12 Noske W, Hensen J, Wiederholt M. Endothelin-like immunoreactivity in aqueous humor of patients with primary open-angle glaucoma and cataract [J]. Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol, 1997, 235: 551 - 552
13 Tezel G, Kass MA, Kolker AE, et al. Plasma and aqueous humor endothelin levels in primary open-angle glaucoma[J]. J Glaucoma, 1997, 6: 83 - 89
14 Chauhan BC, LeVatte TL, Jollimore CA, et al. Model of endothelin-1-induced chronic optic neuropathy in rat[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2004, 45: 144 - 152
15 John SW, Smith RS, Savinova OV, et al. Essential iris atrophy, pigment dispersion, and glaucoma in DBA/2J mice[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1998, 39: 951 - 962
16 Morrison JC, Johnson EC, Cepurna WO, et al. Microvasculature of the rat optic nerve head[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1999, 40: 1702 - 1709
17 Schlamp CL, Li Y, Dietz JA, et al. Progressive ganglion cell loss and optic nerve degeneration in DBA/2J mice is variable and asymmetric[J]. BMC Neurosci, 2006, 7: 66
18 Sugimoto E, Aihara M, Ota T, et al. Effect of light cycle on 24-hour pattern of mouse intraocular pressure[J]. J Glaucoma, 2006, 15: 505 - 511
19 Pang IH, Wang WH, Clark AF. Acute effects of glaucoma medications on rat intraocular pressure[J]. Exp Eye Res, 2005, 80: 207 - 214
20 Morrison JC, Johnson EC, Cepurna W, et al. Understanding mechanisms of pressure-induced optic nerve damage[J]. Prog Retin Eye Res, 2005, 24: 217 - 240
21 Morrison JC, Moore CG, Deppmeier LM, et al. A rat model of chronic pressure-induced optic nerve damage[J]. Exp Eye Res, 1997, 64: 85 - 96
22 Ueda J, Sawaguchi S, Hanyu T, et al. Experimental glaucoma model in the rat induced by laser trabecular photocoagulation after an intracameral injection of India ink[J]. Jpn J Ophthalmol, 1998, 42: 337 - 344
23 WoldeMussie E, Ruiz G, Wijino M, et al. Neuropmtection of retinal ganglion cells by brim onidine in rats with laser-induced chronic ocular hypertension[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2001, 42: 2849 - 2855
24 Levkovitch-Verbin H, Quigley HA, Martin KR, et al. Translimbal laser photocoagulation to the trabecular meshwork as a model of glaucoma in rats[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2002, 43: 402 - 410
25 Bfichi ER, Suivaizdis I, Fu J. Pressure-induced retinal ischemia in rats: an experim ental model for quantitative study [J]. Ophthalmologica, 1991, 203: 138 - 147
26 Adachi M, Takahashi K, Nishikawa M, et al. High intraocular pressure-induced ischemia and reperfusion injury in the optic nerve and retina in rats[J]. Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol, 1996, 234: 445 - 451
27 Grozdanic S, Betts DM, Allbaugh RA, et al. Characterization of the pupil light reflex, electroretinogram and tonometric parameters in healthy mouse eyes[J]. Curr Eye Res, 2003, 26: 371 - 378
28 Barnett NL, Grozdanic SD. Glutamate transporter localization does not correspond to the temporary functional recovery and late degeneration after acute ocular ischemia in rats[J]. Exp Eye Res, 2004, 79: 513 - 524
29 Shareef SR, Garcia-Valenzuela E, Saliemo A, et al. Chronic ocular hypertension following episcleral venous occlusion in rats[J]. Exp Eye Res, 1995, 61: 379 - 382
30 Ko ML, Hu DN, Ritch R, et al. The combined effect of brain-derived neurotrophic factor and a free radical scavenger in experimental glaucoma [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000, 41: 2967 - 2971
31 Mittag TW, Danias J, Pohorenec G, et al. Retinal damage after 3 to 4 months of elevated intraocular pressure in a rat glaucoma model[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000, 41: 3451 - 3459
32 Yu S, Tanabe T, Yoshimura N. A rat model of glaucoma induced by episcleral vein ligation[J]. Exp Eye Res, 2006, 83: 758 - 770
33 Benozzi J, Nahum LP, Campanelli JL, et al. Effect of hyaluronic acid on intraocular pressure in rats[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2002, 43: 2196 - 2200
34 Moreno MC, Marcos HJ, Oscar-Croxatto J, et al. A new experimental model of glaucoma in rats through intracameral injections of hyaluronic acid[J]. Exp Eye Res, 2005, 81: 71 - 80
35 Urcola JH, Hernandez M, Vecino E. Three experimental glaucoma models in rats: comparison of the effects of intraocular pressure elevation on retinal ganglion cell size and death[J]. Exp Eye Res, 2006, 83: 429 - 437
36 罗学港,刘浩忠. 生理盐水加压灌注眼前房引起大鼠急性高眼压[J]. 眼科研究, 1987, 5(4): 222

(收稿:2008-04-23　修回:2008-10-22)

(本文编辑:尹卫靖)

· 调查报告 ·

全基因组扫描高度近视一家系

王俊妨　林　婴　杨正林　张明华　翟宝进

高度近视是指屈光度 > -6.0 D 的屈光不正,又称恶性近视或病理性近视,伴有眼轴的延长和眼基质的改变,视力呈进行性下降,可伴有弱视、青光眼、白内障、玻璃体混浊、视网膜脱离等多种并发症,是致盲的主要原因之一[1]。高度近视有家族性并有明显的遗传倾向,虽在人群中患病率高,但是多由后天因素引起,加上高度近视具有遗传异质性,给高度近视的分子遗传学研究带来了一定困难[2]。高度近视具有种族特异性,本研究对中国原发性近视眼家系进行分子遗传学研究。

1　资料与方法

1.1　研究对象与标本采集　先症者,男,26 岁,双眼高度近视,并伴有眼底病变。其父亲及祖母均有相同疾病。该家系 5 代 9 人发病,我们纳入了患者及其一级亲属 11 人,采用 EDTA 二钾抗凝剂抗凝,抽取 10 mL 静脉血。酚-氯仿提取法提取外周血白细胞 DNA,-20 ℃保存。

1.2　主要试剂与仪器　PCR 扩增试剂(大连 Takara 公司);STR 引物、HD、500LIZ™ Size Standard(美国 ABI 公司);合成引物(成都朝晖生物技术有限公司);低温离心机(德国 Eppendorf);PCR 扩增仪(MJ 公司);ABI-3100 测序仪(美国 ABI

作者单位:300162 天津武警医学院附属医院检验科(王俊妨、张明华、翟宝进);610072 成都,四川省人民医院人类分子生物学与遗传研究中心(林婴、杨正林)

通讯作者:翟宝进(Email: wjyxyylk2008@yahoo.com)

公司);电泳仪(BIO-AD);凝胶成像仪(BIO-AD)。

1.3 全基因组扫描技术

1.3.1 实验步骤 针对已有的常染色体显性遗传原发性高度近视的遗传连锁位点进行筛查和排除,以确定家系的致病基因。选取位于已知位点物理位置较近的 STR 标记物,PCR 扩增其片段,采用 ABI-3100 遗传分析仪进行分析。筛选及全基因组扫描 DNA 模板采用家系 5 例患者及 3 例未患病成员的全基因组 DNA,所用引物为 22 条常染色体上的 382 个 STR 微卫星标记物。5 μL 反应体系:DNA 模板(25 ng/μL) 1.0 μL,10 × PCR 缓冲液 0.5 μL,Mg^{2+} (25 mmol/L) 0.4 μL,dNTPs (2.5 mmol/L)0.4 μL,5 U/μL Taq DNA 聚合酶 0.03 μL,STR 引物 0.4 μL,灭菌纯化水 2.27 μL。反应条件:95 ℃预变性 3 min,94 ℃变性 15 s,55 ℃退火 15 s,72 ℃延伸 30 s,10 个循环;89 ℃变性 15 s,55 ℃退火 15 s,72 ℃延伸 30 s,20 个循环;72 ℃延伸 10 min,4 ℃孵育。取 PCR 的扩增产物用 ABI-3100 遗传分析仪进行连锁分析。应用国际公认的遗传连锁分析方法,根据等位基因(单倍体)分型结果,采用两点法(FASTLINK version 4.1 P 软件中的 MLINK 和 ILINK 程序),分别计算 382 个 STR Markers 的 LOD 值,寻找可能的阳性位点。

2 结果

2.1 遗传模式 该家系为 4 代连续发病,男女均可患病,且机会均等(图 1)。根据孟德尔遗传规律,符合常染色体显性遗传规律。因患者的居住相对集中,居住环境基本相同,可以排除环境因素的影响,遗传因素为该家系致病的主要原因。

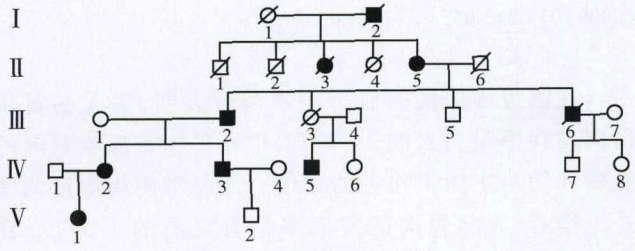

图 1 高度近视家系图谱

2.2 PCR 扩增产物的电泳结果见图 2。

图 2 部分 STR 标记物 PCR 扩增产物电泳图

2.3 阳性位点连锁分析 全基因组扫描及遗传连锁分析发现在 6 号染色体上有几个相邻近的标记物,其 θ = 0.0 时 LOD 值均 > 0,提示有连锁的可能性(表 1)。

表 1 6 号染色体阳性位点连锁分析结果

标记物	LOD 值				
	θ = 0.0	θ = 0.1	θ = 0.2	θ = 0.3	θ = 0.4
D6S1277	1.675 7	1.259 8	0.840 5	0.451 6	1.155 0
D6S1027	0.035 6	0.564 6	0.342 1	0.564 3	0.563 5
D6S2522	0.895 6	0.453 6	0.024 5	0.237 6	0.097 8

2.4 加了新的 STR 标记物,其连锁分析结果见表 2。

表 2 6 号染色体两点法的 LOD 值

标记物	LOD 值				
	θ = 0	θ = 0.1	θ = 0.2	θ = 0.3	θ = 0.4
D6S1277	1.675 7	1.259 8	0.840 5	0.451 6	1.155 0
D6S264	-13.840 8	-1.383 1	-0.447 2	-0.119 9	-0.023 8
D6S1027	0.035 6	0.564 6	0.342 1	0.564 3	0.563 5
D6S281	1.675 7	1.259 8	0.840 5	0.451 6	0.155 0
D6S446	-6.423 8	0.674 8	0.566 0	0.364 9	0.168 6
D6S2522	0.895 6	0.453 6	0.024 5	0.237 6	0.097 8

3 讨论

高度近视的分子遗传学研究是目前研究热点之一,迄今为止,还未发现有高度近视致病基因的报道,只是发现了高度近视的遗传连锁位点。

本研究采用 ABI PRISM ® Linkage Mapping Sets V2.5-MD10,采用标准方法对排除已知位点的高度近视家系进行全基因组扫描。共 382 个短串联重复(STR)多态性标记物,它们之间的平均距离为 10 cm,可以覆盖大部分染色体上的区域。本研究排除了其他已知的遗传连锁位点,说明该家系有新的遗传连锁位点及基因,但全基因组扫描并未发现新的遗传连锁位点,考虑其原因为:(1)382 个标记物在染色体上的位置有的间隔较远,覆盖的遗传信息不是很精细全面,所以并不是所有的家系都能经过全基因组扫描技术发现连锁位点,应结合单倍体分析来判断。(2)影响 LOD 值的因素有临床诊断标准、家系大小、患病个体的数目等,由于标记物遗传信息的不完全,家系成员发病与否还未确定,所以该家系未找到阳性位点,应再增加新的标记物进一步分析。(3)该家系较小,即使是完全连锁的其 LOD 值也不会很高,所以应扩大家系,并且有的患者后天影响因素较多,均会干扰结果的判定。

参考文献

1 Paluru P, Nallasamy S, Devoto M, et al. Identification of a novel locus on 2q for autosomal dominant high-grade myopia[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2005, 46: 2300 - 2307

2 李疆,张清炯. 高度近视的遗传研究进展[J]. 国际遗传学杂志, 2001, 24(2): 89 - 92

(收稿:2008 -08 -08 修回:2008 -11 -05)

(本文编辑:尹卫靖)