论著

文章编号:1000-5404(2008)06-0536-03

脂联素基因 Gly15Gly 多态性与糖尿病大血管病变的关系

艾智华[1],房殿春[1],张忠辉[2] (第三军医大学西南医院:[1]全军消化病研究所;[2]内分泌科,重庆 400038)

摘 要:目的 探讨脂联素基因 Gly15Gly 多态性与糖尿病早期大血管病变发生的关系。**方法** 运用多聚酶链式反应-限制性片段长度基因多态性(PCR-RFLP 法)分析方法,对 56 例伴大血管病变和 120 例无大血管病变的 2 型糖尿病患者脂联素基因 Gly15Gly 多态性位点进行基因分型。**结果** 大血管病变组 GG 基因型频率(25.0%)显著高于无血管病变组(6.2%), G 等位基因频率显著升高($P<0.05$);GG 基因型血浆脂联素水平显著低于 TT 和 TG 基因型。**结论** 脂联素基因 Gly15Gly 多态性与糖尿病大血管并发症的发生有关,脂联素基因 +45 位点 GG 基因型是 2 型糖尿病大血管并发症的易感基因型。

关键词: 脂联素;基因多态性;糖尿病;大血管病变

中图法分类号: R341;R394.3;R587.2 **文献标识码:** A

Association of adiponectin gene Gly15Gly polymorphism with primary macroangiopathy in diabetes mellitus

AI Zhi-hua[1], FANG Dian-chun[1], ZHANG Zhong-hui[2] ([1]Gastroenterology Research Center, [2]Department of Endocrinology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the association adiponectin gene polymorphism with primary macroangiopathy in diabetes mellitus. Methods Type 2 diabetes mellitus (T2DM) patients were included, 56 patients complicated with atherosclerosis (AS) and 120 non-AS group. We evaluated their Gly15Gly polymorphism of adiponectin gene by PCR restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). Results The AS patients were more likely to have GG genotype than the non-AS patients (25.0% *vs* 6.2%, $P<0.05$). Blood adiponectin in the patients with GG genotype was lower than that in ones with TT or TG genotype [(15.10 ± 7.04) g/ml *vs* (19.64 ± 6.64) g/ml and (18.38 ± 7.49) g/ml]. Conclusion Gly15Gly polymorphism of adiponectin gene is related to primary macrovascular complications in T2DM. GG genotype is probably the predisposing gene for primary macrovascular complications in T2DM.

Key words: adiponectin; gene polymorphism; diabetes mellitus; macroangiopathy

脂联素(adiponectin, ADPN)为近年来新发现的一种由脂肪细胞分泌的激素,由 244 个氨基酸残基组成。脂联素基因位于 3q27,包含 3 个外显子和 2 个内含子,基因全长 17 kb[1]。脂联素基因 +45T→G 变异,即外显子 2Gly15Gly 多态性,并没有改变其编码的氨基酸,但对脂联素的表达丰度可造成影响,由于脂联素有抗 AS 作用[2],因此 Gly15Gly 多态性可能影响 2 型糖尿病早期大血管并发症的发生,本研究对此进行了探讨。

基金项目: 国家"十五"攻关项目(2001BA702B01,2001BA702B04)
Supported by the "Tenth Five-Year Plan" for Sci & Tech Research of China (2001BA702B01, 2001BA702B04)

作者简介: 艾智华,男,江西省临川县人,博士研究生,主治医师,主要从事肥胖和糖尿病的基础与临床方面的研究。电话:(023)68765213,E-mail:azh871@sina.com

收稿日期: 2008-01-09;**修回日期:** 2008-01-28

1 对象与方法

1.1 研究对象

176 例病程小于 5 年的汉族 2 型糖尿病患者,彼此之间没有血缘关系,年龄 30~70(50.03 ± 8.56)岁,其中男性 100 例,女性 76 例。采用惠普 HDI5000 型彩色超声仪,体表 10 MHz 宽频探头,于舒张期测量颈总动脉内膜中层的厚度(intima-media thickness, I MT),将患者分为动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)组和无动脉粥样硬化组。糖尿病早期大血管病变的标志为:①动脉内膜中层增厚:颈总动脉 IMT≥1.1 mm;②动脉粥样硬化斑块形成:颈总动脉存在突入管腔的回声结构,表面不光滑,或局部 IMT 值≥0.13 cm。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 抽提 空腹抽取静脉血 8 ml,EDTA 抗凝。酚-氯仿法抽提基因组 DNA, -20 ℃保存。

1.2.2 ADPN 基因的 PCR 扩增 引物序列:上游引物 5′-

GCAGCTCCTAGAAGTAGACTCTGCTG-3′,下游引物 5′-GCAGGTCTGTGATGAAAGAGGCC-3′。PCR 反应体系总体积 25 μl,包括 0.5 μl 基因组 DNA 模板,200 μmol/L dNTP,上下游引物各 1 μmol/L, 2 U *Taq* DNA 聚合酶, 2.5 mmol/L $MgCl_2$。94 ℃预变性 2 min 后进入循环,94 ℃变性 35 s,59 ℃退火35 s,72 ℃延伸 40 s,35 个循环,最后 72 ℃延伸 7 min。取 5 μl PCR 产物,2% 琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色,紫外灯下呈现 372 bp 特异 PCR 扩增产物。

1.2.3　脂联素基因 Gly15Gly 多态性检测　　PCR 扩增产物 10 μl,加入限制性核酸内切酶 *Sma* Ⅰ 2 U,10 × 缓冲液 1 μl,30.0 ℃ 水浴中过夜。酶切产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳(80 V,1 h),凝胶成像系统扫描成像。

1.2.4　临床指标测量　　酶联免疫吸附法测定血浆脂联素(Phoniex 公司 ELISA 试剂盒)。测定空腹血糖(free plasma glucе, FPG)、糖化血红蛋白、空腹胰岛素(free insulin,FINS)、瘦素。测定体质量指数(body mass index, BMI)、腰围、臀围和血压。采用稳态模型的胰岛素抵抗指数(HOMA-IR) 评估胰岛素敏感性,HOMA-IR = FINS × FPG/22.5。

1.3　统计学分析

以 Hardy Weinberg 平衡定律检验样本群体代表性。计量资料结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 10.0 软件进行统计分析。计量资料比较采用 t 检验,HOMA-IR 呈非正态分布,取其自然对数进行统计,在数值表达式中还原成原值。计数资料比较采用 χ^2 检验。对 AS 影响因素进行相关分析和 Logistic 回归分析。

2　结果

2.1　糖尿病早期大血管病变的影响因素

两组的临床特征见表 1,动脉粥样硬化组年龄、糖化血红蛋白显著高于无动脉粥样硬化组,血浆脂联素水平显著低于无动脉粥样硬化组,收缩压、FPS、FINS、HOMA-IR 和 TG 水平均高于无动脉粥样硬化组,但差别无统计学显著性意义($P > 0.05$)。

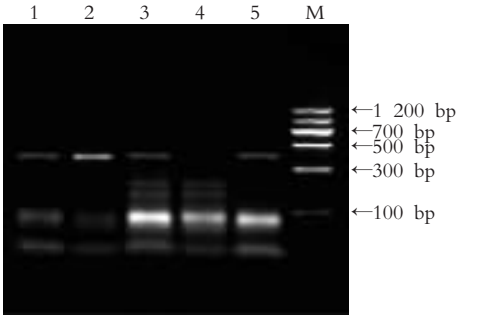
表 1　2 型糖尿病 AS 组和无 AS 组的比较($\bar{x} \pm s$)

检测指标	无 AS 组(n = 120)	AS 组(n = 56)
动脉内膜中层厚度(mm)	0.89 ± 0.09	1.15 ± 0.19[a]
年龄 (岁)	51.67 ± 8.13	55.73 ± 8.81[a]
体质量指数 (kg/m^2)	24.15 ± 2.82	24.12 ± 2.49
腰围(cm)	85.29 ± 7.94	86.71 ± 8.86
腰臀比(m/m)	0.89 ± 0.05	0.89 ± 0.06
收缩压(mmHg)	125.70 ± 15.24	128.68 ± 14.72
舒张压 (mmHg)	76.24 ± 10.15	76.35 ± 10.67
空腹血糖 (mmol/L)	7.04 ± 1.99	7.39 ± 2.01
糖化血红蛋白(%)	6.38 ± 1.16	6.90 ± 1.45[a]
空腹血清胰岛素(mU/L)	7.66 ± 3.99	8.33 ± 4.61
胰岛素抵抗指数	2.39 ± 1.39	2.56 ± 1.68
甘油三酯 (mmol/L)	1.80 ± 1.74	2.31 ± 2.74
总胆固醇 (mmol/L)	4.37 ± 0.87	4.53 ± 0.99
高密度脂蛋白胆固醇 (mmol/L)	1.30 ± 0.29	1.29 ± 0.33
低密度脂蛋白胆固醇(mmol/L)	2.48 ± 0.68	2.49 ± 0.80
脂联素(μg/ml)	19.11 ± 7.06	16.65 ± 7.36[a]
瘦素(ng/ml)	8.09 ± 5.15	8.13 ± 5.34

a: $P < 0.05$,与无 AS 组相比

2.2　ADPN 基因的 PCR 扩增和酶切结果

结果见图 1。ADPN 基因 PCR 扩增产物为 372 bp 的片段。PCR 扩增产物经限制性核酸内切酶 *Sma* Ⅰ 酶切后,野生纯合子 TT 显示 1 条带(372 bp),突变杂合子 TG 显示 3 条带(372、209 bp 和 163 bp),突变纯合子 GG 显示为两条带(209 bp 和 163 bp)。



M: DNA 标准Ⅱ; 1,2,5: TT 型; 3: TG 型; 4: GG 型

图 1　ADPN 基因限制性酶切图谱

2.3　ADPN 基因的 Gly15Gly 变异频率分布

在所有受试对象中,ADPN 等位基因 G 的频率为 31.82%,其中 62 个(35.2%)突变杂合子和 25 个(14.2%)突变纯合子。基因频率分布符合 Hardy Weinberg 遗传平衡,具有群体代表性($P > 0.05$)。

2.4　AS 组和无 AS 组 ADPN 基因型及等位基因的比较

如表 2 所示,两组基因型均以 TT 型为主,但大血管病变组 GG 基因型频率显著高于无血管病变组(χ^2 = 7.854, P = 0.005);而两组的 PP、PA 基因型频率无显著性差异;等位基因频率分布也有显著性差异,大血管病变组 G 等位基因频率显著升高(χ^2 = 5.292, P = 0.021)。说明 2 型糖尿病 ADPN 基因 + 45 位点 GG 基因型是发生大血管并发症的易感基因型。

表 2　ADPN 基因 Gly15Gly 基因型及等位基因分布

组别	n	基因型频率 (%)			等位基因频率 (%)	
		TT	TG	GG	T	G
无 AS 组	120	64(53.3)	45(37.5)	11(6.2)	173(72.1)	67(27.9)
AS 组	56	25(44.6)	17(30.4)	14 (25.0)[a]	67(59.8)[a]	45(40.17)[a]
合计	176	89(50.6)	62(35.2)	25(14.2)	240(68.18)	112(31.82)

a: $P < 0.05$,与无 AS 组比较

2.5　T2DM 脂联素基因 Gly15Gly 多态性与表型的关系

将所有 2 型糖尿病患者按照脂联素基因 + 45 位点基因型的不同分为 TT、TG、GG 3 组,归纳临床特点。结果见表 3,GG 基因型血浆脂联素水平显著低于 TT 基因型者;GG 基因型 HOMA-IR 有升高趋势,但无显著性差异。

2.6　T2DM 大血管病变危险因素的相关性分析

相关分析显示年龄、糖化血红蛋白、脂联素基因 Gly15Gly 多态性与 AS 正相关,循环脂联素水平与 AS 负相关。以发生动脉粥样硬化为应变量,以年龄、糖化血红蛋白、HOMA-IR、脂联素、脂联素基因 Gly15 Gly 基因型为自变量进行 Logistic 逐步回归分析,结果年龄(Wald = 7.914, P = 0.005)、糖化血红蛋白

(Wald = 6.071, P = 0.014)、脂联素基因 Gly15Gly 基因型(Wald = 4.482, P = 0.034)与动脉粥样硬化显著相关。

表3 ADPN 基因 Gly15Gly 基因型和表型的关系($\bar{x} \pm s$)

项目	TT	TG	GG
例数	89	62	25
年龄(岁)	53.72 ± 7.95	52.11 ± 8.99	52.84 ± 9.65
体质量指数 (kg/m^2)	24.05 ± 2.96	24.20 ± 2.46	24.29 ± 2.43
腰围(cm)	85.38 ± 8.19	85.52 ± 8.54	87.72 ± 7.84
腰臀比(m/m)	0.89 ± 0.05	0.88 ± 0.06	0.90 ± 0.05
收缩压(mmHg)	128.24 ± 15.37	126.50 ± 15.85	126.68 ± 11.58
舒张压(mmHg)	76.85 ± 10.00	75.34 ± 10.40	76.56 ± 8.24
空腹血糖(mmol/L)	6.94 ± 1.80	7.10 ± 1.51	7.16 ± 2.40
糖化血红蛋白(%)	6.50 ± 1.16	6.57 ± 1.48	6.64 ± 1.24
空腹血清胰岛素(mU/L)	7.82 ± 3.85	8.09 ± 4.43	8.14 ± 4.64
胰岛素抵抗指数	2.48 ± 1.31	2.53 ± 1.72	2.61 ± 1.45
甘油三酯(mmol/L)	1.74 ± 1.43	1.93 ± 3.05	1.76 ± 1.17
总胆固醇(mmol/L)	4.42 ± 0.83	4.50 ± 0.99	4.36 ± 0.97
高密度脂蛋白胆固醇(mmol/L)	1.29 ± 0.30	1.32 ± 0.30	1.27 ± 0.32
低密度脂蛋白胆固醇(mmol/L)	2.43 ± 0.64	2.57 ± 0.76	2.46 ± 0.88
脂联素(μg/ml)	19.64 ± 6.64	18.38 ± 7.49	15.10 ± 7.04[a]
瘦素(ng/ml)	8.32 ± 5.13	7.91 ± 3.82	7.78 ± 4.27

a: P < 0.05, 与 TT 组比较

3 讨论

糖尿病大血管病变的病理改变为动脉粥样硬化,是导致2型糖尿病患者死亡的主要原因,其发生机制复杂,认为是多种代谢紊乱以及遗传因素共同作用的结果。本研究中,2型糖尿病发生动脉粥样硬化者年龄、糖化血红蛋白显著高于无动脉粥样硬化者,相关分析显示 AS 与糖化血红蛋白、年龄有显著性相关,说明糖化血红蛋白、年龄是2型 DM 大血管病变的独立危险因素。

脂联素是目前唯一发现的随着脂肪组织容量增大,其血浆浓度反而下降的脂肪细胞特异性因子,其血清浓度与胰岛素抵抗、2型 DM、肥胖症、动脉硬化等关系密切[2,3]。脂联素通过抑制与血管内皮损伤和动脉粥样硬化相关因子的产生,防止动脉内膜中层增厚,从而具有抗动脉粥样硬化的作用,在小鼠的动物实验中,脂联素缺陷(adipo +/-)小鼠血管内膜增生较野生型小鼠严重[4]。在本研究中,伴有早期大血管病变的2型糖尿病患者的血浆脂联素水平显著低于无 AS 的2型糖尿病者,提示脂联素缺乏可能促进了2型糖尿病大血管病变的发生。

染色体3q27是T2DM、代谢综合征和冠心病的易感基因位点,同时也是脂联素基因的编码处[5]。目前对脂联素基因多态性与2型 DM 和代谢综合征的相关性研究较多,分歧较大,Fumeron 等[6]发现脂联素基因 SNP45 的 GG 型有增加体重、WHR 及使血糖升高的危险。但 ADPN 基因 +45 位多态性与糖尿病大血管并发症的关系还未见报道,本研究结果显示,2型糖尿病患者中,合并有早期糖尿病大血管病变者与无大血管病变者脂联素 +45 位基因型频率存在显著性差异,合并有 AS 者 GG 基因型频率高于无 AS 者,血浆脂联素水平显著降低,G 等位基因频率也高,逐步回归分析提示这种脂联素基因 Gly15Gly 多态性与 AS 相关,GG 基因型是发生大血管并发症的易感基因型。GG 基因型者可能通过降低血浆脂联素水平,促进 T2DM 大血管并发症的发生和发展。近期有研究表明,脂联素基因 T94G 多态性也能影响血浆脂联素水平[7]。因此,脂联素基因 Gly15Gly 多态性对复制、转录的影响,有必要进行进一步和更大样本量的研究。

参考文献:

[1] Takahashi M, Arita Y, Yamagata K, *et al*. Genomic structure and mutations in adipose-specific gene, adiponectin[J]. Int J Obes Relat Metab Disord, 2000, 24(7): 861 - 868.

[2] Stejskal D, Ruzicka V, Adamovska S, *et al*. Adiponectin concentrations as a criterion of metabolic control in persons with type 2 diabetes mellitus? [J]. Biomed Papers, 2003, 147(2): 167 - 172.

[3] Zietz B, Herfarth H, Paul G, *et al*. Adiponectin represents an independent cardiovascular risk factor predicting serum HDL-cholesterol levels in type 2 diabetes[J]. FBES Lett, 2003, 545(2-3): 103 - 104.

[4] Matsuda M, Shimomura I, Sata M, *et al*. Role of adiponectin in preventing vascular stenosis. The missing link of adipo-vascular axis[J]. J Biol Chem, 2002, 277(40): 37487 - 37491.

[5] Pollin T I, Tanner K, O'connell J R, *et al*. Linkage of plasma adiponectin levels to 3q27 explained by association with variation in the APM1 gene[J]. Diabetes, 2005, 54(1): 268 - 274.

[6] Fumeron F, Aubert R, Siddiq A, *et al*. Adiponectin gene polymorphisms and adiponectin levels are independently associated with the development of hyperglycemia during a 3-year period: the epidemiologic data on the insulin resistance syndrome prospective study[J]. Diabetes, 2004, 53(4):1150 - 1157.

[7] Jeng J R. Plasma adiponectin, T94G gene polymorphism and PAI-1 in patients with and without hypertension[J]. Cardiology, 2007, 107(1): 30 - 37.

(编辑 汪勤俭)