

X连锁无汗性外胚层发育不良一家系的产前诊断及遗传咨询

朱娟 潘小英 吴菁 丁红珂 何薇*

(广州医科大学广东省妇幼保健院,广东 广州 510010)

【摘要】 目的 对一 X-连锁无汗性外胚层发育不良(XLHED)的家系进行 *EDA* 基因诊断,探讨 XLHED的产前诊断及遗传咨询。方法 提取先证者、孕妇外周血及胎儿羊水细胞 DNA,应用聚合酶链反应(PCR)技术结合直接测序法检测 *EDA* 基因,并进行针对性的遗传咨询及优生指导。结果 孕妇为 *EDA* 基因 7 号外显子 c. 871G>A 杂合突变,先证者及胎儿均为 *EDA* 基因 7 号外显子 c. 871G>A 纯合突变,孕妇经遗传咨询后根据伦理原则要求终止妊娠。结论 在本家系中,*EDA* 基因 c. 871G>A 突变为导致 X-连锁无汗性外胚层发育不良的原因,对 *EDA* 基因突变检测可对 XLHED 进行产前诊断。

【关键词】 X-连锁无汗性外胚层发育不良; 基因突变; 产前诊断

【中图分类号】 R714.55 **【文献标识码】** A

【Abstract】 Objective To investigate a procedure for genetic counseling and prenatal diagnosis of X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia (XLHED) by mutation detection in a family with XLHED. **Method** Collected the peripheral blood and fetal amniotic fluid cells, *EDA* gene were amplified with polymerase chain reaction (PCR) technique and directly sequenced. **Results** Pregnant women appear for *EDA* gene 7 extra child c. 871 g>A hybrid mutation, the proband and fetus are 7 extra *EDA* gene show son c. 871 g>A homozygous mutations. **Conclusions** In this family, *EDA* gene 7 extra child c. 871 g>A mutations detection lead to XLHED, *EDA* gene mutation detection can make prenatal diagnosis for the XLHED.

【Key words】 X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia; gene mutation; prenatal diagnosis

外胚层发育不良(ectodermal dysplasia, ED)是一种罕见的以汗腺、毛发及牙齿等外胚层组织发育不良或形态缺陷为主要特征的遗传性疾病,出生发病率约为 1:100 000。X-连锁无汗性外胚层发育不良(X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia, XLHED)是 ED 中最常见的一种类型,为 X 染色体连锁隐性遗传疾病,其临床表现为毛发稀少、汗腺发育不全、前额突出、无牙或少牙畸形、皮肤及其附属器官异常^[1]。XLHED 患儿由于皮肤散热系统异常,早期死亡率高达 30%,余者因环境温度、日光照射及剧烈运动而导致高热,严重影响工作、生活甚

至威胁生命^[2]。由于无有效治疗方法,产前诊断是预防和减少 XLHED 患儿出生的有效措施。本文对 1 例散发 XLHED 患儿及其母亲、高危胎儿应用聚合酶链反应(PCR)技术结合直接测序法检测 *EDA* 基因,并对 XLHED 疾病进行遗传咨询和优生指导,现报道如下。

1 对象与方法

1.1 研究对象 ①先证者:男,7岁,第一胎足月顺产,出生后发现全身无汗,毛发稀少,无眉,鼻梁塌陷,剧烈运动后烦躁,常不明原因发热,全身皮肤干燥,粗糙,牙齿四颗,尖锥样,上下各两个,智力发育正常,在外院诊断为“无汗性外胚层发育不良综合

征”。②孕妇:30 岁,孕 2 产 1 宫内妊娠 24 周单活胎,为先证者母亲,既往体健,全身皮肤毛发无异常,非近亲婚配。孕期顺利,定期产检无特殊不适。③家系及其他成员:丈夫及家族中无类似病例发生。

1.2 研究方法 本研究经过本院医学伦理委员会批准后,遵循非指令性原则,与先证者母亲及父亲进行 XLHED 病例的详细咨询,提供完备且无偏倚的信息后,先证者母亲及父亲均明确表示有避免再次生育 XLHED 患儿的愿望,遂告知其产前诊断的局限性及具体流程,签署知情同意书,提取先证者、母亲血样进行 *EDA* 基因检测。在明确先证者 *EDA* 基因突变位点后,详细告知先证者母亲及父亲侵入

性产前诊断的各种并发症及风险,签署手术同意后抽取羊水进行 *EDA* 基因检测。

1.2.1 实验室方法

1.2.1.1 基因组 DNA 提取 抽取先证者及母亲静脉血 5 ml 加入 EDTA 抗凝管,使用厦门致善核酸自动提取仪提取 DNA。抽取胎儿羊水 10 ml,使用 Qiagen 试剂盒进行 DNA 提取,并置于 -20 °C 保存。

1.2.1.2 引物设计及合成 *EDA* 基因编码区有 8 个外显子,共编码 391 个氨基酸。根据文献^[3-5]设计 8 对特异性引物扩增 *EDA* 基因编码区的 8 个外显子,确认引物核酸序列,由深圳华大基因科技服务有限公司合成引物,见表 1。

表 1 *EDA* 外显子 1-9 PCR 扩增引物序列

外显子	上游引物序列	下游引物序列	长度
Exon1	5'-GCCTGTCAGAGGTCGTGAAC-3'	5'-GAGGTTGCTGAGTGCTCCC-3'	567
Exon2	5'-TTGGCTATGACTGAGTGGGG-3'	5'-CTACCAAGAAGGTAGTTCTTAAAAGG-3'	243
Exon3	5'-CTTGGCTGTGAGACTCCCTC-3'	5'-AATGATTTCTTGTTCCTCAGAAACTAC-3'	322
Exon4	5'-CTGGGCAACAGAGCAGG-3'	5'-GCTCTCAGGATCACCCACTC-3'	318
Exon5	5'-GGTGAGGGGAAAAGGAAGTC-3'	5'-CAGGCCATTAAGGCAGACG-3'	551
Exon6	5'-TGAGCAAGCAGCCATTACTC-3'	5'-ATTATTTGGAGGCTGGGGAG-3'	177
Exon7	5'-TTCTGTTGCCTCGATTATTCTG-3'	5'-CTATGTGGCCTGCACCG-3'	254
Exon8	5'-GTCAATTCACCACAGGGAGG-3'	5'-GGAGTCCTGGCTCCCAAAC-3'	387

1.2.1.3 *EDA* 基因检测 对样本进行常规 PCR 扩增,反应总体积为 25 μl,内含 10×反应缓冲液,200 μmol/dNTP,上下游引物各 50 ng,模板 DNA100 ng,Taq 聚合酶 1U。PCR 反应条件:预变性 95 °C 5 分钟,95 °C 变性 30 秒,56~60 °C 复性 30 秒,72 °C 延伸 30 秒,共 30 个循环,最后 72 °C 延伸 10 分钟。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测确认后,交由深圳华大基因科技服务有限公司纯化后直接测序,测序结果提交 PubMed-Blast 与数据库基因序列进行比较。

1.2.2 胎儿侵入性产前诊断

1.2.2.1 仪器设备 ALOKA1400 超声仪,3.5 MHz 穿刺探头,采用 22G 150 mm PTC 穿刺针。

1.2.2.2 羊膜腔穿刺术 孕妇取仰卧位,常规消毒后,在 B 超介导下经腹行羊膜腔穿刺提取胎儿羊水 10 ml,术程顺利。提取羊水 DNA 后,进行 *EDA* 基

因诊断。

2 结果

检测者 DNA 使用 8 对引物在各自条件下分别扩增出相应产物,基因突变测序结果显示孕妇为 *EDA* 基因 7 号外显子 c. 871G>A 杂合子突变,先证者的 *EDA* 基因 7 号外显子 c. 871G>A 纯合子突变,此位点的鸟嘌呤(G)被腺嘌呤(A)替换,导致 *EDA* 基因的第 291 位氨基酸密码子 GGC 突变成 GAC,导致正常的甘氨酸(Gly)被精氨酸(Arg)替代。胎儿的 *EDA* 基因测序结果显示 7 号外显子 c. 871G>A 纯合子突变,与先证者一样均为 XLHED 患儿。此突变位点与 Gene 数据库公布的人类 *EDA* 基因核苷酸序列进行比对分析,结果见图 1~3。经过遗传咨询,孕妇及家属要求根据伦理原则终止妊娠,引产出一男性胎儿。

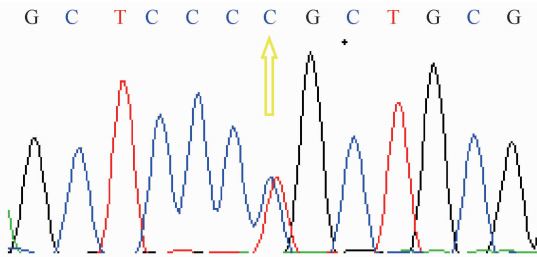


图1 先证者母亲外显子5的871位碱基突变反向测序图

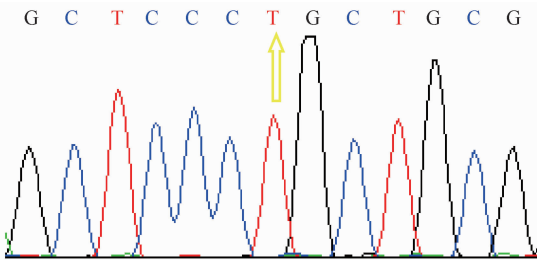


图2 先证者外显子5的871位碱基突变反向测序图

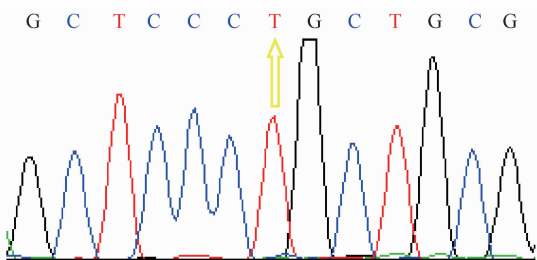


图3 胎儿外显子5的871位碱基突变反向测序图

3 讨论

3.1 病例分型及遗传方式 外胚层发育不良(ED)分有汗型和无汗型两种。有汗性外胚层发育不良(hidrotic ectodermal dysplasia, HED)是一种常染色体遗传疾病,其临床表现为甲发育不良、掌跖角化过度、毛发稀疏或完全缺如等,但汗腺和皮脂腺功能正常^[6]。无汗性外胚层发育不良多数为X-连锁无汗性外胚层发育不良(XLHED),男性发病,女性多为基因携带者,其临床表现主要为无汗、脱发、缺牙三联征^[1,2]。本文家系的先证者具有典型临床表现:全身无汗、毛发稀少、无眉、鼻梁塌陷、剧烈运动后烦躁、常不明原因发热、全身皮肤干燥、粗糙、牙齿四颗,结合EDA基因结果及家系分析可临床诊断为XLHED。XLHED为X染色体连锁隐性遗传疾病,传递给男性后代致病,传递给女性后代为杂合携

带者,其遗传规律如下:①XLHED男性患者与正常女性结婚,其儿子100%正常,其女儿100%为携带者。②正常男性与XLHED女性携带者结婚,其儿子50%正常,50%为患者;其女儿50%正常,50%为携带者。③XLHED男性患者与XLHED女性携带者结婚,其儿子50%正常,50%发病;其女儿50%为携带者,50%发病。④正常男性与XLHED女性患者结婚,其儿子100%为患者,女儿100%为携带者。本例家系中先证者母亲为EDA基因携带者,先证者父亲无异常,若其夫妻要求继续生育,均需进行遗传方式的咨询及胎儿EDA基因产前诊断。

3.2 病因 XLHED的致病基因EDA定位于Xq12~13.1,其基因主要在外胚层中与角质、毛囊、汗腺等起源相关的细胞中表达,其编码区共有8个外显子,编码的ectodysplasin-A蛋白含有391个氨基酸,为II型三聚体单次跨膜蛋白,具有细胞内结构域、跨膜结构域、细胞外结构域、酶裂解结构域、胶原样结构域及肿瘤坏死因子(TNF)同源结构域,在各个结构域编码区均可发现EDA突变,至今报道各类突变已达200多种^[7]。本研究中先证者与胎儿的EDA基因7号外显子第871位点的鸟嘌呤(G)被腺嘌呤(A)转换,使EDA基因的第291位氨基酸密码子GGC突变成GAC,使正常的甘氨酸(Gly)被精氨酸(Arg)替代,此突变位于TNF同源结构域,会导致蛋白合成提前终止,从而影响了EDA基因编码的ectodysplasin-A蛋白与相应受体的结合,中断或削弱了正常外胚层上皮细胞信号通路,影响皮肤及其附属物的正常发育^[8]。

3.3 产前诊断 XLHED的患者由于汗腺发育不全,散热困难,临床上仅能通过物理方法对症治疗,病死率高,存活至成年者较少^[2],因此该病的产前诊断有重要意义。对有或疑有XLHED家族史的孕妇应进行遗传咨询,需对家族中的先证者、可能的携带者及孕妇进行家系分析及EDA基因诊断,明确家系中EDA突变位点后,方可对其胎儿进行产前诊断。同时需告知遗传异质性,不排除临床表现典型却无法找出相关基因突变位点。除了通过侵入性产前诊断方法获取脐血、羊水、绒毛进行EDA基因产前诊断外,有文献报道可通过提取母亲外周血中

游离胎儿细胞进行 EDA 基因诊断^[9],也有报道在中孕晚期利用胎儿镜行宫内胎儿皮肤活检,取胎儿皮肤进行组织病理学分析^[10]。当胎儿经过产前诊断确诊为 XLHED 患儿时,需遵循知情同意及知情选择原则,向孕妇及家属提供真实、充分的信息,并进行有效的遗传咨询,同时需尊重孕妇及家属的选择。若其要求保留胎儿,应告知其在胎儿出生后需及早采取措施避免或减少高热带来的严重后遗症的危害,并尽早治疗。

本文对 1 例散发 XLHED 家系找出 EDA 基因突变位点并进行产前诊断,通过有效的遗传咨询及产前诊断是预防和减少 XLHED 患儿出生的有效措施。

参 考 文 献

[1] Prasun P, Karmarkar SA, Agarwal A, et al. Unusual physical features and heat strike presentation for hypohidrotic ectodermal dysplasia[J]. Clin Dysmorphol, 2012, 21(1): 24-26.

[2] Mc Dermott, Casa DJ, Ganio MS, et al. Acute whole body cooling for exercise-induced hyperthermia: a systematic review [J]. Jathl Train, 2009, 44(1): 84-93.

[3] Canueto J, Zafra-Coboa MI, Ciria S, et al. A novel EDA gene mutation in a Spanish family with X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia [J]. Actas Dermosifiliogr, 2011, 102

(9): 722.

[4] Tong DX, He SP, Wang LW, et al. Association of single nucleotide polymorphisms in the cannabinoid receptor 2 gene with schizophrenia in the Han Chinese population [J]. J Mol Neurosci, 2013, 51(2): 454.

[5] Zhang J, Han D, Song SJ, et al. Correlation between the phenotypes and genotypes of X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia and non-syndromic hypodontia caused by ectodysplasin-A mutations [J]. Eur J Med Genet, 2011, 54(4): e377.

[6] Mittal M, Srivastava D, Kumar A, et al. Dental management of hypohidrotic ectodermal dysplasia: A report of two cases [J]. Contemp Clin Dent, 2011, 6(3): 414-417.

[7] Hsu MM, Chao SC, Lu AC. Gene Symbol: ED1. Disease: Ectodermal dysplasia, anhidrotic [J]. Hum Genet, 2004, 114: 609.

[8] Fan HL, Ye XQ, Shi L, et al. Mutations in the EDA gene are responsible for X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia and hypodontia in Chinese kindreds [J]. Eur J Oral Sci, 2008, 116(5): 412.

[9] Chen HP, Wang TR, Xu XY, et al. Comparison of three methods for the gene analysis of fetal cells from maternal peripheral blood [J]. Chin Med J, 2004, 117: 507-510.

[10] Arnold ML, Rauskolb R, Anton-Lamprecht I, et al. Prenatal diagnosis of anhidrotic ectodermal dysplasia [J]. Prenat Diagn, 1984, 4: 85-98.

(收稿日期: 2015-09-09)

编辑: 宋文颖

读 者 · 作 者 · 编 者

本刊对照片及图像的要求

照(图)片每 3 张图单独占 1 页,集中附于文后,分别按其在正文中出现的先后次序连续编码。每张照(图)片均应有必要的图题及说明性文字置于图的下方,并在注释中标明图中使用的全部非公知公用的缩写;图中箭头标注应有文字说明。大体标本照片在图内应有尺度标记,病理照片要求注明特殊染色方法和高、中、低倍数。照片要求有良好的清晰度和对比度,并在背面标明图号、作者姓名及图的上下方向。说明文字应简短,不应超过 50 字,所有的图在文中相应部分应提及。电子图片采用 jpg 格式,分辨率不低于 300 像素/英寸,并应经过剪切后充分显示关键部分。

动态图像分别按其在正文中出现的先后次序连续编码,文中应标记为“动态图×”。视频资料要求图像清晰稳定,剪接顺畅,保持可能获得的最高清晰度模式,视频文件采用 AVI 格式,大小在 5M 以内。每个文件名均应与文中的名称相符,如“动态图×”。

中国产前诊断杂志(电子版)编辑部