

论著·疑难病研究

ND3 基因 10191T > C 突变导致的线粒体呼吸链复合物 I 缺陷

刘玉鹏¹ 马艳艳¹ 吴桐菲¹ 王峻¹ 孔庆鹏² 魏晓琼¹
张尧¹ 宋金青¹ 常杏芝¹ 张月华¹ 肖江喜³ 杨艳玲¹

(1. 北京大学第一医院儿科, 北京 100034; 2. 中科院昆明动物研究所分子进化与基因组多样性实验室, 云南 昆明 650223; 3. 北京大学第一医院医学影像科, 北京 100034)

[摘要] 目的 本文报道 1 例由于 ND3 基因突变导致线粒体呼吸链复合物 I 缺陷的患儿。该患儿自 6 岁起出现眼睑下垂、无力、癫痫及运动倒退, 呈进行性加重。血液乳酸、丙酮酸增高, 脑 MRI 示双侧基底节对称性损害, 符合 Leigh 综合征诊断。为明确病因, 提取患儿和父母的外周血白细胞线粒体蛋白, 进行氧化磷酸化酶复合物 I ~ V 活性测定, 并提取 DNA, 分析编码线粒体呼吸链复合物 I 的 7 个线粒体结构基因。结果显示患儿线粒体呼吸链复合物 I 活性为 33.1 nmol/min · 毫克线粒体总蛋白 (正常对照 44.0 ± 5.4 nmol/min · 毫克线粒体总蛋白), 复合物 I 与柠檬酸合酶活性比值为 19.8% (正常对照 48.1% ± 11.0%), 均降低。复合物 II ~ V 活性正常。患儿线粒体 ND3 基因 10191T > C 突变。其父母线粒体基因及呼吸链复合物酶活性正常。治疗后, 现患者 16 岁, 癫痫控制良好, 双下肢痉挛性瘫痪, 智力正常。通过外周血白细胞线粒体氧化磷酸化酶复合物活性测定及基因分析, 本研究首次诊断了编码线粒体呼吸链复合物 I 亚基的 ND3 基因 10191T > C 突变导致复合物 I 缺陷, 为 Leigh 综合征的发病原因提供依据。

[中国当代儿科杂志, 2012, 13(8): 561 - 566]

[关键词] Leigh 综合征; ND3 基因; 线粒体呼吸链复合物 I 缺陷; 儿童

[中图分类号] R596.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008 - 8830(2012)08 - 0561 - 06

Mitochondrial respiratory chain complex I deficiency due to 10191T > C mutation in ND3 gene

LIU Yu-Peng, MA Yan-Yan, WU Tong-Fei, WANG Qiao, KONG Qing-Peng, WEI Xiao-Qiong, ZHANG Yao, SONG Jin-Qing, CHANG Xing-Zhi, ZHANG Yue-Hua, XIAO Jiang-Xi, YANG Yan-Ling. Department of Pediatrics, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China (Yang Y-L, Email: organic.acid@126.com)

Abstract: This study reviews a case of mitochondrial respiratory chain complex I deficiency due to the 10191T > C mutation in mitochondrial ND3 gene. The previously healthy boy progressively presented with blepharoptosis, weakness, epilepsy and motor regression at age 6 years. Elevated blood lactate and pyruvate were observed. Brain magnetic resonance imaging showed symmetrical lesions in the basal ganglia. Leigh syndrome was thus confirmed. The protein from the mitochondria and genomic DNA of the boy and his parents was collected from peripheral blood leucocytes for the activity test for mitochondrial complex I to V and genetic analysis. The results showed the activity of complex I (33.1 nmol/min in 1 milligram mitochondrial protein) was lower than normal reference value (44.0 ± 5.4 nmol/min in 1 milligram mitochondrial protein). The ratio of complex I to citrate synthase (19.8%) was also lower than normal reference value (48% ± 11%). The activities of complexes II to V were normal. 10191T > C mutation in ND3 gene of mitochondria was identified in the boy. 10191T > C mutation and complex I deficiency were not detected in his parents. At present, he is 16 years old, and of normal intelligence with spastic paralysis in both lower extremities after treatment. It is concluded that a Chinese boy with isolated complex I deficiency due to 10191T > C mutation in ND3 gene was firstly diagnosed by peripheral leukocytes mitochondrial respiratory chain enzyme assay and gene analysis. This study can provide clinical data for the nosogenesis of Leigh syndrome.

[Chin J Contemp Pediatr, 2012, 13(8): 561 - 566]

Key words: Leigh syndrome; ND3 gene; Mitochondrial respiratory chain complex I deficiency; Child

[收稿日期] 2012 - 01 - 11 [修回日期] 2012 - 04 - 16

[基金项目] 国家十一五规划科技支撑计划重大项目 (No. 2006BAI05A07); 国家自然科学基金 (No. 30872794)。

[作者简介] 刘玉鹏, 女, 硕士, 医师。

[通信作者] 杨艳玲, 教授。

线粒体呼吸链缺陷是导致能量代谢障碍的一组相对常见疾病,国外研究发现呼吸链复合物 I 缺陷是线粒体呼吸链疾病的主要病因,患者可在各年龄段发病,以婴幼儿期发病居多,临床表型复杂^[1-2]。目前我国关于复合物 I 缺陷的报道很少,北京大学第一医院曾报道了 1 例线粒体 *ND5* 基因突变所导致的 Leigh 综合征^[3]。本文拟报道 1 例 *ND3* 基因突变导致的单纯复合物 I 缺陷病,并进行文献综述。

1 概述

1.1 病因及发病机制

线粒体呼吸链复合物 I 亦称烟酰胺腺嘌呤二核苷酸泛醌氧化还原酶,主要功能是将电子从还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)传递给辅酶 Q,完成 NADH 的氧化和辅酶 Q 的还原,在每传递一个电子的同时,向线粒体膜间隙中释放两个质子,在内膜两侧形成质子梯度,以电化学势能的形式将能量储存在线粒体内膜上^[3-4]。复合物 I 是线粒体呼吸链中结构最大最复杂的一个酶复合物,由 45 个不同亚基组成,其中 7 个亚基受线粒体基因(mitochondrial DNA, mtDNA)编码,其余 38 个亚基为核基因编码^[4-5]。因此,呼吸链复合物 I 缺陷有多种遗传方式,包括常染色体隐性遗传、X 连锁遗传和母系遗传。现已发现编码结构亚基和组装因子的 16 个核基因(其中包括 3 个组装因子编码基因)和 7 个线粒体基因的致病性突变^[4-5],已报道的突变中 mtDNA 突变所致的呼吸链复合物 I 缺陷病约占 20%^[6]。Martin 等^[7]和 Gerards 等^[8]取患者肌肉组织进行了线粒体呼吸链复合物活性测定,发现携带突变的纯合子患者酶活性约为正常对照的 25%~50%,而杂合子患者酶活性约为正常的 70%~90%。

1.2 临床表现

线粒体呼吸链复合物 I 缺陷常累及能量代谢旺盛的组织脏器,以神经肌肉为主,导致进行性神经系统损害,临床表现为精神运动发育迟缓、生长落后、共济失调、震颤、肌张力减弱、惊厥发作,一些患者合并心脏、消化系统损害^[8-9]。患者临床表型差异显著,主要包括脑病、心肌病、肌肉病、肝病,一些患者表现为临床综合征,如:Leigh 综合征、Leber 遗传性视神经病、Parkinson 病等^[10-12]。多数患者血液和/或脑脊液乳酸升高,少数患者仅在疾病发作期血液、脑脊液乳酸增高^[2]。虽然国外对复合物 I 缺陷进行了一系列临床研究,但未发现不同基因缺陷、不同程度的酶活性缺陷与临床表型间的相关性。

1.3 诊断与鉴别诊断

对于不明原因的智力运动落后或倒退、进行性神经肌肉损害、多脏器损害、代谢性酸中毒、血液或脑脊液乳酸、丙酮酸增高的患者,应注意线粒体病的可能,头颅影像学检查有助于了解脑损害情况及特征,判断临床表型^[13-15]。有研究报道约 30%~48%的复合物 I 缺陷患者表型为 Leigh 综合征,脑 MRI 扫描可见脑干、基底节、丘脑、小脑和脊髓局灶性对称性改变,少数患者存在脑白质病变和脑萎缩等^[2,16-17]。一些氨基酸、有机酸、脂肪酸代谢病也可以导致进行性神经精神损害及多脏器损害,应注意鉴别^[18-19]。

复合物 I 缺陷患者缺乏特异性的临床症状和体征,需要依靠线粒体呼吸链酶学活性检测和基因分析进行诊断。复合物 I 缺陷病因复杂,涉及很多核基因和线粒体基因,目前只发现了部分基因的相关致病突变,仍有大部分致病突变处于未知状态^[4-5],因此,基因检测不宜作为首选的诊断方法,线粒体呼吸链酶学分析是诊断线粒体复合物缺陷的关键。既往由于实验室技术难度所限,需要新鲜、足量的线粒体蛋白,国外机构多采用脑、肌肉、肝脏、肾脏、皮肤等组织或培养的细胞株^[6],儿科临床实施困难。我国只有少数患者通过组织病理和基因检测方法获得了线粒体病诊断^[3,20-21],绝大多数患者难以得到明确的病因诊断。

1.4 治疗

对于复合物 I 缺陷病目前尚无有效的治疗方法,现在临床上多以促进线粒体能量代谢、增加抗氧化能力以及营养支持治疗为主。左旋肉碱能通过增加氧化磷酸化功能并促进体内蓄积的毒性代谢产物的排出从而改善机体整体状况。实验室研究证实核黄素可以提高体外成纤维细胞的 ATP 合成能力^[22-23]。Ogle 等^[23]报道 1 例携带 3250T>C 突变的复合物 I 缺陷患者经核黄素治疗 3 年病情稳定。另外维生素 C、E 能清除体内氧自由基从而增强机体的抗氧化作用,而硫辛酸能促进线粒体内脂肪与糖的代谢^[22-23],但目前尚缺乏复合物 I 缺陷病病例的良好疗效的报道。

2 病例报告

2.1 病史

患儿,男,于 2003 年(8 岁时)来北京大学第一医院就诊。患儿自 6 岁起出现双眼睑下垂、四肢无力,在当地医院疑诊“重症肌无力”,经新斯的明治

疗后眼睑下垂一度缓解。随后出现运动倒退、易跌倒,间隔1~20 d出现1次全身性癫痫发作,服用奥卡西平后癫痫得到控制,运动障碍呈进行性加重。视力、听力正常,无头痛、呕吐、呛咳等异常。

患儿系第1胎第1产,足月顺产,出生体重2400 g,出生时有轻度窒息史。自幼体格瘦小,智力运动发育落后,7个月会坐,2岁会走。父母亲健康,否认近亲婚配,双方无类似疾病家族史。

2.2 体格检查

患儿神志清,问答切题,身高112 cm,体重23 kg,头围50 cm,心、肺和腹部体查未见异常。四肢肌张力增高,无震颤、痉挛步态,四肢肌力V级,无肌萎缩和肥大,膝腱反射亢进,Babinski征和Oppenheim征阳性。颅神经检查未见异常。

2.3 实验室检查

患儿血、尿常规,肝、肾功能均未见异常;血氨、肌酶、血气分析正常;血清乳酸含量为2.8 mmol/L(正常对照0.5~2.0 mmol/L),丙酮酸为130 μmol/L(正常对照30~100 μmol/L),均轻度增高。血液氨基酸、酯酰肉碱谱分析和尿液有机酸分析未见异常,可排除氨基酸、脂肪酸和有机酸代谢性疾病^[18-19]。腓肠肌肌肉病理显示轻度脂质沉积,未见破碎样红纤维。线粒体DNA点突变分析未检出3243A>G、8993T>G、8993T>C、8344A>G、13513G>A、13084A>T、10158T>C、11777C>A、14487T>C、12706T>C、9537insC和9176T>G突变^[24-26]。复合物IV相关核基因SURF1及丙酮酸脱氢酶复合物E1α亚单位相关PDHA1基因分析未见突变^[26-28]。

2.4 影像学检查

患儿发病初期(6岁时)头颅磁共振成像显示双侧基底节区可见长T1、T2异常信号,符合Leigh综合征诊断^[13-14,24]。现在(16岁)磁共振成像显示疾病无进展表现(图1)。髋关节X光片示右髋关节半脱位。

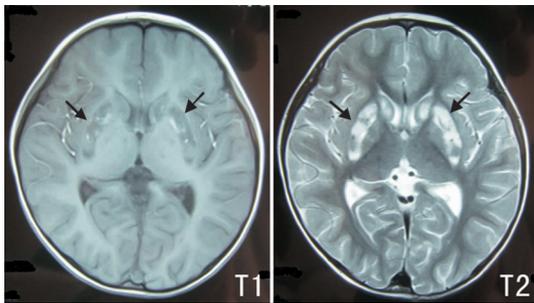


图1 患儿头颅MRI影像 箭头所示为双基底节区对称性长T1和长T2信号。

2.5 呼吸链酶复合物活性检测

检测方法参照文献^[29-31]。

2.5.1 提取外周血白细胞、分离线粒体 抽取患儿静脉血5 mL,肝素抗凝,加入10倍0.1 mM EDTA(pH 8)的裂解液,混匀,静置30 min,4000转/min离心20 min,沉淀用裂解液重悬,重复上述步骤3~4次,获得高纯度的白细胞。用匀浆缓冲液(25 mM蔗糖、75 mM甘露糖、50 μM EDTA-K、10 mM Tris-HCl, pH 7.2)重悬白细胞后匀浆,匀浆液低温离心20 min(600转/min),弃沉淀,上清液以10000 × g低温离心20 min,沉淀物即为制备待测的线粒体。

2.5.2 线粒体呼吸链复合物酶活性测定 复合物I活性测定:在pH 7.2的磷酸缓冲体系中加入终浓度为2 μg/mL抗霉素A、1 mM叠氮钠、100 μM辅酶Q以及20 mM NADH,充分混合后,加入线粒体蛋白启动反应,在340 nm处扫描10 min,分析底物NADH吸收峰的减少来计算复合物I总活力,再在上述体系中加入终浓度为2 μg/mL的鱼藤酮,测得非特异性酶活力,两者之差即为复合物I酶活性。

复合物II活性测定:在pH 7.2的磷酸缓冲体系中加入终浓度为2 μg/mL抗霉素A、1 mM叠氮钠、2 μg/mL鱼藤酮、100 μM辅酶Q、50 μM二氯酚靛酚以及20 mM琥珀酸钠,充分混合后,加入线粒体蛋白启动反应,在600 nm处扫描10 min,根据600 nm处二氯酚靛酚特征吸收峰的减少计算复合物II的酶活性。

复合物I + III活性测定:在pH 7.2的磷酸缓冲体系中加入终浓度为1 mM n-dodecyl-b-D-maltoside、2 mM氰化钾、20 mM NADH、40 μM氧化型细胞色素C、100 μM辅酶Q,充分混合后,加入线粒体蛋白启动反应,在550 nm处扫描10 min,根据550 nm处还原型细胞色素C特征吸收峰的增加来计算复合物I + III的酶活性。

复合物IV活性测定:在pH 7的磷酸缓冲体系中加入终浓度为1 mM n-dodecyl-b-D-maltoside和40 μM还原型细胞色素C,充分混合后,加入线粒体蛋白启动反应,在550 nm处扫描10 min,根据550 nm处还原型细胞色素C特征吸收峰的减少来计算复合物IV的酶活性。

复合物V(ATP合成酶)活性测定:在pH 8的Tris缓冲体系中加入终浓度为2 μg/mL抗霉素A、2.5 mM ATP、2 μg/mL鱼藤酮、0.5 mg/mL丙酮酸激酶、2.5 mM磷酸烯醇丙酮酸、0.5 mg/mL乳酸脱氢酶以及20 mM NADH,充分混合后,加入线粒体蛋白启动反应,在340 nm处扫描10 min,根据NADH

吸收峰值的降低计算出复合物V的总活性。再在上述体系中加入终浓度为10 mM 叠氮钠后可以得到非特异酶活性,总活性减去非特异酶活性即为复合物V的特异酶活性。

柠檬酸合酶活性测定:在pH 8的Tris缓冲体系中加入终浓度为100 μM DTNB,50 μM 乙酰辅酶A、0.1% (w/v) Triton X-100和250 μM 草酰乙酸,充分混合后,加入线粒体蛋白启动反应,在412 nm处扫描10 min,根据特征峰的增加计算柠檬酸合酶的酶活性。

2.5.3 线粒体呼吸链复合物活性比值计算 由于柠檬酸合酶存在于线粒体基质中,其活性可以间接地反映线粒体制备的完整性,因此,采用酶活性(nmol/min·毫克线粒体总蛋白)和活性比值(相应复合物的酶活性/柠檬酸合酶的活性)来综合反映相应复合物的酶活性^[29-31]。

2.6 线粒体呼吸链复合物活性检测结果

患儿呼吸链复合物I活性及与柠檬酸合酶活性比值均低于正常对照(表1),其余呼吸链复合物II、III、IV和V的活性均未发现异常。患儿父母酶活性正常。正常对照为200例健康志愿者,测定结果呈正态分布($P > 0.05$, K-S 检验),5种复合物酶活性值与柠檬酸合酶的活性比值结果亦符合正态分布,根据结果确定95%的正常参考值范围($\bar{x} \pm 1.96s$)^[29]。

表1 患儿线粒体呼吸链复合物活性和相关基因分析

检测项目	患者	正常对照
复合物活性(nmol/min)		
复合物I	33.1	44.0 ± 5.4
复合物II	50.3	47.3 ± 5.3
复合物I + III	96.1	84.4 ± 28.5
复合物IV	68.6	54.1 ± 12.3
复合物V	110.2	103.7 ± 29.2
复合物活性与柠檬酸合酶活性比值(%)		
复合物I/柠檬酸合酶活性比	19.8	48.1 ± 11.0
复合物II/柠檬酸合酶活性比	61.4	50.9 ± 10.7
复合物I + III/柠檬酸合酶活性比	82.3	66.1 ± 14.7
复合物IV/柠檬酸合酶活性比	60.2	58.8 ± 16.5
复合物V/柠檬酸合酶活性比	56.7	43.4 ± 13.4
基因分析		
<i>SURF1</i> 基因突变	阴性	阴性
<i>PDHA1</i> 基因突变	阴性	阴性
线粒体基因突变	10191T > C	阴性

2.7 复合物I相关线粒体基因分析

采用直接测序法^[32-34]分析编码线粒体呼吸链复合物I结构亚基的7个线粒体基因(*ND1*、*ND2*、*ND3*、*ND4*、*ND4L*、*ND5*和*ND6*),发现患儿携带*ND3*

基因10191 T > C 突变^[32-34],见图2。同时用限制性内切酶法(内切酶 *AccI*)分析患儿父母基因未发现突变,见图3。

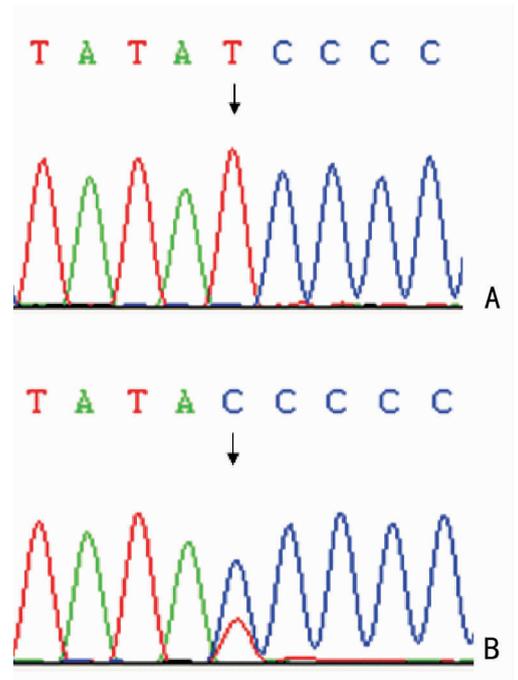


图2 基因测序图 A:正常对照;B:患儿突变型。患儿携带*ND3*基因10191T > C突变。

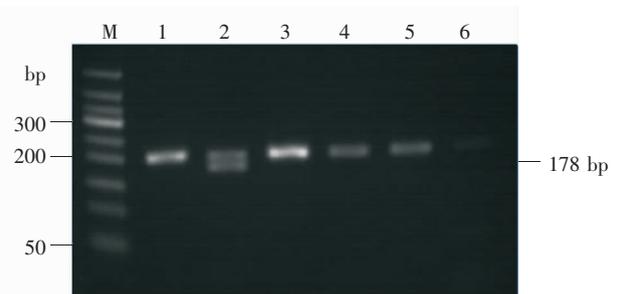


图3 线粒体*ND3*基因10191 T > C突变的家系PCR-RFLP分析结果 M:marker;1:父亲;2:患者;3:母亲;4:PCR产物;5:正常对照;6:阴性对照。其中以ddH₂O代替DNA模板的反应作为阴性对照;经内切酶*AccI*酶切后,野生型仅出现一个条带,产物长度为201 bp;突变型则分解为两个条带,产物长度分别为178 bp和23 bp。

2.8 诊断、治疗与随访

患儿主要表现是运动倒退和癫痫,血液乳酸和丙酮酸增高,头颅磁共振成像显示双侧基底节病变,符合Leigh综合征诊断^[14,20]。外周血白细胞线粒体呼吸链复合物酶活性检测显示患儿线粒体呼吸链复合物I活性下降,经基因检测证实为编码复合物I的*ND3*基因10191 T > C突变,导致线粒体呼吸链复合物I功能缺陷。给予维生素B₁ 90~300 mg/d,分次口服;左旋肉碱1 g/d;辅酶Q₁₀ 60 mg/d;维生素C

300 mg/d; 维生素 E 100 mg/d; 限制糖类、淀粉类等高碳水化合物食品, 鼓励肉类、奶类及豆类食物。现在患儿 16 岁, 体重 57 kg, 病情相对稳定, 癫痫控制良好, 6 年未发作。头颅磁共振成像较 8 年前无明显进展。

3 讨论

呼吸链复合物 I 缺陷是线粒体疾病的主要病因, 约占氧化磷酸化障碍性疾病的 30% 左右^[1-2, 11]。患者临床表型多样, 从婴幼儿早期发病的致死性脑病到成年期起病的神经退行性疾病, 有许多交叉重叠现象, 仅借助于临床表现很难确诊。Lebon 等^[35]对已确定的呼吸链复合物 I 缺陷患者, 进行了编码复合物 I 的线粒体基因序列分析, 基因诊断阳性结果为 20%, 提示在线粒体呼吸链疾病的诊断中, 基因检测应该建立在准确的呼吸链酶学分析的基础上。

线粒体呼吸链酶学分析是诊断线粒体病的关键诊断技术, 线粒体酶活性基因表达存在显著的组织异质性, 与肌肉、脏器、皮肤等组织相比, 外周血白细胞中线粒体蛋白含量较低, 技术难度较大, 但容易获得, 适于儿童临床^[36]。本例患者通过外周血白细胞线粒体呼吸链酶活性分析获得了病因诊断。

Leigh 综合征是儿童线粒体病的常见临床表型, 复合物 I 缺陷是导致 Leigh 综合征最常见的病因^[2, 17], Morris 等^[17]证实呼吸链复合物 I 缺陷中最常见的表型为 Leigh 综合征, 达 48%。关于编码呼吸链复合物 I 结构 45 个亚基的 13 个核基因和 7 个线粒体基因, 国外已有多种类型的致病突变报道, 其中 *ND5* 基因突变被认为是呼吸链复合物 I 缺陷的常见病因^[33], 北京大学第一医院也发现了相关病例^[3]。2001 年 Taylor 等^[34]首次报道了携带 *ND3* 基因 10191T > C 突变的复合物 I 活性缺陷患者, 突变使亲水的丝氨酸转化为疏水的脯氨酸 (S45P), 导致复合物 I 蛋白质折叠障碍, 酶活性降低至正常对照的 40%。McFarland 等^[37]和 Leshinsky-Silver 等^[38]随后报道了复合物 I 缺陷患者的 *ND3* 基因 10191T > C 突变, 认为 10191T > C 突变可能导致 *ND3* 亚基功能不稳定或丧失。

本病例主要表现为运动倒退、无力和癫痫, 病情呈进行性加重, 血乳酸和丙酮酸升高, 头颅磁共振检查符合 Leigh 综合征诊断。外周血白细胞线粒体呼吸链复合物活性分析显示复合物 I 缺陷, 线粒体基因检测发现 *ND3* 基因 10191T > C 突变, 两种诊断

结果吻合, 首次确诊了 *ND3* 基因突变导致的单纯线粒体呼吸链复合物 I 缺陷病的中国儿童病例。与国外报道相比, 患者发病较晚, 临床症状较轻, 与呼吸链复合物 I 活性轻度缺陷相一致。

本病例自 6 岁起病, 最初临床表现为眼睑下垂, 随着疾病进展为进行性运动障碍、双下肢痉挛性瘫痪、癫痫, 但智力无明显损害, 曾被诊断为“重症肌无力、癫痫、神经变性病”, 脑 MRI 显示双侧基底节对称性损害, 考虑遗传代谢病、Leigh 综合征的可能。脑基底节损害是线粒体病、肝豆状核变性、多种有机酸及脂肪酸代谢病共有的影像改变, 需依靠生化、酶学、基因分析进行鉴别诊断。本病例最终通过线粒体呼吸链复合物酶活性分析, 在发现复合物 I 活性降低的基础上, 锁定基因分析目标, 发现了致病基因突变。建议对肌无力、癫痫和神经变性病的患儿注意遗传代谢病的可能, 若 MRI 发现双侧基底节对称性病损时, 应考虑 Leigh 综合征, 进一步鉴别诊断。

线粒体呼吸链复合物 I 缺陷病是能量代谢障碍性疾病的主要病因, 确诊参考临床表现、血清生化检查、头颅 MRI、线粒体呼吸链酶活性分析和基因检测等多角度, 酶学分析是关键技术, 既能明确病因, 同时还可以指导基因分析, 缩小致病突变筛查范围, 提高基因诊断的准确率, 有助于深入全面的认识此类疾病。

[参 考 文 献]

- [1] Kirby DM, Crawford M, Cleary MA, Dahl HH, Dennett X, Thorburn DR. Respiratory chain complex I deficiency: an underdiagnosed energy generation disorder[J]. *Neurology*, 1999, 52(6): 1255-1264.
- [2] Loeffen JL, Smeitink JA, Trijbels JM, Janssen AJ, Triepels RH, Sengers RC, et al. Isolated complex I deficiency in children: clinical, biochemical and genetic aspects[J]. *Hum Mutat*, 2000, 15(2): 123-134.
- [3] 魏晓琼, 孔庆鹏, 张尧, 杨艳玲, 常杏芝, 戚豫, 等. 线粒体基因 13513G > A 突变导致呼吸链酶复合物 I 缺陷 Leigh 综合征[J]. *中国当代儿科杂志*, 2009, 11(5): 333-336.
- [4] Carroll J, Fearley IM, Skehel JM, Shannon RJ, Hirst J, Walker JE. Bovine complex I is a complex of 45 different subunits[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(43): 32724-32727.
- [5] Fernandez-Vizarra E, Tiranti V, Zeviani M. Assembly of the oxidative phosphorylation system in humans; what we have learned by studying its defects[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1793(1): 200-211.
- [6] Kirby DM, McFarland R, Ohtake A, Dunning C, Ryan MT, Wilson C, et al. Mutations of the mitochondrial *ND1* gene as a cause of MELAS[J]. *J Med Genet*, 2004, 41(10): 784-789.
- [7] Martin MA, Blazquez A, Gutierrez-Solana LG, Fernandez-Moreira D, Briones P, Andreu AL, et al. Leigh syndrome associated with mitochondrial complex I deficiency due to a novel mutation in the *NDUFS1* gene[J]. *Arch Neurol*, 2005, 62(4): 659-661.

- [8] Gerards M, Sluiter W, van den Bosch BJ, de Wit LE, Calis CM, Frentzen M, et al. Defective complex I assembly due to C20orf7 mutations as a new cause of Leigh syndrome[J]. *J Med Genet*, 2010, 47(8): 507-512.
- [9] von Kleist-Retzow JC, Cormier-Daire V, de Lonlay P, Parfait B, Chretien D, Rustin P, et al. A high rate (20%-30%) of parental consanguinity in cytochrome-oxidase deficiency[J]. *Am J Hum Genet*, 1998, 63(2): 428-435.
- [10] Pitkanen S, Feigenbaum A, Laframboise R, Robinson BH. NADH-coenzyme Q reductase (complex I) deficiency: heterogeneity in phenotype and biochemical findings[J]. *J Inher Metab Dis*, 1996, 19(5): 675-686.
- [11] Robinson BH. Human complex I deficiency: clinical spectrum and involvement of oxygen free radicals in the pathogenicity of the defect[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1364(2): 271-286.
- [12] 王红梅, 邹丽萍. 线粒体病与婴儿痉挛症的关系[M]. 国外医学. 儿科学分册, 2004, 31(4): 214-216.
- [13] 袁云, 陈清棠, 戚豫, 王朝霞, 吴丽娟, 张月华, 等. Leigh综合症的病理和基因(附4例报告)[J]. *中国神经精神疾病杂志*, 2001, 27(6): 421-423.
- [14] 姜玉武, 黄奕辉, 秦炯, 袁云, 戚豫, 肖江喜, 等. 儿童Leigh综合症的临床、神经病理及分子遗传学研究[J]. *中华儿科杂志*, 2001, 39(6): 330-334.
- [15] 方方, 马祎楠, 王晓慧, 王旭, 丁昌红, 邹丽萍, 等. 线粒体脑肌病伴乳酸血症和卒中样发作综合症的临床特征及遗传学研究[J]. *中国循证儿科杂志*, 2008, 3(3): 169-176.
- [16] Bugiani M, Invernizzi F, Alberio S, Briem E, Lamantea E, Carrara F, et al. Clinical and molecular findings in children with complex I deficiency[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1659(2-3): 136-147.
- [17] 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.
- [18] 杨艳玲, 宋金青, 孙芳, 张月华, 包新华, 钱宁, 等. 气相色谱-质谱联用分析在有机酸尿症筛查与诊断中的应用[J]. *中国医刊*, 2006, 41(2): 38-40.
- [19] 顾学范, 韩连书, 高晓岚, 杨艳玲, 叶军, 邱文娟. 串联质谱技术在遗传性代谢病高危儿童筛查中的初步应用[J]. *中华儿科杂志*, 2004, 42(6): 401-404.
- [20] Yang YL, Sun F, Zhang Y, Qian N, Yuan Y, Wang ZX, et al. Clinical and laboratory survey of 65 Chinese patients with Leigh syndrome[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2006, 119(5): 373-377.
- [21] Zhang Y, Yang YL, Sun F, Cai X, Qian N, Yuan Y, et al. Clinical and molecular survey in 124 Chinese patients with Leigh or Leigh-like syndrome[J]. *J Inher Metab Dis*, 2007, 30(2): 265.
- [22] Bar-Meir M, Elpeleg ON, Saada A. Effect of various agents on adenosine triphosphate synthesis in mitochondrial complex I deficiency[J]. *J Pediatr*, 2001, 139(6): 868-870.
- [23] Ogle RF, Christodoulou J, Fagan E, Blok RB, Kirby DM, Seller KL, et al. Mitochondrial myopathy with tRNA(Leu(UUR)) mutation and complex I deficiency responsive to riboflavin[J]. *J Pediatr*, 1997, 130(1): 138-145.
- [24] 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.
- [25] 王朝霞, 袁云, 陈清棠, 杨艳玲, 张月华, 戚豫. Leigh综合症的线粒体DNA突变分析[J]. *中华神经科杂志*, 2003, 36(1): 28-31.
- [26] 张尧, 孙芳, 孔庆鹏, 魏晓琼, 戚豫, 张英, 等. Leigh综合征患儿核基因和线粒体基因突变的初步分析[J]. *临床儿科杂志*, 2008, 26(12): 1021-1025.
- [27] 孙芳, 杨艳玲, 戚豫, 王朝霞, 袁云, 宋金青, 等. SURF1基因604G→C杂合性错义突变所致Leigh综合征患儿的临床与分子遗传学研究[J]. *中华神经科杂志*, 2005, 38(9): 560-564.
- [28] 张尧, 孙芳, 杨艳玲, 常杏芝, 戚豫, 齐朝月, 等. 丙酮酸脱氢酶E1 α 亚单位缺陷导致Leigh综合征[J]. *中国当代儿科杂志*, 2007, 9(3): 216-219.
- [29] Ma YY, Zhang XL, Wu TF, Liu YP, Wang Q, Zhang Y, et al. Analysis of the mitochondrial complex I-V enzyme activities of peripheral leukocytes in oxidative phosphorylation disorders[J]. *J Child Neurol*, 2011, 26(8): 974-979.
- [30] 马艳艳, 吴桐菲, 刘玉鹏, 王娇, 宋金青, 肖江喜, 等. 线粒体呼吸链复合物III缺陷的临床与生化分析[J]. *中华儿科杂志*, 2011, 49(11): 878-880.
- [31] 马艳艳, 吴桐菲, 刘玉鹏, 王娇, 宋金青, 肖江喜, 等. 线粒体呼吸链复合物II缺陷所致Leigh综合征[J]. *中国当代儿科杂志*, 2011, 13(7): 569-572.
- [32] Bénéit P, Chretien D, Kadhon N, de Lonlay-Debeney P, Cormier-Daire V, Cabral A, et al. Large-scale deletion and point mutations of the nuclear NDUFV1 and NDUFS1 genes in mitochondrial complex I deficiency[J]. *Am J Hum Genet*, 2001, 68(6): 1344-1352.
- [33] Blok MJ, Spruijt L, de Coo IF, Schoonderwoerd K, Hendrickx A, Smeets HJ. Mutations in the ND5 subunit of complex I of the mitochondrial DNA are a frequent cause of oxidative phosphorylation disease[J]. *J Med Genet*, 2007, 44(4): e74.
- [34] Taylor RW, Singh-Kler R, Hayes CM, Smith PE, Turnbull DM. Progressive mitochondrial disease resulting from a novel missense mutation in the mitochondrial DNA ND3 gene[J]. *Ann Neurol*, 2001, 50(1): 104-107.
- [35] Lebon S, Chol M, Benit P, Mugnier C, Chretien D, Giurgea I, et al. Recurrent de novo mitochondrial DNA mutations in respiratory chain deficiency[J]. *J Med Genet*, 2003, 40(12): 896-899.
- [36] Cameron JM, Levandovskiy V, MacKay N, Robinson BH. Respiratory chain analysis of skin fibroblasts in mitochondrial disease[J]. *Mitochondrion*, 2004, 4(5-6): 387-394.
- [37] McFarland R, Kirby DM, Fowler KJ, Ohtake A, Ryan MT, Amor DJ, et al. De novo mutations in the mitochondrial ND3 gene as a cause of infantile mitochondrial encephalopathy and complex I deficiency[J]. *Ann Neurol*, 2004, 55(1): 58-64.
- [38] Leshinsky-Silver E, Lev D, Tzofi-Berman Z, Cohen S, Saada A, Yanoov-Sharav M, et al. Fulminant neurological deterioration in a neonate with Leigh syndrome due to a maternally transmitted missense mutation in the mitochondrial ND3 gene[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 334(2): 582-587.

(本文编辑:万静)