

瘦素受体基因 Gln223Arg 多态性与中国北方汉族人 2 型糖尿病的关联研究

史晓红 孙 亮 王 沥 金 锋 朱小泉 唐 雷 杨 泽

摘 要 **目的** 探讨瘦素受体 (Lepr) 基因第 6 外显子 Gln223Arg 多态性与中国北方人 2 型糖尿病 (T2DM) 的关系。**方法** 应用聚合酶链反应 - 限制性片段长度多态性 (PCR - RFLP) 方法鉴定了相互间无亲缘关系且具有完整临床资料的 728 例中国北方汉族人的 Lepr 基因 Gln223Arg 多态性的基因型 (其中包括有糖尿病家族史的 T2DM 患者 333 例, 非糖尿病健康对照 395 例)。**结果** Lepr 基因 Gln223Arg 多态性的基因型频率和等位基因频率在 T2DM 组和正常对照组中的分布存在显著性差异 ($P < 0.05$)。多因素 Logistic 回归分析结果显示, 进行年龄、性别、BMI 和腰围等因素调整后, GG 基因型的携带仍然能够增加 T2DM 的患病风险。**结论** Lepr 基因第 6 外显子 Gln223Arg 多态性与中国北方人 T2DM 的易感性相关联。

关键词 2 型糖尿病 瘦素受体 基因 多态性

Association of Gln223Arg Polymorphism in Lepr Gene with Type 2 Diabetes in Northern Chinese Han Population. Shi Xiaohong, Sun Liang, Wang Li, Jin Feng, Zhu Xiaoquan, Tang Lei, Yang Ze. The Key Laboratory of Geriatrics, Beijing Hospital & Beijing Institute of Geriatrics, Ministry of Health, Beijing 100730, China

Abstract **Objective** To investigate the association of the Gln223Arg polymorphism in leptin receptor (Lepr) gene with type 2 diabetes (T2DM) in Northern Chinese Han population. **Methods** The genotypes of Lepr gene Gln223Arg polymorphism in 728 unrelated subjects of Han population from northern China (including 333 cases with family history of diabetes and 395 non-diabetic healthy controls) were determined by polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism (PCR - RFLP) method. **Results** Significant differences were observed in the distribution of the genotype and allele in the case and control groups ($P < 0.05$). Multivariate logistic regression analysis showed that after readjusting for the confounding effects of age, gender, BMI and waist circumference, significant effect of GG genotype on T2DM was still found. Those who had GG genotype had a increased risk of T2DM than those with other genotypes. **Conclusion** There was obvious association between Gln223Arg polymorphism in Lepr gene and T2DM in Northern Chinese Han population.

Key words Type 2 diabetes; Leptin receptor; Gene; Polymorphism

瘦素受体 (leptin receptor, Lepr) 属细胞因子受体超家族, 人类 Lepr 基因定位于染色体 1p31。Lepr 基因是 T2DM 的一个重要候选易感基因, 目前已经发现多种 Lepr 基因的多态性, Lepr 基因的多态性对 T2DM 的影响日益受到关注。本文旨在研究 Lepr 基因第 6 外显子内的 Gln223Arg 多态性与中国北方人 T2DM 发生发展的关系。

材料与方法

1. 实验材料: (1) 对象: 所有研究对象选自 2004 ~ 2005 年北京地区和哈尔滨地区 T2DM 流行病学调查资料, 本研究中病例样本为: 有糖尿病家族史, 且相互间无亲缘关系的 T2DM 患者 333 例, 其中男性 120 例, 女性 213 例, 年龄 40 ~ 89 岁, 平均年龄 60.61 ± 11.05 岁。对照样本为: 无糖尿病家族史的糖耐量正常者, 无急性心脑血管疾病、内分泌疾病, 且相互间无亲缘关系, 共 395 例。其中男性 181 例, 女性 214 例; 患者年龄 40 ~ 80 岁, 平均年龄 47.50 ± 6.25 岁。所有受试者均为汉族人, 均签署了知情同意书。T2DM 诊断依据 1999 年 WHO 诊断标准: ①有明确糖尿病病史; ②空腹血浆葡萄糖 $\geq 7.0 \text{ mmol/L}$ 和 (或) 口服葡萄糖耐量实验 2h 血糖 $\geq 11.1 \text{ mmol/L}$ 。根据病史和家族史排除 1 型糖尿病、年轻起病的成人型糖尿病及线粒体性糖尿病。(2) 主要试剂: 全血 DNA 提取试剂盒购自北京天为时代科技有限公司; DNA marker 购自天根生化科技 (北京) 有限公司; 引物由上海生工生物技术有限公司

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30801208, 81061120527); 卫生部北京医院准重点基金资助项目 (BJ - 2005 - 017)

作者单位: 100730 卫生部北京医院/卫生部北京老年医学研究所、卫生部老年医学重点实验室 (史晓红、孙亮、朱小泉、唐雷、杨泽); 100101 北京, 中国科学院遗传与发育生物学研究所 (王沥); 100101 北京, 中国科学院心理学研究所 (金锋)

通讯作者: 杨泽, 研究员, 电子信箱: yangze016@yahoo.com.cn

合成;限制性内切酶 Msp I 购自 TaKaRa 公司;dNTP, Taq 酶购自北京鼎国昌盛生物技术有限公司。(3)主要仪器:PCR 扩增仪为美国 MJ 公司的 PTC-225 型 PCR 仪;凝胶成像系统为美国 Bio-Rad 公司的 Gel DOC-2000 成像系统。

2. 方法:(1)基因组 DNA 的提取:取 EDTA Na₂ 抗凝的外周血 0.3ml, 用全血 DNA 提取试剂盒抽提基因组 DNA。(2)PCR-RFLP 分析 上游引物:5'-ACCCCTTAAGCTGGGTGTC-CCAAATAG-3', 下游引物:5'-AGCTAGCAAATATTTTG-TAAGCAATT-3'。PCR 反应体系为 20μl, 其中包含 10 × PCR buffer 2μl, 10mmol/L dNTP 0.4μl, 引物 (10pmol/μl) 各 0.4μl, Taq 酶(2.5U/μl)0.4μl, 基因组 DNA (10ng/μl) 2μl。扩增条件为 95℃ 预变性 5min;95℃ 变性 30s、64.1℃ 退火 30s、72℃ 延伸 30s,共 35 个循环,完成后 72℃ 延伸 7min。扩增产物用 8% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,Bio-Rad 凝胶成像系统成像。PCR 产物用 Msp I 酶进行消化,反应体系 10μl, 包含 Msp I (10U/μl) 0.3μl、10 × buffer 1μl、0.1% BSA 1μl、PCR 产物 6μl, 37℃ 酶切过夜,取 4μl 酶切产物用 8% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,凝胶成像系统成像,观察结果。

3. 统计学方法:所有统计学分析均采用 SPSS 11.5 软件完成。以 Hardy-Weinberg 平衡判断样本的代表性。相对风险用比值比(OR)值及其 95% 置信区间(95% CI)来评价。组间基因型频率及等位基因频率比较采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异显著性标准。

结 果

1. T2DM 病例组与正常对照组一般特征比较: T2DM 病例组与正常对照组相比,不仅表现为临床上血糖、血脂等指标的变化,其他身体特征和功能也与

正常人群有一定的差异。包括 T2DM 病例组具有显著高的体质质量指数(BMI),腰臀比,腰围,总胆固醇和三酰甘油。

2. 基因型分析:包含 Lepr 基因第 6 外显子 Gln 223 Arg 多态性的 PCR 产物长度为 421bp, 此多态性位点可被限制性内切酶 Msp I 识别。AA 基因型不能被 Msp I 识别, GG 基因型可被 Msp I 切割,可见 294 和 127bp 两条带;因此酶切后不同基因型的电泳带型分别为:AA (421bp), AG (421bp, 294bp, 127bp), GG (294bp, 127bp) (图 1)。

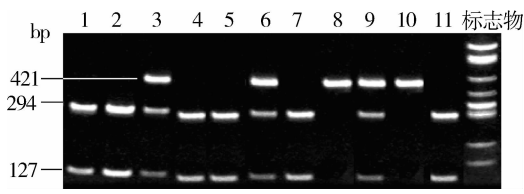


图 1 Lepr 基因第 6 外显子 Gln23Arg 变异基因分型图片
1, 2, 4, 5, 7, 11. GG 型;3, 6, 9. AG 型;8, 10. AA 型

T2DM 组和正常对照组基因型频率经 Hardy-Weinberg 拟合优度检验,均符合 Hardy-Weinberg 平衡($P > 0.05$),表明此基因各基因频率已达遗传平衡,所选择的 T2DM 和正常对照样本均具有群体代表性。T2DM 组和正常对照组间 Lepr 基因第 6 外显子 Gln223Arg 多态性基因型与等位基因频率的比较见表 1。

表 1 Lepr 基因第 6 外显子 Gln223Arg 多态性的基因型与等位基因频率在 2 型糖尿病组和正常对照组中的分布比较[n(%)]

组别	HWE(P)	n	基因型			等位基因	
			GG	AG	AA	G	A
2 型糖尿病组	0.460	333	283(85.0)	49(14.7)	1(0.3)	615(92.3)	51(7.7)
正常对照组	0.950	395	310(78.5)	80(20.3)	5(1.3)	700(88.6)	90(11.4)
	χ^2 (df = 1)		5.06	3.80	2.06	5.76	
	P (df = 1)		0.024	0.051	0.151	0.016	
	OR		1.55	0.68	0.23		
	95% CI		1.04 ~ 2.32	0.45 ~ 1.02	0.01 ~ 2.07		

经自由度为 2 的 χ^2 检验,Lepr 基因第 6 外显子 Gln223Arg 多态性基因型频率在 T2DM 组与正常对照组间的分布存在显著差异($P = 0.047$)。对逐个基因型进行比较发现,GG 基因型在病例组和对照组间的频率分布具有显著差异($P = 0.024$),GG 基因型的携带能增加 T2DM 的患病风险 (OR = 1.55, 95% CI: 1.04 ~ 2.32)。 χ^2 检验表明,Lepr 基因第 6 外显子 Gln223Arg 多态性的等位基因频率在 T2DM 组与对照

组间的分布有显著性差异($P = 0.016$)。

3. Lepr 基因 Gln 223 Arg 多态性的多因素 Logistic 回归分析:由于年龄、性别可能作为 T2DM 的混杂因素,影响基因型参与 T2DM 发生风险的评价,而本研究选取病例对照样本的年龄和性别没有得到很好的匹配,因此对该研究多态性的基因型进行年龄和性别调整,排除其混杂效应,评价易感基因的多态位点的不同基因型独立于年龄和性别之外的风险。同时

由于体质指数 (BMI) 和腰围对于 T2DM 的公认影响, 同时在回归模型分析中引入 BMI 和腰围两个变量, 见表 2。由表 2 可见, Lepr 基因第 6 外显子 Gln223Arg 多态性与 T2DM 有显著的相关性 ($P = 0.003$)。GG 基因型的携带能够增加 T2DM 的患病风险 ($OR = 2.212$, 95% $CI: 1.316 \sim 3.717$)。

表 2 Lepr 基因 Gln223Arg 多态性的多因素

非条件 Logistic 回归分析

因素	回归系数	标准误	χ^2	P	OR	95% CI
年龄	0.153	0.013	137.493	0.000	1.165	1.136 ~ 1.195
性别	1.575	0.275	32.822	0.000	4.832	2.819 ~ 8.282
BMI	-0.151	0.051	8.843	0.003	1.164	1.053 ~ 1.285
腰围	0.123	0.020	37.303	0.000	1.131	1.087 ~ 1.177
Gln223Arg*	-0.793	0.265	8.966	0.003	2.212	1.316 ~ 3.717

* Lepr Gln223Arg GG (1) vs AG/AA (0)

讨 论

Lepr 基因又称糖尿病基因 (diabetes gene, DB)。1995 年人类的 Lepr 基因被定位克隆, 并定位于染色体 1p31, 由 20 个外显子和 19 个内含子组成, 共编码 1165 个氨基酸^[1]。

1996 年, Considine 等^[2]首次报道在人类 Lepr 基因第 6 外显子上存在有 Gln223Arg 变异, 该变异第 6 外显子第 668 位 A→G 的碱基突变, 该突变位于瘦素受体的胞外区, 其所编码的氨基酸由精氨酸 (Arg) 变成谷氨酸 (Gln)。1997 年 Tuomi 等报道该变异与芬兰白种人 T2DM 患者的血糖水平相关。2005 年, Salopuro T 等^[3]在芬兰的 DM 干预研究中发现, Lepr 基因 Gln223Arg 变异与 IGT 向 T2DM 的转归有关, Gln223Gln 基因型的个体较 Arg223 等位基因的携带者相比, 更容易发展为 T2DM。Chagnon 等^[4]在魁北克人群中的研究提示 Gln223Arg 多态性与 BMI 相关。Van Rossum 等^[5]在荷兰青少年中的研究发现 Arg223 变异与高瘦素水平及增重相关。Ataka Y 等^[6]对太平洋岛民以及 Duarte 等对巴西人群的研究显示, 该多态性与肥胖相关。Fnrusawa^[7]对南部印度人的研究显示, 该多态性与肥胖和 T2DM 相关。而 Heo 等^[8]观察了 3263 例研究对象, 包括非洲裔美国人、高加索白种人、丹麦人、芬兰人、法裔加拿大人、尼日利亚人, 结果未发现 Lepr 基因 Gln223Arg 多态性与 BMI 或 WC 相关。在 Park 等^[9,10]对韩国人群的研究中, 未发现该多态性与糖尿病的相关性^[9,10]。Wang 等对中国台湾人群的研究结果显示, 该多态性与肥胖

无相关性。这些表明 Lepr 基因 Gln223Arg 多态性与表型的关系存在种族的差异。目前为止, Gln223Arg 多态性与 T2DM 的相关性仍存在争议。

本次对 Lepr 基因 Gln223Arg 变异的研究显示, 对照组的 G 等位基因频率为 88.6%、A 等位基因频率为 11.4%, 与上海地区正常汉族人 88.9%、11.1%, 山西正常人群 87.6%、12.4%, 日本人报道的 83.8%、16.2% 以及韩国人报道的 85%、15% 分布相似, 提示该等位基因频率分布在亚洲人种中可能保持一致; 但与白种人的 39.0%、61.0% 分布存在极显著差异 ($P < 0.001$), 提示该基因型和等位基因频率分布存在明显的种族差异。

本研究结果显示, 在中国北方人群中 Lepr 基因 Gln223Arg 多态性的野生型纯合子 GG 在人群中最为常见, 而在病例组 and 对照组中突变纯合型 AA 个体均极少。 χ^2 检验结果显示, Lepr 基因 Gln223Arg 多态性的基因型频率在 T2DM 组与正常对照组间的分布存在显著差异 ($P = 0.047$), GG 基因型的携带能增加 T2DM 的患病风险 ($P = 0.024$, $OR = 1.55$, 95% $CI: 1.04 \sim 2.32$)。进行年龄、性别、BMI 和腰围调整后, GG 基因型的携带对增加 T2DM 患病风险的作用更加显著 ($P = 0.003$, $OR = 2.212$, 95% $CI: 1.316 \sim 3.717$)。结果表明, Lepr 基因 Gln223Arg 多态性的 GG 基因型是中国北方汉族人罹患 T2DM 的风险基因型。

综上所述, 本研究发现 Lepr 基因 Gln223Arg 多态性与中国北方汉族人 T2DM 的发生相关, GG 基因型的携带能够增加 T2DM 的患病风险。对于 Lepr 基因 Gln223Arg 多态性对 T2DM 的影响机制还有待更深入的研究。

参考文献

- 1 Tartaglia LA, Demmbis M, Weng X, *et al.* Identification and expression cloning of a leptin receptor [J]. Cell, 1995, 83:1263 - 1270
- 2 Considine RV, Considine EL, Williams CJ, *et al.* The hypothalamic leptin receptor in humans: identification of incidental sequence polymorphisms and absence of the db/db mouse and fa/fa rat mutations [J]. Diabetes, 1996, 45 (7): 992 - 994
- 3 Salopuro T, Pulkkinen L, Lindstrom J, *et al.* Genetic variation in leptin receptor gene is associated with type 2 diabetes and body weight: The Finnish Diabetes Prevention Study [J]. Int J Obes (Lond), 2005, 29 (10): 1245 - 1251
- 4 Chagnon YC, Chung WK, Perusse L, *et al.* Linkages and associations between the leptin receptor (LEPR) gene and human body composition in the Quebec Family Study [J]. Int J Obes Relat Metab Disord, 1999, 23 (3): 278 - 286

- 5 Van Rossum CT, Hoebee B, Van BaakMA, *et al.* Genetic variation in the leptin receptor gene, leptin, and weight gain in young Dutch adults[J]. *Obes Res*, 2003, 11(3):377-386
- 6 Furusawa T, Naka I, Yamauchi T, *et al.* The Q223R polymorphism in LEPR is associated with obesity in Pacific Islanders[J]. *Hum Genet*, 2010, 127(3):287-294
- 7 Murugesan D, *et al.* Association of polymorphisms in leptin receptor gene with obesity and type 2 diabetes in the local population of Coimbatore[J]. *Indian J Hum Genet*, 2010, 16(2):72-77
- 8 Heo M, Leibel RL, Fontaine KR, *et al.* A meta-analytic investigation of linkage and association of common leptin receptor (LEPR) polymorphisms with body mass index and waist circumference[J]. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2002, 26(5):640-646
- 9 Park KS, Shin HD, Park BL, *et al.* Polymorphisms in the leptin receptor (LEPR) - putative association with obesity and T2DM[J]. *J Hum Genet*, 2006, 51(2):85-91
- 10 Han HR, Ryu HJ, Cha HS, *et al.* Genetic variations in the leptin and leptin receptor genes are associated with type 2 diabetes mellitus and metabolic traits in the Korean female population[J]. *Clinical Genetics*, 2008, 74(2):105-115

(收稿:2011-08-22)

外源性 H₂S 通过抑制凋亡途径保护创伤出血性休克大鼠心肌组织

高 操 徐敦全 高昌俊 丁 倩 李 燕 姚立农 李志超 柴 伟

摘 要 **目的** 探索新型气体信号分子硫化氢(H₂S)对创伤出血性休克大鼠心肌的保护作用。**方法** 复制雄性 SD 大鼠创伤出血性休克模型,经左侧股动脉插管监测硫化氢的外源性供体 NaHS 干预(28 μmol/kg)对创伤出血性休克大鼠血流动力学的影响;在注射 NaHS 2h 后取静脉血,测量血清肌酸激酶(CK)及乳酸脱氢酶(LDH)水平,比较各组心肌酶改变;以蛋白印记法观察大鼠心肌组织 survivin(生存素)以及促凋亡因子 caspase-3 与 Bax 的表达变化。**结果** 外源性 H₂S 对创伤出血性休克大鼠的血流动力学指标有不同程度的改善,上调了 survivin 的蛋白表达,下调了凋亡促进因子 caspase-3 及 Bax 的表达。**结论** 外源性 H₂S 可能通过影响凋亡的途径来保护创伤出血性休克大鼠的心肌组织,从而起到保护作用。

关键词 硫化氢 创伤出血性休克 心肌 凋亡

Exogenous H₂S Protects Cardiac Tissue Through Inhibiting Apoptosis in a Traumatic-hemorrhagic Shock Rat Model. Gao Cao, Xu Dunquan, Gao Changjun, Xu Dunquan, Gao Changjun, *et al.* Department of Anesthesiology, Tangdu Hospital, The Fourth Military Medical University, Shanxi 710038, China

Abstract Objective To explore the cardio-protective effects of the third gaseous signaling molecule, H₂S, on a traumatic-hemorrhagic shock rat model. **Methods** Male SD rats traumatic-hemorrhagic shock models were duplicated. Hemodynamic data was recorded by inserting a PE-50 catheter to left femoral artery of the rats which were treated with NaHS (28 μmol/kg) previously. Then the rats' vein blood 2 hours after injection of NaHS were obtained. Serum CK and LDH levels were analyzed and Survivin, caspase-3 and Bax in rat cardiac tissue were detected by western-blotting assay. **Results** Exogenous H₂S improved rats' hemodynamic function, up-regulated expression of survivin and down-regulated expression of the pro-apoptosis factors caspase-3 and Bax. **Conclusion** Exogenous H₂S may have cardio-protective effects through modulating apoptosis pathway.

Key words Hydrogen sulfide; Traumatic-hemorrhagic shock; Cardiac tissue; Apoptosis

创伤出血性休克是平、战时创伤导致死亡的主要

原因之一。创伤出血性休克是机体遭受严重创伤后通过“血管-神经”反射所引起的急性循环功能不全,以微循环障碍为特征,并因此导致的组织器官的缺血、缺氧和多器官功能损害的综合征。如何及时有效的改善机体缺血-再灌损伤,维持组织氧耗-氧供平衡,抑制炎症及氧化应激损伤是影响疾病转归的关键所在^[1]。硫化氢(H₂S)是继 NO 和 CO 之后的一种

基金项目:国家自然科学基金资助项目(面上项目)(30872444)

作者单位:710038 西安,第四军医大学唐都医院麻醉科(高操、高昌俊、丁倩、姚立农、柴伟);第四军医大学基础医学部(徐敦全、李志超);北京军区总医院体检中心(李燕)

通讯作者:柴伟,电子信箱:tdmzka@fmmu.edu