

论著 · 临床研究

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

魏晓琼¹, 孔庆鹏², 张尧¹, 杨艳玲¹, 常杏芝¹, 戚豫³, 齐朝月⁴, 肖江喜⁵, 秦炯¹, 吴希如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. 北京大学第一医院中心实验室, 北京 100034; 4. 中国人民解放军海军总医院医学影像科, 北京 100037;
5. 北京大学第一医院医学影像科, 北京 100034)

〔摘要〕 Leigh 综合征是由于线粒体呼吸链能量代谢障碍所导致的遗传性疾病, 呼吸链酶复合物 I 缺陷是导致 Leigh 综合征的常见原因之一。该研究通过线粒体基因 13513G > A 突变分析首次确诊了 1 例中国人 Leigh 综合征患者。患儿为第一胎, 12 岁时出现抽搐, 13 岁时先后出现双眼视力下降, 13 岁来院就诊左眼颞侧视野缺损, 痉挛步态, 血液乳酸、丙酮酸增高, 腓肠肌活检肌纤维内脂滴轻度增多; 心电图检查显示不完全右束支传导阻滞; 脑 MRI 显示双侧基底节对称性损害, 符合 Leigh 综合征诊断, 合并继发性癫痫。经基因分析证实患者存在线粒体基因 13513G > A 突变, 导致线粒体呼吸链酶复合物 I 活性下降。治疗以多种维生素为主, 补充左旋肉碱、辅酶 Q₁₀, 同时给予卡马西平、苯巴比妥、丙戊酸等抗癫痫治疗。现在患儿 16 岁, 休学, 智力无明显倒退, 体力、体重显著减退。Leigh 综合征病因复杂, 临床表现多种多样, 该患儿以抽搐起病, 合并视力减退, 经基因分析明确了病因, 有助于相关家庭的遗传咨询。
[中国当代儿科杂志, 2009, 11(5): 333-336]

〔关键词〕 亚急性坏死性脑脊髓病 (Leigh 综合征); 线粒体呼吸链酶; 复合物 I 缺陷; 线粒体基因; 13513G > A 突变; 儿童
[中图分类号] R596 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2009)05-0333-04

A case of Leigh syndrome associated with respiratory chain complex I deficiency due to mitochondrial gene 13513G > A mutation

WEI Xiao-Qiong, KONG Qing-Peng, ZHANG Yao, YANG Yan-Ling, CHANG Xing-Zhi, QI Yu, QI Zhao-Yue, XIAO Jiang-Xi, QIN Jiong, WU Xi-Ru. Department of Pediatrics, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China (Yang Y-L, Email: yanlingy@vip.sina.com)

Abstract Leigh syndrome is a genetically heterogeneous disease caused by defects in enzymes involved in aerobic energy metabolism and the Krebs' cycle. Mitochondrial complex I deficiency is a main cause of Leigh syndrome. In this study, a Chinese child with Leigh syndrome caused by 13513G > A mutation was reported. The proband was the first child of his parents. The previously healthy boy presented with generalized epilepsy at 12 years of age. When he visited Peking University First Hospital at 13 years of age, he had subacute loss of vision in two eyes and temporal defect of visual field in the left eye. He walked with a spastic gait. His blood lactate and pyruvate levels were elevated. Muscle biopsy showed mild lipid accumulation in muscle fiber. An electrocardiogram showed incomplete right bundle branch block. Brain magnetic resonance imaging showed bilateral, symmetrical lesions in the basal ganglia, supporting the diagnosis of Leigh syndrome. 13513G > A mutation was identified by gene analysis in the patient, which led to mitochondrial respiratory chain complex I deficiency. Multivitamins and L-carnitine were administered. At present, the patient is 16 years old and has progressive deterioration with significant muscle weakness and body weight loss. He is absent from school. He has no obvious retardation in intelligence. 13513G > A mutation was first identified by gene analysis in Chinese population with Leigh syndrome. This may be helpful in genetic counseling.
[Chin J Contemp Pediatr, 2009, 11(5): 333-336]

Key words: Leigh syndrome; Mitochondrial respiratory chain; Complex I deficiency; Mitochondrial gene; 13513G > A; Child

[收稿日期] 2008-08-12; [修回日期] 2008-09-22
[基金项目] 本课题由国家自然科学基金面上项目 (30872794)、十一五国家科技支撑计划项目 (2006BAI05A00) 资助
[作者简介] 魏晓琼, 女, 硕士研究生。主攻方向: 小儿神经科学, 遗传代谢病。
[通讯作者] 杨艳玲, 女, 教授, 研究员, 北京大学第一医院儿科, 邮编: 100034。

Leigh 综合征又称亚急性坏死性脑脊髓病,是一种儿童时期相对多见的神经退行性疾病,典型特征是脑干和基底节对称性坏死性病变。线粒体基因和核基因突变致线粒体呼吸链酶复合物缺陷(复合物 I, II, III, IV 和 V 缺陷)均可引起 Leigh 综合征,以复合物 I 和 IV 缺陷最为常见^[1]。迄今研究证实复合物 I 至少由 46 个亚单位组成,其中 7 个复合物由线粒体基因编码(ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5, ND6),其余由核基因组编码^[2]。线粒体基因 12337-14148 编码 ND5 亚单位^[3,4]。1997 年, Santorelli 等^[5]报道了首例线粒体基因 13513G > A 突变导致的线粒体脑病、乳酸酸中毒和卒中样发作(mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes, MELAS)患者,此后, Sudo 等^[6]和 Kirby 等^[7]又相继报道了 13513G > A 突变也可引起 Leigh 综合征。本研究通过对 1 例 Leigh 综合征患者的病因调查,首次发现了线粒体基因 13513G > A 突变所致中国人 Leigh 综合征。

1 临床资料

1.1 临床经过

患者,男,13 岁,北京籍,因间断抽搐 20 个月,视力减退 8 月余于 2004 年来院就诊。患儿 12 岁内无异常,体格、智力发育正常。12 岁时出现全身性抽搐,伴高热、头痛、呕吐。此后反复抽搐发作,性格改变,易疲劳。13 岁时先后出现左、右眼进行性视力下降,听力减退,发作性肢体无力,可自行缓解。

体格检查:体格发育、营养状态良好,语言流利,烦躁。心肺、肝脾检查未见异常。眼球活动正常,无眼球震颤,双侧瞳孔等大等圆,瞳孔对光反射正常,左眼颞侧视野缺损。四肢肌力正常,上肢活动灵活,下肢肌张力增高,双侧膝腱、踝腱反射对称亢进,踝阵挛阴性,步态不稳,痉挛步态,双侧巴氏征、克氏征、布氏征均阴性。

家族史:患儿父母亲健康,非近亲婚配,双方家族中无神经、肌肉病史。

1.2 实验室检查

血液、尿液常规化验未见异常,血氨、血气、心肌酶谱正常。血清乳酸 3.6 mmol/L(正常对照 0.5 ~ 2.0 mmol/L),丙酮酸 230 μ mol/L(正常对照 30 ~ 100 μ mol/L),均增高。血清游离肉碱 29.2 μ mol/L(正常对照 34.6 ~ 56.6 μ mol/L),酯酰肉碱谱正常。尿液有机酸分析未见异常。

心电图:不完全右束支传导阻滞。脑电图:边缘

状态,未见明显癫痫放电。腓肠肌活检:肌纤维内脂滴轻度增多,未见典型破碎样红纤维。

1.3 影像学检查

颈部多普勒超声:双大脑中、右和大脑前动脉血流轻度增快。磁共振检查:双侧苍白球和脑室周围白质 T₁ 低信号和 T₂ 高信号,符合 Leigh 综合征改变^[1,8,9]。

1.4 基因分析

(1)基因组 DNA 的提取:采用蛋白酶 K-盐析法提取患者和其父母外周血白细胞 DNA^[10]。

(2)聚合酶链反应-限制性片段长度多态性分析:线粒体基因 3243, 8993, 8344, 11778, 3460, 14484 位点未见突变^[11]。

(3)细胞色素 C 氧化酶 SURF1、丙酮酸脱氢酶复合物 1 PDHA1 基因分析未见异常^[12~14]。

(4)线粒体基因 13513G > A 突变分析:

PCR 反应体系和条件:上游引物 5'-3': TCCAT-CATCCACAACCTTAACAATGA;下游引物 5'-3': AT-GTTTGCGGTTTCGATGATGTGAT。25 μ L PCR 反应体系中,含基因组 DNA 25 ~ 50 ng,上下游引物各 5 pmol,100 mmol/L 的每种 dNTPs,1.5 ~ 2.0 mmol/L MgCl₂ 和 1.25 U Tag DNA 聚合酶。PCR 热循环条件:94℃ 预变性 5 min 后,94℃ 变性 30 s,53℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,循环 35 次,最终以 72℃ 延伸 5 min(icycler™ Thermal cycler, BioRad)。

限制性片段长度多态性分析(restriction fragment length polymorphism, RFLP):20 μ L 酶切体系中,加入 PCR 产物 5 μ L、10 × 酶切缓冲液 2 μ L、MboI 内切酶 5 U(chimerx 公司),37℃ 水浴 4 h。酶切反应后用 3% 的琼脂糖凝胶电泳分离,紫外凝胶成像仪(Alphaimager™ 2200 型,美国 Alpha Innotech 公司)下观看结果。mtDNA 经 PCR 扩增后得到 170 bp 的片段,野生型 mtDNA 在 MboI 限制性核酸内切酶作用下,被切割成 144 和 26 bp 两个片段,而 13513G > A 突变因缺少酶切位点不能被切割。

患者外周血淋巴细胞线粒体基因 13513G > A 突变导致 PCR 产物不能完全被切割,出现 144、26 和 170 bp 3 个条带,26 bp 不能显示,而其父母基因型正常(图 1)。

1.5 诊断与治疗

患者临床表现、实验室检查结果、影像学特点符合 Leigh 综合征诊断,合并继发性癫痫。治疗以多种维生素为主,维生素 B₁ 90 ~ 300 mg/d,分次口服,病情稳定时 90 mg/d,发热、腹泻时增量至 300 mg/d;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。同时给予卡马西平、苯巴比妥、丙戊酸等抗癫痫治疗。患者病情进行性加重,遇发热、感冒时间断惊厥发作。现在患儿 16 岁,休学,智力无明显倒退,体力、体重显著减退,构音障碍,饮水时呛咳,左上肢、双下肢痉挛性瘫痪。复查磁共振,脑损伤较 3 年前加重,双侧基底节对称性高 T₂ 信号,左侧丘脑 T₂ 像高信号(图 2)。

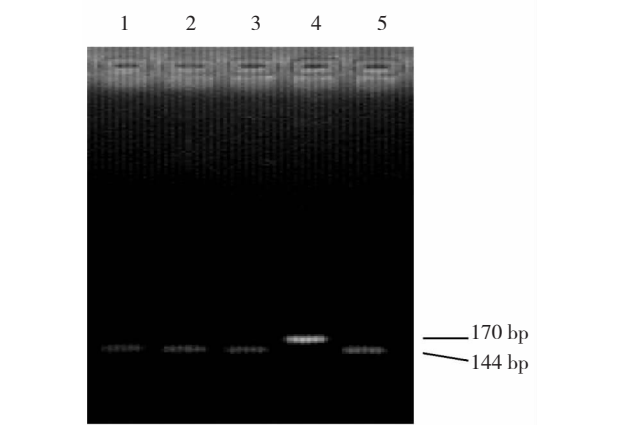


图1 13513G>A 突变的 RFLP 分析 酶切后的 PCR 产物用 3% 的琼脂糖凝胶电泳分析。野生型在 MboI 限制性核酸内切酶作用下,被切割成 144 和 26 bp(不能显示)两个片段,而突变型因缺少酶切位点不能被切割,患者 PCR 产物不能完全被切割,出现 144、26 和 170 bp 3 个条带,而其父母基因型正常。1. 患者父亲; 2. 患者母亲; 3. 患者; 4. 突变型; 5. 野生型。

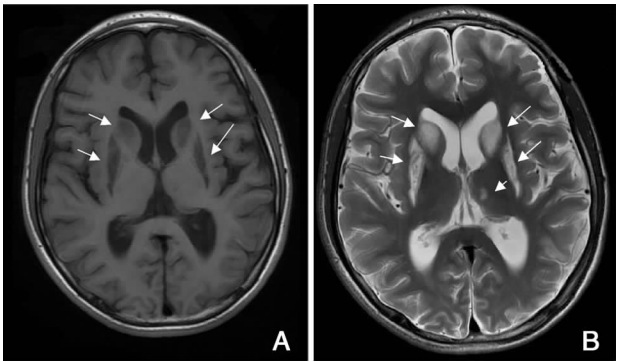


图2 头颅 MRI 扫描结果 A:T₁ 加权像显示双侧基底节对称性低信号,箭头所示; B:T₂ 加权像显示双侧基底节对称性高信号,左侧丘脑点状高信号,箭头所示。

2 讨论

Leigh 综合征患者病因及临床表现复杂,根据发病时期,可分为婴儿型和青少年型。婴儿型多在 2 岁内起病,表现为智力运动落后或倒退,无力,肌张力低下,喂养困难,逐渐出现共济失调、震颤等神经

系统异常,疾病晚期出现脑干损害,如:眼肌麻痹、呛咳、吞咽困难、呼吸节律不整、中枢性呼吸衰竭。少数患者合并癫痫、外周神经病。青少年型,较婴儿型少见,患者常呈亚急性或慢性病程,以锥体外系损害表现为主,如肌张力不全、增高、强直等,部分患者合并癫痫,视力、听力减退等异常。多数患者神经症状可数年稳定,在疾病晚期呈现失代偿改变,病情急性恶化^[15]。本例患者 12 岁起病,以发热后惊厥起病为主,病程中出现视力听力下降、无力、消瘦、呛咳,血液中乳酸、丙酮酸增高,头颅 MRI 显示对称性脑基底节损害,符合青少年型 Leigh 综合征。既往 Leigh 综合征需在患者死亡后经尸检病理学分析确诊,随着医学影像学、生物化学、分子生物学分析技术的进步,越来越多的患者可以获得生前诊断^[16]。

复合物 I 缺陷是导致线粒体疾病的主要原因, 占有呼吸链缺陷疾病的 1/3^[17,18]。上个世纪 80 年代起,国内外同行对于 Leigh 综合征的病因研究逐步深入,发现呼吸链复合物 I 缺陷是导致 Leigh 综合征的常见原因。据 1996 年 Morris 等^[19] 的报道,25 例 Leigh 综合征患者中 7 例(28%) 为复合物 I 单独缺陷所致。复合物 I 缺陷常导致多系统损害,最常累及能量需求大的器官,导致脑、心脏、骨骼肌、肾、肝、眼科等多脏器损害,已发现的临床表型为 Leigh 综合征、Leigh 样综合征、Leber 遗传性视神经病、乳酸酸中毒和卒中样发作、新生儿心肌病、新生儿乳酸酸中毒、白质脑病、非特异性脑病等^[20~22]。其中,Leigh 综合征和 Leigh 样综合征最为常见,占有单独性复合物 I 缺陷病例的一半以上^[19,23,24]。

线粒体呼吸链酶复合物 I 由 mtDNA 和 nDNA 共同编码,大约有 20% 的复合物 I 缺陷为 mtDNA 突变所致^[18]。mtDNA 异常可分为重组和点突变两种,导致复合物 I 缺陷的 mtDNA 点突变主要集中于 tRNA^{Leu} 基因、tRNA^{Ala} 基因和 ND 基因,其中,以 mtDNA ND5 致病突变报道较多^[25]。Bugiani 等^[20] 在 8 例复合物 I 缺陷 Leigh 综合征患者中发现 6 例携带 mtDNA ND 基因突变,提示复合物 I 缺陷 Leigh 综合征与 ND 基因突变密切相关。

复合物 I 至少 39 个亚单位由 nDNA 编码,因此,大多数复合物 I 缺陷患者为 nDNA 突变导致^[26],迄今已发现多种突变类型和临床表型。Santorelli 等^[5] 首次在 1 例 MELAS 患者 mtDNA 发现了 13513G>A 突变,导致 ND5 亚单位天冬氨酸转换为天冬酰胺。国外研究证实 mtDNA 13513G>A 突变是导致复合物 I 缺陷 Leigh 综合征的常见原因,对母系亲属进行 13513G>A 筛选对于遗传咨询

具有指导意义。13513G>A 突变患者临床表型多样,既可表现为 Leigh 综合征,也可导致 MELAS 综合征、视神经萎缩、白内障、耳聋、心脏传导功能障碍^[27]。

本研究在中国人 Leigh 综合征患者中首次发现了 13513G>A 突变,不仅明确了病因诊断,对于相关家庭的遗传咨询有所帮助。患者表现为 Leigh 综合征,合并视力、听力减退及不完全右束支传导阻滞,为 13513G>A 突变的常见表型。

线粒体基因遗传形式为母系遗传,母亲常为健康携带者。本研究 RFLP 分析结果显示,尽管患者有 13513G>A 突变,而其母外周血 mtDNA 未检测到突变,患者的 13513G>A 突变可能为一新生突变,或者由于 mtDNA 的组织异质性^[2],其母外周血 mtDNA 不存在突变,但是可能脑、骨骼肌、肝脏等组织携带此突变。

目前,对于复合物 I 缺陷所致线粒体疾病尚无有效的治疗方法,以对症治疗为主。与其他线粒体疾病类似,维生素 B₁、B₂、C、E 及辅酶 Q₁₀、左旋肉碱、硫辛酸、生酮饮食对部分患者有一定的治疗效果,患者预后不佳,大约 67% 的病人在临床症状出现后 8 个月左右死亡^[27],少数患者在发病后数年内病情稳定,随着疾病进展,出现脑干损伤后病情恶化,导致中枢性呼吸衰竭。

[参 考 文 献]

[1] Smeitink J, van den Heuvel L, DiMauro S. The genetics and pathology of oxidative phosphorylation [J]. *Nat Rev Genet*, 2001, 2 (5): 342-352.

[2] Zeviani M, Donato S. Mitochondrial disorders [J]. *Brain*, 2004, 127 (Pt 10):2153-2172.

[3] Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome[J]. *Nature*, 1981, 290(5806):457-465.

[4] Wallace DC, Lott MT, Torroni A. Report of the Committee on human mitochondrial DNA [M].//Cuticchia AJ, Pearson PL. Human Gene Mapping, 1993: A Compendium. Baltimore: Johns Hopkins Univ, 1994, 813-845.

[5] Santorelli FM, Tanji K, Kulikova R, Shanske S, Vilarinho L, Hays AP, et al. Identification of a novel mutation in the mtDNA ND5 gene associated with MELAS [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 238(2):326-328.

[6] Sudo A, Honzawa S, Nonaka I, Goto Y. Leigh syndrome caused by mitochondrial DNA G13513A mutation: frequency and clinical features in Japan[J]. *J Hum Genet*, 2004, 49(2):92-96.

[7] Kirby DM, Boneh A, Chow CW, Ohtake A, Ryan MT, Thyagarajan D, et al. Low mutant load of mitochondrial DNA G13513A mutation can cause Leigh's disease[J]. *Ann Neurol*, 2003, 54 (4):473-478.

[8] Munnich A, Rötig A, Cormier-Daire V. Clinical presentation of respiratory chain deficiency [M].// Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, et al. The metabolic and molecular bases of inherited disease. 8th ed. New York: McGraw-Hill, 2001, 2261-2274.

[9] 孙芳,戚豫,王丽,杨艳玲. Leigh 综合征的临床和分子遗传学研究进展[J]. *中国当代儿科杂志*, 2005, 7(2):186-189.

[10] Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cell [J]. *Nucleic Acids Res*, 1988, 16(3):1215.

[11] 王朝霞,杨艳玲,张月华,袁云,戚豫,陈清棠,等. 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.

[12] 孙芳,杨艳玲,戚豫,宋金青,钱宁,王朝霞,等. SURF1 基因突变导致 Leigh 综合征家系 1 例 [J]. *中国当代儿科杂志*, 2005, 7(2):115-118.

[13] 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.

[14] 张尧,孙芳,杨艳玲,常杏芝,戚豫,齐朝月,等. 丙酮酸脱氢酶 E1α 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.

[15] Aicardi J. Diseases of the nervous system in childhood [M]. London: Mac Keith Press, 1998, 520-531.

[16] DiMauro S, Schon EA. Mitochondrial respiratory-chain diseases [J]. *N Engl J Med*, 2003, 348(26):2656-2668.

[17] 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.

[18] 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.

[19] 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.

[20] 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.

[21] Janssen RJ, Nijtmans LG, van den Heuvel LP, Smeitink JA. Mitochondrial complex I: structure, function and pathology [J]. *J Inherit Metab Dis*, 2006, 29(4):499-515.

[22] 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.

[23] 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.

[24] 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.

[25] Blok MJ, Spruijt L, de Co 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.

[26] Triepels RH, Van Den Heuvel LP, Trijbels JM, Smeitink JA. Respiratory chain complex I deficiency [J]. *Am J Med Genet*, 2001, 106(1):37-45.

[27] Ruiter EM, Siers MH, van den Elzen C, van Engelen BG, Smeitink JA, Rodenburg RJ, et al. The mitochondrial 13513G>A mutation is most frequent in Leigh syndrome combined with reduced complex I activity, optic atrophy and/or Wolff-Parkinson-White [J]. *Eur J Hum Genet*, 2007, 15(2):155-161.

(本文编辑:吉耕中)