DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.01.024
第24卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 1
2002年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2002

文章编号:1000-5404(2002)01-0055-03

论著

RHO基因突变在视网膜色素变性中的分子遗传学分析

张晓莉,府伟灵,薛 强,张 雪 (第三军医大学附属西南医院检验科,重庆 400038)

提 要:目的 探明我国RP患者视紫红质(rhodopsin, RHO)基因突变的特征和意义。方法 在98例RP患者中运用构象敏感凝胶电泳(conformation sensitive gel electrophoresis, CSGE)和DNA直接测序方法检测RHO基因全编码区范围内的点突变。结果 一个ADRP家系的4名患者第347密码子发生点突变,Pro347Leu;另一个ADRP家系中一名晚发型患者及其目前还未出现症状的女儿在第327密码子出现点突变,Pro327(1-bp del),而对照组100例健康成年人未发现上述两种突变。此外在1名患者和2名对照者中还检出一非致病的点突变,Ala299Ser,属单个碱基多态现象(single nucleotide polymophism, SNP)。结论 98例RP先证者中检出2例携带RHO基因突变,由此可初步预测RHO基因在我国RP患者中的突变频率约为2%(95%的可信区间为0.2%~7.0%)。Pro347Leu突变改变了视蛋白C末端一段高度保守的氨基酸序列,致使该蛋白在胞内的运输发生障碍。Pro327(1-bp del)使突变蛋白的羧基末端失去了原有的磷酸化位点及上述一段高度保守的功能区,其可能的致病机制有待在今后的研究中通过建立相应的转基因模型或细胞培养系统来阐明。

关键词:视网膜色素变性;视紫红质基因;基因突变;构象敏感凝胶电泳;DNA测序
中图法分类号:R394.3;R774.13 文献标识码:A

Molecular study on rhodopsin gene point mutations in retinitis pigmentosa

ZHANG Xiao-li, FU Wei-ling, XUE Qiang, ZHANG Xue (Department of Clinical Laboratories, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To evaluate the patterns and significance of rhodopsin(RHO) gene mutations in Chinese patients with retinitis pigmentosa (RP). **Methods** Conformation sensitive gel electrophoresis (CSGE) and direct DNA sequencing were employed to detect point mutations occurring in the 5 coding exons and splice sites of rhodopsin gene in 98 subjected patients with RP. **Results** Four patients of one autosomal dominant RP (ADRP) family were found to have a missense mutation at codon 347, Pro347Leu. One late-onset RP patient and her daughter, who had no clinical expressions at present, were discovered to have a novel frameshift mutation at codon 327, Pro327 with only one base loss. None of the 2 mutations was found in 100 normal controls. Ala299Ser was found in one patient as missense mutation. Two control subjects also had Ala299Ser, suggesting its nonpathogenicity and just single nucleotide polymophism (SNP). **Conclusion** Since 2 out of 98 RP patients have rhodopsin mutations, the frequency of RHO mutations in RP might be about 2.0% (95% confidence interval 0.2%~7.0%). A highly conserved C-terminal sequence QVS(A)PA is altered due to Pro347Leu and thereby rhodopsin is misdirected to an incorrect subcellular location. Loss of all phosphorylation sites at the C-terminus and the highly conserved sequence QVS(A)PA may occur because of Pro327. To elucidate the predominant biochemical defects in such mutant, the study of transgenic mice and transfected culture cells carrying Pro327(1-bp del) is of great value.

Key words: retinitis pigmentosa; rhodopsin; mutation; conformation sensitive gel electrophoresis; sequencing

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缺损的一组最常见的致盲眼底病,全世界约有150万人患此病,其中中国人占1/4左右[1]。RP同时又是具有遗传异质性的单基因遗传病,目前已证实的人类RP遗传位点已多达50多个,其中视紫红质(Rhodopsin, RHO)基因由于其编码的蛋白仅在视杆细胞中专一性表达,并且基因也定位于常染色体显性遗传RP(Autosomal dominant RP, ADRP)的一遗传位点3q21-24,从而成为了RP分子缺陷研究的第一个候选基因。突变研究至今已证实RHO基因突变可导致RP,并且可能是目前RP最常见的病因[2]。为明确RHO基因在我国RP患者中的突变情况,且也为能发现更多的RP致病突变,本研究应用PCR-CSGE(构象敏感凝胶电泳)和DNA测序技术对98例中国人RP病例进行了RHO基因全编码区突变的筛选与检测。

1 材料与方法

1.1 研究对象

本组98例RP先证者,其就诊年龄介于10~79岁之间,平均年龄约40岁。RP诊断的确立依照国内外的通用标准[3]。对照组为100例健康成年人,以确定所检测到的变异是否系RHO基因的多态现象。对部分发现携带RHO基因突变的RP患者,我们对其家庭成员也做了相应的RHO基因分型,以确认该突变在其家系中是否垂直传递。

1.2 DNA制备

收集研究对象的外周血标本,采用Qiamp Blood试剂盒(QIAGEN公司产品)抽提白细胞DNA。

作者简介:张晓莉(1972-),女,上海市人,博士研究生,主治医师,主要从事遗传性疾病的基因诊断和基因治疗方面的研究,发表论文7篇。电话:(023)68754429
通信作者:府伟灵(E-mail: weilingfu@yahoo.com)
收稿日期:2001-11-30;修回日期:2001-12-29

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.3 CSGE 分析[4]

按已发表的 RHO 基因序列资料(GenBank accession no. U49742, K02281), 运用 Primer Express™ 1.0 软件设计并合成 5 对引物, 见表 1, 扩增区域囊括 RHO 基因的 5 个外显子及其附近的拼接位点。PCR 在 25 μl 的反应体积中进行, 94 ℃预变性 4 min, 而后按 94 ℃ 50 s、60 ℃或 62 ℃ 50 s、72 ℃ 50 s 的顺序, 共 35 个循环, 最后 72 ℃延长 3 min。CSGE 分析前, PCR 产物经 95 ℃变性 5 min、68 ℃退火 30 min 及室温冷却的程序以产生异源双链 DNA, 而后在一 0.8 mm 厚, 含 32 个点样孔的 CSGE 凝胶中电泳。此凝胶含有 2.5 ml 20× TTE 缓冲液(1.8 mol/L Tris 碱/0.6 mol/L 牛磺酸/4 mmol/L EDTA 缓冲液, pH 值 9.0), 37.5 ml 丙烯酰胺:双丙烯酰胺(49∶1) 40% 的溶液, 0.15% 1, 4-双(丙烯)哌嗪, 15 ml 甲酰胺, 10 ml 乙烯乙二醇, 33 ml 重蒸水, 及 0.1% 过硫酸铵和 70 μl TEMED。点样共 3 次, 每次点样后凝胶在 40 W 的功率下电泳 45 min, 这样在每一泳道中可同时分析 3 个长度一致的 PCR 样品。对于 400 bp 的 PCR 样本, 需电泳 8 h 以分离异源双链 DNA(对大于 400 bp 的 PCR 片段, 则相应延长电泳时间)。电泳完毕用 SYBR Gold 染色, 所有显示异源双链 DNA 带型的样品则进一步作 DNA 序列分析, 见图 1。

表 1 RHO 基因 5 对 PCR 引物的碱基序列

Tab 1 Five PCR primers for 5 coding exons within the RHO gene

Amplicon *	Primer sequences 5'→3'	Product size (bp)
Exon1	AGCTCAGGCCTTCGCAGCAT GAGGGCTTTGGATAACATTG	558
Exon2	GAGTGCACCCTCCTTAGGCA TCCTGACTGGAGGACCCTAC	290
Exon3	CTGTTCCCAAGTCCCTCACA CTGGACCCTCAGAGCCGTGA	260
Exon4	ATGCATCTGCCGGCTCCTGCT CCTGGGAGTAGCTTGTCCTT	379
Exon5	ACGTGCCAGTTCCAAGCACA ATTCTGCACAGGCGCTGCTC	273

*: Five amplicons encompassed the 5 coding exons and flanking splice sites

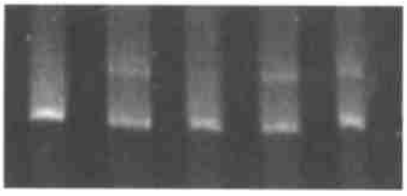


图 1 CSGE 电泳图谱

Fig 1 Electrophoresis with CSGE for 379 bp fragments

2, 4, 5: One single base mismatch presents double bands. The lower is normal band and the upper is heteroduplex band separated from the normal one after being run at 45 W for 8 h

1.4 DNA 序列分析

CSGE 阳性的 PCR 产物经核酸外切酶 I 和碱性磷酸酶处理, 而后加入 dRhodamine 测序混合物(PE 公司产品), 另外同时加入一正义或反义的引物链。反应按 96 ℃ 10 s, 50 ℃ 5 s, 60 ℃ 4 min 的顺序进行, 共 25 个循环。反应混合物经乙醇沉淀后, 即在 ABI377 荧光自动测序仪上进行 DNA 序列分析。

2 结果

研究共发现 6 种碱基变异, 其中 Thr62Thr、Leu259Leu 和 Thr340Thr 为沉默型突变, Ala299Ser 和 Pro347Leu 为错义突变, Pro327(1-bp del)为缺失突变。所有突变均为杂合型突变。

2.1 错义突变

Pro347Leu 在 1 名 55 岁女性患者及其同样患有 RP 的 3 名子女中检出。患者 17 岁出现夜盲, 视野向心性缩窄, 眼底表现为视网膜有弥漫性色素病变, 血管明显缩小, ERG 无杆体及锥体反应。对照组 100 例健康成年人未检出一例携带此错义突变。另一错义突变-Ala299Ser 分别在 1 名 RP 患者及 2 名对照组成员中检出, 系 RHO 基因的多态现象。

2.2 缺失突变

在一名 53 岁的女性患者中, 我们首次发现了一单个碱基缺失突变-Pro327(1-bp del), 在 RHO 基因第 327 密码子处由于单个碱基(C)的缺失使第 326 密码子后的编码氨基酸发生改变, 终止信号延后出现, 导致原有 22 个氨基酸的 C 末端延长为 32 个氨基酸。患者 30 岁出现夜盲, 视觉敏感度下降, 眼底具有 RP 的典型表现。患者的姐姐及父亲都患有 RP, 但此次却未能参与我们的研究。患者 26 岁的女儿同样检出携带这一缺失突变, 除眼底色素上皮出现斑点外, 目前还没有 RP 的任何症状。另外 3 名眼部表现正常的亲属 RHO 基因未检出任何突变。100 例正常对照组无一例发现此种类型的突变。

3 讨论

自 1990 年 Dryа 等[5] 首次发现 RP 患者存在 RHO 基因突变以来, 目前已报道了近 100 种 RHO 基因突变, 其中 90% 左右是单个碱基置换的点突变。Pro23His 在美国是最常见的 RP 病因[2], 但在其他地区如欧洲、日本等地还未有该突变的报告, 因此除去第 23 密码子突变外, RHO 基因在美国人 ADRP 患者中的突变率约为 16%~18%[2], 而在所有 RP 患者中的突变率则约为 6%~7%。本研究在 98 例 RP 患者中发现 2 例 RHO 基因第 327、347 密码子存在突变, 鉴于这两种突变均在家系中垂直传递, 正常对照组又无此类突变, 故该两种突变很可能是相应 RP 患者的病因。由此我们可预测 RHO 基因在我国 RP 患者中的突变率大约为 2.0% (2/98=2.0%, 95% 的可信区间为 0.2%~7.0%), 相比于美国人种中的报道较低, 但这只是初步的评估, 更完善的资料和数据有待在更广泛的 RHO 基因分型中获得。

Pro347Leu 在一名 RP 先证者中发现, 本研究中的检出率(1/98)类似于美国人种中的报道(约占所有 RP 患者的 1.4%)。RHO 基因第 347 密码子可能是一个突变的高发位点[2], 目前已报道的这一密码子的突变类型就有 3 种。该位点的突变改变了视蛋白 C 末端一段与该蛋白有效转运密切相关的氨基酸序列-QVS(A)PA(第 344 至 348 密码子), 致使突变视蛋白不能被有效地传递到杆体外节而聚集在细胞内, 继而干扰了细胞内部一系列新陈代谢如外节盘膜的更新和脱落, 从而最终引发细胞凋亡[6,7]。C 末端突变的表现型往往较重[7], 患者起病早, 病程进展相对较快。本研究中携

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

带 Pro347Leu 的母亲和 3 名子女均在 17 岁时即出现夜盲, 母亲此次就诊时视网膜功能已严重紊乱, 大部分视野已丧失, ERG 已无杆体及锥体反应。

另外在 1 名晚发型 RP 患者中, 我们首次发现了一新的 RHO 基因突变-Pro327(1-bp del)。突变改变了视蛋白 C 末端的阅读框架(自第 327 密码子起), 致使原有的磷酸化位点及末端一段高度保守的序列-QVS(A)PA 均丧失。磷酸化位点的缺失会导致感光细胞光电转换后不能及时复苏而处于过度应激状态, 继而诱发细胞变性[8]。而另一方面 C 末端保守序列的丧失则会影响视蛋白分子在胞内的运输[7], 引发细胞变性的机理类似于 Pro347Leu 突变。以上两种可能的机制究竟哪一种比较占主导, 还有赖于通过建立相应突变的转基因模型或细胞培养系统来进行更深入地研究。

RHO 基因突变以单个碱基改变和微小缺失为突出特征, 检测时须选择比较敏感的突变筛选方法。本研究选用构象敏感凝胶电泳(CSGE), 通过设计适当的 PCR 引物控制 DNA 片断的长度以及优化电泳条件等, CSGE 的突变检出率可维持在 98%以上。另外基于我们的经验, CSGE 优于其他筛选方法的一主要特点在于其操作简便, 可同时在一条泳道中快速筛选多个大小不同的 DNA 片段, 并且电泳条件的重复性好, 适于大批量标本的突变筛选。方法不使用放射性, 不需要特殊的仪器设备或样本前处理, 只需制作一块含有适宜变性剂-缓冲液系统的标准聚丙烯酰胺凝胶[4], 适于在常规分子生物学实验室推广应用。

参考文献:

[1] Berson E L. Retinitis pigmentosa: the Friedenwald lecture[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1993, 34(5): 1 659—1 676.

[2] Dryja T P, McEvoy J A, McGee T L, *et al*. Novel rhodopsin mutations Gly114Val and Gln184Pro in dominant retinitis pigmentosa[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000, 41(10): 3 124—3 127.

[3] Gilbert C, Rahi J, Eckstein M, *et al*. Hereditary disease as a cause of childhood blindness: regional variation[J]. Ophthalmology Genetics, 1995, 16(1): 1—3.

[4] Leung Y F, POS Tam, Tong W C, *et al*. High Throughput conformation sensitive gel electrophoresis (HTCSGE) for rapid detection of novel single nucleotide polymorphisms (SNPs)[J]. Biotechniques, 2001, 30(2): 334—340.

[5] Dryja T P, McGee T L, Hahn L B, *et al*. Mutations within the rhodopsin gene in patients with autosomal dominant retinitis pigmentosa[J]. New Engl J Med, 1990, 323(19): 1 302—1 307.

[6] Li T, Snyder W K, Olsson J E, *et al*. Transgenic mice carrying the dominant rhodopsin mutation P347S: evidence for defective vectorial transport of rhodopsin to the outer segments[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(24): 14 176—14 181.

[7] Deretic D, Schmerl S, Hargrave P A, *et al*. Regulation of sorting and post-Golgi trafficking of rhodopsin by its C-terminal sequence QVS(A)PA[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(18): 10 620—10 625.

[8] McDowell J H, Robinson P R, Miller R L, *et al*. Only phosphorylated residues in the carboxyl terminal region of rhodopsin will activate arrestin[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000, 41: S608.

(编辑　王　红)

(上接 54 页)

3　讨论

在本实验中, 钙离子灌注后 3 h, 两种细胞均开始出现凋亡; 从 3 ~ 24 h, 凋亡发生与诱导后时间呈相关性; 24 ~ 48 h, 相对稳定。其他实验室的相关在体实验则观察到凋亡细胞在出现高峰以后随时间推移而比例渐低。我们认为, 由于离体培养细胞没有来自于机体全身性因素的作用, 如巨噬细胞吞噬、体液信号传导引起的其他细胞参与, 使凋亡细胞呈现相对静止状态。

近来研究发现短暂性脑缺血和脑外伤引起的继发性神经组织死亡也有凋亡。实验声明, 在不同细胞和不同凋亡诱导条件下, 细胞出现凋亡高峰的时间不尽相同, 可能在 5、5、12 或 24 h, 甚至更长[3~5], 这可能与不同的凋亡通路有关, 但多数实验证实凋亡活动具有明显的时间依赖性, 在达到高峰以前与时间呈近似的线性关系。凋亡启动时相点及其发生发展规律的进一步阐明可为临床及时采取有效的治疗措施提供可靠的理论依据。

星形胶质细胞和少突胶质细胞在接受诱导后的差异性表现可能与其不同的自我调节能力有关。已有资料证明, 少突胶质细胞是中枢神经系统中对缺氧损伤的敏感性比神经原更为敏感的细胞。在中枢神经系统中, 胶质细胞之间以及胶质细胞和神经元之间的联系多通过细胞间液内活性成分的作用实现。实验证明在星形胶质细胞膜表面, 存在着中枢神经系统内几乎所有活性因子的受体, 真正理解星型胶质细胞受体功能的意义, 还需要对在体星形胶质细胞功能有更充分的理解。

关键词: 调亡; 星型胶质细胞; 少突胶质细胞
中图法分类号: R338.1　　文献标识码: B

参考文献:

[1] Wu yamin, Ma haihan, Liao weihong. The purified cultivation and identification of astrocytes and oligodendrocytes from rats[J]. J Trauma Surg, 2000, 4(): 22—27.

[2] Kazuhiro Tokuma, Toshio Matsuda, Yoko Kishida, *et al*. Heat shock protects cultured rat astrocytes in a model of reperfusion injury[J]. Brain research. 1996, 735(): 265—270.

[3] Filippovich I V, Sorokina N I, Robillard N, *et al*. Radiation—induced apoptosis in human ovarian carcinoma cells growing as a monolayer and as multicell spheroids[J]. Int J Cancer, 1997, 72(5): 851—859.

[4] Wirleitner B, Baier Bitterlich G, Bock G. 7, 8-Dihydroneopterin—induced apoptosis in Jurkat T lymphocytes: a comparison with anti-Fas- and hydrogen peroxide-mediated cell death[J]. Biochem Pharmacol, 1998, 56(9): 1 181—1 187.

[5] Mello M A, Tuan R S. High density micromass cultures of embryonic limb bud mesenchymal cells: an in vitro model of endochondral skeletal development[J]. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 1999, 35(5): 262—269.

(编辑　王　红)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net