

原发性皮肤淀粉样变一家系全基因组测序结果及初步分析

张玉玲^{1,2}, 吕 萍², 吴芳芳², 杨 超², 陈军臣², 薛汝增², 郭君怡², 陈俊溢², 杨 斌^{1,2}

摘要 目的 利用全基因组测序技术寻找家族性原发性皮肤淀粉样变(FPCA)候选致病基因。方法 采用二代测序技术对一FPCA家系进行全基因组测序;筛选可能的致病性候选基因/位点,并进行Sanger测序验证。结果 在筛选出的26个候选基因中,低密度脂蛋白受体相关蛋白(LRP6)基因在淀粉样前体蛋白的代谢过程、 β 淀粉样蛋白的产生中起重要作用;丝聚蛋白2(FLG2)基因与皮肤角化和屏障相关。另外,该家系患者抑瘤素M受体(OSMR)基因第1538位鸟嘌呤G被腺嘌呤A取代(c.1538G>A),导致第513号氨基酸序列由甘氨酸Gly转变为天冬氨酸Asp(p. Gly513Asp),而家族中健康成员均未检测出此突变。结论 ① LRP6、FLG2基因可能与原发性皮肤淀粉样变(PCA)相关,但需要进一步大样本量验证和相关的功能学研究。② OSMR基因p. Gly513Asp突变可能参与PCA发病。

关键词 原发性皮肤淀粉样变;全基因组测序;OSMR基因;LRP6基因;FLG2基因

中图分类号 R 597.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)08-1308-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.08.029

原发性皮肤淀粉样变(primary cutaneous amyloidosis, PCA)指淀粉样蛋白沉积于皮肤组织中而不累及其他器官的一种慢性皮肤病,少数患者有家族史,多数患者有瘙痒的症状,苔藓样淀粉样变最常见。家族性原发性皮肤淀粉样变(familial primary cutaneous amyloidosis, FPCA)多为青春期前后发病,其发病机制尚不清楚,可能与长期刺激(如摩擦)、紫外线辐射、爱泼斯坦-巴尔二氏(Epstein-barr, EB)病毒感染、遗传等因素相关^[1]。2006年, Lee et

al^[2]通过全基因组扫描技术,发现FPCA与染色体5p13.1-g11.2存在连锁;2008年, Arita et al^[3]首次发现FPCA致病基因为定位于染色体5p13.1-g11.2上的抑瘤素M受体(oncostatin M receptor, OSMR)基因。2010年, Lin et al^[4]对台湾29个FPCA进行筛查,发现10个家系存在OSMR基因杂合错义突变,一个家系存在白介素-31受体(interleukin-31 receptor A, IL-31RA)基因点突变,18个家系中无OSMR和IL31RA基因突变。无OSMR或者IL-31RA基因突变的家系患者,其发病可能与其他遗传因素相关。因此,通过对一家系进行全基因组测序进一步寻找FPCA患者可能候选致病性基因。

1 材料与方法

1.1 病例资料 先证者女,见图1中II-4,29岁,19岁时无明显诱因下双胫前出现对称性的褐色针尖大小的丘疹,伴明显瘙痒,后皮疹逐渐增至米粒大小,丘疹密集分布但不融合,见图2,曾予多种药物外用治疗,皮疹未退,且易反复。其他系统检查未见明显异常。家族中先证者的父亲(I-2)、哥哥(II-1)、弟弟(II-5)发病年龄分别为47、20、24岁,皮疹形态与先证者类似,II-1瘙痒症状重,II-5瘙痒症状轻,I-2无瘙痒。家族中其他成员否认类似疾病史。先证者左小腿丘疹组织病理:可见真皮乳头增宽,其内可见均一嗜酸性团块状物,刚果红染色阳性,见图3。家族中的患者均在广东省皮肤病医院皮肤科确诊为

2019-04-26 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号:81703123);广东省医学科研基金项目(编号:A2017510)

作者单位: ¹安徽医科大学广东皮肤病临床学院皮肤科,广州 510091

²广东省皮肤病医院皮肤科,广州 510091

作者简介: 张玉玲,女,硕士研究生;

杨 斌,女,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail: yangbin101@hotmail.com;

吕 萍,女,博士,主治医师,责任作者,E-mail: lyping75@163.com

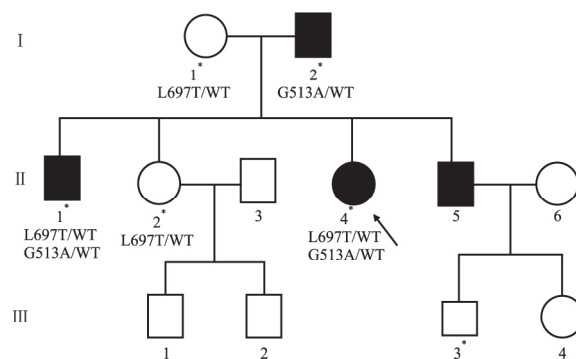


图1 PCA家系图

II-4为先证者;* :采血并做基因检测,其中III-3为Sanger测序,余均为二代测序



图2 先证者的临床表现

A: 先证者双胫前褐色米粒大小的丘疹, 丘疹密集分布但不融合; B: 先证者皮损区的局部放大图

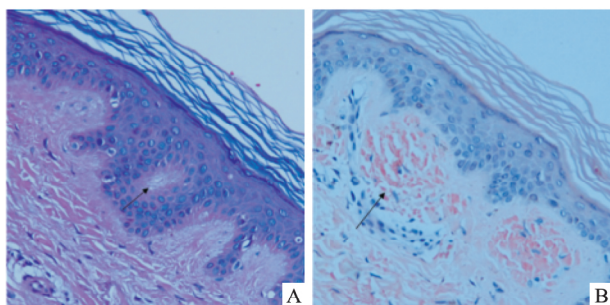


图3 先证者左小腿胫前皮损组织病理

A: 箭头处可见呈嗜伊红性无结构的玻璃样物质, 沉积物与表皮间有裂隙 HE $\times 200$; B: 刚果红染色可见真皮乳头均质红染的团块状沉积物 $\times 200$

苔藓样皮肤淀粉样变病。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 收集该家系中 3 例患者 (I-2、II-1、II-4) 和 3 例健康成员 (I-1、II-2、III-3) 的外周血 5 ml, 通过血液基因组 DNA 试剂盒 (天根生化科技北京有限公司, 货号 DP314) 提取基因组 DNA。本研究通过广东省皮肤病医院医学伦理委员会批准 (GDDHLS-20171029), 该家系成员在采取血样前均签署知情同意书。

1.2.2 筛选可疑突变基因及位点 采用 Hiseq 4000 测序仪 (美国 Illumina 公司) 对人样本进行全基因组测序, 先对原始数据首先应进行数据质控, 将得到单核苷酸变异 (single nucleotide variation, SNP) 和插入缺失 (insertion variation, InDel) 位点与人类参考基因组比对, 采用显性遗传模式对该家系进行过滤, 筛选外显子区和剪接区变异 (保留非同义突变和剪接区变异), 过滤掉高频突变位点, 得到该家系的基因突变位点。另外, 对已知突变的 OSMR 基因的外显子进行 Sanger 测序。

1.2.3 对满足家系共分离及非同义突变的基因分析 利用在线人类孟德尔遗传 (online mendelian inheritance in man, OMIM) 数据库、基因本体 (gene ontology, GO) 数据库和京都基因与基因组百科全书 (kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 数据库分析其生物学特征及编码蛋白可能的作用机制, 之后利用 SIFT、Polyphen-2 软件筛选出能导致编码蛋白功能异常的候选基因 (候选位点), 最后在美国国立生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 逐个对以上候选基因进行查阅。

2 结果

2.1 可疑突变基因及位点 该家系中 3 例患者 (I-2、II-1、II-4) 和 2 例健康成员 (I-1、II-2) 经二代测序, 得到 SNP 和 InDel 位点数目分别为 3 870 204 个、819 403 个, 满足家系共分离 (显性遗传模式) 的 SNP 和 InDel 位点数目分别为 85 781 个、11 078 个。3 例患者共有的 SNP、InDel 位点数目分别为 21 个、3 个, 共有的结构变异 (structure variation, SV)、拷贝数变异 (copy number variation, CNV) 位点数目分别为 365 个、152 个。IL-31RA 基因中满足家系共分离的 SNP 和 InDel 位点数目分别是 5 个和 1 个, OSMR 基因中分别是 4 个和 0 个。

二代测序发现, I-2、II-1、II-4 患者的 OSMR 基因 11 号外显子中第 1 538 位鸟嘌呤被腺嘌呤替代 (c. 1538G > A), 导致第 513 号氨基酸序列由甘氨酸转变为天冬氨酸 (p. Gly513Asp); 另外, Sanger 测序检测 OSMR 基因, 在患者 (I-2、II-1、II-4) 及成员 III-3 中也发现了 OSMR 基因 p. Gly513Asp 位点突变; 同时在正常人 (I-1、II-2) 和 PCA 患者 (II-1、II-4) 中还发现 OSMR 基因第 15 号外显子第 2 090 位腺嘌呤被胞嘧啶替代 (c. 2090A > C), 该位点突变可致第 697 号氨基酸序列由赖氨酸转变为苏氨酸 (p. Lys697Thr)。通过 OSMR 基因 Sanger 测序与二代测序结果比对, 在健康成员 (I-1、II-2) 和 PCA 患者 (II-1、II-4) 的二代测序的原始数据中也发现了 OSMR 基因 p. Lys697Thr 位点突变。见图 4。

2.2 满足家系共分离及非同义突变的基因分析

通过 GO 分析发现, 这些基因主要富集在细胞膜、细胞质中间丝、细胞骨架等细胞组件, 参与信号传感器活动、分子转导活性、蛋白偶联受体活性、信号受体活性、受体活性等分子功能, 涉及细胞黏附、生物黏附、细胞-细胞黏附、化学刺激的感官知觉、感官知

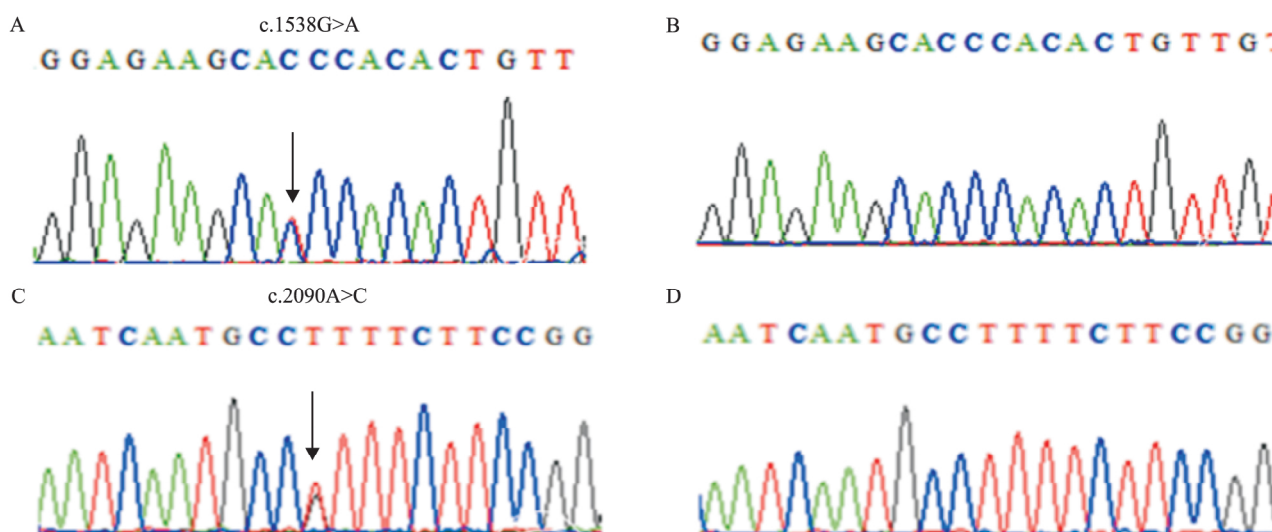


图4 FPCA 患者基因测序结果

A: 先证者 OSMR 基因的 11 号外显子的部分测序图; B、D: 为健康对照者 OSMR 基因的 11 号、15 号外显子的部分测序图; C: 先证者 OSMR 基因的 15 号外显子的部分测序图; 箭头表示突变位点

觉等生物过程。KEGG 通路分析发现,这些基因可能与黏附斑激酶通路、Janus 蛋白酪氨酸激酶(Janus activated kinase, Jak) - 信号传导及转录激活因子(signal transduction and activators of transcription, STAT) 信号通路、丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路、内质网蛋白质加工通路、雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR) 信号通路、钙信号通路、细胞凋亡通路等相关。使用 SIFT、Polyphen-2 软件对以上基因进行有害性预测,最终筛选出 26 个候选基因: ANKRD30A、CHRN2、CNTNAP5、CPA5、EPHB6、FLG2、GIMAP1-GIMAP5、GIMAP5、HNRNPU、KIAA0040、KIAA1549、KIRREL3、LOC155060、LRP6、MPZL2、OR1S2、PCDHA10、PCDHB8、PRH1、PRH1-TAS2R14、RIMKLB、RPS6KC1、SCARB2、SLC38A4、SYNE1、TNFSF18。对于 OSMR 基因,满足家系共分离与非同义突变位点的 SNP 为 1 个,即 p. Gly513Asp,但该位点在千人数据库中的频率为 0.01,不满足突变频率小于 0.005 的这个条件,没有被筛选出来;而另一个 p. Lys697Thr 位点也存在于健康对照者,不满足家系共分离的条件,因此也没有被筛选出来。对于 IL-31RA 基因满足家系共分离的 SNP 和 InDel 分别是 5 个和 1 个,但这些位点不满足非同义突变这一条件,因此没有被筛选出来。对以上 26 个基因逐个进行文献检索发现,低密度脂蛋白受体相关蛋白 6(the low density lipoprotein receptor-related protein, LRP6) 基因在阿尔茨海默病的淀粉

样前体蛋白的代谢过程、 β 淀粉样蛋白的产生中起重要作用;丝聚蛋白 2(filaggrin 2, FLG2) 基因与皮肤的角化和皮肤屏障相关。LRP6、FLG2 可能与 FPCA 发病相关。

3 讨论

FPCA 是一种主要表现为常染色体显性遗传的皮肤病,也可见常染色体隐性遗传,发病机制尚不清楚,但其家族聚集性和种族易感性表明遗传因素在该疾病的发生过程中可能有重要作用。目前大多数学者认为与 FPCA 发病最相关的基因是 OSMR 基因的突变,有报道^[3-5] 该基因突变可能会影响 Jak-STAT、MAPK 信号通路的激活,影响角质形成细胞的增殖、分化、凋亡。OSMR 基因突变位点主要集中于 OSMR β 蛋白胞外区纤维蛋白-III 型亚区中,该突变可能会导致该亚区的受体域发生变化,影响受体域的空间构型、定位和受体二聚化的形成^[6]。本家系中 OSMR 基因 p. Gly513Asp 位点突变与郭独一等^[1] 对两家系 OSMR 基因全外显子及其侧翼序列进行测序的结果一致,说明 OSMR 基因的 p. Gly513Asp 位点突变可能是 PCA 的致病性基因突变位点。然而, Sanger 测序发现在本家系健康成员 III-3 也出现了 OSMR 基因 p. Gly513Asp 位点突变,随访 III-3 发现有瘙痒的表现,但是未表现出 FPCA 的体征,推测可能其暂未到发病年龄(III-3 现年龄为 7 岁,其父亲发病年龄为 24 岁)。除此之外,本家系中的 OSMR 基因 p. Lys697Thr 位点携带者 I 1

(女,33岁)、II2(女,56岁)并未发病,可能是因为环境或其他因素的影响,导致突变位点在本家系部分成员中外显缺失,未出现疾病表型。

通过对本家系成员全基因组测序,筛选出3例患者共有的SV、CNV、SNP、InDel位点数目分别为365、152、21、3个。对编码区SNP和InDel进行多步过滤后再行GO、KEGG分析,发现这些基因参与信号传感器活动、分子转导活性、蛋白偶联受体活性、信号受体活性等分子功能,涉及细胞-细胞黏附、化学刺激的感官知觉等生物过程;可能与黏附斑激酶通路、Jak-STAT信号通路、MAPK信号通路、mTOR信号、钙信号通路、细胞凋亡通路等相关。利用SIFT、PolyPhen-2软件对以上这些基因进行有害性预测,最终筛选出26个候选基因,通过文献检索发现,LRP6基因、FLG2基因可能参与PCA的发病。

LRP是体内一类多配基受体,在经典Wnt信号传导中具有关键功能,而Wnt信号通路在淀粉样前体蛋白的加工中可能具有重要作用。Liu et al.^[8]研究者在阿尔茨海默病患者的脑组织中发现LRP6水平降低,LRP6缺陷会影响阿尔茨海默病患者的神经突触,并有助于 β 淀粉样蛋白产生和形成^[9]。此外,LRP6与前体蛋白相互作用,激活非经典Wnt信号传导,增加 β 淀粉样蛋白的产生^[10]。载脂蛋白E为LRP配体之一,参与阿尔茨海默病淀粉样物质的形成过程^[11]。载脂蛋白E是PCA淀粉样沉积物的主要成分之一^[12]。因此,推测LRP6基因也可能与PCA的淀粉样物质的形成相关,但需要进一步的验证。

FLG2基因编码丝聚蛋白2,该蛋白为S100融合蛋白质,在蛋白质结构、氨基酸组成、表达模式和生物化学性质方面与丝聚蛋白非常相似。FLG2蛋白和丝聚蛋白可能在表皮屏障的形成中具有重叠和协同作用,它们可以提供天然保湿因子的前体,从而保护皮肤免受环境侵害和水分逸出^[11-12]。FLG2蛋白不仅可以维持上皮细胞稳态,还有助于皮肤适当的角化,因此许多皮肤屏障受损与该基因缺陷有关^[13]。因此,推测FLG2基因功能异常可能促进了PCA症状的发生或加重。

综上所述,通过全基因组测序和生物信息学分析,在一个PCA家系中证实了既往已报道的OSMR基因突变,并且还发现LRP6、FLG2基因也可能与

PCA的发生相关,但仍需要大量样本验证,相关功能需进一步研究。

参考文献

- [1] 郭独一,康天济,闫慧敏,等. 家族性原发性皮肤淀粉样变性两家系OSMR基因突变[J]. 中华皮肤科杂志, 2017, 50(2): 91.
- [2] Lee D D, Lin M W, Chen I C, et al. Genome-wide scan identifies a susceptibility locus for familial primary cutaneous amyloidosis on chromosome 5p13.1-q11.2[J]. Br J Dermatol, 2006, 155(6): 1201-8.
- [3] Arita K, South A P, Hans-Filho G, et al. Oncostatin M receptor-beta mutations underlie familial primary localized cutaneous amyloidosis[J]. Am J Hum Genet, 2008, 82(1): 73-80.
- [4] Lin M W, Lee D D, Liu T T, et al. Novel IL31RA gene mutation and ancestral OSMR mutant allele in familial primary cutaneous amyloidosis[J]. Eur J Hum Genet, 2010, 18(1): 26-32.
- [5] Saeedi M, Ebrahim-Habibi A, Haghighi A, et al. A novel missense mutation in oncostatin M receptor beta causing primary localized cutaneous amyloidosis[J]. Biomed Res Int, 2014, 2014: 653724.
- [6] Liu C C, Tsai C W, Deak F, et al. Deficiency in LRP6-mediated Wnt signaling contributes to synaptic abnormalities and amyloid pathology in Alzheimer's disease[J]. Neuron, 2014, 84(1): 63-77.
- [7] Buechler J, Salinas P C. Deficient Wnt signaling and synaptic vulnerability in Alzheimer's disease: emerging roles for the LRP6 receptor[J]. Front Synaptic Neurosci, 2018, 10: 38.
- [8] Elliott C, Rojo A I, Ribe E, et al. A role for APP in Wnt signaling links synapse loss with β -amyloid production[J]. Transl Psychiatry, 2018, 8(1): 179.
- [9] Lane-Donovan C, Herz J. ApoE, ApoE receptors, and the synapse in Alzheimer's disease[J]. Trends Endocrinol Metab, 2017, 28(4): 273-84.
- [10] 邹爱玲,曹育春. 原发性皮肤淀粉样变发病机制的研究概况[J]. 中国中西医结合皮肤性病学杂志, 2016, 15(5): 322-4.
- [11] Margolis D J, Gupta J, Apter A J, et al. Filaggrin-2 variation is associated with more persistent atopic dermatitis in African American subjects[J]. J Allergy Clin Immunol, 2014, 133(3): 784-9.
- [12] Mohamad J, Sarig O, Godsel L M, et al. Filaggrin-2 deficiency results in abnormal cell-cell adhesion in the cornified cell layers and causes peeling skin syndrome type A[J]. J Invest Dermatol, 2018, 138(8): 1736-43.
- [13] Pendaries V, Le Lamer M, Cau L, et al. In a three-dimensional reconstructed human epidermis filaggrin-2 is essential for proper cornification[J]. Cell Death Dis, 2015, 6: e1656.

Whole-genome sequencing results and preliminary analysis of primary cutaneous amyloidosis

Zhang Yuling^{1,2}, Lü Ping², Wu Fangfang², et al

(¹Dept of Dermatology, Guangdong Provincial Dermatology Hospital, Clinical School of Anhui Medical University, Guangzhou 510091; ²Dept of Dermatology, Guangdong Provincial Dermatology Hospital, Guangzhou 510091)

Abstract Objective To search for candidate pathogenic genes by whole-genome sequencing technology in a familial primary cutaneous amyloidosis (FPCA). **Methods** Whole-genome sequencing was conducted on FPCA members of the family, and the candidate gene/site was obtained after the quality control and filtration. Then the candidate variants were confirmed by Sanger sequencing. **Results** Among 26 candidate gene, the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP6) gene plays a vital role in the metabolism of amyloid precursor protein and the production of beta-amyloid protein. The filaggrin 2 (FLG2) gene is associated with skin keratinization and barrier function. Besides, a nonsynonymous mutation site c.1538G > A, which located in exon 11 of the OSMR gene, was found in patients of this family. This mutation lead to the substitution of glycine by aspartic acid at position 513 and was not detected in the healthy members of this family. **Conclusion** In addition to strong replication for one mutation (p. Gly513Asp) in OSMR gene for PCA, LRP6 and FLG2 may be the susceptibility genes of PCA, but functional validation is still needed in a larger population.

Key words primary cutaneous amyloidosis; whole-genome sequencing; OSMR gene; LRP6 gene; FLG2 gene

(上接第 1307 页)

Relationships between the alteration of ACE2 and NLR levels before and after treatment and the CAT scores in patients with AECOPD

Wang Limin, Ji Shuang, Fei Guanghe

(Dept of Respiratory and Critical Care Medicine, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the relationships between the alteration of peripheral blood angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2), neutrophil/lymphocyte ratio (NLR) and platelet/lymphocyte ratio (PLR) before and after treatment and CAT, mMRC and SGRQ scores, and explore the clinical application significance of comprehensive assessment of combining inflammatory biomarkers with questionnaire scores in evaluating the severity of disease in patients with acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease (AECOPD). **Methods** A total of 97 AECOPD patients were enrolled. According to pulmonary function, 97 patients were classified into two groups: mild to moderate group (46 cases) and severe group (51 cases). The serum levels of ACE2, C-reactive protein (CRP), whole blood neutrophils, lymphocytes and platelet counts were measured before and after treatment. CAT, mMRC and SGRQ were simultaneously completed. **Results** Compared to mild to moderate group, the levels of angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) and C-reactive protein (CRP), the value of neutrophil/lymphocyte ratio (NLR) and platelet/lymphocyte ratio (PLR) in severe group were significantly increased ($P < 0.05$). Compared to treatment before, the levels of ACE2 and CRP, the value of NLR and PLR were significantly decreased in patients with AECOPD after treatment ($P < 0.05$). The changes of the levels of ACE2 and CRP, the value of NLR and PLR were positively correlated with chronic obstructive pulmonary disease assessment test (CAT), modified medical research council (mMRC) and St George's respiratory questionnaire (SGRQ) scores in AECOPD patients, respectively ($P < 0.05$). **Conclusion** Comprehensive assessment of combining inflammatory biomarkers with questionnaire scores has a good clinical application value for assessing the severity of AECOPD, and provides a guild for the clinical treatment of AECOPD patients in the future.

Key words AECOPD; angiotensin converting enzyme 2; neutrophil/lymphocyte ratio; CAT score