

# 视网膜色素变性患者视锥杆细胞同源盒基因突变的研究

马润清<sup>1</sup>, 闫光辉<sup>1</sup>, 李自立<sup>2</sup>, 马莉<sup>1</sup>, 容维宁<sup>3</sup>, 李慧平<sup>3</sup>, 刘雅妮<sup>3</sup>, 盛迅伦<sup>3</sup>

基金项目: 中国宁夏回族自治区科技攻关基金资助项目 (No. NKJ2009-232)

作者单位: <sup>1</sup>(750004) 中国宁夏回族自治区银川市, 宁夏医科大学研究生学院; <sup>2</sup>(750004) 中国宁夏回族自治区银川市, 宁夏医科大学附属医院眼科; <sup>3</sup>(750004) 中国宁夏回族自治区银川市, 宁夏回族自治区人民医院宁夏眼科医院

作者简介: 马润清, 宁夏医科大学在读硕士研究生, 研究方向: 眼底病。

通讯作者: 盛迅伦, 硕士, 主任医师, 研究方向: 眼底病. shengxunlun@163. com

收稿日期: 2011-07-14 修回日期: 2011-10-12

## Mutations analysis of CRX gene in 100 Chinese patients with retinitis pigmentosa

Run-Qing Ma<sup>1</sup>, Guang-Hui Yan<sup>1</sup>, Zi-Li Li<sup>2</sup>, Li Ma<sup>1</sup>, Wei-Ning Rong<sup>3</sup>, Hui-Ping Li<sup>3</sup>, Ya-Ni Liu<sup>3</sup>, Xun-Lun Sheng<sup>3</sup>

**Foundation item:** Ningxia Hui Autonomous Region Scientific and Technological Project, China (No. NKJ2009-232)

<sup>1</sup>Postgraduate Education College, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous Region, China; <sup>2</sup>Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous Region, China; <sup>3</sup>Ningxia Eye Hospital, People's Hospital of Ningxia Hui Autonomous Region, Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous Region, China

**Correspondence to:** Xun-Lun Sheng. Ningxia Eye Hospital, People's Hospital of Ningxia Hui Autonomous Region, Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous Region, China. shengxunlun@163. com

Received: 2011-07-14 Accepted: 2011-10-12

## Abstract

• **AIM:** To identify the mutations of cone-rod homeobox gene (CRX) in the patients with retinitis pigmentosa (RP) in Ningxia and to evaluate their potential interaction in the pathogenesis of RP.

• **METHODS:** One hundred individuals with RP were recruited for this study from October 2009 to November 2010. Polymerase chain reaction (PCR) and direct DNA sequencing were used to screen in the entire coding region and splice sites of CRX gene. Multiple analysis was used to examine the role of CRX gene mutation on RP.

• **RESULTS:** In total 5 sequence variants gene were identified, 2 synonymous variants (p. Leu78Leu and p. Ala92Ala), 3 missense variants (p. Ala112Val, p. Gly122Asp

and p. Thr187Ile). p. Ala112Val, p. Gly122Asp were reported as Single Nucleotide Polymorphisms (SNP) and showed no positive correlation with the RP confirmed by the multivariate logistic regression. The p. Thr187Ile variant was found in two ARRP (autosomal recessive RP) patients and was absent in normal control individuals.

• **CONCLUSION:** The prevalence of CRX mutation in Ningxia population (<1%) is lower than other populations. p. Thr187Ile was not a disease-causing mutation, but further study should be conducted to determine whether the p. Thr187Ile variant can effect the express of other gene and increase the risk of developing ARRP.

• **KEYWORDS:** autosomal dominant retinitis pigmentosa; CRX gene; genic mutation

Ma RQ, Yan GH, Li ZL, *et al.* Mutations analysis of CRX gene in 100 Chinese patients with retinitis pigmentosa. *Gujji Yanke Zazhi* (Int J Ophthalmol) 2011;11(11):1921-1924

## 摘要

**目的:** 研究视锥杆细胞同源盒基因 (CRX) 在宁夏地区视网膜色素变性 (retinitis pigmentosa, RP) 患者中的突变频率及特征, 并进一步探讨其在 RP 发病机制中潜在的机制。

**方法:** 运用聚合酶链反应 (PCR) 和直接测序方法, 对 100 例 RP 患者 (包括 18 例 ADRP 患者, 15 例 ARRP 患者, 67 例 SRP 患者) 进行了 CRX 基因全编码区序列突变的检测, 运用多因素分析研究 CRX 基因突变位点对 RP 的作用。

**结果:** 在 100 例 RP 患者 CRX 基因上共检测出 5 个变异位点, 其中 p. Leu78 Leu, p. Ala92Ala 和 p. Thr187Ile 为新发现的突变。其余位点突变均证实为 CRX 基因的多态性。p. Thr187Ile 突变位点仅在 2 例 ARRP 患者身上检出, 在正常对照组未发现该位点突变。

**结论:** 宁夏地区 RP 患者中, CRX 基因的突变率低于其他人群中 (小于 1%)。p. Thr187Ile 不是 RP 的致病性突变, 但它是否可能通过影响其它基因的表达, 增加常染色体显性遗传视网膜色素变性 (ARRP) 的发生, 有待于进一步研究。

**关键词:** 常染色体显性遗传视网膜色素变性; CRX 基因; 基因突变

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-5123. 2011. 11. 015

马润清, 闫光辉, 李自立, 等. 视网膜色素变性患者视锥杆细胞同源盒基因突变的研究. 国际眼科杂志 2011;11(11):1921-1924

## 0 引言

视网膜色素变性 (retinitis pigmentosa, RP) 是一种因视网膜感光细胞和色素上皮细胞变性导致的以夜盲、进行

表1 本研究中发现的 CRX 基因突变位点

突变位点	外显子	氨基酸改变	位点描述	相关显型	突变率	
					实验组( <i>n</i> = 100)	对照组( <i>n</i> = 100)
c. 132C > T	Exon 3	p. Leu78Leu	novel	SRP	0/1/99	0/0/100
c. 24T > G	Exon 4	p. Ala92Ala	novel	SRP	0/1/99	0/0/100
c. 83C > T	Exon 4	p. Ala112Val	rs61748439	SRP	0/1/99	0/1/99
c. 113G > A	Exon 4	p. Gly122Asp	rs61748441	/	0/0/100	0/1/99
c. 308C > T	Exon 4	p. Thr187Ile	novel	ARRP	0/2/98	0/0/100

性视野缺损和视网膜色素沉着为主要临床特征的遗传性视网膜变性疾病。发病率西方为 1/3 500 ~ 1/4 000<sup>[1]</sup>, 国内报道 1/3 784<sup>[2]</sup>。RP 是单基因疾病, 但遗传方式比较复杂, 包括常染色体显性遗传 (autosomal dominant RP, ADRP), 常染色体隐性遗传 (autosomal recessive RP, ARRP), X-染色体连锁遗传型 (X-lined RP, XLRP), 少数表现为双基因突变遗传及线粒体遗传。在各遗传类型中, 常染色体显性遗传视网膜色素变性 (ADRP) 的发病率占 RP 的 15% ~ 25%<sup>[3]</sup>, 40% ~ 50% 为散发型。迄今通过连锁分析和候选基因筛查, 已发现至少 61 个基因位点与 RP 有关, 其中 20 个与 ADRP 有关, 35 个与 ARRP 有关, 6 个与 XLRP 有关<sup>[4]</sup>。这些基因中没有任何一个基因的突变可以单独解释超过 10% 的 RP 病例, 同时有 60% 的 RP 患者尚未找到确切的分子发病机制, 说明还有很多未知的致病基因及位点未被发现。视锥杆细胞同源盒基因的突变已不断在不同类型的 RP 中发现, 占 RP 发病率的 0.4%<sup>[5]</sup>。目前国内对于 CRX 基因的研究报道较少。本研究对宁夏地区 100 例 RP 患者及 100 例正常对照组进行了 CRX 基因的检测分析, 观察其突变频率及突变特征。

## 1 对象和方法

**1.1 对象** 本研究遵循赫尔辛基宣言, 研究对象均来自中国宁夏地区, 并签署了知情同意书。100 例 RP 患者均系 2009-10/2011-11 在宁夏眼科医院和宁夏医科大学附属医院眼科就诊患者, 男 37 例, 女 63 例, 就诊年龄 6 ~ 72 (平均 42 ± 15) 岁。根据家族史确定遗传方式。100 例 RP 患者中, 18 例为 ADRP 患者, 15 例为 ARRP 患者, 其余 67 例为散发视网膜色素变性 (sporadic retinitis pigmentosa, SRP) 患者。所有成员均经过详细的家系调查和全面的眼科检查, 包括直接检眼镜、视野、眼底照相、光学相干断层成像 (OCT) 和视网膜电图 (ERG) 检查, 均有典型的视网膜色素变性的症状和体征。同时以 100 例无血缘关系的健康成年人作为对照, 年龄均 > 60 岁, 所有人经全面眼科检查均无遗传性眼科疾病, 除部分患有轻微的老年性白内障。

**1.2 方法** 采集所有受检者外周静脉血 3 ~ 5 mL, 乙二胺四乙酸 (EDTA) 抗凝, 采用北京天根公司的 DNA 抽提试剂盒提取全基因组 DNA。对 CRX 基因外显子设计四对引物, PCR 反应为 50 μL 体系: PCR Mix 25 μL, Primer (20 pmol/μL) 上游下游各 1 μL, DNA 模板 (70 ng/μL) 5 μL, 加超纯水至 50 μL。PCR 反应条件: 95℃ 预变性 5 min, 95℃ 变性 30 s, 退火 60.2℃ 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 35 个循环后延伸 72℃ 10 min。PCR 反应均在 Bio-Rad 和 ABI 仪器上进行, 反应试剂 PCR Mix 购于 Promega 公司。PCR 反

应结束后, 将反应产物进行 15 g/L 琼脂糖电泳, 透射紫外线鉴定, 以证实 PCR 扩增的片段。对 PCR 扩增产物经纯化试剂纯化后, 应用美国 ABI 公司 3730 测序仪直接测序, 运用 ChromasPro 软件进行 DNA 序列分析, 结果与 CRX 原始序列进行比对。

统计学分析: 全部分析过程在 SPSS 16.0 统计软件上完成,  $P < 0.05$  有统计学意义, 采用  $\chi^2$  检验对每一检测到的 SNP 是否符合 Hardy-Weinberg 平衡分析。采用多因素 Logistic 回归进一步分析 CRX 基因各 SNP 与 RP 发生的相关性。

## 2 结果

在 100 例 RP 患者 CRX 基因第 3 和第 4 外显子上共检测出 5 个变异位点 (表 1), 2 个为同义突变 (p. Leu78 Leu, p. Ala92Ala), 3 个错义突变 (p. Ala112Val, p. Gly122Asp and p. Thr187Ile), 其中 p. Leu78 Leu, p. Ala92Ala 和 p. Thr187Ile 为新发现的 3 个突变位点。经  $\chi^2$  检验这 5 个变异位点均符合 Hardy-Weinberg 平衡。

p. Gly122Asp 变异仅在 1 例散发 RP 患者中检出, p. Ala112Val 分别在 1 例散发患者和 1 例正常对照组中检出, 参照 dbSNP 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>), 这两个位点已被证实为基因多态性。 $\chi^2$  检验发现这两个位点的突变在实验组与对照组中无显著性差异 ( $P > 0.05$ ), 多因素 Logistic 回归分析发现与 RP 的发生无关 ( $P > 0.05$ )。

在新发现的 3 个突变位点中, 密码子 78 和 92 两个位点的第一个碱基和第三个碱基分别由 C 变成 T 和 T 变成 G, 但均未引起编码氨基酸的改变 (p. Leu78 Leu, p. Ala92Ala), 为同义突变。在 2 例 ARRP 患者身上发现第 4 外显子第 187 密码子发生了 C-T 转换 (图 1), 这一改变导致所编码的苏氨酸变为异亮氨酸 (p. Thr187Ile), 这 2 例患者年龄分别为 41 岁和 35 岁, 夜盲出现时间分别为 5, 10 岁, 最佳矫正视力分别为右眼 0.04, 左眼 0.12 和右眼 0.3, 左眼 0.6。进一步筛查这两个 ARRP 家系中的其他患者及正常成员未发现同样的变异。对此位点进行 PSIC 预测, 得分 1.113, 为非致病性突变, 多因素 Logistic 回归进一步分析 p. Thr187Ile 与 RP 发生无相关性 ( $P > 0.05$ )。对照组中未发现此突变位点。

## 3 讨论

CRX 基因主要在发育或成熟的光感受器细胞中表达, 是许多视网膜基因的转录因子, 对维持哺乳动物光感受器是必须的, 缺乏 CRX 基因的光感受器细胞不能形成正常的外节膜盘和末端结构。自 1997 年 Freund 等<sup>[5]</sup>将

图1 CRX 基因第4外显子的部分测序分析 A:发生突变的正向序列;B:发生突变的反向序列;C:野生型正向序列;D:野生型反向序列。箭头所示为发生点突变(C→T)的位置,显示为杂合型。

CRX 基因定位于 19q13.3,迄今已报道 20 余种 CRX 基因的突变,基因突变率为 1%,且所有的突变均为杂合性突变。它们可能通过调控 RHO 和 IRBP 等感光细胞基因表达的功能障碍而引起多种疾病的发生,如:ADRP, Leber 先天性黑矇 III 型和常染色体显性锥杆细胞营养不良 II 型等<sup>[5,9]</sup>。

本研究通过对 100 例散发 RP 患者进行 CRX 基因突变的检测分析,未发现致病性突变。陆莎莎等<sup>[10]</sup>对一个五代 ADRP 家系(包括 20 例 RP 患者、7 例正常同胞和 8 例配偶)进行 CRX 基因的全部编码区测序分析后未发现突变位点。Sohocki 等<sup>[11]</sup>对 164 例 ADRP 患者进行 CRX 基因测序分析在 1RP 患者身上发现存在 Arg41Gln 位点改变,Ziviello 等<sup>[12]</sup>对 43 个意大利 ADRP 家族进行 CRX 序列分析后发现第三外显子处存在移码突变 458delC,突变率为 2.3%。本研究发现宁夏地区 CRX 基因突变率低于 1%。发生这种差异主要的原因有:(1)RP 是一种多基因疾病,同一个基因在不同种族中的致病性可能存在差异;由于种族及地域的差异,不同民族、不同地区的人群可能具有完全不同的突变类型<sup>[13]</sup>;(2)人群分层引起的假关联,特定基因的效应被其他相关基因效应所掩盖而导致的基因相互作用等<sup>[14]</sup>。

本研究共发现同义突变 2 个,虽然它们并不引起密码子改变,但是编码区的序列改变能够通过影响 mRNA 结构的稳定性或使其降解,从而影响蛋白翻译,最终使得编码的蛋白质功能异常,增加 RP 发生的易感性<sup>[15]</sup>。错义突

变 p. Ala112Val, p. Gly122Asp 均为文献已报道过的 SNP。

第四外显子上的错义突变 p. Thr187Ile,为一新发现的变异点。此位点仅在 2 例 ARRP 患者身上发现,该家系另外 1 例 RP 患者和 6 例正常成员及对照组中均未检出。p. Thr187Ile 突变与该家系未出现“共分离”现象,因此该错义突变不是导致该家系发生视网膜色素变性的致病突变。回归分析 p. Thr187Ile 突变与 RP 的发生无关。PSIC 分析结果也显示为非致病性突变。但是,我们发现携带这两个突变位点的患者均为 ARRP 患者,且患者均符合 ARRP 患病特点:夜盲出现时间较早,视力损害较重。此外,在 ADRP 患者、散发患者和正常人身上未检测到此突变位点。因此,我们推测,虽然 p. Thr187Ile 突变位点与 RP 的发生并不相关,但是由于 CRX 基因是一些视网膜表达基因的转录因子,此位点的突变会影响其它 ARRP 相关基因的表达,改变基因的蛋白产物<sup>[16]</sup>,会增加 ARRP 的发生率。此外,我们在 ADRP 患者、散发患者和正常人身上未检测到此突变位点,进一步说明此突变位点与 ARRP 的发生有关。

总之,本研究表明宁夏地区 RP 患者 CRX 基因的突变率比其他人 RP 患者突变率低。根据相应的研究分析,认为 p. Thr187Ile 位点的突变不是 RP 的致病性突变,但是否可能通过调控其它感光细胞基因表达的功能障碍增加 ARRP 的发生。有待于进一步研究。

#### 参考文献

1 Rivolta C, Sharon D, DeAngelis MM, et al. Retinitis pigmentosa and

- allied diseases; numerous diseases, genes, and inheritance patterns. *Hum Mol Genet* 2002;11(10):1219-1227
- 2 Hu DN. Prevalence and mode of inheritance of major genetic eye diseases in China. *J Med Genet* 1987;24(10):584-588
- 3 Briscoe AD, Gaur C, Kumar S. The spectrum of human rhodopsin disease mutations through the lens of interpecific variation. *Gene* 2004 May 12;12:107-118
- 4 <http://www.sph.uth.tmc.edu/RetNet/>
- 5 Freund CL, Wang QL, Chen S, et al. De novo mutations in the CRX homeobox gene associated with Leber congenital amaurosis. *Nature Genet* 1998;18(4):311-312
- 6 Swain PK, Chen S, Wang QL, et al. Mutations in the cone-rod homeobox gene are associated with the cone-rod dystrophy photoreceptor degeneration. *Neurom* 1997;19(6):1329-1336
- 7 Rivolta C, Berson EL, Dryja TP. Dominant Leber congenital amaurosis, cone-rod degeneration, and retinitis pigmentosa caused by mutant versions of the transcription factor CRX. *Hum. Mutat* 2001;18(6):488-498
- 8 Nakamura M, Ito S, Miyake Y. Novel de ntion in CRX gene in a Japanese patient with Leber Congenital Amaurosis. *Am J Ophthalmol* 2002;134(3):465-467
- 9 Swaroop A, Wang QL, Wu W, et al. Leber Congenital Amaurosis caused by a Homozygous mutation (R90W) in the homeodomain of the retinal Transcription factor CRX; direct evidence for the involvement of CRX in the Development of photoreceptor function. *Hum Molec Genet* 1999;8(2):299-305
- 10 陆莎莎,赵晨,李宁东,等. 常染色体显性视网膜色素变性家系的基因连锁定位和候选基因的序列分析. *眼科研究* 2005;23(4):403-407
- 11 Sohocki MM, Sullivan LS, Mintz-Hittner HA, et al. A range of clinical phenotypes associated with mutations in CRX, a photoreceptor transcription-factor gene. *Am J Hum Genet* 1998;63(5):1307-1315
- 12 Ziviello C, Simonelli F, Testa F, et al. Molecular genetics of autosomal dominant retinitis pigmentosa (ADRP): a comprehensive study of 43 Italian families. *J Med Genet* 2005;42(7):47
- 13 Wang DY, Chan WM, Tam PO, et al. Gene mutations in retinitis pigmentosa and their clinical implications. *Clin Chim Acta* 2005;351(1-2):5-16
- 14 Martin ER, Lai EH, Glibert JR, et al. SNPing away at complex disease: analysis of single-nucleotide polymorphisms around APOE in Alzheimer disease. *Am J Hum Genet* 2000;67(2):383-391
- 15 Shen LX, Basilion JP, Stanton VP. Single nucleotide polymorphisms can cause different structural folds of mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96(14):7871-7876
- 16 Sohoeki MM, Sullivan L S, Mintz-Hittner, et al. A range of clinical Phenotypes associated with mutations in CRX. A Photoreceptor transcription-factor gene. *Am J Hum Genet* 1998;63(5):1307-1315