·临床研究·

东北地区一遗传性白内障家系的临床遗传学及基因定位研究

张天晓[1],马立威[1],赵江月[1],张 学[2],张劲松[1]

基金项目:中国辽宁省沈阳市科学技术计划资助项目(No. F10-149-9-54);中国辽宁省博士启动基金资助项目(No. 20101150)

作者单位:[1](110001)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 辽宁省晶状体学重点实验室;[2](100005)中国北京市,中国医学科学院基础医学研究所医学遗传学系

作者简介:张天晓,博士,副教授,研究方向:遗传性眼病基因定位及功能研究。

通讯作者:张劲松,硕士,教授,研究方向:白内障临床及基础研究. zhang980304@163. com

收稿日期: 2012-12-20 修回日期: 2013-05-24

Clinical genetics and gene mapping studies on a family in the area of northeast with hereditary cataract

Tian-Xiao Zhang[1], Li-Wei Ma[1], Jiang-Yue Zhao[1], Xue Zhang[2], Jin-Song Zhang[1]

Foundation items: Science and Technology Project of Shenyang, China(No. F10-149-9-54); Liaoning Province Doctor Startup Fund Program, China(No. 20101150)

[1]Department of Ophthalmology, the Fourth Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China; [2]Department of Medical Genetics of Institute of Basic Medical Sciences Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100005, China

Correspondence to: Jin-Song Zhang. Department of Ophthalmology, the Fourth Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. zhang980304@163. com

Received:2012-12-20 Accepted:2013-05-24

Abstract

• AIM: To map the causal gene of congenital nuclear cataract in a family in the area of northeast.

• METHODS: We investigated there generations of a Chinese family affected with hereditary cataract. Peripheral blood samples were collected from all of the family members, and genomic DNA was then extracted from the blood samples. Linkage analysis was performed using 62microsatellite markers. Two-point LOD scores (Z) were calculated using the LINKAGE programs (ver. 5.2). Haplotypes were constructed according to the allele information.

• RESULTS: The affected members in this family showed classic phenotype of autosomal dominant congenital cataract. The maximum two-point LOD score of 2.71 was obtained for marker D22S689 (θ = 0). Haplotype analysis traced the disease gene on chromosome 22q11.2-12.1, containing *CRYBB1*, *CRYBB2*, *CRYBB3*, *CRYBA4* genes.

• CONCLUSION: The occurrence of congenital nuclear cataract consistents with the autosomal dominant inherited regular, and the causal gene of congenital nuclear cataract localize at 22q11.2-12.1 in this family.

• KEYWORDS: autosomal dominant congenital cataract; linkage analysis; gene

Citation: Zhang TX, Ma LW, Zhao JY, *et al*. Clinical genetics and gene mapping studies on a family in the area of northeast with hereditary cataract. *Guoji Yanke Zazhi*(*Int Eye Sci*) 2013;13(6):1212-1214

摘要

目的:分析一先天性核型白内障家系的遗传方式及致病基因所在位置。

方法:收集一个 3 代遗传性白内障家系成员的临床资料;提取家系成员外周血 DNA,选取 62 个态性微卫星标记进行连锁分析。应用 LINKAGE 软件(version5.2)中的 MLINK 程序计算两点连锁 LOD 值,并人工构建家系成员的单体型。

结果:确定该家系为一常染色体显性遗传性白内障大家系,在微卫星标记 D22S689 可获得最大 LOD 值 2.71(θ=0 时),单体型提示该家系表型可能与染色体 22q11.2-12.1 区域连锁。该区域含有 *CRYBB1*, *CRYBB2*, *CRYBB3*, *CRYBA4*4 个候选基因。

结论:本研究先天性核型白内障家系符合常染色体显性遗传规律,其致病基因定位于 22q11.2-12.1 区域。

关键词:常染色体显性遗传性白内障;连锁分析;基因

DOI:10.3980/j. issn. 1672-5123.2013.06.43

引用:张天晓,马立威,赵江月,等. 东北地区一遗传性白内障家系的临床遗传学及基因定位研究. 国际眼科杂志 2013;13(6):1212-1214

0 引言

先天性白内障是导致儿童失明的重要原因之一[1],我国群体发病率为 0.05%。8% ~25% 的先天性白内障是遗传性的[2,3],其主要遗传方式为常染色体显性遗传。先天性白内障的遗传学研究已经有近百年的历史,随着分子遗传学的迅猛发展,新的致病基因与致病机制不断

表1　位于染色体22q11.2-12.1微卫星标记的LOD值

微卫星标记	物理距离(Mb)	对应基因重组指数(θ)的Lod值							
		0.0	0.01	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4	Zmax
D22S11744	22.818	1.51	1.48	1.39	1.28	1.02	0.73	0.40	1.51
D22S315	24.345	0.90	0.89	0.84	0.77	0.61	0.44	0.24	0.90
D22S1154	24.947	0.60	0.59	0.56	0.51	0.41	0.29	0.16	0.60
D22S1144	26.012	1.81	1.78	1.65	1.49	1.13	0.73	0.31	1.81
D22S689	27.186	2.71	2.67	2.49	2.25	1.74	1.17	0.54	2.71

被发现。但由于先天性白内障分类多,表现型又多有交叉重叠,研究较为困难,虽然已经确定了多个导致遗传性白内障的致病基因,但仍然有很多致病基因尚未发现。本研究对一个3代11例患双眼先天性核性白内障家系的临床及分子遗传学进行了系列研究,现将研究结果报告如下。

1 对象和方法

1.1 对象　在东北地区(黑龙江省鸡东县)收集遗传性白内障大家系1个,追溯调查家系成员共3代21例,其中11例患病。家系成员否认近亲婚配,患者母亲否认怀孕期间用药、患病史,所有患者否认早产史。采血19份,其中患者10例。经眼科检查该家系表型为核性白内障(图1),排除小角膜、小眼球等眼部其他异常改变,4例同时伴有眼球震颤。

1.2 方法　高速低温离心机(Centrifuge 5417R, Eppendorf, Germany),高速离心机(Centrifuge 5415D, Eppendorf, Germany),T1高性能PCR仪(Biometro,德国),小型三用水箱(37℃ ~ 100℃,北京市医疗设备总厂),电泳仪(JY300C,北京君意东方电泳设备有限公司),水平电泳槽(MGO-202T, C. B. S Scientific CO. USA),垂直电泳槽(DYYⅢ,北京市六一仪器厂),SCOUT电子天平(Toledo-SE2020, Mettler,中国常州),凝胶成像系统(Tanon GIS-2008,天能科技上海有限公司),水平摇床(TS-92型,江苏海门市麒麟医用仪器厂)。严格按照国家和国际有关伦理学要求进行家系收集,通过直接检查或家系成员口述的方法对家系中可能追溯到的家庭成员进行详细调查,了解患者的临床表现及其遗传学特征,绘制出标准的家系系谱图(图2)。在履行告知义务及签署知情同意书后,家系成员经全面体格检查,排除眼外疾患,该家系成员共3代21例,所有人行裂隙灯及眼底镜检查,最终11例确诊为核性白内障,Ⅱ2,Ⅱ3,Ⅱ7,Ⅱ9同时伴有眼球震颤,在患者中2例已行白内障摘除术。用碘酒进行皮肤消毒,抽取肘静脉血2 ~ 8mL/例,收集到EDTA抗凝的真空采血管中,血样-70℃保存备用。使用常规酚氯仿法提取家系成员基因组DNA。在目前遗传性白内障已知的基因座中,选择包括20个已知常染色体显性遗传性白内障致病基因的共15个位点及其它10个遗传位点(1p36, 1p22.3, 1q21-25, 2p12, 2p24-pter, 2q33-36, 3p22-24.2, 3q21-25, 3q27.3, 10q25, 11q22.1-23.21, 12q13-14, 13q12.11, 14q22-23, 15q21-22, 16q23.1, 16q22.1, 17p13.3, 17q11-12, 19q13.33, 20p11.23-p12.1, 20p12.1, 20q11.22, 21q22.3和22q11.2-12.1),通过互联网(www.UCSC.com)数据库在其区段内共计选取62个多态性微卫星标记,设计并合成微卫星标记的引物。应用聚合酶链式反应(PCR)扩增各家系全部成员的基因组微卫星片段,通过8%聚丙烯酰胺变性凝胶电泳分离PCR等位片段,硝酸银染色检测片段

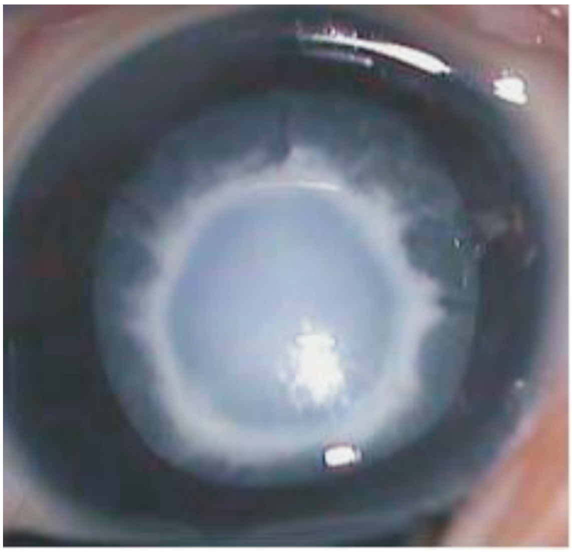

图1　散瞳后晶状体呈核性混浊正面观。

大小,确定各家系成员的基因型。应用LINKAGE软件(version5.2)中的MLINK程序进行微卫星标记两点间连锁分析,计算两点连锁LOD值。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,人工构建家系成员的单体型。

2 结果

2.1 临床遗传学检查结果　该家系都符合大家系标准,系谱图表明先天性白内障患者双亲中一方患病,致病基因是由患者亲代传来;患者同胞中大约1/2会发病,且男女患病机会均等;患者子代中约有1/2会发病;先天性白内障在传代中连续相传。因此该家系为常染色体显性遗传性白内障家系。

2.2 连锁分析及单体型建立结果　通过对家系成员进行微卫星标记的连锁分析,在染色体22q11.2-12.1的五个微卫星标记LOD值均为正值,对于微卫星标记D22S689,当θ=0时,获得最大值为2.71(表1),提示该家系在该区域连锁;整理分析家系成员的等位基因,人工构建包括D22S1174, D22S315, D22S1154, D22S1144, D22S689五个微卫星标记的单体型(图2)。结果表明:这五个标记与该家系成员患病共分离,提示该家系致病基因可能为22q11.2-12附近的与人类晶体发育相关的某个基因。

3 讨论

先天性白内障的临床表型十分多样,早在1910年Harman描述了一个遗传性白内障家系,并将先天性白内障按晶状体混浊形态分为:板层白内障、珊瑚状白内障、星状白内障、前极白内障、后极白内障。此后有人相继报道了一些类型的白内障如:粉尘状、不完全粉尘状、中央粉尘状、核性、不完全中央核性、天蓝色白内障等。以上表型分

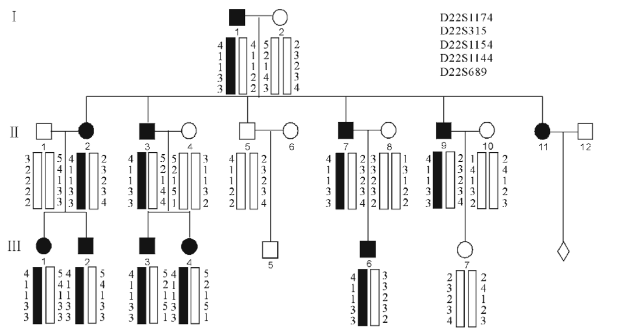

图 2　常染色体显性遗传性白内障系谱图及单体型　白色正方形代表正常男性,白色圆圈代表正常女性,黑色正方形代表患病男性,黑色圆圈代表患病女性。

类不全面且有重叠,为研究人员确定白内障表型带来了一定的困扰。Reddy 等[4]给我们提供了一个分类遗传性单纯性白内障的比较实用的方法。这种表型分类法依赖混浊在晶状体中的位置和在裂隙灯下的表现把遗传性白内障分为前极性白内障、后极性白内障、核性白内障、板层白内障、粉尘状白内障、蓝色白内障、全白内障、皮质性白内障、多形态白内障、缝隙性白内障。根据这种表型分类法,该家系符合核性白内障。

在脊椎动物中,与眼晶状体的正常发育和分化有关的任何基因发生突变均可导致先天性白内障的发生[5]。自从 1963 年 Renwick 等[6]通过连锁分析发现第一个与先天性白内障有关的染色体位点以来,特别是随着分子生物学技术的长足发展,人们已经在寻找遗传性白内障致病基因以及研究其致病机制的工作中取得了很大突破。近年来,一些新的致病基因突变不断被发现,包括了多种晶体蛋白、缝隙连接蛋白、转录因子等。目前已有 39 个基因座被确定[7],其中 20 个遗传性白内障致病基因已被发现。这 20 个致病基因分别是 10 个晶体蛋白基因包括 *CRYAA*, *CRYAB*, *CRYBA1*, *CRYBA4*, *CRYBB1*, *CRYBB2*, *CRYBB3*, *CRYGC*, *CRYGD*, *CRYGS*;4 个膜蛋白基因包括缝隙连结蛋白基因 *GJA3*、*GJA8*,水通道蛋白基因 *MIP*,内源性膜蛋白基因 *LIM2*;3 个转录因子基因包括热休克转录因子 *HSF4*,同源盒转录因子 *PITX3*;碱性亮氨酸拉链转录因子 *MAF*;中间丝样细胞骨架蛋白 *BFSP2*;染色质修饰蛋白基因 *CHMP4B* 和 *EPHA2* 受体络氨酸蛋白激酶基因。一般情况下,同一个基因,尽管突变类型不同,所发生的疾病表型是相同的。但在遗传性白内障中,尽管是同一基因的相同突变,也会产生不同的表型,临床表型相同的家系也可以由不同的基因突变导致,因此,遗传性白内障不但具有表型异质性,还具有很强的遗传异质性,基因型与表型之间缺乏一一对应关系。因此,我们把所有的已知致病基因作为候选基因,把大部分已经定位但没有找到致病基因的位点作为候选位点,对该家系进行了连锁分析。

该家系为核性白内障,在遗传性白内障中比较常见,可以表现为常染色体显性遗传和常染色体隐性遗传。从遗传学角度看,核性白内障的遗传异质性很强,国内外学者已经确定了 9 个常染色体显性遗传性核性白内障位点,其中 8 个致病基因已被查出, 分别是 *GJA8*, *CRYGD*, *BFSP2*, *GJA3*, *CRYBA3*, *CRYAA*, *CRYBB1*, *CRYBB2*[8]。本研究家系的微卫星标记 D22S689 在 $\theta=0$ 时获得最大 LOD 值 2.71,并且在 22q11.2-12.1 内连续 5 个微卫星标记的 LOD 值都是正值,虽然 LOD 值没有达到 3,但也充分提示该家系在此范围内连锁,与已报导的一个位点相吻合。该区域内有 4 个已知致病基因,包括 *CRYBB1*, *CRYBB2*, *CRYBB3*, *CRYBA4*,它们均为晶体蛋白基因。晶体蛋白是脊椎动物晶体内的主要成分,这种蛋白约占整个水溶性晶体蛋白质成分的 90%。它是一种结构稳定的蛋白质,具有特殊的空间立体构象,而正是这种立体结构与晶状体的透明度息息相关。因此,晶体蛋白基因的突变无论是改变晶体蛋白的溶解度还是立体构象均可导致白内障的发生。

总之,本研究通过对一常染色体显性遗传性白内障的临床遗传学及分子遗传学研究,把突变位点定位在 22 号染色体 22q11.2-12.1 范围内。我们将进一步对该范围内的 4 个晶体蛋白进行测序,并用酶切等方法鉴定致病性基因突变,为进一步研究遗传性白内障发病机制打下基础。

参考文献

1 Ionides A, Francis P, Berry V, *et al*. Clinical and genetic heterogeneity in autosomal dominant cataract. *Br J Ophthalmol* 1999;83(7):802-808
2 Francois J. Genetics of cataract. *Ophthalmologica* 1982;184(2):61-71
3 Haargaard B, Wohlfahrt J, Fledelius HC, *et al*. A nationwide Danish study of 1027 cases of congenital/infantile cataracts: etiological and clinical classifications. *Ophthalmology* 2004;111(12):2292-2298
4 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 Lambert SR, Drack AV. Infantile cataracts. *Surv Ophthalmol* 1996;40(6):427-458
6 Renwick J, Lawler S. Probable linkage between a congenital cataract locus and the Duffy blood group locus. *Ann Hum Genet* 1963;27:67-84
7 Hejtmancik JF. Congenital cataracts and their molecular genetics. Semin. *Cell Dev Biol* 2008;19(2):134-149
8 Shiels A, Hejtmancik JF. Genetic origins of cataract. *Arch Ophthalmol* 2007;125(2):165-173