

肝豆状核变性 8 号 14 号外显子基因突变的检测^①

马少春 梁秀龄 徐评议 王丽娟

(中山医科大学附属第一医院神经内科; 广州, 510080)

摘要 目的: 筛选中国人肝豆状核变性的高频突变点。方法: 对中国人肝豆状核变性 39 个家系 45 个患者的 8 号、14 号外显子进行 PCR-SSCP 筛选, 对有异常者进行序列分析(放射自显影), 并通过该突变点的酶切再次筛选。结果: Exon 8 发现有 3 个泳动异常, 两个为多态现象, 对 1 例明显异常者序列分析表明: ①患者的序列发现同义突变 C₂₂₅₀→G, 错义突变 G₂₂₇₃→T 发生 Arg778 Leu, 引起功能缺失。患者上述两个突变同时存在。②患者父亲在 2250 位点 C 及 G 碱基同时存在, 在 2273 位点 G 及 T 碱基同时存在。③发现患者为纯合子, 其父为杂合子, 母亲为正常序列。针对 Arg778 Leu 突变在所有病人中进行酶切, 发现 2 例纯合子占病人总数 4.4%, 11 例杂合子占 24.4%。酶切的阳性率为 28.8%。结论: 本结果支持 8 号外显子 778 密码子作为中国人肝豆状核变性的高频突变点。本研究中出现类似杂合性丢失(LOH)现象, 提示 LOH 现象可能发生在除肿瘤之外的其他遗传疾病中。Exon 14 未见异常, 与欧洲人明显不同。

关键词 肝豆状核变性/遗传学; 基因突变; 外显子

中图分类号 R 742.4

SCREEN FOR GENE MUTATIONS IN EXON 8 AND 14 OF WILSON DISEASE WITH CHINESE PATIENTS

Ma Shaochun Liang Xiuling Xu Pingyi Wang Lijuan

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

Abstract Objective: Screen for high frequency of gene mutation in Chinese patients with Wilson disease. **Methods:** PCR-SSCP was used to screen in exon 8 and 14 with 45 Wilson disease patients in 39 Chinese families and 10 were normal controls; nucleotide sequence analysis by autoradiograph and restriction enzyme digest to the mutate point were carried out. **Results:** 3 mobility shifts with exon 8 were found, but only one mobility shift was affirmed by families analysis of SSCP. There was one missense mutation Arg778 Leu and one same sense mutation C₂₂₅₀→G at the patient. Arg778 Leu mutation point were digested by restriction enzyme *Msp* I at all patients; homozygous patients was 4.4%, heterozygous patients was 24.4%. The authors had not found any abnormal with exon 14. **Conclusions:** The result supports the viewpoint that the high frequency of mutation in Chinese patients with Wilson disease is 778 codon of exon 8. No abnormal was found in exon 14, it is very different with Europe patients. Meantime, the authors found a loss of heterozygosity (LOH) in a family with Wilson disease. This suggested that LOH might happen in other hereditary disease besides tumor and cancer.

Subject headings hepatolenticular degeneration/genetics; gene mutation; exons

肝豆状核变性(Wilson disease, WD)是常染色体隐性遗传性疾病, 以铜代谢障碍为特征, 引起相应的临床症状。近年来国内外学者利用分子生物

学的技术, 对该病基因进行连锁分析, 确定该基因位于 13q14.3 区^[1]。1993 年多位学者报道该基因表达产物为一铜转运 ATP 酶, 并对其外显子序列、

2.2 基因突变的序列分析(放射自显影)

将上述家系的患者、患者父亲、母亲、祖父及 1 例正常人的 Exon 8 测序, 并与 GENE BANK 中的 ATP7B 基因序列对比发现如图 2 所示: ①在患者的序列分析中发现: 2250 位点发生 C → G 突变, 即发生在 770 codon 上, 但是并未改变氨基酸的序列, 突变后仍然表达为 Leu, 故此突变为同义突变; 在 2273 位点发现 G → T, 发生 Arg778 Leu 突变, 引

起该基因表达产物的变化, 引起功能缺失。患者上述两个突变同时存在。②患者父亲的序列分析发现在 2250 位点, C 及 G 碱基同时存在于同一位置, 在 2273 位点, G 及 T 碱基同时存在于同一位置。③患者祖父的序列与患者父亲完全相同。④患者祖母、外祖父、外祖母、母亲、妹妹均示正常序列。上述结果结合 SSCP 结果, 不难看出患者属纯合子, 其父为杂合子, 母亲为正常。

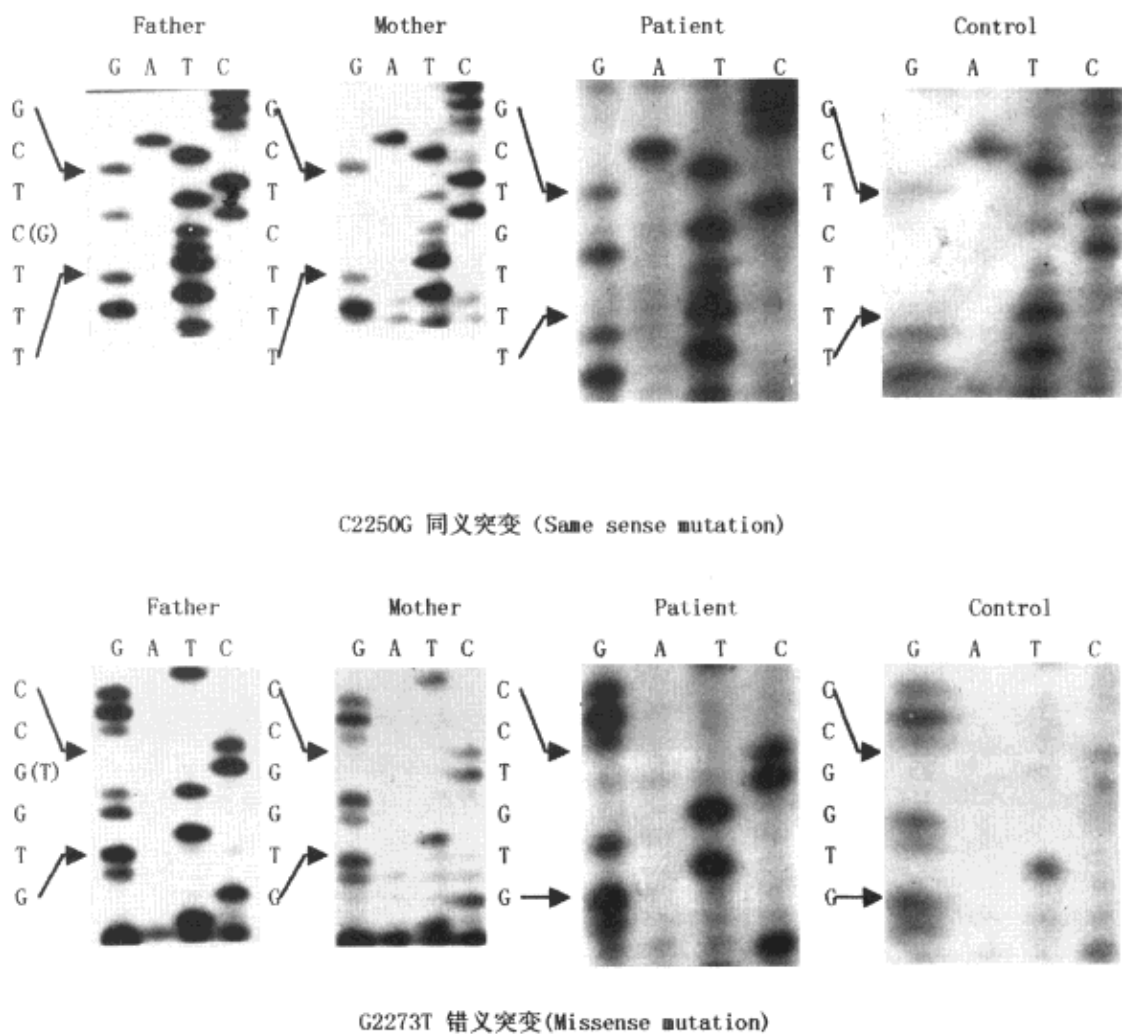


图 2 放射自显影序列分析

Fig. 2 Sequence analysis by autoradiograph

2.3 限制性内切酶 *Msp* I 消化

如图 3 所示结果, 共发现 2 个纯合子, 酶切后其 PCR 产物没有发生变化, 占 4.4%。发现 11 例杂合子, 酶切后出现 2 条带(理论上应该为 3 条, 但其中最长的 1 条已跑出胶带), 两条的颜色深浅相近, 占 24.4%。其余患者均表现为切开, 个别在原

PCR 产物位置也有 1 条颜色极浅的带, 可能是酶切不完全所致。

在本研究中发现 Exon 8 的 Arg778 Leu 突变占 4.4%(2/45), 杂合子占 24.4%, 而该突变点的酶切阳性率为 28.8%。

- morphism and its association with lung cancer and smoking. *Pharmacogenetics*, 1995, 5(4): 199
- 10 Rosvold E A, McGlynn K A, Lustbader E D. Redetection of a point mutation in NQO1 (DT-diaphorase) in a patient with colon cancer. *J Natl Cancer Inst*, 1995, 87: 1802
(1997-07-19 收稿 1997-10-07 修回)

(上接第 17 页)

参 考 文 献

- 1 梁秀龄, 刘焯霖, 陈 嵘, 等. 肝豆状核变性的系列研究. *中山医科大学学报*, 1996, 17(3): 161
- 2 Bull P C, Thomas G R, Rommens J M, *et al.* The Wilson disease gene is a putative copper transporting P-type ATPase similar to the Menkes gene. *Nature Genet*, 1993, 5: 327
- 3 Tanzi R E, Petrukhin K, Chernov I, *et al.* The Wilson disease gene is a copper transporting ATPase with homology to the Menkes disease gene. *Nature Genet*, 1993, 5: 344
- 4 Petrukhin K, Fischer S G, Pirastu M, *et al.* Mapping, cloning and genetic characterization of the region containing the Wilson disease gene. *Nature Genet*, 1993, 5: 338
- 5 Thomas G R, Forbes J R, Roberts E A, *et al.* The Wilson disease gene: Spectrum of mutations and their consequences. *Nature Genet*, 1995a, 9: 210
- 6 Chuang L M, Wu H P, Jang M H, *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 Knudson A G. Mutation and cancer: Statistical study of retinoblastoma. *Proc Nat Acad Sci*, 1971, 68: 820
- 8 Thomas G R, Roberts E A, Walshe J M, *et al.* Haplotypes and mutations in Wilson disease. *Am J Hum Genet*, 1995, 56: 1315
- 9 Guptan P K, Shao C, Zhu Y, *et al.* Loss of heterozygosity analysis in a human fibrosarcoma cell line. *Cytogenet Cell Genet*, 1997, 76: 214
- 10 Scheffer H, Kema I P, Kondo I, *et al.* Localization at a subband level of polymorphic 13q14 DNA probes for diagnosis of hereditary retinoblastoma and Wilson disease. *Hum Genet*, 1987, 77: 335
(1997-10-31 收稿 1997-12-01 修回)

(上接第 22 页)

- 6 Aghajanian G K. Modulation of a transient outward current in serotonergic neurons by alpha-adrenoceptors. *Nature (London)*, 1985, 315: 501
- 7 Halliwell J V, Othman I B, Pelchem-Matteus A, *et al.* Central actions of dendrotoxin: selective reduction of a transient K conductance in hippocampus and binding to localized receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986, 83: 493
- 8 Loo D T, Copani A, Pike C J, *et al.* Apoptosis is induced by beta-amyloid in cultured central nervous system neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 7951
- 9 Rene E, Etsuro I, Christopher S K, *et al.* Soluble beta-amyloid induction of Alzheimer's phenotype for human fibroblast K⁺ channels. *Science*, 1994, 264: 276
- 10 Brorson J R, Bindokas V P, Iwama T, *et al.* The Ca²⁺ influx induced by beta-amyloid peptide 25 ~ 35 in cultured hippocampal neurons results from network excitation. *J Neurobiol*, 1995, 26(3): 325
(1997-04-24 收稿 1997-11-06 修回)

功能区域、突变位点等进行了深入研究^[2-3],目前已有将近95种突变类型被发现,但对亚洲人特别是中国人的该病基因突变类型报道甚少,1995年由Thomas^[5]等报道中发现3例香港人中Arg778Leu突变,1996年台湾学者^[6]报道在此位点发现2个突变类型:Arg778Leu和Arg778Gln,突变率分别为11.4%和9.1%。Thomas^[5]也发现欧洲人中以14号外显子突变率较高,接近30%。因此,我们对8、14号外显子在39个WD家系共45个病人及10例正常人中进行基因突变的检测,以分析中国人中的高频突变点。

1 材料与方法

1.1 临床资料

WD患者经中山医科大学附属第一医院神经内科确诊,具有典型的症状和体征,角膜K-F环阳性以及血清铜蓝蛋白和血清铜水平低下,24h尿铜含量增高,同时患者父母兄弟姐妹甚至其祖父母、外祖父母等均全面采集。正常对照在神经内科门诊采集共10例。

1.2 DNA标本的提取

取10 mL静脉血,常规酚-氯仿DNA标本提取方法提取。

1.3 PCR扩增反应

引物由本实验室合成,引物序列与Thomas等报道一致。

Exon 8引物序列:Primer 1: AACCGTTCACGTGTC-CTTGT; Primer 2: AGGCAGCTCTTTTCTGAAC。

Exon 14引物序列:Primer 1: TCATCTGTATTGTGGTCAG; Primer 2: CAGCTAGGAGA-GAAGGACAT。

扩增条件:95℃,2 min;94℃,40 s;53℃,50 s;72℃,30 s(35循环);72℃,10 min;体积30 μL。

1.4 SSCP分析

PCR扩增产物分别为296 bp和301 bp,采用8%的非变性丙稀酰胺胶,其中加入5%的甘油,缓冲液为0.5×TBE。PCR产物5 μL加入15 μL去离子甲酰胺、溴酚蓝和二甲苯晴混合剂,97℃变性10 min,立即置冰浴中10 min,加样。电泳条件:25℃,200 V,36~48 h。电泳结束后银染。

1.5 序列分析

对SSCP异常者进行序列分析,将PCR产物作

为模板(双链DNA),经蛋白酶K处理,酚-氯仿抽提,过Sepharose 8L柱,以去除蛋白质、杂质、多余的引物和dNTP。序列分析链终止反应采用Promega公司的fmolDNA测序盒,以及α-P³²ATP(北京亚辉生物工程公司)进行标记,反应完毕94℃变性5 min,含7 mol/L尿素的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,电泳条件:室温下1800 V 3 h,放射自显影。为了清楚显示DNA片段的每1个碱基,序列分析有时重复从两个方向进行。

1.6 限制性内切酶消化

采用Biolabs公司Msp I进行酶切,酶切位点为5'...CCGG...3'。本文中进行的酶切基因突变点为Exon 8的Arg778Leu,其处核苷酸序列为:CCGGT,突变后变为CCTGT,即第273位点发生错义突变。正常人该外显子经该酶切后,变为两个片段,分别约为256 bp和40 bp大小。突变后,该酶切位点消失。Marker采用pGEM-7Zf(+)/Hae III标记(华美公司)。采用8%的非变性丙稀酰胺胶,缓冲液为0.5×TBE。PCR产物4 μL加入20u Msp I,12 μL反应体积,37℃酶切6~8 h,加样。电泳条件:25℃,100 V,2 h。电泳结束后溴化乙锭(EB)染色2 min,置于紫外灯下观察结果。

2 结果

2.1 PCR-SSCP结果

Exon 8发现有3个泳动异常,家系分析发现有两个为多态现象,1例则表现如图1所示:患者的祖母、外祖父、外祖母、母亲、妹妹均显示正常,患者的单链位置明显与家人不同,而患者的父亲、祖父则出现4条带,其中两条与正常的位置表现相同,另外两条则与患者的两条位置相同。

Exon 14未见异常。

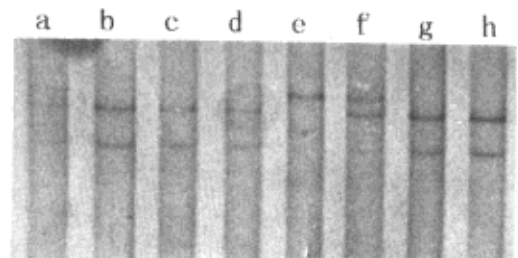


图1 PCR-SSCP结果

Fig. 1 The result of PCR-SSCP

a: Grandfather b: Grandmother c: Maternal grandfather d: Maternal grandmother e: Patient f: Father g: Mother h: Sister

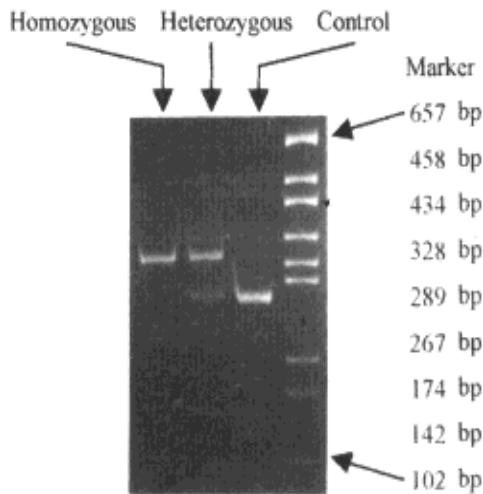


图3 酶切结果

Fig. 3 The results of restriction enzyme digestion

3 讨论

3.1 中国人中肝豆状核变性的高频突变点

1995年Thomas^[5]报道在欧洲人当中 Exon 14 突变率接近30%，主要发生 His1070Gln 突变，Exon 8 突变率为10%，主要发生 Gly1367Lys 突变，其余各外显子的突变频率均在1%~2%左右。在本研究中，Exon 14 未能发现异常，表明中国人高频突变点与欧洲人明显不同。同时，Thomas 还报道在3例中国人中发现 Arg778 Leu 突变，这是有关中国人中该病基因突变类型的首次报道。Thomas^[8] 1995年在另外的论著中再次论证了该发现。此后在众多的研究中未见同类报道，直到1996年台湾学者 Lee-Ming Chuang^[6] 等报道在台湾 WD 病人中检测的结果，其结果显示该位点发生两个类型的突变：Arg778 Leu 和 Arg778 Gln，突变率分别为11.4%和9.1%。同时他们也报道了 C2250→G 突变，但尚未证实是否与其它突变同时发生。本研究中发现2例 Arg778 Leu，占病人总数的4.4%，低于台湾学者的报道，但该突变的杂合子占患者总数24.4%，而该突变点酶切异常率为总数的28.8%。虽然在杂合子患者中该突变对患者的发病不是直接原因，但是由于突变位点的存在，使得 ATP7B 表达产物中没有活性的酶的存在，间接使该酶的总体活性减低，仍是发病的可能诱因，仍然支持8号外显子778密码子，作为中国人 WD 中高频突变点的观点。

3.2 C2250→G 突变的性质

台湾学者认为 C2250→G 是1个多态表现，但并不

未报告发生率有多少。同时，尚未见到该改变在正常人中的发生率报道。在本研究中，45个病人和10个正常人的检测中只发现这种变化1例，而且这个保守改变与 Arg778 Leu 同时存在，因此，本文作者倾向于该改变为1个同义突变的可能。那么它在本研究与 Arg778 Leu 同时出现有何意义，尚待筛选正常人中该改变的发生率之后，确定它是否为多态表现，再行讨论。

3.3 Arg778 Leu 改变与疾病的关系

Exon 8 在整个 ATP7B 基因中处于跨膜功能区(transmembrane domain)^[2~4]，该位点发生突变，导致该蛋白质的1级、2级结构发生改变，使其功能丧失，导致铜的转运在细胞膜上的停滞，最终导致患者致病。在欧洲患者中，Exon 14 突变率最高，而该外显子在 ATP7B 基因中处于磷酸化区(phosphorylation domain)和 ATP 结合区(ATP-binding domain)^[2~4]，在本研究中 Exon 14 无任何异常，提示中国患者和欧洲患者在发病的遗传学基础上有差异，但临床方面的差异尚无肯定的研究报道。

3.4 本例基因突变机制的探讨

在本研究中发现存在1例在同一外显子上的两个突变位点在父亲中均为杂合状态，母亲均为正常表现，而患者为纯合子。确认了该患者确实为其母所亲生，作者认为可以借用 RB 基因突变的2次突变理论^[7]，即杂合子性丢失(loss of heterozygosity, LOH)来解释该现象。该理论认为如果第1次突变存在于双亲之一的配子中，那么患者由于体细胞中有丝分裂时发生不分裂、重组等原因使另1条染色体丢失。从而使患者成为纯合子。该理论目前主要用来解释发生在各种癌症、肿瘤当中发生的 LOH 现象^[9]。在除肿瘤之外的疾病中很少发生 LOH 现象。在本研究中发现 WD 病人中出现类似现象，提示在除了肿瘤之外的体细胞遗传病中，2次突变理论也可能是突变发生的机制之一。即 LOH 现象也可能发生在除肿瘤之外的遗传性疾病中，但本研究仅1例报告，也可能是偶发现象。令人感兴趣的是该 RB 基因也位于13q14区。同时，有作者研究表明 RB 基因与 WD 基因密切相邻^[10]。是否该染色体该区域易发生杂合丢失现象，尚需进一步研究。有关该理论及本研究的结果已有另文讨论。

(下转第26页)