论著

文章编号:1000-5404(2011)18-1932-03

瘦素受体基因 Gln223Arg 多态性与 2 型糖尿病的关系

张阳丹[1],李 苇[1],张名均[2],滕小春[3],陈春全[4],唐晓君[1] (400016 重庆,重庆医科大学公共卫生学院流行病学教研室[1];400050 重庆,重庆市九龙坡区第一人民医院检验科[2];400081 重庆,重钢总医院:老年科[3],药剂科[4])

[摘要] **目的** 研究瘦素受体基因 Gln223Arg 多态性与 2 型糖尿病的关系。**方法** 采用病例对照研究方法,随机抽取重庆市 2 所医院的糖尿病门诊和住院初诊患者及其他疾病和门诊健康体检者共 336 例,其中病例组(糖尿病患者)172 例,对照组(非糖尿病者)164 例,调查其糖尿病危险因素,用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)方法检测其瘦素受体 Gln223Arg 基因多态性,分析其与 2 型糖尿病的关系。**结果** 该人群 AA、AG、GG 的基因型分布频率分别为 0.015、0.307 和 0.678,A 和 G 等位基因频率分别为 0.202 和 0.798,基因型频率分布符合 H-W 平衡(χ^2 = 3.081,P = 0.079)。病例组人群 GG 基因型的检出率(74.42%)高于对照组(60.98%),AA + AG 型检出率(25.28%)低于对照组(39.02%),差异具有统计学意义(χ^2 = 6.96,P = 0.008);非条件 Logistic 回归分析提示高总胆固醇(TC)血症、低高密度脂蛋白(HDL-C)血症、腰臀比(WHR)、糖尿病家族史和 LEPR 基因 Gln223Arg 多态性与 2 型糖尿病发病有关。**结论** 瘦素受体基因 Gln223Arg 多态性与 2 型糖尿病可能有关。

[关键词] 瘦素受体基因,Gln223Arg;2 型糖尿病

[中图法分类号] R587.102;R394-33;R394.3 [文献标志码] A

Correlation between polymorphism of leptin receptor gene GIn223Arg and type 2 diabetes mellitus

Zhang Yangdan[1], Li Ge[1], Zhang Mingjun[2], Teng Xiaochun[3], Chen Chunquan[4], Tang Xiaojun[1] ([1] College of Health Public, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2] First People's Hospital of Chongqing Jiulongpo District, Chongqing, 400050; [3] Department of Genriatrics, [4] Department of Pharmacy, General Hospital of Chongqing Steel and Iron Group, Chongqing, 400081, China)

[**Abstract**] **Objective** To study the correlation between polymorphism of leptin receptor (LEPR) gene Gln223Arg and type 2 diabetes mellitus (DM). **Methods** Three hundred and thirty-six patients with DM or other diseases, randomly sampled from 2 two hospitals in Chongqing, were divided into DM group (n = 172) and control group (n = 164). Risk factors for DM were investigated with case-control method. Polymorphism of LEPR gene Gln223Arg was detected by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP), and its relation with type 2 DM was analyzed. **Results** The genotype distribution frequency of AA, AG, and GG was 0.015, 0307 and 0.678 respectively, while the allele distribution frequency of A and G was 0.202 and 0.798 respectively in DM group. The genotype distribution frequency of AA, AG, and GG accorded with the H-W balance (Chi square = 3.081, P = 0.079). The detection rate of genotype GG was higher while that of genotype AA and AG was lower in DM group than in control group (74.42% *vs* 60.98%, 25.28% *vs* 39.02%, P < 0.05). Unconditional logistic regression analysis revealed that high total cholesterol (TC), low high-density lipoprotein (HDL-C), high waist-hip ratio (WHR), family history of DM, and LEPR gene Gln223Arg mutation were the risk factors for type 2 DM. **Conclusion** Polymorphism of LEPR gene Gln223Arg may be correlated with type 2 DM.

[**Key words**] leptin receptor gene Gln223Arg; diabetes mellitus

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing Municipal Education Commission (KJ070313). Corresponding author: Tang Xiaojun, Tel: 86-23-68485228, E-mail: tangxiaoj0726@qq.com

糖尿病(diabetes mellitus,DM)是一种慢性糖代谢异常疾病,发病机制十分复杂,遗传因素和环境因素对发病都有重要的作用,在相同环境诱因作用下,遗传易感性高的个体更易患 2 型 DM。人类瘦素受体(LEPR)基因存在多种突变与多个多态性位点,几乎在该基因的 20 个外显子上均发现了多态性位点。LEPR 基因 Gln223Arg 位点存在于 LEPR 基因第 6 外显子第 668 位核苷酸。研究显示 LEPR 基因 Gln223Arg 的

[基金项目] 重庆市教委自然科学基金(KJ070313)

[通信作者] 唐晓君,电话:(023)68485228,E-mail: tangxiaoj0726@qq.com

表1 纳入研究的2组患者一般特征

组别	n	体质量(kg)	身高(cm)	BMI	WHR	Glu(mmol/L)	TC(mmol/L)	TG(mmol/L)	HDL-C(mmol/L)	LDL-C(mmol/L)	收缩压 DBP(mmHg)	舒张压 SBP(mmHg)
病例组	172	63.25±12.06	160.10±8.07	24.58±3.76	0.94±0.08	11.67±5.34	5.03±1.68	2.22±1.67	1.41±0.68	2.67±0.89	141.06±19.47	79.14±11.30
对照组	164	60.52±10.34	159.87±7.68	23.70±3.97	0.91±0.08	5.53±0.71	4.63±1.04	1.74±1.37	1.36±0.33	2.57±0.83	134.96±19.76	81.00±11.38
t	1.68	0.20	1.56	2.07	—	1.95	2.16	0.65	0.82	2.15	-1.13	—
P	0.10	0.84	0.12	0.04	—	0.05	0.03	0.51	0.41	0.03	0.26	—

变异在不同的种族间存在明显的差异[1]。本研究对部分重庆地区汉族人群糖尿病患者和健康人群进行基因检测,旨在探讨LEPR Gln223Arg基因多态性与本地区人群2型糖尿病的关系。

1 对象与方法

1.1 对象

随机抽取重庆市2所二甲医院的糖尿病门诊和住院初诊患者及其他疾病和门诊健康体检者336人,糖尿病患者均按WHO 1999年公布的2型糖尿病诊断标准[2],排除1型糖尿病和心、肝疾病、泌尿系统疾病及肾脏疾病者。172例糖尿病患者纳入病例组,其中男性90例,女性82例,年龄(66.52±12.94)岁。选择该2所医院的其他疾病患者或门诊健康体检者164例作为对照组,为正常糖耐量人群,无糖尿病,心、肝疾病,泌尿系统疾病,肾脏疾病及其他内分泌代谢疾病。其中男性87例,女性77例,年龄(64.70±14.81)岁。病例组中有2型糖尿病家庭史者34例,对照组中有2型糖尿病家族史者7例,经卡方检验其差异有统计学意义($\chi^2=18.82$, $P<0.01$)。两组在性别年龄上分布一致(性别:$\chi^2=0.018$, $P=0.89$;年龄:$t=0.90$, $P=0.37$)。见表1。

1.2 现场调查

采用自行设计的调查表,由经过培训的调查员完成,详细询问其一般情况,并测量身高、体质量、腰围、臀围。受检者禁食12~14 h,采集空腹静脉血5 ml,置于EDTA抗凝管,用于基因型检测,存放于-20 ℃冰箱备用。实验室检查项目包括:空腹血糖(Glu)、血清总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白(HDL-C)、低密度脂蛋白(LDL-C)等生化指标检测。

1.3 诊断标准

采用葡萄糖氧化酶法测定血糖,按照WHO 1999年制订的DM新的诊断标准[2]:空腹血糖≥7.0 mmol/L;血脂异常诊断标准:总胆固醇≥5.72 mmol/L、甘油三酯≥1.70 mmol/L、高密度脂蛋白<0.90 mmol/L、低密度脂蛋白≥3.64 mmol/L;肥胖的划分:体质指数(BMI)=体质量(kg)/身高^2(cm^2),体质指数≥24为超重或肥胖(全身性肥胖)。以腰臀比(WHR)=腰围/臀围为依据:男性≥0.90、女性≥0.85为腹型肥胖(向心性肥胖)。

1.4 PCR扩增

经EDTA抗凝的空腹静脉外周血,采用北京博迈德公司小量全血基因组DNA快速提取试剂盒提取DNA。PCR扩增:采用TaKaRa公司Premix *Taq*试剂盒进行PCR反应,引物参考Matsuoka等[3]所采用的引物序列,由TaKaRa公司合成,上游:5′-ACCCTTTAAGCTGGGTGTCCCAAATGA-3′,下游:5′-GCTAGCAAATATTTTTGTAAGCAATT-3′,产物长度为440 bp。PCR反应体系(25 μl):ddH_2O 10.5 μl,上下游引物各0.5 μl, Premix *Taq* 12.5 μl, DNA 1 μl。PCR反应条件:94 ℃预变性5 min,94 ℃变性40 s,60 ℃退火40 s,72 ℃延伸40 s,共35个循环;最后72 ℃延伸7 min。

1.5 限制性内切酶酶切分析

采用TaKaRa公司限制性内切酶*Msp* Ⅰ酶切PCR产物,酶切体系PCR产物5 μl,去酶水10 μl,*Msp* Ⅰ 1 μl,0.1% BSA 2 μl,10×buffer 2 μl。酶切条件37 ℃,2 h。2%琼脂糖凝胶电泳。

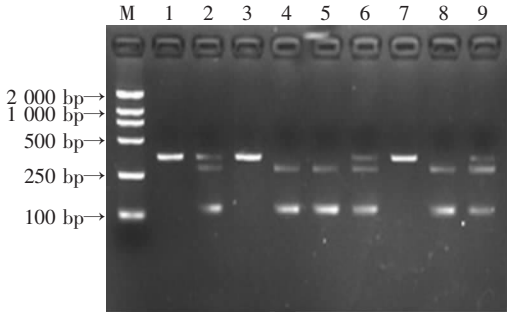
1.6 统计学分析

采用SAS 8.2统计软件,定性资料使用χ^2检验,定量资料以$\bar{x}\pm s$表示,使用t检验,多因素分析使用Logistic回归分析。运用Hardy-Weinberg(H-W)平衡检验确认研究样本的群体代表性。

2 结果

2.1 限制性内切酶酶切分析结果

LR基因第223号密码子由A突变至G,导致Gln223Arg变异,从而产生一个新的*Msp* Ⅰ酶切位点,PCR产物被切为300 bp和140 bp 2个片段。野生型AA纯合子为440 bp 1条带,突变型GG纯合子为300 bp和140 bp 2条带,AG型杂合子为440、300、140 bp 3条带(图1)。



1、3、7:AA型(440 bp);2、6、9:AG型(140、300、440 bp);4、5、8:GG型(300、140 bp)

图1 LEPR基因Gln223Arg多态性电泳结果

2.2 LEPR基因Gln223Arg多态性基因型和等位基因频率比较

本组336例中AA、AG、GG的基因型分布频率分别为0.015、0.307和0.678,A和G等位基因频率分别为0.202和0.798,基因型频率分布符合H-W平衡($\chi^2=3.081$, $P=0.079$)。由于研究人群AA基因型频率极低,故将其与AG基因型合并进行统计分析,见表2。

表2 各组各基因型与等位基因分布频率比较[n(%)]

组别	n	基因型		等位基因	
		AA+AG	GG	A	G
病例组	172	44(25.58)	128(74.42)	48(13.95)	296(86.05)
对照组	164	64(39.02)	100(60.98)	65(19.82)	263(80.18)
统计值		$\chi^2=6.96$, $P=0.008$		$\chi^2=4.15$, $P=0.042$	

2.3 2型糖尿病相关危险因素Logistic回归分析

以Glu≥7.0为切割点，是否患糖尿病为因变量，年龄、BMI、WHR、血脂、血压为因变量，进行多因素非条件Logistic回归分析，以$\alpha=0.05$为显著性水准引入回归模型，提示高总胆固醇血症、低HDL-C血症、腹型肥胖、糖尿病家族史和Gln223Arg基因多态性可能与2型糖尿病发病有关（表3）。

表3 2型糖尿病相关危险因素多因素分析

因素	*Sx*	χ^2	*OR*（95% *CI*）	*P*
TC	0.435 1	13.505 5	4.947(2.109～11.607)	0.000 2
HDL-C	0.528 5	7.055 3	4.070(1.445～11.467)	0.007 9
WHR	0.599 2	5.457 1	4.054(1.253～13.118)	0.019 5
糖尿病家族史	0.612 3	8.762 1	6.126(1.845～20.314)	0.003 1
Gln223Arg多态性	0.322 7	6.920 2	2.337(1.242～4.399)	0.008 5

3 讨论

糖尿病瘦素是一种由多种环境因素和遗传因素联合作用而导致的一种糖代谢障碍疾病，主要表现为高血糖状态，其病变可以累及心、肾、肝、眼、血管等多个器官，严重危害人们的健康。瘦素（leptin）是一种由脂肪组织分泌的激素，可通过抑制神经肽Y（NPY）基因的表达和分泌，使副交感神经抑制、交感神经兴奋，从而减少胰岛素的分泌，瘦素与LEPR结合后方能发挥其生理作用。LEPR属于Ⅰ类细胞因子受体家族，目前已在其20个外显子中发现19种基因多态性。Considine等[4]1996年首次报道在人类LEPR基因第6外显子上存在Gln223Arg多态性。

目前国内外关于该基因与2型糖尿病的关系的研究结论不一致[5-11]。作者认为这可能与不同种族、不同地区和不同群体的相同基因突变频率差异明显及各个研究的设计方案、分析方法及样本选择方法不同有关。本研究采用病例对照的研究方法，在重庆部分汉族人群中进行。现场调查采取了一定的质量控制措施，包括病例组和对照组均制订了严格的排除纳入标准以尽量避免选择偏倚，调查开始前对调查员进行培训以尽量避免调查偏倚。研究结果显示，重庆地区汉族人群中存在LEPR基因（Gln223Arg）A→G的突变，糖尿病组人群中GG基因型检出率（74.42%）高于对照组（60.98%），其差异具有显著性意义（$P=0.017$），说明GG基因型人群更容易患T2DM；调整其他混杂因素，进行多因素非条件Logistic回归分析仍然提示GG基因型可能是重庆地区T2DM的遗传易感标记（$OR=2.337$），说明GG基因型人群发生T2DM的危险性是AA+AG型的2.337倍。其原因可能是，LEPR基因第223号密码子发生A→G的碱基突变，导致谷氨酸被精氨酸取代，LEPR基因RNA剪接异常，产生异常的LEPR，蛋白质性质和功能发生改变，不能与瘦素正常结合，从而使瘦素的生物学效应不能正常发挥。本研究还显示，有糖尿病家族史者、腹型肥胖、高胆固醇血症、高密度脂蛋白异常者人群更易发生T2DM。然而，T2DM是环境与遗传因素共同作用的复杂疾病，饮食和生活习惯对其发病的影响很大，加之LEPR基因Gln223Arg多态性种族差异较大，且与T2DM有关的基因很多，而单个基因单个位点的突变常仅作用于发病的某个环节，并不足以致病。本次研究仅对部分重庆汉族人群T2DM与单个LEPR基因Gln223Arg多态性的相关性进行探讨，仅提示Gln223Arg多态性中G等位基因可能是T2DM的易感基因，尚不能以此次研究结果为充分依据得出LEPR基因Gln223Arg多态性与T2DM有关的结论，因此还需在扩大研究对象来源和样本量的基础上，考虑以上因素之后再做进一步研究，进行基因-环境、基因-基因的交互作用分析以明确该基因对T2DM发生的作用。

参考文献：

[1] Wauters M, Mertens I, Rankinen T, *et al*. Leptin receptor gene polymorphisms are associated with insulin in obese women with impaired glucose tolerance[J]. J Clin Endocrinol Memb, 2001, 86(7): 3227-3232.

[2] World Health Organization. Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications: Report of a WHO Consultation. Part 1: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus[R]. Geneva: World Health Organization Department of Noncommunicable Disease Surveillance, 1999.

[3] 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.

[4] Considine R V, Considine E L, Williams C J, *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.

[5] Tuomi T, Orho M, Kleyz P, *et al*. The putative role of the leptin receptor gene in pathogenesis of leptin resistance[J]. Diabetologia, 1997, 40 suppl 1: A178.

[6] Chiu K C, Chu A, Chuang L M, *et al*. Association of leptin receptor polymorphism with insulin resistance[J]. Eur J Endocrinol, 2004, 150(5): 725-729.

[7] 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.

[8] Guizar-Mendoza J M, Amador-Licona N, Flores-Martinez S E, *et al*. Association analysis of the Gln223Arg polymorphism in the human leptin receptor gene, and traits related to obesity in Mexican adolescents[J]. J Hum Hypertens, 2005, 19(5): 341-346.

[9] 郑以漫，项坤山，张容，等. 瘦素受体基因Gln223Arg变异与上海地区糖尿病患者代谢紊乱及合并高血压的关系[J]. 中华内科杂志，1999，38(3)：174-177.

[10] 谢平，张稷，邓振霞，等. Ⅱ型糖尿病患者瘦素受体基因变异与肥胖及高血压的相关性研究[J]. 中国优生与遗传杂志，2002，10(6)：34-35.

[11] 纪艳婷，左常婷，张媛媛. 血清瘦素及瘦素受体基因Gln223Arg多态性与妊娠期糖尿病的相关性研究[J]. 现代妇产科进展，2009，18(6)：420-423.

（收稿：2011-03-29；修回：2011-05-10）

（编辑 吴培红）