

ATOH7 和 RFTN1 与青少年型原发性开角型青光眼的关联研究

王德贵, 陈建欢, 张铭志, 郑玉倩

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No. 81371033); 广东省自然科学基金资助项目(No. S2013010015618)

作者单位: (515041) 中国广东省汕头市, 汕头大学·香港中文大学联合汕头国际眼科中心

作者简介: 王德贵, 硕士, 主治医师, 研究方向: 青光眼的基础及临床研究。

通讯作者: 张铭志, 硕士, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 常务副院长, 研究方向: 青光眼、白内障基础及临床研究. zzm@jsiec.org

收稿日期: 2016-10-31 修回日期: 2017-02-15

Interactive effects of ATOH7 and RFTN1 in association with juvenile primary open-angle glaucoma

De-Gui Wang, Jian-Huan Chen, Ming-Zhi Zhang, Yu-Qian Zheng

Foundation items: Natural Science Foundation of China (No. 81371033); Natural Science Foundation of Guangdong (No. S2013010015618)

Joint Shantou International Eye Center (JSIEC) of Shantou University and the Chinese University of Hong Kong, Shantou 515041, Guangdong Province, China

Correspondence to: Ming-Zhi Zhang. Joint Shantou International Eye Center of Shantou University and the Chinese University of Hong Kong, Shantou 515041, Guangdong Province, China. zzm@jsiec.org

Received: 2016-10-31 Accepted: 2017-02-15

Abstract

• AIM: To study ATOH7 and RFTN1 sequence variations in patients with juvenile primary open-angle glaucoma (JOAG).

• METHODS: In 298 controls (age ≥ 60 y) and 52 JOAG (age < 35 y), we collected samples from the patients and controls of study, extracted the DNA, and then the single exon of ATOH7 was sequenced by direct sequencing. Additional single nucleotide polymorphisms the RFTN1 SNP (rs690037) and at upstream ATOH7 (rs1900004 and rs3858145) were genotyped by Taqman assay.

• RESULTS: No any coding mutation was detected in JOAG. There were no significance in allele frequencies and haplotypes between JOAG and control group of rs7916697, rs61854782, rs1900004, rs3858145 and rs690037, so no SNP was associated with JOAG ($P > 0.05$).

• CONCLUSION: Although preliminary study has showed combination of ATOH7 and RFTN1 SNPs could increase the

risk of getting adult-onset primary open angle glaucoma, ATOH7 and RFTN1 are not associated with juvenile primary open-angle glaucoma in this study, so different types of open-angle glaucoma may be differences in genetic mechanism and be worthy of further study.

• KEYWORDS: juvenile primary open angle glaucoma; case-control study; gene

Citation: Wang DG, Chen JH, Zhang MZ, et al. Interactive effects of ATOH7 and RFTN1 in association with juvenile primary open-angle glaucoma. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2017; 17(3):440-443

摘要

目的: 前期研究显示 ATOH7 和 RFTN1 基因的 SNPs 之间的相互作用可增加成年型原发性开角型青光眼(primary open angle glaucoma, POAG) 的患病风险, 本实验研究 ATOH7 和 RFTN1 基因的序列变异在青少年型原发性开角型青光眼(juvenile-primary open angle glaucoma, JOAG) 患者中的作用。

方法: 研究对象包括青少年型原发性开角型青光眼患者共 52 例(确诊年龄 < 35 岁)及 298 例对照者(年龄 ≥ 60 岁)。收集研究对象的血样, 提取 DNA, 然后对提取的 DNA 进行聚合酶链反应(PCR)后测定 ATOH7 单外显子的序列。另外对 ATOH7 上游单核苷酸多态性位点(SNP)(rs1900004 和 rs3858145)及 RFTN1 的 SNP(rs690037)进行 TaqMan 分析检测其基因分型。

结果: 在青少年型原发性开角型青光眼患者 ATOH7 单外显子测序结果中没有发现基因突变位点。ATOH7 测序结果发现的两个 SNPs: rs7916697、rs61854782 和 ATOH7 上游 SNPs(rs1900004、rs3858145)及 RFTN1 的 SNP(rs690037)的单倍体型及等位基因频率在患者组与对照组无统计学意义(所有校正 $P > 0.05$), ATOH7 及 RFTN1 与青少年型原发性开角型青光眼没有相关性。

结论: 本实验前期研究虽显示 ATOH7 和 RFTN1 基因的 SNPs 之间的相互作用可增加成年型原发性开角型青光眼的患病风险, 但本研究未发现与青少年型原发性开角型青光眼有相关性, 提示不同类型开角型青光眼可能在基因机制方面的差异, 值得我们进一步研究

关键词: 青少年型原发性开角型青光眼; 病例对照研究; 基因

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2017.3.12

引用: 王德贵, 陈建欢, 张铭志, 等. ATOH7 和 RFTN1 与青少年型原发性开角型青光眼的关联研究. 国际眼科杂志 2017; 17(3):440-443

0 引言

青少年型原发性开角型青光眼(juvenile-primary open angle glaucoma, JOAG)是原发性开角型青光眼(primary open angle glaucoma, POAG)中的一种特殊类型,其发病年龄较早(<35岁),由于该病发病年龄较早,其危害更大,社会负担也更重。JOAG被认为是一组多因素且多基因遗传性的眼病,它的主要特征是病理性眼压升高及进行性视神经乳头的凹陷性萎缩和视野的特征性缺损缩小^[1-3]。与JOAG相关的生物学相关参数有房角、眼压、视野和视盘的杯盘比等,其危险因素有种族、家族遗传等^[4]。Wolf等^[5]在一项研究中证实该病的发病有显著的遗传性特征。本实验室在2012年对POAG的研究中证实:*ATO7*和*RFTN1*两个基因的SNPs之间的相互作用结果显示可增加成人型原发性开角型青光眼的患病风险^[6]。目前*ATO7*和*RFTN1*在JOAG患者中的关联性还有待于进一步研究。

1 对象和方法

1.1 对象 选取2009/2015年期间在汕头国际眼科中心门诊就诊患者,病例组为确诊的青少年型原发性开角型青光眼的患者52例,其中男39例,女13例,年龄9~30(平均21.5±6.7)岁,平均眼压33.0±10.9mmHg;对照组共纳入298例,其中男151例,女147例,年龄50~96(平均71.3±8.7)岁,平均眼压13.3±2.9mmHg。所有研究对象均来自潮汕地区。JOAG的纳入标准:(1)年龄:发病年龄小于30岁。(2)房角:房角检查均为宽角。(3)眼底:垂直C/D值大于0.5;左右眼差值大于0.2;且OCT显示神经纤维层厚度变薄。(4)视野:青光眼的特征性视野改变,包括旁中心暗点、鼻侧阶梯、弓形暗点等,以及晚期可能仅存的管状视野或颞侧视岛等改变。(5)眼压:眼压均大于21mmHg。排除标准:(1)继发性青光眼患者。(2)原发性婴幼儿型青光眼和或伴有其他先天异常。(3)以及不能配合眼科检查的患者均不被纳入本研究。对照组的纳入标准:(1)年龄大于60岁。(2)眼压≤21mmHg。(3)眼底视盘C/D小于0.5。(4)排除青光眼病史及青光眼家族史。(5)排除轻度白内障以外的其他主要眼部疾病。

1.2 方法 所有纳入人群均接受了一套标准的临床专科检查。包括采用裂隙灯生物显微镜(BQ900),前置镜(90D裂隙灯前置镜ocular)检查,眼压检查采用Goldmann眼压计(HAAG-STREZT MANN AT900 BQ),房角检查采用房角镜检查(四面镜);采用Scheie房角分类法记录法。视野检查采用自动视野计(Humphrey自动视野计),视神经纤维层检查采用OCT(Cirrus HD-OCT 4000)。测序在汕头国际眼科中心实验室完成,采用ABI3130XL自动DNA测序仪(Applied Biosystems),BIO-RAD iQTM5 Real-Time PCR仪(PCR Detection System)。采用病例-对照的候选基因相关性研究设计。首先收集研究对象的血液样本,然后提取DNA,再对提取的DNA进行聚合酶链反应即PCR后,最后应用直接测序方法的技术对*ATO7*基因的编码区域进行基因测序。另外对*ATO7*上游的单核苷酸多态性位点(SNP)即(rs1900004和rs3858145)及*RFTN1*的SNP(rs690037)进行TaqMan分析并检测基因分型。本实验所有检查及实验过程均在汕头大学·香港中文大学联合汕头国际眼科中心实验室完成。

统计学分析:本研究统计采用SPSS 16.0软件(2.12.12版本)、HaploView 4.2遗传学统计软件进行分析。并在对照组及患者组中采用HaploView 4.2分析所有SNP



图1 SNPs rs7916697(右),rs61854782(左)。

表1 对照组哈迪-温伯格平衡

基因	SNPs	等位基因	较少等位基因频率	基因组群%	观察杂合度	预测杂合度	P
<i>ATO7</i>	rs7916697	A:G	0.317	99.8	0.442	0.433	0.839
	rs61854782	G:T	0.121	97.8	0.286	0.213	0.437
	rs1900004	A:G	0.323	100	0.464	0.437	0.999
	rs3858145	A:G	0.314	100	0.440	0.431	0.807

表2 *ATO7* SNPs 单倍体型关联分析

单倍体型	频率	卡方值	P
TGGA	0.619	0.980	0.322
TAAG	0.171	1.118	0.290
GAAG	0.123	0.003	0.959
TGAG	0.015	1.741	0.187
TGGG	0.012	0.669	0.414
GAAA	0.010	0.008	0.931
TGAA	0.010	1.182	0.277
TAGG	0.010	0.003	0.956

的哈迪-温伯格平衡,采用HaploView 4.2进行*ATO7*的连锁不平衡分析及单倍体型分析。单个SNP的基因型频率均通过直接计数获得。对JOAG病例组和对照组每个SNP的基因型频率及等位基因频率进行比较采用卡方检验统计方法,用Logistic回归统计分析5个SNP与JOAG的关联性,并针对性别和年龄校正,当 $P < 0.05$ 时认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 *ATO7* 基因的测序结果 在本研究在所纳入的研究对象中筛查*ATO7*基因编码区域,没有发现编码基因突变,但是检测到2个单核苷酸多态性位点,即rs7916697即A>G,rs61854782即T>G,见图1箭头。

2.2 对照组哈迪-温伯格平衡 本研究的对照组中所有SNPs的基因型频率都符合哈迪-温伯格(Hardy-Weinberg)平衡(均 $P > 0.05$),显示本研究所纳入的对照人群是具有一般代表性的,见表1。

2.3 连锁不平衡和单倍体型

2.3.1 连锁不平衡分析 本研究结果显示*ATO7*的SNPs rs7916697、rs61854782、rs1900004及rs3858145紧密连锁($R\text{-square} \geq 0.79$),均位于同一个单倍体域中,该结果证明连锁不平衡关系较强,见图2。

2.3.2 *ATO7* SNPs 单倍体型关联分析 *ATO7*基因的SNPs单倍体型等位基因在患者组与对照组频率相比较重差异无统计学意义,显示*ATO7*基因与JOAG没有关联性,见表2。

2.4 JOAG与对照组等位基因频率及关联性分析 JOAG患者52例与对照者298例共5个SNPs等位基因频率及相关性研究结果(表3)。*ATO7*4个SNPs:rs61854782、rs7916697、rs1900004、rs3858145,及*RFTN1*的SNP:rs690037,其等位基因

表3 JOAG患者和对照组等位基因频率及相关性

基因	SNPs	Allele	等位基因频率		相关性分析		
			JOAG(例,%)	Control(例,%)	OR(95%CI)	P	校正P
ATOH7	rs7916697	G	74(71.2)	385(64.8)	1.339(0.848~2.114)	0.261	0.219
		A	30(28.8)	209(35.2)			
	rs61854782	G	15(14.4)	88(15.1)	0.946(0.523~1.711)	0.261	0.637
		T	89(85.6)	494(84.9)			
	rs1900004	A	31(70.2)	206(34.6)	0.804(0.511~1.264)	0.260	0.287
		G	73(29.8)	390(65.4)			
rs3858145	A	70(67.3)	393(65.9)	1.063(0.683~1.657)	0.261	0.839	
	G	34(32.7)	203(34.1)				
RFTN1	rs690037	A	55(52.9)	322(54.1)	0.955(0.629~1.450)	0.261	0.667
		G	49(47.1)	274(45.9)			

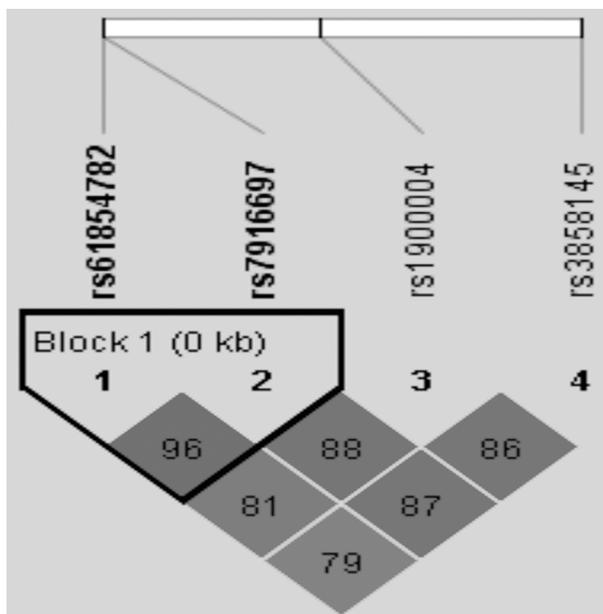


图2 ATOH7 SNPs 连锁不平衡。

频率患者组与对照组相比,差异无统计学意义($P > 0.05$)。针对年龄跟性别矫正后,ATOH7 和 RFTN1 基因的 SNPs 与 JOAG 没有关联性(校正 $P > 0.05$)。

3 讨论

据报道,最初在果蝇体内发现了 ATOH7 基因,该基因位于染色体的位置为 10q21.3,其编码的蛋白能够作用于视网膜光感受器的发育情况^[7]。Brow 等^[8]在斑马鱼,老鼠体内同样发现 ATOH7 基因,而且证明了 ATOH7 在视网膜发育的早期阶段能够高度表达。研究证明果蝇和老鼠的 Atoh 基因与人类的 ATOH7 基因所编码的蛋白有相当高的同源性,且能够影响人眼的视网膜神经节细胞的发育^[9]。在一些全基因组关联分析研究中证实 ATOH7 基因与人的视杯面积、视盘面积和垂直杯盘比都有一定的相关性^[10-12],其中,Macgregor 等^[10]在对澳大利亚人群与英国人群的研究中证实,ATOH7 基因与视盘面积有较强的相关性,相同的结论在亚洲人群和荷兰人群中都得到了证明^[11-12],而原发性开角型青光眼患者的诊断标准中就有垂直杯盘比这个重要参数,原发性开角型青光眼的视神经损害表现为特征性的视野缺损即视神经出现萎缩,是因为视网膜神经节细胞的轴突变性的结果^[13]。

等^[10]证实 RFTN1 与人群的视杯面积有一定的相关性。且该基因同样与了脂(质) 阈构成及 B 细胞信号传导的过程有关^[14],并且还参与到了 T 细胞受体信号传导以及增强 T 辅助淋巴细胞的免疫应答过程,而该基因在青少年原发性开角型青光眼中的关联性还有待于进一步探索。

Macgregor 等^[10]在一项 GWAS 中研究证实 ATOH7 基因的 SNP rs7916697、rs3858145 及 rs1900004 与人的视盘面积有显著的相关性($P = 6.2 \times 10^{-10}$ 、 3.4×10^{-10} 、 1.3×10^{-10})。在荷兰的研究人群中发现 rs1900004 与垂直杯盘比同样有显著相关性($P = 4.2 \times 10^{-11}$),而在美国人群和亚洲人群的研究中没有发现该关联性^[10]。在 2011 年, Khor 等对英国人群与澳大利亚人群的研究中证实 ATOH7 基因的 SNP rs3858145 与视杯面积有明显相关性($P = 1.2 \times 10^{-2}$),且在亚洲人群与荷兰人群中都显示 ATOH7 基因与视盘面积有显著的相关性^[11-12]。

Macgregor 等^[10]的研究结果证实 ATOH7 基因的 SNP rs1900004 与原发性开角型青光眼有相关性($P = 0.04$)。但是 Thorleifsson 等在冰岛的一项大型 GWAS 研究中(包括了 1263 例原发性开角型青光眼患者和 34877 例对照者)显示 caveolin-1 和 caveolin-2 可能是开角型青光眼的易感基因,而在对 ATOH7 基因的研究中却没有发现与原发性开角型青光眼有相关性。而且在对美国人群的一项的研究中同样发现 ATOH7 基因与原发性开角型青光眼之间没有关联性^[15]。本研究同样在中国南方潮汕地区的青少年型原发性开角型青光眼患者中并没有检测到 ATOH7 基因任何编码突变。而且所有 ATOH7 基因 SNP 的关联分析显示青少年型原发性开角型青光眼病例组与对照组之间的等位基因频率没有统计学意义,等位基因优势比接近 1,这证明所有五个 SNP 与青少年型原发性开角型青光眼之间没有关联。

本实验室在 2012 年对成年型原发性开角型青光眼的研究中证实:ATOH7 基因的 SNP rs61854782 与垂直杯盘比有负相关性,显示它与小的垂直杯盘比有相关性,且 RFTN1 基因的 SNP rs690037 次要等位基因与中央角膜厚度有正相关性,显示该 SNP 与厚的角膜厚度相关。ATOH7 和 RFTN1 两个基因的 SNPs 之间的相互作用显示可以增加成年型原发性开角型青光眼的患病风险^[6],这可能提示青少年型与成年型原发性开角型青光眼在遗传机制方面的不同。

本研究在青少年型原发性开角型青光眼患者的

ATOH7 基因的外显子测序结果中没有发现任何基因突变位点。对照组中所有 SNPs 的基因型频率都符合哈迪-温伯格平衡(均 $P > 0.05$),显示本研究所纳入的对照人群是具有代表性的(表 1)。本研究结果显示 *ATOH7* 的 SNPs rs7916697、rs61854782、rs1900004 及 rs3858145 紧密连锁($R\text{-square} \geq 0.79$),均位于同一个单倍体域中,该结果证明连锁不平衡关系较强(图 2)。表 2 显示,*ATOH7* 基因的 SNPs 单倍体型等位基因在患者组与对照组频率相比较重差异无统计学意义,显示 *ATOH7* 基因与 JOAG 没有关联性。这些结果均与我们的前期研究对成年型原发性开角型青光眼的研究相一致。在对检测到的 5 个 SNP: rs61854782、rs7916697、rs1900004、rs3858145 及 rs690037,其等位基因频率患者组与对照组相比,差异无统计学意义($P > 0.05$)。针对年龄跟性别校正后,*ATOH7* 和 *RFTN1* 基因的 SNPs 与 JOAG 没有关联性(校正 $P > 0.05$)。研究结果显示 *ATOH7* 和 *RFTN1* 两个基因的 SNP 与青少年型原发性开角型青光眼也没有相关性(校正 $P > 0.05$)。

青少年型原发性开角型青光眼发病具有明显的遗传倾向,且该病的遗传方式非常复杂,所以到目前为止,已经确认的致病基因只有一个 *MYOC* 及两个相关基因 *WDR36*、*OPTN*,所以继续开展原发性开角型青光眼的基因研究是非常有必要的。眼底特征性视神经损害作为诊断青少年型原发性开角型青光眼的重要参考指标,其视盘的凹陷进行性加大和加深,是发展到一定阶段后的共同临床表现,所以对与视杯或视盘的相关的基因 *ATOH7* 及 *RFTN1* 进行研究,探讨这两个基因与青少年型原发性开角型青光眼的关系,可以进一步阐释该病的可能发病机制。

总之,本实验前期研究虽显示 *ATOH7* 和 *RFTN1* 基因的 SNPs 之间的相互作用可以增加成年型原发性开角型青光眼的患病风险,但未发现与青少年型原发性开角型青光眼有相关性,提示不同类型开角型青光眼可能在基因机制方面的差异,也可能是本研究样本量较小造成结果无相关性,所以仍值得我们进一步研究。

参考文献

- 1 Waryah AM, Nunsani AK, Sheikh SA, et al. The novel heterozygous Thr377Arg MYOC mutation causes severe juvenile open angle glaucoma in a large Pakistani family. *Gene* 2013; 528(2): 356-359
- 2 Kwin YH, Fingert JH, Kuehn MH, et al. Primary open - angle

- glaucoma . *N Engl J Med* 2009; 360(11): 1113-1124
- 3 Raychaudhuri A, Lahiri SK, Bandyopadhyay M, et al. A population based survey of the prevalence and types of glaucoma in rural West Bengal: the West Bengal Glaucoma Study. *Br J Ophthalmol* 2005; 89(12): 1559-1564
- 4 Rivera JL, Bell NP, Feldman RM. Risk factors for primary open angle glaucoma progression: what we know and what we need to know . *Curr Opin Ophthalmol* 2008; 19(2): 102-106
- 5 Wolfs RC, Klaver CC, Ramrattan RS, et al. Genetic risk of primary open-angle glaucoma. Population-based familial aggregation study . *Arch Ophthalmol* 1998; 116(12): 1640-1645
- 6 Chen JH, Wang D, Huang C, et al. Interactive effects of ATOH7 and RFTN1 in association with adult-onset primary open-angle glaucoma . *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012; 53(2): 779-785
- 7 Jarman AP, Grau Y, Jan LY, et al. Natonal is a proneural gene that directs chordotonal organ formation in the Drosophila peripheral nervous system . *Cell* 1993; 73(7): 1307-1321
- 8 Brown NL, Kanekar S, Vetter ML, et al. Math5 encodes a murine basic helix-loop-helix transcription factor expressed during early stages of retinal neurogenesis . *Development* 1998; 125(23): 4821-4833
- 9 Brown NL, Dagenais SL, Chen CM, et al. Molecular characterization and mapping of ATOH7, a human atonal homolog with a predicted role in retinal ganglion cell development. *Mamm Genome* 2002; 13(2): 95-101
- 10 Macgregor S, Hewitt AW, Hysi PG, et al. Genome-wide association identifies ATOH7 as a major gene determining human optic disc size . *Hum Mol Genet* 2010; 19(13): 2716-2724
- 11 Khor CC, Ramdas WD, Vithanaithana EN, et al. Genome - wide association studies in Asians confirm the involvement of ATOH7 and TGFBR3, and further identify CARD10 as a novel locus influencing optic disc area . *Hum Mol Genet* 2011; 20(9): 1864-1872
- 12 Ramdas WD, Van Koolwijk LM, Ikram MK, et al. A genome-wide association study of optic disc parameters . *PLoS Genet* 2010; 6(6): e1000978
- 13 Fitzgibbon T, Taylor SF. Retinotopy of the human retinal nerve fibre layer and optic nerve head. *J Comp Neurol* 1996; 375(2): 238-251
- 14 Saeki K, Miura Y, Aki D, et al. The B cell - specific major raft protein, Raftlin, is necessary for the integrity of lipid raft and BCR signal transduction . *Embo J* 2003; 22(12): 3015-3026
- 15 Fan BJ, Wang DY, Pasquale LR, et al. Genetic variants associated with optic nerve vertical cup-to-disc ratio are risk factors for primary open angle glaucoma in a US Caucasian population . *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011; 52(3): 1788-1792