

# 中国邢台地区 Leber 遗传性视神经病变分子流行病学调查研究

解世朋<sup>1</sup>, 王浩<sup>1</sup>, 常永业<sup>1</sup>, 石慧君<sup>1</sup>, 管敏鑫<sup>2</sup>, 张铭连<sup>1</sup>

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.31471191);河北省科技支撑计划(No.11276103D-12)

作者单位:<sup>1</sup>(054001)中国河北省邢台市,河北省眼科医院中西医结合眼科 河北省中医眼科研究所 河北省眼科学重点实验室;<sup>2</sup>(310058)中国浙江省杭州市,浙江大学遗传学研究所

作者简介:解世朋,硕士,副主任医师,研究方向:神经眼科。

通讯作者:张铭连,主任医师,教授,研究方向:眼底病。zhmlyk@sohu.com

收稿日期:2015-11-30 修回日期:2016-03-10

## Molecular epidemiology of Leber hereditary optic neuropathy in Xingtai China

Shi-Peng Xie<sup>1</sup>, Hao Wang<sup>1</sup>, Yong-Ye Chang<sup>1</sup>, Hui-Jun Shi<sup>1</sup>, Min-Xin Guan<sup>2</sup>, Ming-Lian Zhang<sup>1</sup>

**Foundation items:** National Natural Science Foundation of China (No.31471191); Supporting Project for Science and Technology of Hebei Province (No.11276103D-12)

<sup>1</sup>Department of Combine Traditional Chinese and Western Medicine Ophthalmology, Hebeisheng Eye Hospital, Chinese Traditional Ophthalmology Institute of Hebei Province, Key Laboratory for Ophthalmology in Hebei, Xingtai 054001, Hebei Province, China; <sup>2</sup>Genetics Institute, Zhejiang University, Hangzhou 310058, Zhejiang Province, China

**Correspondence to:** Ming-Lian Zhang. Department of Combine Traditional Chinese and Western Medicine Ophthalmology, Hebeisheng Eye Hospital, Chinese Traditional Ophthalmology Institute of Hebei Province, Key Laboratory for Ophthalmology in Hebei, Xingtai 054001, Hebei Province, China. zhmlyk@sohu.com

Received:2015-11-30 Accepted:2016-03-10

## Abstract

• **AIM:** To estimate the prevalence and molecular epidemiology of Leber hereditary optic neuropathy (LHON) in the south of North China.

• **METHODS:** Patients suspected with LHON who went to Hebei Ophthalmic Hospital (formerly Xingtai Eye Hospital) from December 2001 to December 2014, were conducted mtDNA (mitochondrial DNA) screening. The patients whose origin were Xingtai, the south of North China, were screened out. The LHON families were given detailed follow-up, pedigree investigation and examinations of visual acuity, fundus, color vision, visual field and other clinical exam to diagnose the sick ones in the pedigrees. We took the resident population which date was from the sixth national census in 2010 in

Xingtai area as the base, then conducted statistically analysis for those pedigrees to roughly estimate the incidence and molecular genetics characteristics of LHON in this area.

• **RESULTS:** From December 2001 to December 2014, the 463 people from four generations in 33 LHON families were investigated, and 72 patients were diagnosed as LHON, 65 males and 7 females. One patient was found with mutation at T3866C, 60 at G11778A, 8 at T14484C, 2 at G11696A+G11778A, and 1 at G3460A. In the sixth national census in 2010, the population aged 0~64 in Xingtai area was 6592466, and the prevalence of LHON was 1.092/100000 (95% CI:0.964~1.22/100000), and the incidence of G11778A, which was the most common one, was 0.91/100000 (95% CI:0.79~1.03/100000).

• **CONCLUSION:** The incidence of LHON in Xingtai China is high, the lower limit of prevalence is about 1.092/100000, and the ND4 is the hot spot region. The mutation at G11778A is the most common one. Male patients were significantly more than female patients.

• **KEYWORDS:** Leber hereditary optic neuropathy; incidence rate; epidemiological investigation; gene mutation; mitochondria

**Citation:** Xie SP, Wang H, Chang YY, et al. Molecular epidemiology of Leber hereditary optic neuropathy in Xingtai China. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2016;16(4):738-741

## 摘要

**目的:** 初步估测 Leber 遗传性视神经病变 (Leber's hereditary optic neuropathy, LHON) 在中国邢台地区的发病率及分子流行病学特点。

**方法:** 对 2001-12/2014-12 就诊于河北省眼科医院 (原邢台市眼科医院) 的可疑 LHON 患者进行 mtDNA (mitochondrial DNA) 检测, 筛选出中国华北南部邢台籍的 LHON 患者, 对这些 LHON 家系进行详细的随访、家系调查、视力、眼底、色觉、视野等相关临床检查, 确诊出这些家系的患病人群, 以 2010 年国家第六次人口普查时邢台地区常住人口为基数, 对入组的 LHON 家系进行统计学分析, 粗略地估算出邢台地区 Leber 遗传性视神经病变的发病率与分子遗传学特点。

**结果:** 2001-12/2014-12 期间调查了 33 个 LHON 家系的 4 代母系成员 463 例, 确诊中国华北南部邢台籍 Leber 遗传性视神经病变患者 72 例, 男 65 例, 女 7 例。其中 T3866C 位点突变 1 例, G11778A 位点突变 60 例, T14484C 位点突变 8 例, G11696A+G11778A 位点同时突变 2 例, G3460A 突变 1 例。以 2010 年国家第六次人口

普查时邢台地区 0~64 岁常住人口数 6 592 466 作为基数,计算出中国邢台地区 Leber 遗传性视神经病变患病率为 1.092/10 万(95% CI:0.964/10 万~1.22/10 万),其中以 G11778A 位点突变最为常见,G11778A 位点的发病率为 0.91/10 万(95% CI:0.79/10 万~1.03/10 万)。

**结论:**Leber 遗传性视神经病变在中国邢台地区的发病率较高,其患病率的下限约为 1.092/10 万,其中 ND4 为突变热点区域,以 G11778A 位点突变最为常见,男性患者较女性患者明显多。

**关键词:**Leber 遗传性视神经病变;发病率;流行病学调查;基因突变;线粒体

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2016.4.39

**引用:**解世朋,王浩,常永业,等.中国邢台地区 Leber 遗传性视神经病变分子流行病学调查研究.国际眼科杂志 2016;16(4):738-741

## 0 引言

Leber 遗传性视神经病变 (Leber's hereditary optic neuropathy, LHON) 是眼科常见的一种线粒体 DNA 突变导致视网膜神经节细胞退行性病变的母系遗传性疾病。1871 年,德国眼科医生 Leber<sup>[1]</sup> 首先报道了该病的临床特征,1988 年 Wallace 等<sup>[2]</sup> 首次发现该病与线粒体 DNA (mitochondrial, mtDNA) MT-ND4 基因的 G11778A 突变有关,90%~95% 的患者只携带该病 3 个 mtDNA 原发突变 (即 G3460A、G11778A 或 T14484C) 中的一个。近年来,国外报道携带三个原发位点的 LHON 患者发病率在 1.36 (芬兰北部)/10 万~3.22/10 万 (英格兰东北部)<sup>[3-6]</sup>,欧洲的一项 Meta 分析提示其发病率为 1:45 000<sup>[7]</sup>,T14484C 视功能恢复较好,而 G3460A、G11778A 一般视功能恢复相对较差,男女性别比 (6~12):1<sup>[3,8]</sup>。本病近年来在分子遗传学方面的研究取得较大进展,到目前为止,已经报道的与 LHON 发病有关的 mtDNA 有 60 多个 (<http://www.mitomap.org>),但在治疗方法及药物方面并没有大的突破。我国由于人口众多,人员流动性较强,对 LHON 进行流行病学调查相对困难,因此,探讨分析 LHON 患者在中国邢台地区的发病率有一定的临床意义。我们回顾性研究 2001-12/2014-12 在河北省眼科医院 (原邢台市眼科医院) 就诊具有 ND4 G11778A、ND6 T14484C、ND1 G3460A 线粒体 DNA 突变阳性的 253 例 Leber 遗传性视神经病变患者,筛选出邢台籍的 LHON 先证者 33 例,对这些先证者的 4 代母系成员进行了详细的家系调查和临床检查,得出中国邢台地区的 LHON 患者发病数据。

## 1 对象和方法

**1.1 对象** 病例资料及入选标准:家系调查及进行临床检查前获得医院伦理委员会许可,征得所有患者及家属知情同意,对 2001-12/2014-12 就诊于河北省眼科医院 (原邢台市眼科医院) 符合以下入选标准的 LHON 患者进行研究。病例入选标准:(1) mtDNA 检测 ND4 G11778A、ND6 T14484C、ND1 G3460A 至少一个位点突变阳性,或发现其它已报道与 LHON 相关的基因突变;(2)

进行视野、视觉电生理、FFA 等检查排除合并 Best 病、stargardt 病、青光眼等引起视功能受损的其它眼病;(3) 行头颅 CT 或 MRI 排除颅内疾患;(4) 所有先证者均为邢台籍患者。

**1.2 方法** 对符合病例入选标准的 LHON 患者进行详细的家系调查,绘制出母系家系图,按图对所有母系成员进行性别、年龄登记,并进行视力、色觉、眼底、视觉电生理、荧光素眼底血管造影、自动静态视野等眼科检查,必要时行头颅 CT 排除颅内疾患,得出所有家系的基本资料及临床数据,筛选出 LHON 外显患者,并对这些家系成员进行随访,如有在研究期间发病者将实时更新观察数据。人口学资料根据我国 2010-11-01 零时为标准时点进行了第六次全国人口普查时邢台的 0~65 岁常住人口数为基数。

**基因检测方法:**所有入选病例均委托浙江大学进行 mtDNA 检测。抽取患者外周静脉血 2mL,采用滤纸片法邮寄至浙江大学生命科学院。取 1cm<sup>2</sup> 的滤纸片放到 1.5mL 的离心管中,加入灭菌的 DNA 提取缓冲液 500 $\mu$ L 至离心管中,然后再加入 30 $\mu$ L 新鲜配制的蛋白酶 K 溶液,混匀,置于 37 $^{\circ}$ C 水浴箱过夜。放入乙二胺四乙酸抗凝管中,采用酚一氯仿抽提法提取外周血白细胞 DNA。应用 Primer 3 软件设计 mtDNA 目的片段引物,聚合酶链式反应 (PCR) 扩增片段。引物序列为 17F (5'-TCACTCTCACTGCCCAAGAA-3')、17R (5'-GGAGAATGGGGATAGGTGT-3')、21F (5'-GCATAATTAACCTTACTTC-3')。PCR 反应体系为 50 $\mu$ L:25 $\mu$ L Taq Mix,上下游物各 1 $\mu$ L,基因组 DNA 80ng,加去离子水至 50 $\mu$ L。PCR 反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 30s,56 $^{\circ}$ C 退火 30s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30s,重复循环 36 次,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。采用 15g/L 琼脂糖凝胶电泳观察 PCR 扩增产物是否为单一目的条带,切胶回收,过柱纯化后由上海快基生物科技有限公司进行测序反应并进行测序结果分析。

## 2 结果

**2.1 人口学资料** 邢台地区常住人口为 7 104 114 人,0~14 岁的人口为 1 264 133 人,占总人口的 17.80%;15~64 岁的人口为 5 328 333 人,占 75.00%;65 岁及以上的人口为 511 648 人,占 7.20%。考虑 LHON 的发病特点、人口学特征及本次研究时间跨度较大的特点,我们截取 2010 年第六次人口普查数据中 0~64 岁的人口数 6 592 466 作为基数进行研究。

**2.2 家系情况与基因分布** 共有 33 例先证者,33 个家系,共调查了这些家族的 4 代母系成员 463 例,出现视功能障碍的 LHON 患者 72 例,见表 1。在这些家族中 ND4 G11778A 突变家系 27 个,外显男性 55 例,女性 7 例,年龄 6~38 (平均 15.32 $\pm$ 6.25) 岁;ND6 T14484C 突变家系 3 个,外显男性 6 例,年龄 11~24 (平均 12.32 $\pm$ 5.25) 岁,ND1 G3460A 突变家系 1 个,男性患者 1 例,年龄 21 岁。G11778A+G11696A 突变家系 1 个,外显男性 2 例,发病年龄分别为 13 岁和 21 岁;3866 家系 1 个,男性患者,发病年龄 28 岁。

**2.3 发病率** 在 33 个家系中共有 72 例外显的 LHON 患者视功能出现病理性损害,以 2010 年国家第六次人口普查时邢台地区 0~64 岁常住人口数 6 592 466 作为基数,计算出中国邢台地区 Leber 遗传性视神经病变患病率为

表1 选取33个 LHON 家系情况

家系编号	突变位点	男性总数(例)	发病男性(例)	女性总数(例)	发病女性(例)	先证者发病年龄(岁)
XT01	G11778A	6	2	7	0	40
XT02	G11778A	8	2	7	0	14
XT03	G11778A+G11696A	5	2	6	0	21
XT04	G11778A	8	3	6	0	48
XT05	G11778A	6	1	3	0	47
XT06	G11778A	4	0	4	1	28
XT07	G11778A	14	3	8	1	17
XT08	G11778A	3	1	4	0	14
XT09	G11778A	11	2	11	0	12
XT10	G11778A	5	1	3	0	15
XT11	G11778A	12	8	11	0	13
XT12	G11778A	4	1	6	0	18
XT13	T14484C	10	4	9	0	15
XT14	T14484C	12	1	11	0	15
XT15	G11778A	4	1	8	0	48
XT16	G3460A	7	1	4	0	21
XT17	G11696A	8	3	7	0	46
XT18	G11778A	14	3	7	0	19
XT19	G11778A	4	1	4	1	14
XT20	G11778A	5	2	6	0	14
XT21	G11778A	15	4	9	0	7
XT22	G11778A	3	1	3	0	14
XT23	T14484C	5	2	4	0	17
XT24	G11778A	7	2	5	1	15
XT25	G11778A	4	1	2	1	19
XT26	G11778A	3	1	2	0	53
XT27	G11778A	10	3	15	1	38
XT28	G11778A	9	1	13	0	24
XT29	T3866C	3	1	5	0	28
XT30	G11778A	10	3	11	0	13
XT31	G11778A	5	1	5	1	32
XT32	G11778A	4	2	6	0	17
XT33	T14484C	10	1	13	0	9

1.092/10万(95% CI:0.964/10万~1.22/10万),其中以G11778A位点突变最为常见,G11778A位点的发病率为0.91/10万(95% CI:0.79/10万~1.03/10万);在这些患者中男女性别比为9.29:1(65/7),女性患者均表现为G11778A基因突变。

### 3 讨论

通过本次调查我们发现 LHON 患者中最小的发病年龄仅为6岁,6~12岁儿童发病的 LHON 患者共有4例,20岁以后发病的成人5例,其余63例均为12~20岁发病,提示 LHON 可以在不同年龄段发病,青春期仍然是 LHON 发病较为集中的时期;家系调查中发现 LHON 患者大部分为农村患者(县级以下行政区域),城市(县及县级以上行政区域)患者仅有3例,提示本病农村发病较高;在所调查的 LHON 发病患者中 G11778A 突变患者家系中男:女达到7.86:1(55:7),而 T14484C、G3460A、T3866C 及 G11778A+G11696A 中共有10例患者,均为男性,提示 LHON 患者男性发病率明显高于女性,说明在邢台地区

LHON 患者发病男性明显多于女性,以农村患者居多,儿童和成人均可患病。2002年 Chinnery 在英格兰东北部对2173800人群进行了第一次 LHON 的流行病学调查,结果显示 LHON 发病率为3.22/10万,基因携带者为11.82/10万<sup>[6]</sup>,而后来塞尔维亚及芬兰研究的 LHON 发病率在1.36(芬兰北部)/10万~2/10万之间<sup>[3-4]</sup>,另外欧洲进行的一项 Meta 分析显示 LHON 发病率为1/45000<sup>[7]</sup>。由于这些国家人口相对较少,医疗资源较为丰富,故进行流行病学调查容易控制。我国由于人口众多,近年流动人口增多,而且患者对遗传性疾病的认识不足,惧怕家族隐私泄露,配合较差,因此进行流行病学调查时困难较多。因为受人力、物力等条件的限制,我们暂时做不到对邢台地区的近700万人口进行彻底的流行病学调查。在近14a的临床工作中考虑到邢台地区属于经济欠发达地区,人口流动相对较少,而且河北省眼科医院(原邢台市眼科医院)有建院100余年的历史,在邢台地区有着较高的声誉,眼病患者外诊较少,大多会来该院就诊,LHON 由于其遗传

性特点,故通过对邢台籍的 LHON 先证者进行追溯,采用回顾性分析、家系调查、随访的形式,在这 14a 的时间中保持开放状态,随时更新家系情况,将出现的外显患者纳入研究数据库,对邢台地区的 LHON 发病率进行一个初步估测,从而得出该地区 LHON 发病率的大致情况。这种方法显然不是一种严谨的流行病学调查,研究过程中肯定会有遗漏,实际 LHON 的发病率要高于 1.092/10 万,所以我们得出的数据与英格兰的发病率有一定差距,但是应用这种方法至少可以得出 LHON 的发病率下限,对我国的 LHON 发病率情况有个大致了解。管敏鑫等对 1281 个中国 LHON 先证者进行线粒体基因检测后发现 ND4 片段 G11778A 突变占 35.36%, ND6 段 T14484C 突变占 4.4%<sup>[9-10]</sup>;张铭连等<sup>[11]</sup>对 66 例 LHON 患者进行研究后发现 T11778C 位点突变占 83.33%;T14484C 位点突变占 13.64%;而郭向明等<sup>[12]</sup>曾对 140 例 LHON 先证者进行 mtDNA 研究后发现 G11778A 位点突变占 92.9%, T14484C 位点突变占 5.7%;我们分析以上研究结果数据差异较大的原因主要为管敏鑫研究领域主要为分子生物学,其研究对象为广义 LHON 患者,其目的是为了发现新的基因突变位点及发现 LHON 的致病机制,故病例入选标准较为宽松,而张铭连及郭向明所研究人群多有家族史为临床确诊病例,故筛选出的三个原发位点阳性率较高。我们曾对来院就诊的无家族史疑似 LHON 患者及 30 岁以后发病的 LHON 患者进行 mtDNA 分析,发现疑似患者中 mtDNA 突变阳性占 47.3%,其中 G11778A 突变占 36.6%,T14484C 突变占 4.5%,G3460A 占 1.8%与管敏鑫研究结果相近,而 30 岁以后发病的 LHON 患者中 G11778A 占 77.8%<sup>[13-14]</sup>。在本次调查中,我们发现 ND4 为中国华北南部邢台地区 LHON 突变的热点区域,在三个原发位点突变中 G11778A 突变占有绝对优势,占有所有 LHON 患者的 86.11% (包括 2 例 11696+11778 患者),人群中的发病率达到 0.91/10 万 (95% CI:0.79/10 万 ~ 1.03/10 万),T14484C 位点其次,占 LHON 患者的 11.11%,而 G3460A 位点最少,仅有 1 例发病,占 1.39%,在这些 LHON 患者中还发现了 1 例散发的 3866 位点突变患者。在治疗方面现代医学目前对 LHON 的治疗策略仍然有限,大多认为短链醌类化合物(如艾地苯醌),在疾病的早期阶段对 LHON 患者的视力有保护作用,另外基因治疗虽然是一种很好的方法,但是仍然处于试验阶段<sup>[15-16]</sup>,我们下一步将进一步研究中西医结合治疗对 LHON 患者视功能干预的影响。

由于受条件限制的影响,本次研究尚有很多不足之处,我们将继续对这些家系进行随访,将新发现的邢台籍

LHON 患者纳入我们的研究数据库,继续本项研究,待条件成熟后,采用严谨的流行病学调查方法,对邢台地区进行一次科学的 LHON 流行病学调查,得出我国 LHON 较为客观的发病率。

#### 参考文献

- 1 Leber T. Ueber hereditäre und congenital angelegte sehnervenleiden. *Graefes Arch Ophthalmol* 1871;17:249-291
- 2 Wallace DCSG, Lott MT, Hodge JA, et al. Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science* 1988;242(4884):1427-1430
- 3 Korkiamäki P, Kervinen M, Karjalainen K, et al. Prevalence of the primary LHON mutations in Northern Finland associated with bilateral optic atrophy and tobacco-alcohol amblyopia. *Acta Ophthalmol* 2013;91(7):630-634
- 4 Jancic J, Dejanovic I, Samardzic J, et al. Leber hereditary optic neuropathy in the population of Serbia. *Eur J Paediatr Neurol* 2014;18(3):354-359
- 5 Puomila A, Hämäläinen P, Kivioja S, et al. Epidemiology and penetrance of Leber hereditary optic neuropathy in Finland. *Eur J Hum Genet* 2007;15(10):1079-1089
- 6 Man PY, Griffiths PG, Brown DT, et al. The epidemiology of Leber hereditary optic neuropathy in the North East of England. *Am J Hum Genet* 2003;72(2):333-339
- 7 Mascialino B, Leinonen M, Meier T. Meta-analysis of the prevalence of Leber hereditary optic neuropathy mtDNA mutations in Europe. *Eur J Ophthalmol* 2012;22(3):461-465
- 8 Maciel-Guerra AT, Zanchetta LM, Amaral Fernandes MS, et al. Leber's hereditary optic neuropathy: clinical and molecular profile of a Brazilian sample. *Ophthalmic Genet* 2010;31(3):126-128
- 9 Jiang P, Liang M, Zhang J, et al. Prevalence of mitochondrial ND4 mutations in 1281 Han Chinese subjects with Leber's hereditary optic neuropathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2015;56(8):4778-4788
- 10 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. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014;55(3):1321-1331
- 11 张铭连,石慧君,常永业,等. Leber 遗传性视神经病变患者线粒体 DNA 检测分析. *中华眼底病杂志* 2006;22(2):132-134
- 12 郭向明,贾小云,肖学珊,等. 中国人 Leber 遗传性视神经病变线粒体 DNA 突变频谱. *中华眼底病杂志* 2003;19(5):288-291
- 13 解世朋,石慧君,常永业,等. 疑似 LHON 患者 mtDNA 突变规律及临床研究. *国际眼科杂志* 2013;13(1):59-61
- 14 常永业,解世朋,王浩,等. 30 岁以后发病的 Leber 遗传性视神经病变患者的临床特征. *中华眼底病杂志* 2014;30(3):270-273
- 15 Gueven N, Faldu D. Therapeutic strategies for Leber's hereditary optic neuropathy: A current update. *Intractable Rare Dis Res* 2013;2(4):130-135
- 16 La Morgia C, Carbonelli M, Barboni P, et al. Medical management of hereditary optic neuropathies. *Front Neurol* 2014;31(5):141-148