

# 睑裂狭小综合征一家系的 FOXL2 基因突变研究

徐 伟 贺贵云 李灼日

## The study on FOXL2 gene mutation in a pedigree affected by blepharophimosis ptosis epicanthus inversus syndrome

Xu Wei, He Guiyun, Li Zhuori. Institute of Clinical Medicine, Hunan Provincial People's Hospital, Affiliated First Hospital of Hunan Normal University, Changsha 410005, China

**Abstract Objective** To detect the mutation of FOXL2 gene in a Chinese pedigree affected by autosomal dominant blepharophimosis-ptosis-epicanthus-inversus syndrome (BPES). **Methods** Four patients and 6 normal persons in the same pedigree suffering BPES were studied, and other 50 normal individuals were as contrast. The periphery blood was collected for detection of DNA. The exons of the FOXL2 gene were amplified by polymerase chain reaction and analyzed by directly genomic sequencing. **Results** A known mutation C→892C > T at nucleotides in FOXL2 gene was found in the four affected patients. However, no mutation was found in any of the health members in this family or 50 normal individuals. **Conclusion** FOXL2 may be an important pathogenesis for BPES in this Chinese family.

**Key words** blepharophimosis-ptosis-epicanthus-inversus-syndrome; FOXL2; polymerase chain reaction; gene mutation

**摘要 目的** 确定一个常染色体显性遗传的睑裂狭小综合征 (BPES) 家系的致病基因及其突变位点和类型。 **方法** 应用聚合酶链反应和直接测序技术, 对来自同一家系的 4 例 BPES 患者及家系中 6 例正常人和 50 例正常对照者的外周血 DNA 进行分子遗传学分析, 筛查 FOXL2 基因的外显子序列。 **结果** 来自同一家系的 4 例 BPES 患者均发现有 FOXL2 基因 892C > T 的改变, 为无义突变, 而家系中 6 例正常人及 50 例正常对照者的 FOXL2 基因中均未发现突变。 **结论** FOXL2 基因的一种已知突变可能是该 BPES 家系的重要致病因素。

**关键词** 睑裂狭小综合征; FOXL2 基因; 聚合酶链反应; 基因突变

**分类号** R 777 R 5 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)03-0211-03

先天性睑裂狭小综合征 (blepharophimosis-ptosis-epicanthus-inversus syndrome, BPES) 为常染色体显性遗传疾病<sup>[1]</sup>。迄今为止, 已有多篇报道将其致病基因定位于 3q22-23 区域<sup>[2-4]</sup>。最近, Crisponi 等<sup>[5]</sup>对 3q23 区进行精细定位克隆, 明确 FOXL2 基因为其致病基因。随后, 在不同国家、种族 BPES 患者的 FOXL2 基因编码区已筛查到 135 种突变<sup>[6]</sup>, Beysen 等<sup>[6]</sup>为此创立人类 FOXL2 基因突变数据库 (<http://medgen.ugent.be/foxl2>), 以便对其进行研究。但国内该基因突变的详细报道较罕见。我们对一个 BPES 家系进行候选基因筛查, 以期明确其致病基因的类型, 从而在分子水平阐明该 BEPS 家系的发病机制。

### 1 资料与方法

#### 1.1 资料

BPES 家系来自江西省九江市, 10 例家族成员中 4 例为 BPES 患者, 呈连续传递现象, 男女发病率均等, 为常染色体完全显性遗传。家系图谱如图 1。该家系所有患者均有典型的睑裂狭小、上睑下垂、倒转型内眦赘皮、眦距增宽和弱视, 在该家系中所有已婚男女患者均有后代, 先证者 III 2 及其女 (IV 1) 前来进行遗传咨询并进行相应外科治疗。

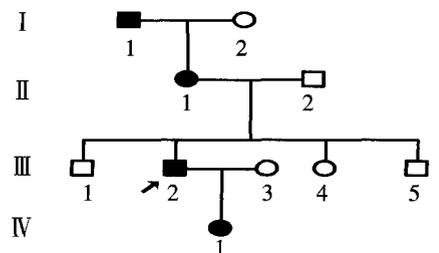


图 1 先天性睑裂狭小综合征家系图谱  
Fig. 1 Pedigree of BPES patients

本课题为湖南省卫生厅基金资助 (W2006-148)  
作者单位: 410005 长沙, 湖南省人民医院临床医学研究所  
通讯作者: 李灼日 (Email: haiying0203@163.com)

### 1.2 方法

**1.2.1 外周血 DNA 的制备** 在征得先证者及亲属同意下,将家系中 4 例患者及家系中 6 例正常人作为研究对象,另外选取 50 例正常人作为正常对照,取外周静脉血 2 mL,2% EDTA 抗凝,常规苯酚/氯仿法提取 DNA。

**1.2.2 PCR 扩增** 采用 9700 型 PCR 扩增仪(美国 ABI 公司),应用 Primer 3 软件设计并合成 4 对引物(表 1),扩增区域覆盖 FOXL2 的外显子及其附近的拼接位点。引物由上海生物工程有限公司合成。PCR 在 25  $\mu$ L 的反应体积中进行,反应体系为 10  $\times$  buffer 2.5  $\mu$ L (含 MgCl<sub>2</sub> 10 mmol/L), 2  $\times$  dNTP 2  $\mu$ L (10 mmol/L),引物 2.5  $\mu$ L (10 mmol/L), 25 U DNA 多聚酶(普通 Taq 酶), 30 ng 基因组 DNA, 加双蒸水至 25  $\mu$ L。95  $^{\circ}$ C 预变性 4 min, 而后按 95  $^{\circ}$ C 30 s、60  $^{\circ}$ C 45 s、72  $^{\circ}$ C 45 s 的顺序,循环 35 次,最后 72  $^{\circ}$ C 延长 10 min。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭/紫外线观察,以证实 PCR 扩增的片段。

**1.2.3 PCR 产物纯化** 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测后,用虾碱性磷酸酶(shrimp alkaline phosphate, SAP)和核酸外切酶处理,酶切反应条件:37  $^{\circ}$ C 孵育 40 min,80  $^{\circ}$ C 孵育 15 min 灭活 SAP 和核酸外切酶,4  $^{\circ}$ C 保存。

**1.2.4 测序与突变分析** 酶切产物在 ABI Prism 3100 DNA 测序仪上直接测序,之后将测序结果与基因库中序列进行对比分析。

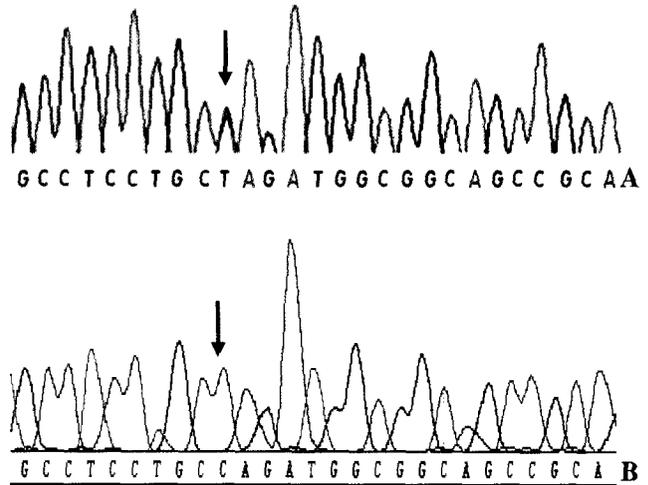
**表 1 FOXL2 的 PCR 扩增引物序列及扩增片段长度**  
Table 1 The primer sequence and PCR product length of FOXL2 gene

Exon	Primer sequence 5' $\rightarrow$ 3'	Fragment length(bp)
1-1	5'-CCGTAAGCGGACTCCTGC-3'	473
	5-AGTACTTGCCCTTGCCGCTC-3'	
1-2	5'-CAGCCTCAACGAGTGCCTCA-3'	583
	5'-CGTGCAGATGCTGTGCGTG-3'	
1-3	5'-ACTCGTACAATGGCCTGGGA-3'	494
	5'-GAGGAGCGACAGGAGCTTAGG-3'	
1-4	5'-CGCACTTCCAGCCCGCAA-3'	304
	5'-TGTGTACGGCCCGTACGA-3'	

## 2 结果

应用 PCR 直接测序技术,对该家系先证者进行 FOXL2 基因全部编码区的突变检测,发现编码 FOXL2 基因的模板链中位于 892 位的胞嘧啶突变为胸腺嘌呤(892C > T),导致 219 位的谷氨酰胺突变为终止密码子(Q219X)(图 2A),致使其下游翻译蛋白提前终止;家系中的其他 3 例患者均发现有 FOXL2 基因的相同突变,该突变在国内 BPES 家系中曾有报道<sup>[7]</sup>。而家

系中的 6 例正常人及 50 例正常对照者(图 2B)均未发现 FOXL2 基因的突变。



**图 2 FOXL2 基因测序结果** A:先证者 FOXL2 基因测序结果 892C $\rightarrow$ C/T(箭头示突变位置 C $\rightarrow$ C/T 杂合) B:家系中未患者和正常人 892C 的测序图谱

Fig. 2 FOXL2 gene sequencing A: Sequence electropherograms of FOXL2 mutation location is 892C > T B: Sequence electropherograms of 892C for normal FOXL2 in this family

## 3 讨论

BPES 是一种罕见的常染色体显性遗传病,在普通人群中的发病率大约为十万分之一<sup>[8]</sup>,本病典型特征为双眼倒向型内眦赘皮、上睑下垂、睑裂狭小、内眦距离宽、上睑提起功能受限或丧失等。BPES 可分为两型, I 型女性患者因卵巢功能早衰( premature ovarian failure, POF) 而不育,男性患者生育功能正常。 II 型男女患者因只累及眼睑故均可生育<sup>[9]</sup>。 I 型为普通型,由父亲传代,女性患者伴有不孕症,其外显率 100%。 II 型外显率 96%, 父母亲传代机会均等<sup>[10-11]</sup>,我国所报道的病例中,父亲传代占绝大多数<sup>[12]</sup>。本家系女性患者生育能力正常,属于 BPES II 型。测序结果显示,该家系 4 例患者均携带相同的 892C > T (Q219X) 突变。因此,我们认为 892C > T (Q219X) 突变为该家系的 BPES 致病基因。迄今为止,与 FOXL2 基因相关的错义突变、缺失、插入、复制及剪切位点突变(135 种突变)在国外均有文献报道,我国也有少量的相关文献报道,表明 FOXL2 基因突变是导致常染色体显性遗传 BPES 的主要病因之一。

FOXL2 的 cDNA 为 2 700 bp,通过与其基因组序列比较,发现其为单外显子基因。最长的开放读码框翻译产生 376 个氨基酸的蛋白质。BLAST 分析表明该

基因属于 winged/ forkhead 转录因子家族,其包含由 100 个氨基酸组成的特征性 DNA 结合结构域。该家系中,所有患者 FOXL2 基因的模板链 892C > T (Q219X),导致终止密码子提前,蛋白截短;表达的蛋白含有完整的 forkhead 蛋白结合域,无多聚丙氨酸序列,其突变为杂合子突变。这一突变导致所有的患者均有典型的 BPES 眼部表现。

由于 BPES 明显影响患者的容貌,因此如需改善容貌均采用手术治疗。而对其后代的遗传咨询和基因治疗则意义重大。植入前遗传学诊断 (pre-implantation genetic diagnosis, PGD) 技术的出现则可以预防子代出现同样的疾患,防止 BPES 患者将其致病基因传递给后代。但 PGD 涉及的伦理学问题仍存在争议。

### 参考文献

- Jewett T, Rao PN, Weaver RG, et al. Blepharophimosis, ptosis, and epicanthus inversus syndrome (BPES) associated with interstitial deletion of band 3q22; review and gene assignment to the interface of band 3q22.3 and 3q23 [J]. *Am J Med Genet*, 1993, 47: 1147 - 1150
- de Die-Smulders CEM, Engelen JJM, Donk JM, et al. Further evidence for the location of the BPES gene at 3q2 [J]. *Med Genet*, 1991, 28: 725
- Amati P, Chomel JC, Nivelon-Chevalier A, et al. A gene for blepharophimosis-ptosis-epicanthus inversus syndrome maps to chromosome 3q23 [J]. *Hum Genet*, 1995, 96: 213 - 215
- Amati P, Gasparini P, Zlotogora J, et al. A gene for premature ovarian failure associated with eyelid malformation maps to chromosome 3q22-q23 [J]. *Am J Hum Genet*, 1996, 58: 1089 - 1092
- Crisponi L, Deiana M, Loi A, et al. The putative forkhead transcription factor FOXL2 is mutated in blepharophimosis/ ptosis/epicanthus inversus syndrome [J]. *Nat Genet*, 2001, 27: 159 - 166
- Beysen D, Vandesompele J, Messiaen L, et al. The human FOXL2 mutation database [J]. *Hum Mutat*, 2004, 24: 189 - 193
- 唐胜建,王小柯,王艳丽,等.小睑裂综合征家系 FOXL2 基因的突变研究 [J]. *中华整形外科杂志*, 2007, 23(1): 48 - 50
- Iwasaki T, Togashi Y, Terauchi Y, et al. All significant association of serum albumin with severity of retinopathy and neuropathy, in addition to that of nephropathy, in Japanese type 2 diabetic patients [J]. *Endocr J*, 2008, 55(2): 311
- Zlotogora J, Sagi M, Cohen T. The blepharophimosis, ptosis, epicanthus inversus syndrome: delineation of two types [J]. *Am J Hum Genet*, 1983, 35: 1020 - 1027
- 胡诞宁.眼科遗传学 [M]. 上海:上海科学技术出版社, 1987: 117
- Diane B, Jo V, Ludwine M, et al. The human FOXL2 mutation database [M]. *Hum Mutat*, 2004, 24(3): 189 - 193
- Siv F, Stylianos EA, Jean L. FOXL2 mutation in blepharophimosis-ptosis-epicanthus inversus syndrome (BPES): Challenges for genetic counseling in female patients [J]. *Am J Med Genet*, 2003, 117(2): 143 - 146

(收稿:2008-05-23 修回:2008-09-26)

(本文编辑:尹卫靖)

## 第二届国际葡萄膜炎、第三届亚太眼内炎症学会 暨第八届中国眼免疫学会研讨会会议通知

第二届国际葡萄膜炎、第三届亚太眼内炎症学会暨第八届中国眼免疫学会研讨会将作为第十四届全国眼科学术大会的国际性卫星会议于 2009 年 8 月 24 日在重庆召开。

第一届国际葡萄膜炎研讨会曾于 2007 年在中国广州成功举行。首届研讨会汇集了来自美国 Jerry Niederkorn、James Rosenbaum、Chi-Chao Chan、Grace Levy-Clarke 教授、荷兰 Aize Kijlstra 教授、英国 Heping Xu 教授、法国 Puhe Lehoang 教授、日本 Shigeaki Ohno 教授等十余位国际著名葡萄膜炎专家,以及我国眼科界著名的专家学者。会议不仅展示了葡萄膜炎研究的国际前沿动态,并且在葡萄膜炎的基础、临床和流行病学研究等多方面进行了广泛地交流和探讨。第二届国际葡萄膜炎研讨会特别联合了第三届亚太眼内炎症学会和第八届中国眼免疫学会共同举办,我们希望为该领域的同仁们构建起一个更加广阔和开放的平台,使国际最新的研究成果以及我国研究者的杰出工作得到充分的展示。

本次会议由重庆医科大学、重庆医科大学第一附属医院、重庆市眼科学重点实验室、重庆市国际葡萄膜炎研究实验室主办,亚太眼内炎症学会、中华医学会眼科分会眼免疫学组协办。我们真诚地欢迎国内眼科专家学者参会。同时欢迎厂商参展。国内代表会务费为 800 元/人。欢迎通过 email 垂询和投稿。

Email: uveitis\_chongqing2009@yahoo. cn

会议网站: <http://uveitis.cqmu.edu.cn>

电话: 023 - 89012851

地址: 重庆市渝中区医学院路 1 号

邮编: 400016

征文相关事宜:

一、征文内容

葡萄膜炎、眼内炎症及眼免疫相关的基础及临床研究论文或经验体会。

二、征文要求

1. 凡报送参加大会交流的论文,均需要提交论文摘要一份(包括目的、方法、结果、结论及关键词,字数不超过 500 字)。请自留底稿,恕不退稿。

2. 格式要求:请下载电子投稿表格填写。文稿顺序为文题、单位、邮编、作者姓名、摘要内容。

3. 凡已在全国性眼科学术会议上或在全国公开发行的刊物上发表过的论文,不予受理。

三、投稿方式

电子邮件投稿,请登录本次会议网站 <http://uveitis.cqmu.edu.cn> 下载投稿表格,填写完毕后以附件形式发送至 uveitis\_chongqing2009@yahoo. cn。

四、截稿日期

2009 年 6 月 15 日,过期恕不受理。

(重庆医科大学第一附属医院)