

• 论 著 •

视网膜色素变性患者 RP1 基因突变位点与临床表型相关性初探

崔福玲¹, 孟令强², 王 静³, 马志国^{4△}

1. 山东省滨州市人民医院康复医学科, 山东滨州, 256610; 2. 山东省东营市中医院检验科, 山东东营 257000; 山东省德州市人民医院; 3. 眼科; 4. 检验科, 山东德州 253000

摘要:目的 探索视网膜色素变性 1 基因(RP1)的新突变及其与特殊临床表型的相关性。方法 将 2018 年 1 月至 2019 年 7 月在山东省滨州市人民医院眼科确诊的视网膜色素变性的 25 个家系的 86 例患者纳入研究, 收集临床相关资料。采用高通量二代基因测序对患者及家系样本进行基因测序, 用 Sanger 验证确认基因变异位点, 并进一步分析患者相关致病基因变异与临床表型。最后用 Next GENE5. 4. 5 分析软件分析基因变异与特殊临床表型的相关性。**结果** 在本研究纳入的 25 个家系先证者中, 检出 RP1 基因中有 9 个未报道致病基因突变位点, 即 c. 1419_1420delTG、c. 2886delA、c. 4129delG、c. 4168_4169insT、c. 4169A>G、c. 4196delG、c. 6353G>A、c. 2624A>T、c. 5699C>T。患者表现为黄斑严重萎缩、动脉血管萎缩明显等特殊临床表型。**结论** 发现中国人群中视网膜色素变性 RP1 基因中 9 个未报道致病基因突变位点。

关键词: 视网膜色素变性 1 基因; 二代基因测序技术; 视网膜色素变性

DOI:10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2022. 02. 021 **中图法分类号:**R774. 1

文章编号:1673-4130(2022)02-0234-05 **文献标志码:**A

Preliminary study on the correlation between RP1 gene mutation and clinical phenotype in patients with retinitis pigmentosa

CUI Fuling¹, MENG Lingqiang², WANG Jing³, MA Zhiguo^{4△}

1. Department of Rehabilitation Medicine, Binzhou People's Hospital, Binzhou, Shandong 256610, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Dongying Hospital of Traditional Chinese Medicine, Dongying, Shandong 257000, China; 3. Department of Ophthalmology; 4. Department of Clinical Laboratory, Dezhou People's Hospital, Dezhou, Shangdong 253000, China

Abstract: **Objective** To explore the correlation between genotype of new variants of retinitis pigmentosa-1 gene (RP1) in retinitis pigmentosa and specific clinical phenotypes in Chinese population. **Methods** A total of 86 patients from 25 families with retinitis pigmentosa diagnosed in Shandong Binzhou People's Hospital from January 2018 to July 2019 were recruited in the study. Clinical data were collected and analyzed. High-throughput Next-Generation Sequencing technology was used to sequence the genes of patients and family samples. Sanger verification was used to confirm the gene variation sites, and the related pathogenic gene variation and clinical phenotype of patients were further analyzed. Finally, Next GENE5. 4. 5 analysis software was used to analyze the correlation between gene variation and special clinical phenotype. **Results** Among the 25 proband in this study, 9 likely pathogenic variants was found in RP1 gene, namely c. 1419_1420delTG, c. 2886delA, c. 4129delG, c. 4168_4169insT, c. 4169A>G, c. 4196delG, c. 6353G>A, c. 2624A>T, c. 5699C>T. The patient showed special clinical phenotypes such as severe macular atrophy, obvious arterial atrophy and so on. **Conclusion** Nine new likely pathogenic mutations in RP1 gene in Chinese pupoltaion are found.

Key words: retinitis pigmentosa-1 gene; Next-Generation Sequencing; retinitis pigmentosa

视网膜色素变性是视网膜变性里最常见的一组以进行性光感受器细胞及视网膜色素上皮功能丧失为共同表现的致盲性眼病, 在临床表型和潜在的遗传缺陷方面具有很强的异质性^[1]。RP 发病率为 1/3 500~1/5 000, 影响全球约 150 万人^[2]。近年来视网膜色素变性基因的发现主要依靠二代测序技术,

二代测序技术能够并行测序所有已知的相关基因, 从预选的基因组区域产生数百万个读数^[3]。有研究发现, 所有突变患者发病年龄均在 21 岁以下, 提示可能没有必要对 50 岁以上的患者进行常规筛查^[4]。本研究对本院临床确诊为视网膜色素变性的人群进行二代测序技术测序和 Sanger 验证, 分析总结视网膜色

作者简介: 崔福玲, 女, 主管护师, 主要从事遗传性疾病方面的研究。△ 通信作者, E-mail: zhgm2008@163. com。
本文引用格式: 崔福玲, 孟令强, 王静, 等. 视网膜色素变性患者 RP1 基因突变位点与临床表型相关性初探[J]. 国际检验医学杂志, 2022, 43(2): 234-238.

素变性的视网膜色素变性 1 基因(RP1 基因)突变及其引起的特殊临床表现特征,为后续临床确诊和遗传咨询等工作提供帮助。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本研究采用横断面研究设计。将 2018 年 1 月至 2019 年 7 月在山东省滨州市人民医院确诊的视网膜色素变性 25 个家系共 86 例患者纳入本研究。纳入标准:(1)夜盲史;(2)视力逐渐下降;(3)典型眼底改变,视盘呈蜡黄色萎缩,视网膜有骨细胞样色素沉着,血管变细,视网膜呈青灰色;(4)早期周边视野呈环形暗点,晚期视野呈向中心缩窄;(5)病变早期即可出现视网膜电图(ERG)、眼电图(EOG)明显异常。其中,男 43 例,女 43 例;年龄 9~88 岁,平均(49.44±3.67)岁。排除标准:(1)不能配合完成相关检查者;(2)无法判断发病原因是遗传因素引起者;(3)无家系血样可以进行基因验证者。

患者和家系成员均通过标准临床检查,以明确诊断,并排除其他非遗传因素引起的眼部疾病。临床检查包括病史询问、物理检查等。其中,病史询问包括基础个人信息(包括性别、年龄、籍贯、民族等),主诉,现病史(初次发病时间、发病规律、就诊情况、用药情况、并发症种类和时间等),既往史(全身情况、基因检测史等),家族遗传史,手术和药物使用史,婚育史等。物理检查包括视力和矫正视力、非接触性眼压、色觉、B 超(天津迈达,型号 ODM-2200)、视野(卡尔蔡司,型号 750i)、眼前节照相、眼底彩色照相(Topcon,型号 TRC NW-300)、光相干断层扫描(OCT,型号 Cirrus HD-OCT 5000)。除此之外,患者还进行常规肘部静脉采血,采用高通量二代基因测序技术进行基因测序^[5]。

1.2 样本采集 将符合要求的患者及家系成员常规采集肘部静脉血 5 mL,ETDA 抗凝,-80℃保存。

1.3 提取基因组 DNA

1.3.1 DNA 提取 QIAGEN 试剂盒提取外周血的 DNA,Qubit 荧光仪检测 DNA 浓度,琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 完整性。

1.3.2 文库制备 参考华大基因的 BGISEQ-500 的文库构建指导手册进行。(1)将质量合格的 DNA 样品通过超声波高性能样品处理系统(Covaris)随机打断,经过片段选择后得到 150~250 bp 的片段;(2)随后进行 DNA 片段末端修复,3'端加上“A”碱基,两端加上文库接头;(3)接头连接后的文库进行线性扩增(LM-PCR)制备成杂交文库;(4)杂交文库与眼科基因芯片(深圳华大生命科学研究院提供 792 个基因 Panel,其中视网膜色素变性基因 78 个)进行捕获富集,洗脱未富集的片段后进行扩增;(5)扩增产物进行单链分离和环化处理,环化文库进行滚环复制生成 DNA 纳米球。采用 Qubit 荧光仪检测文库浓度进行

质量控制。

1.3.3 上机测序 质量控制合格的文库采用 BGISEQ-500 PE50+10 程序上机测序,共检测 792 个眼科目标基因,其中含有 78 个视网膜色素变性相关基因。

1.3.4 信息分析 (1)从测序仪获取原始数据(FASTQ 数据);(2)过滤:对原始 FASTQ 数据进行质量控制,去除低质量数据;(3)比对:利用 SOAP 和 BWA 软件,使用 hg19 参考序列进行比对;(4)去重复:基于 Picard 的去重复算法,去除重复序列;(5)变异检测:基于 GATK 对数据进行变异检测;(6)变异注释:使用 Next GENE5.4.5 分析软件对基因变异与特殊临床表型的相关性进行分析;使用频率数据库 dbSNP、千人基因组数据库、ESP6500 数据库、ExAC 数据库及 BGI 内部数据库进行频率注释;使用 HGVS 对变异进行标准命名;使用 OMIM、HGMD 等疾病数据库进行突变及疾病注释。

1.4 统计学处理 采用 SPSS20.0 统计学软件进行数据处理及统计分析。基因突变以百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 测序结果 25 个家系共 86 例患者,目标序列平均测序深度为 107.79,目标序列覆盖率平均 99.93%。平均 99.98%目标序列覆盖率 $>10\times$,平均 95.41%的目标序列覆盖率 $>30\times$,测序深度和平均覆盖率均符合检测要求。

2.2 基因检出情况 25 个家系先证者中,检测出已知致病性基因突变病例 13 例;检出疑似致病性基因突变病例 9 例;临床意义未明基因突变有 3 例;未检出阴性病例,25 个家系均有阳性发现。8 号患者的 RP1 基因上有 2 个突变位点,分别为 c.2886delA 和 c.4129delG 突变。25 号患者的 RP1 基因上有 4 个致病突变位点,分别为 c.4168_4169insT、c.4196delG、c.4169A>G 和 c.6353G>A 突变。在检出的基因变异位点中,RP1 基因发现 9 个未报道致病基因突变位点,见表 1。

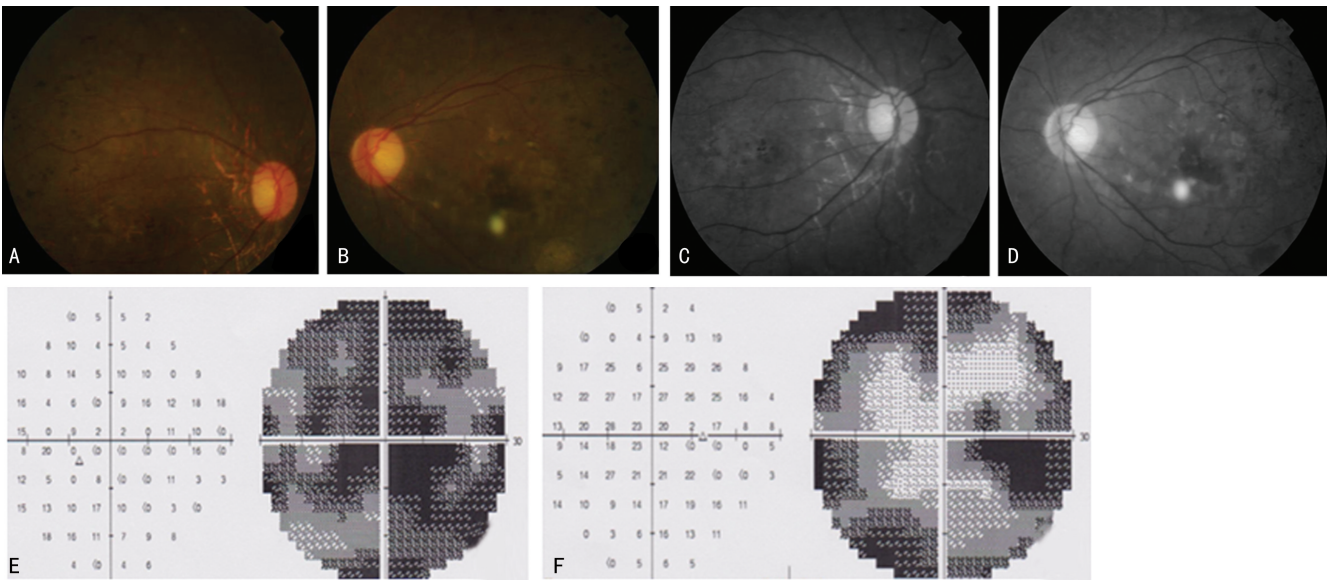
2.3 临床观察 8 号病例:眼视盘界清色蜡黄,血管纤细,视网膜萎缩,呈青灰色,后极黄斑旁及赤道部少量骨细胞样色素析出,眼底照相提示,色素散在分布,未附着于血管旁。自发荧光照相提示,视网膜色素背景荧光变淡,左眼黄斑旁机化瘢痕处点状强荧光。视野检查提示,双眼视野呈不规则片状,左眼中央区视野尚存。见图 1。25 号病例:眼底照相显示,双眼视盘界清色淡,血管极细,黄斑中心凹处色暗,除后极黄斑区外,其余视网膜呈青灰色,未见明显骨细胞样色素沉着。自发荧光照相提示,眼底色素背景荧光极低或消失,呈斑驳样。双眼视野检查提示,视野呈管状,

周边视野完全丧失。OCT 提示双眼黄斑中心凹处极度萎缩,厚度仅为右眼 37 μm ,左眼 31 μm 。椭圆体带严重萎缩,未见明显反射,视网膜厚度中度萎缩。见图 2。

表 1 视网膜色素变性家系基因检测中发现未报道的 RP1 基因位点突变

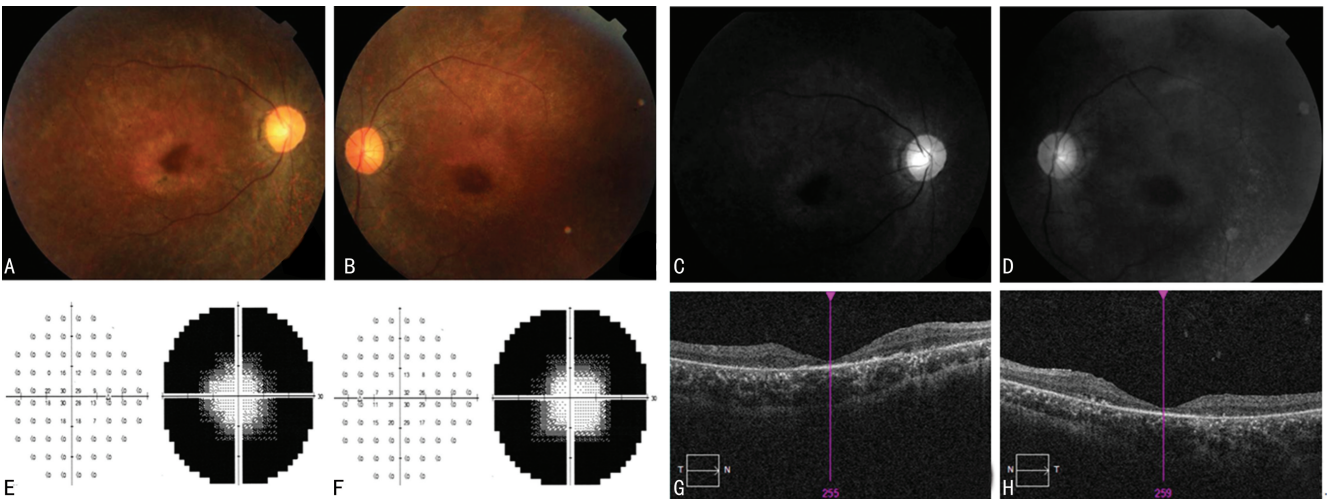
转录本	核苷改变	氨基酸改变	基因亚区	杂合性	染色体位置	遗传模式	突变类型	报告类型
NM_006269.1.1	c.1419_1420delTG	p. Thr473Thrfs13	EX4/CDS3	Het	chr8:54625300	XL	移码突变	VUS
NM_006269	c.2886delA	p. Gly962GlyfsX3	EX4/CDS3	Het	chr8:55539328	AD	移码突变	Likely Pathologic
NM_006269	c.4129delG	p. Asp1377ThrfsX20	EX4/CDS3	Het	chr8:55540571	AD	移码突变	Likely Pathologic
NM_006269.1.1	c.4168_4169insT	p. His1390Serfs6	EX4/CDS3	Het	chr8:54628050	AR	移码突变	Likely Pathologic
NM_006269.1.1	c.4169A>G	p. His1390Arg	EX4/CDS3	Het	chr8:54628051	AR	错义突变	Likely Pathologic
NM_006269.1.1	c.4196delG	p. Cys1399Leufs5	EX4/CDS3	Het	chr8:54628077	AR	移码突变	Likely Pathologic
NM_006269.1.1	c.6353G>A	p. Ser2118Asn	EX4/CDS3	Het	chr8:54630235	AR	错义突变	Likely Pathologic
NM_006269.1	c.2624A>T	p. Asp875Val	EX4/CDS3	Het	chr8:54626506	AR	错义突变	Pathologic
NM_006269.1	c.5699C>T	p. Thr1900Ile	EX4/CDS3	Het	chr8:54629581	AR	错义突变	Pathologic

注:XL 为 X 连锁遗传,AD 为常染色体显性遗传,AR 为常染色体隐性遗传;VUS 为临床意义未明,Likely Pathologic 为可能致病,Pathologic 为致病。



注:A、B 为眼底照相,C、D 为自发荧光照相,E、F 为视野检查;A、C、E 示右眼,B、D、F 示左眼。

图 1 眼底照相、自发荧光照相、视野检查



注:A、B 为眼底照相,C、D 为自发荧光照相,E、F 为视野检查,G、H 为 OCT 检查;A、C、E、G 示右眼,B、D、F、H 示左眼。

图 2 眼底照相、自发荧光照相、视野检查、OCT 检查

3 讨 论

RP1 基因于 1999 年首次被鉴定,它由 4 个外显子组成,编码 2 156 个氨基酸^[6]。RP1 基因编码一种光感受器特异性微管相关蛋白,定位于连接纤毛处,可能参与光感受器内外段之间的蛋白质转运或纤毛结构的维持,在视杆和视锥光感受器外段的结构中起重要作用^[7]。

视网膜色素变性包括一组以视杆状细胞为特征的异质性遗传性视网膜营养不良,其特征是视锥细胞变性之前的视杆细胞变性。视网膜色素变性的遗传可以是常染色体显性遗传、常染色体隐性遗传、X 连锁隐性遗传或单纯型。迄今为止,已经发现大约 80 个致病基因与视网膜色素变性相关,其中 58 个与常染色体隐性遗传形式有关。RP1 基因是与视网膜色素变性关联的 80 多个基因之一,在常染色体显性遗传视网膜色素变性和常染色体隐性遗传视网膜色素变性的病例中已经发现视网膜色素变性相关基因的突变,除了 RP1 基因,还有 bestrophin 1(BEST1)、神经视网膜亮氨酸拉链、核受体亚家族 2 E 组成员 3(NR2E3)、视紫红质(RHO)、视网膜色素上皮基因(RPE65)^[8]。RP1 基因相关的常染色体隐性遗传视网膜色素变性患者通常比 RP1 基因相关的常染色体显性遗传视网膜色素变性患者有更严重的视力损害^[9]。

本研究纳入的 25 个家系,全部找到已知或疑似致病突变或临床意义未明的突变,同时,发现 RP1 基因有 9 个未报道的新突变。

特别值得注意的是,本研究中患者编号为 8 号和 25 号家系的致病突变基因是 RP1 基因,均指向 RP1 基因型视网膜色素变性。8 号患者 RP1 基因的 c.2886delA 和 c.4129delG 突变为缺失移码突变,属于烈性突变,该突变极可能引起编码蛋白质氨基酸序列发生改变而致病。25 号患者 RP1 基因上有 4 个致病突变位点,c.4168_4169insT 和 c.4196delG 突变为插入和缺失移码突变,属于烈性突变,而 c.4169A>G 和 c.6353G>A 突变为错义突变。经过家系共分离检测确认,笔者发现 c.4168_4169insT 和 c.4169A>G 突变位于 DNA 单链,而 c.4196delG 和 c.6353G>A 突变位于另一条链。在临床表现上,笔者也能看到,25 号患者的眼底病变程度远比 8 号患者严重,25 号患者黄斑萎缩严重,中心凹处视锥细胞结构消失,自发荧光照相显示色素上皮背景荧光几乎消失,动脉血管萎缩尤其明显。25 号患者临床表现出全色盲,考虑与黄斑的发育异常有关。因为与色盲有关的基因如 CNGA3 与 CNGB3 等均没有发现异常,而该患者的黄斑发现严重萎缩,视锥细胞的发育缺失,从而导

致色觉缺失。而 8 号患者无色盲,自发荧光照相显示仍有少量色素上皮背景荧光,动脉血管萎缩不明显。综合以上表现笔者认为,RP1 基因的多发位点突变导致的视网膜色素变性症状更显著,危害更严重,这在国内其他同类研究中鲜见报道。

已有研究显示,RP1 基因的突变可导致不同的临床表型,可以将这些表型根据临床发现、遗传模式、发病年龄和病程在临床上相互区分^[10]。基因分析使研究者能够进行有针对性的诊断测试,并确定基因治疗的治疗方法^[11]。随着基因治疗等新型治疗手段的出现,识别与 RP1 基因突变相关的整个临床表型,对于帮助选择合适的患者及评估所提供治疗的效果至关重要。

视网膜色素变性的高发突变基因和突变位点具有异质性,本研究新发现的 RP1 基因变异位点具有特殊临床表型。但是 HUCKFELDT 等^[12]的研究发现,尽管 RP1 基因型相同,但临床诊断包括黄斑营养不良(MD)、椎杆营养不良(CRD)和视网膜色素变性;VERBAKEL 等^[10]的研究也显示,RP1 基因的突变可导致不同的临床表型,具体表现为视网膜色素变性、常染色体隐性遗传 MD 或常染色体隐性遗传 CRD,取决于残留的视网膜细胞的数量和生理功能等情况。

RP1 基因是与 RP 关联的 80 多个基因之一,MIZOBUCHI 等^[13]的研究表明,RP1 基因变异类型/位置和临床表型之间存在基因型-临床表型相关性。RIERA 等^[14]的研究描述了由 RP1 基因突变引起的黄斑营养不良表型,并在该基因中建立了新的基因型-表型相关性。本研究所发现这 9 个 RP1 基因突变位点,与视网膜色素变性之间及这些相关病例所表现出来的特殊临床表型之间,是否存在必然的联系,还需要通过动物实验、基因敲除、基因修复等进一步的研究来验证。

近年来二代高通量基因测序技术发展迅速,可利用特制探针或基因扩增,对特定的蛋白编码区域 DNA 或某段特定序列进行目标捕获并富集,进行高通量测序。该技术具有效率高、费用低、时间短等优点,为大量表型复杂的视网膜色素变性家系研究提供了技术支持,是遗传性视网膜色素变性疾病的有效检测手段,有助于研究者发现新发位点突变,并且临床上可以辅助诊断视网膜色素变性类型,提高该类疾病临床诊治能力。此外,对于临床 RP1 基因治疗,必须全面了解疾病的自然病程,特别是要了解不同的表型,才能较好地评估治疗效果。

参考文献

[1] AYUSO C, MILLAN J M. Retinitis pigmentosa and allied

- conditions today; a paradigm of translational research[J]. *Genome Med*, 2010, 2(5): 34-37.
- [2] ALBARRY M A, HASHMI J A, ALREHELI A Q, et al. Novel homozygous loss-of-function mutations in RP1 and RP1L1 genes in retinitis pigmentosa patients[J]. *Ophthalmic Genet*, 2019, 40(6): 507-513.
- [3] GLÖCKLE N, KOHL S, MOHR J, et al. Panel-based next generation sequencing as a reliable and efficient technique to detect mutations in unselected patients with retinal dystrophies[J]. *Eur J Hum Genet*, 2014, 22(1): 99-104.
- [4] SHANKS M E, DOWNES S M, COPLEY R R, et al. Next-generation sequencing (NGS) as a diagnostic tool for retinal degeneration reveals a much higher detection rate in early-onset disease[J]. *Eur J Hum Genet*, 2013, 21: 274-280.
- [5] 徐晓丽, 林娟, 鄢仁祥. 基因芯片与高通量测序技术的原理与应用的比较[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2018, 34(11): 1166-1174.
- [6] LIU Q, ZHOU J, DAIGER S P, et al. Identification and subcellular localization of the RP1 protein in human and mouse photoreceptors[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2002, 43(1): 22-32.
- [7] LIU Q, LYUBARSKY A, SKALET J H, et al. RP1 is required for the correct stacking of outer segment discs[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003, 44(10): 4171-4183.
- [8] PAYNE A, VITHANA E, KHALIQ S, et al. RP1 protein truncating mutations predominate at the RP1 adRP locus[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2000, 41(12): 4069-4073.
- [9] LYUBARSKY A L, FALSINI B, PENNESI M E, et al. UV- and midwave-sensitive cone-driven retinal responses of the mouse; a possible phenotype for coexpression of cone photopigments[J]. *J Neurosci*, 1999, 19(1): 442-455.
- [10] VERBAKEL S K, VAN HUET R A C, DEN HOLLANDER A I, et al. Macular dystrophy and cone-rod dystrophy caused by mutations in the RP1 gene; extending the RP1 disease spectrum[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2019, 60: 1192-1203.
- [11] AL-BDOUR M, PAULECK S, DARDAS Z, et al. Clinical heterogeneity in retinitis pigmentosa caused by variants in RP1 and RLBP1 in five extended consanguineous pedigrees[J]. *Mol Vis*, 2020, 26: 445-458.
- [12] HUCKFELDT R M, GRIGORIAN F, PLACE E, et al. Biallelic RP1-associated retinal dystrophies; Expanding the mutational and clinical spectrum[J]. *Mol Vis*, 2020, 26: 423-433.
- [13] MIZOBUCHI K, HAYASHI T, OISHI N, et al. Genotype-phenotype correlations in RP1-associated retinal dystrophies; a multi-center cohort study in Japan[J]. *J Clin Med*, 2021, 10(11): 2265-2271.
- [14] RIERA M, ABAD-MORALES V, NAVARRO R, et al. Expanding the retinal phenotype of RP1; from retinitis pigmentosa to a novel and singular macular dystrophy[J]. *Br J Ophthalmol*, 2020, 104(2): 173-181.

(收稿日期: 2021-03-14 修回日期: 2021-08-21)

(上接第 233 页)

- accelerates acquired chemoresistance of gallbladder cancer cells by targeting cyclin M[J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(3): 3305-3312.
- [23] CHENG H, YAN W. MiR-433 regulates myocardial Ischemia reperfusion injury by targeting NDRG4 via the PI3K/Akt pathway[J]. *Shock*, 2020, 54(6): 802-809.
- [24] ZHANG L, ZHANG Y, ZHANG X, et al. MicroRNA-433 inhibits the proliferation and migration of HUVECs and neurons by targeting hypoxia-inducible factor 1 alpha[J]. *J Mol Neurosci*, 2017, 61(2): 135-143.
- [25] LI J, CHEN M, YU B. miR-433 suppresses tumor progression via Smad2 in non-small cell lung cancer[J]. *Pathol Res Pract*, 2019, 215(10): 152591.
- [26] ZHANG T, JIANG K, ZHU X, et al. miR-433 inhibits breast cancer cell growth via the MAPK signaling pathway by targeting Rap1a[J]. *Int J Biol Sci*, 2018, 14(6): 622-632.
- [27] SHI Q, WANG Y, MU Y, et al. MiR-433-3p inhibits proliferation and invasion of esophageal squamous cell carcinoma by targeting GRB2[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 46(5): 2187-2196.
- [28] TAO L, BEI Y, CHEN P, et al. Crucial role of miR-433 in regulating cardiac fibrosis[J]. *Theranostics*, 2016, 6(12): 2068-2083.
- [29] SAUL M C, ZHAO C, DRIESSEN T M, et al. MicroRNA expression is altered in lateral septum across reproductive stages[J]. *Neuroscience*, 2016, 312: 130-140.

(收稿日期: 2021-03-25 修回日期: 2021-08-18)