

ATP7B 基因突变与肝豆状核变性发病关系的探讨

徐彬¹, 余元勋¹, 鲍远程², 王迎新¹, 刘萍¹, 李建平¹, 朱霖¹

摘要 目的 对中国人肝豆状核变性(WD)患者 ATP7B 全基因测序,分析其突变及与 WD 的关系,并探讨 ATP7B 基因复合突变在 WD 发病中的意义。方法 对临床确诊的 WD 患者 84 例及 20 例健康者采集口腔黏膜细胞,提取基因组 DNA 为模板,应用聚合酶链反应对 ATP7B 全部外显子 5' 端 → 3' 端扩增;运用 DNA 直接测序法检测突变,并分析 ATP7B 基因突变临床意义及与预后的关系。结果 在 84 例患者中,ATP7B 基因突变率为 82.14%,还发现一些国内较少报道的 ATP7B 基因复合突变,可能与 WD 相关。结论 ATP7B 基因突变有较大的异质性,对该基因突变的检测,能发现有相关 ATP7B 基因突变的 WD 患者。

关键词 肝豆状核变性;外显子;基因突变;聚合酶链反应
中图分类号 R 742.4

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)12-1762-05

肝豆状核变性(Wilson disease, WD)是一种常染色体单基因隐性遗传的铜代谢障碍疾病,大多在 5~35 岁起病,人群发病率为 1/30 000,携带者概率为 1/90^[1-2];一般肝病出现较早,神经系统症状常在青春期后出现^[3]。WD 致病相关的 P-型铜转运酶(ATP7B)基因定位于 13q14.3,含 21 个外显子、20 个内含子,编码 ATP7B^[4],后者参与铜跨膜转运^[5-6]。ATP7B 基因突变能导致 ATP7B 改变、WD 引起铜蓝蛋白合成减少、铜离子排出受阻,铜在肝、脑、角膜等组织沉积,导致多脏器损害^[7]、肝硬化、神经/精神症状、角膜 K-F 环、尿铜增加等。ATP7B 基因突变常分布在各外显子,迄今已发现至少 651 种突变,突变形式有错义/无义突变(占 63%)、小片段缺失(占 17%)、小片段插入(占 8%)、剪接突变(占 9%)、大片段缺失(占 2%)、同义突变(占 2%)^[8]等;国内以前较少报道复合突变。作者对 84 例 WD 患者 ATP7B 基因进行全外显子 + 5' 端 →

+ 3' 端的测序,旨在探讨 ATP7B 基因的突变的异质性及与 WD 发病的关系。

1 材料与方法

1.1 病例资料 选取安徽中医药大学第一附属医院 2009 年 5 月~2014 年 7 月收治的 84 例中国汉族 WD 患者,诊断标准参照中华医学会 WD 诊断指南^[9]及美国的 AASLD 的 WD 诊断及治疗指南^[10];其中男 55 例,女 29 例;年龄 6~56(20.9±3.6)岁;其中 49 例为先证者,其余 35 例来自于 13 个患者家庭。20 例中国汉族健康输血员,男 14 例,女 6 例;年龄 21~32(27.7±2.8)岁,作为对照组。所采样本对象有临床资料及知情同意书。本研究旨在对临床上确诊为 WD 或疑似 WD 的患者家系成员,采用分子生物学技术进行遗传学确诊,能确定 ATP7B 基因突变型、SNPs。

1.2 方法

1.2.1 生化测定 WD 组及对照组的 WD 相关生化测定 16 项由安徽中医药大学第一附属医院按常规完成,并应用软件对两组化验结果进行统计学分析。

1.2.2 基因诊断 本研究参考方法^[11]进行基因诊断,简述如下:对所有明确诊断的 WD 患者、参与研究的家属、对照者,取口腔黏膜细胞,制备基因组 DNA 溶液,凝胶电泳为一条带,达电泳纯;基因组 DNA 溶液经紫外分光光度计检测,测量光密度(optical density, OD)值,OD₂₆₀/OD₂₈₀为 1.8,纯度合格;基因组 DNA 溶液浓度为 1 μg/μl。引物设计参考美国国立生物技术信息中心的信息,根据参考文献^[11]并利用 Premier 5.0 软件设计外显子 5' 端 → 3' 端的 21 对 PCR 扩增引物,由上海生工生物公司合成。反应体系和扩增条件及产物测序按文献^[11]进行。测序 PCR 的反应产物经荧光全自动 DNA 正向测序及反向测序,分析 ATP7B 基因各外显子 5' 端 → 3' 端的突变,对后者中有疑问者,均经 PCR 克隆测序后再确认。测序仪:ABI3730 型;分析软件:SeqMan、BioEdit。WD 患者和健康者 ATP7B 基因测序结果与 GenBank 中正常者 ATP7B 基因相应序列比对,分

2015-10-09 接收

基金项目:安徽高等学校省级自然科学基金项目(编号:KJ2014A128)

作者单位:¹安徽医学高等专科学校安徽省遗传医学中心“原安徽医科大学遗传室”,合肥 230061

²安徽中医药大学第一附属医院神经内科,合肥 230031

作者简介:徐彬,男,副研究员,责任作者,E-mail:xb.1030@163.com

析突变情况。

1.3 统计学处理 生化检测所得数据以 Excel 建库 采用 SPSS 19.0 软件进行分析 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。数据做正态性 W 检验和方差齐性 Levene 检验 采用随机区组设计的方差分析 比较组间差异。ATP7B 基因的所有外显子 5' 端 → 3' 端 DNA 的测序结果 与由 GenBank 的正常者 ATP7B 基因相应序列进行比对 分析突变情况。

2 结果

2.1 生化检测结果 84 例 WD 患者及 20 例健康者的生化检测结果见表 1。84 例 WD 患者血清铜离子、铜氧化酶、铜蓝蛋白 (ceruloplasmin, CP) 的水平明显低于 20 例健康者, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$) 其中 ATP7B 基因突变者的血清铜离子、铜氧化酶、CP 水平均明显降低。

表 1 84 例 WD 患者及 20 例健康者生化检测结果($\bar{x} \pm s$)

项目	WD 组	对照组	P 值
年龄(岁)	19.240 ± 3.577	21.700 ± 2.680	-
年限(年)	4.560 ± 4.248	0	-
白细胞(×10 ⁹ /L)	4.462 ± 1.572	6.141 ± 1.425	<0.05
红细胞(×10 ¹² /L)	3.862 ± 0.548	5.583 ± 0.639	<0.05
血红蛋白(g/L)	120.737 ± 21.536	129.612 ± 15.132	-
血小板(×10 ⁹ /L)	93.526 ± 37.216	179.630 ± 47.720	<0.05
ALT(IU/L)	78.371 ± 49.237	28.710 ± 8.328	<0.05
AST(IU/L)	69.710 ± 47.310	33.260 ± 9.851	<0.05
总胆汁酸(μmol/L)	38.826 ± 31.958	6.539 ± 3.253	<0.05
总胆红素(μmol/L)	28.275 ± 20.772	14.264 ± 5.349	<0.05
直接胆红素(μmol/L)	18.352 ± 13.775	5.217 ± 1.391	<0.05
血清白蛋白比(g/L)	39.172 ± 7.728	43.629 ± 4.612	<0.05
白/球蛋白(mmol/L)	1.856 ± 0.444	1.827 ± 0.317	-
尿素氮(mmol/L)	4.824 ± 1.370	4.731 ± 1.297	-
肌酐(μmol/L)	63.032 ± 18.941	78.235 ± 20.221	<0.05
血清铜(μmol/L)	8.993 ± 5.871	17.147 ± 3.352	<0.01
铜氧化酶(活性单位/L)	0.074 ± 0.067	0.421 ± 0.113	<0.01
CP(g/L)	0.086 ± 0.030	0.321 ± 0.031	<0.01

2.2 WD 患者 ATP7B 的基因突变测序 本次研究通过对 84 例 WD 患者的 ATP7B 基因的全部 21 个外显子 5' 端 → 3' 端进行直接 DNA 测序 显示 WD 患者 ATP7B 基因突变率较高 种类较多 共检出 23 例纯合子突变 (18 例 Arg778Leu 纯合子突变和 5 例 Arg919Gly 纯合子突变 占总突变的 27.38%) , 36 例单纯杂合子突变(占总突变的 42.86%) , 10 例复合突变 (占总突变的 11.90%) , 15 例未检出突变 (占总突变的 17.86%) 。84 例 WD 患者 168 个 ATP7B 等位基因中的突变总检出率为 82.14% 共检测出致病突变 12 种 其中有 5 种复合突变 突变位点分布于全部外显子 表现在 8、10、12、13、16、21 外显子 其中 6 种单纯突变为: Arg969Gln、Ser975Tyr、Arg778Leu、Gly988Val、Pro992Leu、Ala1018Val 5 种复合突变的具体信息见表 2。在 20 例健康对照者中没有 ATP7B 基因突变。通过在 PubMed 上进行文献检索, 以及在 <http://www.wilsondisease.med.ualberta.ca/database.asp> 和 <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/validate.phP> 进行查询, 结果显示 5 种复合突变国内报道较少 这 5 种 ATP7B 基因复合突变的相应的测序图见图 1 ~ 5。

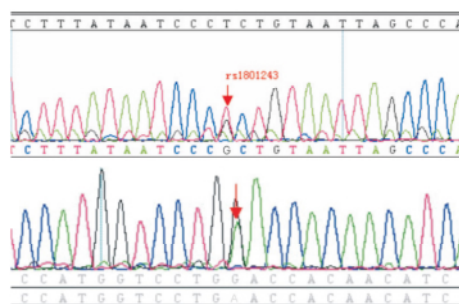


图 1 患者 69 基因突变测序图

男, 17 岁 临床表现: 行走平衡失调 肌张力高 肝肿大 角膜 K-F 环 血清 CP 0.091 g/L; 外显子 2、7 发现新突变 箭头指示突变位置

表 2 WD 患者 ATP7B 的基因突变

患者	核苷酸突变	位置及氨基酸改变等	突变处核苷酸序列	频率	突变结果	ATP7B 的部位
69	1216T > G	2 外显子 [Ser] → [Ala]	ATCCC [T /G] CTGTA	5 / 84	杂合突变	铜离子结合区
	1720G > A	7 外显子 [Gly] → [Asp]	TCCTG [G/A] ACCAC	1 / 84	错义突变	CPC 阳离子跨膜转运区
75	127 - 128 insGCTTT	1 外显子 5'UTR 突变	TGTTT [GCTTT] AGAGC	4 / 84	插入突变	铜离子结合区
	1216T > G	2 外显子 [Ser] → [Ala]	ATCCC [G/T] CTGTA	5 / 84	错义突变	铜离子结合区
	4155 G > T	21 外显子 [Glu] → [Asp]	TATGA [G/T] GCACA	1 / 84	错义突变	ACTGT 区
	3903 + 6 C > T	18 内含子	GTGAG [C/T] GTGGC	1 / 84	内含子突变	GDG ATP 结合区
79	127 - 128 insGCTTT	1 外显子 5'UTR 突变	TGTTT [GCTTT] AGAGC	4 / 84	插入突变	铜离子结合区
	- 75 C > A	1 外显子 5'UTR 突变	ACACC [C/A] CGCTC	3 / 84	杂合插入	铜离子结合区
	1216 T > G	2 外显子 [Ser] → [Ala]	ATCCC [G/T] CTGTA	5 / 84	错义突变	铜离子结合区
83	2171A > G	8 外显子 [Gln] → [Arg]	GTTC [A/G] GGCC	1 / 84	错义突变	CPC 阳离子跨膜转运区
	72391G > A	14 内含子	GGTAC [G/A] TGGA	1 / 84	杂合突变	DKTGT (P 区)
84	1425 G > A	3 外显子 [Ala] → [Thr]	TCTTG [G/A] CAAAG	1 / 84	错义突变	铜离子结合区
	3443 T > C	16 外显子 [Ile] → [Thr]	GCTGA [T/C] TGGAA	1 / 84	错义突变	DKTGT (P 区)

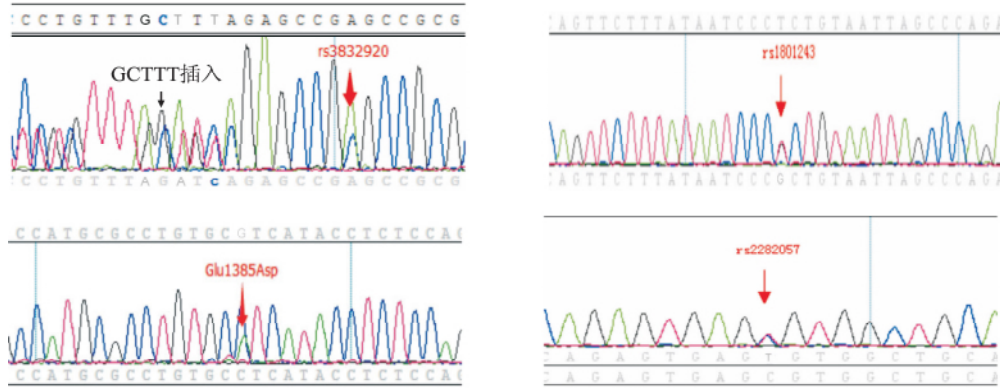


图2 患者75 基因突变测序图

女 28 岁, 临床表现: 缓慢进行震颤, 角膜 K-F 环, 血清 CP 0.065 g/L, 铜氧化酶 0.069 活性单位/L; 外显子 1、2、21、18 内含子发现新突变, 箭头指示突变位置

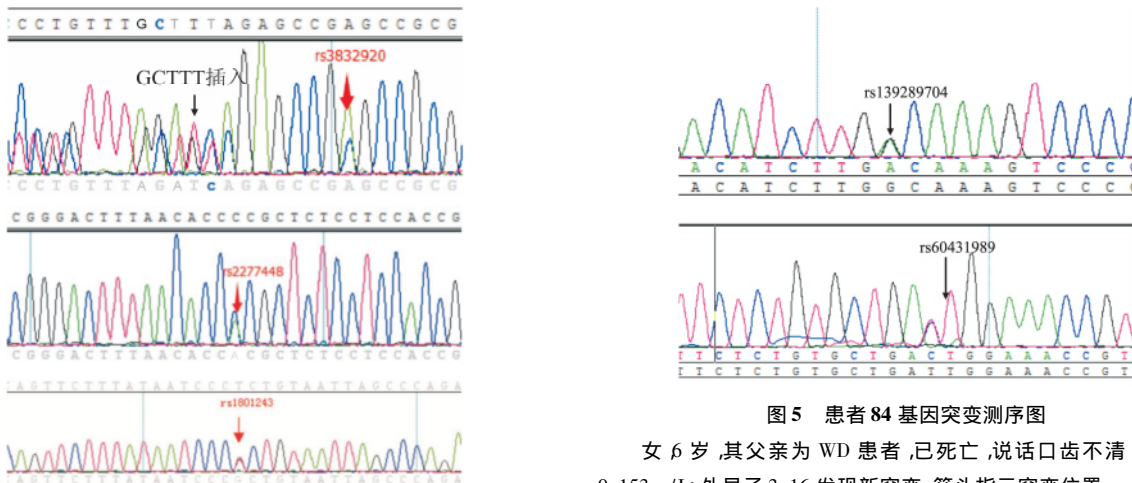


图3 患者79 基因突变测序图

男 25 岁, 记忆力减退、转氨酶升高、肝损害症状, 血清 CP 0.127 g/L, 铜氧化酶 0.139 活性单位/L; 外显子 1、2 发现新突变, 箭头指示突变位置

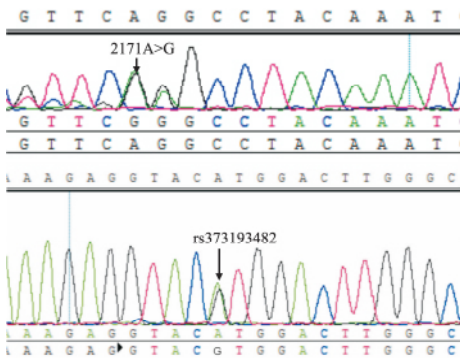


图4 患者83 基因突变测序图

男 21 岁, 肌僵直, 肝功能异常, 血清 CP 0.087 g/L, 血清铜 7.66 μmol/L; 外显子 8、14 内含子发现新突变, 箭头指示突变位置

3 讨论

WD患者中约42% 以肝脏损伤为首表现, 约

图5 患者84 基因突变测序图
女 6 岁, 其父亲为 WD 患者, 已死亡, 说话口齿不清, 血清 CP 0.153 g/L; 外显子 3、16 发现新突变, 箭头指示突变位置

44% 以基底神经节及大脑其他区域铜沉积而呈现神经、精神系统症状为首表现^[3]。本研究中 ATP7B 基因突变患者血清铜离子、铜氧化酶、CP 的水平明显低于正常对照组, 差异有统计学意义, 表明 WD 患者 ATP7B 基因突变失活后, 肝排铜减少, 使患者出现 WD 相关血清生化检验(+), 与 WD 临床发病呈正相关性。

ATP7B 是铜离子转运 P 型 ATP 酶, 含 1 411 个氨基酸残基, 分子量约 150 ku, 在细胞外铜离子水平正常时, ATP7B 位于细胞核周围; 在细胞外铜离子水平升高并大量进入细胞时, ATP7B 转移到细胞质, 结合铜离子后, 促进 ATP 结合区结合 ATP, 使 ATP 水解释放能量, 使天冬氨酸激酶磷酸化区 (P 区) 磷酸化, 然后 ATP7B 转位到细胞膜, 经毛细胆管处排出铜离子。

当 ATP7B 发生突变时, 导致其功能部分或全部丧失, 使铜离子经胆汁排出减少, 同时 CP 合成减

少,使血 CP 减少,血中白蛋白疏松结合的铜离子增加,易沉积到中枢神经系统、肝脏、肾脏、角膜等处,造成相应脏器的形态结构破坏、功能改变而致病。

本研究表明,Arg969Gln、Ser975Tyr、Arg778Leu、Gly988Val、Pro992Leu、Ala1018Val 等单纯突变,在 WD 患者阳性率相对较高(占总突变的 42.86%),10 例复合突变(占总突变的 11.9%);由于对 ATP7B 全基因外显子扫描,本文突变总检出率较高为 82.14%,5 种复合突变少见报道,突变位点分布于全部外显子,与其他研究^[12]结果相一致;如再对内含子扫描,突变检出率可进一步提高^[13]。说明 ATP7B 基因突变可引发单基因遗传 WD,可能是 WD 发病的主要原因。

WD 患者 ATP7B 基因的复合突变形式多样,69 号患者有外显子 2、7 复合突变,第 2 外显子突变出现在 2 铜离子结合区,使 ATP7B 不能结合铜离子、不能活化,排出铜离子减少;第 7 外显子突变出现在 CPC 阳离子跨膜转运区,使 ATP7B 一直停留在核周高尔基体外侧网络,不能到细胞膜排出铜离子。75 号患者有外显子 1、2、21 及 18 内含子区突变,第 1、2 外显子突变出现在 1、2 铜离子结合区,使 ATP7B 不能结合铜离子、不能活化,排出铜离子减少;第 21 外显子突变出现在 C 末端区,阻碍调节 ATP7B 功能;第 18 内含子区纯合突变,使 ATP7B 表达水平降低;结果可引起铜转运停滞,发生疾病。79 号患者有外显子 1、2 突变,第 1、2 外显子突变出现在 1、2 铜离子结合区,使 ATP7B 不能结合铜离子、不能活化,排出铜离子减少。83 号患者有外显子 8、14 内含子区突变,第 8 外显子突变出现在 CPC 阳离子跨膜转运区,使 ATP7B 一直停留在内质网,易被泛素蛋白酶体降解,不能到细胞膜排出铜离子;14 内含子区存在杂合突变,使 ATP7B 表达水平降低,可引起铜转运停滞。84 号患者有外显子 3、16 突变,第 3 外显子突变出现在 3 铜离子结合区,使 ATP7B 不能结合铜离子、不能活化,排出铜离子减少;第 16 外显子突变,使 ATP7B 不能形成 ATP7B-酰基磷酸盐,使 ATP 不能供应能量,使 ATP7B 不能移位转运铜离子。

对于临床检查和实验室检测后仍很难确诊的 WD 患者,通过对 ATP7B 基因进行分子遗传学检测,明确致病的等位基因来确诊非常有用。随着研究的深入,WD 的检出率最高可达 100%^[12]。文献

报道,ATP7B 基因复合突变患者一般比单纯突变患者的临床症状常更重,Maier-Dobersberger et al^[14]对 ATP7B 基因突变位点研究后认为,复合突变比单一突变发病更早。

参考文献

- [1] Dedoussis G V, Genechel J, Sialvera T E, et al. Wilson disease: high prevalence in a mountainous area of Crete [J]. *Ann Hum Genet*, 2005, 69(Pt 3): 268-74.
- [2] Burkhead J L, Gray L W, Lutsenko S. Systematic biology approach to Wilson disease [J]. *Biometals* 2011, 24(3): 455-66.
- [3] Chan H W, Liu T, Verdile Q, et al. Copper induces apoptosis of neuroblastoma cells *via* post-translational regulation of the expression of Bcl-2 family proteins and the tx mouse is a better model of hepatic than brain Cu toxicity [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2008, 1(1): 76-88.
- [4] Gitlin J D. Wilson disease [J]. *Gastroenterology*, 2003, 125(6): 1868-77.
- [5] Nicastro E, Loudianos G, Zancan L, et al. Genotype-phenotype correlation in Italian children with Wilson disease [J]. *J Hepatol*, 2009, 50(3): 555-61.
- [6] Telianidis J, Hung Y H, Materia S, et al. Role of the P-Type ATPases, ATP7A and ATP7B in brain copper homeostasis [J]. *Front Aging Neurosci*, 2013, 5: 44.
- [7] Lee J Y, Kim Y H, Kim T W, et al. New novel mutation of the ATP7B gene in a family with Wilson disease [J]. *J Neurol Sci*, 2012, 313(1-2): 129-31.
- [8] Seo J K. Diagnosis of Wilson disease in young children: molecular genetic testing and a paradigm shift from the laboratory diagnosis [J]. *Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr*, 2012, 15(4): 197-209.
- [9] 中华医学会神经病学分会帕金森病及运动障碍学组,中华医学会神经病学分会神经遗传病学组. 肝豆状核变性的诊断与治疗指南 [J]. *中华神经科杂志*, 2008, 41(8): 566-9.
- [10] Roberts E A, Schilsky M L, AASLD. Diagnosis and treatment of Wilson disease: an update [J]. *Hepatology*, 2008, 47(6): 2089-111.
- [11] 徐彬, 余元勋, 鲍远程, 等. 肝豆状核变性中 ATP7B 基因复合突变的研究 [J]. *第二军医大学学报*, 2014, 35(11): 1209-14.
- [12] Moller L B, Horn N, Jeppesen T D, et al. Clinical presentation and mutations in Danish patients with Wilson disease [J]. *Eur J Hum Genet*, 2011, 19(9): 935-41.
- [13] 黄丽, 李洵桦, 梁秀龄, 等. 各种辅助检查对肝豆状核变性的诊断价值 [J]. *临床神经病学杂志*, 2006, 19(1): 8-11.
- [14] Maier-Dobersberger T, Ferenci P, Polli C, et al. Detection of the His1069Gln mutation in Wilson disease by rapid polymerase chain reaction [J]. *Ann Intern Med*, 1997, 127(1): 21-6.

microRNA-21 对肺癌 A549 细胞增殖和 Smad7 表达的影响

李 斌, 潘跃银, 杜瀛瀛

摘要 目的 探讨微小 RNA-21(miR-21)对肺癌 A549 细胞中 Smad7 表达的调控和对肺癌 A549 细胞增殖的影响。方法 常规培养肺癌细胞系 A549,经脂质体转染 miR-21 模拟物和抑制物及阴性对照片段 48 h 后,采用 Western blot、qRT-PCR 法检测 Smad7 基因及蛋白的表达水平,MTT 法检测 A549 细胞增殖情况。结果 转染 miR-21 模拟物后 Smad7 的 mRNA 和蛋白表达量降低($P < 0.05$),而转染 miR-21 抑制物后 Smad7 的 mRNA 和蛋白表达量升高($P < 0.05$);MTT 结果显示转染 miR-21 模拟物后细胞的增殖能力明显增强($P < 0.05$),而转染 miR-21 抑制物后细胞增殖能力明显减弱($P < 0.05$)。结论 通过下调 miR-21 可提高 Smad7 的 mRNA 和蛋白表达,进而抑制 A549 细胞的增殖。

关键词 肺癌;微小 RNA-21;Smad7;增殖

中图分类号 R 73.3

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)12-1766-04

2015-09-08 接收

基金项目:安徽省科技攻关项目(编号:1301042214);安徽省 2012 年度科研计划项目(编号:12070403072);安徽省高校省级自然科学基金重点项目(编号:KJ2012A157)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院干部肿瘤科,合肥 230022

作者简介:李 斌,男,硕士研究生;

潘跃银,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail: yueyinpan@gmail.com

肺癌是威胁人类健康最常见的恶性肿瘤之一,恶性死亡率逐年上升^[1]。微小 RNA(microRNA, miR)是近年来发现的一类长约 19~22 个核苷酸的非编码单链小分子 RNA,其能与靶序列 mRNA 的 3'非翻译区结合,时序性调控基因表达,在肿瘤细胞增殖、分化和凋亡中发挥重要的调控作用^[2]。文献^[3]报道,miR-21 在肺癌细胞中高表达,但作用机制尚不清楚。研究^[4]证实,miR-21 通过作用于 Smad7 调控肺成纤维细胞的活化增殖。Smad7 是转化生长因子- β 1/Smad 信号通路负调控因子,抑制细胞活化增殖^[5]。miR-21 是否靶向调控 Smad7 表达,影响肺癌 A549 细胞增殖目前尚不十分清楚。该研究旨在探讨 miR-21 对肺癌中 Smad7 表达的调控和 A549 细胞增殖的影响,以期研究 miR-21 在肺癌中的作用以及肺癌基因治疗新靶标开发提供前期实验基础。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂 一抗 Smad7 购自美国 Cell signal 公司; β -actin 购自武汉博士德生物工程有限公司;辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG、辣根酶标记山羊抗兔 IgG 购自美国 Santa Cruz 公司;miR-21 模拟物和抑制物、EzOmics miRNA qPCR Detection Primer 试剂

Research for the relationship of ATP7B gene mutations and WD

Xu Bin¹, Yu Yuanxun¹, Bao Yuancheng², et al

(¹Anhui Medical College, Anhui Province Medical Genetics Center, Hefei 230061;

²Dept of Neurology, The First Affiliated Hospital of Anhui Traditional Chinese Medicine University, Hefei 230031)

Abstract Objective To sequence the WD ATP7B gene, analyze the relationship of the mutations and WD, find in Chinese WD patients the ATP7B gene complicated mutation meaning. **Method** Getting genomic DNA from clinically diagnosed 84 cases of WD patients and 20 cases of the health people, amplifying all exons 5' end \rightarrow + 3' end of ATP7B gene by PCR. PCR products and mutations were analyzed by DNA direct sequencing and analyzing the clinical meaning and the relationship with the mutations. **Results** We found in the 84 cases the ATP7B gene mutation rate was 82.14% and found some complicated mutations that were rarely reported in China and had relationship with WD. **Conclusion** ATP7B gene mutations have the heterogeneity and the mutation checking can find related ATP7B gene mutation carried WD patients.

Key words Wilson disease; exons; gene mutations; PCR