·论　著·

遗传性对称性色素异常症家系中 ADAR1 基因的遗传分析

李艳雯[1]，汪　峰[2]，黎　宇[3]
（南华大学第一附属医院：1. 检验科；2. 皮肤科；3. 骨科，湖南衡阳 421001）

摘　要：目的　研究一个遗传性对称性色素异常症家系的致病基因。**方法**　采用聚合酶链反应（PCR）后酶切测序的方法鉴定 ADAR1 基因是否存在变异。**结果**　在先证者及其 2 个患病的儿子中同时检测到了 ADAR1 基因在编码区发现变异 C. 1105insA 杂合改变，导致其编码的蛋白提前终止 T369fsX374。**结论**　ADAR 基因 T369fsX 变异导致了遗传性对称性色素异常症的发生。

关键词：突变；ADAR1 基因；遗传性对称性色素异常症
doi：10. 3969/j. issn. 1671-8348. 2012. 02. 005　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1671-8348(2012)02-0117-02

Screen of mutation of ADAR1 in a Chinese pedigree with dyschromatosis symmetrica hereditaria

Li Yanwen[1]，*Wang Feng*[2]，*Li Yu*[3]
（1. *Inspection Department*；2. *Dermatological Department*；3. *Orthopedics Department*，
the First Attached Hospital in Nanhua University Hengyan，*Hunan*，421001）

Abstract：Objective　The aim of this study was to screen the mutation of ADAR1 in a Chinese pedigree with dyschromatosis symmetrica hereditaria. **Methods**　ADAR1 gene was direct sequenced after polymerase chain reaction. **Results**　This pedigree contains 9 members including 3 affected members. Sequencing results showed that all the 3 affected members carried an insert mutation at the coding region 1105 of ADAR1 gene，while other 6 normal members did not find this variation. **Conclusion**　The study identified a mutation c. 1105insA as the causitive gene of this DSH pedigree.

Key words：mutation；ADAR1 gene；dyschromatosis symmetrica hereditaris

遗传性对称性色素异常症（DSH，MIM＃127400）是一种较为少见的常染色体显性遗传性皮肤病，外显率高。该病起于婴幼儿期，青春期明显，以后缓慢发展，持续终身。损害为针头至黄豆大、间杂以色素减退的斑点，呈网眼状，对称地散布于四肢末端手足背[1]。2003 年 Miyamura 等[2]在日本 DSH 家系研究中首次报道了 ADAR1 基因的杂合突变可以导致 DSH 的发生。文献[3-8]在中国大陆和中国台湾人群中发现 22 例新的 ADAR1 突变，进一步证实了 ADAR1 基因不仅在日本人群 DSH 患者中起着致病作用，在其他人群中也一样。ADAR1 蛋白催化双链 RNA 脱苷成次黄嘌呤核苷[9]。ADAR1 基因广泛表达[10-11]，但在皮肤组织中的表达情况尚未见报道，其在 DSH 中的致病分子机制也尚未阐明。

1　材料与方法

1.1　材料　从本院皮肤科收集到 DSH 家系一个（图 1），家系成员共 9 人，其中患者 3 人。其遗传方式符合常染色体显性遗传。本研究遵循赫尔辛基宣言，在家系所有成员均知情同意的情况下，抽取家系中 3 例患者和 6 名正常者外周血 8～10 mL。

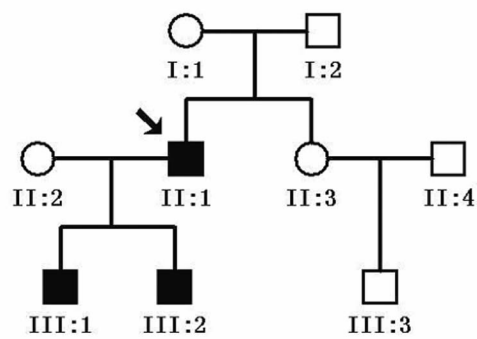
1.2　方法

1.2.1　家系成员皮肤科检测　皮肤科医生对该家系所有成员进行检查及诊断。

1.2.2　基因组 DNA 的提取　取外周血 8～10 mL，采用苯酚氯仿法分步提取基因组 DNA。经紫外分光光度计和质量分数 0.6％琼脂糖凝胶电泳检测样本 DNA 纯度和浓度后于－20 ℃冰箱中保存备用。

1.3　ADAR 基因的突变筛查

1.3.1　聚合酶链反应（polymerase chain reaction，PCR）　使用由加拿大生物研究所提供的 primer3 在线软件（http://www-genome. wi. mit. edu/cgi-bin/primer/primer3. cgi/）设计了覆盖 FRMD7 基因 15 个外显子的引物共 17 对（表 1）。



□：正常男性；○：正常女性；■：患病男性；↘：先证者。

图 1　DSH 患者家系图

1.3.2　PCR 反应体系及条件　使用扩增效率高、特异性强的 Hot Star Taq 酶扩增所有引物，采用 Touchdown 程序进行扩增。总反应体系 10 μL：10′Buffer 1 μL，Q-Buffer 2 μL，$MgCl_2$ 0.5 μL，dNTPs（10 mM）0.2 μL，Hot Star Taq 酶（5 U/mL）0.05 μL，Primers（50 ng/mL）0.3 μL，DNA 模板（50 ng/mL），加 ddH_2O 至 10 μL。反应条件采用 2 相循环，首先 94 ℃预变性 12 min，第 1 相循环时，95 ℃变性 3 min，起始退火温度 63 ℃ 1 min，以后每个循环减少 0.5 ℃，72 ℃延伸 30 s，共 15 个循环。目的是使每对引物扩增时都达到最佳退火温度，都能扩增出目的产物。第 2 相循环 94 ℃变性 30 s，56 ℃退火 1 min，

72 ℃延伸 1 min 50 s,16 个循环,最后 72 ℃延伸 10 min。

1.3.3 酶切后直接测序 取 2 μL PCR 反应产物,在 6%聚丙烯酰胺凝胶上 300 V 电泳 40 min,银染检测 PCR 产物。检测完后,对扩增特异性好的 PCR 产物用虾碱性磷酸酶和核酸外切酶处理,37 ℃酶切 60 min,80 ℃ 15 min 灭活虾碱性磷酸酶和核酸外切酶,处理完后的产物用 3100 基因分析仪测序。

表 1 ADAR 基因引物

外显子	引物名称	序列
Exon1	ADAR-1F	5′-CACTTCCAGTGCGGAGTAGC-3′
	ADAR-1R	5′-CACTGCAACACAAAGCCTGT-3′
Exon2	ADAR-2FA	5′-AATTGCCTCTCAGCCCTTC-3′
	ADAR-2RA	5′-GGTGTTCCTGCCTCTTTCTG -3′
	ADAR-2FB	5′-TCTACCAAGATCAGGAACAAAGG-3′
	ADAR-2RB	5′-TGCATCCTCTCTCGCTTC-3′
	ADAR-2FC	5′-GCCGAGATCAAGGAGAAAATC-3′
	ADAR-2RC	5′-CTGCTCACAAATCAGCCAAG-3′
Exon3	ADAR-3F	5′-CAGAAAATTCCAGGTTGAAGG-3′
	ADAR-3R	5′-AGGGAAGAGTGGGAAGCTGA-3′
Exon4	ADAR-4F	5′-TGACAGGTGGTGGGAATAAAG-3′
	ADAR-4R	5′-TGAGGAGGCAAGGAAGAAAA-3′
Exon5	ADAR-5F	5′-CAGAGGTGATGTGTTCAAGGA-3′
	ADAR-5R	5′-CAGGAAATGTTGAGGGAGTCA-3′
Exon6	ADAR-6F	5′-GGTAGGGCGTTTTCCTACTCA-3′
	ADAR-6R	5′-AAAGCACACCCTTGTTTTCC-3′
Exon7	ADAR-7F	5′-GGCCACATCTTCAGCAAAAC-3′
	ADAR-7R	5′-CGTGTGAGTCATCTTTTCCTTCT-3′
Exon8	ADAR-8F	5′-AAGGAAAAGATGACTCACACGA-3′
	ADAR-8R	5′-TCTCCCTGCCTTGGACTTAC-3′
Exon9	ADAR-9F	5′-TGAGGCTGTTTCTGCCTTG-3′
	ADAR-9R	5′-CGTCTGTCTGAGGGGGATT-3′
Exon10	ADAR-10F	5′-TGCAACATTGAGACTTTTCCTT-3′
	ADAR-10R	5′-CAGTGGAGTGTGGCTTATTGT-3′
Exon11	ADAR-11F	5′-GGCCTTAGAAAACATCCCTTG-3′
	ADAR-11R	5′-AGCAGCCTTGTAGAGACTTGG-3′
Exon12	ADAR-12F	5′-TGAATGAATGTAGCCTGTGG-3′
	ADAR-12R	5′-AAAACACCTGGCAATAAAGCA-3′
Exon13	ADAR-13F	5′-GTACCTCCAAAATCCCCACA-3′
	ADAR-13R	5′-ATGTTCCCCTTGCCCACA-3′
Exon14	ADAR-14F	5′-ACCCCACACTTCCTCTCTCC-3′
	ADAR-14R	5′-TTCACCTGGGACCTGTAAGATAA-3′
Exon15	ADAR-15F	5′-TGGATGGGTAAGGAGACAGG-3′
	ADAR-15R	5′-TGTGATGAGGAATGCTACGA-3′

2 结 果

2.1 临床检查 该家系先证者大儿子 2 岁发病,双手、足呈对称分布点状色素沉着及色素减退斑,左前臂约 4 cm×3 cm 大小咖啡色斑,双面颊、黄豆大小褪色斑。3 例患者症状相似。

2.2 测序结果 用 DNASTAR 软件中的 SeqMan 程序与参照序列进行比对分析。在先证者 ADAR1 基因 2 号外显子编码区发现变异 C.1105insA(图 2),插入碱基 A 后导致了移码,其编码的蛋白提前终止 T369fsX374。随后在先证者 2 个儿子的 DNA 中也检测到了该变异。家系中其他正常者未检测到该变异。

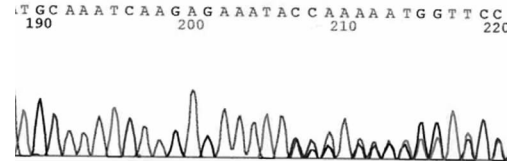


图 2 测序结果

3 讨 论

迄今为止,已经在日本、中国大陆及中国台湾人群中报道了 52 个不同的 ADAR1 突变[6,12-13]。其中 35 个突变(67%)位于ADAR1蛋白脱氨基酶结构域,脱氨基酶结构域由编码的 886 位至 1 221 位氨基酸组成,占此蛋白全长的 27%,提示脱氨基酶结构域是一个突变热点区域。据报道,人类 ADAR1 蛋白包含 2 种形式:一种是 IFN 诱导的全长 150 kD 的蛋白;另一种是 N-端截短的全长 110 kD 的蛋白。2 种不同的蛋白是由 2 个不同的启动子形成的[14]。由甲硫氨酸编码起始密码子全长为 1 226 个氨基酸的产物称 hADAR1-p150,而由第 296 位密码子作为 ATG 起始翻译的全长 931 个氨基酸的蛋白质为 hADAR1-p110。本研究报道的突变 C.1105insA 于 2007 年首先在日本人群中报道[15],插入碱基 A 后导致了移码,其编码的蛋白提前在第 374 位终止。该突变并未位于突变热点区域。其突变会使 2 种蛋白产物 hADAR1-p150 和 hADAR1-p110 都提前终止,产生无功能的截短蛋白,从而不能发挥其将双链 RNA 脱苷催化生成次黄嘌呤核苷的功能。

参考文献:

[1] Tomita Y, Suzuki T. Genetics of pigmentary disorders[J]. Am J Med Genet C Semin Med Genet, 2004, 131(1): 75-81.

[2] 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(5): 693-695.

[3] Suzuki N, Suzuki T, Inagaki K, et al. Mutation analysis of the ADAR1 gene in dyschromatosis symmetrica hereditaria and genetic differentiation from both dyschromatosis universalis hereditaria and acropigmentatio reticularis[J]. J Invest Dermatol, 2005, 124(9): 1186-1192.

[4] Chao SC, Lee JY, Sheu HM, et al. A novel deletion mutation of the DSRAD gene in a Taiwanese patient with dyschromatosis symmetrica hereditaria[J]. Br J Dermatol, 2005, 153(8): 1064-1066.

[5] Cui Y, Wang J, Yang S, et al. Identification of a novel mutation in the DSRAD gene in a Chinese pedigree with dyschromatosis symmetrica hereditaria[J]. Arch Dermatol Res, 2005, 296(4): 543-545.

[6] Liu Q, Jiang L, Liu WL, et al. Two novel(下转第 121 页)

trial of ifferentiated prednisolone treatment in active rheumatoid arthritis: cinical benefits and skeletal side effects [J]. Ann Rheum Dis, 1999, 58: 713-718.

[4] Boers M, Verhoeven AC, Markusse HM, et al. Randomised comparison of combined step down prednisolone, methotrexate, sulphasalazine with sulphasalazine alone in early rheumatoid arthritis[J]. Lancet, 1997, 350: 309-318.

[5] Capell HA, Madhok R, Hunter JA, et al. Lack of radiolo gical and clinical benefit over two years of low dose prednisolone for rheumatoid arthritis: results of a randomized controlled trial[J]. Ann Rheum Dia, 2004, 63: 797-803.

[6] 谢雯,舒荣,张奉春. 糖皮质激素治疗类风湿关节炎的临床分析[J]. 中华全科医师杂志, 2005, 4(4): 153-155.

[7] Svensson B, Boonen A, Albertsson K, et al. Low dose prednisolone in addition to the initial disease modifying antirheumatic drug in patients with early active rheumatoid arthritis reduce joint destruction and increases the remission rate: a two-year randomized trial [J]. Arthritis Rheum, 2005, 52(11): 3360-3370.

[8] Wassenberg S, Rau R, Steinfeld P, Zeidler H. Very low dose prednisolone in early rheumatoid arthritis retards radiographic progression over two years: a multicenter, double-blind, placebo controlled trial[J]. Arthritis Rheum, 2005, 52 (11): 3371-3380.

[9] 徐胜前,徐建华,王芬. 糖皮质激素治疗类风湿关节炎的初步临床分析[J]. 中国实用医药, 2008, 3(4): 16-18.

[10] Choy EH, Kingsley GH, Khoshaba B, et al. A two year randomised controlled trial of intramuscular depot ste roids in patients with established rheumatoid arthritis who have shown anincomplete response to disease modifying antirheumatic drugs[J]. Ann Rheum Dis, 2005, 64: 1288-1293.

[11] 李征寒,吴东红,王丽娟. 联合小剂量糖皮质激素治疗类风湿关节炎临床研究[J]. 中国现代药物应用, 2009, 3 (7): 132-133.

[12] 左晓霞,胡燕青,王浩. 小剂量强的松联合慢作用抗风湿药治疗类风湿关节炎临床研究[J]. 中国医师杂志, 2001, 3(5): 715-716.

[13] Rantalaiho V, Korpela M, Laasonen L, et al. Early comibination disease modifying antirheumatic drug therapy and tight disease control improve long-term radiologic outcome in patients with early rheumatoid arthritis: the 11-year results of the Finnish Rheumatoid Arthritis Combination Therapy trial[J]. Arthritis Research & Therapy, 2010, 12: 122-124.

[14] Mottonen T, Hannonen P, Korpela M, et al. Delay to institution of therapy and induction of remission using single-drug or combination-disease-modifying antirheumatic drug therapy in early rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Rheum, 2002, 4: 894-898.

(收稿日期:2011-06-13 修回日期:2011-08-21)

(上接第 118 页)

mutations and evidence for haploinsufficiency of the ADAR gene in dyschromatosis symmetrica hereditaria[J]. Br J Dermatol, 2006, 154(5): 636-642.

[7] Li CR, Li M, Ma HJ, et al. A new arginine substitution mutation of DSRAD gene in a Chinese family with dyschromatosis symmetrica hereditaria[J]. J Dermatol Sci, 2005, 37(1): 95-97.

[8] Xing Q, Wang M, Chen X, et al. Identification of a novel ADAR mutation in a Chinese family with dyschromatosis symmetrica hereditaria (DSH) [J]. Arch Dermatol Res, 2005, 297(2): 139-142.

[9] Wagner RW, Smith JE, Cooperman BS, et al. A double-stranded RNA unwinding activity introduces structural alterations by means of adenosine to inosine conversions in mammalian cells and Xenopus eggs[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1989, 86(14): 2647-2651.

[10] Goodman RA, Macbeth MR, Beal PA. ADAR proteins: structure and catalytic mechanism [J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2011, 23(4): 547-549.

[11] Laxminarayana D, Khan IU, O'Rourke KS, et al. Induction of 150 kDa adenosine deaminase that acts on RNA (ADAR)-1 gene expression in normal T lymphocytes by anti-CD3-epsilon and anti-CD28[J]. Immunology, 2007, 122(5): 623-625.

[12] Li M, Yang LJ, Zhu XH, et al. Analysis on the mutation of ADAR gene in a pedigree with dyschromatosis symmetrical hereditaria[J]. Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi, 2007, 24(3): 446-448.

[13] Zhang XJ, He PP, Li M, et al. Seven novel mutations of the ADAR gene in Chinese families and sporadic patients with dyschromatosis symmetrica hereditaria (DSH) [J]. Hum Mutat, 2004, 23(5): 629-630.

[14] Kawakubo K, Samuel CE. Human RNA-specific adenosine deaminase (ADAR1) gene specifies transcripts that initiate from a constitutively active alternative promoter [J]. Gene, 2000, 258(2): 165-172.

[15] Suzuki N, Suzuki T, Inagaki K, et al. Ten novel mutations of the ADAR1 gene in Japanese patients with dyschromatosis symmetrica hereditaria[J]. J Invest Dermatol, 2007, 127(2): 309-311.

(收稿日期:2011-06-31 修回日期:2011-08-18)