

## 肠病性肢端皮炎 *SLC39A4* 基因突变的研究

高莹<sup>1</sup>,李秀珍<sup>1</sup>,黄曙<sup>2</sup>,游思洪<sup>2</sup>,范志宁<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>南京医科大学第二附属医院急诊科,<sup>2</sup>消化内科,江苏 南京 210029)

**[摘要]** 目的:研究肠病性肢端皮炎(acrodermatitis enteropathica,AE)患者 *SLC39A4* 基因突变情况,为完善该病的基因诊断与遗传咨询提供分子生物学依据。方法:提取 AE 家系成员(包括 1 例男性 AE 患者及其双亲)和 100 例正常对照外周血白细胞基因组 DNA,PCR 扩增 *SLC39A4* 基因的全部外显子并行 DNA 测序。结果:检测到患者 *SLC39A4* 基因中第 5 号外显子 c.831G>A 和第 10 号外显子 c.1617delA,前者导致编码蛋白密码子 277 位 ATG 变为 ATA,编码的蛋氨酸 Methionine M 变为异亮氨酸 Isoleucine I,后者导致 cDNA1617 位 A 丢失,移码突变。患者的父亲和母亲分别携带 c.831G>A 和 c.1617delA 基因突变,与家系无血缘关系的 100 名正常对照均未发现此突变。结论:*SLC39A4* 基因 c.831G>A 和 c.1617delA 突变是导致该例患者 AE 的特异突变。

**[关键词]** 肠病性肢端皮炎;遗传性;*SLC39A4* 基因;突变

**[中图分类号]** R574

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2014)05-660-04

**doi:**10.7655/NYDXBNS20140525

### A study of *SLC39A4* gene mutation responsible for acrodermatitis enteropathica

Gao ying<sup>1</sup>,Li Xiuzhen<sup>1</sup>,Huang Shu<sup>2</sup>,You Sihong<sup>2</sup>,Fan Zhining<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Institute of Digestive Endoscopy,<sup>2</sup>Medical Center for Digestive Diseases,the Second Affiliated Hospital of NJMU,Nanjing 210011,China)

**[Abstract]** **Objective:**To analyze the *SLC39A4* gene mutation and mutating patterns in a sporadic Chinese patient with acrodermatitis enteropathica (AE) so as to provide a basis for gene diagnosis and genetic counseling of the disorder. **Methods:** Genomic DNA was extracted from whole blood by standard methods from one male AE patient and his parents. DNA samples were also extracted from 100 unrelated,normally individuals as controls. The whole coding region of *SLC39A4* was amplified by PCR and products were analyzed by direct sequencing. **Results:**Molecular analysis of the *SLC39A4* gene in this case of AE revealed a novel heterozygous mutation c.831G>A in exon 5 and c.1617delA in exon 10,which altered a methionine residue with isoleucine residue at position 277 of the protein sequence and caused a reading frame shift,respectively. The patient's father was found to only carry heterozygous c.831G>A mutation,while his mother carried heterozygous c.1617delA mutation. The two novel mutations were not observed in 100 control individuals selected from a Chinese population. **Conclusion:**Our data suggest that c.831G>A and c.1617delA mutation of *SLC39A4* gene is the genetic cause of AE.

**[Key words]** acrodermatitis enteropathica;Genetic;*SLC39A4*;Mutation

[Acta Univ Med Nanjing,2014,34(05):660-663]

肠病性肢端皮炎(acrodermatitis enteropathica,AE,OMIM 201100),又称 Brandt 综合征、Danbolt-Closs 综合征、肠源性肢端皮炎综合征,是一种因锌吸收障碍导致的反复间歇性腹泻、脱发、腔口周围及肢端皮炎为特征的常染色体隐性遗传性疾病<sup>[1-2]</sup>。2001 年,Wang 等<sup>[3]</sup>通过对 1 个近亲结婚的约旦 AE 大家系和 7 个近亲结婚的埃及 AE 家系进行全基因组扫描研究,最先将本病定位在 8 号染色体长臂

8q24.3 条带上遗传微卫星标记 D8S1713 和 D8S2334 之间。次年,Kury 等<sup>[4]</sup>发现本病的致病基因是该区间的 *SLC39A4* 基因。本文对 1 个 AE 患者进行 *SLC39A4* 基因突变检测,发现 2 个位点存在点突变。

#### 1 对象和方法

##### 1.1 对象

患者,男,12岁,自幼常有腹泻,伴有肢端、口周和肛周皮炎。曾在当地医院诊断为 AE,给以口服硫酸锌治疗后症状消退。其后因居住偏僻未能及时购药服用,患者腹泻和皮炎间歇性发生。就诊时患者身高 111 cm,体重 21 kg,未达到同龄儿童水平。患者近 1 周出现腹泻,口周和肛周皮炎。实验室检查,血清锌浓度为 58  $\mu\text{mol/L}$  的 (正常 76.5~170.0  $\mu\text{mol/L}$ ),碱性磷酸酶 46 IU/L (正常 50~150),大便常规示水样便,少许脂肪球。其他检查,包括血常规、血糖、血脂、转氨酶、白蛋白、球蛋白、肾功能检查,均正常。患者父母非近亲结婚,无症状(图 1)。患者确诊为 AE 后,给以甘草锌颗粒口服,每次 5 g,每日 3 次,患者腹泻和皮损症状很快消退。获得患者及其父母书面知情同意书后,进行了 *SLC39A4* 基因突变检测。

## 1.2 方法

### 1.2.1 外周血 DNA 的提取

收集家系 1 位患者及其双亲的外周血 2 ml, EDTA.K2 抗凝,采用美国 Promega 公司 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA。同时提取 100 个与家系无血缘关系的正常成人的基因组 DNA 作为对照。

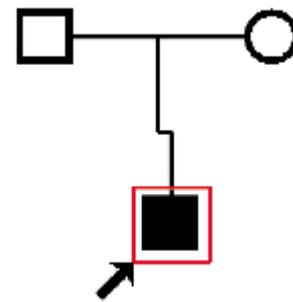


图 1 家系图

Figure 1 Pedigree chart

### 1.2.2 CR 扩增和直接测序

根据 *SLC39A4* 基因 mRNA 序列与基因组 DNA 序列比对结果,将含有外显子及外显子/内含子交界序列的基因组 DNA 序列输入 Primer5.0 软件中设计 12 对引物(表 1)。50  $\mu\text{l}$  PCR 反应体系中,基因组 DNA 0.25  $\mu\text{g}$ ,dNTPs 各 200  $\mu\text{mol/L}$ ,上、下游引物各 25 pmol,Taq DNA 聚合酶 2.5 U。1.5%琼脂糖凝胶电泳检查 PCR 产物。PCR 扩增的目的片段经回收、PCR 纯化试剂盒纯化后物送至上海英骏工程公司进行直接测序。

表 1 PCR 扩增的 12 对引物

Table 1 Primers of PCR

外显子	上游引物(5')	下游引物(3')	片段长度(Bp)	温度(°C)
1	TGGACAACCCAGCAAAGCC	GTGCCAGGTTACTGCCACTA	410	62
2	CATCAAATTGGCAGTGGCTC	CCGAAGGCTTTGCAGCCAGG	623	58
3	TGGATGGCAGAAGGTCACAC	CTGGCAGGGAGAAGAGTTGG	362	62
4	GATTCCCCAGCCTCCACGTC	ATCACGTCCCTGGCACTCAG	319	62
5	CTCATCAGCTCCAGCAACAG	ACTCTCTCCATCCCTCATCC	382	60
6	CAGGAGAGTGGGGCTTTGAG	GAGGTGGGGTGGGTAAGTC	411	58
7	ACCTCCTGACCCCTCTCCCT	TACCTTCCCAAGAAGCCTGA	238	60
8	CTCTTCAATCTCTGCTGCC	TGGGAGTGTGGGCGTGGGAA	313	60
9	ACCGCGTTCCTCCTCCACTT	TTCGCGTGGCCTGTGCCTA	206	60
10	TAGGCGACAGGCCACGCGAA	TGTTCCAGGTCTCCCGCCCA	265	62
11	TAAGAGGGCGGGACCGAAAG	AGCTGAGGAGCAAGTGGGCA	360	57
12	ACATGGTCAGGATGGCGAGG	TGGTTTCTGGGCTGTAGGTT	294	57

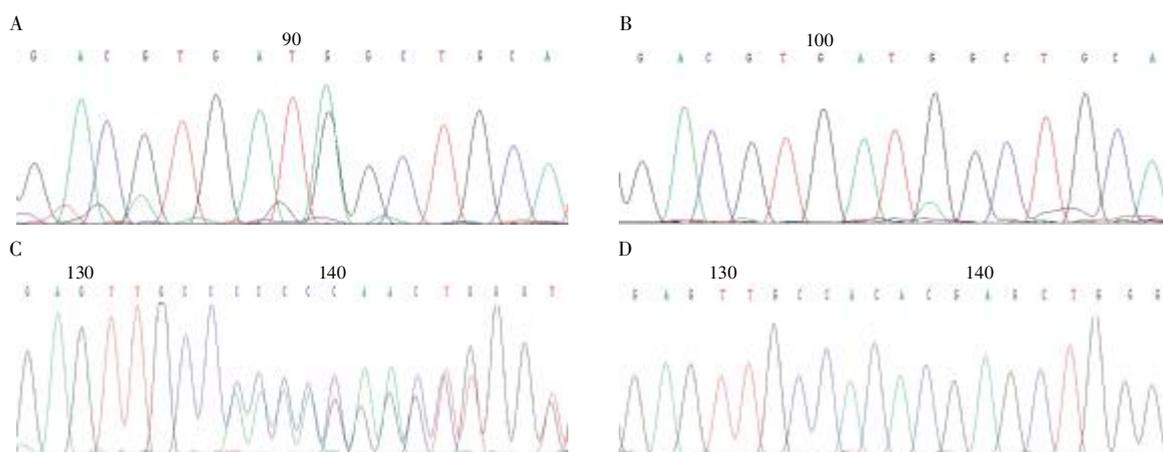
## 2 结果

对 *SLC39A4* 基因的 12 对引物所扩增的 PCR 产物进行测序,发现家系中的患者第 5 号外显子错义突变 c.831G>A 和第 10 外显子移码突变 c.1617delA。前者导致第 831 位碱基鸟嘌呤突变为腺嘌呤,即 831G>A,对应密码子 ATG 变成 ATA,导致第 277 位的蛋氨酸残基被异亮氨酸残基酸替代;后者导致 1617 位碱基腺嘌呤缺失,发生移码突变。患者父亲有 c.1617delA 移码突变,患者母亲有

c.831G>A 错义突变,正常对照均未发现这 2 种突变(图 2)。

## 3 讨论

*SLC39A4* 基因编码人 ZIP 家族中锌/铁调控转运体样蛋白 4 (zinc/iron-regulated transporter-like protein 4,ZIP4),对跨膜运输锌和锌稳态<sup>[5-7]</sup>中起着重要的作用。目前有 2 个 *SLC39A4* 基因的转录变异体(异构体 1,GenBank 序列号 NM\_017767;异构体 2,GenBank 序列号 NM\_130849),常见的 mRNA 转录为异构体 2<sup>[8]</sup>。其中第 2 至第 12 外显子为二者共



A:患者及其母亲 *SLC39A4* 基因第 1115 位碱基 G 转换为碱基 A;B:图 A 对应的正常 *SLC39A4* 基因序列;C:患者及其父亲 *SLC39A4* 基因第 1617 位碱基 A 杂合性缺失突变;D:图 C 对应的正常 *SLC39A4* 基因序列。

图 2 *SLC39A4* 基因测序结果

Figure 2 The sequencing results of *SLC39A4* gene

有序列,导致二者翻译的蛋白具有相同的 C-末端含有 583 个氨基酸残基,仅异构体 1 的 N-末端 39 个氨基酸残基(NM\_017767)不同于异构体 2(NM\_130849)的 64 个氨基酸残基。本研究通过对 AE 家系患者的检测发现了 c.831G>A 和 c.1617delA 两个 *SLC39A4* 基因突变,前者导致第 277 位的蛋氨酸被异亮氨酸替代;后者导致第 1 617 位碱基腺嘌呤缺失,移码突变。通过 GenBank 中提供的基因/编码蛋白序列比较,发现人(*Homo sapiens*)的 *SLC39A4* 基因编码蛋白的 277 位蛋氨酸残基具有高度的保守性,与黑猩猩(*Pan troglodytes*)、猕猴(*Macaca mulatta*)、犬属(*Canis lupus familiaris*)、牛(*Bos taurus*)、小鼠(*Mus musculus*)、褐鼠(*Rattus norvegicus*)完全一致,277 位蛋氨酸残基可能对 ZIP4 的功能具有重要作用。1 617 位碱基腺嘌呤缺失,539 位密码子 cca 变为 ccc,氨基酸脯氨酸(Proline, P)不变,但其后阅读框架漂移,氨基酸残基序列发生改变。患者的父亲和母亲分别携带 c.831G>A 和 c.1617delA 基因突变,虽然可导致 ZIP4 蛋白的减少,但患者的双亲均无症状,没有单倍性不足(haploinsufficiency)<sup>[8]</sup>。100 个正常对照中未发现这 2 个位点突变,提示这 2 个点位突变为患者的致病位点。

检索 PubMed,至今发现 40 多个 *SLC39A4* 基因突变位点<sup>[8-12]</sup>,检索国内万方医学网和中国知网,有关该病的致病基因研究文献仅有 1 篇硕士学位论文<sup>[13]</sup>,其报道的 *SLC39A4* 基因突变位点分别位于第 1 和第 2 外显子,本课题组在国内首次报道了 2 个新的突

变,检索 The Human Gene Mutation Database,2 个突变为新发现的突变位点,扩大了 AE 致病基因的突变谱,为患者提供产前诊断、遗传咨询以及研究 277 位的蛋氨酸对 ZIP4 的活性具有重要作用。

#### [参考文献]

- [1] Moynahan EJ. Letter: Acrodermatitis enteropathica; a lethal inherited human zinc-deficiency disorder [J]. *Lancet*, 1974, 2(7877):399-400
- [2] Geiser J, Venken KJ, De Lisle RC, et al. A mouse model of acrodermatitis enteropathica; loss of intestine zinc transporter ZIP4 (*Slc39a4*) disrupts the stem cell niche and intestine integrity [J]. *PLoS Genet*, 2012, 8 (6): e1002766
- [3] Wang K, Pugh EW, Griffen S, et al. Homozygosity mapping places the acrodermatitis enteropathica gene on chromosomal region 8q24.3 [J]. *Am J Hum Genet*, 2001, 68(4):1055-1060
- [4] Kury S, Dreno B, Bezieau S, et al. Identification of *SLC39A4*, a gene involved in acrodermatitis enteropathica [J]. *Nat Genet*, 2002, 31(3):239-240
- [5] Cousins RJ, Liuzzi JP, Lichten LA. Mammalian zinc transport, trafficking, and signals [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(34):24085-24089
- [6] Mao X, Kim BE, Wang F, et al. A histidine-rich cluster mediates the ubiquitination and degradation of the human zinc transporter, hZIP4, and protects against zinc cytotoxicity [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(10):6992-7000
- [7] Antala S, Dempski RE. The human ZIP4 transporter has two distinct binding affinities and mediates transport of multiple transition metals [J]. *Biochemistry*, 2012, 51(5):

- 963-973
- [8] Schmitt S, Kury S, Giraud M, et al. An update on mutations of the SLC39A4 gene in acrodermatitis enteropathica[J]. Hum Mutat, 2009, 30(6):926-933
- [9] Park CH, Lee MJ, Kim HJ, et al. Congenital zinc deficiency from mutations of the SLC39A4 gene as the genetic background of acrodermatitis enteropathica [J]. J Korean Med Sci, 2010, 25(12):1818-1820
- [10] Kilic M, Taskesen M, Coskun T, et al. A zinc Sulphate-Resistant acrodermatitis enteropathica patient with a novel mutation in SLC39A4 gene [J]. JIMD Rep, 2012, 2(1):25-28
- [11] Coromilas A, Brandling-Bennett HA, Morel KD, et al. Novel SLC39A4 mutation in acrodermatitis enteropathica[J]. Pediatr Dermatol, 2011, 28(6):697-700
- [12] Jung AG, Mathony UA, Behre B, et al. Acrodermatitis enteropathica; an uncommon differential diagnosis in childhood - first description of a new sequence variant [J]. J Dtsch Dermatol Ges, 2011, 9(12):999-1002
- [13] 任亚莉. 肠病性肢端皮炎中 SLC39A4 基因的新突变类型[D]. 武汉:华中科技大学, 2011
- [收稿日期] 2013-05-07

## 本刊来稿题名和作者署名的注意事项

### 1. 题名

- (1) 题名应以简明、确切的词语反映文章中最重要特点内容, 要符合编制题录、索引和检索的有关原则, 并有助于选定关键词。
- (2) 中文题名一般不超过 20 个字, 必要时可加副题名。
- (3) 英文题名应与中文题名含义一致。
- (4) 题名应避免使用非公用的缩写词、字符、代号, 尽量不出现数学式或化学式。

### 2. 作者署名和工作单位

- (1) 文章都应有作者署名, 这是文责自负和拥有著作权的标志;
- (2) 作者姓名署于题名下方;
- (3) 英文摘要中附与中文同样的作者姓名与排列顺序, 写法为: 姓前名后, 姓全部大写, 名的首字母大写, 其余字母小写, 名间加连字符, 如 ZHOU Ping, SHI Hong-lei;
- (4) 作者单位需注明全称(标注到二级或三级单位, 如“南京医科大学第一附属医院心内科”, “南京医科大学公共卫生学院流行病与统计学系”)、所在城市及邮政编码;
- (5) 对于有基金课题资助的论文需在课题负责人的名字后加上标“\*”, 并在论文首页下补充基金的名称、编号, 以及课题负责人的 E-mail。
- (6) 本刊对于没有课题资助的文章一律不标注通讯作者。

(本刊编辑: 接雅俐)