

• 临床研究 •

[文章编号] 1007-3949(2009)17-02-0150-03

中国潍坊地区汉族人过氧化体增殖物激活型受体 γ 2 基因 Pro12A la 多态性与糖尿病的相关性

刘凤静¹, 刘长山², 冯波¹, 逢力男², 祝宝青²

(1. 同济大学附属东方医院内分泌科, 上海市 200120; 2. 潍坊医学院附属潍坊市人民医院内分泌科, 山东省潍坊市 261041)

[关键词] 2型糖尿病; 过氧化体增殖物激活型受体 γ 2 基因多态性; 胰岛素抵抗

[摘要] 目的 观察中国潍坊地区汉族人过氧化体增殖物激活型受体 γ 2 基因 Pro12A la 多态性的分布情况, 探讨其与 2 型糖尿病的相关性。方法 利用聚合酶链反应限制片段多态性测定 170 例 2 型糖尿病患者和 54 例健康人过氧化体增殖物激活型受体 γ 2 基因 Pro12A la 基因型, 比较基因型和等位基因频率在不同组间的差异。结果 在 224 例潍坊地区汉族人中, 过氧化体增殖物激活型受体 γ 2 基因 Pro12A la 多态性分布以 Pro/Pro 基因型为主, Pro/Pro, Pro/A la 及 A la/A la 基因型频率分别为 0.902, 0.094 及 0.004。Pro 等位基因的频率为 0.9487, A la 等位基因频率为 0.0513。正常对照组中 A la 等位基因的频率为 0.093, 明显高于糖尿病组 (0.041, $P = 0.039$)。结论 潍坊地区汉族人过氧化体增殖物激活型受体 γ 2 基因 Pro12A la 多态性 (A la 等位基因) 可能是 2 型糖尿病发病的保护性因子。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Association Between Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ 2 Gene Pro12A la Polymorphism and Type 2 Diabetes Mellitus in Weifang Han Population

LIU Feng-Jing, LIU Chang-Shan, FENG Bo, FENG Li-Lan, and ZHU Bao-Qing

(Department of Endocrinology, Shanghai East Hospital Affiliated to Tongji University, Shanghai 200120, China)

[KEY WORDS] Type 2 Diabetes Mellitus; Peroxisome Proliferator Activated Receptor- γ ; Gene Polymorphism; Insulin Resistance

[ABSTRACT] **Aim** To evaluate the possible association between PPAR γ 2 gene Pro12A la polymorphism and type 2 diabetes mellitus in a population-based study in Weifang Han population. **Methods** Genomic DNA was extracted from peripheral blood leucocytes of 170 patients with type 2 diabetes mellitus and 54 normal subjects. The Pro12A la polymorphism was screened using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). **Results** The frequencies of Pro allele and A la allele were 0.9487 and 0.0513 respectively in 224 subjects from Han people of Weifang Chinese. The A la allele frequency in the control group and type 2 diabetes mellitus group were 0.093 and 0.041 respectively. The A la allele frequency in type 2 diabetes mellitus was significantly lower than that in the control group ($P = 0.039$). **Conclusion** PPAR γ 2 gene Pro12A la polymorphism is associated with the incidence of type 2 diabetes mellitus in Han people of Weifang Chinese. The A la allele confers modest protection against the onset of type 2 diabetes mellitus.

过氧化体增殖物激活型受体 γ 2 (peroxisome proliferator activated receptor γ 2, PPAR γ 2) 是一种核转录因子, 属于核激素受体超家族成员, 具有促进脂肪细胞分化和脂肪酸的代谢、改善胰岛素敏感性等作用。1997 年 Yen 等^[1]提出 PPAR γ 2 外显子 B 存在 Pro12A la 多态性, 并且在不同种族和人群中突变率存在差异。由于 PPAR γ 2 基因参与多种人体的代谢过程, 因此其基因多态性可能与 2 型糖尿病 (type

2 diabetes mellitus, T2DM)、血脂紊乱、肥胖、胰岛素抵抗等存在内在关系。本研究旨在观察和探讨 PPAR γ 2 基因 Pro12A la 多态性是否与潍坊地区汉族人 2 型糖尿病相关。

1 对象和方法

1.1 研究对象

根据 1999 年 WHO 糖尿病诊断标准选择 2 型糖尿病患者 170 例, 其中男 84 女 86, 年龄 62.2 ± 10.7 岁, 全部来自山东潍坊及周边地区, 相互间无血缘关系。收集同期参加体检的健康对照者 54 例, 其中男 34 女 20 例, 年龄 54.0 ± 10.3 岁, 两组在性别

[收稿日期] 2008-07-31 [修回日期] 2009-01-04

[作者简介] 刘凤静, 博士研究生, 研究方向为糖尿病慢性并发症, Email 为 liufengjing7@sina.com。通讯作者刘长山, 主任医师, 硕士研究生导师, Email 为 liuchangshan0996@sina.com。冯波, 主任医师, 博士研究生导师。

和年龄上相匹配。

1.2 基因组 DNA 提取

采集外周全血 1 mL, 以 20 μ L 0.5 mol/L EDTA 抗凝, 利用 EZ-10 Spin Column Genomic DNA Isolation Kit(上海生工生物工程有限公司)提取白细胞 DNA, -20℃保存备用。

1.3 聚合酶链反应扩增目的基因片断

引物序列参照 Yen 等^[1]的设计, 由上海生工生物工程有限公司合成。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'。在 50 μ L 反应体系中: 10 \times PCR Buffer 5.0 μ L, 25 mmol/L MgCl₂ 6.0 μ L, 10 mmol/L dNTP 2.0 μ L, 10 μ mol/L Primer: F 和 Primer: R 各 1.0 μ L, 基因组 DNA 1.0 μ L, 5 U/L Taq DNA Polymerase (Promega 公司) 0.2 μ L, Sterilized ddH₂O 33.8 μ L 补足。在 PCR 仪 (W hatman150-801 型, B iometra) 上扩增。反应条件: 95℃预变性 5 min 后, 以 94℃变性 30 s, 52℃退火 30 s, 72℃延伸 30 s 为一个循环, 共 36 个循环, 最后 72℃延伸 7 min, 4℃保存。以 1% 琼脂糖凝胶电泳 PCR 产物, 扩增成功的样本继续进行多态性分析。

1.4 限制片长多态性分析

在 20 μ L 体系中, 将 PCR 产物以限制性内切酶 HpaⅠ酶切消化, 反应体系: PCR 扩增产物 10.0 μ L, HpaⅠ 0.5 μ L, 10 \times Buffer R 2.0 μ L, BSA (10 g/L) 0.2 μ L, Sterilized ddH₂O 7.3 μ L 补足体系。37℃水浴过夜。取样 10 μ L 以 3% 琼脂糖凝胶电泳确定基因型。

1.5 基因型判别

取酶切产物 10 μ L, 以 3% 琼脂糖凝胶电泳 (90 V, 40 min) 确定基因型。PCR 产物长度为 267 bp 经 HpaⅠ酶切消化后, 野生纯合子 (Pro/Pro) 显示为 224 bp 和 43 bp 两条带; 突变杂合子 (Pro/A la) 显示为 267 bp, 224 bp 和 43 bp 三条带; 突变纯合子 (A la/A la) 不能被切开, 显示为一条带, 长度为 267 bp。对部分 PCR 产物进行测序, 以明确扩增序列的特异性; 对突变纯合子 (A la/A la) 采用 BstⅠ再次酶切, 以进一步确认结果的可靠性。

1.6 统计学方法

采用 SPSS12.0 分析软件, 多态性位点的基因型和等位基因频率在组间的差异分析采用 χ^2 检验, 组间比较采用成组 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般临床资料比较

糖尿病组体质指数、血脂、空腹血糖及血压水平与对照组比较差异显著 (表 1)。

表 1 一般临床资料比较 ($\bar{x} \pm s$)

指 标	糖尿病组 (<i>n</i> = 170)	对照组 (<i>n</i> = 54)
体质指数 (kg/m ²)	24.1 \pm 4.0 ^a	23.5 \pm 3.0
收缩压 (mmHg)	143 \pm 21 ^b	134 \pm 18
舒张压 (mmHg)	80 \pm 12 ^b	76 \pm 9
空腹血糖 (mmol/L)	9.6 \pm 3.7 ^b	4.9 \pm 0.6
总胆固醇 (mmol/L)	5.2 \pm 1.3 ^b	4.6 \pm 1.2
甘油三酯 (mmol/L)	1.9 \pm 0.9 ^b	1.6 \pm 1.0
高密度脂蛋白 (mmol/L)	1.3 \pm 0.4 ^b	1.5 \pm 0.4
低密度脂蛋白 (mmol/L)	3.0 \pm 1.0 ^b	2.5 \pm 0.9

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较。

2.2 基因型和等位基因频率比较

在 224 例潍坊地区的汉族人中, PPAR γ 2 基因 Pro12A la 多态性分布以 Pro/Pro 基因型为主, Pro/Pro, Pro/A la 和 A la/A la 基因型频率分别为 0.902, 0.094 和 0.004, Pro 等位基因频率为 0.9487, A la 等位基因频率为 0.0513, 符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡, 具有群体代表性。对照组 A la 等位基因频率为 0.093, 糖尿病组为 0.041, 对照组显著高于糖尿病组 ($P = 0.039$, 图 1 和表 2)。

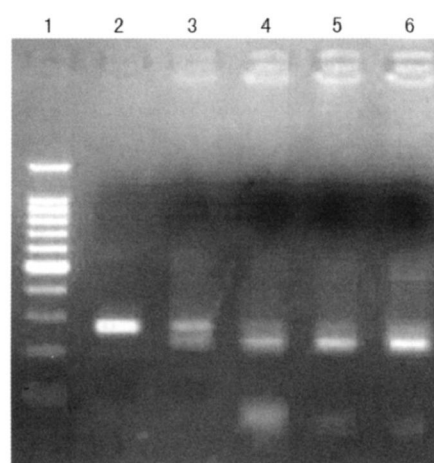
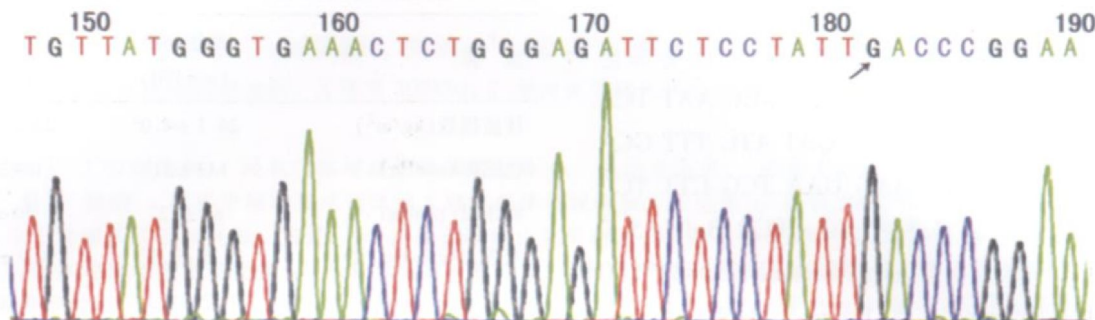


图 1 PPAR γ 2 基因 Pro12A la 基因型 1 为 100 bp DNA Ladder Marker, 2 为 A la/A la 基因型, 3 为 Pro/A la 基因型, 4~6 为 Pro/Pro 基因型。

表 2 PPAR γ 2基因 Pro12A1a基因型和等位基因频率(例)

分 组	n	基因型		等位基因	
		Pro/Pro	Pro/A1a+ A1a/A1a	Pro	A1a
对照组	54	44(0.815)	10(0.185)	98(0.907)	10(0.093)
糖尿病组	170	157(0.924)	13(0.076)	326(0.959)	14(0.041)

图 2 PPAR γ 2基因测序结果

3 讨论

PPAR γ 2基因作为2型糖尿病的候选基因,是近年来研究的热点。目前有关PPAR γ 2基因Pro12A1a多态性与2型糖尿病之间的相关性有所研究,但各家报道结果不一。在美籍日本人中,糖耐量正常组A1a等位基因频率为0.093,而2型糖尿病组中为0.022,提示A1a/A1a纯合子对2型糖尿病人群具有保护作用^[2]。在中老年芬兰人中,A1a等位基因与低体质指数显著相关,并可以增加胰岛素敏感性^[2];丹麦非糖尿病人群中携带A1a等位基因者胰岛素抵抗综合征的发病率明显降低,这有助于减少2型糖尿病的发生^[3],但在芬兰携带A1a等位基因的肥胖IGT患者更易发展为2型糖尿病^[4],而在中国上海也未发现Pro12A1a多态性与2型糖尿病相关^[5]。这种种族和区域之间差异的原因目前并不清楚。对整个人群Meta分析后证实,在整个人群中携带A等位基因者2型糖尿病的发病率下降25%^[2]。本研究发现,在潍坊地区的汉族糖尿病人群中,A1a等位基因频率明显低于正常对照人群,提

2.3 PCR产物序列

测序结果与GenBank报道的基因序列完全一致(图2),箭头所指为多态位点,突变时胞嘧啶C变为鸟嘌呤G。

示PPAR γ 2基因Pro12A1a多态性与潍坊地区汉族人群2型糖尿病有一定的相关性,可能是2型糖尿病的保护性基因。

[参考文献]

- [1] Yen CJ, Beamer BA, Negri C, et al. Molecular scanning of the human peroxisome proliferator activated receptor gamma (hPPAR gamma) gene in diabetic Caucasians: identification of a Pro12A1a PPAR gamma2 missense mutation [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, **241** (2): 270-274.
- [2] Deeb SS, Fajas L, Nemoto M, et al. A Pro12A1a substitution in PPAR γ 2 associated with decreased receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity [J]. *Nat genet*, 1998, **20** (3): 284-287.
- [3] Frederksen L, Brodbeck K, Fenger M, et al. Comment: studies of the Pro12A1a polymorphism of the PPAR-gamma gene in the Danish MONICA cohort: homozygosity of the A1a allele confers a decreased risk of the insulin resistance syndrome [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, **87** (8): 3989-792.
- [4] Lindi VI, Uusitupa MI, Lindström J, et al. Association of the Pro12A1a polymorphism in the PPAR-gamma2 gene with 3-year incidence of type 2 diabetes and body weight change in the Finnish Diabetes Prevention Study [J]. *Diabetes*, 2002, **51** (8): 2581-586.
- [5] 董艳, 李果, 骆天红, 等. PPAR γ 2基因Pro12A1a多态性与上海地区2型糖尿病的相关性 [J]. *上海第二医科大学学报*, 2004, **24** (5): 345-347.

(此文编辑 文玉珊)