

# 中国人 Wilson 病 ATP7B 基因 Arg778Leu/Gln 点突变与中医证型的相关性研究

杨 斌<sup>△</sup> 胡纪源 洪铭范 杨任民

**内容提要** 目的 探讨中国人 Wilson 病(WD)ATP7B 基因 Arg778Leu/Gln 点突变与中医证型的关系。方法 应用 PCR 技术分别扩增 90 例 WD 患者和 30 名健康人 ATP7B 基因的第 8 外显子,其 PCR 产物行限制性内切酶 Msp I 酶切分析。90 例 WD 患者进行中医辨证分型。结果 90 例 WD 患者有 34 例 Arg778Leu/Gln 点突变,WD 患者中医辨证分型属肝风内动者 Arg778Leu/Gln 点突变占 20 例。结论 Arg778Leu/Gln 点突变组患者的发病年龄迟于未见该点突变组的患者,Arg778Leu/Gln 点突变可能与中医肝风内动证型相关。

**关键词** Wilson 病 突变 基因型 表型 中医证型

**Study on Relationship between Arg778Leu/Gln Gene Mutation Spot in ATP7B and TCM Syndrome Type in Chinese Patients with Wilson Disease** YANG Bin ,HU Ji-yuan ,HONG Ming-fan ,et al *Institute of Neurology , Anhui College of TCM , Hefei ( 230031 )*

**Objective :** To investigate the relationship between Arg778Leu/Gln gene mutation spot in ATP7B and TCM Syndrome type in Chinese patients with Wilson disease( WD). **Methods :** Exon 8 of ATP7B of 90 WD patients and 30 healthy controls were amplified by PCR and analysed by restriction enzyme Msp I , the TCM Syndrome type of the patients was differentiated at the same time. **Results :** In the 90 WD patients , 34 with Arg778Leu/Gln of exon 8 were detected , among them 20 cases belonged to the TCM Syndrome type of endogenous Liver-Wind agitation. **Conclusion :** Onset age of WD patients with Arg778Leu/Gln mutation is later than that without this mutation. Arg778Leu/Gln mutation might be related to the TCM Syndrome type of endogenous Liver-Wind agitation

**Key words** Wilson disease , mutation , gene type , phenotype , TCM Syndrome type

Wilson 病(WD)是一种常染色体隐性遗传性疾病,致病基因突变致铜代谢障碍而发病。因 ATP7B 基因突变点的不同,致 ATP7B 基因产物 ATP7B 酶的结构及功能发生不同的改变,导致 WD 患者的发病年龄、铜生化检查、首发症状及中医证型亦不同。本研究探求中国人 ATP7B 基因的高频突变位点 Arg778Leu/Gln 与中医证型之间的相关性。

## 资料和方法

1 研究对象 90 例 WD 患者全部来自安徽中医学院神经病学研究所附属医院 2000 年 9~12 月住院患者,其中男 53 例,女 37 例,首次发病的平均年龄(14.57±7.67)岁。全部病例均符合 WD 诊断标准<sup>(1)</sup>。健康对照组均为无血缘关系的健康自愿者,共 30 名,其铜生化检查均在正常水平。

2 主要仪器及试剂 PCR 自动热循环仪(MJ research,美国);贝克曼超速离心机(L7-35,美国);恒压恒流电泳仪(DY-Ⅲ型,北京六一仪器厂);水平电泳槽(DY-Ⅲ型,北京六一仪器厂);Complete Gel Documentation & Analysis system(GDS8000,英国);TaqDNA 聚合酶(Promega,美国);限制性内切酶 Msp I (Promega,美国);PCR 引物(上海植物生物研究所)。

3 人类基因组 DNA 的提取 参照 Miller 等<sup>(2)</sup>介绍的盐析法提取。

4 PCR 扩增第 8 外显子 根据 Thomas 等<sup>(3)</sup>报道的第 8 外显子 PCR 扩增的引物序列及反应条件进行。

5 Msp I 酶切分析第 8 外显子的 PCR 产物 根据 Msp I 产品说明,设计每份样品的酶切条件进行酶切后,酶切产物采用 2.0% 琼脂糖凝胶电泳。电泳结束后,紫外灯上观察,判断结果。

6 中医辨证 根据中医分型标准<sup>(4)</sup>结合 WD 患者临床表现的特点,分为 3 型(1)痰湿内阻:临床以胸

安徽中医学院神经病学研究所(合肥 230031)

<sup>△</sup>现在安徽省省立儿童医院神经内科(合肥 230051)

闷脘痞、头身困重、纳呆呕恶、肌肤面目发黄、舌淡胖苔腻、脉滑为辨证要点。同时,尚有湿、痰内阻不同部位而出现相应的临床症状,如头晕目眩、神志昏蒙、精神抑郁、或胡言乱语、喜怒无常、打人毁物;或全身抽搐、口吐痰涎、两目上视;或肌肤不仁、肢体麻木、动作不灵、关节疼痛;或面目肌肤发黄、黄色晦暗如烟熏、或黄色鲜明如桔、小便短涩、大便不爽、肢体浮肿、甚至腹胀大等。(2)肝风内动:临床以肢体震颤或蠕动、关节屈伸不利、言语謇涩、急躁易怒、舌淡红少津苔白、脉弦细为辨证要点。在 WD 患者中,其肝风内动有阴虚动风、血虚动风两证。阴虚动风除上述主证外,尚有面部烘热、五心烦热、午后潮热、盗汗、咽干口燥、形体消瘦等阴虚之证;血虚动风除上述主证外,尚有头晕耳鸣、两目干涩、面白无华、爪甲不荣、拘挛急迫、肢体麻木、肌肉动。女子血虚,可见月经量少色淡,甚则闭经。(3)气血两虚:临床以头晕目眩、少气懒言、乏力自汗、面色淡白或萎黄、心悸失眠、舌淡苔白、脉沉弱为辨证要点。WD 患者因久病不愈、失治延治,终至气血两虚。除上述主证外,尚可有手足徐动、动作迟缓笨拙、步态不稳、或反应迟钝、目光呆滞、神志恍惚。后期甚则大肉已脱、卧床不起、足痿无力、步履全废。男子尚有精少不育、阳痿;女子经少色淡,甚则闭经不孕。

7 统计学方法 全部数据经 SPSS 统计软件处理,计数资料比较  $\chi^2$  检验。两样本均数比较用  $t$  检验。

### 结 果

1 第 8 外显子 PCR 产物 Msp I 酶切结果 第 8 外显子正常时仅有 1 个 Msp I 酶切位点,完全酶切可得到 237bp 和 59bp 两种片段。发生 Arg778Leu/Gln 纯合突变的患者,因两条染色体上 778 位密码子均由 CCG 突变为 CTG/CAG,使 DNA 顺序由 5'...CCGG...3'变成 5'...CT(A)GG...3',无法被 Msp I 识别,仍为单一的 296 片段。杂合突变将得到 296bp、237bp、59bp 三种片段。根据此特点,本组 90 例患者中,8 例患者判断为纯合突变,26 例患者为杂合突变,56 例患者未发生点突变。90 例 WD 患者该点突变检出率为 37.8%(34/90 例),染色体突变检出率为 23.3%(42/180 例)。

2 WD 患者 Arg778Leu/Gln 点突变与临床表现的关系 见表 1、2。第 8 外显子 Arg778Leu/Gln 点突变组患者较无该点突变组的患者发病年龄迟 ( $P < 0.01$ )。患者的性别、首发症状、血清铜生化水平与该点突变无明显相关 ( $P > 0.05$ )。

3 Arg778Leu/Gln 点突变与中医证型的关系 见表 3。提示 Arg778Leu/Gln 点突变与肝风内动型可能相关 ( $P < 0.05$ ),与痰湿内阻型及气血两虚型无明显相关 ( $P > 0.05$ )。

表 1 WD 患者 Arg778Leu/Gln 点突变与性别及首发症状关系 (例)

组别	例数	性别		首发神经症状		首发肝症状	
		男	女	有	无	有	无
非突变	56	32	24	26	30	28	28
突变	34	21	13	22	12	13	21

表 2 WD 患者 Arg778Leu/Gln 点突变与发病年龄及铜生化水平关系 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	发病年龄 (岁)	血清铜 ( $\mu\text{mol/L}$ )	血清铜蓝蛋白 (mg/L)	血清铜氧化酶 (活力单位)
非突变	56	12.88 ± 7.41	4.5607 ± 2.9851	61.48 ± 29.74	0.0811 ± 0.1403
突变	34	17.35 ± 7.38*	4.3606 ± 3.1175	73.94 ± 56.87	0.0830 ± 0.1368

注:与非突变组比较,\* $P < 0.01$

表 3 Arg778Leu/Gln 点突变与中医证型的关系 (例)

组别	例数	肝风内动		痰湿内阻		气血两虚	
		有	无	有	无	有	无
非突变	56	20	36	19	37	17	39
突变	34	20	14*	8	26	6	28

注:与非突变组比较,\* $P < 0.05$

### 讨 论

1 WD 患者 ATP7B 基因突变的高频位点与临床表型的关系 Wilson 病大多于 10~30 岁间起病(症状暴露),文献报道,年龄最小 4 岁,最大 59 岁。为何起病年龄的不同,一直未得到阐明。近年基因组学的研究,提示与 WD 基因相关。1993 年,国外 3 个实验室几乎同时克隆了 WD 基因,即 ATP7B 基因<sup>(5,6)</sup>。自 1996 年起,多位学者均证实了 Arg778Leu/Gln 点突变是中国人 WD 患者 ATP7B 基因突变的第一热区<sup>(7,8)</sup>。

本研究发现第 8 外显子 Arg778Leu/Gln 点突变组的发病年龄迟于未见该点突变组,其原因可能是第 8 外显子所编码的氨基酸位于 ATP7B 酶的第 4 跨膜区,精氨酸(Arg)为碱性氨基酸,而亮氨酸(Leu)和谷氨酰胺(Gln)分别属于中性氨基酸和酸性氨基酸。推测编码氨基酸的极性改变可能致 ATP7B 酶第 4 跨膜区蛋白构象的改变,而致转铜障碍,但仍残存有转铜功能。另外 ATP7B 基因的插入、缺失、无义和移码突变,均推测损毁了 ATP7B 酶的功能,故发病年龄较早,且症状较重。而错义突变致 ATP7B 酶尚残存有转铜功能,故发病较迟,症状亦较轻<sup>(3)</sup>。Arg778Leu/Gln 属于错义突变,故突变组的发病年龄相对较迟。还需指出,WD 患者 ATP7B 基因突变多数属复合杂合突变,完整地阐明 WD 患者基因突变型与临床表型之间的

关系还有助于检测技术的提高。本研究 Arg778Leu/Gln 点突变组与无突变组在首发症状、铜生化水平等诸方面发现无明显相关,可能与上面因素相关。

2 WD 患者 ATP7B 基因突变的高频位点与中医证型的关系 WD 目前已明确属常染色体隐性遗传性铜代谢障碍性疾病,铜在体内各脏器沉积,尤以大脑豆状核、肝脏、肾脏及角膜的大量沉积,出现如震颤、扭转痉挛、精神障碍、肝脾肿大、腹水等多种多样的临床症状,中医学分别归属于“颤证”、“癲狂”、“积聚”、“黄疸”等范畴<sup>[9,10]</sup>。WD 患者由于父母体质素虚,致胎儿先天禀赋不足,肾精亏虚。因肾为先天之本,先天肾精亏虚,致后天脾胃运化失常,泌别清浊功能受损,铜浊积聚体内,痰湿内阻,此为 WD 患者发病早期的中医证型。进而气血津液化生不足,阴血亏虚,出现筋脉失养,虚风内动之证候,为 WD 患者发病的中晚期证候。本研究发现,90 例 WD 患者的 Arg778Leu/Gln 点突变组多见于肝风内动型,与痰湿内阻、气血两虚型无明显相关。肝风内动是在先天肾精亏虚的基础上致脾胃运化失常,铜浊为患,痰湿内阻,气血津液化生不足发展而来,故发病年龄较迟。因 Arg778Leu/Gln 点突变组患者的发病年龄相对较迟,故与肝风内动证型可能相关。

参 考 文 献

1. 杨任民. 肝豆状核变性. 合肥:安徽科学技术出版社,1995:

1—3.  
2. Miller SA, Dykes DD, Poiesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucl Acids Res 1988 ;16:1215.  
3. Thomas GR, Forbes JR, Roberts EA, et al. The Wilson disease gene: spectrum of mutation and their consequences. Nature Genet 1995 ;9:210—217.  
4. 邓铁涛. 中医诊断学. 上海:上海科学技术出版社,1984: 99—120.  
5. 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.  
6. Tanzi RE, Petrukhin K, Chernov I, et al. The Wilson's disease gene is a copper transporting ATPase with homology to the Menkes gene. Nature Genet 1993 ;5:344—350.  
7. 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区. 中华医学遗传学杂志 1998 ;15(5):284—287.  
8. 吴志英, 王 柠, 慕容慎行, 等. 肝豆状核变性基因第 3~20 号外显子突变及多态的 DNA 测序研究. 中华神经科杂志 1998 ;31(6):341—342.  
9. 孙 怡, 杨任民主编. 实用中西医结合神经病学. 北京:人民卫生出版社,1999:550—552.  
10. 洪铭范, 胡纪源, 胡文彬, 等. 肝豆状核变性的中医辨证分型. 安徽中医学院学报 1998 ;17(1):10—11.

(收稿 2001-08-29 修回 2002-01-08)

第六次全国中西医结合呼吸病  
学术交流会议征文通知

第六次全国中西医结合呼吸病学术交流会议拟于 2002 年 10 月在青岛市召开,现将征文的有关事项通知如下。

1 征文内容 支气管哮喘、慢性阻塞性肺疾病、肺间质纤维化和肺癌、睡眠呼吸暂停综合征、肺栓塞等呼吸系统疾病的中医、西医、中西医结合基础和临床研究进展、临床研究、实验研究、方法学、基础理论等诊治研究。

2 征文要求 (1)5 000 字以内的全文 1 份,1 000 字左右的摘要 2 份,尽量使用打印稿,有条件者附软盘 1 张(应用 Word 软件)。征文可以是研究性论文,也可是综述或讲座形式。(2)论文须未公开发表,加盖单位公章,注明作者单位、邮编、具体通信地址及联系电话。(3)截稿日期:2002 年 6 月 30 日(以邮戳为准)。(4)请在信封上注明“呼吸会议征文”字样。来稿请寄:北京海淀区西苑操场 1 号 中国中医研究院西苑医院呼吸科,邮编:100091。联系人:张燕萍、张京安、苗青。电话:010-62862284。

全国第六届中西医结合妇产科  
学术会议征文通知

全国第六届中西医结合妇产科学术会议拟于 2002 年 10 月在成都市举行,现将有关征文事项通知如下。

1 征文内容 (1)中西医结合生育调节研究。(2)妇产科疾病中西医结合临床和基础研究。

2 征文要求 (1)来稿必须实事求是,有科学性及实用性,从未在任何学术期刊上发表。请附单位介绍信或单位盖章。(2)来稿一律用 Word 软件排印,并附软盘。来稿要求全文(4 000 字以内)及摘要(800 字)各 1 份。摘要应以目的、方法、结果、结论顺序表达,无摘要者恕不采用。(3)来稿务必写清作者、单位、邮编,请自留底稿,来稿一律不退。(4)截稿日期:2002 年 7 月 30 日(以邮戳为准)。

3 征文寄送地点 上海市中西医结合学会(北京西路 1623 号 邮政编码 200040)张雯菊收。信封上请注明“全国第六届中西医结合妇产科学术会议征文”字样。亦可用 E-mail 发送至如下地址:djli@shmu.edu.cn。