

第一届海峡两岸 线粒体医学前沿研究学术研讨会

会议组委会: 陈清棠 魏耀挥 刘树森

会议秘书长: 徐建兴

学术委员会: 丁树哲 王鲁宁 孙相如 刘树森 伍期专 李林
陈清棠 陈全 沈定国 吴希如 吴才宏 吴丽娟
张勇 郭玉璞 唐朝枢 徐建兴 戚豫 程伯基
程时 魏耀挥 (按姓氏笔划排列)

中国人线粒体基因组的 5 个新的多态性位点

北京大学第一临床医学院

戚豫 刘孜孜 蒋思慧 潘虹 张英 王朝霞 吕建军 包新华 魏耀挥 萧广仁 吴希如

【摘要】目的 通过分析线粒体基因组序列,全面了解中国人线粒体基因多态性特点。方法 对 4 个中国人进行线粒体基因全长 16569bp 进行分段 PCR 和荧光测序的基础上,针对发现的 7 个未报道的新点突变,以寻找识别突变点的限制性内切酶和通过引物变动人工增加识别位点的方法,对这些突变进行 100 个正常人对照的 PCR-限制酶切分析。结果 发现 5 个未经 MITOMAP 收录或发表的线粒体基因序列变化: C298T、C638G、C3206T、A6323G 和 C6326T,均属多态性位点,基因频率分别为: 17.65%、32.04%、62.77%、33.33%和 32.26%。结论 5 个新发现的多态性位点,1 个位于线粒体基因组调控区 (C298T),2 个位于编码蛋白 MTCO1 区 (A6323G、C6326T),另外两个分别位于编码 12S 和 16S 的 rRNA 区 (C638G 和 C3206T),为在中国人中首先报道的多态性。

作者单位: 100034 北京大学第一医院中心实验室 (戚豫、张英) 儿科 (吕建军、潘虹、包新华、吴希如) 神经科 (王朝霞); 台北荣民总医院临床生化研究室 (刘孜孜、蒋思慧、萧广仁); 台北阳明大学生化研究所 (魏耀挥)

通讯联系人: 戚豫 Email: zxsy@mail.bjmu.edu.cn 电话 010-66176598

Five de novo polymorphisms found in Chinese mitochondrial genome.

Qi Yu, Tze-Tze Liu, Si-Hui Jiang et al. Frist Hospital of Peking University 100034

【Abstract】Objective To master more polymorphic changes on mitochondrial genome in Chinese. Method PCRs and sequencing of 16569bp long mtDNA were repeated on 4 Chinese individuals. Restriction endonuclease digest, include artificial created restriction site (ACRS), was done onto 7 new single base substitution sites on another 100 normal controls alternatively. Result 5 point mutation, C298T, C638G, C3206T, A6323G and C6326T, neither appeared in MITOMAP database nor in literatures, were identified in Chinese people. Their gene frequencies are 17.65%, 32.04%, 62.77%, 33.33% and 32.26% separately. Conclusion The five sequence changes, found in Chinese mitochondrial genome firstly, confirmed to be de novo polymorphisms.

线粒体基因组是人类基因组中多态性较高的部分。对于中国人各种线粒体

相关疾病中 mtDNA 上的种种突变, 多年来已有许多报道。然而尚缺少有关国人线粒体基因组正常的多态性的全面的研究。本文对此进行了探讨。

对象和方法

一、对象 三名患有 Rett 综合征的儿童, 两女一男, 以及一名正常女性, 共 4 例, 由北大第一医院小儿神经科提供。另有 100 名正常无关个体, 取自河北石家庄地区。

二、方法 所有对象分别取 EDTA 抗凝血 10ml, Miller 法提取白细胞 DNA⁽¹⁾。以 mtDNA 上 33 对引物, 对来自北大第一医院的 4 例个体逐一进行 mtDNA 全长 (16569bp) 的分段 PCR 扩增。用 Promega 公司 Wizard 离心柱对 PCR 产物进行纯化。BigDye 法进行测序反应, ABI377 测序仪自动荧光测序。对新发现的突变用取自河北的 100 个正常人 DNA 进行 PCR 和限制酶切分析。针对其中不能为内切酶直接识别的突变点, 重新设计引物, 在其中增加内切酶位点识别突变 (表 1)

表 1 人工增加内切酶位点的引物

突变	新引物序列 (5'3')	位置	内切酶
C298T	CATCATAACAAAAGATTTC	278-297	BsaBI
C737T	ATGCTTGTCCTTTTGACCGT	757-737	BsaJI
C3206T	AACCCTGTTCCAGGGTGGGTG	3226-3207	XcmI

注: 下划线碱基为改造后的错配碱基

结果

在 4 个人的测序结果中发现了 7 个突变: C298T、C638G、C737T、C3206T、A6323G、C6326T 和 C9860T (图: a~g), 均未被 MITOMAP 数据库收录(MITO: <http://www.gen.emory.edu>), 且未曾报道。

对这 7 个突变分别进行了 100 个正常人的 PCR-限制酶分析, 发现其中 5 个 (C298T、C638G、C3206T、A6323G 和 C6326T) 在正常人中亦存在, 为多态性位点, 基因频率见表。而另外两个突变 (C737T、C9860T) 未在正常人中检出, 可能是 Rett 综合征相关突变 (表 2)。

表 2 mtDNA 上 7 个新突变的鉴定

新突变	所在基因	识别内切酶	首次检出个体	基因频率
C298T	mtDNA 调控区	BsaBI	Rett 患者	17.65%
C638G	12SrRNA	HphI	Rett 患者	32.04%
C3206T	16SrRNA	XcmI	Rett 患者	62.77%
A6323G	MTCOI	HaeIII	Rett 患者	33.33%
C6326T	MTCOI	AluI	正常人	32.26%
C737T	12SrRNA	BsaJI	Rett 患者	0
C9860T	tRNA	MwoI	Rett 患者	0

讨论

mtDNA 位于线粒体内, 环境特殊, 处在活性氧和其他自由基包围之中。更由于缺乏组蛋白保护, mtDNA 很容易发生突变。迄今在总长仅 116569bp 的线粒体基因组上累积的多态性位点接近 1000 个, 平均十几个碱基就有一个多态性。特别是其基因调控区, 即包含取代环 (D-loop) 的 1kb 多一点的非编码区, 多态性位点多达 400 余个⁽²⁻⁷⁾。这些发现不仅加深了我们对线粒体功能的认识,

如特殊的 DNA 复制方式(不对称复制),缺乏有效的自我修复系统,也使 mtDNA 具备了相当大的研究和应用价值。如对疾病发生、生物进化、种族迁移的研究,异种之间、同种之间亲缘关系的鉴定,mtDNA 作为一种标记发挥了巨大作用。因此多年来对其多态性的研究一直持续不断⁽⁸⁾⁻¹⁰。

在以往的 mtDNA 多态性研究中,人们大量使用的是限制酶片段长度多态性(RFLP)的方法^{(4),(5),(10)}。此方法的优点是跨越基因范围较大,可重复的个体数较多。但缺点是可能遗漏一些少见内切酶的酶切位点。另外不直接造成内切酶识别位点变化的突变也不能用此方法检出,如本文中发现的 C298T、C737T 和 C3206T。随着 DNA 测序手段的飞速发展,对一些基因进行多个个体的全序列分析变得可行和更加有效,尤其适用于单核苷酸多态性(SNPs)的寻找。本文对 4 例中国人 mtDNA 进行了全长测序,就发现了 5 个新的多态性和两个可能与疾病相关的位点,可为一斑。此 5 个多态性中一个位于非编码区,4 个位于编码区,其中 2 个位于编码 rRNA 的基因,相对已发现的仅 70 余个多态性,比较少见,值得注意。至于它们对线粒体 DNA 复制和表达是否有意义,则有待进一步探讨。

参考文献:

1. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cell. *Nucleic Acid Res* 1988, 16(3):1215
2. 陈伟, 李钰, 陈宇, 等。中国北方汉族人 mtDNA D 环多态性研究。中华医学遗传学杂志 1999, 16 (4): 246-248
3. 汪宪平 20 例藏族 mtDNA 多态性研究 遗传 1992, 14 (2): 24-26
4. Yu Minshu, Qiu Xinfang, Xue Jinglun et al. Mitochondrial DNA polymorphism in Chinese. *Scientia Sinica (series B)*. 1988, 31(7):860-872
5. Yu Minshu, Qiu Xinfang, Xue Jinglun et al. Identification of partial mutational sites in human mitochondrial DNA in the Chinese and its significance. *Science in China (series B)*. 1989, 32(4):468-477
6. Kogelnik AM, Lott MT, Brown MD et al. MITOMAP: a human mitochondrial genome database--1998 update. *Nucleic Acids Res*. 1998, 26(1): 112-5
7. Attimonelli M, Cooper JM, D'Elia D et al. Update of the Human MitBASE database. *Nucleic Acids Res*. 1999, 27(1): 143-6
8. Wallace DC, Lott MT, Lezza AM et al. Mitochondrial DNA mutations associated with neuromuscular diseases: analysis and diagnosis using the polymerase chain reaction. *Pediatr Res*. 1990, 28(5): 525-8
9. Hou JH, Wei YH. The unusual structures of the hot-regions flanking large-scale deletions in human mitochondrial DNA. *Biochem J*. 1996, 318 (Pt 3): 1065-70
10. Chen JZ, Hebert PD. Terminal branch haplotype analysis: a novel approach to investigate newly arisen variants of mitochondrial DNA in natural populations. *Mutat Res*. 1999, 434(3): 219-31
11. Finnila S, Hassinen IE, Majamaa K. Restriction fragment analysis as a source of error in detection of heteroplasmic mtDNA mutations. *Mutat Res*. 1999, 406(2-4): 109-14
12. Rando JC, Cabrera VM, Larruga JM et al. Phylogeographic patterns of mtDNA reflecting the colonization of the Canary Islands. *Ann Hum Genet*. 1999, 63 (Pt 5): 413-28
13. Green LD, Derr JN, Knight-A. mtDNA affinities of the peoples of North-Central Mexico.

Am J Hum Genet. 2000, 66(3): 989-98

14. Ivanova R, Astrinidis A, Djoulah S et al. Mitochondrial DNA polymorphisms of a west Algerian population (Oran region). Biomed Pharmacother. 1999, 53(8): 386-92
15. Jorde LB, Watkins WS, Bamshad MJ et al. The distribution of human genetic diversity: a comparison of mitochondrial, autosomal, and Y-chromosome data. Am J Hum Genet. 2000, 66(3): 979-88
16. Krings M, Salem AE, Bauer-K et al. mtDNA analysis of Nile River Valley populations: A genetic corridor or a barrier to migration? Am J Hum Genet. 1999, 64(4): 1166-76

钙超载大鼠心肌对缺血再灌注及氧自由基损伤的敏感性研究

李载权 曹军¹ 常英姿 庞永正 唐朝枢

北京大学第一医院心血管病研究所 (北京 100034)

¹宁夏医学院病理生理学教研室 (银川 750004)

慢性细胞钙超载 (calcium overload) 不但是高血压、动脉粥样硬化、心肌缺血再灌注损伤等心血管病发生的重要病理特征, 而且在衰老和 vitamin D₃(vit D₃) 慢性中毒等发病机制中也具有重要的病理学意义。线粒体具有储存钙离子并调节细胞浆钙含量的作用, 线粒体在心肌细胞供能代谢中也具有特殊的意义。研究表明线粒体钙超载会导致氧化磷酸化发生障碍, 但是否进一步增加心肌缺血再灌注损伤、或氧自由基心肌损伤的敏感性尚未见报道。本文在细胞内钙超载模型大鼠基础上研究细胞钙稳态在缺血再灌注及氧自由基损伤的生理意义。

1 材料与方

心肌钙超载大鼠模型: SD 雄性大鼠, 300000 IU/kg vitamin D₃(vit D₃) 脂质体肌注, 然后 25 mg/kg 尼古丁灌胃, 10h 后重复灌胃 1 次, 正常喂养 16 d, 以制备心肌钙超载大鼠模型[BJ of Path. 1990;102(supp):326]。制备钙超载大鼠离体心脏后再采用正常 Krebs-Henseite (K-H) 灌流液以 Langendorff 灌流方式进行预灌 15 min、缺血 45 min 和再灌注 15min 制备缺血再灌注损伤心脏; 或采用含自由基发生体系 (FeSO₄+Vit C) 的 K-H 灌流液制备氧自由基损伤心脏。实验分组分别为正常大鼠离体心脏与钙超载大鼠离体心脏; 缺血再灌注离体心脏与钙超载缺血再灌注离体心脏; 和氧自由基损伤离体心脏与钙超载氧自由基损伤离体心脏 (n=7)。

按 Sulakhe 方法将心肌组织匀浆、差速离心、制备心肌线粒体, 测定心肌和心肌线粒体中细胞色素 c 氧化酶和葡萄糖-6-磷酸酶活性, 分别作为线粒体和肌浆网标志酶以鉴定线粒体纯化程度。以 Lowry 法测定线粒体蛋白含量。心肌和心肌线粒体经浓硝酸消化处理后, 以原子吸收法测定钙含量。心肌组织丙二醛 (MDA) 含量和谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-PX) 活性测定方法见[Chin J of Pathophys. 1993; 9(4):510]。

2 结果与讨论

2.1 单纯钙超载对心肌和心肌线粒体钙含量的影响 钙超载大鼠心肌组织