

# 上皮基底膜角膜营养不良家系的 TGFBI 基因突变 1 例研究

杨晓波, 陈丽娟

作者单位: (157000) 中国黑龙江省牡丹江市医学院附属红旗医院一门诊眼二科

作者简介: 杨晓波, 本科, 主任医师, 研究方向: 白内障、青光眼、眼底病。

通讯作者: 杨晓波. chenlijuan0719@sina.com

收稿日期: 2012-04-27 修回日期: 2012-09-04

## Stufy on the TGFBI gene in a Chinese family with epithelial basement membrane dystrophy

Xiao-Bo Yang, Li-Juan Chen

Department of Second Ophthalmology, First Outpatient of Mudanjiang Medical University Affiliated Hongqi Hospital, Mudanjiang 157000, Heilongjiang Province, China

**Correspondence to:** Xiao - Bo Yang. Department of Second Ophthalmology, First Outpatient of Mudanjiang Medical University Affiliated Hongqi Hospital, Mudanjiang 157000, Heilongjiang Province, China. chenlijuan0719@sina.com

Received: 2012-04-27 Accepted: 2012-09-04

### Abstract

• **AIM:** To identify the mutation within the TGFBI gene in a Chinese family with epithelial basement membrane dystrophy (EBMD).

• **METHODS:** A detailed family history was collected and after full clinical examination, genomic DNA of three affected and four unaffected family members was extracted from peripheral leukocytes. All exons of TGFBI gene were amplified by PCR methods and direct sequencing was carried out for mutation analysis.

• **RESULTS:** A missense mutation c.417C>T in exon 4 of TGFBI led to an amino acid substitution R124C which was responsible for the familial disorder. This change co-segregated with all affected members of the family, but was not detected either in the non-carrier relative or control individuals.

• **CONCLUSION:** This is the first report of the R124C mutation within the TGFBI gene in EBMD. The results broaden the relationship between genotype and phenotype of corneal dystrophy, and establish the foundation for the further molecular genetics studies.

• **KEYWORDS:** TGFBI gene; epithelial basement membrane dystrophy; gene mutation

**Citation:** Yang XB, Chen LJ. Stufy on the TGFBI gene in a Chinese family with epithelial basement membrane dystrophy. *Guoji*

*Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2012;12(10):2029-2032

### 摘要

**目的:**检测 1 例中国上皮基底膜角膜营养不良家系 TGFBI 基因突变类型。

**方法:**经过详细的病史采集及临床检查后,提取先证者及其家系内其他 2 例患者和 4 例有血缘关系的正常家系成员的静脉血白细胞 DNA,应用 PCR 直接测序法对 TGFBI 的 17 个外显子进行候选基因的突变检测。

**结果:**在该家系患者的 TGFBI 基因 4 号外显子发现了 c.417C>T,导致了杂合突变 R124C。家系中正常成员及对照组均未检测到该突变。

**结论:**本研究首次报道了 TGFBI 基因的 R124C 杂合突变导致了上皮基底膜角膜营养不良,拓宽了角膜营养不良的基因型与表现型关系,为进一步的分子遗传学研究奠定了基础。

**关键词:**TGFBI 基因;上皮基底膜角膜营养不良;基因突变  
DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2012.10.72

**引用:**杨晓波,陈丽娟.上皮基底膜角膜营养不良家系的 TGFBI 基因突变 1 例研究. *国际眼科杂志* 2012;12(10):2029-2032

### 0 引言

角膜营养不良是由于正常角膜组织中的细胞在某种突变基因的作用下,导致其结构和功能产生进行性损害的一类遗传性疾病<sup>[1]</sup>。其共同的病理组织学特征为在角膜组织中形成异常的物质沉积。导致角膜明显混浊,引起视力下降。常染色体显性遗传为其主要的遗传方式,此外,常染色体隐性遗传和 X 连锁遗传方式也有报道<sup>[2]</sup>。随着分子遗传学理论及分子生物学技术的迅速发展,角膜营养不良的研究已深入到了染色体和基因水平。迄今为止已报道的与角膜营养不良相关的染色体有 1,4,5,9,10,12,16,17,20,21 和 X 染色体<sup>[3]</sup>;已确定的相关致病基因有: TGFBI, CHST6, K3, K12, M1SI, GSN, COL8A2 和 GLA 等<sup>[3]</sup>。TGFBI 基因(transforming growth factor  $\beta$ -induced gene),转化生长因子诱导基因,是第一个被确定的与角膜营养不良相关的致病基因。其导致的角膜营养不良临床表型也最为多见,包括上皮基底膜营养不良(EBMD)<sup>[4]</sup>、Reis-Bucklers 角膜营养不良(RBCD)<sup>[5]</sup>、颗粒状角膜营养不良<sup>[6]</sup>、格子状角膜营养不良 I 型(LCD I)<sup>[7]</sup>、IIIA 型(LCD IIIA)<sup>[8]</sup>、I/IIIA 型(LCD I/IIIA)<sup>[9]</sup>和 IV 型(LCD IV)<sup>[10]</sup>。其中的上皮基底膜营养不良(EBMD)是较常见的临床表型之一,也称为地图-点状-指纹状营养不良。裂隙灯下可见角膜上皮层及基底膜出现指纹状细小线条、地图样线和灰白色小点或微小囊肿。目前已确定的与 EBMD 相关的 TGFBI 基因突变类型有 L509R 和 R666S<sup>[4]</sup>。

表1 TGFBI 基因的引物序列

外显子	正向引物(5'-3')	反向引物(5'-3')	退火温度(°C)
1	5'-GCGCTCTCACTTCCCTGGAG-3'	5'-GACTACCTGACCTTCCGCAG-3'	54
2	5'-GGTGGACGTGCTGATCATCT-3'	5'-AGCCAGCGTGCATACAGCTT-3'	55
3	5'-CTCTTCCCTTGGCTGTCCAGG-3'	5'-TCCTCTCTCCACCATTCCC-3'	55
4	5'-CCCCAGAGGCCATCCCTCCT-3'	5'-CCGGGCAGACGGAGGTCATC-3'	60
5	5'-TAAACACAGAGTCTGCAGCC-3'	5'-TTCATTATGCACCAAGGGCC-3'	55
6	5'-TGTGTTGACTGCTCATCCTT-3'	5'-CATTACAGGGGAACCTGCTCT-3'	50
7	5'-TTCAGGGAGCACTCCATCTT-3'	5'-ATCTAGCGCACAAATGAGG-3'	55
8	5'-CTTGACCTGAGTCTGTTTGG-3'	5'-GAAAGTCGCCCAAAGATCTCT-3'	52
9	5'-ACTTTTGAACCCACTTTCTC-3'	5'-CAATCTAACAGGGATGCCTT-3'	55
10	5'-TCTGGACCTAACCATCACCC-3'	5'-CAGGAGCATGATTTAGGACC-3'	55
11	5'-CTCGTGGAAGTATAACCAGT-3'	5'-TGGGCAGAAGCTCCACCCGG-3'	55
12	5'-AAATACCTCTCAGCGTGGTG-3'	5'-TCAATCCTTGATGTGCCAAC-3'	56
13	5'-GGGATTAACTCTATCTCCTT-3'	5'-TGTGTATAATTCCATCCTGG-3'	50
14	5'-CTGTTACAGTAAACACTTGCT-3'	5'-CTCTCCACCAACTGCCACAT-3'	55
15	5'-CACTCTGGTCAAACCTGCCT-3'	5'-AGGCTAGGGCGAAACCTAGC-3'	55
16	5'-TCTGCCAAGGCCACCTGAGG-3'	5'-CAGCAGATGGCAGGCTTGGG-3'	60
17	5'-GGGAGATCTGCACCTATTTG-3'	5'-TGGTGCATCTCTCTGTAGT-3'	55

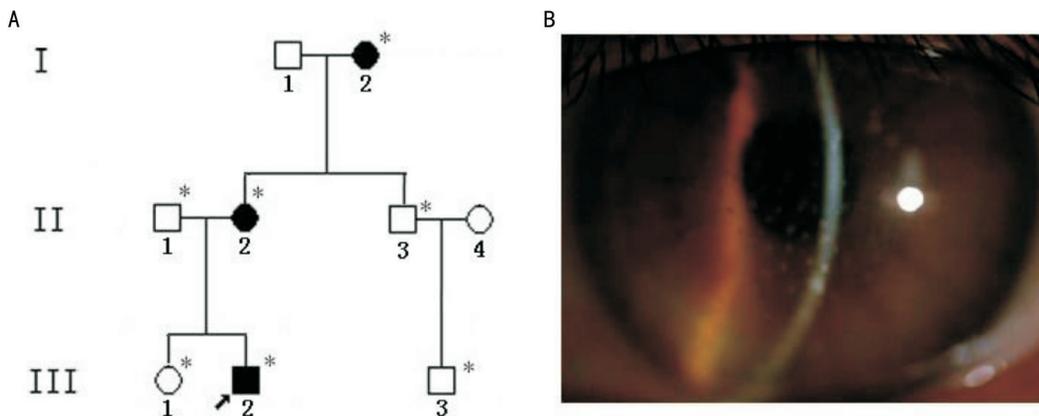


图1 家系遗传图谱及家系角膜裂隙灯检查 A:家系遗传方式符合常染色体显性遗传;B:角膜中央的上皮层及基底膜内灰白色小点,可反复发生上皮剥脱。

本研究中,我们对1例中国地图-点状-指纹状角膜营养不良家系进行分子遗传学分析,以进一步了解我国EBMD患者所存在TGFBI基因突变类型。

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角膜营养不良一家系。遵循医学伦理学原则,在知情同意的情况下,对家系中3例患者及4例有血缘关系的正常家系成员及门诊随机选取的20例正常对照者进行了详细的眼科检查,分别采集静脉血5mL。

1.2 方法

1.2.1 基因组DNA的提取 使用血液基因组DNA提取试剂盒抽提外周血液基因组DNA。紫外分光光度计和1.5%琼脂糖凝胶电泳检测样本DNA纯度和浓度。

1.2.2 候选基因的引物合成 我们参照相关文献的TGFBI基因引物序列<sup>[11]</sup>,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10X缓冲液2.5μL,dNTP(2.5mM)2μL,上下游引物(10μM)各0.5μL、基因组DNA(100ng/μL)1.5μL、DNA

Taq聚合酶(5U/μL)0.25μL,去离子水17.75μL。反应条件:95℃ 5min;95℃ 20s,引物退火温度30s,72℃ 30s,循环35次;最后72℃延伸10min。随后1.5%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分离的。

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(图1A)。患者共同的临床表现为:20岁以前发病,症状表现为眼痛、畏光等刺激症状,渐进性视力下降。先证者裂隙灯检查可见角膜中央的上皮层及基底膜内灰白色小点,可反复发生上皮剥脱(图1B)。其母亲长期反复发作角膜上皮糜烂剥脱,视力严重受损。所有患者经适当的专科检查未发现有其他眼部及全身疾病。

2.2 测序结果 经过测序及序列对比分析,在家系先证者

的 TGFBI 基因发现了 c.417C>T 的杂合错义突变(图 2A),此突变导致了编码的第 124 位氨基酸由精氨酸至半胱氨酸的改变,即 R124C 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 2B)。

### 3 讨论

转化生长因子诱导基因(transforming growth factor  $\beta$ -induced gene, TGFBI)亦称为 BIGH3 基因,是 Skonier 等<sup>[12,13]</sup>1992 年在培养由 TGF- $\beta$  诱导的人肺腺癌细胞中分离得到的,并将此基因定位于人染色体 5q31。TGFBI 基因编码一个由 683 个氨基酸组成的分子量为 68kDa 的蛋白质—角膜上皮蛋白,即 KE(keratoepithelin)蛋白<sup>[14]</sup>。其存在于各种组织中,在眼部主要表达于角膜上皮细胞和基质内角膜细胞中<sup>[15]</sup>。KE 蛋白有 3 个主要的功能结构域,包含一个氨基端的分泌前导信号序列,一个羧基端的位于密码子 622~624 间的 RGD 序列,及中间 4 个由 140 个氨基酸组成的内部重复同源序列(FAS1 结构区)。这些 FAS1 结构区在空间上组成一个有两个结合位点的四聚体结构,每个位点均位于链间二聚体内,这种双价结构可以使单个的角膜上皮蛋白分子结合于两个不同细胞的表面蛋白,参与细胞间通讯和信号传递,起着桥梁作用<sup>[12]</sup>。而多种细胞外基质蛋白中的 RGD 序列均是整合素的配体识别位点,角膜上皮蛋白中的 RGD 序列能与各种整合素相互作用,影响细胞间的黏附功能<sup>[16]</sup>。

由于角膜上皮蛋白的结构特殊性,很多科学家把对 TGFBI 基因突变的研究转入到蛋白功能的研究水平。然而 TGFBI 基因突变导致在角膜组织中形成异常物质沉积的具体机制还不十分明确。Clout 等<sup>[17]</sup>认为基因的突变可能影响了蛋白质间的相互作用。Kim 等<sup>[18]</sup>通过对野生型及突变型 TGFBI 蛋白的分子性能研究显示:野生型 TGFBI 相互聚合成一种纤维状的结构,此结构能加固其与 I 型胶原蛋白、层粘连蛋白及纤维蛋白相互作用。但突变型 TGFBI 蛋白没能显著地影响这种性能,因而认为这些突变体可能需要其它的特殊性角膜因子参与才能导致角膜沉积物的形成。而 Morand 等<sup>[19]</sup>认为,突变后的角膜上皮蛋白可能通过直接作用于细胞受体或间接作用于细胞外基质系统两个途径与周围其他细胞相互作用诱导凋亡。还有研究发现,角膜上皮细胞分泌的最重要的生长因子—TGF- $\beta$ 1 参与细胞间的黏附和爬行,从而调控和维持角膜上皮细胞的正常增生和分化等形态学发生过程。TGFBI 基因突变可能将影响这个过程,从而导致角膜沉积物的形成<sup>[20,21]</sup>。

自 1997 年 Munier 等<sup>[14]</sup>首次对角膜营养不良的 TGFBI 基因突变位点进行了系统研究后,到目前为止,TGFBI 基因突变热点主要位于外显子 4,11,12,14<sup>[22]</sup>。R124 和 R555 是两个最常见的突变位点。R555W,R124C 及 R124H 突变可发生在不同的种族人群中,且认为不存在假定的始祖效应。其中据报道与 TGFBI 基因 R124C 突变相关的角膜营养不良临床表型包括:格子状角膜营养不良 I 型(LCD I),颗粒状角膜营养不良 I 型(CDGG I),Reis-

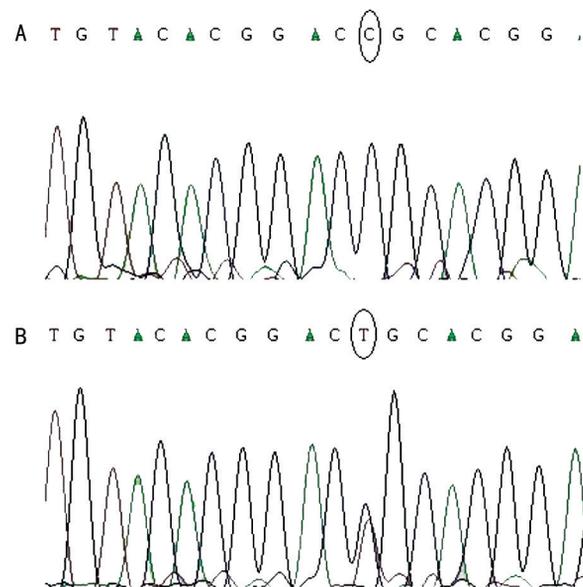


图2 家系测序及序列对比分析 A:TGFBI 基因发现 c.417C>T 的杂合错义突变;B:PCR 正反双向测序证实该突变存在于家系中的所有患者。

Buckler 角膜营养不良,Avellino 角膜营养不良及 Thiel-Behnke 蜂窝状角膜营养不良(CDTB)<sup>[23-27]</sup>。本研究是迄今为止首次报道 R124C 突变为 1 例上皮基底膜营养不良家系的致病原因。上皮基底膜营养不良(EBMD)亦称为地图-点状-指纹状营养不良。以往人们不认为这种疾病具有遗传倾向,直到 Boutboul 等<sup>[4]</sup>于 2006 年在 2 例符合常染色显性遗传方式的 EBMD 患病家系中检测到 TGFBI 基因的 2 个突变位点(R666S 和 L509R)后才被确定 TGFBI 基因是与 EBMD 相关的致病候选基因。现今,我们通过对该 EBMD 家系患者的 TGFBI 基因检测,发现了 R124C 突变位点。拓宽了上皮基底膜营养不良基因型与表现型的关系,进一步证实了角膜营养不良具有一定的遗传异质性。

本研究首次报道了 TGFBI 基因的杂合突变位点 R124C 导致了上皮基底膜角膜营养不良。该突变的发现进一步丰富了目前关于 EBMD 的 TGFBI 基因突变研究范围,并为将来角膜营养不良的分子遗传学研究奠定了基础。

### 参考文献

- 1 陈家祺,袁进.眼科学.北京:人民卫生出版社 2010:190
- 2 Schmid E, Lisch W, Philipp W. A new, X-linked endothelial corneal dystrophy. *Am J Ophthalmol* 2006; 141(3):478-487
- 3 Klintworth GK. The molecular genetics of the corneal dystrophies current status. *Front Biosci* 2003; 8(5):687-713
- 4 Boutboul S, Black GC, Moore JE. A subsets of patients with epithelial basement membrane corneal dystrophy have mutations in TGFBI/BIGH3. *Human Mutation* 2006;27(6):553-557
- 5 Afshari NA, Mullally JE, Afshari MA. Survey of patients with granular, lattice, Avellino, and Reis-Bucklers corneal dystrophies for mutations in the BIGH3 and gelsolin genes. *Arch Ophthalmol* 2001;119(1):16-22
- 6 Kannabiran C, Klintworth GK. TGFBI gene mutations in corneal

dystrophies. *Hum Mutat* 2006; 27(7):615-625

7 Dong WL, Zou LH, Pan ZQ, et al. Molecular genetic study on patients with lattice corneal dystrophy in China. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi* 2005; 41(6):523-526

8 Munier FL, Fruech BE, Othenin-Girard P. BIGH3 mutation spectrum in corneal dystrophies. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43(4):949-954

9 Stewart H, Black GC, Donnai D. A mutation within exon 14 of the TGFB1 (BIGH3) gene on chromosome 5q31 causes an asymmetric, late-onset form of lattice corneal dystrophy. *Ophthalmology* 1999; 106(5):964-970

10 Fujiki K, Hotta Y, Nakayasu K. A new L527R mutation of the beta1GH3 gene in patients with lattice corneal dystrophy with deep stromal opacities. *Hum Genet* 1998;103(3):286-289

11 Li DD, Qi YH, Wang L, et al. An atypical phenotype of Reis-Bucklers corneal dystrophy caused by the G623D mutation in TGFB1. *Mol Vis* 2008;14(8):1298-1302

12 Skonier J, Neubauer M, Madisen L. cDNA cloning and sequence analysis of beta ig-h3, a novel gene induced in a human adenocarcinoma cell line after treatment with transforming growth factor-beta. *DNA Cell Biol* 1992;11(7):511-522

13 Skonier J, Bennett K, Rothwell V, et al. Beta ig-h3: a transforming growth factor-beta-responsive gene encoding a secreted protein that inhibits cell in nude mice. *DNA Cell Biol* 1994;13(6):571-584

14 Munier FL, Korvatska E, Djemai A. Kerato-epithelin mutations in four 5q31-linked corneal dystrophies. *Nat genet* 1997;15(3):247-251

15 葛红岩, 刘平. BIGH3 基因与人角膜营养不良. *国际眼科杂志* 2006;6(6):1386-1389

16 于洁, 邹留河. TGFB1 基因与角膜营养不良. *国外医学眼科学* 2002;26(1):54-58

17 Clout NJ, Hobenester E. A model of FAS1 domain 4 of the corneal

protein beta (ig) -h3 gives a clearer view on corneal dystrophies. *Mol Vis* 2003;9(9):440-448

18 Kim JE, Park RW, Choi JY, et al. Molecular properties of wild-type and mutant beta1G-H3 proteins. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43(3):656-661

19 Morand S, Buchillier V, Maurer F. Induction of apoptosis in human corneal and hela cells by mutated BUGH3. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44(7):2973-2979

20 Ferguson JW, Mikesh MF, Wheeler EF. Developmental expression patterns of Beta-ig (beta1G-H3) and its function as a cell adhesion protein. *Mech Dev* 2003; 120(8):851-864

21 Kim JE, Kim SJ, Lee BH. Identification of motifs for cell adhesion with in the repeated domains of transforming growth factor-beta-induced gene, beta ig-h3. *J Biol Chem* 2000; 275(40):30907-30915

22 Korvatska E, Munier FL, Djemai A. Mutation hot spots in 5q31-linked corneal dystrophies. *Am Hum Genet* 1998;62(2):320-324

23 Romero P, Moraga M, Herrera L. Different phenotypes of lattice corneal dystrophy type I in patients with 417C>T (R14C) and 1762A>G (H572R) mutations in TGFB1 (BIGH3). *Mol Vis* 2010; 16(8):1601-1609

24 Patel DA, Chang SH, Harocopos GJ, et al. Granular and lattice deposits in corneal dystrophy caused by R124C mutation of TGFB1p. *Cornea* 2010;29(11):1215-1222

25 Ma K, Liu G, Yang Y, et al. TGFB1 gene mutation analysis in a Chinese pedigree of Reis-Bucklers corneal dystrophy. *Mol Vis* 2010;16(3):556-561

26 Lisch W, Moller HU. Genotype of lattice corneal dystrophy (R124C mutation in TGFB1) in a patient presenting with features of Avellino corneal dystrophy. *Cornea* 2011; 30(8):949

27 Chang L, Zhiquan W, Shijing D, et al. Arg124Cys mutation of the TGFB1 gene in 2 Chinese families with Thiel-Behnke corneal dystrophy. *Arch Ophthalmol* 2009;127(5):641-644

· 短篇报道 ·

## 阿托品散瞳后检影验光与电脑验光比较分析

夏红玉, 许江涛, 马艳玲, 孙青, 周莹, 郝玉星

作者单位:(650034)中国云南省昆明市儿童医院眼科  
作者简介:夏红玉,女,本科,主治医师,研究方向:斜视、弱视。  
通讯作者:夏红玉. Yuanls74@yahoo.com.cn  
收稿日期:2012-04-26 修回日期:2012-08-31

DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2012.10.73

引用:夏红玉,许江涛,马艳玲,等.阿托品散瞳后检影验光与电脑验光比较分析. *国际眼科杂志* 2012;12(10):2032-2033

### 0 引言

验光在眼科临床实践中有着相当重要的位置,电脑验

光以其方便、快捷、易操作等优越性而被广泛应用,但其测量屈光度的准确性尚需进一步验证。目前检影验光是临床常用的验光方法,其检测的屈光度较为准确,作为临床客观验光的标准被广泛应用,但因其完全是人工操作,比较费时是其弊端。我们使用阿托品眼膏涂眼散瞳使睫状肌麻痹后,静态下分别行检影验光和电脑验光以比较二者之间的差别及准确性,以期提高工作效率,为临床验光寻求快速、理想的方法。

### 1 临床资料

随机抽取2011-02/07至我院门诊验光的患儿727例1454眼,年龄2~14(平均6.74)岁,均为远视、近视、散光患儿,除外其他眼部疾病。所有患儿均先行裂隙灯及眼底检查排除眼部器质性疾病,阿托品眼膏点眼3d,每天3次,充分散瞳使睫状肌麻痹,先用带状光检影镜对其行检影验光,检影距离为1m,嘱患儿注视5m处视标,用镜片法寻找中和点和散光轴及确定散光轴的度数,再行电脑验光,采取自动测量3次模式取其平均值。为了便于比较,近视或远视的散光度按散光最小弥散度折算为球镜屈光度,即以近视或远视散光度数的1/2与原球镜相加<sup>[1]</sup>。计算两种验光的符合率:临床工作中远视屈光度相差≤0.5D