

## 家族性慢性良性天疱疮一家系致病基因新突变的发现

张正中<sup>1,2</sup>, 李 伟<sup>1</sup>, 周伏圣<sup>1</sup>, 高 敏<sup>1</sup>, 肖凤丽<sup>1</sup>, 方巧云<sup>1</sup>,  
沈玉君<sup>1</sup>, 杜文辉<sup>1</sup>, 眭维耻<sup>2</sup>, 杨 森<sup>1</sup>, 张学军<sup>1</sup>

<sup>1</sup>安徽医科大学皮肤病研究所 安徽医科大学第一附属医院皮肤科 教育部  
“重要遗传病基因资源利用”重点实验室(省部共建), 合肥 230032

<sup>2</sup>川北医学院 附属医院皮肤性病科, 四川南充 637000

通信作者: 张学军 电话: 0551-5161002, 传真: 0551-5161016, 电子邮件: ayzxi@vip.sina.com

**摘要:** **目的** 对家族性慢性良性天疱疮一家系的 *ATP2C1* 基因突变进行检测。**方法** 采用聚合酶链反应扩增该家系患者和健康对照个体 *ATP2C1* 基因的全部外显子, 直接测序法进行 DNA 测序, 100 例无亲缘关系的正常人作为对照。**结果** 该家系患者 *ATP2C1* 基因内含子 3 的末端 235-2 碱基发生了 1 个腺嘌呤(A)→鸟嘌呤(G)的杂合性剪接位点突变。家系中健康对照个体及无亲缘关系的正常对照均未发现该突变。**结论** 该剪接位点突变可影响基因转录和翻译产物, 是 *ATP2C1* 基因新的特异性突变。

**关键词:** 家族性慢性良性天疱疮; *ATP2C1* 基因; 突变

中图分类号: R753.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-503X(2007)02-0163-04

### Identification of A Novel Mutation in the *ATP2C1* Gene in A Chinese Pedigree with Hailey-Hailey Disease

ZHANG Zheng-zhong<sup>1,2</sup>, LI Wei<sup>1</sup>, ZHOU Fu-sheng<sup>1</sup>, GAO Min<sup>1</sup>, XIAO Feng-li<sup>1</sup>, FANG Qiao-yun<sup>1</sup>,  
SHEN Yu-jun<sup>1</sup>, DU Wen-hui<sup>1</sup>, SUI Wei-chi<sup>2</sup>, YANG Sen<sup>1</sup>, ZHANG Xue-jun<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Dermatology & Department of Dermatology, the First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, the Key Laboratory of Gene Resource Utilization for Genetic Disease, Ministry of Education and Anhui Province, Hefei 230032, China

<sup>2</sup>Department of Dermatology, the Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan 637000, China

Corresponding author: ZHANG Xue-jun Tel: 0551-5161002, Fax: 0551-5161016, E-mail: ayzxi@vip.sina.com

**ABSTRACT: Objective** To study a Chinese pedigree with Hailey-Hailey disease (HHD) and examine the *ATP2C1* gene mutation in this family. **Method** All exons of *ATP2C1* gene were analyzed with polymerase chain reaction and DNA sequencing in all patients of this family and 100 unrelated population-match controls. **Results** We identified a novel heterozygous nucleotide A→G transition at position 235-2 in intron 3 of *ATP2C1* gene. This splice site mutation was not found in the healthy members of this pedigree and in the controls. **Conclusion** The splicing mutation can affect the result of transcription and translation, and it is a specific novel mutation of *ATP2C1* gene.

**Key words:** Hailey-Hailey disease; *ATP2C1* gene; mutation

*Acta Acad Med Sin*, 2007, 29(2): 163-166

家族性慢性良性天疱疮由 Hailey 兄弟于 1939 年首次报道, 又称 Hailey-Hailey 病<sup>[1]</sup> (Hailey-Hailey disease, HHD)。该病是一种罕见的常染色体显性遗传性皮肤病, 临床上以皮肤皱褶部位反复出现水疱和糜烂为特征。组织病理示表皮内棘层松解, 基底层上方裂隙及水疱形成, 疱内可见棘刺松解细胞, 基底层上如倒砖墙样外观。基因连锁分析将 HHD 致病基因定位于染色体 3q21-q24, 有研究表明, *ATP2C1* 基因的异常是 HHD 的致病原因<sup>[2]</sup>。本研究报道中国四川汉族人 HHD 一家系, 并通过直接测序

的方法对家系成员进行 *ATP2C1* 基因的突变检测。

## 对象和方法

**对象** HHD 家系来自四川省, 共调查 3 代 16 个个体。研究对象均为汉族人, 分别为先证者及其父母、弟弟、妹妹共 8 人, 包括 5 例患者和 3 例正常人 (图 1)。所有患者均具有 HHD 的典型临床特征, 符合 HHD 的诊断标准。

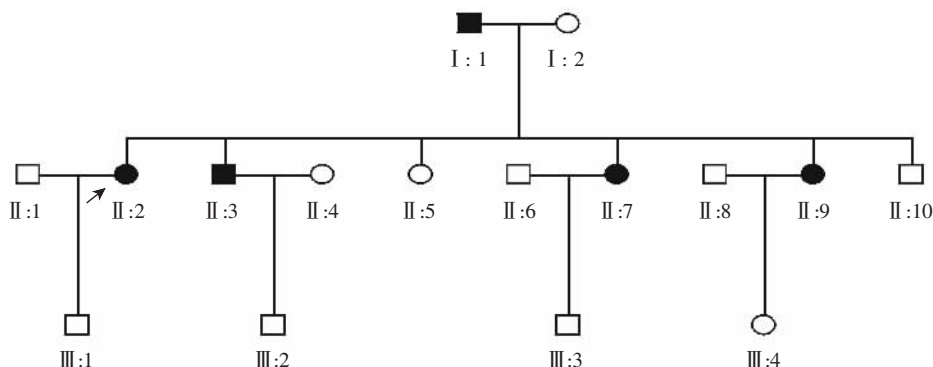


图 1 家族性慢性良性天疱疮家系图

Fig 1 A pedigree of Hailey-Hailey disease

箭头: 先证者

Arrow: proband

**先证者病史:** 先证者 (II:2), 女, 52 岁。因双侧腹股沟及腋下反复起水疱、糜烂 7 年就诊。7 年前双侧腹股沟开始出现水疱, 继之糜烂、浸渍、结痂, 后双腋下亦受累。自觉无瘙痒, 时有轻微疼痛。活动、出汗、摩擦、感染时皮损加重。病情长期反复发作, 时轻时重, 一般只累及双侧腹股沟。先证者既往有 20 余年白癜风病史, 现颜面、颈部、四肢、手背等处仍见白色色素脱失斑。皮肤科情况: 左侧腹股沟可见边界较清楚的椭圆形皮损区, 为片状糜烂、浸渍、结痂, 其边缘可见松弛性水疱, 尼氏征阳性; 右侧腹股沟可见少许色素沉着。颈、腋下、乳房下、肛周等皱褶部位未见皮损。左侧腹股沟皮损病理活检显示基底层上水疱形成和许多棘刺松解细胞, 基底细胞如倒砖墙样外观, 符合家族性慢性良性天疱疮病理特征。

**家系调查:** 先证者父亲有家族性慢性良性天疱疮病史, 母亲有白癜风病史, 先证者患有家族性慢性良性天疱疮伴白癜风; 其 1 个弟弟及 2 个妹妹亦有家族性慢性良性天疱疮病史; 家人中无近亲婚配史, 第 3 代子女未见发病。

**基因组 DNA 的提取** 在取得患者及其家属知情同意后, 采集 HHD 家系中作为研究对象的 5 例患者和 3 例正常人肘静脉血 5 ml, 放置于 EDTA<sub>N<sub>a</sub></sub> 抗凝管中, -85℃ 冰柜储存。采用盐析法提取研究对象基因组 DNA, 同时提取 100 例无亲缘关系正常人 (来自门诊随机挑选的非 HHD 患者, 已签署知情同意书) 的基因组 DNA 作为对照, 以排除可能存在的基因多态性。

**引物设计** 通过因特网 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 检索 *ATP2C1* 基因 mRNA 序列, 序列对比得到 *ATP2C1* 基因的全基因组序列。针对 *ATP2C1* 基因的 27 个外显子设计 26 对引物, 因为外显子 14、15 产物的片段太短, 合并设计成 1 对引物。外显子 4、27 的引物为自行设计, 扩增序列包括整个外显子及超出目标序列边界 (内含子内) 50 bp 的序列, 其余引物参考文献 [3]。采用 Primer 5.0 引物设计软件设计的外显子 4 引物为: F 5'-TTCCAGTCAT-GCTCTTATG-3'; R 5'-CCAACTACTCAGGATGCT-3'; 外显子 27 引物为: F 5'-CTACCAATGATTGCCTCC-3'; R 5'-GCAGAGTTCCAAAGAGTG-3'。所有引物均由上

海生工生物工程技术有限公司合成，引物采用 PAGE 胶纯化后稀释为 20 μmol/L 备用。

**PCR 扩增** PCR 反应体系为 10 μl，含 10 × Buffer 1.0 μl，Primer (20 mmol/L) 0.25 μl × 2，dNTP (10 mmol/L) 0.2 μl，MgCl<sub>2</sub> (25 mmol/L) 0.6 μl，Taq 聚合酶 1.0 U，模板 DNA 0.5 μl，ddH<sub>2</sub>O 补至 10 μl。PCR 反应在 9700 型 PCR 扩增仪 (美国 ABI 公司) 上进行，采用 Touchdown 程序，反应条件如下：预变性 94℃ 3 min，变性 94℃ 40 s、退火 64℃ 50 s、延伸 72℃ 50 s，前 14 个循环每个循环退火温度下降 0.5℃，14 个循环后降至 57℃，再以 57℃ 为退火温度 30 个循环，最后 72℃ 延伸 10 min。PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测，采用 Exon I 和 SAP 酶切纯化，将纯化产物进行测序 PCR 反应，反应后再进行测序前纯化。

**直接测序** 将测序前 PCR 纯化产物上样，经 CEQ 8800 型 DNA 全自动测序仪 (美国贝克曼库尔特公司) 直接测序，测序结果采用 Chromas 软件 (版本 2.0) 对基因序列进行对比分析，确定突变位点。

## 结 果

该 HHD 家系 5 例患者 *ATP2C1* 基因内含子 3 的末端 235 - 2 碱基均发生了一个 A → G 的剪接位点杂合突变 (235 - 2 A → G) (图 2)，导致该处剪辑和加工异常，不能形成正确的 mRNA 分子。家系中 3 例

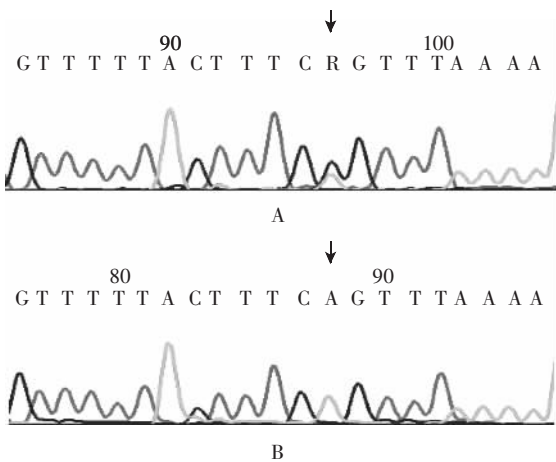


图 2 *ATP2C1* 基因第 3 号内含子 5' 端测序图  
 Fig 2 Direct sequencing from 5' of the polymerase chain reaction product in intron 3 of *ATP2C1* gene  
 A. 患者; B. 正常对照  
 箭头: 突变点 235 - 2 A → G  
 A. patients; B. normal controls  
 Arrow: the position of mutation site (235 - 2 A → G)

健康对照个体及无亲缘关系的 100 例正常人对照均未发现该突变位点。

## 讨 论

家族性慢性良性天疱疮 (HHD) 是一种以皮肤皱褶部位反复出现水疱和糜烂为特征的罕见遗传性皮肤病，组织病理特征为棘刺松解细胞如倒砖墙样外观。本研究先证者具有典型的临床和病理特征，其余患者亦具有 HHD 的典型临床特征，病情轻重不一。该家系中患者双亲之一是患者，I、II 代患者呈连续传递，具垂直传递现象，符合常染色体显性遗传模式。III 代个体未见发病，可能与未到发病年龄有关。先证者父亲有家族性慢性良性天疱疮病史，母亲有白癜风病史，先证者同时患有家族性慢性良性天疱疮和白癜风，这种遗传方式的病例较少。

HHD 致病基因定位于 3q21-q24，其发病由 *ATP2C1* 基因突变所致。由于 *ATP2C1* 基因突变导致角质形成细胞内钙离子信号传导障碍，从而导致棘刺松解的发生，出现病理下特有的倒砖墙样外观<sup>[4]</sup>。该基因共有 27 个外显子，突变位点散布在整个 *ATP2C1* 基因，没有热点突变区<sup>[5]</sup>，且每个家系都拥有其独特的突变型<sup>[6]</sup>。目前，尚无证据表明 HHD 有遗传异质性<sup>[7]</sup>。近年中国人 HHD 患者已检测出 34 种突变，其中 29 种是新突变<sup>[7-9]</sup>。

本研究对 1 个四川汉族 HHD 家系进行突变检测，5 例患者 *ATP2C1* 基因内含子 3 的末端 235 - 2 碱基均发生了一个 A → G 的剪接位点杂合突变 (235 - 2 A → G)，家系中 3 例健康对照个体及无亲缘关系的 100 例正常人对照均未发现该突变位点，表明该剪切位点突变是导致家系发病的特异性突变，经文献检索未见报道，是 HHD 的一种新的突变方式。剪切位点突变是指在外显子与内含子交界的第一或二个碱基处 (内含子内) 发生的突变，一般认为此处碱基序列恒定，为剪切提供识别位点。剪切位点处发生突变，通常会引起外显子的剪切异常，或使用内含子中新的潜在的剪切位点，这样通常会在其下游形成提前终止密码子，进而影响基因转录和翻译产物，导致蛋白质的结构、功能异常，从而发病<sup>[9,10]</sup>。

对本研究 HHD 家系进行初次家系调查时，现场调查仅发现 I : 1、II : 2、II : 7 3 例患者，电话询问 5 例否认类似病史。而实验结果显示 I : 1、II : 2、II : 3、II : 7、II : 9 均有突变位点，表明 II : 3、II : 9 亦是患

者。对先证者家人再次家系调查,临床证实了Ⅱ:3、Ⅱ:9患病,只是临床表型略轻,被误诊为湿疹。该2例患者基因诊断先于临床诊断。

本研究证实了四川汉族人HHD一家系的致病基因是*ATP2C1*基因,进一步表明HHD致病突变的多样性,为HHD患者的遗传咨询和产前诊断打下了基础。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Burge SM. Hailey-Hailey disease : the clinical features , response to treatment and prognosis [ J ]. Br J Dermatol , 1992 , 126( 3 ) 275-282.
- [ 2 ] Hu Z , Bonifas JM , Beech J , *et al.* Mutations in *ATP2C1* , encoding a calcium pump , cause Hailey-Hailey disease [ J ]. Nat Genet , 2000 , ( 1 ) 24 61-65.
- [ 3 ] Chao SC , Tsai YM , Yang MH. Mutation analysis of *ATP2C1* gene in Taiwanese patients with Hailey-Hailey disease [ J ]. Br J Dermatol , 2002 , 146( 4 ) 595-600.
- [ 4 ] 朱亚刚,张学军,杨 森. 家族性良性天疱疮的分子遗传学研究新进展 [ J ]. 中国皮肤性病学杂志 , 2005 , 19 ( 2 ) :115.
- [ 5 ] Li H , Sun XK , Zhu XJ. Four novel mutations in *ATP2C1* found in Chinese patients with Hailey - Hailey disease [ J ]. Br J Dermatol , 2003 , 149( 3 ) 471-474.
- [ 6 ] 颜潇潇,张福仁. 家族性良性天疱疮分子生物学研究新进展 [ J ]. 国外医学皮肤性病学分册 , 2005 , 31( 6 ) : 371.
- [ 7 ] Zhang XQ , Wu HZ , Li BX , *et al.* Mutations in the *ATP2C1* gene in Chinese patients with Hailey-Hailey disease [ J ]. Clin Exp Dermatol , 2006 , 31( 5 ) 702-705.
- [ 8 ] Zhu YG , Yang S , Gao M , *et al.* Two novel mutations of the *ATP2C1* gene in Chinese families with Hailey-Hailey disease [ J ]. J Dermatol Sci , 2006 , 42( 2 ) :125-127.
- [ 9 ] 颜潇潇,张德科,张福仁,等. 家族性良性天疱疮基因突变研究 [ J ]. 中华皮肤科杂志 , 2006 , 39( 6 ) 310.
- [ 10 ] 李 航,孙秀坤,卜定方,等. 11例慢性家族性良性天疱疮患者的基因突变 [ J ]. 北京大学学报( 医学版) , 2003 , 35( 4 ) 391.

( 2006-12-20 收稿 )