

Wilson 病双(多)胞胎家系的临床和基因突变研究

程楠 王训 喻绪恩 周志华 高伟明 饶烧 胡纪源 杨任民 韩咏竹

【摘要】 目的 观察双(多)胞胎 Wilson 病家系的临床和基因突变特点。**方法** 收集双(多)胞胎 Wilson 病家系的临床资料,留取其全血标本,提取基因组 DNA,应用短串联重复(short tandem repeats, STR)分型判定双胞胎是否为同卵双生,用 DNA 测序法检测 *ATP7B* 基因各外显子的突变。**结果** 5 个双胞胎家系的患者均符合 Wilson 病的诊断标准。STR 分型提示 4 个家系为同卵双生,1 个家系为异卵双生。3 个双胞胎家系的患者均以肝症状起病,另外 2 个家系的患者以脑症状起病。在 4 个家系的患者中检出 *ATP7B* 基因的突变,均位于第 8 和/或第 13 外显子,其中 1 个家系的患者同时携带第 8 外显子 p. R778W 杂合突变和第 13 外显子 p. P992L 纯合突变,其父母分别为 p. R778W 杂合突变和 p. P992L 杂合突变的携带者,因此该家系的患者发生了杂合丢失现象。有 1 个家系的 2 例患者及其父母亲各外显子均未检出突变。1 个三胞胎家系中的 1 名女性成员为脑症状起病的 Wilson 病患者,1 名男性为无症状的亚临床型 Wilson 病患者,另 1 例女性成员未患病,这 3 位成员及其母亲均检出第 13 外显子 p. P992L 杂合突变。**结论** 我们的研究进一步证实了遗传因素在 Wilson 病发病中的主要作用。杂合丢失现象是除点突变外 Wilson 病的另一种发病机制。

【关键词】 Wilson 病; 双(多)胞胎; *ATP7B* 基因; 基因突变; 临床表型

Clinical and genetic study of Wilson's disease in affected twins and siblings* CHENG Nan, WANG Xun, YU Xu-en, ZHOU Zhi-hua, GAO Ming-wei, RAO Rao, HU Ji-yuan, YANG Ren-min, HAN Yong-zhu. (Hospital Affiliated to Institute of Neurology, Anhui College of TCM, Hefei, Anhui 230061, P. R. China)

Corresponding author: WANG Xun, Email: neurodoc@163.com

【Abstract】 Objective To study the clinical and genetic characteristics of twins and siblings affected with Wilson's disease (WD). **Methods** Clinical data and blood samples were collected from the subjects after informed consent was obtained. Genomic DNA was extracted and potential mutations in the exons in *ATP7B* gene were detected with PCR-DNA sequencing. Short tandem repeat (STR) genotyping was performed to determine the zygosity of the twins. **Results** The 5 pairs of twins have all met the diagnostic criteria for WD. STR genotyping has confirmed that 4 pairs were monozygotic twins. 3 pairs of twins had an onset with liver symptoms, the other 2 had an onset with brain symptoms. *ATP7B* gene mutations were detected in 4 pairs of twins, which have all located in exons 8 and 13. A heterozygous p. R778W mutation in exon 8 and homozygous p. P992L mutation in exon 13 were detected in all patients from one family, whose parents have carried a heterozygous p. R778W mutation and p. P992L heterozygous mutation, respectively, which suggested loss of heterozygosity (LOH). In one family, no mutation was detected in all exons of the *ATP7B* gene in the patients and their parents. For a triplet, one female was with definite WD and brain symptoms at the onset, one male had subclinical type with WD, whilst another female was completely normal. The triplets and their mother have all carried a p. P992L heterozygous mutation. **Conclusion** Our study has confirmed an important role for genetic factors in the pathogenesis of WD. In addition to point mutations, LOH is also involved in the pathogenesis for WD.

【Key words】 Wilson's disease; Twins or multiple births; *ATP7B* gene; Gene mutation; Clinical phenotype

* Supported by the Natural Science Foundation of China (81173212) and Natural Science Foundation of Anhui Province (1208085MH144)

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-9406.2013.03.002

基金项目:国家自然科学基金(81173212);安徽省自然科学基金(1208085MH144)

作者单位:230061 合肥,安徽中医学院神经病学研究所附属医院

通信作者:王训,Email: neurodoc@163.com

Wilson 病(Wilson's disease, WD)又称肝豆状核变性(hepatolenticular degeneration),是一种好发于青少年的常染色体隐性铜代谢障碍性疾病。本病的病因为 13q14.3 区 *ATP7B* 基因的突变,导致铜离子跨膜转运障碍,使过量的铜在肝、脑、肾、角膜等器官中沉

积,患者可出现肝硬化、神经及精神症状、肾损害、角膜 K-F 环等临床表现。Wilson 病在欧美人群中的患病率约为(1~3.3)/10 万^[1]。我们既往在安徽省含山县 11 万余例汉族人群中发现 WD 的患病率约为 6.21/10 万^[2]。

WD 患者的临床表现并不完全与 *ATP7B* 基因的突变类型相对应^[3-6]。由于双生子研究能够评估遗传因素在疾病发病中的作用而被广泛用于遗传学研究^[7-8],对同为隐性遗传病的 WD 而言也是一种重要的研究方法。目前国内关于 WD 双(多)胞胎家系的研究资料较少,且多为个案报道^[9]。我们收集了多例双(多)胞胎 WD 家系的临床资料,通过分析其临床特点并检测 *ATP7B* 基因的突变,以观察相同遗传背景下 WD 患者的临床和基因突变特点。

1 对象与方法

1.1 对象 以 2011 年 1 月至 2012 年 12 月住院治疗的双(多)胞胎 WD 家系的患者及其家系成员为研究对象。

1.2 方法

1.2.1 临床研究方法 患者及其家系成员入院后均行血清铜蓝蛋白等其铜生化指标检测、双眼角膜 K-F 环和肝胆脾肾 B 超等检查。根据中华医学会神经病学分会帕金森病及运动障碍学组和神经遗传性疾病学组 2008 年《肝豆状变性的诊断与治疗指南》中的诊断标准^[10]确定其是否为 WD 患者。对于不能确诊者行青霉胺负荷试验(penicillamine challenge tests, PCT)和/或肝脏穿刺活检等检查以确定或排除诊断^[11]。

1.2.2 *ATP7B* 基因突变检测 所有患者及其家系成员在签署知情同意后,采集其外周静脉血,分离白细胞,提取基因组 DNA。按文献^[12]报道的 *ATP7B* 基因的 21 个外显子及其侧翼区的引物序列合成引物(上海英骏生物技术有限公司)。PCR 反应条件为:50 μ L 扩增体系中包含基因组 DNA 500 ng,引物各 0.25 μ mol/L, 2 $\times$ PCR Master Mix (Beijing Solarbio Science & Technology Co. Ltd.) 含 Tris-HCl 20 mmol/L, KCl 100 mmol/L, MgCl₂ 3 mmol/L, dNTP 500 μ mol/L each, 0.1 U/ μ L *Taq* DNA 聚合酶。PCR 扩增反应条件为:95 $^{\circ}$ C 10 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 63 $^{\circ}$ C~56 $^{\circ}$ C 复性 45 s(从 63 $^{\circ}$ C 开始,每个循环降低 0.5 $^{\circ}$ C,一直降至 56 $^{\circ}$ C), 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s,然后复性,温度固定为 56 $^{\circ}$ C,其他条件不变,行 20 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物纯化后送上海英骏生物技术有限公司测序。将测序结果与 GenBank 中人类 *ATP7B* 基因序列(NC-000013)比较,用 Omiga 软件分析比对结果。

测序结果异常者行双向测序,对检测出的新的突变类型则在健康对照组中测序验证以排除多态。

1.2.3 双胞胎卵型鉴定 应用短串联重复(short tandem repeat, STR)分型检测技术鉴定双胞胎患者是否同卵双生,鉴定工作委托北京华大基因公司进行。

2 结果

2.1 双(多)胞胎 WD 家系的临床资料(表 1)

2.1.1 双胞胎 WD 家系的临床资料 共收集了 5 个双胞胎家系(家系 1~5),其中 4 对(家系 2~5)STR 分型一致为同卵双生,1 对(家系 1)STR 分型不一致,提示为异卵双生。5 个家系中有 3 个家系(家系 1、2、4)的所有患者以肝症状起病,临床表现为肝功能异常、黄疸、腹水、肝硬化等),另外 2 个家系(家系 3、5)的所有患者均以脑症状起病,临床表现为手抖、言语不清、行走不稳等锥体外系症状及肝损伤症状。5 个家系的所有患者血清铜蓝蛋白(ceruloplasmin, CP)均明显降低,腹部 B 超检查提示肝硬化等肝损伤改变。尽管有 2 个家系(家系 2、4)的患者未检出角膜 K-F 环,但根据临床和实验室检查综合判断均符合 WD 的诊断标准。同一双胞胎家系的患者不仅起病形式、临床症状相同,有 1 个家系(家系 2)的患者甚至出现在同一天对同一种药物过敏的现象。

2.1.2 三胞胎 WD 家系的临床资料 我们还收集了 1 个三胞胎家系(家系 6),该家系有 2 名女性成员,1 名男性成员。其中 1 名女性成员(6-1)以锥体外系症状起病、角膜 K-F 环阳性、血清 CP 明显减低(67.8 μ g/L)、B 超提示肝硬化,为 WD 确诊患者;男性成员(6-2)无临床症状、角膜 K-F 环阴性,但血清 CP 减低(179.4 μ g/L)、B 超提示肝回声欠均匀、PCT(+),为亚临床型 WD 患者;另 1 例女性成员(6-3)无临床症状、角膜 K-F 环阴性、血清 CP 正常(257.8 μ g/L)、PCT(-),临床排除 WD 的诊断。

2.2 双(多)胞胎 WD 家系的 *ATP7B* 基因检测结果 (表 1 和图 1)双胞胎 WD 家系中有 4 个家系的患者检出 *ATP7B* 基因的突变。家系 5 的患者均为第 8 外显子 c.2333G>T(p. R778L)纯合突变,其父母均为 p. R778L 杂合突变的携带者;家系 3 的患者同时携带第 8 外显子 c.2332C>T(p. R778W)杂合突变和第 13 外显子 c.2975C>T(p. P992L)纯合突变,其父亲为 p. R778W 杂合突变,母亲为 p. P992L 杂合突变的携带者,故该家系患者发生了杂合丢失现象(loss of heterozygosity, LOH)。家系 1 的患者均为第 8 外显子 p. R778L 杂合突变,其母亲为 p. R778L 杂合突变的携带者,父亲未检出突变。家系 4 的患者均为第

表 1 双(多)胞胎家系的临床资料、STR 分型和基因检测结果

家系	患者	性别	起病年龄(岁)	首发症状	临床分型	STR 分型	铜蓝蛋白(μg/L)	腹部 B 超	K-F 环	ATP7B 基因突变检测结果	家系成员(父母亲) ATP7B 基因突变检测结果	备注
家系 1	1-1	男	9	肝症状	肝型	STR 分型不一致,	51.3	肝豆肝硬化	阳性	Arg778Leu 杂合突变	父亲:未检出突变	
	1-2	男	9	肝症状	肝型	为异卵双生	44.3	肝豆肝硬化	阳性	Arg778Leu 杂合突变	母亲: Arg778Leu 杂合突变	
家系 2	2-1	女	9	肝症状	肝型	STR 分型一致,	46.1	肝豆肝病(星光点征)	阴性	未检出突变	父亲:未检出突变	
	2-2	女	9	肝症状	肝型	为同卵双生	47.6	肝豆肝病(星光点征)	阴性	未检出突变	母亲:未检出突变	
家系 3	3-1	男	22	锥体外系症状	脑-内脏型	STR 分型一致,为同卵双生	63.1	肝豆肝硬化	阳性	Arg778Trp 杂合突变 Pro992Leu 纯合突变	父亲: Arg778Trp 杂合突变	LOH
	3-1	男	22	锥体外系症状	脑-内脏型		65.1	肝豆肝硬化	阳性	Arg778Trp 杂合突变 Pro992Leu 纯合突变	母亲: Pro992Leu 杂合突变	LOH
家系 4	4-1	女	5	肝症状	肝型	STR 分型一致,为同卵双生	105	轻度弥漫性损伤	阴性	Pro992Leu 杂合突变	父亲: Pro992Leu 杂合突变 母亲:未检出突变	
	4-2	女	5	肝症状	肝型		111.6	轻度弥漫性损伤	阴性	Pro992Leu 杂合突变		
家系 5	5-1	女	13	锥体外系症状	脑型	STR 分型一致,为同卵双生	52.9	肝豆肝病(岩层征)	阳性	Arg778Leu 纯合突变	父亲: Arg778Leu 杂合突变 母亲: Arg778Leu 杂合突变	
	5-2	女	13	锥体外系症状	脑型		24.6	肝豆肝病(岩层征)	阳性	Arg778Leu 纯合突变		
家系 6	6-1	女	15	锥体外系症状	脑-内脏型		67.8	肝豆肝病(岩层征)	阳性	Pro992Leu 杂合突变	父亲:未检出突变 母亲: Pro992Leu 杂合突变	
	6-2	男	15	无症状	亚临床型		179.4	肝回声欠均匀	阴性	Pro992Leu 杂合突变		PCT (+)
	6-3	女	15	无症状	排除 WD 诊断		257.8	肝回声欠均匀	阴性	Pro992Leu 杂合突变		PCT (-)

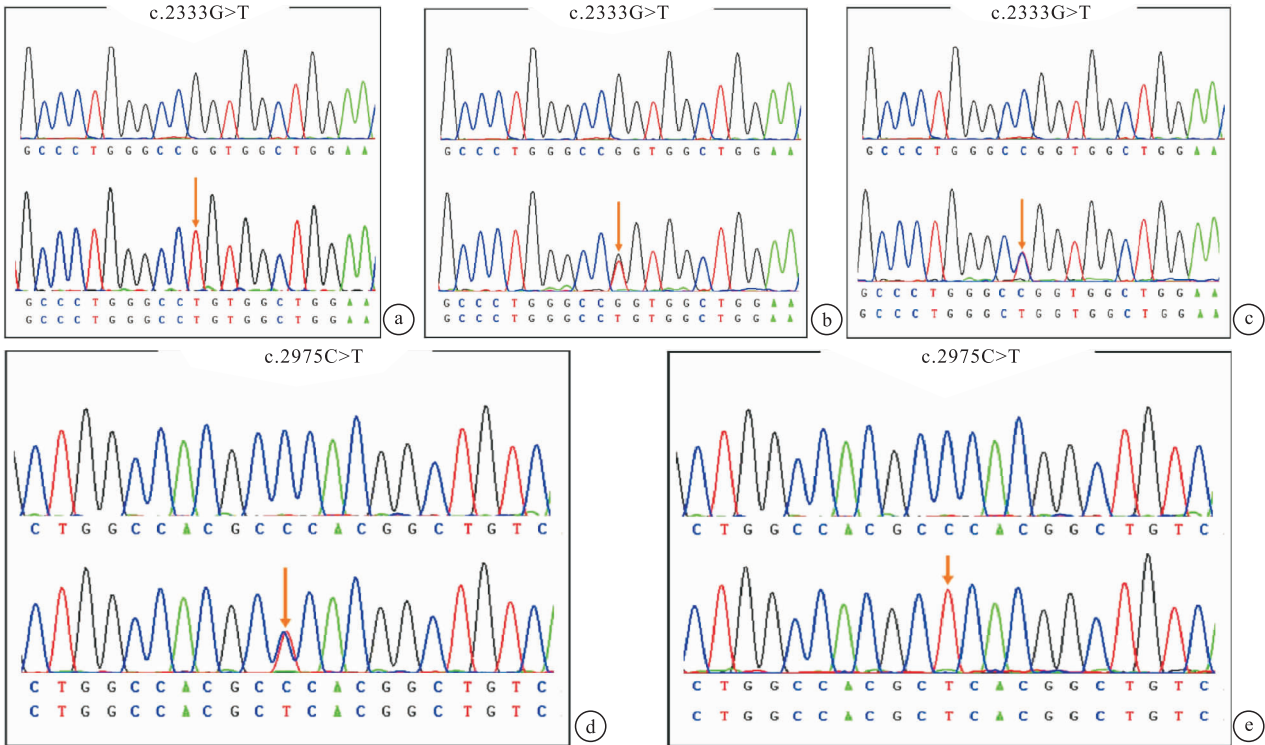


图 1 双(多)胞胎 WD 家系的 ATP7B 基因测序结果 a: 第 8 外显子 c. 2333G>T(p. R778L)纯合突变;b: 第 8 外显子 c. 2333G>T(p. R778L)杂合突变;c: 第 8 外显子 c. 2332C>T(p. R778W)杂合突变;d: 第 13 外显子 c. 2975C>T(p. P992L)杂合突变;e: 第 13 外显子 c. 2975C>T (p. P992L)纯合突变

13 外显子 p. P992L 杂合突变,其父亲为 p. P992L 杂合突变的携带者,母亲未检出突变。另有 1 个家系的 2 例患者及其父母亲各外显子均未检出突变。三胞胎 WD 家系的同胞兄弟姐妹 3 人及其母亲均检出第 13 外显子 p. P992L 杂合突变,其父亲未检出突变。

3 讨论

研究者发现,即使是突变类型相同的 WD 患者,其临床表型也可能迥然不同,提示 WD 的临床表型也与环境等非遗传因素有关^[13-14]。

同患 WD 的双生子为研究本病的基因型与表型的对应关系提供了最好的素材。Senzolo 等^[15]报道了 1 个同卵双生双胞胎家系,2 例患者均具有 *ATP7B* 基因 p. A1183G/p. R1319X 的复合杂合突变。其中 1 例患者表现为肝硬化等肝损伤症状和锥体外系症状,接受肝移植后病情明显改善,锥体外系症状消失;另 1 例患者则肝损伤症状明显,曾 2 次出现食管胃底静脉曲张破裂出血,并伴有重度神经精神症状,行肝移植治疗后症状无改善,并于 2 个月后死亡。研究者认为,除 *ATP7B* 基因特定的突变类型外,其他未知的基因突变以及环境、药物或病毒感染等非遗传因素亦可能导致具有相同遗传背景的双胞胎患者具有完全不同的临床表现。

Czlonkowska 等^[16]报道了 2 个双胞胎 WD 家系。1 个家系的 2 人均检出 p. H1069Q/p. N404Kfs 复合杂合突变,其中 1 例患者 7 岁始出现肝损伤症状,36 岁时发展至肝硬化失代偿期并合并有明显的锥体外系症状,另 1 例随访至 39 岁仍无临床症状。另 1 个家系的 2 例患者均检出 p. H1069Q 杂合突变,1 例患者 26 岁时出现言语不清、手抖等锥体外系症状,另 1 例随访至 28 岁仍无临床症状。作者分析,除 *ATP7B* 基因突变外,后天性因素如 DNA 甲基化和组蛋白修饰差异等以及非遗传因素如生活方式和生活环境等的改变均可能参与 WD 的发病^[17-18],但两类因素相互作用的机制及其具体环节尚有待进一步明确。

目前国内仅黄素芳等^[9]曾报告 1 个双胞胎 WD 家系,其中的患病个体均为以锥体外系症状起病的脑型患者,表现为血清 CP 降低、角膜 K-F 环阳性。我们报告的 5 个双胞胎家系中,每个家系 WD 确诊患者的发病形式、临床症状和实验室检查结果基本相同(同一家系患者甚至出现了相同药物过敏的现象),其中 4 个家系的患者经 STR 分型证实为同卵双生,具有相同的遗传背景,其基因突变检测结果完全一致。异卵双生的患者虽然遗传背景有差异,但其基因突变也在同一位点。因此本组 WD 患者相同的临床表型对应相同

的基因突变检测结果,证实了遗传因素对 WD 的发病起主导作用。

已有的研究资料显示,*ATP7B* 基因第 8、12、13 外显子是中国人 WD 患者的突变热区^[19-20],本组双(多)胞胎患者的基因突变也同样位于第 8 和 13 外显子。研究表明^[21],*ATP7B* 基因第 8 外显子编码铜转运 *ATP7B* 蛋白第 4 跨膜区(Tm4),该外显子的突变可引起其编码的氨基酸极性发生改变并破坏 Tm4 区的结构。Forbes 等^[22]将 *ATP7B* cDNA 突变体瞬时转染入中国仓鼠卵巢细胞,发生 p. R778L 突变的 *ATP7B* 蛋白不能定位于高尔基体(TGN)并发生 TGN $\leftrightarrow$ 细胞质囊泡间隔的迁移障碍,而这种亚细胞功能定位障碍导致了 *ATP7B* 蛋白的铜跨膜转运障碍。第 13 外显子在编码 Tm6 的同时还编码跨膜离子通道区。因此,第 13 外显子 p. P992L 错义突变在改变编码氨基酸的极性、破坏 *ATP7B* 蛋白 Tm6 区的结构、影响 *ATP7B* 蛋白亚细胞功能定位的同时,还可能因 *ATP7B* 蛋白跨膜离子通道的结构改变直接影响铜离子的跨膜转运。但 Pro992Leu 突变影响铜代谢的具体机制尚需进一步的实验证实。

我们通过对 WD 患者的父母进行测序,发现家系 3 发生了 LOH。该家系的患者在继承其母亲携带的 p. P992L 杂合突变和父亲携带的 p. R778W 杂合突变的同时,来源于其父亲的染色体发生了二次突变,使患者成为 p. P992L 纯合子。LOH 最早见于 Knudson 等^[23]的报道,在儿童视网膜细胞瘤(retinoblastoma, RB)患者中由于体细胞有丝分裂时某个染色体发生不分裂、重组等原因而造成 13q14.1 区的等位基因丢失,也是其他多种肿瘤的发病原因。LOH 在体细胞遗传病中较少报道,国内仅马少春等^[24]报道了 1 个发生 LOH 的 WD 家系,认为体细胞二次突变是 WD 的另一种发病机制。

在我们报告的 1 个三胞胎 WD 家系中,尽管在 3 名患者的 *ATP7B* 基因均检测到了相同的突变,但其临床表型完全不同:1 人为典型的 WD 患者,1 人为无症状的临床型 WD 患者,另 1 人则为正常人。在已有的大样本 WD 基因突变的研究中,仅有 80% 左右的确诊患者在 *ATP7B* 基因的编码区能检测到突变^[25]。有研究者推测,这些患者在非编码区(内含子或调控区)可能存在未知突变。由于在患者的父亲的编码区未检测到突变,我们推测其父亲可能存在非外显子区的致病突变,导致这个三胞胎的家系成员的遗传背景并不相同(5-1 和 5-2 可能为复合杂合突变,而 5-3 可能为 p. P992L 杂合突变的杂合子)而出现完全不同的临床表型,但其具体原因尚有待进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] Ala A, Walker AP, Ashkan K, et al. Wilson's disease. *Lancet*, 2007, 369: 397-408.
- [2] Hu WB, Han YZ, Xue BC, et al. Epidemiological investigation on hepatolenticular degeneration in Hanshan county, Anhui province. *Natl Med J China*, 2011, 91: 894-897. [胡文彬, 韩咏竹, 薛本春, 等. 安徽省含山县肝豆状核变性的流行病学调查研究. *中华医学杂志*, 2011, 91: 894-897.]
- [3] Riordan SM, Williams R. The Wilson's disease gene and phenotypic diversity. *J Hepatol*, 2001, 34: 165-171.
- [4] Gromadzka G, Schmidt HH, Genschel J, et al. Frameshift and nonsense mutations in the gene for ATPase7B are associated with severe impairment of copper metabolism and with an early clinical manifestation of Wilson's disease. *Clin Genet*, 2005, 68: 524-532.
- [5] Gromadzka G, Schmidt HH, Genschel J, et al. p. H1069Q mutation in ATP7B and biochemical parameters of copper metabolism and clinical manifestation of Wilson's disease. *Mov Disord*, 2006, 21: 245-248.
- [6] Cz? onkowska A, Rodo M, Gromadzka G. Late onset Wilson's disease; therapeutic implications. *Mov Disord*, 2008, 23: 896-898.
- [7] Migeon BR, Dunn MA, Thomas G, et al. Studies of X inactivation and isodisomy in twins provide further evidence that the X chromosome is not involved in Rett syndrome. *Am J Hum Genet*, 1995, 56: 647-653.
- [8] Munar-Que's M, Pedrosa JL, Coelho T, et al. Two pairs of proven monozygotic twins discordant for familial amyloid neuropathy (FAP) TTRMet 30. *J Med Genet*, 1999, 36: 629-632.
- [9] Huang SF, Wang W, Hu MY. Twins with Wilson's disease. *Chin J Contemp Pediatr*, 2003, 5: 382. [黄素芳, 王伟, 胡孟瑛. 双胞胎同患 Wilson 病. *中国当代儿科杂志*, 2003, 5: 382.]
- [10] Liang XL, Yang RM, Wu ZY, et al. Guidelines of diagnosis and treatment of hepatolenticular degeneration. *Chin J Neurol*, 2008, 41: 566-569. [梁秀龄, 杨任民, 吴志英, 等. 肝豆状核变性的诊断与治疗指南. *中华神经科杂志*, 2008, 41: 566-569.]
- [11] Roberts EA, Schilsky ML. Diagnosis and treatment of Wilson disease: An update. *Hepatology*, 2008, 47: 2089-2111.
- [12] Lam CW, Mak CM. Allele dropout in PCR-based diagnosis of Wilson disease: mechanisms and solutions. *Clin Chem*, 2006, 52: 517-520.
- [13] Bonne-Tamir B, Frydman M, Agger MS, et al. Wilson's disease in Israel: a genetic and epidemiological study. *Ann Hum Genet*, 1990, 54(Pt 2): 155-168.
- [14] Gupta A, Chattopadhyay I, Dey S, et al. Molecular pathogenesis of Wilson disease among Indians: A perspective on mutation spectrum in ATP7B gene, prevalent defects, clinical heterogeneity and implication towards diagnosis. *Cell Mol Neurobiol*, 2007, 27: 1023-1033.
- [15] Senzolo M, Loreno M, Fagioli S, et al. Different neurological outcome of liver transplantation for Wilson's disease in two homozygotic twins. *Clin Neurol Neurosurg*, 2007, 109: 71-75.
- [16] Cz? onkowska A, Gromadzka G, Chabik G. Monozygotic female twins discordant for phenotype of Wilson's disease. *Mov Disord*, 2009, 24: 1066-1069.
- [17] Machin GA. Some causes of genotypic and phenotypic discordance in monozygotic twin pairs. *Am J Med Genet*, 1996, 61: 216-228.
- [18] Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, et al. Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102: 10604-10609.
- [19] Xu YF, Fan YX, Yu L, et al. Identification of a mutation hotspot in exon 8 of Wilson's disease gene by cycle sequencing. *Chin J Med Genet*, 1998; 15: 284-287. [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. *中华医学遗传学杂志*, 1998; 15: 284-287.]
- [20] Cheng N, Lu BX, Du YG, et al. Rapid detection of high frequency mutational sites of Chinese Wilson's disease gene. *J Apoplexy Nervous Dis*, 2009, 26: 414-417. [程楠, 陆兵勋, 杜益刚, 等. 中国人 Wilson 病患者基因高频突变位点的快速检测. *中风与神经疾病杂志*, 2009, 26: 414-417.]
- [21] Terada K, Schilsky M, Miura N, et al. ATP7B (WND) protein. *Int J Biochem Cell Biol*, 1998, 30: 1063-1067.
- [22] Forbes JR, Cox DW. Copper-independent trafficking of Wilson disease mutant ATP7B proteins. *Hum Mol Genet*, 2000; 9: 1927-1935.
- [23] Knudson AG Jr. Mutation and cancer; Statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1971, 68: 820-823.
- [24] Ma SC, Ni XQ, Xu PY, et al. Loss of heterozygosity in a patient's family with Wilson's disease and probable mechanism. *Hereditas*, 1999, 20: 11-14. [马少春, 倪星群, 徐评议, 等. 肝豆状核变性类似杂合丢失现象的报告及可能机制探讨. *遗传*, 1999, 20: 11-14.]
- [25] Vrabelova S, Letocha O, Borsky M, et al. Mutation analysis of the ATP7B gene and genotype/phenotype correlation in 227 patients with Wilson disease. *Mol Genet Metab*, 2005; 86: 277-285.

(收稿日期: 2012-10-16)

(本文编辑 李岭)