

DOI:10.14188/j.1671-8852.2017.0446

文章编号 1671-8852(2018)02-0264-05

全外显子组测序检测视网膜色素变性家系的致病基因

李 印 李 拓 李家璋 但汉东 张丹丹

恩施州中心医院眼科/武汉大学恩施临床学院眼科 湖北 恩施 445000

摘要 目的:应用全外显子组测序检测 3 个中国土家族常染色体隐性遗传的视网膜色素变性(ARRP)家系的致病基因。方法:对 3 个 ARRP 家系先证者进行病史采集、视力检查、眼底检查及全视网膜电图(ERG)检查。绘制家系图,收集先证者外周血抽提 DNA,全外显子组测序和数据分析,筛选突变基因,对符合条件的突变进行 Sanger 测序验证和家系共分离分析。结果:收集 3 个中国土家族 ARRP 家系的先证者。患者表现为自幼或青少年发病,夜盲,进行性周边视力受损。眼底检查显示视网膜色素上皮骨细胞样沉着。全视野 ERG 显示 a、b 波振幅明显下降甚至记录不到。其中家系 A 和家系 B 均有近亲结婚史。家系 B 的患者自幼伴有耳聋。家系 C 为双胞胎姐妹患病。经全外显子组测序,根据 RETNET 网站上提供的基因数据,进行基因筛查和突变筛查排除后,在家系 B 中发现 USH2A 基因的突变符合条件,但 Sanger 测序验证,不符合家系共分离。结论:通过对 3 个中国土家族 ARRP 家系进行全外显子组测序及分析,发现一个可能的致病基因,但最终不符合生物信息学分析,说明全外显子组测序也有一定的局限性,这三个 ARRP 家系的遗传机制仍需进一步研究。

关键词 视网膜色素变性;全外显子组测序;基因;常染色体隐性遗传

中图分类号 R774.1⁺3 文献标识码 A

Detection of Pathogenic Genes in Pedigrees of Retinitis Pigmentosa by Whole-Exome Sequencing

LI Yin, LI Tuo, LI Jiazhang, DAN Handong, ZHANG Dandan

Dept. of Ophthalmology, Central Hospital of Enshi Autonomous Prefecture & Enshi Clinical College of Wuhan University, Enshi 445000, Hubei, China

Abstract

Objective: To detect the pathogenic genes of three Chinese autosomal recessive retinitis pigmentosa (ARRP) pedigrees using whole-exome sequencing. **Methods:** Three probands of ARRP pedigrees were collected, clinical features were evaluated by medical history, visual acuity, fundus examination and full electroretinogram (ERG). Pedigrees diagrams were drawn, and DNA was extracted from peripheral blood of probands. Whole-exome sequencing and data analysis were carried out to screening mutation genes. Sanger sequencing and the co-segregation analysis were performed to confirm the mutations. **Results:** Three probands with ARRP families of Chinese Tujia nationality were collected. Patients showed childhood or adolescent onset, night blindness, progressive peripheral vision impairment. Fundus examination showed retinal pigmentation. ERG showed the amplitude of a wave and b wave decreased significantly or even not recorded. Among them, family A and family B had consanguineous marriage history, proband of family B was with

课题来源:国家自然科学基金资助项目(编号:81360154)

作者简介:李印,男,1983-,医学硕士,主治医师,主要从事眼底病的研究, E-mail:258415106@qq.com

通讯作者:李拓,男,1963-,医学博士,主任医师,博士生导师,主要从事眼科玻璃体视网膜疾病的研究, E-mail:13986840088@139.com

childhood deafness, and proband of family C was the twin sisters patients. After whole-exome sequencing, gene and mutation screening were performed according to the gene data provided on the RETNET website. The results showed that USH2A gene mutation was found in family B, which was verified by Sanger sequencing. However, it did not accord with family co-segregation.

Conclusion: Through the whole-exome sequencing and analysis of three Chinese Tujia ARRP pedigrees, we found a possible causative gene, but ultimately did not meet the bioinformatics analysis. This study indicated that the whole-exome sequencing also had some limitation, the genetic mechanism of these three ARRP families still needed further research.

Key Words Retinitis Pigmentosa; Whole-Exome Sequencing; Gene; Autosomal Recessive

视网膜色素变性(retinitis pigmentosa, RP)是一类感光细胞及色素上皮细胞病变导致的具有高度遗传异质性的视网膜变性疾病。临床表现有夜盲、向心性视野缺损甚至失明等,各年龄阶段均可发病。眼底典型表现为骨细胞样色素沉着、视网膜血管变细、视盘蜡黄等。该病的患病率约为1/3 000-1/8 000,无明显性别差异,是世界范围内失明的主要原因之一^[1]。RP是单基因遗传疾病,20%-25%为常染色体显性遗传模式(autosomal dominant RP, ADRP),15%-20%为常染色体隐性遗传模式(autosomal recessive RP, ARRP)。10%-15%为X染色体连锁遗传模式(X-linked RP, XLRP),约30%表现为散发病例(sporadic RP, SRP),其中大部分为隐性遗传;少数表现为双基因突变遗传模式及线粒体遗传模式^[2]。目前,人们已鉴定的RP致病基因共60个,其中常染色体显性遗传基因22个,常染色体隐性遗传基因36个,X性连锁遗传基因2个(<https://sph.uth.edu/retnet/sum-dis.htm>)。其中NR2E3、NRL、RHO、RP1、RPE65五个基因在ADRP和ARRP中均有报道。大部分ARRP的基因比较罕见。单个基因致病的发病率多在5%以下。目前所发现的致病基因只能解释约60%RP患者的发病原因,还有许多RP患者未能找到明确的致病基因^[3]。随着测序技术的发展,特别是高通量下一代测序(next-generation sequencing, NGS)的迅猛发展,如全外显子组测序和全基因组测序,更多的致病基因被发现。本研究通过全外显子组测序的方法,在3个中国常染色体隐性遗传的RP家系中探索其致病基因,报告如下。

1 对象与方法

1.1 对象 收集3个中国鄂西地区土家族隐性遗传RP家系,抽取3个家系先证者的外周血。本研究经恩施州中心医院伦理委员会同意并遵守《赫尔辛

基宣言》中的伦理原则,所有检查及采样均告知被检查对象并签署知情同意书。

1.2 检测项目及诊断标准 所有患者均进行详细的病史询问。眼科检查包括验光、眼底检查和照相(TOPCON,日本)、视野(Humphrey750i视野计,德国蔡司公司)、全视野视网膜电图(ERG)(RETF-Scan视觉电生理仪,德国Roland公司),家系B行听力检测。RP的临床表现:①症状:夜盲,进行性视力下降;②体征:典型眼底改变,即视盘呈蜡黄色或变淡,视网膜血管变细,视网膜呈青灰色,有骨细胞样色素沉着;③辅检:早期视野有环形暗点,晚期视野向心性缩窄呈管状;ERG无电位反应,尤其a波、b波在明暗适应状态振幅均重度降低,接近熄灭,b波潜伏期延长。依据病史、症状、体征及视野、视觉电生理特征,对本病可作出诊断。

1.3 致病基因研究

1.3.1 血标本采集及DNA提取 以EDTA抗凝管收集3位先证者的外周静脉血5 ml用于提取DNA,经典苯酚-氯仿的方法抽提基因组DNA。-20℃保存。

1.3.2 全外显子组测序 对先证患者DNA样本进行全外显子测序分析:测序平台:Illumina Genome Analyzer II,平均测序深度: $\times 60$ 。测序分析使用Illumina方法。具体测序方法由千年基因(Macrogen,深圳)公司操作。

1.3.3 致病基因数据分析

第一步:排除最小等位基因频率(minor allele frequency, MAF) ≥ 0.01 的变异。将初步获得的变异,包括SNPs和小段插入缺失变异通过dbSNP132,1 000 Genome Project(1 000 G),HapMap,炎黄计划数据库注释,排除MAF ≥ 0.01 的变异,此类变异被认为是对功能无影响的变异和公共数据库中的常见变异。

第二步:筛基因。目前,与 RP 相关的基因都包括在 RETNET 网站上,结合 RETNET 网站上收录的 300 个遗传性视网膜病的致病基因,保留在这 300 个基因上的变异。

第三步:筛突变。根据遗传方式和致病性筛选符合情况的突变,遗传方式为隐性遗传的保留,突变在 SIFT 和 Polyphen 2 中有一个是 D(damage)或者 not-available(除错义突变外的其他类型突变目前无法预测)的保留。

1.3.4 致病基因家系样本测序验证 通过以上三步筛选仅在家系 B 中发现 USH2A 的突变(c.6875dupG, p. Ala2293fs)符合条件,将该突变做

Sanger 测序验证及家系共分离分析。测序引物用 DNASTar 软件进行设计,由上海生工公司合成引物。家系 B 成员中的另一个患者及 2 个正常成员的 DNA 样本以及正常对照经 PCR 扩增后,在自动测序仪 ABI 3130XL Genetic Analyzer 上进行测序。

2 结果

2.1 家系遗传方式 3 个家系,父母均正常,无 RP 疾病的典型临床特征,子女中至少 1 人为 RP 疾病患者,1 人正常,但不排除处在疾病早期。3 个家系的遗传模式符合典型的常染色体隐性遗传模式。家系图见图 1。

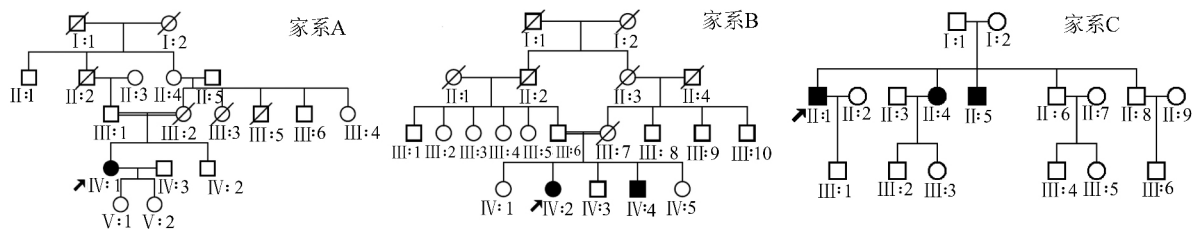


图 1 三位先证者的家系图

家系中父母均正常,无 RP 疾病的典型临床特征,子女中至少 1 人为 RP 疾病患者,1 人正常,符合常染色体隐性遗传。斜箭头所指为先证者

2.2 家系临床表现 家系 A 先证者:Ⅳ:1,女,25 岁,土家族,家族有近亲结婚史(爷爷和外婆是亲兄妹),自幼(约 2 岁时)发现视力差,伴有夜盲,现双眼视力:0.02(矫不应),伴眼球水平震颤。眼底检查显示双眼视网膜色素上皮萎缩,散在骨细胞样色素沉着,黄斑区色素沉着,视网膜血管变细(眼底照片见图 2A,B),全视野 ERG 显示明暗适应时 a、b 波振幅均重度降低,接近熄灭状态(结果未附录)。

家系 B 先证者:Ⅳ:2,女,46 岁,土家族,家族有近亲结婚史(爷爷和外婆是亲兄妹)。自幼伴有耳聋,十余岁时发现双眼视力逐渐下降,伴有夜盲,现右眼视力:0.08(矫不应),左眼视力:0.15(矫不应)。眼底检查显示双眼视网膜中周部骨细胞样色素沉着,视网膜血管变细(眼底照片见图 2C,D)。全视野 ERG 显示明暗适应时 a、b 波振幅严重降低,接近熄灭状态,b 波潜伏期延长(见图 3A,B)。听力检查双耳中度听力障碍(见图 4)。

家系 C 先证者:Ⅱ:1,男,30 岁,土家族,家族无近亲结婚史,10 岁左右发现视力逐渐下降伴有夜盲,现右眼视力:0.1,左眼视力 0.05(均矫不应),双眼底视盘色可,视网膜色泽晦暗,中周部网膜色素上皮骨细胞样改变,血管变细,黄斑区色素紊乱(眼底照片,

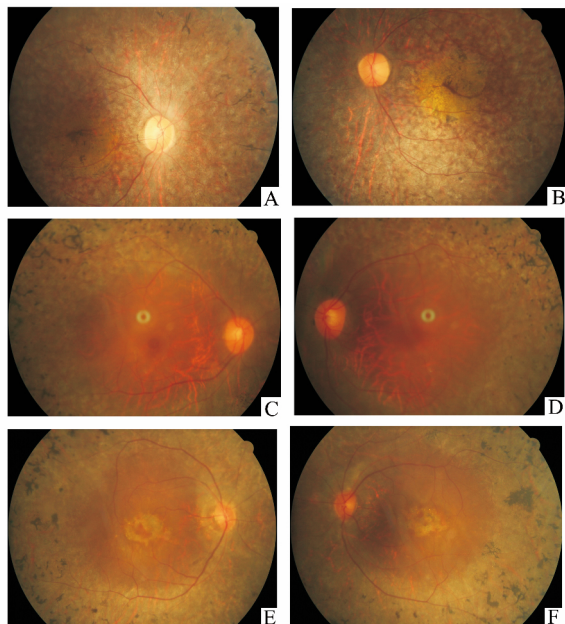


图 2 三位先证者眼底彩照

A 和 B 分别为家系 A 先证者Ⅳ:1 的右眼和左眼底彩照,见视盘色稍淡,视网膜色素上皮骨细胞样改变,血管变细。C 和 D 分别为家系 B 先证者Ⅳ:2 的右眼和左眼底彩照,见视网膜中周部色素上皮骨细胞样改变。E 和 F 分别为家系 C 先证者Ⅱ:1 的右眼和左眼底彩照,见视网膜色泽晦暗,中周部色素上皮骨细胞样改变,黄斑区色素紊乱

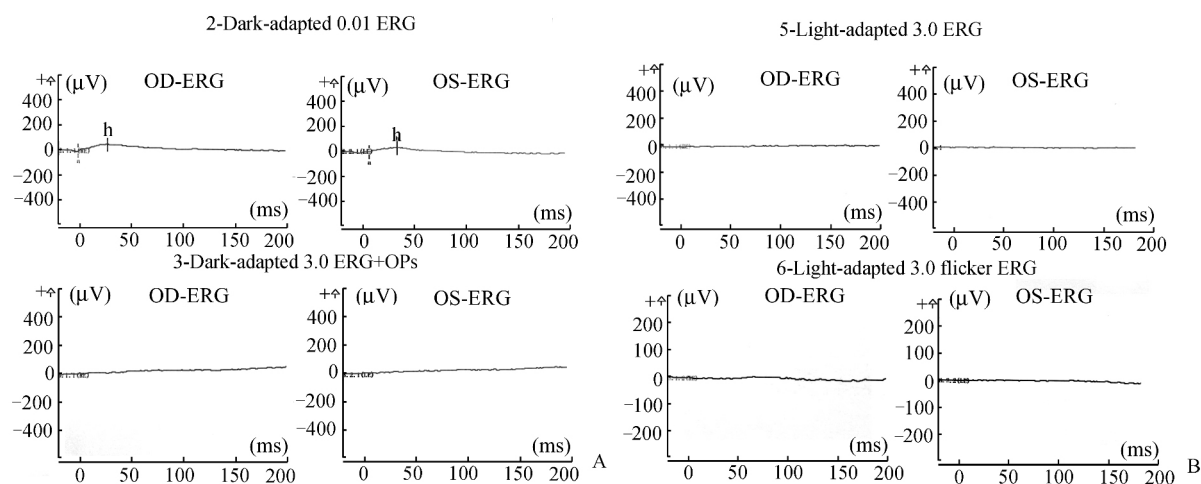


图3 家系B先证者全视野ERG的检查结果

A和B分别为家系B先证者Ⅳ:2的暗适应和明适应结果,提示a、b波振幅均严重降低,接近熄灭状

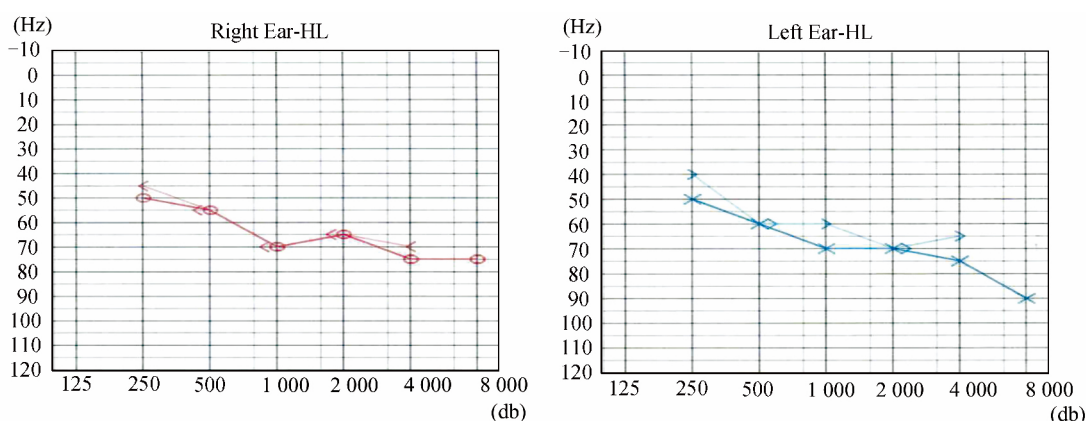


图4 家系B先证者的听力检查结果

家系B先证者Ⅳ:2的听力检查结果提示双耳中度听力障碍

图2E,F)。全视野ERG显示明暗适应时a、b波振幅显著降低,接近熄灭状态,b波潜伏期延长(结果未附录)。

2.3 外显子测序及数据分析 本研究对3例先证者进行了全外显子组测序,平均测序深度为 $60\times$ 。在排除 $MAF\geq 0.01$ 的变异时,从134 999条记录中找到18 581个符合变异。结合RETNET网站上收录的基因,第二步筛选基因后发现233个突变,第三步筛选突变后剩余纯合的突变只有三个,其中一个在X染色体上被排除,一个预测不致病被排除。只有在家系B先证者Ⅳ:2中发现USH2A的突变(c.6875dupG,p. Ala2293fs)符合条件(见图5)。由于是框移突变,现有的预测软件无法预测其致病性。结合家系的病例资料,我们高度怀疑USH2A突变致病的可能性。于是在家系B中进行共分离分析。我们设计了针对该基因的引物。并用Sanger测序

法对该家系2个健康成员和另一患病者的DNA样本进行测序验证。结果在正常未患病家人中也发现这个突变,进一步在我们收集的正常对照中进行测序,同样发现了这个突变,说明这个突变不是致病的突变,故排除该突变致病的可能。

3 讨论

RP可分为非综合征型RP(nonsyndromic RP或typical RP)和综合征RP(syndromic RP),非综合征型RP约占所有病例的65%。在非综合征型RP中,约30%-40%为常染色体显性遗传,50%-60%为常染色体隐性遗传,5%-15%为X连锁遗传。还有20%-30%的RP以综合征的形式表现。可导致RP的综合征有30余种,最常见的有Usher综合征和Bardet-Biedl综合征^[4]。Usher综合征以耳聋和RP为特征的一种常染色体隐性遗传病,是最常见的

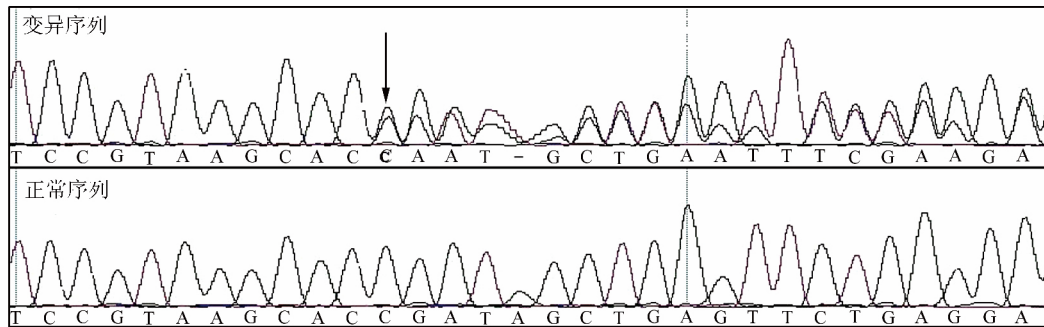


图 5 家系 B 先证者Ⅳ:2 中发现 USH2A 基因的突变(c. 6875dupG, p. Ala2293fs)

上排为发生突变序列,下排为正常对照序列。箭头所指为突变起始点

引起耳聋伴眼盲的疾病。发病率是 1/16 000-1/50 000。该综合征分为 3 型: Usher 综合征 I 型(USH1)、II 型(USH2)、III 型(USH3)^[5]。USH2 型以婴幼儿期出现听力损害和青春期出现视力损害为特征^[6]。在我们收集的 3 个家系中家系 B 的先证者除了有青春期出现的视力损害外,还合并有早期出现的耳聋,可以诊断为 Usher 综合征 II 型。目前已找到 3 个 USH2 的致病基因: USH2A、GPR98 (MIM: 602851) 和 WHRN (MIM: 607928)。USH2A (MIM: 608400) 也是 Usher 综合征 II 型的致病基因,其突变可以解释 19%-23% 的 ARRP 的病因,在美国是最常见的 RP 致病基因^[7]。

在本研究中,通过对 3 个中国土家族常染色体隐性遗传的 RP 家系进行全外显子测序及生物信息学分析,虽然在家系 B 的先证者中找到 USH2A 基因的突变(c. 6875dupG, p. Ala2293fs),但进一步研究不符合家系共分离。因而在这 3 个常染色体隐性遗传的 RP 家系未能找到致病突变。究其原因可能有以下几个方面:①RP 的遗传机制仍未完全阐明。目前,虽然国际上已经鉴定出众多的 RP 致病基因位点。然而这些基因只能解释其中大约 60% 患者的发病。尚有约 40% 的 RP 患者不能被已报道的 RP 致病基因所解释,因此,仍需继续探索未知的 RP 致病基因。②RetNet 基因无法完全涵盖 RP 的致病基因。我们筛查的基因来源于 RetNet 基因网站,目前收录在 RetNet 网站上的 RP 基因有 300 个,有可能家系的致病基因是一个未知的基因,这样突变就无法筛出来。我们发现了一个 USH2A 基因的突变,但不符合家系共分离分析。Xu 等通过全外显子组测序,在 RetNet 基因中有 57.3% 的 RP 先证者发现潜在致病突变,仍有近 40% 的 RP 患者未能发现致病突变。RetNet 基因预测致病变异在 90 个家系中发现有 16 个家系不符合家系共分离^[8]。③全外显子测序也有局限性。我们做的是全外显子测序,外

显子序列只占全基因组序列的 1%。全外显子组测序虽然给遗传性疾病致病基因的检测和分子诊断提供了更广阔的空间,但也存在一些局限性。例如不能覆盖非编码区和基因调节区,不能检测线粒体基因突变,不能检测大片段缺失重复的结构变异,不能检测基因组拷贝数变异和表观遗传学修饰缺陷等。未检测到的突变有可能存在上述基因组缺陷,可进一步做全基因组扫描才能筛到。但是非外显子区段的序列功能很多都未阐明,不足以作为筛选的条件,故未行全基因组扫描。④全外显子组测序发现的变异中也可能存在着未被确认的与疾病相关的新基因。因而这些家系虽未找到突变,但对于寻找 RP 新的致病原因提供了有价值的线索。我们将保留三个家系的所有数据,待 RP 的致病机理得到进一步阐明时做进一步的筛选。

参考文献

- [1] Ali MU, Rahman M, Cao J, et al. Genetic characterization and disease mechanism of retinitis pigmentosa; current scenario[J]. 3 Biotech, 2017, 7(4): 251.
- [2] Ferrari S, Di Iorio E, Barbaro V, et al. Retinitis pigmentosa; genes and disease mechanisms[J]. Curr Genomics, 2011, 12(4): 238-249.
- [3] Berger W, Kloeckener-Gruissem B, Neidhardt J. The molecular basis of human retinal and vitreoretinal diseases[J]. Prog Retin Eye Res, 2010, 29(5): 335-375.
- [4] Hartong DT, Berson EL, Dryja TP. Retinitis pigmentosa[J]. Lancet, 2006, 368(9549): 1 795-1 809.
- [5] Bonnet C, El-Amraoui A. Usher syndrome (sensorineural deafness and retinitis pigmentosa); pathogenesis, molecular diagnosis and therapeutic approaches [J]. Curr Opin Neurol, 2012, 25(1): 42-49.
- [6] Seeliger MW, Fischer MD, Pfister M. Usher syndrome; clinical features, diagnostic options, and therapeutic prospects[J]. Ophthalmologie, 2009, 106(6): 505-511.

(下转第 290 页)

浓度。

总之,这是首次临床研究表明曲马多抑制由 0.3 mg/kg 依托咪酯引起的肌阵挛,且无明显的镇静、呼吸抑制、呕吐等副作用。曲马多能有效降低患者肌阵挛的发生率和严重程度,且预注剂量为 1 mg/kg 的曲马多更能提供稳定的血流动力学。这为临床麻醉静脉诱导提供了参考,是较理想的静脉麻醉选择。

参考文献

- [1] Wu GN, Xu HJ, Liu FF, et al. Low-dose ketamine pretreatment reduces the incidence and severity of myoclonus induced by etomidate: a randomized, double-blinded, controlled clinical trial[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2016,95(6):e2701.
- [2] Doenicke AW, Roizen MF, Hoernecke R, et al. Solvent for etomidate may cause pain and adverse effects[J]. *Br J Anaesth*, 1999,83(3):464-466.
- [3] Huter L, Schreiber T, Gugel M, et al. Low-dose intravenous midazolam reduces etomidate-induced myoclonus: a prospective, randomized study in patients undergoing elective cardioversion[J]. *Anesth Analg*, 2007,105(5):1 298-1 302.
- [4] Abreu M, Aguado D, Benito J, et al. Tramadol-induced hyperalgesia and its prevention by ketamine in rats: A randomised experimental study[J]. *Eur J Anaesthesiol*, 2015,32(10):735-741.
- [5] 曹建平, 徐建国. 曲马多和哌替啶用于全麻后寒战的预防[J]. *中华麻醉学杂志*, 2003,23(3):60-61.
Cao JP, Xu JG. Tramadol and Pethidine for the prevention of shivering after general anesthesia[J]. *Chin J Anesthesiol*, 2003,23(3):60-61.
- [6] Doenicke AW, Roizen MF, Kugler J, et al. Reducing myoclonus after etomidate[J]. *Anesthesiology*, 1999, 90(1):113-119.
- [7] Nooraei N, Solhpour A, Mohajerani SA. Priming with atracurium efficiently suppresses etomidate-induced myoclonus[J]. *Acta Anaesthesiologica Taiwanica*, 2013,51(4):145-148.
- [8] Ri HS, Shin SW, Kim TK, et al. The proper effect site concentration of remifentanyl for prevention of myoclonus after etomidate injection[J]. *Korean J Anesthesiol*, 2011,61(2):127-132.
- [9] El-okdi NS, Lumbrezer D, Karanovic D, et al. Serotonin syndrome after the use of tramadol and ziprasidone in a patient with a deep brain stimulator for Parkinson disease[J]. *Am J Ther*, 2014,21(4):e97-e99.
- [10] He L, Ding Y, Chen H, et al. Dezocine pretreatment prevents myoclonus induced by etomidate: a randomized, double-blinded controlled trial[J]. *J Anesth*, 2015,29(1):143-145.
- [11] Lv Z, Fang J, Zhu J, et al. Intravenous dezocine pretreatment reduces the incidence and intensity of myoclonus induced by etomidate[J]. *J Anesth*, 2014,28(6): 944-947.
- [12] Fassoulaki A, Pateras C, Kaniaris P. Fentanyl in the prevention of etomidate-induced myoclonus[J]. *Cah Anesthesiol*, 1987,35(3):201-202.
- [13] Miyano K, Minami K, Yokoyama T, et al. Tramadol and its metabolite m1 selectively suppress transient receptor potential ankyrin 1 activity, but not transient receptor potential vanilloid 1 activity[J]. *Anesth Analg*, 2015,120(4):790-798.

(2017-05-08 收稿)
编辑 孙孝云

(上接第 268 页)

- [7] Mcgee TL, Seyedahmadi BJ, Sweeney MO, et al. Novel mutations in the long isoform of the USH2A gene in patients with Usher syndrome type II or non-syndromic retinitis pigmentosa[J]. *J Med Genet*, 2010, 47(7): 499-506.
- [8] Xu Y, Guan L, Shen T, et al. Mutations of 60 known causative genes in 157 families with retinitis pigmentosa based on exome sequencing[J]. *Hum Genet*, 2014, 133(10): 1 255-1 271.

(2017-05-11 收稿)
编辑 张峻