

色素失禁症患者一家系 NEMO 基因序列检测分析*

路荣忠¹, 许晓松², 孙克涛¹

(1. 淄博市中心医院, 山东淄博 255031; 2. 山东百福基因科技有限公司, 山东淄博 255000)

摘要:目的 用跨越断裂点 PCR 方法对色素失禁症患者一家系的 NEMO 基因序列进行检测分析。方法 收集该色素失禁症患者一家系成员的临床症状及家族史, 并提取其外周血 DNA, 运用跨越断裂点的 PCR 方法分别扩增 NEMO 基因及 Δ NEMO 假基因序列, 通过琼脂糖凝胶电泳和测序对上述基因序列进行检测分析, 同时对 1 例与该家系无血缘且身体健康的对照者进行同样检测分析。结果 琼脂糖凝胶电泳及测序结果显示, 2.5 岁先证者及其母亲、外祖母均存在 NEMO 基因外显子 4-10 特异性缺失, 其他家系成员及无血缘健康对照者均未检测到 NEMO 基因缺失。所有家系成员及无血缘健康对照者均未检测到 Δ NEMO 基因缺失。结论 NEMO 基因外显子 4-10 缺失是该先证者的致病基因突变。跨越断裂点 PCR 扩增技术可用于检测色素失禁症 NEMO 基因突变, 具有一定的推广和应用价值。

关键词:色素失禁症; NEMO 基因; Δ NEMO 假基因; 基因缺失

中图分类号: R758.5; R446.7 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2018)05-042-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2018.05.012

Detection and Analysis of NEMO Sequence in a Family of Incontinentia Pigmenti

LU Rong-zhong¹, XU Xiao-song², SUN Ke-tao¹

(1. Central Hospital of Zibo, Shandong Zibo 255031, China;

2. Shandong Baifu Gene Technology Co., Ltd, Shandong Zibo 255000, China)

Abstract: Objective To detect and analyze the NEMO sequence of a pigmented incontinence family by PCR method across the break point. **Methods** The clinical symptoms and family history of the family members were collected, and the peripheral blood DNA was extracted. The specific deletion of NEMO gene or delta NEMO pseudogenes was amplified by PCR method across the break point, and analyzed by agarose gel electrophoresis and sequencing analysis, the same analysis was performed on a healthy control who was not related to the family. **Results** 2.5 year old proband and her mother, grandmother, there were NEMO gene deletion of exon 4-10, other family members and non-blood healthy control were not detected in the absence of NEMO. All family members and non-blood healthy control were not detected in the absence of Δ NEMO. **Conclusion**

The deletion of exon 4-10 of NEMO gene is the mutation of the pathogenetic gene of the precursor. The PCR method across the break point can be used to detect the mutation of NEMO gene of pigment incontinence, which has certain value of promotion and application.

Keywords: incontinentia pigmenti; NEMO gene; Δ NEMO pseudogene; gene deletion

色素失禁症(incontinentia pigmenti, IP)是一种罕见的 X 连锁显性遗传性皮肤病, 多见于女性, 男性患儿通常在宫内死亡^[1]。色素失禁症的临床症状主要表现为皮肤损害, 而且伴有牙齿、神经系统和眼睛等病变^[2], 该病在新生儿早期多以皮肤损害为首发症状。IP 的主要致病基因为 NF- κ B 必须调节蛋白(NF- κ B-essential modulator, NEMO), 又称 IKBKG 基因。NEMO 基因长度为 23 kb, 包含 10 个外显子和 3 个交替出现的非编码的第一外显子, 共编码 415 个氨基酸。NEMO 基因下游 35.5 kb 重复区域中存在一个高度同源的假基因 Δ NEMO, 序列排列方向与 NEMO 基因相反^[3]。目前约 80% 的 IP 可找到基因突变, 其中 NEMO 基因共有序列 NEMO Δ 4~10 缺失可以导致 60%

~80% 的 IP^[4]。本文对 1 个 IP 家系的 NEMO 序列进行检测分析。

1 材料与方法

1.1 研究对象

1.1.1 临床资料

1.1.1.1 先证者: 女, 2.5 岁, 早期红斑、水疱。现左右胸口处留有片状淡褐色不规则色素沉着, 右腿留有旋涡状淡褐色色素沉着, 左腿有典型水泡遗留色素沉着。眼失明, 聋、哑, 骨骼发育异常(不会走路、手不能握拳), 被诊断为 IP。

1.1.1.2 先证者父亲: 男, 30 岁, 身体健康。

1.1.1.3 先证者母亲: 女, 27 岁, 视力: CF/30cm, 生育二女, 三胎怀孕 4 个月自然流产一男胎。

1.1.1.4 先证者姐姐: 女, 7 岁, 身体健康。

* 作者简介: 路荣忠(1964—), 男, 医学硕士, 副主任技师, 研究方向: 分子生物学和血液病诊断与检测, E-mail: zblrz@126.com。

1.1.1.5 先证者外祖母:女,55岁,视力:双眼HM/10cm,贫血貌,其余正常,生育一女。

1.1.1.6 健康对照:女,36岁,身体健康,与该家系无血缘关系。

1.1.2 遗传家系图谱:见图1。根据临床资料绘制该家系的遗传家系图谱。

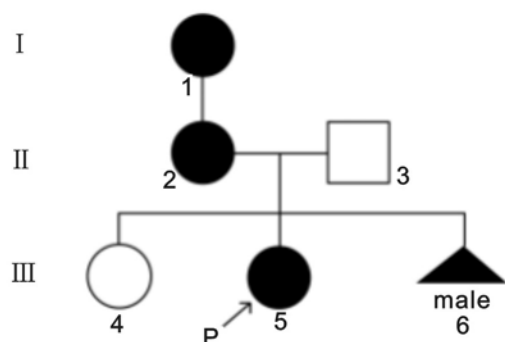


图1 遗传家系图谱

1.2 方法

1.2.1 DNA提取:经患者及家属、健康对照知情同意后,分别抽取所有成员外周静脉血2 ml于EDTA-K₂抗凝管,采用全血基因组DNA提取试剂盒(百泰克公司)提取基因组DNA, -20℃保存。

1.2.2 目的片段扩增:参照文献[5]的方法,采用跨越断裂点方法鉴定NEMO和 Δ NEMO基因特异性缺失,引物由北京中美泰和公司合成。

1.2.2.1 NEMO基因引物:上游:In2, 5'-GAG-GACCAATACCGAGCATC-3', 下游:JF3R, 5'-CTCGGAGACACAGGAACCAGCA-3'。

1.2.2.2 Δ NEMO基因引物:上游:Rev2, 5'-GCCATCTGITFFFGCGTGTG-3', 下游:JF3R, 5'-CTCGGAGACACAGGAACCAGCA-3'。引物In2, JF3R扩增片段长度为2.6kb,说明NEMO基因特异性缺失;引物Rev2, JF3R扩增片段长度为2.5kb,说明 Δ NEMO基因特异性缺失^[5]。未缺失者无法扩增出目的片段。原理见图2。

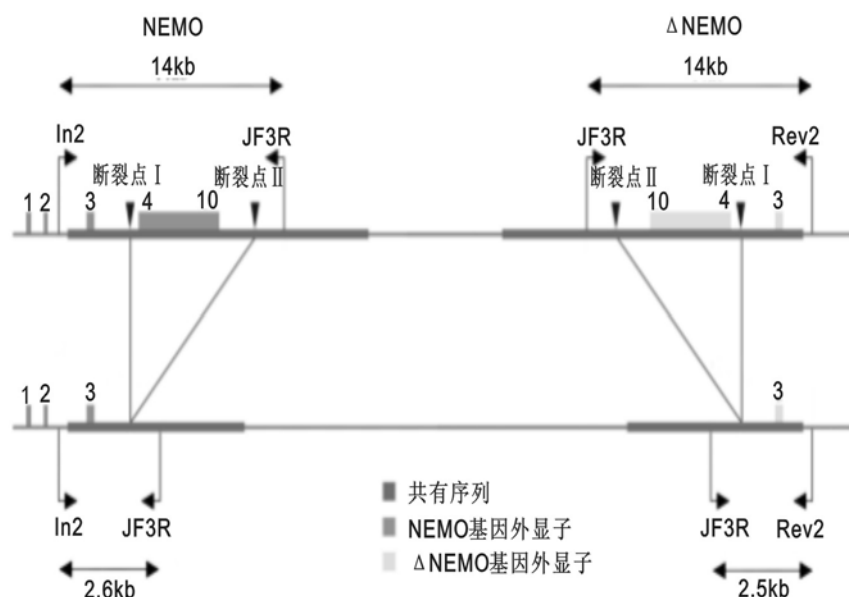


图2 特异性引物及扩增片段示意图

50 μ l PCR反应体系如下:灭菌超纯水(UPW) 17 μ l, PCR Mix(百泰克公司) 25 μ l, 上游引物(25 μ mol/ μ l) 1.5 μ l, 下游引物(25 μ mol/ μ l) 1.5 μ l, 模板DNA 5 μ l。

PCR反应循环参数:94℃预变性5 min;94℃变性30 s, NEMO基因60℃/ Δ NEMO基因58℃复性1 min, 68℃延伸4 min, 进行30个循环;68℃延伸10 min, 4℃保存。

1.2.3 PCR产物电泳:扩增后的产物于2 g/dl琼

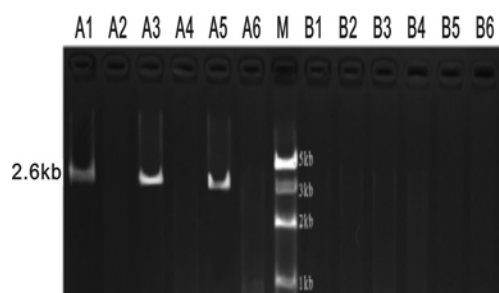
脂糖凝胶进行电泳,结束后用凝胶成像扫描仪(美国伯乐)观察目的条带并拍照保存。

1.2.4 PCR产物测序:对1.2.3所得三个扩增产物进行测序以确定突变位点,由北京中美泰和公司提供测序引物并完成测序。

1.2.5 血细胞检测:用日本SysMex XN-1000对所采血样进行血细胞检测。

2 结果

2.1 PCR产物电泳结果 见图3。



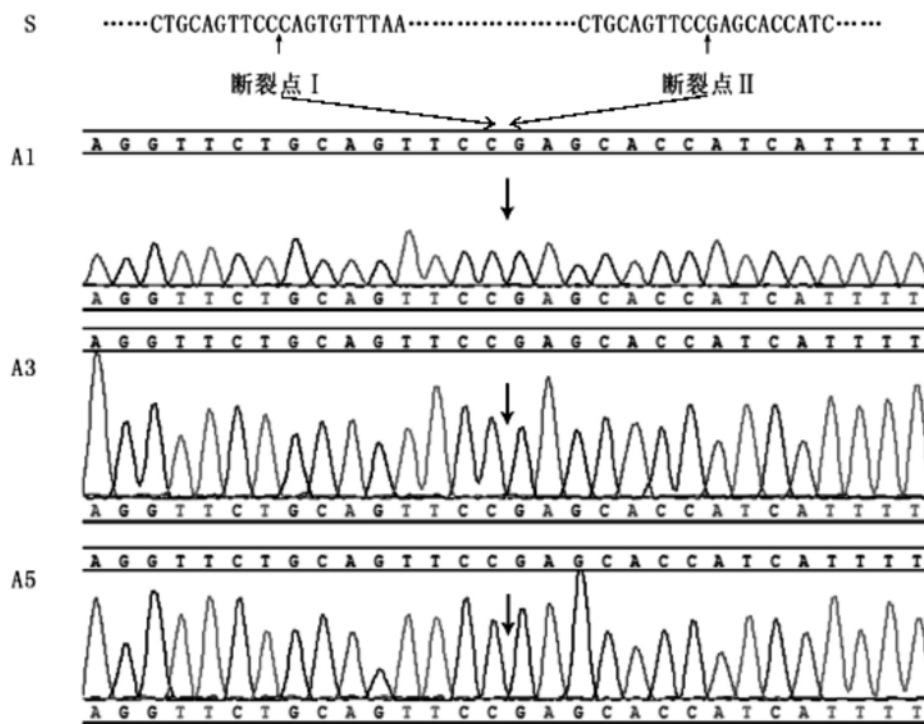
M: DNA Marker; A1, A2, A3, A4, A5, A6 分别代表外祖母、父亲、母亲、姐姐、先证者及健康对照的 NEMO 基因扩增片段; B1, B2, B3, B4, B5, B6 分别代表外祖母、父亲、母亲、姐姐、先证者及健康对照的 Δ NEMO 基因扩增片段。

图3 PCR产物凝胶电泳图
电泳结果显示先证者及其母亲、外祖母均能观

测到引物 In2, JF3R 扩增的 2.6kb 大小的片段, 其父亲、姐姐和健康对照未见该目的片段。所有家系成员及健康对照均未观测到引物 Rev2, JF3R 扩增的 2.6 kb 大小的片段。

2.2 PCR产物测序结果 对先证者及其外祖母、母亲的 NEMO 基因特异性缺失扩增产物进行测序, 测序结果见图 4。三人均未检测到断裂点 I, II 之间的序列(图 2), 测序图中箭头所指位置的左侧为断裂点 I 左侧的序列, 右侧为断裂点 II 右侧的序列, 说明三人均有 NEMO 基因外显子 4-10 的缺失。

2.3 血细胞检测 所有家族成员及健康对照者白细胞计数及分类均未见明显异常, 血细胞分析仪和涂片瑞氏染色也未发现嗜酸性粒细胞增多, 仅有先证者外祖母的 Hb 为 34 g/L, 接近重度贫血。



S: NEMO 基因断裂点附近的标准序列;
A1, A3, A5 分别代表外祖母、母亲、先证者的 NEMO 基因部分测序结果, 箭头指示位置为断裂点。

图4 先证者及其外祖母、母亲的 NEMO 基因部分测序结果

3 讨论 色素失禁症最早于 1906 年由 Garrod 研究报道, 是 X 染色体显性遗传病。女性有两个 X 染色体, 杂合子患者由于 X 染色体失活偏移可以存活, 并表现出不同程度的表型症状; 男性仅有一条 X 染色体, 不存在 X 染色体失活偏移, 通常会在胎儿期死亡, 存活的男性 IP 患者多为 NEMO 基因点突变导致^[6], 还有几例为 47-XXY 性染色体异常

型(Klinefelter 综合征)或者存活男性为存在正常基因和 NEMO Δ 4-10 缺失的嵌合体^[6~8]。由于该症可导致智力发育迟缓、神经系统损害、眼睛、牙齿等发育异常, 因此临床需提高对该病的认识。IP 女性患者表型差异随个体变化很大, 除造成皮肤损伤外, 还会在皮肤附属物(脱发和指甲营养不良)、牙齿(个别牙缺失、小牙畸形、推迟生齿、锥形牙

齿)、口腔(小颌畸形、凸颌、高腭)、中枢神经系统(癫痫、精神发育迟滞、头小畸形)、眼(视网膜脱离、色素性视网膜病变、晶状体后发育不良、斜视、白内障)和血液(嗜酸性粒细胞增多)等方面出现临床症状^[2]。本文先证者已出现皮肤、眼和中枢神经系统等的损伤,其母亲和外祖母除眼睛视力障碍外尚未发现其他系统的损伤,血细胞常规检查也未发现明显异常,未见嗜酸性粒细胞增多。

本次研究应用 Bardaro 等^[5]的方法,在 NEMO 基因内含子 2 和 Δ NEMO 基因外显子 3 的外侧设计上游引物,分别对 NEMO 基因或 Δ NEMO 基因特异性缺失进行鉴定,此方法已在其他研究中验证其准确度和实用性^[3,7,10]。此次检测结果显示:先证者及其母亲和外祖母均存在 NEMO 基因 4-10 特异性缺失,其父亲、姐姐和健康对照者未见该缺失;所有家系成员及健康对照者均未检测到 Δ NEMO 缺失。先证者的 NEMO 基因 4-10 特异性缺失遗传自其母亲,检测结果符合该家系临床症状,NEMO 基因外显子 4-10 缺失是先证者的致病基因突变。目前约 80% 的 IP 患者可以找到其致病基因,另外的 20% 尚未明确病因,所以对发现病例进行深入分析研究有重要意义。在已发现的可导致 IP 的基因突变中,NEMO 基因共有序列 NEMO Δ 4-10 缺失占 60%~80%^[4],10% 为微缺失、点突变^[9]。近年来已经证实 NEMO 基因为色素失禁症致病基因,将有助于解决该症诊断困难的难题。NEMO 基因突变分析还可提供产前诊断技术,值得应用和推广。

参考文献:

- [1] Minic S, Trpinac D, Obradovic M. A novel frameshift mutation of the IKBKG gene causing typical incontinentia pigmenti [J]. *Srp Arh Celok Lek*, 2015, 143 (11/12): 752-754.
- [2] Narayanan MJ, Rangasamy S, Narayanan V. Chapter 20-incontinentia pigmenti (Bloch-Sulzberger syndrome) [J]. *Handb Clin Neurol*, 2015, 132: 271-280.
- [3] 张新愉, 蒋玮莹, 陈路明, 等. 一例色素失禁症女婴 IKBKG/NEMO 基因的突变分析 [J]. *新医学*, 2013, 44(11): 793-796.
Zhang XY, Jiang WY, Chen LM, et al. Analysis of the IKBKG/NEMO gene mutation in a female infant with incontinentia Pigmenti [J]. *New Medicine*, 2013, 44 (11): 793-796.
- [4] Okita M, Nakanishi G, Fujimoto N, et al. NEMO gene rearrangement (exon 4-10 deletion) and genotype-phenotype relationship in Japanese patients with incontinentia pigmenti and review of published work in Japanese patients [J]. *J Dermatol*, 2013, 40(4): 272-276.
- [5] Bardaro T, Falco G, Sparago A, et al. Two cases of misinterpretation of molecular results in incontinentia pigmenti and a PCR based method to discriminate NEMO/IKKc gamma gene deletion [J]. *Human Mutation*, 2002, 21(1): 8-11.
- [6] 郝胜菊, 陈雪, 闫有圣, 等. 色素失禁症 1 例临床特征及基因分析 [J]. *临床儿科杂志*, 2013, 31(12): 1173-1175.
Hao SJ, Chen X, Yan YS, et al. Clinical characteristics and genetic analysis in one case of incontinentia pigmenti [J]. *Journal of Clinical Pediatrics*, 2013, 31(12): 1173-1175.
- [7] Buinauskaite E, Buinauskiene J, Kucinskiene V, et al. Incontinentia pigmenti in a male infant with Klinefelter syndrome: a case report and review of the literature [J]. *Pediatr Dermatol*, 2010, 27(5): 492-495.
- [8] Margari L, Lamanna AL, Buttiglione M, et al. Long-term follow-up of neurological manifestations in a boy with incontinentia pigmenti [J]. *Eur J Pediatr*, 2013, 172(9): 1259-1262.
- [9] Fusco F, Paciolla M, Pescatore A, et al. Microdeletion/duplication at the Xq28 IP locus causes a de novo IKBKG/NEMO/IKK gamma exon4-10 deletion in families with Incontinentia Pigmenti [J]. *Hum Mutat*, 2009, 30(9): 1284-1291.
- [10] 张慧芳, 张秀芳, 于淑群, 等. 色素失禁症在新生儿期的临床特点及基因分析 [J]. *中国儿童保健杂志*, 2015, 23(5): 457-459.
Zhang HF, Zhang XF, Yu SQ, et al. Typical clinical manifestations and genetic examination of incontinentia pigmenti in neonatal period [J]. *Chinese Journal of Child Health Care*, 2015, 23(5): 457-459.

收稿日期: 2018-08-07

修回日期: 2018-09-03