

先天性无虹膜家系致病基因的突变检测

耿仁芳¹, 郑洁¹, 周青², 汪渊², 李寿玲¹

摘要 目的 对一常染色体显性遗传的先天性无虹膜(AN)家系进行PAX 6基因突变筛查,以确定其致病基因及致病突变。方法 收集一常染色体显性遗传的AN家系,采集该家系患者、家族健康成员外周静脉血,提取基因组DNA,应用聚合酶链式反应(PCR)方法扩增PAX 6基因 exon 4 ~ exon 13 共 11 个外显子以及外显子-内含子拼接部,将纯化后的PCR扩增产物直接测序,运用DNASar软件(综合性序列分析软件)对测序结果进行序列分析,检测PAX 6基因的突变类型,并与80名随机抽取的与该家系无血缘关系的健康人PAX 6基因序列进行比对。结果 该家系患者PAX 6基因 exon 11 存在一个杂合突变 c. 949 C>T (P. R 317 X),导致第317位精氨酸的密码子CGA被终止密码子UGA替代,造成编码PAX 6蛋白的过早终止,而该家系其他健康成员及

80名与该家系无血缘关系的健康对照组成员均未检测到该突变。结论 PAX 6基因 c. 949 C>T (P. R 317 X)突变导致PAX 6蛋白提前编码终止是该常染色体显性遗传先天性无虹膜家系的致病原因。

关键词 先天性无虹膜; PAX 6基因; 基因突变

中图分类号 R 773.1; R 394.3

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)09-1312-04

先天性无虹膜(OMIM 106210, congenital aniridia, AN)是临床上较为罕见的一种眼畸形疾病,具有遗传性,其发病率为1:64 000~1:100 000^[1]。约2/3的AN病例呈家族性,多为常染色体显性遗传,具有较高外显率,但表现度不一,其余1/3病例呈散发性,无种族和性别差异^[2]。主要临床特征是虹膜组织的退化,表现为双眼虹膜的部分或完全缺失,可合并有眼部或全身其他异常表现,如角膜血管翳、白内障、青光眼、WAGR综合征等^[3]。PAX 6基因为目前该病发现的唯一致病基因,1991年,PAX 6基因便作为AN的候选基因被定位克隆,将其定位

2015-03-13 接收

作者单位:¹安徽医科大学第一附属医院眼科,合肥 230022

²安徽医科大学教育部“重要遗传病基因资源利用”重点实验室(省部共建),合肥 230032

作者简介:耿仁芳,女,硕士研究生;

李寿玲,女,教授,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail: shoulingli@126.com

Expression and significance of IL-12p40 and IL-12p70 in classical Hodgkin lymphoma

Chen Cong^{1,2}, Liu Fang³, Zhang Cong^{1,2}, et al

(¹Dept of Pathology, Anhui Medical University, Hefei 230032; ²The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022; ³Dept of Pathophysiology, Medical College of Foshan University, Foshan 528000)

Abstract Objective To investigate the expression and clinical significance of interleukin-12p40 (IL-12p40) and interleukin-12p70 (IL-12p70) in patients with classical Hodgkin lymphoma (CHL). **Methods** IL-12p40 and IL-12p70 were stained by immunohistochemical EnVision two-step method in 41 cases of CHL, 92 cases of DLBCL and 20 cases of reactive lymphoid hyperplasia (RLH). **Results** The positive rates of IL-12p40 and IL-12p70 were 51.22%, 70.73% in CHL and 0.00%, 4.35% in DLBCL, no expression of IL-12 was observed in RLH. The expression rates of IL-12p40 and IL-12p70 in CHL were significantly higher than that in DLBCL and RLH ($P < 0.05$). There was no significant correlation between IL-12p40 and IL-12p70 with sex, age, bulky disease, B symptom, clinic stage, serum LDH level, and international prognostic score. IL-12p40 was positively correlated with the expression of IL-12p70 in CHL ($P < 0.05$). **Conclusion** The IL-12p40 and IL-12p70 play important roles in the pathogenesis of CHL.

Key words classical Hodgkin lymphoma; diffuse large B-cell lymphoma; IL-12p40; IL-12p70; immunohistochemistry

于人类 11 号染色体短臂 1 区 3 带(11 p 13)^[4]。到目前为止,已鉴定出与 AN 相关的 PAX 6 基因突变方式多达 300 余种,并收录在人类 PAX 6 基因突变数据库(<http://pax6.hgu.mrc.ac.uk>)中。该研究是对一 AN 家系中的 AN 患者进行 PAX6 基因的突变检测,以期确定该家系的分子遗传学的致病原因。

1 材料与方法

1.1 病例资料 选择 2014 年 3 月在安徽医科大学第一附属医院眼科就诊并确诊的一 AN 患者(先证者)进行详细病史询问并确定该患者有家族史,该家系成员均为中国汉族,3 代共 13 名成员,包括 3 名患者(1 名患者已逝)和 10 名正常人,以上家系成员否认近亲婚配史。随机抽取 80 名与该家系无血缘关系的汉族健康人群作为对照。

1.2 研究方法

1.2.1 遗传学调查及样本采集 由经验丰富的眼科专家对该家系 12 名健在成员进行详细病史询问及多项专科检查,如视力(裸眼视力和最佳矫正视力)、角膜、虹膜、晶状体、眼底、眼压等,分析家系遗传特征,并详细绘制家系遗传图谱。遵守世界医学会《赫尔辛基宣言》中涉及人类受试者医学研究的伦理原则和知情同意原则,分别采集该家系患者、家系其他健康成员以及 80 名与该家系无血缘关系的健康对照者的外周静脉血,均为 4 ml,EDTA 抗凝,置于 -86 °C 冰箱中保存备用。

1.2.2 基因组 DNA 的提取 采用经典酚-氯仿提取法提取所有研究对象外周静脉血白细胞基因组 DNA,溶于 TE 缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl 1 mmol/L EDTA pH=8.0)中。检测浓度及纯度合格后,置于 -86 °C 冰箱中保存备用。

1.2.3 引物设计和合成 查询 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)获得 PAX 6 基因序列,根据参考文献^[4-5]合成 PCR 引物,由上海生工生物工程股份有限公司合成,扩增 PAX 6 基因 exon 4 ~ exon 13 共 11 个外显子以及外显子-内含子拼接部,引物序列见表 1。

1.2.4 PCR 扩增目的基因 所有反应均在 PCT-2000 型温度梯度 PCR 仪上进行,以稀释至 20 ng/ μ l 的基因组 DNA 为模板,PCR 反应体系为: Premix Taq (含 Buffer、dNTP Mixture 及 DNA Polymerase) 25 μ l, 上游引物 1 μ l, 下游引物 1 μ l, 模板 DNA 16 μ l, 灭菌蒸馏水 7 μ l, 共 50 μ l。PCR 反应条件: 94 °C 预变性

| 外显子 (exon) | 引物序列(5'-3') | 退火温度 (°C) |
|---------------|------------------------------|--------------|
| 4 | F: TTGGGAGTTCAGGCCTACCT | 58 |
| | R: GAAGTCCCAGAAAGACCAGA | |
| 5 | F: CCTCTCACTCTGCTCTCTT | 60 |
| | R: ATGAAGAGAGGGCGTTGAGA | |
| 5a 和 6 | F: GGGCTACAAATGTAATTTAAGAAA | 60 |
| | R: AGAGAGGGTGGGAGGAGGTA | |
| 7 | F: GTGAGCTGAGATGGGTGA | 60 |
| | R: GACAGGCAAAGGGATGCAC | |
| 8 | F: GGGAAATGTTTTGGTGAGGCT | 62 |
| | R: CAAAGGGCCCTGGCTAAATT | |
| 9 | F: GTAGTCTGGCACAATATGG | 60 |
| | R: GTACTCTGTACAAGCACCTC | |
| 10 | F: GTAGACACAGTGCTAACCTG | 62 |
| | R: CCCGGAGCAAACAGTTTAA | |
| 11 | F: TTAAACCTGTTTGTCCGGG | 61 |
| | R: TTATGCAGGCCACCACCAGC | |
| 12 | F: GCTGTGTGATGTGTTCTCA | 55 |
| | R: TGCAGCCTGCAGAAACAGTG | |
| 13 | F: CATGTCTGTTTCTCAAAGGG | 60 |
| | R: CCATAGTCACTGACTGAATTAACAC | |

4 min; 按 94 °C 变性 30 s, 根据不同引物的退火温度退火复性 35 s, 72 °C 延伸 30 s 的顺序, 循环 35 次; 最后 72 °C 延伸 10 min。PCR 扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶, 恒压 100 V 电泳 30 min 后, 置于 UV 型紫外线透视仪下观察, 产物条带单一、清晰明亮、无杂带、长度符合理论要求才是所需的特异性目的片段。

1.2.5 PCR 产物纯化和序列分析 PCR 扩增产物经由上海生工生物工程股份有限公司纯化后, 在 ABI 3730 XL 测序仪上对其进行双向直接测序, 测序结果采用 DNASTar 软件进行分析。

2 结果

2.1 临床表现 先证者(Ⅲ4): 男性, 6 岁, 双眼矫正视力 0.12, 眼球水平震颤, 角膜透明, 虹膜全部缺失, 右眼晶状体尚透明, 左眼晶状体皮质浑浊, 双侧视网膜颜色正常, 血管走行大致正常, 黄斑部显示欠清, 中心凹反光未见, 眼压正常, 眼前节照片见图 1。

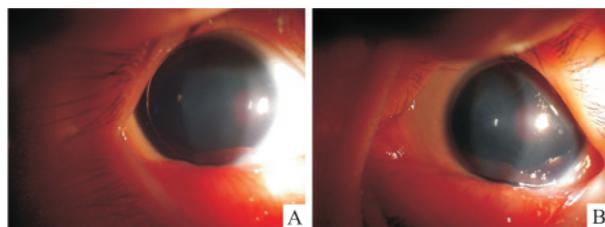


图 1 先证者(Ⅲ4)双眼前节照片
A: 右眼; B: 左眼

先证者母亲(II 3): 女性, 38 岁, 双眼裸眼视力 0.08, 角膜透明, 虹膜缺如, 仅见周边部有少许残余虹膜, 晶状体混浊, 眼底窥不清, 眼压正常, 上述两名患者均未发现全身其他系统并发症。该家系连续 3 代成员中, 每代均有发病者, 其中男性患者 1 名, 女性患者 2 名, 无性别差异, 遗传方式为常染色体显性遗传, 家系图谱见图 2。

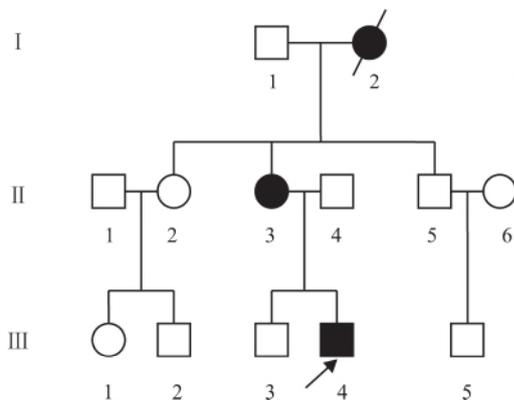


图 2 该 AN 家系系谱图

□: 正常男性; ○: 正常女性; ■: 男性患者; ●: 女性患者; /: 已逝成员; ♂: 先证者

2.2 PAX6 基因突变检测 对所有研究对象 PAX 6 基因进行双向测序, 结合 GenBank 基因组数据库, 采用 DNASTar 软件对测序结果进行对比分析发现, 该家系两名患者(II 3, III 4) 的 PAX 6 基因 exon 11 测序图存在碱基 C 突变为 T 的杂合双峰见图 3, 该突变导致第 317 位精氨酸密码子 CGA 被终止密码子 UGA 替代, 造成编码 PAX 6 蛋白的过早终止。在家系健康成员及 80 名对照组健康人群中未发现该突变。

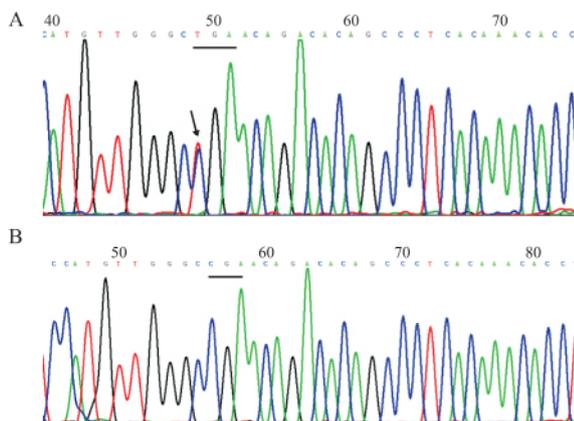


图 3 PAX 6 基因 exon 11 的测序图

A: AN 患者; 箭头所指峰为杂合突变 c. 949 C>T; B: 正常者

3 讨论

PAX 6 基因是眼球发育的主要控制基因, 在角膜、虹膜、晶状体、视网膜、视盘等中均有表达, 研究^[4]证实, PAX 6 基因是 AN 的主要致病基因, PAX 6 突变最普遍的表现就是先天性虹膜缺失, 同时还伴有角膜变性、青光眼、白内障、视盘和黄斑发育不全等其他眼部异常, 甚至导致个体发育异常, 如多趾、足内翻、颅骨发育不全、智力发育不全、Wills 瘤等。PAX 6 基因的突变方式多样, 包括无义突变、移码突变、剪切突变、错义突变、框内缺失或插入突变和连缀突变, 其中以无义突变、移码突变和剪切突变较为多见。在 AN 的分子遗传学研究^[6-7]中, 无虹膜表型的出现多由无义突变、移码突变和剪切突变引起, 该类突变使肽链合成提前终止, 产生截短蛋白, 导致无效等位基因产生, 引起基因单倍剂量不足。研究^[8]表明只要 PAX 6 等位基因突变造成截短蛋白的产生, 不论突变类型和发生在基因中的什么位置, 其表型甚至都是无虹膜。国内外多个研究^[9-10]表明 AN 患者临床表现类型与 PAX 6 基因突变类型间无明显联系, 相同的基因突变类型可导致不同的临床表现, 甚至在同一家系中, 相同突变类型的不同患者间都会存在很大差异。由 PAX 6 基因突变所致的 AN 患者中, 散发性比例占 25%, 遗传学比例可高达 50.5%^[11]。

人类 PAX 6 基因位于第 11 号染色体短臂 13 位点(11 p 13), 全长 33 170 bp, 含 14 个外显子, 其 cDNA 的编码区自 exon 4 末至 exon 13, 编码一个含 422 个氨基酸的转录调控因子。该基因结构至少包括 4 个功能区: 成对结构域(PD, 编码 128 个氨基酸), 同源结构域(HD, 编码 61 个氨基酸), 存在于 PD 与 HD 间的由 78 个氨基酸组成的连接体(LNK), 以及与 HD 羧基端相连的一个富含丝氨酸、脯氨酸和苏氨酸共 153 个氨基酸的转录激活域(TAD), 其中 PD 的氨基末端还包括一个由 14 个氨基酸组成的选择性外显子 5a, exon 5a 使 PD 结合 DNA 的特异性发生改变, PD 氨基端亚结构域不能结合 DNA, 从而转为羧基端亚结构域结合 DNA 而产生不同生物学功能, 可见 exon 5a 具有作为某些指定靶基因的分子开关功能^[6-12]。

在本研究中, 该 AN 家系患者中均发现相同的杂合性 PAX 6 基因 c. 949 C>T (P. R 317 X) 突变, 而家系中健康成员和 80 名健康成员中均未发现此突变, 该突变造成截短蛋白的产生, 即无效等位基因

生成,基因单倍剂量不足,进而导致无虹膜的发生。根据人类基因突变及疾病相关数据库记载,该突变类型已被报道,在多个不同国家和地区的无虹膜家系和散发患者中均有报道,并与 c. 607 C > T 和 c. 718 C > T 列为最普遍的突变热点^[10-11,13],在我国人群中亦有报道^[14-15],该同类突变类型可以导致多种临床表型,所以对 PAX 6 基因功能进一步研究将有助于阐述 PAX 6 突变导致不同临床表型的潜在机制,本研究结果亦支持 c. 949 C > T 为最常见的一种突变。先天性无虹膜的遗传方式主要是常染色体显性遗传,患者后代的发病率高达 50%,此病在常规产前检查中难以发现,所以对有 AN 家族史的孕妇行产前基因检测以预防该病的发生很有必要,可对家系成员再次生育进行产前诊断和遗传咨询,从而预防后代中再次出现患病者有重要意义。

参考文献

- [1] Lee H, Khan R, O'Keefe M. Aniridia: current pathology and management [J]. *Acta Ophthalmol* 2008, 86(7): 708-15.
- [2] Grønskov K, Olsen J H, Sand A et al. Population-based risk estimates of Wilms tumor in sporadic aniridia. A comprehensive mutation screening procedure of PAX 6 identifies 80% of mutations in aniridia [J]. *Hum Genet* 2001, 109(1): 11-8.
- [3] Kokotas H, Petersen M B. Clinical and molecular aspects of aniridia [J]. *Clin Genet* 2010, 77(5): 409-20.
- [4] Glaser T, Walton D S, Maas R L. Genomic structure, evolutionary conservation and aniridia mutations in the human PAX 6 gene [J]. *Nat Genet* 1992, 2(3): 232-9.
- [5] Love J, Axton R, Churchill A et al. A new set of primers for mutation analysis of the human Pax6 gene [J]. *Hum Mutat* 1998, 12(2): 128-34.
- [6] Tzoulaki I, White I M, Hanson I M. PAX 6 mutations: genotype-phenotype correlations [J]. *BMC Genet* 2005, 6: 27.
- [7] Hingorani M, Hanson I, van Heyningen V. Aniridia [J]. *Eur J Hum Genet* 2012, 20(10): 1011-7.
- [8] Ramirez-Miranda A, Zenteno J C. PAX 6 gene intragenic deletions in Mexican patients with congenital aniridia [J]. *Mol Vis* 2006, 12: 318-23.
- [9] Lim H T, Seo E J, Kim G H et al. Comparison between aniridia with and without PAX 6 mutations: clinical and molecular analysis in 14 Korean patients with aniridia [J]. *Ophthalmology* 2012, 119(6): 1258-64.
- [10] Zhang X, Wang P, Li S et al. Mutation spectrum of PAX 6 in Chinese patients with aniridia [J]. *Mol Vis* 2011, 17: 2139-47.
- [11] Neethirajan G, Solomon A, Krishnadas S R et al. Genotype/phenotype association in India congenital aniridia [J]. *India J Pediatr*, 2009, 76(5): 513-7.
- [12] Aauma N, Yamaguchi Y, Handa H et al. Missense mutation in the alternative splice region of the pax6 gene in eye anomalies [J]. *Am J Hum Genet* 1999, 65(3): 656-63.
- [13] Dharmaraj N, Reddy A, Kiran V et al. PAX 6 gene mutations and genotype-phenotype correlations in sporadic cases of aniridia from India [J]. *Ophthalmic Genet* 2003, 24(3): 161-5.
- [14] Chien Y H, Huang H P, Hwu W L et al. Eye anomalies and neurological manifestations in patients with PAX6 mutations [J]. *Mol Vis* 2009, 15: 2139-45.
- [15] Luo F, Zhou L, Ma X et al. Mutation analysis of PAX 6 in a Chinese family and a patient with a presumed sporadic case of congenital aniridia [J]. *Ophthalmic Res* 2012, 47(1): 27-31.

Mutation analysis of the PAX 6 gene in a Chinese family

Geng Renfang¹, Zheng Jie¹, Zhou Qing² et al

(¹Dept of Ophthalmology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

²Laboratory of Molecular Biology, Anhui Province and Key Laboratory of Gene Resource Utilization for Severe Disease Ministry of Education PCR, Hefei 230032)

Abstract Objective To identify the mutation of the PAX 6 gene in a Chinese family with autosomal dominant hereditary congenital aniridia (AN). **Methods** Genomic DNA from peripheral blood of the AN patients was extracted, the relatives of the AN family and the 80 normal controls were extracted. The exons contain exon 4 to exon 13 and the flanking introns of the PAX 6 gene were amplified by PCR and sequenced bi-directionally. The sequencing results were analyzed by DNASTar software. **Results** A heterozygous c. 949 C > T transition in the exon 11 of PAX 6 was detected, which resulted in the substitution of a termination codon for a highly conserved arginine codon (P. R 317 X). It was not detected in the unaffected relatives and unrelated control members. **Conclusion** The heterozygous mutation (c. 949 C > T) of the PAX 6 gene is the pathogenic cause of the AN family.

Key words congenital aniridia; PAX 6 gene; mutation