

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.00179

线粒体 DNA 3243、3316、3394 位点突变与精神分裂症相关分析

张景亮¹, 程晓丽^{1*}, 刘淑莲^{1,3}, 曹玉媛², 封青川¹, 徐朝阳¹

1. 郑州大学基础医学院细胞生物学与医学遗传学教研室, 郑州 450052

2. 郑州市精神病防治医院, 郑州 450005

3. 郑州卫校基础护理教研室, 郑州 450003

[摘要] **目的** 分析线粒体 tRNA^{Leu(UUR)} 基因 3243 位点及 ND1 基因 3316、3394 位点突变对精神分裂症(SZ)发病的影响。**方法** 采用 PCR 扩增、限制性内切酶消化、琼脂糖凝胶电泳分型检测、DNA 测序等方法,对随机抽取的无亲缘关系的 250 例患者(SZ 组)和 292 例对照组的外周血 mtDNA 进行 3243、3316 和 3394 位点的突变检测。**结果** 在 SZ 组中发现 8 例 3316G/A 突变,对照组中 3 例,两组相比差异无统计学意义($P=0.138$)。在 SZ 组中发现 15 例 3394T/C 突变,对照组中有 4 例,两组相比差异有统计学意义($P=0.007$)。在精神分裂症患者组和对照组中均未发现 3243A/G 突变。**结论** mtDNA 3394T/C 突变可能与 SZ 发生有一定关系,mtDNA 3243A/G、3316G/A 突变可能与 SZ 发生无关。

[关键词] 精神分裂症; 线粒体 DNA; tRNA^{Leu(UUR)} 基因; ND1 基因; 点突变

[中图分类号] R 749.3 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2011)02-0179-03

Correlation analysis of polymorphisms in mtDNA 3243, 3316, 3394 point mutation with schizophrenia

ZHANG Jing-liang¹, CHENG Xiao-li^{1*}, LIU Shu-lian^{1,3}, CAO Yu-yuan², FENG Qing-chuan¹, XU Zhao-yang¹

1. Department of Cell Biology and Medical Genetics, College of Basic Medicine, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan, China

2. Zhengzhou Hospital of Mental Diseases, Zhengzhou 450005, Henan, China

3. Department of Basic Nursing, Zhengzhou Health School, Zhengzhou 450003, Henan, China

[Abstract] **Objective** To study the effects of mitochondrial DNA (mtDNA) point mutations 3243A/G, 3316G/A, and 3394T/C on the incidence of schizophrenia (SZ) in the Han nationality in Henan province. **Methods** A total of 250 unrelated patients and 292 normal controls without family history of schizophrenia were included in the present study, and their peripheral blood samples were subjected to examination by PCR, digestion with different restriction enzymes, agarose gel electrophoresis, and DNA sequencing to detect the mutations of mtDNA 3243, 3316, and 3394. Statistical analysis was performed by SPSS17.0 statistic software. **Results** mtDNA 3316 G/A mutation was found in 8 SZ patients and in 3 controls ($P>0.05$). mtDNA 3394 mutation was found in 15 SZ patients and 4 controls, with significant difference between the two groups ($P<0.05$). No mtDNA 3243 mutation was found in the two groups. **Conclusion** The findings in the present study indicate that mutation of mtDNA 3394T/C may be related to SZ, and the mutation of mtDNA 3243A/G and 3316G/A may not be related to SZ.

[Key words] schizophrenia; mitochondrial DNA; RNA^{Leu(UUR)} gene; ND1 gene; point mutation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(2):179-181]

精神分裂症(schizophrenia, SZ)是以大脑精神活动异常、认知能力障碍为核心症状的一类常见精神病。机体中大脑是耗能最高的组织器官,弥漫性大脑能量需求改变是引发精神类疾病的重要原因之一。SZ被认为是一种多基因遗传病。Doi 等^[1]对芬兰 SZ 患者的研究发现 mtDNA 突变是 SZ 主要致病

原因之一。Lauritzen 等^[2]通过特制工具酶直接证明线粒体上的点突变在精神疾病认知能力障碍中有重要作用。

mtDNA 3243 位于线粒体 tRNA^{Leu(UUR)} 基因的双氢尿嘧啶环中,是促进转录终止因子的结合部位,3316 和 3394 位于线粒体 ND1 基因上,3 个位点的

[收稿日期] 2010-11-19 **[接受日期]** 2010-12-23

[基金项目] 河南省卫生厅科技基金(200903006). Supported by Foundation for Science and Technology of Health Department of Henan Province(200903006).

[作者简介] 张景亮,硕士生. E-mail:903246195@qq.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 0371-66658161, E-mail: chengxiaoli@zsu.edu.cn

突变都将会影响线粒体供能。本实验选择 mtDNA 3243、ND1 基因 3316、3394 位点对 SZ 患者及正常对照进行突变比较研究,以进一步探讨其突变与中国汉族人 SZ 发生之间的联系。

1 对象和方法

1.1 对象 对照组选择河南汉族健康人 292 人, SZ 患者 250 例,病例纳入标准根据美国精神障碍诊断统计手册第 3 版修订本(DSM-III-R)标准确诊为精神分裂症患者,排除伴有严重躯体疾病和脑器质性障碍个体患者。患者监护人和健康人签署知情同意书。

1.2 引物设计 引物 1:(H 链 3130~3149)5'-AGG ACA AGA GAA ATA AGG CC-3',引物 2:(L 链 3423~3402)5'-AAC GTT GGG GCC TTT GCG TAG-3'。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.3 DNA 提取 消毒后,抽取外周静脉血 3~5 ml,20 g/L EDTA 抗凝,无菌管置-20℃保存。采用标准酚/氯仿法抽提总 DNA,752 型分光光度计对 DNA 量及纯度进行测定。

1.4 PCR 扩增 所有样本采用 25 μl 总反应体系进行扩增,PCR 循环参数:95℃预变性 5 min,94℃变性 30 s,53℃退火 30 s,72℃延伸 30 s,共 25 个循环,最后 72℃延伸 5 min。PCR 产物长度为 293 bp,对扩增产物进行 RFLP 分析。

1.5 突变检测 用限制性内切酶 *Hae* III (Promega 公司)对 PCR 产物进行消化,37℃,4 h,3%琼脂糖凝胶电泳检测酶切结果,预期结果见表 1。对所有突变个体进行重复验证。

表 1 突变型和野生型 mtDNA 片段长度

Tab 1 Mutant and wild-type mtDNA length

Marker	Length (bp)	
	Wild-type	Mutant type
mt3243	168+97+28	113+97+55
mt3316	168+97+28	265+28
mt3394	168+97+28	168+78+28+20

1.6 DNA 序列测定 随机选取正常和突变个体各 3 例 PCR 产物,由 Invitrogen 公司进行纯化测序。用 Chromas 读取测序结果、Clustal X 软件进行多重序列完全比对,以 mtDNA 剑桥标准序列为参照。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析,并对数据进行 χ^2 检验的连续性校正 (correction for continuity) 分析。检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 线粒体 tRNA^{Leu(UUR)} 基因 3243A/G 突变 对 292 例对照和 250 例患者 DNA 酶解后电泳分析未见突变(电泳图未附)。

2.2 线粒体 ND1 基因 mt3316G/A 和 mt3394 T/C 的突变 SZ 患者中检测出 3316G/A 突变 8 例,在对照组中检测出 3 例;SZ 患者中检测出 3394T/C 突变 15 例,在对照组中检测出 4 例。电泳检测结果见图 1。对比 2 组每个突变个体的突变位点,未发现同时具有 mt3316 和 mt3394 双重突变个体(对比表未附)。

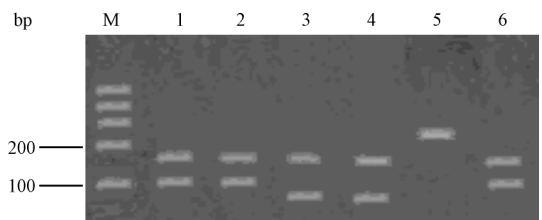


图 1 ND1 基因 mt3316 和 mt3394 位点酶切结果

Fig 1 mt3316 and mt3394 of ND1 gene after digestion

1,2,6: Wild-type of 3394; 3,4: Mutant of 3394; 5: Mutant of 3316; M: Marker

2.3 测序结果 ND1 基因 3316G/A 突变将致使 1 个酶切位点(GGCC)消失。3394T/C 突变将新生成 1 个酶切位点(GGCC)。2 个位点测序结果见图 2。

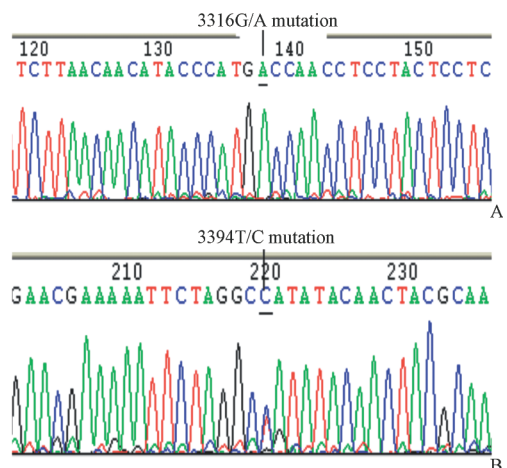


图 2 mt3316 突变基因(A)和 mt3394 突变基因(B)测序图

Fig 2 Sequence of mt3316 mutation(A) and mt3394 mutation(B)

2.4 统计分析结果 SZ 组和对照组中均未发现 mtDNA 3243A/G 突变。对 mtDNA 3316 G/A 突变发生率进行检验,得出 $P=0.138$,差异不具有统

计学意义。对 mtDNA 3394 T/C 突变发生率进行检验,得出 $P=0.007$,差异具有统计学意义。统计结果见表 2。

表 2 病例组与对照组突变发生的频率

Tab 2 Mutation frequencies in case and control groups

Marker	Mutation distribution(n/N, %)		χ^2	P
	Case	Control		
mt3243	0(0/250)	0(0/292)		
mt3316	3.2(8/250)	1.03(3/292)	2.198	0.138
mt3394	6(15/250)	1.37(4/292)	7.222	0.007

3 讨论

mtDNA 突变率和异质性甚高,这些特点使具有相同病理表现的 SZ 个体可有各不相同的突变基础。Walsh 等^[3]的研究证实神经系统传导通路中的众多单个稀有基因突变都会影响 SZ 的发生,即 SZ 的分子病因个性化程度甚高。本研究也未发现 1 例是同时具有 2 种突变的,支持 Walsh 等一些稀有突变增加 SZ 易感性的观点。

唐春等^[4]发现,mtDNA 变异是影响线粒体功能的重要因素。线粒体基因 3243 位点在 tRNA^{Leu(UUR)} 基因的双氢尿嘧啶环中,也是促进转录终止因子的结合部位,该位点突变将导致 tRNA^{Leu(UUR)} 合成障碍,妨碍转录因子的结合,致使蛋白质合成缺陷,线粒体氧化磷酸化功能受损,能量供应不足。因此,它成为许多病的致病原因,如线粒体脑肌病伴乳酸血症和卒中样发作(MELAS)、遗传性糖尿病^[5-6]等。Munakata 等^[7]报道线粒体 tRNA^{Leu(UUR)} 基因 3243 位点突变与 SZ 有关,但本实验则未发现 3243 位点突变与 SZ 发生有关,不支持 Munakata 等的结论。

国内外的既往研究尚未对 mtDNA3316 和 mtDNA3394 突变在 SZ 发生中的影响作出评估,两突变点均位于 ND1 保守区,前者可使非极性的丙氨酸(Ala)变为极性的苏氨酸(Thr),后者可使中性酪氨酸(Tyr)变为碱性组氨酸(His)。2 个位点的变异,将使 NADH 脱氢酶复合体 I 的亚单位 I 的二级结构发生改变,从而影响呼吸链复合体酶的活性,导致线粒体氧化磷酸化功能受损,可直接影响能量需

求旺盛的器官(如脑、胰岛)的功能,导致出现精神紊乱症、胰岛分泌受损等^[7-8]。本实验发现 mtDNA3316G/A 在 SZ 组突变率为 3.2%,在对照组为 1.03%,两组差异不具有统计学意义($P>0.05$)。mtDNA3394T/C 突变率在 SZ 组为 6%,在对照组为 1.37%,两组差异具有统计学意义($P<0.05$)。因此,mtDNA3394 位点可能与精神分裂症的发生有关。

【参考文献】

- [1] Doi N, Hoshi Y, Itokawa M, Usui C, Yoshikawa T, Tachikawa H. Persistence criteria for susceptibility genes for schizophrenia: a discussion from an evolutionary viewpoint[J]. PLoS ONE, 2009, 4: e7799.
- [2] Lauritzen K H, Moldestad O, Eide L, Carlsen H, Nesse T, Storm J F, et al. Mitochondrial DNA toxicity in forebrain neurons causes apoptosis, neurodegeneration, and impaired behavior [J]. Mol Cell Biol, 2010, 30: 1357-1367.
- [3] Walsh T, McClellan J M, McCarthy S E, Addington A M, Pierce S B, Cooper G M, et al. Rare structural variants disrupt multiple genes in neurodevelopmental pathways in schizophrenia[J]. Science, 2008, 320: 539-543.
- [4] 唐春, 别平, 李昆, 张玉君, 马正伟. 梗阻性黄疸大鼠肝细胞线粒体 DNA 损伤的定量研究[J]. 第二军医大学学报, 2007, 28: 48-52.
Tang C, Bie P, Li K, Zhang Y J, Ma Z W. Quantitative study of hepatocyte mtDNA damage in rats with obstructive jaundice [J]. Acad J Sec Mil Med, 2007, 28: 48-52.
- [5] Harrison-Gómez C, Harrison-Ragle A, Macías-Hernández A, Guerrero-Sánchez V. A3243G mitochondrial DNA mutation and heterogeneous phenotypic expression[J]. Rev Med Inst Mex Seguro Soc, 2009, 47: 219-225.
- [6] Gál A, Szabó A, Pentelényi K, Pál Z. Maternally inherited diabetes mellitus, deafness, chronic progressive external ophthalmoplegia and myopathy as the result of A3243G mutation of mtDNA[J]. Orv Hetil, 2008, 149: 1593-1598.
- [7] Munakata K, Iwamoto K, Bundo M, Kato T. Mitochondrial DNA 3243A>G mutation and increased expression of LARS2 gene in the brains of patients with bipolar disorder and schizophrenia[J]. Biol Psychiatry, 2005, 57: 525-532.
- [8] Yu P, Yu D, Liu D M. Relationship between mutations of mitochondrial DNA ND1 gene and type 2 diabetes[J]. Chin Med J, 2004, 117: 985-989.

【本文编辑】尹茶