

一个氨基糖苷类抗生素致聋家系线粒体 DNA 突变研究

王为未¹, 张丽珊¹, 黄鹰¹, 周晓雷¹, 洪泽辉¹, 龚常虹¹, 黄志纯^{1,2}

(1. 南京铁道医学院生物教研室, 江苏南京 210009; 2. 南京铁道医学院附属医院耳鼻喉科, 南京 210009)

摘要: 应用 PCR、PCR-SSCP 和 DNA 序列分析等分子生物学技术, 对一个有明确氨基糖苷类抗生素应用史的母亲遗传耳聋家系共 8 人(包括聋人和听力正常者)的线粒体 DNA 进行研究, 结果显示, 家系中有 4 份样品存在线粒体 DNA 12S rRNA 1 555 位点 A→G 的突变。提示线粒体 DNA 点突变是导致该家系致聋的主要因素之一。

关键词: 线粒体 DNA; 氨基糖苷类抗生素致聋; 基因突变

中国分类号: Q987; R394.6

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2000)02-0078-03

Mutation Analysis for the Mitochondrial DNA in a Pedigree with Aminoglycoside Antibiotic Induced Deafness

WANG Wei-wei¹, ZHANG Li-shan¹, HUANG Ying¹, ZHOU Xiao-lei¹,
HONG Ze-hui¹, GONG Chang-hong¹, HUANG Zhi-chun²

(1. Department of Biology, Nanjing Railway Station, Nanjing 210009; 2. Department of Otorhinolaryngology, Affiliated Hospital of Nanjing Railway Station, Nanjing 210009, China)

Abstract: Blood samples were obtained from a pedigree with aminoglycoside antibiotic induced deafness. DNA was extracted from the isolated leukocytes. The mitochondrial DNA fragments were detected by PCR-SSCP and DNA sequencing. It was found that four individuals from the pedigree carried 1 555 A→G mutation. From our results, mitochondrial DNA mutation may be one of major factors in aminoglycoside antibiotic induced deafness.

Key words: mitochondrial DNA(mtDNA); aminoglycoside antibiotic induced deafness (AAID); gene mutation

氨基糖苷类抗生素(aminoglycoside antibiotics, AmAn)是临床上应用较广泛的一类抗生素,但其具有严重的耳毒性副作用,可使患者发生不可逆转的听力丧失。近年来研究发现线粒体 DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)突变在氨基糖苷类抗生素致聋(aminoglycoside antibiotic induced deafness, AAID)的发病中起重要作用。为了进一步阐明 mtDNA 突变与 AAID 遗传易感性的关系,我们收集了一个较典型的 AAID 易感家系,对家系中所有成员的 mtDNA 进行分析,研究结果表明,mtDNA 突变是导致该家系致聋的主要原因之一。

1 材料与方 法

1.1 家系资料(图 1)

先证者, III₁, 男, 16 岁, 出生 8 个月时因肺炎注射庆大霉素 1 次后出现双侧听力下降, 伴双侧耳鸣。电测听示双耳重度感觉神经性耳聋。

其外婆, I₁, 女, 已故。生前耳聋。是否用过 AmAn

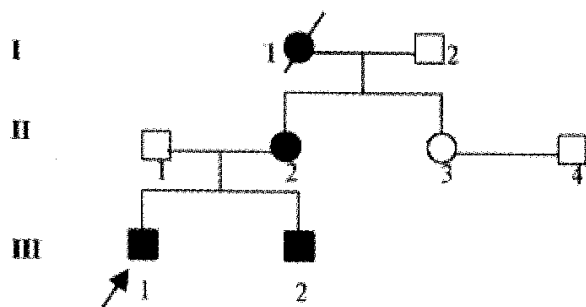


图 1 氨基糖苷类抗生素致聋家系

收稿日期: 1998-12-04; 修回日期: 1999-04-06

基金项目: 江苏省科委资助项目

作者简介: 王为未(1971-), 女, 山东泰安人, 硕士研究生, 专业方向: 医学遗传学。

不详。

其母, II₂, 女, 42 岁。5 岁时因扁桃体炎注射链霉素和庆大霉素 10 天后出现耳聋, 纯音测听双耳言语听阈为 60~70dB HL, 高频听力损害严重。

其弟, III₂, 男, 14 岁, 1 岁时因肺炎注射链霉素和庆大霉素 1 次后出现双侧听力下降, 伴双侧耳鸣。电测听示双耳重度感觉神经性耳聋。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取

取家系中所有成员(7 人)及家系外一正常人的外周静脉血 5ml, 按常规方法提取总 DNA(内含 mtDNA), 作为 PCR 扩增反应的模板。

1.2.2 PCR 扩增

以 mtDNA nt 1 326~1 355 及 nt 1 684~1 704 为引物, 全部引物由上海生工(Sangon)公司合成。引物序列为 5'-AGG TCA AGG TGT AGC CCA TGA GGT GGC AAG-3'(L 链 1 326~1 355); 5'-GGT TTG GGT GAG GTG GAA TGA-3'(H 链 1 704~1 684)。PCR 反应体系含模板 DNA 0.3μg, 上下游引物各 25pmol/L, dNTP 各为 200, TaqDNA 聚合酶 2U, 总反应体积为 50μl。PCR 反应参数为 94℃ 4min 变性; 94℃ 45s, 60℃ 45s, 72℃ 45s 35 个循环。以 2% 琼脂糖水平凝胶电泳观察聚合酶链反应结果。

1.2.3 PCR-SSCP

取 PCR 产物 5μl, 加入等体积的变性液(98% 甲酰胺 10 mmol/L EDTA, pH8.0, 0.5g/L 溴酚蓝, 0.5g/L 二甲苯蓝)98℃ 变性 5min 后立即置于冰水浴, 上样后在 15℃(电压 200V)开始电泳。电泳后, 7.5% 乙酸固定 10min, 洗涤 3 次; 加入 1% 的硝酸银染色 20min, 洗涤 2 次; 再加入显色液(1.5% NaOH, 0.4% 甲醛)显色, 水冲洗后在读片灯上观察结果。

1.2.4 mtDNA 序列分析

PCR 产物经低熔点凝胶和 WizardTM PCR 纯化系统(Promega 产品), 回收纯化后送大连宝生物工程公司进行自动测序。

2 结果

2.1 PCR-SSCP 结果

家系中所有成员共 7 人, 经 PCR-SSCP 筛查, 结果显示存在 II₂、II₃、III₁ 和 III₂ 4 例阳性标本, 这些标本与正常对照比较, 其单链 DNA 都出现了条带位置的相对移动(图 2)。

2.2 mtDNA 序列分析

为进一步确定突变的位置和性质, 对 SSCP 检测为阳性的标本进行 DNA 测序, 结果证实发生了 mtDNA 1 555 位点 T→C 的突变(H 链), 对应 L 链为 A→G 的突变(图 3)。

3 讨论

家族性抗生素致聋现象在国内外均有报道, 但对其遗传方式曾有不同的观点。Higashi 在研究了两个日本家系和已报道的中国家系后, 认为 AAID 是母系遗传(即线粒体遗传)^[1]。1993 年, Prezant 等人通过对 3 个 AmAn 致聋家系的研究, 首次报道患者与 mtDNA 12S rRNA 基因 1 555 位点 A→G 的点突变有关^[2], 并且只通过母亲传递这种突变。空间结构分析和细胞生物学研究进一步证实了 1 555 点突变在 AAID 病因上的重要作用^[3]。1996 年, 张丽珊等人也证实了 Prezant 的发现^[4]。现对家族性抗生素致聋的研究证实有三种因素能够影响表型的改变^[5], 这些因素都影响细胞中的氧化磷酸化水平。第一种是环境因素, 其中 AmAn 的使用是由 1 555 位点突变导致耳聋的触发因素。有可能还存在其他尚未认识到的环境因素也起了相似的作用, 比如影响氧基的形成

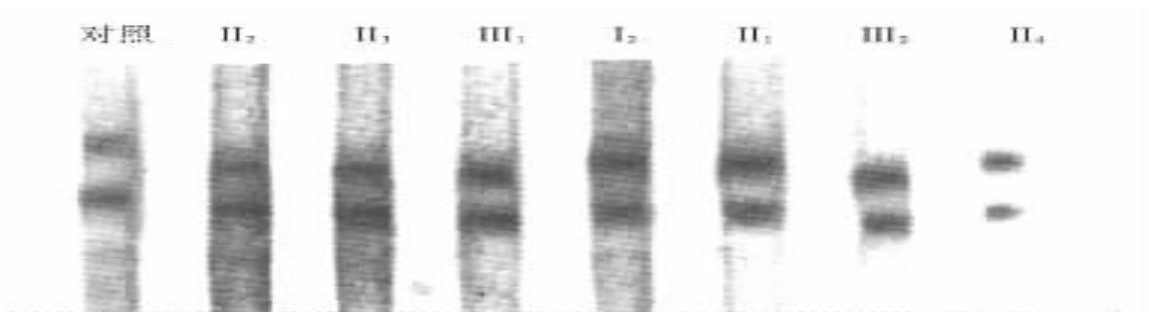


图 2 AmAn 致聋家系的 PCR-SSCP 检测结果
II₂、II₃、III₁ 和 III₂ 4 例为突变个体。

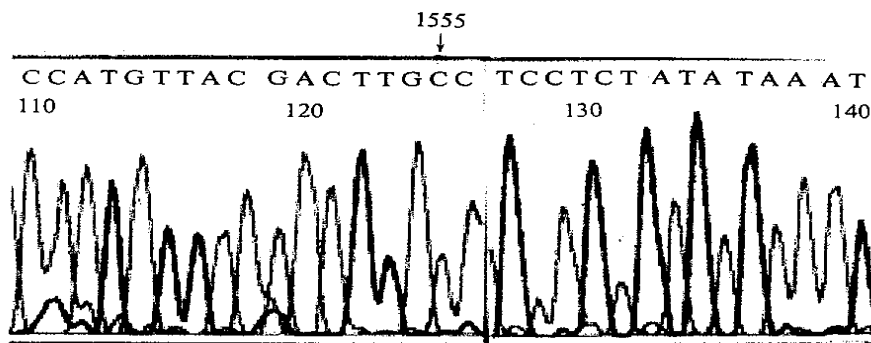


图3 AmAn 致聋患者的 mtDNA 序列分析

与分离的饮食和药物。第二种因素是线粒体基因的影响,本研究国内外众多资料都表明,线粒体基因第 1 555 位点突变是 AmAn 致聋的主要原因之一。1994 年, Reid 首先在一个苏格兰的 AAID 家庭中发现线粒体 tRNA^{Ser(UCN)} 7 445 位点 T→C 的突变^[6]。袁慧军等^[7]通过对一个 AAID 家系的研究认为, mtDNA 1 555 突变并不是 AAID 遗传易感性为唯一的分子基础。其他位点的突变也能导致 AmAn 致聋。第三个因素是细胞核基因, 1996 年, Guan 等人^[8]对一个 AAID 家系(此家系的所有成员都生活在同一个村落里相近的环境中, 并且所有母系亲属具有相同的线粒体单倍体) 中的听力正常和听力丧失的成员的成淋巴细胞的生化指标进行研究, 发现生化指标存在着明显的差异。此研究证实了细胞核因素在疾病的发生过程中也起到了一定的作用。

在本研究中, 我们收集了一个比较典型的母系遗传 AAID 家系, 该家系中耳聋患者都具有明确的 AmAn 使用史。采用 PCR、PCR-SSCP 的分子生物学技术对家系中的所有成员的外周血标本进行分析, 共检出 II₂、II₃、III₁ 和 III₂ 等 4 例阳性标本。为得到更为准确的证据, 对 4 例阳性标本进行了 DNA 序列分析, 证实了突变发生在 mtDNA 12S rRNA 1 555 位点。在所研究的 4 例阳性标本中共有 3 例患者, 他们都有 1 555 位点突变和 AmAn 使用史, 与临床表型一致。家系中 I₂、II₁ 和 II₄ 线粒体第 1 555 位点突变为阴性, 他们是患者的非母系亲属, 与线粒体遗传无关。II₃ 虽然具有 mtDNA 1 555 位点突变, 但通过回访调查, 发现此个体没有 AmAn 使用史, 故未发生耳聋。这表明, mtDNA 1 555 位点突变以及使用氨基糖苷类抗生素, 是导致该家系 AAID 致聋的主要原因。同时也表明, 具有 mtDNA 1 555 位点突变的个体, 只要避

免使用氨基糖苷类抗生素, 就可以避免发生耳聋现象。因此, 母系亲属具有耳聋现象的个体最好尽早进行线粒体检查, 如有 1 555 位点突变, 则要避免使用氨基糖苷类抗生素。同样, 临床医生在给病人使用氨基糖苷类抗生素时要持慎重态度, 用前一定要询问清楚该病人的母系亲属是否具有耳聋现象。对于氨基糖苷类抗生素和 mtDNA 1 555 位点突变相互作用导致耳聋的分子机制, 有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Higashi K. Unique inheritance of streptomycin-induced deafness[J]. *Clini Genet*, 1989, 35(6): 433~435.
- [2] Prezant T R, Agopian J V, Bohlman M C, *et al*. Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic-induced and nonsyndromic deafness[J]. *Nature Genet*, 1993, 4: 289.
- [3] Inoue K, Takai D, Soejima A, *et al*. Mutant mtDNA at 1 555 A to G in 12S rRNA gene and hypersusceptibility of mitochondrial translation to streptomycin can be co-transferred to rho 0 HeLa cell[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, 223: 496~501.
- [4] 张丽珊, 张志平, 周晓雷. 三例氨基糖苷类抗生素致聋患者的线粒体 DNA 序列分析[J]. *遗传*, 1996, 18(6): 3~5.
- [5] Fischel - Ghodsian N. Mitochondrial Mutations and Hearing Loss: Paradigm for Mitochondrial Genetics[J]. *Am J Hum Genet*, 1998, 62: 15~19.
- [6] Reid F M, Vernham G A, Jacobs H T. A novel mitochondrial point mutation in a maternal pedigree with sensorineural deafness[J]. *Hum Mutat*, 1994, 3: 243~247.
- [7] 袁慧军, 姜泗长, 杨伟炎, 等. 氨基糖苷类抗生素致聋家系 mtDNA 1 555 位点突变分析[J]. *中华耳鼻咽喉科杂志*, 1998, 33(2): 67~70.
- [8] Guan M, Fischel - Ghodsian N, *et al*. Biochemical evidence for nuclear gene involvement in phenotype of non-syndromic deafness associated with mitochondrial 12S rRNA mutation[J]. *Hum Mol Genet*, 1996, 5: 963~972.