# 一个先天性小眼球家系致病基因的排除性定位

殷亚男[①②*] 李 慧[②③*] 俞 萍[④] 周 强[⑤] 赵鲁杭[①†] 张亚平[②†]

(① 浙江大学医学院生物化学与分子生物学教研室, 杭州 310006; ② 中国科学院昆明动物研究所细胞与分子进化重点实验室, 昆明 650223; ③ 中国科学院研究生院, 北京 100049; ④ 浙江大学医学院医学遗传学教研室, 杭州 310006; ⑤ 浙江富阳中医骨伤科医院, 富阳 311400. * 同等贡献. † 联系人, E-mail: zhaoluhang@263.net, zhangyp1@263.net.cn)

摘要 先天性小眼球是一种先天发育异常性眼科疾病. 通过基因扫描和连锁分析对一个 6 代常染色体显性遗传先天性小眼球中国家系的疾病相关基因进行研究. 根据已报道的与小眼球相关的 5 个基因座位(*MITF*, *SOX2*, *PAX6*, *MCOP* 和 *NNO2*), 在 3, 11, 14 和 15 号染色体上选取了 14 个微卫星标记, 以荧光标记引物的聚合酶链反应(PCR)扩增目的片段, 用 ABI 377 DNA 遗传分析仪对该家系成员进行基因扫描和基因分型, 并采用 Linkage 软件包对基因分型结果进行连锁分析. 结果显示, 该家系致病基因与这些已报道的座位均不连锁, 即该家系致病基因不是已报道的座位, 可能是一个尚未报道的对眼球发育至关重要的新基因座位.

关键词 先天性小眼球 基因定位 微卫星标记 连锁分析

先天性小眼球(congenital microphthalmia, CMIC)是一种先天发育异常性眼科疾病, 主要表现为眼球体积小, 约为正常人的 2/3, 眼球前后径小于正常范围(< 20 mm), 睑裂窄, 眼眶小, 眼球深陷于眼眶内. 患者视力通常较差, 由于眼球前后径小, 成像时焦点落在视网膜后, 会造成远视屈光不正; 如果儿童时期没有及时矫正视力, 就会发展成不可逆转的弱视. 患者还常伴有闭角型青光眼, 这是由于小梁网发育异常致使房水回流受阻、眼内压升高造成的. 在临床上, 先天性小眼球有多种表现类型: (ⅰ) 仅表现为眼球体积小, 不伴有其他异常者称为单纯性小眼球[1], 较少见; (ⅱ) 多数先天性小眼球伴有眼部其他畸形, 如前节发育不全、先天性白内障、脉络膜视网膜缺损、视网膜发育不良和视神经缺损等[2]; (ⅲ) 最严重的类型是先天性无眼球. 国内一项调查资料显示, 先天性小眼球在国内的患病率为 0.009% (1∶1077)[3]. 该病散发病例居多, 也有家族遗传的家系报道, 遗传方式有常染色体显性遗传(autosomal dominant, AD)、常染色体隐性遗传(autosomal recessive, AR)和X连锁隐性遗传(X-linked recessive, XR).

先天性小眼球的发病机制还不太清楚, 目前认为眼球发育相关基因发生突变与小眼球的形成有关[4,5]. 研究发现, *mitf*基因和*pax6* 基因突变都可以导致小鼠出现小眼球表型, 它们在人类中的同源基因分别是位于 3p14.1-q12.3 的*MITF*基因和位于 11p13 的 *PAX6* 基因, 而目前已有*MITF*基因突变导致 2 型 Waardenburg综合征、*PAX6* 基因突变导致人类无虹膜表型的报道[6,7]. 另外, 多个研究小组发现, 位于 3q26.3-q27 的*SOX2* 基因的不同突变可以导致人类出现小眼球表型[8~10]. 国外研究已将不同的先天性小眼球家系的致病基因定位于不同的染色体区域内: Othman等人[11]对一个常染色体显性遗传的小眼球大家系(小眼球伴高度远视和闭角型青光眼)进行基因连锁分析, 发现该家系致病基因与微卫星标记 D11S905, D11S903, D11S1313, D11S4191 和D11S987 连锁, 在D11S903 处得到最大LOD值为 5.92, 从而初步将该家系致病基因*NNO1* (*Nanophthalmos1*, OMIM #600165)定位在 11p13 上 14.7 cM的范围内; Bessant 等人[12]对一个 5 代常染色体隐性遗传的巴基斯坦小眼球家系进行全基因组扫描连锁分析, 发现该家系致病基因与微卫星标记D14S987, D14S65 和D14S267 连锁, 在D14S65 处重组率为 0 时得到最大LOD值为 3.55, 从而将该家系的致病基因 *MCOP* (*Microphthalmos*, OMIM＃251600)定位于染色体 14q32 上 7.3 cM的范围内; Morle等人[13]对一个常染色体显性遗传(性状不完全外显)的 5 代西班牙裔犹太人小眼球家系进行连锁分析, 发现该家系致病基因与 D15S1002 和D15S1040 之间的 10 个微卫星标记连锁, 在D15S1007 处重组率为 0 时得到最大LOD值为 3.77, 初步将该家系致病基因*NNO2* (*Nanophthalmos2*, OMIM #605738)定位于染色体 15q12-q15 上约 13.8 cM的范围内, 单倍型分析进一步将该区域缩小到D15S1002

和D15S1048 之间 4.5 cM以及D15S1043 和D15S1040 之间 7.1 cM的 2 个较小范围内. 为了探讨中国的小眼球家系是否也与目前已报道的小眼球家系致病基因座位相关, 我们研究了一个浙江省 6 代常染色体显性遗传单纯性小眼球家系. 该家系是中国第一个被研究分析和报道的小眼球家系.

## 1 对象与方法

(ⅰ) 家系. 研究对象是一个来自浙江省的 6 代遗传的单纯性小眼球家系(图 1), 该家系符合常染色体显性遗传的特点: 致病基因在常染色体有垂直性的连续传代史, 与性别无关; 父母之一有病时, 子代约 50%发病; 父母正常时, 子女不发病; 两性发病率相等. 作为连锁分析的理想家系要求迁移较小、相对封闭的人群; 家系的数目及家系的大小要达到一定要求; 对家系要有明确的遗传相关数据, 如遗传方式、遗传度、外显率等 [14]. 我们研究的这个家系达到了以上要求.

对患者进行眼科检查发现, 双侧眼球明显缩小, 眼球下陷于眼窝内; 睑裂较小, 眼睑轻度下垂; 前房浅, 角膜略小, 瞳孔无异常; 无其他明显异常. 先证者Ⅳ8 是同母异父近亲婚配, 表现为双侧小眼球, 眼轴长 19.9 mm; 眼睑窄小, 轻度下垂; 角膜略小, 水平径 9.7 mm; 垂直径 9.4 mm; 前房浅, 裂隙灯检查未见眼底畸变; 外周血淋巴细胞培养未见染色体异常, 核型为 46, XX. 先证者夫妻三儿一女早夭 [15].

(ⅱ) 基因组 DNA 的提取. 在取得知情同意后, 采集该家系成员的外周静脉血 5 mL, 按常规方法抽提血液基因组 DNA, –20℃保存.

(ⅲ) PCR 扩增微卫星多态标记. 根据文献报道的 5 个先天性小眼球候选位点在染色体上的位置, 选取位于 3, 11, 14 和 15 号染色体上的共 14 个微卫星多态标记(表 1). 微卫星多态标记的引物用 6-FAM (蓝色)荧光染料标记, 由上海生工生物工程公司合成. 利用 UNO-Thermoblock PCR 仪(Biometra, 德国)进行扩增. PCR 反应体系为: 25 μL, 包括模板 DNA 10 ng, 10×PCR 缓冲液 2.5 μL, dNTP 终浓度为 200 μmol/L, 引物浓度为 0.4 μmol/L, $Mg^{2+}$浓度为 1.5 mmol/L, Taq DNA 聚合酶 1 U, BSA 0.1 mg/mL. PCR 反应条件: 94℃预变性 3 min; 94℃变性 30 s, 53~59℃退火 30 s, 72℃延伸 30 s, 共 35 个循环; 72℃延伸 5 min.

(ⅳ) 基因扫描与基因分型. 用甲酰胺、葡聚糖和分子量内标(GeneScan™-350 ROX™)以 8∶4∶3 的比例配制上样液, PCR 扩增产物 1.5 μL 与上样液 2 μL 混合, 95℃保温 4 min 变性后迅速置于冰上, 然后在 ABI Prism 377 遗传分析仪上将 PCR 产物进行 5%聚丙烯酰胺凝胶电泳约 2 h. 通过 GeneScan 3.1 和 Genotyper 2.0 软件收集和分析数据, 将电泳条带转换成相应的扫描吸收峰, 再根据分子量内标进行片段长度校正, 确定扩增片段的大小, 并记录每个微卫星多态标记在家系中的基因型分布. 将获得的基因分型数据进行家系对照, 对不符合孟德尔遗传规律的

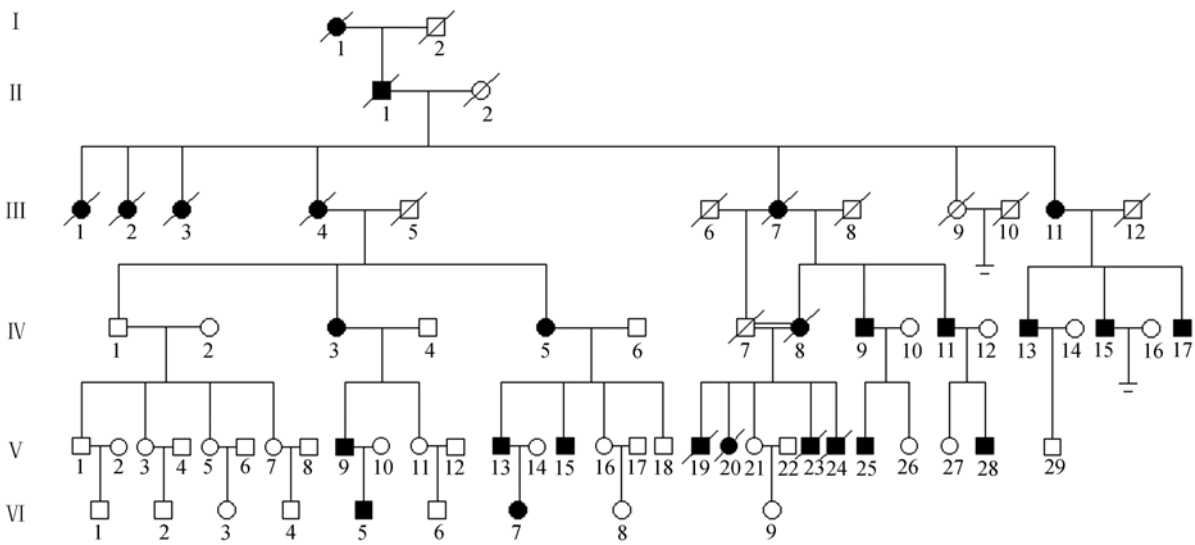



图 1 先天性小眼球家系系谱图

表 1 候选位点及用于连锁分析的微卫星多态标记的引物序列

| 候选位点 | 位置 | 选用标记 | 片段大小/bp |
|---|---|---|---|
| *MITF* | 3p14.1-p12.3 | D3S1300 | 217~241 |
| | | D3S1239 | 187~193 |
| | | D3S3566 | 218~234 |
| | | D3S3698 | 270~278 |
| | | D3S1285 | 232~242 |
| | | D3S3524 | 225~269 |
| | | D3S3551 | 242~264 |
| *SOX2* | 3q26.3-q27 | D3S2314 | 210~222 |
| *PAX6* | 11p13 | D11S904 | 185~201 |
| | | D11S1324 | 110~128 |
| | | D11S914 | 274~285 |
| | | D11S1751 | 248~310 |
| *MCOP* | 14q32 | D14S987 | 308~320 |
| *NNO2* | 15q12-q15 | D15S1007 | 165~189 |

基因型重新校对胶图或者重新分型.

(ⅴ) 连锁分析. 用 Linkage5.2 软件包中的 Mlink 程序对基因分型结果进行连锁分析, 设定遗传方式为常染色体显性遗传, 疾病基因频率为 0.0001, 外显率为 100%, 男女两性重组率相等, 根据优势对数法计算 LOD 值, 判断连锁关系是否成立.

## 2 结果与讨论

连锁分析是根据基因的连锁关系来确定基因相对位置的方法, 是目前进行基因定位的重要手段. 优势对数法(LOD 法)是最为常用的连锁分析方法, 是在获得两个位点系谱资料的基础上, 将假设这两个位点以某一重组率连锁时获得这份资料的几率与假设这两个位点不连锁时获得这份资料的几率相比较, 得到支持或反对连锁的优势(odds). LOD值即指该优势值的对数(log of odds). LOD值≥1 支持连锁, LOD值≥3 肯定连锁, LOD值≤–2 否定连锁. 本研究中的家系, 两点连锁分析显示各个微卫星多态标记位点在重组率为 0 时LOD值均<–2(表 2), 可否定连锁关系, 在其他重组率时LOD值也都<1, 不支持连锁, 表明该家系致病基因与所检测的 14 个微卫星多态标记均不连锁. 连锁分析结果表明, 该家系的致病基因不在已知座位*MITF*, *SOX2*, *PAX6*, *MCOP*和*NNO2* 内. 另外, 2004 年俞萍等人 [16]曾对该家系进行过初步的连锁分析, 排除了此家系致病基因在已知座位 *CHX10*, *MITF*, *RX*, *MCOP*, *NNO1*, *NNO2* 上的可能. 综合这两项工作可知, 该常色体显性遗传小眼球家系的致病基因不在目前报道的已知座位*SOX2*, *PAX6*, *CHX10*, *MITF*, *RX*, *MCOP*, *NNO1*, *NNO2* 内; 应该是一个新的突变位点导致了本研究家系的小眼球性状.

先天性小眼球是一种遗传异质性疾病, 发病原因比较复杂. 眼球先天畸形发生的一个重要时期是胚胎早期(指胚眼形成前后), 在胚胎第 4 周, 前脑两侧突出左右两个视泡, 但如果原始视泡发生后受到环境因素或者遗传因素的影响, 导致眼球发育停滞, 就会成为小眼球. 环境因素包括妊娠期间营养障碍, 使得胚胎早期缺乏某种维生素或氨基酸, 影响了组织器官的发育而导致小眼畸形; 母体妊娠期间的物理化学刺激, 如X线照射、病毒感染(如风疹病毒、巨细胞病毒)、服药史等也可能导致眼球发育异常 [2]. 遗传因素主要是指与眼球发育相关的基因发生突变或者相关的区域发生染色体缺失、易位. 综合国内外

表 2 小眼球与微卫星标记两点连锁分析的 LOD 值

| 微卫星标记 | 重组率 | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0 | 0.01 | 0.05 | 0.10 | 0.20 | 0.30 | 0.40 |
| D3S1300 | −∞ | 0.082 | 0.646 | 0.776 | 0.726 | 0.537 | 0.293 |
| D3S1239 | −∞ | −1.166 | −0.504 | −0.253 | −0.064 | −0.009 | −0.003 |
| D3S3566 | −∞ | −0.763 | −0.145 | 0.057 | 0.168 | 0.162 | 0.111 |
| D3S3698 | −∞ | −0.224 | 0.356 | 0.506 | 0.502 | 0.375 | 0.216 |
| D3S1285 | −∞ | −2.717 | −1.392 | −0.879 | −0.441 | −0.231 | −0.110 |
| D3S3524 | −∞ | −2.461 | −1.143 | −0.642 | −0.248 | −0.108 | −0.060 |
| D3S3551 | −∞ | −4.406 | −2.360 | −1.519 | −0.747 | −0.359 | −0.151 |
| D3S2314 | −∞ | −2.570 | −1.255 | −0.754 | −0.353 | −0.185 | −0.096 |
| D11S904 | −∞ | −2.831 | −1.458 | −0.898 | −0.406 | −0.182 | −0.074 |
| D11S1324 | −∞ | −4.470 | −2.389 | −1.517 | −0.713 | −0.318 | −0.118 |
| D11S914 | −3.774 | −1.658 | −0.926 | −0.612 | −0.321 | −0.160 | −0.063 |
| D11S1751 | −∞ | −3.147 | −1.200 | −0.487 | 0.020 | 0.137 | 0.104 |
| D14S987 | −∞ | −4.196 | −2.119 | −1.263 | −0.503 | −0.167 | −0.032 |
| D15S1007 | −∞ | −5.497 | −2.815 | −1.739 | −0.763 | −0.286 | −0.068 |

的研究进展，先天性小眼球多为单侧发病，同侧眼球常伴发眼部其他畸形；也可一侧为小眼球，另一侧为其他眼部畸形，如先天性囊状眼球、瞳孔移位等. 而过去的研究表明，不同小眼球家系的致病基因位于不同的染色体区域 [11~13]，提示小眼球疾病的致病因非常复杂，可能涉及到多个基因. 同时，即使在同一个家系中，受累个体也会表现为严重程度不同的小眼球，甚至表现为无眼球，因而提示环境因素对该疾病的外显率也有一定的影响 [2,13]. 综上所述，遗传因素和环境因素及其共同作用都可能是小眼球的致病因，这可能是导致本研究在中国先天性小眼球家系中未能找到相关致病基因座位的主要原因. 下一步工作拟对该小眼球家系进行全基因组扫描，在所有常染色体的范围内，采用中等密度的微卫星标记(约 400 个，每个标记之间相距 10 cM)进行基因扫描和连锁分析，期望能定位及克隆这一小眼球家系的致病基因.

致谢 感谢孔庆鹏博士在手稿的准备和修改方面给予的帮助. 本工作为国家自然科学基金(批准号: 30021004)和云南省科技厅资助项目.

## 参 考 文 献

1 Weiss A H, Kousseff B G, Ross E A, et al. Simple microphthalmos. Arch Ophthalmol, 1989, 107: 1625—1630
2 Warburg M. Classification of microphthalmos and coloboma. J Med Genet, 1993, 30: 664—669
3 HU D N. Prevalence and mode of inheritance of major genetic eye diseases in China. J Med Genet, 1987, 24: 584—588
4 Freund C, Horsford D J, Mcinnes R R. Transcription factor genes and the developing eye: A genetic perspective. Hum Mol Genet, 1996, 5: 1471—1488
5 Graw J. Genetic aspects of embryonic eye development in vertebrates. Dev Genet, 1996, 18: 181—197 [DOI]
6 Tassabehji M, Newton V E, Read A P. Waardenburg syndrome type 2 caused by mutation in the human micmphthalmia (MITF) gene. Nat Genet, 1994, 8: 251—255 [DOI]
7 Hanson I M. PAX6 and congenital eye malformations. Pediatr Res, 2003, 54: 791—796 [DOI]
8 Fantes J, Ragge N K, Lynch S A, et al. Mutations in SOX2 cause anophthalmia. Na Genet, 2003, 33: 461—462 [DOI]
9 Ragge N K, Lorenz B, Schneider A, et al. SOX2 anophthalmia syndrome. Am J Med Genet, 2005, 135A: 1—7 [DOI]
10 Hagstrom S A, Pauer G, Reid J, et al. SOX2 mutation causes anophthalmia, hearing loss, and brain anomalies. Am J Med Genet, 2005, 138A: 95—98 [DOI]
11 Othman M I, Sullivan S A, Skuta G L, et al. Autosomal dominant nanophthalmos (NNO1) with high hyperopia and angle-closure glaucoma maps to chromosome 11. Am J Hum Genet, 1998, 63: 1411—1418 [DOI]
12 Bessant D A, Khaliq S, Hameed A, et al. A locus for autosomal recessive congenital microphthalmia maps to chromosome 14q32. Am J Hum Genet, 1998, 62: 1113—1116 [DOI]
13 Morle L, Bozon M, Zech J C, et al. A locus for autosomal dominant colobomatous microphthalmia maps to chromosome 15q12-q15. Am J Hum Genet, 2000, 67: 1592—1597 [DOI]
14 刘万清，贺林. 自动化大规模基因组扫描与连锁分析——遗传病相关基因定位的策略. 生命科学, 1998, 10: 233—235
15 周永明，章冬琴，毛昭娣，等. 先天性小眼球一家系 25 例报告. 遗传与疾病, 1988, 5: 57—58
16 俞萍，周强，郭磊，等. 常染色体显性遗传小眼球病与 12 个微卫星多态标志的初步连锁分析. 实验生物学报, 2004, 37: 85—90

(2006-06-17 收稿, 2006-09-06 接受)