

## 线粒体病分子诊断技术进展\*

沈丽君, 王 娅, 周怀彬, 陈连婷, 蔡 雯, 方合志<sup>△</sup>

浙江省医学遗传学重点实验室/温州医科大学检验医学院(生命科学学院), 浙江温州 325035

**摘要:**线粒体病是一类重要的遗传代谢病,其发病可覆盖全年龄段,尤其是儿童线粒体病致死致残率极高。随着生物化学及分子与细胞生物学技术的发展,线粒体病的实验室诊断经历了快速的发展,相关诊断路径和策略也从高度有创的实验室检测逐渐过渡到以无创筛查为主。但是,线粒体病实验室诊断仍然存在单一检测策略的阳性诊断率不足、实验室漏检与待排查比例居高不下的困扰,因此新的线粒体病检测技术被开发并用于协助疾病的诊断。该文从基因、酶生物化学与代谢生物学 3 个层面对当前线粒体病实验室诊断的进展进行综述,旨在为特定场景下线粒体病实验室诊断策略选择提供参考,也为后续检测技术的研发提供一些建议。

**关键词:**线粒体病; 诊断; 标志物; 氧化磷酸化

**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2024.17.001

**中图法分类号:**R596;R446.9

**文章编号:**1673-4130(2024)17-2049-09

**文献标志码:**A

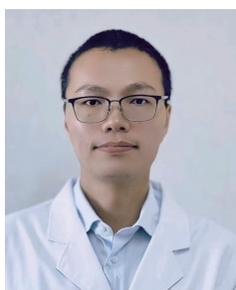
## Progress in molecular diagnosis of mitochondrial disease\*

SHEN Lijun, WANG Ya, ZHOU Huaibin, CHEN Lianting, CAI Wen, FANG Hezhi<sup>△</sup>

Zhejiang Provincial Key Laboratory of Medical Genetics/College of Laboratory Medicine and Life Sciences, Wenzhou Medical University, Wenzhou, Zhejiang 325035, China

**Abstract:** Mitochondrial disease is one of the major types of inherited metabolic disease that can affect all age groups, particularly in children where it has a high mortality and disability rate. With the development of biochemical, molecular, and cellular biology techniques, the laboratory diagnosis of mitochondrial disease has undergone rapid development. The diagnostic pathways and strategies have gradually transitioned from highly invasive laboratory tests to mainly non-invasive screenings. However, the challenge remains that the positive diagnostic rate of single testing strategies is insufficient, and the proportion of missed and pending investigations remains high. Consequently, new mitochondrial disease laboratory diagnostic techniques continue to emerge and are used to aid in disease diagnosis. This review attempts to summarize the current progress in mitochondrial disease laboratory diagnostics at three levels: genetics, enzyme biochemistry, and metabolic biology, providing references for the selection of laboratory diagnostic strategies in specific scenarios, as well as suggestions for the development of future detection technologies.

**Key words:** mitochondrial disease; diagnosis; biomarker; oxidative phosphorylation



方合志

线粒体是人体内所有细胞(除成熟红细胞外)重要的产能细胞器,同时也是糖类、脂肪与蛋白质等诸多物质代谢的核心场所,故线粒体功能异常有可能影响到任何一个组织或器官,并导致疾病的发生。线粒体病是一类以氧化磷酸化系统(OXPHOS)功能

障碍为典型特征的遗传代谢病,主要受累器官为肝脏、心脏、神经和肌肉系统等高耗能器官<sup>[1]</sup>。线粒体病是最常见的遗传代谢病之一,总的人群患病风险达 1/5 000<sup>[2]</sup>,其中儿童(<16 岁)线粒体病发病率在(5~15)/100 000,成年人人群中由线粒体 DNA(mtDNA)突变引起线粒体病的发病率约为 9.6/100 000,由核 DNA(nDNA)变异引起的线粒体病发病率约为 2.9/100 000<sup>[1,3-4]</sup>。线粒体病发病年龄可覆盖全年

\* 基金项目:浙江省“尖兵领雁+X”研发攻关计划项目(2024C03152)。

**专家介绍:**方合志,教授,博士研究生导师;长期从事线粒体遗传病的实验室诊断与基础科学研究;担任中国生化与分子生物学会生物技术专委会副主任委员,中华医学会检验医学分会分子诊断学组成员,浙江省医学遗传学会常委;先后入选浙江省高层次人才特殊支持计划和浙江省高校领军人才培养计划,并获国家优青和浙江省杰青等项目资助;近 3 年作为通信作者在《Science Translational Medicine》《Cell Discovery》《Cell Reports》《Diabetes》等国际期刊上发表研究论文十余篇;担任《国际检验医学杂志》青年编委,《Orphanet Journal of Rare Diseases》线粒体遗传病方向编委。△ 通信作者, E-mail: fangh@wmu.edu.cn。

网络首发 <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1176.R.20240615.2152.002.html>(2024-06-17)

龄段。

1962 年 LUFT 首次报道了线粒体病,患者的症状主要表现为非甲状腺高代谢、近端无力,电镜检查肌肉组织线粒体结构异常,以及肌细胞线粒体 OXPHOS 功能异常,线粒体病开始进入人们视野。1988 年 HOLT 所在研究团队<sup>[5]</sup>在“线粒体肌病”患者活检肌肉组织中检出 mtDNA 大片段缺失,同年 WAL-LACE 团队<sup>[6]</sup>在一个 Leber 遗传性视神经病变(LHON)家系中发现首个致病性 mtDNA 突变(MT-ND4 基因,点突变),自此拉开了线粒体病遗传学和病因研究的序幕。而随着一代测序技术及二代测序技术的发展,层出不穷的测序技术已经成为线粒体病实验室诊断的主要方式<sup>[7]</sup>。随着测序成本的不断下降,有创活检已不再是线粒体病实验室诊断的第一选择。高通量测序完成初筛,再结合临床有选择地开展活检是当前线粒体病实验室诊断的趋势。近年来,随着蛋白质组学与代谢组学技术的进一步发展,利用多组学技术发现高灵敏度和高特异性的无创血液标志物正逐渐成为实验室诊断的可选方案之一<sup>[8]</sup>。

本文将介绍线粒体病的生物化学与细胞生物学机制,并概述线粒体病诊断技术的发展历程。

## 1 线粒体及线粒体病

### 1.1 线粒体

线粒体蛋白由 nDNA 和 mtDNA 共同编码,包含约 1 100 个核编码基因和 37 个线粒体编码基因<sup>[9]</sup>。mtDNA 为双链闭合环状 DNA,全长约 16 kb,包括一个控制区(D-Loop)和 37 个编码基因。这些基因分别编码 2 个 rRNA,22 个 tRNA 和 13 个呼吸链复合体亚基<sup>[10]</sup>。除此以外,线粒体的其他蛋白均由 nDNA 编码,在细胞质合成后转运进入线粒体<sup>[11]</sup>。

线粒体不仅是哺乳动物细胞 ATP 合成的主要场所,同时也是诸多代谢通路的调控中枢。此外,线粒体还通过信号传导等途径调控细胞内的基因表达。见图 1。

在 ATP 合成层面,线粒体主要依靠内膜上的电子传递链传递电子对,最终由复合体 IV 将电子传递给氧并形成 H<sub>2</sub>O。在这一电子传递过程中,复合体 I、III 和 IV 向线粒体内、外膜间隙泵出质子,质子经复合体 V 回流,同时驱动复合体 V 催化 ADP 与无机磷酸合成 ATP 为细胞供能。这一过程也称氧化磷酸化作用。在代谢调控层面,线粒体除了是三大营养物质体内代谢的重要场所外,还通过多条代谢途径参与细胞调控。例如线粒体可以通过释放细胞色素 c (cyto c) 调控细胞凋亡;可以通过激活线粒体定位的 AMPK (mitoAMPK) 实现线粒体质量控制(如线粒体自噬);通过释放 mtDNA 激活细胞免疫应答;通过释放三羧酸循环(TCA 循环)的代谢中间产物实现对细胞命运和细胞功能的调控等<sup>[12]</sup>。值得一提的是,多个 TCA

循环代谢中间产物可以通过参与染色质修饰和蛋白的翻译后修饰,从而实现了对基因表达和细胞功能的调控。比如 TCA 循环中的乙酰辅酶 A(乙酰-CoA)作为乙酰基的主要供体可以参与细胞内蛋白质的翻译后修饰,以及核基因表达的表观遗传学调控。又如 TCA 循环中的  $\alpha$ -酮戊二酸( $\alpha$ -KG)是 2-氧戊烯酸依赖性双加氧酶(2-OGDD)催化羟甲基化反应所必需的共同底物,在染色质的修饰过程中起关键作用。此外, $\alpha$ -KG 还是一些染色质修饰酶(如 Jumonji 含 C 结构域组蛋白赖氨酸去甲基化酶)所需的底物。因此,线粒体通过  $\alpha$ -KG 间接实现了对核基因的表达调控。再如,TCA 循环中的富马酸可以通过抑制脯氨酰羟化酶(PHD)活性,在常氧条件下制造假缺氧状态从而维持缺氧诱导因子(HIF)-1 $\alpha$  的稳定。HIF-1 $\alpha$  一旦进入细胞核可以通过与 HIF-1 $\beta$  结合激活 HIF 靶基因的表达从而参与细胞代谢调控、免疫反应、肿瘤侵袭等过程。在基因调控层面,线粒体通过逆向信号传导途径调控核基因的表达,主要以释放线粒体 ROS (mtROS)、调节 Ca<sup>2+</sup> 水平、调控 AMP/ATP 等方式实现对核相关基因表达的调控。

### 1.2 线粒体病

线粒体病种类繁多,共包括 300 多种疾病亚型,其中常见的是 Leigh 综合征、线粒体脑肌病伴乳酸酸中毒和卒中样发作(MELAS)、肌阵挛性癫痫伴破碎红纤维(MERRF)、LHON、Alpers-Huttenlocher 综合征(AHS)、母系遗传性耳聋、母系遗传性糖尿病及 mtDNA 耗竭综合征(MDDS),见表 1。

线粒体病临床表型复杂,缺乏特征表型。由于线粒体受 nDNA 和 mtDNA 双重调控,并且 mtDNA 突变存在异质性和阈值效应,因此线粒体病发病原因、临床表型都极为复杂。线粒体病常见的临床表型包括上眼睑下垂、外眼肌麻痹、近端肌病、运动不耐受、心肌病、感音神经性耳聋、视神经萎缩、色素性视网膜病变、糖尿病、癫痫发作、中风样发作、共济失调和痴呆等<sup>[13]</sup>。但这些症状并非线粒体病的特征表型,而是与其他疾病相似的症状,这也使得线粒体病临床诊断极为困难。下文将从受累遗传物质、患者发病年龄、受累器官和生化特征等多方面对线粒体病进行分类介绍,这将有助于医生在诊断过程中对线粒体病因的查找。

根据受累遗传物质的不同,线粒体病可划分为 mtDNA 变异引起的线粒体病和 nDNA 变异引起的线粒体病,二者遗传方式大为不同。mtDNA 突变相关线粒体病往往表现为母系遗传(如 LHON),而 nDNA 突变线粒体病则遵循孟德尔遗传方式(如 AHS)。此外,也有一些子代的新生突变可直接导致疾病的发生<sup>[14]</sup>。无论哪一种类型的突变,OXPHOS 功能缺陷

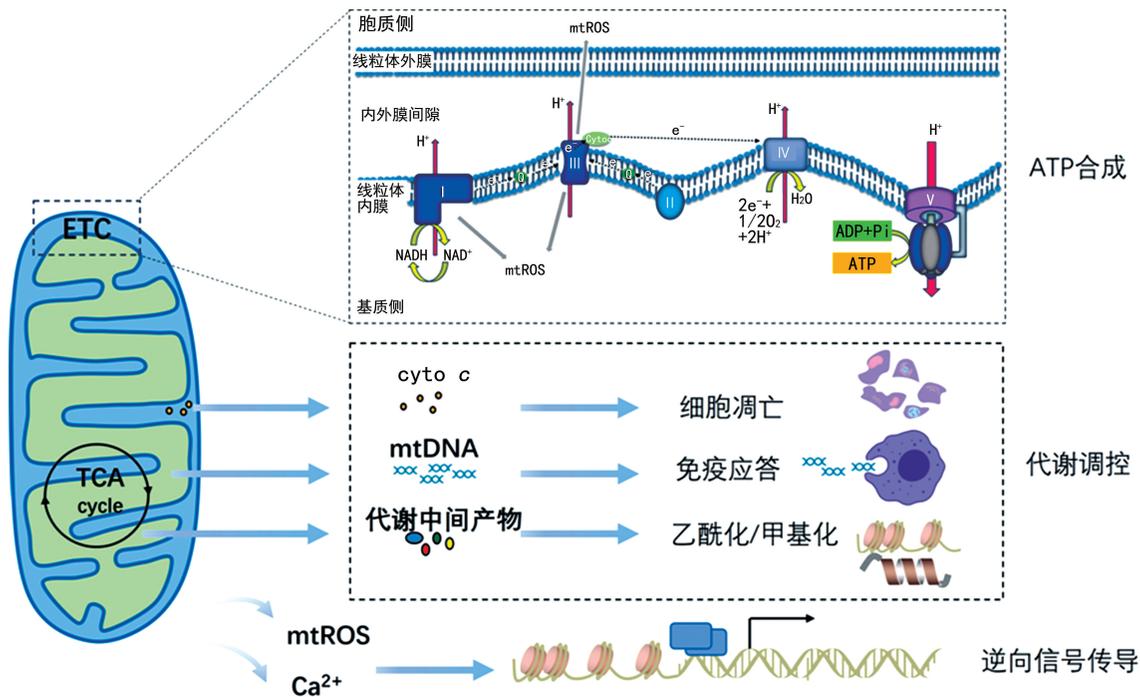
是线粒体病的主要生化特征。

根据患者发病年龄,线粒体病可划分为儿童线粒体病(年龄<16岁)与成人线粒体病。二者除发病年龄差异外,在疾病的严重程度上也存在差异。儿童线粒体病相对而言病情较重,常伴随严重的神经系统退行性病变,具有发病早、多器官累及、进展快速及死亡率高等特点,且98%儿童线粒体病患者具有儿童线粒体脑病特征<sup>[15]</sup>。儿童线粒体病亚型中最常见的为Leigh综合征,常在婴儿期或幼儿期发病,并表现为发育迟缓和神经退行性病变<sup>[16]</sup>。成人线粒体病患者病情相对较轻,如慢性进行性眼外肌麻痹、耳聋和糖尿病等,也可能表现为神经系统退行性病变<sup>[16]</sup>。此外,就发病原因而言,儿童原发性线粒体病通常由nDNA突变引起(占儿童线粒体病患者的70%~75%),并遵循孟德尔遗传规律;而成人线粒体病更多的是由mtDNA突变引起<sup>[16-17]</sup>。通常情况下当同为mtDNA

致病时,儿童线粒体病患者mtDNA突变异质率往往高于成人线粒体病患者<sup>[17]</sup>。表1列举了常见线粒体病、发病年龄及临床表型。

根据生化特征,OXPHOS功能缺陷相关线粒体病可分为原发性线粒体病(PMD)和继发性线粒体病(SMD)。PMD为一系列引起线粒体OXPHOS功能障碍的遗传性疾病的总称,可直接由线粒体呼吸链各蛋白亚基编码基因突变所致,亦可由参与OXPHOS运行的其他组分编码基因突变所致,从而导致细胞产能缺陷<sup>[18]</sup>。SMD则为除PMD之外的线粒体功能异常所致的疾病,如SMN1基因缺陷引起的脊髓性肌萎缩、FXN基因缺陷引起的Friedreich共济失调等<sup>[19]</sup>。

根据受累组织器官的不同,线粒体病又可分为单一器官受累线粒体病(如LHON和感音神经性耳聋)和多器官受累线粒体病(常伴有神经系统病变和肌病,如线粒体脑肌病)。



注:ETC为电子传递链;TCA cycle为三羧酸循环;I、II、III、IV、V分别为呼吸复合体I、II、III、IV、V;mtROS为线粒体ROS;cyto c为细胞色素c;mtDNA为线粒体DNA。

图1 线粒体主要功能示意图

表1 常见线粒体病(亚型)致病变异、发病年龄与临床表型

线粒体病类型	致病变异	发病年龄	临床表型
KSS	mtDNA 大片段缺失	<20岁	进行性眼外肌麻痹,色素性视网膜炎,脑脊液蛋白>1 g/L,小脑共济失调,心脏传导阻滞
PS	mtDNA 大片段缺失	幼年起病(多为<1岁)	顽固性铁粒幼细胞性贫血或全血细胞减少,胰腺外分泌功能异常,可伴发糖尿病、肝病、肾小管病
CPEO	mtDNA 大片段缺失(主要); mtDNA 片段重排; nDNA 突变(如 POLG1、Twinkle、ANT1 等)	全年龄段起病(多为18~50岁)	慢性进行性双侧眼睑下垂和眼外肌麻痹,一般不出现复视;少数患者可伴复视或四肢无力,轻度运动不耐受

续表 1 常见线粒体病(亚型)致病变异、发病年龄与临床表型

线粒体病类型	致病变异	发病年龄	临床表型
MELAS	mtDNA 点突变 (m. 3243 A>G 约占 80%)	2~40 岁(75%在 20 岁前发病,少数在 40 岁之后发病)	慢性进行性脑病,癫痫,头痛,卒中样发作,肌病,睡眠呼吸暂停综合征,身材矮小,癫痫,痴呆,高乳酸血症,糖尿病,听力损失,心肌病
MERRF	mtDNA 点突变 (m. 8344 A>G 占 75%以上)	常于儿童或青少年期起病	肌阵挛,肌病,小脑性共济失调,可出现心肌病、耳聋、痴呆;肌活检可见破碎红纤维
LHON	m. 11778 G>A, m. 3460 G>A, m. 14484 T>C(尤以 m. 11778 G>A 占比最多,达 50%~80%)	青少年期至成年起病(多为 15~35 岁,男:女≈4:1)	无痛、亚急性、双侧视力丧失,部分患者可能有震颤、肌病或神经病变
NARP	m. 8993 T>G	常于童年到成年早期起病	肌病,周围神经病变,共济失调,色素性视网膜病变,癫痫,痴呆,也可出现偏头痛和精神发育迟滞
Leigh 综合征	m. 8993 T>G/C;>100 个核基因(最常见编码复合体 I 或复合体 IV 相关蛋白的基因,以及丙酮酸脱氢酶相关基因)	3 个月至 2 岁	运动发育迟滞,脑干和(或)基底节受累的症状与体征,容易出现呼吸衰竭;也可晚发,可出现小脑性共济失调,痴呆,听力下降,视力下降,心肌病;MRI 显示双侧基底节和(或)脑干异常信号,可出现小脑萎缩
AHS	TWINK、POLG1 等	双峰分布:3 个月至 8 岁(多为 2~4 岁)或 10~27 岁	脑病伴难治性癫痫,神经病变,肝衰竭

注:KSS 为卡恩斯-塞尔综合征;PS 为皮尔逊综合征;CPEO 为慢性进行性眼外肌麻痹;MELAS 为线粒体脑肌病伴乳酸酸中毒和卒中样发作;MERRF 为肌阵挛性癫痫伴破碎红纤维;LHON 为 Leber 遗传性视神经病变;NARP 为神经源性肌无力,共济失调,视网膜色素变性;AHS 为 Alpers-Huttenlocher 综合征。

## 2 当前线粒体病诊断的主要策略

从最初的有创活检、血浆生化标志物检测,到现在的“临床初诊+基因检测+有创活检”,临床科研工作者一直在探寻更高效的无创新方法。当前在初步怀疑为线粒体病的情况下,可根据线粒体病诊断标准(MDC)对患者进行评估打分。MDC 可以通过评分量化线粒体相关疾病的患病概率,有助于将线粒体病与其他多系统疾病进行区分,并决定是否需要进一步诊断<sup>[20-21]</sup>。线粒体病的常规诊断包含以下几个方面:临床影像学检查、体液(血液、尿液、脑脊液)生化检测、基因测序、组织病理与酶学检测。临床初诊患者符合相应症状时,应怀疑线粒体病并进行进一步检测以确诊。但是,通常情况下,多数线粒体病患者并不具有这些易于识别的临床表型,从而造成漏诊。因此,当患者存在多器官受累和(或)母系遗传特征时,也应怀疑线粒体病,并做进一步检查。线粒体病常规诊断策略流程示意图见图 2。

线粒体病的诊断是一个复杂而耗时的过程,最新的一项研究显示,线粒体病患者从症状出现到确诊平均耗时约 10 年,平均需经历 6.7 个医生<sup>[22]</sup>。而线粒体病诊断一直存在困境,单一方法很难对线粒体病进行确诊。比如很大一部分怀疑线粒体病的患者血液标本中根本无法检测到已知的致病性 mtDNA 突变,基因检测检出率低。另外,线粒体病不具有典型的临床表型,且常与其他疾病具有交叉相似的临床表型,

单靠临床诊断往往无法确诊。因此,目前常规的诊断路径是采用“临床初诊+基因检测+有创活检”三者相结合的方式。这三者中,随着分子诊断技术的发展,其以无创、快速、便捷等特点成为当前线粒体病诊断的核心部分。但是目前这种联合模式下线粒体病的诊断率也仅 50%左右。开发新的检测手段,寻找灵敏度高、特异性强的检测标志物将是今后线粒体病诊断研究的重要方向。

## 3 线粒体病分子诊断技术方法

### 3.1 基于基因的线粒体病诊断

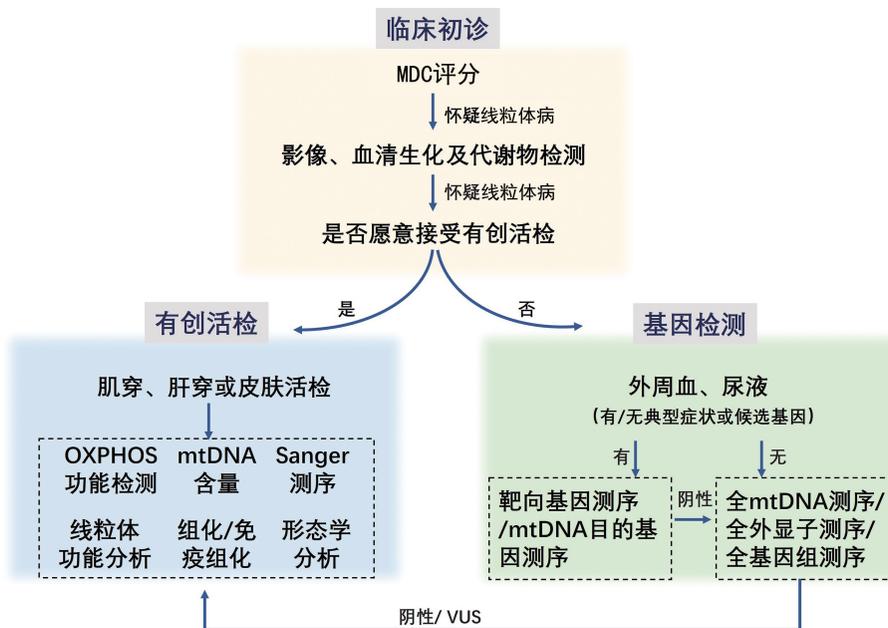
过去数十年间,在已知的近 1 200 个线粒体定位蛋白中,已经确证的有 400 余个基因缺陷与线粒体病相关。因此,除这 400 余个基因外,仍有相当大量的基因变异是潜在的线粒体病致病基因,并有待进一步进行功能验证。早期线粒体病基因诊断是根据患者的症状及皮肤或肌肉活检的结果,预测可能的突变基因,并利用 Sanger 测序对候选基因进行逐一排除。例如,针对 mtDNA 变异常见的有 mtDNA 大片段缺失(KSS 和 CPEO)、m. 3243A>G(MELAS)、m. 11778 G>A(LHON)和 m. 8344 A>G(MERRF)等,针对 nDNA 变异常见的有 POLG,SPG7 和 OPA1 等基因突变。但由于线粒体病患者常不具有典型的临床表现,因此确定候选基因十分困难,且确诊率低。随着二代测序技术的发展,DNA 测序的精度和深度不断提升,同时费用逐步降低,因此二代测序目前已成为线粒体病诊断中至关

重要的工具。

利用外周血样本进行二代测序大大提高了基因诊断的效率。并且将高通量的二代测序前置,亦可以减少有创活检给患者带来的痛苦。根据是否有明确的候选基因,可以选择 Targeted panels 测序、全外显子测序(WES)或全基因组测序(WGS)。当高度怀疑患者为线粒体病,且有比较明显的临床表型(如符合 MELAS、MERRF、LHON、Pearson 综合征等症状),或者经济条件限制,此时可针对目的基因进行 Targeted panels 测序;当患者没有比较明显的符合常见线粒体病的症状同时又怀疑线粒体病,又或者 Targeted

panels 测序结果为阴性时,则应考虑 WES 或 WGS,若怀疑 nDNA 变异引起的线粒体病可选择 WES,否则可选择对核基因和线粒体基因组同时检测的 WGS。虽然二代测序的高效性使得线粒体病的检出率在 16%~60%,但也伴随着诸多问题,例如检测周期长、费用高昂及外显子中高 GC 区域难测通等。

**3.2 基于蛋白分子的线粒体病诊断** 虽然二代测序技术提高了线粒体病的基因诊断率,但无法对线粒体病进展、严重程度及预后进行评估。基于蛋白质组学的检测技术可以在一定程度上弥补这一缺陷。下文将对用到的基于蛋白分子的诊断技术进行概述。



注:MDC为线粒体病标准;VUS为意义未明变异位点;OXPHOS为氧化磷酸化系统;mtDNA为线粒体DNA。

图2 线粒体病实验室诊断常规流程图

**3.2.1 基于线粒体 OXPHOS 复合体水平的检测技术** 蓝色非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(BN-PAGE)是一种可以分离并测定线粒体膜蛋白复合物(主要为内膜上呼吸复合体)在天然状态下的水平和结构完整性的方法<sup>[23]</sup>。该方法具有所需标本量少,操作简便,耗时短等优点,因此可针对有创活检标本和原代培养细胞开展检测。目前广泛认可的理论是线粒体内膜上的呼吸链复合体不仅以单体形式存在,也可以超级复合体和呼吸体的形式存在<sup>[24]</sup>。复合体的装配成熟,以及超级复合体和呼吸体的组装成熟均需要各种组装因子的参与。当复合体水平和装配环节出现问题,便可在BN-PAGE的电泳条带上得以反映。因此,BN-PAGE也得以在线粒体病的诊断中应用,尤其是在OXPHOS功能障碍引起的原发性线粒体病诊断方面,BN-PAGE可以提供丰富的信息,诸如复合体水平、大小、复合体和超复合体组装情况等<sup>[25]</sup>。

**3.2.2 基于质谱的蛋白检测技术** 1998年,科研人

员利用双向电泳结合质谱技术对线粒体进行蛋白质组学的研究,并试图利用正常组织与疾病组织进行对比,寻找线粒体病的诊断性标志物。双向电泳虽然可以直接对样本蛋白质丰度的改变进行比较,但其在膜蛋白、高相对分子质量和低相对分子质量蛋白的分离,以及低丰度蛋白分离方面存在不足,限制了双向电泳-质谱技术在临床线粒体病研究中的应用<sup>[26]</sup>。近年来,随着串联质谱的发展及色谱-质谱技术的进步,上述困难已成功克服,极大地推动了线粒体蛋白质组学的研究。该方法主要针对患者血液或尿液样本开展检测研究。例如,通过对MELAS患者血浆进行检测发现了多个显著区别于对照组的蛋白及代谢标志物,且这些标志物大部分与疾病的严重程度高度相关<sup>[27]</sup>;而对线粒体病患者尿液进行检测分析,可以发现其与健康人的尿液存在截然不同的代谢特征<sup>[28]</sup>。

**3.2.3 复合体组学技术** 复合体组学技术通过将BN-PAGE、色谱或密度梯度离心等分离方法与串联

质谱相结合,应用于蛋白的鉴定和定量分析,实现了对患者样本中 OXPHOS 复合体蛋白丰度,以及蛋白相对分子质量变化的分析<sup>[29]</sup>。在线粒体病诊断研究中,该技术主要应用于针对 OXPHOS 组装动力学的研究,即突变导致复合体组装异常的分析。该方法常以线粒体病患者和健康对照来源的成纤维细胞或线粒体病细胞模型为样本来源<sup>[30-32]</sup>。

**3.2.4 酶学检测技术** 很大一部分线粒体病是由 OXPHOS 复合体功能缺陷引起,因此对组织或细胞 OXPHOS 复合体的酶学检测是线粒体病诊断研究的一个重要方面。酶学检测技术主要针对有创活检标本进行酶学检测,亦可针对皮肤来源或淋巴细胞来源的细胞系开展 OXPHOS 酶学检测。目前已知超过 400 个基因突变可导致 OXPHOS 功能缺陷。尽管目前二代测序仍是线粒体病检测的首选手段,但其诊断成功率仍不能满足诊断要求,此外,发现的大量意义未明的突变仍需进行功能验证。因此,基于 OXPHOS 功能的酶学检测目前仍是线粒体病诊断的重要组成部分。其中,呼吸复合物酶动力学检测主要通过加入待测复合体的底物,利用酶标仪检测反应前后体系吸光度的变化,实现对酶活性的分析。该方法即可分析复合体 I~V 单一酶活性,亦可检测多个酶的联合活性,例如复合体 II+复合体 III 联合测定可用于诊断泛醌缺乏症<sup>[33]</sup>。酶组织化学检测则是基于有创活检的组织线粒体酶学和形态学的一种检测方法。该方法曾经一度是线粒体病检测的金标准,并为线粒体病的诊断提供可靠的依据<sup>[34]</sup>。随着基因检测技术的进步,酶组织化学分析虽然不再作为首选检测手段,但在其余检测手段均无法确诊的情况下,会考虑采用该方法。胶内酶活分析是一种方便、有效的超级复合体组分分析方法。该方法首先利用 BN-PAGE 电泳分离呼吸复合物,由于这一过程中复合体的空间结构及蛋白相互作用未被破坏,复合体仍具有酶活性,此时给予复合体相应的底物及显色剂对电泳后的凝胶进行酶活染色,从而达到检测待测组织或细胞 OXPHOS 组分构成和能量代谢状态的目的<sup>[35]</sup>。

**3.2.5 除 OXPHOS 复合体外的其他蛋白检测** 由于不同蛋白的功能差异较大,目前并没有统一的检测方式。然而,除了 OXPHOS 复合体亚基和组装因子,以及电子传递载体 cyto c 和辅酶 Q 缺陷外,大量其他蛋白缺陷,如 SERAC1、PDHA1、FBXL4、POLG2 和 OPA1 等,也会导致 OXPHOS 缺陷相关线粒体病。因此,很多时候也可以通过 OXPHOS 缺陷分析结合基因检测来发现一些新的线粒体病致病蛋白,进而拓宽线粒体病致病基因突变谱,为线粒体病诊断提供一定依据。

### 3.3 基于代谢的线粒体病分子诊断

**3.3.1 乳酸和丙酮酸** 线粒体病诊断常用的代谢标志物有血液乳酸、丙酮酸、肌酸激酶、有机酸、氨基酸、肉碱、氧化应激标志物和循环细胞因子等<sup>[36]</sup>。目前临床上常用的有血乳酸和血丙酮酸水平,其作为线粒体病诊断标志物的原理为细胞内葡萄糖分子经糖酵解生成丙酮酸,在有氧条件下丙酮酸在丙酮酸脱氢酶复合体作用下生成乙酰-CoA 进入 TCA 循环,并通过 TCA 循环为细胞提供还原力。NADH 作为复合体 I 的底物为线粒体内膜上的电子传递链提供电子对,同时 NADH 被氧化为  $\text{NAD}^+$ ,维持线粒体内  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  的动态平衡。当细胞由于 OXPHOS 功能缺陷,电子对无法在电子传递链上完成高效率传递时,NADH 便无法及时氧化生成  $\text{NAD}^+$ ,从而导致线粒体内  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  升高,对丙酮酸脱氢酶复合体形成反馈抑制,从而造成细胞内丙酮酸大量堆积。为了消耗大量堆积的丙酮酸,细胞便选择通过乳酸脱氢酶将细胞质中的丙酮酸转化为乳酸,因此造成了线粒体病患者体液(血液、尿液和脑脊液)中乳酸水平升高,甚至酸中毒。

血液乳酸水平是检测线粒体病的首选分子标志物,以 2 mmol/L 浓度作为界值。血乳酸水平检测具有操作简便(机器自动化检测),检测样本获取方式简单等优点。但也存在如下缺点:血乳酸水平升高不一定由 OXPHOS 缺陷引起,也有可能由于操作不当,如抗凝剂错用、采血时患者剧烈挣扎等因素引起;此外,也有可能是由其他疾病引起,如丙酮酸和 Krebs 循环障碍、糖原储存与糖异生障碍相关疾病、感染、败血症和糖尿病等<sup>[37-38]</sup>。同时,某些线粒体病患者血乳酸水平却并不升高或仅轻微上升<sup>[39]</sup>。因此,血乳酸水平缺乏敏感性和特异性,不足以单独作为线粒体病诊断标志物。

线粒体病诊断的另一个指标是乳酸/丙酮酸(L/P)。乳酸和丙酮酸分别是丙酮酸脱氢酶的产物和底物,正常情况下  $\text{L}/\text{P} \leq 10$ ,而当细胞处于缺氧、氰中毒或 OXPHOS 功能障碍时,堆积的丙酮酸在乳酸脱氢酶作用下转化为乳酸,导致细胞 L/P 上升<sup>[40]</sup>。L/P 受解离常数  $K$ 、 $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  和细胞质 pH 值影响,因此 L/P 常用于间接反映细胞的氧化还原状态( $\text{NADH}/\text{NAD}^+$ ),可作为 OXPHOS 功能障碍的指标。当  $\text{L}/\text{P} > 25$  时,提示 OXPHOS 功能障碍<sup>[40-42]</sup>。但由于丙酮酸在体外不稳定,容易造成结果 L/P 偏大;而在某些情况下(如急性酮症酸中毒、慢性肾衰竭或呼吸衰竭)细胞 pH 值急剧降低,亦可造成 L/P 失真<sup>[43]</sup>。此外,也有研究显示,乳酸水平及 L/P 在儿童肝衰患者中也普遍升高,并不仅限于线粒体病<sup>[38]</sup>。因此,目前在线粒体病诊断中乳酸水平及 L/P 仅可作为

参考指标,而无法作为诊断依据。

**3.3.2 细胞因子** [如成纤维细胞生长因子-21 (FGF21)与生长分化因子 15(GDF15)] 长期以来,人们一直致力于寻找线粒体病的血液检测标志物,但是除了乳酸和丙酮酸之外收效甚微。近年来,有研究显示,血液中 FGF21 水平对线粒体病及其进展的严重程度有指示性意义<sup>[44]</sup>。FGF21 主要在肝脏、脂肪组织和骨骼肌等部位合成,并参与调控机体的脂质代谢和饥饿反应。FGF21 水平受线粒体综合应激反应(mitoISR)调控,当 OXPHOS 功能缺陷时,细胞 mitoISR 激活,并刺激下游 FGF21 高表达,高表达的 FGF21 随后通过调控线粒体稳态、线粒体功能等方式实现细胞的代谢适应<sup>[45-47]</sup>。在线粒体病患者 OXPHOS 功能缺陷的情况下,骨骼肌细胞 FGF21 表达水平升高,代偿性增强骨骼肌细胞的线粒体功能,因此可以在患者体液中检出 FGF21 水平升高<sup>[45]</sup>。大量研究认为,FGF21 可作为以肌肉受累为主要表型的线粒体病标志物(尤其对 mtDNA 维持障碍和 mtDNA 片段重排引起的线粒体肌病),而且 FGF21 与疾病的进展具有相关性<sup>[44,48-51]</sup>。但也有研究指出,FGF21 水平与线粒体病的进展并无明显相关性<sup>[52]</sup>。作为诊断标志物而言,FGF21 虽然足够稳定,也具有很高的敏感性,但仍缺乏特异性,例如在糖尿病、肝病、肾功能不全、肥胖或代谢综合征患者中 FGF21 水平同样上升<sup>[36,53-54]</sup>。虽然存在上述不足,但 FGF21 作为线粒体肌病的检测指标仍具有一定的临床意义,在怀疑线粒体肌病的前提下,检测血清 FGF21 水平,并结合二代测序,可以很好地检出线粒体肌病。

GDF15 作为细胞因子的一种,受 p53 和氧化应激调节,属于人类转化生长因子  $\beta$  超家族。GDF15 主要在胎盘、肾、肝、肺、胰腺和前列腺等组织表达,并进入血液。在炎症反应情况下,GDF15 水平会升高<sup>[55-56]</sup>。近年来,血液 GDF15 水平异常和 FGF21 一起作为线粒体病新的候选标志物,并且 GDF15 似乎比 FGF21 具有更高的敏感性。但与 FGF21 不同的是,GDF15 对 OXPHOS 缺陷的指示性与疾病的临床表型无关<sup>[50]</sup>。与 FGF21 相似的是,GDF15 同样缺乏特异性,在一些非线粒体病患者血液中也检出 GDF15 水平升高<sup>[44]</sup>,也无法指示线粒体病的进展<sup>[57]</sup>。因此,在今后的工作中,应该就 FGF21 和 GDF15 的特异性开展进一步研究。

#### 4 总结及展望

由于线粒体病包含大量疾病亚型,受限于线粒体病的临床表型复杂性与异质性,大量的线粒体病患者在明确其存在线粒体功能缺陷后,仍只能简单地诊断为线粒体肌病、脑肌病或脑白质病等。而基于有创活

检的线粒体酶学或线粒体形态学评估一度被认为是线粒体病诊断的金标准,但活检存在较高的假阴性率与假阳性率,例如经基因检测确诊的儿童线粒体病中,其肌肉活检线粒体功能缺陷的阳性率一度只有 60%<sup>[17]</sup>。反之,在一些非线粒体病患者中发现 26% 的患者存在线粒体功能异常,提示有创肌肉活检尚存在较高的假阳性率<sup>[58]</sup>。而二代测序方法虽然可以实现高通量大规模的基因筛查,但其同样存在诊断率不高且耗时长等缺点。目前的诊断模式——临床初诊+基因检测+有创活检,只能确诊约 50% 的线粒体病患者,未能被确诊的仍只能归类在临床高度疑似线粒体病之列。因此,开发无创、高效的线粒体病诊断标志物具有深远的临床意义。研究发现,线粒体病患者的尿液和血液中存在与健康人截然不同的代谢特征,并且一些代谢特征的改变可用于提示线粒体病的进展和严重程度<sup>[27-28]</sup>。因而,除检测经典的生物标志物乳酸和丙酮酸外,充分关注线粒体病患者的代谢特征,寻找更具特异性的标志物,有可能改变目前的诊断模式。这将使患者免除有创活检的痛苦,减轻 WES 的负担,缩短线粒体病临床检验诊断的时间,并进一步提升临床检验诊断与干预治疗的时效性。

#### 参考文献

- [1] RUSSELL O M, GORMAN G S, LIGHTOWLERS R N, et al. Mitochondrial diseases: hope for the future[J]. Cell, 2020, 181(1): 168-188.
- [2] SCHAEFER A M, MCFARLAND R, BLAKELY E L, et al. Prevalence of mitochondrial DNA disease in adults[J]. Ann Neurol, 2008, 63(1): 35-39.
- [3] GORMAN G S, CHINNERY P F, DIMAURO S, et al. Mitochondrial diseases[J]. Nat Rev Dis Primers, 2016, 2: 16080.
- [4] NG Y S, TURNBULL D M. Mitochondrial disease: genetics and management[J]. J Neurol, 2016, 263(1): 179-191.
- [5] HOLT I J, HARDING A E, MORGAN-HUGHES J A. Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies[J]. Nature, 1988, 331(6158): 717-719.
- [6] 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.
- [7] MAVRAKI E, LABRUM R, SERGEANT K, et al. Genetic testing for mitochondrial disease: the United Kingdom best practice guidelines[J]. Eur J Hum Genet, 2023, 31(2): 148-163.
- [8] LABORY J, FIERVILLE M, AIT-EL-MKADEM S, et al. Multi-omics approaches to improve mitochondrial disease diagnosis: challenges, advances, and perspectives [J].

- Front Mol Biosci, 2020, 7;590842.
- [9] RATH S, SHARMA R, GUPTA R, et al. MitoCarta3. 0: an updated mitochondrial proteome now with sub-organellar localization and pathway annotations [J]. Nucleic Acids Res, 2021, 49(D1);D1541-D7.
- [10] 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.
- [11] LIGHTOWLERS R N, TAYLOR R W, TURNBULL D M. Mutations causing mitochondrial disease: what is new and what challenges remain [J]. Science, 2015, 349(6255);1494-1499.
- [12] MARTINEZ-REYES I, CHANDEL N S. Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease [J]. Nat Commun, 2020, 11(1);102.
- [13] KLOPSTOCK T, PRIGLINGER C, YILMAZ A, et al. Mitochondrial disorders [J]. Dtsch Arztebl Int, 2021, 118(44);741-748.
- [14] COPELAND W C. Inherited mitochondrial diseases of DNA replication [J]. Annu Rev Med, 2008, 59;131-146.
- [15] PEREZ-ALBERT P, DE LUCAS COLLANTES C, FERNANDEZ-GARCIA M A, et al. Mitochondrial disease in children; the nephrologist's perspective [J]. JIMD Rep, 2018, 42;61-70.
- [16] KISLER J E, WHITTAKER R G, MCFARLAND R. Mitochondrial diseases in childhood; a clinical approach to investigation and management [J]. Dev Med Child Neurol, 2010, 52(5);422-433.
- [17] MURARESKU C C, MCCORMICK E M, FALK M J. Mitochondrial disease; advances in clinical diagnosis, management, therapeutic development, and preventative strategies [J]. Curr Genet Med Rep, 2018, 6(2);62-72.
- [18] CONTI F, DI MARTINO S, DRAGO F, et al. Red flags in primary mitochondrial diseases; what should we recognize [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(23);16746.
- [19] NIYAZOV D M, KAHLER S G, FRYE R E. Primary mitochondrial disease and secondary mitochondrial dysfunction; importance of distinction for diagnosis and treatment [J]. Mol Syndromol, 2016, 7(3);122-137.
- [20] PARIKH S, GOLDSTEIN A, KARAA A, et al. Patient care standards for primary mitochondrial disease; a consensus statement from the Mitochondrial Medicine Society [J]. Genet Med, 2017, 19(12);10.
- [21] MORAVA E, VAN DEN HEUVEL L, HOL F, et al. Mitochondrial disease criteria; diagnostic applications in children [J]. Neurology, 2006, 67(10);1823-1826.
- [22] THOMPSON J L P, KARAA A, PHAM H, et al. The evolution of the mitochondrial disease diagnostic odyssey [J]. Orphanet J Rare Dis, 2023, 18(1);157.
- [23] SCHAGGER H, VON JAGOW G. Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form [J]. Anal Biochem, 1991, 199(2);223-231.
- [24] JAVADOV S, JANG S, CHAPA-DUBOCQ X R, et al. Mitochondrial respiratory supercomplexes in mammalian cells; structural versus functional role [J]. J Mol Med (Berl), 2021, 99(1);57-73.
- [25] GOMEZ-SERRANO M, CAMAFEITA E, LOUREIRO M, et al. Mitoproteomics; tackling mitochondrial dysfunction in human disease [J]. Oxid Med Cell Longev, 2018, 2018;1435934.
- [26] JIANG Y, WANG X. Comparative mitochondrial proteomics; perspective in human diseases [J]. J Hematol Oncol, 2012, 5;11.
- [27] SHARMA R, REINSTADLER B, ENGELSTAD K, et al. Circulating markers of NADH-reductive stress correlate with mitochondrial disease severity [J]. J Clin Invest, 2021, 131(2);e136055.
- [28] HALL A M, VILASI A, GARCIA-PEREZ I, et al. The urinary proteome and metabolome differ from normal in adults with mitochondrial disease [J]. Kidney Int, 2015, 87(3);610-622.
- [29] CABRERA-OREFICE A, POTTER A, EVERS F, et al. Complexome profiling-exploring mitochondrial protein complexes in health and disease [J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9;796128.
- [30] STENTON S L, SHEREMET N L, CATARINO C B, et al. Impaired complex I repair causes recessive Leber's hereditary optic neuropathy [J]. J Clin Invest, 2021, 131(6);e138267.
- [31] ALAHMAD A, NASCA A, HEIDLER J, et al. Bi-allelic pathogenic variants in NDUFC2 cause early-onset Leigh syndrome and stalled biogenesis of complex I [J]. EMBO Mol Med, 2020, 12(11);e12619.
- [32] CUNATOVA K, REGUERA D P, VRBACKY M, et al. Loss of COX4I1 leads to combined respiratory chain deficiency and impaired mitochondrial protein synthesis [J]. Cells, 2021, 10(2);369.
- [33] FRAZIER A E, VINCENT A E, TURNBULL D M, et al. Assessment of mitochondrial respiratory chain enzymes in cells and tissues [J]. Methods Cell Biol, 2020, 155;121-156.
- [34] FRANCO-IBORRA S, TANJI K. Histochemical and immunohistochemical staining methods to visualize mitochondrial proteins and activity [J]. Methods Cell Biol, 2020, 155;247-270.
- [35] LIANG T, DENG J, NAYAK B, et al. Characterizing the electron transport chain; structural approach [J]. Methods Mol Biol, 2022, 2497;107-115.
- [36] FINSTERER J, ZARROUK-MAHJOUB S. Biomarkers for detecting mitochondrial disorders [J]. J Clin Med,

- 2018,7(2):16.
- [37] KOLLEE L A, WILLEMS J L, DE KORT A F, et al. Blood sampling technique for lactate and pyruvate estimation in children[J]. *Ann Clin Biochem*, 1977, 14(5):285-287.
- [38] FELDMAN A G, SOKOL R J, HARDISON R M, et al. Lactate and lactate: pyruvate ratio in the diagnosis and outcomes of pediatric acute liver failure[J]. *J Pediatr*, 2017, 182:217-222. e3.
- [39] TOUATI G, RIGAL O, LOMBES A, et al. In vivo functional investigations of lactic acid in patients with respiratory chain disorders[J]. *Arch Dis Child*, 1997, 76(1):16-21.
- [40] REDANT S, HUSSEIN H, MUGISHA A, et al. Differentiating hyperlactatemia type A from type B; how does the lactate/pyruvate ratio help[J]. *J Transl Int Med*, 2019, 7(2):43-45.
- [41] PLACIDO NAVAS L S. Mitochondrial diseases: theory, diagnosis and therapy [M]. Berlin, Heidelberg; Springer, 2021.
- [42] DEBRAY F G, MITCHELL G A, ALLARD P, et al. Diagnostic accuracy of blood lactate-to-pyruvate molar ratio in the differential diagnosis of congenital lactic acidosis [J]. *Clin Chem*, 2007, 53(5):916-921.
- [43] LEVY B. Lactate and shock state; the metabolic view[J]. *Curr Opin Crit Care*, 2006, 12(4):315-321.
- [44] LEHTONEN J M, FORSSTROM S, BOTTANI E, et al. FGF21 is a biomarker for mitochondrial translation and mtDNA maintenance disorders [J]. *Neurology*, 2016, 87(22):2290-2299.
- [45] JI K, ZHENG J, LV J, et al. Skeletal muscle increases FGF21 expression in mitochondrial disorders to compensate for energy metabolic insufficiency by activating the mTOR-YY1-PGC1alpha pathway [J]. *Free Radic Biol Med*, 2015, 84:161-170.
- [46] YAN B, MEI Z, TANG Y, et al. FGF21-FGFR1 controls mitochondrial homeostasis in cardiomyocytes by modulating the degradation of OPA1[J]. *Cell Death Dis*, 2023, 14(5):311.
- [47] CROON M, SZCZEPANOWSKA K, POPOVIC M, et al. FGF21 modulates mitochondrial stress response in cardiomyocytes only under mild mitochondrial dysfunction [J]. *Sci Adv*, 2022, 8(14):eabn7105.
- [48] SUOMALAINEN A, ELO J M, PIETILAINEN K H, et al. FGF-21 as a biomarker for muscle-manifesting mitochondrial respiratory chain deficiencies: a diagnostic study[J]. *Lancet Neurol*, 2011, 10(9):806-818.
- [49] MOROVAT A, WEERASINGHE G, NESBITT V, et al. Use of FGF-21 as a biomarker of mitochondrial disease in clinical practice[J]. *J Clin Med*, 2017, 6(8):80.
- [50] LI Y, LI S, QIU Y, et al. Circulating FGF21 and GDF15 as Biomarkers for screening, diagnosis, and severity assessment of primary mitochondrial disorders in children [J]. *Front Pediatr*, 2022, 10:851534.
- [51] RILEY L G, NAFISINIA M, MENEZES M J, et al. FGF21 outperforms GDF15 as a diagnostic biomarker of mitochondrial disease in children[J]. *Mol Genet Metab*, 2022, 135(1):63-71.
- [52] KOENE S, DE LAAT P, VAN TIENOVEN D H, et al. Serum FGF21 levels in adult m. 3243A>G carriers: clinical implications[J]. *Neurology*, 2014, 83(2):125-133.
- [53] LI H, DONG K, FANG Q, et al. High serum level of fibroblast growth factor 21 is an independent predictor of non-alcoholic fatty liver disease: a 3-year prospective study in China[J]. *J Hepatol*, 2013, 58(3):557-563.
- [54] DUSHAY J, CHUI P C, GOPALAKRISHNAN G S, et al. Increased fibroblast growth factor 21 in obesity and non-alcoholic fatty liver disease[J]. *Gastroenterology*, 2010, 139(2):456-463.
- [55] WAN Y, FU J. GDF15 as a key disease target and biomarker; linking chronic lung diseases and ageing[J]. *Mol Cell Biochem*, 2024, 479(3):453-466.
- [56] LUAN H H, WANG A, HILLIARD B K, et al. GDF15 is an inflammation-induced central mediator of tissue tolerance[J]. *Cell*, 2019, 178(5):1231-1244. e11.
- [57] STEELE H E, HORVATH R, TAYLOR R W. The swinging pendulum of biomarkers in mitochondrial disease: the role of FGF21 [J]. *Neurology*, 2016, 87(22):2286-2287.
- [58] SCHON K R, HORVATH R, WEI W, et al. Use of whole genome sequencing to determine genetic basis of suspected mitochondrial disorders: cohort study [J]. *BMJ*, 2021, 375:e066288.

(收稿日期:2024-05-20 修回日期:2024-06-07)

(本文编辑:宣艳艳 张耀元)