

doi: 10.3978/j.issn.1000-4432.2020.07.03

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1000-4432.2020.07.03>

原发性开角型青光眼家系的致病基因筛查

赵燕燕¹, 刘勇¹, 李乾²

[1. 空军特色医学中心(原空军总医院)眼科, 北京 100142; 2. 国家卫生健康委科学技术研究所, 北京 100081]

[摘要] 目的: 观察对一原发性开角型青光眼(primary open-angle glaucoma, POAG)家系的临床特点并筛查致病基因突变。方法: 对先证者进行系统的临床检查, 包括视力、眼压、裂隙灯、前房角镜、眼底、光学相干断层成像及视野检查。应用全外显子测序技术对先证者进行致病基因筛查, 结合临床表型, 锁定候选基因致病突变位点, 应用Sanger测序技术对先证者及其家系成员进行致病突变验证。结果: 该家系4代共18人, 为常染色体显性遗传方式, 临床表型为POAG, 其中POAG患者共8人(男3人, 女5人)。先证者携带肌纤蛋白基因(MYOC)-c.754G>A (p.Gly252Arg)杂合错意突变, 而另外2个非患病家系成员(先证者之兄及先证者女儿)未发现该突变。结论: 通过对患者致病基因筛查, 发现该POAG家系患病可能是由MYOC-c.754G>A (p.Gly252Arg)基因突变引起。MYOC Gly252Arg目前被认为与青少年起病的POAG表型相关, 该基因突变在国内POAG家系遗传研究中尚未见报道。

[关键词] 原发性开角型青光眼; 肌纤蛋白基因; Gly252Arg突变; 全外显子测序

Pathogenic gene screening in families with primary open-angle glaucoma

ZHAO Yanyan¹, LIU Yong¹, LI Qian²

(1. Department of Ophthalmology, Air Force Medical Center, Beijing 100142; 2. National Research Institute for Family Planning, Beijing 100081, China)

Abstract **Objective:** To analyze the clinical characters and identify the genetic cause of primary open-angle glaucoma (POAG) in a four-generation Chinese family. **Methods:** The proband underwent comprehensive clinical examinations, including the best vision acuity, interocular pressure, slit-lamp microscopy, gonioscopy, optical coherence tomography and visual field measurement. Whole exome sequencing (WES) was employed to detect potential mutation in the proband. Suspected mutations were validated by the result of Sanger sequencing in the proband and her family members. **Results:** Clinical phenotype in this pedigree was inherited POAG, and the mode of inheritance was

收稿日期 (Date of reception): 2020-05-05

通信作者 (Corresponding author): 李乾, Email: liqian_gene@163.com

基金项目 (Foundation item): 国家人口与生殖健康科学数据中心“复杂遗传病远程协同服务网示范应用”项目(2005DKA32408)。This work was supported by the National Population and Reproductive Health Scientific Data Center “Complex Genetic Disease Remote Collaborative Service Network Demonstration Application” Project, China (2005DKA32408).

autosomal dominant. Eight subjects (3 male, 5 female) of eighteen descendants had POAG. A heterozygous missense mutation c.754G>A (p.Gly252Arg) was detected in the proband. The brother and the daughter of the proband who were not affected did not carry the mutation. **Conclusion:** The MYOC c.754G>A (p.Gly252Arg) mutation was probably the mutation in this POAG family. This mutation was reported to be a juvenile-onset primary open angle glaucoma (J-POAG) phenotype, which has not been reported in Chinese POAG family.

Keywords primary open-angle glaucoma; myocilin gene; myocilin Gly252Arg mutation; whole exome sequencing

青光眼是一组复杂的慢性进行性视神经损害性疾病, 临床特点为眼压升高、视盘凹陷和萎缩、视野缺损, 是目前全球视力损害和致盲的第二大疾病。原发性开角型青光眼(primary open-angle glaucoma, POAG)是青光眼的主要类型之一, 有青光眼家族史的患者发病的风险比普通人群高7~10倍。POAG的发病机制目前尚不清楚, 遗传因素和环境因素均可影响该病的发生, 而遗传因素是POAG的主要因素。目前已发现与POAG相关的基因突变位点至少有20个。全外显子测序技术具有快速准确、高通量及高速度等特点, 被越来越多地应用于临床基因筛查和诊断中。本研究对1个POAG家系患者进行临床表型的研究, 并应用全外显子测序技术对致病基因进行了筛查, 现报告如下。

1 对象与方法

1.1 对象

选择2017年在空军特色医学中心(原空军总医院)就诊的1例POAG患者, 通过详细询问及遗传学调查, 分析其家系遗传特征, 绘制系谱图。对该患者及其可获得的家系成员进行全面的眼科检查, 包括视力、最佳矫正视力、眼压(Goldman非接触眼压计)、裂隙灯显微镜、眼底检查、前房角镜、视野(Humphrey自动视野计)、相干光断层扫描检查。POAG诊断标准(参照中华医学会青光眼学组推荐标准): 1)两眼中至少1只眼眼压持续>21 mmHg(1 mmHg=0.133 kPa); 2)前房角镜检测为开角; 3)眼底存在青光眼特征性视网膜视神经损害和视野损害; 4)没有与眼压升高相关的病理性眼部或全身其他异常。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取

抽取各受试者外周血5 mL, 进行EDTA抗凝,

于-20℃冰箱中保存。采用全血基因组DNA提取试剂盒提取DNA。本研究经空军特色医学中心(原空军总医院)医学伦理委员会审核批准, 受试者均签署知情同意书, 并遵循赫尔辛基宣言涉及人类受试者的医学伦理学原则。

1.2.2 全外显子测序

基因组DNA送北京贝瑞和康生物有限公司, 进行人类全基因组外显子高通量基因测序。测序原始数据净质量控制后, 应用BWA软件对数据进行比对, 采用GATK和VarScan软件对单个核苷酸多态位点、小的缺失和插入进行分析, 应用dbSNP数据库、HapMap数据库、ExAC数据库、千人基因组数据库(1 000 g)及100名正常对照人群SNP数据库对数据进行过滤, 将突变频率<0.01的变异视为可疑变异, 应用Polyphen-2和SIFT软件对可疑突变进行致病性预测, 同时使用基因突变相关数据库HGMD和Clinvar进一步对可疑致病位点进行确认, 找出致病位点肌纤蛋白(myocilin, MYOC)基因的c.754G>A。

1.2.3 Sanger 测序验证

根据全外显子测序结果, 采用Sanger测序对先证者及其家系成员进行突变结果验证。针对MYOC基因的c.754G>A突变, 应用Primer3软件设计引物, 并合成基因引物。

1.2.4 PCR 扩增目标片段

采用聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增DNA, 扩增产物经2%琼脂糖凝胶电泳检测后, 将产物进行纯化, 应用美国ABI公司的3730xl型测序仪进行测序。测序结果与GenBank中的MYOC基因第3外显子正常序列(GenBank NM_000261)进行BLAST比对, 记录对比结果。

2 结果

2.1 先证者临床资料

患者, 女, 39岁, 反复头疼17年, 2017年

5月23日于空军特色医学中心(原空军总医院)眼科首诊。体格检查: 右眼视力1.2, 左眼视力1.2; 右眼眼压21.5 mmHg, 左眼眼压25.7 mmHg。双角膜透明, 前房中深, 晶体透明, 瞳孔对光反射灵敏, 眼底见视盘界清, 色正, C/D 0.8~0.9, 视网膜血管走形比例可, 黄斑中反清晰。房角镜检查: 双眼360°宽角, 无房角粘连和房角发育异常。动态视野: 右眼鼻下与生理盲点相连的视野缺损, 左眼颞侧和鼻下视野缺损。视盘光学相干断层扫描(optical coherence tomography, OCT): 右眼上方神经纤维层变薄, 左眼鼻侧和上方神经纤维层变薄。视神经纤维变薄区与视野缺损区相对应(图1)。24 h眼压监测阳性(最低: 右眼10.3 mmHg, 左眼11.7 mmHg; 最高: 右眼29.3 mmHg, 左眼31 mmHg; 压差: 右眼19 mmHg, 左眼19.3 mmHg)。临床诊断: 双眼POAG。给予“曲伏前列腺素滴眼液, 点双眼, 每

晚1次; 卡替洛尔滴眼液, 点双眼, 每日2次”治疗, 定期复查眼压均位于正常范围, 随访至2019年8月, 视神经纤维层轻度变薄, 视野损害略有进展(图2, 图3)。

2.2 家系患者临床资料

该家系4代共18人, 其中POAG患者共8人, 男3人, 女5人。本家系连续4代发病, 以垂直方式从一代传到下一代连续传递, 男女均发病, 符合常染色体显性遗传方式(图4)。该家系中, 先证者之姐(III13, 48岁)、母亲(II5, 73岁)、外祖母(I2), 其母亲的一个姐姐(II4, 75岁), 3个弟弟(II7, 72岁; II8, 70岁; II9, 67岁)均患有POAG。患者(III14)确诊年龄为39岁, 确诊时视野已出现显著损害, 其姐姐(III13)42岁因头疼就诊, 确诊为POAG(晚期), 行小梁切除手术治疗, 但目前(48岁)已致盲(管状视野)。

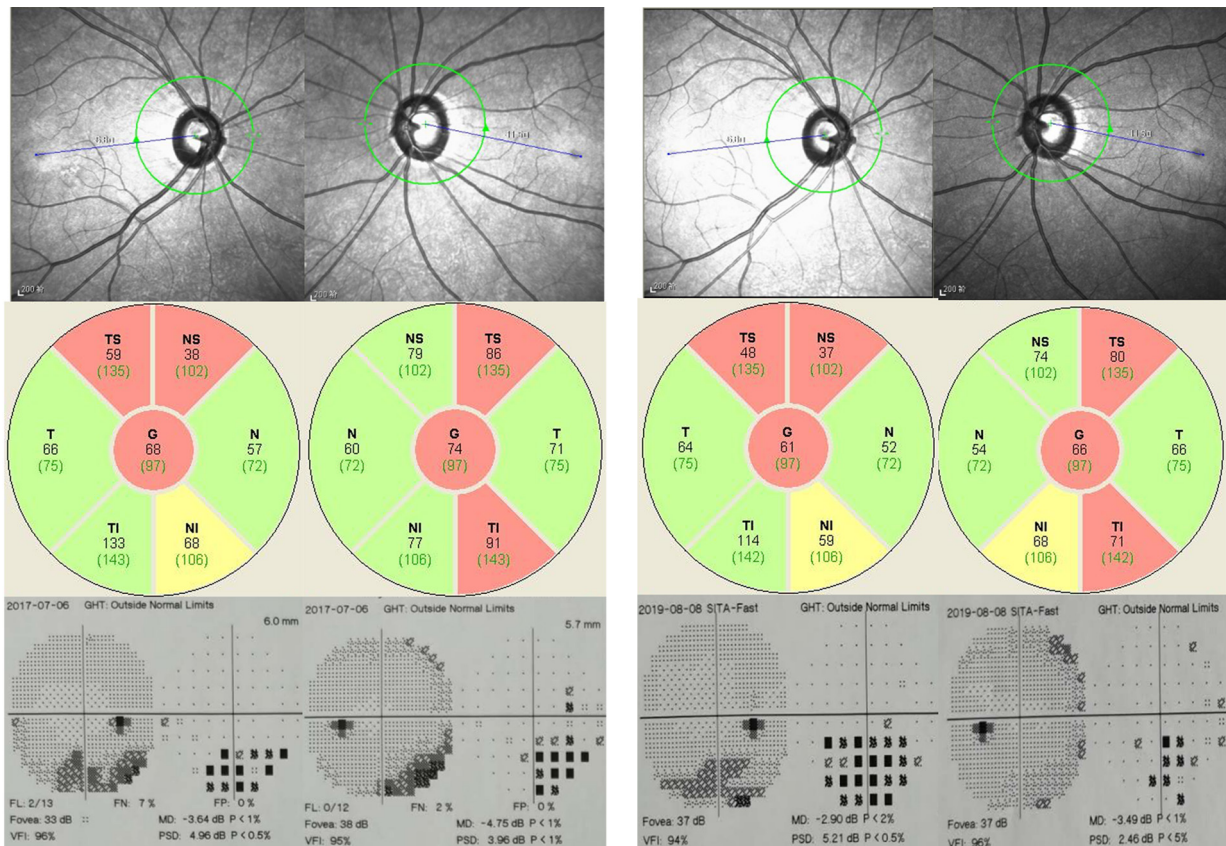


图1 初次及末次就诊时眼底像、视盘OCT及视野图

Figure 1 Optic disc appearance, optical coherence tomography and visual field findings of the proband at the initial and final visits

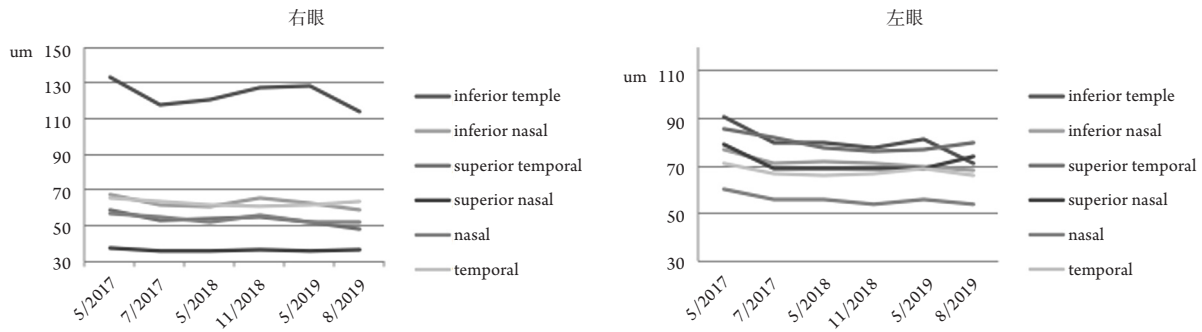


图2 视盘OCT示神经纤维层厚度3年随访变化
Figure 2 OCT revealing RNFL changes in 3-year follow-up

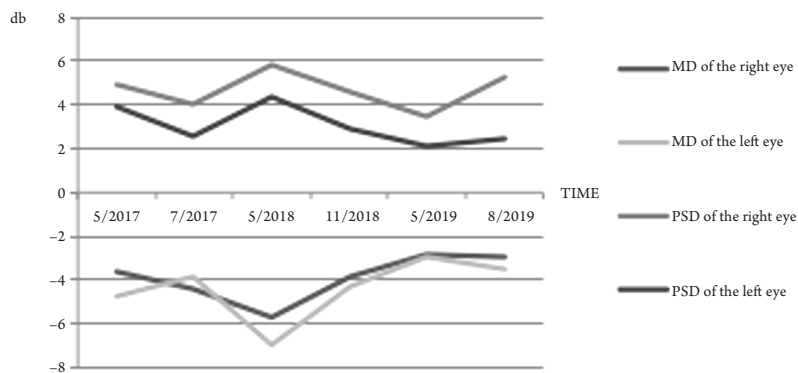


图3 视野损害指数MD及PSD值3年随访变化
Figure 3 Changes in MD and PSD in 3-year follow-up

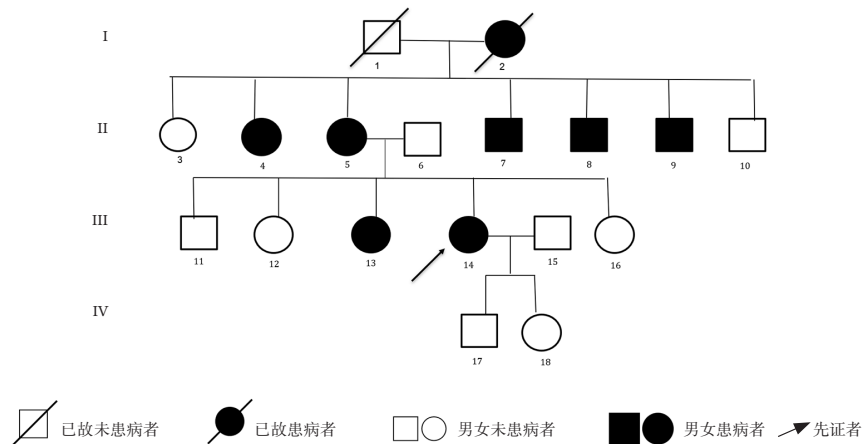


图4 该谱系中的主要个体
Figure 4 Principal individuals from this pedigree

2.3 基因突变结果

经dbSNP137, ESP6500, 千人基因组数据库, ExAC等数据库的过滤筛选以后, 在先证者1号染色体MYOC基因第3外显子发现点突变c.754G>A, 该突变造成蛋白质翻译在252位氨基酸由甘氨酸变为

精氨酸(p.Gly252Arg)。该变异已被HGMD数据库收录, 且Clin Var数据库将其定义为致病性突变。Sanger测序验证先证者携带的MYOC基因c.754G>A(p.Gly252Arg)突变, 在另外2个非患病家系成员(IV18, 20岁; III11, 50岁)中未发现该突变(图5)。

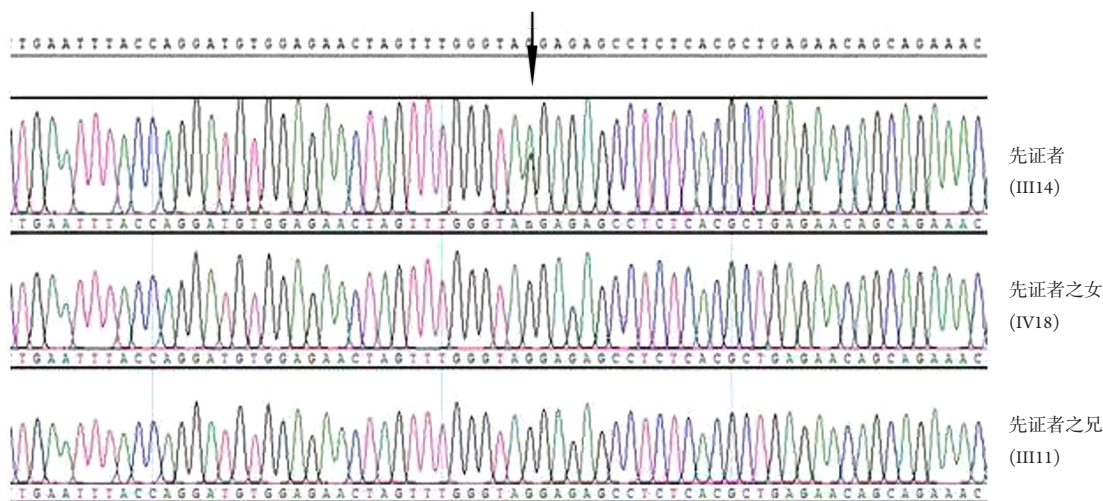


图5 先证者(III14)及其家族成员(IV18, III11)的测序结果

Figure 5 Sequencing results in the proband (III14) and her family members (IV18, III11)

3 讨论

目前已发现与POAG相关的基因约20个, MYOC基因是发现的第一个^[1]、也是最常见的一个致病基因^[2]。MYOC基因位于1号染色体1q21-31的GLCIA位点^[3], 该基因编码长为504个氨基酸的一种多肽糖蛋白^[4]。MYOC基因变异至少有270多种, 超过半数的MYOC基因变异导致青光眼^[5], MYOC基因突变占POAG患者的2%~4%^[6]和J-POAG的22%~36%^[7]。多数致病突变集聚在第3个外显子上, 较少位于第1、第2外显子, 启动子、内含子1、内含子2也有基因突变的报道^[8]。MYOC普遍存在人的各种组织中, 在眼组织特别是小梁、睫状体中浓度较高^[9], 可能在细胞外基质相互作用^[10]、细胞迁移^[11]、线粒体功能^[12]方面发挥作用。变异型MYOC基因的产生改变了蛋白质二级结构, 导致其功能受到影响^[13], 基因变异可以导致蛋白在小梁网表面的错误折叠和积聚, 导致不溶性蛋白在小梁网细胞中的聚集^[14], 致组织裂解或细胞死亡, 引起细胞外基质组成的改变^[15], 通过改变细胞骨架的性状, 影响小梁网细胞的正常功能, 使房水流出通道受阻^[16], 眼压升高最终诱导POAG的产生。Kalrali等^[17]还发现: MYOC在巩膜筛板及视网膜的视神经节细胞轴突及星状胶质细胞中都有表达, 因此还可能通过影响巩膜筛板及视网膜的视神经节细胞的功能和存活性, 来促进青光眼的发生。

本研究通过对1个POAG常染色体显性遗传家系研究, 发现先证者携带MYOC基因的c.754G>A(p.Gly252Arg)突变, 而在另外2个非患病家系成员中未发现该突变。c.754G>A位于MYOC基因第3外显子, 在以往的研究^[6-7]中, 正常人群均未发现该变异, 因此被认为是致病突变而非基因多态性。

c.754G>A(p.Gly252Arg)突变曾被认为与青少年起病的POAG(J-POAG)表型相关。该突变最先由Richards等^[18]通过对一个美国的高加索人家系研究发现; 之后Booth等^[19]报道了1个苏格兰人家系; Willoughby等^[20]报道了1个两代的新加坡华人家系。但携带MYOC Gly252Arg基因突变的患者并非为青少年时发病, 有1例日本裔患者于49岁时确诊POAG。Hewitt等^[21]报道了1个澳大利亚大家系, 该家系患者平均确诊年龄为31~60(46.3±11.4)岁。Booth等^[19]通过房角镜检查, 发现携带该突变的患者房角存在异常血管, 即中胚层组织残留, 但Hewitt等^[21]的研究并没有类似发现, 且家系的患者病情较轻, 发病年龄明显大于之前报道的家系患者^[18-19], 其原因可能为上述房角结构的差异。

本研究首次在中国人POAG家系中发现MYOC基因的c.754G>A(p.Gly252Arg)突变, 该家系患者年龄明显大于之前报道的华人家系^[20]的年龄。可能有一些未知的因素, 如环境或表观遗传因素, 导致了这种表型上的差异。本研究扩展了中国人

群POAG致病基因变异谱, 研究结果为家系的遗传诊断提供了实验依据。下一步拟进一步扩大筛查范围, 对可采集的所有家系成员均进行基因突变的筛查工作, 进一步证实该变异位点的致病性。

参考文献

1. Stone EM, Fingert JH, Alward WL, et al. Identification of a gene that causes primary open angle glaucoma[J]. *Science*, 1997, 275(5300): 668-670.
2. Lam DS, Leung YF, Chua JK, et al. Truncations in the TIGR gene in individuals with and without primary open angle glaucoma[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2000, 41(6): 1386-1391.
3. Sheffield VC, Stone EM, Alward WL, et al. Genetic linkage of familial open angle glaucoma to chromosome 1q21-q31[J]. *Nat Genet*, 1993, 4(1): 47-50.
4. Polansky JR, Fauss DJ, Chen P, et al. Cellular pharmacology and molecular biology of the trabecular meshwork inducible glucocorticoid response gene product[J]. *Ophthalmologica*, 1997, 211(3): 126-139.
5. Braghini CA, Neshich IA, Neshich G, et al. New mutation in the myocilin gene segregates with juvenile-onset open-angle glaucoma in a Brazilian family[J]. *Gene*, 2013, 523(1): 50-57.
6. Fingert JH, Heon E, Liebmann JM, et al. Analysis of myocilin mutations in 1703 glaucoma patients from five different populations[J]. *Hum Mol Genet*, 1999, 8(5): 899-905.
7. Shimizu S, Lichter PR, Johnson AT, et al. Age-dependent prevalence of mutations at the GLC1A locus in primary open-angle glaucoma[J]. *Am J Ophthalmol*, 2000, 130(2): 165-177.
8. Hewitt AW, Mackey DA, Craig JE, et al. MYOC allele-specific glaucoma phenotype database[J]. *Hum Mutat*, 2008, 29(2): 207-211.
9. Ortego J, Escribano J. Gene expression of proteases and protease inhibitors in the human ciliary epithelium and ODM-2 cells[J]. *Exp Eye Res*, 1997, 65(2): 289-299.
10. Goldwisch A, Scholz M, TammE R. Myocilin promotes substrate adhesion, spreading and formation of focal contacts in podocytes and mesangial cells[J]. *Histochem Cell Biol*, 2009, 131(2): 167-180.
11. Kwom HS, Tomarev SI. Myocilin, a glaucoma-associated protein, promotes cell migration through activation of integrin-focal adhesion kinase-serine/threonine kinase signaling pathway[J]. *J Cell Physiol*, 2011, 226(12): 3392-3402.
12. Sakai H, Shen X, Koga T, et al. Mitochondrial association of myocilin, product of a glaucoma gene, in human trabecular meshwork cells[J]. *J Cell Physiol*, 2007, 213(3): 775-784.
13. Kubota R, Kudoh J, Mashima Y, et al. Genomic organization of the human myocilin gene (MYOC) responsible for primary open angle glaucoma (GLCIA)[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 242(2): 396-400.
14. Zode GS, Kuehn MH, Nishimura DY, et al. Reduction of ER stress via a chemical chaperone prevents disease phenotypes in a mouse model of primary open angle glaucoma[J]. *J Clin Invest*, 2011, 121(9): 3542-3553.
15. Nguyen TD, Chen P, Huang WD, et al. Gene structure and properties of TIGR, an olfactomedin - related glycoprotein cloned from glucocorticoid-induced trabecular meshwork cells[J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(11): 6341-6350.
16. Kubota R, Noda S, Wang Y, et al. A novel myosin-like protein(myocilin) expressed in the connecting cilium of the photoreceptor: molecular cloning, tissue expression, and chromosomal mapping[J]. *Genomics*, 1997, 41(3): 360-369.
17. Karali A, Russell P, Stefani FH, et al. Localization of myocilin/trabecular meshwork-inducible glucocorticoid response protein in the human eye[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2000, 41(3): 729-740.
18. Richards JE, Ritch R, Lichter PR, et al. Novel trabecular meshwork inducible glucocorticoid response mutation in an eight-generation juvenile-onset primary open-angle glaucoma pedigree[J]. *Ophthalmology*, 1998, 105(9): 1698-1707.
19. Booth AP, Anwar R, Chen H, et al. Genetic screening in a large family with juvenile on set primary open angle glaucoma[J]. *Br J Ophthalmol*, 2000, 84(7): 722-726.
20. Willoughby CE, Chan LL, Herd S, et al. Defining the pathogenicity of optineurin in juvenile open-angle glaucoma[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2004, 45(9): 3122-3130.
21. Hewitt AW, Bennett SL, Richards JE, et al. Myocilin Gly252Arg mutation and glaucoma of intermediate severity in caucasian individuals[J]. *Arch Ophthalmol*, 2007, 125(1): 98-104.

本文引用: 赵燕燕, 刘勇, 李乾. 原发性开角型青光眼家系的致病基因筛查[J]. 眼科学报, 2020, 35(3): 161-166. doi: 10.3978/j.issn.1000-4432.2020.07.03

Cite this article as: ZHAO Yanyan, LIU Yong, LI Qian. Pathogenic gene screening in families with primary open-angle glaucoma[J]. *Yan Ke Xue Bao*, 2020, 35(3): 161-166. doi: 10.3978/j.issn.1000-4432.2020.07.03