 以溶血性贫血为首发症状的肝豆状核变性[J]. 中国当代儿科杂志,2002, 4(3):243-244.

[9] 袁向东. 儿童肝豆状核变性肾脏损害 17 例临床分析[J]. 中国当代儿科杂志, 2000, 2(5):353-354.

[10] 王亚萍,戴宇文,汤文娟. 以肾脏损害为首表现的肝豆状核变性 15 例[J]. 中国当代儿科杂志, 2000, 2(4):277-278.

[11] Yuce A, Kocak N, Demir H, Gurakan F, Ozen H, Saltik IN, et al. Evaluation of diagnostic parameters of Wilson disease in childhood [J]. Indian J Gastroenterol, 2003, 22(1):4-6.

[12] Medici V, Rossaro L, Sturniolo GC. Wilson disease-A practical approach to diagnosis, treatment and follow-up [J]. Dig Liver Dis, 2007, 39(7):601-609.

[13] Aston NS, Watt N, Morton IE, Tanner MS, Evans GS. Copper toxicity affects proliferation and viability of human hepatoma cells (HepG2 line) [J]. Hum Exp Toxicol, 2000, 19(6):367-376.

[14] 刘玲,杨于嘉,宋健辉,刘杰波. 高压氧治疗对新生大鼠缺氧缺血性脑损伤模型神经细胞胞浆 Bcl-2 Bax 和细胞色素 C 表达的影响[J]. 中国当代儿科杂志, 2005, 7(4):333-336.

[15] Rawat S, Gray C, Johnson TS, Raftery AT, El Nahas AM, Haylor J. Apoptosis and expression of BCL-2 and BAX in cyclosporine-induced experimental renal fibrosis [J]. Transplant Proc, 2003, 35 (1):187-188.

[16] Yamamoto K, Tomita N, Yoshimura S, Nakagami H, Taniyama Y, Yamasaki K, et al. Hypoxia-induced renal epithelial cell death through caspase-dependent pathway: role of Bcl-2, Bcl-xL and Bax in tubular injury [J]. Int J Mol Med, 2004, 14(4):633-640.

[17] Korsmeyer SJ. BCL-2 gene family and the regulation of programmed cell death [J]. Cancer Res, 1999, 59(7 Suppl):1693s-1700s.

[18] Sprick MR, Walczak H. The interplay between the Bcl-2 family and death receptor-mediated apoptosis [J]. Biochem Biophys Acta, 2004, 1644(2-3):125-132.

(本文编辑:吉耕中)