

# 先天性无虹膜合并先天性白内障家系致病基因突变分析

陈靖<sup>1</sup>, 朱思泉<sup>2</sup>

引用:陈靖,朱思泉.先天性无虹膜合并先天性白内障家系致病基因突变分析.国际眼科杂志 2019;19(8):1396-1399

作者单位:<sup>1</sup>(350001)中国福建省福州市,福建省立医院眼科;

<sup>2</sup>(100730)中国北京市,首都医科大学附属北京同仁医院眼科

作者简介:陈靖,毕业于首都医科大学,硕士研究生,住院医师,研究方向:白内障。

通讯作者:朱思泉,主任医师,研究方向:白内障. siquanzhu@sina.com

收稿日期:2019-02-28 修回日期:2019-07-10

## 摘要

目的:对先天性无虹膜合并先天性白内障家系进行 *PAX6* 基因突变位点筛查,丰富该致病基因的突变谱。

方法:选取就诊于北京同仁医院眼科门诊的1个先天性无虹膜合并先天性白内障家系和100名健康志愿者,采集外周静脉血,提取基因组DNA,采用直接测序法进行 *PAX6* 基因突变位点的筛查。

结果:该家系中先证者和其他患者均表现为无虹膜合并白内障,*PAX6* 基因测序结果显示,该致病基因第11外显子无义突变 c.991 C>T,造成 *PAX6* 基因编码的蛋白截短(R331X),从而使该蛋白失去功能,且该突变在家系内与疾病表型共分离,不存在于家系内及家系外健康样本的基因中。

结论:*PAX6* R331X 突变与先天性无虹膜合并先天性白内障的发生有关。

关键词:先天性无虹膜;先天性白内障;*PAX6* 基因;常染色体显性遗传

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2019.8.31

## Mutation analysis of a family affected with congenital aniridia and congenital cataract

Jing Chen<sup>1</sup>, Si-Quan Zhu<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, Fujian Provincial Hospital, Fuzhou 350001, Fujian Province, China; <sup>2</sup>Department of Ophthalmology, Beijing Tongren Hospital, Beijing 100730, China

Correspondence to: Si-Quan Zhu. Department of Ophthalmology, Beijing Tongren Hospital, Beijing 100730, China. siquanzhu@sina.com

Received:2019-02-28 Accepted:2019-07-10

## Abstract

• AIM: To identify the potential mutation in a Chinese family affected with congenital aniridia and cataract, which can expand the mutation spectrum of autosomal dominant congenital aniridia.

• METHODS: A Chinese family with congenital aniridia and cataract and 100 unrelated controls were recruited, peripheral venous blood was collected for genomic DNA extraction. Candidate genes sequencing was performed by direct DNA sequencing to screen out the *PAX6* mutation.

• RESULTS: All affected individuals in the family showed aniridia and cataract. A novel non-sense mutation c.991 C>T in exon 11 of *PAX6* was exclusively observed in all affected individuals but not in any of the unaffected family members or unrelated controls, which results in the truncation of encoding protein (R331X).

• CONCLUSION: We identified a novel mutation in the *PAX6* R331X, which may be responsible for the pathogenesis of congenital aniridia and cataract.

• KEYWORDS: congenital aniridia; congenital cataract; *PAX6* gene; autosomal dominant

Citation: Chen J, Zhu SQ. Mutation analysis of a family affected with congenital aniridia and congenital cataract. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2019;19(8):1396-1399

## 0 引言

先天性无虹膜(congenital aniridia)是一种严重的常染色体显性遗传疾病,多双眼发病,以部分或全部虹膜缺失为其特征性临床表现,可伴有其它眼部结构异常,包括角膜混浊、青光眼、白内障、晶状体异位、斜视、眼球震颤等<sup>[1]</sup>。凡是肉眼可在前房周边见到部分虹膜结构者称为部分性无虹膜,需用房角镜检查才能窥见少许虹膜残端者称为无虹膜。无虹膜患者多数伴有晶状体皮质、前后极或弥漫性混浊,偶尔可见晶状体脱位或晶状体缺损。此外,先天性无虹膜患者常因并存前房角小梁组织结构异常导致先天性或发育性青光眼<sup>[2]</sup>。因致盲性及严重的并发症,先天性无虹膜成为目前有待进一步明确其致病基因的遗传性眼部疾病之一。

先天性无虹膜在临床上罕见,文献报道其发病率约为1:96000~1:64000,其中瑞典为1:76000,挪威为1:70000<sup>[3]</sup>,我国发病率约为1:100000。约2/3的病例为家族性,具有很高的外显率,但表现度不一,有研究发现其外显率达100%。此外,约1/3的病例为散发病例,部分散发病例常伴有全身异常,如骨骼畸形、颜面部发育不良、泌尿系统先天异常、发育迟缓及肾母细胞瘤(nephroblastoma,又称Wilms瘤),称为WAGR综合征(W指Wilms瘤;A指aniridia,即无虹膜;G指genitourinary anomalies,即泌尿生殖系统畸形;R指mental retardation,即智力发育迟缓)<sup>[4]</sup>。目前关于先天性无虹膜的基因研究已成为热点,普遍认为人类配对盒基因(paired box gene, *PAX6*)是其致病基因。*PAX6* 基因是一种高度保守的转录因子,是眼球发育的主要调控基因,并且对胰岛细胞合成与分泌胰岛素发挥调节作用<sup>[5]</sup>,但并非所有先天性无

表 1 引物序列

外显子	正向引物(5'-3')	反向引物(5'-3')
1	AGGGAACCGTGGCTCGGC	GGGTGAGGGAAGTGGCTGC
2	TTATCTCTCACTCTCCAGCC	GGAGACCTGTCTGAATATTGC
3	TCAGAGAGCCCATCGACGTAT	CTGTTTGTGGGTTTTGAGCC
4	AGTTCAGGCCTACCTGATGC	GTCGCGAGTCCCTGTGTC
5	CTCCCTCATCTTCTCTTCC	GGGTCATAAATTAGCATCG
6~7	GGGCTACAAATGTAATTTTAAGAAA	AGAGAGGGTGGGAGGAGGTA
8	GAGCTGAGATGGGTGACTG	GAGAGTAGGGGACAGGCAAA
9	AGACTACACCAGGCCCTTT	TGAAGATGTGGCATTACTTTGA
10	GTACCGAGAGACTGTGCAGTTTC	TGAGGGCAAGAGAAATGACACTAG
11	GGGCTCGACGTAGACACAGT	GGAAACTGAGGGCAAGAGAA
12	CGGGCTCTGACTCTCACTCT	GCCACTCCTCACTTCTCTGG
13	GCTGTGGCTGTGTGATGTGT	AGGAGATTCTGTTTGGGTA
14	TCCATGTCTGTTTCTCAAAGG	TCAACTGTTGTGCCCCATAG

虹膜病例皆为该基因突变所致。本研究收集了就诊于北京同仁医院眼科门诊的某先天性无虹膜合并先天性白内障家系,通过直接测序方法进行 *PAX6* 基因筛查,以寻找可能的致病突变基因位点。

### 1 对象和方法

**1.1 对象** 于 2014-01/2015-01 收集就诊于首都医科大学附属北京同仁医院眼科门诊的先天性无虹膜合并先天性白内障家系 1 个,该家系为具有明确遗传病史的常染色体显性遗传家系,其中先天性无虹膜合并先天性白内障患者 3 例。另选取 100 名健康志愿者作为对照。本研究遵循《赫尔辛基宣言》,并经我院伦理委员会批准,所有受检者均知情同意。

### 1.2 方法

**1.2.1 检查方法** 先天性无虹膜合并先天性白内障家系成员均进行视力、角膜、前房、虹膜、晶状体、玻璃体、视网膜、眼压、B 型超声、裂隙灯、眼底照相、前房角(表面麻醉下)等眼科检查,并进行全身检查以排查是否伴有其它系统异常。

**1.2.2 基因检测** 清晨于肘正中静脉处采集受检者外周静脉血 5mL。采用经典酚-氯仿提取法提取 DNA,经紫外分光光度法检测提取的 DNA 纯度和浓度。根据美国国家生物技术信息中心(National Center of Biotechnology Information,NCBI)提供的 *PAX6* 基因序列和参考文献[4]设计引物,扩增区覆盖 4~13 外显子及外显子内含子接头处,引物序列见表 1。以基因组 DNA 为模板,进行特异性扩增,PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,观察条带并判断是否扩增成功。对扩增特异性好的 PCR 产物用虾碱性磷酸酶(SAP)和核酸外切酶 I 处理,37℃ 酶切 40min,80℃ 5min;对扩增特异性差的 PCR 产物,用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳(溴化乙锭染色)分离 PCR 产物,并用 TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit(天根生化科技有限公司)回收特异性扩增产物。PCR 扩增产物经 Millipore 纯化板纯化,对纯化的产物加入 BigDye(美国 ABI)做测序反应,测序产物再次纯化,纯化产物溶解后上机,读取基因序列信息。使用 DNA star 软件、Chromas 软件对测序图进行拼接、读取,寻找杂合位点并使用 CLC DNAwrkbench 5.0 软

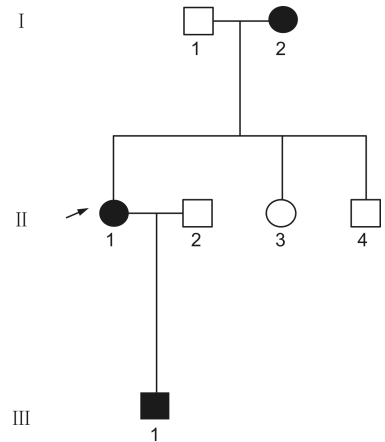


图 1 先天性无虹膜家系图 圆圈表示女性,方框表示男性,实心表示患病,空心表示正常,罗马数字表示代数,箭头指示为先证者。

件分析突变位点是否导致氨基酸改变,并与 100 名健康志愿者的测序结果相对比,初步判断是否为新的且保守的突变位点。

### 2 结果

**2.1 系谱分析和临床表现** 本研究选取的先天性无虹膜合并先天性白内障家系共 3 代,连续 3 代成员每代均有发病,患者 3 例,其中女 2 例,男 1 例,患者的父母均有一方患病,子女发病的可能性为 1/2,无性别差异,根据遗传学图谱分析,该家系呈常染色体显性遗传(图 1)。先证者是 1 名 27 岁女性,双眼完全性无虹膜伴晶状体皮质及核混浊,彩色眼底照相结果因混浊晶状体而模糊(图 2)。3 例患者均表现为完全性无虹膜,并伴有晶状体混浊,眼部检查无其它畸形,角膜透明,眼压正常,无眼球震颤等。该家系成员均未合并其它系统并发症。

**2.2 *PAX6* 基因测序结果** *PAX6* 基因突变分析结果显示,在该家系先证者(II 1)中发现一个杂合性 c.991 C>T 突变,位于 *PAX6* 基因外显子 11 编码区,其母亲(I 2)的测序结果也发现这一杂合突变(图 3)。该基因突变是一个无义突变,使精氨酸(Arg)变为终止密码(R331X),使得翻译提前终止,造成一个截短的蛋白,从而该蛋白失去功能。该家系其他正常成员与 100 名健康志愿者的测序结果中未发现此突变。

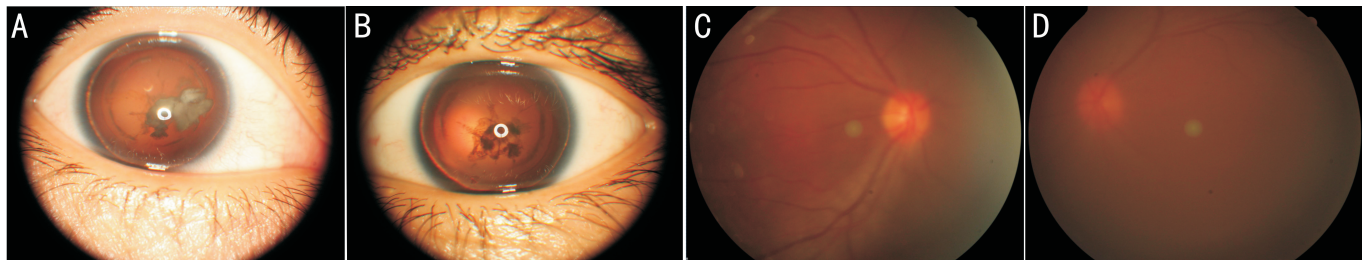


图2 先证者检查结果 A:右眼弥散光检查结果;B:左眼弥散光检查结果;C:右眼彩色眼底照相;D:左眼彩色眼底照相。

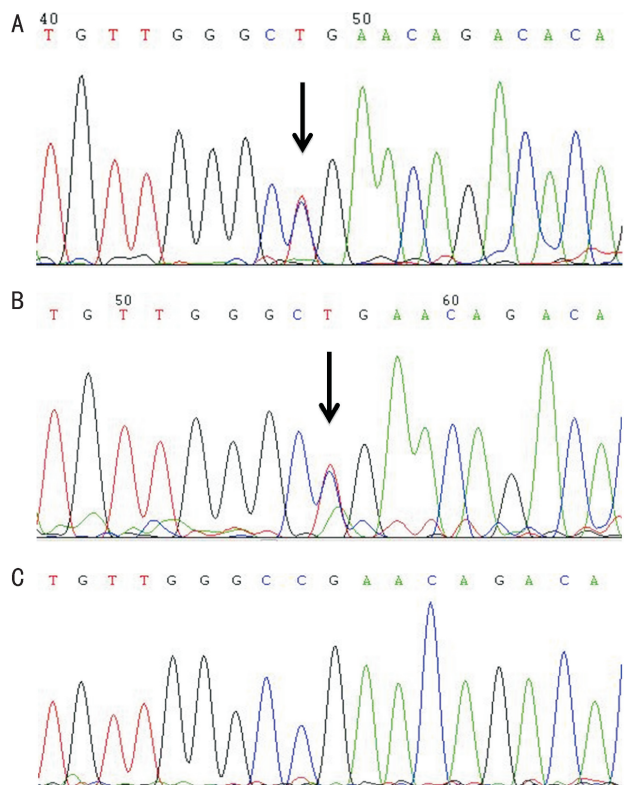


图3 PAX6 基因测序图 A:先证者(II 1)测序图;B:先证者母亲(I 2)测序图;C:健康志愿者测序图。箭头所示为突变位点, PAX6 基因 11 外显子 c.991 C>T。

### 3 讨论

先天性无虹膜是由于在胚胎发育过程中神经外胚层和中胚层出现障碍,导致眼部结构发育异常,多为双眼发病,分为部分性无虹膜和无虹膜。无虹膜者约 50%~85% 伴有白内障,并有进展趋势,多伴有晶状体板层、前后极或弥漫性混浊;由于悬韧带的节段性缺失,还可见晶状体脱位。另有约 20% 的患者可合并角膜混浊,其多继发于角膜缘干细胞缺乏<sup>[1]</sup>。此外,约 6%~75% 的患者常合并青光眼,其中约 91% 的患者因前房角小梁组织结构异常,常需多次抗青光眼手术才能相对控制眼压进展<sup>[6]</sup>。无虹膜者还因瞳孔极度散大,常有畏光,睑裂变小,并由于眼部异常而引起视力减退,可并发眼球震颤、斜视等<sup>[7]</sup>。

胚胎发育过程中, PAX6 基因在组织和器官的形成中发挥重要作用。 PAX6 基因位于第 11 号染色体短臂 13 位点(11p13),是由 14 个外显子组成的高度保守的转录因子,编码由 422 个氨基酸组成的蛋白,包含 61 个氨基酸组成的同源结构域(homeodomain, HD)和 128 个氨基酸组成的成对结构域(paired domain, PD),两者间由一个 79 个氨基酸组成的连接体区域(link domain, LNK)分隔,其下游

还有一个由 79 个氨基酸组成的富含脯氨酸、丝氨酸和苏氨酸的转录反式激活域(proline serine threoninrichdomain, PST),可激活 PAX6 蛋白调控的下游基因的表达<sup>[8]</sup>。目前, PAX6 基因在眼球发育中发挥的作用还未完全阐明, PAX6 蛋白被认为能够激活参与眼球、中枢神经系统及胰腺发育的相关基因。此外, PAX6 蛋白亦表达于眼球各种组织中,包括视盘、视泡、晶状体、角膜上皮、虹膜、睫状体、神经视网膜各层以及视网膜色素上皮。对于发育中的眼球, PAX6 蛋白首先在视窝中表达,其次是视泡,随后为分化的视网膜<sup>[9]</sup>。目前已有超过 400 个 PAX6 基因的突变位点被报道<sup>[10]</sup>。 PAX6 基因突变多发生在外显子 5~14, 突变方式多样,分为 6 种突变类型,即无义突变、剪接突变、框移突变、框内缺失或插入突变、错义突变和连缀突变。无义介导降解(nonsense-mediated decay, NMD)为先天性无虹膜最常见的突变类型,通常使包含 PTCs(pre-mature termination codons, PTCs)的 mRNA 在翻译成截短蛋白前降解,阻止了截短蛋白合成, PAX6 基因发生突变而成为无效等位基因,致使基因单倍剂量不足,出现典型的无虹膜症状<sup>[11]</sup>。

临床观察发现,先天性无虹膜与先天性白内障可同时存在,这部分患者的白内障发病年龄较早、手术难度大、术后视力改善有限<sup>[12]</sup>,有研究认为其发病原因可能与 PAX6 基因突变有关<sup>[13-14]</sup>。此外,先天性白内障还可并发先天性虹膜缺损,有文献报道该过程与 16 号染色体 MAF 基因突变有关<sup>[15]</sup>,也有学者认为其致病基因可能位于 2q33 染色体上<sup>[16]</sup>。另有研究观察 15 例先天性白内障合并虹膜发育异常患者的临床表型发现,其中 7 例核性白内障患者并发完全性虹膜缺损,2 例全白内障患者并发部分完全性虹膜缺损,5 例全白内障患者并发无虹膜,1 例缝性白内障患者并发无虹膜,表明先天性白内障表型与虹膜发育不全有一定的规律性,但还需进一步观察研究<sup>[17]</sup>。

本研究在先证者及该家系其他患病成员的 PAX6 基因 11 外显子中发现一个无义突变 c.991 C>T(p.331R>X),家系中其他正常成员及家系外正常对照无该突变,提示这一突变是导致该家系先天性无虹膜合并先天性白内障的主要原因。该突变位点的发现,不仅扩展了 PAX6 基因的突变谱,还为先天性无虹膜合并先天性白内障家系的遗传咨询与产前诊断提供重要的依据,对预防患者后代中再次出现该病的发生具有一定的指导意义。

#### 参考文献

- Nelson LB, Spaeth GL, Nowinski TS, et al. Aniridia. A review. *Surv Ophthalmol* 1984; 28(6): 621-642
- Ton CC, Hirvonen H, Miwa H, et al. Positional cloning and characterization of a paired box- and homeobox-containing gene from the aniridia region. *Cell* 1991; 67(6): 1059-1074
- Edén U, Iggman D, Riise R, et al. Epidemiology of aniridia in Sweden

- and Norway. *Acta Ophthalmol* 2008; 86(7): 727-729
- 4 Redeker EJ, de Visser AS, Bergen AA, *et al.* Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) enhances the molecular diagnosis of aniridia and related disorders. *Mol Vis* 2008; 14: 836-840
- 5 Cheng F, Song W, Kang Y, *et al.* A 556kb deletion in the downstream region of the PAX6 gene causes familial aniridia and other eye anomalies in a Chinese family. *Mol Vis* 2011; 17: 448-455
- 6 Tsai JH, Derby E, Holland EJ, *et al.* Incidence and prevalence of glaucoma in severe ocular surface disease. *Cornea* 2006; 25(5): 530-532
- 7 Weisschuh N, Wissinger B, Gramer E. A splice site mutation in the PAX6 gene which induces exon skipping causes autosomal dominant inherited aniridia. *Mol Vis* 2012; 18: 751-757
- 8 Li H, Leung CK, Wong L, *et al.* Comparative study of central corneal thickness measurement with slit-lamp optical coherence tomography and visante optical coherence tomography. *Ophthalmology* 2008; 115(5): 796-801
- 9 Kumar JP. Signalling pathways in Drosophila and vertebrate retinal development. *Nat Rev Genet* 2001; 2(11): 846-857
- 10 Coutinho P, Pavlou S, Bhatia S, *et al.* Discovery and assessment of conserved Pax6 target genes and enhancers. *Genome Res* 2011; 21(8): 1349-1359
- 11 Yepiskoposyan H, Aeschimann F, Nilsson D, *et al.* Autoregulation of the nonsense-mediated mRNA decay pathway in human cells. *RNA* 2011; 17(12): 2108-2118
- 12 Hejtmancik JF. Congenital cataracts and their molecular genetics. *Semin Cell Dev Biol* 2008; 19(2): 134-149
- 13 Brémond-Gignac D, Biltoun P, Reis LM, *et al.* Identification of dominant FOXE3 and PAX6 mutations in patients with congenital cataract and aniridia. *Mol Vis* 2010; 16: 1705-1711
- 14 Cai F, Zhu J, Chen W, *et al.* A novel PAX6 mutation in a large Chinese family with aniridia and congenital cataract. *Mol Vis* 2010; 16: 1141-1145
- 15 Jamieson RV, Perveen R, Kerr B, *et al.* Domain disruption and mutation of the bZIP transcription factor, MAF, associated with cataract, ocular anterior segment dysgenesis and coloboma. *Hum Mol Genet* 2002; 11(1): 33-42
- 16 Abouzeid H, Meire FM, Osman I, *et al.* A new locus for congenital cataract, microcornea, microphthalmia, and atypical iris coloboma maps to chromosome 2. *Ophthalmology* 2009; 116(1): 154-162
- 17 韦春玲, 李娟娟, 胡竹林, 等. 先天性白内障合并先天性虹膜发育异常的临床表型. *中华实验眼科杂志* 2012; 30(7): 630-632