

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00830

中国人 Wilson 病患者 ATP7B 基因外显子突变研究

朱霖^{1*}, 刘萍¹, 徐彬¹, 鲍远程², 傅咏南³, 余元勋¹, 李建平¹

- 1. 安徽医学高等专科学校, 合肥 230061
- 2. 安徽中医学院第一附属医院神经内科, 合肥 230031
- 3. 中国优生优育基因科学专家指导中心, 上海 200433

[摘要] **目的** 对 Wilson 病(WD)患者 ATP7B 基因外显子进行 PCR 扩增测序, 研究其突变的特点。**方法** 对 41 例患者(WD 组)、10 例健康者(对照组)以及 1 个 WD 家系(先证者女儿及其父母 3 人)提取基因组 DNA, PCR 扩增外显子相关片段, 并对扩增产物进行直接测序。**结果** 健康对照组未见异常, WD 组发现 11 例患者存在外显子 8 点突变, 其中 6 例患者呈 Arg778Leu 的复合杂合突变; 4 例患者存在外显子 12 点突变, 其中 2 例存在 Arg952Lys 突变。在 Wilson 病家系中, 先证者女儿携带 2 种杂合性突变, 分别是父源的外显子 8 中 Arg778Leu 杂合性突变和母源的外显子 13 中 Pro992Leu 杂合性突变, 其父母均为表型正常的杂合子携带者。**结论** 中国人 WD 患者中 ATP7B 基因外显子 8、12 为突变的热点区, 但也存在其他外显子的突变, 如外显子 13。

[关键词] Wilson 病; ATP7B 基因; 突变; 外显子

[中图分类号] R 575.24 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)08-0830-04

Mutations in exon of ATP7B gene in Chinese patients with Wilson's disease

ZHU Lin^{1*}, LIU Ping¹, XU Bin¹, BAO Yuan-cheng², FU Yong-nan³, YU Yuan-xun¹, LI Jian-ping¹

- 1. Anhui Medical College, Hefei 230061, Anhui, China
- 2. Department of Neurology, the First Affiliated Hospital of Anhui Traditional Chinese Medicine College, Hefei 230031, Anhui, China
- 3. Specialist Center for Genetic Research of Chinese Healthy Birth & Child Care, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To amplify the ATP7B gene of Wilson disease (WD) patients by PCR and to sequence the amplification product, so as to characterize the possible mutations. **Methods** The genomic DNA of 41 WD patients, 10 normal controls and a WD genealogy (proband's daughter and parents) were extracted. The fragments of exon 8 and 12 of ATP7B gene were amplified using PCR, and the PCR products were directly sequenced. **Results** No abnormality was found in the control group. Mutations of exon 8 were found in 11 WD patients, with 6 WD patients having Arg778Leu heterozygous mutations. Mutations of exon 12 were found in 4 WD patients, with 2 patients having Arg952Lys mutations. In the sibs of the WD patient, the proband's daughter carried 2 heterozygous mutations: Arg778Leu mutation of exon 8 was from her father and Pro992Leu mutation of exon 13 from her mother; the proband's parents were found as normal heterozygous carriers. **Conclusion** Exon 8 and 12 of ATP7B gene are prone to mutations in Chinese WD population, and the mutations of other exons, such as exon 13, also exist.

[Key words] Wilson's disease; ATP7B gene; mutation; exon

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(8): 830-833]

Wilson 病(WD)又称肝豆状核变性, 是常染色体隐性遗传的铜代谢障碍疾病。该病发生率为活产婴儿的 1/100 000~1/30 000, 患病率为 15/100 万~30/100 万^[1], 尤其好发于青少年。WD 基因被定位于 13q14.3^[2], 其表达产物为 P 型铜转运三磷酸腺苷

酶(ATP7B), 可参与铜的跨膜转运^[3]。WD 患者由于 ATP7B 基因突变, 铜转运蛋白异常, 导致铜在体内代谢障碍并沉积, 从而出现进行性加剧的肢体震颤、角膜色素环, 并可致肝硬变和神经系统退行性病变更^[4]。ATP7B 基因全长约 80 kb, 含 21 个外显子

[收稿日期] 2010-06-10 **[接受日期]** 2010-07-23

[基金项目] 安徽省教育厅自然科学基金项目(2006KJ152C). Supported by Natural Science Research Program of Anhui Provincial Education Department (2006KJ152C).

[作者简介] 朱霖, 副教授、副研究员。

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 0551-2868133, E-mail: ZL@ahyz.cn

和 20 个内含子,已报道 380 多种突变^[5]。研究表明:欧洲人以外显子 14 和 18 为基因突变热区^[6-8];而中国人的基因突变热点则在外显子 8、12^[9-11]。本研究通过对中国人 WD 患者 ATP7B 基因的所有外显子进行双向测序,以发现中国人 ATP7B 基因外显子的突变特点。

1 资料和方法

1.1 研究对象 41 例 WD 患者均为 2006 年 9 月至 2009 年 11 月安徽中医学院第一附属医院神经内科收治的患者和携带者,其中男 27 例,女 14 例,年龄 14~56 岁,平均(24±7.1)岁。1 个 WD 家系,其中先证者女儿 22 岁,为 WD 患者,其父亲 56 岁,母亲 55 岁,表型均正常,因女儿患病而到医院接受 WD 基因检测。WD 诊断标准:(1)锥体外系症状、肝损害及精神异常;(2)角膜 K-F 环阳性;(3)血清铜蓝蛋白降低。具备以上两项者可诊断为 WD;部分患者以上症状不典型,可根据其阳性家族史,并实验室检查铜代谢情况,如果 24 h 尿铜排泄增多、血铜减少且 D-青霉胺治疗有效即可诊断为 WD。另有 10 例健康者(来自无血缘关系的该院健康献血员)作为健康对照组,男 6 例,女 4 例,平均年龄(26.7±2.7)岁,不具备 WD 临床表现且血清铜蓝蛋白水平正常。

本研究获得医院伦理委员会审核并批准,所有研究对象均完整填写临床资料调查表及知情同意书。

1.2 基因组 DNA 的抽提 抽取 WD 病例组和健康对照组的外周静脉血各 3 ml 并抗凝,高浓度碘化钾(5 mol/L)裂解白细胞,每管加 10 μl 蛋白酶 K(100 μg/ml)置 55℃ 水浴锅过夜,再用酚-氯仿法提取基因组 DNA,保存在-20℃ 备用。同时取 5 μl 基因组 DNA 溶液经 1% 琼脂糖凝胶电泳进行质量检查并用紫外分光光度计测 D_{260}/D_{280} ,确定样本浓度及纯度合格。

1.3 引物的设计 外显子 8 引物序列:上游为 5'-aag cta gag gct ttg cca tcc-3',下游为 5'-cct gaa ggc cag gtt tct tta-3',PCR 扩增片段长度为 592 bp;外显子 12 引物序列:上游为 5'-caa tga cac cac ttt ggc tca-3',下游为 5'-cct gca gaa gga gag tga ctg-3',PCR 扩增片段长度为 587 bp;外显子 13 引物序列:上游为 5'-ggg atg tgg aga gca gta acg-3',下游为 5'-tga gtg gct ctc agg ctt ttc-3',PCR 扩增片段长度为 470 bp。其余外显子的引物序列略。

1.4 PCR 反应体系及条件 本实验对 ATP7B 基因的所有外显子进行 PCR 扩增,反应体系为 20 μl,含基因组 DNA 1 μl(20 ng),HotStar Taq DNA 聚合酶(Qiagen 公司)1 U,dNTP 0.2 mmol/L,上游、

下游引物(0.2 pmol/μl)各 0.5 μl,MgCl₂ 2.0 mmol/L,10× PCR Buffer 2 μl,余下体积由灭菌双蒸水补足。反应体系上覆盖灭菌石蜡油 30 μl,上 Pharmacia PCR 扩增仪扩增。

Touchdown PCR 扩增条件:95℃ 热变性 15 min,94℃ 变性 15 s,复性温度从 62℃ 开始,每进行一个热循环复性温度降低 0.5℃,一直降至 57℃,热循环中复性的时间为 40 s,延伸为恒定 72℃ 下 1 min,这个过程一共 11 个热循环。经过这个条件后,反应进入第二轮,即恒定扩增期。将复性温度设定为 57℃,其他条件不变,进行 24 个热循环。最后 72℃ 延伸 15 min。

1.5 琼脂糖凝胶电泳 取 PCR 产物 3 μl,加上样液 1 μl,混匀后加入加样孔中,在 1% 琼脂糖凝胶中,100 V 下电泳 30 min,电极缓冲液为 1× TBE(含溴化乙锭 0.5 μg/ml),紫外灯下观察 PCR 扩增片段并记录结果。

1.6 PCR 产物测序 PCR 产物经 Qiaquick Spin 柱(Qiagen 公司)纯化后,由中国优生优育基因科学专家指导中心细胞分子遗传学检测中心完成 DNA 荧光全自动双向测序(包括正向测序及反向测序),分析各外显子的突变,对有疑问者,均经 PCR 克隆测序后再确认。分析测序图时,只分析核苷酸荧光扫描峰高且噪声几乎贴近底线的部分,以免噪声干扰,且测序引物距离要分析的外显子 50 bp 以上。

1.7 突变分析 扩增 41 例患者及 10 例正常人 ATP7B 基因的所有外显子,并将 DNA 的测序结果与 GenBank 中获得的正常人相应外显子序列进行比对,分析突变情况。

2 结果

2.1 PCR 产物电泳结果 ATP7B 基因第 8、12、13 外显子 PCR 扩增产物的电泳条带清晰,无引物二聚体,见图 1。

2.2 外显子 8 和 12 的突变情况

2.2.1 外显子 8 的突变 11 例 WD 患者 ATP7B 基因的外显子 8 发生 Arg778Leu(CGG778CTG)突变(图 2A);其中 6 例既有上述 778 密码子错义突变,同时还发生 Leu770Leu(CTT770CTG)同义纯合突变(图 2B)。

2.2.2 外显子 12 的突变 4 例 WD 患者 ATP7B 基因的外显子 12 检出 4 种突变,其中 2 例发生 Arg952Lys(AGA952AAA)突变(图 2C);1 例在发生 Arg952Lys 突变的同时还伴有 Arg919Gly(CGG919GGG)突变;1 例为 Thr935Met(ACG935ATG)突变;1 例是 Ile940Ile(ATT940ATA)突变。

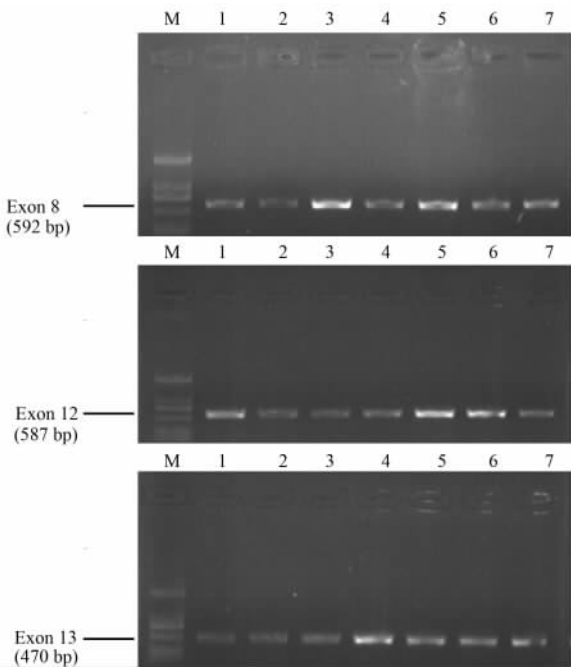


图1 ATP7B基因外显子8、12和13的PCR产物
 Fig 1 PCR products of ATP7B gene exon 8, 12 and 13
 M: D2000 markers; 1: Control; 2-7: Patients

2.3 家系成员外显子8和13的突变情况 女儿(先证者)携带两种突变,分别是:外显子8的Arg778Leu(CGA778CTA)杂合性突变及外显子13中Pro992Leu(CCG992CTG)杂合性突变(图2D)。其父为未发病的突变杂合子携带者,外显子8有Arg778Leu杂合性突变;其母也为未发病的突变杂合子携带者,外显子13有Pro992Leu杂合性突变。

3 讨论

WD是神经系统常见的铜代谢异常疾病,若在症状前期开始驱铜治疗,绝大多数预后良好,因此应通过早期诊断而及早治疗;若治疗较晚,肝、肾及脑等重要器官会发生不可逆损害,预后不佳。然而仅依据临床表现和铜检验进行诊断,往往错过对症状前患者的早期诊断和治疗。如果通过基因检测,发现ATP7B基因突变,可以及时治疗,减少铜摄入和促进铜排出,使机体器官免受损害。目前该病基因诊断已用于产前诊断和新生儿筛查^[12]。

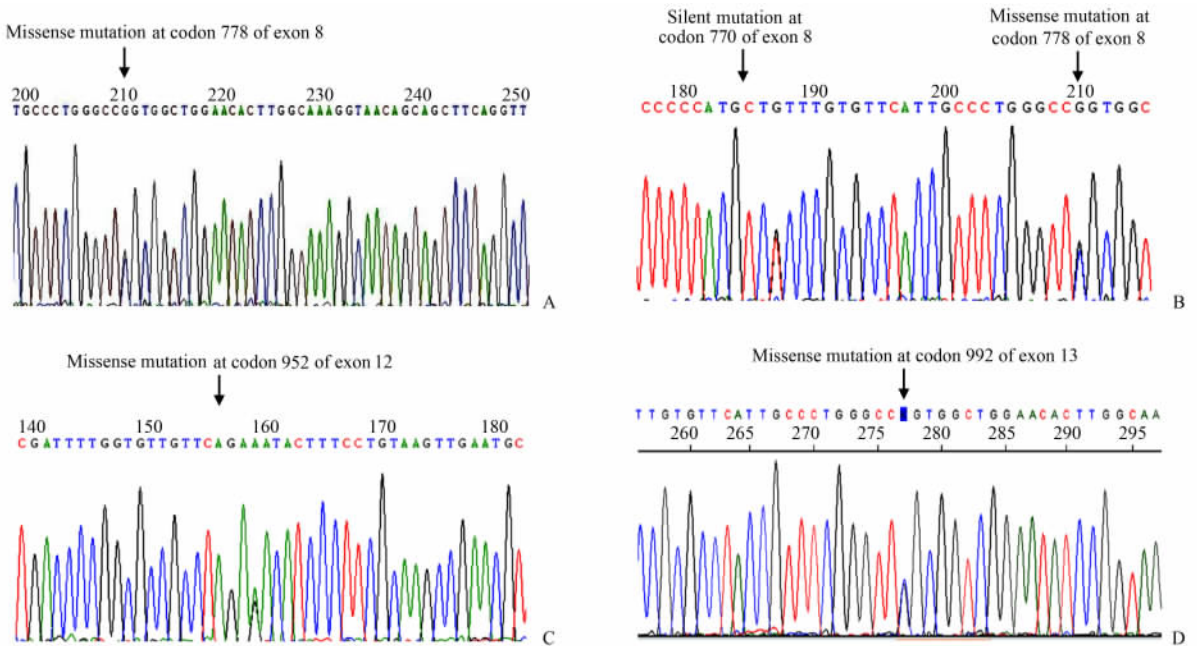


图2 ATP7B基因突变患者的DNA测序图

Fig 2 DNA sequence chart of mutant ATP7B gene in Wilson disease patients

A: Exon 8 DNA sequence chart of the patient was found with Arg778Leu; B: Exon 8 DNA sequence chart of the patient was found with both Leu770Leu and Arg778Leu; C: Exon 12 DNA sequence chart of the patient was found with Arg952Lys; D: Exon 13 DNA sequence chart of the patient was found with Pro992Leu

自ATP7B基因被克隆以来,世界各国对ATP7B基因突变的研究较多,1995年加拿大学者Thomas等^[6]证实外显子14的His1069Gln型突变率为28%,外显子18的Gly1266Lys型突变率为

10%,表明外显子14和18是北欧裔WD患者ATP7B基因的突变热点;Karabanov等^[7]研究了俄罗斯42例WD患者的ATP7B基因的14、15、16、18外显子,发现外显子14的His1069Gln型突变率达

60%(包括纯合子与杂合子)。在匈牙利、德国等欧美白种人群中,ATP7B 基因外显子 14 的 H1069Q 的突变率为 28.8%~68.3%^[8]。而在对亚洲人群的研究中,一项对 27 例印度人群中 WD 患者的外显子突变研究中,发现了外显子 18 和 13 的突变^[13];对韩国的 37 例 WD 患者的研究中发现 Arg778Leu 突变频率为 37.9%^[14]。

台湾学者在对 22 名无血缘关系的汉族 WD 患者的 ATP7B 基因研究中发现,外显子 8 的 Arg778Leu 和 Arg778Gln 的突变率分别为 11.4% 和 9.1%^[9];吴志英等^[10]对 84 例 WD 患者的 ATP7B 外显子进行基因检测,发现 Arg778Leu 和 Thr935Met 为 ATP7B 基因突变热点,突变频率分别高达 37.7% 和 10.0%,认为 Thr935Met 是中国人 WD 患者基因突变的一个热点。此后陆续报道的突变分布在外显子 5、7、8、12、14、18,其中外显子 8 的 Arg778Leu 突变频率为 11.4%~37.5%,为中国人 WD 患者 ATP7B 基因的突变高频“热点”,外显子 12 的 Thr935Met 型突变率为 6.3%~10.0%,为中国人 WD 患者 ATP7B 基因的突变次“热点”^[11]。

为探讨中国人 WD 患者 ATP7B 基因外显子的突变特点,本研究对 41 例 WD 患者、1 个家系(1 名患者、2 名携带者)及 10 名健康对照的 ATP7B 基因的全部外显子进行了测序,并将结果与 GenBank 的正常人相应外显子序列进行比对。结果发现 WD 患者 ATP7B 基因外显子 8、12 分别为第一、第二突变热点,而外显子 14、18 则少见突变,提示中国人 ATP7B 基因突变的形式与西方人群可能存在着明显差异。

我们在研究中发现了 1 个 WD 的家系,1 例患者(女儿)和 2 例携带者(父亲和母亲),其父为外显子 8 Arg778Leu 突变杂合子携带者,其母为外显子 13 Pro992Leu 突变杂合子携带者,先证者(女儿)携带这两种杂合性突变。本研究提示除外显子 8 和 12 这两个热点突变外,中国人 WD 患者 ATP7B 基因还可存在其他处突变,如外显子 13。建议通过对 WD 患者 ATP7B 基因全部外显子进行全面测序,从而发现突变热点外的其他散在突变,为临床早期诊断和产前诊断服务。

[参考文献]

[1] de Bie P, Muller P, Wijmenga C, Klomp L W J. Molecular pathogenesis of Wilson and Menkes disease: correlation of muta-

tions with molecular defects and disease phenotypes[J]. *J Med Genet*, 2007, 44: 673-688.

- [2] Gojová L, Jansová E, Kůlm M, Pouchlá S, Kozák L. Genotyping microarray as a novel approach for the detection of ATP7B gene mutations in patients with Wilson disease[J]. *Clin Genet*, 2008, 73: 441-452.
- [3] Davies L P, Macintyre G, Cox D W. New mutations in the Wilson disease gene, ATP7B: implications for molecular testing[J]. *Genet Test*, 2008, 12: 139-145.
- [4] Gupta A, Maulik M, Nasipuri P, Chattopadhyay I, Das S K, Gangopadhyay P K, et al. Molecular diagnosis of Wilson disease using prevalent mutations and informative single-nucleotide polymorphism markers[J]. *Clin Chem*, 2007, 53: 1601-1608.
- [5] Lepori M B, Lovicu M, Dessi V, Zappu A, Incollu S, Zancan L, et al. Twenty-four novel mutations in Wilson disease patients of predominantly Italian origin[J]. *Genet Test*, 2007, 11: 328-332.
- [6] Thomas G R, Forbes J R, Roberts E A, Walshe J M, Cox D W. The Wilson disease gene: spectrum of mutations and their consequences[J]. *Nat Genet*, 1995, 9: 210-217.
- [7] Karabanov A V, Ovchinnikov I V, Illarioshkin S N, Poleshchuk V V, Slominskii P A, Markova E D, et al. Analysis of mutations in ATP7B gene and experience with direct DNA-diagnosis in hepato-lenticular degeneration[J]. *Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova*, 2001, 101: 44-47.
- [8] Riordan S M, Williams R. The Wilson's disease gene and phenotypic diversity[J]. *J Hepatol*, 2001, 34: 165-171.
- [9] Chuang L M, Wu H P, Jang M H, Wang T R, Sue W C, Lin B J, et al. High frequency of two mutations in codon 778 in exon 8 of the ATP7B gene in Taiwanese families with Wilson disease[J]. *J Med Genet*, 1996, 33: 521-523.
- [10] 吴志英, 王柠, 林珉婷, 方玲, 慕容慎行. Wilson 病基因全长外显子的突变检测和分析[J]. *中华神经科杂志*, 2001, 34: 152-155.
- [11] 易露茜, 杨旭. 肝豆状核变性分子生物学研究进展[J]. *中国实用内科杂志*, 2006, 26: 620-621.
- [12] Kim G H, Yang J Y, Park J Y, Lee J J, Kim J H, Yoo H W. Estimation of Wilson's disease incidence and carrier frequency in the Korean population by screening ATP7B major mutations in newborn filter papers using the SYBR green intercalator method based on the amplification refractory mutation system[J]. *Genet Test*, 2008, 12: 395-399.
- [13] Santhosh S, Shaji R V, Eapen C E, Jayanthi V, Malathi S, Chandu M, et al. ATP7B mutations in families in a predominantly southern Indian cohort of Wilson's disease patients[J]. *Indian J Gastroenterol*, 2006, 25: 277-282.
- [14] Yoo H W. Identification of novel mutations and the three most common mutations in the human ATP7B gene of Korean patients with Wilson disease[J]. *Gene Med*, 2002, 4(6 Suppl): 43S-48S.

[本文编辑] 孙岩