

# 肥厚型心肌病患者心肌 mtDNA 大片段缺失的探讨

尹桂芝<sup>1)</sup> 张丽容<sup>1)</sup> 李殿富<sup>1)</sup> 张丽珊<sup>2)</sup>

(1. 南京铁道医学院附属医院心内科, 2. 南京铁道医学院生物教研室, 南京 210009)

**摘要** 应用 Long PCR 及 Primer Shift Long PCR 技术对 3 例肥厚型心肌病(HCM) 患者和 10 例正常引产胎儿的 13 份心肌标本予以线粒体 DNA 缺失检测, 结果在 1 例 HCM 患者心肌线粒体 DNA 中发现约 5.0kb 缺失, 而在正常引产胎儿的标本未见该缺失, 提示 HCM 的发生可能与 mtDNA 缺失相关。

**关键词** 肥厚型心肌病, 线粒体 DNA, 缺失

**中图分类号** Q39

## Analysis of mtDNA Deletion on Heart Muscles of Hypertrophic Cardiomyopathy Patients

YIN Gui-Zhi ZHANG Li-Rong LI Dian-Fu ZHANG Li-Shan

(Nanjing Railway Medical College, Nanjing 210009)

**Abstract** Using long PCR and primer shift long PCR techniques, we analyzed the mitochondrial DNA (mtDNA) isolated from the heart muscles of 3 hypertrophic cardiomyopathy (HCM) patients and 10 normal abortive fetuses. Almost 5.0kb deletion was found in the heart mtDNA of one HCM patient, while no deletion was detected in that of 10 fetuses. It is concluded that HCM may correlate with mtDNA deletion.

**Key words** Hypertrophic cardiomyopathy, Mitochondrial DNA, Deletion

线粒体是细胞氧化磷酸化 (OXPHOS) 产生能量的场所, OXPHOS 所需的酶是由核 DNA 与 mtDNA 共同编码的, 因此 mtDNA 突变 (缺失、点突变) 会直接影响到线粒体功能<sup>[1]</sup>。迄今已发现 100 多种疾病与线粒体功能障碍有关, 在心脏方面主要表现为心肌病变<sup>[2]</sup>。1990 年 Ozawa 等首先在原发性心肌病患者心肌 mtDNA 中发现缺失, 分析它是心肌病的致病因素之一<sup>[3]</sup>; 1991 年我们也在 1 例 HCM 患者心肌中发现 mtDNA 400bp 缺失, 认为它与 HCM 的发生密切相关<sup>[4]</sup>。本文应用 Long PCR 及 Primer Shift Long PCR 技术扩增 mtDNA (共 16 569bp), 在第 2 695~16 445 位碱基范围 (约 14kb) 内分析 3 例 HCM 患者及 10 例正常引产胎儿心肌 mtDNA 缺失情况, 发现 1 例患者存在约 5.0kb 缺失。

## 1 材 料 和 方 法

### 1.1 研究对象

符合临床诊断标准的肥厚型心肌病患者 3 例, 取其心肌标本, 另取 10 例正常引产胎儿心肌标本为对照。

### 1.2 试剂与方法

1.2.1 心肌组织 DNA 提取 采用常规酚、氯仿、异戊醇抽提法提取心肌组织 DNA (内含 mtDNA), 将抽提出的 DNA 溶于 TE 缓冲液, 置于 4℃ 冰箱保存备用。

1.2.2 PCR 扩增 试剂购自美国 PE 公司 XL PCR kit (内含 rTthDNA 聚合酶, 3.3× buffer, dNTP, Mg(OAc)<sub>2</sub>), 引物由中国科学院上海细胞生物学研究所合成。

引物起止位置	序 列	扩增片段长度
L <sub>1</sub> 2 695~2 720	GAG CTC GCG GGC AAC ACA CAG CAA AC	L <sub>1</sub> ~H <sub>1</sub>
H <sub>1</sub> 16459~16436	GGC CTT CCG GAG CGA GAC TAG	13.7kb
L <sub>2</sub> 5606~5626	CAG TGC ATC GAT AAC ATA CAA	L <sub>2</sub> ~H <sub>2</sub>
H <sub>2</sub> 16445~16426	TTA AAA CTT CAG AGC GAG GA	10.8kb

大片段扩增: 反应总体积 50μl, dNTP1.0 mmol/L, 引物各为 0.5μmol/L, Mg<sup>2+</sup> 1.5mmol/L, rTth DNA 聚合酶 3u, 模板 DNA 0.3~0.5μg, 将 200μl eppendorf 管置于 DNA 热循环仪中(Biorad 公司产), 按以下程序扩增, 94℃ 1min 后, 以 94℃ 15sec, 68℃ 8min 15sec 循环 16 次, 继以 94℃ 15sec, 68℃ 8min 15sec~11min 15sec 循环 16 次, 72℃ 延伸 15min 以使反应完全。

引物移位大片段扩增: 具体步骤同大片段扩增, 引物用 L<sub>2</sub>~H<sub>2</sub>, 循环条件为 94℃ 1min 后以 94℃ 15sec, 59℃ 1min, 72℃ 6min 15sec 循环 16 次, 继以 94℃ 15sec, 59℃ 1min, 72℃ 6min 15sec~9min 15sec 循环 16 次, 72℃ 延伸 15min。

1.2.3 琼脂糖凝胶电泳 1×TBE 为电泳缓冲液, 配制 0.8%胶, 上样后, 5V/cm 电泳, 指示剂迁移至适当位置, 在紫外灯下观察结果并摄像。

## 2 结 果 与 讨 论

10 例正常引产胎儿及 2 例 HCM 患者心肌 mtDNA 经 L<sub>1</sub>~H<sub>1</sub> 扩增后, 均出现一特异性 13.7kb 带, 而一 38 岁男性 HCM 患者仅出现一条约为 9kb 带 (见图 1), 提示该患者心肌 mtDNA 中存在近 5.0kb 缺失。

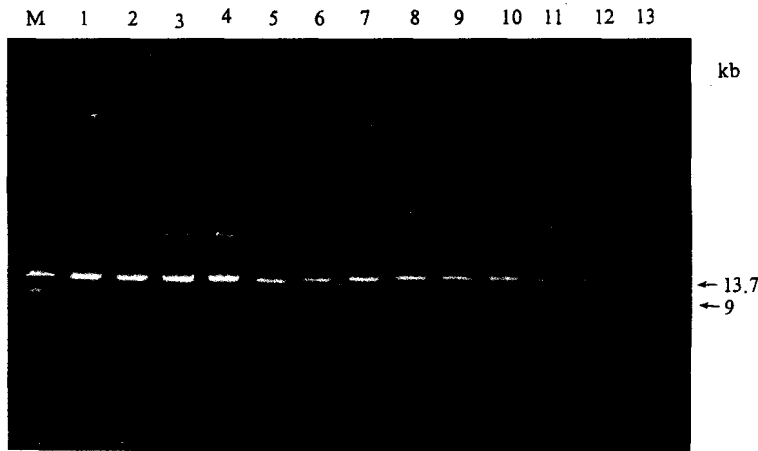


图 1 大片段扩增结果

M. λDNA/EcoRI HindIII marker; 1~10. 10 例正常引产胎儿心肌标本; 11~13. 3 例肥厚型心肌病患者心肌标本。

经 L<sub>2</sub>~H<sub>2</sub> 扩增后, 该例 HCM 患者心肌 mtDNA 仅出现一条约为 6kb 带, 正常引产胎儿及另 2 例 HCM 患者出现一特异性 10.8kb 带 (见图 2)。L<sub>1</sub>~H<sub>1</sub> 转换到 L<sub>2</sub>~H<sub>2</sub> 后, 所能扩增片段也相应缩短 3kb, 证明其 mtDNA 中确实存在近 5.0kb 缺失。

线粒体 OXPHOS 产生的 ATP 对于心脏维持正常功能至关重要, mtDNA 缺失会直接影响这一产能途径, 使 ATP 生成减少, 导致心脏功能异常。本文在一例 HCM 患者 (男, 38 岁, 因劳累后心悸气短三年, 加重半月, 拟行手术治疗入院) 心肌 mtDNA 中发现近 5.0kb 的缺失, 缺失区域编码呼吸链复合物 I、IV、V 中的部分蛋白质亚单位。复合物 I~IV 组成电子传递链, 来自线粒体外的电子经复合物 I 传递至线粒体内, 再经过复合物 II、III、IV 传递至 O<sub>2</sub>, 通过氧化磷酸化偶联机制驱动 ATP 合成, 因此, mtDNA 5.0kb 缺失导致复合物 I、IV 的缺陷会影响 OXPHOS 功能。

由于缺失片段位于轻链复制点 ( $O_L$ ) 与重链复制点 ( $O_H$ ) 之间, 不包括  $O_H$  与  $O_L$  本身, 且 mtDNA 复制转录的酶由核 DNA 编码而使 mtDNA 复制速度与其长度呈正相关, 因此, 缺失型 mtDNA 复制较快, 在组织中含量得以富集; 另一方面, 由于成年后 OXPHOS 功能在正常情况下也呈逐年下降趋势<sup>(5)</sup>, 且缺失型 mtDNA 会使 OXPHOS 过程受阻而且使氧自由基增加, 氧自由基又会进一步加重 mtDNA 的缺失<sup>(2)</sup>。在 mtDNA 缺失与 OXPHOS 功能之间形成一恶性循环, 这一过程促使心肌形态、结构发生相应改变, 当 OXPHOS 产生的 ATP 不再能满足心脏维持正常功能所需能量的阈值时, 患者就表现出明显的心功能不全症状。由于 OXPHOS 功能是由核 DNA 与 mtDNA 共同调控的, 所以在 OXPHOS 功能未达到阈值以前, 组织细胞内的 mtDNA 即使完全为突变型, 线粒体产生的能量仍能满足组织正常活动的需要而使患者不表现出症状<sup>(6)</sup>。

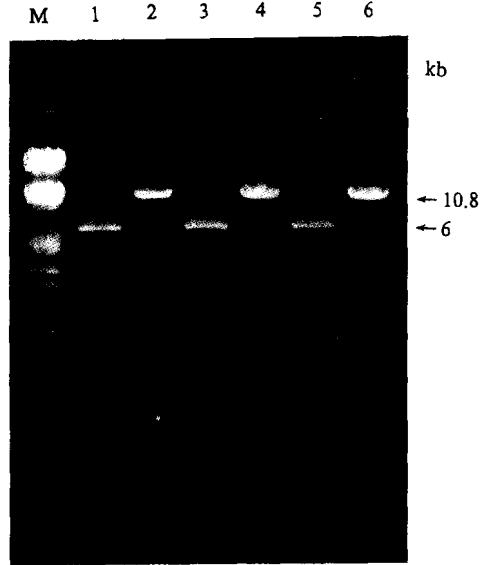


图2 引物移位大片段扩增结果

M.  $\lambda$ DNA/*EcoRI HindIII* marker; 1、3、5. mtDNA 有缺失的 HCM 患者心肌标本 3 次扩增结果;  
2、4. mtDNA 无缺失的 HCM 患者心肌标本; 6. 正常引产胎儿心肌标本。

未检测到缺失的 2 例 HCM 患者心肌 mtDNA 中也许存在小片段缺失或缺失型 mtDNA 的含量极低而使我们检测不到; 由于 HCM 发病的异质性<sup>(7)</sup>, 这两例患者也可能存在 mtDNA 点突变。

## 参 考 文 献

- 1 Morgan-Hughes J A, Sweeney M G, Cooper J M *et al.* Mitochondrial DNA (mtDNA) diseases: Correlation of genotype to phenotype. *Biochim Biophys Acta*, 1995, 1271: 135~140
- 2 Wallace D C. Disease of the mitochondrial DNA. *Annu. Rev. Biochem.*, 1992, 61: 1175~1212
- 3 Ozawa T, Tanaka M, Sugiyama S *et al.* Multiple mitochondrial DNA deletions exist in cardiomyocytes of patients with hypertrophic or dilated cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res. Commun.*, 1990, 170: 830~832
- 4 张丽容, 李殿富, 张丽珊等. 心脏病与线粒体DNA异常的探讨. *北京医科大学学报*, 1994, 26: 232
- 5 Cortapassi G A, Arnheim N. Detection of a specific mitochondrial DNA deletion in tissues of older humans. *Nucleic Acids Res.*, 1990, 18(23): 6927~6933
- 6 Cortapassi G A, Shibata D, Soong N W *et al.* A pattern of accumulation of a somatic deletion of mitochondrial DNA in aging human tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, 89: 7370~7374
- 7 Merante F, Tein I, Benson L *et al.* Maternally inherited hypertrophic cardiomyopathy due to a novel T-to-C transition at nucleotide 9997 in the mitochondrial DNA tRNA<sup>glycine</sup>. *Gene*, 1994, 55(3): 437~446

1997-09-05 收稿, 1998-06-11 修回。