

中国人 Wilson 病 WD 基因 12 号外显子突变研究

严永兴¹ 程楠² 洪铭范² 胡纪源² 韩咏竹² 杨任民²

(1. 杭州市第三人民医院 310009 2. 安徽中医学院神经病学研究所附属医院 230031)

摘要: 目的 研究中国人 Wilson 病(WD)基因第 12 外显子突变特征。方法 应用聚合酶链反应-单链构象多态型(PCR-SSCP)银染技术研究 70 例无亲缘关系的 WD 患者和 30 例正常组的 WD 基因 12 外显子,对有异常泳动者经 DNA 自动测序技术证实其突变性质和位置。结果 正常组未见异常。患者组发现 11 例异常(11/70 占 15.7%),二种错义突变,其中 9 例为 Thr935Met 突变(9/70,占 12.9%) 2 例为 Lys952Arg 突变(2/70 占 2.8%)。结论 第 12 外显子是中国人 WD 基因突变热区之一,发现一种未见报道的新型错义突变。

关键词: Wilson 病;WD 基因;PCR-SSCP;基因突变

中图分类号 R575.24 文献标识码: A 文章编号:1006-9534(2005)01-0039-03

The Study of mutation in exon 12 of Wilson's Disease(WD) gene in Chinese people. (YAN Yong-xing, CHENG Nan, HONG Ming-fan, et al.) (1. The Third People Hospital of Hangzhou 310009 2. Affiliated Hospital, Institute of Neurology, Anhui College of Chinese Traditional Medicine, Hefei 230061, China)

Abstract: Objective: To Study the frequency of mutation in exon 12 of Wilson's disease(WD) gene in Chinese people. Methods: Screening for exon12 mutation was conducted in 70 unrelated WD patients and 30 normal controls. Mobility shift of exon12 was analyzed by SSCP and further confirmed by direct sequencing. Results: No abnormality was found in 30 controls. In 70 patients, two missense mutation were identified in 11 cases(15.7%), including 9 cases of Thr935Met mutation(12.9%) and 2 of Lys952Arg mutation(2.8%). Conclusion: Exon12 was one of hot point mutation of WD in Chinese people, A novel missense mutation was identified.

Key words: Wilson disease; WD gene; PCR-SSCP; Gene mutation

肝豆状核变性又名 Wilson 病(WD)是一种以铜代谢障碍为特征的常染色体隐性遗传病,是常见的一种神经系统遗传病。该病基因定位于 13q14.3,跨度大于 80kb,有 22 个外显子,编码 1411 个氨基酸的 P 型 ATP 酶,故又称 ATP7B 基因^[1]。自 1993 年该基因被克隆以来,众多学者对其突变位点进行深入研究,目前已发现 225 种突变形式。欧美人种以 14 号外显子 His1069Gln 和 18 号外显子 Gly266Arg 错义突变最为常见,分别达 28%、10%^[2]。中国人 WD 基因突变位点分别在 5.8.11.12.14.16.18 等外显子均有报道,其中第 8 外显子 Arg778Leu/Gln 为高频突变位点已被国内众多学者所证实和公认,而第 12 号外显子是否为突变热区尚存争议^[9,13]。我们对第 12 外显子进行检测,发现该外显子亦是中国人 WD 基因突变热区之一,且发现一种新型错义突变。

资料与方法

一、一般资料

1. 研究对象:70 例患者均为安徽中医学院神经病学研究所 WD 专科病房 2002 年 11 月-2003 年 4 月间住院患者,其中男 34 例,女 36 例,平均年龄 19.7±8.96,平均发病年龄为 16.1±8.1 岁。全部病例均符合诊断标准^[3]。

2. 正常对照组:30 例正常对照组均为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±6.8 岁。铜生化检查均为正常水平。

二、方法

1. DNA 制备:取外周静脉血 10ml,加 3ml ACD 抗凝,常规分离白细胞,然后用盐析法提基因组 DNA,具体操作按文献进行^[4]。

2. PCR 扩增:扩增 WD 基因第 12 外显子的引物与文献一致^[2], primer1 5'-cttgggtgtttttatc-3'; primer2 5'-accaccatagcccagg-3',由上海基康公司合成。目的片段 229bp。在 25μl 反应体系中,基因组 300ng,引物各 0.5μmol/L, dNTP200μmol/L, TaqDNA 聚合酶 1.0U(Promega 公司)反应在美国 MJresearch PCR 自动热循环仪中进行,扩增条件为 97℃ 预变性 5min, 93℃ 变性 45s, 58℃ 退火 45s, 72℃ 延伸 90s, 共 30 个循环后, 72℃ 延伸 10min 结束反应,产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

3. 单链构象多态性(SSCP)和银染:PCR 扩增产物 8μl 与等体积加样缓冲液混合, 98℃ 变性 6min,立即冰浴骤冷, 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶 25℃, 500V 电泳 4-5h,电泳结束后用常规方法固定、染色、显色、拍照分析结果。

4. DNA 测序:PCR 产物以 Qiaquick 过柱纯化,采用 PE 公司生产的 ABIPRISM377DNA 自动测序仪进行序列分析。

结果

PCR-SSCP 银染结果 在对 70 例患者和 30 例正常对

照组的 WD 基因 12 号外显子进行 SSCP 筛选时,发现正常对照组均呈单一的泳动带型(I 型带型),而患者组呈四种泳动带型,其中 58 例呈现与正常人相同的带型(I 型带型),另外 12 例分别呈现三种异常的泳动带型:其中 9 例呈现 III 型带型,2 例呈现 IV 型带型,1 例呈现 II 型带型(图 1)。

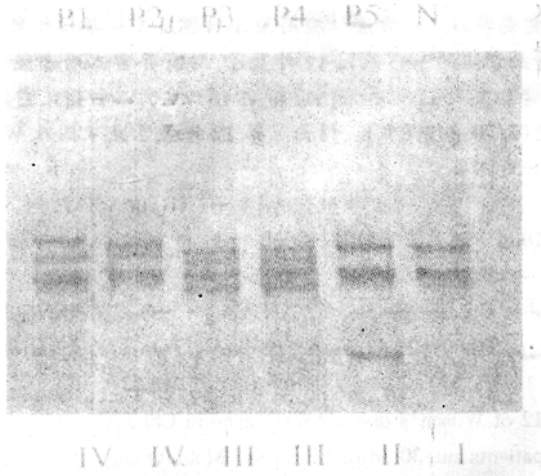


图 1 ATP7B 基因第 12 外显子 SSCP 电泳分析
N 正常对照;P1-P5:WD 患者

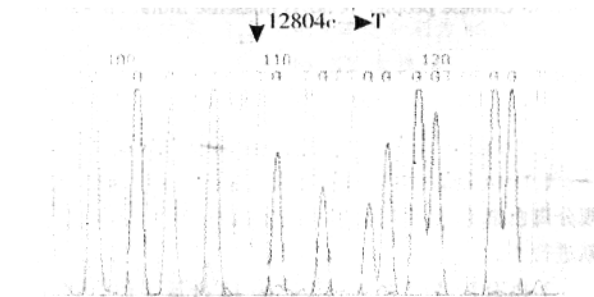


图 2 ATP7B 基因第 12 外显子的序列分析结果:第 935 密码子由 ACG → ATG,导致发生 Thr935Met 杂合错义突变

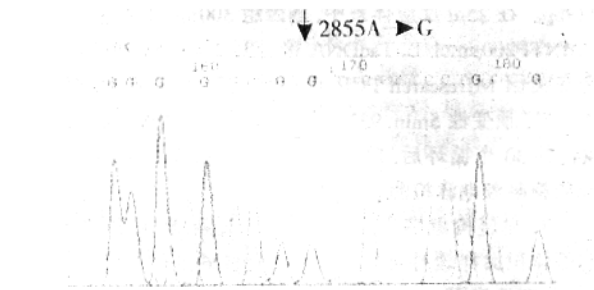


图 3 ATPB 基因第 12 外显子的序列分析结果:第 952 密码子由 AAA → AGA,导致发生 Lys952Arg 杂合错义突变

基因突变的序列分析 对上述 12 例异常泳动带型的患者及正常对照者的 PCR 产物进行 DNA 序列测定,并与 GENE BANK 序列进行对照,结果发现正常对照者的 DNA 序列与 GENE BANK 序列一致,9 例 III 型带型的患者均发生了 Thr935Met 杂合错义突变,碱基改变为 2804C → T(图 2),2

例 IV 型带型的患者发生了 Lys952Arg 杂合突变,碱基改变为 2855A → G(图 3),另 1 例 II 型带型的患者发生了 +22 内含子缺失 T(图 4)。即在 15.7%(11/70)的患者中检测到 12 号外显子的错义突变。

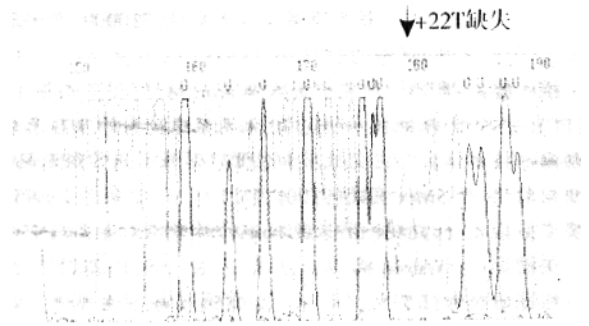


图 4 ATP7B 基因第 12 外显子后的内含子序列分析结果发生了 +22 内含子缺失 T

讨 论

WD 是少数几种可以治疗的遗传性疾病之一,其治疗效果与开始治疗的早晚有极大关系,如能早期诊断、早期治疗,尤其在症状前期即开始治疗,则可终身不出现临床症状;若在晚期才开始治疗,由于肝、脑、肾等重要脏器已发生不可逆损伤,预后欠佳。以往本病仅能依据临床表现及铜代谢检查进行诊断,无法进行产前及症状前诊断,故较少对症状前患者进行早期治疗。近年来随着对 WD 分子遗传学机理的阐明,特别是 WD 基因的克隆,使本病的产前及症状前期诊断成为现实。

近年来国内外多数研究证实,中国人 WD 基因的突变特征与欧美白种人存在着明显差异,中国人在作为欧美白种人突变热区的第 14、18 外显子却未发现相应的高频突变^[2,5,9]。台湾学者 Chuang LM 等(1996)首次对 22 例中国人 WD 患者检测时发现第 8 外显子 Arg778Leu 和 Arg778Gln 突变频率为 11.4% 和 9.1%^[6]。此后国内众多研究单位对 8 号外显子研究发现 Arg778Leu/Gln 突变频率高达 11.4% - 37.5%^[7,8,9],同时提出 8 号外显子是中国人 WD 基因突变第一热区。吴志英等^[9](1998)对中国人 WD 基因第 3 - 20 号外显子研究发现,12 外显子突变率为 18.1%,其中 Thr935Met 突变率占 13.6%,进而提出 12 外显子为中国人 WD 基因第二突变热区。针对 12 外显子 Thr935Met 突变位点设计的内切酶 Mae II 进行酶切阳性率达 12.5% - 16.1%^[10,11],但梁秀龄等^[12](2000)针对此酶切点用 TaiI 酶切未发现异常,未能获得支持该突变热区的结论,但实验均未予测序进一步证实。本研究采用 PCR - SSCP 方法对 70 例 WD 患者 12 号外显子行 PCR - SSCP 银染技术研究,发现有 12 例泳动异常,进一步测序表明 9 例发生 Thr935Met 突变,频率占 12.9%,与吴志英等^[8]报道基本一致。另 2 例发现 Lys952Arg 突变(占 2.8%),1 例发生内含子 +22 T 缺失。本组研究表明 12 外显子总突变率为 15.7%,仅次于 8 外显

子突变率,支持 12 外显子为另一突变热区。目前国内外在 12 外显子发生的错义突变有 Thr935Met, Arg919Gly, Leu936Ter, Gly943Ser, Gly943Asp 等^[2]。本研究发现的 Lys952Arg 突变为一种未见报道的新型错义突变, Lys952Arg 突变位于 P 型 ATP 酶第 5 跨膜区(Tm5),由精氨酸代替了赖氨酸,破坏了 ATP 酶跨膜区的结构,使患者致病,二者均属于酸性氨基酸。临床上这 2 例患者起病均迟,1 例于 21 岁,另 1 例于 32 岁起病,均因以锥体外系症状为首发和主要症状得以诊断,临床表型均符合假性硬化型^[3],经驱铜治疗后明显好转。2 例患者起病迟,症状轻,且治疗效果好,是否可能为赖氨酸与精氨酸均为同性氨基酸, Lys952Arg 错义突变导致的 ATP7B 基因表达蛋白功能影响程度较弱有关。这些发现对建立中国人 WD 患者直接基因诊断方法提供了重要的理论依据,即在对中国人 WD 患者进行基因诊断时,可首选第 8、12 外显子这两个突变热区。

参 考 文 献

- [1] Bull PC, Thomas GR, Rommens JM, et al. The Wilson disease gene is a putative coppertransporting P-type ATPase similar to the menkes gene[J]. *Nature Genet*, 1993, 5: 327.
- [2] Thomas GR, Forbes JR, Roberts EA, et al. The Wilson disease gene: spectrum of mutation and their consequences[J]. *Nature Genet*, 1995, 9: 210.
- [3] 杨任民. 肝豆状核变性[M]. 第 1 版, 合肥: 安徽科学技术出版社,

1995, 167-188.

- [4] Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells[J]. *Nucleic Acids Res*, 1988, 16(3):1215.
 - [5] 吴志英, 王柠, 慕容慎行, 等. 中国人 WD 基因第 14 和 18 号外显子的错义突变[J]. *中华医学遗传学杂志*, 1999, 16(2):91-93.
 - [6] Chuang LM, Wu HP, Jang MH, 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.
 - [7] 马少春, 梁秀龄, 徐评议, 等. 肝豆状核变性 8、14 号外显子基因突变的检测[J]. *中山医科大学学报*, 1998, 19: 14-17.
 - [8] 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: 284-287.
 - [9] 吴志英, 王柠, 慕容慎行, 等. 肝豆状核变性第 3-20 号外显子突变及多态的 DNA 测序研究[J]. *中华神经科杂志*, 1998, 31(6): 35.
 - [10] 程楠, 胡纪源, 杨任民, 等. PCR-酶切法检测 Wilson 病 935 密码子基因突变[J]. *中国优生与遗传杂志*, 2000, 8(3): 24.
 - [11] 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(5): 281-283.
 - [12] 梁秀龄, 马少春, 徐评议, 等. 肝豆状核变性的检测及酶切诊断方法[J]. *中华神经科杂志*, 2000, 33(3): 159-161.
- 收稿日期: 2004-01-09 修回日期: 2004-02-24

(上接第 38 页)

SRY 基因调控序列突变或与性分化有关的其他基因的变异。Livadas 等发现 9 号染色体短臂部分缺失可引起 46, XY 女性^[8]。Sock 等证实位于 17q24 的 SOX9 基因与 CD 骨骼畸形综合征、性反转综合征有关^[9]。Annette 等发现位于 Xp21 的 DSS 位点如果出现倍增,可压倒 Y 染色体上决定男性性征的 SRY 基因的影响^[10]。促使胚胎的生殖腺向卵巢方向发育。据此我们将做进一步的研究,以确定该病例具体发病机制。另外,嵌合体患者 45, X 细胞系及 46, XY 细胞系比例约为 3:1, 46, XY 细胞数目较少也是该患者睾丸未分化的原因之一。Kocova 等也曾报道在某些 45, XO/46, XY 患者存在 SRY 基因,这类患者患性腺母细胞瘤的风险及男性化程度均与 SRY 基因存在与否正相关。

SRY 阴性 46, XY 女性(病例 7), PY3.4 探针杂交结果阳性, SRY 探针杂交结果与病例 5 相似,亦为阴性。此患者虽有 Y 染色体,但也无睾丸发育。致病机理同病例 5,因 SRY 蛋白缺失,无 MIS 蛋白产生,未分化性腺将发育成卵巢。

上述研究结果支持“SRY 基因是人类睾丸决定因子的最佳候选基因”的论断,对性腺发育不全患者进行 SRY 基因检测是必要的。与此同时,本次研究也表明,性别决定这一复杂过程中还有其他基因参与。

参 考 文 献

- [1] Ostrer H. 万方数据 Differentiation[J]. *Semin Reprod Med*, 2000, 18:

(1) 41-49.

- [2] Agata T, Hawkins JR, Taglor A, et al. Sex reversal in a child with a 46, X, Ypt karyotype: support for the existence of a gene(s) located in distal Xp, involved in testis formation[J]. *J Med Genet*, 1992, 29: 226.
- [3] Alvarez-Nava F, Martínez MC, González S, et al. FISH and PCR analysis of the presence of Y-chromosome sequences in a patient with Xq-isochromosome and testicular tissue[J]. *Clin Genet*, 1999, 55: 356-61.
- [4] Zhou C, Li LY, Fu JJ, et al. 46, XY female sex reversal patient with a novel point mutation in the coding sequence of the SRY gene[J]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*, 2003, 20: 369-72.
- [5] Ilon R, Telvi L, Chaussain JL, et al. Failure of testicular development associated with a rearrangement of 9p24.1 proximal to the SNF2 gene[J]. *Hum Genet*, 1998, 102: 151-6.
- [6] Vilain E, Edward R, et al. Autosomal or X-linked mutation results in true hermaphrodites and 46, XX males in the same family[J]. *J Med Genet*, 1998, 35: 17-22.
- [7] Harley VR, et al. *Endocr Rev*, 2003, 24: 466.
- [8] Livadas S, Mavrou A, Sofocleous C, et al. Gonadoblastoma in a patient with de(9)(p22) and sex reversal: report of a case and review of the literature[J]. *Cancer Genet Cytogenet*, 2003, Jun, 143: 174-7.
- [9] Sock E, Pagon RA, Keymolen K, et al. Loss of DNA-dependent dimerization of the transcription factor SOX9 as a cause for campomelic dysplasia[J]. *Hum Mol Genet*, 2003, Jun 15, 12: 1439-47.
- [10] Annette Baumstark, Gottold Barbi, Mahmoud Djalali. Xp duplications with and without sex reversal[J]. *Hum Genet*, 1996, 97: 79-86.

收稿日期: 2003-12-29 修回日期: 2004-02-16