论著

文章编号:1000-5404(2006)19-1952-03

北京地区早发糖尿病家系MODY5基因突变的筛查

贾贺堂[1,2],张素华[1],纪立农[3],韩学尧[3] ([1]重庆医科大学附属第一医院内分泌科,重庆 400016;[2]郑州大学附属第一医院内分泌科,郑州 450052;[3]北京大学人民医院内分泌科,北京 100044)

提 要:目的 了解年轻起病成人型糖尿病(maturity-onset diabetes of the young, MODY)基因(HNF-1β)在早发家族性2型糖尿病发病中的作用。**方法** 收集100个2型糖尿病家系,先证者均在40岁前被诊断为糖尿病,且至少还有1个一级亲属在45岁之前被诊断糖尿病。提取先证者血DNA,用PCR产物扩增MODY5基因的所有外显子和外显子/内含子拼接区,将PCR产物直接进行测序。另选100名非糖尿病者为对照。**结果** 在MODY5基因的筛查中发现2个非编码区的DNA变异IVS8 +42 G>A, IVS9 - 22 C> T及1个编码区的变异ExonA513T。而对100名非糖尿病对照组进行DNA测序未发现此变异。**结论** MODY5基因内或附近的基因变异不是早发2型糖尿病家系的主要致病原因。在新发现的MODY5基因变异中(A513T),有可能是一个疾病关联突变,但具体致病机制有待蛋白质功能研究证实。

关键词: 2型糖尿病;青年发病的成人糖尿病;遗传学
中图法分类号: R181.33; R446.9; 587.1 **文献标识码:** A

Molecular scanning for MODY5 mutation in Beijing population of familial early-onset type 2 diabetes

JIA He-tang[1,2], ZHANG Su-hua[1], JI Li-nong[3], HAN Xie-yao[3] ([1]Department of Endocrinology, The First Affiliated Hospital, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016; [2]Department of Endocrinology, The First Affiliated Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052; [3]Department of Endocrinology, The Peoples Hospital of Beijing University, Beijing 100044, China)

Abstract: Objective To explore the disease-associated gene (MODY5) mutations in familial early-onset type 2 diabetes. Methods One hundred pedigrees of early-onset type 2 diabetes were collected in Beijing, of which the probands were diagnosed as type 2 diabetes under 40 years old and, at least, another first relatives was diagnosed as type 2 diabetes under 45 years old. Another 100 non-diabetic subjects were enrolled as controls. By PCR, all the exons and exon/intron splice sites of MODY5 gene were amplified and PCR products were sequenced to identify the DNA variants. Results By screening MODY5 gene, 2 DNA variants were identified in noncoding region including IVS8 +42G > A, IVS9 - 22C > T, 1 mutation in coding region including A513T. No target gene mutations were found in 100 controls. Conclusion No enough evidence demonstrates that the variation in or near MODY5 genes is the major cause of early-onset type 2 diabetes in Beijing population. A novel mutation of MODY5 gene was found to possibly relate to diabetes, which mechanism needs to be proved by further study of protein function.

Key words: type 2 diabetes; MODY; genetics

年轻起病成人型糖尿病(maturity-onset diabetes of the young, MODY)是一种常染色体显性遗传的单基因遗传病,主要是由于胰岛β细胞中葡萄糖刺激的胰岛素分泌功能障碍所致,β细胞功能常随着病程的延长而逐渐衰退,而胰岛素抵抗不是其致病因素。MODY的患病率具有明显的种族差异。目前已发现的MODY基因有6个,其中MODY5是肝细胞核因子1β(HNF-1β)突变所致。本研究首先对家族性早发糖尿病患者的临床资料进行综合分析,通过对100个先证者进行DNA直接测序明确MODY5基因与早发糖尿病家系遗传易感性的关系。

1 对象与方法

1.1 研究对象

所有患者为北京大学人民医院门诊登记的北京地区2型糖尿病患者,签署知情同意书后进行相关检查。2型糖尿患者的诊断均按1999年WHO标准,ICA和GAD抗体阴性,无自发酮症倾向,排除1型糖尿病的可能。诊断年龄≤40岁者为早发2型糖尿病,家系中至少有1个患者在40岁前诊断2型糖尿

基金项目: 国家高技术研究发展计划专题项目(2002-2230331)
Supported by the National High-Tech Development Plan of China (2002-2230331)
作者简介: 贾贺堂(1966-),男,河南省郑州市人,博士,副主任医师,主要从事糖尿病家系方面的研究。电话:13838005281, E-mail: Jiahetang001@yahoo.com
收稿日期: 2005-12-16; **修回日期:** 2006-05-15

病,至少 2 个患者在 45 岁前诊断,所有患者至少有 2 个一级亲属患糖尿病,共 100 个家系。正常对照 100 例,为空腹血糖和 OGTT 2 h 血糖正常,糖化血红蛋白小于 6%,无糖尿病家族史。详细资料见表 1。

表 1　早发 2 型糖尿病家系的先证者与正常对照组临床特征的比较($n=100$)

项目	先证者	正常对照
性别(男:女)	42/58	44/56
年龄(岁)	42 ±7	48 ±8
诊断年龄(岁)	34 ±4	—
空腹血糖(mmol/L)	9.5 ±0.3	5.0 ±0.3
T-CHO(mmol/L)	4.7 ±1.2	5.1 ±1.2
TG(mmol/L)	1.8 ±1.5	1.6 ±1.1
HDL-C(mmol/L)	1.2 ±0.30	1.2 ±0.3
LDL-C(mmol/L)	2.6 ±0.9	2.8 ±0.6
SBP(mmHg)	116 ±15	119 ±17
DBP(mmHg)	74 ±8.5	78 ±10
HbA_1c(%)	7.7 ±1.9	5.0 ±0.5
BMI(kg/m^2)	25.4 ±3.1	24.0 ±3.0
WHR	0.86 ±0.06	0.79 ±0.05
空腹胰岛素	2.4 ±0.6	2.3 ±0.3
30 min 胰岛素	3.0 ±0.8	—
120 min 胰岛素	3.5 ±0.8	—

1.2　方法

先证者及亲属空腹取血,测定空腹血糖,胰岛素,血总胆固醇,甘油三酯,高密度脂蛋白和低密度脂蛋白,血肌酐,糖化血红蛋白。生化指标在日立 7170 全自动生化分析仪上进行,糖化血红蛋白(HbAlc)用高压液相法(Biorad 公司,VARIANT 糖化血红蛋白分析仪)测定。血糖的测定用葡萄糖氧化酶法。胰岛素用放射免疫法测定。

1.3　统计学分析

各项指标正态分布的用 $\bar{x} \pm s$ 表示,非正态分布者用对数转换后进行统计分析。采用统计软件 SPSS11.0,组间率的比较用 χ^2 检验,均数的比较用 t 或 t' 检验。

1.4　试验方法

采用国际上通用的基因筛查引物,采用 PCR 扩增 MODY5 基因外显子,PCR 产物纯化后直接测序(在华大中生公司和北方基因中心进行)(表 2)。

表 2　HNF-1β 基因扩增及测序引物

外显子	上游(5′-3′)	下游(5′-3′)	退火温度(℃)
1	gggtggagggttcctggat	cgggcgcagtgtcactcagg	62
2	ctcccactagtaccctaacc	gagagggcaaaggtcacttcag	58
3	agtgaaggctacagaccctatc	ttcctgggtctgtgtacttgcc	60
4	tgtgttttgggccaagcacca	aaccagataagatccgtggc	59
5	tgccgagtcattgttccagg	cctcttatcttatcagctccag	60
6	ctgctctttgtggtccaagtcc	gagtttgaagaagacctacag	58
7	atccacctctccttatcccag	acttccgagaaagttcagacc	60
8	tttgcctgtgtatgcacctgt	gccgagtccatgcttgccaca	60
9	ctttgctggttgagttgggca	ttccatgacagctgcccagag	59

2　结果

MODY5 突变筛查结果:对 100 位先证者 MODY5 基因的筛查结果显示 2 个非编码区的变异分别是 IVS8 +42 G→A(变异频率为 2%),在 100 个正常人中未发现此种变异;IVS9 -22 C→T(变异频率为 35%),和正常人相比变异频率无显著性差异($P>0.05$);一个编码区的变异 Exon8 gca→aca A(丙氨酸)变为 513T(苏氨酸)突变频率为 1%,在 100 个正常人中未发现此种变异。

3　讨论

近年来糖尿病的发病率逐年上升,而且发病年轻化,以糖尿病诊断年龄 40 岁为切点将小于 40 岁者称为早发 2 型糖尿病。国际上及我们对中国人早发 2 型糖尿病的病理生理特征研究显示该类患者 β-细胞功能缺陷表现的更显著,家族内的遗传倾向更强。虽然近年来的遗传学研究显示早发糖尿病的病因是异质性的,如自身免疫破坏 β-细胞所导致的 1 型糖尿病(包括缓慢进展的 1 型糖尿病)、MODY、线粒体基因突变[$tRNA^{leu(UUG)nt3243}$]型糖尿病,但上述已明确病因糖尿病的一个共同的病理生理特征是 β-细胞功能的严重缺陷。

MODY 仅占 2 型糖尿病患者中 2% ~5%。目前已经发现的 MODY 基因共 6 个——MODY1(肝细胞核因子 4α)、MODY2(葡萄糖激酶基因) MODY3 (肝细胞核因子-1α)、MODY4(胰岛素启动子因子,IPF)、MODY5(肝细胞核因子 1β)、MODY6(神经分化因子 1,NEURODl)。已知 MODY 的患病率在不同种族可能有差异,这也可能是选择研究对象的标准、采用的筛查技术的差异和种族差异造成的。国内这方面研究较少,而且样本量小,都是采用敏感性低的单链构像多态性(SSCP)技术检测基因突变,目前还未见一个 MODY 家系的报道。

MODY5 是肝细胞核因子 1β(HNF-1β)突变所致,HNF-1β 位于 17 号染色体长臂(17q21.3)。HNF-1β 含有转录因子的同源区,结构上与 HNF-1α 相关,HNF-1β 以同型二聚体或 HNF-1α 形成异型二聚体起作用[1],它们对肝脏、肾脏、小肠和胰岛组织中的组织特异性基因的表达起调节作用,并参与上述器官的胚胎发育[2]。HNF-1β 对葡萄糖转运蛋白 2(GLUT2)及胰岛素基因有转录激活作用。故 HNF-1β 基因突变可使胰岛素基因、GLUT2 基因转录减少,从而使患者的胰岛素分泌部分受损[3]。另外,对大鼠胚胎发育的研究提示 HNF-1β 对肾脏发育的诱导期及细胞分化后期十分重要[4],HNF-1β 基因缺陷会导致严重的肾脏畸形。

迄今为止,已有 13 个 HNF-1β 基因突变分别在日本、英国、意大利和挪威的早发性糖尿病或 MODY 家系中报道[5-10]。这些家系中突变携带者存在与糖尿病肾病无关的肾脏功能减退、肾囊肿及肾发生畸形。本研究表明 2 个非编码区的变异分别是 IVS8 +42 G→A、IVS9 -22 C→T 及 1 个编码区的变异 Exon8 gca→aca A(丙氨酸)513T(苏氨酸),其意义有待进一步研究。

综上所述,本研究表明在中国人早发性糖尿病家系中存在 MODY5 基因突变,但 MODY5 基因突变不是中

国人早发性、家族性2型糖尿病家系的主要致病基因。

参考文献：

[1] MENDEL D B, HANSEN L P, GRAVES M K, *et al*. HNF-1 alpha and HNF-1 beta (vHNF-1) share dimerization and homeo domains, but not activation domains, and form heterodimers *in vitro*[J]. Genes Dev, 1991, 5(6): 1042-1056.

[2] LAZZARO D, DE-SIMONE V, DE-MAGISTRIS L, *et al*. LFB1 and LFB3 homeoproteins are sequentially expressed during kidney development[J]. Development, 1992, 114(2): 469-479.

[3] OKITA K, YANG Q, YAMAGATA K, *et al*. Human insulin gene is a target gene of hepatocyte nuclear factor-1alpha (HNF-1alpha) and HNF-1beta[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1999, 263(2): 566-569.

[4] HORIKAWA Y, IWASAKI N, HARA M, *et al*. Mutation in hepatocyte nuclear factor-1 beta gene (TCF2) associated with MODY[J]. Nat Genet, 1997, 17(4): 384-385.

[5] BINGHAM C, BULMAN M P, ELLARD S, *et al*. Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1beta gene are associated with familial hypoplastic glomerulocystic kidney disease[J]. Am J Hum Genet, 2001, 68(1): 219-224.

[6] NISHIGORI H, YAMADA S, KOHAMA T, *et al*. Frameshift mutation, A263fsinsGG, in the hepatocyte nuclear factor-1beta gene associated with diabetes and renal dysfunction[J]. Diabetes, 1998, 47(8): 1354-1355.

[7] LINDNER T H, NJOLSTAD P R, HORIKAWA Y, *et al*. A novel syndrome of diabetes mellitus, renal dysfunction and genital malformation associated with a partial deletion of the pseudo-POU domain of hepatocyte nuclear factor-1beta[J]. Hum Mol Genet, 1999, 8(11): 2001-2008.

[8] YOSHIUCHI I, YAMAGATA K, ZHU Q, *et al*. Identification of a gain-of-function mutation in the HNF-1beta gene in a Japanese family with MODY[J]. Diabetologia, 2002, 45(1): 154-155.

[9] CARBONE I, COTELLESSA M, BARELLA C, *et al*. A novel hepatocyte nuclear factor-1beta (MODY-5) gene mutation in an Italian family with renal dysfunctions and early-onset diabetes[J]. Diabetologia, 2002, 45(1): 153-154.

[10] FURUTA H, FURUTA M, SANKE T, *et al*. Nonsense and missense mutations in the human hepatocyte nuclear factor-1 beta gene (TCF2) and their relation to type 2 diabetes in Japanese[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2002, 87(8): 3859-3863.

（编辑　龙　亮）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2006)19-1954-01

关节镜加后入路治疗后交叉韧带止点撕脱骨折的疗效观察

杨　荣，董新华，项　敏，周国庆，彭光军，衡德峰，张子龙　（山东枣庄矿业集团枣庄医院骨科，枣庄 277101）

我院自2000年7月至2006年1月应用关节镜加后入路治疗膝部外伤合并后交叉韧带（posterior cruciate ligament, PCL）止点撕脱骨折15例，效果满意，现报告如下。

1　资料与方法

本组15例膝部外伤合并后交叉韧带止点撕脱骨折患者，其中男性10例，女性5例。年龄12～56岁，平均33岁。左膝7例，右膝8例。手术时间为伤后1～14 d，平均5 d。后抽屉试验阳性15例，7例小腿明显后沉，合并同侧胫骨干骨折1例及股骨干骨折各2例，分别于骨折术后1～2周行膝关节镜术。

所有病例均摄患膝正侧位X线片，均有胫骨后缘撕脱骨折块，胫骨后沉7例，7例行磁共振检查，均提示有后交叉韧带止点损伤及不同程度的半月板损伤。

硬膜外麻醉或腰麻后，患者仰卧，膝前外、前内入口为关节镜（与进水口共用）及手术器械入口，有时加用髌韧带中央入口，常规作关节镜检查，先处理关节内各种合并伤。发现合并半月板破裂5例，行镜下半月板成型术4例，全切除术1例；发现股骨髁软骨损伤2例，清除关节内软骨片。仔细观察后交叉韧带损伤情况（3例加髌韧带中央入口用于观察），15例患者均无体部断裂情况（和术前诊断一致），镜下可见撕脱骨折块向上移位，新鲜的骨折可见折块周围满布血痂和机化物，陈旧性的骨折可见折块与周围组织黏连，甚至有纤维性的骨痂连接。患者改用俯卧位，作后正中偏内侧纵切口，一般切口长5～6 cm，仔细暴露后关节腔，可用椎间盘自动拉钩辅助手术，暴露PCL止点及撕脱骨块，据骨折块大小决定固定方法，其中骨折块较大（以能固定螺钉为标准）的9例，行可吸收螺钉1～2枚固定，固定时做极力前抽屉试验；另6例在后交叉韧带胫骨后缘止点两侧向胫骨结节内下方钻2个直径约3 mm，间距约10 mm的平行骨隧道，钢丝把止点的小骨折块拢住，再把钢丝两端引至胫骨结节下，2个骨洞外口之间的骨桥上打结拧紧，固定时亦做前抽屉试验，完成固定。固定时保持屈膝约30°位。

术后常规关节内放置引流管，于24 h后拔除。患肢用弹力绷带固定2 d，参照PCL重建后的康复方法进行康复，前2周用支具固定，进行股四头肌等长收缩和直腿抬高训练。术后第3周开始进行渐进的膝关节活动度训练和本体感受器训练，术后6周内，用可调节支具将患膝锁定在完全伸直位下地逐渐负重，在休息时强调用支具在伸膝位固定。6～8周后去除支具，开始各种灵活性训练。

2　结果

术后6～10周，所有骨折均愈合，未出现骨折移位，术后3个

（下转1958页）

作者简介：杨　荣（1973-），男，山东省枣庄市人，主治医师，主要从事骨科微创治疗方面的研究，发表论文5篇。电话：13240431713，E-mail：yangrong128@163.com

收稿日期：2005-12-20；修回日期：2006-05-19