

胰岛素启动子因子 1 基因 P239Q 突变与中国汉族人 2 型糖尿病易感性的关系

黄知敏, 翁建平, 吴 华, 廖志红, 修玲玲

(中山医科大学附属第一医院内分泌科, 广东 广州 510080)

摘 要: 【目的】了解胰岛素启动子因子 1 基因 P239Q 突变在中国汉族人中的分布情况, 以探讨其在 2 型糖尿病的发生发展中的作用。【方法】用 PCR-RFLP 对 233 例 2 型糖尿病患者及 89 例非糖尿病健康志愿者进行该点突变的筛查, 对检出阳性者进行家系调查。【结果】病人组中仅发现 1 例突变基因携带者, 对照组均为阴性, 家系研究显示该点突变不与糖尿病共分离。【结论】该点突变在中国汉族人(包括 2 型糖尿病患者)中相当少见。该突变不与糖尿病共分离, 且在非糖尿病患者中亦可被检出, 推测其可能作为一种修饰基因, 与其它位点的突变共同作用, 促进糖尿病发生。

关键词: 糖尿病/遗传学; 疾病遗传易感性; 胰岛素启动子因子 1 基因; 点突变

中图分类号: R587.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-257X(2002)02-0108-03

Relationship Between P239Q Mutation in the Insulin Promoter Factor 1 Gene and Predisposition of Type 2 Diabetes Mellitus in Chinese Han Population HUANG Zhi-min, WENG Jian-ping, WU Hua, LIAO Zhi-hong, XIU Ling-ling. (Department of Endocrinology, First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510080, China)

Abstract 【Objective】To investigate the distribution of P239Q mutation in the insulin promoter factor 1 gene, and the part it may share in the predisposition of type 2 diabetes mellitus, it was screened in Chinese Han population. 【Methods】233 type 2 diabetics and 89 non-diabetics were screened for the mutation using PCR-RFLP. Family study was carried out after the identification of the mutant proband. 【Results】One out of 233 diabetics was found to carry the mutation, while none among the non-diabetic group. Family study showed that the P239Q variant of IPF1 did not cosegregate with diabetes. 【Conclusion】The P239Q mutation of IPF1 is rather rare in Chinese Han population, including in type 2 diabetics. It can also be identified in non-diabetic subjects and its poor cosegregation with type 2 diabetes, we suggest that it might act as a modifying gene, which together with variants in other genes could increase susceptibility to type 2 diabetes.

Key words: diabetes mellitus/genetics; genetic predisposition to disease; insulin promoter factor 1; point mutation

2 型糖尿病是一种多基因遗传的复杂病, 近十多年来对其分子遗传学的研究^[1], 尤其是年青的成年发病型糖尿病(maturity onset diabetes of the young, MODY)的基因研究所取得的突破性进展, 使人们对 2 型糖尿病发病机制有了更深的认识。已证实胰岛素启动子因子 1(insulin promoter factor 1, IPF1; MODY4)所表达的转录因子与胚胎期胰腺发育及维持葡萄糖稳态的某些胰腺特异性基因表达密切相关, 并且确实发现了一些位点突变(Q59L, D76N, InsCCG243, C18R, R197H, P239Q)与晚发性 2 型糖尿病(late-onset type 2 diabetes mellitus, 发病年龄 ≥ 40 岁)的发生有关^[2-4], 其中位于第二外显子内的第 239 密码子因发生错义突变(CCG \rightarrow CAG), 使脯氨酸被谷氨酰胺所代替(P239Q), 该突变在斯堪的纳维亚白种人 2 型糖尿

病和健康人中均可被检出, 功能学研究显示该点突变导致其表达产物的转录活性较野生型下降约 50%。本实验研究该位点突变在中国汉族人中的分布情况, 以探讨其在 2 型糖尿病发生发展中所起的作用。

1 研究对象与方法

1.1 研究对象

病人组: 根据 1985 年 WHO 糖尿病诊断及分型标准确诊为 2 型糖尿病患者 233 例, 年龄(56 \pm 13)岁, 平均病程 6.18 年, BMI(23 \pm 4) kg/m², 有或无糖尿病家族史, 均为 1999 年 1 月至 2000 年 12 月间就诊我院的门诊及住院病人。对照组: 89 例同期非糖尿病健康自愿者, 年龄(52 \pm 11)岁, BMI(23 \pm 3) kg/m², 无已知的糖尿病家族史。

收稿日期: 2001-10-16

基金项目: 广东省卫生厅基金资助项目(A2001114)

作者简介: 黄知敏(1972-), 女, 湖南平江人, 学士; 翁建平, 教授, 课题负责人

1.2 外周血提取 DNA

取5 mL 外周血,用经典的酚/氯仿法提取基因组 DNA。

1.3 PCR-RFLP 法检测点突变

①引物序列为 5'-CATCAAGATCTGGTTCCAAAACCGC-3' (上游) 及 5'-AGTGGTTGAAGCC-CCTCAGCCA-3' (下游); ②反应体系: 以 100 ng DNA 为模板, 5× NHP 缓冲液 6 μL [含 1 mol/L (NH₄)₂SO₄ 4 mL, 1 mol/L Tris 16.75 mL (pH8.8), 吐温 20 0.025 g], 2 mmol/L dNTP 2.5 μL, 25 mmol/L MgCl₂ 2.5 μL, 20 mmol/L 引物各 1 μL, 二甲基亚砜 1.5 μL, H₂O 10 μL, *Taq* 酶 2.5 U, 总体积 32 μL; ③扩增条件: 96 °C 预变性 5 min 后加入 *Taq* 酶, 96 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延长 30 s, 共 37 个循环, 最后 72 °C 再延长 10 min; ④酶切方案: 选用 *Pst* I 限制性内切酶 0.2 μL (20×10⁶ U/L), NE 缓冲液 3 (10×) 2.5 μL (由 BioLabs 公司生产, 与 *Pst* I 配用), H₂O 12.3 μL, PCR 产物 10 μL, 总体积 25 μL; 37 °C 孵育 4 h 或过夜, 酶切产物于 20 g/L 琼脂糖凝胶上电泳, 溴化乙锭染色并在紫外透射仪上观察筛查结果。

1.4 家系调查

对检出阳性者进行家系研究, 筛查突变基因携带者, 对未达到糖尿病诊断标准者进行口服葡萄糖耐量试验 (OGTT)。

2 结果

2.1 PCR-RFLP 筛查结果

PCR 扩增产物为 325 bp, 若携带 P239Q 突变则产生一个 *Pst* I 限制性内切酶识别位点, 经酶切后得 150 bp 及 175 bp 的 2 个片段, 而无突变者则保持 325 bp 的完整序列。病人组 233 人中仅检出 1 例携带 P239Q 突变者 (图 1), 而对照组 89 人全部阴性。

2.2 P239Q 突变基因携带者家系调查

家系调查结果 (图 2) 显示非糖尿病的母亲为突变基因携带者, 而同患糖尿病的父亲筛查结果阴性, 也即患者的 P239Q 突变基因来自母亲而非父亲。两个姐姐无糖尿病, 亦非突变基因携带者, OGTT 结果显示母亲及两个姐姐均为正常糖耐量。

3 讨论

3.1 IPF1 是维持葡萄糖稳态的重要转录因子

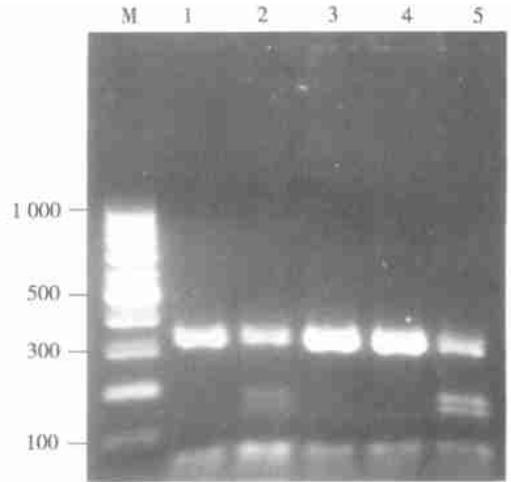


图 1 PCR-RFLP 筛查 IPF1 的 P239Q 突变

Fig 1 Result of P239Q mutation screening using PCR-RFLP

M: 100 bp DNA ladder; 5: positive heterozygote control; 1, 3, 4: negative for the variant; 2: mutation carrier

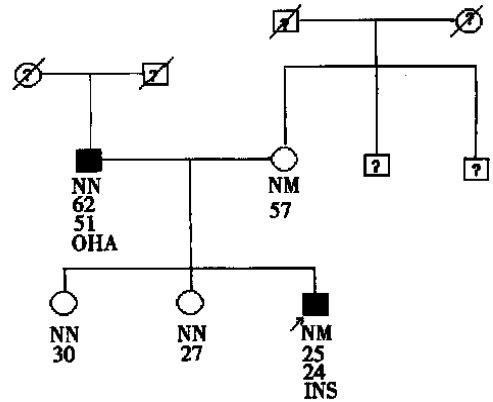


图 2 IPF1 的 P239Q 基因突变携带者家系图谱

Fig 2 Pedigree of the P239Q mutation carrier

The proband was indicated by an arrow. Genotype, age at onset and treatment were listed below the symbols. N: normal allele, M: mutant allele. ○ normal glucose tolerant, ■ diabetes, ? not determined

IPF1 对胚胎期胰腺发育以及成年期胰腺内分泌特异性基因如 β 细胞中的胰岛素、葡萄糖转运体 2 (GLUT 2)、葡萄糖激酶 (GCK) 基因以及 D 细胞中的生长抑素基因等转录调节起着重要作用, 以维持机体葡萄糖的稳态^[5]。IPF1 基因突变在糖尿病发生中所起的作用, 在 1997 年 Stoffers 等^[6,7]报道 1 例先天性胰腺缺如的病例后引起重视, 由于 IPF1 的第一个外显子中第 63 密码子脯氨酸缺失一个胞嘧啶而发生移码突变 (Pro63fsdelC), 在纯合子先证者引起先天性胰腺发育不全, 而在杂合子家系成员中发生 MODY4。Pro63fsdelC 是目前发现的唯一与 MODY4 共分离的突变类型, 该家系也是迄今所

发现的唯一一个 MODY4 家系,其临床表现并不严格地符合 MODY 的诊断标准,而近几年若干研究发现 IPF1 基因的某些位点突变(C18R、Q59L、D76N、R197H、InsCCG243、P239Q)似乎与晚发性 2 型糖尿病易感性有关,其中有些位点的突变(如 D76N 及 P239Q)还与被称作单基因遗传病的 MODY3 突变并存,因此有学者开始质疑 IPF1 是否应该被称为 MODY 基因,似乎它与普通 2 型糖尿病有更密切联系^[4]。

3.2 P239Q 突变与斯堪的那维亚人群糖尿病易感性

翁建平等^[4]用 SSCP 及基因测序的方法,在斯堪的那维亚白种人中研究了 115 个有家族史的早发性 2 型糖尿病家系 IPF1 基因突变与糖尿病易感性关系,并将检出的突变在 183 例晚发性 2 型糖尿病患者及 92 名非糖尿病对照中进行基因扫描,结果发现了 P239Q 突变,它是该基因最活跃的突变位点,其频率在早发性、晚发性 2 型糖尿病患者及健康对照中分别为 1.7%、1.6% 及 1.1%,虽然该突变与糖尿病并非共分离,但是功能学研究证明了突变蛋白转录活性下降(约 50%),表型分析也显示了突变基因携带者在葡萄糖负荷条件下具有更高的空腹血糖及胰岛素/葡萄糖比率的下降,提示了该位点突变对糖尿病发生的修饰作用。

3.3 P239Q 突变与中国汉族人 2 型糖尿病

本实验在 233 例 2 型糖尿病患者中仅发现 1 例突变基因携带者(0.4%),而在健康对照中没有发现该点突变,突变频率与斯堪的纳维亚白种人(1.6%)没有显著性差异($P = 0.237$)。该点突变在中国汉族人 2 型糖尿病患者中相当少见。家系调查显示突变基因来自非患病的母亲,而不是同患糖尿病的父亲,这说明该点突变不与糖尿病共分离,也提示了该点突变的单独作用并不足以导致糖尿病发生,因为携带突变基因的先证者母亲 53 岁

仍未发生糖尿病,而先证者有可能携带了来自父亲的一部分致病基因,该点突变的存在使糖尿病的发生提前了(父亲 51 岁发病,先证者 24 岁发病),并且加速了胰岛 β 细胞功能衰退。先证者在起病时空腹 C 肽水平为 0.89 pmol/L,而一年后空腹 C 肽为 0.43 pmol/L,目前已接受胰岛素治疗。尽管 IPF1 的 P239Q 突变在中国汉族人 2 型糖尿病中少见,且不与糖尿病共分离,鉴于功能学研究证实该点突变导致胰岛素启动子因子 1 转录活性下降,从而减少了胰岛素的产量,故推测它可能作为一种修饰基因,与其它易感基因的某些位点突变一起促进糖尿病发生。

参考文献:

- [1] 张庆,曾瑞萍,杜传书. 线粒体 DNA tRNA leu(UUR) 和 ND1 双重突变糖尿病家系报道[J]. 中山医科大学学报, 1998, 19(4): 258.
- [2] Hani E H, Stoffers D A, Chevre J C, *et al.* Defective mutations in the insulin promoter factor-1 (IPF-1) gene in late-onset type 2 diabetes mellitus[J]. J Clin Invest, 1999, 104(12): R41.
- [3] Macfarlane W M, Frayling T M, Ellard S, *et al.* Missense mutations in the insulin promoter factor-1 gene predispose to type 2 diabetes[J]. J Clin Invest, 1999, 104(12): R33.
- [4] Weng J P, Macfarlane W M, Lehto M, *et al.* Functional consequences of mutations in the Mody4 gene (IPF1) and coexistence with Mody3 mutation[J]. Diabetologia, 2001, 44(2): 249.
- [5] Habener J F, Stoffers D A. A newly discovered role of transcription factors involved in pancreas development and the pathogenesis of diabetes mellitus[J]. Proc Assoc Am Phys, 1998, 110(1): 12.
- [6] Stoffers D A, Zinkin N T, Stanojevic V, *et al.* Pancreatic agenesis attributable to a single nucleotide deletion in the human IPF1 gene coding sequence[J]. Nat Genet, 1997, 15(1): 106.
- [7] Stoffers D A, Stanojevic V, Habener J F, *et al.* Insulin promoter factor-1 gene mutation linked to early-onset type 2 diabetes mellitus directs expression of a dominant negative isoprotein[J]. J Clin Invest, 1998, 102(1): 232.

(编辑 黄小延)

· 简 讯 ·

本刊在医学类高等学校学报影响因子排名第二

据《中国科技期刊引证报告》2001 年 11 月最新报告:《中山大学学报(自然科学版)》在综合性高等学校学报影响因子排名第一,《中山医科大学学报》在医学类高等学校学报影响因子排名第二,仅位于《北京医科大学学报》后面。

(学 讯)