

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2016.02.010

论著 · 临床研究

## 1 例自身免疫性多内分泌腺病综合征 I 型患者的 临床及家系 AIRE 基因突变分析

孙永香 何亚非 栗夏连

(郑州大学第一附属医院内分泌科, 河南 郑州 450052)

**【摘要】** 收集 1 例自身免疫性多内分泌腺病综合征 I 型患者的临床资料, 应用 PCR-DNA 直接双向测序法对患者及其父母自身免疫调节因子 (AIRE) 基因的 14 个外显子进行突变筛查, 同时选取 50 名无血缘关系的正常对照人群进行检测。并用生物学信息方法进行结构和功能预测。基因的序列分析结果显示患儿携带 AIRE 基因第 5 外显子的杂合突变, 即 c.622G>T (p.G208W)。经检索人类基因突变数据库和最新文献, 此突变为新突变。50 名无血缘关系的正常对照人群未检测到该突变。AIRE 基因中的新发突变 [c.622G>T (p.G208W)] 可能在本例患者的发病机制中扮演着重要角色。 [中国当代儿科杂志, 2016, 18 (2): 147-151]

**【关键词】** 自身免疫性多内分泌腺病综合征 I 型; 自身免疫调节因子; 基因突变

### Clinical analysis and autoimmune regulator gene mutation of autoimmune polyendocrinopathy syndrome type I in a family: a report of one case

SUN Yong-Xiang, HE Ya-Fei, LI Xia-Lian. Department of Endocrinology, First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China (Li X-L, Email: xialianli@hotmail.com)

**Abstract:** The clinical data of one patient with autoimmune polyendocrinopathy syndrome type I were collected. PCR-DNA direct bidirectional sequencing was applied for mutation screening of 14 exons in autoimmune regulator (AIRE) gene in the patient and her parents. A total of 50 unrelated healthy controls were selected and tested. The bioinformatic methods were used to predict the possible impact of the mutations on the structure and function of the AIRE protein. The results of sequencing showed that heterozygous mutation c.622G>T (p.G208W) in exon 5 of the AIRE gene was detected in the patient and was a novel mutation, which had not been reported in the HGMD database and latest articles. This mutation was not detected in the 50 unrelated normal controls. The novel mutation of c.622G>T (p.G208W) in AIRE gene might play an important role in the pathogenesis of this case of autoimmune polyendocrinopathy syndrome type I. [Chin J Contemp Pediatr, 2016, 18(2): 147-151]

**Key words:** Autoimmune polyendocrinopathy syndrome type I; Autoimmune regulator; Gene mutation

自身免疫性多内分泌腺病综合征 I 型 (autoimmune polyendocrinopathy syndrome type I, APS I) 是由自身免疫调节因子 (autoimmune regulator, AIRE) 基因突变引起 T 淋巴细胞耐受缺损的单基因遗传病, 导致多个内分泌腺以及非内分泌器官功能受损, 主要表现为自身免疫性甲状腺旁腺功能减退、原发性肾上腺皮质功能减退和慢性皮肤黏膜念珠菌病, 又称自身免疫性多发性内分泌病-念珠菌病-外胚层营养不良 (autoimmune

polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy, APECED) [1-2]。迄今为止, 人类基因突变数据库收录 AIRE 基因致病突变有 117 种, 包括错义突变、沉默突变、插入和缺失、无义突变以及剪接位点突变。不同民族和地区引起 APS I 的突变类型各不相同。目前国内关于 AIRE 基因突变报道甚少 [3-4]。2010 年, 刘彩虹等 [3] 首次报道中国汉族人 APS I 患者 AIRE 基因具有 A19T 和 R257X 的复合杂合突变。本研究针对 1 例 APS I 患者及其父母进行

[收稿日期] 2015-09-17; [接受日期] 2015-11-18

[作者简介] 孙永香, 女, 硕士研究生。

[通信作者] 栗夏连, 女, 主任医师。

AIRE 基因序列分析,并用生物学技术对其功能进行预测,以获得确切的基因学诊断。

## 1 资料与方法

### 1.1 病例介绍

先证者,女,15岁,因恶心、呕吐、腹泻2年半,口腔肿痛、间断发热2年,院外对症治疗效果欠佳,无手足抽搐,于1年前首次收住我院。体查:体型消瘦,营养不良,贫血貌;颊黏膜、舌体可见散在溃疡,深约5mm,局部白膜覆盖;双手指甲菲薄。实验室检查:贫血,血红蛋白波动于69~76g/L(参考值110~150g/L);血钙低,血总钙波动于0.82~0.98mmol/L(参考值2.0~2.7mmol/L);血磷升高,波动于2.72~2.49mmol/L(参考值0.81~1.90mmol/L);甲状旁腺激素低,波动于2.30~4.94ng/mL(参考值15~65ng/mL);曲霉菌半乳甘露聚糖抗原检测(即GM试验)阳性;甲状腺功能、血清促肾上腺皮质激素、血清皮质醇、24h尿游离皮质醇均正常。根据临床表现及检查结果诊断为APS I。予肠内高营养、制霉菌素片、氟康唑注射液、阿法骨化醇软胶囊、碳酸钙D<sub>3</sub>片治疗,体温降至正常,口腔溃疡面愈合、白膜消失,血钙回升。7个月前,以反复口腔溃疡

7d再次收入院。体查:营养中等,舌体及口腔黏膜分布大小不等散在溃疡,较表浅。实验室检查:血红蛋白97g/L(贫血);仍低钙高磷:血钙波动于1.19~1.36mmol/L;血磷波动于2.81~3.42mmol/L;甲状旁腺激素仍低(8.9ng/mL)。予罗盖全、钙尔奇、叶酸、腺苷钴胺片、沙利度胺片治疗,血钙升高,口腔溃疡明显好转。院外规律用药。4个月前,以四肢抽搐1个月第3次入院,抽搐时伴短暂意识丧失、牙关紧闭、口吐白沫,持续10min自行好转。复查实验室指标:血红蛋白88g/L(贫血);仍低钙高磷:血钙波动于1.06~1.78mmol/L,血磷波动于2.53~3.02mmol/L;甲状旁腺激素仍低(4.2ng/mL);24h尿钙升高(50.88mmol/24h);血清促肾上腺皮质激素,血清皮质醇、24h尿游离皮质醇正常。沙利度胺可能会引起癫痫大发作,停用沙利度胺片后,随访3个月,抽搐未再发作,余治疗不变,血钙回升至1.78mmol/L。既往史:无特殊。家族史:祖父患“冠心病”,祖母患“高血压、脑出血”,外祖父因“肝癌”去世,外祖母体健。父亲患“糖尿病”,母亲体健,非近亲婚配。1个弟弟体健。家族中无同类病史。家系图谱见图1。遂对患者及其一级家属AIRE基因进行测序。

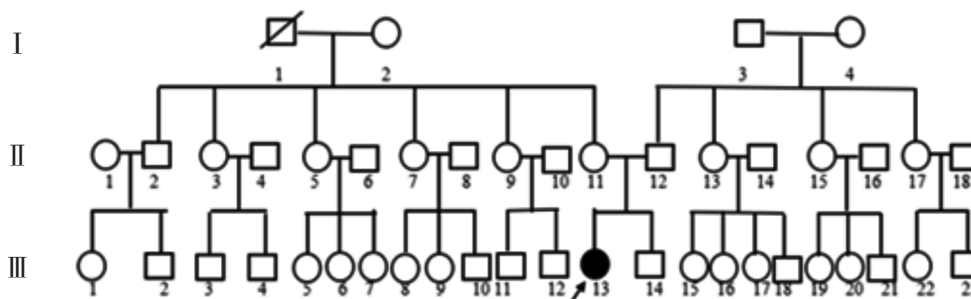


图1 APS I 患者家系图谱 □示健康男性;○示健康女性;▨示死亡男性;●示 APS I 女性患儿;黑色箭头示先证者。

### 1.2 基因组 DNA 的提取及引物合成

签署知情同意后,采集患儿、患儿父母及50名无血缘关系的正常对照人群外周血标本3mL,酚-氯仿法提取基因组DNA。所有引物委托上海生物工程股份有限公司设计合成,引物序列见表1。

### 1.3 聚合酶链反应

聚合酶链反应反应体系(50μL):包括模

板1μL,正反向引物各1μL,dNTP(10mmol/L)1μL,Taq Buffer 5μL,MgCl<sub>2</sub>(25mmol/L)5μL,Taq酶(5U/μL)0.5μL,去离子水35.5μL。PCR反应条件:95℃预变性3min;94℃变性30s;55~60℃退火35s;72℃延伸40~50s,进行35个循环;然后72℃修复延伸5~8min,4℃保存。

表 1 AIRE 基因 PCR 扩增及测序引物

片段	正向引物 (5' → 3')	反向引物 (5' → 3')
AIRE-1	CGTGGTCGCGGGGTATAAC	GCGGGTCTCTCTGGAACCT
AIRE-2	TCCACCACAAGCCGAGGAGAT	GGCTCTCAAACACCACTCCG
AIRE-3	TGATGTTCCAGGACCGTCTTG	GAAGACTGGAGACCCCTGGCTG
AIRE-4	CAAAGGGACTACCCAGCACT	ACTGGCAAGATCATGCTTAGAC
AIRE-5	GCCTGCTTCTGGCATAGAGTAT	ACTCTGGCTACCTGAGCAACA
AIRE-6-7	GAATCCACCTGTCTCTGCTAG	TTACCATTGCGTATTATCAGGA
AIRE-8	GAGTTCAGCTACCCAGAGATGCT	TTCAGGGTCACTGGGTGGAG
AIRE-9	CCTCTGTGAAAAGACATGGTCGG	TAGTGCTATGGCTGGGGCACTC
AIRE-10	GCACTCACTGACTCCTGGGTG	TAGGTCTGGGCTCCTTGAA
AIRE-10 测序用	ACTCCTGGGTGGTGCCG	
AIRE-11	GCTCCTCACTTGCCCTAGA	GTGGTTGTGGGCTGTATGATGT
AIRE-12	ATACCCCGAGGTGGCACTC	GGCTCTGCCCTGAGATGTGCT
AIRE-13	CAGTGGAGCTGGGTGTAAGAAT	TGAGTTTCCACGGCTCAAGA
AIRE-14F	CTTTGACTTAGAGGGAAGGTG	AATGGGGAGTGAGTGTTCAT

### 1.4 DNA 测序

委托上海生物工程股份有限公司进行 DNA 双向测序，用 3730 测序列分析仪分析测序结果。使用 DNASTAR 软件包中的 Seqman 进行测序基因与正常 AIRE 基因的比对分析。突变的命名参考 Genebank 中的 cDNA 序列 NM\_000383.3。

### 1.5 生物学信息分析

使用 Polyphen2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>)、SNPs3D (<http://www.snps3d.org/>)、SIFT (<http://sift.jcvi.org/>) 软件对发现的突变位点进行功能预测。

行功能预测。

## 2 结果

### 2.1 DNA 测序结果

先证者 AIRE 基因有一处杂合突变：第 5 外显子 622 位 G → T，密码子由 GGG → TGG，导致编码的 208 位甘氨酸被色氨酸代替 (Gly → Trp, G208W)，先证者父亲和母亲第 5 外显子测序均未发现此突变 (图 2)。

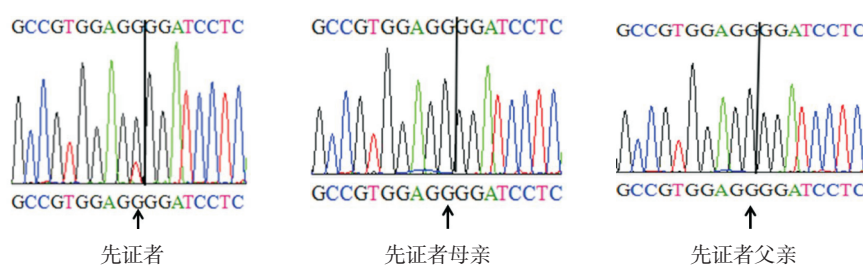


图 2 第 5 外显子 622 位测序峰图 黑色箭头示突变所在位点。

经检索人类基因突变数据库和最新文献，位于第 5 外显子的突变 c.622G>T (p.G208W) 为新突变。50 名无血缘关系的正常对照人群中未发现同样突变，排除其单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP)。另外，在患者的 AIRE 基因上检测到已报道的 5 个 SNP 位点，即 c.57T>C、c.588C>T、c.834C>G、c.1197T>C、c.1578T>C。其中 c.834C>G 为非同义 SNP 位点，导致编码的

278 位氨基酸丝氨酸被精氨酸替代 (Ser → Arg, S278R)，先证者父亲第 7 外显子测序结果与野生型相同，而母亲第 7 外显子 834 位存在这一纯合突变，但未发病，支持此突变为非致病性突变。

### 2.2 生物学信息分析

应用 Polyphen2、SNPs3D、SIFT 对 622 位 G → T 突变进行功能预测。Polyphen2 预测结果分数为 1.00 (分数越接近 1.00，突变损害可能性越



大；越接近于 0，突变损害可能性越小），同源性分析发现此突变区域在多物种中具有高度保守性（图 3）；SNPs3D 预测结果为 -2.11（正值：无害；

负值：有害）；SIFT 预测分数结果为 0.00（分数 <0.05 认为可能影响蛋白质功能），以上 3 个软件均认为此突变可影响 AIRE 蛋白功能。

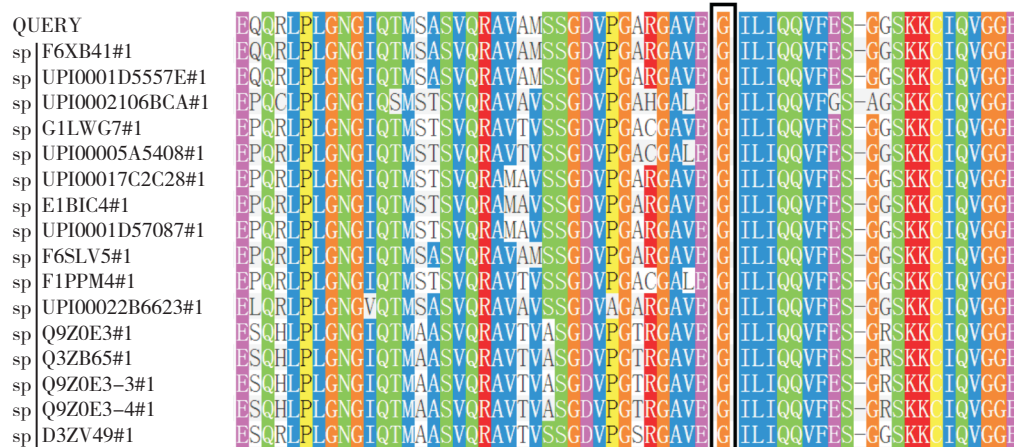


图 3 AIRE 蛋白 c.622G>T ( p.G208W ) 突变区域同源性分析 黑框区为突变所在位点。

### 3 讨论

患者在 3 年内先后出现了慢性皮肤黏膜念珠菌感染、自身免疫性甲状旁腺功能减退和指甲发育不良，临床符合 APS I 诊断。DNA 双向测序结果显示：患者存在 c.622G>T ( p.G208W ) 杂合突变，先证者父亲和母亲第 5 外显子测序均未发现此突变，且检索人类基因突变数据库及最新文献证实此突变为新突变。

APS I 是一种单基因常染色体隐性遗传病，由 AIRE 基因突变引起，该疾病在某些地区人群多发，例如芬兰人、撒丁岛人、犹太人<sup>[5]</sup>，但是在中国这种疾病稀少。患者常在儿童或者青少年时期发病<sup>[6]</sup>，临床表现多为自身免疫性甲状旁腺功能减退、原发性肾上腺皮质功能减低和慢性皮肤黏膜念珠菌感染，称为 APS I “三联征”，其中慢性念珠菌感染常见和最早出现。尽管 APS I 是一种单基因遗传病，但是其临床表现复杂多样，尚可合并其他自身免疫性炎症导致的多内分泌腺功能减退和非内分泌腺体的自身免疫疾病如原发性自身免疫性性腺功能减退、自身免疫性甲状旁腺功能减退、自身免疫性 1 型糖尿病、慢性萎缩性胃炎、自身免疫性肝炎等<sup>[7-8]</sup>。此外，临床表现还包括外胚层发育不良导致的脱发和白癜风等。当至少存在“三联征”中 2 种临床表现时即可诊断

APS I，若有相应的家族史则具有 1 种病症也可诊断<sup>[6]</sup>。本例患者先后 3 年里出现顽固性口腔黏膜念珠菌感染、指甲发育不良等外胚层器官发育不良以及吸收不良综合征等表现，原发性甲状旁腺功能减退诊断无误，临床符合 APS I 诊断。患者无低钙抽搐症状与患者长期低钙，机体已适应有关。随后的抽搐与沙利度安的应用有关而非甲状旁腺功能减退所致。APS I 患者的治疗包括激素补充治疗和抗真菌治疗，病人应该长期随访观察其是否有其他病变的出现，为了明确诊断应对其 AIRE 基因行测序分析或者检测相应的自身免疫性抗体。在本例患儿的诊疗中，对患者行抗真菌治疗以及补充相应的激素，患者营养良好、口腔溃疡愈合、血钙回升。对患者 AIRE 基因进行 DNA 双向测序分析，发现患者具有 c.622G>T ( p.G208W ) 杂合突变。

Nagamine 等<sup>[9]</sup>和芬兰 - 德国<sup>[10]</sup>两个研究小组在 1997 年分离出 APECED 基因，命名为 AIRE 基因，该基因编码 AIRE 蛋白在许多组织中表达，但主要在胸腺髓质上皮细胞和单核树突状细胞这两种抗原呈递细胞上表达，该基因功能区结构改变会影响其亚细胞定位和蛋白的转录活性，干扰自身反应性 T 细胞（阴性选择）和 / 或通过产生免疫调节性 T 细胞影响自身耐受的维持<sup>[11]</sup>。AIRE 蛋白包含 1 个保守的核定位信号、2 个植物同源结构

域锌指结构、4 个 LXXLL 基序、DNA 结合功能区 SAND (Sp100、AIRE-1、NucP41/75、DEAF-1)、同源染色功能区。其中, SAND 区含有 DNA 结合活性,是来自 sp100 的异构体,参与核区室化作用,分析显示在这个能够结合 DNA 的功能区有唯一的一个蛋白折叠<sup>[12]</sup>,该区的缺失和点突变会导致胞质多肽的聚集反应,干扰正常的核定位<sup>[13]</sup>。SAND 是 AIRE 基因的热点突变区之一,经典的芬兰突变 R257X 即位于此结构域。另外 Meloni 等<sup>[14]</sup>报道第 6 外显子 755 位 P252L 突变,导致与脯氨酸富集区相关的基因二级螺旋结构破坏,这一突变同时也位于 SAND 区。Cetani 等<sup>[15]</sup>报道,在 SAND 区上的 G228W 突变以显性方式遗传。以上研究说明,发生在 SAND 区的突变会对 AIRE 蛋白功能产生不可忽略的影响。且本例 G208W 突变同 G228W 突变<sup>[15]</sup>一样发生在 SAND 区,且均由甘氨酸突变为色氨酸,一方面芳香族侧链的引入可能改变了蛋白分子的极性,另一方面由最小最灵活的氨基酸突变为庞大的氨基酸可能改变了蛋白分子的构象。那么 c.622G>T (p.G208W) 突变有可能与 G228W 突变类似,以显性方式遗传,导致本病的发生。同时,本研究采用 Polyphen2、SNPs3D、SIFT 软件对 c.622G>T (p.G208W) 突变进行预测分析,发现此突变极可能影响 AIRE 蛋白功能。相关文献及功能预测提示在本例 APS- I 患者中位于第 5 外显子的 c.622G>T (p.G208W) 突变极可能是其致病的分子因素。由于本实验只进行了外显子 Sanger 测序,因此不排除可能存在的无法识别的大片段插入和缺失突变参与本病的发生,因此 c.622G>T (p.G208W) 突变致病性的确定尚需进一步的实验、随访和循证医学证据。

另外,遗传素质会与环境相互作用,导致自身耐受的破坏和自身免疫<sup>[16]</sup>,可能使具有同一基因突变的 APS- I 患者具有不同的表型。因此,APS- I 临床表现复杂多样,一些表现随年龄增长逐渐出现。进行基因筛查以及定期随访,可望使患者得到早期治疗的机会。

#### [参 考 文 献]

- [1] Perheentupa J. Autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006, 91(8): 2843-2850.
- [2] Nagamine K, Peterson P, Scott HS et al. Positional cloning of the APECED gene[J]. *Nat Genet*, 1997, 17(4): 393-398.
- [3] 刘彩虹,石岩,阴怀清,等. 中国人自身免疫多内分泌腺病综合征 1 型 AIRE 基因突变[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2010, 27(1): 18-22.
- [4] Zhang J, Liu H, Liu Z, et al. A functional alternative splicing mutation in AIRE gene causes autoimmune polyendocrine syndrome type 1[J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e53981.
- [5] Björse P, Aaltonen J, Vikman A, et al. Genetic homogeneity of autoimmune polyglandular disease type I[J]. *Am J Hum Genet*, 1996, 59(4): 879-886.
- [6] Buzi F, Badolato R, Mazza C, et al. Autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy syndrome: time to review diagnostic criteria?[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003, 88(7): 3146-3148.
- [7] Michels AW, Eisenbarth GS. Autoimmune polyendocrine syndrome type 1 (APS-1) as a model for understanding autoimmune polyendocrine syndrome type 2 (APS-2)[J]. *J Intern Med*, 2009, 265(5): 530-540.
- [8] Shikama N, Nusspaumer G, Holländer GA. Clearing the AIRE: on the pathophysiological basis of the autoimmune polyendocrinopathy syndrome type-1[J]. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 2009, 38(2): 273-288.
- [9] Nagamine K, Peterson P, Scott HS, et al. Positional cloning of the APECED gene[J]. *Nat Genet*, 1997, 17(4): 393-398.
- [10] Finnish-German APECED Consortium. An autoimmune disease, APECED, caused by mutations in a novel gene featuring two PHD-type zinc-finger domains[J]. *Nat Genet*, 1997, 17(4): 399-403.
- [11] Lopes N, Ferrier P, Irla M. Induction of central tolerance by the factor Aire: molecular and epigenetic regulation[J]. *Med Sci (Paris)*, 2015, 31(8-9): 742-747.
- [12] Bottomley MJ, Collard MW, Huggenvik JI, et al. The SAND domain structure defines a novel DNA-binding fold in transcriptional regulation[J]. *Nat Struct Biol*, 2001, 8(7): 626-633.
- [13] Ramsey C, Bukrinsky A, Peltonen L. Systematic mutagenesis of the functional domains of AIRE reveals their role in intracellular targeting[J]. *Hum Mol Genet*, 2002, 11(26): 3299-3308.
- [14] Meloni A, Perniola R, FaàV, et al. Delineation of the molecular defects in the AIRE gene in autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy patients from Southern Italy[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, 87(2): 841-846.
- [15] Cetani F, Barbesino G, Borsari S, et al. A novel mutation of the autoimmune regulator gene in an Italian kindred with autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy, acting in a dominant fashion and strongly cosegregating with hypothyroid autoimmune thyroiditis[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001, 86(10): 4747-4752.
- [16] Temajo NO, Howard N. The mosaic of environment involvement in autoimmunity: the abrogation of viral latency by stress, a non-infectious environmental agent, is an intrinsic prerequisite prelude before viruses can rank as infectious environmental agents that trigger autoimmune diseases[J]. *Autoimmun Rev*, 2014, 13(6): 635-640.

(本文编辑: 万静)