

一青光眼大家系的致病基因筛查研究

刘晓红¹, 杨洁², 刘璐³, 陈晓明⁴, 王云⁵, 牛静宜¹, 刘旭阳⁵

基金项目: 国家自然科学基金(No. 81270993); 深圳市科创委科技创新计划基础研究项目(No. JCYJ20140414093858910)

作者单位:¹(518101) 中国广东省深圳市宝安区人民医院眼科;
²(330046) 中国江西省南昌市, 南昌大学附属眼科医院;
³(510632) 中国广东省广州市, 暨南大学第一临床医学院眼科学专业;
⁴(610041) 中国四川省成都市, 四川大学华西医院眼科;
⁵(518040) 中国广东省深圳市眼科医院

作者简介: 刘晓红, 毕业于南华大学医学院五官专业, 副主任医师。

通讯作者: 陈晓明, 博士, 教授, 博士研究生导师. chenxm58@163.com

收稿日期: 2015-03-27 修回日期: 2015-07-15

Study on disease - causing genes screening of a pedigree with glaucoma

Xiao-Hong Liu¹, Jie Yang², Lu Liu³, Xiao-Ming Chen⁴, Yun Wang⁵, Jing-Yi Niu¹, Xu-Yang Liu⁵

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (No. 81270993); Basic Research Project of Shenzhen Municipal Bureau of Science and Technology Innovation Program Committee (No. JCYJ20140414093858910)

¹Department of Ophthalmology, Shenzhen Bao'an District People's Hospital, Shenzhen 518101, Guangdong Province, China; ²Affiliated Eye Hospital of Nanchang University, Nanchang 330046, Jiangxi Province, China; ³Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou 510632, Guangdong Province, China; ⁴Department of Ophthalmology, West China Hospital of Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China; ⁵Shenzhen Eye Hospital, Shenzhen 518040, Guangdong Province, China

Correspondence to: Xiao - Ming Chen. Department of Ophthalmology, West China Hospital of Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China. chenxm58@163.com
Received: 2015-03-27 Accepted: 2015-07-15

Abstract

• **AIM:** To study a large glaucoma family by screening the disease - causing genes in order to understand the pathogenesis mechanism of glaucoma.

• **METHODS:** The diagnosis of glaucoma family was made by ophthalmological examination; peripheral blood was collected and the pedigree map was drawn. The genome DNA of the patients was extracted. The exons of MYOC, CYP1B1, OPTN, and WDR36 were amplified by PCR and sequenced. The data were analyzed by comparing the corresponding reference sequence in the database. Based on the target gene region capture technology, ophthalmic chip was used for further analysis. We were hoping to identify disease gene of the family or discover the new pathogenic site.

• **RESULTS:** Among all exons of MYOC, CYP1B1, OPTN, and WDR36, was no mutation gene identified as the disease causing gene, excluded most known candidate gene mutation of glaucoma and found 5 suspicious sites by the ophthalmic chip.

• **CONCLUSION:** Glaucoma is a polygenic disease, the known glaucoma-causing genes may not be involved the pathogenesis of the glaucoma in this family. Further studies are needed to identify the molecular basis of this family with glaucoma.

• **KEYWORDS:** glaucoma family; gene mutation; ophthalmic chip; sequencing

Citation: Liu XH, Yang J, Liu L, et al. Study on disease - causing genes screening of a pedigree with glaucoma. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2015;15(8):1375-1377

摘要

目的: 为了了解青光眼的可能致病基因, 我们对一青光眼大家系致病基因进行了筛查研究。

方法: 采集外周血和绘制家系图, 提取患者全基因组 DNA, PCR 扩增目的基因 MYOC, CYP1B1, OPTN, WDR36 的外显子并鉴定, 测序后进行数据分析, 与数据库中相应参考序列进行比对。通过基于目标区域捕获技术的眼科基因定制芯片对家系样本进行了测序分析, 希望能鉴定该家系的致病基因或发现新的致病位点。

结果: 对该家系进行已知青光眼候选基因 MYOC, CYP1B1, WDR36, OPTN 测序分析及目标区域捕获技术的眼科基因定制芯片分析, 并经家系内其他患者及正常成员测序验证, 排除了已知青光眼候选基因突变, 仅发现了 5 个多态性位点。

结论: 青光眼属多基因遗传疾病, 已知致病基因并不能覆盖所有青光眼, 推测可能存在某些我们目前尚不知道的青光眼致病基因, 本青光眼家系的致病基因有待进一步研究。

关键词: 青光眼家系; 基因突变; 眼科芯片; 测序

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2015.8.17

引用: 刘晓红, 杨洁, 刘璐, 等. 一青光眼大家系的致病基因筛查研究. *国际眼科杂志* 2015;15(8):1375-1377

0 引言

青光眼是一组威胁和损害视神经及其通路, 从而损害视觉功能的疾病, 表现为视盘凹陷性萎缩和视野缺损, 是首要的不可逆的主要致盲眼病^[1]。据 WHO 调查估计, 2010 年全球青光眼发病形式严峻, 到 2020 年全球将有青光眼患者 8000 万^[2]。青光眼发病具有一定遗传性, 研究认为青光眼存在遗传异质性^[2]。目前, 已明确几个青光眼致病基因, 仍有很多青光眼患者致病原因不明。因此, 选取有意义的青光眼家系进行遗传学分析, 十分必要。本研究以一典型遗传性青光眼家系为研究对象, 该

表1 家系患者临床体征

患者	性别	年龄(岁)	视力		眼压(mmHg)		房角		眼底(C/D)	
			右	左	右	左	右	左	右	左
I 3	男	76	0.3	0.3	17	17	开	开	1.0	1.0
II 7	男	47	0.6	0.6	17	15	开	开	1.0	1.0
II 10	女	46	0.06	0.12	25	25	开	开	0.5	0.4
II 11	男	45	0.8	0.6	34.4	31.6	开	开	1.0	0.9
II 16	女	38	0.8	0.8	37.0	36.0	开	开	0.8	0.7
III 3	女	21	0.1	0.2	27	28	开	开	0.35	0.3

家系在表现上具有开角型青光眼的特征,如:眼压升高、房角开放、青光眼视神经损害 and 视野改变。该家系无其它疾病表征,可排除其他因素导致的青光眼,如能成功在此家系中鉴定致病基因或者发现新的致病位点,将有助于加深对青光眼的发病机制的认识,并应用于基因诊断和基因治疗。

1 对象和方法

1.1 对象 本次所采集的家系是一川籍青光眼大家系,3代共33人,其中患者6例,男女各3例。该研究遵循世界医学会有关医学伦理学赫尔辛基宣言(The Declaration of Helsinki of the World Medical Association)。并经深圳市宝安区人民医院伦理委员会批准进行血样采集及分子遗传学分析。

1.2 方法

1.2.1 家系的采集和整理 对该家系患者做了详细的眼专科检查:包括裂隙灯检查,视力,眼压,视野,前房角镜,OCT等。家系中所有患者均具有眼压升高、视力下降、房角异常、视神经损害 and 视野改变等临床表现。通过眼压、裂隙灯、房角检查及眼底和视野检查,明确所有患者均为开角型青光眼,然后,采集外周血,分装后置于-80℃保存。所有被研究人员都签署知情同意书,建立家庭成员个人通讯档案,定期进行随访。详尽的资料档案,还包括已患病者其病情的进展情况,发病时间以及治疗的效果等。绘制家系图谱(图1)。

1.2.2 提取全血基因组 DNA 选用 Qiagen 公司试剂盒(Qiamp Blood DNA mini Kit),按步骤提取家系成员的全血基因组 DNA。将抽取分装后的 200μL 抗凝血置于管中,使用试剂盒中的缓冲液裂解血液样本,并过 QIAamp MinElute 离心柱,使 DNA 结合到 QIAamp 硅胶膜上。用洗涤缓冲液洗涤 QIAamp MinElute 离心柱,去除杂质,用水洗脱得到 DNA。通过质量分数 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的完整性。

1.2.3 候选基因引物设计及聚合酶链反应体外扩增目的基因 参照待筛查基因核酸序列文献/PRIMER5 设计,在候选基因 MYOC, CYP1B1, WDR36, OPTN 所有外显子区域前后设计相应的聚合酶链反应(PCR)引物(由华大公司合成)。PCR 反应体系简述如下:在 0.2mL 薄壁 PCR 管中加入 2×Taq Master Mix 15μL, 10pmol/L 上下游引物各 0.8μL, 模板 DNA 1.4μL, 加 ddH₂O 使总反应体系为 30μL。PCR 的反应程序为:94℃ 预变性 2min, 然后 94℃ 变性 10s, 55℃ ~ 60℃ 退火 30s, 72℃ 延伸 1min, 进行 35 个循环,最后 72℃ 延伸 5min。PCR 扩增产物经凝胶紫外线成像系统观察 DNA 电泳带,照相及分析结果(包括条带大小,是否有杂带等)。

1.2.4 DNA 序列分析测序 PCR 产物纯化后直接进行测序分析,分析比较家系中患者及家庭中正常人的 DNA 序列,寻找突变位点。

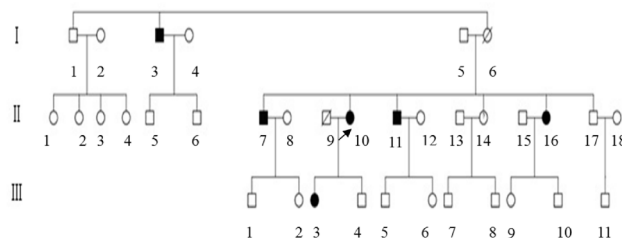


图1 青光眼家系图谱,箭头所示为先证者,实心黑色为患者。



图2 II 10 眼底视盘表现 A:右眼 B:左眼。

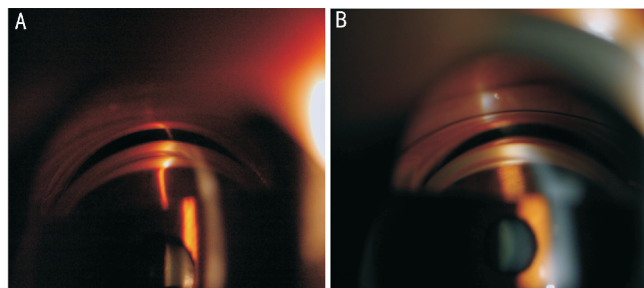


图3 III 3 房角表现 A:右眼;B:左眼。

1.2.5 基因芯片分析 在已知青光眼候选基因检测未发现突变后,我们又对该家系的先证者和患病者采用目标区域捕获技术的眼科基因定制芯片进行分析,该芯片覆盖了包括 ADAMTS10, BEST1, FBN1, FOXC1, LOXL1, OPA1, PAX6, PITX2, VSX1 共 9 个与青光眼有关的致病基因及其他眼病基因。

2 结果

2.1 系谱图 将家系所有成员绘制成系谱图,确定该家系为常染色体显性遗传青光眼家系。

2.2 临床结果 家系中共有 6 例青光眼患者,根据他们的临床特征,均符合原发性开角型青光眼诊断(表1,图2,3),其中,II 3 与 II 7 两位患者的眼压为抗青光眼术后所测,每个患者的视野均有不同程度缺损。

2.3 候选基因筛查结果 本研究对 MYOC, CYP1B1, WDR36, OPTN 基因进行突变检测,通过数据库及文献查找,鉴定突变位点,目前暂时没有发现与该疾病相关的突变。仅在 CYP1B1 基因发现 5 个 SNP(图4)。

2.4 基因芯片结果 该芯片覆盖了包括 ADAMTS10, BEST1,

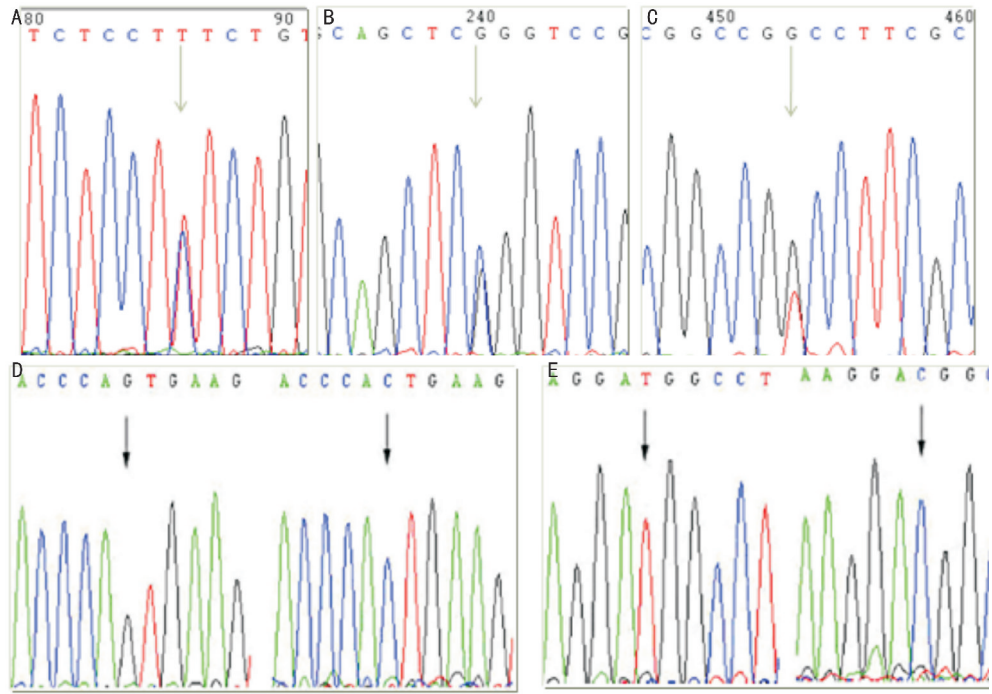


图4 CYP1B1的5个SNP测序峰图(箭头指示突变位点) A:1号内含子上C>T杂合;B:2号外显子上C>G杂合(R48G);C:2号外显子G>T杂合(A119S);D:3号外显子G>C杂合(V432L);E:3号外显子T>C杂合(D449D)。

FBN1, FOXC1, LOXL1, OPA1, PAX6, PITX2, VSX1 共9个与青光眼有关的致病基因及其他眼病基因,经家系内患者及正常成员测序验证,排除了已知众多的青光眼候选基因突变,亦未发现新的突变位点,其致病原因有待进一步研究。

3 讨论

原发性开角型青光眼是一组威胁和损害视神经及其通路,进而损害视觉功能的疾病,是常见不可逆致盲眼病,其发病机制尚不十分明了,其特点是眼压虽然升高,房角始终是开放的,房水外流受阻于小梁网-Schlemm管系统。组织学检查提示小梁网胶原纤维和弹性纤维变性,内皮细胞脱落或增生,小梁网增厚,网眼变窄或闭塞等病理改变。许多研究表明,青光眼发病具有一定遗传性,且为多基因遗传,现有的诊断和治疗都具有极大的局限性。目前,已报道的青光眼致病基因包括 MYOC, CYP1B1, OPTN, WDR36 等^[3-6]。但这些基因并不能完全覆盖所有的青光眼的发生^[7,8],即使是与这些基因相关的青光眼,其致病机制也尚不完全清楚。所以,肯定还存在有其他尚未被发现的,与青光眼遗传性因素相关的基因位点或基因。广泛选取有意义的青光眼家系进行遗传学分析十分必要^[9-11]。本研究以一典型遗传性开角型青光眼家系为对象。该家系具有开角型青光眼的特征,无其它疾病表征,可以排除其他因素造成的青光眼,其中先证者在发病前期有反复发作眼胀,雾视的症状,就诊时右眼视力已下降到0.06,左眼0.12,双眼眼压25mmHg,房角开放,杯盘比增大(图2),视野也有明显改变,家系中其他患者也都有典型的开角型青光眼特征,课题组在现阶段研究中筛查了该家系中所有患者的 MYOC, CYP1B1, OPTN, WDR36 基因,并未发现致病突变,说明该家系的发病与这些基因无关。然后,我们进一步对该家系的先证者采用目标区域捕获技术的眼科基因定制芯片进行分析,该芯片覆盖了包括 ADAMTS10, BEST1, FBN1, FOXC1, LOXL1, OPA1, PAX6, PITX2, VSX1 共9个与青光眼有关的致病基因及其他眼病基因,也未发现相关突变,仅发现了一些可疑位点。对这些可疑位点我们进行了比较研究,与家系中其他患者及正常成员比较,未发现确切的突变基因,那么该家系的确切致病因素是什

么呢? 值得我们更深入的研究,我们推测,致病基因为新基因的可能性较大,但我们在现有的研究中尚未能成功发现新基因,所以,在以后进一步的研究中,我们将继续跟踪该家系,寻找可能与青光眼相关的新致病基因并研究其机制,以补充青光眼的致病基因库。

同时,继续寻找更多的青光眼患者和更多的青光眼家系,建立青光眼相关的临床和分子遗传学资源库。随着人类基因组计划的完成,分子克隆技术日新月异,我们相信,新的青光眼致病基因都将得到定位与克隆,届时将能较为充分揭示青光眼的致病机制,并能为将来的基因诊断和治疗提供依据。

参考文献

- 1 Quigley HA. Number of people with glaucoma worldwide. *Br J Ophthalmol* 1996;80(5):389-393
- 2 Quigley HA, Broman AT. The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. *Br J Ophthalmol* 2006;90(3):262-267
- 3 Liang YB, Friedman DS, Zhou Q, et al. Prevalence of primary open angle glaucoma in a rural adult Chinese. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52(11):8250-8257
- 4 蔡素萍,陈晓明,闫乃红,等. 青光眼分子遗传学研究进展. 中华临床医师杂志(电子版)2011;5(5):1-14
- 5 Iefors B, Négrel AD. The global impact of glaucoma. *Bull World Health Organ* 1994;72(3):323-326
- 6 Allingham RR, Liu Y, Rhee DJ. The genetics of primary open-angle glaucoma: a review. *Exp Eye Res* 2009;88(4):837-844
- 7 Audo I, Bujakowska KM, Leveillard T, et al. Development and application of a next-generation-sequencing (NGS) approach to detect known and novel gene defects underlying retinal diseases. *Orphanet J Rare Dis* 2012;7(2):196-206
- 8 Schadt EE, Turner S, Kasarskis A. A window into third-generation sequencing. *Hum Mol Genet* 2010;19(20):R227-240
- 9 Rehm HL. Disease-targeted sequencing: a cornerstone in the clinic. *Nat Rev Genet* 2013;14(4):295-300
- 10 Chen X, Zhao K, Sheng X, et al. Targeted sequencing of 179 genes associated with hereditary retinal dystrophies and 10 candidate genes identifies novel and known mutations in patients with various retinal diseases. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013;54(3):2186-2197
- 11 Daiger SP, Sullivan LS, Bowne SJ. Genes and mutations causing retinitis pigmentosa. *Clin Genet* 2013;84(2):132-141