

· 论著 ·

两例颗粒角膜营养不良患者临床特征及基因突变分析*

李瑾¹ 旷龙昊² 王婷² 黄滔² 闫晓河^{2,*}

1.暨南大学第二临床医学院 (广东 深圳 518000)

2.暨南大学附属深圳眼科医院眼底病科 (广东 深圳 518040)

【摘要】目的 分析两例颗粒状角膜营养不良(GCD)中年女性患者的临床特征及利用高通量测序结合PCR测序鉴定其基因突变位点。**方法** 结合两名患者典型临床表现及眼前段照相结果对临床特征进行分析, 并对其外周血进行目标序列捕获高通量测序技术结合PCR测序鉴定基因突变位点。**结果** 两名患者临床表现为反复发生的角膜刺激症状伴视力下降, 眼前段照相显示角膜基质层颗粒状或雪花状混浊, 患者外周血基因测序发现TGFB1基因上分别存在c.1663C>T:p.R555W及c.371G>A:p.R124杂合位点突变。**结论** 两名颗粒状角膜营养不良患者均表现为角膜刺激症状, 该疾病分别由TGFB1基因的c.1663C>T:p.R555W及c.371G>A:p.R124位点杂合突变导致, 基因检测分别诊断为GCD1型及GCD2型。

【关键词】 颗粒状角膜营养不良; 基因突变; TGFB1 基因

【中图分类号】 R772.23

【文献标识码】 A

【基金项目】 教育部留学回国人员科研启动基金[教外同留(2015)1098号]; 深圳市医疗卫生三名工程项目(SZSM202011015)

DOI:10.3969/j.issn.1009-3257.2022.03.008

Analysis of Clinical Manifestations and Gene Mutations in Two Patients with Granular Corneal Dystrophy*

LI Jin¹, KUANG Long-hao², WANG Ting², HUANG Tao², YAN Xiao-he^{2,*}.

1.The Second Clinical Medical College, Jinan University, Shenzhen 518000, Guangdong Province, China

2.Department of Fundus Diseases, Jinan University Shenzhen Eye Hospital Affiliated to Jinan University, Shenzhen 518040, Guangdong Province, China

Abstract: Objective To analyze the clinical manifestations and its genetic mutations in two Chinese female patients with Granular Corneal Dystrophy (GCD) by target sequence capture sequencing and PCR sequencing. **Methods** Clinical data and anterior segment photographs of both patients were collected, DNA was isolated from peripheral blood and chip capture high-throughput sequencing and PCR were used for mutation identification. **Results** The clinical manifestations of both patients were recurrent corneal irritation and decreased vision. The anterior segment photography showed granular or snowflake opacity in the corneal stromal layer. A heterozygous TGFB1 gene mutation (c.1663C>T:p.R555W or c.371G>A:p.R124) was found in each patient, respectively. **Conclusion** Both patients with granular corneal dystrophy showed symptoms of corneal irritation. We found a heterozygous mutation at c.1663C>T:p.R555W or c.371G>A:p.R124 in TGFB1 gene in each patient, respectively. GCD type 1 and GCD type 2 are diagnosed through genetic diagnosis.

Keywords: Granular Corneal Dystrophy; Gene Mutation; TGFB1 Gene

颗粒状角膜营养不良(granular corneal dystrophy, GCD)是常染色体显性角膜营养不良疾病, 其临床表型及遗传学特征具有高度特异性。近年来, 随着分子生物学的发展, 基因鉴定技术得到更广泛的推广, 对遗传性疾病的诊断提供了确切可靠的依据。本研究旨在对两例GCD患者的突变基因进行筛查鉴定, 这对于患者诊断和分型具有重要意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 在暨南大学附属深圳眼科医院收集两例颗粒状角膜营养不良患者, 两名患者均为中青年女性, 临床表现为反复出现的角膜刺激症状伴视力下降。本研究经过暨南大学深圳附属眼科医院伦理委员会批准, 患者签署基因检测知情同意书。

1.2 方法 抽取两名患者的外周血各2mL, 试管内用乙二胺四乙酸抗凝。从受检者外周血样本中提取基因组DNA, 采用韦翰斯生物定制的探针, 基于探针杂交捕获的方法, 捕获并富

集目标基因的外显子及毗邻剪接区域(约20bp)。构建好的文库经质检后, 通过高通量测序仪(Illumina HiSeq X)进行双端测序。下机的原始数据经质控后获得Clean data, 使用BWA软件通过与参考基因组比对分析, 经过GATK软件call出其中的SNV和InDel变异, 再用Clinvar、HGMD等专业数据库和预测软件进行注释分析, 筛选与受检者表型一致的变异位点。

1.3 眼科学检查 对受检者进行眼科检查, 包括视力、眼压, 眼前节裂隙灯及前置镜检查眼底; 辅助检查包括眼前段照相。

2 结果

2.1 受检者眼部临床特征及治疗 患者1是一名38岁女性, 主因“双眼畏光、红痛伴视力下降14d”来院。双眼戴镜矫正视力0.6。裂隙灯下检查发现双眼结膜充血(++), 角膜上皮糜烂, 浅层基质可见灰白色点状混浊, 合成大小不等点片状、雪花状混浊(图1A~图1B), 前房轴深4CT, 周边前房深1/2CT, 房水清, 瞳孔圆, 对光反射灵敏, 晶状体密度增高,

【第一作者】 李瑾, 女, 硕士研究生, 主要研究方向: 眼底病及遗传性眼部疾病。E-mail: 353666036@qq.com

【通讯作者】 闫晓河, 男, 副主任医师、副教授, 主要研究方向: 眼底病、遗传性眼病、眼科罕见病。E-mail: xhyan@jnu.edu.cn

玻璃体轻度混浊,眼底:视盘界清,色淡红,C/D约0.3,视网膜动静脉比约为2:3,视网膜平伏,黄斑中心凹反光可见。临床诊断为:角膜炎ou,角膜营养不良ou。治疗上以营养角膜和保护角膜上皮滴眼液为主。

患者2是一名39岁女性,以相同的双眼红痛、畏光、流泪主诉来我院门诊就诊。眼科查体显示:Vod 0.6++0.75DC×60矫正0.9;Vos 0.9矫正无助,裂隙灯下检查发现角膜上皮糜烂,基质层可见白色混浊,呈大小不等环状、雪花状、线条样混浊(图1C~1D)。临床诊断:角膜营养不良ou,予以小牛血去蛋白提取物滴眼液及玻璃酸钠滴眼液保护营养角膜上皮对症治疗。

两位患者均在近5年反复发生角膜上皮糜烂伴角膜刺激症状,角膜基质层出现白色点片状混浊(图1),视力出现不同程度受损,临床上以对症治疗为主。

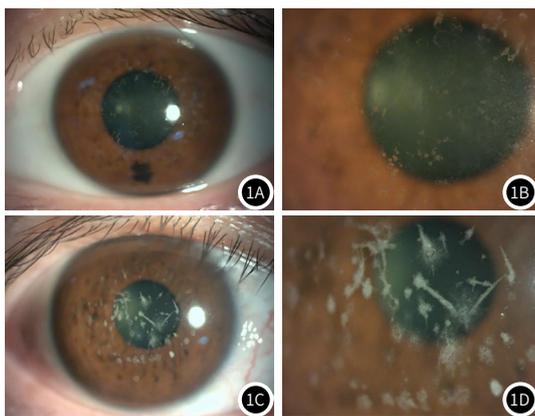


图1 颗粒状角膜营养不良患者角膜临床特征。患者1角膜浅层基质受累,可出现多个小而清晰圆形的灰白色颗粒,呈放射状及旋涡状,不累及角膜缘(图1A~图1B)。患者2角膜基质层可见白色混浊,呈大小不等环状、雪花状、线条样混浊,未累及角膜缘(图1C~图1D)。

2.2 GCD患者的基因突变筛查 通过目标序列捕获高通量测序技术筛选281个眼科疾病相关基因,经PCR一代测序鉴定核实患者1TGFBI基因存在杂合错义变异c.1663C>T:p.R555W(图2A),患者2发TGFBI基因存在杂合错义变异c.371G>A:p.R124(图2B)。

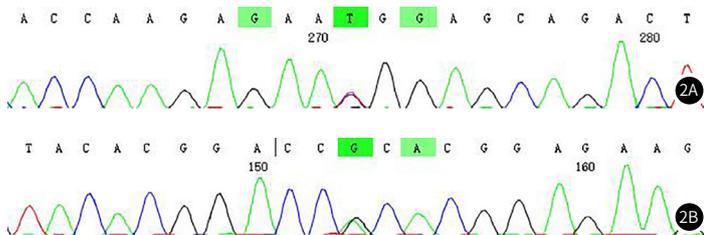


图2 颗粒状角膜营养不良患者基因检测结果。TGFBI基因测序图。图2A:患者1杂合突变位点c.1663C>T:p.R555W;图2B:患者2杂合突变位点c.371G>A:p.R124。

3 讨论

角膜营养不良是遗传性角膜疾病,是一组双眼性、原发性的有病理组织特征改变的疾病^[1-2]。其中颗粒状角膜营养不良是一组常见的常染色体显性遗传性角膜营养不良,主要由TGFBI基因突变导致^[3]。TGFBI基因,即转化生长因子β诱导

基因,位于染色体5q31.1,基因全长2804bp,包含17个外显子,编码683个氨基酸。TGFBI基因编码角膜上皮素,又称KE蛋白。KE蛋白的表达异常将导致各型GCD,但是在各个类型角膜营养不良中的发病机制至今仍不明确^[4]。

根据解剖学分类,GCD属于上皮-基质TGFBI相关营养不良^[2],GCD广义上可分为四型,包括:典型颗粒状角膜营养不良(granular corneal dystrophy type 1,GCD1)、颗粒状角膜营养不良2型(granular corneal dystrophy type 2,GCD2)、Reis-Bücklers角膜营养不良(Reis-Bücklers corneal dystrophy,RBCD)和Thiel-Behnkes角膜营养不良(Thiel-Behnkes corneal dystrophy,TBCD)。在我国,GCD 4种类型中GCD1最多,GCD2其次^[5]。

TGFBI基因上R555W突变常导致典型颗粒状角膜营养不良即1型GCD(GCD1),该型发病年龄最早可小于10岁,早期视力通常不会受到影响,角膜尚透明,表现为浅层基质受累,可出现多个小而清晰的灰白色颗粒混浊,呈放射状及旋涡状,不累及角膜缘。一般无角膜上皮层糜烂,症状不明显^[6]。随着年龄增长,基质层的混浊相互融合并向下角累及深层基质,颗粒增大,呈现雪花样外观,晚期延至角膜缘,患者在此时会出现明显的症状,从早期的眩光,畏光到晚期由于角膜上皮反复糜烂导致上皮凹凸不平进而导致散光及视力下降。电镜显示基质层蛋白沉积呈现“虫蚀样”外观^[6]。

TGFBI基因的R124H位点突变常导致颗粒状角膜营养不良2型(GCD2)。该类型最开始于1992年由意大利的Avellino医生所报道,又被称为“Avellino角膜营养不良(Avellinocornea dystrophy, ACD)”^[7]。后来发现在日本、韩国等亚洲地区更常见,故被ICD3更名为GCD2。该类型发病通常晚于其他GCD类型,症状轻,且疾病进展缓慢,通常不发生角膜上皮糜烂^[8]。平均来说,GCD2患者的视力好于GCD1。早期表现为角膜中央少量混浊,后期裂隙灯下可见“中空”环状混浊及“毛玻璃样”混浊,部分患者呈“手指状排列”其混浊特征表现为范围的扩大,而不是数量增多。病理学显示角膜基质层透明质及淀粉样蛋白沉积。此外,与杂合子患者相比,纯合子患者发病更早,进展更快,角膜表面呈灰白色混浊,视力在幼年时经常受损,需要及时行角膜移植手术治疗^[9]。

此外,GCD的其他两种类型。包括在四种类型中病变最严重的RBCD,可蔓延至角膜缘的地图状混浊,角膜上皮反复糜烂,多在5岁内起病,多与TGFBI基因的R124L位点突变相关。TBCD,又称蜂窝状角膜营养不良,临床表现与RBCD相似,角膜呈蜂窝状混浊是其标志特征,可累计除角膜缘1mm~2mm内的所有角膜前弹力层及基质,通常为TGFBI基因的12号外显子R555Q位点突变所致^[6-10]。

本研究中两名患者均表现为典型颗粒状角膜营养不良,临床上表现为反复出现的角膜上皮糜烂伴角膜刺激症状,针对患者临床表现及眼科学检查,对其进行了目标基因二代测序,发现其中患者1为TGFBI上杂合错义变异c.1663C>T:p.

(下转第25页)

R555W, 具有典型GCD1以角膜浅层基质雪花状混浊的特征表现。而患者2则被发现GCD2的罕见杂合错义变异c.371G>A:p.R124, 其角膜基质层具有环状、雪花状、线条样混浊。本研究在基因水平上进一步证实TFGBI基因与GCD的相关性, 对研究中国人GCD发病的分子致病机理有一定意义。另外, GCD致病基因位点很多, 基因型与临床表型之间缺乏明确的对应关系, 采用第二代高通量测序大大简化了基因检测流程, 现已在临床逐步开展^[11]。该测序通过目标序列捕获测序技术利用基因探针的捕获目标区域, 再对目标基因外显子及毗邻剪接区域富集, 最后用第二代测序技术进行测序。这种测序方法更高效, 成本更低, 在遗传病研究和基因检测中具有重要的作用。

目前临床上针对反复发作角膜瘢痕化, 散光大严重影响视力的患者, 主要手术治疗方式包括治疗性准分子激光角膜切削术 (phototherapeutic keratectomy, PTK)、穿透性角膜移植术 (penetrating keratoplasty, PK)、板层角膜移植术 (lamellar keratoplasty, LK)、同种穿透性角膜中央-角膜缘成形术。其中, PTK是临床上常用的治疗GCD的方式, 但其较易复发, PK复发率较低, 但其排斥反应发生率高^[1]。此外, 角膜接触镜、局部滴眼液等作为辅助治疗方式, 但仅能解决角膜上皮糜烂引起的刺激症状, 对视力的提高无明显改善。对于此类基因所致的角膜上皮营养不良疾病, 基因治疗是其主要根治方法。未来基因治疗及3D人工角膜打印等新技术的发展将会为遗传性角膜致盲性疾病的治疗带来新的突破。

本研究分析了两例颗粒状角膜营养不良女性患者的临床特征, 利用高通量测序结合PCR测序鉴定其分别存在

c.1663C>T:p.R555W及c.371G>A:p.R124杂合位点突变, 并通过基因检测结果对该疾病进行分型, 对研究我国GCD分子遗传学及其致病机制具有一定的意义。

参考文献

- [1] 葛坚, 王宁利, 黎晓新, 等. 眼科学 (供8年制及7年制临床医学等各专业用) [M]. 北京: 人民卫生出版社. 2015.
- [2] Weiss J S, Møller H U, Aldave A J, et al. IC3D classification of corneal dystrophies—edition 2 [J]. *Cornea*, 2015, 34 (2): 117–159.
- [3] Eiberg H, Møller H U, Berendt I, et al. Assignment of granular corneal dystrophy Groenouw type I (CDGG₁) to chromosome 5q [J]. *Eur J Hum Genet*, 1994, 2 (2): 132–138.
- [4] Munier F L, Schorderet D F. Chromosome 5q31 linked corneal dystrophies: Outline for a new classification [J]. *Klin Monbl Augenheilkd*, 2001, 218 (3): 136–139.
- [5] Yang J, Han X, Huang D, et al. Analysis of TGFBI gene mutations in Chinese patients with corneal dystrophies and review of the literature [J]. *Mol Vis*, 2010, 16: 1186–1193.
- [6] Han K E, Choi S I, Kim T I, et al. Pathogenesis and treatments of TGFBI corneal dystrophies [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2016, 50: 67–88.
- [7] Holland E J, Daya S M, Stone E M, et al. Avellino corneal dystrophy. Clinical manifestations and natural history [J]. *Ophthalmology*, 1992, 99 (10): 1564–1568.
- [8] Kim H S, Rim T H, Kim T I, et al. Association between visual acuity and the corneal area occupied by granular lesions, linear lesions, or diffuse haze in patients with granular corneal dystrophy type 2 [J]. *Cornea*, 2018, 37 (5): 542–547.
- [9] Moon J W, Kim S W, Kim T I, et al. Homozygous granular corneal dystrophy type II (Avellino corneal dystrophy) Natural history and progression after treatment [J]. *Cornea*, 2007, 26 (9): 1095–1100.
- [10] Lisch W, Weiss J S. Clinical and genetic update of corneal dystrophies [J]. *Exp Eye Res*. 2019, 86: 107715.
- [11] 耿健, 孙爱梅. Rubinstein-Taybi综合征一例报告 [J]. *罕少疾病杂志*, 2021, 28 (6): 6–7, 10.

(收稿日期: 2021-12-22)