

doi:10.3969/j.issn.1000-9760.2012.01.002

中国北方一马凡氏综合征家系致病基因突变研究^{*}

张 华 许 菲 睢瑞芳 董方田

(中国医学科学院北京协和医学院, 北京 100730)



张华, 1984 级校友。医学博士, 眼科博士后, 教授, 中国医学科学院北京协和医学院科技成果与专利办公室主任; 中国微循环学会眼微循环专业委员会秘书长, 中国微循环学会副秘书长; 国家自然科学基金评审专家, 教育部博士点基金评审专家, 国家科技支撑计划课题经费预算评估专家, 第二批“青年千人计划”中共中央组织部海外高层次人才引进工作评审专家。参加国家科技部重点攻关项目“遗传性视网膜变性疾病的诊断和基因治疗”; 参编《北京协和医院眼科诊疗规范》、《美国国立卫生研究院眼科诊疗规范》以及《神经眼科学图谱》。第十届全国青联委员, 第三届中央国家机关青联委员, 第三届、第四届中国青年科技工作者协会会员; 多次赴美国参加国际眼科学术会议; 2007 年参加中国青年科学家代表团赴法国访问。2010 年参加中国青年代表团赴韩国访问。中国科学技术协会第八届全国代表大会代表。

摘 要 目的 研究确定我国北方一马凡氏综合征(MFS)家系致病基因突变位点。**方法** 对马凡氏综合征一家系进行临床研究和系谱分析。采集家系中 3 例患者和 3 例健康成员的静脉血, 提取基因组 DNA。应用聚合酶链反应(PCR)扩增马凡氏综合征致病基因原纤维蛋白 1(FBN1)基因外显子及外显子-内含子接头处, 直接测序确定致病的基因突变。**结果** 马凡氏综合征患者的 FBN1 基因外显子 6 发生了错义突变, cDNA 640 位的鸟嘌呤被腺嘌呤取代(G640A); 对应的甘氨酸改变为丝氨酸。突变后 Eag I 内切酶位点消失。该突变在家系中表现为与疾病共分离。**结论** FBN1 基因突变 G640A 是该马凡氏综合征家系的致病基因突变。

关键词 原纤维蛋白 1; 马凡氏综合征; 突变; 基因

中图分类号: R596.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-9760(2012)02-005-04

Identify the mutation gene of a family with Marfan syndrome in north china

ZHANG Hua, XU Fei, SUI Rui-fang, et al

(Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100730, China)

Abstract: Objective To identify the mutation gene of a family with Marfan syndrome in north china. **Methods** Clinical observation and pedigree analysis were undertaken in a family with Marfan syndrome. Venous blood was drawn from 3 affected and 3 unaffected subjects. Genomic DNA was extracted. Mutation of FBN1 gene which has been found to cause Marfan syndrome was screened by PCR of the exons and exons-intron boundaries. The mutation was identified using direct sequencing. **Results** A missense mutation g640a in exon6 of FBN1 gene was identified in affected patients of this chinese family. The correspond amino acid change was gly241ser. Restrictive endonuclease site Eag I was eliminated. This mutation was not found in unaffected family members of this family. **Conclusion** A recurrent mutation g640a of FBN1 gene with glycine to serine change is responsible for the Marfan syndrome patients in a chinese family.

Key words: Fibrillin1; Marfan syndrome; Mutation; Genes

马凡氏综合征(Marfan Syndrome, MFS)为常染色体显性遗传的结缔组织病, 其发病率约为 1/

^{*} [基金项目] 科技部国际合作项目资助(编号: 2010DFB33430)

5000~10000, 25%~30%为散发病例。该病为不规则显性遗传病,其外显率虽高,由于存在表现度的差异,致使其临床表现多样化,主要涉及心血管、骨骼和眼等系统,其次是肺、皮肤和中枢神经系统。

1990年, Kainulainen等^[1]应用连锁分析的方法将马凡氏综合征的致病基因定位于15号染色体上, 1991年, Dietz等^[2]进一步确定其基因定位于15q15~q21.3。同年, Dietz等^[3]首先在马凡氏综合征病人里发现了两种FBN1基因突变, R239P和C1409S, 并提出FBN1基因突变是马凡氏综合征的致病原因。1996年, Ghent疾病分类学把FBN1基因突变作为马凡氏综合征诊断的主要指标^[4]。我们对我国北方一马凡氏综合征家系的FBN1基因进行突变筛查, 直接测序确定其基因突变位点。

1 材料和方法

1.1 家系资料

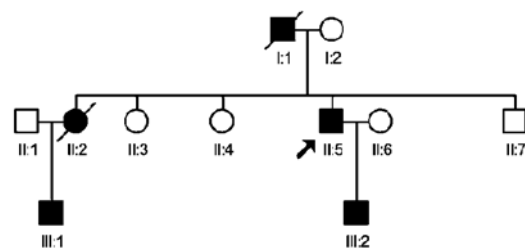
我们收集马凡氏综合征该家系3代10人资料, 其中患者5例, 男4例, 女1例, 患者中2例已死亡。先证者(Ⅱ:5)男, 40岁, 因自幼双眼视物不清40余年, 于2007年4月就诊于泰山医学院附属医院眼科中心。入院查体: 视力VOD0.06, VOS0.08, 双侧晶体不全脱位(图1), 可见部分晶体边缘及悬韧带, 眼底仅见部分网膜, 中心凹反射未见异常。家族史: 阳性马凡综合征家族史, 患者父亲, 姐姐, 儿子, 外甥均为马凡氏综合征患者(图2)。其中父亲, 姐姐已去世。我们对家系成员全部行全身检查, 做超声心动图测量主动脉根部直径, 并进行眼部检查。家系中现存另外两位患者除存在双眼的晶体脱位, 高度近视外, 还存在蜘蛛样指等骨骼的异常。该家系长期居住在山东济宁, 汉族, 无近亲婚姻史。

1.2 样品

我们在知情同意的前提下, 采集该家系二代6个个体的外周静脉血进行基因突变筛查, 其中受累个体3人, 表型正常个体3人。



图1 先证者示晶状体脱位并发白内障



黑色、白色图标分别代表受累及正常个体

图2 常染色体显性遗传马凡氏综合征家系图谱

1.3 引物

1.3.1 PCR引物的合成 本实验引物由大连TAKARA生物公司及上海生工生物技术公司合成, 其分子量计算公式如下: $MW = (A \text{ 碱基数} \times 312) + (C \text{ 碱基数} \times 288) + (G \text{ 碱基数} \times 328) + (T \text{ 碱基数} \times 303) - 61$

1.3.2 引物稀释 将引物用去离子水统一稀释成10pmol/ μ l。

1.4 方法

分析文献中马凡氏综合征临床表型与FBN1基因型的关系, 在FBN1基因65个外显子中, 选择在临床表现异常程度轻微的突变多发的外显子3-6, 13, 15, 28, 60-63进行首批筛查, 随后筛查外显子17, 18, 23-27, 33-37, 59, 64, 65。PCR分别扩增所选外显子, 参照文献^[5]设计引物, 复性温度48-58℃。PCR产物纯化后, 用ABI377型自动测序仪进行测序。对可疑致病突变在无血缘关系的正常人群中(50名)进行筛查。若突变同时改变内切酶位点, 则采用酶切消化检验法。酶切产物用2%琼脂糖凝胶电泳分离。

2 结果

2.1 临床结果

先证者因双眼晶体脱位两次入院行“晶体摘除术及前部玻璃体切割术”, 术后视力右眼0.12, 左眼0.1。心血管系统的随访未见异常改变。

2.2 实验结果

2.2.1 测序结果分析 在先证者的FBN1基因第6外显子检测到一个错义突变后, 扩增家系所有成员的外显子6, 将扩增产物送TAKARA公司测序。我们在该家系所有患者均检测到相同的突变位点, 突变核苷酸序列为CDNA640位的鸟嘌呤被腺嘌呤取代(G640A), 密码子GGC变为AGC, 编码的氨基酸由甘氨酸(Gly)改变为丝氨酸(Ser)

(G214S),而在家系中健康成员均未发现该种突变。该突变表现为与家系中的患者共分离。同时该错义突变使限制性核酸内切酶 *Eag* I 识别位点消失。该种突变以往曾在单纯性晶体脱位中有过报道^[6],证实其为致病性突变,并已排除了未知群体多态性的可能。

2.2.2 PCR 产物电泳图片及测序结果 见图 3、图 4、图 5、图 6。

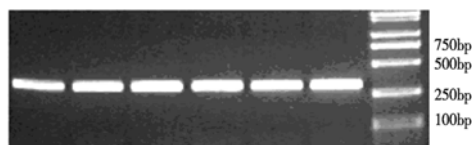


图 3 FBN1 基因 exon-6 PCR 产物电泳图

FBN1 基因 exon-6 PCR 产物测序结果(部分)。

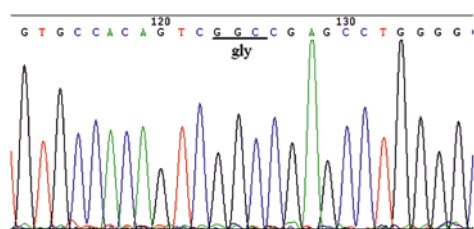


图 4 家系中正常个体 II:7 正向测序结果

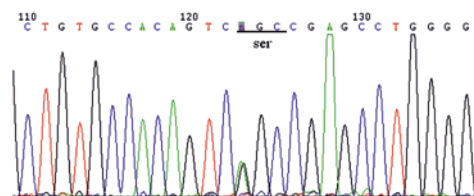


图 5 家系中患者 II:5 正向测序结果

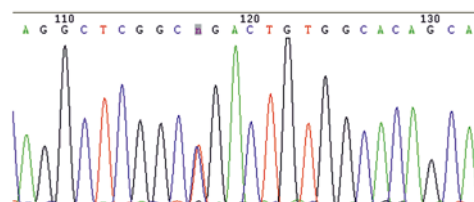


图 6 家系中患者 II:5 反向测序结果

2.2.3 限制性酶切验证 家系中所有患者存在的该错义突变致限制性核酸内切酶 *Eag* I 识别位点消失,该内切酶所识别的序列结构为 5' C-G G C C G 3',采用限制性酶切法验证突变位点,见图 7。

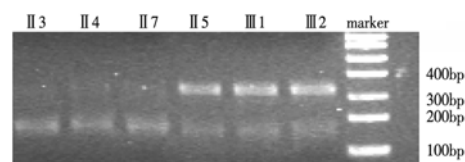


图 7 限制性酶切电泳图片

3 讨论

3.1 马凡氏综合征患者病理改变的分子基础

原纤维蛋白 1 基因主要编码原纤维蛋白,而原纤维蛋白是构成微纤维的主要成分。微纤维广泛分布于皮肤、血管、软骨、肌腱、晶状体悬韧带、结膜、睫状体、角膜基质、Schlemm 管内皮、巩膜基质、筛板、Bruch 膜及脉络膜等组织中^[6]作用包括^[7]:1)为弹性蛋白沉积及弹性纤维形成提供支架;2)通过弹性纤维个体之间的负荷再分布,参与成熟纤维的形成;3)为非弹性组织如睫状小带提供 1 个附着点;4)将内皮细胞或上皮细胞固定到细胞外基质中的弹性纤维上;5)提供表皮与真皮的连接;6)支持血小板的黏附功能。因此,FBN 结构或功能异常所致的疾病,多表现为全身的异常。

3.2 FBN1 基因结构和基因突变

1991 年,Dietz 应用原位杂交技术定位并克隆出 FBN1。FBN1 基因位于 15q15~q21.3,基因组 DNA 全长 235kb,含 65 个外显子,FBN1 基因转录产物为 10 kb 的 mRNA,其编码产物为原纤维蛋白 1(FBN1)前体,为分泌性糖蛋白,相对分子量为 350000,由 2871 个氨基酸构成,其中 14% 为半胱氨酸。除去信号肽,原纤维蛋白前体还有 4 个不同的结构区域,这些重要的结构区在维持微纤维正常形态和功能方面发挥着不可替代的作用:1)类表皮生长因子区(EGF-like module):区域内含有 6 个半胱氨酸残基,4 个位于 N 端,2 个位于 C 端,组成 3 对二硫键。原纤维蛋白共有 47 个 EGF 区,其中 43 个包含保守的钙结合共识序列(calcium binding consensus sequence cb-EGF)^[8],与钙结合的 FBN 分子可以保持伸展状态,并避免酶蛋白的降解;2)潜伏转化生长因子结合蛋白区(latent transforming growth factor- β binding protein LTBP)LTBP:区内含有 8 个半胱氨酸残基,其内部簇集了 3 个保守的半胱氨酸残基。原纤维蛋白共有 7 个 LTBP,其中第 4 个 LTBP 含有 RGD 序列(Arg-Gly-Asp)。RGD 序列可与细胞表面整合蛋白家族

受体相互作用,调节细胞黏附。原纤维蛋白-1 的 RGD 序列可通过整合蛋白 $\alpha V\beta 3$ 来促进细胞黏附^[9];3)杂合序列区因其同时包含 EGF 和 LTBP 的特征,又被称为 Fib 基序。与 LTBP 相同,Fib 基序含有 8 个半胱氨酸残基;4)富含辅氨酸的铰链区位于 FBN1 的氨基端,作用如同分子枢纽,参与 FBN 二聚体的合成。

FBN1 基因突变所致的疾病,又称为 FBN 病,具有高度临床异质性,疾病谱从严重的致死性新生儿马凡氏综合征至无全身异常的晶状体异位。FBN1 基因具有较高的突变率,目前已发现的基因突变有 601 种,几乎所有的突变在受累的个人和家庭中是独特的,约 12% 的 FBN1 基因突变为再发突变。突变的位置分布在整个 FBN1 基因中,而没有明显的热点位置。然而,这种分布在少数的区域显示了明显的差别:突变较少的区域是外显子 57 和外显子 65;而突变较多的区域是外显子 13,外显子 16 和外显子 27。研究表明,由于错义突变导致半胱氨酸残基的产生或置换与晶状体异位的高风险性有关^[10],而下游早期终止密码子(PTC)与更为严重的骨骼特征和关节松弛有关^[11],但眼的表型较轻,发生在 24-32 外显子的基因突变多与马凡氏综合征严重的表型有关^[12],理论上讲,该区域是编码 FBN1 多肽中一个重要的连续性、伸展性 12 个 cbEGF 区,其两边侧翼又 3 到 4 个类 TGF- β 区,改变 cbEGF 区高度保守半胱氨酸或钙结合氨基酸可导致严重的病变;发生在区域之间的突变会影响 FBN1 的结构,造成严重的马凡氏综合征表型^[13],而临床表现异常程度较轻的突变多表现在 FBN1 的氨基端或羧基端。FBN1 非高度保守区的突变,通常影响 FBN 的折叠或减弱钙结合力。本研究发现的突变在靠近氨基端的第 1 个 Fib 区,突变后甘氨酸变成了丝氨酸,氨基酸的极性发生了改变,势必影响 FBN1 的聚合、高级结构的形成及蛋白的功能。该突变在单纯性晶状体异位家系中已有报道^[14],而单纯性晶状体异位是马凡氏综合征患者的主要眼部表现,该家系中 3 位患者均存在双眼晶体脱位。

致病基因的确定能在分子水平揭示与 FBN1

基因异常相关疾病的发病机制,并为研究治疗方法提供依据。本研究所报道的马凡氏综合征家系中,病人相关的临床症状如晶状体脱位,眼轴增长,蜘蛛样指,腕征指征阳性等均与 FBN1 基因突变所致蛋白产物功能和结构缺陷相关。

参考文献:

- [1] Kainulainen K, Pulkkinen L, Savolainen A, et al. Location on chromosome 15 of the gene defect causing Marfan syndrome [J]. *New Eng J Med*, 1990, 323: 935-939.
- [2] Dietz HC, Pyeritz RE, Hall BD, et al. The Marfan syndrome locus: confirmation of assignment to chromosome 15 and identification of tightly linked markers at 15q15~q21.3 [J]. *Genomics*, 1991, 9: 355-361.
- [3] Dietz HC, Cutting GR, Pyeritz RE, et al. Marfan syndrome caused by a recurrent de novo missense mutation in the fibrillin gene [J]. *Nature*, 1991, 352: 337-339.
- [4] De Paepe A, Devereux RB, Dietz HC, et al. Revised diagnostic criteria for the Marfan syndrome [J]. *Am J Med Genet*, 1996, 62: 417-426.
- [5] Caroline Hayward, Mary E, et al. Mutation screening of all 65 exons of the fibrillin-1 gene in 60 patients with Marfan syndrome: report of 12 novel mutations [J]. *Hum Mutat*, 1997, 10: 280-289.
- [6] Sakai LY, Keene DR, et al. Fibrillin, a new 350-kd glycoprotein, is a component of extracellular microfibrils [J]. *J Cell Biol*, 1986, 103: 2499-2509.
- [7] 郝芮,周伟,张咸宁,等.晶状体异位的分子遗传学研究进展 [J]. *国外医学遗传学分册*, 2005, 28: 342-346.
- [8] Handford PA, Mayhew M, et al. Key Residues involved in calcium-binding motifs in EGF-like domains [J]. *Nature*, 1991, 351: 164-167.
- [9] Stephen S, Knott V, Handford PA, et al. Structure of integrin binding fragment from fibrillin-1 gives new insights into microfibril organization [J]. *Structure*, 2004, 12: 717-729.
- [10] Ades LC, Holman KJ, Brett MS, et al. Ectopia lentis phenotypes and FBN1 gene [J]. *Am J Med Genet*, 2004, 126a: 284-289.
- [11] Loeys B, De Backer J, Van Acker P, et al. Comprehensive molecular screening of the FBN1 gene favors locus homogeneity of classical Marfan syndrome [J]. *Hum Mutat*, 2004, 24: 140-146.
- [12] Faivre L, Collod-Beroud G, Loeys BL, et al. Effect of mutation type and location on clinical outcome in 1013 probands with Marfan syndrome or related phenotypes and FBN1 mutations: an international study [J]. *Am J Hum Gene*, 2007, 81: 454-466.
- [13] Lesley CA, Eric AH, et al. Characterization of four novel fibrillin-1 (FBN1) mutations in Marfan syndrome [J]. *J Med Genet*, 1996, 33: 665-671.
- [14] 睢瑞芳,赵家良,魏洪斌,等.原纤维蛋白 1 基因新突变导致单纯性晶状体异位 [J]. *中华眼科杂志*, 2004, 40: 828-831.

(收稿日期 2011-12-11)