

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2009.00265

线粒体基因组 D-Loop 区基因多态性与 2 型糖尿病的相关性

陈芳建, 俞红, 樊璠, 吕建新

温州医学院, 浙江省医学遗传学重点实验室, 温州 325035

摘要: 随机选取 199 例浙江地区 2 型糖尿病患者与 102 例正常对照, 采用聚合酶链反应(Polymerase chain reaction, PCR)、基因片段直接测序来检测线粒体基因组 D-Loop 区域基因变异情况, 同时分析其与主要临床指标的关系。结果显示: 线粒体基因组 D-Loop 区域为一高变异区, np73A-G、np263A-G、np16223C-T、np16519T-C 为 4 个高变异位点; 发现 29 个未见报道的新变异位点; np193A-G、np234A-G、np16108C-T 等变异与糖尿病家族史有关。这表明浙江籍汉族人线粒体基因组 D-Loop 区存在大量基因多态性现象, 此区域的某些变异可能与糖尿病的发生发展等具有一定相关性。

关键词: 线粒体基因组; D-Loop 区基因; 2 型糖尿病; 变异

Mitochondrial D-Loop gene polymorphisms in the patients with type 2 diabetes mellitus

CHEN Fang-Jian, YU Hong, FAN Fan, LU Jian-Xin

Zhejiang Provincial Key Laboratory of Medical Genetics, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China

Abstract: Polymerase chain reaction (PCR) and direct nucleotide sequencing were used to analyze the mitochondrial D-loop gene of 199 Zhejiang patients with T2DM and 102 controls and the relationship between D-Loop gene variations and the main clinical symptoms. The mitochondrial D-Loop gene was a hypervariable area and np73A-G, np263A-G, np16223C-T, and np16519T-C were four high variations, and 29 unreported new variations were found. np193A-G, np234A-G, and np16108C-T were related to diabetes mellitus with family history. These results showed that there are various forms of polymorphism in mitochondrial DNA D-Loop gene in a Zhejiang population, some of which are related to diabetes mellitus.

Keywords: mitochondrial DNA; D-Loop gene; type 2 diabetes mellitus; genovariation

线粒体(Mitochondria)是哺乳动物内存在于细胞核外唯一带有遗传物质的细胞器, 它是生物氧化与能量转换的主要场所。1981 年, Anderson 等^[1]首次公布了人类线粒体基因组(mtDNA)的全部核苷酸序列,

包括编码序列与非编码序列。后者中比较重要的是 mtDNA 复制的控制区(Control region displacement loop, D-Loop 区), 此区占全部 mtDNA 的 6% 左右, 位置在 np16028-577 bp, 富含 A-T 碱基, 遗传上是高突

收稿日期: 2008-08-01; 修回日期: 2008-09-28

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 30470958)资助

作者简介: 陈芳建(1968-), 男, 硕士, 副主任医师, 研究方向: 分子诊断。Tel: 0570-3055059; E-mail: cfj68@163.com

通讯作者: 吕建新(1963-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 分子诊断。Tel: 0577-86689905; E-mail: jxlu313@163.com

变区, mtDNA 的重链和轻链复制起始点均位于此区内, 主要是调控 mtDNA 的转录和复制。已经有大量的研究工作^[2]证实该区是 mtDNA 突变的热点区域, 并发现该区的突变具有累积效应, 随年龄的增长有突变增加的趋势。如果突变发生在 D-Loop 区, 将引起 mtDNA 复制速率的变化甚至使整个线粒体功能发生紊乱。由于上述 D-Loop 区的结构特点, 目前已有许多学者对该区突变与各种疾病之间的关系进行了深入的研究。研究显示, mtDNA D-Loop 区的突变可以引起许多线粒体病^[3]。

在线粒体糖尿病方面, Noda 等^[4]认为, mtDNA 变异一方面影响线粒体呼吸链活性, 氧化磷酸化受抑制, ATP 产生减少, 引发三羧酸循环障碍, 导致胰岛素分泌不足; 另一方面导致 β 细胞凋亡。这些均将引起 T2DM 的发生, 故线粒体糖尿病已逐渐为人们所重视。1996 年 Maassen 和 Kadowaki^[5]两位学者将线粒体糖尿病作为糖尿病的一种新亚型正式报道, 作为窥查糖尿病遗传病因学的重要窗口, 线粒体基因缺陷糖尿病在近年来一直是糖尿病研究的一大热点。但 D-Loop 区基因与 T2DM 之间的相关性报道较少, 仅见有部分学者对该区的 np16189T-C 突变与糖尿病关系进行了相关研究^[6,7]。为进一步了解完整的 D-Loop 区变异与 2 型糖尿病发生之间的相关性, 本实验对 T2DM 患者和正常人 D-Loop 区序列与人类标准剑桥序列进行比对分析, 在了解浙江地区人群 mtDNA D-Loop 区基因多态性的基础上探讨与 T2DM 的发病及与各临床指标之间有关的变异位点。

1 对象与方法

1.1 对象

随机收集浙江地区人群, 病例组为根据 1999 年 WHO 糖尿病诊断标准确诊为 T2DM 的住院患者 199 例, 患者间无亲缘关系; 正常对照组为健康体检者 102 例, 无高血压、高血脂、脑血管病、糖尿病及家族史, 口服葡萄糖耐量正常。两组间年龄、性别等指标无统计学差异 ($P > 0.05$), 具有可比性。所有的检查以及标本的采集手续和过程均按照赫尔辛基宣言的原则进行, 并获得我校伦理委员会批准, 严格按照其规定的程序进行, 并同时得到患者的知情同意。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取

静脉采集经 EDTA- K_2 处理过的抗凝血 2~3 mL, 标本来源于 2005 年 4 月至 2006 年 9 月在浙江省人民医院及温州医学院附属第一医院内分泌科被确诊为 T2DM 的住院病人 199 例及 102 例健康体检者正常对照。采用 Universal Genomic DNA Extraction Kit (宝生物工程(大连)有限公司) 提取受试者外周血白细胞总 DNA, 具体方法见说明书。

1.2.2 引物合成及 PCR 扩增

引物参照 Rieder 等^[8], 由宝生物工程(大连)有限公司合成。序列分别为 F_1 : 5'-TCATTGGACAAGTAGCATCC-3', R_1 : 5'-GAGTGGTTAATAGGGTGATAG-3'; F_2 : 5'-CACCATCTCTCCGTGAAATCA-3', R_2 : 5'-AGGCTAAGCGTTTTGAGCTG-3'。扩增产物为 mtDNA np15811-775 片段, 此片段覆盖 D-Loop 基因序列。扩增条件: 94 预变性 5 min, 94 变性 30 s, 59 复性 45 s, 72 延伸 1 min, 共 35 个循环, 72 再延伸 5 min。

1.2.3 DNA 序列测定及分析

将 PCR 产物纯化后送至温州基康生物公司进行 DNA 测序, 并对测序结果利用 GENTle 软件与剑桥参考序列(Cambridge reference sequence, CRS)进行比对分析查找变异位点。

1.2.4 患者相关临床资料收集

记录病例组(T2DM 组)患者的性别、发病年龄、家族史及并发症(神经性耳聋、视网膜病变、高血压和酮症酸中毒等症状), 并检测其体重指数(BMI)、空腹血糖(FBG)、餐后 1 h 血糖(P_1BG)、餐后 2 h 血糖(P_2BG)、糖化血红蛋白(HbA1c)、空腹胰岛素(FIns)、餐后 1 h 胰岛素(P_1Ins)、餐后 2 h 胰岛素(P_2Ins)、空腹 C 肽(FCP)、餐后 1 h C 肽(P_1CP)、餐后 2 h C 肽(P_2CP)水平、胰岛素抵抗指数(IR)、胰岛素敏感指数(ISI)、总胆固醇(TC)、总甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白(HDL-C)、低密度脂蛋白(LDL-C)。

1.2.5 统计学方法

用 SPSS13.0 统计软件分析病例组与正常对照组的变异例数以及病例组中各项临床资料的统计学

差异。计量资料各数以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 采用 t 检验; 计数资料采用 χ^2 检验及 Fisher 精确概率法。

2 结果与分析

2.1 T2DM 组与正常对照组变异性分析

199 例 T2DM 组中发现有 222 个变异, 其中有 24 个为本研究新发现的变异, 102 例正常对照组中发现 143 个变异, 其中有 5 个为新发现的变异, 而且两组样本中每一例样本都存在变异, 新发现的变异具体见表 1。经统计学分析这些变异在两组间的发生率无显著性差异($P>0.05$), 在两组中除共同存在的 24

种变异发生率大于 10%的变异外, 其中 np73A-G、np263A-G、np16223C-T、np16519T-C 为 4 个高变异位点, 它们在病例组和对照组的发生率分别为 99.5%和 88.2%、97.4%和 87.3%、50.8%和 49.0%、56.8%和 46.0%(表 2), 其余的变异在两组中的发生率低(小于 3%)。

2.2 D310 区微卫星多态性分析

mtDNA np303-315 称 D310 区, 该区主要以 np310 位胸腺嘧啶(T)转变为多种碱基形式, 称微卫星。在病例组中共发现 186 例, 对照组中共发现 73 例, 具有统计学差异($P<0.01$)(表 3)。

表 1 T2DM 组与正常对照组中新发现的变异

突变位点	核苷酸改变	病例组	对照组	突变位点	核苷酸改变	病例组	对照组
16	A-T	1	0	45	ins C	2	0
54	G-C	2	0	56	A-G	0	1
187	G-T	1	0	275	G-A	1	0
308	C-T	1	0	310	T-CCCCC	1	0
323	C-G	1	0	343	C-A	0	1
372	T-C	1	0	409	G-T	1	0
411	C-G	2	0	470	A-T	0	1
507	T-C	1	0	518	C-T	1	0
524	C-T	1	0	534	C-T	1	0
571	C-G	0	1	16068	T-C	1	0
16125	T-C	1	0	16190	ins TC	1	0
16194	insC	2	0	16204	G-A	1	0
16267	C-T	1	0	16295	ins A	0	1
16434	G-A	2	0	16504	del G	2	0
16514	G-A	1	0				

表 2 T2DM 组与正常对照组中共同存在的高变异位点

突变位点	核苷酸改变	病例组	对照组	突变位点	核苷酸改变	病例组	对照组
73	A-G	198	90	146	T-C	24	13
150	C-T	36	16	152	T-C	54	20
207	G-A	19	10	249	del A	39	21
263	A-G	194	89	310	T-CTC	63	32
310	T-CCTC	26	10	310	T-C	31	12
310	T-TC	47	18	489	T-C	75	40
522-523	del CA	48	18	16129	G-A	37	22
16172	T-C	27	19	16182	A-C	35	12
16183	A-C	60	23	16189	T-C	73	30
16223	C-T	101	50	16304	T-C	32	18
16311	T-C	23	12	16319	G-A	21	12
16362	T-C	57	34	16519	T-C	113	47

表 3 D310 区微卫星多态性

微卫星多肽	病例组	对照组	P 值
T-C	31	12	>0.05
T-CC	2	0	>0.05
T-CCC	4	0	>0.05
T-CCCC	10	1	>0.05
T-CCCCC	1	0	>0.05
T-CCTC	26	8	>0.05
T-CT	1	0	>0.05
T-CTC	63	32	>0.05
T-CTCC	2	2	>0.05
T-TC	47	18	>0.05
合 计	186	73	<0.01

表 4 np16181-16193 区域变异所形成的不同碱基排列形式

分组	碱基排列形式	病例组	对照组	P 值
野生型	AAACCCCTCCCC			
1	CCCCCCCCCCCC	1	0	> 0.05
2	ACCCCCCCCCCCC	33	12	> 0.05
3	ACCCCCCTCCCC	3	0	> 0.05
4	AACCCCCCCCCC	23	9	> 0.05
5	AAATCCCCTCCCC	4	3	> 0.05
6	AAACTCCCTCCCC	4	2	> 0.05
7	AAACCTCCCCCCC	1	0	> 0.05
8	AAACCCTCTCCCC	1	0	> 0.05
9	AAACCCCTTCCCC	1	0	> 0.05
10	AAACCCCCCCCC	10	4	> 0.05
11	AAACCCCCCCTC	3	0	> 0.05
12	ACCCCTTCCCCC	1	0	> 0.05
13	AAACCCCTCCTC	3	2	> 0.05
14	AACCCCTCCCC	1	1	> 0.05
15	AAATCCCCCCCC	1	4	> 0.05
合计		90	37	> 0.05

2.3 np16181-16193 区域变异分析

np16181-16193 区域为高度变异区, 此区域的 13 个位点除了 16190、16191、16193 位置的碱基 C 未发现变异外, 其余 10 个碱基均发生变异, 并存在多种变异形式。统计学分析发现此区域的变异发生率在两组间无统计学差异($P>0.05$), 但发现有 7 种变异形式仅存在于 T2DM(表 4)。

2.4 D310 区及 np16181-16193 区域与临床资料间关系

根据 D310 区域和 np16181-16193 区域是否存在

变异将病例组分为变异组和非变异组, 对其临床资料进行统计学分析发现, 在 D310 区域各临床资料在变异组和非变异组中无显著性差异($P>0.05$)(表 5); 在 np16181-16193 区域变异组餐后 1 h 血糖明显高于非变异组($P<0.05$), 其余临床资料无显著性差异(表 6)。

2.5 与家族史及并发症相关的变异位点

根据有无糖尿病家族史, 把发生基因变异的 T2DM 患者分为有家族史组和无家族史组, 分析发现: np193A-G、np234A-G、np16108C-T 这些位点的改变仅在有糖尿病家族史的患者中出现($P<0.05$),

并发现在有家族史的患者中女性患者明显多于男性患者($P<0.01$)(表 7), 测序峰图见图 1, 而两组的主要生化指标比较均无统计学意义($P>0.05$)。

对有无视网膜病变及有无肾病病变的患者的比

较中, 未发现在两组间有显著性差异的变异位点存在; 在有周围神经病变组与无周围神经病变组的比较中发现 np234A-G 变异仅存在于周围神经病变患者组中($P<0.05$)(表 7)。

表 5 糖尿病组 D310 区域变异与非变异组各临床资料比较($\bar{x}\pm s$)

项目	变异组	非变异组	P 值
BMI(kg/m ²)	23.32±3.74	24.98±3.24	0.153
FBG(mmol/L)	8.36±3.57	7.53±1.95	0.435
P ₁ BG(mmol/L)	14.36±4.39	14.95±3.24	0.693
P ₂ BG(mmol/L)	15.79±5.49	16.41±4.73	0.716
FIns(MIU/L)	16.1±18.2	11.7±7.0	0.450
P ₁ Ins(MIU/L)	42.0±40.1	36.6±29.7	0.694
P ₂ Ins(MIU/L)	47.3±41.1	40.7±22.8	0.616
FCP(ng/mL)	2.92±2.23	2.25±2.01	0.359
P ₁ CP(ng/mL)	3.62±2.67	4.24±3.21	0.506
P ₂ CP(ng/mL)	6.11±7.47	6.08±3.31	0.990
IR(mmol*MIU/L ²)	4.43±2.81	3.73±1.81	0.440
ISI(mg/(kg*min))	-1.99±0.33	-1.87±0.23	0.264
TC(mmol/L)	4.83±1.21	4.75±1.14	0.811
TG(mmol/L)	1.98±2.35	1.74±1.30	0.726
HDL-C(mmol/L)	1.25±0.41	1.16±0.33	0.337
LDL-C(mmol/L)	2.47±0.72	2.55±0.76	0.711

注: 表中缩写词含义见 1.2.4 患者相关临床资料收集部分。

表 6 糖尿病组 np16181-16193 区域变异与非变异组各临床资料比较 ($\bar{x}\pm s$)

项 目	变异组	非变异组	P 值
BMI(kg/m ²)	22.99±4.30	23.64±3.63	0.327
FBG(mmol/L)	8.42±3.65	7.83±2.84	0.272
P ₁ BG(mmol/L)	15.40±4.73	13.76±3.43	0.028
P ₂ BG(mmol/L)	16.31±5.85	15.2±4.88	0.193
FIns(MIU/L)	16.2±21.6	16.6±17.3	0.900
P ₁ Ins(MIU/L)	41.6±43.8	46.1±39.4	0.579
P ₂ Ins(MIU/L)	43.8±40.9	52.9±42.1	0.244
FCP(ng/mL)	1.58±1.08	1.67±0.96	0.617
P ₁ CP(ng/mL)	3.47±2.65	4.20±2.86	0.150
P ₂ CP(ng/mL)	4.62±3.01	5.47±3.32	0.139
IR(mmol*MIU/L ²)	5.74±8.76	5.69±7.0	0.975
ISI(mg/(kg*min))	-1.97±0.41	-1.99±0.27	0.705
TC(mmol/L)	4.86±1.31	4.79±1.26	0.767
TG(mmol/L)	1.95±1.70	2.07±2.27	0.783
HDL-C(mmol/L)	1.29±0.44	1.30±0.38	0.888
LDL-C(mmol/L)	2.46±0.78	2.39±0.70	0.596
发病年龄(岁)	52.0±12.06	51.6±12.35	0.840

表 7 与家族史及周围神经病变相关的变异位点比较

项目	有家族史	无家族史	<i>P</i> 值	有神经病变	无神经病变	<i>P</i> 值
np193A-G	3/66	0/133	0.035	2/44	1/155	0.124
np234A-G	3/66	0/133	0.035	3/44	0/155	0.010
np16108C-T	3/66	0/133	0.035	1/44	2/155	0.530
性别(男/女)	28/39	87/45	0.001	26/22	88/63	0.616

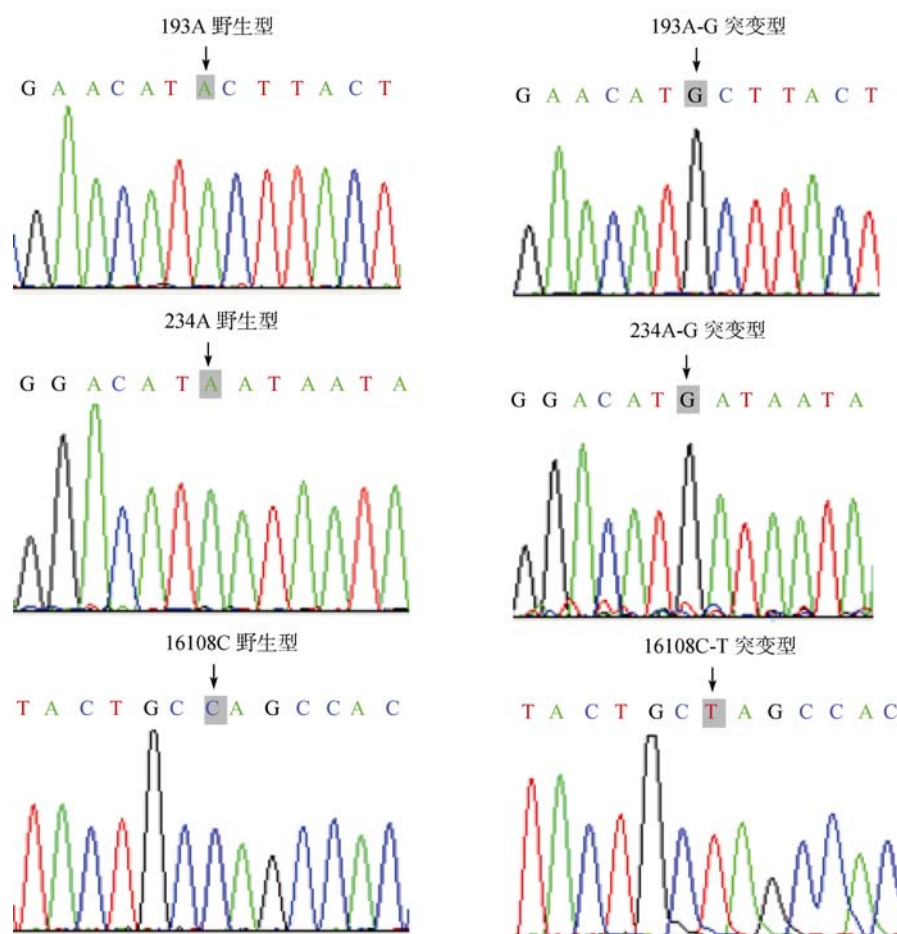


图 1 3 个变异位点的测序峰图

3 讨论

已有大量的研究工作证实mtDNA D-Loop区基因是mtDNA突变的热点区域^[2], 并已发现许多疾病与发生在mtDNA D-Loop区的突变有关, 因此该区被认为是研究各类与基因相关疾病中mtDNA突变的一个热点区域^[9]。

本研究通过对 199 例 T2DM 患者和 102 例正常对照进行 mtDNA D-Loop 区基因的序列检测, 并与 CRS 进行比对, 发现存在着大量的基因变异位点, 在两

组每例样本中均发现 mtDNA D-Loop 区有变异位点存在, 说明 D-Loop 区是 mtDNA 的高变异区, 与有关文献报道一致^[2]。mtDNA D-Loop 区虽然是线粒体基因组的非编码区, 但它包含了转录和复制的必需元件, D-Loop 区的突变可能通过改变与重要的顺式作用因子的亲和性而影响 mtDNA 的复制速度。这种作用有可能通过 D-Loop 区多个位点的突变而改变编码区基因的转录和翻译, 而在编码区中得以表现。mtDNA D-Loop 区大量变异的存在提示线粒体氧化应激过程对于突变可能是高度易感的^[10], 这些突变

可能会轻微提升线粒体内部反应性氧化物质的水平从而改变线粒体的内部环境,影响线粒体功能,从而可能与疾病的发生有关。另外,两组中共有 29 个新发现的变异位点,我们认为浙江地区人群和以西方白种人群为来源的人类 mtDNA 参考序列并不完全一致,可能与地域、人种以及样本量有关。

通过本研究, np73A-G 和 np263A-G 90% 以上的高变异率提示 mtDNA np73G 和 np263G 两个位点的碱基可能是浙江地区人群野生型参考位点。另外, np16223C-T 和 np16519T-C 两个变异发生率相对较高的变异位点是否可以认为是浙江地区人群的野生型参考位点,还需作进一步的研究。

本实验通过对 D310 区域及 np16181-16193 区域的位点突变情况进行分析,发现此两区域均为高度变异区,并在该段区域存在多种碱基变异形式。结合本研究的分析结果, D310 区在 T2DM 组中的变异明显高于正常对照组。由于 D310 区由 12~18 个胞嘧啶残基组成,在 np310 位有一个胸腺嘧啶(T), D310 区是最多发现线粒体微卫星多态性的区域^[11],也是 mtDNA 上的主要微卫星不稳定区。不论是由于 T-C 点突变、插入 C、TC 缺失、CC 或 CCC 缺失,无一例外改变了此区域内胞嘧啶 C 的长度。有学者观察到 mtDNA 的突变经常发生在 np310 附近,本研究也证实了这一点,而这个区域负责 RNA-DNA 的形成,从而开始 mtDNA 的复制^[12],因此一旦发生不稳定将影响其功能的发挥。另外,由于 D-Loop 区是编码蛋白质的控制区, mtDNA D-Loop 区 128-599 片段包含了其 H 链上控制 mtDNA 复制与转录的大部分区域,尤其是 mtDNA 的突变热点区 D310 的 C-stretch 位于这一区域内,在该区域的位点突变可能增加了 T2DM 的发病易感性和增加疾病发展的程度。

在 np16181-16193 区域也同样为高度的变异区。在我们的检测中发现, mtDNA D-Loop 区中 np16181-16193 区域的变异在 T2DM 组的发生率为 45.2%,在正常对照组中其发生率为 36.3%,将两组结果进行统计学比较,两者间无显著性差异存在 ($P>0.05$),与 Chinnery 等^[13]报道一致,并且在该区域所发生的变异率明显高于与 Chinnery 等^[13]所报道的 22.8%,可能与人种及环境因素有关。

在 D310 区的研究中,未发现在 T2DM 变异与未变异组之间各临床生化指标之间存在差异,而在

np16181-16193 区域引起的变异与各临床相关资料的分析中,发现变异组餐后 1 h 血糖明显高于未变异组 ($P<0.05$),其余各项指标在两组间比较并无显著性的差异 ($P>0.05$),与纪力农等^[14]的报道有一定的出入,可能与所选择的人群等有关。而根据 Lin 等^[15]的研究认为: np16189T-C 的变异与糖尿病的发病没有直接的关系,但通过对发生 np16189T-C 突变型与野生型的两组样本进行检测 TBARS 及 Thiols,即氧化应激产物与抗氧化产物,发现 np16189T-C 突变降低了应激状态下的抗氧化作用,从而证实此变异有增加糖尿病易感性及病情发展。mtDNA np16189T-C 位于线粒体 D 环,是调控基因转录及复制的重要部位,具体致病机制未明,一般认为变异可能通过影响外周(肌肉、脂肪细胞)葡萄糖的摄取和利用而促进胰岛素抵抗及糖尿病的发生。也有研究认为:这个区域的突变有可能导致胰岛细胞中 mtDNA 拷贝数量的减少和/或线粒体基因组的基因表达受抑制^[16],然而与核基因组相比, D-loop 区突变的效应目前尚不明确。

本实验中,我们发现病例组 np193A-G、np234A-G、np16108C-T 3 个位点的变异均只在有家族史的 T2DM 病例中发现,虽然 np16108C-T 突变在正常对照组中亦有发现,但我们不能排除环境对突变位点的不同影响。提示这些突变位点的存在可能对糖尿病的发生有一定作用,但其怎样影响蛋白质或 ATP 的合成还需要通过大量的功能实验作进一步的研究。

在糖尿病常见并发症的研究中,本实验仅在周围神经病变组与无周围神经病变组的比较中发现 np234A-G 变异仅存在于有周围神经病变患者组中 ($P<0.05$)。分析认为可能有两方面的因素:一方面由于基因的变异造成线粒体氧化磷酸化受损,胰岛素分泌不足,血糖长期维持在较高水平;另一方面,高血糖能够产生氧自由基^[17],氧自由基又可促进 mtDNA 的损伤。Butler 等^[18]对培养的内皮细胞进行研究,发现高血糖可以增加其 mtDNA 突变率,也就是说其中不少变异是由于长期的高血糖状态造成的,两者互为因果。

本研究显示在 D-Loop 区的某些位点与浙江地区人群中 2 型糖尿病患者的家族史、个别临床症状及并发症有关,所检测到的 D-Loop 区变异大多数可

能是 mtDNA 多态性位点,但也不能排除少部分变异与 T2DM 有直接的相关性,需要进一步增大样本量及相关的功能实验进行证实,以便从遗传学角度做更深入的分析、探讨。

参考文献(References):

- [1] Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJ, Staden R, Young IG. Sequence and organization of human mitochondrial genome. *Nature*, 1981, 290(5806): 457–465. [\[DOI\]](#)
- [2] Wallace DC. Mitochondrial DNA sequence variation in human evolution and disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(19): 8739–8746. [\[DOI\]](#)
- [3] Poulton J, Brown MS, Cooper A, Marchington DR, Phillips DI. A common mitochondrial DNA variant is associated with insulin resistance in adult life. *Diabetologia*, 1998, 41(1): 54–58. [\[DOI\]](#)
- [4] Noda M, Yamaashita S, Takahashi N, Eto K, Shen LM, Izumi K, Daniel S, Tsubamoto Y, Nemoto T, Iino M, Kasai H, Shap GW, Kadowaki T. Switch to anaerobic glucose metabolism with NADH accumulation in the beta-cell model of mitochondrial diabetes. Characteristics of betaHC9 cells deficient in mitochondrial DNA transcription. *J Biol Chem*, 2002, 277(44): 41817–41826. [\[DOI\]](#)
- [5] Maassen JA, Kadowaki T. Maternally inherited diabetes and deafness: a new diabetes subtype. *Diabetologia*, 1996, 39(4): 375–382. [\[DOI\]](#)
- [6] Gill Randall R, Sherratt EJ, Thomas AW, Gagg JW, Lee A, Alcolado JC. Analysis of a polycytosine tract and heteroplasmic length variation in the mitochondrial DNA D-loop of patients with diabetes, MELAS syndrome and race-matched controls. *Diabet Med*, 2001, 18(5): 413–416. [\[DOI\]](#)
- [7] Poulton J, Luan J, Macaulay V, Hennings S, Mitchell J, Wareham NJ. Type 2 diabetes is associated with a common mitochondrial variant: evidence from a population-based case-control study. *Hum Mol Genet*, 2002, 11(13): 1581–1583. [\[DOI\]](#)
- [8] Rieder MJ, Taylor SL, Tobe VO, Nickerson DA. Automating the identification of DNA variations using quality-based fluorescence re-sequencing: analysis of the human mitochondrial genome. *Nucleic Acids Research* 1998, 26(4): 967–973. [\[DOI\]](#)
- [9] Richard SM, Bailliet G, Paez GL, Bianchi MS, Peltomaki P, Bianchi NO. Nuclear and mitochondrial genome instability in human breast cancer. *Cancer Res*, 2000, 60(15): 4231–4237. [\[DOI\]](#)
- [10] Cadet J, Berger M, Douki T, Ravanat JL. Oxidative damage to DNA: formation, measurement, and biological significance. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 1997, 131: 1–87.
- [11] Cavellier L, Jazin E, Jalonen P, Gyllestein U. MtDNA substitution rate and segregation of heteroplasmy in coding and noncoding regions. *Hum Genet*, 2000, 107(1): 45–50.
- [12] Lee DY, Clayton DA. Initiation of mitochondrial DNA replication by transcription and R-LOOP processing. *J Biol Chem*, 1998, 273(46): 30614–30621. [\[DOI\]](#)
- [13] Chinnery PF, Elliott HR, Patel S, Lambert C, Keers SM, Durham SE, McCarthy MI, Hitman GA, Hattersley AT, Walker M. Role of the mitochondrial DNA 16184-16193 poly-C tract in type 2 diabetes. *Lancet*, 2005, 366(9497): 1650–1651. [\[DOI\]](#)
- [14] 纪立农, 高蕾莉, 韩学尧. 线粒体 16189T→C 变异与 2 型糖尿病遗传易感性的相关性研究. *中华医学杂志*, 2001, 81(12): 711–714.
- [15] Lin TK, Chen SD, Wang PW, Wei YH, Lee CF, Chen TL, Chuang YC, Tan TY, Chang KC, Liou CW. Increased oxidative damage with altered antioxidative status in Type 2 diabetic patients harboring the 16189 T to C variant of mitochondrial DNA. *Ann N Y Acad Sci*, 2005, 1042: 64–69. [\[DOI\]](#)
- [16] Shadel GS, Clayton DA. Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates. *Annu Rev Biochem*, 1997, 66: 409–435. [\[DOI\]](#)
- [17] Temperley RJ, Seneca SH, Tonska K, Bartnik E, Bindoff LA, Lightowlers RN, Chrzanowska Lightowlers ZM. Investigation of a pathogenic mtDNA microdeletion reveals a translation-dependent deadenylation decay pathway in human mitochondria. *Hum Mol Genet*, 2003, 12(18): 2341–2348. [\[DOI\]](#)
- [18] Butler AE, Janson J, Bonner Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC. Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes*, 2003, 52(1): 102–110. [\[DOI\]](#)