

# 先天性白内障一患病家系的致病基因筛查

杨晓波, 陈丽娟, 李娟

作者单位: (157000) 中国黑龙江省牡丹江市, 牡丹江医学院红旗医院眼二科

作者简介: 杨晓波, 女, 主任医师, 研究方向: 白内障、青光眼。

通讯作者: 陈丽娟, 女, 本科, 住院医师, 研究方向: 白内障、青光眼. chenlijuan0719@sina.com

收稿日期: 2011-11-11 修回日期: 2012-01-04

## Disease-causing genes screening for a family of congenital cataract

Xiao-Bo Yang, Li-Juan Chen, Juan Li

Second Department of Ophthalmology, Hongqi Hospital of Mudanjiang Medical College, Mudanjiang 157000, Heilongjiang Province, China

**Correspondence to:** Li-Juan Chen. Second Department of Ophthalmology, Hongqi Hospital of Mudanjiang Medical College, Mudanjiang 157000, Heilongjiang Province, China. chenlijuan0719@sina.com

Received: 2011-11-11 Accepted: 2012-01-04

### Abstract

• **AIM:** To conduct a screening of disease-causing genes mutations for a sick family of congenital nuclear cataract in order to explore its potential genetic defects.

• **METHODS:** After a detailed history taking and clinical examination, mutation detection of the candidate genes for nuclear cataract was conducted with the application of PCR-direct sequencing on the proband and the other 9 patients of his family, 11 blood-related normal family members and 20 unrelated normal controls.

• **RESULTS:** c. 139G > A heterozygous missense mutation was found in GJA8 gene of this family patients, leading to the change of No. 47 highly conserved aspartic acid into asparagine (p. D47N), but the normal family members and normal controls were not found in the mutant.

• **CONCLUSION:** p. D47N mutations in Chinese families of congenital cataract is the first report. The prevalence of this mutation is a potential genetic causes of this sick family, GJA8 gene is one of the congenital cataract disease-causing genes. This study also confirms that congenital cataract is a clinically and genetically heterogeneous disease, such a heterogeneity is more apparent especially between different ethnic groups.

• **KEYWORDS:** congenital cataract; mutation; GJA8 gene

Yang XB, Chen LJ, Li J. Disease-causing genes screening for a family of congenital cataract. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2012;12(2):329-332

### 摘要

**目的:**对先天性核型白内障一患病家系进行致病基因突变筛查,以探索其潜在遗传学缺陷。

**方法:**经过详细的病史采集及临床检查后,应用PCR直接测序法对先证者及其家系内其他9例患者和11名有血缘关系的正常家系成员以及20名无血缘关系的正常对照者进行核型白内障候选基因的突变检测。

**结果:**在该家系患者的GJA8基因发现了c. 139G > A的杂合错义突变,导致第47位高度保守的天冬氨酸改变为天冬酰胺(p. D47N),而家系内正常成员及正常对照者中均未发现该突变。

**结论:**p. D47N突变在中国先天性白内障家系中是首次报道。这一突变是该患病家系的潜在遗传学病因,GJA8基因是先天性白内障的致病基因之一。本研究也证实了先天性白内障是一种临床和遗传异质性疾病,特别是在不同种族之间这种异质性更加明显。

**关键词:**先天性白内障;突变;GJA8基因

DOI:10. 3969/j. issn. 1672-5123. 2012. 02. 43

杨晓波,陈丽娟,李娟. 先天性白内障一患病家系的致病基因筛查. 国际眼科杂志 2012;12(2):329-332

### 0 引言

先天性白内障是一种常见的视觉障碍性眼病,占全世界儿童致盲因素的百分之十。约有1/3先天性白内障是遗传性的。遗传性先天性白内障可只表现为晶状体的单一混浊,也可伴发眼部及其他系统的先天性异常。其遗传方式有三种,既常染色体显性、常染色体隐性及X连锁隐性遗传,其中以常染色体显性先天性白内障(autosomal dominant congenital cataract, ADCC)最为常见。定位致病基因位点及其候选基因是研究先天性白内障分子遗传学缺陷的关键步骤。迄今为止,国内外学者共发表了130余篇关于先天性白内障基因突变筛查的文献报道,共提及了30多个位点、24个基因与先天性白内障的发生有关<sup>[1]</sup>。这些基因包括9个编码晶状体结构蛋白的基因(CRYAA, CRYAB, CRYBA1/A3, CRYBA4, CRYBB1, CRYBB2, CRYGC, CRYGD, CRYGS);5个编码晶状体膜蛋白的基因(GJA3, GJA8, MIP, LIM2, TMEM114);2个编码晶状体发育过程中调控蛋白的基因(PAX6, PITX3);2个编码转录因子的基因(HSF4, MAF);及其它类别的基因(BFSP2, FTL, CHMP4B, EPHA2, VIM, GALK1)。另外,还有一些位点与先天性白内障连锁,但突变的基因尚未鉴定出。本研究中我们对1例涉及4代9例患者的ADCC中国家系进行致病基因突变筛查,现将结果报告如下。

### 1 对象和方法

**1.1 对象** 收集黑龙江省常染色体显性先天性白内障一家系5代共62人。本研究遵循赫尔辛基宣言,在知情同意的情况下,对家系中9例患者及11例有血缘关系的正

表1 核性先天性白内障候选基因的引物序列、退火温度和扩增片段

外显子名称	正向引物(5'-3')	反向引物(5'-3')	目的片段长度(bp)	退火温度(℃)
CRYAA-1	AGCAGCCTTCTTCATGAGC	CAAGACCAGAGTCCATCG	584	60.6
CRYAA-2	GGCAGGTGACCGAAGCATC	GAAGGCATGGTGCAGGTG	550	61.9
CRYAA-3	GCAGCTTCTCTGGCATGG	GGGAAGCAAAGGAAGACAGA	511	60
CRYBA1-1	GGCAGAGGGAGAGCAGAGTG	CACTAGGCAGGAGAAGTGGG	550	57.5
CRYBA1-2	AGTGAGCAGCAGAGCCAGAA	GGTCAGTCACTGCCTTATGG	508	60.3
CRYBA1-3	AAGCACAGAGTCAGACTGAAGT	CCCCTGTCTGAAGGGACCTG	463	63.8
CRYBA1-4	GTACAGCTCTACTGGGATTG	ACTGATGATAAATAGCATGAACG	355	61.7
CRYBA1-5	GAATGATAGCCATAGCACTAG	TACCGATACGTATGAAATCTGA	597	56.9
CRYBA1-6	CATCTCATACCATTGTGTTGAG	CATCTCATACCATTGTGTTGAG	528	59.1
CRYGC-1	TGCATAAAATCCCCTTACCG	CCTCCCTGTAACCCACATTG	514	59.2
CRYGC-2	TGGTTGGACAAATTCTGGAAG	CCCACCCATTCACTTCTTA	430	60.2
CRYGD-1	CAGCAGCCCTCCTGCTAT	GGGTCTGACTTGAGGATGT	550	60.3
CRYGD-2	GCTTTTCTTCTCTTTTATTTCTGG	AAGAAAGACACAAGCAAATCAGT	308	58.5
CRYGS-1	GAAACCATCAATAGCGTCTAAATG	TGAAAAGCGGGTAGGCTAAA	575	54.8
CRYGS-2	AATTAAGCCACCCAGCTCCT	GGGAGTACACAGTCCCCAGA	479	53.1
CRYGS-3	GACCTGCTGGTGATTTCAT	CACTGTGGCGAGCACTGTAT	974	52.5
GJA8-1	CCGCGTTAGCAAAAACAGAT	CCTCCATGCGGACGTAGT	420	56
GJA8-2	GCAGATCATCTTCGTCTCCA	GGCCACAGACAACATGAACA	330	60
GJA8-3	CCAGGGAGAAAACCATCTTC	GAGCGTAGGAAGGCAGTCTC	350	58
GJA8-4	TCGAGGAGAAGATCAGCACA	GGCTGCTGGCTTTGCTTAG	500	58
GJA3-1	CGGTGTTTCATGAGCATTTTC	CTCTTCAGCTGCTCCTCCTC	450	58
GJA3-2	GAGGAGGAGCAGCTGAAGAG	AGCGGTGTGCCCATAGTAG	450	58
GJA3-3	TCGGGTTCCCACCCTACTAT	TATCTGCTGGTGGGAAGTGC	300	58
CRYBB2-1	GTTTGGGGCCAGAGGGGAGTGGT	TGGGCTGGGGAGGGACTTTCAGTA	350	60.4
CRYBB2-2	CCTTCAGCATCCTTTGGGTTCTCT	GCAGTTCTAAAAGCTTCATCAGTC	330	58
CRYBB2-3	GTAGCCAGGATTCTGCCATAGGAA	GTGCCCTCTGGAGCATTTCATAGT	360	60
CRYBB2-4	GGCCCCCTCACCCATACTCA	CTTCCCTCCTGCCTCAACCTAATC	230	62
CRYBB2-5	CTTACCCTTGGGAAGTGGAATGG	TCAAAGACCCACAGCAGACAAGTT	600	62
CRYAB-1	AACCCCTGACATCACCATTC	AAGGACTCTCCCGTCTTAGC	250	58
CRYAB-2	CCATCCCATTCCTTACCTT	GCCTCCAAAGCTGATAGCAC	350	60
CRYAB-3	TCTCTCTGCCTCTTTCCTCA	CCTTGGAGCCCTCTAAATCA	400	60
MIP-1	GACTGTCCACCAGACAAGG	GTCAGGGAGTCAGGGCAATA	493	61.4
MIP-2	GGGGAAGCTTTGAGGAGGTA	AAAGTTGGGAAAGGTTTAGGG	300	61.4
MIP-3	GAGAAAGCTGGGGTGCAGTAG	AACCTGCAGTCCACAACCAT	196	58
MIP-4	CCACTAAGGTGGCTGGAAAA	ACCCTCCCACAGTCTCTTT	360	54
PITX3-1	AAGCCAGCGCATATTCTCC	AGAGGTGCATGCTGAGAGGT	459	52.7
PITX3-2	GAAGGAGAGACGGTGTGAGG	GACCTCCTAAGCCACTCGCT	520	64
PITX3-3	CCAGTCAAAATGACCCCACT	GATGAGGTGGCTAGAGACGG	794	64.6
BFSP2-1	GGGATAGGGGAGATTCCAGA	GCCTCAGCCTACTCACAAACC	887	65
BFSP2-2	GCTCCCAGTGACCTTGTCTC	CCTGGGTGATTCTGAGCATT	551	65
BFSP2-3	CTGCACTAACAGTGCCCTCA	GAAGCACAGGCAGACAGATG	550	64.1
BFSP2-4	TCTGTGAAGCCTGTGTCTGG	GCCTCTCACCTTAGCTTGA	480	65
BFSP2-5	TGACTCTCCACAGCAACAGG	GATATTTCCGTGGGGCACTA	481	61.4
BFSP2-6	TTAAGTCATGGCCCAAGGTC	TCCAGGAAGCTTTTCAGCTC	412	51.3
BFSP2-7	AGGGGAAAGCGCTGAGTATATA	CCGAGACGAGACCCTGTATC	326	65

常家系成员进行全面的体格检查,排除其他眼部疾病及系统疾病后,分别采集静脉血 5mL,使用 EDTA 抗凝。门诊随机选取正常对照的外周血共 20 份。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 使用血液基因组 DNA 提取试剂盒(TIANamp Blood DNA Kit, Tiangen Biltch Co. Ltd, Beijing, China)抽提外周静脉血基因组 DNA。紫外分光光度计和 15g/L 琼脂糖凝胶电泳检测样本 DNA 纯度和浓度。

1.2.2 候选基因的引物设计 迄今为止,国内外文献报道的与常染色体显性遗传性先天性核性白内障发病相关的候选致病基因为 13 个,既 CRYAA,CRYAB,CRYBA1/A3,CRYBB1,CRYBB2,CRYGC,CRYGD,CRYGS,GJA3,GJA8,MIP,BFSP2,PITX3。利用 PRIMER 3 软件对以上基因设计引物,由上海英骏生物工程技术有限公司合成(表 1)。

1.2.3 PCR 扩增及 DNA 测序 PCR 反应体系为 25μL,其中 10 × 缓冲液 2.5μL,dNTP(2.5mmol/L)2μL,上下游引物

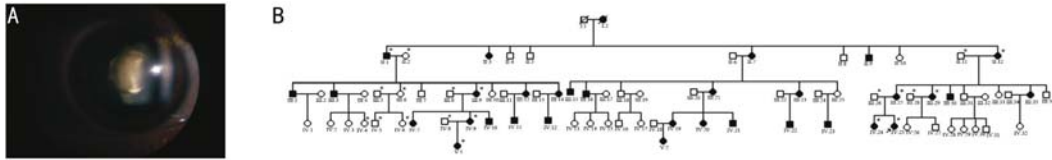


图1 患者资料 A:先证者眼前节照片;B:家系图。

(10 $\mu$ mol/L)各0.5 $\mu$ L,基因组DNA(100ng/ $\mu$ L)1.5 $\mu$ L,LA Taq DNA聚合酶(5U/ $\mu$ L)0.25 $\mu$ L,双蒸水17.75 $\mu$ L。反应条件:95 $^{\circ}$ C 5min;95 $^{\circ}$ C 20s,引物退火温度30s,72 $^{\circ}$ C 30s,循环35次;最后72 $^{\circ}$ C延伸10min。随后15g/L琼脂糖凝胶电泳检验PCR产物的扩增是否有效。将合格的PCR产物送测序公司(上海英骏生物技术有限公司)进行纯化及DNA序列测定。测序结果与GenBank中原始序列进行比对,寻找碱基序列的改变。如有改变并排除了单核苷酸多态性的可能后,再与该家系中正常成员进行对比,以确定这种碱基序列的改变在该家系中是可共分离的。

**1.2.4 蛋白结构功能预测** 利用PolyPhen在线软件(<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>)预测氨基酸的改变对蛋白的空间构想及功能的影响。

## 2 结果

**2.1 临床表现** 经详细的系谱调查,该家系遗传方式符合常染色体显性遗传特征。患者眼部检查表型均为晶状体点状核性混浊,且无其他眼部及全身疾病(图1)。

**2.2 测序结果** 经过测序及序列对比分析,在家系先证者的GJA8基因发现了c.139G>A的杂合错义突变。此突变导致了编码的第47位氨基酸由天冬氨酸至天冬酰胺的改变,即D47N突变。经过PCR-正反双向测序证实该突变存在于家系中的所有患者,但不存在于其他正常家系成员,也不存在于20名正常对照者(图2)。

**2.3 功能预测结果** PolyPhen在线软件的预测结果为“破坏蛋白的空间构想及功能”。

## 3 讨论

GJA8基因(NM\_005267)位于1q21.1,编码一个由433个氨基酸组成的蛋白质——缝隙连接蛋白50,简称Cx50。Cx50是缝隙连接蛋白家族中的一员,表达于晶状体纤维细胞膜上。其功能为在细胞间传导离子、分子量小于1000Da的小分子物质等。Cx50蛋白四次跨膜,形成两个细胞外环(E1,E2),一个胞质内环及位于胞质内的N-末端和C-末端。相邻细胞外环相互作用形成一个六聚体叫做连接子。相邻细胞间的两个连接子再相互连接,于是形成了细胞间的缝隙连接通道。因为晶状体是无血管的组织,所以它必须依靠这些缝隙连接通道形成的细胞间广泛的通讯网来运输营养物质及细胞代谢产物,以保持晶状体的内稳态及透明性<sup>[2]</sup>。细胞外环不但是形成连接子的重要部位,而且细胞外环1(E1)还参与调控细胞间电阻高低以利于离子物质在细胞间的通透及通道的开放,对传递细胞间的生物信息至关重要<sup>[3]</sup>。研究中发现的c.139G>A错义突变导致了编码Cx50蛋白的第47位氨基酸由带正电荷的天冬氨酸变成了不带电荷的天冬酰胺,而且GJA8基因的第47位天冬氨酸在各物种之间是高度保守的(图3)。生物学软件预测结果显示D47N突变体会引发蛋白质空间构想的改变和蛋白质表面极性的改变。由于D47N突变体位于Cx50蛋白的细胞外环1,而细胞外环是形成连接子的重要部位,那么有突变的连接子形成的缝隙

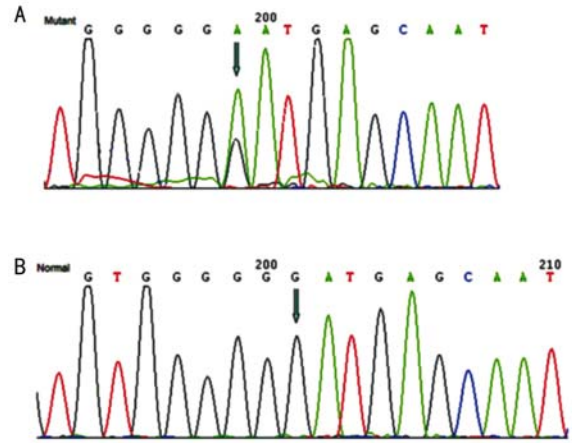


图2 GJA8基因外显子c.139G>A错义突变测序图 A:箭头所示为患者的杂合突变碱基(G/A);B:箭头所示为正常人的对照碱基。

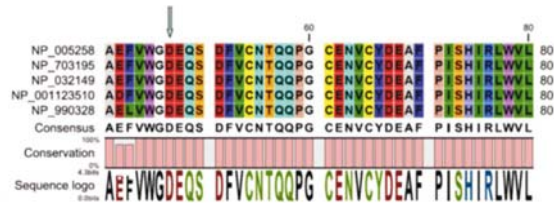


图3 多物种GJA8基因编码氨基酸序列对比结果 多序列对比显示GJA8基因编码的第47位氨基酸(箭头所示)在哺乳动物完全保守。

表2 先天性白内障GJA8基因突变谱

突变位点	临床表现	种族	遗传方式	参考文献
p. R23T	核性	伊朗	AD	[5]
p. I31T	核性	中国	AD	[6]
p. V44E	核性、小角膜	印度	AD	[7]
p. W45S	水母状	印度	AD	[8]
p. D47Y	核性	中国	AD	[9]
p. D47N	点状、核性	中国	AD	本文
p. D47N	粉尘状、核性	英国	AD	[4]
p. E48K	带状、粉尘状	巴基斯坦	AD	[10]
p. V64G	核性	中国	AD	[11]
p. V79L	满月性、缝性	印度	AD	[12]
p. P88S	带状、粉尘状	英国	AD	[13]
p. P88Q	气球样、缝状	印度	AD	[14]
p. P88Q	粉尘状、核性	印度	AD	[15]
p. P189L	星状、小角膜	丹麦	AD	[16]
p. R198W	核性、小角膜	中国	AD	[1]
p. R198Q	核性、小角膜	印度	AD	[7]
p. 203fs	全白内障	印度	AR	[17]
p. S276F	粉尘状、核性	中国	AD	[18]
c. 776insG	三角形、核性	德国	AR	[19]

连接通道将会破坏细胞间的通讯网,继而影响晶状体的透  
明性,导致白内障的发生。

到目前为止,国内外已报道的与先天性白内障发生有  
关的 GJA8 基因突变位点有 16 处,如表 2 所示,其中大部  
分先天性白内障家系的表型为晶状体核性混浊<sup>[1-19]</sup>。本  
研究中白内障家系的患者晶状体混浊的形态呈点状核性,  
引起该家系患病的遗传学发病机制是 GJA8 基因的  
p. D47N 杂合错义突变。这与 2008 年 Arora 等<sup>[4]</sup>在一英国  
先天性白内障家系中发现的基因突变位点是一致的,只有  
表型上的略微不同。本研究在扩充中国先天性白内障家  
系 GJA8 基因突变谱的同时,进一步证实了先天性白内障  
的遗传异质性,即同一基因突变可有不同的临床表现,而  
同一临床表现可源于不同的治病基因突变,尤其在不同种  
族之间这种异质性更加明显。

GJA8 基因 p. D47N 错义突变在国内首次报道。此发  
现扩充了 GJA8 基因的突变谱;证实了先天性白内障的遗  
传异质性。有利于我们对 GJA8 致先天性白内障发病机  
制的进一步认知。

#### 参考文献

- 1 Hu S, Wang B, Zhou Z, *et al.* A novel mutation in GJA8 causing cataract-microcornea syndrome in a Chinese pedigree. *Mol Vis* 2010;16:1585-1592
- 2 White TW. Unique and redundant connexin contributions to lens development. *Science* 2002;295:319-320
- 3 Xu X, Ebihara L. Characterization of a Mouse Cx50 Mutation Associated with the No2 Mouse Cataract. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40(8):1844-1850
- 4 Arora A, Minogue PJ, Liu X, *et al.* A novel connexin50 mutation associated with congenital nuclear pulverulent cataracts. *J Med Genet* 2008;45(3):155-160
- 5 Willoughby CE, Arab S, Gandhi R, *et al.* A novel GJA8 mutation in an Iranian family with progressive autosomal dominant congenital nuclear cataract. *J Med Genet* 2003;40:e124
- 6 Wang K, Wang B, Wang J, *et al.* A novel GJA8 mutation (p. I31T) causing autosomal dominant congenital cataract in a Chinese family. *Mol Vis* 2009;15:2813-2820
- 7 Devi RR, Vijayalakshmi P. Novel mutations in GJA8 associated with

- autosomal dominant congenital cataract and microcornea. *Mol Vis* 2006;12:190-195
- 8 Vanita V, Singh JR, Singh D, *et al.* A novel mutation in GJA8 associated with jellyfish-like cataract in a family of Indian origin. *Mol Vis* 2008;14:323-236
- 9 Lin Y, Liu NN, Lei CT, *et al.* A novel GJA8 mutation in a Chinese family with autosomal dominant congenital cataract. *Zhonghua Yi Xue Yi Chan Xue Za Zhi* 2008;25(1):59-62
- 10 Berry V, Mackay D, Khaliq S, *et al.* Connexin 50 mutation in a family with congenital "zonular nuclear" pulverulent cataract of Pakistani origin. *Hum Genet* 1999;105:168-170
- 11 Ma Z, Zheng J, Yang F, *et al.* Two novel mutations of connexin genes in Chinese families with autosomal dominant congenital nuclear cataract. *Br J Ophthalmol* 2005;89:1535-1537
- 12 Vanita V, Hennies HC, Singh D, *et al.* Novel mutation in GJA8 associated with autosomal dominant congenital cataract in a family of Indian origin. *Mol Vis* 2006;12:1217-1222
- 13 Shiels A, Mackay D, Ionides A, *et al.* A missense mutation in the human connexin50 gene (GJA8) underlies autosomal dominant "zonular pulverulent" cataract, on chromosome 1q. *Am J Hum Genet* 1998;62:526-532
- 14 Vantia V, Singh JR, Singh D, *et al.* A mutation in GJA8 (p. P88Q) is associated with "balloon-like" cataract with Y-sutural opacities in a family of Indian origin. *Mol Vis* 2008;14:1171-1175
- 15 Arora A, Minogue PJ, Liu X, *et al.* A novel GJA8 mutation is associated with autosomal dominant lamellar pulverulent cataract: further evidence for gap junction dysfunction in human cataract. *J Med Genet* 2006;43:e2
- 16 Hansen L, Yao W, Eiberg H, *et al.* Genetic heterogeneity in microcornea-cataract: five novel mutations in CRYAA, CRYGD, and GJA8. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:3937-3944
- 17 Ponnamp SPG, Ramesha K, Tejwani S, *et al.* Mutation of the gap junction protein alpha 8 (GJA8) gene causes autosomal recessive cataract. *J Med Genet* 2007;44:e85
- 18 Yan M, Xiong C, Ye SQ, *et al.* A novel connexin 50 (GJA8) mutation in a Chinese family with a dominant congenital pulverulent nuclear cataract. *Mol Vis* 2008;14:418-424
- 19 Schmidt W, Klopp N, Lllig T, *et al.* A novel GJA8 mutation causing a recessive triangular cataract. *Mol Vis* 2008;14:851-856