文章编号:1000-5404(2007)02-0097-04

论著

高原鼠兔和Wistar大鼠骨骼肌线粒体的比较蛋白质组学初步研究

陈 建,高钰琪,黄 瑊,蔡明春,高文祥 (第三军医大学高原军事医学系病理生理学与高原生理学教研室,全军高原医学重点实验室,重庆 400038)

提 要: 目的 采用比较蛋白质组学方法研究高原鼠兔和Wistar大鼠线粒体蛋白的差异。**方法** 分别在海拔4 500 m高原(高原鼠兔)和模拟4 500 m低压舱内麻醉动物后取双侧腓肠肌,分离纯化线粒体蛋白进行二维电泳和凝胶图像分析,对差异蛋白质用MALDI-TOF-MS质谱仪进行肽指纹图谱测定和ESI-Q-TOF串联质谱鉴定。**结果** 高原鼠兔和Wistar大鼠线粒体蛋白二维凝胶图谱有明显差异;鉴定了泛醌-细胞色素C还原酶核心蛋白Ⅰ、硫氧还原蛋白依赖性过氧化物还原酶线粒体前体蛋白、线粒体胸苷激酶2、肌酸激酶线粒体异构体4、推测蛋白XP_499518、未知功能蛋白、肌酸激酶、F_1F_0-ATP酶d亚基、镁依赖性蛋白磷酸酶1D、推测蛋白LOC498909等差异线粒体蛋白。**结论** 高原鼠兔和Wistar大鼠有差异线粒体蛋白,提示高原鼠兔线粒体能量代谢、抗氧化能力、线粒体DNA稳定性等方面有其特点。

关键词: 缺氧;线粒体;骨骼肌;鼠兔;蛋白质组学
中图法分类号: Q244;Q445;Q591.2 **文献标识码**: A

Comparative proteomic analysis of plateau Pika and Wistar rat gastrocnemius mitochondria

CHEN Jian, GAO Yu-qi, HUANG Jian, CAI Ming-chun, GAO Wen-xiang (Department of Pathophysiology and High Altitude Physiology, Department of High Altitude Military Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To explore high-altitude-adaptation-related mitochondrial proteins by analyzing the differences of gastrocnemius mitochondrial protein profiles between plateau Pika and Wistar rat. **Methods** The plateau Pikas were captured in Kunlun Mountain (4 500 m) while Wistar rats were bred at low altitude (Chongqing, 300 m) and exposed to hypobaric hypoxia (4 500 m) for 30 d. After animals of both groups were anesthetized, bilateral gastrocnemius were collected and mitochondria were extracted and purified. Two dimensional electrophoresis and PDQuest were applied and the peptide mass fingerprinting of differential proteins was analyzed with matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry analysis (MALDI-TOF MS) and Q-TOF(quatropde-time of flight) MS/MS. **Results** Great difference in gastrocnemius mitochondrial profiles of plateau Pika and Wistar rat was found. Among the differential protein spots, 11 were identified. Six plateau Pika specific protein spots were identified as ubiquinol-cytochrome c reductase core protein I, creatine kinase, mitochondrial isoform 4, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, creatine kinase, hypothetical protein XP_499518 and a novel protein. Five Wistar rat specific protein spots were identified as subunit d of mitochondrial H-ATP synthase (2 spots), LOC498909 protein and creatine kinase. **Conclusion** Our results suggest the difference in mitochondrial energy metabolism, antioxidative activity, mitochondrial DNA stability exist between plateau Pika and Wistar rat.

Key words: hypoxia; mitochondria; skeletal muscle; *Ochotona curzoniae*; proteomics

基金项目:国家自然科学基金(30393131,30300123)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30393131, 30300123)
作者简介:陈 建(1974-),男,贵州省毕节市人,博士,讲师,主要从事缺氧病理生理学方面的研究。电话:(023)68752335-8204, E-mail:jchenone@163.com
通讯作者:高文祥,电话:(023)68752335-8023, E-mail: gaowx@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2006-06-09;**修回日期**:2006-11-21

世居高原者具有更完善的氧运输和氧利用的能力[1]，能够较好地适应高原低氧。这种高原低氧适应机制，至今仍未阐明。线粒体是机体利用氧的一个关键环节，同时具有产生活性氧、调节氧化还原电势和细胞氧化还原信号转导、调控细胞凋亡和基因表达等多种重要的生理功能。线粒体结构和功能的改变是动物习服高原低氧环境的一个重要机制[2]。急性缺氧可以抑制 mtDNA 转录和翻译，损害线粒体的结构和功能，而慢性缺氧时线粒体损伤得到一定程度的恢复，细胞内线粒体数量增加，使长期暴露于低氧环境中的动物逐渐取得低氧习服[3-5]。

高原鼠兔（*ochotona curzoniae*）是生活在青藏高原海拔 3 000 m 以上区域的特有物种，在低氧环境下漫长的生物进化过程中可能已获得高原低氧适应的遗传学基础，形成了独特的适应高原低氧环境的机制[6,7]。因此，推测其线粒体对于低氧环境的适应性改变可能通过自然选择的作用固定下来，并由此获得了对高原低氧环境的适应能力。我们在建立了骨骼肌线粒体蛋白质的二维电泳和质谱分析的基础上，比较高原鼠兔和 Wistar 大鼠线粒体蛋白表达谱的差异，寻找鼠兔高原低氧适应相关蛋白。

1 材料与方法

1.1 动物与分组

实验动物分为 2 组。高原鼠兔组（plateau Pika group）为 12 只健康野生高原鼠兔，雄性，体质量 140 ~ 180 g，捕自青海省 4 500 m 昆仑山区；Wistar 大鼠组（Wistar rat group）为 12 只健康 Wistar 大鼠（清洁级，第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心），雄性，体质量 205 ~ 228 g，在模拟海拔 4 500 m 高原低压舱内饲养，连续低压缺氧 30 d。各组动物麻醉后取双侧腓肠肌液氮冻存备用。标本采集分别在 4 500 m 高原现场（高原鼠兔组）和模拟海拔 4 500 m 低压舱内（Wistar 大鼠组）进行。

1.2 线粒体提取和纯化

参照 Taylor 等[8]的方法。取液氮冻存的腓肠肌组织块，按 1∶10 加入线粒体分离介质（250 mmol/L 蔗糖，10 mmol/L Tris-HCl，pH 7.4），匀浆，1 500 × *g* 离心 10 min 2 次，取上清。8 000 × *g* 离心 15 min，弃上清后用 MSHE（210 mmol/L 甘露醇，70 mmol/L 蔗糖，5 mmol/L Hepes，1 mmol/L EGTA）悬浮。按1∶1∶1依次加入 35% 甲泛葡胺 6% Percoll 溶液、17% 甲泛葡胺 6% Percoll 溶液、线粒体 MSHE 悬液，45 000 × *g* 离心 45 min，取沉淀，用 MSHE 洗涤 1 次，12 000 × *g* 离心 15 min，沉淀用 MSHE 悬浮，液氮冻存备用。上述操作均在 0 ~ 4 ℃进行。用 Western blot 检测肌动蛋白（actin）、动力素（dynamin）Ⅱ、KDEL 和 LAMP1 鉴定线粒体蛋白的纯度，检测 NDUFS2、复合物Ⅱ的 70 × 10^3 亚基、复合物Ⅲ的核心Ⅰ亚基、复合物Ⅳ和 ATP 酶的 α 亚基鉴定线粒体蛋白的完整性[8]。

1.3 蛋白质样品的制备和双向凝胶电泳

分别将 2 组线粒体样品混合，每组共进行 4 次双向电泳。线粒体蛋白质样品按 Chevallet 等[9]的方法制备。用裂解液（40 mmol/L Tris，7 mol/L Urea，2 mol/L thiourea，4% CHAPS，1% DTT，1 mmol/L EDTA 二钠）溶解纯化的线粒体，室温放置 30 min，间歇振荡。15 000 × *g* 离心 45 min，取上清，-70 ℃冻存备用。线粒体蛋白提取物经 Bradford 法定量后取 100 μg（银染）或 1 000 μg（考染）与重泡胀溶液（7 mol/L 尿素，2 mol/L 硫脲，2% CHAPS，15 mmol/L DTT，0.5% IPG 缓冲液 pH 3 ~ 10，痕量溴酚蓝）混合，总体积 350 μl，与 IPG 胶条共同泡胀，等电聚焦在 20 ℃按设定程序进行：重泡胀 0 h，30 V 12 h，100 V 1 h，500 V 1 h，1 000 V 1 h，8 000 V 下总伏小时数最终达 100 000 Vh 止。等电聚焦结束后，每根 IPG 胶条用 10 ml 平衡液（1.5 mol/L Tris-HCl，pH 8.8，6 mol/L Urea，30% 甘油，2% SDS 痕量溴酚蓝）平衡 2 次，每次 15 min，第 1 次为还原过程，平衡液内加 1 mol/L DTT 溶液 200 μl，第 2 次平衡为烷基化过程，平衡液内加碘乙酰胺 0.25 g。然后用 13% 凝胶做第 2 向 SDS-PAGE 电泳，以每 1 胶条 20 mA 恒流电泳 30 min，加大电流至 30 mA 恒流电泳至溴酚蓝到达胶的底线。按 Amersham Pharmacia 公司的方法进行银染或考马斯亮蓝 G-250 染色。

1.4 凝胶图像采集与分析

染色、脱色完成后的双向电泳凝胶用凝胶图像扫描仪透射扫描。采用阿玛西亚公司的 ImageMaster 2D Platinum 5.0 版，以 Wistar 大鼠线粒体蛋白凝胶图像为参考胶进行分析。

1.5 胶内酶切

选择高原鼠兔或 Wistar 大鼠凝胶上的特异蛋白斑点，将它们切下，放入样品管中，用 100 mmol/L 碳酸氢铵溶液配制的 50% 乙腈溶液 100 μl 脱色，真空冷冻干燥后加入 3 ~ 7 μl 0.01 mg/ml 胰蛋白酶的 25 mmol/L 碳酸氢钠溶液，4 ℃放置 15 min 使酶液完全被吸收，补加 25 mmol/L 碳酸氢钠覆盖全部胶粒，37 ℃水浴 10 ~ 12 h，收集酶切后的上清。在胶块内加 5% TFA 覆盖全部胶粒，37 ℃水浴 1 h，收集上清。再在胶块内加入含有 2.5% TFA 和 50% 乙腈的溶液覆盖全部胶粒，37 ℃水浴 1 h，收集上清。最后在胶块内加入乙腈，轻微振荡，室温放置 15 min，收集并合并上清，离心干燥。

1.6 质谱分析及质谱数据库搜寻

在干燥后的肽混合物内加入 2 ~ 7 μl 0.5% TFA，混匀后，取 0.5 ~ 1 μl 溶液和等体积饱和基质溶液混合，MALDI-TOF-MS 质谱仪测定肽指纹谱。剩余的样品可用于 ESI-MS/MS 分析。

将提取肽段和基质 α-腈-4-羟肉桂酸的混合溶液加至不锈钢靶上，室温干燥后装靶测定，于 20 V、阳离子模式下在 Bruker REFLEX Ⅲ型 MALDI-TOF-MS 质谱仪上获取数据。质谱峰的质量准确度以胰酶的自切峰为内标进行校正。

ESI-MS/MS 为英国 Micromass 公司的电喷雾四极杆正交加速飞行时间串联质谱仪 Q-TOF2。配备毛细管液相色谱和纳升喷雾源。所有测定均在正离子方式下进行。酶切后所得肽段混合物经 ZipTip C18（Millipore）脱盐后，导入专用 nanospray 喷雾针内，进行 nano-ESI-MS/MS 分析。设毛细管电压为 800 ~

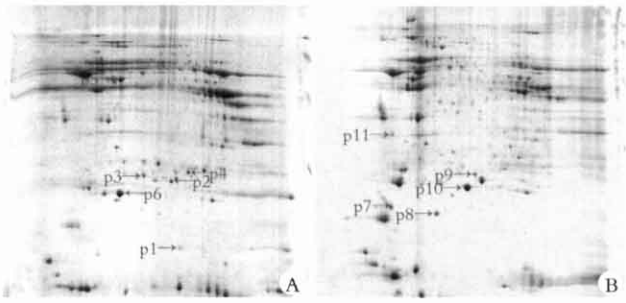
1 000 V,调节碰撞能量和碰撞气体的大小使得到一个好的串联质谱图。

质谱数据用 Mascot 软件在 SwissProt 和 NCBInr 数据库内进行检索,其中鼠兔的蛋白点检索限定在哺乳动物蛋白质数据库,大鼠蛋白点则限定在大鼠蛋白质数据库(检索参数允许 ± 0.01 的误差、一处漏切、可变修饰选择半胱氨酸的碘乙酰胺烷基化和甲硫氨酸的氧化)。

2　结果

2.1　蛋白质表达变化

双向凝胶电泳(2-DE)凝胶经银染(100 μg)后可检测到约 450 个蛋白点,经考染(1 000 μg)后可检测到约 350 个蛋白点(图 1)。用 ImageMaster 2D Platinum 软件对高原鼠兔组和 Wistar 大鼠组线粒体蛋白图谱进行分析比较,显示 2 组线粒体蛋白质 2-DE 图谱有较大差异,匹配率只有(35 ± 7.4)% (n = 4)。



p1 – p6: 高原鼠兔特异性表达蛋白,p7 – p11: 大鼠特异性表达蛋白
A: 高原鼠兔组; B: Wistar 大鼠组

图 1　高原鼠兔和 Wistar 大鼠腓肠肌线粒体双向电泳考染图谱

2.2　蛋白质鉴定

对 2-DE 凝胶上特异性表达于高原鼠兔或 Wistar 大鼠2-DE 凝胶蛋白谱的 11 个蛋白质斑点(其中 6 个见于高原鼠兔 2-DE 凝胶蛋白谱,5 个见于 Wistar 大鼠 2-DE 凝胶蛋白谱)进行切割(图 1),用胰蛋白酶消化后,进行 MALDI-TOF-MS 检测,得到肽质量指纹谱。经 Mascot 查询 SwissProt 和 NCBInr 数据库,结合 2-DE 凝胶上蛋白点的分子量和等电点,推测分别为泛醌-细胞色素 C 还原酶核心蛋白 I (ubiquinol-cytochrome c reductase core protein Ⅰ)、硫氧还原蛋白依赖性过氧化物还原酶(thioredoxin-dependent peroxide reductase)线粒体前体蛋白、线粒体胸苷激酶 2(mitochondrial thymidine kinase 2, TK-2)、肌酸激酶(creatine kinase)线粒体异构体 4、推测蛋白 XP_499518、未知功能蛋白(以上特异表达于高原鼠兔 2-DE 凝胶蛋白谱)、肌酸激酶、F_1F_0-ATP 酶 d 亚基(2 蛋白点)、镁依赖性蛋白磷酸酶 1D(protein phosphatase 1D magnesium-dependent, PPM1D)、推测蛋白 LOC498909(以上见于 Wistar 大鼠 2-DE 凝胶蛋白谱)(表 1)。其中蛋白点 6 和蛋白点 7 进一步经串联质谱分析鉴定,结果蛋白点 6 为一未知功能的蛋白(编号为 56206698),蛋白点 7 为肌酸激酶。

表 1　高原鼠兔和 Wistar 大鼠腓肠肌线粒体差异表达蛋白的质谱鉴定

编号	鉴定蛋白质	数据编号	表达物种
1	泛醌-细胞色素 C 还原酶核心蛋白 I	51948476	高原鼠兔
2	硫氧还原蛋白依赖性过氧化物还原酶线粒体前体蛋白	55634883	高原鼠兔
3	线粒体胸苷激酶 2	10798606	高原鼠兔
4	肌酸激酶线粒体异构体 4	73952165	高原鼠兔
5	推测蛋白 XP_499518	51466134	高原鼠兔
6[a]	未知功能蛋白	56206698	高原鼠兔
7[a]	肌酸激酶	6978661	Wistar 大鼠
8	F_1F_0-ATP 酶 d 亚基	220904	Wistar 大鼠
9	镁依赖性蛋白磷酸酶 1D	62656713	Wistar 大鼠
10	F_1F_0-ATP 酶 d 亚基	220904	Wistar 大鼠
11	推测蛋白 LOC498909	75775127	Wistar 大鼠

a: 串联质谱鉴定结果,其余为 MALDI-TOF-MS 结果

3　讨论

高原鼠兔在高原低氧环境下已经生活了 3 700 万年以上,是一种经过无数代的自然选择而保留下来的青藏高原特有的土生动物。近 10 年来,国内外学者对其生物习性、形态学、生理学及生化等方面做了研究,认为该动物是研究低氧适应的最佳动物模型[10]。高原鼠兔低氧性肺血管收缩反应钝化,肺动脉压不高,无右心室肥大,红细胞数(RBC)、血球压积(Hct)和血红蛋白(Hb)不因海拔高度的增加而明显改变,其生理特征与在同样环境下的移居大鼠及人类明显不同,而与其他土生动物如牦牛、南美洲高原的羊驼等相似[10]。这些结果提示,通过自然选择过程,鼠兔对低氧环境已充分适应,已发生了可以遗传,并具有遗传基础的生理生化及解剖学上的特征,机体氧利用率明显提高[6,7]。因此,我们选取高原鼠兔作为高原适应动物模型。而大鼠于模拟高原环境暴露 30 d 即可出现一定程度的肺动脉高压、红细胞增多、右心室肥大[11]等慢性低氧表现,是一种稳定的慢性缺氧动物模型。同时,由于大鼠从外貌、体形、生活习性等与高原鼠兔均有相当程度的相似,是进行高原鼠兔研究中最常被选用的对照动物。

高原鼠兔和 Wistar 大鼠线粒体蛋白 2-DE 图谱比较分析显示,两者的图谱差异较大,有多个仅见于高原鼠兔或 Wistar 大鼠的蛋白质斑点。我们对 11 个特异蛋白斑点进行胶内酶切-质谱鉴定,通过数据查询鉴定,提示这些线粒体蛋白可能与能量代谢(泛醌-细胞色素 C 还原酶、F_1F_0-ATP 酶、肌酸激酶)、抗氧化能力(硫氧还原蛋白依赖性过氧化物还原酶)、线粒体 DNA 稳定性(线粒体胸苷激酶、镁依赖性蛋白磷酸酶 1D)有关。

泛醌-细胞色素 C 还原酶和 F_1F_0-ATP 酶即为线粒体呼吸链复合物Ⅳ和Ⅴ,是线粒体氧化磷酸化的关节,其功能活性直接影响线粒体 ATP 合成。线粒体肌酸

激酶位于线粒体内膜，催化磷酸肌酸（creatine phosphate，CP）与 ATP 的相互转换，即肌酸（creatine，Cr）+ ATP→CP + ADP。线粒体肌酸激酶与线粒体 ATP/ADP 载体相互偶联，其活性受线粒体内 ATP/ADP 底物浓度调节。

以往的研究表明，缺氧时 F_1F_0-ATP 酶蛋白表达下调，活性降低[4]；线粒体肌酸激酶 mRNA 表达下调[12]，认为这是低氧组织损伤机制之一。但关于它们结构改变对于线粒体能量代谢的影响研究较少。本研究表明，高原鼠兔和 Wistar 大鼠的泛醌-细胞色素 C 还原酶、F_1F_0-ATP 酶、线粒体肌酸激酶结构差异显著，提示高原鼠兔能量代谢相关蛋白的独特结构特点可能与其高原低氧适应机制有关。

硫氧还原蛋白依赖性过氧化物还原酶又称为 Peroxiredoxin 3，是 Peroxiredoxin 蛋白家族成员。Peroxiredoxin 蛋白是新近发现的一类过氧化物酶，它们通过硫氧还蛋白还原过氧化物或超氧化物，在消除代谢产生的过氧化物中具有重要作用。硫氧还原蛋白依赖性过氧化物还原酶（Peroxiredoxin 3）定位于线粒体，该蛋白除具有抗氧化作用外，还与细胞增殖和分化、细胞信号转导有关[13]。越来越多的研究提示，缺氧损伤机制的核心问题是氧化损伤问题。高原鼠兔具有独特的硫氧还原蛋白依赖性过氧化物还原酶结构，提示其抗氧化能力可能与低氧适应机制有关。

脱氧核糖核苷激酶（deoxynucleoside kinase）催化核苷酸补救合成途径，催化脱氧核糖核苷生成相应的核苷酸，可以节省从头合成时能量和一些氨基酸的消耗。TK-2 定位于线粒体，在整个细胞周期过程中持续高活性，是调控线粒体 dNTP 池的一个关键酶，对于维持线粒体 DNA 数目和完整性有重要作用[14]。TK-2 不足可导致线粒体 DNA 拷贝数减少，细胞色素氧化酶（线粒体呼吸链复合物Ⅲ）活性下降[14]。TK-2 突变可导致线粒体肌病，甚至是致死性线粒体肌病[14,15]。

PPM1D 可能与 DNA 修复有关，其过表达可导致基因组不稳定性和突变率增加。有关 PPM1D 的研究多关注其对于核基因的作用，其对于线粒体基因组的研究尚显缺如，推测可能与其对于核 DNA 的作用类似。

本研究表明高原鼠兔 TK-2 和 PPM1D 蛋白点在 2-DE 图谱上的位置与 Wistar 大鼠显著差异，提示其具有独特的 TK-2 和 PPM1D 结构。通过 TK-2 和 PPM1D 调控线粒体 dNTP 池，维持线粒体 DNA 的数目、完整性和稳定性，减少突变率，可能对于高原鼠兔适应高原低氧环境有重要意义。

另外，未知功能蛋白序列内含有 ChaC 功能域，是一个 ChaC 样蛋白。ChaC 蛋白的功能还不清楚，可能与 Ca^{2+}/H^+ 阳离子转运蛋白有关。推测蛋白 XP_499518 和推测蛋白 LOC498909 目前未确定其功能。这些蛋白在线粒体中的作用和高原鼠兔高原低氧适应中的意义尚不明确。

总之，这些高原鼠兔和 Wistar 大鼠差异线粒体蛋白值得进一步研究，为我们深入揭示高原世居动物的低氧适应机制提供了新思路。

（致谢：感谢军事医学科学院张学敏主任、杨根锁副主任、杨松成教授、王鸿丽老师、王杰老师和王红霞老师的悉心指导和无私帮助！）

参考文献：

[1] Moore L G, Armaza F, Villena M, *et al*. Comparative aspects of high-altitude adaptation in human populations[J]. Adv Exp Med Biol, 2000, 475: 45-62.

[2] 宋 玲，孙秉庸，张国斌. 模拟高原缺氧不同时间对大鼠心肌线粒体功能的影响及其在习服-适应中的意义[J]. 高原医学杂志，1999, 9(3): 9-12.

[3] 高文祥，柳君泽，吴利平，等. 低氧大鼠脑线粒体体外转录活性的研究[J]. 中国应用生理学杂志，2001, 17(4): 323-326.

[4] 高文祥，柳君泽，吴利平 等. 急、慢性缺氧对大鼠脑线粒体能量代谢的影响[J]. 中国病理生理杂志，2000, 16(10): 879-882.

[5] 蔡明春，柳君泽，吴利平，等. 急、慢性低氧对大鼠脑线粒体蛋白翻译合成的影响[J]. 中国病理生理杂志，2002, 18(9): 1038-1041.

[6] 杜继曾，李庆芬. 模拟低氧对高原鼠兔和大鼠器官与血液若干指标的影响[J]. 兽类学报，1982, 2(1): 35-42.

[7] Du J Z, Li Q F, Chen X G. Effect of simulated altitude on liver of Ochotona curzoniae and rats[J]. Acta Zool Fennica, 1984, 171: 201-203.

[8] Taylor S W, Warnock D E, Glenn G M, *et al*. An alternative strategy to determine the mitochondrial proteome using sucrose gradient fractionation and 1D PAGE on highly purified human heart mitochondria[J]. J Proteome Res, 2002, 1(5): 451-458.

[9] Chevallet M, Santoni V, Poinas A, *et al*. New zwitterionic detergents improve the analysis of membrane proteins by two-dimensional electrophoresis[J]. Electrophoresis, 1998, 19(11): 1901-1909.

[10] 陈秋红，刘凤云. 高原鼠兔低氧适应机制的研究概况[J]. 动物学杂志，2003, 38(5): 109-113.

[11] 谢增柱，刘福玉，万 强，等. 药物预防和治疗缺氧性右心室肥大的实验观察[J]. 第三军医大学学报，1993, 15(5): 395-399.

[12] 李 芳，李 辉，朱世军，等. 磷酸肌酸对大鼠心肌缺氧、复氧心肌线粒体肌酸激酶肌膜型亚基 mRNA 表达水平的影响[J]. 中国病理生理杂志，2000, 16(2): 143-145.

[13] 章 波，粟永萍，艾国平. Peroxiredoxin 蛋白家族与电离辐射[J]. 中华放射医学与防护杂志，2005, 25(1): 95-97.

[14] Perez-Perez M J, Hernandez A I, Priego E M, *et al*. Mitochondrial Thymidine Kinase Inhibitors[J]. Curr Top Med Chem, 2005, 5(3): 1205-1219.

[15] Tulinius M, Moslemi A R, Darin N, *et al*. Novel mutations in the thymidine kinase 2 gene (TK2) associated with fatal mitochondrial myopathy and mitochondrial DNA depletion[J]. Neuromuscul Disord, 2005, 15(6): 412-415.

（编辑 龙 亮）