

仅男性患病的汉族 Leber 遗传性视神经病变家系突变基因分析

鹿晓燕 金学民 史小玲

450052 郑州大学第一附属医院眼科(鹿晓燕);450003 郑州,河南省立眼科医院 河南省眼科研究所(金学民);361100 厦门大学附属厦门眼科中心(史小玲)

通信作者:史小玲,Email:410154257@qq.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.08.009

【摘要】 **背景** Leber 遗传性视神经病变(LHON)是由线粒体 DNA(mtDNA)错义突变引起的母系遗传性致盲眼病,表现为双侧视神经急性或亚急性病变和无痛性中心视力丧失,且具有不完全外显和男性患病偏倚的临床特点。迄今为止,仍没有一个理论可以完整解释其所有的临床表现。**目的** 对一汉族 LHON 家系突变基因进行检测,探讨其男性患病偏倚的机制。**方法** 2008 年 1 月至 2016 年 8 月收集河南省安阳市一汉族 LHON 家系,采集此家系中 4 例患者、13 名母系成员和 10 名非母系成员的外周静脉血 5~10 ml,纳入 107 个与该家系无血缘关系的正常人样本作为对照。用 PCR 进行 DNA 测序,用 ABI-PRISM 3100 基因分析仪进行基因扫描,用 Genotyper 3.7 软件进行基因型分析,Linkage 软件进行连锁分析,计算两点参数优势对数比值比(LOD),检测该家系是否携带 3 个原发突变。对先证者 mtDNA 进行全测序,将测序结果与修正的 mtDNA 剑桥标准序列进行比对,确定该家系的突变位点;采用微卫星荧光标记基因组扫描法扫描 X 染色体进行家系连锁分析,绘制单倍体型图。**结果** 该家系 5 代共 71 位成员,患病者 6 例,均为男性,视力 ≤ 0.10 ,均存在中心视野缺损;急性期视盘色红,慢性期有不同程度的视神经纤维层萎缩;视觉诱发电位(VEP)振幅较低,峰潜时延长;母系成员共 30 名,母系家系的女性成员视力及眼部检查未发现异常,符合母系遗传特征,家族中 LHON 外显率为 20%。PCR 测序证实该家系成员均未携带 3 个原发突变。先证者 mtDNA 全测序发现 31 个改变位点,包括 1 个已报道的致病突变位点 G3635A 和未报道过的 ND5 A12340G 错义突变及 ND4 T11809C 同义突变,其他 28 个突变点均为已报道的线粒体多态,先证者属于线粒体单倍体型 F1。母系成员均同时携带 G3635A 和 A12340G 突变,而正常家系成员和 107 位正常对照者不存在该突变。连锁分析在 DXS1060 得到最大两点 LOD 值 1.46($\theta=0.0$),但是两点非参数分析和多点非参数分析结果显示所有标记的差异均无统计学意义(均 $P>0.05$)。**结论** 此家系同时携带 A12340G 和 G3635A 2 个突变位点,其中 A12340G 突变为首次报道;在此家系中并未发现与 LHON 有关的 X 连锁修饰基因位点。

【关键词】 Leber 视神经病变/遗传性; X 染色体连锁修饰基因; 微卫星荧光标记; 参数连锁分析; 非参数连锁分析

Mutation analysis of a Chinese pedigree of Leber hereditary optic neuropathy with only male patients Lu Xiaoyan, Jin Xuemin, Shi Xiaoling

Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China (Lu XY); Henan Eye Hospital, Henan Eye Institute, Zhengzhou 450003, China (Jin XM); Affiliated Xiamen Eye Center & Eye Institute of Xiamen University, Xiamen 361100, China (Shi XL)

Corresponding author: Shi Xiaoling, Email: 410154257@qq.com

【Abstract】 **Background** Leber hereditary optic neuropathy (LHON) is a maternally inherited disorder characterized by a bilateral acute or subacute painless central visual loss in young adults, predominately in males. So far no one theory can completely explain all clinical manifestations of LHON. **Objective** This study was to investigate whether there is a linkage between X-chromosomal and mitochondrial mutation in the inheritance of a Chinese LHON pedigree with only male patients. **Methods** This study was approved by Ethic Committee of Affiliated First Hospital of Zhengzhou University and followed by Declaration of Helsinki. A Chinese LHON pedigree was included in Anyang city from January 2008 to August 2016. Periphery blood of 5-10 ml was collected from 4 sufferers, 13 maternal members and 10 non-maternal members for DNA extraction and PCR sequencing. The gene scanning and genotyping analysis were performed by ABI-PRISM 3100 genetic analyzer and Genotyper 3.7 software, and linkage analysis was carried out with Linkage software for the calculation of logarithm of odds (LOD).

Mitochondrial DNA (mtDNA) sequence, fluorescence-based Genescan for X- chromosomal sequence were analyzed in the proband and haplotype was evaluated. **Results** A total of 5 generations and 71 families were included in the pedigree, with 6 male sufferers, 30 maternal members and 41 non-maternal members. The visual acuity was ≤ 0.10 , and the central visual field defection, the optic nerve flushing was found in the acute phase, different levels of the optic nerve fibers atrophy were found in the chronic phase; visual evoked potential (VEP) amplitude was low and peak latency were found in the male patients, and no any ocular abnormality was seen in the maternal members, meeting a maternally inherited characteristics, with the penetrance of 20%. The three primary mutations were not been found in this family by PCR sequencing. mtDNA sequencing appeared 31 variation of loci in the proband, including a known G3635A mutation, as well as an unknown ND5 A12340G missense mutation and ND4 T11809C synonymous mutation as well as 28 polymorphism of locus, and the proband was mitochondrial haplotype F1. The maternal families were mutation carriers of G3635A and A12340G loci, while the same mutation was not found in the normal family members and 107 controls. The maximum two point parametric LOD score was 1.46 ($\theta=0.0$) for marker DXS1060, located at Xp22.3, and the two-point and multipoint non-parametric linkage analysis were significant (all at $P>0.05$). **Conclusions** The ND5 A12340G and ND1 G3635A mutations coexist in this LHON family, and the ND5 A12340G mutation is a newly reported mutation. There is no evidence for an X-linked modifiers loci in this Chinese LHON family.

[Key words] Leber hereditary optic neuropathy/genetics; X-linked modifiers locus; Microsatellite marker; Parametric linkage analysis; Non-parametric linkage analysis

Leber 遗传性视神经病变 (Leber hereditary optic neuropathy, LHON) 是一种由线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 错义突变引起的母系遗传性致盲眼病, 1988 年研究发现该病患者 mtDNA 上的 G11778A 突变, 确定了 LHON 的线粒体遗传模式^[1]。迄今已报道的相关突变有近 50 余种 (<http://www.mitomap.org>), 目前越来越多的研究也发现了其他的继发突变^[2-7], 其中 3 个原发突变 ND4 G11778A、ND1 G3460A、ND6 T14484C 在不同种族的 LHON 家系中占绝大多数^[1,8-9], 在 Caucasian 人群中高达 95% 的患者存在 3 种突变中的 1 个, 而亚洲人群中 90% 以上患者是由 G11778A 突变引起的^[10-15]。LHON 的一个显著临床特点就是不完全的外显和男性患病偏倚。理论上讲女性携带者将致病的 mtDNA 传递给后代, 后代应该全部发病, 然而事实并非如此。不完全外显可能与 mtDNA 异质性和发病阈值有关, 但不足以解释男性患病偏倚, 迄今为止仍没有一个理论可以合理解释此病所有的临床表现。Bu 等^[13]于 1991 年提出了 LHON 存在线粒体-核基因双位点遗传模式以尝试解释男性患病偏倚现象, 即可能在核基因上存在与 LHON 发病相关的基因——X 染色体连锁修饰基因^[14-16]。本研究拟探讨 X 染色体与 LHON 发病间的关系, 进一步验证 LHON 的双位点遗传模式。

1 资料与方法

1.1 一般资料

2008 年 1 月至 2016 年 8 月收集河南省安阳市一仅有男性患病的汉族

LHON 家系。采集 27 个家系成员外周静脉血 5 ~ 10 ml, 包括 4 例患者 (Ⅲ3、Ⅲ9、Ⅳ14 和 V8)、13 名母系成员 (Ⅲ6、Ⅲ13、Ⅲ16、Ⅳ2、Ⅳ5、Ⅳ11、Ⅳ13、Ⅳ30、Ⅳ31、Ⅳ32、V7、V9 和 V10) 和 10 名非母系成员 (Ⅲ5、Ⅳ12、Ⅳ15、Ⅳ23、Ⅳ24、Ⅳ25、Ⅳ28、Ⅳ29、V12 和 V13) (图 1)。所有相关的医学实验室检查均在郑州大学第一附属医院重点实验室进行。所有母系成员眼科检查均由郑州大学第一附属医院同一临床经验丰富的眼科医师完成, 必要者行视野、视觉诱发电位 (visual evoked potential, VEP)、视网膜电图、荧光素眼底血管造影、色觉检查。本研究遵循赫尔辛基宣言, 研究过程和所有相关医学检验均征得家系成员的口头知情同意。本研究方案经郑州大学第一附属医院医学伦理委员会审核批准 (伦审号: 2008 年科研第 3 号)。

1.2 诊断标准及视力损害分级

LHON 诊断标准: (1) 同一家族内有 2 人以上发病, 严重视力障碍, 符合 Lossen 法则 (男性患者的子女不发病) 和北岛法则 (半数以上女性携带者可传递给子女, 自身也可以发病); (2) 双眼同时或先后、突然或

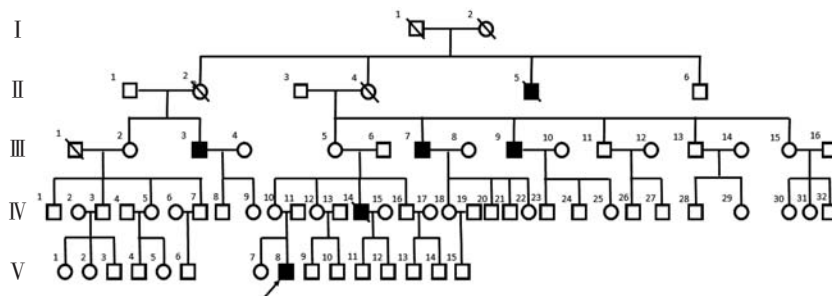


图 1 该 LHON 家系的家系图 ■: 患病男性; □: 未患病男性; ●: 患病女性; ○: 未患病女性; ↗: 先证者; \: 死亡

逐渐视力减退,严重者多有中心暗点;(3)急性期视盘色红,视网膜血管弯曲,FFA 可见有毛细血管扩张性病变,但无荧光素渗漏;(4)慢性期有不同程度的黄斑视盘神经纤维层萎缩。视力损害程度分级参照文献[17-18]的方法,分级如下:视力>0.3 为正常,0.1≤视力≤0.3 为轻度损害,0.05≤视力<0.1 为中度损害,0.02≤视力<0.05 为重度损害,视力<0.02 为严重损害。

1.3 家系成员基因测序

采集家系成员外周静脉血 5~10 ml,采用标准的酚-氯仿抽提法提取基因组 DNA。利用 Primer5 设计覆盖整条线粒体模板的 43 对引物,选择其中包含 LHON 3 个原发突变位点的 3 对引物,对先证者 mtDNA 进行 PCR 扩增,用质量分数 6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳,SAP 与 EXOI 酶切纯化,用 ABI Prism BigDye Terminator V3.1 循环测序工具包(美国 ABI 公司)在 ABI-PRISM 3130XL 自动测序仪(美国 ABI 公司)上测序,对家系内 27 位成员(4 例患者、13 名母系非患者和 10 名非母系成员)和与该家系无亲缘关系的 107 名正常对照者进行突变位点检测和分析。

1.4 基因位点连锁分析

在 ABI PRISM® 链接映射集 2.5 版中挑选可以覆盖整条 X 染色体的 18 个微卫星荧光标记,对家系内 24 名成员(Ⅲ3、Ⅲ5、Ⅲ6、Ⅲ9、Ⅲ13、Ⅲ16;Ⅳ2、Ⅳ5、Ⅳ11、Ⅳ12、Ⅳ13、Ⅳ14、Ⅳ23、Ⅳ24、Ⅳ25、Ⅳ28、Ⅳ29、Ⅳ30、Ⅳ31、Ⅳ32;Ⅴ7、Ⅴ8、Ⅴ9、Ⅴ10)进行 X 染色体扫描和家系连锁分析。对家系内 24 名成员(4 例男性患者,13 名母系非患者,7 名非母系成员)的 DNA 进行 PCR 测序。(1)用 ABI-PRISM 3100 基因分析仪(美国 ABI 公司)进行基因扫描,以 GS-400HD ROX SIZE STD 作内标。(2)利用 Genotyper 3.7 软件(美国 Invitrogen 公司)进行基因型分析,Linkage 软件(美国 Invitrogen 公司)进行连锁分析,计算两点参数优势对数比值比(logarithm of odds, LOD)。然后在可能存在连锁的 X 染色体区域挑选精细 marker (MARSHFIELD 数据库与 NCBI-uniSTS 数据库)进行精细扫描,Linkage 软件计算两点参数 LOD 值,Merlin 1.1.2 软件(美国 Invitrogen 公司)计算两点非参数连锁分析值(non-parametric linkage score, NPL)及多点 NPL 值,利用 Cyrillie 软件(美国 Invitrogen 公司)构成单体型图,确定 X

染色体连锁修饰基因位点。

2 结果

先证者(V8),男,就诊时 13 岁。首诊时病程 1.5 年,眼底可见双眼视盘边界清,颞侧视盘颜色略淡,视盘血管轻度迂曲、扩张(图 2)。双眼视力 0.1;视野检查可见双眼大片中心暗区,色觉检查结果正常。患者于 2005 年 6 月出现双眼视力的同时下降,伴有中心暗点,无其他伴随症状,发病后 1 个月双眼视力降至手动/30 cm,数月后视力逐渐恢复,2 年后恢复至正常。该家系共 71 名成员,其中母系成员 30 名,非母系成员 41 名。母系成员中男性 16 人,占 53.3%,女性 14 人,占 46.7%。所有家系成员中有 6 例发病,均为男性,家系中女性的最佳矫正视力均在正常范围,眼底检查未发现典型的 LHON 相关表现(表 1),符合母系遗传特征,家族中 LHON 外显率为 20%。6 例患者Ⅱ5、Ⅲ3、Ⅲ7、Ⅲ9、Ⅳ14、Ⅴ8 的发病年龄分别为 40、30、35、30、22 和 13 岁。视力下降最低值右眼分别为数指/50 cm、数指/80 cm、0.04、0.01、0.02 和 0.1,左眼分别为数指/60 cm、数指/60 cm、0.04、0.01、0.02 和 0.1(表 2)。Ⅲ7、Ⅳ14 和 Ⅴ8 视力均有不同程度的恢复。随着遗传代数的递增,发病年龄逐渐减小,呈现遗传早现现象。

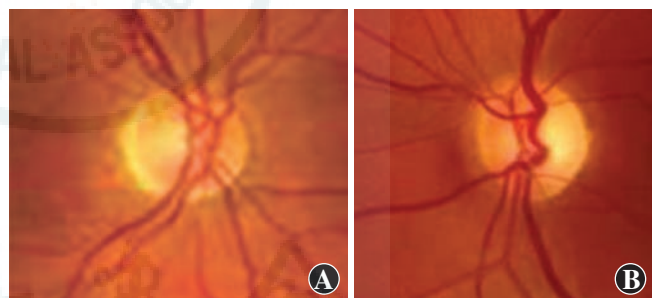


图 2 先证者彩色眼底照相 可见双眼视盘边界清,颞侧颜色稍淡,血管轻度迂曲、扩张 A:右眼 B:左眼

表 1 LHON 家系部分女性携带者的临床资料

女性携带者	年龄(岁)	视力(裸眼视力→矫正视力)		眼底表现	VEP
		右眼	左眼		
Ⅲ6	50	0.6→1.0	0.8→1.0	正常	正常
Ⅲ16	52	0.5→0.8	0.6→0.8	正常	正常
Ⅳ5	35	1.0	1.0	正常	正常
Ⅳ11	34	1.0	1.0	正常	正常
Ⅳ13	30	0.1→0.6	0.3→0.8	高度近视改变	正常
Ⅳ30	32	1.0	1.0	正常	正常
Ⅳ31	30	1.0	1.0	正常	正常
Ⅴ7	5	0.8	0.8	正常	正常
Ⅴ9	8	1.0	1.0	正常	正常

注:LHON:Leber 遗传性视神经病变;VEP:视觉诱发电位

表 2 LHON 家系患者临床特点

患者	性别	采集标本年龄(岁)	发病年龄(岁)	中心视力		视力下降	恢复
				右眼	左眼		
Ⅱ5	男	-	40	数指/50 cm	数指/60 cm	严重	否
Ⅲ3	男	50	30	数指/80 cm	数指/60 cm	严重	否
Ⅲ7	男	55	35	0.04	0.04	重度	是
Ⅲ9	男	52	30	0.01	0.01	严重	否
Ⅳ14	男	33	22	0.02	0.02	重度	是
Ⅴ8	男	16	13	0.10	0.10	轻度	是

注:LHON:Leber 遗传性视神经病变;-:未采集

重新对先证者 mtDNA 进行全测序,发现 31 个同质突变位点(表 3),其中包括 1 个已报道的致病突变位点 G3635A 和 2 个未报道过的突变位点 ND5 A12340G 和 ND4 T11809C。T11809C 为同义突变,A12340G 为错义突变,剩余 28 个突变点均为已报道过的线粒体多态,该先证者属于线粒体单倍体型 F1。多点非参数分析结果显示,所有标志物均 $P > 0.05$,单倍体型分析图未发现共分离单倍体。母系成员均同时携带 G3635A 和 A12340G 突变,107 名正常对照者中不存在此突变(图 3)。

微卫星荧光标记基因组扫描法扫描 X 染色体进行家系连锁分析时,本研究中假设 X 连锁修饰基因遗传模式为 X 染色体隐性遗传,外显率为 80%,X 连锁修饰基因的频率为 0.000 1。当重组率 $\theta = 0.0$ 时,标志物 DXS1060 LOD 值为 1.46,提示位于 Xp22.32 的 DXS1060 位点附近可能存在与 LHON 相关的 X 染色体连锁修饰基因。利用 MARSHFIELD 与 NCBI-uniSTS 数据库在 DXS1060 附近区域挑选 DXS1233、DXS1223、DXS7107、DXS7100 和

表 3 LHON 家系先证者 mtDNA 全测序发现 31 个改变位点

基因	核苷酸位置	核苷酸改变	氨基酸改变	线粒体多态	曾经是否报道
D-loop	73	A→G	-	是	是
D-loop	16304	T→C	-	是	是
D-loop	16311	T→C	-	是	是
D-loop	16519	T→C	-	是	是
RNR1	750	A→G	syn	是	是
RNR1	1438	A→G	syn	是	是
RNR2	2706	A→G	-	是	是
RNR2	3107	3107del	rCRS 校正	是	是
ND1	3635	G→A	S110N	突变	是
ND1	3970	C→T	syn	是	是
ND2	4732	A→G	N-S	是	是
ND2	4769	A→G	syn	是	是
ND2	5147	G→A	syn	是	是
CO1	6392	T→C	syn	是	是
CO1	6962	G→A	syn	是	是
CO1	7028	C→T	syn	是	是
ATP6	8860	A→G	T-A	是	是
ND3	10310	G→A	syn	是	是
ND3	10321	T→C	V-A	是	是
ND4L	10609	T→C	M-T	是	是
ND4	10976	C→T	syn	是	是
ND4	11719	G→A	syn	是	是
ND4	11809	T→C	T350T	是	否
ND5	12340	A→G	T2A	新突变	否
ND5	12406	G→A	V-I	是	是
ND5	12633	C→T	syn	是	是
ND5	12882	C→T	syn	是	是
ND5	13928	G→C	S-T	是	是
ND6	14476	G→A	D110N	是	是
CYB	14766	C→T	T-I	是	是
CYB	15326	A→G	T-A	是	是

注:LHON: Leber 遗传性视神经病变;mtDNA: 线粒体 DNA;-:无改变

DXS996 这 5 个精细标志物,家系内 24 位成员的 X 染色体扫描连锁分析显示仅有 DXS1233 位点附近两点 LOD 值为 0.76 ($\theta = 0.0$),其他 4 个标记附近两点 LOD 值均 < -2 。两点非参数分析和多点非参数分析结果均 $P > 0.05$ (表 4)。利用 CYRILLIC 软件对 DXS1233、DXS7100、DXS7107、DXS1060、DXS996、DXS1223 进行单倍体型构建后未发现共分离单倍体(图 4),表明区间内并不存在与该病有关的可疑基因。精细标志物间的平均距离为 0.68 cM。

3 讨论

先前报道的俄罗斯 LHON 家系和 4 个中国 LHON 家系均携带 G3635A 突变^[19-22],与本研究的家系中突变一致,但是临床表型有很大的异质性。有研究表明,异质性对发病和视力预后均无影响^[23]。携带 G3635A 的俄罗斯家系和其他 4 个中国家系中患病者与未患病者比例分别为 8:20、7:4、1:8 和 2:5,男女患者比例分别为 6:2、4:3、1:0 和 1:1,本研究中患病者与未患病者比例为 1:4,男女患者比例为 6:0。Bu 等^[13]曾提出

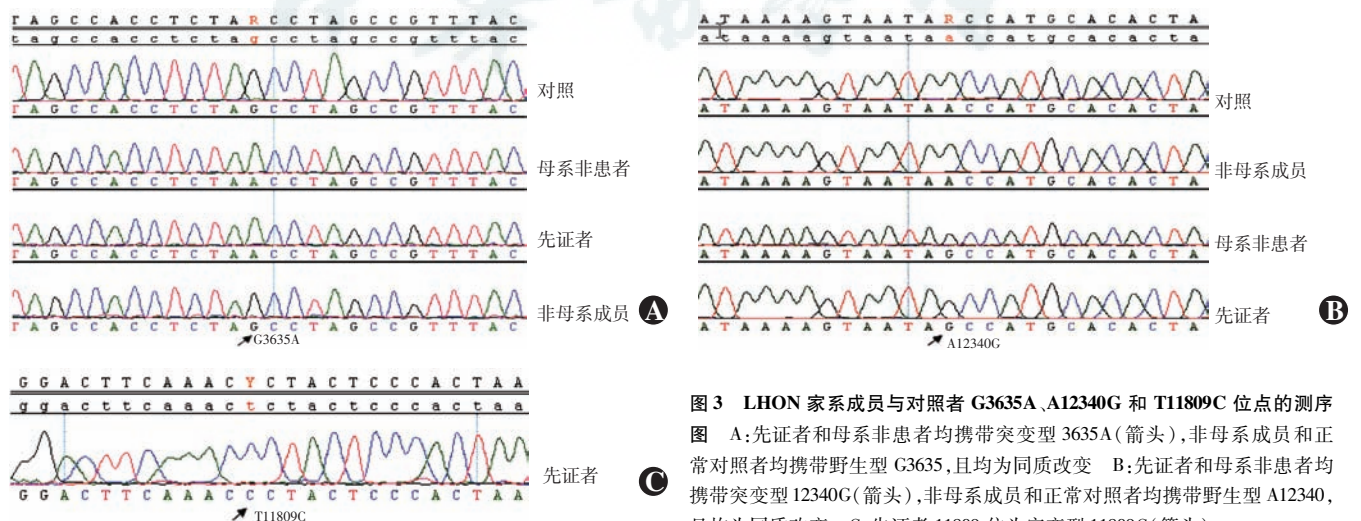


图 3 LHON 家系成员与对照者 G3635A、A12340G 和 T11809C 位点的测序图 A:先证者和母系非患者均携带突变型 3635A(箭头),非母系成员和正常对照者均携带野生型 G3635,且均为同质改变 B:先证者和母系非患者均携带突变型 12340G(箭头),非母系成员和正常对照者均携带野生型 A12340,且均为同质改变 C:先证者 11809 位为突变型 11809C(箭头)

表 4 覆盖整条 X 染色体 23 个标记的遗传距离、两点参数 LOD 值、两点及多点 NPL 值

标志物	遗传距离 (cM)	两点参数 LOD 值 θ						两点 NPL 值	P 值	多点 NPL 值	P 值
		0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5				
DXS1233	13.33	0.76	0.57	0.36	0.16	0.02	0.00	0.30	0.12	0.39	0.09
DXS7100	13.50	-4.89	0.17	0.21	0.13	0.04	0.00	0.05	0.30	0.38	0.09
DXS7107	13.50	-4.34	0.66	0.56	0.33	0.10	0.00	0.35	0.10	0.38	0.09
DXS1060	15.12	1.46	1.13	0.78	0.43	0.14	0.00	0.57	0.05	0.38	0.09
DXS996	15.66	-4.68	0.42	0.41	0.28	0.12	0.00	0.05	0.30	0.38	0.09
DXS1223	16.75	-4.36	0.65	0.55	0.33	0.10	0.00	0.35	0.10	0.38	0.09
DXS8051	17.29	-4.59	0.39	0.34	0.18	0.02	0.00	0.34	0.11	0.38	0.09
DXS987	22.18	-12.72	-1.28	-0.65	-0.34	-0.14	0.00	-0.02	0.60	-0.02	0.60
DXS1226	27.59	-5.24	0.48	0.39	0.18	0.01	0.00	0.10	0.20	-0.02	0.60
DXS1214	33.54	-10.89	-0.68	-0.31	-0.17	-0.08	0.00	-0.02	0.60	-0.02	0.60
DXS1068	37.33	-6.12	-0.65	-0.35	-0.18	-0.07	0.00	-0.02	0.60	-0.02	0.60
DXS993	42.21	-5.82	-0.23	-0.02	0.05	0.05	0.00	-0.00	0.60	-0.03	0.60
DXS991	52.50	-19.37	-0.97	-0.30	-0.03	0.05	0.00	-0.04	0.70	-0.04	0.70
DXS986	57.37	-9.15	-1.70	-0.74	-0.29	-0.07	0.00	-0.02	0.60	-0.02	0.60
DXS990	60.62	-5.88	-0.36	-0.05	0.06	0.07	0.00	-0.01	0.60	-0.02	0.60
DXS1106	66.58	0.04	0.01	-0.00	-0.01	-0.01	0.00	0.02	0.40	-0.03	0.60
DXS8055	70.91	0.43	0.35	0.27	0.18	0.10	0.00	0.20	0.20	-0.03	0.60
DXS1001	75.79	-12.68	-1.24	-0.62	-0.29	-0.11	0.00	-0.03	0.70	-0.04	0.70
DXS1047	82.07	-17.56	-1.37	-0.61	-0.25	-0.07	0.00	-0.04	0.70	-0.04	0.70
DXS1227	88.33	-11.87	-1.71	-0.82	-0.38	-0.13	0.00	-0.04	0.70	-0.04	0.70
DXS8043	94.22	-5.89	-0.56	-0.31	-0.17	-0.08	0.00	-0.02	0.60	-0.03	0.70
DXS8091	96.14	0.03	0.00	-0.01	-0.01	-0.01	0.00	0.02	0.40	-0.03	0.70
DXS1073	102.35	-13.28	-1.36	-0.71	-0.37	-0.16	0.00	-0.03	0.60	-0.03	0.60

注:18 个标志物来自 ABI PRISM® Linkage Mapping Set Version 2.5,5 个精细标志物来自 MARSHFIELD 数据库与 NCBI-uniSTS 数据库,其中遗传距离均来自 MARSHFIELD 数据库。DXS1233 至 DXS1223 之间共 6 个标志物,平均遗传距离为 0.68 cM LOD:优势对数比值比; NPL:非参数连锁分析值

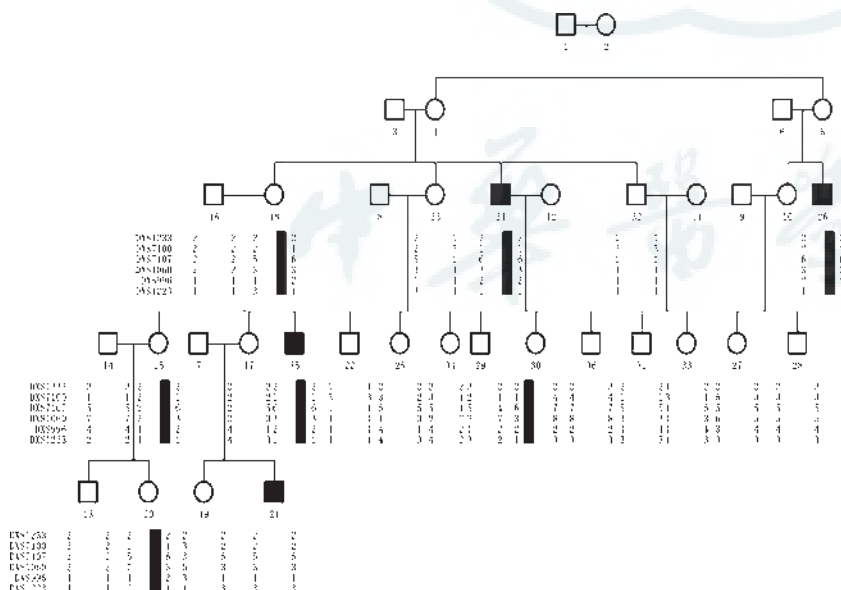


图 4 LHON 家系单体型图 此家系的 6 个标志物单倍体型分析图未发现共分离单倍体

LHON 存在线粒体-核基因双位点遗传模式的设想,即对于男性患者 X 染色体修饰基因与 LHON 的 mtDNA 突变同时遗传,女性患者需具备下列条件之一才能发

病,即 X 染色体纯合突变或 X 染色体杂合突变同时 X 染色体失活。因此,本研究推测该家系可能存在与 LHON 发病相关的基因位点,即 X 连锁修饰基因位点,从而解释本研究报道的家系中男性发病偏倚现象。

本研究中对 25 个 LHON 家系进行了分子生物学检测,其中 24 个携带 3 个原发突变中的 1 个,但是本研究中的 1 个安阳家系不携带任何 1 个原发突变,而且仅有男性发病,本研究对此家系进行分析。在本研究中,假设 LHON 为 X 染色体隐性遗传,两点参数连锁分析后 DXS1060 最大 LOD 值为 1.46,说明该位点可疑连锁,但是遗传距离更近的 5 个标记的两点 LOD 值均为负值,说明 DXS1060 可能是个假阳性结果,可能与所挑选的遗传标记信息量不够、参数设置不合理等原因有关。为此我们运用非参数方法进行两点及多点连锁分析,结果发现所有标记均无统计学意义,进一步表明 DXS1060 是个假阳性结果,此外单体型分析也未发现共分离单倍体型,排除了该家系中存在与 LHON 发病相关的 X 连锁修饰基因的可能性。本研究中首先用挑选 ABI PRISM® 链接映射集 2.5 版本中覆盖整条 X 染色体的 18 个微卫星荧光标志物,对家系内 24 个成员进行 X 染色体连锁分析,结果显示 DXS1060 附近 LOD 值为 1.46($\theta=0$),接近 2,提示 DXS1060 与 X 连锁修饰基因可能连锁。为了进一步证实其是否连锁,本研究选取了 5 个精细标志物进一步进行连锁分析,其结果仍为阴性。Shankar 等^[24]研究阳性连锁位点附近标志物间的平均遗传距离为 1.04 cM,所选取的标志物分布跨度大,本研究中所选取的精细标志物之间的平均遗传距离是 0.68 cM,且分布较均匀,因此本研究中所选取的精细标志物对连锁结果更有说服力。本研究中同时运用了参数分析和非参数分析 2 种方法对此家系进行连锁分析,结果均为阴性,比先前只用 1 种参数分析方法结果更为可信。本研究中进行 X 染色体连锁分析是对整条 X 染色体

进行全部扫描,然后再进一步精细定位,较其他研究仅挑选某些标志物进行扫描的方法更全面。

综上所述,本研究结果显示该仅有男性患病的汉族 LHON 家系同时携带 ND5 A12340G 和 ND1 G3635A2 个突变位点,其中 ND5 A12340G 突变位点为首次报道。X 染色体连锁分析结果证实,该家系 X 染色体上不存在与 LHON 发病相关的基因位点——X 连锁修饰基因位点,不支持 LHON 的线粒体-核基因双位点遗传模式,其男性发病和部分外显的机制尚需进一步探讨,该家系可能是由于线粒体-核基因双位点遗传模式及文献中报道的其他因素,如氰化物中毒、吸烟、饮酒、创伤应激、营养缺乏和 mtDNA 甲基化等多种因素导致的线粒体破坏综合影响所决定的^[24-29]。

参考文献

- [1] 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.
- [2] 高敏,张赛,张增君,等.线粒体 DNA T8821G 新变异与 Leber 遗传性视神经病变的相关性[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2015, 32(4): 485-489. DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-9406.2015.04.007. Gao M, Zhang S, Zhang ZJ, et al. A novel mutation T8821G in mitochondrial DNA may be associated with Leber's hereditary optic neuropathy[J]. *Chin J Med Genetics*, 2015, 32(4): 485-489. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-9406.2015.04.007.
- [3] Martínez-Romero Í, Herrero-Martín MD, Llobet L, et al. New MT-ND1 pathologic mutation for Leber hereditary optic neuropathy[J]. *Clin Exp Ophthalmol*, 2014, 42(9): 856-864. DOI:10.1111/ceo.12355.
- [4] Wray CD, Friederich MW, du SD, et al. A new mutation in MT-ND1 m.3928G>C p.V208L causes Leigh disease with infantile spasms[J]. *Mitochondrion*, 2013, 13(6): 656-661. DOI:10.1016/j.mito.2013.09.004.
- [5] Shidara K, Wakakura M. Leber's hereditary optic neuropathy with the 3434, 9011 mitochondrial DNA point mutation[J]. *Jpn J Ophthalmol*, 2012, 56(2): 175-180. DOI:10.1007/s10384-011-0106-3.
- [6] 黄旅珍,李天琦,王斌,等. Leber 遗传性视神经病变的临床特征及线粒体突变位点分析[J]. *中华实验眼科杂志*, 2016, 34(10): 920-924. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.10.012. Huang LZ, Li TQ, Wang B, et al. Clinical phenotype and maternal mutation analysis of Leber hereditary optic neuropathy[J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2016, 34(10): 920-924. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.10.012.
- [7] 田博,周和政,郑山根,等. Leber 遗传性视神经病变一家系的线粒体分子遗传学研究[J]. *中华实验眼科杂志*, 2012, 30(10): 936-940. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2012.10.019. Tian B, Zhou HZ, Zheng SG, et al. Mitochondrial molecular genetics for a pedigree with Leber hereditary optic neuropathy[J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2012, 30(10): 936-940. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2012.10.019.
- [8] 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.
- [9] Johns DR, Neufeld MJ, Park RD. An ND-6 mitochondrial DNA mutation associated with Leber hereditary optic neuropathy[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992, 187(3): 1551-1557.
- [10] 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.
- [11] Ryan SE, Ryan F, O'Dwyer V, et al. A real-time ARMS PCR/high-resolution melt curve assay for the detection of the three primary mitochondrial mutations in Leber's hereditary optic neuropathy[J]. *Mol Vis*, 2016, 22: 1169-1175.
- [12] Eustace RS, Ryan F, Barton D, et al. Development and validation of a novel PCR-RFLP based method for the detection of 3 primary mitochondrial mutations in Leber's hereditary optic neuropathy patients [J/OL]. *Eye Vis (Lond)*, 2015, 2: 18 [2016-08-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4657363/>. DOI:10.1186/s40662-015-0028-0.
- [13] Bu XD, Rotter JL. X chromosome-linked and mitochondrial gene control of Leber hereditary optic neuropathy: evidence from segregation analysis for dependence on X chromosome inactivation[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991, 88(18): 8198-8202.
- [14] Ji Y, Jia X, Li S, et al. Evaluation of the X-linked modifier loci for Leber hereditary optic neuropathy with the G11778A mutation in Chinese[J]. *Mol Vis*, 2010, 16: 416-424.
- [15] Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome[J]. *Nature*, 1981, 290(5806): 457-465.
- [16] Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, et al. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA [J/OL]. *Nat Genet*, 1999, 23(2): 147 [2016-08-20]. <http://www.nature.com/doi/10.1038/13779>. DOI:10.1038/13779.
- [17] Qu J, Li R, Zhou X, et al. The novel A4435G mutation in the mitochondrial tRNAMet may modulate the phenotypic expression of the LHON-associated ND4 G11778A mutation[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2006, 47(2): 475-483. DOI:10.1167/iovs.05-0665.
- [18] Wei QP, Zhou X, Yang L, et al. The coexistence of mitochondrial ND6 T14484C and 12S rRNA A1555G mutations in a Chinese family with Leber's hereditary optic neuropathy and hearing loss[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 357(4): 910-916. DOI:10.1016/j.bbrc.2007.04.025.
- [19] Brown MD, Zhadanov S, Allen JC, et al. Novel mtDNA mutations and oxidative phosphorylation dysfunction in Russian LHON families[J]. *Hum Genet*, 2001, 109(1): 33-39.
- [20] Yang J, Zhu Y, Tong Y, et al. Confirmation of the mitochondrial ND1 gene mutation G3635A as a primary LHON mutation[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 386(1): 50-54. DOI:10.1016/j.bbrc.2009.05.127.
- [21] Zhang AM, Zou Y, Guo X, et al. Mitochondrial DNA mutation m.3635G>A may be associated with Leber hereditary optic neuropathy in Chinese[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 386(2): 392-395. DOI: 10.1016/j.bbrc.2009.06.051.
- [22] Carelli V, Achilli A, Valentino ML, et al. Haplogroup effects and recombination of mitochondrial DNA: novel clues from the analysis of Leber hereditary optic neuropathy pedigrees[J]. *Am J Hum Genet*, 2006, 78(4): 564-574. DOI:10.1086/501236.
- [23] 杜利平,马旭,金学民. Leber 遗传性视神经病变 11778 突变家系异质性的研究[J]. *眼科研究*, 2009, 27(7): 582-586. Du LP, Ma X, Jin XM. Heteroplasmy of Leber's hereditary optic neuropathy families with 11778 mutation[J]. *Chin Ophthalm Res*, 2009, 27(7): 582-586.
- [24] Shankar SP, Fingert JH, Carelli V, et al. Evidence for a novel x-linked modifier locus for leber hereditary optic neuropathy[J]. *Ophthalmic Genet*, 2008, 29(1): 17-24. DOI:10.1080/13816810701867607.
- [25] Giordano L, Deceglie S, d'Adamo P, et al. Cigarette toxicity triggers Leber's hereditary optic neuropathy by affecting mtDNA copy number, oxidative phosphorylation and ROS detoxification pathways[J/OL]. *Cell Death Dis*, 2015, 6: e2021 [2016-08-10]. <http://www.nature.com/cddis/journal/v6/n12/full/cddis2015364a.html>. DOI: 10.1038/cddis.2015.364.
- [26] 张阿梅,姚永刚. Leber 遗传性视神经病变研究进展和挑战[J]. *遗传*, 2013, 35(2): 123-135. DOI:10.3724/SP.J.1005.2013.00123. Zhang AM, Yao YG. Research progress of Leber hereditary optic neuropathy[J]. *Hereditas*, 2013, 35(2): 123-135. DOI: 10.3724/SP.J.1005.2013.00123.
- [27] Procaccio V, Bris C, de la Barca JM C, et al. Perspectives of drug-based neuroprotection targeting mitochondria[J]. *Rev Neurol (Paris)*, 2014, 170(5): 390-400. DOI:10.1016/j.neuro.2014.03.005.
- [28] Kerrison JB, Miller NR, Hsu F, et al. A case-control study of tobacco and alcohol consumption in Leber hereditary optic neuropathy[J]. *Am J Ophthalmol*, 2000, 130(6): 803-812.
- [29] 张阳阳. Leber 遗传性视神经病变研究进展[J]. *中华实验眼科杂志*, 2015, 33(8): 755-759. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.08.018. Zhang YY. Research progress of Leber hereditary optic neuropathy[J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2015, 33(8): 755-759. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.08.018.

(收稿日期:2016-12-16)

(本文编辑:刘艳)