中国儿童线粒体病的临床特征及分子遗传学研究

方方¹, 刘志梅¹, 方合志², 伍建³, 沈丹敏¹, 孙素真⁴, 丁昌红¹, 韩彤立¹, 伍姮¹,
吕俊兰¹, 杨蕾¹, 李舒方¹, 吕建新², 沈颖^{1*}

1 国家儿童医学中心, 首都医科大学附属北京儿童医院神经内科, 北京 100045;

2 温州医科大学检验医学院, 温州 325035;

3 中国人民解放军总医院, 转化医学中心, 北京 100853;

4 河北省儿童医院神经内科, 石家庄 050031

* 联系人, E-mail: shenyinying@bch.com.cn

收稿日期: 2018-07-02; 接受日期: 2018-07-11; 网络版发表日期: 2018-09-05

摘要 线粒体病具有高度临床异质性和基因异质性, 对于临床医生来说诊断非常困难. 本研究分析了中国线粒体病患儿的临床特征和基因特点, 为临床医生的诊断提供了一定的参考依据. 本文总结了2012年10月~2015年1月就诊北京儿童医院的141例已进行二代测序基因检测的疑似线粒体患儿, 分析基因确诊病例的临床特征以及遗传学特点. 本研究共收集了40例基因确诊病例, 包括8种不同类型的线粒体病, 而Leigh综合征是最常见类型, 其次是线粒体脑肌病伴乳酸中毒和卒中样发作(MELAS)综合征. 不同的线粒体病发病年龄各异, 但是普遍临床早发. 40例基因确诊病例中, 25例(62.5%)为mtDNA突变, 15例(37.5%)为nDNA突变. m.3243A>G突变7例, 在mtDNA突变中最为常见, nDNA突变包括SURF1 7例, PDHA1 2例, NDUFV1, NDUFAF6, SUCLA2, SUCLG1, RRM2B, 以及C12orf65各一例.

关键词 线粒体病, 二代测序, 临床特征, 基因

线粒体病是一类由线粒体DNA (mitochondrial DNA, mtDNA)或核DNA (nuclear DNA, nDNA)突变导致氧化磷酸化系统功能障碍性疾病, 临床、生化、遗传异质性强, 任何年龄均可发病, 任何一个器官或组织均可受累, 遗传基因也具有多样性, 受mtDNA和nDNA双重调控. 线粒体病发病率估计至少为1/5000, 其中20%由mtDNA突变所致^[1,2].

线粒体病的诊断依据包括临床表现、生化等代谢检查、影像学表现、组织病理检查、酶学分析和基因

检测, 基因检测仍是诊断线粒体病的金标准. 随着线粒体病和相关突变基因数目的增加, 由于时间及经济成本等问题, 应用Sanger测序等一代测序诊断线粒体病不再满足临床需求. 随着科学技术的不断发展, 尤其是二代测序(next-generation sequencing, NGS)技术的出现与成熟, 其通过基因捕获技术捕获目标基因或全外显子, 对大量候选基因或全外显子进行平行测序, 可同时检测mtDNA点突变和片段缺失, 有着测序通量高、简单、快捷、花费低等优点.

引用格式: 方方, 刘志梅, 方合志, 等. 中国儿童线粒体病的临床特征及分子遗传学研究. 中国科学: 生命科学, 2018, 48: 975–985, doi: 10.1360/N052018-00131
英文版见: Fang F, Liu Z M, Fang H Z, et al. The clinical and genetic characteristics in children with mitochondrial disease in China. Sci China Life Sci, 2017, 60: 746–757, doi: 10.1007/s11427-017-9080-y

二代测序技术从2009年开始应用于线粒体病的诊断, 相比于传统的诊断手段, 多个研究表明基于二代测序技术的分子诊断与传统测序技术作出的诊断性结论是一致的, 且诊断率提高^[3-5]. 本研究将对基因确诊的中国儿童不同线粒体病的常见临床特征进行总结及研究.

1 资料与方法

1.1 研究对象

对2012年10月~2015年1月在首都医科大学附属北京儿童医院门诊就诊或住院的疑似线粒体病患者进行线粒体病标准(mitochondrial disease criteria, MDC)评分, 通过MDC评分, 共有141例疑似线粒体病患者纳入本研究中. 本研究通过首都医科大学附属北京儿童医院伦理委员会批准(伦理号: 2014-10), 均取得患儿家长的知情同意.

1.2 DNA提取和NGS文库构建

留取患者及家属外周静脉EDTA抗凝血2 mL, 用康为世纪(北京)基因组提取试剂盒提取DNA. 根据Illumina生产商的标准, 至少需要3 μ g DNA用于构建文库, DNA片段化后, 最终选取包括接头序列在内的300~400 bp DNA片段作为文库测序样本.

1.3 线粒体基因和核基因靶向测序

采用北京迈基诺基因科技有限公司的目标区域捕获试剂盒对扩增的DNA文库进行目标基因捕获. 目标基因为mtDNA基因组(16569 bp)和1033个与线粒体结构和功能相关的nDNA外显子. 核基因和mtDNA区域覆盖度分别为~146 $\times$ 和~3616 $\times$ (表1). 核基因依照MitoCarta列表选择^[3-5], 捕获实验依据实验手册进行. 简单来说, 1 μ g DNA文库与Buffer BL和GenCap基因panel探针(Mygenostics, 北京)混合均匀, 在PCR仪上先95 $^{\circ}$ C加热7 min, 再65 $^{\circ}$ C保温2 min; 然后加入23 μ L 65 $^{\circ}$ C预热的Buffer HY (Mygenostics, 北京), 混合均匀; 于PCR仪上65 $^{\circ}$ C下加盖连续保温22 h进行杂交. 用500 L 1 $\times$ binding buffer冲洗50 μ L MyOne磁珠(Life Technology, 美国) 3次后悬浮于80 μ L 1 $\times$ binding buffer中. 先将64 μ L 2 $\times$ binding buffer加入上述杂交混合物中, 然后转入加有80 μ L MyOne磁珠的管中. 混合液在离心机

表1 线粒体测序统计

目的DNA	核DNA	mtDNA
基因组数量	1033	37
目的基因片段大小(bp)	NA	16569
覆盖度		
平均覆盖度	146	3616
%目的片段覆盖 $\geq$ 1 $\times$	98	100
%目的片段覆盖 $\geq$ 10 $\times$	94	100
%目的片段覆盖 $\geq$ 20 $\times$	86	100

上离心1 h. 室温下先用WB1 buffer冲洗磁珠一次(15 min), 再用WB3 buffer 65 $^{\circ}$ C下冲洗磁珠3次(每次15 min). 之后, 结合在磁珠上的DNA被Buffer Elute洗脱下来. 洗脱的DNA用如下方法扩增15个循环: 98 $^{\circ}$ C 30 s (1次); 98 $^{\circ}$ C 25 s, 65 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s (15次); 72 $^{\circ}$ C 5 min (1次). 根据操作手册用SPRI beads (Beckman Coulter)对PCR产物进行纯化, Illumina HiSeq 2000测序仪将富集文库进行测序.

1.4 聚类 and 测序

Illumina独特的“桥式”扩增反应在流动池Flow cell表面进行. Flow cell流动池是装载在HiSeq 2000上的像载玻片大小的芯片, 一个Flow cell表面包含着上百万个能进行延伸和成像循环的反应簇. Illumina测序采用边复制, 边测序模式, 利用4种不同的荧光信号确认碱基种类. 每次循环都是4种碱基出现, 根据4种不同的荧光信号确认碱基种类, 这种判断标准比只出现一种碱基来做判断碱基种类的准确性更高, 能够保证最终核酸序列质量, 经过多个循环后, 完整读取核酸序列.

1.5 生物信息学分析

为进行序列分析, 利用BWA程序将Illumina测序获得的read与人类基因组参考序列(hg19, UCSC)和线粒体基因组参考序列(NC_012920)进行比对, 用GATK软件进行质量评分、调整和再比对. 重复的reads用Sequence Alignment/Map tools (SAM tools)移除, 筛选出的独特reads用于变异挖掘. 用GATK统一型单样本模式筛选SNVs和进行基因分型, 用GATK变异模式过滤变异. 用GATK Indel Genotyper V2 Annotation发现变异的Indels, 例如, 位置(外显子、内含子和基因间序列

等), 利用生物信息软件借助RefSeq (hg19, from UCSC) 和UCSC annotation (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>)对编码蛋白的影响(同义、错义、无义、移码等)进行注释. 在dbSNP138, 1000 Genomes, 300亚洲内部等数据库中出现频率>5%的SNPs/indels将被过滤. 用PolyPhen-2, SIFT和Mutation-Taster等软件评估非同义突变的致病性.

为了分析线粒体基因组中的大片段扩增或缺失, 沿碱基绘制了线粒体基因组上每个位置的测序深度, 利用峰图是否有异常峰或凹陷来观察是否存在缺失或重复.

2 结果

所有临床数据和鉴定的基因变异信息都已经录入到罕见病数据库eRAM中(<http://www.pediascape.org/eram/>).

2.1 基因结果

通过靶向捕获二代测序技术, 本研究中141例疑似线粒体病患者中40例为基因确诊病例, 25例(62.5%)为mtDNA突变, 15例(37.5%)为nDNA突变, 仍有71.6%病例病因未知(图1A).

25例mtDNA突变患儿中(表2), 包括7例m.A3243G突变, 3例m.T14487C突变, 2例m.T8993G/C突变, 2例m.G13513A突变, m.A1555G, m.G3460A, m.G3697A, m.G3946A, m.A8344G, m.T9176C, m.T10158C, m.T10191C, m.G11778A, m.T14484C和m.T14502C突变各1例(图1B). 未见大片段mtDNA缺失. 15例nDNA突变患儿中(表3), 发现8个致病基因, 包括*SURF1*, *PDHAI*, *NDUFV1*, *NDUFAF6*, *SUCLA2*, *SUCLG1*, *RRM2B*和*C12orf65* (图1C), 共发现22种突变类型, 其中12种未见文献报道, 包括有明确致病性的移码突变, 剪切突变或无义突变, 还有5个是错义突变, 经过PolyPhen2, SIFT, MutationTaster等软件进行致病性预测分析, 其中4个为致病性突变, 1个为意义不明突变(网络版附表1).

2.2 基因型和表型关系

40例基因确诊的线粒体病患者中, 23例男性, 17例女性, 包括8种临床表型: LS 22例, MELAS 8例, LHON

1例, LHON plus 2例, MDS 3例, 线粒体肌病(mitochondrial myopathy, MM)、线粒体耳聋(MID)、伴视神经萎缩的痉挛性截瘫, 以及不能分类(m.T14484C 100%突变)各1例(图2). 发病年龄从新生儿到10岁不等, 中位数为1岁, 其中, 23例(57.5%) 1岁之内起病, 7例(17.5%) 1~3岁起病, 4例(10%) 3~6岁起病, 6例(15%) 6岁以上起病(图3). 不同临床表型起病年龄存在显著差异, LS和MDS起病年龄最早, 而MM和LHON发病晚.

LS患儿22例, 男12例, 女10例, 起病年龄从生后到4岁, 其中72.7% 1岁以内起病, 18.2% 1~2岁起病, 9.1% 3~4岁起病. 11例为mtDNA突变, 突变位点包括m.T14487C, m.T8993G/C, m.G13513A, m.T10158C, m.T9176C, m.G3697A和m.T10191C, 另外11例由nDNA突变所致, 包括*SURF1*, *PDHAI*, *NDUFV1*和*NDUFAF6*. LS的首发症状主要是发育落后或发育倒退(17例), 其余为肌张力障碍(2例), 共济失调、喂养困难、眼睑下垂各一例. 18例患儿行血乳酸检测, 其中血乳酸升高15例, 占84.2%. 22例患儿均存在头颅影像学异常(图4), 包括脑干对称性异常信号16例, 基底节受累15例, 丘脑受累10例, 小脑受累4例, 脊髓(颈髓)受累3例, 脑白质受累2例, 4例脑萎缩样改变.

8例MELAS患儿, 男5例, 女3例, 其中7例为m.A3243G突变, 1例为m.G3946A突变. 起病年龄为2~7岁, 其中4例是以癫痫发作为首发症状, 1例以肌无力和运动不耐受起病, 3例因发育迟缓就诊. 8例患儿血乳酸均升高, 波动在3.4~11.9 mmol/L (正常<2.2 mmol/L). 8例患儿的头颅影像学均异常, 其中脑萎缩样改变4例, 基底节钙化3例, 脑梗塞样改变5例.

1例LHON, 2例LHON plus, 1例m.T14484C突变不能分类, 男2例, 女2例. 2例1岁以内起病, 2例9岁以后起病. m.G11778A 100%突变患儿, 男, 9岁7个月以单侧视力下降伴眼睑下垂起病, 有母系遗传史, 患儿舅外祖父、舅舅、表舅及表姨均有视力障碍、血乳酸升高、头颅MRI无异常, 临床表现为典型的LHON. m.T14502C 100%突变患儿, 男, 13岁9个月, 临床表现符合LHON, 有多发性硬化样(multiple sclerosis, MS)改变(图5), 头颅MRS示乳酸峰. m.G3460A 17%突变患儿, 女, 5个月, 主要表现为急性视力丧失、发育落后、痉挛发作、听力异常、生长迟缓、生长因子下降、合并肝功能损害、血乳酸轻度升高, 头颅MRI为室管膜下结节, 考虑为灰质异位, 诊断LHON plus. m.T14484C

图 1 141例疑似线粒体病患者突变情况

A: 141例疑似线粒体病患者中, 40例(28.4%)得到基因确诊, 余71.6%尚未确诊; B: mtDNA突变25例, 其中m.A3243G为热点突变; C: nDNA突变15例, 包括8个基因SURF1, PDHA1, NDUFV1, NDUF6, SUCLA2, SUCLG1, RRM2B, C12orf65, 其中SURF1最为常见

100%突变患儿, 女, 1岁, 生后喂养困难伴腹泻, 6个月添加牛奶时明显, 主要表现为牛奶蛋白过敏, 消化道症状明显, 合并精神运动发育迟滞, 肌无力, 生长迟缓(身高、体重均在标准曲线第3百分位以下), TT3降低、肝功损害、心肌损害、胆囊结石多系统受累表现, VEP及乳酸均正常, 尿筛查提示轻度酮性双羧酸尿, 血串联质谱提示游离肉碱降低, 头颅MRI无异常. 患儿1岁6个月死于“麻疹肺炎”.

3例基因确诊的MDS, 均为男性, 其中1例RRM2B基因突变患儿的临床资料不完整. 另外2例患儿的起病年龄从生后到5个月. 临床特点符合SUCLA2和SUCLG1相关脑肌病型MDS. 血乳酸水平平均升高, 尿有机酸分析提示, 甲基丙二酸轻度升高, 血串联质谱分析提示丙酰肉碱(C3)和甲基丙二酰肉碱(C4DC)轻度升高. 头颅MRI提示尾状核、壳核长T2信号伴萎缩, 脑萎缩样改变(图6).

表 2 25例mtDNA突变患儿临床资料^{a)}

ID/Sex	发病年龄 (years)	临床表现	乳酸(mmol/L)		头MRI/CT	家族史	临床表型	基因	突变及比例
			血	脑脊液					
1/F	1	MR、发育倒退、胃肠道症状、肌无力、抽搐、反复发作的 脑病、身矮、多毛、消瘦	5	NA	脑萎缩	+	MELAS	MT-TL1	A3243G 69.2%
2/M	4.1	抽搐、卒中样发作、发育倒退、眼睑下垂、肌无力、胃肠道 症状、身矮、多毛、消瘦	11.9	7.2	脑梗塞样改变	+	MELAS	MT-TL1	A3243G 100%
3/M	5	眼睑下垂、肌无力、抽搐、呕吐、眼球运动障碍、发育倒 退、身矮、多毛、消瘦	5.2	5.1	双侧顶叶、基底节异常信号	+	MELAS	MT-TL1	A3243G 65.6%
4/M	2	MR、抽搐、肌无力、呕吐、反复发作的脑病、吞咽困难、 身矮、多毛、消瘦	10.7	7.2	进行性脑萎缩, 后期出现大脑半球广 泛异常信号	+	MELAS	MT-TL1	A3243G 74%
5/F	8	抽搐、卒中样发作、胃肠道症状	NA	NA	脑梗塞样改变	-	MELAS	MT-TL1	A3243G 34%
6/F	7	抽搐、头痛、胃肠道症状、生长迟缓、多毛	4.24	NA	MRI (-) CT示双侧基底节钙化	+	MELAS	MT-TL1	A3243G 47%
7/M	7	抽搐、发育倒退、卒中样发作	NA	NA	左侧额、顶、枕、颞叶、丘脑梗梗 塞样改变, 伴小脑萎缩	-	MELAS	MT-TL1	A3243G 62%
8/M	2	MR、眼睑下垂、眼球运动障碍、消瘦、肌张力高、运动障 碍	3.44	NA	双侧基底节异常信号、脑萎缩	-	MELAS	MT-ND1	G3946A 46%
9/M	9.6	双侧视力障碍、眼睑下垂	3.4	NA	-	+	LHON	MT-ND4	G11778A 100%
10/M	10	抽搐、发育倒退、视力损害、中枢性面瘫、共济失调、视神 经萎缩	1.4	2.8	多发性硬化样改变	-	LHON plus	MT-ND6	T14502C 100%
11/F	0.5	牛奶蛋白过敏、胃肠道症状、生长迟缓、MR、肌无力、运 动不耐受、低T3综合征	1.1	NA	-	-	不能分类	MT-ND6	T14484C 100%
12/F	0.3	MR、痉挛发作、视力障碍、消瘦、听力异常	2.5	NA	灰质异位	-	LHON plus	MT-ND1	G3460A 17%
13/F	0.3	发育落后伴倒退、肌张力增高、肌张力障碍、CK升高、呼吸、 吞咽受累、眼震	2.28	NA	脑萎缩, 双侧基底节、脑干、丘脑异 常信号	-	MILS	MT-ND6	T14487C 100%
14/M	0.7	发育落后伴倒退、肌张力增高、VEP异常	1.7	NA	双侧基底节、脑干、丘脑异常信号	-	MILS	MT-ND6	T14487C 100%
15/F	4	眼外肌麻痹、运动障碍、运动不耐受、肌张力增高	1.5	NA	双侧基底节、脑干异常信号	-	MILS	MT-ND6	T14487C 88%
16/M	0.3	发育落后伴倒退、肌张力增高、VEP异常	3.1-6.6	NA	脑萎缩, 双侧基底节异常信号	-	MILS	MTATP6	T8993G/C 67.8%
17/F	0.3	发育落后伴倒退、肌张力增高、嗜睡、共济 失调、肌张力增高	2.8	NA	双侧基底节异常信号	±	MILS	MTATP6	T8993G/C 86.3%
18/M	0.3	MR、抽搐	2.9-5.9	NA	双侧丘脑、脑干异常信号	-	MILS	MT-ND5	G13513A 53%
19/M	2	眼睑下垂、喂养困难、胃肠道症状、面瘫	4.1	NA	双侧脑干、丘脑异常信号	-	MILS	MT-ND5	G13513A 50%
20/M	1	发育落后伴倒退、眼睑下垂、共济失调	4.05	NA	双侧苍白球、脑干异常信号	+	MILS	MTATP6	T9176C 100%
21/M	2	MR、发育倒退、肌张力降低、运动障碍、运动不耐受、共 济失调、喂养困难	2.07	NA	双侧壳核异常信号	-	MILS	MT-ND1	G3697A 100%
22/M	生后	宫内发育迟滞、喂养困难、发育迟滞、呼吸、生长迟 缓、贫血、肝脾大、抽搐	6.8	NA	双侧丘脑、脑干异常信号	+	MILS	MT-ND3	T10191C 88%
23/F	生后	喂养困难、生长迟缓、抽搐、肌张力增高、眼震、呕吐、多 毛、消瘦	4.22	4.94	双侧丘脑、脑干、基底节、脑室 旁、半卵圆中心异常信号	+	MILS	MT-ND3	T10158C 96%
24/F	9	肌无力、运动不耐受、眼睑下垂、Gower征阳性、CK升高	8.7-12.7	NA	脑萎缩样改变	-	Mitochondrial Myopathy	MT-TK	A8344G 83%
25/M	0.75	听力损害、MR、胃肠道症状、肌无力、生长迟缓	4.67	NA	脑沟增深	+	MID	MT-RNR1	A1555G 100%

a) NA: 无数据; MR: 精神运动发育迟滞; MELAS: 线粒体脑肌病伴乳酸酸中毒和卒中样发作; LHON: Leber's遗传性视神经病; MILS: 母系遗传性Leigh综合征; MID: 母系遗传性耳聋

表 3 15例nDNA突变患儿临床资料^{a)}

ID/Sex	发病年龄 (years)	临床表现	乳酸 (mmol/L)		头颅MRI	临床表型	基因	核苷酸改变	氨基酸改变
			血	脑脊液					
26/F	生后	发育落后伴倒退,肌张力减低,肌张力障碍,周围神经损害,呼吸、吞咽受累,胃肠道症状,生长迟缓,多毛	3.8	NA	脑萎缩,双侧脑干、基底节、小脑异常信号	LS	SURF1	c.792_793delAG (父源) +c.653_654delCT (母源)	p.264fs+p.218fs
27/F	0.3	MR、喂养困难、生长迟缓、小下颌	NA	NA	双侧脑干异常信号	LS	SURF1	homo c.751+1G>A	Splicing
28/F	1	发育落后伴倒退,肌张力低下,眼睑下垂,眼震,呼吸、吞咽受累,喂养困难,生长迟缓,多毛	3.1	NA	双侧脑干、小脑、脊髓异常信号	LS	SURF1	c.751+1C>A (母源) +c.751C>T (父源)	Splicing+p.Q251X
29/M	1	发育落后伴倒退,肌张力低下、消瘦、周围神经损害	2.2	NA	双侧基底节、脑干、丘脑异常信号	LS	SURF1	homo c.636delC*	p.T121fs*
30/F	0.3	发育落后伴倒退,肌张力低下、吞咽困难、生长迟缓、周围神经损害	4.4	4.6	双侧脑干、小脑、脊髓异常信号	LS	SURF1	c.752_755delAGAG* (母源) +c.772C>T* (父源)	p.Q251fs*+p.P258S*
31/M	0.4	发育迟滞、肌无力、走路不稳、眼震、周围神经损害	3.8	NA	双侧脑干、脊髓异常信号	LS	SURF1	c.752_755delAGAG* (母源) +c.792_793delAG (父源)	p.Q251fs*+p.264fs
32/M	生后	喂养困难、生长迟缓、发育迟滞、步态异常、运动障碍、共济失调	1.67	NA	双侧脑干异常信号,逐渐进展到基底节、丘脑、小脑	LS	SURF1	c.431_432delCT* (母源) +c.427_428delTG* (父源)	p.T144fs*+p.S143fs*
33/M	0.3	MR、惊厥,肌张力低下,肌张力障碍,呼吸、吞咽受累,喂养困难,体重增长缓慢	7.1	6.5	脑萎缩,双侧壳核、苍白球、丘脑异常信号	LS	PDHA1	c.1132C>T (<i>de novo</i>)	p.R378C
34/M	2	MR、间歇性共济失调、消瘦、多毛	5.2	4.8	双侧苍白球异常信号	LS	PDHA1	c.808C>G (<i>de novo</i>)	p.R270G
35/F	1.8	肌张力障碍、肌张力增高、MR、左室高血压	3.6	3.6	双侧基底节、脑干、丘脑异常信号	LS	NDUFV1	c.605C>T (母源)+c.816T>G* (父源)	p.A202V*+p.H272Q
36/F	4	运动障碍、步态异常、运动不耐受、肌无力、吞咽困难、肌张力增高	1.4-2.08	NA	双侧基底节异常信号、逐渐累及半卵圆中心	LS	NDUFAF6	c.337C>T* (父源) +c.265G>A* (母源)	p.R113X*+p.A89T*
37/M	生后	MR、肌张力低下、肌张力障碍、眼睑下垂、肌无力、肌萎缩、胸廓畸形、脊柱侧凸、喂养困难、生长迟缓、听力损害、视神经萎缩、血和尿MMA升高	4.1	NA	脑萎缩,双侧基底节受累	MDS	SUCLA2	homo c.970G>A*	p.G324S*
38/M	0.4	MR、肌张力低下、肌张力障碍、肌无力、肌萎缩、胸廓畸形、喂养困难、体重增长缓慢、听力障碍、尿MMA升高	4.1	NA	脑萎缩,双侧基底节受累	MDS	SUCLG1	c.826_2A>G* (母源) +c.550G>A* (父源)	Splicing*+p.G184S*
39/M	0.3	MR、肌张力低下、肌张力障碍、肌无力、肌萎缩、喂养困难、生长迟缓	NA	NA	NA	MDS	RRM2B	c.121C>T (父源)+c.122G>A (母源)	p.R41W*+p.R41Q
40/F	1.5	运动障碍、视力损害、视神经萎缩	1.93	NA	-	痉挛性截瘫伴视神经萎缩	C12orf65	c.6_7delCA* (父源) +c.394C>T (母源)	p.2fs*+p.R132X

a) *: 未报道; LS: Leigh综合征; MDS: 线粒体DNA耗竭综合征

图 2 40例基因确诊线粒体病患儿的临床诊断
共有8种临床表型, 其中, LS为最为常见的综合征

图 3 40例基因确诊线粒体病患儿的年龄和性别分布情况
Y轴代表患者例数, 发病年龄从出生到10岁不等, 其中, 23例患儿发病年龄小1岁, 男女之间无差异

1例MM为m.A8344G 83%突变的9岁女孩, 以肌无力起病, 伴有下肢水肿、运动不耐受、眼睑下垂、CK和血乳酸升高。头颅MRI提示脑萎缩样改变。其母亲无症状, m.A8344G突变率为50%。

MID患儿为7月龄男婴, 检测到m.A1555G突变(100%), 临床表现为听力损害、发育迟滞、胃肠道症

状、乏力、生长迟缓、高乳酸血症, 同时头颅MRI提示脑沟增宽。存在精神病、矮小、肝病、白血病的母系家族史。

伴视神经萎缩的痉挛性截瘫为6岁女孩, 由c12orf65突变所致, 以双下肢痉挛性瘫痪、视力下降、视神经萎缩为主要表现, 血乳酸和头颅、脊髓MRI无异常。

3 讨论

线粒体病是一种先天的代谢性和退行性疾病, 主要发生于儿童期, 由mtDNA和nDNA突变所致。该疾病可累及单个器官, 也可以同时累及多个系统, 包括神经系统, 肌肉系统, 眼、耳、消化系统、内分泌系统, 心血管系统、肾脏、血液系统等等^[6,7]。由于临床、生化、基因的复杂性和异质性, 亟需一套线粒体病标准来进行诊断及分类。目前, 线粒体病的诊断仍需要临床、实验室检查、神经影像学、组织学、基因检测综合性分析。但对于临床医生而言, 诊断或是除外线粒体病, 尤其是非典型病例, 仍是一个巨大的挑战。自从2009年二代测序应用于线粒体病的诊断以来, 一

图 4 LS头颅MRI

1例SURF1突变患儿, 表现为双侧基底节、脑干和丘脑对称性长T2信号

图 5 LHON plus头颅MRI (多发性硬化样表现)

A: 第1次复发, 表现为左颞叶及部分枕顶部脑回肿胀, 双枕部、小脑、脑回、丘脑异常信号; B: 第2次复发, 表现为左颞叶及小脑病基本消失, 双枕部及丘脑信号较前明显

些研究表明, 线粒体病的诊断率可达31%~55%, 其中一些研究是基于呼吸链酶学结果基础上再使用二代测序进行基因筛查^[3,8,9]。在中国, 有创的肌肉活检很难被患者家长所接受, 尤其是婴幼儿, 导致线粒体病的诊断面临很大的挑战。本研究, 141例疑似线粒体患儿无法通过临床诊断直接确诊或除外诊断, 通过二代测序技术进行线粒体基因组测序, 和/或1033个与线粒体结构和功能相关的nDNA测序, 诊断率为28.3%。在全外

显子测序技术应用之前, 与传统Sanger测序相比, 诊断率令人满意^[10]。

由于mtDNA或nDNA突变导致的表现为一类临床特征的患儿往往可以归结为一种临床综合征, 例如Kearns-Sayre综合征(KSS)、MELAS、肌阵挛癫痫伴破碎样红肌纤维(myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers, MERRF)、视网膜色素变性共济失调性周围神经病(neuropathy, ataxia and retinitis pig-

图 6 MDS头颅MRI

SUCLA2突变患儿, 表现为尾状核、壳核长T2信号伴萎缩, 脑萎缩样改变

mentosa, NARP)、LS等。但是, 由于存在临床异质性, 许多患儿难以划分为某一种特定的临床综合征^[11]。

在基因确诊的40例线粒体病患儿中, 25例(62.5%)为mtDNA突变, 15例(37.5%)为nDNA突变。与既往报道的nDNA突变占线粒体病80%相比, 本研究恰恰相反。分析如下: 首先, 基因检测前缺乏严谨的筛查和酶学检测; 其次, 线粒体病具有很强的临床异质性, 而且核基因突变导致临床表现非常复杂, 缺乏敏感的筛查标记物对临床筛查造成了巨大的困难。

40例基因确诊的线粒体病中, LS占55%。在研究组中, 起病年龄从生后到10岁不等, 小于1岁的占56.4%, 其中72.7%确诊为LS。不超过2岁的患儿中LS占91%。LS多以发育迟缓或发育倒退起病, 占77%, 其他的首发症状包括肌张力障碍、共济失调、喂养困难、眼睑下垂等。其中血乳酸升高者占84.2%, 头颅MRI表现为脑干或基底节受累, 也有丘脑受累。Rahaman等人^[12]将LS诊断标准定义为: 进行性加重的精神运动发育迟滞或倒退, 基底节和/或脑干受累的症状或体征、影像学证据, 血或脑脊液乳酸升高。大多数LS可以通过典型的起病方式和头颅MRI特异性征象来诊断, 非典型病例难以诊断, 例如, 以眼睑下垂起病的, 很容易误诊为重症肌无力。目前与LS相关的基因大约有75个^[13]。本研究中的LS患儿, nDNA突变占50%, 其中主要为SURF1突变, 其次是PDHA1突变。MILS非常常见, 但是尚未发现热点突变, 1/3的患儿为m.T14487C突变,

其次是m.T8993G/C和m.G13513A突变。

据报道, LS的头颅MRI改变可能与突变基因相关^[14]。本研究发现, 所有SURF1突变患儿的头颅MRI提示脑干受累, 伴或不伴壳核受累, m.T14487C突变可见基底节和脑干受累, PDHA1突变可见基底节受累, 而脑干往往无受累, 以后需要更多的病例来验证这个规律。如果临床诊断为LS, 头MRI提示脑干受累, 检测SURF1基因或许为首选。

m.G13513A可以导致MELAS, LS, MELAS-LS叠加综合征, MELAS-LHON叠加综合征^[15,16]。本研究中2例为m.G13513A突变。1例为3月龄婴儿, 突变率为53%, 临床表现为眼睑下垂, 喂养困难, 眼震, 嗜睡和肌张力增高, 头颅MRI提示双侧脑干、丘脑背侧和延髓对称性损害, 符合LS诊断。另一例为2岁幼儿, 突变率50%, 临床表现为眼睑下垂, 喂养困难, 消化道症状, 面神经麻痹, 头颅MRI提示脑干、丘脑损害, 也符合LS诊断。据文献报道, m.T8993G/C导致的MILS占LS的10%, 其他mtDNA突变占10%~20%, nDNA突变占70%~80%^[17]。本研究的中国患儿中, MILS占LS的50%, 未发现热点突变, 因此建议对于临床诊断LS的患儿首先做线粒体基因测序。

LHON以双侧、无痛性、亚急性视力损害为特征, 多青壮年起病, 也有些会出现非典型的神经系统症状。m.G11778A, m.G3460A和m.T14484C是LHON的热点突变, 约占全部LHON的96%。本研究组中, 1例LHON,

2例LHON plus, 1例不能分类. 本研究中3例为上述热点突变, 只有1例m.G11778A 100%突变患儿为典型LHON. m.G3460A和m.T14484C突变患儿均为婴儿期起病, 发育迟滞、生长迟缓, 一例主要表现为消化道症状, 另一例表现为急性视力障碍、合并灰质异位和婴儿痉挛. 据文献报道, 也有婴儿期起病的LHON, 症状不典型, 11~12岁才通过G11778A和T14484C检测确诊^[18,19]. 由于T14484C突变患儿的视力损害在15月龄死亡时尚未观察到, 难以确定其临床表型. 1例m.T14502C突变的LHON, 临床表现和头颅MRI都和多发性硬化相一致, 具有时间多发和空间多发、复发缓解的特点. 据报道, LHON的多种突变类型(包括最常见的3种突变)可以表现为多发性硬化样表现, 可诊断为LHON plus^[20]. 因此, 如果LHON有典型的临床表现, 首先应该筛查3个热点突变; 如果临床表现不典型, 首先考虑做线粒体环基因检测, 尽早选择合适的检测方法对于诊断有很大的帮助.

本研究中8例MELAS, 包括非典型病例, 其中热点突变m.3243A>G占87.5%, 与文献报道的80%基本相一致. 头颅CT/MRI多表现为非血管分布的脑梗塞样改变, 以后头部为主, 后期出现皮质萎缩, 基底节区也可受累, 表现为对称性基底节钙化. 在这8例中, 3例为非典型MELAS, 缺乏脑梗塞样改变, 但有基底节钙化和/或脑萎缩. 根据日本MELAS研究学组制定的MELAS的诊断标准, 卒中样发作为必备条件, 且具备线粒体功能障碍的证据, 以及已知的线粒体基因突变^[21]. 在这个诊断标准中, 脑梗塞样改变不再是必要条件, 而是更注重早期卒中的征象, 因此对于携带m.3243A>G突变以前被认为非典型或不能诊断为MELAS的患者

将会得到早期诊断和早期治疗.

m.A8344G是MERRF最常见的致病变异, 在具有典型临床表现的患者中超过80%, 也与单纯性肌病, 类似肢带型肌营养不良或LS相关^[22]. MERRF的临床诊断基于四大典型特征: 肌阵挛、全面性癫痫发作、共济失调、肌肉活检破碎样红肌纤维(ragged-red fibers, RRF), 本研究中的病例表现为肌病、无肌阵挛、全面性癫痫发作或共济失调, 故诊断为MM.

据报道, m.A1555G与线粒体遗传性耳聋(多为氨基糖苷类诱导)、限制性心肌病相关^[23]. 尽管存在听力损害, 母系家族史, 但此病例的临床表现并非典型, 包括发育迟滞、胃肠道症状、肌无力、生长迟缓, 考虑可能是发病年龄早, 或者是线粒体病的复杂性有关.

在二代测序技术的帮助下, 诊断了中国第一例SUCLA2, SUCLG1相关线粒体DNA耗竭综合征. 病例临床表现典型, 实验室检查和影像表现与文献报道一致^[24]. 这几个突变未见文献报道, 扩展了SUCL基因突变谱.

虽然没有足够的证据证明药物治疗有效, 一系列维生素和辅因子还是被应用于疑似线粒体病患儿中. 作为丙酮酸脱氢酶复合体的辅因子, 维生素B1对于大于12个月的由PDHA1突变导致的反复共济失调、疑似LS有明显疗效^[25]. 对1例反复发作的共济失调, 诊断为PDHA1突变导致的LS患儿, 给予大剂量维生素B1治疗, 效果显著.

总的来说, 本研究应用二代测序技术诊断疑似线粒体病的患儿, 28.4%的线粒体病可以得到基因诊断, 包括一些非典型病例. 认为NGS对于线粒体病的诊断有很大的临床意义.

致谢 感谢患儿及家长的配合, 感谢迈基诺和信诺佰世公司所提供的技术支持与服务.

参考文献

- 1 Donato S D. Disorders related to mitochondrial membranes: pathology of the respiratory chain and neurodegeneration. *J Inherited Metab Dis*, 2000, 23: 247-263
- 2 Distelmaier F, Koopman W J H, van den Heuvel L P, et al. Mitochondrial complex I deficiency: from organelle dysfunction to clinical disease. *Brain*, 2009, 132: 833-842
- 3 Vasta V, Merritt II J L, Saneto R P, et al. Next-generation sequencing for mitochondrial diseases: a wide diagnostic spectrum. *Pediatrics Int*, 2012, 54: 585-601

- 4 Shen P, Wang W, Krishnakumar S, et al. High-quality DNA sequence capture of 524 disease candidate genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 6549–6554
- 5 Vasta V, Ng S B, Turner E H, et al. Next generation sequence analysis for mitochondrial disorders. *Genome Med*, 2009, 1: 100
- 6 Pagliarini D J, Calvo S E, Chang B, et al. A mitochondrial protein compendium elucidates complex I disease biology. *Cell*, 2008, 134: 112–123
- 7 Finsterer J. Central nervous system manifestations of mitochondrial disorders. *Acta Neurol Scand*, 2006, 114: 217–238
- 8 Calvo S E, Compton A G, Hershman S G, et al. Molecular diagnosis of infantile mitochondrial disease with targeted next-generation sequencing. *Sci Transl Med*, 2012, 4: 118ra10
- 9 Lieber D S, Calvo S E, Shanahan K, et al. Targeted exome sequencing of suspected mitochondrial disorders. *Neurology*, 2013, 80: 1762–1770
- 10 Neveling K, Collin R W J, Gilissen C, et al. Next-generation genetic testing for retinitis pigmentosa. *Hum Mutat*, 2012, 33: 963–972
- 11 Chinnery P F. Mitochondrial Disorders Overview. Seattle: University of Washington, 1993
- 12 Rahman S, Blok R B, Dahl H H M, et al. Leigh syndrome: clinical features and biochemical and DNA abnormalities. *Ann Neurol*, 1996, 39: 343–351
- 13 Gorman G S, Chinnery P F, DiMauro S, et al. Mitochondrial diseases. *Nat Rev Dis Primers*, 2016, 2: 16080
- 14 Lebre A S, Rio M, Faivre d’Arcier L, et al. A common pattern of brain MRI imaging in mitochondrial diseases with complex I deficiency. *J Med Genet*, 2011, 48: 16–23
- 15 Pulkes T, Eunson L, Patterson V, et al. The mitochondrial DNA G13513A transition in ND5 is associated with a LHON/MELAS overlap syndrome and may be a frequent cause of MELAS. *Ann Neurol*, 1999, 46: 916–919
- 16 Shanske S, Coku J, Lu J, et al. The G13513A mutation in the ND5 gene of mitochondrial DNA as a common cause of MELAS or Leigh syndrome. *Arch Neurol*, 2008, 65: 368–372
- 17 Thorburn D R, Rahman J, Rahman S. Mitochondrial DNA-Associated Leigh Syndrome and NARP. Seattle: University of Washington, 1993
- 18 Frye R E. Leber’s hereditary optic neuropathy mutations associated with infantile-onset myoclonic epilepsy. *J Child Neurol*, 2011, 26: 782–785
- 19 Grazina M M, Diogo L M, Garcia P C, et al. Atypical presentation of Leber’s hereditary optic neuropathy associated to mtDNA 11778G>A point mutation—A case report. *Eur J Paediatr Neurol*, 2007, 11: 115–118
- 20 Andalib S, Talebi M, Sakhinia E, et al. Multiple sclerosis and mitochondrial gene variations: a review. *J Neurol Sci*, 2013, 330: 10–15
- 21 Yatsuga S, Povalko N, Nishioka J, et al. MELAS: a nationwide prospective cohort study of 96 patients in Japan. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1820: 619–624
- 22 DiMauro S, Hirano M. MERRF. Seattle: University of Washington, 1993
- 23 Santorelli F M, Tanji K, Manta P, et al. Maternally inherited cardiomyopathy: an atypical presentation of the mtDNA 12S rRNA gene A1555G mutation. *Am J Hum Genet*, 1999, 64: 295–300
- 24 Valayannopoulos V, Haudry C, Serre V, et al. New SUCLG1 patients expanding the phenotypic spectrum of this rare cause of mild methylmalonic aciduria. *Mitochondrion*, 2010, 10: 335–341
- 25 Van Dongen S, Brown R M, Brown G K, et al. Thiamine-responsive and non-responsive patients with PDHC-E1 deficiency: a retrospective assessment. *JIMD Rep*, 2015, 15: 13–27