

•临床研究•

[文章编号] 1007-3949(2005)13-05-0604-03

## 过氧化体增殖物激活型受体 $\gamma$ 2 基因多态性与 2 型糖尿病及其早期动脉粥样硬化的相关性

张 焱, 白 然, 刘加和, 张 寒, 高 月, 杜建玲, 李昌臣  
(大连医科大学附属第一医院内分泌科, 辽宁省大连市 116011)

[关键词] 内科学; 糖尿病血管病变的分子机制; 聚合酶链反应—限制性片长多态性; 过氧化体增殖物激活型受体  $\gamma$ 2; 2 型糖尿病; 动脉粥样硬化; 基因多态性

[摘要] 目的 探讨过氧化体增殖物激活型受体  $\gamma$ 2 基因多态性与 2 型糖尿病及早期动脉粥样硬化的关系。方法 应用聚合酶链反应—限制性片长多态性检测大连地区汉族人 2 型糖尿病患者(包括动脉粥样硬化组和非动脉粥样硬化组)过氧化体增殖物激活型受体  $\gamma$ 2 基因外显子 B 的 Pro12Ala 变异。结果 在动脉粥样硬化组、非动脉粥样硬化组及对照组中过氧化体增殖物激活型受体  $\gamma$ 2 基因 Pro/Pro 基因型频率分别为 0.961、0.896 及 0.892, Pro/Ala 分别为 0.039、0.104 及 0.108, Ala/Ala 均为 0, 过氧化体增殖物激活型受体  $\gamma$ 2 基因 Pro12Ala 变异在对照组和糖尿病组间以及非动脉粥样硬化组和动脉粥样硬化组间差异均无显著性( $P=0.407$ ,  $P=0.096$ )。结论 过氧化体增殖物激活型受体  $\gamma$ 2 基因 Pro12Ala 变异与 2 型糖尿病及其早期动脉粥样硬化的发生无明显相关。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

### The Association Study of Peroxisome Proliferator Activated Receptor $\gamma$ 2 Gene Polymorphism with Type 2 Diabetes Mellitus and Early Period Atherosclerosis

ZHANG Tao, BAI Ran, LIU Jia-He, ZHANG Han, GAO Yue, DU Jia-Ling, and LI Chang-Chen  
(Endocrinology Department of the 1st Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011, China)

[KEY WORDS] Peroxisome Proliferator Activated Receptor  $\gamma$ 2; Type 2 Diabetes Mellitus; Atherosclerosis; Gene Polymorphism; Allele; Hpa  $\text{I}$ ; Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the association of peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$ 2 (PPAR $\gamma$ 2) gene polymorphism with type 2 diabetes mellitus (T2DM) and early period atherosclerosis (As) in Han people of Dalian (Chinese). **Methods** The genotypes of Pro12Ala variant in PPAR $\gamma$ 2 gene exon B were determined by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) assay in 202 T2DM patients (77 cases with As and 125 cases without As) and 102 control subjects. **Results** The genotype frequencies in As group, non-As group and control group are 0.961, 0.896 and 0.892 for Pro/Pro. The genotype frequencies are 0.039, 0.104 and 0.108 for Pro/Ala. All of them are 0 for Ala/Ala. The frequencies of Pro/Pro are not different between subjects in control group and diabetes ( $P=0.407$ ). There is no difference between diabetic patients without As and those with As ( $P=0.096$ ). In control group, subjects with Ala carrier have higher BMI than those with non-As carrier ( $P=0.003$ ). Stepwise regression analysis shows PPAR $\gamma$ 2-Pro12Ala is not an independent danger factor for BMI. In diabetic group, there is no association between PPAR $\gamma$ 2 polymorphism and clinical characteristics. **Conclusions** PPAR $\gamma$ 2 gene Pro12Ala polymorphism is not associated with the incidence of T2DM and early period As in Han people of Dalian Chinese. But subjects with Ala carrier have higher BMI than those with non-As carrier in control group.

目前认为胰岛素抵抗可能为 2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 和动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 的共同发病机制, 而过氧化体增殖物激活型受体  $\gamma$  (peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$ ,

PPAR $\gamma$ ) 的激活与胰岛素抵抗密切相关。所以, 近年来国内外学者对 PPAR $\gamma$ 2 基因多态性与 T2DM、代谢综合征及冠心病的相关性进行了研究, 结论不一。国内尚未见 T2DM 合并 As 与 PPAR $\gamma$ 2-Pro12Ala 变异的相关报道。本研究旨在探讨大连地区汉族人 2 型糖尿病及其早期 As 与 PPAR $\gamma$ 2 基因多态性的关系。

[收稿日期] 2004-0-0 [修回日期] 2004-0-0

[基金项目] “十五”国家科技攻关课题(2001BA702B01); 辽宁省科技厅攻关项目(2002225003-6); 辽宁省教育厅课题(202203266)

[作者简介] 张焱, 硕士研究生, 医师, 研究方向为 2 型糖尿病大血管病变分子机制的研究, E-mail 为 dlzhangtao@tom.com。白然, 硕士, 教授, 主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向为 1 型糖尿病基因治疗, E-mail 为 bairan@hotmail.com。通讯作者杜建玲, 硕士, 教授, 主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向为 2 型糖尿病大血管病变的基础与临床研究, E-mail 为 dujianling63@163.com。

### 1 对象与方法

#### 1.1 对象及一般资料

选择 202 例新诊断或已明确诊断但病程在 1 年以内的 T2DM 患者(按 WHO1999 年标准确诊), 均为

大连地区汉族人, 根据超声波大动脉内膜中膜厚度 (intima-media thickness, IMT) 检测分 As 组和非 As 组, 分组标准同参考文献<sup>[1]</sup>。选择空腹血糖、血压正常且无糖尿病、高血压家族史的大连地区汉族人 102 例作为对照组。研究对象的临床资料见表 1 (Table 1)。

表 1. 各组临床资料的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1. Comparison of clinical characteristics in study groups

临床资料	对照组 (102 例)	糖尿病组(202 例)	
		As 组(77 例)	非 As 组(125 例)
性别 (男/女)	59/43	42/35	65/60
年龄 (岁)	57.6 ± 12.3 <sup>b</sup>	52.8 ± 7.8	51.9 ± 7.7
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	24.55 ± 3.36 <sup>a</sup>	25.97 ± 2.75	25.27 ± 2.76
腰臀比	0.83 ± 0.06 <sup>b</sup>	0.90 ± 0.05	0.89 ± 0.06
收缩压 (mm Hg)	114 ± 12 <sup>b</sup>	131 ± 18	123 ± 15 <sup>d</sup>
舒张压 (mm Hg)	74 ± 7 <sup>b</sup>	84 ± 11	80 ± 10 <sup>c</sup>
TC (mmol/L)	4.22 ± 1.34 <sup>b</sup>	5.22 ± 0.99	5.01 ± 1.17
TG (mmol/L)	1.20 ± 0.75 <sup>b</sup>	2.11 ± 1.37	2.50 ± 2.83
HDLc (mmol/L)	1.16 ± 0.33 <sup>b</sup>	1.36 ± 0.26	1.32 ± 0.31
LDLc (mmol/L)	2.30 ± 0.79 <sup>b</sup>	2.93 ± 0.63	2.76 ± 0.68
HbA1c (%)		6.92 ± 2.18	6.87 ± 1.94
ISI	-3.96 ± 0.52 <sup>b</sup>	-3.84 ± 0.63	-3.65 ± 0.66 <sup>c</sup>

a:  $P < 0.05$ , b:  $P < 0.01$ , 与糖尿病组比较。c:  $P < 0.05$ , d:  $P < 0.01$ , 与非 As 组间的比较。

## 1.2 动脉内膜中膜厚度的测定

采用高分辨力多功能彩色多普勒超声诊断仪 ALT-HDI 5000 型, 探头频率 5.0~12.0 Hz。受检者休息 5 min, 取仰卧位, 测 3 处动脉长轴后壁内膜内表面至中膜外表面之间的垂直距离作为动脉 IMT。测量位置分别为颈总动脉距颈动脉球部膨大 10 mm 内最厚处、髂总动脉距腹主动脉分叉远端 10 mm 内最厚处和股动脉分叉近端 10 mm 内最厚处。

## 1.3 过氧化体增殖物激活型受体 $\gamma 2$ 基因 Pro12Ala 变异分析

取静脉血 4 mL, Genome DNA Extraction Kit 提取外周血基因组 DNA, 以 0.1  $\mu$ g DNA 为模板在 30  $\mu$ L 的反应体系中进行聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 扩增。引物序列参考 Yen 等<sup>[2]</sup> 的设计: 上游引物: 5'-GCC AAT TCA AGC CCA GTC-3', 下游引物: 5'-GAT ATG TTT GCA GAC AGT GTA TCA GTG AAG GAA TCG CTT TCC G-3'。反应条件: 95  $^{\circ}$ C 预变性 5 min  $\rightarrow$  94  $^{\circ}$ C 变性 40 s  $\rightarrow$  58  $^{\circ}$ C 退火 40 s  $\rightarrow$  72  $^{\circ}$ C 延伸 40 s, 共 35 个循环, 72  $^{\circ}$ C 延伸 5 min。PCR 扩增产物片段长为 267 bp, 经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳确认扩增结果后, 继以限制性内切酶 Hpa I (MBI 公司,

酶切位点为 C || CCG) 37  $^{\circ}$ C 水浴 16 h, 经 3% 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色后紫外凝胶成像系统观察: PCR 产物可被降解为 224 bp 及 43 bp 两个片段。Pro/Pro 为 224 bp 及 43 bp; Pro/Ala 为 267 bp、224bp 及 43 bp; Ala/Ala 为 267 bp。

## 1.4 统计学处理

用 Hardy-Weinberg 平衡原理估测样本的群体代表性。统计在 SPSS10.0 统计软件中进行, 计数资料间的比较用检验, 计量资料 ( $\bar{x} \pm s$ ) 间的比较用  $t$  或  $t'$  检验。相关性分析采用逐步回归分析。  $P < 0.05$  有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 过氧化体增殖物激活型受体 $\gamma 2$ 基因型频率及等位基因频率的比较

过氧化体增殖物激活型受体  $\gamma 2$  基因 Pro/Pro、Pro/Ala 和 Ala/Ala 基因型频率分别为 0.911、0.089 及 0, Pro 等位基因的频率为 0.956, Ala 等位基因频率为 0.044, 符合 Hardy-Weinberg 平衡。对照组与糖尿病组的基因型频率及等位基因频率均差异无显著性 ( $\chi^2 = 0.687, P = 0.407; \chi^2 = 0.655, P = 0.418$ )。As 组与非 As 组基因型频率及等位基因频率也无显著性差异 ( $\chi^2 = 2.764, P = 0.096; \chi^2 = 2.650, P = 0.104$ ) (表 2, Table 2)。

表 2. 各组过氧化体增殖物激活型受体  $\gamma 2$  基因型及等位基因频率分布及比较

Table 2. Genotype and allele frequency distribution and comparison of PPAR $\gamma 2$

分 组	n	基 因 型			等位基因频率	
		Pro/Pro	Pro/Ala	Ala/Ala	Pro	Ala
对照组	102	91 (89.2%)	11 (10.8%)	0(0)	94.6%	5.4%
As 组	77	74 (96.1%)	3 (3.9%)	0(0)	98.1%	1.9%
非 As 组	125	112 (89.6%)	13 (10.4%)	0(0)	94.8%	5.2%

### 2.2 过氧化体增殖物激活型受体 $\gamma 2$ 基因 Pro12Ala 变异的基因型与各临床指标的关系

在对照组内 (表 3, Table 3), Pro/Ala 基因型组 BMI 高于 Pro/Pro 组 ( $P = 0.003$ ), 以 BMI 为因变量, 性别、年龄、PPAR $\gamma 2$ -Pro12Ala、WHR、SBP、DBP、TC、TG、HDLc、LDLc、ISI 为自变量进行逐步回归分析可见, PPAR $\gamma 2$ -Pro12Ala 不是 BMI 的独立危险因素; 其它临床指标在两基因型亚组间均无统计学意义。在糖尿病组内, 各临床指标在两基因型亚组间均无统

计学意义。

表 3. 对照组内 Pro/Pro 和 Pro/Ala 基因型亚组间各临床指标的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 3. Clinical characteristics in control group stratified by PPAR $\gamma$ 2 genotype

临床指标	Pro/Pro 组	Pro/Ala 组
例数 (男/女)	91(53/38)	11(6/5)
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	24.20 $\pm$ 3.20	27.39 $\pm$ 3.42 <sup>a</sup>
腰臀比	0.82 $\pm$ 0.06	0.89 $\pm$ 0.06
收缩压 (mm Hg)	113.30 $\pm$ 12.16	118.64 $\pm$ 10.75
舒张压 (mm Hg)	74.01 $\pm$ 7.20	71.82 $\pm$ 7.51
TC (mmol/L)	4.21 $\pm$ 1.37	4.31 $\pm$ 1.19
TG (mmol/L)	1.23 $\pm$ 0.77	0.95 $\pm$ 0.61
HDLC (mmol/L)	1.14 $\pm$ 0.33	1.32 $\pm$ 0.29
LDLC (mmol/L)	2.21 $\pm$ 0.80	2.91 $\pm$ 0.21
ISI	-3.94 $\pm$ 0.51	-4.14 $\pm$ 0.61

a:  $P < 0.05$ , 与 Pro/Pro 组比较。

### 3 讨论

PPAR $\gamma$ 2 外显子 B 在第 34 位核苷酸 C $\rightarrow$ G 替换而造成脯氨酸转变为丙氨酸(即 PPAR $\gamma$ 2-Pro/Ala 变异),使其特有的氨基酸序列发生改变,脯氨酸有防止  $\alpha$  螺旋形成的作用,而丙氨酸促进  $\alpha$  螺旋形成,该氨基酸的改变引起构象的改变,从而影响了其功能。

Deeb 等<sup>[3]</sup> 研究发现 PPAR $\gamma$ 2 基因 Pro12Ala 变异导致 PPAR $\gamma$  与 PPAR 反应元件 (PPRE) 结合能力降低,引起 PPAR $\gamma$  转录活性下降,同时也发现糖尿病组 Pro12Ala 变异率较对照组低。Mori 等<sup>[4]</sup> 研究日本人群发现糖尿病组 PPAR $\gamma$ 2-Pro12Ala 变异率较正常人群变异率明显降低。说明 PPAR $\gamma$ 2 基因 Pro12Ala 变异者糖尿病的发生率降低。但是,本研究发现,PPAR $\gamma$ 2 基因 Pro12Ala 变异与大连地区汉族人 2 型糖尿病的发生无明显相关性,与项坤三等<sup>[5]</sup> 及傅茂等<sup>[6]</sup> 的研究结果一致,可能与种族及环境因素有关。

糖尿病发生 As 的危险性增加。PPAR $\gamma$  在 As 斑块的泡沫细胞中表达,其激动剂通过增加清道夫受体 CD36 表达使巨噬细胞对 ox-LDL 的摄取增加,ox-LDL 上调 PPAR $\gamma$  表达,促进泡沫细胞的形成,从而导致 As 的形成。PPAR $\gamma$  激活可改善内皮功能,又通过抑制炎症反应、抑制血管细胞的增殖及迁移,以及促进胆固醇的外流而达到抗 As 的作用。由此可见,PPAR $\gamma$  的激活对 As 的形成是一把双刃剑。同时其

基因的变异在 As 形成中所起的作用也存在争论。Ridker 等<sup>[7]</sup> 研究发现,PPAR $\gamma$ 2 基因 Pro12Ala 变异与心肌梗死的发生明显相关,发生心肌梗死的人群其 Pro12Ala 变异率较对照组低;而 Bl $\cdot$ her 等<sup>[8]</sup> 研究发现,在 T2DM 患者中 PPAR $\gamma$ 2 基因 Pro12Ala 变异与发生冠心病无明显相关性。本研究未发现 Pro12Ala 变异与 T2DM 患者早期 As 明显相关。文献[3] 报告 PPAR $\gamma$ 2 基因 Pro12Ala 变异与 BMI 低明显相关。但是,也有研究认为 PPAR $\gamma$ 2 基因 Pro12Ala 变异与 BMI 无明显相关性<sup>[9]</sup>。本研究发现,在对照组中 PPAR $\gamma$ 2 基因 Pro12Ala 变异与高 BMI 明显相关,但在逐步回归分析中提示 Pro12Ala 变异不是 BMI 的独立危险因素,高 BMI 可能与 PPAR $\gamma$ 2 基因 Pro12Ala 变异等多种因素共同作用有关。

2 型糖尿病及其 As 的病因及发病机制复杂,目前认为与年龄、BMI、胰岛素抵抗、炎症反应等有关,但 PPAR $\gamma$ 2 基因 Pro12Ala 变异与 2 型糖尿病、动脉粥样硬化的发生及相关代谢紊乱的关联性有待进一步研究。

### [参考文献]

- [1] 潘琦,郭立新,初明峰,满永,孙明晓,李铭,等. 糖尿病患者同型半胱氨酸及其代谢相关酶基因多态性与颈动脉内膜-中膜厚度的关系. 中国动脉硬化杂志, 2005, 13: 195-198
- [2] Yen CJ, Beamer BA, Negri C, Silver K, Brown KA. Molecular scanning of the human peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$  (hPPAR $\gamma$ ) gene in diabetic Caucasians: Identification of a Pro12Ala PPAR $\gamma$ 2 missense mutation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1997, 240: 270-274
- [3] Deeb SS, Fajas L, Nemoto M, Pihlajamaki J, Mykkanen L, Kuusisto J, et al. Pro12Ala substitution in PPAR $\gamma$ 2 associated with decreased receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity. *Nature Genetics*, 1998, 20: 284-287
- [4] Mori H, Ikegami H, Kawaguchi Y, Seino S, Yokoi N, Takeda J, et al. The Pro12 $\rightarrow$ Ala substitution in PPAR $\gamma$  is associated with resistance to development of diabetes in the general population: Possible involvement in impairment of insulin secretion in individuals with type 2 diabetes. *Diabetes*, 2001, 50: 891-894
- [5] 项坤三, 陆惠娟, 贾伟平, 方启晨. 过氧化脂质增殖物激活的受体  $\gamma$ 2-Pro12Ala 变异对常见代谢病的影响. 中华内分泌代谢杂志, 2000, 16: 164-168
- [6] 傅茂, 程桦, 李秀钧, 李洁, 吴斌, 陈黎红, 等. 过氧化物酶增殖物激活受体- $\gamma$ 2 基因 Pro12Ala 变异与 2 型糖尿病的关系. 中华医学遗传学杂志, 2002, 19: 234-238
- [7] Ridker PM, Cook NR, Cheng S, Erlich HA, Lindpaintner K, Plutzky J, et al. Alanine for Proline substitution in the peroxisome proliferator-activated receptor gamma2 (PPARG2) gene and the risk of incident myocardial infarction. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 2003, 23: 859-863
- [8] Bl $\cdot$ her M, Klemm T, Gerike T, Krankenberg H, Schuler G, Paschke R. Lack of association between peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ 2 gene variants and the occurrence of coronary heart disease in patients with diabetes mellitus. *European Journal of Endocrinology*, 2002, 146: 545-551
- [9] Eun YO, Kyeong MM, Jae HC, Yong KM, Myung SL, Kwang WK, et al. Significance of Pro12Ala mutation in peroxisome proliferator activated receptor- $\gamma$ 2 in Korean diabetic and obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000, 85: 1801-804

(此文编辑 朱雯霞)