论著

文章编号:1000-5404(2005)15-1596-03

LR 3 057位基因多态性与2型DM和肥胖及血脂的关系

唐晓君[1],卢仙娥[1],张素华[2],李启富[2],李 萍[2] (重庆医科大学:[1]流行病学教研室,[2]附属第一医院内分泌科,重庆 400016)

提 要:目的 探讨瘦素受体(leptin receptor, LR)基因第20外显子基因变异与2型糖尿病(diabetes mellitus, DM)和肥胖及血脂的关系。**方法** 采用聚合酶链反应-限制性酶切片段长度多态性(PCR-RFLP)方法,对134例血标本检测了瘦素受体基因第20外显子+3 057位核苷酸基因多态性,并分析其与2型DM及肥胖的关系。**结果** 对75例2型DM病人和59例血糖正常者检测LR基因+3 057位核苷酸G→A的变异频率,总变异频率为82.09%,其中DM组为87.33%,正常对照组为75.42%($P<0.05$),$OR=2.25$。DM患者中AA型频率显著高于对照组,而GA型频率低于对照组,病例组中未见GG型频率(趋势$\chi^2=6.77$,$P<0.01$),按BMI及WHR划分,未见其基因变异与肥胖的关系。AA基因型组甘油三酯、收缩压、舒张压高于GA型组,而高密度脂蛋白低于GA型组($P<0.05$)。**结论** 重庆地区存在LR基因第20外显子+3 057位核苷酸基因变异,它可能是该地区人群2型DM的遗传易感标记,A等位基因与2型DM及高血压、高血脂发病有一定的关系。

关键词: 2型糖尿病;瘦素受体;基因多态性

中图法分类号: R394-33; R587.1; R589.2 **文献标识码:** A

Relationship of the variation of leptin receptor gene at 3 057 nucleotide to type 2 diabetes mellitus, obesity and plasma lipid levels

TANG Xiao-jun[1], LU Xian-e[1], ZHANG Su-hua[2], LI Qi-fu[2], LI ping[2] ([1]Department of Epidemiology, [2]Department of Endocrinology, The First Affiliated Hospital, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To explore the relationship between the variation of leptin receptor (LR) gene and type 2 diabetes mellitus (DM), obesity and plasma lipid levels. **Methods** The variation of LR gene exon 20 was detected by polymerase chain reaction (PCR) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) and their relations to type 2 DM and obesity were analyzed. **Results** The variant frequency at 3 057 nucleotide of G to A transversion was 82.09% for total, 87.33% for DM group, 75.42% for control group. The frequency of AA genotype in DM cases was higher than that in controls, but that of GA genotype was lower, and that of GG in cases did not indicate. According to BMI and WHR level, there was no obvious relationship between gene variations and obesity. There were significant differences between AA genotype and GA genotype about the serum levels of TG, HDL and SBP, DBP. **Conclusion** At nucleotide 3 057 in LR exon 20, a G to A transversion was found, which may be the susceptibility marker of DM in Chongqing population. An allele was associated with high blood lipid and increased blood pressure.

Key words: type 2 diabetes mellitus; leptin receptor; gene variation

瘦素受体(leptin receptor, LR)基因又称为糖尿病基因,于1995年被定位克隆,它位于人类1P31,由20个外显子,19个内含子组成[1,2]。瘦素主要通过与LR结合,发挥调节能量平衡、代谢、饮食摄入、生长、生殖等功能。LR与糖尿病、肥胖密切联系,成为当前研究的热点领域。本实验选择LR基因第20外显子3 057处核苷酸G→A变异,探讨该变异与肥胖及2型糖尿病的关系。

1 对象与方法

1.1 研究对象

根据1999年WHO糖尿病诊断标准,于2003年2-4月选择重庆医科大学附属第一医院内分泌科住院和门诊病人,2型糖尿病患者75例,同期健康体检者59例作为对照组。

1.2 方法

1.2.1 临床检测 所有研究对象均测定身高、体质量、腰围、臀围、血压等,检测空腹血糖、口服75 g葡萄糖后2 h血糖

作者简介:唐晓君(1970-),女,四川省达州市人,硕士,讲师,主要从事慢性病流行病学方面的研究。电话:(023)68485228

收稿日期:2005-06-08;修回日期:2005-06-21

及血脂等生化指标。体质量指数(BMI) = 体质量(kg)/身高^2(m^2)，腰臀比(WHR) = 腰围/臀围。

1.2.2　PCR 扩增　　取用 EDTA 抗凝的外周血 1 ml，采用上海华舜生工的小量基因组 DNA 抽提试剂盒提取 DNA，PCR 引物[3]由上海生工公司合成。PCR 反应体积 30 μl：模板 DNA 5 μl，引物各 2 μl，dNTP 5 μl，10 × PCR buffer 3 μl，*Taq* 酶 2 U。PCR 反应条件：95 ℃预变性 5 min，继之 30 个循环，每个循环中变性 94 ℃ 1 min，复性 55 ℃ 30 s，延伸 72 ℃ 50 s，最后 72 ℃再延伸 7 min。

1.2.3　限制性酶切分析　　内切酶 *Hinc* Ⅱ酶切 PCR 扩增基因产物，37 ℃水浴 2 ~ 4 h，10% 聚丙烯酰胺凝胶分离酶切产物，0.8 μl EB 染色 30 min，于凝胶成像分析系统和凝胶成像分析软件中观察结果。

1.3　统计学分析

所有实验室数据和流行病学调查资料在 EPI info 6.0 软件中建立数据库，采用 SAS 8.0 软件包对数据进行分析。等位基因变异频率比较用 χ^2 检验，计量资料用 t 检验，多因素分析采用非条件 Logistic 回归分析。

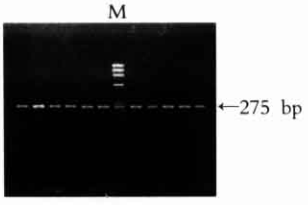
2　结果

2.1　研究对象的一般情况

本次研究对象共 134 例，男性 64 人，女性 70 人，其中 DM 组 75 例(男 32 人，女 43 人)，正常对照组 59 例(男 32 人，女 27 人)。病例组与对照组男、女性别差异无显著性($\chi^2 = 1.772$，$P = 0.183$)，病例组平均年龄为(58.07 ± 11.49)岁，对照组平均年龄为(59.91 ± 11.84)岁，两组年龄差异无显著性($t = 0.911\ 9$，$P = 0.363\ 5$)，说明两组在年龄、性别上均衡可比。

2.2　PCR 产物酶切结果

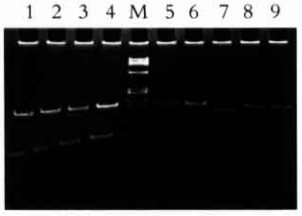
PCR 扩增产物为 275 bp，内切酶 *Hinc* Ⅱ作用后有 3 种结果：GG(176、70、29 bp)，GA(205、176、70 bp)，AA(205、70 bp)，见图 1，2。



M：Marker

图 1　目的基因 PCR 结果

Fig 1　The result of target gene PCR product



M：Marker；1，2，4，5，6，8，9：AA；3：GA；7：GG

图 2　LR 基因 Pro1019Pro 的基因多态性

Fig 2　Electrophoretic results of PCR product digested by *Hinc* Ⅱ

2.3　LR 基因(Pro1019Pro)各等位基因及基因型在病例组与对照组中的分布

LR 基因在 3 057 位核苷酸 G→A 变异，总的基因变异频率(A 等位基因)为 82.09%(220/268)，DM 组的变异频率为 87.33%，正常对照组的变异频率为 75.42%，病例组 A 等位基因频率显著高于对照组，其 *OR* 值为 2.25，95% *CI* 为：1.14 ~ 4.47。病例组中 AA 型的频率(74.67%)显著高于对照组(55.93%)，而 GA 型的频率(25.33%)低于对照组(38.98%)。AA 型和 GA 型相比较，其 *OR* 值为 2.05(95% *CI*：0.91 ~ 4.63)，随着等位基因 A 的增加，患 DM 的危险性显著增高，结果见表 1。

表 1　LR 基因各等位基因及基因型的分布与频率(%)

Tab 1　Comparison of LR allele and genotype frequencies (%)

Group	n	Allele		Genotype		
		G	A	GG	GA	AA
DM group	75	19(12.67%)	131(87.33%)	0(0.00%)	19(25.33%)	56(74.67%)
Normal group	59	29(24.58%)	89(75.42%)	3(5.08%)	23(38.98%)	33(55.93%)

Allele frequencies：$\chi^2 = 6.37$，$P = 0.011\ 6$；Genotype frequencies：$\chi^2 = 7.52$，$P = 0.02$；Chi square for trend：$\chi^2 = 6.77$，$P = 0.009$

2.4　LR 3 057 位基因多态性与肥胖的关系

以 BMI≥25 kg/m^2 为切割点分成 4 组，计算各组基因型频率(表 2)，DM 肥胖组变异频率高于正常对照组，但 4 组之间比较差异无显著性意义。

表 2　LR 3 057 位基因多态性与 BMI 的关系

Tab 2　The relationship of LR 3 057 gene polymorphisms and BMI level

Gene	Genotype			Allele		Frequency(%)
	GG	GA	AA	G	A	
DM group						
BMI≥25	0	9	20	9	49	84.48
BMI<25	0	10	36	10	82	89.13
Control group						
BMI≥25	2	7	13	11	33	75.00
BMI<25	1	16	20	18	56	75.68

$\chi^2 = 6.90$，$P = 0.075$

以 WHR 男性≥0.90、女性≥0.85 为腹型肥胖划分成 4 组，计算各组基因型频率(表 3)，DM 肥胖组变异频率高于 WHR 正常对照人群，但 4 组之间比较差异无显著性意义。

表 3　LR 3 057 位基因多态性与 WHR 的关系

Tab 3　The relationship of LR 3 057 gene polymorphisms and WHR level

Gene	Genotype			Allele		Frequency(%)
	GG	GA	AA	G	A	
DM group						
Obesity	0	5	15	5	35	87.50
Normal	0	14	41	14	96	87.27
Control group						
Obesity	2	6	8	10	22	68.75
Normal	1	17	25	19	67	77.91

$\chi^2 = 7.70$，$P = 0.052\ 5$

2.5　LR 3 057 位基因多态性与血脂、血压的关系

AA 基因型组甘油三脂、收缩压、舒张压高于 GA 型组，而

高密度脂蛋白低于 GA 型组，结果见表4。

2.6 多因素非条件 Logistic 回归分析

以2型糖尿病发病与否为因变量，以所选择的研究因素（包括临床及基因检测指标）为自变量，以 $\alpha=0.05$ 为显著性水准进入回归模型的变量有：腰臀比（$OR=2.352$）、收缩压（$OR=2.956$）、AA 基因型（$OR=2.372$）。

表4 LR 3057 位基因多态性与血脂、血压的关系（$\bar{x}\pm s$）

Tab 4 Effect of LR 3057 gene polymorphisms on the blood lipid level and blood pressure（$\bar{x}\pm s$）

Genotype	n	TC	TG	HDL	LDL	SDP	BDP
GA	42	5.33±1.01	1.55±0.99 *	1.63±0.44 **	3.03±0.95	122.10±21.93 **	75.57±11.68 **
AA	89	5.65±1.55	2.16±1.45	1.36±0.43	3.27±1.43	140.62±22.56	80.69±10.66

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$，*vs* AA；TC：total cholesterol；TG：triglyceride；HDL：high density lipoprotein；LDL：low density lipoprotein；SBP：systolic blood pressure；DBP：diastolic blood pressure

3 讨论

瘦素（leptin）是肥胖基因编码的一种脂源性激素，它与位于下丘脑和脂肪组织的瘦素受体结合，方能发挥调节能量代谢和体脂平衡的作用。目前已在 LR 基因20个外显子中发现了19种基因多态性，但关于该基因变异与人类肥胖和糖尿病的关系报道不一[3,4]。Matsuoka 等[5]应用 PCR-RFLP 和 PCR-SSCP 技术对日本肥胖病人瘦素受体基因第2～20外显子进行扩增测序分析发现7种氨基酸顺序变异，分别是 Lys109Arg、Gln223Arg、Ser343Ser、Ser492Thr、Lys656Asn、Ala976Asp、Pro1019Pro，其中在第109、223、976、1 019位基因变异频率较高，分别为79%、91%、100%、85%。Matsuoka 仅研究了其变异与肥胖的关系，而未见相关性。

本研究结果显示：重庆地区汉族人存在瘦素受体基因变异，在第20外显子3 057处核苷酸由鸟嘌呤（G）→腺嘌呤（A），导致了密码子第1 019位（pro1 019pro）脯氨酸同义突变，其 A 等位基因总的变异频率为82.09%，糖尿病组变异频率为87.33%，正常对照组变异频率为75.42%，两组差异有显著性（$P<0.05$），说明具有 A 等位基因的人群更易发生2型 DM，其 OR 值为2.25（95% CI：1.14～4.47）。GA 型频率低于对照组，病例组中未见 GG 型，若以 AA 型和 GA 型比较，则暴露于 AA 基因型的 OR 值是2.05，说明随着等位基因 A 的增加，患糖尿病的危险性逐渐增加（趋势 $\chi^2=6.77$，$P=0.009$），提示 LR 的 A 等位基因可能是重庆地区人群2型 DM 的遗传易感标记。本次研究结果表2、3显示瘦素受体基因变异与肥胖无关，与国内鲁红云等[6]、国外 Matsuaka 等[5]报道基本一致。表4显示，AA 基因型具有更高的甘油三脂、收缩压、舒张压及更低的高密度脂蛋白，LR 是肥胖基因编码产物的受体，其基因变异主要影响机体的体脂分布和脂肪代谢，并通过调节胰岛素的敏感性来参与 DM 的发生，且瘦素可增加心血管疾病的风险，其基因变异与肥胖无关，可能解释为：① 3 057 位核苷酸 G→A 变异导致了 Pro1019Pro 同义突变，该变异可能仅影响了氨基酸表达的丰度，而不影响氨基酸的表型，从而对瘦素信号传递不产生明显影响。② 肥胖是多基因遗传病，其发病有遗传异质性，不同的个体有不同的基因参与其发病，同一个体又可能有若干个致病基因，单一基因只是以不同的风险率参与疾病的发生[7]。总之，由于瘦素受体基因结构复杂，变异多样，且具有种族差异，对其与肥胖、2型 DM、脂质代谢的关系，以及瘦素信号传递机制，基因表达调控等，尚有待于更深入的研究。

参考文献：

[1] Tartaglia L A, Dembski M, Weng X, *et al*. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R [J]. Cell, 1995, 83(7): 1263－1271.

[2] Chen H, Charlat O, Tartaglia L A, *et al*. Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice[J]. Cell, 1996, 84(3): 491－495.

[3] Ross J A, Oeffinger K C, Davies S M, *et al*. Genetic variation in the leptin receptor gene and obesity in survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia: a report from the Childhood Cancer Survivor Study [J]. J Clin Oncol, 2004, 22(17): 3558－3562.

[4] Liu Y J, Rocha Sanchez S M, Liu P Y, *et al*. Tests of linkage and/or association of the LEPR gene polymorphisms with obesity phenotypes in Caucasian nuclear families[J]. Physiol Genomics, 2004, 17(2): 101－106.

[5] Matsuoka N, Ogawa Y, Hosoda K, *et al*. Human leptin receptor gene in obese Japanese subjects: evidence against either obesity-causing mutations or association of sequence variants with obesity [J]. Diabetologia, 1997, 40 (10): 1204－1210.

[6] 鲁红云，徐焱成，朱宜莲，等. 瘦素受体基因多态性与2型糖尿病及肥胖的关系[J]. 中华医学遗传学杂志，2002，19(2)：163－164.

[7] 秦贵军，符云峰，余 勤，等. 2型糖尿病家系胰岛功能和血脂代谢的改变[J]. 郑州大学学报(医学版)，2003，38(6)：878－881.

（编辑 陈聪连）