

# 先天性膜性白内障一家系致病基因的遗传分析

袁芳 李飞峰 刘伟 刘华 季健 马旭

## Mutation of 22q11.2 – q12.1 gene in a family with autosomal dominant congenital membranous cataract

Yuan Fang, Li Feifeng, Liu Wei, Liu Hua, Ji Jian, Ma Xu. Tianjin Medical University Eye Center, Tianjin 300070, China

**Abstract Objective** Autosomal dominant congenital cataract (ADCC) is a common heredit disease. Some known genes and mutated loci related to ADCC have been found. The present study provides other disease-causing genes in the ADCC family. This study was to identify the genetic defect in four generations of a Chinese family with autosomal dominant congenital membranous cataracts and demonstrate the functional analysis of a candidate gene in the family. **Methods** The family with hereditary cataract was recruited from the Tianjin Medical University Eye Center. The family history was collected and recorded. Clinical and ophthalmologic examinations were performed on 6 affected and 14 unaffected family members and periphery blood samples were collected from all of the subjects for genomic DNA preparation. The members were genotyped with microsatellite markers at loci associated with cataracts. Multiplex polymerase chain reaction (PCR) was carried out with microsatellite markers near to candidate loci related to congenital cataracts. PCR products from each DNA sample were separated on a polyacrylamide gel and analyzed. Exclusion analysis was performed by allele sharing analysis and gene sequencing. This trial was approved by the Human Research Ethics Committee of this hospital. The oral informed consent was obtained from all of the subjects before the initiation of this trial. **Results** The hereditary characteristic of this family was in accordance with the autosomal dominant inheritance with a gene penetrance 100%. Affected members of the family were diagnosed with membranous cataracts without other ocular symptom. The disease-causing gene locus were mapped to 22q11.2 – q12.1 at a size of about 2.4 Mbp. The multiple-sequence alignments of complete coding region and splice site of *CRYBB1*, *CRYBB2*, *CRYBB3*, *CRYBA4* were obtained but no mutation was found in this study. *CRYBB1*, *CRYBB2*, *CRYBB3*, *CRYBA4* were screened by directly sequencing. **Conclusion** All known ADCC loci have been excluded from the family. Further study should be carried out to screen other relevant genes or loci in patients with ADCC. The pathogenic gene in the family should be identified through extensive scanning of genes, and a new disease-causing gene may exist in this family.

**Key words** congenital cataract; autosomal dominant; membranous cataract; microsatellite markers

**摘要 目的** 分析一个先天性白内障家系的遗传规律,对其突变基因进行初步研究。 **方法** 选取一先天性膜性白内障家系,对家系成员进行临床检查并采集静脉血。标准饱和酚/氯仿抽提法提取 DNA,选取多态性微卫星遗传标记,合成引物,聚合酶链反应,聚丙烯酰胺凝胶电泳,基因分型,等位基因共享分析法对已知候选基因进行排除性定位。 **结果** 该家系为常染色体显性遗传性先天性白内障家系。其致病基因与 D22S315 联系紧密,重组发生在以 D22S303 和 D22S1167 为上下边界的范围内。对该范围内已知的先天性白内障致病基因 *CRYBB1*、*CRYBB2*、*CRYBB3*、*CRYBA4* 进行 DNA 直接测序,未发现突变。 **结论** 该家系致病基因定位于 22q11.2 ~ q12.1 的 2.4 Mbp 范围内,其致病基因与已知基因座不同。该范围内可能存在导致先天性膜性白内障的新的致病基因。

**关键词** 先天性白内障; 常染色体显性; 膜性白内障; 微卫星标记

**分类号** R 776.1 Q 812 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)12-1100-04

本课题为中国国家基础研究项目(2007CB511905)、中国遗传资源基础研究项目(08JCYBJC08600)、天津市应用基础及前沿技术研究计划(2006DKA21300)资助

作者单位:300070 天津医科大学眼科中心[(袁芳,硕士研究生,现在天津市第五中心医院眼科 300450)、刘伟、刘华、季健];100081 北京,国家人口计生委科学技术研究所(李飞峰、马旭)

通讯作者:季健 (Email:tjygzx@yahoo.com.cn)

先天性白内障是一种严重的致盲性晶状体疾病。其发病机制复杂,约 1/4 ~ 1/3 为家族性。孟德尔遗传法则中的 3 种遗传方式,即常染色体显性遗传、常染色体隐性遗传、性染色体连锁遗传,在先天性白内障家系研究中均有报道,以常染色体显性遗传先天性白内障(autosomal dominant congenital cataract, ADCC)最为多见<sup>[1-2]</sup>,目前已发现 39 个位点、17 个基因与先天性白内障相关<sup>[3]</sup>。本研究对一 ADCC 家系进行相关致病基因的等位基因共享与连锁分析,报道如下。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

于天津眼科中心就诊的一先天性膜性白内障家系共 4 代(20 例成员),其中患者 6 例(图 1)。对家系所有成员进行全面检查,美多丽滴眼液散瞳后经裂隙灯和检眼镜检查确定临床表型,对患者眼部图像进行数码采集和处理。经受检者知情同意,采集其中 16 例家系成员的外周静脉血 5 mL 进行 DNA 研究。

### 1.2 方法

**1.2.1 基因组 DNA 的提取** 采用标准饱和酚/氯仿抽提法提取白细胞基因组 DNA,于 -20 °C 保存备用。

**1.2.2 微卫星标记位点的选择** 选取在物理距离及遗传距离上与已知先天性白内障致病基因紧密连锁的 46 个微卫星分子标记。引物序列取自基因组数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。

**1.2.3 微卫星标记物的扩增** PCR 反应体系 50 μL: 基因组 DNA 150 ng; 10 × PCR buffer 5 μL; dNTP 混合物(2.5 μmol/L)0.5 μL; 上下游引物(均为 10 μmol/L)各 2 μL; Taq DNA 聚合酶(5 U/μL)0.5 μL; ddH<sub>2</sub>O 40 μL。反应采用 Touch-Down PCR 程序,共两相循环:95 °C 预变性 5 min,第 1 相循环 94 °C 30 s,起始退火温度 63 °C 45 s,以后每个循环下降 0.8 °C,72 °C 45 s,共 10 个循环;第 2 相循环 94 °C 30 s,55 °C 45 s,72 °C 45 s,共 25 个循环,最后 72 °C 延伸 10 min,4 °C 保存。

**1.2.4 微卫星基因型分析** 取 PCR 产物 3 μL,94 °C 变性 7 min 后,立即置于冰浴 5 min,在 6% 变性丙烯酰胺凝胶中电泳,常规固定、银染、显色后用于基因分型。

**1.2.5 等位基因共享与连锁分析** 分别假设最上一代患者的 2 个等位基因与疾病同线,计算在世代传递中发生互换的次数,凡与上代不符者计 1 次互换。在患者成员出现等位基因共享后,通过对整个家系进行基因分型,确定共享等位基因的来源。

**1.2.6 CRYBB1、CRYBB2、CRYBB3、CRYBA4 基因的突变筛查** 根据 CRYBB1、CRYBB2、CRYBB3、CRYBA4 基

因的序列设计 2 对引物。PCR 反应体系 30 μL: 基因组 DNA 150 ng; 10 × PCR buffer 2.5 μL; dNTP 混合物(2.5 μmol/L)0.5 μL; 上下游引物(均为 10 μmol/L)各 2 μL; Taq DNA 聚合酶(5 U/μL)0.4 μL; ddH<sub>2</sub>O 20 μL。PCR 反应条件:95 °C 预变性 5 min,95 °C 变性 30 s,退火 55 °C 30 s,72 °C 延伸 10 min,4 °C 保存,35 个循环。DNA 扩增产物的纯化及序列分析:PCR 扩增产物在 2% 琼脂糖凝胶上 120 V 恒压电泳 10 min。紫外透射仪下显示扩增成功后,PCR 原液纯化后测序,包括全部编码序列、启动子、外显子 5' 端和 3' 端与内含子连接部非编码区。

## 2 结果

### 2.1 家系特点

**2.1.1 遗传学特点** 家系谱调查和全面的眼科检查发现,该家系成员 20 例中有 6 例为患者,患者在家系谱中连续出现,男女患病机会相等,受累个体父亲或母亲中有 1 例为患者(图 1),符合常染色体显性遗传的特点,外显率为 100%。

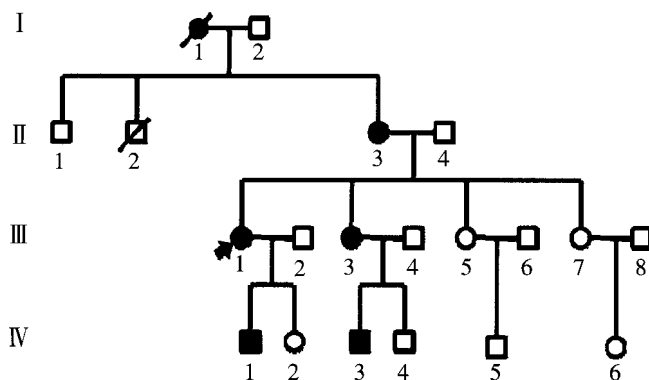


图 1 患者家系图 □正常男性 ○正常女性 ■患病男性 ●患病女性 先证者 ●死亡  
Fig. 1 Pedigree of the family □male ○female solid mark: affected individual ▣ proband ● death

**2.1.2 临床特点** 采集血样的 16 例中,患者 5 例,其中男 2 例,女 3 例。家系成员视力 0.2 ~ 0.8。晶状体混浊特点为双眼发病,生后即有,部分患者双眼混浊程度并不一致,不同患者间的混浊程度及形态也不完全相同,但大多表现为膜性混浊(图 2);先证者(III 1)晶状体阙如,右眼可见一层纤维化的晶状体膜,左眼在瞳孔散大时可见周边少量剩余皮层。所有患者不伴有其他眼前节异常或眼底改变,无系统性疾病。

### 2.2 等位基因共享分析结果

所选 46 个微卫星标记在该家系成员中等位基因数目均为 2 ~ 6 个,表明其在该家系中均具有较好的杂

合度。D22S315(图3)与先天性膜性白内障临床症状共分离。在 D22S303(图4)、D22S1167(图5)处等位基因发生交换(图6),将致病基因定位于 22q11.2~q12.1 的 2.4 Mbp 的范围内(图7)。

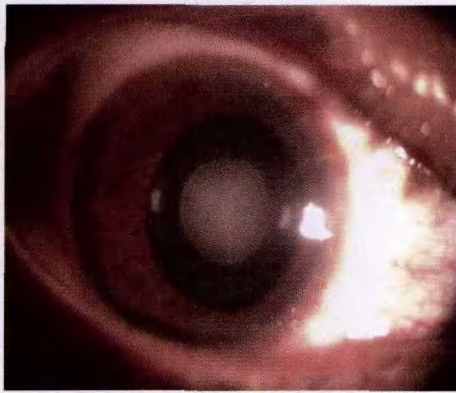


图2 先证者(Ⅲ1)先天性膜性白内障  
Fig.2 Slit lamp photograph illustrate membranous cataract of individual Ⅲ1



图3 家系成员以 D22S315 为引物 DNA 扩增产物聚丙烯酰胺凝胶电泳图

Fig.3 PCR products from each DNA sample were separated on a polyacrylamide gel by D22S315 microsatellite markers



图4 家系成员以 D22S303 为引物 DNA 扩增产物聚丙烯酰胺凝胶电泳图

Fig.4 PCR products from each DNA sample were separated on a polyacrylamide gel by D22S303 microsatellite markers

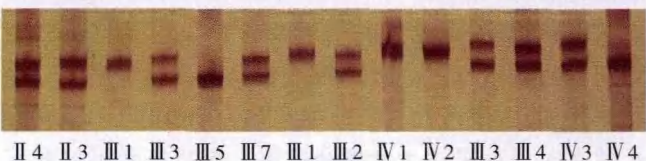


图5 家系成员以 D22S1167 为引物 DNA 扩增产物聚丙烯酰胺凝胶电泳图

Fig.5 PCR products from each DNA sample were separated on a polyacrylamide gel by D22S1167 microsatellite markers

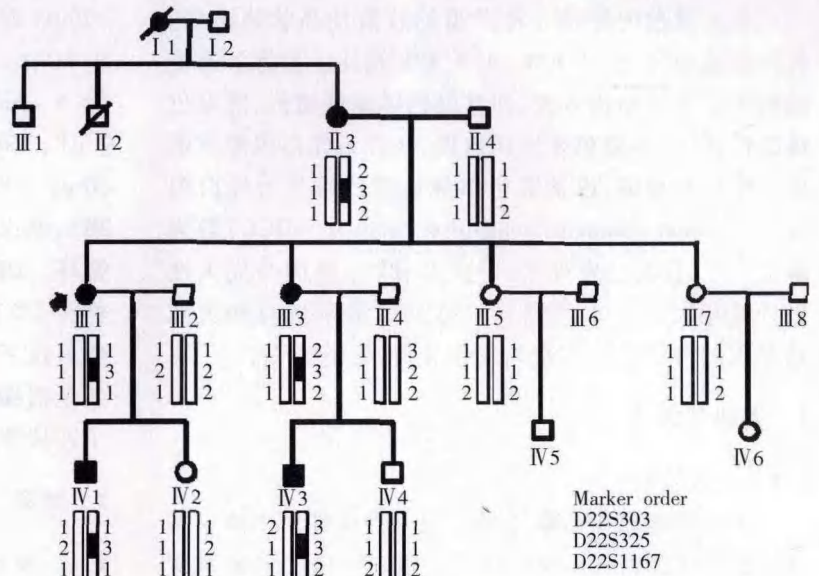


图6 单倍型图 重组发生在以 D22S303 和 D22S1167 为上下边界的范围内

Fig.6 Pedigree of a family showing segregation of three microsatellite markers from D22S303 to D22S1167

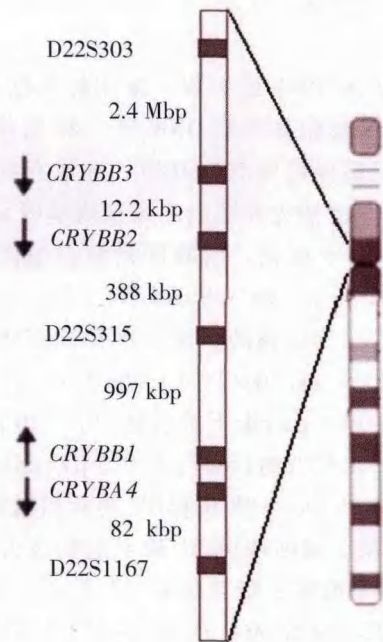


图7 22号染色体微卫星标记顺序、距离及β晶状体蛋白基因群,箭头表示基因转录方向

Fig.7 Integrated genetic and physical order of microsatellite marker across the β-crystallin gene cluster in the chromosomal regions 22q 11.2 - q12.1. Arrows indicate the direction of transcription

### 2.3 基因测序结果

对22q11.2~q12.1的2.4 Mbp范围内已知的先天性白内障致病基因 *CRYBB1*、*CRYBB2*、*CRYBB3*、*CRYBA4* 进行测序,结果与基因突变数据库([www.hgmd.cf.ac.uk](http://www.hgmd.cf.ac.uk))中公布的正常基因序列进行比对。该家系患者 *CRYBB1*、*CRYBB2*、*CRYBB3*、*CRYBA4* 基因全

部编码区及启动子、外显子与内含子拼接处序列均与基因突变数据库提供的序列相同,该家系 *CRYBB1*、*CRYBB2*、*CRYBB3*、*CRYBA4* 基因无突变。提示在 22q11.2 ~ q12.1 的 2.4 Mbp 范围内可能存在新的可导致膜性先天性白内障的致病基因。

### 3 讨论

#### 3.1 临床表现型

先天性白内障是造成儿童失明和视力损害的重要原因,占儿童失明原因的第二位,发病率约为 1/10 000 ~ 6/10 000,其中约 1/3 为家系遗传<sup>[4-5]</sup>。先天性遗传性白内障具有很强的临床异质性和遗传异质性<sup>[6-7]</sup>。先天性白内障依据其混浊部位和裂隙灯下的形态可分为前极性白内障、后极性白内障、核性白内障、板层白内障、Marner 白内障、板层粉尘状白内障、Coppock 样白内障、皮质白内障、全白内障、粉尘状白内障、蓝点状白内障、缝性白内障、针刺状白内障、Volkman 白内障以及多形性白内障<sup>[8-9]</sup>。膜性白内障在临床上较少见,单眼或双眼发病,视力损害严重<sup>[10]</sup>。有人认为它是全白内障的一种,也有人认为它是一个独立的表型,是先天性全白内障的晶状体纤维在宫内发生退行性变时其皮质逐渐吸收而形成的。临床表现为灰白色的硬膜,可有多少不等带色彩的斑点,表面不规则,有时在膜的表面可看到睫状突和血管,后者可能来自胚胎血管膜。当皮质肿胀或玻璃体动脉牵拉后囊膜,可引起后囊膜破裂,加速皮质的吸收,即表现为先天性无晶状体。亦可有纤维组织伸到膜的表面,故又称为血管膜性白内障或纤维性白内障。

#### 3.2 先天性膜性白内障的致病基因

先天性膜性白内障临床较为少见,其致病基因也少有报道。Butt 等<sup>[11]</sup>报道了 1 个近亲结婚的常染色体隐性遗传先天性膜性白内障伴角膜混浊、小角膜、眼球震颤的巴基斯坦家系,并将其致病基因定位在 1 p34.3 ~ p32.2 的 20.80 Mbp 范围内,由于该家系临床表现复杂多样,表现出源于眼部其他组织先天异常最终导致晶状体出现白内障的可能。

#### 3.3 遗传性白内障的基因定位策略

目前,常用的方法是先将致病基因进行初步定位,再对该区域内的候选基因进行致病基因突变的筛选。具体操作:首先选择覆盖面积大、相互距离远的分子标记进行致病基因的粗略定位。然后利用覆盖面积小、相互距离近分子标记进行进一步的连锁分析,将致病基因定位在较小的区域,再对照物理图谱,对该区域

所有已知基因和功能基因进行克隆<sup>[12]</sup>。包括家系连锁分析、等位基因共享分析及人群相关性分析等。

定位候选基因克隆最核心的内容是建立遗传分子标记与致病基因间的联系。本研究通过 46 个微卫星标记在该家系的定位克隆,找到了与临床表型共分离的基因片段,进一步验证了该方法在先天性白内障致病基因定位中的应用价值。本研究应用等位基因共享及连锁分析的方法将致病基因定位于 22q11.2 ~ q12.1 的 2.4 Mbp 的范围内,为寻找该家系致病基因缩小了范围,为寻找白内障新的致病基因提供了重要线索。本研究肯定了人类白内障的发生是个非常复杂的过程,其中任何一个重要基因的突变都能够导致白内障的发生,进一步提示白内障是遗传异质性和临床异质性很强的疾病。对于该家系的进一步研究,可通过全基因组扫描获取该家系致病基因的候选区域,并根据功能和位置候选的原则,对该区域进行致病基因的突变筛查。

### 参考文献

- 1 布娟,李宁东,杨永佳,等.常染色体显性遗传白内障一家系基因排除定位研究[J].眼科研究,2007,25(2):135-137
- 2 Devi RR, Vijayalakshmi P. Novel mutations in GJA8 associated with autosomal dominant congenital cataract and microcornea[J]. Mol Vision, 2006, 12: 190-195
- 3 Hejtmancik JF. Congenital cataracts and their molecular genetics[J]. Semin Cell Dev Biol, 2008, 19(2): 134-149
- 4 Lambert SL, Drack AV. Infantile cataracts[J]. Surv Ophthalmol, 1996, 40: 427-458
- 5 Reddy M, Francis PJ, Berry V. Molecular genetic basis of inherited cataract and associated phenotypes[J]. Surv Ophthalmol, 2004, 49: 300-315
- 6 Mihelec M, St Heaps L, Flaherty M, et al. Chromosomal rearrangements and novel genes in disorders of eye development, cataract and glaucoma[J]. Twin Res Hum Genet, 2008, 11(4): 412-421
- 7 Lorenz B. Genetic examination in cases of congenital cataract[J]. Ophthalmologie, 2007, 104(7): 559-565
- 8 West S. Epidemiology of cataract; accomplishments over 25 years and future directions[J]. Ophthalmic Epidemiol, 2007, 14(4): 173-178
- 9 Amaya L, Taylor D, Russell-Eggitt I. The morphology and natural history of childhood cataracts[J]. Surv Ophthalmol, 2003, 48: 125-144
- 10 Song ZM, Fu XY, Xue AQ. Binocular membranous cataract associated with binocular retinal detachment[J]. Clin Exp Ophthalmol, 2007, 35(4): 387-389
- 11 Butt T, Yao WL, Kaul H, et al. Localization of autosomal recessive congenital cataracts in consanguineous Pakistani families to a new locus on chromosome 1p[J]. Mol Vision, 2007, 13: 1635-1640
- 12 Bu L, Jin Y, Shi Y, et al. Mutant DNA-binding domain of HSF4 is associated with autosomal dominant lamellar and Marner cataract[J]. Nat Genet, 2002, 31(3): 276-278

(收稿:2009-07-15 修回:2009-10-21)

(本文编辑:尹卫靖)