

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.03.003

网络首发 <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20190114.1302.030.html>(2019-01-14)

## 一个共同性外斜视家系基因突变研究\*

李永蓉, 王 慧

(安徽省合肥市第二人民医院眼科 230011)

**[摘要]** **目的** 研究一个共同性外斜视家系中患者的基因突变位点及其发病机制。**方法** 对一个共同性外斜视一家系检查,抽取 4 例患者外周静脉血,及 1 名正常家系成员,3 名非家系健康人外周静脉血作阴性对照,以外周血基因组为模板,通过 PCR 扩增 ARIX 基因外显子、TUBB2b 基因外显子、TUBB3 基因的外显子,并将 PCR 产物纯化后测序。测序结果与 GenBank 公布的基因正常序列进行比对。**结果** 该家系成员在 ARIX 基因无任何外显子突变,而 1 例患者在 TUBB2b 基因外显子存在位点 rs2259136 同义突变,3 例患者在 TUBB3 基因中 3'UTR 区域 rs1135425 位点出现突变。**结论** 共同性外斜视遗传受多因素影响,TUBB3 基因 rs1135425 位点突变可能是引起该家系外斜视的一种原因。

**[关键词]** 外斜视;突变;共同性外斜视家系;ARIX 基因;TUBB2b 基因;TUBB3 基因

**[中图分类号]** R77 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2019)03-0370-04

### Study on genetic mutation in a family of concomitant exotropia\*

LI Yongrong, WANG Hui

(Department of Ophthalmology, the Second People's Hospital of Hefei, Hefei, Anhui 230011, China)

**[Abstract]** **Objective** To study the genetic mutation locus and pathogenesis in a family of concomitant exotropia. **Methods** The examination was performed on a family of concomitant exotropia, peripheral blood was collected from 4 patients, 1 normal family member and 3 non-family normal subjects as the negative control. With the genomic DNA obtained from peripheral blood as the template, the exon in ARIX gene and exon in TUBB2b and TUBB3 genes were amplified by PCR, after purifying the PCR products, the sequencing was performed. Then the sequencing results were compared with the gene normal series published by GenBank. **Results** There was no the exon mutation of ARIX gene in this family; one patient had synonymous mutation at the TUBB2b gene exon site (rs2259136). The mutagenesis occurred in 3 patients at the 3' UTR region rs1135425 in the TUBB3 gene. **Conclusion** Concomitant exotropia is influenced by multiple factors, and the mutation of TUBB3 gene rs1135425 locus might be one of the factors causing concomitant exotropia of this family.

**[Key words]** exotropia; mutation; concomitant exotropia; ARIX gene; TUBB2b gene; TUBB3 gene

斜视是指由于各种原因所致眼外肌作用不平衡,眼位偏斜的一种眼科常见疾病,分为共同性斜视和非共同性斜视。在亚洲人口中,共同性外斜视最常见<sup>[1]</sup>,影响儿童视力发育、双眼融合功能和立体视,目前发病原因尚未明确。共同性外斜视具有较高的遗传性,MATSUO 等<sup>[2]</sup>报道,共同性外斜视遗传性表现为多种基因遗传,并有一些敏感的染色体位点。非共同性外斜视中的先天性眼外肌纤维化(CFEOM)是一种特殊的家族性遗传疾病,为单基因遗传。有研究发现共同性外斜视与非共同性外斜视 CFEOM 有相似的遗传基因突变可能性,ARIX 基因突变与 CFEOM2 有关<sup>[3]</sup>,最新研究发现 TUBB3 基因、TUBB2b 基因

与 CFEOM3 有关<sup>[4]</sup>,本研究在共同性外斜视家系中同时检测 ARIX、TUBB2b、TUBB3 基因,探讨 ARIX、TUBB2b、TUBB3 基因在共同性外斜视遗传中的作用。

#### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 患者 1,女,46 岁;患者 2,男,41 岁。两例患者为同父母姐弟,2014 年 7 月因共同性外斜视来本院行手术治疗。经追查发现一个完整共同性外斜视家系,患者母亲年轻时患有外斜视,已手术矫正。两例患者各有 1 名女儿患有共同性外斜视(隐斜),暂保守观察。所有患者及家系为健康人,均足月顺产,无低出生体质量、无吸氧史、无传染病史,排除家系其

\* 基金项目:安徽省科技攻关计划项目(15011d04057)。 作者简介:李永蓉(1969—),副主任医师,本科,主要从事白内障、青光眼、斜视弱视治疗方面的研究。

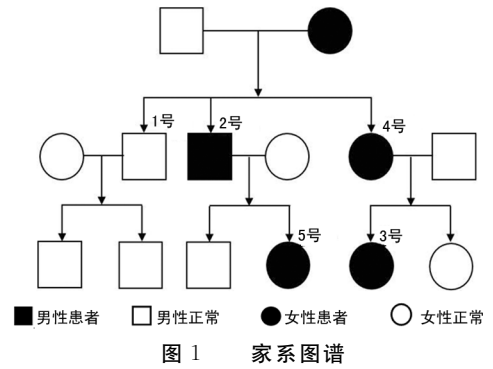
他疾病及遗传性疾病史。

1.2 方法

1.2.1 试验取材 本研究通过本院医学伦理委员会评估(批准号:201439),遵循赫尔辛基宣言,征求患者及家属同意并签署知情同意后,抽取 1 名正常亲属外周静脉血,标记为 1 号,抽取 4 例患者外周静脉血,分别标记为 2、3、4、5 号。1、2、4 号为亲姐弟 3 人,其中 2、4 号为共同性外斜视患者并行斜视矫正手术;3、5 号分别为 4、2 号女儿,患有共同性外隐斜,暂不需治疗。5 人间有血缘关系,采取标本送 ARIX 基因突变检查,并绘制家系图谱(图 1)。另抽取其他 3 名无血缘关系健康人外周静脉血作为阴性对照,分别标记为 6、7、8 号,和上述 5 个标本一起送 TUBB2b 基因、TUBB3 基因突变检查。所有标本采取后存放于-80℃的冰箱中保存,OMEGA 试剂盒,PCR 扩增引物由生工生物工程(上海)有限公司合成。

1.2.2 试验方法 通过对家系患者外周血基因组 DNA 提取、引物合成及 PCR 扩增、纯化产物测序,进行该家系患者 ARIX 基因、TUBB2b 基因及 TUBB3 基因与 Genbank 公布的基因正常序列比对。试验方

法分为基因组 DNA 提取,引物设计及 PCR 扩增,测序 3 步进行。



1.2.2.1 基因组 DNA 提取 外周血液 DNA 的提取:采用 E. Z. N. A.® 血液 DNA 微量提取试剂盒(Omega 公司,美国),按照说明书提取 DNA 后测量基因组 DNA 的浓度和光密度(OD)值(Nanodrop 2000, ThermoFisher 公司,美国)。提取的 DNA 取 2 μL 进行电泳检测。基因组 DNA OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 值为 1.72~2.01,浓度为 40~75 ng/μL,1%琼脂糖凝胶电泳检测显示条带单一,基因组 DNA 于-80℃保存。

表 1 ARIX 基因、TUBB2b 基因、TUBB3 基因外显子引物序列

| 引物名称           | 外显子     | 引物序列(5'-3')           | 扩增长度(bp) |
|----------------|---------|-----------------------|----------|
| ARIX-E01-F     | Exon1   | ATCCAGCTCCACACCTC     | 713      |
| ARIX-E01-R     |         | TCGTATTCTGGGGGTCTCTC  |          |
| ARIX-E02-F     | Exon2   | TGTCTTGCTGGAGTATTGGAT | 663      |
| ARIX-E02-R     |         | GGAGGTAGCCTGGAGCTAAAC |          |
| ARIX-E03-F     | Exon3   | CGAAGGCCCTCCAAGTAGTA  | 720      |
| ARIX-E03-R     |         | ACCGAGGGGTGAGACAGTAG  |          |
| TUBB2b-E01-F   | Exon1   | CCTAGGGCTCGGAGCATTAC  | 427      |
| TUBB2b-E01-R   |         | GCCAGGAAGTCTGCATTTG   |          |
| TUBB2b-E0203-F | Exon2-3 | TGTGAGCCTTGGCGTTTCTG  | 659      |
| TUBB2b-E0203-R |         | GCTTTCCTCTGGCAATCAC   |          |
| TUBB2b-E04-F   | Exon4   | TTGAGGGTTTGAGGTAAG    | 818      |
| TUBB2b-E04-R   |         | CACGAAGTAGCTGCTGTTCT  |          |
| TUBB3-E01-F    | Exon1   | CAGCCCTCCTTTCGAATG    | 469      |
| TUBB3-E01-R    |         | CATCCCTTGTTCAGGTTTC   |          |
| TUBB3-E02-F    | Exon2   | TGAGGGCTAAAAGGCTTCAC  | 313      |
| TUBB3-E02-R    |         | ACCCATGGGAGGACAGAGAT  |          |
| TUBB3-E03-F    | Exon3   | CGGGCACAGAATTCAGAAAG  | 316      |
| TUBB3-E03-R    |         | TTCCACCATTTCAGGATCAT  |          |
| TUBB3-E04-F    | Exon4   | GGAGGTCTGGACTGCAGAGT  | 1 535    |
| TUBB3-E04-R    |         | CTGGGAGAGGATGAGCTCTT  |          |

1.2.2.2 引物设计及 PCR 扩增 设计引物分别扩增 ARIX 基因、TUBB2b 基因及 TUBB3 基因外显子区域。引物由生工生物工程(上海)有限公司合成,PCR 扩增引物见表 1。PCR 扩增反应体系为 20 μL,包括 1 μL 模板 DNA(10~60 ng/μL),10 μL Takara 2×PCR Premix(RR003A),1 μL 引物(2.5 pmol/μL),9 μL ddH<sub>2</sub>O。使用 ABI 公司的 9700 PCR 仪进行 PCR 反应。

ARIX 基因反应程序:95℃ 5 min,(94℃ 45 s,59℃ 45 s,72℃ 45 s)×40 个循环,72℃ 10 min 终止反应。TUBB2b 基因反应程序:95℃ 5 min,(94℃ 30 s,60℃ 45 s,72℃ 30 s)×40 个循环,72℃ 10 min 终止反应。TUBB3 基因反应程序:95℃ 5 min,(94℃ 30 s,62℃ 30 s,72℃ 30 s)×40 个循环,72℃ 10 min 终止反应。PCR 产物经 2.0% 琼脂糖凝胶电泳鉴

定条带均单一。扩增产物按照 PCR 产物回收试剂盒 (OMEGA D2500-01) 说明书的操作步骤进行回收纯化。

**1.2.3 测序** PCR 产物经过琼脂糖检测有目的条带后,由奥美德诺(北京)基因科技有限公司进行切胶纯化双向测序。测序 PCR 的条件为:预变性 96 °C 30 s,95 °C 变性 30 s,退火温度 50 °C 30 s,60 °C 延伸 4 min,25 个循环后,最后 60 °C 延伸 5 min,16 °C 结束反应,纯化后上 3730xl (BigDye Version3.1,美国应用生物系统公司,美国)遗传分析仪器进行测序。应用 DNASTAR 软件分析,并与 Genebank 进行比对。

## 2 结果

**2.1 ARIX 基因测序结果** 与 GenBank 中公布的人野生型 ARIX 基因序列比较,本研究筛查的家系中患者 2、3、4、5 号在 ARIX 基因热点突变区域 NM\_005169.3;c.156C>T (p. Leu52=);c.215C>T (p. Ala72Val);c.217+19C>A 没有出现突变,见图 2。

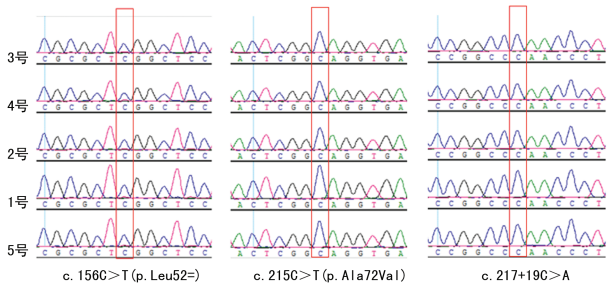


图 2 ARIX 基因热点突变区域突变情况

**2.2 TUBB2b 基因测序结果** 与 GenBank 中公布的人野生型 TUBB2b 基因序列比较,本研究筛查的家系中 2 号患者在 TUBB2b 基因外显子 rs2259136 位点发生同义突变,见图 3。

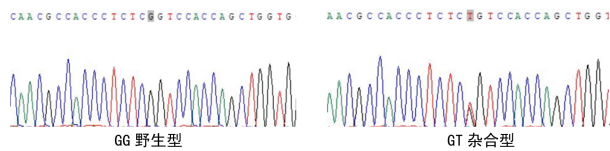


图 3 TUBB2b 基因外显子 rs2259136 位点基因型

**2.3 TUBB3 基因测序结果** 与 GenBank 中公布的人野生型 TUBB3 基因序列比较,本研究筛查的家系中 2、4、5 号患者在 TUBB3 基因 3'UTR rs1135425 位点存在基因突变,见图 4。

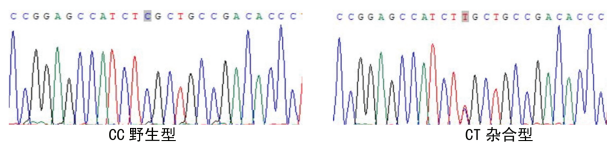


图 4 TUBB3 基因 3'UTR rs1135425 位点基因型

## 3 讨论

共同性外斜视是一种常见的斜视类型,早期表现为外隐斜、间歇性外斜视,最后发展为恒定性外斜视。常发病于幼儿,早期表现不容易被家长所识别,一旦

外斜视从间歇性转变为恒定性,即使手术治疗,恢复双眼单视与立体式的可能性也较小。临床上常见的治疗方式是手术治疗,许多患儿因为多种原因发展到恒定性外斜视时才接受手术治疗,严重影响视功能。因此,对共同性外斜视的发病机制的研究至关重要。

共同性外斜视具有遗传性,国外有研究提出了一些敏感性位点,但无明确的基因定位,日本学者调查了 55 个共同性斜视家庭( $n=258$ ),进行全基因 MOD 评分法分析,发现在一些敏感染色体 4q28.3 和 7q31.2 位点区域,有来源于父亲或母亲的遗传现象<sup>[5]</sup>。GONG 等<sup>[6]</sup>通过研究一对母女都患有间歇性外斜视的患者,在配对基因 PAX3 中发现了 1 种新的杂合突变(c. G434T)。ZHANG 等<sup>[7]</sup>研究表明 MGST2 和 WNT2 是日本患者共同性外斜视敏感性的候选基因。

共同性外斜视发病有家族聚集性特点,LEE 等<sup>[8]</sup>研究发现在兄弟姐妹中有一对患有斜视时,共同性外斜视的发病年龄、屈光状态、临床特征、斜视的亚型都是相同的,也证明了共同性外斜视的遗传特性。MATSUO 等<sup>[9]</sup>研究孪生兄弟或姐妹患有共同性斜视病例中,单卵双生子或三胞胎斜视表现一致性最常见,达 84%,双卵双生或多卵三胎四胞胎的斜视表现一致性较低,其中间歇性外斜视为主要表现形式。

研究表明共同性外斜视的遗传是一个多因素方式,包括遗传和环境因素,最主要的危险因素有早产儿、低出生体质量、早产儿视网膜病变、母亲孕期吸烟、远视和屈光参差、遗传因素等<sup>[10]</sup>。BAGHERI 等<sup>[11]</sup>研究发现,近亲结婚发生共同性外斜视比例比非近亲结婚高。

CFEOM 是一种罕见的常染色体显性遗传性眼肌疾病,临床上主要表现为动眼神经缺陷引起的斜视。赵堪兴<sup>[12]</sup>提出 CFEOM 的发生和 KIF21A 这种驱动蛋白不能输送动眼神经轴突、神经肌肉接头和眼外肌发育所需物质有关,这种斜视是由支配眼球运动的颅神经发育异常导致。OUYANG 等<sup>[13]</sup>研究发现共同性外斜视患者大脑的几个区域脑白质体积明显降低,动眼神经传导异常。2007 年刘桂香等<sup>[14]</sup>发现共同性外斜视的 1 个突变基因——ARIX 基因位于染色体 11q13 上,由 3 个外显子组成,编码 1 个同源结构域翻译因子,对交感神经和与眼位控制有关的脑干运动神经元亚群的传代和生存起关键作用。本研究这个家族性共同性外斜视家系,并没有发现患者有 ARIX 基因外显子的任何突变。

ARIX 基因突变与 CFEOM2 有关,CFEOM 表现为先天性上睑下垂和外斜视,外斜视眼球运动受限可能是由于在运动蛋白 KIF21A 或 tubulin 等类型的 TUBB3 或 TUBB2b 中杂合子错义突变引起的<sup>[15]</sup>。这些基因突变会改变蛋白质的功能,导致运动神经元轴突生长和引导缺陷。日本学者 NAKANO 等<sup>[16]</sup>通

过研究 4 个 CFEOM2 家系,对这些家族成员进行基因测序和突变筛查,发现该家系 ARIX/PHOX 2 A 基因的 3 个纯合子突变与发病密切相关。CFEOM 的 3 种遗传形式被定义为 CFEOM1、CFEOM2 和 CFEOM3。CFEOM2 是一种由转录因子 PHOX2A 中纯合突变引起的神经元规范的常染色体隐性障碍,而 CFEOM1 和 CFEOM3 是轴突诱导的常染色体显性障碍,分别由 KIF21A 和 TUBB3 或 TUBB2b 的杂合突变引起<sup>[17]</sup>。

通过进一步检测本研究这个家系患者的 TUBB2b 基因的外显子,发现 2 号患者在 rs2259136 位点有同义突变,虽并未引起氨基酸改变,但该位点 rs2259136 首次在共同性外斜视患者中发现,其意义值得进一步研究。本家系中 2、4、5 号 3 例共同性外斜视患者,在 TUBB3 基因中发现 3' UTR 区域 rs1135425 位点突变,3' UTR 具有转录调节功能,可与 miRNA 或 RNA 结合影响 mRNA 的稳定性,进而影响基因的转录及翻译,本研究推断 3' UTR 区域 rs1135425 位点改变可能是引起该家系外斜视的病因。

对于共同性外斜视遗传性来说,阐明特定的基因突变仍然是一个巨大的挑战,大多数学者认为其遗传性是由遗传和环境多因素影响的。随着新兴的基因组测序工具的使用,学界可能会产生新的见解,现在斜视的遗传性研究也开始有从研究斜视肌肉分子组成、调控基因表达方向进行的,AGARWAL 等<sup>[18]</sup>研究发现斜视肌的分子组成发生了实质性的改变。未来还会有更多新的研究方向产生,本研究发现的基因突变位置可能是未来研究的基础,了解这些基因突变的作用有助于了解目前尚不清楚的发病机制,这也是本课题组临床研究工作开展的目的。

## 参考文献

- [1] LEE H J, KIM S J, YU Y S. Clinical characteristics of sibling patients with comitant strabismus[J]. *Int J Ophthalmol*, 2017, 10(5): 772-775.
- [2] MATSUO T, YAMANE T, OHTSUKI H. Heredity versus abnormalities in pregnancy and delivery as risk factors for different types of comitant strabismus[J]. *Pediatr Ophthalmol Strabismus*, 2001, 38(2): 78-82.
- [3] YAZDANI A, CHUNG D C, ABBASZADEGAN M R, et al. A novel PHOX2A/ARIX mutation in an Iranian family with congenital fibrosis of extraocular muscles type 2 (CFEOM2) [J]. *Am J Ophthalmol*, 2003, 136(5): 861-865.
- [4] 杨璐, 杨海军, 易敬林, 等. 两个中国籍先天性眼外肌纤维化家系基因定位与临床分型[J]. *眼科新进展*, 2017, 37(12): 1153-1157.
- [5] SHAABAN S, MATSUO T, STRAUCH K, et al. Investigation of parent-of-origin effect in comitant strabismus using MOD score analysis[J]. *Molecular Vision*, 2009, 15(15): 1351-1358.
- [6] GONG H M, WANG J, XU J, et al. Identification of rare paired box 3 variant in strabismus by whole exome sequencing[J]. *Int J Ophthalmol*, 2017, 10(8): 1223-1228.
- [7] ZHANG J, MATSUO T. MGST2 and WNT2 are candidate genes for comitant strabismus susceptibility in Japanese patients[J]. *PeerJ*, 2017, 5(10): e3935.
- [8] LEE H J, KIM S J, YU Y S. Clinical characteristics of sibling patients with comitant strabismus[J]. *Int J Ophthalmol*, 2017, 10(5): 772-775.
- [9] MATSUO T, HAYASHI M, FUJIWARA H, et al. Concordance of strabismic phenotypes in monozygotic versus multizygotic twins and other multiple births [J]. *Jpn J Ophthalmol*, 2002, 46(1): 59-64.
- [10] MACONACHIE G D, GOTTLÖB I, MCLEAN R J. Risk factors and genetics in common comitant strabismus: a systematic review of the literature[J]. *JAMA Ophthalmol*, 2013, 131(9): 1179-1186.
- [11] BAGHERI M, FARVARDIN M, SAADAT M. A study of consanguineous marriage as a risk factor for developing comitant strabismus[J]. *J Community Genet*, 2015, 6(2): 1-4.
- [12] 赵堪兴. 斜视弱视的临床与基础研究[J]. *天津科技*, 2014, 41(3): 19-23.
- [13] OUYANG J, YANG L, HUANG X, et al. The atrophy of white and gray matter volume in patients with comitant strabismus: evidence from a voxel-based morphometry study[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(3): 3276-3282.
- [14] 刘桂香, 赵会元, 孔庆兰, 等. 共同性外斜视的 ARIX 基因多态性研究[J]. *眼科研究*, 2007, 25(1): 57-60.
- [15] WHITMAN M C, ENGLE E C. Ocular congenital cranial dysinnervation disorders (CCDDs): insights into axon growth and guidance[J]. *Hum Mol Genet*, 2017, 26(1): 37-44.
- [16] NAKANO M, YAMADA K, FAIN J, et al. Homozygous mutations in ARIX(PHOX2A) result in congenital fibrosis of the extraocular muscles type 2[J]. *Nature Genet*, 2001, 29(3): 315-320.
- [17] WHITMAN M C, ANDREW C, CHAN W, et al. Two Unique TUBB3 mutations cause both CFEOM3 and malformations of cortical development[J]. *Am J Med Genet A*, 2016, 170(2): 297-305.
- [18] AGARWAL A B, FENG C Y, ALTICK A L, et al. Altered protein composition and gene expression in strabismic human extraocular muscles and tendons[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2016, 57(13): 5576-5585.