

研究成果

肝豆状核变性分子生物学研究

徐评议, 梁秀龄, 马少春, 王丽娟, 刘焯霖

(中山医科大学附属第一医院神经科, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】探讨中国人肝豆状核变性(WD)的分子发病机制和基因诊断的方法。【方法】应用基因工程技术对 WD 进行了 10 年的分子生物学研究。【结果】①WD 的基因定位研究: 通过 RFLP 及微卫星多态性分析, 应用两位点及多位点连锁软件, 建立了中国人 WD 基因在 $D_{13q}^{14.2-3}$ 区域的精细遗传连锁图谱, 从而首次对中国人 WD 基因进行了精确定位; ②WD 基因突变研究: 应用 PCR-SSCP 及 DNA 测序技术, 对 39 个家系 45 名 WD 患者进行该致病基因的 21 个外显子突变筛选, 发现 WD 基因 5 号外显子存在新的 T 插入突变, 并证实中国人 WD 基因的突变热点为 8 号外显子, 突变形式为 Arg778Leu, 其频率为 22.8%; ③WD 的症状前诊断和杂合子检出: 应用 DNA 重组技术对 79 个家系进行基因诊断, 成功地进行了 WD 的症状前诊断和杂合子检出, 并建立了 WD 的基因筛选的 PCR-*Msp* I 酶切方法。【结论】中国人 WD 基因定位与白种人基本相同, 但基因突变热点不同, 其发病机制存在差异, 从而基因诊断的方法也不同。

关键词: 肝豆状核变性/遗传学; 分子生物学; 基因突变; 肝豆状核变性/诊断

中图分类号: R742.4 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2001)01-0001-04

The Molecular Biological Study of Hepatolenticular Degeneration

XU Ping-yi, LIANG Xiu-ling, MA Shao-chun, WANG Li-juan, LIU Zhuo-lin

(Department of Neurology, First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】To investigate the molecular basis of hepatolenticular degeneration (Wilson disease, WD) and to attempt to construct the feasibility of gene diagnosis in the disease. 【Methods】We have performed the molecular biological study on this disease for 10 years by molecular genetic techniques. 【Results】①Location of WD gene in Chinese: Using pairwise linkage analysis and multipoint linkage analysis method, we constructed a genetic map of DNA markers within $D_{13q}^{14.2-3}$ which refined the location of WD gene by restriction fragment length polymorphism (RFLP) and microsatellite polymorphism analysis; ②Screen for mutations of WD gene in Chinese people: we detected the structure of 21 exons of WD gene in 45 patients from 39 pedigrees by PCR-SSCP (Single strand conformation polymorphism) and PCR-DNA sequencing technology, found a new mutation in exon 5 and nucleotide sequence analysis showed it is a T insertion. We also conformed the Arg778Leu in exon 8, the highest frequency mutation point in Chinese people, with mutation rate 22.8% in total; ③Carrier detection and presymptomatic diagnosis of WD: Based on DNA recombination technology, we performed successfully the gene diagnosis in all individuals of 79 families with WD and built up a helpful specific enzyme cut method (PCR-*Msp* I) to detect the carrier and presymptomatic patients in Chinese people with WD. 【Conclusion】These results showed that the location of WD gene within $D_{13q}^{14.2-3}$ is the same in Chinese as in Caucasians, but the gene high mutation point, the gene diagnosis method and its pathogenesis are markedly different.

收稿日期: 1999-11-15

基金项目: 国家自然科学基金(39670270)、国家教委博士点基金(9503106)、卫生部重点科研基金(970567)、卫生部基金(940346)、广东省自然科学基金(950334)、广东省科委“八·五”重点攻关项目基金(930213)资助。成果获 1999 年卫生部科技进步一等奖、1999 年国家教委科技进步一等奖、1999 年广东省科技进步二等奖及 1999 年广东省医学卫生科技进步一等奖

作者简介: 徐评议(1964-), 男, 江西临川人, 博士, 副教授; 梁秀龄(1931-), 女, 广东中山人, 教授, 博士生导师。

Key words: hepatolenticular degeneration/genetics; molecular biology; gene mutation; hepatolenticular degeneration/diagnosis

肝豆状核变性又称 Wilson 病(WD), 是一种较常见的以铜代谢障碍为特征的常染色体隐性遗传病。本病好发于青少年, 生化特征为血清铜蓝蛋白、血清铜水平下降和 24 h 尿铜升高。由于铜蓝蛋白合成减少及胆汁排铜减少, 导致金属铜在机体各个器官, 特别是肝脏、肾脏、大脑基底节、骨、角膜和皮肤等器官的沉积, 从而引起急慢性肝损害、神经精神障碍、肾功能损害及角膜 K-F 环阳性等症状和体征。据估计, 全球该病的发病率大约为 1/2 万~1/20 万, WD 的基因频率为 0.56%, 杂合子频率为 1/100~1/200。我国尚无大资料的流行病学调查报告。据我科 1981~1992 年神经系统遗传病专科门诊 955 例统计, 该病占神经遗传病的 10.14%, 仅次于假性肥大性肌营养不良, 居第 2 位。

由于该病为可治性神经遗传病, 早期诊断及早期驱铜治疗可缓解患者的临床症状, 并改善其生活质量, 而杂合子检出是降低 WD 发病率的主要措施, 故近年来国内外相继开展了 WD 的分子生物学研究, 利用基因技术以达到早期诊断和杂合子检出的目的。我科自 70 年代末期开始 WD 的临床、生化、病理及影像学研究, 至 80 年代末进入 WD 的分子生物学研究, 近 10 年来, 在 WD 的基因定位、连锁分析、基因突变及基因诊断等研究方面取得较大进展。现与国外研究水平比较, 简介如下。

1 WD 基因定位及遗传图谱的建立

我们利用 Southern blot 印迹分子杂交技术首次系统地研究了中国人人群中 5 个 DNA 标记在 *Bam*H1、*Taq* 1、*Rsa* 1、*Ran* II 及 *Apa* 1 等酶切位点的等位基因频率及杂合率, 其中 $P^{68RS2.0}/Rsa$ 1、 $D_{13}S_{306}$ 、 S_{59}/Bam H1、ESD-cDNA/*Apal*、*RB1* 基因 $P^{123M1.8}/Bam$ H1 的多态性属国内首次报道^[1~5]。在国内首次应用 *RB1* 基因 5' 端第一个内含子 $P^{123M1.8}/Bam$ H1 对 75 例无亲缘关系的正常个体进行 DNA 多态性分析, 发现 4.4 kb、2.3 kb、2.1 kb 3 条带, 其中 2.3 kb、2.1 kb 两条片段同时出现, 其基因频率分别为: 4.4 kb(47.3%)、2.3 kb+2.1 kb(52.7%), 其杂合子频率为 52%, 多态信

息含量较高, 适于作遗传标记。对 9 个完整的 WD 家系进行连锁分析, 通过两位点连锁分析软件, 发现 *RB1* 基因 $P^{123M1.8}/Bam$ H1 标记与 WD 基因位点存在紧密连锁关系 ($\theta = 0.05$, Lod Score = 3.847)^[6~9]。

用 *Taq* 1 酶切人类基因组 DNA, $D_{13}S_{31}$ 位点 P^{CR1324} 探针杂交后出现两条等位片段, 其长度分别为 6.7 kb、4.6 kb。我们检测了 150 条无亲缘关系的正常个体的染色体, 结果显示 6.7 kb 等位片段的频率为 0.46, 4.6 kb 等位片段的频率为 0.54, 杂合子频率为 0.53。用两位点连锁分析发现 $D_{13}S_{31}$ 位点与 WD 基因位点存在紧密连锁关系 ($\theta = 0.02$, Lod Score = 5.74), $D_{13}S_{31}$ 位点与 *RB1* 基因位点也存在紧密连锁关系 ($\theta = 0.05$, Lod Score = 3.296)。用多位点连锁分析软件进行排序, 确定了 WD 基因位点定位于 $D_{13}q^{14.2-3}$ 区域, 其遗传图谱为: 着丝点—*RB1*— $D_{13}S_{31}$ —WD^[10, 11]。

2 微卫星 DNA 多态性及与 WD 基因的连锁关系

为了进一步对中国人 WD 基因进行更系统、更精确的定位, 我们应用 AFLP-PAGE (Amp-FLP polyacrylamid gel electrophoresis, 扩增片段长度多态性) 技术对 22 个 WD 家系 113 名成员及 100 名正常对照组成员的 DNA 基因组进行了 5 个 STR (short tandem repeat) PCR 分析, 其 5 个微卫星 DNA 标记分别为 AFM238vc3、AFM084xc5、 $D_{13}S_{316}$ 、 $D_{13}S_{296}$, 其等位基因数分别为 21、17、14、19、18, 比国外相应报道的 9、8、10、9、11 为多, 等位基因片段频率及长度也不相同。概论比较分析发现: 5 个 STR 位点的等位片段中, 两个相等等位基因的概率 P_2 平均为 0.0152; 两个都不相等等位基因概率 P_3 为 0.7126; 一个等位基因相同的概率 P_1 为 0.2272; 父权排除率 P_e 平均为 0.7143; 个体识别力 D_p 平均为 0.9848; PIC (polymorphism information content) 平均为 0.9141; 杂合率平均为 0.916, 远高于国外报道的 0.744, 其 H-R 平衡吻合度检测显示 5 个多态位点等位基因频率在正常人群中符合 H-R 平衡分布, 显示每个微卫星 DNA 标记具有较高

的个体识别力和父权排除率,适合作为WD基因分析的遗传标记^[12~13]。

应用LINKAGE软件中的MLINK软件对22个WD家系进行两位点连锁分析,发现WD位点与D₁₃S₃₀₁存在紧密连锁关系($\theta=0.07$, $Z_{\max}=3.457$);与D₁₃S₃₁₆($\theta=0.1$, $Z_{\max}=2.314$)及D₁₃S₂₉₆($\theta=0.1$, $Z_{\max}=1.503$)也存在紧密连锁关系;与AFM238vc3位点($Z_{\max}=0.053$, $\theta=0.4$)和AFM084xc5位点($\theta=0.2$, $Z_{\max}=0.315$)存在连锁关系。采用LINKMAP软件进行多位点连锁分析并进行位点排序发现:当一组排序为AFM238vc3-D₁₃S₃₀₁-WD-D₁₃S₃₁₆-D₁₃S₂₉₆时,总Lod Scores值达峰值,为3.010;另一组排序为D₁₃S₃₀₁-D₁₃S₃₁₆-WD-D₁₃S₂₉₆-AFM084xc5时,总Lod Scores值也达峰值,为2.398,故确定AFM084xc5位于D₁₃S₂₉₆远侧。综合两组排序结果,可以精确地推测WD基因与5个微卫星位点之间的精细遗传图谱为:着丝点-AFM238vc3-D₁₃S₃₀₁-WD-D₁₃S₃₁₆-D₁₃S₂₉₆-AFM084xc5-端粒,这个结果较RFLP的基因定位更精确,从而对中国人WD基因进行了精确定位,有利于WD基因克隆。根据连锁分析结果,对与WD基因紧密或中度连锁的5个微卫星DNA标记位点进行连锁不平衡分析,发现D₁₃S₃₀₁的“1、3、6、8”、D₁₃S₃₁₆的“3、7”、D₁₃S₂₉₆的“6、10”、AFM238vc3的“1、3”和AFM084xc5的“5”等几个等位基因片段与WD基因位点存在明显的连锁不平衡性,其相对危险度为 9.75 ± 7.65 , $P < 0.05$,提示其为疾病的危险因素,其病因分数为 0.250 ± 0.081 ,其疾病预防分数为 0.0226 ± 0.032 ^[19~20]。

3 WD基因突变研究

WD基因由21个外显子和20个内含子组成,编码1444个氨基酸组成的P型ATP酶(ATP7B),生理功能是从铜离子活化。国外报道WD基因存在134种突变类型,其中错义或无义突变81种,31种为小缺失,7种小插入,3种调节基因突变,1种插入和缺失同时存在,以及9种剪接突变和2种大片段缺失。白种人WD基因的突变热点为14、18号外显子,频率分别为28%和10%,以点突变为主,累及的是ATP酶功能区,而非离子通道区。我国台湾学者也在1996年报道22个家系存在8号外显子G₂₂₇₃T置换(27%)。我们在国内首次应用PCR-SSCP及PCR-DNA测序技术对39个WD

家系45名患者进行12个外显子结构分析,首次在国际上发现中国人WD基因5号外显子在4例患者中存在明显异常,DNA测序表明这是一种新的T插入突变,导致密码子顺序发生改变,突变频率为8.89%,与白种人WD基因的突变形式明显不同^[14~16]。8号外显子的突变研究表明,该外显子在39个家系45名患者中存在多个泳动异常,DNA测序发现其存在770密码子(2250位)C-G同义突变和778密码子(2273位)G-C错义突变,即Arg778Leu改变,基因突变频率为22.8%。对45名患者进行限制性内切酶Msp I酶切分析,发现了2例WD纯合子和11例杂合子,从而证实8号外显子突变是中国人WD基因突变的热点^[17,18]。另外,1个家系的DNA测序结果表明,其父亲为杂合子,母亲为正常人,而患者为Arg778Leu突变的纯合子,亲子鉴定为紧密的血缘关系,从而推测该家系中可能存在杂合丢失现象(LOH现象),推测LOH现象也可能存在于非肿瘤细胞之外,也可能是体细胞遗传疾病的发病机制之一,从而进一步证实WD存在遗传异质性^[17]。

4 WD症状前诊断和杂合子检出

1994年我们联合应用P^{68RS2.0}、P^{123M1.8}、D₁₃S₃₁三个位点探针对18个WD家系99名成员进行RFLP连锁分析,在45名未发病的同胞中获得连锁分析信息者33名,占73.3%,其中确定WD症状前患者6名,正常野生型10名,肯定杂合子17名,占37.8%,另外12名同胞未获得确诊,占26.7%。这些结果在80%可信限度内,提示RFLP连锁分析对WD的基因检测仍存在局限性,而且在分析过程中需要较大家系^[6,9]。

1995年我们利用5个微卫星标记(FM238vc3、AFM084xc5、D₁₃S₃₀₁、D₁₃S₃₁₆、D₁₃S₂₉₆)联合对22个家系进行AFLP-PAGE单倍体连锁分析,均获得连锁分析信息(100%),在33名WD患者的未患同胞中有29例可获得准确的基因诊断,占87.8%。其中症状前患者4名,占12.1%,杂合子8例,占24.4%,正常人17例,占51.5%。另4例获得倾向性诊断,占12.1%,其中可疑症状前患者2例,可疑杂合子2例^[12,16]。

1997年以来,我们在发现8号外显子778密码子突变为中国人WD患者基因高频突变热点的

基础上,首次针对该突变点设计了酶切技术,建立了PCR-*Msp* 1酶切基因诊断法。在45名来自39个WD家系的未患同胞中检出11名杂合子,2名纯合子,酶切阳性率28.8%。该方法简单、快速,不需要连锁分析,目前国内未见报道^[5]。

1999年,我们首次应用最先进的荧光PCR-*Msp* 1酶切基因诊断法对58个家系66名患者进行分析,发现5例突变纯合子,21例复合型杂合子,其余40例患者在此位点未发现突变。该位点纯合子及杂合子的突变频率分别为7.58%和31.82%,共39.40%,显示荧光PCR检测率较以往的检测方法明显提高。在此基础上,我们检测了与患者有血缘关系的55名未发病同胞,结果发现12名无症状致病基因携带者,占21.8%。另外,在1个WD家系中,还发现WD患者体细胞存在该基因8号外显子778密码子突变纯合子与杂合子的嵌合体,其形式为该患者WD基因8号外显子既存在纯合状态的2250G→G(位于770密码子,为同义突变),还存在2273G→T(位于778密码子,为错义突变)纯合子与杂合子的嵌合体,亦即部分纯合子^[16]。

我们的研究结果表明,本成果在制定中国人的WD基因精细遗传图谱的基础上,通过PCR-SSCP及PCR-DNA测序技术分析中国人WD基因的内部结构,发现WD基因的遗传顺序结构与白种人基本相同,但其DNA标记的多态性及频率与白种人有明显的差异。进一步分析表明,WD基因在中国人中的突变热点为5、8号外显子,其突变形式与白种人明显不同,从而为中国人的WD的发病率为何远高于白种人这个长期悬而未决的问题在分子水平上作出了合理的解释。在此基础上利用RFLP及微卫星DNA多态性成功地开展了WD的基因筛查,并取得较好的成果,为WD的早期诊断和杂合子的检测作出了贡献,并利用5、8号外显子高频突变点开展快速、有效的PCR-*Msp* 1酶切技术,为WD基因筛查在临床常规开展奠定了基础。

参考文献:

- [1] 徐评议,梁秀龄,刘焯霖. Rb1基因位点P^{123M1.8}多态性的建立及其在Wilson's病中的连锁关系[J]. 中华医学遗传学杂志, 1995, 12(4): 193.
- [2] 王丽娟,梁秀龄,徐评议. 应用PCR-SSCP技术检测肝豆状核变性基因突变及多态[J]. 中华神经科杂志, 1997, 30(1): 8.
- [3] 徐评议,梁秀龄,马少春. Wilson's病家系基因突变分

析[J]. 中华医学遗传杂志, 1999, 15(2): 88.

- [4] 徐评议,梁秀龄. 应用PCR-SSCP法对Wilson's病基因进行突变分析研究[J]. 中华神经科杂志, 1999, 12(4): 37.
- [5] 梁秀龄,徐评议. Wilson's病外显子基因突变的检测及初步的基因诊断方法的建立[J]. 中华神经科杂志, 1999, 12(4): 12.
- [6] 徐评议,梁秀龄,刘焯霖. 用P^{68SRS2.0}标记多态性对Wilson's病的早期诊断及杂合子的检测[J]. 中山医科大学学报, 1996, 17(1): 12.
- [7] 徐评议,梁秀龄,刘焯霖. 中国人W₁₃S₃₁位点多态性及与肝豆状核变性的连锁关系[J]. 中山医科大学学报, 1995, 16(1): 17.
- [8] 徐评议,梁秀龄,刘焯霖. 肝豆状核变性基因连锁图谱的研究[J]. 中山医科大学学报, 1995, 16(Suppl): 15.
- [9] 徐评议,梁秀龄,刘焯霖. Wilson's病基因连锁分析及早期诊断和杂合子检出[J]. 中国神经精神疾病杂志, 1996, 22(2): 69.
- [10] 徐评议,梁秀龄,刘焯霖. 肝豆状核变性RFLP连锁分析的建立及症状前诊断和杂合子检出的研究[J]. 中国神经精神疾病杂志, 1994, 20(6): 325.
- [11] 徐评议,梁秀龄,刘焯霖. 肝豆状核变性基因诊断的研究[J]. 当代医师, 1996, 1(2): 5.
- [12] 王丽娟,徐评议,梁秀龄. Wilson's病与微卫星DNA连锁分析[J]. 中国神经精神疾病杂志, 1998, 24(4): 205.
- [13] 王丽娟,梁秀龄,徐评议. 应用微卫星DNA单体型检测Wilson病症状前患者及杂合子[J]. 中华医学遗传学杂志, 1998, 5(4): 241.
- [14] 马少春,徐评议,梁秀龄. 肝豆状核变性8号14号外显子基因突变的检测[J]. 中山医科大学学报, 1998, 19(1): 14.
- [15] 徐评议,梁秀龄. 肝豆状核变性基因突变研究[J]. 中国神经精神疾病杂志, 1998, 24(1): 12.
- [16] 马少春,梁秀龄,徐评议. 肝豆状核变性8号外显子778密码子基因突变的酶切检测[J]. 中国神经精神杂志, 1998, 24(6): 233.
- [17] 马少春,梁秀龄,徐评议. 肝豆状核变性杂合丢失现象的报告及可能机制探讨[J]. 遗传(北京), 1999, 20(3): 17.
- [18] 徐评议,梁秀龄,马少春. Wilson's病exon 5, exon 8突变检测[J]. 中山医科大学学报, 1999, 20(2): 12.
- [19] 王丽娟,梁秀龄,徐评议. 中国人群AFM238vc3基因多态性及Wilson's病基因诊断价值的研究[J]. 临床神经病学杂志, 1999, 12(1): 28.
- [20] 王丽娟,梁秀龄,徐评议. 中国人群AFM084xc基因多态性及Wilson's病基因诊断价值的研究[J]. 临床神经病学杂志, 1999, 12(5): 274.

(编辑 刘清海)