

中国人 Wilson 病 ATP7B 基因 Thr935Met 突变与临床表型的关系研究

R5 A

杨 斌, 胡纪原, 程 楠, 杨广娥, 杨任民 (安徽中医学院神经病学研究所, 230031)

摘要: 目的 探讨 Wilson 病(Wilson disease, WD)ATP7B 基因突变的高频位点之一 Thr 935Met 与临床表现的关系。方法 应用 PCR 技术扩增 90 例 WD 患者和 30 例正常人 ATP7B 基因第 12 外显子, 其 PCR 产物行限制性内切酶 Tai I 酶切分析。结果 正常人组酶切未见异常。90 例 WD 组第 12 外显子有 10 例 Thr 935Met 杂合突变, 未见纯合突变, 检出率为 11.1%。突变组的平均发病年龄为 19.10 岁 $\pm$ 8.52 岁, 无突变组的平均发病年龄为 14.00 岁 $\pm$ 7.42 岁, 差异有显著意义 ($P = 0.047$)。结论 Thr 935Met 突变组患者的发病年龄迟于未见该点突变组的患者, 而性别、首发症状及铜生化水平与该点突变无明显相关性。

关键词: Wilson 病; 突变; 基因; 表型

Relation of ATP 7B gene Thr 935 Met mutation and clinical phenotype in Chinese with Wilson disease. Yang Bin, et al. (Institute of Neurology, Anhui Traditional Medicine College, 230031)

Abstract: Objective: To investigate the correlation between high frequency spot Thr 935Met of gene mutation, clinical manifestation in Chinese with Wilson disease. Methods: Exon 12 of ATP 7B of 90 WD patients and 30 controls were amplified by PCR and analysis was performed by restriction enzyme Tai I. Results: In WD group, 10 cases of heterozygous mutation of Thr 935Met of exon 12 were detected, no homozygous mutation detected, the frequency of mutation 11.1%. No abnormality was founded in normal control group. conclusion: Onset age of WD patients with Thr 935Met mutation group (19.10 $\pm$ 8.52 years old) are later than that without this mutation group (14.00 $\pm$ 7.42 years old) ($P = 0.047$), but this mutation show no significant relativity to patients' sex, first symptoms and metabolism of copper.

Key words: Wilson disease; Mutation; Gene; Phenotype

Wilson 病是一种常染色体隐性遗传性疾病, ATP7B 基因突变致铜代谢障碍而发病。本病出现复杂多样的临床症状。一部分患者以震颤、肌张力障碍、舞蹈样不自主运动等锥体外系为主要症状; 一部分患者以暴发性肝炎、急性肝炎、肝硬化等肝症状为主要表现; 少部分患者则表现为两种症状同时存在^[1]。1993 年, WD 基因 ATP7B 被国外实验室成功地克隆^[2-4]。Thr 935Met 错义突变目前已被证实了是中国人 WD 患者基因突变的高频突变位点之一^[6]。本实验即寻求 Thr 935Met 突变点与临床表现的相关性。

资料与方法

一、一般资料

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 月 ~ 2000 年 12 月住院患者, 其中男 53 例, 女 37 例, 平均发病年龄为 14.57 岁 $\pm$ 7.67 岁。全部病例均符合 WD 诊断标准^[1]。

2. 正常对照组 30 例正常对照组均无血缘关系的健康自愿者, 其中男 17 例, 女 13 例, 平均年龄 20.5 岁 $\pm$ 4.8 岁。血清铜生化检查均为正常水平。

二、PCR 扩增第 12 外显子根据 Thomas 等^[7]介绍的引物序列及扩增条件将 ATP7B 基因第 12 外显子进行 PCR 扩增。

三、Tai I 酶切分析第 12 号外显子 PCR 产物 根据 Tai I

产品说明将第 12 号外显子的 PCR 产物进行酶切, 酶切产物采用 2.0% 琼脂糖凝胶电泳后, 紫外灯上观察并判断结果。

四、统计学处理: 计数资料比较采用 χ^2 检验, 两样本均数比较采用 t 检验。以 $P < 0.05$ 为显著性差异。

结果

一、第 12 外显子 PCR 产物 Tai I 酶切结果 90 例 WD 患者中 Thr 935Met 杂合突变 10 例, 未见纯合突变。该点突变检出率为 11.1% (10/90), 染色体突变检出率为 5.6% (10/180)。正常对照组未见该点突变。

二、第 12 外显子 Thr 935Met 突变与临床表型的关系 (表 1, 2)。

从表 1, 2 可以看出, Thr 935Met 点突变患者组较无该点突变的患者组发病年龄迟, 两组差异有显著意义 ($P = 0.047$); 而患者的性别、首发症状、血清铜生化水平均与该点突变无明显相关性。

表 1 WD 患者 Thr 935Met 点突变
与性别及首发症状的关系

组别	例数	性别		首发神经症状		首发肝症状	
		男	女	有	无	有	无
突变组	10	6	4	7	3	3	7
非突变组	80	47	33	41	39	38	42
χ^2		0.07		0.615		0.505	
P 值		> 0.05		> 0.05		> 0.05	

* 现安徽省立儿童医院神经内科工作 (230054)

表 2 WD 患者 Thr935Met 突变与发病年龄及铜生化水平关系

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)
突变组	10	19.10 ± 8.52	4.7220 ± 4.6547	88.40 ± 28.38	0.1336 ± 0.2428
非突变组	80	14.00 ± 7.42	4.4555 ± 2.7925	63.41 ± 31.95	0.0754 ± 0.1200
<i>t</i> 值		2.016	0.262	1.261	1.786
<i>P</i> 值		< 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05

讨 论

Wilson 病系铜代谢障碍性疾病。本病大多于 10 岁 ~ 30 岁间起病(症状暴露),文献报道,年龄最小的为 4 岁,最大的为 59 岁,为何起病年龄的迥异,一直未得到阐明。近年来基因组学的研究,似可予以解释。

1995 年,Thomas 等^[7]对 58 例 WD 患者进行了基因突变研究,发现欧洲人 WD 患者有两种点突变频率较高,即 His1069Gln 和 Gly1266Lys。其中报道了 3 例香港人 WD 患者的 ATP7B 基因研究结果,均发现为第 8 号外显子 778 密码子处的精氨酸(Arg)错义突变为亮氨酸(Leu)(Arg778Leu),此为中国人 ATP7B 基因突变的首次报道。台湾学者 Chuang 等(1996 年)^[9]及国内学者许月芳等(1998 年)^[5]均发现第 8 号外显子 Arg778Leu/Gln 点突变是中国人 WD 患者基因突变热点。吴志英等(1999 年)^[6]研究了 40 例 WD 患者 ATP7B 基因的第 12 号外显子,6 例发生了 935 密码子处的苏氨酸(Thr)错义突变为蛋氨酸(Met),Thr935Met 点突变率为 15%,得出 Thr935Met 亦是中国人 WD 患者基因突变的另一热点。

本实验的研究发现第 12 号外显子 Thr935Met 突变组的发病年龄迟于未见该点突变组的患者($P = 0.047$),而二组患者的性别、首发症状及铜生化水平无明显相关性($P > 0.05$)。关于第 12 号外显子 Thr935Met 突变组的发病年龄迟于未见该点突变组的原因,可能是第 12 号外显子所编码的氨基酸位于 ATP7B 酶的第 5 跨膜区,苏氨酸(Thr)为亲水氨基酸,蛋氨酸(Met)为疏水氨基酸。推测编码氨基酸的极性改变可能致 ATP7B 酶第 5 跨膜区蛋白构象的改变,而致转铜障碍,但仍可能残存转铜功能。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 酶尚残存转铜功能,故发病较迟,症状亦较轻^[7]。Thr935Met 属于错义突

变,故突变组的发病年龄较该点突变组的发病年龄迟。因 WD 患者 ATP7B 基因突变多数属复合杂合突变,全面完整地阐明 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。本实验 Thr935Met 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性,可能亦与此因素相关。

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
- [2]Ball 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
- [3]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
- [4]Yamaguchi Y, Heiny MY, Gitlin JD, et al. Isolation and characterization of a human liver cDNA as a candidate gene for Wilson disease. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993, 197: 271
- [5]许月芳, 范玉新, 余龙, 等. PCR 直接测序在 Wilson 病基因第 8 号外显子检出一个突变热点. *中华医学遗传学杂志*, 1998, 15(5): 284 ~ 287
- [6]吴志英, 王柠, 慕容慎行, 等. 肝豆状核变性基因第 12 号外显子突变特征的研究. *中华医学杂志*, 1999, 79(6): 422 ~ 424
- [7]Thomas GR, Forbes JR, Roberts EA, et al. The Wilson disease gene: spectrum of mutation and their consequences. *Nature Genet*, 1995, 9: 210 ~ 217
- [8]Maier DT, Ferenci P, Polli C, et al. Detection of the His1069Gln mutation in Wilson disease by rapid polymerase chain reaction. *Ann Intern Med*, 1997, 127(1): 70 ~ 72
- [9]Chuang LM, Wu HP, Jang TR, et al. High frequency of two mutations in codon 778 in exon 8 of the ATP7B gene in Taiwanese families with Wilson disease. *J Med Genet*, 1996, 33(6): 521 ~ 523

收稿日期: 2001-07-02 修回日期: 2001-08-09

(上接第 8 页)

参 考 文 献

- [1]周丽萍, 方周溪, 周 洁, 等. 解脲支原体宫内感染与胎盘绒毛膜超微结构改变的相关性研究. *疾病监测*, 2001, 16(6): 859 ~ 860
- [2]周丽萍, 陈 韶, 杨介钻, 等. 解脲支原体小鼠宫内感染的实验研究. *中国人兽共患病杂志*, 1999, 15(1): 49 ~ 51
- [3]Kruger T, Baier J. Induction of neutrophil chemoattractant cytokines by mycoplasma hominis in alveolar type II cells. *Infect Immun*, 1997, 65(2): 5131 ~ 5136
- [4]张国威, 邹光彪, 吕中法, 等. 解脲支原体的致病性研究. *疾病监测*, 2001, 16(6): 931
- [5]Waites KB, Crouse DT, Cassell GH. Systemic neonatal infection due to

- ureaplasma urealyticum*. *Clin Infect Dis*, 1993, 17(Suppl 1): S131 ~ 135
- [6]徐 坚, 薛文群, 张 红. 妇科病人沙眼衣原体、解脲支原体、淋球菌感染的流行病学研究. *中国优生与遗传杂志*, 1999, 7(6): 72
- [7]孙红妹, 郭章颢, 张景华, 等. 胎盘感染支原体的 PCR 分解及对出生体重的影响. *中华流行病学杂志*, 1998, 19(3-A): 150 ~ 152
- [8]杜金洁, 王怡芳, 谢维卫. 502 例孕妇人型支原体、生殖支原体、发酵支原体感染的分子流行病学杂志, 2000, 8(3): 40 ~ 41
- [9]周 勤, 薛文群, 龚晓红, 等. 早产儿咽部 5 种支原体感染状况调查研究. *中国优生与遗传杂志*, 2001, 9(1): 64 ~ 65
- [10]李琴, 谢 平, 汪圣强, 等. 液体培养法与套式 PCR 法检测解脲支原体比较研究. *中国优生与遗传杂志*, 2000, 8(5): 33 ~ 34

收稿日期: 2001-10-22