

· 临床研究 ·

***SURF1* 基因突变导致 Leigh 综合征家系 1 例**

孙芳¹, 杨艳玲¹, 戚豫², 宋金青¹, 钱宁¹, 王朝霞³, 姜玉武¹, 肖江喜⁴, 王丽¹, 秦炯¹, 吴希如¹

(北京大学第一医院 1. 儿科; 2. 中心实验室; 3. 神经内科; 4. 医学影像科 北京 100034)

[摘 要] Leigh 综合征是一种由于线粒体氧化磷酸化障碍所导致的严重退行性脑病。常染色体 *SURF1* 基因突变所致细胞色素 C 氧化酶缺乏是导致 Leigh 综合征的常见原因, 国外已报道多种突变类型。该研究回顾了 1 例 *SURF1* 基因 604G > C 杂合性错义突变所致中国人 Leigh 综合征患者及其家系的临床与遗传学特点。患者, 女, 9 个月起病, 表现为喂养困难, 营养不良, 进行性运动倒退, 肌张力低下, 眼震。17 个月时来院就诊, 23 个月时死于呼吸衰竭。脑 MRI 显示双侧基底节对称性损害, 脑干、小脑萎缩。聚合酶链式反应扩增 *SURF1* 基因的全部外显子, 进行序列测定及限制性片断长度多态性分析均显示患者及其母亲、舅舅的 *SURF1* 基因的外显子 7 存在一个 604G > C 杂合性错义突变, 其父亲及正常对照的相关外显子序列未发现异常。该研究首次报道了 1 例中国人群中由于 *SURF1* 基因 604G > C 杂合性错义突变导致的 Leigh 综合征及其家系, 不仅明确了病因, 亦将有助于今后对患者家系的遗传咨询。
[中国当代儿科杂志, 2005, 7(2): 115-118]

[关 键 词] Leigh 综合征; *SURF1* 基因; 突变; 细胞色素 C 氧化酶

[中图分类号] R394; R442.8 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2005)02-0115-04

604G > C heterozygous mutation of *SURF1* identified in a Chinese pedigree with Leigh syndrome

Fang SUN, Yan-Ling YANG, Yu QI, Jin-Qing SONG, Ning QIAN, Zhao-Xia WANG, et al. Department of Pediatrics, First Hospital, Peking University, Beijing 100034, China (Yang Y-L, Email: yanlingy@sina.com)

Abstract: Leigh syndrome is a severe early-onset progressive neurodegenerative disorder due to mitochondrial oxidative phosphorylation defects. Nuclear *SURF1* mutations are the main causes of Cytochrome C oxidase deficiency resulting in Leigh syndrome. This study reviewed the clinical and genetic characteristics of a Chinese girl with Leigh syndrome due to 604G > C heterozygous mutation in *SURF1*. The female patient fell ill at age of 9 months, manifesting with feeding difficulty, malnutrition, progressive motor degeneration, hypotonia and nystagmus. She was hospitalized at 17 months and died of respiratory failure at 23 months. Her blood lactate and pyruvate levels detected during admission were significantly increased. Brain MR imaging showed characteristic focal, bilateral lesions in brain stem, thalamus, and basal ganglia. Brain stem and cerebellar atrophy were also found. Mitochondrial gene mutations were excluded. All of the exons of *SURF1* amplified by polymerase chain reaction (PCR) sequencing and PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) showed a 604G > C heterozygous mutation of *SURF1* in the proband. Her mother and uncle had the mutations of *SURF1* but no mutations were identified in her father and in 100 normal controls aged 14-18 years. This is the first reported case in China of Leigh syndrome due to 604G > C heterozygous mutation in *SURF1* and it will be helpful for the diagnosis of Leigh syndrome and genetic counseling of the patient's pedigree in future.

[Chin J Contemp Pediatr, 2005, 7(2): 115-118]

Key words: Leigh syndrome; *SURF1*; Mutation; Cytochrome C oxidase

Leigh 综合征 (Leigh syndrome), 又称亚急性坏死性脑脊髓病 (subacute necrotizing encephalopathy, SNE), 多见于婴幼儿, 因线粒体能量代谢障碍导致中枢神经系统进行性退行性损害, 临床表现复杂, 病理特征为脑基底节、脑干海绵样变性^[1,2]。线粒体

呼吸链复合物 IV, 即细胞色素 C 氧化酶 (cytochrome C oxidase, COX) 缺陷是造成 Leigh 综合征最常见的原因^[3-5], 其遗传方式是常染色体隐性遗传。其中 *SURF1* 基因缺陷是造成 COX 功能障碍的主要原因^[6,7]。迄今我国已有关于线粒体基因突变导致

[收稿日期] 2004-08-12; [修回日期] 2004-12-08

[基金项目] 北京大学人类疾病基因研究中心科研基金 (2001-02)、卫生部临床学科重点项目 (2001-0912) 资助项目。

[作者简介] 孙芳 (1979-), 女, 在读硕士。主攻方向: 神经遗传学。

[通讯作者] 杨艳玲, 北京大学第一医院儿科, 北京市西城区西安门大街 1 号, 邮编: 100034。

Leigh 综合征的报道^[2,8,9],但尚未见核基因突变导致 Leigh 综合征的报道。本文对 1 例 *SURF1* 基因突变所致 Leigh 综合征患者的临床经过及其家系基因分析结果进行研究。

1 对象与方法

1.1 对象

1.1.1 临床经过 先证者,女,因“营养不良,运动发育落后”于 1 岁 5 个月时来院。患儿为第 1 胎,足月剖宫产出生,出生体重 3 200 g,6 个月时会坐,9 个月内智力、运动、营养发育正常。9 个月起喂养困难,体重增加不良。1 岁时颈部向左斜,1 岁 1 个月后,进行性运动倒退,无力,双手抖动,认知无明显倒退。来院时竖头不稳,不能独坐,不会翻身。入院时体检:精神萎靡,重度营养不良貌,头围 46.5 cm,体重 7.3 kg,身长 71 cm。心、肺、腹部未见异常,四肢肌力差,肌张力低下,跟、膝腱反射活跃,双侧巴氏征阳性。血、尿常规分析未见异常。肝肾功能正常,血糖、血氨正常,血乳酸脱氢酶 280 IU/L(正常值 100~240 IU/L),羟丁酸脱氢酶 314 IU/L(正常值 90~220 IU/L),阴离子间隙 20.78 mmol/L(正常值 <16 mmol/L),乳酸 5.1 mmol/L(正常值 0.5~2.0 mmol/L), β 羟丁酸 0.60 mmol/L(正常值 0.03~0.30 mmol/L),丙酮酸 285 μ mol/L(正常值 30~100 μ mol/L)。血气分析:血 pH 值 7.335, BE -13.5 mmol/L,显示代谢性酸中毒。

1.1.2 脑 MRI 双侧基底节、脑干对称性局灶性损害(见图 1)。

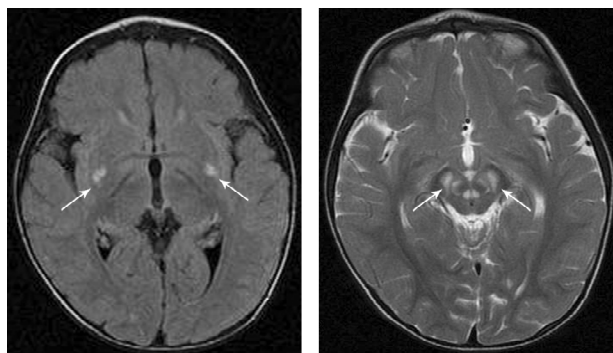


图 1 脑核磁共振成像
双侧基底节、脑干对称性局灶性坏死性病变

1.1.3 诊断与治疗 根据上述临床及影像结果, Leigh 综合征诊断成立^[2]。给予维生素 B₁、维生素 C、维生素 E、维生素 B₁₂、左旋肉碱、中链脂肪酸及饮食治疗。患儿全身情况一度改善,治疗 2 个月后会

坐,食欲提高,体重增加至 9 kg。23 个月时无明显诱因尖叫后突然呼吸停止,死亡。

1.1.4 家系调查 患儿父母健康,非近亲结婚,双方家族均无类似疾病史。

1.1.5 正常对照 100 例对照选自我院留取的正常人的标本,性别比为 1:1,年龄范围 14~18 岁,无惊厥病史和代谢异常。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 按 protease-NaCl 盐析法提取患者及其双亲和舅舅的基因组 DNA^[10]。同时,留取 100 名正常对照 DNA。

1.2.2 线粒体基因突变筛查 通过 PCR-限制性酶切分析方法^[8,9],检测患儿外周血白细胞线粒体基因 3243,8344,8993 位点无异常。

1.2.3 聚合酶链式反应 扩增该家系和 100 个正常人 *SURF1* 基因全部 9 个外显子。

PCR 反应体系和条件:50 μ L PCR 反应体系中,加入基因组 DNA 50 ng,正、反向引物各 0.3 mM,200 μ M 的 dNTPs,50 mmol/L Tris-HCl(pH 8.8),15~20 mmol/L MgCl₂,2.0 U Tag DNA 聚合酶。PCR 热循环条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min 后,94 $^{\circ}$ C 变性 40 s,退火(温度各不相同,见表 1)40 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,循环 43~45 次,最终以 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min,然后降至 4 $^{\circ}$ C 结束反应(icyclerTM Thermal cycler, Bio-Rad)。在外显子 1~2 的 PCR 体系中加入的 5M/L 甜菜碱和 50% 二甲基亚砷各 5 μ L。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳,通过 UV 凝胶成像系统(AlphamagerTM2200, Alpha Innotech Corporation)鉴定扩增结果。

表 1 5 对引物设计

外显子	引物序列(5'-3')	退火温度 ($^{\circ}$ C)	产物长度 (bp)
1-2	上游 AGCCCTCATCCCACTG	62	566
	下游 CCACGACAACCCCTTCAAAGT		
3-4	上游 TGGCTCCATGTCAGTGTGT	58	389
	下游 AGGGCTCTGCTGTTGAAGTCT		
5	上游 TGTGTAGTCTGCCACCTCA	58	355
	下游 GTTGGGATTGTGAAGGAAA		
6-7	上游 ACCCTCCCCACCTGAAGTAG	56	437
	下游 GACTGGGCAATGAGGGTTAG		
8-9	上游 CGCAAAAATGACAGCCACTA	63	459
	下游 TGAAACCAAGCCAGGATTTT		

1.2.4 测序 对扩增的患者及其父母、舅舅和 50 个正常对照(按突变分析的统计学要求)全部外

显子进行正反向测序(ABI3730 测序仪)。

1.2.5 PCR-限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)再证实:核酸内切酶 *Ava*II 识别序列为 G^A GWCC,酶切消化先证者及其父母、舅舅和另 50 个正常对照(按突变分析的统计学要求)外显子 6~7 片段,酶切体系:总体积 20 μ L, 酶 3U, 10 $\times$ buffer 2 μ L, BSA (10 μ g/ μ L) 0.2 μ L, PCR 产物 6 μ L, 37 $^{\circ}$ C 孵育 6 h, 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 硝酸银染色后观察结果。

2 结果

2.1 线粒体基因检测

3243, 8344, 8993 位点未见突变。

2.2 *SURF1* 基因检测

经测序证实患儿及母亲、舅舅在外显子 7 的 604 位发生 $G > C$ 的杂合性错义突变, 导致 *SURF1* 蛋白的 202 位氨基酸残基由酸性的天冬氨酸变成了碱性的组氨酸, 其余外显子序列正常。患儿父亲及正常对照的该位点未见异常(见图 2)。

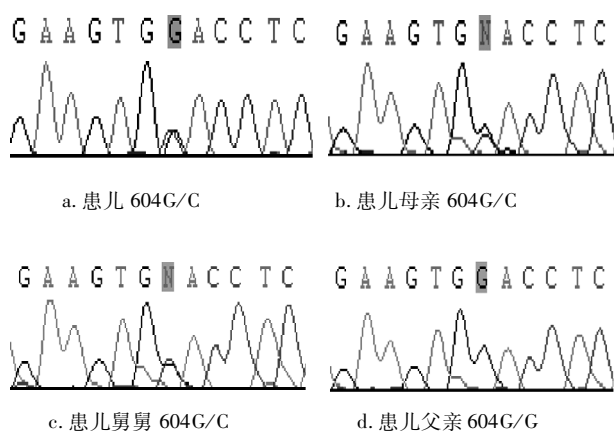


图 2 *SURF1* 基因检测

患儿及母亲、舅舅 *SURF1* 基因外显子 7 的 604 位点发生 $G > C$ 的杂合性错义突变, 患儿父亲该位点未见异常。

2.3 核酸内切酶水解扩增的外显子 6~7 片段

核酸内切酶 *Ava*II 识别位点为 G^A GWCC, 分别在正常核苷酸链的第 210 和第 368 位切断, 产生 209 bp, 158 bp, 70 bp 3 种片段。而在含有 604G $>$ C 突变核苷酸链上只在第 368 位切开, 只产生 367 bp 和 70 bp 2 种片段。患者及其母和舅均有 4 种片段: 367 bp, 209 bp, 158 bp, 70 bp, 说明该突变是杂合性突变。其父只有后 3 种片段, 没有 367 bp 片段(见图 3)。

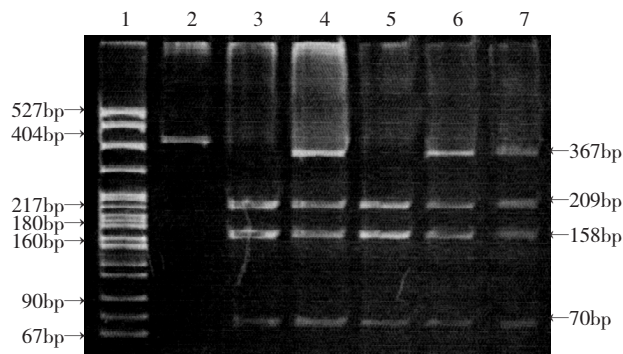


图 3 PCR-RFLP 分析

1. Marker (PBR322/*Msp*I); 2. 正常 exon 6-7 PCR 扩增产物(片段大小 437 bp); 3. 酶切后正常对照(片段大小 209、158 和 70 bp); 4. 患者; 5. 其父(片段大小 209、158 和 70 bp); 6. 其母; 7. 其舅(片段大小 367、209、158 和 70 bp)。

3 讨论

Leigh 综合征是一种高度致死性线粒体脑病, 临床表现复杂。经典婴儿型常于 1 岁以内起病, 发病前精神运动发育多正常, 主要表现为进行性精神运动倒退、无力、共济失调、惊厥、喂养困难、呕吐、呼吸异常、视力听力减退、眼球运动障碍及其它颅神经损害, 多于 2 岁内死亡^[1,2,11]。部分患者因发热、腹泻等诱因猝死。患者血液、脑脊液乳酸、丙酮酸水平多明显升高, 脑 CT、核磁分析等影像学检查常见双侧基底节、脑干对称性缺血缺氧样损害^[1,2,12]。本患儿于 9 个月起病, 喂养困难, 运动倒退, 曾经被诊断为“营养不良、脑性瘫痪”等疾病, 就诊过程曲折。

Leigh 综合征的遗传学机制复杂, 由 5 种酶复合物组成的呼吸链中, 除复合物 III 之外, 复合物 I, II, IV, V^[13] 以及丙酮酸脱氢酶复合物^[14] 功能障碍均可导致 Leigh 综合征。COX 是真核生物呼吸链的终末酶, 位于线粒体内膜, 由 13 个多肽亚单位组成, 其中 3 个是由线粒体 DNA 编码, 构成细胞色素 C 氧化酶的催化亚单位, 起电子传递和质子泵的功能; 其余 10 个由核 DNA 编码的亚单位, 可能起调节作用^[15]。COX 缺陷是常染色体隐性遗传, 临床表现和生化特点有相当大的异质性。

SURF1 基因突变是造成的 COX 缺陷的常见原因^[6,7]。从原核到真核生物都发现有 *SURF1* 基因的同源序列, 说明该基因有进化上的保守性^[16]。*SURF1* 基因位于 9q34.2, 基因组序列全长 4 695 bp, 共有 9 个外显子, mRNA 1037 bp, 蛋白有 300 个氨基酸。既往国外对 *SURF1* 的突变研究共发现了 40 种致病突变^[17], 其中有 35 种突变可导致 Leigh 综合征, 604G $>$ C 突变导致 *SURF1* 蛋白的第 202 位

氨基酸残基由酸性的天冬氨酸转变为碱性的组氨酸,保守的 *SURF1* 蛋白结构和功能发生改变,引起 COX 功能障碍,导致 Leigh 综合征的发生。Poyau 等^[14]已证实该突变为致病突变。此次我们在中国患者中首次找到该突变并得到家系结果,且在足够数量的正常人群中进行了该突变的筛查,排除了多态性的可能。证实该突变在中国人群有与西方人群同样的致病性。

本患者临床经过、生化分析及影像学检查结果符合 Leigh 综合征诊断,线粒体基因分析未见异常。经基因测序及 PCR-RFLP 分析证实患儿及其母亲和舅舅均携带有 *SURF1* 基因 604G > C 的杂合性错义突变,患儿父亲的 *SURF1* 基因序列正常,证实患儿携带的突变是从母亲遗传来的。患儿和母亲及舅舅同样携带有该位点的突变,但患儿的临床表现十分严重,而母亲和舅舅却正常。此现象的出现可能是与两条等位基因不等失活有关:患者的不含致病突变的那条等位基因可能失活,而含致病基因的那条等位基因发挥生物学功能,编码出有缺陷的 *SURF1* 蛋白,不能行使正常的生理功能,导致 Leigh 综合征的发生。而患者母亲和舅舅含致病突变的那条等位基因可能失活,正常的那条等位基因编码正常的 *SURF1* 蛋白,故不表现出致病性。还有可能是患儿存在另一种突变,虽然患儿其余外显子序列正常,也许在启动子区、调控区或内含子的剪切位点区域另有一个突变。

Leigh 综合征目前尚无有效的治疗方法,既往确诊多依靠死亡后病理分析。随着分子生物学研究的进步,很多患者可以通过外周血或组织基因分析获得诊断^[1,2]。本研究通过对 1 例 Leigh 综合征患者及其家系的基因分析,证实为 *SURF1* 基因的 604 位点突变导致 COX 缺陷,不仅明确了病因,同时也可为患者家系的遗传咨询、今后同胞的产前诊断提供帮助。

[参 考 文 献]

- [1] Leigh D. Subacute necrotizing encephalomyelopathy in an infant [J]. J Neurochem, 1951, 14(3): 216-221.
- [2] 姜玉武,黄奕辉,秦炯,袁云,戚豫,肖江喜,等. 儿童 Leigh 综

- 合征的临床、神经病理及分子遗传学研究 [J]. 中华儿科杂志, 2001, 39(6): 330-334.
- [3] Rahman S, Blok RB, Dahl HH, Danks DM, Kirby DM, Chow CW, et al. Leigh syndrome: clinical features and biochemical and DNA abnormalities [J]. Ann Neurol, 1996, 39(3): 343-351.
 - [4] Morris AA, Leonard JV, Brown GK, Bidouki SK, Bindoff LA, Woodward CE, et al. Deficiency of respiratory chain complex I is a common cause of Leigh disease [J]. Ann Neurol, 1996, 40(1): 25-30.
 - [5] Zeviani M, Bertagnolio B, Uziel G. Neurological presentations of mitochondrial diseases [J]. J Inher Metab Dis, 1996, 19(4): 504-520.
 - [6] Zhu Z, Yao J, Johns T, Fu K, De Bie I, Macmillan C, et al. *SURF1*, encoding a factor involved in the biogenesis of cytochrome c oxidase, is mutated in Leigh syndrome [J]. Nat Genet, 1998, 20(4): 337-343.
 - [7] Tiranti V, Hoertnagel K, Carrozzo R, Galimberti C, Munaro M, Granatiero M, et al. Mutations of *SURF1* in Leigh disease associated with cytochrome c oxidase deficiency [J]. Am J Hum Genet, 1998, 63(6): 1609-1621.
 - [8] 王朝霞,袁云,陈清棠,杨艳玲,张月华,戚豫. Leigh 综合征的线粒体 DNA 突变分析 [J]. 中华神经科杂志. 2003, 36(1): 28-31.
 - [9] 戚豫,姜玉武,杨艳玲,潘虹,王朝霞,袁云,等. 亚急性坏死性脑病的线粒体 DNA8993 位点突变 [J]. 中华医学遗传学杂志, 2000, 17(6): 445-446.
 - [10] Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells [J]. Nucleic Acid Res, 1988, 16(3): 1213.
 - [11] Valanne L, Ketonen L, Majander A, Suomalainen A, Pihko H. Neuroradiologic findings in children with mitochondrial disorders [J]. Am J Neuroradiol, 1998, 19(2): 369-377.
 - [12] Smeitink J, van den Heuvel L, DiMauro S. The genetics and pathology of oxidative phosphorylation [J]. Nat Rev Genet, 2001, 2(5): 342-352.
 - [13] DiMauro S, De Vivo DC. Genetic heterogeneity in Leigh syndrome [J]. Ann Neurol, 1996, 40(1): 5-7.
 - [14] Naito E, Ito M, Yokota I, Saijo T, Ogawa Y, Kuroda Y. Diagnosis and molecular analysis of three male patients with thiamine-responsive pyruvate dehydrogenase complex deficiency [J]. J Neurol Sci, 2002, 201(1-2): 33-37.
 - [15] Shoubridge EA. Cytochrome c oxidase deficiency [J]. Am J Med Genet. 2001, 106(1): 46-52.
 - [16] Poyau A, Buchet K, Godinot C. Sequence conservation from human to prokaryotes of *Surf1*, a protein involved in cytochrome c oxidase assembly, deficient in Leigh syndrome [J]. FEBS Lett. 1999, 462(3): 416-420.
 - [17] <http://uwcmlls.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/search/120394.html> [DB/OL], 2005-02-20.
 - [18] Poyau A, Buchet K, Bouzidi MF, Zabot MT, Echenne B, Yao J, et al. Missense mutations in *SURF1* associated with deficient cytochrome c oxidase assembly in Leigh syndrome patients [J]. Hum Genet. 2000, 106(2): 194-205.

(本文编辑:吉耕中)