DOI:10.16016/j.1000-5404.201509011

常染色体显性遗传玻璃体视网膜脉络膜病变一家系的致病基因筛查及临床分析

宣 杰[1],吴 静[2],李海军[1],朱晓燕[1],朱小敏[1],宿 艳[2],李 欣[2],黄 辉[2],祁 鸣[2],谢 琳[1] (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所眼科[1];518083 广东 深圳,华大基因研究院[2])

[**摘要**] **目的** 使用外显子结合目标区域捕获测序检测常染色体显性遗传玻璃体视网膜脉络膜病变(autosomal dominant vitreoretinochoroidopathy ,ADVIRC)家系的致病基因,并分析其临床表型。**方法** 收集重庆地区常染色体显性遗传玻璃体视网膜脉络膜病变先证者及4代成员的临床资料,完善眼科检查。采集该家系4例患者及8例健康成员的外周静脉血,提取基因组DNA,运用外显子结合目标区域捕获测序芯片进行测序,并对测序结果进行分析后得到候选致病基因性突变位点。运用PCR和直接测序进行验证,确定致病基因。根据致病基因的临床表型对该家系进行临床分析。**结果** 基因检测发现第六外显子的杂合突变BEST1(c.704TR>C),家系患者中出现的小角膜、先天性白内障、周边视网膜脉络膜发育不良、晚期易发生青光眼等符合该突变基因的临床表型。**结论** BEST1基因的c.704TR>C杂合突变为该ADVIRC家系的致病基因之一。

[**关键词**] 常染色体显性遗传玻璃体脉络膜视网膜病变;外显子测序;青光眼;BEST1基因
[**中图法分类号**] R394-33; R596.1; R773.4 [**文献标志码**] A

Autosomal dominant vitreoretinochoroidopathy: screening for disease-causing genes and clinical analysis of a pedigree

Xuan Jie[1], Wu Jing[2], Li Haijun[1], Zhu Xiaoyan[1], Zhu Xiaomin[1], Su Yan[2], Li Xin[2], Huang Hui[2], Qi Ming[2], Xie Lin[1] ([1]Department of Ophthalmology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042; [2]Biological Technology of BGI, Shenzhen, Guangdong Province, 518083, China)

[**Abstract**] **Objective** To detect disease-causing genes in a Chinese pedigree with autosomal dominant vitreoretinochoroidopathy (ADVIRC) by capture and sequencing for exon binding target region, and analyze the clinical phenotypes. **Methods** A ADVIRC pedigree, including 4 patients (probands) and 8 health family members, was recruited in this study. All the patients and family members of 4 generations received complete ophthalmic examinations. Peripheral blood samples were collected from 12 persons of the family to extract their DNA from the peripheral blood leukocytes using phenol-chloroform DNA extraction. A capture sequencing chip based on exon in combination with target-binding region was used to sequence. And then PCR and direct sequencing were employed for mutation analysis on the candidate etiologic genes in all members of the family. Clinical analysis was performed in the family according to the clinical phenotypes. **Results** Heterozygous mutation of BEST1 (c.704TR>C) in exon 6, were discovered in the ADVIRC family in this study. This mutation was reported in China for the first time. Microcornea, congenital cataract, retinal choroid dysplasia and glaucoma were found in the family members, which were in accordance with clinical phenotypes of the mutation. **Conclusion** Heterozygous mutation of BEST1 (c.704TR>C) is one of disease-causing genes of the ADVIRC pedigree.

[**Key words**] autosomal dominant vitreoretinochoroidopathy; exons; glaucoma; BEST1

Corresponding author: Xie Lin, E-mail: xielin_66@163.com

[**通信作者**] 谢 琳, E-mail:xielin_66@163.com

[**优先出版**] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20151207.1701.020.html (2015-12-07)

基因及其产物的时空协同作用影响眼球发育。基因的突变可能影响眼球结构发育,且表现为复杂的遗传性眼疾病。常染色体显性遗传玻璃体视网膜脉络膜病变(autosomal dominant vitreoretinochoroidopathy,ADVIRC)是一种 BEST1 基因突变的罕见眼部疾病,以环形的周边视网膜色素沉着和外围视网膜脉络膜萎缩为典型特征[1-3]。其他临床症状包括小角膜、小眼球、先天性白内障、黄斑病变,晚期可能发展为闭角型青光眼[2,4]。文献[5]首次报道 ADVIRC 与 BEST1 基因有关。BEST1 基因为视网膜色素上皮细胞基底外侧膜斑萎蛋白[6]。

近年来,外显子结合目标区域捕获测序应用广泛,提高了外显子区域的基因测序效率[7-10]。本研究利用该技术对重庆地区的先天性小角膜大家系进行基因突变检测分析,探讨其可能致病基因,并为其防治提供相关依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象

获取重庆地区的常染色体显性遗传玻璃体视网膜脉络膜病变先证者及 4 代成员的病史及临床体征,并绘制家系图(图 1)。根据赫尔辛基原则,本研究通过了第三军医大学大坪医院野战外科研究所伦理委员会审理,所有参与的家系成员签署了知情同意书。完善常规眼部检查,包括裂隙灯检查法、眼底、视野、黄斑部光学扫描(OCT)、视网膜血管造影(FFA)、眼科超声显微镜检查(UBM)、眼科 A 超、角膜内皮镜和角膜共聚焦显微镜检查等。

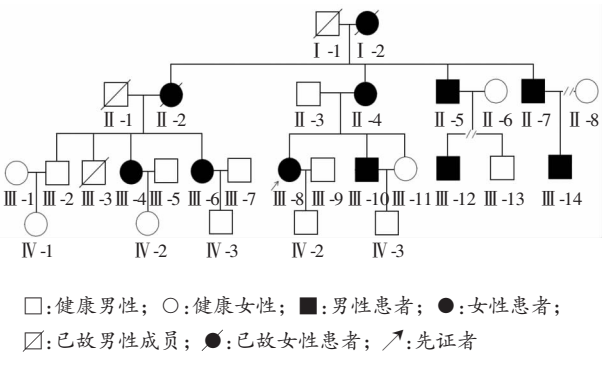


图 1 常染色体显性遗传玻璃体视网膜脉络膜病家系图

1.2 方法

采取外周血抗凝血 5 mL,利用 Qiamp Blood 试剂盒(德国 QIAGEN 公司)提取全基因组 DNA。DNA 浓度≥50 mg/L,光密度[$D(260)/D(280)$]为 1.8~2.0。DNA 总量≥6 μg,送检深圳市华大基因公司检测。

1.2.1 全外显子组捕获测序 根据 SeqCap EZ Human Exome Library v3.0 (64M)芯片标准流程进行全外显子组测序。捕获文库置于 Hiseq2000 平台,使用高通量测序技术进行测序。由 Illumina basecalling Software 处理原始的图像文件,得到 90 bp 双向测序片段和 8 bp index 标记序列的 reads。

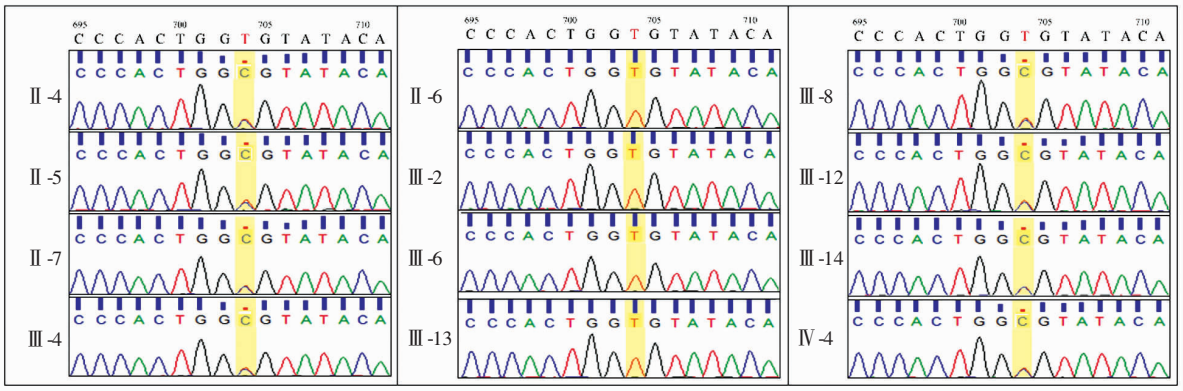
1.2.2 Sanger 测序 变异点验证和家系共分离使用 Sanger 测序法,首先参考 NCBI GeneBank 数据库中的人类基因组序列(HG19),针对所需要扩增的区域设计特异性引物。PCR 产物经纯化后,按照 ABIPrism® BigDye Terminator protocol (ABI, Foster City, CA, USA)进行测序反应,然后使用 ABI PRISM 3730 自动测序仪(Applied Biosystems)进行测序,结果使用 DNASTAR SeqMan software (DNASTAR, Madison, isconsin, USA)进行峰图分析。

1.2.3 信息分析 将产生的原始数据进行过滤;去除含有 adapter 的 reads,去除质量值小于 10 的碱基占总碱基数 50% 以上的 reads,去除 N 的比例大于 10% 的 reads。过滤后用 BWA (版本:0.7.10 - r789,软件参数为:-I -L -o 1 -e 20 -i 5 -l 31)软件比对 hg19[(UCSC Feb.2009) + NC_012920.1 (chrM)]的人类基因组参考序列上,比对结果用 Picard 软件、GATK 软件进行校正及检测,过滤低质量的变异。对保留的变异位点用 refgene(UCSC hg19 database, 2013-05-21 release)进行基因位置注释,并用 OMIM (2013-04-08 release)数据库进行基因-疾病关联注释。dbSNP 数据库、人类基因组单体型图计划数据库、1 000 人基因组计划数据库用于变异位点的频率注释。

2 结果

2.1 基因检测

通过对家系中Ⅲ-8、Ⅲ-12、Ⅲ-13、Ⅱ-7 4 个样本进行全外显子常染色体显性遗传流程分析,发现 1 个 BEST1 基因的 c.704T > C(p.Val235Ala)杂合突变。该突变在 3 个患者中存在,在健康对照中不存在,且在人群中的频率极低(图 2)。

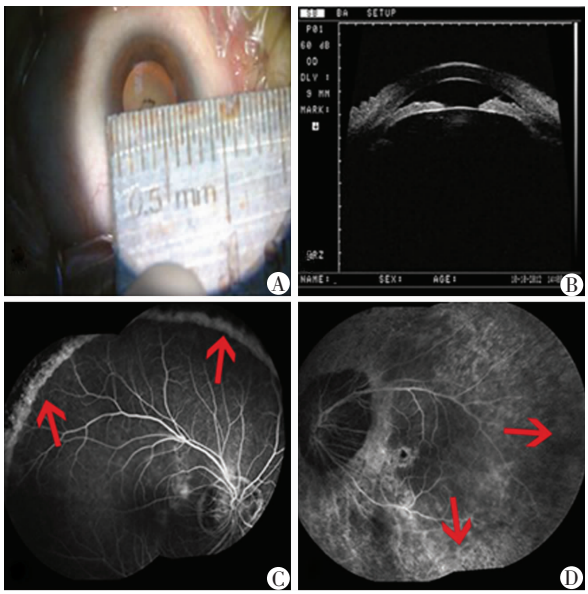


BEST1(GenBank Accession: NM_004183.3)的基因序列,家系成员Ⅱ-4、Ⅱ-5、Ⅱ-7、Ⅲ-4、Ⅲ-8、Ⅲ-12、Ⅲ-13和Ⅳ-4示突变型

图2　常染色体显性遗传玻璃体脉络膜视网膜病变家系DNA测序

2.2　家系成员眼科临床检查

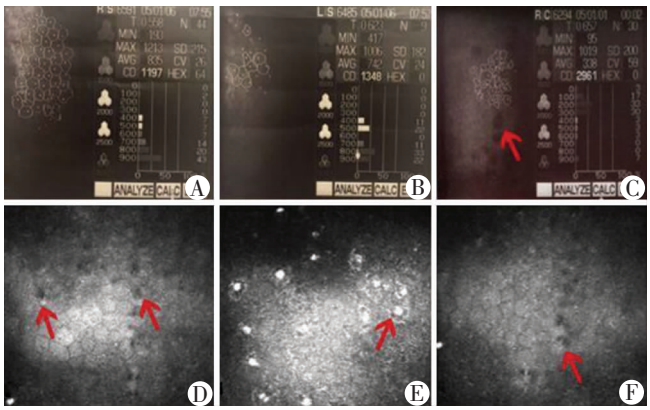
该家系先证者(Ⅲ-8)从小视力差,38岁时因右眼视力下降严重伴有眼胀到医院就诊,就诊检查发现该先证者双眼视力右眼为0.05,左眼为0.3,右眼眼压高达32 mmHg,双眼角膜直径小于正常值(10 mm),晶体混浊(右眼为甚),前房深度浅,眼底可见视盘周边脉络膜萎缩斑,并有眼球水平震颤,行角膜共聚焦显微镜检查显示角膜内皮形态可,但可见突出的赘疣,行角膜内皮镜检查显示多处暗区,行眼底视盘造影显示周边视网膜脉络膜病变,此后,患者分别行双眼激光虹膜周切术和右眼白内障超声乳化手术,定期随访3年内未发生眼压升高、视野进展等闭角型青光眼症状(图3)。



A:家系先证者(Ⅲ-8)前节照相,可见患者角膜直径小于10 mm;B:家系先证者(Ⅲ-8)UBM检查可见房角狭窄,甚至关闭;C:家系先证者(Ⅲ-8)视网膜血管造影结果,周边视网膜存在色素沉着(箭头示);D:家系成员(Ⅲ-14)视网膜血管造影结果,周边视网膜色素沉着(箭头示)

图3　常染色体显性遗传玻璃体脉络膜视网膜病变家系患者眼科临床检查

家系成员(Ⅲ-14)26岁时因双眼视力差到医院就诊,发现双眼视力为0.1,双眼角膜直径小于正常值(10 mm),晶体混浊,眼底可见视盘周边脉络膜萎缩斑,并有眼球水平震颤,角膜共聚焦显微镜检查显示角膜内皮形态可,但可见突出的赘疣,行角膜内皮镜检查显示角膜内皮细胞形态不规则,且细胞计数少于正常值(图4)。此后,患者行双眼白内障超声乳化手术,术后定期随访5年未发生眼压升高视野进展等闭角型青光眼症状。



A、B:家系成员(Ⅲ-14)角膜内皮镜检查,可见该成员的角膜内皮细胞形态欠规则,且其角膜内皮细胞数量少于正常值;C:先证者(Ⅲ-8)角膜内皮镜检查,可见多个暗区(箭头示);D:先证者(Ⅲ-8)行角膜共聚焦显微镜检查,示角膜内皮细胞层可见少许突出的赘疣(箭头示);E:家系成员(Ⅲ-14)角膜共聚焦显微镜检查,角膜内皮细胞层同样出现少许白色高反光区(箭头示);F:家系成员(Ⅲ-14)角膜共聚焦显微镜检查,角膜内皮细胞层同样出现少许突出的赘疣(箭头示)

图4　常染色体显性遗传玻璃体脉络膜视网膜病变家系患者角膜内皮镜和共聚焦显微镜检查

家系成员(Ⅱ-4)从小视力差、45岁双目失明,62岁到医院就诊,发现双眼角膜葡萄肿,角膜直径小于

正常值(10 mm),双眼眼压高达35 mmHg,眼底看不清。

其余家系患者都是从小视力差,角膜直径小于正常值(10 mm),部分家系患者并在青年时期行单纯性白内障手术治疗,自诉术后视力无明显下降;而家系中双眼失明患者几乎是未行任何治疗所导致。

家系成员眼科临床检查发现BEST1杂合突变的患者都存在小角膜、白内障、视网膜脉络膜病变,且患者随年龄增长出现闭角型青光眼,符合BEST1基因突变中的一个常染色体显性遗传性玻璃体视网膜脉络膜病变(ADVIRC),但少数患者出现角膜内皮发育不良情况。

3 讨论

常染色体显性玻璃体视网膜脉络膜病变(ADVIRC)由BEST1基因突变引起,眼底的典型表现为周边视网膜环状色素沉着合并视网膜赤道部脉络膜视网膜萎缩,常伴眼球发育异常,包括小角膜、闭角型青光眼、白内障、浅前房、虹膜发育不良等,亦可伴有眼球震颤和视网膜水肿[11]。在此次研究中,本4代家系患者的一系列临床表现符合常染色体显性玻璃体视网膜脉络膜病变(ADVIRC)的表型,即小角膜、白内障、视网膜脉络膜病变,而部分个体出现角膜内皮发育不良情况。Burgess和他的团队报道的常染色体显性玻璃体视网膜脉络膜病变(ADVIRC)家系,首次报道BEST1基因的c.704T>C(p.Val235Ala)突变[3]。

目前已经报道将近250例治病基因定位在BEST1基因上的患者,与该突变基因紧密联系的疾病包括了卵黄样黄斑发育不良(BVMD),常染色体显性遗传性玻璃体视网膜脉络膜病变(ADVIRC),小角膜、视锥细胞发育不良,白内障、后巩膜葡萄膜肿综合征(MRCS),色素性视网膜炎,常染色体隐性斑萎蛋白病变(ARB)[3,12-14]。目前BEST1基因突变引起视网膜以外疾病已被证实,更清楚理解BEST1基因的临床表型和基因遗传,有助于患者未来选择治疗方式[15]。

过往研究者提出Ca^{2+}激活氯离子通道[7],为Ca^{2+}通道[8]或者HCO_3^-通道[9]在色素上层细胞的基底膜的调节器[10],现提出外显子剪切增强子在决定剪接体对mRNA前体的外显子/内含子边界的正确识别具有重要作用。构建BEST1基因的c.704T>C(p.Val235Ala)突变体在HEK293细胞中进行剪切实验发现:BEST1基因的c.704T>C(p.Val235Ala)减弱了外显子剪切增强子依赖性的剪切过程,使SR蛋白(serine/arginine-rich protein)ASF/SF2对外显子剪切增强子序列的结合增强,且会导致mRNA的异常剪切。BEST1基因的c.704T>C(p.Val235Ala)突变是常染色体显性遗传性玻璃体视网膜脉络膜病的致病突变[14]。

BEST1基因引起的眼前节发育不良、小眼球、小角膜很大程度提高了闭角型青光眼的发病率[5,14,16]。研究表明BEST1基因的斑萎蛋白在眼球的表达不仅仅在视网膜上[3],且和前节发育异常有很大的联系。本研究报道了一个常染色体显性遗传性玻璃体视网膜脉络膜病变(ADVIRC)的大家系,家系先证者因视力下降严重伴眼胀到医院就诊,发现前节发育异常,且前房较浅,眼轴正常,行角膜内皮镜发现内皮发育异常,眼底可见周边视网膜脉络膜病变,此后患者右眼分别行激光虹膜周切、白内障超声乳化和人工晶体植入术。家系中其他患者多数在发病早期已行双眼白内障手术治疗,为了加深前房空间,避免导致闭角型青光眼,家系中患者(Ⅱ-7)因青光眼发作于43岁行左眼小梁切除术,此后因术后眼压再次升高放弃治疗后失明。其余患者因个人延误治疗时间而双眼失明。

家系中的个别患者检查发现角膜内皮异常,如同Fuchs角膜内皮营养不良的临床表型,是否常染色体显性遗传性玻璃体视网膜脉络膜病变所导致,还需要进一步研究证实。

综上所述,外显子结合目标区域捕获测序为临床表型多样的常染色体显性遗传性玻璃体视网膜脉络膜病变的基因检测提供新的技术手段。常染色体显性遗传性玻璃体视网膜脉络膜病变导致视网膜以外的前节病变,若早期患者不及时诊断、治疗和医师未意识前房和眼压情况,会导致闭角型青光眼的发生,最终导致失明。若早期家系患者及早行白内障和YAG激光治疗,可以降低闭角型青光眼的发病率。

参考文献:

[1] Kaufman S J, Goldberg M F, Orth D H, *et al*. Autosomal dominant vitreoretinochoroidopathy[J]. Arch Ophthalmol, 1982, 100(2): 272-278.

[2] Traboulsi E I, Payne J W. Autosomal dominant vitreoretinochoroidopathy. Report of the third family[J]. Arch Ophthalmol, 1993, 111(2): 194-196.

[3] Burgess R, MacLaren R E, Davidson A E, *et al*. ADVIRC is caused by distinct mutations in BEST1 that alter pre-mRNA splicing[J]. J Med Genet, 2009, 46(9): 620-625. DOI: 10.1136/jmg.2008.059881

[4] Lafaut B A, Loeys B, Leroy B P, *et al*. Clinical and electrophysiological findings in autosomal dominant vitreoretinochoroidopathy: report of a new pedigree[J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2001, 239(8): 575-582.

[5] Yardley J, Leroy B P, Hart-Holden N, *et al*. Mutations of VMD2 splicing regulators cause nanophthalmos and autosomal dominant vitreoretinochoroidopathy (ADVIRC)[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2004, 45(10): 3683-3689. DOI:10.1167/iovs.04-0550

[6] Marmorstein A D, Marmorstein L Y, Rayborn M, *et al*. Bestrophin, the product of the Best vitelliform macular dystrophy gene (VMD2), localizes to the basolateral plasma membrane of the retinal pigment epithelium[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(23): 12758-12763. DOI:10.1073/pnas.220402097

[7] Sun H, Tsunenari T, Yau K W, *et al*. The vitelliform macular dystrophy protein defines a new family of chloride channels[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(6): 4008-4013. DOI:10.1073/pnas.052692999

[8] Rosenthal R, Bakall B, Kinnick T, *et al*. Expression of bestrophin-1, the product of the VMD2 gene, modulates voltage-dependent Ca2+ channels in retinal pigment epithelial cells[J]. FASEB J, 2006, 20(1): 178-180. DOI:10.1096/fj.05-4495fje

[9] Qu Z, Hartzell H C. Bestrophin Cl^- channels are highly permeable to HCO_3^-[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2008, 294(6): C1371-C1377. DOI:10.1152/ajpcell.00398.2007

[10] Gomez N M, Tamm E R, Straubeta O. Role of bestrophin-1 in store-operated calcium entry in retinal pigment epithelium[J]. Pflugers Arch, 2013, 465(4): 481-495. DOI:10.1007/s00424-012-1181-0

[11] Vincent A, McAlister C, Vandenhoven C, *et al*. BEST1-related autosomal dominant vitreoretinochoroidopathy: a degenerative disease with a range of developmental ocular anomalies[J]. Eye (Lond), 2011, 25(1): 113-118. DOI:10.1038/eye.2010.165

[12] Davidson A E, Millar I D, Urquhart J E, *et al*. Missense mutations in aretinal pigment epithelium protein, bestrophin-1, cause retinitis pigmentosa[J]. Am J Hum Genet, 2009, 85(5): 581-592.

[13] Petrukhin K, Koisti M J, Bakall B, *et al*. Identification of the gene responsible for Best macular dystrophy[J]. Nat Genet, 1998, 19(3): 241-247.

[14] Boon C J, Klevering B J, Leroy B P, *et al*. The spectrum of ocular phenotypes caused by mutations in the BEST1 gene[J]. Prog Retin Eye Res, 2009, 38(3): 187-205. DOI:10.1016/j.preteyeres.2009.04.002

[15] Sodi A, Menchini F, Manitto M P, *et al*. Ocular phenotypes associated with biallelic mutations in BEST1 in Italian patients[J]. Mol Vis, 2011, 17: 3078-3087.

[16] Wittstrom E, Ponjavic V, Bondeson M L, *et al*. Anterior segment abnormalities and angle-closure glaucoma in a family with a mutation in the BEST1 gene and best vitelliform macular dystrophy[J]. Ophthalmic Genet, 2011, 32(4): 217-227. DOI:10.3109/13816810.2011.567884

(**收稿**:2015-09-02;**修回**:2015-10-13)

(编辑 张 维)