

网络出版时间: 2020-7-15 9:02 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20200713.1200.031.html>

1 个北村网状肢端色素沉着症大家系 ADAM10 基因突变研究

葛宏松¹, 张成¹, 周洁¹, 曹婷婷¹, 董瑛¹, 吴建平¹, 冉颖¹, 张莉¹, 李明²

摘要 调查中国 1 个北村网状肢端色素沉着症(RAK)大家系的临床表型并检测其 ADAM10 基因的突变位点。回顾分析 RAK 大家系 5 代 54 人临床资料,并采集了家系中部分成员及 100 例无血缘关系的健康对照者血标本。用 PCR 扩增 ADAM10 基因所有的外显子并进行测序分析。所有患者均表现为网状的雀斑样色素沉着斑分布于手足背面及颈部,并检测到 ADAM10 基因的第 4 号外显子发生移码突变(c. 425-426 delGA; p. R142IfsX2),该突变在正常家系成员及无血缘关系的正常对照中未检测到。该新的 ADAM10 基因突变可能导致该基因编码的蛋白截短,从而导致疾病的发生。

关键词 网状肢端色素沉着症; ADAM10 基因; 突变

中图分类号 R 785.5

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2020)08-1303-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.08.031

北村网状肢端色素沉着症(reticulate acropigmentation of Kitamura, RAK)是一种罕见的色素障碍性遗传疾病,常染色体显性遗传,外显率高^[1],1943 年由 Kitamura 和 Akamatsu 首次报道后,在日本、印度、中国、尼泊尔、土耳其、伊朗、沙特阿拉伯、意大利和拉丁美洲等国家和地区人群中均有单个病例及家系报道^[2-4]。但该病与屈侧网状色素异常病(dowling-degos disease, DDD)等^[5]色素障碍性疾病在临床上有许多相似性,过去由于技术原因,只能根据这些疾病的分布、形态、排列、发病年龄和有无低色素斑点对各种实体进行描述,同时该病本身也存在较大的临床异质性,往往造成很多误诊。随着分子遗传学技术发展,一系列单基因色素障碍性疾病的致病基因被发现,这些疾病的诊断才逐渐清晰。2013 年, Kono et al^[6]首次确定了 RAK 的致病基因 ADAM10,从而从基因水平区分与其它临床表现相近的色素障碍性疾病。该研究报道了在中国人群

RAK 临床特点及新的 ADAM10 基因突变位点。

1 材料与方法

1.1 家系成员调查 先证者(46 号患者):女性,27 岁,其女(53 号患者)患有湿疹来安徽医科大学附属省儿童医院皮肤科就诊,发现其家族成员有多名患者,通过先证者联系对家系进行现场调查,制作调查表以了解家族中各成员的临床表现及发病情况,并绘制家系图。

1.2 血细胞基因组 DNA 提取及分离 经过患者及其他正常人签署遗传性皮肤病研究知情同意后,采集家系中外周血样本(患者血样 10 例,正常对照 12 例),同时采集无血缘关系中国汉族正常对照血样 100 例,琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的完整性和数量。使用血液 DNA 试剂盒^[7](美国普罗米加公司)分离出 DNA,该研究通过安徽医科大学附属省儿童医院伦理委员会审查,符合赫尔辛基宣言。

1.3 PCR 扩增及基因测序 在线(<http://www.genome.ucsc.edu/>) 查取 POFUT1、POGLUT1、ADAM10、KRT5 以及 ADAR1 外显子及其剪接区域进行检测,根据公布的基因序列设计 ADAM10 基因全部编码外显子的特异性引物(表 1)进行 PCR 扩增,方法如下:5 min 内升温至 94 °C 后,持续变性(94 °C、30 s),退火(55 ~ 60 °C、30 s),延伸(72 °C、45 s),共 35 个循环,最后充分延伸 10 min。应用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测提取的 PCR 产物。PCR 产物送上海安百隆生物技术有限公司进行正向测序,测序结果与以上 5 种人类基因组序列比较,如发现突变再行反向测序进行验证。

2 结果

2.1 临床表型资料 共发现该家系 5 代共有成员 54 人(其中患者 16 人,正常 38 人,男 25 人,女 29 人,11 人已去世),家系中男女均发病(其中男患者 7 人,3 人去世,女患者 9 人,3 人已去世),无隔代遗传现象,符合常染色体显性遗传模式(图 1)。家系中先证者及所有患者发病年龄在 10 岁以后,皮疹逐渐加重,查体:一般情况可,颈部及手部的网状色素

2020-03-30 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81472867)

作者单位:¹ 安徽医科大学附属省儿童医院皮肤科,合肥 230032

² 上海交通大学医学院附属新华医院皮肤科,上海 200092

作者简介:葛宏松,男,副主任医师;

李明,男,博士,主任医师,责任作者,E-mail: Liming01@xinhua.med.com.cn

表 1 扩增 ADAM10 基因 16 个外显子引物序列及基因片段长度

ADAM10 基因外显子序号	引物序列(5'-3')	产物大小 (bp)	ADAM10 基因外显子序号	引物序列(5'-3')	产物大小 (bp)
01	F: ACCAAGCCCCTTCAGTTCTCC R: CGGCTGGGCTGACTGACG	250	09	F: AGTCTTGGACCAAAGAACTTTTGCAT R: TCTTCCTCCCTTTCAGTATGGTCAAAT	485
02	F: GCTGGGATTAGGGAGAAGTTGTTTCAT R: CAAATGAAGACCTTGCATTAGAGAAGGA	376	10	F: CAAGCTTCCATTGTTTTCCTGATGAGA R: GCAATAGTAAAATGCAGGTGCTGGGTA	396
03	F: AAAAATCTTGCTCAGCGTATTTACAAAA R: TGAATTCAACCTCCTCTGGATTATAACCT	382	11	F: TTCATCAAAGTTTTCCTTTATCCCTTTGTT R: GCAAAGTTTCAAACCATATGCATCTCT	372
04	F: GCTGTTACATCTCACAATCTGCTTGA R: CAGCTAATGCTTCATTTGCTCCACAC	444	12	F: AAGTGATGAGACTTAGGATTTAAAAATTGG R: TGTAGCTTTAAGCATCAATAATTCTTCTGA	390
05	F: AAAATGCCTAGCATAATGCCTTTTCCA R: CATTCCCACAGTGGTGTAAAGTCTTT	372	13	F: TGGAAAGCTCATACTTGCTCTGCTGTTA R: AAATTATCTGGCCAAACTGTAGCTCAAAG	300
06	F: TGATTTTATGAACCTTTAATGGCAGCAGA R: CCCAACTGCTCTTTCAGTTATCCATGT	470	14	F: TTTCCCTCTTTGTAATTTGCACAAGTGG R: AACTTTGATGACTTCTGGCCAAAGTAAAA	390
07	F: GCAGGACATGAATAATTACTGATTTTGGGA R: GTGGCTGCTAAATGCCAGGACTAAAA	355	15	F: CAGATTGACGGGTTTCTCTATGAGAT R: TCCAATAATCCCATCTTACGGAGAAAAGTA	499
08	F: TATTGTCCAGCTGTACGCAGAAGAAGG R: AAAAAGCTCTTCATCTATTGTGGCTTT	462	16	F: TTGAAACAGCAGCTTTGCTTTTAAAGAT R: TGTGACGGTTTACTTTGGAGATGATGACT	273

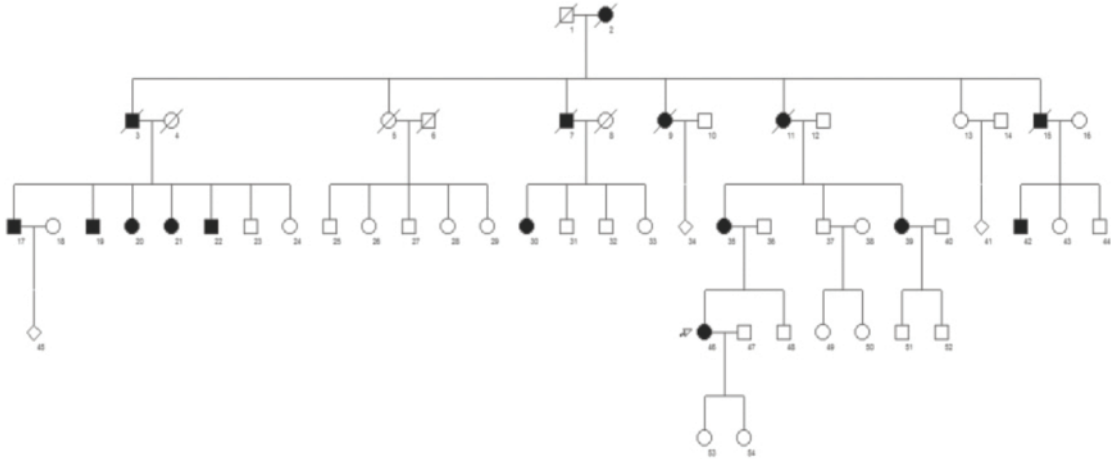


图 1 RAK 家系分布图

方形: 男; 圆形: 女; 菱形: 不清楚或未证实; 填充黑色: 患者; 填充白色: 正常表型; 斜线: 已去世; 箭头: 指示先证者

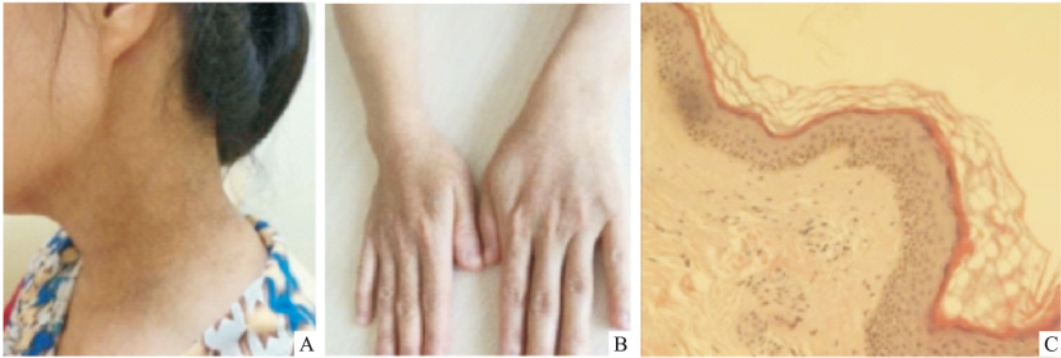


图 2 RAK 家系中先证者

A: 颈部的网状色素沉着斑; B: 手部的网状色素沉着斑; C: 先证者色素沉着区皮损组织病理

沉着斑,未见色素脱失斑,无掌跖部凹陷损害,无其它系统性病变发现,先证者皮损组织病理显示,色素斑处表皮轻微萎缩,角质形成细胞内黑素蓄积,基底层色素细胞增多(图 2)。

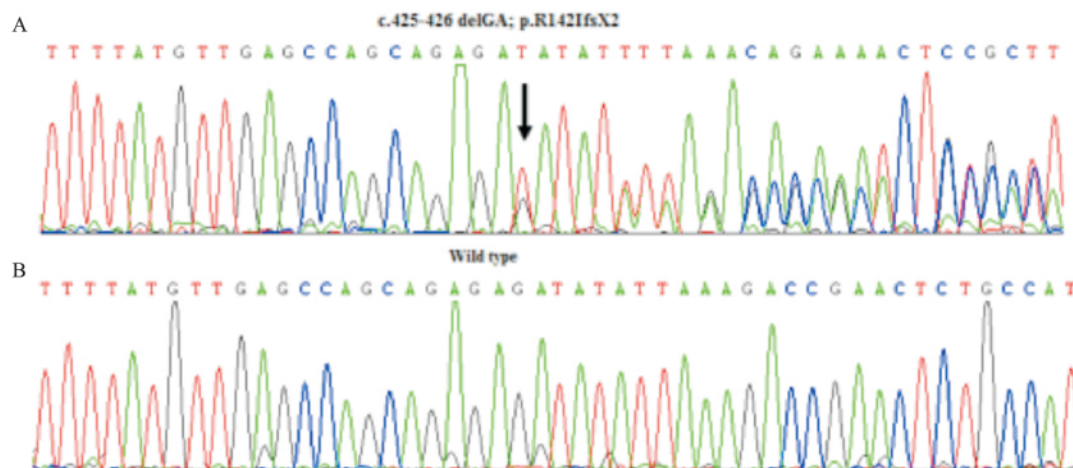


图3 RAK 家系患者 ADAM10 基因突变检测

A: 患者个体中检测到突变 c. 425 - 426 delGA; p. R142IfsX2; B: 家系中正常个体及无亲属关系的正常个体均未检测到该突变

2.2 基因检测结果 每个样品提取得到 2 μ g 以上的基因组 DNA, 用琼脂糖凝胶电泳检测显示均无明显拖尾, 基因组 DNA 完整性较好。各 PCR 产物用琼脂糖凝胶电泳检测显示条带单一, 片段大小符合预期。基因测序结果与参考序列比对显示均为特异性扩增。引起色素异常的 POFUT1、POGLUT1、KRT5 以及 ADAR1 基因未发现致病突变, 而在 ADAM10 基因的第 4 号外显子发生移码突变, 即 c. 425 - 426 delGA; p. R142IfsX2, 该突变在正常对照家系成员及无血缘关系的 100 例正常对照中并未检测到, 突变导致该蛋白截短, 引起单倍型剂量不足, 从而导致疾病的发生(图 3)。

3 讨论

RAK 的特征性表现为色素沉着、角状、不规则的斑点样病变, 表面萎缩, 在手、足背、颈部呈网状排列^[1]。病变通常开始于儿童期或青春期, 逐渐扩展到四肢, 很少发生在面部和眼睑。随着时间的推移, 病变逐渐变暗, 阳光会使病情恶化。掌心、脚底和指背表面的皮纹有凹坑和裂口, 伴掌跖皮肤纹理破坏。色素斑的病理检查可见表皮萎缩, 表皮突延长, 黑素增加。但不是所有患者均具有掌跖和指(趾)表面小凹陷, 皮肤纹理破坏。本组患者表现为网状的雀斑样色素沉着斑分布于手足背面及颈部, 皮疹表现为萎缩性的斑片, 无色素减退斑及掌跖部虫蚀样损害, 所有患者大约 10 ~ 20 岁间发病, 逐渐加重, 未见其它系统性损害。

RAK 的鉴别诊断以网状或点状色素沉着为表现的疾病, 包括网状色素性皮肤病^[1] (dermatopathia

pigmentosa reticularis, DPR): 2 岁左右婴儿期发病, 躯干部多见, 可累及颈、肩、大腿等部位, 伴有色素沉着、非瘢痕性秃发和甲病三联征, 组织病理为真皮上部大量色素及噬色素细胞。遗传性泛发性色素异常症 (dyschromatosis universalis hereditaria, DUH): 大多数 1 岁内发病, 晚发偶见, 全身皮肤甚至黏膜可见界限清楚的棕色及白色斑, 混杂分布, 主要累及躯干及四肢近端, 偶伴系统损害, 组织病理示表皮色素颗粒增加及色素失禁, Xing et al^[2] 将此病的致病基因定位于 6 号染色体 6q24.2 - 1q25.2 区域。遗传性对称性色素异常症 (dyschromatosis symmetrica hereditaria, DSH): 一种肢端色素沉着病, 通常起于婴儿期或幼儿期, 青春期明显, 持续终身, 表现为手、足背点状黄褐色至褐色斑点夹杂脱色素斑疹, 构成网格样图, 组织病理表皮下层色素增加真皮上层噬色素细胞多见及少量炎性淋巴细胞, 脱色素斑处基底层色素减少甚至消失。2003 年 Zhang^[3] 课题组首次将 DSH 致病基因定位于 1 号染色体 1q11 - 1q21 区域内, 随后发现致病基因 ADAR^[4]。家族性进行性色素沉着症褐色斑出生后发生, 随年龄增大逐渐增多, 好发于眼周、口周、颈侧、躯干、四肢及手足背部雀斑样斑点, 其间可见正常皮肤, 病理示基底层色素增加、色素细胞正常, Wang et al^[5] 在国际上首先明确该病的致病基因为 KITLG。DDD 一般为 20 岁以后发病, 主要见于颈、乳房下、腋窝、臀间、腹股沟等屈侧花纹样棕褐色斑, 也可累及躯干和前臂, 近年来, 关于 RAK 与 DDD 共存于同一患者的报道越来越多, 但在 2006 年, Betz et al^[6] 首先发现部分 DDD 是由 KRT5 基因突变所致; 在 2013 年^[7], 排除了

KRT5 基因突变后,国际上首次报道了泛发性 DDD 是由 POFUT1 基因突变所致,Kono et al^[8]首次应用全外显子组测序确定 ADAM10 突变是造成 RAK 的原因,这是一种不同于 DDD 等其他色素 POFUT 异常性疾病,同时,在 5 个 RAK 家系中,确定了 6 种 ADAM10 基因突变。在 RAK 家族中发现了 ADAM10 基因突变,该基因编码锌金属蛋白酶-崩解素和 ADAM 10。众所周知,ADAM 10 参与了皮肤中各种基质的外域脱落,因此,遗传研究显示 RAK 和 DDD 是不同的疾病。2018 年,Pan et al^[13]在 2 例单独发病的中国 RAK 患者中,通过测序分析检测出 ADAM10 内含子突变(c.2026-2A>G)。ADAM10 蛋白参与多种生物过程,包括调节角质形成细胞中黑色素的分布和转运过程。迄今为止,包括本组患者在内,共报道了 14 个 ADAM10 突变导致 RAK。在这些患者中,甚至在 ADAM10 突变相同的家庭成员中,也发现了色素沉着和凹陷分布的多样性,以及其他特征的存在,如特应性皮炎、脑膜瘤和足底角化病。RAK 的表型复杂性提示,除了 ADAM10 突变外,其他迄今未知的环境或遗传因素也可能与 RAK 的发病机制有关。

1998 年,Yavari et al^[14]通过 FISH 技术把 ADAM10 基因定位于 15q22。人类 ADAM10 的 mRNA 含 3 410 个碱基,16 个外显子,基因的上游区域可能存在 BRN2、SREBP、OCT1 和 NFκB 等的结合位点。Hartmann et al^[15]建立了 ADAM10 缺陷小鼠,该小鼠在胚胎 9.5 d 死亡,通过原位杂交显示,该小鼠 NOTCH 靶基因 Hes5 在神经管中的表达下降,而 NOTCH 配体 DLL1 的表达则增加,表明 ADAM10 在 NOTCH 信号通路中发挥着重要作用。进一步的研究还显示,ADAM10 是小鼠边缘区 B 细胞发育必不可少的。缺乏 ADAM10 的 B 细胞 NOTCH2 信号通路严重受损,ADAM10 作为 CD23 的释放酶,可能以某种不可被替代的机制,启动了 NOTCH2 信号通路。Kono et al^[8]报道 ADAM10 单倍体功能不足引起无毛小鼠皮肤上雀斑样色素沉着,小鼠的色素斑首发于四肢背侧,成年鼠躯干可观察到弥漫性色素沉着。这一表现类似于人类的 RAK。但两者明显的区别是,小鼠出现色素沉着需要同时具备 ADAM10 突变致单倍体功能不足和无毛基因纯合突变两个条件。而人类 RAK 患者,全身毛发正常,且经检测,也不存在无毛基因的任何突变。

综上,虽然以前的研究已经明确 RAK 是由 ADAM10 基因异常所致,也已经建了两个 ADAM10 突

变小鼠模型,但这两个模型一个在胚胎期即死亡,另一个需同时合并无毛基因的纯合突变,均与人类 RAK 有明显的不同,不适合进行 RAK 发病机制的研究。所以,ADAM10 基因突变如何影响人类的黑色素形成,如何导致人类皮肤的色素代谢障碍,最终使患者的皮肤表现出 RAK 表型,需要进一步研究。本研究中患者的临床仅表现为颈、手部的网状色素沉着斑,无掌跖部凹陷损害,新 ADAM10 基因 4 号外显子突变的发现,丰富了该病突变库,同时对该家族成员今后的产前诊断、优生优育有一定的帮助。

参考文献

- [1] 薛春雨,李 鑫,邢 新,等. 具有色素沉着表现的临床综合征 [J]. 中国美容医学,2004,13(4):481-5.
- [2] Joshi A, Sah S P, et al. Reticulate acropigmentation of Kitamura: first case reports from Nepal [J]. J Dermatol, 2000, 27(11):745-7.
- [3] El-Hoshy K, Hashimoto K. Bony anomalies in a patient with reticulate acropigmentation of Kitamura [J]. J Dermatol, 1996, 23(10):713-5.
- [4] Albes B, Viraben R. Sporadic reticulate acropigmentation of Kitamura on pale skin [J]. J Eur Acad Dermatol Venereol, 1999, 12(1):71-2.
- [5] Kono M, Sugiura K, Suganuma M, et al. Whole-exome sequencing identifies ADAM10 mutations as a cause of reticulate acropigmentation of Kitamura, a clinical entity distinct from Dowling-Degos disease [J]. Hum Mol Genet, 2013, 22(17):3524-33.
- [6] 葛宏松,李 越,张 成,等. 1 例斑斑病大家系临床表型及基因突变研究 [J]. 安徽医科大学学报,2019,54(6):954-6.
- [7] Xing Q H, Wang M T, Chen X D, et al. A gene locus responsible for dyschromatosis symmetrica hereditaria (DSH) maps to chromosome 6q24.2-q25.2 [J]. Am J Hum Genet, 2003, 73(2):377-82.
- [8] Zhang X J, Gao M, Li M, et al. Identification of a locus for dyschromatosis symmetrica hereditaria at chromosome 1q11-1q21 [J]. J Invest Dermatol, 2003, 120(5):776-80.
- [9] Miyamura Y, Suzuki T, Kono M, et al. Mutations of the RNA-specific adenosine deaminase gene (DSRAD) are involved in dyschromatosis symmetrica hereditaria [J]. Am J Hum Genet, 2003, 73(3):693-9.
- [10] Wang Z Q, Si L, Tang Q, et al. Gain-of-function mutation of KIT ligand on melanin synthesis causes familial progressive hyperpigmentation [J]. Am J Hum Genet, 2009, 84(5):672-7.
- [11] Betz R C, Planko L, Eigelschoven S, et al. Loss-of-function mutations in the keratin 5 gene lead to Dowling-Degos disease [J]. Am J Hum Genet, 2006, 78(3):510-9.
- [12] Li M, Cheng R, Liang J, et al. Mutations in POFUT1, encoding protein O-fucosyltransferase 1, cause generalized Dowling-Degos disease [J]. Am J Hum Genet, 2013, 92(6):895-903.
- [13] Pan Y, Zhong W, Wang H, et al. Reticulate acropigmentation of

网络出版时间: 2020-7-15 9:02 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20200713.1200.032.html>

CalliSpheres 载药微球在肝癌介入治疗中的临床疗效评价

宋文, 彭赵宏, 张德志, 李晓舒, 张国兵, 施万印, 熊壮, 赵本胜, 汪名权, 陶龙香

摘要 对 58 例原发性肝癌和 24 例转移性肝癌患者采用载药微球经导管灌注化疗栓塞治疗, 采用改良实体瘤疗效评价标准对 2 组患者进行疗效评价, 比较 2 组患者治疗后肝功能变化及术后并发症发生率。原发组和转移组治疗后的 1 个月疾病缓解率分别为 74.14% 和 50.00%, 疾病控制率分别为 100.00% 和 75.00%, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。转移组肝脏功能损害高于原发组 ($P < 0.05$)。2 组患者术后均出现不同程度的并发症, 但转移组发生概率高于对照组, 部分差异有统计学意义。CalliSpheres 载药微球经导管灌注化疗栓塞肝癌安全有效, 在疗效方面原发性肝癌比转移性肝癌更为确切, 安全性更高。

关键词 肝癌; 化疗栓塞; 载药微球; CalliSpheres

2020-04-16 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81901726)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院放射科, 合肥 230022

作者简介: 宋文, 男, 主治医师;

张德志, 男, 副主任医师, 责任作者, E-mail: hfzhangdezhi@126.com

中图分类号 R 735.7

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)08-1307-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.08.032

经导管灌注化疗栓塞术(transarterial chemoembolization, TACE)是中晚期包括原发性肝癌和转移性肝癌主要治疗手段之一, 疗效在临床上已经获得广泛认可^[1]。常见的栓塞材料系碘化油和化疗药物的乳化剂以及明胶海绵等。然而这种乳化剂的稳定性相对较差, 化疗药物局部作用持续时间短, 周围扩散快, 易导致全身不良反应^[2]。近年来, 由于栓塞材料的不断发展, 载药微球经导管灌注化疗栓塞(drug-eluting beads transarterial chemoembolization, DEB-TACE)成为一种新的肝癌介入治疗方法, 在临床上得到逐步开展^[3-5]。载药微球是通过静电吸附化疗药物, 经导管栓塞瘤体后, 在瘤体局部化疗药物缓慢释放, 从而较长时间保持化疗药物的局部浓度,

Kitamura with a novel mutation in ADAM10 [J]. Clin Exp Dermatol, 2019, 44(6): 700-3.

[4] Yavari R, Adida C, Brayward P, et al. Human metalloprotease-disintegrin Kuzbanian regulates sympathoadrenal cell fate in development and Neoplasia [J]. Hum Mol Genet, 1998, 7(7): 1161-

7.

[5] Hartmann D, De Strooper B, Serneels L, et al. The disintegrin/metalloprotease Adam 10 is essential for NOTCH signalling but not for alphasecretase activity in fibroblasts [J]. Hum Mol Genet, 2002, 11(21): 2615-24.

Study on ADAM10 gene mutation in a pedigree with a reticulate acropigmentation of Kitamura

Ge Hongsong, Zhang Cheng, Zhou Jie, et al

(Dept of Dermatology, The Affiliated Provincial Children's Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract To investigate the clinical phenotype and ADAM10 mutated locus of reticular acral pigmentation in a Chinese pedigree. The clinical data of 54 people from 5 generations of RAK family were retrospectively analyzed, and some members of the family and 100 unrelated healthy control blood samples were collected. All exons of ADAM10 gene were amplified by PCR and sequenced. All the affected patients showed a network of freckle-like pigmentation spots distributed on the back and neck of the hands and feet. Transcoding mutations in the 4th exon of ADAM10 gene(c.425-426 delGA; p.R142Ifsx2) were detected in the probands of this family and in all patients, which was not detected in normal control family members or in non-related normal controls. A new mutation of ADAM10 gene may lead to the truncation of the protein that it encodes, resulting in the occurrence of disease.

Key words reticulate acropigmentation of Kitamura; ADAM10 genes; mutation