

大理白族 2 型糖尿病与脂联素基因多态性相关性分析*

康庄¹, 苏恒¹, 张云¹, 虞艳芳¹, 欧杨¹, 薛元明^{1△}, 赵惠珠² (1. 云南省第一人民医院内分泌科, 昆明 650032; 2. 云南省大理州人民医院 671000)

【摘要】目的 检测云南省大理白族脂联素基因启动子单核苷酸多态性(SNP)与 2 型糖尿病的相关性。**方法** 采用聚合酶链反应直接测序法在 300 例无血缘关系的云南省大理白族人群(健康者 120 例, 2 型糖尿病患者 180 例)中检测 SNPs+45、+276 的基因型, 分析以上 2 个多态性位点与 2 型糖尿病的相关性。**结果** SNP+45 位点在健康者和 2 型糖尿病患者具有明显差异, SNP+276 在两组差异无统计学意义。连锁不平衡分析显示, 健康组和病例组间 SNPs+45、+276 存在一定差异。**结论** 大理白族人群脂联素基因上 SNP+45G 与 2 型糖尿病的发生存在关联; SNP+45G 是 2 型糖尿病发生的一项危险因素。

【关键词】 脂联素基因; 单核苷酸多态性; 2 型糖尿病; 大理白族

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2013.23.017 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2013)23-3122-03

Genetic association analysis of the adiponectin polymorphisms in type 2 diabetes of Bai nationality at Dali area* KANG Zhuang¹, SU Heng¹, ZHANG Yun¹, YU Yan-fang¹, OU Yang¹, XUE Yuan-ming^{1△}, ZHAO Hui-zhu² (1. Department of Endocrinology, the First People's Hospital of Yunnan Province, Kunming, Yunnan 650032, China; 2. Dali People's Hospital, Dali, Yunnan 671000, China)

【Abstract】Objective Adiponectin gene is associated with BMI, insulin sensitivity and diabetes. To detect the impact of adiponectin gene promoter single nucleotide polymorphism(SNP) on type II diabetes in Bai nationality of Yunnan province. **Methods** We detected adiponectin gene +276G/T and +45T/G with PCR- direct sequencing in 300 cases of unrelated people which contain healthy control subjects($n=120$) and type 2 diabetic patients($n=180$) in Bai nationality of Yunnan province, then analyzed their relationship with type 2 diabetes. **Results** SNP+45(G/T) showed significant difference of allele frequencies between type 2 diabetic group and the control group($P=0.013$). Not statistically significant difference was found at adiponectin gene polymorphisms +276G/T in this study. Linkage disequilibrium(LD) of +276G/T and +45T/G between cases and controls showed significant differences. **Conclusion**

The present study provides evidence that SNP+45G in exon 2 region of the adiponectin gene contributes to the development of type 2 diabetes in Bai nationality of Yunnan province.

【Key words】 adiponectin gene; single nucleotide polymorphism; type 2 diabetes; Bai nationality

脂联素(APN)通过增强胰岛素敏感性,从而调节体内糖类和脂肪代谢^[1]。此外, APN 还与机体炎症反应、心血管疾病、生殖发育及肿瘤发生等都有密切关系^[2-4]。本研究采用聚合酶链反应(PCR)-直接测序法对大理白族人群中 APN 基因启动子单核苷酸多态性(SNP)的 2 个位点(SNPs+45 和 SNPs+276)进行了检测,对这些多态性位点在白族人群中的分布情况及与 2 型糖尿病(T2DM)的相关性进行了研究,报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2009 年以来云南省各医院收集到的 180 例 T2DM 患者为 T2DM 组。T2DM 组入选标准采用 1999 年国际糖尿病联盟世界卫生组织的 T2DM 诊断标准。对照组为 120 例健康随机人群,空腹及餐后血糖均正常,无糖尿病家族史。所有参与者均为大理白族,实验前均签署知情同意书,研究对象相互之间无血缘关系。

1.2 方法

1.2.1 体检及生化检测 测量受试者身高、体质量,计算体质量指数(BMI)。受试者均清晨空腹采静脉血 10 mL,分 2 管(每管 5 mL),其中一管不抗凝,采用日立 7600 全自动生化分

析仪测定空腹血糖(FPG)、总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、低密度脂蛋白-胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白-胆固醇(HDL-C);另一管乙二胺四乙酸抗凝,用于基因组 DNA 提取。

1.2.2 外周血基因组 DNA 提取 用天根生化科技(北京)有限公司血液基因组 DNA 试剂盒提取外周血中的 DNA,严格按照试剂盒说明书操作,经核酸微量测定仪测定其纯度和浓度。

1.2.3 PCR 引物设计及扩增 apn 基因的引物设计参照有关文献,由北京三博远志生物技术有限公司合成。上游引物:5'-GAT GGA CGG AGT CCT TTG TAG GTC-3';下游引物:5'-CCA AAT CAC TTC AGG TTG CTT ATG PCR-3'。反应条件为:95 ℃ 5 min;95 ℃ 45 s,59 ℃ 45 s,72 ℃ 1 min,共 30 个循环;72 ℃ 10 min,扩增产物长 420 bp。扩增后用 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测是否有特异性扩增产物。PCR 扩增试剂由天根生化科技(北京)有限公司提供。

1.2.4 测序与基因型确定 PCR 扩增后的产物经纯化后,送北京三博远志生物技术有限公司用 ABI3730 测序仪进行双向 DNA 序列测定。测序结果由 2 人采用 Chromas 2.0 软件分别阅读,结合正、反向测序结果确定基因型。

1.3 统计学方法 采用 SPSS16.0 软件计算各基因型及等位

* 基金项目:云南省卫生厅内设机构科研资助项目(2009NS015);中华医学会临床医学科研专项资金(10020130235)。△ 通讯作者, E-mail: xym@public.km.yn.cn。

基因频率,以 Hardy Weinberg 平衡检验标本的群体代表性。采用 χ^2 检验比较各组基因型及等位基因频率,多因素方差分析用于 T2DM 组与对照组的临床指标相关性比较。正态计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,非正态分布数据进行对数转换,使之正态化后进行统计学分析。应用 SHEsis 在线软件进行 2 个 SNP 位点的连锁不平衡检测及单倍型构建,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 个体临床指标比较 见表 1。T2DM 组中标本的 FPG、TC 和 LDL-C 明显高于对照组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.2 PCR 及测序结果分析 PCR 扩增产物经 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测, +45 G>T 和 +276 G>T 位点为所扩增出的目的片段约为 420 bp,经测序后确认为扩增片段长度为 420 bp,均与理论扩增结果相符,包含了预期 apn 基因的 2 个 SNP 位点。

2.3 多态性结果分析和连锁平衡分析 见表 2。将上述 2 个位点的基因型测序结果进行分析,基因型频率分布符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律。SNP+45 基因型和等位基因分布频率在 T2DM 组和对照组之间差异有统计学意义 ($P < 0.05$),T2DM 组 G 等位基因分布明显较高;与对照组相比,SNP+276 基因型和等位基因的分布频率差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.4 两组 SNP+26 和 SNP+45 单倍型频率比较 见表 3。对 SNP+45 和 SNP+276 进行连锁不平衡分析结果表明,2 个位点之间存在连锁 ($D' = 0.876$),构建 SNP+276 和 SNP+45 多态性位点单倍型,结果显示,SNP 276-G-SNP 45-G 单倍型在 T2DM 组的频率高于对照组 ($P < 0.01, OR = 2.006, 95\% CI: 1.382 \sim 2.912$)。SNP+276-G-SNP+45-T 单倍型和 SNP+276-T-SNP+45-G 单倍型在 T2DM 组的频率低于对照组 ($P < 0.05, OR = 0.632, 95\% CI: 0.455 \sim 0.878; P < 0.05, OR = 0.001, 95\% CI: 0.000 \sim 0.012$)。

表 1 两组一般资料比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	性别 (男/女)	年龄 (岁)	BMI (kg/m ²)	FPG (mmol/L)	TC (mmol/L)	TG (mmol/L)	LDL-C (mmol/L)	HDL-C (mmol/L)
对照组	120	74/46	49.8±8.7	21.6±2.3	5.6±0.7	5.1±2.1	2.1±1.4	2.9±1.7	1.1±0.2
T2DM 组	180	98/82	52.3±9.6	22.4±2.1	11.9±3.8*	5.4±1.8*	2.4±1.9	3.9±1.5*	1.2±0.5

注:与对照组比较,* $P < 0.05$ 。

表 2 两组 SNP+276 和 +45 基因型频率及等位基因频率比较

组别	位点	n	GG	TG	TT	G	T	χ^2	P	Odds Ratio[95% CI]
T2DM 组	+276	180	119(66.1)	54(30.0)	7(3.9)	292(81.1)	68(18.9)	0.694	0.405	1.188[0.792~1.780]
	+45	180	26(14.4)	79(43.9)	75(41.7)	131(36.4)	229(63.6)	6.204	0.013	1.573[1.100~2.250]
对照组	+276	120	72(60.0)	44(36.7)	4(3.3)	188(78.3)	52(21.7)	—	—	—
	+45	120	8(6.7)	48(40.0)	64(53.3)	64(26.7)	176(73.3)	—	—	—

注:—表示无数据。

表 3 两组不同基因型及对照组多态性位点单倍型频率比较[n(%)]

组别	GG	GT	TG	TT
T2DM 组	131(36.39)	161(44.72)	0(0.00)	68(18.89)
对照组	53(22.08)	135(56.25)	11(4.58)	41(17.08)
χ^2	13.644	7.514	15.458	0.279
P	0.000	0.006	0.000	0.597
Odds Ratio(95% CI)	2.006(1.382~2.912)	0.632(0.455~0.878)	0.001(0.000~0.012)	1.122(0.732~1.719)

2.5 T2DM 组与对照组间临床指标分析结果比较 见表 4。APN+45 位点不同基因型,对照组与 T2DM 组间相比较,

BMI、FPG、TG、TC、LDL-C 及 HDL-C 等在对照组和 T2DM 组不同基因型之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 4 T2DM 组和对照组 +45 位点不同基因型间临床参数比较($\bar{x} \pm s$)

组别	基因型	n	BMI(kg/m ²)	FPG(mmol/L)	TC(mmol/L)	TG(mmol/L)	LDL-C(mmol/L)	HDL-C(mmol/L)
对照组	TT	64	22.3±2.1	5.8±0.5	4.9±1.3	1.9±1.1	2.9±1.2	1.3±0.1
	TG	48	21.5±2.7	5.5±0.9	5.3±1.1	2.3±0.6	2.5±0.3	0.9±0.2
	GG	8	19.4±1.2	5.4±0.5	5.1±0.6	2.1±0.3	3.4±0.3	1.1±0.2
T2DM 组	TT	75	22.7±2.6	12.5±3.6	5.1±1.6	2.7±1.3	3.9±1.1	1.3±0.1
	TG	79	22.1±3.0	11.4±2.3	5.7±1.3	2.4±1.9	4.2±1.2	1.1±0.2
	GG	26	21.4±2.4	11.7±3.5	5.6±1.4	2.4±0.8	3.6±1.2	1.2±0.1

3 讨 论

APN 由 apn1 基因编码,该基因特异且高丰度表达于脂肪组织。全基因组扫描证明,apn1 位于糖尿病及代谢综合征的易感位点染色体 3q27 附近。已有研究发现,apn1 存在很多

变异,例如外显子 2 存在 T45G 多态性,外显子 3 存在 T164T、R221S、H241P、R112C 错义突变,以及近端启动子区的 SNP-11391、11377 及 11426 等^[5-6]。有研究显示,apn1 的遗传变异在胰岛素抵抗及 T2DM 的发病中可能起决定性作用^[7]。因此

针对 APN 的遗传变异研究逐渐成为当今研究的热点。

国内外研究表明, apm1 基因的多个 SNPs 位点存在于不同种族及人群中, 对 T2DM 及胰岛素抵抗易感的贡献也不尽相同。而对于同一 SNP 位点, 之前 apm1 基因多态性的相关性研究也都结论不一。这些研究表明, apm 基因 SNP 位点多态性对 T2DM 的影响及其可能的作用机制在不同种族中存在一定差异。国内已研究的大部分 apn1 基因多态性表明, 汉族人群中 SNP+45T/G 与 T2DM 相关^[8-10], 而 SNP+276G/T 与 T2DM 是否相关尚存在争议。

本研究中选择 apm1 基因上 SNP+276 和 +45, 对其与大理白族的 T2DM 相关性进行分析。本次研究结果表明, 大理白族 SNP+45 等位基因 G 的频率在 T2DM 组和对照组间差异有统计学意义($P < 0.05$), 由此提示 SNP+45G 基因型可能是大理白族 T2DM 的危险因素, 在 T2DM 的发病机制中具有一定作用。

迄今为止, 国内外针对 apm1 基因多态性与 T2DM 的相关性研究所得结果不尽相同, 考虑与研究对象的种族、地域差异、标本量大小、标本纳入标准及 T2DM 的遗传异质性有关。因此, 需要在不同种族中进行大标本、多位点的相关研究, 以进一步了解 apm1 基因多态性对 T2DM 发病的影响, 从而为 T2DM 的早期预测、预防、诊断及治疗奠定基础。

参考文献

[1] Siasos G, Tousoulis D, Kollia C, et al. Adiponectin and cardiovascular disease: mechanisms and new therapeutic approaches[J]. *Curr Med Chem*, 2012, 19(8): 1193-1209.
 [2] Li L, Wu LL. Adiponectin and interleukin-6 in inflammation-associated disease[J]. *Vitam Horm*, 2012, 90: 375-

395.

[3] Ding M, Rzucidlo EM, Davey JC. Adiponectin in the heart and vascular system[J]. *Vitam Horm*, 2012, 90: 289-319.
 [4] Palin MF, Bordignon VV, Murphy BD. Adiponectin and the control of female reproductive functions[J]. *Vitam Horm*, 2012, 90: 239-287.
 [5] Ohashi K, Ouchi N, Kihara S, et al. Adiponectin I164T mutation is associated with the metabolic syndrome and coronary artery disease[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2004, 43(7): 1195-1200.
 [6] Gibson F, Froguel P. Genetics of the APM1 locus and its contribution to type 2 diabetes susceptibility in French Caucasians[J]. *Diabetes*, 2004, 53(11): 2977-2983.
 [7] Menzaghi C, Ercolino T, Di Paola R, et al. A haplotype at the adiponectin locus is associated with obesity and other features of the insulin resistance syndrome[J]. *Diabetes*, 2002, 51(7): 2306-2312.
 [8] 刘德敏, 靳立忠, 于德民, 等. 2 型糖尿病患者中脂联素基因多态性的研究[J]. *中华糖尿病杂志*, 2005, 12(6): 397-398.
 [9] 夏晖, 莫永珍, 卞茸文, 等. 中国人脂联素基因单核苷酸多态性与 2 型糖尿病的相关性[J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2004, 20(3): 236-237.
 [10] 杜鹏飞, 徐敏, 洪洁, 等. 脂联素基因多态性与胰岛素抵抗的相关性研究[J]. *中华糖尿病杂志*, 2004, 12(6): 393-396.

(收稿日期: 2013-04-22 修回日期: 2013-08-27)

(上接第 3121 页)

预防与控制医院感染的暴发流行。同时应针对重要危险因素积极采取有效的防控措施: (1) 加强医院感染相关知识培训, 提高 ICU 医务人员预防医院感染的意识, 真正认识到医院感染的危害性和重要性。 (2) 控制和减少患者住院时间, 住院时间与医院感染互为因果关系, 住院时间越长, 发生医院感染的危险性越大; 反之, 医院感染又使住院时间延长。 (3) 强化手卫生制度, 严格按规范进行洗手或手消毒。医院感染大部分为接触传染, 医护人员的手为病原菌重要传播媒介, 提高医务人员洗手的依从性至关重要^[7]。 (4) 加强侵袭性操作管理, 强化无菌观念, 规范医务人员侵袭性操作行为, 加强各种导管的护理, 尽可能减少各种插管的留置时间, 可有效减少 ICU 患者医院感染的发生率。 (5) 合理使用抗菌药物。加强对各临床科室抗菌药物使用的监管, 减少预防性使用抗菌药物, 避免长期使用广谱抗菌药物^[8]。慎重使用抗菌药物对预防和减缓耐药菌株产生有重大意义^[9]。

总之, 应针对 ICU 重点人群实行目标性监测, 加强各种导管的护理, 严格执行无菌操作和医务人员手卫生, 加强消毒灭菌和隔离, 减少侵入性操作, 合理使用抗菌药物及激素等, 制订 ICU 及医护人员行为规范, 预防或减少医院感染发生。

参考文献

[1] 中华人民共和国卫生部. 医院感染诊断标准(试行)[J]. *中华医学杂志*, 2001, 81(5): 314-320.

[2] Gordts B, Vrijens F, Hulstaert F, et al. The 2007 Belgian national prevalence survey for hospital-acquired infections[J]. *J Hosp Infect*, 2010, 75(3): 163-167.
 [3] 李卫光, 秦成勇, 王一兵, 等. 山东省 12 所综合性医院 ICU 目标监测分析[J]. *中华医院感染学杂志*, 2009, 19(4): 384-386.
 [4] 吴安华, 任南, 文细毛, 等. 159 所医院医院感染现患率调查结果与分析[J]. *中国感染控制杂志*, 2005, 4(1): 12-17.
 [5] 任南, 文细毛, 吴安华, 等. 178 所医院医院感染危险因素调查分析[J]. *中国感染控制杂志*, 2003, 2(1): 6-10.
 [6] 胡必杰, 何礼贤, 殷少军, 等. 上海市 18 家综合性医院院内感染发病的队列研究[J]. *中华医院管理杂志*, 2000, 16(9): 536-539.
 [7] 游建萍, 黄庆, 府伟灵, 等. 手卫生所致医院感染的预防和控制措施的探讨[J]. *中华医院感染学杂志*, 2005, 15(4): 426-428.
 [8] 肖光明, 高洪波, 陈万山, 等. 重症肝炎患者人工肝术后并发医院感染的调查分析[J]. *国际医药卫生导报*, 2009, 15(13): 26-29.
 [9] 叶高峰, 龙江丽, 张镒, 等. 强化医院超级耐药菌感染监控[J]. *中华医院感染学杂志*, 2011, 21(13): 2679.

(收稿日期: 2013-05-15 修回日期: 2013-07-09)