

# 常染色体显性遗传性白内障一家系致病基因的研究

肖伟<sup>1</sup>, 赵岱新<sup>1</sup>, 梁小芳<sup>1</sup>, 石磊<sup>2</sup>, 华芮<sup>3</sup>

基金项目: 中国国家自然科学基金资助项目(No. 30973276); 中国辽宁省科技厅科学计划基金资助项目(No. 2008408002-1)

作者单位:<sup>1</sup>(110003) 中国辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属盛京医院眼科;<sup>2</sup>(110001) 中国辽宁省沈阳市, 中国医科大学基础医学院人类基因组教研室;<sup>3</sup>(100730) 中国北京市, 中国医学科学院基础医学研究所

作者简介: 肖伟, 博士, 副教授, 博士研究生导师, 研究方向: 遗传性白内障基因突变筛查及儿童白内障手术治疗。

通讯作者: 肖伟. xiaow@sj-hospital.org

收稿日期: 2011-02-24 修回日期: 2011-03-14

## Pathogenic gene research in a family with autosomal dominant congenital cataract

Wei Xiao<sup>1</sup>, Dai-Xin Zhao<sup>1</sup>, Xiao-Fang Liang<sup>1</sup>, Lei Shi<sup>2</sup>, Rui Hua<sup>3</sup>

**Foundation items:** National Natural Science Foundation of China (No. 30973276); Scientific Project of Liaoning Provincial Science and Technology Office, China (No. 2008408002-1)

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, the Affiliated Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110003, Liaoning Province, China; <sup>2</sup>Teaching and Research Section of Human Genome, College of Basic Medical Sciences of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China; <sup>3</sup>Institute of Basic Medical Sciences of Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100730, China

**Correspondence to:** Wei Xiao. Department of Ophthalmology, the Affiliated Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110003, Liaoning Province, China. xiaow@sj-hospital.org

Received: 2011-02-24 Accepted: 2011-03-14

## Abstract

• **AIM:** To detect the pathogenic gene in a four-generation family with autosomal dominant congenital cataract.

• **METHODS:** Fifteen members of the family (including eight affected and seven unaffected individuals) were enrolled into the study. The fifteen individuals underwent full ophthalmological and clinical examinations to rule out any concomitant disorders. Blood samples were collected from all the 15 subjects for genomic DNA preparation. Microsatellite markers which were near the reported loci to be associated with autosomal dominant congenital cataract were selected, and amplified from each DNA sample using polymerase chain reactions (PCR). Then the PCR products were separated and analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis. Location analysis was performed by linkage analysis, Lod scores of possibly linked markers were calculated. According to the allele and the relation between family members, the family haplotype was constructed artificially. For the ascertained domain in the chromosome, gene sequencing was

performed to identify the mutation.

• **RESULTS:** The phenotype of the family is perinuclear cataract. The Lod scores were 2.71 in the polymorphic microsatellite markers on 17q11-12 and all the affected had the same allele, indicating that there was linkage between these microsatellite markers and congenital cataract related genes in this family. Gene sequencing did not found *CRYBA1/A3* mutation.

• **CONCLUSION:** The pathogenic mutation is not caused by the mutation of the exons and untranslated region in *CRYBA1/A3*. There may be other gene mutation or mechanism leading to the morbidity of this autosomal dominant congenital cataract.

• **KEYWORDS:** perinuclear cataract; autosomal dominant; linkage analysis; microsatellite marker

Xiao W, Zhao DX, Liang XF, *et al.* Pathogenic gene research in a family with autosomal dominant congenital cataract. *Gujia Yanke Zazhi (Int J Ophthalmol)* 2011;11(4):584-587

## 摘要

**目的:** 对一个4代常染色体显性遗传先天性白内障家系进行致病基因研究。

**方法:** 对15例家系成员(8例患者, 7例非患者)进行眼部检查, 采集静脉血, 提取基因组DNA, 选取已报道的与常染色体显性遗传性白内障相关的19个位点附近的微卫星标记, PCR扩增后进行基因型分析, 用连锁分析进行定位; 对提示连锁的标记计算Lod值, 并构建单体型; 对定位区域内已知候选基因测序。

**结果:** 该家系患者表型为绕核性白内障; 患者在17q11-12有共享基因型, 该位点微卫星标记与致病基因间的两点连锁最大Lod值为2.71, 证实该位点与该家系的致病基因连锁; 测序未发现*CRYBA1/BA3*突变。

**结论:** 该家系的致病突变不是由于*CRYBA1/A3*外显子和调控区突变, 可能是未被发现基因突变或机制参与该家系的发病。

**关键词:** 绕核性白内障; 常染色体显性遗传; 连锁分析; 微卫星标记

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2011.04.006

肖伟, 赵岱新, 梁小芳, 等. 常染色体显性遗传性白内障一家系致病基因的研究. 国际眼科杂志 2011;11(4):584-587

## 0 引言

先天性白内障是造成儿童失明和视力损伤的重要原因, 其中约1/3与遗传有关<sup>[1]</sup>, 其遗传方式有常染色体显性遗传 (autosomal dominant congenital cataract, ADCC)、常染色体隐性遗传 (autosomal recessive congenital cataract, ARCC) 和 X 连锁遗传 3 种, 其中 ADCC 最为常见。先天性白内障可以独立发生, 也可以作为眼部或全身综合征的伴

发症状。先天性白内障遗传异质性极高,迄今发现至少42个位点与先天性白内障相关<sup>[2]</sup>。现对中国东北一个先天性白内障家系进行已知位点的连锁分析如下。

### 1 材料和方法

**1.1 材料** 一个4代ADCC家系共21例,其中患者8例(图1),纳入本研究的有15例。遵守赫尔辛基宣言,签署知情同意后,对家系成员进行全身及眼部检查,散瞳后进行裂隙灯和眼底镜检查,并对患者进行眼部图像采集。本家系21例中有8例为患者,男2例,女6例,其遗传方式符合常染色体显性遗传。该家系发病特点为出生后双眼视力障碍较轻,但进行性加重,5岁左右最重。先证者为4岁男孩(其余家系患者均在童年或青年时期已行白内障摘除手术),裂隙灯检查表现为绕核性白内障(图2),伴轻微眼球震颤及内斜视,不合并其它眼部异常和全身疾病。我们共采集到15例个体的血样,分别是I 2, II 1, II 2, II 4, II 5, II 6, II 8, III 1, III 2, III 3, III 4, III 6, III 8, IV 1, IV 2。取外周血4~5mL, EDTA抗凝。

### 1.2 方法

**1.2.1 基因型分型和连锁分析** 采用TaKaRa宝生物工程有限责任公司(大连)的DNA提取试剂盒提取白细胞基因组DNA,经15g/L琼脂糖凝胶电泳检测样本DNA后于-20℃保存备用。在UCSC(<http://genome.ucsc.edu/>)距离1p32, 1p36, 1q21-q25, 2q33-q35, 3q21-q22, 3q26. 3, 8q13. 3, 10q25, 11p13, 11q23-q24, 12q12-q14, 13q11-q13, 16q22. 1, 16q23, 17q11-q12, 19q13. 4, 20q11. 2, 22q11-q12, 21q22. 3 这些区段上下游约4cm范围内,选取微卫星标记,引物序列由NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)的Primer 3设计, DNAMAN软件分析获得最佳引物序列,由上海Sangon公司合成。PCR反应体系20μL: dNTP混合物3.2μL, 2×GC Buffer I 10μL, 正反向引物(10pmol/L)及DNA各0.8μL, Taq DNA聚合酶0.2μL, ddH<sub>2</sub>O 4.2μL。PCR反应条件: 94℃ 3min; 35个循环: 94℃ 30s, 55℃ ~ 62℃ 30s, 72℃ 20s; 最后72℃ 5min。反应结束,行15g/L琼脂糖凝胶电泳检测PCR扩增产物。取与甲酰胺变性加样缓冲液1:5或1:4混合, 95℃变性20min, 冰浴10min, 吸取5μL PCR产物与变性缓冲液的混合物上样, 80g/L尿素变性聚丙烯酰胺凝胶分离微卫星标记等位片段, 电泳缓冲液为1×TBE, 电压500V, 电泳时间4.5~6h; 电泳结束后, 凝胶进行常规固定、银染和显色; 根据凝胶上DNA片段大小确定微卫星标记等位基因型。将家系中每一个体的基因型信息填充到Microsoft Excel表格, 并将其转化为Linkage软件要求的pre文件; 根据白内障在家系中的遗传特点, 假设致病基因频率为0.0001, 男女发病率均等; 应用Linkage软件(Version 5.2)中的MLINK进行微卫星标记与该家系致病位点的两点间连锁分析, 计算Lod值。判断标准: Lod值≥3, 两个位点肯定连锁; Lod值≤-2, 两个位点不连锁; -2 < Lod值 < 3, 提示连锁。

**1.2.2 构建单体型** 根据个体的等位基因型, 家系成员间的亲缘关系及孟德尔遗传定律, 人工构建该家系单体型。

**1.2.3 基因测序** 对可能连锁区域内的候选基因的外显子、外显子内含子交界区、5' UTR, 3' UTR和上游一段高度保守序列测序, 在UCSC(<http://genome.ucsc.edu/>)获得基因的全部序列, 设计引物(表1)同前述方法, 以家系成员II 1为DNA模板, Tm值均为58℃, PCR扩增成功后, 送博迈德公司测序。

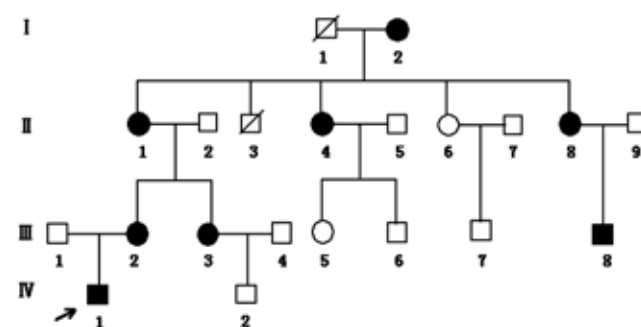


图1 遗传性白内障家系系谱图(箭头所指为先证者)。

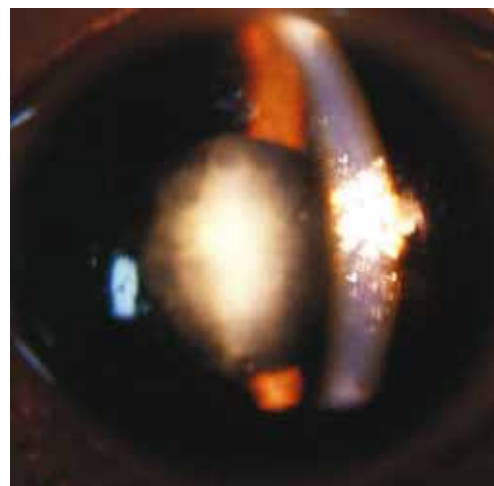


图2 患者(IV1)裂隙灯检查影像,为绕核性白内障。

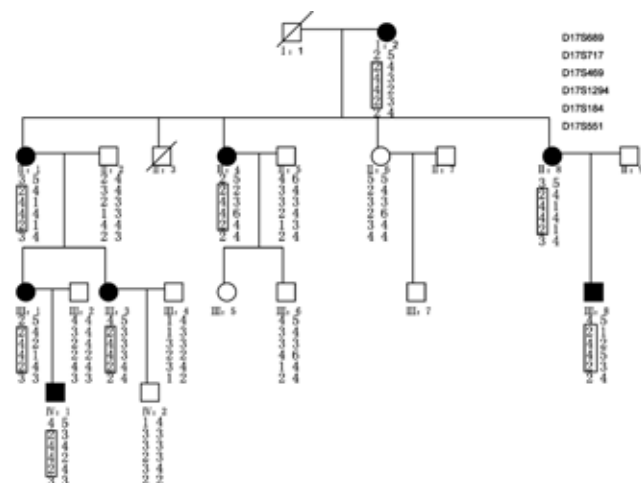


图3 17号染色体单体型。

## 2 结果

**2.1 微卫星标记连锁分析** 通过对家系成员进行微卫星标记的连锁分析, 发现位于17q11-12染色体区段以外的微卫星标记与该家系均无连锁关系, Lod值为负值。位于17q11-12的微卫星标记Lod值存在正值( $\theta = 0$ ); 对于微卫星标记D17S469和D17S184, 当 $\theta = 0$ 时, 最大Lod值为2.71(表2)。

**2.2 单体型构建** 采用软件包人工构建D17S689, D17S717, D17S469, D17S1294, D17S184和D17S551等6个微卫星标记单体型, 对家系的15名成员进行单体型分析, 可见中间4个标记患者享有共同等位基因, 该家系的致病位点与这4个标记连锁, 提示家系的致病基因位于17q11-12附近(图3)。

**2.3 基因测序结果** 在连锁的区域内与ADCC有关的基

表1 基因测序引物

	位置	引物序列(F/R)	片段大小(bp)
CRYBA15'UTR	24,597,617-24,598,243	ACATCTGTATGGAAGTGAGGTGC TTAGTTGCTAGGGCAGTGGTTATT	627
CRYBA1E1	24,597,975-24,598,126	TAAAGAGGAGGGCCACAGAGCA ACTAGGCAGGAGAACTGGGC	152
CRYBA1E2	24,600,216-24,600,640	TTTCAAGGCATTCCCTCACC CTGTTGCTGGGCTGCTGTAT	434
CRYBA1E3	24,601,259-24,601,487	GCTGTTGACCTGGACCTCTGTT ACCTGAAATAAGGGGCTGCGG	229
CRYBA1E4	24,603,145-24,603,408	GCCTTCTCCCAAGGCCATA GTCCACACCCTCTTGTCCTA	264
CRYBA1E5E6	24,604,501-24,605,682	CCCTTGTTGGCTGCATTTTG GGTGTGATTTATGTGAAGCATGGTAGT	1182
CRYBA13'UTR	24,604,537-24,605,683	ACTGTCAAATCCTCTTCATTGTTC AGGTGTGATTTATGTGAAGCATGG	1147
CRYBA1FC	24,592,426-24,592,842	ATGGAGGCAAGTTCTCCCCAG GGCATTTCGAACCTTGGGCTT	417

表2 17号染色体长臂部分微卫星标记 Lod 值

Marker	17q11-12 的微卫星标记 Lod 值						
	0	0.01	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4
D17S689	-∞	-1.02	0.23	0.64	0.84	0.73	0.44
D17S717	1.15	1.12	0.98	0.79	0.43	0.15	0.03
D17S469	2.71	2.67	2.49	2.25	1.74	1.17	0.57
D17S1294	1.81	1.78	1.65	1.49	1.13	0.74	0.33
D17S184	2.71	2.67	2.49	2.25	1.74	1.17	0.57
D17S551	-∞	-3.61	-1.61	-0.82	-0.17	0.07	0.11

因为 *CRYBA1/A3*, 对该基因的 6 个外显子、外显子内含子交界区、5' UTR 和 3' UTR 及上游的高度保守序列测序均未发现突变。

### 3 讨论

根据先天性白内障的临床表现和晶状体混浊分布的特点, 一般将其分为(按发生频率由高到低排序): 绕核性(板层)白内障、核性白内障、粉尘状白内障、后极性白内障、蓝点状白内障、前极性白内障、完全白内障、膜性白内障、缝状白内障、珊瑚状白内障、盘状白内障<sup>[3]</sup>。ADCC 具有明显遗传异质性, 一方面由不同基因的突变可导致相同表现型的白内障, 另一方面不同表现型的白内障却可由相同的基因突变造成<sup>[4]</sup>。以往 ADCC 家系致病基因定位和基因突变研究中, *CRYAB* (*D140N*), *CRYGC* (*R168W*), *CRYGD* (*P24T*), *GJA8* (*P88Q*) 和 *HSF4* (*L114P*) 这些基因突变都可导致先天性板层白内障的发生<sup>[5-8]</sup>。*GJA8* 基因的突变可以导致不同表现型的白内障的发生。*GJA8* (*P88S*) 突变使第二个跨膜区发生脯氨酸替代丝氨酸, 导致该 ADCC 家系表型为带状粉尘状白内障;*GJA8* 的突变 (*V44E*), (*P88Q*), (*V64G*) 和 (*R198Q*) 分别与完全白内障、板层白内障、核性白内障和后囊下混浊白内障的发生密切相关<sup>[7,9,10]</sup>。另外, 先天性白内障的遗传异质性还表现为同一基因的突变在家系的不同患者之间以及同一患者的不同眼别之间表现型上的明显差异。*CRYAA* 的突变 (*c.346G > A*) 在同一家系表型不同, 不同患者的晶状体表现为点状混浊、核性混浊或完全混浊<sup>[11]</sup>。本研究中, 虽然先证者 (IV1) 晶状体混浊形态表现为绕核性白内障, 而其他患病成员已

经行白内障摘除手术我们看不到晶状体混浊形态, 但可以推测, 该家系其他 7 例患者白内障表型未必一定都是绕核性白内障。

晶状体蛋白占晶状体中蛋白质的 90%, 包括  $\alpha$ ,  $\beta$  和  $\gamma$ -晶状体蛋白 3 种。晶状体蛋白基因突变后不仅能造成晶状体蛋白结构的异常而影响其紧密排列, 还会降低晶状体蛋白的溶解性而导致混浊的形成。 $\beta$ -晶状体蛋白占晶状体蛋白质总量的 35%。该蛋白家族有 4 个酸性蛋白质和 3 个碱性蛋白质, 分别由 6 个基因编码。 $\beta$ -A1-晶状体蛋白和  $\beta$ -A3-晶状体蛋白由位于 17q11.2-q12 同一个基因 *CRYBA1/A3* 编码。该家族成员都是晶状体中的主要结构蛋白, 在结构上具有相似性, 均含有两个结构域, 每个结构域又由两个高度保守的 Greek key 基序组成。这种非常稳定的结构对构建和维持晶状体的透明性是至关重要的。已知 *CRYBA1/BA3* 有两个突变热点。Qi 等<sup>[12]</sup> 研究一表型为核性的中国 ADCC 家系发现, 位于 *CRYBA1* 基因外显子 4 的编码序列有三个碱基 GGA 的缺失, 导致所编码蛋白质的第 91 位甘氨酸的缺失, 改变了蛋白质空间构象, 影响了其稳定性和可溶性, 导致白内障的发生。Bateman 等<sup>[13]</sup> 报道由于 *CRYBA1* 内含子 3 的剪切突变 *c.215 + 2T > A*, 导致了一 ADCC 家系带状缝隙状晶状体混浊。本研究中位于 17q11-q12 的候选基因为 *CRYBA1/BA3*。在本研究中, 测序结果没有上述报道的改变, 也没有发现其它外显子突变, 在 3' UTR 和 5' UTR 及上游高度保守序列区域均未发现突变。在已定位区域内, 不排除有其它基因突变或机制导致该家系遗传性先天性白内障的发生。同时, 也不能排除拷贝数变异导致该家系遗传性先天性白内障发生的可能性, 该家系致病机制还需要进一步研究发现。

### 参考文献

- Francis PJ, Moore AT. Genetics of childhood cataract. *Curr Opin Ophthalmol* 2004;15(1):10-15
- Hejtmanic JF, Smaoui N. Molecular genetics of cataract. *Dev Ophthalmol* 2003;37:67-82
- 布娟, 赵堪兴. 先天性白内障分子发病机制的研究进展. 国际眼科杂志 2005;5(5):973-977
- Reddy MA, Francis PJ, Berry V, et al. Molecular genetic basis of inherited cataract and associated phenotypes. *Surv Ophthalmol* 2004;49

(3):300-315

5 Liu Y, Zhang X, Luo L, et al. A novel alphaB-crystallin mutation associated with autosomal dominant congenital lamellar cataract. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47(3):1069-1075

6 Santhiya ST, Shyam Manohar M, Rawley D, et al. Novel mutations in the gamma-crystallin genes cause autosomal dominant congenital cataracts. *J Med Genet* 2002;39(5):352-358

7 Arora A, Minogue PJ, Liu X, et al. A novel GJA8 mutation is associated with autosomal dominant lamellar pulverulent cataract; further evidence for gap junction dysfunction in human cataract. *J Med Genet* 2006;43(1):e2

8 Bu L, Jin YP, Shi YF, et al. Mutant DNA-binding domain of HSF4 is associated with autosomal dominant lamellar and Marmor cataract. *Nat Genet* 2002;31(3):276-278

9 Devi RR, Vijayalakshmi P. Novel mutations in GJA8 associated with

autosomal dominant congenital cataract and microcornea. *Mol Vis* 2006;12:190-195

10 Ma Z, Zheng JQ, Li J, et al. Two novel mutations of connexin genes in Chinese families with autosomal dominant congenital nuclear cataract. *Br J Ophthalmol* 2005;89(10):1535-1537

11 Gu F, Luo W, Li X, et al. A novel mutation in AlphaA-crystallin (CRYAA) caused autosomal dominant congenital cataract in a large Chinese family. *Hum Mutat* 2008;29(5):769

12 Qi Y, Jia H, Huang S, et al. A deletion mutation in the betaA1/A3 crystallin gene (CRYBA1/A3) is associated with autosomal dominant congenital nuclear cataract in a Chinese family. *Hum Genet* 2004;114(2):192-197

13 Bateman JB, Geyer DD, Flodman P, et al. A new betaA1-crystallin splice junction mutation in autosomal dominant cataract. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41(11):3278-3285

## · 短篇报道 ·

# 结膜松弛的诊断与治疗

李娟

作者单位:(110003)中国辽宁省沈阳市,解放军第202医院眼科  
作者简介:李娟,女,毕业于解放军军医进修学院,副主任医师,  
研究方向:结膜、角膜和眼表疾病。

通讯作者:李娟. lijuan0930@yahoo. cn

收稿日期:2011-01-13 修回日期:2011-03-07

李娟. 结膜松弛的诊断与治疗. 国际眼科杂志 2011;11(4):587

## 0 引言

结膜松弛是指结膜过度松弛堆积在眼球与下睑缘内外眦部之间,引起眼表异常的一组病变。我科自2006-03/2007-09对49例结膜松弛患者进行有效治疗,并对其中溢泪较重者进行治疗,现报道如下。

## 1 临床资料

结膜松弛患者49例58眼,男18例,女31例;年龄48~72(平均62)岁;农民25例,工人16例,退休干部8例。病例选择:(1)患者主诉溢泪或眼干涩;(2)下方球结膜堆积;(3)下睑缘缺少正常的泪液新月面;(4)室内观察5~10min有泪液自睑裂溢出;(5)泪道冲洗通畅,无鼻泪管开口处阻塞的鼻腔病变或异常者;(6)排除倒睫、泪小点狭窄阻塞。轻度球结膜松弛导致或加重泪膜不稳定,局部以1g/L爱丽滴眼液缓解症状;重度球结膜松弛堆积使泪河不完整,阻碍泪液的流向,或直接堵塞下泪小点开口处,引起泪溢者,手术切除松弛的球结膜或结膜缝线固定术。手术方法:5g/L的卡因结膜囊内表面麻醉后,用眼显微无齿镊提松弛结膜后计算切除范围。在切除部位球结膜下注射少许20g/L利多卡因以助球结膜与筋膜分离,切除前缘距角膜缘约4mm,设计半月形切口切除宽约3~6mm松弛结膜,10-0尼龙线连续缝合结膜。手术后6~7d拆线,术后滴抗生素眼液预防感染<sup>[1]</sup>。术后随访3mo~1a,患者异物感、溢泪、结膜下出血症状均消失,无复发,无并发症,下睑缘上方未见多余的结膜皱襞。

## 2 讨论

结膜松弛患者多数无临床症状,通常被临床医师忽

略。部分患者出现溢泪、异物感就诊时,因临床医师缺乏对此疾病的认识,易将其误诊为结膜炎,反复药物治疗无效。患者出现异物感或疼痛症状是由于患者在眨眼或闭眼时多余的球结膜对眼球形成的压力所致。同时堆积于下睑缘上方的结膜皱襞可堵塞下泪小点并影响下方新月形泪河的形成引起溢泪症状<sup>[2]</sup>。

结膜松弛多发于老年人,无性别差异,最常发生于眼球下方中央部,其次是内、外侧。松弛的球结膜因过多而无法紧贴眼球移动,故成皱折,多夹在眼球与下睑缘之间,一些松弛结膜甚至突出跨在下睑缘上。严重患者常有刺痛感、灼痛感,突出在睑缘上的松弛结膜下有出血或小溃疡。结膜松弛多发生于下睑处,可能有下列原因:(1)当向上或下方注视时,上睑随着眼球转动而上下移动,而下睑基本不动,这就导致下睑球结膜的摩擦和挤压比上睑多,久之使下方球结膜松弛;(2)下方球结膜与巩膜的连接可能比上方球结膜与巩膜连接更加疏松;(3)老年人球结膜较薄,弹性差,张力低,使球结膜松弛度更大;(4)下穹隆较浅,松弛的球结膜易于脱出。

结膜松弛症的结膜病理表现为结膜弯曲皱折,鳞状上皮明显增生,厚薄不均,角化不全,基底细胞轻重不等的色素沉着。固有层间质淤血水肿,淋巴细胞、浆细胞浸润。固有层病变随临床分级的上升而加重,甚至有片状出血。弹力纤维染色示弹力纤维明显减少,泪液清除延缓可导致大量降解酶堆积,使胶原纤维溶解,弹力纤维变形,引起眼表泪液异常病理循环。松弛结膜皱折内血管弯曲、变形,瞬目时眼睑挤压松弛球结膜,容易引起血管的破裂而出现结膜下出血<sup>[3]</sup>。角膜、结膜和泪膜三者关系紧密,互为影响,任何一者改变都将导致眼表、泪液的不稳定,而引起眼表损伤,它们之间可能存在一个自动反馈调节系统,调节眼表环境稳定。而在结膜松弛症时,这种机制可能不健全。松弛结膜切除后泪液的改善,随着术后时间延长,疗效提高,一般在术后4wk稳定,其主要是由于手术切除的结膜伤口渐愈合,刺激症状消失。

## 参考文献

- 1 张兴儒. 结膜松弛症性溢泪的手术治疗. 中国实用眼科杂志 2002;20(4):299-301
- 2 张梅,陈家祺,刘祖国,等. 干眼患者115例的临床特点分析. 中华眼科杂志 2003;39(1):5-9
- 3 张兴儒,项敏淑,李青松,等. 结膜松弛症的发病机理研究. 国际眼科杂志 2008;8(5):1001-1005