

preoperative intravitreal conbercept for proliferative diabetic retinopathy [J]. 2018, 18(2): 363-366. DOI: 10. 3980/j. issn. 1672-5123. 2018. 2. 42.

[30] Meleth AD, Carvounis PE. Outcomes of vitrectomy for tractional retinal detachment in diabetic retinopathy [J]. Int Ophthalmol Clin, 2014, 54(2): 127-139. DOI: 10. 1097/HIO. 000000000000021.

[31] 延艳妮, 魏文斌, 周金琼. 增生性糖尿病视网膜病变围手术期抗 VEGF 药物使用时机的选择 [J]. 国际眼科纵览, 2015, 39(5): 333-336. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 1673-5803. 2015. 05. 008.

Yan YN, Wei WB, Zhou JQ. The using timing of anti-vascular endothelial growth factor at perioperative period for proliferative diabetic retinopathy [J]. Int Rev Ophthalmol, 2015, 39(5): 333-336. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 1673-5803. 2015. 05. 008.

(收稿日期: 2020-01-23 修回日期: 2020-07-25)

(本文编辑: 张宇)

· 临床经验 ·

Leber 先天性黑朦一家系 *CRB1* 基因新突变

彭海鹰 周钟强 史平玲 唐贺 魏圆梦 李苗 梁迎娟 聂晓东 黄爱国

河南省人民医院 河南省立眼科医院 河南省眼科研究所 郑州大学人民医院, 郑州 450003

通信作者: 黄爱国, Email: aiguo Huang0107@163. com

DOI: 10. 3760/cma. j. cn115989-20190813-00347

Novel mutation in the *CRB1* gene in a family affected with Leber congenital amaurosis

Peng Haiying, Zhou Zhongqiang, Shi Pingling, Tang He, Wei Yuanmeng, Li Miao, Liang Yingjuan, Nie Xiaodong, Huang Aiguo

Henan Province People's Hospital, Henan Eye Hospital, Henan Eye Institute, People's Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450003, China

Corresponding author: Huang Aiguo, Email: aiguo Huang0107@163. com

DOI: 10. 3760/cma. j. cn115989-20190813-00347

CRB1 基因突变与多种视网膜退行性病有关^[1-3]。Leber 先天性黑朦 (Leber congenital amaurosis, LCA) 是一种基因和表型不同的疾病, 多为常染色体隐性遗传。患者多于 1 岁以内发病, 出生时视力即严重受损, 眼底检查早期多正常, 数年后可见眼底椒盐样或骨细胞样色素沉积、视网膜血管狭窄、视网膜色素上皮和脉络膜萎缩, 视网膜电图 (electroretinography, ERG) 检查异常, 本研究对一 LCA 家系进行基因检测, 明确该家系致病基因。

1 资料与方法

1.1 一般资料 于 2017 年在河南省人民医院纳入 1 个汉族 LCA 家系, 共 3 名家庭成员 (图 1)。本研究严格遵守赫尔辛基宣言, 经河南省人民医院伦理委员会批准 [批文号: HNEECKY-2019(15) 号], 所有受检者均签署知情同意书。

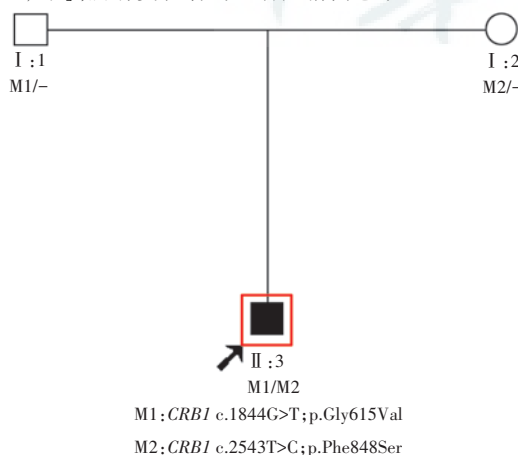


图 1 LCA 家系图 ■: 男性患者 □: 正常男性 ○: 正常女性
↗: 先证者

1.2 方法 采集家系中 3 位受检者的外周静脉血各 4 ml, 采用血液基因组 DNA 提取试剂盒 (美国 Omega 公司) 提取全基因组 DNA, 用紫外分光光度计 (美国 NardropOne 公司) 进行定量及质量控制。以包含 441 个致病基因的遗传眼病捕获芯片 (北京中因科技有限公司) 进行靶向捕获富集高通量测序, 每个受检者提取 3 μg DNA, 用超声仪将 DNA 打断为约 150 bp 的片段, 采用 SureselectXT 捕获试剂盒 (美国安捷伦公司) 进行杂交、洗脱并对文库进行扩增。采用 HiSeq Xten 测序仪进行高通量测序, 测序数据通过人类基因组数据库、dbSNP 数据库、人类孟德尔遗传网上数据库、人类基因突变数据库 (human gene mutation database, HGMD) 进行单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 注释, 确定致病基因及突变位点。在 HGMD 中查看发现的可疑基因变异是否为已报道致病突变。如果是新发现变异则在 Polyphen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) 和 SIFT (http://sift.jcvi.org/www/SIFT_chr_coords_submit.html) 网站上预测其对蛋白功能的影响, 并在 1000Genome (<http://browser.1000genomes.org/index.html>)、EVS (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>) 和 ExAC (<http://exac.broadinstitute.org/>) 数据库中查看变异在正常人群的等位基因频率。采用 Sanger 测序法在家系成员中进行共分离分析。

2 结果

2.1 家系成员临床表型 先证者 (II₁), 男, 1 岁, 出生后即出现双眼球轻度震颤, 不能固视以及追随, 无指压征。质量分数 1% 阿托品扩瞳验光示右眼 -1.00 DS/-0.75 DC×180°, 左眼 -1.50 DS/-1.00 DC×175°。双眼前节未见异常, 眼底视盘色淡, 边界清晰, 杯盘比约为 0.3, 视网膜血管变细, 周边视网膜未见色素改变 (图 2)。全视野明、暗适应 ERG a、b 波均明显

下降(图 3)。先证者父亲(I₁)和母亲(I₂)双眼视力 1.0,双眼前节及眼底检查均未见异常(图 4),全视野 ERG 波形均正常(图 5)。

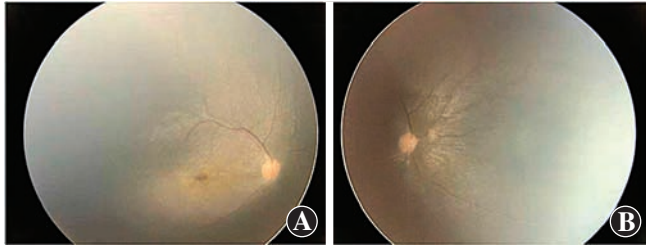


图 2 先证者(II₁)彩色眼底照相 双眼视盘色淡,视网膜血管变细
A:右眼 B:左眼

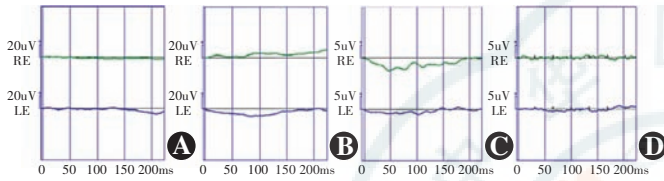


图 3 先证者(II₁)双眼全视野闪光 ERG 表现 A:暗适应 0.01 ERG 波形记录不到 B:暗适应 3.0 ERG 波形记录不到 C:明适应 3.0 ERG 波形记录不到 D:明适应 3.0 闪烁光 ERG 波形记录不到

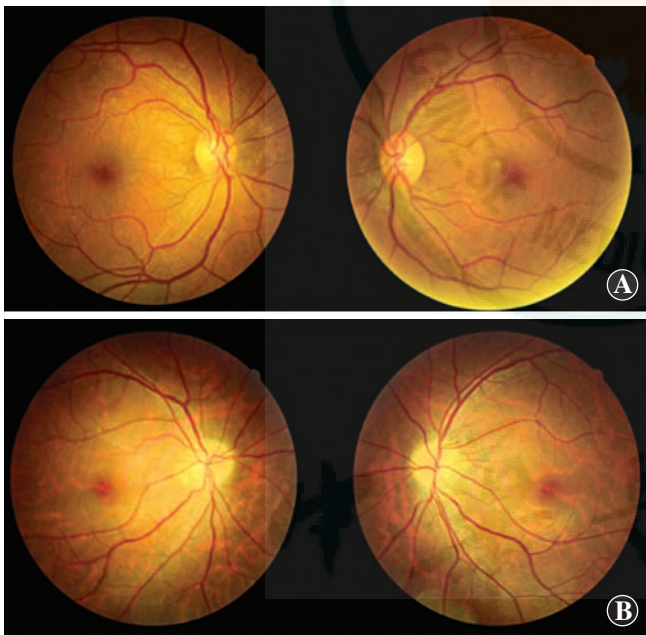


图 4 I₁和 I₂彩色眼底照相 均未见异常 A:I₁双眼 B:I₂双眼

2.2 基因检测 II₁患者 *CRBI* 基因第 6 外显子和第 10 外显子检测到双等位基因突变 c. 1844G>T (p. Gly615Val) 和 c. 2543T>C (p. Phe848Ser), 其中 c. 1844G>T 为已知错义突变, 导致所编码氨基酸由甘氨酸变为缬氨酸, c. 2543T>C 为新发现错义突变, 导致所编码氨基酸由苯丙氨酸变为丝氨酸(图 6)。

2.3 生物信息学分析和致病性推断 c. 2543T>C 为新发现错义突变, PubMed 检索发现 *CRBI* 基因为 c. 2543T>C (p. Phe848Ser), 其致病性尚未见报道, 在 dbSNP 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>) 中和 ExAC (The Exome Aggregation Consortium) 数据库未检索到该突变位点, 且不属于

多态性位点, 其在人群中发生频率极低。该突变位点在 Mutation Taster、Polyphen-2、Sift 分析预测值分别为 0.999 9、0.898 和 0, 根据《遗传变异分类标准与指南》和 2015 年版《ACMG STANDARD AND GUIDELINES》确定其为致病突变。先证者父亲(I₁)携带等位基因 1 突变 c. 1844G>T (p. Gly615Val), 先证者母亲(I₂)携带等位基因 2 突变 c. 2543T>C (p. Phe848Ser), 符合常染色体隐性遗传方式, 突变在该家系中呈现共分离状态。

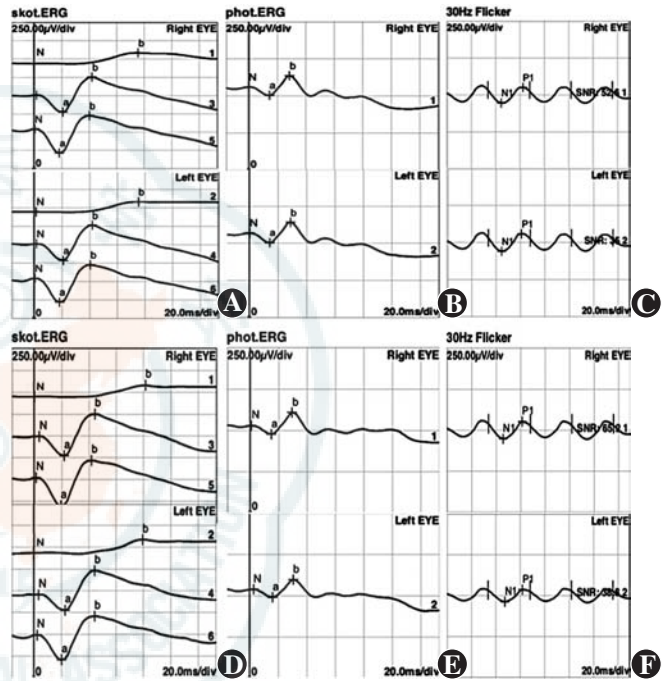


图 5 I₁和 I₂全视野 ERG 检查 A:I₁ 双眼暗适应 0.01、3.0、10.0 ERG 波形正常 B:I₁ 双眼明适应 3.0 ERG 波形正常 C:I₁ 双眼 30 Hz 闪烁光 ERG 波形正常 D:I₂ 双眼暗适应 0.01、3.0、10.0 ERG 波形正常 E:I₂ 双眼明适应 3.0 ERG 波形正常 F:I₂ 双眼 30 Hz 闪烁光波形正常

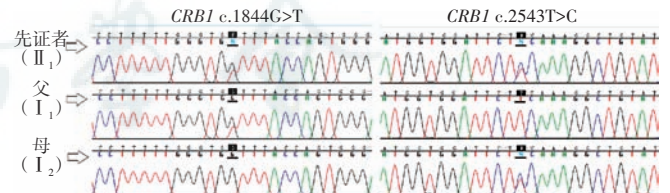


图 6 LCA 家系 *CRBI* 基因测序图 I₁ 携带等位基因 1 突变 c. 1844G>T, I₂ 携带等位基因 2 突变, c. 2543T>C, II₁ 同时携带 2 个突变位点

2.4 氨基酸保守性分析及蛋白质三维结构分析 *CRBI* 基因翻译的氨基酸序列第 615 位甘氨酸及第 848 位苯丙氨酸在人、猩猩、猕猴、犬、小白鼠、褐鼠、鸡、爪蟾、斑马鱼中高度保守(图 7)。蛋白三维分子结构分析发现突变型 *CRBI* 蛋白第 615 位氨基酸由具有极强亲水性的极性氨基酸甘氨酸突变为疏水性极强的缬氨酸, 第 848 位氨基酸由非极性疏水性苯丙氨酸突变为极性中性氨基酸丝氨酸, 其蛋白质空间结构发生较大改变(图 8)。

人	576	EAVTLTLIDDSCKE--KCIAKAPLES--D--QSCAFQNSFLGGLPVGHTS	622
黑猩猩	576	EAVTLTLIDDSCKE--KCIAKAPLES--D--QSCAFQNSFLGGLPVGHTS	622
猕猴	576	EAVTLTLIDDSCKE--KCIKAPLES--D--QSCAFQNSFLGGLPVGHTS	622
犬	576	EAVTLTLIDDSCKE--KCIKAPLES--D--QSCAFQNSFLGGLPVGHTS	622
小白鼠	576	EAVTLTLIDDSCKE--KCIKAPLES--D--QSCAFQNSFLGGLPVGHTS	622
褐鼠	576	EAVTLTLIDDSCKE--KCIKAPLES--D--QSCAFQNSFLGGLPVGHTS	622
鸡	576	EAVTLTLIDDSCKE--KCIKAPLES--D--QSCAFQNSFLGGLPVGHTS	622
爪蟾	576	EAVTLTLIDDSCKE--KCIKAPLES--D--QSCAFQNSFLGGLPVGHTS	622
斑马鱼	576	EAVTLTLIDDSCKE--KCIKAPLES--D--QSCAFQNSFLGGLPVGHTS	622
人	822	WKIEKGDVYIIGGLPDKQTEELNGGFFKGCIQDVRLLNNQNLEFFPNPTN-	870
黑猩猩	822	WKIEKGDVYIIGGLPDKQTEELNGGFFKGCIQDVRLLNNQNLEFFPNPTN-	870
猕猴	822	WKIEKGDVYIIGGLPDKQTEELNGGFFKGCIQDVRLLNNQNLEFFPNPTN-	870
犬	822	WKIEKGDVYIIGGLPDKQTEELNGGFFKGCIQDVRLLNNQNLEFFPNPTN-	870
小白鼠	822	WKIEKGDVYIIGGLPDKQTEELNGGFFKGCIQDVRLLNNQNLEFFPNPTN-	870
褐鼠	822	WKIEKGDVYIIGGLPDKQTEELNGGFFKGCIQDVRLLNNQNLEFFPNPTN-	870
鸡	822	WKIEKGDVYIIGGLPDKQTEELNGGFFKGCIQDVRLLNNQNLEFFPNPTN-	870
爪蟾	822	WKIEKGDVYIIGGLPDKQTEELNGGFFKGCIQDVRLLNNQNLEFFPNPTN-	870
斑马鱼	822	WKIEKGDVYIIGGLPDKQTEELNGGFFKGCIQDVRLLNNQNLEFFPNPTN-	870

图 7 不同物种中 *CRB1* 基因的氨基酸位点保守性 A:615 位甘氨酸 (Gly) B:848 位苯丙氨酸 (Phe)

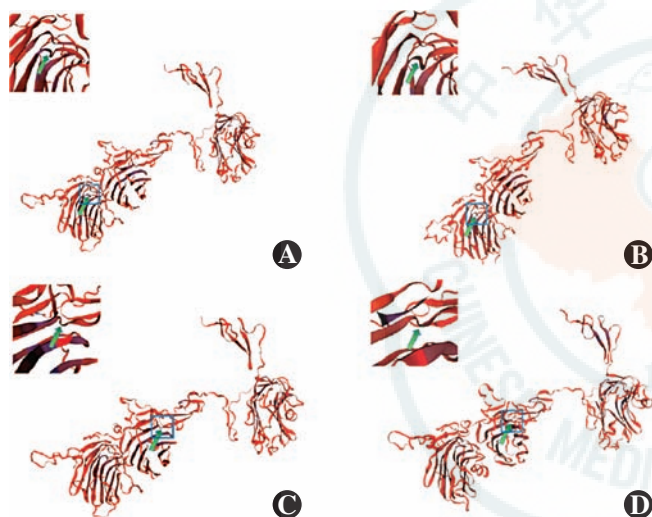


图 8 *CRB1* 蛋白三维分子结构分析 A:野生型 *CRB1* p. G615V B:突变型 *CRB1* p. G615V C:野生型 *CRB1* p. F848S D:突变型 *CRB1* p. F848S

3 讨论

本研究发现 *CRB1* c. 2543T>C 为杂合突变,在 1000Genome 和东亚人群数据库 (ExAC_EAS) 中未见报道。Mutation Taster、Polyphen-2、SIFT 分析表明该突变位于 *CRB1* 蛋白高度保守区,改变后的氨基酸导致蛋白结构功能变化而致病,根据中国遗传学会遗传咨询分会《ACMG 遗传变异分类标准中文版专家共识指南》(<http://acmg.cbcc.org.cn>) 确定其为致病突变。

目前已确定与 LCA 相关的致病基因 20 余个^[4-5],约 10% 的患者由 *CRB1* 基因突变所致^[5]。*CRB1* 基因位于 1q31,包含 12 个外显子和 11 个内显子,编码 2 种蛋白质,分别由 1376 和 1406 个氨基酸构成,为单次跨膜蛋白,包含 19 个表皮生长因子结构域,3 个球状层粘连蛋白结构域和 1 个 c 型凝集素结构域。*CRB1* 蛋白在视网膜发育中起重要作用,其基因突变可能导致其编码的光感受器细胞内节的蛋白质异常而致病^[6-7]。一项中国人群 145 例 LCA 队列研究发现,*CRB1* 基因仅有 3 例突变与欧美人种相同,并发现了 8 例未报道过的新突变^[8]。一项关于中国人群 91 例 LCA 研究发现 *CRB1* 基因的常见突变位点为 p.

K838X^[9]。本研究中 c. 2543T>C (p. Phe848Ser) 是新发现突变,位于 *CRB1* 基因第 7 个外显子,编码蛋白质细胞外区域,为球状层粘连蛋白结构域 2,该结构存在于多种蛋白质中,其可能是不同蛋白质之间相互连接的区域。由于 *CRB1* 蛋白存在于 Müller 细胞顶端,该区域与光感受器外节相互作用,推测突变可能引起该区域蛋白质结构功能改变,导致 Müller 细胞与光感受器之间连接异常而影响光感受器的发育。另一突变位点 c. 1844G>T (p. Gly615Val) 已有报道^[6],位于第 6 外显子,编码蛋白区域位于细胞外蛋白结构域 EGF11,该区域包含 6 个半胱氨酸残基,通过二硫键相互作用,形成稳定的 β 二级结构。该突变可能导致该区域的蛋白质二级结构变化,从而影响其功能。

本研究中先证者无明显眼球震颤和指压征等 LCA 典型表现,易误诊,提示我们临床工作中对注视能力差、眼底无明显改变的幼儿应常规进行全视野 ERG 检查和基因筛查。本家系在 *CRB1* 基因上检测到的 c. 1844G>T (p. Gly615Val) 在汉族人群中为首次报道,c. 2543T>C (p. Phe848Ser) 为新发现突变,2 个错义突变共同构成复合杂合突变,为本家系的致病原因,家系成员在 *CRB1* 基因 2 个位点同时出现变异时才表现出临床症状。本研究扩大了 *LCA8* 基因的突变谱,对更深入了解 LCA 的发生和发展过程以及未来的靶向基因治疗和优生优育提供了帮助。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Vincent A, Ng J, Gerth-Kahlert C, et al. Biallelic mutations in *CRB1* underlie autosomal recessive familial foveal retinoschisis [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2016, 57(6): 2637-2646. DOI: 10.1167/iovs.15-18281.
- [2] Tsang SH, Burke T, Oll M, et al. Whole exome sequencing identifies *CRB1* defect in an unusual maculopathy phenotype [J]. Ophthalmology, 2014, 121(9): 1773-1782. DOI: 10.1016/j.ophtha.2014.03.010.
- [3] Khan AO, Aldahmesh MA, Abu-Safieh L, et al. Childhood cone-rod dystrophy with macular cystic degeneration from recessive *CRB1* mutation [J]. Ophthalmic Genet, 2014, 35(3): 130-137. DOI: 10.3109/13816810.2013.804097.
- [4] 中国眼遗传病诊疗小组, 中国眼科遗传联盟. 眼遗传病基因诊断方法专家共识 [J]. 中华实验眼科杂志, 2018, 36(7): 481-488. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2018.07.001.
- [5] 赵明威, 曲进峰, 周鹏. 视网膜图谱 [M]. 2 版. 北京: 中国科学技术出版社, 2019: 127.
- [6] Richard M, Roepman R, Aartsen WM, et al. Towards understanding *CRUMBS* function in retinal dystrophies [J/OL]. Hum Mol Genet, 2006, 15(suppl_2): R235-243 [2019-08-03]. https://academic.oup.com/hmg/article/15/suppl_2/R235/623649. DOI: 10.1093/hmg/ddl195.
- [7] Tepass U, Theres C, Knust E. Crumbs encodes an EGF-like protein expressed on apical membranes of *Drosophila* epithelial cells and required for organization of epithelia [J]. Cell, 1990, 61(5): 787-799. DOI: 10.1016/0092-8674(90)90189-1.
- [8] Wang H, Wang X, Zou X, et al. Comprehensive molecular diagnosis of a large Chinese Leber Congenital amaurosis cohort [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2015, 56(6): 3642-3655. DOI: 10.1167/iovs.14-15972.
- [9] Xu K, Xie Y, Sun T, et al. Genetic and clinical findings in a Chinese cohort with Leber congenital amaurosis and early onset severe retinal dystrophy [J]. Br J Ophthalmol, 2020, 104(7): 932-937. DOI: 10.1136/bjophthalmol-2019-314281.

(收稿日期: 2020-03-13 修回日期: 2020-07-07)

(本文编辑: 刘艳)