

论著·临床研究

青少年的成人起病型糖尿病家系 *NEUROD1* 基因突变的筛查与功能解析

张娟¹, 葛晓旭^{2,3}, 张荣², 蒋伏松², 蒋燕燕², 李鸣², 李甜甜², 刘婵薇², 陈亚婷², 刘丽梅²

1. 黄淮学院医学院形态学教研室, 驻马店 463000; 2. 上海交通大学医学院附属第六人民医院内分泌代谢科, 上海市糖尿病研究所, 上海 200233; 3. 上海交通大学医学院附属同仁医院内分泌代谢科, 上海 200336

[摘要] 目的·筛查青少年的成人起病型糖尿病 (maturity-onset diabetes of the young, MODY) 家系中 *NEUROD1* 基因突变, 分析突变与中国人 MODY6 发病的相关性及其潜在的致病机制。方法·采用 PCR-直接测序法对 96 例 *GCK/MODY2*、*HNF1A/MODY3*、*HNF1B/MODY5* 突变阴性的中国 MODY 先证者进行 *NEUROD1* 突变筛查, 同时比较 96 例 MODY 先证者与 100 例非糖尿病对照者 *NEUROD1* 基因变异的基因型频率。采用从头建模法构建 *NEUROD1* 蛋白野生型和突变体的 3D 结构, 采用双荧光素酶报告基因系统检测野生型和突变体蛋白对胰岛素基因转录活性的影响。结果·在一个 MODY 家系中发现 *NEUROD1* 基因杂合错义突变 Glu59Gln (NM_002500.5, c.175G>C)。3D 结构分析发现, 该突变将野生型中带负电荷的 Glu59 转化为突变中不带电荷的 Gln59, 导致两个盐桥键 Glu59-Arg54 和 Glu59-Lys88 缺失, 并形成一个新的氢键 Gln59-Arg54。与野生型相比, Glu59Gln 突变体的胰岛素基因转录活性下降 36.3% ($P<0.05$)。与非糖尿病对照相比, 96 例 MODY 先证者中 Ala45Thr (G-A) 变异的 AA+GA 基因型频率显著升高 ($P=0.002$)。结论·Glu59Gln 突变改变了 *NEUROD1* 蛋白 N 端的分子构象, 导致其胰岛素基因转录活性显著下降, 是该家系突变携带者胰岛素分泌缺陷的原因。Ala45Thr 变异与 MODY6 先证者糖尿病发病年龄的提前有关。

[关键词] 青少年的成人起病型糖尿病; *NEUROD1* 基因; MODY6; Glu59Gln 突变; 功能解析

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2023.10.005 **[中图分类号]** R587.1 **[文献标志码]** A

Screening and functional analysis of mutations in *NEUROD1* gene in pedigrees of maturity-onset diabetes of the young

ZHANG Juan¹, GE Xiaoxu^{2,3}, ZHANG Rong², JIANG Fusong², JIANG Yanyan², LI Ming², LI Tiantian², LIU Chanwei², CHEN Yating², LIU Limei²

1. Department of Morphology, School of Medicine, Huanghuai University, Zhumadian 463000, China; 2. Department of Endocrinology and Metabolism, Shanghai Sixth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai Diabetes Institute, Shanghai 200233, China; 3. Department of Endocrinology and Metabolism, Tongren Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200336, China

[Abstract] **Objective**·To screen the mutations of *NEUROD1* gene in families of maturity-onset diabetes of the young (MODY), and investigate the correlation between the mutation and MODY6 and its potential pathogenesis in Chinese. **Methods**·PCR-direct sequencing was used for screening *NEUROD1* mutations from 96 MODY probands who were negative for mutations in the *GCK/MODY2*, *HNF1A/MODY3* and *HNF1B/MODY5* genes, and the genotypic frequency of *NEUROD1* variations were compared between the 96 MODY probands and 100 non-diabetic control subjects. A de novo modeling method was used to predict the three-dimensional (3D) structures of wild type (WT) and mutated *NEUROD1* proteins. Transcriptional activities of both WT and mutant of *NEUROD1* on insulin gene were detected by using dual luciferase reporter gene system. **Results**·Glu59Gln (NM_002500.5, c.175G>C), a heterozygous missense mutation in the *NEUROD1* gene, was identified in a MODY pedigree. 3D structural analysis showed that the mutation transformed the negatively charged Glu59 of WT into uncharged mutation Gln59, leading to the loss of Glu59-Arg54 and Glu59-Lys88, two salt bridge bonds, and the formation of Gln59-Arg54, one new hydrogen bond. Transcriptional activity of Glu59Gln mutant for insulin gene was reduced by 36.3% when compared with that of WT ($P<0.05$). A common variation Ala45Thr (G-A) was identified, and AA+GA genotypic frequency of the variation was significantly elevated in the 96 MODY probands in comparison to non-diabetic control subjects ($P=0.002$). **Conclusion**·Glu59Gln mutation alters the N-terminal

[基金项目] 河南省科技攻关项目 (212102310764); 国家自然科学基金 (81970686, 81770791)。

[作者简介] 张娟 (1989—), 女, 讲师, 博士; 电子信箱: 839329711@qq.com。

[通信作者] 刘丽梅, 电子信箱: lmliu@sjtu.edu.cn。

[Funding Information] Project of Science and Technology of Henan Province (212102310764); National Natural Science Foundation of China (81970686, 81770791)。

[Corresponding Author] LIU Limei, E-mail: lmliu@sjtu.edu.cn。



molecular conformation of NEUROD1 protein, resulting in decreased transcriptional activity of insulin gene, which is the cause of the defective insulin secretion in mutation carriers of the MODY6 pedigree. The Ala45Thr variation is associated with earlier age of onset of diabetes in MODY6 probands.

[Key words] maturity-onset diabetes of the young (MODY); *NEUROD1* gene; MODY6; Glu59Gln mutation; functional analysis

NEUROD1蛋白又名BETA2,是一种碱性螺旋-环-螺旋(basic helix-loop-helix, bHLH)转录因子,不仅调节内分泌腺发育,而且与细胞中广泛存在的bHLH蛋白E47结合形成异源二聚体,作用于胰岛素启动子,激活胰岛素基因表达^[1]。在胰岛素基因转录中起主导作用的*NEUROD1*能够与转录因子*PDX1*和*MafA*相互作用,协同激活胰岛β细胞中的胰岛素基因^[2]。除胰岛素基因外,*NEUROD1*还激活青少年的成人起病型糖尿病(maturity-onset diabetes of the young, MODY)其他相关基因,如*ABCC8/MODY12*、*GCK/MODY2*和转录因子基因*PAX6*,从而间接调节胰岛素基因的转录和表达^[3]。

NEUROD1失活导致小鼠和人类发生糖尿病。靶向破坏小鼠*NeuroD1*双等位基因导致小鼠发展为严重的糖尿病,并在围生期死亡;同时观察到胰岛β细胞数量显著减少、胰岛发育不成熟,表明NEUROD1对正常胰岛结构的形态发生至关重要^[4]。研究^[1]发现,NeuroD1为功能性α和β细胞分化所必需,因小鼠*NeuroD1*缺失改变了α和β细胞的特性(包括α和β细胞分化、β细胞增殖、胰岛素产生和胰岛形成的关键转录因子的表达),最终导致严重的新生小鼠糖尿病。人类胚胎干细胞(human embryonic stem cells, HESCs)的研究^[5]发现,HESCs中NEUROD1失活导致β细胞转录网络无法激活,以致其无法分化为功能性β细胞。此外,人类*NEUROD1*杂合突变导致MODY6亚型^[6],而纯合突变导致表型更为严重的永久性新生儿糖尿病^[7]。而且,*NEUROD1*基因Ala45Thr多态与2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)显著相关,特别是在亚洲人群中^[8-9]。

与*GCK/MODY2*和*HNF1A/MODY3*不同,*NEUROD1/MODY6*非常少见。迄今为止,报道了约20种*NEUROD1*基因突变与MODY6亚型相关,且主要是高加索人群的突变(人类基因突变数据库:<https://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>),在亚洲人中则鲜有报道^[10]。*NEUROD1*基因突变非常罕见,可能是由于突变表型的不完全外显而导致其被忽视。本研究对96例*GCK/MODY2*、*HNF1A/MODY3*、

*HNF1B/MODY5*基因阴性的中国MODY先证者进行*NEUROD1*突变筛查,并对鉴定出的突变进行结构和功能解析,探讨突变与临床表型的遗传-共分离,同时分析*NEUROD1*基因Ala45Thr多态与MODY先证者发病的相关性。

1 对象与方法

1.1 研究对象

2018—2021年96例不相关MODY先证者及其家庭成员被转诊或招募到上海交通大学医学院附属第六人民医院糖尿病研究所,并所进行标准化临床特征评估和*NEUROD1*基因突变筛查。96例MODY先证者符合以下标准:①发病年龄<25岁。②糖尿病家族史≥3代。③胰岛β细胞抗体阴性。④*GCK/MODY2*、*HNF1A/MODY3*、*HNF1B/MODY5*突变阴性。此外,从该医院体检中心招募100名无血缘关系的非糖尿病对照受试者(年龄≥60岁,无糖尿病家族史,糖耐量正常)。通过口服葡萄糖耐量试验(oral glucose tolerance test, OGTT)检测非糖尿病对照受试者的糖耐量,同时满足以下3个标准则判定为糖耐量正常^[11]:①空腹血糖<5.6 mmol/L。②餐后2 h血糖<7.8 mmol/L。③糖化血红蛋白<5.7%。

1.2 遗传分析

使用Qiagen试剂盒(Qiagen,德国)从外周血白细胞或唾液中提取受试者的基因组DNA。应用PCR-直接测序和多重连接依赖探针扩增技术(multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA)筛查样本中的*NEUROD1*突变。使用3对引物检测该基因的编码序列以及*NEUROD1*的侧翼序列^[10]。Sanger测序用于检测筛选出的突变与家族其他成员高血糖的共分离情况。

1.3 生物信息学分析

使用Clustal O(<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)对来自不同物种的NEUROD1蛋白的特定区域进行比对,以评估物种间的保守性。应用SIFT、

Polyphen-2 和 MutationTaster 软件预测突变的有害、致病性。此外,由于蛋白质晶体结构数据库中没有 *NEUROD1* 的晶体结构和相似性很高的同源蛋白,采用从头建模方法预测野生型 *NEUROD1* 和突变体的三维结构^[12]。

1.4 双荧光素酶报告基因系统检测

将人胰岛素启动子区域亚克隆至 pGL3-质粒(美国 Promega 公司)构建报告基因载体。使用 QuikChange[®] 定点诱变试剂盒将 Glu59Gln 突变引入小鼠 *NeuroD1* (*mNeuroD1*) cDNA,并通过 DNA 测序进行验证。使用 pcDNA3.3 (+)、pcDNA3.3-*mNeuroD1*-WT 和 pcDNA3.3-*mNeuroD1*-Glu59Gln 构建表达载体并转染到小鼠 MIN6 细胞,同时共转染 pGL3-hINS 启动子载体和作为内部对照的含有海肾荧光素酶基因的 pRL-TK 载体。转染后 48 h 收集细胞,并根据试剂盒说明书检测荧光素酶活性,每个实验重复 3 次。Western blotting 用于检测转染的野生型 *NeuroD1* 和 Glu59Gln 突变蛋白的表达水平是否相等。

1.5 统计学方法

使用 SPSS 28.0 和 GraphPad Prism 7.0 软件对数据

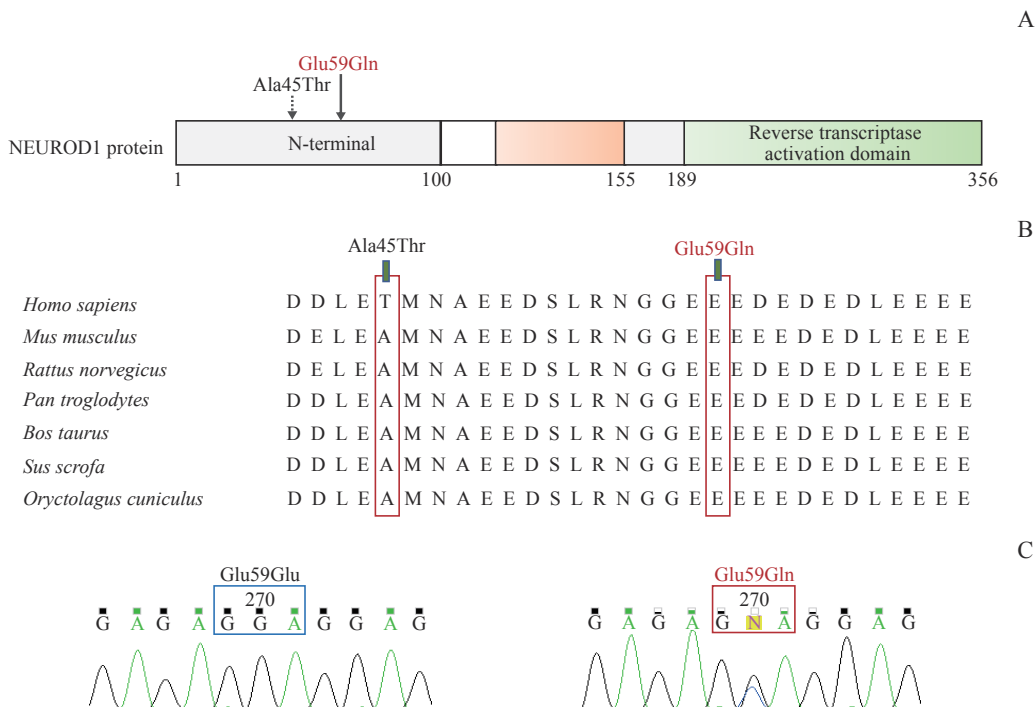
进行分析和处理。数据表示为 $\bar{x} \pm s$ 或中位数(四分位数间距)。组间定量资料比较采用 *t* 检验或单因素方差分析,偏态分布的数据在分析前进行对数变换。组间基因型及等位基因频率分布比较采用 Fisher 确切概率法或 χ^2 检验。计算等位基因及相应基因型的 OR 值(95%CI)。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 遗传分析

在一个 MODY 家系中鉴定出 *NEUROD1* 基因杂合错义突变 Glu59Gln (NM_002500.5, c.175 G>C),通过 Sanger 测序基因分型发现,在 100 名非糖尿病对照者中不存在该突变。

在该家族中,先证者、先证者的儿子、先证者的 1 个哥哥和 1 个姐姐被证实携带该突变且为糖尿病患者,分别在 25、12、30 和 33 岁被诊断患有糖尿病;而先证者的父亲(63 岁)虽然携带 Glu59Gln 突变,但 OGTT 结果显示其糖耐量正常;先证者的母亲 56 岁时被诊断为 2 型糖尿病但不携带该突变。Glu59Gln 突变发生在 *NEUROD1* 蛋白的 N 端, E59 在哺乳动物间高度保守(图 1)。



Note: A. Schematic organization of *NEUROD1* protein. The numbers indicate the amino acids bordering the functional domains. Solid and dashed arrows indicate the identified mutation Glu59Gln and variation Ala45Thr in *NEUROD1* gene, respectively. B. Alignment of specific regions of *NEUROD1* from different mammals using Clustal O. C. DNA sequences of two genotypes of WT (Glu59Glu) and mutant (Glu59Gln) in *NEUROD1*.

图 1 *NEUROD1* 基因中 Glu59Gln 突变的鉴定

Fig 1 Identification of Glu59Gln mutation in *NEUROD1* gene

此外, 与T2DM相关的 *NEUROD1* 基因 Ala45Thr 变异亦是 MODY 先证者的常见多态。与非糖尿病对照组相比, MODY 先证者队列中 AA+GA 基因型频率显著增加 ($OR=3.6$, $95\%CI$ 1.6~8.1, $P=0.002$), A 等位基因频率亦显示相似增加趋势 ($OR=3.6$, $95\%CI$ 1.7~7.9, $P=0.001$) (表1)。

2.2 生物信息学分析

为了研究 *NEUROD1*-Glu59Gln 突变对蛋白质结构的影响, 建立 *NEUROD1* 的 3D 结构模型, 并进一步分析野生型 Glu59 和突变型 Gln59 与其周围氨基酸的相互作用 (图2)。图2A 和 2B 显示野生型 Glu59 和突变型 Gln59 在 *NEUROD1* 蛋白整体结构中的定位。带负电的野生型 Glu59 与周围带正电的 Arg54 和 Lys88 形成了强盐桥键, 而 Glu59 的主链与 Gly56 和

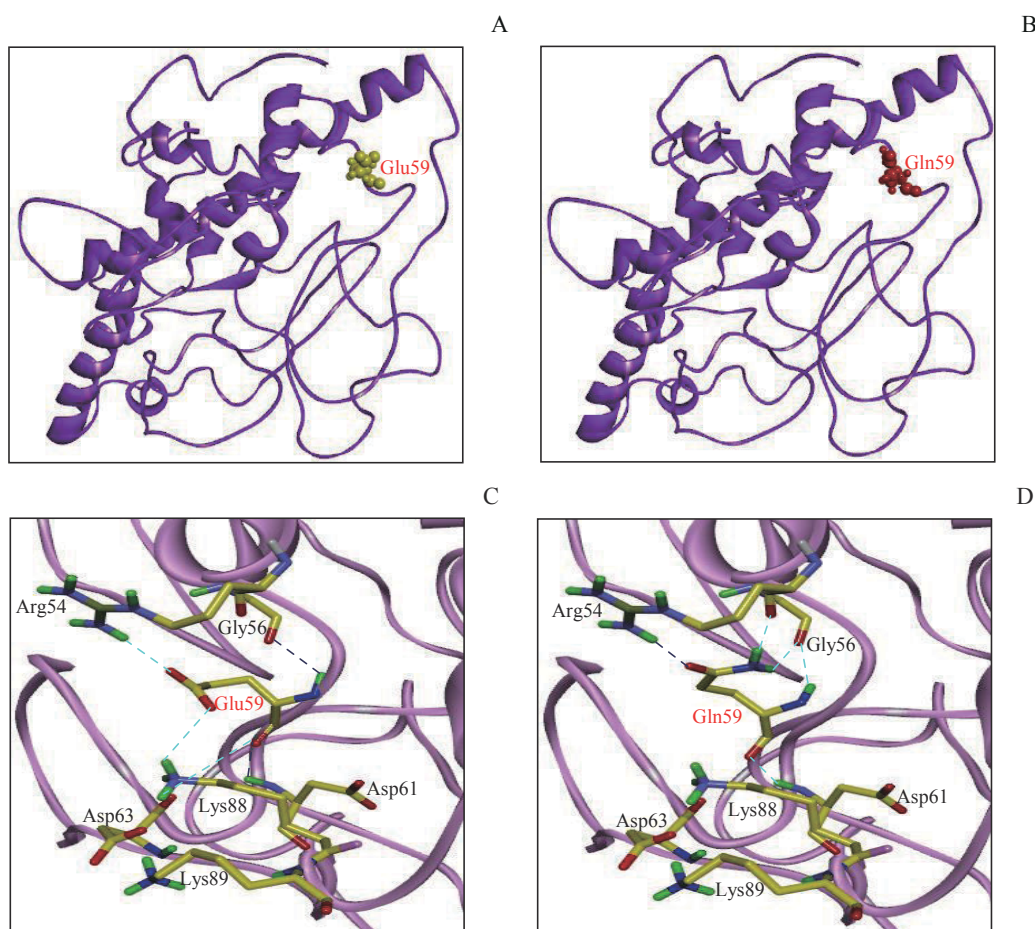
表1 非糖尿病对照者与 MODY 先证者 *NEUROD1* 基因 Ala45Thr 变异的分布 [$n(\%)$]

Tab 1 Distribution of Ala45Thr variation in *NEUROD1* gene between non-diabetic controls and MODY probands [$n(\%)$]

Group	n	Frequency of genotypes			Frequency of alleles	
		AA	GA	GG	A	G
Non-diabetic control	100	0 (0)	9 (9.0)	91 (91.0)	9 (4.5)	191 (95.5)
MODY proband	96	3 (3.1)	22 (22.9) ^①	71 (74.0)	28 (14.6) ^②	164 (85.4)

Note: ^① $P=0.002$, ^② $P=0.001$, compared with non-diabetic controls.

Asp61 分别形成了氢键 (图2C)。在 Glu59Gln 突变中, Glu59 侧链的盐桥键被破坏, 而突变的 Gln59 与 Arg54 形成了新的氢键 (图2D)。此外, SIFT、Polyphen-2 和 MutationTaster 软件预测结果显示 Glu59Gln 突变有害、致病。



Note: A/B. The location of wild type Glu59(A) and mutant Gln59(B) on the global landscape of *NEUROD1* protein. C. Interaction of Glu59 with surrounding residues. The side chains of Glu59 formed strong salt bridge bonds with Arg54 and Lys88, and the main chains of Glu59 formed hydrogen bonds with Gly56 and Asp61, respectively. D. Interaction of Gln59 with surrounding amino acids. In the Glu59Gln mutation, the salt-bridge bonds of the side chains of Glu59 were disrupted, while the mutated Gln59 formed a new hydrogen bond with Arg54. Blue dotted lines represent salt bridge bonds formed between amino acids, while green dotted lines represent hydrogen bonds.

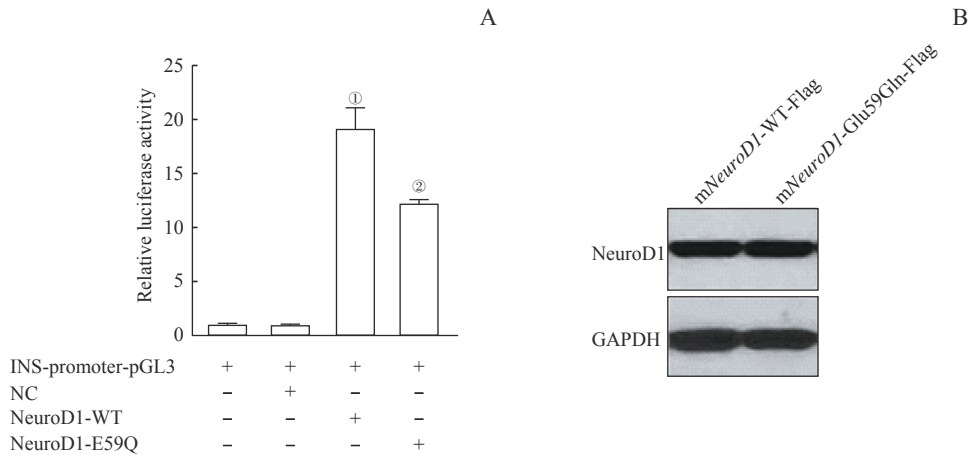
图2 *NEUROD1* 野生型和 Glu59Gln 突变体的 3D 结构模型

Fig 2 3D structural models of wild type and Glu59Gln mutant of *NEUROD1* protein

2.3 转录活性

为了进一步评估 Glu59Gln 突变对蛋白功能的影响,使用双荧光素酶报告基因系统在小鼠胰岛β细胞(MIN6细胞)中分别检测了 *NeuroD1* 野生型和突变体的胰岛素基因转录活性。与 pcDNA3.3-m*NeuroD1*-

WT 相比, pcDNA3.3-m*NeuroD1*-Glu59Gln 的相对荧光素酶活性降低了 36.3% ($P<0.05$) (图 3A)。Western blotting 结果显示在转染细胞中 Glu59Gln 突变体的表达水平与野生型 *NeuroD1* 相当 (图 3B),提示突变导致蛋白转录活性下降。



Note: A. Relative luciferase activities of the human insulin promoter luciferase reporter gene stimulated by m*NeuroD1*-WT and m*NeuroD1*-Glu59Gln in MIN6 cells. B. Expression of m*NeuroD1*-WT-Flag and m*NeuroD1*-Glu59Gln-Flag by Western blotting assay in MIN6 cells. ^① $P=0.000$, compared with NC; ^② $P=0.024$, compared with m*NeuroD1*-WT. NC—pcDNA3.3.

图3 野生型和突变型 *NeuroD1* 蛋白的转录活性测定

Fig 3 Transcriptional activities of wild type and mutant of *NeuroD1* protein

3 讨论

自 1999 年 *NEUROD1* 被报道为 MODY6 基因以来,我们曾在中国人群中报道了 *NEUROD1* 基因 S159P 突变和 A45T 变异^[9-10]。2015 年在印度的一个 MODY 家系中发现 Glu59Gln 突变,先证者在 30 岁时被诊断为糖尿病,但是没有对该突变进行结构-功能解析^[13]。本研究在 1 个中国典型 MODY 家系中首次发现 Glu59Gln 突变。先证者的突变遗传自其糖耐量正常的父亲,这也是中国 MODY 家系中首次报道的 *NEUROD1* 基因突变的不完全外显遗传。通过构建 3D 模型发现,突变导致其与周围氨基酸的相互作用发生了改变,并且体外实验证实突变体的胰岛素基因的转录活性显著下降。这些结果提示,突变蛋白的结构变化导致的功能降低,支持了 Glu59Gln 突变在该不完全外显遗传家系糖尿病发病中的作用。

3.1 *NEUROD1* 基因突变的临床特点和不完全外显遗传

NEUROD1-Glu59Gln 突变在该中国 MODY 家族中表现为不完全外显遗传,其他种族的研究也支持

MODY6 基因突变呈现这种遗传方式^[14-16]。*NEUROD1*-H241Q 突变的 2 个捷克 MODY 家系研究发现,4 个非糖尿病个体(年龄 4~30 岁)携带该突变,提示不完全外显可能与他们的年龄较小有关^[14]。此外,冰岛 MODY 研究^[15]显示, *NEUROD1*-E110K 突变引起的糖尿病发病年龄最高者为 68 岁,而日本研究中由 *NEUROD1*-H206PfsTer38 突变导致的糖尿病发病年龄最高为 76 岁^[16]。这些 *NEUROD1* 突变携带者发生糖尿病的年龄范围很广,从童年到成年晚期均有,支持了 MODY6 的不完全外显。此外,FAJANS 等^[17]指出,在多代 MODY 家系中,较年轻一代的糖尿病发病年龄较早。根据以上结果可以推测,本研究中先证者的父亲虽然在 63 岁时尚未发病,但不能排除晚年患糖尿病的可能性。本研究中先证者的母亲并没有携带该突变,根据其临床表型和实验室检测结果诊断为 T2DM。这导致当我们使用经典的 MODY 诊断标准招募先证者和家庭成员时,这个“三代糖尿病家族史”也被纳入研究设计中。因此,在中国人群中使用“宽松”的 MODY 标准,即连续 2 代糖尿病患者和 1 例 25 岁前诊断为糖尿病的患者,可以识别出更多的 MODY6 患者。

3.2 N端突变改变了NEUROD1蛋白的3D结构

人类 *NEUROD1* 基因包含 2 个外显子, 定位于染色体 2q32, 编码的蛋白包括 1 个 N 端区域、1 个 bHLH 结构域和 1 个 C 端反转录激活结构域。虽然 bHLH 结构域对于 E47 二聚化和 DNA 结合至关重要, 但缺少 N 端或 C 端的 *NEUROD1* 蛋白激活 INS 启动子的能力明显降低, 提示 N 端或 C 端对 *NeuroD1* 蛋白发挥转录激活作用的重要性^[3]。本研究发现的 Glu59Gln 突变位于 *NEUROD1* 蛋白的 N 端, 并且 Glu59 残基在哺乳动物物种中高度保守, 这表明该残基的替换 (突变) 可能致病。通过构建野生型和突变的 *NeuroD1* 蛋白的三维结构, 我们发现在 Glu59Gln 突变中, 带负电的 Glu59 残基被不带电 Gln59 残基所取代。负电荷的丢失导致 Gln59 与周围氨基酸之间的相互作用减弱, 即盐桥键 (Glu59-Arg54 和 Glu59-Lys88) 丢失和新氢键 (Gln59-Arg54) 形成。N 端局部构象改变使突变体结构不稳定, 可能进一步导致了突变蛋白的功能受损。

3.3 Glu59Gln 突变降低了 *NeuroD1* 蛋白的转录活性

本研究中双荧光素酶报告基因检测结果显示, *NeuroD1* 蛋白 N 端 Glu59Gln 突变对胰岛素基因的转录活性比野生型下降了 36.3%。此外, 我们在先前的研究^[10], 即 1 个三代 MODY 家系中发现 *NEUROD1* 蛋白 C 端 (156aa-356aa) Ser159Pro 突变, 突变导致蛋白转录活性下降 25%。我们的研究结果支持了 N 端或 C 端对 *NEUROD1* 蛋白发挥转录激活作用的重要性^[3]。一项高加索人群研究^[15] 报道了 *NEUROD1* 蛋白 DNA 结合结构域突变 (Arg111Leu) 和反转录激活结构域突变 (206+C), 而这些突变导致了更严重的转录活性降低 (分别为 80% 和 72%)。综合以上研究结果, 不同位点突变对功能影响的差异, 可以解释本研究 Glu59Gln 突变的 MODY 家族与其他 *NEUROD1* 基因突变的 MODY 家族之间糖尿病临床表型严重程度不同。

3.4 *NEUROD1* 基因 Ala45Thr 多态促进 MODY 先证者发病

本研究在 MODY 先证者中亦发现了 Ala45Thr 多态。与非糖尿病对照相比, Ala45Thr 多态使 MODY 先证者的糖尿病发病风险增加了 2.6 倍, 这与早发

T2DM 的研究结果相似^[9,18]。一项 meta 分析结果^[8] 表明, *NEUROD1* 基因 Ala45Thr 多态性与 T2DM 发病显著相关, 而且这种相关性在亚洲人群中尤为明显; 这不仅支持了我们的结果, 还体现了该多态在糖尿病发病中的种族异质性。我们先前的研究^[9,18] 发现, *NEUROD1* 基因 Ala45Thr 多态主要与具有家族史的早发 T2DM 发病相关, 而 MODY (发病年龄小于 25 岁) 是早发 T2DM (发病年龄小于 40 岁) 的特殊类型, 发病年龄更早。因此我们认为, 携带 *NEUROD1* 基因 Thr45 等位基因可能使中国 MODY 先证者的糖尿病发病年龄早于传统定义上的早发 T2DM。

综上所述, 我们在一个中国典型 MODY 家族中发现 *NEUROD1* 基因 Glu59Gln 突变。*NEUROD1*-Glu59Gln 突变显著影响 59 号氨基酸残基与其周围氨基酸的相互作用, 从而改变了 *NEUROD1* 蛋白 N 端分子构象; 构象的改变导致 Glu59Gln 突变体的胰岛素基因转录活性显著下降, 从而导致胰岛素分泌缺陷的 MODY6 亚型的发生。此外, Ala45Thr 变异促进了 MODY 先证者的发病并使携带者糖尿病发病年龄提前。

利益冲突声明/Conflict of Interests

所有作者声明不存在利益冲突。

All authors disclose no relevant conflict of interests.

伦理批准和知情同意/Ethics Approval and Patient Consent

本研究涉及的所有实验均已通过上海交通大学医学院附属第六人民医院伦理委员会的审核批准 (审批号: YS-2019-084)。所有实验均遵照《赫尔辛基宣言》的条例进行。受试对象或其亲属已经签署知情同意书。

All experiment protocols in this study were reviewed and approved by Ethics Committee of Shanghai Sixth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine (Approval Letter No. YS-2019-084), and all experiments were carried out by following the guidelines of *Declaration of Helsinki*. Consent letters have been signed by the research participants or their relatives.

作者贡献/Authors' Contributions

刘丽梅负责研究方案设计及论文审定, 张娟和葛晓旭负责论文撰写, 张荣、蒋伏松、蒋燕燕、李鸣、李甜甜、刘婵薇和陈亚婷参与了数据收集与分析。所有作者均阅读并同意了最终稿件的提交。LIU Limei designed the study and finalized the draft. ZHANG Juan and GE Xiaoxu wrote the paper. The data was collected and analyzed by ZHANG Rong, JIANG Fusong, JIANG Yanyan, LI Ming, LI Tiantian, LIU Chanwei and CHEN Yating. All the authors have read the last version of paper and consented for submission.

• Received: 2023-08-13
• Accepted: 2023-09-22

• Published online: 2023-10-28

参·考·文·献

- [1] BOHUSLAVOVA R, SMOLIK O, MALFATTI J, et al. *NEUROD1* is required for the early α and β endocrine differentiation in the pancreas[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(13): 6713.
- [2] ARAMATA S, HAN S I, YASUDA K, et al. Synergistic activation of the insulin gene promoter by the beta-cell enriched transcription factors *MafA*, *Beta2*, and *Pdx1*[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1730(1): 41-46.
- [3] HORIKAWA Y, ENYA M. Genetic dissection and clinical features of MODY6 (*NEUROD1*-MODY)[J]. *Curr Diab Rep*, 2019, 19(3): 12.
- [4] NAYA F J, HUANG H P, QIU Y, et al. Diabetes, defective pancreatic morphogenesis, and abnormal enteroendocrine differentiation in *BETA2*/*neuroD*-deficient mice[J]. *Genes Dev*, 1997, 11(18): 2323-2334.
- [5] ROMER A I, SINGER R A, SUI L, et al. Murine perinatal β -cell proliferation and the differentiation of human stem cell-derived insulin-expressing cells require *NEUROD1*[J]. *Diabetes*, 2019, 68(12): 2259-2271.
- [6] BRODOSI L, BARACCO B, MANTOVANI V, et al. *NEUROD1* mutation in an Italian patient with maturity onset diabetes of the young 6: a case report[J]. *BMC Endocr Disord*, 2021, 21(1): 202.
- [7] RUBIO-CABEZAS O, MINTON J A, KANTOR I, et al. Homozygous mutations in *NEUROD1* are responsible for a novel syndrome of permanent neonatal diabetes and neurological abnormalities[J]. *Diabetes*, 2010, 59(9): 2326-2331.
- [8] LI Y Y, WANG H, ZHANG Y Y. Neuronal Differentiation 1 gene Ala45Thr polymorphism and type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of 7, 940 subjects[J]. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2021, 31(6): 1809-1821.
- [9] LIU L M, JIA W P, ZHENG T S, et al. Ala45Thr variation in *neuroD1* gene is associated with early-onset type 2 diabetes with or without diabetic pedigree in Chinese[J]. *Mol Cell Biochem*, 2006, 290(1/2): 199-204.
- [10] LIU L, FURUTA H, MINAMI A, et al. A novel mutation, Ser159Pro in the *NeuroD1/BETA2* gene contributes to the development of diabetes in a Chinese potential MODY family[J]. *Mol Cell Biochem*, 2007, 303(1/2): 115-120.
- [11] American Diabetes Association Professional Practice Committee. 2. classification and diagnosis of diabetes: standards of medical care in diabetes-2022[J]. *Diabetes Care*, 2022, 45(suppl 1): S17-S38.
- [12] YANG J Y, ZHANG Y. I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions[J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(W1): W174-W181.
- [13] CHAPLA A, MRUTHYUNJAYA M D, ASHA H S, et al. Maturity onset diabetes of the young in India: a distinctive mutation pattern identified through targeted next-generation sequencing[J]. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2015, 82(4): 533-542.
- [14] GONSORCÍKOVÁ L, PRŮHOVÁ S, CINEK O, et al. Autosomal inheritance of diabetes in two families characterized by obesity and a novel H241Q mutation in *NEUROD1*[J]. *Pediatr Diabetes*, 2008, 9(4 pt 2): 367-372.
- [15] MALECKI M T, JHALA U S, ANTONELLIS A, et al. Mutations in *NEUROD1* are associated with the development of type 2 diabetes mellitus[J]. *Nat Genet*, 1999, 23(3): 323-328.
- [16] HORIKAWA Y, ENYA M, MABE H, et al. *NEUROD1*-deficient diabetes (MODY6): identification of the first cases in Japanese and the clinical features[J]. *Pediatr Diabetes*, 2018, 19(2): 236-242.
- [17] FAJANS S S, BELL G I. MODY: history, genetics, pathophysiology, and clinical decision making[J]. *Diabetes Care*, 2011, 34(8): 1878-1884.
- [18] 刘丽梅, 赵蔚菁, 郑泰山, 等. 早发2型糖尿病家系 *NeuroD1* 基因突变筛查与功能研究[J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2009, 25(1): 34-38.
- LIU L M, ZHAO W J, ZHENG T S, et al. Mutation screening and functional study of *NeuroD1* gene in pedigrees with early-onset type 2 diabetes mellitus [J]. *Chinese Journal of Endocrinology and Metabolism*, 2009, 25(1): 34-38.

[本文编辑] 吴洋

