

# 原发性先天性青光眼患者 CYP1B1 突变的研究

孙青青<sup>1</sup>, 华亮<sup>2</sup>, 李婉玲<sup>2</sup>, 冯光强<sup>2</sup>

**基金项目:**广东省医学科研基金立项资助项目(No. A2014567)  
**作者单位:**<sup>1</sup>(510900)中国广东省广州市,南方医科大学第五附属医院;<sup>2</sup>(510120)中国广东省广州市妇女儿童医疗中心  
**作者简介:**孙青青,女,毕业于广州医学院眼科学,硕士,主治医师,研究方向:青光眼。  
**通讯作者:**冯光强,男,硕士,副主任医师,研究方向:青光眼、屈光不正、视光。gzfgq68@126.com  
**收稿日期:**2016-09-27 **修回日期:**2016-12-01

## CYP1B1 gene research of primary congenital glaucoma

Qing-Qing Sun<sup>1</sup>, Liang Hua<sup>2</sup>, Wan-Ling Li<sup>2</sup>, Guang-Qiang Feng<sup>2</sup>

**Foundation item:** Medical Research Foundation in Guangdong Province(No. A2014567)

<sup>1</sup>The Fifth Affiliated Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510900, Guangdong Province, China; <sup>2</sup>Guangzhou Women and Children Health Care Center, Guangzhou 510120, Guangdong Province, China

**Correspondence to:** Guang-Qiang Feng, Guangzhou Women and Children Health Care Center, Guangzhou 510120, Guangdong Province, China. gzfgq68@126.com

Received:2016-09-27 Accepted:2016-12-01

### Abstract

• **AIM:** To investigate the genetic variation of CYP1B1 (Cytochrome P450 family 1 subfamily B polypeptide 1) gene in Primary Congenital Glaucoma(PCG) patients.

• **METHODS:** CYP1B1 gene hot mutation area were screened in 20 PCG patients using high resolution melting(HRM) method. The result was verified by direct sequencing.

• **RESULTS:** Mutations variation g. 6767C>T(p. D449D) was detected in 2 PCG patients and g. 2527C>G(p. R48G) was found in 1 patient. The two mutations were detected from 1 patient, simultaneously.

• **CONCLUSION:** HRM can be used for screening PCG patients with high sensitive and high specific. The variation of g. 6767C>T(p. D449D) and g. 2527C>G(p. R48G) may cause PCG, and two kinds of mutations may lead to more serious PCG.

• **KEYWORDS:** primary congenital glaucoma; Cytochrome P450 family 1 subfamily B polypeptide 1 gene; high resolution melting; mutation

**Citation:** Sun QQ, Hua L, Li WL, et al. CYP1B1 gene research of primary congenital glaucoma. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2017;17(1):91-94

### 摘要

**目的:**了解原发性先天性青光眼患者致病基因 CYP1B1 (Cytochrome P450 family 1 subfamily B polypeptide 1) 的变异情况。

**方法:**采用高分辨率熔解(high-resolution melting, HRM)方法,分析 20 例原发性先天性青光眼患者的 CYP1B1 基因热点突变区,同时采用测序的方法验证 HRM 的检测结果。

**结果:**检出 g. 6767C>T(p. D449D) 变异 2 例, g. 2527C>G(p. R48G) 变异 1 例,两种变异共存者 1 例。

**结论:**在 CYP1B1 基因突变筛查方法中,HRM 具有高度的灵敏性和特异性,可用于筛查原发性先天性青光眼。PCG 的原因可能与 g. 6767C>T(p. D449D) 和 g. 2527C>G(p. R48G) 的变异有关;两种变异共存者可能导致更严重的 PCG。

**关键词:**原发性先天性青光眼;CYP1B1 基因;高分辨率熔解;突变

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2017.1.23

**引用:**孙青青,华亮,李婉玲,等.原发性先天性青光眼患者 CYP1B1 突变的研究. *国际眼科杂志* 2017;17(1):91-94

### 0 引言

原发性先天性青光眼(primary congenital glaucoma, PCG)根本病因在于胚胎期发育异常、房角结构先天畸形,从而导致房水排出受阻,进而引起眼压升高<sup>[1]</sup>。临床症状主要表现在溢泪、畏光和眼睑痉挛,还有眼球扩大及视神经乳头的凹陷。PCG 是一种遗传性、可使儿童致盲的疾病,治疗效果较差,并且一旦致盲便无法再复明。迄今已有报道,CYP1B1、LTBP2 和 MYOC 是与 PCG 密切相关的几组基因<sup>[2]</sup>,其中最早被发现的是 CYP1B1 基因,并且也是被研究最多的基因。早在 1997 年,Stoilov 等<sup>[3]</sup>就已经首次发现了 3 种 CYP1B1 基因纯合突变,从那时起,CYP1B1 就已经被确定为是 PCG 的致病基因。为了解 PCG 患者与 CYP1B1 基因的关系,我们对 20 例 PCG 患者的 CYP1B1 基因的热点突变区进行了 HRM 分析,尝试寻找 PCG 患者相关的致病基因,现报告如下。

#### 1 对象和方法

**1.1 对象** 本次研究样本来自 2013/2015 年广州市妇女儿童医疗中心眼科住院及门诊复诊患者。所有患者均接受两位及两位以上医生的共同检查,确诊为 PCG 的患儿 20 例,其中男 13 例,女 7 例,发病年龄 2 月龄~5 岁 3 月龄。另外排除 PCG 正常儿童 3 例,其中男 1 例,女 2 例,年龄 5 月龄~6 岁 4 月龄。所有病例父母均非近亲结婚。入选患者标准:(1)眼压升高,且伴有原因不明的眼睑痉挛、畏光流泪等;(2)角膜直径增大,且直径大于正常值 0.5mm 以上,并且伴有 Haab 纹、云翳等;(3)眼底检查 C/D

表1 CYP1B1 引物设计 (GenBank:AY393998)

外显子	引物名称	引物序列(5'→3')	扩增产物位置	扩增片段长度
2	CYHRM1F	GTCCATCCAGCAGACCACG	2433 ~ 2685	253bp
	CYHRM1R	CTCGCCATTGAGCACCCTA	2433 ~ 2685	253bp
2	CYHRM2F	CCCCATAGTGGTGTGAATG	2661 ~ 2802	142bp
	CYHRM2R	CTCCGAGTAGTGCCGAAAG	2661 ~ 2802	142bp
2	CYHRM3F	CTACTCGAGCACTGGAAGG	2793 ~ 3078	286bp
	CYHRM3R	GAATCTTCGTTGTGGCTGA	2793 ~ 3078	286bp
3	CYHRM4F	CAGGCAGAATTGGATCAGGT	6489 ~ 6579	91bp
	CYHRM4R	CATAAAGGAAGCCAGGACA	6489 ~ 6579	91bp
3	CYHRM5F	TGTCCTGGCCTTCCTTATG	6560 ~ 6657	98bp
	CYHRM5R	GGTAGCCCAAGACAGAGGTG	6560 ~ 6657	98bp
3	CYHRM6F	GACCCACTGAAAGTGGCCTAA	6708 ~ 6804	97bp
	CYHRM6R	TCATCACTCTGCTGGTCAGG	6708 ~ 6804	97bp

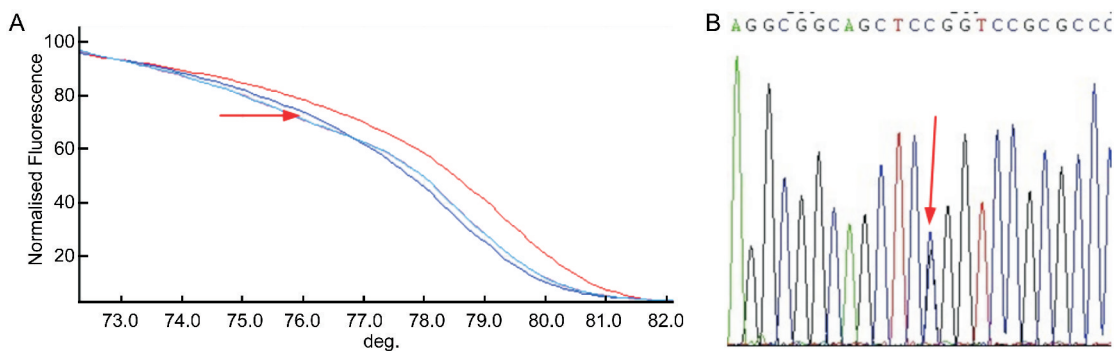


图1 CYP1B1 碱基变异样本253bp片段 HRM 检测图及基因测序图 A:253bp片段的 HRM 检测图,图中红色箭头指示曲线为存在碱基变异的片段;B:253bp片段的基因测序图,图中红色箭头指示为 g. 2527C>G(p. R48G)变异。

比值高于正常;(4)符合以上标准,且能排除患者合并全身其他异常。

1.2 方法 所有受试者均在其监护人知情并同意的情况下,采集外周静脉全血 3mL,EDTA 抗凝,保存于-70℃。

1.2.1 外周血基因组 DNA 的提取 DNA 提取采用 QIAamp DNA Blood Mini Kit,按照试剂盒操作说明书提取样本基因组 DNA,根据吸光度(A)260 值确定所提取 DNA 的浓度,并将基因组 DNA 样品稀释至 10ng/μL,于-20℃条件下保存。

1.2.2 引物设计 以 CYP1B1 全基因序列 (AY393998.1) 作为模板,利用 Primer Premier 5.0 软件分别针对 CYP1B1 的热点突变区进行引物设计,引物名称及位置见表 1。

1.2.3 PCR 反应 PCR 扩增采用 GoTaq<sup>®</sup> Green Master mix 试剂。荧光染料为 LC Green。PCR 反应采用 25μL 体系,其中包括 2xGreen GoTaq<sup>®</sup>反应缓冲液 12.5μL,上游引物 10pmol,下游引物 10pmol,模板 DNA 100ng,LC Green 染料 1μL。扩增条件为:95℃ 总变性 5min;94℃ 30s,60℃ (外显子 2 片段)/55℃ (外显子 3 片段)30s,72℃ 30s;共 40 个循环,最后 72℃ 总延伸 10min。

1.2.4 HRM 分析 PCR 完成后直接在 Rotor-Gene 6000 多通道荧光定量 PCR 仪上进行 HRM 分析。具体条件为:75℃ 持续 90s,溶解曲线数据收集从 75℃ ~ 90℃,温度上升速率为 0.1℃/步,持续 2s。

1.2.5 序列测定 HRM 试验数据收集完成后,将 PCR 产物直接进行测序分析(由美国 Invitrogen 公司广州分公司完成)。

## 2 结果

经 HRM 检测,20 例 PCG 患儿中,其中 4 例患儿的部分扩增片段存在碱基的变异,1 例 253bp 片段存在碱基变异,2 例 97bp 片段存在碱基变异,1 例 253bp 和 97bp 片段同时存在碱基变异。基因测序的结果证实了这些碱基变异的存在:253bp 片段碱基变异者的样本中被证实存在有 g. 2527C>G(p. R48G)的变异(图 1);2 例 97bp 片段碱基变异者的样本中均存在 g. 6767C>T(p. D449D)的变异(图 2);253bp 和 97bp 片段均有碱基变异者的样本则同时存在了上述两种变异。

## 3 讨论

PCG 的根本病因在于胚胎期发育异常、房角结构先天畸形,从而导致房水排出受阻,进而引起眼压升高,最终导致青光眼。PCG 是一种严重的危害儿童视力的,可致盲且不可逆的眼病。PCG 患者一般发病年龄在 3 岁以内,80% 的患者在出生后 1a 内即发病,在常见的儿童青光眼患者中,PCG 约占到 20%<sup>[4]</sup>,尤其在婴幼儿青光眼中最为常见。遗传因素是 PCG 的主要病因,目前研究最多的是 CYP1B1 基因突变。目前已有报道的 PCG 的遗传方式有常染色体隐性遗传假说和常染色体假显性遗传<sup>[4]</sup>。

CYP1B1 基因位于染色体 2p22-p21 区域的 GLC1A 位点,包括了 3 个外显子和 2 个内含子。外显子的长度分别是 371bp,1044bp 和 3 707bp;而内含子的长度分别是 390 和 3 032bp。编码区的开放阅读框长度为 1 629bp,编码 543 个氨基酸的 CYP1B1 蛋白<sup>[5]</sup>。

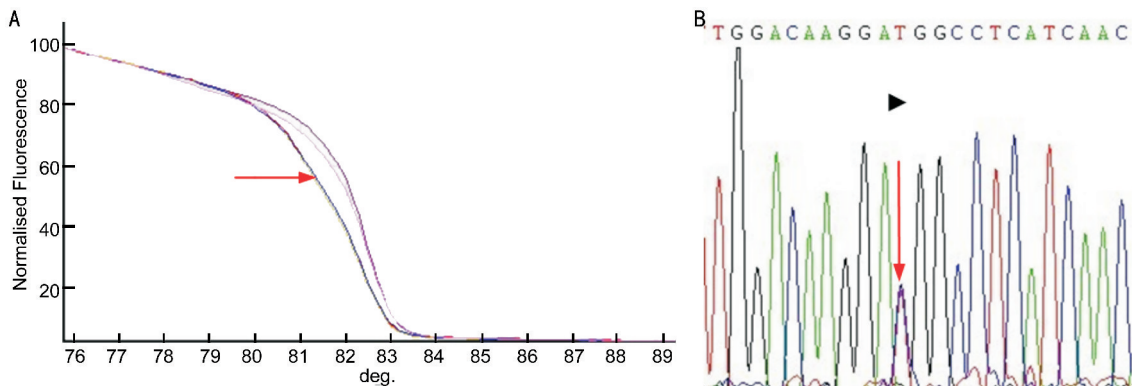


图2 CYP1B1 碱基变异样本97bp 片段 HRM 检测图及基因测序图 A:97bp 片段的 HRM 检测图,图中红色箭头指示曲线为存在碱基变异的片段;B:97bp 片段的基因测序图,图中红色箭头指示为 g. 6767C>T(p. D449D) 变异。

研究认为:CYP1B1 蛋白作为细胞色素 P450 超家族的成员之一,能够代谢内源性和外源性底物,同时能够催化某些氧化应激反应,参与某些激素的生物合成,并作用于信号传导途径,从而调节组织的分化和生长,因此 CYP1B1 可能与眼球早期的分化发育有关<sup>[7]</sup>。内源性底物包括糖皮质激素、视黄酸、花生四烯酸等。内源性激素通过结合该基因启动区域的 DNA 反应元件调节某些基因(包括 CYP1B1)。Mookherjee 等<sup>[6]</sup> 研究发现:17 $\beta$  雌二醇主要存在于眼球的小梁网细胞和视网膜色素上皮细胞中。作为 CYP1B1 蛋白酶的底物,17 $\beta$  雌二醇的代谢产物 4-羟基雌二醇是一种致癌物,氧化反应后形成反应性醌,进而形成氧化应激<sup>[7]</sup>。Bhattacharjee 等<sup>[8]</sup> 发现:CYP1B1 基因突变转染以及 17 $\beta$  雌二醇堆积的视网膜色素上皮细胞中可产生更多的活性氧,从而引起视网膜神经节细胞的凋亡<sup>[9]</sup>。

Vasiliou 等<sup>[4]</sup> 发现:12(R)-羟基二十碳四烯酸[12(R)HETE]是一种角膜上皮的花生四烯酸,是角膜上皮 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶活性的潜在抑制物,而后者主要调节角膜的透明度,而 12(R)HETE 的代谢需要 CYP1B1 酶的参与。一旦发生 CYP1B1 基因突变,则代谢物堆积在角膜上,导致 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶活性的改变,从而影响角膜对眼压的水和作用,导致青光眼患者的角膜水肿。视黄酸作为一个维甲酸信号通路中的配体,可以直接调节眼球等器官胚胎模式的形成,因为体内视黄酸的合成和分解与 CYP1B1 酶有关,所以 CYP1B1 基因突变可能会破坏维甲酸在体内的平衡,从而影响眼球的发育,因此发育型青光眼可能与此有关。Vasiliou 等<sup>[4]</sup> 还发现,褪黑激素也是 CYP1B1 酶的底物之一,其具有调节光感受器、眼压、眼球生长和眼球发育等多种作用,褪黑激素的表达与房水分泌以及眼压的调节有关,而 CYP1B1 基因突变使其底物褪黑素减少,从而引起代谢物堆积于前房,导致眼压升高,最终形成 PCG。

如果 CYP1B1 基因突变在不同的位点上,则会产生不同的酶活性水平,同时可以改变底物的专一性,这种代谢通道作用于不同的人则表现出不同的疾病类型。

据报道,CYP1B1 基因突变主要发生在外显子 2、3 区,而外显子 1 区、内含子以及启动子区域的基因突变则较少<sup>[10]</sup>。Suri 等<sup>[11]</sup> 研究表明:携带一个 CYP1B1 等位基因突变位点,可能产生无义突变,如果发展为青光眼,则很大可能是 PCG,而含 2 个突变位点则会导致更为严重的 PCG。

在我们的研究中,20 例患儿中 CYP1B1 基因,其中 2 例存在 g. 6767C>T(p. D449D) 变异,1 例存在 g. 2527C>G(p. R48G) 变异,1 例同时存在 g. 6767C>T(p. D449D) 和 g. 2527C>G(p. R48G) 的变异。突变的检出率为 20%(4/20)。通过临床观察,我们发现同时存在两种 CYP1B1 基因变异的患者,其青光眼严重程度较只有单一基因变异的患者更为严重,与 Suri 等<sup>[11]</sup> 观察到的结果一致。

国内 Gong 等<sup>[12]</sup> 对来自四川省人民医院的 416 例青光眼患者和 657 例正常对照人群进行了 CYP1B1 基因分析,共检出了 25 例 PCG 患者,发现了 13 种基因变异(p. P93S, p. R259C, p. A295T, p. L475P, p. L107V, p. E229K, p. V320L, p. R48G, p. A119S, p. V243V, p. V432L, p. D449D, p. N453S),其中包括了 9 种已知的变异及其他 4 种之前未报道过的基因变异。以上 13 种基因变异在 PCG 患者中均有检出,9 种变异(p. L107V, p. E229K, p. V320L, p. R48G, p. A119S, p. V243V, p. V432L, p. D449D, p. N453S)在患者和正常对照人群中同时检出。Gong 等学者因此认为 CYP1B1 的基因变异在 PCG 患者和正常人群中并无明显差异。

我们推测,我们和 Gong 等<sup>[12]</sup> 研究结果不一致的可能原因为:(1) 患者所处的地域不同:不同地域的人群由于遗传背景、生活环境以及地域和生活方式的不同,其结果长期累积造成的遗传异质性可能是造成结果不一致的重要原因。(2) 研究的人群不一致,我们的研究对象为 5 岁以内的婴幼儿,Gong 等<sup>[12]</sup> 研究的则是成年人。我们的研究与 Gong 等<sup>[12]</sup> 研究也共同证实了 Vasiliou 等<sup>[4]</sup> 研究结果:CYP1B1 基因可能与眼球早期的分化发育有关。

目前 PCG 的发病机制尚不完全清楚,需综合考虑所有的影响因素。Wiggs<sup>[13]</sup> 指出:演奏高亢性管乐器者、常饮咖啡者、练瑜伽者、喜欢打紧领带者、举重物者等人的眼压可能增加。另外,营养因素和生活习惯因素等也可能会影响 PCG 的进展。Wiggs<sup>[13]</sup> 从表观遗传学的角度阐释了表观遗传效应对基因表达的调节,尤其是在主要 DNA 序列并没有改变的情况下。推测患 PCG 的因素中,基因突变为始动因素,而外界环境所导致的表观遗传的改变则可以调控基因表达。因此,找到 PCG 患者相关的致病基因,并进行基因治疗就是一种理想的方法。然而,目前发现的 PCG 患者的相关致病基因并不能解释大部分 PCG 患者的发病机制<sup>[14]</sup>,比如:CYP1B1 基因是 PCG 的致病基因,但是 CYP1B1 基因突变在正常人群中亦被发现。此外,突变

后的 CYP1B1 如何引起 PCG 还不能确定,究竟是酶活性丧失,还是激活氧化应激而影响小梁网细胞功能? 研究 CYP1B1 基因以及突变后蛋白酶的作用或许能进一步揭示 PCG 的发病机制,或许能为抗青光眼治疗拓展一条新的思路。

#### 参考文献

- 1 Ho CL, Walton DS. Primary congenital; 2004 update. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus* 2004;41(5):271-288
- 2 冉敏,冯光强.原发性先天性青光眼分子遗传学研究进展. *国际眼科纵览* 2012;36(5):293-297
- 3 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. *Hum Mol Genet* 1997;6(4):641-647
- 4 Vasiliou V, Gonzalez FJ. Role of CYP1B1 in glaucoma. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2008;48:333-358
- 5 Tanwar M, Dada T, Sihota R, et al. Mutation spectrum of CYP1B1 in North Indian congenital glaucoma patients. *Mol Vis* 2009;15:1200-1209
- 6 Mookherjee S, Acharya M, Banerjee D, et al. Molecular basis for involvement of CYP1B1 in MYOC upregulation and its potential

implication in glaucoma Pathogenesis. *PLoS One* 2012;7(9):e45077

- 7 Liehr JG, Ulubelen AA, Strobel HW. Cytochrome P-450-mediated redox cycling of estrogens. *J Biol Chem* 1986;261:16865-16870
- 8 Bhattacharjee A, Banerjee D, Mookherjee S, et al. Leu432Val polymorphism in CYP1B1 as a susceptible factor towards predisposition to primary open-angle glaucoma. *Mol Vis* 2008;14:841-850
- 9 Izzotti A, Bagnis A, Sacca SC. The role of oxidative stress in glaucoma. *Mutat Res* 2006;612:105-114
- 10 黄一鸿,吴瑜瑜. CYP1B1 基因突变与原发开角型青光眼发病关系的研究进展. *中华实验眼科杂志* 2014;32(7):654-658
- 11 Suri F, Kalhor R, Zargar SJ, et al. Screening of common CYP1B1 mutations in Iranian POAG patients using a microarray-based PrASE protocol. *Mol Vis* 2008;14:2349-2356
- 12 Gong B, Qu C, Li X, et al. Mutation spectrum of CYP1B1 in Chinese patients with primary open-angle glaucoma. *Br J Ophthalmol* 2015;99(3):425-430
- 13 Wiggs JL. The cell and molecular biology of complex forms of glaucoma: updates on genetic, environmental, and epigenetic risk factors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012;53:2467-2469
- 14 肖情,冯光强. microRNA 对原发性青光眼 TGF- $\beta$  和 CYP1B1 基因调控的研究进展. *眼科新进展* 2014;34(5):103-106