

白点状眼底与视网膜色素变性共存家系的 RDH5 基因诊断

王春霞, 孙琦, 于紫燕, 周文凯, 张劲松

基金项目: 中国国家自然科学基金资助项目 (No. 81000402)
作者单位: (110005) 中国辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属第四医院眼科 中国医科大学眼科医院 辽宁省晶状体重点实验室
作者简介: 王春霞, 博士, 讲师, 研究方向: 遗传性眼病。
通讯作者: 王春霞. cxwang@mail.cmu.edu.cn
收稿日期: 2011-11-25 **修回日期:** 2011-12-09

Genetic diagnosis of RDH5 gene in family with fundus albipunctatus and retinitis pigmentosa

Chun-Xia Wang, Qi Sun, Zi-Yan Yu, Wen-Kai Zhou, Jin-Song Zhang

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 81000402)
Department of Ophthalmology, the Fourth Affiliated Hospital of China Medical University, Eye Hospital of China Medical University, Key Lens Research Laboratory of Liaoning Province, Shenyang 110005, Liaoning Province, China
Correspondence to: Chun-Xia Wang, Department of Ophthalmology, the Fourth Affiliated Hospital of China Medical University, Eye Hospital of China Medical University, Key Lens Research Laboratory of Liaoning Province, Shenyang 110005, China. cxwang@mail.cmu.edu.cn
Received: 2011-11-25 Accepted: 2011-12-09

Abstract

• **AIM:** To identify mutations in the RDH5 gene in a family with a mother having fundus albipunctatus (FA) and 3 children with retinitis pigmentosa (RP).
• **METHODS:** Ophthalmological examinations were performed to diagnose FA and RP. Mutational analysis of RDH5 was performed by polymerase chain reaction (PCR) and direct DNA sequencing.
• **RESULTS:** The proband's mother was diagnosed with FA, and 3 children were diagnosed with RP. The mother, brother, and sister had a novel mutation c. 689_690CT > GG in RDH5 gene. The proband and mother had a previously reported mutation c. 928delCinsGAAG.
• **CONCLUSION:** A novel disease-causing mutation in RDH5 gene (Pro230Arg) was found in a family with a mother having FA and 3 children with RP. The mother's FA was caused by compound heterozygous mutations. Further studies will be needed to determine the gene responsible for children's RP.
• **KEYWORDS:** fundus albipunctatus; retinitis pigmentosa; night blindness; RDH5 gene; mutation

Wang CX, Sun Q, Yu ZY, et al. Genetic diagnosis of RDH5 gene in family with fundus albipunctatus and retinitis pigmentosa. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2012;12(2):326-328

摘要

目的: 在母亲诊断为白点状眼底 (fundus albipunctatus, FA) 而 3 个子女均为视网膜色素变性 (retinitis pigmentosa, RP) 的家系中进行 RDH5 基因的分子遗传学检查, 确定一种新型变异。
方法: 对家系成员进行系统的眼科检查, 同时采用聚合酶链反应 (PCR) 和 DNA 直接测序法对 RDH5 基因的编码区进行基因组测序和突变筛查, 并在 100 名正常对照者中对 RDH5 基因突变的检测结果进行验证。
结果: 先证者的母亲确诊为 FA, 而 3 个子女诊断为 RP。母亲、哥哥和姐姐的 RDH5 基因检测出 c. 689_690CT > GG 突变, 而先证者及其母亲存在已报道的 c. 928delCinsGAAG 变异。
结论: 本家系中母亲的 FA 来源于复杂的异质突变, 其中 c. 689_690CT > GG 突变是包括欧美各国在内没有报道过的新变异, 而 3 个子女患 RP 的分子遗传学病因还有待进一步的研究。
关键词: 白点状眼底; 视网膜色素变性; 夜盲; RDH5 基因; 变异
DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2012.02.42

王春霞, 孙琦, 于紫燕, 等. 白点状眼底与视网膜色素变性共存家系的 RDH5 基因诊断. 国际眼科杂志 2012;12(2):326-328

0 引言

白点状眼底 (fundus albipunctatus, FA) 是一种常染色体隐性遗传性疾病, 临床特征表现为视网膜色素上皮水平大量散在的白点和先天性静止性夜盲, 没有血管病变及视网膜色素沉着, 血清维生素 A 在正常水平, 视紫质再生延迟, 导致暗适应时间延长, 并产生正常振幅的视网膜电图 (ERG)。绝大多数的 FA 是由 RDH5 基因变异所致^[1], 而在已报道的 FA 病例中, c. 928delCinsGAAG 变异被广泛检出, 推测其为一种奠基者效应^[2-6]。本文描述了一个极不寻常的家系, 包括诊断为 FA 的母亲和具有典型视网膜色素变性 (retinitis pigmentosa, RP) 临床表现的 3 个子女。我们检测了这个家系的 RDH5 基因型, 并发现了一个新变异。

1 对象和方法

1.1 对象 先证者为 12 岁女孩, 自诉 7 岁起出现夜盲。先证者 43 岁的母亲、19 岁的哥哥和 18 岁的姐姐也有夜盲症状, 母亲就诊时正口服几种治疗缺铁性贫血和高血压的药物。所有家系成员均没有明显视力下降。

1.2 方法

1.2.1 眼科检查 对家系成员进行系统的眼科检查,包括视力、眼压、裂隙灯检查、眼底照相、眼底荧光造影(FFA)和眼科电生理学检查等。

1.2.2 变异分析 在获得知情同意的前提下,抽取家系成员外周静脉血 2mL,使用 QIAamp DNA Blood Kit 提取基因组 DNA,参照文献报道合成引物^[1],采用聚合酶链反应(PCR)扩增 RDH5 基因的蛋白质编码区域(外显子 2-5),通过 DNA 直接测序法对精制后的 PCR 产物进行基因组测序和突变分析,并在 100 名正常对照者中对 RDH5 基因突变的检测结果进行验证。同时,对于发现序列存在异常的患者,进一步将两个等位基因克隆至 pBLUESCRIPT II SK(+)质粒(Stratagene, La Jolla, CA),并分别检测各自的碱基序列。

2 结果

2.1 眼科检查所见 先证者(患者 P1,图 1)双眼矫正视力均为 1.0,视野检查提示周边视野轻度缺损,眼底检查发现大量骨细胞样色素沉着,双眼均呈现典型的 RP 表现(图 2),且单次闪光 ERGs 的 a 波和 b 波显著降低。

先证者的母亲(P2)双眼矫正视力分别为右眼 0.9,左眼 1.0,视野检查未见明显异常。眼底检查结果视网膜血管弓外侧可见大量黄白色点状沉积物,而黄斑区未受累(图 2)。暗视网膜电图及全视野视网膜电图的振幅均明显降低,但在暗适应 120min 后逐渐恢复正常水平(图 3)。暗适应时间的延长及随后 ERG 振幅的恢复是 FA 的典型表现。先证者的哥哥(P3)和姐姐(P4)双眼矫正视力均为 1.0。视野检查 P3 示周边视野轻度缺损,而 P4 可见环形暗点。P3 双眼底视网膜周边部可见色素沉着,FFA 显示血管弓周围视网膜色素上皮萎缩形成的大片窗样缺损,而中心部黄斑区未受累。P4 亦可见视网膜大量骨细胞样色素沉着。姐弟两人的单次闪光 ERG 均显示 a 波及 b 波显著降低。

2.2 RDH5 基因变异分析 RDH5 基因组测序结果显示,P2,P3 和 P4 的外显子 4 中存在一种新的 2 个连续碱基的错义突变 c. 689_690CT > GG (Pro230Arg)(图 4),而采用限制性内切酶 *Mnl*I 消化 PCR 产物的方法在 100 名正常对照中未能检出该种点突变(图 5)。由此证实 c. 689_690CT > GG 是一种病理性突变而非多型。

3 讨论

本文报道的此种由 2 个连续碱基改变引起的突变非常少见。我们检索了 *MutationView*和 *HGMD* 数据库登录的 1700 多种致病基因,仅在 15 个基因中发现了 25 种类似的变异^[7,8]。表 1 详细列出了包括本文报道病例在内的共 26 种此类 2 个连续碱基的突变,其中 RDH5 基因的 CT > GG 突变是首次报道,且此种变异在 RDH5 以外的人类致病基因所有已知错义变异中亦是首例报道,其互补序列的改变(AG > CC)也未见报道。目前认为 2 个或以上连续碱基的突变是由 DNA 损伤修复失败或复制错误所引起的,推测核苷酸切除修复(NER)、错配修复或同源重组介导的 DNA 修复^[9]等多种机制可能参与其中。

但是,在 2 个连续碱基对的变异中是否有特殊机制的存在尚未明确。从表 1 可以看出,碱基的颠换明显多于转换,即不同类碱基间的置换明显多于同类碱基的置换,数量比为 32:20。这是个非常有趣的现象,已知在单一碱

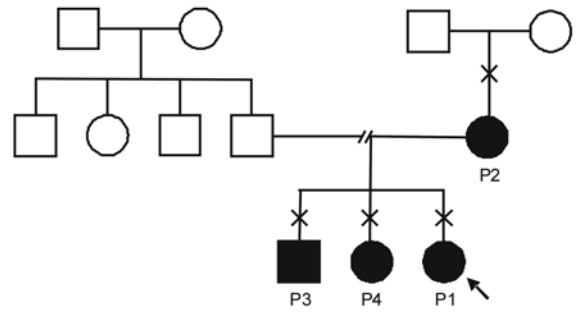


图 1 家系图 先证者; 患者; x: 受检者。所有受检家系成员均有夜盲主诉。

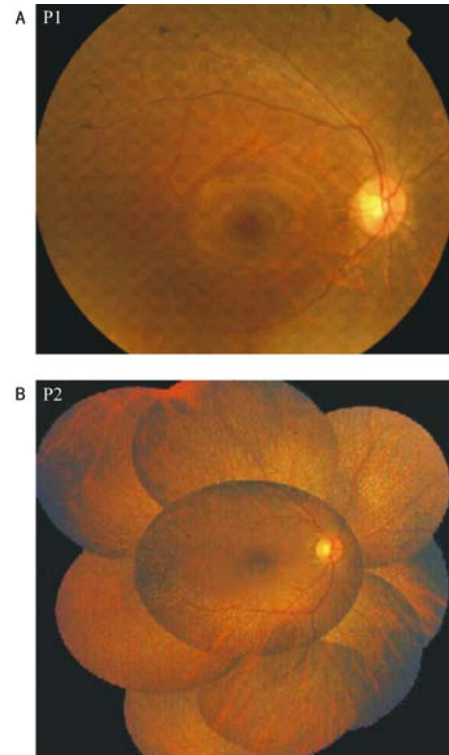


图 2 眼底照片 A: P1 周边视网膜可见大量骨细胞样色素沉着; B: P2 血管弓外侧可见大量黄白色点状沉积而中央黄斑区未受累。

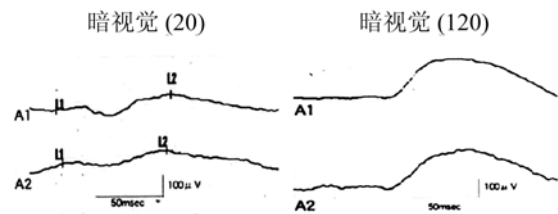


图 3 P2 的暗视 ERGs 检查 P2 的暗视 ERGs 检查可见明显的暗视反应降低,在暗适应 120min 后才逐渐恢复正常水平。

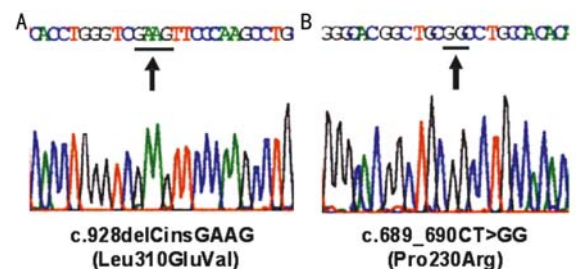


图 4 变异解析结果 A: P1 和 P2 中检出的 c. 928delCinsGAAG 变异; B: P2, P3 和 P4 中检出的 c. 689_690CT > GG 变异。P1, P3 和 P4 的另一等位基因未见异常。

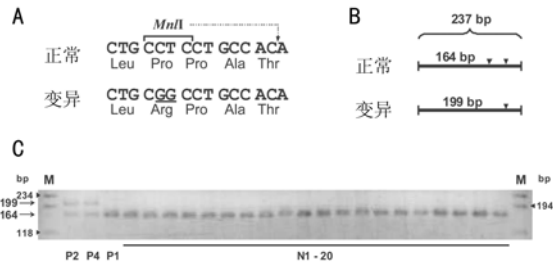


图5 新变异 c.689_690CT > GG 的限制性内切酶分析 A: 正常及变异的外显子4的部分碱基序列。正常序列中存在 *MnlI* 的识别位点 (CCTC), 而突变的基因序列中不存在。点线箭头表示切断位点。B: 位于外显子4及其相邻内含子区域 PCR 扩增区域 (237 bp) 内的 *MnlI* 位点 (箭头)。发生突变的等位基因因失去限制性内切酶的识别位点导致无法被切断, 而正常序列可被切断并产生 164bp 长的片段。C: 3 例患者 (P1, P2, P4) 及部分正常对照 (N1 至 20) PCR 扩增产物的限制性内切酶分析结果。只有 P2 和 P4 的 DNA 产生 199bp 的变异片段。164bp 片段在 P1, P2, P4 和对照者中均可检出。M 为 DNA 分子标记。

表1 已报道的连续2个碱基突变

基因	变异	类型*	氨基酸改变
1 ARSA	286_287TC > CT	SS	S96L
2 ATM	7875_7876TG > GC	VV	D2625_A2626indelIEP
ATM	8565_8566TG > AA	VS	S2855_V2856indelIRI
3 CFTR	1294_1295AC > TA	VV	T388X
CFTR	2916_2917TC > AT	VS	L973F
4 CNGB3	1573_1574TT > AA	VV	F525N
5 DYSF	200_201TG > AT	VV	V67D
DYSF	3444_3445TG > AA	VS	Y1148X
6 F9	1092_1093TA > CG	SS	S365G
7 GJB1	64_65CG > TA	SS	R22X
8 IL2RG	536_537TG > AA	VS	L179X
9 KCNE1	152_153TG > AT	VV	L51H
KCNE1	176_177TG > CT	SV	L59P
10 MLH1	531_532GG > AT	SV	E178X
MLH1	1852_1853AA > GC	SV	K618A
MLH1	1852_1853AA > CG	VS	K618R
11 NF1	945_946GC > AA	SV	L316M
NF1	4861_4862GT > AG	SV	V1621R
NF1	7424_7425CT > AG	VV	S2475X
12 NPHP4	1334_1335TC > AA	VV	F445X
13 NR5A1	104_105GC > AA	SV	G35E
14 PAH	470_471GA > AC	SV	R157N
PAH	796_797AC > GA	SV	T266E
15 PAX6	363_364AT > CA	VV	M1Q
PAX6	862_863CG > GA	VS	S167X
16 RDH5	689_690CT > GG	VV	P923R

注: *类型分为 S (transition, 转换) 和 V (transversion, 颠换), S 和 V 的例数分别为 20 和 32。

基置换引起的突变中, 转换变异多于颠换变异, 因此提示某种因素可能与此种类型变异的发生机制有关。今后有待进一步的研究来解释此种变异的产生机制。

在 P1 和 P2 中发现的另一种变异是外显子 5 中的 c.928delCinsGAAG (Leu310GluVal) 突变 (4), 此变异在很多 FA 病例中已有报道^[2-6]。因此, P2 的 FA 推断很可能是由 RDH5 的复合杂合突变, 即 c.689_690CT > GG 和 c.928delCinsGAAG 所致。关于 FA 和 RP 共存家系的报道迄今为止只有 2 例。Kuroiwa 等^[10]报道了一个家系, 包括 1 例存在 RDH5 复合杂合突变 (Val177Gly 和 Arg280His) 的 FA 患者和 1 例患有 RP 但未检测出基因变异的家族成员。Sato 等^[11]报道了一个诊断为 FA 同时伴有双眼视网膜鼻下象限性 RP 的病例, 并在 RDH5 中检出了一种纯合子突变 (Gly107Arg)。据我们所知, 本文描述的此种母亲患 FA 而 3 个子女均为典型 RP 的家系还是首次报道。关于 3 个子女患 RP 的遗传学致病机制还有待进一步的研究。

参考文献

- 1 Yamamoto H, Simon A, Eriksson U, et al. Mutations in the gene encoding 11- cisretinol dehydrogenase cause delayed dark adaptation and fundus albipunctatus. *Nat Genet* 1999;22:188-191
- 2 Hirose E, Inoue Y, Morimura H, et al. Mutations in the 11-cis retinol dehydrogenase gene in Japanese patients with fundus albipunctatus. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:3933-3935
- 3 Nakamura M, Lin J, Miyake Y. Young monozygotic twin sisters with fundus albipunctatus and cone dystrophy. *Arch Ophthalmol* 2004; 122 (8):1203-1207
- 4 Sekiya K, Nakazawa M, Ohguro H, et al. Long-term fundus changes due to fundus albipunctatus associated with mutations in the RDH5 gene. *Arch Ophthalmol* 2003;121:1057-1059
- 5 Wada Y, Abe T, Fuse N, et al. A frequent 1085delC/insGAAG mutation in the RDH5 gene in Japanese patients with fundus albipunctatus. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:1894-1897
- 6 Hayashi T, Goto-Omoto S, Takeuchi T, et al. Compound heterozygous RDH5 mutations in familial fleck retina with night blindness. *Acta Ophthalmol Scand* 2006;84(2):254-258
- 7 Minoshima S, Mitsuyama S, Ohtsubo M, et al. The KMDB/MutationView: A mutation database for human disease genes. *Nucl Acids Res* 2001;29:327-328
- 8 Cooper DN, Ball EV, Krawczak M. The human gene mutation database. *Nucleic Acids Res* 1998;26:285-287
- 9 Spencer DM, Bilardi RA, Koch TH, et al. DNA repair in response to anthracycline-DNA adducts: a role for both homologous recombination and nucleotide excision repair. *Mutat Res* 2008;638(1-2):110-121
- 10 Kuroiwa S, Kikuchi T, Yoshimura N. A novel compound heterozygous mutation in the RDH5 gene in a patient with fundus albipunctatus. *Am J Ophthalmol* 2000;130:672-675
- 11 Sato M, Oshika T, Kaji Y, et al. A novel homozygous Gly107Arg mutation in the RDH5 gene in a Japanese patient with fundus albipunctatus with sectorial retinitis pigmentosa. *Ophthalmic Res* 2004; 36:43-50