

广西地区妊娠期糖尿病患者所生新生儿线粒体 tRNA_{Leu}(UUR) 基因 3243 位点突变的研究

李颖, 王琳, 覃婷, 张继红, 刘斐, 王文杰, 冯伟桦, 刘敏, 姜敏菊

基金项目: 广西医疗卫生重点科研课题(编号:重2010033); 广西自然科学基金资助项目(编号:2011GXNSFA018201)

作者单位: 530021 南宁, 广西壮族自治区人民医院产前诊断中心

作者简介: 李颖(1986-), 女, 医学硕士, 住院医师, 研究方向: 优生遗传学。E-mail: 86842523@qq.com

通讯作者: 王琳(1962-), 女, 大学本科, 医学学士, 主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向: 优生遗传学。E-mail: wangxiaolin122@163.com

[摘要] 目的 探讨线粒体 tRNA_{Leu}(UUR) 基因 3243 位点 A→G 突变在广西地区妊娠期糖尿病患者所分娩的新生儿中发生的频率。方法 采用 DNA 测序技术, 对广西地区 50 例妊娠期糖尿病产妇所分娩的新生儿和 50 名正常健康对照者分娩的新生儿进行线粒体 tRNA_{Leu}(UUR) 基因 3243 位点检测。结果 妊娠期糖尿病患者分娩的新生儿及正常对照者分娩的新生儿脐血中均未检测到线粒体 tRNA_{Leu}(UUR) 基因 3243 位点 A→G 突变。结论 线粒体 tRNA_{Leu}(UUR) 基因 3243 位点 A→G 突变尚不能作为该地区孕妇妊娠期糖尿病产前筛查的参考指标。

[关键词] 妊娠期糖尿病; 线粒体 tRNA_{Leu}(UUR) 基因 3243 位点; 突变; 产前筛查; 新生儿

[中图分类号] R 71 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2015)11-1025-03

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2015.11.05

Detection of Mitochondrial tRNA_{Leu}(UUR) Mutations at Position A3243G in Newborns of diabetic pregnant women in Guangxi Li Ying, WANG Lin, QIN Ting, et al. Prenatal Diagnosis Center, the People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, China

[Abstract] **Objective** To investigate the frequencies of the mitochondrial tRNA_{Leu}(UUR) mutations at position 3243A/G in newborns of diabetic pregnant women in Guangxi. **Methods** The point mutations of tRNA_{Leu}(UUR)3243A/G in 50 newborns of diabetic pregnant women and 50 newborns healthy controls were detected by DNA sequencing. **Results** No one carrying the mitochondrial tRNA_{Leu}(UUR)3243A/G mutation was found in the two groups. **Conclusion** The mitochondrial tRNA_{Leu}(UUR)3243A/G mutation may not yet be an important genetic predisposing factor of prenatal screening for gestational diabetes mellitus in Guangxi.

[Key words] Gestational diabetes mellitus; Mitochondrial tRNA_{Leu}(UUR)3243A→G; Mutations; Newborns; Prenatal screening

妊娠期糖尿病若不予以及时控制, 将威胁母婴健康, 影响妊娠结局^[1]。其发病机制复杂, 目前普遍认为是遗传因素与环境因素共同作用的结果。随着分子遗传学的研究发展, 越来越多研究证实妊娠期糖尿病的发生发展与一些基因突变相关。van den Ouweland^[2]首次发现了一个伴神经性耳聋的糖尿病家系, 并发现先证者存在线粒体 tRNA_{Leu}(UUR) 基因 3243 位点 A→G 突变, 通过家系研究, 从多名家系成员中也检测出了该位点的突变, 随后有研究相继证实该位点突变也参与了 2 型糖尿病的发病过程^[3]。普遍认为妊娠期糖尿病是 2 型糖尿病的早期

阶段, 两者在遗传背景上有许多相似之处, 一些基因位点的多态性可能与两者发病均有关系^[3], 而目前尚无妊娠期糖尿病与 tRNA_{Leu}(UUR) 基因 3243 位点 A→G 突变的相关报道。随着妊娠期糖尿病发病率的逐年上升, 为了寻找若干能够在妊娠早期筛查出妊娠期糖尿病高危人群的基因靶点, 做到早发现早干预, 2010-09 ~ 2015-03, 我们开展了有关的研究。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 研究对象 根据 2010 年美国糖尿病学会(American Diabetes Association, ADA)指南标准:(1)空

腹血糖 ≥ 5.1 mmol/L; (2) 妊娠 24 ~ 28 周空腹 8 h 后行 75 g OGTT 后 1 h 血糖 ≥ 10.0 mmol/L; (3) OGTT 2 h 血糖 8.5 mmol/L, 血糖值超过上述任何一项指标即可诊断为妊娠期糖尿病 (GDM)。随机选取 50 例诊断为妊娠期糖尿病产妇所分娩的新生儿作为实验组, 同期住院的 50 名正常健康产妇所分娩的新生儿作为对照组, 上述产妇均于 2010-09 ~ 2015-03 在广西壮族自治区人民医院产科规范产检并住院分娩, 均为广西地区汉族适婚年龄女性, 既往均无糖尿病及其他内分泌代谢病史, 并且无血缘关系。实验组产妇的平均年龄为 (29.54 ± 4.34) 岁, 孕前 BMI (21.46 ± 3.09) kg/m², 孕期增重 (14.36 ± 4.58) kg, 新生儿出生体重 (3067.00 ± 616.66) g。对照组产妇平均年龄为 (30.62 ± 4.64) 岁, 孕前 BMI (21.07 ± 2.56) kg/m², 孕前增重 (15.01 ± 3.66) kg, 新生儿出生体重 (3102.00 ± 576.49) g。两组上述各项临床指标差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。本试验经由广西壮族自治区人民医院伦理委员会批准, 所有受检新生儿的监护人均已签署知情同意书。

1.2 研究方法 (1) 全血 DNA 提取: 采取 2 ml EDTA 抗凝处理后的刚分娩新生儿脐带静脉血, 通过淋巴细胞分离液梯度离心分离白细胞, 运用经典苯酚-氯仿-异戊醇法从白细胞中抽提基因组 DNA。(2) 目的片段 PCR 扩增: 根据目的线粒体 tRNA^{Leu}(UUR) 基因序列, 以序列为 5'-TTGGATCAGGACATC-CCG-ATGGTGCAG-3' 为上游引物, 序列 5'-GTTTTAGGG-GATATTTGGTGAAGAGTT-3 作为下游引物, 配以 5 μ l 10 \times PCR Buffer, 5 μ l 2.5 mM dNTP, 3 μ l 25 mM MgCl₂, 0.25 U Tap 酶共同构成 PCR 反应体系; 经过 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 62 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 经 30 个循环后, 72 $^{\circ}$ C 终延伸 5 min, 扩增出全长为 393 bp 的 PCR 产物。(3) PCR 产物测序: 纯化的 DNA 模板 20 ng, 测序缓冲液 2 μ l, 测序引物 10 pmol 组成 8 μ l 反应体系进行测序 PCR; 反应条件为 98 $^{\circ}$ C 1 min, 96 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 4 min, 25 个循环; 3M 醋酸 (pH5.2) 和无水乙醇沉淀 DNA, 75% 乙醇洗涤 1 次, 加入 18 μ l 模板变性剂, 测序模板在 95 $^{\circ}$ C 水浴 5 min, 立即置冰水中 5 min 将其淬灭成单链, 转移至测序管, 在 ABI3730 全自动序列分析仪上进行毛细管电泳测序; 测序结果经 Chromas、Cexpress、Mutation Surveyor 序列判读比较, 以发现突变位点。

2 结果

DNA 测序结果 两组产妇新生儿脐血线粒体

tRNA^{Leu}(UUR) 基因 3243 位点 A→G 的突变频率为 0。见图 1, 2。

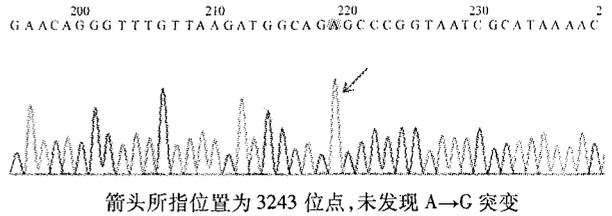


图 1 对照组新生儿脐血中线粒体 tRNA^{Leu}(UUR) 基因 DNA 测序结果图

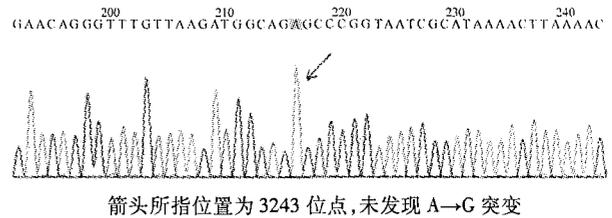


图 2 实验组新生儿脐血中线粒体 tRNA^{Leu}(UUR) 基因 DNA 测序结果图

3 讨论

3.1 线粒体 DNA 具有自我复制、转录和编码的功能, 是一套独立于细胞核染色体的基因组。由于缺乏有效的修复机制以及组蛋白的保护, 极易受自由基和活性氧的侵害, 导致线粒体 DNA 的突变率是细胞核 DNA 的 10 ~ 20 倍, 且这些突变可随着机体年龄的增长逐渐累积, 进而导致疾病发生。线粒体 tRNA^{Leu}(UUR) 基因 3243 位点 A→G 单基因突变是目前唯一公认的与糖尿病关系密切的单基因突变位点, 其机制可能为突变降低了线粒体 DNA 编码蛋白稳定性以及氨基酸与 tRNA 的结合能力, 导致了蛋白质合成障碍^[4]。此外, 3243 位点临近线粒体终止因子结合点, 突变影响了转录因子的结合, 位点相邻 rRNA 生成减少, 进而引起 ATP 产量下降。由于胞质中的 ADP/ATP 不足, 胰岛素分泌过程中信号传导障碍从而导致胰岛素分泌功能减退引发糖尿病^[5]。

3.2 妊娠期糖尿病患者的子代患妊娠期糖尿病的风险高于正常人群, 而线粒体 DNA 通过母系遗传的方式进行遗传物质的传递, 因此我们以广西地区妊娠期糖尿病患者的子代脐血为标本, 检测线粒体 tRNA^{Leu}(UUR) 基因 3243 位点 A→G 单基因突变发生率, 为广西地区孕产妇妊娠期糖尿病的早期筛查提供理论依据。然而我们未在实验组及对照组中发现线粒体 tRNA^{Leu}(UUR) 基因 3243 位点 A→G 单基因突变。虽然母系遗传伴耳聋的线粒体相关性糖尿病有高达 85% 的病例与线粒体 tRNA^{Leu}(UUR)

基因 3243 位点 A→G 突变有关^[6],但该类型糖尿病与其他类型糖尿病的遗传背景不尽相同,突变频率也有所差异。既往研究显示,在突尼斯的糖尿病患者中检测到该突变的发生率为 1.07%^[7],中国汉族人群中 2 型糖尿病患者 tRNA^{Leu}(UUR) 基因 3243 位点 A→G 突变率达 1.69%^[8],在云南地区的 2 型糖尿病患者中也未检测到 3243 位点的突变^[9],我们的研究数据与既往研究结果,尤其是与我国汉族人群和临近省份人群的突变率近似。

综上所述,线粒体 tRNA^{Leu}(UUR) 基因 3243 位点 A→G 单基因突变发生率在不同种族、不同地区人群中突变率不同,线粒体 tRNA^{Leu}(UUR) 基因 3243 位点 A→G 单基因突变在广西地区妊娠期糖尿病人群子代中的发生率极低,不建议作为广西地区孕妇妊娠期糖尿病产前筛查的参考指标。

参考文献

- 1 张春. 妊娠期糖尿病孕妇 138 例妊娠结局分析[J]. 中国临床新医学, 2015, 8(4): 305-307.
- 2 van den Ouweland JM, Lemkes HH, Ruitenbeek W, et al. Mutation in mitochondrial tRNA(Leu)(UUR) gene in a large pedigree with

- maternally transmitted type II diabetes mellitus and deafness[J]. Nat Genet, 1992, 1(5): 368-371.
- 3 Tawata M, Ohtaka M, Iwase E, et al. New mitochondrial DNA homoplasmic mutations associated with Japanese patients with type 2 diabetes[J]. Diabetes, 1998, 47(2): 276-277.
- 4 Maassen JA, van Essen E, van den Ouweland JM, et al. Molecular and clinical aspects of mitochondrial diabetes mellitus[J]. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2001, 109(3): 127-134.
- 5 Maassen JA, T Hart LM, Van Essen E, et al. Mitochondrial diabetes: molecular mechanisms and clinical presentation [J]. Diabetes, 2004, 53 Suppl 1: S103-S109.
- 6 Naing A, Kenchaiah M, Krishnan B, et al. Maternally inherited diabetes and deafness (MIDD): diagnosis and management[J]. J Diabetes Complications, 2014, 28(4): 542-546.
- 7 Wang S, Wu S, Zheng T, et al. Mitochondrial DNA mutations in diabetes mellitus patients in Chinese Han population[J]. Gene, 2013, 531(2): 472-475.
- 8 Bouhaha R, Abid Kamoun H, Elgaied A, et al. A3243G mitochondrial DNA mutation in Tunisian diabetic population[J]. Tunis Med, 2010, 88(9): 642-645.
- 9 石柔, 雷又鸣, 宋滇平, 等. 云南地区 2 型糖尿病患者线粒体 tRNA^{Leu}(UUR) 3243A/C 突变的筛查[J]. 昆明医科大学学报, 2014, 35(3): 44-46.

[收稿日期 2015-06-04][本文编辑 韦所苏]

课题研究·论著

枸橼酸氢钾钠防治经皮肾镜取石术后 结石残留及复发的研究

蓝志相, 王伟, 蔡斌, 郝南

基金项目: 广西医疗卫生重点科研课题(编号:重 2012104)

作者单位: 530021 南宁, 广西壮族自治区人民医院泌尿外科

作者简介: 蓝志相(1967-), 男, 医学硕士, 硕士研究生导师, 主任医师, 研究方向: 泌尿系结石的诊治。E-mail: lanzhixiangen@126.com

[摘要] 目的 评估枸橼酸氢钾钠对肾结石患者经皮肾镜取石术后残留结石的清除和预防结石复发的效果。方法 选择 154 例因上尿路结石而行经皮肾镜取石术后无结石残留或有结石残留的患者被纳入研究。根据结石清除情况将患者分为无残石组 84 例和有残石组 70 例, 每组再随机分为治疗组 and 对照组。治疗组给予枸橼酸氢钾钠颗粒治疗, 10 g/d, 3 次/d, 疗程 3 个月; 对照组不加用任何药物, 饮食要求与治疗组相同, 术后 12 个月比较治疗组和对照组结石复发率或结石生长情况。结果 无残石组接受药物治疗的患者 12 个月后结石复发率显著低于对照组(8.33% vs 38.46%, $P < 0.05$), 有残石组中接受药物治疗的患者结石增大的比率显著低于对照组(10.71% vs 59.37%, $P < 0.05$)。结论 枸橼酸氢钾钠不仅显著降低经皮肾镜术后结石的复发率, 而且抑制术后残留结石的生长。

[关键词] 经皮肾镜取石术; 枸橼酸氢钾钠; 肾结石

[中图分类号] R 692.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2015)11-1027-04

doi: 10.3969/j.issn.1674-3806.2015.11.06