

·临床观察与报道·

一例重型斑驳病患者的KIT基因突变检测

邓伟平¹, 彭琛², 陈敏华¹, 戴少霞¹

(1. 广东省医学科学院//广东省人民医院皮肤科, 广东广州 510080; 2. 上海市皮肤病医院, 上海 200050)

摘要:【目的】对1例斑驳病小家系中的先证者进行致病基因KIT和SLUG(SNAI2)编码序列的突变检测,寻找致病性突变。【方法】应用PCR扩增KIT和SLUG基因编码区及外显子-内含子交界区,对PCR产物进行直接测序。在50例正常对照中进行新突变的测序分析,以排除多态性。【结果】家系先证者SLUG基因检测未发现异常,KIT基因检测到1个国际数据库中尚未报道的点突变c.860T>A(p.V287E),患者父母均未检测到此突变。该突变位于KIT基因编码蛋白的细胞外配体结合区域,第287位的缬氨酸突变为谷氨酸,可能导致了与249位谷氨酸相排斥,破坏了D3结构域中βD和βD/βE稳定性,最终影响SCF(stem cell factor)的结合功能。【结论】KIT基因的新生突变可能是引起本重型斑驳病患者发病的原因。

关键词:斑驳病;KIT基因,SLUG基因;de novo突变

中图分类号:R758.5

文献标志码:A

文章编号:1672-3554(2017)06-0949-06

Detection of KIT gene of a case with serious phenotypes of piebaldism

DENG Wei-ping¹, PENG Chen², CHEN Min-hua¹, DAI Shao-xia¹

(1. Guangdong Academy of Medical Sciences// Guangdong General Hospital, Guangzhou 510080; 2. Shanghai Dermatology Hospital, Shanghai 200050, China)

Corresponding to: DENG Wei-ping. E-mail: oldeng148@aliyun.com

Abstract: 【Objective】To investigate the mutations of KIT gene and SLUG(SNAI2)gene in one patients with piebaldism in China. 【Methods】All coding exons and exon-intron boundaries of KIT gene and SLUG gene were amplified by PCR. The PCR products were sequenced. The DNA samples from 50 normal subjects were also sequenced for control. 【Results】The novel mutation, c.860T>A(p.V287E), was detected in patient. This mutation was absent in his parents and the controls, indicating a de novo mutation. The detection result of all coding exons and exon-intron boundaries of SLUG gene was normal. This p.V287E mutation was located in the extracellular ligand-binding domain (ectodomain) of KIT, which may generate clash with E249 and disrupt the conformation of βD and βD/βE of D3 that required for SCF(stem cell factor)binding. 【Conclusion】We have identified a novel mutation of KIT gene, c.860T>A(p.V287E), which is probably associated with serious phenotypes of piebaldism.

Key words: piebaldism; KIT gene; SLUG gene; de novo mutation

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2017, 38(6):949-954]

斑驳病(piebaldism)是一种临床上罕见的常染色体显性遗传性皮肤病,目前尚无有效疗法。其特征性临床表现为额部中央部位的三角形或菱形白斑,并伴有横跨发际的局限性白发,常可累及手足、腕踝、面、胸腹部。有些病人仅表现为躯干部位色素沉着斑或咖啡斑,临床上易与多发性神

经纤维瘤病1型相混淆^[1]。本病亦可伴发虹膜异常、聋哑、精神发育异常、兔唇,耳、齿畸形等。斑驳病主要与肥大细胞/干细胞生长因子受体KIT基因(NM:000222)突变及SLUG(SNAI2)基因(NM:003068)缺失相关^[2-3]。本文对1例斑驳病患者的KIT及SLUG基因进行突变检测,发现1个国

收稿日期:2017-07-16

基金项目:广东省自然科学基金(S2013010015872)

作者简介:邓伟平,通信作者,医学博士,主任医师,研究方向:皮肤遗传病致病基因研究,E-mail:oldeng148@aliyun.com

际上尚未报道的新突变,现报道如下。

1 材料与amp;方法

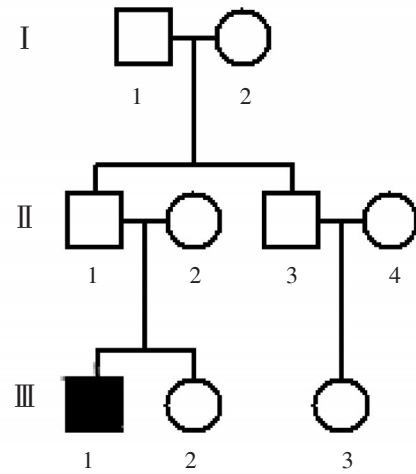
1.1 临床资料

先证者,男,18岁。出生时额部即有菱形白斑及白发,腹部及双下肢可见大片乳白色斑,其间散在蚕豆大小色素正常的皮岛,躯干部散在多个绿豆至蚕豆大小咖啡斑(图1),白斑面积约占体表面积43%(以手掌面积为1%计算)。体格检查未见虹膜异色症、聋哑及面部畸形等异常。患者家族成员均非近亲结婚,无类似病史(图2)。

1.2 实验方法

1.2.1 提取外周血基因组DNA 签署知情同意后,抽取斑驳病患者及其父母和50例无关健康对照者外周血4 mL,2%的EDTA抗凝,使用血液基因组DNA提取试剂盒(北京天根生化科技公司)提取外周血DNA。

1.2.2 PCR扩增目的基因 根据基因序列信息,利用软件Oligo 6.0和Primer Premier 5.0设计PCR引物和测序引物。PCR扩增区域包括KIT及SLUG基因所有的编码区、内含子-外显子交界区域。引物序列均由上海生工生物工程服务有限公司合



Black box indicates proband

图2 重型斑驳病家系图谱

Fig.2 Family pedigree of a case with serious phenotype of piebaldism

成。KIT基因21个外显子及SLUG基因的3个外显子引物序列详细见表1-2。扩增条件:95℃预变性5 min后,95℃变性30 s,55~64℃退火30 s,72℃延伸1 min,共35个循环,72℃后延伸10 min。2%琼脂糖凝胶电泳检查PCR产物。

1.2.3 DNA的纯度及浓度检测 提取的DNA用



图1 斑驳病患者临床图片

Fig.1 Clinical features of patients with piebaldism

2%的琼脂糖凝胶进行电泳,DNA的条带长度及亮度参照DNA marker半定量,DNA出现明亮单一一条带。用紫外线分光光度计测量提取的DNA浓度和纯度。当 $D_{260/280}$ 值在1.8-2.0之间表示纯度达标。样品浓度一般在30-50 ng/ μ L之间。

1.2.4 测序分析 PCR产物采用全自动DNA测序仪(上海英潍捷基公司)进行测序,并与Genbank中所公布序列进行比对。

1.2.5 确定基因突变位置及蛋白质结构预测 用NCBI Open Reading Frame Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)来确定基因突变位置,查

询the Interpro数据库和人类蛋白质参考数据库上的蛋白质功能域信息以获取蛋白结构域,分析蛋白质水平结构域改变导致功能的影响^[4]。

2 结 果

2.1 PCR结果

以基因组DNA为模板,覆盖KIT基因全部外显子的21个片段及SLUG基因3个外显子PCR扩增产物全部扩增成功,对照组均扩增出相应大小的DNA片段。各片段大小分别见表1及表2。

表1 PCR扩增分析KIT基因的引物
Table 1 Primers-PCR analysis of KIT gene

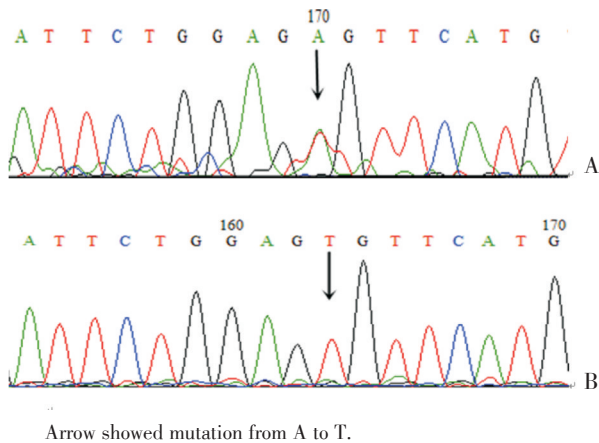
Exon	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')	Size/bp
EXON1	TGGGAGGAGGGGCTGCTG	CCTGACGCCCGGGAGTCA	418
EXON2	ATTGTAGAGTACACAGA	CCTACTGACTCGGTATCT436bp	
EXON3	GTGTTTTTCAGTGTCTGTGAC	CTGAAGAGAAGAGCAACT	380
EXON4	TGTACACATTTGAGGAGAAA	GCTGATCACGCAGACAGT	375
EXON5	TGGAGAAGTTAATTGCTGCT	CTTCTTTAATAATCTGTC	282
EXON6	AGTTAAAATTCTCTTATTGCCA	GGACCGTTTCTCTTTCAGAC	399
EXON7	TATGTGTGTGCGTGTTFATG	GTCGACGTTCCCTGAGTTGACG	335
EXON8	CTCAGGAAGGTTGTAGGG	AATGACTTACTGAAGAGAT382bp	
EXON9	TTCCTAGAGTAAGCCAGGG	TGGTATAGTCAGTACTAA	327
EXON10	GATCCCATCCTGCCAAAGTT	CACGAGATTACTGACTCTGCTA	282
EXON11	CAGGTAACCATTTATTTGTT	CAAGGTGGACTTTGTTACT	292
EXON12	ATGTCTCTGGACAACATTG	CGGTCAACACGAAAAACGA232bp	
EXON13	GAGGCAACTGCTTATGGCT	CCATCTTGTCCGGTCTGTA	299
EXON14	GTCTGATCCACTGAAGCTG	CTGTCCGTCAAGTACCCCA	277
EXON15	AACTTTACATGACTTTCTCTC	TCAACTCCAACGTTACCCCA235bp	
EXON16	GACACCAGGGAAGTGATCTGC	ACACCATTGGTTTTCGTCTCCT	370
EXON17	GTTTTCACTCTTACAAGT	CAAAGGACACTGAAAGTATTACAT	332
EXON18	TGAGCTTCTGAATTAACAT	TGTTCTACTAGTTCCTTCC	233
EXON19	GATCCYYGCCAAAGACAA	AGAAATACTGTGTGACCAG	203
EXON20	TACTGAAGTTGCTCCATGC	GGGTCAAGGTCCACACAGG206bp	
EXON21	GCCACAAAGTTCTTGAAAACCAC	GACGTTAGGACAGAAAGACTCGTG	2330

表2 PCR扩增分析SLUG基因的引物
Table 2 Primers-PCR analysis of SLUG gene

Exon	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')	Size/bp
EXON1	CAGTTCGTAAAGGAGCCG	CAGTTCGTAAAGGAGCCG254bp	254
EXON2	CCATCACTGTGTGGACTACC	TCTCAGAGTAACATTCCTGCC	546
EXON3	CACACACACACCCACAGAGA	GCAACCAGACAACCGACAT	1 312

2.2 测序结果

DNA 直接测序后结果与 Genbank 所公布的 KIT 基因序列比对,发现患者 KIT 基因第 5 外显子上存在错义突变 c.860T>A(p.V287E),即第 860 位胸腺嘧啶(T)被腺嘌呤(A)替代,使得密码子由 GTG 变为 GAG(图 3A),从而导致基因所编码的 287 位氨基酸由缬氨酸变为谷氨酸,此突变在患者父母及 50 例对照组中未发现(图 3B),提示该突变为一新生突变(de novo mutation)。捕获的遗传突变与人类基因组突变数据(HGMD)进行比对并查询 PubMed 上已发表的文章确定所检突变是新突变。



Arrow showed mutation from A to T.

图3 先证者及正常人第5外显子测序结果比较

Fig.3 Partial sequencing results of the patient and the control individuals

2.3 跨种属保守性分析结果

跨种属氨基酸同源序列比对结果显示,第 287 位氨基酸(V)中的 T 碱基在人、牛、狗、大鼠、小鼠等物种间高度保守(图 4)。

Human	GCAACGTTGACTATCAGTTCAGCGAGAGTTAATGATTCTGGAGTGTTCATGTGTTATGCC
Cattle	GAAAGGTTGACTATCAGCTCAGCAAGAGTGAATGATTCCGGTGTGTTCATGTGTTACGCC
Dog	GAAAAGTTGATTATCAGCTCAGCAAGAGTGAATGATTCTGGAGTGTTCATGTGTTACGCC
Rat	GAGACGCTGACTATCAGCTCAGCAAGAGTGAACGATTCCGGAGTGTTCATGTGTTATGCC
Mouse	GAGACGCTGACTATCAGCTCGCAAGAGTTGACGATTCTGGAGTGTTCATGTGTTATGCC
	* * * ** *

图4 跨种属比对图

Fig.4 Comparison diagram of cross-species conserved sequences

2.4 蛋白结构预测结果

第 287 位缬氨酸位于 KIT 细胞外配体结合区域(包含 5 个结构域 D1-D5)D3 结构域的 βF, 与 βC/βD 环中的第 249 位谷氨酸非常接近。且 βD 和 βD/βE 形成的环状结构位于 SCF 结合位点表面。当第 287 位的缬氨酸突变为谷氨酸(由非极性氨基酸变为极性中性氨基酸),可能会导致与 249 位谷氨酸相排斥,破坏 D3 结构域中 βD 和 βD/βE 稳定,最终影响 SCF 的结合(图 5)。

3 讨论

斑驳病又称图案状白癜风,是一种罕见的遗传性皮肤病。其主要致病基因 KIT 基因位于染色体 4q21,是一种起源于 HZ4 猫肉瘤病毒的原癌基因,其基因组 DNA 全长约 70 kb^[2],包含 21 个外显子。主要作用为编码含有 976 个氨基酸的酪氨酸激酶(RTK)。RTK 是一种跨膜蛋白,属于 III 型蛋白酪氨酸激酶受体超家族。主要分布于细胞膜表面,由胞外结构域、单一跨膜区及胞内酪氨酸激酶区域三部分组成,参与多条细胞内外信号转导通路。胚胎发育期间,RTK 与其配体肥大细胞生长因子(SCF)结合,RTK 多肽链可形成同源二聚体,从而激活细胞内 RTK 活性区域,使得活性区域内的酪氨酸残基及信号转导通路中各种末梢蛋白磷酸化传递信号,从而参与成黑素细胞的增殖和迁移^[5]。研究表明 75% 的斑驳病患者都存在 KIT 基因突变^[6-7]。目前文献已经报道的 KIT 基因突变包括转换和颠换的点突变,插入及缺失的移码突变以及染色体倒位,引起该 RTK 功能下降或失活,使得胚胎发育期间的成黑素细胞增殖及迁移障碍,从而导致了斑驳病的发病^[8]。迄今报道 KIT 基因无义或错义突变 31 个,剪切位点突变 7 个,移码

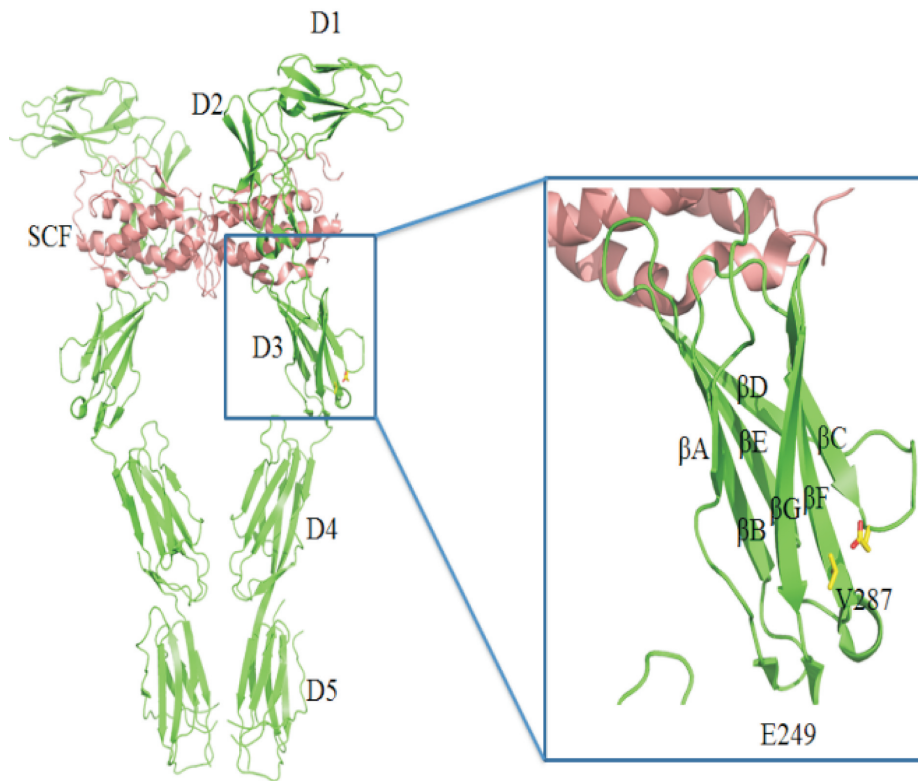


图5 *KIT* 编码的细胞质区域蛋白质结构预测图

Fig.5 Structure prediction of the extracellular ligand-binding domain (ectodomain) of *KIT*

突变 13 个,框移突变 1 个,部分或完全缺失突变 3 个^[9-11]。2002 年,Ramadevi 等^[12]还报道 1 例患者出现 4 号染色体臂间倒位 4(p16q12)。既往作者在国内报道过 p.S850N、p.V604I、p.Ser862Cys 突变,这些突变分别来自不同的家系^[13-15]。此外,Sanchez-Martin 等^[16]研究发现,部分不存在 *KIT* 基因突变的斑驳病患者存在 *SLUG* 基因的缺失,从而证实了 *SLUG* 基因是斑驳病的另一致病基因。*SLUG* 基因位于染色体 8q11,包含 3 个外显子,总长约 4 034 kb^[3],属于乙炔型锌指转录因子。*SLUG* 基因编码由 268 个氨基酸组成的锌指神经嵴转录因子。*SLUG* 在胚胎期神经嵴衍生的细胞发育中起到重要作用,可调控表达 *KIT* 基因神经嵴细胞的迁移,从而影响黑素细胞的发育^[17]。

本研究对 1 例斑驳病患者进行了 *KIT* 基因及 *SULG* 基因的突变筛查。通过对 PCR 产物的直接测序的方法,在患者中发现了 *KIT* 基因新生错义突 c.860T>A(p.V287E),HGMD 检索证明该突变为一个新突变。在 *SULG* 基因没有发现基因突变或

基因片段缺失。*KIT* 基因编码蛋白细胞外配体结合区域含 5 个子结构域: D1、D2、D3、D4 和 D5。D1、D2、D3 为干细胞因子(SCF)结合位点;*KIT* 的功能激活是基于干细胞因子的结合。蛋白质预测结果表明第 287 位缬氨酸位于 D3 结构域的 βF ,与 $\beta C/\beta D$ 环中的第 249 位谷氨酸非常接近。且 βD 和 $\beta D/\beta E$ 形成的环状结构位于 SCF 结合位点表面。当第 287 位的缬氨酸突变为谷氨酸,可能会导致与 249 位谷氨酸相排斥,破坏 D3 结构域中 βD 和 $\beta D/\beta E$ 稳定,最终影响 SCF 的结合细胞,从而影响细胞内外信号转导通路,最终导致疾病发生,此结构域的功能障碍可能导致了此患者的严重表型大面积乳白斑的发生。此新突变的发现丰富了斑驳病的遗传及临床数据库,有助于将来进一步的蛋白功能学研究、产前诊断以及基因治疗。

参考文献:

- [1] Narita T, Oiso N, Fukai K, et al. Two children with a mild or moderate piebaldism phenotype and a father

- without leukoderma in a family with the same recurrent missense mutation in the kinase domain of KIT[J]. *Eur J Dermatol*, 2011, 21(3):446-447.
- [2] Vandenberg GR, deCastro CM, Taylor H, et al. Cloning and structural analysis of the human KIT gene[J]. *Oncogene*, 1992, 7(7):1259-1266.
- [3] Cohen ME, Yin MF, Paznekas WA, et al. Human *SLUG* gene organization, expression, and chromosome map location on 8q[J]. *Genomics*, 1998, 51(3):468-471.
- [4] Keshava Prasad TS, Goel R, Kandasamy K, et al. Human Protein Reference Database-2009 update[J]. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(1):767-772.
- [5] Syrris P, Malik NM, Murday VA, et al. Three novel mutations of the proto-oncogene KIT cause human piebaldism[J]. *Am J Med Genet*, 2000, 95(1):79-81.
- [6] Murakami T, Hosomi N, Oiso N, et al. Analysis of KIT, SCF, and initial screening of SLUG in patients with piebaldism[J]. *J Invest Dermatol*, 2005, 124(3):670-672.
- [7] Wasag B, Chmara M, Legius E. Molecular characterization of two novel KIT mutations in patients with piebaldism[J]. *J Dermatol Sci*, 2012, 66(1):78-79.
- [8] Arase N, Wataya-Kaneda M, Oiso N, et al. Repigmentation of leukoderma in a piebald patient associated with a novel KIT gene mutation, G592E, of the tyrosine kinase domain[J]. *J Dermatol Sci*, 2011, 64(2):147-149.
- [9] Bondanza S, Bellini M, Roversi G, et al. Piebald trait: implication of kit mutation on in vitro melanocyte survival and on the clinical application of cultured epidermal autografts[J]. *J Invest Dermatol*, 2007, 127(3):676-686.
- [10] Lin ZM, Xu Z, Bu DF, et al. New mutations of KIT gene in two Chinese patients with piebaldism[J]. *Br J Dermatol*, 2006, 155(6):1303-1304.
- [11] Murakami T, Fukai K, Oiso N, et al. New *KIT* mutations in patients with piebaldism[J]. *J Dermatol Sci*, 2004, 35(1):29-33.
- [12] Ramadevi AR, Naik U, Dutta U, et al. De novo pericentric inversion of chromosome 4, inv(4)(p16q12) in a boy with piebaldism and mental retardation[J]. *Am J Med Genet*, 2002, 113(2):190-192.
- [13] 邓伟平, 黄跃深, 陆春, 等. 中国南方斑驳病一家系的一种新的KIT基因突变[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2005, 22(6):668-670.
- Deng WP, Huang RS, Lu C, et al. A novel KIT gene mutation from a family with piebaldism in the southern part of China[J]. *Chin J Med Genet*, 2005, 22(6):668-670.
- [14] 邓伟平, 陆春, 朱国兴, 等. 斑驳病的一种新的KIT基因突变[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2005, 22(5):545-547.
- Deng WP, Lu C, Zhu GX, et al. Detection in Gene Mutation in Patient with piebaldism[J]. *Chin J Med Genet*, 2005, 22(5):545-547.
- [15] 邓伟平, 陆春, 朱国兴, 等. 斑驳病C-KIT基因突变检测[J]. *中国皮肤性病学杂志*, 2005, 19(12):712-713.
- Deng WP, Lu C, Zhu GX, et al. A novel C-KIT gene mutation results in piebaldism[J]. *Chin J Derm Venereol*, 2005, 19(12):712-713.
- [16] Sanchez-Martin M, Perez-Losada J, Rodriguez-Garcia A, et al. Deletion of the *SLUG* (*SNAI2*) gene results in human piebaldism[J]. *Am J Med Genet*, 2003, 122A(2):125-132.
- [17] Shirley SH, Greene VR, Duncan LM, et al. Slug expression during melanoma progression[J]. *Am J Pathol*, 2012, 180(6):2479-2489.

(编辑 刘清海)