

DOI: 10.1360/yc-007-0433

一个2型糖尿病家系中新发现的线粒体DNA G7444A突变分析

程祖建, 杨滨, 刘奇才, 江凌, 谢海花, 欧启水

福建医科大学附属第一医院检验科, 福建医科大学基因诊断研究室, 福建医科大学医学检验系, 福州 350005

摘要: 应用PCR-RFLP和测序对一个2型糖尿病家系的线粒体DNA G7444A的突变进行检测, 并分析其临床资料的特点。结果发现, 27例家系成员中, 11例母系亲属均存在线粒体DNA G7444A突变, 而配偶及父系亲属中未发现该突变。11例突变者中确诊为2型糖尿病患者5例, 糖耐量受损1例, 均表现为乳酸和血糖增高。因此, 线粒体DNA G7444A突变是该家系中糖尿病的遗传易感因素, 是导致2型糖尿病的一个新的突变位点。

关键词: 线粒体DNA; 2型糖尿病; G7444A突变

Study on a new point mutation of *mt7444 G→A* in the mitochondrial DNA in a type 2 diabetes mellitus family

CHENG Zu-Jian, YANG Bin, LIU Qi-Cai, JIANG Ling, XIE Hai-Hua, OU Qi-Shui

Department of Laboratory Medicine, The First Affiliated Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou 350005, China

Abstract: Polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) and direct sequencing were applied to detect a new point mutation of *mt7444 G→A* in the mitochondrial DNA in a type 2 diabetes mellitus family. The related clinical data were also collected and analyzed. mtDNA *G7444A* mutation in the cytochrome c oxidase I (COI) gene was found in 11 of 27 cases, all of whom were from the maternal side. Among them, 5 were confirmed to have type 2 diabetes mellitus, and one had impaired glucose tolerance. We conclude that the novel point mutation of mtDNA *G7444A* may be an independent factor associated with type 2 diabetes mellitus.

Keywords: mitochondrial DNA; type 2 diabetes mellitus; *mt7444 G→A* mutation

糖尿病(diabetes mellitus, DM)是常见的内分泌代谢性疾病之一, 遗传因素在其发生中起重要作用。线粒体DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)突变作为重要的遗传因素, 是导致家族性糖尿病的重要原因, 并成为糖尿病领域的研究热点^[1]。目前已发现多个与糖尿病有关的线粒体DNA的突变, 如最常见的

*nt3243A→G*突变。此外, 在tRNA^{Leu(UUR)}基因内还发现了超过10个与糖尿病相关的突变位点, 如*nt3252T→C*、*nt3250C→T*、*nt3256C→T*、*nt3260A→G*、*3316G→A*突变等^[2,3]。我们在对2型糖尿病患者进行线粒体DNA突变位点筛查中, 新发现了线粒体DNA COI基因区存在7444 G→A突变的一个大家系。

收稿日期: 2006-07-17; 修回日期: 2006-09-22

基金项目: 福建医科大学科学研究发展基金(编号: FJGXY04005)资助[Supported by Science Development Foundation of Fujian Medical University (No. FJGXY04005)]

作者简介: 程祖建(1974—), 男, 福建人, 硕士研究生, 专业方向: 基因诊断。Tel: 0591-87982326; E-mail: chengzujian@163.com

通讯作者: 欧启水(1970—), 男, 福建人, 博士, 副教授, 研究方向: 基因诊断。Tel: 0591-83340702; E-mail: ouqishui@163.com

1 对象和方法

1.1 对象

1 个 2 型糖尿病家系, 共 4 代 27 例(图 1)。其中患病 5 例, 分别为 2、2、5、7、9; 糖耐量受损 1 例(3); 先证者(5), 男性, 55 岁, 诊断为 2 型糖尿病已 15 年, 糖尿病肾病 2 年, 左眼白内障切除 3 年, 双眼重度近视, 近 2 年出现听力轻度下降。27 例成员中, 包括直系亲属 17 例(母系亲属 11 例, 父系亲属 6 例), 配偶 10 例。糖尿病的诊断参考 1997 年美国糖尿病协会制定的诊断标准, 即空腹 8 h 后, 血浆葡萄糖浓度 ≥ 126 mg/dL (7.0 mmol/L) 或者餐后的血浆葡萄糖浓度 ≥ 200 mg/dL (11.1 mmol/L)。

1.2 方法

1.2.1 DNA 抽提

签署知情同意后, 取家系各成员外周血 5 mL。使用 Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit (Promega 公司) 提取 DNA, 按使用说明操作。

1.2.2 PCR 引物及 PCR 反应

用 Primer Express 软件自行设计引物, 上游引物: 5'-gctacaccctagaccacaaacta-3'; 下游引物: 5'-ccgtagtcggtgtactctgta-3' (由上海生工生物工程技术服务有限公司合成)。PCR 反应体积为 25 μ L, 含 50 ng 样品 DNA, 0.06 mol/L 引物, 0.2 mmol/L dNTP, 10 \times PCR 缓冲液 2.5 μ L, 2.0 mmol/L Mg²⁺, 1 U Taq 酶 (Promega 公司)。在 PE9700 热循环仪上 94 \times 5 min 热变性后, 94 \times 60 s 58 \times 60 s 72 \times 60 s, 循环 35 次, 72 \times 延长 10 min。1.5% 琼脂糖凝胶电泳观察结果。

1.2.3 PCR 产物纯化和酶切

(1) PCR 产物纯化: 使用 Promega 公司 Wizard[®]

DNA clean-up system kit, 按使用说明操作; (2) 限制性内切酶消化: PCR 产物 10 μ L 加入限制性内切酶 *Xba* (Promega 公司) 5 U, 37 \times 2 h。1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 观察酶切结果。

1.2.4 PCR 产物直接测序

PCR 产物送上海生工生物工程技术服务有限公司进行 DNA 纯化和测序。

1.2.5 临床资料收集

所有家系成员进行血糖、乳酸、脂类、胱抑素 C 测定, 记录家系成员的其它临床一般资料(年龄、性别、发病年龄、病程、家族史、并发症及治疗情况)。生化指标测定: 空腹血糖(GLU)(葡萄糖氧化酶法), 乳酸(LAC)(乳酸氧化酶法), 脂类(TG、LDL)(酶法), 胱抑素 C(速率比浊法)。

2 结果

2.1 PCR-RFLP

限制性内切酶 *Xba* 的酶切识别序列为 5'...TCTAGA...3', 酶切识别序列中任何一个碱基的改变, 都会导致原来存在的 *Xba* 酶切位点的消失。PCR 产物的酶切识别序列中如含有碱基突变, 用 *Xba* 内切酶切割时仍为 818 bp 1 条带, 而无此突变的扩增片段则被切割成 482 bp 和 336 bp 2 条带。本家系检测的 27 例成员中有 16 例出现 482 bp 和 336 bp 两条带, 酶切序列突变阴性; 有 11 例样品酶切后可见 1 条 818 bp 条带, 酶切序列突变阳性(图 2)。

2.2 DNA 序列分析

对相应的 PCR 产物进行 DNA 测序。结果与 NCBI 网站上公布的 mtDNA 标准序列(NC 001807) 比对, 限制性内切酶 *Xba* 酶切阳性的结果均被证实为 mtDNA G7444A 突变(图 3)。

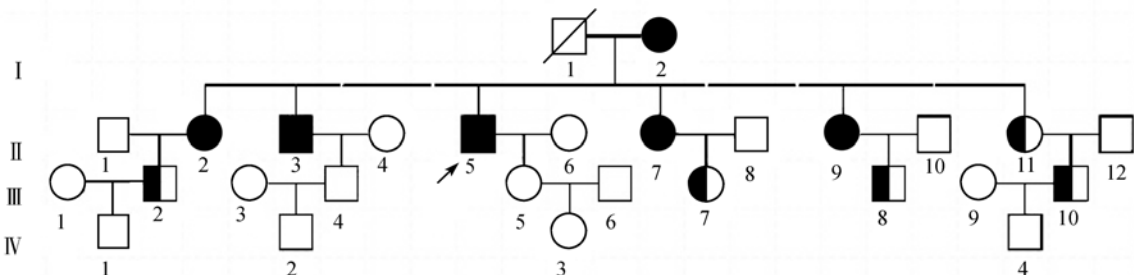


图 1 2 型糖尿病患者家系图

: 先证者; \bullet : 2 型糖尿病患者; \square : 正常人; \blacksquare : mtDNA G7444A 突变携带者。

Fig. 1 Pedigree of the family with type 2 diabetes mellitus

: Indicates the proband; \bullet : Type 2 Diabetes Mellitus; \square : Normal; \blacksquare : Obligate carrier.

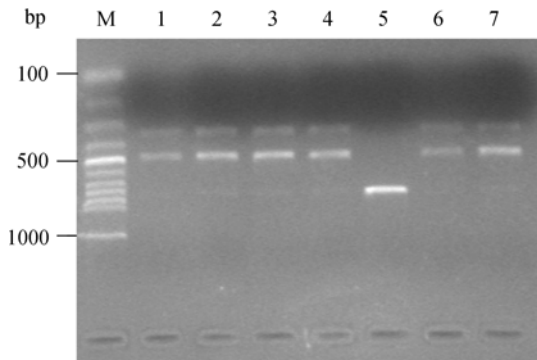


图 2 含 mtDNA 7444 位点的 PCR 产物的限制性内切酶 (*Xba*) 酶切结果

M: Marker; 1 4, 6, 7: mtDNA 7444 未突变的 PCR 产物酶切结果; 5: mtDNA 7444 突变的 PCR 产物酶切结果。

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis results of PCR products containing mtDNA 7444 site cut by *Xba*

M: 100 bp ladder; 1 4, 6, 7: PCR products with wildtype mtDNA7444 cut by *Xba* ; 5: PCR product with mutated mtDNA7444 cut by *Xba* .

2.3 临床资料

临床资料见表 1, 可见 mt DNA G7444A 突变阳性的成员乳酸及血脂的值高于正常人。

3 讨论

线粒体是细胞内的重要细胞器, 是细胞的供能场所, 通过氧化磷酸化合成 ATP 供给细胞各种生命活动的需要。线粒体 DNA 具有独特的遗传学特性, 包括母系遗传、易突变、异质性与阈值效应等特点。由于线粒体内的氧化磷酸化在胰岛 细胞胰岛素分泌过程中的重要作用, 使 mtDNA 突变所致的线粒体糖尿病(MIDD) 成为糖尿病(DM) 的一个重要类型。

通过分析该突变家系的临床资料, 发现具有以下特征:(1)呈母系遗传: 家系中先证者的母亲亲属均存在 mtDNA G7444A 突变, 而配偶及父系亲属未见该突变;(2) 突变与糖尿病: 11 例突变者中 5 例已被诊断为 2 型糖尿病, 糖耐量受损 1 例;(3) DM 起病年龄: 本家系 5 例 mtDNA G7444A 突变的 DM 患者平均起病年龄为 45.5 岁, 表现中年起病;(4) 乳酸和血脂: 家系中 mtDNA G7444A 突变阳性者的乳酸和血脂均超过正常范围。上述特点表明该家系发病符合线粒体病的一般特征。本家系中糖尿病特点为母系遗传、中年起病、血脂高、乳酸高、多伴有其他临床

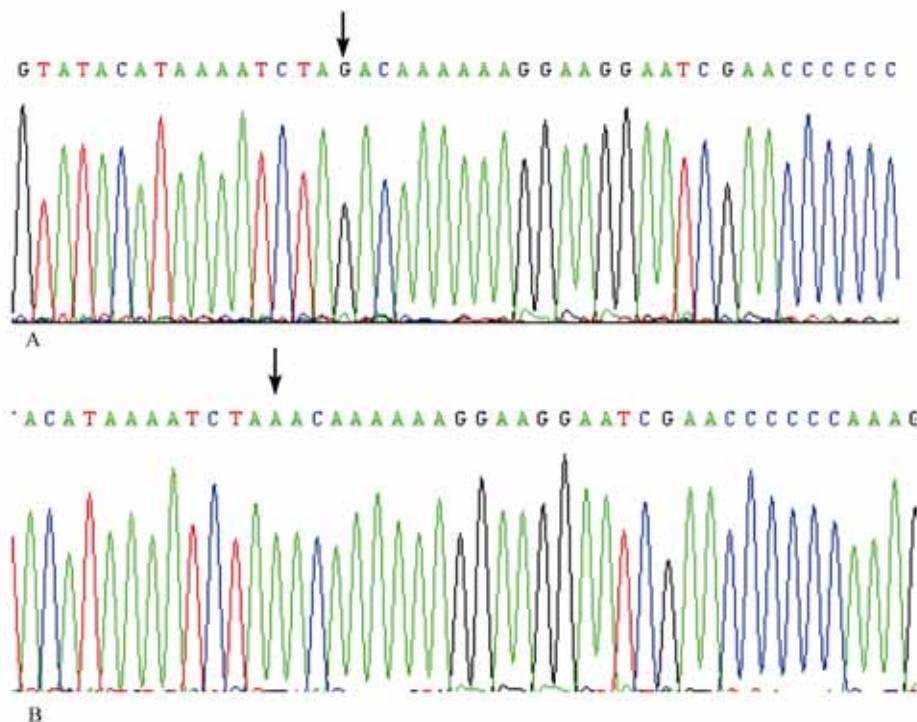


图 3 部分含 mtDNA 7444 位点的 PCR 产物测序的结果

A: 图中箭头所示 G 为 mtDNA 7444 正常位点; B: 图中箭头所示 A 为 mtDNA 7444 位点发生突变(G A)。

Fig. 3 Sequence of PCR products containing mtDNA 7444

A: Normal control, the arrow indicates the wildtype nucleotide; B: A patient of the pedigree family, with the arrow indicating the mutated nucleotide (G A).

症状、经胰岛素治疗有效等。Brown等^[4]首先报道了mtDNA G7444A突变与Leber遗传性视神经病(LHON)相关。目前,国内外mtDNA G7444A突变与2型糖尿病的关系尚未见报道。本文发现的mtDNA G7444A突变的糖尿病家系,系国内外首次报道。

本家系中5例mtDNA G7444A突变阳性,但目前血糖正常,其年龄都小于40岁。而家系中多数mtDNA G7444A突变的糖尿病患者是中年起病。因此不能排除突变携带者随年龄增长出现糖耐量异常或糖尿病的可能。我们将做进一步随访。

研究表明,线粒体COI基因区mtDNA 7444点突变改变了电子传递酶复合物VI(细胞色素氧化酶C, COI)的多肽结构,即COI基因的末端终止密码子AGA改变为AAA,使由COI基因翻译出的COI亚单位在C末端增加了额外的3个氨基酸(赖氨酸-谷氨酰胺-赖氨酸),延长了原来的氨基酸序列,影响细胞色素氧化酶C的活性,阻碍了呼吸链上的电子传递过程,影响能量的合成^[4]。另外该突变也可能改变线粒体DNA的空间结构,影响转录、翻译的顺利进行,使ATP合成相对不足,胰岛β细胞的ATP依赖性K⁺通道不能正常关闭,胰岛素分泌减少,导致糖尿病的形成^[5]。Guan等^[6]通过实验证明tRNA^{ser(UCN)}前体上A7445G突变导致tRNA^{ser(UCN)}前体加工缺陷,引起tRNA^{ser(UCN)}稳定性和ND6的rRNA量的明显下降。可以推测,与7445突变毗邻的mtDNA G7444A突变可能也会以相同机制造成线粒体功能下降。

参考文献(References):

- [1] Maassen JA, Van Essen E, Van den Ouweland JM, Lemkes HH. Molecular and clinical aspects of mitochondrial diabetes mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2001, 109(3): 127-134.
- [2] Tawata M, Ohtaka M, Iwase E, Ikegishi Y, Aida K, Onava T. New mitochondrial DNA homoplasmic mutation associated with Japanese patient with type 2 diabetes. *Diabetes*, 1998, 47(2): 276-277.
- [3] ZHOU Xiao-Lei, ZHANG Li-Shan, HUANG Ying, TIAN Cheng-Gong, QIU Ding-Hong, LU Ming-Hua, ZHANG Zhi-Ping. Mitochondrial DNA mutation associated with NIDDM. *Hereditas* (Beijing), 1997, 19(2): 5-8. 周晓雷, 张丽珊, 黄鹰, 田成功, 邱定红, 陆明华, 张志平. 线粒体基因突变与NIDDM发生的关系. *遗传*, 1997, 19(2): 5-8.
- [4] Brown MD, Yang CC, Trounce I, Torroni A, Lott MT, Wallace DC. A mitochondrial DNA variant, identified in Leber hereditary optic neuropathy patients, which extends the amino acid sequence of cytochrome oxidase subunit I. *Am J Hum Genet*, 1992, 51(2): 378-385.
- [5] Maassen JA, Thart LM, Van Essen E, Heine RJ, Nijpels G, Jahangir Tafrechi RS, Raap AK, Janssen GM, Lemkes HH. Mitochondrial diabetes: molecular mechanisms and clinical presentation. *Diabetes*, 2004, 53: 103-109.
- [6] Guan MX, Enriquez JA, Fischel-Ghodsian N, Puranam RS, Lin CP, Maw MA, Attardi G. The deafness associated mtDNA 7445 mutation, which affects tRNA^{ser(UCN)} precursor processing, has long-range effects on NADH dehydrogenase ND6 subunit gene expression. *Mol Cell Biol*, 1998, 18(10): 5868-5879.

•遗传咨询•

地中海贫血的基因诊断

问:我在南方某市妇幼保健院做地中海贫血基因诊断检查,结果如下:α地中海贫血-1杂合子,基因型:-SEA/αα。

(1)医生说是患有α型地中海贫血,请问这是重型还是轻型?此结果是什么意思?(2)因我已怀孕20周,医生让我老公也去做地中海贫血基因检查,可是他的血常规检查正常,还有必要去吗?(3)如果他也是地中海贫血,做羊膜腔穿刺在第几周合适?

答:(1)基因检查结果是轻型α地中海贫血(地贫),表示携带东南亚型缺失地贫基因,又称α地贫-1携带者或杂合子,指一条染色体上的两个α珠蛋白基因全部缺失,另一条上的两个正常,表现为正常或轻度贫血。(2)血常规中,与地贫有关的项目主要是平均红细胞体积(MCV)和血红蛋白浓度(Hb),个别轻型地贫患者这两个指标也可以正常,但专项地贫筛查试验如红细胞脆性试验可能异常。为慎重起见,男方最好也做个地贫筛查。如果男方为南方人,特别是两广地区的,因该地区α地贫基因人群携带率高达10%左右,可考虑做个基因检查,以排除携带α地贫基因的可能。(3)如果男方也携带α地贫基因,则有1/4机会生育重型α地贫患者,可以进行产前基因诊断来判别,如果确诊为重型α地贫患胎,一般主张终止妊娠。羊水穿刺一般在16~20周为宜,超过此时间可以进行脐带血穿刺检查。目前广东、广西、海南等地的大医院都能开展地贫的基因诊断。

(咨询专家:李巍)