文章编号:1005-6947(2004)03-0228-03

·简要论著·

肝移植后 2 型糖尿病患者葡萄糖激酶基因突变研究

吴意, 陈雪初, 吴金术

(湖南省人民医院 检验科, 湖南 长沙 410002)

摘要:为探讨肝移植后 2 型糖尿病患者葡萄糖激酶(glucokinase, GCK)基因的突变情况。应用多聚酶链反应-单链构像多态性(PCR-SSCP)的分析方法,对湖南,湖北 30 例肝移植后 2 型糖尿病患者 GCK 基因 12 个外显子进行突变检测,在 30 例肝移植后 2 型糖尿病患者 GCK 基因的 12 个外显子中均没有发现突变。葡萄糖激酶基因可能不是中国湖南,湖北汉族人肝移植后 2 型糖尿病患者的发病原因可能与 GCK 突变无关。

关键词:肝移植; 糖尿病,胰岛素依赖型; 基因,葡萄糖激酶; 突变

中图分类号:R657.3; R587.1　　**文献标识码**:B

器官移植应用于临床治病救人已有近半个世纪的历史,是 20 世纪外科领域的重大进展之一。1964 年,美国 Starzl 教授在动物狗肝移植实验的基础上,成功地进行了人类肝脏移植。目前,我国已经有多家医院,可以开展肾脏、肝脏等器官的移植手术。

1992 年,Mishra[1] 等就将葡萄糖激酶(GCK)基因定位于 $7q^{5-7}$,并证实 GCK 基因与 2 型糖尿病有关,其主要功能是促使胰岛素分泌,作用于肝细胞和胰岛 β 细胞中糖代谢的第一个限速部位,催化葡萄糖磷酸化。2000 年,Nam 等[2] 对 58 个肾移植后糖尿病患者的基因组 DNA(gDNA)做了突变检测,在 5 号外显子,7,9 号内含子发现了突变。为探讨肝脏移植后糖尿病发病机制与 GCK 基因的相关性,笔者对 30 例肝脏移植后的患者,做了 GCK 基因 12 个外显子的突变检测,旨在找出中国人移植后糖尿病发病基因的突变热点。

1 对象与方法

1.1 对象

收集来自湖南、湖北的汉族人种中 30 例肝移植后 2 型糖尿病患者血样(糖尿病诊断及分型均符合 1999 年 WHO 的标准),采用 PCR-SSCP 的分析方法,对 GCK 基因的 12 个外显子进行突变检测。

1.2 主要试剂与仪器

TakaRa Taq 酶(大连宝生生物公司);中型和大型垂直电泳槽,低电压电源电泳仪(Bio-Rad 公司);377 测序仪(美国 Perkin-Elmer 公司)。RTE-211 型恒温水浴箱(Neslab 公司);PERKIN ELMER 9600 PCR 仪(美国 Perkin-Elmer 公司)。

1.3 方法

1.3.1 模板的准备　常规苯酚/氯仿法抽提外周血基因组 DNA。

1.3.2 引物设计　采用互联网上引物设计软件 Primer 3 设计引物,引物序列见附表。

1.3.3 PCR 扩增　在薄壁 PCR 管中进行 PCR 扩增,PCR 反应体系(50 μl):10 × Buffer 5.0 μl,10 mM dNTP 1.0 μl,20 mmol/L 5′引物 1.5 μl,20 mmol/L 3′引物 1.5 μl,Taq 酶 2 U,模板 100 ng,加 ddH_2O 至体系为 50 μl。扩增条件:96℃ 预变性 3 min,以 95℃ 20 s,60℃ 20 s,72℃ 40 s 循环 30 次,72℃ 延长 10 min。取 4 μl PCR 产物,在 6% 非变性聚丙烯酰胺凝胶上 300V 电泳 40 min,银染,显色。

基金项目:湖南省卫生厅资助项目(Y02-099)。

收稿日期:2003-09-06; **修订日期**:2004-01-08。

作者简介:吴意(1970-),男,湖北广水人,湖南省人民医院主治医师,硕士,主要从事临床免疫学、临床化学,分子免疫学方面的研究。

附表　GCK 基因 12 个外显子的引物设计

外显子	上游引物(5′→3′)	下游引物(5′→3′)	片段长度(bp)
1a	GGA GAA GCC TTG GAT ATT TCC	GGC TCA AAC AAA CCA TGG AAT G	202
1b	AGC AGG CAG GAG CAT CTC TG	GGT AAT CTG CAA AAC CAA GGC	182
1c	CTC ACA TGG CCA ACT GCT AC	GAA GAA GAG GTT CCA TCT GAC	121
2	TGC AGA TGC CTG GTG ACA GC	CAC AGC TGC TTC TGG ATG AG	290
3	TAA TAT CCG GCT CAG TCA CC	CTG AGA TCC TGC ATG CCT TG	295
4	TAG CTT GGC TTG AGG CCG TG	CTC CCC TCA TCT GCC TTC TG	241
5	GAT ATG TTA GCA GCC ACG AGG	AGA AAG GCA GGC AGT GCT GG	203
6	TTC TCC TTG GCT TCC AGC AC	GCC CTT GAA GCC TGT TGT AC	214
7	CGG GGC AGT GCA GCT CTC	CTC CCA TCT GCC GCT GCA C	295
8	TGC CTG CTG ATG TAA TGG TC	TGA GAC CAA GTC TGC AGT GC	262
9-1	GAG CGA CAC TCA GCG ACC G	ATG CGG TTG ATG ACG CCC G	201
9-2	CCT GCG AGA GCG TGT CTA C	CTT GGA GCT TGG GAA CCG CA	229
10	CGG TAA TGA ATG TGG AGG ATG	AGC ACT TCC CCA TGG AGC C	276

1.3.4　单链构像多态性(SSCP)电泳　将扩增好的 PCR 产物 10μl 在 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶(含 7% 甘油)上,4℃,8W,电泳 19h 40min,银染,显色(附图)。

附图　GCK 基因 5 号外显子 SSCP 电泳图

2　结　果

30 例肝移植术后糖尿病(PTDM)患者 GCK 基因 12 个外显子 SSCP 检测均未发现异常条带。

3　讨　论

糖尿病是一种慢性内分泌代谢性疾病,主要是由于胰岛素分泌和胰岛素作用的缺陷。肝移植是治疗终末期肝脏疾病的最后手段,而移植后由于多种因素也可引起糖尿病[3],它与肾脏等器官移植后引起的糖尿病,统称为移植后糖尿病,发病机制目前不很清楚。对于肝脏移植后糖尿病发病的机制,目前认为有以下一些学说:(1)免疫移植剂学说[4];(2)肝移植修正学说[5];(3)胰岛素减少学说[6];(4)自主神经受损学说[7]。但这些学说,目前都有待进一步证实。

笔者对湖南、湖北汉族人种 30 例 PTDM 进行了研究,在 GCK 基因中均未检测到突变。说明 GCK 基因的突变可能不是中国湖南、湖北汉族人种 PTDM 发生的易感因素。也即 GCK 基因的突变,与中国湖南湖北汉族人种 PTDM 患者糖尿病的发生无关。Nam[2] 在肾移植后糖尿病患者中发现 GCK 基因 5 号外显子,7,9 号内含子存在突变,Chiu[8,9] 发现 GCK 基因启动子的突变是迟发型 2 型糖尿病的重要危险因素,但此结论在芬兰和丹麦的人群研究中亦未得到证实。这些说明 GCK 基因与迟发型 2 型糖尿病的相关性存在种族的差异。本次研究未发现突变,可能存在其他致病基因、易感基因,或者不是由于基因的变异。同时由于标本数量有限,也可能造成偏差。希望本研究能为以后大规模对中国汉族人种 PTDM 的研究起到抛砖引玉的作用。

(华中科技大学同济医院李辉军提供部分标本,特表致谢!)

参考文献:

[1] Mishra SK, Helms C, Dorsey D, *et al*. A 2-cM genetic linkage map of human chromosome 7p that includes 47 loci[J]. Genomics, 1992, 12(2):326-334.

[2] Nam JH, Lee HC, Kim YH, *et al*. Identification of glucokinase mutation in subjects with post-renal transplantation diabetes mellitus[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2000, 50(3):169-176.

[3] Steinmuller TH, Stockann M, Bechstein WO, *et al*. Exp Clin En-

docrinol Diabetes, 2000,108(6):401 - 405.

[4] Fernandez LA, Lehmann R, Luzi L, *et al*. The effects of maintenance doses of FK5056 versus cyclosporin A on glucos and lipid metabolism after orthotopie liver transplantation[J]. Transplantation,1999,68(10):1532 - 1541.

[5] Shettty A, Wilson S, Ruo P, *et al*. Liver transplantation improves cirrhosis - associated impaired oral glucose tolerrance. Transplantation, 2000,69(11):2451 - 2454.

[6] Sheiner PA, Magliocca JF, Bodian CA, *et al*. Long - term medical complications in patients surviving > or - 5years after liver transplant[J]. Am J Perinatol,2000,17(6):299 - 302.

[7] Low PA. Autonomic neuropathies[J]. Curr Opin Neurol ,1998, 11(5):531 - 537.

[8] Chiu KC, Province MA, Permutt MA. Glucokinase gene is genetic marker for NIDDM in American blacks[J]. Diabetes, 1992, 41(7): 843 - 849.

[9] Chiu KC, Mc Cathy JE. Promoter variation in the liver glucokinase is a risk factor for non - insulin - dependent diabetes mellitus[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1996, 221(3):614 - 618.

文章编号:1005 - 6947(2004)03 - 0230 - 01

·病例报告·

食管、胃同时多源性癌1例

王小林, 白华, 白翎

(解放军第三二三医院 普外科, 陕西 西安 710054)

关键词:肿瘤,多原发性; 消化系统肿瘤; 病例报告

中图分类号:R735 **文献标识码:**D

患者 男,64岁。因上腹部疼痛伴返酸1个月余,于2003年1月6日入院。体查:一般状况尚可,未触及浅表肿大的淋巴结,心肺部及腹部检查均未见异常。上消化道钡餐示食管中段之右后壁可见局部隆起改变,长约2cm,高约0.2~0.3cm,胃小弯角切迹下方可见1.8cm×2.4cm大小之龛影,周围呈环堤征,黏膜破坏,局部蠕动消失。诊断为食管中段癌,胃窦癌。纤维内镜检查距门齿35cm食管后壁可见一隆起性病变,大小约为0.8cm×1.0cm,表面覆白苔,组织脆易出血。胃角可见一巨大不规则凹陷性溃疡,表面覆污秽苔,周围黏膜粗大集中充血水肿,组织较硬。两处活检病理诊断为食管高分化鳞癌,胃窦中-低分化腺癌(图1)。胸片及腹部B超均未见异常。经术前准备后,于2003年1月14日在全麻下同时行食管癌及胃癌根治术,消化道重建采用结肠代食管经颈部与食管吻合术(图2),手术顺利,术后恢复良好,于2003年1月29日康复出院。术后病理诊断:食管高分化腺癌,侵及黏膜下层;胃中分化腺癌,侵及深肌层达浆肌层。

图1 肿瘤部位示意图

图2 消化道重建示意图

讨论 多源性癌系指人体不同部位及器官同时或先后发生2个以上原发性恶性肿瘤,多源发性癌有同时和异时性之分,前者系指6个月内先后发生2个以上部位的原发性恶性肿瘤,同时多源性癌少见,而同时存在的多源性癌更少见。本例属同时存在的同时性食管、胃多源性癌。

收稿日期:2003 - 12 - 18。

作者简介:王小林(1966 -),男,陕西乾县人,解放军第三二三医院住院医师,主要从事胃肠道肿瘤方面的研究。