

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2013.00123

Leber 遗传性视神经病变研究进展和挑战

张阿梅, 姚永刚

中国科学院昆明动物研究所, 动物模型和人类疾病机理重点实验室, 昆明 650223

摘要: Leber 遗传性视神经病变(Leber hereditary optic neuropathy, LHON; MIM535000)是最典型的线粒体遗传病之一, 主要由线粒体 DNA (Mitochondrial DNA, mtDNA)3 个原发突变(Primary mutation, m.11778G>A、m.3460G>A 和 m.14484T>C)引起。患者表现为无痛性双侧视力下降或丧失, 主要易感人群为青壮年男性。不完全外显(Incomplete penetrance)和性别偏好(Gender bias)是该病亟待解决的两大难题, 目前尚无有效的预防及治疗措施。文章对近年来 LHON 的分子发病机制、临床症状及特点、体外实验和动物模型研究、预防及治疗等方面的研究进展进行综述, 并集中介绍了我们近期对于我国 LHON 患者的研究成果。

关键词: LHON; 线粒体 DNA; 核基因; 功能验证

Research progress of Leber hereditary optic neuropathy

ZHANG A-Mei, YAO Yong-Gang

Key Laboratory of Animal Models and Human Disease Mechanisms of Chinese Academy of Sciences & Yunnan Province, Kunming Institute of Zoology, Kunming 650223, China

Abstract: Leber hereditary optic neuropathy (LHON; MIM 535000) is one of the most common mitochondrial diseases, with a clinical manifestation of painless, acute or sub-acute bilateral visual loss in young adults leading to blindness and central scotoma. Over 95% of LHON patients were caused by one of three primary mtDNA mutations (m.11778G>A, m.3460G>A and m.14484T>C). Incomplete penetrance and gender bias are two riddles of this disease. Here we summarized recent research progress of LHON, with a focus on the molecular pathogenic mechanisms, clinical features, *in vitro* experiments and animal models, and prevention and treatment of LHON. In particular, we presented the main findings and challenges in our recent efforts to decipher genetic susceptibility and mechanism of LHON in Chinese patients.

Keywords: LHON; mtDNA; nuclear genes; functional assay

Leber 遗传性视神经病变 (Leber's hereditary optic neuropathy, LHON; MIM 535000) 是最常见、最经典的线粒体遗传病之一, 也是目前世界上最常

见的青壮年致盲性疾病之一^[1~4]。其主要症状表现为急性或亚急性视力减退或丧失, 多发于 15~35 岁之间的青壮年男性, 不完全外显(Incomplete pene-

收稿日期: 2012-08-24; 修回日期: 2012-10-09

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 30925021)和云南省高端科技人才项目(编号: 2009C1119)资助

作者简介: 张阿梅, 博士, 助理研究员, 研究方向: 遗传性视神经病的致病因子。E-mail: zam1980@yeah.net

通讯作者: 姚永刚, 博士, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 疾病遗传学。E-mail: yaoyg@mail.kiz.ac.cn

网络出版时间: 2012-10-12 15:28:03

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20121012.1528.001.html>

trance)和性别偏好(Gender bias)是该病的两大特性,也是目前亟待解决的两大难题。早在 1871 年,德国眼科医生Theodore Leber就对LHON的临床症状进行了描述,直至大约 100 年后人们才对该病因有所了解,提出LHON可能仅由母亲遗传给后代,符合母系遗传的特点^[5]。LHON女性患者或突变携带者的后代均遗传了致病性突变,但并非所有后代都会发病(临床称为不完全外显),而且男性突变携带者的发病率高于女性(即性别偏好)。1988 年,Wallace等^[6]首次发现 LHON 是由线粒体 DNA(Mitochondrial DNA, mtDNA)上 $MT-ND4$ 基因的点突变 $m.11778G>A$ 引起,但对于该病的具体发病机制不明确。随后,另外两个 LHON 原发致病突变($m.3460G>A$ 和 $m.14484T>C$)也相继被报道^[7-9]。世界各国的研究人员对LHON进行了大量系统的研究;早在上一世纪 90 年代,我国广州、南京和福建等地的学者也对该病开展了基因诊断和临床病例的分析工作^[10-14],这些研究工作极大地丰富了我们对于LHON致病风险和致病机理的了解。虽然已经证明mtDNA的 3 个突变是LHON的病因,但是其不完全外显和男性好发的临床特点表明该病的发生还受到其他遗传及环境因素的影响。因此,现在普遍认为mtDNA原发突变是LHON发生的重要但非充分条件。

1 LHON 临床特点和诊治

LHON患者具有较典型的临床特点:(1)发病表现出母系遗传家族史,但也存在相当多的临床散发病例(Sporadic case);(2)发病表现为无痛性、无特殊诱因的双眼同时或先后突发明显视力下降甚至丧失;(3)男性青壮年好发。依据临床发病特点,可将LHON分为急性期和慢性期,发病年龄从几岁到几十岁,大约 50%的男性突变携带者和 10%的女性突变携带者会发病,但主要易感人群集中在 15~35 岁青壮年男性^[15]。该病的进程一般较快,即多数患者属于急性发病,并且是双眼同时(约 25%)或相继(约 75%)发生视力障碍,从视力下降到视力严重受损一般不超过 8 周^[16]。这一阶段进行眼底检查可见视网膜血管变形及充血、视神经纤维层水肿等^[3],但是有部分患者眼底检查在该时期没有病理变化^[17]。另外,有些患者发病稍缓慢,病程可能持续 6 个月以上,而该病的眼底检查又不具备明显特征性,因此给临床诊

断造成了一定的困难^[18],特别是对无典型家族史的LHON患者。除典型的LHON症状外,患者可能还会并发其他器官或组织的异常,如并发神经肌肉萎缩、多发性硬化和心脑血管异常等^[19-21],这些症状在LHON患者中出现的频率高于正常人。由于LHON临床表现差异度较大,使得对有复杂症状的LHON患者不能及时准确地诊断。

对LHON患者一个重要的诊断标准就是看是否具有母系遗传家族史,但对于既无明显的临床特点又无家族史的患者,分子遗传学检测,即针对 3 个原发突变(Primary mutation)的检测(位于 $MT-ND1$ 基因的 $m.3460G>A$ 、位于 $MT-ND4$ 基因的 $m.11778G>A$ 和位于 $MT-ND6$ 基因的 $m.14484T>C$),是精确的诊断方法^[22, 23]。值得注意的是,目前临床上存在大量疑似LHON症状但无家族史及原发突变的疑似LHON患者,对于该类患者的诊断存在一定的困难,这也提示存在其它的遗传或环境因素影响LHON的发病。

目前尚未发现针对LHON病的有效治疗方法,主要是通过一些神经营养及保护剂(如维生素B12)、抗氧化剂(如维生素C)和血管扩张剂的联合使用对其进行治疗^[24],但是治疗效果却各不相同,甚至同一家系中对不同个体治疗效果都会有差异,因此推测这些药物可能并没有真正对疾病起到治疗作用。报道表明有些患者,虽然未经过任何治疗,视力会在发病后一段时间得到恢复,但很少能恢复到发病前水平;这其中,突变 $m.14484T>C$ 引起的LHON愈后效果最好(约 37%患者自愈),而 $m.11778G>A$ 突变导致的失明愈后最差(自愈率只有约 4%)^[4, 7, 25]。

2 LHON 流行病学

在欧洲,不同的国家对LHON的发病率进行了统计,但得到的结果不尽相同。英格兰东北地区LHON的发病率约为 1/25 000^[26, 27],荷兰的发病率为 1/39 000^[28],而芬兰发病率为 1/50 000^[29]。在我国和亚洲其他地区,目前尚未见流行病学调查资料。不完全外显是LHON研究急需解决的难题之一,即LHON原发突变的携带者未必会发病,正常人中很可能存在不发病的携带者(LHON家系中未发病个体除外)。2008 年Elliott等^[30]对约 3 000 例正常新生儿脐带血进行了包括 3 个LHON原发突变在内的 10

个mtDNA致病突变的检测,结果发现LHON原发突变在新生儿中均有发生,其频率分别达到千分之一水平(m.3460G>A:0.107% [3/2807]; m.11778G>A:0.108% [3/2770]; m.14484T>C:0.105% [3/2855]),从而提示LHON原发突变在正常人群中存在。我们研究组针对我国普通人群中这3个LHON原发突变的携带率进行了检测,结果未在检测的1555个成年人中发现有原发性突变的携带者。排除我们检测手段的敏感性及人群样本数量较小等原因,这一结果提示LHON突变在我国普通人群中频率极低,与欧洲人群表现出差异^[31]。

3 线粒体 DNA 原发突变

3.1 3个原发突变

LHON发病过程中未解之谜使得该病始终是研究的焦点之一。自从1988年Wallace等^[6]首次提出mtDNA的突变是LHON的致病病因以来,很多mtDNA突变被报道并被认为是LHON的致病原发突变或继发突变(c.f. <http://www.mitomap.org>),但超过95%的LHON患者由3个mtDNA的原发突变引起,这3个突变均位于呼吸链复合体I的亚基,并且可以导致其功能损伤^[1~4]。这3个原发突变的保守性变异较大,突变m.11778G>A从低等的酵母到高等的人都非常保守,而m.3460G>A和m.14484T>C则属于中低度保守,这说明并非所有致病性突变均发生在高度进化保守区。不同地区LHON患者人群中这3个原发突变所占的比例不尽相同。在欧洲,m.11778G>A引起的LHON患者占56.6%,m.3460G>A和m.14484T>C突变致病的患者分别占22.6%和20.8%^[32]。在我国LHON人群中,携带m.11778G>A突变的患者所占比率显著高于欧洲LHON人群,可达90.2%,而m.3460G>A和m.14484T>C突变在我国LHON患者人群中比率分别为1.1%和8.7%^[23,33~35]。由于奠基者效应(Founder effect)的影响,加拿大法籍LHON患者主要的致病突变是m.14484T>C,占患者总数的87%^[36,37]。由此可见,人群变化不影响这3个原发突变的致病性,但不同人群中原发突变发生的频率存在明显的地区差异。

3.2 稀有原发突变

除了3个原发突变外,一些稀有原发突变相继

被报道,但由于这些突变的频率较低、人群差异较大,因此对其致病性的界定需要进一步验证^[38]。近期,我们报道了一个携带突变m.3635G>A的LHON家系,该家系具有明显的母系遗传特点及LHON临床表型^[39]。经过文献查阅,早在2001年,Brown等^[40]报道了一例俄罗斯LHON家系携带此突变,功能实验证实该突变降低线粒体呼吸链的功能。几乎与我们在同一时期,Yang等^[41]也报道了另外2个携带有m.3635G>A突变的我国LHON家系。通过我们近期建立的网络检索方法^[38],我们对突变m.3635G>A进行了充分检索,结果未在报道的5794条人类mtDNA全基因组序列中发现该突变,而且该突变在脊椎动物中高度保守,进一步提示m.3635G>A是一个LHON稀有原发突变^[39]。随后,Jia等^[42]针对我国不含有3个原发突变、大样本的疑似LHON患者进行了检测,在8个无亲缘关系的疑似LHON患者中检测到该突变。近期,Bi等^[43]对这些家系患者进行了mtDNA全基因组分析,发现这些患者中可能还存在一些潜在的协同致病突变,研究结果进一步证实了m.3635G>A的致病性。目前可以肯定m.3635G>A是我国LHON患者人群中一个原发突变,其整体发生频率和m.3460G>A突变相当。

最近,Yang等^[44]和本实验室^[45,46]的研究显示,位于MT-ND4L基因的突变m.10680G>A是我国LHON患者人群中另外一个稀有原发突变。Yang等^[44]报道的家系中所有母系成员均出现视力降低或失明的症状,LHON外显率达到100%;通过mtDNA全序列测定分析发现,该家系母系成员个体的mtDNA同时存在原发突变m.14484T>C和新突变m.10680G>A。据此,Yang等^[44]提出m.10680G>A可能是导致该家系LHON全外显的原因。我们研究组针对不含已知原发突变但有发病家族史的疑似LHON家系进行分析后,在其中的一个家系也检测到m.10680G>A,并且从进化医学角度分析提示该突变可能是致病突变^[45]。近期,我们采用位点特异性PCR(Allele specific PCR, AS-PCR)的方法,对我国774例疑似LHON患者进行了m.10680G>A筛查,结果在2例患者中检测到突变。网络数据检索^[38]结果显示,该突变目前仅发现于Yang等^[44]和本实验室^[45,46]报道的患者中。针对MT-ND4蛋白结构疏水性预测和保守性分析提示,m.10680G>A突变改变了蛋白结构,从而致病

[46]。此外,还有一些突变位点如m.12338T>C被认为是LHON继发突变[47],但是该变异在正常人中大量存在[48],因此将此变异归为致病性突变存在较大问题[49]。

3.3 原发突变的异质性

mtDNA的异质性(Heteroplasmy)是指在同一个体、同一组织或同一细胞中存在两种或以上的mtDNA基因型。致病性突变异质性的影响高低影响线粒体疾病发生[50]。大多数携带原发突变的LHON家系都是同质性突变,约有10%~15%的突变携带者存在异质性[1~4]。异质性程度的高低对LHON的发病有影响,有报道表明原发突变的异质性低于60%时,发病的可能性较低[51],但也有一些报道显示,即使原发突变的异质性程度较低,并且没有携带其它继发突变,也会发病[52,53]。因此,LHON发病和原发突变的异质性高低关系具有家族特异性和家系成员异质性。

本课题组研究显示在我国LHON患者中,原发突变异质性的比率很低,在479个携带m.11778G>A的患者中,只有1个患者被检出携带异质性突变(异质性比率约0.2%)[54];而携带m.14484T>C突变患者的异质性程度高于携带m.11778G>A的患者,达5.8%[33]。我们针对1626个疑似和确诊的LHON患者筛选得到6例m.3460G>A突变,其中一例表现有家族史的LHON家系中,先证者m.3460G>A突变的异质性约为40%,该家系的外显率为12.5%,低于我国携带m.3460G>A的LHON家系的总体外显率(25.6%)[34]。我们推测m.3460G>A突变的异质性可能是导致该家系外显率较低的一个原因[34]。相对而言,临床收集到的我国LHON先证者中,绝大多数的病人都含有m.11778G>A突变,但该致病突变基本上都表现为同质性[54]。这种异质性突变分布模式和欧洲人群也存在一些差异。针对含有m.11778G>A突变家系进行全部突变携带者的检测,将有望阐明m.11778G>A突变异质性的由来。

4 其他 mtDNA 突变和线粒体遗传背景对 LHON 发病的影响

除3个原发mtDNA突变、稀有致病性mtDNA突变(如m.3635G>A)及原发突变的异质性外,mtDNA的继发突变和mtDNA的遗传背景(单倍型类群,

haplogroup)等因素都可能影响LHON的发病。

4.1 继发突变的协同作用

不同LHON家系的外显率表现出较大差异,从低于10%到100%不等。影响这种外显率的因素很多,其中继发突变对原发突变的协同作用是不可忽视的一个重要因素。LHON继发突变一般表现为人群中常见变异。目前世界各地学者对LHON继发突变对原发突变的致病协同作用进行了大量的研究。m.12811T>C被认为是LHON的继发突变之一[55],同时该变异在正常人群中被大量报道,是东亚人群mtDNA单倍型类群M7b1'2的界定位点[48]。我们的研究结果提示,M7b1'2类群是m.11778G>A突变外显的重要危险因素[54],这些结果都提示m.12811T>C的继发突变角色。m.593T>C是位于mt-tRNA^{Phe}基因的常见变异,我们近期的一项研究表明,该变异位点可能通过改变MT-TF基因的二级或高级结构,进而影响携带原发突变m.11778G>A的患者发病,增加外显率[56]。

4.2 其他已知致病突变的协同作用

除继发突变外,两个LHON原发突变共发生于同一个家系的病例时有发生报道。2001年Brown等[57]报道了一例同时携带m.11778G>A和m.14484T>C突变的9岁白人女孩。其中m.11778G>A突变存在异质性,在先证者血液提取的DNA中突变异质性为94%,而其母亲血液中为31%;m.14484T>C突变在先证者和其母亲体内均为同质性[57]。该患者的母亲是一个正常携带者,可能与其m.11778G>A突变异质性较低和核基因遗传背景有关[57]。2008年Tonska等[58]报道了一例波兰LHON家系,该家系成员同时携带有m.11778G>A突变和m.3460G>A突变,m.11778G>A是同质性而m.3460G>A突变呈现异质性,该家系成员中男性成员均出现LHON症状但无其他神经系统病症,而所有女性成员均未发病。以上研究似乎表明,原发突变同时存在并没有提高LHON的外显率,也没有加重LHON的临床表现,因此其它因素对LHON发病的影响作用不可忽视。

LHON原发突变和其他线粒体病的致病突变共存于同一个家系的病例也时有发生报道。Mimaki等[59]报道了来自日本的一例携带m.11778G>A和m.12192G>A(心肌病的致病突变)的患者,在51岁因体重迅速减

轻及全身不适入院,当时未出现视神经萎缩的症状,但入院6个月后视力急速下降最终失明。2008年,我们发现一个LHON家系外显率很高(78.6%),通过对先证者mtDNA全基因组分析发现,除m.11778G>A突变外该家系还携带有线粒体遗传性耳聋(非综合征性耳聋)的致病性突变m.1555A>G。临床检查表明,先证者及其母系亲属均无耳聋症状,因此我们推测突变m.1555A>G在该家系中可能只起到增加LHON外显率的作用^[60]。由此可见,两个致病性突变同时发生时,可能一个致病性突变起主导作用,仅表现出一种临床表型,另一个致病突变对其有协同作用;亦或是两个致病性突变独立发挥作用^[60]。

4.3 mtDNA 单倍型类群

线粒体DNA单倍型类群(Haplogroup)是指共享一组相同古老变异的mtDNA世系构成的特定的mtDNA遗传背景。由于mtDNA自身的特点,即突变率高(约是核基因的10倍或以上)、无重组、无组蛋白保护和母系遗传等,使得mtDNA单倍型类群成为标识不同地区人群特定的遗传标记之一。早在1992年, Brown等^[61]提出m.11778G>A突变携带者的发病受多个变异(位于呼吸链复合物I和III)联合作用的影响,具有特定单倍型(Haplotype)(5244-13708-15257-15812)的人群LHON发病率高于正常人。1997年, Torroni等^[62]对37个意大利LHON患者(其中28个携带m.11778G>A, 7个携带m.3460G>A, 2个携带m.14484T>C)进行了mtDNA单倍型类群的划分,结果提示单倍型类群J增加携带m.11778G>A和m.14484T>C突变个体的发病风险。2006年, Shafa Shariat Panahi等^[63]对30个携带原发突变之一、但相互无亲属关系的伊朗LHON患者及100例正常对照进行了研究,依据mtDNA两个高变区的测定结果对这些个体进行单倍型类群的划分,结果发现J类群和W类群分别增加携带m.11778G>A和m.3460G>A的LHON患者的发病率。但该研究样本小,结果需要在大量样本群体中得到验证。

近年来,国内外的研究者加大了mtDNA单倍型类群对LHON外显率及发病影响的研究力度,并取得了一定的成果。2007年, Hudson等^[32]对159个欧洲LHON家系3613个个体进行单倍型类群的分析,结果发现单倍型类群J2(对m.11778G>A携带者)、

J1(对m.14484T>C携带者)和K(对m.3460G>A携带者)是LHON发病的危险因素,而单倍型类群H对m.11778G>A携带者有保护作用。系统进化分析提示,位于J和K类群系统树基部MT-CYB基因上的非同义变异可能是影响LHON发病的原因。虽然欧洲LHON人群的发病受到mtDNA单倍型类群的影响,但由于欧洲人与中国人存在遗传结构差异,是否我国LHON人群的发病也受到单倍型类群的影响呢?为回答这一问题,我们和中山大学中山眼科中心合作,收集了175个无亲属关系并携带m.11778G>A突变的LHON家系,结合前人报道的7个携带m.11778G>A突变的LHON家系^[64-68]共1859人,进行了单倍型类群对LHON临床外显率影响的分析^[35]。结果发现类群M7b1'2明显增加LHON的发病,而类群M8a则起保护效应。经系统进化分析后我们认为位于M7b1'2类群基部的特征性变异m.12811T>C及位于M8a类群基部的变异m.8584G>A和m.8684C>T可能是导致这两个类群产生作用的潜在原因^[35]。随后,我们增大了LHON样本量($n=479$),并收集了大量疑似LHON患者的样本($n=843$),进一步探索mtDNA单倍型类群组成结构对发病的影响^[54]。结果发现线粒体遗传背景和疑似患者的发病没有相关性,单倍型类群M7b和D4在携带m.11778G>A的患者中的比例明显高于正常人或疑似患者群体,而单倍型类群F在LHON患者中的比例则非常低,表明携带m.11778G>A的LHON患者的发病受到这些mtDNA单倍型类群的影响^[54]。

虽然相关性分析显示mtDNA单倍型类群影响LHON发病,但如何从功能上对这种影响作用进行验证却是一个难题。2009年, Suissa等^[69]研究了mtDNA古老变异对其复制和转录的影响,显示J类群的古老变异影响mtDNA的复制且降低其稳定性。同年, Ghelli等^[70]研究了mtDNA单倍型类群结合环境因素对携带m.11778G>A和m.14484T>C的LHON杂合细胞(cybrid)的影响,发现在2,5-己二酮存在的环境中,J类群的LHON杂合细胞较易死亡,而类群U和H对细胞生存有保护作用,提示mtDNA单倍型类群与环境因素结合对LHON的发病起影响作用。

4.4 mtDNA 的突变热点区

相对于含有原发突变的LHON确诊患者,临床

上存在大量有 LHON 症状但无 3 个原发突变的患者 [23, 71]。这类患者的诊断较为困难,特别是在家系信息不明或不具备典型家族史的情况下,较易出现误诊 [22]。基于此类患者的研究,将有望发现新的致病性突变,并能够为相关诊治提供依据。除报道的一些继发 mtDNA 突变外,也有学者提出这类患者具有 mtDNA 的突变热点区(Hot spots),突变热点区域没有固定的致病性突变位点,但是该区域内的非同义点突变都有可能影响呼吸链复合体的功能,进而导致 LHON 的发病 [72, 73]。基于欧洲人群的研究表明, *MT-ND1* 和 *MT-ND6* 基因是无 3 个原发突变 LHON 患者的突变热点区 [72, 73], 但我们的研究显示 *MT-ND1* 和 *MT-ND5* 基因是我国无原发突变 LHON 患者的突变热点区域 [45]。虽然不同研究发现的突变热点区不同,但这些基因都编码呼吸链复合体 I 组成成分,这些区域的非同义变异很可能引起复合体 I 的功能下降。这些研究提示,不同地区无原发突变的 LHON 人群可能存在不同的突变热点区。为什么这些基因是突变热点区,这些突变热点区的变异如何引发 LHON 等问题还有待于进一步研究。

5 核基因的研究

5.1 X 染色体的研究

除线粒体外,还存在其它的遗传因素(如核基因)影响 LHON 的发病。男性好发的特点提示 X 染色体基因参与该病发生。X 染色体失活被认为是男性高发率的一个可能原因 [74, 75]。线粒体和核基因双位模型提出后(该模型强调只有在 mtDNA 致病突变和 X 染色体易感基因同时存在时,才会导致 LHON 的发生,而女性的 X 染色体易感基因为纯合时才会发病,因此女性的发病率显著低于男性),研究人员对不同地区 LHON 患者人群进行了 X 染色体连锁性分析,但不同的研究发现的 X 染色体连锁区段存在较大差异。Vilkkil 等 [76] 对 6 个 LHON 家系进行 X 染色体连锁分析发现,位于 X 染色体长臂的 DXS7 位点所在区域与 LHON 发病紧密连锁。1996 年, Oostr 等 [77] 和 Pegoraro 等 [78] 分别对女性 LHON 患者的 X 染色体进行了研究,未发现 X 染色体特定区域与 LHON 发病有连锁关系,这与 Vilkkil 等 [76] 的结论相矛盾。之后更多的研究被开展, Hudson 等 [79] 对 100 个 LHON 家系(分别

来自芬兰、英国、西班牙及匈牙利等)的 389 个个体进行了 X 染色体连锁分析,发现 DXS8090(166)-DXS1068(258)区段与 LHON 的发病存在连锁关系,但是这种连锁关系是独立存在的,即该连锁关系不与 mtDNA 的单倍型类群共同发挥作用。Shankar 等 [80] 对巴西一例 LHON 家系的 61 名母系成员 X 染色体进行分析,将连锁易感区域定位在 Xp25-Xq27.2。针对 X 染色体编码的线粒体呼吸链复合物 I 的组成基因 *NDUFB11*(该基因靠近 DXS1219-DXS8016 区域)和 *NDUFA1* 的分析表明,这两个候选基因都不参与影响 LHON 原发性突变的外显 [81, 82]。

在我国 LHON 人群中,针对 X 染色体的研究相对较少。最近, Ji 等 [83] 对 175 例携带 m.11778G>A 的男性 LHON 患者和 100 例正常男性 X 染色体的 12 个微卫星标记和 4 个单核苷酸多态位点(SNP)进行分析,发现两个微卫星(DXS6803 和 DXS984)与 LHON 的发病有相关性,而 SNP 位点在 LHON 患者和正常人中无统计学差异。该结果与前人报道的结果存在差异,提示不同地区人群的差异。X 染色体究竟如何发挥作用影响 LHON 发病目前还是一个未解难题。X 染色体失活可能是引起 LHON 发病的原因。另有研究表明在 LHON 女性患者中, X 染色体活性与未发病的原发突变携带女性或正常对照没有显著差异,然而患者组雄激素受体纯合子(Homozygotes)远远高于另外两组人群,因此,雄激素受体可能是 LHON 发病的影响因素或易感基因 [84]。

5.2 其他核基因的研究

X 染色体的失活、X 染色体编码基因的影响和雄激素受体并不能完全解释 LHON 临床发病出现的不完全外显和性别偏好,因此对于其它核基因的研究很有必需,也将发现新的易感基因和机制。Abu-Amero 等 [85] 对 62 例携带 m.11778G>A 突变的 LHON 患者和 62 例年龄、性别等均匹配的正常对照个体细胞进行了全基因组表达谱分析,在 LHON 患者中发现 137 个上调基因和 152 个下调基因,约 13.8% 的上调基因和 17.8% 的下调基因参与细胞的转运或转录过程。他们的结果进一步显示, *OPAI* 基因在 LHON 患者中的表达量明显低于正常对照组 [85]。 *OPAI* 基因的突变是常染色体显性遗传性视神经萎

缩的主要致病因素,它的主要功能参与调节线粒体内膜和嵴的融合及分裂过程^[86],从而维持线粒体的正常形态及功能,该基因的表达下降可能导致线粒体动态结构的破坏,从而增加LHON的患病风险。

最近, Phasukkijwatana 等^[87]对9个携带m.11778G>A的泰国LHON家系进行了全基因组关联扫描,并对可能的关联区域做了深入分析,发现染色体3q26.2-3q28区段与LHON的发病相关,该区段包含*OPA1*和*PARL*等6个基因。他们对*PARL*基因进行了深入的研究,发现该基因上的两个SNP位点(rs3749446和rs1402000)与LHON的发病存在相关性^[87]。针对这一结果,本课题组选取了179例携带m.11778G>A的LHON患者,170例疑似LHON患者和58例正常对照个体进行*PARL*基因SNP基因型、等位基因型和单倍型分析,未能在我国人群中证实rs3749446和rs1402000与LHON的发病的相关性^[88]。有研究表明,GWAS研究与疾病有关联的常见SNP位点可能不是致病位点的真实反映^[89],因此我们的结果并未完全排除*PARL*基因与LHON发病的潜在相关性。

6 环境因素的影响

虽然LHON是典型的线粒体遗传病,但是其发病受环境因素的影响^[4]。该病的主要发病人群为青壮年男性,这使研究者把目光投向一些特殊的环境和生活因素,如吸烟、饮酒等。同时药物使用和其他疾病也可能对LHON发病产生影响^[4]。无论在欧美发达国家还是在亚太地区发展中国家,抑或是非洲落后国家,男性吸烟及饮酒的比例均高于女性,是否这两个常见的环境因素对LHON的发病产生影响呢?早在20世纪90年代,Charlmers等^[90]就对英国50例LHON患者(35例携带m.11778G>A,7例携带m.3460G>A,8例携带m.14484T>C)和50例正常对照人群进行了环境因素影响的研究,无药物使用史或其它疾病史与LHON的发病有相关性,吸烟不影响LHON的发病,而饮酒可以增加m.3460G>A和m.14484T>C外显率。由于该研究样本量小,结果可信度不高。近期,Kirkman等^[91]开展的一个较大规模(196例患者和206例对照个体)的基因-环境因素相互作用的研究,得到了与Charlmers等^[90]相反的结论。他们的结果显示,吸烟对LHON发病的影响不依

赖于性别和饮酒习惯而独立发生;只有当过量饮酒时,LHON的发病才受酗酒的影响^[90]。以上结果均表明环境因素(特别是生活习惯)与LHON的发病相关,而吸烟和酗酒对LHON的影响似乎可以部分解释性别偏好这一特点。

除上述的一些环境因素外,其他疾病也可能是诱发LHON的因素之一。一些原发突变携带者并没有在高发年龄(即青壮年)表现出任何眼科疾病的症状,但随着年龄的增长,特别是当其发生某种疾病时可能诱发LHON。近期,Shah等^[92]报道了一例72岁的老人病例,虽然该病人有多种疾病,如高血压、糖尿病、冠状动脉病等,但是直到他接受了白内障手术后才诱发LHON症状的出现,并且病程发展较缓慢。这说明对于一些携带者,衰老和其它眼科疾病可能是LHON发病的一个相关因素;这同时提示LHON发病的复杂性。

7 功能实验及动物模型

线粒体有其自身编码的DNA,每个细胞含有100~1000个线粒体,而每个线粒体内有几个到几十个mtDNA,因此部分mtDNA分子突变会造成突变的异质性,并且线粒体蛋白的密码子不同于核基因,所有这些因素导致mtDNA突变致病性的功能验证在技术上存在很大的难度。LHON作为典型的mtDNA突变引起的疾病,自然成为研究线粒体病的极好模型。

近年来,很多研究者运用同素异位表达(Allotopic expression)的方法对LHON进行了研究。该方法根据核基因的密码子合成一段mtDNA自身编码蛋白的DNA序列,并将该DNA序列构建入载体,在编码序列前面加上线粒体引导序列(起到把该蛋白导入线粒体的作用),后方加上标签序列如FLAG(便于检测表达的外源蛋白是否进入线粒体),以及促进蛋白线粒体定位的3'UTR序列(促进表达的外源蛋白序列能顺利进入线粒体)^[93,94]。该方法建立后,研究者以LHON为主要研究对象进行了一系列损伤修复研究,结果表明野生型外源蛋白均能恢复突变时呼吸链复合物I的受损活性^[95]。虽然该方法在现阶段有大量尝试,但有研究表明此方法存在一定的局限性,如某些线粒体编码的亚基疏水性非常强,这些蛋白是否能进入线粒体并有效的整合到复合物上发挥作用尚

不能确定^[96, 97]。近期, Wang等^[98]创建了一种更优越的方法将外源的线粒体RNA序列导入线粒体内部, 并能正确定位和折叠。该方法中同样用 5'和 3'的线粒体定位序列将RNA引导至靠近线粒体外膜, mRNA在进入线粒体的同时也不断进行着翻译过程, 最终合成相应的蛋白亚基, 正确整合进复合物中。这种方法虽然简化了mtDNA突变的功能研究, 但该方法也存在一些不足, 如不确定是否能引导较长的外源RNA进入线粒体等, 需要进一步探索。

因为技术上的不足, 线粒体病动物模型的构建非常困难。基于以上限制因素, 研究者考虑构建组织特异性损伤的动物模型。2007年, Qi等^[99]将有m.11778G>A突变的MT-ND4蛋白分别转入小鼠的视网膜神经母细胞和小鼠的眼球中, 结果发现一系列细胞表型或活性的变化, 如细胞存活率降低、凋亡增加、氧化自由基水平增高、小鼠视神经萎缩等, 证明LHON的原发突变确实能单独发挥损伤细胞及影响视力的作用。2008年, Ellouze等^[100]利用电穿孔技术将突变的MT-ND4蛋白转入小鼠的眼球内, 结果发现小鼠出现失明症状, 随后又用野生型的MT-ND4蛋白对其进行拯救, 发现失明的小鼠视力有所恢复。虽然现有的动物模型存在很多局限, 如只能通过局部注射构建局部动物模型, 无法构建持续表达突变体的动物模型等, 但动物模型的建立已经取得了较大的突破, 为下一步模型的制作提供了一定的参考和依据。

最近, Tachibana等^[101]对替换了线粒体的猴卵母细胞进行培养, 并将其成功培育成幼猴, 遗传学鉴定证明3只猴子的核基因均来自亲本, 而mtDNA来自捐献者。这项研究使mtDNA突变引起的线粒体病患者(包括LHON患者)看到了治愈的曙光, 但是这样培养出的幼猴会有两个以上的父母, 如果该技术应用于人类必定引发伦理学方面的争论。另外, 应用该技术培育出的幼猴未经过长期的观察, 不能确定这项技术是否存在某些未知的负面影响。

8 结语与展望

LHON是最常见的青壮年男性致盲原因之一。失明给人们的生活带来很大的不便, 严重影响生活质量, 因此对该病进行研究以寻找有效的防治方法很有必要。虽然3个mtDNA原发突变已确定是LHON

的病因, 但是该病的不完全外显、男性发病偏好和青壮年时期发病一直是困扰研究者的三大难题, 这也提示必定有其它的遗传因素或环境因素在LHON的发病过程中发挥作用。mtDNA的继发突变、其它的mtDNA致病性突变、mtDNA遗传背景、核基因和环境因素均可影响LHON的发病, 但是不同地区人群的现有研究没有得到统一的结论, 吸烟饮酒等生活习惯对LHON发病的影响也需要进一步的证实。核编码线粒体蛋白基因的表现遗传学研究, 如基因甲基化水平以及microRNA表达调控, 也许可以部分解释LHON发病的临床特点。另外, LHON原发突变还可影响其他组织器官的功能障碍, 如我们近期在一个大家系中发现m.14484T>C突变可导致高血压而非LHON^[102], 提示这些原发突变致病的复杂性。随着研究技术和方法的发展, LHON的研究将向着后基因组时代如功能基因组、结构基因组学、表观基因组和蛋白组学等迈进。虽然LHON的发病机制非常复杂, 目前尚未找到有效的预防和治疗方法, 但对于LHON发病机制的研究将为以后的遗传咨询和临床诊治奠定坚实的理论基础, 也将成为线粒体病研究的范式。

参考文献(References):

- [1] Man PYW, Turnbull DM, Chinnery PF. Leber hereditary optic neuropathy. *J Med Genet*, 2002, 39(3): 162-169. [DOI](#)
- [2] Carelli V, Ross-Cisneros FN, Sadun AA. Mitochondrial dysfunction as a cause of optic neuropathies. *Prog Retin Eye Res*, 2004, 23(1): 53-89. [DOI](#)
- [3] Yen MY, Wang AG, Wei YH. Leber's hereditary optic neuropathy: a multifactorial disease. *Prog Retin Eye Res*, 2006, 25(4): 381-396. [DOI](#)
- [4] Yu-Wai-Man P, Griffiths PG, Hudson G, Chinnery PF. Inherited mitochondrial optic neuropathies. *J Med Genet*, 2009, 46(3): 145-158. [DOI](#)
- [5] Erickson RP. Leber's optic atrophy, a possible example of maternal inheritance. *Am J Hum Genet*, 1972, 24(3): 348-349. [DOI](#)
- [6] Wallace DC, Singh G, Lott MT, Hodge JA, Schurr TG, Lezza AM, Elsas LJ 2nd, Nikoskelainen EK. Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science*, 1988, 242(4884): 1427-1430. [DOI](#)
- [7] Mackey D, Howell N. A variant of Leber hereditary optic neuropathy characterized by recovery of vision and by an unusual mitochondrial genetic etiology. *Am J Hum Genet*,

- 1992, 51(6): 1218–1228. [DOI](#)
- [8] Huoponen K, Vilkki J, Aula P, Nikoskelainen EK, Savontaus ML. A new mtDNA mutation associated with Leber hereditary optic neuroretinopathy. *Am J Hum Genet*, 1991, 48(6): 1147–1153. [DOI](#)
- [9] Howell N, Bindoff LA, McCullough DA, Kubacka I, Poulton J, Mackey D, Taylor L, Turnbull DM. Leber hereditary optic neuropathy: identification of the same mitochondrial ND1 mutation in six pedigrees. *Am J Hum Genet*, 1991, 49(5): 939–950. [DOI](#)
- [10] 张志平, 张丽珊, 黄鹰, 王世浚, 李方园, 童绎, 高静娟, 朱斌. Leber氏病的mtDNA突变. *遗传*, 1992, 14(2): 21–23. [DOI](#)
- [11] 冯雪梅, 高殿文, 张巍. 散发性Leber遗传性视神经病的基因诊断. *遗传*, 2000, 22(1): 19–20. [DOI](#)
- [12] 林玲, 陈贻锴, 童绎, 郑志斌, 林建银, 朱进伟. Leber遗传性视神经病变家系的线粒体基因突变分析. *遗传*, 2003, 25(3): 267–270. [DOI](#)
- [13] 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](#)
- [14] 郭向明, 贾小云, 肖学珊, 郭莉, 黎仕强, 张清炯. 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. [DOI](#)
- [15] Seedorff T. The inheritance of Leber's disease. A genealogical follow-up study. *Acta Ophthalmol (Copenh)*, 1985, 63(2): 135–145. [DOI](#)
- [16] Harding AE, Sweeney MG, Govan GG, Riordan-Eva P. Pedigree analysis in Leber hereditary optic neuropathy families with a pathogenic mtDNA mutation. *Am J Hum Genet*, 1995, 57(1): 77–86. [DOI](#)
- [17] Riordan-Eva P, Harding AE. Leber's hereditary optic neuropathy: the clinical relevance of different mitochondrial DNA mutations. *J Med Genet*, 1995, 32(2): 81–87. [DOI](#)
- [18] Nikoskelainen EK, Huoponen K, Juvonen V, Lamminen T, Nummelin K, Savontaus ML. Ophthalmologic findings in Leber hereditary optic neuropathy, with special reference to mtDNA mutations. *Ophthalmology*, 1996, 103(3): 504–514. [DOI](#)
- [19] La Morgia C, Achilli A, Iommarini L, Barboni P, Pala M, Olivieri A, Zanna C, Vidoni S, Tonon C, Lodi R, Vetrugno R, Mostacci B, Liguori R, Carroccia R, Montagna P, Rugolo M, Torroni A, Carelli V. Rare mtDNA variants in Leber hereditary optic neuropathy families with recurrence of myoclonus. *Neurology*, 2008, 70(10): 762–770. [DOI](#)
- [20] Jaros E, Mahad DJ, Hudson G, Birchall D, Sawcer SJ, Griffiths PG, Sunter J, Compston DA, Perry RH, Chinnery PF. Primary spinal cord neurodegeneration in Leber hereditary optic neuropathy. *Neurology*, 2007, 69(2): 214–216. [DOI](#)
- [21] Sorajja P, Sweeney MG, Chalmers R, Sachdev B, Syrris P, Hanna M, Wood ND, McKenna WJ, Elliott PM. Cardiac abnormalities in patients with Leber's hereditary optic neuropathy. *Heart*, 2003, 89(7): 791–792. [DOI](#)
- [22] Ferré M, Bonneau D, Milea D, Chevrollier A, Verny C, Dollfus H, Ayuso C, Defoort S, Vignal C, Zanlonghi X, Charlin JF, Kaplan J, Odent S, Hamel CP, Procaccio V, Reynier P, Amati-Bonneau P. Molecular screening of 980 cases of suspected hereditary optic neuropathy with a report on 77 novel OPA1 mutations. *Hum Mutat*, 2009, 30(7): E692–E705. [DOI](#)
- [23] Jia XY, Li SQ, Xiao XS, Guo XM, Zhang QJ. Molecular epidemiology of mtDNA mutations in 903 Chinese families suspected with Leber hereditary optic neuropathy. *J Hum Genet*, 2006, 51(10): 851–856. [DOI](#)
- [24] Mashima Y, Kigasawa K, Wakakura M, Oguchi Y. Do idebenone and vitamin therapy shorten the time to achieve visual recovery in Leber hereditary optic neuropathy? *J Neuroophthalmol*, 2000, 20(3): 166–170. [DOI](#)
- [25] Stone EM, Newman NJ, Miller NR, Johns DR, Lott MT, Wallace DC. Visual recovery in patients with Leber's hereditary optic neuropathy and the 11778 mutation. *J Clin Neuroophthalmol*, 1992, 12(1): 10–14. [DOI](#)
- [26] Chinnery PF, Johnson MA, Wardell TM, Singh-Kler R, Hayes C, Brown DT, Taylor RW, Bindoff LA, Turnbull DM. The epidemiology of pathogenic mitochondrial DNA mutations. *Ann Neurol*, 2000, 48(2): 188–193. [DOI](#)
- [27] Man PYW, Griffiths PG, Brown DT, Howell N, Turnbull DM, Chinnery PF. The epidemiology of Leber hereditary optic neuropathy in the North East of England. *Am J Hum Genet*, 2003, 72(2): 333–339. [DOI](#)
- [28] Spruijt L, Kolbach DN, de Coe RF, Plomp AS, Bauer NJ, Smeets HJ, de Die-Smulders CE. Influence of mutation type on clinical expression of Leber hereditary optic neuropathy. *Am J Ophthalmol*, 2006, 141(4): 676–682. [DOI](#)
- [29] Puomila A, Hamalainen P, Kivioja S, Savontaus ML, Koivumaki S, Huoponen K, Nikoskelainen E. Epidemiology and penetrance of Leber hereditary optic neuropathy in Finland. *Eur J Hum Genet*, 2007, 15(10): 1079–1089. [DOI](#)
- [30] Elliott HR, Samuels DC, Eden JA, Relton CL, Chinnery PF. Pathogenic mitochondrial DNA mutations are common in the general population. *Am J Hum Genet*, 2008, 83(2): 254–260. [DOI](#)
- [31] Bi R, Zhang AM, Yu D, Chen D, Yao YG. Screening the three LHON primary mutations in the general Chinese

- population by using an optimized multiplex allele-specific PCR. *Clin Chim Acta*, 2010, 411(21–22): 1671–1674. [DOI](#)
- [32] 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](#)
- [33] Yu DD, Jia XY, Zhang AM, Li SQ, Zou Y, Zhang QJ, Yao YG. Mitochondrial DNA sequence variation and haplogroup distribution in Chinese patients with LHON and m. 14484T>C. *PLoS ONE*, 2010, 5(10): e13426. [DOI](#)
- [34] Yu D, Jia X, Zhang AM, Guo X, Zhang YP, Zhang Q, Yao YG. Molecular characterization of six Chinese families with m. 3460G>A and Leber hereditary optic neuropathy. *Neurogenetics*, 2010, 11(3): 349–356. [DOI](#)
- [35] Ji Y, Zhang AM, Jia X, Zhang YP, Xiao X, Li S, Guo X, Bandelt HJ, Zhang Q, Yao YG. Mitochondrial DNA haplogroups M7b1'2 and M8a affect clinical expression of leber hereditary optic neuropathy in Chinese families with the m. 11778G>A mutation. *Am J Hum Genet*, 2008, 83(6): 760–768. [DOI](#)
- [36] Macmillan C, Kirkham T, Fu K, Allison V, Andermann E, Chitayat D, Fortier D, Gans M, Hare H, Quercia N, Zackon D, Shoubridge EA. Pedigree analysis of French Canadian families with T14484C Leber's hereditary optic neuropathy. *Neurology*, 1998, 50(2): 417–422. [DOI](#)
- [37] Macmillan C, Johns TA, Fu K, Shoubridge EA. Predominance of the T14484C mutation in French-Canadian families with Leber hereditary optic neuropathy is due to a founder effect. *Am J Hum Genet*, 2000, 66(1): 332–335. [DOI](#)
- [38] Bandelt HJ, Salas A, Taylor RW, Yao YG. Exaggerated status of "novel" and "pathogenic" mtDNA sequence variants due to inadequate database searches. *Hum Mutat*, 2009, 30(2): 191–196. [DOI](#)
- [39] Zhang AM, Jia X, Guo X, Zhang Q, Yao YG. Mitochondrial DNA mutation m. 3635G>A may be associated with Leber hereditary optic neuropathy in Chinese. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 386(2): 392–395. [DOI](#)
- [40] Brown MD, Zhadanov S, Allen JC, Hosseini S, Newman NJ, Atamonov VV, Mikhailovskaya IE, Sukernik RI, Wallace DC. Novel mtDNA mutations and oxidative phosphorylation dysfunction in Russian LHON families. *Hum Genet*, 2001, 109(1): 33–39. [DOI](#)
- [41] Yang JH, Zhu YH, Tong Y, Chen L, Liu LJ, Zhang ZQ, Wang XY, Huang DG, Qiu WT, Zhuang SL, Ma X. Confirmation of the mitochondrial *ND1* gene mutation G3635A as a primary LHON mutation. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 386(1): 50–54. [DOI](#)
- [42] Jia X, Li S, Wang P, Guo X, Zhang Q. mtDNA m. 3635G>A may be classified as a common primary mutation for Leber hereditary optic neuropathy in the Chinese population. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 403(2): 237–241. [DOI](#)
- [43] Bi R, Zhang AM, Jia X, Zhang Q, Yao YG. Complete mtDNA genome sequence variation of Chinese families with mutation m. 3635G>A and LHON. *Mol Vis*, 2012, 18: 3087–3094.
- [44] Yang JH, Zhu YH, Tong Y, Zhang ZQ, Chen L, Chen SJ, Cao ZF, Liu CM, Xu JH, Ma X. The novel G10680A mutation is associated with complete penetrance of the LHON/T14484C family. *Mitochondrion*, 2009, 9(4): 273–278. [DOI](#)
- [45] Zou Y, Jia XY, Zhang AM, Wang WZ, Li SQ, Guo XM, Kong QP, Zhang QJ, Yao YG. The *MT-ND1* and *MT-ND5* genes are mutational hotspots for Chinese families with clinical features of LHON but lacking the three primary mutations. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 399(2): 179–185. [DOI](#)
- [46] Zhang AM, Jia X, Guo X, Zhang Q, Yao YG. Mitochondrial DNA mutation m. 10680G>A is associated with Leber hereditary optic neuropathy in Chinese patients. *J Transl Med*, 2012, 10(1): 43. [DOI](#)
- [47] 冀延春, 刘晓玲, 赵福新, 张娟娟, 章豫, 周翔天, 瞿佳, 管敏鑫. 线粒体T12338C突变可能是与Leber遗传性视神经病变相关的突变位点. *遗传*, 2011, 33(4): 322–328. [DOI](#)
- [48] Kong QP, Bandelt HJ, Sun C, Yao YG, Salas A, Achilli A, Wang CY, Zhong L, Zhu CL, Wu SF, Torroni A, Zhang YP. Updating the East Asian mtDNA phylogeny: a prerequisite for the identification of pathogenic mutations *Hum Mol Genet*, 2006, 15(13): 2076–2086. [DOI](#)
- [49] Bi R, Zhang AM, Yao YG. Leber's hereditary optic neuropathy. *Ophthalmology*, 2011, 118(7): 1489–1489.e1.
- [50] DiMauro SSchon EA. Mitochondrial respiratory-chain diseases. *N Engl J Med*, 2003, 348(26): 2656–2668. [DOI](#)
- [51] Chinnery PF, Andrews RM, Turnbull DM, Howell NN. Leber hereditary optic neuropathy: Does heteroplasmy influence the inheritance and expression of the G11778A mitochondrial DNA mutation? *Am J Med Genet*, 2001, 98(3): 235–243. [DOI](#)
- [52] Jacobi FK, Leo-Kottler B, Mittelviehhaus K, Zrenner E, Meyer J, Pusch CM, Wissinger B. Segregation patterns and heteroplasmy prevalence in Leber's hereditary optic neuropathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2001, 42(6): 1208–1214. [DOI](#)

- [53] Black GC, Morten K, Laborde A, Poulton J. Leber's hereditary optic neuropathy: heteroplasmy is likely to be significant in the expression of LHON in families with the 3460 ND1 mutation. *Br J Ophthalmol*, 1996, 80(10): 915–917. [DOI](#)
- [54] Zhang AM, Jia XY, Bi R, Salas A, Li SQ, Xiao XS, Wang PF, Guo XM, Kong QP, Zhang QJ, Yao YG. Mitochondrial DNA haplogroup background affects LHON, but not suspected LHON, in Chinese patients. *PLoS ONE*, 2011, 6(11): e27750. [DOI](#)
- [55] Huoponen K, Lamminen T, Juvonen V, Aula P, Nikoskelainen E, Savontaus ML. The spectrum of mitochondrial DNA mutations in families with Leber hereditary optic neuroretinopathy. *Hum Genet*, 1993, 92(4): 379–384. [DOI](#)
- [56] Zhang AM, Bandelt HJ, Jia X, Zhang W, Li S, Yu D, Wang D, Zhuang XY, Zhang Q, Yao YG. Is mitochondrial tRNA (phe) variant m. 593T>C a synergistically pathogenic mutation in Chinese LHON families with m. 11778G>A? *PLoS ONE*, 2011, 6(10): e26511. [DOI](#)
- [57] Brown MD, Allen JC, Van Stavern GP, Newman NJ, Wallace DC. Clinical, genetic, and biochemical characterization of a Leber hereditary optic neuropathy family containing both the 11778 and 14484 primary mutations. *Am J Med Genet*, 2001, 104(4): 331–338. [DOI](#)
- [58] Tonska K, Kurzawa M, Ambroziak AM, Korwin-Rujna M, Szaflik JP, Grabowska E, Szaflik J, Bartnik E. A family with 3460G>A and 11778G>A mutations and haplogroup analysis of Polish Leber hereditary optic neuropathy patients. *Mitochondrion*, 2008, 8(5–6): 383–388. [DOI](#)
- [59] Mimaki M, Ikota A, Sato A, Komaki H, Akanuma J, Nonaka I, Goto YI. A double mutation (G11778A and G12192A) in mitochondrial DNA associated with Leber's hereditary optic neuropathy and cardiomyopathy. *J Hum Genet*, 2003, 48(1): 47–50. [DOI](#)
- [60] Zhang AM, Jia XJ, Yao YG, Zhang QJ. Co-occurrence of A1555G and G11778A in a Chinese family with high penetrance of Leber's hereditary optic neuropathy. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 376(1): 221–224. [DOI](#)
- [61] Brown MD, Voljavec AS, Lott MT, Torroni A, Yang CC, Wallace DC. Mitochondrial DNA complex I and III mutations associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Genetics*, 1992, 130(1): 163–173. [DOI](#)
- [62] Torroni A, Petrozzi M, D'Urbano L, Sellitto D, Zeviani M, Carrara F, Carducci C, Leuzzi V, Carelli V, Barboni P, De Negri A, Scozzari R. Haplotype and phylogenetic analyses suggest that one European-specific mtDNA background plays a role in the expression of Leber hereditary optic neuropathy by increasing the penetrance of the primary mutations 11778 and 14484. *Am J Hum Genet*, 1997, 60(5): 1107–1121. [DOI](#)
- [63] Shafa Shariat Panahi M, Houshmand M, Tabassi AR. Mitochondrial D-loop variation in leber hereditary neuropathy patients harboring primary G11778A, G3460A, T14484C mutations: J and W haplogroups as high-risk factors. *Arch Med Res*, 2006, 37(8): 1028–1033. [DOI](#)
- [64] Li RH, Qu J, Zhou XT, Tong Y, Hu YW, Qian YP, Lu F, Mo JQ, West CE, Guan MX. The mitochondrial tRNA^{Thr} 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](#)
- [65] Qian YP, Zhou XT, Hu YW, Tong Y, Li RH, Lu F, Yang HM, Mo JQ, Qu J, Guan MX. Clinical evaluation and mitochondrial DNA sequence analysis in three Chinese families with Leber's hereditary optic neuropathy. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 332(2): 614–621. [DOI](#)
- [66] Qu J, Li RH, Tong Y, Hu YW, Zhou XT, Qian YP, Lu F, Guan MX. Only male matrilineal relatives with Leber's hereditary optic neuropathy in a large Chinese family carrying the mitochondrial DNA G11778A mutation. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 328(4): 1139–1145. [DOI](#)
- [67] 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^{Met} may modulate the phenotypic expression of the LHON-associated ND4 G11778A mutation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2006, 47(2): 475–483. [DOI](#)
- [68] Qu J, Li R, Zhou X, Tong Y, Yang L, Chen J, Zhao F, Lu C, Qian Y, 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](#)
- [69] Suissa S, Wang ZB, Poole J, Wittkopp S, Feder J, Shutt TE, Wallace DC, Shadel GS, Mishmar D. Ancient mtDNA genetic variants modulate mtDNA transcription and replication. *PLoS Genet*, 2009, 5(5): e1000474. [DOI](#)
- [70] Ghelli A, Porcelli AM, Zanna C, Vidoni S, Mattioli S, Barbieri A, Iommarini L, Pala M, Achilli A, Torroni A, Rugolo M, Carelli V. The background of mitochondrial DNA haplogroup J increases the sensitivity of Leber's hereditary optic neuropathy cells to 2, 5-hexanedione toxicity. *PLoS ONE*, 2009, 4(11): e7922. [DOI](#)
- [71] Newman NJ. Hereditary optic neuropathies: from the mitochondria to the optic nerve. *Am J Ophthalmol*, 2005, 140(3): 517–523. [DOI](#)
- [72] Chinnery PF, Brown DT, Andrews RM, Singh-Kler R, Riordan-Eva P, Lindley J, Applegarth DA, Turnbull DM,

- Howell N. The mitochondrial ND6 gene is a hot spot for mutations that cause Leber's hereditary optic neuropathy. *Brain*, 2001, 124(Pt 1): 209–218. [DOI](#)
- [73] Valentino ML, Barboni P, Ghelli A, Bucchi L, Rengo C, Achilli A, Torroni A, Lugaesi A, Lodi R, Barbiroli B, Dotti M, Federico A, Baruzzi A, Carelli V. The ND1 gene of complex I is a mutational hot spot for Leber's hereditary optic neuropathy. *Ann Neurol*, 2004, 56(5): 631–641. [DOI](#)
- [74] 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](#)
- [75] Bu X, Rotter JI. Leber hereditary optic neuropathy: estimation of number of embryonic precursor cells and disease threshold in heterozygous affected females at the X-linked locus. *Clin Genet*, 1992, 42(3): 143–148. [DOI](#)
- [76] Vilkki J, Ott J, Savontaus ML, Aula P, Nikoskelainen EK. Optic atrophy in Leber hereditary optic neuroretinopathy is probably determined by an X-chromosomal gene closely linked to DXS7. *Am J Hum Genet*, 1991, 48(3): 486–491. [DOI](#)
- [77] Oostra RJ, Kemp S, Bolhuis PA, Bleeker-Wagemakers EM. No evidence for 'skewed' inactivation of the X-chromosome as cause of Leber's hereditary optic neuropathy in female carriers. *Hum Genet*, 1996, 97(4): 500–505. [DOI](#)
- [78] Pegoraro E, Carelli V, Zeviani M, Cortelli P, Montagna P, Barboni P, Angelini C, Hoffman EP. X-inactivation patterns in female Leber's hereditary optic neuropathy patients do not support a strong X-linked determinant. *Am J Med Genet*, 1996, 61(4): 356–362. [DOI](#)
- [79] Hudson G, Keers S, Man PYW, Griffiths P, Huoponen K, Savontaus ML, Nikoskelainen E, Zeviani M, Carrara F, Horvath R, Karcagi V, Spruijt L, de Coe IFM, Smeets HJM, 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](#)
- [80] 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](#)
- [81] Man PY, Brown DT, Wehnert MS, Zeviani M, Carrara F, Turnbull DM, Chinnery PF. NDUFA-1 is not a nuclear modifier gene in Leber hereditary optic neuropathy. *Neurology*, 2002, 58(12): 1861–1862. [DOI](#)
- [82] Petruzzella V, Tessa A, Torraco A, Fattori F, Dotti MT, Bruno C, Cardaioli E, Papa S, Federico A, Santorelli FM. The *NDUFB11* gene is not a modifier in Leber hereditary optic neuropathy. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 355(1): 181–187. [DOI](#)
- [83] Ji Y, Jia X, Li S, Xiao X, Guo X, Zhang Q. Evaluation of the X-linked modifier loci for Leber hereditary optic neuropathy with the G11778A mutation in Chinese. *Mol Vis*, 2010, 16: 416–424. [DOI](#)
- [84] Hudson G, Carelli V, Horvath R, Zeviani M, Smeets HJ, Chinnery PF. X-Inactivation patterns in females harboring mtDNA mutations that cause Leber hereditary optic neuropathy. *Mol Vis*, 2007, 13: 2339–2343. [DOI](#)
- [85] Abu-Amero KK, Jaber M, Hellani A, Bosley TM. Genome-wide expression profile of LHON patients with the 11778 mutation. *Br J Ophthalmol*, 2010, 94(2): 256–259. [DOI](#)
- [86] Olichon A, Baricault L, Gas N, Guillou E, Valette A, Belenguer P, Lenaers G. Loss of OPA1 perturbs the mitochondrial inner membrane structure and integrity, leading to cytochrome c release and apoptosis. *J Biol Chem*, 2003, 278(10): 7743–7746. [DOI](#)
- [87] Phasukkijwatana N, Kunhapan B, Stankovich J, Chuenkongkaew WL, Thomson R, Thornton T, Bahlo M, Mushiroda T, Nakamura Y, Mahasirimongkol S, Tun AW, Srisawat C, Limwongse C, Peerapittayamongkol C, Sura T, Suthammarak W, Lertrit P. Genome-wide linkage scan and association study of PARL to the expression of LHON families in Thailand. *Hum Genet*, 2010, 128(1): 39–49. [DOI](#)
- [88] Zhang AM, Jia X, Zhang QJ, Yao YG. No association between the SNPs (rs3749446 and rs1402000) in the PARL gene and LHON in Chinese patients with m.11778G>A. *Hum Genet*, 2010, 128(4): 465–468. [DOI](#)
- [89] Dickson SP, Wang K, Krantz I, Hakonarson H, Goldstein DB. Rare variants create synthetic genome-wide associations. *PLoS Biol*, 2010, 8(1): e1000294. [DOI](#)
- [90] Charlmers RM, Harding AE. A case-control study of Leber's hereditary optic neuropathy. *Brain*, 1996, 119 (Pt 5): 1481–1486. [DOI](#)
- [91] Kirkman MA, Yu-Wai-Man P, Korsten A, Leonhardt M, Dimitriadis K, De Coe IF, Klopstock T, Chinnery PF. Gene-environment interactions in Leber hereditary optic neuropathy. *Brain*, 2009, 132(Pt 9): 2317–2326. [DOI](#)
- [92] Shah VA, Randhawa S, Mizen T, Lee AG, Foroozan R. You're too old for that. *Surv Ophthalmol*, 2008, 53(4): 403–410. [DOI](#)
- [93] Sylvestre J, Margeot A, Jacq C, Dujardin G, Corral-Debrinski M. The role of the 3' untranslated region in mRNA sorting to the vicinity of mitochondria is conserved from yeast to human cells. *Mol Biol Cell*, 2003, 14(9):

- 3848–3856. [DOI](#)
- [94] Guy J, Qi XP, Pallotti F, Schon EA, Manfredi G, Carelli V, Martinuzzi A, Hauswirth WW, Lewin AS. Rescue of a mitochondrial deficiency causing Leber Hereditary Optic Neuropathy. *Ann Neurol*, 2002, 52(5): 534–542. [DOI](#)
- [95] Bonnet C, Augustin S, Ellouze S, Benit P, Bouaita A, Rustin P, Sahel JA, Corral-Debrinski M. The optimized allotopic expression of *ND1* or *ND4* genes restores respiratory chain complex I activity in fibroblasts harboring mutations in these genes. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1783(10): 1707–1717. [DOI](#)
- [96] Figueroa-Martínez F, Vázquez-Acevedo M, Cortés-Hernández P, García-Trejo JJ, Davidson E, King MP, González-Halphen D. What limits the allotopic expression of nucleus-encoded mitochondrial genes? The case of the chimeric *Cox3* and *Atp6* genes. *Mitochondrion*, 2011, 11(1): 147–154. [DOI](#)
- [97] Perales-Clemente E, Fernandez-Silva P, Acín-Pérez R, Pérez-Martos A, Enriquez JA. Allotopic expression of mitochondrial-encoded genes in mammals: achieved goal, undemonstrated mechanism or impossible task? *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(1): 225–234. [DOI](#)
- [98] Wang G, Shimada E, Zhang J, Hong JS, Smith GM, Teitell MA, Koehler CM. Correcting human mitochondrial mutations with targeted RNA import. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(13): 4840–4845. [DOI](#)
- [99] Qi XP, Sun L, Lewin AS, Hauswirth WW, Guy J. The mutant human *ND4* subunit of complex I induces optic neuropathy in the mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2007, 48(1): 1–10. [DOI](#)
- [100] Ellouze S, Augustin S, Bouaita A, Bonnet C, Simonutti M, Forster V, Picaud S, Sahel JA, Corral-Debrinski M. Optimized allotopic expression of the human mitochondrial *ND4* prevents blindness in a rat model of mitochondrial dysfunction. *Am J Hum Genet*, 2008, 83(3): 373–387. [DOI](#)
- [101] Tachibana M, Sparman M, Sritanandomchai H, Ma H, Clepper L, Woodward J, Li Y, Ramsey C, Kolotushkina O, Mitalipov S. Mitochondrial gene replacement in primate offspring and embryonic stem cells. *Nature*, 2009, 461(7262): 367–372. [DOI](#)
- [102] Guo H, Zhuang XY, Zhang AM, Zhang W, Yuan Y, Guo L, Yu D, Liu J, Yang DK, Yao YG. Presence of mutation m.14484T>C in a Chinese family with maternally inherited essential hypertension but no expression of LHON. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1822(10): 1535–1543. [DOI](#)

•科学新闻•

东北优质粳稻品种“稻花香 2 号”分子改良取得重要进展

“稻花香 2 号”是黑龙江省第一积温带主栽品种，也是目前我国最优质的粳稻品种。该品种的常年种植面积在 120 万亩左右，占第一积温带水稻栽培总面积的 80%。受市场对优质米的消费需求影响，由该品种引导的大米加工销售企业最多时达到 450 家，目前仍然有 240 多家企业以该品种为经营主体，成为黑龙江省五常市农业经济中最具特色的引领产业。

作为优质特种香稻，“稻花香 2 号”自 2000 年开始在第一积温带推广种植。由于单一品种的长期大面积栽培，导致该品种原有的特征特性严重丧失，香味、粒形严重退化，异源品种严重混杂，抗倒伏能力严重削弱，稻瘟病潜在发生趋势明显。

为了解决“稻花香 2 号”面临的现实问题，中国科学院遗传发育所姚善国课题组以“中科院北方粳稻分子育种联合研究中心”为依托，与五常市最大民营企业金福粮油有限公司合作开展了“稻花香 2 号的分子改良”研究。研究结果显示，目前生产上农户使用的“稻花香 2 号”异源品种混杂率达到 10%-12%，是导致该品种香味、粒形等性状退化的主要原因，针对上述种性退化问题，姚善国课题组开发了 24 个品种特异性分子标记对该品种进行了提纯复壮，并指导建立了“同心圆”结构的良种繁育体系。在对“稻花香 2 号”稻瘟病、倒伏、品质等相关性状的等位基因型分析基础上，利用全基因组分子标记选择技术培育了该品种抗稻瘟、抗倒伏等性状的单基因品系，为“稻花香 2 号”的持续平稳发展奠定了良好的基础。该体系建立后的经济效益明显，短短 2 年时间就为企业带来了约 200 万元的销售收入。更为重要的是，我们的良种繁育体系有效地保证了生产用种的质量，由此确保了五常市作为“优质稻米之乡”在市场上的信誉和地位。