

m.3472T>C 突变导致莱伯遗传性视神经病变机制研究

张欢欢^{1,2}, 单文琪^{2,3}, 美合日阿依·亚生^{2,3}, 管敏鑫^{1,2,3}

- 温州医科大学检验医学院 生命科学学院 Attardi 线粒体生物医学研究院, 浙江 温州 325035
- 浙江大学遗传学研究所, 浙江 杭州 310058
- 浙江大学医学院附属第四医院眼科, 浙江 义乌 322000

[摘要] **目的:**探讨 m.3472T>C(p.Phe56Leu)突变相关莱伯遗传性视神经病变(LHON)的分子机制。**方法:**从 1397 例 LHON 患者中筛选出三个携带 m.3472T>C 突变的大家系(WZL122、WZ676、WZ706)作为研究对象。采集 2 例携带 m.3472T>C 突变的 LHON 患者及 2 名健康对照者的外周血建立永生淋巴母细胞系。使用 MitoTool 软件对线粒体 DNA 全序列进行分析明确其单倍型背景;通过 MitoMap 数据库评估线粒体 DNA 突变位点的保守性;应用在线预测软件对 NADH 脱氢酶亚基 1(ND1)蛋白的二级结构进行预测分析;应用 PyMOL 对野生型和突变型 ND1 蛋白的三维结构及分子相互作用变化进行可视化分析;蛋白质印迹法检测关键蛋白质表达水平;化学发光法检测细胞腺苷三磷酸(ATP)水平;流式细胞术检测线粒体膜电位和活性氧水平。**结果:**线粒体 DNA 单倍型分析显示,研究对象线粒体单倍型属于东亚线粒体单倍型群 D4, m.3472T>C 突变导致线粒体复合体 I 中 ND1 的一个高度保守的苯丙氨酸被亮氨酸取代(p.Phe56Leu),可能扰乱 ND1 蛋白的空间构象和稳定性。在携带该突变的永生淋巴母细胞系中 ND1 表达水平降低,线粒体 ATP 生成减少,膜电位水平降低,活性氧生成增加,过氧化氢酶和超氧化物歧化酶 2 表达增加(均 $P<0.01$),提示复合体 I 功能受损。**结论:**m.3472T>C 突变可通过破坏复合体 I 中 ND1 的结构稳定性,导致线粒体功能障碍,从而参与 LHON 的发病过程。



[关键词] 莱伯遗传性视神经病变;母系遗传;线粒体 DNA;m.3472T>C 突变;线粒体功能障碍

[中图分类号] R774 **[文献标志码]** A

收稿日期(Received):2025-03-27 修改返回日期(Revised):2025-10-20 接受日期(Accepted):2025-11-01 网络预发表日期(Online):2025-11-12

基金项目(Funding):国家重点研发计划(2021YFC2700902)

第一作者(First author):张欢欢, 硕士研究生, 主要从事线粒体分子遗传研究;E-mail: zresearch2025@163.com;ORCID: 0009-0000-6927-0533

通信作者(Corresponding author):管敏鑫, 教授, 博士生导师, 主要从事线粒体遗传学和母系遗传性疾病基础研究及临床转化;E-mail: gminxin88@zju.edu.cn;ORCID: 0000-0001-5067-6736

Pathogenic mechanisms of Leber hereditary optic neuropathy caused by m.3472T>C mutation

ZHANG Huanhuan^{1,2}, SHAN Wenqi^{2,3}, YASHENG Meiheriayi^{2,3}, GUAN Minxin^{1,2,3}

(1. School of Laboratory Medicine and Life Sciences, Attardi Institute of Mitochondrial Biomedicine, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, Zhejiang Province, China; 2. Institute of Genetics, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; 3. Department of Ophthalmology, the Fourth Affiliated Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Yiwu 322000, Zhejiang Province, China)

Corresponding author: GUAN Minxi, E-mail: gminxin88@zju.edu.cn, ORCID: 0000-0001-5067-6736

[**Abstract**] **Objective:** To investigate the molecular mechanism underlying Leber hereditary optic neuropathy (LHON) caused by the m.3472T>C (p.Phe56Leu) mutation. **Methods:** Three large pedigrees (WZL122, WZ676, WZ706) carrying the m.3472T>C mutation were identified and selected from a cohort of 1397 LHON patients. Immortalized lymphoblast cell lines were established from peripheral blood samples obtained from two affected individuals carrying homoplasmic m.3472T>C mutation (derived from one Han Chinese LHON pedigree) and two genetically unrelated, matched healthy controls. The MitoTool software was used to analyze the complete mitochondrial DNA sequence to determine the haplogroup background, and the conservation of the mitochondrial DNA (mtDNA) mutation site was evaluated using the MitoMap database. The secondary structure of the NADH dehydrogenase subunit 1 (ND1) protein was predicted and analyzed using online prediction software. The three-dimensional structure and molecular interaction changes of wild-type and mutant ND1 proteins were visualized and analyzed using PyMOL. Western blotting was performed to determine the expression levels of key proteins. Cellular adenosine triphosphate (ATP) levels were measured using a chemiluminescence assay. Mitochondrial membrane potential and intracellular reactive oxygen species (ROS) levels were assessed by flow cytometry. **Results:** mtDNA haplotype analysis showed that all the subjects belonged to the East Asian mitochondrial haplogroup D4. The m.3472T>C mutation results in the substitution of a highly conserved phenylalanine with leucine (p.Phe56Leu) in the ND1 of mitochondrial complex I, which may alter the structure and function of ND1. In lymphoblast cell lines carrying the m.3472T>C mutation, manifestations of mutant ND1 instability were observed, including reduced ND1 protein levels, diminished mitochondrial ATP production, decreased mitochondrial membrane potential, and increased mitochondrial ROS production. Concurrently, the expression levels of antioxidant enzymes catalase and superoxide dismutase 2 were elevated (all $P < 0.01$). These findings collectively suggest impaired complex I function. **Conclusion:** The m.3472T>C mutation contributes to the pathogenesis of LHON by disrupting the structural stability of ND1 in complex I, leading to mitochondrial dysfunction.

[**Key words**] Leber hereditary optic neuropathy; Maternal inheritance; Mitochondrial DNA; m.3472T>C mutation; Mitochondrial dysfunction

[缩略语] 莱伯遗传性视神经病变(Leber hereditary optic neuropathy, LHON); NADH脱氢酶(NADH dehydrogenase, ND); 聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR); 定量PCR(quantitative PCR, qPCR); 放射免疫沉淀法(radioimmunoprecipitation assay, RIPA); 腺苷三磷酸(adenosine triphosphate, ATP); 细胞色素b(cytochrome b, CYB); 细胞色素c氧化酶亚基2(cytochrome c oxidase subunit 2, CO2); ATP合酶F0亚基8(ATP synthase F0 subunit 8, ATP8); 线粒体外膜转运酶(translocase of outer mitochondrial membrane, TOM); NADH-泛醌氧化还原酶(NADH-ubiquinone oxidoreductase, NDUF); 琥珀酸脱氢酶黄素蛋白亚基A(succinate dehydrogenase complex flavoprotein subunit A, SDHA); 泛醇-细胞色素c还原酶核心蛋白(ubiquinol-cytochrome c reductase core protein, UQCRC); 细胞色素c氧化酶亚基5A(cytochrome c oxidase subunit 5A, COX5A); ATP合酶F1亚基 α (ATP synthase F1 subunit alpha, ATP5A1, ATP5F1A); 超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD); 聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF); 磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS); 含吐温-20的PBS(PBS with Tween-20, PBST); 核糖体RNA(ribosomal RNA, rRNA); 羰基氰化物-对-三氟甲氧基苯胺(carbonyl cyanide-*p*-trifluoromethoxyphenylhydrazine, FCCP); 四甲基罗丹明甲酯(tetramethylrhodamine methyl ester, TMRM)

LHON由德国医生Theodor Leber在1871年定义,是最早发现的与线粒体DNA突变相关的母系遗传性眼病^[1-2]。LHON特异性损伤视网膜神经节细胞,患者常表现为急性或亚急性、单侧或双侧视力减退^[3]。LHON的遗传模式为母系遗传,与其相关的线粒体突变大多表现为同质性突变。1988年,Wallace等^[1]发现了第一个与LHON相关的突变m.11778G>A,该突变位点与后继发现的m.3460G>A^[4]以及m.14484T>C^[5]均认为是LHON的原发位点,即这些位点能够单独导致疾病发生,具有明确的致病性。在美国、意大利、澳大利亚等国家的1517例LHON患者中,这三个原发位点突变占90%以上^[6]。一项对我国1300多例LHON患者资料的分析提示,m.11778G>A约占85%,m.14484T>C约占12%,m.3460G>A约占3%^[7-9]。除上述突变外,还存在m.3394T>C^[10]和m.3866T>C^[11]等继发突变,其本身致病性较弱,但可通过与原发位点突变发生协同作用,增加LHON的表型表达。

线粒体ND1、ND4、ND6基因是与LHON相关的热点基因,其中线粒体ND1基因由956个核苷酸组成,其编码产生的ND1蛋白含318个氨基酸,是线粒体呼吸链复合物I的核心亚基之一^[12],除原发位点m.3460G>A突变之外,m.3635G>A^[13]、m.3733G>A^[14]、m.3890G>A^[15]等ND1突变位点也与LHON相关。这些突变最终促使细胞功能障碍,导致视网膜神经节细胞变性坏死,引起视力

下降。此外,有报道了在两例LHON患者中检出位于ND1基因上的m.3472T>C突变:一例是40岁男性,其双眼表现为严重的中心视力丧失,眼底检查提示视盘苍白,同时具有双侧致密的中心盲点、色觉明显下降等临床表现^[16];另一例为19岁男性,双侧视力严重无痛性丧失,同时表现为明显的色素异常和双眼盲中心暗点^[17]。本研究在LHON家系中检测发现,先证者及其母系成员均携带m.3472T>C突变。目前,m.3472T>C突变在LHON中的致病性尚不明确。本研究通过建立携带该突变的永生淋巴母细胞模型,从线粒体能量代谢、氧化应激等方面系统评估其生物学效应,旨在阐明该突变在LHON发病中的潜在机制。

1 对象与方法

1.1 对象

通过对1397例符合LHON临床诊断标准^[18]的患者及485名健康对照者的资料进行分析,发现WZL122、WZ676及WZ706家系携带m.3472T>C突变,对这三个家系的先证者进行血液标本采集和临床资料收集。

1.2 试剂和仪器

B95-8细胞购自中国科学院细胞库;RPMI-1640细胞培养基(G4535)为中国武汉塞维尔生物科技有限公司产品;胎牛血清(A5256701)为美国Gibco公司产品;Cocktail蛋白酶抑制剂(HY-

K0010)为中国生工生物工程(上海)股份有限公司产品;5×蛋白质上样缓冲液(FD006)为中国杭州弗德生物科技有限公司产品;三色预染蛋白分子量标准(WB1902S)为中国北京博泰斯生物技术有限公司产品;DNA提取试剂盒(KIT0103)、MitoSOX指示剂(M36008)为美国Invitrogen公司产品;Hieff® qPCR SYBR Green Master Mix (11203ES03)为中国翌圣生物科技(上海)股份有限公司产品;RIPA裂解液(P0013B)、100×青霉素-链霉素(C0222)、Hanks平衡盐溶液(C0218)、增强型ATP检测试剂盒(S0027)、辣根过氧化物酶标记二抗(A0208)为中国上海碧云天生物技术有限公司产品;抗霉素A(KS1019)为中国武汉普因特生物工程有限公司产品;ND1多克隆抗体(19703-1-AP)、MT-CYB多克隆抗体(55090-1-AP)、MTCO2多克隆抗体(55070-1-AP)、ATP8多克隆抗体(26723-1-AP)、TOM20多克隆抗体(11802-1-AP)、NDUFA10多克隆抗体(32947-1-AP)、SDHA多克隆抗体(14865-1-AP)、UQCRC2多克隆抗体(14742-1-AP)、COX5A多克隆抗体(11448-1-AP)、ATP5A1多克隆抗体(14676-1-AP)以及β-肌动蛋白单克隆抗体(66009-1-Ig)为中国武汉三鹰生物技术有限公司产品;SOD1单克隆抗体(A12537)、SOD2多克隆抗体(A21805)、过氧化氢酶单克隆抗体(A11220)为中国武汉爱博泰克生物科技有限公司产品。酶标仪(Synergy H1)、流式细胞分析仪(NovoCyte)为美国Agilent Technologies公司产品。

1.3 眼科检查

对先证者及部分家系成员进行眼科检查,包括视力、眼底照相、视野检查等。视力损伤程度根据视力定义如下:0.30及以上为正常;0.10~<0.30为轻度损伤;0.05~<0.10为中度损伤;0.02~<0.05为重度损伤;0.02以下为极重度损伤。

1.4 线粒体全基因组测序

用DNA提取试剂盒提取LHON患者和健康对照者的肝素抗凝外周血DNA。以提取到的DNA作为起始模板,PCR扩增。对扩增后的DNA进行线粒体全基因组测序。通过SnapGene等软件将测序结果与修正的剑桥参考序列^[19]进行比对,使用MitoTool软件进行线粒体单倍型分析。

1.5 生物信息学方法分析突变基因

1.5.1 基因保守性分析 从GenBank、UniProt等数据库获取相应物种的线粒体ND1基因序列

及其编码的氨基酸序列,使用MitoMap数据库中的MITOMASTER工具比对家牛、人、白掌长臂猿、小鼠、黑猩猩、环尾狐猴、猕猴、非洲爪蟾、阿拉伯狒狒、绵羊、家犬、鸭嘴兽、黑腹果蝇、红原鸡线粒体序列在相应突变位点的保守性;运用DNAMAN软件对人、小鼠、挪威鼠、猪、果蝇、黑猩猩、斑马鱼、非洲爪蟾ND1蛋白氨基酸序列进行ND1蛋白第56位苯丙氨酸的保守性分析。

1.5.2 软件预测线粒体蛋白质结构变化 将氨基酸序列提交至在线软件(<http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp>)进行二级结构定位预测。用Pymol软件分析野生型和突变型的ND1蛋白,分析突变对ND1蛋白结构的影响及蛋白分子间相互作用是否发生变化,并对其蛋白质三级结构进行可视化分析。

1.6 细胞实验分析分子生物学机制

1.6.1 永生化淋巴母细胞模型的构建及培养 EB病毒能与入外周血B淋巴细胞膜上的EB病毒受体结合发生转化和增殖^[20]。利用EB病毒这一特性,使用来源于B95-8细胞的EB病毒,将具有相同D4型线粒体单倍型的WZL122家系患者(Ⅲ-1,18岁女性;Ⅲ-2,16岁男性)和健康对照者(C1,20岁女性;C2,18岁男性)的淋巴细胞成功转化为可长期传代的永生化淋巴母细胞,分别记为突变组和对照组^[21]。向RPMI-1640培养基中加入10%胎牛血清配成细胞培养液,使用T25培养瓶培养细胞,放置在37℃、5%二氧化碳恒温细胞培养箱中,及时更换新鲜配制的细胞培养液。

1.6.2 细胞蛋白质提取 按照1:100的比例,向RIPA裂解液中加入100×蛋白酶抑制剂,即每毫升RIPA裂解液中加入100 μL 100×蛋白酶抑制剂。向细胞沉淀中加入相当于沉淀量3~5倍体积的含蛋白酶抑制剂的RIPA裂解液,冰上裂解细胞。4℃、20 000×g离心20 min,取上清液与5×蛋白质上样缓冲液和含有蛋白酶抑制剂的RIPA裂解液共同配制成5.5 μg/μL浓度的蛋白样品。98℃高温变性后迅速置于冰上降温,4℃、2000×g离心5 s后-80℃保存。

1.6.3 蛋白质印迹法检测蛋白质表达 用SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳技术分离蛋白质,4℃下将蛋白质转至PVDF膜上。与凝胶接触面朝上,使用1×PBST新鲜配制的5%脱脂牛奶室温慢摇,封闭PVDF膜。洗膜后以PVDF膜上蛋白质为抗原,与对应一抗在4℃下孵育过夜。选择与一抗

相应的辣根过氧化物酶标记二抗,用以1×PBST为介质新鲜配制的5%脱脂牛奶稀释后孵育。将PVDF膜洗净后均匀涂布新鲜配制的显影液,避光条件下使用显影仪检测发光信号,使用ImageJ软件对蛋白条带进行定量分析。

1.6.4 化学发光法检测ATP水平 两组分别取 2×10^5 个淋巴细胞,并各分为两份,分别加入ATP检测培养基10 mmol/L葡萄糖和10 mmol/L 2-脱氧-D-葡萄糖(糖酵解受到抑制),将细胞置于37℃、无二氧化碳的培养箱中孵育2 h。孵育结束后,使用ATP检测裂解液裂解细胞后,4℃、12 000×g下离心5 min,取上清液,在荧光素酶和荧光素过量条件下使用Synergy H1酶标仪检测荧光值。通过ATP标准曲线计算上清液ATP浓度,同时利用BCA法测定蛋白浓度并对结果进行校正。

1.6.5 qPCR检测线粒体DNA拷贝数 取 1×10^6 个细胞,使用DNA提取试剂盒提取各个样本DNA。检测DNA浓度和纯度,取少量样品DNA均稀释为10 ng/ μ L。以18S rRNA为内参基因,16S rRNA为目的基因,按照Hieff® qPCR SYBR Green Master Mix试剂说明书20 μ L体系使用三步法进行qPCR检测。

1.6.6 流式细胞术检测线粒体膜电位 两组均收集一定数量细胞并分别分为三份进行平行处理,一份先加入10 μ mol/L FCCP工作液并在37℃下孵育30 min, PBS清洗后再加入100 nmol/L TMRM并在37℃下孵育30 min;一份使用PBS代替FCCP工作液,其余同上;一份使用PBS代替FCCP工作液和TMRM,其余同上。孵育结束后使用PBS清洗,再用一定量的PBS重悬细胞后用流式细胞仪检测,读取PE-H通道的平均荧光强度,分析线粒体膜电位的变化。

1.6.7 流式细胞术检测线粒体活性氧水平 MitoSOX超氧化物指示剂事先加入130 μ L二甲基亚砜制成100×的储存液,使用时用Hanks平衡盐溶液稀释成1×MitoSOX Red工作液。两组均收集一定数量细胞并分别分为三份进行平行处理:

一份细胞沉淀加入1 mmol/L过氧化氢并在37℃下孵育30 min, PBS清洗后加入MitoSOX Red工作液并在37℃下孵育30 min;一份使用Hanks液代替过氧化氢,其余同上;一份使用Hanks液代替过氧化氢和1×MitoSOX Red工作液,其余同上。各组孵育结束后用PBS清洗,使用PBS重悬后用流式细胞仪检测。计算受过氧化氢刺激的细胞与未受刺激的细胞之间荧光强度的比值。

1.7 统计学方法

所有统计分析均采用GraphPad Prism 8.0软件,每个细胞株独立检测三次,并分别对对照组(C1、C2)和突变组(Ⅲ-1、Ⅲ-2)组内求平均值作为两组最终统计值,符合正态分布的计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。各组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 先证者所在家系临床及遗传学筛查结果

3例先证者所在家系共60名成员,其中母系成员46名。三个家系母系成员中,WZL122、WZ706家系中各有2例患者,WZ676家系仅1例患者,外显率分别为33.3%(2/6)、9.5%(2/21)、5.3%(1/19),见图1。5例患者的临床资料如表1所示,放射学及其他神经病学检查未见异常,无其他重要病史。3例先证者均携带同质性的m.3472T>C突变(图2)。

2.2 线粒体ND1基因3472位点进化上具有保守性

通过对健康对照者(C1、C2)和WZL122家系

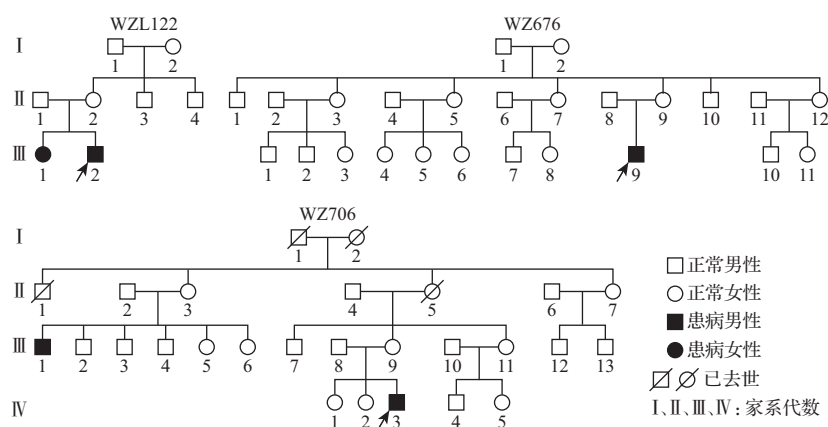


图1 携带m.3472T>C突变的3例先证者所在家系图(箭头指示先证者)

Figure 1 Three pedigrees carrying the m.3472T>C mutation (arrows denote the probands)

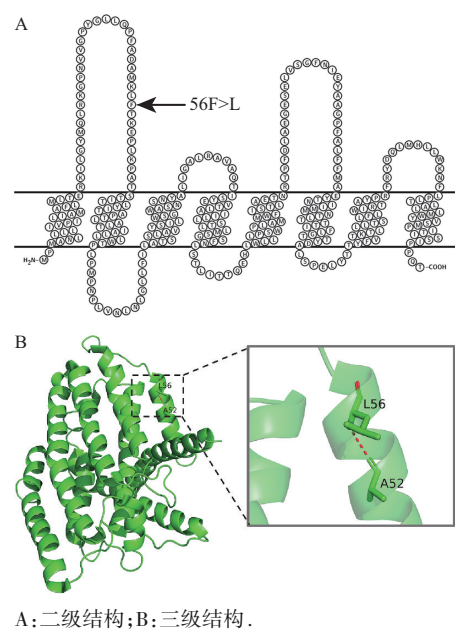


图4 NADH脱氢酶亚基1结构预测图
Figure 4 Predicted NADH dehydrogenase subunit 1 structures

抑制,突变组线粒体ATP水平仅为对照组水平的(36.0±25.9%)($P<0.01$)。结果表明,m.3472T>C突变导致线粒体ATP水平下降。

2.6 m.3472T>C突变导致线粒体膜电位水平降低

突变组线粒体DNA拷贝数水平为对照组的(115.8±4.0%)($P<0.01$),而线粒体膜电位水平为对照组的(71.5±2.9%)($P<0.01$),见图6。提示m.3472T>C突变导致线粒体膜电位水平降低。

2.7 m.3472T>C突变导致线粒体活性氧水平升高

突变组线粒体活性氧水平为对照组的(119.9±2.9%)($P<0.01$),见图7。蛋白质印迹法检测结果显示,突变组过氧化氢酶和SOD2水平明显增加,分别为对照组的(172.6±49.6%)和(224.7±56.7%)(均 $P<0.01$),SOD1水平为对照组的(108.2±17.4%)($P>0.05$),见图8。结果提示,m.3472T>C突变导致线粒体活性氧水平升高,细胞通过上调过氧化氢酶和SOD2发挥抗氧化作用。

3 讨论

LHON是与线粒体突变相关的母系遗传性眼病,其典型特征为视网膜

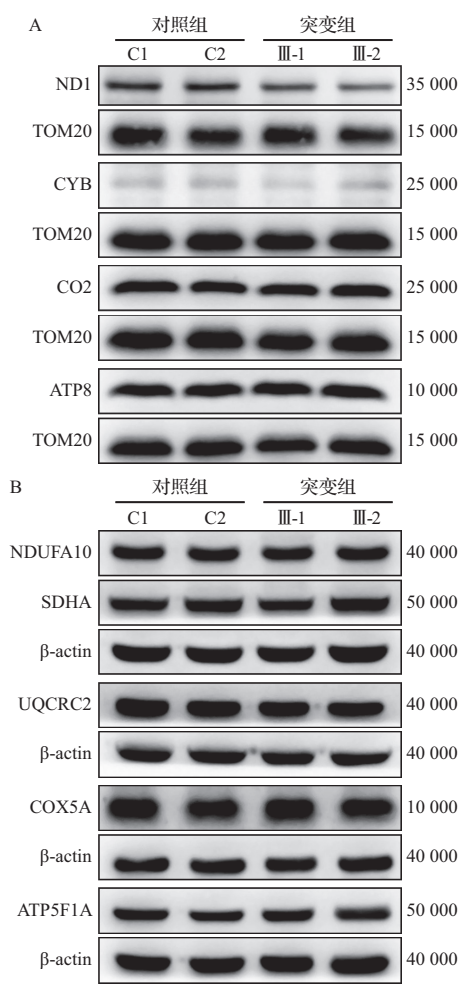
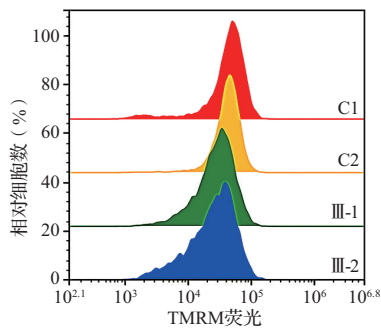


图5 两组线粒体编码、核编码蛋白电泳图
Figure 5 Electrophoresis of mitochondrially-encoded and nuclear-encoded proteins in the control and the mutant groups

表2 对照组与突变组线粒体编码、核编码蛋白表达水平比较
Table 2 Comparison of mitochondrially-encoded and nuclear-encoded protein expression levels between the control and the mutant groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	ND1	CYB	CO2	ATP8	NDUFA10	SDHA	UQCRC2	COX5A	ATP5F1A
对照组	100±6	100±6	100±6	100±2	100±10	100±17	100±18	100±8	100±7
突变组	70±12**	102±20	101±11	103±9	103±7	96±23	102±21	102±12	92±7

与对照组比较,** $P<0.01$ 。ND:NADH脱氢酶;CYB:细胞色素b;CO2:细胞色素c氧化酶亚基2;ATP8:ATP合酶F0亚基8;NDUFA10:NADH-泛醌氧化还原酶亚基A10;SDHA:琥珀酸脱氢酶黄素蛋白亚基A;UQCRC:泛醇-细胞色素c还原酶核心蛋白;COX5A:细胞色素c氧化酶亚基5A;ATP5F1A:ATP合酶F1亚基α。



C1、C2为对照组，Ⅲ-1、Ⅲ-2为突变组。峰值越靠左，则荧光强度越低，膜电位水平越低。TMRM：四甲基罗丹明甲酯。

图6 对照组和突变组线粒体膜电位检测结果
Figure 6 Flow cytometric analysis of mitochondrial membrane potential in the control and the mutant groups

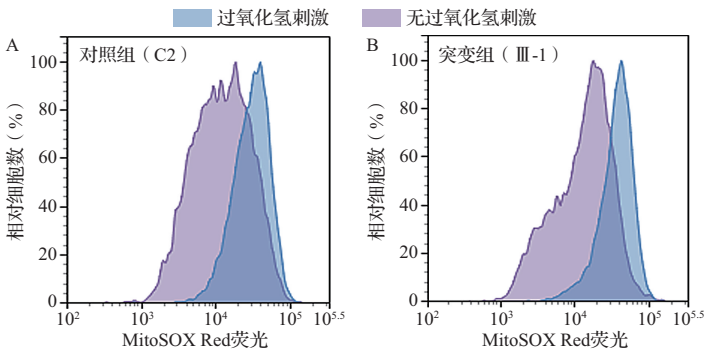
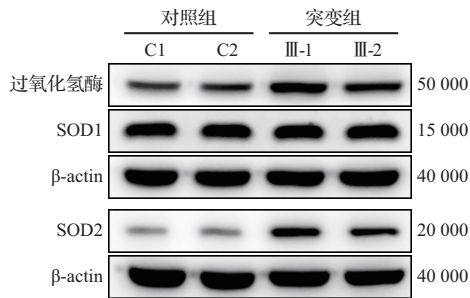


图7 对照组和突变组线粒体活性氧检测结果
Figure 7 Mitochondrial reactive oxygen species production in the control and the mutant cells



SOD：超氧化物歧化酶；actin：肌动蛋白。

图8 对照组和突变组细胞中抗氧化酶相关蛋白电泳图
Figure 8 Electrophoresis of antioxidant enzyme-related proteins in the control and the mutant cells

神经节细胞及其轴突发生变性，进而导致中心视力的急性或亚急性丧失。在前期收集 1397 例 LHON 患者的临床资料基础上，本研究对携带 m.3472T>C 突变的家系进行了临床评估，针对由家系遗传线索指向但尚未明确具体致病性的

ND1 罕见突变进行功能验证，从细胞水平补充 LHON 致病突变谱的研究证据。本文资料中，先证者具有典型的 LHON 临床特征，呈现不同程度的视觉功能受损，视力检查结果从 0.02 到 0.06 不等。除视力受损外，这些家系的综合病史中无其他临床异常，如糖尿病、肌肉病变、听力损伤和神经系统疾病等。这与已报道的中国人携带原发位点突变的 LHON 临床表现一致^[22-23]。

LHON 倾向于影响青壮年男性群体，具有不完全外显的特性。课题组前期收集到的 3 个携带 m.3472T>C 突变家系的外显率为 5.3%~33.3%，低于中国人群中携带 m.11778G>A 突变^[24-25]以及丹麦携带原发位点突变的 LHON 人群外显率^[26]；与继

发性突变 m.3394G>A^[27]、m.11696G>A^[28] 的 LHON 人群外显率相当。本文资料中，携带 m.3472T>C 突变的 3 个家系发病年龄从 16 岁到 38 岁不等，发病年龄的中位数为 18 岁，这与已报道中国家系^[8,22]和高加索人家系^[29]中 LHON 的发病年龄范围基本吻合。不管是在同一家系或不同遗传背景的不同家系中，携带 m.3472T>C 突变的个体患病严重程度和发病率均有明显差异，这表明除突变本身外，可能有其他修饰因素共同促进 LHON 的表型表达，如环境因素^[30-31]、核基因修饰因素^[32-33]、线粒体单倍型^[34]等。

本研究构建了携带 m.3472T>C 突变的永生淋巴母细胞模型，并对突变细胞的线粒体功能展开进一步研究。哺乳动物线粒体 DNA 为双链环状 DNA 分子且存在多个拷贝，本研究发现在携带 m.3472T>C 突变的 LHON 患者来源永生淋巴母细胞中，线粒体拷贝数比对照组增加了 15.8%，这与已有报道一致^[35]。有研究显示，无临床表现的 LHON 携带者比出现临床表现的 LHON 携带者有更高的线粒体拷贝数^[36]，这可能是机体为了应对突变带来的不利影响而做出的补偿机制^[37]。本研究进一步探索了 LHON 相关 m.3472T>C 突变的分子机制，发现 m.3472T>C 突变会导致线粒体 ATP 产量减少、线粒体膜电位水平降低以及活性氧水平增加，这与 LHON 相关突变引起的线粒体功能异常一致^[38-39]。线粒体功能障碍可能导致视网膜

神经节细胞功能障碍或死亡,从而促进视神经病变的发生发展。

LHON患者视力减退往往是突然发生且持久存在,难以通过现有手段进行有效矫正,因此给患者造成了极大的身心困扰。LHON的发病机制根植于线粒体DNA中的三个核心原发突变位点,这些位点构成了疾病发生的重要分子生物学基础^[22-23,28]。此外,线粒体中的继发突变位点也在LHON的发病过程中发挥着不可忽视的作用^[10,40-44]。这些线粒体DNA突变的主要病理效应在于损害了线粒体复合体I的结构和功能,从而减少了ATP的合成并增加了活性氧的产生。本研究分析了携带m.3472T>C突变患者的分子及生化功能特征,发现m.3472T>C突变可能作为一个协同因素加剧了LHON发生的风险。鉴于基因检测在LHON诊断中的重要作用,m.3472T>C同质性突变可以被视为一个关键的继发位点,用于筛查LHON易感个体。这对于促进LHON患者群体的早期遗传咨询服务和产前诊断具有重要意义,有望为该病的预防和管理提供新的策略。

本文附加文件见电子版。



致谢 本研究得到国家重点研发计划(2021YFC2700902)支持

Acknowledgements This study was supported by National Key R&D Program of China (2021YFC2700902)

作者贡献 张欢欢、单文琪、美合日阿依·亚生和管敏鑫参与论文选题和设计或参与资料获取、分析或解释,起草研究论文或修改重要智力性内容。所有作者均已阅读并认可最终稿件,并对数据的完整性和安全性负责。具体见电子版

Author Contributions ZHANG Huanhuan, SHAN Wenqi, YASHENG Meiheriayi and GUAN Minxin participated in brewing and designing experiments, or acquisition, analysis, or interpretation of data for the work; drafting the work, or revising it critically for important intellectual content. All authors have read and approved the final manuscript, and take responsibility for the integrity and security of the data. See the electronic version for details

数据可用性 本研究的相关数据已在论文正文及附件中完整呈现

Data Availability All relevant data supporting the findings of this study are fully available within the article and supplementary materials

医学伦理 本研究通过浙江大学医学院伦理委员会审查(2021-IRB-288)并符合1964年《赫尔辛基宣言》及之后的修订版或类似的伦理标准。所有参与家庭成员均签署知情同意书

Ethical Approval All procedures performed in this study involving human participants were in accordance with the ethical standards of Zhejiang University School of Medicine (2021-IRB-288), and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards. All participating family members had signed an informed consent form

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突。本文由至少两名编委以外的同行专家评审,最终决定由与作者无利益冲突的其他编委作出

Conflict of Interests The authors declare that there is no conflict of interests. The manuscript was assigned to at least two independent outside reviewers, and the decision was made by other editorial board members who do not have conflicts of interests with the author

©The author(s) 2025. This is an open access article under the CC BY-NC-ND 4.0 license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

参考文献(References)

- [1] WALLACE D C, SINGH G, LOTT M T, et al. Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy[J]. *Science*, 1988, 242(4884): 1427-1430.
- [2] YEN M Y, WANG A G, WEI Y H. Leber's hereditary optic neuropathy: a multifactorial disease[J]. *Prog Retin Eye Res*, 2006, 25(4): 381-396.
- [3] ZHANG J, JI Y, LIU X, et al. Leber's hereditary optic neuropathy caused by a mutation in mitochondrial tRNA^{Thr} in eight Chinese pedigrees[J]. *Mitochondrion*, 2018, 42: 84-91.
- [4] HOWELL N, BINDOFF L A, MCCULLOUGH D A, et al. Leber hereditary optic neuropathy: identification of the same mitochondrial ND1 mutation in six pedigrees [J]. *Am J Hum Genet*, 1991, 49(5): 939-950.
- [5] MACKEY D, HOWELL N. A variant of Leber hereditary optic neuropathy characterized by recovery of vision and by an unusual mitochondrial genetic etiology[J]. *Am J Hum Genet*, 1992, 51(6): 1218-1228.
- [6] POINCENOT L, PEARSON A L, KARANJIA R. Demo-

- graphics of a large international population of patients affected by Leber's hereditary optic neuropathy[J]. **Ophthalmology**, 2020, 127(5): 679-688.
- [7] LIANG M, JIANG P, LI F, et al. Frequency and spectrum of mitochondrial *ND6* mutations in 1218 Han Chinese subjects with Leber's hereditary optic neuropathy[J]. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, 2014, 55(3): 1321-1331.
 - [8] JIANG P, LIANG M, ZHANG J, et al. Prevalence of mitochondrial *ND4* mutations in 1281 Han Chinese subjects with Leber's hereditary optic neuropathy[J]. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, 2015, 56(8): 4778-4788.
 - [9] JI Y, LIANG M, ZHANG J, et al. Mitochondrial *ND1* variants in 1281 Chinese subjects with Leber's hereditary optic neuropathy[J]. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, 2016, 57(6): 2377-2389.
 - [10] LIANG M, GUAN M, ZHAO F, et al. Leber's hereditary optic neuropathy is associated with mitochondrial *ND1* T3394C mutation[J]. **Biochem Biophys Res Commun**, 2009, 383(3): 286-292.
 - [11] ZHOU X, QIAN Y, ZHANG J, et al. Leber's hereditary optic neuropathy is associated with the T3866C mutation in mitochondrial *ND1* gene in three Han Chinese families[J]. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, 2012, 53(8): 4586-4594.
 - [12] MANICKAM A H, MICHAEL M J, RAMASAMY S. Mitochondrial genetics and therapeutic overview of Leber's hereditary optic neuropathy[J]. **Indian J Ophthalmol**, 2017, 65(11): 1087-1092.
 - [13] ZHANG J, JIANG P, JIN X, et al. Leber's hereditary optic neuropathy caused by the homoplasmic *ND1* m.3635G>A mutation in nine Han Chinese families [J]. **Mitochondrion**, 2014, 18: 18-26.
 - [14] YASHENG M, JI Y, HE Y, et al. Leber's hereditary optic neuropathy-associated *ND1* 3733G>C mutation ameliorates the mitochondrial quality control and cellular homeostasis[J]. **J Biol Chem**, 2025, 301(8): 110464.
 - [15] VACCHIANO V, CAPORALI L, MORGIA C L, et al. The m.3890G>A/*MT-ND1* mtDNA rare pathogenic variant: expanding clinical and MRI phenotypes[J]. **Mitochondrion**, 2021, 60: 142-149.
 - [16] MARTÍNEZ-ROMERO Í, DOLORES HERRERO-MARTÍN M, LLOBET L, et al. New *MT-ND1* pathologic mutation for Leber hereditary optic neuropathy[J]. **Clin Exp Ophthalmol**, 2014, 42(9): 856-864.
 - [17] FINSTERER J, ZARROUK-MAHJOUB S. Pathogenicity of the LHON variant m.3472T>C is uncertain[J]. **J Neurol Sci**, 2017, 382: 164-165.
 - [18] CARELLI V, CARBONELLI M, DE COO I F, et al. International consensus statement on the clinical and therapeutic management of Leber hereditary optic neuropathy[J]. **J Neuroophthalmol**, 2017, 37(4): 371-381.
 - [19] ANDREWS R M, KUBACKA I, CHINNERY P F, et al. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA[J]. **Nat Genet**, 1999, 23(2): 147.
 - [20] HENLE W, DIEHL V, KOHN G, et al. Herpes-type virus and chromosome marker in normal leukocytes after growth with irradiated Burkitt cells[J]. **Science**, 1967, 157(3792): 1064-1065.
 - [21] 孙吉吉, 赵晓旭, 乔丽华, 等. 线粒体遗传疾病细胞模型的构建: 永生淋巴细胞系和转线粒体细胞系[J]. **遗传**, 2016, 38(7): 666-673.
SUN Jiji, ZHAO Xiaoxu, QIAO Lihua, et al. Cellular models for mitochondrial DNA-based diseases: lymphoblastoid cell lines and transmitochondrial cybrids[J]. **Hereditas**, 2016, 38(7): 666-673. (in Chinese)
 - [22] ZHANG J, JI Y, CHEN J, et al. Association between Leber's hereditary optic neuropathy and *MT-ND1* 3460G>A mutation-induced alterations in mitochondrial function, apoptosis, and mitophagy[J]. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, 2021, 62(9): 38.
 - [23] SUN Y H, WEI Q P, ZHOU X, et al. Leber's hereditary optic neuropathy is associated with the mitochondrial *ND6* T14484C mutation in three Chinese families[J]. **Biochem Biophys Res Commun**, 2006, 347(1): 221-225.
 - [24] QIAN Y, ZHOU X, HU Y, et al. Clinical evaluation and mitochondrial DNA sequence analysis in three Chinese families with Leber's hereditary optic neuropathy[J]. **Biochem Biophys Res Commun**, 2005, 332(2): 614-621.
 - [25] ZHOU X, ZHANG H, ZHAO F, et al. Very high penetrance and occurrence of Leber's hereditary optic neuropathy in a large Han Chinese pedigree carrying the *ND4* G11778A mutation[J]. **Mol Genet Metab**, 2010, 100(4): 379-384.
 - [26] ROSENBERG T, NØRBY S, SCHWARTZ M, et al. Prevalence and genetics of Leber hereditary optic neuropathy in the Danish population[J]. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, 2016, 57(3): 1370-1375.
 - [27] JI Y, ZHANG J, YU J, et al. Contribution of mitochondrial *ND1* 3394T>C mutation to the phenotypic manifestation of Leber's hereditary optic neuropathy[J]. **Hum Mol Genet**, 2019, 28(9): 1515-1529.
 - [28] QU J, LI R, ZHOU X, et al. Cosegregation of the *ND4* G11696A mutation with the LHON-associated *ND4* G11778A mutation in a four generation Chinese family [J]. **Mitochondrion**, 2007, 7(1-2): 140-146.
 - [29] HARDING A E, SWEENEY M G, GOVAN G G, et al. Pedigree analysis in Leber hereditary optic neuropathy families with a pathogenic mtDNA mutation[J]. **Am J Hum Genet**, 1995, 57(1): 77-86.
 - [30] LAYROLLE P, ORSSAUD C, LELEU M, et al. The optic nerve at stake: update on environmental factors modulating expression of Leber's hereditary optic neuropathy[J]. **Biomedicines**, 2024, 12(3): 584.
 - [31] GIORDANO L, DECEGLIE S, D'ADAMO P, et al. Cigarette toxicity triggers Leber's hereditary optic neuropathy by affecting mtDNA copy number, oxidative phosphorylation and ROS detoxification pathways[J/OL].

- Cell Death Dis**, 2015, 6(12): e2021.
- [32] YU J, LIANG X, JI Y, et al. PRICKLE3 linked to ATPase biogenesis manifested Leber's hereditary optic neuropathy[J]. **J Clin Invest**, 2020, 130(9): 4935-4946.
- [33] JIANG P, JIN X, PENG Y, et al. The exome sequencing identified the mutation in YARS2 encoding the mitochondrial tyrosyl-tRNA synthetase as a nuclear modifier for the phenotypic manifestation of Leber's hereditary optic neuropathy-associated mitochondrial DNA mutation [J]. **Hum Mol Genet**, 2016, 25(3): 584-596.
- [34] ZHANG M, ZHOU X, LI C, et al. Mitochondrial haplogroup M9a specific variant *ND1* T3394C may have a modifying role in the phenotypic expression of the LHON-associated *ND4* G11778A mutation[J]. **Mol Genet Metab**, 2010, 101(2-3): 192-199.
- [35] FILOGRANA R, MENNUNI M, ALSINA D, et al. Mitochondrial DNA copy number in human disease: the more the better?[J]. **FEBS Lett**, 2021, 595(8): 976-1002.
- [36] BIANCO A, VALLETTI A, LONGO G, et al. Mitochondrial DNA copy number in affected and unaffected LHON mutation carriers[J]. **BMC Res Notes**, 2018, 11(1): 911.
- [37] FILOGRANA R, KOOLMEISTER C, UPADHYAY M, et al. Modulation of mtDNA copy number ameliorates the pathological consequences of a heteroplasmic mtDNA mutation in the mouse[J]. **Sci Adv**, 2019, 5(4): eaav9824.
- [38] JIANG P, LIANG M, ZHANG C, et al. Biochemical evidence for a mitochondrial genetic modifier in the phenotypic manifestation of Leber's hereditary optic neuropathy-associated mitochondrial DNA mutation[J]. **Hum Mol Genet**, 2016, 25(16): 3613-3625.
- [39] QIAN Y, ZHOU X, LIANG M, et al. The altered activity of complex III may contribute to the high penetrance of Leber's hereditary optic neuropathy in a Chinese family carrying the *ND4* G11778A mutation[J]. **Mitochondrion**, 2011, 11(6): 871-877.
- [40] JIN X, ZHANG J, YI Q, et al. Leber's hereditary optic neuropathy arising from the synergy between *ND1* 3635G>A mutation and mitochondrial YARS2 mutations [J]. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, 2021, 62(7): 22.
- [41] ZHAO F, GUAN M, ZHOU X, et al. Leber's hereditary optic neuropathy is associated with mitochondrial *ND6* T14502C mutation[J]. **Biochem Biophys Res Commun**, 2009, 389(3): 466-472.
- [42] 赵福新, 周翔天, 瞿佳, 等. 中国 Leber 遗传性视神经病变 G11696A 突变两个家系分析[J]. **中华医学遗传学杂志**, 2007, 24(5): 556-559.
- ZHAO Fuxin, ZHOU Xiangtian, QU Jia, et al. Leber's hereditary optic neuropathy is associated with the mitochondrial G11696A mutation in two Chinese families [J]. **Chinese Journal of Medical Genetics**, 2007, 24(5): 556-559. (in Chinese)
- [43] JI Y, QIAO L, LIANG X, et al. Leber's hereditary optic neuropathy is potentially associated with a novel m.5587T>C mutation in two pedigrees[J]. **Mol Med Rep**, 2017, 16(6): 8997-9004.
- [44] LIU X L, ZHOU X, ZHOU J, et al. Leber's hereditary optic neuropathy is associated with the T12338C mutation in mitochondrial *ND5* gene in six Han Chinese families[J]. **Ophthalmology**, 2011, 118(5): 978-985.

[本文编辑 沈敏余方]

· 学术动态 ·

弹性蛋白降解片段导致机体衰老

2025年9月25日,浙江大学基础医学院/良渚实验室欧阳宏伟教授团队在《自然·老化》(*Nature Aging*)杂志发表题为“Elastin-derived extracellular matrix fragments drive aging through innate immune activation”的论文(DOI: 10.1038/s43587-025-00961-8)。细胞外基质(ECM)中的弹性蛋白、胶原、透明质酸和纤连蛋白等成分保持动态重塑与降解,释放游离ECM片段进入局部微环境和全身循环,然而这些降解片段对机体衰老的影响尚不清晰;同时,机体组织的衰老如何导致全身衰老也未明了。研究人员在大样本人类队列中发现血液中的弹性蛋白、透明质酸、纤连蛋白和胶原蛋白降解片段含量与年龄均呈正相关,进一步筛选发现弹性蛋白片段(尤其是弹性蛋白中的VGVAPG寡肽,即E-motif)对小鼠寿命缩短和致衰老表型的效应最为显著。研究人员发现长期注射E-motif可导致小鼠淋巴细胞比例升高,注射早期外周血单核细胞和中性粒细胞的比例升高。E-motif通过单核巨噬细胞表面的弹性蛋白受体复合物神经氨酸酶1(NEU1)介导下游的炎症反应。研究人员进一步探究了NEU1小分子抑制剂的效应,发现其可延长野生型自然衰老小鼠的寿命(17%),并延缓了野生型小鼠、免疫人源化小鼠和约克夏猪的衰老相关表型。

易俊志博士、王逸轩博士研究生、大学生隋海如和陈志初为论文第一作者。研究得到国家重点研发计划、国家自然科学基金和浙江省“尖兵领雁+X”研发攻关计划等资助。