

# 家族性糖尿病中线粒体 tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> 基因突变的发生率及临床特点<sup>①</sup>

张庆<sup>1②</sup> 曾瑞萍<sup>1</sup> 杜传书<sup>1</sup> 修玲玲<sup>2</sup> 程桦<sup>3</sup>

(1 中山医科大学医学遗传学教研室: 广州, 510089

2 中山医科大学内分泌教研室 3 中山医科大学孙逸仙纪念医院内分泌科)

**摘要** 应用 PCR-RFLP方法,对 140例有家族史的糖尿病患者的线粒体 tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>基因 nt3243A→G 突变进行筛查,结果发现 6例(4.3%)该突变基因阳性者。总结其主要临床特征为:①呈母系遗传 ②起病早(<40岁) ③多消瘦(BMI<24 mg/m<sup>2</sup>) ④继发性口服降糖药失效需用胰岛素治疗 ⑤多伴有神经性耳聋。本研究提示该突变在中国人家族性糖尿病群体中有较高的发生率;在临床上属于另一种糖尿病亚型。

**主题词** 突变; 线粒体 遗传学; RNA, 转移 遗传学; 糖尿病 遗传学

中图分类号 R 587.1

近年研究发现线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 突变是导致家族性糖尿病的原因之一。1992年, Ballinger<sup>[1]</sup> 等和 Van den Ouweland<sup>[2]</sup> 等分别在母系传递的糖尿病 (diabetes mellitus, DM) 伴耳聋家族中发现 mtDNA 10.4 kb 的缺失和 mtDNA tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> 基因 nt3243A→G 点突变, 为 DM 病因的遗传异质性提供了证据。研究表明, 3243 bp 突变是迄今为止所知的唯一一致糖尿病点突变, 为了解该突变在华南地区中国人家族性 DM 群体中的发生率及该类 DM 的临床特点, 我们对 140 例有一级亲属或母系亲属患病史的 DM 患者进行该基因的筛查, 并对基因突变阳性者的临床资料进行分析总结。

## 1 材料和方法

### 1.1 对象

从本校附属第一医院和孙逸仙纪念医院内分泌专科门诊就诊的 DM 患者中, 选择无亲缘关系, 家族中有两个以上一级亲属或母系亲属患 DM 的患者 140 例, 男 39 例, 女 101 例, 年龄 9~75 岁 (平均 54.17 岁 ± 11.41 岁), 其中胰岛素依赖型糖尿病 (IDDM) 14 例, 非胰岛素依赖型糖尿病 (NIDDM) 126 例。所有患者按照 1985 年 WHO 的糖尿病诊断标准进行诊断。另外选择 50 例正常人作对照, 男 18 例, 女 32 例, 年龄 25~68 岁 (平均 31.03 岁 ± 10.76

岁)。

### 1.2 DNA 抽提

研究对象空腹取静脉血 3~5 mL, 用 SDS 蛋白酶 K 于 50°C 水浴摇床中消化过夜, 苯酚、氯仿和异戊醇抽提白细胞总 DNA。

### 1.3 引物设计及 DNA 片段扩增

以线粒体 DNA nt(2993-3019) 和 nt(3467-3493) 为引物进行 PCR 扩增。在 0.5 mL 离心管中, 加入模板 DNA 100 ng, 10× PCR 缓冲液 3.0 μL, 4 种 dNTP 各 200 μmol/L, 一对引物各 10 pmol, TaqDNA 聚合酶 1.0 U, 反应总体积 30 μL。扩增产物为 501 bp, 经琼脂糖凝胶电泳鉴定。

### 1.4 PCR-RFLP 分析

mtDNA nt3243A→G 突变产生了 *Apa*I 酶切位点 (GAGCCC→GGCCCC) 和 *Hae*III 酶切位点 (AGCC→GGCC)。PCR 产物分别用 *Apa*I 酶 (promega 产品) 和 *Hae*III 酶 (天象人产品) 酶解, 37°C, 2 h。酶解产物经非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 硝酸银染色, 观察限制性片段长度大小, 识别突变。

### 1.5 阳性对照标本

为 1 例经测序证实为 3243A→G 突变的 DM 患者的 PCR 产物克隆质粒 (TA vector), 经转化、筛选、质粒 DNA 提取、酶切和纯化等步骤获取 3243 bp 突变阳性片段, 做为上述两种酶切的阳性对照。

① 卫生部科研基金资助项目; ② 第一作者, 女, 1959 年出生, 1994 级博士生

## 2 结果

### 2.1 突变筛选结果

在 140例有家族史的 DM 患者中检出 6例 (4.3%) 3243A>G 突变。突变患者的 PCR 产物经 *Apal* 酶切可见一个未酶解的 501 bp 片段和两个酶解的 250 bp 和 251 bp 片段 (重叠呈一条带), 无

突变者仅见 501 bp 的片段。 *HaeIII* 酶解突变者 PCR 产物可见 155 169 两个 97 72 65 和 15 bp 6 个片段, 无突变者只有 155 169 97 65 和 15 bp 5 个片段 (图 1, 图 2)。并且该突变是异质性的 (heteroplasmy), 即细胞内同时存在野生型和突变型两种 mtDNA, 故突变患者的 PCR 产物一部分被酶解, 一部分不能被酶解。50例正常对照组中未发现该突变。

### 2.2 6例突变阳性者的临床资料

本组 6例突变阳性者的临床情况, 见表 1

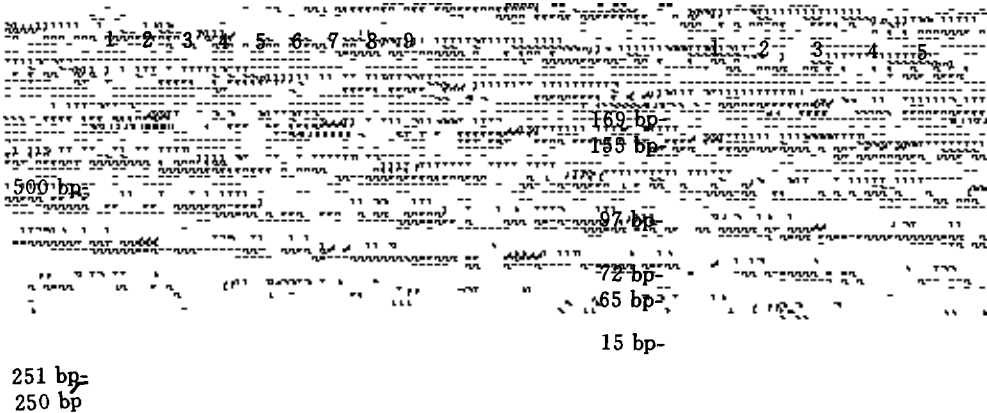


图 1 *Apal* 酶解 PCR 产物电泳图谱  
1 3243A>G 突变者; 2-7, 9 无突变者; 8 阳性对照

图 2 *HaeIII* 酶解 PCR 产物电泳图谱  
1, 4, 5 正常人; 2 3243A>G 突变者; 3 阳性对照

表 1 3243 bp 突变患者的临床和实验室资料

病 例	1	2	3	4	5	6
性 别	M	F	F	F	M	F
年龄 / 发病年龄 (岁)	50/39	36/32	45/29	36/35	40/25	63/52
体重指数 [ BMI (kg / m <sup>2</sup> ) ]	18.7	20.1	19.2	28.2	15	17.9
类 型	NIDDM	IDDM	NIDDM	NIDDM	IDDM	NIDDM
目前治疗	胰岛素	胰岛素	胰岛素	磺脲类	胰岛素	胰岛素
耳 聋	+	+	+	-	+	
糖基化血红蛋白 (%)	8.4	8.2	11.8	6.7	13.9	9.7
胰岛细胞抗体	+	-	+	-	-	
胰高糖素-C肽释放试验 (pmol / mL)						
空腹	0.12	0.36	0.35	1.01	0.27	0.56
6 min	0.44	0.67			0.32	0.75
胰高糖素胰岛素释放试验 (mU / L)						
空腹	< 2.5	3.3	< 2.5			
6 min	3.1	15	< 2.5			

### 3 讨论

我们在 140 例有家族史的 DM 患者中发现 6 例 mtDNA tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> nt3243A→G 突变,发生率为 4.3%,比文献报道的调查值为高,这可能与调查对象的选择标准不同及种族间的差异有关。例如 Otabe<sup>[3]</sup>等在随机抽样的日本 DM 病人中检出该突变率为 0.9%; Vionet 等<sup>[4]</sup>报道在有阳性家族史的法国人 NIDDM 群体中该突变发生率是 1.9%。提示本病并不罕见,比其它致糖尿病的候选基因如胰岛素基因、胰岛素受体基因及葡萄糖激酶基因突变在 DM 群体中的检出率高<sup>[3]</sup>。

从 6 例突变阳性者的临床资料中总结其主要临床特征如下:①有家族史并呈母系遗传。经家系调查和家系成员的基因分析,证实突变基因由母亲传给子女,而父亲不传递该突变基因,这符合线粒体基因的母系遗传方式,家系分析详见另文报道。②发病年龄较早,多 < 40 岁。③消瘦, BMI 多 < 24 kg/m<sup>2</sup>, 仅病例 4 BMI 为 28.2 kg/m<sup>2</sup>。④继发性口服降糖药失效,需用胰岛素治疗。5 例患者中除 2 例 IDDM 外, 3 例 NIDDM 随着病情进展,逐渐出现对胰岛素的依赖;病例 4 因患病仅半年,现服用口服降糖药。⑤不同程度的神经性耳聋。4 例患者有耳聋, 1 例(病例 6)因死亡未检查,发生率在 60% 以上,均出现于 DM 后数年,DM 和耳聋的因果关系尚不清楚。⑥胰岛 β-细胞功能进行性损害,胰岛素分泌降低,但胰岛细胞抗体(ICA)检测可为阴性。6 例中有 2 例 NIDDM 者 ICA 阳性,这可能由于含有 mtDNA 突变的 β-细胞不稳定性增加,诱发自身免疫介导的 β-细胞破坏。Oka 等<sup>[5]</sup>曾报道过部分 3243 bp 突变的 NIDDM 患者 ICA 呈阳性。以上特征与近年来报道的突变家系情况相似<sup>[2,3,6-9]</sup>。有学者认为,该类 DM 属于一种特殊的亚型,称其为慢性进行性 IDDM 或胰岛素需要型 NIDDM<sup>[7]</sup>。

对有上述临床特征尤其是数种情况并存者进行该突变基因的筛查。3243 bp A→G 突变产生了 *Apa*I 和 *Hae*III 酶切位点,可通过观察酶解片段参照阳性对照来识别该突变,无需进行测序分析。因为线粒体 DNA 突变是异胞质性的,有时白细胞中突变 mtDNA 含量很低 (< 5%),很难检出或漏诊。为了能敏感准确地筛查突变,本研究应用一对特殊引物,将突变位点设计在扩增片段 501 bp 的中间位置

(250 bp 处), *Apa*I 酶解后产生 250 bp 和 251 bp 两个片段,增强了酶解带的强度。此方法简便、敏感,适用于临床筛查。

在选择筛查对象时,应注意:这类患者的家族史常常不完全,因为许多亲属从未做过糖尿病的各项检查或发病前已死亡;对母亲无病或已亡故,而家族中有母系亲属或兄弟姐妹患病者也应列为筛查对象。对有 3243 bp 突变的 DM 患者,临床医师应注意早期未发现神经性耳聋,进行听力检测,晚期使用听力辅助。这类患者由于线粒体氧化磷酸化功能受损,可辅以抗氧化剂治疗,如辅酶 Q、抗坏血酸盐等,据报道有较好疗效<sup>[10]</sup>。

### 参 考 文 献

- 1 Ballinger SW, Shoffner JM, Hedaya HV, *et al.* Maternally transmitted diabetes and deafness associated with a 10.4 kb mitochondrial DNA deletion. *Nature Genet*, 1992, 1: 11
- 2 Van den Ouweland JMW, Lemkes HHPJ, Ruitenbeek K, *et al.* Mutation in mitochondrial tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> gene in a large pedigree with maternally transmitted type II diabetes mellitus and deafness. *Nature Genet*, 1992, 1: 368
- 3 Otabe S, Sakura H, Shimokawa K, *et al.* The high prevalence of the diabetic patients with a mutation in the mitochondrial gene in Japan. *J Clin Endocrinol Metab*, 1994, 79: 768
- 4 Vionet N, Passa P, Froguel P. Prevalence of mitochondrial gene mutation in families with diabetes mellitus. *Lancet*, 1993, 342: 1429
- 5 Oka Y, Katagiri H, Yazaki Y, *et al.* Mitochondrial gene mutation in islet cell-antibody-positive patients who were initially non-insulin-dependent diabetic. *Lancet*, 1993, 342: 527
- 6 Katagiri H, Asano T, Ishihara H, *et al.* Mitochondrial diabetes mellitus prevalence and clinical characterization of diabetes due to mitochondrial tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> gene mutation in Japanese patients. *Diabetologia*, 1994, 37: 504
- 7 Kadowaki T, Kadowaki H, Mori Y, *et al.* A subtype of diabetes mellitus associated with a mutation of mitochondrial DNA. *New Engl J Med*, 1994, 330: 962
- 8 Iwanishi M, Obata T, Yamada S, *et al.* Clinical and laboratory characteristics in the families with diabetes and a mitochondrial tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> gene mutation. *Diab*

Res Clin Prac, 1995, 29: 75

- 9 项坤三, 陆惠娟, 吴松华, 等. 线粒体 tRNA<sup>leu(UUR)</sup>基因突变糖尿病的基因诊断. 中华医学杂志, 1995, 75(4): 216

abetic amyotrophy associated with 3243 mitochondrial tRNA<sup>leu(UUR)</sup> mutation and successful therapy with coenzyme Q<sub>10</sub>. Endocr J, 1995, 42: 141

- 10 Suzuki Y, Kadowaki H, Atsumi Y, *et al*. A case of di-

(1996-09-09收稿 1996-10-26修回)

## PREVALENCE OF MITOCHONDRIAL tRNA<sup>leu(UUR)</sup> GENE MUTATION IN DIABETIC PATIENTS WITH FAMILY HISTORY AND CLINICAL CHARACTERIZATION OF THE SUFFERED PATIENTS

Zhang Qing<sup>1</sup> Zeng Ruiping<sup>1</sup> Du Chuanshu<sup>1</sup> Xiu Lingling<sup>2</sup> Cheng Hua<sup>3</sup>

(1 Department of Sun Yat-sen Medical Genetics, 2 Endocrinology of First Affiliated Hospital,

3 Endocrinology of Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510089)

There is suggestion recently that an A to G transition at nucleotide pair 3243 of the mitochondrial gene, a tRNA<sup>leu(UUR)</sup> mutation may play a role in the pathogenesis of diabetes mellitus. To assess the prevalence of this mutation in South China, we screened 140 unrelated diabetic patients with family history of diabetes using polymerase chain reaction (PCR) and restriction fragment length polymorphism (RFLP). Six patients (4.3%) were identified as having this mutation. There was none with this mutation in 50 normal controls. Those with the mutation possess the following clinical features: ① the mitochondrial gene is maternally inherited; ② the age of diabetes onset is lower (< 40 years old); ③ the patients relatively have lean constitutions (BMI < 24 kg/m<sup>2</sup>); ④ they more likely have to be treated with insulin due to secondary failure to oral hypoglycemic agents; ⑤ about 60% of them suffered from hearing loss. The study suggested that diabetes mellitus and deafness associated with the mutation represents a subtype of diabetes found in both patients with IDDM and NIDDM in China and the prevalence of the mutation is relatively high in diabetes mellitus with a family history.

**Subject headings** mutation; mitochondria/genetics; RNA, transfer/genetics; diabetes mellitus/genetics