

云南地区 2 型糖尿病患者线粒体 tRNA^{Leu(UUR)}3243A/G 突变的筛查

石柔¹⁾, 雷又鸣²⁾, 宋滇平¹⁾, 普玲¹⁾, 韩睿¹⁾

(1) 昆明医科大学第一附属医院糖尿病科; 2) 干疗外科, 云南昆明 650032)

[摘要] **目的** 探讨线粒体 tRNA^{Leu(UUR)} 基因 3243 位点 A/G 突变在云南地区 2 型糖尿病 (T2DM) 患者中的发生率. **方法** 采用聚合酶链反应和限制性片段长度多态性分析 (PCR-RFLP)、DNA 测序技术, 对 235 例 T2DM 患者和 128 例糖耐量正常的健康对照者进行检测. **结果** 在 235 例 T2DM 患者及 128 例对照者中未检出线粒体 tRNA^{Leu(UUR)}3243 A/G 突变. **结论** 线粒体 tRNA^{Leu(UUR)} 基因 3243 位点 A/G 突变在云南地区 T2DM 人群中并不常见, 可能不是该地区 T2DM 的常见遗传易感因素.

[关键词] 2 型糖尿病; 线粒体 DNA; 突变

[中图分类号] R587.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095 - 610X (2014) 03 - 0044 - 03

Detecting of Mitochondrial tRNA^{ALeu(UUR)} Mutations at Position A3243G in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus in Yunnan

SHI Rou¹⁾, LEI You-ming²⁾, SONG Dian-ping¹⁾, PU Ling¹⁾, HAN Rui¹⁾

(1) Dept. of Diabetes; 2) Dept. of Vip Surgery Ward, The 1st Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650032, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the prevalence of the mitochondrial tRNA^{Leu(UUR)} mutations at position 3243A/G in patients with type 2 diabetes mellitus in Yunnan Province. **Methods** Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis and DNA sequencing were used to screen the point mutations of tRNA^{Leu(UUR)} 3243 A/G in 235 patients with type 2 diabetes and 128 healthy controls with normal glucose tolerance. **Results** There was no one carrier of the mitochondrial tRNA^{Leu(UUR)} mutation at position 3243A/G in T2DM group and control group. **Conclusions** The mitochondrial tRNA^{Leu(UUR)} gene at position 3243A/G mutation was uncommon and it may be not a major genetic predisposing factor of type 2 diabetic mellitus in patients of Yunnan Province.

[Key words] Type 2 diabetes mellitus; Mitochondrial DNA; Mutation

2 型糖尿病 (Type 2 diabetes mellitus, T2DM) 的病因尚未完全阐明, 目前认为多种因素, 包括遗传和环境因素及其相互作用与该病的发生密切相关. 随着分子生物学发展, 线粒体基因缺陷与糖尿病的关系倍受关注. 目前已报道和糖尿病相关的线粒体 DNA 突变位点已达 50 余个. 其中线粒体 tRNA^{Leu(UUR)} 基因 3243 位点 A/G 突变与糖尿病的关系成为研究热点, 并已在多个种族被发现,

但在不同国家及地区人群中患病率存在差异^[1]. 笔者欲通过 PCR-RFLP, 并结合 DNA 测序来探讨该突变在中国云南地区 2 型糖尿病人群中的发生频率, 同时为今后线粒体基因突变糖尿病的临床诊断及群体筛查奠定一定基础.

1 资料与方法

[基金项目] 云南省应用基础研究联合专项基金资助项目 (2010CD159)

[作者简介] 石柔 (1978~), 女, 云南开远市人, 医学硕士, 主治医师, 主要从事内分泌代谢病诊疗工作.

[通讯作者] 韩睿. E-mail: ruihan.6666@yahoo.com.cn

1.1 研究对象

随机选取据1999年WHO标准诊断为2型糖尿病的无血缘关系患者235例为糖尿病组(DM组),其中男127例,女108例,年龄(58.98 ± 13.50)岁,均为2010年7月至2012年2月于昆明医科大学第一附属医院住院的患者。同期在昆明医科大学第一附属医院体检的糖耐量正常且无糖尿病家族史的健康对照者128例为正常对照组(NC组),男62例,女66例,年龄(56.56 ± 4.28)岁。2组均为中国云南地区居住的汉族人,2组间年龄、性别无统计学差异。

1.2 方法

1.2.1 临床及生化指标检测 记录研究对象的性别、年龄、病程、家族史等情况。测量身高、体重、腰围、臀围并计算体重指数(BMI)和腰臀比(WHR)。禁食10h后次晨采静脉血,新鲜标本测定空腹血糖(FPG)及餐后2h血糖(2hFPG)、血脂,空腹及餐后2h胰岛素和C肽水平,糖化血红蛋白(A1C)值。

1.2.2 线粒体 tRNA^{Leu(UUR)} 基因 3243A/G 多态性分析 用酚/氯仿法提取外周血白细胞DNA作为模版。以寡核苷酸5'-AAG GTT CGT TTG TTC AAC GA-3'为上游引物,5'-AAC GTT GGG GCC TTT GCG TAG-3'为下游引物进行聚合酶链反应(PCR)。以50 μL体系进行PCR,其中DNA模板1 μL,10 × Buffer (MgCl₂-Free) 5 μL, MgCl₂ (25 mmol/L) 3 μL, DNTP (2.5 mmol/L) 1 μL,上下游引物(20 μmol/L)各1 μL, Taq DNA聚合酶(5 U/μL) 0.8 μL,双蒸水37.2 μL。PCR反应条件:95 °C预变性3 min;33个循环94 °C变性45 s、62 °C退火45 s、72 °C延伸45 s;最后72 °C延伸5 min。PCR产物5 μL以10 U限制性内切酶ApaI在恒温箱中37 °C水浴过夜。酶切产物在4%的琼脂糖凝胶中电泳,经溴化乙锭染色后观察结果。PCR产物纯化并交于大连宝生物工程有限公司进行单向测序加以确证。

2 结果

2.1 线粒体基因突变 PCR 产物的 RFLP 分析

线粒体 tRNA^{Leu(UUR)} 基因若发生3243A→G突变则产生新的酶切位点,因此G/G基因型有218 bp和175 bp的2条片段;A/G基因型有393 bp、218 bp和175 bp三条片段,若不发生突变,则无ApaI的酶切位点,因此A/A基因型只有393 bp一条片段(图1)。结果显示,235例2型糖尿病患者

和128例正常对照者均只见一条约393 bp的DNA片段,未见因3243 A/G变所致的218 bp和175 bp两条片段。

2.2 DNA 测序

PCR产物纯化并交于大连宝生物工程有限公司进行单向测序(图2)。DNA的测序结果与PCR-RFLP分析结果一致。

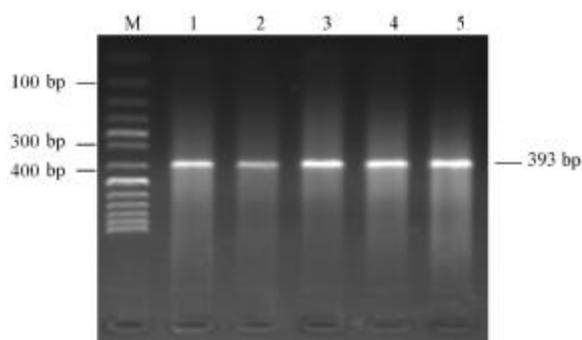


图1 线粒体 tRNA^{Leu(UUR)}基因 3243 位基因型电泳图

Fig. 1 Electrophoretogram of mitochondrial tRNA^{Leu(UUR)} at position 3243

M: 代表50 bp递增的DNA标记物(Marker), 1、2、3、4、5代表A/A基因型只有393 bp一条片段。

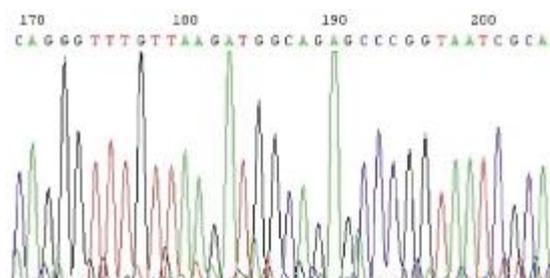


图2 A/A基因型对应的产物侧序图,箭头所指为3243位点

Fig. 2 Product sequencing of A/A genotype

3 讨论

线粒体(mt)是真核细胞内的重要细胞器,是能量储存和供给场所。mtDNA是独立于细胞核染色体外的基因组,具有自我复制、转录和编码功能。mtDNA无内含子,无组蛋白保护,在氧化磷酸化过程所产生的活性氧和自由基的影响下,其突变率比核DNA高10~20倍。因此mtDNA任何突变都可能影响线粒体的功能,引起多种疾病的发生。自从Van den ouweland等^[2]报道了母系遗传糖尿病耳聋综合(MIDD),自此揭开了线粒体基因突变糖尿病研究的序幕。迄今为止,已发现近50余个mtDNA突变位点与糖尿病相关。但tRNA^{Leu(UUR)} 3243A/G仍是目前国际上唯一一公

认的线粒体糖尿病致病点突变,也是国内外报道最多、发病率较高的单基因糖尿病突变位点。

国内外的研究数据显示 tRNA^{Leu} (UUR) 3243A/G 突变发生率在随机检测糖尿病人群中为 0.25%~2.72%^[3,4],在有糖尿病家族史、发病早(≤45岁)、体型非肥胖、口服降糖药失效的糖尿病人群中筛查则可达 1.33%~2.7%^[5-7]。本研究在 2 型糖尿病人群及正常健康人群中均未发现 tRNA^{Leu} (UUR) 基因 3243 位点 A/G 突变,由此说明该位点的突变率确实很低。分析可能存在以下原因:(1)此次筛查样本含量偏少,可能存在抽样误差;(2)tRNA^{Leu} (UUR) 3243A/G 突变在不同地域、不同种族间的分布频率具有一定的差异性,甚至在亚洲人群中也不尽相同。韩国 2 型糖尿病人群中约 0.2%^[8],中国温州地区 2 型糖尿病人群中约 0.41%^[9],而在日本可达 1.0%~6.0%^[2];(3) mtDNA 突变存在异质性,肌肉、大脑和胰腺组织中该位点的突变率较高,而外周血中突变率较低,且随年龄增长,突变比例逐年下降,近期研究还发现 2 型糖尿病患者的线粒体 DNA 异质性高于正常人群^[10]。本次研究 DNA 提取自外周白细胞且研究对象年龄偏大,可能也是我们未检出该突变的原因。

综上所述,笔者的研究结果提示在中国云南地区 2 型糖尿病患者中线粒体 tRNA^{Leu} (UUR) 基因 3243 位点 A/G 突变并不常见,可能不是该地区 2 型糖尿病的常见易感基因。笔者将继续通过扩大样本量,或进行家系研究,并联合其他突变位点的筛查,以进一步揭示线粒体基因突变与 2 型糖尿病的内在联系。

[参考文献]

[1] 王鉴,顾鸣敏. 线粒体基因突变与糖尿病的相关性研究进展[J]. 现代生物医学进展,2012,12(24):4 752 -

4 756.

- [2] VAN DEN OUWELAND J M W, LEMAKEMS H H P J, TREMBATH R C, et al. Mutation in mitochondrial tRNA^{Leu} (UUR) gene in a large pedigree with maternally transmitted type II diabetes mellitus and deafness [J]. *Nature Genet*, 1992, 1(5):368 - 371.
- [3] 王子,王斯琪. 线粒体基因突变糖尿病及 NT3243A-G 点突变相关研究进展[J]. 中国医疗前沿, 2011, 6(5): 25 - 26.
- [4] 汤冬玲,李栋,文重远. 线粒体 DNA 变异与老年 2 型糖尿病患者易感性的相关性 [J]. 中国老年学杂志, 2012, 12(32):448 - 451.
- [5] 涂萍,吴和平,丁浔,等. 家族性 2 型糖尿病线粒体基因突变发生率及其临床意义 [J]. 中国糖尿病杂志, 2009, 17(5):353 - 355.
- [6] 王遂军,吴松华,郑泰山,等. 线粒体 tRNA^{Leu} (UUR) 基因 nt3243A→G 突变糖尿病临床特点分析[J]. 中华医学遗传学杂志, 2009, 26(2):191 - 195.
- [7] DURAISAMY P, ELANGO S, VISHWANANDHA V P, et al. Prevalence of mitochondrial tRNA gene mutations and their association with specific clinical phenotypes in patients with type 2 diabetes mellitus of Coimbatore [J]. *Genet Test Mol Biomarkers*, 2010, 14(1):49 - 55.
- [8] LEE H C, SONG Y D, LI H R, et al. Mitochondrial gene transfer ribonucleic acid (tRNA) Leu (UUR) 3243 and tRNA (Lys)8344 mutations and diabetes mellitus in Korea [J]. *Clin Endocrinol Metab*, 1997, 82(2):372 - 374.
- [9] 赵晶,季敬璋,汪大望,等. 温州地区 2 型糖尿病患者线粒体 DNA 3243、3316 位点的突变筛查 [J]. 遗传, 2006, 28(10):1 206 - 1 212.
- [10] TAN F, CHENG X, CHEN S, et al. Heterogeneity of mitochondrial DNA in black and white hair of patients with type 2 diabetes [J]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 2012, 32(1):85 - 88.

(2014-01-02 收稿)