

线粒体 DNA 5178C/A 多态性与 2 型糖尿病关系的研究

胡晓美¹, 吕建新² (1. 江苏省扬州市第一人民医院核医学科 225001; 2. 温州医学院, 浙江省医学遗传学重点实验室 325035)

【摘要】 目的 研究线粒体 DNA 5178C/A 多态性与 2 型糖尿病(T2DM)及其并发症的关系。**方法** 采用聚合酶链反应(PCR)与 PCR 产物直接测序的方法,对 2 型糖尿病组(220 例)及正常对照组(126 例)进行基因分析。**结果** 5178C 基因型与 5178A 基因型的 T2DM 患者在性别、发病年龄、体重指数、血糖、血脂等水平差异无统计学意义,但 T2DM 患者中 5178C 基因型并发视网膜病变的频率要高于 5178A 基因型($P<0.05$)。**结论** 线粒体 DNA 5178C/A 多态性可能与 T2DM 患者并发视网膜病变负相关。

【关键词】 2 型糖尿病; 线粒体 DNA; 多态性

DIO:10.3969/j.issn.1672-9455.2010.17.014

中图分类号:R587.1

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2010)17-1820-03

Study on the association of the mitochondrial DNA 5178C/A polymorphism with type 2 diabetes mellitus HU Xiao-Mei¹, Lv Jian-Xin². 1. Department of Nuclear Medicine, First People's Hospital of Yangzhou, Jiangsu 225001, China; 2. Wenzhou Medical College, Zhejiang Provincial Key Laboratory of Medical Genetics, Wenzhou 325035, China

【Abstract】 Objective To investigate the association of the mitochondrial DNA 5178C/A polymorphism with type 2 diabetes mellitus(T2DM) and its complications. **Methods** The gene was amplified by polymerase chain reaction(PCR), and sequenced with the direct sequencing method to analyze mitochondrial DNA 5178C/A polymorphism genotypes of 220 T2DM patients and 126 healthy controls. **Results** The clinical data of age at onset, sex, BMI, and the serum levels of blood glucose, and blood fat had no significant difference in the 5178C and 5178A genotype of T2DM patients. However, the incidence of retinopathy complication in the 5178C genotype of T2DM patients was significantly higher than that in the 5178A genotype($P<0.05$). **Conclusion** The mitochondrial DNA 5178C/A polymorphism may be negative correlation to retinopathy complication of T2DM patients.

【Key words】 type 2 diabetes mellitus; mitochondrial DNA; polymorphism

糖尿病(DM)是一种以慢性高血糖为特征的代谢紊乱性疾病,2 型糖尿病(T2DM)约占糖尿病患者总数的 90%。1997 年美国糖尿病学会(ADA)把线粒体糖尿病列为特殊类型糖尿病,在糖尿病患者群中发病率为 0.5%~1.5%^[1]。目前,已发现了 20 余种线粒体基因突变位点与糖尿病相关。近年来国外研究表明,线粒体 DNA5178C/A 多态性与长寿有关^[2],与血脂异常相关且在糖尿病患者中有抗动脉粥样硬化作用^[3],5178A 基因型的个体心肌梗死的发病率较低^[4]。国内对此位点多态性的研究较少,为此本研究旨在探讨这一多态性在 2 型糖尿病患者及正常人中的分布情况,以及该多态性与 2 型糖尿病及其并发症的关系。

1 对象与方法

1.1 对象 糖尿病组为随机选取的在温州医学院附属第一医院就诊的 2 型糖尿病(根据 1997 年 WHO 糖尿病诊断标准)住院患者 220 例(男 118 例、女 102 例);正常对照组为同期健康体检者 126 名(男 68 例、女 58 例),无糖尿病家族史且口服葡萄糖耐量正常。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 抽取静脉血 2~3 mL,EDTA-K₂ 抗凝。采用酚-氯仿法提取外周血白细胞基因组 DNA。

1.2.2 PCR 扩增 参照剑桥序列(revised cambridge reference sequence, rCRS)扩增目的基因片段 np4485~5420,设计上游引物为 5'-ACTAATTAATCCCCTGCCCC-3',下游引物

为 5'-CCTGGGGTGGGTTTGTATG-3'^[5],由大连宝生物工程有限公司合成(PAGE 级纯化,纯度 $\geq 99\%$)。PCR 反应条件:94℃预变性 5 min,94℃变性 30 s,60℃退火 45 s,72℃延伸 1 min,共 35 个循环,72℃再延伸 6 min。

1.2.3 DNA 测序分析 用 PCR 产物纯化试剂盒(大连宝生物工程有限公司)进行 PCR 产物的回收纯化,PCR 纯化产物送往上海基康生物技术有限公司进行测序。

1.2.4 患者临床资料收集 询问糖尿病组患者的年龄、发病年龄等情况,并测量其身高、体重、空腹血糖(FBG)、餐后 2h 血糖(P2BG)、糖化血红蛋白(HbA1c)等指标,同时对其糖尿病并发病进行诊断。

1.3 统计学方法 使用 SPSS13.0 统计软件进行数据处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示呈正态分布的数据,采用 t 检验。计数资料采用 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 5178C/A 测序图见图 1。

2.2 临床资料统计

2.2.1 线粒体 DNA 5178C/A 多态性在糖尿病组及正常对照中的分布 见表 1。两者比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.2.2 2 型糖尿病患者 mtDNA 5178C/A 多态性的临床特征 的比较 5178C 基因型与 5178A 基因型的 T2DM 患者在性别、发病年龄、体质指数、血糖、血脂等水平差异无统计学意义($P>0.05$),见表 2。

表 1 糖尿病组与正常对照组 mtDNA 5178C/A 多态性的比较[n(%)]			
组别	5178C(n=172)	5178A(n=48)	P
糖尿病组(n=220)	172(78.2)	48(21.8)	0.49
正常对照组(n=126)	103(81.7)	23(18.3)	

图 1 5178C/A 的测序结果图

表 2 2 型糖尿病患者 mtDNA 5178C/A 多态性的临床特征的比较			
临床特征	5178C	5178A	P
n	172	48	
性别(男/女)	83/89	29/19	0.328
年龄(岁)	58.47±13.55	56.81±12.98	0.45
发病年龄(岁)	50.63±12.99	50.21±10.89	0.838
病程(年)	7.84±7.07	6.60±6.56	0.277
BMI(kg/m²)	22.12±3.42	23.21±3.46	0.054
HbA1C(%)	9.26±2.51	9.49±2.43	0.574
FBG(mmol/L)	8.74±3.52	8.54±3.54	0.731
P2BG(mmol/L)	16.19±4.74	17.05±4.43	0.259
TC(mmol/L)	4.58±1.15	4.89±1.57	0.122
TG(mmol/L)	1.56±0.87	1.72±0.66	0.243
HDL-C(mmol/L)	1.23±0.46	1.15±0.34	0.205
LDL-C(mmol/L)	2.43±0.80	2.38±0.71	0.653

表 3 2 型糖尿病患者 mt5178C/A 多态性并发 DM 并发症的情况比较					
DM 并发症		<i>n</i>	5178C (<i>n</i> = 172)	5178A (<i>n</i> = 48)	<i>P</i>
视网膜病变	有	64	57	7	0.012 *
	无	156	115	41	
周围神经病变	有	68	55	13	0.598
	无	152	117	35	
肾病	有	172	54	118	0.105
	无	48	9	39	
高血压	有	107	86	21	0.514
	无	113	86	27	

注:两组间比较,* P<0.05。

2.2.3 2 型糖尿病患者 mt5178C/A 并发 DM 并发症的情况

比较 T2DM 患者中 5178C 基因型并发视网膜病变的频率要高于 5178A 基因型,两者比较差异有统计学意义($P<0.05$);两种基因型在其他 DM 并发症的发病率上差异无统计学意义($P>0.05$)(表 3)。

3 讨 论

线粒体基因突变主要通过影响能量合成、细胞功能下降引发胰岛素抵抗和 β 细胞功能下降,从而引起 2 型糖尿病的发生。NADH 脱氢酶亚单位 2(NADH dehydrogenase 2, ND2)基因为线粒体电子呼吸链上复合体 I 的编码基因之一,在呼吸链中直接参与氢与电子传递并通过氧化磷酸化产生 ATP。线粒体 DNA5178C→A 碱基置换导致线粒体 DNA ND2 基因第 237 位亮氨酸被甲硫氨酸取代(Leu237Met),可能影响 NADH 脱氢酶的生化特性,从而进一步影响糖代谢及氧化应激水平。Levine 等^[6]提出甲硫氨酸(Met)残基组成重要的抗氧化防御机制,各种氧化剂容易与 Met 反应产生甲硫氨酸亚砷, Met 残基暴露在表面可产生很高浓度的反应物,因此可作为一种有效的氧化剂清除剂。在 ND2 亚单位中 5178C→A(Leu237Met)的置换可以对线粒体的氧化损伤起保护作用^[4]。

日本学者 Tanaka 等^[2]最初发现线粒体 DNA 5178C/A 多态性与长寿相关,线粒体 DNA 5178A 基因型在长寿人群中比例较高。随后,Wang 等^[7]发现 5178C 基因型的 2 型糖尿病患者的平均发病年龄比 5178A 基因型提前。Matsunaga 等^[8]发现,5178A 基因型在 2 型糖尿患者中有抗动脉粥样硬化作用。Katsumasa 等^[4]发现了 5178A 基因型的个体心肌梗死的发病率较低。此外,Kokaze 等^[9-11]和 Akatsuki 等^[9-12]先后研究发现了该多态性还与血压、血脂水平、眼内压、空腹血糖水平以及葡萄糖耐量等有关。

在本研究中发现,线粒体 DNA 5178C/A 多态性在糖尿病组及正常对照中的分布无显著性差异。5178C 基因型与 5178A 基因型的 T2DM 患者在性别、发病年龄、体重指数、血糖、血脂等水平上差异无统计学意义。而古今刚等^[13]发现 5178A 基因型血清胆固醇水平低于 5178C 基因型,由此还需加大样本量进一步研究。

糖尿病患者长期的高血糖状态,可引起蛋白激酶 C(protein kinase C,PKC)异常活化,糖基化终末产物形成(advanced glycosylation end products,AGEs),多元醇旁路活化等,这些代谢紊乱均最终引起活性氧产物(reactiveoxygen species,ROS)增多,进而引起视网膜病变等糖尿病并发症。Levine 等^[6]报道了 Met 残基构成一个重要的抗氧化防御机制,并且 5178A(Met)可以保护线粒体抵抗因 5178A/C 多态性造成氨基酸的转变(Met→Leu)而产生的氧化损伤。Matsunaga 等^[3]发现,在日本 2 型糖尿病患者中,5178C 基因型者双侧颈动脉的基底层细胞的厚度要高于 5178A 基因型者,5178A 基因型在糖尿病患者中有抗动脉粥样硬化作用。Kokaze 等^[11]研究发现在日本人群中 5178A 基因型者眼内压的值要低于 5178C 基因型者。

糖尿病并发症是决定糖尿病患者预后的最主要因素,是导致糖尿病致死率和致残率增高的最主要原因。在本研究中发现,T2DM 患者中 5178A 基因型并发视网膜病变的频率要低于 5178C 基因型,两者比较差异有统计学意义,推测 5178A 基因型的 T2DM 患者可能会降低并发视网膜病变的风险,提示 ND2 基因 5178C/A 多态性可能与糖尿病性视网膜病变的发生和发展相关。但 5178C/A 两种基因型在其他 DM 并发症的发病率上差异无统计学意义。其机制以及更多的线粒体 DNA

5178C/A 多态性与 2 型糖尿病及其并发症的关系还有待于进一步研究。

参考文献

- [1] 李永航. 线粒体糖尿病概述[J]. 辽宁实用糖尿病杂志, 2004, 12(1): 3-5.
- [2] Tanaka M, Gong JS, Zhang J, et al. Mitochondrial genotype associated with longevity [J]. Lancet, 1998, 351 (9097): 185.
- [3] Matsunaga H, Tanaka Y, Tanaka M, et al. Antiatherogenic mitochondrial genotype in patients with type 2 diabetes [J]. Diabetes Care, 2001, 24(3): 500-503.
- [4] Takagik G, Yamada Y, Gong JS, et al. Association of a 5178C→A (Leu237Met) polymorphism in the mitochondrial DNA with a low prevalence of myocardial infarction in Japanese individuals [J]. Atherosclerosis, 2004, 175 (1): 281-286.
- [5] Mark J, Rieder, Scott L, et al. Automating the identification of DNA variations using quality-based fluorescence re-sequencing; analysis of the human mitochondrial genome[J]. Nucleic Acids Research, 1998, 26(4): 967-973.
- [6] Levine RL, Mosoni L, Berlett BS, et al. Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(150): 36-40.
- [7] Wang D, Taniyama M, Suzuki Y, et al. Association of the mitochondrial DNA 5178 A/C polymorphism with maternal inheritance and onset of type 2 diabetes in Japanese patients[J]. Diabetes, 2001, 109: 361-364.

- [8] Kokaze A, Ishikawa M, Matsunaga N, et al. Longevity associated mitochondrial DNA 5178 A/C polymorphism and blood pressure in the Japanese population[J]. Hum Hypertens, 2004, 18: 41-45.
- [9] Kokaze A, Ishikawa M, Matsunaga N, et al. Association of the mitochondrial DNA 5178 A/C polymorphism with serum lipid levels in the Japanese population[J]. Hum Genet, 2001, 109: 521-525.
- [10] Kokaze A, Ishikawa M, Matsunaga N, et al. Longevity associated mitochondrial DNA 5178 A/C polymorphism modulates effects of daily drinking and cigarette consumption on serum triglyceride levels in middle-aged Japanese men[J]. Exp Gerontol, 2003, 38: 1071-1076.
- [11] Kokaze A, Yoshida M, Ishikawa M, et al. Longevity-associated mitochondrial DNA 5178 A/C polymorphism is associated with intraocular pressure in Japanese men[J]. Clin Exp Ophthalmol, 2004, 32: 131-136.
- [12] Kokaze A, Ishikawa M, Matsunaga N, et al. Longevity-associated mitochondrial DNA 5178 C/A polymorphism is associated with fasting plasma glucose levels and glucose tolerance in Japanese men[J]. Mitochondrion, 2005, 5(6): 418-425.
- [13] 古今刚, 周新, 李霞, 等. 线粒体 DNA5178A/C 多态性与 2 型糖尿病患者血脂水平的关系[J]. 医学新知杂志, 2005, 15 (2): 40-44.

(收稿日期: 2010-03-08)

(上接第 1819 页)

者减轻心理压力, 缓冲紧张情绪。手术完成后介绍手术效果, 术后可能出现的不适及对策, 交待术后注意事项, 教会家属护理方面的技巧, 提升看护技能和康复知识, 指导患者及家属如有问题困扰时及时寻求帮助。

综上所述, 联合监测 PIVKA-II 和 INR, 对患者进行心理治疗有利于对心脏机械瓣膜置换术后口服华法林患者个性化治疗和康复。

参考文献

- [1] Bach AU, Anderson SA, Foley AL, et al. Assessment of vitamin K status in human subjects administered "minidose" warfarin[J]. Am Clin Nutr, 1996, 64(6): 894-902.
- [2] Shimodair AH, Takahashi K, Kano K. Enhancement of anticoagulant action by warfarin-benzbromarone interaction[J]. Clin Pharmacol, 1996, 36(2): 168-174.
- [3] Toyohira H, Nakamura K, Kariyazono H. Significance of combined use of anticoagulants and antiplatelet agents in

the early stage after prosthetic valve replacement [J]. Kyobu Geka, 1995, 48(9): 749-755.

- [4] Sadowski JA, Russell RM. The interaction between vitamin K nutriture and warfarin administration in patients with bacterial overgrowth due to atrophic gastritis [J]. Nutr Health Aging, 1998, 2(2): 73-78.
- [5] Daniel JT, Rick AN, Dennis AG, et al. Modern management of prosthetic valve anticoagulation [J]. Mayo Clin Proc, 1998, 73: 665-680.
- [6] 杜心灵, 张凯伦, 胡志伟, 等. 人工机械瓣膜置换术后合理抗凝强度的研究[J]. 中华胸心血管外科杂志, 2002, 18 (6): 370.
- [7] 陆再英. 内科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008.
- [8] 王洪芳, 李彤, 谢廷香. 冠心病型行为负性情绪的干预研究进展[J]. 河北职工医学院学报, 2005, 22(3): 40-43.

(收稿日期: 2010-03-03)