

一常染色体显性遗传寻常型鱼鳞病 家系致病基因的定位

胡正茂¹, 谢志国¹, 邬玲仟¹, 梁德生¹, 朱海燕²,
潘 乾¹, 龙志高¹, 戴和平¹, 夏家辉¹, 夏 昆¹

¹中南大学 湘雅医院医学遗传学国家重点实验室, 长沙 410078

²南京市鼓楼医院妇产科, 南京 210008

通信作者: 夏昆 电话: 0731-4805357, 电子邮件: nlmglcy@xysm.net

摘要:目的 研究一常染色体显性遗传寻常型鱼鳞病家系的致病基因。方法 采用基因组扫描方法, 利用 1 号染色体上的微卫星标记对该家系进行连锁分析, 然后对候选基因 *FLG* 的部分编码区及外显子与内含子交界处进行突变检测。结果 在 D1S2696 得到最大两点连锁 LOD 值 3.46 ($\theta=0$), 单体型分析将疾病基因定位在 D1S2726-D1S305 之间约 15cM 范围内; 在 *FLG* 基因的外显子非重复序列及部分重复序列未发现与疾病相关的突变。结论 该寻常型鱼鳞病家系的致病基因位于 D1S2696 附近, 其致病基因可能是除 *FLG* 以外的其他基因。

关键词: 寻常型鱼鳞病; 微卫星标记; 连锁分析; 突变分析

中图分类号: R394.3; R758.5 文献标识码: A 文章编号: 1000-503X(2007)03-0302-05

Mapping of Pathogenic Genes in a Pedigree with Autosomal Dominant Ichthyosis Vulgaris

HU Zheng-mao¹, XIE Zhi-guo¹, WU Ling-qian¹, LIANG De-sheng¹, ZHU Hai-yan²,
PAN Qian¹, LONG Zhi-gao¹, DAI He-ping¹, XIA Jia-hui¹, XIA Kun¹

¹National Laboratory of Medical Genetics of China, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410078, China

²Department of Gynecology and Obstetrics, Nanjing Drum Tower Hospital, Nanjing 210008, China

Corresponding author: XIA Kun Tel: 0731-4805357, E-mail: nlmglcy@xysm.net

ABSTRACT: Objective To elucidate the pathogenic genes in a pedigree with autosomal dominant ichthyosis vulgaris (IV). **Methods** Linkage analysis was performed by using STR markers in chromosome 1, and mutation detection was used to screen for *FLG* gene mutation. **Results** A maximum two-point Lod score of 3.46 ($\theta=0$) was obtained at D1S2696. Haplotype analysis placed the critical region in a 15-CM interval defined by D1S2726 and D1S305, but no mutation of *FLG* was found in our IV patients. **Conclusion** The pathologic gene of the IV family locates near D1S2696, and the *FLG* gene may not ruled out from the pathologic genes.

Key words: ichthyosis vulgaris; micro-satellite markers; linkage analysis; mutation detection

Acta Acad Med Sin, 2007, 29(3): 302-306

鱼鳞病是一种以皮肤干燥伴有鱼鳞状鳞屑为特征的遗传性角化障碍性皮肤病,类似鱼的皮肤,故称鱼鳞病。根据遗传方式、形态学和组织学不同可分为4型:显性遗传寻常型鱼鳞病(ichthyosis vulgaris, IV)、性连锁隐性遗传鱼鳞病、显性遗传先天性鱼鳞病样红皮病、隐性遗传鱼鳞病样红皮病,另外还有与鱼鳞病相关的综合征。IV是遗传性鱼鳞病最常见的一种类型,其主要临床特点是:出生数月后发病,患者在1~4岁时症状已较明显,皮面出现细薄的片状鳞屑,皮损以四肢伸侧为重,尤以小腿明显,同时伴有掌跖角化增厚,手背、上臂、股外侧皮肤增厚,有时还伴有甲变脆、毛发稀疏等。国际上报道IV发病率在1:250到1:5300之间^[1,2],根据四川省流行病学的调查报道,国内患病率为0.229%^[3]。IV的发病机理目前尚不清楚。2006年,Smith等^[4]首次克隆了一个IV的致病基因—filaggrin(*FLG*)。本研究收集了一个IV家系,首先对其进行

了基因组扫描与连锁分析,之后进行了单体型分析及突变分析,以期克隆该家系致病基因。

对象和方法

家系收集 1个来自河北省的IV家系(图1),该家系共有4代27个家系成员。先证者(III-4)临床特征表现为皮肤干燥,四肢伸侧及背部皮肤具灰白色至淡棕色菱形或多角形鳞屑,鳞屑中央固着,边缘翘起,如鱼鳞状,面部皮肤正常;掌跖可见线状皲裂和掌纹加深(图2A),病理组织切片表现为表皮中等角化过度,颗粒层稍变薄,真皮浅层血管扩张,轻度淋巴细胞、组织细胞浸润(图2B)。经专科医生严格的皮肤检查,确诊家系中有IV患者7人,7名患者在家系中表现连续3代分布,其中男性患者3人,女性患者4人,无明显性别差异,符合常染色体显性遗传特征。

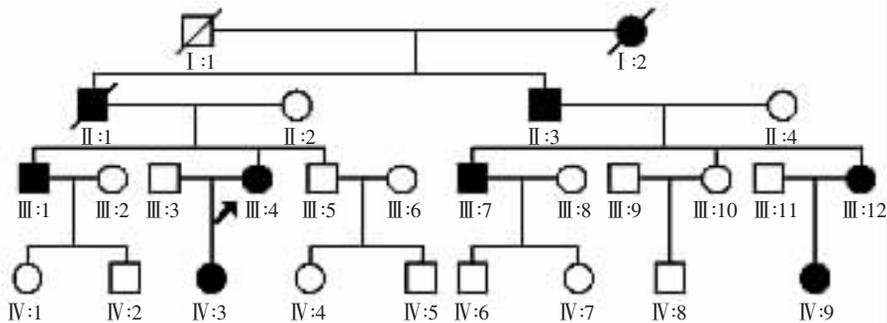


图1 中国河北寻常型鱼鳞病家系
Fig 1 Pedigree of ichthyosis vulgaris
箭头所示为先证者
Arrow: proband

外周血 DNA 提取 在患者知情同意的前提下,采集22个家系成员外周血样各10 ml(除III-9、III-11),常规苯酚、氯仿抽提基因组DNA。

基因组扫描 用1号染色体上微卫星荧光标记引物(ABI PRISM™ Linkage Mapping Set Version 2)进行基因组扫描。在5 μl反应体系中进行多重PCR,包含30 ng gDNA,10 × PCR缓冲液0.5 μl,10 mmol/L dNTPs 0.1 μl,25 mmol/L MgCl₂ 0.6 μl,每条引物80 pmol和0.2 U GOLD Taq酶。PCR产物在ABI3100测序仪上电泳,数据分析用GeneScan3.0和Genotyper 2.1软件。

连锁分析 采用Linkage5.1软件计算两点连锁值。疾病设为常染色体显性遗传模式,外显率为

95%,疾病基因频率设为0.0001,男女重组率设为相同。

精细定位 在Marshfield数据库中D1S252、D1S498和D1S484的附近选取D1S2696等10个微卫星标记,平均相距2 cM左右,重新进行全基因组扫描和连锁分析,进行精细定位研究。

构建单体型图 为了确定该家系疾病基因的最小候选区间,根据微卫星标记的基因分型结果,采用Cyrillic软件构建单体型后,再进行人工校正。

候选基因突变分析 选择定位区间内的候选基因*FLG*进行突变分析。*FLG*基因有3个外显子,其中1号外显子不编码,起始密码子位于2号外显子内,3号外显子大部分为重复序列。根据*FLG*基因

的序列 (NM_002016), 设计了 *FLG* 基因 2 号外显子、3 号外显子非重复序列的引物 (表 1); 同时参照 Smith 等^[4]和 Sandilands 等^[5]订购了 *FLG* 基因部分重复序列的引物, 由上海博亚生物技术有限公司合成。采用热启动 PCR 扩增各对引物, PCR 扩增产物

经过聚丙烯酰胺凝胶电泳检测后, 用虾碱性磷酸酶和核酸外切酶消化, 酶切产物在 ABI3100 测序仪上直接测序, 测序结果用 DNASTAR 软件中的 EditSeq、SeqMan 程序分析, 以 NM_002016 序列为参照, 进行序列比对分析。

表 1 *FLG* 基因突变检测设计的引物
Table 1 Primers for mutation screening of *FLG* gene

引物名称 Primer	正向引物序列 Forward primer sequence	反向引物序列 Reverse primer sequence	产物长度 Product length
FLG-1	ttctcatgtccattctccattc	aagagctcaaaataacccttgc	376 bp
FLG-2	ggctgataatgtgattctgtctg	tgttctcttgggctcttgg	360 bp
FLG-3	gaccctcaagctctgaaagaag	atcagtggtgcataggcttca	374 bp
FLG-4	ggaagaggctaagtgaagacttg	ctgcagagtgccatgact	318 bp
FLG-5	caggatgaagcctatgacacca	gtttgtctgtgcaacttctgg	995 bp
FLG-6	gcactggaggaagacaaggatc	gaactagaactgtgaggactgc	676 bp
FLG-7	tgaggaaacagtcaggagacg	accttttgccttccagtgc	460 bp
FLG-8	tcacaagattctgcgtatcactc	gccacataaacctgggtctct	318 bp
FLG-9	ggtgaatccgggttagaca	cccagaatctcta aaataactcc	497 bp

结 果

连锁分析结果 通过初步定位分析, 在 D1S252 处得到 LOD 值 2.17, D1S498 处得到 LOD 值 1.70,

在 D1S484 处得到 LOD 值 1.08, 进一步利用 Marshfield 数据库选择的遗传标记进行精细定位, 结果在 D1S2696 得到最大两点 LOD 值为 3.46 ($\theta = 0$), 在 D1S187 处 LOD = 3.11 ($\theta = 0$)。遗传标记和疾病位点之间的两点 LOD 值见表 2。

表 2 疾病位点和 1 号染色体上 12 个标记之间的两点 LOD 值
Table 2 Two-point LOD scores between the disease gene and 12 markers of chromosome 1

遗传标记 Locus	LOD Score at $\theta =$ 不同重组率下的 LOD 值					
	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
D1S2726	-4.67	0.47	-0.26	-0.16	-0.08	0.0
D1S187	3.11	2.55	1.93	1.26	0.56	0.0
D1S2746	1.93	1.51	1.07	0.6	0.19	0.0
D1S2881	1.97	1.59	1.18	0.75	0.35	0.0
D1S189	2.29	1.86	1.39	0.91	0.43	0.0
D1S252	2.17	1.97	1.56	1.06	0.52	0.0
D1S534	2.54	2.07	1.55	0.99	0.42	0.0
D1S2696	3.46	2.85	2.18	1.45	0.67	0.0
D1S2346	2.17	1.75	1.30	0.82	0.35	0.0
D1S305	-1.35	1.37	1.10	0.69	0.29	0.0
D1S3466	2.84	2.32	1.76	1.16	0.53	0.0
D1S1153	-1.03	1.69	1.40	0.95	0.45	0.0

单体型图的构建 根据家系中交换数最少的原则对单体型进行人工修正后, 单体型分析被用来确定共分离区的边界 (图 3)。结果显示, 所有患者均携带同一单体型; III-1、III-4、IV-3 在 D1S2346 和 D1S305 之间发生了重组, IV-9 在 D1S2726 和 D1S187 之间发生了重组。据此将该家系的致病基因

定位在 D1S2726-D1S305 之间。

候选基因突变分析结果 扩增产物经 6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测, 所有引物均扩增出与预期大小基本符合的片段。*FLG* 测序结果分析, 先证者 (III-4) 外显子 2 和外显子 3 的非重复序列及部分重复序列均未发现与疾病相关的突变。

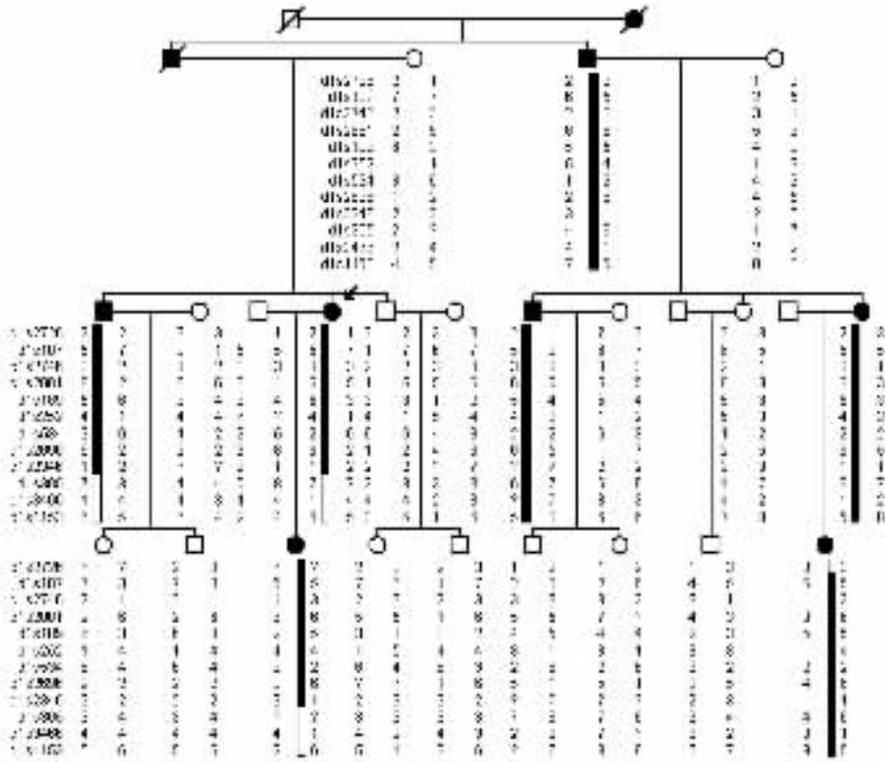


图3 寻常型鱼鳞病家系1号染色体上12个微卫星标记的单体型分析
Fig 3 Haplotype analysis of Ichthyosis vulgaris pedigree

讨 论

迄今为止，关于IV致病基因的定位和克隆研究甚少。2002年，Compton等^[6]对2个IV家系进行了定位研究：对其中一个家系以颗粒层缺失为表型，分别按显性与隐性两种遗传方式进行连锁分析，在D1S1664得到最大LOD值3.6（显性遗传模式），在D1S2346和PFCA得到最大LOD值3.4（隐性遗传模式）；而在另一家系中未得到阳性结果。2003年，Zhong等^[7]研究了2个IV家系，将其致病基因定位于1q22上。2006年，Smith等^[4]研究了7个IV家系，首次发现了1号染色体上的*FLG*基因突变可以导致IV的发生，Sandilands等^[5]也在*FLG*基因中发现了与IV有关的突变。综合上述研究结果，笔者决定首先对采集的IV家系的1号染色体进行基因组扫描。经过基因组扫描和连锁分析，本研究在D1S252处得到LOD值2.17，提示该家系致病基因可能与1号染色体连锁。随后进行了精细定位，在D1S2696得到最大两点Lod值3.46（ $\theta = 0$ ）。为了确定共分离的边界，本研究进行了单体型分析，结果显示，所有患者均携带同一单体型；III-1、III-4、IV-3在D1S2346

和D1S305之间发生了重组，提示疾病基因位点位于1号染色体长臂D1S305的着丝粒端及1号染色体短臂；IV-9在D1S2726和D1S187之间发生了重组。进一步提示疾病基因位点位于1号染色体短臂D1S2726的着丝粒端。这些结果尤其是这些重组事件的发生则将该IV家系致病基因定位于D1S2726和D1S305之间15cM区域。

颗粒层变薄或消失是寻常型鱼鳞病病理特征之一，而透明角质颗粒（keratohyalin granules, KHG）是颗粒层特征性结构，丝聚合蛋白是KHG的主要组成成分，丝聚合蛋白原是丝聚合蛋白的无活性不溶性前体。2000年，Presland等^[8]构建了IV小鼠动物模型：发现在一种突变体为片层状尾巴的小鼠体内丝聚合蛋白原mRNA含量明显低于正常对照；同时，在培养的IV患者皮肤角质细胞中发现丝聚合蛋白原蛋白表达降低。有研究发现IV患者的丝聚合蛋白原、丝聚合蛋白减少或缺如；除此之外，还有研究人员在IV患者中发现丝聚合蛋白mRNA减少^[9,10]。人类丝聚合蛋白原的相对分子质量约300 000，其编码基因*FLG*位于人类染色体1q21区，人类丝聚合蛋白原基因包含3个外显子，被2个长度分别为9 713 bp和570 bp的内含子分隔开^[11]，其中第1个外显子不编

码,而第3个外显子主要由10~12个长度为972 bp的丝聚合蛋白重复序列组成,这些重复单元相似性极高,接近100%。2006年,Smith等^[4]首次发现了IV患者中存在*FLG*基因突变,Gruber等^[12]的研究也证实了这一结果,从而提供了丝聚合蛋白原基因可以导致鱼鳞病的直接证据。本研究定位的区间内正好包括*FLG*基因,因此首先选择*FLG*基因在家系中进行突变分析。由于*FLG*基因结构的特殊性,传统的基于PCR的测序方法无法覆盖整个序列,因此只检测了外显子2、外显子3的非重复序列以及已报道发现突变的部分重复序列。测序结果并未在该基因中发现与疾病相关的突变。由于对*FLG*基因全部编码序列进行突变检测极为困难,同时突变也可能存在于*FLG*基因的内含子中,因此本研究还不能完全排除*FLG*基因是该家系的致病基因。

但是,Zhong等^[7]定位的区间并不包含*FLG*基因在内,提示1号染色体上可能还有别的IV致病基因位点。通过UCSC数据库检索,本研究定位的区间内共有Kown Gene 455个,refseq Gene 200个,其中包括1个表皮分化复合物基因簇,有丝聚合蛋白、套膜蛋白、兜甲蛋白、外皮蛋白、毛透明蛋白、钙结合蛋白家族和富含脯氨酸小蛋白家族等一系列基因,它们的功能都与细胞套膜形成、表皮的终末分化密切相关^[13]。这些都提示1号染色体可能存在其他的IV致病基因。这些尚未克隆的IV致病基因既有可能通过与*FLG*之间的相互影响,也可能通过其他的机制影响IV的发生。因此一方面应该采用其他技术对*FLG*基因的重复区域进行研究,另一方面应在笔者定位的区域内继续选择相关基因(如表皮分化复合物基因簇的基因)进行突变分析,以便阐明该家系的致病基因,为从分子水平进一步研究IV的发病机制,及更好地诊断、预防和治疗此类疾病奠定基础。

(本文图2见插图第1页)

参 考 文 献

- [1] Segre JA. Epidermal differentiation complex yields a secret: mutations in the cornification protein filaggrin underlie ichthyosis vulgaris [J]. *J Invest Dermatol*, 2006, 126(6): 1202-1204.
- [2] Wells RS, Kerr CB. Clinical features of autosomal dominant and sex-linked ichthyosis in an English population [J]. *Br*

Med J, 1966, 1: 947-950.

- [3] 雷观鲁,张谊之,胡应,等.四川省鱼鳞病流行病学调查报告[J].*中华皮肤科杂志*, 1992, 25(2):105-106.
- [4] Smith FJ, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, et al. Loss-of-function mutations in the gene encoding filaggrin cause ichthyosis vulgaris [J]. *Nat Genet*, 2006, 38(3): 337-342.
- [5] Sandilands A, O'Regan GM, Liao H, et al. Prevalent and rare mutations in the gene encoding filaggrin cause ichthyosis vulgaris and predispose individuals to atopic dermatitis [J]. *J Invest Dermatol*, 2006, 126(8): 1770-1775.
- [6] Compton JG, DiGiovanna JJ, Johnston KA, et al. Mapping of the associated phenotype of an absent granular layer in ichthyosis vulgaris to the epidermal differentiation complex on chromosome 1 [J]. *Exp Dermatol*, 2002, 11(6): 518-526.
- [7] Zhong W, Cui B, Zhang Y, et al. Linkage analysis suggests a locus of ichthyosis vulgaris on 1q22 [J]. *J Hum Genet*, 2003, 48(7): 390-392.
- [8] Presland RB, Boggess D, Lewis SP, et al. Loss of normal profilaggrin and filaggrin in flaky tail (ft/ft) mice: an animal model for the filaggrin-deficient skin disease ichthyosis vulgaris [J]. *J Invest Dermatol*, 2000, 115(6): 1072-1081.
- [9] Nirunskiri W, Presland RB, Brumbaugh SG, et al. Decreased profilaggrin expression in ichthyosis vulgaris is a result of selectively impaired posttranscriptional control. *J Biol Chem*, 1995, 270(2): 871-876.
- [10] Nirunskiri W, Zhang SH, Fleckman P. Reduced stability and bi-allelic, coequal expression of profilaggrin mRNA in keratinocytes cultured from subjects with ichthyosis vulgaris [J]. *J Invest Dermatol*, 1998, 110(6): 854-861.
- [11] Gan SQ, McBride OW, Idler WW, et al. Organization, structure, and polymorphisms of the human profilaggrin gene [J]. *Biochemistry*, 1990, 29(40): 9432-9440.
- [12] Gruber R, Janecke AR, Fauth C, et al. Filaggrin mutations p. R501X and c. 2282del4 in ichthyosis vulgaris [J]. *Eur J Hum Genet*, 2007, 15(2): 179-184.
- [13] Mischke D, Korge BP, Marenholz I, et al. Genes encoding structural proteins of epidermal cornification and S100 calcium-binding proteins form a gene complex ("epidermal differentiation complex") on human chromosome 1q21 [J]. *J Invest Dermatol*, 1996, 106(5): 989-992.

(2007-01-29 收稿)