

土家族高度近视患者 *P4HA2* 基因突变筛查

杨琳¹ 李拓² 蔡小军¹ 柯敏¹ 陈中山¹

¹武汉大学中南医院眼科 430071; ²恩施州中心医院眼科 445000

通信作者:陈中山, Email: CZS1112@163.com

【摘要】 **目的** 探索 *P4HA2* 基因在土家族高度近视人群中的突变情况。 **方法** 收集 2015 年 6 月至 2017 年 6 月土家族双眼屈光度 ≥ 6.0 DS 且眼轴长度 ≥ 26 mm 的高度近视患者 288 例,对患者行眼科相关检查并采集外周静脉血 5 ml,用酚氯仿法抽提患者外周血 DNA。通过 Sanger 测序筛查 *P4HA2* 基因可能的致病突变。对于发现的疑似致病突变,均在同地区 192 例正常人群中进行验证,并通过生物信息学分析预测基因突变的致病性。 **结果** 本研究在 288 例土家族高度近视患者中共发现 4 个 *P4HA2* 基因突变,包括 1 个错义突变 (c. 145C>A)、2 个内含子突变 (c. 1306-62C>T, c. 82+22C>T) 和 1 个插入突变 (c. 179+16_179+17 ins T),其中 2 个内含子突变及 1 个插入突变通过在线预测不致病,而错义突变 c. 145C>A 通过 Polyphen2 在线预测为可疑致病,参照美国 ACMG 的标准,此变异致病性不确定。 **结论** *P4HA2* 基因错义突变 c. 145C>A 为土家族高度近视患者可疑致病基因突变。

【关键词】 高度近视; *P4HA2* 基因; Sanger 测序; 基因突变

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.09.010

Mutation screen of *P4HA2* gene in Tujia high myopia patients

Yang Lin¹, Li Tuo², Cai Xiaojun¹, Ke Min¹, Chen Zhongshan¹

¹Department of Ophthalmology, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, China; ²Department of Ophthalmology, Central Hospital of Enshi Autonomous Prefecture, Enshi 445000, China

Corresponding author: Chen Zhongshan, Email: CZS1112@163.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the mutation of *P4HA2* gene in Tujia high myopia patients. **Methods** Clinical data and genomic DNA were collected from 288 Tujia patients with high myopia, whose spherical error ≥ -6.00 diopters and axial length ≥ 26 mm. All coding exons regions of *P4HA2* were screened in patients to detect causative mutation by Sanger sequencing. The detected mutation was further screened in 192 normal control chromosomes in the same district. The pathogenicity of genetic mutations was predicted through bioinformatics analysis. This study followed the Declaration of Helsinki. All patients or their guardians signed informed consent.

Results Four variations of *P4HA2* gene were found in 288 patients, including one missense mutations (c. 145C>A), two in-containing mutations (c. 1306-62C>T, c. 82+22C>T) and one insertion mutation (c. 179+16_179+17 ins T). Missense mutation c. 145C>A was predicted as suspicious pathogenic gene by Polyphen2. According to the standard of ACMG in the United States, the variation was uncertain in pathogenicity. **Conclusions** Missense mutation c. 145C>A in *P4HA2* gene is a suspicious pathogenic gene mutation in Tujia patients with high myopia.

【Key words】 High myopia; *P4HA2* gene; Sanger sequence; Gene mutation

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.09.010

近视是全球性公共卫生问题^[1],中国青少年近视发生率高达 64.9%^[2]。由于高度近视往往会导致一些并发症,包括巩膜、脉络膜及视网膜色素上皮的变性,视网膜脱离,白内障以及青光眼,被认为是常见的致盲眼病之一^[3]。流行病学研究显示,高度近视有很强的遗传性^[4]。通过全基因组关联研究已经鉴定了

许多近视的易感基因,包括与神经递质功能相关基因 (*GJD2*、*RASGRF1* 和 *GRIA4*)、视磺酸代谢相关基因 (*RDH5*、*RGR* 和 *RORB*)、离子通道相关基因 (*KCNQ5*、*KCN12*、*KCNMA1* 和 *CACNAID*) 以及眼和中枢神经系统发育相关基因 (*SIX6*、*CHD7*、*ZIC2* 和 *PRSS56*)^[5]。研究者们也已经筛查出一些与高度近视相关的基因和位

点,如 *CTNND2*、*SNTB1*、*VIPR2*、*ZFHX1B*、11q24.1、13q12.12、4q25 和 1q14^[5]。然而,这些基因和位点极少被重复验证,除了 *SNTB1* 曾被 2 个独立的全基因组关联研究验证^[6-7]。除此之外,通过对家系的全外显子测序或者克隆研究已经鉴定出与高度近视相关的 4 个常染色体显性遗传基因 (*ZNF644*^[8]、*CCDC111*^[9]、*SCO2*^[10] 和 *SLC39A5*^[11]) 和 2 个常染色体隐性遗传基因 (*LEPREL1*^[12] 和 *LRPARI*^[13])。然而这些候选基因仅在少部分高度近视患者中出现,不同种族和地域高度近视的发病率也存在显著差异,其致病基因也存在异质性^[14]。*P4HA2* 基因是最新报道的与中国汉族人群高度近视相关的致病基因^[15],但其与土家族高度近视人群的关系尚不明确。本研究拟在土家族高度近视人群中筛查 *P4HA2* 基因可能的致病突变,进一步探索 *P4HA2* 基因与土家族高度近视的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集恩施州中心医院 2015 年 6 月至 2017 年 6 月眼科门诊或住院部诊断为高度近视散发或家系的先证者 288 例,同时收集正常对照 192 人。高度近视纳入标准:(1)籍贯为恩施土家族;(2)早发性高度近视,双眼屈光度 ≥ -6.0 D 并且眼轴长度 >26 mm。排除标准:夜盲、眼球震颤、斜视之外的其他眼部疾病以及全身病变。正常对照人群纳入标准:(1)籍贯为恩施土家族;(2)屈光度为 $+0.5 \sim -0.5$ D;(3)双眼裸眼视力大于 0.8;(4)无近视家族史,无其他眼部或全身病变;(5)双眼无任何眼部手术史,未配戴角膜接触镜;(6)参与个体之间无血缘关系。每例患者和正常对照均被告知本研究的目的和意义,并签署知情同意书,未成年人由其监护者代签。本研究设计遵循赫尔辛基宣言。

1.2 方法

1.2.1 临床检查 所有受试者均由相同的经验丰富的眼科医生行全面的眼科检查,包括眼压测量,屈光度检测(KR-8000 电脑验光仪,日本 Topcon 公司),最佳矫正视力(best corrected visual acuity, BCVA)测量,裂隙灯显微镜(日本 Topcon 公司)检查,眼轴长度、角膜曲率和前房深度测量(IOL Master 5.0 光学生物测量仪,德国 Carl Zeiss 公司),眼底照相(CNAN-CR-2,日本 Topcon 公司)。记录每例患者发病信息,包括发病年龄、首次配镜年龄及度数、眼病家族史及家系图、其他眼病史和手术史以及眼部检查情况,并且登记每例患者 2 个有效联系电话和 1 个有效联系地址,以备检测到突变后与患者联系。

1.2.2 DNA 提取及 *P4HA2* 基因扩增 抽取先证者及正常对照者外周静脉血 5 ml,按全血溶解法及酚抽提法提取白细胞基因组 DNA。将 DNA 溶于 200 μ l 1 倍 TE 中,室温下溶解过夜,使用 Nanodrop 测定吸光度(A)值,并且记录 $A_{260/280}$ 和 $A_{260/230}$ 的比值。首先搜索相关的人类基因组碱基序列,通过人类基因组数据库(www.ncbi.nlm.nih.gov);然后应用在线软件 Primer3 web(http://primer3.ut.ee/)设计基因的引物扩增 *P4HA2* 基因编码区 14 个外显子,引物序列和目的片段长度见表 1;引物需满足的条件有:(1)引物序列长度为 18 ~ 23 bp;(2)引物 GC 含量不超过 60%;(3)退火温度为 58 ~ 60 $^{\circ}$ C。将设计好的引物序列发送至上海生工生物技术有限公司,由公司合成相应的引物并用高亲和力纯化方法进行纯化。

表 1 *P4HA2* 基因 PCR 扩增引物序列

外显子	引物序列(5'-3')	扩增长度(bp)	退火温度($^{\circ}$ C)
E1	正向 ACTTTGTTGATGCAGTGATTGTC	186	58
	反向 CATGTGAGCCAAGGTGTCAG		
E2	正向 TATTCTGTGCCCAAGGAAG	472	58
	反向 GCACTGGCATGAAGTAACCA		
E3	正向 TATGTGGGTGGACGCATTAG	348	58
	反向 GAAGGGAGAGACCCATGAGA		
E4	正向 CTGGAGTCATCAGGGACAAC	362	58
	反向 TCCCCCCTAAAGAGACAC		
E5	正向 ATGTCCGATGGAGTTCTGCT	419	58
	反向 CAGTTCCTCTGCCACTCTCC		
E6	正向 GCTGGGAGAGAAACCCCTTACA	569	58
	反向 CCCAACAGTGAGTGAAGCAA		
E7	正向 GTCCAAACTCTGGTCTCA	488	58
	反向 GCAAACCAACCACCCATAGT		
E8-9	正向 GGAGAAGGGATGAGCAGTGA	720	58
	反向 CCCTGTGAGACCATCTAGCC		
E10	正向 GCTCTGGGAGTTCTGGTTG	259	58
	反向 GATGTGGAGGCTGAAATGCT		
E11	正向 ACTCCATGCCCTAGCCAGAA	467	58
	反向 GTGCTGAGAGCCAGAAGGAC		
E12	正向 ACCTTGTCATGTCTTTGTGG	188	58
	反向 GCCTTGCTTCAACCTCTGAC		
E13	正向 CATGGGAAAATGAGGGTGT	266	58
	反向 ATAAGCAAAGCCCAAGCTGA		
E14	正向 AGGAGTCATTCATTAGGCTAC	673	58
	反向 TGAAATCCAAGACCCAAGATG		

1.2.3 测序分析及突变筛查 取纯化后的 PCR 扩增产物,使用 ABI3100 遗传分析仪进行 Sanger 测序。将

每个先证者的测序结果输入 Lasergene 软件包 (Lasergene8.0, DNASTAR, Madison, WI) 的 SeqMan II 程序,与 NCBI 人类基因组数据库中的基因标准进行序列比对。突变按照人类基因组变异协会 (<http://www.hgvs.org>) 的命名规则进行命名。对错义突变,从 NCBI 网站上查找不同物种基因的氨基酸序列,输入 Lasergene 软件包的 MegAlign 程序,进行不同物种蛋白质序列比对,判断变异所在位点的保守性,应用在线软件 Polyphen2 分析其致病性。

2 结果

纳入土家族高度近视患者 288 例,其中男 158 例,女 130 例;有家系遗传史的患者 192 例,通过对患者行 *P4HA2* 基因的 Sanger 测序共发现 4 个 *P4HA2* 基因突变,包括 1 个错义突变 (c. 145C>A),2 个内含子突变 (c. 1306-62C>T、c. 82+22C>T),1 个插入突变 (c. 179+16_179+17 ins T),4 个 *P4HA2* 基因突变的 Sanger 测序的结果如图 1 所示。内含子突变 c. 1306-62C>T、

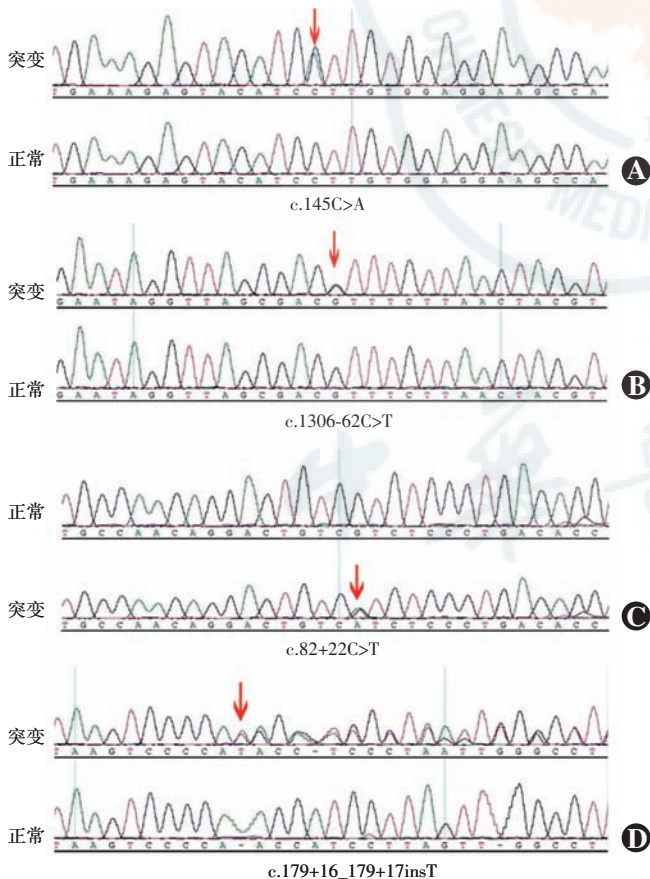


图 1 *P4HA2* 基因突变阳性患者 Sanger 测序结果 A: 错义突变 (c. 145C>A) Sanger 测序结果 B: 内含子突变 c. 1306-62C>T Sanger 测序结果 C: 内含子突变 c. 82+22C>T Sanger 测序结果 D: 插入突变 c. 179+16_179+17 insT Sanger 测序结果 上方为患者测序结果,下方为正常人群测序结果

c. 82+22C>T及插入突变通过在线预测不致病,而错义突变 c. 145C>A 通过 Polyphen2 在线预测可疑致病,参照美国 ACMG 的标准^[16]此变异致病性不确定,通过 ExAC Browser 外显子集合数据库网站查询正常人群中不存在该突变。错义突变 (c. 145C>A) 发生在 1 例 48 岁土家族男性患者,视力右眼 -15.0 DS→0.15,左眼 -16.5 DS→0.1;眼轴长度右眼为 29.3 mm,左眼为 30.7 mm;患者双眼前节未见明显异常,双眼底呈豹纹样眼底改变,可见散在小片状漆裂纹,视盘周围可见脉络膜萎缩。该患者母亲已故,由于患者女儿在外地,未能搜集到样本,该患者父亲和姐姐均无高度近视,通过对该患者父亲和姐姐进行 *P4HA2* 基因检测,未发现此突变,符合家系共分离验证 (图 2)。

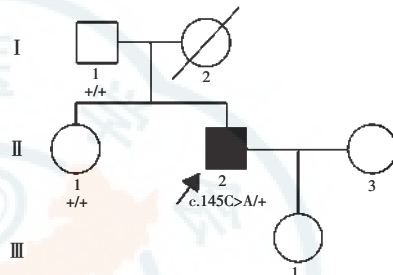


图 2 错义突变 (c. 145C>A) 患者家系图 ■: 患病男性; ○: 正常女性; ♂: 先证者; /: 证 (图 2)。已去世; +: 不携带突变基因

3 讨论

土家族是中国 55 个少数民族中的人口数量最多的十个少数民族之一。土家族主要分布在武陵山脉及其邻近地区,湖北恩施地区是土家族聚居地之一。湖北恩施地区水险山高,交通闭塞,人类迁徙少,且多年以前土家族以自给自足为主,当地居民大部分是农民,受教育程度低,近距离用眼少,该地区人群由于环境因素导致高度近视的可能性较小,本研究中以湖北恩施地区土家族人群作为对象具有明显的意义。本研究中通过对 288 例土家族高度近视患者行 *P4HA2* 基因 Sanger 测序分析,在 1 例 48 岁患有高度近视的土家族男性患者 *P4HA2* 基因中发现了 1 个可能与高度近视相关的错义突变 c. 145C>A,此突变在 192 个同地区正常人群中未发现并符合家系共分离验证,通过 Polyphen2 在线预测为可疑致病,参照美国 ACMG 的标准推测此变异致病性不确定。该可疑的致病突变在土家族高度近视患者中突变频率较低 (1/288),因此本研究推测 *P4HA2* 基因该错义突变可能不是土家族高度近视的主要致病基因。

P4HA2 基因是近年来由中国研究团队通过全外显子测序在一中国高度近视大家系中发现的与高度近视相关的致病基因,该研究发现 *P4HA2* 基因一个新的致病突变 (c. 871G>A)^[16]。在此之前,只有少数疾病

被报道与 *P4HA2* 基因突变有关,主要集中在乳腺癌以及胶原相关的疾病。*P4HA2* 基因的主要功能是维持胶原蛋白的稳定性,基因突变以后则可能失去对胶原蛋白羟基化的能力,胶原蛋白的螺旋结构因失去稳定性而容易解聚。巩膜层解聚的胶原蛋白越来越多,导致巩膜变薄,同时对眼球的支撑能力下降,导致眼轴延长,进而形成近视^[17-18]。

综上所述,本研究在土家族高度近视患者中发现 *P4HA2* 基因上的 1 个错义突变 c. 145C>A 导致编码区第 49 位亮氨酸突变为异亮氨酸,该突变是否会影响编码的蛋白功能而致病还有待进一步研究。另外,研究样本量不足也可能会影响筛查结构,因此 *P4HA2* 基因与土家族高度近视发病之间的关系仍有待扩大样本量以进一步验证。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Williams KM, Hammond CJ. Prevalence of myopia and association with education in Europe [J]. *Lancet*, 2014, 383 (suppl 1): S109.
- [2] You QS, Wu LJ, Duan JL, et al. Prevalence of myopia in school children in greater Beijing: the Beijing Childhood Eye Study [J]. *Acta Ophthalmol*, 2014, 92 (5): 398-406.
- [3] Morgan IG, Ohno-Matsui K, Saw SM. Myopia [J]. *Lancet*, 2012, 379 (9827): 1739-1748. DOI: 10.1016/S0140-6736(12)60272-4.
- [4] No authors listed. Genes versus environment in ocular refraction [J/OL]. *J Med Genet*, 2002, 39 (3): 177 [2019-01-22]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11897816>. DOI: 10.1136/jmg.39.3.177.
- [5] Hysi PG, Wojciechowski R, Rahi JS, et al. Genome-wide association studies of refractive error and myopia, lessons learned, and implications for the future [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2014, 55 (5): 3344-3351. DOI: 10.1167/iovs.14-1414
- [6] Shi Y, Gong B, Chen L, et al. A genome-wide meta-analysis identifies two novel loci associated with high myopia in the Han Chinese population [J]. *Hum Mol Genet*, 2013, 22 (11): 2325-2333. DOI: 10.1093/hmg/ddt066.
- [7] Khor CC, Miyake M, Chen LJ, et al. Genome-wide association study identifies ZFX1B as a susceptibility locus for severe myopia [J]. *Hum Mol Genet*, 2013, 22 (25): 5288-5294. DOI: 10.1093/hmg/ddt385.
- [8] Shi Y, Li Y, Zhang D, et al. Exome sequencing identifies ZNF644 mutations in high myopia [J/OL]. *PLoS Genet*, 2011, 7 (6): e1002084 [2018-12-11]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21695231>. DOI: 10.1371/journal.pgen.1002084.
- [9] Zhao F, Wu J, Xue A, et al. Exome sequencing reveals CCDC111 mutation associated with high myopia [J]. *Hum Genet*, 2013, 132 (8): 913-921. DOI: 10.1007/s00439-013-1303-6.
- [10] Tran-Viet KN, Powell C, Barathi VA, et al. Mutations in SCO2 are associated with autosomal-dominant high-grade myopia [J]. *Am J Hum Genet*, 2013, 92 (5): 820-826. DOI: 10.1016/j.ajhg.2013.04.005.
- [11] Guo H, Jin X, Zhu T, et al. SLC39A5 mutations interfering with the BMP/TGF- β pathway in non-syndromic high myopia [J]. *J Med Genet*, 2014, 51 (8): 518-525. DOI: 10.1136/jmedgenet-2014-102351.
- [12] Mordechai S, Gradstein L, Pasanen A, et al. High myopia caused by a mutation in LEPREL1, encoding prolyl 3-hydroxylase 2 [J]. *Am J Hum Genet*, 2011, 89 (3): 438-445. DOI: 10.1016/j.ajhg.2011.08.003.
- [13] Aldahmesh MA, Khan AO, Alkuraya H, et al. Mutations in LRPAP1 are associated with severe myopia in humans [J]. *Am J Hum Genet*, 2013, 93 (2): 313-320. DOI: 10.1016/j.ajhg.2013.06.002.
- [14] Zejmo M, Formińska-Kapuścik M, Pieczara E, et al. Etiopathogenesis and management of high-degree myopia. Part I [J]. *Med Sci Monit*, 2009, 15 (9): RA199-202.
- [15] Guo H, Tong P, Liu Y, et al. Mutations of P4HA2 encoding prolyl 4-hydroxylase 2 are associated with nonsyndromic high myopia [J]. *Genet Med*, 2015, 17 (4): 300-306. DOI: 10.1038/gim.2015.28.
- [16] 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.
- [17] Myllyharju J, Kivirikko KI. Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms [J]. *Trends Genet*, 2004, 20 (1): 33-43. DOI: 10.1016/j.tig.2003.11.004.
- [18] Myllyharju J. Prolyl 4-hydroxylases, key enzymes in the synthesis of collagens and regulation of the response to hypoxia, and their roles as treatment targets [J]. *Ann Med*, 2008, 40 (6): 402-417. DOI: 10.1080/07853890801986594.

(收稿日期:2019-04-12 修回日期:2019-07-27)

(本文编辑:张宇)

读者·作者·编者

本刊对医学研究中知情同意和医学伦理学描述的要求

根据国际医学期刊编辑委员会提供的“生物医学期刊投稿统一要求”的表述,本刊对作者撰写稿件时关于“知情同意”和“医学伦理学”的描述提出如下要求:

(1) 知情同意 在未事先获得知情同意的情况下,患者有隐私不被侵犯的权力。患者的身份信息,包括姓名、来源、住院号等均不应该以文字、图片或家系信息的方式在出版物上公开,除非这些信息对于本研究是必需的,如需在出版物上显示,应征得患者(或者父母、监护人)签署的书面同意书。

发表的文章中应该省略不必要的患者个人信息,但难以做到完全匿名时(如在照片中掩盖患者的眼部,不足以保护患者的隐私权),应提供知情同意的信息。如果用改变患者的身份特征(如遗传家系等)以保护患者隐私权的方法,作者应该确保这些改变不影响研究的科学性,并且编辑应在文中对此予以说明。

(2) 医学伦理学 以人体为实验对象的研究,作者应该提及试验步骤是否符合相应的负责机构、国家委员会或 1975 年赫尔辛基宣言(2005 年修订)的医学伦理学标准。如果研究过程对是否符合赫尔辛基宣言有疑问或存在一定的问题,作者应当做出客观说明并解释研究的合理性,提交已通过审查机构的批准情况。以动物为实验对象的研究,作者应当说明是否遵循当地的相关机构、学会(国内或国外)及国家实验动物保护和利用指南。

(本刊编辑部)