

· 专家述评 ·

遗传性眼病致病基因突变分析中应重视临床表型的评估

李杨

100730 北京,首都医科大学附属北京同仁医院 北京同仁眼科中心 北京市眼科研究所
眼科学与视觉科学北京市重点实验室

通信作者:李杨,Email:yanglibio@aliyun.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.08.001

【摘要】 一代测序(Sanger 测序)技术可对候选基因进行测序分析,其测序读长较长,准确性高,是过去三四十年来常用的基因突变分析方法,但因其存在测序通量小及成本高等缺点,限制了其在具有高度遗传异质性疾病及大样本量基因突变分析中的应用。二代测序(NGS)技术是 2005 年以来发展起来的在临床上广泛应用的基因测序技术,测序通量高,费用较低,自动化程度高,为遗传性眼病的基因诊断带来了很大的便利。但实际上,单基因遗传性眼病具有高度遗传异质性和临床异质性,在应用 NGS 技术对遗传性眼病的分析过程中过度依赖基因突变分析技术而忽略患者复杂临床表型的评估可能在基因测序检测方法的选择上出现偏差,造成检测结果判断的失误或给患者带来经济负担。目前,单基因遗传性眼病基因突变分析方法主要是 NGS 分析结合 Sanger 测序验证,在此过程中应重视患者临床表型的准确评估,以确保准确选择基因检测方法和合理判定致病基因突变。

【关键词】 高通量核苷酸测序/应用; 分子诊断技术/方法; 突变; DNA 测序分析/应用; 遗传性眼病; 表型

基金项目: 国家自然科学基金项目(81570886); 北京市卫生系统高层次卫生技术人才(学科带头人)培养计划项目(2013-2-021)

Clinical phenotype assessment is very important in mutation analysis for patients with hereditary eye disease

Li Yang

Beijing Institute of Ophthalmology, Beijing Tongren Eye Center, Beijing Tongren Hospital, Capital Medical University, Ophthalmology & Visual Sciences Key Lab of Beijing, Beijing 100730, China

Corresponding author: Li Yang, Email: yanglibio@aliyun.com

【Abstract】 Sanger sequencing technology is the most commonly used method for genetic analysis in inherited eye disease in the past few decades on account of its long DNA sequencing read length and high accuracy. However, application of this method is limited in genetically heterogeneous diseases because of the high economic and time cost. Next generation sequencing (NGS) technology is a high-throughput, cost-effective, and highly automated method which has been widely used since 2005. Although NGS is especially suitable for studies on genetically heterogeneous inherited eye disease, overdependence on the technique itself and neglect of the assessment of the phenotype may lead to misjudgment of the testing results and higher economic burden for the patients. So far, the most common method on researches of monogenic inherited eye disease is to combine NGS and Sanger sequencing technique. Precise evaluation of the clinical phenotype of patients is very important, as it is related with selection of detection methods and determination of disease-causing mutations.

【Key words】 High-throughput nucleotide sequencing/utilization; Molecular diagnostic techniques/methods; Mutation; Sequence analysis, DNA/utilization; Hereditary eye disease; Phenotype

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81570886); Beijing Health System High-Level Health Technical Talent (Academic Leader) (2013-2-021)

单基因遗传性眼病是一类具有高度遗传和临床异质性的致盲眼病,主要包括角膜营养不良、先天性白内障、眼前节发育异常、遗传性视网膜疾病等。对这类疾病致病基因突变分析的经典方法是首先对遗传家系致病基因进行连锁分析染色体定位,然后用一代测序(Sanger 测序)对候选基因进行测序分析以确定致病基因突变。在过去的三四十年里,Sanger 测序因其测序读长较长及准确性高等优势,一直是基因突变分析的主要检测方法,但其缺点是测序通量小及成本高等,限制了其在具有高度遗传异质性疾病及大样本量基因突变分析中的应用。自 2005 年以来,二代测序(next generation sequencing, NGS)技术应运而生,因其测序通量高、费用较低、速度快及自动化程度高等优点而得到广泛的应用^[1]。近 10 年来,国内外许多研究团队用基因定点捕获技术(targeted exome sequencing, TES)或全外显子捕获技术(whole exome sequencing, WES)结合 Sanger 测序等检测技术确定了大量遗传性眼病的致病基因及相应基因的大量致病突变,许多第三方生物公司乃至医院将致病基因突变分析的研究成果转化到临床,纷纷开展了遗传性眼病患者的基因诊断工作。尽管基因突变分析技术取得了飞跃式发展,但在遗传性眼病致病基因突变分析研究中及临床患者基因诊断过程中对患者临床表型的详细评估与准确诊断却不容忽视。

1 准确的临床诊断可正确选择基因检测方法或检测的 Panel

尽管许多单基因遗传性眼病具有遗传异质性,即不同致病基因可导致相同的临床表型,如视网膜色素变性(retinitis pigmentosa, RP)的致病基因多达 80 余种,但有些遗传性眼病的致病基因却比较单一,如就目前所知,先天性无虹膜的致病基因仅为 *PAX6*,遗传性视网膜劈裂致病基因为 *RS1*,结晶样视网膜色素变性(Bietti crystalline corneoretinal dystrophy, BCD)致病基因为 *CYP4V2*,无脉络膜症致病基因为 *CHM* 等^[2-7]。这些致病基因均较小,编码外显子均不超过 20 个,如 *RS1* 基因只有 6 个编码外显子,最大的 *CHM* 基因也只有 15 个编码外显子,因此对这些疾病患者致病基因突变进行分析时(无论是研究工作还是临床基因诊断)就没有必要进行相对复杂的 NGS,直接用 Sanger 测序分析即可准确完成基因诊断,且简单、快速和方便,应作为首选的方法。在临床上,部分医生将先天性无虹膜(特别是部分无虹膜)与虹膜缺损相混淆,这 2 种疾病均属于眼前节发育异常,但虹膜缺损患者常伴有脉

络膜缺损,而先天性无虹膜患者则可伴有先天性白内障、继发性青光眼或黄斑发育不全等,通过眼前节和眼底详细检查即可鉴别。先天性无虹膜患者 *PAX6* 基因突变中存在一定比例基因组 DNA 的拷贝数异常,即 1 个或多个外显子,甚至整个基因的丢失或重复,由于该病为常染色体显性(autosomal dominant, AD)遗传,Sanger 测序不能检查到此类突变,需要用多重链接探针扩增(multiple link probe amplification, MLPA)或实时定量 PCR 等方法来检测和分析^[8]。本实验室前期对 42 例先天性无虹膜患者进行了 *PAX6* 基因直接测序,在 31 例患者中找到了致病突变,随后对 9 例基因检测结果阴性的患者进行了 *PAX6* 基因的 MLPA 分析,在 8 例患者中检测到该基因多个外显子,甚至整个基因的丢失,检出率高达 98% (41/42)。BCD 患者眼底有特征性点状黄白色小结晶,与其他遗传性视网膜疾病不易混淆^[5],因此可对这些患者进行 *CYP4V2* 基因的直接 Sanger 测序。本实验室前期对百余例 BCD 患者进行了 *CYP4V2* 基因直接测序分析,全部找到了致病突变,检出率高达 100%。

除上述致病基因单一的遗传性眼病外,具有遗传异质性眼病患者的临床表型评估也同样重要。WES 可以检测基因组 DNA 所有编码基因,与致病基因目标区域捕获技术,即 TES 相比费用较高,另外就检测技术来说,捕获 Panel 中包括的基因越多,各个基因捕获覆盖的一致性就会越低,某些基因序列中高 GC 含量或重复序列的片段捕获深度就降低,发生在这些区域的基因突变也易遗漏^[9-11]。因此,目前在致病基因突变分析研究和临床患者基因诊断工作中大多数采用 TES 结合 Sanger 测序验证的方法。根据研究目的或疾病类型,目标区域捕获 Panel 所包括的基因类型和数目也各不相同,TES Panel 的选择往往取决于患者的临床诊断。在临床上,有些疾病临床表型多样并且表现度不同,如视锥细胞营养不良患者早期仅表现为视力不好、视盘色淡和黄斑中心凹反光略弥散,如果未详细询问病史及进行视网膜电图(electroretinography, ERG)等检查,可能会诊断为视神经萎缩,如果用视神经萎缩相关 Panel 进行基因突变分析肯定找不到相应的致病基因。本实验室前期在可疑遗传性视神经萎缩致病基因突变分析中,后期对 197 例检测阴性患者重新进行临床评估,发现 2 例患者为锥杆细胞营养不良(cone-rod dystrophy, CRD),并在后续研究中发现这 2 例患者均携带 *ABCA4* 致病基因突变。

2 准确的临床诊断有助于致病基因突变的判定

由于大多数单基因遗传性眼病具有高度的临床和

遗传异质性,即使用先进的 NGS 分析(无论是用 TES 还是 WES),患者致病基因突变的检出率也只有 60%~70%,如遗传性视网膜疾病,主要包括 RP、脉络膜视网膜变性(chorioretinal degeneration, CRD)、Leber 先天性黑朦(Leber congenital amaurosis, LCA)等^[9-11]。以目前常用的 TES 为例,通常研究遗传性视网膜基因的捕获 Panel 包括 200~300 个已知遗传性视网膜疾病的致病基因(RetNet, <https://sph.uth.edu/Retnet/sumdis.htm>),每个待测患者样本通过基因组 DNA 建库、目标区域捕获富集和测序,测序结果进行初步生物信息学分析后,每个样本大约发现 450 个单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)和 30 个小的缺失或插入,这些数据再经过公共 SNP 数据库及自身数据库等滤过分析,最后每个样本剩下 2~3 个基因的 5~6 个可疑致病基因变异^[9-11]。对受检患者临床表型进行准确、全面地评估及其家族史的正确追溯和判断对确定其致病基因突变十分重要,如果患者有明确的 AD 家族史,那致病基因突变肯定首选 AD 的致病基因,如患者父母为近亲婚配,则首选常染色体隐性(autosomal recessive, AR)遗传致病基因的纯合突变。但有些情况则比较复杂,某些基因的致病突变既可通过 AD 遗传,又可通过 AR 遗传的方式进行传递,如 *RPI* 基因突变既可造成 ADRP,又可导致 ARRP^[12]。本实验室前期对 1 例临床诊断 Usher 综合征的患者进行了基因定点捕获分析,我们使用的捕获 Panel 包括 371 个遗传性眼病的致病基因,经过 TES 分析流程的筛选,选出 6 个基因的变异为可疑致病突变,均为杂合变异,其中包括 3 个 RP 的基因、1 个 CRD 的基因和 2 个其他非视网膜疾病的致病基因,其中 *RPI* 的无义突变 p. R1933X 似乎是致病突变,在随后的家系共分离分析中发现其孪生患病弟弟携带相同突变,但迄今尚未发现 *RPI* 基因突变导致 Usher 综合征的报道^[12],另外患者母亲眼底检查完全正常,也携带上述相同无义突变,因此我们又对该患者最初的 483 个 SNP 进行分析,找到了 1 个 *MYO7A* 基因的纯合错义突变,家系共分离分析 2 例患者携带相同突变,而患者父母分别携带该杂合错义突变,最终确定这 2 例患者的致病基因是 *MYO7A*。更为复杂的是还有一些基因的致病突变以 AD 传递时导致的临床表型与以 AR 传递时引起的临床表型不同,如 *GUCY2D* 基因的杂合错义突变导致 CRD 的临床表型,而纯合或复合杂合突变(主要是无义或小缺失或插入突变)则导致严重的 LCA; *PDE6B* 基因的杂合致病突变导致 AD 先天性静止性夜盲,而复合杂合或纯合突变则导致 ARRP^[13]。对可能携带

这些基因突变患者更需要仔细进行临床表型评估及准确地判定遗传方式。另外,还有少数患者通过 NGS 分析后仅找到 AR 致病基因的杂合突变,在这种情况下,准确的临床诊断对判断该基因是否为致病基因也很重要,关系到下一步基因分析方法的选择。例如,1 例临床上诊断 RP 的患者经 TES 分析发现 1 个 *BBS2* 基因的无义杂合突变, *BBS2* 基因突变导致 Bardet-Biedl 综合征(Bardet-Biedl syndrome, BBS),患者除有 RP 的临床表型外,还可伴有肾病、肥胖、多指(趾)、发育迟缓等表型^[13]。与其他遗传性视网膜病变相似, BBS 患者的临床表型差别很大,一些患者除了 RP 和多指(趾)的临床表型外,没有上述其他的临床表型,而许多患者出生后不久就已手术切除多指(趾),有些患者甚至不知道有该临床表型,因此在这种情况下要对患者的临床表型再次评估,如临床上诊断为 BBS,就可初步推测 *BBS2* 是该患者的致病基因,另外 1 个突变等位基因可能是大片段缺失或重复等基因组 DNA 拷贝数异常,或者 NGS 过程中对该基因某些区域覆盖捕获不好造成遗漏,需用 Sanger 测序进行补充测序查找。理论上 NGS 可以检测到拷贝数异常,但是由于其检出的敏感性与 NGS 的捕获深度和拷贝数异常的大小等因素有关,对可疑携带拷贝数异常的患者样本往往还需要用 MLPA 等其他方法进行分析。

3 小结

总之,随着分子遗传学技术,特别是 NGS 技术的发展,发现了越来越多的遗传性眼病的致病基因和致病基因突变,越来越多的患者也得到了相应的基因诊断。相关的研究人员和临床工作者在遗传性眼病致病基因突变分析研究或患者基因诊断过程中应重视临床表型的准确评估,因为其在很大程度上关系到检测方法的选择和致病基因突变的最后判定。

参考文献

- [1] Shendure J, Ji H. Next-generation DNA sequencing [J]. Nat Biotechnol, 2008, 26(10): 1135-1145. DOI: 10.1038/nbt1486.
- [2] Zhang X, Zhang Q, Tong Y, et al. Large novel deletions detected in Chinese families with aniridia: correlation between genotype and phenotype [J]. Mol Vis, 2011, 17: 548-557.
- [3] Zhang X, Tong Y, Xu W, et al. Two novel mutations of the *PAX6* gene causing different phenotype in a cohort of Chinese patients [J]. Eye (Lond), 2011, 25(12): 1581-1589. DOI: 10.1038/eye.2011.215.
- [4] 郝朋, 应铭, 韩瑞芳, 等. 先天性无虹膜患者 *Pax6* 基因突变筛查 [J]. 中华实验眼科杂志, 2016, 34(10): 900-904. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.10.007.
Hao P, Ying M, Han RF, et al. Mutation analysis of *Pax6* in Chinese patients with congenital aniridia [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2016, 34(10): 900-904. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.10.007.
- [5] Shan M, Dong B, Zhao X, et al. Novel mutations in the *CYP4V2* gene associated with Bietti crystalline corneoretinal dystrophy [J]. Mol Vis, 2005, 11: 738-743.

- [6] Chen J, Xu K, Zhang X, et al. Novel mutations of the *RS1* gene in a cohort of Chinese families with X-linked retinoschisis [J/OL]. *Mol Vis*, 2014, 20 : 132 - 139 [2017 - 03 - 20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3913487/>.
- [7] Zhou Q, Liu L, Xu F, et al. Genetic and phenotypic characteristics of three Mainland Chinese families with choroideremia [J]. *Mol Vis*, 2012, 18 : 309 - 316.
- [8] 李杨. 先天性无虹膜症 *PAX6* 基因突变分析中应重视大片段缺失的检测 [J]. 国际眼科纵览, 2013, 37 (1) : 1 - 4. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 1673-5803. 2013. 01. 001.
Li Y. The interest of large deletions screening in the *PAX6* gene mutations analysis in aniridia [J]. *Int Rev Ophthalmol*, 2013, 37 (1) : 1 - 4. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 1673-5803. 2013. 01. 001.
- [9] Wang F, Wang H, Tuan HF, et al. Next generation sequencing-based molecular diagnosis of retinitis pigmentosa; identification of a novel genotype-phenotype correlation and clinical refinements [J]. *Hum Genet*, 2014, 133 (3) : 331 - 345. DOI: 10. 1007/s00439-013-1381-5.
- [10] Wang J, Zhang VW, Feng Y, et al. Dependable and efficient clinical utility of target capture-based deep sequencing in molecular diagnosis of retinitis pigmentosa [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2014, 55 (10) : 6213 - 6223. DOI: 10. 1167/iov. 14-14936.
- [11] Daiger SP, Sullivan LS, Bowne SJ. Genes and mutations causing retinitis pigmentosa [J]. *Clin Genet*, 2013, 84 (2) : 132 - 141. DOI: 10. 1111/cge. 12203.
- [12] Siemiatkowska AM, Astuti GD, Arimadyo K, et al. Identification of a novel nonsense mutation in *RPI* that causes autosomal recessive retinitis pigmentosa in an Indonesian family [J/OL]. *Mol Vis*, 2012, 18 : 2411 - 2419 [2017 - 04 - 18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3472925/>.
- [13] Ayuso C, Millan JM. Retinitis pigmentosa and allied conditions today: a paradigm of translational research [J/OL]. *Genome Med*, 2010, 2 (5) : 34 [2017 - 04 - 20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2887078/>. DOI: 10. 1186/gm155.

(收稿日期:2017-06-10)

(本文编辑:尹卫靖)

消息

《中国儿童青少年近视防控流程的建议》一书出版

由方严教授和石一宁医生撰写的《中国儿童青少年近视防控流程的建议》一书已由陕西科学技术出版社出版发行。该书共分为 11 部分,包括中国儿童青少年近视防控的总战略、总体思路、近视防控总目标、预期目的、防控防线、近视防控的准备工作、防控流程的实施框架、近视防控的具体可操作流程、近视防控理论及补充、示范 100 例病例等,内容详实具体,对中国儿童青少年近视的防控有一定的指导作用和借鉴意义。更为重要的是,该书汇集了百余年来国内积累的关于近视研究的经验和成果,凝练了作者 20 余年来对中国人近视发病过程的观察总结和防治经验,可作为临床医生和其他读者进行近视防控、眼健康保健的参考工具,也可以成为儿童家长、眼保健师、视光师、眼科医师、幼儿园和中小学校医、社区和卫生院医师、妇幼保健师的工作手册。基于作者长期进行的近视研究的经验和总结,撰写此书的目的在于为完善近视防控流程、呵护中国儿童的眼健康贡献一份薄力,期待读者的回馈意见和建议。

该书共 100 页,预售价 18 元/本,邮费 10 元。欢迎通过微信号:18192063900,石一宁眼健康工作室进行预订购。

(方严 石一宁)

读者·作者·编者

本刊对论文中关键词的著录要求

本刊投稿的论文请分别在中英文摘要下方标引 3~5 个关键词以便于编制文献索引。关键词应选取能反映文章主题概念的词或词组,中英文关键词应一致。投稿作者可登陆 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh> 或 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=mesh> 网站从美国国立医学图书馆的 MeSH 数据库中选取关键词,其中文译名可参照中国医学科学院信息研究所编译的《医学主题词注释字顺表》。未被词表收录的新的专业术语(自由词)可直接作为关键词使用,但应排序在最后。中医药关键词应从中国中医科学院中医药信息研究所编写的《中医药主题词表》中选取。关键词中的缩写词应按《医学主题词注释字顺表》还原为全称,各关键词之间用“;”分隔。

本刊对一稿两投的处理

作者投稿请勿一稿两投或一稿多投。本刊编辑部发现一稿两投并经证实后,稿件将不予审理并对作者进行告知。如果发现一稿两用,本刊将做出如下处理:(1)在本刊杂志及网站上刊登撤销该论文及该文系重复发表的声明,并在中华医学会系列杂志上通报。(2)向作者所在单位和该领域内的其他科技期刊进行通报。(3)2 年内拒绝发表其作为第一作者或通信作者的任何来稿。

文章未在公开发表物上发表者、以不同文字分别投往国外期刊和国内期刊以供不同受众者阅读者不属于一稿两投的行为,但本刊严格遵照国际医学期刊编辑委员会《国际生物医学期刊投稿统一要求》(http://www.icmje.org/urm_main.html),属于以不同语言文字二次发表者,请作者在首次接受稿件的期刊发表后 1 周再另行投稿,并请提供首次发表期刊同意以不同语言发表的同意函。

(本刊编辑部)