

# 散发性 Leber 遗传性视神经病的基因诊断

冯雪梅, 高殿文, 张巍

(中国医科大学第二临床学院眼科, 沈阳 110003)

**摘要:**为了探讨散发性 Leber 遗传性视神经病(LHON)的诊断方法,对无家族史原因不明视神经萎缩病例,应用 PCR 扩增线粒体 DNA 片段,限制性内切酶 *Sfa*NI、*Mae* III 双重鉴定 np11 778 G→A 突变及 *Bsa*HI 检测 np3 460 G→A 突变的有无。结果二例呈现 np11 778 点突变阳性, np3 460 点突变阴性,明确诊断为 LHON。上述点突变的检测,是目前诊断散发性 LHON 的首选有效方法。

**关键词:** Leber 遗传性视神经病, 线粒体 DNA, 点突变, 基因诊断

中图分类号: R774

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2000)01-0019-20

## The Gene Diagnosis of Sporadic Cases of Leber's Hereditary Optic Neuropathy

FENG Xue-mei, GAO Dian-wen, ZHANG Wei

(Department of Ophthalmology, The Second Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110003, China)

Leber 遗传性视神经病 (Leber's hereditary optic neuropathy, LHON) 是一种严重危害视功能的线粒体 DNA (mtDNA) 眼病,多在青春期发病,呈双眼先后急剧的视力下降而终至视神经萎缩。过去临床上一直是通过典型的家族史和临床特点来判断的,因此,散发的 LHON 曾经较难确诊。自 Wallace 等首次发现 LHON 与 mtDNA 11 778 G→A 突变密切相关<sup>[1]</sup>,以及 np 3 460 等碱基点突变<sup>[2]</sup>的发现以来,很快被国外学者用于 LHON 的临床诊断之中。我国学者于 1992 年报道了 Leber 氏病的 DNA 突变研究<sup>[3]</sup>。为了鉴别与诊断,我们对一些无家族史原因不明的视神经萎缩病例进行了上述点突变的检测,现对呈现阳性的二病例进行简要报道。

### 1 临床资料与检测方法

病例 1 为 11 岁独生子男孩,双眼视力下降 3 年。曾在当地医院诊断为双眼视神经炎,给与口服皮质类固醇激素治疗未见好转。头部 CT 未见异常。家族史阴性。此次来诊,右眼视力 0.2,左眼 0.3,不能矫正。双眼底视盘界清色淡,颞侧重。视觉诱发电位 P<sub>100</sub> 波峰潜时延长。眼压正常。病例 2 为 18 岁男性,半年前双眼视力下降,当地医院诊断为急性视神

经炎,给与大剂量皮质类固醇激素等药物治疗后左眼好转。患者为独生子,否认家族中有相同病史。右眼视力 0.1,左眼 0.6,矫正不应。双眼底视盘颞侧色淡(右眼重),鼻侧略充血。右眼有中心及旁中心暗点,左眼有旁中心暗点,视觉诱发电位右眼 P<sub>100</sub> 波峰潜时延长,左眼峰潜时正常仅有波幅低平。眼压正常。以上二例均因无家族史,临床上诊断为双眼原因不明视神经萎缩。

外周血提取的白细胞 DNA 为模板,分别扩增第 11 914 ~ 10 991 位 (924bp) 和第 3 153 ~ 3 551 位 (399bp) mtDNA 片段,并经电泳鉴定。然后再分别用 *Sfa*NI、*Mae* III 与扩增的 924bp 片段、*Bsa*HI 与扩增的 399bp 片段在 37℃ 孵育过夜,消化片段经 EB 染色的 1.6% 琼脂糖凝胶电泳后,在紫外线检测仪上观察并摄影,分析点突变的有无。

### 2 结果与讨论

#### 2.1 *Sfa*NI 的酶解片段

正常者的 PCR 扩增片段 924bp 被切成 799bp 和 125bp 两条带,表示不存在点突变。而该二例患者仅呈现一条 924bp 的电泳带,说明正常存在的酶识别位点因 np 11 778 G→A 的点突变而丧失。

## 2.2 Mae III 的酶解片段

正常者该扩增区域仅存一个 Mae III 的识别位点而呈现 662bp 和 262bp 两条带。该二例患者因点突变阳性在 np 11 778 碱基近旁产生了一个新的 Mae III 识别位点而使 262bp 的片段再次消化切断成 138bp 和 124bp 两条带(在本实验条件下因两条断片分子量相差太小几乎重合在一起)。

## 2.3 BsaHI 的酶解片段

当 np3 460 碱基发生 G→A 点突变时则失去 BsaHI 的识别位点, 而该二例患者与正常者同样被切成两条断片, 即不存在该点突变(见图 1)。

以上分别确定了该二例患者均有 np 11 778 G→A 点突变, 结合临床改变可以明确诊断为 LHON。

LHON 是一种并不少见的遗传性眼病, mtDNA np1 178 点突变是 LHON 的一个突变热点, 尤其日本

突变阳性时, 分别出现 SfaNI 识别位点的丧失和一个新的 Mae III 识别位点的产生, 这样可避免因实验技术上的偏差而造成的假阳性或假阴性结果, 提高了诊断的精确度。单纯用 SfaNI 一种酶判断时, 有时会把 np 11 779 位碱基的多态性(约 2.3%) 误判为 np 11 778 点突变阳性, 而国内目前仍使用单一的 SfaNI 消化法。

著者认为, np 11 778 点突变的检测对于散发的或不典型的 LHON 是最具有价值的辅助诊断手段, 尤其是对蒙古系人种的中国人。而目前已发现的其他点突变如 np3 460、np14 484(9%~10%)<sup>[5,7]</sup>、np15 257(7%~9%) 等<sup>[7]</sup>因阳性率较低不适合做为首选。另外 LHON 具有明显的母系遗传特征, 因此有必要检查其母亲的 mtDNA。LHON 也呈现着遗传异质性, 目前已发现 LHON 有多个 mtDNA 的点突变, 所以 np 11 778 点突变阴性时不应完全否定 LHON。

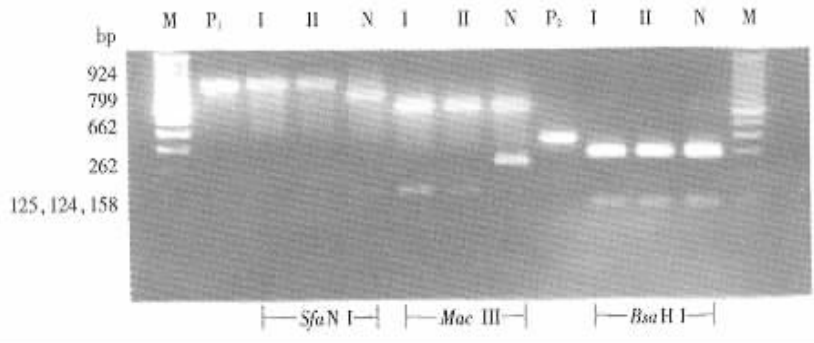


图 1 LHON 的基因诊断结果

M. 100 bp Ladder 的 DNA 标记; N. 正常对照; P<sub>1</sub>. 未经酶消化的 PCR 片段(np 11 914~10 991);

P<sub>2</sub>. 未经酶消化的 PCR 片段(np 3 153~3 551); I. 病例 1; II. 病例 2。

人高达 80%~90%<sup>[4,5]</sup>, 我国为 66%<sup>[6]</sup>, 而正常人对照组却无一此点突变。np3 460 点突变的频率次之(8%~25%)<sup>[7]</sup>, 但在日本却很少见(4%)<sup>[4]</sup>, 我国尚未见报道。由于 np 11 778 的高突变阳性频率, 其检测在日本已成为 LHON 不可缺少的诊断依据之一, 大约 1/3 的病例无家族史而是通过基因诊断技术来确诊的<sup>[4]</sup>。目前国内有关 np 11 778 点突变的研究, 均是对有明显家族史的 LHON 的检测, 对散发病例的研究并通过基因诊断技术确诊的报告尚无。我国 np 11 778 点突变阳性率低于同是蒙古系人种的日本人, 其差异就可能来自这些无明显家族史的散发病例。在临床特点上, np 11 778 点突变的视力大多在 0.1 以下(85.9%)<sup>[4]</sup>, 仅个别病例可恢复到 0.6 以上, 因此, 视力较好者也不应排除 LHON 的可能性。

本研究为检测 np 11 778 点突变, 分别采用了 SfaNI、Mae III 两种限制性内切核酸酶。当患者呈现点

## 参考文献:

- [1] Wallace DC, Singh G, Lott MT, et al. Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy[J]. Science, 1988, 242: 1427~1430.
- [2] Houponen K, Vilkkii J, Aula P, et al. A new mtDNA mutation associated with Leber hereditary optic neuroretinopathy[J]. Am J Hum Genet, 1991, 48: 1147~1153.
- [3] 张志平, 张丽珊, 黄鹰, 等. Leber 氏病的 mtDNA 突变[J]. 遗传, 1992, 14(2): 21~23.
- [4] Hotta Y, Fujiki K, Hayakawa M, et al. Clinical features of Japanese Leber's hereditary optic neuropathy with 11 778 mutation of mitochondrial DNA[J]. Jpn J Ophthalmol, 1995, 39: 96~108.
- [5] Mashima Y, Yamada K, Wakakura M, et al. Spectrum of pathogenic mitochondrial DNA mutations and clinical features in Japanese families with Leber's hereditary optic neuropathy[J]. Curr Eye Res, 1998, 17: 403~408.
- [6] 张丽珊, 黄鹰, 李方园, 等. 中国人 Leber 遗传性视神经病家系线粒体 DNA 突变的研究[J]. 中华医学杂志, 1994, 74: 349~351.
- [7] Newman N. Leber's hereditary optic neuropathy new genetic considerations[J]. Arch Neurol, 1993, 50: 540~548.