

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫

成果報告
期中進度報告

(計畫名稱)

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC91 - 2314 - B - 002 - 346 -

執行期間：91年8月1日至93年7月31日

計畫主持人：嚴崇仁

共同主持人：

計畫參與人員：

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

赴國外出差或研習心得報告一份

赴大陸地區出差或研習心得報告一份

出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份

國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

執行單位：國立臺灣大學醫學院附設醫院

中 華 民 國 年 月 日

研究計畫中英文摘要：請就本計畫要點作一概述，並依本計畫性質自訂關鍵詞。

(一) 計畫中文摘要。(五百字以內)

(二) 計畫英文摘要。(五百字以內)

(一) 計畫中文摘要

自由基 (free radicals) 會破壞體內的大分子物質，可能和糖尿病之長期併發症有關。有一些研究顯示：粒腺體內染色體的突變與某些人罹患糖尿病有關。第二型超氧化物歧化酵素 (或 Mn-superoxide dismutase, Mn-SOD) 是由體染色體控制而在粒腺體內代謝自由基的酵素之一，若此酵素之基因有突變存在，可能會導致自由基代謝速率改變，使粒腺體內染色體或蛋白質受自由基攻擊的機會上升，而使某些人容易罹患糖尿病。因此吾人將探討 Mn-SOD 基因是否為糖尿病或其併發症的候選基因 (candidate gene)。近來的研究發現 Mn-SOD 的粒腺體導引序列 (mitochondrial targeting sequence) 有 Ala-9Val (鹼基由 T 變成 C) 多型性存在，此多型性變化可能會導致 Mn-SOD 無法正確輸送至粒腺體代謝自由基。為了評估此多型性變化之臨床意義，吾人進行此實驗。

首先我們收集健康志願者 (共收集到 27 位基因型為 CT、77 位為 TT 者)，取其白血球來觀察白血球在高糖(25mM)狀態下釋放 chemiluminescence (或氧化壓力) 是否受基因型之影響；結果 CT、TT 兩組沒有明顯差異。其次，我們收集 4 組受試者，包括：309 位健康志願者、248 位非糖尿病末期腎病患者、57 位糖尿病無明顯併發症者以及 114 位糖尿病併末期腎病患者，統計發現 CC、CT、TT 基因型在各組之分佈亦無明顯差異。因此 Mn-SOD 基因之 Ala-9Val 多型性可能不會增加發生糖尿病或糖尿病腎病變之危險性。

關鍵詞：過氧化物歧化酵素基因、糖尿病、粒腺體

(二) 計畫英文摘要

Free radicals can attack macromolecules in the body and may contribute to the development of long-term complications of diabetes mellitus. Several reports have shown that mutations of mitochondrial DNA are associated with the susceptibility of diabetes mellitus. Type II superoxide dismutase or Mn-superoxide dismutase (Mn-SOD) is encoded in nuclear DNA and it is, then, sent into mitochondria for metabolizing superoxide. If there is an Mn-SOD gene mutation, the metabolism of free radicals may change and the risk of mitochondrial DNA and proteins damage by free radicals may increase, which may lead to increased susceptibility to diabetes mellitus. Therefore, Mn-SOD gene may be a potential candidate gene for diabetes mellitus and its complications. Previous studies had found an Ala-9Val polymorphism (T to C change in nucleotide) in the mitochondrial targeting sequence of human Mn-SOD. The polymorphism may affect its effective transport to mitochondria and ability to metabolize free radicals. To determine the clinical significance of the polymorphism, we performed this study.

We first recruited 104 healthy volunteers with different genotypes (27 CT and 77 TT cases) to observe the difference of chemiluminescence released from leukocytes in high glucose state (25mM). There was no statistical difference in chemiluminescence (or oxidative stress) between the CT and TT group. Then, another 4 groups of volunteers were enrolled, including 309 normal controls, 248 nondiabetic uremic subjects, 57 diabetics without apparent complications and 114 patients of diabetic nephropathy in end-stage renal disease. The distribution of CC/CT and TT genotypes was not statistically different among the 4 groups. Therefore, Ala-9Val polymorphism in Mn-SOD gene probably does not contribute to the increased susceptibility of diabetes or diabetic nephropathy.

Keywords: superoxide dismutase, diabetes mellitus, mitochondria

報告內容：

(一) 前言：

自由基 (free radicals) 會破壞體內的大分子物質，可能和糖尿病之長期併發症有關。有一些研究顯示：粒腺體內染色體的突變與某些人罹患糖尿病有關。第二型超氧化物歧化酵素 (或 Mn-superoxide dismutase, Mn-SOD) 是由體染色體控制而在粒腺體內代謝自由基的酵素之一，若此酵素之基因有突變存在，可能會導致自由基代謝速率改變，使粒腺體內染色體或蛋白質受自由基攻擊的機會上升，而使某些人容易罹患糖尿病。因此吾人將探討 Mn-SOD 基因是否為糖尿病或其併發症的候選基因 (candidate gene)。

(二) 研究目的：

評估 Mn-SOD 基因多型性是否有臨床之重要性。

(三) 文獻探討：

細胞進行有氧呼吸及某些代謝反應的過程中會產生自由基，例如：superoxide、hydrogen peroxide、hydroxy radical、nitric oxide 等。這些自由基因外側軌道有不成對電子，反應性極強，會攻擊體內許多重要的大分子物質，如：蛋白質、核酸、脂質等，對生物體構成氧化壓力(oxidative stress)。體內為減輕這種傷害，採取許多防禦措施〔1,2〕，包括：代謝自由基的酵素、修補 DNA 的酵素、抗氧化物等。在高血糖狀態下，體內許多生化反應會加速，像：glucose autoxidation、polyol pathway、protein glycation 等，這些反應皆會增加自由基 (free radicals) 之生成〔3,4〕。不少研究曾發現糖尿病患有較高的氧化壓力〔3,5,6〕，也有許多研究認為氧化壓力與糖尿病長期併發症的發生相關〔7-9〕。然而，並非每一位糖尿病患者皆會發生腎病變，這固然受各人血糖控制好壞等環境因子所影響，但各人體內對抗氧化壓力的能力強弱是否也影響腎病變的發生機會乃是值得深入探討的課題。

超氧化物歧化酵素 (superoxide dismutase, SOD) 可代謝 superoxide，是體內重要防衛機制之一。人體內共有三種 SOD，分別由不同基因轉錄後再轉譯而來。SOD 第 1 型 (Zn,Cu-SOD) 在細胞質中作用，第 2 型 (Mn-SOD) 於粒腺體內作用，第 3 型 (EC-SOD) 則在細胞外作用〔1,2〕。細胞內超過 95% 的氧氣在粒腺體中耗用代謝，自由基在該處產生甚多；另一方面，粒腺體中的 DNA 缺少 histone 保護，而粒腺體修補本身 DNA 的能力又差，所以粒腺體本身的 DNA 易因自由基攻擊產生突變，並可因此導致退化性疾病〔2〕。近來有一些研究顯示：粒腺體 DNA 之突變與部分人罹患糖尿病相關〔10-12〕，也有學者指出粒腺體失調可能會誘發糖尿病患者產生微量蛋白尿 (microalbuminuria)〔13〕，這是一種糖尿病腎病變的早期變化。Mn-SOD 是粒腺體內對抗自由基的一個重要防線，若其功能因基因突變產生缺損，可能會使粒腺體內核酸或蛋白質受自由基攻擊之機會大幅上升，是否會因此與糖尿病或糖尿病腎病變之發生相關，則有待進一步研究。

人類 Mn-SOD 基因的分子結構雖已被發表〔14,15〕，但不同報告的結果並不一致，尤其在某些 introns 與 5'端部分。這顯示此基因有多型性存在或某些分子結構研究的定序有誤。在白種人，此酵素的第 58 個胺基酸可因基因多型性由 Ile 變成 Thr，此種變化會導致此酵素之活性降低〔16〕。此外，在美國與日本也分別有研究指出：導引 Mn-SOD 至粒腺體的序列 (mitochondrial targeting sequence) 也有多型性存在，第 9 個胺基酸可由 Ala 變成 Val (鹼基由 T 變成 C)〔17,18〕。這種改變影響 Mn-SOD 能否正確地被傳送至粒腺體發揮作用，而與罹患 Parkinson's disease 相關〔18〕。目前無論在任何人種，皆

尚無有關 Mn-SOD 基因多型性與糖尿病相關性之研究。

由於基因多型性在不同人種會有不同的分佈，吾人收集 48 位本地糖尿病腎病變患者，利用 SSCP 方式篩檢 Mn-SOD 之 6 個 exons。結果 Ala-9Val 之變化也一樣發生於國人，-9Val (C allele) 出現之機率約為 14.6%，至於另一 Ile58Thr 多型性則未在此群病患發現。有此初步結果後，吾人想進一步了解此種多型性到底是否有任何臨床意義，於是設計本實驗，一方面觀察不同基因型白血球對抗高糖誘發之氧化壓力之能力是否有差別，同時也觀察 Mn-SOD 是否為糖尿病或糖尿病腎病變之候選基因。

(四) 研究方法：

A. Mn-SOD 多型性與高葡萄糖誘發之氧化壓力

1. 收集受試者分離白血球：

健康志願者填寫同意書後，靜脈採血 10 ml 加入肝素防止血液凝固，並立即以鋁箔紙包起避光，以免干擾後續自由基測量。部份全血以自動分析儀測量單位體積中白血球數目，並取部份血液抽取白血球中之 genomic DNA 且測定其濃度備用。

2. 決定受試者之基因型：

利用 5'CTGTGCTTTCTCGTCTTCAG3' 及 5'CGCTCAGCCTGGAACCTAC3' 為 primers，取 genomic DNA 為模板，以聚合酵素連鎖反應放大 Mn-SOD 之 exon 2，再跑 SSCP 膠片。從跑膠結果可得知基因型，-9Val homozygote (CC) 者得單一跑較快的 band，-9Ala homozygote (TT) 得一跑較慢的 band，而 heterozygote (CT) 則有兩個 bands。不確定個案再以直接定序 (sequencing) 方式確認。

3. 高葡萄糖誘發之自由基增產的測量：

白血球分別以含 5mM 及 25mM 葡萄糖的 RPMI medium 培養。自由基與 lucigenin 起反應後可改變 lucigenin 所釋放出之 chemiluminescence (CL) 的量，因此從 CL 值可推算自由基含量。最後再比較不同基因型的檢體在高葡萄糖狀態下 CL 值之變化。

B. Mn-SOD 多型性與糖尿病腎病變之關係

1. 收集志願受試者：

收集已填寫志願書之健康人、糖尿病無明顯併發症者、糖尿病併末期腎病患者以及非糖尿病末期腎病患者，登錄其基本資料。

2. 決定受試者基因型：

抽血取白血球之 genomic DNA，利用 SSCP 或直接定序決定各檢體之基因型。

3. 統計分析：

觀察各組間 CC、CT 及 TT 之分布頻率是否有差異。若 CC/CT 在糖尿病末期腎病組出現頻率偏高，則可支持此多型性可能與糖尿病腎病變之發生相關。

(五) 結果與討論：

A. Mn-SOD 多型性與高葡萄糖誘發之氧化壓力

總共收集 104 位無糖尿病之健康志願者，將其白血球培養於含不同濃度葡萄糖的 RPMI medium 中，然後加入 lucigenin 測量所釋放出之 CL 的量。受試者有 27 位基因型呈 CT, 77 位呈 TT。因為所測得 CL 數值不呈常態分佈，統計使用 Mann-Whitney U-Wilcoxon rank sum W test 來比較 CT 與 TT 兩組間在高糖情況下自由基產量之變化。結果兩組皆約有 2.2 倍之增加，沒有統計上之差異。

B. Mn-SOD 多型性與糖尿病腎病變之關係

總共收集 309 位健康志願者、248 位非糖尿病末期腎病患者、57 位糖尿病無明顯併發症者以及 114 位糖尿病併末期腎病患者，共計 728 人。各組經 SSCP 或核酸定序後，各種基因型之個案數如下表：

	CC	CT	TT	總計
健康志願者	6	72	231	309
非糖尿病末期腎病患者	3	67	178	248
糖尿病無明顯併發症者	1	11	45	57
糖尿病併末期腎病患者	3	23	88	114
總計	13	173	542	728

隨後以 Chi-square test 分析各種基因型在不同受試者組別之分佈是否有差異。結果 p 值大於 0.05，未發現統計上之差異。吾人並進一步使用 t-test 觀察不同基因型是否影響透析開始之年齡，結果 CC/CT 組平均開始透析年齡為 55.4+/-15.6 歲，而 TT 組平均開始透析年齡為 53.3+/-15.2 歲，亦無統計上差異。

C. 討論

本研究並未如預期發現 Mn-SOD 多型性影響高糖下白血球自由基釋出量，可能原因包括：第 9 個胺基酸由 Ala 變成 Val（鹼基由 T 變成 C）真的不影響其功能、體內其他代謝自由基之物質能充分代償 Mn-SOD 基因改變所造成之影響以及未知的環境因子干擾實驗進行導致測量值不準而結果看不出變化。

本研究也未發現 Mn-SOD 多型性與糖尿病或糖尿病併末期腎病之發生相關連。其可能原因則包括：Mn-SOD 多型性確實沒有臨床意義、Mn-SOD 多型性需與其他代謝自由基酵素（如：glutathione peroxidases）之多型性合併考量才能發現臨床意義以及取樣問題使統計無法呈現有意義變化（如：糖尿病無明顯併發症者與糖尿病併末期腎病患者兩組個案數稍少）因此，目前可暫認為 Mn-SOD 基因之 Ala-9Val 多型性可能不會影響發生糖尿病或糖尿病腎病變之機會，但未來仍需收集更多個案，並同時分析幾個與自由基代謝相關之酵素以釐清真相。

（六）參考文獻：

1. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM: Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 7915-22, 1993.
2. Fridovich I: Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 64: 97-112, 1995.
3. Giugliano D, Ceriello A, Paolisso G: Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* 19: 257-67, 1996.
4. Ha H, Lee HB. Effect of high glucose on peritoneal mesothelial cell biology. *Perit Dial Int* 2000; 20(Suppl 2):S15-18.
5. Rehman A, Nourooz-Zadeh J, Moller W, Tritschler H, Pereira P, Halliwell B: Increased oxidative damage to all DNA bases in patients with type II diabetes mellitus. *FEBS Lett* 448: 120-2, 1999.
6. Nuttal SL, Dunne F, Kendall MJ, Martin U: Age-independent oxidative stress in elderly patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. *QJM* 92: 33-8, 1999.
7. Hinokio Y, Suzuki S, Hirai M, Chiba M, Hirai A, Toyota T: Oxidative DNA damage in diabetes mellitus: its association with diabetic complications. *Diabetologia* 42: 995-8,

- 1999.
8. Hofmann MA, Schiekofer S, Isermann B, Kanitz M, Henkels M, Joswig M, Treusch A, Morcos M, Weiss T, Borcea V, Abdel-Khalek AK, Amiral J, Nawroth PP, et al: Peripheral blood mononuclear cells isolated from patients with diabetic nephropathy show increased activation of the oxidative-stress sensitive transcription factor NF-kappa B. *Diabetologia* 42: 222-32, 1999.
 9. Morocutti A, Sethi M, Hayward A, Lee A, Viberti G: Glutathione reverses the growth abnormalities of skin fibroblasts from insulin-dependent diabetic patients with nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 9: 1060-6, 1998.
 10. Ballinger SW, Shoffner JM, Hedaya EV, et al: Maternally transmitted diabetes and deafness associated with a 10.4 kb mitochondrial DNA deletion. *Nature Genet* 1: 11-5, 1992.
 11. 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 and deafness. *Nature Genet* 1: 368-71, 1992.
 12. Kameoka K, Isotani H, Tanaka K, et al: Noval mitochondrial DNA mutation in tRNA^{Lys} (8296A-->G) associated with diabetes. *Biochem Biophys Res Commun* 245: 523-7, 1998.
 13. Takebayashi S, Kaneda K: Mitochondrial derangement: possible initiator of microalbuminuria in NIDDM. *J Diab Complic* 5: 104-6, 1991.
 14. Ho YS, Crapo JD: Isolation and characterization of complementary DNAs encoding human manganese-containing superoxide dismutase. *FEBS Lett* 229: 256-60, 1988.
 15. Wan XS, Devalaraja MN, St. Clair DK: Molecular structure and organization of the human manganese superoxide dismutase gene. *DNA Cell Biol* 13: 1127-36, 1994.
 16. Borgstahl GEO, Parge HE, Hickey MJ, et al: Human mitochondrial manganese superoxide dismutase polymorphic variant Ile58Thr reduces activity by destabilizing the tetrameric interface. *Biochemistry* 35: 4287-97, 1996.
 17. Rosenblum JS, Gilula NB, Lerner RA: On signal sequence polymorphisms and diseases of distribution. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 4471-3, 1996.
 18. Shimoimoda-Matsubayashi S, Matsumine H, Kobayashi T, et al: Structural dimorphism in the mitochondrial targeting sequence in the human manganese superoxide dismutase gene. *Biochem Biophys Res Commun* 226: 561-5, 1996.

研究結果自評：

本研究並未如預期發現 Mn-SOD 多型性影響高糖下白血球自由基產量，也未發現 Mn-SOD 多型性與糖尿病或糖尿病併末期腎病之發生相關，初步可說 Mn-SOD 多型性沒有臨床重要性。但辛苦收集的數百名個案以及本研究所採用之技術仍可作為進一步研究之基礎，未來可以繼續用於分析其他糖尿病或尿毒症候選基因之重要性。