

· 临床研究 ·

原发性开角型青光眼一家系致病位点筛查

王俊妨 马文江 林婴 杨正林

300384 天津医科大学眼科医院(王俊妨、马文江);610072 成都,四川省人民医院眼科(林婴、杨正林)

通信作者:王俊妨,Email:jfwang3000@163.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2018.07.010

【摘要】 目的 筛查原发性开角型青光眼 POAG 一家系的基因致病位点,为 POAG 的分子遗传学研究提供依据。**方法** 于 2005 年 1—8 月在四川省人民医院纳入 POAG 一个家系,详细收集病史及临床资料,采用国际通用的全基因组扫描技术对家系成员进行全基因组扫描,应用国际公认的遗传连锁分析方法,根据等位基因(单倍体)分型结果,应用两点法分别计算短串联重复序列(STR)标志物的 LOD 值,以最大 LOD 值确定阳性位点。**结果** 该家系共 4 代 35 名成员,患病者 18 例,表型正常者 17 人。患者属于青少年型开角型青光眼,均可见视盘损害和典型视野缺损。患者在儿童时期均有不同程度的双眼视力减退及视野缺损,视功能损伤比较严重。2 号染色体上有 3 个 STR 标志物 LOD 值均大于 3.0: D2S2369 (LOD 值 4.003 3)、D2S2332 (LOD 值 3.840 2)、D2S337 (LOD 值 4.752 0)。该家系在这 3 个遗传标志物附近有遗传连锁。该家系阳性位点定位在 15 号染色体短臂到 16 号染色体短臂 2 区,遗传距离约为 9 Mb,位于标志物 D2S2369 和 D2S2397 之间。**结论** GLCIH 为该 POAG 大家系的遗传连锁位点,为中国汉族 POAG 发病机制的研究提供了依据。

【关键词】 原发性开角型青光眼;位点;全基因组扫描;家系

The screening of pathogenic locus in a primary open angle glaucoma pedigree Wang Junfang, Ma Wenjiang, Lin Ying, Yang Zhenglin

Tianjin Medical University Eye Hospital, Tianjin 300384, China (Wang JF, Ma WJ); Department of Ophthalmology, Sichuan Provincial Peoples' Hospital, Chengdu 610072, China (Lin Y, Yang ZL)

Corresponding author: Wang Junfang, Email: jfwang3000@163.com

[Abstract] Objective To screen the pathogenic locus and gene in a primary open angle glaucoma (POAG), and to provide a basis for molecular genetic study of POAG. **Methods** A POAG pedigree with 35 members was diagnosed in Sichuan peoples' Hospital from January to August 2005. The disease history and clinical data were collected. Genome-wide scan was performed for the families. Specific software was used to calculate the LOD value, which based on the allele (haploid) typing result with two-point method to definite the positive loci by the largest LOD value. **Results** The POAG family had 35 members of 4 generations. 18 patients were diagnosed as juvenile open angle glaucoma from visual disc shape abnormality and loss of typical visual field. All of the patients in this family suffered various degrees of binocular vision loss and vision loss in childhood, with poorly visual function. The LOD values of 3 short tandem repeat (STR) markers on chromosome 2 were greater than 3.0, they were D2S2369 (LOD value 4.003 3), D2S2332 (LOD value 3.840 2) and D2S337 (LOD value 4.752 0). There was a genetic linkage near the three genetic markers in the family. The primary glaucoma positive locus was a in chromosome p15 to chromosome p16.2, and the genetic distance was about 9 Mb, locating in between the markers D2S2369 and D2S2397.

Conclusions GLCIH is a pathogenic locus for this POAG pedigree, which supplies an evidence for elucidating the pathogenesis of POAG.

[Key words] Primary open angle glaucoma; Locus; Genome-wide scan

原发性开角型青光眼(primary open angle glaucoma, POAG)指无明显原因且前房角开放的情况下发生青光

眼性视神经病变和相对应视野缺损的致盲眼病。流行病学资料表明,青光眼是在全球仅次于白内障的导致

视力丧失的主要病因。POAG 的发病机制复杂,其中遗传因素起了很大作用^[1]。目前,随着分子生物学技术与遗传学研究的进展,一些青光眼的致病位点和相关基因已被定位。本研究对一个原发中国汉族 POAG 家系,采用 ABI3100 遗传分析仪进行全基因组扫描,筛查该家系致病基因位点。

1 资料与方法

1.1 一般资料

于 2005 年 1—8 月在四川省人民医院纳入一个含 35 个家族成员的 POAG 家系。由于是对家系进行遗传连锁分析,故并未设定同期的健康对照组。本研究遵循赫尔辛基宣言及中国卫生部颁布的人类遗传病标本采集指南,参与者均签署由四川省人民医院提供的知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 临床检查 详细询问该家系家族史,并进行的眼科专科检查,包括眼压测定、房角镜检查、视野检查及眼底检查。

1.2.2 DNA 的提取及 PCR 扩增 抽取受检者静脉血 10 ml,采用酚-氯仿提取法提取外周血 DNA。收集家系成员的 DNA 样本,以 382 个 STR 微卫星标志物为引物进行 PCR 扩增,PCR 反应体系 5.00 μ l,包括 25 ng/ μ l DNA 模板 1.00 μ l、10 倍 PCR 缓冲液 0.50 μ l、25 mmol/L Mg^{2+} 0.40 μ l、2.5 mmol/L dNTPs 0.40 μ l、5 U/ μ l (商品单位)(大连 TakaRa 公司)Taq DNA 聚合酶 0.03 μ l、STR 引物 0.40 μ l、灭菌纯化水 2.27 μ l。PCR 反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min,94 $^{\circ}$ C 变性 15 s,55 $^{\circ}$ C 退火 15 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,共 10 个循环;89 $^{\circ}$ C 反应 15 s,55 $^{\circ}$ C 反应 15 s,72 $^{\circ}$ C 反应 30 s,共 20 个循环;72 $^{\circ}$ C 反应 10 min,4 $^{\circ}$ C 条件下保温。

1.2.3 扩增产物遗传连锁分析 取 8.0 μ l HD(美国 ABI 公司)和 0.2 μ l 500LIZTM Size Standard(美国 ABI 公司)及 PCR 的扩增产物 1.0 μ l,混匀,加到平板

中,95 $^{\circ}$ C 反应 5 min,迅速置于冰上冷却,之后置于 ABI3100 遗传分析仪上采用专用程序进行分析。

1.2.4 遗传数据分析 完成了该家系 22 条常染色体上 382 个微卫星标志物的全基因组扫描。根据每个家系成员的等位基因分型结果,采用两点法(FASTLINK version 4.1P 软件包的 MLINK 和 ILINK 程序),分别计算 382 个 STR Markers 的 LOD 值,寻找可能的阳性位点。

1.2.5 连锁位点的排查与确认 选择 LOD 值>0 的 STR 微卫星标志物,应用更多在其染色体上附近位置的 STR 微卫星标志物对这些位点进行确认。LOD 值>3.0 为肯定连锁;3.0 $\geq$ LOD 值>2.0 为可能连锁;2.0 $\geq$ LOD 值>1.0 为不确定是否连锁,需添加家系成员进行确定;LOD 值在 0~1 为无法确定;LOD 值<-2 为排除连锁。

1.2.6 候选基因的筛查 如果筛选出的基因位点为已知位点,则对该位点的致病基因进行测序,判断该家系的致病基因;如能筛选出新的致病基因位点,则对该位点附近的基因进行候选基因的筛查。

2 结果

2.1 该家系基本情况

该 POAG 家系共 4 代 35 位成员,共有 18 例患者,其中采集到标本的患者共 11 例;表型正常者 17 人。(图 1)。

2.2 该家系患者眼部临床表现及特点

患者发病年龄均小于 35 岁,属于青少年型开角型青光眼。患者眼压均高于 22 mmHg(1 mmHg=0.133 kPa),房角为Ⅲ级或Ⅳ级,视野检查有典型视野缺损;眼底检查可见不同程度的视盘凹陷,杯盘比为 0.7~0.9。

患者在儿童时期(5~10 岁)均有不同程度的双眼视力减退及视野缺损,且有视疲劳、眼痛、眼部肿胀、头痛等症状,部分患者有畏光流泪。6 例患者双眼视力丧失。

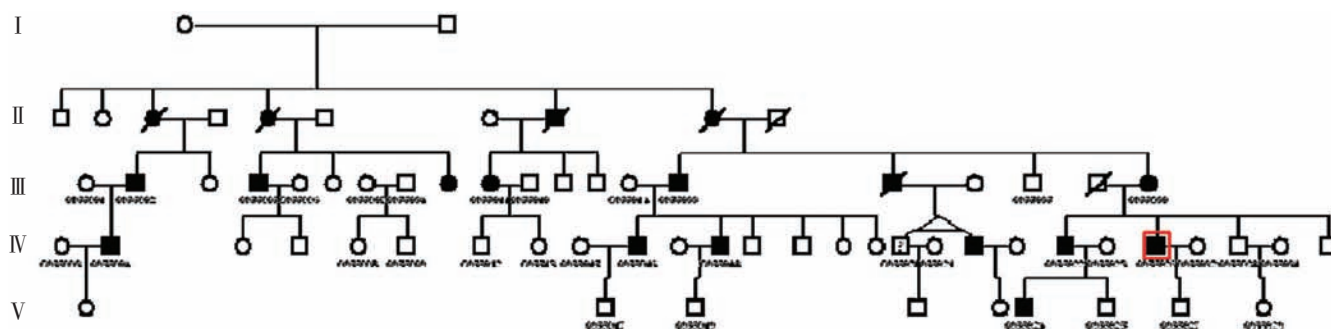


图 1 该 POAG 家系图 ↑先证者;□:正常男性;○:正常女性;■:患病男性;●:患病女性;/:已故成员

2.3 该家系两点法遗传连锁分析结果

当 $\theta=0.0$ 时, 2 号染色体上有 3 个 STR 标志物 LOD 值均大于 3.0: D2S2369 (LOD 值 4.003 3)、D2S2332 (LOD 值 3.840 2) 和 D2S337 (LOD 值 4.752 0), 该家系在这 3 个遗传标志物附近有遗传连锁, 在 D2S378 位点上 LOD 值为 2.362 9, 提示该位点附近有连锁的可能性。2 号染色体阳性位点的 STR 标志物及 LOD 值见表 1。

2.4 该家系阳性位点定位

该阳性位点定位在 15 号染色体短臂到 16 号染色体短臂 2 区, 遗传距离约为 9 Mb, 在标志物 D2S2369 和 D2S2397 之间(图 2)。

3 讨论

POAG 是常见的青光眼类型, 占有青光眼的 60% ~ 70%, 其中遗传因素在其发病中起了很大的作用, 所以 POAG 分子遗传学的研究对阐明其发病机制十分重要。已知 POAG 的遗传连锁位点有 GLC1A^[2]、GLC1E^[3]、GLC3A^[4]、GLC1G^[5]、GLC1B^[6]、GLC1C^[7]、GLC1D^[8]、GLC1F^[9]、GLC3B^[10] 和 GLC1H^[11], 已经发现的 POAG 候选基因有 *TIGR* (*MYOC*) 基因^[12]、*OPTN* 基因^[13]、*CYP11B* 基因^[14]、*WDR36* 基因^[8] 和 *EFEMP1*

基因^[15]等。2017 年, Micheal 等^[16]通过测序又发现了一个新的致病基因 *TP53BP2*, Liao 等^[17]在中国一个 POAG 家系中发现了 *MYOC* 基因新的突变。

本研究采用全基因扫描技术对中国汉族的 POAG 家系进行遗传连锁分析, 所用的 382 个 STR 标志物在染色体上的间距大约为 10 cM, 基本能涵盖全部染色体区域。应用国际通用的 Linkage 软件(V5.1)进行两点连锁分析, 对判定遗传连锁位点有直接证据。部分家系成员年龄小, 可能存在虽携带了致病基因但还未发病的情况, 因此本研究同时采用分析患者的 LOD 值和单倍体分析方法进行基因型数据分析, 以免漏掉可能的阳性位点。

本研究发现的这个基因致病位点与 Suriyapperuma 等^[11]发现的位点一致, 但由于 POAG 具有种族特异性, 所以在这个中国汉族家系发现的致病位点有着重要的意义。Suriyapperuma 等^[11]的研究包括了一个非洲裔美国人(牙买加人)家系和 6 个白种人家系, 患者平均患病年龄为 58 岁。本研究中的中国汉族家系, 平均患病年龄均小于 35 岁, 属于青少年型开角型青光眼, 与 Suriyapperuma 等^[11]的研究有一定区别, 但临床表现一致。Suriyapperuma 等^[11]研究的几个家系都定位在 2P15 ~ 2P16, 但几个家系有遗传连锁

的 STR 微卫星标志物略有不同, 能将基因定位在约 3 Mb 的物理距离。本研究的连锁位点约定位在 D2S337 和 D2S2332 之间, 在染色体上的位置约为 2P16.1, 能将基因定位在 1 Mb 以内。这 2 个研究共同覆盖的 STR 微卫星标志物有 D2S123、D2S2352 和 D2S2332, 由此可以看出尽管连锁位置在染色体上的大体位置相同, 但由于青光眼分型及种族不同的原因, 还是有细微的差异。Suriyapperuma 等^[11]未能将候选基因筛选出来, 该区域共 61 个候选基因, 他们已经对 35 个基因进行了测序, 均未发现有意义的突变。本研究也对候选基因 *EFEMP1* 进行了测序, 未发现有意义的突变, 同时又选取了候选位置的 *AHSA2*、*OTX1*、*GPR75*、*KIAA1212*、*KIAA1841* 等 5 个基因, 均未发现基因突变, 由此推测该家系可能存在新的致病基因, 如果能发现该位置新的致病基因并对其功能进行

表 1 2 号染色体两点法的 LOD 值

标志物	遗传位置	物理位置	LOD 值				
			$\theta=0.0$	$\theta=0.1$	$\theta=0.2$	$\theta=0.3$	$\theta=0.4$
D2S391	70.31 cM	46 164 872	-5.283 6	1.085 6	1.033 6	0.716 4	0.281 2
D2S123	73.61 cM	51 041 882	-12.370 2	0.076 1	0.391 9	0.322 0	0.145 3
D2S2369	73.61 cM	52 977 802	4.003 3	3.261 4	2.449 0	1.566 4	0.666 4
D2S2352	76.34 cM	53 629 382	-0.973 4	1.473 9	1.182 4	0.735 7	0.255 1
D2S2153	76.88 cM	54 461 970	0.335 2	2.486 6	1.882 4	1.129 7	0.413 9
D2S378	77.43 cM	57 057 077	2.362 9	1.862 3	1.339 6	0.806 8	0.315 1
D2S2388	77.97 cM	57 971 417	-5.036 8	0.495 6	0.557 6	0.346 6	0.068 3
D2S406	80.16 cM	59 122 543	-3.300 1	1.788 5	1.541 1	0.964 5	0.294 5
D2S2332	80.69 cM	61 045 808	3.840 2	3.053 9	2.215 8	1.359 2	0.576 5
D2S337	80.69 cM	61 423 360	4.752 0	3.876 7	2.924 5	1.905 2	0.879 9
D2S2397	82.82 cM	64 390 296	-10.525 9	-0.689 0	-0.216 9	-0.037 6	-0.012 6
D2S380	83.88 cM	65 402 489	-4.812 6	1.091 1	0.983 5	0.609 5	0.209 7
D2S2368	85.48 cM	66 967 109	-2.824 0	0.088 3	0.176 6	0.123 7	0.036 6

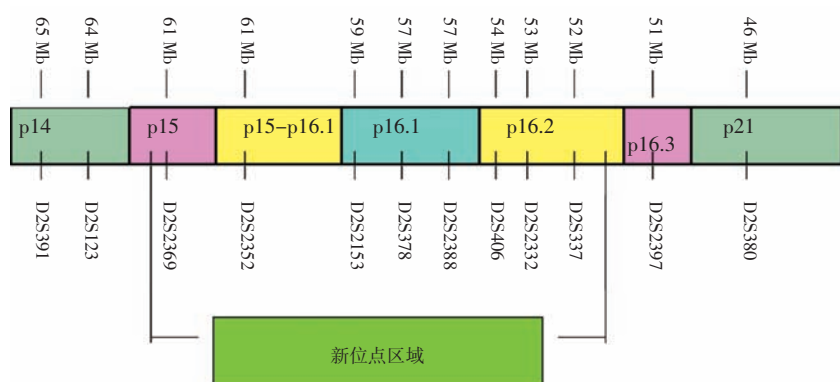


图 2 该家系阳性位点示意图

研究,对青少年开角型青光眼的发病机制研究可能具有重要意义。

参考文献

- [1] Takamoto M, Araie M. Genetics of primary open angle glaucoma [J]. Japan J Ophthalmol, 2014, 58: 1-15.
- [2] Sheffield VC, Stone EM, Alward WL, et al. Genetic linkage of familial open angle glaucoma to chromosome 1q21-q31 [J]. Nat Genet, 1993, 4(1): 47-50. DOI:10.1038/ng0593-47.
- [3] Stoilova D, Child A, Trifan OC, et al. Localization of a locus (GLC1B) for adult-onset primary open angle glaucoma to the 2cen-q13 region [J]. Genomics, 1996, 36(1): 142-150. DOI:10.1006/geno.1996.0434.
- [4] Wirtz MK, Samples JR, Kramer PL, et al. Mapping a gene for adult-onset primary open-angle glaucoma to chromosome 3q [J]. Am J Hum Genet, 1997, 60(2): 296-304.
- [5] Trifan OC, Traboulsi EI, Stoilova D, et al. A third locus (GLC1D) for adult-onset primary open-angle glaucoma maps to the 8q23 region [J]. Am J Ophthalmol, 1998, 126(1): 17-28.
- [6] Sarfarazi M, Child A, Stoilova D, et al. Localization of the fourth locus (GLC1E) for adult-onset primary open-angle glaucoma to the 10p15-p14 region [J]. Am J Hum Genet, 1998, 62(3): 641-652. DOI:10.1086/301767.
- [7] Wirtz MK, Samples JR, Rust K, et al. GLC1F, a new primary open-angle glaucoma locus, maps to 7q35-q36 [J]. Arch Ophthalmol, 1999, 117(2): 237-241.
- [8] Monemi S, Spaeth G, Dasilva A, et al. Identification of a novel adult-onset primary open-angle glaucoma (POAG) gene on 5q22.1 [J]. Hum Mol Genet, 2005, 14(6): 725-733.
- [9] Sarfarazi M, Akarsu AN, Hossain A, et al. Assignment of a locus (GLC3A) for primary congenital glaucoma (Buphthalmos) to 2p21 and evidence for genetic heterogeneity [J]. Genomics, 1995, 30(2): 171-177.
- [10] Akarsu AN, Turacli ME, Aktan SG, et al. A second locus (GLC3B) for primary congenital glaucoma (Buphthalmos) maps to the 1p36 region [J]. Hum Mol Genet, 1996, 5(8): 1199-1203.
- [11] Suriyapperuma SP, Child A, Desai T, et al. A new locus (GLC1H) for adult-onset primary open-angle glaucoma maps to the 2p15-p16 region [J]. Arch Ophthalmol, 2007, 125(1): 86-92. DOI:10.1001/archophth.125.1.86.
- [12] Stone EM, Fingert JH, Alward WL, et al. Identification of a gene that causes primary open angle glaucoma [J]. Science, 1997, 275(5300): 668-670.
- [13] Sarfarazi M, Child A, Stoilova D, et al. Localization of the fourth locus (GLC1E) for adult-onset primary open-angle glaucoma to the 10p15-p14 region [J]. Am J Hum Genet, 1998, 62(3): 641-652. DOI:10.1086/301767.
- [14] 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 [J]. Hum Mol Genet, 1997, 6(4): 641-647.
- [15] Mackay DS, Bennett TM, Shiels A. Exome sequencing identifies a missense variant in EFEMP1 co-segregating in a family with autosomal dominant primary open-angle glaucoma [J/OL]. PLoS One, 2015, 10(7): e0132529 [2017-03-21]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26162006>. DOI:10.1371/journal.pone.0132529.
- [16] Micheal S, NTM S, Hogewind BF, et al. Identification of TP53BP2 as a novel candidate gene for primary open angle glaucoma by whole exome sequencing in a large multiplex family [J]. Mol Neurobiol, 2018, 55(2): 1387-1395. DOI:10.1007/s12035-017-0403-z.
- [17] Liao RF, Zhong ZL, Ye MJ, et al. Identification of mutations in myocilin and Beta-1, 4-galactosyltransferase 3 genes in a Chinese family with primary open-angle glaucoma [J]. Chin Med J (Engl), 2016, 129(23): 2810-2815. DOI:10.4103/0366-6999.194641.

(收稿日期:2017-09-21 修回日期:2018-05-24)

(本文编辑:杜娟)

· 病例报告 ·

遗传性 2A 型进行性腓骨肌萎缩症并发视神经萎缩一例

徐青 宫朝举 乔磊 彭颖 刘亚鲁 刘海洋 李甦雁

221002 徐州市第一人民医院 徐州市眼病防治研究所 徐州市眼科医院

通信作者:李甦雁, Email:lisuyan1226@126.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2018.07.011

患者,男,7岁,2015年6月22日因双眼视力下降1个月至徐州市眼科医院就诊。眼部检查:视力右眼0.2,左眼0.15,矫正均不能提高,患者自述2014年双眼视力均为0.8;眼压右眼13 mmHg(1 mmHg=0.133 kPa),左眼14 mmHg;双眼眼前节未见异常;采用彩色眼底照相机(日本Nidek公司)进行眼底照相,显示双眼视盘颞侧色泽略淡(图1);采用眼底荧光血管造影仪(德国Heidelberg公司)进行荧光素眼底血管造影(fundus fluorescein angiography, FFA),示早期、中期及晚期双眼视盘均为低荧光(图2);采用视觉电生理仪(德国Roland公司)检查图形视觉诱发电位(photo visual evoked potential, PVEP),提示双眼1°方格检查P100波振幅降低,潜时值明显延迟,双眼15°方格检查P100波振幅严重降低,潜时值正常(图3);视野计(瑞士Haag-Streit AG公司)检查示右眼颞上及下方扇形视野缺

损,与生理盲点相连,并波及中心5°视野,左眼中心略偏颞侧暗岛,与生理盲点相连,下方扇形视野缺损,与生理盲点相连(图4);光相干断层扫描血管成像(angio-optical coherence tomography, OCTA)(美国OPTOVUE公司)示视网膜神经纤维层(retinal nerve fiber layer, RNFL)变薄,神经节细胞层变薄,视细胞丢失严重(图5)。全身检查:患者双侧小腿周围神经病变3年,表现为双手弯曲,无法伸直;双下肢远端肌无力、肌萎缩、腱反射减退,双下肢呈“倒立酒瓶状”改变,足弓高耸,马蹄内翻畸形,行走时表现特殊的跨越步态,平时穿矫形鞋,定期在外院行肢体功能训练(图6)。根据腓骨肌萎缩症的诊断标准^[1],临床诊断为双下肢腓骨肌萎缩症,双眼视神经萎缩。给予双眼球旁注射甲基强的松龙(上海法玛西亚普强公司)20 mg,口服甲钴胺片(北京星昊医药公司)1.5 mg/d,维生素B1片30 mg/d,