

· 临床研究 ·

全外显子组测序法对中国先天性白内障一家系致病基因的研究

布娟 刘敬 庞宏蕾 刘峰 王乐今

100191 北京大学第三医院眼科 教育部视觉损伤与修复重点实验室

通信作者:王乐今, Email:wanglejin_puec@sina.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.10.006

【摘要】 **背景** 基因突变是导致遗传性先天性白内障的主要原因,全外显子组测序技术是目前研究致病基因突变较为理想的检测手段。**目的** 应用高通量测序技术对中国汉族常染色体显性遗传先天性白内障(ADCC)一家系的3例患者进行全外显子组测序,筛选该ADCC家系的致病基因。**方法** 采用横断面研究方法,收集中国汉族先天性白内障一家系,共有4代48人家系成员,其中I1和I2已去世。在II、III、IV代中各取1例患者的静脉血8~10 ml,采用全外显子捕获和新一代测序技术进行高通量测序,测序结果与人类HA PMAP8、dbSNP130和1000 Genome Project数据库进行比对,过滤已报道的常见变异后,再过滤掉同义突变,最后通过Sanger法测序排除外显子测序的假阳性结果,筛选出候选基因,并对其进行突变筛查。**结果** 该家系的所有成员中共11例患病者,且各代均有患病者,男女发病比例相当,符合ADCC的遗传规律,所有患者均为核性白内障。全外显子组测序发现,在各候选基因中,主要内源性蛋白(MIP)基因是ADCC的已知基因,故采用Sanger法首先对MIP基因进行验证并确定杂合突变(chr12:56845250 C>T)为该家系的致病突变。该突变位于剪切位点上,造成由第4外显子编码的61个氨基酸被亮氨酸-组氨酸-丝氨酸所替代,导致异常截短蛋白的产生。**结论** MIP基因剪切位点的杂合突变是导致该ADCC家系致病的分子发病机制。

【关键词】 家系; 白内障/遗传; 膜糖蛋白/基因; 突变/基因; 水通道蛋白/遗传; 可变剪切/基因; 常染色体显性遗传; 全外显子组测序; 主要内源性蛋白/基因; 中国人

基金项目: 国家自然科学基金项目(81300789、81470665)

Identification of genetic mutation in a Chinese pedigree with congenital cataract by whole-exome sequencing

Bu Juan, Liu Jing, Pang Honglei, Liu Feng, Wang Lejin

Department of Ophthalmology, Peking University Third Hospital, Key Laboratory of Vision Loss and Restoration, Ministry of Education, Beijing 100191, China

Corresponding author: Wang Lejin, Email:wanglejin_puec@sina.com

[Abstract] **Background** Genetic mutation remains to be the most common cause of congenital cataract. Whole exon sequencing technology is an ideal method to detect the pathogenic gene mutations. **Objective** This study was to identify the pathogenic gene in a Chinese autosomal dominant congenital cataract (ADCC) family by whole-exome sequencing. **Methods** This study complied with Helsinki Declaration and the protocol was approved by Ethic Committee of Peking University Third Hospital. Informed consent was obtained from each subject before any medical examination. A cross-sectional study was designed. A Chinese ADCC family with 4 generations and 48 members were enrolled in Peking University Third Hospital, of which I1 and I2 died. The periphery blood of 8–10 ml was collected from each member of II, III and IV generations for the high throughput sequencing of genes using whole exon trapping and new sequencing technology, and the sequencing results were compared with the data of human HA PMAP8, dbSNP130 and 1000 Genome Project database. The synonymous mutation was filtered after reported common variants, and the false positive results of explicit sequencing were finally excluded by Sanger sequencing and then the candidate genes were identified. The mutation genes were screened to determine the pathogenic gene of this ADCC family. **Results** Eleven ADCC patients were found in this family, and the patients distributed in each generation with an equal chance for involvement in male and female subjects, which conformed to an autosomal dominant inheritance pattern. All the patients were nuclear cataract. Genome-wide whole-exome sequencing found that major

intrinsic protein (*MIP*) gene was known genes of ADCC in initially identified candidate genes, so the Sanger was used to verify the *MIP* gene. The heterozygous mutation of *MIP* gene (chr12:56845250 C>T) appeared to be the pathogenic cause of this ADCC family. The mutation occurred in the splice sites of the gene, resulting in the fourth exon coded-61 amino acids are replaced by leucine, histidine and serine, which lead to the abnormal truncated proteins. **Conclusions** The heterozygous mutation of *MIP* gene is the molecular pathogenesis of this Chinese ADCC family.

[Key words] Pedigree; Cataract/genetics; Membrane glycoproteins/genetics; Mutation/genetics; Aquaporins/genetics; Alternative splicing/genetics; Autosomal dominant; Whole-exome sequencing; Major intrinsic protein/genetics; Chinese

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81300789, 81470665)

先天性白内障是儿童主要的致盲眼病之一,发病率为 0.01% ~ 0.06%,约 1/3 以上的患者与遗传有关。目前先天性白内障的已知致病基因有 44 个,其中与常染色体显性遗传先天性白内障 (autosomal dominant congenital cataract, ADCC) 相关的致病基因至少有 22 个^[1],包括 10 个晶状体蛋白 (crystallin, *CRY*) 基因 (*CRYAA*、*CRYAB*、*CRYBB2*、*CRYBB3*、*CRYBA4*、*CRYBA1/A3*、*CRYGC*、*CRYGD*、*CRYGS*)、4 个膜蛋白基因 [缝隙连接蛋白基因 (*CJA3*、*GJA8*)、主要内源性膜蛋白 (major intrinsic protein, *MIP*) 基因 (*MIP26*) 和晶状体内在膜蛋白 (lens inner membranaire/membran protein, *LIM1/MP*) 基因 (*LIM1/MP19*)]、4 个转录调节因子 (*MAF*、*PITX3*、*HSF4*、*PAX6*)、细胞骨架蛋白基因之一 (*BFSP2*)、上皮细胞激酶基因 (*EPHA2*)、染色质修饰蛋白基因 (*CHMP4B*) 以及铁蛋白轻链基因。随着近年来基因测序技术的迅猛发展,高通量基因测序的成本逐年下降,促进了全外显子组测序技术的临床应用。全外显子组测序技术能检测待测组织中所有突变的外显子基因,是目前研究致病基因突变较为理想的检测手段。由于 ADCC 的致病基因较多,为了广泛收集 ADCC 患者的致病基因谱,积极开展 ADCC 患者的致病基因突变机制的研究,本研究拟利用全外显子组测序的方法对中国汉族一 ADCC 家系的致病基因进行分子遗传学研究。

1 资料与方法

1.1 一般资料

采用横断面研究方法,收集 2011 年在北京大学第三医院眼科就诊的中国汉族先天性白内障一家系,该家系共有 4 代 48 名成员,其中 I 1 和 I 2 已去世。本研究遵循赫尔辛基宣言,所有家系成员检查前均知情同意,并签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 眼科检查 先证者于 2011 年就诊于北京大学

第三医院眼科,详细询问病史及家族史后,纳入家系成员中所有患病者,均经全面的体格检查,排除眼部以外的疾患。所有患者均行视力检查,复方托吡卡胺滴眼液点眼扩瞳后行裂隙灯显微镜检查以观察眼前节表现,采用间接检眼镜行眼底检查。

1.2.2 基因组 DNA 的提取 抽取家系中 10 例患者和 12 例正常人的外周血 8 ~ 10 ml,分离提取基因组 DNA,采用紫外分光光度计和 6 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测样本 DNA 纯度和浓度,然后加入 1 000 μ l TE 置于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中保存备用。

1.2.3 基因组 DNA 全外显子测序 将基因组 DNA 任意打断成约 500 bp 的片段,在 DNA 片段两端分别连接上接头。经过 PCR 库检验合格后的 DNA 片段与 SureSelect 靶向富集系统 (美国 Angilent 公司) 进行杂交捕获,行外显子测序后获得原始数据,经过去污染等过滤处理,比对参考基因组,对采集的数据行标准信息分析流程处理,包括对单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 和 InDel 等进行检测、注释和统计分析,同时对数据进行质控检测,包括测序深度、覆盖度均一性等分析,序列比对使用 bioscope 软件 (美国 ABI 公司)。参考数据库为 NCBI 数据库中的人类 HAPMAP8、dbSNP130 和 1000 Genome Project 数据库。逐步过滤法筛选出候选基因及突变位点。

1.2.4 Sanger 法测序验证候选基因 对于候选突变,扫描 44 个白内障已知基因,发现了一个已知基因—*MIP* 基因的突变,对其进行 Sanger 测序,以确认该突变是否为该家系的致病突变。*MIP* 基因的 PCR 引物序列为 F:5'-AAGTTTGCACCAACCAGCTC-3', R:5'-ACTGCGCCTGTCCAAAAATA-3'。反应总体系包括 10 倍缓冲液 2.5 μ l (Mg^{2+} 1.5 mmol/L)、4 倍 dNTP 2.0 μ l (2 mmol/L)、上下游引物各 0.5 μ l (20 pmol/ μ l)、Taq DNA 聚合酶 1.0 μ l [1 U/ μ l (商品单位)]、模板 DNA 1.0 μ l (100 ng/ μ l),加无菌 ddH₂O 至 25.0 μ l。PCR 反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;95 $^{\circ}$ C 变性 30 s,

56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 45 s, 共 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。行 DNA 扩增产物的纯化及序列分析。

2 结果

2.1 眼科检查

经家系系谱调查和全面的眼科检查发现, 该家系

中发病者在 4 代系谱中连续出现, 患者双亲中有一方患病, 则患者子女中有 1/2 发病, 且男女患病机会均等, 符合常染色体显性遗传特点。该家系 48 名成员中有 11 例患病者, 37 例正常人 (图 1)。患者的发病特点是出生后即双眼患病, 晶状体呈不同程度的核性混浊 (图 2), 视力为数指/眼前 ~0.4。

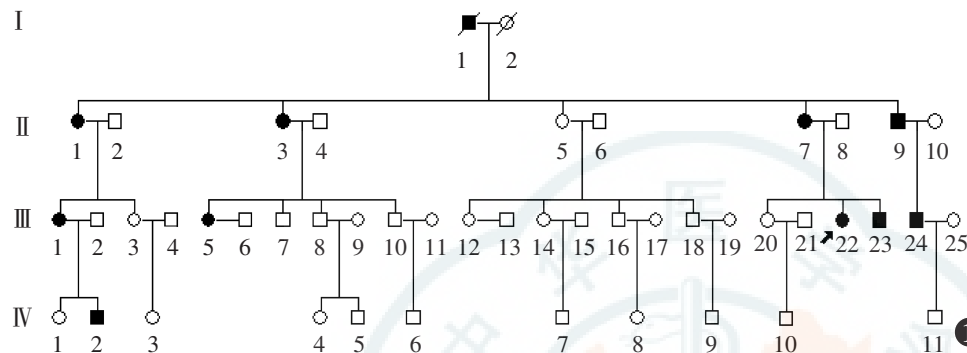


图 1 先天性白内障家系图 □: 正常男性; ○: 正常女性; ■: 患病男性; ●: 患病女性; ▣: 去世男性; ∅: 去世女性; ↗: 先证者 图 2 家系患者典型的眼部裂隙灯显微镜检查图像

2.2 全外显子组测序

2.2.1 样本覆盖度分析 该家系中的 4 个样本 (1 名正常者和 3 例患者) 的基因组全外显子组测序目标区域 (44 M) 的平均深度为 66.44, 平均覆盖率为 99.42%, 测序深度在 10 倍以上的覆盖率为 96.67%。

2.2.2 外显子组测序 每个样本平均检测到的 SNP 数目为 94 936 个, 插入/缺失多态性 (insertion/deletion polymorphisms, InDel) 的数目为 9 256。经过滤公共数据库、内部数据库和遗传模式之后, 有 13 个 SNP 和 2 个 InDel 被保留下来, 其中一个突变 (chr12:56845250 C>T, g. 17701G>A) 是位于先天性白内障已知致病基因 *MIP* 的剪切位点上。

2.3 *MIP* 基因测序

家系中的所有患者存在 *MIP* 基因杂合突变 (chr12:56845250 C>T, g. 17701G>A) (图 3A), 而家系中正常人及 100 例正常对照者未检出该突变 (图 3B)。*MIP* 基因突变发生于剪切位点上, 造成可变剪切, 使得

第 4 个外显子的编码序列和 3' 非翻译区的部分序列被剪切掉, 导致终止密码子的位置发生了改变。其蛋白水平的变化为原本由第 4 外显子编码的 61 个氨基酸被亮氨酸-组氨酸-丝氨酸所替代, 造成 *MIP* 基因编码蛋白的截短, 因此对编码蛋白质的结构产生较大影响 (图 4)。

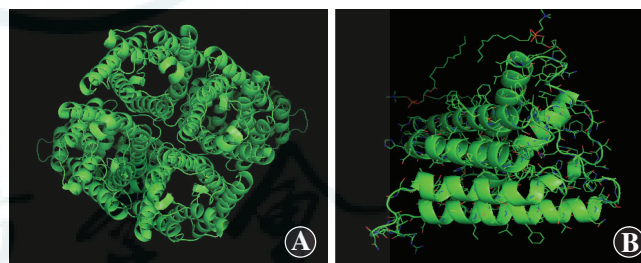


图 4 *MIP* 基因编码的蛋白结构 A: 正常人 *MIP* 基因编码的蛋白呈致密、整齐的螺旋结构 B: 基因突变患者 *MIP* 基因编码的蛋白呈松散、混乱的螺旋或丝状结构

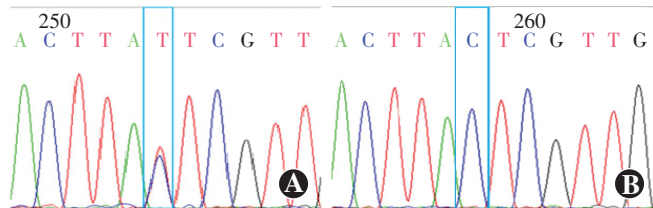


图 3 先天性白内障家系患者及正常人 *MIP* 基因测序结果 A: 先天性白内障家系患者 *MIP* 基因测序结果 B: 先天性白内障家系正常人 *MIP* 基因测序结果

3 讨论

先天性白内障的形态多样, 常见的临床类型为板层性白内障、核性白内障、粉尘状白内障、后极性白内障和前极性白内障^[2]。晶状体由上皮细胞分化而来的纤维细胞组成, 由于缺乏各种细胞器, 这些细胞无法维持自身的代谢活动, 必需由表层的上皮细胞和分化程度较低的纤维细胞提供的水、离子和各种代谢物才能存活。

MIP 是水通道蛋白家族的一员^[3],是晶状体特异性蛋白质,也是成熟晶状体纤维中含量最丰富的膜蛋白,占晶状体细胞膜蛋白总量的 80%,该蛋白由 263 个氨基酸组成,主要表达于晶状体纤维细胞,普遍存在于细胞膜上,参与晶状体的水代谢,通过减少晶状体纤维细胞间的空隙维持晶状体的透明性和内环境稳定。水通道蛋白通常形成四聚体,每个单体是一个功能性的水通道,有助于水流进行双向跨膜运输。

有研究表明,MIP 基因突变与先天性白内障的发生有关^[4-5],迄今为止,导致 ADCC 的 MIP 基因突变类型有 11 种,包括 8 个错义突变、1 个碱基缺失导致的移码突变、1 个密码子突变和 1 个剪切位点突变^[6-15]。外显子和内含子交界处的剪切位点 GT-AG 序列在生物进化史上是极其保守的,该序列上出现任何一个突变都会对基因的转录产生很大影响。本研究中发现 MIP 基因剪切位点突变后,其表达产物与野生型的相比会产生截短或空间结构的改变,形成了异常截短的水通道蛋白,从而影响晶状体的水代谢及其透明性和内环境稳定,导致先天性白内障的发生。

本研究中所发现的 MIP 基因剪切位点的突变与以往报道的突变位置相同^[15],但是本研究家系患者为核性白内障,与报道中的蜗牛状白内障的表型不同,其机制尚不清楚,可能与先天性白内障的高度遗传异质性有关^[16-17],即同一种白内障表型可以由一种或多种致病基因或基因型所引起,并且可以呈现出不同的遗传方式,而多种白内障表现型也可以由同一个基因或同一基因家族的突变所引起。因此,本研究的结果也进一步证实了 MIP 基因突变与 ADCC 的密切关系。有关 MIP 突变后其具体的信号通路等功能机制的研究仍是我们进一步研究的主要方向。

参考文献

- [1] Shiels A, Hejtmanck JF. Genetics of human cataract [J]. Clin Genet, 2013, 84(2): 120-127. DOI:10.1111/cge.12182.
- [2] Ionides A, Francis P, Berry V, et al. Clinical and genetic heterogeneity in autosomal dominant cataract [J]. Br J Ophthalmol, 1999, 83(7): 802-808.
- [3] Francis PJ, Berry V, Bhattacharya SS, et al. The genetics of childhood cataract [J]. J Med Genet, 2000, 37(7): 481-488.
- [4] Berry V, Francis P, Kaushal S, et al. Missense mutations in MIP underlie autosomal dominant "polymorphic" and lamellar cataracts linked to 12q [J]. Nat Genet, 2000, 25(1): 15-17. DOI:10.1038/75538.
- [5] Hejtmanck JF, Smaoui N. Molecular genetics of cataract [J]. Dev Ophthalmol, 2003, 37: 67-82.
- [6] Wang KJ, Li SS, Yun B, et al. A novel mutation in MIP associated with congenital nuclear cataract in a Chinese family [J]. Mol Vis, 2011, 17: 70-77.
- [7] Yang G, Zhang G, Wu Q, et al. A novel mutation in the MIP gene is associated with autosomal dominant congenital nuclear cataract in a Chinese family [J]. Mol Vis, 2011, 17: 1320-1323.
- [8] Lin H, Hejtmanck JF, Qi Y. A substitution of arginine to lysine at the COOH-terminus of MIP caused a different binocular phenotype in a congenital cataract family [J]. Mol Vis, 2007, 13: 1822-1827.
- [9] Wang W, Jiang J, Zhu Y, et al. A novel mutation in the major intrinsic protein (MIP) associated with autosomal dominant congenital cataracts in a Chinese family [J]. Mol Vis, 2010, 16: 534-539.
- [10] Gu F, Zhai H, Li D, et al. A novel mutation in major intrinsic protein of the lens gene (MIP) underlies autosomal dominant cataract in a Chinese family [J]. Mol Vis, 2007, 13: 1651-1656.
- [11] Senthil KG, Kyle JW, Minogue PJ, et al. An MIP/AQP0 mutation with impaired trafficking and function underlies an autosomal dominant congenital lamellar cataract [J]. Exp Eye Res, 2013, 110: 136-141. DOI:10.1016/j.exer.2012.10.010.
- [12] Geyer DD, Spence MA, Johannes M, et al. Novel single-base deletion mutation in major intrinsic protein (MIP) in autosomal dominant cataract [J]. Am J Ophthalmol, 2006, 141(4): 761-763. DOI:10.1016/j.ajo.2005.11.008.
- [13] Xiao X, Li W, Wang P, et al. Cerulean cataract mapped to 12q13 and associated with a novel initiation codon mutation in MIP [J]. Mol Vis, 2011, 17: 2049-2055.
- [14] Jiang J, Jin C, Wang W, et al. Identification of a novel splice-site mutation in MIP in a Chinese congenital cataract family [J]. Mol Vis, 2009, 15: 38-44.
- [15] Jin C, Jiang J, Wang W, et al. Identification of a MIP mutation that activates a cryptic acceptor splice site in the 3' untranslated region [J]. Mol Vis, 2010, 16: 2253-2258.
- [16] Francis PJ, Berry V, Moore AT, et al. Lens biology: development and human cataractogenesis [J]. Trends Genet, 1999, 15(5): 191-196.
- [17] Reddy MA, Francis PJ, Berry V, et al. Molecular genetic basis of inherited cataract and associated phenotypes [J]. Surv Ophthalmol, 2004, 49(3): 300-315. DOI:10.1016/j.survophthal.2004.02.013.

(收稿日期:2016-04-11)

(本文编辑:尹卫靖 刘艳)

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。

(本刊编辑部)