

中国人 Wilson 病 ATP7B 基因 Arg778Leu/Gln 点突变与中医证型的相关性研究

杨 斌[△] 胡纪源 洪铭范 杨任民

内容提要 目的: 探讨中国人 Wilson 病(WD)ATP7B 基因 Arg778Leu/Gln 点突变与中医证型的关系。方法: 应用 PCR 技术分别扩增 90 例 WD 患者和 30 名健康人 ATP7B 基因的第 8 外显子, 其 PCR 产物行限制性内切酶 MspI 酶切分析。90 例 WD 患者进行中医辨证分型。结果: 90 例 WD 患者有 34 例 Arg778Leu/Gln 点突变; WD 患者中医辨证分型属肝风内动者 Arg778Leu/Gln 点突变占 20 例。结论: Arg778Leu/Gln 点突变组患者的发病年龄迟于未见该点突变组的患者, Arg778Leu/Gln 点突变可能与中医肝风内动证型相关。

关键词 Wilson 病 突变 基因型 表型 中医证型

Study on Relationship between Arg778Leu/Gln Gene Mutation Spot in ATP7B and TCM Syndrome Type in Chinese Patients with Wilson Disease YANG Bin, HU Ji-yuan, HONG Ming-fan, et al *Institute of Neurology, Anhui College of TCM, Hefei (230031)*

Objective: To investigate the relationship between Arg 778Leu/Gln gene mutation spot in ATP7B and TCM Syndrome type in Chinese patients with Wilson disease (WD). **Methods:** Exon 8 of ATP7B of 90 WD patients and 30 healthy controls were amplified by PCR and analysed by restriction enzyme Msp I, the TCM Syndrome type of the patients was differentiated at the same time. **Results:** In the 90 WD patients, 34 with Arg778Leu/Gln of exon 8 were detected, among them 20 cases belonged to the TCM Syndrome type of endogenous Liver-Wind agitation. **Conclusion:** Onset age of WD patients with Arg 778Leu/Gln mutation is later than that without this mutation. Arg778Leu/Gln mutation might be related to the TCM Syndrome type of endogenous Liver-Wind agitation

Key words Wilson disease, mutation, gene type, phenotype, TCM Syndrome type

Wilson 病(WD)是一种常染色体隐性遗传性疾病,致病基因突变致铜代谢障碍而发病。因 ATP7B 基因突变点的不同,致 ATP7B 基因产物 ATP7B 酶的结构及功能发生不同的改变,导致 WD 患者的发病年龄、铜生化检查、首发症状及中医证型亦不同。本研究探求中国人 ATP7B 基因的高频突变位点 Arg778Leu/Gln 与中医证型之间的相关性。

资料和方法

1 研究对象 90 例 WD 患者全部来自安徽中医学院神经病学研究所附属医院 2000 年 9~12 月住院患者,其中男 53 例,女 37 例,首次发病的平均年龄(14.57±7.67)岁。全部病例均符合 WD 诊断标准⁽¹⁾。健康对照组均为无血缘关系的健康自愿者,共 30 名,其铜生化检查均在正常水平。

2 主要仪器及试剂 PCR 自动热循环仪(MJ research, 美国);贝克曼超速离心机(L7-35, 美国);恒压恒流电泳仪(DY-III型,北京六一仪器厂);水平电泳槽(DY-III型,北京六一仪器厂);Complete Gel Documentation & Analysis system (GDS8000, 英国);TaqDNA 聚合酶(Promega, 美国);限制性内切酶 Msp I (Promega, 美国);PCR 引物(上海植物生物研究所)。

3 人类基因组 DNA 的提取 参照 Miller 等⁽²⁾介绍的盐析法提取。

4 PCR 扩增第 8 外显子 根据 Thomas 等⁽³⁾报道的第 8 外显子 PCR 扩增的引物序列及反应条件进行。

5 Msp I 酶切分析第 8 外显子的 PCR 产物 根据 Msp I 产品说明,设计每份样品的酶切条件进行酶切后,酶切产物采用 2.0% 琼脂糖凝胶电泳。电泳结束后,紫外灯上观察,判断结果。

6 中医辨证 根据中医分型标准⁽⁴⁾,结合 WD 患者临床表现的特点,分为 3 型:(1)痰湿内阻:临床以胸

安徽中医学院神经病学研究所(合肥 230031)

[△]现在安徽省省立儿童医院神经内科(合肥 230051)

闷脘痞、头身困重、纳呆呕恶、肌肤面目发黄、舌淡胖苔腻、脉滑为辨证要点。同时，尚有湿、痰内阻不同部位而出现相应的临床症状，如头晕目眩，神志昏蒙，精神抑郁；或胡言乱语，喜怒无常，打人毁物；或全身抽搐，口吐痰涎，两目上视；或肌肤不仁，肢体麻木，动作不灵，关节疼痛；或面目肌肤发黄，黄色晦暗如烟熏，或黄色鲜明如桔，小便短涩，大便不爽，肢体浮肿，甚至腹胀大等。(2)肝风内动：临床以肢体震颤或蠕动，关节屈伸不利，言语謇涩，急躁易怒，舌淡红少津苔白，脉弦细为辨证要点。在 WD 患者中，其肝风内动有阴虚动风、血虚动风两证。阴虚动风除上述主证外，尚有面部烘热，五心烦热，午后潮热，盗汗，咽干口燥，形体消瘦等阴虚之证；血虚动风除上述主证外，尚有头晕耳鸣，两目干涩，面白无华，爪甲不荣，拘挛急迫，肢体麻木，肌肉颤动。女子血虚，可见月经量少色淡，甚则闭经。(3)气血两虚：临床以头晕目眩，少气懒言，乏力自汗，面色淡白或萎黄，心悸失眠，舌淡苔白，脉沉弱为辨证要点。WD 患者因久病不愈，失治延治，终至气血两虚。除上述主证外，尚可手足徐动，动作迟缓笨拙，步态不稳；或反应迟钝，目光呆滞，神志恍惚。后期甚则肉已脱，卧床不起，足痿无力，步履全废。男子尚有精少不育，阳痿；女子经少色淡，甚则闭经不孕。

7 统计学方法 全部数据经 SPSS 统计软件处理，计数资料比较 χ^2 检验。两样本均数比较用 t 检验。

结 果

1 第 8 外显子 PCR 产物 Msp I 酶切结果 第 8 外显子正常时仅有 1 个 Msp I 酶切位点，完全酶切可得到 237bp 和 59bp 两种片断。发生 Arg778Leu/Gln 纯合突变的患者，因两条染色体上 778 位密码子均由 CCG 突变为 CTG/CAG，使 DNA 顺序由 5'...CCGG...3' 变成 5'...CT(A)GG...3'，无法被 Msp I 识别，仍为单一的 296 片断。杂合突变将得到 296bp、237bp、59bp 三种片断。根据此特点，本组 90 例患者中，8 例患者判断为纯合突变，26 例患者为杂合突变，56 例患者未发生点突变。90 例 WD 患者该点突变检出率为 37.8%(34/90 例)，染色体突变检出率为 23.3%(42/180 例)。

2 WD 患者 Arg778Leu/Gln 点突变与临床表现的关系 见表 1、2。第 8 外显子 Arg778Leu/Gln 点突变组患者较无该点突变组的患者发病年龄迟 ($P < 0.01$)。患者的性别、首发症状、血清铜生化水平与该点突变无明显相关 ($P > 0.05$)。

3 Arg778Leu/Gln 点突变与中医证型的关系 见表 3。提示 Arg778Leu/Gln 点突变与肝风内动型可能相关 ($P < 0.05$)，与痰湿内阻型及气血两虚型无明显相关 ($P > 0.05$)。

表 1 WD 患者 Arg778Leu/Gln 点突变与性别及首发症状关系 (例)

组别	例数	性别		首发神经症状		首发肝症状	
		男	女	有	无	有	无
非突变	56	32	24	26	30	28	28
突变	34	21	13	22	12	13	21

表 2 WD 患者 Arg778Leu/Gln 点突变与发病年龄及铜生化水平关系 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	发病年龄 (岁)	血清铜 ($\mu\text{mol/L}$)	血清铜蓝蛋白 (mg/L)	血清铜氧化酶 (活力单位)
非突变	56	12.88±7.41	4.5607±2.9851	61.48±29.74	0.0811±0.1403
突变	34	17.35±7.38*	4.3606±3.1175	73.94±56.87	0.0830±0.1368

注：与非突变组比较，* $P < 0.01$

表 3 Arg778Leu/Gln 点突变与中医证型的关系 (例)

组别	例数	肝风内动		痰湿内阻		气血两虚	
		有	无	有	无	有	无
非突变	56	20	36	19	37	17	39
突变	34	20	14*	8	26	6	28

注：与非突变组比较，* $P < 0.05$

讨 论

1 WD 患者 ATP7B 基因突变的高频位点与临床表型的关系 Wilson 病大多于 10~30 岁间起病(症状暴露)，文献报道，年龄最小 4 岁，最大 59 岁。为何起病年龄的不同，一直未得到阐明。近年基因组学的研究，提示与 WD 基因相关。1993 年，国外 3 个实验室几乎同时克隆了 WD 基因，即 ATP7B 基因^(5,6)。自 1996 年起，多位学者均证实了 Arg778Leu/Gln 点突变是中国人 WD 患者 ATP7B 基因突变的第一热区^(7,8)。

本研究发现第 8 外显子 Arg778Leu/Gln 点突变组的发病年龄迟于未见该点突变组，其原因可能是第 8 外显子所编码的氨基酸位于 ATP7B 酶的第 4 跨膜区，精氨酸(Arg)为碱性氨基酸，而亮氨酸(Leu)和谷氨酰胺(Gln)分别属于中性氨基酸和酸性氨基酸。推测编码氨基酸的极性改变可能致 ATP7B 酶第 4 跨膜区蛋白构象的改变，而致转铜障碍，但仍残存有转铜功能。另外 ATP7B 基因的插入、缺失、无义和移码突变，均推测损毁了 ATP7B 酶的功能，故发病年龄较早，且症状较重。而错义突变致 ATP7B 酶尚残存有转铜功能，故发病较迟，症状亦较轻⁽³⁾。Arg778Leu/Gln 属于错义突变，故突变组的发病年龄相对较迟。还需指出，WD 患者 ATP7B 基因突变多数属复合杂合突变，完整地阐明 WD 患者基因突变型与临床表型之间的

关系还有助于检测技术的提高。本研究 Arg778Leu/Gln 点突变组与无突变组在首发症状、铜生化水平等诸方面发现无明显相关,可能与上面因素相关。

2 WD 患者 ATP7B 基因突变的高频位点与中医证型的关系 WD 目前已明确属常染色体隐性遗传性铜代谢障碍性疾病,铜在体内各脏器沉积,尤以大脑豆状核、肝脏、肾脏及角膜的大量沉积,出现如震颤、扭转痉挛、精神障碍、肝脾肿大、腹水等多种多样的临床症状,中医学分别归属于“颤证”、“癫狂”、“积聚”、“黄疸”等范畴^(9,10)。WD 患者由于父母体质素虚,致胎儿先天禀赋不足,肾精亏虚。因肾为先天之本,先天肾精亏虚,致后天脾胃运化失常,泌别清浊功能受损,铜浊积聚体内,痰湿内阻,此为 WD 患者发病早期的中医证型。进而气血津液化生不足,阴血亏虚,出现筋脉失养,虚风内动之证候,为 WD 患者发病的中晚期证候。本研究发现,90 例 WD 患者的 Arg778Leu/Gln 点突变组多见于肝风内动型,与痰湿内阻、气血两虚型无明显相关。肝风内动是在先天肾精亏虚的基础上致脾胃运化失常,铜浊为患,痰湿内阻,气血津液化生不足发展而来,故发病年龄较迟。因 Arg778Leu/Gln 点突变组患者的发病年龄相对较迟,故与肝风内动证型可能相关。

参 考 文 献

1. 杨任民. 肝豆状核变性. 合肥: 安徽科学技术出版社, 1995 :

1—3.

2. Miller SA, Dykes DD, Poiesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl Acids Res* 1988; 16:1215.

3. Thomas GR, Forbes JR, Roberts EA, et al. The Wilson disease gene: spectrum of mutation and their consequences. *Nature Genet* 1995; 9 :210—217.

4. 邓铁涛. 中医诊断学. 上海: 上海科学技术出版社, 1984 : 99—120.

5. Bull PC, Thomas GR, Rommens JM, et al. The Wilson disease gene is a putative copper transporting P-type ATPase similar to the Menkes gene. *Nature Genet* 1993; 5 :327.

6. Tanzi RE, Petrukhin K, Chernov I, et al. The Wilson's disease gene is a copper transporting ATPase with homology to the Menkes gene. *Nature Genet* 1993; 5 :344—350.

7. 许月芳, 范玉新, 余 龙, 等. PCR 直接测序在 Wilson 病基因第 8 外显子检出一个突变热区. *中华医学遗传学杂志* 1998; 15(5) :284—287.

8. 吴志英, 王 柠, 慕容慎行, 等. 肝豆状核变性基因第 3 ~ 20 号外显子突变及多态的 DNA 测序研究. *中华神经科杂志* 1998; 31(6) :341—342.

9. 孙 怡, 杨任民主编. 实用中西医结合神经病学. 北京: 人民卫生出版社, 1999 :550—552.

10. 洪铭范, 胡纪源, 胡文彬, 等. 肝豆状核变性的中医辨证分型. *安徽中医学院学报* 1998; 17(1) :10—11.

(收稿: 2001—08—29 修回: 2002—01—08)

第六次全国中西医结合呼吸病
学术交流会议征文通知

第六次全国中西医结合呼吸病学术交流会议拟于 2002 年 10 月在青岛市召开, 现将征文的有关事项通知如下。

1 征文内容 支气管哮喘、慢性阻塞性肺疾病、肺间质纤维化和肺癌、睡眠呼吸暂停综合征、肺栓塞等呼吸系统疾病的中医、西医、中西医结合基础和临床研究进展、临床研究、实验研究、方法学、基础理论等诊治研究。

2 征文要求 (1) 5 000 字以内的全文 1 份, 1 000 字左右的摘要 2 份, 尽量使用打印稿, 有条件者附软盘 1 张(应用 Word 软件)。征文可以是研究性论文, 也可是综述或讲座形式。(2) 论文须未公开发表, 加盖单位公章, 注明作者单位、邮编、具体通信地址及联系电话。(3) 截稿日期: 2002 年 6 月 30 日(以邮戳为准)。(4) 请在信封上注明“呼吸会议征文”字样。来稿请寄: 北京海淀区西苑操场 1 号 中国中医研究院西苑医院呼吸科, 邮编: 100091。联系人: 张燕萍、张京安、苗青。电话: 010—62862284。

全国第六届中西医结合妇产科
学术会议征文通知

全国第六届中西医结合妇产科学术会议拟于 2002 年 10 月在成都市举行, 现将有关征文事项通知如下。

1 征文内容 (1) 中西医结合生育调节研究。(2) 妇产科疾病中西医结合临床和基础研究。

2 征文要求 (1) 来稿必须实事求是, 有科学性及实用性, 从未在任何学术期刊上发表。请附单位介绍信或单位盖章。(2) 来稿一律用 Word 软件排印, 并附软盘。来稿要求全文(4 000 字以内)及摘要(800 字)各 1 份。摘要应以目的、方法、结果、结论顺序表达, 无摘要者恕不采用。(3) 来稿务必写清作者、单位、邮编, 请自留底稿, 来稿一律不退。(4) 截稿日期: 2002 年 7 月 30 日(以邮戳为准)。

3 征文寄送地点 上海市中西医结合学会(北京西路 1623 号, 邮政编码: 200040)张雯菊收。信封上请注明“全国第六届中西医结合妇产科学术会议征文”字样。亦可用 E-mail 发送至如下地址: djli@shmu.edu.cn。