

# 原纤维蛋白-2 干扰诱导小鼠视网膜病变及其可能的机制

张瑞雪<sup>1</sup> 蒋文君<sup>2</sup> 郭大东<sup>2</sup> 石永伟<sup>2</sup> 毕宏生<sup>2</sup> 温莹<sup>2</sup>

<sup>1</sup>山东中医药大学, 济南 250014; <sup>2</sup>山东中医药大学附属眼科医院 山东省中西医结合眼病防治重点实验室 山东省眼病防治研究院, 济南 250002

通信作者: 毕宏生, Email: hongshengbi@126.com; 温莹, Email: wenyinyeye@163.com

**【摘要】** 目的 探索潜伏转化生长因子- $\beta$  结合蛋白(LTBP)、转化生长因子- $\beta$ (TGF- $\beta$ )、周期蛋白依赖性激酶 2(CDK2)、细胞周期素 D2(CCND2)在原纤维蛋白-2(FBN2)缺陷诱导视网膜病变模型小鼠视网膜中的表达。方法 将 27 只 8 周龄 C57BL/6J 小鼠按照随机数字表法随机分为正常对照组、空载体组和 FBN2 干扰组, 每组 9 只。正常对照组不做处理, 空载体组和 FBN2 干扰组右眼玻璃体腔内分别注射 3  $\mu$ l 空载体和 3  $\mu$ l 携带 sh-FBN2 干扰质粒的腺相关病毒(AAV)。于注射后 4 周采用光学相干断层扫描(OCT)和全视野视网膜电图(ERG)检测视网膜结构形态和功能变化。采用免疫荧光染色法检测视网膜 FBN2 蛋白表达分布情况; 采用实时荧光定量 PCR、Western blot 法检测小鼠视网膜中 FBN2、LTBP-1、TGF- $\beta$ 2 及 CDK2、CCND2 mRNA 和蛋白表达水平。结果 注射后 4 周, OCT 检测结果显示, 与正常对照组和空载体组相比, FBN2 干扰组视网膜色素上皮层不规则, 出现高密度反射区。全视野 ERG 结果显示, 与空载体组和正常对照组比较, FBN2 干扰组 Rod-a、Rod-b、Max-a、Max-b 波形振幅均下降, 差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。免疫荧光染色结果显示 FBN2 表达在视网膜全层, FBN2 干扰组中 FBN2 荧光强度均弱于正常对照组和空载体组。正常对照组、空载体组和 FBN2 干扰组小鼠 FBN2 荧光强度分别为  $16.21 \pm 2.21$ 、 $15.57 \pm 3.63$  和  $5.32 \pm 1.06$ , 总体比较差异有统计学意义( $F = 66.03, P < 0.05$ ), 其中 FBN2 干扰组 FBN2 蛋白荧光强度较空载体组和正常对照组明显降低, 差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。与空载体组和正常对照组相比, FBN2 干扰组 LTBP-1、TGF- $\beta$ 2 mRNA 和蛋白相对表达量明显升高, FBN2、CDK2、CCND2 mRNA 和蛋白相对表达量明显下降, 差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。结论 LTBP-1、TGF- $\beta$ 2 升高以及 G1/S 期相关蛋白 CDK2、CCND2 降低参与 FBN2 缺陷型视网膜病变的发展。

**【关键词】** 原纤维蛋白-2; 腺相关病毒; 视网膜病变

**基金项目:** 国家重点研发计划(2021YFC2702103); 山东省重点研发计划(2021LCZX09)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20231014-00130

## Fibrillin-2 interfering induced retinopathy and its possible mechanism

Zhang Ruixue<sup>1</sup>, Jiang Wenjun<sup>2</sup>, Guo Dadong<sup>2</sup>, Shi Yongwei<sup>2</sup>, Bi Hongsheng<sup>2</sup>, Wen Ying<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, China; <sup>2</sup>The Eye Hospital Affiliated to Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Key Laboratory of Eye Disease Prevention and Treatment Technology of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine of Shandong Province, Shandong Academy of Eye Disease Prevention and Treatment, Jinan 250002, China

Corresponding authors: Bi Hongsheng, Email: hongshengbi@126.com; Wen Ying, Email: wenyinyeye@163.com

**【Abstract】** **Objective** To investigate the expression of latent transforming growth factor- $\beta$ -binding protein (LTBP), transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), cyclin-dependent kinase 2 (CDK2) and cyclin D2 (CCND2) in fibrillin-2 (FBN2) interfering induced mouse retinopathy. **Methods** Twenty-seven 8-week-old C57BL/6J mice were randomly divided into normal control group, empty vector group and FBN2 interference group according to the random number table method, with 9 mice in each group. The normal control group was not treated. The empty vector group and FBN2 interference group were intravitreally injected with 3  $\mu$ l empty vector and 3  $\mu$ l adeno-associated virus (AAV) carrying the sh-FBN2 interference plasmid in the right eye, respectively. The structural and functional changes

of the retina were detected at 4 weeks after injection by optical coherence tomography (OCT) and full-field electroretinography (ERG). The expression and distribution of FBN2 protein in the retina were detected by immunofluorescence staining. The mRNA and protein expression levels of FBN2, LTBP-1, TGF- $\beta$ 2, CDK2 and CCND2 in mouse retina were detected by real-time fluorescence quantitative PCR and Western blot. All experiments complied with the ARVO statement. The research scheme was approved by the Experimental Animal Ethics Committee of Shandong University of Traditional Chinese Medicine (No. 2019036). **Results** Four weeks after injection, the results of OCT examination showed that compared with normal control and empty vector groups, the retinal pigment cortex of the FBN2 interference group was irregular with high density reflection areas. Full-field ERG results showed that compared with normal control and empty vector groups, the amplitude of Rod-a, Rod-b, Max-a and Max-b waveforms in FBN2 interference group decreased, and the differences were statistically significant (all at  $P < 0.05$ ). The results of immunofluorescence staining showed that FBN2 was expressed in the whole retina, and the fluorescence intensity of FBN2 was weaker in FBN2 interference group than that in normal control and empty vector groups. The fluorescence intensity of FBN2 in normal control group, empty vector group and FBN2 interference group was  $16.21 \pm 2.21$ ,  $15.57 \pm 3.63$  and  $5.32 \pm 1.06$ , respectively, with a statistically significant overall difference ( $F = 66.03$ ,  $P < 0.05$ ). The fluorescence intensity of FBN2 protein in FBN2 interference group was significantly lower than that in empty carrier group and normal control group (both at  $P < 0.05$ ). Compared with normal control and empty vector groups, the relative expression levels of LTBP-1 and TGF- $\beta$ 2 mRNA and protein were significantly increased in FBN2 interference group, while the relative expression levels of FBN2, CDK2 and CCND2 mRNA and protein were significantly decreased, and the differences were statistically significant (all at  $P < 0.05$ ). **Conclusions** The increase of LTBP-1 and TGF- $\beta$ 2 and the decrease of G1/S phase related proteins CDK2 and CCND2 are involved in the development of FBN2-deficient retinopathy.

[Key words] Fibrillin-2; Adeno-associated virus; Retinopathy

**Fund program:** National Key R&D Plan Project (2021YFC2702103); Key R&D Plan Project in Shandong Province (2021LCZX09)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20231014-00130

原纤维蛋白-2 (fibrillin-2, FBN2) 是微纤维的重要组成部分,参与全身结缔组织中弹性纤维的形成。研究表明, FBN2 基因变异可引起黄斑变性疾病,包括年龄相关性黄斑变性 (age-related macular degeneration, AMD) 和早发性黄斑变性,导致视物变形、黄斑变性、色素上皮萎缩和萎缩性黄斑<sup>[1]</sup>。Duvvari 等<sup>[2]</sup>在 AMD 患者中发现 FBN2 基因罕见错义变异 c. 4141G>T (p. His1381Asn), 并确认该变异具有致病性。FBN2 基因可以调节转化生长因子- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ ) 表达<sup>[3]</sup>。据报道,在新生血管性 AMD 中, FBN2 缺失会异常激活 TGF- $\beta$ , 这表明 TGF- $\beta$  在视网膜纤维化过程中起关键作用,并直接诱导人原代视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) 细胞增殖,并活化成纤维细胞<sup>[4]</sup>。前期研究表明,玻璃体腔注射 FBN-2 抗体后视网膜中 TGF- $\beta$  表达水平升高<sup>[5]</sup>。成熟 TGF- $\beta$  的同源二聚体可与潜伏相关蛋白非共价结合,形成潜伏 TGF- $\beta$  结合蛋白 (latent TGF- $\beta$  binding protein, LTBP-1), 使成熟的 TGF- $\beta$  失去活性。FBN 已被证实可以通过与 LTBP 结合来调节 TGF- $\beta$  活性,进而调节大鼠肝细胞系细胞周期<sup>[6-7]</sup>。TGF- $\beta$  在控制细

胞增殖和分化中起关键作用,可以调节 G1/S 期细胞周期<sup>[8]</sup>。周期蛋白依赖性激酶 2 (cyclin-dependent kinases2, CDK2)、细胞周期素 D2 (cyclin D2, CCND2) 是 G1/S 期细胞周期标志物<sup>[9]</sup>。本课题组前期研究发现,小鼠玻璃体腔注射腺相关病毒 (adeno-associated virus, AAV) 介导 FBN2 基因干扰后 4 周,视网膜 FBN2 表达水平降低、视网膜结构及功能发生改变<sup>[10]</sup>。本研究在前期研究的基础上,进一步明确 LTBP/TGF- $\beta$  和 G1/S 期细胞周期相关蛋白 CDK2、CCND2 在 FBN2 缺陷型视网膜病变发病过程中的作用机制,为 FBN2 缺陷型视网膜病变的精准治疗提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物与分组** 27 只 8 周龄 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠,体质量 21~23 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司 [许可证号:SCXK(京)2012-0001]。入组前对小鼠进行眼部筛查,排除角膜病、白内障以及眼底疾病。所有实验均符合 ARVO 对于动物在眼睛和视觉方面的应用规则。本研究方案经山东

中医药大学实验动物伦理委员会审核批准(批文号:2019036)。

**1.1.2 主要试剂及仪器** 氧氟沙星滴眼液[山东辰欣佛都药业(汶上)有限公司];FBN2 干扰载体 AAV (5'-GCACATACAATGTCGGCAAAG-3')(108093,上海吉满生物科技有限公司);小鼠 FBN2 抗体(sc-393968,美国 Santa 公司);兔抗 LTBP-1 多克隆抗体(ab78294,美国 Abcam 公司);兔抗 TGF- $\beta$ 2 (bs-20412R)、兔抗 CDK2 (bs-0757R)、兔抗 CCND2 (bs-1148R)、兔抗  $\beta$ -actin (bs-8783R) 抗体(北京博奥森生物技术有限公司);山羊抗兔 IgG (bs-80295G-HRP)、Alexa Fluor 594 标记山羊抗小鼠 IgG (zb2305,北京中杉金桥生物技术有限公司);Trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司);逆转录试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司);BCA 蛋白定量试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);RIPA 裂解缓冲液(武汉塞维尔生物技术有限公司);苯基甲基磺酰氟(上海雅酶生物医药科技有限公司);12%十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶(上海雅酶生物医药科技有限公司)、聚偏二氟乙烯膜[生工生物工程(上海)股份有限公司];DAB 显色剂(美国 Sigma 公司);显微注射针头(33G,瑞士汉密尔顿公司)。光学相干断层扫描(optical coherence tomography, OCT)仪(德国海德堡公司);视觉电生理仪(英国 OPTOROBIE 公司);LightCycler<sup>®</sup> 480 II 实时荧光定量 PCR 仪(美国 Roche 公司);FUSION FX7 多功能成像系统、Fusion CAPT 软件(法国 Vilber Lourmat 公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 实验分组及 FBN2 缺陷型视网膜病变模型的制备** 将 27 只小鼠按照随机数字表法分为正常对照组、空载体组和 FBN2 干扰组,每组 9 只。其中正常对照组不做处理,空载体组和 FBN2 干扰组小鼠腹腔注射 10 g/L 戊巴比妥钠溶液(50 mg/kg)进行麻醉,用复方托吡卡胺滴眼液点眼扩瞳。待瞳孔扩大后行玻璃体腔注射,于角膜缘颞侧后垂直巩膜进针,有突破感后针头向眼球后极部倾斜,在手术显微镜下透过小鼠角膜观察针尖在玻璃体内的位置,避免刺伤晶状体和视网膜,分别注射 3  $\mu$ l AAV 空载体(1 ng/ $\mu$ l)或 3  $\mu$ l 携带 sh-FBN2 干扰质粒的 AAV(1 ng/ $\mu$ l)。

**1.2.2 OCT 观察各组小鼠视网膜结构形态** 玻璃体腔注射后 4 周,腹腔注射 10 g/L 戊巴比妥钠溶液(50 mg/kg)麻醉小鼠,复方托吡卡胺滴眼液点眼扩瞳,小鼠受检眼配戴屈光度为-25 D、直径为 3 mm 的角膜接触镜,将受检眼对准扫描镜头,调整镜头距离,

以视盘为中心进行扫描。每只小鼠至少获取 3 张图片,观察视盘周围视网膜结构形态。

**1.2.3 全视野视网膜电图分析** 各组小鼠视网膜功能 玻璃体腔注射后 4 周,将小鼠置于黑暗环境 8 h 以上进行暗适应;检测过程保持室内黑暗环境。腹腔注射 10 g/L 戊巴比妥钠溶液(50 mg/kg)麻醉小鼠,复方托吡卡胺滴眼液点眼扩瞳;将动物置于操作台上,采用 RETI port 系统,将环状角膜电极固定在小鼠双眼角膜,将针状参考电极分别插入小鼠左右口角肌肉丰厚处,针状接地电极缓慢扎入小鼠右上肢皮下肌肉,待检测屏上显示电阻小于 5 K $\Omega$  且地线稳定后,开始记录视网膜电图(electroretinography, ERG)。在刺激强度为 0.03 log cd  $\cdot$  s/m<sup>2</sup> 时记录 Rod 以反映暗适应性视杆细胞反应,在刺激强度为 3 log cd  $\cdot$  s/m<sup>2</sup> 时记录 Max 以反映暗适应性混合细胞反应,刺激间隔为 30 s。记录 Rod-a、Rod-b、Max-a、Max-b 振幅,每个波形取 3 个数值,取平均值。a 波振幅定义为基线到 a 波谷的距离,b 波振幅定义为波谷和波峰之间的距离。

**1.2.4 实时荧光定量 PCR 法检测** 各组小鼠视网膜 FBN2、LTBP-1、TGF- $\beta$ 2、CDK2 和 CCND2 mRNA 表达情况 玻璃体腔注射后 4 周,每组各任意选取 6 只小鼠,腹腔注射戊巴比妥钠进行安乐死,取右眼视网膜组织,将视网膜用剪刀经冠状切面沿视神经分成 2 份,放入液氮中(-80  $^{\circ}$ C)。取其中 1 份视网膜组织,使用 Trizol 试剂提取总 RNA,使用逆转录试剂盒逆转录为 cDNA。FBN2 正向引物 5'-GTGTAAGTCCCGCCCTGACTTCC-3',反向引物 5'-ACCTACGCCGACCTCTGTGTTGC-3';TGF- $\beta$ 2 正向引物 5'-CTCCCCTGGCTTCTAGTGC-3',反向引物 5'-GCCTTAGTTTGGACAGGATCTG-3';LTBP-1 正向引物 5'-TGGCCCAGAAACAGACCCTTACTT-3',反向引物 5'-ACACAGCGCCGTTTTCAAA-3';CDK2 正向引物 5'-CCGCTGGACACTGAGACTGAAG-3',反向引物 5'-GGACCCGATGAGAATGGCAAAT-3';CCND2 正向引物 5'-TTTTGCAGGACCCGATGAAGAAG-3',反向引物 5'-GTGGCAACAAAGAGGGGACTG-3'; $\beta$ -actin 正向引物 5'-GTGAGCCTTCTCCTGTTAG-3',反向引物 5'-CATTACAGCTCCGCAAGACTT-3'。引物序列从 NCBI 网站获取。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。PCR 反应程序:95  $^{\circ}$ C 预变性 15 s;95  $^{\circ}$ C 变性 30 s,60  $^{\circ}$ C 退火及延伸 60 s,循环 40 次。以  $\beta$ -actin 为内参,采用 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> 法定量分析 FBN2、LTBP-1、TGF- $\beta$ 2、CDK2 和 CCND2 mRNA 的相对表达量。实验重复 3 次,取平均值。

**1.2.5 免疫荧光染色法检测各组小鼠视网膜 FBN2 蛋白表达分布情况** 玻璃体腔注射后 4 周, 每组任意选取 3 只小鼠, 腹腔注射戊巴比妥钠进行安乐死, 剖取完整眼球, 去除肌肉、筋膜后进行常规石蜡包埋。平行视神经进行石蜡切片, 切片厚度为 5  $\mu\text{m}$ , 随机选取 10 张切片脱蜡、抗原修复后, 滴加抗 FBN2 抗体 (1 : 1 000) 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜, PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min; 滴加 Alexa Fluor 594 标记山羊抗小鼠 IgG (1 : 200), 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 30 min, DAPI 室温孵育 10 min; PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min, 用抗荧光淬灭封片剂封片, 荧光显微镜下观察并照相, 采用 ImageJ 软件分析 FBN2 蛋白的荧光强度。

**1.2.6 Western blot 法检测各组小鼠视网膜 FBN2、LTBP-1、TGF- $\beta$ 2、CDK2 和 CCND2 蛋白表达量** 取 1.2.4 部分中剩余的视网膜组织, 用 RIPA 裂解缓冲液按质量体积比 1 : 10 (mg :  $\mu\text{l}$ ) 加入 1 mmol/L 的苯基甲基磺酰氟, 加入液氮研磨, 8 000 $\times g$  离心 5 min, 收集上清。BCA 测蛋白总浓度, 取 5  $\mu\text{l}$  进行上样, 采用 12% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳对蛋白进行分离, 并将蛋白转印至聚偏二氟乙烯膜。将膜加入 FBN2 (1 : 1 000)、LTBP-1 (1 : 1 000)、TGF- $\beta$ 2 (1 : 1 000)、CDK2 (1 : 1 500)、CCND2 (1 : 1 500) 和  $\beta$ -actin (1 : 10 000) 抗体稀释液中, 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜, 用 TBST 洗涤; 加入相应的二抗 (均 1 : 2 000 稀释) 稀释液在室温下孵育 2 h, TBST 洗涤; DAB 显色, 采用 Fusion FX7 成像系统的 Fusion CAPT 软件进行定量。以  $\beta$ -actin 为内参, 计算 FBN2、LTBP-1、TGF- $\beta$ 2、CDK2 和 CCND2 蛋白相对表达量。实验重复 3 次, 取平均值。

**1.3 统计学方法**

采用 SPSS 21.0 统计学软件进行统计分析, 计量资料数据经 Shapiro-Wilk 检验证实呈正态分布, 以  $\bar{x} \pm s$  表示, 经 Levene 检验证

实方差齐。正常对照组、空载体组、FBN2 干扰组间全视野 ERG 振幅, FBN2、LTBP-1、TGF- $\beta$ 2、CDK2 和 CCND2 mRNA 和蛋白相对表达量总体差异比较均采用单因素方差分析, 多重比较采用 LSD-*t* 检验。采用双尾检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

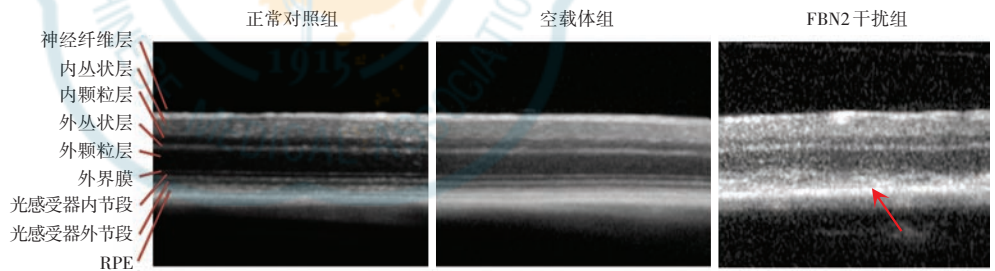
**2 结果**

**2.1 各组小鼠视网膜结构比较**

注射后 4 周, 正常对照组和空载体组 RPE 层组织结构正常, 光反射规则; FBN2 干扰组 RPE 层光带不规则, 出现高密度反射区 (图 1)。

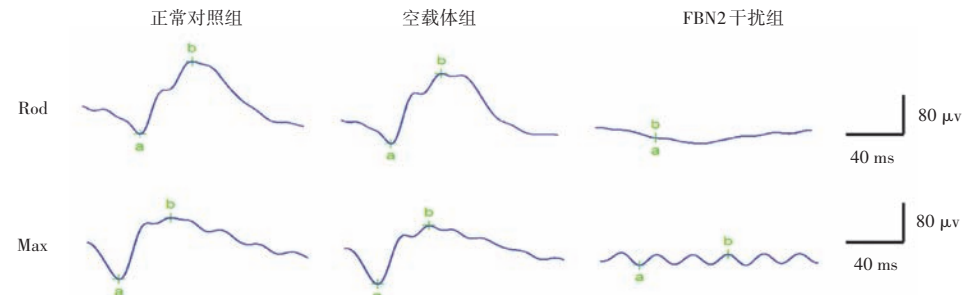
**2.2 各组小鼠全视野 ERG Rod、Max 振幅比较**

注射后 4 周各组 Rod-a、Rod-b、Max-a、Max-b 波振幅组间总体比较差异均有统计学意义 ( $F = 78.99$ 、112.67、125.48、37.06, 均  $P < 0.05$ ), 其中 FBN2 干扰组各波形振幅均较空载体组和正常对照组降低, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ); 空载体组与正常对照组各波形振幅差异均无统计学意义 (均  $P > 0.05$ ) (图 2, 表 1)。



**图 1 各组小鼠视网膜 OCT 图像** 正常对照组和空载体组视网膜组织结构正常, 光反射规则。FBN2 干扰组 RPE 层出现光带不规则 (箭头) FBN2: 原纤维蛋白-2; RPE: 视网膜色素上皮

**Figure 1 OCT images of mouse retina in different groups** The retinal tissue structure of normal control and empty vector groups was normal and the light reflection was regular. Light band irregularity (red arrow) appeared in the retinal pigment epithelium layer in FBN2 interference group FBN2: fibrillin-2; RPE: retinal pigment epithelium



**图 2 各组小鼠全视野 ERG 波形图** 正常对照组和空载体组 Rod 和 Max 波形及振幅正常, FBN2 干扰组各波振幅降低, 呈熄灭型 FBN2: 原纤维蛋白-2

**Figure 2 Full-field ERG waveform of mice in different groups** The waveforms and amplitudes of mice in normal control and empty vector groups were normal, while the amplitudes of mice in FBN2 interference group were reduced and extinguished FBN2: fibrillin-2

表 1 各组全视野 ERG 反应振幅比较 ( $\bar{x}\pm s, \mu V$ )

Table 1 Comparison of full-field ERG response amplitudes among three groups ( $\bar{x}\pm s, \mu V$ )

| 组别       | 样本量 | Rod a 波                   | Rod b 波                  | Max a 波                   | Max b 波                  |
|----------|-----|---------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|
| 正常对照组    | 9   | -40.33±9.50               | 121.35±21.60             | -117.25±15.88             | 31.46±8.82               |
| 空载体组     | 9   | -47.46±8.67               | 127.18±28.93             | -128.92±21.26             | 29.46±6.59               |
| FBN2 干扰组 | 9   | -20.33±6.38 <sup>ab</sup> | 31.28±9.32 <sup>ab</sup> | -20.44±5.35 <sup>ab</sup> | 15.73±4.90 <sup>ab</sup> |
| F 值      |     | 78.99                     | 112.67                   | 125.48                    | 37.06                    |
| P 值      |     | 0.009                     | <0.001                   | <0.001                    | 0.020                    |

注:与正常对照组相比,<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与空载体组相比,<sup>b</sup> $P<0.05$ (单因素方差分析,LSD-*t*检验) ERG:视网膜电图;FBN2:原纤维蛋白-2

Note:Compared with normal control group,<sup>a</sup> $P<0.05$ ;compared with empty vector group,<sup>b</sup> $P<0.05$ (One-way ANOVA,LSD-*t* test) ERG:electroretinography;FBN2:fibrillin-2

### 2.3 各组小鼠视网膜 FBN2、LTBP-1、TGF-β2、CDK2 和 CCND2 mRNA 相对表达量比较

注射后 4 周,正常对照组、空载体组和 FBN2 干扰组 FBN2、LTBP-1、TGF-β2、CDK2 和 CCND2 mRNA 相对表达量总体比较差异均有统计学意义( $F = 77.32、62.85、80.53、62.06、70.67$ ,均  $P < 0.05$ )。其中与正常对照组和空载体组比较,FBN2 干扰组 FBN2、CDK2 和 CCND2 mRNA 相对表达量均明显降低,LTBP-1 和 TGF-β2 相对表达量均明显升高,差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ )(表 2)。

### 2.4 各组小鼠视网膜 FBN2 蛋白分布及荧光强度比较

注射后 4 周,免疫荧光染色结果显示 FBN2 在视网膜全层均有表达,FBN2 干扰组中 FBN2 荧光强度均弱于正常对照组和空载体组。正常对照组、空载体组和 FBN2 干扰组小鼠 FBN2 荧光强度分别为  $16.21 \pm 2.21、15.57 \pm 3.63$  和  $5.32 \pm 1.06$ ,总体比较差异有统计学意义( $F = 66.03, P < 0.05$ );其中与正常对照组和空载体组比较,FBN2 干扰组中 FBN2 荧光强度明显降低,

差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ )(图 3)。

### 2.5 各组小鼠视网膜 FBN2、LTBP-1、TGF-β2、CDK2 和 CCND2 蛋白相对表达量比较

注射后 4 周,FBN2 干扰组 FBN2、CDK2 和 CCND2 蛋白电泳条带灰度较正常对照组和空载体组明显减弱,LTBP-1、TGF-β2 蛋白电泳条

表 2 各组 FBN2、LTBP-1、TGF-β2、CDK2、CCND2 mRNA 相对表达量比较 ( $\bar{x}\pm s$ )

Table 2 Comparison of relative expressions of FBN2,LTBP-1,TGF-β2,CDK2 and CCND2 mRNA among three groups ( $\bar{x}\pm s$ )

| 组别       | 样本量 | FBN2                    | LTBP-1                  | TGF-β2                  | CDK2                    | CCND2                   |
|----------|-----|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 正常对照组    | 6   | 1.00±0.00               | 1.00±0.00               | 1.00±0.00               | 1.00±0.00               | 1.00±0.00               |
| 空载体组     | 6   | 1.03±0.05               | 0.93±0.07               | 1.07±0.06               | 1.03±0.06               | 0.96±0.07               |
| FBN2 干扰组 | 6   | 0.53±0.10 <sup>ab</sup> | 1.53±0.21 <sup>ab</sup> | 1.63±0.25 <sup>ab</sup> | 0.56±0.05 <sup>ab</sup> | 0.67±0.11 <sup>ab</sup> |
| F 值      |     | 77.32                   | 62.85                   | 80.53                   | 62.06                   | 70.67                   |
| P 值      |     | 0.037                   | 0.041                   | 0.025                   | 0.044                   | 0.038                   |

注:与正常对照组相比,<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与空载体组相比,<sup>b</sup> $P<0.05$ (单因素方差分析,LSD-*t*检验) FBN2:原纤维蛋白-2;LTBP:潜伏转化生长因子-β 结合蛋白;TGF-β:转化生长因子-β;CDK2:周期蛋白依赖性激酶 2;CCND2:细胞周期素 D2

Note:Compared with normal control group,<sup>a</sup> $P<0.05$ ;compared with empty vector group,<sup>b</sup> $P<0.05$ (One-way ANOVA,LSD-*t* test) FBN2:fibrillin-2;LTBP:latent transforming growth factor-β binding protein;TGF-β:transforming growth factor-β;CDK2:cyclin dependent kinase 2;CCND2:cyclin D2

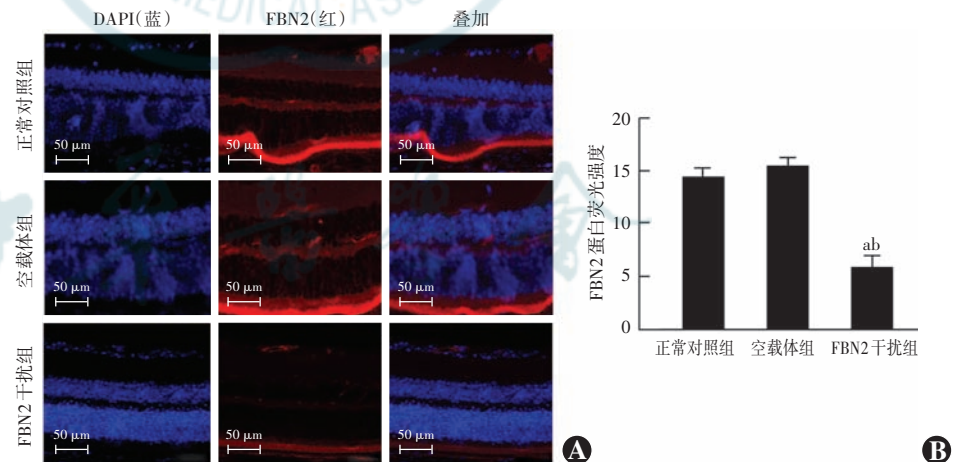


图 3 各组小鼠实验眼视网膜 FBN2 蛋白表达情况 A:各组小鼠实验眼视网膜 FBN2 蛋白表达荧光图(Alexa Fluor 594 ×400,标尺=50 μm) FBN2 蛋白在视网膜全层表达,FBN2 干扰组荧光强度较正常对照组和空载体组全视野膜明显均匀减弱 B:各组视网膜 FBN2 蛋白荧光强度量化比较  $F = 66.03, P < 0.05$ 。与正常对照组相比,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与空载体组相比,<sup>b</sup> $P < 0.05$ (单因素方差分析,LSD-*t*检验, $n = 3$ ) DAPI:二脒基苯基吲哚;FBN2:原纤维蛋白-2

Figure 3 Expression of FBN2 protein in mouse retina in the experimental eyes in different groups A:Immunofluorescence staining of retinal FBN2 protein expression in the mouse experimental eyes in different groups (Alexa Fluor 594 ×400, scale bar=50 μm) FBN2 protein was expressed throughout the retina and its fluorescence intensity was weaker in FBN2 interference group than in normal control group and empty vector group B:Comparison of fluorescence intensity of FBN2 protein among three groups  $F = 66.03, P < 0.05$ . Compared with normal control group,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;compared with empty vector group,<sup>b</sup> $P < 0.05$ (One-way ANOVA,LSD-*t* test, $n = 3$ ) DAPI:diamidindine phenyl indole;FBN2:fibrinin-2

带灰度明显增强。正常对照组、空载体组、FBN2 干扰组 FBN2、LTBP-1、TGF-β2、CDK2 和 CCND2 蛋白相对表达量总体比较,差异均有统计学意义 ( $F = 79.57、50.66、63.88、89.67、43.18$ , 均  $P < 0.05$ ), 其中与正常对照组和空载体组比较,FBN2 干扰组 FBN2、CDK2 和 CCND2 蛋白相对表达量均明显降低,LTBP-1、TGF-β2 蛋白相对表达量均明显升高,差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ) (图 4, 表 3)。

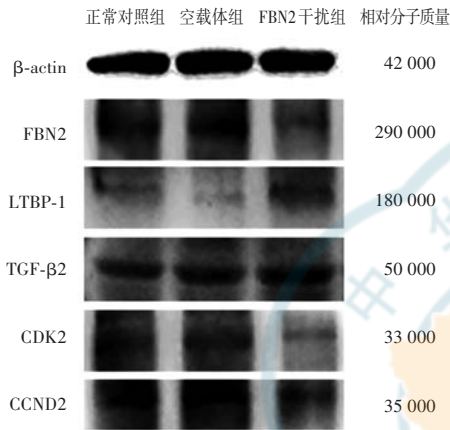


图 4 各组 FBN2、LTBP-1、TGF-β2、CDK2、CCND2 蛋白表达电泳图 与正常对照组和空载体组相比,FBN2 干扰组 LTBP-1、TGF-β2 蛋白条带灰度增强,FBN2、CDK2、CCND2 蛋白条带灰度减弱 FBN2:原纤维蛋白-2;LTBP:潜伏转化生长因子-β 结合蛋白;TGF-β:转化生长因子-β;CDK2:周期蛋白依赖性激酶 2;CCND2:细胞周期素 D2

Figure 4 Electrophoretogram of FBN2, LTBP-1, TGF-β2, CDK2 and CCND2 proteins expression in different groups Compared with normal control and empty vector groups, the gray levels of LTBP-1 and TGF-β2 protein bands in the FBN2 interference group were stronger, and the gray levels of FBN2, CDK2 and CCND2 protein bands were weaker FBN2: fibrillin-2; LTBP: latent transforming growth factor-β binding protein; TGF-β: transforming growth factor-β; CDK2: cyclin dependent kinase 2; CCND2: cyclin D2

表 3 各组 FBN2、LTBP-1、TGF-β2、CDK2、CCND2 蛋白相对表达量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )  
Table 3 Comparison of relative expressions of FBN2, LTBP-1, TGF-β2, CDK2 and CCND2 proteins among three groups ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别       | 样本量 | FBN2                    | LTBP-1                  | TGF-β2                  | CDK2                    | CCND2                   |
|----------|-----|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 正常对照组    | 6   | 1.00±0.15               | 1.08±0.42               | 1.05±0.12               | 1.01±0.06               | 1.11±0.09               |
| 空载体组     | 6   | 1.13±0.01               | 1.01±0.04               | 1.07±0.06               | 1.14±0.09               | 1.12±0.08               |
| FBN2 干扰组 | 6   | 0.60±0.07 <sup>ab</sup> | 1.52±0.25 <sup>ab</sup> | 1.55±0.17 <sup>ab</sup> | 0.55±0.09 <sup>ab</sup> | 0.67±0.12 <sup>ab</sup> |
| F 值      |     | 79.57                   | 50.66                   | 63.88                   | 89.67                   | 43.18                   |
| P 值      |     | <0.001                  | 0.006                   | 0.002                   | <0.001                  | 0.005                   |

注:与正常对照组相比,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与空载体组相比,<sup>b</sup> $P < 0.05$  (单因素方差分析,LSD-*t* 检验) FBN2:原纤维蛋白-2;LTBP:潜伏转化生长因子-β 结合蛋白;TGF-β:转化生长因子-β;CDK2:周期蛋白依赖性激酶 2;CCND2:细胞周期素 D2

Note:Compared with normal control group,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;compared with empty vector group,<sup>b</sup> $P < 0.05$  (One-way ANOVA, LSD-*t* test) FBN2: fibrillin-2; LTBP: latent transforming growth factor-β binding protein; TGF-β: transforming growth factor-β; CDK2: cyclin dependent kinase 2; CCND2: cyclin D2

### 3 讨论

AMD 是全球老年人不可逆盲的主要原因,是一种复杂、高度遗传、多因素疾病,由年龄、遗传和环境因素相互作用引起。预计 2050 年,患有 AMD 的亚洲人将超过世界其他地区患病人数总和<sup>[11]</sup>。已有研究表明 FBN2 基因变异与早发性黄斑变性和 AMD 有关<sup>[1]</sup>,而 FBN2 基因变异导致视网膜疾病的发病机制尚不明确。AAV 载体具有宿主范围广、转染效率高、免疫原性低、免疫应答弱等优点,是视网膜疾病的优秀转染载体<sup>[12-13]</sup>。本课题组前期研究结果发现,以 AAV 为载体进行 FBN2 敲减后可以构建 FBN2 缺陷型视网膜病变模型<sup>[10]</sup>。在本研究中,敲减 FBN2 后出现的视功能下降和 RPE 结构不规则改变与前期研究结果一致<sup>[10]</sup>。本研究进一步发现 FBN2 缺陷型视网膜病变小鼠视网膜中 LTBP-1、TGF-β2 表达升高,CDK2、CCND2 表达降低,这为探索 FBN2 基因缺陷型视网膜病变发病机制提供了理论依据。

LTBP-1 和 TGF-β2 是纤维化标志物,活化的 TGF 可刺激肌成纤维细胞积聚紊乱和细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 僵硬,导致纤维化<sup>[14]</sup>。LTBP-1 是 TGF-β2 的上游因子,调节 TGF-β 在 ECM 内的分泌和定位活化<sup>[15]</sup>,诱导 ECM 内胶原积累和纤维化,最终诱发 AMD<sup>[16]</sup>。有研究发现,TGF-β2 在增生性玻璃体视网膜病变中表达增加,通过影响组织谷氨酰胺转移酶的量及活性及 RPE 细胞的分化状态促进疾病进展<sup>[17]</sup>。此外本课题组前期研究发现,玻璃体内注射 FBN2 抗体后 TGF-β2 表达水平升高,认为是导致 FBN2 缺陷型视网膜病变的重要发病机制<sup>[5]</sup>。在本研究中,玻璃体内注射 AAV 进行 FBN2 干扰后,视网膜内 TGF-β2 和 LTBP-1 表达明显高于 AAV 空载体注射眼,这一结果与以往研究结果一致,说明 TGF-β2 和 LTBP-1 参与了 FBN2 缺陷型视网膜病变的发展。

先天性挛缩性蜘蛛样指症和马凡综合征为常见遗传性结缔组织病,多由于 FBN2 基因变异导致 FBN2 蛋白合成减少和全身结缔组织纤维化<sup>[18]</sup>。有研究表明 G1/S 停滞是导致纤维化的重要影响因素<sup>[19]</sup>。此外,TGF-β2 的激

活可引起 G1/S 停滞。CDK 和 CCND2 表达的降低可以引起 G1/S 转换的停滞<sup>[20]</sup>。CDK2 是 RNA 转录和 G1/S 期推进的重要控制者,并参与一系列生物过程,在 DNA 损伤、细胞内转运、蛋白质降解、信号转导、DNA 和 RNA 代谢及翻译等途径中与蛋白质相互作用并使蛋白磷酸化<sup>[21]</sup>。CCND2 是细胞周期调节因子,也是细胞周期蛋白 D2-CDK4 (DC) 复合物的关键成员。CCND2 通过调节 G1 到 S 的相变来调节细胞周期,对细胞增殖和发育至关重要<sup>[22]</sup>。也有研究表明以细胞周期停滞为特征的细胞衰老是包含 AMD 在内的年龄相关疾病的重要因素<sup>[23]</sup>。在 AMD 中氧化损伤触发了 RPE 细胞的 G1/M 停滞,从而降低了细胞活力,增加了总细胞凋亡<sup>[24]</sup>。以上研究说明 G1/S 期停滞在 *FBN2* 缺陷型视网膜病变的发展中具有重要作用。在本研究中,G1/S 期相关蛋白 CDK2 和 CCND2 表达降低,与以上研究结果一致,表明在 *FBN2* 缺陷型视网膜病变中 CDK2、CCND2 表达抑制是疾病发展的重要机制。

本研究首次证明了 LTBP-1、TGF- $\beta$ 2 表达升高以及 G1/S 期相关蛋白 CDK2、CCND2 表达降低参与 *FBN2* 缺陷型视网膜病变的发展。该研究为探索 *FBN2* 基因缺陷引起的眼部疾病进展提供了实验研究基础,为进一步明确 *FBN2* 缺陷型视网膜病变发病机制提供了证据,也为研究 *FBN2* 缺陷型视网膜病变的精准治疗提供了新的靶点。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

**作者贡献声明** 张瑞雪:实施研究、采集/分析数据、统计分析、文章撰写;蒋文君、郭大东、石永伟:实施研究;毕宏生、温莹:酝酿和设计实验、指导研究、对文章的知识性内容作批评性审阅及定稿

## 参考文献

- Ratnapriya R, Zhan X, Fariss RN, et al. Rare and common variants in extracellular matrix gene fibrillin 2 (FBN2) are associated with macular degeneration [J]. Hum Mol Genet, 2014, 23 (21): 5827-5837. DOI: 10.1093/hmg/ddu276.
- Duvvari MR, van de Ven JP, Geerlings MJ, et al. Whole exome sequencing in patients with the cuticular drusen subtype of age-related macular degeneration [J/OL]. PLoS One, 2016, 11 (3): e0152047 [2023-11-16]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27007659. DOI: 10.1371/journal.pone.0152047.
- Nistala H, Lee-Arteaga S, Smaldone S, et al. Fibrillin-1 and -2 differentially modulate endogenous TGF- $\beta$  and BMP bioavailability during bone formation [J]. J Cell Biol, 2010, 190 (6): 1107-1121. DOI: 10.1083/jcb.201003089.
- Schlecht A, Leimbeck SV, Jägle H, et al. Deletion of endothelial transforming growth factor- $\beta$  signaling leads to choroidal neovascularization [J]. Am J Pathol, 2017, 187 (11): 2570-2589. DOI: 10.1016/j.ajpath.2017.06.018.
- Xu F, Guo D, Jiang Q, et al. Association between anti-fibrillin-2 protein induced retinal degeneration via intravitreal delivery and activated TGF- $\beta$  signalling in mice [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2022, 49 (5): 586-595. DOI: 10.1111/1440-1681.13631.
- Zilberberg L, Todorovic V, Dabovic B, et al. Specificity of latent TGF- $\beta$  binding protein (LTBP) incorporation into matrix: role of fibrillins and fibronectin [J]. J Cell Physiol, 2012, 227 (12): 3828-3836. DOI: 10.1002/jcp.24094.
- Chiu YS, Wei CC, Lin YJ, et al. IL-20 and IL-20R1 antibodies protect against liver fibrosis [J]. Hepatology, 2014, 60 (3): 1003-1014. DOI: 10.1002/hep.27189.
- Chang C, Wang D, Xi L, et al. The orphan GPR50 receptor interacting with T $\beta$ RI induces G1/S-phase cell cycle arrest via Smad3-p27/p21 in BRL-3A cells [J/OL]. Biochem Pharmacol, 2022, 202: 115117 [2023-11-16]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35671788. DOI: 10.1016/j.bcp.2022.115117.
- Hume S, Dianov GL, Ramadan K. A unified model for the G1/S cell cycle transition [J/OL]. Nucleic Acids Res, 2020, 48 (22): 12483-12501 [2023-11-16]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33166394/. DOI: 10.1093/nar/gkaa1002.
- 张瑞雪, 蒋文君, 石永伟, 等. 玻璃体内注射腺相关病毒介导原纤维蛋白-2 基因干扰对小鼠视网膜的影响 [J]. 眼科新进展, 2021, 41 (9): 806-811. DOI: 10.13389/j.cnki.rao.2021.0169. Zhang RX, Jiang WJ, Shi YW, et al. Effect of intervening the fibrillin-2 gene via intravitreal injection of adeno-associated virus on mouse retina [J]. Rec Adv Ophthalmol, 2021, 41 (9): 806-811. DOI: 10.13389/j.cnki.rao.2021.0169.
- Wong CW, Yanagi Y, Lee WK, et al. Age-related macular degeneration and polypoidal choroidal vasculopathy in Asians [J]. Prog Retin Eye Res, 2016, 53: 107-139. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2016.04.002.
- Gonzalez-Cordero A, Goh D, Kruczek K, et al. Assessment of AAV vector tropisms for mouse and human pluripotent stem cell-derived RPE and photoreceptor cells [J]. Hum Gene Ther, 2018, 29 (10): 1124-1139. DOI: 10.1089/hum.2018.027.
- Jia R, Meng X, Chen S, et al. AAV-mediated gene-replacement therapy restores viability of BCD patient iPSC derived RPE cells and vision of Cyp4v3 knockout mice [J]. Hum Mol Genet, 2023, 32 (1): 122-138. DOI: 10.1093/hmg/ddac181.
- Klingberg F, Chau G, Walraven M, et al. The fibronectin ED-A domain enhances recruitment of latent TGF- $\beta$ -binding protein-1 to the fibroblast matrix [J/OL]. J Cell Sci, 2018, 131 (5): jcs201293 [2023-11-18]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29361522. DOI: 10.1242/jcs.201293.
- Mazzieri R, Jurukovski V, Obata H, et al. Expression of truncated latent TGF-beta-binding protein modulates TGF-beta signaling [J]. J Cell Sci, 2005, 118 (Pt 10): 2177-2187. DOI: 10.1242/jcs.02352.
- García-Onrubia L, Valentín-Bravo FJ, Coco-Martin RM, et al. Matrix metalloproteinases in age-related macular degeneration (AMD) [J/OL]. Int J Mol Sci, 2020, 21 (16): 5934 [2023-11-18]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32824762. DOI: 10.3390/ijms21165934.
- Priglinger SG, May CA, Neubauer AS, et al. Tissue transglutaminase as a modifying enzyme of the extracellular matrix in PVR membranes [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003, 44 (1): 355-364. DOI: 10.1167/iovs.02-0224.
- Davis MR, Summers KM. Structure and function of the mammalian fibrillin gene family: implications for human connective tissue diseases [J]. Mol Genet Metab, 2012, 107 (4): 635-647. DOI: 10.1016/j.ymgme.2012.07.023.
- Taguchi K, Elias BC, Sugahara S, et al. Cyclin G1 induces maladaptive proximal tubule cell dedifferentiation and renal fibrosis through CDK5 activation [J/OL]. J Clin Invest, 2022, 132 (23): e158096 [2023-11-18]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/36453545. DOI: 10.1172/JCI158096.
- Li X, Liu F, Lin B, et al. miR-150 inhibits proliferation and tumorigenicity via retarding G1/S phase transition in nasopharyngeal carcinoma [J]. Int J Oncol, 2017, 50 (4): 1097-1108. DOI: 10.3892/ijo.2017.3909.
- Tadesse S, Anshabo AT, Portman N, et al. Targeting CDK2 in cancer: challenges and opportunities for therapy [J]. Drug Discov Today, 2020, 25 (2): 406-413. DOI: 10.1016/j.drudis.2019.12.001.
- Jeong OS, Chae YC, Jung H, et al. Long noncoding RNA linc00598 regulates CCND2 transcription and modulates the G1 checkpoint [J/OL]. Sci Rep, 2016, 6: 32172 [2023-11-18]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27572135. DOI: 10.1038/srep32172.
- Terao R, Ahmed T, Suzumura A, et al. Oxidative stress-induced cellular senescence in aging retina and age-related macular degeneration [J/OL]. Antioxidants (Basel), 2022, 11 (11): 2189 [2023-11-18]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/36358561. DOI: 10.3390/antiox11112189.



[24] Liu H, Liu W, Zhou X, et al. Protective effect of lutein on ARPE-19 cells upon H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced G2/M arrest[J]. Mol Med Rep, 2017, 16(2): 2069-2074. DOI: 10. 3892/mmr. 2017. 6838.

(收稿日期: 2024-01-23 修回日期: 2024-08-11)

(本文编辑: 张宇 骆世平)

## · 病例报告 ·

# SOX2 基因突变 (c. 70\_86del) 导致先天性无眼症合并智力障碍一例

袁均<sup>1</sup> 李艳<sup>2</sup> 孙荣<sup>1</sup> 李欣<sup>1</sup> 张勇<sup>1</sup>

<sup>1</sup>湖北医药学院附属十堰市太和医院眼科中心, 十堰 442000; <sup>2</sup>十堰市太和医院生殖医学中心, 十堰 442000

通信作者: 张勇, Email: inforzy@163. com

基金项目: 湖北省十堰市科技局指导项目 (18Y32); 太和医院院级项目 (2019JJXM004)

**Congenital anophthalmia with mental retardation due to SOX2 mutation (c. 70\_86del): a case report**

Yuan Jun<sup>1</sup>, Li Yan<sup>2</sup>, Sun Rong<sup>1</sup>, Li Xin<sup>1</sup>, Zhang Yong<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology Center, Taihe Hospital, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, China;

<sup>2</sup>Taihe Hospital Reproductive Medicine Center, Shiyan 442000, China

Corresponding author: Zhang Yong, Email: inforzy@163. com

**Fund program:** Guidance Project of Shiyan Science and Technology Bureau (18Y32);

College-level Project of Taihe Hospital (2019JJXM004)

DOI: 10. 3760/cma. j. cn115989-20210909-00505

患儿, 女, 3 岁。因出生后双眼无眼裂于 2019 年 10 月 26 日来十堰市太和医院就诊。患儿为足月顺产第 1 胎, 出生时身高 50 cm, 体质量为 3 180 g, 母亲孕早期无感冒, 无用药及疾病史, 无放射性及毒物接触史, 优生优育五项检测 (TORCH) 阴性, 父母非近亲结婚, 否认家族史。患儿目前身高为 95 cm, 属正常范围, 双下肢肌张力减低, 无法正常行走, 语言障碍, 韦氏幼儿智力量表得分为 58 分, 提示智力落后。幼女外生殖器发育正常, 平时饮食及泌尿系统正常, 未出现癫痫症状, 生长激素 (GH) 峰值为 15 ng/ml, 心电图未见异常, 骨骼系统未做过检测。眼部检查: 双眼窝轻度内陷, 双眼眼裂小, 睁开困难, 弹足 2 次皱眉, 双眼上下睑缘存在, 可分开, 睑缘睫毛整齐排列。眼部触诊显示眼窝柔软, 双眼未触及眼球及硬结组织。上下眼睑正常, 上下泪小点在位, 双眼眼窝可见, 结膜囊内结膜覆盖, 未见角膜及巩膜等眼球形态 (图 1)。眼部 B 型超声检查结果示双眼未探及正常眼球组织 (图 2)。眼眶核磁共振 (magnetic resonance imaging, MRI) 检查结果显示双侧眼球缺失, 双侧视神经萎缩、变细, 考虑先天发育异常 (图 3)。颅脑 MRI、CT、脑电图检查均未见明显异常, 全外显子组测序和 Sanger 测序发现患者的 SOX2 基因杂合突变 c. 70\_86del (p. Asn24GlyfsTer66), 患儿父母及正常对照均未检测到该突变 (图 4), 诊断如下: (1) 先天性眼球缺如; (2) 先天性视神经缺如; (3) 基因自发突变。患儿父母为备孕第 2 胎, 查明原因后将进行产前诊断。本研究通过十堰市太和医院伦理委员会审核批准 (批文号: 2020KS045), 并征求患者家属知情同意。

**讨论:** 先天性无眼症是一种罕见且非常严重的先天缺陷, 指出生时眼眶内没有眼组织, 可单侧或双侧发病, 其发病率约为 0.3/10 000, 可以单独发生或者合并心脏、骨骼系统及中枢神经系统的异常<sup>[1-2]</sup>。该病的发病机制仍存在争议, 主要包括

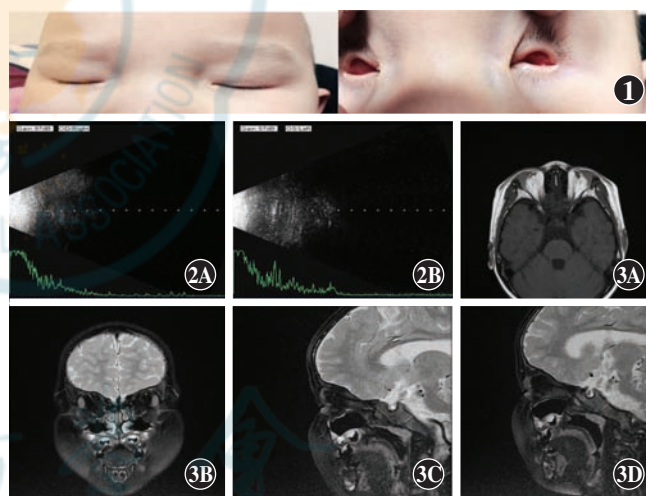


图 1 患儿眼部外观图像 双眼上下眼睑正常, 眼窝可见, 未见角膜及巩膜等眼球形态 图 2 双眼 B 型超声图像 A: 右眼 B: 左眼 未发现正常眼球组织 图 3 患儿眼眶 MRI 图像 A: 横切面 B: 冠状位 (压脂序列) C: 右眼矢状位 (压脂序列) D: 左眼矢状位 (压脂序列) 双侧眼眶内未见眼球及视神经

遗传缺陷和遗传性因素 (孕早期环境、病毒及药物影响), 遗传方式包括常染色体显性、常染色体隐性及 X 连锁遗传<sup>[3]</sup>。余洪华等<sup>[4]</sup>曾报道 2 例先天性无眼球病例, 认为发病原因可能是孕早期母体感染病毒和服用某些药物所致。潘开明等<sup>[5]</sup>报道了 1 个家系中出现 4 例常染色体隐性遗传的先天性无眼球患者。无眼症和小眼症属于同一临床谱系, 具有高度的遗传异质性, 目前已报道出有 90 多个关联基因, 但主要与 3q26 (SOX2) 缺失、3q29 重复、11p13 (PAX6) 重复和 17q11.2 (NF1) 突变、SALL2 突变有关<sup>[6-7]</sup>, 而关键转录因子 SOX2 的突变占人类无眼症和小眼症的 20%, 被确定为主要的致病基因<sup>[8]</sup>, SOX2