

• 研究报告 •

线粒体基因突变与 NIDDM 发生的关系

周晓雷 张丽珊 黄 鹰 田成功^①

邱定红 陆明华 张志平^②

(南京铁道医学院生物学教研室, 南京 210009)

摘 要 采用 PCR-SSCP、PCR-RFLP 及 PCR 产物直接测序等技术对 90 例 NIDDM (即非胰岛素依赖型糖尿病)及 80 例正常对照个体的血细胞线粒体 DNA 进行了突变分析。结果在 2 例患者中发现线粒体 DNA(mitochondrial DNA, mtDNA) ND1(NaDH Dehydrogenase subunit I)基因上 3 316 位点存在 G→A 的点突变, 导致丙氨酸错义突变成苏氨酸, 而在 80 例正常对照个体中均不存在此位点突变。国内外已证实的和 1.5% NIDDM 发生有关的 mtDNA tRNA Leu^(UUR)基因上 3 243 位点 A→G 的突变在本实验中并未发现。由此推断, 3 316 位点 G→A 的突变可能与 NIDDM 的发生有关, 3 243 位点 A→G 的突变率确实很低, 可见糖尿病的发生在线粒体遗传上具有广泛的异质性。

关键词 非胰岛素依赖型糖尿病, 线粒体 DNA, 错义突变

Mitochondrial DNA Mutation Associated with NIDDM

Zhou Xiaolei Zhang Lishan Huang Ying Tian Chenggong^③

Qiu Dinghong Lu Minghua Zhang Zhiping

(Department of Biology, Nanjing Railway Medical College, Nanjing 210009)

Abstract Using PCR-SSCP, PCR-RFLP and PCR product direct sequencing techniques, we analysed the mitochondrial DNAs (mtDNAs) of 90 patients with NIDDM (Non Insulin-Dependent Diabetes Mellitus) and those of 80 normal controls. The results showed that a G to A mutation which leads alanine's missense mutaton to threonine in the mitochondrial ND1(NaDH Dehydrogenase subunit I gene at nucleotide pair 3 316 occurred in the blood cells of 2 patients. We have not however, indentified with the A to G mutation at nucleotide pair 3 243 of the mitochondrial tRNA Leu^(UUR) gene, which has been reported to associate with NIDDM in about 1.5% of the diabetic population. We infer that the mutation at position 3316 is perhaps associated with the development of NIDDM, the occurance of the mutation at position 3243 is actually rare, and NIDDM has an intensive mitochondrial genetic heterogenous background.

Key words Non-Insulin dependent diabetes mellitus (NIDDM), Mitochondrial DNA (mtDNA), Missense mutation

①南京市鼓楼医院内分泌科 南京 210008.

②Department of Molecular Medicine and Laboratory Medicine, Karolinska Hospital, Stockholm, Sweden.

③Department of Endocrinology, Gulou Hospital, Nanjing 210008.

近年来的分子遗传学研究表明,少数非胰岛素依赖型糖尿病的发生与线粒体基因突变有关。1992年, Ballinger SW 等人首先报道一个伴感觉神经性耳聋的符合母系遗传方式的糖尿病家系,该家系患者的线粒体 DNA 中有一个 10.4kb 片段的缺失⁽³⁾。随后, Reardon 和 Vanden Ouwelard 等人又分别发现了线粒体 tRNA Leu 基因 3243 位点 A→G 突变的 NIDDM 家系。此后国内外的研究不仅证实了这一突变位点存在于少部分 NIDDM 家系及散发病例中^(2,5,7-11,12,14),而且发现 tRNA Leu^(UUR) 基因是突变热区,其上至少有 4 个位点与糖尿病发生有关,说明糖尿病在线粒体遗传上具有异质性。本实验拟进一步研究 tRNA Leu^(UUR) 3243 位点在中国 NIDDM 人群中的突变率,同时筛查其他可能与 NIDDM 发生有关的基因突变。

1 对象和方法

1.1 病例筛选

为提高 3243 位点及潜在位点的检出率,仅对符合以下一种或数种条件的 NIDDM 患者进行基因筛查:(1)有家族史;(2)起病年龄早,一般 < 40 岁;(3)无肥胖,病情较重且需用胰岛素治疗;(4)伴神经性耳聋或其他系统如眼(眼外肌麻痹,视网膜色素变性)、神经等线粒体神经肌肉性疾病表现者。病例由南京市鼓楼医院内分泌科田成功主任提供。

1.2 常规苯酚/氯仿法抽提患者周围血细胞中的基因组 DNA

1.3 PCR 扩增

采用 Perkin/Cetus 公司热循环仪进行扩增,所用的一对引物由中国科学院上海细胞生物学研究所合成:

L 链(3130~3149) 5'-AGGACAAGAGAAATAAGGCC-3'

H 链(3423~3403) 5'-CACGTTGGGGCCTTTGCGTA-3'

建立 25 μ l 反应体系,内含 0.5 μ g 总 DNA 为模板,先经 94 $^{\circ}$ C 变性 3 分钟后,加入 0.7 μ l(2.1U)的 Taq 酶循环 30 个周期(每个周期 92 $^{\circ}$ C 30 秒, 58 $^{\circ}$ C 30 秒, 72 $^{\circ}$ C 30 秒),最终 72 $^{\circ}$ C 延长 10 分钟。

1.4 PCR 产物的 SSCP 检测

取 4 μ l 产物,加入 4 μ l 甲酰胺, 4 μ l 溴酚蓝/二甲苯青混合液,混匀,98 $^{\circ}$ C 变性 10 分钟后迅速置于冰浴中。加入 6%非变性聚丙烯酰胺凝胶(交联度为丙烯酰胺:亚甲双丙烯酰胺=29:1,离子强度为 0.5 \times TBE,甘油浓度为 5%)加样孔中,500V 于 20 $^{\circ}$ C 恒压电泳 2 小时。电泳结束后,将凝胶取下,依次用固定液(10%无水乙醇+0.5%冰乙酸)浸泡 10 分钟,用双蒸水洗涤 2 次,加入 0.2% AgNO₃,室温于摇床上染色 10 分钟,双蒸水短暂漂洗 2 次,最后加入显色液(1.5% NaOH+0.4%甲醛)直到出现清晰条带为止(约 10 分钟),10%醋酸定影,并照相。

1.5 PCR 产物 HaeIII 酶解的 RFLP 分析

取 PCR 产物 4 μ l, 10 \times buffer c 缓冲液 3 μ l, HaeIII 酶 1 μ l(24U),建立总体积为 30 μ l 的反应体系,37 $^{\circ}$ C 下温育过夜。于 8%非变性聚丙烯酰胺凝胶 200V 恒压电泳 3 小时,然后将凝胶取下,EB 染色 45 分钟,紫外灯下观察酶切图谱并照相。

1.6 PCR 产物的序列分析

取 1 μ l PCR 产物,稀释 500 倍,再从中取 1 μ l 进行非对称性 PCR 扩增。引物 I 和 II 的比例为 1:50,其余条件同 1.3 PCR 扩增。结束后,按 Pharmacia T₇ 试剂盒说明书进行测序。反应结束后,于 6%变性聚丙烯酰胺凝胶 2500V 恒压电泳 3 小时,然后将凝胶取下,用 Saran 保鲜膜覆盖,-70 $^{\circ}$ C 放射自显影 36 小时。

2 结果

2.1 PCR-SSCP-银染结果

同正常对照及阳性标本相比,图 1 中两例患者的第三条带位置稍高,故异常。

2.2 PCR-HaeIII 酶解-RFLP 结果

无突变者, 电泳见 169bp、97bp 两条带。若 3 243 位点有 A→G 突变, 可形成一个新的突变位点, 电泳应见 169 bp、97 bp、72 bp 3 条带(图 2), 2 例患者的电泳结果只有 280bp 左右的 1 条带, 说明其 3 316 位点附近的酶解识别位点丧失。所有标本中均未发现有 3 243 位点处的突变。

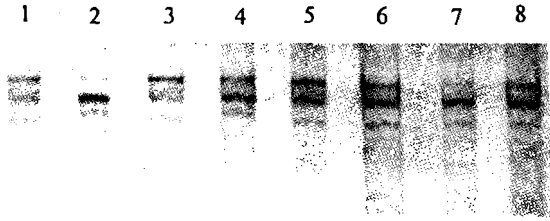


图 1 PCR-SSCP 银染结果 (2、4 异常)

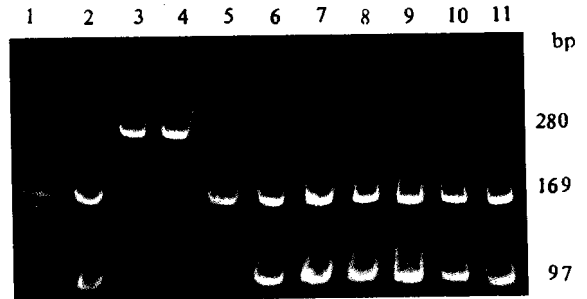


图 2 PCR-RFLP 结果 (3、4 异常)

2.3 PCR 产物序列分析结果

由图 3 可见, 2 例患者线粒体 DNA H 链 3 316 位点处 C 突变为 T, 相应于 L 链 G 突变为 A。

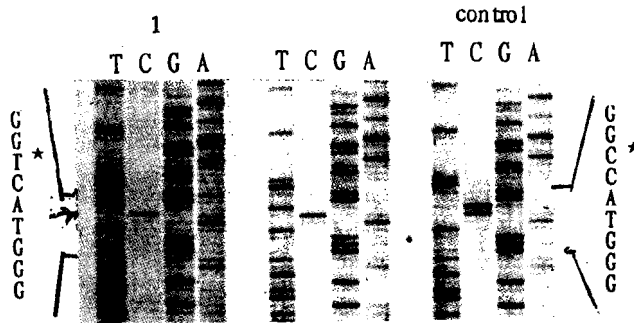


图 3 患者线粒体 DNA 序列分析结果

箭头示 1、2 号标本的第 3316 位点出现转换; ★ 示突变碱基

3 讨 论

国内外研究证实, tRNA Leu^(LUR) 基因 3 243 位点的突变率较低, 只发生在 1.5% 的 NIDDM 人群中。尽管本实验所筛查的病例属于容易发生此位点突变的 NIDDM 人群, 但并未检出阳性病例, 这并不表明此突变位点在中国 NIDDM 人群中不存在 (上海市第六人民医院项坤三教授曾报道了一个阳性家系^[1]), 而是进一步证实了此位点的突变率确实很低, 可能在整个中国人群中或本实验病例来源区中更低一些。另外本实验中的 mtDNA 取自患者的血细胞, 而研究表明在血细胞中 mtDNA 突变数量要低于成纤维细胞、骨骼肌、上皮细胞等, 这也是未检出 3 243 位点突变的原因之一。

线粒体是细胞能量产生的场所, 经氧化磷酸化(Oxphos)过程合成的 ATP 用于供给细胞各种生理活动的需要, 包括胰岛 β 细胞分泌胰岛素。线粒体 DNA 是最经济、最实用的 DNA 分子, 几乎全部由编码区组成, 线粒体 DNA 上发生的任何突变几乎都伴有 Oxphos 功能上的改变。现已公认, 胰岛素分泌缺陷是 NIDDM 发病的主要原因之一, 因此, mtDNA 的突变必将与 NIDDM 的发生有关。

3 316 位点位于呼吸链复合物 I(coI) *ND1* 基因上。3 316 位点处于 *ND1* 基因上的一个跨膜(α 螺旋区域)上, 在

不同的物种,其组成氨基酸均是疏水性的,如非洲蟾蜍属为异亮氨酸,小鼠为亮氨酸,牛为异亮氨酸⁽⁶⁾。其G→A的点突变导致疏水性的甘氨酸(GCC)错义突变成亲水性的苏氨酸(ACC)。此外,本实验在对照组中未检出此位点突变,进一步说明此位点保守度较高,因此,该位点的突变可能引起复合物I功能障碍,从而影响胰岛β细胞产生和分泌胰岛素的功能,导致糖尿病。

目前已证明,NDI基因上的突变确实具有功能意义。例如,已发现其4160位点T→C突变,3460位点G→A突变,4136位点A→G的突变均能引起Leber氏遗传性视神经病(LHON)⁽⁶⁾,这也从侧面提示了NDI基因突变和NIDDM的发生有关。

即使这一位点属于多态,它们也能影响线粒体的Oxphos功能,Dionne等人的实验支持这一观点⁽⁴⁾。大部分随机突变似乎是中性的,但这只意味着它们对Oxphos功能的影响还没有达到发病的程度。另外,即使是表型哑突变也可以轻度改变线粒体产能装置的功能,从而增加或降低对某种疾病的易感性。本实验筛查出的3316位点也可能属于这类情况,突变使患糖尿病的易感性增加,在其他遗传及环境因素的协同作用下发病。

本实验进一步证实了糖尿病在线粒体遗传上具有异质性。实验中发现的3316位点突变可能与糖尿病的发生有关。综合应用PCR、PCR-RFLP、PCR-SSCP技术可在临床上快速诊断及筛查NIDDM。

本实验仅涉及tRNA Leu^(UUR)基因邻近区域,mtDNA上可能还存在其他的突变位点,有待于进一步研究和证实。

参 考 文 献

- 1 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,1995,4(75):216~219
- 2 Awata T, Matsumoto T, *et al.* Japanese case of diabetes mellitus and deafness with mutation in mitochondrial tRNA Leu^(UUR) gene. *Lancet*, 1993, 341: 1291
- 3 Ballinger S W, Shoffner J M, *et al.* Maternally transmitted diabetes and deafness associated with a 10.4kb mitochondrial DNA deletion. *Nature Genet.*, 1992, 1: 11~15
- 4 Dionne F T, Turcotte L, *et al.* Mitochondrial DNA sequence polymorphism VO_{2max} and response to endurance training. *Med. Sci. Sports Exere.*, 23: 177~185
- 5 Gerbitz K D, Paprotta A, *et al.* Diabetes mellitus is one of the heterogenous phenotypic features of mitochondrial DNA point mutation within the tRNA Leu^(UUR) gene. *GEBS Lett*, 1993, 321: 194
- 6 Ian M, Fearnley, John E, *et al.* Conservation of sequences of subunits of mitochondrial complex I and their relationships with other proteins. *Biochemica et Biophysica Acta*, 1992, 1140: 105~134
- 7 Katagiri H, *et al.* Mitochondrial diabetes: clinical characterization of patients with mitochondrial tRNA Leu^(UUR) gene mutation and diabetes mellitus. *Lancet*, 1993, 42(suppl): 109A
- 8 Odawara W, Yamashita K. Mitochondrial gene mutation in Japanese diabetes mellitus. *Diabetes*, 1994, 43(Suppl): 223A
- 9 Otabe S, Sakura H, *et al.* The high prevalence of a mutation in the mitochondrial gene in diabetes patients in Japan. *Diabetes*, 1994, 43(Suppl): 169A
- 10 Reardon W, Ross R J M, *et al.* Diabetes mellitus associated with a pathogenic point mutation in mitochondrial DNA. *Lancet*, 1992, 340: 1376~9
- 11 Reardon W, Ross R J M, *et al.* Diabetes mellitus associated with a pathogenic point mutation in mitochondrial DNA. *Lancet*, 1992, 340: 1376
- 12 Sue C M, Holmes-Walker D J, *et al.* Mitochondrial gene mutation and diabetes mellitus. *Lancet*, 1993, 341: 437
- 13 van den Ouweland J M W, *et al.* Mutation in mitochondrial tRNA Leu^(UUR) gene in a large pedigree with maternally transmitted type 11 diabetes mellitus and deafness. *Nature Genet.*, 1992, 1: 368~371
- 14 Vilnnet N, Passa P, Groguel P. Prevalence of mitochondrial gene mutation in families with diabetes mellitus. *Lancet*, 1993, 342: 1429

1996-04-29 收稿, 1996-09-27 修回.