

线粒体 NDUF6 基因单核苷酸多态与 2 型糖尿病关系的研究

吴 刚, 苏建彬, 徐 峰, 王晓华, 王雪琴

(南通大学第二附属医院内分泌科, 江苏 南通 226001)

[摘要] 目的: 通过对线粒体基因 NDUF6 [NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex] 进行单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 的检测, 对高频率 SNP 进行基因分型, 研究 NDUF6 基因与 2 型糖尿病的相关性。方法: 使用 PCR+测序方法, 以 15 个 2 型糖尿病患者和 9 个正常人为样本, 对 NDUF6 基因的启动子、外显子以及临近的内含子进行测序以确定该基因的 SNP; 对高频率的 SNP, 仍使用 PCR+测序方法分别在 192 个 2 型糖尿病患者与正常人中进行基因分型。结果: 总共发现 NDUF6 基因的 6 个 SNP, 其中 3 个 SNP 出现频率较高。NDUF6 基因启动子的 1 个 SNP(-1211C > T) 在 2 型糖尿病人群与正常人群有显著差异 ($P < 0.05$)。结论: NDUF6 基因启动子的 -1211C > T 多态性可能与 2 型糖尿病的发病有关。

[关键词] NADH 脱氢酶泛素 1 亚单位基因; 单核苷酸多态性; 2 型糖尿病

[中图分类号] R587.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)03-368-04

doi:10.7655/NYDXBNS20130317

The SNP study of mitochondrial NDUF6 gene with type 2 diabetes

Wu Gang, Su Jianbin, Xu Feng, Wang Xiaohua, Wang Xueqin

(Department of Endocrinology, Second Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the association of mitochondrial NDUF6 gene with type 2 diabetes by single nucleotide polymorphism (SNP) detection and genotyping. **Methods:** Sequences of coding regions (including sequence near splicing site) of NDUF6 gene was detected by PCR-sequencing in 15 type 2 diabetics and 9 normal controls. To high frequency SNPs, PCR-sequencing was used in 192 type 2 diabetics and 192 normal controls for geno-typing. **Results:** A total of 6 SNPs were identified for NDUF6 gene; there were 3 high frequency SNPs and 3 low frequency SNPs. One SNP (-1211C > T) located in the promoter region of NDUF6 had significant difference of genotype distribution between type 2 diabetics and controls ($P < 0.05$). **Conclusion:** The NDUF6 gene -1211C > T polymorphism may associate with type 2 diabetics in Chinese.

[Key words] NNADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex gene (NDUF6); single nucleotide polymorphism (SNP); type 2 diabetes mellitus

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(3): 368-371]

2 型糖尿病是由遗传因素与环境因素相互作用而导致的一种多基因遗传病, 胰岛素抵抗和胰岛素分泌相对不足是导致 2 型糖尿病的两个基本环节。人类基因组中单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 是研究复杂多基因疾病的十分有效的遗传学工具; SNP 在基因组中不仅数量多、密度大, 而且能改变基因表达水平或功能的 SNP 本身可能就是致病位点^[1]。线粒体呼吸链的氧化磷酸化所产生的三磷酸腺苷 (ATP) 是人体生理活动的基础。2 型糖尿病患者的胰岛素抵抗使其骨骼肌氧化磷酸化发生障碍, 导致葡萄糖的转运和糖原合成、脂肪酸的代谢能力降低。

近年来人体细胞线粒体的形态改变或功能缺陷在 2 型糖尿病发病过程中的作用逐渐引起人们的重视^[2-3]; 细胞线粒体的形态改变或功能缺陷可能引起细胞的基础代谢率或运动状态下的代谢率有所改变, 即三大能源物质: 糖、蛋白质、脂肪转化为 ATP 的效率降低。有研究提示胰岛素信号转导障碍和线粒体功能缺陷可能互为因果关系, 线粒体的基因缺陷可能导致脂质在骨骼肌积聚、影响骨骼肌的糖代谢^[4]。NDUF6 基因在线粒体呼吸链电子传递过程中起着重要的作用。文献报道 NDUF6 基因的多态性与通过运动锻炼改善胰岛素敏感性和 ATP 合成酶的流量变化有关^[5-6]。肥胖个体 NDUF6 基因的

启动子区甲基化状态的改变可引起基因表达量下降^[7]。有研究表明中国汉族人 2 型糖尿病相关基因位于 9 号染色体与 D9S171 连锁的 9p21 区域^[8]。本文选择位于该连锁区域的线粒体 NDUF6 基因,通过 SNP 检测与基因分型,分析 NDUF6 基因与 2 型糖尿病的相关性。

1 对象和方法

1.1 对象

2008~2010 年在本院内分泌科就诊的 192 例无血缘关系的 2 型糖尿病患者[江苏南通地区汉族人,年龄(58 ± 12)岁,糖尿病病程(86.3 ± 52.4)个月]。2 型糖尿病的诊断参照 1999 年 WHO 糖尿病专家委

员会提出的诊断标准,另取无血缘关系的 192 例正常人[年龄(58 ± 12)岁],抽取受试对象外周血 5 ml,常规酚氯仿法抽提 DNA。

先对 15 例 2 型糖尿病患者和 9 例正常人,共 24 例进行基因测序,以发现所研究的 NDUF6 基因片段有几个 SNP。对所发现的高频率 SNP 进一步在大样本的人群中仍通过 PCR+测序法进行基因分型。

1.2 方法

1.2.1 引物设计

NDUF6 基因共有 4 个外显子,对该基因的启动子、外显子以及临近的内含子进行引物设计,引物参数:片段长度 300~500 bp,引物最佳长度 21 bp,最佳变性温度 62℃(表 1)。

表 1 NDUF6 基因的 PCR 引物
Table 1 Primers for NDUF6 gene in PCR amplification

编号	正向引物(5'→3')	反向引物(5'→3')	目的片段位置
1	AATTCATACTAAGTTGGGTTGCAG	ATTCTGGTTTGGTCTGCTCTGC	启动子
2	GCATTTTCATTGCTTTGTTGTGTG	CGTGTGGTGAATAATGAAAAGAGC	启动子
3	GCAGTCCCTTTATTTAGGAATTTGGG	CCACCTCCAGTCTCTCTACGC	启动子
4	TCCCCACCCGGTCCTAATT	GGGAGCGGACGTTTCAGTGT	外显子 1
5	GCATTTTGTCTGGACTTTGTAGG	GTGGCAGATTATTTCCACTAAGTAGGG	外显子 2
6	CAAGGCTGGTGATGAGAACCA	GCTTGGAAAGGGAGGAAAAGG	外显子 3
7	GGGAATGCCAGAACTCAAGTACAT	TTCACCTGTGCATACCCTGATACC	外显子 4

1.2.2 样本 DNA 扩增

样本 DNA 扩增的 PCR 反应体系(25 μl)为:10 × 缓冲液 2.5 μl,引物(20 μmol/L) 0.375 μl × 2, dNTPmix(10 mmol/L) 0.5 μl, MgCl₂(25 mmol/L) 3 μl, Taq DNA 聚合酶 0.2 μl, ddH₂O 17.05 μl, DNA 模板 1 μl。用 Touch-down 的 PCR 反应程序:95℃ 预变性 2 min, 94℃ 30 s, 63℃ 1 min -0.5℃/循环, 72℃ 35 s, 10 个循环;94℃ 30 s, 57℃ 40 s, 72℃ 35 s, 30 个循环, 72℃ 8 min, 4℃ 保存。

1.2.3 PCR 产物纯化

25 μl PCR 产物加入 150 μl Resin 树脂静置 10 min, 2 200 r/min 离心 2 min, 弃废液。加入 150 μl 80%异丙醇, 2 200 r/min 离心 2 min, 弃废液, 不加异丙醇, 2 200 r/min 离心 3 min 弃残留的异丙醇, 真空抽干 8 min 加去离子水 20 μl, 震荡后静置 10 min。换新 96 孔板。2 200 r/min 离心 5 min。

1.2.4 测序反应

每孔加入 0.8 μmol/L 引物、PCR 纯化产物、测序反应液(PE 公司, 美国)各 2 μl; PCR 扩增:96℃ 预变性 10 s, 96℃ 变性 10 s, 50℃ 退火 5 s, 60℃ 延伸 4 min, 35 个循环, 60℃ 4 min, 4℃ 保存。加入 70%

乙醇 50 μl, 室温沉淀 25 min; 4 000 r/min, 4℃ 离心 30 min。弃上清, 将 96 孔板倒置离心 800 r/min 即停; 每孔加入上样缓冲液 3 μl, 2 000 r/min 离心 1 min, 90℃ 变性 2 min, 上样、测序。

1.3 统计学方法

计量资料结果均以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。运用 Hardy-Weinberg 平衡检验确认样本的群体代表性。用基因计数法计算各组基因型的频率。采用 SAS 软件进行统计分析。两组间计量资料比较采用 *t* 检验。两组间基因型分布比较采用 Fisher 确切概率法。*P* ≤ 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

所测 NDUF6 基因片段总长 3 054 bp, 其中启动子区 1 502 bp, (5'非翻译区 5'UTR)68 bp; 发现 3 个 SNP。编码区 399 bp, 所发现的 SNP 有 1 个。临近剪切位点的内含子区 786 bp, 发现 SNP 2 个。(3'非翻译区 3'UTR)113 bp, 没有发现 SNP。NDUF6 共检测到 6 个 SNP, 其中高频率的 SNP 有 3 个。与国际公共数据库(www.ncbi.nlm.nih.gov)相比较, 发现只有 SNP1 (atactgtaYaaattcc) 对应公共数据库中的 rs725130, 其

余5个SNP均为本研究新发现的SNP(表2)。

对于NDUFB6基因3个非高频的SNP,本研究未在糖尿病人群和正常人群进行基因分型。对3个高频SNP,在较大样本量的2型糖尿病患者与正常

人进行下一步的基因分型(表3),发现位于启动子区-1211位点的SNP1,等位基因C>T的基因型分布频率有显著差异($P=0.017$)。即在2型糖尿病患者中C/T杂合子出现的频率较高。

表2 检测到的NDUFB6基因SNP

Table 2 The detected SNP of NDUFB6 gene

名称	SNP在基因中的位置	SNP在9号染色体位置	靠近SNP的序列	SNP的发生频率(%)
SNP1	启动子	83160	ATACTGTAYAAATTCC	≥15
SNP2	启动子	84231	AGAAGTGGRGGTGGA	<5
SNP3	启动子	84365	TTGCAGAGYGGGAGC	>5, <15
SNP4	第1外显子	84501	GAAGGCCGRTGGCTGA	<5
SNP5	第1内含子	86345	TAGAGTTTYGTAATA	≥15
SNP6	第2内含子	98383	GAGATGCCTRTTTGATA	≥15

SNP的代号:R=A/G、Y=C/T。

表3 NDUFB6基因高频SNP基因型的相关分析

Table 3 Genotype association analysis of high frequency SNP of NDUFB6

组别	例数	SNP1			SNP5			SNP6		
		C/C	C/T	T/T	C/C	C/T	T/T	A/A	A/G	G/G
2型糖尿病患者	192	55	96	41	56	36	100	42	71	79
正常人群	192	76	69	47	60	40	92	46	66	80
χ^2 值		8.149			0.682			0.371		
P值		<0.05			>0.05			>0.05		

3 讨论

人体细胞的线粒体中三羧酸循环和呼吸链氧化磷酸化是糖、脂类及蛋白质生物氧化的最后共同通路。线粒体在能量代谢中被称为细胞的动力工厂。NADH氧化呼吸链是线粒体内膜上主要的电子传递链,它为人体的各种生理活动提供所需的ATP。线粒体功能受损引起脂肪在骨骼肌、肝脏的积聚,即脂肪毒性影响葡萄糖代谢和胰岛素的敏感性^[9-10]。

糖尿病是一种具有明显遗传倾向的、以血糖升高为特征的临床综合征,久病可引起严重的视网膜、心血管、肾、神经并发症。目前只有青少年起病的成人型糖尿病(MODY)的致病基因研究得较为清楚,而占糖尿病人群的90%、影响着10%~20%中老年人的2型糖尿病发病的分子机制仍未明确。全世界许多研究把各自人群的2型糖尿病易感基因定位在不同的染色体区域,因此,它是一种高度异质性的复杂多基因疾病^[3,11]。SNP是染色体上的分子多态,位于基因启动子的SNP可能改变基因表达水平,可能就是疾病的致病位点^[12]。

曾有研究提示华东地区汉族2型糖尿病的易感基因定位在第9号染色体短臂与D9S171相连锁的9p21区域^[8],所选择的NDUFB6基因位于该基

因连锁区域,它表达的蛋白是线粒体NADH脱氢酶家族的一员,糖、蛋白质和脂肪的生物氧化都与此有关。

本研究观察到线粒体NDUFB6基因启动子-1211位点的SNP1,即等位基因C>T多态性可能与2型糖尿病相关。NDUFB6基因启动子区的变化可能引起该基因表达蛋白的量上升或下降,导致胰岛素抵抗、糖尿病的发生。有文献报道随着年龄的增大,NDUFB6基因在骨骼肌中的表达量有下降趋势;NDUFB6基因启动子区的单核苷酸多态(rs629566,A/G)可使甲基化状态有所改变,引起该基因在骨骼肌中的表达量下降^[13]。提示线粒体的NDUFB6基因在2型糖尿病中的作用应予以重视。

[参考文献]

- [1] Garcia EA, King P, Sidhu K, et al. The role of ghrelin and ghrelin-receptor gene variants and promoter activity in type 2 diabetes[J]. Eur J Endocrinol, 2009, 161(2): 307-315
- [2] Hernandez-Mijares A, Rocha M, Apostolova N, et al. Mitochondrial complex I impairment in leukocytes from type 2 diabetic patients[J]. Free Radic Biol Med, 2011, 50(10): 1215-1221
- [3] Shea J, Agarwala V, Philippakis AA, et al. Comparing strategies to fine-map the association of common SNPs at

- chromosome 9p21 with type 2 diabetes and myocardial infarction[J]. *Nature Genetics*, 2011, 48(8): 801-805
- [4] Sleigh A, Raymond-Barker P, Thackray K., et al. Mitochondrial dysfunction in patients with primary congenital insulin resistance[J]. *J Clin Invest*, 2011, 121(6): 2457-2461
- [5] Kacerovsky-Bielez G, Chmelik M, Ling C, et al. Short-term exercise training does not stimulate skeletal muscle ATP synthesis in relatives of humans with type 2 diabetes[J]. *Diabetes*, 2009, 58(6): 1333-1341
- [6] Kacerovsky-Bielez G, Kacerovsky M, Chmelik M, et al. A single nucleotide polymorphism associates with the response of muscle ATP synthesis to long-term exercise training in relatives of type 2 diabetic humans[J]. *Diabetes Care*, 2012, 35(2): 350-357
- [7] Lomba A, Martinez JA, Garcia-Diaz DF, et al. Weight gain induced by an isocaloric pair-fed high fat diet: a nutriepigenetic study on FASN and NDUFB6 gene promoters[J]. *Mol Genet Metab*, 2010, 101(2-3): 273-278
- [8] Luo TH, Zhao Y, Li G, et al. A genome-wide search for Type II diabetes susceptibility genes in Chinese Hans [J]. *Diabetologia*, 2001, 44(4): 501-506
- [9] Zorzano A, Liesa M, Palacin M. Mitochondrial dynamics as a bridge between mitochondrial dysfunction and insulin resistance[J]. *Arch Physiol Biochem*, 2009, 151(1): 1-12
- [10] Szendroedi J, Schmid AI, Meyerspeer M, et al. Impaired mitochondrial function and insulin resistance of skeletal muscle in mitochondrial diabetes [J]. *Diabetes Care*, 2009, 32(4): 677-679
- [11] Hasstedt SJ, Chu WS, Das SK, et al. Type 2 diabetes susceptibility genes on chromosome 1q21-24 [J]. *Ann Hum Genet*, 2008, 72(2): 163-169
- [12] Short AD, Saleh NM, Catchpole B, et al. CTLA4 promoter polymorphisms are associated with canine diabetes mellitus [J]. *Tissue Antigens*, 2010, 75(3): 242-252
- [13] Ling C, Poulsen P, Simonsson S, et al. Genetic and epigenetic factors are associated with expression of respiratory chain component NDUFB6 in human skeletal muscle [J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(11): 3427-3435

[收稿日期] 2012-10-19

科技出版物中数字的用法

1. 凡是可以用阿拉伯数字且很得体的地方, 均应使用阿拉伯数字。
2. 日期和时刻的表示。需注意年份不能简写, 如 1997 年不能写成 97 年。
3. 计量或计数单位前的数字应采用阿拉伯数字; 多位阿拉伯数字不能拆开转行; 小数点前或后超过 4 位数(含 4 位)的应从小数点起向左或向右每 3 位空出适当间隙, 不用千分撇“,”; 数值的有效数字应全部写出, 如“1.50、1.75、2.00”, 不能写成“1.5、1.75、2”。
4. 参数与偏差范围的表示:
 - (1) 数值范围: 5~10; 注意 $3 \times 10^3 \sim 8 \times 10^3$, 不能写成 $3 \sim 8 \times 10^3$;
 - (2) 百分数范围: 20%~30%, 不能写成 20~30%;
 - (3) 具有相同单位的量值范围: 1.5~3.6 mA 不必写成 1.5 mA~3.6 mA;
 - (4) 偏差范围: $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 不写成 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, $(85 \pm 2)\%$ 不能写成 $85 \pm 2\%$;
5. 附带尺寸单位的量值相乘写为: 50 cm×80 cm×100 cm, 不能写成 50×80×100 cm, 或 50×80×100 cm³。

(本刊编辑: 接雅俐)