

# 我国东北地区格子状角膜营养不良家系的 TGFBI 基因突变研究

胡莹,刘驰

基金项目:沈阳市科技计划项目(No.18-014-4-70)  
作者单位:(110031)中国辽宁省沈阳市第四人民医院眼科  
作者简介:胡莹,博士,主治医师,研究方向:青光眼。  
通讯作者:胡莹.eyehuying@163.com  
收稿日期:2018-07-20 修回日期:2018-11-27

## Study of TGFBI gene mutations in the patients with corneal dystrophy in northeast of China

Ying Hu, Chi Liu

**Foundation item:** Science and Technology Project of Shenyang (No. 18-014-4-70)

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, The Fourth People's Hospital of Shenyang, Shenyang 110031, Liaoning Province, China

**Correspondence to:** Ying Hu. Department of Ophthalmology, The Fourth People's Hospital of Shenyang, Shenyang 110031, Liaoning Province, China. eyehuying@163.com

Received: 2018-07-20 Accepted: 2018-11-27

### Abstract

• **AIM:** To explore the mutation type of TGFBI gene in a lattice-like corneal dystrophy (LCD) family in northeast China.

• **METHODS:** A basic ophthalmologic examination was performed on the patients and two normal persons in the family. Genomic DNA of three affected, two unaffected family members and 50 normal individuals was extracted from peripheral leukocytes. All exons of TGFBI were amplified by polymerase chain reaction (PCR) methods and direct sequencing was carried out for mutation analysis.

• **RESULTS:** A missense mutation (c.370C>T) in exon 4 of TGFBI led to an amino acid substitution R124C in the TGFBI protein in all affected family members, but the mutation was not detected in normal subjects of the family and control individuals.

• **CONCLUSION:** We conclude that the novel mutation R124C causes lattice corneal dystrophy type I in the studied family. It was verified that R124C is a hot spot mutation in LCD I.

• **KEYWORDS:** lattice-like corneal dystrophy; hereditary; gene mutation

**Citation:** Hu Y, Liu C. Study of TGFBI gene mutations in the patients with corneal dystrophy in northeast of China. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2019;19(1):128-131

### 摘要

**目的:** 探讨我国东北地区一个格子状角膜营养不良(lattice corneal dystrophy, LCD)家系中 TGFBI 基因的突变类型与临床分型的相关性。

**方法:** 对该家系中的 2 名正常人和患者进行眼科基本检查,抽取外周血进行基因突变检测。选取 50 名健康个人作为对照。应用聚合酶链反应(PCR)方法对 TGFBI 基因的所有外显子进行测序以检测突变位点。

**结果:** 该家系中患者均检出 TGFBI 基因第 4 外显子 R124C 突变(c.370C>T)。该家系中正常成员及其他 50 名健康个体均未发现该位点的突变。

**结论:** 确定该 LCD 家系患者的角膜病变由 TGFBI 基因 R124C 突变引起,同时也验证了 R124C 突变热点。

**关键词:** 格子状角膜营养不良;遗传性;基因突变

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2019.1.29

**引用:** 胡莹,刘驰. 我国东北地区格子状角膜营养不良家系的 TGFBI 基因突变研究. *国际眼科杂志* 2019;19(1):128-131

### 0 引言

格子状角膜营养不良(lattice corneal dystrophy, LCD)是一种常染色体显性遗传病,是角膜基质层营养不良,以双侧角膜基质层折光格子线条的淀粉样沉积物为特征<sup>[1]</sup>,可以发生在任何年龄。其分为四种类型 LCD I、LCD II、LCD III 和 LCD III A 型,还有一种兼具 LCD I 的某些特征和 LCD III 或 LCD III A 的一些特征,由于不能归属于任何一型,因此在 2002 年法国学者 Schmitt-Bernard 等建议将其定义为中间型 LCD 即 LCDi(intermedium)型<sup>[2-3]</sup>。其中最常见的是 LCD I。目前报道的 LCD I 的基因突变,除伴有全身淀粉样变性的 LCD II 型(又称 Meretoja 综合征)为 9 号染色体 Gelsolin 基因突变外,其余均为位于染色体 5q31 上的 TGFBI 基因(transforming growth factor  $\beta$ -induced gene),TGFBI 基因也是第一个被确定的角膜营养不良的致病基因<sup>[4]</sup>。它包含 17 个外显子,其中第 4、11、12、13、14 外显子被认为是突变热点<sup>[5]</sup>。我们对我国东北地区一家系中家族性 LCD I 患者的 TGFBI 基因进行突变检测,了解我国东北地区家族性 LCD 的临床表型和突变类型。

### 1 对象和方法

**1.1 对象** 于 2017-02 选取来自中国东北地区同一家系的 2 名正常者(II:3 和 III:2)和 3 例患者(III:1、III:4、III:5,图 1)为研究对象。对该家族所有参与者进行裂隙灯检查,以确定是否受到角膜营养不良影响或不受影响,并确定疾病表型。获得所有参与对象的详细临床病史,例

如发病年龄、初始体征和症状、疾病进展、其他眼部治疗过程等。从沈阳市第四人民医院体检中心招募了 50 名健康人作为对照组,无相关视力障碍的病史。该家系成员为汉族,无近亲联姻史,长期居住辽宁省。本研究已经取得沈阳市第四人民医院伦理委员会批准,在研究之前获得所有受试者书面知情同意书。本研究中的所有程序都遵循赫尔辛基宣言的原则。

## 1.2 方法

**1.2.1 DNA 提取** 取外周静脉血 2mL,置于真空采血管中,4℃ 冰箱保存,1wk 内应用血液基因组 DNA 提取试剂盒进行 DNA 提取。

**1.2.2 聚合酶链反应** 采用聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 分别对 TGFBI 基因的外显子进行扩增。特异性引物均由上海生工生物公司合成,引物序列见表 1。PCR 体系: ddH<sub>2</sub>O 37.4μL, 10× Buffer 5μL, dNTP 2μL, 引物 F 2μL, 引物 R 2μL, DNA 模板 2μL, LA Taq 酶 0.4μL。PCR 循环条件: 95℃ 预变性 5min, 94℃ 变性 30s, 退火 30s (不同引物退火温度不同,表 1), 72℃ 延伸 45s 共 30 个循环,最后 72℃ 总延伸 7min。PCR 产物检测: 用 2% 琼脂糖电泳,取 PCR 扩增产物 3μL 与 1μL 甘油溴酚蓝加样液混合均匀后加入凝胶上样孔中,进行 95V 恒压电泳,电泳缓冲液为 0.5×TBE。暗箱式紫外投射仪中成像检测,保存图片。

**1.2.3 PCR 产物直接测序** 将 PCR 产物和引物送华大基因生物技术有限公司进行纯化,并进行测序。将其结果与 GenBank 中的原始序列进行 Blast 比对,并对所得到的序列图谱进行分析,以确定是否存在基因突变。

## 2 结果

**2.1 临床检测结果** 通过眼科检查和追问家族史确定了该家系中有 6 例患者,其中 3 例患者 (Ⅲ:1、Ⅲ:4、Ⅲ:5) 参与本研究。受影响的 LCD I 受试者表现出类似的临床特征,除了患者 Ⅲ:5 呈现轻度症状。该家族中的先证者 (Ⅲ:1) 和患者 Ⅲ:4 曾就诊于我院,最初被诊断为 LCD I。先证者自 35 岁以来经历了双侧反复发作性眼红、疼痛、畏光、异物感、流泪等角膜刺激症状,并且在过去的 10a 中双侧视力进行性恶化。裂隙灯检查显示中央角膜表面基质伴有上皮侵蚀中的各种不同线性沉积物 (图 2)。在具有 LCD I 的该家庭中鉴定出 TGFBI 基因中的 R124C 突变。也发现患者在大约 21~25 岁时开始表现出轻微的异物感,并表现出明显的视力下降。

**2.2 分子遗传学检测结果** 该家系中患者的测序结果均发现 TGFBI 基因第 4 外显子 370 位点碱基 C>T 的改变,蛋白质由编码精氨酸的 CGC 突变为编码半胱氨酸的 TGC,即发生了 R124C 突变,为杂合子 (图 3)。家系中的正常成员 (Ⅱ:3 和 Ⅲ:2) 和正常对照组均未发生 TGFBI 基因突变。

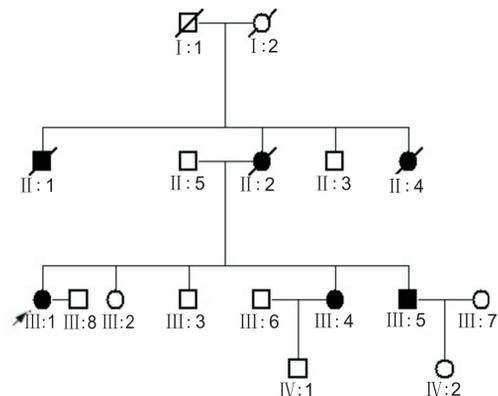
**2.3 生物信息学分析结果** 应用 Polyphen-2 软件分析突变蛋白的各物种间的保守性结果显示 (图 4),该突变氨基酸在各物种间高度保守,并且该突变具有致病性。

## 3 讨论

LCD I 是一种常染色体显性遗传性角膜淀粉样变性病,伴有严重的视觉缺陷,TGFBI 基因突变是 LCD I 发病的主要原因。本研究中,在一个中国东北地区 LCD I 家系

表 1 TGFBI 基因第 4、11、12、13、14 外显子的引物序列和 PCR 扩增条件

外显子	引物序列	退火温度(℃)	片段长度(bp)
4F	CTGTCAGAGAAGGGAGGGTGG	59	296
4R	CGGGGAAGTAAGGCAGATC		
11F	TGACCCTGCTAATGCTCTG	60	277
11R	CCAGCATGACCAACTGGG		
12F	AAAATACCTCTCAGCGGGTG	58	270
12R	GCCCTGAGGGATGACTACTTAG		
13F	CCAGGCTAATTACCATTCTG	60	250
13R	TGAGATATGCTCTGGAGCC		
14F	GGCGACAAGATTGAACCTC	59	230
14R	TCTTCTCTCCACCAACGCC		



□:正常男性;○:正常女性;■:男性患者;●:女性患者;

■, ●:男性或女性死于本病;●:女先证者;□, ○:男女死于其他病

图 1 格子状角膜营养不良家系图谱。

中检测到 TGFBI 基因的杂合突变 c. 370C>T (p. R124C)。近年来研究发现,TGFBI 基因的突变至少与 5 种类型遗传性角膜营养不良的发病相关。在所报道的突变中,TGFBI 基因中的 R124 似乎是全世界各种族群不同类型角膜营养不良中检测到的“热点”点突变<sup>[6]</sup>。同时,研究也发现 TGFBI 基因的第 4 外显子中的 R124 在许多不同物种中高度保守 (图 4),表明该残基是蛋白质的重要功能和结构位点。因此,研究该疾病的基因突变并鉴定发病家族的临床特征和表型-基因型相关性非常重要。

伴有相同突变甚至在同一家族中的角膜营养不良患者的表型变异潜在机制需要进一步研究。因此,虽然已经有 LCD I 家系中 R124C 突变的表型变异的研究<sup>[7]</sup>,本研究中还要对该家族中被诊断为 LCD I 的 3 例患者进行基因突变分析,以评估遗传异质性。在本研究中,具有 R124C 突变的患者表现出与 LCD I 类似的临床特征。虽然患者 Ⅲ:5 表现出轻微的症状,但它们都具有细微线性混浊,主要位于角膜基质并伴有上皮侵蚀。分子遗传学分析对确定角膜营养不良的分类很重要,揭示可靠的临床诊断标准,提高临床诊断的准确性。尽管患者 Ⅲ:5 没有表现出 LCD I 的典型临床特征,但是与其他 2 例患者携带相同的 R124C 突变,因此被诊断为 LCD I。这表明遗传分析可能用于产前和产后 DNA 诊断。在裂隙灯检查受影响的家庭成员时,发现他们的角膜上皮均被侵蚀,表现为畏光和流泪。有学者观察发现角膜营养不良的患者 Bowman 膜异常形态,发现神经纤维密度明显减少甚至消失;损伤

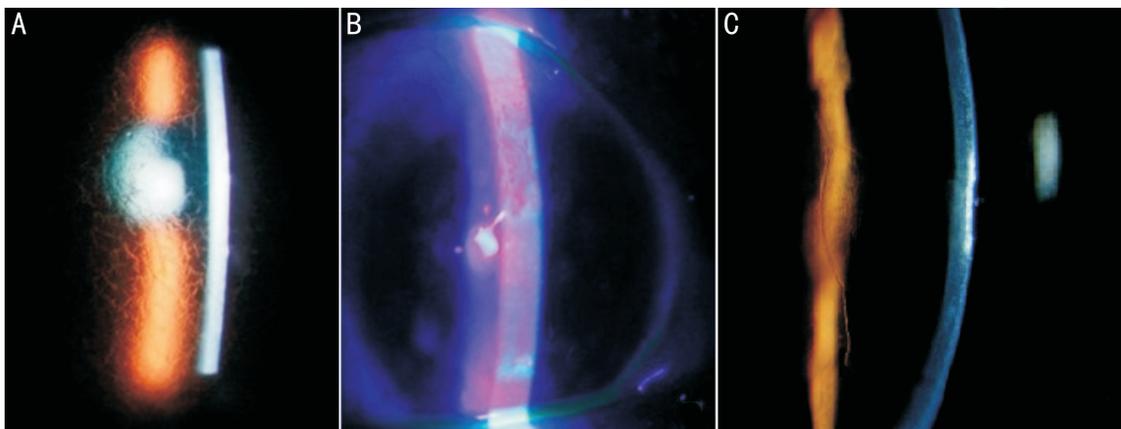


图2 先证者和Ⅲ:5患者的角膜裂隙灯显微镜照片 A:先证者的角膜上皮混浊,基质层中典型的格子状线条;B:先证者的角膜上皮荧光素染色显示上皮缺损;C:Ⅲ:5患者(17岁),角膜上皮小片缺损,基质层中单个的格子状线条。

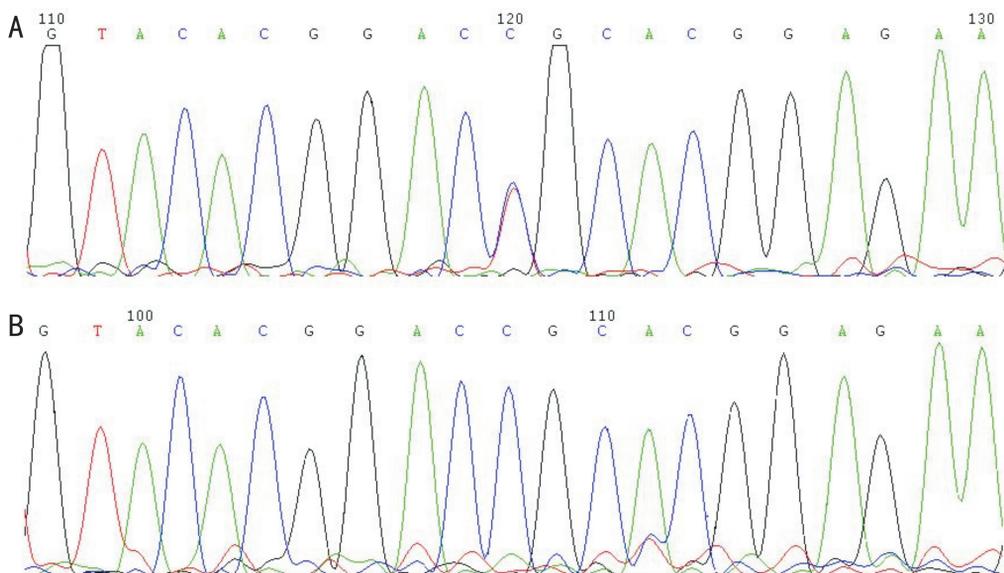


图3 分子遗传学检测结果 A:家系中患者TGFBI基因4号外显子第370个碱基呈杂合性点突变C→T,导致编码该密码子的精氨酸变成半胱氨酸;B:正常的4号外显子序列。



图4 Polyphen-2 软件分析结果,该突变氨基酸在各物种间高度保守,并且该突变具有致病性。

的 Bowman 膜很可能不能为角膜神经生长提供营养,从而导致角膜沉积。如果这种角膜营养不良是由于缺乏营养,这种疾病可能用神经营养因子治疗。TGFBI 蛋白涉及各种细胞类型的细胞黏附和迁移,包括上皮细胞、成纤维细胞、内皮细胞和血管平滑肌细胞<sup>[8]</sup>。因此,患有 TGFBI

R124C 突变的患者可能表现出角膜上皮细胞与整个上皮层之间连接的松弛,导致该家族中角膜基质营养不良。此外,神经纤维不能长入 Bowman 层导致角膜上皮细胞缺乏神经营养,导致角膜上皮脱落(图2)。

总之,在具有 LCD I 的中国东北地区家庭中鉴定了

TGFBI 基因的突变。目前的研究结果表明了 LCD I 的临床特征,并在该家族中揭示了明确的基因型相关表型,这可能有助于进一步理解 TGFBI 基因突变在 LCD I 发展中的作用。然而,患者角膜层的组成仍然未知,因此其具体的潜在机制需要进一步研究,且需要未来的功能性研究以确认 TGFBI 基因的作用和疾病发生的潜在机制。

#### 参考文献

- 1 Munier FL, Korvatska E, Djemaã A, *et al.* Kerato-epithelin mutations in four 5q31-linked corneal dystrophies. *Nature Genetics* 1997;15(3):247-251
- 2 Stewart H, Black G, Donnai D, *et al.* A mutation within exon 14 of the TGFBI (BIGH3) gene on chromosome 5q31 causes an asymmetric, late-onset form of lattice corneal dystrophy. *Ophthalmology* 1999;106(5):964-970
- 3 Schmittbernard CF, Guittard C, Arnaud B, *et al.* BIGH3 exon 14

- mutations lead to intermediate type I/IIIA of lattice corneal dystrophies. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41(6):302-308
- 4 Korvatska E, Munier FL, Chaubert P, *et al.* On the role of kerato-epithelin in the pathogenesis of 5q31-linked corneal dystrophies. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40(10):2213
  - 5 Aldave AJ, Sonmez B. Elucidating the molecular genetic basis of the corneal dystrophies: are we there yet? *Arch Ophthalmol* 2007;125(2):177-186
  - 6 Lakshminarayanan R, Chaurasia SS, Anandalakshmi V, *et al.* Clinical and genetic aspects of the TGFBI-associated corneal dystrophies. *Ocul Surf* 2014;12(4):234-251
  - 7 Liu Z, Wang YQ, Gong QH, *et al.* An R124C mutation in TGFBI caused lattice corneal dystrophy type I with a variable phenotype in three Chinese families. *Mol Vis* 2008;14:1234-1239
  - 8 Runager K, Enghild JJ, Klintworth GK. Focus on molecules: Transforming growth factor beta induced protein (TGFBIp). *Exp Eye Res* 2008;87(4):298-299