

外胚层发育不良患者基因突变分析及功能验证

赵凯^{1,2}, 喻康^{1,2}, 王凤², 黄伟², 孙媛元^{1*}, 吴轶群^{1,2*}

(1.上海交通大学医学院附属第九人民医院·口腔医学院 口腔第二门诊部, 2.口腔种植科, 国家口腔疾病临床医学研究中心, 上海市口腔医学重点实验室, 上海市口腔医学研究所, 上海 200011)

[摘要] 目的: 寻找先天性外胚层发育不良(ectodermal dysplasia, ED)可能致病的基因突变并进行功能验证。方法: 收集8例ED患者血液样本并进行基因组抽提, 利用全外显子测序(whole-exome sequencing, WES)对患者基因组DNA进行高通量测序。对测序结果进行质量控制, 确保质检合格后, 从中筛选可能的致病基因突变。利用软件对筛选的基因突变致病性进行预测, 利用免疫荧光实验及双荧光素酶实验对基因突变致病性进行功能验证。结果: 所有样本全外显子测序有效率(effective rate)均为97.5%以上, 错误率(error rate)均小于0.03%, Q20所占比例大于97.0%, 目标区域的平均测序深度均为90×以上, 提示测序数据质量良好。经筛选后, 共发现3个可能致病的EDA基因点突变: c.959A>G, c.1073A>G, c.1001G>A, 数据库比对显示其均为罕见变异, 软件预测均为致病性突变。免疫荧光实验发现3个EDA突变可导致p65蛋白核移位减少, 双荧光素酶实验进一步表明3个EDA突变可导致NF-κB通路活性降低。结论: 本研究利用全外显子测序在ED患者基因组中发现了EDA突变, 并对突变致病基因进行了功能验证, 为进一步理解ED的发病机制提供了依据。

[关键词] 外胚层发育不良; 全外显子测序; NF-κB通路; 功能验证

[中图分类号] R782.1

[文献标志码] A

DOI: 10.19439/j.sjos.2019.03.009

Mutation screening and functional analysis for 8 patients with ectodermal dysplasia ZHAO Kai^{1,2}, YU Kang^{1,2}, WANG Feng², HUANG Wei², SUN Yuan-yuan¹, WU Yi-qun^{1,2}. (1. Second Dental Clinic, 2. Department of Dental Implantology, Shanghai Ninth People's Hospital, College of Stomatology, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine; National Clinical Research Center for Oral Diseases; Shanghai Key Laboratory of Stomatology & Shanghai Research Institute of Stomatology. Shanghai 200011, China)

[Abstract] PURPOSE: To identify the potentially pathogenic mutations in patients with ectodermal dysplasia (ED) and to investigate the pathogenicity of mutations by functional studies. **METHODS:** Eight Chinese ED patients were included in this study. Peripheral venous blood was taken from the patients and DNA was extracted. Whole-exome sequencing (WES) was performed using DNA samples. After quality control of the sequencing data, the potentially pathogenic mutations were screened. The pathogenicity of the mutations was predicted in silico. Immunofluorescence study and dual luciferase assays were performed to investigate the pathogenicity of the mutations. **RESULTS:** The effective rates of all sequencing samples were above 97.5% and the error rates were less than 0.03%. The proportions of Q20 were more than 97.0%. The average sequencing depths of the target region were more than 90×. The sequencing data were acceptable for further analysis. After data screening, three missense mutations of EDA were detected, including c.959A>G, c.1073A>G and c.1001G>A. The allele frequency was low in population database for all three mutations and in silico analysis indicated all three mutations were disease-causing. Immunofluorescence analysis showed that p65 protein nuclear translocation was compromised by EDA mutations, dual luciferase assays also showed that the activation of NF-κB pathway was decreased by EDA mutations. **CONCLUSIONS:** This study identified EDA mutations in Chinese ED patients and further verified

[收稿日期] 2019-02-18; **[修回日期]** 2019-03-11

[基金项目] 国家自然科学基金(81700944);

科技部国家重点研发计划(2017YGB1302904);

上海交通大学医工(理)交叉基金(YG2016ZD01)

[作者简介] 赵凯(1992-), 男, 硕士研究生, E-mail: zhaokaidentist@126.com

[通信作者] 吴轶群, E-mail: yiqunwu@hotmail.com;

孙媛元, E-mail: sunyy1205@163.com。* 共同通信作者

©2019 年版权归《上海口腔医学》编辑部所有

the pathogenicity of the mutations by functional studies, contributing to the understanding of the pathogenesis of ED.

[Key words] Ectodermal dysplasia; Whole-exome sequencing; NF- κ B signaling pathway; Functional studies
Shanghai J Stomatol, 2019, 28(3): 268-274.

先天性外胚层发育不良 (ectodermal dysplasia, ED) 是一种先天性遗传发育缺陷, 主要累及外胚层来源的组织器官。ED 有多种不同的临床类型, 其中, 少汗性外胚层发育不良 (hypohidrotic ectodermal dysplasia, HED) 最为常见。典型的 ED 临床症状主要表现为: 先天性乳牙缺失或恒牙缺失、毛发发育异常、少汗等, 同时患者可伴有颌骨萎缩, 面型发育异常, 角膜或结膜干燥, 呼吸系统症状等其他组织器官功能异常^[1-2]。许多 ED 患者有明显的家族遗传倾向, 目前认为, ED 发病主要与遗传因素有关。ED 的遗传模式可表现为伴 X 染色体或常染色体遗传模式, 其中, 伴 X 染色体隐性遗传较为常见^[3]。目前对于 ED 患者的治疗只能以对症为主, 缺乏早期诊断及早期治疗手段, 明确 ED 病因及发病机制对于指导 ED 患者的早期筛查、早期诊断及临床治疗具有重要意义^[4-6]。

第 2 代高通量测序技术 (next generation sequencing, NGS) 已逐渐发展成熟。利用 NGS 技术, 可以对患者基因组 DNA 序列进行高通量测序; 通过对患者基因组或外显子区域基因变异信息进行分析, 可进一步探讨基因变异与遗传疾病之间的关系, 为遗传疾病的诊断及咨询提供帮助^[7]。目前, 第 2 代高通量测序技术已经在基因组学、遗传病研究及肿瘤研究等多个领域中得到广泛应用^[8-10]。本研究采用全外显子测序方法, 对 8 例外胚层发育不良患者进行基因分析, 寻找患者基因组中可能致病的基因突变, 并利用细胞功能实验对突变的致病性进行验证。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

DMEM 培养基 (HyClone, 美国); 胎牛血清、胰酶消化液 (Gibco, 美国); 双磷酸盐缓冲溶液 (Gibco, 美国); Lipofectamine 2000 (Invitrogen, 美国); 限制性核酸内切酶 (New England Biolabs, 美国); 血基因组抽提试剂盒 (Qiagen, 德国); 培养皿 (Corning, 美国); 双荧光素酶试剂盒 (Promega, 美国); DNA 凝胶回收试剂盒 (Axygen, 美国); 质粒抽提试剂盒 [天根生化科技 (北京) 有限公司, 中国]; p65 蛋白抗体 (CST, #9936, 美国); Opti-MEM 培养基 (Gibco, 美国);

); PCR 工作仪 (Eppendorf, 德国); 离心机 (Thermo, 美国); 显微镜 (Olympus, 日本); 细胞培养箱 (Thermo, 美国) 等。

1.2 研究对象

本研究纳入就诊于上海交通大学医学院附属第九人民医院的先天性外胚层发育不良患者 8 例, 包括男 7 例, 女 1 例, 年龄 18~28 岁。纳入患者均具有至少 2 种以下临床表现: 先天性乳牙或恒牙缺失; 毛发稀少或缺如; 少汗或无汗; 同时可伴有指/趾甲发育异常, 颌骨发育差, 面型异常等全身或局部症状。所有患者均对本项目知情同意, 本研究获得上海交通大学医学院附属第九人民医院伦理委员会批准。

1.3 实验方法

1.3.1 外显子测序 抽取 ED 患者外周静脉血, 采用血基因组抽提试剂盒 (Qiagen), 按试剂盒操作方法抽提血基因组 DNA。经 DNA 质量检测、外显子捕获与文库构建后, 对文库进行质量控制; 文库质检合格后, 在 Illumina 测序平台对样本进行全外显子测序。

1.3.2 数据分析及筛选 采用数据分析软件, 对测序数据的有效性、错误率、碱基分布、Q20、Q30、测序深度、测序覆盖度等进行分析, 评估测序质量。确保原始测序数据质量合格后, 将测序数据与参考基因组数据比对, 对测序数据中的单核苷酸变异 (SNVs)、插入缺失 (InDels) 等进行标注。将标注后的数据按以下标准过滤: 去除 Exome Aggregation Consortium (ExAC) 及 1000 Genome Browsers (1000G) 数据库中频率大于 0.01 的突变; 去除内含子区的突变, 保留外显子区突变; 去除不改变氨基酸序列的同义突变。将滤过后的基因突变进行进一步筛选, 寻找是否有 EDA、EDAR、EDARADD、Wnt10A、IKBKKG、NFKBIA、Nectin-1 等已知与 ED 发病相关基因的突变。将筛选的基因突变用 Polymorphism Phenotyping v2 (PolyPhen2)、Sorting Intolerant from Tolerant (SIFT) 等软件预测其致病性, 并对其影响的氨基酸进行多物种间保守性比对。

1.3.3 表达载体构建 将人源全长 EDA 基因片段及 pcDNA3.0 表达载体经 DNA 限制性核酸酶切后, 进行 DNA 凝胶电泳; 凝胶回收后, 利用 T4 DNA 连接酶将 EDA 基因片段插入 pcDNA3.0 表达载体。将

连接后产物转化大肠杆菌感受态,经热激、复苏后,涂大肠杆菌平板培养基,37℃温箱培养 12~16 h;从培养板内挑单个克隆,37℃摇床摇菌 12~16 h后,按试剂盒操作方法抽提质粒,检测浓度并送公司进行 Sanger 测序(上海博尚生物技术有限公司);对测序结果进行比对,将成功构建的阳性克隆保留。采用基于聚合酶链式反应(PCR)的方法构建相应点突变表达载体^[1],所有克隆均送测序鉴定确认。

1.3.4 稳转细胞系构建 将人源全长 EDAR 基因序列克隆至 PCDH-puro 表达载体,方法同前。将 HEK-293T 细胞铺 6 孔板,待细胞密度长至 70%~80%后,分别转染 PCDH 空载及 PCDH-EDAR 表达载体。转染 24 h 后,采用嘌呤霉素(puromycin)对细胞株进行筛选,筛选 2 周后,收集部分细胞样品,抽提总蛋白后,采用 Western 免疫印迹对细胞 EDAR 表达进行鉴定。

1.3.5 双荧光素酶实验 取对数生长期 293T 细胞株或 293T-EDAR 稳转细胞株,将细胞接种于 24 孔板,待细胞密度长至 80%左右融合时,分别转染相应质粒,每组实验设置 3 个复孔。将目的质粒(800 ng/孔)、NF- κ B 荧光报告质粒(300 ng/孔)及 pRL-TK Renilla 质粒(10 ng/孔)与 100 μ L Opti-MEM 培养基混匀,同时将 Lipofectamine 2000(1.5 μ L)与 100 μ L Opti-MEM 培养基混匀。5 min 后,将两者混匀,室温放置。20 min 后,将细胞培养基更换为 Opti-MEM 培养基(300 μ L 每孔),同时将上述混合物加入细胞培养基后混匀。细胞在 37℃培养 4~6 h 后,更换含 10%FBS 的正常培养基。培养 24 h 后,吸掉细胞培养基,将 1 \times passive lysis 裂解液加入细胞培养皿,室温摇床摇 15 min,使细胞裂解,采用 Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega)系统检测细胞荧光表达值,并进行统计学分析。

1.3.6 免疫荧光 取对数生长期 293T 细胞株,接种于 6 孔板,待细胞密度长至 80%左右融合时进行细胞转染。将含有野生型 EDAR 及突变型 EDAR 基因序列的 pcDNA3.0 表达载体按每孔 4 μ g 质粒分别转染 293T 细胞。当日取对数生长期 293T-EDAR 稳转细胞株,接种于 12 孔板内,盖玻片,培养过夜。细胞培养 24 h 后,分别取转染野生型 EDAR 及突变型 EDAR 的 293T 细胞培养上清液,加入培养 293T-EDAR 稳转细胞株的 12 孔板内,每孔加上清 1 mL,刺激 60 min 后终止。将 12 孔板内的 293T-EDAR

细胞用 10%多聚甲醛固定 20 min,PBS 漂洗;0.1% Triton 透化细胞 10 min,PBS 漂洗;3% BSA 室温封闭 1 h;将 anti-p65 抗体用 3% BSA 按 1:400 比例稀释后,进行抗体孵育,4℃过夜;PBST 漂洗细胞 3 次,每次 10 min;二抗孵育后,将 DAPI 按 1:3000 比例用 PBS 稀释后,进行细胞核染色,室温下染色 15 min 后,加 PBS 进行漂洗;将盖玻片取出后,放在载玻片上,封片,避光吹干。采用 Olympus FV1200 激光扫描共聚焦显微镜观察样品染色结果,分别采用 405、488 nm 波长激发光进行观察。

2 结果

2.1 外显子测序结果

8 例 ED 患者全外显子测序原始数据量(raw data)均为 10 G 以上,测序有效率(effective rate)为 97.5%以上;4 种碱基平均分布,GC 碱基比例占 50%~52%。所有样本测序数据的错误率(error rate)不高于 0.03%,Q20 所占比例大于 97.0%,Q30 所占比例大于 91.0%。目标区域的平均测序深度为 90 \times 以上,目标区域平均覆盖度 98.5%以上。其中,目标区域中测序深度 10 \times 的以上碱基所占比例超过 98.5%,测序深度 20 \times 以上的碱基所占比例超过 95%。以上质量控制结果表明,测序数据质量良好,可用于后续分析。图 1 为 1 例患者外显子测序质量的分析结果。

2.2 突变致病性预测

对测序数据进行筛选后,发现 3 个可能致病的 EDAR 基因点突变:c.959A>G,c.1073A>G,c.1001G>A,其对应的氨基酸序列改变分别为 p.Tyr320Cys、p.Gln358Arg、p.Arg334His。3 个 EDAR 基因突变均位于 EDAR 基因第 8 位外显子,且均为错义点突变,可导致单个氨基酸序列改变(表 1)。

3 个 EDAR 突变在 ExAC 数据库的等位基因频率分别为 0、0、0.0009;在 1000 G 数据库的等位基因频率分别为 0、0、0.005,提示其为人群中罕见的单核苷酸变异。同时,3 个 EDAR 突变在 PolyPhen2 软件的预测评分值均大于 0.9,在 SIFT 的预测值小于 0.05,且 Mutationtaster 软件预测均为“Disease causing”,提示 3 个 EDAR 突变可能为致病性突变(图 2)。进行氨基酸同源序列比对,结果显示,3 个 EDAR 突变所编码的氨基酸在不同物种间高度保守(图 3)。

2.3 突变致病性功能验证

在 293T 细胞系中直接过表达 EDAR,利用双荧

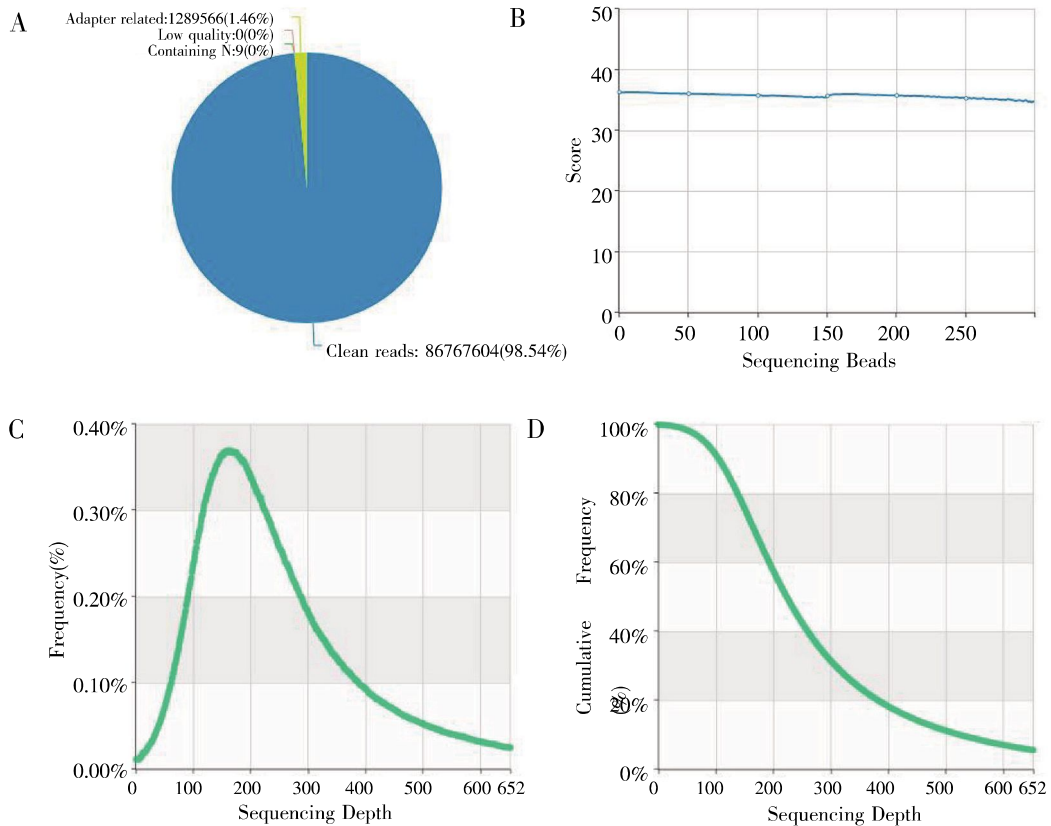


图 1 1例患者全外显子数据质量分析结果。A.原始测序数据过滤情况；B.测序质量值分布；C、D.碱基测序深度分布

Figure 1 Quality analysis of the WES data in one patient. A. Filtering of the Raw data; B. Quality score the sequencing data; C, D. Sequencing depth of the WES data

表 1 先天性外胚层发育不全患者 EDA 基因突变情况

Table 1 EDA mutations in patients with ectodermal dysplasia

患者编号	基因	碱基突变	氨基酸改变	外显子位置	突变类型	ExAC	1000G	SIFT	Polyphen2	Mutationtaster
1	EDA	c.959A>G	p.Tyr320Cys	8	错义突变	0	0	0.03	1	Disease causing
2	EDA	c.1073A>G	p.Gln358Arg	8	错义突变	0	0	0.03	0.990	Disease causing
3	EDA	c.1001G>A	p.Arg334His	8	错义突变	0.0009	0.005	0	0.925	Disease causing

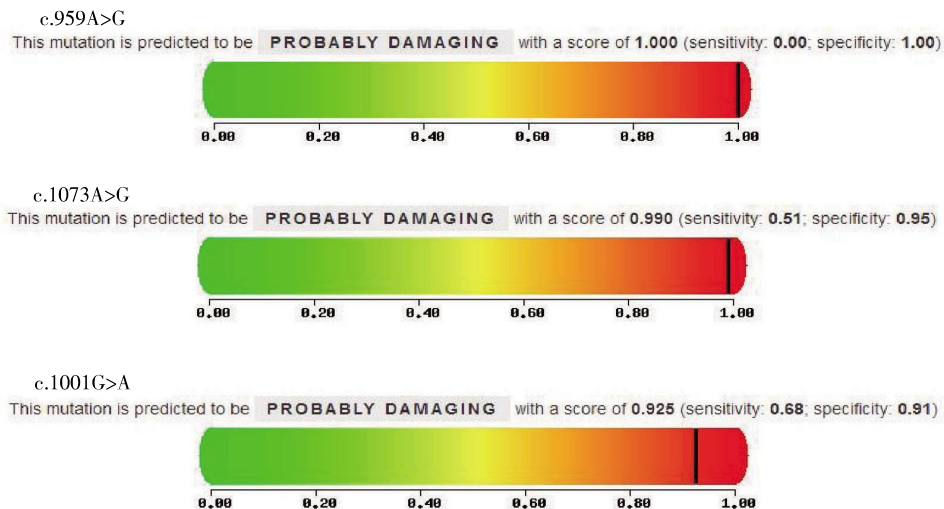


图 2 EDA 突变致病性 PolyPhen2 预测结果

Figure 2 Pathogenicity prediction of EDA mutations using PolyPhen2

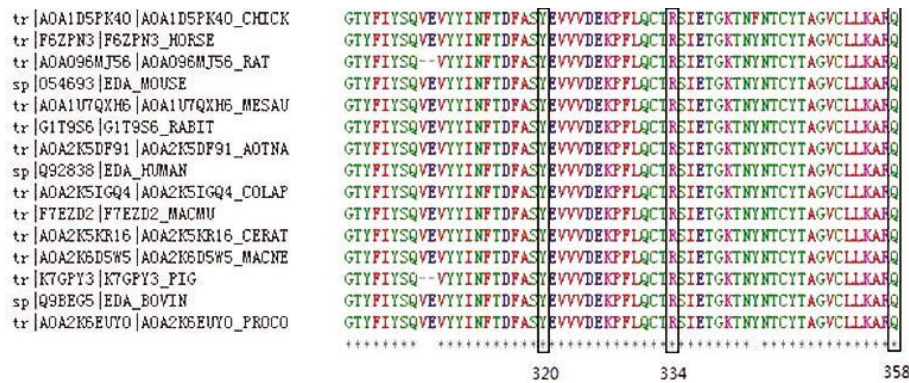


图 3 EDA 突变氨基酸多物种保守性比对结果

Figure 3 Multiple sequence alignment of the mutated amino acid

光素酶实验检测 NF-κB 通路活性,发现单独过表达 EDA 后 NF-κB 通路激活效果不明显,可能与 293T 内源 EDAR 受体表达量较低有关(图 4A)。因此,构建了稳定表达 EDAR 受体的细胞系作为工具细胞。在 293T-EDAR 细胞中过表达 EDA,可明显激活 NF-κB 通路(图 4B);而过表达 EDA 突变体(c.959A>G,c.1073A>G,c.1001G>A),仅部分激活 NF-κB 通路,说明 EDA 突变体激活 NF-κB 通路的能力降低(图 5)。

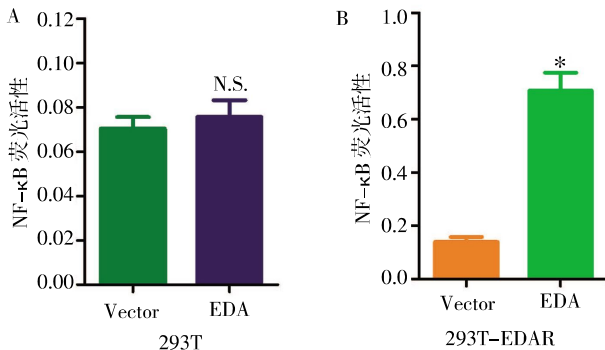


图 4 EDA 过表达对 NF-κB 通路活性的影响。A.293T 细胞中过表达 EDA 后双荧光报告实验检测 NF-κB 通路活性;B.293T-EDAR 细胞中过表达 EDA 后双荧光报告实验检测 NF-κB 通路活性(N.S. 差异无统计学意义; *P<0.05)

Figure 4 Effect of EDA overexpression on the activity of NF-κB pathway. A. Detection of NF-κB luciferase activity after overexpression of EDA in 293T cells; B. Detection of NF-κB luciferase activity after overexpression of EDA in 293T-EDAR cells. (N.S.no significant difference; *P<0.05)

p65 蛋白免疫荧光共定位实验发现,正常情况下,p65 蛋白主要定位于细胞质,野生型 EDA 可刺激 p65 蛋白进入细胞核,而 EDA 突变体刺激 p65 蛋白进入细胞核的能力明显减弱,进一步说明 EDA 突变体激活 NF-κB 通路的能力降低(图 6)。

3 讨论

先天性外胚层发育不良是累及全身多个组织器

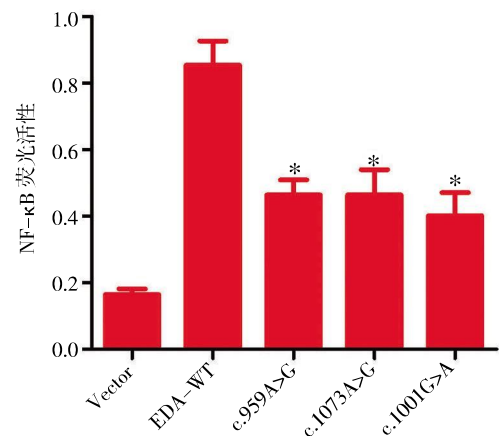


图 5 EDA 突变对 293T-EDAR 细胞 NF-κB 通路活性的影响 (*P<0.05)

Figure 5 Effect of EDA mutations on NF-κB pathway activity in 293T-EDAR (*P<0.05)

官的罕见先天性发育疾病。外胚层来源组织器官的生长发育受体多种信号通路调控,包括 NF-κB 通路、Wnt/β-catenin 通路、Sonic Hedgehog 通路等。各信号通路之间相互协同,共同调控外胚层组织器官的生长发育^[12-13]。

已有文献报道,ED 患者主要的致病基因包括 EDA、EDAR、EDARADD,其中以 EDA 基因最为常见^[14]。EDA 基因定位于染色体 Xq12-13.1,是肿瘤坏死因子(TNF)超家族配体的成员之一。EDA 蛋白为 II 型跨膜蛋白,包括 N 端的胞内结构域、跨膜结构域及 C 端的胞外结构域。其中 EDA 蛋白胞外结构域包含 3 个重要结构域: furin 蛋白剪接结构域、Gly-X-Y 胶原重复结构域及 TNF 同源结构域。EDA 蛋白可在细胞外 furin 剪接位点发生剪接,进而分泌至细胞外,成为可溶性配体。可溶性 EDA 单体在胶原重复结构域的介导下形成三聚体,通过 TNF 同源结构域与胞膜受体 EDAR 结合后,激活下游信号通路^[15]。EDA 蛋白的功能结构域突变可能影响蛋白功

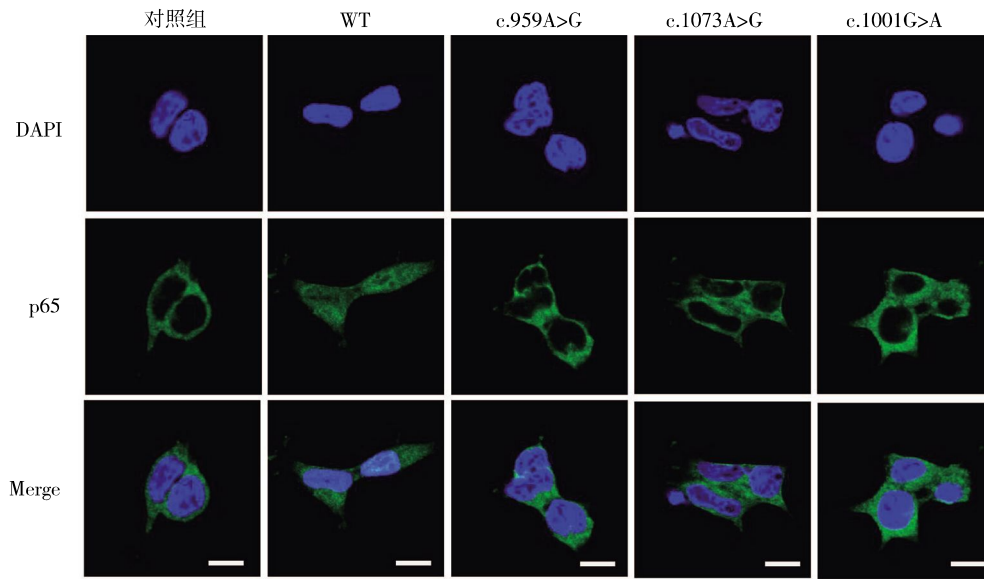


图6 EDA突变对293T-EDAR细胞p65蛋白细胞核移位的影响(标尺长度=10 μm)

Figure 6 Effect of EDA mutations on nuclear translocation of p65 protein in 293T-EDAR (scale bar=10 μm)

能,进而导致ED。本研究在ED患者基因组中检测到的3个EDA突变(c.959A>G,c.1073A>G,c.1001G>A)均位于可能影响EDA蛋白与EDAR受体结合的TNF同源结构域,3个EDA突变均影响不同物种间高度保守的氨基酸,且均为人群罕见突变位点,提示EDA的TNF同源结构域可能是ED多发突变的结构域。

文献报道NF-κB通路是EDA/EDAR/EDARADD的主要下游信号通路^[6]。EDA与EDAR结合后,可进一步招募EDARADD,形成蛋白复合物,进而进一步招募下游Traf家族蛋白,导致IκBα蛋白降解,释放NF-κB转录因子;NF-κB进一步进入细胞核内,激活下游靶基因表达^[7]。由于本研究中检测到EDA突变位于其重要的TNF同源结构域,故推测EDA突变可能影响NF-κB通路激活。通过免疫荧光实验发现,野生型EDA可促进p65蛋白细胞核移位,而突变型EDA介导的p65蛋白细胞核移位明显减少。利用双荧光素酶实验发现,突变型EDA可导致下游NF-κB通路激活减弱,进一步说明在ED患者基因组中检测到的EDA基因突变可影响NF-κB通路活性。

除常见的EDA、EDAR、EDARADD基因外,也有部分文献报道了其他与ED相关的致病基因,如Wnt10A、IKBK等^[18-20]。Wnt10A是Wnt配体家族成员之一,可激活经典的Wnt/β-catenin信号通路,调控下游基因表达。Wnt10A突变主要与单纯性缺牙

有关,许多单纯缺牙患者基因组中可检测到Wnt10A基因突变^[21]。有研究表明,Wnt10A突变与ED发病也有关,提示Wnt10A应作为ED的候选致病基因之一^[18-19]。IKBK基因可编码NEMO蛋白,NEMO蛋白是IKK复合体组成蛋白之一,参与NF-κB通路调节;IKBK基因突变可影响NF-κB通路激活,进而导致ED发生^[20]。本研究在部分ED患者基因组中检测到EDA基因突变,然而部分患者体内未检测到已报道与ED相关的基因突变,提示ED患者可能存在其他尚未报道的致病基因,有待进一步研究。

利益冲突声明:无。

作者贡献声明:赵凯、喻康负责实验实施、数据采集、整理及论文撰写;王凤、黄伟、孙媛元提供实验设计指导,数据分析并修改论文;吴轶群提出研究思路,设计研究方案并终审论文。

[参考文献]

- [1] Deshmukh S, Prashanth S. Ectodermal dysplasia: a genetic review [J]. *Int J Clin Pediatr Dent*, 2015, 5(3): 197-202.
- [2] Trzeciak WH, Koczorowski R. Molecular basis of hypohidrotic ectodermal dysplasia: an update [J]. *J Appl Genet*, 2016, 57(1): 51-61.
- [3] Pagnan NA, Visinoni ÁF. Update on ectodermal dysplasias clinical classification [J]. *Am J Med Genet A*, 2014, 164A(10): 2415-2423.
- [4] Machado M, Wallace C, Austin B, et al. Rehabilitation of ectodermal dysplasia patients presenting with hypodontia: outcomes of implant rehabilitation part 1 [J]. *J Prosthodont Res*,

- 2018, 62(4): 473–478.
- [5] Wang Y, He J, Decker AM, et al. Clinical outcomes of implant therapy in ectodermal dysplasia patients: a systematic review [J]. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 2016, 45(8): 1035–1043.
- [6] Ngoc VTN, Duong NT, Chu DT, et al. Clinical, radiographic, and genetic characteristics of hypohidrotic ectodermal dysplasia: A cross-sectional study [J]. *Clin Genet*, 2018, 94(5): 484–486.
- [7] Yohe S, Thyagarajan B. Review of clinical next-generation sequencing [J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2017, 141 (11): 1544–1557.
- [8] Wen M, Shen T, Wang Y, et al. Next-generation sequencing in early diagnosis of dent disease I: two case reports [J]. *Front Med (Lausanne)*, 2018, 5: 347.
- [9] Kuo FC. Next generation sequencing in hematolymphoid neoplasia [J]. *Semin Hematol*, 2019, 56(1): 2–6.
- [10] Wei Y, Shen K, Lv T, et al. Three new disease-progression modes in NSCLC patients after EGFR-TKI treatment by next-generation sequencing analysis [J]. *Lung Cancer*, 2018, 125: 43–50.
- [11] Liu H, Naismith JH. An efficient one-step site-directed deletion, insertion, single and multiple-site plasmid mutagenesis protocol [J]. *BMC Biotechnol*, 2008, 8: 91.
- [12] Pathney C, Gunhaga L. Signaling pathways regulating ectodermal cell fate choices [J]. *Exp Cell Res*, 2014, 321(1): 11–16.
- [13] Deshmukh S, Prashanth S. Ectodermal dysplasia: a genetic review [J]. *Int J Clin Pediatr Dent*, 2012, 5(3): 197–202.
- [14] Cluzeau C, Hadj-Rabia S, Jambou M, et al. Only four genes (EDA1, EDAR, EDARADD, and WNT10A) account for 90% of hypohidrotic/anhidrotic ectodermal dysplasia cases [J]. *Hum Mutat*, 2011, 32(1): 70–72.
- [15] Schneider P, Street SL, Gaide O, et al. Mutations leading to X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia affect three major functional domains in the tumor necrosis factor family member ectodysplasin-A [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(22): 18819–18827.
- [16] Yan M, Wang LC, Hymowitz SG, et al. Two-amino acid molecular switch in an epithelial morphogen that regulates binding to two distinct receptors [J]. *Science*, 2000, 290(5491): 523–527.
- [17] Le febvre S, Mikkola ML. Ectodysplasin research –where to next? [J]. *Semin Immunol*, 2014, 26(3): 220–228.
- [18] Krøpigård AB, Clemmensen O, Gjørup H, et al. Odonto-onycho-dermal dysplasia in a patient homozygous for a WNT10A nonsense mutation and mild manifestations of ectodermal dysplasia in carriers of the mutation [J]. *BMC Dermatol*, 2016, 16: 3.
- [19] Guazzarotti L, Tadini G, Mancini GE, et al. WNT10A gene is the second molecular candidate in a cohort of young Italian subjects with ectodermal derivative impairment (EDI) [J]. *Clin Genet*, 2018, 93(3): 693–698.
- [20] Döffinger R, Smahi A, Bessia C, et al. X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency is caused by impaired NF- κ B signaling [J]. *Nat Genet*, 2001, 27(3): 277–285.
- [21] Arzoo PS, Klar J, Bergendal B, et al. WNT10A mutations account for 1/4 of population-based isolated oligodontia and show phenotypic correlations [J]. *Am J Med Genet A*, 2014, 164A(2): 353–359.