

· 临床研究 ·

# ABCA1 基因编码区稀有变异与原发开角型青光眼关联分析

徐玉霞<sup>1</sup> 黄璐琳<sup>2</sup> 龚波<sup>2</sup> 陈宇虹<sup>3</sup> 孙兴怀<sup>3</sup> 杨正林<sup>2</sup>

<sup>1</sup>成都中医药大学医学技术学院 610075; <sup>2</sup>电子科技大学附属医院 四川省人民医院 人类疾病基因研究四川省重点实验室, 成都 610072; <sup>3</sup>复旦大学附属眼耳鼻喉科医院 上海市五官科医院 200031

通信作者: 杨正林, Email: zliny@yahoo.com

**【摘要】** 目的 对原发性开角型青光眼(POAG)患者 ABCA1 基因编码区变异进行分析, 探讨 ABCA1 基因稀有非同义变异在 POAG 患者中的分布情况。方法 采用前瞻性队列研究方法, 自 2017 年 3 月至 2018 年 3 月共招募复旦大学附属眼耳鼻喉科医院就诊的 POAG 患者 398 例, 并招募同期就诊的年龄和性别匹配的健康对照者 198 人。采集受检者外周静脉血 2~5 ml, 提取基因组 DNA, 利用全外显子测序(WES)技术对受检者 ABCA1 基因 50 个外显子区的稀有非同义变异进行测序和分析。结果 POAG 患者 ABCA1 基因稀有非同义变异检出率为 6.8% (27/398), 发现 21 个稀有非同义变异位点, 其中有 4 个新变异, 包括 c. 4310C>A (p. Thr1437Asn)、c. 3772G>T (p. Asp1258Tyr)、c. 775A>G (p. Lys259Glu) 和 c. 1507\_1508insGAGGT (p. Glu503GlyfsX7)。健康对照者 ABCA1 稀有变异检出率为 2.5% (5/198), POAG 患者 ABCA1 稀有变异检出率明显高于健康对照者, 差异有统计学意义( $\chi^2=4.72, P=0.03, OR=2.81$ )。结论 ABCA1 的稀有非同义变异与 POAG 发病有一定关联, 丰富了 ABCA1 基因的稀有变异谱。

**【关键词】** 开角型青光眼/基因; 基因变异; DNA 序列分析/方法; 非同义变异; 全外显子测序; ABCA1 基因

**基金项目:** 国家自然科学基金项目 (81430008、81790643、81300802、81670853、81670895); 国家精准医疗计划项目 (2016YFC0905200); 四川省科技厅基金项目 (2014SZ0169、2015SZ0052、2015JQ0057、2016HH0072、2017JQ0024)

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.06.007

## Association of ABCA1 rare nonsynonymous variants with primary open angle glaucoma

Xu Yuxia<sup>1</sup>, Huang Lulin<sup>2</sup>, Gong Bo<sup>2</sup>, Chen Yuhong<sup>3</sup>, Sun Xinghui<sup>3</sup>, Yang Zhenglin<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Medical Technology College, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine of China, Chengdu 610075, China;

<sup>2</sup>The Sichuan Provincial Key Laboratory for Human Disease Gene Study, Sichuan Provincial People's Hospital, School of Medicine, University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu 610072, China; <sup>3</sup>Department of Ophthalmology and Visual Science, Eye and Ear Nose Throat (ENT) Hospital, Shanghai Medical School, Fudan University, Shanghai 200031, China

Corresponding author: Yang Zhenglin, Email: zliny@yahoo.com

**[Abstract]** **Objective** To explore the rare nonsynonymous variants of ABCA1 gene in primary open angle glaucoma (POAG). **Methods** A prospective cohort study was carried out. Three hundred and ninety-eight POAG patients and 198 healthy controls matched in age and gender were recruited from March 2017 to March 2018 in Eye and Ear Nose Throat (ENT) Hospital of Fudan University. The periphery blood of 2-5 ml from all the subjects was collected for extraction of DNA, and rare variant analysis of the ABCA1 gene was conducted by whole exome sequencing (WES) data of these subjects. The study protocol was approved by Ethic Committee of Eye and Ear Nose Throat Hospital of Fudan University and Sichuan Provincial People's Hospital (No. 2016-32-1), and written informed consent was obtained from each subject prior to entering the study cohort. **Results** A total of 21 rare nonsynonymous variants (minor allele frequency MAF<0.01) were detected in the coding regions of ABCA1 gene in 27 subjects of the 398 POAG, with the detection rate of 6.8%. Among them, c. 4310C>A (p. Thr1437Asn), c. 3772G>T (p. Asp1258Tyr), c. 775A>G (p. Lys259Glu) and c. 1507\_1508insGAGGT (p. Glu503GlyfsX7) were

four novel variants. In the 198 healthy controls, five rare nonsynonymous variants were detected in the *ABCA1* gene from five subjects respectively, with the detection rate of 2.5%, the detection rate of nonsynonymous in POAG group was higher than that in healthy control group, showing a significant difference ( $\chi^2 = 4.72, P = 0.03, OR = 2.81$ ).

**Conclusions** Rare nonsynonymous variants in *ABCA1* is associated with the pathogenesis of POAG. These variants can enrich the variation spectrum of *ABCA1*.

**[Key words]** Glaucoma, Open angle/genetics; Genetic variation; Sequence analysis, DNA/methods; Nonsynonymous variants; Whole exome sequencing; *ABCA1* gene

**Fund program:** National Natural Science Foundation of China (81430008, 81790643, 81300802, 81670853, 81670895); National Precision Medicine Project (2016YFC0905200); Department of Science and Technology of Sichuan Province (2014SZ0169, 2015SZ0052, 2015JQ0057, 2016HH0072, 2017JQ0024)

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.06.007

二代测序技术 (next generation sequencing technology, NGS) 的应用实现了基因检测速度快、通量高的目标。全外显子测序 (whole exome-sequencing, WES) 是 NGS 的主要技术之一。外显子组是基因组 DNA 上所有蛋白质编码序列的总合<sup>[1]</sup>。虽然人类外显子组仅占全部基因组序列的约 1%, 但研究表明大约 85% 的疾病致病突变均与编码区序列变异有关<sup>[2]</sup>。以往的全基因组关联分析 (genome wide association study, GWAS) 基于常见疾病-常见变异假说, 在识别与复杂疾病相关联的常见变异 [最小等位基因频率 (minor allele frequency, MAF) > 0.05] 方面取得了很大进展, 但同时也发现常见变异只能对部分常见疾病进行解释, 仍会漏掉严重的遗传缺失问题<sup>[3]</sup>。近年来随着 NGS 技术的发展, 对外显子, 甚至整个基因组的测序研究逐渐增多, 研究表明稀有变异 (MAF < 0.01 或 0.05) 对常见疾病的易感性有一定影响, 可以解释大部分的遗传缺失<sup>[4]</sup>。原发性开角型青光眼 (primary open angle glaucoma, POAG) 是临床上常见的复杂疾病之一, 其发病机制至今尚未阐明。近年来的多个研究证实 *ABCA1* 基因常见变异与 POAG 发病存在关联<sup>[5-7]</sup>, 但是目前关于稀有非同义变异与 POAG 的关系尚未见报道。本研究拟探讨 *ABCA1* 基因编码区稀有非同义变异在 POAG 中的分布情况, 为进一步研究 *ABCA1* 与 POAG 的关系提供参考。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

采用前瞻性队列研究方法, 于 2017 年 3 月至 2018 年 3 月共招募复旦大学附属眼耳鼻喉科医院就诊的散发型 POAG 患者 398 例, 其中男 257 例, 女 141 例; 年龄 (48.5 ± 16.3) 岁。同期招募医院体检的健康对照者 198 人, 其中男 106 人, 女 92 人; 年龄 (61.0 ± 9.0) 岁。2 个组受检者年龄及性别分布差异均无统计学意义

(年龄:  $t = 9.92, P = 0.00$ ; 性别:  $\chi^2 = 6.77, P = 0.01$ )。所有受检者均接受眼底、视野、光相干断层扫描 (optical coherence tomography, OCT) 及符合国际临床视觉电生理标准化的视网膜电图 (electroretinogram, ERG) 检查, 由同一位眼科医生按照 POAG 诊断标准进行诊断, 参照文献 [6] 的标准建立 POAG 组和健康对照组纳入和排除标准, 2 个组均排除高血压、糖尿病和高血脂等全身性疾病者。本研究遵循《赫尔辛基宣言》, 研究方案经复旦大学眼耳鼻喉医院和四川省人民医院伦理委员会审查批准 [批文号: 伦审 (研) 2016 年第 32-1 号], 所有受检者进入队列前均签署知情同意书。

### 1.2 方法

**1.2.1 基因组 DNA 提取** 采集受检者外周静脉血 2 ~ 5 ml, 置于 EDTA-K2 抗凝管中于 -20 °C 条件下保存备用。按照外周血基因组 DNA 提取试剂盒 (北京天根生化科技有限公司) 说明书提取基因组 DNA, 采用 NanoDrop 2000 测定其浓度和纯度。

**1.2.2 WES 及数据处理** WES 操作按照本研究组建立的方法进行<sup>[8]</sup>。利用 wANNOVAR (<http://wannovar.wglab.org/>) 在线工具对测序结果进行变异注释<sup>[9-10]</sup>, 依据在 4 个公共数据库 (dbSNP、1000 Genomes、ExAC database、gnomAD) 查询的 MAF 对稀有变异 (MAF < 0.01) 进行筛选, 利用 12 个在线软件 (SIFT、Polyphen2、LRT、Mutation Taster、Mutation Assessor、FATHMM、PROVEAN、MetaSVM、MetaLR、M-CAP、CADD 和 fathmm-MKL) 预测稀有变异对蛋白质功能及结构的影响。

所有变异均在 HGMD 数据库 (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>) 中查询其是否报道过, 利用 NCBI 网站 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/homologene>) 分析不同物种间氨基酸序列保守性。参照美国医学遗传学与基因组学学会 (American College

of Medical Genetics and Genomics, ACMG) 遗传变异分类标准与指南对稀有变异进行分类<sup>[11]</sup>。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计学软件进行统计分析。本研究计数资料以频数和率进行比较,采用均衡分组两水平研究设计,POAG 组与健康对照组间异常基因检出率差异比较采用  $\chi^2$  检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义,计算基因变异致病的 OR 值。

## 2 结果

### 2.1 POAG 中 ABCA1 基因(稀有)非同义变异检测分析

398 例 POAG 患者中, ABCA1 基因变异检出率为 6.8% (27/398)。共有 21 个 ABCA1 非同义变异位点,包括 19 个错义变异、1 个无义变异 (c. 2725C>T (p. Arg909X)) 以及 1 个移码变异 [c. 1507\_1508insGAGGT

(p. Glu503GlyfsX7)], 均为杂合变异。21 个 ABCA1 变异位点均为稀有变异,其中 c. 5492C>T (p. Ala1831Val) 在 4 例 POAG 患者中检出,为变异热点;有 4 个变异在公共数据库中未出现,为新变异,包括 c. 4310C>A (p. Thr1437Asn)、c. 3772G>T (p. Asp1258Tyr)、c. 775A>G (p. Lys259Glu) 和 c. 1507\_1508insGAGGT (p. Glu503GlyfsX7) (表 1)。根据 ACMG 分类标准, c. 3772G>T (p. Asp1258Tyr) 和 c. 1507\_1508insGAGGT (p. Glu503GlyfsX7) 为可能的致病位点, c. 4310C>A (p. Thr1437Asn) 和 c. 775A>G (p. Lys259Glu) 则为意义不明确的位点。其他 7 个可能致病的位点为 c. 2725C>T (p. Arg909X)、c. 2518T>C (p. Trp840Arg)、c. 2471C>T (p. Ser824Leu)、c. 2014C>T (p. Arg672Trp)、c. 1826C>T (p. Thr609Met)、c. 1486C>T (p. Arg496Trp) 和 c. 1040A>G (p. Tyr347Cys) (表 2)。

表 1 ABCA1 稀有非同义变异位点等位基因频率及功能软件预测结果

核苷酸改变	氨基酸改变	不同数据库等位基因频率							不同软件功能预测结果												
		例数	1000 Genomes	1000 Genomes#	ExAC#	gnomAD_exome#	gnomAD_genome#	dbSNP	SIFT	Polyphen2_HDIV	Polyphen2_HVAR	LRT	Mutation Taster#	Mutation Assessor	FATH MM	PROV EAN	Meta SVM	Meta LR	M-CAP	CADD	fathmm-MKL
POAG 组																					
c. 5492C>T	p. Ala1831Val	4	NA	NA	0.0016	0.0025	0.0043	rs753324965	N	N	N	D	D	L	D	N	T	D	D	22.9	D
c. 5020G>A	p. Val1674Ile	2	0.0010	0.0030	0.0036	0.0026	0.0018	rs138422574	N	N	N	D	D	L	D	N	T	T	T	25.8	D
c. 5002G>A	p. Val1668Ile	1	NA	NA	0.0006	0.0006	0.0006	rs767589350	N	P	N	N	D	L	D	N	T	T	T	22	D
c. 4310C>A	p. Thr1437Asn	2	NA	NA	NA	NA	NA	NA	N	N	N	N	N	N	D	N	T	D	D	11.21	D
c. 4195A>T	p. Thr1399Ser	1	0.0008	NA	0.0000	0.0000	0.0000	rs538614702	N	N	N	N	N	N	D	N	T	T	D	1.421	N
c. 3818G>A	p. Arg1273Gln	1	NA	NA	0.0006	0.0003	0.0000	rs151175933	N	N	N	N	D	M	D	N	T	D	D	23.8	D
c. 3772G>T	p. Asp1258Tyr	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	D	D	D	D	D	M	D	D	D	D	D	26.6	D
c. 3286G>A	p. Val1096Ile	1	NA	NA	0.0020	0.0016	0.0019	rs13306073	N	N	N	N	N	N	T	N	T	T	D	16.69	N
c. 2725C>T	p. Arg909X	1	NA	NA	NA	0.0001	NA	NA	NA	NA	NA	D	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	44	D
c. 2660G>T	p. Cys887Phe	1	0.0012	0.0040	0.0025	0.0017	0.0006	rs187652566	N	N	N	D	D	N	D	N	T	T	D	18.37	D
c. 2518T>C	p. Trp840Arg	1	NA	NA	NA	0.0001	NA	NA	D	D	D	D	D	H	D	D	D	D	D	26.4	D
c. 2471C>T	p. Ser824Leu	1	0.0002	NA	0.0000	0.0000	NA	rs551884479	N	P	P	D	D	L	D	D	D	D	D	24.3	D
c. 2014C>T	p. Arg672Trp	1	NA	NA	0.0001	0.0003	NA	rs759576379	D	D	D	D	D	M	D	D	D	D	D	33	D
c. 1826C>T	p. Thr609Met	1	NA	NA	0.0000	0.0000	0.0000	rs755276277	D	D	P	D	D	M	D	D	D	D	D	28.5	D
c. 1636A>G	p. Ile546Val	1	NA	NA	0.0012	0.0010	NA	rs13306068	N	N	N	N	N	N	D	N	T	D	T	0.307	N
c. 1507_1508insGAGGT	p. Glu503GlyfsX7	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	D	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
c. 1486C>T	p. Arg496Trp	1	NA	NA	0.0015	0.0012	0.0006	rs147675550	D	P	N	N	N	L	D	D	D	D	D	24.2	D
c. 1390G>A	p. Val464Met	2	0.0004	NA	0.0001	0.0001	0.0006	rs563149622	N	N	N	N	N	N	D	N	T	T	D	15.98	N
c. 1040A>G	p. Tyr347Cys	1	NA	NA	0.0000	NA	NA	rs778491693	D	D	D	D	D	M	D	D	D	D	D	26.7	D
c. 775A>G	p. Lys259Glu	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	N	N	N	N	N	N	D	N	T	T	D	0.158	N
c. 484C>T	p. Leu162Phe	1	0.0002	0.0010	0.0001	0.0001	NA	rs576319110	N	P	P	D	N	L	D	N	D	D	D	8.746	D
健康对照组																					
c. 3200C>T	p. Ser1067Phe	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	D	D	D	D	D	M	D	D	D	D	D	32	D
c. 3667C>T	p. His1223Tyr	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	D	P	N	D	D	L	D	N	D	D	D	27.4	D
c. 3974C>T	p. Thr1325Ile	1	NA	NA	0.0001	0.0001	NA	rs780255270	N	N	N	D	N	L	D	N	T	T	D	13.39	D
c. 5020G>A	p. Val1674Ile	1	0.0010	0.0030	0.0036	0.0026	0.0018	rs138422574	N	N	N	D	D	L	D	N	T	T	T	25.8	D
c. 5492C>T	p. Ala1831Val	1	NA	NA	0.0016	0.0025	0.0043	rs753324965	N	N	N	D	D	L	D	N	T	D	D	22.9	D

注: \* :数据库中所有样本;#:数据库中东亚人群样本。NA:无相关资料;N:良性的;D:有害的;P:可能有害的;L:低度有害的;M:中度有害的;H:高度有害的

氨基酸序列保守性分析显示,21 个稀有变异中有 12 个变异位点在不同物种的 ABCA1 蛋白中高度保守(表 2)。这些稀有变异多发生在 ABCA1 蛋白的胞外域 extracellular domain, ECD), 其中 ECD1 有 8 个变异位点,在 9 例 POAG 患者中检出;ECD2 有 2 个变异位点,在 3 例 POAG 患者中检出。其次为 2 个跨膜区,其中跨膜结构域(transmembrane domain, TMD) 1 有 4 个

变异位点,分别在 4 例 POAG 患者中检出;TMD2 有 3 个变异位点,在 7 例 POAG 患者中检出。在 ATP 结合区,有 2 个变异位点位于 NBD1,分别在 2 例 POAG 患者中检出;NBD2 未检测到变异(图 1)。新变异 c. 3772G>T(p. Asp1258Tyr)位于 R1 和 TM7 之间的铰链区,其碱基改变使编码的第 1258 位天冬氨酸变为酪氨酸,经软件预测其对 ABCA1 蛋白质有害,ACMG 判定其为可能致病的位点。

表 2 ABCA1 稀有非同义变异位点 ACMG 分类

核苷酸改变	氨基酸改变	检出率		新变异	外显子	蛋白质结构域	蛋白质长度改变	功能预测	氨基酸保守性	ACMG 分类
		POAG	健康对照							
c. 5492C>T	p. Ala1831Val	0.010	0.005	1	40	TMD2	/	/	保守	意义不明确
c. 5020G>A	p. Val1674Ile	0.005	0.005	1	37	TMD2	/	/	保守	意义不明确
c. 5002G>A	p. Val1668Ile	0.002	0	1	37	TMD2	/	/	保守	意义不明确
c. 4310C>A	p. Thr1437Asn	0.005	0	是	31	ECD2	/	/	/	意义不明确
c. 4195A>T	p. Thr1399Ser	0.002	0	1	30	ECD2	/	/	/	意义不明确
c. 3818G>A	p. Arg1273Gln	0.002	0	1	27	铰链区	/	/	保守	意义不明确
c. 3772G>T	p. Asp1258Tyr	0.002	0	是	26	铰链区	/	有害	保守	可能致病
c. 3286G>A	p. Val1096Ile	0.002	0	1	23	NBD1	/	/	/	意义不明确
c. 2725C>T	p. Arg909X	0.002	0	1	19	NBD1	是	有害	保守	可能致病
c. 2660G>T	p. Cys887Phe	0.002	0	1	19	TMD1	/	/	保守	意义不明确
c. 2518T>C	p. Trp840Arg	0.002	0	1	17	TMD1	/	有害	保守	可能致病
c. 2471C>T	p. Ser824Leu	0.002	0	1	17	TMD1	/	/	/	可能致病
c. 2014C>T	p. Arg672Trp	0.002	0	1	15	TMD1	/	有害	保守	可能致病
c. 1826C>T	p. Thr609Met	0.002	0	1	14	ECD1	/	有害	保守	可能致病
c. 1636A>G	p. Ile546Val	0.002	0	1	13	ECD1	/	/	/	意义不明确
c. 1507_1508insGAGGT	p. Glu503GlyfsX7	0.002	0	是	12	ECD1	是	有害	保守	可能致病
c. 1486C>T	p. Arg496Trp	0.002	0	1	12	ECD1	/	/	/	可能致病
c. 1390G>A	p. Val464Met	0.005	0	1	12	ECD1	/	/	/	意义不明确
c. 1040A>G	p. Tyr347Cys	0.002	0	1	9	ECD1	/	有害	保守	可能致病
c. 775A>G	p. Lys259Glu	0.002	0	是	8	ECD1	/	/	/	意义不明确
c. 484C>T	p. Leu162Phe	0.002	0	1	8	ECD2	/	/	/	意义不明确
c. 3200C>T	p. Ser1067Phe	0	0.005	是	22	NBD1	/	有害	/	意义不明确
c. 3667C>T	p. His1223Tyr	0	0.005	是	25	R1	/	/	保守	意义不明确
c. 3974C>T	p. Thr1325Ile	0	0.005	1	28	铰链区	/	/	/	意义不明确

注:POAG:原发性开角型青光眼;ECD:胞外域;NBD:ATP 结合域;TMD:跨膜结构域;R:调节域。有害表示所有软件均预测该位点对蛋白有损害;保守表示该位点在 80% 以上物种间氨基酸序列保守

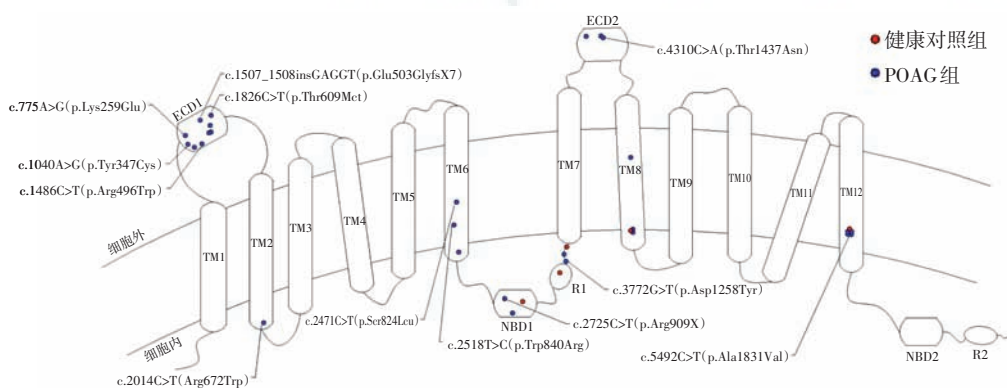


图 1 ABCA1 稀有非同义变异在 ABCA1 蛋白上的分布 每个小圈代表 1 例参与者检出 ABCA1 稀有变异,蓝色代表 POAG 患者,红色代表健康对照者;小圈重叠时表示同一变异位点 ECD:胞外域;NBD:核苷酸结合域;TM:跨膜结构域;R:调节域;POAG:原发性开角型青光眼

## 2.2 POAG 和健康人 ABCA1 基因稀有非同义变异比较

198 名健康对照者中共检出 5 个 ABCA1 变异,均为稀有变异,其中 c. 5020G>A(p. Val1674Ile) 和 c. 5492C > T (p. Ala1831Val) 也存在于 POAG 患者中,c. 3200C>T (p. Ser1067Phe)、c. 3667C>T (p. His1223Tyr) 和 c. 3974C>T (p. Thr1325Ile) 仅在健康对照者中检出。根据 ACMG 标准,这 5 个变异位点致病意义均不明确。健康对照组 ABCA1 稀有变异检出率为 2.5% (5/198), 低于 POAG 组的 6.8%, 差异有统计学意义( $\chi^2 = 4.72, P = 0.03, OR = 2.81$ )。

## 3 讨论

青光眼是一组以特征性视神经萎缩和视野缺损为特征的眼部疾病,视网膜神经节细胞 (retinal ganglion cells, RGCs) 死亡是青光眼的主要病理结局<sup>[12]</sup>。青光眼是全球第二大致盲疾病,超过 7000 万人受累<sup>[13-14]</sup>。近年来,越来越多的研究表明基因变异在 POAG 的发病过程中起关键作用<sup>[5,15-16]</sup>。

大量研究显示,脂代谢异常与 POAG 发病也有一定关系<sup>[17-19]</sup>。脂质代谢异常导致视网膜和脉络膜小血管的退行性变化,可能导致早期缺血性视网膜神经血管病变,这一过程使眼部灌注不足,加之眼部小血管内径变化导致血流速度和血管阻力指数变化,与 RGCs 有关的微循环发生紊乱,进而可能引起永久性的视觉障碍<sup>[20-22]</sup>。POAG 患者的脂质代谢一直是各种研究的焦点,但研究结论尚不一致。Elisaf 等<sup>[23]</sup>研究发现,POAG 患者和健康对照组间血清总胆固醇、三酰甘油、高密度脂蛋白(high-density lipoprotein, HDL)和低密度脂蛋白(low-density lipoprotein, LDL)水平无明显差异;但 Pavljasević 等<sup>[24]</sup>研究发现 POAG 组患者血清胆固醇水平明显高于健康对照组,认为胆固醇可作为 POAG 的预测因素之一。Minna 等<sup>[19]</sup>研究发现,POAG 患者血清氧化低密度脂蛋白(oxidized low-density lipoprotein, ox-LDL)水平较健康对照组明显升高,推测青光眼的病理改变可能与脂质代谢异常引起的氧化应激和炎症反应有关。

*ABCA1* 基因(NM\_005502)位于 9q31.1,片段长度为 149 kb,由 50 个外显子和 49 个反应内含子组成,编码 2 261 个氨基酸组成的 ATP 结合盒转运体 A1(ATP-binding cassette transporter A1, ABCA1)蛋白,相对分子质量为 250 000<sup>[25]</sup>。作为脂代谢中的关键分子,ABCA1 蛋白以 ATP 为能源,介导细胞内磷脂和游离胆固醇流出,后者结合至细胞表面的载脂蛋白 A-I(apolipoprotein A-I, apoA-I),形成 HDL,进而启动胆固醇的逆向转运<sup>[26-27]</sup>。ABCA1 是一种膜蛋白,新生的 ABCA1 必须由细胞内运输至质膜上才能发挥其转运脂质的功能<sup>[28-29]</sup>。因此,ABCA1 的正确运输与定位在其转运脂质过程中起着重要作用。ABCA1 蛋白包括 2 个 TMD1 和 TMD2,每个跨膜结构域包括 6 个跨膜  $\alpha$  螺旋管道,TMD1 和 TMD2 之后紧连着核苷酸结合区(nucleotide binding domain, NBD)1、NBD2 和一个小的调节域(R1 和 R2)。2 个大的胞外域 ECD1 和 ECD2 是与 apoA-I 结合的区域<sup>[30-31]</sup>。

*ABCA1* 的突变会导致丹吉尔病(Tangier disease, TD)。TD 是一种常染色体隐性疾病,表现为组织中 HDL 缺乏或显著降低以及胆固醇的沉积<sup>[32-33]</sup>。有研究报道,TD 患者会出现不同程度的神经病变及眼部并发症<sup>[34]</sup>。Storti 等<sup>[17]</sup>认为 *ABCA1* 在视网膜色素上皮(retinal pigment epithelial, RPE)细胞中介导脂质外排途径以及 HDL 生物合成,这一途径的受损可能引起年龄相关性脂代谢紊乱,从而导致眼病的进展。本研究团队联合其他 2 个团队于 2014 年利用 GWAS 技术在

*ABCA1* 上游发现了 4 个单核苷酸多态性位点(rs2487032、rs2164560、rs2472459 和 rs2472519)与 POAG 关联,证实了 *ABCA1* 在 RGCs 中高度表达,认为 *ABCA1* 参与了 RGCs 的正常功能及凋亡过程,其调节机制与其介导的脂质代谢过程密切相关<sup>[6]</sup>。

作为 apoA-I 的潜在结合位点,ECD 发生变异会导致 *ABCA1* 与 apoA-I 的作用障碍,影响 *ABCA1* 的稳定性,加速其降解,导致 HDL 无法形成<sup>[30,35]</sup>。本研究中有 4 个可能致病的变异[c. 1826C>T(p. Thr609Met)、c. 1486C>T(p. Arg496Trp)、c. 1040A>G(p. Tyr347Cys)及 c. 1507\_1508insGAGGT(p. Glu503GlyfsX7)]位于 ECD1 区域。位于 TMD 上的变异会影响 *ABCA1* 的构象,使其无法正确地整合到细胞膜上,变异体迅速降解,进而影响其功能<sup>[30]</sup>。本研究在 TMD1 区域检测到 3 个可能致病变异[c. 2518T>C(p. Trp840Arg)、c. 2471C>T(p. Ser824Leu)和 c. 2014C>T(p. Arg672Trp)]。NBD 区域的完整性对于 *ABCA1* 功能的维持是必要的,该区域发生变异可导致 ATP 无法与 *ABCA1* 结合,从而无法产生主动运输所需的能量<sup>[30]</sup>。本研究中 c. 2725C>T(p. Arg909X)即位于 NBD1,氨基酸同源性比较显示其高度保守,多个软件均预测其对 *ABCA1* 蛋白有损害,ACMG 判定其可能具有致病性。

本研究中利用 WES 技术在 POAG 患者中共检出 *ABCA1* 基因 21 个稀有非同义变异位点,包含 4 个新变异,经功能软件预测为有害的位点 7 个,ACMG 判定可能具有致病性的位点共 9 个,其中 c. 5020G>A(p. Val1674Ile)、c. 2725C>T(p. Arg909X)、c. 2660G>T(p. Cys887Phe)、c. 2518T>C(p. Trp840Arg)、c. 2471C>T(p. Ser824Leu)及 c. 1486C>T(p. Arg496Trp)在脂代谢异常患者中检出<sup>[36-41]</sup>。这些变异位点是否与 POAG 发病有关及其具体机制还需进一步的功能学研究,但本研究中 POAG 患者 *ABCA1* 稀有变异检出率明显高于健康对照者,为 POAG 的发病机制提供了新的思路。本研究的不足在于尚未采集患者的血液样本对 POAG 患者的血脂水平与 *ABCA1* 基因型的关系进行分析,以确定这些基因异常对患者脂代谢是否有影响,这也是我们今后研究的方向。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

## 参考文献

- [1] Ng SB, Buckingham KJ, Lee C, et al. Exome sequencing identifies the cause of a mendelian disorder[J]. Nat Genet, 2010, 42(1): 30-35. DOI: 10.1038/ng.499.
- [2] Choi M, Scholl UI, Ji W, et al. Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel DNA sequencing[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106(45): 19096-19101. DOI: 10.1073/pnas.

- 0910672106.
- [3] Visscher PM. Sizing up human height variation [J]. *Nat Genet*, 2008, 40(5) : 489–490. DOI:10. 1038/ng0508-489.
  - [4] Manolio TA, Collins FS, Cox NJ, et al. Finding the missing heritability of complex diseases [J]. *Nature*, 2009, 461 (7265) : 747–753. DOI: 10. 1038/nature08494.
  - [5] Huang L, Chen Y, Lin Y, et al. Genome-wide analysis identified 17 new loci influencing intraocular pressure in Chinese population [J]. *Sci China Life Sci*, 2019, 62(2) : 153–164. DOI: 10. 1007/s11427-018-9430-2.
  - [6] Chen Y, Lin Y, Vithana EN, et al. Common variants near ABCA1 and PM2 are associated with primary open-angle glaucoma [J]. *Nat Genet*, 2014, 46(10) : 1115–1119. DOI:10. 1038/ng. 3078.
  - [7] Gharahkhani P, Burdon KP, Fogarty R, et al. Common variants near ABCA1, AFAP1 and GMDS confer risk of primary open-angle glaucoma [J]. *Nat Genet*, 2014, 46(10) : 1120–1125. DOI:10. 1038/ng. 3079.
  - [8] Huang L, Zhang Q, Huang X, et al. Mutation screening in genes known to be responsible for retinitis pigmentosa in 98 small Han Chinese families [J/OL]. *Sci Rep*, 2017, 7(1) : 1948 [2018–11–22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28512305>. DOI: 10. 1038/s41598-017-00963-6.
  - [9] Wang K, Li M, Hakonarson H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data [J/OL]. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(16) : e164 [2018–12–02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20601685>. DOI:10. 1093/nar/gkq603.
  - [10] Chang X, Wang K. wANNOVAR: annotating genetic variants for personal genomes via the web [J]. *J Med Genet*, 2012, 49(7) : 433–436. DOI:10. 1136/jmedgenet-2012-100918.
  - [11] Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology [J]. *Genet Med*, 2015, 17(5) : 405–424. DOI:10. 1038/gim. 2015. 30.
  - [12] Casson RJ, Chidlow G, Wood JP, et al. Definition of glaucoma: clinical and experimental concepts [J]. *Clin Exp Ophthalmol*, 2012, 40(4) : 341–349. DOI:10. 1111/j. 1442-9071. 2012. 02773. x.
  - [13] Quigley HA. Glaucoma [J]. *Lancet*, 2011, 377(9774) : 1367–1377. DOI:10. 1016/S0140-6736(10)61423-7.
  - [14] Tham YC, Li X, Wong TY, et al. Global prevalence of glaucoma and projections of glaucoma burden through 2040: a systematic review and meta-analysis [J]. *Ophthalmology*, 2014, 121(11) : 2081–2090. DOI: 10. 1016/j. ophtha. 2014. 05. 013.
  - [15] Kumar S, Malik MA, Goswami S, et al. Candidate genes involved in the susceptibility of primary open angle glaucoma [J]. *Gene*, 2016, 577(2) : 119–131. DOI:10. 1016/j. gene. 2015. 11. 032.
  - [16] Chen Y, Hughes G, Chen X, et al. Genetic variants associated with different risks for high tension glaucoma and normal tension glaucoma in a Chinese population [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2015, 56(4) : 2595–2600. DOI:10. 1167/iovs. 14-16269.
  - [17] Storti F, Raphael G, Griesser V, et al. Regulated efflux of photoreceptor outer segment-derived cholesterol by human RPE cells [J]. *Exp Eye Res*, 2017, 165 : 65–77. DOI:10. 1016/j. exer. 2017. 09. 008.
  - [18] Huang L, Zhang H, Cheng CY, et al. A missense variant in FGD6 confers increased risk of polypoidal choroidal vasculopathy [J]. *Nat Genet*, 2016, 48(6) : 640–647. DOI:10. 1038/ng. 3546.
  - [19] Helin-Toiviainen M, Rönkkö S, Kaarniranta K, et al. Oxidized low-density lipoprotein, lipid and calcium aggregates reveal oxidative stress and inflammation in the conjunctiva of glaucoma patients [J]. *Acta Ophthalmol*, 2017, 95(4) : 378–385. DOI:10. 1111/aos. 13380.
  - [20] Modrzejewska M, Grzesiak W, Zaborski D, et al. The role of lipid dysregulation and vascular risk factors in glaucomatous retrobulbar circulation [J]. *Bosn J Basic Med Sci*, 2015, 15(2) : 50–56. DOI:10. 17305/bjbm. 2015. 299.
  - [21] Deokule S, Vizzeri G, Boehm AG, et al. Correlation among choroidal, parapapillary, and retrobulbar vascular parameters in glaucoma [J]. *Am J Ophthalmol*, 2009, 147(4) : 736–743. DOI:10. 1016/j. ajo. 2008. 10. 020.
  - [22] Berge KE, Leren TP. Mutations in APOA-I and ABCA1 in Norwegians with low levels of HDL cholesterol [J]. *Clin Chim Acta*, 2010, 411(23–24) : 2019–2023. DOI:10. 1016/j. cca. 2010. 08. 027.
  - [23] Elisaf M, Kitsos G, Bairaktari E, et al. Metabolic abnormalities in patients with primary open-angle glaucoma [J]. *Acta Ophthalmol Scand*, 2001, 79(2) : 129–132.
  - [24] Pavljasević S, Asćerić M. Primary open-angle glaucoma and serum lipids [J]. *Bosn J Basic Med Sci*, 2009, 9(1) : 85–88. DOI:10. 17305/bjbm. 2009. 2863.
  - [25] Zeng WW, Zhou B, Liu HR, et al. Identification of the tree shrew ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) and its expression in tissues: cDNA sequence and expression of tree shrew ABCA1 [J]. *Mol Biol Rep*, 2009, 36(3) : 443–448. DOI:10. 1007/s11033-007-9199-7.
  - [26] Wang S, Smith JD. ABCA1 and nascent HDL biogenesis [J]. *Biofactors*, 2014, 40(6) : 547–554. DOI:10. 1002/biof. 1187.
  - [27] Yamauchi Y, Yokoyama S, Chang TY. ABCA1-dependent sterol release: sterol molecule specificity and potential membrane domain for HDL biogenesis [J]. *J Lipid Res*, 2016, 57(1) : 77–88. DOI:10. 1194/jlr. M063784.
  - [28] Singaraja RR, Kang MH, Vaid K, et al. Palmitoylation of ATP-binding cassette transporter A1 is essential for its trafficking and function [J]. *Circ Res*, 2009, 105(2) : 138–147. DOI:10. 1161/CIRCRESAHA. 108. 193011.
  - [29] Litvinov DY, Savushkin EV, Dergunov AD. Intracellular and plasma membrane events in cholesterol transport and homeostasis [J/OL]. *J Lipids*, 2018, 2018 : 3965054 [2018–12–12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30174957>. DOI:10. 1155/2018/3965054.
  - [30] Qian H, Zhao X, Cao P, et al. Structure of the human lipid exporter ABCA1 [J]. *Cell*, 2017, 169(7) : 1228–1239. DOI:10. 1016/j. cell. 2017. 05. 020.
  - [31] Bielicki JK. ABCA1 agonist peptides for the treatment of disease [J]. *Curr Opin Lipidol*, 2016, 27(1) : 40–46. DOI:10. 1097/MOL. 0000000000000258.
  - [32] Brooks-Wilson A, Marcil M, Clee SM, et al. Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency [J]. *Nat Genet*, 1999, 22(4) : 336–345. DOI:10. 1038/11905.
  - [33] Brunham LR, Kang MH, van Karnebeek C, et al. Clinical, biochemical, and molecular characterization of novel mutations in ABCA1 in families with tangier disease [J]. *JIMD Rep*, 2015, 18 : 51–62. DOI:10. 1007/8904-2014-348.
  - [34] Cheung MC, Mendez AJ, Wolf AC, et al. Characterization of apolipoprotein A-II- and A-II-containing lipoproteins in a new case of high density lipoprotein deficiency resembling Tangier disease and their effects on intracellular cholesterol efflux [J]. *J Clin Invest*, 1993, 91(2) : 522–529. DOI:10. 1172/JCI116231.
  - [35] Shaw PX, Zhang L, Zhang M, et al. Complement factor H genotypes impact risk of age-related macular degeneration by interaction with oxidized phospholipids [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(34) : 13757–13762. DOI:10. 1073/pnas. 1121309109.
  - [36] Berge KE, Leren TP. Mutations in APOA-I and ABCA1 in Norwegians with low levels of HDL cholesterol [J]. *Clinica Chimica Acta*, 2010, 411(23) : 2019–2023.
  - [37] Marcil M, Brooks-Wilson A, Clee SM, et al. Mutations in the ABC1 gene in familial HDL deficiency with defective cholesterol efflux [J]. *Lancet*, 1999, 354(9187) : 1341–1346.
  - [38] Hu S, Zhong Y, Hao Y, et al. Novel rare alleles of ABCA1 are exclusively associated with extreme high-density lipoprotein-cholesterol levels among the Han Chinese [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2009, 47(10) : 1239–1245. DOI:10. 1515/CCLM. 2009. 284.
  - [39] Probst MC, Thumann H, Aslanidis C, et al. Screening for functional sequence variations and mutations in ABCA1 [J]. *Atherosclerosis*, 2004, 175(2) : 269–279. DOI:10. 1016/j. atherosclerosis. 2004. 02. 019.

[40]Bochem AE, van Wijk DF, Holleboom AG, et al. ABCA1 mutation carriers with low high-density lipoprotein cholesterol are characterized by a larger atherosclerotic burden [J]. Eur Heart J, 2013, 34 (4) : 286-291. DOI:10.1093/eurheartj/ehs376.

[41]Cohen JC, Kiss RS, Pertsemlidis A, et al. Multiple rare alleles contribute to low plasma levels of HDL cholesterol [J]. Science, 2004, 305 (5685) :

869-872. DOI:10.1126/science.1099870.

(收稿日期:2019-01-24 修回日期:2019-05-06)

(本文编辑:尹卫靖)

## · 临床经验 ·

## 慢性泪囊炎合并慢性鼻-鼻窦炎同期手术疗效评估

高磊 李世超 王卫卫 尹志华 孙占伟 庆惠玲 张俊歌 王广科

郑州大学人民医院 450003

通信作者:王广科, Email:eyebhwgk@163.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.06.008



扫码观看手术视频

慢性泪囊炎为眼科常见病,鼻内镜下泪囊鼻腔造孔术是其  
主要手术方式。临床上慢性泪囊炎患者多合并不同程度鼻部  
疾病,需前期先处理鼻部病变,二期再行泪囊鼻腔造孔术,近年  
来,随着鼻内镜技术的发展,同期鼻内镜下行鼻腔鼻窦手术及  
泪囊鼻腔造孔术逐渐在临床上展开<sup>[1]</sup>,但其疗效仍需进一步证  
实。本研究中对接受鼻内镜下泪囊鼻腔造孔术的慢性泪囊炎  
合并慢性鼻-鼻窦炎患者的术后疗效进行总结。

## 1 资料与方法

## 1.1 病例资料

采用回顾性病例观察研究。纳入 2013 年 1 月至 2017 年 3  
月于郑州大学人民医院就诊的慢性泪囊炎合并慢性鼻-鼻窦炎患  
者 89 例 89 眼。同期手术组 55 例,其中男 6 例,女 49 例;年龄  
18~77 岁,平均(45.0±6.7)岁,年龄 60 岁以上患者 28 例。分  
期手术组 34 例,其中男 4 例,女 30 例;年龄 21~71 岁,平均  
(49.0±7.3)岁,年龄 60 岁以上患者 15 例。同期手术组中 9 例  
患者伴有鼻息肉,分期手术组 4 例患者伴有鼻息肉,术前所有  
患者均接受过药物及泪道冲洗等治疗,效果欠佳,术前常规行  
鼻窦冠状位及轴位 CT(图 1)、鼻内镜及泪道碘油造影检查。术  
前 2 个组患者各基线资料比较,差异均无统计学意义(均  $P >$   
0.05)。所有患者均为首次行鼻腔鼻窦手术及泪囊鼻腔造孔术  
且同时符合慢性泪囊炎及慢性鼻-鼻窦炎的手术适应证,均为单  
侧慢性泪囊炎且同侧合并有慢性鼻-鼻窦炎。术前均排除控制

欠佳的高血压、糖尿病、凝血功能障碍、精神方面疾病等。

## 1.2 方法

1.2.1 手术方法 (1)同期手术组 患者全身麻醉后,取仰卧  
位头稍后仰,操作前用含丁卡因肾上腺素的棉片收缩鼻腔,先  
处理鼻腔鼻窦病变,然后行泪囊鼻腔造孔术。鼻内镜下泪囊鼻  
腔造孔术参考文献<sup>[2]</sup>:第一步以中鼻甲根部及钩突前缘为标  
志,行 2 个间隔 10 mm 的弧形切口,分离并保留局部黏膜瓣,准  
确定位到上颌骨额突及泪骨前部的交界处;第二步 Kerrison 咬  
骨钳配合磨钻从交界处自下而上清除上颌骨额突及泪骨前部,  
充分扩大骨窗,暴露泪囊内壁;第三步用镰状刀“J”或“L”形切  
开泪囊,形成蒂在下方的泪囊黏膜瓣,复位鼻腔黏膜瓣于裸露  
的骨面并将泪囊黏膜瓣与钩突前缘黏膜对合。泪囊腔内填入  
锥形可吸收止血海绵进行扩张,中鼻甲与造瘘孔填塞可吸收止  
血棉起到防粘连作用(视频)。(2)分期手术组 一期先处理鼻  
腔鼻窦病变,待鼻腔鼻窦炎症控制后二期再行鼻内镜下泪囊鼻  
腔造孔术,麻醉和手术方法与同期手术组相似。

1.2.2 术后处理 患者用药按照鼻内镜鼻窦手术围手术期处  
理<sup>[3]</sup>。术后常规行泪道冲洗每周 1 次,连续 4 周。术后 2 周、1  
个月、3 个月、6 个月、1 年随访观察造瘘孔周围情况及鼻腔情  
况,及时处理囊泡、息肉、肉芽组织以及鼻腔黏膜粘连等,之后  
根据不同患者鼻腔黏膜恢复的个体差异,确定复查间隔时间。

1.2.3 疗效评定标准 治愈:患者溢泪、流脓等症状消失,泪  
囊造瘘孔形成,上皮化,泪道冲洗通畅,术后随访患者对术后效  
果满意;好转:溢泪、流脓等症状缓解,泪囊造瘘孔形成,上皮化,  
冲洗泪道通畅或加压后通畅,术后随访患者对术后效果能够接  
受;无效:症状无缓解,冲洗泪道及加压后不通,造瘘孔闭锁,随  
访患者对术后效果不满意<sup>[4]</sup>。治愈和好转相加为有效率。

## 1.3 统计学方法

采用 SPSS 22.0 统计学软件进行统计分析,本研究中计数  
资料比较采用  $\chi^2$  检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

## 2.1 术后随访

同期手术组 40 例治愈,症状消失,造瘘孔通畅;11 例患者  
好转,其中 2 例患者因中鼻甲过于肥大与造瘘孔发生粘连(图

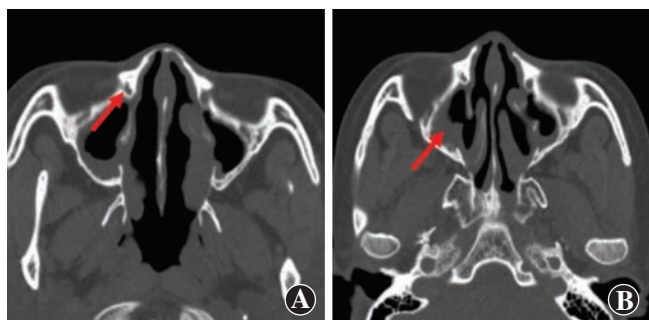


图 1 患者鼻窦轴位 CT A:右侧泪囊可见稍高密度影,体积稍增  
大,且有钙化灶形成(箭头) B:右侧同时合并明显上颌窦黏膜炎性  
病变(箭头)