

文章编号:1003-2754(2021)11-1016-04

doi:10.19845/j.cnki.zfyjzbzz.2021.02611

# 1 例早发脑型肝豆状核变性家系 ATP7B 基因突变和临床表型分析

钱南南<sup>1</sup>, 王久香<sup>2</sup>, 裴培<sup>3</sup>, 杨悦<sup>1</sup>, 杨文明<sup>3</sup>

**摘要:** **目的** 探讨 1 例早发脑型肝豆状核变性家系的临床表型和遗传学病因。**方法** 提取该家系先证者及其父母和弟弟的外周白细胞基因组 DNA,用 Sanger 法对先证者 ATP7B 基因外显子及外显子/内含子连接区进行序列分析,并对先证者的弟弟进行突变位点检测。**结果** 该家系先证者主要临床特征是记忆力减退,言语不清,肢体不自主抖动,角膜 K-F 环(+),肝功能正常。Sanger 测序显示先证者 ATP7B 基因第 8 和第 13 外显子分别存在 c.2333G>T(p.Arg>Leu)、c.2975C>T(p.Pro>Leu)复合杂合错义变异。两种变异均为已知致病突变,分别来自母亲和父亲。先证者弟弟携带 c.2333G>T(p.Arg>Leu),目前表型正常。**结论** 该家系为 ATP7B 基因突变导致的脑型 Wilson 病。ATP7B 基因 c.2333G>T(p.Arg>Leu)和 c.2975C>T(p.Pro>Leu)是该家系患病的遗传学病因,对家系中的后代再发风险有重要的指导意义。

**关键词:** 肝豆状核变性; ATP7B; 脑型

**中图分类号:**R742.4 **文献标识码:**A

**Identification of pathogenic variations in a Chinese pedigree affected with Wilson's disease** QIAN Nannan, WANG Jiuxiang, PEI Pei, et al. (Clinical Research and Experimental Center of the First Affiliated Hospital of Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230031, China)

**Abstract:** **Objective** To determine the mutational characterization of P-type ATP7B gene in a Chinese family with neurological Wilson disease (WD). **Methods** Genomic DNA was isolated from venous blood samples of all available family members. The exons and exon-intron boundaries of ATP7B in four members were analyzed by Sanger sequencing. **Results** The proband was presented with memory loss, unclear speech and involuntary shaking, k-f ring with normal liver function. By direct Sanger sequencing of ATP7B, the proband have carried two heterozygous missense mutations c.2333G>T p.R778L and c.2975C>T p.P992L, which were derived her mother and father respectively. The younger brother of the proband carried c.2333G>T p.R778L with normal presentation. **Conclusion** We identified two heterozygous missense mutations (c.2120A>G p.Q707R and c.2333G>T p.R778L) were this neurological WD causative sites, which have important guiding significance for the risk of offspring recurrence in this family.

**Key words:** Wilson disease; ATP7B; Neurological presentation

肝豆状核变性(Wilson's Disease, WD, MIM 277900)是一种常染色体隐性遗传的以铜代谢紊乱为特征的代谢性疾病,主要表现为肝功能异常、神经或精神损害、角膜可见 K-F 环(Kayser-Fleischer ring)甚至肾损伤。临床上,该病主要分为肝型(肝功能损伤)、脑型(神经精神异常)和混合型(二者都异常)。患者一般在 5~35 岁发病,儿童以肝型为主,脑型患者少见<sup>[1,2]</sup>。目前发现 WD 是由 ATP7B 基因突变所导致,我们对 1 例中国汉族早发型脑型 WD 家系进行 ATP7B 变异鉴定,以明确其遗传学病因,为该家系的疾病诊断提供遗传学证据,对家系其他成员的再发风险进行指导。

## 1 对象与方法

1.1 对象 先证者,女,13 岁。2017 年 7 月份

渐出现口角流涎、言语不清,写字慢、字体歪斜。就诊于当地卫生所考虑“胃炎”,予口服药治疗未见好转(具体用药不详)。发病 16 m 开始出现左手不自主抖动,记忆力明显减退。患者双眼角膜 K-F 环

收稿日期:2021-07-20;修订日期:2021-10-11

基金项目:国家自然科学基金(81703109);国家自然科学基金(81803903);国家自然科学基金(81973825);国家中医药脑病循证能力提升及平台建设项目(2019XZZX-NB001);安徽中医药大学自然科学基金(2017zryb020);安徽中医药大学新安医学教育部重点实验室开放基金(2020xayx12)

作者单位:(1.安徽中医药大学研究生院,安徽合肥 230038;2.安徽中医药大学第一附属医院临床研究实验中心,安徽合肥 230031;3.安徽中医药大学第一附属医院脑病科,安徽合肥 230031)

通讯作者:杨文明,E-mail:yangwm8810@126.com

表 1 ATP7B 外显子及其侧翼区 PCR 扩增引物序列

外显子	名称	序列(5'-3')	产物大小(bp)
1	1F	TCCTCTCCCGGGACTTTAAC	231
	1R	GCGAGTAAGCGCCGAAC	
2	2-1F	CCAGAGAAGCTGGGATGTTG	792
	2-1R	TGACCACATGGCTTCCTTG	
	2-2F	TGACATGGGATTTGAAGCTG	
3	2-2R	GCAGGGCTCACCTATACCAC	420
	3F	CTCACCAAGAGCCCTGAAAC	
4	3R	TTGCTGGGTATTCTGAAGGG	363
	4F	TGGGAAGATGTGTTTCTTTGTTC	
5	4R	CAGACACGTCCAAGATGGG	362
	5F	CTCCCTGGACTGGCTTTCAC	
6	5R	TTCCATGGGAAAAGTTGAAG	275
	6F	CACAAAGTCTACTGAGGCACTTTTAG	
7	6R	CAGAGTTGGGCCAGGTAG	329
	7F	CTGTGTCCTCAGAAGGGGAG	
8	7R	TTAGCGGGCAGAATATCTGAG	524
	8F	ATAAACGCCCATCACAGAGG	
9	8R	GCACCTTAATTATATGGAGGTTTCC	253
	9F	ACCACGCTTGTGACTCTCAG	
10~11	9R	TCAATACAACATGGGCATCTG	540
	10-11F	AACAGCTGGCCTAGAACCTG	
12	10-11R	TCTGATTTCCCAGAACTCTTCAC	317
	12F	CAATCTTTATCCATGCTTGTGG	
13	12R	TGAATAATTAAGCCCAGTGAATC	360
	13F	TCCTTATGTGATTAGAGTTCTGGG	
14	13R	GAGTGGCTCTCAGGCTTTTC	383
	14F	GTTGGGTGAAGTCTGCCTC	
15	14R	TGGTTTTCCAGACCACACAG	349
	15F	CTTCACCCTGTGTCCCTGTC	
16	15R	CAGAGGCAATCACTGCTGG	302
	16F	GCTGTAAAAGGATTGCATGG	
17	16R	AAAGGAGGACTCTTTTGCCTG	343
	17F	TGCAAGTGTGGTATCTTGG	
18~19	17R	TGGAGAGAAAAGCATCCAGC	602
	18-19F	CAACATCACTGACTGGACCC	
20	18-19R	CCACTCACTAACCCAGCAG	283
	20F	GTGCCTGAAGCCCTCTCC	
21	20R	TTGTCCCAGGTGAATGAATG	474
	21F	AGGCCTTCACCAGGCTTAG	
	21R	TATCCAGGGAGCGGAAGTC	

阳性,脑部 MRI 显示双侧基底节区、黑质对称性异常低信号(见图 1),24 h 尿铜 621.7 μg/d,ALT、AST、GGT 和 AKP 正常,CER 0.093 g/L(参考值 0.2 ~ 0.6 g/L),考虑“肝豆状核变性”,予排铜、保脑等综合治疗后口角流涎及左手不自主抖动较前好转。患者 4 岁时患过病毒性脑炎。

本研究遵循《赫尔辛基宣言》,经中国合肥安徽

中医药大学第一附属医院伦理委员会批准,本研究参与者均签署知情同意书。

### 1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 EDTA 抗凝管采集先证者及家系其他成员的外周血 3 ml(见图 2A),全血基因组 DNA 提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司)提取基因组 DNA,并用分光光度计(Eppen-

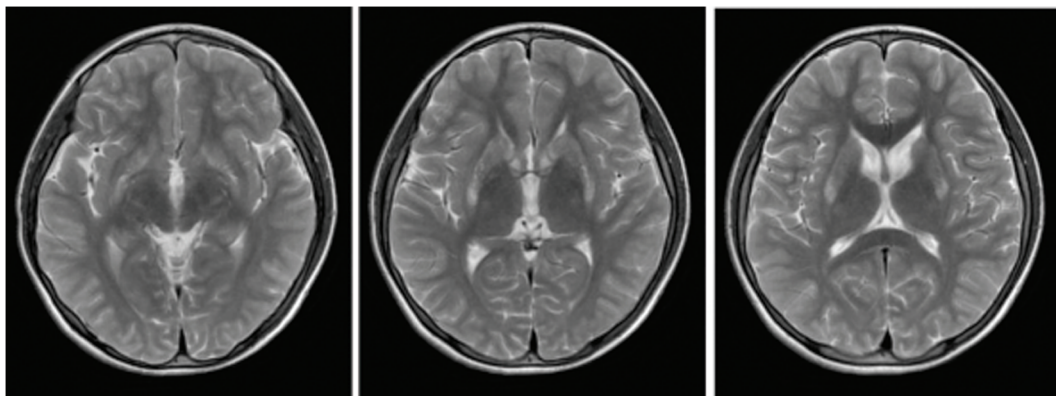
dorf, 德国) 检测其浓度和质量。

1.2.2 基因测序 利用 Primer Premier 5 软件设计扩增包含 ATP7B 基因外显子及其外显子内含子连接区引物,由武汉擎科生物有限公司合成(见表 1)。PCR 体系(50 μl):5X PrimeSTAR 缓冲液(含 Mg<sup>2+</sup>)10 μl(Takara)、基因组 DNA 100 ng、上下游引物各 0.2 μmol/L、dNTP Mixture 0.2 mmol/L(Takara),PrimeSTAR DNA polymerase 0.5U(Takara),用 H<sub>2</sub>O 补足至 50 μl 体系。PCR 反应条件:98 °C 预变性 5 min;98 °C 变性 10 s;55 °C ~ 60 °C 退火 5 s,72 °C 延伸 1 min,共 35 个循环,最后 72 °C 延伸 10 min,4 °C 保存。PCR 产物送武汉擎科生物有限公司用 ABI PRISM 3100 测序仪测序。测序结果与 NCBI 数据库中的 ATP7B 基因序列进行比对(见图 2B-

2E)。

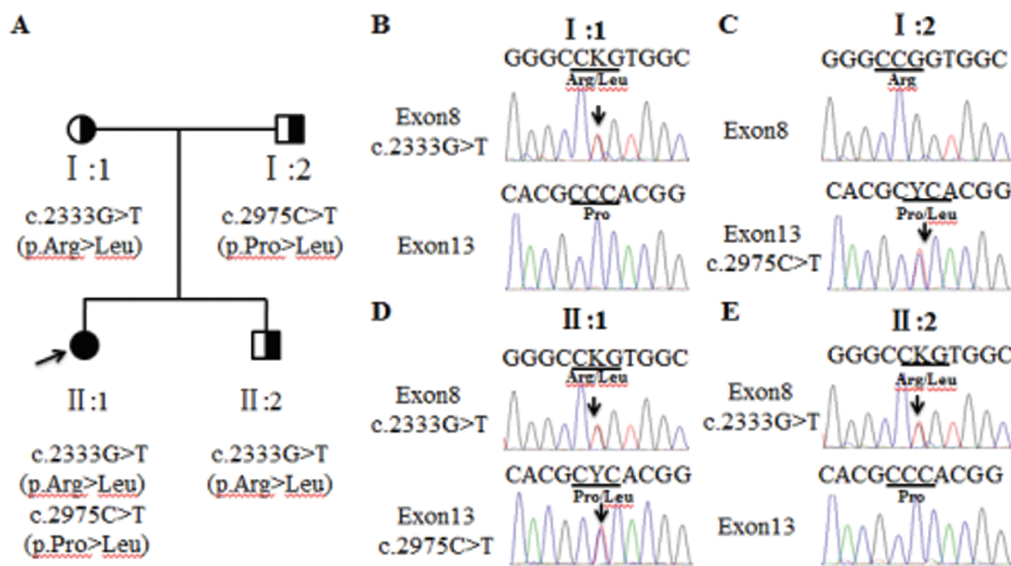
### 2 结果

ATP7B 基因测序结果:外显子直接测序结果显示,先证者 ATP7B 基因存在 c.2333G>T 和 c.2975C>T 复合杂合错义变异(见图 2C),分别导致 ATP7B 第 778 位精氨酸变成亮氨酸,第 992 位脯氨酸变成亮氨酸。经检索 HGMD 数据库、dbSNP、千人基因组等数据库证实,c.2333G>T 和 c.2975C>T 均为已知 WD 致病位点。先证者母亲携带 c.2333G>T (p.Arg778Leu) 突变(见图 2B),先证者父亲携带 c.2975C>T (p.Pro992Leu) 突变(见图 2C)。先证者的弟弟携带 c.2333G>T (p.Arg778Leu) 突变(见图 2E)。



先证者脑部 MRI 显示双侧基底节区、黑质对称性异常低信号

图 1 先证者头部 MRI



A:先证者家系图,箭头指示先证者;B~E:ATP7B 测序结果(正向),箭头指示变异位点

图 2 先证者家系及测序结果图

### 3 讨 论

WD 是由于体内铜离子异常累积导致的一种罕见隐性遗传病。ATP7B 是目前已知的 WD 致病基因,其定位于 13q14.3,编码含有 1465 氨基酸残基的跨膜蛋白。铜离子的代谢障碍导致其在脑部、肝脏、眼底甚至肾脏累积,导致患者出现肝硬化、神经精神紊乱、角膜 K-F 环甚至肾损伤。因此早诊断、早治疗可减少患者肝、脑等组织的损伤,延缓病情进展,明显提高 WD 患者的生存质量,最终回归家庭和社会。患者自出生即存在铜代谢障碍,一般 3 岁以后才开始出现症状,临床表现各异且大部分为非特异性,因此早期诊断仍较为困难<sup>[3]</sup>。本文先证者发病初期口角流涎、言语不清,曾考虑胃炎,外院治疗后未见好转。发病 4 月后,流涎、言语不清加重,开始出现左手不自主抖动。

目前 ATP7B 基因已经发现有 600 多个 WD 致病突变位点。H1069Q 是目前中欧最常见的 WD 突变位点,在波兰、罗马尼亚,奥地利等中欧国家的等位基因频率为 30% ~ 60%<sup>[4]</sup>。R778L 是日本、韩国、中国等亚洲患者的热点变异位点<sup>[5]</sup>。R778L 等位基因在韩国 WD 患者的携带率约为 37.9%、日本约为 27%,中国约 28% ~ 44%<sup>[4,6,7]</sup>。c. 2975C > T (p. Pro992Leu) 突变位于 ATP7B 第 8 外显子,蛋白的跨膜结构域。2013 年,有学者报道了 1 例 9 岁的中国 WD 男童,携带与本文先证者相同的突变位点 ATP7B c. 2333G > T 和 c. 2975C > T<sup>[8]</sup>。该患者神经精神正常,本文中的先证者有明显的神经精神症状;角膜 K-F 环阴性,本文患者阳性;肝功能指标 ALT (137 IU/L)、AST (106 IU/L) 明显升高,本文先证者 ALT (16 U/L, 参考值 5 ~ 35 U/L)、AST (22 U/L, 参考值 5 ~ 35 U/L)。有多位学者尝试寻找患者基因型和发病年龄、性别、临床表型的关系,但是没有明确的结论<sup>[9-11]</sup>。最新研究显示 ATP7B DNA 甲基化可能与患者临床表型相关<sup>[12]</sup>。此外先证者 4 岁时曾患有病毒性脑炎,是否与患者的早期发病相关亦未可知。

先证者的母亲携带 ATP7B c. 2333G > T 突变,父亲携带 c. 2975C > T 突变。先证者从双亲遗传到 ATP7B c. 2333G > T 和 c. 2975C > T 符合杂合突变,结合患者临床症状、生化检查及体征,诊断 WD 明确。通过对先证者的弟弟 ATP7B 基因 21 个外显子

和外显子内含子衔接区的测序发现其只携带 c. 2333G > T 突变,提示其弟弟的发病可能性不大,可密切随访观察。

我们报告了一例早发型脑型 WD 家系,明确该家系 WD 发病的遗传学基础是 ATP7B c. 2333G > T 和 c. 2975C > T,并对先证者的弟弟进行突变检测,分析其患病的可能性。

#### [参考文献]

- [1] Wiernicka A, Ddalski M, Jańczyk W, et al. Early Onset of Wilson Disease[J]. J Pediatr Gastr Nutr, 2017, 65(5):555-560.
- [2] Wang L, Huang Y, Shang X, et al. Mutation analysis of 73 southern Chinese Wilson's disease patients: identification of 10 novel mutations and its clinical correlation[J]. J Hum Genet, 2016, 56(9):660-665.
- [3] Litwin T, Dusek P, Szafranski T, et al. Psychiatric manifestations in Wilson's disease: possibilities and difficulties for treatment[J]. Therapeutic Advances in Psychopharmacology, 2018, 8(7):199-211.
- [4] Liu XQ, Zhang YF, Liu TT, et al. Correlation of ATP7B genotype with phenotype in Chinese patients with Wilson disease[J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(4):590-593.
- [5] Chuang LM, Wu HP, Jang MH, et al. High frequency of two mutations in codon 778 in exon 8 of the ATP7B gene in Taiwanese families with Wilson disease[J]. J Med Genet, 1996, 33(6):521-523.
- [6] Li X, Lu Z, Lin Y, et al. Clinical features and mutational analysis in 114 young children with Wilson disease from South China[J]. Am J Med Genet A, 2019, 179(8):1451-1458.
- [7] Liu M, Jin M, Chen X, et al. ATP7B mutation detection and pathogenicity analysis: One atypical case of Wilson's disease with adrenocortical insufficiency[J]. J Mol Neurosci, 2018, 64(1):20-28.
- [8] Geng J, Wang J, Yao R, et al. Identification of one novel and nine recurrent mutations of the ATP7B gene in 11 children with Wilson disease[J]. World J Pediatr, 2013, 9(2):158-162.
- [9] Wu Z, Zhao G, Chen W, et al. Mutation analysis of 218 Chinese patients with Wilson disease revealed no correlation between the canine copper toxicosis gene MURR1 and Wilson disease[J]. Journal of Molecular Medicine, 2006, 84(5):438-442.
- [10] Wu Z, Wang N, Lin M, et al. Mutation analysis and the correlation between genotype and phenotype of Arg778Leu mutation in Chinese patients with Wilson disease[J]. Archives of Neurology, 2001, 58(6):971-976.
- [11] Ferenci P, Stremmel W, Czlonkowska A, et al. Age and sex but not ATP7B genotype effectively influence the clinical phenotype of Wilson disease[J]. Hepatology, 2019, 69(4):1464-1476.
- [12] Mordaunt CE, Kieffer DA, Shibata NM, et al. Epigenomic signatures in liver and blood of Wilson disease patients include hypermethylation of liver-specific enhancers[J]. Epigenet Chromatin, 2019, 12(1):10-11.