

一个掌跖角化-牙周破坏综合征患者家系 组织蛋白酶C基因突变分析

胡婷婷 邹小炎 叶芳

南昌大学附属口腔医院牙周科 江西省口腔生物医学重点实验室, 南昌 330006

[摘要] 目的 对一个掌跖角化-牙周破坏综合征(PLS)患者及其家系组织蛋白酶C基因(CTSC)突变位点进行分析,探讨PLS的分子致病机制。方法 提取1例PLS先证者及其直系血亲(父母、弟弟)的基因组DNA,应用聚合酶链反应和DNA直接测序技术分析先证者及其直系血亲CTSC基因的突变情况。结果 PLS先证者CTSC基因存在复合型杂合突变。先证者位于外显子6的第800位碱基发生了一个杂合错义突变,该碱基对中的碱基T被C取代(c.800T>C),其编码的氨基酸由亮氨酸改变为脯氨酸(p.L267P);位于外显子7的第1015位碱基发生了一个杂合错义突变,该碱基对中的碱基C被T取代(c.1015C>T),其编码的氨基酸由精氨酸改变为半胱氨酸(p.R339C)。其中,c.800T>C来自母亲,c.1015C>T来自父亲,弟弟的CTSC基因未见突变。结论 PLS的临床表征与CTSC基因突变有关。

[关键词] 掌跖角化-牙周破坏综合征; 组织蛋白酶C; 基因突变

[中图分类号] R 781.4 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.7518/hxkq.2019.01.006

Gene mutational analyses of cathepsin C gene in a family with Papillon-Lefèvre syndrome Hu Tingting, Zou Xiaoyan, Ye Fang. (Dept. of Periodontics, Affiliated Stomatological Hospital of Nanchang University, The Key Laboratory of Oral Biomedicine, Jiangxi Province, Nanchang 330006)

Supported by: Natural Science Foundation of Jiangxi Province(2515BAB205095). Correspondence: Ye Fang, E-mail: fangye999@qq.com.

[Abstract] **Objective** This study aimed to investigate the gene mutational characteristics of cathepsin C (CTSC) gene in a Chinese patient with Papillon-Lefèvre syndrome (PLS) and further confirm the genetic basis for the phenotype of PLS. **Methods** Peripheral blood samples were obtained from the PLS proband and his family members (his parents and younger brother) for genomic DNA extraction. The coding region and exon boundaries of the CTSC gene were amplified and sequenced by polymerase chain reaction and direct sequencing of DNA. **Results** Compound heterozygous mutations of CTSC gene were identified in the patient. A heterozygous missense mutation occurred in the 800th base of exon 6, and the base T in the base pair was replaced by C (c.800T>C). The encoded amino acid leucine changed to proline (p. L267P). A heterozygous missense mutation occurred in the 1015th base of exon 7, and base C in the base pair was replaced by T (c.1015C>T). The encoded amino acid arginine changed to cysteine (p.R339C). Among the mutations, c.800T>C originated from the mother, c.1015C>T was identified from the father. No mutations were detected in the younger brother. **Conclusion** Mutations of CTSC gene are responsible for the phenotype of PLS.

[Key words] Papillon-Lefèvre syndrome; cathepsin C; gene mutation

掌跖角化-牙周破坏综合征(Papillon-Lefèvre syndrome, PLS)于1924年由Papillon与Lefèvre首次报道^[1],是一种常染色体隐性遗传性疾病,患病率为

百万分之一至百万分之四,约1/3有近亲婚配史^[2]。PLS的临床特征是快速性的早期牙周组织破坏,肘部、膝盖、掌跖部位的皮肤过度角化。男女发病率相似,无种族差异^[3],常致乳牙和恒牙过早脱落。PLS主要由组织蛋白酶C(cathepsin C, CTSC)基因突变引起,导致CTSC功能丧失,引起免疫调节紊乱继而发生严重的炎症反应^[4]。本研究对临床确

[收稿日期] 2018-01-13; **[修回日期]** 2018-05-19

[基金项目] 江西省自然科学基金(2515BAB205095)

[作者简介] 胡婷婷, 硕士, E-mail: 351089952@qq.com

[通信作者] 叶芳, 主任医师, 硕士, E-mail: fangye999@qq.com

诊的一个掌跖角化-牙周破坏综合征患者的家系进行了CTSC基因分析。

1 材料和方法

1.1 研究对象

先证者为一名临床确诊为PLS的患儿，男，11岁，2017年6月因多牙松动、部分脱落、前牙牙龈肿痛就诊。该患儿恒牙列，卫生状况差，牙石(++)，前牙区牙龈红肿，质地松软，探诊易出血，探诊深度为3~10 mm。16、12、11、21、22、26、32、42、46牙Ⅲ度松动，36牙Ⅱ度松动；31、41牙缺失，下颌缺失牙区牙槽嵴低平；牙体发育未见明显异常，

无龋坏(图1)。全景片显示全口牙槽骨广泛性吸收，根尖孔尚未形成的牙齿及牙胚牙槽骨均未见明显牙槽骨吸收(图2)。患儿发育一般，智力正常。手掌、脚掌、肘部、膝盖的皮肤过度角化、皲裂、脱屑，病损厚度不均，呈鱼鳞状(图3)；双侧膝关节皮损累及大腿根部，耳前区见轻度脱屑，指甲、手背、脚背无明显异常。无多汗及臭汗。家系追溯3代，现存22人(图4)，患者父母无近亲结婚史，了解相关病史，对各家系成员进行全身及牙周专科检查，仅发现先证者一人受累。先证者共有直系血亲3人，包括父亲、母亲及一同胞弟弟，3人的牙周及全身检查结果均显示无侵袭性牙周炎及掌跖角化症状。



A: 正面观; B: 右侧位观; C: 左侧位观。

图1 患者初诊时口内照

Fig 1 Intraoral view of propositus at the baseline

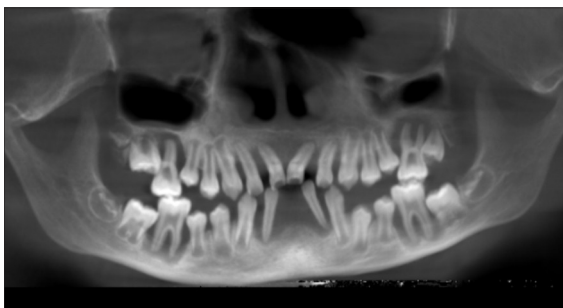


图2 患者初诊时的全景片

Fig 2 Panoramic radiograph of propositus at the baseline

1.2 方法

1.2.1 基因组DNA的提取 因该PLS家系仅患儿一名先证者，故选择先证者及其直系血亲作为实验对象。取得受试者知情同意后，抽取外周静脉血各4 mL，EDTA抗凝，使用血液DNA提取试剂盒(上海生工生物工程股份有限公司)提取基因组DNA。

1.2.2 引物设计和合成 参照Toomes等^[5]和Hart等^[6]关于CTSC基因1~7外显子引物设计方案设计引物，并用NCBI网站上的Primer-BLAST进行引物特异性比对。引物由上海生工生物工程股份有限公司合成(表1)。



A: 手掌; B: 脚掌; C: 肘部; D: 膝盖。

图3 患者手掌、脚掌、肘部、膝盖皮肤过度角化、皲裂、脱屑，呈鱼鳞状

Fig 3 Bilaterally symmetrical hyperkeratotic plaques over hands and feet which have involved dorsal aspects of hands, feet, elbow and knee skin

1.2.3 聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) PCR反应体系为25 μL体系，包括10×PCR

Buffer 1 μL 10 mmol·L⁻¹, dNTP 0.5 μL 10 μmol·L⁻¹, 上游引物0.5 μL 10 μmol·L⁻¹, 下游引物0.5 μL 5 U·μL⁻¹,

Taq酶0.2 μL, ddH₂O 20 μL, 模板DNA 1 μL。PCR反应条件: 95 °C预变性3 min, 94 °C变性30 s, 按外显子的退火温度58 °C退火30 s, 72 °C延伸30~60 s, 35

个循环后于72 °C再延伸10 min。反应在PCR仪 (Verity 96well, 美国ABI公司) 上进行。

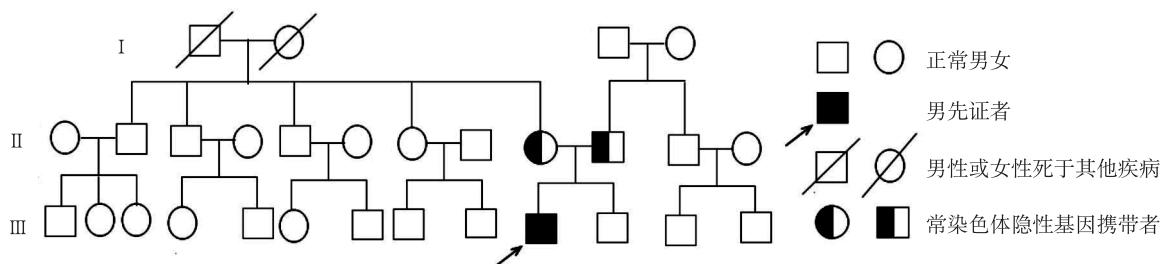


图 4 患者3代家系图

Fig 4 Family tree of three generations of proband

表 1 CTSC基因PCR扩增引物及PCR产物特征

Tab 1 CTSC gene PCR amplimer and PCR characteristic product

引物名称	引物序列	产物长度/bp
外显子1	F: 5'-TCCAGTTGCAGCCAAGTGAG-3' R: 5'-GGTCCCCGAATCCAGTCAA-3'	536
外显子2	F: 5'-CTCAAAGTGGGTAGCATGAAAGG-3' R: 5'-GGTGTCAATCCGGTCATCTTC-3'	381
外显子3	F: 5'-ACCTCTCAGGGTGAAGTTTTTGT-3' R: 5'-TTTTACATAGCATGCCTAATATTCT-3'	424
外显子4	F: 5'-ACCACTTCCACTTAGGCACAGA-3' R: 5'-GGCGAGCAACACTGGTAGGA-3'	343
外显子5	F: 5'-CAGGTGCTCTGGGTCTGAATCTA-3' R: 5'-ATCATGCCCATCCATCTAGGTAT-3'	352
外显子6	F: 5'-TGTTAGTTGAGTCTTCTTATTGTGCT-3' R: 5'-GCCAGACTTGCACTCAGATTTT-3'	415
外显子7	1F: 5'-TAGAAGGAGGATGAAAGGATAGTTA-3' 1R: 5'-CTGGAAGGCATACCCTACAATT-3' 2F: 5'-CTGGGGTGAGAATGGCTACTT-3' 2R: 5'-CTCCCTGTCATAAAGGTTTCATAGTT-3'	699 659

1.2.4 DNA直接测序 纯化后的PCR产物送上海生物工程技术有限公司测序, 外显子使用PCR扩增引物, 测序结果与人类基因组中的CTSC基因序列进行对比, 分析先证者及其直系血亲CTSC基因的突变情况。

2 结果

患者及其父母、弟弟的CTSC基因外显子1~5均未发现基因突变, 表现为正常序列, 基因外显子6和7发生了错义突变。

2.1 CTSC基因外显子6的错义突变

患者位于外显子6的第800位碱基发生了一个杂合错义突变, 该碱基对中的碱基T被C取代 (c.800T>C) (图5A), 与之相对应的第267位氨基酸密码子

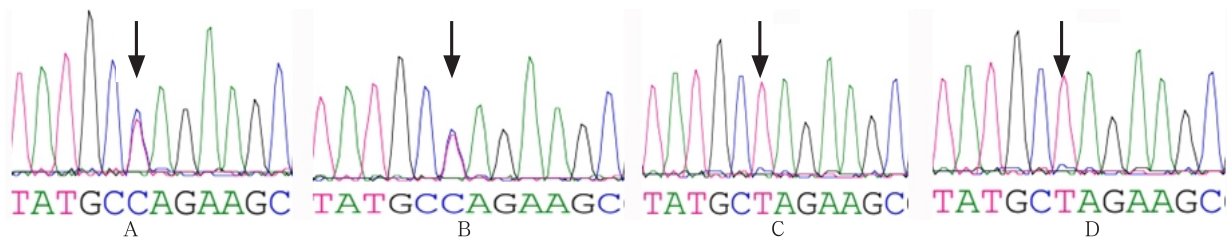
由CTA改变为CCA, 其编码的氨基酸由亮氨酸改变为脯氨酸 (p.L267P)。先证者的母亲在外显子6的第800位碱基也发生了一个与先证者相同的杂合突变 (图5B), 先证者的父亲及弟弟均未在外显子6上发生突变 (图5C、D)。

2.2 CTSC基因外显子7的错义突变

患者位于外显子7的第1015位碱基发生了一个杂合错义突变, 该碱基对中的碱基C被T取代 (c.1015C>T) (图6A), 与之相对应的第339位氨基酸密码子由CGT改变为TGT, 其编码的氨基酸由精氨酸改变为半胱氨酸 (p.R339C)。先证者的父亲于外显子7的第1015位碱基也发生了一个与先证者相同的杂合突变 (图6B), 先证者的母亲及弟弟均未在外显子7的第1015位碱基上发生突变 (图6C、D), 但其母亲及弟弟均在外显子7上的第1173位碱基发生杂合同

义突变，该碱基对中的碱基T被G取代，与之相对应的第391位氨基酸密码子由ACT变为ACG，但编码的

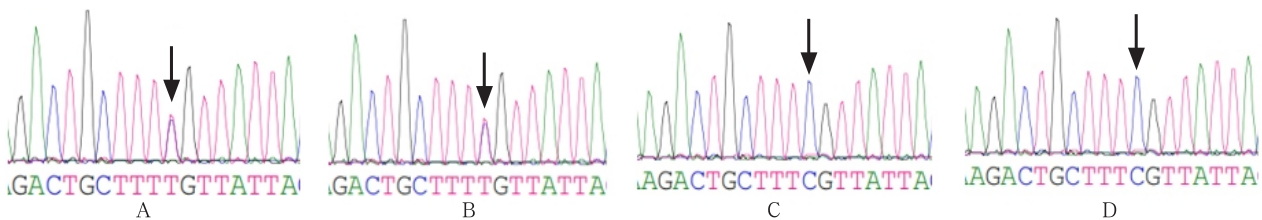
氨基酸仍为苏氨酸，未发生改变。



A: 患者; B: 患者母亲; C: 患者父亲; D: 患者弟弟。A、B中箭头指示患者及其母亲c.800T>C杂合突变位点; C、D中箭头指示其父亲及弟弟c.800T正常序列。

图 5 CTSC基因外显子6测序

Fig 5 Sequencing of exon 6 of CTSC gene



A: 患者; B: 患者父亲; C: 患者母亲; D: 患者弟弟。A、B箭头指示患者及其父亲c.1015C>T杂合突变位点; C、D箭头指示患者母亲及弟弟c.1015C正常序列。

图 6 CTSC基因外显子7测序

Fig 6 Sequencing of exon 7 of CTSC gene

由此可见，PLS先证者CTSC基因存在复合型杂合突变，突变位点是外显子6上的c.800T>C和外显子7上的c.1015C>T。c.800T>C来自母亲，c.1015C>T来自父亲，而弟弟未见此改变。

3 讨论

PLS属于常染色体隐性遗传性疾病，位于常染色体11q14.2的CTSC基因突变是PLS的致病基础。PLS常导致乳牙和恒牙过早脱落及掌跖部位皮肤过度角化，皮肤部位的损害在冬天有加重趋势^[7]。但在一些病例报道中，第三磨牙可幸免于牙周破坏^[8]。除这两个典型临床表现外，还可伴发其他的全身疾病。其中，以反复感染为多，主要表现为脓皮病、肝脓肿，还有报道伴有黄色肉芽肿性肾盂肾炎及无症状硬脑膜异位钙化^[9]。

目前，全球共报告了70多种CTSC基因突变型与PLS有关，其中无义突变约占致病性CTSC突变的23%，大多数突变位于外显子5和外显子7上^[10]。在CTSC基因突变类型中，以纯合突变或纯合子突变合并杂合突变为主，目前尚不能确定CTSC基因是否有特异性突变。在我国，有关CTSC基因突变的报道不多，突变包括以下位点：c.116delG、c.415G>A、c.748C>T、c.763T>A、c.774C>G、c.778T>C、c.941T>

C、c.1005A>C、c.1015C>T、c.1040A>G^[11-13]。本研究发现了c.800T>C突变位点，目前在NCBI人类基因组中暂未发现c.800T存在单核苷酸多态性，这可能是CTSC基因的新突变位点。c.800T和c.1015C都位于CTSC基因的高度保守序列^[14]，本例患者是由两个杂合突变组合成的复合突变，c.800T>C导致第267位氨基酸密码子CTA改变为CCA，转录过程中脯氨酸替换正常序列中的亮氨酸（p.L267P）。c.1015C>T导致第339位氨基酸密码子CGT改变为TGT，转录过程中半胱氨酸替换正常序列中的精氨酸（p.R339C）。虽然目前的研究显示CTSC基因突变导致其编码的蛋白质异常是引起PLS的主要原因，但PLS的病因学仍不清楚，对皮肤病损和牙龈病变二者的关系也不确定。本实验中先证者的2个新突变可能改变了肽链的结构，影响肽链的折叠和组装，妨碍CTSC功能蛋白质的形成，改变了CTSC基因编码的蛋白质结构，降低甚至是抑制了CTSC的活性，影响了免疫反应，引起了疾病的显型。

CTSC在中性粒细胞、具有细胞毒性的淋巴细胞、自然杀伤细胞、牙槽骨内巨噬细胞以及肥大细胞等免疫细胞中表达较高，可以活化中性粒细胞衍生的丝氨酸蛋白酶和粒酶，影响免疫反应^[15]。由于CTSC基因突变引起的免疫紊乱增加了PLS患者的炎症易感性，致使PLS患者更容易发生严重的炎症性

疾病^[16]。先证者存在乳牙早脱、萌出恒牙早发性重度牙周炎及明显的掌跖部位过度角化的临床表现，与上述推测符合。

学者^[17]就CTSC基因的突变位点及类型与PLS患者的临床表型之间的关系进行了研究，结果显示：PLS患者致病基因的遗传异质性低、等位基因异质性强，即PLS的致病基因仅是CTSC基因，CTSC基因发生不同类型的突变产生多种异常表型的概率高；PLS患者显著的表型异质性与特别的基因突变类型间无确切联系，但可能与一些附加基因的修饰和后天环境因素的影响有关。PLS需与Haim-Munk综合征相鉴别，Haim-Munk综合征是一种极罕见的常染色体隐性遗传性疾病，亦与CTSC基因突变有关，临床表现除有掌跖过度角化和牙周组织破坏外，还有肢端骨质溶解症及蜘蛛样细长指（趾），有时也有特征性的甲弯曲和扁平足^[18]。

目前对PLS还没有明确的治疗方法，常规的治疗措施可以控制牙周病：1）口腔卫生宣教，指导患者保持良好的口腔卫生；2）常规牙周治疗，通过对特定牙周微生物的鉴定，使用特定抗生素降低口腔病原微生物的数量，及时拔除无保留价值的患牙，延长余牙使用寿命；3）在牙周炎活跃期，给予系统抗生素以保护牙齿，防止菌血症和肝脓肿；4）对缺失的牙齿进行牙周、外科、修复、正畸联合治疗，保留恒牙，维持颌间间隙，恢复咀嚼功能^[19]。对皮肤部位的治疗，有报道^[20]服用维生素A类药物及局部涂拭水杨酸、润肤剂可以缓解PLS患者的皮肤角化。

本研究对一个PLS家系的CTSC基因的外显子1~7进行了测序分析，发现患者的父母分别存在c.800T>C、c.1015C>T的杂合突变。经询问，患者的父母及其3代以内并无血缘关系，说明该基因突变在我国的人群中有一定的频率。鉴于PLS是常染色体隐性遗传病，避免近亲结婚可能降低其发病频率。另外，研究^[21]观察，PLS患者的牙周炎症在青少年时期达到顶峰，之后牙周炎症反应随着年龄增长而降低。牙周炎症反应的改变与血清IgE含量变化一致，控制IgE水平有可能作为降低PLS牙周炎症的一个目标。CTSC基因检测可作为一种筛查手段，增大早期发现PLS的机率，及早确定PLS的病因和致病机制，对症治疗。采用基因治疗的方法纠正或补偿CTSC基因的正常和缺陷，有望打破PLS治疗方面的困境。

[参考文献]

[1] Papillon MM, Lefevre P. Two cases of symmetrically fami-

lial palmar and plantar hyperkeratosis (Meleda disease) withinbrother andsister combined with severe dental alterations in both cases[J]. Bull Soc Fr Dermatol Syphiligr, 1924, 31(2): 82-87.

[2] Gorlin RJ, Pindborg J, Cohen MM. Syndromes of the head and neck[M]. 2nd ed. New York: McGraw-Hill Publishing House, 1976: 373-376.

[3] Cury VF, Costa JE, Gomez RS, et al. A novel mutation of the cathepsin C gene in Papillon-Lefèvre syndrome[J]. J Periodontol, 2002, 73(3): 307-312.

[4] Dhanawade SS, Shah SD, Kakade GM. Papillon-lefevre syndrome with liver abscess[J]. Indian Pediatr, 2009, 46(8): 723-725.

[5] Toomes C, James J, Wood AJ, et al. Loss-of-function mutations in the cathepsin C gene result in periodontal disease and palmoplantar keratosis[J]. Nat Genet, 1999, 23(4): 421-424.

[6] Hart PS, Zhang Y, Firatli E, et al. Identification of cathepsin C mutations in ethnically diverse papillon-Lefèvre syndrome patients[J]. J Med Genet, 2000, 37(12): 927-932.

[7] Siragusa M, Romano C, Batticane N, et al. A new family with Papillon-Lefèvre syndrome: effectiveness of etretinate treatment[J]. Cutis, 2000, 65(3): 151-155.

[8] Hart TC, Hart PS, Bowden DW, et al. Mutations of the cathepsin C gene are responsible for Papillon-Lefèvre syndrome[J]. J Med Genet, 1999, 36(12): 881-887.

[9] Hart TC, Bowden DW, Ghaffar KA, et al. Sublocalization of the Papillon-Lefevre syndrome locus on 11q14-q21[J]. Am J Med Genet, 1998, 79(2): 134-139.

[10] Nagy N, Vályi P, Csoma Z, et al. CTSC and Papillon-Lefèvre syndrome: detection of recurrent mutations in Hungarian patients, a review of published variants and database update[J]. Mol Genet Genomic Med, 2014, 2(3): 217-228.

[11] 李晓峰, 张雄, 章锦才, 等. 一个掌跖角化牙周病变综合征家系的组织蛋白酶C基因突变分析[J]. 中华医学遗传学杂志, 2008, 25(5): 502-505.

Li XF, Zhang X, Zhang JC, et al. Mutational analysis of the cathepsin C gene in a family of Hart nationality with Papillon-Lefevre syndrome[J]. Chin J Med Genet, 2008, 25(5): 502-505.

[12] 杨媛, 白小文, 宋淑娟, 等. 侵袭性牙周炎家系组织蛋白酶C基因的突变分析[J]. 现代口腔医学杂志, 2006, 20(5): 479-481.

Yang Y, Bai XW, Song SJ, et al. Cathepsin C gene mutations in a Chinese aggressive periodontitis pedigree[J]. J Modern Stomatol, 2006, 20(5): 479-481.

- [13] 杨媛, 白小文, 刘宏胜, 等. 掌跖角化牙周病综合征患者组织蛋白酶C基因的新突变[J]. 中华口腔医学杂志, 2006, 41(10): 602-605.
Yang Y, Bai XW, Liu HS, et al. Novel mutations of cathepsin C gene in two Chinese patients with Papillon-Lefèvre syndrome[J]. Chin J Stomatol, 2006, 41(10): 602-605.
- [14] Nakano A, Nomura K, Nakano H, et al. Papillon-Lefèvre syndrome: mutations and polymorphisms in the cathepsin C gene[J]. J Invest Dermatol, 2001, 116(2): 339-343.
- [15] Sørensen OE, Clemmensen SN, Dahl SL, et al. Papillon-Lefèvre syndrome patient reveals species-dependent requirements for neutrophil defenses[J]. J Clin Invest, 2014, 124(10): 4539-4548.
- [16] Hart TC, Bowden DW, Ghaffar KA, et al. Sublocalization of the Papillon-Lefèvre syndrome locus on 11q14-q21[J]. Am J Med Genet, 1998, 79(2): 134-139.
- [17] 陈远娇, 李晨军. 掌跖角化-牙周破坏综合征个案患者家系组织蛋白酶C的基因突变分析[J]. 华西口腔医学杂志, 2016, 34(4): 346-349.
Chen YJ, Li CJ. Gene mutational analyses of the cathepsin C gene in families with Papillon-Lefèvre syndrome[J]. West Chin J Stomatol, 2016, 34(4): 346-349.
- [18] Rai R, Thiagarajan S, Mohandas S, et al. Haim Munk syndrome and Papillon Lefevre syndrome: allelic mutations in cathepsin C with variation in phenotype[J]. Int J Dermatol, 2010, 49(5): 541-543.
- [19] Lux CJ, Kugel B, Komposch G, et al. Orthodontic treatment in a patient with papillon-lefèvre syndrome[J]. J Periodontol, 2005, 76(4): 642-650.
- [20] Almuneef M, Al Khenazian S, Al Ajaji S, et al. Pyogenic liver abscess and Papillon-Lefèvre syndrome: not a rare association[J]. Pediatrics, 2003, 111(1): e85-e88.
- [21] Wang X, Liu Y, Liu Y, et al. Long-term change of disease behavior in Papillon-Lefèvre syndrome: seven years follow-up[J]. Eur J Med Genet, 2015, 58(3): 184-187.

(本文编辑 李彩)

国际学术传播新工具 III——ReadCube

ReadCube是Digital Science公司旗下的学术文献整合、管理工具, 集成了PubMed和Google Scholar搜索引擎, 适合拥有上述资源访问权限的读者使用, 读者可以在程序界面直接搜索。PubMed是由美国国家生物技术信息中心开发的基于生物医药和生命科学的免费文献搜索引擎, 数据主要来源于MEDLINE数据库。Google Scholar是涵盖自然科学、人文科学、社会科学等多学科的免费搜索引擎。

对研究者来说, ReadCube客户端界面优美、功能丰富, 用户可以通过该客户端阅读、管理、搜索文献。用户免费注册后具有以下功能: 1) 建立个人图书馆, 批量导入PDF格式参考文献或者添加在线文献; 2) 获取在线文章补充材料、可点击的内联文献、高清图片、文章评价指标、参考文献列表, 还可添加阅读笔记或批注, 一键搜索作者信息等; 3) 获取个性化最新文章推荐; 4) 多设备同步个人图书馆。

对机构用户来说, 除上述文献管理功能外, 机构成员还可通过ReadCube共享文献、笔记和建立讨论组等。

对出版商来说, ReadCube采用基于Html5的PDF交互阅读器, 通过后台植入代码, 整合到出版商文章页面, 大幅提高在线阅读PDF文献时的加载速度; 出版商通过与ReadCube免费合作的形式, 即可使出版内容被ReadCube索引, 大大提高了出版内容的显示度(内容被检索、被推荐)。

由ReadCube提供技术支持, Wiley公司于2017年7月启动了内容分享计划(Wiley Content Sharing), 即作者和订阅用户可将其免费阅读全文的文章链接通过社交平台、电子邮件、学术交流平台等分享给部分同行和非订阅用户。该功能适用于Wiley Online Library的所有期刊。在之前试运行的4个月中, Wiley有7 000篇文章链接被分享。Springer Nature已于2年前启动分享计划, 名为SharedIt。

ReadCube详情参见<https://www.readcube.com>。