

内蒙古地区单纯性病理性近视患者 Decorin 基因突变筛查

冯月兰,董 竞,刘志英,唐静晓

作者单位:(014010)中国内蒙古自治区包头市,包头医学院附属第一医院眼科

作者简介:冯月兰,硕士,主治医师,研究方向:眼表疾病及眼视光。

通讯作者:冯月兰. fyl-2006-ky@163.com

收稿日期:2015-10-27 修回日期:2016-02-14

Screening for mutation of Decorin gene in simple pathological myopia in Inner Mongolia region

Yue-Lan Feng, Jing Dong, Zhi-Ying Liu, Jing-Xiao Tang

Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Baotou Medical College, Baotou 014010, Inner Mongolia Autonomous Region, China

Correspondence to: Yue-Lan Feng. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Baotou Medical College, Baotou 014010, Inner Mongolia Autonomous Region, China. fyl-2006-ky@163.com

Received:2015-10-27 Accepted:2016-02-14

Abstract

• **AIM:** To investigate the relation of Decorin (DCN) gene and simple pathological myopia in Inner Mongolia region.

• **METHODS:** Genomic DNA was collected from 100 control subjects and 100 patients with simple pathological myopia. The exon7 and exon8 and the flanking intron regions of DCN gene were analyzed by polymerase chain reaction (PCR) and direct sequencing. The relation of Decorin gene exon7 and exon8 with simple pathological myopia was statistically analyzed.

• **RESULTS:** In simple pathological myopia group, 2 patients' gene mutations were identified. Both was 41775T→C, located at the flanking intron regions of exon8. No variation was found in others including control group. The gene mutation between controls and simple pathological myopia groups were not different ($P>0.05$).

• **CONCLUSION:** DNC gene exon7 and exon8 mutation may not be the disease gene in this group in Inner Mongolia region.

• **KEYWORDS:** simple pathological myopia; Decorin gene; mutation

Citation: Feng YL, Dong J, Liu ZY, et al. Screening for mutation of Decorin gene in simple pathological myopia in Inner Mongolia region. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2016;16(3):579-581

摘要

目的:研究内蒙古地区单纯性病理性近视患者核心蛋白聚糖(Decorin, DCN)基因与高度近视的关系。

方法:收集单纯性病理性近视患者血液100例,视力正常者血液100例作为对照组,提取全血基因组DNA,应用聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)方法分别扩增DCN基因第7、第8个外显子及其邻近内含子并进行测序分析。统计学分析研究DCN基因外显子7、8的突变位点与单纯性病理性近视的相关性。

结果:单纯性病理性近视患者100例中发现有2例发生突变,均为41775T→C,位于外显子8的邻近内含子区域,其余均未发现任何突变。与正常组对比差异无统计学意义($P>0.05$)。

结论:内蒙古地区单纯性病理性近视患者的DCN基因外显子7、8突变与本组高度近视无关。

关键词:单纯性病理性近视;核心蛋白聚糖基因;突变

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2016.3.51

引用:冯月兰,董竞,刘志英,等.内蒙古地区单纯性病理性近视患者 Decorin 基因突变筛查. *国际眼科杂志* 2016;16(3):579-581

0 引言

病理性近视(pathological myopia, PM)又称变性近视,是因为眼轴过度增长而造成眼底后极部损害为特征的高度近视^[1],其特点为眼轴异常延长,近视度数持续进行性加深,且发展快,成年后会相对变慢或静止;通常伴有后巩膜葡萄肿、眼底退行性变性、视网膜脱离、白内障、青光眼、弱视、玻璃体混浊及黄斑出血等严重并发症的一类近视。单纯性病理性近视为不伴有全身其他疾病的高度近视。单纯性高度近视的病因不明,定位于12q23内的核心蛋白聚糖DCN基因被认为是“最可能”的高度近视候选基因^[2],它在细胞外基质中表达蛋白聚糖中的蛋白质部分。蛋白聚糖可以与胶原蛋白相互作用限制纤维的增长,与巩膜的正常生长发育密切相关,对巩膜的生长及代谢也起着重要的调节作用。我们采用PCR、基因测序的方法在内蒙古地区单纯性病理性近视患者群体中进行DCN基因突变筛查,分析其与单纯性病理性近视的关系。

1 对象和方法

1.1 对象 选取单纯性病理性近视患者100例,为2011-09/2014-12年就诊于内蒙古科技大学附属第一医院眼科的病理性近视患者,纳入标准:(1)经散瞳验光确定双眼屈光状态 $\geq -6.00D$,A型超声测量仪测眼轴长度 $\geq 26mm$;(2)青少年时期屈光度发展迅速且持续性加深,成年后发展速度变慢或相对静止;(3)眼底具有特征性改变:如后巩膜葡萄肿、豹纹状眼底、近视弧形斑、黄斑部病变等(儿童可无上述改变);(4)无全身性疾病。排除标准:

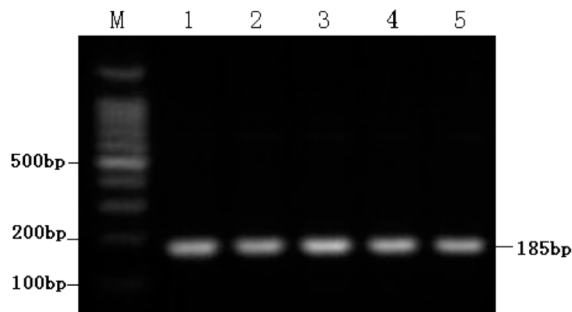


图1 DCN 外显子7 扩增电泳图 M:100bp Lander Marker; 1~5:DCN 外显子7 扩增产物。

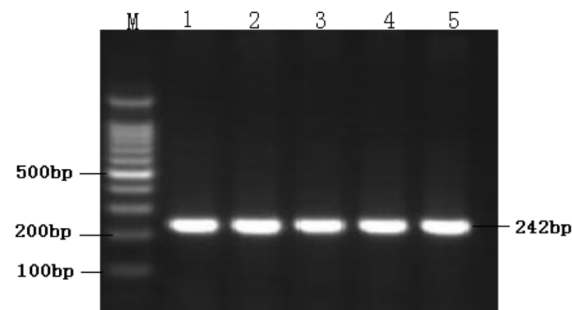


图2 DCN 外显子8 扩增电泳图 M:100bp Lander Marker; 1~5:DCN 外显子8 扩增产物。

(1)排除眼外伤及手术史;(2)排除因其他眼科疾病而并发的病理性近视;(3)排除患有全身性疾病的患者,如高血压病、糖尿病等。正常对照组 100 例,纳入标准:(1)电脑验光仪测屈光度: $\pm 0.50D$ (等值球镜)。(2)A 型超声测量仪测眼轴长: $<26mm$ 。(3)不伴病理性近视眼底改变。所有研究对象均无其它遗传病,均为内蒙古地区汉族。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取及基因扩增 抽取患者的外周静脉血,应用 DNA 提取试剂盒(Axygen 公司)提取全血基因组 DNA。根据 DCN 基因的序列设计 2 对引物,外显子 7:AGAAAGGCATCCATGTGTGG/TGTACTTATGCTCTGCCAG(185bp, 56°C);外显子 8:ATTATTTTCTATCGTTTCATGTTG/AATGAGGGCTTTCCTGAGAA(242bp, 56°C)(引物序列后为片段长度和复性温度)。应用 PCR 分别扩增 DCN 基因 2 个外显子及其邻近内含子,PCR 产物经 2% 琼脂糖电泳,于紫外光下检测电泳结果。

1.2.2 PCR 产物测序 将 PCR 扩增产物送 invitrogen 公司进行正向和反向测序反应分析,利用 DNASTar 7.1 软件将双向测序的结果进行拼接,得到完整序列。使用 DNASTar 7.1 软件将拼接后的序列与在 GenBank 中查到的 DCN 序列(NG_011672.1)进行比对。

统计学分析:运用 SPSS 17.0 软件包建立数据库。采用卡方检验和 Fisher 双侧确切概率检验进行统计学分析。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 PCR 扩增 所有病理性近视患者和正常对照组均扩增出目的条带。Decorin 第 7 外显子片段长度为 185bp,外显子 8 片段长度为 242bp,PCR 扩增的 DNA 产物大小与引物设计吻合(见图 1、2)。

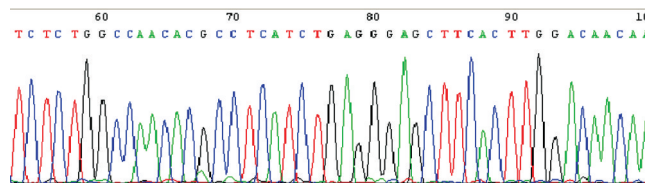


图3 外显子7 扩增产物测序图。

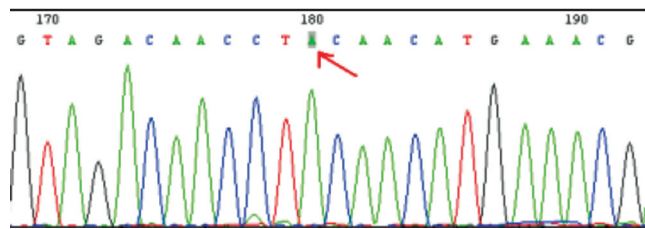


图4 外显子8 正常测序图。

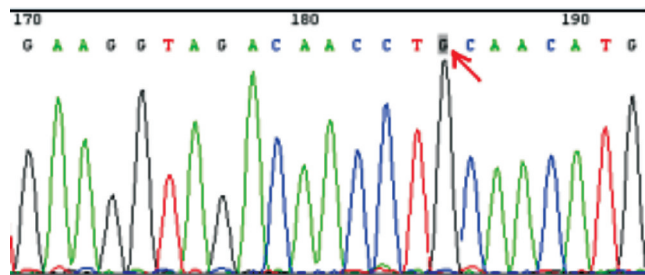


图5 外显子8 突变测序图。

2.2 DNA 测序结果分析 使用 DNASTar 7.1 软件将双向测序的结果进行拼接,将拼接后的序列进行比对,分析突变位点。DCN 基因外显子 7 在单纯性病理性近视组和对照组中均未发现突变位点如图 3 所示(任选部分所测序列图谱)。在病理性近视组有 2 个病例发现突变位点,均为 41775T→C,位于外显子 8 的邻近内含子区域,如图 4(正常外显子 8 测序图)、图 5 所见(外显子 8 发生突变位点测序图),其余病理性近视组患者和正常对照组患者均未发现基因突变位点。经统计学分析单纯性高度近视组与对照组之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。

3 讨论

近视的发病主要受环境因素与遗传因素影响,环境因素如近距离作业、阅读时间过长、阅读时距离过短、阅读时照明光线过强或过弱等,但遗传因素在近视的发病中也起着举足轻重的作用。虽然病理性近视的遗传学研究取得了很大进展,现已成功鉴定出病理性近视的多个易感基因及遗传连锁位点,但是要鉴定其致病基因还有一定难度。1998 年 Young 等^[2]对 1 个德国/意大利族混血常染色体显性遗传的高度近视的大家系进行连锁分析和全基因组扫描分析确定了常染色体显性遗传单纯高度近视的两个基因位点:18p11.31(MYP2)和 12q21-23(MYP3),Nürnberg 等^[3]对一个 6 代德国高度近视家系进行基因芯片研究,该家系在 MYP3 基因处 12q14.3-12q21.31 区域显示出高度连锁。Li 等^[4]对来自 254 个家系共 1411 个研究对象进行了全基因组扫描,在 12 号染色体 q21.2-24.12(36.59 cM)区域得到了 3.48 的最高 LOD 值。可见 MYP3 基因在更多的家系中得到了验证。DCN 基因定位于 12q23 恰位于该区域内,该基因由 8 个外显子和 7 个内含子构成^[5-6],其编码的核心蛋白聚糖是一种隶属于富含亮氨酸的小分子蛋白聚糖(the small leucine-rich repeat proteins, SLRPs)家族的细胞外蛋白。SLRPs 被认为与巩膜和玻璃体的胶

原纤维构成有关,眼球的形状绝大部分取决于巩膜和玻璃体,所以SLRP家族的缺陷可能会导致近视。核心蛋白聚糖在人巩膜组织中的表达已经得到了证实^[7-8],其在巩膜组织中含量的改变和分布排列的异常将会影响巩膜组织的结构与功能。内蒙古自治区地处内蒙古高原,空气稀薄,日照时间长,且常年低压缺氧,尤其太阳光中的强紫外线辐射甚至可诱发基因突变。我们对内蒙古地区100个单纯性病理性近视者的DCN基因进行了分析,发现其中有2例患者出现基因突变,均为41775T→C,位于外显子8的邻近内含子区域,其余正常对照组患者均未发现基因突变位点。与对照组比较单纯性高度近视组外显子8邻近内含子区域出现的基因突变频率较低,经统计学分析组间无差异($P>0.05$)。分析可能是新出现的单核苷酸多态。本研究未发现DCN的第7、第8外显子在单纯性高度近视患者中存在突变,可以初步排除DCN基因第7、第8外显子与本组高度近视的相关性。虽然突变区域位于内含子区域,不编码蛋白质,但是内含子的碱基改变也可以对基因表达进行调节,可能影响蛋白质的结构或功能。故不能完全否认DCN基因是高度近视致病基因的可能性。关于单纯性高度近视的致病基因有待于进一步扩大样本量并在其他外显子中继续查找。

参考文献

- 1 胡诞宁,褚仁远,吕帆,等. 近视眼学. 北京:人民卫生出版社. 2009: 225-277
- 2 Young TL, Ronan SM, Alvear AB, *et al.* A second locus for familial high myopia maps to chromosome 12q. *Am J Hum Genet* 1998; 63(5): 1419-1424
- 3 Nürnberg G, Jacobi FK, Broghammer M, *et al.* Refinement of the MYP3 locus on human chromosome 12 in a German family with Mendelian autosomal dominant high-grade myopia by SNP arraymapping. *Int J Mol Med* 2008; 21(4):429-438
- 4 Li YJ, Guggenheim JA, Bulusu A, *et al.* An international collaborative family-based whole-genome linkage scan for high-grade myopia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;100(7):3116-3127
- 5 Danielson KG, Fazzio A, Cohen I, *et al.* The human decorin gene: intron-exon organization, discovery of two alternatively spliced exons in the 5-prime untranslated region, and mapping of the gene to chromosome 12q23. *Genomics* 1993;15(10):146-160
- 6 Vetter U, Vogel W, Just W, *et al.* Human decorin gene: intron exon junctions and chromosomal localization. *Genomics* 1993;15(8):161-168
- 7 Young TL, Scavell GS, Paluru PC, *et al.* Microarray analysis of gene expression in human donor sclera. *Mol Vis* 2004;10(10):163-176
- 8 Young TL, Guo XD, King RA, *et al.* Identification of genes expressed in a human scleral cDNA library. *Mol Vis* 2003;9(1):508-514