

DNA 测序证实的 Wilson's 病 ATP7B 基因第 14 外显子一种新型移码突变

安徽中医学院神经病学研究所(合肥, 230031) 张 志 洪铭范 任明山 胡纪原 韩咏竹 蔡永亮 杨任民
安徽省池州地区人民医院(贵池, 247100) 琚双五
复旦大学遗传所(上海, 200437) 范玉新

摘 要 目的: 了解中国人肝豆状核变性患者基因(ATP7B 基因)第 14 外显子(exon14)的突变情况, 为该病的基因诊断和治疗提供依据。方法: 用聚合酶链反应(PCR)扩增 ATP7B 基因的第 14 外显子片段, 通过 DNA 单链构象多态(SSCP)筛选, 以 PCR 产物(PCR-DNA)循环测序予以鉴定。结果: 在 85 例肝豆状核变性患者和 39 例正常人的 PCR-SSCP 均呈现两种泳动带型(I、II 型), 我们分别对两组中各种带型的 PCR-DNA 进行循环测序, 发现 II 型中 WD 患者第 1046 密码子后插入了碱基 A(1046insA)而产生移码突变。结论: 肝豆状核变性患者中发现一种未见报道的新型移码突变。

关键词 Wilson's 病 基因突变 PCR-SSCP 循环测序

肝豆状核变性(hepatolenticular degeneration, HLD), 又称 Wilson's 病(WD), 好发于青少年, 由于铜代谢障碍引起肝硬化、大脑基底神经节尤其是豆状核变性、肾损害以及角膜色素环等为临床表现。1971 年 Hail 通过家系调查首先提出该病属常染色体隐性遗传病^[1]。人群中携带频率为 0.011, 基因频率为 0.0056, 发病率为 1/33500^[2]。WD 是少数可治性遗传病之一, 但如不予长期驱铜治疗, 常可于发病后 3-5 年内死亡。近年来 WD 在分子遗传领域中的研究取得了突破性进展, 随着 WD 基因的克隆, 从而使人们研究 WD 基因突变类型和临床表现型之间的关系成为可能, 为基因诊断和治疗开辟了新的途径。我所已经完成对 ATP7B 基因的第 7、9 及 18 外显子的筛查, 发现了第 7 外显子错义突变(Ser662Cys)^[3,4]和第 18 外显子是中国 WD 基因的突变热区^[5]。为了探讨 WD 基因第 14 外显子突变情况, 我们应用 PCR-SSCP 筛选, 并对 PCR-DNA 进行了测序研究, 现将结果报道如下:

对象与方法

一、研究对象 全部病例均系安徽中医学院神经病学研究所 WD 专病病房 1996 年 10 月-1998 年 3 月间住院患者, 其中男 58 例, 女 27 例, 平均年龄 18.5 ± 7.6 岁, 发病年龄 15.7 ± 5.14 岁。全部病例均具有典型角膜色素环、锥体外系症状或/及肝症状, 铜氧化酶 < 0.2 活力单位, 血铜减低、尿铜增高或铜代谢障碍符合 WD 的诊断标准^[6]。

正常对照组为成年人 39 例, 男 27 例, 女 12 例, 平均年龄 20 ± 5.48 岁。血清铜氧化酶均 > 0.2 活力单位且无 WD 家族史的健康志愿者。

二、检测方法

1. 基因组 DNA 的提取 取外周血 10ml, 加入 3ml ACD 抗凝, 常规分离白细胞, 然后用盐析法抽提基因组 DNA。具体操作按文献^[7]进行, 制备出的 DNA 经琼脂糖凝胶电泳检测, 其分子量均大于 23Kb。

2. PCR 引物及反应条件 根据 Thomas 等人的报道^[8], 设计第 14 外显子的引物为 5'-TCCATCTGT-

TATTGTGGTCAG-3' 和 5'-CAGCTAGGAGAGAAGGACAT-3'。25 μ l 反应体系中包含基因组 DNA800ng, 引物各 0.5 μ mol/L, dNTP 各 200 μ mol/L, Tris·Cl(PH=8.5)20 μ mol/L, KCl 150mmol/L, MgCl₂2mmol/L, 5% 甲酰胺和 TaqDNA 聚合酶(美国 Promega 公司产品)1.0U。PCR 采用热后启动法, 即先于 97℃ 变性 5 分钟, 降至 80℃ 时再加入 TaqDNA 聚合酶, 反应在小型热循环仪(美国 MJ Research)中进行, 扩增条件为 93℃/45 秒, 58℃/45 秒和 70℃/90 秒, 35 个循环后, 70℃ 延伸 10 分钟。

3. SSCP 及银染 按文献^[9]方法进行。

4. PCR-DNA 直接测序 选择 SSCP 筛选的各种带型的 PCR-DNA 直接进行循环测序。测序前先将 PCR-DNA 纯化, 具体操作按照 The high pure product kit(Boehringer Mannheim 公司, 德国)说明书进行。

DNA 测序采用 SequiTherm EXCEL™ II DNA 测序试剂盒(Epicentre technologies, USA), 具体操作按说明书进行同位素引物标记及测序反应。反应完毕后于 98℃ 变性 6 分钟, 8% 变性聚丙烯酰胺凝胶(含 8mol/L 尿素)电泳。电泳条件: 室温下 60W, 恒功率电泳 5-7 小时。-82℃ 超低温放射自显影 72 小时。

结 果

一、PCR-SSCP 结果(图 1) 85 例 WD 患者和 39 例正常人的 ATP7B 基因的第 14 外显子进行 SSCP 筛选时, 发现均有两种迁移带型, 分别命名为 I 型和 II 型, I 型呈现两条迁移带, II 型为四条。WD 组中 I 型 76 例(89.4%), II 型 9 例(10.6%); 对照组中 I 型 38 例(97.4%), 而 II 型仅见 1 例(2.6%)(表 1)。

表 1 ATP7B 基因 Exon14 PCR-SSCP 结果

单链构象	WD 组	对照组	合计
I	76(76/85)	38(38/39)	114
II	9(9/85)	1(1/39)	10
合计	85	39	124

二、PCR-DNA 直接测序结果 为了进一步确定我们所发现 PCR-SSCP 的各种电泳迁移带型的本质,我们选择 WD 组和对照组中每种带型的 DNA 同时进行循环测序分析(图 2),结果并与 CENEBAK 中的 ATP7B 基因序列(图 3)对比,发

现 SSCP II 型的一例 WD 患者 1046 密码子后一个碱基 A 的插入突变,导致其下游核苷酸序列的移码突变。I 型 WD 患者序列和正常人相同且与 GENEBAK(U03464 CDS)对应序列一致。

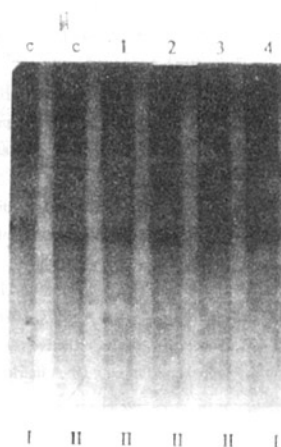


图 1 SSCP 迁移带型

(c: 正常对照; 1-4: 患者; I、II 示两种迁移带型)

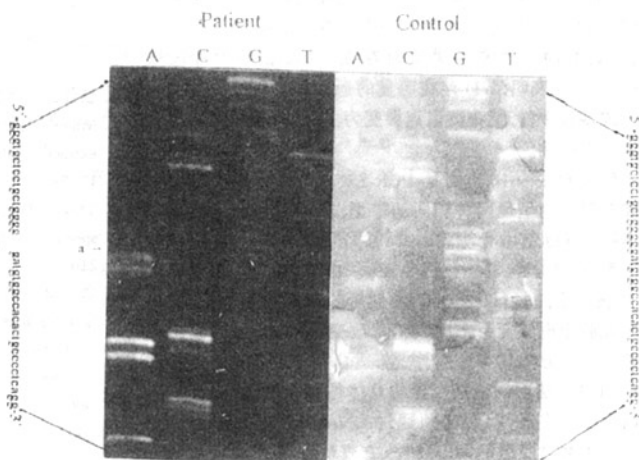


图 2. PCR-DNA 直接测序结果

CENEBAK(U03464 CDS)ATP7B 基因 E14 序列如下:

intron13/exon14

tgttttggcag/ATAAAGACTGTGATGTTTGACAAGACTGGCACCATTACCCATGGCGTCCCA

↓ (A)

GGGTCATGCGGGTGCTCCTGCTG GGG GAT GTGGCCACACTGCCCTCAGGAAG

GTTCTGCTGTGGTGGGACTGCGGAGGCCAGCAGTGAACACCCCTTGGGCGTGGCAGT

CACCAATACTGTAAAGAG/gtactgggactt

exon14/intron14

讨 论

WD 是目前少数可以治疗的遗传病之一,其治疗效果和预后与治疗开始的早晚密切关系,而早期诊断又是早期治疗关键。然而经典的临床和铜生化检查不仅不能作出产前诊断,而且对少部分铜蓝蛋白正常的症状前 WD 患者也难实现早期诊断。近年曾用限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)和短串联重复顺序多态连锁分析等基因诊断手段虽能较有效地诊断 WD 先证者家族成员中的症状前患者,但对于无 WD 家族史的症状前患者仍无法在症状显化前作出产前诊断^[10]。因此,直接检测基因突变成为本病产前和症状前诊断的重要手段。WD 基因于 1993 年底分别被三个不同实验室克隆^[11,12,13],它位于 13 号染色体(13q14.3),编码一种 P 型铜转运 ATP 酶(ATP7B),故又称

ATP7B 基因,全长约 80Kb,含 22 个外显子和 21 个内含子。由于外显子所编码的氨基酸功能和结构不同,各个外显子大小和结构也不相同,其中以外显子 2 和内含子 12 最大,而第 1 号外显子和内含子 8 最小。结构分析表明,WD 基因由 6 个铜离子结合区、1 个高度保守区和 1 个疏水区组成。高度保守区主要由磷酸酯酶转导区、离子通道、磷酸化作用区和 ATP 结合区组成,是基因突变的热点区^[14]。ATP7B 酶参与铜跨膜转运过程,它的生理功能为从事铜离子活化、使金属铜结合入铜蓝蛋白中,从而维持正常铜代谢。目前的研究认为本病是由于 WD 基因突变导致 ATP7B 蛋白构象(一、二级结构的改变),亦可导致翻译提前终止或破坏蛋白某一功能区的形成,最终使该酶的功能减弱或消失而致病^[13]。

Thomas 等(1995)报道^[8]在 ATP7B 基因第 2、5、8、10、12 及 14-20 号外显子上均发现突变存在,共有 25 种,包括 13 个

插入或缺失突变、7 个错义突变、3 个剪接位点突变及 2 个无义突变,其中 2 种错义突变频率较高(以染色体计算),在 34 个欧洲病人中占 38%,一个为 14 外显子 His1070Gln,占 28%;另一个为第 18 外显子 Gly 1267Lys,占 10%。提示通过检测这两个突变热区,可对 1/3 的北欧 WD 进行症状前诊断。到 1999 年初已发现有 134 种突变,其中错义或无义突变为 81 种类型,9 种剪接点突变,3 种调节基因突变,31 种小缺失,7 种小插入,1 种插入和缺失同时存在,以及 2 种大片段缺失^[15]。有研究表明,WD 存在明显的遗传异质性^[12],其基因突变形式多种多样,但主要以点突变为主,从而有可能解释临床症状的多样性。

本研究对 exon14 进行了 PCR-SSCP 筛查。发现 WD 患者组和对照组均呈现两种相同的带型,二组组内两型的比率明显不同。WD 组中 I 型占 89.4%,II 型占 10.6%;而对照组中 I 型占 97.4%,II 型仅占 2.6%。由于 SSCP 方法首次于 1989 年被提出,利用双链 DNA 变性后的单链,在非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳迁移率随其构象改变的性质,可以检出碱基的差异。该方法具有简便、快速、适合大样本突变筛查等优点,但 SSCP 无法明确碱基变异的具体位置和形式,也无法区分基因突变和多态现象,必须通过 DNA 测序才能进一步证实。本组正常对照组绝大多数 SSCP 表现为 I 型,仅有 1 例表现为 II 型,测序证实这两型的序列与 GENE BANK 一致,说明正常人在第 14 外显子有两种多态,其中 II 型是一种罕见多态。本组 WD 患者的 SSCP I 型的 PCR-DNA 测序证实与正常人序列一致,而 II 型的 PCR-DNA 直接测序发现了一种未见报道的新型插入突变 1046insA,丰富了 WD 基因突变谱,也提示中国人的基因突变与北欧白种人存在差异^[8]。推测原因可能是由于遗传的异质性,地域和人种的差异造成黄种人和白种人在基因型上的不同^[16]。第 14 外显子位于 ATP7B 基因高度保守的磷酸化区,该区域的插入突变致使该基因编码至 1046Gly 时发生移码突变,影响 ATP7B 酶的表达,至于这个移码突变最终会使 ATP7B 酶的活性改变多少,有待通过基因表达来进一步鉴定。

参 考 文 献

1. Rrewer GJ, Yuzbasiyan-Gurkan V. Wilson disease. Medicine, 1992, 71

(3):139

2. Danks DM. Hereditary disorders of copper metabolism in Wilson disease and Menkes disease. New York: McGraw-Hill, 1989:1252-1264
3. 杨任民,范玉新,余 龙,等. 肝豆状核变性基因的一种新型错义突变. 中华医学杂志, 1997, 5:344-347
4. 范玉新,余 龙,任明山,等. 中国人 P 型铜转运 ATP 酶基因突变的初步研究. 复旦学报(自然科学版), 1997, 36(5):517-523
5. 任明山,杨任民,范玉新,等. Wilson 病基因第 18 外显子突变的初步研究. 临床神经病学杂志, 1997, 10(3):136-138
6. 杨任民. 肝豆状核变性. 第 1 版,合肥:安徽科技出版社, 1995:167
7. Miller SA, Dykes DD, Poiesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucl Acids Res, 1988, 16: 1215
8. Thomas GR, Forbes JR, Roberts EA, et al. The Wilson disease gene: spectrum of mutation and their consequences. Nature Genet, 1995, 9: 210
9. 余 龙,官立群,邓余,等. 一种用于 PCR-SSCP 和 STR 分析的银染 PAG 胶膜片简易制备法. 中华医学遗传学杂志, 1986, 13:177
10. Farrer LA, Bowcock AM, Hebert JM, et al. Predictive testing for Wilson's disease using tightly linked and flanking DNA markers. Neurology, 1991, 41:992
11. 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
12. Tanzi RE, Petrukhin K, Chernov I, et al. The Wilson disease gene is a copper transporting ATPase with homology to the menkes disease gene. Nature Gene, 1993, 5:344
13. 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
14. 徐评议,梁秀龄. 肝豆状核变性基因突变研究. 中国神经精神杂志, 1998, 24(1):12-13
15. The human gene mutation database. <http://www.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/hgmd0.html>, 1999/1/15
16. Chu-NS; Hung-TP. Geographi variations in Wilson's disease. J Neurol Sci. 1993 Jul, 117(1-2):1-7

(上接第 22 页)

以确保 PCR 结果准确率^[3]。因此,在强直性脊椎炎病人中检测 B27 基因有助于早期诊断。

2. 本文对 16 例 AS 病人进行影像学 X 线片检测。在 X 线片未发现椎骨异常 12 例病人中, B27 基因阳性 10 例,阳性率为 83.3%。在 X 线片未发现强直性病变的 AS 病人有 83.3% 可通过 PCR-SSP 检测出 B27 基因。说明检测 B27 基因可作为确诊 AS 病的一个重要指标,尤其在 AS 病初发早期,而 X 线片未发生病变者的诊断中。

3. AS 与风湿性疾病早期临床症状类似。这两类疾病通常以影像学、血沉等结果作为辅助诊断依据。AS 病人中有 87.5% 发现血沉升高,风湿性疾病中有 80% 以上发现血沉升

高。而两类疾病大部分病人的影像学 X 线片未发现脊椎病变。所以,用血沉及影像学作为鉴别指标难以区分,而通过 PCR-SSP 技术检测 B27 基因可提高鉴别诊断的正确率。AS 病人组 B27 基因阳性率占 68.8%,风湿性病人组 B27 基因阳性率占 11.4%, $P < 0.005$, 有非常显著性差异。因此, B27 基因可作为 AS 与风湿性疾病鉴别诊断的重要依据。

参 考 文 献

1. 赵桐茂. HLA 分型原理和应用. 第 1 版, 上海科学技术出版社, 1984:231,233
2. 陈灏珠. 内科学. 第 3 版, 人民卫生出版社, 1992:805-808
3. 张祖文, 兰炯采, 等. HLA-B27 PCR 基因分型及血清学结果比较. 中国输血杂志, 1997, 10(2):67-68