

视紫红质和 Peripherin/RDS 基因在视网膜色素变性家系中的突变检测

章雪敏¹, 刘铁城¹, 金鑫¹, 张宝全¹, 徐华²

¹解放军总医院 眼科, 北京 100853; ²四川省宣汉县人民医院 眼科, 达州 636150

摘要: 目的 对一常染色体显性视网膜色素变性 (autosomal dominant retinitis pigmentosa, adRP) 家系进行视紫红质基因 (rhodopsin, RHO)、盘膜边缘蛋白/视网膜变性慢基因 (Peripherin/retinal degeneration slow, Peripherin/RDS)、视杆外节盘膜蛋白 1 基因 (retinal outer segment membrane protein 1, ROM1)、神经视网膜亮氨酸拉链基因 (neural retinal leucine zipper, NRL) 和视锥杆细胞同源盒基 (cone-rod homeobox-containing gene, CRX) 基因的突变检测。方法 采集一连续 3 代发病的 adRP 家系 28 名成员外周血, 提取基因组 DNA, 采用聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 和直接测序技术, 对 RHO、Peripherin/RDS、ROM1、NRL 和 CRX 基因进行检测, 结果与标准核酸序列进行比对和分析。结果 该家系成员在 RHO、Peripherin/RDS、ROM1、NRL 和 CRX 基因中未发现致病突变, 但是在 Peripherin/RDS 基因第 1 外显子和第 3 外显子编码区发现 4 处单核苷酸改变。结论 该家系在 RHO、Peripherin/RDS、ROM1、NRL 和 CRX 基因中未检测到致病突变, Peripherin/RDS 基因外显子中 4 处单核苷酸改变属于单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphisms, SNPs)。

关键词: 视紫红质; 视网膜色素变性; 常染色体显性; 基因检测; 单核苷酸多态性

中图分类号: R 774.13 文献标识码: A 文章编号: 1005-1139(2012)06-0646-03

网络出版时间: 2012-02-14 09:12:08

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3275.R.20120214.0912.003.html>

Mutation of rhodopsin and peripherin/rhodopsin genes in a family with retinitis pigmentosa

ZHANG Xue-min¹, LIU Tie-cheng¹, JIN Xin¹, ZHANG Bao-quan¹, XU Hua²

¹Department of Ophthalmology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China; ²Department of Ophthalmology, Xuanhan People's Hospital, Dazhou 636150, Sichuan Province, China

Corresponding author: LIU Tie-cheng. Email: ltc301@yahoo.com.cn

Abstract: **Objective** To detect the mutations of rhodopsin(RDS), peripherin/RDS, retinal outer segment membrane protein 1(ROM1), neural retinal leucine(NRL) zipper and cone-rod homeobox-containing(CRX) genes in a family with retinitis pigmentosa(RP). **Methods** Peripheral blood samples were taken from 28 members of a family with autosomal dominant retinitis pigmentosa(adRP) to isolate genomic DNA. RHO, peripherin/RDS, ROM1, NRL and CRX genes were detected by PCR and direct sequencing respectively and compared with the standard nucleic acid sequences. **Results** No pathogenic mutation of RHO, peripherin/RDS, ROM1, NRL and CRX genes was detected in the family members. However, single nucleotide polymorphisms(SNP) were detected in exons 1 and 3 coding areas of the peripherin/RDS gene. **Conclusion** No pathogenic mutation of RHO, peripherin/RDS, ROM1, NRL and CRX genes is detected in this family. The variation of peripherin/RDS in exon-coding areas belongs to SNP of single nucleotide. **Key words:** rhodopsin; retinitis pigmentosa; autosomal dominant; gene detect; single nucleotide polymorphisms

原发性视网膜色素变性 (retinitis pigmentosa, RP) 是视网膜感光细胞和色素上皮细胞变性导致夜盲和进行性视野损害的遗传性致盲眼病。我国发病率约为 1/3 784^[1]。RP 的遗传方式复杂多样, 非综合征 RP 至少有 4 种遗传方式, 其中 15%~25% 为常染色体显性遗传 (adRP), 5%~20% 为常染色体隐性遗传 (autosomal recessive RP, arRP), 5%~15% 为 X-连锁遗传 (X-linked RP, XLRP), 另有 5% 早发型 RP 即隐性 Leber's 先天性黑蒙 (LCA II

型)。当患者因缺乏家族史无法确定其遗传方式时, 将其定义为散发型 RP (sporadic RP, SRP), 约占 40%~50%^[2]。多数 RP 为单基因遗传, 但也存在二基因-双等位基因和二基因-三等位基因遗传方式^[3]。迄今为止, 发现与 RP 有关的致病基因共 59 个, 其中 adRP 23 个^[4]。本研究对一个常染色体显性视网膜色素变性家系成员进行 RHO、Peripherin/RDS、ROM1、NRL 和 CRX 5 个常见候选基因检测, 在分子水平阐述该家系的发病机制。

对象和方法

1 对象 本研究家系来自四川省达州市普光县, 5 代 46 名成员, 已采集外周血的成员为 28 名, 其中 6 名 RP 患者、1 名疑似成员和 21 名正常成员。该家系 RP 性状连续 3 代传递, 男女均可发病, 发

收稿日期: 2012-01-12

修回日期: 2012-02-03

基金项目: 军队“十一五”面上课题 (2006wzlh26)

作者简介: 章雪敏, 女, 在读硕士。研究方向: 眼遗传病。Email: zhangxuemin.010@163.com

通信作者: 刘铁城, 男, 副主任医师, 硕士生导师。Email: ltc301@yahoo.com.cn

病比例为 1:5, 符合常染色体完全显性遗传特征。

2 临床资料采集 按照 RP 诊断标准^[5] 询问家系成员病史, 绘制家系图谱 (图 1), 确定疾病遗传类型, 所有研究对象均行视力、眼压、房角、晶状体、眼底、视野及视网膜电图 (electroretinography, ERG) 等检查。分析家系的临床特点: 患者年龄 33-79 岁, 出现夜盲时间为 5-15 岁。视野损害出现时间各异, 患者 II:1、III:1 和 IV:1 无视野缩小病史。III:1 和 III:3 出现红色觉减弱。III:5 和 III:7 虹膜膨隆, 房角为窄角 III-IV 级, 但眼压均正常。III:1、III:3、III:5 和 III:7 出现并发性白内障。III:1 和 III:3 玻璃体呈烟灰样混浊。除 II:1 外, 所有患者黄斑区均出现骨细胞样色素沉着。疑似成员 V:1 为 11 岁男性, 父母诉其 5 岁出现夜盲, 眼部检查未见异常。采集到血样的 21 名正常成员为 III:2、III:4、III:6、III:9、IV:2-IV:6、IV:12、IV:13、IV:17、IV:18、V:2-V:9, 眼底均未见异常。

3 外周血 DNA 制备 本研究通过解放军总医院伦理委员会论证, 所有受检者签署知情同意书。抽取该家系中 6 名患者、1 名疑似成员和 21 名正常成员外周静脉血 8-10ml, EDTA 抗凝。DNA 抽提采用天根生化科技 (北京) 有限公司提供的离心柱型血液基因组 DNA 抽提试剂盒, 按操作方法提取外周血白细胞 DNA, -80℃ 保存待用。

4 PCR 扩增 采用 Primer3 软件在线设计 RHO、Peripherin/RDS、ROM1、NRL 和 CRX 基因的 16 个外显子及其与内含子交界处序列的引物^[6-8], 引物由北京奥科生物技术公司合成。PCR 反应在 25 μl 体系中进行: 2 × Taq PCR MasterMix (含染料, 蓝色) 12.5 μl, 正反向引物各 5 μl (引物原液加灭菌 ddH₂O 稀释 50 倍), DNA 模板 2.5 μl (模板原液)。

反应条件: 94℃ 3min, 94℃ 30s, 55℃ 30s, 72℃ 1min, 共 30 个循环, 72℃ 延伸 5min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭 / 紫外线鉴定, 证实 PCR 扩增片段存在。

5 测序结果分析 将所得 PCR 产物送至北京中美泰和生物技术有限公司测序, 所得结果使用 Chromas 软件、GeneTool 软件和在线 BLAST 程序 (http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST) 进行阅读和碱基序列比对。

结 果

该家系患者扩增产物在 RHO、Peripherin/RDS、ROM1、NRL 和 CRX 基因中未发现致病突变, 但在 Peripherin/RDS 基因第 1 外显子 (exon) 和第 3 外显子编码区发现 4 处单核苷酸改变, 属于单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphisms, SNPs)。在正常成员中, 这些部位的氨基酸均和美国国立生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 数据库上公布的标准序列一致。如表 1 所示。相对应的峰图见图 2。

表 1 Peripherin/RDS 基因测序结果
Tab 1 Peripherin/RDS gene sequencing

Exon	Nucleotide changes	Codon changes	Amino acid changes
1	318T>C	GTT>GTC	Val106Val
3	910C>G	CAG>GAG	Gln304Glu
3	929G>A	AGG>AAG	Arg310Lys
3	1013A>G	GAC>GGC	Asp338Gly

讨 论

据报道^[9], RHO 和 Peripherin/RDS 基因分别占 adRP 致病基因的 25%-30% 和 5%-10%, 因此, 本研究首先选取 RHO (Exon1-5)、Peripherin/RDS (Exon 1-3)、ROM1 (Exon1-3)、CRX (Exon2-4) 和 NRL

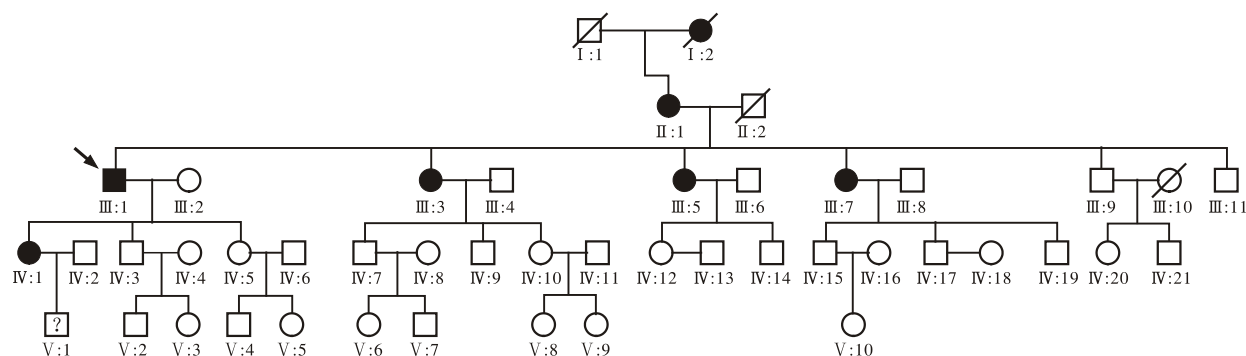


图 1 adRP 家系图谱

系谱图注释: □ 男性 ○ 女性 □/○ 已故 ■ ● RP 患者 ?/⊙ 诊断不明者 ■ ● 先证者

Fig 1 Pedigree of adRP

Note: □ male ○ female □/○ death ■ ● RP patient ?/⊙ diagnosis uncertainty ■ ● proband

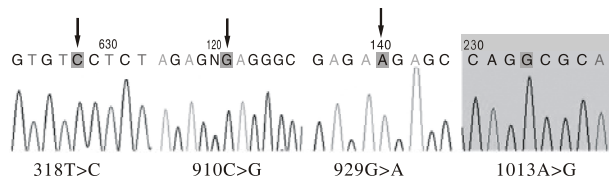


图2 SNPs测序峰图

Fig 2 Sequencing picture of SNP

(Exon2、3) 基因的 16 个外显子进行初步筛查, 结果发现在 Peripherin/RDS 基因上存在 4 处 SNPs: 910C>G、929G>A 和 1013A>G 为错义突变, 对应的氨基酸改变为: Gln304Glu、Arg310Lys 和 Asp338Gly; 318T>C 为同义突变。其余候选基因未发现碱基改变。

RHO 基因定位于 3q21-q24, 由 5 个外显子和 4 个内含子组成, 长约 6952bp, 编码由 348 个氨基酸组成的视紫红质 (rhodopsin, RHO) 蛋白, 该蛋白仅在视杆光感受器细胞中专一性表达, 与 RP 发病早期即存在视杆细胞变性相一致^[10]。目前, 已发现 100 余种^[6]RHO 突变与 RP 有关, 在这些突变谱中, 90% 以上是单个碱基突变, 少数是小片段的插入或缺失突变 (Indel), 一般不超过 20 个碱基。研究表明, Pro23His 和 Pro347Leu 突变在欧美最为常见, Pro347Leu 突变在我国较常见^[11]。RHO 基因突变率存在地区差异, 我国低于欧美, 约占 adRP 致病基因的 7%^[12]。本研究 RHO 基因未发现碱基改变, 确定该基因与本研究 adRP 家系临床表型无关。

Peripherin/RDS 基因位于 6p21^[13], cDNA 长 3 212 个碱基, 由 3 个外显子和 2 个内含子组成, 编码由 346 个氨基酸组成的盘膜周边蛋白, 表达于光感受器细胞内, 其功能可能与光感受器的发生有关, 并且维持外节盘缘的结构及其稳定性。Peripherin/RDS 基因突变最重要的特点是疾病表型多样化, 目前, 公认的观点是由于修饰位点的存在和环境因素的影响所致^[14]。Peripherin/RDS 基因突变引起的表型改变可以分为四类: ADRP、进行性黄斑变性、双基因 RP 和视网膜图形样变性, 该基因内不同位点和突变类型引起疾病的严重程度不同: 第三和四跨膜区之间的错义突变和读框缺失引起 ADRP 和严重黄斑变性; 分布于整个 Peripherin/RDS 基因的无意义突变引起图形样黄斑变性和双基因 RP。本研究未发现该家系在 Peripherin/RDS 基因中存在致病突变, 但在 Peripherin/RDS 基因外显子 1 和 3 编码区发现 4 处 SNPs, 均不与疾病共分离。说明 Peripherin/RDS 基因存在遗传异质性。

本研究家系患者临床表型差异性明显, 其原因可能是由于核苷酸碱基的单倍体不同, 或顺式或反式等位基因不同, 也可能是环境因素影响了致病基因的突变, 从而影响疾病的临床表型^[15]。现通过直接测序的方法已排除 RHO、Peripherin/RDS、ROM1、NRL 和 CRX 基因与该家系临床表型相关, Peripherin/RDS 基因外显子区发现的 4 处 SNPs, 与 dbSNP 数据库中 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>) 的记录进行比对, 未发现与本研究相同的 SNP 位点, 因此, 本研究发现的 SNPs 有可能是新的 SNP 位点。我们下一步的工作是, 继续对剩余的 18 个 adRP 候选基因进行检测, 鉴于用 Sanger 测序法工作量大, 所需时间长, 因此采用高通量测序技术进行后续工作 (另文报告)。本家系表型差异性大, 不排除存在新的致病基因的可能。

参考文献

- 覃泳杰, 郭海科. 常染色体遗传型视网膜色素变性相关基因的研究进展 [J]. 眼科研究, 2009, 27 (12): 1159-1163.
- Daiger SP, Bowne SJ, Sullivan LS. Perspective on genes and mutations causing retinitis pigmentosa [J]. Arch Ophthalmol, 2007, 125 (2): 151-158.
- Kajiwar K, Berson EL, Dryja TP. Digenic retinitis pigmentosa due to mutations at the unlinked peripherin/RDS and ROM1 loci [J]. Science, 1994, 264 (5165): 1604-1608.
- Summaries of Genes and Loci Causing Retinal Diseases [EB/OL]. <https://sph.uth.tmc.edu/RetNet/sum-dis.htm>.
- 庄文娟, 邓大君, 盛迅伦, 等. 常染色体显性遗传 RP 患者视紫红质基因突变的检测分析 [J]. 眼科研究, 2006, 24 (4): 348-351.
- 刘逾, 贾晓林, 李进军, 等. 视网膜色素变性患者视紫红质基因突变分析 [J]. 中国全科医学, 2011, 14 (15): 1659-1662.
- Matias-florentino M, Ayala-ramirez R, Graue-wiechers F, et al. Molecular screening of rhodopsin and peripherin/RDS genes in mexican families with autosomal dominant retinitis pigmentosa [J]. Curr Eye Res, 2009, 34 (12): 1050-1056.
- Ferrari S, Di IE, Barbaro V, et al. Retinitis pigmentosa: genes and disease mechanisms [J]. Curr Genomics, 2011, 12 (4): 238-249.
- Pagon RA, Daiger SP. Retinitis pigmentosa overview [M]. Washington: Gene Clinics, 2005.
- Zhang XL, Liu M, Meng XH, et al. A complete screen for mutations of the rhodopsin gene in a panel of Chinese patients with autosomal dominant retinitis pigmentosa [J]. Chin Med Sci J, 2005, 20 (1): 30-34.
- Zhang XL, Liu M, Meng XH, et al. Mutational analysis of the rhodopsin gene in chinese ADRP families by conformation sensitive gel electrophoresis [J]. Life Sci, 2006, 78 (13): 1494-1498.
- 管涛, 麻张伟, 丁世萍. 散发性视网膜色素变性视紫红质基因突变筛查 [J]. 中国眼耳鼻喉科杂志, 2008, 8 (6): 351-353.
- Travis GH, Christerson L, Danielson PE, et al. The human retinal degeneration slow (RDS) gene: chromosome assignment and structure of the mRNA [J]. Genomics, 1991, 10 (3): 733-739.
- 周占宇, 严密, 陈大年. 盘膜边缘蛋白和杆体外节盘膜蛋白与视网膜光感受器变性 [J]. 中华眼底病杂志, 1999, 15 (3): 197.
- 盛迅伦. 视网膜色素变性的遗传异质性和临床异质性 [J]. 山东大学耳鼻喉眼学报, 2011, 25 (5): 94-98.