

现代青光眼研究进展

现代

青光
眼

研究
进展



葛坚 孙兴怀 王宁利 主编

科学出版社

版
社

现代青光眼研究进展

葛 坚 孙兴怀 王宁利 主编

科学出版社

2000

内 容 简 介

本书介绍有关青光眼的病因、发病机制和神经损害的基础研究进展,临床上对各类常见青光眼的检测手段、评价指标,以及药物和手术治疗、并发症的处理等研究进展。内容着重于 20 世纪 90 年代中后期对青光眼研究、治疗的最新认识和临床应用,具有相当的科学价值和实用性。

本书可供各级医院眼科医生和青光眼领域相关的各级研究人员学习参考。

现代青光眼研究进展

葛 坚 孙兴怀 王宁利 主编

责任编辑 程 犁

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码: 100717

江苏省句容市排印厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

2000 年 9 月第一版

开本: 787×1092 1/16

2000 年 9 月第一次印刷

印张: 14 1/2

印数: 0001—2 000

字数: 330 000

ISBN 7-03-003649-2/R·187

定价: 28.00 元

《现代青光眼研究进展》

编委会名单

主 编 葛 坚 孙兴怀 王宁利

编 委 (以姓氏笔画为序)

王宁利 叶天才 刘 杏 孙兴怀

任泽钦 余敏斌 杨新光 袁援生

徐 亮 郭文毅 葛 坚

序

近几年来青光眼的基础研究和临床应用研究有了巨大的进展。现代分子生物学、分子遗传学技术在青光眼基础研究领域的应用加深了我们对青光眼遗传、发病机制、视神经损害机制的认识,为青光眼的病因学诊断及病因治疗提供了可能和基础。新的诊断仪器的使用提高了青光眼的早期诊断水平及视功能损害进展的监控;增加葡萄膜巩膜房水引流的新型药物为青光眼的降眼压治疗提供了新的选择。新的激光技术、眼内窥镜技术为青光眼的治疗提供了新的手段。近几年新的高分子医用生物材料的发展也促进了青光眼治疗技术的改善。例如各类新型青光眼房水引流物的应用,促进了复杂性及难治性青光眼的手术成功率。可降解生物填充材料在青光眼手术中的应用使非穿透深层巩膜切除手术获得了新生,并在近几年再次引起重视。基因治疗技术的发展为青光眼病因治疗及视神经损害的防护治疗提供了另一新的潜在途径。总之,在 20 世纪末的几年内青光眼的研究 and 治疗发生了重大的变化,但也将一些尚不能攻克的课题留到了 21 世纪,例如青光眼视神经损害的防护及再生、原发性开角型青光眼原始病因的探索,这是本世纪青光眼工作者的重要任务。在我国著名青光眼专家的指导下,我国几位中青年青光眼工作者组织了国内相关领域的青光眼工作者编写了《现代青光眼研究进展》一书。本书对上述青光眼研究领域的进展进行了总结及评述。作者均年富力强,具有研究生以上学历,在各自的专业中有所建树,积累了一定的实践经验。不少作者曾在国外进修学习,了解国内外青光眼的发展水平。这些都保证了本书知识的新颖、丰富,并能反映当今时代青光眼领域最新成果和国际青光眼发展趋势。

作为一个老一辈青光眼工作者,为他们所作的工作感到欣慰和高兴,并希望此书能跟踪时代的发展,定期出版,为我国青光眼图书园地提供新的奇葩。此书将为推动我国青光眼研究的发展作出一定的贡献,是我国眼科工作者、青光眼专业人员、研究生以及有关科研人员的重要参考书之一。

中华医学会眼科分会青光眼学组名誉组长 周文炳

2000 年 8 月

目 录

·基础篇·

第一章 青光眼基因研究·····	葛 坚等(3)
第二章 视神经乳头筛板结构的研究·····	任泽钦 (14)
第三章 高眼压性青光眼动物模型·····	孙兴怀 (39)
第四章 葡萄膜巩膜房水排出通道的研究·····	王宁利等(50)
第五章 青光眼神经节细胞凋亡及其神经保护治疗·····	孙兴怀 (64)
第六章 青光眼的基因治疗·····	王宁利等(73)

·临床篇·

第七章 视神经分析仪在青光眼早期诊断中的作用·····	徐 亮 (93)
第八章 光学相干断层成像术检测视网膜神经纤维层·····	刘 杏等(100)
第九章 视神经乳头微循环与青光眼·····	孙兴怀等(107)
第十章 超声生物显微镜检查在青光眼研究中的应用·····	王宁利等(114)
第十一章 青光眼视野检查·····	袁援生 (123)
第十二章 原发性闭角型青光眼的早期诊治·····	王宁利 (132)
第十三章 青光眼的降眼压药物治疗·····	杨新光 (144)
第十四章 青光眼手术治疗进展及抗代谢药的应用·····	叶天才 (160)
第十五章 难治性青光眼及其处理·····	孙兴怀 (176)
第十六章 青光眼的导管植入术治疗·····	郭文毅 (184)
第十七章 视网膜玻璃体手术与青光眼·····	王宁利等(195)
第十八章 青光眼滤过泡的并发症及治疗·····	余敏斌等(207)
第十九章 青光眼的争议性问题·····	葛 坚等(215)

基 础 篇

三三三三三

第一章 青光眼基因研究

青光眼分子遗传学的研究已成为当前眼科学领域的一个研究热点。青光眼的遗传倾向早在 150 年前即已被人们所关注。大量的家系调查发现,约 13%—47% 开角型青光眼(open-angle glaucoma, OAG)具有家族史,而在 OAG 患者的亲属中, OAG 发病率为 2.8%—16.5%, 远高于正常群体的发病率。因此,青光眼的遗传倾向已被国内外学者所公认。但是,由于青光眼特别是原发性开角型青光眼(POAG)等的遗传方式颇为复杂,有常染色体隐性遗传、常染色体显性遗传及多因素遗传等,一些与该病有关的因素如视杯大小(杯盘比)、眼压、房水流畅度及激素对眼压反应等均有明显的遗传现象,加上受到研究手段的限制,所以对青光眼分子遗传学的研究一直没有取得较大的进展。近年来,分子生物学的飞速发展及人类基因组计划(human genome project, HGP)的提出和实施,促进了青光眼分子遗传学研究的发展,一些青光眼相关致病基因被相继定位在相应的染色体上,并进行基因的克隆、测序、表达调控及突变分析。随着对功能基因组学(functional genomics)的认识,对这些青光眼相关致病基因功能的研究是一个更为紧迫的课题,随着基因研究的不断深入,青光眼发病机制研究将会有更大的发展。

一、人类基因组计划(human genome project, HGP)和疾病的基因学

人类基因组计划旨在阐明人类基因组 DNA 3×10^9 核苷酸的序列,发现所有人类基因并阐明其在染色体上的位置,破译人类全部遗传信息,使得人类第一次在分子水平上全面地认识自我。通过各国政府和科学家的共同努力, HGP 已成为全球性的合作项目,并已取得重大进展,不仅提前实现了原定于 1998 年底完成的作图计划从而进入了大规模测序和基因识别的阶段,而且极大地带动了人类疾病相关基因的定位、克隆与结构、功能研究。从“定位克隆”到“定位候选克隆”遴选疾病基因策略的改变,人类基因组序列、结构研究的快速发展,使得基因功能的研究很快就成为科学家们关注的热点,“后基因组计划”(post-genome project)即功能基因组学、“蛋白质组(proteome)计划”、“环境基因组学(environmental genomics)”和“癌肿基因组解剖学计划(cancer genome anatomy project, CGAP)”、疾病相关基因的网络概念等相继被提出来,人类基因组计划的内涵及外延在不断地扩展。特别需要强调的是,包括基因多样性的研究、识别人类基因的共同变异型(common variants)、对其他生物的测序、基因组的表达调控和蛋白产物的功能、基因组生物信息学(bioinformative)、模式生物体、比较基因组研究以及功能缺失突变(loss-of-function mutation)等研究的功能基因组学的研究,将是新世纪基因研究的主流,是人类全面认识基因结构及功能极有力的武器。

人类基因研究的进展为各种疾病发病机制的研究营造了极为有利的环境,同时也为青光眼分子遗传学研究打下了良好的基础。

二、青光眼的分子遗传学研究

1. 青光眼相关眼内因素遗传背景

与青光眼相关的眼内因素主要包括视杯大小(杯盘比)、眼压、房水流畅度及激素对眼压的反应等,这些相关眼内因素均有明显的遗传现象。研究表明个体的杯盘比和父母、兄弟姐妹相似,和配偶则有明显差别。对单卵双生及二卵双生的研究更显示出视杯大小的有明显的遗传性。杯盘比的种族差异也比较明显,有证据表明眼压在正常范围内的黑人视杯明显比白人的大。Armaly、Becker 等还发现对滴用皮质类固醇引起高眼压反应者杯盘比大多大于 0.3。这些均表明视杯大小的具有一定的遗传性。

对眼压遗传性的分析显示直系亲属之间眼压表现为高度的遗传性,有青光眼家族史的人眼压比没有家族史的人普遍较高。有数据表明,家族中如有 2 个以上的人发生青光眼,其他未发病者眼压高于 30mmHg(4.00kPa)* 的几率为 5.5%,而年龄超过 40 岁者更高达 9.7%,是没有青光眼家族史 40 岁以上人群发生率的 5 倍。另有证据表明大杯盘比者眼压较高,其因果关系有待阐明,而环境因素对于眼压的作用也需要进一步确定。

房水流畅度在兄弟姐妹之间有高度相关性,而青光眼病人的直系亲属房水流畅度明显下降。

在糖皮质激素诱发的开角青光眼(glucocorticoid-induced glaucoma, GIG)研究方面,有资料显示局部滴用皮质类固醇类滴眼液的眼压反应具有遗传性。Armaly、Becker 把滴用皮质类固醇后的眼压反应分为三类,分别为高、中、低反应,并认为这种反应性的差异可能受一隐性基因控制,并可遵循孟德尔遗传规律。Becker 推测这个基因和慢性开角性青光眼相关基因相同,而 Armaly 则认为它可能只是众多青光眼相关基因之一。Francois 则对这种单基因理论表示怀疑, Schwartz、Palmberg 等在对单卵双生及二卵双生子对皮质类固醇眼压反应的研究后也指出这种单基因理论的精确性有限。所以 Polansky 等针对个体间对激素反应的差异,提出环境及遗传因素双重作用的假说。

众所周知,闭角型青光眼特别是瞳孔阻滞性闭角型青光眼患者的亲属中浅前房、厚晶体、晶体前移及远视眼的发生率较高,也较易发生闭角型青光眼。还有研究显示眼压随眼轴增长而升高。所以说,眼球大小与眼压之间也有一定的关系,并具有遗传性。

2. 青光眼相关致病基因

人类基因组计划的顺利实施,使青光眼相关致病基因的研究也取得了令人瞩目的成绩。自从 1993 年 Sheffield 首次在一原发性青少年型青光眼家系中发现青光眼相关致病基因以来,青光眼相关致病基因的研究有了较大的发展,一些青光眼相关致病基因先后被定位、克隆和测序。青光眼相关致病基因的命名原则是根据人类基因组织的规定,用“GLC”表示青光眼致病基因;以 1、2、3 分别表示开角、闭角和先天性青光眼;A、B、C 顺序代表所发现的第一、第二、第三个基因。目前研究发现的相關基因有 GLC1A、GLC1B、GLC1C、GLC1D、GLC1E、GLC1F、GLC3A、GLC3B、RIEG1 和 RIEG2 等(表 1-1)。

* 1mmHg=0.1333kPa

表 1-1 青光眼相关致病基因及其表型特征情况

青光眼类型	基因座	基因定位	遗传方式	发病年龄(岁)	突变基因	眼压情况
原发开青						
青少年型	GLC1A	1q24.3—q25.2	AD ¹⁾	3—45	MYOC/ TIGR	极高
或成年型						
成年型	GLC1B	2cen—q13	AD	>40	不清	正常或 中度升高
成年型	GLC1C	3q21—q24	AD	<40	不清	中度或极 度升高
中间型	GLC1D	8q23	AD		不清	
正常眼压性	GLC1E	10p15—p14	AD		不清	
原发开青	GLC1F	7q35—36	AD	28—70	不清	
原发性先青						
	GLC3A	2p21	AR ²⁾	<3	CYP1B1	极高
	GLC3B	1p36	AR	<3	不清	极高
发育性青光眼						
Rieger 综合征						
AD 虹膜发育不全	RIEG1	4q25	AD		PITX2	
虹膜房角发育	IRID2					
不全综合征						
Rieger 综合征	RIEG2	13q14	AD		不清	
Axenfeld—Rieger	IRID1	6p25	AD		FKHL1/ FREAC3?	
先天异常						
虹膜发育不全	IRID1	6p25	AD		FKHL1/ FREAC3?	
虹膜房角发育	IRID1	6p25	AD		FKHL1/ FREAC3?	
不良家族性青光眼						
房角发育不全	IRID1	6p25	AD		FKHL1/ FREAC3?	
家族性青光眼						
其他位点						
色素播散综合征	GPDS1	7q35—q36	AD		不清	
色素播散综合征	GPDS2	18q11—21	AD		不清	
Nail—patella	NPS1	9Q34	AD		LMX1B	
综合征						
假性剥脱综合征		2p16	AD?		不清	

1) 常染色体显性遗传; 2) 常染色体隐性遗传。

(1) GLC1A 基因

原发性青少年型青光眼(juvenile-onset open-angle glaucoma, JOAG)是一种较少见但病情严重的青光眼类型。患者表现为常染色体显性遗传, 有较高的外显率, 约 80%—96%。可在各种年龄(3—45 岁)发病, 但多在 3—20 岁之间。因病情较重, 药物难以奏效, 常需进行手术治疗。

应用连锁分析技术, Sheffield 等于 1993 年首次在一患 JOAG 常染色体显性遗传美国

人家系中发现一相关致病基因,取名为 GLC1A 基因并标定于染色体 1q21—1q31(在 D1S196 至 D1S191 之间,长约 23 Centimorgan, cM),这是 JOAG 遗传学研究的里程碑。Johnson 等(1996)对 JOAG 家系进行单倍型分析,将 GLC1A 位点缩小在 D1S445 至 D1S218 之间 8cM 区域,处在最初由 Sheffield 等所报道的区域(23cM)之内。此后, Sundén 等研究分析了两大 JOAG 家系的青光眼表现型与高频多态遗传标志(highly polymorphic genetic markers)之间的基因重组情况,将 GLC1A 基因的区域进一步缩小限定在 1q23—q25 约 3cM 区间(D1S3665—D1S3664)。

对染色体 1q 内的若干个可能成为青光眼致病基因位点的甄别研究先排除了 LAMC1、NPR1 和 CNR2,又排除了 ATP1B1、ATP2B4、ATP1A2 及离子通道(VDAC4)、抗凝血酶 III(AT3)、前列腺素合成酶(PTGS2)等的转录基因成为青光眼致病基因的可能性;研究又发现 SELE 和 SELL 基因位于 JOAG 患者所共有的半合子区间以外。根据 YACSTS 目录图(yeast artificial chromosome sequence tagged site content mapping 酵母人工染色体序列标志目录图)和放射杂交图(radiation hybrid mapping),确定三个位于 GLC1 最窄小区域内,最有可能是 JOAG 的致病基因,它们分别是 TXGP1(基因库检索号为 MD90224)、APT1G1、和 TIGR(基因库检索号 R95491, R95443, R47209 和 U85257),最后确定意义较大的是 TIGR 基因。

TIGR 基因共含 3 个外显子,分别由 604、126 及 782 个碱基对组成,由 2 个内含子分开,还有 5'和 3'端的非翻译区,翻译起始位点包括 2 个与 TATA 和 CAT 盒相邻的胞嘧啶残基。其启动子区域内含有多个重要的与基因调控有关的基元(motif),如:1)激活蛋白 1,2(AP-1,2)转录因子家族,含有 C-Fos 和 C-Jun 等早期反应基因等;2)糖皮质激素结合点;3)基因调节蛋白(转录因子)NF κ B,该蛋白最初因可促使编码 B 淋巴细胞 Kappa 族免疫球蛋白基因的转录而得名;4)切应力反应性元件(SSRE);5)甲状腺激素反应元件(TRE):甲状腺激素受体可与其结合,此与甲状腺激素在 DNA 转录水平上的作用有关。6)以组织特异性方式进行调节的顺序:包括 Prl-FP II 和 Prl-FP III(靶组织为垂体),HNF-1(肝细胞瘤核心因子-1),VBP(黄体生成素结合蛋白)(靶组织为肝)和 KTF(靶组织为表皮)位点;7)特殊的结构:包括 1 个近端(GT)13 重复单元,1 个近端(CA)6 重复单元,1 个近端 MIR 重复区域(位于 nt-514 到-319)和 1 个末端 Alu 重复区域(位于 nt-3942 到-3823)。

TIGR 中的 cDNA 为 2kb 大小,其编码产物属于黏蛋白/糖蛋白(504 氨基酸)。其结构与功能特征包括:1)两簇 7 个亮氨酸组成的拉链重复结构,与 TIGR 蛋白寡聚体形成有关;2)糖胺聚糖启动点,与 TIGR 蛋白、糖胺聚糖及其他蛋白相互作用有关;3)在第 3 外显子区域存在羧基端由 178 个氨基酸组成的与嗅素(olfactomedin)(嗅神经上皮细胞外基质的主要成分)高度同源区。有意义的是,这一区域包含了所有已知的 TIGR 突变,并且它编码的蛋白与细胞的活性密切相关;4)信号序列,用于蛋白分泌;5)硫酸乙酰肝素结合点及透明质酸结合点,与细胞表面和周围环境相互作用有关;6)糖基化点,与 TIGR 蛋白翻译后处理有关;7)在 N 端存在与肌球蛋白重链同源区。TIGR 基因的复杂性及调控的广泛性与开角型青光眼发病机制的复杂性和多重性是一致的。

最近,一种新型与 TIGR 基因同源的肌球蛋白样蛋白-Myocilin(MYOC)基因定位于染色体 1q23—q24。人类 Myocilin 的 cDNA 的核苷酸序列除一处外与 TIGR 基因完全

相同,这一差别是 MYOC 基因的 107—108 密码子处多了一个“GA”,移码突变的结果使 109 密码子变成了起始密码“ATG”。TIGR 基因的起始密码位于 MYOC 基因的第 65 密码子。

Myocilin 基因已从人类视网膜 cDNA 文库中克隆出来,它编码一酸性蛋白,分布于睫状体长足细胞和基底细胞,与光感受细胞的纤毛相连。这种蛋白是一种新型的细胞骨架蛋白,参与纤毛样神经上皮(如光感受细胞)的形态发生。MYOC 基因 mRNA 大量存在于人视网膜中,还有少量存在于骨骼肌。其他组织诸如心脏、脑、胎盘、肺、肝、肾和胰脏中没有表达。目前的研究认为 Myocilin 在视网膜杆细胞的椭圆体中合成,之后转运到连接纤毛的基底器,N-末端的疏水性区域可能作为微管间的黏合物质,或承担核与基底体连接器的功能。MYOC 在连接纤毛 rootlet 和基底体的精确定位及这种蛋白特异性的组织分布可能会有助于理解 JOAG 患者体内该基因(或 TIGR)的功能。小梁网亦有细胞骨架构筑,MYOC 基因与 TIGR 基因相互作用可能是青光眼小梁网损害的分子基础。

自 TIGR 基因被定位于 1q23—24(GLC1A)内而成为青光眼致病基因的候选基因后,Stone 等(1997)先对 8 个家系中的患者进行 TIGR 基因分析,结果于其中 5 个家系中发现 TIGR 基因突变。其中一 lq 连锁 JOAG 家系中 22 例青光眼患者均存在第 430 密码子突变,酪氨酸变为组氨酸(Tyr430 His);2 个家系(其中 1 个为成人 POAG 家系)中 15 例患者存在第 357 密码子突变,甘氨酸变成缬氨酸(Gly357 Val);另 2 个家系存在第 361 密码子无义突变,谷氨酰胺变为终止密码(Gln361 Stop);TIGR 基因编码产物 C 端截断 136 个氨基酸。

与 POAG(成人型)比较,JOAG 患者除发病年轻、眼压较高及明显的常染色体显性遗传现象外,其余均与 POAG 一致。近年来 TIGR 基因突变分析表明:GLC1A/TIGR 基因可为成人及青少年原发性开角型青光眼的致病基因。患者携带基因突变者,多有阳性家族史。此外,在上述第二、三组中各出现 2.9%及 0.3%的 Gln361 终止无义突变,提示该基因突变和多种类型青光眼有关。

对日本 POAG 家系 TIGR 基因的研究发现,一 POAG 家族中的两个患者(父女二人,女儿是先证者),基因组中编码 TIGR 蛋白第 370 个氨基酸残基的密码子第二个核苷酸发生了一杂合性 C→T 突变,使亮氨酸代替了原来的脯氨酸(Pro370Leu)。先证者的母亲和姐姐既无青光眼的症状,又无 TIGR 基因突变,所以该突变为常染色体显性方式遗传。另外一例有家族史的患者,其编码 TIGR 蛋白第 367 个氨基酸残基密码子的第一个核苷酸发生了一杂合性 G→A 突变,使甘氨酸变成了精氨酸(Gly367Arg)。研究表明,日本人家族性 POAG 也可由 TIGR 基因突变引起,TIGR 基因 3 号外显子的突变约与 4%的日本家族性青光眼的发病有关,目前关注的热点是在 367 氨基酸残基附近,该区域在 POAG 的发病过程中可能起关键性的作用。

目前发现的较肯定的 TIGR 突变有 Pro370Leu 突变、Gln337Arg、Gly367Arg、Gln368STOP、11e477Ser、Asn480Lys、11e499Phe 等,这些突变都集中在第三外显子区域,提示这些位置可能是蛋白的功能活性区。

我们长期追踪随访的一个完整青光眼家系共有 52 个成员 14 例开角型青光眼患者,符合孟德尔遗传规律,呈常染色体显性遗传,命名为 GZ(Guangzhou).1 家系。对其 TIGR

基因突变的研究发现,8例患者中,有4例患者 TIGR 基因第三外显子发生突变,突变位置在第 370 密码子,由 CCG→CTG,氨基酸也由脯氨酸变为亮氨酸(Pro370Leu),此结果与日本报道的家族性青光眼基因突变结果一致,但与西方国家大部分报道结果不同。该结果提示中国人家族性青光眼的发病与 TIGR 基因突变有关,但中国人家族性青光眼在发病机制上与其他国家可能存在种族上、地区上的差异。另外的 4 例患者并没有发现 TIGR 基因突变,可能是假阴性;也可能确实没有突变,即提示 TIGR 基因突变并不是中国人家族性青光眼发病的惟一因素,可能还有其他一些未知因素的调控和参与。

随着近年人小梁细胞体外培养的成功,研究糖皮质激素对体外培养小梁细胞特性与功能的影响已成为探索 POAG 和 GIG 发病机制的一个理想模型。已经证实,小梁细胞存在着与糖皮质激素特异性结合的糖皮质激素受体(GR),糖皮质激素与 GR 结合后启动基因的表达,诱导小梁细胞分泌特异的蛋白和酶(其中重要的是 TIGR,即小梁网诱导糖皮质激素反应蛋白),从而使小梁细胞在细胞外基质、细胞内框架、细胞的形态与功能等发生一系列改变,这些改变与来自 POAG 患者活体的病理超微改变基本一致,包括小梁网糖胺多糖的堆积及胶原蛋白、弹性蛋白、纤维连接蛋白或唾液酸蛋白等细胞外基质在小梁网表达增多所致;糖皮质激素还可减少细胞外蛋白酶包括纤维溶解酶、基质溶解酶等表达,而且可以抑制小梁细胞的吞噬功能使碎屑堆积于小梁网,这些改变对药物作用也呈时间依赖性,因此推测这可能是 POAG 或 GIG 发病的共同分子基础。

以上众多的研究表明:小梁网是 POAG 及 GIG 发病的共同通路,其表现的病理形式都是小梁细胞形态、功能和表达异常,其中备受重视的是 TIGR 表达的异常,TIGR 表达的异常可能参与影响了小梁细胞的细胞外基质的结合、降解以及细胞内骨架的形成。前面已经提到:UGR 基因的突变与 POAG 致病有关,TIGR 基因在非选择性 POAG 患者的突变率为 2.8%;而 Polansky 等通过对小梁网诱导的糖皮质激素反应基因产物的细胞药理学和分子生物学特性研究后指出:对 TIGR 基因的深入研究可能是探索 POAG 或 GIG 发病机制的关键。然而,在韩国一项研究中显示 GIG 的发病与 TIGR 基因的突变无关,这就更增加了 POAG 和 GIG 的复杂性。

在国内,以往的资料显示 POAG 的发病率比国外低,但近期的资料表明国内 POAG 的发病率有明显上升的倾向,这与普查和筛选的积极开展、各项检查手段的提高及设备的先进不无关系。而由于糖皮质激素在临床上的广泛应用与滥用,GIG 在眼科临床实践中也屡见不鲜,尤其多见于青少年男性,所造成的视功能损害也往往更为严重。可见,POAG 和 GIG 的研究是防盲治盲工作的重点课题之一。

我们对 70 例非选择性中国人 POAG 患者 TIGR 基因突变的研究发现,经 SSCP 筛选出 2 例迁移率异常的带型,克隆后测序发现 1 例在第 388 密码子有突变,由原来的 GAT→AAT,氨基酸由天冬氨酸替换为天冬酰胺,即 Asp388Asn,另 1 例没有突变,突变率仅为 1.4%(1/70),较国外报道低,突变位点与国外已经报道的也不一致,提示中国人 POAG 发病机制可能与国外不同;此外,该位点也与本文 GZ.1 家系中患者的突变位点不同,提示中国人 POAG 发病虽然与 TIGR 基因突变有关,但本身也存在复杂多变的因素。

同时对中国人 45 例 GIG 患者 TIGR 基因研究发现,经 SSCP 筛选出 1 例异常带型,克隆后测序没有发现突变,初步的结果显示 GIG 与 TIGR 基因突变无关,但因本实验组的病例比 POAG 组少,所以并不能完全排除 TIGR 基因突变的因素,推测或许同时有其

他因素的参与,其确切的机制有待于进一步的深入研究。

(2) GLC1B 基因和 GLC1C 基因

两者均是成年发病开角型青光眼(adult onset POAG)的致病基因。表现型为常染色体显性遗传,40 岁以后发病,眼压正常至中度升高(GLC1B)或中度、极度升高(GLC1C)。

GLC1B 基因于 1996 年 8 月由 Stoilova 等首次报道,定位于染色体 2cen—q13 (D2S2161 至 D2S176 间,约 11.2cM)。选择了 17 个 POAG 家系进行研究,选择家系的标准为:白种人血缘关系;双眼 OAG;常染色体显性遗传;每家系中最少有三位子代患者和一位仍存活的亲代。研究表明,6 个家系中共 16 名患者与 GLC1B 基因有连锁关系。患者表现为眼压正常或中等度升高;患病年龄在 40 岁以后;房角为开角无异常发现;药物治疗效果良好。对另外 8 个家系的研究显示发病与 GLC1B 无关,可能为异因同效的结果。

第二个成年发病 POAG 致病基因 GLC1C 由 Wirtz 等于 1997 年首次报道。在对一常染色体显性遗传 POAG 北美白人家系的研究中发现该基因并定位于染色体 3q21—q24 (即 D3S3637 至 D3S1744 之间约 11.1cM 区域)。研究中,Wirtz 等按如下标准确定患者:既往已确诊为 POAG 并进行过治疗者或符合以下条件二条以上者:1) 治疗前 IOP > 3.2kPa(24mmHg);2) 青光眼进展性视神经纤维层损害或视乳头 C/D > 0.7 者;3) Humphrey 视野检查异常者;4) 双眼鼻侧阶梯状暗点者。Wirtz 等还进行了多位点分析(D1S194,D1S196,D1S201,和 D1S218),排除了该家系 OAG 发病与 GLC1A 基因的相关关系。Avramopoulos 等用微卫星标记法对另一成年发病 POAG 希腊人家系进行过研究,也表明该家系 OAG 发病确与 GLC1A 基因无关。

POAG 通常被认为是多基因多因素遗传,由于发病较迟以及疾病的外显性较弱,致使许多家系的常染色体显形遗传性状不明显,甚至在非常大之家系中明确诊断的 POAG 患者也很有限,这就使得对 POAG 家系的连锁研究难以展开。为克服此困难,Coole 等设计出一套评分方法,依此来确定家系中拟进行连锁分析的成员,值得借鉴。

迄今为止,在染色体 3q21—q24(即 D3S3637 至 D3S1744 间)上至少有 11 个基因位点可能与成年发病 POAG 相关,其中 MME(membrane endopeptidase)基因最有可能成为 POAG 的致病基因。MME 是表达在许多类型细胞(包括小梁网)上的 II 型膜糖蛋白,这种中性肽链内切酶与 IOP 的控制有关。有关该基因的实变分析正在研究中。在染色体 2cen—q13 区域内也存在许多已知的基因位点,但迄今尚无一被确认为 POAG 的致病基因。进一步鉴别 GLC1B 及 GLC1C 基因,还有赖于对大量的新家系进行分析研究并使含该基因的片段精确缩小。一般认为,一个基因位点缩小至大约 1cM 时,就可利用物理标记技术(physical mapping techniques)鉴别该基因。

(3) GLC3A 基因和 GLC3B 基因

GLC3A 和 GLC3B 均为原发性先天性青光眼(primary congenital glaucoma,PCG)致病基因。CG 在此处即指原发性婴幼儿性青光眼,它是一种较少见的遗传性眼病,因小梁网发育异常致房水流出障碍而发病。CG 多为散在发病,10%—12% 患者有家族史,表现为常染色体隐性遗传,外显率为 40%—100%。GLC3A 基因由 Sarfarazi 等于 1995 年在对 11 个 CG 家系的研究中发现并定位于染色体 2p21(在 D2S117 位点上取得最大 LOD 值 9.40);GLC3B 基因则由 Akarsu 等于 1996 年发现,定位于染色体 1p36(在 D1S283 位点取得最大 LOD 值 4.51)。Akarsu 等在对 8 个 CG 家系的研究中发现,有 4 个家系发病与

GLC3B 相关而与 GLC3A 无连锁关系;另 4 个家系与 GLC3A 及 GLC3B 均无连锁关系,提示至少存在另外一个 GLC3 基因位点。Anderson 等在对患 CG 阿拉伯人 25 个家系的研究后认为, GLC3A 基因与 CG 的发病无关。

为进一步明确 GLC3A 基因, Sarfarazi 等还对 2p21 区间内 7 个基因位点进行研究, 排除了 CAD、CALM2 和 L11CGR 做为 CG 发病基因的可能性, 但是, 其他 4 个基因位点 PRKR, TIK, SOS1 和 SPTBN1 的突变与 CG 发病的关系尚有待进一步研究。

CYP1B1 是目前惟一已知的细胞色素 P450 家族 CYP1B 亚家族中的成员, 定位于 2q21—22 区。CYP1B1 基因组区域范围大于 12kb, 由 3 个外显子组成。其开放阅读框为 1629bp, 外显子 2 和 3 编码 - 543 个氨基酸的蛋白, 从基因作图上看, 与 PCG 的候选基因 GLC3A 的定位一致。

CYP1B1 蛋白的 C-末端, 有保守性结构核心区域, 该区域均由细胞色素 P450 分子构成, 它们之间是血红素结合区。CYP1B1 保守性 C 末端的三维模型结构中有 4 个螺旋束(螺旋 D、I、L 及与之反向平行的螺旋 E)、螺旋 J 和 K、 β 片层 1 和 2、血红素结合区和“meander”区(位于血红素结合区的 N 端), 估计与血红素的结合和分子的精确折叠有关。

Stoilova 等用 Northern blot 方法对 CYP1B1 mRNA 在人体中的分布进行了研究, 结果发现在前葡萄膜有强杂交信号, 包括睫状体、睫状上皮的非色素层和虹膜, 小梁网中也有杂交信号, 但 CYP1B1 mRNA 在角膜、视网膜色素上皮及视网膜的表达量较低。在许多眼外组织中, 均可见 CYP1B1 的微量表达, 但只有肾的表达水平相对较高。

CYP1B1 是 P450 超基因家族中的一个成员, 它可能在眼前节正常发育和功能形成的过程中, 参与了重要的分子水平的代谢, 其中, 类固醇和花生四烯酸衍生物可能是它的靶物质。有证据显示 CYP1B1 能使 17- β 雌二醇中的 4 个位点羟化, 而眼中有雌二醇受体存在。Schwartzman 等研究表明一种细胞色素 P450 依赖性花生四烯酸代谢物可以抑制角膜上的 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶的活性, 参与角膜透明度的调节和房水的分泌。这一发现与角膜混浊、眼压升高这两个原发性先天性青光眼的重要诊断依据是一致的。

随着研究的不断深入, 人们对 CYP1B1 基因突变与 PCG 之间关系的认识也不断加深。Stoilov 等在 5 个 GLC3A 相关家族中发现了一些可遗传的细胞色素 P4501B1 (CYP1B1) 的突变。在 1 个近亲性和 1 个非近亲性家族中, 有 1 长 13 个碱基的纯合性基因缺失, 该缺失位于 CYP1B1 基因核苷酸链 1410—1422 处(外显子 3 内), 引起阅读框的改变, 使终止密码(TAG)提前出现, 导致突变下游 203 个碱基缺失, 产生一 C 末端缺少 189 个氨基酸的多肽链。与此相类似, 另两个近亲家族核苷酸序列 1209—1214(外显子 2 中)6 个连续的胞嘧啶中, 有一单碱基纯合性胞嘧啶插入, 使该插入点后 106 个碱基处出现终止密码, 产生一共缺失 254 个氨基酸的截短蛋白。第三个纯合性突变发现在一近亲家族中, 其 2 号内含子和 3 号外显子间有一大的缺失, 由于 2 号内含子 3' 端拼接区缺失, 影响了 CYP1B1 基因的正常拼接, 导致截短蛋白或无效等位基因的产生。

Stoilov 等还对 22 个 PCG 家族的 CYP1B1 进行了序列分析, 发现了 16 种突变。其中 8 种突变改变了 CYP1B1 的开放阅读框架, 包括 1 个无义突变(glu281→终止密码), 6 个移码突变(847insT, 1209insC, 1410del13, 1546dup10, 1691delG, 1749dup27)和 1 个大片段缺失。另有 8 种错义突变: Trp57 变为 Cys, Gly61 变为 Glu, Gly365 变为了 Trp, Pro379 变为 Leu, Glu387 变为 Lys, Arg390 变为 His, Pro437 变为 Leu, Arg469 变为 Trp。在调查的

家族中, CYP1B1 等位基因符合常染色体隐性遗传规律。所有截短突变都截短了 CYP1B1 的开放阅读框, 使 CYP1B1 多肽羧基端丢失了 79—327 个氨基酸。这些突变会导致合成的蛋白缺少血红素结合区, 直接影响细胞色素 P450 分子的功能。

(4) 其他 GLC 基因

1998 年, Wirtz 等通过对一个轻至中度眼压升高的北美 POAG 家系研究, 将 GLC1D 定位在 8q23。同时, 他们还通过对一常染色体显性遗传 POAG 家系进行了研究, 该家系发病年龄平均 50 多岁, 眼压均低于 22mmHg, 为正常眼压性青光眼家系, 其相关致病基因 GLC1E 被定位于 10p15—p14。Wirtz 等通过对另一较大的含四代人, 10 个患者, 发病年龄从 28—70 岁的 POAG 家连锁分析, 将 GLC1F 定位于 7q35—36。

某些遗传性发育异常性眼病常伴发青光眼, 因此, 这类眼病的致病基因位点也可能含有青光眼致病基因(GLC)。例如, Rieger 综合征的 2 个致病基因位点 4q25 和 13q14 就被许多学者当成 GLC 候选基因。再如, Andersen 等报道的 4 个色素播散综合征(pigment dispersion syndrome, PDS)家系, 经连锁分析研究证实, PDS 致病基因位于染色体 7q35—q36 D7S2462 至 D7S2423 约 10cM 之间, 为探索 GLC 基因, 对该区域内特定基因的研究也将随之进行。最近研究表明与虹膜房角发育不全(Iridogoniodysgenesis anomaly, IGDA)、Axenfeld-Rieger 发育不全等相关的在 6p25 上致病基因位点 IRID1 的 FKHL7 也可能成为 GLC 候选基因之一。IGDA 为常染色体显性遗传性眼病, 其临床特征为虹膜萎缩, 房角发育不全伴 JOAG。IGDA 致病基因表达在眼前节的发育, 故不难想象某些开角型或闭角型青光眼的发病可能与该位点基因突变相关。对与开角型青光眼有关的 Nail-patella 综合征家系的研究发现, 定位于 9q34 的 LMX1B 基因发生了突变。

三、青光眼基因研究存在的问题与展望

青光眼相关致病基因的研究进展, 使我们能够深入从基因水平认识青光眼的发病机制, 改变既往对青光眼认识上的观点, 并为进一步的基因治疗奠定基础。但是, 还有一些存在的问题急待解决, 如这些所谓致病基因的突变的意义如何, 是否真正引起相应编码的蛋白质空间结构的改变, 以致引起功能的改变而引发相应类型的青光眼还需进一步研究证实。假若确实引起了特定蛋白分子空间结构的改变, 它是直接作用引起青光眼还是阻碍或干扰了在特定生化通路中的生物大分子的相互作用引起青光眼也不清楚。某一基因的突变和其他基因的关系, 是否引起多基因或多通路间的平衡失调, 还是“一个基因一种病”还需要进一步研究。此外, DNA 芯片技术及 DNA 微阵列技术(DNA chips & DNA microarray)的应用将会极大地加速相关基因的检出, 基因功能特性研究日益重要。

对青光眼致病基因的认识, 正逐渐改变既往青光眼分类的某些概念。例如, JOAG 致病基因(GLC1A)和 POAG 致病基因(GLC1B、GLC1C)的临床表现型在发病年龄上有重叠, Meyer 等报道的一 JOAG 法国人家系, 其成员中 20 名患者的发病年龄从 11 岁至 51 岁, 平均 36 岁, 与 POAG 发病年龄重叠。因此, 主要根据发病年龄划分的原发性婴幼儿性青光眼(6 岁以内发病)JOAG(6—30 岁发病)和成年发病 POAG(30 岁以后发病)等传统分类概念显得不尽合理; 将青光眼分为开角型、闭角型和先天性等也只是一种解剖学的分类。因此, 有作者提议, 新的青光眼分类应根据它的遗传方式、致病基因、发病年龄、房