

## Peters' 异常患者 Sox11 及 CYP1B1 基因变异分析

贾秀华<sup>1</sup>, 郭向明<sup>2\*</sup>

(中山大学 1. 附属第三医院眼科, 广东 广州, 510630; 2. 中山眼科中心, 广东 广州, 510060)

**摘要:**【目的】研究中国人 Peters' 异常患者 Sox11 及 CYP1B1 基因变异情况。【方法】从眼遗传疾病库中选取 13 例 Peters' 异常的先证者以及 100 例正常对照, 采用直接测序的方法分析 Sox11 及 CYP1B1 基因的外显子及其相邻内含子基因变异情况; 通过测序识别的基因突变, 使用 HA-SSCP 分析的方法, 在 100 例正常对照中做进一步评估。筛查中国人群 Peters' 异常患者 Sox11 及 CYP1B1 基因变异, 并研究其相关表型。【结果】在 13 例 Peters' 异常的患者中检测到一个 Sox11 同义突变, 一个 CYP1B1 错义突变, 在正常对照中未发现此基因突变。【结论】本研究首次对 Peters' 异常患者进行 Sox11 进行基因筛查, 并验证了 CYP1B1 是 Peters' 异常的致病基因之一, 进一步扩大了 Peters' 异常患者 CYP1B1 基因突变的突变频谱, 增加了我们对基因型与表型之间关系的认识, 并有望为将来该疾病致病机制的基因学及功能学方面的研究提供基础。

**关键词:** Peters' 异常; Sox11; CYP1B1; 基因变异

中图分类号: R349.6 文献标志码: A 文章编号: 1672-3554(2013)04-0633-05

### Genovariation Analysis of Sox11 and CYP1B1 in Patients with Peter's Anomaly

JIA Xiu-hua<sup>1</sup>, GUO Xiang-ming<sup>2\*</sup>

(1. Department of Ophthalmology, The Third Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China; 2. Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, China)

**Abstract:** 【Objective】 To investigate the genovariation of Sox11 and CYP1B1 in Chinese population with Peters' anomaly. 【Methods】 13 probands of Peters' anomaly and 100 normal controls were selected from our ocular genetic diseases bank. Cycle sequencing was used to analyze the exons and adjacent introns of Sox11 and CYP1B1. The variation detected was further evaluated in 100 normal controls using the heteroduplex analysis-single strand conformation polymorphism (HA-SSCP) methods. Screening the gene mutation of Sox11 and CYP1B1 in Chinese patients with Peters' anomaly, and the related phenotypes of them. 【Results】 One synonymous mutation of Sox11 and one missense mutation of CYP1B1 were detected in the 13 patients with Peters' anomaly. No such new mutation was found in 100 normal controls. 【Conclusions】 To our knowledge, it is the first time of Sox11 gene screening on patients with Peters' anomaly. And our finding support the role of CYP1B1 as a causative gene in Peters' anomaly and expand the mutation spectrum of CYP1B1. Furthermore, it enriches our knowledge of genotype-phenotype relation. Our results may provide basis for the functional and genomic study of this kind of disease.

**Key words:** Peters' anomaly; Sox11; CYP1B1; genovariation

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2013, 34(3): 633-637]

Peters' 异常是眼前节发育异常的一种, 该病最初在 20 世纪由 Peter 依据临床表现及组织学特点进行描述。该病常以散发的形式发病, 但也可以为常染色体显性(AD)或者隐性(AR)的方式发生<sup>[1]</sup>。其中 80% 的 Peters' 异常的患者为双眼发病, 超过

50% 的病例会同时合并有青光眼的发生, 导致严重的视力损害。临床主要表现为角膜白斑以及角膜白斑部位的虹膜角膜粘连<sup>[2]</sup>。该病的发病机制目前尚不明确, 基因、感染、外伤、病毒等很可能在该病的发生中发挥了重要的作用。基因检测对深

收稿日期: 2012-11-01

基金项目: 广东省科技计划项目(2009B030801187; 2009B090300058)

作者简介: 贾秀华, 医学博士, 住院医师, 研究方向: 眼遗传学, E-mail: happy-xiuhua@163.com; \* 通信作者: 郭向明, 医学博士, 教授, E-mail: 22531188@qq.com.

刻认识疾病的发病原因、预防、诊断、乃至治疗都将发挥越来越重要的作用。至今尚无明确的单一染色体异常与 Peters' 异常的发生有关,已有的研究表明 Pax6、CYP1B1、Sox11、PITX2、PITX3、FOXC1、FOXE<sup>[3-6]</sup>等基因改变均与该病的发生有一定的联系。Sox11 基因定位于 2P25,该基因缺乏内含子,在胚胎发育阶段呈现时空表达的特征<sup>[7]</sup>。在人、小鼠、大鼠、鸡以及斑马鱼等多种物种中均有表达。目前有研究表明小鼠 Sox11 基因的缺陷将导致眼球前节发育不良,Sox11 缺陷小鼠表现为晶状体茎的持续存在,晶状体形成迟滞,在出生时可表现为 Peters' 异常及小眼畸形<sup>[8]</sup>。CYP1B1 基因定位于 2P21,包含三个外显子和 2 个内含子,编码 543 个氨基酸组成的细胞色素 P450 蛋白。在眼球的发育过程中,CYP1B1 是一种参与眼前节发育的酶,能使参与眼球发育的信号转导通路运作正常,并参与调节角膜透明性和房水分泌<sup>[9]</sup>。目前认为 CYP1B1 可能参与了早期眼球的分化过程,通过内源性物质的代谢途径产生信号分子参与青光眼及其他眼前节发育异常的发病机制。国外已有多项研究发现 Peters' 异常患者中存在 CYP1B1 基因突变。迄今为止尚未见中国人群中 Peters' 异常患者 Sox11 及 CYP1B1 基因突变的报道。在中国人群中进行该项研究,既可以了解中国人群眼前段发育不良患者中 Sox11、CYP1B1 基因的突变情况,丰富基因的突变频谱,并可与其他人群中得出的研究结果进行对比分析,为进一步研究其发病机制提供就线索。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究对象

Peters' 异常患者:角膜中央白斑;虹膜角膜后粘连;可伴有其他少见的眼部异常包括小角膜,小眼球,前房角、虹膜发育不良,上睑下垂,视神经、黄斑发育异常,眼球震颤等眼前段或后段异常;可单眼或双眼;排除单纯性的先天性青光眼、无虹膜及虹膜角膜内皮综合征;无全身发育异常。100 例正常对照无已知眼遗传病及全身遗传病;与患者无血缘关系,相互间无血缘关系。本研究遵守赫尔辛基宣言,在征得患者同意后抽血制备基因组 DNA,并收集相关临床资料,所得资料来源于门诊和住院病历(2000-2009 年)。共有 13 名无亲缘关

系家系 Peters' 异常的患者参加了本研究。

### 1.2 外周血白细胞基因组 DNA 抽提及基因组 DNA 浓度测定

使用标准酚-氯仿法(蛋白酶 K,MECK 公司;氯仿、异戊醇等均为实验室常备试剂)提取外周血白细胞基因组 DNA,使用 DNA/酶活荧光测量仪(广州仪涛科学仪器有限公司)进行基因组 DNA 浓度测定(随后将 DNA 模板稀释至工作浓度 40 ng/ $\mu$ L)。

### 1.3 引物设计及合成

由人类基因组数据库(www.ncbi.nlm.nih.gov)检索人类 SOX11、CYP1B1 基因序列;NCBI human genome build 36.3, NC\_000002.11 for gDNA, NM\_003108.3 for cDNA and NP\_003099.1 for protein of SOX11, NCBI human genome build 36.3, NC\_000002.11 for gDNA NM000104.3 for cDNA NP000095.2 for protein of CYP1B1)应用 Lasergene 软件包(DNAStar 公司,威斯康星)的 PrimerSelector 程序来设计引物扩增产物的长度和退火温度如(表 1、表 2)。引物由上海生工生物技术有限公司合成。

表 1 Sox11 基因 PCR 反应引物和反应条件

Table 1 Oligonucleotides used for Sox11 amplification		
Exon	Sequences (5'-3')	Annealing temperature/ $^{\circ}$ C
Exon1-A-F	F: GGGGTGCCGAGGACTTTG	66
Exon1-A-R	R: TCGGCCGCTTGATGTGG	
Exon1-B-F	F: CCCC GGAGGCGCTGGACACG	68
Exon1-B-R	R: GCCGCCGCGCTCTTCTCTGG	
Exon1-BC-F	F: ATGGCCGACTACCCCGACTACAAG	68
Exon1-BC-R	R: CTCCTCGTCCGGCTCCTGTTGAT	
Exon1-C-F	F: GGGGGCGCGGGCAGACTA	68
Exon1-C-R	R: CGCTGCTGCTGGACGAGGAGGTG	
Exon1-D-F	F: GCAGCCGCTCTACTACACG	68
Exon1-D-R	R: CTCTCCCTCCACCCTACCA	
Exon1-E-F	F: GCGTCGGCCACATCAAG	68
Exon1-E-R	R: TCGTCTGCTCCTCATCCAGAAAC	

### 1.4 测序

应用 ABI3100 遗传分析仪(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)对 PCR 产物直接测序及测序 PCR 反应产物的纯化,上机测序。

### 1.5 测序结果分析

表2 CYP1B1 基因 PCR 反应引物和反应条件

Table 2 Oligonucleotides used for CYP1B1 amplification

Exon	Sequences (5'-3')	Annealing temperature/°C
EXON1-AF	ATGCCCGCAGCCTTGTCCCAGAT	68.5
EXON1-AR	GCCAGCGCAGCGAACGAGAGGTGA	
EXON1-BF	AGACCACGCTCCTGCTACTCCTG	65.6
EXON1-BR	CGGCTGGCCGCTGAAGAA	
EXON1-CF	CCTTCGCCTCCTCCGTGTGGTGT	68.5
EXON1-CR	CGAGTCCC CGCCGCTTCTTTT	
EXON1-DF	CAACCGCACTTCAGCAACTTCAT	59.5
EXON1-DR	CAGGGAGGGGACGATAGAGACAA	
EXON2-AF	TTTACTGAGAAATTAGGAAGC	55
EXON2-AR	CCAGGATGGAGATGAAGAG	
EXON2-BF	CTTGTGCCTGTCACTATTC	55
EXON2-BR	ATGCTCACCTTAAACGCTA	
HA-SSCP Analysis of F:	TCCATCCAGCAGACCACG	59.8
Mutation in EXON1 R:	CTCGCCATTCAGCACCAC	

1.5.1 突变点查找 将每个病人的测序结果输入 Lasergene 软件包 (DNASar 公司, 威斯康星) 的 SeqMan II 程序, 以 NCBI 上人类基因组数据库中 Sox11 (NC\_000002.11), CYP1B1 (NC\_000002.11) 序列作为标准序列进行比对, 以识别突变。每个突变进行双向测序以确定测序的准确性。根据人类基因组变异协会 (HGVS, <http://www.hgvs.org>) 的命名规则对突变位点进行描述。

1.5.2 遗传信息改变的确定 将含有碱基变异的测序结果输入 Lasergene 软件包 (DNASar 公司, 威斯康星) 的 MapDraw 程序, 以 NCBI 上人类基因组数据库中以上 3 个基因的 DNA 序列作为标准序列, 进行比对识别碱基变异对氨基酸编码产生的影响。从 NCBI 网站上查找不同物种 Sox11、CYP1B1 蛋白质序列, 输入 Lasergene 软件包的 MegAlign 程序 (DNASar 公司, 威斯康星), 做 Clustalw 状态下不同物种蛋白质序列比对, 对变异所在位点的保守性进行估计。对突变位点可能导致的氨基酸变化的差异以及可能致病性通过 Blosum 62 及 PolyPhen 软件对该错义突变导致的氨基酸对该病的致病性进行评估。

## 1.6 异源双链-单链构象多态性分析

通过测序识别的 CYP1B1 基因突变, 使用 HA-SSCP 分析的方法, 在 100 例正常对照中做进一步评估。以 100 名正常对照者基因组 DNA 为模板, 进

行 PCR 扩增, 反应体系同前, 反应条件见表 2。

## 2 结果

### 2.1 基因变异

对 13 例 Peters' 异常的患者 Sox11、CYP1B1 基因的外显子区域以及外显子毗邻的内含子区域进行直接测序。检出一例 Sox11 新变异 (图 1): 导致位于该基因外显子的第 339 位密码子 (TAC) 的第三个核苷酸的改变: c.339C>T, 该突变未引起第 113 位氨基酸的改变; 一例 CYP1B1 错义突变 (位于第一个外显子, 图 2): c.859G>A (p. A287T)。

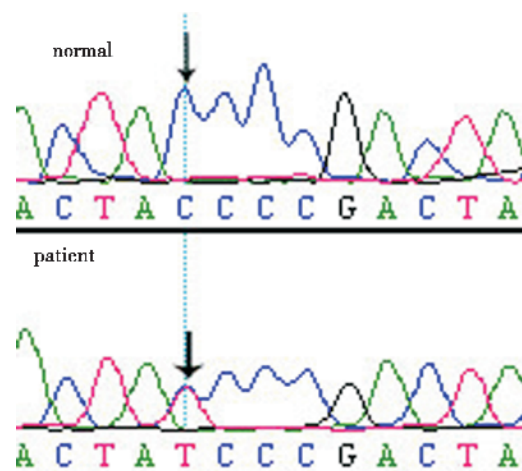


图1 Peters' 异常患者 Sox11 基因突变直接测序图

Fig.1 The map of Sox11 cycle sequencing

The mutation of c.339C>T was identified in the patient with Peters' anomaly and confirmed by bidirectional sequencing, which the arrow indicates. The other arrow shows the corresponding normal sequence from the unaffected control individual.

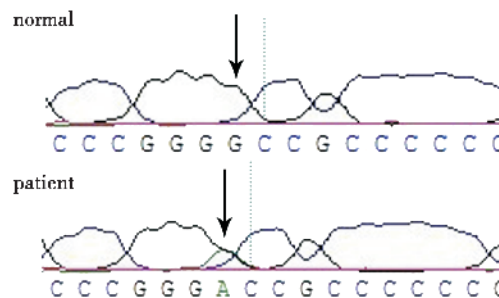


图2 Peters' 异常患者 CYP1B1 基因突变直接测序图

Fig.2 The map of CYP1B1 cycle sequencing

The mutation of c.859G>A was identified in the patient with Peters' anomaly and confirmed by bidirectional sequencing, which the arrow indicates. The other arrow shows the corresponding normal sequence from the unaffected control individual.

## 2.2 临床表现

本研究中 CYP1B1 基因 c.859G>A (p.A287T) 突变的患者为足月顺产的 4 岁女童。该患者眼压正常 (Schiotz 眼压计测量), 单眼角膜白斑, 虹膜纹理窥不清; A 超显示右眼眼轴长度为 21.53 mm, 左眼眼轴长度为 21.80 mm; B 超检查显示玻璃体混浊, 双眼眼球壁的声学图像不流畅; 其他器官系统均正常。

[ <i>Bos taurus</i> ]	RESLRPGAAPRDMMDAFIHS
[ <i>Canis lupus familiaris</i> ]	RESLQPGAAPRDMMDAFILS
[ <i>Homo sapiens</i> ]	CESLRPGAAPRDMMDAFILS
[ <i>Mus musculus</i> ]	RESLVPGAAPRDMDTDAFILS
[ <i>Ornithorhynchus anatinus</i> ]	RRCIGEEELSKLQLFLFTAIL
[ <i>Rattus norvegicus</i> ]	RESLVPGAAPRDMMDAFILS

图 3 突变位点氨基酸的保守性分析

Fig.3 Conservatism analysis of amino acid in the mutation point

As shown in the square, the Ala at position 287 is highly conserved for CYP1B1, which was demonstrated by analysis of 6 orthologs from different mammalian species.

## 3 讨论

由于眼前段发育是很多因子参与的复杂过程, 这些因子在不同的时间不同的部位依次表达, 任何干扰这些因子参与的因素都会导致眼前段发育的异常。

Sox11 是进化上高度保守的基因, 以往的研究主要针对 Sox11 对动物晶状体发育方面的影响, 尚未见该基因在人类眼部疾病中的研究。鉴于该基因敲除可导致小鼠 Peters' 异常的发生, 我们首次对人 Peters' 异常的患者进行了 Sox11 基因的筛查, 仅在 1 例患者中发现存在该基因的同义突变, 未发现 Sox11 基因的致病突变。

以往的研究认为, 同义突变时 DNA 一维序列发生单个碱基的置换, 改变了 mRNA 的密码子, 结果导致蛋白质中相应位点发生相同氨基酸的取代, 由于氨基酸的序列及一级结构未发生变化, 因此以往认为最终得到的蛋白的结构和功能也不会发生变化, 不会成为致病的原因。但近来 Kimchi 等认为, 这种“沉默突变”(silence mutation) 在特定的环境下, 会影响最终翻译出的蛋白质功能<sup>[10]</sup>。近年来随着对基因调控区、内含子等非翻译区突变的研究, 发现同义突变虽不引起氨基酸序列的改

变, 基因编码区内出现的同义突变可由于同一氨基酸对简并密码子的翻译效率不同, 或转录水平的差异而导致蛋白质表达量上的改变, 当这种改变达到一定程度时便产生了疾病。也有研究<sup>[11]</sup>表明同义突变可以改变 mRNA 的构象, 从而降低 mRNA 的稳定性和翻译效率, 氨基酸序列三维折叠的速度下降, 最终使三维结构受到影响, 导致蛋白的表达减少。因此, 同义突变也可能通过转录、转录后水平、翻译及翻译后修饰等多个环节中的某些步骤来影响蛋白质的功能而导致疾病的发生。该研究中报道的同义突变能否致病, 尚需对同义突变进行进一步的功能方面的研究。

目前 CYP1B1 被认为可能通过雌激素代谢、视黄酸类转化和花生四烯酸代谢这 3 种方式影响眼部结构的正常发育<sup>[12-14]</sup>。国内已有学者对原发性先天性青光眼(PCG)与 CYP1B1 基因的关系进行研究, 结果提示 CYP1B1 基因是导致中国人 PCG 的致病基因<sup>[15-16]</sup>。近年来有报道认为部分 PCG 患者携带有无功能的 CYP1B1 基因, 并且其无效等位基因与疾病严重程度相关<sup>[17]</sup>, CYP1B1 亚等位基因的突变是目前已知的导致 POAG 的主要遗传危险因素<sup>[18]</sup>。2001 年 Vincent 等<sup>[19]</sup>首次报道在 Peters' 异常的患者中存在 CYP1B1 基因突变, 其后 Churchill 等<sup>[20]</sup>报道在 Peters' 异常的无亲缘关系的先证者中存在 CYP1B1 基因的 V432L/R, 占筛查者的 23%。

上述研究表明 CYP1B1 对于眼前段结构的发育是极其重要的, 本研究中我们在一例 Peters' 异常患者中发现 CYP1B1 基因突变, 该基因突变导致第 287 位氨基酸丙氨酸被苏氨酸代替。通过比对不同物种蛋白质序列, 发现 CYP1B1 基因新突变所在的第 287 位酪氨酸在哺乳动物中高度保守(图 3)。进一步通过 Blosum 62 及 PolyPhen 软件对该错义突变导致氨基酸变化的可能致病性进行分析, 结果显示 Blosum 62 软件分析发现该基因突变导致的氨基酸改变具有较高的致病性(软件分析结果: 4→0), 通过 PolyPhen 软件分析亦表明该突变与致病性之间具有一定的关联性(软件分析结果: benign, 0.016)。

通过本研究, 我们从分子水平上分析、评价 Sox11、CYP1B1 基因对 Peters' 异常患者的影响, 为 Peters' 异常疾病候选基因的定位和发现提供了新的线索和思路, 并最终为疾病的预防及治疗提供

新的思路。

#### 参考文献:

- [1] Hittner HM, Kretzer FL, Antoszyk JH, et al. Variable expressivity of autosomal dominant anterior segment mesenchymal dysgenesis in six generations [J]. *Am J Ophthalmol*, 1982, 93(1): 57-70.
- [2] Kuper C, Kuwabara T, Stark WJ. The histopathology of Peters' anomaly[J]. *Am J Ophthalmol*, 1975, 80(4): 653-660.
- [3] Holmstrom GE, Reardon WP, Baraitser M, et al. Heterogeneity in dominant anterior segment malformations [J]. *Br J Ophthalmol*, 1991, 75(10): 591-597.
- [4] Semina EV, Ferrell RE, Mintz-Hittner HA, et al. A novel homeobox gene PITX3 is mutated in families with autosomal-dominant cataracts and ASMD [J]. *Nat Genet*, 1998, 19(2): 167-170.
- [5] Ormestad M, Blixt A, Churchill A, et al. Foxe3 haploinsufficiency in mice: a model for Peters' anomaly [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2002, 43(5): 1350-1357.
- [6] Collinson JM, Quinn JC, Hill RE, et al. The roles of Pax6 in the cornea, retina, and olfactory epithelium of the developing mouse embryo[J]. *Dev Biol*, 2003, 255(2): 303-312.
- [7] de Martino S, Yan YL, Jowett T, et al. Expression of sox11 gene duplicates in zebrafish suggests the reciprocal loss of ancestral gene expression patterns in development[J]. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 2000, 217(3): 279-292.
- [8] Wurm A, Sock E, Fuchshofer R, et al. Anterior segment dysgenesis in the eyes of mice deficient for the high-mobility-group transcription factor Sox11 [J]. *Exp Eye Res*, 2008, 86(6): 895-907.
- [9] Stoilov I, Akarsu AN, Sarfarazi M. Identification of three different truncating mutations in cytochrome P4501B1 (CYP1B1) as the principal cause of primary congenital glaucoma (Buphthalmos) in families linked to the GLC3A locus on chromosome 2p21 [J]. *Hum Mol Genet*, 1997, 6(4): 641-647.
- [10] Kimchi NA, Eliakim R, Suissa A, et al. [The contribution of capsule endoscopy to the diagnosis of small-bowel tumors in cases of obscure overt gastrointestinal bleeding][J]. *Harefuah*, 2006, 145(11): 811-814, 862, 861.
- [11] Duan J, Wainwright MS, Comeron JM, et al. Synonymous mutations in the human dopamine receptor D2 (DRD2) affect mRNA stability and synthesis of the receptor[J]. *Hum Mol Genet*, 2003, 12(3): 205-216.
- [12] Libby RT, Smith RS, Savinova OV, et al. Modification of ocular defects in mouse developmental glaucoma models by tyrosinase[J]. *Science*, 2003, 299(5612): 1578-1581.
- [13] Jansson I, Stoilov I, Sarfarazi M, et al. Effect of two mutations of human CYP1B1, G61E and R469W, on stability and endogenous steroid substrate metabolism [J]. *Pharmacogenetics*, 2001, 11(9): 793-801.
- [14] Choudhary D, Jansson I, Stoilov I, et al. Metabolism of retinoids and arachidonic acid by human and mouse cytochrome P450 1b1[J]. *Drug Metabol Dispos Biol Fate Chem*, 2004, 32(8): 840-847.
- [15] 刘晓文,姜发纳. 湖北地区汉族原发性先天性青光眼患儿 CYP1B1 基因突变分析 [J]. *眼视光学杂志*, 2006(03): 164-166.  
Liu XW, Jiang FG. PCR-SSCP analysis of the CYP1B1 gene mutation in primary congenital glaucoma patients of Hubei Han nationality [J]. *Chin J Optometry Ophthalmol*, 2006(03): 164-166.
- [16] 黄丽娜,姬鹏翔,成洪波,等. 原发性先天性青光眼 cyp1b1 基因变异初步研究 [J]. *中国实用眼科学杂志*, 2007, 25(3): 280-282.  
Huang LN, Ji PX, Cheng HB, et al. Initial study in CYP1B1 gene of primary congenital glaucoma [J] *Chin J Practical Ophthalmol*, 2007, 25(3): 280-282.
- [17] Campos-Mollo E, Lopez-Garrido MP, Blanco-Marchite C, et al. CYP1B1 mutations in Spanish patients with primary congenital glaucoma: phenotypic and functional variability[J]. *Mol Vis*, 2009, 15: 417-431.
- [18] Lopez-Garrido MP, Blanco-Marchite C, Sanchez-Sanchez F, et al. Functional analysis of CYP1B1 mutations and association of heterozygous hypomorphic alleles with primary open-angle glaucoma [J]. *Clin Gene*, 2010, 77(1): 70-78.
- [19] Vincent A, Billingsley G, Priston M, et al. Phenotypic heterogeneity of CYP1B1: mutations in a patient with Peters' anomaly[J]. *J Med Genet*, 2001, 38(5): 324-326.
- [20] Churchill AJ, Yeung A. A compound heterozygous change found in Peters' anomaly [J]. *Mol Vis*, 2005, 11:66-70.

(编辑 刘清海)