

一中国家系常染色体显性遗传性后极性白内障 *CRYAB* 基因突变分析

张素华 高宇端 张哲

【摘要】 背景 约 50% 的先天性白内障与遗传因素有关,最常见的遗传方式是常染色体显性遗传 (AD)。迄今为止,已证实 AD 性先天性白内障 (ADCC) 相关的候选基因位点 39 个及相关基因 26 个,确定先天性白内障的致病基因及突变位点是治疗的前提。目的 对 1 个 3 代 AD 性后极性白内障中国家系的致病基因进行分析,确定其发病的遗传学基础。方法 于 2009 年 6—12 月由山西省眼科医院收集 1 个中国汉族 ADCC 家系,家系的 19 名成员中共 8 例后极性白内障,11 名表型正常。在获得所有受试者的知情同意后,对该家系成员进行临床检查,采集家系所有成员外周静脉血各 8 ml 并提取 DNA。对微卫星标志物进行 PCR 扩增及其等位基因的检测,并在染色体 1q21-25、1p22.3、2q33-36、11q22.1-23.21、7q11-12、21q22.3、22q11.2-12.1 的区段内分别选取 21 个多态性微卫星标志物进行连锁分析,计算对数优势 (LOD) 值;对可能致病的候选基因外显子进行扩增和测序验证突变基因;对新发现的突变用 PolyPhen2 软件进行突变致病性预测,预测范围值按渐增的风险程度定为 0~1。结果 该家系 3 代中各代均有后极性白内障患者,共 8 例,各代患者中男女发病机会均等,符合 AD 发病特征。连锁分析结果显示,在微卫星标志物 D11S3178 处最大 LOD 值为 4.06 ($\theta=0$)。单体型分析表明,该致病基因位于 D11S4176 ~ D11S908 区域内。对编码区的测序结果表明,*CRYAB* 基因的第 2 个外显子有 1 个错义突变 (c.209T>C),导致其编码的晶状体蛋白第 70 位的亮氨酸被脯氨酸替代 (p. Leu 70 Pro)。PolyPhen2 软件分析测试结果表明,该新突变引起所编码的蛋白质结构和功能的损害预测分值为 0.996。结论 *CRYAB* 基因为该家系中遗传性先天性后极性白内障的致病基因。

【关键词】 白内障/先天性; 基因相关研究; 家系; 中国; DNA 突变分析; 对数优势比值; 微卫星标记; α -晶状体蛋白 B 链

***CRYAB* gene mutation analysis in a Chinese family with congenital posterior polar cataract** Zhang Suhua, Gao Yudian, Zhang Zhe. Shanxi Eye Hospital, Taiyuan 030002, China
Corresponding author: Zhang Suhua, Email: cfykys@163.com

[Abstract] **Background** About 50% congenital cataract is associated with inheritance, and the autosomal dominant (AD) inheritance is the most common mode. At least 39 candidate genetic locus and 26 cataract-related genes have been identified to be relevant with AD congenital cataract (ADCC). To identify the disease-causing gene is important. **Objective** This study was to identify the mutation gene in a three-generation Chinese family with AD congenital posterior polar cataract. **Methods** A Chinese family of AD congenital posterior polar cataract was investigated in Shanxi Eye Hospital from June to December in 2009. Nineteen families were included in this pedigree with 8 patients and 11 normal phenotypes. Regular ocular examinations were performed and 8 ml periphery blood samples were collected for the extraction of DNA under the informed consent in each subject. PCR amplification and allele detection were carried out in microsatellite markers. Logarithm of the odds (LOD) scores were calculated using the linkage analysis of 21 polymorphic microsatellite markers in the region of chromosome of 1q21-25, 1p22.3, 2q33-36, 11q22.1-23.21, 7q11-12, 21q22.3, 22q11.2-12.1. Mutations were detected by DNA sequence analysis of the candidate genes. Mutation pathogenicity was predicted by PolyPhen2 software for new mutations with the risk intensity from 0 to 1. **Results** Eight ADCC patients distributed in each generation with the similar subjects in male and female members, complying with the AD mode. Linkage analysis showed the maximal limit of detection (LOD) scores of 4.06 ($\theta=0$) in microsatellite marker D11S3178. Haplotype analysis showed that the candidate gene located in the region between D11S4176 and D11S908. Direct DNA sequence of *CRYAB* revealed a T→C mutation at nucleotide

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.04.009

基金项目:山西省自然科学基金项目(2008011086)

作者单位:030002 太原,山西省眼科医院(张素华、张哲);030032 太原,山西医学科学院 山西大医院眼科(高宇端)

通信作者:张素华,Email:cfykys@163.com

LOD>1 提示连锁, LOD<-2 否定连锁, 以此判定微卫星位点附近区域可能致病的候选基因, 并根据个体的等位基因型、家系成员间的亲缘关系及孟德尔遗传定律人工构建该家系单体型。

1.2.5 可能致病的候选基因外显子扩增及产物测序

AD 性白内障家系 *CRYAB* 基因外显子 PCR 引物序列及产物大小见表 1。PCR 扩增条件: (1) *CRYAB* 基因外显子 1 94 °C 预变性 3 min; 随后 94 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 40 s, 共 35 个循环, 最后 72 °C 再延伸 8 min。(2) *CRYAB* 基因外显子 2 94 °C 预变性 3 min; 随后 94 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 40 s, 共 35 个循环, 最后 72 °C 再延伸 8 min。(3) *CRYAB* 基因外显子 3 94 °C 预变性 3 min; 随后 94 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 40 s, 共 35 个循环, 最后 72 °C 再延伸 8 min。纯化后的 PCR 产物测序由 TaKaRa 宝生物工程(大连)有限公司完成, 使用 PRISM™ 377XL DNA 自动测序仪(美国 ABI 公司), 应用双脱氧末端终止法进行序列分析, 测序结果与 GenBank 中的原始序列进行 BLAST 比对。

表 1 AD 性白内障家系 *CRYAB* 基因外显子 PCR 引物序列及产物大小

基因	外显子	引物	引物序列(5'-3')	片段长度(bp)
<i>CRYAB</i>	外显子 1	正向	ACCCCTGACATCACCATTCC	462
		反向	GGCACTAGCAACCTCCTCAT	
	外显子 2	正向	GAGCCTTAGGTATCACTGTG	382
		反向	CTGATAGCACTACCTGGACT	
	外显子 3	正向	CTCACCTAAGGGGAAATCAG	789
		反向	ATTCAGATGTGTTCCAGTCC	

注: AD: 常染色体显性遗传

1.3 基因突变验证

针对在患者中发现的突变设计错配引物 *CRYAB*BMF: 5'-CTTGCTATTTCTAGATGGGCC-3' (引入的突变 c. 206C>G) 和 *CRYAB*MR: 5'-TACCTGGCGCTCTTCATGTT-3', 在携带 c. 209T>C 突变的等位基因中引入 *Apal* I 酶切位点 GGGCCC。以受试的 19 名家系成员和 100 名同种族无关个体的基因组 DNA 为模板, 先以 *CRYAB* 外显子 2 正义链和 *CRYAB* 外显子 2 反义链为引物对基因进行扩增, PCR 产物适当稀释后, 取 0.5 μl 作为模板, 再以错配引物 *CRYAB*BMF 和 *CRYAB*MR 为引物进行巢式 PCR。2 次 PCR 反应均使用 10.0 μl LATAq 反应体系, 循环条件相同, 第 2 次 PCR 产物以限制性内切酶 *Apal*I 消化分析。酶切反应体系 10.0 μl, 包含 1.0 μl 10 倍缓冲液、0.5 μl *Apal* I、

6.5 μl ddH₂O 和 2.0 μl PCR 产物。37 °C 消化 4 h; 在消化产物中加 6.0 μl ddH₂O 和 4.0 μl 10 倍上样缓冲液, 混匀, 取其中 3.0 μl 行 8% 聚丙烯酰胺凝胶 400 V 电泳 2.5 h, 经常规硝酸银染色后观察结果。

1.4 基因突变致病性验证

运用 PolyPhen2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2>) 软件分析突变对翻译产物结构和功能的影响。风险预测分值范围为 0~1, 分值越接近 1, 患病风险越高。

2 结果

2.1 家系基因连锁分析

连锁分析结果显示, 在微卫星标志物 D11S3178 处最大 LOD 值为 4.06 (θ=0)。单体型分析表明该致病基因位于 D11S4176~D11S908(表 2)。

表 2 11 号染色体长臂部分微卫星标记的 LOD 值

微卫星标志物	cM	不同 θ 时的 LOD 值							
		0.00	0.01	0.05	0.10	0.20	0.30	0.40	
D11S4176	93.7	0.45	0.37	0.32	0.22	0.14	0.10	0.02	
D11S917	96.6	0.90	0.87	0.84	0.72	0.03	0.42	0.24	
D11S923	100.0	0.60	0.59	0.54	0.47	0.32	0.17	0.15	
D11S3178	112.3	4.06	3.21	2.29	1.04	0.99	0.32	0.20	
D11S4090	112.6	1.30	1.18	1.09	0.96	0.73	0.45	0.21	
D11S908	114.8	-∞	-2.90	-1.47	-0.82	-0.38	-0.14	-0.03	

注: LOD: 对数优势比; cM: 厘摩; θ: 重组率

2.2 家系成员基因测序

对 *CRYAB* 基因编码区的测序结果表明, *CRYAB* 基因的第 2 个外显子有 1 个错义突变 (c. 209T>C), 导致其编码晶状体蛋白第 70 位的亮氨酸被脯氨酸替代 (p. Leu 70 Pro) (图 3)。

2.3 *CRYAB* 基因突变验证

CRYAB 基因的第 2 个外显子有 1 个错义突变 (c. 209T>C) 产生了 1 个新的 *Apal* I 限制性内切酶位点, 使 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳上出现额外的 120 bp 的条带。这个改变见于所有家系中的患者, 而家系中所有正常个体和 100 个不同遗传背景的正常对照均无此改变(图 4), 因此认为 209 位碱基的错义突变是与该家系白内障共分离的遗传突变。

2.4 *CRYAB* 基因突变致病性预测

PolyPhen2 软件对突变基因致病的可能性分析显示, *CRYAB* 基因突变致病的预测分值为 0.996, 为很有可能有害, 表明该突变基因引起所编码蛋白质结构和功能损害的风险很大, 是导致先天性白内障的致病基因。

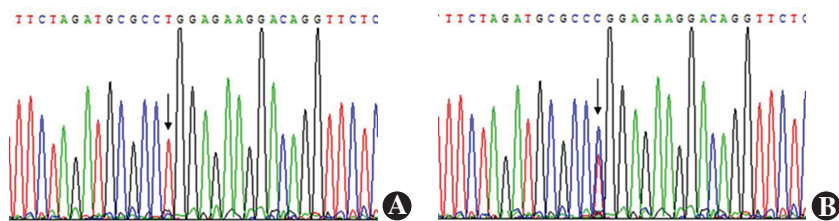


图3 *CRYAB* 的序列分析图 A:正常人 *CRYAB* 基因第2个外显子测序结果正常(箭头)
B:患者 *CRYAB* 基因第2个外显子的1个错义突变(c.209T>C)(箭头)

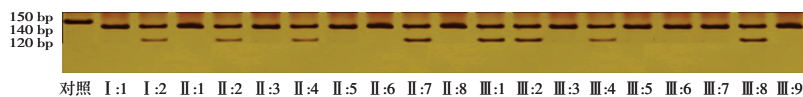


图4 巢式 PCR 法对突变 *CRYAB* 基因的验证

3 讨论

先天性白内障表型复杂多变,且多有交叉重叠,同时又具有遗传异质性,故对其分子遗传学的研究较为困难^[1-3,9]。目前,对先天性白内障相关候选基因的研究工作一方面是从与白内障形成有关的功能蛋白出发,寻找其染色体编码位点作为突变研究中的重要候选基因^[10];另一方面对先天性白内障的大样本家系资料进行基因组扫描和连锁分析确定染色体定位,再对定位区域内候选基因筛选测序发现突变点^[11-13]。目前,已发现与 ADCC 相关的 39 个候选遗传位点以及 26 个白内障疾病相关基因^[3-7,9-13],分类如下:(1)晶状体蛋白基因,编码晶状体中 90% 以上的结构蛋白,突变导致晶状体纤维结构和排列异常引起晶状体混浊。已经被鉴定的与 ADCC 相关的晶状体蛋白基因共 8 个,包括 *CRYAA*、*CRYAB1*、*CRYBA1*、*CRYBB1*、*CRYBB2*、*CRYGC*、*CRYGD* 和 *CRYGS*。(2)膜转运蛋白基因,如 *MIP*、*GJA3* 和 *GJA8*,突变导致细胞间正常的信息传递受影响引起晶状体混浊。(3)细胞骨架编码基因,如 *BFSP2*,突变引起晶状体细胞的支架异常导致晶状体混浊。(4)发育调节因子编码基因,如 *PITX3* 以及 *HSF4*,突变导致晶状体发育过程中的调控蛋白及与代谢有关的蛋白表达异常,使晶状体混浊,引起白内障。

本研究选取了 21 个与 ADCC 相关遗传位点的微卫星位点进行连锁分析,两点连锁分析得出最大 LOD 值 4.06($\theta=0$) 在 STR 标记物为 D11S3178 处获得,显示疾病相关候选基因与该微卫星位点紧密连锁,支持了 *CRYAB* 为该独特表型先天性白内障疾病相关候选基因。进一步的研究发现,*CRYAB* 基因的第 2 个外显子中第 209 位碱基发生 T>C 错义突变,引起第 70 位编码亮氨酸被脯氨酸替代,此改变与疾病表型完全共分离。家系中所有患者均有此改变,而健康者均无此

改变,并且 100 个不同遗传背景的正常对照样本亦无此改变,提示 *CRYAB* 基因因此独特表型白内障疾病相关候选基因。此外,PolyPhen2 软件分析结果也表明,p. Leu 70 Pro 突变对蛋白质结构和功能的损害程度很大,从而导致该家系中患者先天性白内障的发生和发展。Berry 等^[3]2001 年报告 1 个 4 代英国家系的先天性白内障患者具有完全相同的基因突变,并确定 *CRYAB* 基因的第 3 个外显子有 1 个缺失突变 450delA,这导致了 *CRYAB* 基因编码的蛋白质中第 150 个密

码子发生移码突变。晶状体蛋白中大约有 90% 以上是水溶性晶状体蛋白,分为 α 晶状体蛋白、 β 晶状体蛋白和 γ 晶状体蛋白。 α 晶状体蛋白是晶状体中最广泛存在的可溶性蛋白,它由 αA 和 αB 亚基组成,这 2 个亚基分别由 *CRYAA* 和 *CRYAB* 基因编码。*CRYAA* 在晶状体内表达率很高,在非晶状体组织内很少表达,而 *CRYAB* 却广泛表达在非晶状体组织内,包括心脏和骨骼肌内。Vicart 等^[14]在 1 个法国家系发现了 1 个错义突变 Arg120Gly,以及 Selcen 等^[15]发现 2 个肌原纤维肌病患者具有 2 个其他的 *CRYAB* 突变。Liu 等^[16]发现 αA 晶状体蛋白和 αB 晶状体蛋白具有不同的功能机制来抑制紫外线诱导的凋亡,因此我们推测 *CRYAB* 基因突变以及 Leu 70 Pro 突变导致抑制晶状体上皮细胞凋亡的功能减弱或消失,从而引起了白内障。

本研究发现由 *CRYAB* 基因第 2 外显子的 1 个错义突变导致后极性先天性白内障表型的发生,进一步证实了先天性白内障的遗传异质性。随着越来越多的人类白内障相关候选基因被定位和克隆,使明确先天性白内障的基因型和表现型的相关关系成为可能。

参考文献

- [1] 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.
- [2] Wistow G. The human crystallin gene families [J/OL]. *Hum Genomics*, 2012, 6: 26 [2014-03-26]. <http://www.humgenomics.com/content/6/1/26>. doi:10.1186/1479-7364-6-26.
- [3] Berry V, Francis P, Reddy MA, et al. Alpha-B crystallin gene (*CRYAB*) mutation causes dominant congenital posterior polar cataract in humans [J]. *Am J Hum Genet*, 2001, 69(5): 1141-1145.
- [4] Vanita V, Singh D. A missense mutation in *CRYGD* linked with autosomal dominant congenital cataract of aculeiform type [J]. *Mol Cell Biochem*, 2012, 368(1-2): 167-172. doi: 10.1007/s11010-012-1355-2.
- [5] Veromann S. Theoretical considerations regarding the study "Alpha-B

- crystallin gene (CRYAB) mutation causes dominant congenital posterior polar cataract in humans [J]. *Am J Hum Genet*, 2002, 71(3): 684-685.
- [6] Yang G, Zhang G, Wu Q. 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.
- [7] Clark AR, Naylor CE, Bagnéris C. Crystal structure of R120G disease mutant of human α B-crystallin domain dimer shows closure of a groove [J]. *J Mol Biol*, 2011, 408(1): 118-134. doi:10.1016/j.jmb.2011.02.020.
- [8] Kumar M, Kaur P, Kumar M, et al. Molecular and structural analysis of genetic variations in congenital cataract [J]. *Mol Vis*, 2013, 24(19): 2436-2450.
- [9] Shentu X, Yao K, Xu W, et al. Special fasciculiform cataract caused by amutation in the gammaD crystalline gene [J]. *Mol Vis*, 2004, 29(10): 233-239.
- [10] Chen Q, Ma J, Yan M, et al. A novel mutation in CRYAB associated with autosomal dominant congenital nuclear cataract in a Chinese family [J]. *Mol Vis*, 2009, 10(15): 1359-1365.
- [11] Willoughby CE, Arab S, Gandhi R, et al. A novel GJA8 mutation in an Iranian family with progressive autosomal dominant congenital nuclear cataract [J/OL]. *J Med Genet*, 2003, 40(11): e124 [2014-06-10]. <http://jmg.bmj.com/content/40/11/e124.long>. doi: 10.1136/jmg.40.11.e124.
- [12] Sun H, Ma Z, Li Y, et al. Gamma-S crystallin gene (CRYGS) mutation causes dominant progressive cortical cataract in humans [J]. *J Med Genet*, 2005, 42(9): 706-710. doi:10.1136/jmg.2004.028274.
- [13] Pras E, Mahler O, Kumar V, et al. A new locus for autosomal dominant posterior polar cataract in Moroccan Jews maps to chromosome 14q22-23 [J/OL]. *J Med Genet*, 2006, 43(10): e50 [2014-05-28]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2563169/>.
- [14] Vicart P, Caron A, Guicheney P, et al. A missense mutation in the alphaB-crystallin chaperone gene causes a desmin-related myopathy [J]. *Nat Genet*, 1998, 20(1): 92-95. doi:10.1038/1765.
- [15] Selcen D, Engel AG. Myofibrillar myopathy caused by novel dominant negative alpha B-crystallin mutations [J]. *Ann Neurol*, 2003, 54(6): 804-810. doi:10.1002/ana.10767.
- [16] Liu Y, Zhang X, Luo L, et al. A novel alphaB-crystallin mutation associated with autosomal dominant congenital lamellar cataract [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2006, 47(3): 1069-1075. doi:10.1167/iovs.05-1004.

(收稿日期:2014-09-06)

(本文编辑:刘艳)

消息

天津医科大学眼科医院第九届国际会议 中国眼底病论坛·糖尿病视网膜病变专题研讨会·2015 天津 天津市医学会眼科学分会 2015 年度学术年会通知

由天津医科大学眼科医院、中华眼底病杂志以及天津市医学会眼科学分会主办,新加坡全国眼科中心协办的“天津医科大学眼科医院第九届国际会议、中华眼底病论坛·糖尿病视网膜病变专题研讨会·2015 天津、天津市医学会眼科学分会 2015 年度学术年会”将于 2015 年 10 月 16—18 日(周五至周日)在天津举行。现将征文及注册参会事宜通知如下:

1 征文范围

(1)“天津医科大学眼科医院第九届国际会议”征文范围涉及眼科各专业基础及临床研究进展。

(2)“中国眼底病论坛·糖尿病视网膜病变专题研讨会·2015 年天津”征文范围包括糖尿病视网膜病变诊断治疗经验以及基础研究,尤其关注糖尿病视网膜病变诊疗指南和相关规范的临床应用经验以及以疾病为中心的学科专业融合诊疗模式探索及平台建设的稿件。

2 征文要求

(1)征文仅需提交约 600 字的以 Word 格式撰写中英文摘要。

(2)务请注明作者姓名、单位、职称(职务)、通信地址和邮政编码、电子邮箱以及手机号码。

(3)投稿邮箱:tmueh2015@163.com,邮件主题请注明“天津医科大学眼科医院第九届国际会议征文+作者姓名”或“中国眼底病论坛征文+作者姓名”。

(4)截止日期:2015 年 7 月 31 日。

3 注册及费用

注册表可从网站 www.tmuec.com 下载。请于 2015 年 9 月 1 日前发回注册表,并缴纳注册费 780 元;2015 年 9 月 1 日之后缴纳者注册费为 880 元。

4 联系方式

联系人:杜静 杨荔 电话:022-58280725,022-58280866,022-58280836;传真:022-23346434;Email:tmueh2015@163.com。

(天津医科大学眼科医院)