

线粒体脑肌病伴高乳酸血症和卒中样发作 综合症的线粒体 DNA 突变特点

王朝霞 刘淑萍 杨艳玲 沈定国 吴丽娟 戚豫 陈清棠

【摘要】 目的 探讨线粒体脑肌病伴高乳酸血症和卒中样发作(MELAS 综合征)的分子遗传学特点。方法 用聚合酶链反应-限制片段长度多态性(PCR-RFLP)方法检测来自 7 个家庭的 9 例 MELAS 患者及其部分母系亲属的肌肉和(或)外周血细胞的 mtDNA 的 A3243G 和 T3271C 点突变,并进行突变型 mtDNA 的定量。结果 在 9 例患者和 1 例亲属的肌肉和(或)外周血细胞中检测到 A3243G 点突变,未检测到 T3271C 突变。在这 10 例 A3243G 阳性标本中,外周血细胞(9 例)的突变型 mtDNA 的比例为 26.8%~50.3%;肌肉组织(4 例)的突变型 mtDNA 的比例为 46.8%~61.0%;对 3 例患者同时进行了肌肉和血细胞标本的检测,突变型 mtDNA 的比例肌肉组织均高于血细胞。对 6 个家庭的部分母系亲属的血细胞研究表明:只有 1 例先证者的同胞有此突变;另外 3 例先证者的母亲及 2 例先证者的同胞均未检测到此突变。另外有 2 例先证者的儿子临床表现符合 MELAS,血中也检测到此突变。结论 mtDNA A3243G 突变在本组 MELAS 综合征中的发生率较高,并且可在不同组织中检测到此突变,与国外文献报道一致;但国外报道多为母系遗传,而我们的病例以散发的居多,推测是由于新生突变所致。

【关键词】 线粒体脑肌病; 酸中毒,乳酸性; MELAS 综合征; DNA,线粒体

Analysis of mitochondrial DNA A3243 G point mutation in 9 cases with mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes WANG Zhaoxia*, LIU Shuping, YANG Yanling, et al.

* Department of Neurology, First Hospital of Beijing University, Beijing 100034, China

【Abstract】 **Objective** To study the characteristics of molecular genetics concerning Chinese mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes (MELAS). **Methods** A3243G and T3271C point mutations in the mtDNA of muscle and (or) blood cells were investigated in 9 patients with MELAS and some of their maternal relatives from 7 families by using PCR-RFLP. Furthermore, mutant mtDNA in the sample harboring mutation was quantitatively analysed. **Results** The mtDNA A3243G point mutation was unanimously identified in tissues of all patients and 1 of their relatives. However, the T3271C point mutation was identified in none of series in our study. The proportion of mtDNA A3243G was 46.8%~61.0% in muscle (4 cases) as well as 26.8%~50.3% in blood (9 cases). In the 3 patients with muscles and blood cells available, their mutant mtDNA proportion in muscle is consistently higher than in blood cells. The study of leukocytes of some maternal relatives from 6 families showed that, while only 1 proband had a sister harboring A3243G mutation and none of the mothers of another 3 probands or siblings of the other 2 probands had the point mutation. However, the sons of 2 probands had not only phenotype of MELAS, but also mtDNA A3243G point mutation in their blood. **Conclusion** mtDNA A3243G mutation highly exists in the series with MELAS syndrome in our study and can be detected in various tissues, which is consistent with reports abroad. However, most of our cases are sporadic rather than maternal inherited. It is presumed caused by a de novo mutation. Whether it is due to ethnic difference or sporadic event needs to be investigated further.

【Key words】 Mitochondrial encephalomyopathies; Acidosis, lactic; MELAS syndrome; DNA, mitochondrial

线粒体脑肌病伴高乳酸血症和卒中样发作(MELAS 综合征)是线粒体脑肌病中较常见的一种

类型^[1],其临床主征是高乳酸血症、脑卒中样发作和癫痫^[2]。近几年研究发现,MELAS 综合征由线粒体 DNA(mtDNA)上的点突变所致,已报道的有 mtDNA 的第 3243、3271、3260、3252、1642 等位点上的点突变至少 10 种^[3],大部分位于 mtDNA 的转移 RNA (tRNA) 基因,其中以 3243 tRNA^{Leu(UUR)} A G

作者单位:100034 北京大学第一医院神经内科(王朝霞、刘淑萍、吴丽娟、陈清棠),儿科(杨艳玲),中心实验室(戚豫);解放军总医院神经内科(沈定国)

(A3243G) 最常见, 约在 80% 的 MELAS 患者中发现^[4], T3271C 点突变次之, 约占 MELAS 患者的 10%。目前国内报道的多为临床及病理表现^[5], 有关分子生物学方面的研究较少。我们就来自 7 个家庭的 9 例 MELAS 患者及其部分母系亲属进行了 mtDNA A3243G 和 T3271C 点突变的分析。

资料和方法

一、资料

收集 1993 年以来北京大学第一医院、解放军总医院及山东大学齐鲁医院的 9 例患者, 其中女性 6 例, 男性 3 例, 发病年龄 9~36 岁, 病程 0.5~7 年, 临床诊断均符合 MELAS 综合征。详细临床资料见表 1。病例 8、9 分别为病例 5、6 之子。除病例 3 未能得到其母系亲属的血标本外, 其余 6 个家庭均获得其部分母系亲属的血标本, 共 8 例, 包括病例 1、2、4 之母, 病例 5、6 的姐姐及病例 7 的 2 兄 1 姐, 其临床表型均正常。

正常对照组 20 名, 男女各 10 名, 均为本院工作人员, 取静脉血 5 ml。

二、方法

1. DNA 的提取: 用常规酚/氯仿法提取肌肉组织的 DNA; 蛋白酶 K 盐析法提取外周血 DNA。

2. PCR 的条件及检测方法: 扩增 A3243G 的引物: 正向 5' CCTCCCTGTACGAAAGGACA 3' (3116~3135), 反向 5' GCCTAGGTTGAGGTTGACCA 3' (3609~3590); 扩增 T3271C 的引物: 正向引物同上, 反向引物 5' AATTCACAGICTCCAA GTTAA GGA GAAGAAT 3' (3301~3272), 下划线处为错配碱基。PCR 反应: 20 μ l PCR 反应体系中含引物各 0.5 μ mol/L, dNTP 各 100 μ mol/L, Tris-HCl 10 mmol/L, KCl 50 mmol/L,

Mg²⁺ 1.5 mmol/L, 0.1% TritonX-100, Taq 酶 1 U, DNA 模板 50~100 ng。PCR 反应条件: 94 预变性 3 min, 94 变性 1 min, 56 退火 1 min, 72 延伸 1 min, 共 30 个循环, 最后一个循环于 72 延伸 10 min。反应结束后取 PCR 产物 10 μ l, 加入限制性内切酶(检测 A3243G 用 ApaI 内切酶, T3271C 用 Afl 内切酶) 10 U, 10 \times 酶切缓冲液 2 μ l, 乙酰化牛血清白蛋白 (1 mg/ml) 2 μ l, 加水至 20 μ l, 37 消化过夜, 然后以 2% 琼脂糖凝胶(内含 0.5 μ g/ml 的溴化乙啶)电泳, 电泳结束后紫外灯下观看并进行条带密度扫描分析, 用定量分析软件(molecular analyst) 计算突变型 mtDNA 的比例(突变比例 = 突变新增片断密度之和/突变所降解片断残留密度 + 突变新增片断密度)。

结 果

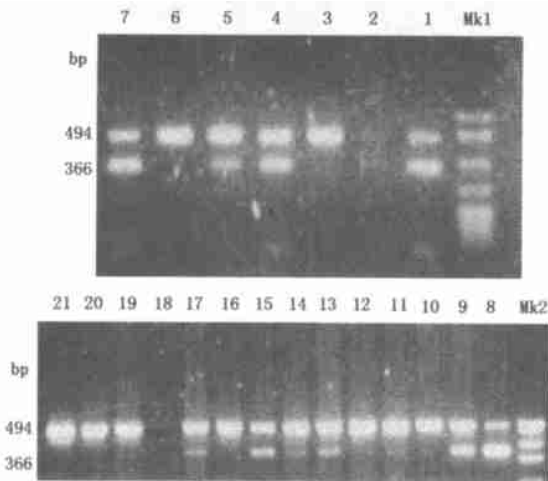
如图 1 所示, 以扩增 A3243G 的引物 PCR 反应结束后, 再用 Apa 酶切, 野生型 mtDNA 只有 494 bp 处一个条带; 而突变型 mtDNA 因为 A3243G 点突变产生了一个新的 Apa 酶切位点, 所以被切成 366 bp 和 128 bp 两个片段。我们在所有患者的肌肉和(或)血细胞中均检测到 A3243G 的点突变。但在 6 个家庭的 8 例母系亲属的血细胞中, 只有 1 例(例 5 之姐)检测到此突变, 其余 5 个家庭的 7 例亲属均未检测到 A3243G 的突变。在对照组中, 均未检测到 A3243G 点突变(结果未显示)。在所有的患者及正常对照中, 均未检测到 T3271C 突变(未显示)。

在检测到 A3243G 突变的 10 例阳性标本中, 突变均为异胞质性(heteroplasmy), 即突变型和野生型共存。其中血细胞中突变型 mtDNA 的比例为 26.8%~50.3% (9 例); 肌肉组织中突变型 mtDNA 的比例为 46.8%~61.0% (4 例); 有 3 例患者(例 1、

表 1 9 例 MELAS 患者临床资料

例序	性别	发病年龄(岁)	病程(年)	家族史	癫痫发作	脑卒中样发作	智能发育倒退	血乳酸增高	脑电图异常	CT 或 MRI 示多发脑梗死	肌肉病理可见 RRF
1	女	12	0.5	-	+	+	+	+	+	+	+
2	女	19	6.0	-	+	+	+		+	+	+
3	女	9	1.5	-	+	+	+	+		+	+
4	女	9	0.5	-	+	+	+	+	+	+	-
5	女	36	7.0	+	+	-	+	+	+	+	+
6	女	35	6.0	+	-	+	+			+	+
7	男	29	2.0	-	-	+	+			+	+
8	男	19	1.0	+	+	-	-	+	+	+	+
9	男	21	1.0	+	-	-	-				+

注: 空格为未行此项检查



Mkl1, Mkl2 分别为 DNA 相对分子质量标志 PBR322/MspI 和 PUC19/MspI, 1~3 为例 1 的肌肉、血和其母亲的血; 4~6 为例 2 的肌肉、血和其母亲的血; 7 为例 3 的肌肉; 8~10 为例 4 的肌肉、血和其母亲的血; 11~13 为例 5 和其姐、子的血; 14~16 为例 6 和其子、妹的血; 17, 19~21 为例 7 和其 2 兄 1 妹的血; 18 为空白对照

图 1 Apa 酶解 PCR 产物电泳图

2、4) 同时进行了肌肉和血细胞标本的检测, 突变型 mtDNA 的比例肌肉组织均高于血细胞(表 2)。

表 2 患者及其部分亲属的不同组织的 mtDNA A3243G 突变型的比例(%)

例序	肌肉组织	血细胞	患者之母的血细胞	患者之子的血细胞	患者之妹的血细胞	患者之兄的血细胞
1	55.0	50.3	0			
2	46.8	38.3	0			
3	54.3					
4	61.0	42.0	0			
5		26.8		33.0*	28.0	
6		28.9		38.4**	0	
7		31.1			0	0

* 为表 1 中的病例 8; ** 为病例 9; 空格为未行此项检查

讨 论

自从 1984 年 Pavlakis 等^[6]首先报道了 MELAS 综合征以后, 它作为一种独立的线粒体疾病才被人们所认识。该病的典型临床表现为身材矮小, 癫痫发作, 伴随限局性神经功能缺失的反复卒中样发作, 反复发作性头痛, 随疾病进展而出现智能发育倒退, 肌活检可见不整红边纤维(RRF), 但也有不伴 RRF 的报道。mtDNA A3243G 的突变影响线粒体 tRNA 的形成并造成 rRNA 转录的终止, 导致线粒体呼吸链

酶复合体和活性的缺陷, ATP 合成受阻, 从而造成器官能量供应障碍, 产生临床症状^[7]。在我们报道的这 9 例 MELAS 患者中, 都检测到 A3243G 的突变, 但未发现 T3271C 点突变。郭玉璞等^[5]也报道在 1 例 MELAS 患者的组织中, 发现 A3243G 的突变。这些结果证明 A3243G 突变是国人 MELAS 综合征发生率较高的致病突变。

目前, 将 mtDNA 突变相关的线粒体脑肌病分为两大类: 缺失相关的综合征如 Kearns-Sayre 综合征和慢性进行性眼外肌麻痹(CPEO); 点突变相关的综合征如 MELAS 综合征、肌阵挛性癫痫伴 RRF 综合征(MERRF) 和母系遗传的 Leigh 综合征(MLS) 等。前一类多为散发性发病, 而后者多表现为母系遗传的特点^[8]。国外报道的 A3243G 突变所致的 MELAS 综合征大部分为母系遗传^[9-11], 散发性的很少^[12, 13]。虽然患者的母亲临床表现正常或仅有轻微症状, 但在其组织内也可检测到比例很低的突变型 mtDNA^[14]。但在我们的这些患者中, 只有病例 5 的家庭证实为母系遗传。因为病例 5 为先证者, 其子临床表现也符合 MELAS 综合征, 其姐到目前为止尚未表现出临床症状, 但在这 3 例的血中均检测到 A3243G 突变。但另外 5 个家庭的实验结果均未提示母系遗传: 病例 1、2、4 的母亲血中, 均未发现此突变, 提示患者的突变可能为新生(de novo)突变; 病例 6、7 的同胞中也未发现 A3243G 突变, 所以这 2 例患者的突变也极有可能为新生突变, 但我们未能得到病例 6、7 的母亲和其他母系亲属的标本用以进一步明确遗传规律。所以, 我们的结果似乎表明 MELAS 综合征 A3243G 突变的发生以散发居多(5/6), 推测可能是在卵母细胞期或受精卵期发生自发性的 mtDNA 突变, 而非来自母亲遗传。但母亲一旦发生了突变, 就很容易传递到下一代^[15]。国外仅有极少数报道 A3243G 为新生突变, 在目前报道的检测到 A3243G 突变的 20 多个家系中, 只有几个家系报道为新生突变。所以 mtDNA A3243G 突变散发性较多的特点值得我们进一步研究。

不同组织中突变型 mtDNA A3243G 的比例, 文献报道差别较大。肌肉中为 20%~95%, 血细胞为 10%~75%^[10, 16]。我们的结果表明, MELAS 患者的各种组织中突变型 mtDNA 的比例均较高, 尤其在肌肉组织中突变型的比例为 46.8%~61.0%, 明显高于血细胞(因病例数目少, 未行统计学处理), 并且在血细胞中, 突变型 mtDNA 的比例随年龄增长有下降

的趋势。Poulton 等^[17]也发现 MELAS 患者的血细胞 mtDNA 基因突变的阳性率低于肌肉组织。究其原因,一是因为血细胞随细胞分裂会逐渐排斥突变型 mtDNA;二是可能因为线粒体基因突变优先发生于野生型 mtDNA 较多的肌肉组织。

有关突变型 mtDNA 比例与临床症状的相关性,文献报道结论不一^[17,18]。在我们报道的这些病例中,突变比例与临床表现间似乎无明显相关性。如在病例 1~4 中,肌肉中突变比例最高的病例 4 (61.0%)和比例最低的病例 2 (46.8%)的临床症状严重程度间无明显差别。另外,病例 5 的姐姐虽然无临床症状,突变比例却稍高于患者。所以,无论是肌肉组织还是血细胞中,突变型 mtDNA A3243G 的比例与临床表型的严重程度之间可能无一定的相关性。

志谢:感谢中心实验室卜定方,神经内科袁云、张秋荣、左越焕老师对本实验提供的帮助

参 考 文 献

- Shoffner JM. Mitochondrial myopathy diagnosis. *Neurologic Clinics*, 2000, 18: 105-123.
- Simon DK, Johns DR. Mitochondrial disorders: clinical and genetic features. *Annu Rev Med*, 1999, 50: 111-127.
- Mitochondrial encephalomyopathies: gene mutation. *Neuromusc Disord*, 2000, 10: X-XIV.
- Goto Y, Nonaka I, Horai S A. Mutation in the tRNA^{(Leu(UUR))} gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature*, 1990, 348: 651-653.
- 郭玉璞, 郭重, 陈琳, 等. MELAS 型线粒体脑肌病的临床病理和基因研究. *中华神经科杂志*, 1996, 29: 266-270.
- Pavakis SG, Phillips PC, Dimauro S, et al. Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes (MELAS): a distinctive clinical syndrome. *Ann Neurol*, 1984, 16: 481-488.
- Hess JF, Parisi MA, Bennett JL, et al. Impairment of mitochondrial transcription termination by a point mutation associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature*, 1991, 351: 236-239.
- DiMauro S, Moraes CT. Mitochondrial encephalomyopathies. *Arch Neurol*, 1993, 50: 1197-1208.
- Koga Y, Akita Y, Takane N, et al. Heterogeneous presentation in A3243G mutation in the mitochondrial tRNA^{(Leu(UUR))} gene. *Arch Dis Child*, 2000, 82: 407-411.
- Ciafaloni E, Ricci E, Shanske S, et al. MELAS: clinical features, biochemistry, and molecular genetics. *Ann Neurol*, 1992, 31: 391-398.
- Onishi H, Inoue K, Osaka H, et al. Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes (MELAS) and diabetes mellitus: molecular genetic analysis and family study. *J Neurol*

Sci, 1993, 114: 205-208.

- Yamamoto M. Did de novo MELAS common mitochondrial DNA point mutation (mtDNA3243A G transition) occur in the mother of a proband of a Japanese MELAS family? *J Neurol Sci*, 1996, 135: 81-84.
- Campos Y, Martin MA, Lorenzo G, et al. Sporadic MERRF/MELAS overlap syndrome associated with the 3243 tRNA^{(Leu(UUR))} mutation of mitochondrial DNA. *Muscle Nerve*, 1996, 19: 187-190.
- Martinuzzi A, Bartolomei L, Carozzo R, et al. Correlation between clinical and molecular features in two MELAS families. *J Neurol Sci*, 1992, 113: 222-229.
- Chinney PF, Howell N, Lightowers RN, et al. MELAS and MERRF: the relationship between maternal mutation load and the frequency of clinically affected offspring. *Brain*, 1998, 121: 1889-1894.
- Ciafaloni E, Ricci E, Servidei S, et al. Widespread tissue distribution of a tRNA^{(Leu(UUR))} mutation in the mitochondrial DNA of a patient with MELAS syndrome. *Neurology*, 1991, 41: 1663-1665.
- Poulton J, Mörten K. Noninvasive diagnosis of the MELAS syndrome from blood DNA. *Ann Neurol*, 1993, 34: 116.
- Suomalainen A, Majander A, Pihko H, et al. Quantification of tRNA^(Leu3243) point mutation of mitochondrial DNA in MELAS patients and its effects on mitochondrial transcription. *Hum Mbl Genet*, 1993, 2: 525-534.

(收稿日期: 2000-11-16)

(本文编辑: 包雅琳)

防治卒中的新突破 —— PROGRESS 研究结果公布

2001 年 7 月 16 日, PROGRESS (Perindopril Protection Against Recurrent Stroke Study) 研究项目新闻发布会暨学术会议在北京隆重召开, 共有来自全国各地的 400 多位专家参加了此次盛会, PROGRESS 研究项目主席 J. Chalmers 教授和国内著名医学专家刘力生、王文、李舜伟、张善同等应邀参加了本次会议。J. Chalmers 教授和刘力生教授就 PROGRESS 研究结果及其意义作了重要的学术报告。PROGRESS 研究是由澳大利亚、比利时、中国、法国、爱尔兰、意大利、日本、新西兰、瑞典和英国的 172 家医院共同参与的大规模的多中心研究, 研究采用双盲、随机、安慰剂对照的方法, 该研究包括了 6 105 例随机分组的患者, 入选标准为既往有脑血管病史, 表现为脑梗死、脑出血、不明原因的卒中或短暂性脑缺血发作(包括一过性黑矇)。该研究包括正常血压和高血压患者, 所有患者采用培哚普利每日 4 mg 或相应安慰剂, 对无明确禁忌证的患者再加用吲达帕胺或相应安慰剂。研究的主要终点为卒中, 次要终点为致命性或致残性卒中、主要心血管事件、总的心血管病死亡率、总病死率以及痴呆和严重的认知功能下降。本研究由澳大利亚、新西兰的医学研究基金组织及法国施维雅公司资助。