

# 原发性先天性青光眼 CYP1B1 基因变异初步研究

黄丽娜 姬鹏翔 成洪波 曹玉丽

**【摘要】 目的** 了解 CYP1B1 基因变异在中国原发性先天性青光眼 (PCG) 患者发病中的作用。**方法** 收集来自不同地区的 16 例 PCG 患者, 对其 CYP1B1 基因编码外显子进行直接测序, 对照组进行单核苷酸多态性分析。**结果** 在 1 例 PCG 患者中发现了一种变异, 为 8006G>A (R390H)。它是位于外显子 III 的错义突变。还发现了五种单核苷酸多态性, 分别为 3793T>G, R48G, A119S, A330S, V432L。**结论** CYP1B1 基因是导致中国人 PCG 患者的致病基因, 但也有其他变异可能和 PCG 变异有关。

**【关键词】** 原发性先天性青光眼; CYP1B1 基因; 变异

**Initial study in CYP1B1 gene of primary congenital glaucoma** HUANG Lina, JI Pengxiang, CHENG Hongbo, et al. Shenzhen Ophthalmic Center of Medical College of Jinan University, Shenzhen Eye Hospital, Shenzhen 518001, China

**【Abstract】 Objective** The aim of this study was to understand the role of CYP1B1 (Cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1) mutations in causing primary congenital glaucoma(PCG) in Chinese populations. **Methods** The study included 16 cases of PCG from different district of China. Direct sequencing evaluated the coding and the promoter regions of CYP1B1 in PCG patients. Single strand conformation polymorphism (SSCP) analysis was used in normal groups to screen other mutations. **Result** A pathogenic mutation (8006G>A, R390H) was observed in one case which has been described ever. It is a missense mutation in exon III. And we found five single nucleotide polymerases(snps) in PCG patients, they are 3793T>G, R48G, A119S, A330S, V432L. **Conclusions** The mutation in CYP1B1 cause primary congenital glaucoma in Chinese populations, but other mutations probably relate to PCG.

**【Key words】** Primary congenital glaucoma; Cyp1b1 gene; Mutation

原发性先天性青光眼 (Primary Congenital Glaucoma, PCG) 是一种遗传性的儿童致盲疾病, 治疗效果较差, 且致盲后无法再复明。在我国 6 个省市的 0-6 岁儿童致盲率的普查中, 由 PCG 造成的盲目就占 6.3%<sup>[1]</sup>。而防治 PCG 关键在于通过揭示疾病的致病基因, 进行基因筛查, 减少患病儿的出生。目前, 已确定的 PCG 致病基因是位于染色体 2p21 区的人类细胞色素 P450 基因 (CYP1B1, Cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1)<sup>[2]</sup>。本文对 16 例 PCG 患者进行

CYP1B1 基因变异分析, 结果报告如下。

## 临床资料与实验方法

### 一、临床资料

本研究收集 2004 年 - 2005 年期间暨南大学深圳市眼科中心住院及门诊复诊的确诊 PCG 病例 16 例, 所有对象均接受暨南大学深圳眼科中心两位医生的共同检查。其中男性 12 例, 女性 4 例, 男: 女 = 3: 1。发病年龄 50 天 ~ 11 岁, 平均 4.3 岁。除 2 例外, 其他患者均双眼发病。有家族史者 6 人, 占 37.5%。所有病例父母均非近亲结婚。诊断标准<sup>[3]</sup>: ①眼压升高, 不明原因的畏光流泪、眼睑痉挛; ②角膜直径增大 > 正常值 0.5mm, 可伴有云翳、Haab 线; ③眼底 C/D 比值增大; ④排除合并全身及眼部其他先天或继发异常。正常对照组 1: PCG 直系正

基金项目: 深圳市科技计划项目 编号 200004077

作者单位: 518001 深圳, 暨南大学医学院深圳眼科中心; 深圳市眼科医院

通讯作者: 黄丽娜

常亲属 14 人。正常对照组 2: 住院单纯外眼或眼表疾病患者 20 人, 如倒睫、眼外伤、角膜溃疡等患者, 排除先天性眼部发育异常和先天性青光眼家族史。经所有研究对象同意后, 分别收集 16 例原发性先天性青光眼家族成员和 34 例正常对照组成员的外周静脉血 2mL, 置入 EDTA 抗凝管 1mL × 2 支, 保存在 -80℃ 冰箱。

## 二、实验方法

1. 提取外周血 DNA: 采用上海生物工程有限公司的 UNIQ-10 柱式血液基因组抽提试剂盒。

2. 聚合酶链反应(Polymerase Chain Reaction, PCR) 扩增 CYP1B1 基因具有编码功能的两段外显子序列: 采用大连宝生物工程有限公司的 TaKaRa PCR Amplification Kit 试剂盒。根据 CYP1B1 的已知序列, 设计 3 对引物扩增 CYP1B1 的转录区<sup>[4]</sup>, 扩增产物分别为 786bp, 787bp, 885bp, 由上海生物工程有限公司合成。PCR 反应在 50μl 反应液中进行, 其中包括 10 × PCR Buffer 液 5μl, 正反向引物 (20μM) 1μl, 100μg 基因组 DNA, 1U Taq 多聚酶, dNTP (各 0.1mM) 4μl, 引物 1 和 2 需加 1.5mM 的氯化镁和 10% 二甲基亚砜, 引物 3 需要 2.0mM 的氯化镁。先变性 94℃ 2 分钟后再进行 35-40 个循环, 每个循环包括变性 94℃ 30 秒, 退火 54-56℃ 30 秒, 延伸 72℃ 1 分钟, 最后延伸 72℃ 7 分钟。反应结束后, 2% 的琼脂糖电泳确定扩增产物。

3. 所有 16 例 PCG 患者的扩增产物交与上海生物工程有限公司正反双向测序。测序结果与正常野生型 CYP1B1 基因序列 BLAST 比较 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)(GenBank 号: HSU56438), 评估突变位置与意义。

4. 单链构象多态性分析 (single strand conformation polymorphism, SSCP)。对测序发现的变异片断 3 用限制性核酸内切酶 EcoRII 酶切为 240bp、315bp 及 330bp 片断后与对照组进行 SSCP<sup>[5]</sup> 分析, 判断对照组中是否存在变异。

## 结 果

一、在 16 例 PCG 患者中发现 1 例存在 CYP1B1 基因变异, 为 8006G>A, 密码子由 CGC 变为 CAC, 导致第 390 位氨基酸由精氨酸变为组氨酸, 即 R390H (图 1, 2)。突变率为 1/16=6.25%。

二、变异的 PCG 患者临床特征。

患者, 男性, 无 PCG 家族史, 现年龄 15 岁, 门诊复诊病人, 发病年龄为生后 50 天, 当时以左眼黑



图 1 变异基因 8006G>A (R390H)



图 2 野生型相同位置核苷酸为 G

眼球变白就诊, 入院确诊为 PCG 后行两眼手术治疗。之后左眼因眼压控制不理想又于 1 年后二次手术, 现左眼间断使用一种降眼压药水。目前情况为, 视力右眼 0.2, 左眼手动/眼前; 眼压右眼 16mmHg (1mmHg = 0.133kpa), 左眼 22mmHg; 角膜直径右眼 15mm, 左眼 17mm; 右眼角膜后弹力层线状混浊, 左眼角膜全层混浊; 前房双眼轴深 6CT; 瞳孔右眼 1.5mm × 1.5mm, 虹膜部分后粘连, 光反应消失, 左眼 3mm × 4mm, 光反应消失; 左眼 10 点钟虹膜可见周切口; 眼底杯盘比右眼 0.4, 左眼窥不见。

三、在 16 例 PCG 患者中发现了 5 种单核苷酸多态性 (Single Nucleotide Polymorphism, SNP)。

四、SSCP 分析在对照组 1 和对照组 2 均未发现异常变异。在对照组 2 中随机抽取两名正常人进行 CYP1B1 片断测序, 结果发现上述 5 种 SNP。

表 1 5 种单核苷酸多态性

核苷酸改变	氨基酸改变	纯合型	杂合型	阳性率
3793T>G	内含子	7	6	13/16=81.2%
3947C>G	R48G	2	7	9/16=56.2%
4160G>T	A119S	2	7	9/16=56.2%
4794G>T	A330S	0	16	16/16=100%
8131G>C	V432L	13	3	16/16=100%

## 讨 论

PCG 是指由于胚胎发育异常, 房角结构先天异常而致房水排出障碍所引起的青光眼。主要临床表现为泪溢、畏光及眼睑痉挛, 眼球扩大和视神经乳头凹陷。国际上对先天性青光眼的分类至今尚不一致。我国根据中华医学会第二届全国眼科学术会议的青光眼分类方法<sup>[3]</sup> (1979), 将先天性青光眼分为原发性婴幼儿型青光眼 (primary infantile glaucoma), 青少年型青光眼 (juvenile glaucoma) 及合并其它先天异常的青光眼 (glaucoma associated with developmental disorders) 3 个类型。

PCG 在婴幼儿性青光眼中最为常见。其在人群中的发病率因种族和地域的不同而不同。在普通人群中的发病率约为 1: 10000-20000。沙特阿拉伯人

群和斯洛伐克的吉普赛人群中分别高达 1: 2500<sup>[6]</sup>和 1: 1250。发病率较高的患者往往在近亲婚配的家族中被发现。PCG 遗传方式大多显示是常染色体隐性遗传。但少数家系显示为常染色体假显性遗传。现代的观点倾向于多基因或多因子遗传。男性发病率明显高于女性大约占 65%。75% 的 PCG 患者双眼同时或先后发病。且 80% 在出生后一年内发病。大多数呈单个地发病<sup>[7]</sup>。本研究的 PCG 患者中散发病例占 62.5%，双眼发病率高，且男性发病率明显高于女性，与上述报道接近。

目前所知，与 PCG 有关的染色体位点有 3 个：分别是 GLC3A(2p21)、GLC3B(1p36)和 GLC3C(14q24.3)<sup>[4-7]</sup>。CYP1B1 已被确定为 GLC3A 基因。CYP1B1 由 3 个外显子 (371、1044、3707bp) 和 2 个内含子 (390、3032bp) 组成，编码蛋白为 543 个氨基酸。它是一种单加氧酶，能够催化很多反应 包括药物的代谢及胆固醇、类固醇和其他脂类的合成。这种酶位于内质网上，并参与多环芳香烃和 17-β 雌二醇等前致癌物的代谢。其中，类固醇和花生四烯酸衍生物可能是它的靶物质。Schwartzman 等<sup>[8]</sup>研究表明一种细胞色素 P450 依赖性花生四烯酸代谢物可以抑制角膜上的 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶的活性，参与角膜透明度的调节和房水的分泌。这一发现与角膜混浊、眼压升高这两个原发性先天性青光眼的临床表现是一致的。但其确切的致病机制还不十分清楚。

通过对不同种族人群的家系和散发病例的研究，已经发现了超过 40 种的 CYP1B1 基因变异<sup>[9]</sup>。主要影响 P450 蛋白的 hinge 区和 (或) 保守性核心结构 (CSS)。保守性核心结构位于 P450 蛋白 C 端，包括 4 个螺旋束 (D、I、L 螺旋和反平行的 E 螺旋)，J、K 螺旋，β 片层 1、2，血红素结合区和 “meander” 区。突变的类型可以是错义突变、移码突变、无义突变或大片缺失等多种形式。本研究发现的变异 8006G>A (R390H) 位于 CYP1B1 基因外显子 III，属于错义突变，核苷酸密码子由 CGC 变为 CAC，导致第 390 位氨基酸由精氨酸变为组氨酸，和 Stoilov I 等报道一致<sup>[2]</sup>。此位的精氨酸是 K 螺旋转角的一部分，推测可能构成盐键，共同组成 P450 蛋白的绝对保守的 EXXR 序列，突变为组氨酸后直接影响到 P450 蛋白的保守性核心结构，最终可能影响 P450 蛋白的正常功能。这例病例临床表型严重，手术效果差，预后不良。

单核苷酸多态性 (SNP) 是近年来出现的继第一代限制性片段长度的多态性标记、第二代微卫星即简单的串联重复标记后的第三代遗传标记，它是指单个碱基的缺失、插入以及单个碱基的置换，其中最少的一种在群体的频率不小于 1%，在复杂疾病的基因定位、关联分析、个体疾病易感性分析等的研究中发挥着愈来愈重要的作用。本研究发现的 5 种 SNP 与 Matsumoto 等<sup>[2,10]</sup>发现相同。在 PCG 患者中出现频率较高，分别为 56.2%~100%，与突变是否存在高度连锁还需进一步研究。

总之，CYP1B1 基因突变导致了 PCG 的发生，但本文发现的突变率远比国外低，仅为 6.25%，提示在中国 PCG 人群中可能还存在其他致病基因，需进一步进行相关研究。此外，本研究病例数较少，需进一步收集更多的病例做更深入的研究，以期能加深对 PCG 发病分子机制的了解，为以后能从基因水平诊断和治疗该疾病提供理论依据，最终减少该病的发病率和致盲率。

#### 参 考 文 献

- 1 P Fu, L Yang, SY Bo, et al. A national survey on low vision and blindness of 0-6 years old children in China. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2004; 84: 1545-8
- 2 Stoilov I, Akarsu AN, Alozie I, et al. Sequence analysis and homology modeling suggest that primary congenital glaucoma on 2p21 results from mutations disrupting either the hinge region or the conserved core structures of cytochrome P4501B1. *Am J Hum Genet*, 1998; 62(3):573-584
- 3 李凤鸣主编. 眼科全书. 人民卫生出版社, 1996: 1962-1974
- 4 Ivaylo R, Stoilov Vital P, Costa Jose P.C, et al. Molecular Genetics of Primary Congenital Glaucoma in Brazil. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 2002; 43:1820-1827
- 5 Y Ohtake, T Tanino, Y Suzuki, et al. Phenotype of cytochrome P4501B1 gene (CYP1B1) mutations in Japanese patients with primary congenital glaucoma. *Br J Ophthalmol*, 2003; 87:302-304
- 6 Stoilov I, Akarsu AN, Sarfarazi M. Identification of three different truncating mutations in cytochrome P4501B1 (CYP1B1) as the principal cause of primary congenital glaucoma (Buphthalmos) in families linked to the GLC3A locus on chromosome 2p21. *Hum Mol Genet*, 1997 6:641-7
- 7 周文炳主编. 先天性青光眼. 海天出版社, 1992 10:74-80
- 8 Aklillu E, Oscarson M, Hidestrand M. Function analysis of six different polymorphic CYP1B1 enzyme variants found in an Ethiopian population. *Mol Pharmacol* 2002 61:586-594
- 9 R Sitorus, S M Ardjo, B Lorenz, M Preising. CYP1B1 gene analysis in primary congenital glaucoma in Indonesian and European patients. *Journal of Medical Genetics* 2003 40:e9
- 10 Mashima Y, Suzuki Y, Sergeev Y, et al. Novel cytochrome P4501B1 (CYP1B1) gene mutations in Japanese patients with primary congenital glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2001 42:2211-2216

(收稿时间: 2006-04)