

· 临床研究 ·

先天性特发性眼球震颤家系 *FRMD7* 基因突变分析

杜伟 张野 解正高

扬州大学附属苏北人民医院眼科, 江苏省扬州市 225001

通信作者: 解正高, Email: zhenggaoxie@163.com

【摘要】 目的 分析先天性特发性眼球震颤(ICN)家系 *FRMD7* 基因的致病基因突变。**方法** 收集苏北人民医院眼科就诊的 6 个 ICN 家系, 抽取全部受检者的外周静脉血, 采集同期 100 名正常人静脉血作为正常对照, 提取基因组 DNA, PCR 扩增 *FRMD7* 基因的全部编码区及外显子-内含子交界区剪切位点附近的序列, Sanger 测序法检测 ICN 家系潜在的致病突变。**结果** 通过家系内基因型与表型的共分离验证, 在其中 2 个家系中筛选出 *FRMD7* 基因 3 个致病突变: c. 902A>G, c. 1944T>A 和 c. 1945G>T, 其中错义突变 c. 1944T>A 和无义突变 c. 1945G>T 为新发现突变位点。在 100 个正常对照中未发现相同的突变。其余 4 个家系先证者 *FRMD7* 基因编码区及邻近剪切位点未发现相关有意义的突变。**结论** 发现了 *FRMD7* 基因 2 个新的致病突变位点, 扩展了 ICN 致病基因 *FRMD7* 的突变谱。

【关键词】 先天性特发性眼球震颤; *FRMD7* 基因; 错义突变; 无义突变

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81500759)

DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2019. 09. 008

Mutations analysis of *FRMD7* gene in idiopathic congenital nystagmus families

Du Wei, Zhang Ye, Xie Zhenggao

Department of Ophthalmology, Subei People's Hospital Affiliated to Yangzhou University, Yangzhou 225001, China

Corresponding author: Xie Zhenggao, Email: zhenggaoxie@163.com

【Abstract】 Objective To reveal the pathogenic mutations in Chinese families with idiopathic congenital nystagmus (ICN). **Methods** Six families with ICN were recruited from Subei People's Hospital. DNA was extracted from peripheral blood samples of all participants. All coding and exon-intronic boundary regions of the targeted gene *FRMD7* were amplified with PCR and sequenced using Sanger sequencing to detect potential pathogenic mutations. This study followed the Helsinki Declaration and was approved by the Ethics Committee of Subei People's Hospital (NO. 2015KY-126). All patients or their guardians signed informed consent. **Results** Three mutations (c. 902A>G, c. 1944T>A and 1945G>T) were screened in two families after co-segregation validation of intrafamilial genotype-phenotype, c. 1944T>A and 1945G>T were newly detected mutations which were not detected in 100 normal controls. No significant mutations were found in the *FRMD7* coding region and adjacent splicing sites in the probands of the other four families. **Conclusions** Two novel pathogenic mutations of *FRMD7* are discovered, which expands the pathogenic mutational spectrum of *FRMD7* gene causing ICN.

【Key words】 Idiopathic congenital nystagmus; *FRMD7* gene; Missense mutation; Nonsense mutation

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81500759)

DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2019. 09. 008

先天性特发性眼球震颤 (idiopathic congenital nystagmus, ICN) 是因控制眼球运动的神经系统出现障碍导致眼球不自主运动的一种疾病, 常在婴幼儿发病。该病常导致视网膜上影像过多晃动和黄斑注视时间的减少, 从而造成严重视力损害^[1]。该疾病表现为较大的遗传和临床异质性, 其致病基因也尚未完全明确。ICN 较常见的遗传方式为 X 染色体连锁遗传, 其主要

的致病基因位点有 Xq26.2、Xp11.4 和 Xp22.3^[2-4]。有报道称约 47% 的中国先天性眼球震颤家系是由 *FRMD7* 基因突变所致^[5]。迄今, ICN 仍未有较好的治疗手段。分子诊断不仅能有效地辅助临床诊断, 还能为 ICN 家系提供有效的产前诊断及遗传咨询。本研究中对 6 个有遗传家族史 ICN 家系的 *FRMD7* 基因进行突变位点分析, 以期扩展 *FRMD7* 基因的突变谱。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集苏北人民医院确诊的 6 个 ICN 家系的临床资料,并抽取受检者 4 ml 静脉血。采集同期 100 名无任何眼部疾患的正常人静脉血样本作为正常对照,本研究方案经苏北人民医院伦理委员会批准(批文号:2015KY-126),并且严格遵循赫尔辛基宣言,本研究患者和/或监护人均知情并签署知情同意书。

1.2 方法

对家系患者进行详细的眼科检查,包括裂隙灯显微镜、眼底检查、最佳矫正视力(best corrected visual acuity, BCVA)和眼球运动及眼位检查。使用 DNA 分离试剂盒(美国 Roche Diagnostics 公司)提取人类基因组 DNA,通过 PCR 反应扩增 *FRMD7* 基因的全部编码区及外显子-内含子交界区剪切位点附近的序列,引物序列见表 1。纯化 PCR 产物后加入 Bigdye 进行测序反应,通过 ABI-3130 遗传分析仪(美国 ABI 公司)行扩增产物的双向 Sanger 直接测序。将测序得到的 DNA 序列与标准序列进行严格比对后,得到单核苷酸变异及插入和缺失变异,检测出的所有变异在 dbSNP14 (<http://hgdownload.cse.ucsc.edu/goldenPath/hg19/database/snp144.txt.gz>)、HapMap project (<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/hapmap>)、1000 Genome Project (<ftp://ftp.1000genomes.ebi.ac.uk/vol1/ftp>)、YH database (<http://yh.genomics.org.cn/>)、Exon Variant Server (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>)及 ExAC database (<http://exac.broadinstitute.org/>) 6 个单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)数据库中进行比对,滤过已出现的杂合变异,并在 100 名正常对照中检测有无相同突变发生,进一步在其他家系成

员中进行基因型及表型的共分离验证以确定致病突变。*FRMD7* 基因序列参考 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 网站。

表 1 *FRMD7* 基因引物序列

外显子	引物序列(5'-3')	产物长度(bp)
1	F:GCTGAGTTTAAGAAGGCTAGAGG R:ATTGCTATTGTTGCCCTTGAG	563
2	F:AAGGTAATTTGCAGATGTAGC R:ACAAAGAGGGAGGACAAAACACTAG	548
3	F:AGGGGCGAGATTAACGCTAG R:GCAGTGCCAGAAAATGAGATA	505
4	F:GAGGGGACGGAAGAGGAGAGC R:GGCATAACCCCAAGTGGATAC	450
5	F:CCCAAAAAGGCATCTGACTG R:AGGCCATGCTGTTTCTCTCTATC	375
6,7	F:CCAAACACACACCCCCTATAG R:CCTATTTCTGTCCCATCTATCC	851
8	F:ACCCCTTCTTGCTTGCATTC R:GGCAAAAAGAAAAGACACACCATC	440
9	F:GGAGCCAAGTGGAAAATCAGAAG R:CCCATCTTCTCCCTCCTAGTTAG	480
10,11	F:GCCTTCTGACTAGTTGAGTTGT R:GCCAGTCTCTCCAGTCTATAAGG	676
12-1	F:TCTGGAAGTAGGATGGCATTGAG R:TGATTGGCTCTGGGACCTTTTA	975
12-2	F:CCCAATTAGAGCAGAGGAAAAGG R:GCCAACCCTACTGTCACCATTC	962

注:F:正义链;R:反义链

2 结果

所有患者均临床确诊为 ICN,并且均表现为水平型眼球震颤,未发现眼部器质性病变或全身系统性疾病。在家系 1(图 1A)和家系 2(图 1B)中发现了 *FRMD7* 基因的致病突变。其余参与研究的家系 3~6(图 1C~F)中未发现 *FRMD7* 基因编码区及邻近剪切位点的相关突变。

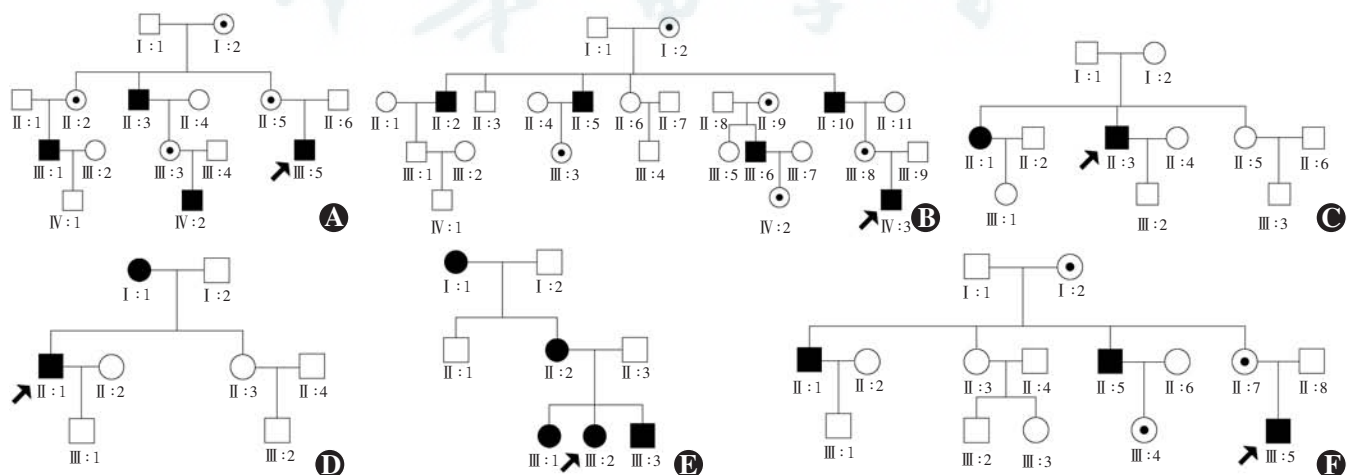


图 1 ICN 家系图 A:家系 1 B:家系 2 C:家系 3 D:家系 4 E:家系 5 F:家系 6 □:正常男性;○:正常女性;■:男性患者;●:女性患者;○:女性携带者;↗:先证者

家系 1 中 15 个成员参与本研究,4 例男性患者以双眼先天性水平眼球震颤为主要表现(表 2),伴轻度视力损害,其中视力最好的双眼视力均可达 1.0。2 例患者伴有间歇性外斜视,先证者伴有双眼外展不到位,右眼内转时合并异常下转,上转差。其余眼前节和眼底均未见明显异常。先证者的 *FRMD7* 基因测序结果显示第 9 号外显子的错义突变 c. 902 A>G,氨基酸改变为 p. Y301C(图 2)。蛋白序列同源性分析结果提示,p. Y301C 突变所对应的第 301 号氨基酸位点在多个物种中均高度保守。家系内共分离验证结果显示,该家系中男性患者均携带该突变,女性携带者未发病。正常对照中未检测到该突变。该突变既往文献中已有报道^[2]。

表 2 ICN 家系 1 患者临床表现

患者	年龄(岁)	BCVA		眼球震颤类型及是否合并斜视
		右眼	左眼	
II 3	55	0.4	0.6	水平冲动型,无斜视
III 1	35	0.8	0.6	水平冲动型,无斜视
III 5	16	0.3	0.4	水平冲动型,外斜视合并眼球运动异常
IV 2	6	0.5	0.6	水平冲动型,间歇性斜视

注:ICN:先天性特发性眼球震颤;BCVA:最佳矫正视力

家系 2 中 24 个成员参与本研究,5 例男性患者主要表现为双眼先天性水平眼球震颤(表 3),伴有不同程度的视力损害(单眼视力 0.3~0.6)。眼前后节检查均未见明显异常。先证者的 *FRMD7* 基因测序结果发现第 12 号外显子的 1 个错义突变 c. 1944T>A 和 1 个无义突变 c. 1945G>T,氨基酸改变分别为 P. S648R 和 E649X(图 3)。家系内共分离验证结果显示,该家系中男性患者均携带这 2 个突变并临床上表现为 ICN,女性携带者未发病。正常对照中未检测到该突变。dbSNP 数据库及既往文献中尚未有这 2 个突变的相关报道。

表 3 ICN 家系 2 患者临床表现

患者	年龄(岁)	BCVA		眼球震颤类型
		右眼	左眼	
II 2	71	0.3	0.4	水平冲动型
II 5	68	0.4	0.6	水平冲动型
II 10	53	0.4	0.5	水平冲动型
III 6	38	0.5	0.5	水平冲动型
IV 3	4	0.6	0.5	水平冲动型

注:ICN:先天性特发性眼球震颤;BCVA:最佳矫正视力

家系 3~6 均选取先证者行 *FRMD7* 基因编码区及邻近剪切位点测序,未发现相关有意义的突变。其中

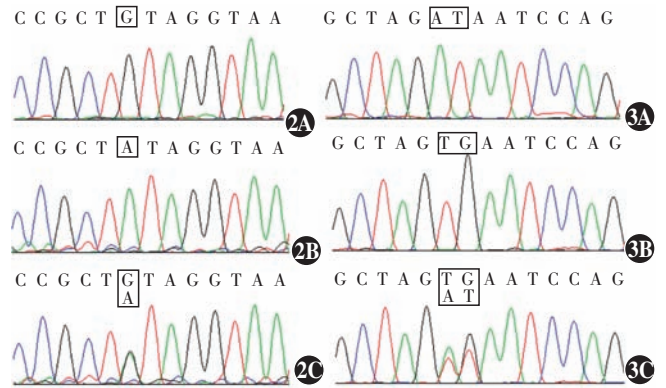


图 2 家系 1 *FRMD7* 基因突变位点分析 显示 *FRMD7* 基因突变(c. 902 A>G) A:先证者测序图 B:正常对照者测序图 C:女性携带者测序图 图 3 家系 2 *FRMD7* 基因突变位点分析 A:先证者测序图 B:正常对照者测序图 C:女性携带者测序图 显示 *FRMD7* 基因 2 个突变位点 c. 1944T>A 和 c. 1945G>T

家系 3、4 和 5 中患者均表现为双眼先天性水平眼球震颤,伴有不同程度视功能损害,眼前节和眼底检查均未见明显异常。由于家系成员较少,这 3 个家系难以判断为常染色体遗传还是 X 染色体连锁遗传。家系 6 中所有患者均为男性,且先证者为隔代遗传,考虑 X 连锁隐性遗传可能性较大,家系所有患者亦表现为双眼先天性水平性眼球震颤,同时合并-6.00~-10.00 DS 的高度近视,但所有患者视力损害较小,双眼矫正视力均为 0.8~1.0,眼前节和眼底检查均未见明显异常。

3 讨论

FRMD7 基因有 12 个外显子,总长度 3 186 bp,编码 714 氨基酸残基组成的酵母功能域包含蛋白 7(ferm domain containing protein 7, *FRMD7*),在神经元发育过程中起重要作用。其中超过 70 个突变被人类基因突变数据库(The human gene mutation database, HGMD)收录,包括错义突变、无义突变、移码突变、插入突变、剪接位点突变和大片段缺失等^[2,6-15]。He 等^[5]推断 *FRMD7* 基因突变在中国 X 连锁遗传的 ICN 家系发病中起主要作用,并通过分析既往文献发现在中国约 47% X 连锁遗传的 ICN 家系有 *FRMD7* 基因突变。

在家系 1 中存在 *FRMD7* 基因的 c. 902A>G 突变。该基因突变导致 *FRMD7* 基因所编码蛋白的第 301 号氨基酸从酪氨酸突变为半胱氨酸(p. Y301C)。蛋白序列同源性分析结果提示,*FRMD7* 第 301 号氨基酸位点在多个物种中均高度保守,提示该碱基位点的突变对基因功能有较大影响。在家系 2 中存在 2 个 *FRMD7* 基因突变位点:c. 1944T>A 和 c. 1945G>T,造成 *FRMD7* 编码蛋白的羧基末端合成被截断,而羧基末端在该蛋白亚细胞水平的定位中起着重要作用^[16]。该

突变会产生截短的转录本,通过无义介导的 mRNA 衰变细胞保护性机制而降解。值得注意的是,家系 2 中的 2 个突变位于同一条染色体上,因而无法通过单个突变位点的共分离验证来明确 c. 1944T>A 错义突变的致病性。明确了家系的致病突变,可根据家系中疾病的遗传特点和家系成员是否携带突变进行遗传咨询,推断子代患病风险,甚至进行产前诊断。本研究中有 4 个家系未发现 *FRMD7* 基因编码区及剪切区域有意义的突变,提示可能有其他基因的突变导致该疾病的发病。

FRMD7 是建立神经元回路极性的重要调节器^[17]。研究发现,*FRMD7* 在胚胎第 37 天表达于控制眼球运动的中脑和后脑;胚胎第 56 天表达于前脑室、中脑、小脑原基和视网膜神经层。*FRMD7* 基因与另外 2 种含有 FERM 结构域的基因 *FARP1* 和 *FARP2* 具有同源性,这 2 个基因编码的蛋白在神经元树突和轴突的生长和分化过程中起重要的调控作用^[2],同时近年研究也发现 *FRMD7* 基因在神经元发育,特别是控制稳定眼球运动的中脑和小脑部分扮演着重要角色,特别是在轴突和树突的延长中起重要作用^[18-19]。Pu 等^[20]研究表明,*FRMD7* 基因在 *Rac1* 信号激活中起作用,而 *Rac1* 能调节肌动蛋白纤维的重组并控制神经元的生长,羧基末端截断的 *FRMD7* 蛋白几乎不能与 Rho-GDP 解离抑制因子 α 相互作用,从而也不能激活 *Rac1* 信号通路。因此我们推测 *FRMD7* 基因突变可能通过影响 *Rac1* 信号激活和重塑肌动蛋白细胞骨架来影响动眼神经元的发育,进而造成眼球震颤发病^[21]。

综上所述,本研究结果发现了 *FRMD7* 基因新的致病突变 c. 1944T>A 和 c. 1945G>T,进一步扩展了 ICN 致病基因 *FRMD7* 的突变谱。尽管 ICN 的发病机制目前尚不十分清楚,但通过对致病基因的探索可以进一步加深对疾病的认识,为该疾病的诊治技术的发展和遗传咨询提供帮助。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Papageorgiou E, McLean RJ, Gottlob I. Nystagmus in childhood [J]. *Pediatr Neonatol*, 2014, 55 (5) : 341-351. DOI: 10. 1016/j. pedneo. 2014. 02. 007.
- [2] Tarpey P, Thomas S, Sarvananthan N, et al. Mutations in *FRMD7*, a newly identified member of the FERM family, cause X-linked idiopathic congenital nystagmus [J]. *Nat Genet*, 2006, 38 (11) : 1242-1244. DOI: 10. 1038/ng1893.
- [3] Cabot A, Rozet JM, Gerber S, et al. A gene for X-linked idiopathic congenital nystagmus (NYS1) maps to chromosome Xp11. 4-p11. 3 [J]. *Am J Hum Genet*, 1999, 64 (4) : 1141-1146. DOI: 10. 1086/302324.
- [4] Liu JY, Ren X, Yang X, et al. Identification of a novel GPR143

- mutation in a large Chinese family with congenital nystagmus as the most prominent and consistent manifestation [J]. *J Hum Genet*, 2007, 52 (6) : 565-570. DOI: 10. 1007/s10038-007-0152-3.
- [5] He X, Gu F, Wang Z, et al. A novel frameshift mutation in *FRMD7* causing X-linked idiopathic congenital nystagmus [J]. *Genet Test*, 2008, 12 (4) : 607-613. DOI: 10. 1089/gte. 2008. 0070.
- [6] Choi JH, Shin JH, Seo JH, et al. A start codon mutation of the *FRMD7* gene in two Korean families with idiopathic infantile nystagmus [J/OL]. *Sci Rep*, 2015, 5 : 13003 [2019-01-23]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26268155>. DOI: 10. 1038/srep13003.
- [7] Zhao H, Huang XF, Zheng ZL, et al. Molecular genetic analysis of patients with sporadic and X-linked infantile nystagmus [J/OL]. *BMJ Open*, 2016, 6 (4) : e010649 [2019-01-20]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27036142>. DOI: 10. 1136/bmjopen-2015-010649.
- [8] Gupta S, Pathak E, Chaudhry VN, et al. A novel mutation in *FRMD7* causes X-linked idiopathic congenital nystagmus in a North Indian family [J]. *Neurosci Lett*, 2015, 597 : 170-175. DOI: 10. 1016/j. neulet. 2015. 04. 037.
- [9] AlMoallem B, Bauwens M, Walraedt S, et al. Novel *FRMD7* mutations and genomic rearrangement expand the molecular pathogenesis of X-linked idiopathic infantile nystagmus [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2015, 56 (3) : 1701-1710. DOI: 10. 1167/iovs. 14-15938.
- [10] Kohmoto T, Okamoto N, Satomura S, et al. A *FRMD7* variant in a Japanese family causes congenital nystagmus [J/OL]. *Hum Genome Var*, 2015, 2 : 15002 [2019-01-18]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27081518>. DOI: 10. 1038/hgv. 2015. 2.
- [11] Guo Y, Song Z, Xu H, et al. Heterogeneous phenotype in a family with the FERM domain-containing 7 gene R335X mutation [J]. *Can J Ophthalmol*, 2014, 49 (1) : 50-53. DOI: 10. 1016/j. cjo. 2013. 09. 001.
- [12] Zhang X, Ge X, Yu Y, et al. Identification of three novel mutations in the *FRMD7* gene for X-linked idiopathic congenital nystagmus [J/OL]. *Sci Rep*, 2014, 4 : 3745 [2019-01-21]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24434814>. DOI: 10. 1038/srep03745.
- [13] Zhu Y, Zhuang J, Ge X, et al. Identification of a novel mutation p. I240T in the *FRMD7* gene in a family with congenital nystagmus [J/OL]. *Sci Rep*, 2013, 3 : 3084 [2019-01-21]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24169426>. DOI: 10. 1038/srep03084.
- [14] Liu Z, Mao S, Pu J, et al. A novel missense mutation in the FERM domain containing 7 (*FRMD7*) gene causing X-linked idiopathic congenital nystagmus in a Chinese family [J]. *Mol Vis*, 2013, 19 : 1834-1840.
- [15] 汪洋. X 连锁先天性眼球震颤一家系致病基因研究 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2017, 35 (8) : 725-726. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2017. 08. 012.
- [16] Pu J, Li Y, Liu Z, et al. Expression and localization of *FRMD7* in human fetal brain, and a role for F-actin [J]. *Mol Vis*, 2011, 17 : 591-597.
- [17] Yonehara K, Fiscella M, Drinnenberg A, et al. Congenital nystagmus gene *FRMD7* is necessary for establishing a neuronal circuit asymmetry for direction selectivity [J]. *Neuron*, 2016, 89 (1) : 177-193. DOI: 10. 1016/j. neuron. 2015. 11. 032.
- [18] Betts-Henderson J, Bartesaghi S, Crosier M, et al. The nystagmus-associated *FRMD7* gene regulates neuronal outgrowth and development [J]. *Hum Mol Genet*, 2010, 19 (2) : 342-351. DOI: 10. 1093/hmg/ddp500.
- [19] Self J, Haitchi HM, Griffiths H, et al. *FRMD7* expression in developing mouse brain [J]. *Eye (Lond)*, 2010, 24 (1) : 165-169. DOI: 10. 1038/eye. 2009. 44.
- [20] Pu J, Mao Y, Lei X, et al. FERM domain containing protein 7 interacts with the Rho GDP dissociation inhibitor and specifically activates *Rac1* signaling [J/OL]. *PLoS One*, 2013, 8 (8) : e73108 [2019-01-29]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23967341>. DOI: 10. 1371/journal.pone. 0073108.
- [21] Watkins RJ, Thomas MG, Talbot CJ, et al. The role of *FRMD7* in idiopathic infantile nystagmus [J/OL]. *J Ophthalmol*, 2012, 2012 : 460956 [2019-01-01]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21904664>. DOI: 10. 1155/2012/460956.

(收稿日期:2019-03-01 修回日期:2019-07-29)

(本文编辑:张宇)