

[10] 韩晶,周民,姜乃可,等.老年与非老年组多发性骨髓瘤患者的血清TRacp-5b及IL-6水平分析[J].广州医科大学学报,2016,44(4):68-70.

[11] CASTELLI R, PANTALEO G, GALLIPOLI P, et al. Salvage therapy with bortezomib and dexamethasone in elderly patients with relapsed/refractory multiple myeloma [J]. *Anticancer Drugs*, 2015, 26(10):1078-1082.

[12] 朱春华,罗世玉.感染可能性评分监测多发性骨髓瘤患者院内血流感染的价值[J].中国老年学杂志,2017,37(19):4872-4873.

[13] 王永宾,刘文涛,王晓娜,等.血清蛋白电泳与免疫球蛋白联合检测在多发性骨髓瘤诊断中的临床应用探究[J].医学检验与临床,2017,28(12):40-41,32.

[14] QUACH H, JOSHUA D, HO J, et al. Treatment of patients with multiple myeloma who are not eligible for stem cell transplantation: position statement of the myeloma foundation of australia medical and scientific advisory group [J]. *Intern Med J*, 2015, 45(3):335-343.

[15] 马瑞霞,李作林,王彤,等.肾功能不全为首发临床表现多发性骨髓瘤的临床特征[J].中华肿瘤杂志,2016,38(7):552-555.

[16] SONG MK, CHUNG JS, LEE JJ, et al. Risk stratification model in elderly patients with multiple myeloma: clinical role of magnetic resonance imaging combined with international staging system and cytogenetic abnormalities [J]. *Acta Haematol*, 2015, 134(1):7-16.

[17] 王海飞,刘辉,魏建平.老年人意义未明单克隆免疫球蛋白血症转归为多发性骨髓瘤的临床特征分析[J].中华老年医学杂志,2015,34(6):651-653.

[18] 岑岭,姜玉,张修文,等.60例老年多发性骨髓瘤的细胞遗传学改变与VEGF及TRacp-5b水平的相关性[J].中华医学遗传学杂志,2016,33(5):602-605.

[19] 江美英.18F-FDG PET/CT显像在老年多发性骨髓瘤骨病变和累及范围评估中的价值[J].中国老年学杂志,2017,37(8):1995-1996.

(收稿日期:2018-08-13,修回日期:2018-09-24)

doi: 10.3969/j.issn.1009-6469.2020.01.030

◇临床医学◇

GJB2 基因突变在长岛型掌跖角化病发病中的作用

刘慧茹,叶碧珍,魏转弟

作者单位:东莞市中医院皮肤科,广东 东莞 523000

基金项目:东莞市社会科技项目(2018507150291435)

摘要:目的 鉴定一家系长岛型掌跖角化症(NPPK)的突变位点,阐明NPPK的发病机制。方法 将收集的2例NPPK病人外周血,提取DNA后对GJB2、GJB3、GJB4、GJB6、GJA1五个基因进行测序,鉴定突变位点;连接蛋白转录物显微注射卵母细胞,分别为:缝隙连接蛋白(Connexin, Cx)26、Cx31、Cx26+Cx31、Cx26+Cx26-S183F、Cx31+Cx26-S183F及注射水的对照组,并通过膜片钳实验记录半通道电流;蛋白质印迹检测法检测NPPK突变体及野生型Cx31的表达水平;通过免疫共沉淀检测Cx26 NPPK突变体与Cx31的互作情况。**结果** 测序发现Cx26(GJB2)基因发生了突变(c.548C>T),第183位的丝氨酸被苯丙氨酸取代(p.Ser183Phe)导致了NPPK;当在卵母细胞单独表达Cx26-S183F时,不能形成间隙连接通道或半通道;突变体与野生型Cx31的共表达,显示Cx31间隙连接通道的反式显性抑制,而不降低Cx31蛋白质合成;免疫共沉淀表明,与野生型相比,突变体Cx26对Cx31蛋白更有效地下拉,说明增强了异型连接子的形成;在Cx26突变体存在下,异型连接子的形成导致Cx31半通道活性显著增加。**结论** Cx26-S183F不能单独形成半通道或间隙连接,但在与Cx31共表达时可以增强半通道活性,从而引起NPPK。Cx26突变体具有修饰Cx31半通道和缝隙连接的能力,对研究Cx26和Cx31在表皮疾病的作用具有重要的意义。

关键词:皮肤角化病,掌跖; 缝隙连接蛋白beta 2; 膜片钳术; 印迹法,蛋白质; 免疫沉淀法; 突变位点

Mechanism of GJB2 gene mutation leading to the occurrence of nagashima-type palmoplantar Keratosis

LIU Huiru, YE Bizhen, WEI Zhuandi

Author Affiliation: Department of Dermatology, Dongguan Traditional Chinese Medicine Hospital, Dongguan, Guangdong 523000, China

Abstract: Objective To identify the mutation site in a Nagashima-type Palmoplantar Keratosis (NPPK) and clarify the pathogenesis mechanism of NPPK. **Methods** We collected two blood samples from two NPPK patients. After extracted the DNA from blood samples, five genes of GJB2, GJB3, GJB4, GJB6 and GJA1 were sequenced to identify the mutation site. Oocytes were injected with connexin transcripts alone or in combination: Cx26, Cx31, Cx26+Cx31, Cx26+Cx26-S183F, Cx31+Cx26-S183F and control (injected

with H₂O). Then patch clamp recording technique were taken to recorded hemichannel currents. Western blot was used to detect the expression of NPPK mutant and wild-type Cx31. Detection of interaction between Cx26 NPPK mutant and Cx31 were detected by co-immunoprecipitation assay. **Results** we found a heterozygous c.548C>T transition at codon 183 of the GJB2 gene, then a substitution of a serine by a phenylalanine (p.Ser183Phe), which caused Nagashima-type Palmoplantar Keratosis (NPPK). When the oocyte expresses the Cx26-S183F alone, it failed to form gap junction channels or hemichannels. Co-expression of the mutants with wild-type Cx31 resulted a trans-dominant inhibition of Cx31 gap junction channels, without decreased the synthesis of Cx31 protein. Compared with the wild-type cells, co-immunoprecipitation shown Cx31 being pulled down more efficiently with Cx26 mutant, which was confirmed that Cx26 mutant could enhanced formation of heteromeric connexons. The formation of heteromeric connexons was significantly increased Cx31 hemichannel activity in the presence of Cx26 mutants. **Conclusions** Cx26-S183F, unable to form hemichannels or gap junctions alone, however, increased hemichannel activity and caused NPPK when co-expressed with Cx31. The Cx26 mutants have the ability of modify hemichannels and gap junctions of Cx31. It is important to study the effect of Cx26 and Cx31 in the NPPK.

Key words: Keratoderma, palmoplantar; Gap junction protein beta 2; Patch-clamp techniques; Blotting, western; Immunoprecipitation; Point mutation

长岛型掌跖角化症(Nagashima-type palmoplantar Keratosis, NPPK)是一种常染色体隐性遗传病,男女发病率相似,临床表现的特征为掌跖角化症,该病于1977年首次在长岛被报告^[1]。其临床特征包括手掌和脚掌上界限清楚的红斑并轻中度角化过度;长岛型掌跖角化症通常在婴幼儿期开始发病,表现为轻微的掌跖斑疹病,皮疹进展慢^[2]。

GJB2属于β-族间隙连接蛋白家族,按蛋白分子量命名为Cx26。间隙连接蛋白与缝连接蛋白组成一个完整的缝隙连接通道,在细胞间信息传导和物质交换起重要作用。表皮的基底层含有增殖的角质形成细胞,分化产生的细胞可迁移到棘突和颗粒层^[3]。角质形成细胞具有许多细胞间连接,包括间隙连接^[4]。β-族间隙连接蛋白突变可能诱导皮肤病发生,其中Cx26的GJB2突变会导致皮肤病综合征,包括耳聋的掌跖角化病(PPK),Vohwinkel综合征(VS)和角膜炎鱼鳞病耳聋综合征(KID)^[5-7]。Cx31(GJB3)和Cx30.3(GJB4)突变引起的皮肤病症状相似,主要表现为变异性红皮肤角化症(EKV)^[8]。目前大量研究集中在间隙连接蛋白导致KID综合征的作用机制,但对于与NPPK相关的突变鲜有研究。

本研究于2017年收集了家系的2例NPPK病人,对病人的外周血提取DNA,进行SERPINB7基因外显子8常见突变位点c.796C>T(p.Arg266Ter)进行测序,未发现突变。因此,我们推测该家系病人可

能是由于其他相关基因(GJB2、GJB3、GJB4、GJB6、GJA1)突变引起。本研究拟通过鉴定NPPK的突变位点,阐明NPPK的发病机制,为NPPK的治疗提供一定的理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 研究对象为收集的2例家系NPPK病人,分别于3岁和4岁开始发病,临床表现为双手掌、指背、足底、手腕、踝部、跟腱等对称性红斑、角化性斑丘疹、斑块伴脱屑。组织病理学表现为表皮角化过度、颗粒层和棘层增厚,无表皮松解性角化过度的特点,真皮浅层少量毛细血管扩张,少量炎症细胞浸润。该例病人的临床及组织病理符合长岛型掌跖角化症。

1.2 实验方法

1.2.1 DNA提取与sanger测序 收集NPPK病人外周血3~5 mL,根据DNA提取试剂盒说明书提取血液DNA,利用紫外分光光度计检测DNA的浓度和纯度,保存-70℃备用。从美国国家生物技术信息中心(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中获得GJB2、GJB3、GJB4、GJB6、GJA1这5个基因的序列,设计引物(表1)。以下条件进行PCR扩增:95℃预变性3 min,95℃变性30 s,58℃退火30 s,在72℃延伸2 min,30个循环,72℃延伸10 min终止反应。1%琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物,将获得的5个基因的PCR产物送华大基因进行正反向引物测序。用

表1 长岛型掌跖角化症(NPPK)中GJB2、GJB3、GJB4、GJB6、GJA1基因PCR扩增引物序列

| 基因 | 正向引物(5'-3') | 反向引物(5'-3') |
|--------------|--------------------------|---------------------------|
| Cx31(GJB3) | TACGATGGTTTTTCCTCTAATTCT | CATAACTTAGTGAAGTCCAGAG3 |
| Cx30(GJB6) | TTGGCTTCAGTCTGTAATATCACC | TCATTTACAACTCTTCAGGCTACAG |
| Cx26(GJB2) | GCATGCTTGCTTACCCAGACTC | AGGGGAGCAGAGCTCCATTG |
| Cx30.3(GJB4) | AGCAATCCCTACCCTACCA | GGATGTCAGGCTTGCTCTCG |
| Cx32(GJB1) | TGGGACAGGAAGAGTTTGCC | AGGCTGTTGAGTACCACCTA |

Gene tool 软件将测定的序列与标准序列进行比对, 标准序列参考: GJB2: NM_004004, GJB6: NM_001110219, GJB3: NM_001005752, GJB1: NM_000166, GJB4: NM_153212。

1.2.2 体外转录及卵母细胞显微注射 将Cx26和Cx31克隆到pCS2+表达载体中,用于非洲爪蟾卵母细胞的功能研究^[9]。通过定点诱变制备Cx26-S183F结构体^[10],并将DNA结构体克隆到pBlueScrip1pt II载体中并测序,然后亚克隆到pCS2+表达载体中。将定点诱变的结构体使用SP6 mMessage mMachine体外转录试剂盒线性化并转录。从非洲爪蟾雌性中收集卵母细胞,并在改良的Barth(MB)培养基中培养^[11],向卵母细胞注射10 ng反义非洲爪蟾Cx38寡核苷酸^[12],然后单独或组合注射连接蛋白转录物,注入水的卵母细胞作为阴性对照。Cx31 RNA和其他cRNA都以相同的浓度注射。

1.2.3 记录半通道电流 卵母细胞注射各种cRNA 24h后使用Gene Clamp 500放大器检测其半通道电流。将卵母细胞培养在不添加Ca²⁺的MB培养基中,在室温条件下进行膜片钳实验。将电极拉至1~2 MΩ的电阻,电极内灌注电极内液。通过记录半通道电流:钳制电压为-40 mV,电压从-30 mV去极化至+40 mV,阶跃10 mV每次持续5 s,从而获得半通道电流-电压(I-V)曲线。并在初始钳制电压-40 mV情况下,测量两个细胞的电流变化来计算连接电导(G_j)。一个细胞受±20 mV的交变脉冲,在另一个细胞中记录由电压变化产生的电流,其大小与连接电流(I_j)相等,通过I_j除以电压差计算电导率,即G_j = I_j/(V₁-V₂)。

1.2.4 蛋白质印迹法 卵母细胞如1.2.2做相同的处理,24 h后提取蛋白。在12%的SDS凝胶上电泳分离并转移到硝酸纤维素膜上,用5%的脱脂奶粉37 °C封闭1 h,用CX26(GBJ2)或Cx31(GBJ3)(ABCAM, Cambridge)的多克隆抗体进行检测,然后用辣根过氧化物酶标记的二抗37 °C孵育1 h。用GADPH(ABCAM, Cambridge)作为内参。使用Image J软件对条带灰度值进行量化分析。

1.2.5 免疫共沉淀 卵母细胞如1.2.2做相同的处理,24 h后利用膜蛋白提取试剂盒提供的说明书提取膜蛋白。用PBS清洗两遍珠子,用PBS将Protein A agarose配制成50%浓度,蛋白样品中加入Protein A琼脂糖珠去除非特异性蛋白。用Cx26抗体孵育,加入Protein A琼脂糖珠来捕捉抗原抗体复合物,收集琼脂糖珠-抗原抗体复合物,样品煮沸5 min变性。在SDS凝胶上进行电泳,转膜后使用Cx26或Cx31

的抗体进行WB检测蛋白质。

1.3 统计学方法 采用GraphPad Prism 6.0和SPSS 11.0软件对实验数据统计分析,进行单因素方差分析One-Way ANOVA,并用Student's *t*检验进行差异比较分析,*P* < 0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 sanger 测序筛选出 GJB2 突变引起 NPPK GJB2 基因核苷酸序列第584位碱基由C突变成T(c.548C > T)发生了突变,导致编码的蛋白第183位的丝氨酸被苯丙氨酸取代(p.Ser183Phe)。NPPK病人的父母均为GJB2p.Ser183Phe杂合子突变携带者,100个与该家族不相关的正常汉族人中没有检测到p.Ser183Phe突变位点。

2.2 Cx26 突变体无功能且抑制野生型连接蛋白 Cx31 已有研究证实Cx31突变体可引起严重的皮肤病,当其与野生型Cx31共表达时,通道电导率降低,影响间隙连接通道的能力^[13]。因此我们猜测Cx26突变体可能通过与Cx31互相作用从而出现NPPK。为证实这一点,Cx26-S183F及其他表皮连接蛋白在非洲爪蟾卵母细胞中表达及Cx31在非洲爪蟾卵母细胞中表达,检测间隙连接电导G_j。用水注射的卵母细胞阴性对照组的电导几乎可忽略(G_j = 0.18 μS),而只注射Cx26的细胞的平均G_j为8.6 μS。在单独注射Cx26-S183F的卵母细胞中测量的电导与阴性对照组细胞相同(G_j = 0.13 μS),说明功能丧失。当共同注射Cx26-S183F和Cx26时,平均电导为2.9 μS,显著低于单独注射Cx26的(*P* < 0.05,图1A)。Cx26-S183F还显示出对Cx31的反式显性抑制,当两者都存在于卵母细胞中时,Cx26-S183F显著抑制Cx31(G_j = 0.77 μS, *P* < 0.05,图1B)。结果表明Cx26-S183F能有效抑制野生型Cx31,Cx26突变体与Cx31互作可能会产生NPPK。

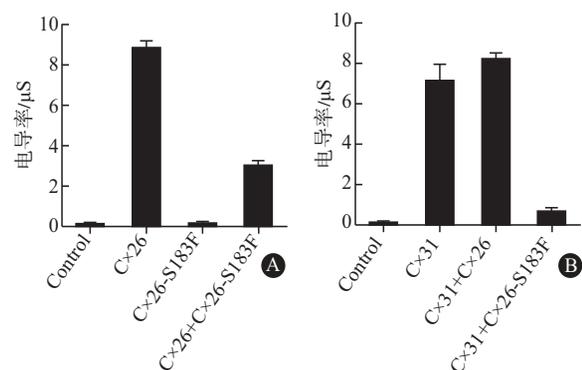


图1 检测各处理组(注入水、Cx26、Cx26-S183F、Cx26-S183F+Cx26)卵母细胞的间隙连接的电导率:A为检测野生型Cx26、Cx26突变体及Cx26-S183F+Cx26的电导率,B为检测野生型Cx31、Cx31+Cx26及Cx31+Cx26-S183F的电导率

2.3 突变蛋白表达缺失不会引起电导率的降低
用蛋白质印迹法检测野生型和突变体连接蛋白的表达。结果显示,注射 Cx31、Cx31+Cx26、Cx31+Cx26-S183F 的处理组中均检测到 Cx31 蛋白(31kDa)(图 2A),灰度值分析表明各处理之间差异无统计学意义($P > 0.05$,图 2B)。同理,在 Cx26、Cx31+Cx26、Cx26-S183F、Cx26+Cx26-S183F 及 Cx31+Cx26-S183F 处理组中均检测到 Cx26(26kDa)(图 2C),且表达量一致,定量分析显示各处理组之间差异无统计学意义($P > 0.05$,图 2D)。说明 Cx26-S183F 突变体存在时功能活性的丧失与 Cx31 的翻译效率无关。

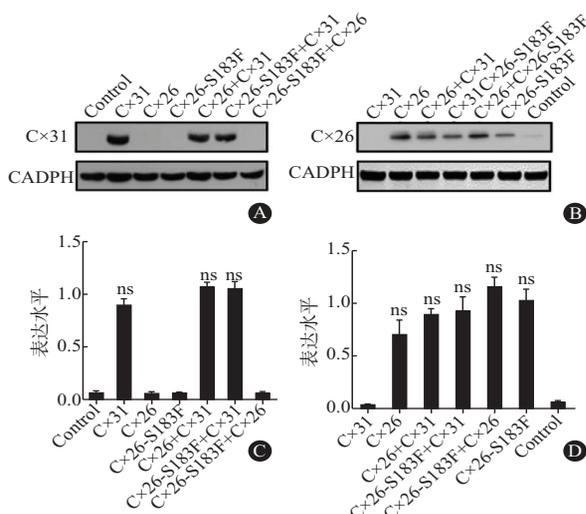


图2 蛋白质印迹法检测长岛型掌跖角化症(NPPK)突变体及野生型Cx31的表达水平:A为WB检测各处理组中Cx31的表达情况;B为WB检测各处理组中Cx26的表达情况;C为量化分析Cx31的蛋白表达量;D为量化分析Cx26的蛋白表达量

2.4 Cx26 突变体与 Cx31 的互相作用 为了证实 Cx26 突变体和 Cx31 可能形成异型通道,我们对共表达 Cx31 和 Cx26 突变体的细胞进行免疫共沉淀实验。结果表明,在 Cx26 相关样品中检测到 Cx26 蛋白,而在含有 Cx31 的样品中均检测到 Cx31 蛋白(图 3A 和图 3B),说明细胞裂解液可进行后续 CO-IP 实验。CO-IP 显示 Cx26 蛋白在野生型和突变体样品中有表达,Cx26+Cx31 样品在 31kDa 出现较弱的条带,说明野生型 Cx26 与 Cx31 结合较弱。共表达 Cx31 和 Cx26-S183F 样品中蛋白的表达量较高,表明 Cx26 突变体蛋白与 Cx31 发生免疫共沉淀(图 3C)。

2.5 Cx26 突变体不能形成功能性半通道 KID 综合征突变体单独存在时通常形成活跃的半通道^[14-16],而 NPPK 突变是否会出现类似的情况,为证实这一结果,在单个卵母细胞中表达 Cx26 和 Cx26-S183F 来分析半通道活性。结果显示,注射水的卵母细胞对照在所有电压阶段被限流(图 4A),Cx26

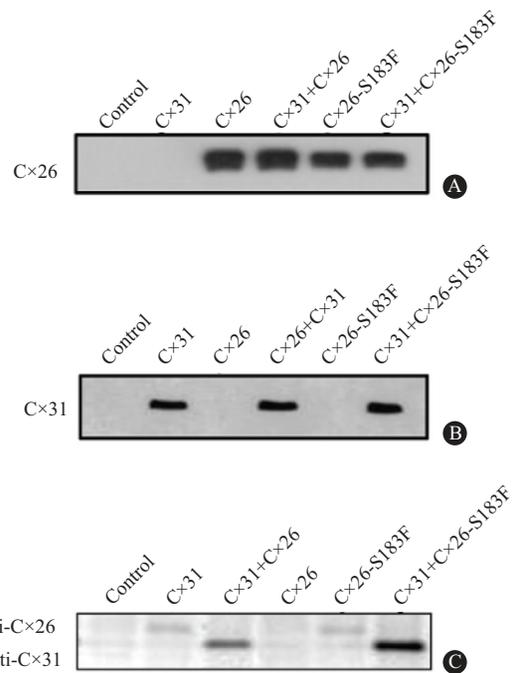


图3 免疫共沉淀(CO-IP)检测长岛型掌跖角化症(NPPK)中Cx26突变体与Cx31的互作情况:A和B分别为WB检测细胞裂解液中Cx31、Cx26的表达情况;C为CO-IP检测Cx26突变体与Cx31的互相作用

半通道活性在去极化时出现外向电流(图 4B),与注射 Cx26 的细胞相比,Cx26-S183F 的膜电流显著地降低(图 4C)。以平均膜电流和膜电压作图,表达 Cx26 的细胞出现较高的外向电流,并随着去极化的增加而增加,在+60mV 时,Cx26 产生的电流显著高于对照及 Cx26-S183F 突变体($P < 0.05$,图 4D)。结果说明,注射突变体的细胞天然半通道活性丧失,Cx26-S183F 与野生型 Cx26 的共表达导致半通道活性降低。

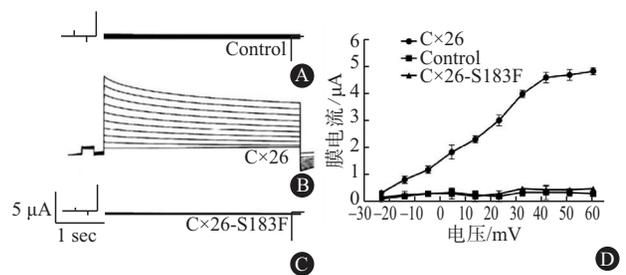


图4 膜片钳实验检测长岛型掌跖角化症(NPPK)野生型Cx26和突变体的膜电流:A为检测注射水的对照组卵母细胞的电流,B为检测单独注射Cx26的卵母细胞的电流,C为检测单独注射Cx26突变体的卵母细胞的电流,D为半通道I-V曲线图

2.6 Cx26 突变体能增强 Cx31 半通道 CO-IP 实验证明 Cx31 与异型半通道中的 Cx26 突变体结合,从而导致 Cx26 NPPK 突变体改变了 Cx31 的活性。因此验证了 Cx26-S183F 是否也会影响 Cx31 半通道活性。结果显示,单独注射 Cx31 的卵母细胞没有半通道活性(图 5A),由 Cx31 和 Cx26-S183F 组成的异型

半通道出现较高的电流(图5B)。以电流和电压作图,结果发现在电压的增加下,共表达Cx26-S183F和Cx31的细胞中的半通道活性显著增加,说明具有半通道功能。Cx31和Cx26-S183F共表达细胞产生的电流在-30、-20、-10、0、10、20、30、40、50、60 mV分别达到0.135、0.21、0.235、0.3、0.315、0.38、0.40、0.41、0.44、0.46 μA ,显著高于单独表达Cx31的细胞产生的电流($P=0.0316$,图5C)。这些结果说明,当共表达形成异型连接子时,Cx31和Cx26突变体能够形成功能性半通道。

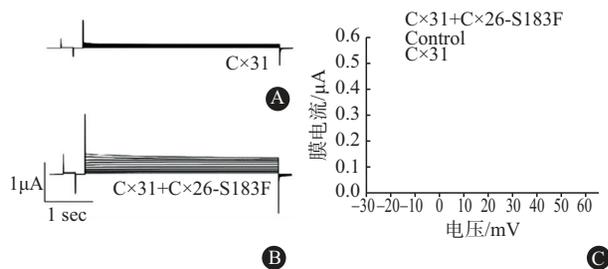


图5 膜片钳实验检测长岛型掌跖角化症(NPPK)Cx31和Cx26-S183F共表达时的膜电流:A为检测单独注射Cx31的卵母细胞的电流,B为检测注射Cx26-S183F+Cx31的卵母细胞的电流,C为半通道I-V曲线图

3 讨论

NPPK由丝氨酸蛋白酶抑制剂B7(SERPINB7)基因突变引起。在本实验中,测序发现2例病人的NPPK并不是由SERPINB7突变引起,通过测序发现一个与NPPK发生相关的GJB2突变。

当单独表达时,Cx26-S183F不能形成功能性同源半通道或间隙连接,但与Cx31共表达后,降低了Cx31间隙连接的活性,并增加了半通道活性。Cx31和Cx26突变体的免疫共沉淀显示形成异型连接子,Cx26突变体具有修饰Cx31半通道和缝隙连接的能力。

目前,大量研究表明间隙连接半通道在病理条件下能开放,为细胞间的物质交换提供通路。间隙连接半通道过量或长时间的开放会导致离子调节的失常,细胞内ATP浓度的变化和代谢产物丢失,最终导致细胞死亡^[17]。不同间隙连接蛋白基因的突变可以导致同一种遗传学疾病,已有研究发现,Cx26突变与Cx43互作会引起掌跖角化病^[18]。本研究发现了Cx26-S183F与Cx31共表达会增强间隙连接半通道活性,从而引起NPPK。

Cx31在表皮上表达,而且Cx31突变会引起遗传性皮肤病,被称为变异型红皮肤角化病(EKV),其特征为躯干和四肢的皮肤过度角化,并伴有红斑出现^[19]。研究发现,与Cx26突变相关的引起的皮肤病

有KID综合征、PPK、先天性耳聋伴发角质厚皮病等^[20-23]。目前为止关于Cx26突变引起皮肤病的机制有两种:(1)抑制其他角质形成细胞连接蛋白;(2)异常的半通道的形成。反式显性负效应作用会减少连接蛋白类型的数量从而影响表皮细胞间通讯,导致通道功能异常,而活跃的半通道会产生代谢物向细胞外释放,可能对邻近细胞产生不利影响,从而引发细胞凋亡^[24]。

在Cx26和Cx31突变引起皮肤病的病人中,观察两者之间的临床特征存在相似性。四肢出现过度角化病变,这表明可能与NPPK出现的机制相似。除此之外,还有Cx26突变引起的Bart-Pumphrey综合征KHLS也有相似的临床症状,包括角化过度和白细胞减少症^[25]。尽管症状相似,但仍需要进一步研究突变体确认其相关机制,Cx31-G8V突变的表达导致半通道的形成,允许钙离子流入细胞,从而造成KHLS^[26]。有研究发现Cx30.3突体会引起变异型红皮肤角化病(EKV),当Cx31和Cx30.3-F137L共同转染时,在细胞膜上检测到与Cx31形成间隙连接,并能形成异聚体连接子^[27]。最近的一项研究表明,造成KID形成的Cx26-S17F突变体存在的情况下,Cx31半通道活性增加^[28]。这与我们的研究结果一致,Cx26-S183F不能单独形成半通道或间隙连接,但在与Cx31共表达时可以增强半通道活性,从而引起NPPK。

这些研究结果表明Cx26在皮肤疾病中的重要性,并进一步突出了Cx26突变体和Cx31互相作用在遗传性皮肤病中的作用机制,为进一步治疗皮肤病提供一定的理论基础。

参考文献

- [1] NONOMURA Y, OTSUKA A, MIYACHI Y, et al. Suspected nagashima-type palmoplantar keratosis with atypical hyperkeratotic lesions on the ears [J]. *European Journal of Dermatology Ejd*, 2012, 22(3):392-393.
- [2] KABASHIMA K, SAKABE J, YAMADA Y, et al. "Nagashima-type" keratosis as a novel entity in the palmoplantar keratoderma category [J]. *Archives of Dermatology*, 2008, 144(3):375-379.
- [3] BLANPAIN C, FUCHS E. Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10(3):207-217.
- [4] KAM E, MELVILLE L, PITTS JD. Patterns of junctional communication in skin [J]. *Journal of Investigative Dermatology*, 1986, 87(6):748-753.
- [5] BAKIRTZIS G, CHOUDHRY R, AASEN T, et al. Targeted epidermal expression of mutant connexin 26 (D66H) mimics true vohwinkel syndrome and provides a model for the pathogenesis of dominant connexin disorders [J]. *Hum Mol Genet*, 2003, 12(14):

- 1737-1744.
- [6] RICHARD G, BROWN N, ISHIDA -YAMAMOTO A, et al. Expanding the phenotypic spectrum of Cx26 disorders: bart-pumphrey syndrome is caused by a novel missense mutation in GJB2 [J]. *J Invest Dermatol*, 2004, 123(5):856-863.
- [7] ZELANTE L, GASPARINI P, ESTIVILL X, et al. Connexin26 mutations associated with the most common form of non-syndromic neurosensory autosomal recessive deafness (dfnb1) in mediterraneans [J]. *Human Molecular Genetics*, 1997, 6(9):1605-1609.
- [8] COMMON JE, O'TOOLE EA, LEIGH IM, et al. Clinical and genetic heterogeneity of erythrokeratoderma variabilis [J]. *J Invest Dermatol*, 2005, 125(5):920-927.
- [9] DEROSA AM, MEŞE G, LI L, et al. The cataract causing Cx50-S50P mutant inhibits Cx43 and intercellular communication in the lens epithelium [J]. *Experimental Cell Research*, 2009, 315(6):1063-1075.
- [10] HORTON R M, CAI Z L, HO S N, et al. Gene splicing by overlap extension: tailor-made genes using the polymerase chain reaction [J]. *Biotechniques*, 1990, 8(5):528-535.
- [11] MHASKE PV, LEVIT NA, LI L, et al. The human Cx26-D50A and Cx26-A88V mutations causing keratitis-ichthyosis-deafness syndrome display increased hemichannel activity [J]. *American Journal of Physiology Cell Physiology*, 2013, 304(12):C1150-C1158.
- [12] BRUZZONE R, HAEFLIGER JA, GIMLICH RL, et al. Connexin40, a component of gap junctions in vascular endothelium, is restricted in its ability to interact with other connexins [J]. *Molecular Biology of the Cell*, 1993, 4(1):7-20.
- [13] ROUAN F, LO CW, FERTALA A, et al. Divergent effects of two sequence variants of GJB3 (G12D and R32W) on the function of connexin 31 in vitro [J]. *Exp Dermatol*, 2003, 12(2):191-197.
- [14] GERIDO DA, DEROSA AM, RICHARD G, et al. Aberrant hemichannel properties of Cx26 mutations causing skin disease and deafness [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2007, 293(1):C337-C345.
- [15] SÁNCHEZ HA, MEŞE G, SRINIVAS M, et al. Differentially altered Ca²⁺ regulation and Ca²⁺ permeability in Cx26 hemichannels formed by the A40V and G45E mutations that cause keratitis ichthyosis deafness syndrome [J]. *Journal of General Physiology*, 2010, 136(1):47-62.
- [16] STONG BC, CHANG Q, SHOEB A, et al. A novel mechanism for connexin 26 mutation linked deafness: cell death caused by leaky gap junction hemichannels [J]. *Laryngoscope*, 2006, 116(12):2205-2210.
- [17] ORELLANA JA, VON BERNHARDI R, GIAUME C, et al. Glial hemichannels and their involvement in aging and neurodegenerative diseases [J]. *Reviews in the Neurosciences*, 2012, 23(2):163-177.
- [18] SHUJA Z, LI L, GUPTA S, et al. Connexin26 mutations causing palmoplantar keratoderma and deafness interact with connexin43, modifying gap junction and hemichannel properties [J]. *Journal of Investigative Dermatology*, 2016, 136(1):225-235.
- [19] RICHARD G, SMITH L E, BAILEY R A, et al. Mutations in the human connexin gene GJB3 cause erythrokeratoderma variabilis [J]. *Nature Genetics*, 1998, 20(4):366-369.
- [20] BONDESON ML, NYSTRÖM AM, GUNNARSSON U, et al. Connexin 26 (GJB2) mutations in two swedish patients with atypical vohwinkel (mutilating keratoderma plus deafness) and KID syndrome both extensively treated with acitretin [J]. *Acta Derm Venereol*, 2006, 86(6):503-508.
- [21] ZHOU F, FU H, LIU L, et al. No exonic mutations at GJB2, GJB3, GJB4, GJB6, ARS (Component B), and LOR genes responsible for a Chinese patient affected by progressive symmetric erythrokeratoderma with pseudoainhum [J]. *International Journal of Dermatology*, 2014, 53(9):1111-1113.
- [22] GARCÍA IE, BOSEN F, MUJICA P, et al. From hyperactive connexin26 hemichannels to impairments in epidermal calcium gradient and permeability barrier in the keratitis-ichthyosis-deafness syndrome [J]. *J Invest Dermatol*, 2016, 136(3):574-583.
- [23] BOUSFIHA A, BAKHCHANE A, ELRHARCHI S, et al. Intra-familial phenotypic variability in a moroccan family with hearing loss and palmoplantar keratoderma (PPK) [J]. *Current Research in Translational Medicine*, 2016, 64(2):61-64.
- [24] KOVAL M. Pathways and control of connexin oligomerization [J]. *Trends Cell Biol*, 2006, 16(3):159-166.
- [25] BART RS, PUMPHREY RE. Knuckle pads, leukonychia and deafness. A dominantly inherited syndrome [J]. *New England Journal of Medicine*, 1967, 276(4):202-207.
- [26] WANG H, CAO X, LIN Z, et al. Exome sequencing reveals mutation in GJA1 as a cause of keratoderma-hypotrichosis-leukonychia totalis syndrome [J]. *Human Molecular Genetics*, 2015, 24(1):243-250.
- [27] PLANTARD L, HUBER M, MACARI F, et al. Molecular interaction of connexin 30.3 and connexin 31 suggests a dominant-negative mechanism associated with erythrokeratoderma variabilis [J]. *Human Molecular Genetics*, 2003, 12(24):3287-3294.
- [28] GARCÍA IE, MARIPILLÁN J, JARA O, et al. Keratitis-ichthyosis-deafness syndrome-associated Cx26 mutants produce nonfunctional gap junctions but hyperactive hemichannels when co-expressed with wild type Cx43 [J]. *Journal of Investigative Dermatology*, 2015, 135(5):1338-1347.

(收稿日期:2018-08-21,修回日期:2019-03-23)