

线粒体肌病患者线粒体 DNA 的突变分析

张小爱 吴华成 张炳峰 于文 樊绮诗

【摘要】 目的 分析线粒体肌病患者线粒体 DNA 的突变情况, 为疾病诊断提供依据。方法 用常规 HE、酶组化染色和电镜检查等病理形态学方法对 3 例线粒体肌病疑似患者进行诊断, 并用聚合酶链反应-单链构象多态和 DNA 测序等方法对患者线粒体 DNA 中全部 22 个 tRNA 基因进行突变筛查。结果 3 例患者均被确诊为线粒体肌病, 其中例 1 tRNA^{-Val} 基因发生 A 1627G 纯合突变, 例 2 tRNA^{-Val} 基因发生 A 1627G/A 杂合突变, 例 3 tRNA^{-Trp} 基因发生 T 5554C 突变, tRNA^{-Arg} 基因发生 A 10412C/A 杂合突变。结论 线粒体 DNA 中的 tRNA 基因突变是线粒体肌病的重要病因之一。

【关键词】 线粒体肌病; 线粒体 DNA; 突变筛查; 测序

Mitochondrial DNA mutation analysis in patients with mitochondrial myopathy ZHANG Xiaoi¹, WU Hua-cheng², ZHANG Bing-feng¹, YU Wen³, FAN Qi-shi¹. (¹Department of Medical Laboratory Science, ²Department of Pathology, ³Department of Neurology, Ruijin Hospital, Shanghai Second Medical University, Shanghai, 200025 P. R. China. Email: rjyk@yahoo.com.cn)

Corresponding author: FAN Qi-shi

【Abstract】 Objective To examine mitochondrial DNA mutations in mitochondrial myopathy. **Methods** Three suspected cases of mitochondrial myopathy were examined by HE staining, histochemical staining methods and electron microscopy. The mutations in all 22 tRNA genes of mitochondrial genome were screened by polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism and DNA sequencing. **Results** The three cases were diagnosed as mitochondrial myopathy. The examinations revealed that patient 1 had a homoplasmic A 1627G mutation in tRNA^{-Val} gene, and patient 2 had a heteroplasmic A 1627G/A mutation in tRNA^{-Val} gene, and patient 3 had two mutations: one was homoplasmic T 5554C mutation in tRNA^{-Trp} gene, the other was heteroplasmic A 10412C/A mutation in tRNA^{-Arg} gene. **Conclusion** tRNA genes mutations of mtDNA might be one of the etiologies of mitochondrial myopathy.

【Key words】 mitochondrial myopathy; mitochondrial DNA; mutation screening; sequencing

线粒体肌病是发病率较高的肌病之一, 以骨骼肌极度不能耐受疲劳为主要特征, 病因为线粒体功能缺陷^[1]。线粒体肌病主要由线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 的突变造成, 包括点突变、缺失、重复等。自从 1988 年首次报道 mtDNA 突变以来, 目前已证实有 100 多个点突变和 200 多种缺失、插入和重排与线粒体疾病有关, 其中 60% 为影响 tRNA 的点突变, 35% 影响呼吸链多肽亚单位, 5% 影响线粒体 tRNA^[2]。线粒体肌病可通过病理形态学、生物化学和分子生物学等方法进行诊断。我们用常规 HE 和酶组化染色、电镜检查等病理形态学方法, 对 3 例线粒体肌病疑似患者骨骼肌活检标本进行诊断后, 对疾病的分子原因作了研究。我们对患者线粒体 DNA 中全部 22 个 tRNA 基因进行突变筛查, 旨在了解线粒体肌病患者发病的分子基础。

1 对象与方法

1.1 对象 例 1, 女, 31 岁; 例 2, 男, 43 岁; 例 3, 男, 19 岁。3 例患者均为散发病例, 家族中无明显类似发作者。患者均表现为进行性四肢乏力, 不能耐受疲劳, 四肢近端肌肉萎缩明显, 近端肌力 III-V 度, 远端肌力 IV-V 度, 双侧大致对称, 无肌痛和肌痉挛。例 3 患者双眼无法完全睁开, 上眼睑下垂明显。EMG 显示 3 例患者均为肌源性改变。3 例患者均做肌活检, 取材部位为三角肌。另取 40 名成年体检健康者外周血作为正常对照。

1.2 病理学观察 新鲜肌组织一部分经液氮-异戊烷速冻, 制成 10 μm 厚的冰冻切片, 分别行苏木素-伊红染色 (Hematoxyline-eosin, HE)、Gomori 多色染色 (Trichroism Gomori, TG)、尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸-四唑蓝还原酶染色 (Nicotinamide adenine dinucleotide hydrolase, NADH-TR) 及琥珀酸脱氢酶染色 (Succinate dehydrogenase, SDH) 染色。每例患者选 1 张 MGT 切片, 高倍镜下 (40×) 随机选 10 个视野

作者单位: 200025 上海第二医科大学附属瑞金医院检验科(张小爱、张炳峰、樊绮诗), 病理科(吴华成), 神经科(于文)

通信作者: 樊绮诗, Email: rjyk@yahoo.com.cn

分别计数破碎红纤维 (ragged red fiber, RRF), 计算公式为: (RRF 数/肌纤维总数) × 100%。

1.3 电镜观察 一部分肌组织经 2.5% 戊二醛固定, 1% 锇酸后固定, 常规制作超薄切片, 透射电镜观察。

1.4 tRNA 基因突变分析

1.4.1 用酚/氯仿法按常规步骤从骨骼肌活检冰冻组织和外周血中抽提 DNA。

1.4.2 应用 Primer Designer 软件设计 16 对引物扩增线粒体全部 22 个 tRNA 基因。PCR 引物序列、退火温度及产物大小等见表 1。

1.4.3 PCR 反应体积为 25 μl, 含 50 ng 样品 DNA, 0.4 μmol/L 引物, 0.2 mmol/L dNTP, 1 mmol/L Mg²⁺, 1 U Taq 酶。反应条件: 94 预变性 5 min, 94 40 s, 58~62 40 s, 72 60 s, 共扩增 35 个循环, 再以 72 延伸 5 min。PCR 产物进行单链构象多态 (single strand conformation polymorphism, SSCP) 分析, 取 PCR 产物 10 μl, 加等体积甲酰胺变性液, 100 变性 10 min, 冰浴 5 min。变性产物加入 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶, 100 V/cm 电泳 8 h 后, 用 0.1% AgNO₃ 显色观察结果, 患者电泳图谱与正常对照有差异者送测序。

表 1 PCR 引物序列、退火温度及产物大小

Table 1 Primer sequences, annealing temperatures and products of PCR

Genes (基因)	Primer sequences (引物序列)	Annealing temp (退火温度)	Product size (产物大小) (bp)
tRNA ^{-Phe}	F: 5'-ACACCGCTGCTAACCCCA TA-3' R: 5'-AGAAA GGCTA GGA CCAAA CC-3'	60	151
tRNA ^{-Val}	F: 5'-GGA GACAA GTCGTAA CA TGG-3' R: 5'-TCTGGTA GTAA GGTGGA GTG-3'	60	160
tRNA ^{-Leu}	F: 5'-TACTTCA CAAA GCCTTCC-3' R: 5'-TGGCCA TGGGTA GTTGTGA-3'	62	170
tRNA ^{-Ile, Gln}	F: 5'-TCCA TA CCA TTA CAA TCT-3' R: 5'-TACTTTA GGA TGGGTGTGA-3'	60	184
tRNA ^{-Met}	F: 5'-GAA TCCAAA TTCTCCGTGC-3' R: 5'-TGGTA GA GTA GA TGA CGGGT-3'	58	147
tRNA ^{-Tyr}	F: 5'-ACGCTACTCCTA CCTA TCTC-3' R: 5'-TTTGCCTTCA GTTGA TGA G-3'	58	159
tRNA ^{-Ala, Asn}	F: 5'-GCCCTCA GTAA GTTGCAA TA-3' R: 5'-GCGGGA GAA GTA GA TTGAA G-3'	62	191
tRNA ^{-Cys, Tyr}	F: 5'-GGA CT TAAA CCA CAAA CA C-3' R: 5'-GTGA GGTAAAA TGGCTGA GT-3'	55	228
tRNA ^{-Ser, Asp}	F: 5'-ACCTA CCA CA CA TTCGAA G-3' R: 5'-TTGCGCTGCA TGTGCCA TTA-3'	60	201
tRNA ^{-Lys}	F: 5'-GCCCATA TTTACCTA TA GC-3' R: 5'-CGGTA GTA TTTA GTTGGGGC-3'	60	137
tRNA ^{-Gly}	F: 5'-CTGGCA TTTTGA GA TGTGG-3' R: 5'-TAGTAA GGCTA GGA GGGTGT-3'	58	178
tRNA ^{-Arg}	F: 5'-CCTAA GTCTGGCCTA TGA GT-3' R: 5'-GTAAA TGA GGGGCA TTTGGT-3'	62	130
tRNA ^{-His}	F: 5'-TCTCCTCCTA TCCCTCAA CC-3' R: 5'-GGGCA TGA GTTA GCA GTTC-3'	60	150
tRNA ^{-Ser, Leu}	F: 5'-GTGAA TCTGACAA CA GGC-3' R: 5'-GGGTGGTTA TA GTA GTGTGC-3'	58	197
tRNA ^{-Glu}	F: 5'-GAA GAAAA CCCCCA AACC-3' R: 5'-GGTCA TTGGTGTTCCTTGA G-3'	60	141
tRNA ^{-Thr, Pro}	F: 5'-CCTAA TTA CCAACTA TCTCCC-3' R: 5'-CTGCTTCCCA TGAAA GAAC-3'	60	205

2 结果

2.1 HE 染色 患者肌活检标本见肌纤维排列尚紧

密, 肌纤维大小不一, 部分肌纤维肌浆有裂隙及不典型小空泡增多, 肌纤维间隙略有增宽。TG 特染 (图 1) 见肌膜下有深染的红色沉积物聚集并伸入肌浆内, 肌纤维破碎状, 呈典型的破碎红纤维, RRF 与肌纤维总数之比均超过 4% (例 1 为 11%, 例 2 为 13%, 例 3 为 40%)。NADH-TR 和 SDH 染色见 RRF 主要累及 I 型肌纤维。

2.2 电子显微镜检查 肌纤维局灶性溶解, 肌原纤维间异常肿胀的线粒体增多 (图 2)。

2.3 PCR-SSCP 分析结果初步显示, 例 1 和例 2 tRNA^{-Val} 基因, 例 3 tRNA^{-Arg}, tRNA^{-Tyr} 基因的电泳图谱与正常对照有差异 (图 3)。测序结果显示 (图 4), 例 1、例 2 tRNA^{-Val} 基因均发生 A 1627G 突变 (正常人 tRNA^{-Val} 基因序列: CAAA GCA CCAACT), 其中例 1 为纯合突变, 例 2 为杂合突变; 例 3 发生两处突变: 一处为 tRNA^{-Tyr} 基因发生 T 5554C 纯合突变 (正常人 tRNA^{-Tyr} 基因序列: CAAA GCCCTCA GTAA), 另一处为 tRNA^{-Arg} 基因发生 A 10412C/A 杂合突变 (正常人 tRNA^{-Arg} 基因序列: GTATA TA-GTTTAAA)。

3 讨论

目前一般认为^[3,4] RRF 超过 4% 可以诊断为线粒体肌病或脑肌病。在本研究中, 3 例散发患者 RRF 比例均远超过 4%, 临床表现主要累及骨骼肌系统, 并没有脑部相应的临床特征, 故初步诊断为线粒体肌病。

本研究中 3 例患者骨骼肌电子显微镜观察结果显示: 肌纤维肌膜下和肌原纤维间常见大量异常线粒体堆积, 形态大小不一, 线粒体内出现嗜锇小体及类结晶样包涵体, 这些变化提示患者的线粒体受到损伤。作为直接观察线粒体数量和形态的方法, 电镜检查为线粒体肌病的诊断提供了有力依据。

RRF 的产生是细胞能量供应下降, 线粒体受刺激增生并大量堆积所致; 是线粒体基因点突变及大量重排的相应产物, 是影响线粒体内蛋白质合成的 mtDNA 受损的形态学表现^[5]。由于大多数线粒体 DNA 的突变都发生于线粒体 tRNA 基因中^[2], 因此, 我们对上述患者 mtDNA 中全部 22 个 tRNA 基因进行了突变筛查, 以进一步理解病理性改变的分子基础。

确定一个 mtDNA 突变是否为致病突变, 有以下几个标准^[5]: (1) 在种系发生中属高度保守位点或此位点在 mtDNA 结构上具有明显的重要性; (2) 以异质状态存在 (细胞中同时存在野生型和突变型的 mtDNA), 这是导致线粒体病的 mtDNA 突变的一个普遍特点; (3) 突变在大量的正常人群中未能发现;

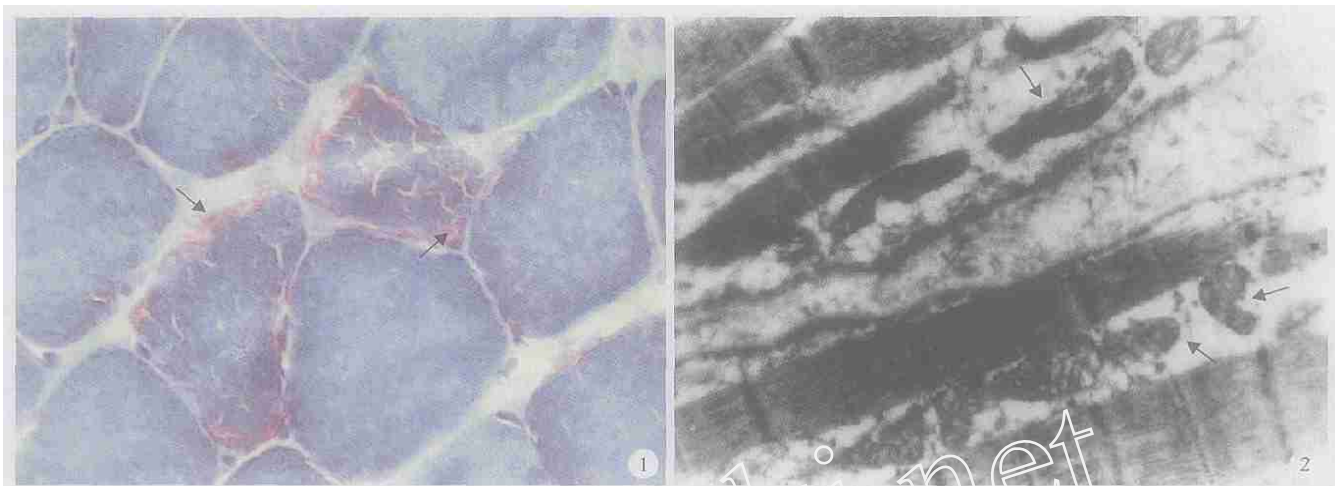


图 1 肌纤维 TG 特殊染色 ×200 肌纤维大小不一,部分肌纤维包裂隙状,红色沉积物聚集,呈典型破碎红纤维。箭头所示为破碎红纤维 图 2 肌纤维超微结构 EM ×6000 肌纤维局灶性溶解,肌原纤维线粒体增多、肿胀,箭头所示为线粒体

Fig 1 TG special staining ×200 Myofibers were different in size, some of which were typical ragged red fibres (arrow) with fissurae in cytoplasm and red-stained deposit beneath sarcolemmas Fig 2 U ltramicrostructure of myofibers ×6000 Myofibers were focally dissolved and between which mitochondrials (arrowed) increased and swelled

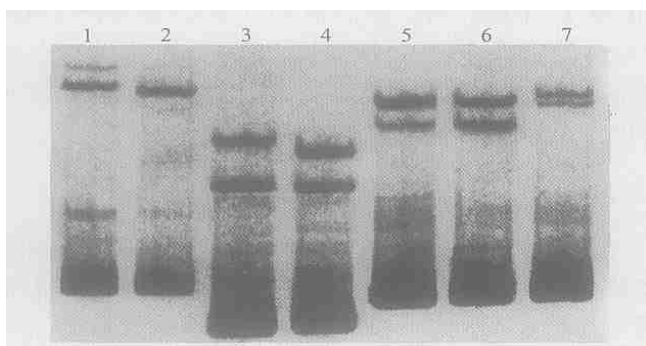


图 3 线粒体 tRNA 基因 SSCP 结果 1: 例 3 tRNA-T_{rp} 基因; 2: 正常人 tRNA-T_{rp} 基因; 3: 例 3 tRNA-A_{rg} 基因; 4: 正常人 tRNA-A_{rg} 基因; 5: 例 2 tRNA-V_{al} 基因; 6: 例 1 tRNA-V_{al} 基因; 7: 正常人 tRNA-V_{al} 基因

Fig 3 The SSCP result of m itochondrial tRNA genes Lane 1: patient 3 tRNA-T_{rp} gene; lane 2: normal tRNA-T_{rp} gene; lane 3: patient 3 tRNA-A_{rg} gene; lane 4: normal tRNA-A_{rg} gene; lane 5: patient 2 tRNA-V_{al} gene; lane 6: patient 1 tRNA-V_{al} gene; lane 7: normal tRNA-V_{al} gene

(4)在有类似表现型却又不属于同一家系的患者中发现相同的突变;(5)突变发生的严重程度与临床及生化表型的严重程度呈正相关;(6)使用无 m tDNA 细胞系的细胞融合实验证实,该突变足以引起呼吸链缺损;(7)呈母系遗传。例 1、例 2 患者来自不同的家系,临床表现基本相似。二者具有相同的突变,但在 40 名健康对照组中未能发现此突变,并且在细胞中同时存在野生型和突变型的 m tDNA,这些现象符合以上标准中的多条,故我们认为 tRNA-V_{al} 基因 A 1627G/A 突变可能为例 1 和例 2 的致病突变。例 1 中尚未检测到野生型 m tDNA,可能是因为骨骼肌细胞中突变型 m tDNA 含量太高,m tDNA 突变的表达主要由某种组织中野生型和突变型 m tDNA 的相对比例及该种组织对线粒体 ATP 供应的依赖程度所决定,中枢神经系统、骨骼肌等对能量的需求较高,因而 m tDNA 的突变

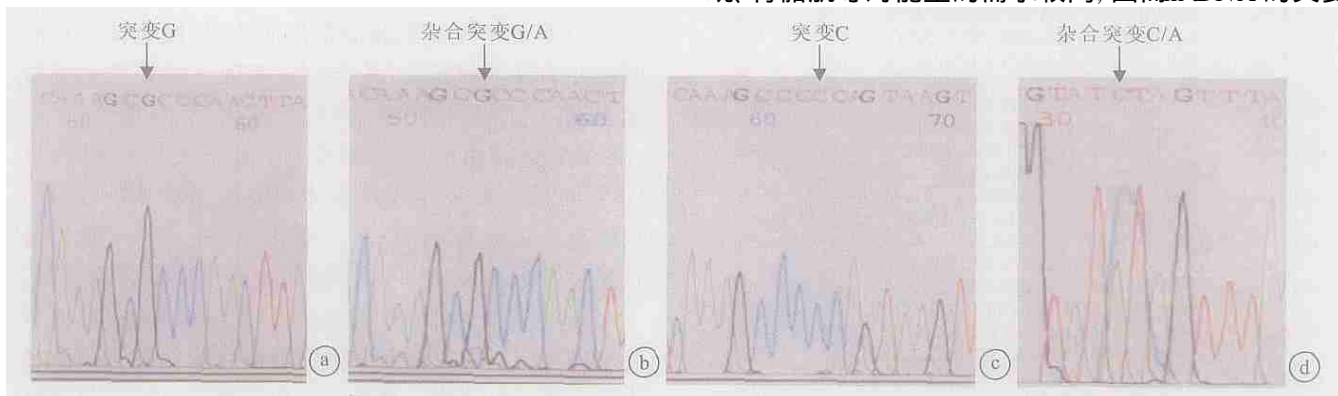


图 4 tRNA-V_{al} 基因, tRNA-T_{rp} 基因, tRNA-A_{rg} 基因测序图 a: 例 1 tRNA-V_{al} 基因; b: 例 2 tRNA-V_{al} 基因; c: 例 3 tRNA-T_{rp} 基因; d: 例 3 tRNA-A_{rg} 基因

Fig 4 The sequencing results of tRNA-V_{al} gene, tRNA-T_{rp} gene and tRNA-A_{rg} gene a: part sequence of tRNA-V_{al} gene in patient 1; b: part sequence of tRNA-V_{al} gene in patient 2; c: part sequence of tRNA-T_{rp} gene in patient 3; d: part sequence of tRNA-A_{rg} gene in patient 3

表型也往往容易表现出来^[6]。

例 3 患者 m tDNA 的突变分析发现存在两处突变,这是在单纯性线粒体肌病患者中发现两处突变的首次报告,同时在 40 名健康对照中未发现相同的突变。我们用 tRNA scan-SE 软件 (<http://www.genetics.wustl.edu/eddy/tRNA-scan-SE/>) 对例 3 发生突变的 tRNA 进行二级结构分析提示, tRNA^{-A_{rg}} 基因发生 A 10412C 突变后,破坏了氨基酸臂的 AU 配对; tRNA^{-T_{rp}} 基因发生 T 5554C 突变后,破坏了反密码臂的 AU 配对。患者骨骼肌中破碎红纤维比例高达 40%,同时该患者的临床症状也较另外 2 例患者更严重,因此我们推测,这些可能是由于两处突变共同造成的。

上述突变会对相应 tRNA 的功能造成什么样的影响及由此引发的病理生理变化,还需要进一步的研究。它们在线粒体肌病发病中所起的作用仍有待于进一步扩大患者和正常对照的样本量来验证,其致病的分子机制值得深入研究。

参 考 文 献

- 1 Attardi G, Yoneda M, Chomyn A. Complementation and segregation behavior of disease-causing mitochondrial DNA mutations in cellular model systems *Biochim Biophys Acta*, 1995, 1271: 241-248
- 2 Naviaux RK. Mitochondrial DNA disorders *Eur J Pediatr*, 2000, 159 (Suppl 3): S219-S226
- 3 Li XD, Gao F, Chen QT. Mitochondrial genetic disease *Beijing Med*, 2001, 23: 39-40 [李晓东, 高枫, 陈清棠. 线粒体遗传病 *北京医学*, 2001, 23: 39-40]
- 4 Petty RK, Harding AE, Morgan-Hughes JA. The clinical features of mitochondrial myopathy. *Brain*, 1986, 109 (Pt5): 915-938
- 5 Chen QT, Li XD. Primary mitochondrial myopathy and encephalomyopathy. *J Chin Neurol*, 2003, 16: 249-250 [陈清棠, 李晓东. 原发性线粒体肌病和脑肌病 *临床神经病学杂志*, 2003, 16: 249-250]
- 6 Mongini T, Doriguzzi C, Chiado-Piat L, et al. MERRF/MELAS overlap syndrome in a family with A 3243G m tDNA mutation. *Clin Neuropathol* 2002, 21: 72-76

(收稿日期: 2004-06-28)

(本文编辑 刘华)

· 病例报告 ·

Dejerine-Sottas 病一例

冯善伟 张成 姚晓黎 陈维 吴义方

患者 女, 13 岁, 因进行性四肢无力、肌萎缩 11 年于 2003 年入院。患者出生时正常, 2 岁始学走路, 以脚尖行走, 并逐渐出现双足内翻, 3 岁时在当地医院行左足肌腱松解术后未能再行走。4 岁渐出现双手无力, 手指不能伸直, 并向近端发展, 直至出现双手屈曲畸形, 肌电图示神经原性损害。患者自发病来无肌跳, 无肢体疼痛麻木, 无视物重影、头痛头晕等症状。患者足月顺产, 父母均健康, 非近亲结婚, 有一弟, 正常, 家族中否认有类似患者。

查体: 神志清, 言语对答流利, 颅神经无异常, 双手屈曲畸形, 双肘关节以下皮肤硬韧, 肌肉萎缩, 近端肌力 IV 级, 远端 II 级, 肌张力低, 双侧肱二头肌反射、肱三头肌反射 (+), 双侧膝关节以下皮肤硬韧, 肌萎缩明显, 小腿变细, 以后组肌群为主, 弓形足, 肢体近端肌力 IV 级, 远端 0 级, 肌张力低, 膝反射 (+), 踝反射未引出, 病理征 (-)。左侧肘关节可触及粗大的尺神经, 四肢末端呈手套袜筒样深浅感觉减退, 脊柱无畸形, 外生殖器

无异常。

实验室检查: 血常规、尿常规、心酶 5 项、肝功、血乳酸检查均在正常范围, 腰穿压力、脑脊液蛋白正常, 心电图示窦性心动过速, 肌电图示神经原性损害。肌活检: 光镜下见腓肠神经束萎缩和胶原化, 髓鞘染色神经束大部分区域髓鞘脱失, 仅见少量残留髓鞘和轴索的存在。电镜示部分髓鞘塌陷卷曲, 轴索内线粒体肿胀峭断裂, 部分髓鞘粘连、板层融合或崩解、稀疏, 可见洋葱球样结构, 部分洋葱球样结构的中心轴索变薄或消失。

讨论 Dejerine-Sottas 病 (Dejerine-Sottas disease, DSD) 属遗传性运动感觉性神经病 (hereditary motor and sensory neuropathy, HM SN), 好发于儿童或青少年的一种脱髓鞘性周围神经病变, 多为常染色体隐性遗传, 主要累及许旺细胞和髓鞘使周围神经功能减弱或缺失, 其临床特征主要有: (1) 多为常染色体隐性遗传; (2) 婴儿期起病; (3) 运动发育迟缓, 部分患者出现步态不稳, 共济失调, 弓形足等; (4) 脑脊液蛋白含量常可升高; (5) 神经传导速度明显变慢或测不出; (6) 腓肠肌神经活检显示严重的节段性脱髓鞘, 葱皮样结构和/或髓鞘变细。本患者符合上述 DSD 的诊断标准。

基金项目: 国家自然科学基金 (30170337, 39870804); 卫生部临床学科重点项目 (2001321)

作者单位: 510080 广州, 中山大学医学院附属第一医院神经内科 (冯善伟、张成、姚晓黎、陈维), 医学院电镜室 (吴义方)

通信作者: 张成, Email: czym@gzsums.edu.cn

(收稿日期: 2004-09-08)

(本文编辑 刘华)