

【临床研究】

李超堃(1978-),男,河南焦作人,博士,副教授,硕士研究生导师,研究方向:线粒体功能与脑损伤机制;E-mail:lichakun@hotmail.com。

mitochondrial DNA was extracted according to the instructions of the mitochondrial DNA extraction kit. The specific primer sequence of MT-CYB gene and polymerase chain reaction were used to specifically amplify MT-CYB gene sequence, the variation of MT-CYB gene was analyzed by DNA sequencing. **Results** The MT-CYB gene has m. 14784 T>C, m. 15043 G>A, m. 15301G>A site mutation associated with pathological changes. There were 3 genotypes of CC (homozygous mutant type), CT (heterozygous mutant type) and TT (wild type) in all subjects at m. 14784 T>C site; there were 3 genotypes of AA (homozygous mutant type), AG (heterozygous mutant type), GG (wild type) in all subjects at m. 15043 G>A site; there were 3 genotypes of AA (homozygous mutant type), AG (heterozygous mutant type), GG (wild type) in all subjects at m. 15301G>A site. In the PD group, the frequency of CC genotype frequency and C allele frequency at m. 14784 T>C site of MT-CYB gene was significantly higher than that in the control group ($P<0.05$), the frequency of TT genotype frequency and T allele frequency was significantly lower than that in the control group ($P<0.05$), there was no statistically significant difference in the CT genotype frequency between the PD group and the control group ($P>0.05$). In the PD group, the frequency of GG genotype frequency and G allele frequency at m. 15043 G>A site of MT-CYB gene was significantly higher than that in between the PD group and control group ($P<0.05$), the frequency of AA genotype frequency and A allele frequency was significantly lower than that in between the PD group and control group ($P<0.05$). There was no significant difference in the AG genotype frequency between the PD group and the control group ($P>0.05$). In the PD group, the frequency of AA genotype frequency and A allele frequency at m. 15301G>A site of MT-CYB gene was significantly higher than that in control group ($P<0.05$), the frequency of GG genotype frequency and G allele frequency was significantly lower than that in control group ($P<0.05$). There was no significant difference in the AG genotype frequency between the PD group and the control group ($P>0.05$). **Conclusion** MT-CYB gene polymorphism plays an important role in the pathogenesis of PD in northern Henan. The m. 14784 T>C, m. 15043 G>A and m. 15301G>A polymorphism in MT-CYB gene may be related to the occurrence and development of PD in northern Henan province.

Key words: Parkinson disease; gene polymorphism; mitochondria; mitochondrial cytochrome b

帕金森病(Parkinson disease, PD)是中老年人常见的神经退行性疾病^[1]。研究表明,PD 的发病机制可能与环境、遗传、线粒体功能障碍、免疫异常等因素有关,其中线粒体功能障碍是目前 PD 发病机制研究中的一个热点^[2-3]。线粒体是除了核基因组外唯一拥有自身基因组的细胞器,线粒体脱氧核糖核酸(mitochondrial deoxyribo nucleic acid, mtDNA)具有较高的突变频率,较核脱氧核糖核酸高 10 倍以上。mtDNA 突变可导致氧化磷酸化复合体异常蛋白合成,细胞呼吸功能受损,三磷酸腺苷产生紊乱,活性氧(reactive oxygen species, ROS)生成增加^[4-5]。研究表明,mtDNA 多态性和突变在包括 PD 在内的许多人类疾病的发病机制中起着重要作用^[6-8]。而线粒体细胞色素 b (mitochondrial cytochrome b, MT-CYB)基因是唯一参与编码线粒体复合体Ⅲ的 mtDNA,可能具有较高的突变频率,MT-CYB 基因突变可能导致线粒体呼吸链的异常。线粒体呼吸链是体内生成 ROS 的主要场所,呼吸链中任何部位受到抑制均可使 ROS 生成增加,ROS 又可导致 mtDNA 损伤,触发线粒体损伤与氧化应激之间的恶性循环,引起黑质细胞死亡,从而导致 PD 的发生^[9-10]。然而,目前关于 MT-CYB 基因多态性与 PD 之间的关系尚不清楚。本研究通过观察豫北地区人群 MT-CYB 基因多态性与 PD 的关系,旨在探讨 MT-CYB 基因多态性在豫北地区 PD 患者发病中的作用及临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2018 年 3 月至 2019 年 12 月新乡医学院第一附属医院收治的 104 例 PD 患者为研究对象(PD 组),其中男 44 例,女 60 例,年龄 45~85(64.43±11.78)岁。纳入标准:(1)符合 2015 年国际运动障碍协会关于 PD 的诊断标准^[11];(2)临床资料完整;(3)签署知情同意书并通过伦理审查。另选择同期与 PD 组性别、年龄相匹配的 95 例健康体检者为对照组,男 36 例,女 59 例,年龄 40~78(61.21±15.50)岁。所有入选对象均行头颅 CT 或磁共振成像检查,并由 2 名神经内科专业医师进行临床资料收集。排除标准:(1)有脑血管疾病史或头部外伤史者;(2)各种帕金森叠加综合征(如多系统萎缩、进行性核上性麻痹等)及继发性帕金森综合征(如中毒性、药源性等)患者;(3)患有严重精神系统疾病者;(4)严重肝肾疾病、心肺功能不全者;(5)合并糖尿病者;(6)因文盲、失聪、失明或沟通障碍等不能完成知情同意者。2 组受试者性别、年龄比较差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。本研究通过医院医学伦理委员会审核批准,受试者或其家属均知情同意并签署知情同意书。

1.2 主要试剂与仪器 DL1000 DNA Marker 购自宝生物工程(大连)有限公司,血液线粒体 DNA 提取试剂盒购自上海扶生实业有限公司,MT-CYB 基

因引物由武汉金开瑞生物工程有限公司合成,2 × Taq Master Mix 购自上海近岸蛋白科技有限公司; StepOne 聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 仪购自美国 ABI 公司,核酸凝胶电泳仪购自北京君意东方电泳设备有限公司,WD-9409B 紫外分析仪购自北京六一生物科技有限公司,XRS + 型凝胶成像仪购自美国伯乐公司。

1.3 线粒体 DNA 提取 所有受试者抽取清晨空腹肘静脉血约 4 mL,置于乙二胺四乙酸抗凝管中,严格按照血液线粒体 DNA 提取试剂盒的说明操作提取线粒体 DNA,采用 WD-9409B 紫外分析仪检测 DNA 的浓度及纯度,放入 -80 ℃ 冰箱冻存备用。

1.4 MT-CYB 基因引物的设计与合成 根据美国国家生物信息中心 MT-CYB 基因序列设计,在基因组找到目的片段,采用引物设计软件 Oligo Analyzer 设计引物,由武汉金开瑞生物工程有限公司合成。MT-CYB 基因上游引物序列为 5'-GGACTACAAC-CACGACCAAT-3',下游引物序列为 5'-CATCTCCG-GTTTACAAGACTG-3',产物长度 1 249 bp。

1.5 MT-CYB 基因获取 PCR 反应体系(50 μL): 模板 DNA 1 μL,双蒸水 20 μL,2 × Taq PCR Mix 25 μL,上、下游引物各 2 μL,PCR 反应条件:94 ℃ 预变性 5 min,94 ℃ 变性 30 s,55 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 100 s,共 35 个循环。PCR 反应结束后,取 2 μL PCR 产物,加入 1 μL 核酸染料染色,混匀,在 170 V 恒压下使用质量分数 1% 的琼脂糖凝胶进行核酸电泳 8 min 左右,然后使用 XRS + 型凝胶成像仪确认扩增产物。

1.6 PCR 产物测序 选取可以扩增出 MT-CYB 基因的 PCR 产物,将该产物送至武汉金开瑞生物工程有限公司进行测序,测序结果使用 DNAMAN8 软件进行比对分析,使用 Chromas 软件读取测序峰图,对 PD 组和对照组受试者 MT-CYB 基因型进行比对。

1.7 统计学处理 应用 SPSS25.0 统计软件进行分析,计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较采用 *t* 检验;计数资料以例数和百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验;基因型频率和等位基因频率分布采用基因计数法,2 组间基因型频率和等位基因频率分布的差异性比较采用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法;*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PD 组患者及对照组受试者与病变相关联的位点突变情况 MT-CYB 基因存在 m. 14784 T > C 位点、m. 15043 G > A 位点、m. 15301G > A 位点等 3

个与病变相关联的位点突变,其中 PD 组患者与对照组受试者 m. 14784 T > C 位点均存在 CC(纯合突变型)、CT(杂合突变型)、TT(野生型)3 种基因型,m. 15043 G > A 位点均存在 AA(纯合突变型)、AG(杂合突变型)、GG(野生型)3 种基因型,m. 15301G > A 位点均存在 AA(纯合突变型)、AG(杂合突变型)、GG(野生型)3 种基因型。

2.2 PD 组患者及对照组受试者与病变相关联的位点突变基因及基因型频率的比较 结果见表 1、表 2 和表 3。PD 组患者 MT-CYB 基因 m. 14784 T > C 位点 CC 基因型频率和 C 等位基因频率显著高于对照组受试者(*P* < 0.05),TT 基因型频率和 T 等位基因频率显著低于对照组受试者,差异有统计学意义(*P* < 0.05),CT 基因型频率与对照组受试者比较差异无统计学意义(*P* > 0.05)。PD 组患者 MT-CYB 基因 m. 15043 G > A 位点 GG 基因型频率和 G 等位基因频率显著高于对照组受试者(*P* < 0.05),AA 基因型频率和 A 等位基因频率显著低于对照组受试者,差异有统计学意义(*P* < 0.05),AG 基因型频率与对照组受试者比较差异无统计学意义(*P* > 0.05)。PD 组患者 MT-CYB 基因 m. 15301 G > A 位点 AA 基因型频率和 A 等位基因频率显著高于对照组受试者(*P* < 0.05),GG 基因型频率和 G 等位基因频率显著低于对照组受试者,差异有统计学意义(*P* < 0.05),AG 基因型频率与对照组受试者比较差异无统计学意义(*P* > 0.05)。

表 1 2 组受试者 m. 14784 T > C 位点基因型及等位基因频率分布比较

| Tab.1 Comparison of genotype and allele frequencies of m. 14784 T > C locus between the two groups 例(%) | | | | | |
|---|----------|----------|--------|----------|--------------------|
| 组别 | <i>n</i> | 基因型 | | | 等位基因 |
| | | CC | CT | TT | C T |
| 对照组 | 95 | 10(10.5) | 5(5.3) | 80(84.2) | 25(13.2) 165(86.8) |
| PD 组 | 104 | 64(61.5) | 2(2.0) | 38(36.5) | 130(62.5) 78(37.5) |
| χ^2 | | 55.312 | 0.796 | 46.749 | 101.671 101.671 |
| <i>P</i> | | <0.001 | >0.05 | <0.001 | <0.001 <0.001 |

表 2 2 组受试者 m. 15043 G > A 位点基因型及等位基因频率分布比较

| Tab.2 Comparison of genotype and allele frequencies of m. 15043 G > A locus between the two groups 例(%) | | | | | |
|---|----------|----------|--------|----------|--------------------|
| 组别 | <i>n</i> | 基因型 | | | 等位基因 |
| | | AA | AG | GG | A G |
| 对照组 | 95 | 75(78.9) | 5(5.3) | 15(15.8) | 155(81.6) 35(18.4) |
| PD 组 | 104 | 64(61.5) | 2(2.0) | 38(36.5) | 130(62.5) 78(37.5) |
| χ^2 | | 7.145 | 0.796 | 10.939 | 17.778 17.778 |
| <i>P</i> | | 0.008 | >0.05 | <0.001 | <0.001 <0.001 |

表 3 2 组受试者 m. 15301 G > A 位点基因型及等位基因频率分布比较

Tab.3 Comparison of genotype and allele frequencies of m. 15301 G > A locus between the two groups 例(%)

| 组别 | n | 基因型 | | | 等位基因 | |
|----------|-----|----------|--------|----------|-----------|-----------|
| | | AA | AG | GG | A | G |
| 对照组 | 95 | 15(15.8) | 5(5.3) | 75(78.9) | 35(18.4) | 155(81.6) |
| PD 组 | 104 | 64(61.5) | 2(2.0) | 38(36.5) | 130(62.5) | 78(37.5) |
| χ^2 | | 43.407 | 0.796 | 36.387 | 79.492 | 79.492 |
| P | | <0.001 | >0.05 | <0.001 | <0.001 | <0.001 |

3 讨论

目前,PD 的诊断主要依据病史及临床表现,包括静止性震颤、运动迟缓、肌强直和姿势步态障碍等,这些临床表现与黑质致密部(substantia nigra pars compacta,SNPC)多巴胺能神经元的丧失有关^[12]。大多数情况下,症状出现时,SNPC 中约 60% 的多巴胺能神经元已经出现功能缺失,因此,仅依赖病史及临床表现会存在较高的漏诊率和误诊率,特别是病程早期的漏诊率和误诊率会更高。一项临床病理研究显示,PD 早期诊断准确率很低,即使随着病程的延长,诊断准确率依然不到 90%^[13]。因此,筛选出灵敏度和特异度均较高的生物学标志物对于 PD 的临床早期诊断和干预具有重要意义。目前,虽然基因学标志物仅能解释少数 PD 的发病原因,但基因学研究对于更好地理解 PD 的发生、发展以及筛选 PD 患病高风险人群均有重要的临床意义。

研究表明,线粒体功能障碍在 PD 的发病机制中起着核心作用,线粒体复合体 I 功能障碍可导致 ROS 产生增多,进而导致 PD 的发生,但目前线粒体复合体 III 与 PD 的相关性却鲜有文献报道^[14-15]。MT-CYB 是线粒体复合体 III 中由 8 个跨膜螺旋组成的疏水蛋白,其核心组分由 MT-CYB 基因进行编码,它是氧化磷酸化系统的核心成分,促使细胞产生能量,并导致 ROS 生成增加^[16-17]。ROS 生成增加可导致线粒体电子传递链复合物酶失活,改变正常的线粒体功能^[18]。导致能量产生和线粒体功能改变的基因突变或变异常被认为是导致 PD 发生的一个重要因素。DASGUPTA 等^[19]研究发现,线粒体编码的 MT-CYB 基因突变可能导致蛋白的过度表达,促使 ROS 生成增加。在 PD 病变中,由于多巴胺能神经元的分解代谢过程是自动氧化,对氧自由基浓度变化极其敏感,因此 ROS 的产生可以导致多巴胺能神经元变性坏死,进而导致 PD 的发生。因此,对于 MT-CYB 基因多态性的检测,可对 PD 的早期诊断提

供有益参考。

本研究提取 PD 患者及对照组受试者外周血进行 MT-CYB 基因检测,结果显示,MT-CYB 基因存在 m. 14784 T > C、m. 15043 G > A、m. 15301G > A 3 个位点突变,且 PD 患者及对照组受试者 MT-CYB 基因 m. 14784 T > C 位点的 CC 和 TT 基因型频率、m. 15043 G > A 位点的 AA 和 GG 基因型频率、m. 15301G > A 位点的 AA 和 GG 基因型频率及这三个位点的等位基因频率差异均有统计学意义,提示 MT-CYB 基因 m. 14784 T > C、m. 15043 G > A、m. 15301G > A 位点的多态性可能与 PD 的发生、发展有关。因此,人体内 MT-CYB 基因多态性检测可以作为预测 PD 发生的有效指标,为 PD 的早期诊断及治疗提供更加科学化的检测指标。

综上所述,MT-CYB 基因多态性在豫北地区 PD 发病中具有重要作用,MT-CYB 基因 m. 14784 T > C、m. 15043 G > A、m. 15301G > A 多态性可能与豫北地区 PD 的发生、发展相关,可为 PD 的基因诊断及治疗提供帮助,为后续 PD 患者早期的基因诊断方法学开发提供了数据与理论基础。但本研究也存在一定的局限性:由于受地区位置的影响,本研究的纳入对象均为豫北地区 PD 患者,且样本量偏小,因此,需要在以后的研究中收集多个中心的样本,丰富样本资源,扩大样本量及收集范围,以便更加准确地研究 MT-CYB 基因与 PD 的关系,以正确评价 MT-CYB 基因在 PD 发病中的作用及应用价值。

参考文献:

[1] SURMEIER D J,SCHUMACKER P T,GUZMAN J D,*et al.* Calcium and Parkinson's disease[J]. *Biochem Biophys Res Commun*,2017,483(4):1013-1019.

[2] PANG S Y,HO P W,LIU H F,*et al.* The interplay of aging,genetics and environmental factors in the pathogenesis of Parkinson's disease[J]. *Transl Neurodegener*,2019,8(1):23.

[3] AMMAL KAIDERY N,THOMAS B. Current perspective of mitochondrial biology in Parkinson's disease[J]. *Neurochem Int*,2018,117:91-113.

[4] BATTOGTOKH G,CHOI Y S,KANG D S,*et al.* Mitochondria-targeting drug conjugates for cytotoxic,anti-oxidizing and sensing purposes;current strategies and future perspectives[J]. *Acta Pharm Sin B*,2018,8(6):862-880.

[5] PARMAR H S,HOUDEK Z,PESTA M,*et al.* Protective Effect of aspirin against oligomeric Aβ42 induced mitochondrial alterations and neurotoxicity in differentiated EC P19 neuronal cells[J]. *Curr Alzheimer Res*,2017,14(8):810-819.

超声心动图检测能够快速实现心脏三维空间结构、形态的重建,更为准确地显示二维超声无法捕获的切面结构;(3)三维超声能够通过对任意平面的切割和重建对心功能进行评估,避免了二维超声几何形态假设,结果更为准确。

综上所述,实时三维超声心动图检测能够较好的区分健康胎儿与法洛四联症胎儿,同时还可以对法洛四联症胎儿心功能进行更灵敏准确的评估,值得临床推广使用。

参考文献:

[1] 陈焱,范祥明,李志强,等. 法洛四联症根治术后早期并发症的临床分析与处理[J]. 心肺血管病杂志,2014,33(2):182-185.

[2] 卫云峰. 胎儿超声心动图检查对法洛四联症的产前诊断价值[J]. 西部医学,2016,28(3):406-408.

[3] QUANDT D, RAMCHANDANI B, PENFORD G, et al. Right ventricular outflow tract stent versus BT shunt palliation in Tetralogy of Fallot[J]. *Heart*, 2017, 103(24):1985-1991.

[4] 崔存英,张连仲,刘琳,等. 实时三维超声心动图评价法洛四联症手术前后右心室收缩功能[J]. 中国医学影像学杂志,2014,22(8):581-584.

[5] CORTEZ D, BARHAM W, RUCKDESCHEL E, et al. Noninvasive predictors of ventricular arrhythmias in patients with tetralogy of Fallot undergoing pulmonary valve replacement[J]. *JACC-EP*, 2017, 3(2):162.

[6] SESLAR S, ROBINSON M. Understanding sudden death risk in

tetralogy of fallot: from bedside to bench[J]. *Heart*, 2017, 103(5):333-334.

[7] 黄娟娟,张利平,李华,等. MTHFR C677T 基因多态性与儿童法洛四联症相关性的 meta 分析[J]. 临床儿科杂志,2018,36(7):77-80,90.

[8] WU Q, WANG T, CHEN S, et al. Cardiac protective effects of remote ischaemic preconditioning in children undergoing tetralogy of Fallot repair surgery: a randomized controlled trial[J]. *Eur Heart J*, 2018, 39(12):1028-1037.

[9] 霍玉峰,金梅. 内外科镶嵌治疗法洛四联症的临床进展[J]. 心肺血管病杂志,2014,33(2):186-189.

[10] YIM D, RIESENKAMPFF E, CARO-DOMINGUEZ P, et al. Assessment of diffuse ventricular myocardial fibrosis using native T1 in children with repaired tetralogy of fallot[J]. *Circ Cardiovasc Imaging*, 2017, 10(3):e005695.

[11] 曹婷,王锡明,程召平,等. 128 层双源 CT 对比剂优化方案在法洛四联症患儿成像中的应用[J]. 中华医学杂志,2015,95(11):810-813.

[12] 王鹏高,张军喜,蒋丽芳,等. 先天性室间隔缺损危险因素分析[J]. 新乡医学院学报,2018,35(12):1064-1067.

[13] 刘芳,陶国伟,姜丽丽,等. 速度向量成像技术分析妊娠高血压综合征孕妇胎儿左室心肌力学[J]. 山东大学学报(医学版),2014,52(12):73-77.

[14] 苏金花,寇海燕,梁莉. 实时三维超声心动图对法洛四联症患者右心室收缩功能变化的评估价值研究[J]. 海南医学院学报,2016,22(1):96-98.

(本文编辑:杨 博)

(上接第 547 页)

[6] TOURE S, MBAYE F, GUEYE M D, et al. Somatic mitochondrial mutations in oral cavity cancers among senegalese patients[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2019, 20(7):2203-2208.

[7] WADE F B, SALL M P, MBAYE F, et al. Mitochondrial DNA mutations and rheumatic heart diseases[J]. *J Cardiovasc Dev Dis*, 2019, 6(4):36.

[8] JANCIC J, ROVCANIN B, DJURIC V, et al. Analysis of secondary mtDNA mutations in families with Leber's hereditary optic neuropathy: four novel variants and their association with clinical presentation[J]. *Mitochondrion*, 2019, 50(1):132-138.

[9] SHUVO S R, WIENS L M, SUBRAMANIAM S, et al. Increased reactive oxygen species production and maintenance of membrane potential in VDAC-less *Neurospora crassa* mitochondria[J]. *J Bioenerg Biomembr*, 2019, 51(5):341-354.

[10] LEE K, HADDAD A, OSME A, et al. Hepatic mitochondrial defects in a nonalcoholic fatty liver disease mouse model are associated with increased degradation of oxidative phosphorylation subunits[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2018, 17(12):2371-2386.

[11] POSTUMA R B, BERG D, STERN M, et al. MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease[J]. *Mov Disord*, 2015, 30(12):1591-1601.

[12] CACABELOS R. Parkinson's disease: from pathogenesis to pharmacogenomics[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(3):551.

[13] BEACH T G, ADLER C H. Importance of low diagnostic accuracy

for early Parkinson's disease[J]. *Mov Disord*, 2018, 33(10):1551-1554.

[14] LIU S M, LI X Z, ZHANG S N, et al. *Acanthopanax senticosus* protects structure and function of mesencephalic mitochondria in a mouse model of Parkinson's disease[J]. *Chin J Integr Med*, 2018, 24(11):835-843.

[15] ISLAM M T. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked neurodegenerative disorders[J]. *Neurol Res*, 2017, 39(1):73-82.

[16] SEDDIGH S, DARABI M. Functional, structural, and phylogenetic analysis of mitochondrial cytochrome b (cytb) in insects[J]. *Mitochondrial DNA A DNA Mapp Seq Anal*, 2018, 29(2):236-249.

[17] IOMMARINI L, GHELLI A, LEONE G, et al. Mild phenotypes and proper supercomplex assembly in human cells carrying the homoplasmic m. 15557G > A mutation in cytochrome B gene[J]. *Hum Mutat*, 2018, 39(1):92-102.

[18] WALLACE L S, MEHRABI S, BACANAMWO M, et al. Expression of mitochondrial genes MT-ND1, MT-ND6, MT-CYB, MT-COI, MT-ATP6, and 12S/MT-RNR1 in colorectal adenopolyps[J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(9):12465-12475.

[19] DASGUPTA S, HOQUE M O, UPADHYAY S, et al. Mitochondrial cytochrome B gene mutation promotes tumor growth in bladder cancer[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(3):700-706.

(本文编辑:李胜利)