

线粒体 DNA $tRNA^{leu(UUR)}$ 和 $ND1$ 双重突变 ——糖尿病家系报道

张庆^① 曾瑞萍 杜传书

(中山医科大学医学遗传教研室, 广州, 510089)

摘要 目的: 探讨线粒体 DNA 突变在糖尿病发病中的作用。方法: 采用 PCR-RFLP、亚克隆及 DNA 序列分析等技术, 对一个母系遗传糖尿病家系成员的线粒体 DNA $tRNA^{leu(UUR)}$ 及其临近区域进行了突变分析。结果: 发现 mtDNA $tRNA^{leu(UUR)}$ nt 3 243 A→G 和 $ND1$ nt 3 365 T→A 双重突变。结论: 结合该家系糖尿病患者具有发病年龄早(<30 岁), 对胰岛素依赖, 伴耳聋等较严重的临床表型, 推测 $ND1$ 和 $tRNA^{leu(UUR)}$ 突变一起在发病中起协同作用。

关键词 突变; 线粒体/遗传学; 糖尿病/遗传学

中图分类号 R 587.1

A COMBINATION OF MITOCHONDRIAL $tRNA^{leu(UUR)}$ AND $ND1$ GENE MUTATIONS IN A DIABETIC FAMILY

Zhang Qing Zeng Ruiping Du Chuanshu

(Department of Medical Genetics, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510089)

Abstract Objective: To explore the relationship between mitochondrial DNA mutation and the pathogenesis of diabetes mellitus. **Methods:** Mitochondrial DNA in the region encoding $tRNA^{leu(UUR)}$ and the adjacent region in a family with maternally inherited diabetes mellitus was analyzed by applying polymerase chain reaction (PCR)-restriction fragment length polymorphism (RFLP), subcloning and sequencing techniques. **Results:** A combination of mtDNA $tRNA^{leu(UUR)}$ gene at nt 3 243 A to G and gene $ND1$ nt 3 365 T to A mutations was found. **Conclusion:** Since the patients in the family had the clinical characteristics of maternal transmission, lower age of onset, hearing loss and impaired insulin secretion, we suggested that the extent and severity of the diabetes and deafness in this family could be associated with the additional gene $ND1$ mutation.

Subject headings mutations; mitochondria/genetics; diabetes mellitus/genetics

近年来的研究表明, 母系遗传糖尿病是一种有明确临床特征的糖尿病(diabetes mellitus, DM), 其线粒体基因组(mitochondrial DNA, mtDNA)缺陷在疾病发生中起作用。mtDNA $tRNA^{leu(UUR)}$ nt 3 243 A→G 突变引起的母系遗传 DM 和/或耳聋是一种独特的 DM 亚型, 各国学者已陆续报道了具有该突变的家系^[1], 我们亦在广州地区发现了数个该病家系^[2]。3 243 bp 突变患者的临床表型差异较大, 从糖耐量异常(impaired glucose tolerance, IGT)到胰岛素依赖型糖尿病(insulin-dependent diabetes

mellitus, IDDM)伴耳聋, 甚至伴发线粒体脑肌病。我们对一个有明确母系遗传史的 DM 伴耳聋家系的 mtDNA 进行了基因分析, 以探讨 mtDNA 突变产生的不同临床表型中, 是否伴有其它 mtDNA 或核 DNA 的突变。

1 材料和方法

1.1 病例

先证者为男性, 40 岁, 身高 162 cm, 体质量 40

^① 深圳市笋岗西路红十字会医院血液病研究所工作

kg, 体质指数(BMI)15。25岁时出现 DM 症状, 口服降糖药治疗无效, 诊断为 IDDM。先后 7 次发生酮症酸中毒, 伴发周围神经炎、糖尿病肾病和心肌植物神经病等。7 年前出现听力减退, 现已明显耳聋。家族中其母亲和 4 个兄弟姐妹均患有 DM 和不同程度的耳聋。

1.2 DNA 提取

抽取研究对象外周血 2~3 mL, 肝素抗凝, 低渗溶血, SDS-蛋白酶 K 消化, 苯酚/氯仿/异戊醇抽提。

1.3 PCR 扩增 mtDNA(nt 2 993~3 493)片段

参照人 mtDNA Cambridge 顺序^[3]合成一对引物: 正向引物(nt 2 993~3 019): 5'-TTG GAT CAG GAC ATC CCG ATG GTG CAG-3', 反向引物(nt 3 493~3 467): 5'-GTT TTA GGG GCT CTT TGG TGA AGA GTT-3'。在 30 μ L PCR 反应体积中含模板 DNA 0.1 μ g, 一对引物各 20 pmol, 4 种 dNTP 各 200 μ mol/L, 10 \times PCR 缓冲液 3 μ L, *Taq* DNA 聚合酶 1.0 U。扩增条件为: 先 97 $^{\circ}$ C 变性 10 min, 然后 94 $^{\circ}$ C 30 s, 56 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 共进行 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

1.4 PCR 产物酶切分析

取 PCR 产物 5 μ L, 在 37 $^{\circ}$ C 时用 20 000 U/L 的 *Apa* I 酶解 2 h, 经 60 g/L 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 硝酸银染色, 观察结果。在有 3 243 A \rightarrow G 突变的情况下, 由于可形成一个新的 *Apa* I 酶切位点, 用 *Apa* I 可将 PCR 产物切成 250 bp 和 251 bp 两条片段。很容易与无突变的 mtDNA 扩增产物(501 bp)相区别。

1.5 亚克隆及 DNA 序列测定

以 mtDNA nt (3 130~3 149)和 nt (3 404~3 423)为引物进行 PCR 扩增, 扩增产物经纯化和回收后与 *Sma* I 酶解的载体 PUC18 连接, 转化 JM109 宿主菌。提取质粒 DNA, 用 PCR 和限制性内切酶分析法鉴定克隆的目的基因。选择两个以上含有野生型和突变型单一片段的克隆, 采用 PUC18 克隆测序通用引物进行 dsDNA 双向测序和 PRISM 310 型全自动测序仪(Perkin Elmer, 美国)测序。

2 结果

2.1 PCR-酶切分析

患者 DNA 样品经 PCR 扩增 *Apa* I 酶解后,

在聚丙烯酰胺凝胶上可见一个未酶解的 501 bp 片段和两个酶解的 250 bp 和 251 bp 片段, 说明患者的部分 mtDNA *tRNA^{leu(UUR)}* 发生了突变, 产生了 *Apa* I 酶切位点(GGGCCC), 该突变是异质性的(即细胞内同时存在野生型和突变型两类型的 mtDNA)。正常对照 mtDNA 仅见 501 bp 片段。(图 1)

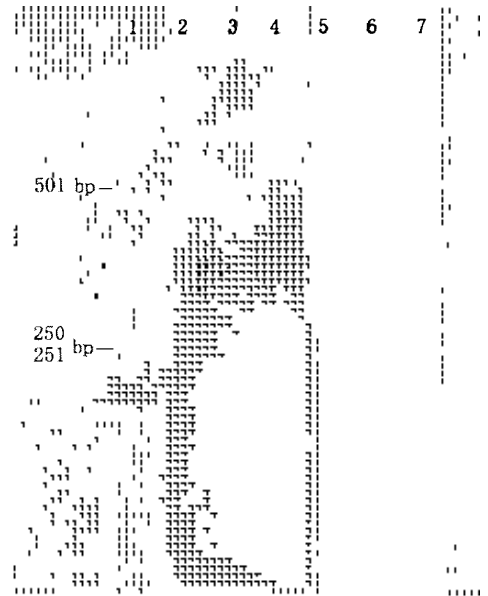


图 1 *tRNA^{leu(UUR)}* nt 3 243 突变 *Apa* I 酶解分析

Fig. 1 *Apa* I restriction digest test for the *tRNA^{leu(UUR)}* nt 3 243 mutation

lanes 1—4 7: Heteroplasmic mutant sequence generates a *Apa* I site at which the 501 bp fragment is cleaved into 250 and 251 bp fragments; lane 5: Normal sequence lacks the *Apa* I site and leaves an uncut 501 bp fragment; lane 6: Molecular markers of 100 bp

2.2 突变家系成员的基因和临床分析

II₅ 是先证者, 家系中先证者母亲有 DM 病史 10 余年, 5 年前死于糖尿病并发症。先证者同胞 5 人均患有 DM, 都在 30 岁以前发病, 并于 DM 5~7 年后出现不同程度的听力障碍, 体质消瘦。家系中 8 人接受了基因筛查, II₃、II₅、II₇、II₉ 和 III_b 均有 3 243 A \rightarrow G 突变, *Apa* I 酶切呈阳性, 并且突变均呈异质性。该突变基因由母亲传递给子女(如 II₇ \rightarrow III_b), 父亲则不传递该基因(如 III_b, III_d 无突变), 推测该家系中的致病基因由 I₂ 传递而来。第 II 代年龄均小于 18 岁, 无糖尿病症状, 血糖和糖耐量试验未查。(图 2)

2.3 DNA 序列分析

选择 *Apa* I 酶切阳性和阴性克隆进行 DNA

顺序分析,与相应的 mtDNA Cambridge 顺序(nt 3 130~3 423)比较。在 *Apa* I 阳性克隆片段中发现两个点突变:nt 3 243 A→G 和 nt 3 365 T→A;而在 *Apa* I 阴性克隆中只存在一个点突变:nt 3 365 T→A(图 3,4)。2 例正常 mtDNA 序列无 3 243 和 3 365 突变,另外 5 个 3 243 突变家系先证者的 *Apa* I 阳性克隆片段仅有 3 243 突变而无 3 365 突变。说明 3 365 突变只存在于该家系,该突变发生在编码 NADH 脱氢酶复合物亚单位 1 的 *ND* 1 基因保守区,导致氨基酸的替代。

同种族和家族的流行病学研究表明,由母亲传递的 DM 是父亲传递的 2~3 倍^[1],提示母亲因素在发病中起重要作用。这除了妊娠期宫内环境因素对胎儿以后发病的影响外,以母系遗传方式为规律的线粒体基因组缺陷可能是致病因素之一,因为线粒体的氧化磷酸化功能在胰腺 β-细胞分泌胰岛素的过程中起关键作用^[1]。mtDNA 突变使 mtDNA 编码的呼吸链酶活性降低,ATP 产生减少,影响 β-细胞分泌胰岛素。1992 年, Van den Ouweland 等^[4]首次报道了一个母系遗传 DM 伴耳聋家族有 mtDNA *tRNA^{leu(UUR)}* nt 3 243 A→G 点突变,其后各国学者陆续报道了具有该突变的 DM 家系^[5],我国亦报道了数个该突变家系^[2,6]。目前认为该类 DM 是一种独特的 DM 亚型,称为母系遗传 DM 伴耳聋(MIDD)或称线粒体糖尿病^[1]。

本文报道的突变家系具有以下临床特征:①有母系遗传 DM 家族史;②起病年龄均小于 30 岁;③患者均消瘦,体质质量指数(BMI)小于 24;④病情随年龄增长而逐渐加重,最终需用胰岛素治疗;⑤患 DM 数年后出现不同程度的听力障碍。这些特征与文献报道的 3 243 bp 突变者的特征相符合^[2,3],但该家系中所有 5 个兄弟姐妹均在 30 岁以前发病,对胰岛素依赖,并伴有耳聋及其它并发症,说明具有较严重的临床表型。

现已发现,在家族内和家族间 3 243 bp 突变者的临床表型各异,范围从糖耐量正常到胰岛素依赖性糖尿病,也可引起更加严重的 MELAS 综合征(线粒体脑肌病、乳酸酸中毒和休克样发作综合征)、慢性进行性外侧眼肌麻痹(CPEO)、Parkinsons 病和心肌病等^[7],同一突变何以产生不同的临床表型尚不清楚,除了与突变 mtDNA 在不同组织中分布的异质性程度不同有关外,可能有其它线粒体或核基因突变的存在调节表现型。本例家系中存在 nt 3 243 和 nt 3 365 双重突变,前者位于 *tRNA^{leu(UUR)}* 的双氢尿嘧啶环中,该部位在进化中是高度保守的,该核苷酸可能与 tRNA 三叶草结构中氨基酸受体臂上的尿嘧啶残基形成第 3 位的氢键,以利于 tRNA 三级结构的形成,在氨基酰化反应中与氨基酰-tRNA 合成酶及核糖体相互作用。突变可能使多肽链合成中亮氨酸的掺入受到影响,造成线粒体蛋白质合成缺陷,影响呼吸链酶活性。后一突变位于 *ND* 1 区,导致 *ND* 1 高度保守区域的氨基酸替换,第 20 位密码子由原来编码非极性亮氨酸

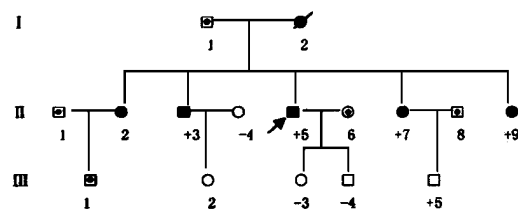


图 2 糖尿病家系图谱

Fig. 2 Pedigree of diabetic family

□ ○ Male and Female; ■ ● Patients of diabetes and deafness; □ ⊙ Undetermined; ● Proband; ● Deceased; + Mutant; - Normality

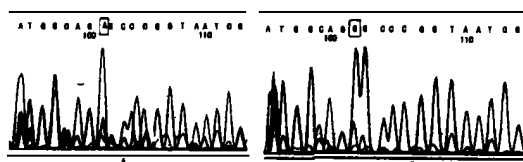


图 3 *tRNA^{leu(UUR)}* nt 3 243 A→G 突变序列分析结果

Fig. 3 Mitochondrial DNA sequence surrounding the mutated site in mitochondrial *tRNA^{leu(UUR)}* nt 3 243 A→G substitution

A: Normal mitochondrial gene; B: Mutated mitochondrial gene



图 4 *ND* 1 nt 3 365 T→A 突变序列分析结果

Fig. 4 Mitochondrial DNA sequence surrounding the mutated site in mitochondrial *ND* 1 nt 3 365 T→A mutation

A: Normal mitochondrial gene; B: Mutated mitochondrial gene

3 讨论

糖尿病是一组具有遗传异质性的综合征,不

(CTA)变为编成极性谷氨酰胺(CAA)。ND1蛋白是高度疏水的蛋白质,存在5个跨膜 α -螺旋二级结构,牛、鼠和爪蟾等不同物种的ND1亚单位第20位氨基酸均是亮氨酸,因此,谷氨酰胺的替代可能会影响该蛋白质二级和三级结构的形成或稳定性,使复合物I酶活性改变。

Ozawa等^[8]观察到双重突变的个体比单个纯syn突变者临床表型更为严重,其寿命更短。Jaksch等^[9]在一个患有MELAS综合征、扩张性心肌病和胰岛素依赖型糖尿病家系中发现*tRNA^{Leu(UUR)}* nt 3 243 A→G和ND1基因nt 3 365→C双重突变,先证者的复合物I酶活性明显降低;而另外两例无关的MELAS 3 243突变者的复合物I酶活性正常。类似的情况在遗传性视神经病(LHON)中也很常见^[10]。本研究家系中的3 365突变不存在于正常个体及其它5个3 243突变DM家系,且位于编码基因的高度保守区,导致氨基酸的替换,提示该突变与3 243突变一起在该家系中与DM的临床表型相关联。

参 考 文 献

- 1 Alcolado J C, Thomas A W. Maternally inherited diabetes mellitus: the role of mitochondrial DNA defects. *Diabetic Med*, 1995, 12: 102
- 2 张庆,曾瑞萍,杜传书,等.母系遗传糖尿病中线粒体*tRNA^{Leu(UUR)}*基因突变的研究. *中华医学遗传学杂志*, 1997, 14(2): 88
- 3 Anderson S, Bankier A T, Barrell B G, *et al*. Sequence and organization of the human mitochondrial genome.

Nature, 1981, 290(9): 457

- 4 Van den Ouweland J M, Lemkes H H, Ruitenbeek W, *et al*. Mutation in mitochondria *tRNA^{Leu(UUR)}* gene in a large pedigree with maternally transmitted type II diabetes mellitus and deafness. *Nat Genet*, 1992, 1: 368
- 5 Katagiri H, Asano T, Ishihara H, *et al*. Mitochondrial diabetes mellitus: prevalence and clinical characterization of diabetes due to mitochondrial *tRNA^{Leu(UUR)}* gene mutation in Japanese patients. *Diabetologia*, 1994, 37(5): 504
- 6 项坤三,陆惠娟,吴松华,等.线粒体*tRNA^{Leu(UUR)}*基因突变糖尿病的基因诊断. *中华医学杂志*, 1995, 75(4): 216
- 7 Goto Y, Nonaka I, Horoi S. A mutation in the *tRNA^{Leu(UUR)}* gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature*, 1990, 348: 651
- 8 Ozawa T, Katsumata K, Hayakawa M, *et al*. Mitochondrial DNA mutation and survival rate. *Lancet*, 1995, 345: 189
- 9 Jaksch M, Hofmann S, Kaufhold P, *et al*. A novel combination of mitochondrial tRNA and ND1 gene mutations in a syndrome with MELAS, cardiomyopathy, and diabetes mellitus. *Hum Mutat*, 1996, 7(4): 358
- 10 Wallace D C. Mitochondrial DNA sequence variation in human evolution. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 8739

(1998-03-31收稿 1998-07-30修回)

·新成果·

运动促进衰老脑神经元树突和突触可塑性的研究

课题负责人 姚志彬

(中山医科大学人体解剖学教研室; 广州, 510089)

本课题对运动作为健脑和防治脑衰老的机制进行了研究: ①建立运动模型 C57BL/6J 鼠跑转笼 8 个月和 19 个月, 以对照组心质量/体质量比率 2 倍标准差(SD)上限值为运动有效标准。②旷场试验和平衡术试验显示: 长期运动能够保留老年鼠对新环境探索的特征, 改善平衡协调及运动学习能力。③证明长期运动能够逆转衰老过程中海马胆碱能纤维的丢失, 促进侧枝抽芽, 为阐明运动改善学习记忆提供了形态学基础。④发现海马、脊髓和小脑突触素含量随增龄下降, 长期运动能延缓突触素的减少, 并增加突触数量, 为运动改善平衡协调能力提供了依据。⑤荧光偏振和 Fura-2 技术显示运动提高了脑突触体膜的流动性, 降低了突触游离 Ca^{2+} 浓度提示运动易化了突触传递和保护钙缓冲系统。⑥揭示长期运动减少了衰老过程中脊髓神经元的丢失, 促进神经元增大及树突的增生。该研究阐明运动延缓脑衰老作用机制, 并提出运动延缓脑衰老促进中枢神经系统(CNS)结构的可塑性代偿的新概念。于 1997 年获广东省自然科学三等奖

(陈丽芳)