

疑似 LHON 患者 mtDNA 突变规律及临床研究

解世朋, 石慧君, 常永业, 王 浩, 张铭连

基金项目: 河北省科技支撑计划项目 (No. 11276103D-12)
作者单位: (054001) 中国河北省邢台市眼科医院 河北省眼病治疗中心

作者简介: 解世朋, 毕业于河北医科大学, 硕士, 主治医师, 研究方向: 中西医结合眼科、眼底病。

通讯作者: 张铭连, 毕业于河北医科大学, 学士, 主任医师, 院长, 硕士研究生导师, 研究方向: 中西医结合眼科、眼底病、葡萄膜炎。zhmlyk@sohu.com

收稿日期: 2012-09-04 修回日期: 2012-12-15

Research on mitochondrial DNA mutations and clinical feature of suspected leber hereditary optic neuropathy

Shi-Peng Xie, Hui-Jun Shi, Yong-Ye Chang, Hao Wang, Ming-Lian Zhang

Foundation item: Science and Technology Support Plan Project of Hebei Province, China (No. 11276103D-12)

Xingtai Eye Hospital, Xingtai 054001, Hebei Province, China

Correspondence to: Ming-Lian Zhang. Xingtai Eye Hospital, Xingtai 054001, Hebei Province, China. zhmlyk@sohu.com

Received: 2012-09-04 Accepted: 2012-12-15

Abstract

• AIM: To study the mtDNA mutation in patients with suspected Leber's hereditary optic neuropathy (LHON) regularity and clinical manifestations.

• METHODS: Totally 175 patients admitted from January 2006 to January 2012, according to whether had a family history or not, were divided into control group and observation group. Control group oral took vitamin B1 tablets, mecobalamin tablets; observation group oral took vitamin B1 tablets, mecobalamin tablets and combined with methylprednisolone injection. Both groups were draw veinal blood. mtDNA 11778, 3460, 14484 and other mutation hot spot were tested. The age, rate of mutation, mutation, and logMAR best-corrected visual acuity were analyzed.

• RESULTS: Observation group: male 78 cases, female 34 cases, maximum age of 42 years, minimum of 8 years, and average was 23 ± 4.5 years. The mtDNA mutation negative was in 59 cases, mtDNA mutations were in 53 cases, G11778A in 41 cases, T14484C in 5 cases, G3460A in 2 cases, G15927A in 1 case, A15951G in 1 case, G11696A in 1 case, G11778A+G11696A in 1 case, G11778A+G3316A in 1 case. The mtDNA mutation negative average best-corrected visual acuity was 1.11 ± 0.31 logMAR. Control group: male 46 cases, female 17 cases, the maximum age of 44 years, minimum of 7 years, average were 18 ± 6.5 ,

G11778 mutation in 53 (84.1%), T14484C mutation in 8 (12.7%), G3460A mutation in 2 (3.2%), the average visual acuity was 1.13 ± 0.32 logMAR.

• CONCLUSION: In patients with suspected LHON, age at onset of LHON patients was relatively large. The result showed mtDNA G11778A accounted for the majority of mutations, presence of multiple mtDNA mutation and other mtDNA mutation; it is not sensitive to glucocorticoid treatment, and best corrected visual acuity was 1.1 logMAR.

• KEYWORDS: suspected Leber's hereditary optic neuropathy; mtDNA; logMAR vision

Citation: Xie SP, Shi HJ, Chang YY, et al. Research on mitochondrial DNA mutations and clinical feature of suspected leber hereditary optic neuropathy. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2013; 13(1):59-61

摘要

目的: 研究临床疑似 Leber 遗传性视神经病变 (Leber's hereditary optic neuropathy, LHON) 患者的 mtDNA 突变规律及临床表现。

方法: 对 2006-01/2012-01 就诊于邢台市眼科医院符合病例入选标准的 175 例患者, 按是否有家族史分为对照组及观察组, 对照组患者口服维生素 B1 片、甲钴胺片治疗, 观察组患者加用注射用甲泼尼龙琥珀酸钠, 对两组患者抽取静脉血, 进行 mtDNA 11778, 3460, 14484 三个原发突变位点及相关突变热点进行检测, 分析其发病年龄、突变率、突变位点、logMAR 最佳矫正视力。

结果: 观察组: 男 78 例, 女 34 例, 年龄 8~42 (平均 23 ± 4.5) 岁, mtDNA 突变阴性者 59 例 (52.7%), mtDNA 突变阳性者 53 例 (47.3%), 其中 G11778A 突变 41 例 (36.6%), T14484C 突变 5 例 (4.5%), G3460A 突变 2 例 (1.8%), 另外尚有 G15927A 突变 1 例, A15951G 突变 1 例, G11696A 突变 1 例, G11778A + G11696A 突变 1 例, G11778A + G3316A 突变 1 例。mtDNA 突变阴性者平均 logMAR 视力为 1.11 ± 0.31 。对照组: 男 46 例, 女 17 例, 年龄 7~44 (平均 18 ± 6.5) 岁, G11778 突变 53 例 (84.1%), T14484C 突变 8 例 (12.7%), G3460A 突变 2 例 (3.2%), 平均 logMAR 视力为 1.13 ± 0.32 。

结论: 疑似 LHON 患者发病年龄较 LHON 患者偏大, mtDNA 突变 G11778A 占多数, 存在多个 mtDNA 同时突变及其它 mtDNA 位点突变; 对糖皮质激素治疗不敏感, 最佳矫正 logMAR 视力在 1.1 左右。

关键词: 疑似 LHON; 线粒体 DNA; logMAR 视力

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2013.01.13

引用: 解世朋, 石慧君, 常永业, 等. 疑似 LHON 患者 mtDNA 突变规律及临床研究. 国际眼科杂志 2013; 13(1):59-61

0 引言

Leber 遗传性视神经病变 (Leber's hereditary optic neuropathy, LHON) 又叫 Leber 视神经萎缩, 是一种线粒体 DNA 突变相关的母系遗传致盲性眼病, 本病的临床特点为视网膜神经节细胞及其轴突凋亡导致中心视力急性或亚急性损害。本病青少年男性多发, 由于现代社会观念及其他因素导致社会整体生育率降低, 家庭中子女较前明显减少, 大多家庭为独生子女, 另外人口的流动性较前也明显增强, 故此病的遗传特点越来越不明显, 临床中很多 LHON 患者询问病史时并无家族遗传史, 诊治时较易与特发性脱髓鞘性视神经炎相混淆, 甚至有些患者在不同的医疗机构多次应用大剂量糖皮质激素冲击治疗, 给患者身心及经济造成不良影响, 因此对无家族史疑似 LHON 患者我们更应该重视, 要善于利用现代基因检测技术, 即可以明确诊断, 又可以向患者正确的交代疾病预后, 减轻患者因求医所造成的不必要的经济损失及过度治疗。我们对 2006-01/2012-01 就诊于邢台市眼科医院的疑似 LHON 患者及确诊 LHON 抽取静脉血进行 mtDNA 检测, 对 mtDNA 突变位点及 logMAR 视力等进行研究, 以了解其 mtDNA 突变规律及视功能情况。

1 对象和方法

1.1 对象 研究开始前获得医院伦理委员会许可, 征得所有患者知情同意。对 2006-01/2012-01 就诊于邢台市眼科医院符合以下入选标准的视神经疾病患者进行研究。观察组病例入选标准: 行头颅 CT 或 MRI 排除颅内疾患; 家族中无视神经疾病患者; 排除 Best 病、stargardt 病等引起中心视力下降的视网膜营养不良性疾病; 双眼发病, 病程 < 15d, 初诊时视力 < 0.15, 诊为“特发性脱髓鞘性视神经炎”, 采用“甲泼尼龙琥珀酸钠”冲击治疗及营养神经药物治疗 20d 后视力无提高或仍然 < 0.15; 对照组入选标准: 患者母系中有视神经疾病患者; 行 mtDNA 检测 G11778A, T14484C, G3460A 突变阳性; 不应用激素治疗患者; 行头颅 CT 或 MRI 排除颅内疾患。

1.2 方法

1.2.1 临床观察 观察组均应用注射用甲泼尼龙琥珀酸钠 1000mg, 1 次/d 静脉滴注连用 3d, 之后 500mg, 1 次/d 静脉滴注连用 3d, 之后按每日 1mg/kg 改为口服醋酸泼尼松片, 每 5d 减量 5mg, 应用激素治疗同时口服维生素 B1 片、甲钴胺片, 应用 snellen 视力表查出患者治疗前后的视力 (VA), 应用公式 $\log\text{MAR} = \lg(1/\text{VA})$ 换算出患者的 logMAR 视力; 对照组不应用糖皮质激素, 单纯口服维生素 B1 片、甲钴胺片, 比较两组患者治疗前及治疗后 20d 时 logMAR 视力。

1.2.2 基因检测 抽取患者外周静脉血 2mL 放入 EDTA 抗凝管中, 采用酚-氯仿抽提法提取外周血白细胞 DNA。应用 Primer 3 设计 mtDNA 目的片段引物。聚合酶链式反应 (PCR) 扩增片段。PCR 反应体系为 50 μL : 25 μL Taq Mix, 上下游引物各 1 μL 、基因组 DNA 80ng, 加去离子水至 50 μL 。PCR 反应条件如下: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30s, 重复循环 36 次, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10min。PCR 产物纯化及测序: 用 15g/L 琼脂糖凝胶电泳观察 PCR 扩增产物是否为单一目的条带, 切胶回收, 过柱纯化后进行测序反应并进行测序结果分析。

统计学分析: 采用 SPSS 16.0 统计软件统计分析, 对观察组和对照组患者 logMAR 视力及年龄应用 *t* 检验, 性别应用卡方检验。 *P* < 0.05 为有统计学意义。

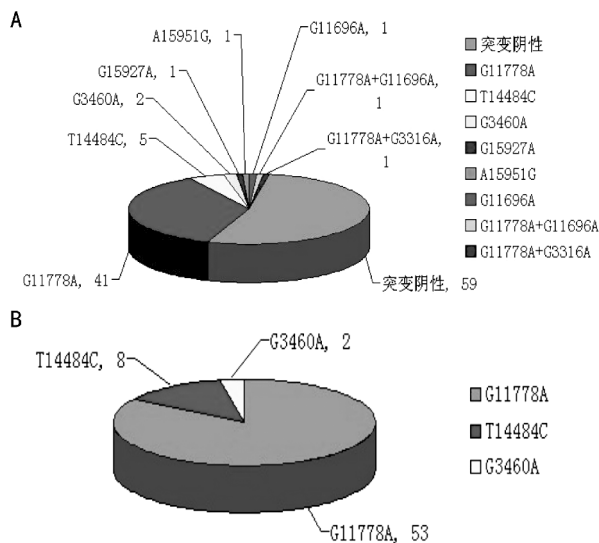


图 1 线粒体 DNA 检测结果 A: 观察组; B: 对照组。

表 1 观察组和对照组治疗前后 logMAR 视力 $\bar{x} \pm s$

组别	眼数	治疗前	治疗后	
观察组	阳性	106	1.17 ± 0.33 ^{b,c}	1.10 ± 0.3 ^{a,b,c}
	阴性	118	1.13 ± 0.35 ^b	1.11 ± 0.31 ^{a,b}
对照组	126	1.14 ± 0.31	1.13 ± 0.32 ^a	

^a*P* > 0.05 vs 治疗前; ^b*P* > 0.05 vs 对照组; ^c*P* > 0.05 vs 阴性。

2 结果

2.1 患者性别及发病年龄 观察组: 112 例 224 眼, 男 78 例, 女 34 例, 年龄 8 ~ 42 (平均 23 ± 4.5) 岁。对照组: 63 例 126 眼, 男 46 例, 女 17 例, 年龄 7 ~ 44 (平均 18 ± 6.5) 岁。性别无统计学差异 (*P* > 0.05), 年龄有统计学意义 (*P* < 0.05)。

2.2 线粒体 DNA 检测 线粒体 DNA 检测结果见图 1。观察组: mtDNA 突变阴性者者占 52.7% (59/112), mtDNA 突变阳性者占 47.3% (53/112)。mtDNA 突变阳性者中 G11778A 占 77.4% (41/53) 例, T14484C 占 9.4% (5/53), G3460 占 3.8% (2/53), G15927A 占 1.9% (1/53), A15951G 占 1.9% (1/53), G11696A 占 1.9% (1/53), G11778A+G11696A 占 1.9% (1/53), G11778A+G3316A 占 1.9% (1/53)。对照组: G11778A 突变阳性者占 84.1% (53/63), T14484C 突变占 12.7% (8/63), G3460A 突变占 3.2% (2/63)。

2.3 最佳矫正 logMAR 视力 观察组及对照组在治疗 20d 后可视区最佳矫正 logMAR 视力比较见表 1。证明疑似疑似 LHON 患者中 mtDNA 突变阴性及 mtDNA 突变阳性的确诊 LHON 患者均对糖皮质激素不敏感。

3 讨论

至今 LHON 病仍无有效疗法, 发病年龄早的患者, 部分可有视力自发恢复的可能, 大部分患者视力在 0.1 左右。由于线粒体多倍体基因组、胞质异质性、复杂膜系统和制作动物模型的困难等因素, 这些均阻碍了 LHON 的治疗研究。目前公认的 LHON 原发突变位点为 11778, 3460, 14484, 但是尚有 5% ~ 10% LHON 患者不存在此三种突变, 是否还存在新的突变位点可以导致 LHON 正在进一步的研究中。在国外, 发现其他 mtDNA 的位点突变与 LHON 有关, 目前报道的有 14459, 15257, 9438, 9804, 13730, 4160 等 40 种基因, 其中 ND6 基因是 LHON 的突变热点区域^[1-4]。

由于目前国内人民的生活习惯及社会观念转变,大的家族正在逐渐减少,人口流动性增加,家庭中以独生子女或2个子女者居多,因此某些 LHON 患者的遗传特征不明显,较多患者表现为散发性。LHON 患者早期表现与特发性脱髓鞘性视神经炎相似,很多患者在被确诊之前都曾经用糖皮质激素冲击治疗,甚至有的经历多次激素冲击治疗,给患者及家庭造成了严重的心理及经济影响。在本次研究中,发现无家族史可疑 LHON 的患者 mtDNA 突变阳性率为 47.3% (53/112),与之前的研究相似,而各突变位点的分布情况与国内有关报道一致^[4,5]。我们现在应用 logMAR 视力计算患者的视力平均值,较之前简单应用 snellen 视力平均值更能反映出患者的客观情况^[6],本次研究中患者的平均视力 1.25 ± 0.16 logMAR,相当于 snellen 视力 6/150 ~ 6/75 之间,较相关研究报道偏低,考虑 LHON 部分患者视力可能有自发性恢复^[7],而本研究所选的病例处于视力下降的急性期有关。研究中发现部分 LHON 患者在应用糖皮质激素冲击治疗早期有一定的视力恢复,而在 5 ~ 10d 后视力会相对稳定,可能与应用激素后减轻了视神经水肿,视神经轴索内轴浆流运输得到部分改善有

关,但是这部分数据在进行分析后无统计学差异,因此不主张对 LHON 患者进行激素治疗。

参考文献

- 1 Spruijt L, Kolbach DN, de Coe RF. Influence of mutation type on clinical expression of Leber hereditary optic neuropathy. *Am J Ophthalmol* 2006;141:676-682
- 2 Qu J, Li RH. Cosegregation of the ND4 G11696A mutation with the LHON-associated ND4 G11778A mutation in a four generation Chinese family. *Mitochondrion* 2007;7:140-146
- 3 Valentino ML, Avoni P. Mitochondrial DNA nucleotide changes C14482G and C14482A in the ND6 gene are pathogenic for Leber's hereditary optic neuropathy. *Ann Neurology* 2002;51:774-778
- 4 张铭连,石慧君,常永业,等. Leber 遗传性视神经病变患者线粒体 DNA 检测分析. *中华眼底病杂志* 2006;22(2):132-134
- 5 郭向明,贾小云,肖学珊,等. 中国人 Leber 遗传性视神经病变线粒体 DNA 突变频谱. *中华眼底病杂志* 2003;19(5):288-291
- 6 Jack T, Holladay FACS. Proper method for calculating average visual acuity. *J Refract Surg* 1997;13:388-391
- 7 韦企平,孙艳红. Leber 遗传性视神经病变的临床和基础研究现状. *中国中医眼科杂志* 2010;20(2):63-66

IES 投稿提示

为了进一步提高期刊的质量,从 2013 年始本刊不再接收“眼科护理、短篇报道、病例报告”类文章,并取消相应的栏目。敬请广大作者、读者理解并相互告知!

《国际眼科杂志》编辑部