

# Leber 氏病的 mtDNA 突变\*

张志平 张丽珊 黄 鹰 王世浚  
李方园 童 绎<sup>1)</sup> 高静娟<sup>1)</sup> 朱 斌  
(南京铁道医学院生物学教研室, 210009)

Leber 氏病是一种典型的母系遗传病,表现为急性、亚急性视神经萎缩,Wallace 于 1988 年首次证实了此病患者中存在 mtDNA 的特异性改变——Wallace 突变。我们研究了 8 个独立来源的中国汉族人 Leber 氏病患者,其中在 4 个患者中找到了 mtDNA 的 Wallace 突变,支持了 Wallace 关于 Leber 氏病发病机理的假说。

**关键词:** Leber 氏病, mtDNA, 基因突变

Leber 氏遗传性视神经网膜病 (Leber's Hereditary Optic Neuropathy, LHON) 由 Leber 医生于 1971 年首次报道<sup>[1]</sup>, 也称 Leber 氏病。我国统计的发病率仅为 0.1/万, 明显低于国外, 本病在青春期发病, 表现为急性、亚急性视力减退, 半年后病情稳定, 全盲者少见。眼底检查可见视神经退行性变。此病除视觉障碍外, 还常伴有神经系统及心血管系统其它症状。至今尚未发现一个男性患者可将此病传给后代, 该病均是通过女性向后代传递的, 为典型的母系遗传, 提示本病为细胞质遗传, 但一直未找到可靠的依据<sup>[3,7]</sup>。近年来, 随着分子遗传学的发展, Wallace 于 1988 年首次在 LHON 患者中发现了特异的 mtDNA 第 11778 位碱基突变<sup>[4,5]</sup>。以后 Vilkki 和 Norby 等进一步证实了 Wallace 的发现<sup>[6,9]</sup>。关于中国汉族人 LHON 的分子遗传学研究至今未见报道。我们研究了 8 个独立来源的汉族人 LHON 患者, 其中在 4 个患者中找到了“Wallace 突变”。从而支持了 Wallace 关于 LHON 发病的 mtDNA 突变假说, 表明 LHON 发病机理无种族特异性。

## 材 料 和 方 法

### (一) 材料

LHON 家系患者的外周血由福建医学院眼科童绎教授提供; 限制酶 *Sfa* NI 从医科院基础所购得; 同位素  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dATP 为英国 Amersham 公司产品; 人正常肝组织取自引产胎儿肝脏。

### (二) 方法

#### 1. mtDNA 提取及纯化

(1) 线粒体粗制品制备 将人肝组织 20 g 剪碎成糜, 15000—20000rpm 匀浆 10 秒, 共三次, 经 GTE (50mmol/L 葡萄糖, 25mmol/L Tris-HCl, 10mmol/L EDTA) 稀释后, 1000g 离心 10 分钟, 取上清 10000g 离心 10 分钟, 再用 5ml GTE 溶解沉淀。

#### (2) 碱变性法提取 mtDNA<sup>[8]</sup> 上述线

Zhang Zhiping et al.: Wallace Mutation Associated With Leber's Hereditary Optic Neuropathy

\* 国家自然科学基金资助的课题。

1) 福建医学院眼科教研室, 350004。

本文于 1990 年 12 月 12 日收到。

粒体粗制品加 10ml NS(0.2mol/L NaOH, 1% SDS) 混匀, 冰浴 10 分钟, 再加 5mol/L KAC 摇匀, 冰浴 10 分钟, 10000g 离心, 上清经饱和酚及酚: 氯仿提取, 异丙醇沉淀 mtDNA。

(3) mtDNA 的纯化 mtDNA 经 *Bam* HI 酶解后, 琼脂糖凝胶电泳, 用透析袋电泳洗脱法回收纯化的 mtDNA, 以作制备 mtDNA 探针用。

## 2. 分子杂交

用 ACD 抗凝的外周血经  $\text{NH}_4\text{Cl}$  破红细胞膜后, 用酚: 氯仿提取 DNA(内含 mtDNA), 用限制酶 *Sfa* NI 酶解, 按  $1\mu\text{gDNA}/\text{孔}$  加样, 1.5—2.0% 琼脂糖凝胶电泳, 转移至硝酸纤维素尼龙膜 (Z-Probe) 上, 与经同位素  $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ -dATP 通过缺口平移法标记的 mtDNA 杂交, 洗膜采用  $65^\circ\text{C}$  磷酸系统<sup>[2]</sup>,  $-70^\circ\text{C}$  放射自显影二天。

## 结 果

经 *Sfa* NI 酶解的各患者外周血 DNA(含 mtDNA), 经与 mtDNA 探针分子杂交后, 患者  $\text{P}_1$ 、 $\text{P}_3$ 、 $\text{P}_5$ 、 $\text{P}_6$  均出现一条 1594bp 的杂交带, 而正常人和其它几位患者 ( $\text{N}_1$ 、 $\text{N}_2$ 、 $\text{N}_3$  和  $\text{P}_2$ 、 $\text{P}_4$ 、 $\text{P}_7$ 、 $\text{P}_8$ ) 均出现 915bp 和 679bp 两条带 (见

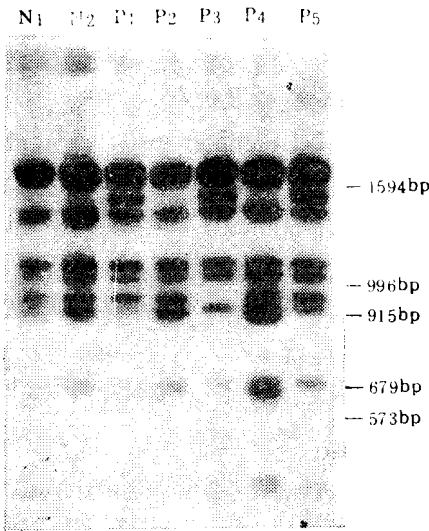


图 1 *Sfa* NI/mtDNA 杂交结果  $\text{N}_1$ 、 $\text{N}_2$ 、 $\text{N}_3$  为正常对照,  $\text{P}_1$ — $\text{P}_8$  为患者

P6 P7 P8 N3

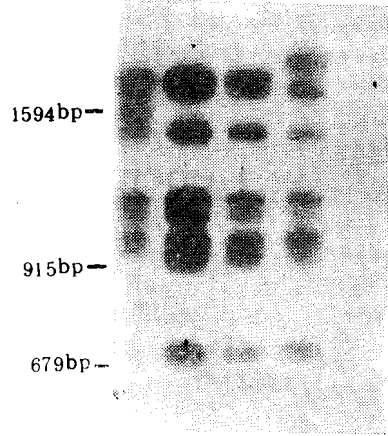


图 2 *Sfa* NI/mtDNA 杂交结果  $\text{N}_3$  为正常对照,  $\text{P}_6$ — $\text{P}_8$  为患者

图 1 和图 2)。这说明,  $\text{P}_1$ 、 $\text{P}_3$ 、 $\text{P}_5$ 、 $\text{P}_6$  这 4 位患者的 mtDNA 中的正常 *Sfa* NI 识别位点发生了突变, 使 *Sfa* NI 不能识别和切割, 从而产生了由 915bp 和 679bp 融合而成的 1594bp 带。另外  $\text{P}_3$  缺失 996bp 的杂交带, 而出现了 422bp 和 573bp 两条带, 这很可能是由于 mtDNA 的 4247 位发生了 T → C 突变, 从而产生新的 *Sfa* NI 识别位点所致。用 *Hae* III、*Hin* fl、*Msp* I、*Dde* I 和 *Ava* II 酶解, 在 LHON 患者中均未见特异的多态片段。

## 讨 论

人 mtDNA 为 16596bp 的环状 DNA 分子<sup>[1]</sup>, 编码 2 个 rRNA、22 个 tRNA 和与细胞氧化磷酸化有关的 13 条多肽链, 即: NADH 脱氢酶的 7 个亚单位 (ND1、ND2、ND3、ND4、ND4L、ND5、ND6)、细胞色素 b、细胞色素 c 的 I、II、III 亚单位和 ATP 合成酶的第 6、第 8 亚单位。mtDNA 的基因产物与细胞氧化磷酸化供能有关。mtDNA 的突变必将影响细胞的氧化磷酸化过程。细胞里的 mtDNA 以多拷贝的形式存在。因而, 可以想象, mtDNA 突变呈现的症状并非象核基因突变那么典型, 是否发病或发病的轻重程度可能与突变的 mtDNA 所占的百分比有关。也就是说, 突变

的 mtDNA 必须达到或超过某一“阈值”才能发病,这一点与线粒体肌病的研究结果相吻合<sup>[4]</sup>。一般认为, LHON 患者外周血 mtDNA 中绝大多数为突变的 mtDNA,用普通的 Southern 杂交法很难发现杂合性,这与我们所得的结果完全一致,只有采用 PCR 法扩增后,才能清楚地测得 mtDNA 的杂合性<sup>[5]</sup>。

Wallace 在白种人和黑人中发现,起码有 50% 的 LHON 患者,其 mtDNA 的 11778 位存在着 G→A 突变,从而导致 mtDNA 的 ND4 基因所编码的第 340 位精氨酸密码子突变成组氨酸密码子。虽然这两种氨基酸均为碱性氨基酸,但这一位点上的精氨酸在不同种生物中是相当保守的,可能该位点上的精氨酸对维持 ND4 的正常功能非常重要。LHON 患者中的突变,可能改变了 ND4 的空间构型及局部带电性,使 NADH 脱氢酶活性下降。我们研究了 8 个中国汉族人 LHON 患者,发现其中 4 个存在 Wallace 突变,说明 Wallace 突变不仅存在于白种人和黑人,也存在于黄种人。LHON 患者的 Wallace 突变无种族特异性。

Wallace 突变可对 50% 的 LHON 患者给予满意的解释。那些无“Wallace 突变”的患者,可能同样存在着 mtDNA 的改变,只不过突变位点不同而已。mtDNA 编码 13 条与细胞氧化磷酸化有关的多肽链,其突变可能会影响呼吸链的功能。如 Vilkki 发现的 ND5 基因的 13637 位 A→G 或 T 的突变,ND2 基因的 4633 位 C→G 的突变。对 LHON 的研究不应局限于用限制酶来寻找 mtDNA 突变。

最好能将患者的 mtDNA 进行全序列分析,以寻找 Wallace 突变以外的其它突变,并结合对线粒体内与呼吸链有关的各种成分的生化分析,从基因水平→蛋白质水平→细胞水平来阐明 LHON 的发病机理。

目前对 LHON 的发病机制从分子遗传学角度有一定的认识,但作为一种线粒体病研究的模型还远远不够,许多现象还得不到合理的解释,如 LHON 患者的 Wallace 突变是如何产生的?在细胞里成百上千个 mtDNA 分子中,突变的 mtDNA 是如何保存、发展并占优势的?是否存在某种诱发因素等等,因而还需对该病深入研究,用以进一步阐明 mtDNA 突变在母系遗传病中的作用,开创线粒体病研究的新领域。

### 参 考 文 献

[1] 张志平等: 1991。《国外医学》遗传学分册, 1: 1-4。  
 [2] 杨焕明、鲁晓璋: 1988。遗传与疾病, 6: 165。  
 [3] Chen Jiade, et al.: 1989. *Hum. Genet.*, 82: 203-207。  
 [4] Holt, I. J. et al.: 1988. *Nature*, 331: 717-719。  
 [5] Marie, T. et al.: 1990. *Am. J. Ophthalmology*, 109: 625-631。  
 [6] Norby, S. et al.: 1990. 5th European Congress on Biotechnology。  
 [7] Novotny, E. J. et al.: 1987. *Neurology*, 36: 1053-1060。  
 [8] Tamura, K. et al.: 1988. *Biochem. Genet.*, 26: 815-819。  
 [9] Vilkki, J. et al.: 1989. *Am. J. Hum. Genet.*, 45: 206-211。  
 [10] Wallace, D. C. et al.: 1988. *Science*, 242: 1427-1430。  
 [11] Wallace, D. C. et al.: 1989. *Cytogenet. Cell Genet.*, 51: 612-621。

(上接第 17 页)

### 参 考 文 献

[1] 陶文洪: 1986。《国外医学》肿瘤学分册, 13(3): 146-149。  
 [2] 许海修等: 1989。肿瘤, 9(1): 3-4。  
 [3] 曹幸纾等: 1985。环境化学物致突变致畸致癌试验方法, 浙江科学技术出版社, 第 218-248 页。  
 [4] 王国钦: 1987。《国外医学》卫生学分册, 14(4): 207-210。

[5] 吕群等译 (David Brusick, 1985): 1987。遗传毒理学原理, 复旦大学出版社, 第 94, 185 页。  
 [6] 上海第一医学院卫生统计学教研室: 1979。医学统计方法, 上海科技出版社, 第 29-149 页。  
 [7] 谢林等: 1988。遗传学报, 15(5): 368-373。  
 [8] Heddle, J. A. et al.: 1983. *Mut. Res.*, 123: 61。  
 [9] Kanda, N. et al.: 1979. *Exp. Cell Res.*, 118: 431。  
 [10] Kimm, S. W. et al.: 1983. *Korean. J. Biochem.*, 14: 47。