

ZFP161 基因与中国高度近视人群的相关性研究

王国兵¹,张清炯¹,肖学珊¹,李家璋²,张丰生³,黎仕强¹,李 玮⁴,
李 舵²,贾小云¹,郭 莉¹,郭向明¹

(1. 中山大学中山眼科中心暨卫生部眼科学实验室眼遗传分子生物学室,广州 510060;
2. 湖北恩施市航空路 90 号恩施市人民医院眼科,恩施 445000;3. 内蒙古包头市沙河镇朝聚眼科医院,包头 014060;
4. 深圳市笋岗西路深圳市第二人民医院,深圳 518035)

摘要:为了探讨 ZFP161 基因与高度近视的相关性,从而寻找高度近视的致病基因,以来自不同地区和家系的中国单纯性高度近视先证者 204 例和排除高度近视及相关疾病的正常人 116 例为材料,采用 PCR-SSCP 法检测病例组及正常人群外周血白细胞基因组 DNA 中 ZFP161 基因 2 个外显子是否存在基因突变,对存在突变的外显子区域经克隆测序后确定变异性质,结合对照组及家系分析确定 ZFP161 基因突变与高度近视的相关性。结果表明:1. ZFP161 基因内含子 1 第 58 号碱基前存在 AT 序列插入突变,即 IVS1 58~59 突变(1/204),该突变仅存在于高度近视先证者中;2. ZFP161 基因外显子 2 的第 168 号碱基由 C 颠换为 A,即 Ala56Ala 突变(Codon56 GCC→GCA, Ala56Ala)(5/204),该突变存在于正常人群中(3/116),亦存在于患者的正常亲属中;结合正常对照和家系分析,初步排除 ZFP161 基因与中国单纯性高度近视之间的相关性。

关键词:高度近视;ZFP161 基因;PCR-SSCP

中图分类号:R778.11

文献标识码:A

文章编号:0253-9772(2004)02-0155-05

Variations of the Zinc Finger Protein 161 Gene in Chinese with or Without High Myopia

WANG Guo-Bing¹, ZHANG Qing-Jiong¹, XIAO Xue-Shan¹, LI Jia-Zhang², ZHANG Feng-Sheng³,
LI Shi-Qiang¹, LI Wei⁴, LI Tuo², JIA Xiao-Yun¹, GUO Li¹, GUO Xiang-Ming¹

(1. Ocular Genetics and Molecular Biology, National Ophthalmological Labs and Zhongshan Ophthalmic Center, Zhongshan University, Guangzhou 510060, China;2. Department of Ophthalmology, The people's Hospital of Enshi Autonomous Prefecture, 90 Hangkong Street, Enshi, Hubei 445000, China;3. Chaoju Eye Hospital, Shahe Town, Baotou, Inner Mongolia 014060, China;4. Shenzhen 2nd People's Hospital, Sungang Street, Shenzhen 518035, China)

Abstract: To investigate the association between variations of ZFP161 gene and high myopia, A total of 204 probands with simple high myopia (≤ -6.0 dipoters) were collected while 116 normal persons from different families without high myopia or related disease were used as controls. Genomic DNA was prepared from the peripheral leucocytes. The coding sequences of ZFP161 gene in 320 subjects were analyzed by using exon-by-exon PCR-hetero-

收稿日期:2003-02-19;修回日期:2003-07-08

基金项目:国家 863 计划(Z19-01-04-02)、广东省重点科技攻关项目(99M04805G)、卫生部优秀青年人才基金(97016)、211 工程重点学科建设(98001)(项目负责人:张清炯)。广东省高教厅千百十人才基金[Supported by the National 863 Project(Z19-01-04-02)、Major Scientific Project of Guangdong Province(99M04805G)、Excellent Youth Talent Foundation of the Ministry of Health, PRC(97016)、Major Subject Foundation of 211 Project(98001)(Project Principal: Zhang Qingjiong)、the Thousand, Hundred, Ten Talents Foundation of the Department of Higher Education of Province Guangdong]

作者简介:王国兵(1976-),男,硕士研究生。研究方向:高度近视候选基因的筛查。Tel:0755-83936252,(0)13530779986;E-mail:rogasan@163.net

通讯作者:张清炯(1963-),男,教授,博导。专业方向:小儿眼科遗传病。Tel:020-87330399,87330400;E-mail:qjzhang2000@yahoo.com

duplex-SSCP analysis. Identification of the Variations by cloning and sequencing, combined with controls and family analysis, was used to disclose the correlation between *ZFP161* gene and high myopia. A mutation of *ZFP161* gene was identified as an insertion of AT before the 58th nucleotide of intron 1 (IVS1 58-59)(1/204) and a variation of *ZFP161* gene was identified as a heterozygous C to A of the 168th nucleotide in exon 2 (Codon56, GCC→GCA, Ala56Ala). Ala56Ala is a non-sense mutation identified in 5 of the 204 patients and 3 of 116 controls. No evidence shows that these variations are responsible for high myopia.

Key words: high myopia; *ZFP161*; PCR-SSCP

高度近视 (high myopia, HM), 又称为病理性近视或恶性近视, 是指屈光度等于或大于 $-6.00D$ 以上, 眼轴进行性延长的屈光不正。其临床表现为视功能严重受损, 并常伴有眼底退行性改变如颞侧弧形斑、豹纹状眼底、Fuchs 斑、黄斑部改变等。绝大多数为单纯性高度近视, 不伴有全身异常。也有少数高度近视并发于其他综合征。高度近视在人群中的患病率较高 (约为 1%), 并存在种族差异, 黄种人的发病率远高于白种人^[1~6]。高度近视是一种单基因遗传眼病, 遗传方式上表现为常染色体显性遗传 (AD)、常染色体隐性遗传 (AR) 和 X-连锁隐性遗传 (XR), 并有遗传异质性^[6~8]。目前, 已通过家系连锁分析将其致病基因定位在 *MYP1*、*MYP2*、*MYP3* 3 个基因座上。*MYP1* 定位于 Xq28^[7,9], 与色盲基因及视网膜萎缩基因相连锁; *MYP2* 定位于 18p11.31, 处于 *D18S63* ~ *D18S52* 两个 DNA 多态标记之间 0.8cM 的区域内^[8]; *MYP3* 定位于 12q21~23, 处于 *D12S1684* ~ *D12S1605* 之间的 30.1cM 的区域内^[10]。另外, 高度近视还可能存在其他的致病基因座 7q36^[11]。

锌指蛋白 161 (Zinc Finger Protein 161, *ZFP161*) 基因位于 18p11.31 下游, 紧邻单纯性高度近视的基因突变基因座 *MYP2* (*D18S63* ~ *D18S52* 之间 0.8cM 的区域), 且与鼠类 *ZF5* 基因高度同源 (99%)^[12,13]。部分学者研究认为, 在参与近视形成的多个遗传因素中决定眼生长速率和周期的遗传因素对高度近视的形成起决定作用^[14]。而相关的病理研究发现, 在高度近视的发生发展过程中伴随有脉络膜的增厚等组织改变^[15]。鼠类 *ZF5* 蛋白能抑制原癌基因 *c-MYC* 和胸苷激酶 TK 的转录, 参与调控细胞的生长与增殖分化过程^[12,13]。人 *ZFP161* 基因与鼠类 *ZF5* 基因高度同源 (99%), 因而考虑 *ZFP161* 基因可能为高度近视的候选基因之一。本文通过分子遗传学的方法来分析 *ZFP161* 基因与单

纯性高度近视之间的相关性, 并进一步探讨高度近视形成的分子机制。

1 材料和方法

1.1 研究对象

204 例单纯高度近视家系的先证者为 1996 ~ 2001 年在中山大学眼科中心和包头市眼科医院门诊的患者。诊断标准: 散瞳检影单眼或双眼球镜值大于或等于 $-6.00D$, 无其他全身畸形或先天异常。正常人 116 例。所有先证者和正常对照的种族及地区来源随机, 且收集资料和抽血前均已征得受试者的知情同意。

1.2 研究方法

1.2.1 基因组 DNA 的制备

抽取患者及正常人外周静脉抗凝血 5mL, 全血溶解, 按酚-氯仿-异戊醇法抽提外周血白细胞基因组 DNA。

1.2.2 扩增 *ZFP161* 基因

登陆 NCBI 网站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 查询 *ZFP161* 基因全序列 (*ZFP161* 基因在 GenBank 的登陆编码为 L7541, OMIM 602126, NT_024990.6 GI:20557180, 部分序列尚未完成)。根据其序列信息设计引物扩增其外显子序列, *ZFP161* 基因已知序列含有 2 个外显子, 共设计 4 对引物。引物序列如下: 外显子 1 (227bp) F: 5' GGG ATA CAG GAA GAT CCT ACC 3', R: 5' AGA AGT GTT CAT GCA CAA TCA 3'; 外显子 2-1 (274bp) F: 5' ATT GCT ACG GCC AGG AAG TAG 3', R: 5' AAT GGC CTG TCC GCC GTG TG 3'; 外显子 2-2 (268bp) F: 5' GGC AGA TTG AGG AAG CAT GAG 3', R: 5' GAT CCT TGA GGT GAG ACT TGT G 3'; 外显子 2-3 (295bp) F: 5' CGT TTG CGT GCC ACA TGT GTG 3'; R: 5' AAA GTG TCC CTG TCC CAC CG

3'(引物均由上海基康生物技术有限公司合成)。PCR 反应条件:95℃ 预变性 5min;94℃ 30s、56℃ 或 58℃(温度视不同引物而定)45s、72℃ 45s,循环 30 次;末次延伸 72℃ 5min。PCR 反应总体积 30 μ L,10 \times 缓冲液 3 μ L、dNTP 200 μ M、引物 100pmol、*Taq* 酶 1U、Genomic DNA 2 μ L、加 ddH₂O 至 30 μ L。PCR 产物经 1% 琼脂糖电泳,于紫外光下检测电泳结果。

1.2.3 SSCP-异源双链分析

取 PCR 产物 5 μ L 与等体积的变性剂(95% 甲酰胺、0.05% 溴酚蓝、0.05% 二甲苯青)混匀后于 94℃ 热变性 5min,放置冰上 3min;在 8% 聚丙烯酰胺(49:1)和 6% 聚丙烯酰胺(99:1)上分别加样 2 μ L 电泳,0.5 \times TBE(8%)或 1 \times TBE(6%),30W,8h。银染。

1.2.4 克隆及序列测定

经 SSCP 异源双链构象多态分析发现带纹变异者,将 PCR 产物与 pGEM-T Easy 载体(promega 公司,按试剂盒说明操作)连接,并以热激法转化感受态大肠杆菌 DH-5 α 。用含 X-gal、IPTG 及氨苄青霉素的 LB 培养基平板筛选阳性克隆。按碱裂解法抽提质粒 DNA,用限制性内切核酸酶 *Eco*RI 酶切质粒 DNA,1% 琼脂糖电泳检测结果,并用 SSCP 检测是否为突变带的插入。挑选阳性克隆,用通用引物 SP6 和 T7 在 ABI377 全自动测序仪中进行测序,然后与基因库序列比较确定变异性质(SP6 5' ATT-TAGGTGACACTATAGAATAC 3',T7 5' TCGC-CCTATAGTGAGTTCGTATTA 3')。

2 结果

2.1 SSCP-异源双链结果

在 204 例高度近视先证者患者中共发现突变 6 例,其中内含子 1 仅有 1 例突变、外显子 2 有 5 例突变;在 116 例正常对照中,外显子 2 有 3 例突变;其余外显子未发现突变(图 1)。

2.2 测序结果及突变类型(见图 2、3 及表 1)

3 讨论

高度近视在人群中的患病率较高(1%),并存在种族差异。高度近视的遗传方式较为复杂,并有遗传异质性。单纯性高度近视是一种单基因遗传眼病。高度近视也可并发于其他疾病,并与其致病基

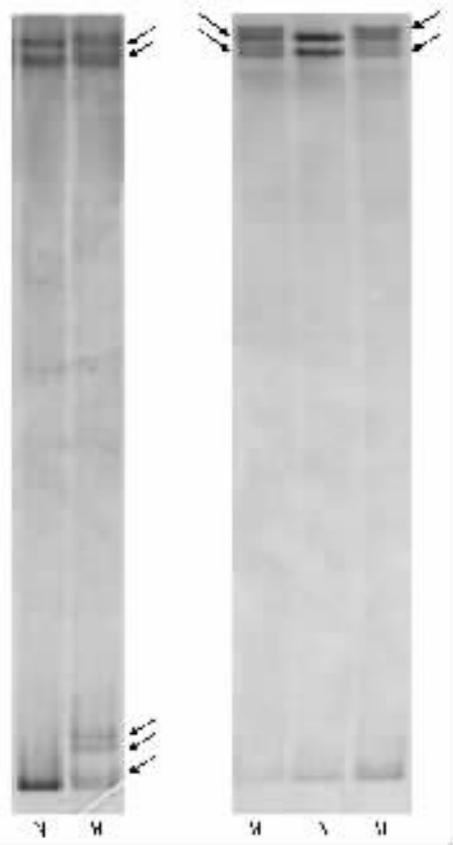


图 1 *ZFP161* 基因内含子 1、外显子 2 PCR-SSCP 8% 聚丙烯酰胺电泳结果

N(Normal)为正常标本;

M(Mutation)为突变标本(箭头所指为异常电泳带型)。

Fig. 1 The PCR-SSCP 8% polyacrylamide gel electrophoretic results of the intron1 and exon 2 of *ZFP161* gene

N:Normal;M:Mutation (mutant bands were showed as pointed).

因相关联,如 Marfan 综合征的 *FBN1* 基因、Stickler 综合征 I 型的 *COL2A1* 基因、Knobloch 综合征的 *COL18A1* 基因、原发性开角型青光眼的 *GLCIA* 基因等^[1~8]。目前国内外尚未确定单纯性高度近视的致病基因,但通过遗传连锁将其定位在多个基因座上,并确定其有多个致病基因^[8~11]。这使得对高度近视的基因研究变得非常困难。

认识高度近视的致病基因及其基因突变频谱,对高度近视的预防、诊断、治疗具有重要意义。本研究通过候选基因法对高度近视人群进行候选基因的突变筛查。*ZFP161* 基因处于 18p11.31 下游,紧邻单纯性高度近视的突变基因座 *MYP2* (*D18S63* ~ *D18S52* 之间 0.8cM 的区域)。与鼠类基因 *ZF5* 高度同源(99%)。*ZFP161* 基因含有 2 个外显子,外显

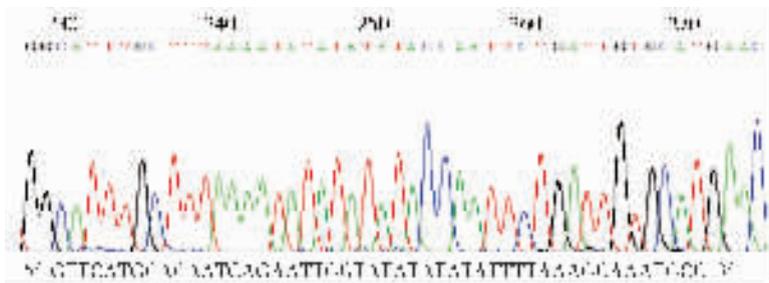


图 2 PCR 扩增产物外显子 1 部分测序结果

测序引物为 T7。

Fig. 2 Partial sequencing result of the PCR product of primer Exon1

The Primer is T7.

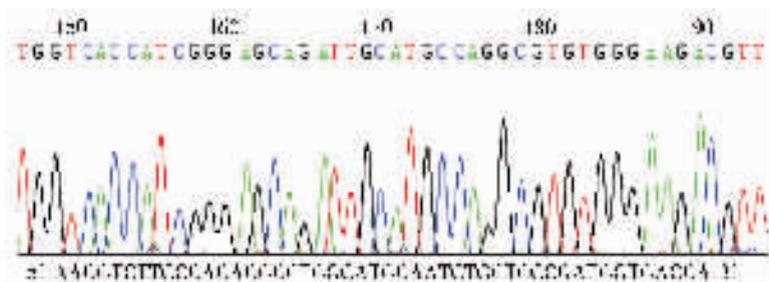


图 3 PCR 扩增产物 Exon2-1 部分测序结果

测序引物为 T7。

Fig. 3 Partial sequencing result of the PCR product of primer Exon2-1

The Primer is T7.

表 1 ZFP161 基因突变情况分析表

Table 1 Summary of mutations found in ZFP161 gene

突变类型 Mutation Type	位点改变 Changes of Site	先证者中突变频率 Frequencies of Mutation in Proband	正常对照中突变频率 Frequencies of Mutation in Normal Persons
IVS1	58-59ATins	1/204(0.49%)	0
Ala56Ala	2527C→A	5/204(2.45%)	3/116(2.59%)

注:核酸序列与 GenBank L7541 相同。

Note:DNA sequence is the same as L7541 on GenBank.

子 1 不编码,外显子 2 编码一种含有 449 个氨基酸、约 51kDa 的锌指蛋白 ZFP161,在多种组织均有表达。ZFP161 具有与其功能相关的 Kruppel-type C2H2 锌指结构域和高度保留的 BTB/POZ 结构域。其中 Kruppel-type C2H2 锌指结构域是 ZFP161 蛋白与 DNA 结合的必需结构域,而 BTB/POZ 结构域则与其转录抑制功能相关。鼠类中与人 ZFP161 蛋白高度同源的 ZF5 蛋白是原癌基因 c-MYC 和胸苷激酶 TK 的转录抑制因子,参与调节细胞的生长和增殖分化^[12,13]。因此,ZFP161 基因有可能参与了高度近视形成的调节。迄今尚未见对高度近视患者 ZFP161 基因进行分析的报道。我们

对 204 例高度近视先证者 ZFP161 基因进行分析,发现 ZFP161 基因存在 2 种突变:ZFP161 基因的内含子 1 的插入突变(IVS1 58-59ATins)不会影响 ZFP161 基因的转录剪接和 ZFP161 蛋白的结构;而 ZFP161 基因的 2527C→A 是同义突变,不会引起蛋白质改变,A 多态存在于 5 例先证者(5/204)和 3 例正常人(3/116)中。同时,人类基因组计划中 ZFP161 基因的测序工作尚未完成,本课题对目前 ZFP161 基因已知稳定序列进行了筛查,可以初步排除上述突变与高度近视之间的相关性,但不能完全否认 ZFP161 基因是高度近视致病基因的可能。而本研究也发现 ZFP161 基因存在多处突变。关于

单纯性高度近视的致病基因有待进一步的研究。

参 考 文 献 (References):

- [1] Krumpaszky H G, Haas A, Klauss V, Selbmann H K. New blindness incidents in Wurttemberg-Hohenzollern. *Ophthalmologie*, 1997, 94(3):234~236.
- [2] Kainulainen K, Karttunen L, Puhakka L, Sakai L, Peltonen L. Mutations in the fibrillin gene responsible for dominant ectopia lentis and neonatal Marfan syndrome. *Nat Genet*, 1994, 6: 64~69.
- [3] Ahmad N N, McDonald-McGinn D M, Dixon P, Zackai E H, Tasman W S. PCR assay confirms diagnosis in syndrome with variably expressed phenotype; mutation detection in Stickler syndrome. *J med Genet*, 1996, 33(8):678~681.
- [4] Cherny M, Brooks A M, Gillies W E. Progressive myopia in early onset chronic angle closure glaucoma. *J Ophthalmol*, 1992 Dec, 76(12):758~759.
- [5] Seaver L H, Joffe L, Spark R P, Smith B L, Hoyme H E. Congital scalp defects and vitreoretion degeneration; redefining the Knobloch syndrome. *Am J Med Genet*, 1993 Apr 15, 46(2):203~208.
- [6] HU Dan-Ning. Epidemiologic and genetic study of several primary genetic ophthalmic diseases in Chinese. *Acta Genetica Sinica*, 1988, 15(3):231~236.
胡诞宁. 几种主要遗传眼病在我国的发病情况与遗传规律. *遗传学报*, 1988, 15(3):231~236.
- [7] Gregg F M, Feinberg E B. X-linked Pathologic myopia. *Ann Ophthalmol*, 1992 Aug, 24(8):310~312.
- [8] Young T L, Atwood L D, Ronan S M, Dewan A T, Alvear A B, Peterson J, Holleschau A, King R A. Further refinement of the *MYP2* locus for autosomal dominant high myopia by linkage disequilibrium analysis. *Ophthalmic-Genet*, 2001 Jun, 22(2): 69~75.
- [9] Schwartz M, Haim M, Skarsholm D. X-linked myopia: Bornholm eye disease linkage to DNA markers on the distal part of Xq. *Clin Genet*, 1990 Oct, 281~286.
- [10] Young T L, Ronan S M, Alvear A B, Wildenberg S C, Oetting W S, Atwood L D, Wilkin D J, King R A. A Second Locus for Familial High Myopia Maps to Chromosome 12q. *Am J Hum Genet*, 1998(63):1419~1424.
- [11] Naiglin L, Gazagne C, Dallongeville F, Thalamas C, Idder A, Rascol O, Malecaze F, Calvas P. A genome wide scan for familial high myopia suggests a novel locus on chromosome 7q36. *J Med Genet*, 2002, 39:118~124.
- [12] Sobek-Klocke I, Disque-Kochem C, Ronsiek M, Klocke R, Jockusch H, Breuning A, Ponstingl H, Rojas K, Overhauser J, Eichenlaub-Ritter U. The human gene *ZFP161* on 18p11.21-pter encodes a putative c-MYC repressor and is homologous to murine *ZFP161* (Chr 17) and *ZFP161-rs1* (X Chr). *Genomics*, 1997 Jul 15, 43(2): 156~164.
- [13] Sugiura K, Muro Y, Nagai Y, Kamimoto T, Wakabayashi T, Ohashi M, Hagiwara M. Expression cloning and intracellular localization of a human *ZF5* homologue. *Biochim-Biophys-Acta*, 1997 May 2, 1352(1): 23~26.
- [14] Zbou G, William R W. Eye1 and Eye2: Gene Loci that modulate eye size, lens weight, and retinal area in the mouse. *IOVS* 1999, 40(5): 817~825.
- [15] Winawer J, Wallman J, Kee C. Differential responses of ocular length and choroids thickness in chick eyes to brief periods of plus and minus lens-wear. *Invest Ophthalmol Vis Sci Suppl*, 40, S963 1999.