

DOI:10.3724/SP.J.1008.2014.01209

肝豆状核变性中 *ATP7B* 基因复合突变的研究

徐彬^{1*}, 余元勋¹, 鲍远程², 王迎新¹, 李建平¹, 刘萍¹, 黄迅威¹, 朱霖¹

1. 安徽医学高等专科学校, 安徽省遗传医学中心分子室, 合肥 230061

2. 安徽中医学院第一附属医院神经内科, 合肥 230031

[摘要] **目的** 通过对肝豆状核变性(Wilson's disease, WD)患者 *ATP7B* 基因测序, 探讨其突变率及与 WD 的关系, 分析 WD 中 *ATP7B* 基因复合突变的意义。**方法** 提取 67 例临床确诊的 WD 患者口腔黏膜细胞的基因组 DNA, 应用 PCR 技术对 *ATP7B* 全部外显子 5' 端 → 3' 端扩增, 运用 DNA 直接测序法检测突变。**结果** 在 67 例患者中, 发现 WD 中 *ATP7B* 基因突变患者 52 例, 检出率为 77.61%, 其中 16 例纯合子突变(12 例 Arg778Leu 纯合子突变和 4 例 Arg919Gly 纯合子突变), 5 例复合突变, 31 例单纯杂合子突变。5 种 *ATP7B* 基因复合突变国内罕见报道。**结论** 本研究发现 5 种 *ATP7B* 基因的复合突变, 这些复合突变可能与 WD 的发生发展相关, 值得进一步深入研究。

[关键词] 肝豆状核变性; 外显子; 突变; 聚合酶链反应

[中图分类号] R 742.4

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2014)11-1209-06

Complex mutations of *ATP7B* gene in Wilson's disease

XU Bin^{1*}, YU Yuan-xun¹, BAO Yuan-cheng², WANG Ying-xin¹, LI Jian-ping¹, LIU Ping¹, HUANG Xun-wei¹, ZHU Lin¹

1. Department of Molecule, Medical Genetics Center of Anhui Province, Anhui Medical College, Hefei 230061, Anhui, China

2. Department of Neurology, the First Affiliated Hospital of Anhui Traditional Chinese Medicine, Hefei 230031, Anhui, China

[Abstract] **Objective** To sequence the *ATP7B* gene in patients with Wilson's disease (WD) and to analyze the relationship between the mutations and WD. **Methods** The genomic DNA was obtained from the oral mucosal cells of 67 clinically diagnosed WD patients; PCR was used to amplify all the exons 5' end → 3' end of *ATP7B* gene. And the PCR products were subjected to DNA direct sequencing for mutations. **Results** We found that the *ATP7B* gene mutation rate was 77.61% (52/67) in WD patients. Of these patients, 16 had homozygote mutations (including 12 patients with Arg778Leu and 4 with Arg919Gly), 5 had complex mutations, and 31 had simple heterozygote mutations. Five types of the *ATP7B* gene complex mutations were rarely reported in China. **Conclusion** We have identified 5 complex mutations of *ATP7B* gene, which might be related to the development and progression of WD and deserves further study.

[Key words] Wilson's disease; exons; mutation; polymerase chain reaction

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2014, 35(11):1209-1214]

肝豆状核变性(Wilson's disease, WD)是常染色体隐性遗传的铜代谢障碍疾病, 患病率为 1/50 000~1/30 000^[1-3], 好发于儿童、青少年。WD 患者由于 *ATP7B* 基因发生功能丧失性突变, 使铜沉积于肝、脑等处, 导致多脏器损害, 临床表现多样, 以肝、神经系统的损害为主, 有不同程度的锥体外系病变、精神障碍、角膜 K-F 环等。1993 年 Bull 等克

隆了 *ATP7B* 基因, 该基因定位于 13q14.3, 基因全长为 78 821 bp, mRNA 长 8.5 kb, 含 21 个外显子和 20 个内含子; 编码的 *ATP7B* 蛋白含 1 465 个氨基酸残基, 相对分子质量 159 000, 为 P 型铜离子转运 ATP 酶^[4-7]。 *ATP7B* 突变可导致细胞内铜离子转运、排出功能丧失, 迄今已发现 651 种突变, 突变形式有错义/无义突变(占 63%)、小片段缺失(占

[收稿日期] 2014-04-25 **[接受日期]** 2014-07-03

[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] 徐彬, 副研究员。

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 0551-62866890, E-mail: xb.1030@163.com

17%)、小片段插入(占 8%)、剪接突变(占 9%)、大片段缺失(占 2%)、同义突变(占 2%)^[3]等;以往国内鲜有报道复合突变(指有 2 个或 2 个以上突变点)。本研究对 WD 患者 *ATP7B* 基因全部外显子 5' 端 → 3' 端进行测序,发现了一些 *ATP7B* 基因错义、插入突变及复合突变,现报告如下。

1 资料和方法

1.1 研究对象 67 例中国汉族 WD 患者均为 2009 年 5 月至 2013 年 1 月在安徽中医药大学第一附属医院接受治疗的患者,诊断标准参照中华医学会 WD 诊断指南^[8]及美国 Roberts 和 Michael 编写的 AASLD 的 WD 诊断及治疗指南^[9];其中男 46 例,女 21 例,年龄 6~56 岁,平均(21.7±2.6)岁。其中 34 例为先证者患者,其余的 33 例患者来自于 12 个患者家庭。选取安徽中医药大学第一附属医院中国汉族健康献血员 20 例,设为正常对照组,其中男 14 例,女 6 例,年龄 21~32 岁,平均(27.7±2.8)岁。本研究经医院伦理委员会批准,所采集样本对象均有临床数据调查表并签署知情同意书。

1.2 基因组 DNA 抽提 取 67 例 WD 患者和 20 例正常人口腔黏膜细胞,制备细胞悬液,4℃ 保存。在 1.5 mL 离心管中,加入 200 μL 口腔黏膜细胞悬液,再加裂解缓冲液 STE 410 μL,10% SDS 90 μL,蛋白酶 K 液(100 μg/mL)5 μL,65℃ 消化 15 h。加入 300 μL 饱和 NaCl 液轻摇 3 min。加氯仿 340 μL,混匀后高速离心,将上清液吸入另一离心管中,加异丙醇 650 μL 混匀后高速离心。弃上清液,加 500 μL 75% 乙醇,高速离心 2 次,弃上清得 DNA 沉淀,室温干燥 1.5 min,加 30 μL 蒸馏水溶解,4℃ 保存。取 3 μL 基因组 DNA 溶液经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检查质量,为一条带,达电泳纯;基因组 DNA 溶液经紫外分光光度计检测, D_{260}/D_{280} 为 1.8,纯度合格;基因组 DNA 溶液浓度为 1 μg/μL。

1.3 PCR 引物的设计 PCR 引物设计参考美国国立生物技术信息中心(NCBI)的 *ATP7B* 基因序列信息,用 Premier 5 软件设计 21 对外显子+5' 端和+3' 端的 PCR 扩增引物,由上海生工生物工程技术服务有限公司合成,引物信息见表 1。

1.4 PCR 反应体系和扩增条件 PCR 反应总体积 10 μL,含 *Taq* 酶 1 U,2 μmol/L 上、下游引物各

表 1 *ATP7B* 基因外显子 PCR 扩增引物及序列

Tab 1 Primers for PCR amplification of *ATP7B* gene exons

Primer	Sequence (5'-3')
ATP7B-EXON1-F	CCCACTCTCCCTCACGC
ATP7B-EXON1-R	GGTGC GGGGTTTCCATT
ATP7B-EXON2-F	GCTTGCTTTCTGTGTATGTTATGTTT
ATP7B-EXON2-R	AGGGCTCACCTATACCACCATC
ATP7B-EXON3-F	CATCTGTGCAGGAAGTGGCTC
ATP7B-EXON3-R	CCTAACTGAGAAGTCTATCCACAAAAG
ATP7B-EXON4-F	ACCTACCCTGGGATACTCTGATTT
ATP7B-EXON4-R	CAGGGCAGTCCACCGTCTT
ATP7B-EXON5-F	GCTGCCTGTTACCTAGACTCCC
ATP7B-EXON5-R	AATGTCTTTTCTCATCTTTCTCTTAC
ATP7B-EXON6-F	ACAGGGTTTGTAGGGCTATTGG
ATP7B-EXON6-R	CACTGTTTCAGAGGGTTCACATTAC
ATP7B-EXON7-F	ATTTTAACCCCTGGTGGTCTGT
ATP7B-EXON7-R	GCCCTTAGTAGTCCCCACA
ATP7B-EXON8-F	TTCATAAACGCCATCACAGAG
ATP7B-EXON8-R	GGTGTTCAGAGGAAGTGAGATTG
ATP7B-EXON9-F	CACGCTTGTGACTCTCAGGCT
ATP7B-EXON9-R	TTCTGCCCACTCACAAGGT
ATP7B-EXON10-F	CAGCTGGCCTAGAACCTGACC
ATP7B-EXON10-R	AGATTGGGATAATCTCCTTCATTT
ATP7B-EXON(11-12)-F	CCAGGTGAGATGGCTTGTTTC
ATP7B-EXON(11-12)-R	GCCCAGTGAATCTAAGATATGAAAG
ATP7B-EXON13-F	CTCTGCTCCTGTAATGCCTCTTT
ATP7B-EXON13-R	GGTGGCTACTCTGTTGCTACTGTT
ATP7B-EXON14-F	GGGAGTTGTTGAACCCTGAGAT
ATP7B-EXON14-R	GCAAATGCCTGTGACACTGAAC
ATP7B-EXON15-F	CTTTCTCTCAGTTCCCGCTTTC
ATP7B-EXON15-R	GCAATCACTGCTGGGCGT
ATP7B-EXON16-F	GTCACAAGAGGTGCTTACAAGGTTA
ATP7B-EXON16-R	TGACTCTGAACTGCCACCTG
ATP7B-EXON17-F	CGAAAATGAAATCACTCGTAATCC
ATP7B-EXON17-R	TCACGTGCAACTACATGGC
ATP7B-EXON(18-19)-F	CGTAACTTGAGTTTCTGCTGCT
ATP7B-EXON(18-19)-R	CAGCCAAGCATCTCCACTAGC
ATP7B-EXON20-F	GGGGCTTCTGAGCACGC
ATP7B-EXON20-R	CAGCCCTTGAGGAGCAGAGTA
ATP7B-EXON21-F	CAAAAGTTAGTGGCAGCCTACAAT
ATP7B-EXON21-R	AGCCTCACAGAAGCCCTCG

1 μL,基因组 DNA 液 1 μL,10 × buffer 1 μL,50 mmol/L MgCl₂ 0.3 μL,10 mmol/L dNTPs 0.2 μL,水补齐至 10 μL。外显子短片段扩增条件:95℃ 预

变性 5 min, PCR 扩增 40 个循环 (95°C 15 s, 60°C 20 s, 72°C 30 s), 72°C 下延伸 15 min, 4°C 保存。外显子 (2、11、12、18、19、21) 长片段扩增条件: 95°C 预变性 5 min, PCR 扩增 40 个循环 (95°C 15 s, 60°C 20 s, 72°C 2 min), 72°C 下延伸 15 min, 4°C 保存。

1.5 PCR 产物测序 PCR 反应产物经 Qiaquick Spin 柱纯化后, 由广州华大生物科技有限公司检验中心使用 ABI3730 型测序仪进行荧光全自动 DNA 正向测序及反向测序, 用 SeqMan、BioEdit 分析软件分析 *ATP7B* 基因全部外显子 5' 端 → 3' 端的突变, 对初步发现的突变中有疑问者, 均经 PCR 克隆测序后再确认; 分析测序图时, 注意使用核苷酸荧光扫描峰较高且噪声线几乎贴近底线的图分析, 以免噪声干扰; 且测序引物一般距离要分析的外显子若干 bp。

1.6 突变分析 扩增 67 例 WD 患者和 20 例正常人 *ATP7B* 基因的所有外显子 5' 端 → 3' 端, 并将其 DNA 的测序结果与由 GenBank 中获得的正常人

ATP7B 基因相应序列进行比对, 分析突变情况。

2 结 果

本次研究通过对 67 例 WD 患者的 *ATP7B* 基因的全部外显子 5' 端 → 3' 端进行直接扩增测序, 发现 16 例纯合子突变 (12 例 Arg778Leu 纯合子突变和 4 例 Arg919Gly 纯合子突变), 5 例复合突变, 31 例单纯杂合子突变, 15 例未检出突变, 突变总检出率为 77.61% (52/67)。5 种国内罕见的 *ATP7B* 基因复合突变的具体信息见表 2, 相应的测序图见图 1。通过 PubMed 数据库中文献检索, 以及在肝豆状核变性突变网站 (<http://www.wilsonsdisease.med.ualberta.ca/database.asp>) 和人类突变数据库 (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/validate.phP>) 进行查询, 发现这 5 种 *ATP7B* 基因复合突变在中国汉族人群中罕见报道。正常对照组中未发现 *ATP7B* 基因突变。

表 2 肝豆状核变性患者 *ATP7B* 基因的新复合突变

Tab 2 New complex mutations of *ATP7B* gene in Wilson' disease patients

Patient	Nucleotide mutation	Exon	AA change	Sequence	Rate
7	1216T→G	2	[Ser]→[Ala]	ATCCC[G/T]CTGTA	2/67
	2419T→C	16	[Val]→[Ala]	TGCAG[C/T]CCCC	1/67
	1172G→A	21	3'UTR mutation	CATCT[A/G]TTTAC	1/67
15	3132G→A	13	[Pro]→[Leu]	CCGTG[A/G]GCGTG	1/67
	4058insG	20	[Cys]→[Ser]	GGGCT[C/G]CAGCG	1/67
26	-127insGCCGC	1	5'UTR mutation	GCCGA [GCGGC/-] GCCGC	1/67
	-75C→A	1	5'UTR mutation	ACACC[A/C]CGCTC	2/67
	2785G→A	12	[Val]→[Ile]	TTATC[G/A]TCATC	1/67
43	2855G→A	12	[Arg]→[Lys]	TCAGA[A/G]ATACT	1/67
	3419T→C	16	[Val]→[Ala]	TGCAG[C/T]CCCC	1/67
51	-127insGCGGC	1	5'UTR mutation	GCCGA[-/GCGGC]GCCGC	1/67
	-75C→A	1	5'UTR mutation	ACACC[A/C]CGCTC	2/67
	1216T→G	2	[Ser]→[Ala]	ATCCC[G/T]CTGTA	2/67
	1366G→C	3	[Val]→[Leu]	CATCT[G/C]TGCAG	1/67
	1524G→C	3	[Arg]→[Ser]	GAAAG[C/G]AATCT	1/67
	2495A→G	10	[Lys]→[Arg]	CGTCA[A/G]GGTGG	1/67

3 讨 论

铜是维持人正常生理活动必需的微量元素, 参与机体氧化还原反应、细胞呼吸、活性氧防御、细胞

代谢、生存或凋亡等, 常参与形成铜蛋白、铜酶。肠道吸收的 Cu^{2+} 进入肝门静脉, 在血中 90% 与铜蓝蛋白结合, 其余的与白蛋白、组氨酸等结合成三元复合体。细胞摄取 Cu^{2+} 时主要通过铜蓝蛋白、白蛋白及

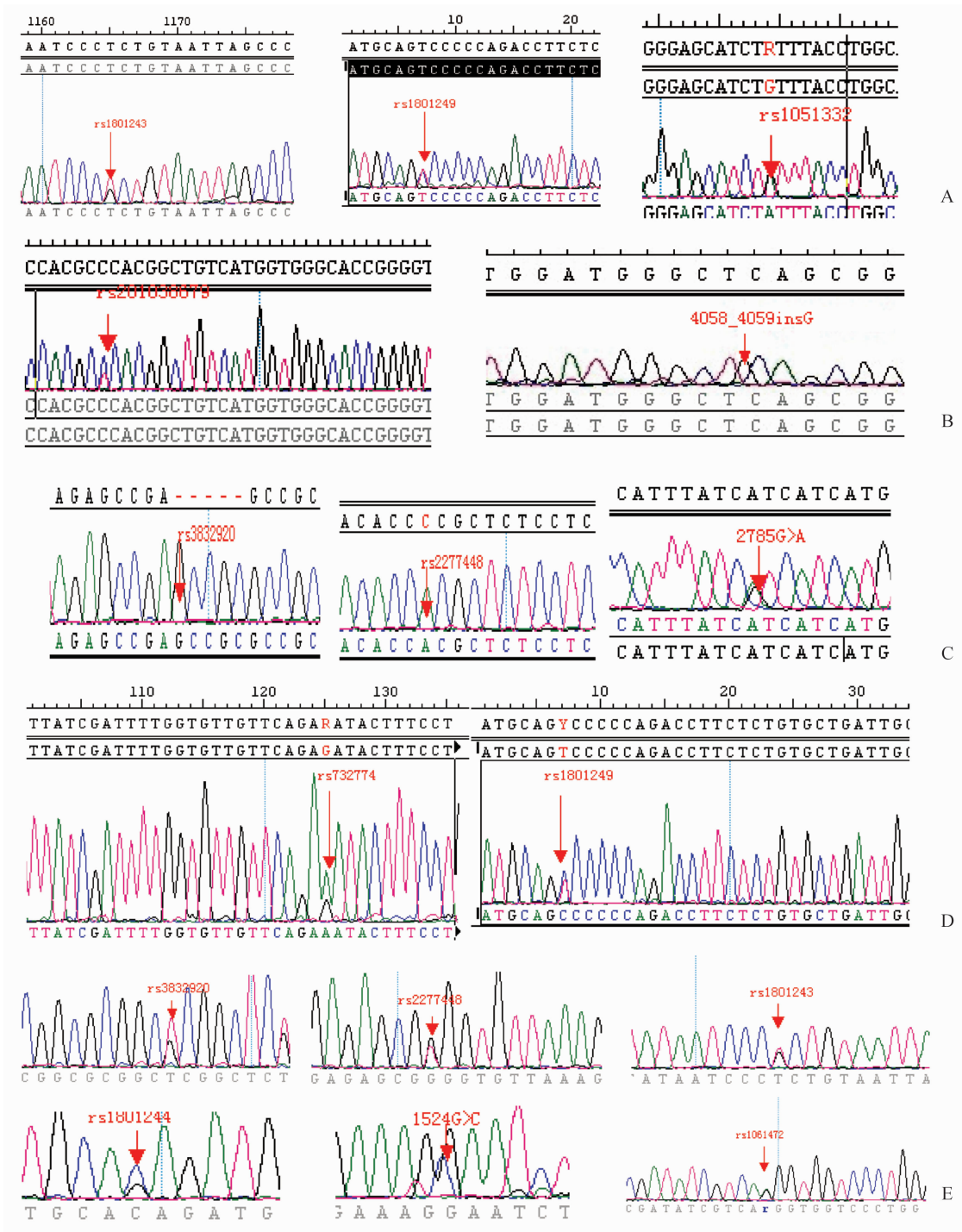


图1 5种 ATP7B 基因复合突变测序图

Fig 1 Sequences of 5 complex mutations of ATP7B gene

A: Patient 7, exon 2, 16, and 21 mutation; B: Patient 15, exon 13, 20 mutation; C: Patient 26, exon 1, 1, and 12 mutation; D: Patient 43, exon 12, 16 mutation; E: Patient 51, exon 1, 1, 2, 3, 3, and 10 mutation

组氨酸释放 Cu^{2+} ，经细胞表面的还原酶还原为 Cu^+ ，通过转运载体摄入细胞，再由还原型谷胱甘肽运输到不同细胞器，细胞内的 Cu^+ 能通过铜转运蛋白转运给铜蛋白，合成超氧化物歧化酶(SOD)、金属硫蛋白(MT)等；多余的 Cu^+ 主要由 ATP7B 排出

细胞。

一般肝细胞内的 ATP7B 主要定位于核周高尔基体外侧网络，当细胞质 Cu^+ 水平升高后，ATP7B 移至细胞质， Cu^+ 能结合、活化 ATP7B，促进后者 ATP 结合区结合 ATP、释放能量，使天冬氨酸激酶

磷酸化区(P区)磷酸化^[10-11],再将 Cu^+ 转运至细胞膜,或者形成铜蓝蛋白排入血,或者把 Cu^+ 排入毛细胆管经肠道排出,从而避免过多 Cu^+ 积聚于细胞内。细胞质 Cu^+ 水平过高时,肝细胞也能经溶酶体小泡排出 Cu^+ ^[10]。

ATP7B 分子有 7 个功能区,有的可发生突变:(1) N 端区,有 6 个 Cu^+ 结合区(与 1~6 外显子相关),第 1~4 Cu^+ 结合区突变时,如已报道的 G85A、G591D 等突变,患者可出现症状;(2) TGES 磷酸酶区(与 11 外显子相关),能使磷酸化的 *ATP7B* 第 1 027 位天冬酰胺去磷酸化,其突变后能使 *ATP7B* 过度磷酸化,丧失催化活性,停留在细胞膜,不能转运 Cu^+ ,如 G591D;(3) CPC 阳离子跨膜转运区(与 7~10/12~13 外显子相关)突变,会导致 *ATP7B* 一直停留在核周高尔基体、内质网,不能排出 Cu^+ ,如 Arg778Leu、Gly937Ser 等突变;(4) DKTGT 天冬氨酸激酶磷酸化区(P区,与 14~16 外显子相关),*ATP7B* 活化时,DKTGT 基序中的 D1027(天冬酰胺)磷酸化,使 *ATP7B* 能转移位置,如果该天冬酰胺突变,则阻断 *ATP7B* 形成 *ATP7B*-酰基磷酸盐,使 ATP 不能供应能量,*ATP7B* 不能转移位置,也不能转运 Cu^+ ;(5) GDGV *ATP* 结合区(N区,与 17~18 外显子相关),该区 H1069 等突变,*ATP7B* 不能结合 ATP,因而不能被 γ -磷酸化,不能形成 *ATP7B*-酰基磷酸盐,不能转运 Cu^+ ,该区目前已发现至少 40 多种突变;(6) C 端磷酸化作用区(DVP,与 19~20 外显子相关);(7) C 末端区(ACTGT 区,与 21 外显子相关),参与调节 *ATP7B* 功能^[10-11]。

本研究发现 WD 患者 *ATP7B* 基因复合突变的形式有一定异质性,7 号患者有 exon 2、16、21 复合突变,第 2 外显子突变出现在第 2 Cu^+ 结合区,使 *ATP7B* 不能结合 Cu^+ 、排出 Cu^+ 减少;第 16 外显子突变出现在天冬氨酸激酶磷酸化区,使该区不能磷酸化,不能到细胞质结合 Cu^+ ,不能排 Cu^+ ;第 21 外显子突变在 C 末端区,使 *ATP7B* 功能不正常,不能排 Cu^+ ,导致 Cu^+ 转运停滞,引起疾病发生。15 号患者有 exon 13、20 复合突变,第 13 外显子突变出现在 CPC 阳离子膜转运区,使 *ATP7B* 一直停留在核周高尔基体外侧网络、内质网,不能到细胞膜排出 Cu^+ ,第 20 外显子突变出现在磷酸化作用区,使 *ATP7B* 不能完全磷酸化,不能到细胞质结合 Cu^+ ,

不能排出 Cu^+ 。26 号患者有 exon 1、12 复合突变,第 1 外显子突变出现在第 1 Cu^+ 结合区,使 *ATP7B* 不能结合 Cu^+ 、不能活化,*ATP7B* 由高尔基体转移到细胞质的速度减慢,排出 Cu^+ 减少;第 12 外显子突变出现在 CPC 阳离子膜转运区,使 *ATP7B* 一直停留在核周高尔基体外周网络、内质网,不能到细胞膜排出 Cu^+ 。43 号患者有 exon 12、16 复合突变,第 12 外显子突变,不能排出 Cu^+ ;第 16 外显子突变出现在 DKTGT 天冬氨酸激酶磷酸化区,阻断 *ATP7B* 形成 *ATP7B*-酰基磷酸盐,ATP 不能供应能量,*ATP7B* 不能移位转运 Cu^+ 。51 号患者有 exon 2、3、10 复合突变,第 1、2、3 外显子突变出现在第 1、2、3 Cu^+ 结合区 1~3,使 *ATP7B* 不能结合 Cu^+ 、不能活化,排出 Cu^+ 减少;第 10 外显子突变出现在 CPC 铜离子跨膜转运区,使 *ATP7B* 一直停留在核周高尔基体外周网络、内质网,不能到细胞膜排出 Cu^+ ^[12-13]。

本研究检测的 67 例 WD 患者中,*ATP7B* 基因突变率为 77.61%,还发现了 5 种国内罕见的复合突变,显示 *ATP7B* 基因突变有较大的异质性。对 WD 患者 *ATP7B* 基因的复合突变,目前还有待进一步深入研究。Maier-Dobersberger 等^[14] 对 *ATP7B* 基因突变位点研究后认为,复合突变比单一突变者发病常更早。WD 为一种常染色体隐性遗传性疾病,因此只有 2 个突变为直接导致疾病发生的,其余的一般均可视为单核苷酸多态性(SNPs)。SNPs 可能在 WD 发生发展中起着一定的作用。从 1995 年到目前对 WD 中 *ATP7B* 基因突变的研究中,欧美患者的单突变类型主要是 HIS1069Gln(28%)、Gly1266Lys(10%),其他突变各见于 3% 以下患者。许多国外资料显示,肝豆状核变性基因 14 号外显子第 1 069 位密码子突变是一个典型的热点突变,染色体突变频率高达 28%~68.3%^[15]。国内学者对中国 WD 患者基因突变研究后发现 8 号外显子 Arg778Leu 突变频率为 11.4%~60%^[16],此突变公认为中国 WD 患者 *ATP7B* 基因第一突变热点,陆续报道的突变分布在外显子 5、7、8、11、12、13、14、18,而对第二突变热点目前存在一定的争议性^[17]。2013 年复旦大学附属儿科医院报道,53 例 WD 患者 *ATP7B* 基因突变频率 91.5%,纯合子突变 8 例,复合杂合突变 36 例,杂合突变 9 例;复合杂

合突变即有 2 个或 2 个以上突变点,因此在 *ATP7B* 全基因检测时,要仔细找出全部突变点^[18]。复合突变一般分别来自父亲、母亲,2013 年 Coffey 等^[19]也有同样报道,发现复合突变,提示可引发 *ATP7B* 多处功能损伤并与患者症状较重可能相关,值得重视,我们也将进一步研究。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

[1] Nicastro E, Loudianos G, Zancan L, D' Antiga L, Maggiore G, Marcellini M, et al. Genotype-phenotype correlation in Italian children with Wilson's disease[J]. *J Hepatol*, 2009, 50: 555-561.

[2] Burkhead J L, Gray L W, Lutsenko S. Systems biology approach to Wilson's disease[J]. *Biometals*, 2011, 24: 455-466.

[3] Seo J K. Diagnosis of Wilson disease in young children: molecular genetic testing and a paradigm shift from the laboratory diagnosis[J]. *Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr*, 2012, 15: 197-209.

[4] Gojová L, Jansová E, Kül 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.

[5] Forbes N, Goodwin S, Woodward K, Morgan D G, Brady L, Coulthart M B, et al. Evidence for synergistic effects of *PRNP* and *ATP7B* mutations in severe neuropsychiatric deterioration[J]. *BMC Med Genet*, 2014, 15: 22-34.

[6] Gaier E D, Eipper B A, Mains R E. Copper signaling in the mammalian nervous system: synaptic effects[J]. *J Neurosci Res*, 2013, 91: 2-19.

[7] Telianidis J, Hung Y H, Matera S, Fontaine S L. Role of the P-type ATPases, *ATP7A* and *ATP7B* in brain copper homeostasis[J]. *Front Aging Neurosci*, 2013, 5: 1-17.

[8] 中华医学会神经病学分会帕金森病及运动障碍学组, 中华医学会神经病学分会神经遗传病学组. 肝豆状核变性的诊断与治疗指南[J]. *中华神经科杂志*, 2008, 41: 566-569.

[9] Roberts E A, Schilsky M L. American Association for Study of Liver Diseases (AASLD). Diagnosis and treat-

ment of Wilson disease: an update [J]. *Hepatology*, 2008, 47: 2089-2111.

[10] 杨静芳, 陈彪. 中国人肝豆状核变性基因突变的分布特征[J]. *中国临床康复*, 2004, 8: 690-692.

[11] Fieten H, Leegwater P A, Watson A L, Rothuizen J. Canine models of copper toxicosis for understanding mammalian copper metabolism [J]. *Mamm Genome*, 2012, 23(1-2): 62-75.

[12] La Fontaine S, Ackland M L, Mercer J F. Mammalian copper-transporting P-type ATPases, *ATP7A* and *ATP7B*: emerging roles [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2010, 42: 206-209.

[13] Braiterman L T, Murthy A, Jayakanthan S, Nyasae L, Tzeng E, Gromadzka G, et al. Distinct phenotype of a Wilson disease mutation reveals a novel trafficking determinant in the copper transporter *ATP7B* [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111: E1364-E1373.

[14] Maier-Dobersberger T, Ferenci P, Polli C, Balać P, Dienes H P, Kaserer K, et al. Detection of the His1069Gln mutation in Wilson disease by rapid polymerase chain reaction [J]. *Ann Intern Med*, 1997, 127: 21-26.

[15] Lepori M B, Zappu A, Incollu S, Dessì V, Mameli E, Demelia L, et al. Mutation analysis of the *ATP7B* gene in a new group of Wilson's disease patients: contribution to diagnosis [J]. *Mol Cell Probes*, 2012, 26: 147-150.

[16] Ye S, Gong L, Shui Q X, Zhou L F. Wilson disease: identification of two novel mutations and clinical correlation in Eastern Chinese patients [J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 13: 5147-5150.

[17] Lin C W, Er T K, Tsai F J, Liu T C, Shin P Y, Chang J G. Development of a high-resolution melting method for the screening of Wilson disease-related *ATP7B* gene mutations [J]. *Clin Chim Acta*, 2010, 411(17-18): 1223-1231.

[18] 陆怡, 王建设, 俞蕙, 王小红. 儿童肝豆状核变性临床表型及 *ATP7B* 基因突变关联性分析 [J]. *中国循证儿科杂志*, 2013, 8: 346-351.

[19] Coffey A J, Durkie M, Hague S, Mclay K, Emmerson J, Lo C, et al. A genetic study of Wilson's disease in the United Kingdom [J]. *Brain*, 2013, 136 (Pt5): 1476-1487.