

肝豆状核变性基因高频突变位点与 中医证型关系的探讨*

杜益刚, 胡纪源[△], 程楠, 赵静, 韩咏竹, 杨任民
安徽中医学院神经病研究所, 安徽 合肥 230061

[摘要] 目的: 探讨肝豆状核变性(HLD)ATP7B 基因高频突变位点 Arg778Leu、Thr935Met、Pro992Leu 点突变与中医证型的关系。方法: 选择 142 例无血缘关系的 HLD 确诊患者, 采用 Touchdown PCR (TD-PCR) 扩增 ATP7B 基因的第 8、12、13 号外显子, 并对 PCR 扩增产物予以限制性内切酶酶切检测第 778、935、992 密码子的基因突变, 对检测的阳性结果进行 DNA 测序验证。同时对以上 142 例 HLD 患者进行中医辨证分型, 分析基因突变类型与中医证型的关系。结果: 142 例 HLD 患者中 48.59% (69/142) 的患者在第 8 外显子检出 Arg778Leu 突变, 5.63% (8/142) 的患者在第 12 外显子检出 Thr935Met 杂合突变, 24.65% (35/142) 的患者在第 13 外显子检出 Pro992Leu 突变。发生 Arg778Leu 突变的患者中, 肝肾阴虚型 32 例, 气血两虚型 13 例, 湿热内蕴型 21 例; 发生 Pro992Leu 突变的患者中, 肝肾阴虚型 12 例, 气血两虚型 9 例, 湿热内蕴型 11 例。结论: Arg778Leu 突变类型与肝肾阴虚型存在相关性 ($P=0.03$)。Pro992Leu 突变类型与各中医证型无相关性 ($P>0.05$)。

[关键词] 肝豆状核变性; 基因突变; PCR; 中医证型

[中图分类号] R241.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1004-6852 (2013) 10-0001-04

Exploration on the Relationship between TCM Patterns and High Frequency Mutated Gene Locus in the Patients with Hepatolenticular Degeneration

DU Yigang, HU Jiyuan[△], CHENG Nan, ZHAO Jing, HAN Yongzhu, YANG Renmin
Neurology Institute of Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230061, China

Abstract Objective: To discuss the relationship between TCM patterns and the mutations of gene locus including Arg 778Leu, Thr935Met and Pro992Leu located at ATP7B gene of Chinese patients suffering from hepatolenticular degeneration(HLD). Method: All 142 patients with HLD were chosen, the exon 8, 12 and 13 located at ATP7B gene was amplified with Touchdown PCR (TD-PCR), gene mutation of the codon 778, 935 and 992 was tested through amplification product of PCR dissected with restriction enzyme, the positive results were tested with DNA sequencing. Above 142 patients were differentiated into patterns, the relationship between gene mutation and TCM patterns was analyzed. Result: Among 142 HLD patients, 48.59% (69/142) of the patients were tested with Arg778Leu mutation in the exon 8, 5.63% (8/142) of the patients were detected with Thr935Met heterozygous mutation in the exon 12; 24.65% (35/142) of the patients were tested with Pro992Leu mutation. Among the patients with Arg778Leu mutation, there were 32 cases of liver-kidney Yin deficiency pattern, 13 cases of dual deficiency of Qi-blood and 21 cases of internal accumulation of dampness-heat; among the patients with Pro992Leu mutation, there were 12 cases of liver-kidney Yin deficiency pattern, nine cases of dual deficiency of Qi-blood and 11 cases of internal accumulation of dampness-heat. Conclusion: The types of Arg778Leu mutation are related to liver-kidney Yin deficiency pattern ($P=0.03$). The types of Pro992Leu mutation show no relativity to different TCM patterns ($P>0.05$).

Keywords hepatolenticular degeneration; gene mutation; PCR; TCM patterns

肝豆状核变性 (hepatolenticular degeneration, HLD) 是一种常染色体隐性遗传铜代谢障碍疾病, 由于铜在肝、脑、肾、角膜等组织中沉积引起相应器官功能障碍, 临床以急慢性肝脏损害、神经 / 精神症状、角膜 K-F 环等为主要表现。其临床类型繁多, 中医证型亦可分为多种类型, 可能与 HLD 基因的突变位点相关, 本研究拟探求 HLD 基

因高频突变位点 Arg778Leu、Thr935Met、Pro992Leu 点突变与中医证型的关系。

1 资料与方法

1.1 临床资料 HLD 组: 所有患者均为 2008 年 6 月至 2009 年 3 月期间安徽中医学院神经病研究所附属医院收住的患者, 均符合 HLD 诊断标准^[1], 共 142 例, 其中男 85 例, 女 57 例; 年龄 4~44 岁,

平均(18.39±6.87)岁;对照组:30例健康人,其中男18例,女12例;年龄7~49岁,平均(19.71±4.76)岁;2组病程均<6个月。血清铜蓝蛋白及铜氧化酶等生化检查均正常。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 将1 mL 抗凝全血至于5 mL 无菌离心管中,应用全血基因组 DNA 提取试剂盒严格按凯基基因组 DNA 提取试剂盒说明书进行提取。DNA 样本经测定 A260/A280 比值定量,分装后于-20℃的冰箱中保存。

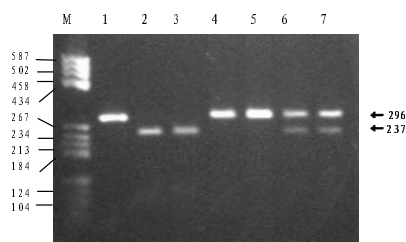
1.2.2 多聚酶链式反应扩增 DNA 片聚合酶链式反应(PCR 扩增) PCR 扩增反应的引物参考文献[2-3]及根据各外显子 GENE BANK 序列设计的引物序列,引物由上海英骏生物技术有限公司合成,PCR 扩增反应条件参考文献[4]。

1.2.3 限制性内切酶消化 PCR 产物及 DNA 序列

测定 酶切反应体系中含 6 μ L PCR 产物、2 μ L 限制性内切酶和 2 μ L 10 $\times$ 缓冲液,以去离子双蒸水补至 20 μ L,覆盖 20 μ L 石蜡油后孵育 8~12 小时使样品完全酶切。取酶切产物 15 μ L 于 2.0% 琼脂糖凝胶 100 V 恒压电泳 2.5 小时,EB 染色,缓冲液为 0.5 $\times$ TBE。以 pBR322 DNA/BsuRI (HaeIII) 为分子量标记。电泳结束后,紫外灯上观察、拍照。各外显子的突变位点、酶切位点、限制性内切酶 / 反应温度、酶切产物片段大小见表 1。以正常人为对照,根据酶切产物电泳分离得到的限制性内切酶图谱分析有无突变(图 1-3)。酶切异常的 PCR 产物以纯化试剂盒(爱思进生物技术杭州有限公司)过柱纯化后送上海英骏生物技术有限公司在 ABI 3730 自动测序仪上行 DNA 测序。将测序结果与 GeneBank 中人类 ATP7B 基因序列(NC-000013)比较,用 Omiga 软件分析比对结果(图 4-8)。

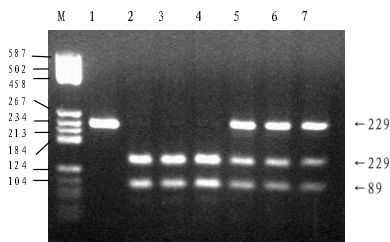
表 1 各外显子引物序列及限制性内切酶酶切条件

外显子	突变位点	酶切位点	引物序列	限制性内切酶 / 反应温度	酶切产物片段大小
8	Arg778Leu	CGG $\rightarrow$ CTG	F: 5'-AACCCCTCACTGTCCTTGTC-3' R: 5'-AGGCAGCTCTTTCTGAAC-3'	MspI/37℃	237+59
12	Thr935Met	ACG $\rightarrow$ ATG	F: 5'-CTTGTGGTGTATTTATTC-3' R: 5'-ACCACCATATAGCCCAAG-3'	TaiI/65℃	140+89
13	Pro992Leu	CCC $\rightarrow$ CTC	F: 5'-CCCCTGAAATGTCCTTATGTG-3' R: 5'-ACACTGCTGTCTTGAGTGGCT-3'	BstDsI/65℃	196+188



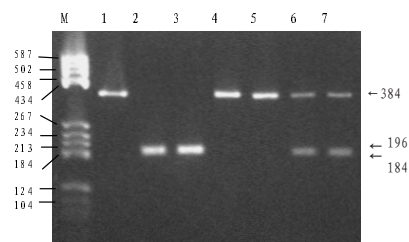
1 为未经酶切的正常人 PCR 产物;2 为正常人 PCR 产物完全酶切;3 为 HLD 患者未检出 Arg778Leu 突变;4, 5 为 HLD 患者检出 Arg778 Leu 纯合突变;6, 7 为 HLD 患者检出 Arg778Leu 杂合突变;M 为 pBR322 DNA/BsuRI (HaeIII) 为分子量标记

图 1 HLD 基因第 8 外显子 MspI 限制性酶切图谱



1 为未经酶切的正常人 PCR 产物;2 为正常人 PCR 产物完全酶切;3, 4 为 HLD 患者未检出 Thr935Met 突变;5, 6, 7 为 HLD 患者检出 Thr935Met 杂合突变;M 为 pBR322 DNA/BsuRI (HaeIII) 为分子量标记

图 2 HLD 基因第 12 外显子 TaiI 限制性酶切图谱



1 为未经酶切的正常人 PCR 产物;2 为正常人 PCR 产物完全酶切;3 为 HLD 患者未检出 Pro992Leu 突变;4, 5 为 HLD 患者检出 Pro992Leu 纯合突变;6, 7 为 HLD 患者检出 Pro992Leu 杂合突变;M 为 pBR322 DNA/BsuRI (HaeIII) 为分子量标记

图 3 HLD 基因第 13 外显子 BstDsI 限制性酶切图谱

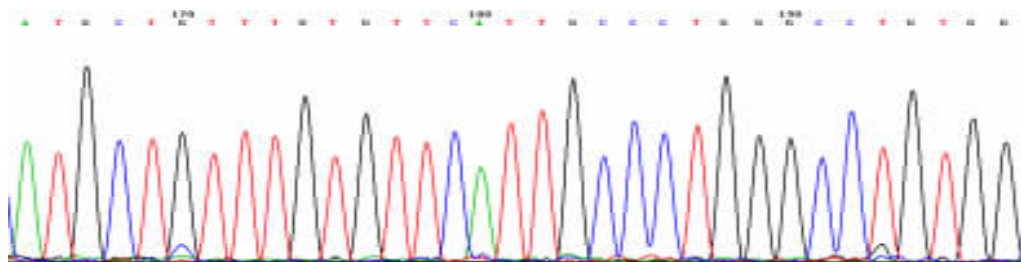


图 4 Arg778Leu 纯合突变 DNA 测序

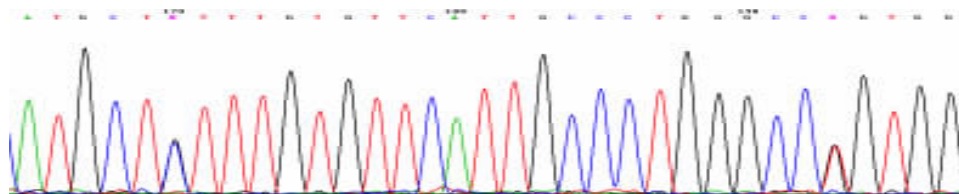


图 5 Arg778Leu 杂合突变 DNA 测序

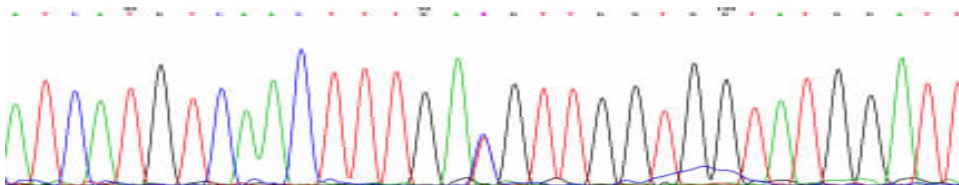


图 6 Thr935Met 杂合突变 DNA 测序

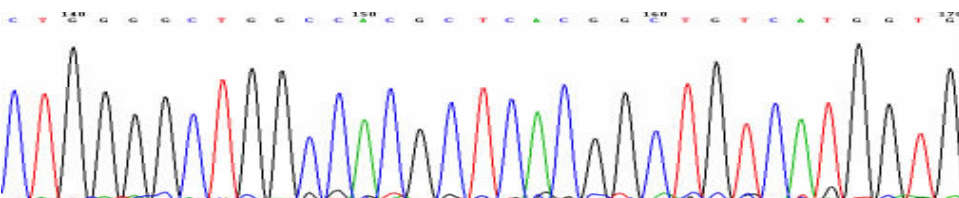


图 7 Pro992Leu 纯合突变 DNA 测序

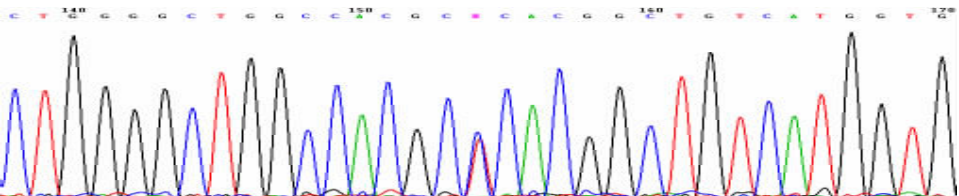


图 8 Pro992Leu 杂合突变 DNA 测序

1.3 中医证型^[5] 142 例 HLD 患者分为肝肾阴虚(53 例)、气血两虚(29 例)、痰湿内蕴(53 例)、痰蒙清窍(5 例)及痰火扰心(2 例)5 型。

2 结果

2.1 HLD 患者基因突变情况 142 例 HLD 患者中 48.59%(69/142)的患者在第 8 外显子检出 Arg778 Leu 突变,其中纯合突变 13 例,杂合突变 56 例,染色体突变频率为 28.87%(82/284);5.63%(8/142)的患者在第 12 外显子检出 Thr935Met 杂合突变,染色体突变频率为 2.82%(8/284);24.65%(35/142)的患者在第 13 外显子检出 Pro992Leu 突变,其中纯

合突变 3 例,杂合突变 32 例,染色体突变频率为 13.38%(38/284)。检出突变的患者中有 12 例为 Arg778Leu/Pro992Leu 复合杂合突变,1 例 Arg778Leu/Thr935Met 复合杂合突变,1 例 Arg778Leu 纯合突变合并 Pro992Leu 杂合突变,故其总突变检出率为 69.01%(98/142),总染色体突变检出率为 45.07%(128/284)。

2.2 Arg778Leu 突变、Pro992Leu 突变与中医证型的关系 Arg778Leu 突变类型与肝肾阴虚型存在相关性($P=0.03$)。Pro992Leu 突变类型与各中医证型无相关性($P>0.05$)。见表 2—3。

表 2 Arg778Leu 突变与中医证型的关系

组别	肝肾阴虚		气血两虚		湿热内蕴		痰蒙清窍	痰火扰心
	有	无	有	无	有	无		
非突变组	21	52	16	57	32	41	2	2
突变组	32 [▲]	37	13 [◆]	56	21 [◆]	48	3	0

注:▲表示与非突变组比较, $P<0.05$;◆表示与非突变组比较, $P>0.05$ 。

表 3 Pro992Leu 突变与中医证型的关系

组别	肝肾阴虚		气血两虚		湿热内蕴		痰蒙清窍	痰火扰心
	有	无	有	无	有	无		
非突变组	41	66	20	87	42	65	3	1
突变组	12 [◆]	23	9 [◆]	26	11 [◆]	24	2	1

注:◆表示与非突变组比较, $P>0.05$ 。

3 讨论

肝豆状核变性为常染色体隐性遗传的铜代谢障碍性疾病,目前已明确主要与 ATP7B 基因突变密切相关,HLD 的临床表现按祖国医学分别归属于“臌胀”“黄疸”“颤症”“痉症”“癫狂”等范畴,先天禀赋不足是引起本病的根本原因。

近年来,有关中医证型与基因的相关性研究成为中医基础理论研究的热点。中医学关于疾病“因人、因地、因时”的个体化辨证治疗模式符合基因多态性的特点。随着基因组学研究的迅猛发展和不断深入,把基因组学融入中医学,从基因微观分子水平研究中医辨证分型,建立证型基因表达谱,以逐步揭示证的客观物质基础,有助于未病先防,便于在诊断中进行基因检测,提高辨证的准确性,在治疗时,又可以根据基因和基因功能表达谱,采取宏观辨证与微观辨证相结合的方法,能更有针对性地进行个体化治疗^[6]。

研究证实,HLD 基因全长约 80 kb,含有 21 个外显子和 20 个内含子,其 cDNA 编码一种分子量约 165 Kda 的由 1411 个氨基酸组成的 P 型铜转运 ATP 酶(ATP7B),HLD 基因又称 ATP7B 基因^[7-9]。关于中国人中 HLD 患者基因突变的研究,Thomas 等^[2]首先发现了 3 例中国香港人第 8 外显子存在 Arg778Leu 突变。随后国内多家单位研究发现第 8 外显子 Arg778Leu 和第 12 外显子 Thr935Leu 突变频率较高,为中国人的突变热点^[10-12]。Gu YH 等^[13]对 39 例汉族和 1 例回族 HLD 患者 ATP7B 全长外显子行基因检测分析,结果发现 57.5%突变位于第 8、12、13 外显子上,其中 55%的患者可检出 Arg778Leu 突变,而 13 外显子突变率为 17.5%,我们在前期工作中采用 DNA 测序方法对我国中华和华东地区 139 例非同源家系的 HLD 患者第 13 号外显子进行了检测,总的检出率为 29.49%,Pro992Leu 突变率为 23.02%,证实 Pro992Leu 点突变为中国人的第二突变热点^[4]。

对于 HLD 患者的基因与中医证型的相关性研究文献报道较少,此次我们对 142 例 HLD 患者的基因高频突变位点分析结果认为 Arg778Leu 点突变与肝肾阴虚存在显著的相关性,而其他突变类型则与中医证型无明显相关性。

本研究结果显示 Arg778Leu 点突变与肝肾阴虚型存在显著的相关性,为本病的中医辨证分型提供了一定的理论依据。但基因型与中医证型的相关性研究必须基于大样本病例的分析,否则难以得出客观的结论,同时由于 HLD 基因全长达

80 kb,且其具有显著的遗传异质性,仅对单个位点进行相关性研究,如同“盲人摸象”,很难得出其真正的规律,在以后的研究中,应对更大样本的 HLD 患者进行 HLD 基因全长序列研究,尝试寻找 HLD 基因型与中医证型的相关性。

参考文献

- [1] 杨任民. 肝豆状核变性[M]. 合肥:安徽科技出版社,1995:196-205.
- [2] Thomas GR,Forbes JR,Roberts EA,et al.The Wilson disease gene:spectrum of mutations and their consequences[J]. Nature Genet,1995,9(2):210-217.
- [3] Wan L,Tsai CH,Tsai Y,et al.Mutation analysis of Taiwanese Wilson disease patients[J].Biochem Biophys Res Commun,2006,345(2):734-738.
- [4] 程楠,陆兵勋,杜益刚,等. 中华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[J]. 临床神经病学杂志,2010,23(1):1-3.
- [5] 洪铭范,胡纪源,胡文彬,等. 肝豆状核变性的中医辨证分型[J]. 安徽中医学院学报,1998,17(1):10-11.
- [6] 唐亚平,罗丽洁,贾微,等. 中医证型与基因相关性的研究进展[J]. 辽宁中医杂志,2008,35(1):148-150.
- [7] 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]. Nature Genet,1993,5(4):327-337.
- [8] Tanzi RE,Petrushkin K,Chernov I,et al.The Wilson disease gene is a copper transporting ATPase with homology to the menkes disease gene[J]. Nature Gene,1993,5(4):344-350.
- [9] Petrushkin K.Mapping cloning and genetic characterization of the region containing the wilson disease gene[J]. Nature Genet,1993,5(4):338-343.
- [10] 许月芳,范玉新,余龙,等. PCR 直接测序在 Wilson 病基因第 8 外显子检出一个突变热点[J]. 中华医学遗传学杂志,1998,15(5):284-287.
- [11] 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(6):422-424.
- [12] 徐评议,梁秀龄,马少春. Wilson's 病 8 号外显子突变研究[J]. 中华医学遗传学杂志,1999,16(2):88-89.
- [13] 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 ethnic patients with Wilson's disease[J]. Clin Genet,2003,64(6):479-484.

收稿日期:2013-01-04

* 基金项目:安徽省教育厅科研计划项目(编号 2000j1143)

作者简介:杜益刚(1980—),男,硕士学位,主治医师。研究方向:神经病学的中西医结合诊治。

△ 通讯作者:胡纪源(1955—),男,主任医师,教授。研究方向:神经病学的中西医结合诊治。