

中国人 WD 基因 12 号外显子突变研究

严永兴 程楠 洪铭范 胡纪源 韩咏竹 杨任民

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 例无血缘关系的 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实变性质和位置。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: R742.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-351X(2004)04-0248-03

The Study of Mutation in Exon 12 of Wilson's Disease(WD) Gene in Chinese People

YAN Yongxing, CHENG Nan, HONG Mingfan, et al.

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 Thr 935 Met mutation(12.9%) and 2 of Lys 952 Arg mutation (2.8%). **Conclusions:** Exon 12 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,最常见的一种神经系统遗传病。该病基因定位于 13q^[14,3],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]。因此我们对第 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。

资料和方法

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±8.98 岁,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。

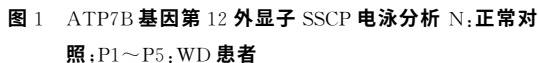
方法

1. DNA 制备:取外周静脉血 10ml,加 3mlACD 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]。

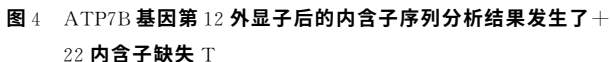
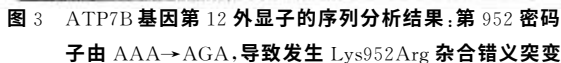
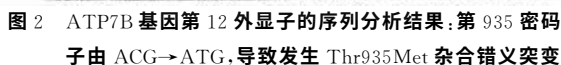
2. PCR 扩增:扩增 WD 基因第 12 外显子的引物与文献一致^[2], primer1:5'-cttggtggtgtttttatctt-3'; primer2:5'-accaccatagcccaag-3',由上海基康公司合成。目的片段 229bp。在 25μl 反应体系中,基因组 300ng,引物各 0.5μmol/L, dNTP 200μmol/L, TaqDNA 聚合酶 1.0u(Promega 公司)反应在美国 MJresearchPCR 自动热循环仪中进行,扩增条件为:97℃预变性 5min,93℃变性 45sec,58℃退火 45sec,72℃延伸 90sec,共 30 个循环后,72℃延伸 10min 结束反应,产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测。

4. DNA 测序:PCR 产物以 Qiaquick 过柱纯化,采用 PE 公司生产的 ABIPRISM™377DNA 自动测序仪进行序列分析。

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(1 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)。



万方数据



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。目前使用的早期诊断方法主要有 RFLP 或/和 STR 的标记连锁分析,PCR-酶切法,PCR-SSCP 以及 DNA 直接测序法等,但对这些方法的各自优缺点相比较,目前认为 PCR-SSCP 结合 DNA 直接测序法不失为 WD 基因诊断的首选方法。但 WD 基因长达 80kb,含 22 个外显子,在作产前或症状前诊断时,究竟优先选择哪些外显子进行突变筛选才能最快做出诊断,这就涉及到该基因突变热点的寻找问题。

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 MaeII 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+22T 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, Arg919Gln~Leu936Ter, Gly943Ser, Gly943Asp 等^[2]。但本研究发现的 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。但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 copper transporting P-type ATPase similar to the menkes gene. *Nature Genet* 1993; 5:327
- 2 Thomas GR, Forbes JR, Roberts EA, et al. The Wilson disease gene: spectrum of mutation and their consequences. *Nature Genet*, 1995; 9:210
- 3 杨任民主编. 肝豆状核变性. 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. *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. *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 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. *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. *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. *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. *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. *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. *中华神经科杂志*, 2000, 33(3):159~161