

• 临床检验研究论著 •

采用 SNaPshot 方法对中国老年黄斑变性与 C2 和 C3 基因单核苷酸多态性进行相关性研究*

刘小琦^{1,2}

(1. 西南交通大学材料科学与工程学院, 四川成都 610031; 2. 四川省人民医院检验科, 四川成都 610031)

摘要:目的 通过对中国大陆汉族人 C2、C3 基因的多态性进行病例对照研究。探寻补体旁路途径中相关基因变异与老年黄斑变性(AMD)的关系。方法 收集 200 例湿性 AMD 患者, 120 例干性 AMD 患者, 500 例匹配的健康对照, 采用单碱基末端延伸(SNaPshot)方法对其 C2、C3 基因上的各 2 个单核苷酸多态性位点(SNP)进行基因型检测, 并进行关联分析。结果 C2、C3 基因中的 4 个 SNP 位点与中国汉族人的干性和湿性 AMD 没有有显著的相关性($P>0.05$)。结论 C2、C3 基因中的 rs547154、rs9332739、rs2230199 和 rs1047286 位点与中国汉族人的干、湿性 AMD 发生无关。

关键词:老年黄斑变性; C2; C3; 单核苷酸多态性

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.03.012

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)03-0285-03

Association study of the C2 and C3 and age-related macular degeneration in Chinese population by SnaPshot methods*

Liu Xiaoqi^{1,2}

(1. College of materials science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu, Sichuan 610031, China;

2. Department of Clinical Laboratory, Peoples Hospital of Sichuan Province, Chengdu, Sichuan 610031, China)

Abstract: Objective To investigate the association between complement pathway related genes, including CFH and CFB, and age related macular degeneration (AMD) in a Han Chinese population. **Methods** Two hundred patients with wet AMD, 120 patients with soft drusen and 500 matched controls were recruited among Han Chinese in mainland China. Seven single nucleotide polymorphisms (SNPs) in CFH and two SNPs CFB were genotyped using the SNaPshot method. **Results** Four SNPs including rs547154 ($P=0.088$), rs9332739 ($P=0.4343$), rs2230199 ($P=0.5492$) and rs1047286 ($P=0.2884$) in CFH showed no significant association with wet AMD and dry AMD in our cohort. **Conclusion** We demonstrated that rs547154, rs9332739 in C2 and rs2230199, rs1047286 in C3 were not significantly associated with wet and dry AMD in a mainland Han Chinese population as Caucasian population.

Key words: AMD; C2; C3; SNP

老年黄斑变性(age related macular degeneration, AMD)是导致老年人失明的主要疾病, 它表现为视网膜色素上皮细胞、Bruch膜或是黄斑区脉络膜毛细血管等光感受器的慢性进展性病变^[1-2]。其临床和病理特征为 Bruch膜变薄、玻璃疣的形成、网膜上皮细胞病理性改变、感受器萎缩、络膜新生血管形成以及黄斑组织纤维化等, 这些病变导致中心视力的降低^[1-2]。根据临床表现的不同, AMD分为干性和湿性(或渗出型)两种类型, 其中干性占 80%, 表现为视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)内或下层出现疣、RPE不规则或是存在地图样萎缩; 湿性占 20%, 表现为 RPE严重的脱位和(或)脉络膜新生血管生成。AMD晚期表现如地图样萎缩和渗出出血与失明有很强的相关性^[3]。然而在中国汉族人口中, 由于地图样萎缩罕见, 故湿性 AMD已成为导致失明的主要原因。虽然中国目前没有准确的 AMD调查数据, 但据北京人口流行病学调查结果显示, 40岁以上的人群中由于 AMD导致的视力下降和致盲比例分别为 2%和 7.7%^[4]。AMD的发生现已成为导致患者和社会经济负担加重的重要因素, 随着中国的经济发展, 这一问题将更加严重和明显。

尽管 AMD的发病机制仍不完全清楚, 但可明确的是 AMD是一种受多种基因调控和环境影响的多因素疾病^[5-10]。

与补体旁路有关的基因如补体因子 H(complement factor H, CFH)^[11-20]、补体成分 2(complement component 2, C2)^[21-24]、补体因子 B(CFB)^[21-23]和补体成分 3(complement component 3, C3)^[22]等已在不同人群中证实与 AMD有关。与 LOC387715/HTRA1 这一在中国人和日本人等亚裔人群中证实了的与 AMD发生有重要关联的基因位点不同^[25-30], C2和 C3与亚裔人群患 AMD的关系还存在争议^[31-32]。

单碱基末端延伸(SNaPshot)技术主要用于中等通量的单核苷酸多态性 SNP分型。在一个含有测序酶、4种荧光标记的 ddNTP、紧挨多态位点 5'端的不同长度延伸引物和 PCR产物模板的反应体系中, 引物延伸一个碱基即终止, 根据峰的颜色可知掺入的碱基种类, 从而确定该样本的基因型, 根据峰移动的胶位置确定该延伸产物对应的 SNP位点。

为了明确中国人群患 AMD与 C2和 C3易感基因的关系, 笔者在前期工作的基础上挑选了 4个 SNP位点, 采用美国 ABI公司的 SNaPshot方法检测 AMD患者和健康人该 4个 SNP位点, 从而进行一系列相关性研究。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本研究所有病例标本来自于四川省人民医院, 患者来源为四川省城乡居民, 健康对照组为同一地区年龄

* 基金项目: 四川省卫生厅科研基金资助项目(120121)。 作者简介: 刘小琦, 男, 在读博士, 主要从事人类疾病基因研究。

相似的城乡居民。采集标本前均签署了知情同意书。AMD 患者和健康对照者都进行了眼科检查。所有 AMD 对象按国际老年黄斑变性流行病学分类标准分类^[33-34]。黄斑异常的患者根据异常类型、疣的大小和数量、色素沉着过多或不足将 AMD 分为 1~5 级。健康对照人员年龄均大于 60 岁,没有疣和 RPE 色素异常改变等早期 AMD 改变。最后选定了 200 例湿性 AMD、120 例干性 AMD(软疣)和 500 例匹配的健康对照者作为研究对象。所有研究对象基本情况见表 1。

表 1 AMD 和健康对照基本情况

表型分类	n	男(n)	女(n)	年龄(岁)
湿性 AMD	200	86	114	64±3.7
干性 AMD	120	58	62	67±5.5
健康对照	500	223	277	65±8.4

1.2 基因分型 按如下步骤对研究对象的补体相关基因 SNP 和缺失进行基因分型:EDTA 抗凝静脉血,用酚氯仿抽提乙醇沉淀法提取基因组 DNA,再采用 ABI 公司的 SNaPshot

法检测 SNP 位点的基因型。引物设计由 primer3 完成(<http://frodo.wi.mit.edu/>),PCR 试剂采用 Takara 公司 PCR 试剂盒,按基因组 DNA 50 ng,1 μL 10×缓冲液(Takara Bio Inc),正反向引物(10 pmol/μL)各 1 μL,dNTP(2 mmol/L) 0.8 μL,MgCl₂(2.5 mmol/L)0.4 μL,ExTaq 聚合酶(5 U/μL) 0.1 μL,加水至 10 μL 体系配置进行 PCR 反应。PCR 产物参照 ABI 公司的 SNaPshot 方法进行处理,再利用 ABI 公司的 ABI 3130 遗传分析仪和 Genemapper 软件对 C2、C3 基因的各 2 个 SNP 位点进行基因分型。C2 和 C3 基因 SNP 分型中所设计的 PCR 和 SNaPshot 引物如表 2。

1.3 统计学处理 为了检验所测样本的 SNP 结果是否符合总人口分布和基因分型结果是否正确,笔者对每一 SNP 结果进行 Hardy-Weinberg 平衡检验(HWE)。针对每一 SNP 位点,进行了病例组和健康对照组的基因型和等位基因型的频率比较和卡方检验,并计算优势比(OR)值。统计显著性值定义为 $P < 0.05$ 。所有的统计分析运用 SPSS 13.0 软件。

表 2 PCR 和 SNaPshot 引物

基因	引物名称	引物序列(5'~3')
C2	rs547154 正向	AAT AGT GAC ATG CCA GGG TG
	rs547154 反向	ATG AGC TAG GGT CCA AGA AG
	rs547154 SNaPshot 序列	AAG TGA GGG GCA CTG TGT CCA GGT TCC CAA
	rs9332739 正向	GCG TTG CCA TTA TCA CCT TT
	rs9332739 反向	CCT GCA GCA TCT CAG AAT GA
	rs9332739 SNaPshot 序列	CAA AGT CCT CAT GTC TGT CCT GAA CGA CAA CTC CCG GGA TAT GAC TGA
C3	rs2230199 正向	CCT CGC ACC TCC TTC ACA
	rs2230199 反向	TCT GGC TGG CAC CTC AAT
	rs2230199 SNaPshot 序列	AGC CAA CAG GGA GTT CAA GTC AGA AAA GGG G
	rs1047286 正向	GGA GGG ATG GAC CTG AAG C
	rs1047286 反向	GGT GGC AGA CAC GTA CAA AGA
	rs1047286 SNaPshot 序列	GTG CTG AGC CGG AAG GTA CTG CTG GAC GGG GTG CAG AAC C

2 结 果

2.1 单核苷酸多态性分析 如表 2 所示,所有的 SNP 的等位基因结果均通过 Hardy-Weinberg 平衡检验,这说明基因分型结果无明显错误,且这些 SNP 的基因型符合人群分布,研究样本是随机的无地区差异。研究结果显示:C2 基因中的 SNP 位点 rs547154 与干性、湿性 AMD 没有明显的相关性(P 值分别为 0.088 0 和 0.410 3),rs9332739 也与干性、湿性 AMD 没有明显的相关性(P 值分别为 0.434 3 和 0.356 0)。C3 基因中的 SNP 位点 rs2230199 与干性、湿性 AMD 没有明显的相关性(P 值分别为 0.549 2 和 0.210 8),rs1047286 也与干性、湿性 AMD 没有明显的相关性(P 值分别为 0.288 4 和 0.190 2)。由于 P 值均大于 0.05,故不进行 OR 值的计算。具体见表 3。

2.2 连锁不平衡和单倍体相关性分析 连锁不平衡和单倍体相关性采用 Haploview 软件进行分析。SNP 之间两两配对连锁不平衡显示 C2 基因中 rs547154 和 rs9332739 位于不同同一个连锁不平衡区($D' = 0.64$),C3 基因中 rs2230199 和 rs1047286 也位于不同同一个连锁不平衡区($D' = 0.32$)。

表 3 中国汉族人群 AMD 与 C2、C3 变异的相关性

基因	SNP	表型分类	Allele 频率	HWE	Allelic P 值	
C2	rs547154	湿性 AMD	0.062	0.632	0.088 0	
		(A)	干性 AMD	0.071	0.536	0.410 3
		健康对照	0.078	0.376		
	rs9332739	湿性 AMD	0.017	0.892	0.434 3	
		(C)	干性 AMD	0.031	0.944	0.356 0
		健康对照	0.023	0.920		
C3	rs2230199	湿性 AMD	0.02	0.744	0.549 2	
		(G)	干性 AMD	0.01	0.932	0.210 8
		健康对照	0.010	0.552		
	rs1047286	湿性 AMD	0.006	0.828	0.288 4	
		(T)	干性 AMD	0.003	0.880	0.190 2
		健康对照	0.005	0.762 0		

3 讨 论

AMD 是一种复杂疾病,发病起因、过程和各种并发症对 AMD 的影响都不是十分清楚,因此对 AMD 进行分类的过程

是很复杂的,每个患者的病理情况不尽相同,甚至受各种并发症干扰。这种干扰会直接导致结果的偏差。本研究在研究分类时参考了 AMD 流行病学研究组所推荐的方法,其主要特点是根据黄斑区玻璃疣的大小和数量、着色过度还是着色不足等,可以把患者大体分为中国汉族人湿性 AMD(主要是 CNV)和中国汉族人干性 AMD(主要是玻璃疣)。

有报道认为 C2 和 C3 基因与白人 AMD 有关联^[21-24],但对韩国人群的研究发现 C2、C3 基因的这 4 个 SNP 位点与湿性 AMD 患者和对照组之间没有显著差异^[35]。为了明确中国人患 AMD 与 C2 和 C3 易感基因的关系,本研究对 C2 基因的 2 个 SNP (rs547154 和 rs9332739), C3 基因的 2 个 SNP (rs2230199 和 rs1047286)采用 SNaPshot 方法对其与 AMD 的关联性进行了研究。

SNaPshot 技术由美国应用生物公司 (ABI) 开发,主要针对中等通量的 SNP 分型项目。该技术跟其他 SNP 分型技术 (RFLP、Taqman、SNPstream 等) 相比的优势在于: (1) 分型准确; (2) 多位点同时检测; (3) 不受 SNP 位点多态特性限制; (4) 可以检测出受污染的样本。所以本实验采用了该先进的方法检测 C2 和 C3 的 4 个 SNP 基因型。

C2 基因的 2 个 SNP 位点 (rs547154、rs9332739) 和 C3 基因的 2 个 SNP 位点 (rs2230199、rs1047286) 无论是中国汉族人干性 AMD 还是中国汉族人湿性 AMD 的 *P* 值均大于 0.05。也就是说从单个 SNP 位点进行分析,均无统计学差异,即 C2 基因与中国汉族人 AMD 不存在相关性。健康人群中该 4 个 SNP 结果和 NCBI 中 HapMap-HCB(中国汉族北京人,健康对照, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>) 数据较为接近。可以得出结论: C2 基因不是中国汉族人的主效致病基因。这可能与这些 SNP 在中国人群中变异很少 (<5%) 有关。尽管 C2、CFB、C3 可能与中国人群 AMD 无关,但是仍不能排除这些基因中其他可能存在 SNP 与 AMD 有关,这将是本课题组下一步的研究内容。本研究和其他研究所存在的观点差异,除了受人种的遗传背景、环境因素的影响之外,这种分类的差异也是一个较为重要的影响因素。

总之,本研究证实 C2 和 C3 中的 rs547154、rs9332739 和 rs2230199、rs1047286 这 4 个 CFH 的 SNP 位点变异与中国汉族人患干、湿性 AMD 没有有显著的关联。然而与 LOC387715/HTRA1 突变导致 AMD 不同,补体旁途径中的基因突变与 AMD 的发生关联性在中国人以及其他亚裔人群中不如白种人的关联性大。

参考文献

- [1] de Jong PT. Age-related macular degeneration[J]. *N Engl J Med*, 2006, 355(14): 1474-1485.
- [2] Klein RJ, Zeiss C, Chew EY, et al. Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration[J]. *Science*, 2005, 308(5720): 385-389.
- [3] Allikmets R, Shroyer NF, Singh N, et al. Mutation of the stargardt disease gene (ABCR) in age-related macular degeneration[J]. *Science*, 1997, 277(5333): 1805-1807.
- [4] Xu L, Wang Y, Li Y, et al. Causes of blindness and visual impairment in urban and rural areas in Beijing: the Beijing Eye Study [J]. *Ophthalmology*, 2006, 113(7): e1-11.
- [5] Swaroop A, Branham KE, Chen W, et al. Genetic susceptibility to age-related macular degeneration: a paradigm for dissecting com-

- plex disease traits[J]. *Hum Mol Genet*, 2007, 16(2): R174-182.
- [6] Haddad S, Chen CA, Santangelo SL, et al. The genetics of age-related macular degeneration: a review of progress to date[J]. *Surv Ophthalmol*, 2006, 51(4): 316-363.
- [7] Seddon JM, George S, Rosner B, et al. CFH gene variant, Y402H, and smoking, body mass index, environmental associations with advanced age-related macular degeneration[J]. *Hum Hered*, 2006, 61(3): 157-165.
- [8] Francis PJ, George S, Schultz DW, et al. The LOC387715 gene, smoking, body mass index, environmental associations with advanced age-related macular degeneration[J]. *Hum Hered*, 2007, 63(3/4): 212-218.
- [9] Seddon JM, George S, Rosner B. Cigarette smoking, fish consumption, omega-3 fatty acid intake, and associations with age-related macular degeneration: the US twin study of age-related macular degeneration[J]. *Arch Ophthalmol*, 2006, 124(7): 995-1001.
- [10] Moshfeghi DM, Blumenkranz MS. Role of genetic factors and inflammation in age-related macular degeneration[J]. *Retina*, 2007, 27(3): 269-275.
- [11] Zarepari S, Branham KE, Li M, et al. Strong association of the Y402H variant in complement factor H at 1q32 with susceptibility to age-related macular degeneration[J]. *Am J Hum Genet*, 2005, 77(1): 149-153.
- [12] Klein RJ, Zeiss C, Chew EY, et al. Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration[J]. *Science*, 2005.
- [13] Haines JL, Hauser MA, Schmidt S, et al. Complement factor H variant increases the risk of age-related macular degeneration[J]. *Science*, 2005.
- [14] Hageman GS, Anderson DH, Johnson LV, et al. A common haplotype in the complement regulatory gene factor H (HF1/CFH) predisposes individuals to age-related macular degeneration[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(20): 7227-7232.
- [15] Edwards AO, Ritter R, Abel KJ, et al. Complement factor H polymorphism and age-related macular degeneration [J]. *Science*, 2005, 308(5720): 421-424.
- [16] Li M, Atmaca-Sonmez P, Othman M, et al. CFH haplotypes without the Y402H coding variant show strong association with susceptibility to age-related macular degeneration [J]. *Nat Genet*, 2006, 38(9): 1049-1054.
- [17] Maller J, George S, Purcell S, et al. Common variation in three genes, including a noncoding variant in CFH, strongly influences risk of age-related macular degeneration[J]. *Nat Genet*, 2006, 38(9): 1055-1059.
- [18] Hu J, Yuan Y, Shen L, et al. Age-related macular degeneration-susceptibility single nucleotide polymorphisms in a han chinese control population[J]. *Ophthalmic Epidemiol*, 2011, 18(3): 137-142.
- [19] Yucel D, Yilmaz M, Durukan AH, et al. Association of CFH Y402H polymorphism with both forms of advanced age-related macular degeneration in Turkish patients[J]. *Ophthalmic Genet*, 2012, 33(3): 144-149.
- [20] Wright AF. A rare variant in CFH directly links age-related macular degeneration with rare glomerular nephropathies [J]. *Nat Genet*, 2011, 43(12): 1176-1177.
- [21] Gold B, Merriam JE, Zernant J, et al. Variation in factor B (BF) and complement component 2 (C2) genes is associated with age-related macular degeneration[J]. *Nat Genet*, 2006, 38(4): 458-462.

显示所有菌株均扩增出目的基因,表明其固有存在,但多重耐药株的检出水平显著高于敏感株,证明 MexAB-OprM 主动外排系统与铜绿假单胞菌多重耐药性密切相关。

L-酚丙氨基-L-氨基酰-β-萘胺(MC-207,110)为广谱外排泵抑制剂,对铜绿假单胞菌引起临床耐药的 4 类主要的外排泵(MexAB-OprM、MexCD-OprJ、MexEF-OprN 和 MexXY-OprM)均有抑制作用^[8],因此其可较好地选出外排表型阳性的铜绿假单胞菌。本次检测的 13 株重药耐药菌株中 9 株外排表型阳性,占 69.2%,与张鹏和姚慧林^[9]报道的 66.7%(24/36)相近,弱高于夏景洋等^[10]报道的 61%(50/82),说明主动外排在多药耐药铜绿假单胞菌中普遍存在,其中 6 株 mexB 基因 mRNA 相对表达量高于野生株铜绿假单胞菌,可认为 MexAB-OprM 表达的增加是这些菌株耐药的主要原因,但也存在其他主动外排系统。近年来研究发现,mexR 是 MexAB-OprM 的负调控基因^[11],当其突变时,可导致 MexAB-OprM 去抑制而表达增强,从而形成获得性耐药。为了进一步研究 MexAB-OprM 高表达的机制,本实验扩增了 6 株 MexAB-OprM 高表达菌株的 mexR 基因,并对产物进行测序,发现其中有 5 株 mexR 发生变异,均发生点突变,出现了氨基酸替换,氨基酸的替换和插入都可能会影响阻遏蛋白 MexR 的结构,使其不能与操纵子结合,从而导致主动外排泵 MexAB-OprM 的高表达,导致对多种抗菌药物的耐药^[12]。mexR 基因发生突变的 5 株铜绿假单胞菌,其 mexB 相对表达量都高于野生株。因此 mexR 基因的突变导致了这些菌株 MexAB-OprM 表达的增强。另外 1 株没有发生 mexR 突变的铜绿假单胞菌,表明这些菌株中存在其他机制导致了 MexAB-OprM 的高表达。

这 5 株 mexR 突变为相同位点,是否有同源性,有待进一步作分子流行病学调查。

参考文献

[1] 鲍红荣. 医院铜绿假单胞菌的分布与耐药性变迁分析[J]. 中华医

院感染学杂志,2010,20(4):573-575.
[2] 陈日炳,胡琴. 深圳东部地区临床常见病原菌分布及铜绿假单胞菌的耐药性分析[J]. 国际检验医学杂志,2010,31(11):1276-1277.
[3] 胡会平. 重症监护病房铜绿假单胞菌的分布及耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志,2010,20(1):107-108.
[4] 陈键. 重症监护病房老年患者感染铜绿假单胞菌的耐药性分析[J]. 国际检验医学杂志,2011,32(16):1826-1827.
[5] Jo JT, Brinkman FS, Hancock RE. Aminoglycoside efflux in pseudomonas aeruginosa: Involvement of novel outer membrane proteins [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2003, 47(3): 1101-1111.
[6] 吴春明,李洪涛,覃慧敏,等. 建立 SYBR Green 实时 RT-PCR 定量方法检测铜绿假单胞菌 MexAB-OprM mRNA 水平[J]. 中华医院感染学杂志,2007,17(11):1349-1352.
[7] 施凯舜,潘发愤. 铜绿假单胞菌耐药研究进展[J]. 浙江医学,2008,30(20):199-202.
[8] 骆俊,朱德妹. 铜绿假单胞菌对碳青霉烯类抗生素耐药机制的研究进展[J]. 中国感染与化疗杂志,2008,8(1):76-79.
[9] 张鹏,姚慧琳. 铜绿假单胞菌主动外排表型及 OprM 基因检测[J]. 国际检验医学杂志,2010,31(6):538-539.
[10] 夏景洋,何刘媛,陈建江. 多药耐药铜绿假单胞菌的 MexAB-OprM 表达水平研究[J]. 中华医院感染学杂志,2011,21(2):221-223.
[11] Poole K, Tetro K, Zhao O, et al. Expression of the multidrug resistance operon mexA-mexB-oprM in pseudomonas aeruginosa: mexR encodes a regulator of operon expression[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1996, 40(9): 2021-2028.
[12] 魏志华,沈继录,徐元宏. 多药耐药铜绿假单胞菌 MexAB-OprM 主动外排系统的耐药作用[J]. 中华医院感染学杂志,2010,20(9):1205-1207.

(收稿日期:2012-09-01)

(上接第 287 页)

[22] Yates JR, Sepp T, Matharu BK, et al. Complement C3 variant and the risk of age-related macular degeneration[J]. N Engl J Med, 2007, 357(6): 553-561.
[23] Maller JB, Fagerness JA, Reynolds RC, et al. Variation in complement factor 3 is associated with risk of age-related macular degeneration[J]. Nat Genet, 2007, 39(10): 1200-1211.
[24] Thakkinstian A, McEvoy M, Chakravarthy U, et al. The association between complement component 2/complement factor B polymorphisms and age-related macular degeneration: a HuGE review and meta-analysis[J]. Am J Epidemiol, 2012, 176(5): 361-372.
[25] Dewan A, Liu M, Hartman S, et al. HTRA1 promoter polymorphism in wet age-related macular degeneration[J]. Science, 2006, 314(5801): 989-992.
[26] Lu F, Hu J, Zhao P, et al. HTRA1 variant increases risk to neovascular age-related macular degeneration in Chinese population [J]. Vision Res, 2007, 47(24): 3120-3123.
[27] Lin JM, Wan L, Tsai YY, et al. HTRA1 polymorphism in dry and wet age-related macular degeneration [J]. Retina, 2008, 28(2): 309-313.
[28] Tam PO, Ng TK, Liu DT, et al. HTRA1 variants in exudative age-related macular degeneration and interactions with smoking and CFH[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2008, 49(6): 2357-2365.
[29] Yoshida T, DeWan A, Zhang H, et al. HTRA1 promoter polymor-

phism predisposes Japanese to age-related macular degeneration [J]. Mol Vis, 2007, 13: 545-548.
[30] Kondo N, Honda S, Ishibashi K, et al. LOC387715/HTRA1 variants in polypoidal choroidal vasculopathy and age-related macular degeneration in a Japanese population [J]. Am J Ophthalmol, 2007, 144(4): 608-612.
[31] Chen Y, Zeng J, Zhao C, et al. Assessing susceptibility to age-related macular degeneration with genetic markers and environmental factors[J]. Arch Ophthalmol, 2011, 129(3): 344-351.
[32] Liu X, Zhao P, Tang S, et al. Association study of complement factor H, C2, CFB, and C3 and age-related macular degeneration in a Han Chinese population[J]. Retina, 2010, 30(8): 1177-1184.
[33] Yang Z, Camp NJ, Sun H, et al. A variant of the HTRA1 gene increases susceptibility to age-related macular degeneration[J]. Science, 2006, 314(5801): 992-993.
[34] Bird AC, Bressler NM, Bressler SB, et al. An international classification and grading system for age-related maculopathy and age-related macular degeneration. The international ARM epidemiological study group[J]. Surv Ophthalmol, 1995, 39(5): 367-374.
[35] Kim SJ, Lee SJ, Kim NR, et al. Association of polymorphisms in C2, CFB and C3 with exudative age-related macular degeneration in a Korean population[J]. Exp Eye Res, 2012, 96(1): 42-47.

(收稿日期:2012-08-09)