

华中和华东地区肝豆状核变性患者 ATP7B 基因第 13 号外显子突变的研究

程楠, 陆兵勋, 杜益刚, 王训, 胡纪源, 韩咏竹, 潘速跃, 杨任民

【摘要】 目的 对华中和华东地区肝豆状核变性(HLD)患者 ATP7B 基因第 13 号外显子突变进行研究。方法 应用 PCR-DNA 测序技术对来自我国华中和华东地区的 139 例非同源家系的 HLD 患者的 ATP7B 基因第 13 号外显子进行检测,并与 52 名正常对照者进行比较。结果 正常对照组测序未见异常。HLD 组共检出 6 种 ATP7B 基因的突变类型和 1 种多态,其中 Gly988Val 杂合突变为新的发现。HLD 组突变及多态总的检出率为 29.49% (41/139),染色体突变频率为 15.83% (44/278);其中 Pro992Leu 纯合或杂合突变的检出率为 23.02% (32/139),其染色体突变频率为 12.59% (35/278)。结论 ATP7B 基因第 13 号外显子是华中和华东地区 HLD 患者的一个基因突变热区,是筛选 HLD 可疑患者时优先检测的外显子之一。

【关键词】 肝豆状核变性; 基因突变; 核酸序列分析

【中图分类号】 R742.4 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1004-1648(2010)01-0001-03

Investigation on the mutation of exon 13 of ATP7B gene in patients with hepatolenticular degeneration located in middle east of China CHENG Nan, LU Bing-xun, DU Yi-gang, et al. Department of Neurology, Nanfang Hospital Affiliated to Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To investigate the mutation of exon 13 of ATP7B gene in patients with hepatolenticular degeneration(HLD) located in middle east of China. **Methods** Exon 13 of ATP7B gene in 139 not family HLD patients(HLD group) which came from middle east of China were detected by PCR-DNA sequencing. And the results were compared with 52 normal controls(NC group). **Results** No abnormality was found in NC group. 6 mutations and 1 polymorphism were found in HLD group, and there was a novel mutation(Gly988Val). The total rate of mutation and polymorphism of exon 13 in HLD group was 29.49% (41/139), and its frequency of chromosome mutation was 15.83% (44/278). Besides, the rate of Pro992Leu homozygous or heterozygous mutation was 23.02% (32/139), and its frequency of chromosome mutation was 12.59% (35/278). **Conclusions** Exon 13 of ATP7B gene is a hot location of mutation in HLD patients which come from middle east of China, and it is one of the exons which should be detected preferentially when screening doubtful HLD patients.

Key words: hepatolenticular degeneration; gene mutation; nucleotide sequence analysis

肝豆状核变性(HLD)是与铜代谢障碍有关的常染色体隐性遗传病,不同人群的发病率约 1/10 万~3.3/10 万。本病患者因铜在肝、脑、角膜等器官沉积,临床可出现肝硬化、神经/精神症状、角膜 K-F 环等表现,严重者可危及生命^[1]。随着 HLD 基因被克隆^[2],不同种族 HLD 患者的基因突变特征陆续被报道^[3]。不同国家和地区的研究资料显示,HLD 患者 ATP7B 基因第 13 号外显子突变类型众多,目前基因突变数据库已收录了该外显子的 40 余种突变类型^[4]。为此,本研究采用 PCR-DNA 测序方法对我国华中和华东地区 139 例非同源家系的 HLD 患者 ATP7B 基因第 13 号外显子进行检测,以期了解我国 HLD 患者第 13 号外显子的突变特征。

作者单位: 510515 广州,南方医科大学南方医院神经内科(程楠,陆兵勋,潘速跃);安徽中医学院神经病学研究所附属医院(杜益刚,王训,胡纪源,韩咏竹,杨任民)

1 对象与方法

1.1 对象 (1)HLD 组:系 2008 年 5~11 月间在安徽中医学院神经病学研究所附属医院住院治疗的确诊病例,分别来自华中和华东地区(安徽 35 例,河南 32 例,浙江 20 例,山东 18 例,江苏 13 例,江西 12 例,湖北 9 例)的不同家系。男 81 例,女 58 例;年龄 4~48 岁,平均(15.51±8.01)岁;病程 6 个月~25 年,平均(3.91±4.08)年。均符合 HLD 的诊断标准^[5,6]。(2)正常对照组:52 名,无亲缘关系的健康对照者,经铜生化及 K-F 环检查均正常,男 27 人,女 25 人;年龄 12~43 岁,平均(16.87±9.32)岁。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 用含枸橼酸钠抗凝剂的真空采血管采集受检者 3~5 ml 外周静脉血,应用全血基因组 DNA 提取试剂盒(凯基生物科技发展有限

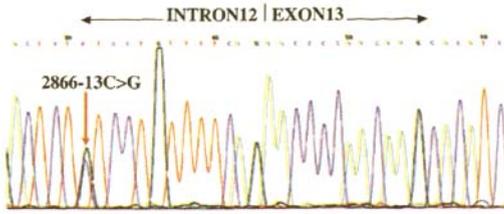


图 8 2866-13C>G 杂合多态

3 讨论

虽然典型的 HLD 患者根据特征性临床表现及实验室铜代谢检查等不难诊断,但许多患者早期症状复杂多样,极易被误诊为其他疾病^[7],铜代谢检查又常存在假阴性或假阳性结果^[6],因此,本病的早期诊断特别是症状前期和产前诊断较为困难。HLD 基因的克隆使得采用基因诊断技术对 HLD 患者进行症状前期及产前诊断成为可能。

研究^[3]显示,HLD 基因存在高度的遗传异质性,各外显子的突变位点众多,目前已发现超过 300 种形式的基因突变,且多为复合杂合突变,常见突变形式少见,多为罕见突变,在不同人种间突变形式亦存在明显差异。这虽然解释了 HLD 临床表现复杂多样的原因,但给基因诊断走向实用带来了困难。基于此,Chloe 等^[8]建议首先需明确不同地域、不同人群 HLD 基因的高频突变位点,然后采用 PCR 或 多重 PCR 扩增这些高频突变位点所在的区域并进行序列比对分析,从而达到快速检出致病患者的目的。

国内多家单位经 DNA 测序研究发现,中国人 ATP7B 基因的第 8 号外显子的 778 密码子和第 12 号外显子的 935 密码子有较高的突变率^[9-11];王柠等^[12]应用限制性酶谱分析法检测了 56 例非同源家系的 HLD 患者的第 8、12 号外显子,突变的检出率分别为 37.5% 和 16.1%。该研究提示,检测中国人第 8 号和 12 号外显子可使约半数的 HLD 患者得以确诊。如果在此基础上找到其他的高频突变位点,则能大大提高本病的检出率并可使其应用于临床。

上世纪末,Tsai 等^[13]首先发现我国台湾地区的 HLD 患者 ATP7B 基因第 13 号外显子存在 Pro992Leu 突变。2003 年,Gu 等^[14]在 39 例汉族和回族 HLD 患者中发现了 HLD 基因第 13 号外显子的 Pro992Leu、Ser975Try、2885delC 和 Gln963Stop codon 4 种突变类型。2006 年,杨静芳等^[15]在国人 HLD 患者中除了检测到 ATP7B 基因第 13 号外显子 Pro992Leu、Ser975Try 这 2 种突变类型外,还发现了 Thr977Met、Cys980Tyr 错义突变及位于侧翼区第 12 号内含子的 2866-13C>G 杂合多态。上述研究结果提示,国人 HLD 患者 ATP7B 基因第 13 号外显子存在较多的突

变类型并有可能为另一突变热区。

本研究对华中和华东地区 HLD 患者 ATP7B 基因第 13 号外显子的检测结果除了发现已报道的国人中 Pro992Leu 纯合/杂合突变、Ser975Tyr 纯合/杂合突变、Thr977Met 杂合突变、Ala1018Val 杂合突变和 2866-13C>G 杂合多态外,还发现 1 例以肝损害为主要表现的安徽籍 HLD 患者存在 Arg969Gln 合并 Gly988Val 的复合杂合突变,其中 Arg969Gln 杂合突变在国人中首次报道,Gly988Val 杂合突变则为新发现(GENEBANK 注册号:FJ705811)。本组患者突变及多态总的检出率为 29.49% (41/139),其中 Pro992Leu 纯合/杂合突变的检出率为 23.02% (32/139),其突变频率仅次于 ATP7B 基因的第 8 号外显子且明显高于第 12 号外显子的检出率。因此,第 13 号外显子是华中和华东地区 HLD 患者的基因突变热区,在筛选 HLD 可疑患者时除了检测第 8 和 12 号外显子外,第 13 号外显子也应是优先检测的外显子之一。

[参考文献]

- [1] Ala A, Walker AP, Ashkan K, et al. Wilson's disease[J]. *Lancet*, 2007, 369: 397.
- [2] 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[J]. *Nat Genet*, 1993, 5: 327.
- [3] Ferenci P. Regional distribution of mutations of the ATP7B gene in patients with Wilson disease: impact on genetic testing[J]. *Hum Genet*, 2006, 120:151.
- [4] <http://www.wilsonsdisease.med.ualberta.ca/database.asp>.
- [5] 杨任民主编. 肝豆状核变性[M]. 合肥:安徽科技出版社, 1995: 167.
- [6] Roberts EA, Schilsky ML. A practice guideline on Wilson disease[J]. *Hepatology*, 2003, 37: 1475.
- [7] 胡纪源,吕达平,王共强,等. 肝豆状核变性的临床误诊研究[J]. *中华医学杂志*, 2001, 81: 642.
- [8] Chloe MM, Ching WL, Sidney T, et al. Mutational analysis of 65 Wilson disease patients in Hong Kong Chinese: Identification of 17 novel mutations and its genetic heterogeneity[J]. *J Hum Genet*, 2008, 53:55.
- [9] 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[J]. *中华医学遗传学杂志*, 1998, 15: 284.
- [10] 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[J]. *中华医学杂志*, 1999, 79: 422.
- [11] 徐评议,梁秀龄,马少春. Wilson 的病 8 号外显子突变研究[J]. *中华医学遗传学杂志*, 1999, 16: 88.
- [12] 王柠,吴志英,林珉婷,等. 应用限制性酶谱分析法快速检出 Wilson 病基因突变热点[J]. *中华神经科杂志*, 1999, 32: 281.
- [13] Tsai CH, Tsai FJ, Wu JY, et al. Mutation analysis of Wilson disease in Taiwan and description of six new mutations[J]. *Hum mutat*, 1998, 12: 370.
- [14] Gu YH, Kodama H, Du SL, et al. Mutation spectrum and polymorphisms in ATP7B identified on direct sequencing of all exons in Chinese Han and Hui ethnicpatients with Wilson's disease[J]. *Clin Genet*, 2003, 64: 479.
- [15] 杨静芳,梁秀龄,马守忠,等. 74 例肝豆状核变性患者中 ATP7B 基因七种新突变的发现[J]. *中华神经科杂志*, 2006, 39: 673.

(收稿日期 2009-02-09 修回日期 2009-06-24)