

两个常染色体显性遗传先天性白内障家系突变热点筛查

张新愉, 刘奕志, 罗莉霞, 吴明星, 程 钢, 胡 斌

(中山大学中山眼科中心, 广东 广州 510060)

摘 要:【目的】对 2 个常染色体显性遗传先天性白内障中国家系进行基因突变热点筛查, 以了解这两个家系的先天性白内障是否与文献报道的 17 个突变热点相关。【方法】对两个家系共 20 名成员(包括患者 11 人, 非患者 9 人)抽取外周血提取基因组 DNA, 针对截至 2003 年 1 月为止国外文献报道的与常染色体显性遗传先天性白内障发病相关的 10 个基因上的 17 个突变热点, 包括 CRYAA (ARG116CYS), CRYAB(del450A), CRYBA1 (EX3-4 DEL), CRYBB2 (GLN155TER), CRYGC (THR5PRO, 5-BP DUP at NT226), CRYGD (ARG14-CYS, PRO23THR, ARG58HIS, ARG36SER), GJA3 (ASN63SER, PRO187LEU), GJA8 (GLU48LYS, PRO88SER), BFSP2 (ARG287TRP) 及 MIP (GLU134GLY, THR138ARG), 设计引物使 PCR 扩增片段涵盖上述热点, 对扩增产物进行序列分析, 检测这 11 名患者在突变热点上是否有相应的序列改变。【结果】20 名被检者的 10 个基因片段序列与 GenBank 发表序列相同, 在 17 个突变热点均未发现相应基因突变。【结论】初步排除这个家系的先天性白内障与 17 个突变热点相关。

关键词:先天性白内障; 常染色体显性遗传; 序列分析; 基因突变; 突变热点

中图分类号: R776

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2005)01-0079-05

Mutation Hot Spots Screening in Two Autosomal Dominant Congenital Cataract Pedigrees

ZHANG Xin-yu, LIU Yi-zhi, LUO Li-xia, WU Ming-xing, CHENG Gang, HU Bin

(Zhongshan Ophthalmic Center, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510060, China)

Abstract: 【Objective】To screen mutation hot spots in two Chinese autosomal dominant congenital cataract pedigrees. 【Methods】Twenty family members of the 2 pedigrees (including 11 affected and 9 unaffected individuals) were enrolled into the study with informed consent. All subjects underwent a full ophthalmologic and general examination to rule out any concomitant disorders. Genomic DNA was extracted from 5 ml EDTA-sequestered blood samples from each subject. Seventeen mutation hot spots on 10 different genes were identified as the cause of autosomal dominant congenital cataract, including CRYAA (ARG116CYS), CRYAB (del450A), CRYBA1 (EX3-4 DEL), CRYBB2 (GLN155TER), CRYGC (THR5PRO, 5-BP DUP at NT226), CRYGD (ARG14CYS, PRO23THR, ARG58HIS, ARG36SER), GJA3 (ASN63SER, PRO187LEU), GJA8 (GLU48LYS, PRO88SER), BFSP2 (ARG287TRP) and MIP (GLU134GLY, THR138ARG) genes. These 17 loci were screened by PCR amplification of the 10 gene segments encompassing the mutation hot spots mentioned above and sequencing analysis of the PCR products was done. 【Results】Sequencing analysis demonstrated identical sequences in the 20 subjects with those published in the GenBank. No mutation was found at the 17 autosomal dominant mutation hot spots in all 20 subjects. 【Conclusion】The association of 17 autosomal dominant mutation hot spots with congenital cataract in these two families was preliminarily excluded.

收稿日期: 2004-07-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30070802); 广州市科技计划基金资助项目(科技攻关引导项目) 2002Z1-E0141)

作者简介: 张新愉 (1972-), 女, 广东广州人, 博士生, 主治医师; 刘奕志, 教授, 导师. E-mail: zhangxinyu02@hotmail.com

Key words: congenital cataract; autosomal dominant; sequence analysis; mutation; hot spots

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2005,26(1):79-83]

先天性白内障是儿童主要致盲眼病之一,发病率为 1~6/万个活产儿。约 1/3 的先天性白内障是由遗传决定的,主要有 3 种遗传方式,常染色体显性遗传、常染色体隐性遗传及 X 染色体连锁遗传,以常染色体显性遗传最为常见且外显率高。在遗传性先天性白内障中,白内障既可作为孤立的眼部异常,也可与其它眼部及多系统异常构成综合征出现。致病基因筛查是探索疾病发生内在分子机制的重要步骤。对正常晶状体发育和透明性维持起重要作用的基因是先天性白内障的候选基因,目前通过遗传连锁分析和基因编码区测序等方法,已在这些候选基因上发现了一些先天性白内障位点。截至 2003 年 1 月为止国外文献报道在 10 个基因上有 17 种突变与常染色体显性遗传先天性白内障 (autosomal dominant congenital cataract, ADCC) 发病相关,这些基因突变热点包括 CRYAA (ARG116CYS), CRYAB (del450A), CRYBA1 (EX3-4 DEL), CRYBB2 (GLN155TER), CRYGC (THR5PRO, 5-BP DUP at NT226), CRYGD (ARG14CYS, PRO23THR, ARG58HIS, ARG36-SER), GJA3 (ASN63SER, PRO187LEU), GJA8 (GLU48LYS, PRO88SER), BFSP2 (ARG287 TRP) 及 MIP (GLU134GLY, THR138ARG)^[1-16]。国内这方面研究比较少, Bu 等^[17]通过全基因组连锁分析和 PCR 产物直接测序法对一个中国 ADCC 家系进行突变检测,发现在 HSF4 基因第 348 个核苷酸发生 T→C 错义突变,可能与疾病有关。为了研究中国南方人群先天性白内障的致病突变,了解其与国外报道的突变是否相关,我们收集了两个来自中国南方地区的 ADCC 家系,针对上述 17 个突变热点,对家系成员相应位点作突变筛查。

1 对象与方法

1.1 对象

我们于 2002 年 2 月至 2003 年 6 月期间在中山眼科中心白内障专科收集了两个 ADCC 家系,一个 4 代家系 (ADCC-1) 来自江西共 17 人,包括患

者 10 人,非患者 7 人,其中 11 名家庭成员 (患者 7 人,非患者 4 人) 知情同意进入本研究。另一个 5 代家系 (ADCC-2) 来自湖南怀化,共 29 人,包括患者 12 人,非患者 17 人,其中 9 名家庭成员 (患者 4 人,非患者 5 人) 知情同意进入本研究。所有入选成员均在中山眼科中心接受全身及眼部检查。全身检查包括一般检查、血常规、尿常规、大便常规、血生化、肝功能、血脂、胸部透视及心电图检查。眼部检查包括视力、裂隙灯显微镜、直接/间接眼底镜、非接触眼压计及眼部超声波检查。

1.2 方法

对 20 名家系成员常规抽取外周血 5 mL, EDTA 抗凝,用苯酚-氯仿-异戊醇提取基因组 DNA,乙醇沉淀, TE 溶解。取 2 μ L DNA 标本加入 498 μ L 高压灭菌的去离子双蒸水中充分混匀,以双蒸水为空白对照,分别测定波长为 260, 280 和 330 nm 的吸光度值,按下列公式计算 DNA 的浓度和比值,确定待测标本的浓度和纯度。

$$\text{DNA 浓度}(\mu\text{g/mL}) = (A_{260} - A_{330}) \times 50 \times 250$$

$$\text{DNA 纯度} = (A_{260} - A_{330}) / (A_{280} - A_{330}) \quad (\text{比值 } 1.8 \sim 1.0 \text{ 为佳})$$

根据 GenBank 发表的 CRYAA、CRYAB、CRYBA1/A3、CRYBB2、CRYGC、CRYGD、GJA8、GJA3、MIP 及 BFSP2 这 10 个基因的序列,应用计算机辅助设计软件 PRIMER EXPRESS 2.0 设计引物,使扩增片段涵盖 17 个突变热点(引物序列详见表 1)。将总体积为 50 μ L 的反应体系 40 μ L 5 $\times$ PCR buffer, 1 μ L 上游引物 (25 μ mol/L), 1 μ L 下游引物 (25 μ mol/L), 1 μ L dNTPs (10 mmol/L), 2 μ L Taq 酶, 5 μ L 样本 DNA, 30 μ L ddH₂O。其中 PCR buffer 成分为 10 mmol/L Tris-HCl (pH8.0), 150 mmol/L KCl, 2 mmol/L MgCl₂) 加入 PE9600 PCR 仪, 先进行 94 $^{\circ}$ C 7 min 变性, 后进行 35 个循环 (94 $^{\circ}$ C 1 min, 57~62 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min), 最后 72 $^{\circ}$ C 5 min 延伸 (每一引物退火温度见表 1)。用 QIAGEN II Agarose Gel Extraction Protocol 试剂盒 (QIAGEN, 德国) 进行 PCR 产物纯化。用 ABI3100 型全自动测序仪进行纯化的 PCR 产物测序。用 BLAST 软件将扩增的 10 个基因片段测序

结果与 GenBank 发表的基因序列进行比对和分 析。

表 1 PCR 反应引物序列及扩增条件

Table 1 Primer sequences and reaction condition of PCR amplification			
Gene	Primer sequences	PCR product size (bp)	Annealing temperature (℃)
CRYAA	Forward: 5'-CCCCACCCTCTCCAGGAC-3'	450	57
	Reverse: 5'-CTATCTAAAGGAGTGTGAGGTGCG-3'		
CRYAB	Forward: 5'-TCCACAGGAAATACCGGATCC-3'	273	57
	Reverse: 5'-CCCTTAGCATTAATAAGCTTCAGCAC-3'		
CRYBA1/A3	Forward: 5'-CAATCCTCCCTCCACCTC-3'	520	57
	Reverse: 5'-TCCTTCCTTCTAGCTTTGG-3'		
CRYGD	Forward: 5'-CCTCGCCTTGTCCTCCG-3'	340	57
	Reverse: 5'-TTAACTTTTGCTTGAAACCATCCA-3'		
GJA8	Forward: 5'-AGGAGGTGAATGAGCACTCCA-3'	251	57
	Reverse: 5'-GTGCCCCACGTACATCAGG-3'		
CRYGC	Forward: 5'-AATGCCTGTTAGGAGCAAATAATGT-3'	261	59
	Reverse: 5'-GCTGAGGCCCATCCATTG-3'		
CRYBB2	Forward: 5'-GTGGCTTATGGATGCTCTATCTCTC-3'	182	60
	Reverse: 5'-AAAGTCGCTGCTGCCTTGTAGT-3'		
GJA3	Forward: 5'-TGCAACACCCAGCAGCC-3'	474	60
	Reverse: 5'-GGCCACGCCAGCAT-3'		
MIP	Forward: 5'-GAGGAGGTAACACTGTGGCAGC-3'	198	60
	Reverse: 5'-AGAAGCCAACGGCCAGG-3'		
BFSP2	Forward: 5'-GCTGCTGCACAAACAGTTGG-3'	286	62
	Reverse: 5'-TTCTGTTTCTAATGAGGTTGAAGTTGTTA-3'		

2 结 果

2.1 临床表现

两个家系中所有患者均表现为双眼对称的先天性白内障,不伴有其它眼部疾病,全身未见异常体征,血、尿、大便常规及各项生化指标均在正常范围,胸透及心电图检查心肺未见异常。家系图见图 1 图 2。每代均有患者,男女发病率相仿,且男性患者可将疾病传给男性后代, 故遗传方式为常染色体显性。家系 ADCC-1 中患者起病年龄 0-5 岁,视力 0.01~0.3,有 6 名患者已在本中心接受双眼白内障超声乳化摘除联合人工晶状体植入术,白内障表型为绕核性。家系 ADCC-2 中患者起病年龄 0~3 岁,视力 0.02~0.5,有 3 名患者已在本中心接受双眼白内障超声乳化摘除联合人工晶状体植入术,白内障表型核性 3 人,全白内障 1 人。

2.2 序列分析

两个家系共 20 人 其中患者 11 人,非患者 9 人) 在中山大学达安基因诊断中心接受分子生物

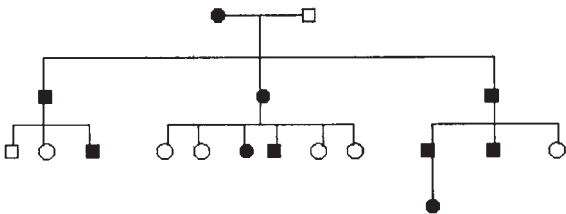


图 1 家系 ADCC-1 系谱图

Fig.1 Pedigree of ADCC-1

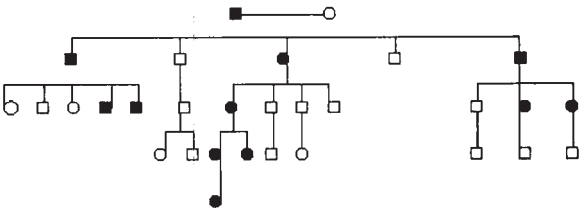


图 2 家系 ADCC-2 系谱图

Fig.2 Pedigree of ADCC-2

■denote affected male, □denote unaffected male, ●denote affected female, ○denote unaffected female. Autosomal dominant inheritance is suggested both by the presence of affected males and females in each generation and by male to male transmission

学检查。我们针对文献报道与 ADCC 相关的 10 个

基因 17 个突变点设计引物,使扩增片段涵盖突变热点,扩增后产物进行测序和序列分析。这 20 名被检者 10 个基因片段 PCR 产物的序列分析结果与 GenBank 发表序列相同,在 17 个位点上均未发现相应突变。

3 讨 论

任何与正常晶状体发育分化有关的基因发生突变均可能导致先天性白内障。同一基因的不同突变可导致大致相同表型的白内障,然而在一些家系中不同个体表型的多样化亦提示即使是同一基因的相同突变也可能导致不同的白内障表型^[18]。本研究所收集的两个家系中 ADCC-1 表型为绕核性白内障,即晶状体混浊局限于胚胎核周围的板层,ADCC-2 表型为核性及全白内障。动物模型提示与白内障形成相关的基因在表达上有一定的时间顺序,核性白内障提示基因表达异常发生在晶状体发育的早期,皮质性混浊发生在晶状体发育晚期,而全白内障可发生在各种类型白内障的终末期^[19]。到目前为止,基因型-表现型的对应关系仍未确立。

晶状体中有 3 类主要的蛋白质对维持其透明性起作用^[20]。一是晶状体蛋白,其特殊的空间结构和排列方式对维持晶状体的透明性起重要作用。二是间隙连接和通道系统,起维系晶状体上皮与成熟纤维细胞之间联系的作用,可防止细胞结构蛋白沉淀和白内障发生。三是细胞骨架蛋白,起结构支持、胞浆组成及维持细胞体积、形态与活动度的作用。正常的细胞骨架蛋白功能及其与晶状体蛋白之间的相互作用对正常晶状体发育及透明性的维持起重要作用。综上所述,编码上述 3 类蛋白质的基因是先天性白内障的候选基因。国外学者通过对 ADCC 家系进行连锁分析和基因编码区测序发现,编码晶状体蛋白的 CRYAA,CRYAB,CRYBA1/A3,CRYBB2,CRYGC 和 CRYGD 基因,编码连接蛋白(connexin)的 GJA3 和 GJA8 基因,编码主要嵌入蛋白(Major intrinsic protein)的 MIP 基因及编码细胞骨架蛋白中 Beaded filament structural protein-2 的 BFSP2 基因发生的 17 种突变与 ADCC 相关。由于 ADCC 有高度的遗传异质性,致病突变可能有种族差异,故我们试图通过 PCR 扩增涵盖上述 17 个突变热点的基因片段,

并对 PCR 产物进行序列分析,对所收集的这两个来自中国南方地区的 ADCC 家系进行突变筛查,了解其发病是否与这些突变热点有关。虽然结果显示这两个家系 11 名患者在突变热点均未发生相应突变,但并不能排除致病突变在上述 10 个候选基因上,因为我们没有对这些基因所有外显子进行检测,致病突变可能位于热点以外区域。我们将对这两个家系进行进一步研究,可先做连锁分析将疾病位点定于某一个染色体区段,再对该区段已知基因进行外显子分析,或全基因组扫描等方法查找致病突变。

参考文献:

- [1] Berry V, Francis P, Kaushal S, *et al.* Missense mutations in MIP underlie autosomal dominant “polymorphic” and lamellar cataracts linked to 12q [J]. *Nat Genet*, 2000, 25(1):15-7.
- [2] Kannabiran C, Rogan PK, Olmos L, *et al.* Autosomal dominant zonular cataract with sutural opacities is associated with a splice mutation in the betaA3/A1-crystallin gene [J]. *Mol Vis*, 1998, 4:21.
- [3] Heon E, Priston M, Schorderet DF, *et al.* The gamma-crystallins and human cataracts: a puzzle made clearer [M]. *Am J Hum Genet*, 1999, 65(5):1261-7.
- [4] Santhiya ST, Shyam Manohar M, Rawley D, *et al.* Novel mutations in the gamma-crystallin gene cause autosomal dominant congenital cataracts [J]. *J Med Genet*, 2002, 39(5):352-8.
- [5] Ren Z, Li A, Shastry BS, *et al.* A 5-base insertion in the gamma C-crystallin gene is associated with autosomal dominant variable zonular pulverulent cataract [J]. *Hum Genet*, 2000, 106(5):531-7.
- [6] Berry V, Mackay D, Khaliq S, *et al.* Connexin50 mutation in a family with congenital “zonular nuclear” pulverulent cataract of Pakistani origin [J]. *Hum Genet*, 1999, 105(1-2):168-70.
- [7] Shiels A, Mackay D, Ionides A, *et al.* A missense mutation in the human connexin 50 gene (GJA8) underlies autosomal dominant “zonular pulverulent” cataract, on chromosome 1q [J]. *Am J Hum Genet*, 1998, 62(3):526-32.
- [8] Litt M, Kramer P, LaMorticella DM, *et al.* Autosomal dominant congenital cataract associated with a missense mutation in the human alpha crystalline gene CRYAA [J]. *Hum Mol Genet*, 1998, 7(3): 471-4.
- [9] Stephan DA, Gillanders E, Vanderveen D, *et al.*

- Progressive juvenile-onset punctate cataracts caused by mutation of the gamma D-crystallin gene [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(3): 1008-12.
- [10] Kmoch S, Brynda J, Asfaw B, *et al.* Link between a novel human gammaD-crystallin allele and a unique cataract phenotype explained by protein crystallography [J]. *Hum Mol Genet*, 2000, 9(12): 1779-86.
- [11] Mackay D, Ionides A, Kibar Z, *et al.* Connexin46 mutation in autosomal dominant congenital cataract [M]. *Am J Hum Genet*, 1999, 64(5): 1357-64.
- [12] Ree MI, Watts P, Fenton I, *et al.* Further evidence of autosomal dominant congenital zonular pulverulent cataracts linked to 13q11(CZP3) and a novel mutation in connexin46 (GJA3) [J]. *Hum Genet*, 2000, 106(2): 206-9.
- [13] Conley YP, Erturk D, Keverline A, *et al.* A juvenile-onset, progressive cataract locus on chromosome 3q21-q22 is associated with a missense mutation in the beaded filament structural protein-2 [J]. *Am J Hum Genet*, 2000, 66(4): 1426-31.
- [14] Jakobs PM, Hess JF, FitzGerald PG, *et al.* Autosomal-dominant congenital cataract associated with a deletion mutation the human beaded filament protein gene BFSP2 [J]. *Am J Hum Genet*, 2000, 66(4): 1432-6.
- [15] Berry V, Francis P, Reddy MA, *et al.* Alpha-B crystalline gene (CRYAB) mutation causes dominant congenital posterior polar cataract in humans[J]. *Am J Hum Genet*, 2001, 69(5):1141-5.
- [16] Litt M, Carrero-Valenzuela R, LaMorticella DM, *et al.* Autosomal dominant cerulean cataract is associated with s chain termination mutation in the human beta-crystallin gene CRYBB2[J]. *Hum Mol Genet*, 1997, 6(5): 665-8.
- [17] Bu L, Jin Y, Shi Y, *et al.* Mutant DNA-binding domain of HSF4 is associated with autosomal dominant lamellar and Marner cataract[J]. *Nat Genet*, 2002, 31(3):276-8.
- [18] Francis P, Berry V, Moore A, *et al.* The genetics of childhood cataract [J]. *J Med Genet*, 2000,37(7):481-8.
- [19] Graw J. Cataract mutations as a tool for developmental geneticists [J]. *Ophthalmic Res*, 1996, 28 Suppl 1:8-11.
- [20] He W, Li S. Congenital cataracts: gene mapping [J]. *Hum Genet*, 2000, 106(1):1-13.

(编辑 刘清海)

(上接第 64 页 from page 64)

养心肌细胞凋亡的研究中发现,在培养的心肌细胞中加入 H_2O_2 后,首先出现线粒体呼吸功能减弱,继而出现一系列细胞凋亡。目前对于细胞凋亡的机制研究,提出了 2 条信号通路,即线粒体信号通路与死亡受体通路^[11,12]。对于分化程度很高,线粒体含量十分丰富的心肌细胞,在海洛因作用下上述通路发挥何种作用,需要进一步的探讨。

参考文献:

- [1] Janet L, Barry S, Ephraim D. The effect of heroin and multiple drug abuse on the electrocardiogram [J]. *American Heart Journal*, 1973, 86(5): 663-8.
- [2] 郭晓红,张肇玖,张晓冬,等.海洛因依赖大鼠模型建立的实验研究[J]. *中国药物滥用防治杂志*, 1999, 1(1):32-3.
- [3] Fliss H, Gaottinger D. Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium[J]. *Circ Res*, 1996,79(5): 949-56.
- [4] Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR. Cell death: the significance of Apoptosis[J]. *Int Rev Cytol*, 1980,68: 251-306
- [5] Greene WB, Balentine JD, Hennigar GR. Selective mitochondrial degeneration in renal tubules following hyperbaric oxygen exposure[J]. *Ultrastruct Pathol*, 1979, 96(3): 737-52.
- [6] Lioreta J, Roquer J, Corominas JM, *et al.* Hyperthyroid myopathy with mitochondrial paracrystalline rectangular inclusions[J]. *Ultrastruct Pathol*, 1996,20(1): 61-5.
- [7] Gottlieb RA, Burleson KO, Kloner RA, *et al.* Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes[J]. *J Clin Invest*, 1994,94(4):1621-8.
- [8] Pich S, Klein HH, Lindert S, *et al.* Cell death in ischemic reperfused porcine hearts: a histochemical and function study[J]. *Basic Res Cardiol*, 1988,83(5):550-9.
- [9] Victor G, Hani N, Abbas S, *et al.* Abnormalities of cardiocytes in regions bordering fibrous scars of dogs with heart failure[J]. *Int J Cardiol*, 1997, 60(3): 273-9.
- [10] Chen E, Proestou G, Bourbeau D, *et al.* Rapid up-regulation of peptide elongation factor EF-1 alpha protein levels is an immediate early event during oxidative stress-induced apoptosis [J]. *Exp Cell Res*, 2000, 259(1): 140-8.
- [11] Crow MT. Hypoxia BNip3 proteins, and the mitochondrial death pathway in cardiomyocytes [J]. *Cric Res*, 2002,91(3): 183-5.
- [12] Das DK. Redox regulation of cardiomyocyte survival and death[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2001,3(1): 23-37.

(编辑 黄小延)