

· 临床论著 ·

肝豆状核变性中医证型与 ATP7B 基因突变的相关性研究

韩 辉¹ 郑明翠² 吴丽敏³ 宋书婷² 杨文明¹

摘要 目的 探讨肝豆状核变性(hepatolenticular degeneration, HLD)不同中医证型与 ATP7B 基因突变位点之间的关系。**方法** 101 例 HLD 患者中医辨证分型为痰瘀互结证、湿热内蕴证、脾肾阳虚证、肝肾阴虚证、肝气郁结证及其他证型,采用 Sanger 测序法行基因突变位点检测,并分析中医证型与突变位点的关系。**结果** 101 例 HLD 患者中,痰瘀互结证是最常见中医证型;ATP7B 基因突变最常见的外显子为 8,13,2,ATP7B 基因的基因型及等位基因在 HLD 不同中医证型的分布中无差异($P > 0.05$),性别不能造成遗传差异($P > 0.05$),而不同中医证型与突变外显子之间存在差异($\chi^2 = 29.57, P < 0.05$);痰瘀互结证与外显子 2 呈正相关($P < 0.05$),湿热内蕴证与外显子 8,2 呈负相关($P < 0.05, P < 0.01$)。**结论** HLD 患者中医证型与突变外显子有一定的相关性,可为 HLD 患者的中医辨证提供客观化依据。

关键词 肝豆状核变性; ATP7B 基因; 中医证型; 相关性; Sanger 测序

Correlation Study on Chinese Medicine Syndrome Types of Hepatolenticular Degeneration and ATP7B Gene Mutation HAN Hui¹, ZHENG Ming-cui², WU Li-min³, SONG Shu-ting², and YANG Wen-ming¹ 1 Department of Neurology, First Affiliated Hospital, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei (230031); 2 Graduate School, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei (230038); 3 Center for Medicine, First Affiliated Hospital, University of Science and Technology of China, Hefei (230001)

ABSTRACT Objective To study the correlation between different syndrome types of traditional Chinese medicine (TCM) and ATP7B gene mutation in hepatolenticular degeneration (HLD) patients. **Methods** According to TCM syndrome typing, 101 HLD patients were classified into intermingled phlegm and blood stasis syndrome, dampness-heat accumulation syndrome, Pi-Shen yang deficiency syndrome, Gan-Shen yin deficiency syndrome, Gan-qi depression syndrome, and other syndrome types. The ATP7B gene mutation in them were detected by Sanger sequencing method. Their relations were analyzed. **Results** Intermingled phlegm and blood stasis syndrome was the most common TCM syndrome type. The most common mutation exons were 8, 13, and 2. There was no significant difference in the genotype and allele of ATP7B gene among different TCM syndrome types ($P > 0.05$). The gender had no significant difference in mutated gene ($P > 0.05$), whereas there were significant differences between TCM syndrome types and mutant exons ($\chi^2 = 29.57, P < 0.05$). Intermingled phlegm and blood stasis syndrome was positively correlated with exon 2 ($P < 0.05$), and dampness-heat accumulation syndrome was negatively correlated with exon 8 and 2 ($P < 0.05, P < 0.01$). **Conclusion** The TCM syndrome types were correlated with exon mutations, which could provide objective evidence for syndrome differentiation of TCM in HLD patients.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No. 81473534; No. 81673811); 安徽省科技攻关项目(No. 1604a0802070); 安徽省高校优秀青年人才支持计划重点项目(No. gxyqZD2016137); 安徽省高校学科拔尖人才项目(No. gxbjZD22)

作者单位: 1. 安徽中医药大学第一附属医院脑病中心(合肥 230031); 2. 安徽中医药大学研究生院(合肥 230038); 3. 中国科学技术大学附属第一医院医学研究中心(合肥 230001)

通信作者: 吴丽敏, Tel: 0551-62283402, E-mail: wuliminmail@126.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20180606.136

KEYWORDS hepatolenticular degeneration; ATP7B gene; syndrome types of traditional Chinese medicine; correlation; Sanger sequencing

肝豆状核变性(hepatolenticular degeneration, HLD)又称威尔逊病(Wilson's disease, WD),是由于致病基因 ATP7B 突变引起的常染色体隐性单基因遗传铜代谢障碍疾病,临床上表现为锥体外系、肝脏损害、角膜(Kayser-Fleischer, K-F)环等症状^[1,2]。HLD 在全世界的发病率为 1/30 000 ~ 1/100 000,携带者约为 1/90^[1]。由于 ATP7B 基因突变位点种类繁多,到目前为止与中医证型的关系未有明确报道,证候的差异性来自于遗传与环境共同作用^[3],中医证型具有特定的基因组学基础,近些年关于中医证型与基因突变位点的相关性研究成为中医学学术领域研究热点。本研究拟探讨五种常见中医证型与 ATP7B 基因突变位点之间是否存在一定的相关性,有助于临床中医证型与相关客观化指标的研究,为进一步指导治疗 HLD 提供一定的试验依据。

资料与方法

1 诊断及辨证分型标准 西医诊断标准:HLD 诊断按照文献[4]标准。(1)肝病史、肝病征或锥体外系表现;(2)血清铜蓝蛋白显著降低和(或)肝铜增加:血清铜蓝蛋白 <200 mg/L,尤其是 <80 mg/L 或血铜氧化酶 <0.2 活力单位/L;肝铜 >250 μg/g 肝干重;(3)角膜 K-F 环;(4)阳性家族史:同胞有 HDL 病患者或死于原因不明的肝病。符合(1)、(2)、(3)或(1)(2)(4)可确诊 HDL 病;符合(1)、(3)、(4)为很可能为典型 HDL 病;符合(2)、(3)、(4)为很可能为症状前 HDL 病;如具有 4 条中的 2 条则可能为 HDL 病。中医辨证分型标准根据《肝豆状核变性诊疗方案》^[5]及《肝豆状核变性中医临床路径》^[6]辨证标准。分为湿热内蕴证、痰瘀互结证、肝气郁结证、肝肾阴亏证、脾肾阳虚证以及其他证型。中医证候积分的证候要素制定参照《中华人民共和国国家标准:中医临床诊疗术语·证候部分》^[7]和《中医诊断学》^[8],共包括 11 个证候要素,分别为:痰湿、火热、气郁、血瘀、气虚、血虚、肾阴虚、肾阳虚、阳亢、肝阴虚、脾阳虚。各项目所得积分值相加即为该证候要素的积分(最高分为 30 分),积分 ≥7 分为该证候诊断成立。

2 纳入及排除标准 纳入标准:(1)符合上述诊断标准及辨证分型的患者;(2)年龄 10 ~ 55 岁;(3)ATP7B 基因检测出突变位点的患者;(4)签署知情同意书者。排除标准:(1)合并严重心血管及呼吸系统

疾病或其他严重疾病者;(2)存在认知障碍及严重焦虑、抑郁的患者;(3)不能配合及各种原因拒绝参与者。

3 一般资料 收集 2016 年 6 月—2017 年 9 月在安徽中医药大学第一附属医院脑病中心诊断为 HLD 的住院患者 108 例。其中男性 70 例,年龄 10 ~ 49 岁,平均(19.46 ± 9.85)岁;女性 38 例,年龄 10 ~ 55 岁,平均(21.50 ± 10.44)岁。本试验通过安徽中医药大学第一附属医院医学伦理委员会审核(审批号:2016AHLL-05)。

4 基因突变位点检测及方法 根据上述诊断及辨证标准,将 108 例患者进行辨证分型;采用 Sanger 测序法对 108 例患者进行基因突变位点检测。由贝康医疗有限公司协助检测。

5 统计学方法 采用 SPSS 23.0 统计软件分析,一般资料采用描述性分析,ATP7B 基因的基因型及等位基因与中医证型的关系和中医证型及性别与突变外显子的行 × 列双向无序资料采用 χ^2 检验及 Fisher 确切概率法,对中医证型与 ATP7B 基因外显子及氨基酸改变相关性的回归分析以常见中医证型是否痰瘀互结证,是否湿热内蕴证,是否肝气郁结证,是否肝肾阴虚证,是否脾肾阳虚证等依次作为因变量,是该型的赋值为 1,非该型的赋值为 0。将突变外显子及氨基酸设置成虚拟变量作为自变量。采用二元 Logistic 回归分析,选入或剔除变量的标准为 $\alpha = 0.05$ 。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 HLD 患者一般情况及中医证型分布 共收集 108 例患者,其中 7 例未检测到突变位点,实际发现突变位点的患者 101 例。年龄 10 ~ 55 岁,平均(19.90 ± 9.95)岁,男性 66 例,女性 35 例;痰瘀互结证 34 例(33.7%),湿热内蕴证 30 例(29.7%),肝肾阴虚证 16 例(15.8%),脾肾阳虚证 10 例(10.0%),肝气郁结证 6 例(5.9%),其他证型 5 例(4.9%)。

2 HLD 患者基因突变情况(表 1,图 1-3) 纳入的 101 例患者中,其中 11 例患者只检测出 1 个突变位点;83 例患者检测出 2 个突变位点,其中纯合突变 14 例(17.28%),余为复合杂合突变;7 例患者检测出 3 个突变位点。不同的突变位点多集中于第 2,14,18 外显子。

表 1 HLD 患者 ATP7B 基因突变性质及类型 (例)							
突变位点个数	例数	突变性质		突变类型			
		杂合突变	纯和突变	错义突变	移码突变	错义移码突变	其他类型
1	11	11	—	8	2	—	1
2	83	69	14	72	—	9	2
3	7	7	—	4	—	3	—

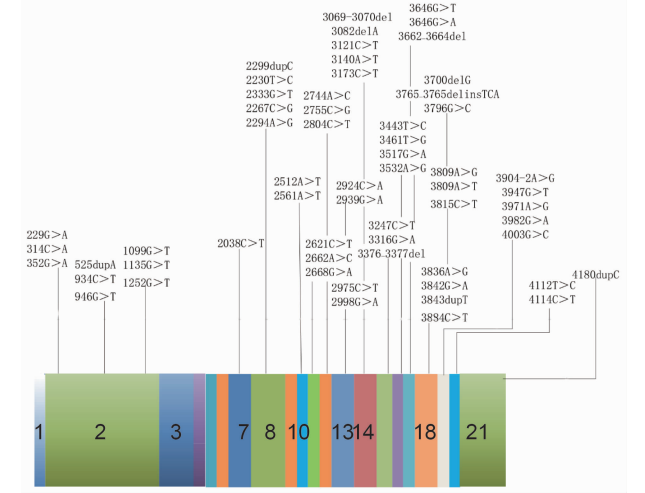


图 1 ATP7B 基因 21 个外显子上突变核苷酸位点

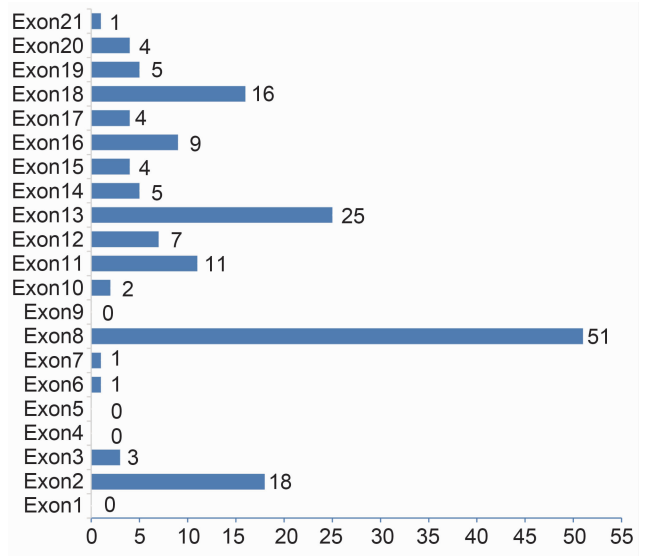


图 2 突变位点在 ATP7B 基因 21 个外显子中的分布

101 例 HLD 患者中 50.5% (51/101) 的患者在第 8 外显子检测出突变位点,其中 92.2% (47/51) 的氨基酸改变在 p.Arg778Leu,突变位点在 c. 2333G>T;24.8% (25/101) 的患者在第 13 号外显子检测出突变位点,其中 84% (21/25) 的氨基酸改变为 p.Pro992Leu,突变核苷酸位点在 c. 2975C>T;17.8% (18/101) 患者在第 2 外显子检测出突变位点,

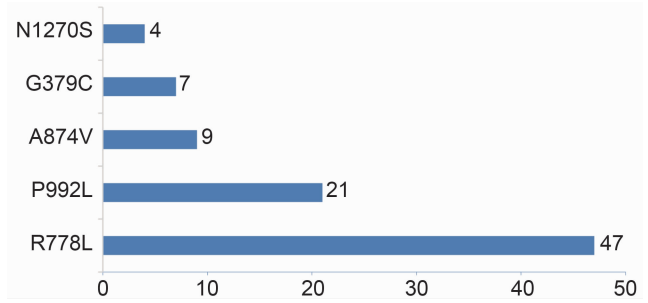


图 3 突变氨基酸位点在 5 个外显子中的分布

其中 38.9% (7/18) 的氨基酸改变在 p. Gly379Cys,突变核苷酸位点 c. 1135G>T;15.8% (16/101) 在外显子 18 检测出突变位点,其中 25% (4/16) 的氨基酸改变在 p. Asn1270Ser,突变核苷酸位点为 c. 3890A>G;10.9% (11/101) 患者突变位点在 11 外显子,其中 81.8% (9/11) 的氨基酸改变在 p.Ala874Val,突变核苷酸位点为 c. 2621C>T;8.9% (9/101) 患者突变位点在外显子 16,6.9% (7/101) 在外显子 12,5.9% (6/101) 在 19 外显子,5.0% (5/101) 分别在 14 与 19 外显子,4.0% (4/101) 在 15、17、20 外显子,1、4、5、9 未检测出突变位点。

3 ATP7B 基因的基因型及等位基因在 HLD 不同中医证型的分布(表 2) 因 HLD 患者为 ATP7B 基因突变导致,所以选取的患者中未出现 AA 型(无突变纯合子),统计时将 AA 型与 Aa 型(突变杂合子)合并在一起分析。结果显示各证型 ATP7B 基因型及等位基因频率比较,差异无统计学意义($\chi^2 = 9.41, 9.03, P > 0.05$)。

表 2 HLD 各证型 ATP7B 基因型及等位基因频率比较 [例(%)]

中医证型	例数	基因型		等位基因	
		AA + Aa	aa	A	a
痰瘀互结	34	5(14.7)	29(85.3)	5(7.4)	63(92.6)
湿热内蕴	30	1(3.3)	29(96.7)	1(1.7)	59(98.3)
肝肾阴虚	16	0(0.0)	16(100.0)	0(0.0)	32(100.0)
脾肾阳虚	10	2(20.0)	8(80.0)	2(10.0)	18(90.0)
肝气郁结	6	1(16.7)	5(83.3)	1(8.4)	11(91.6)
其他证型	5	2(40.0)	3(60.0)	2(20.0)	8(80.0)

4 HLD 不同性别及各中医证型突变外显子的分布(表 3、4) 纳入的 101 例患者中,男性 66 例,女性 35 例,男性和女性突变外显子分布比较,差异无统计学意义($\chi^2 = 1.29, P > 0.05$)。各中医证型突变外显子分布比较差异有统计学意义($\chi^2 = 29.57, P < 0.05$)。

表 3 HLD 不同性别中突变外显子的分布 (例)

性别	外显子				
	2	8	11	13	其他
男性	9	20	11	15	11
女性	6	13	6	6	4

表 4 HLD 不同中医证型中突变外显子的分布 (例)

中医证型	外显子				
	2	8	11	13	其他
痰瘀互结	4	17	4	3	6
湿热内蕴	4	5	7	12	2
肝肾阴虚	4	3	2	3	4
脾肾阳虚	0	5	3	1	1
肝气郁结	3	1	1	1	0
其他证型	0	2	0	1	2

5 HLD 中医证型与突变外显子及氨基酸回归分析(表 5) 外显子 2 与痰瘀互结证呈正相关($OR = 6.021, P < 0.05$);外显子 8 及 2 与湿热内蕴证患者呈负相关($OR = 0.175, P < 0.05, OR = 0.146, P < 0.01$)。中医证型与突变氨基酸无相关性。

表 5 痰瘀互结证、湿热内蕴证与外显子的二分类 Logistic 回归分析

中医证型	变量	β	SE	Wald	df	P	OR	95%CI
痰瘀互结	外显子 2	1.795	0.717	6.276	1	0.012	6.021	[1.478-24.525]
湿热内蕴	外显子 8	-1.741	0.779	4.996	1	0.025	0.175	[0.038-0.807]
	外显子 2	-1.923	0.662	8.452	1	0.004	0.146	[0.040-0.534]

讨 论

中医古文献未有对本病的明确记载,但根据临床症状表现不同,中医学将本病归属于“肝风”、“颤病”、“瘥病”、“癲狂”、“黄疸”、“积聚”、“臌胀”等范畴。现代医学发现,HLD 是一种常染色体隐性单基因遗传病,因此先天禀赋不足,肾中精气匮乏与本病的发生发展息息相关。肾为先天之本,《素问·上古天真论》曰:“肾者主水,受五脏六腑之精而藏也”;《灵枢·本神》曰:“肾藏精,精舍志”;肾藏精,精生髓舍志;先天肾精亏虚,以致髓海不足。颤病及瘥病在现代医学中多因大脑锥体外系病变引起的症状,临床中本病典型症状多见于锥体系及锥体外系症状合并有肝脏损害症状。我国该病较多见,主要发病人群是儿童和青少年,且常隐匿起病,临床表现多样,很容易被误诊,通过基因检测可早期进行确诊,此病是少有的在发病早期可用药物进行干预治疗的遗传疾病,但由于西药螯合剂等长期治疗不良反应明显,因此,中医药行排铜治疗占

有一定的优势^[9]。前期对 HLD 患者中医证候规律及病因病机研究较为详细,为中医药治疗奠定了一定的基础^[10]。而近年来有不少学者在基因水平上对证的实质作了研究,因此探索中医证候与基因突变位点的相关性,有助于为 HLD 患者的中医辨证提供依据,更加客观化、量化地认识中医证候本质^[11]。

研究 101 例患者中医证型分布情况,发现痰瘀互结证占 33.7%,湿热内蕴证占 29.7%,这与课题组前期研究^[10]结果一致,临床中以痰瘀互结、湿热内蕴、肝气郁结、肝肾阴虚、脾肾阳虚五种证型常见,但其研究中痰瘀互结证占全部病例的 66.7%,这可能是选取样本量大小造成的差异。ATP7B 基因由 21 个外显子和 20 个内含子组成,编码一种由 1465 个氨基酸组成的细胞内蛋白质,称为铜转运 P-型 ATP 酶^[12]。本研究中患者基因突变位点显示:(1)患者至少存在一个 ATP7B 基因突变位点,且检测出最多的在外显子第 8,13,2,18 号,分别占据总人数的 50.5%,24.8%,17.8%,15.8%,而外显子 1,4,5,9 未检测出突变位点;(2)其次常见的氨基酸位点改变分别是第 8 号外显子 p.Arg778Leu,第 13 号外显子 p.Pro992Leu,第 11 号外显子 p. Ala874Val,第 2 号外显子 p. Gly379Cys,此结果证实了国内最常见的突变位点为第 8 号外显子 p.Arg778Leu^[13],而 18 号外显子上存在 10 个不同的突变位点,提示了第 18 号氨基酸的突变位点多变且复杂,而其原因需要进一步研究;(3)突变类型以错义突变为主,约占 83%,移码突变约 15%,其中 22%的患者存在转录终止或翻译中止,有研究对 HLD 患者突变类型进行分析,发现 64.9%的患者为错义突变,与本研究结果一致^[14]。

本研究 108 例符合诊断标准的患者中,其中 7 例患者未检测出突变位点,11 例患者只检测出一个突变位点。对这些患者病例进行分析,依据 HLD 诊断标准,发现:(1)未检测出突变位点的患者可确诊 2 例,临床症状表现典型,且其中 1 例由于肝硬化失代偿期出现三系减少等症状行切脾手术,余 4 例可能为 HLD 患者,表现为肝功能或锥体外症状,以及异常的铜生化指标;(2)11 例一个突变位点的患者中,发现 7(64%)例患者可确诊为 HLD 患者,临床症状典型,其中 1 例患者由于肝硬化失代偿期出现三系减少等症状行切脾手术,1 例患者在第 19 号外显子上存在点突变 c. 3904-2A > G,未出现氨基酸改变,但其出现典型的临床表现肝功能、铜生化异常及角膜 K-F 环(+),且因腹水行肝移植手术,术后 5 个月左右出现走路不稳及言语不清等锥体外系表现。

由于 HLD 是一种常染色体隐性单基因遗传病, 当同时检测出两个等位基因才会发病, 而上述 9 位患者是不符合检测结果却出现典型临床表现, 推测原因为: (1) Sanger 测序法仅对 21 个外显子进行检测, 这就导致当突变位点存在于外显子以外的基因序列时, 则不能被检测; (2) 有研究指出患者表现型是由特定基因型决定的, 则 Sanger 测序法对候选基因内的突变检测是非常有效的, 但 WD 基因突变具有很大的遗传异质性, 种族差异、环境、人体铜耐受及遗传因素等都会影响基因突变^[15,16]; (3) Sanger 测序法只能在聚合酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 扩增后才可进行直接或克隆测序, 通过电泳分离出不同的碱基序列, 逐段测序进行分析, 无法完成全基因组的分析^[17]; (4) 也有学者提出 Sanger 测序不能检测出大片段重复和缺失, 临床中当患者只检测出一个突变位点但却有很典型的临床表现时, 需要进行完整的基因测序^[18]。因此, 高通量测序可以考虑对 HLD 患者进行突变位点检测以减低假阳性结果, 提高 WD 基因诊断的准确性。

近年来, 中医证型与基因的相关性及 HLD 中医证型与临床指标、表型等研究日益增多, 而 HLD 中医证型与基因突变的相关性研究鲜有报道。本研究结果指出不同中医证型之间的突变外显子有差异 ($\chi^2 = 29.57, P < 0.05$), 而不同性别之间各突变外显子无差异 ($\chi^2 = 1.29, P > 0.05$), 即性别差异不造成 HLD 患者遗传差异。在不同中医证型中, ATP7B 基因的基因型及等位基因频率的分布无差异 ($\chi^2 = 9.41, \chi^2 = 9.03, P > 0.05$)。杜益刚等^[19]研究肝肾阴虚证、气血两虚证及湿热内蕴证三种证型与 HLD 基因高频突变位点的关系, 结果指出第 8 号外显子上 p.Arg778Leu 点突变与肝肾阴虚存在显著的相关性。造成各医家研究结果差异可能的原因是: (1) 目前为止, 已有 700 多种 ATP7B 基因突变引起不同的临床表现^[14], 由于突变位点繁多, 具有很大的表型变异, 给临床上确定临床表型及相关性带来一定的困难; (2) HLD 患者基因位点多为复合杂合突变, 也给确定基因型与表型带来一定的影响; (3) 即使是在 ATP7B 基因同一个功能区的氨基酸突变也会导致不同的致病性, 突变在分子水平表现多样, 引起突变体在转运体内铜时出现稳定性、位置、催化及运输的显著不同^[20]。本研究发现, 痰瘀互结证患者中与 2 号外显子具有相关性 ($OR = 6.021$), 而对于湿热内蕴患者, 与第 8 及 2 号外显子具有相关性 ($OR = 0.175, OR = 0.146$), 未发现两种证型与氨基酸突变的关系。

ATP7B 基因包含 6 个金属离子结合域 (metal-binding domains, MBDs), 8 个不连续的横跨膜离子通道, 以及 ATP 结合域 (ATP-binding domain, N-domain), 磷酸化域 (phosphorylation domain, P-domain) 和磷酸酶域 (phosphatase domain, A-domain)^[21], 其中外显子 2 可结合细胞质中游离的铜离子即位于 N 端的 MBDs^[14], 外显子 8 可促进铜转运位于横跨膜离子通道区域^[22]。有研究表明外显子 8 上的碱基突变可影响横跨膜的铜离子转运以及铜代谢缺陷, 且有显著的肝脏症状^[23-25]。抗氧化蛋白 1 (Antioxidant protein 1, Atox1) 将细胞质的铜离子传递给 ATP7B 基因的 MBDs, 外显子 2 上的 MBD1-MBD4, 通过特殊的蛋白质相互作用及铜离子高亲和在接收 Atox1 传递的铜离子^[26]。若外显子 2 突变则导致 MBDs 区域蛋白质空间结构改变引起铜离子不能与 ATP7B 结合, 导致过多的铜滞留在细胞内。痰瘀证候是患者体内铜毒内聚长期演变而来, 导致疾病后期病情缠绵难愈, 湿热内蕴即人体中湿热蕴于中焦脾胃及肝胆, 加之先天铜毒内聚损伤脾胃, 健运功能受损, 而外显子 8 及 2 突变导致铜毒进一步积聚, 使患者出现严重的肝脏症状, 伴随而来脑部及其他器官损害的表现。

中医证候是指机体在疾病发生发展过程中的某一病理概括, 通过对中医证候表现可重复性的量化分析, 将其基因组变异性与其基因表达组、蛋白组等差异性进行关联, 进而研究特定时刻单一基因组^[27]。本研究结果显示中医证型与 ATP7B 基因外显子突变存在相关性, 痰瘀互结证与外显子 2 存在正相关, 湿热内蕴证与外显子 8, 2 存在负相关, 为肝豆状核变性患者的中医辨证提供客观化依据。目前, 中医证候及其中医分型的标准不一, 证候之间相互组合繁杂, 以致无法对研究结果进行统一分析, 而证候的规范化与标准化是建立中医证候基因组学的前提。ATP7B 基因的表达具有很大的遗传异质性, 这给中医证型与基因型的相关性研究带来一定的困难, 后期应选取大样本调查, 并设置对照组, 分析基因位点等位基因突变频率, 进一步研究其基因多态性对中医证型是否有一定的影响, 并深入研究突变位点繁多且复杂的外显子的分子生物学结构及功能。

利益冲突: 无。

参 考 文 献

- [1] Ala A, Walker AP, Ashkan K, et al. Wilson's disease[J]. Lancet, 2007, 369(9559): 397-408.
- [2] Bandmann O, Weiss KH, Kaler SG. Wilson's disease and other neurological copper disorders[J].

- Lancet Neurol, 2015, 14(1): 103–113.
- [3] 陈刚, 周欣, 薛文达, 等. 全基因组关联分析在中医证候研究中的应用展望 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2017, 23 (1): 141–143.
 - [4] 杨任民主编. 肝豆状核变性 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2015: 181–184.
 - [5] 杨文明, 鲍远程, 张波, 等. 肝豆状核变性诊疗方案 [J]. 中医药临床杂志, 2012, 24 (11): 1130–1131.
 - [6] 国家中医药管理局医政司. 22 个专业 95 个病种中医临床路径 (合订本) [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2010: 21.
 - [7] 国家技术监督局. 中华人民共和国国家标准: 中医临床诊疗术语·证候部分 [M]. 北京: 中国标准出版社, 1997: 23–27.
 - [8] 朱文峰主编. 中医诊断学 [M]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 12.
 - [9] 张静, 方媛, 崔圣伟, 等. 肝豆汤联合二巯基丙磺酸钠对湿热内蕴型肝豆状核变性患者的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23 (17): 190–194.
 - [10] 韩辉, 杨文明, 张娟, 等. 肝豆状核变性的中医证候特征 [J]. 中医药临床杂志, 2014, 26 (1): 16–19.
 - [11] 齐真, 许家伦, 周昌乐. 基于基因组学的中医“证”本质的研究概况 [J]. 时珍国医国药, 2014, 25 (8): 1953–1955.
 - [12] Tuan Pham LA, Nguyen TT, Nga Le HB, et al. Genetic analysis of 55 northern Vietnamese patients with Wilson disease: seven novel mutations in ATP7B [J]. J Genet, 2017, 96(6): 933–939.
 - [13] Wei Z, Huang Y, Liu A, et al. Mutational characterization of ATP7B gene in 103 Wilson's disease patients from Southern China: identification of three novel mutations [J]. Neuroreport, 2014, 25 (14): 1075–1080.
 - [14] Dong Y, Ni W, Chen WJ, et al. Spectrum and classification of ATP7B variants in a large cohort of Chinese patients with Wilson's disease guides genetic diagnosis [J]. Theranostics, 2016, 6(5): 638–649.
 - [15] Meyts I, Bosch B, Bolze A, et al. Exome and genome sequencing for inborn errors of immunity [J]. J Allergy Clin Immunol, 2016, 138 (4): 957–969.
 - [16] Ferenci P. Phenotype-genotype correlations in patients with Wilson's disease [J]. Ann N Y Acad Sci, 2014, 1315: 1–5.
 - [17] 郭奕斌. 基因诊断中测序技术的应用及优缺点 [J]. 遗传, 2014, 36 (11): 1121–1130.
 - [18] Bennett J, Hahn SH. Clinical molecular diagnosis of Wilson disease [J]. Semin Liver Dis, 2011, 31 (3): 233–238.
 - [19] 杜益刚, 胡纪源, 程楠, 等. 肝豆状核变性基因高频突变位点与中医证型关系的探讨 [J]. 西部中医药, 2013, 26 (10): 1–4.
 - [20] Huster D, Kuhne A, Bhattacharjee A, et al. Diverse functional properties of Wilson disease ATP7B variants [J]. Gastroenterology, 2012, 142 (4): 947–956.
 - [21] Wu F, Wang J, Pu C, et al. Wilson's disease: A comprehensive review of the molecular mechanisms [J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(12): 6419–6431.
 - [22] Lenartowicz M, Krzeptowski W. Structure and function of ATP7A and ATP7B proteins-Cu-trans-
porting ATPase [J]. Postepy Biochem, 2010, 56 (3): 317–327.
 - [23] Wu ZY, Lin MT, Murong SX, et al. Molecular diagnosis and prophylactic therapy for presymptomatic Chinese patients with Wilson disease [J]. Arch Neurol, 2003, 60(5): 737–741.
 - [24] Dziezyc K, Gromadzka G, Czlonkowska A. Wilson's disease in consecutive generations of one family [J]. Parkinsonism Relat Dis, 2011, 17(7): 577–578.
 - [25] Okada T, Shiono Y, Kaneko Y, et al. High prevalence of fulminant hepatic failure among patients with mutant alleles for truncation of ATP7B in Wilson's disease [J]. Scand J Gastroenterol, 2010, 45(10): 1232–1237.
 - [26] Walker JM, Huster D, Ralle M, et al. The N-terminal metal-binding site 2 of the Wilson's disease protein plays a key role in the transfer of copper from atox1 [J]. J Biol Chem, 2004, 279 (15): 15376–15384.
 - [27] 赵明地. 中医证候物质基础研究路径的思考 [J]. 中国医药指南, 2017, 15 (14): 201.

(收稿: 2017–12–19 在线: 2018–06–22)

责任编辑: 李焕荣

英文责编: 张晶晶