

51 个视网膜色素变性家系遗传学特征分析

周玲玲 周梦涵 沈吟

武汉大学人民医院眼科中心, 武汉 430060

通信作者: 沈吟, Email: yinshen@whu.edu.cn

【摘要】 目的 分析视网膜色素变性(RP)家系的致病基因。方法 采用家系调查研究方法,收集2019年6月至2022年12月就诊于武汉大学人民医院的中国51个RP家系的临床资料,包括患者病史、家族史及眼科检查临床资料,眼科检查临床资料包括最佳矫正视力、裂隙灯显微镜、彩色眼底照相、眼底自发荧光、黄斑区光学相干断层扫描、视野及视网膜电图。采集患者及家属外周血,提取DNA,进行全外显子测序,对发现的变异位点进行生物信息学分析、Sanger验证。采用SIFT、Polyphen等在线软件预测错义变异致病性,采用Mutation Taster在线软件评估错义变异位点的保守性,采用varSEAK、spliceAI对剪切变异进行预测,并用Clustalw软件对新发现的变异位点进行多物种蛋白质氨基酸序列比对。结果 51个家系中,2例先证者伴有听力障碍,被诊断为Usher综合征,2例先证者眼底成像除典型RP特征外还出现黄白色结晶样物质沉着,其余家系先证者眼底成像表现为典型RP。51个家系中,29个家系在15个致病基因中检测出38个单核苷酸变异(SNVs)和3个拷贝数变异,包括PRPF6、PRPF31、RHO、CYP4V2、USH2A、EYS、MERTK、PCDH15、ABCA4、BBS2、PROM1、SPATA7、RPE65、RPGR、OFD1基因,38个SNVs中有6个未曾报道过的新变异,分别是USH2A基因c.12523T>C(p.Trp4175Arg)、c.1723T>C(p.Cys575Arg)、c.1875C>G(p.Phe625Leu)、CYP4V2基因c.1441C>T(p.Leu481Phe)、MERTK基因c.2487-8A>G和PCDH15基因c.5183del(p.Arg1728LysfsTer116)。SIFT、Polyphen预测软件对USH2A基因p.Trp4175Arg、p.Cys575Arg、p.Phe625Leu和CYP4V2基因p.Leu481Phe这4个错义变异位点造成的氨基酸改变预测均为致病或有害,保守性分析显示其在多个物种中保守。spliceAI、varSEAK预测软件均提示,MERTK基因c.2487-8A>G可能会导致剪切异常,影响蛋白质功能。PCDH15基因c.5183del(p.Arg1728LysfsTer116)为移码变异,会改变下游氨基酸序列并使翻译提前终止。CYP4V2、USH2A、RPGR基因为RP患者中变异频率较高的基因,占有检出致病基因家系的50%以上,其中CYP4V2基因致病的先证者起病较晚,但视功能下降和视网膜退变更严重。结论 本研究发现了6个未报道过的变异可能是RP的致病变异;CYP4V2、USH2A和RPGR基因是中国RP患者主要的致病基因;CYP4V2基因致病的患者起病较晚,但疾病进展较快。

【关键词】 视网膜色素变性; 全外显子测序; 致病基因; 变异

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFE0103400)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20230221-00058

Genetic characteristics of 51 retinitis pigmentosa families

Zhou Lingling, Zhou Menghan, Shen Yin

Eye Center, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China

Corresponding author: Shen Yin, Email: yinshen@whu.edu.cn

【Abstract】 **Objective** To analyze the disease-causing genes of families affected by retinitis pigmentosa (RP). **Methods** A pedigree investigation study was performed. The clinical data of 51 Chinese families with RP treated at the Renmin Hospital of Wuhan University from June 2019 to December 2022 were collected, including patient history, family history and clinical data of ophthalmic examination. Ophthalmic examination including best corrected visual acuity, slit lamp microscopy, color fundus photography, fundus autofluorescence, macular optical coherence tomography, visual field and electroretinogram. Peripheral blood samples from patients and their family members were collected for DNA extraction and whole exome sequencing. The mutation sites found were analyzed by bioinformatics and verified by Sanger sequencing. The pathogenicity of the missense mutations was predicted using SIFT, Polyphen and other online software. Conservation of the missense mutation site was evaluated using Mutation

Taster. The shear mutation was predicted using varSEAK and spliceAI. The amino acid sequences of the newly discovered mutation sites were compared using Clustalw software. This study adhered to the Declaration of Helsinki. The study protocol was approved by the Ethics Committee of Renmin Hospital of Wuhan University (No. WDRY2019-K032). **Results** Among the 51 families, two proband patients had hearing impairment and were diagnosed as Usher syndrome. In addition to typical RP features, the two proband patients also showed yellow-white crystalline substance deposits in fundus imaging, while the other proband patients showed typical RP. A total of 38 single nucleotide variants (SNVs) and 3 copy number variants were detected in 15 pathogenic genes in 29 of 51 families, including *PRPF6*, *PRPF31*, *RHO*, *CYP4V2*, *USH2A*, *EYS*, *MERTK*, *PCDH15*, *ABCA4*, *BBS2*, *PROM1*, *SPATA7*, *RPE65*, *RPGR* and *OFD1* genes. There were 6 of the 38 SNVs that were novel variants that had not been reported, which were *USH2A* gene c. 12523T>C (p. Trp4175Arg), c. 1723T>C (p. Cys575Arg), c. 1875C>G (p. Phe625Leu), *CYP4V2* gene c. 1441C>T (p. Leu481Phe), *MERTK* gene c. 2487-8A>G and *PCDH15* gene c. 5183del (p. Arg1728LysfsTer116). SIFT and Polyphen prediction software predicted that amino acid changes caused by the 4 missense variants, *USH2A* gene p. Trp4175Arg, p. Cys575Arg, p. Phe625Leu and *CYP4V2* gene p. Leu481Phe, are all pathogenic or harmful. Conservation analysis showed that they are conserved in multiple species. The prediction software spliceAI and varSEAK suggested that *MERTK* gene c. 2487-8A>G may lead to abnormal shear and affect protein function. *PCDH15* gene c. 5183del (p. Arg1728LysfsTer116) is a frameshift variant that alters the downstream amino acid sequence and terminates translation early. *CYP4V2*, *USH2A*, and *RPGR* were frequently mutated genes in RP patients, accounting for more than 50% of the families with pathogenic genes detected. The proband with *CYP4V2* variants had late onset, but severe visual impairment and retinal degeneration. **Conclusions** Six previously unreported variants may be novel pathogenic variants of RP. *CYP4V2*, *USH2A*, and *RPGR* may be the most common pathogenic genes in Chinese RP patients. Patients with *CYP4V2* variants have late onset, but faster disease progression.

[Key words] Retinitis pigmentosa; Whole exome sequencing; Pathogenic genes; Variants

Fund program: National Key R&D Program of China (2017YFE0103400)

DOI:10. 3760/cma. j. cn115989-20230221-00058

视网膜色素变性 (retinitis pigmentosa, RP) 是一种主要以光感受器和色素上皮层退变为特点的视网膜进行性病变, 世界范围内发病率约为 1/4 000^[1]。RP 的主要特点是从周边视网膜开始发生光感受器细胞凋亡, 并逐渐向黄斑中心进展, 导致相应的周边部视野逐渐丧失, 最终黄斑中心凹光感受器细胞受累, 中心视力丧失。眼底主要表现为色素沉着、视网膜血管变细和视盘蜡黄^[2]。根据是否伴有全身症状, RP 又可分为综合征性 RP 和非综合征性 RP, 其中综合征性 RP 主要包括 Usher 综合征和 Bardet-Biedl 综合征^[3]。临床上主要通过临床表现、彩色眼底照相、光学相干断层扫描 (optical coherence tomography, OCT)、视网膜电图 (electroretinogram, ERG)、视野及眼底血管造影检查来诊断 RP, 分子诊断也逐渐成为临床诊断的重要组成部分。目前已发现超过 90 个 RP 相关致病基因 (<https://web.sph.uth.edu/RetNet/>), 这些基因编码的蛋白在光转导级联、视觉循环、RNA 剪切、视网膜代谢、纤毛的结构与功能维持等方面发挥重要作用^[4-6]。本研究通过全外显子测序 (whole exome sequencing, WES) 明确 RP 家系的致病基因, 分析 RP 患者的遗传

学特征及致病基因频谱, 为 RP 患者的诊断和遗传咨询以及中国 RP 人群的流行病学研究提供参考依据, 并为 RP 基因治疗的研究方向提供新的思路。

1 资料与方法

1.1 一般资料

采用家系调查研究方法, 选取 2019 年 6 月至 2022 年 12 月就诊于武汉大学人民医院眼科中心的中国 51 个 RP 家系作为研究对象, 其中 6 个家系 (占 11.8%) 有明确家族史, 45 个家系 (占 88.2%) 无家族史。家系中先证者男 35 例 (占 68.6%), 女 16 例 (占 31.4%); 年龄 12~60 岁, 平均 (37.9±10.6) 岁; 平均起病年龄 (22.5±10.8) 岁, 49.0% 的 RP 患者起病于 20 岁之前。所有先证者均主诉双眼夜盲、视力下降和视野变小。23.5% 患者为低视力 (视力 0.05~0.30), 13.7% 患者为法定盲 (视力 < 0.05)。本研究遵循《赫尔辛基宣言》, 研究方案经武汉大学人民医院伦理委员会审批 (批文号: WDRY2019-K032), 先证者或其监护人均签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 临床检查 收集患者的病史、家族史及眼科检

查临床资料,包括最佳矫正视力(best corrected visual acuity, BCVA)、裂隙灯显微镜(英国 Keeler 公司)、彩色眼底照相、眼底自发荧光(英国 Optos 公司)、黄斑区 OCT(美国 Optovue 公司)、视野(德国 Carl Zeiss 公司)及 ERG 检查等。

1.2.2 WES 抽取先证者及相关家系成员外周血各 5 ml,使用 Blood Mini Kit 试剂盒(QiAamp®, 德国 Qiagen 公司)提取全基因组 DNA,分光光度计(德国 IMPLEN 公司)检测 DNA 浓度和纯度。使用 DNA 超声破碎仪(美国 Covaris 公司)将 DNA 片段化至 150~300 bp。对片段化的 DNA 进行末端修复及加 A 反应,连接接头后扩增。使用 xGen® Exome Research Panel v1.0 试剂盒(美国 IDT 公司)对扩增后的文库进行靶向捕获。使用 Illumina Novaseq 6000(美国 Illumina 公司)对 DNA 样本进行测序。

1.2.3 生物信息学分析及变异验证

1.2.3.1 生物信息学分析 使用 BWA 将 reads 比对到人类参考基因组(GRCH37/hg19)上^[6],使用 GATK 标准变异检测流程检测单核苷酸多态性、indel^[7]。使用 ANNOVAR 对获得的变异结果进行注释^[8]。在变异位点的筛选过程中,过滤掉 gnomAD、ExAC、千人数据库和 ESP6500 数据库中等位基因频率均大于 1% 的变异。依次进行优先级排序,以研究潜在的有害变异。根据 ACMG 遗传变异分类标准与指南进行变异位点的分类^[9]。

1.2.3.2 Sanger 验证和拷贝数变异检测 对怀疑致病的变异进行 Sanger 验证,采用 Primer 5.0 软件设计引物,PCR 扩增目标片段,对扩增片段进行纯化和测序,Chromas 软件分析测序结果。拷贝数变异(copy number variation, CNV)的检测参考内部样本,采用实时定量 PCR 进行验证。

1.2.3.3 变异位点分析 采用 SIFT、Polyphen 等在线软件预测错义变异致病性,采用 Mutation Taster 在线软件中的 PhyloP 值评估错义变异位点的保守性(数值为-14~6,数值越大,保守性越高),采用 varSEAK、spliceAI(数值为 0~1,数值越大,剪切变异致病的可能性越大)对剪切变异进行预测,并用 Clustalw 软件对新发现的变异位点进行多物种蛋白质氨基酸序列比对。

2 结果

2.1 各家系临床表型

51 个家系中,2 例先证者伴有听力障碍,被诊断为 Usher 综合征,2 例先证者眼底成像除典型 RP 特征外还出现黄白色结晶样物质沉着(家系 7、10),其余家系先证者眼底成像表现为典型 RP(图 1)。

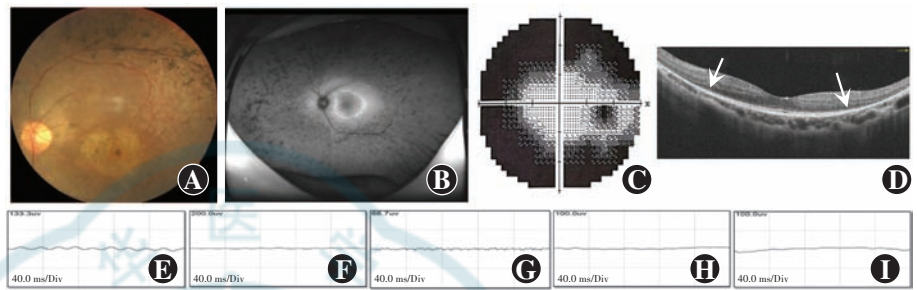


图 1 典型 RP 临床特征 A:彩色眼底照相 视网膜可见骨细胞样色素沉着、视网膜血管变细、视盘蜡黄 B:超广角眼底自发荧光 周边视网膜低自发荧光,黄斑区异常高自发荧光环 C:视野检查 管状视野 D:黄斑区 OCT 椭圆体带断裂(箭头) E~I:ERG 暗适应和明适应呈熄灭型改变

Figure 1 Clinical characteristics of typical RP A: Fundus photograph Bone spicule pigmentation deposits, attenuated retinal blood vessels and a waxy-pale optic disc in the retina B: Ultra-wide field fundus autofluorescence Decreased autofluorescence in the peripheral retina and abnormal hyperautofluorescence ring in the macula C: Visual field Tunnel vision D: OCT Disruption of the retinal ellipsoid zone (arrows) E-I: ERG Extinguished scotopic and photopic adaptation

2.2 基因测序及生物信息学分析

51 个家系中,共 29 个家系(占 56.9%)检测出 RP 相关致病基因,其中 3 个家系为常染色体显性遗传,致病基因分别为 *PRPF6* (1/29)、*PRPF31* (1/29)、*RHO* (1/29);14 个家系为常染色体隐性遗传,8 个家系先证者为散发性 RP,与 10 个致病基因有关,分别为 *CYP4V2* (8/29)、*USH2A* (4/29)、*EYS* (2/29)、*MERTK* (2/29)、*ABCA4* (1/29)、*BBS2* (1/29)、*PCDH15* (1/29)、*SPATA7* (1/29)、*PROM1* (1/29)、*RPE65* (1/29) 基因;4 个家系为 X 染色体连锁遗传,致病基因为 *RPGR* (3/29)、*OFD1* (1/29) 基因。2 例 Usher 综合征先证者变异基因分别为 *USH2A* 和 *PCDH15*,视网膜出现结晶样颗粒的 2 例先证者变异基因均为 *CYP4V2*。

29 个确定致病基因的家系中,共发现 3 个 CNV 变异(*PRPF31*、*MERTK* 和 *SPATA7* 基因,均为片段缺失变异,占 7.3%)和 38 个单核苷酸变异(single nucleotide variations, SNVs)(表 1),SNVs 包含 22 个错义变异(占 53.7%)、5 个移码变异(占 12.2%)、4 个剪切变异(占 9.8%)、3 个无义变异(占 7.3%)、3 个缺失变异(占 7.3%)和 1 个小片段插入缺失变异(占 2.4%)。

表 1 29 个 RP 家系中确定的致病基因变异信息
Table 1 Variant information of disease-causing genes detected in 29 RP families

家系	性别	诊断	遗传模式	变异基因	转录本	变异位点	氨基酸变化	变异类型
1	女	RP	AD	<i>PRPF31</i>	NM_015629.3	CNV	-	CNV
2	女	RP	AD	<i>PRPF6</i>	NM_012469.3	c. 514C>T	p. Arg172Trp	错义
3	女	RP	AD	<i>RHO</i>	NM_000539.3	c. 50C>T	p. Thr17Met	错义
4	男	结晶样 RP	AR	<i>CYP4V2</i>	NM_207352.3	c. 802-8_810delinsGC	p. Val268_Glu329del	插入缺失
5	男	结晶样 RP	AR	<i>CYP4V2</i>	NM_207352.3	c. 802-8_810delinsGC	p. Val268_Glu329del	插入缺失
6	男	结晶样 RP	AR	<i>CYP4V2</i>	NM_207352.3	c. 958C>T	p. Arg320Ter	无义
				<i>CYP4V2</i>	NM_207352.3	c. 802-8_810delinsGC	p. Val268_Glu329del	插入缺失
7	女	结晶样 RP	AR	<i>CYP4V2</i>	NM_207352.3	c. 1091-2A>G	-	剪切
				<i>CYP4V2</i>	NM_207352.3	c. 802-8_810delinsGC	p. Val268_Glu329del	插入缺失
8	女	结晶样 RP	AR	<i>CYP4V2</i>	NM_207352.3	c. 283G>A	p. Gly95Arg	错义
				<i>CYP4V2</i>	NM_207352.3	c. 992A>C	p. His331Pro	错义
9	男	结晶样 RP	散发	<i>CYP4V2</i>	NM_207352.3	c. 1091-2A>G	-	剪切
				<i>CYP4V2</i>	NM_207352.3	c. 1441C>T	p. Leu481Phe	错义
10	男	结晶样 RP	散发	<i>CYP4V2</i>	NM_207352.3	c. 802-8_810delinsGC	p. Val268_Glu329del	插入缺失
				<i>CYP4V2</i>	NM_207352.3	c. 65T>A	p. Leu22His	错义
11	男	结晶样 RP	散发	<i>CYP4V2</i>	NM_207352.3	c. 992A>C	p. His331Pro	错义
12	男	Usher 综合征	AR	<i>PCDH15</i>	NM_033056.3	c. 5254_5280del	p. Pro1752_Pro1760del	缺失
				<i>PCDH15</i>	NM_033056.3	c. 5183del	p. Arg1728LysfsTer116	移码
13	男	Usher 综合征	散发	<i>USH2A</i>	NM_206933.2	c. 12523T>C	p. Trp4175Arg	错义
				<i>USH2A</i>	NM_206933.2	c. 1723T>C	p. Cys575Arg	错义
14	男	RP	散发	<i>USH2A</i>	NM_206933.2	c. 13576C>T	p. Arg4526Ter	无义
				<i>USH2A</i>	NM_206933.2	c. 1875C>G	p. Phe625Leu	错义
15	男	RP	AR	<i>USH2A</i>	NM_206933.2	c. 13465G>A	p. Gly4489Ser	错义
				<i>USH2A</i>	NM_206933.2	c. 2802T>G	p. Cys934Trp	错义
16	男	RP	散发	<i>USH2A</i>	NM_206933.2	c. 12094G>A	p. Gly4032Arg	错义
				<i>USH2A</i>	NM_206933.2	c. 6741del	p. Ala2249ProfsTer30	移码
17	男	RP	散发	<i>EYS</i>	NM_001142800.1	c. 9248G>A	p. Gly3083Asp	错义
				<i>EYS</i>	NM_001142800.1	c. 9209T>C	p. Ile3070Thr	错义
18	男	RP	散发	<i>EYS</i>	NM_001142800.1	c. 6557G>A	p. Gly2186Glu	错义
				<i>EYS</i>	NM_001142800.1	c. 2953_2961del	p. T985_G987del	缺失
19	女	RP	AR	<i>MERTK</i>	NM_006343.2	c. 225del	p. Gly76GlufsTer3	移码
				<i>MERTK</i>	NM_006343.2	c. 2220G>A	-	剪切
20	男	RP	AR	<i>MERTK</i>	NM_006343.2	c. 2487-8A>G	-	剪切
				<i>MERTK</i>	NM_006343.2	CNV	-	CNV
21	男	RP	AR	<i>RPE65</i>	NM_006343.2	c. 1399C>G	p. Pro467Ala	错义
				<i>RPE65</i>	NM_006343.2	c. 200T>G	p. Leu67Arg	错义
22	男	RP	AR	<i>SPATA7</i>	NM_018418.4	c. 1112T>C	p. Ile371Thr	错义
				<i>SPATA7</i>	NM_018418.4	CNV	-	CNV
23	女	RP	AR	<i>PROM1</i>	NM_006017.2	c. 139del	p. His47IlefsTer12	移码
24	男	RP	AR	<i>BBS2</i>	NM_031885.3	c. 647G>C	p. Arg216Pro	错义
				<i>BBS2</i>	NM_031885.3	c. 79A>C	p. Thr27Pro	错义
25	女	RP	AR	<i>ABCA4</i>	NM_000350.2	c. 1761-2A>G	-	剪切
				<i>ABCA4</i>	NM_000350.2	c. 101_106del	p. Ser34_Leu35del	缺失
26	男	RP	XL	<i>RPGR</i>	NM_001034853.1	c. 2293del	p. Glu765ArgfsTer50	移码
27	男	RP	XL	<i>RPGR</i>	NM_001034853.1	c. 1070G>A	p. Gly357Asp	错义
28	男	RP	XL	<i>RPGR</i>	NM_001034853.1	c. 550C>T	p. Gln184Ter	无义
29	男	RP	XL	<i>OFD1</i>	NM_003611.2	c. 1244C>T	p. Ala415Val	错义

续表 1

家系	外显子/ 内含子	合子类型	人群频率 gnomAD (东亚)	SIFT	Polyphen2	Phylop	SpliceAI	varSEAK	ACMG	报道 (PMID)
1	E2-3 缺失	杂合	无	-	-	-			致病	-
2	E5	杂合	0	D	D	4.544			意义不明	31213501
3	E1	杂合	无	D	D	6.01			可能致病	1897520
4	I6	纯和	无	-	-	-			致病	29641573
5	I6	纯和	无	-	-	-			致病	29641573
6	E7	杂合	无	-	-	4.441			可能致病	21565171
	I6	杂合	无	-	-	-			致病	29641573
7	I8	杂合	0.000 54	-	-	-	0.96	SE	致病	29641573
	I6	杂合	无	-	-	-			致病	29641573
8	E2	杂合	0	D	D	5.064			致病	16179904
	E8	杂合	0.001	D	D	5.753			可能致病	15042513
9	I8	杂合	0.000 54	-	-	-	0.96	SE	致病	29641573
	E11	杂合	0.001	D	D	4.574			意义不明	新变异
10	I6	杂合	无	-	-	-			致病	29641573
	E1	杂合	无	T	D	0.086			意义不明	30429639
11	E8	纯和	0.001	D	D	5.753			可能致病	31872526
12	E33	杂合	无	-	-	-			可能致病	31178897
	E33	杂合	无	-	-	-			可能致病	新变异
13	E63	杂合	0.000 2	D	D	5.969			意义不明	新变异
	E10	杂合	0	D	D	4.761			意义不明	新变异
14	E63	杂合	无	-	-	-			致病	21593743
	E11	杂合	无	D	D	2.078			意义不明	新变异
15	E63	杂合	无	T	D	5.631			致病	32188678
	E13	杂合	0.002 5	D	D	4.035			致病	21686329
16	E62	杂合	0	D	D	5.034			致病	33105608
	E35	杂合	无	D	D	-			致病	29625443
17	E43	杂合	无	T	D	3.509			意义不明	27375351
	E43	杂合	0.004	D	D	0.71			意义不明	31213501
18	E32	杂合	0.000 56	D	D	3.836			致病	20237254
	E19	杂合	0.002 2	-	-	-			意义不明	31960602
19	E2	杂合	0.000 1	-	-	-			致病	25324289
	E17	杂合	0.000 054	-	-	-	0.99	LSE	意义不明	Clinvar
20	I18	杂合	无	-	-	-	0.69	SE	意义不明	新变异
	E2-4 缺失	杂合	无	-	-	-	0.98	SE	可能致病	-
21	E13	杂合	0.000 054	D	D	5.985			可能致病	30996589
	E3	杂合	0.000 1	D	D	4.781			可能致病	25030840
22	E10	杂合	0.000 7	D	D	3.203			意义不明	28481129
	E10 缺失	杂合	无	-	-	-			可能致病	-
23	E2	纯和	0.000 4	-	-	-			致病	24938718
24	E6	杂合	无	D	D	4.554			意义不明	22509104
	E1	杂合	无	T	D	1.42			可能致病	33777945
25	I12	杂合	0.000 055	-	-	-			致病	26780318
	E2	杂合	0.000 3	-	-	-			致病	25412400
26	E15	半合	无	-	-	-			可能致病	31960602
27	E10	半合	无	D	D	4.728			意义不明	31645972
28	E6	半合	无	-	-	-			可能致病	32856788
29	E13	半合	0.000 1	D	D	1.372			可能致病	31054281

注: RP: 视网膜色素变性; AD: 常染色体显性遗传; AR: 常染色体隐性遗传; CNV: 拷贝数变异; E: 外显子; I: 内含子; D: 有害的; SE: 剪切影响; LSE: 可能剪切影响; T: 可耐受的; XL: X 染色体连锁遗传; -: 未提及

Note: RP: retinitis pigmentosa; AD: autosomal dominant; AR: autosomal recessive; CNV: copy number variation; E: exon; I: intron; D: deleterious/damaging; SE: splicing effect; LSE: likely splicing effect; T: tolerated; XL: X-linked; -: not mentioned

在所有发现的致病基因中, 变异频率排名前 3 位的依次为 *CYP4V2*、*USH2A* 和 *RPGR*, 为 15 个(占 51.72%)家系的致病基因(图 2A)。8 个家系(占 27.6%)检测出 *CYP4V2* 基因的 7 个 SNVs, 4 个家系(占 13.8%)检测出 *USH2A* 基因的 8 个 SNVs, 3 个家系(占 10.3%)检测出 *RPGR* 基因的 3 个 SNVs。在这 3 个基因上检测到的变异在蛋白结构域上的分布见图 2B, 除 *RPGR* 基因 c.2293delG 变异位于 15 外显子开放阅读框(open reading frame, ORF)区域外, 其余变异位点均位于蛋白结构域或跨膜区域中。

在检测出的 38 个 SNVs 中, 在 5 个家系(家系 9、12、13、14、20)中共发现 6 个未报道过的变异, 分别为 *USH2A* 基因 c.12523T>C (p. Trp4175Arg)、c.1723T>C (p. Cys575Arg)、c.1875C>G (p. Phe625Leu)、*CYP4V2* 基因 c.1441C>T (p. Leu481Phe)、*MERTK* 基因 c.2487-8A>G 和 *PCDH15* 基因 c.5183del (p. Arg1728LysfsTer116)(图 3A~F), 这 6 个新变异在东亚人群中的频率极低或无记录。SIFT、Polyphen 预测软件对 *USH2A* 基因 p. Trp4175Arg、p. Cys575Arg、p. Phe625Leu 和 *CYP4V2* 基因 p. Leu481Phe 这 4 个错义变异造成的氨基酸改变预测均为致病或有害, 保守性分析显示 4 个变异位点的 PhyloP 值分别为 5.969、4.761、2.078 和 1.105, 均大于 0, 且多物种序列对比图示这 4 个错义变异位点对应的氨基酸在多个物种中保守(图 3G~J)。spliceAI、varSEAK 预测软件均提示, *MERTK* 基因 c.2487-8A>G 可能会导致剪切异常, 影响蛋白功能。*PCDH15* 基因 c.5183del (p. Arg1728LysfsTer116) 为移码变异, 会改变下游氨基酸序列并使翻译提前终止。

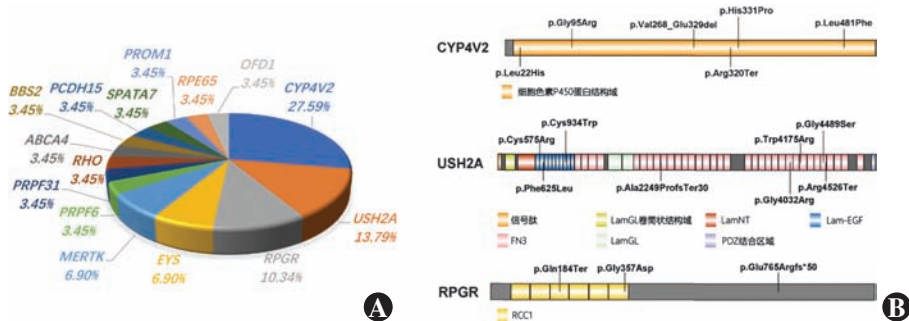


图 2 确定的 RP 致病基因比例图及 *CYP4V2*、*USH2A*、*RPGR* 蛋白变异位点示意图 A: 确定的 RP 致病基因比例图 B: *CYP4V2*、*USH2A*、*RPGR* 蛋白变异位点示意图
Figure 2 Proportions of genes associated with RP and schematic representation showing variants of *CYP4V2*, *USH2A* and *RPGR* protein A: Proportions of genes associated with RP B: Schematic representation showing variants of *CYP4V2*, *USH2A* and *RPGR* protein

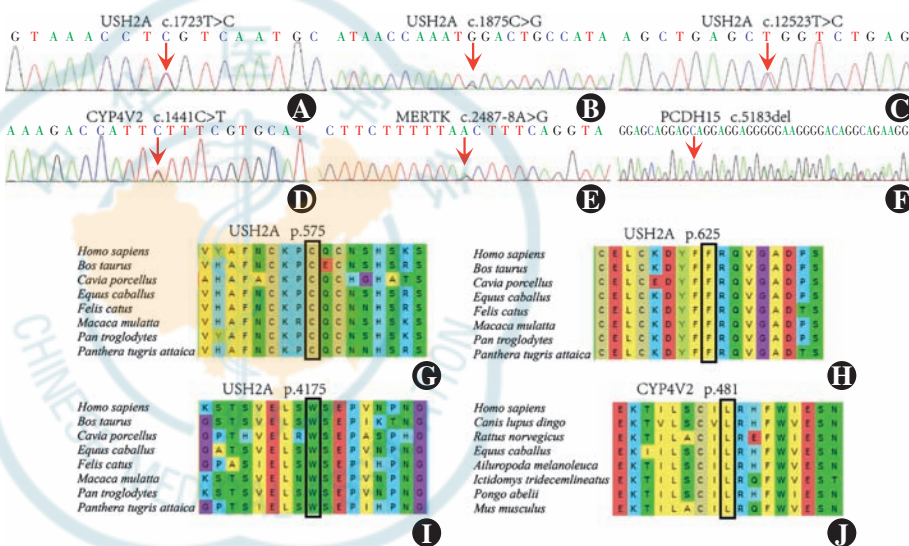


图 3 6 个新变异的 Sanger 验证结果和 4 个新错义变异的多物种序列比对 A: 家系 13, *USH2A* 基因第 1 723 位碱基由 T 变为 C (箭头) B: 家系 14, *USH2A* 基因第 1 875 位碱基由 C 变为 G (箭头) C: 家系 13, *USH2A* 基因第 12 523 位碱基由 T 变为 C (箭头) D: 家系 9, *CYP4V2* 基因第 1 441 位碱基由 C 变为 T (箭头) E: 家系 20, *MERTK* 基因第 2 487-8 位碱基由 A 变为 G (箭头) F: 家系 12, *PCDH15* 基因第 5 183 位碱基缺失 (箭头) G~I: *USH2A* 蛋白第 575、625、4 175 个氨基酸(方框)在多个物种间保守 J: *CYP4V2* 蛋白第 481 个氨基酸(方框)在多个物种间保守
Figure 3 Sanger sequencing of 6 novel variants and multi-species sequence alignments of 4 missense variants A: Base at position 1 723 of *USH2A* gene changed from T to C in family 13 (arrow) B: Base at position 1 875 of *USH2A* gene changed from C to G in family 14 (arrow) C: Base at position 12 523 of *USH2A* gene changed from T to C in family 13 (arrow) D: Base at position 1 441 of *CYP4V2* gene changed from C to T in family 9 (arrow) E: Base at position 2 487-8 of *MERTK* gene changed from A to G in family 20 (arrow) F: Base at position 5 183 of *PCDH15* gene was deleted in family 9 (arrow) G-I: The amino acids at position 575, 625 and 4 175 of *USH2A* protein (box) were conserved among multiple species J: The amino acid at position 481 of *CYP4V2* protein (box) was conserved among multiple species

2.3 *CYP4V2* 基因变异临床表型分析

本研究中变异频率最高的 *CYP4V2* 基因变异家系中 2 例先证者的眼底成像见图 4, 该类患者平均起病年龄为(29.3±7.5)岁, 大于整体 RP 患者平均起病年龄(22.5±10.8)岁。但该基因变异患者视功能普遍下降严重, 6 例先证者视力严重下降, 达到低视力或法定盲, 且 6 例先证者眼底自发荧光显示包括黄斑区在内的

全视网膜低自发荧光(图 5),黄斑 OCT 示视网膜严重萎缩变薄(图 6),为 RP 晚期,提示在 RP 患者中,*CYP4V2* 基因变异患者起病较晚,但病情发展较快。

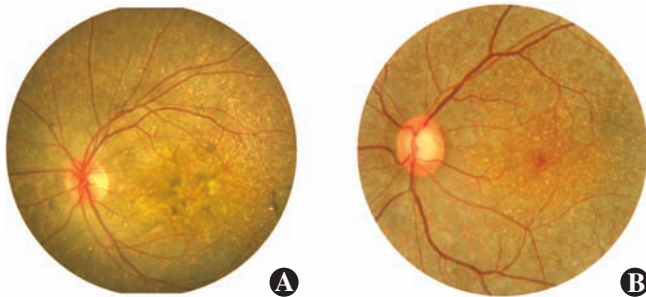


图 4 2 例 *CYP4V2* 基因变异患者彩色眼底照相 A: 家系 7 B: 家系 10

Figure 4 Color fundus photographs of two patients with *CYP4V2* gene variants A: Family 7 B: Family 10

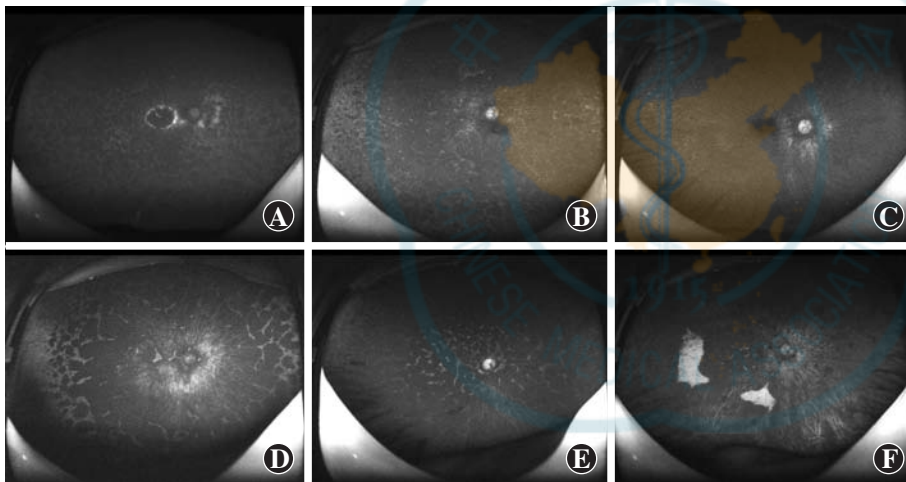


图 5 6 例 *CYP4V2* 基因变异患者超广角眼底自发荧光成像 A~F: 家系 5、6、8、9、10、11 先证者视网膜广泛低自发荧光

Figure 5 Ultra-wide field fundus autofluorescence images of 6 patients with *CYP4V2* gene variants A~F: Families 5, 6, 8, 9, 10 and 11 showed widespread decreased autofluorescence in the retina

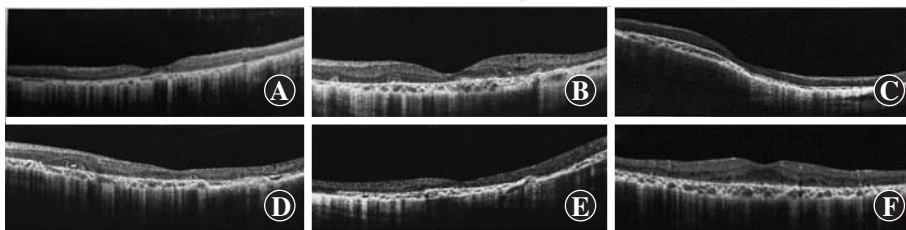


图 6 6 例 *CYP4V2* 基因变异患者黄斑 OCT 图像 A~F: 家系 5、6、8、9、10、11 先证者视网膜结构严重萎缩, 椭圆体带缺失

Figure 6 Macular OCT images of 6 patients with *CYP4V2* gene variants A~F: Families 5, 6, 8, 9, 10 and 11 showed severe retinal atrophy and the loss of the ellipsoid zone

3 讨论

目前,全世界约有 250 万 RP 患者,各地区的患病率具有地域差异性,中国 RP 患病率可能更高,达

1/1 000^[10-11]。本研究中 49% 的先证者起病于 20 岁前,但视网膜发生退变的时间往往早于患者视觉症状出现的时间^[12],因此我们认为大多数 RP 患者从儿童或青少年时期开始即出现视网膜退变。基因测序是临床上 RP 重要的辅助诊断方法,针对 RP 患者遗传学特征的分析可为流行病学和基因治疗的研究提供参考依据。

本研究纳入 51 个临床诊断为 RP 的家系进行 WES,共 29 个家系检测出 RP 相关致病基因,检出率为 56.9%。29 个家系中,超过 50% 的家系检出的致病基因为 *CYP4V2*、*USH2A* 或 *RPGR*,与 Jin 等^[13]的研究一致。其中,*CYP4V2* 基因检出率最高,与之前报道的 *USH2A* 基因为中国 RP 人群检出率最高的致病基因存在差异^[14-15],可能原因:(1)本研究样本与中国总体 RP 人群之间存在抽样误差;(2)中国 RP 人群中 *CYP4V2* 基因变异占比较高,与 *USH2A* 基因致病的占比可能相差不多,如 Jin 等^[13]的研究中两者之间占比相差约 3.2%,Shen 等^[16]的研究中两者占比相差约 5%;(3)中国地域辽阔,各个地区 *CYP4V2* 基因变异携带率可能有所差异,本研究纳入对象主要为华中地区的汉族人群。目前,针对 *CYP4V2*、*USH2A* 和 *RPGR* 基因均已开展相关基因治疗临床研究,此外 *RPE65* 基因治疗药物 Luxturna 已成功上市,*MERTK*、*ABCA4* 基因的临床试验也在进行中。

CYP4V2 基因是结晶样 RP 的主要致病基因,结晶样 RP 又称 Bietti 结晶样角膜视网膜营养不良,中国人群携带 *CYP4V2* 基因致病变异的概率约为 5/1 000,发病率远高于欧美国家^[17-18],在 RP 疾病中占 15%~19.4%^[13,16]。*CYP4V2* 蛋白为细胞色素 P450 蛋白家族的成员之一,主要参与脂肪酸代谢,在视网膜色素上皮细胞中高度表达^[19]。该基因致病的患者除表现为典型的 RP 外,在视网膜后极部还可见结晶样物质沉着,RP 晚期结晶样物质沉着逐渐减少,甚至消失。本研究中 8 例先证者的起病年龄大于总体平均年龄,6 例先证者为

低视力或法定盲,6 例先证者行超广角眼底自发荧光均呈现全视网膜低自发荧光,提示 RP 已处于晚期。因此,CYP4V2 基因变异导致的 RP 可能起病较晚,但疾病进展较快,与 Shen 等^[16]的研究结果一致,进一步证明了 CYP4V2 基因致病的严重性。5 例先证者均检出同一致病变异 c. 802-8_810delinsGC,其中 2 例先证者为纯合 c. 802-8_810delinsGC 变异,该变异可造成 7 号外显子的氨基酸缺失,使编码蛋白结构严重破坏,各有 2 个家系检出 c. 992A>C 和 c. 1091-2A>G 变异,这 3 个变异是中国人 CYP4V2 基因常见的变异,检出频率高达 83.3%^[20-21]。基于该基因变异的地域差异性,目前世界范围内,2 种 CYP4V2 基因治疗药物 VGR-R01 和 ZVS101e 临床试验均在中国开展(NCT04722107、NCT05399069),这 2 种药物采用重组腺相关病毒(recombinant adeno-associated virus, rAAV)作为载体行视网膜下腔注射后,在视网膜色素上皮细胞中表达 CYP4V2 蛋白以弥补缺失的蛋白功能。

USH2A 基因是世界范围内 RP 变异频率较高的致病基因,造成了 7%~23%的非综合征性 RP 和 50% 以上的 Usher 综合征^[22-24],编码的跨膜蛋白与 ADGRV1 蛋白和 whirlin 蛋白构成 USH2 蛋白复合体,在光感受器中主要参与维持纤毛结构和纤毛物质运输。本研究发现 4 例先证者致病基因为 USH2A,包含 1 例 Usher 综合征患者,检出的 8 个变异包括 6 个错义变异、1 个无义变异和 1 个移码变异,其中 c. 12523T>C、c. 1723T>C、c. 1875C>G 为 3 个未报道过的新变异。USH2A 基因相对分子质量大,超过 rAAV 载体的容量,因此目前开展的 USH2A 基因治疗临床试验主要是反义寡核苷酸药物 QR-412a 治疗 USH2A 基因 c. 2299delG 变异(NCT03780257),现已进行 2/3 期临床试验,前期结果发现部分受试者经多次给药后视功能改善。

RPGR 基因引起的 RP 占 RP 总数的 10%~20%^[25-26],会导致 X 染色体隐性遗传性 RP,相比常染色体隐性和显性遗传 RP 发病时间更早,视功能减退更明显^[27-28]。RPGR 基因含有 19 个外显子,编码的异构体以 RPGR^{Ex1-19} 和 RPGR^{ORF15} 较为常见,RPGR^{Ex1-19} 由全部 19 个外显子编码,RPGR^{ORF15} 由 1~14 外显子 ORF15 编码^[29-30]。ORF15 由 15 外显子和部分 15 内含子组成,RPGR 高达 60% 的变异位于此区域^[30-31],编码蛋白主要参与光感受器的纤毛运输。本研究中 RPGR 为 3 个家系的潜在致病基因,检测出的 3 个变异包括 1 个移码变异 c. 2293delG、1 个错义变异 c. 1070G>A(p. Gly357Asp)和 1 个无义变异 c. 550C>T(p. Gln184Ter),其中 c. 2293delG 位于 ORF15 区域,

p. Gly357Asp 和 p. Gln184Ter 2 个变异位点均位于 RPGR 蛋白染色体凝聚调控因子样结构域中,该区域在进化中具有高度保守性,参与小 G 蛋白的激活^[32],能促进视紫红质运输。全球已开展 4 项 RPGR 基因治疗药物的临床试验(NCT03116113、NCT03252847、NCT03316560、NCT04517149),通过 rAAV 载体经视网膜下注射或玻璃体腔注射,将 RPGR 基因递送至光感受器细胞,弥补变异造成的蛋白缺陷。

本研究共发现 6 个新 SNVs 变异,包括 4 个错义变异、1 个剪切变异和 1 个移码变异,分别来源于 USH2A、CYP4V2、MERTK、PCDH15 基因,这些变异在 gnomAD 人群数据库东亚人群中变异频率极低或无记录。视网膜中 USH2A 蛋白是 1 个含有很大大胞外区域的跨膜蛋白,3 个新发现的 USH2A 基因错义变异对应的氨基酸位点均位于胞外区域,Cys575 位点与 Cys584 位点形成二硫键,c. 1723T>C(p. Cys575Arg)变异导致 2 个半胱氨酸之间二硫键无法形成,可能对 USH2A 蛋白的层粘连蛋白表皮生长因子样结构域的正确折叠和维持产生影响,且既往有报道该位点由半胱氨酸变为丝氨酸导致 Usher 综合征的病例^[33],进一步证明该变异的致病性;c. 1875C>G(p. Phe625Leu)变异导致第 625 位氨基酸由二级结构趋向 β 折叠的苯丙氨酸替换为二级结构趋向 α 螺旋的脂肪族亮氨酸;c. 12523T>C(p. Trp4175Arg)变异导致第 4175 位氨基酸由非极性二级结构趋向 β 折叠的色氨酸变为极性带正电无二级结构趋向的精氨酸,既往有该位点变异为甘氨酸后导致 RP 的报道^[34];CYP4V2 蛋白作为细胞色素 P450 家族的一员,血红素结合位点 E329 和巯基配体结合位点 C467 对蛋白功能极其重要,本研究新发现的 CYP4V2 蛋白 p. Leu481Phe 变异发生在保守的 P450 结构域内靠近巯基配体结合位点的位置,可能会影响半胱氨酸硫代铁(III)血红素复合物的形成,从而损害 CYP4V2 蛋白的酶功能。SIFT、Polyphen2 等功能预测软件对上述 4 个错义变异的预测结果均为有害或致病,且 4 个变异的多物种序列对比和 PhyloP 值提示这 4 个位点氨基酸具有保守性,提示这 4 个变异位点所在区域可能在蛋白产物的生物功能中发挥重要作用,从而导致疾病的发生。另外,MERTK 基因 c. 2487-8A>G 位于剪切区域,spliceAI、varSEAK 等功能软件预测该变异可能影响剪切;PCDH15 基因 c. 5183del(p. Arg1728LysfsTer116)可改变下游氨基酸序列并使翻译提前终止,可能对蛋白结构造成影响。因此,本研究认为上述 6 个新发现的变异可能是 RP 的致病变异。

尽管 WES 技术提高了遗传性视网膜病变的诊断率,但仍有 40%~50% 的 RP 患者无法确认致病基因^[35],本研究中 22 个家系(占 43.1%)未能明确致病基因,可能的原因有:(1)相关致病基因的变异被遗漏或未被解释为致病变异;(2)其他基因的变异尚未与 RP 相关联;(3)存在尚未被发现的新型遗传机制;(4)致病的深度内含子变异无法被 WES 捕获^[36],如 *CEP290* 基因的深度内含子变异 c.2991+1655A>G 是欧美地区 Leber 先天性黑矇患者 10 型(LCA10)常见的致病变异^[37],60%~90% 的 LCA10 患者存在此变异^[38]。另外,还有研究发现 *ABCA4*、*ADGRV1*、*USH2A*、*OPA1*、*RPGRIP1*、*CNGB3*、*PCDH15* 等基因的深度内含子变异可能会影响 mRNA 的剪切而致病^[36,39-40],因此采用全基因组测序可能会提高致病基因内含子变异的检出率。

本研究利用 WES 对 51 个 RP 家系进行分析,29 个家系(占 56.9%)在 15 个 RP 相关致病基因中存在变异,其中 *CYP4V2*、*USH2A* 和 *RPGR* 基因变异频率较高,占确定致病基因家系的 50% 以上,*CYP4V2* 基因致病的患者可能起病较晚,但病情发展较快。本研究共检出 38 个 SNVs 和 3 个 CNV,报道了 6 个新变异,拓展了 RP 基因变异频谱,有助于为临床医师进行遗传诊断和咨询提供依据,也进一步为 RP 的致病机制、流行病学和基因治疗研究提供新的思路和线索。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 周玲玲:试验设计、数据统计分析、文章撰写;周梦涵:数据整理;沈吟:研究指导、论文审阅及定稿

参考文献

- [1] Pagon RA. Retinitis pigmentosa [J]. *Surv Ophthalmol*, 1988, 33 (3) : 137-177. DOI:10.1016/0039-6257(88)90085-9.
- [2] Verbakel SK, van Huet R, Boon C, et al. Non-syndromic retinitis pigmentosa [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2018, 66 : 157-186. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2018.03.005.
- [3] Hartong DT, Berson EL, Dryja TP. Retinitis pigmentosa [J]. *Lancet*, 2006, 368 (9549) : 1795-1809. DOI: 10.1016/S0140-6736(06)69740-7.
- [4] Guadagni V, Novelli E, Piano I, et al. Pharmacological approaches to retinitis pigmentosa: a laboratory perspective [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2015, 48 : 62-81. DOI:10.1016/j.preteyeres.2015.06.005.
- [5] Nash BM, Wright DC, Grigg JR, et al. Retinal dystrophies, genomic applications in diagnosis and prospects for therapy [J]. *Transl Pediatr*, 2015, 4 (2) : 139-163. DOI:10.3978/j.issn.2224-4336.2015.04.03.
- [6] Veleri S, Lazar CH, Chang B, et al. Biology and therapy of inherited retinal degenerative disease: insights from mouse models [J]. *Dis Model Mech*, 2015, 8 (2) : 109-129. DOI:10.1242/dmm.017913.
- [7] do Valle ÍF, Giampieri E, Simonetti G, et al. Optimized pipeline of MuTect and GATK tools to improve the detection of somatic single nucleotide polymorphisms in whole-exome sequencing data [J/OL]. *BMC Bioinformatics*, 2016, 17 (Suppl 12) : 341 [2024-05-15]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28185561/>. DOI: 10.1186/s12859-016-1190-7.
- [8] Wang K, Li M, Hakonarson H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data [J/OL]. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38 (16) : e164 [2024-05-15]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20601685/>. DOI:10.1093/nar/gkq603.
- [9] 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.
- [10] Haim M. Epidemiology of retinitis pigmentosa in Denmark [J]. *Acta Ophthalmol Scand Suppl*, 2002, (233) : 1-34. DOI:10.1046/j.1395-3907.2002.00001.x.
- [11] Xu L, Hu L, Ma K, et al. Prevalence of retinitis pigmentosa in urban and rural adult Chinese: the Beijing Eye Study [J]. *Eur J Ophthalmol*, 2006, 16 (6) : 865-866. DOI:10.1177/112067210601600614.
- [12] Buch H, Vinding T, La Cour M, et al. Prevalence and causes of visual impairment and blindness among 9980 Scandinavian adults: the Copenhagen City Eye Study [J]. *Ophthalmology*, 2004, 111 (1) : 53-61. DOI:10.1016/j.ophtha.2003.05.010.
- [13] Jin B, Li J, Yang Q, et al. Genetic characteristics of suspected retinitis pigmentosa in a cohort of Chinese patients [J/OL]. *Gene*, 2023, 853 : 147087 [2024-05-15]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36464167/>. DOI:10.1016/j.gene.2022.147087.
- [14] Huang L, Zhang Q, Huang X, et al. Mutation screening in genes known to be responsible for retinitis pigmentosa in 98 small Han Chinese families [J/OL]. *Sci Rep*, 2017, 7 (1) : 1948 [2024-05-16]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28512305/>. DOI: 10.1038/s41598-017-00963-6.
- [15] Gao FJ, Li JK, Chen H, et al. Genetic and clinical findings in a large cohort of Chinese patients with suspected retinitis pigmentosa [J]. *Ophthalmology*, 2019, 126 (11) : 1549-1556. DOI:10.1016/j.ophtha.2019.04.038.
- [16] Shen C, You B, Chen YN, et al. Whole-exome sequencing identified genes known to be responsible for retinitis pigmentosa in 28 Chinese families [J]. *Mol Vis*, 2022, 28 : 96-113.
- [17] Meng XH, He Y, Zhao TT, et al. Novel mutations in *CYP4V2* in Bietti corneoretinal crystalline dystrophy: next-generation sequencing technology and genotype-phenotype correlations [J]. *Mol Vis*, 2019, 25 : 654-662.
- [18] 杨极, 韦春玲, 张娟, 等. 结晶样视网膜色素变性中与 *CYP4V2* 基因相关的致病突变 [J]. *国际眼科杂志*, 2021, 21 (6) : 1125-1129. DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2021.6.37.
- [19] Yang J, Wei CL, Zhang J, et al. Identify pathogenic mutations of *CYP4V2* gene in Bietti crystalline corneoretinal dystrophy [J]. *Int Eye Sci*, 2021, 21 (6) : 1125-1129. DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2021.6.37.
- [20] Nakano M, Kelly EJ, Wiek C, et al. *CYP4V2* in Bietti's crystalline dystrophy: ocular localization, metabolism of ω -3-polyunsaturated fatty acids, and functional deficit of the p. H331P variant [J]. *Mol Pharmacol*, 2012, 82 (4) : 679-686. DOI:10.1124/mol.112.080085.
- [21] Yin X, Yang L, Chen N, et al. Identification of *CYP4V2* mutation in 36 Chinese families with Bietti crystalline corneoretinal dystrophy [J]. *Exp Eye Res*, 2016, 146 : 154-162. DOI:10.1016/j.exer.2016.03.007.
- [22] Meng XH, Guo H, Xu HW, et al. Identification of novel *CYP4V2* gene mutations in 92 Chinese families with Bietti's crystalline corneoretinal dystrophy [J]. *Mol Vis*, 2014, 20 : 1806-1814.
- [23] Zhu T, Chen DF, Wang L, et al. *USH2A* variants in Chinese patients with Usher syndrome type II and non-syndromic retinitis pigmentosa [J]. *Br J Ophthalmol*, 2021, 105 (5) : 694-703. DOI:10.1136/bjophthalmol-2019-315786.
- [24] Bonnet C, Grati M, Marlin S, et al. Complete exon sequencing of all known Usher syndrome genes greatly improves molecular diagnosis [J/OL]. *Orphanet J Rare Dis*, 2011, 6 : 21 [2024-05-16]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21569298/>. DOI: 10.1186/1750-1172-6-21.
- [25] Lenarduzzi S, Vozzi D, Morgan A, et al. Usher syndrome: an effective sequencing approach to establish a genetic and clinical diagnosis [J]. *Hear Res*, 2015, 320 : 18-23. DOI:10.1016/j.heares.2014.12.006.
- [26] Tee JJ, Smith AJ, Harcastle AJ, et al. RPGR-associated retinopathy: clinical features, molecular genetics, animal models and therapeutic options [J]. *Br J Ophthalmol*, 2016, 100 (8) : 1022-1027. DOI:10.1136/bjophthalmol-2015-307698.
- [27] Talib M, van Schooneveld MJ, Thiadens AA, et al. Clinical and genetic characteristics of male patients with *RPGR*-associated retinal dystrophies: a long-term follow-up study [J]. *Retina*, 2019, 39 (6) : 1186-1199. DOI:10.1097/IAE.0000000000002125.
- [28] Cehajic-Kapetanovic J, Xue K, Martinez-Fernandez de la Camara C, et



- al. Initial results from a first-in-human gene therapy trial on X-linked retinitis pigmentosa caused by mutations in RPGR[J]. Nat Med, 2020, 26(3): 354-359. DOI: 10. 1038/s41591-020-0763-1.
- [28] Salvetti AP, Nanda A, MacLaren RE. RPGR-related X-linked retinitis pigmentosa carriers with a severe "male pattern" [J]. Ophthalmologica, 2021, 244(1): 60-67. DOI: 10. 1159/000503687.
- [29] Meindl A, Dry K, Herrmann K, et al. A gene (*RPGR*) with homology to the *RCC1* guanine nucleotide exchange factor is mutated in X-linked retinitis pigmentosa (RP3) [J]. Nat Genet, 1996, 13(1): 35-42. DOI: 10. 1038/ng0596-35.
- [30] Vervoort R, Lennon A, Bird AC, et al. Mutational hot spot within a new *RPGR* exon in X-linked retinitis pigmentosa [J]. Nat Genet, 2000, 25(4): 462-466. DOI: 10. 1038/78182.
- [31] Shu X, McDowall E, Brown AF, et al. The human retinitis pigmentosa GTPase regulator gene variant database [J]. Hum Mutat, 2008, 29(5): 605-608. DOI: 10. 1002/humu. 20733.
- [32] Raghupathy RK, Gautier P, Soares DC, et al. Evolutionary characterization of the retinitis pigmentosa GTPase regulator gene [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2015, 56(11): 6255-6264. DOI: 10. 1167/iops. 15-17726.
- [33] Sun T, Xu K, Ren Y, et al. Comprehensive molecular screening in Chinese Usher syndrome patients [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2018, 59(3): 1229-1237. DOI: 10. 1167/iops. 17-23312.
- [34] Maranhao B, Biswas P, Gottsch AD, et al. Investigating the molecular basis of retinal degeneration in a familial cohort of Pakistani decent by exome sequencing [J/OL]. PLoS One, 2015, 10(9): e0136561 [2024-05-16]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26352687/>. DOI: 10. 1371/journal.pone. 0136561.
- [35] Dias MF, Joo K, Kemp JA, et al. Molecular genetics and emerging therapies for retinitis pigmentosa: basic research and clinical perspectives [J]. Prog Retin Eye Res, 2018, 63: 107-131. DOI: 10. 1016/j. preteyeres. 2017. 10. 004.
- [36] Qian X, Wang J, Wang M, et al. Identification of deep-intronic splice mutations in a large cohort of patients with inherited retinal diseases [J/OL]. Front Genet, 2021, 12: 647400 [2024-05-17]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33737949/>. DOI: 10. 3389/fgene. 2021. 647400.
- [37] Yzer S, Hollander AI, Lopez I, et al. Ocular and extra-ocular features of patients with Leber congenital amaurosis and mutations in CEP290 [J]. Mol Vis, 2012, 18: 412-425.
- [38] Dulla K, Aguila M, Lane A, et al. Splice-modulating oligonucleotide QR-110 restores CEP290 mRNA and function in human c. 2991+1655A>G LCA10 models [J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2018, 12: 730-740. DOI: 10. 1016/j. omt. 2018. 07. 010.
- [39] Fadaie Z, Khan M, Del Pozo-Valero M, et al. Identification of splice defects due to noncanonical splice site or deep-intronic variants in *ABCA4* [J]. Hum Mutat, 2019, 40(12): 2365-2376. DOI: 10. 1002/humu. 23890.
- [40] Weisschuh N, Sturm M, Baumann B, et al. Deep-intronic variants in *CNGB3* cause achromatopsia by pseudoexon activation [J]. Hum Mutat, 2020, 41(1): 255-264. DOI: 10. 1002/humu. 23920.

(收稿日期: 2024-05-20 修回日期: 2024-08-13)

(本文编辑: 刘艳 施晓萌)

读者 · 作者 · 编者

本刊对中英文摘要的要求

论著或综述文稿正文请撰写中英文摘要。原创性论著文稿要求为结构式摘要,包括目的 (Objective)、方法 (Methods)、结果 (Results) 和结论 (Conclusions) 4 个要素,摘要应能够回答以下问题:(1) 为什么进行这项研究。(2) 主要用什么方法进行研究。(3) 获得什么主要结果。(4) 通过研究得出什么结论等。其中目的部分为本课题对上述提出问题设立的目标。方法部分应提供研究对象、样本量、分组情况、各组的干预情况、与研究相适应的观察或检测指标,获得结局指标的手段和设备等。临床研究请说明是前瞻性研究、回顾性研究还是观察性研究。结果部分请客观描述研究的主要发现,包括主要的形态学检查表现、相关的关键性或主要的量化资料以及相应的统计学比较结果,须写明统计学量值及其概率值。结论部分请提出与本研究论据直接相关的、必然的推论,避免得出过度推测性、评价性和扩大化的结论。摘要请用第三人称客观表述,不列图表,不引用文献,不加评论和解释。英文摘要应与中文摘要内容相对应,但为了对外交流的需要,可以略详细。英文摘要应包括论文文题 (正体) 及全部作者姓名 (汉语拼音,姓在前,首字母大写,名在后,首字母大写,双字连写。如: Yin Xiaohui)、标准化的单位名称、城市名称 (汉语拼音)、邮政编码及国家名称 (全部为斜体)。并请另起一行提供通信作者姓名的汉语拼音和 Email 地址,如 *Corresponding author: Yin Xiaohui, Email: xiaohuih@126.com*。专家述评或综述类文稿请撰写指示性中英文摘要,摘要内容应包含研究涉及的概念、研究的目的、综述资料的来源、复习的文献量、研究的新发现或应用领域、综合的结果和结论及其意义等必要的信息。

研究论文为前瞻性研究者应在中英文摘要结束处提供临床试验注册号,以“临床试验注册 (Trial registration)”为标题,提供注册机构名称和注册号。前瞻性临床研究的论著摘要应注明遵循 CONSORT 声明 (Consolidated Standards of Reporting Trials) (<http://www.consort-standart.org/home>)。

本刊对论文中关键词的著录要求

本刊投稿的论文请分别在中英文摘要下方标引 3~8 个关键词以便于编制文献索引。关键词应选取能反映文章主题概念的词或词组,中英文关键词应一致。投稿作者可登陆 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh> 或 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=mesh> 网站从美国国立医学图书馆的 MeSH 数据库中选取关键词,其中文译名可参照中国医学科学院信息研究所编译的《医学主题词注释字顺表》。未被词表收录的新的专业术语 (自由词) 可直接作为关键词使用,但应排序在最后。中医药关键词应从中国中医科学院中医药信息研究所编写的《中医药主题词表》中选取。关键词中的缩写词应按《医学主题词注释字顺表》还原为全称,每个关键词之间用“;”分隔。

(本刊编辑部)