

Peters 异常 PITX2 及 PAX6 基因型表型分析

孟永¹, 卢国华², 谢阳², 孙新成², 黄丽琴²

引用:孟永,卢国华,谢阳,等. Peters 异常 PITX2 及 PAX6 基因型表型分析.国际眼科杂志 2019;19(12):2118-2122

基金项目:常州市卫生局指导性项目(No.WZ201315)
作者单位:¹(213000)中国江苏省常州市第三人民医院眼科;
²(213000)中国江苏省常州市第二人民医院眼科
作者简介:孟永,毕业于中山大学中山眼科中心,硕士,主治医师,研究方向:眼底病。
通讯作者:黄丽琴,毕业于中山大学中山眼科中心,硕士,主治医师,研究方向:眼遗传病. 13861047902@163.com
收稿日期:2019-06-19 修回日期:2019-11-08

摘要

目的:分析中国人 Peters 异常(PA)患者的临床特征,研究 Peters 异常患者 PITX2 及 PAX6 基因变异情况。

方法:选取 2016/2019 年在常州市第二人民医院及第三人民医院眼科就诊的 15 例 Peters 异常患者,并收集详细的相关临床资料。征得患者及其家系成员的同意后抽血制备基因组 DNA,用聚合酶链反应(PCR)对致病基因 PITX2 及 PAX6 的编码区及其临接内含子进行扩增后,直接测序筛查中国人群 Peters 异常患者 PITX2 及 PAX6 基因变异,异源双链-单链构象多态性分析(HA-SSCP)的方法对突变患者及其家系成员及 80 例正常对照进行验证;分析比较国内已报道的 Peters 异常患者 PITX2 及 PAX6 基因突变并研究其相关表型。

结果:Peters 异常患者 15 例 PITX2 基因突变筛查结果发现了 1 种新 PITX2 的突变 c.296delG(P.R99fsx56),导致该基因的功能异常,分析突变患者临床特征,该患者右眼诊断为 Axenfeld-Rieger 综合征(ARS),左眼诊断为 Peters 异常。而家系成员中该患者父母及无亲缘关系的正常对照者均未发现相同突变,故此突变为新生突变。PAX6 基因突变筛查未能发现突变。

结论:PA 患者 15 例中检测到 1 个新 PITX2 基因突变,丰富了 PITX2 基因突变频谱,进一步明确了 PA 合并 ARS 眼病的临床特点,为该种少见眼病的临床诊断和发病原因提供了依据。

关键词:Peters 异常;Axenfeld-Rieger 综合征;PITX2 基因;PAX6 基因;突变

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2019.12.28

Genotype-phenotype analysis in Peters' anomaly patients with PITX2 and PAX6 genes

Yong Meng¹, Guo-Hua Lu², Yang Xie², Xin-Cheng Sun², Li-Qin Huang²

Foundation item: Guidance Project of Changzhou Municipal Health

Bureau (No.WZ201315)

¹Department of Ophthalmology, Changzhou No.3 People's Hospital, Changzhou 213000, Jiangsu Province, China; ²Department of Ophthalmology, Changzhou No. 2 People's Hospital, Changzhou 213000, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Li-Qin Huang. Department of Ophthalmology, Changzhou No. 2 people's Hospital, Changzhou 213000, Jiangsu Province, China. 13861047902@163.com

Received:2019-06-19 Accepted:2019-11-08

Abstract

• **AIM:** To analyze the clinical characteristics of patients with Peters' anomaly (PA) in Chinese, and to study the variation of PITX2 and PAX6 genes in patients with PA, so as to provide basis for clinical diagnosis and pathogenesis of this rare ophthalmopathy.

• **METHODS:** Fifteen patients with PA were selected from 2016 to 2019 in Changzhou No. 2 People's Hospital and Changzhou No. 3 People's Hospital, and the detailed clinical data were collected. Genomic DNA was prepared from venous leukocytes after obtaining the consent of the patients and their family members. The coding regions and the flanking exon-intron junctions of the PITX2 and PAX6 genes were amplified by polymerase-chain reaction (PCR) and subsequently analyzed by direct sequencing. Variations detected were further evaluated in any unaffected member and 80 normal controls by HA-SSCP. Analyzing and comparing the mutation of PITX2 and PAX6 genes and the related phenotypes in Chinese patients with PA.

• **RESULTS:** Sequence analysis of the PITX2 gene revealed one novel mutation c.296delG (P.R99fsx56) in fifteen patients with PA. Nucleotide sequence analysis showed that this mutation led to the functional abnormal of this gene. The clinical characteristics of the mutant patient were analyzed, the right eye of the patient was diagnosed as Axenfeld-Rieger syndrome (ARS), and the left eye was diagnosed as Peters' anomaly. However, the mutation was not found in the family members of the patient's parents and unrelated normal controls, and therefore it was a de novo mutation. No mutation was found in PAX6 gene mutation screening.

• **CONCLUSION:** A novel PITX2 gene mutation was detected in 15 patients with PA, which was the first report of PITX2 gene mutation in a patient with Peters' anomaly complicated with ARS in China. The results enrich the mutation spectrum of PITX2 gene and further clarify the clinical characteristics of PA complicated with ARS. All these will be useful foundations for clinical diagnosis and

pathogenesis. Furthermore, it enriches our knowledge of genotype-phenotype relationship of PA. In addition, our results may provide basis for the functional and genomic study of the pathogenesis of the disease in the future.

• **KEYWORDS:** Peters' anomaly; Axenfeld - Rieger syndrome; PITX2 gene; PAX6 gene; mutation

Citation: Meng Y, Lu GH, Xie Y, *et al.* Genotype-phenotype analysis in Peters' anomaly patients with PITX2 and PAX6 genes. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2019;19(12):2118-2122

0 引言

Peters 异常 (Peters' anomaly, PA) 是较少见的眼前段发育不良性眼病,1906 年由 Peters 首先报道,临床表现为先天的角膜中央区混浊,对应区域的角膜后基质层变薄和后弹力层缺损、虹膜角膜粘连等^[1]。该病在新生儿中的发病率国外报道为 1.2/100000,绝大部分病例为散发,但也有一些常染色体显性及隐性遗传的报道^[2-3]。Peters 异常分型:按照文献描述的方法可将 Peters 异常分为 I 型和 II 型,仅有角膜混浊、虹膜前粘连而无晶状体异常者为 I 型,同时合并白内障或存在晶状体与角膜内皮粘连者为 II 型,如果还伴有神经起源的全身异常则诊断为 Peters 综合征。临床中 Peters 异常患者可合并有其它眼部非特征性异常如巩膜化角膜、牵牛花综合征、Axenfeld-Rieger 综合征 (Axenfeld-Rieger syndrome, ARS)、永存原始玻璃体增生症 (persistent hyperplastic primary vitreous, PHPV) 等^[4-5]。目前国外有 Peters 异常相关致病基因 PITX2、PAX6 等的分子遗传学的研究;而国内 Peters 异常 PITX2 和 PAX6 基因的报道很少^[6-7]。PITX2 是 Paired-Bicoiced 同源盒蛋白家族成员,剪切翻译形成 271aa,317aa,324aa 三种亚型,这三种亚型同源结构域以及羧基端的序列相同,而氨基端不同,第 60 位的氨基酸同源结构域 2 (homeobox-2) 可通过其内在的“螺旋-旋转-螺旋” (helix-turn-helix, HTH) 结构与特异性 DNA 位点相结合,在发育中起着重大作用,第 50 位同源结构域氨基酸赖氨酸对于特异性结合 DNA 具有决定性作用;PAX6 是眼球发育的主控基因之一,其编码产物是结合蛋白家族之一,其中的配对盒结构域和同源结构域作为高度保守的转录因子,可通过结合特定序列在视网膜、晶状体和角膜中广泛表达。在中国人群中进行该项研究,既可以了解中国人群 Peters 异常患者中 PITX2 和 PAX6 基因的突变情况,分析中国人群中 Peters 异常基因型表型的关系,为进一步研究其发病机制提供线索。

1 对象和方法

1.1 对象 对 2016-01-01/2019-03-30 于常州市第二人民医院和第三人民医院就诊的 15 例 Peters 异常患者的临床资料进行分析,详细询问病史和家族史并进行 PITX2 和 PAX6 基因筛查;对发现的突变患者其家系成员均完善眼科检查,并排除全身的异常,收集临床的资料。80 例正常对照者均无眼或全身遗传性疾病,和患者无任何血缘关系。遵循相关伦理原则,征得患者及所有成员的同意后抽血制备基因组 DNA,并收集相关临床资料。

1.2 方法

1.2.1 聚合酶链反应 (PCR) 扩增 采集 Peters 异常患者和所有成员外周血 DNA,引物序列及扩增条件见本文作者之前发表 Peters 异常一文^[6]。

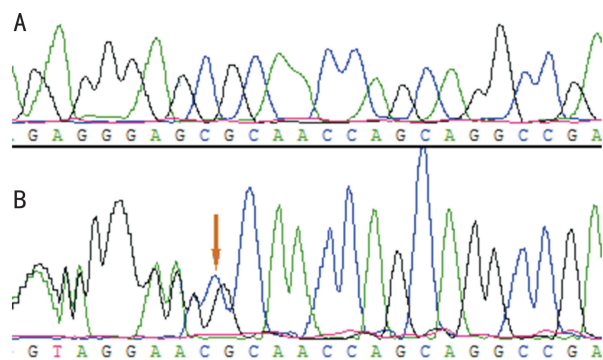


图 1 正常对照者及突变患者测序图 A:正常对照者;B:突变患者。

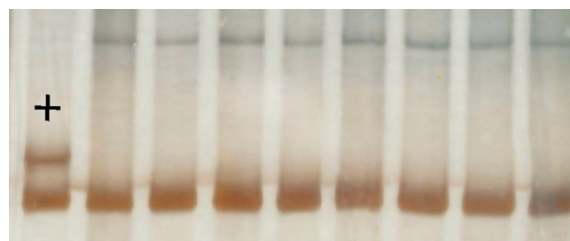


图 2 异源双链-单链构象多态性分析结果 +:突变患者。

1.2.2 突变基因筛查 PCR 产物纯化以后,加入 BigDye 双向测序反应,使用 AB13730 分析仪双向测序,测序发现的 PITX2 和 PAX6 新突变结果与 NCBI 数据库中 PITX2 及 PAX6 的序列进行比对,确定突变位点。根据人类基因组变异协会 (HGVS, <http://www.hgvs.org/>) 命名法对 PITX2 和 PAX6 突变进行命名。

1.2.3 测序结果分析 将碱基变异的测序结果输入 DNASTar 公司的 MapDraw 程序进行遗传信息改变的确定,NCBI 上人类基因组数据库中,PITX2 及 PAX6 两个基因的 DNA 序列作为标准序列,以识别碱基变异对氨基酸编码产生的影响。

1.2.4 异源双链-单链构象多态性分析 用异源双链-单链构象多态性 (HA-SSCP) 的方法对突变患者及其父母及 80 例正常对照进行对比验证。

2 结果

对 15 例 Peters 异常患者 PITX2 和 PAX6 基因的外显子及邻近的内含子区域进行直接测序,15 例 Peters 异常患者 PAX6 基因未能发现任何突变,患者中检测到 1 个已报道 PITX2 缺失突变 c.296delG (P.R99fsx56),正常对照者及突变患者测序图对照 (图 1)。分析其详细临床资料,这是中国首次报道伴有 ARS 的 Peters 异常眼病 PITX2 基因突变。

2.1 基因突变筛查 Peters 异常 1 例及 ARS 合并症患者中发现 1 例 PITX2 基因突变,该突变为缺失突变,位于 PITX2A 的第五外显子内,编码区第 296 位的碱基 G 缺失,该碱基缺失的后果会导致羧基端读码框架的移位,使编码的第 98 位氨基酸和原蛋白发生偏离,并且移位的读码框架在编码第 153 个氨基酸后产生了一个提前的终止密码子,致使理论上不能继续编码蛋白,致使 PITX2 羧基端丢失。

2.2 异源双链-单链构象多态性分析结果 异源双链-单链构象多态性的方法对直接测序结果做了进一步证实,结果该患者条带不同于正常对照者 (图 2),该患者家系中的表型正常的患者父母及 80 例正常对照者中均未发现同样突变,证明该患者的 PITX2 基因的突变存在。

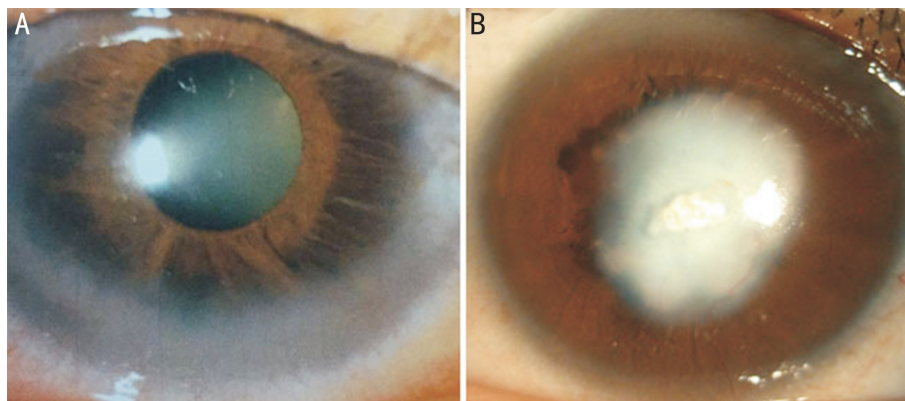


图3 突变患者双眼眼前节照相 A:右眼;B:左眼。

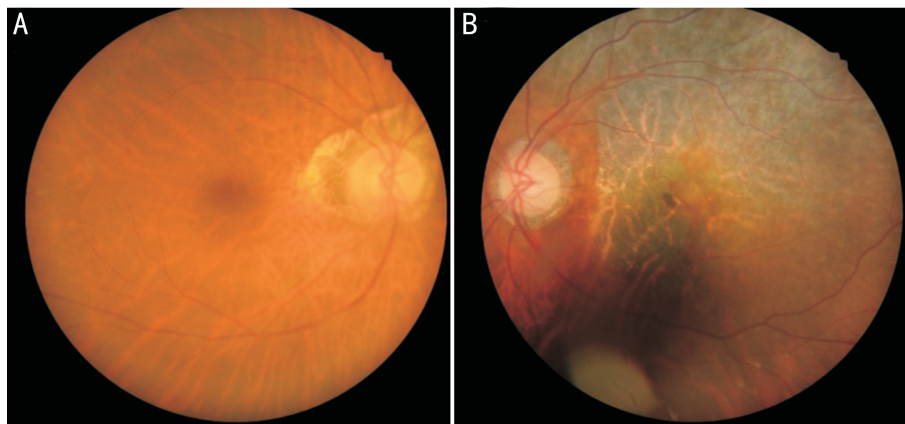


图4 图3同患者术后6mo 双眼眼底照相 A:右眼:未见明显异常;B:左眼:黄斑区发育不良。

2.3 PITX2 突变患者病例资料 PITX2 突变患者,男,45岁,因“双眼视物不见40余年”来我院门诊求进一步诊治(双眼眼前节照相见图3)。既往史:患者诉自出生被发现左眼发白,否认吸氧史、家族遗传病史以及外伤史。眼科检查:双眼水平性眼球震颤,视力右眼为0.3,左眼为光感,眼压:右眼19mmHg,左眼18mmHg。A超扫描眼轴右眼为26.00mm,左眼为27.00mm,由于双眼的眼球震颤明显,双眼验光:测不出。患者右眼角膜透明,虹膜发育不全虹膜萎缩裂孔形成,周边虹膜与角膜粘连,典型的改变是粗大的线样条带自虹膜周边部跨越房角附于Schwalbe线上,晶状体略混浊,眼底未见明显异常;左眼角膜中央混浊,直径5mm×5mm,白色混浊区的角膜后部基质变薄和后弹力层缺损,虹膜角膜粘连,周边角膜血管化,余眼内结构不清。患者及家属要求行左眼手术治疗,向患者详细介绍了左眼的自然病程、手术风险及并发症后,最后行左眼穿透性角膜成形术,术中见虹膜角膜黏连,瞳孔大小约2mm,白内障形成,随术中予以联合白内障摘除+眼前段玻璃体切除术,术后视力无明显提高。术后6mo患者复查,左眼角膜植片透明,眼底可见黄斑区发育不良(图4)。临床诊断:右眼ARS,左眼Peters异常II型。

3 讨论

眼前段发育不良(anterior segment dysgenesis, ASD)是一系列眼前段组织结构形态异常疾病的总称,可分为不同的亚型:ARS、PA、无虹膜等,这些亚型被认为是由神经嵴细胞的异常迁移引起的,它是受局部因素、受体、感应器以及视杯和眼周间质等组织之间的信号相互作用共同结

果^[8]。Peters异常和Axenfeld-Rieger综合征均可引起眼前段组织结构形态异常,患者常因眼压升高引起青光眼,最终导致视力严重障碍,是致盲性眼病。在本研究中,我们对2016-01-01/2019-03-30于常州市第二人民医院和第三人民医院就诊的15例Peters异常患者进行PITX2及PAX6基因突变分析,发现1例新的突变,并分析临床表型,该患者双眼分别表现为ARS和Peters异常两种罕见的眼前段异常表型,且左眼眼底合并严重黄斑部发育不良;并且回顾性分析比较国内已报道的Peters异常患者PITX2及PAX6基因突变以及相关表型。

3.1 Peters异常与ARS临床特点 Peters异常是先天性角膜混浊白斑中最常见的一种眼病,国外报道的新生儿发病率为1.2/100000,主要为散发病例,亦有常染色体显性及隐性遗传的报道。Peters异常同时合并白内障或存在晶状体与角膜内皮粘连者为II型。ARS是临床中少见病,患者可双眼发病,发病率约为1/200000,典型的特点为周边部角膜增厚突起和前移的Schwalbe线(角膜后胚胎环),虹膜的发育异常为:虹膜变薄裂孔或多瞳形成,瞳孔异位变形,葡萄膜外翻;ARS患者可有全身的异常如面额部的发育异常、牙齿发育不良,脐周赘皮等。两种疾病眼压升高导致的青光眼发病率约为50%。本研究中的该突变患者临床特点:(1)双眼先天起病,水平眼球震颤,斜视;(2)患者右眼角膜透明,虹膜发育不全虹膜萎缩裂孔形成,周边虹膜与角膜粘连,可见角膜后胚胎环;(3)左眼角膜中央混浊,直径5mm×5mm,白色混浊后方的基质变薄和后弹力层缺损,中央虹膜角膜粘连,合并白内障;以上

临床特点符合右眼 ARS 和左眼 Peters 异常 II 型的临床诊断。

3.2 Peters 异常基因型-表型的关系 已报道的 PITX2 基因突变大多导致 Axenfeld-Rieger 综合征,1977 年 Awan^[9]首次将一患者右眼 ARS 和左眼 Peter 异常合并为 Peters-Rieger 综合征,同时也提到了 Peters-Rieger 综合征的复杂性眼部和全身异常,但未进行相关基因分析;1999 年 W-Doward 第一个报道 PITX2 突变可引起 Peters 异常,2000 年 Perveen 等发现 PITX2 基因突变导致一患者左右眼 Axenfeld-Rieger 综合征和 Peters 异常两种眼病^[10-11],这似乎意味着两者眼病发病原因间某种共同联系。W-Doward 等报道 1 例 PITX2 基因第 3 内含子位点 A~T 突变引起 Peter 异常,而对侧眼有白内障和虹膜发育不良,并有牙齿和脐带异常,另有轻度左房发育不全病例,在 1999 年的功能分析中表明,被诊断为 Peters 异常合并 Axenfeld-Rieger 综合征。神经嵴细胞紊乱也影响身体的其他部分,除典型的全身表现外,还报告了其他不寻常的眼部异常。Bhate 等^[12]和 Park 等^[13]分别报告了 2 例 ARS 患者眼外肌发育不全引起的斜视。眼外肌起源于中胚层,神经嵴细胞起源的中胚层的发育障碍可能解释了眼外肌的临床表现。

2010 年贾秀华等报道了 1 例 10 月龄的中国男婴 PAX6 的新突变 P. Asn17Lys,该突变患者具有 Peters 异常临床特征,先证者双眼均有小角膜、小眼球、眼球震颤、先天性角膜白斑、虹膜发育不良和前极部白内障,B 超检查眼部表现为玻璃体和视神经结构异常,对患者进行了 PITX2 和 FOXC1 基因突变筛查,但均未发现突变^[7]。2011 年 Zhang 等^[14]报道了中国人人群中 PAX6 基因同一突变导致家系中不同患者眼部表型不同的病例。2016 年黄丽琴等^[6]报道 1 例 Peters 综合征患者 P. Arg69His 突变,而国外文献报道的该突变导致 Axenfeld-Rieger 综合征,该突变可导致 PPS 和 ARS 两种不同的眼前段发育不良临床表型。PA 以及 ARS 均是临床少见病。Peters 异常与 ARS 通常被认为眼前段发育不良的两种眼病,而临床中 Peters 异常患者可合并有其它眼部异常:包括小角膜、白内障、永存原始玻璃体增生症等,目前国外 Peters 异常合并 ARS 的 PITX2 的研究也仅有 2 篇,在本研究中,我们对 15 例 Peters 异常患者进行了 PITX2 基因和 PAX6 基因突变的筛查,PAX6 基因未能发现突变,PITX2 检测到了 1 种新的框移突变 c. 296delG(P. R99fsx56),该例患者右眼 ARS 合并左眼 Peters 异常。

PITX2 基因突变可引起同一患者 ARS 合并 Peters 异常表型,国外亦有 FOXC1 突变引起患者 ARS 合并 Peters 异常表型。2002 年,Honkanen 等^[15]首次报道了由 FOXC1 基因点突变(Phe112Ser)引起的 ARS 和 PA 双眼异常,患者无全身异常,视神经正常,眼压正常,无青光眼发生。Berry 等^[16]已经证明 FOXC1 和 PITX2 相互作用的,并推测这种相互作用在胚胎发生过程中神经嵴细胞的正确迁移分化必不可少,从而促进眼前段正常发育,从而解释了两基因突变能产生相同的表型原因。PITX2 属于 Paired-Bicooid 同型盒蛋白家族,60 个氨基酸组成的同源结构 2

可由其内部的“螺旋-旋转-螺旋”结构与特异性的 DNA 位点相结合,在个体发育中起重要作用。PITX2 基因在视网膜以及晶状体中无正常表达,但该研究中的患者眼底合并有黄斑发育不良,PAX6 编码产物属于结合蛋白家族,同源结构域识别、结合特定序列而调节其靶基因的表达,已有研究表明该基因与角膜、虹膜、晶状体形成后期、神经视网膜形成密切相关,PAX6 是同步不同来源的细胞间复杂相互作用的关键因素,而这些细胞类型都是适当的前后眼形态发生所必需的。但在本研究中患者 PAX6 基因的筛选阴性,对于该患者发生严重眼底黄斑发育不良的原因,有一些可能的解释:(1)可能存在尚未发现的修饰基因突变或其他一些影响表型的基因;(2)下游靶基因或辅助因子基因的特定等位基因可能与患者广泛的眼病有关。

在本研究中,我们对中国人人群中的 15 例 Peters 异常患者进行 PITX2 及 PAX6 基因突变的筛查,并分析比较国内已报道的 Peters 异常 PITX2 及 PAX6 基因突变。这是目前国内第一个报道 Peters 异常合并 ARS 眼病 PITX2 基因突变 c. 296delG(P. R99fsx56),结果丰富了 PITX2 基因突变频谱,并研究其相关表型,有助于进一步了解该复杂疾病,阐明其可能发病的分子遗传学病因,希望这方面的进一步研究能为 Peter 异常和 Axenfeld-Rieger 综合征的确切机制提供依据;本研究更进一步提醒我们临床眼科医师,对于先天性角膜混浊病例,应该结合眼前段及眼后段共同分析的重要性,对 Peters 异常患者的手术效果提供有价值的信息。由于 Peters 异常与 ARS 是临床少见病,Peters 异常合并 ARS 眼病临床中更是少见,本研究中由于样本量少,因此 PITX2 和 PAX6 基因与该 Peters 异常的关系还有待进一步研究。

参考文献

- MacDonald IM, Tran M, Musarella MA. Ocular Genetics: Current Understanding. *Surv Ophthalmol* 2004;49(2):159-196
- Holmstrom GE, Reardon WP, Baraitser M, et al. Heterogeneity in dominant anterior segment malformations. *Br J Ophthalmol* 1991;75:591-597
- Hittner HM, Kretzer FL, Antoszyk JH, et al. Variable expressivity of autosomal dominant anterior segment mesenchymal dysgenesis in six generations. *Am J Ophthalmol* 1982;93(1):57-70
- Mayer UM. Peters Anomaly and Combination with Other Malformations-(Series of 16 Patients). *Ophthalmic Paediatr Genet* 1992;13(2):131-135
- Heon E, Barsoumhomys M, Cevrette L, et al. Peters Anomaly-the Spectrum of Associated Ocular and Systemic Malformations. *Ophthalmic Paediatr Genet* 1992;13(2):137-143
- 黄丽琴,卢国华,谢阳,等.Peters 综合征临床特征和基因突变的研究. *国际眼科杂志* 2016;16(12):2237-2240
- Jia X, Guo X, Xiao X, et al. A novel mutation of PAX6 in Chinese patients with new clinical features of Peters' anomaly. *Mol Vis* 2010;16:676-681
- Scott MP, Tamkun JW, Hartzell GW. The structure and function of the homeodomain. *Biochim Biophys Acta* 1989;989(1):25-48
- Awan KJ. Peters-Rieger's syndrome. *J Pediatric Ophthalmol* 1977;14(2):112-116

10 Holmstrom GE, Reardon WP, Baraitser M, *et al.* Heterogeneity in dominant anterior segment malformations. *Br J Ophthalmol* 1991; 75 (10):591-597

11 Perveen R, Lloyd IC, Clayton-Smith J, *et al.* Phenotypic variability and asymmetry of Rieger syndrome associated with PITX2 mutations. *Invest Ophthalmol Visual Sci* 2000;41(9):2456-2460

12 Bhate M, Martin FJ. Unilateral inferior rectus hypoplasia in a child with Axenfeld-Rieger syndrome. *J AAPOS* 2012;16(3):304-306

13 Park SW, Kim HG, Heo H, *et al.* Anomalous scleral insertion of superior oblique in Axenfeld-Rieger syndrome. *Korean J Ophthalmol* 2009;23(1):62-64

14 Zhang X, Tong Y, Xu W, *et al.* Two novel mutations of the PAX6 gene causing different phenotype in a cohort of Chinese patients. *Eye (Lond)* 2011;25(12):1581-1589

15 Honkanen RA, Nishimura DY, Swiderski RE, *et al.* A family with Axenfeld-Rieger syndrome and Peters Anomaly caused by a point mutation (Phe112Ser) in the FOXC1 gene. *Am J Ophthalmol* 2003;135 (3):368-375

16 Berry FB, Lines MA, Oas JM, *et al.* Functional interactions between FOXC1 and PITX2 underlie the sensitivity to FOXC1 gene dose in Axenfeld-Rieger syndrome and anterior segment dysgenesis. *Hum Mol Genet* 2006;15(6):905-919

国际眼科杂志中文版(IES)近5年影响因子趋势图

