

DOI:10.16781/j.0258-879x.2019.05.0583

• 短篇论著 •

家族性良性慢性天疱疮一家系及 *ATP2C1* 基因突变分析

赵 静¹, 高 英¹, 吴建华^{2*}

1. 华中科技大学同济医学院附属武汉中心医院皮肤科, 武汉 430014

2. 海军军医大学(第二军医大学)长海医院皮肤科, 上海 200433

[摘要] **目的** 报道家族性良性慢性天疱疮一家系, 并对 *ATP2C1* 基因突变进行分析。**方法** 收集家族性良性慢性天疱疮家系成员的一般资料, 进行临床调查, 绘制家系图谱。采用 PCR 及 Sanger 直接测序法对该家系中 4 例患者的 *ATP2C1* 基因进行检测, 并以该家系 3 例健康者和 100 例无亲缘关系的正常人作为对照。**结果** 4 例家族性良性慢性天疱疮患者 *ATP2C1* 基因的第 21 号外显子的第 472 位核苷酸由 G 变为 A, 该突变导致原先 158 位的天冬氨酸变为天冬酰胺 (p.Asp158Asn) 的错义突变。而家系中健康对照及无亲缘关系的正常人均未发现该突变。**结论** *ATP2C1* 基因的第 21 号外显子的第 472 位核苷酸由 G 变为 A 是 *ATP2C1* 基因新的突变位点, 可能是家族性良性慢性天疱疮家系发病的主要原因。

[关键词] 良性家族性慢性天疱疮; 钙转运 ATP 酶类; *ATP2C1* 基因; 基因突变

[中图分类号] R 758.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2019)05-0583-04

A family with Hailey-Hailey disease and its *ATP2C1* gene mutation analysis

ZHAO Jing¹, GAO Ying¹, WU Jian-hua^{2*}

1. Department of Dermatology, The Central Hospital of Wuhan, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430014, Hubei, China

2. Department of Dermatology, Changhai Hospital, Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To report a family with Hailey-Hailey disease (HHD) and to analyze the *ATP2C1* gene mutation. **Methods** The general data of HHD family members were collected for clinical investigation, and the family tree was drawn. *ATP2C1* gene was detected by PCR and Sanger direct sequencing in 4 HHD patients of the family, and 3 healthy members in the family and 100 unrelated normal volunteers were taken as controls. **Results** In the 4 HHD patients, a novel missense mutation (c.472G>A) on the 21th exon of the *ATP2C1* gene was identified, which resulted in a missense mutation of aspartic acid (p.Asp158Asn). But the mutation was not found in the healthy members in the family or the unrelated normal individuals. **Conclusion** The missense mutation c.472G>A on exon 21 of *ATP2C1* gene is a new mutation site, which may be the main cause of HHD.

[Key words] benign familial pemphigus; calcium-transporting ATPases; *ATP2C1* gene; gene mutation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2019, 40(5): 583-586]

家族性良性慢性天疱疮又称 Hailey-Hailey 病 (Hailey-Hailey disease, HHD), 是一种罕见的常染色体显性遗传性皮肤病^[1]。HHD 典型的临床表现为颈部、腋下、腹股沟、外阴等皮肤皱褶部位反复出现红斑、水疱、糜烂, 自觉瘙痒; 通常于青春后期发病, 临床上常误诊为湿疹或股癣, 但其组织病理具有特征性, 表现为表皮内棘层松解, 呈倒塌砖墙样外观^[2]。目前研究表明 Hailey-Hailey 病是由

一种编码细胞钙泵的 *ATP2C1* 基因突变所致^[3-4]。*ATP2C1* 基因包含 27 个外显子, HHD 的突变位点主要位于外显子 12、13、21、23、24 和 25^[5-6]。本研究通过 Sanger 直接测序法对 HHD 一家系成员进行了 *ATP2C1* 基因检测并予以分析, 发现患者第 21 号外显子的第 472 位核苷酸由 G 变为 A, 导致错义突变, 经检索文献, 未见有关该突变的报道, 现将本研究结果报告如下。

[收稿日期] 2018-09-17 [接受日期] 2018-12-18

[作者简介] 赵 静, 硕士生. E-mail: 13807262695@163.com

*通信作者(Corresponding author). Tel: 021-31161562, E-mail: wujh_ch@163.com

1 资料和方法

1.1 临床资料 收集 HHD 家系成员的一般资料进行临床调查。共调查了该家系 4 代共 23 人,其中 HDD 患者 7 例,男 3 例、女 4 例,25~33 岁发病,家系谱见图 1A。先证者,男,32 岁,双侧腹股沟和腋下红斑、糜烂反复发作 7 年,皮损夏天加重、冬天趋于缓解。专科体格检查:双侧腋

下散在多个暗褐色斑疹,无水泡、糜烂、渗出,双侧腹股沟、阴囊、肛周有弥漫性暗褐色斑片,苔藓化明显,边界不清,表面粗糙,呈增殖性损害,无红斑、水泡及糜烂(图 1B)。皮损组织病理检查提示:基底层上裂隙和“绒毛”形成,可见许多棘刺松解细胞,呈倒塌砖墙样外观(图 1C)。根据患者的临床表现及组织病理特征确诊为 HHD。



图 1 HHD 家系图谱及先证者相关图片

A: HHD 家系图谱; B: 先证者临床表现(腹股沟有弥漫性暗褐色斑片,呈增殖性损害); C: 先证者皮损组织 H-E 染色结果(基底层上裂隙和“绒毛”形成,可见许多棘刺松解细胞,呈倒塌样砖墙样外观)。HHD: 家族性良性慢性天疱疮。Original magnification: $\times 200$ (C)

1.2 外周血 DNA 的提取 该家系共 7 例患者,其中 1 例患者已去世,另 2 例患者不愿接受我们的检查,最终本研究收集了 4 例患者的外周血。患者及家属签署知情同意后,抽取家系中这 4 例患者外周血 5 mL,经 2% EDTA 抗凝,用试剂盒(美国 Promega 公司)提取基因组 DNA,同样抽取家系中 3 例健康者和 100 例无亲缘关系的正常人进行对照,以排除基因的多态性。

1.3 引物设计 在线(<http://asia.ensembl.org>)检索 *ATP2C1* 基因 mRNA 序列,经序列对比得到 *ATP2C1* 基因的全基因组序列,应用 Primer 5.0 软件设计 *ATP2C1* 基因的 27 对引物,其中用于扩增的 21 号外显子的引物序列为:上游引物 5'-TTC TGG CTT CTG CAG TCA TCA-3',下游引物 5'-AAG CAA CTG TAA CGA ATA G-3'。所有引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.4 PCR 扩增 PCR 反应体系共 25 μ L: 上下游引物(0.4 mmol/L)各 1 μ L,模板 DNA 1 μ L, *Taq* 酶 1.25 U, dNTP(0.4 mmol/L) 0.5 μ L、 $MgCl_2$ (2.0 mmol/L) 1.5 μ L,其余用 ddH_2O 补足至 25 μ L。在 9700 型 PCR 扩增仪(美国 Applied Biosystems 公司)上进行 PCR 扩增,反应条件: 94 $^{\circ}C$ 5 min; 94 $^{\circ}C$ 45 s, 55~60 $^{\circ}C$ 50 s, 72 $^{\circ}C$

50 s,共 35 个循环; 72 $^{\circ}C$ 8 min。PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,使用 PCR 产物纯化试剂盒[生工生物工程(上海)股份有限公司]纯化,将纯化产物送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序,确定突变位点。

2 结果

基因测序结果(图 2)显示, HHD 家系 4 例患者 *ATP2C1* 基因的第 21 号外显子的第 472 位核苷酸由 G 变为 A,该突变导致原先 158 位的天冬氨酸变为天冬酰胺(p.Asp158Asn)的错义突变,其编码的蛋白质发生结构和功能丧失。该家系中 3 例健康者和 100 例无亲缘关系的正常人均未发现此突变。结果证明此突变是该 HHD 家系的致病突变而非单核苷酸多态性。

3 讨论

HHD 是一种罕见的常染色体显性遗传性皮肤病,本研究报道的该 HHD 家系中 4 代共 23 人,其中 HDD 患者 7 例,在 25~33 岁发病,男女皆有发病,符合常染色体显性遗传模式,且从家系图谱上我们发现该家系存在同母异父的现象,先证者的外婆为患者,有过 2 次婚姻,且两边家庭成员均有发病。

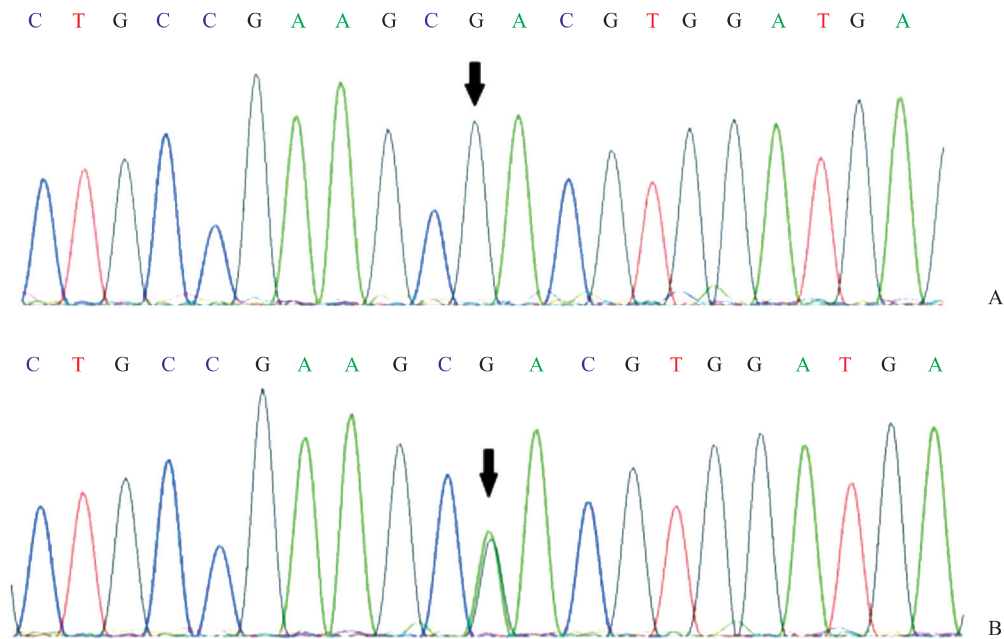


图2 HHD家系 *ATP2C1* 基因测序结果 (箭头所示: c.472G>A)

A: 正常对照; B: HHD患者. HHD: 家族性良性慢性天疱疮

本研究对该 HHD 家系进行基因检测分析, 发现了 *ATP2C1* 基因一个新的突变位点, 即第 21 号外显子第 472 位核苷酸由 G 变为 A, 该突变导致原先 158 位的天冬氨酸变为天冬酰胺 (p.Asp158Asn) 的错义突变。Hu 等^[3]研究发现, 第 21 号外显子编码的氨基酸参与 Mn^{2+} 的结合, 对维持蛋白质的结构和功能起重要作用, 该基因突变导致编码蛋白质的结构和功能丧失, 从而出现相应的临床表现。本研究该家系中 3 例健康者和 100 例无亲缘关系的正常人均未发现此突变。

2000 年 Hu 等^[3]和 Sudbrak 等^[4]分别通过家系连锁分析与定位克隆技术找到 HHD 的致病基因为 *ATP2C1* 基因。*ATP2C1* 基因定位于人染色体 3q21-q22, 包含 27 个外显子^[5]。*ATP2C1* 基因编码的蛋白质是一种存在于高尔基体的新型钙泵 ATP 酶, 又称为人类分泌途径 Ca^{2+}/Mn^{2+} -ATP 酶 (hSPCA1), hSPCA1 功能障碍导致表皮颗粒层中 Ca^{2+} 浓度降低, 从而影响桥粒的完整性和 Ca^{2+} 敏感受体激活, 而 Ca^{2+} 敏感受体在触发细胞与细胞间黏附、颗粒层细胞分化与 Ca^{2+} 的重新分布中发挥重要作用^[7]。Behne 等^[8]研究发现 HHD 患者表皮游离 Ca^{2+} 浓度与正常皮肤相比减少, 而 Ca^{2+} 浓度对维持桥粒结构的完整性起重要作用, 这也解释了 HHD 患者发生棘层松解的原因。

目前研究确定至少有 177 个突变位点散布

于 *ATP2C1* 基因中, 其突变类型分别为: 51 个 (28.8%) 错义突变, 44 个 (24.9%) 小缺失突变, 36 个 (20.3%) 剪接突变, 25 个 (14.1%) 无义突变, 12 个 (6.8%) 重复突变, 4 个 (2.3%) 复杂重排, 3 个 (1.7%) 大片段缺失, 2 个 (1.1%) 插入缺失突变^[6]。62.1% (110/177) 的突变属于点突变; 37.3% (66/177) 的 *ATP2C1* 突变位点主要位于外显子 12、13、21、23、24 和 25, 其中第 12 号和 23 号外显子编码的氨基酸对 Ca^{2+} 结合发挥至关重要的作用, 第 13 号外显子编码的氨基酸参与磷酸化, 第 21 号外显子编码的氨基酸参与 Mn^{2+} 的结合^[6], Matsuda 等^[9]推测, 若这些区域发生突变将会对 SPCA1 的功能产生严重影响。在本研究报道的这个家系中, 我们通过基因检测发现 *ATP2C1* 基因突变位点位于第 21 号外显子, 导致原先 158 位天冬氨酸变为天冬酰胺 (p.Asp158Asn) 的错义突变, 推测该基因突变可能导致编码的蛋白质发生结构和功能丧失, 从而影响 Mn^{2+} 的结合, 这可能是该家系发病的主要原因。

目前, 已报道的中国人 HHD 患者 *ATP2C1* 基因突变有 29 种, 其中错义突变 5 种、剪切位点突变 7 种、无义突变 8 种、移码突变 7 种、其他方式 2 种^[10-11]。突变位点分布于整个 *ATP2C1* 基因, 没有突变热点区, 大部分突变均导致提前终止密码子。朱亚刚等^[10]研究发现, 基因突变的类型与临床

表现并无明确的关系,即使相同的突变也会导致不同的临床表现,认为机械摩擦、高温等环境因素也会影响患者的临床表现。

综上所述,本研究基因检测结果显示,*ATP2C1*基因的第21号外显子的第472位核苷酸由G变为A,导致原先158位天冬氨酸变为天冬酰胺(p.Asp158Asn)的错义突变,这可能是该HHD家系发病的主要原因,为该家系成员进行产前诊断及遗传咨询奠定了基础。

志谢 感谢海军军医大学(第二军医大学)长海医院皮肤科陈琢医师、胡蕴琦医师在样本采集及病史采集中提供的帮助。

[参考文献]

- [1] ROSENTHAL L H. Familial benign chronic pemphigus (Hailey)[J]. Arch Derm Syphilol, 1948, 57(3 Pt 2): 433.
- [2] 赵辨. 中国临床皮肤病学[M]. 4版. 南京:江苏科学技术出版社,2010:1470-1472.
- [3] HU Z, BONIFAS J M, BEECH J, BENCH G, SHIGIHARA T, OGAWA H, et al. Mutations in *ATP2C1*, encoding a calcium pump, cause Hailey-Hailey disease[J]. Nat Genet, 2000, 24: 61-65.
- [4] SUDBRACK R, BROWN J, DOBSON-STONE C, CARTER S, RAMSER J, WHITE J, et al. Hailey-Hailey disease is caused by mutations in *ATP2C1* encoding a novel Ca^{2+} pump[J]. Hum Mol Genet, 2000, 9: 1131-1140.
- [5] TON V K, MANDAL D, VAHADJI C, RAO R. Functional expression in yeast of the human secretory pathway Ca^{2+} , Mn^{2+} -ATPase defective in Hailey-Hailey disease[J]. J Biol Chem, 2002, 277: 6422-6427.
- [6] NELLEN R G, STEIJLEN P M, VAN STEENSEL M A, VREEBURG M, European Professional Contributors, FRANK J, et al. Mendelian disorders of cornification caused by defects in intracellular calcium pumps: mutation update and database for variants in *ATP2A2* and *ATP2C1* associated with Darier disease and Hailey-Hailey disease[J]. Hum Mutat, 2017, 38: 343-356.
- [7] BRINI M, CARAFOLI E. Calcium pumps in health and disease[J]. Physiol Rev, 2009, 89: 1341-1378.
- [8] BEHNE M J, TU C L, ARONCHIK I, EPSTEIN E, BENCH G, BIKLE D D, et al. Human keratinocyte *ATP2C1* localizes to the Golgi and controls Golgi Ca^{2+} stores[J]. J Invest Dermatol, 2003, 121: 688-694.
- [9] MATSUDA M, HAMADA T, NUMATA S, TEYE K, OKAZAWA H, IMAFUKU S, et al. Mutation-dependent effects on mRNA and protein expressions in cultured keratinocytes of Hailey-Hailey disease[J]. Exp Dermatol, 2014, 23: 514-516.
- [10] 朱亚刚,张学军,杨森. 家族性慢性良性慢性天疱疮 2家系的基因突变分析[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2012,26:189-191.
- [11] ZHANG F, YAN X, JIANG D, TIAN H, WANG C, YU L. Eight novel mutations of *ATP2C1* identified in 17 Chinese families with Hailey-Hailey disease[J]. Dermatology, 2007, 215: 277-283.

[本文编辑] 尹 茶