

结晶样视网膜色素变性中与 *CYP4V2* 基因相关的致病突变

杨 极, 韦春玲, 张 娟, 胡竹林, 焦康为

引用: 杨极, 韦春玲, 张娟, 等. 结晶样视网膜色素变性中与 *CYP4V2* 基因相关的致病突变. 国际眼科杂志 2021; 21(6): 1125-1129

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No.81960180); 云南省科技厅科技计划项目 [No.2019FB093, 2018FB123, 2018FE001(-008)]; 云南省卫生科技计划项目 (No.2017NS130)

作者单位: (650000) 中国云南省昆明市, 云南大学附属医院 云南省第二人民医院 云南省眼科医院 云南省眼部疾病临床医学研究中心 云南省眼病临床医学中心

作者简介: 杨极, 硕士, 住院医师, 研究方向: 遗传性视网膜退行性病变。

通讯作者: 焦康为, 博士, 主治医师, 研究方向: 遗传性视网膜退行性病变细胞死亡机制、玻璃体视网膜疾病. Kangwei.jiao@whu.edu.cn

收稿日期: 2020-09-14 修回日期: 2021-04-29

摘要

目的: 使用 Sanger 测序法鉴定 2 个中国结晶样视网膜色素变性 (BCD) 家系中 *CYP4V2* 基因的突变位点。

方法: 收集 2019-01/09 临床诊断为 BCD 患者的临床相关资料。采集患者、患者家系成员的外周血, 提取 DNA, 利用 Sanger 测序法鉴定突变位点。

结果: 共收集 2 个 BCD 先证者, 先证者均表现为渐进性视力下降, 眼底均可见典型的结晶样物质沉积。测序发现先证者 1 及其患病的哥哥, 妹妹均在 *CYP4V2* 基因上存在 c.802-8_810del17insGC 的纯合突变。而先证者 2 则在 *CYP4V2* 基因上存在 c.219T>A (p.F73L)、c.802-8_810del17insGC 杂合突变。

结论: 中国 BCD 患者中最常见的 c.802-8_810del17insGC 突变在先证者 1 家系中为纯合突变, 是其家系的致病突变。而先证者 2 则携带了中国 BCD 患者最常见的 c.802-8_810del17insGC 杂合突变, 同时先证者 2 还携带 c.219T>A (p.F73L) 错义突变, 突变均影响了 *CYP4V2* 基因的正常编码, 进而导致疾病。

关键词: 结晶样视网膜色素变性; Sanger 测序; *CYP4V2*; 突变位点

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2021.6.37

Identify pathogenic mutations of *CYP4V2* gene in Bietti crystalline corneoretinal dystrophy

Ji Yang, Chun-Ling Wei, Juan Zhang, Zhu-Lin Hu, Kang-Wei Jiao

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (No. 81960180); Science and Technology Program of Yunnan

Provincial Science and Technology Department [No.2019FB093, 2018FB123, 2018FE001(-008)]; Health Science and Technology Program of Yunnan Province (No.2017NS130)

Affiliated Hospital of Yunnan University; Second People's Hospital of Yunnan Province; Yunnan Eye Hospital; Yunnan Clinical Medical Research Center of Eye Diseases; Yunnan Clinical Medical Center of Eye Diseases, Kunming 650000, Yunnan Province, China

Correspondence to: Kang-Wei Jiao. Affiliated Hospital of Yunnan University; Second People's Hospital of Yunnan Province; Yunnan Eye Hospital; Yunnan Clinical Medical Research Center of Eye Diseases; Yunnan Clinical Medical Center of Eye Diseases, Kunming 650000, Yunnan Province, China. Kangwei.jiao@whu.edu.cn

Received: 2020-09-14 Accepted: 2021-04-29

Abstract

• AIM: To identify pathogenic mutations of *CYP4V2* gene in two Chinese families with Bietti crystalline corneoretinal dystrophy (BCD) by Sanger sequencing.

• METHODS: The relevant clinical examination of BCD patients were collected. Peripheral blood of patients and their family members was collected. Then DNA was extracted from peripheral blood, and Sanger sequencing was used to identify mutation sites.

• RESULTS: Two probands of BCD from different families were collected. All the probands showed progressive decrease of visual acuity and typical crystal-like material deposition could be seen in the fundus. Sanger sequencing showed that proband 1 and her brother and sister all had homozygous mutation of c.802-8_810del17insGC in *CYP4V2* gene. On the other hand, proband 2 had a compound heterozygous mutation of c.219T>A (p.F73L) and c.802-8_810del17insGC in *CYP4V2* gene.

• CONCLUSION: The most common mutation was c.802-8_810del17insGC in Chinese BCD patients. The homozygous c.802-8_810del17insGC mutation was the cause of BCD in the proband 1 family. On the other hand, proband 2 had c.802-8_810del17insGC heterozygous mutation and c.219T>A (p.F73L) heterozygous missense mutation, all of which affected the normal coding of *CYP4V2* gene and led to disease.

• KEYWORDS: Bietti crystalline corneoretinal dystrophy; Sanger sequencing; *CYP4V2*; mutation site

Citation: Yang J, Wei CL, Zhang J, et al. Identify pathogenic mutations of *CYP4V2* gene in Bietti crystalline corneoretinal dystrophy. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2021; 21(6): 1125-1129

0 引言

结晶样视网膜色素变性(Bietti crystalline corneoretinal dystrophy, BCD)是一种常染色体隐性遗传性眼病。此病早期病情隐匿,患者往往因视功能损害不明显而未及时就诊,临床主要特征为眼底视网膜内白色结晶样物质沉积,脉络膜血管硬化,或伴有角膜边缘营养不良^[1]。BCD在欧美人群中较少见,其致病基因为 *CYP4V2*,有学者报道我国BCD致病基因频率为0.005,群体患病率约为1/24 000^[2]。大部分患者在10~40岁出现视力减退、夜盲、中央暗点等症状,随后发展为周边视野缺失和中心视力缺损,通常在40或50岁后视力下降至法定盲^[3-4]。2015年孟晓红^[5]对184个BCD家系中215例患者进行大规模临床检查和基因诊断后,充分揭示了中国人BCD临床特点和基因突变谱,目前已知的致病性 *CYP4V2* 基因突变位点已达82个,故对患者进行临床诊断的同时进行基因筛查有利于增加疾病的精确诊断率,为进一步深入研究BCD的发病机制和为相关治疗提供依据。本研究对2个BCD家系进行Sanger测序,筛查患者的致病突变,现将结果报道如下。

1 对象和方法

1.1 对象

描述性研究。收集2019-01/09就诊于云南省第二人民医院眼科门诊并确诊为BCD的先证者2例。从先证者出发,详细询问其家族遗传史,绘制家系图,并收集家族中其他成员纳入研究。共搜集BCD家系2个,家系1有明确的家族遗传病史,先证者及其哥哥,妹妹均患有BCD。家系2中先证者为散发病例,其父母已故。其中2例先证者均为女性。本研究遵守《赫尔辛基宣言》,经云南省第二人民医院伦理委员会批准,参与本研究的成员均签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 检查方法

对2例BCD先证者进行了详细的病史、家族史询问,同时进行了全面的眼科检查。临床检查包括裸眼视力、色觉、最佳矫正视力(BCVA)、裂隙灯下眼前段及眼底检查、眼底照相、眼部光学相干断层成像技术(OCT)检查、眼底荧光造影检查。

1.2.2 基因检测

签署知情同意书后,使用EDTA抗凝管采集先证者及参与研究的家族成员静脉血5mL,用基因组DNA提取试剂盒提取外周血DNA。提取的DNA需满足样本浓度均>50ng/ μ L, D(260nm)/D(280nm)为1.8~2.0, DNA样本-20℃冰箱保存^[6]。根据美国国家生物技术信息中心提供的 *CYP4V2* 基因序列和参考文献^[4]设计引物,利用PCR技术扩增目标DNA序列。采用传统50.0 μ L PCR扩增反应体系,加入DNA模板1.0 μ L,上、下游引物各1.0 μ L, 2 \times EasyTaq R CR SuperMix 25.0 μ L,加入超纯水22.0 μ L。94℃预变性5min,94℃变性30s,50℃~65℃退火30s,72℃延伸1min,共反应35个循环,最后72℃延伸5min。操作步骤及流程严格按照云南省第二人民医院实验中心生化实验室要求进行。

通过dbSNP, ExAC Browser, the 1000 Genomes Project, Genome Aggregation Database等数据库获得变异的最小等位基因频率,运用Mutation Taster、SIFT、PolyPhen2、GERP++、REVEL等生物信息学蛋白功能预测软件来进行危害性预测,并制作三维蛋白模型结构^[7-9]。采用同源序列多重比对,结合OMIM、NCBI等数据库^[8],利用UGENE

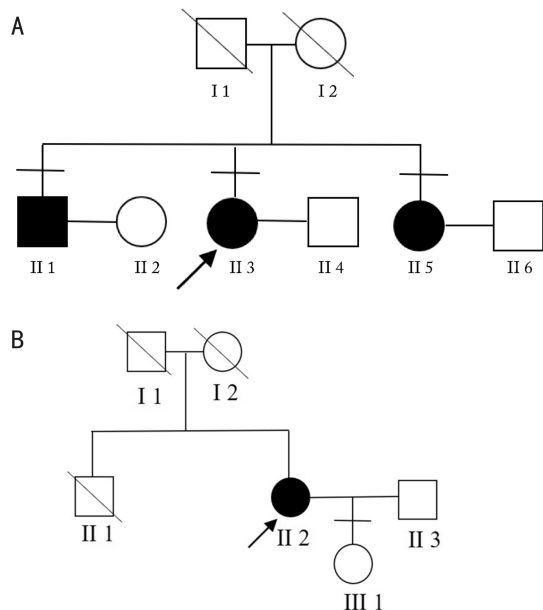


图1 患者家系资料 A:先证者1家系图;B:先证者2家系图。

软件分析突变位点在不同物种间的保守型。依据美国医学遗传学与基因组学学会(ACMG, 2015)分级标准对突变位点进行致病性判断^[10]。

2 结果

2.1 BCD患者临床特征

先证者 F1 II3(图1A),女性,33岁,主诉为“双眼渐进性视力下降1a”, BCVA: OD:0.05, OS:0.2。眼前节均未见明显异常,眼底可见大量密集黄白色结晶样颗粒物质沉积,后极部视网膜广泛脱色素至颜色变淡(图2A~F)。色觉检查:红绿色弱。后极部OCT提示:椭圆体带及色素上皮层萎缩,仅黄斑区少许残留,在萎缩区可见大量细小颗粒样物质均匀堆积,其下脉络膜毛细血管及中血管层相应萎缩,清晰可见大血管轮廓(图2G、H)。荧光造影检测可见结晶颗粒未显影(图2I、J)。哥哥 F1 II1,男性,44岁, BCVA: OD:0.02, OS:0.05, 妹妹 F1 II5,女性,31岁, BCVA: OD:0.1; OS: 0.02, 均可见眼底大量密集黄白色结晶样颗粒物质沉积。

先证者 F2 II2(图1B),女性,41岁,主诉为“双眼渐进性视力下降7a”, BCVA: OD:0.05; OS:0.12。眼前节均未见明显异常,眼底见不同程度的结晶样物质沉积,伴视网膜色素上皮层萎缩及色素沉着。女儿 F2 III 1,视力正常。

2.2 Sanger 测序结果

对先证者 F1 II3 和其近亲属 F1 II1, F1 II5 的外周血 DNA 进行 Sanger 测序后,检测出 *CYP4V2* 基因上存在 c.802-8_810del17insGC 的纯合突变(图3A~C)。根据 ACMG 指南(PVS+PS1+PM2),该变初步判定为致病性变异。PVS:该变异为零效变异,可能导致基因功能丧失。PS1:HGMD 数据库已有该位点的致病性报道。PM2:在 dbSNP, ExAC Browser, the 1000 Genomes Project 等数据库中为低频变异。同时保守性分析显示此突变位于不同物种间氨基酸高度保守的位置。

由于先证者 F2 II2 的父母、哥哥已故,无法进行家系共分离验证,对先证者和其女儿的外周血 DNA 进行全外显子测序后,检测出先证者 *CYP4V2* 基因上存在和 F1 家系一致的 c.802-8_810del17insGC 杂合突变,同时 F2 II2 还存在 c.219T>A(p.F73L) 突变(图3D~E)。依据 ACMG 指南(PS1+PM2), c.219T>A(p.F73L) 为疑似致病性变异,

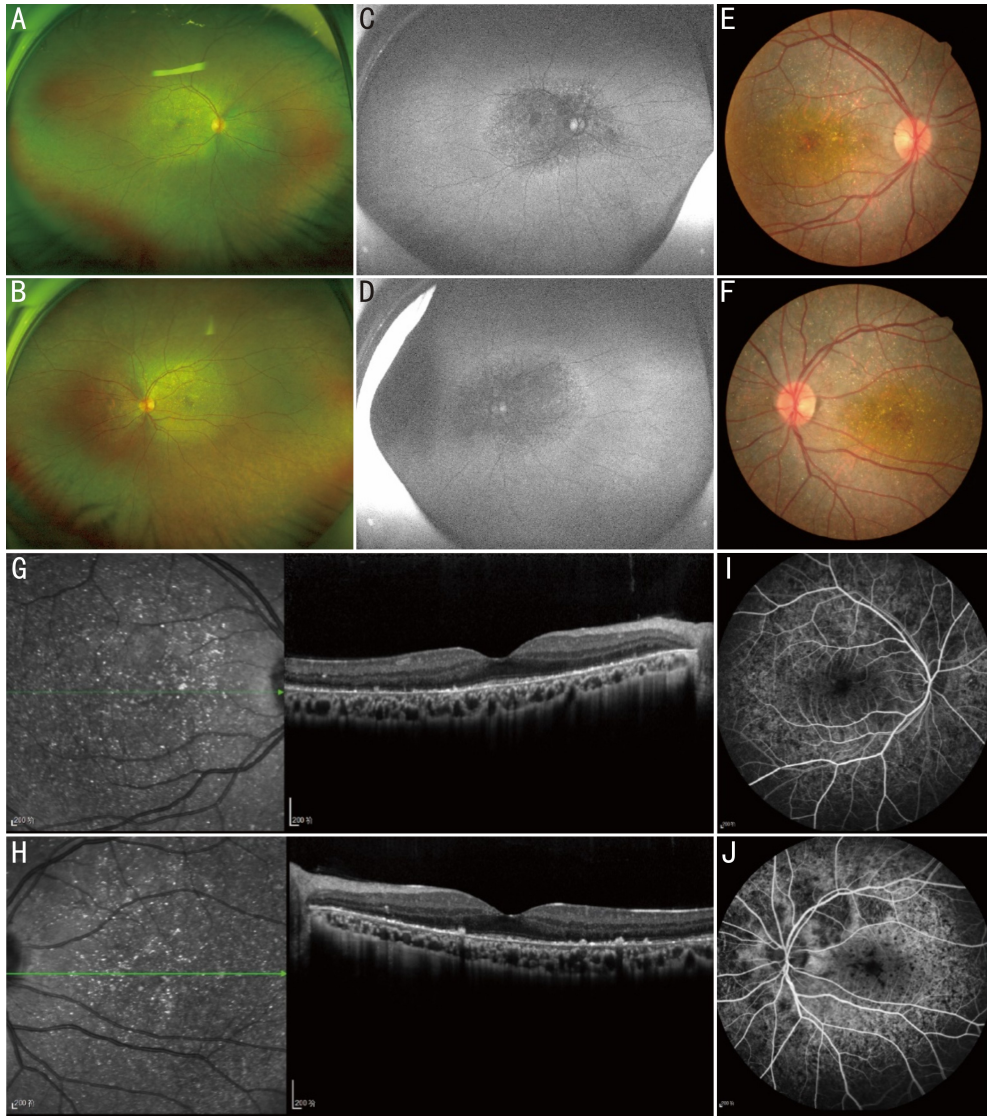


图2 同一患者影像学资料 A、B:广角眼底照,不同程度的结晶样物质沉积,伴视网膜色素上皮层萎缩及色素沉着;C、D:自发荧光可见视网膜结晶样物质沉积区域低荧光;E、F:眼底照,不同程度的结晶样物质沉积;G、H:OCT检查椭圆体带及色素上皮层萎缩,仅黄斑区少许残留,在萎缩区可见大量细小颗粒样物质均匀堆积,其下脉络膜毛细血管及中血管层相应萎缩,清晰可见大血管轮廓;I、J:荧光造影可见结晶样物质荧光遮蔽。

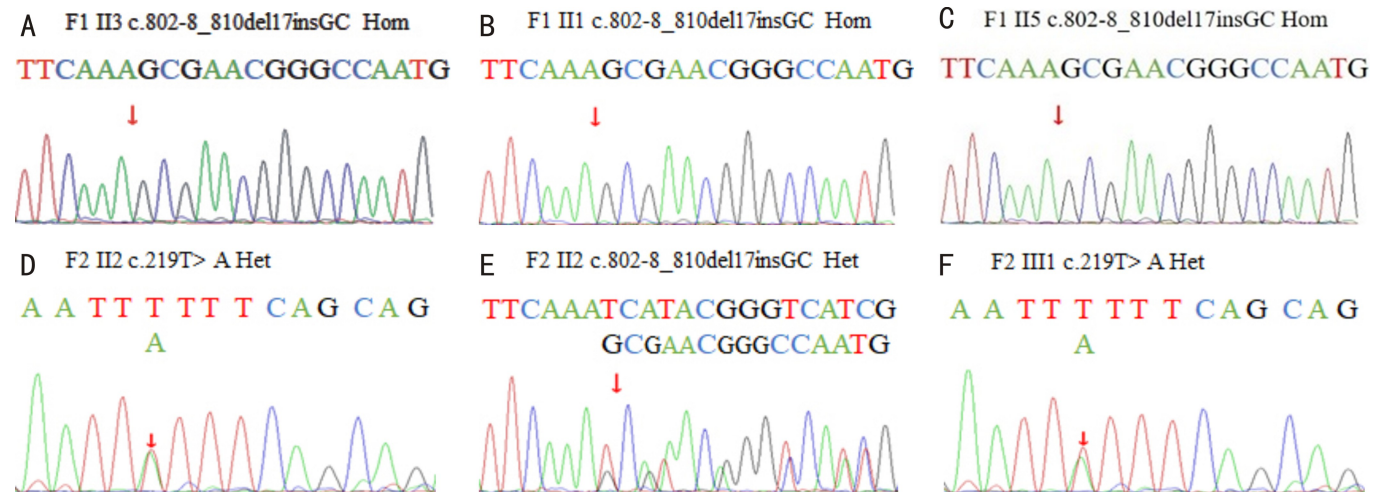


图3 Sanger 测序结果 A~C:家系1中II3,III1,II5 检测出 *CYP4V2* 基因上存在 c.802-8_810del17insGC 的纯合突变;D~E:F2 II2 检出 c.219T>A(p.F73L)和 c.802-8_810del17insGC 杂合突变;F:F2 III1 检出 c.219T>A(p.F73L)杂合突变。

PS1:HGMD 数据库已有该位点的致病性报道。PM2:在正常人数据库中为低频变异。同时生物信息学蛋白功能预测软件 MutationTaster、GERP++、PolyPhen2 均预测此突变

为有害。保守性分析显示 c.802-8_810del17insGC、c.219T>A(p.F73L)突变位于不同物种间氨基酸高度保守的位置(图4A、B)。3D 蛋白预测模型提示 c.219T>A(p.F73L)

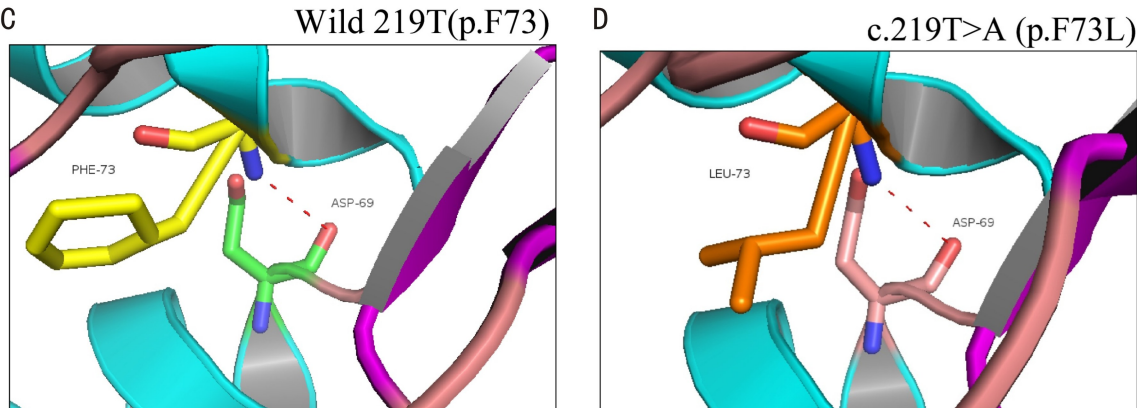
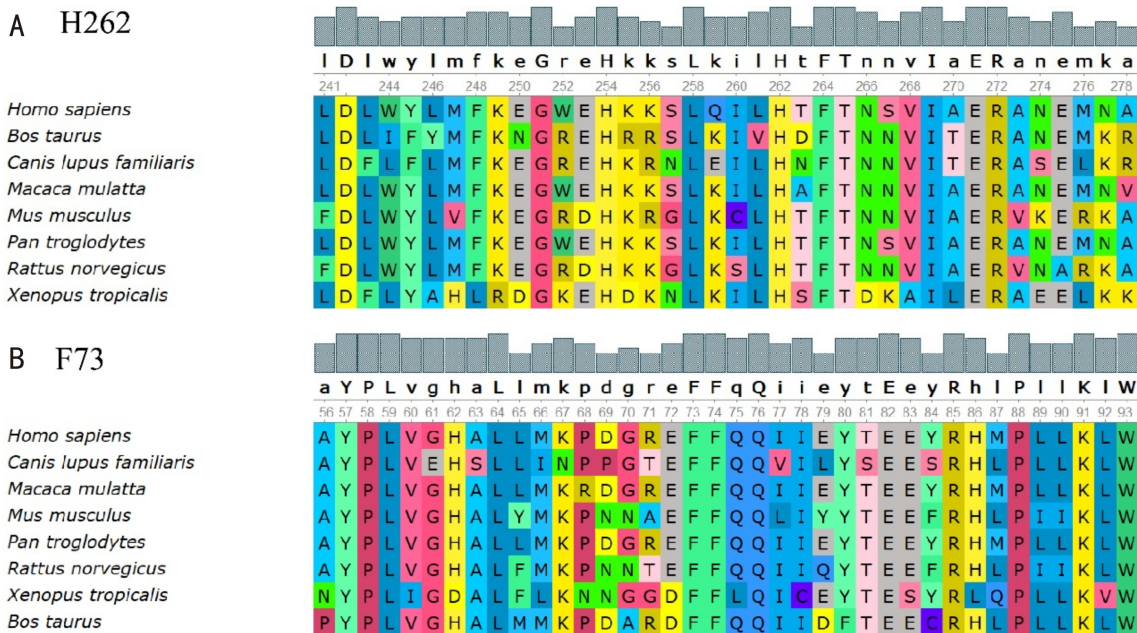


图4 保守性分析和蛋白三维结构预测结果 A、B:保守性分析显示 c.8028_810del17insGC (H262), c.219T>A (p.F73L) (F73) 突变位于不同物种间氨基酸高度保守的位置;C、D:3D 蛋白预测模型提示 c.219T>A (p.F73L) 突变影响蛋白质的局部构像。

突变影响蛋白质的局部构像(图4C、D)。先证者 F2 II2 无 BCD 症状的女儿发现 *CYP4V2* 基因上存在 c.219T>A (p.F73L) 杂合突变(图3F)。

3 讨论
 BCD (OMIM#210370) 是一类常见的常染色体隐性遗传性视网膜变性疾病,在 1937 年由 Bietti 医生首次报道,其在视网膜色素变性疾病中比例高达 18.5%,在中国人群中发病率远高于欧美人群^[5, 11]。BCD 的致病基因为 *CYP4V2*,位于 4q35-qter,由 11 个外显子组成,编码 525 个氨基酸,属于细胞色素氧化酶 P450 (CYP450) 超家族^[12]。目前 *CYP4V2* 导致 BCD 发病的机制研究还未完全明了,有研究表明 *CYP4V2* 参与脂肪酸代谢,BCD 患者血清三酰甘油、总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇和正常人群存在差异,但 *CYP4V2* 突变对全身各组织器官影响较小,推测其发病方式可能为基因突变影响了视网膜色素上皮细胞的脂质代谢而致病^[13]。BCD 具有高度遗传异质性,至今已发现的 BCD 致病突变位点达 82 个,绝大部分为错义突变、缺失以及无意突变,涉及所有 11 个外显子区域,对 BCD 患者进行进一步,尤其是致病基因 *CYP4V2* 相关突变位点筛查明确病因具有重要意义^[14-15]。

BCD 患者健康的女儿进行了基因检测。通过基因检测,我们发现在 *CYP4V2* 基因上存在 c.219T>A (p.F73L), c.802-8_810del17insGC 突变。本文研究的 2 个 BCD 家系,先证者均具有明显的 BCD 表现,其中 F1 II3 和其近亲属 III1, III5 均具有多年的夜盲病史,伴有视力下降,眼底存在典型的结晶样物质沉积,并检测到 c.802-8_810del17insGC 纯合突变。先证者 F2 II2 眼底可见结晶样物质沉积,同时存在 c.219T>A (p.F73L), c.802-8_810del17insGC 复合杂合突变,先证者 F2 II2 的女儿发现 *CYP4V2* 基因上存在 c.219T>A (p.F73L) 杂合突变,但先证者 F2 II2 女儿未出现 BCD 的症状。

本研究发现的 c.802-8_810del17insGC 突变为中国人群中 *CYP4V2* 基因最常见的突变方式,在 *CYP4V2* 基因突变比例中占 62.6%,此突变可导致氨基酸编码终止进而影响蛋白功能的发挥。Lai 等^[3] 研究报道了 c.802-8_810del17insGC 突变与表型间的关联,发现突变眼电图上可显示低 Arden 比,并表现出不可记录的暗适应 FERG,以及不可记录的 30Hz 闪烁 ERG。Gekka 等^[16] 比较了 2 例 *CYP4V2* 突变患者的临床特征,发现纯合缺失/插入突变 (c.802-8_810del17insGC) 的患者均出现了视野受损。1 例患者的视杆、视锥细胞 ERG 振幅严重降低。相反,另 1 例患者虽然有复合杂合子突变,临床表现轻微,视锥和

视杆细胞的 ERG 振幅未受到明显影响。但是发病年龄和病程对视网膜功能改变相关因素的影响未见报道,不存在明显的基因型-表型关联。虽然表型与基因型之间存在较大差异,但表型的严重程度与疾病的病程有关,发病越早,严重表型持续时间越长,本研究中 F1 III 已有夜盲病史 10 余年,患者目前 44 岁,已双眼失明。

先证者 F2 II2 检测到的 c.219T>A (p.F73L) 突变在 2014 年由 Yin 等^[17]首次报道,此突变在健康人群中未被报道,在 dbSNP, ExAC Browser, the 1000 Genomes Project 等数据库中为低频变异,而 73 号位点的苯丙氨酸在多物种间均为一个高度保守的序列,三维蛋白结构预测也可见此突变影响了局部蛋白质的二级结构,进而影响了蛋白质的疏水性和稳定性。CYP4V2 基因编码跨膜氨基酸与 18 个 α 螺旋以 β 折叠和卷曲的形式构成跨膜结构,此结构可与亚铁血红素相识别。错义突变可影响 α 螺旋与卟啉环的结合,进而导致该结构失去功能。CYP4V2 基因的错义突变一般可影响蛋白跨膜段,干扰 CYP4V2 蛋白与膜的整合,在酶的活性位点干扰其与卟啉环的配位^[18-19]。本研究再次证明了 c.802-8_810del17insGC 和 c.219T>A (p.F73L) 突变在中国 BCD 人群的发病中扮演重要角色。

但是,由于 BCD 的高度遗传异质性,对其了解仍然很少,基于通过研究大样本不同 BCD 患者的遗传特征,进一步阐明其致病的分子机制,不但提高该疾病诊断的准确率,对解释 BCD 疾病发生发展的本质和探索其基因型和表型之间的分析就显得尤为重要,同时可为开发该病个性化的基因治疗奠定基础。

参考文献

- Li AR, Jiao XD, Munier FL, et al. Bietti crystalline corneoretinal dystrophy is caused by mutations in the novel gene CYP4V2. *Am J Hum Genet* 2004;74(5):817-826
- Xie YC, Bai ZX, Sun ZL, et al. Analysis of phenotype and CYP4V2 gene variants in two pedigrees affected with Bietti crystalline corneoretinal dystrophy. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 2020; 37(12):1340-1343
- Lai TY, Ng TK, Tam PO, et al. Genotype phenotype analysis of Bietti's crystalline dystrophy in patients with CYP4V2 mutations. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48(11):5212-5220
- Wang W, Chen W, Bai X, et al. Multimodal imaging features and genetic findings in Bietti crystalline dystrophy. *BMC Ophthalmol* 2020;20(1):331

- 孟晓红. 中国人群 Bietti 结晶样角膜视网膜变性遗传学和临床特征研究. 第三军医大学 2015
- 邵彬彬, 乔凤昌, 刘安, 等. 全外显子测序技术诊断 Sheldon Hall 综合征. *南京医科大学学报(自然科学版)* 2019;39(12):1809-1812
- Kumar P, Henikoff S, Ng PC. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc* 2009;4(7):1073-1081
- McKenna A, Hanna M, Banks E, et al. The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res* 2010;20(9):1297-1303
- Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, et al. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods* 2014;11(4):361-362
- Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 2015;17(5):405-424
- Meng XH, He Y, Zhao TT, et al. Novel mutations in CYP4V2 in Bietti corneoretinal crystalline dystrophy: Next-generation sequencing technology and genotype-phenotype correlations. *Mol Vis* 2019; 25:654-662
- 许菲, 睢瑞芳, 董方田. 结晶样视网膜色素变性分子遗传学研究进展. *中华眼科杂志* 2012;48(10):948-951
- 李孟达, 殷晓贝, 何婷, 等. 结晶样视网膜色素变性患者血脂浓度的变化. *中华实验眼科杂志* 2015;33(1):47-50
- 颜虹, 陆勤康, 王惠云. 结晶样视网膜变性患者的基因突变检测. *浙江医学* 2019;41(3):220-224
- García-García GP, Martínez-Rubio M, Moya-Moya MA, et al. Current perspectives in Bietti crystalline dystrophy. *Clin Ophthalmol* 2019;13:1379-1399
- Gekka T, Hayashi T, Takeuchi T, et al. CYP4V2 mutations in two Japanese patients with Bietti's crystalline dystrophy. *Ophthalmic Res* 2005;37(5):262-269
- Yin HF, Jin CF, Fang XY, et al. Molecular analysis and phenotypic study in 14 Chinese families with Bietti crystalline dystrophy. *PLoS One* 2014;9(4):e94960
- Jiao X, Li A, Jin ZB, et al. Identification and population history of CYP4V2 mutations in patients with Bietti crystalline corneoretinal dystrophy. *Eur J Hum Genet* 2017;25(4):461-471
- Fuerst NM, Serrano L, Han G, et al. Detailed functional and structural phenotype of Bietti crystalline dystrophy associated with mutations in CYP4V2 complicated by choroidal neovascularization. *Ophthalmic Genet* 2016;37(4):445-452