

论 著  
(临床研究)

## 一个 Leber 先天性黑蒙症家系的分子诊断与产前诊断

余秀蓉, 刘伊楚, 兰风华, 曾 健, 林 娟, 王志红

**【摘要】 目的** 对 1 个 Leber 先天性黑蒙症 (LCA) 家系进行基因突变分析, 并对该家系中的 1 个高危胎儿进行产前分子诊断。 **方法** 采集该家系先证者及其父母外周血, 使用二代测序方法查找先证者致病基因及突变位点, 并用 Sanger 测序验证该突变位点。明确先证者及其父母基因型后, 采集羊水标本, 通过 PCR 扩增及直接测序的方法进行产前分子诊断。 **结果** 该家系先证者为 *IQCB1* 基因 c. 1090C>T 纯合突变。父母均为 *IQCB1* 基因 c. 1090C>T 杂合突变。胎儿携带与父母相同的 c. 1090C>T 杂合突变。 **结论** 建立了对 LCA 进行分子诊断和产前分子诊断的方法, 并成功应用于一个 LCA 家系, 为该家系进行遗传咨询和指导生育。

**【关键词】** Leber 先天性黑蒙症; 眼-肾综合征; 二代测序; *IQCB1* 基因; 产前诊断

**【中图分类号】** R774.1 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1672-271X(2021)06-0619-04

**【DOI】** 10.3969/j.issn.1672-271X.2021.06.013

## Molecular diagnosis and prenatal diagnosis in a Leber congenital amaurosis family

YU Xiu-rong<sup>1</sup>, LIU Yi-chu<sup>2</sup>, LAN Feng-hua<sup>1</sup>, ZENG Jian<sup>1</sup>, LIN Juan<sup>1</sup>, WANG Zhi-hong<sup>1</sup>

(1. Center for Medical Genetics, Laboratory of Basic Medicine, 2. Department of Clinical Laboratory, Dongfang Hospital of Xiamen University Medical College/Fuzong Clinical College of Fujian Medical University/900th Hospital of the Joint Logistics Team, PLA, Fuzhou 350025, Fujian, China)

**【Abstract】 Objective** To identify the mutation in *IQCB1* gene and provide prenatal diagnosis for a Leber congenital amaurosis (LCA) family. **Methods** The disease-causing mutation in the proband was discovered by next generation sequencing. To confirm this mutation, the genomic DNA of the proband and his parents was analyzed by Sanger sequencing. Prenatal diagnosis was performed by amniocentesis sampling and direct sequencing of the PCR product after genotyping the proband and the parents. **Results** In the family, the affected proband was a homozygote for the mutation c. 1090C>T in the *IQCB1* gene and his parents were heterozygous for the mutation. The fetus carried the same heterozygous mutation with the parents. **Conclusion** Methods for molecular diagnosis and prenatal molecular diagnosis of LCA were established and successfully applied to a LCA family for genetic counseling and reproduction guidance.

**【Key words】** Leber congenital amaurosis; Senior-Loken syndrome; next generation sequencing; *IQCB1* gene; prenatal diagnosis

## 0 引 言

Leber 先天性黑蒙症 (Leber congenital amaurosis, LCA) 是 1869 年由德国眼科医师 Theodor

Leber 首先报道<sup>[1]</sup>。该病是最严重的遗传性视网膜疾病, 可导致婴儿在出生后 1 个月内完全丧失视力<sup>[2]</sup>。患儿常表现为眼球震颤、固视障碍、畏光、按压眼球、黑蒙性瞳孔等眼部症状。视网膜电图 (electroretinogram, ERG) 表现为 a、b 波平坦, 甚至消失, 具有诊断价值。LCA 具有遗传和临床异质性, 多数为常染色体隐性遗传, 也有少数报道为常染色体显性遗传, 基因突变谱在不同的种群间存在

作者单位: 350025 福州, 厦门大学附属东方医院 (解放军联勤保障部队第九〇〇医院)/福建医科大学福总临床医学院基础医学实验室医学遗传中心 (余秀蓉、兰风华、曾 健、林 娟、王志红), 检验科 (刘伊楚)

通信作者: 王志红, E-mail: xiaonvwang@163.com

差异<sup>[3]</sup>。LCA 常见的致病基因主要有 *CEP290*、*GUCY2D*、*CRB1*、*RPE65*、*IMPDH1*、*AIPL1* 和 *RPGRIP1* 等,约 50%~60% 的 LCA 患者可以通过基因检测明确病因<sup>[4]</sup>。本研究采用二代测序方法对一个 LCA 家系的先证者进行基因诊断,并通过 PCR 扩增及直接测序方法对该家系的高危胎儿进行产前分子诊断,并回顾了相关文献。

## 1 资料与方法

**1.1 研究对象** 先证者,女,2014 年 12 月生,1 岁,因“生后不能视物”就诊于我院眼科,眼科检查:角膜透明,瞳孔直径 2.5 mm,对光反应存在,眼球震颤,眼球内陷,指眼征阳性。标准全视野 ERG:双眼未引出正常波形,双眼各振幅熄灭。眼底照相提示视网膜色素变性,显示周边视网膜色素沉着,见图 1。患儿肾脏彩超、生化全套、动脉血气分析、尿常规、尿微量蛋白检查均正常,患儿听力正常,智力、运动发育正常。根据患者病史及检查结果,临床拟诊 LCA。先证者父母既往身体健康,无 LCA 家族史。先证者母亲再次妊娠 16 周行遗传咨询,并要求对先证者行 LCA 相关的基因诊断以及对所怀胎儿进行产前诊断。家系图见图 2。本研究经本院伦理委员会批准(批准号:2016019),先证者父母均签署知情同意书。

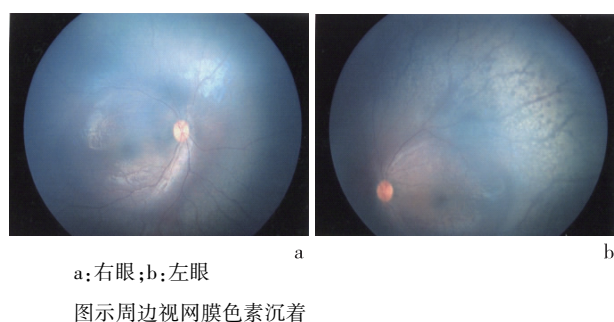
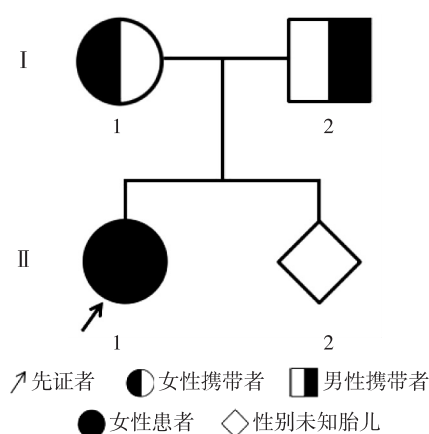


图 1 Leber 先天性黑蒙症患者眼底照相

## 1.2 方法

**1.2.1 基因组 DNA 提取** 采集先证者及其父母外周血各 2 mL,先证者母亲妊娠 20 周,由产科医师穿刺抽取其羊水约 10 mL。使用 DNA 提取试剂盒(Qiagen 公司)分别提取该家系的外周血和羊水细胞的基因组 DNA,并将 DNA 样本置-20℃冰箱保存备用。



I-1: 先证者母亲; I-2 先证者父亲; II-1: 先证者; II-2: 胎儿

图 2 Leber 先天性黑蒙症家系图

**1.2.2 二代测序** 先证者外周血送深圳华大临床检验中心进行 LCA 相关的基因 Panel (*AIPL1*、*CABP4*、*CEP290*、*CRB1*、*CRX*、*GUCY2D*、*IQCB1*、*LCA5*、*LRAT*、*RD3*、*RDH12*、*RPE65*、*RPGRIP1*、*SPATA7*、*TULP1*、*IMPDH1*、*OTX2*、*KCNJ13* 和 *NMNAT1*) 检测。主要包括 DNA 文库制备,芯片捕获和富集,测序仪完成基因检测,基因突变分析并结合致病变异和正常人基因组等数据库筛选出 LCA 相关的变异。

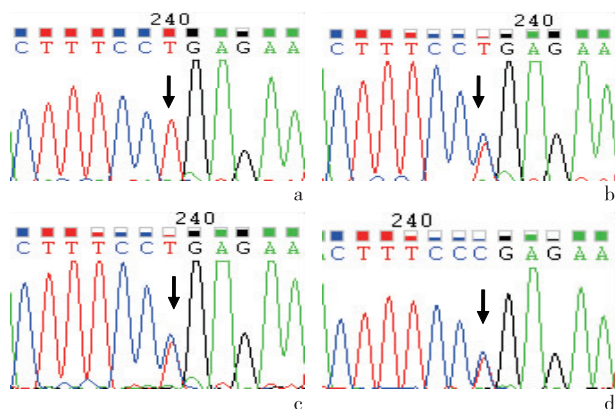
**1.2.3 Sanger 测序** 针对先证者在 *IQCB1* 第 11 外显子发现的突变,按照参考文献<sup>[5]</sup>,由铂尚生物技术(上海)合成覆盖突变位点的引物,上游序列: 5'-AGATTGCACAACAGCAGCAG-3',下游序列: 5'-TCATCACGTAGCTAGAAAAGTTGG-3'。扩增产物片段长度为 389 bp,包含 *IQCB1* 基因 c. 1090C>T 突变位点。对先证者及其父母和高危胎儿的基因组 DNA 进行 PCR 扩增,配置 PCR 反应体系,设置循环参数: 95℃/5 min; 95℃/30 s, 56℃/30 s, 72℃/30 s, 共 35 个循环; 72℃/5 min。PCR 产物送铂尚生物技术(上海)有限公司进行 Sanger 测序。

**1.2.4 母体基因组污染排除** 取胎儿羊水细胞和父母外周血的基因组 DNA,按照参考文献<sup>[6]</sup>用 Identifiler 试剂盒(ABI 公司)进行 PCR 扩增,使用 3100 Avant 遗传分析仪(ABI 公司)检测 15 个短串联重复序列(short tandem repeat, STR),再用 GeneMapper Software v3.7 软件鉴定 STR 位点。根据母亲独有的 STR 位点是否在羊水细胞样本中出现,判断是否存在母体基因组污染<sup>[7]</sup>。

## 2 结 果

**2.1 二代测序** LCA 相关基因 Panel 测序发现先证者 *IQCB1* 基因 c. 1090C>T (p. R364X) 纯合突变。该突变为已知致病性突变。

**2.2 Sanger 测序** 测序结果证实先证者存在 *IQCB1* 基因 c. 1090C>T 纯合突变, 先证者父母和高危胎儿的 *IQCB1* 外显子 11 基因测序显示均为 c. 1090C>T 杂合突变, 见图 3。



a:先证者(Ⅱ-1)检出*IQCB1*基因c.1090C>T纯合突变;b:  
先证者父亲(Ⅰ-2)检出*IQCB1*基因c.1090C>T杂合突变;  
c:先证者母亲(Ⅰ-1)检出*IQCB1*基因c.1090C>T杂合突  
变;d:胎儿(Ⅱ-2)检出*IQCB1*基因c.1090C>T杂合突变

图3 Leber 先天性黑蒙症家系 *IQCB1* 基因外显子 11 部分序列图

### 2.3 母体基因组 DNA 污染的排除

胎儿及其父母基因组 DNA 的 STR 位点分析结果显示:母亲基因组 DNA 独有的 STR 位点均未在胎儿羊水细胞中出现,羊水细胞基因组 DNA 来自独立个体,因此,可以排除母体基因组 DNA 污染。

### 3 讨 论

*IQCB1* (IQ motif containing B1) 基因, 也称 *NPHP5* (nephrocystin-5) 基因, 是眼-肾综合征 (Senior-Loken syndrome, SLSN) 最常见的致病基因, 该病呈常染色体隐性遗传<sup>[8]</sup>。近年来 *IQCB1* 基因突变报道主要见于 LCA 和 SLSN 患者, 截至 2019 年 4 月, 人类基因突变数据库 (The Human Gene Mutation Database) 已收录 44 种突变类型, 包括 19 种无义与错义突变、6 种剪接突变、12 种小片段缺失突变和 7 种小片段插入突变。通过二代测序, 本研究发现先证者存在 *IQCB1* 基因 c. 1090C > T

(p. R364X) 致病性纯合突变。该突变由美国 Khanna 等<sup>[9]</sup>于 2009 年首次报道, Tong 等<sup>[5]</sup>和 Yu 等<sup>[10]</sup>在 3 个中国 SLSN 患者检测出该纯合突变。通过一代测序验证, 先证者的父母亲都携带有 *IQCB1* 基因 c. 1090C>T 杂合突变, 他们没有眼部及肾脏的病变, 符合常染色体隐性遗传的特征。

*IQCB1* 基因位于 3q13.3, 有 15 个外显子, 编码由 598 个氨基酸残基组成的蛋白, 其中包含一个螺旋结构域 (340-373 氨基酸残基) 和两个钙调蛋白 IQ 结合域 (294-323 和 387-416 氨基酸残基)。该蛋白主要表达在连接感光细胞的纤毛和肾小管上皮细胞的初级纤毛, 负责上皮细胞的完整性。有研究表明该蛋白合成障碍会导致视网膜变性和肾囊肿形成<sup>[8]</sup>。c. 1090C>T (p. R364X) 为无义突变, 该突变提前引入终止密码子, 使得 mRNA 转录提前终止, 产生由 363 个氨基酸组成的异常截短蛋白。由于该截短蛋白丧失了原有蛋白完整的螺旋结构域和钙调蛋白 IQ 结合域, 导致蛋白功能缺陷, 从而致病。

*IQCB1* 基因突变所致的 SLSN 典型临床表现是视网膜和肾脏的病变,而无其他器官损害。该型患者 100% 会出现视网膜病变,重者早期出现 LCA,轻者表现为轻度视力损害和视网膜色素变性,部分患者可仅表现为早发视网膜色素变性或 LCA 而无肾功能衰竭<sup>[11-12]</sup>。2016 年,美国犹他大学的 Ronquillo 等<sup>[13]</sup>对 *IQCB1* 基因敲除小鼠进行实验研究,发现 *IQCB1* 基因编码的蛋白对小鼠光感受器外节层形成至关重要,但对小鼠肾脏和小鼠胚胎成纤维细胞纤毛的形成不是必须的。有研究表明,*IQCB1* 基因突变患者发生肾功能衰竭的年龄差异较大,早者 3 岁发病,迟者可延迟到 50 岁,因此,仅表现为 LCA 的患者发生肾功能衰竭的风险高,若未能早期诊断,有可能突然死于水电解质失衡<sup>[14]</sup>。目前 *IQCB1* 基因已成为临床表型为 LCA 和 (或) 肾单位肾病 (nephronophthisis, NPHP) 患者的共同筛查基因,可明显提高 SLSN 的临床诊断率。

本研究中先证者目前仅表现出 LCA 而无肾脏病变,需要定期进行尿常规、尿微量蛋白、肾功能等监测以达到早发现早治疗、预防肾衰竭的目的。目前,虽然有报道基因治疗方法应用该病的临床治疗<sup>[15]</sup>,但是产前诊断/胚胎植入前产前诊断仍然是预防此类患儿出生的主要途径。本研究中胎儿检测结果为 *IQCB1* 基因 c. 1090C>T 杂合突变,根据

遗传规律,该胎儿出生后患 SLSN 的风险低。先证者母亲于妊娠 36 周 2 天顺产 1 健康女孩,LCA / NPHP 相关的眼部及肾脏检查均未发现异常。

# 【参考文献】

- [1] Koenekoop RK. An overview of Leber congenital amaurosis: a model to understand human retinal development[J]. *Surv Ophthalmol*, 2004, 49(4): 379-398.
- [2] Perrault I, Rozet JM, Gerber S, *et al.* Leber congenital amaurosis[J]. *Mol Genet Metab*, 1999, 68(2): 200-208.
- [3] Wang S, Zhang Q, Zhang X, *et al.* Clinical and genetic characteristics of Leber congenital amaurosis with novel mutations in known genes based on a Chinese eastern coast Han population [J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2016, 254(11): 2227-2238.
- [4] Cremers FP, van den Hurk JA, den Hollander AI. Molecular genetics of Leber congenital amaurosis[J]. *Hum Mol Genet*, 2002, 11(10): 1169-1176.
- [5] Tong H, Yue Z, Sun L, *et al.* Clinical features and mutation of NPHP5 in two Chinese siblings with Senior-Loken syndrome[J]. *Nephrology (Carlton)*, 2013, 18(12): 838-842.
- [6] Lan F, Wang Z, Ke L, *et al.* A rapid and sensitive protocol for prenatal molecular diagnosis of X-linked adrenoleukodystrophy [J]. *Clin Chim Acta*, 2010, 411(23-24): 1992-1997.
- [7] 严爱贞,郑德柱,曾 健,等. 21 羟化酶缺乏症高风险胎儿的产前诊断分析[J]. *东南国防医药*, 2013, 15(6): 573-576.
- [8] Otto EA, Loeys B, Khanna H, *et al.* Nephrocystin-5, a ciliary IQ domain protein, is mutated in Senior-Loken syndrome and interacts with RPGR and calmodulin[J]. *Nat Genet*, 2005, 37(3): 282-288.
- [9] Khanna H, Davis EE, Murga-Zamalloa CA, *et al.* A common allele in RPGRIP1L is a modifier of retinal degeneration in ciliopathies[J]. *Nat Genet*, 2009, 41(6): 739-745.
- [10] Yu PH, Kuo YR, Altmüller J, *et al.* Senior-Loken syndrome with IQCB1 mutation in Taiwan [J]. *Kaohsiung J Med Sci*, 2018, 34(10): 588-589.
- [11] Ronquillo CC, Bernstein PS, Baehr W. Senior-Loken syndrome: a syndromic form of retinal dystrophy associated with nephronophthisis[J]. *Vision Res*, 2012, 75: 88-97.
- [12] Chaki M, Hoefele J, Allen SJ, *et al.* Genotype-phenotype correlation in 440 patients with NPHP-related ciliopathies[J]. *Kidney Int*, 2011, 80(11): 1239-1245.
- [13] Ronquillo CC, Hanke-Gogokhia C, Revelo MP, *et al.* Ciliopathy-associated IQCB1/NPHP5 protein is required for mouse photoreceptor outer segment formation [J]. *FASEB J*, 2016, 30(10): 3400-3412.
- [14] Estrada-Cuzcano A, Koenekoop RK, Coppieters F, *et al.* IQCB1 mutations in patients with leber congenital amaurosis[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011, 52(2): 834-839.
- [15] Sumaroka A, Garafalo AV, Semenov EP, *et al.* Treatment Potential for Macular Cone Vision in Leber Congenital Amaurosis Due to CEP290 or NPHP5 Mutations: Predictions From Artificial Intelligence. [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2019, 60(7): 2551-2562.

(收稿日期:2020-10-09; 修回日期:2021-05-10)

(责任编辑:叶华珍; 英文编辑:朱一超)