

# Avellino 角膜营养不良家系致病基因的定位研究

曹文萍<sup>1\*</sup>, 苑海刚<sup>2\*</sup>, 李雪<sup>1</sup>, 刘平<sup>1</sup>, 胡琦<sup>1</sup>

基金项目:黑龙江省博士后科研启动金资助项目(No. LBH-Q13126);哈医大一院科研基金(No. 2011BS017)

作者单位:<sup>1</sup>(150001)中国黑龙江省哈尔滨市,哈尔滨医科大学附属第一医院眼科;<sup>2</sup>(150001)中国黑龙江省哈尔滨市,黑龙江中医药大学附属第一医院

作者简介:曹文萍,女,医学博士,主治医师,研究方向:角膜病及眼视光学;苑海刚,男,医学博士,主治医师,研究方向:遗传疾病的基础研究。

注:\*曹文萍和苑海刚对本文贡献一致。

通讯作者:胡琦,教授,主任医师,研究方向:角膜病、眼视光学。

huqi51115@sina.com

收稿日期:2016-07-08 修回日期:2016-08-22

## Gene mapping in Avellino corneal dystrophy pedigree

Wen-Ping Cao<sup>1</sup>, Hai-Gang Yuan<sup>2</sup>, Xue Li<sup>1</sup>, Ping Liu<sup>1</sup>, Qi Hu<sup>1</sup>

Foundation items: the Ph. D. Programs Foundation of Heilongjiang Province (No. LBH-Q13126); the Research Foundation of the First Affiliated Hospital, Harbin Medical University (No. 2011BS017)

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital, Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China; <sup>2</sup>First Affiliated Hospital, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China

Co-first authors: Wen-Ping Cao and Hai-Gang Yuan

Correspondence to: Qi Hu. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital, Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China. huqi51115@sina.com

Received:2016-07-08 Accepted:2016-08-22

## Abstract

• AIM: To point the susceptible gene in Avellino corneal dystrophy family with autosomal dominant inheritance.

• METHODS: Genomic DNA was extracted from the peripheral blood samples of all individuals of the pedigree. Several microsatellite makers were selected for gene scan in the hot regions of mutation. Linkage analysis was carried out using a Linkage software package. The haplotype data were processed using Cyrillic software to define the region of the disease gene.

• RESULTS: In our pedigree, significant evidence of linkage was obtained at marker D5S396 and D5S393 [LOD score (Z)=3.01, recombination fraction ( $\theta$ )=0.00]. The haplotype analysis of our pedigree was located between the microsatellite markers D5S808 and D5S638.

• CONCLUSION: The pathogenic gene of the Avellino corneal dystrophy pedigree is traced to a 11.2 cM region

in the chromosome 5q.

• KEYWORDS: corneal dystrophy; autosomal dominant; linkage analysis; gene mutation

Citation: Cao WP, Yuan HG, Li X, et al. Gene mapping in Avellino corneal dystrophy pedigree. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2016;16(10):1921-1923

## 摘要

目的:对收集到的一个常染色体显性遗传性 Avellino 角膜营养不良家系的致病基因进行初步定位。

方法:采集家系中所有成员的外周静脉血,从中提取基因组 DNA 样本。在热点区域内选取微卫星标记进行基因扫描,分别利用 LINKAGE 软件和 CYRILLIC 软件进行连锁分析及单体型分析,以确定候选基因所在的染色体区域。

结果:该 Avellino 角膜营养不良家系的连锁分析结果在 D5S396 和 D5S393 这两个微卫星标记处获得最大优势对数计分(LOD)值, $Z_{\max}=3.01(\theta=0.00)$ 。单体型分析将致病基因定位于微卫星标记 D5S808 和 D5S638 之间。

结论:该 Avellino 角膜营养不良家系的致病基因初步定位于染色体 5q 上的遗传距离约为 11.2 厘摩(cM)的一段区域内。

关键词:角膜营养不良;常染色体显性;连锁分析;基因突变

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2016.10.34

引用:曹文萍,苑海刚,李雪,等. Avellino 角膜营养不良家系致病基因的定位研究. *国际眼科杂志* 2016;16(10):1921-1923

## 0 引言

Avellino 角膜营养不良(Avellino corneal dystrophy, ACD),亦称为混合性格子-颗粒状角膜营养不良,属常染色体显性遗传疾病。最早于意大利 Avellino 的三个家庭中发现,并由此得名<sup>[1]</sup>。临床表现个体差异明显,裂隙灯检查常可见到角膜基质内有盘状、环状、雪花状、星形的混浊,线形混浊少见,且与格子状角膜营养不良比较不典型,病理检查发现在角膜基质中有较多圆点状结晶体聚集,常伴有淀粉样物质存在<sup>[2]</sup>。目前医学研究发现,ACD 均与 5 号染色体上的 TGFBI 基因突变相关<sup>[3]</sup>。本研究通过微卫星标记(short tandem repeat polymorphism, STRP)及连锁分析的方法,对来自我国北方的一个连续 4 代遗传的 ACD 家系进行了致病基因的初步定位,为下一步在定位区域内筛选候选基因打下基础。

## 1 对象和方法

1.1 对象 本课题收集了来自我国黑龙江省的一个角膜营养不良家系(图 1),该家系共 4 代,17 个家系成员(其中患者 8 例),年龄为 2~64 岁。该家系患者表现为双眼同时发病,发病年龄及角膜混浊程度均有显著差别。轻

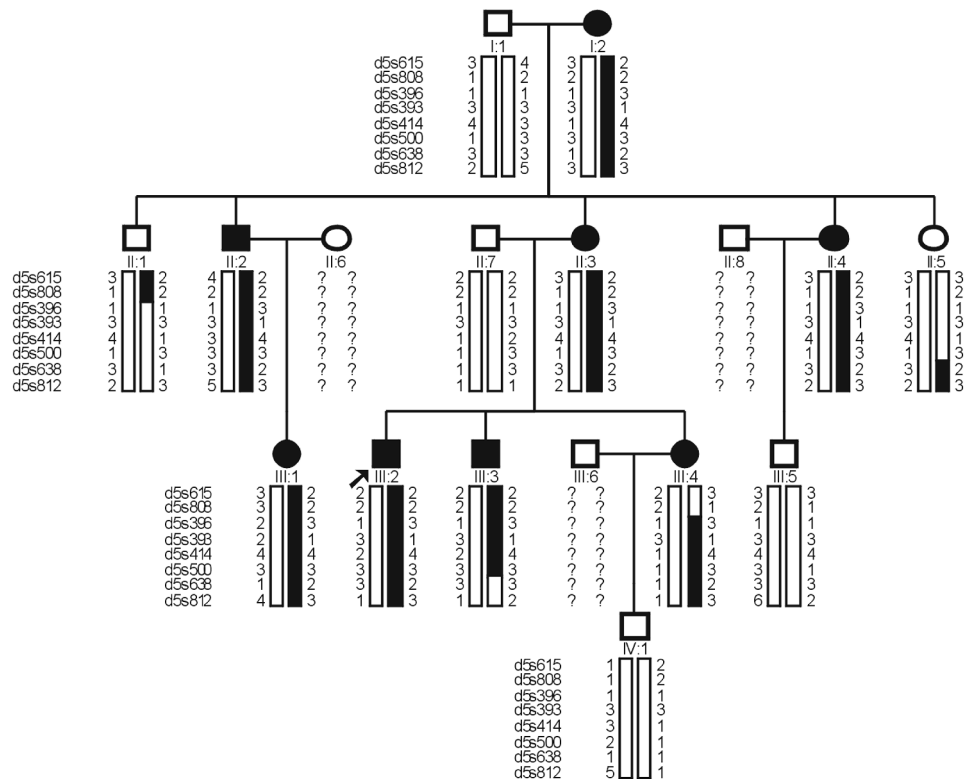


图1 ACD家系的单体型 方形和圆形分别表示男女性别,空白代表正常人,黑色填充代表患者,斜线代表已经去世。黑色矩形条代表致病基因的单倍型,白色矩形条代表正常基因的单倍型。

症者均发病较晚,仅可见角膜中央散在的点、环状混浊,无明显的视力下降。随年龄增长,角膜混浊呈缓慢进行性发展;重症病患大多于10岁之前发病,病患角膜基质内常呈星形、环状、雪花状、盘状混浊,大部分角膜被覆盖,导致视力受到严重影响。家系中患者除上述眼部角膜异常外,均无其他全身疾病或异常。家系内正常成员未检出眼部及其它相关系统疾病。临床确定诊断为 Avellino 角膜营养不良,该病在家系中世代连续传递,系谱分析符合常染色体显性遗传的特征。

### 1.2 方法

**1.2.1 提取基因组的 DNA** 参加调查的所有家系成员均已明确了解本试验的目的及意义,并自愿签署知情同意书。于外周静脉处抽取所有家系成员静脉血各5mL,经EDTA抗凝处理后,通过 QIAGEN 公司生产的 QIAamp DNA Blood Mini Kit 试剂盒提取血液样本基因组的 DNA。

**1.2.2 短串联重复序列多态性的选取** 根据相关医学资料报道发现,截至目前被发现的所有格子状角膜营养不良及常染色体显性遗传导致的 Avellino 角膜营养不良均为位于5号染色体5q31上的 TGFBI 基因突变所导致<sup>[4-8]</sup>。因此,本研究选取了 TGFBI 基因附近的8个微卫星标记(表1),群体杂合度均在75%以上。所选用的微卫星标记来自 marshfield 网站 (<http://www.marshfieldclinic.org/research/genetics>),序列及相关信息来自 NCBI 网站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>),由美国 Invitrogen 公司合成。

**1.2.3 聚合酶链反应** 聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 体系为25 $\mu$ L,其中含有 DNA 25ng, Taq DNA 聚合酶 1.0U,其它成分终浓度为 dNTP 200 $\mu$ mol/L,单向引物 0.4 $\mu$ mol/L, MgCl<sub>2</sub> 1.0 $\mu$ mol/L,最后加 ddH<sub>2</sub>O 至终体积 20 $\mu$ L。反应条件为 95 $^{\circ}$ C 5min, 94 $^{\circ}$ C 30s, 57 $^{\circ}$ C ~ 62 $^{\circ}$ C

30s, 72 $^{\circ}$ C 30s, 35个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7min。

**1.2.4 基因分型及等位基因共享** 将所得 PCR 产物 5 $\mu$ L 加 10 $\mu$ L 的变性上样缓冲液 (其中含 0.05% 溴酚蓝, 0.05% 二甲苯青 FF, 1mmol/L EDTA 和 95% 甲酰胺溶液),将温度控制在 98 $^{\circ}$ C,进行变性 5min,然后迅速冰浴,接着于 8% 变性的聚丙烯酰胺凝胶中进行电泳,最后用 0.1% 硝酸银溶液进行染色,并对微卫星标记的产物进行基因分型。

**1.2.5 连锁分析** 利用 LINKAGE 软件包 5.1 版对 ACD 家系进行连锁分析,将杂合子中致病基因的频率和外显率分别设定为 0.0001 及 0.9999,在群体中各等位片段频率相同,重组率( $\theta$ )分别在 0.00、0.10、0.20、0.30、0.40、0.50 时对 LOD 值进行计算。试验所得结果的判定标准:LOD 值 >1 视为提示连锁;LOD 值 < -2 视为否定连锁。

**1.2.6 单体型分析** 采用 Cyrillic 软件,将已绘制好的家系个体遗传标记的等位基因型导入,对图谱中所产生的分型信息依据其上下代遗传关系进行手动调节。按照单体型在角膜营养不良家系患者中的共享情况,可以发现其发生相互交换,最终形成由所有病患共享的某段区域。

## 2 结果

**2.1 连锁分析** 结果显示,在 D5S396 和 D5S393 两个微卫星标记处得到最大 LOD 值,  $Z_{max} = 3.01$  ( $\theta = 0.00$ );在 D5S396、D5S393、D5S500 这三个微卫星标记处获得连续的阳性 LOD 值,分别为 3.01、3.01 和 1.81 ( $\theta = 0.00$ ),并且都大于 1,提示该 Avellino 角膜营养不良家系的致病基因与此区域连锁,详细数据见表 2。

**2.2 致病基因的染色体定位** 单体型分析结果如图 1,将致病区域确定在 D5S808 和 D5S638 之间,根据 Marshfield 图谱查询获得上述两个遗传标记之间的遗传距离约为 11.2 厘摩 (cM)。

表1 ACD 家系致病基因定位所用的微卫星标记

微卫星标记	片段大小(bp)	正向引物	反向引物
D5S615	359	AACCCTCAAGCAGTCTAGG	TACACCATCATCTCTCCTGG
D5S808	116 ~ 132	TGCCATTGACACTCCAGCC	CTGTGCCCAACCATGAATAG
D5S396	165	CCCAGAATTAACATGGTGA	TAGAGACAGTGTGCTGAGAGG
D5S393	162 ~ 182	TTCTACCTGNCCTTTCTCT	CATTCTCATTCTCATTCC
D5S500	270	CGATTAGGGATCAGTCAACA	TCGGTGAAATGCAACTACTT
D5S414	185 ~ 206	GGCCAGTTCAGTCAAGTG	TGGTTCACAGCATATAGCC
D5S638	133 ~ 145	GGAAACACTCAGTAGTATCATTGCC	TTTAGAGAAACACACGCACCAGTA
D5S812	154 ~ 162	TACCACAGCAACCACAAAGA	GAGGAAAGCAAAGACCATGA

表2 ACD 家系两点间连锁分析结果

微卫星标记	位置(cM)	LOD 值 $\theta =$					
		0.00	0.10	0.20	0.30	0.40	0.50
D5S615	133.65	$-\infty$	0.60	0.75	0.60	0.33	0.00
D5S808	137.46	$-\infty$	-0.19	0.01	0.07	0.06	0.00
D5S396	139.33	3.01	2.51	1.94	1.31	0.62	0.00
D5S393	140.72	3.01	2.51	1.94	1.31	0.62	0.00
D5S500	140.72	1.81	1.49	1.13	0.73	0.31	0.00
D5S414	141.82	0.90	0.73	0.54	0.36	0.18	0.00
D5S638	148.63	$-\infty$	0.60	0.75	0.60	0.33	0.00
D5S812	150.34	$-\infty$	0.58	0.62	0.51	0.30	0.00

### 3 讨论

Avellino 角膜营养不良, 以往大多眼科学者均认为其是颗粒状角膜营养不良的一种变异类型, 在日本等国家, ACD 是遗传性角膜营养不良中最常见的类型, 约占 TGFBI 基因相关角膜营养不良的 72% 以上<sup>[9]</sup>, 导致 Avellino 角膜营养不良的地域上显著差异的原因, 目前尚不清楚。

本研究通过对我国北方一个连续 4 代遗传的 Avellino 角膜营养不良家系进行连锁分析及单体型分析, 将其致病基因定位于染色体 5q 上的遗传距离约为 11.2cM 的一段区域内。该区域内确实存在着与 Avellino 角膜营养不良密切相关的基因——TGFBI 基因, 但也许存在其他致病的新候选基因, 这需要我们通过进一步的精细扫描来确定或排除。对遗传性疾病的致病基因定位和致病突变检测是我们研究其发病机制的基础和关键。

截至目前, 所有报道过的散发病例及家系的致病突变类型均是 TGFBI 基因上的 R124H 突变<sup>[5-8]</sup>。Okada 等<sup>[7]</sup>于 1998 年首次指出 Avellino 角膜营养不良表型的病情轻重程度均与突变的纯合状态或杂合状态密切相关, 纯合子患者则表现为发病年龄较早、角膜严重混浊以及视力明显受损; 而杂合子的病患则发病年龄较晚、角膜混浊较轻、对视力基本无明显影响等特点。Fujiki 等<sup>[8]</sup>在 1998 年的角膜营养不良家系研究中再次证明了以上结论。此外, Watanabe 等<sup>[10]</sup>在 2001 年的角膜营养不良家系试验研究中发现同为纯合性 R124H 突变的病患中, 具有明显不同的两种临床表型。其中一种临床表型表现为: 角膜中央部呈蜂窝状混浊, 在蜂窝状混浊的中心位置可见透明的无混浊区; 另外一种临床表型表现则是: 角膜中央布满灰白色、圆点状混浊。他们认为在 Avellino 角膜营养不良的致病机制中可能存在着其他一些调控基因或调控因子, 对 R124H 突变起到一定的修饰作用, 但是具体的致病机制和遗传学基础还有待于进一步研究。

随着多种类型引起角膜营养不良的致病基因及其相关基因突变逐渐地被确定, 基因型与表现型相对应的谱系已经逐步趋于完善, 更多眼科学者们通过尝试利用分子生物学方法从角膜营养不良的病因及病变机制的角度对其

进行客观分类与诊断。这种比较客观且精确的基因诊断方法, 一方面利于临床医师对许多过去不为人知且容易相互混淆的角膜营养不良进行鉴别<sup>[11]</sup>; 另一方面, 通过基因诊断的方法我们能判定病患及其后代的基因表型, 可使医生在病患出现症状之前, 采取针对性预防治疗措施, 延缓病情发展, 减轻病情程度。

#### 参考文献

- Folberg R, Alfonso, Croxatto JO, et al. Clinically atypical granular corneal dystrophy with pathologic features of lattice-like amyloid deposits: a study of three families. *Ophthalmology* 1988;95(1):46-51
- Klintworth GK. Advances in the molecular genetics of corneal dystrophies. *Am J Ophthalmol* 1999;128(6):747-754
- Munier FL, Korvatska E, Djemai A, et al. Kerato-epithelin mutations in four 5q31-linked corneal dystrophies. *Nat Genet* 1997;15(3):247-251
- Gupta SK, Hodge WG. A new clinical perspective on corneal dystrophies through molecular genetics. *Curr Opin Ophthalmol* 1999;10(4):234-241
- Mashima Y, Konishi M, Nakamura Y. Severe form of juvenile corneal stromal dystrophy with homozygous R124H mutation in the keratoepithelin gene in five Japanese patients. *Br J Ophthalmol* 1998;82(11):1280-1284
- Korvatska E, Henry H, Mashima Y, et al. Amyloid and non-amyloid forms of 5q31-linked corneal dystrophy resulting from keratoepithelin mutations at Arg-124 are associated with abnormal turnover of the protein. *J Biol Chem* 2000;275(15):11465-11469
- Okada M, Yamamoto S, Inoue Y, et al. Severe corneal dystrophy phenotype caused by homozygous R124H keratoepithelin mutations. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39(10):1947-1953
- Fujiki K, Hotta Y, Nakayasu K, et al. Homozygotic patients with big-h3 gene mutation in granular dystrophy. *Cornea* 1998;17(3):288-292
- Mashima Y, Yamamoto S, Inoue Y, et al. Association of autosomal dominantly inherited corneal dystrophies with BIGH3 gene mutations in Japan. *Am J Ophthalmol* 2000;130(4):516-517
- Watanabe H, Hashida Y, Tsujikawa K, et al. Two patterns of opacity in corneal dystrophy caused by the homozygous BIG-H3 R124H mutation. *Am J Ophthalmol* 2001;132(2):211-216
- Kocak-Altintas AG, Kocak-Midillioglu I, Akarsu AN, et al. BIGH3 gene analysis in the differential diagnosis of corneal dystrophies. *Cornea* 2001;20(1):64-68