

5-HTTLPR 基因多态性与 2 型糖尿病关联性研究

秦永章 荣海钦 季虹 胡敬 张勇 郭振奎

摘要 目的 探讨山东汉族人群 2 型糖尿病与 5-羟色胺转运体启动子区基因多态性(5-HTTLPR)的关系。方法 选取 387 例 2 型糖尿病患者和 286 例对照个体,采用聚合酶链反应(PCR)技术检测 5-HTTLPR 多态性。结果 LS 基因型和 SS 基因型在病例组所占比例(74.2%)明显高于对照组(62.9%)($P < 0.01$),5-HTTLPR 等位基因频率分布两组之间差异具有统计学意义($P < 0.05$);S 等位基因明显增加患 2 型糖尿病的遗传风险性($OR = 1.73$,95% 可信区间 1.24 ~ 2.43, $P < 0.01$)。结论 5-HTTLPR 基因多态性可能与 2 型糖尿病相关。

关键词 5-HTTLPR 基因 基因多态性 2 型糖尿病

Relationship between the Serotonin Transporter Promoter Polymorphism (5-HTTLPR) and Type 2 Diabetes Mellitus. Qin Yongzhang, Rong Haiqin, Ji Hong, Hu Jing, Zhang Yong, Guo Zhenkui. Shandong Institute of Endocrine and Metabolic Diseases, Shandong 250062, China

Abstract Objective To investigate the relationship between the serotonin transporter promoter polymorphism(5-HTTLPR) and type 2 diabetes mellitus in the Chinese Han population from Shandong province. **Methods** The study selected 387 subjects diagnosed with type 2 diabetes mellitus and 286 non-diabetic subjects. The PCR technology was used to examine the 5-HTTLPR polymorphism. **Results** The frequency of LS and SS genotypes of the 5-HTTLPR was significantly higher in the cases(74.2%) than in the controls(62.9%) ($P < 0.01$). And significant difference was found in the frequency of allele of 5-HTTLPR between the cases and the controls ($P < 0.05$). The S allele significantly increased the genetic risk of type 2 diabetes mellitus compared to the controls ($OR = 1.73$,95% CI = 1.24 ~ 2.43, $P < 0.01$). **Conclusion** The 5-HTTLPR gene polymorphism might be associated with type 2 diabetes mellitus.

Key words 5-HTTLPR gene;Gene polymorphism;Type 2 diabetes mellitus

2 型糖尿病(T2DM)的发病机制复杂,目前普遍认为 T2DM 是一种多基因、多因素影响的高度遗传异质性疾病。近年来,越来越多的研究表明,5-羟色胺(5-HT)在维持体内葡萄糖内环境稳态中发挥重要作用。血清素转运体蛋白(5-HTT)作为 5-HT 的转运载体,在调控 5-HT 生理功能中发挥重要作用。而 5-HTTLPR 基因能调控 5-HTT 蛋白的转录活动,进而影响其功能。本研究拟探讨 5-HTTLPR 基因多态性与 T2DM 是否存在关联性。

对象与方法

1. 对象:选取 2008 年 7 月~2009 年 8 月首次来笔者医院就诊的 T2DM 患者 387 例(男性 197 例,女性 190 例),年龄 30~80 岁,平均 50.28 ± 9.42 岁,病程 0~25 年,符合 1999 年 WHO 诊断标准。排除标准:①通过临床诊断将 1 型糖尿病、其他特殊类型糖尿病以及妊娠期糖尿病排除;②患有精神系统疾病和近期服用 5-HT 受体激动剂或阻断剂者;③患有已知的心血管疾病者。正常对照组为健康查体人员 286 例(男

性 140 例,女性 146 例),入选标准如下:空腹血浆葡萄糖 $< 6.1 \text{ mmol/L}$ 且 OGTT 试验 2h 血糖水平 $< 7.8 \text{ mmol/L}$,没有服用影响糖脂代谢的药物,无其他系统性疾病,且一级亲属无糖尿病病史。两组均为山东地区汉族人群,均无血缘关系。所有研究对象均进行人体测量学指标检查,如体重指数(BMI),同时测定相关生化指标如空腹血浆葡萄糖和脂代谢等相关指标。

2. 材料:主要试剂:TaqDNA 聚合酶、dNTPs 购自大连宝生物公司,引物由济南博亚生物技术公司合成。上游引物:5'-GGCGTTGCCGCTCTGAATGC-3';下游引物:5'-GAGG-GACTGAGCT-GGACAACCAC-3'。

3. 实验方法:(1)DNA 提取:抽取外周静脉血 5ml,2% EDTA 抗凝,用改良苯酚氯仿抽提法提取白细胞总 DNA,置 -70°C 保存备用。(2)PCR 扩增目的基因:采用多聚酶链反应(PCR)扩增目的 DNA 并进行基因分型。PCR 反应总反应体系 $20 \mu\text{l}$,含有约 200ng 基因组 DNA、1U TaqDNA 聚合酶、 $2 \mu\text{l}$ $10 \times$ buffer、 1.5 mmol/L Mg^{2+} 、 0.2 mmol/L dNTPs 和 4 pmol 引物。PCR 温度循环条件为: 94°C 预变性 4min;然后以 94°C 变性 30s、 61°C 复性 30s、 72°C 延伸 1min,循环反应 30 次, 72°C 终延伸 5min。扩增产物用 DNAMarker DL2000 作为参照物比对。(3)基因型判读:PCR 扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳,

电压为 120V,时间 30min。置荧光/可见光成像分析系统(Alpha Innotech 公司)下观察,图像分析可检测到基因片段 528bp 与 484bp。5-HTTLPR 基因多态性分析扩增产物为 3 种基因型 LL 型、SS 型和 LS 型(图 1)。

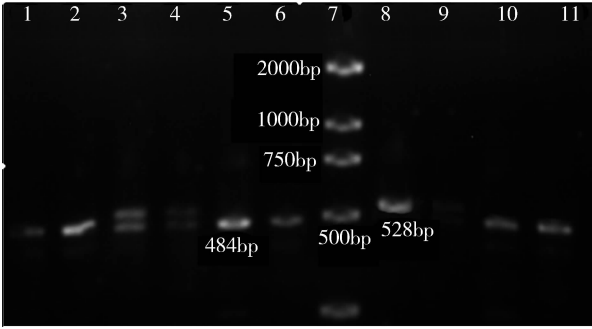


图 1 5-HTTLPR 基因分型琼脂糖凝胶电泳图

基因型 LL. 8;基因型 LS. 3、4;基因型 SS. 1、
2、5、6、10、11;7. Marker

4. 统计学分析:应用吻合度 χ^2 检验 5-HTTLPR 各基因型频率是否符合 Hardy-Weinberg(H-W)遗传平衡定律。病例组和对照组之间的基因型频率以及等位基因频率的差异采用 χ^2 检验,正常对照组和 T2DM 组的人体测量学和生化指标的统计采用 t 检验。*Logistic* 回归模型计算优势比(OR)及其 95% 可信区间(CI)表示各基因型与 T2DM 风险关联性。吻合度检验用 Arlequin3.0 软件处理,其他所有数据应用统计分析软件包 SPSS 11.5 处理。

结 果

1. 受试人群的临床特点:所有研究对象均采用两总体独立样本 t 检验分析,结果显示性别、年龄、舒张压、总胆固醇、高密度脂蛋白、血肌酐两组之间差异无统计学意义,其他各项指标两组之间差异具有统计学意义(表 1)。

表 1 健康对照组和病例组人体测量学指标及生化指标

指标	对照组	病例组	<i>P</i>
性别(男性/女性)	140/146	197/190	0.616
年龄(岁)	49.70±9.75	50.28±9.42	0.430
BMI(kg/m ²)	24.55±2.97	25.59±3.35	0.000
SBP(mmHg)	122.86±13.01	127.47±13.12	0.000
DBP(mmHg)	78.65±7.83	79.20±8.48	0.387
TG(mmol/L)	1.44±0.90	1.97±1.42	0.000
TCHO(mmol/L)	5.05±1.01	5.01±1.13	0.63
HDL-C(mmol/L)	1.36±0.38	1.39±0.36	0.248
LDL-C(mmol/L)	2.49±0.61	2.70±0.81	0.000
FPG(mmol/L)	5.18±0.43	9.74±2.96	0.000
BUN(mmol/L)	4.42±1.94	4.79±1.24	0.002
CRE(μmol/L)	72.05±18.02	69.72±19.99	0.12
UA(μmol/L)	275.2±68.0	291.1±93.8	0.015

2. 遗传平衡吻合度检验:研究对象基因型符合 H

-W 遗传平衡定律($\chi^2=2.508,P>0.05$),样本具有群体代表性。

3. 两组基因型和等位基因频率分布比较:5-HTTLPR 基因 3 种不同基因型在病例组和对照组频率分布差异具有统计学意义($\chi^2=10.118,P<0.01$);将至少携带有一个 S 等位基因的基因型(LS+SS)归为一组时,发现这种差异具有统计学意义($\chi^2=9.753,P<0.01$);但将至少携带一个 L 等位基因的基因型(LL+LS)分为一组时,之间的差异无统计学意义($\chi^2=0.316,P>0.05$)。等位基因在病例组和对照组频率分布差异具有统计学意义($\chi^2=5.644,P<0.05$),见表 2。

表 2 两组 5-HTTLPR 基因型及等位基因
频率分布比较[n(%)]

		病例组	对照组	<i>P</i>
基因型	LL	100(25.8)	106(37.1)	0.006
	LS	196(50.6)	118(41.2)	
	SS	91(23.6)	62(21.7)	
以 S 等位	LS+SS	287(74.2)	180(62.9)	0.002
基因分组	LL	100(25.8)	106(37.1)	
以 L 等位	LL+LS	296(76.5)	224(78.3)	
基因分组	SS	91(23.5)	62(21.7)	0.018
等位基因	L	396(51.2)	330(57.7)	
	S	378(48.8)	242(42.3)	

4. *Logistic* 回归分析:以 T2DM 为因变量,5-HTTLPR 基因型为自变量进行单因素 *Logistic* 回归分析。LL 基因型表现出具有明显的保护优势(OR=0.59,95%CI=0.43~0.82, $P<0.01$);L 等位基因携带组(LL+LS)也具有保护倾向,但差异无统计学意义(OR=0.90,95%CI=0.62~1.29, $P>0.05$)。而 LS 基因型增加患 T2DM 的风险性(OR=1.46,95%CI=1.07~1.99, $P<0.05$);S 等位基因携带组(LS+SS)显示患 T2DM 的风险性较单独 LS 基因型明显增加(OR=1.69,95%CI=1.21~2.35, $P<0.01$)。进行多因素 *Logistic* 回归分析,结果显示以上各自差异更显著(表 3)。

表 3 5-HTTLPR 基因型与 T2DM 风险性关系

基因型	未校正模型			校正模型*		
	OR	95% CI	<i>P</i>	OR	95% CI	<i>P</i>
LL	0.592	0.425~0.824	0.002	0.577	0.412~0.808	0.001
LS	1.461	1.073~1.989	0.016	1.459	1.067~1.994	0.018
SS	1.111	0.770~1.602	0.574	1.143	0.789~1.656	0.480
LS+SS	1.690	1.214~2.353	0.002	1.733	1.238~2.425	0.001
LL+LS	0.900	0.624~1.299	0.574	0.875	0.604~1.268	0.480

* 校正性别、年龄、BMI

讨 论

5-HTT 基因位于染色体 17q11.1~q12 区,全长 37.8 kb,由 14 个外显子组成。该基因启动子区功能相关多态性(5-HTTLPR)位点为位于转录起始位点上游约 1kb 处 5'侧翼区域的重复单元序列,由 14~16 个基本重复单元构成,每个单元包含约 20~23 个碱基对,分别形成长型(L)和短型(S)两个常见的等位基因。不同等位基因变异体调控 5-HTT 基因表达水平是不一致的,具体表现为 S 型占优势的变异体呈现 5-HTT 基因的低表达,结果进一步导致 5-HTT 摄取和释放 5-HT 的能力下降,而在 L 型则表现为增加 5-HTT 基因的表达水平,转录活性约为 S 型的 3 倍^[1]。

本实验研究结果显示,至少携带一个 S 等位基因者(LS+SS)所占比例(74.2%),病例组明显高于对照组(62.9%),且二组之间差异具有统计学意义,这与 Iordanidou M 等人^[2]的研究结果相似。*Logistic* 回归分析显示 LS 具有明显的遗传风险性($OR=1.46$, 95% CI 1.07~1.99, $P<0.05$);将 LS 基因型和 SS 基因型归为一组时,发现这种遗传风险性更加明显($OR=1.73$, 95% CI 1.24~2.43, $P<0.01$)。在高加索人群中,携带至少一个 S 等位基因明显增加 T2DM 的遗传风险性($OR=2.08$ 95% CI 1.39~3.12, $P<0.01$)^[2]。由此推测,S 等位基因可能是 T2DM 的一个危险因素。日本一项临床试验研究发现^[3],仅通过营养干预而不给予任何药物治疗的 264 名患有糖尿病、高胆固醇血症或高血压妇女,SS 基因型携带者较其他基因型实验前后空腹血糖差值(Δ FPG)变化最大,实验后 FPG 较实验前明显升高。这进一步说明 S 等位基因与糖尿病存在密切联系。另灵长类动物研究结果显示,携带至少一个 S 等位基因的变异体与 LL 基因型变异体相比,其空腹血浆胰岛素水平是降低的($P=$

0.052)^[4]。由此可见,S 等位基因可能通过影响血糖或胰岛素水平,进而诱发糖尿病。

此外,同样是在灵长类动物的一项研究结果中显示携带 LL 基因型的变异体血浆胰岛素、血糖是降低的^[5]。在本实验,对照组 LL 基因型所占比例(37.1%)是明显高于病例组的(25.8%),单因素 *Logistic* 回归分析显示 LL 基因型具有明显的保护倾向($OR=0.59$, 95% CI 0.425~0.824, $P<0.01$),推测 LL 基因型可能是糖尿病发生进展中的一个保护因素。但 L 等位基因携带者(LL+LS)在病例组和对照组并没有差异($P>0.05$);*Logistic* 回归分析显示 L 等位基因携带者(LL+LS)也具有保护倾向,但无统计学意义($P>0.05$)。因此,单独 L 等位基因可能并不具备保护作用。结合上述分析可以看出 5-HTTLPR 基因多态性可能与糖尿病相关,LL 基因型在糖尿病的发生进展中起保护作用,其 S 等位基因可能是 T2DM 的一个危险因素。

参考文献

- 1 Heils A, Teufel A, Petri S, *et al.* Allelic variation of human serotonin transporter gene expression. *J Neurochem*, 1996, 66(6):2621-2624
- 2 Iordanidou M. The serotonin transporter promoter polymorphism (5-HTTLPR) is associated with type 2 diabetes. *Clin Chim Acta*, 2010, 411(3-4):167-171
- 3 Yamakawa M, Fukushima A, Sakuma K, *et al.* Serotonin transporter polymorphisms affect human blood glucose control. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 334(4):1165-1171
- 4 Hoffman JB, Kaplan JR, Kinkead B, *et al.* Metabolic and reproductive consequences of the serotonin transporter promoter polymorphism (5-HTTLPR) in adult female rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Endocrine*, 2007, 31(2):202-211
- 5 Jarrell H, Hoffman JB, Kaplan JR, *et al.* Polymorphisms in the serotonin reuptake transporter gene modify the consequences of social status on metabolic health in female rhesus monkeys. *Physiol Behav*, 2008, 93(4-5):807-819

(收稿:2010-10-17)

《医学研究杂志》启用远程稿件处理系统启事

《医学研究杂志》(原名《医学研究通讯》)于 1972 年创刊,是由卫生部主管,中国医学科学院主办的国家级医学学术刊物。中国科技论文统计源期刊,中国科技核心期刊。中文科技期刊数据库统计源期刊,中文科技期刊数据库核心期刊,中国学术期刊全文数据库收录期刊,中国学术期刊引证报告统计源期刊。《医学研究杂志》已经启用远程稿件处理系统,请各位作者登陆《医学研究杂志》网站:<http://www.yxyjzz.cn>,注册登陆投稿系统,填写作者相关信息后进行投稿。咨询电话:010-52328679(单政编辑)。

《医学研究杂志》编辑部