

一先天性无虹膜症家系的 PAX6 基因突变研究

孟 岩 苏 亮 宋翔宇 彭园园 黄尚志

摘 要 **目的** 确定一先天性无虹膜症家系的 PAX6 基因致病突变。**方法** 采集先证者及其患病女儿、表型正常父母和弟弟的外周静脉血,提取 DNA,对先证者 PAX6 的全部外显子及外显子内含子接头处进行 PCR 扩增及测序,发现异常后检测其他家庭成员的 PAX6 基因是否存在此改变;选取 PAX6 基因附近的 STR 进行亲缘关系检测和突变来源鉴定。**结果** 患者的 PAX6 基因 c. 219 位缺失一个 T 的 (c. 219delT),造成移码突变,使肽链合成提前终止;其患病的女儿也有同样改变;先证者的父母和弟弟均无此改变。先证者发生突变的等位基因条带来源于其父亲,其弟获得同样的父源基因标记。**结论** 先证者 PAX6 基因的 c. 219delT 改变为致病突变,且为新生突变。

关键词 先天性无虹膜 PAX6 基因 突变 新生突变

Gene Mutation Analysis of PAX6 in a Family with Congenital Aniridia. Meng Yan, Su Liang, Song Xiangyu, Peng Yuanyuan, Huang Shangzhi. Department of Medical Genetics, Institute of Basic Medicine, School of Basic Medicine, CAMS & PUMC, WHO Collaborating Centre for Community Control of Hereditary Diseases, Beijing 100710, China

Abstract Objective To characterize the PAX6 gene mutation in a family with congenital aniridia. **Methods** Blood samples of family members were collected. Mutation was screened by direct sequencing the exons and the flanking introns of PAX6 gene amplified by polymerase chain reaction (PCR). The parental origin of mutation was carried out by STR analysis near PAX6 gene. **Results** A1bp deletion (C. 219 delT) was identified in the proband and her affected daughter, which was not detected in her healthy parents and her young brother. **Conclusion** The c.219delT in PAX6 gene is the cause of congenital aniridia in the family. It was a new mutation and was not reported in the literature.

Key words Congenital aniridia; PAX6 gene; Mutation

先天性无虹膜症 (congenital aniridia, OMIM # 106210) 是一种罕见而严重的先天性眼病,属常染色体显性遗传,外显率极高,但临床表现差异较大。患者主要表现为虹膜部分或完全发育不良,在婴儿早期就可表现为羞明、视敏度下降和眼球震颤,还常伴发其他眼部异常,如白内障、青光眼、角膜混浊、晶体半脱位、视神经发育不良等。其发病率为 (1:64000 ~ 1:96000),无种族和性别差异^[1]。致病基因 PAX6 定位在 11p13,其功能丧失导致先天性无虹膜症的发生,至今已经鉴定出致病突变达 300 种以上^[1]。本研究对一先天性无虹膜症家系的患者进行 PAX6 基因突变检测。

对象与方法

1. 对象:先证者,女性,29 岁。生后 2 ~ 3 天内都不睁眼,

7 ~ 8 个月时出现眼睑下垂、畏光、眼球水平震颤、瞳孔大,看不远,上学后发现视力差。28 岁时双眼视力仅 0.1,在北京协和医院眼科就诊,诊断为先天性无虹膜症伴青光眼、白内障。先证者女儿,7 个月,生后 3 天内不睁眼,后发现羞明、畏光、眼球震颤,与其母婴儿期症状类似。先证者父母及弟弟均健康。患者及参与基因分析的家庭成员均经知情同意。家系图见图 1。

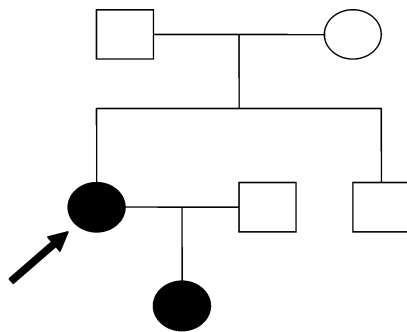


图 1 患者家系图

□ 正常男性 ○ 正常女性 ● 患病女性 ➔ 先证者

基金项目:科技部“十一五”国家科技支撑计划 (2006BIA05A08);北京市科学技术委员会研发攻关类基金 (D0906005040491)

作者单位:100710 中国医学科学院基础医学研究所/北京协和医学院基础学院医学遗传学系/WHO 遗传病社区控制合作中心

通讯作者:黄尚志,电子信箱:hsz_pumc@ibms.pumc.edu.cn

2. 基因组 DNA 提取:抽取外周静脉血 2 ~ 3ml, EDTA 抗凝,用盐析-氯仿法提取基因组 DNA,应用紫外分光光度计进行 DNA 定量,稀释到工作浓度 50 ~ 100ng/μl。

3. 聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 和产物直接测序: 使用 UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu>) 获得 PAX6 基因序列, 参考文献 [2] 合成 PAX6 基因的外显子 5~13 的 PCR 引物, 扩增外显子及两旁侧包含剪接信号的内含子序列。PCR 扩增产物经用纯化后, 用双脱氧末端终止法、ABI3700 测序仪进行 DNA 序列测定, 将测序结果与正常基因组序列进行在线比对, 确定患者突变。

4. 多态性分析: 选择 2 个距 PAX6 基因 1Mb 之内的 STR (D11S1312, D11S2001), 合成引物 1312F: 5' - ACAACACCGTTTTTGCTAA - 3', 1312R: 5' - CTCCTGGAGGTAGGGAGT - 3'; 2001F: 5' - TTGCTTAAGAATGGAAATTCC - 3', 2001R: 5' - TGAAATCACCTAATGGTGGG - 3'。患者及家系成员的 DNA 进行 PCR 扩增, PCR 产物通过变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 分离, 银染显色, 确定先证者发生突变的等位基因的来源。

结 果

1. PAX6 基因突变检测: 对先证者 PAX6 的全部外显子及外显子内含子接头处进行 PCR 扩增及测序, 发现外显子 6 存在异常, 经比对确定为 PAX6 基因 c. 219 位缺失一个 T (c. 219delT), 造成移码突变, 使肽链合成提前终止, 在第 74 位甘氨酸后不仅氨基酸序列发生改变, 还导致肽链在第 79 位氨基酸处提

前终止 (图 2)。此突变未见文献报道。先证者患病的女儿也有同样改变, 而父母和弟弟均无此改变 (第 139 页彩图 1)。

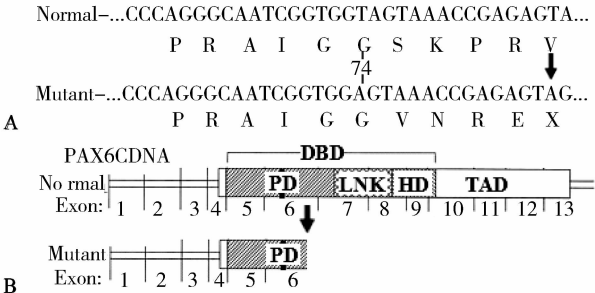


图 2 PAX6 基因突变检测

- A. 患者基因突变造成 PAX 基因碱基序列和氨基酸序列的改变;
- B. 患者突变造成的 PAX6 基因 CDNA 结构区域大部分缺失

2. 突变等位基因的亲源分析: 2 个 STR D11S1312 和 D11S2001 的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳显示, 先证者发生突变的等位基因条带来源于其父亲, 并传给其患病女儿, 其弟也具有此条带 (图 3 箭头所指条带)。以此推断先证者的致病基因突变为新生突变 (new mutation)。

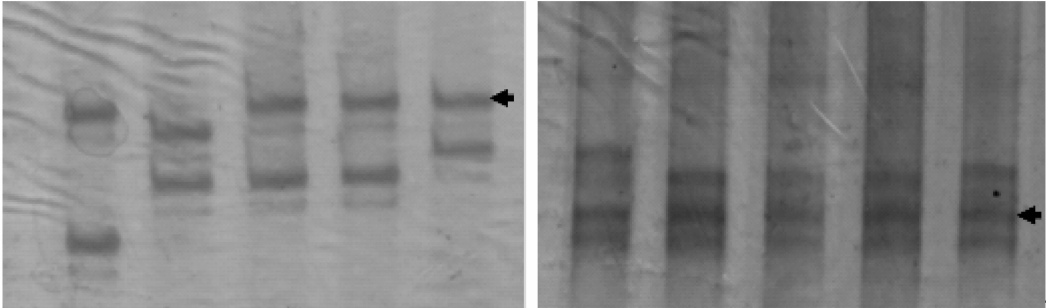


图 3 家系 STR 变性 PAGE 图

左图为 D11S2001, 右图为 D11S1312; 样品从左到右分别为父亲、母亲、先证者、弟弟、先证者女儿

讨 论

人类 PAX6 基因位于 11p13, 全长 22kb, 有 14 个外显子, 编码一个含 422 个氨基酸的转录调控因子, 其 cDNA 的编码区自外显子 4 末至外显子 13, 包含 2 个区域, 即 DNA 连接区 (DNA - binding domain, DBD) 和激活区 (transactivation domain, TAD), DBD 又包含结合域 (paired domain, PD)、连接区 (linker region, LNK) 和同源结构域 (homeodomain, HD), 如图 2 所示 [3]。PAX6 基因是眼球发育的主要控制基因, 在胚胎至成年全过程均有表达, 在物种进化中具有高度保守性 [4,5]。PAX6 基因突变除引起无虹膜症外, 还

可导致晶状体、角膜、视神经和黄斑的病变, 甚至导致个体发育异常 [6]。至今已鉴定的 PAX6 基因突变超过 300 种, 在先天性无虹膜症患者中, 约 75% 为无义突变、移码突变和剪切位点突变造成的肽链合成提前终止, 导致 PAX 蛋白单倍剂量不足而致病 [7]。本研究家系患者由于在外显子 6 中缺失 1 个碱基, 造成移码突变, 使肽链合成过早终止在 PD 区域, 其后续的一部分 PD、全部的 LNK、HD 和 TAD 均缺失, 导致 PAX 蛋白功能丧失, 从而引起患者出现严重的无虹膜症和其他眼部疾患, 这个突变是以往文献中未报道过的, 属新突变。

先天性无虹膜症是常染色体显性遗传病,一般患者的父母中有 1 人患同病,并且后代患病风险为 50%。本研究中的先证者是家族中的第 1 个患者,经 STR 连锁分析后发现,发生突变的等位基因来源于父亲,但由于其父和弟弟(父源等位基因标记与先证者相同)表型正常,测序也未发现异常,因此判断先证者的基因突变为新生突变。先证者将此突变传给女儿,导致女儿患病。此病在常规产前检查时难以发现,因此对先证者的基因突变检测不仅是其确诊的依据,还是其再次生育进行产前诊断以及为家系其他成员进行遗传咨询的基础。

参考文献

- 1 Yuan HP, Kang Y, Shao B, *et al.* Two novel PAX6 mutations identified in northeastern Chinese patients with aniridia. *Molecular Vision*, 2007, 13:1555 - 1561

- 2 陈琳琳,刘红梅,李栋,等. 先天性无虹膜家系 PAX6 基因的突变研究. *眼科新进展*, 2007, 27(6):420 - 423
- 3 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
- 4 Robinson DO, Howarth RJ, Williamson KA, *et al.* Genetic analysis of chromosome 11p13 and the PAX6 gene in a series of 125 cases referred with aniridia. *Am J Med Genet. A*, 2008, 146A(5):558 - 569
- 5 Gehring WJ, Ikeo K. Pax 6: mastering eye morphogenesis and eye evolution. *Trends Genet*, 1999, 15(9):371 - 377
- 6 Dansault A, David G, Schwartz C, *et al.* Three new PAX6 mutations including one causing an unusual ophthalmic phenotype associated with neurodevelopmental abnormalities. *Mol Vis*, 2007, 13:511 - 523
- 7 Tzoulaki I, White MS, Hanson IM. PAX6 mutations: genotype - phenotype correlations. *BMC Genetics*, 2005, 6:27

(收稿:2010 - 04 - 07)

胰岛素抑制自体移植静脉内皮细胞凋亡

边杰芳 周 宁 王 廷 王海昌 高峰

摘 要 目的 探讨胰岛素对移植静脉进行处理是否保护缺血、再灌注的自体移植静脉血管内皮细胞。**方法** 32 只杂种犬施行自体颈静脉 - 颈动脉移植术,术中将取出的移植静脉段分别浸入不同分组的处理液(每组 8 只):肝素生理盐水(vehicle)组(saline;0.9% NaCl;肝素 12500U/L);GIK 组(葡萄糖;250g/L;胰岛素;60U/L;KCl;80mmol/L;肝素 12500U/L);GK 组(葡萄糖;250g/L;KCl;80mmol/L;肝素 12500U/L);GIK 加渥曼青霉素(GIK + Wortmannin)组[处理液同 GIK 组,移植静脉再灌注前 5min 和后 1 ~ 4h 静脉注射渥曼青霉素 2 μ g/(kg · min)]。术后 4h 获取移植静脉段进行凋亡蛋白 caspase - 3 免疫组织化学测定和用末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 原位平端标记法(TUNEL)定性和定量检测内皮细胞凋亡。**结果** 与肝素生理盐水组相比,GK 组增加移植静脉段内皮细胞和血管平滑肌细胞的凋亡($P < 0.001$),而 GIK 组则显著减少凋亡($P < 0.001$),渥曼青霉素则能有效抵抗胰岛素的抗凋亡作用。**结论** 胰岛素对移植静脉段内皮细胞有保护作用,可能对移植静脉再狭窄有一定预防作用。

关键词 移植静脉 再狭窄 胰岛素 凋亡

The Antiapoptotic Effect of Insulin in Endothelial Cells of Autovenous Grafts. *Bian Jiefang, Zhou Ning, Wang Ting, Wang Haichang, Gao Feng. Department of Vascular Surgery, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Shanxi 710032, China*

Abstract Objective This study was aimed at examining whether utilization of insulin exerted protective effect on the ischemic/reperused canine autologous vein graft. **Methods** Thirty - two mongrel dogs were subjected to jugular - carotid interposition bypass grafting, and underwent infusions of vehicle (saline, 0.9% NaCl;heparin, 12500U/L), GIK (glucose, 250g/L; insulin, 60U/L; potassium, 80mmol/L; heparin, 12500U/L), GK or GIK plus wortmannin [i. v, 2.0 μ g/(kg · min) for 1h immediately after reperfusion] 5min before and 4h after reperfusion, respectively ($n = 8$ in each group). All dogs were euthanized at 4h postoperatively to harvest vein grafts. Apoptosis of endothelial cells (ECs) and vascular smooth muscle cells (VSMCs) in vein grafts were measured by active caspase - 3 immunohistochemistry and TUNEL staining. **Results** Compared with vehicle, treatment with GK aggravated the apoptosis of ECs and VSMCs ($P < 0.001$). However, treatment with GIK significantly decreased apoptosis of both ECs and VSMCs ($P < 0.001$). Wortmannin

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30571827)

作者单位:710032 西安,第四军医大学西京医院血管外科(边杰芳、王廷);心血管内科(周宁、王海昌);基础部生理教研室(高峰)

通讯作者:边杰芳,电子邮箱:jfbian@fmmu.edu.cn