

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2012.01031

## 7 例携带线粒体 tRNA<sup>Ala</sup> C5601T 突变的 Leber 遗传性视神经病变家系的相关研究

周晖晖<sup>1,2</sup>, 戴显宁<sup>1,2</sup>, 林蓓<sup>1,2</sup>, 米慧<sup>1,2</sup>, 刘晓玲<sup>2</sup>, 赵福新<sup>2</sup>, 张娟娟<sup>2</sup>, 周翔天<sup>2</sup>, 孙艳红<sup>3</sup>, 韦企平<sup>3</sup>, 瞿佳<sup>2</sup>, 管敏鑫<sup>1,4</sup>

1. 温州医学院 Attardi 线粒体生物医学研究院和浙江省医学遗传学重点实验室, 温州 325035;
2. 温州医学院眼视光学院, 温州 325027;
3. 北京中医药大学东方医院眼科, 北京 100078;
4. 浙江大学生命科学学院, 杭州 310023

**摘要:** 文章收集了 7 例携带线粒体 tRNA<sup>Ala</sup> C5601T 突变的中国 Leber 遗传性视神经病变(Leber's hereditary optic neuropathy, LHON)的家系, 通过眼科检查和遗传学分析, 发现 7 个家系的外显率很低, 分别为 9.5%、14.3%、4.5%、8.3%、10.0%、22.2%和 25.0%。用 24 对有部分重叠的引物对 7 个先证者线粒体 DNA(Mitochondrial DNA, mtDNA)全序列进行扩增, 并进行相关的分子生物学分析, 结果发现这些家系均未携带 G11778A、G3460A 和 T14484C 这 3 个常见的原发突变位点, 而在 tRNA<sup>Ala</sup> 上发现了 C5601T 同质性突变, 多态性位点分析分别属于东亚线粒体单体型 G2、G2a1、G2a1、G2、G2b、G2a1、G2。C5601T 突变位于线粒体 tRNA<sup>Ala</sup> 的高度保守区(通用位点为 59 位), 可能引起 tRNA 空间结构和稳定性发生改变, 继而影响 tRNA 的代谢, 导致线粒体蛋白和 ATP 合成障碍, 最终导致视力损害。因此, tRNA<sup>Ala</sup> C5601T 突变可能是与 LHON 相关的线粒体突变位点。同时低外显率提示其他因素(包括核修饰基因、环境因素)可能影响这 7 个中国 C5601T 突变家系的表型表达。

**关键词:** Leber 遗传性视神经病变; 线粒体; 突变; 视力损害; tRNA

## The analysis of Leber's hereditary optic neuropathy associated with mitochondrial tRNA<sup>Ala</sup> C5601T mutation in seven Han Chinese families

ZHOU Hui-Hui<sup>1, 2</sup>, DAI Xian-Ning<sup>1, 2</sup>, LIN Bei<sup>1, 2</sup>, MI Hui<sup>1, 2</sup>, LIU Xiao-Ling<sup>2</sup>, ZHAO Fu-Xin<sup>2</sup>, ZHANG Juan-Juan<sup>2</sup>, ZHOU Xiang-Tian<sup>2</sup>, SUN Yan-Hong<sup>3</sup>, WEI Qi-Ping<sup>3</sup>, QU Jia<sup>2</sup>, GUAN Min-Xin<sup>1,4</sup>

1. Giuseppe Attardi Institute of Mitochondrial Biomedicine and Zhejiang Provincial Key Laboratory of Medical Genetics, School of Life Sciences, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China;

收稿日期: 2011-12-07; 修回日期: 2012-01-05

基金项目: 浙江省教育厅(编号: Y201017001), 温州市科技局(编号: Y20100114), 温州医学院眼视光创新引导课题(编号: YNCX201010)和温州医学院眼视光遗传实验室(编号: YNKT0503)资助

作者简介: 周晖晖, 在读硕士研究生, 专业方向: 遗传学。Tel: 13587433203; E-mail: readwood@gmail.com

通讯作者: 管敏鑫, 教授, 博士生导师, 研究方向: 人类遗传学和线粒体病。E-mail: gminxin88@gmail.com

2. School of Ophthalmology and Optometry, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325027, China;

3. Department of Ophthalmology, Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine and Pharmacology, Beijing 100078, China;

4. College of Life Science, Zhejiang University, Hangzhou 310023, China

**Abstract:** We reported here the clinical, genetic, and molecular characterization of Leber's hereditary optic neuropathy (LHON) with C5601T mutation in seven Chinese families. The ophthalmologic examinations of seven Chinese families who were clinically diagnosed LHON were conducted. Strikingly, these families exhibited very low penetrance of visual impairment, and the penetrance was 9.5%, 14.3%, 4.5%, 8.3%, 10.0%, 22.2% and 25.0%. Meanwhile, entire mitochondrial genome of seven probands was amplified by PCR using 24 pairs of oligonucleotide primers with overlapping fragments. Molecular analysis of mitochondrial DNA (mtDNA) in these pedigrees revealed the absence of three common LHON associated G11778A, G3460A and T14484C mutations but the presence of homoplasmic LHON associated tRNA<sup>Ala</sup> C5601T mutation in probands and other matrilineal relatives. These mtDNA polymorphism sites belongs to the Asian haplogroups G2, G2a1, G2a1, G2, G2b, G2a1 and G2. By analyzing mitochondrial genome, seven LHON families all carry the C5601T mutation. The C5601T mutation occurs at the highly conserved nucleotide (conventional position 59) of tRNA<sup>Ala</sup>, thereby contributing to the structural formation and stabilization of functional tRNAs and leading to mitochondrial dysfunction involved in visual impairment. The incomplete penetrance of visual loss in these seven Chinese pedigrees strongly indicates that the tRNA<sup>Ala</sup> C5601T mutation was itself insufficient to produce a clinical phenotype. The lack of functional mtDNA variants in these pedigrees ruled out the role of mitochondrial background in the phenotypic expression of visual loss. Therefore, nuclear backgrounds and environmental factors seem to be modifying factors for the phenotypic manifestation of the tRNA<sup>Ala</sup> C5601T mutation in the seven Chinese families.

**Keywords:** Leber's hereditary optic neuropathy; mitochondrial; mutation; visual impairment; tRNA

Leber遗传性视神经病变(Leber's hereditary optic neuropathy, LHON)是一种主要累及视网膜、巩膜筛板前部视乳头黄斑束纤维,导致视网膜神经节细胞退行性病变的母系遗传性疾病(即母系后代发病而父系后代不发病)。1871年德国眼科医生Theodor Leber首次报道该病的临床症状、体征和遗传特性。LHON表现为青壮年男性好发,发病年龄常在20~30岁,视力下降为后天引起。LHON患者可呈现轻度、中度、重度到极重度等不同程度的视力损伤。临床上主要表现为双眼同时或先后急性或亚急性无痛性视力减退,可同时伴有中心视野缺失及色觉障碍<sup>[1,2]</sup>,视力可在2年内渐进性下降,也可突然完全丧失,这不仅给病人造成了巨大的困难和痛苦,也给社会和家庭带来沉重负担。

1988年Wallace等<sup>[3]</sup>发现LHON家族中mtDNA *ND4* G11778A突变,揭示了线粒体DNA(Mitochondrial DNA, mtDNA)突变是LHON发病主要的分子基础,直到目前已发现50多个mtDNA突变位点与

LHON发病密切相关(<http://www.mitomap.org/>)。这些突变包括原发性和继发性两种,其中*ND1* G3460A、*ND4* G11778A 和*ND6* T14484C 3个突变位点是最主要的原发突变<sup>[4]</sup>,它们改变了进化中高度或中度保守的氨基酸。这种突变存在着明显的种族差异,在欧洲白人种中,携带3种mtDNA原发突变的群体中,仅50%的男性、10%的女性发病<sup>[5]</sup>。携带相同突变的不同家系和同一家系的不同家系成员之间LHON的外显率、表现度及发病年龄也有着显著的差异。这种不完全外显以及男性多发的现象表明还存在其他因素,如核基因、线粒体单体型和/或环境因素在发病过程中起着重要作用。为了进一步探究LHON的发病机制,我们在全中国范围内收集了大量的LHON家系,除上述3个原发性突变位点外,相继发现了tRNA<sup>Met</sup> A4435G、*ND4* G11696A、tRNA<sup>Thr</sup> A15951G、*ND1* T3394C、*ND1* T3866C、tRNA<sup>Glu</sup> A14693G突变与LHON相关<sup>[6-12]</sup>。本研究对7个有典型LHON临床特征的中国汉族家系进行了线粒体全基因组测序分

析,发现tRNA<sup>Ala</sup> C5601 突变可能是与LHON相关的线粒体突变位点。

## 1 对象与方法

### 1.1 研究对象

经温州医学院伦理道德委员会的许可,所有实验对象签署知情同意书。对患者及其亲属进行进一步详细的询问和临床眼科检查,结合家族遗传特征和临床表现,诊断为 LHON。采集这 7 个家系(图 1)先证者和母系成员的外周静脉血样 3 mL 进行检测,其中 WZ220、WZ221、WZ222 收集于北京东方眼科医院, WZ223、WZ224、WZ225、WZ226 收集于温州医学院附属眼视光医院。另外采集 104 名中国正常人血样作为对照。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 眼科检查

对该家族中的所有成员进行眼科检查,包括视力、眼底、色觉、视野和视觉诱发电位(VEP) 检查。病例纳入标准:①双眼视力损害程度 1 级以上(包括 1 级),不包括单眼正常的病例。视力的损害程度分级遵循标准:正常 0.3; 0.1 1 级<0.3; 0.05 2 级<0.1; 0.02 3 级<0.05; 4 级<0.02(参考世界卫生组织 1973 年视力损伤标准)。②具有典型的视神经萎缩临床表现。发病初期主要表现为视盘充血或水肿;视神经纤维层肿胀或萎缩,颞侧表现明显;荧光眼底

血管造影可见视乳头周围的浅层毛细血管扩张,但不渗漏荧光;视野检查常可发现中心暗点。③存在视力损伤家族史或不明原因的视神经萎缩。

#### 1.2.2 基因组 DNA 的提取

对家系先证者及母系成员抽取外周静脉血经 EDTA-K2 抗凝或制成血滤纸,用经典的酚-氯仿法提取全基因组 DNA。

#### 1.2.3 线粒体全基因组的扩增及测序

以提取的DNA为模板,首先对先证者及母系成员 3 个原发位点所在区域进行扩增。接着使用 24 对有部分重叠引物<sup>[13]</sup>对 3 个家系先证者线粒体基因组全序列进行扩增纯化和分析,复性温度为 54~58℃(根据不同引物优化)。PCR反应体系:DNA模板 20~50 ng, dNTP终浓度为 200 μmol/L, MgCl<sub>2</sub> 终浓度为 1.5 mmol/L, 引物终浓度为 0.1 μmol/L, TaKaRa Ex Taq 0.5 U/L。扩增产物使用 1%琼脂糖凝胶电泳,紫外光分析仪观察扩增的结果。PCR产物经 AxyPrep PCR Clean-up Kit纯化后送上海基康生物有限公司进行双向测序。

#### 1.2.4 数据分析

DNAstar软件包中的SeqMan对 24 对正反向测序结果进行拼接,再与修正的线粒体DNA剑桥参照序列比对<sup>[14]</sup>,查找突变位点;用ClustalX软件对测序结果进行保守性分析。同时,对家系其他成员和

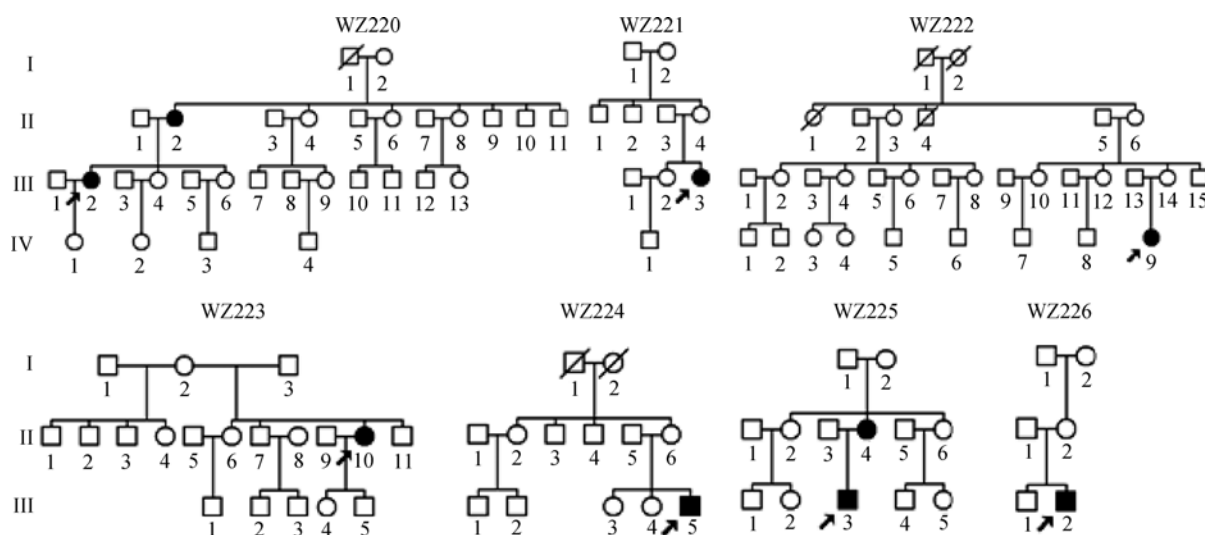


图 1 7 个 LHON 家系图

104 例正常对照血样进行扩增、测序并分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 临床表现

7 个家系色觉检查均正常。VEP 检查除 WZ220 家系显示 P100 波潜时延长, 振幅正常, 其余家系显示 P100 峰潜时延长, 振幅下降。家系 WZ221 和 WZ224 曾用激素治疗, 并无改善, 家系 WZ222 激素治疗后有好转。对 7 个家系其他母系成员进行全身系统检查除 WZ222 有多发性硬化病, 均未发现其他疾病, 具体见表 1。

### 2.2 线粒体全基因组分析

PCR 扩增并测序分析 7 个先证者及家系中其他母系成员的 *ND1*、*ND4*、*ND6* 这 3 个基因片段, 均未发现 G11778A、G3460A 和 T14484C 这 3 个原发突变位点。接着通过对家系先证者的线粒体全基因组进行扩增、测序和生物信息学分析, 发现 7 个先证者的 DNA 序列上携带共 88 个线粒体基因突变位点 (表 2), D-Loop 区 29 个, 12S rRNA 3 个, 16S rRNA 3 个, 蛋白编码区存在 59 个多态性位点, 包括 45 个同义突变和 14 个错义突变。错义突变包括: *ND1* 基因 T3593C(V96A), *CO2* 基因 T7652C(F23L), *ATP6* 基因 A8701G(T59A), T8705C(M60T), A8860G(T112A), G8921A(G132D), T9103C(F193L), *ND3* 基因 C10192T(S45F), A10398G(T114A), *ND4* 基因 C11151T(A131V), *ND6* 基因 A14418G(V86I), *Cytb* 基因 C14766T(T7I), A15326G(T194A), G15497A(G251S)。7 个先证者同时携带了 25 个相同的变异位点, 通过对人 (*Homo sapiens*)、牛 (*bos taurus*)、鼠 (*Mus musculus*)、爪蟾 (*Xenopus laevis*) 4 个不同物种进行保守性分析, 发现 25 个相同的变异位点中 A750G、A1438G、C5601T、A10398G 这 4 个变异位点在进化上相对保守。进一步研究发现 A750G、A1438、A10398G 在 104 例中国正常对照者中的突变频率分别为 100%、97.1%、51.9%, 而 C5601T 在 104 例中国正常对照者中不存在, 且这些变异位点除 tRNA<sup>Ala</sup> C5601T (图 2) 外, 均已报道<sup>[4]</sup>与 LHON 的发病无关。进一步对 17 个物种的 mtDNA 种系发生学进行分析, 发现 C5601T 的保守系数为 82.4% (图 3)。根据系统进化树分析发现, 7 个

先证者的 mtDNA 序列分别属于东亚线粒体单体型 G2、G2a1、G2a1、G2、G2b、G2a1、G2。

## 3 讨论

本研究的 7 个家系先证者尽管都具有相似的 LHON 临床表型, 但其视力损伤程度从轻度到重度不等, 发病年龄从 8 岁到 29 岁不等, 平均发病年龄 17 岁 (表 1), 除先证者有视力损害, 未发现其他临床疾病。这 7 个家系发病率较低, 分别为 9.5%、14.3%、4.5%、8.3%、10.0%、22.2%、25.0%。与 tRNA<sup>Met</sup> A4435G、*ND4* G11696A、tRNA<sup>Thr</sup> A15951G、*ND1* T3394C、*ND1* T3866C、tRNA<sup>Glu</sup> A14693G 突变的 中国汉族人家系外显率类似<sup>[6-12]</sup>。与欧洲白人 中, G11778A、T14484C、G3460A 这 3 个原发突变位点 LHON 平均外显率<sup>[4]</sup>相近。但与欧美白人 中 T4216C、A4917G、G9804A、G13708A、G15257A、G15812A、G7444A 等继发突变协同原发突变或其他继发突变影响 LHON 的外显率相比明显较低<sup>[15]</sup>。这 7 个家系 中携带相同突变的不同家系和有相同线粒体遗传背景 的同一家系的不同母系成员之间 LHON 外显率、表现度及发病年龄有着显著的差异, 这表明 C5601T 突变是视神经病变发病的分子基础, 但突变本身不足以造成 LHON 的表型表达, 提示其他修饰因子 (线粒体单体型、核修饰基因和环境因素) 在疾病的发生中起着一定的作用。

7 个家系的线粒体单体型分别属于 G2、G2a1、G2a1、G2、G2b、G2a1、G2。研究显示, 线粒体单体型可影响携带原发突变位点 LHON 家系的外显率和表现度。其中, T4216C、G13708A、G15257A 和 G15812A 突变常同时出现在 LHON 易感单体型 J<sup>[16]</sup>中。Vergani 等<sup>[17]</sup>对 mtDNA 单体型 J 上携带 G11778A 突变的转线粒体细胞系的呼吸功能研究证实, 其细胞氧消耗量较携带 G11778A 突变而非线粒体单体型 J 的要少。而单体型 K 对 G3460A 突变的表型表达也具有协同作用<sup>[18]</sup>。但单体型 H 能够降低携带 G11778A 突变的人群患 LHON 的风险。Howell 等<sup>[19]</sup>发现 mtDNA 单体型 H 也会协同 T14484C 突变而增加 LHON 的外显率。大部分 LHON 家系中男性发病率多于女性 (男性好发) 的现象提示 X 染色体上的核修饰基因在 LHON 的发生中起着重要作用<sup>[20-22]</sup>。但

表 1 7 个家系先证者的临床资料小结

临床资料	家系						
	WZ220	WZ221	WZ222	WZ223	WZ224	WZ225	WZ226
先证者	Ⅲ-2	Ⅲ-3	Ⅳ-9	Ⅱ-10	Ⅲ-5	Ⅲ-3	Ⅲ-2
其他患者	Ⅱ-2	无	无	无	无	Ⅱ-4	无
来源	湖北	浙江	河南	浙江	甘肃	河北	浙江
性别	女	女	女	女	男	男	男
检查年龄(岁)	33	22	12	32	15	25	16
发病年龄(岁)	29	18	10	8	15	25	14
右眼视力	0.1	CF/50cm	0.2	0.25	0.06	0.05	0.2
左眼视力	0.2	CF/50cm	0.2	0.75	0.05	0.05	0.2
右眼眼压(mmHg)	15.0	19.0	15.0	12.5	—	—	—
左眼眼压(mmHg)	15.0	11.0	15.0	10.0	—	—	—
视力下降	双眼渐进性同时视力下降	双眼视力同时骤降	双眼前后间隔 3 月突然下降	—	双眼同时渐进性视力下降	—	双眼视力同时下降
眼底检查	瞳孔对光反射减弱, 视盘正常, 视野中心暗点, 双眼视神经萎缩。	瞳孔对光反射减弱, 视盘色淡苍白, 视野周边缩小。	瞳孔对光反射存在。双眼视盘色淡, 双眼中心暗点, 边界清楚, 网膜血管未见异常, 黄斑组织清, 中心凹光反射可见。视野检查可见上方缺损。	视盘色淡, 双眼中心暗点, 双视乳头暗黄色, 双眼呈视神经萎缩状。	瞳孔对光反射存在。视盘边缘小血管扩张迂曲, 双眼中心暗点。	视盘色淡, 双眼中心暗点, 双视乳头暗黄色, 双眼呈视神经萎缩状。	瞳孔对光反射存在。视野检查发现在。视盘侧侧萎缩, 双眼中心暗点。
伴随症状	眼痛和运动障碍	眼痛	左下肢劳累后行动迟缓	受热或运动后视力下降, 光幻觉, 耳鸣, 眼痛, 运动障碍	无	无	无
视力损伤	中度	重度	轻度	轻度	重度	重度	轻度
诱发因素	无	高热	情绪不稳、疲劳	无	无	无	无
外显率(%)	9.5	14.3	4.5	8.3	10.0	22.2	25.0

表 2 7 个先证者线粒体 DNA 突变位点分析

基因	位点	氨基酸改变	保守(人/牛/小鼠/爪蟾)	修正的剑桥参考序列 <sup>[14]</sup>	家系								报道与否 <sup>a</sup>
					WZ220	WZ221	WZ222	WZ223	WZ224	WZ225	WZ226	WZ227	
D-loop	73	A-G		A	G	G	G	G	G	G	G	G	是
	152	T-C		T			C				C		是
	146	T-C		T				C		C			是
	189	A-C		A			C						是
	214	A-G		A								G	是
	263	A-G		A	G	G	G	G		G	G	G	是
	309	C-CC		C	CC								是
	310	T-CTC		T	CTC	CTC		CTC		C	TC	TC	是
	489	T-C		T	C	C	C	C		C	C	C	是
	523	A-Del		A			Del						是
	524	C-Del		C			Del						是
	16145	G-A		G	A								是
	16172	T-C		T					C		C		是
	16183	A-C		A								C	是
	16189	T-C		T								C	是
	16194	A-C		A								C	是
	16195	T-C		T								C	是
	16209	T-C		T		C							是
	16223	C-T		C	T	T	T	T	T	T		TC	是
	16227	A-G		A		G	G	G		G		G	是
	16233	A-G		A	G						G		是
	16272	A-G		A			G						是







续表 2

基因	位点	氨基酸改变	保守(人/牛/ 小鼠/爪蟾)	修正的剑桥 参考序列 <sup>[14]</sup>	家系								报道 与否 <sup>a</sup>
					WZ220	WZ221	WZ222	WZ223	WZ224	WZ225	WZ226	WZ227	
Leu(CUN) <i>ND5</i>	11914	G-A		G					A				是
	12280	A-G	A/G/A/A	A			G						是
	12423	A-G		A							G		是
	12705	C-T		C	T	T	T	T	T	T	T	T	是
	12747	A-G		A								G	是
<i>ND6</i>	13563	A-G		A	G	G	G	G	G	G	G	G	是
	13581	T-C		T							C		是
	13926	T-C		T		C							是
	14182	T-C		T							C		是
	14200	T-C		T	C	C		C		C		C	是
Glu <i>Cytb</i>	14418	C-T(Val86Ile)	V/K/W/S	C							T		否
	14569	G-A		G	A	A	A	A	A	A	A	A	是
	14683	A-G	A/A/A/C	A							G		否
	14766	C-T(Thr7Ile)	T/S/T/S	C	T	T	T	T	T	T	T	T	是
	14783	T-C		T	C	C	C	C	C	C	C	C	是
	14839	A-G		A		G							否
	14905	G-A		G							A		是
	15043	G-A		G	A	A	A	A	A	A	A	A	是
	15301	G-A		G	A	A	A	A	A	A	A	A	是
	15326	A-G(Thr194Ala)	T/M/I/I	A	G	G	G	G	G	G	G	G	是
	15497	G-A(Gly251Ser)	G/G/G/G	G	A								是

<sup>a</sup> 见线粒体基因组数据库网站: <http://www.mitomap.org> 和 <http://www.genpat.uu.se/mtDB/>。

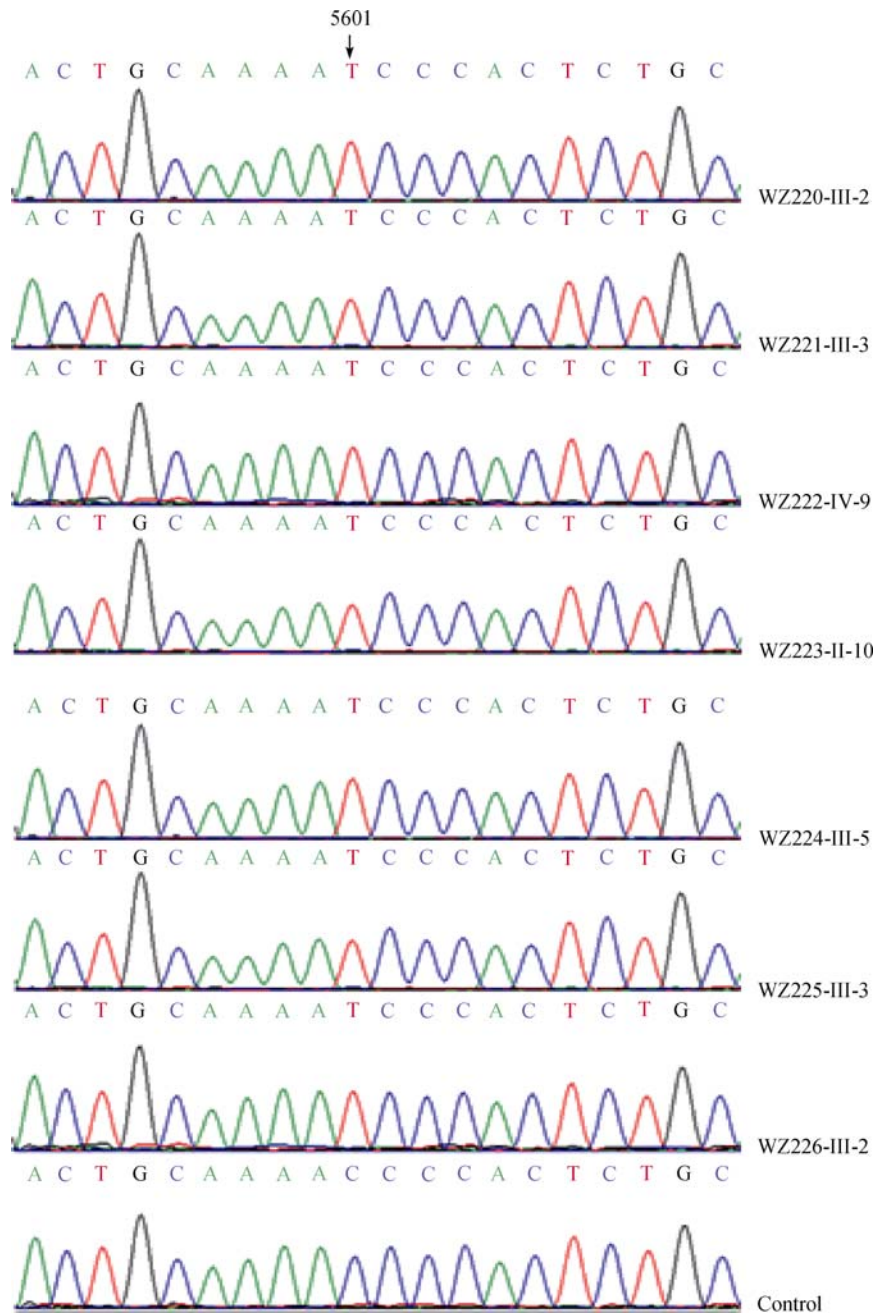


图 2 7 个先证者  $tRNA^{Ala}$  基因的部分测序峰图  
箭头所指为 C5601T 突变的位置。

本文 7 个家系不完全外显且家系成员男女发病率无明显差异提示可能存在常染色体上的核修饰基因对 LHON 的发病起修饰作用。但是迄今为止, 没有一个与 LHON 相关的核修饰基因被确定。

本研究对先证者线粒体全基因组分析发现的  $tRNA^{Ala}$  C5601T 同质性突变, 已报道与线粒体疾病发病可能相关。C5601T 突变位于  $tRNA^{Ala}$  T $\Psi$ C 环上

第 59 通用位点(图 4), T $\Psi$ C 环涉及 tRNA 与核糖体表面的结合。氨基酸接受茎、T $\Psi$ C 茎、D 茎、反密码茎间折叠成右手反平行双螺旋形成 tRNA 三级结构时, T $\Psi$ C 环参与三级结构氢键的形成。因此这个突变可能会通过影响 tRNA 与核糖体表面的结合, 影响 tRNA 二级结构的功能和稳定, 影响 tRNA 三级结构氢键的形成, 最终使得 tRNA 空间结构和功能稳定

	27	32	39	44	49	↓	61	66	73
<i>Cebus albifrons</i>	GTTGA	TTTGC	TCAAT	TGAT-	GCAAG	GTATAG-	TTTGC	AGTCC	A
<i>Cercopithecus aethiops</i>	GTTGA	TTTGC	TCAAT	TGAT-	GCAGA	GTAGGGT	TTTGC	AGTCC	A
<i>Colobus guereza</i>	ATTGA	TTTGC	TCAGT	TGAT-	GCAGA	GTAGAGT	TTTGC	AGTCC	A
<i>Gorilla gorilla</i>	GCTGA	TTTGC	TCAGT	TGAT-	GCAGA	GTAGGGT	TTTGC	AGTCC	A
<i>Homo sapiens</i>	GCTGA	TTTGC	TCAGT	TGAT-	GCAGA	GTGGGGT	TTTGC	AGTCC	A
<i>Hylobates lar</i>	ACTGA	TTTGC	TCGGT	TGAT-	GCAAA	GTGGGG-	TTTGC	AGTCC	G
<i>Lemur catta</i>	ATTGA	TTTGC	TCAGT	TGAT-	GTAAG	ATATAGT	CTTGC	AGTCC	A
<i>Macaca mulatta</i>	GTTGA	TTTGC	TCAAT	TGAT-	GCAGA	GTAGGTG	TTTGC	AGTCC	A
<i>Mus musculus</i>	AATTG	ATTTG	TTCAA	TAGAT	GTAGG	ATGAAGT	CTTAC	AGTCC	A
<i>Nycticebus coucang</i>	TAATT	GATTT	GTTCA	GTTGA	TGTAG	GAGAAGT	CTTGC	AGTCC	A
<i>Tarsius bancanus</i>	GCTAA	TTTGC	TTAGT	TGAT-	GTAGA	GTGAGTC	TTTGC	AGTCC	A
<i>Trachypithecus obscurus</i>	ACTGG	TTTGC	TCAGT	TGAT-	GCAGA	ATGAGGT	TCTGT	AGTCC	A
<i>Pan paniscus</i>	GCTGA	TTTGC	TCAGT	TGAT-	GCAGA	GTGGGGT	TTTGC	AGTCC	A
<i>Pan troglodytes</i>	GCTGA	TTTGC	TCAGT	TGAT-	GCAGA	GTGGGGT	TTTGC	AGTCC	A
<i>Papio hamadryas</i>	ATTGA	TTTGC	TCAGT	TGAT-	GCGGA	GTAGGTG	TCTGC	AGTCC	A
<i>Pongo pygmaeus</i>	GCTGA	TTTGC	TCAGT	TGAT-	GCAAA	GTGGGGT	TTTGC	AGTCC	A
<i>Pongo pygmaeus abelii</i>	GCTGG	TTTGC	TCAGT	TGAT-	GCAGA	GCGGGGC	TTTGC	AGTCC	A

图 3 17 个物种间 tRNA<sup>Ala</sup> 基因的保守性分析  
箭头所指为 C5601T 突变的位置。

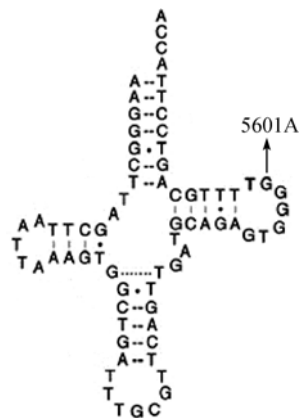


图 4 线粒体 tRNA<sup>Ala</sup> 二级结构图  
箭头所指为 C5601T 突变的位置。

性发生改变,继而影响 tRNA 的代谢,导致线粒体蛋白和 ATP 合成受损,引起疾病的发生。因此,tRNA<sup>Ala</sup> C5601T 突变可能是一个与 LHON 相关的线粒体基因突变位点。其他修饰因子,包括核修饰基因(包括 X 连锁易感基因和其他核修饰基因),线粒体继发突变和单体型,表观遗传因素以及环境因素(如吸烟、饮酒、药物的使用、饮食习惯以及毒物接触等),与之共同作用加重线粒体功能障碍,引起视网膜神经节细胞内 ATP 合成减少,同时,这些氧化磷酸化的缺陷导致大量活性氧(Reactive oxygen species, ROS) 的产生,因而损伤线粒体和细胞内的蛋白、脂类和核酸。而这些视网膜神经节细胞对 ROS 和氧化还原失衡比较敏感。从而造成细胞功能的丧失或细胞凋亡,导致视力障碍。

参考文献(References):

[1] Qu J, Guan MX. Molecular pathogenetic mechanism of Leber's hereditary optic neuropathy. *Chin J Optometry Ophthalmol*, 2006, 8(6): 341-348. DOI

[2] Man PY, Turnbull DM, Chinnery PF. Leber hereditary optic neuropathy. *J Med Genet*, 2002, 39(3): 162-169. DOI

[3] Wallace DC, Singh G, Lott MT, Hodge JA, Schurr TG, Lezza AM, Elsas LJ II, Nikoskelainen EK. Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic-neuropathy. *Science*, 1988, 242(4884): 1427-1430. DOI

[4] MITOMAP: A Human Mitochondrial Genome Database. <http://www.mitomap.org>,2009.

[5] Yen MY, Wang AG, Wei YH. Leber's hereditary optic neuropathy: a multifactorial disease. *Prog Retin Eye Res*, 2006, 25(4): 381-396. DOI

[6] Qu J, Li RH, Zhou XT, Tong Y, Lu F, Qian YP, Hu YW, Mo JQ, West CE, Guan MX. The novel A4435G mutation in the mitochondrial tRNA<sup>Met</sup> may modulate the phenotypic expression of the LHON-associated ND4 G11778A mutation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2006, 47(2): 475-483. DOI

[7] Qu J, Li RH, Zhou XT, Tong Y, Yang L, Chen J, Zhao FX, Lu CJ, Qian YP, Lu F, Guan MX. Cosegregation of the ND4 G11696A mutation with the LHON-associated ND4 G11778A mutation in a four generation Chinese family. *Mitochondrion*, 2007, 7(1-2): 140-146. DOI

[8] Li RH, Qu J, Zhou XT, Tong Y, Hu YW, Qian YP, Lu F, Mo JQ, West CE, Guan MX. The mitochondrial tRNA<sup>Thr</sup> A15951G mutation may influence the phenotypic expression of the LHON-associated ND4 G11778A mutation in a

- Chinese family. *Gene*, 2006, 376(1): 79–86. [DOI](#)
- [9] Liang M, Guan MQ, Zhao FX, Zhou XT, Yuan MX, Tong Y, Yang L, Wei QP, Sun YH, Lu F, Qu J, Guan MX. Leber's hereditary optic neuropathy is associated with mitochondrial *ND1* T3394C mutation. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 383(3): 286–292. [DOI](#)
- [10] 赵福新, 周翔天, 瞿佳, 韦企平, 童绎, 杨丽, 吕建新, 管敏鑫. 中国Leber遗传性视神经病变G11696A突变的两个家系分析. *中华医学遗传学杂志*, 2007, 24(5): 556–559. [DOI](#)
- [11] 刘燕, 庄淑流, 童绎, 瞿佳, 周翔天, 赵福新, 张娟娟, 张永梅, 章豫, 管敏鑫. 线粒体*ND1* 基因T3866C突变可能是Leber's遗传性视神经病和四肢畸形跛行相关的突变. *遗传*, 2010, 32(2): 141–147. [DOI](#)
- [12] 张永梅, 冀延春, 刘晓玲, 周翔天, 赵福新, 孙艳红, 韦企平, 张娟娟, 刘燕, 瞿佳, 管敏鑫. 线粒体tRNA<sup>Glu</sup> A14693G可能是与Leber遗传性视神经病变相关的基因突变. *遗传*, 2010, 32(4): 353–359. [DOI](#)
- [13] Zhao H, Li RH, Wang QJ, Yan Q, Deng JH, Han D, Bai Y, Young WY, Guan MX. Maternally inherited aminoglycoside-induced and nonsyndromic deafness is associated with the novel mutation in the mitochondrial DNA in a large Chinese family. *Chinese J Otolaryngology*, 2005, 3(1): 1–12. [DOI](#)
- [14] Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM, Howell N. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat Genet*, 1999, 23(2): 147. [DOI](#)
- [15] Brown MD, Torroni A, Reckord CL, Wallace DC. Phylogenetic analysis of Leber's hereditary optic neuropathy mitochondrial DNA's indicates multiple independent occurrences of the common mutations. *Hum Mutat*, 1995, 6(4): 311–325. [DOI](#)
- [16] Chen B, Sun D, Yang L, Zhang C, Yang A, Zhu Y, Zhao J, Chen Y, Guan M, Wang X, Li R, Tang X, Wang J, Tao Z, Lu J, Guan MX. Mitochondrial *ND5* T12338C, tRNA<sup>Cys</sup> T5802C, and tRNA<sup>Thr</sup> G15927A variants may have a modifying role in the phenotypic manifestation of deafness-associated 12S rRNA A1555G mutation in three Han Chinese pedigrees. *Am J Med Genet A*, 2008, 146A(10): 1248–1258. [DOI](#)
- [17] Vergani L, Martinuzzi A, Carelli V, Cortelli P, Montagna P, Schievano G, Carrozzo R, Angelini C, Lugaresi E. mtDNA mutations associated with Leber's hereditary optic neuropathy: studies on cytoplasmic hybrid (cybrid) cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, 210(3): 880–888. [DOI](#)
- [18] Hudson G, Carelli V, Spruijt L, Gerards M, Mowbray C, Achilli A, Pyle A, Elson J, Howell N, La Morgia C, Valentino ML, Huoponen K, Savontaus ML, Nikoskelainen E, Sadun AA, Salomao SR, Belfort R Jr, Griffiths P, Man PY, de Coe RF, Horvath R, Zeviani M, Smeets HJ, Torroni A, Chinnery PF. Clinical expression of Leber hereditary optic neuropathy is affected by the mitochondrial DNA-haplogroup background. *Am J Hum Genet*, 2007, 81(2): 228–233. [DOI](#)
- [19] Howell N, Herrnstadt C, Shults C, Mackey DA. Low penetrance of the 14484 LHON mutation when it arises in a non-haplogroup J mtDNA background. *Am J Med Genet A*, 2003, 119A(2): 147–151. [DOI](#)
- [20] Bu XD, Rotter JI. X chromosome-linked and mitochondrial gene control of Leber hereditary optic neuropathy: evidence from segregation analysis for dependence on X chromosome inactivation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88(18): 8198–8202. [DOI](#)
- [21] Hudson G, Keers S, Yu Wai Man P, Griffiths P, Huoponen K, Savontaus ML, Nikoskelainen E, Zeviani M, Carrara F, Horvath R, Karcagi V, Spruijt L, de Coe IF, Smeets HJ, Chinnery PF. Identification of an X-chromosomal locus and haplotype modulating the phenotype of a mitochondrial DNA disorder. *Am J Hum Genet*, 2005, 77(6): 1086–1091. [DOI](#)
- [22] Shankar SP, Fingert JH, Carelli V, Valentino ML, King TM, Daiger SP, Salomao SR, Berezovsky A, Belfort R Jr, Braun TA, Sheffield VC, Sadun AA, Stone EM. Evidence for a novel X-linked modifier locus for leber hereditary optic neuropathy. *Ophthalmic Genet*, 2008, 29(1): 17–24. [DOI](#)