

线粒体基因 ND1/T3394C 突变与糖尿病

修玲玲, 梁伟, 吴华, 梁奕铨, 余斌杰

(中山医科大学附属一院内分泌科, 广东广州 510080)

摘要:【目的】调查线粒体 NADH 脱氢酶亚单位 I (ND1) 基因的 T3394C 位点突变与中国人糖尿病的发病情况。【方法】随机收集 338 例无血缘关系的糖尿病患者及 262 例正常对照组, 用聚合酶链反应扩增、限制性内切酶 *Hae* III 消化进行突变筛查, DNA 序列分析确认。【结果】糖尿病患者中 T3394C 突变者共 8 例(2.37%), 正常对照组中只有 1 例(0.38%, $P < 0.01$)。糖尿病突变患者中 4 例有糖尿病家族史, 4 例病人由于胰岛素分泌功能下降和/或出现并发症, 需用胰岛素治疗。【结论】ND1/T3394C 突变在糖尿病患者中的发生率明显高于正常对照组, 提示这个位点突变可能是导致线粒体糖尿病的易感基因之一。

关键词: 线粒体 ND1 基因; 糖尿病; 突变

中图分类号: R587.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2002)02-0111-03

Mitochondrial ND1/T3394C Mutations Associated with Diabetes Mellitus in Chinese XIU Ling-ling, LIANG Wei, WU Hua, LIANG Yi-quan, YU Bin-jie. (Department of Endocrinology, First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510080, China)

Abstract 【Objective】To investigate the contribution of the ND1/3394 mutations in mitochondrial genes to the development of diabetes in Chinese diabetic population 【Methods】Using PCR-*Hae* III-RFLP and PCR product direct sequencing techniques, 338 randomly selected Chinese patients with diabetes mellitus without prior information about type of diabetes, age of onset, family history, mode of therapy, or any other clinical features, and 262 nondiabetic control subjects were examined 【Results】A homoplasmic mutation at position 3394 T-C was observed in 2.37% of diabetic patients and 0.38% of nondiabetic controls. The frequency was significantly higher in the diabetic patients than in the control subjects. Among eight unrelated subjects with 3394 mutation, half of them required insulin therapy due to secondary failure to oral hypoglycemic agents and/or decreased insulin secretory capacity. 【Conclusion】The high incidence of mutations in Chinese diabetic patients suggests that the ND1/3394 is associated with diabetes mellitus. Clinical features of the patients with the ND1/3394 mutation are similar to that of type 2 diabetes mellitus.

Key words: mitochondrial ND1 gene; diabetes mellitus; mutation

线粒体糖尿病以 tRNA^{Leu(UUR)} 为“突变热区”, 其中 3243A-G 突变最常见^[1-3], WHO 已将此类糖尿病分型为胰岛 β 细胞功能遗传缺陷性糖尿病^[4]。线粒体基因因遗传变异部位不同, 使它对 β 细胞胰岛素分泌功能的影响不一样, 因而产生不同的临床表现, 包括胰外器官的影响——即遗传异质性导致临床表现型的异质性。Hirai 等^[5] 报道与 tRNA^{Leu(UUR)} 基因临近的 NADH 脱氢酶复合物亚单位 I (NADH Dehydrogenase subunit 1, ND1) 基因中, 3394T-C 新的突变点为日本 2 型糖尿病人群的易感基因之一。本研究了解 ND1/T3394C 突变在中国汉族糖尿病群体中的分布情况及其临床特征, 以探讨其在糖尿病的发生发展中所起的作用。

1 材料与方 法

1.1 研究对象

随机抽样无血缘关系的糖尿病患者 338 例, 男 164 例, 女 174 例, 年龄(56.1±13.9)岁, 平均病程 6.2 年, 其中有糖尿病家族史的 112 例。262 例正常对照组, 男 127 例, 女 135 例, 年龄(51.7±11.8)岁。糖尿病诊断标准按 WHO 的标准确定。

1.2 引物合成

根据人 mtDNA Cambridge 序列合成引物: L 链 nt3130-3149, H 链 nt3423-3403, 由 Bex 公司合成。

1.3 方 法

按常规方法提取患者外周血细胞的 DNA 进行 PCR-RFLP 测定。PCR 扩增条件: 94℃变性 2 min; 94℃15 s, 61℃15 s, 72℃15 s, 共进行 30 个循环, 最后 72℃延伸 2 min。PCR 产物经限制性

收稿日期: 2001-06-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39770310)

作者简介: 修玲玲(1958-), 女, 福建厦门人, 博士, 副研究员

内切酶 *Hae* II 酶解消化, 用 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 鉴定酶切产物。DNA 序列测定应用荧光标记引物循环测序试剂盒 (Amersham Pharmacia biotech), 直接测序法对突变 PCR 产物进行序列分析, 以确认突变点的位置。此外, 对 3394 突变患者再进行 mtDNA 3243A→G、3316G→A 和 3391G→A 等位点的筛查。

2 结果

2.1 PCR-*Hae* II 酶解-RFLP 结果

线粒体 DNA 第 3394 位核苷酸 T-C 的改变使 *Hae* II 酶解后在电泳带上可见 169 bp、76 bp 和 21 bp 3 条带, 而正常者的电泳带为 169 bp、97 bp 和 21 bp 3 条带(图 1A, 因 21 bp 片段较短故在琼脂糖凝胶上不显示), 该突变为同质性的(homoplasmy)。

2.2 PCR 产物序列分析

图 1B 测序结果可见患者线粒体 DNA L 链 3394 位点由 T 突变为 C, 这与 PCR-RFLP 结果一致。此突变位点位于呼吸链复合物 I ND1 基因上, 并导致氨基酸替代。

2.3 线粒体 ND1/3394 突变发生率及其临床表现

①发生率: 338 例糖尿病患者中, 8 例 (2.37%) 为 3394 T→C 突变, 而 262 例正常人中只有 1 例 (0.38%) 为该突变者 ($P < 0.01$); ②遗传: 糖尿病患者中一级亲属有糖尿病的 112 例, 检出率为 3.56%, 无家族史的为 1.77%。8 例先证者中, 只有 4 例有糖尿病家族史(其中 3 例为母系家族史, 1 例子女有糖尿病史), 4 例为无家族糖尿病史; ③发病年龄: 平均发病年龄 41 岁 (22~58 岁); ④胰岛功能: 除 1 例 1 型糖尿病外, 7 例为 2 型糖尿病, 其

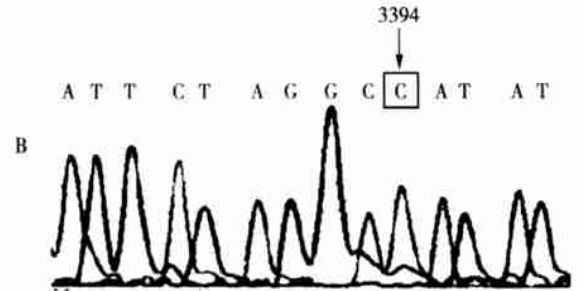
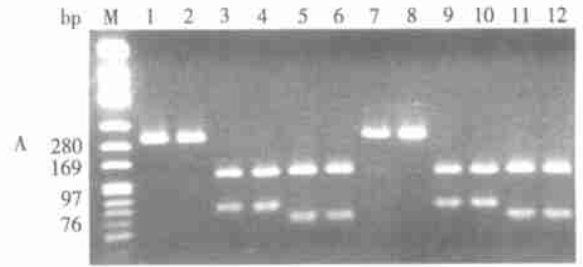


图 1 线粒体 ND1/T3394C 突变的鉴定

Fig. 1 Identification for mitochondrial ND1/T3394C mutation

A: Analysis of ND1/T3394C by PCR-*Hae* III RFLP. The presence of mutant DNA resulted in the formation of 169 bp and 76 bp fragments (lane 5, 6, 11, 12)

B: Mitochondrial DNA sequence surrounding the mutated site 3394 T-C substitution

中 4 例空腹 C 肽水平偏低; ⑤肥胖情况: BMI 平均为 20.9, 无 1 例肥胖者; ⑥其它表现: 6 例患者伴发不同的并发症, 4 例病人由于胰岛素分泌功能下降和/或出现并发症, 需用胰岛素治疗; 尚未发现该突变患者伴有耳聋症状; ⑦其它突变位点: 本组患者中有 6 例为 3243A→G, 8 例 3316G→A 的先证者, 在这些带有变异的同一患者中未检测出同时存在两个突变的位点。详细情况见表 1。

表 1 糖尿病 ND1/3394T-C 突变患者的临床情况

Table 1 Clinical features of the patients with the ND1/3394 mutation

| Subject No. | Sex | Age/ Age at onset (yr) | BMI (kg/m ²) | Family history | F-C peptide (nmol/L) | Complication ¹⁾ | Therapy ²⁾ |
|-------------|-----|------------------------|--------------------------|----------------|----------------------|----------------------------|-----------------------|
| 1 | M | 50/48 | 24.8 | + | 3.31 | a | OHA |
| 2 | M | 56/26 | 19.0 | - | 0.10 | d | Insulin |
| 3 | F | 38/22 | 19.1 | - | 0.19 | e | Insulin |
| 4 | F | 60/55 | 24.7 | + | 1.38 | a, b | OHA |
| 5 | M | 39/32 | 22.9 | + | 0.68 | - | Insulin |
| 6 | F | 37/37 | 16.4 | - | 0.30 | - | OHA |
| 7 | F | 61/50 | 24.3 | + | 0.37 | d, e | Insulin |
| 8 | F | 70/58 | 18.8 | - | 0.42 | c | OHA |

1) a: hypertension, b: hypertriglyceridemia, c: osteoporosis, d: diabetic retinopathy, e: diabetic neuropathy; 2) OHA: oral hypoglycaemic

3 讨论

研究表明在 tRNA^{Leu(UUR)} 临近的 ND1 基因上存在着与糖尿病相关的突变位点^[5,6], ND1 蛋白是高度疏水性的蛋白质, 存在5个跨膜 α -螺旋二级结构。3394nt 处于呼吸链复合物I (Co I) ND1 基因上, 在进化中保守度较高。当 3394T \rightarrow C 突变使第30位密码子由原来编码的酪氨酸(TAT)被组氨酸(CAT)替代, 可能影响该蛋白质二级和三级结构的形成或稳定性, 引起 ND-1 酶活性的改变使复合物I 功能发生障碍, 从而影响胰岛 β 细胞的功能, 最终发生糖尿病。另 ND1 基因功能的重要性亦在 Leber 氏遗传性视神经病(LHON)、Parkinson 病和 Alzheimer 病等疾病中证实了。

每一种线粒体疾病并不限于某一特定位置的突变, 不同患者可检出不同的位点, 这些不同的突变位点在疾病的严重程度或影响的范围上亦不相同。例如, 在与 LHON 相关的4个突变位点中, 并非表现的严重程度都相同^[7], 有的突变仅与 LHON 有关, 有的则表现出更严重的临床症状; 从变异部位的分布和发病人数上, 这些突变位点也有差异。但与其他线粒体疾病相比较, LHON 还是有较定型的临床表现。是否在线粒体糖尿病的发生中也有类似的情况出现? Hirai^[8] 在365例2型糖尿病患者中检测出18例此突变点(4.9%), 在225例对照组中发现3例突变者(1.3%), 但二者的突变频率有显著性差异, 这与本研究结果相似。另一项调查结果该突变的频率在日本儿童1型糖尿病中为3.2%, 并认为这一基因突变导致糖尿病的发生可能与其它连锁基因和/或环境因素改变有关^[8]。

3394T \rightarrow C 突变糖尿病患者中既有1型也有2型糖尿病; 发病年龄不一; 有无糖尿病家族史的各占一半, 并不都是有母系家族史; 虽然多数患者有糖尿病常见的并发症, 但未见伴有特殊的神经系统疾病; 胰岛分泌功能也不尽相同。本突变患者的临

床表现与一般的糖尿病患者基本相似——无特殊的临床表现, 尤其与 tRNA^{Leu(UUR)} 3243A \rightarrow G 突变的患者明显不同(如母系糖尿病家族史; 伴神经性耳聋; 低体重指数等)。其他的研究表明, 在不同的线粒体疾病中尽管突变的基因型相同, 但临床表现却不同, 或者有较多的临床症状, 给诊断带来不少困难, 本研究的 ND1/T3394C 突变糖尿病患者亦不例外。本研究还对 3316G \rightarrow A、3391G \rightarrow A 和 3243A \rightarrow G 进行了筛选, 未在同一患者中发现有两种突变同时存在, 每一个突变位点的分布和临床情况亦有所不同, 说明了线粒体糖尿病也是一种高度异质性的疾病。

参考文献:

- [1] Otake S, Sakura H, Shimokawa K, *et al.* The high prevalence of the diabetic patients with a mutation in the mitochondrial gene in Japan[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1994, 79(3): 768.
- [2] 修玲玲, 张庆, 余斌杰, 等. 伴线粒体基因突变的家族性糖尿病的临床特征[J]. *中华医学杂志*, 1997, 77(6): 418.
- [3] 张庆, 曾瑞萍, 杜传书, 等. 家族性糖尿病中线粒体 tRNA^{Leu(UUR)} 基因突变的发生率及临床特点[J]. *中山医科大学学报*, 1997, 18(1): 57.
- [4] Report of a WHO consultation. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Geneva: WHO/NCS, 1999. 2.
- [5] Hirai M, Suzuki S, Onoda M, *et al.* Mitochondrial DNA 3394 mutation in the NADH dehydrogenase subunit 1 associated with non-insulin dependent diabetes mellitus[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, 219(3): 951.
- [6] Nakagawa Y, Ikegami H, Yamato E, *et al.* A new mitochondrial DNA mutation associated with non-insulin dependent diabetes mellitus[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, 209(2): 664.
- [7] Jun A S, Trounce I A, Brown M D, *et al.* Use of trans-mitochondrial cybrid to assign a complex I defect to the mitochondrial DNA, NADH dehydrogenase subunit 6, gene mutation at nucleotide pair 14459 that causes Leber hereditary optic neuropathy and dystonia[J]. *Mol Cell Biol*, 1996, 16(12): 771.
- [8] Matsuura N, Suzuki S, Yokota Y, *et al.* The prevalence of mitochondrial gene mutations in childhood diabetes in Japan[J]. *Pediatr Endocrinol Metab*, 1999, 12(1): 27.

(编辑 黄小延)

·简讯·

眼科中心卫生部眼科学实验室被评为良好类实验室

国家科技部委托国家自然科学基金委员会对生命科学国家重点实验室、部门开放实验室进行评估, 我校眼科中心的卫生部眼科学实验室作为卫生部的部门开放实验室通过了评估并被评为良好类实验室, 该实验室的各项工作得到以杨雄里院士为组长的评议专家组的好评。