

# 家族性渗出性玻璃体视网膜病变患者 *LRP5* 基因突变研究

刘玉庆<sup>1,3</sup>, 朱雄<sup>1,3</sup>, 李姝锦<sup>4</sup>, 杨业明<sup>1,3</sup>, 杨牧<sup>1,4</sup>, 赵培泉<sup>2</sup>, 朱献军<sup>1,3,4</sup>

1. 电子科技大学医学院, 电子科技大学附属医院, 四川省人民医院人类疾病基因研究四川省重点实验室, 成都 610072;
2. 上海交通大学医学院附属新华医院眼科学系, 上海 200092;
3. 四川省医学科学院, 四川省人民医院实验动物研究所, 成都 610212;
4. 中国科学院成都生物研究所, 成都 610042

**摘要:** 家族性渗出性玻璃体视网膜病变(familial exudative vitreoretinopathy, FEVR)是一种遗传性眼科疾病, 主要特征为视网膜周边血管发育异常和病变。由于病变程度不同, 临床表型可从无明显症状到眼睛完全失明。本文通过研究 3 个中国 FEVR 家系和 1 个散发型患者, 探索其致病突变与疾病表型之间的关系。收集家系中患者及亲属的外周血制备基因组 DNA, 设计引物以扩增 FEVR 致病基因 *FZD4*、*LRP5*、*NDP* 和 *TSPAN12* 的外显子区域并通过 Sanger 法进行测序。结果发现, 在 *LRP5* 基因上存在 3 个未在 dbSNP 数据库及千人基因组计划数据库中报道过的杂合突变 p.M181R、p.R399S 和 p.G503R, 以及 2 个已发现但未在 FEVR 中报道过的杂合突变 p.R494Q 和 p.G876S。生物信息学分析表明这 5 个突变位点均高度保守, 为有害突变。荧光素酶报告基因实验证明了这 5 个突变均不能激活 Norrin/ $\beta$ -catenin 信号通路, 进一步证明了这 5 个突变的致病性。该研究扩充了我国 FEVR 疾病的遗传数据库, 可为该疾病的分子诊断提供依据。

**关键词:** 家族性渗出性玻璃体视网膜病变; 低密度脂蛋白受体相关蛋白 5; 基因突变

## Identification of *LRP5* mutations in families with familial exudative vitreoretinopathy

Yuqing Liu<sup>1,3</sup>, Xiong Zhu<sup>1,3</sup>, Shujin Li<sup>4</sup>, Yeming Yang<sup>1,3</sup>, Mu Yang<sup>1,4</sup>,  
Peiquan Zhao<sup>2</sup>, Xianjun Zhu<sup>1,3,4</sup>

1. Sichuan Provincial Key Laboratory for Human Disease Gene Study, Hospital of the University of Electronic Science and Technology of China and Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610072, China;
2. Department of Ophthalmology, Xinhua Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200092, China;
3. Institute of Laboratory Animal Sciences, Sichuan Academy of Medical Sciences and Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610212 China;
4. Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610042, China

收稿日期: 2016-10-16; 修回日期: 2017-01-18

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 81470668, 81271007)和四川省科技厅项目(编号: 2014JQ0023, 2016TD0009)资助[Supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 81470668, 81271007) and Sichuan Science and Technology Department project (Nos. 2014JQ0023, 2016TD0009)]

作者简介: 刘玉庆, 硕士研究生, 专业方向: 生物医学工程。E-mail: liuyuqing610@yeah.net

朱雄, 博士研究生, 专业方向: 生物医学工程。E-mail: zhuxiong7555711@163.com

刘玉庆和朱雄为并列第一作者。

通讯作者: 朱献军, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 疾病基因研究。E-mail: xjzhu@uestc.edu.cn

DOI: 10.16288/j.yczs.16-339

网络出版时间: 2017/2/17 10:27:10

URI: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20170217.1027.006.html>

**Abstract:** Familial exudative vitreoretinopathy (FEVR) is a hereditary eye disease characterized by defects in the development of periphery retinal vessels. However, the clinical phenotypes of FEVR vary widely from asymptomatic to complete blindness. We analyzed patients from three Chinese families and one sporadic patient with FEVR to investigate the clinical features and disease-causing mutations. Ocular phenotypes included increased ramification of the peripheral retinal vessels, a peripheral avascular zone, inferotemporal dragging of the optic disc and macula, and retinal folds. Peripheral blood DNA samples were obtained from patients with FEVR and their family members. Primers were designed to amplify the coding exons and adjacent intronic regions of the FEVR-causing genes *FZD4*, *LRP5*, *NDP* and *TSPAN12*. By polymerase chain reactions, each amplicon was subjected to direct Sanger sequencing analysis. Potential pathogenic changes of the sequence variants were analyzed by the orthologous protein sequence alignment and computational prediction software. We identified five *LRP5* mutations: three novel heterozygous mutations-p.M181R, p.R399S and p.G503R and two known mutations that were never reported in FEVR patients: p.R494Q and p.G876S. All five mutations involved highly conserved residues and were predicted to be damaging by SIFT and PolyPhen-2. None was present in 500 normal individuals. To assess the pathogenesis of these mutations, wild-type and all five mutant *LRP5* proteins were assayed for the ability to activate the Norrin/ $\beta$ -catenin pathway by established luciferase reporter assays, and all mutants failed to activate the pathway. This study extends the genetic database of the FEVR disease in China and provides a basis for molecular diagnosis of the disease.

**Keywords:** familial exudative vitreoretinopathy (FEVR); low density lipoprotein receptor related protein-5 (LRP5); gene mutation

家族渗出性玻璃体视网膜病变(familial exudative vitreoretinopathy, FEVR)是一种遗传性眼科疾病,其特点是周边部视网膜血管发育异常,最早由Criswick及Schepens于1969年报道<sup>[1]</sup>。患者由于周边部视网膜血管发育缺陷,导致视力不同程度受损,也可发展为视网膜脱落<sup>[2]</sup>。目前已发现FEVR可表现出多种方式遗传,包括常染色体显性遗传<sup>[3-5]</sup>,常染色体隐性遗传<sup>[6,7]</sup>和伴X连锁遗传<sup>[8-10]</sup>,其中以常染色体显性遗传最为常见<sup>[11,12]</sup>。现已发现5个与FEVR相关的致病基因,其中4个基因参与了Wnt/Norrin- $\beta$ -catenin信号通路,包括卷曲蛋白4(frizzled 4, *FZD4*)<sup>[13,14]</sup>、低密度脂蛋白5(low-density lipoprotein receptor-related protein 5, *LRP5*)<sup>[15-17]</sup>、Norrie蛋白(*NDP*)<sup>[8-12]</sup>和四跨膜蛋白-12(*TSPAN12*)<sup>[17]</sup>。Wnt/Norrin- $\beta$ -catenin信号通路在组织发育、细胞分化方面都起到了非常重要的作用,参与细胞的生长、增殖和迁移,与血管生成密切相关。而第5个致病基因,锌指蛋白408(*ZNF408*)<sup>[18,19]</sup>最近也被证实在斑马鱼中参与了正常血管的生长。本研究在FEVR患者样本中发现3个从未被报道的*LRP5*新突变,以及2个已被发现但未在FEVR中报道的突变。进一步运用基于HEK293 STF细胞的荧光素酶报告基因检测系

统分析这5个突变位点对*LRP5*蛋白功能的影响,发现这5个突变导致*LRP5*蛋白丧失了激活Norrin/ $\beta$ -catenin信号通路的活性。

## 1 研究对象和方法

### 1.1 病人和临床检查

本研究符合赫尔辛基宣言,遵照中国卫生部颁发的人类遗传疾病标本的采集指南,并得到上海交通大学医学院附属新华医院伦理委员会和电子科技大学医学院附属医院四川省人民医院伦理委员会的批准。所有患者及家属(3个家系和1个散发病例共10人)和500例对照受试者均签署了知情同意书,未成年受试者由其监护人签署了知情同意书。500例正常对照均经眼底检查,没有发现任何眼科疾病。

### 1.2 突变检测

采集外周静脉血约5~10 mL,血样用EDTA二钾抗凝剂进行抗凝处理,4℃抗凝保存,在采血后24 h内进行处理,使用盐析法提取基因组DNA。采用Premier 6对*FZD4*、*LRP5*、*TSPAN12*、*NDP*四个基因的外显子编码区设计引物,至少包含内含子100个碱基。PCR产物经QIAquick Gel Extraction Kit纯

化(Qiagen, USA), 使用 Sanger 法进行测序(ABI Applied Biosystems, USA), 同时对原发患者的家族其他成员进行测序分析, 最后使用 ABI software version 5.3 读取结果。

### 1.3 生物信息学分析

将人类 *Homo sapiens* (NP\_002326.2) *LRP5* 蛋白序列和其他种属: 鸡 *Gallus gallus* (NP\_001012915.1), 小鼠 *Mus musculus* (NP\_032539.2), 大鼠 *Rattus norvegicus* (NP\_001099791.2), 狼 *Canis lupus* (XP\_003432463.1), 牛 *Bos taurus* (XP\_002699451.1), 黑猩猩 *Pan troglodytes* (XP\_508605.3) 的氨基酸序列进行同源性比较(数据来源: <http://www.ebi.ac.uk/clustalw>), 判断该突变位点及附近氨基酸的保守性。采用软件 SIFT 和 PolyPhen-2 进行生物信息学分析, 分析 *LRP5* 基因错义突变是否可能引起蛋白结构和功能的改变。

### 1.4 构建表达质粒

使用限制性内切酶 *Xba* I 和 *Hind* III 将野生型 *LRP5* 编码区序列(Origene, USA)克隆至载体 pRK5 (BD company, USA)内, 构建野生型 *LRP5* 真核表达质粒 pRK5-*LRP5*。 *FZD4* 和 *Norrin* 的表达质粒由 Dr. Jeremy Nathans 提供<sup>[20]</sup>。使用 Agilent 公司的 QuikChange Mutagenesis Kit 构建突变型 *LRP5* 表达质粒并进行测序验证。

### 1.5 细胞荧光素酶活性检测试验

本研究使用 HEK293 STF 细胞。这种细胞株携带 SuperTopflash(STF)报告基因(在报告基因中 7 个 LEF/TCF 串联结合位点驱动萤火虫荧光素酶表达), 能够在 Wnt/Norrin 信号诱导下表达荧光素酶, 因此可以通过检测荧光素酶表达水平方便地检测 Wnt/Norrin- $\beta$ -catenin 信号通路的活化程度。将适量 HEK293 STF 细胞接种于 24 孔板中, 每孔中的细胞数大致相同, 于 37°C 细胞培养箱内培养过夜。第二天 24 孔板中每孔的细胞密度达到 90% 左右, 用 Lipofectamine 2000 转染试剂将以下各质粒共转染至 HEK293 STF 细胞: 野生型或突变型 *LRP5* 的表达质粒 240 ng、野生型 *NDP* 质粒 200 ng、*FZD4* 质粒 200 ng 和 pSV- $\beta$ -gal 质粒 100 ng (Promega, USA) (内参)。转

染 48 h 后吸去培养液, 以预冷的 PBS 缓冲液洗涤细胞 2 遍, 双荧光素酶检测试剂盒(dual-luciferase assay reagents, Promega, USA)测定报告基因活性, 以  $\beta$  半乳糖苷酶活性值来校正每个样品的荧光素酶的荧光强度, 同一反应重复 3 个孔, 每个实验重复 3 次。

### 1.6 突变型 *LRP5* 蛋白在细胞中的表达

将适量 HEK293 STF 细胞种于六孔板中, 使每孔细胞数相同, 加入 2 mL 的 DMEM 高糖培养基(含有 10% 胎牛血清和 1% 青/链霉素), 培养所用试剂均购自美国 Hyclone 公司。细胞汇合度达 70% 时分别加入含 1  $\mu$ g 野生型或突变型 *LRP5* 质粒/脂质体混合物。48 h 后收集细胞进行免疫印迹检测。同时接种 COS7 细胞至 24 孔板(无菌的盖玻片预先放置到每个孔的底部), 将 400 ng *LRP5* 质粒(野生型或突变体)或 400 ng pCMV6 空载体质粒按照说明书转染 24 孔板的细胞。48 h 后用 1×PBS 洗涤细胞 3 次之后 4% 多聚甲醛固定(PFA)细胞 15 min, 1×PBS 洗涤后细胞直接用于免疫荧光实验。

## 2 结果与分析

### 2.1 临床表型

在家系 3015 中, 先证者是一个 5 岁的男孩, 两眼典型的镰状视网膜皱褶; 其父亲是该突变的携带者, 父亲通过荧光素眼底血管造影术(fluorescein fundus angiography, FFA)检查显示周边部视网膜无血管区和周边视网膜血管异常(图 1, A~D)。3008 家系中, 先证者是一个女孩, 双侧视网膜黄斑皱褶。其母亲有正常的眼底, 但是父亲通过 FFA 检查表现出典型眼底改变, 包括周边视网膜血管分叉和周边视网膜的无血管区(图 1, E~H)。3095 家系中, 先证者是一个两岁的男孩两只眼睛出现典型的镰状影响的黄斑视网膜皱褶(图 1, I~L)。另外一个散发病例 FEVR315 经眼科专家诊断为 FEVR, 但由于年龄太小, 没有眼底检查结果。

### 2.2 测序结果分析

在 3095 家系先证者的 FEVR 候选(或致病)基因中发现了 2 个突变, 其中 c.G566A(p.C189Y)是一个已知的 *TSPAN12* 突变<sup>[17]</sup>, 另外一个为 *LRP5* 的变异 c.A394G(p.I132V)(图 2)。该家系的致病突变是已知的

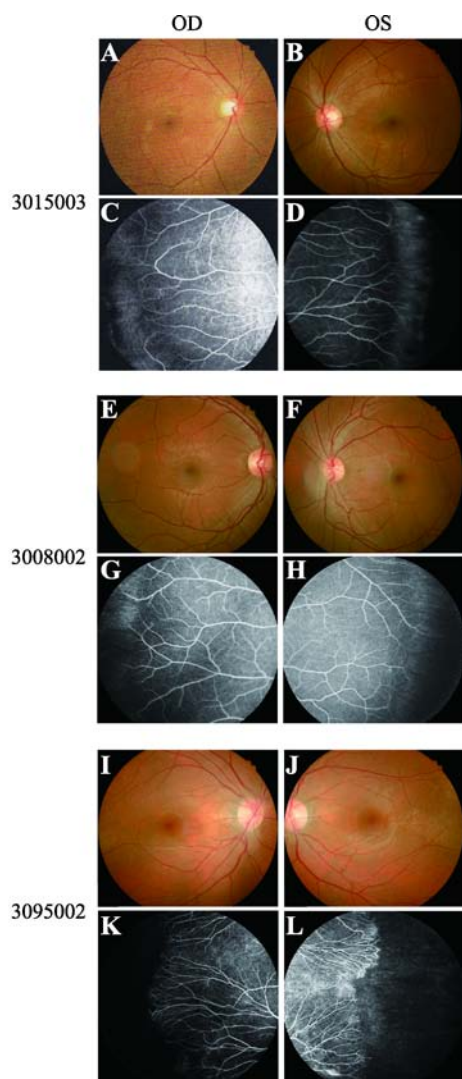


图 1 家系成员眼底照片和视网膜血管造影检查结果  
Fig. 1 Fundus photographs and retinal angiography results of family members

3015 家系中, A、B 分别显示患者父亲(3015003)右眼和左眼的后极部眼底正常; C、D 分别为患者父亲右眼和左眼 FFA 显示周边部视网膜无血管区, 视网膜血管呈毛刷样改变, 并伴有环状血管末梢交通。3008 家系中, E、F 分别显示患者父亲(3008002)右眼和左眼后极部眼底正常; G、H 分别为患儿父亲右眼和左眼 FFA。显示双眼周边部视网膜无灌注区, 视网膜周边部血管晚期可见荧光渗漏。周边部视网膜可见新生血管。3095 家系中, I、J 分别显示患儿母亲(3095002)右眼和左眼的后极部眼底正常; K、L 分别为患儿母亲右眼和左眼 FFA。显示周边部视网膜无血管区, 周边视网膜形成无灌注区, 可见视网膜无血管区的形成, 及其之间形成的分界带, 周边血管分支增多、迂曲、异常吻合。OD 代表右眼, OS 代表左眼。

*TSPAN12* c.G566A(p.C189Y)突变<sup>[17]</sup>。在 3015 家系中, 先证者及其父亲均携带 *LRP5* 基因第 7 外显子的杂合错义突变 c.G1481A(图 2), 该突变导致 *LRP5* 蛋白

第 494 位的谷氨酰胺变为精氨酸(p.R494Q)。该突变在相应的家系中与疾病表型共分离。在 3008 家系中, 先证者和其有症状的父亲均存在 *LRP5* 基因第 7 号外显子复合杂合错义突变 c.G1507A(p.G503R)和 c.G1197T(p.R399S)(图 2)。散发病例 FEVR315 中有 2 个突变 c.T542G(p.M181R)和 c.G2626A(p.G876S)(图 3)。这 5 个突变在相应的家系中与疾病表型共分离, 并且在 500 个正常对照中均未发现。在 7 种同源基因的蛋白质序列中进行比较, 这 5 个突变均在高度保守区(图 4)<sup>[20]</sup>。通过 SIFT 和 PolyPhen-2 等软件进行相关生物信息学预测, 结果表明突变会对蛋白的功能造成损害(表 1)。

### 2.3 *LRP5* 基因突变的致病性分析结果

为进一步确证发现的 *LRP5* 基因突变的致病性, 根据测序结果构建了 *LRP5* 突变质粒, 并将其与携带 *NDP*、*FZD4* 和 p SV-将其半乳糖苷酶(*Lac Z*)(内参)基因的质粒共同导入 HEK293 STF 细胞系, 进行了荧光素酶活性实验。在生理情况下, *Norrin*、*FZD4* 和 *LRP5* 构成的复合体能够激活 *Wnt* 或 *Norrin* 激活酶活性实验。这一过程可通过对 *Norrin* 应答的荧光素酶活性报告体系来诠释。

#### 2.3.1 *LRP5* 致病突变表达及定位分析

构建 *LRP5* 致病突变表达质粒(包括野生型和突变型), 分别进行细胞转染, 结合免疫组化等方法, 通过高分辨激光共聚焦显微镜、荧光共定位等分析其在细胞膜上的表达及定位情况, 发现 *LRP5* 蛋白在细胞膜和细胞质都有表达, 但是包含 p.G876S 突变的质粒没有检测到荧光信号, 说明 p.G876S 突变使 *LRP5* 蛋白不稳定(图 5A)。

#### 2.3.2 *LRP5* 致病突变表达 Western blot 分析

使用 anti-*LRP5* 抗体直接检测 *LRP5* 蛋白,  $\beta$ -actin 作为内参。结果显示大多数 *LRP5* 基因突变的表达水平与野生型相一致, 但是 p.M181R 和 p.G876R 突变蛋白不稳定(图 5B)。

#### 2.3.3 荧光素酶活性实验结果

通过荧光素酶活性检测来确定在复杂的生理条件下这 5 个 *LRP5* 蛋白的突变能否激活 *Wnt/Norrin*-



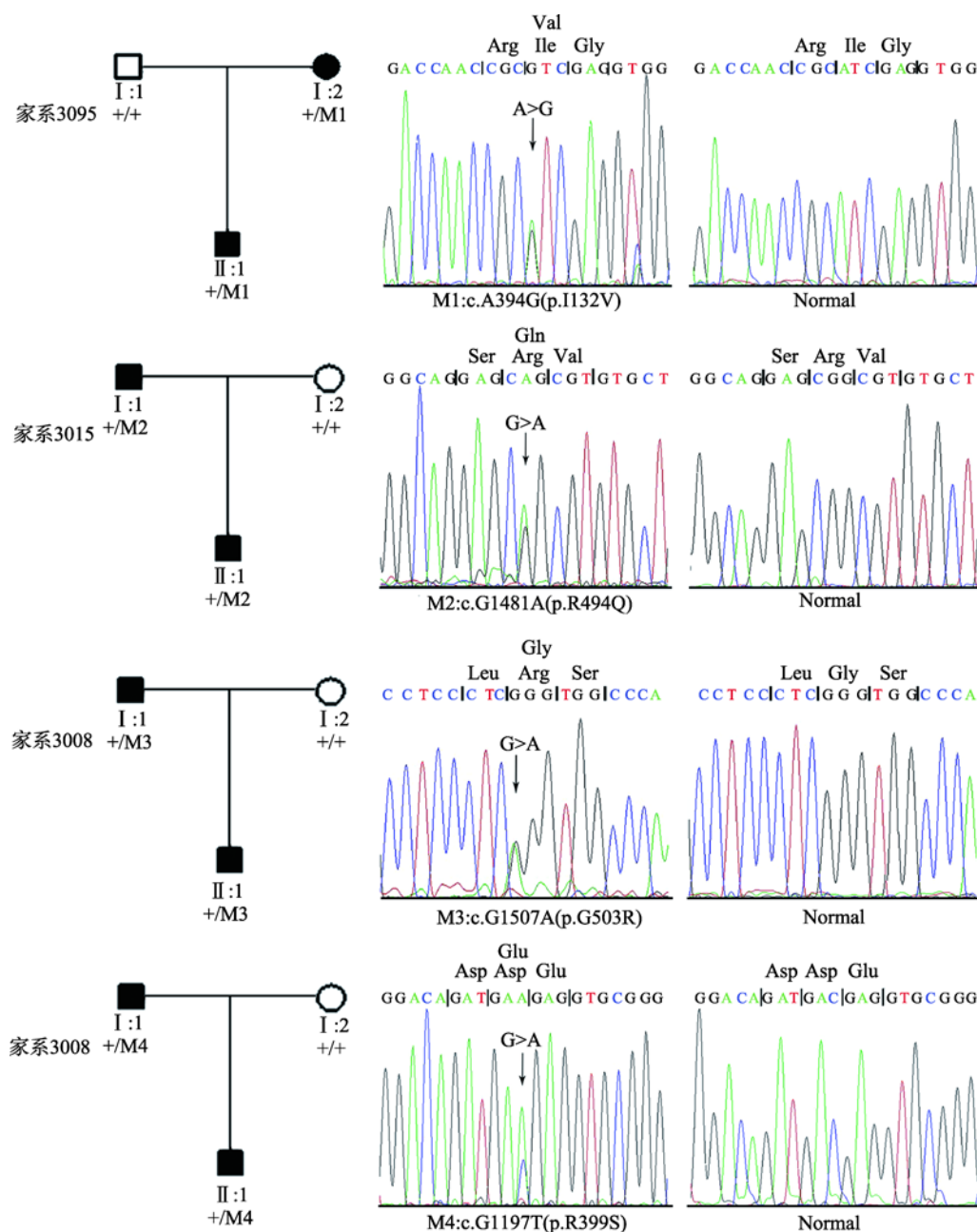


图 2 3 个 FEVR 家系中 *LRP5* 基因位点突变检测结果

Fig. 2 Identification of *LRP5* mutations in three FEVR families

家系 3095 中患者及其患病的母亲的 *LRP5* 基因上的突变 c.A394G(p.I132V)。家系 3015 中患者及其患病的父亲的 *LRP5* 基因上的突变 c.G1481A(p.R540Q)。家系 3008 中患者及其患病的父亲的 *LRP5* 基因上的突变 c.G1507A(p.G503R)和 c.G1197T(p.R399S)；右侧分别为野生型对照。

$\beta$ -catenin 信号通路。结果显示 5 个 *LRP5* 的突变都引起了荧光素酶活性均有显著下降(图 5C)。与既往文献报道相似,阳性对照(*LRP5* p.R570Q)荧光强度较野生型 *LRP5* 也有显著下降,说明本研究中荧光素酶活性实验结果可靠<sup>[19]</sup>。这些数据进一步说明

这 5 个突变是具有致病性的。

### 3 讨论

本研究中的患者临床表现多样,从无任何症状到完全失明。对于无临床症状的患者,通过荧光素

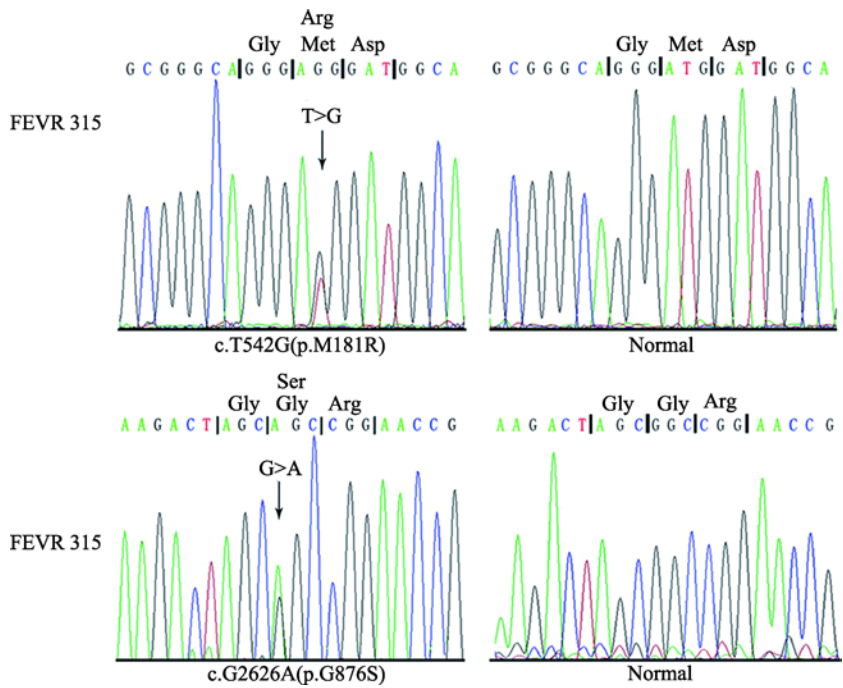


图 3 FEVR315 散发病例中 *LRP5* 基因位点突变检测结果  
Fig. 3 Identification of *LRP5* mutations in the sporadic FEVR patient FEVR315  
散发病例 FEVR315 的 *LRP5* 基因上的两个突变 p.M181R 和 p.G876S；右侧为野生型正常对照。

表 1 *LRP5* 基因突变及其功能预测结果  
Table 1 *LRP5* gene mutations and bioinformatic prediction results

先证者	外显子	蛋白质变化	Provean(cutoff=-2.5)	SIFT(cutoff=0.05)	PolyPhen-2(cutoff=1)
FEVR315	3	M181R	-5.12	0.000, 损害	0.999, 很可能
FEVR315	12	G876S	-5.12	0.000, 损害	1.000, 很可能
3008001	6	R399S	-5.29	0.001, 损害	0.679, 有可能
3008001	7	G503R	-4.19	0.034, 损害	0.986, 很可能
3015001	7	R494Q	-3.44	0.000, 损害	0.995, 很可能
3095001	2	I132V	-0.79	0.004, 损害	0.913, 很可能

血管造影来观察眼底血管病变情况，这样得到的外显率较早期只通过依据临床症状而确诊的概率明显提高。因此，在分子水平对家系进行 FEVR 的突变检测对诊断家族渗出性视网膜病变具有非常重要的意义<sup>[21~23]</sup>。

FEVR 病人的表型不一，通常表现为视网膜周边血管发育异常和病变，为典型的遗传病，通常会随着年龄的增长病情变得越来越重，具体发病年龄不固定。*FZD4*、*LRP5*、*TSPAN12* 和 *ZNF408* 等基因的突变可解释约 50% 的 FEVR 病例，*FZD4* 编码的跨膜蛋白 FRIZZLED-4 与 Wnt 通路有关，它的突变导致了信号通路受阻，引起病变。*TSPAN12* 基因突变

导致的表型的致病机制与 *LRP5* 相似，但它的病情表现的较重。*ZNF408* 基因与视网膜血管的出芽障碍有关，但具体的机制尚未阐明<sup>[18]</sup>。本文主要研究了 *LRP5* 突变对 FEVR 发病的影响。

*LRP5* 蛋白在人体的多项生理活动中起到重要的作用。到目前为止，已经有 30 多个突变被证实与 FEVR 疾病相关。*LRP5* 蛋白是一个多功能的细胞表面受体，由 1615 个氨基酸组成。其结构由 4 个细胞外域、1 个跨膜区和 1 个细胞内区 3 个部分组成的单次跨膜蛋白。每个胞外域结构由 6 个节段组成，形成了一个  $\beta$  螺旋桨结构，之后连接一个内皮生长因子(endothelial growth factor, EGF)样结构域。在这

	I132V	M181R	R399S
<i>H. sapiens</i>	LYWTDSE <sup>NI</sup> EVANLNGTSR	GETPRIERAG <sup>MD</sup> GSTRKIIIVD	WTDDEVRAIR <sup>RAY</sup> LDGSGAQ <sup>T</sup>
<i>G. gallus</i>	LYWTDSE <sup>NI</sup> EVANLNGTSR	GETPRIERAG <sup>MD</sup> GSTRKIIIVD	WTDDEVRAIR <sup>RAY</sup> LDGSGAQ <sup>T</sup>
<i>M. musculus</i>	LYWTDSE <sup>NI</sup> EVANLNGTSR	GETPRIERAG <sup>MD</sup> GSTRKIIIVD	WTDDEVRAIR <sup>RAY</sup> LDGSGAQ <sup>T</sup>
<i>R. norvegicus</i>	LYWTDSE <sup>NI</sup> EVANLNGTSR	GETPRIERAG <sup>MD</sup> GSTRKIIIVD	WTDDEVRAIR <sup>RAY</sup> LDGSGAQ <sup>T</sup>
<i>C. lupus</i>	LYWTDSE <sup>NI</sup> EVANLNGTSR	GEAPRIERAG <sup>MD</sup> GSTRKIIIVD	WTDDEVRAIR <sup>RAY</sup> LDGSGAQ <sup>T</sup>
<i>B. taurus</i>	LYWTDSE <sup>NI</sup> EVANLNGTSR	GEAPRIERAG <sup>MD</sup> GSTRKIIIVD	WTDDEVRAIR <sup>RAY</sup> LDGSGAQ <sup>T</sup>
<i>P. troglodytes</i>	LYWTDSE <sup>NI</sup> EVANLNGTSR	GETPRIERAG <sup>MD</sup> SSTRKIIIVD	WTDDEVRAIR <sup>RAY</sup> LDGSGAQ <sup>T</sup>
	R494Q	G503R	G876S
<i>H. sapiens</i>	IECANLDGQ <sup>ER</sup> RVLVNASL <sup>GW</sup>	ERRVLVNASL <sup>GW</sup> PNGALALDL <sup>Q</sup>	HSIERADKTS <sup>G</sup> GRNRTL <sup>IQ</sup> GH <sup>L</sup>
<i>G. gallus</i>	IECANLDGQ <sup>ER</sup> RVLVNASL <sup>GW</sup>	ERRVLVNASL <sup>GW</sup> PNGALALDL <sup>Q</sup>	HSIERADKTS <sup>G</sup> GRNRTL <sup>IQ</sup> GH <sup>L</sup>
<i>M. musculus</i>	IECANLDGQ <sup>ER</sup> HILVNTSL <sup>GW</sup>	ERHILVNTSL <sup>GW</sup> PNGALALDL <sup>Q</sup>	HSIERADKTS <sup>G</sup> GRNRTL <sup>IQ</sup> GH <sup>L</sup>
<i>R. norvegicus</i>	IECANLDGQ <sup>ER</sup> HILVNTSL <sup>GW</sup>	ERHILVNTSL <sup>GW</sup> PNGALALDL <sup>Q</sup>	HSIERADKTS <sup>G</sup> GRNRTL <sup>IQ</sup> GH <sup>L</sup>
<i>C. lupus</i>	IECANLDGR <sup>D</sup> RHVLVNTSL <sup>GW</sup>	DRHVLVNTSL <sup>GW</sup> PNGALALDL <sup>Q</sup>	HSIERADKTS <sup>G</sup> GRNRTL <sup>IQ</sup> GH <sup>L</sup>
<i>B. taurus</i>	IECANLDGR <sup>D</sup> RHVLVNTSL <sup>GW</sup>	DRHVLVNTSL <sup>GW</sup> PNGALALDL <sup>Q</sup>	HSIERADKTS <sup>G</sup> GRNRTL <sup>IQ</sup> GH <sup>L</sup>
<i>P. troglodytes</i>	IECAYLDGSE <sup>ER</sup> RVLVNTSL <sup>GW</sup>	ERRVLVNTSL <sup>GW</sup> PNGALALDL <sup>E</sup>	HSIERADKTS <sup>G</sup> GRNRTL <sup>IQ</sup> GH <sup>L</sup>

图 4 7 种不同物种中 LRP5 蛋白突变氨基酸序列同源性比较

**Fig. 4 The sequence alignment of affected amino acid residues of mutant LRP5 proteins in seven species**

7 种物种分别为：人 *H. sapiens* (NP\_002326.2)，鸡 *G. gallus* (NP\_001012915.1)，小鼠 *M. musculus*(NP\_032539.2)，大鼠 *R. norvegicus* (NP\_001099791.2)，狼 *C. lupus*(XP\_003432463.1)，牛 *B. taurus*(XP\_002699451.1)，类人猿 *P. troglodytes*(XP\_508605.3)。6 个错义突变氨基酸及其附近序列(红色标记)是高度保守的。

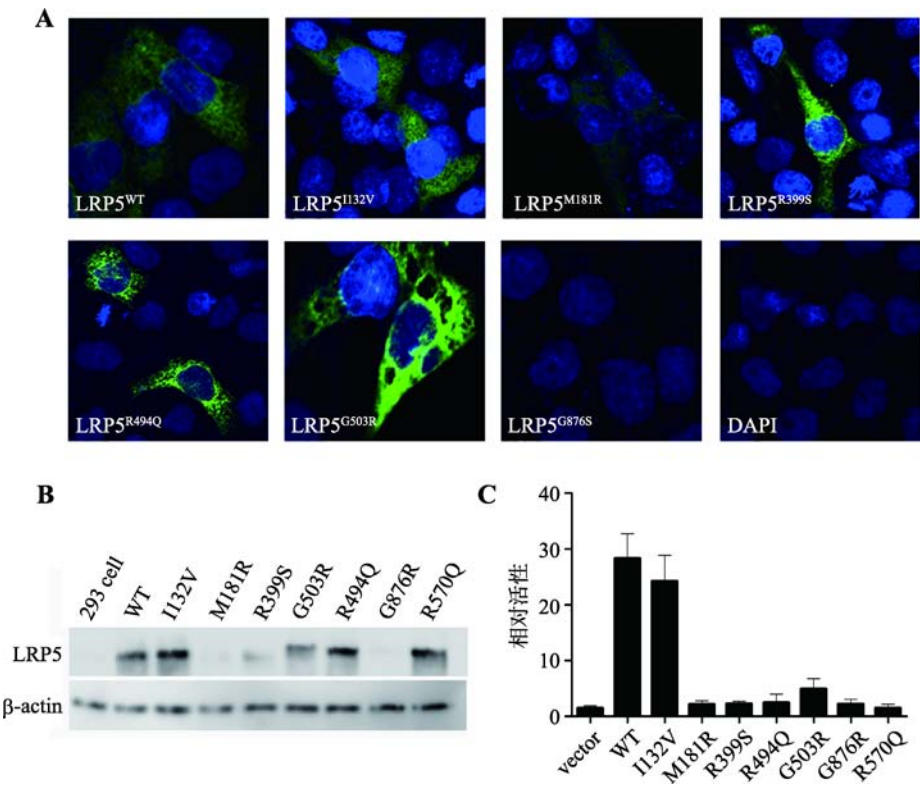


图 5 FEVR 突变 LRP5 蛋白功能分析

**Fig. 5 Functional analyses of LRP5 mutant proteins identified in this study**

A：COS7 细胞转染了带有野生型 LRP5 的质粒和突变型 LRP5 的质粒，进行细胞免疫荧光实验。结果显示突变 p.M181R 荧光信号很弱而 p.G876S 没有检测到荧光信号。B：免疫印迹实验显示大多数 LRP5 基因突变的表达水平与野生型(WT)相一致，但是 p.M181R 和 p.G876R 突变蛋白不稳定。C：荧光素酶活性检测结果显示 5 个 LRP5 的突变(p.M181R、p.R399S、p.R494Q、p.G503R 和 p.G876S)都引起了荧光素酶活性显著下降。阳性对照(LRP5 p.R570Q)荧光强度较野生型 LRP5 有显著下降，LRP5c. A394G(p.I132V)没有引起荧光素酶活下降。vector 代表空载体质粒。

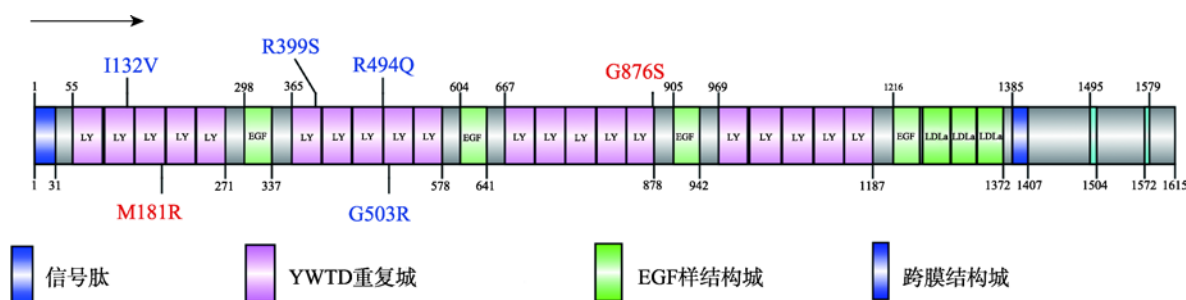


图 6 本研究中检测到的 FEVR 相关突变在 LRP5 蛋白结构位置

Fig. 6 Localization of FEVR mutations in the LRP5 protein detected in this study

6 个节段中, 前 5 个为酪氨酸-色氨酸-苏氨酸-天冬氨酸(Tyr-Trp-Thr-Asp, YWTD)LDL-B 类重复结构, 第 6 个则不包含 YWTD 结构(图 6)。

本研究在 3 个 FEVR 家系和 1 个散发病例中分别发现了 5 个 LRP5 的突变位点, 这 5 个突变在相应的家系中与疾病表型共分离, 并且在 500 个正常对照中均未发现。p.R494Q 和 p.G876S 突变已被报道可引起骨质酥松症, 但是在我们所研究的病例中并没有发现有骨质酥松症的临床表型, 可能是由于遗传背景差异所致。这 5 个突变都位于 LRP5 基因的  $\beta$  螺旋桨结构(YWTD-EGF domain), 之前的研究已表明 YWTD-EGF domain 是 LDL-R 家族蛋白的中心结构区域<sup>[24,25]</sup>。突变 p.M181R 位于第一个  $\beta$  螺旋桨结构, 荧光素酶活性实验显示 p.M181R 突变能导致荧光素酶活性的显著下降, 基本丧失了活性。

突变 p.R399S、p.R494Q 和 p.G503R 位于第 2 个  $\beta$  螺旋桨结构, 荧光素酶活性实验显示这 3 个突变能导致荧光素酶活性显著下降。与之前报道的位于第 2 个  $\beta$  螺旋桨结构的突变(p.A422T, p.L540P 和 p.R570Q)结果一致<sup>[17,26,27]</sup>。突变 G876S 位于第 3 个 YWTD 间隔重复结构域, ICC 和 Western blot 结果显示这个突变导致该蛋白可能已丧失荧光素酶活性。以上结果表明本研究发现的 5 个突变是具有致病性的。

综上所述, 通过荧光素酶活性实验和其他体外实验对 LRP5 基因突变的致病性结果分析显示本研究发现的 5 个 LRP5 基因突变(p.M181R、p.R399S、p.R494Q、p.G503R 和 G876S)在 FEVR 病变过程中均发挥了重要作用。

## 参考文献(References):

[1] Criswick VG, Schepens CL. Familial exudative vitreore-

tinopathy. *Am J Ophthalmol*, 1969, 68(4): 578-594. [DOI]

[2] Canny CL, Oliver GL. Fluorescein angiographic findings in familial exudative vitreoretinopathy. *Arch Ophthalmol*, 1976, 94(7): 1114-1120. [DOI]

[3] Vannouhuys CE. Dominant exudative vitreoretinopathy. *Ophthalmic Paediatr Genet*, 1985, 5(1-2): 31-38. [DOI]

[4] Feldman EL, Norris JL, Cleasby GW. Autosomal dominant exudative vitreoretinopathy. *Arch Ophthalmol*, 1983, 101(10): 1532-1535. [DOI]

[5] Gow J, Oliver GL. Familial exudative vitreoretinopathy. An expanded view. *Arch Ophthalmol*, 1971, 86(2): 150-155. [DOI]

[6] de Crecchio G, Simonelli F, Nunziata G, Mazzeo S, Greco GM, Rinaldi E, Ventruto V, Ciccocicola A, Miano MG, Testa F, Curci A, D'Urso M, Rinaldi MM, Cavaliere ML, Castelluccio P. Autosomal recessive familial exudative vitreoretinopathy: evidence for genetic heterogeneity. *Clin Genet*, 1998, 54(4): 315-320. [DOI]

[7] Shastri BS, Trese MT. Familial exudative vitreoretinopathy: further evidence for genetic heterogeneity. *Am J Med Genet*, 1997, 69(2): 217-218. [DOI]

[8] Chen ZY, Battinelli EM, Fielder A, Bunday S, Sims K, Breakefield XO, Craig IW. A mutation in the Norrie disease gene (NDP) associated with X-linked familial exudative vitreoretinopathy. *Nat Genet*, 1993, 5(2): 180-183. [DOI]

[9] Plager DA, Orgel IK, Ellis FD, Hartzler M, Trese MT, Shastri BS. X-linked recessive familial exudative vitreoretinopathy. *Am J Ophthalmol*, 1992, 114(2): 145-148. [DOI]

[10] Berger W, van de Pol D, Warburg M, Gal A, Bleeker-Wagemakers L, de Silva H, Meindl A, Meitinger T, Cremers F, Ropers HH. Mutations in the candidate gene for Norrie disease. *Hum Mol Genet*, 1992, 1(7): 461-465. [DOI]

[11] Shastri BS, Hejtmancik JF, Hiraoka M, Ibaraki N, Okubo



- Y, Okubo A, Han DP, Trese MT. Linkage and candidate gene analysis of autosomal-dominant familial exudative vitreoretinopathy. *Clin Genet*, 2000, 58(4): 329–332. [DOI]
- [12] Kondo H, Ohno K, Tahira T, Hayashi H, Oshima K, Hayashi K. Delineation of the critical interval for the familial exudative vitreoretinopathy gene by linkage and haplotype analysis. *Hum Genet*, 2001, 108(5): 368–375. [DOI]
- [13] Fei P, Zhu X, Jiang ZL, Ma S, Li J, Zhang Q, Zhou Y, Xu Y, Tai ZF, Zhang L, Huang LL, Yang ZL, Zhao PQ, Zhu XJ. Identification and functional analysis of novel *FZD4* mutations in Han Chinese with familial exudative vitreoretinopathy. *Sci Rep*, 2015, 5: 16120. [DOI]
- [14] Robitaille J, MacDonald MLE, Kaykas A, Sheldahl LC, Zeisler J, Dubé MP, Zhang LH, Singaraja RR, Guernsey DL, Zheng BY, Siebert LF, Hoskin-Mott A, Trese MT, Pimstone SN, Shastry BS, Moon RT, Hayden MR, Goldberg YP, Samuels ME. Mutant frizzled-4 disrupts retinal angiogenesis in familial exudative vitreoretinopathy. *Nat Genet*, 2002, 32(2): 326–330. [DOI]
- [15] Jiao XD, Ventruto V, Trese MT, Shastry BS, Hejtmancik JF. Autosomal recessive familial exudative vitreoretinopathy is associated with mutations in *LRP5*. *Am J Hum Genet*, 2004, 75(5): 878–884. [DOI]
- [16] Toomes C, Bottomley HM, Jackson RM, Towns KV, Scott S, Mackey DA, Craig JE, Jiang L, Yang ZL, Trembath R, Woodruff G, Gregory-Evans CY, Gregory-Evans K, Parker MJ, Black GCM, Downey LM, Zhang K, Inglehearn CF. Mutations in *LRP5* or *FZD4* underlie the common familial exudative vitreoretinopathy locus on chromosome 11q. *Am J Hum Genet*, 2004, 74(4): 721–730. [DOI]
- [17] Xu Y, Huang LL, Li J, Zhang Q, Fei P, Zhu X, Tai ZF, Ma S, Gong B, Li Y, Zang WZ, Zhu XJ, Zhao PQ, Yang ZL. Novel mutations in the *TSPAN12* gene in Chinese patients with familial exudative vitreoretinopathy. *Mol Vis*, 2014, 20: 1296–1306. [DOI]
- [18] Collin RWJ, Nikopoulos K, Dona M, Gilissen C, Hoischen A, Boonstra FN, Poulter JA, Kondo H, Berger W, Toomes C, Tahira T, Mohn LR, Blokland EA, Hetttershijt L, Ali M, Groothuismink JM, Duijkers L, Inglehearn CF, Sollfrank L, Strom TM, Uchio E, van Nouhuys CE, Kremer H, Veltman JA, van Wijk E, Cremers FPM. *ZNF408* is mutated in familial exudative vitreoretinopathy and is crucial for the development of zebrafish retinal vasculature. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(24): 9856–9861. [DOI]
- [19] Xu Q, Wang YS, Dabdoub A, Smallwood PM, Williams J, Woods C, Kelley MW, Jiang L, Tasman W, Zhang K, Nathans J. Vascular development in the retina and inner ear: control by norrin and frizzled-4, a high-affinity ligand-receptor pair. *Cell*, 2004, 116(6): 883–895. [DOI]
- [20] Guo YB. Sequencing technology in gene diagnosis and its application. *Hereditas (Beijing)*, 2014, 36(11): 1121–1130. 郭奕斌. 基因诊断中测序技术的应用及优缺点. 遗传, 2014, 36(11): 1121–1130. [DOI]
- [21] Chang RN, Yuan GG, Tan JQ, Lai QN, Ma J, Yang YJ, Shu W, Hou W, Yuan ZG. Analysis of *SCA3/MJD3* gene mutation and genetic polymorphism in a Guangxi family with spinocerebellar ataxia 3. *Hereditas (Beijing)*, 2013, 35(11): 1300–1306. 畅荣妮, 袁广之, 谭建强, 赖青鸟, 马军, 杨益金, 舒伟, 侯伟, 袁志刚. 广西一脊髓小脑共济失调 3 型家系 *SCA3/MJD* 基因突变和多态性的分析. 遗传, 2013, 35(11): 1300–1306. [DOI]
- [22] Musada GR, Syed H, Jalali S, Chakrabarti S, Kaur I. Mutation spectrum of the *FZD-4*, *TSPAN12* AND *ZNF408* genes in Indian FEVR patients. *BMC Ophthalmol*, 2016, 16: 90. [DOI]
- [23] Salvo J, Lyubasyuk V, Xu MC, Wang H, Wang F, Nguyen D, Wang KQ, Luo HR, Wen C, Shi C, Lin DN, Zhang K, Chen R. Next-Generation Sequencing and novel variant determination in a cohort of 92 familial exudative vitreoretinopathy patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2015, 56(3): 1937–1946. [DOI]
- [24] Springer TA. An extracellular  $\beta$ -propeller module predicted in lipoprotein and scavenger receptors, tyrosine kinases, epidermal growth factor precursor, and extracellular matrix components. *J Mol Biol*, 1998, 283(4): 837–862. [DOI]
- [25] Jeon H, Meng WY, Takagi J, Eck MJ, Springer TA, Blacklow SC. Implications for familial hypercholesterolemia from the structure of the LDL receptor YWTD-EGF domain pair. *Nat Struct Biol*, 2001, 8(6): 499–504. [DOI]
- [26] Mao BY, Wu W, Li Y, Hoppe D, Stanek P, Glinka A, Niehrs C. LDL-receptor-related protein 6 is a receptor for Dickkopf proteins. *Nature*, 2001, 411(6835): 321–325. [DOI]
- [27] Ai MR, Heeger S, Bartels CF, Schelling DK, Osteoporosis-Pseudoglioma Collaborative Group. Clinical and molecular findings in osteoporosis-pseudoglioma syndrome. *Am J Hum Genet*, 2005, 77(5): 741–753. [DOI]