

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2013.00752

线粒体 tRNA^{Ile} A4317G 突变可能影响 12S rRNA A1555G 突变相关的耳聋表型表达

梁玲芝¹, 伍越¹, 阳娅玲¹, 蔡沁², 肖红利¹, 郑静^{1,3}, 郑斌娇¹, 唐霄雯¹, 朱翌²,
吕建新¹, 管敏鑫^{1,3}

1. 温州医学院 Attardi 线粒体生物医学研究院, 温州 325035;
2. 温州医学院附属第一医院, 温州 325000;
3. 浙江大学生命科学学院, 杭州 310058

摘要: 线粒体 12S rRNA 基因 A1555G 突变与非综合征型耳聋和氨基糖甙类抗生素(Aminoglycoside antibiotics, AmAn)致聋相关。文章通过对一个携带线粒体 12S rRNA A1555G 突变的汉族母系遗传耳聋大家系成员进行听力学检查和遗传学分析, 发现该家系耳聋外显率很高, 包括 AmAn 使用史的耳聋外显率为 81%, 不包括 AmAn 使用史的耳聋外显率 66.7%, 明显高于其他携带 A1555G 突变的耳聋家系。对该家系进行线粒体基因组全序列分析发现存在同质性的 tRNA^{Ile} A4317G 突变和 38 个多态位点, 属于东亚线粒体 B4c1b2 单体型。进一步分析发现 A4317G 突变位于 tRNA^{Ile} 的 tRNA^{Ile} TΨC 环区的高保守性区域(第 59 通用位点), 该突变可能影响 tRNA^{Ile} 二级结构和功能, 从而导致线粒体功能缺陷, 且在 961 例正常对照中未发现该突变。同时, 其他线粒体 DNA 并未发现有功能意义的突变位点。因此, A4317G 突变可能影响 tRNA^{Ile} 的代谢并加重 A1555G 突变导致的线粒体功能缺陷, 最终导致耳聋的外显率增高。从而推测线粒体 tRNA^{Ile} A4317G 突变可能是一个影响 12S rRNA A1555G 突变的耳聋表型表达的因素。

关键词: 耳聋; 突变; 线粒体; tRNA; 表型表达

Mitochondrial tRNA^{Ile} A4317G mutation may influence the phenotypic manifestation of deafness-associated 12S rRNA A1555G mutation

LIANG Ling-Zhi¹, WU Yue¹, YANG Ya-Ling¹, CAI Qin², XIAO Hong-Li¹, ZHENG Jing^{1,3},
ZHENG Bin-Jiao¹, TANG Xiao-Wen¹, ZHU Yi², LU Jian-Xin¹, GUAN Min-Xin^{1,3}

1. Attardi Institute of Mitochondrial Biomedicine, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China;

收稿日期: 2012-10-12; 修回日期: 2012-12-25

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 81070794, 30971600), 国家青年科学基金项目(编号: 31100903), 浙江省自然科学基金项目(编号: Y2110399), 浙江省卫生厅医药卫生科学研究基金(编号: Y2009A135), 温州市瓯海区科技计划项目(编号: 2011XM047)和 2012 年温州医学院学生科研立项资助项目(编号: wyx201201036)资助

作者简介: 梁玲芝, 在读硕士研究生, 专业方向: 临床检验诊断学和线粒体疾病。Tel: 15258638528; E-mail: lianglingzhi2010@gmail.com

通讯作者: 管敏鑫, 教授, 博士生导师, 研究方向: 人类遗传学和线粒体疾病。E-mail: gminxin88@gmail.com

网络出版时间: 2013-4-24 16:38:12

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20130424.1638.005.html>

2. Department of Otolaryngology, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, China;

3. College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China

Abstract: Mitochondrial 12S rRNA A1555G mutation has been associated with both aminoglycoside-induced and non-syndromic hearing loss. In this report, we performed a clinical and genetic evaluation, and mitochondrial genome analysis of one hearing-impaired Chinese family carrying the A1555G mutation. Strikingly, the penetrances of hearing loss in this family, which were 81% and 66.7%, respectively, when aminoglycoside-induced hearing loss was included or excluded. The penetrances of hearing loss in this family were significantly higher than those in other Chinese families carrying the A1555G mutation. Sequence analysis of their mitochondrial genomes revealed the presence of homoplasmic tRNA^{lle} A4317G mutations and 38 mtDNA polymorphisms belonging to East-Asian haplogroup B4c1b2. Further analysis revealed that other mitochondrial DNA variants were not functional significantly, while the A4317G mutation is localized to a highly conserved nucleotide (conventional site 59) at tRNA^{lle} TΨC loop of tRNA^{lle}. The mutation may alter secondary structure and function of this tRNA, thereby leading to mitochondrial dysfunction. Allelic analysis showed that this mutation was absent in 961 hearing normal Chinese controls. Thus, the altered tRNA^{lle} metabolism by the A4317G mutation may aggravate mitochondrial dysfunction associated with the A1555G mutation, and contribute to the higher penetrance of hearing loss. Therefore, the tRNA^{lle} A4317G mutation may act as a mitochondrial modifier to influence the phenotypic manifestation of the A1555G mutation.

Keywords: hearing loss; mutation; mitochondrial; tRNA; phenotypic expression

耳聋是常见的多发病之一。在我国, 听力残疾是 5 大残疾之首, 成为严重危害我国人口健康素质的疾病。在众多发病原因中, 线粒体 DNA (Mitochondrial DNA, mtDNA) 突变是导致耳聋发生的重要原因之一, 它是一种母系遗传方式的突变^[1]。目前, 线粒体 12S rRNA A1555G 和 C1494T 突变已被证明与非综合征型耳聋和 AmAn 导致的耳聋相关, 其他修饰因子包括 mtDNA 单体型和核修饰基因, 在线粒体 12S rRNA A1555G 或 C1494T 突变相关的耳聋表型表达上也起着协同作用^[2,3]。同时, 在中国汉族家系研究中已发现 6 个线粒体 tRNA 突变可影响线粒体 A1555G 突变患者的耳聋表型表达, 这些突变位点分别是 tRNA^{Cys} G5821A、tRNA^{Ser(UCN)} G7444A、tRNA^{Arg} T10454C、tRNA^{Glu} A14693G、tRNA^{Thr} T15908C 和 tRNA^{Thr} G15927A, 且这些 tRNA 突变是已明确对耳聋的表型具有调控作用的继发突变^[4-6]。

为了更深入的研究是否还有其他继发突变位点对携带线粒体 A1555G 突变患者的耳聋表型表达有影响, 我们对浙江省聋病人群进行了全面的 12S rRNA 和 *GJB2* 基因突变筛查^[7,8]。本文主要针对一个携带线粒体 A1555G 突变家系进行临床和分子遗传学评估, 探讨影响该家系耳聋高外显率和表现度

的原因。

1 对象和方法

1.1 研究对象

自 2004 年, 收集来自浙江省各合作医院耳鼻喉科门诊和聋哑学校的耳聋患者共 1 789 例, 正常对照 961 例。根据温州医学院伦理委员会相关管理规定的办法, 参加此项目研究的耳聋患者及家系成员全部签署了知情同意书。同时, 为了明确是否存在综合征型耳聋和 AmAn 使用史以及其他耳聋相关的影响因素, 我们详细地询问了耳聋患者的病史并对其进行了系统体格检查。经筛查, 发现有 106 个携带线粒体 A1555G 突变的家系。其中一个家系(编号: FE163)同时携带线粒体 A1555G 突变和 tRNA^{lle} A4317G 突变。该家系来自浙江省温州市, 家系成员的耳聋外显率和表现度相当高, 包括 AmAn 使用史的耳聋外显率为 81%, 不包括 AmAn 使用史的耳聋外显率为 66.7%, 且该家系呈现典型的母系遗传方式。我们对该家系成员进行全面的临床和分子遗传学研究, 并探讨线粒体 tRNA^{lle} A4317G 突变对该家系线粒体 A1555G 突变相关的耳聋表型表达的影响。

1.2 方法

1.2.1 体格检查和听力学检查

首先对 FE163 家系先证者及母系成员进行系统而全面的体格检查和听力学检查。体格检查主要包括全身系统检查和综合征型耳聋相关体征检查等。听力学检查包括纯音测听(Pure tone audiometry, PTA)、声阻抗、听觉脑干反应(Auditory brainstem respons, ABR)和畸变产物耳声反射(Distortion product otoacoustic emission, DPOAE)。按照 WHO (1980 年)耳聋分级标准,以听力水平的分贝(dB)数为单位进行听力损失检测,以语言频率(0.5、1、2 kHz)的平均听阈将耳聋的严重程度分成 5 级:正常为 <26 dB,轻度聋为 26~40 dB,中度聋为 41~70 dB,重度聋为 71~90 dB,极重度聋为 >90 dB。

1.2.2 基因组 DNA 的提取

抽取 FE163 家系先证者及母系成员外周静脉血 2 mL 于 EDTA-K2 抗凝管中,用 Universal DNA 分离试剂盒(宝生物工程(大连)有限公司)提取全基因组 DNA(包含 mtDNA)。

1.2.3 线粒体全基因组全序分析

本研究以提取的全基因组 DNA 为模板进行线粒体 12S rRNA 和 tRNA^{lle} 目的片段的 PCR 扩增,其中线粒体 12S rRNA 基因的引物位于 mtDNA 618~635(正向)和 1988~2007(反向)^[9],线粒体 tRNA^{lle} 的引物位于 mtDNA 3777~3796(正向)和 4660~4679(反向)。并对筛查到的所有携带 A1555G 突变的先证者线粒体基因组 DNA 使用 24 对有部分重叠的引物^[10]进行全序列扩增、纯化和测序。用限制性内切酶 *BsmA* 和 *Af* 分别检测 A1555G 突变和 tRNA^{lle} A4317G 突变是否为同质性突变,酶切产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳分析,经溴化乙锭染色后用激光光密度仪测定已酶切产物和未酶切产物的比例^[11]。PCR 产物经纯化后,通过 Big Dye 末端循环测序反应试剂盒在 ABI 3700 DNA 自动测序仪上测序,测序结果使用 DNAMAN 软件与校正后的人类 mtDNA 剑桥参考序列^[12]比对,发现可疑突变位点后用 Chromas 2.0 软件读取测序结果的峰图文件,进行确认或排除。并在 FE163 家系母系成员和 961 例正常对照中筛查线粒体 12S rRNA 基因和 tRNA^{lle},方法同上。

1.2.4 GJB2 突变分析

GJB2 突变在耳聋的表型表达中起着重要的作用,它是常见的引起遗传性非综合征型耳聋的核基因^[13]。为了排除该基因对 FE163 家系耳聋表型表达的影响,本研究对该家系母系成员 *GJB2* 编码区进行 PCR 扩增及产物纯化测序,并分析测序结果。PCR 引物为 5'-TATGACACTCCCCAGCACAG-3'(正向)和 5'-GGGCAATGCTTAAACTGGC-3'(反向),使扩增片段覆盖 *GJB2* 整个编码区^[14]。测序方法同上,测序结果与野生型 *GJB2* 标准序列(GenBank:M86849)进行比对,以确定是否含有耳聋相关的突变位点。

1.2.5 种系发生分析和单体型分析

保守性指数(Conservation index, CI),即相应位点核苷酸为野生型的物种个数占 17 种物种数的百分比,如果该值大于 75%说明该位点在进化上是保守的^[4,8]。本研究将线粒体 tRNA^{lle} A4317G 突变位点在 17 个灵长类物种间进行保守性分析(表 1)。

同时,根据东亚线粒体单体型树对线粒体全基因组的测序结果进行单体型分型^[15],以探讨在相同单体型的情况下是否存在耳聋表型的差异。

2 结果与分析

2.1 临床和遗传学评估

首先对 FE163 家系进行临床和遗传学评估。该家系共 4 代,母系成员 21 人,男性 8 人,女性 13 人,且所有耳聋患者都属于母系成员(图 1)。先证者(III-3)是在温州医学院附属第一医院就诊时发现,男,23 岁,左耳佩戴助听器,2 岁时能说话,后因感冒发烧就诊,慢慢发现对声音没有反应,有庆大霉素用药史。其中包括先证者共有耳聋患者 17 人,3 人有 AmAn 使用史。母系成员中包括 AmAn 使用史的耳聋外显率为 81%,不包括 AmAn 使用史的耳聋外显率 66.7%。母系成员的听力损失程度从轻度,中度,重度到极重度不等。听力图结构不相同,包括平坦型,斜坡型,山型,和切迹型(表 2,图 2)。家系成员中各耳聋患者的发病年龄均不相同,且以双侧对称性听力损失为主,未发现其他临床症状。

2.2 线粒体全基因组分析

从 FE163 家系图可知该家系所有耳聋患者均为

表 1 17 个灵长类物种间线粒体 tRNA^{Ile} 4317 位点保守性分析

物种	线粒体 tRNA ^{Ile} 部分位点和对应碱基									
	27	32	39	44	49	54	59	61	66	73
<i>Cebus albifrons</i>	TTACT	TTGATAG	AGTAA	ACTAT	AGAGG	TTTAAAT	CCTCT	TATTTCT	A	
<i>Cercopithecus aethiops</i>	TTACT	TTGATAG	AGTAA	ATGAT	AGGGG	CTCCAAC	CCTCT	TATTTCT	A	
<i>Colobus guereza</i>	TTACT	TTGATAG	AGTAA	ATAAT	AGAGG	ACCTAAC	CCTCT	TATTTCT	A	
<i>Gorilla gorilla</i>	TTACT	TTGATAG	AGTAA	ATAAT	AGAGG	TTTAAAC	CCCCT	TATTTCT	A	
<i>Homo sapiens</i>	TTACT	TTGATAG	AGTAA	ATAAT	AGGAG	CTTAAAC	CCCCT	TATTTCT	A	
<i>Hylobates lar</i>	TTACT	TTGATAG	AGTAA	ATAAT	AGGGG	TTTAAAT	CCCCT	TATTTCT	A	
<i>Lemur catta</i>	TTACT	TTGATAG	AGTAA	ATAAT	AGAGG	TTTAAAT	CCCCT	TATTTCT	A	
<i>Macaca mulatta</i>	TTACT	TTGATGG	AGTAA	ATAAT	AGAGG	CCCCAAT	CCTCT	TGTTTCT	A	
<i>Macaca sylvanus</i>	TTACT	TTGATAG	AGTAA	ATAAT	AGAGG	CCCCAAC	CCTCT	TATTTCT	A	
<i>Nycticebus coucang</i>	TTACT	TTGATAG	AGTAA	AACAT	AGAGG	TGAGAGC	CCTCT	TATTTCT	A	
<i>Pan paniscus</i>	TTACT	TTGATAG	AGTAA	ATAAT	AGGAG	TTTAAAT	CCCCT	TATTTCT	A	
<i>Pan troglodytes</i>	TTACT	TTGATAG	AGTAA	ATAAT	AGGAG	TTCAAAT	CCCCT	TATTTCT	A	
<i>Papio hamadryas</i>	TTACT	TTGATAG	AGTAA	ACAAT	AGAGG	CCCCAAT	CCTCT	TATTTCT	A	
<i>Pongo pygmaeus</i>	TTACT	TTGATAG	AGTAA	AAAAT	AGAGG	TCTAAAT	CCCCT	TATTTCT	A	
<i>Pongo pygmaeus abelii</i>	TTACT	TTGATAG	AGTAA	AAAAT	AGAGG	TCTAAAT	CCCCT	TATTTCT	A	
<i>Tarsius bancanus</i>	TTACT	TTGATAG	AGTAA	ATAAT	AGAGG	TCAAGC	CCTCT	TATTTCT	A	
<i>Trachypithecus obscurus</i>	TTACT	TTGATAG	AGTAA	ATAAT	AGAGG	TGCTTAAT	CCTCT	TATTTCT	A	

注: 第 59 通用位点是对应的线粒体 tRNA^{Ile} 4317 位点; 参考线粒体基因组数据库网站 <http://mamit-trna.u-strasbg.fr/>。

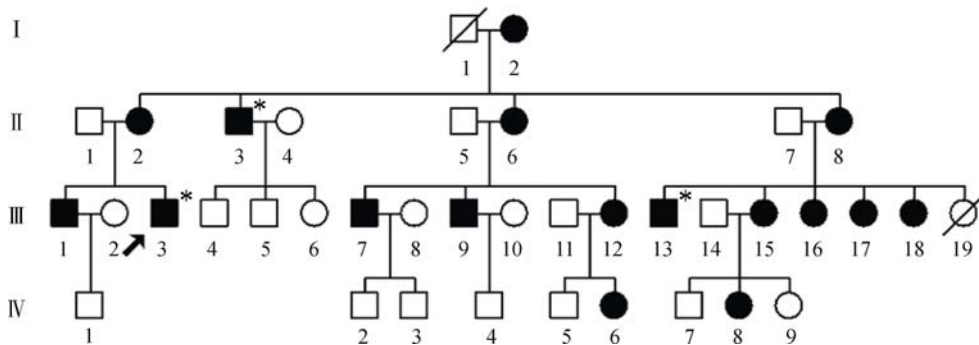


图 1 FE163 家系的系谱图

黑色符号表示听力下降患者; 箭头所指为先证者; *表示有 AmAn 用药史。

母系成员, 呈现典型的母系遗传方式, 提示 mtDNA 突变可能是该家系致病的分子基础。因此, 本研究对 FE163 家系先证者进行线粒体全基因组扩增和测序。结果显示该家系除了线粒体 12S rRNA A1555G 突变外, tRNA^{Ile} 上携带有一个已知的 tRNA^{Ile} A4317G 突变外(图 3), 还存在多个多态性位点(表 3)。在非编码 D-loop 区有 16 个已知多态性位点, 12S rRNA 基因上有 4 个已知多态位点, 16S rRNA 基因上有 3 个已知多态位点。蛋白质编码区发现 7 个已报道的无义突变和 6 个错义突变(<http://www.mitomap.org>)。

这些错义突变分别为 *ND1* 的 C3497T(A64V) 和 C3571T(L89F), *ATP6* 的 G8573A (G16D)和 A8860G (T112A), 以及 *CytB* 的 C14766T (T7I)和 A15326G (T194A)。本研究对这些突变进行不同种系包括 17 个灵长类物种的保守性分析, 发现线粒体 tRNA^{Ile} A4317G 突变 CI 为 88.2%, 在错义突变中, C3571T(L89F)、G8573A (G16D)和 A8860G (T112A) 这 3 个在进化上是高度保守的(表 3), 其他突变在进化上均不具有高度保守性。虽然这 3 个错义突变在进化上是保守的, 但在多态位点对照(<http://www.mitomap.org>)。

表 2 FE163 家系 17 位母系成员临床资料

成员	性别	测听年龄(岁)	发病年龄(岁)	平均纯音测听水平		听力损失情况	听力曲线
				左耳(dB)	右耳(dB)		
-2	女	74	40	81	85	重度	平坦型
-2	女	44	/	63	52	中度	斜坡型
-3	男	47	5	85	88	重度	斜坡型
-6	女	55	/	41	41	中度	斜坡型
-8	女	52	2	83	53	中度	山型
III-1	男	24	/	59	58	中度	斜坡型
III-3	男	22	2	95	104	极重度	斜坡型
III-7	男	34	/	71	73	重度	斜坡型
III-9	男	32	/	55	61	中度	斜坡型
III-12	女	29	/	58	65	中度	山型
III-13	男	15	0	88	97	极重度	斜坡型
III-15	女	30	/	40	35	轻度	平坦型
III-16	女	27	/	43	32	轻度	切迹型
III-17	女	23	/	42	31	轻度	切迹型
III-18	女	19	/	31	29	轻度	斜坡型
IV-6	女	10	/	30	33	轻度	平坦型
IV-8	女	9	/	32	33	轻度	平坦型

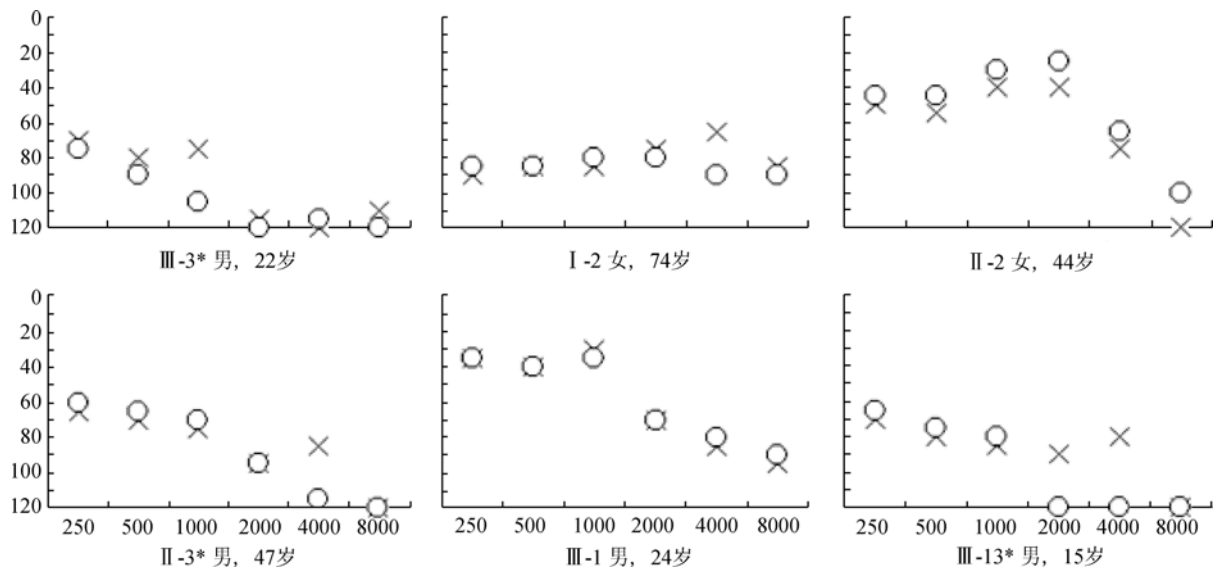


图 2 部分家系成员听力图

x : 左耳, o : 右耳; *表示有 AmAn 用药史。

genpat.uu.se/mtDB/)和 961 例正常对照中均有发现, 因此不具备对该家系的耳聋表型表达影响的特异性, 影响可能性较小。而 tRNA^{lle} A4317G 突变发生在 tRNA^{lle} 的 TΨC 环区的高度保守性区(图 4), 在正常对照中未发现该突变位点。本研究对先证者家系母系成员进行线粒体 12S rRNA 和 tRNA^{lle} 筛查, 均发

现存在线粒体 A1555G 突变和 tRNA^{lle} A4317G 突变。此外, 经限制性内切酶 *BsmA* 和 *Af* 消化分别检测 A1555G 突变和 tRNA^{lle} A4317G 突变以及测序峰图(图 3)发现, 这两个突变均为同质性突变。线粒体基因组全序列(表 3)分析发现该家系属于东亚线粒体 B4c1b2 单体型。

表 3 FE163 家系线粒体基因全序列分析

基因	位点	碱基(氨基酸)改变	保守性(%)	校正的剑桥参考序列	是否报道 ^a
D-loop	73	A to G		A	是
	146	T to C		T	是
	150	C to T		C	是
	263	A to G		A	是
	310	T to CCCTC		T	是
	523	del A		A	是
	524	del C		C	是
	16140	T to C		T	是
	16182	A to C		A	是
	16183	A to C		A	是
	16189	T to CC		T	是
	16217	T to C		T	是
	16242	C to A		C	是
	16274	G to A		G	是
	16335	A to G		A	是
	16519	T to C		T	是
	12S rRNA	709	G to A	72.2	G
750		A to G	100	A	是
1119		T to C	44.4	T	是
1438		A to G	94.4	A	是
16S rRNA	1555	A to G	88.9	A	是
	2706	A to G	88.9	A	是
	3107	del N		N	是
ND1	3116	C to T	88.9	C	是
	3497	C to T(Ala to Val)	11.1	C	是
tRNA-Ile	3571	C to T(Leu to Phe)	94.4	C	是
	4317	A to G	88.2	A	是
ND2	4769	A to G		A	是
CO1	6531	C to T		C	是
	7028	C to T		C	是
NC7	8271-79	9-bp del			是
ATP6	8573	G to A(Gly to Asp)	83.3	G	是
	8772	T to C		T	是
	8860	A to G(Thr to Ala)	77.8	A	是
ND4	11719	G to A		G	是
Cytb	14766	C to T(Thr to Ile)	44.4	C	是
	15326	A to G(Thr to Ala)	50	A	是
	15346	G to A		G	是

注: ^a 见线粒体基因组数据库网站: <http://www.mitomap.org> 和 <http://www.genpat.uu.se/mtDB/>。

2.3 GJB2 突变分析

GJB2 为遗传性非综合征型耳聋最常见的核基因之一^[13], 为排除 *GJB2* 突变对耳聋表型表达的影响, 我们对 FE163 家系的母系成员进行了 *GJB2* 突变筛查, 结果显示 *GJB2* 编码区未发现突变和多态性位点, 因此, 可以排除该家系的耳聋外显率受 *GJB2*

影响。

3 讨论

本研究分析了一个同时携带线粒体 A1555G 突变和 tRNA^{Ile} A4317G 突变的耳聋家系的临床、遗传和分子生物学特征。该家系母系成员患者仅听力下

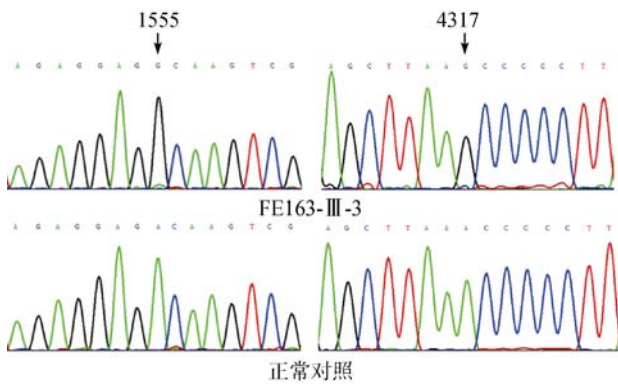
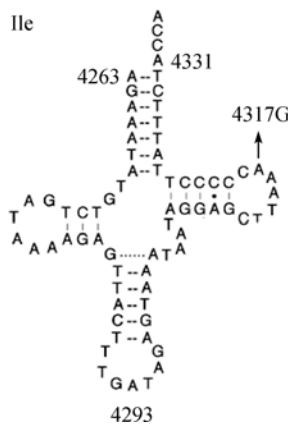


图 3 线粒体 1555 位点和 4317 位点测序峰图结果

图 4 线粒体 tRNA^{Ile} A4317G 突变二级结构图

降, 无其他临床症状。根据 tRNA 二级结构(图 4), A4317G 同质性突变发生在 tRNA^{Ile} 的保守性区域, 该突变造成了 tRNA^{Ile} TΨC 环区(第 59 通用位点)的

结构改变^[16], 影响了 tRNA^{Ile} 的 3'端的 CCA-加尾^[17]。核苷酸序列的完整性和正确性决定了碱基的识别修饰从而进行有效的氨基酰化^[18]。该突变可能影响了 tRNA^{Ile} 的氨基酰化程度, 导致 tRNA 的不稳定^[19], 从而影响蛋白质的合成^[20,21]。且该突变只存在这个家系的母系成员中, 不存在于 961 例正常对照。

本研究分析的这个家系的耳聋患者中包括 AmAn 使用史和排除 AmAn 使用史的耳聋外显率分别高达 81%和 66.7%。为了研究造成此家系高外显率的原因, 我们进一步分析关于线粒体 A1555G 突变表型表达的各种影响因素。目前, 有研究报道几种修饰因子, 如核背景、AmAn 和线粒体单体型与耳聋外显率和表现度都是相关的。核背景对线粒体 A1555G 突变表型表达可能有影响, 线粒体耳聋表型相关的核修饰基因包括目前研究已知的 *TRMU*、*MTO1*、*GTPBP3* 等^[1,22-25], 可能还有一些尚未研究报道过的核修饰基因。而在 FE163 家系中我们针对较常见的 *GJB2* 编码区进行筛查, 未发现存在突变和多态性位点, 所以可以排除 *GJB2* 对该家系的耳聋外显率影响。其他核修饰基因暂未研究, 不能完全排除, 可能对该家系的耳聋表型也有影响。另一方面, 根据线粒体基因组全序列分析发现该家系属于东亚线粒体 B4c1b2 单体型。然而, 对比同类型的东亚线粒体 B 单体型(表 4)的携带线粒体 A1555G 突变家系的耳聋外显率, 发现该家系成员的外显率和表现度均明显高于其他 3 个无继发突变的家系。因此可以初步排除线粒体单体型对该家系高耳聋表型

表 4 10 个携带线粒体 A1555G 突变的 B 单体型家系的临床资料

家系	母系成员数目	外显率(%) ^a		mtDNA 继发突变	mtDNA 单体型
		包括 AmAn 使用者	不包括 AmAn 使用者		
FE163	21	81	66.7	tRNA ^{Ile} A4317G	B4c1b2
WZD1 ^b	17	5.9	0	无	B4c1c1
WZD44 ^c	14	7.1	0	无	B4
WZD48	15	26.7	6.7	无	B4a1
WZD58	8	50	37.5	COI/tRNA ^{Ser(UCN)} G7444A	B4b1c
WZD59	31	41.9	35.5	COI/tRNA ^{Ser(UCN)} G7444A	B4
YJ049 ^d	12	33.3	25	COI/tRNA ^{Ser(UCN)} G7444A	B4c1
WZD33 ^e	27	51.9	44.4	tRNA ^{Thr} G15927A	B5b1
WZD34	19	50	39	tRNA ^{Thr} G15927A	B5b1
WZD9 ^f	13	46	31	tRNA ^{Thr} G15927A	B5b1

注: ^a表示母系成员耳聋患者/所有母系成员; 表格中的数据来源于文献^b[31]、^c[5]、^d[32]、^e[6]、^f[33]。

表达的影响。同时,分析发现该家系母系成员中包括先证者在内的 3 人有 AmAn 使用史,家系内母系成员的临床表型不同(包括听力损失程度和听力曲线不同类型在内)以及包括 AmAn 耳聋和排除 AmAn 耳聋时外显率的不同,表明 AmAn 作为修饰因子在该家系的耳聋表型上起了一定的作用。然而,已报道的 6 个携带 12S rRNA A1555G 突变的中国家系听力损失的外显率为 31.7%^[26-29],也有报道过 20 个中国家系的外显率很低,包括 AmAn 耳聋时外显率平均仅为 11.5%(4%~18%)^[27,30]。而 FE163 家系耳聋的外显率却非常高,远远超过那些携带 A1555G 突变的家系的外显率,在排除以上几种修饰因子的前提下,我们推测在 FE163 家系中,线粒体 tRNA^{Ile} A4317G 突变可能对其家系成员耳聋的表型表达起了一定作用。因此,该家系的高耳聋外显率可能是由线粒体 tRNA^{Ile} A4317G 突变和 12S rRNA A1555G 突变协同作用造成的。同时,该家系成员的外显率和表现度与携带 12S rRNA A1555G 突变合并 COI/tRNA^{Ser(UCN)} G7444A 或 tRNA^{Thr}G15927A 继发突变的家系相比(表 4)略高,且线粒体 tRNA^{Ile} A4317G 的 CI 达 88.2%。因此,我们进一步推测线粒体 tRNA^{Ile} A4317G 突变可能是 12S rRNA A1555G 突变患者的耳聋表型具有调控作用的一个新的继发突变位点。

参考文献(References):

- [1] Guan MX. Mitochondrial 12S rRNA mutations associated with aminoglycoside ototoxicity. *Mitochondrion*, 2011, 11(2): 237-245. DOI
- [2] 杨爱芬, 郑静, 吕建新, 管敏鑫. 修饰因子对线粒体 DNA 突变致聋的影响. *中华医学遗传学杂志*, 2010, 28(2): 165-171. DOI
- [3] 管敏鑫, 赵立东. 与氨基糖甙类抗生素耳毒性相关的线粒体 12S rRNA 突变的流行病学特征. *中华耳科学杂志*, 2006, 4(2): 98-105. DOI
- [4] Ruiz-Pesini E, Wallace DC. Evidence for adaptive selection acting on the tRNA and rRNA genes of human mitochondrial DNA. *Hum Mutat*, 2006, 27(11): 1072-1081. DOI
- [5] Lu JX, Qian YP, Li ZY, Yang AF, Zhu Y, Li RH, Yang L, Tang XW, Chen BB, Ding Y, Li YY, You JY, Zheng J, Tao Z, Zhao F, Wang J, Sun D, Zhao J, Meng Y, Guan MX. Mitochondrial haplotypes may modulate the phenotypic manifestation of the deafness-associated 12S rRNA 1555A>G mutation. *Mitochondrion*, 2010, 10(1): 69-81. DOI
- [6] Wang XJ, Lu JX, Zhu Y, Yang AF, Yang L, Li RH, Chen BB, Qian YP, Tang XW, Wang JD, Zhang X, Guan MX. Mitochondrial tRNA^{Thr} A15927G mutation may modulate the phenotypic manifestation of ototoxic 12S rRNA A1555G mutation in four Chinese families. *Pharmacogenet Genom*, 2008, 18(12): 1059-1070. DOI
- [7] 郑斌娇, 彭光华, 陈波蓓, 方芳, 郑静, 伍越, 梁玲芝, 南奔宇, 唐霄雯, 朱翌, 吕建新, 管敏鑫. 浙江省非综合征型耳聋患者 12S rRNA 突变频谱分析. *遗传*, 2012, 34(6): 695-704. DOI
- [8] Lu JX, Li ZY, Zhu Y, Yang AF, Li RH, Zheng J, Cai Q, Peng GH, Zheng WW, Tang XW, Chen BB, Chen JF, Liao ZS, Yang L, Li YY, You JY, Ding Y, Yu H, Wang JD, Sun DM, Zhao JY, Xue L, Wang JY, Guan MX. Mitochondrial 12S rRNA variants in 1642 Han Chinese pediatric subjects with aminoglycoside-induced and nonsyndromic hearing loss. *Mitochondrion*, 2010, 10(4): 380390. DOI
- [9] Li R, Xing G, Yan M, Cao X, Liu XZ, Bu X, Guan MX. Cosegregation of C-insertion at position 961 with the A1555G mutation of the mitochondrial 12S rRNA gene in a large Chinese family with maternally inherited hearing loss. *Am J Med Genet A*, 2004, 124A(2): 113-117. DOI
- [10] Rieder MJ, Taylor SL, Tobe VO, Nickerson DA. Automating the identification of DNA variations using quality-based fluorescence re-sequencing: analysis of the human mitochondrial genome. *Nucleic Acids Res*, 1998, 26(4): 967-973. DOI
- [11] Li R, Greinwald JH Jr, Yang L, Choo DI, Wenstrup RJ, Guan MX. Molecular analysis of the mitochondrial 12S rRNA and tRNA^{Ser(UCN)} genes in paediatric subjects with non-syndromic hearing loss. *J Med Genet*, 2004, 41(8): 615-620. DOI
- [12] Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM, Howell N. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat Genet*, 1999, 23(2): 147. DOI
- [13] Dai P, Yu F, Han B, Yuan YY, Li Q, Wang GJ, Liu X, He J, Huang DL, Kang DY, Zhang X, Yuan HJ, Schmitt E, Han DY, Wong LJ. The prevalence of the 235delC *GJB2* mutation in a Chinese deaf population. *Genet Med*, 2007, 9(5): 283-289. DOI
- [14] Tang XW, Li RH, Zheng J, Cai Q, Zhang T, Gong SS, Zheng WW, He XM, Zhu Y, Xue L, Yang AF, Yang L, Lu JX, Guan MX. Maternally inherited hearing loss is associated with the novel mitochondrial tRNA Ser(UCN) 7505T>C mutation in a Han Chinese family. *Mol Genet Metab*, 2010, 100(1): 57-64. DOI
- [15] Kong QP, Bandelt HJ, Sun C, Yao YG, Salas A, Achilli A, Wang CY, Zhong L, Zhu CL, Wu SF, Torroni A, Zhang YP.

- Updating the East Asian mtDNA phylogeny: a prerequisite for the identification of pathogenic mutations. *Hum Mol Genet*, 2006, 15(13): 2076–2086. [DOI](#)
- [16] Suzuki T, Nagao A, Suzuki T. Human mitochondrial tRNAs: biogenesis, function, structural aspects, and diseases. *Annu Rev Genet*, 2011, 45: 299–329. [DOI](#)
- [17] Tomari Y, Hino N, Nagaike T, Suzuki T, Ueda T. Decreased CCA-addition in human mitochondrial tRNAs bearing a pathogenic A4317G or A10044G mutation. *J Biol Chem*, 2003, 278(19): 16828–16833. [DOI](#)
- [18] Grosjean H, Edqvist J, Stråby KB, Giegé R. Enzymatic formation of modified nucleosides in tRNA: dependence on tRNA architecture. *J Mol Biol*, 1996, 255(1): 67–85. [DOI](#)
- [19] Agris PF. The importance of being modified: roles of modified nucleosides and Mg^{2+} in RNA structure and function. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 1996, 53: 79–129. [DOI](#)
- [20] Zheng J, Ji YC, Guan MX. Mitochondrial tRNA mutations associated with deafness. *Mitochondrion*, 2012, 12(3): 406–413. [DOI](#)
- [21] Jühling F, Pütz J, Bernt M, Donath A, Middendorf M, Florentz C, Stadler PF. Improved systematic tRNA gene annotation allows new insights into the evolution of mitochondrial tRNA structures and into the mechanisms of mitochondrial genome rearrangements. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(7): 2833–2845. [DOI](#)
- [22] Guan MX, Yan QF, Li XM, Bykhovskaya Y, Gallo-Teran J, Hajek P, Umeda N, Zhao H, Garrido G, Mengesha E, Suzuki T, del Castillo I, Peters JL, Li RH, Qian YP, Wang XJ, Ballana E, Shohat M, Lu JX, Estivill X, Watanabe K, Fischel-Ghodsian N. Mutation in *TRMU* related to transfer RNA modification modulates the phenotypic expression of the deafness-associated mitochondrial 12S ribosomal RNA mutations. *Am J Hum Genet*, 2006, 79(2): 291–302. [DOI](#)
- [23] Bykhovskaya Y, Mengesha E, Wang D, Yang HY, Estivill X, Shohat M, Fischel-Ghodsian N. Phenotype of non-syndromic deafness associated with the mitochondrial A1555G mutation is modulated by mitochondrial RNA modifying enzymes *MTO1* and *GTPBP3*. *Mol Genet Metab*, 2004, 83(3): 199–206. [DOI](#)
- [24] Bykhovskaya Y, Mengesha E, Wang D, Yang HY, Estivill X, Shohat M, Fischel-Ghodsian N. Human mitochondrial transcription factor B1 as a modifier gene for hearing loss associated with the mitochondrial A1555G mutation. *Mol Genet Metab*, 2004, 82(1): 27–32. [DOI](#)
- [25] Yan QF, Bykhovskaya Y, Li RH, Mengesha E, Shohat M, Estivill X, Fischel-Ghodsian N, Guan MX. Human *TRMU* encoding the mitochondrial 5-methylaminomethyl-2-thiouridylate-methyltransferase is a putative nuclear modifier gene for the phenotypic expression of the deafness-associated 12S rRNA mutations. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 342(4): 1130–1136. [DOI](#)
- [26] Yuan HJ, Qian YP, Xu YJ, Cao JY, Bai LN, Shen WD, Ji F, Zhang X, Kang DG, Mo JQ, Greinwald JH, Han DY, Zhai SQ, Young WY, Guan MX. Cosegregation of the G7444A mutation in the mitochondrial *COI*/tRNA^{Ser(UCN)} genes with the 12S rRNA A1555G mutation in a Chinese family with aminoglycoside-induced and nonsyndromic hearing loss. *Am J Med Genet A*, 2005, 138A(2): 133–140. [DOI](#)
- [27] Zhao LD, Wang QJ, Qian YP, Li RH, Cao JY, Hart LC, Zhai SQ, Han DY, Young WY, Guan MX. Clinical evaluation and mitochondrial DNA sequence analysis in two Chinese families with aminoglycoside-induced and non-syndromic hearing loss. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 336(3): 967–973. [DOI](#)
- [28] Young WY, Zhao LD, Qian YP, Li RH, Chen J, Yuan HJ, Dai P, Zhai SQ, Han DY, Guan MX. Variants in mitochondrial tRNA^{Glu}, tRNA^{Arg}, and tRNA^{Thr} may influence the phenotypic manifestation of deafness-associated 12S rRNA A1555G mutation in three Han Chinese families with hearing loss. *Am J Med Genet A*, 2006, 140(20): 2188–2197. [DOI](#)
- [29] Young WY, Zhao LD, Qian YP, Wang QJ, Li N, Greinwald JH Jr, Guan MX. Extremely low penetrance of hearing loss in four Chinese families with the mitochondrial 12S rRNA A1555G mutation. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 328(4): 1244–1251. [DOI](#)
- [30] Dai P, Yuan YY, Huang DL, Qian YP, Liu X, Han DY, Yuan HJ, Wang XJ, Young WY, Guan MX. Extremely low penetrance of deafness associated with the mitochondrial 12S rRNA T1095C mutation in three Chinese families. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 348(1): 200–205. [DOI](#)
- [31] Tang XW, Yang L, Zhu Y, Liao ZS, Wang JD, Qian YP, Tao ZH, Hu LN, Wu GM, Lan JS, Wang XJ, Ji JZ, Wu J, Ji Y, Feng JB, Chen JF, Li ZY, Zhang X, Lu JX, Guan MX. Very low penetrance of hearing loss in seven Han Chinese pedigrees carrying the deafness-associated 12S rRNA A1555G mutation. *Gene*, 2007, 393(1–2): 11–19. [DOI](#)
- [32] 唐霄雯, 李智渊, 吕建新, 朱翌, 李荣华, 王金丹, 管敏鑫. 线粒体 tRNA^{Thr} G15927A 突变可能影响耳聋相关的 12S rRNA A1555G 突变的表型表达. *遗传*, 2008, 30(10): 1287–1294. [DOI](#)
- [33] Chen BB, Sun DM, Yang L, Zhang CQ, Yang AF, Zhu Y, Zhao JY, Chen YY, Guan MQ, Wang XJ, Li RH, Tang XW, Wang JD, Tao ZH, Lu JX, Guan MX. Mitochondrial *ND5* T12338C, tRNA^{Cys} T5802C, and tRNA^{Thr} G15927A variants may have a modifying role in the phenotypic manifestation of deafness-associated 12S rRNA A1555G mutation in three Han Chinese pedigrees. *Am J Med Genet A*, 2008, 146A(10): 1248–1258. [DOI](#)