

Leber 遗传性视神经病一家系的遗传学研究

霍玲 刘丹

【摘要】 目的 对 Leber 遗传性视神经病一家系进行线粒体 DNA 基因突变检测,并探讨其临床特点。方法 完成家系调查和系谱分析,收集家系成员的临床资料,并进行眼科专科检查(视力、视野和眼底检查)。利用聚合酶链式反应及 DNA 测序方法对线粒体 DNA 三个原发突变位点 G3460A、G11778A 和 T14484C 进行突变检测。结果 该家系表现为典型的母系遗传特征。突变检测结果提示:先证者及家系患者均存在线粒体 DNA 的 G11778A 原发突变位点,该位点突变后导致 ND4 基因第 340 位氨基酸由精氨酸变为组氨酸。在家系健康成员及 100 名健康对照中均未发现该突变位点。此外,在先证者及患者中进行 3460 和 14484 原发突变位点检测时未发现突变。结论 该家系先证者及患者中均发现线粒体 DNA 的 G11778A 原发突变位点。结合临床特征及基因突变检测结果,该家系可明确诊断为 Leber 遗传性视神经病。

【关键词】 DNA, 线粒体; Leber 遗传性视神经病; 基因诊断; 家系

Genetic analysis of a family with Leber's hereditary optic neuropathy Huo Ling, Liu Dan.
Department of Obstetrics and Gynecology, 201 Hospital of PLA, Liaoyang 111001, China
Corresponding author: Huo Ling, Email: 66415310@qq.com

【Abstract】 Objective To make genetic diagnose in a matrilineal inherited family of Leber's hereditary optic neuropathy (LHON), and discuss the clinical characteristics. **Methods** Family investigation and pedigree analysis were performed in this family. ND1, ND4 and ND6 gene of mitochondrial DNA (mtDNA) were detected by combining polymerase chain reaction with DNA direct sequencing. **Results** The family was characterized as matrilineal inheritance. Mutation detection of mtDNA showed that a primary mtDNA mutation (G11778A) was found in the proband and family patients, which resulted in the 340th amino acid of ND4 gene change from Arginine to Histidine. There was no change for this site in healthy family members and control populations. In addition, there was no mutation for the other two primary mutations (G3460A and T14484C) in the two proband and family patients. **Conclusion** The mutation of G11778A is found in the proband and family patients. According to clinical features and the result of mutation detection, this family is diagnosed as Leber's hereditary optic neuropathy.

【Key words】 DNA, mitochondrial; Leber's hereditary optic neuropathy; Genetic diagnose; Family

Leber 遗传性视神经病 (Leber's hereditary optic neuropathy) 是一种主要累及视盘黄斑束纤维的视神经退行性疾病,是最常见的线粒体遗传病之一。Leber 遗传性视神经病最早是由德国眼科医生 Leber

在 1871 年首次报道。该病典型症状表现为单眼无痛性的视力下降,发病初期表现为单眼出现无明显诱因的视物模糊,可伴有色觉障碍,周边视野通常不受累。随着疾病进展,双眼逐渐受累,通常表现为急性或亚急性起病并进行性恶化。大部分患者除视力障碍外无其他症状,少数 Leber 遗传性视神经病患者除眼部症状外,还有一部分会出现全身症状,如痴呆、耳聋、共济失调等神经系统、心电传

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2014.17.013

作者单位: 111001 辽宁辽阳,解放军第 201 医院妇产科(霍玲);
第三军医大学研究生管理一大队(刘丹)

通讯作者: 霍玲, Email: 66415310@qq.com

导异常及骨骼系统异常^[1-2]。

1988年,Wallace研究小组首次发现线粒体DNA突变可以导致Leber遗传性视神经病发生^[3],随后多个研究小组报道线粒体DNA的3460和14484位点也为Leber遗传性视神经病的原发突变位点^[4-5],并进一步证实该病为母系遗传性疾病。文献报道,90%~95%的Leber遗传性视神经病患者都与线粒体DNA的3种原发性突变位点(G3460A、G11778A、T14484C)有关,这三个突变位点分别位于ND1、ND4和ND6基因,均编码线粒体呼吸链复合物1亚单位^[6-8],在我国,G11778A是最为常见的突变位点,突变率在90%以上^[7]。部分Leber遗传性视神经病患者在进行基因突变分析时,缺乏这3种原发突变位点,但可以发现其他线粒体DNA突变位点,如14459、9438、13730等。此外,有一部分患者除了发现原发突变位点外,还伴有其他线粒体DNA突变位点,这些位点为继发突变位点,如4216和15257等^[9-10]。

本研究主要对一个临床表现为双眼视力逐渐下降的Leber遗传性视神经病患者及其家系成员进行线粒体DNA三个原发突变位点(G3460A、G11778A和T14484C)的突变检测,并探讨其临床特征。

资料与方法

一、临床资料

该家系来自辽宁省辽阳市,汉族,该家系共有3代,患者6例(图1)。先证者III4为10岁男孩,以“双眼视力逐渐下降2年”为主诉而入院。先证者于2年前出现无明显诱因的双眼视力下降,伴有双眼视物不清,无眼痛、恶心、呕吐等其他症状。现双眼视力明显下降,并伴有眼痛症状,故入院进行详细检查。

二、突变检测

在取得家系成员同意并签署知情同意书,获得解放军201医院伦理委员会批准后,收集包括先证者在内的家系成员的外周静脉血各2ml,EDTA抗凝,采用全血基因组DNA抽提试剂盒提取线粒体基因组DNA。同时选取100名健康人群作对照。健康对照的入选标准:与本研究中家系无血缘关系,身体健康,汉族,无家族遗传性疾病,无慢性疾病史。

利用引物设计软件Primer Premier 5.0设计线粒

体DNA的ND1、ND4和ND6三个亚单位的引物(表1),送至上海生工公司合成。50 μl体系进行PCR反应,反应条件:首先95℃ 5 min预变性,然后94℃ 30 s变性,56℃ 30 s退火,72℃ 30 s延伸,35个循环,最后72℃ 5 min延伸。2%琼脂糖凝胶电泳对PCR产物进行检测。采用普通DNA产物纯化试剂盒(天根,北京)对上述PCR产物进行纯化,纯化后用ABI3130遗传分析仪进行测序。测序得到的序列与数据库NCBI中的序列进行比对,查找突变位点。

表1 线粒体DNA三个原发突变位点的引物序列及退火温度

亚单位	引物序列(5'-3')	退火温度(℃)
ND1	F: GGCATTCTAATGCTTACCGA	56
	R: TGATCAGAGGATTGAGTAA	
ND4	F: ATGGCAAGCCAACGCCACTT	56
	R: GTGGTACTAGCACAGAGAGTTC	
ND6	F: TCAACCAGTAACTACTACT	56
	R: TTTGGGGGAGGTTATATGG	

结 果

一、临床表现

家系共有3代,6例患者,患者平均发病年龄在24岁,患者均出现不同程度的视力下降,严重者视力低于0.1。先证者III4主要表现为双眼视力进行性下降,并伴有眼痛症状,无头痛、头晕、恶心和呕吐等其他不适。眼科检查:左眼视力0.1,右眼视力0.1。双侧外眼检查结果正常。眼底检查结果提示双眼视盘轻度水肿,视网膜动脉变细,黄斑中心凹反光可见。双眼色觉检测未见异常。辅助检查:(1)FFA全套造影诊断:双眼视神经病变;(2)视野表现:右眼30°视野颞侧偏盲,中心暗点,鼻侧视敏度降低,左眼30°视野残存,不规则视野。家系中其他患者I2、II2、II3、II6、III1均有不同程度的视力下降或视物模糊。

二、基因诊断

1. PCR扩增反应:对先证者、家系患者、家系中正常人及所选取的健康对照均进行了线粒体DNA三个亚单位ND1、ND4和ND6扩增。如图2所示,三个原发突变位点所在的基因均能成功扩增,扩增条带单一、清晰,可用于后续的测序反应。

2. 线粒体DNA突变检测:测序结果发现,先证者线粒体DNA中ND4亚单位中第11778位碱基由G变为A(c.11778 G>A,图3A),导致第340位氨基酸由精氨酸(Arg)变为组氨酸(His)(p.

Arg340His), 同时在家系成员 I 2、II 2、II 3、II 6 和 III 1 均发现了该突变位点。而在家系中正常人及选取的 100 名健康对照者中均未发现该突变位点(图 3B)。同时, 另外两个原发突变位点(G3460A 和 T14484C) 测序均未发现异常。

讨 论

一、Leber遗传性视神经病诊断

Leber 遗传性视神经病为典型的母系遗传性病, 男性发病率高于女性。患者通常在 10~20 岁出现视力下降, 也有到 70 岁才发病的病例^[6]。多数患者视力损伤可至 0.1, 发病后 3~4 个月视力趋于稳定。大多数 Leber 遗传性视神经病患者视力丧失严重且是永久性的。该病典型症状表现为单眼无痛性的视力下降, 随着疾病进展出现双眼受累。也有少数患者突然出现视力完全丧失或进行性恶化。大多数患者眼底检查主要表现为典型的三联征: 即视盘周围毛细血管扩张性微血管病变、视盘神经纤维层水肿和荧光血管造影中无视盘或周围渗漏。其他检查如视觉诱发电位、视网膜电图、视网膜视纤维层等可表现为一定的异常。

国内外研究表明, 90%以上的 Leber 遗传性视神经病患者中存在一个原发位点^[7-8], 即 G3460A、G11778A 或 T14484C, 分别位于 ND1、ND4 和 ND6 基因, 它们均为编码线粒体呼吸链复合物 1 亚单位的基因。其中 11778 (G-A) 是最为常见的突变位点, 该位点突变可导致 ND4 基因第 340 位氨基酸由精氨酸变为组氨酸。精氨酸对于维持 ND4 亚单位功能非常重要, 其突变后导致 ND4 空间构型改变, 使 NADH 脱氢酶活性下降及线粒体产能效率下降, 导致细胞氧化和呼吸链功能障碍, 进而导致 Leber 遗传性视神经病的发生。Leber 遗传性视神经病患者的临床特征、视力损伤程度及预后与线粒体 DNA 突变位点明显相关。研究表明, G11778A 位点突变的患者视力丧失最严重, 预后最差, 仅有 4% 的病例视力有一定程度的恢复。T14484C 突变的患者临床表型最轻, 预后较好, 部分患者视力可恢复正常, 该位点突变时, 视力丧失时年龄越小, 恢复的越好^[7]。G3460A 位点的患者临床表现和预后介于两者之间, 约 22% 的患者可恢复正常^[11]。

Leber 遗传性视神经病的诊断主要依据典型的临床特征、家族史及基因突变检测结果。本研究的家系共 3 代, 有 6 例患者, 由图 1 可以看出, 该家

系表现为典型的母系遗传特征。先证者出现双眼视力逐渐下降。眼底检查结果提示双眼视盘轻度水肿, 视网膜动脉变细, 黄斑中心凹反光可见。视野检查结果提示: 右眼 30° 视野颞侧偏盲, 中心暗点, 鼻侧视敏度降低, 左眼 30° 视野残存, 不规则视野。家系中其他患者也存在不同程度的视力受损。基因突变检测发现先证者及患者存在 G11778A 突变位点。结合家族史、临床特征及基因突变检测结果, 该家系可明确诊断为 Leber 遗传性视神经病。

二、Leber 遗传性视神经病发病机制探讨

Leber 遗传性视神经病为母系遗传的线粒体疾病, 具体病因还尚不清楚。目前对于 Leber 遗传性视神经病的发病机制有一定的认识, 主要有以下几种学说占主要地位: (1) 细胞质遗传及线粒体突变学说。1988 年首次发现线粒体 DNA 的突变可以导致 Leber 遗传性视神经病的发病, 但该学说不能解释 Leber 遗传性视神经病的某些临床特征, 如家系中的低外显率、男性发病率高。之前有人发现核基因 OPA1 突变可以导致编码的线粒体蛋白异常, 但新近研究表明 OPA1 基因的突变也不能解释 Leber 遗传性视神经病的不完全外显率^[12]; (2) 染色体遗传学说。提出该假说主要的根据是该病在男性中发病率高, 其母亲通常为携带者, 但一般不发病。但男性患者的后代从来不发病, 女性患者的后代有很高的发病率, 这种现象不能用性连锁显性遗传来解释; (3) 慢性氰化物中毒学说。研究表明在 Leber 遗传性视神经病中, 相关突变可以导致氰化物在患者体内蓄积, 同时吸烟、过量饮酒、环境毒物接触等也可引起患者体内氰化物含量的升高, 从而通过抑制细胞色素 C 氧化酶而导致视神经及其他脱髓鞘病变; (4) 视交叉部蛛网膜炎学说。研究表明发现 Leber 遗传性视神经病患者视神经颅内段尤其是在视交叉部的蛛网膜有炎症并伴有脑脊液滞留从而造成视神经的损害。

三、Leber 遗传性视神经病治疗及预防

随着分子遗传学技术的发展, 对 Leber 遗传性视神经病主要应加强预防。婚前进行遗传咨询并进行分子遗传学检查, 进行突变检测, 可以显著降低患者的出生率, 特别在已知 Leber 遗传性视神经病的家庭中, 更应该重视遗传咨询工作, 防止患儿出生, 减少家庭及社会负担。

Leber 遗传性视神经病目前无特效的治疗方法, 主要采取对症治疗。具有抗氧化功能的药物如

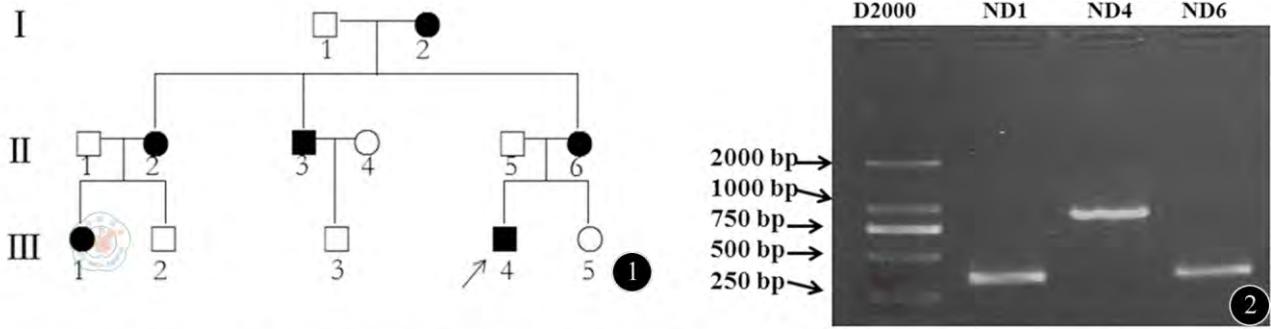


图1 家系系谱图。↗为先证者，■为男性患者，●为女性患者 图2 先证者III4线粒体DNA三个亚单位PCR扩增结果

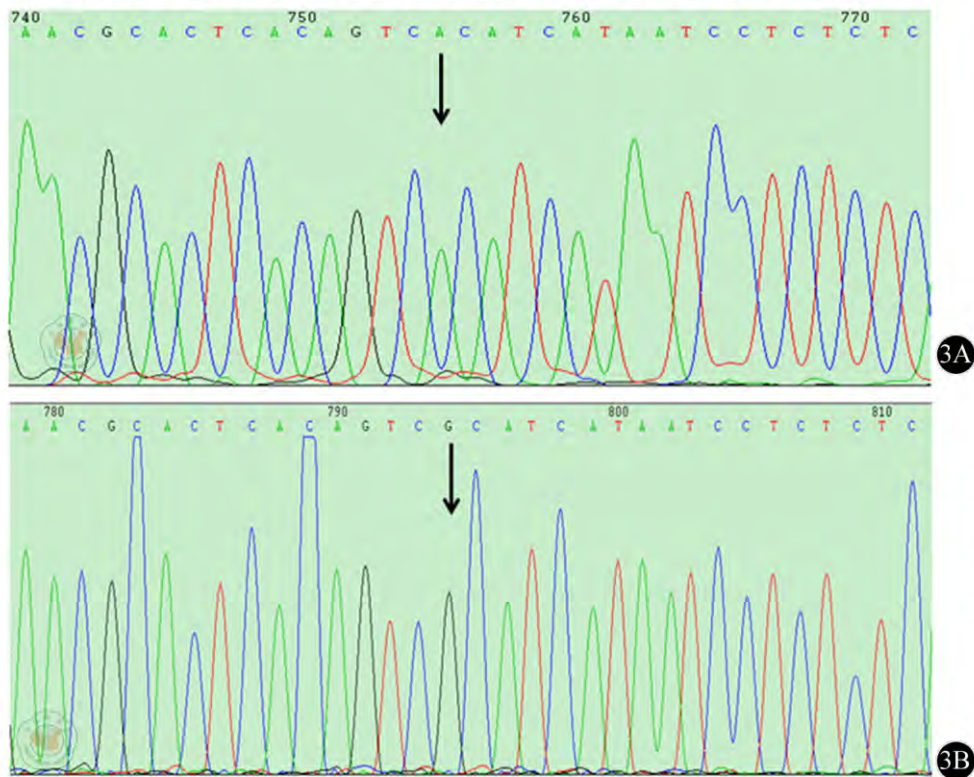


图3 线粒体DNA的ND4亚单位部分测序结果。3A图为先证者III4部分测序图，3B图为健康对照部分测序图。箭头表示突变位点

辅酶 Q10、琥珀酸盐、维生素 K1、K3 等可用于急性期视盘血液循环的恢复。同时建议 Leber 遗传性视神经病患者避免吸烟、过量饮酒以及与环境中的毒物接触。随着基因诊断及治疗技术的发展及应用，有望通过用试验性碱基替代疗法，使变异的氨基酸序列改为正常之后，从而有效治疗 Leber 遗传性视神经病^[13-15]。

参 考 文 献

[1] Gallenmüller C, Klopstock T. Leber's hereditary optic neuropathy-phenotype, genetics, therapeutic options[J]. *Klin Monbl Augenheilkd*, 2014, 231(3): 216-221.

[2] Liu Y, Zhuang SL, Tong Y, et al. Leber's hereditary optic neuropathy and limbs abnormality claudication may be associated with the mitochondrial ND1 T3866C mutation[J]. *Yi Chuan*, 2010, 32(2): 141-147.

[3] Wallace DC, Singh G, Lott MT, et al. Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy[J]. *Science*, 1988, 242(4884): 1427-1430.

[4] Huoponen K, Vilkki J, Aula P, et al. A new mtDNA mutation associated with Leber hereditary optic neuroretinopathy[J]. *Am J Hum Genet*, 1991, 48(6): 1147-1153.

[5] Johns DR, Neufeld MJ. Cytochrome c oxidase mutations in Leber hereditary optic neuropathy[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993, 196(2): 810-815.

[6] Zoccollella S, Petruzzella V, Prascina F, et al. Late-onset Leber hereditary optic neuropathy mimicking Susac's syndrome[J]. *J Neurol*, 2010, 257(12): 1999-2003.

[7] 王燕, 邻向明, 贾小云, 等. 中国人 Leber 遗传性视神经变的原发突变及临床特征[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2005, 22: 334-346.

[8] Romero P, Fernández V, Slabaugh M, et al. Pan-American mDNA

haplogroups in Chilean patients with Leber's hereditary optic neuropathy[J]. Mol Vis, 2014, 20: 334-340.

[9] Zhadanov SI, Atamanov VV, Zhadanov NI, et al. A novel mtDNA ND6 gene mutation associated with LHON in a Caucasian family[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 332(4): 1115-1121.

[10] Kodroń A, Krawczyński MR, Tońska K, et al. m. 3635G>A mutation as a cause of Leber hereditary optic neuropathy[J]. J Clin Pathol, 2014, 67(7): 639-641.

[11] Koilkonda RD, Guy J. Leber's Hereditary Optic Neuropathy-Gene Therapy: From Benchtop to Bedside[J]. J Ophthalmol, 2011, 2011: 179412.

[12] Hudson G, Yu-Wai-Man P, Griffiths PG, et al. Variation in OPA1 does not explain the incomplete penetrance of Leber hereditary optic neuropathy[J]. Mol Vis, 2010, 16: 2760-2764.

[13] Sadun AA, Carelli V, Salomao SR, et al. Extensive investigation of a large Brazilian pedigree of 11778/haplogroup J Leber hereditary optic neuropathy[J]. Am J Ophthalmol, 2003, 136(2): 231-238.

[14] Yu-Wai-Man P, Griffiths PG, Chinnery PF. Mitochondrial optic neuropathies-disease mechanisms and therapeutic strategies[J]. Prog Retin Eye Res, 2011, 30(2): 81-114.

[15] Cwerman-Thibault H, Augustin S, Ellouze S, et al. Gene therapy for mitochondrial diseases: Leber Hereditary Optic Neuropathy as the first candidate for a clinical trial[J]. C R Biol, 2014, 337(3): 193-206.

(收稿日期: 2014-07-22)
(本文编辑: 戚红丹)

霍玲, 刘丹. Leber 遗传性视神经病一家系的遗传学研究 [J/CD]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2014, 8 (17): 3128-3132.

