论著

文章编号:1000-5404(2012)06-0530-04

AMPKα2基因多态性与2型糖尿病及血清脂联素、颈动脉粥样硬化的关系

王金霞,任建功,罗 辉,胡雪剑,李燕妮 (730030 兰州,兰州大学第二医院糖尿病2科)

[摘要] **目的** 探讨腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)α2基因rs1124900G/T单核苷酸多态性与2型糖尿病(T2DM)及血清脂联素(adiponectin,APN)、颈动脉粥样硬化的关系。**方法** 采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)的方法,收集2010年4-9月期间在本院内分泌科住院治疗的2型糖尿病患者178例,其中男性93例,女性85例,年龄(54.6±10.1)岁,对照组为同期本院体检的健康人员160例,男性84例,女性76例,年龄(51.8± 9.8)岁,检测AMPK-rs1124900G/T基因型,分析2组人群之间基因型和等位基因频率的差异。同时测定身高、体质量、血压、血脂、APN、颈动脉内膜中层厚度(carotid intima-media thickness, CIMT)等。**结果** ①在T2DM组G/G、G/T、T/T基因型频率分别为29.8%、43.2%、26.9%,T等位基因频率为48.6%。对照组G/G、G/T、T/T基因型频率为32.5%、42.5%、25.0%,T等位基因频率为46.3%,2组间无显著性差异($P>0.05$)。②在T2DM组和对照组TT型者的血清TG、LDL-C水平明显高于GG型者,CIMT及斑块发生率显著高于GG基因型者,APN水平明显低于GG型者,差异有统计学意义($P<0.05$)。③相关分析表明,CIMT及斑块发生率与血清TG($r=0.349\,6$, $P<0.01$)、LDL-C($r=0.416\,7$, $P<0.01$)正相关,与APN水平负相关($r=-0.262\,3$, $P<0.05$)。**结论** rs1124900多态性位点与甘肃地区2型糖尿病的发生无关;与脂联素、TG、LDL、颈动脉内膜厚度及斑块有关。

[关键词] 腺苷酸活化蛋白激酶;基因多态性;2型糖尿病;脂联素;颈动脉粥样硬化
[中图法分类号] R345;R394.3;R587.102 [文献标志码] A

Relationship of AMPKα2 gene single nucleotide polymorphism with type 2 diabetes, serum adiponectin level and carotid atherosclerosis

Wang Jinxia, Ren Jiangong, Luo Hui, Hu Xuejian, Li Yanni (Second Department of Diabetes, Second Hospital, Lanzhou University, Lanzhou, Gansu Province, 730030, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the relationship of single nucleotide polymorphism (SNP) of AMPKα2 gene rs1124900G/T with type 2 diabetes (T2DM), serum adiponectin (APN) level and carotid atherosclerosis. **Methods** One hundred and seventy-eight patients with T2DM [male 93 and female 85, average age (54.6±10.1)] who hospitalized in the Department of Endocrinology, Second Hospital of Lanzhou University from April 2010 to September 2010 were assigned as a T2DM group, and 160 healthy examinees [male 84 and female 76, average age (51.8±9.8)] at the same period were assigned as a control group. The genotype of AMPKα2 rs1124900G/T was examined in all the subjects by PCR-RFLP. The differences of genotype and allele frequency between the two groups were compared. The indices including height, body weight, blood pressure, blood lipid, APN and carotid intima-media thickness (CIMT) were measured. **Results** (1)The genotype frequencies of AMPKα2-rs1124900 G/G, G/T and T/T were 29.8%, 43.2% and 26.9% in the T2DM group, respectively, and 32.5%, 42.5% and 25.0% in the control group, respectively. The T allele frequencies were 48.6% in the T2DM group and 46.3% in the control group. There was no significant difference between the 2 groups ($P>0.05$). (2) In the T2DM group and the control group, the serum levels of TG and LDL-C, CIMT and incidence of plaque in the T/T subgroup were higher than those in the G/G subgroup. The level of APN in the T/T subgroup was significantly lower than that in the G/G group ($P<0.05$). (3) The CIMT and incidence of plaque were positively correlated with the serum levels of TG ($r=0.349\,6$, $P<0.01$) and LDL-C ($r=0.416\,7$, $P<0.01$), but were negatively correlated with the level of APN ($r=-0.262\,3$, $P<0.05$). **Conclusion** AMPKα2-rs1124900 SNP is not related to the incidence of T2DM in Gansu Province, China, but is related to the serum levels of APN, TG and LDL-C, CIMT and plaque incidence.

[通信作者] 任建功,E-mail:ren-jg@tom.com

[**Key words**] AMP-activated protein kinase; single nucleotide polymorphisms; type 2 diabetes; adiponectin; carotid atherosclerosis

Corresponding author: Ren Jiangong, E-mail: ren-jg@tom.com

颈动脉粥样硬化是 2 型糖尿病(T2DM)常见的大血管并发症,被认为是预测卒中发生的主要危险因素[1-2]。脂联素是由脂肪细胞分泌的一种糖蛋白,在体内外都能激活 AMPK,增加胰岛素的敏感性,影响糖脂代谢,多项临床实验证实脂联素水平与颈动脉内膜中层厚度(carotid intima-media thickness, CIMT)负相关[3]。腺苷酸活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)激活后可以通过增加葡萄糖的摄取及脂肪酸的氧化,减少脂肪酸及胆固醇的合成等途径调节能量代谢,被称为"细胞能量调节器"。AMPK 是由 α、β、γ 3 个亚基组成的三聚体蛋白激酶复合物。其亚基存在 α1、α2、β1、β2、γ1、γ2、γ3 几种亚型,催化亚基 α 含有激酶的活性功能域,调节功能域及自抑制结构域。β 亚基为连接 α 与 γ 亚基的桥梁,γ 亚基的 C 末端有 4 个 CBS 功能域,主要用于结合 AMP 及三磷酸腺苷(ATP),以调节 AMPK 的活性。α2 高表达于骨骼肌、心肌及肝脏中,在小鼠肌肉中,敲除 α2 亚基可使 AMPK 活性降至很低,而敲除 α1 亚基则对 AMPK 活性无明显影响,通常认为 α2 亚基在 AMPK 活性调节中发挥了更大作用。本实验研究 AMPKα2 基因 rs1124900 位点基因多态性与 T2DM、APN 及颈动脉粥样硬化的关系。

1 对象与方法

1.1 研究对象

收集 2010 年 4 - 9 月期间在兰州大学第二医院住院治疗的 T2DM 患者 178 例,其中男性 93 例,女性 85 例,年龄(54.6 ± 10.1)岁,T2DM 诊断依据严格按照 1999 年 WHO 标准,排除酮症酸中毒及高渗性昏迷患者、1 型糖尿病、其他特殊类型糖尿病及妊娠糖尿病、胰腺肿瘤及肝肾功能损害患者。并收集同期体检的健康人员 160 例作为对照组,其中男性 84 例,女性 76 例,年龄(51.8 ± 9.8)岁,均无慢性病史及长期服药史、非妊娠及哺乳期妇女、血糖及胰岛功能正常。所有研究对象均为本地居住 5 年以上的常住居民。

1.2 方法

所有研究对象测量身高、体质指数(BMI)、血压、抽取空腹 8 ~ 12 h 后静脉血,采用全自动生化分析仪测定生化指标,放射免疫法检测胰岛素及 C 肽水平,酶联免疫吸附法(ELISA)测定血清脂联素。采末梢血测定糖化血红蛋白。彩色超声多普勒检测颈动脉内膜中层厚度及有无粥样斑块,CIMT < 0.9 mm 为正常,0.9 mm ≤ CIMT ≤ 1.3 mm 为增厚,CIMT > 1.3 mm 视为斑块形成[4]。另取 2 ml 静脉血以 EDTA 抗凝,-70 ℃低温保存,采用蛋白酶 K 法提取基因组 DNA,参考已公布的 AMPKα2 序列,设计并委托上海捷瑞生物公司合成上游引物 5′-TGGAGGATTTGAGGCTGAGGA-3′ 和下游引物 5′-GCCTACCCAGCATTTCTTCAG-3′,进行 PCR 反应,反应体系为 25 μl,组成如下:PCR-Mix 12.5 μl,引物各 1 μl,DNA 2 μl,双蒸水 8.5 μl。PCR 反应程序:酶激活 95 ℃ 4 min,94 ℃变性 30 s,退火温度 52 ℃,反应 45 s,延伸 72 ℃ 30 s,共 35 个循环,终末延伸 72 ℃ 10 min,4 ℃保存。2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物(全长 332 bp),采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)的方法,检测 AMPK-rs1124900 G/T 基因多态性,酶切体系为(20 μl 体系):PCR 产物 10 μl,10 × NEB 缓冲液 2 μl,内切酶 *Nsp* Ⅰ 0.5 μl,ddH_2O 7.5 μl,37 ℃水浴消化 16 h 后,2.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,即得到 AMPK-rs1124900 G/T 基因型结果。

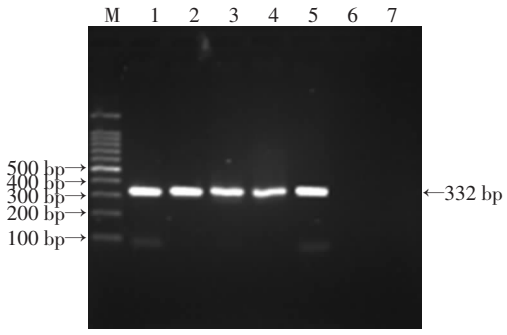
1.3 统计学方法

运用 Hardy-Weinberg 平衡检验确认研究样本的群体代表性。采用 SPSS 17.0 软件进行数据处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计数资料以率表示。病例-对照的等位基因频率、基因型分布差异用 χ^2 检验。2 组间计量资料的比较用 t 检验,多组间比较用方差分析。并以 CIMT 及斑块发生率为因变量,其余相关指标为自变量进行多元逐步回归分析。

2 结果

2.1 PCR 扩增及酶切产物

PCR 扩增获得 332 bp 长度的产物(图 1),经 *Nsp* Ⅰ 酶切后,G/G 纯合子被切成 132、200 bp 2 条带,G/T 突变杂合子的 PCR 产物被切成 132、200、332 bp 3 条带,T/T 突变纯合子不被切开,为 1 条 332 bp 长的条带(图 2)。2 型糖尿病与正常人群 AMPK-rs1124900 G/T 基因型和等位基因频率分布差异不显著($P > 0.05$,表 1)。



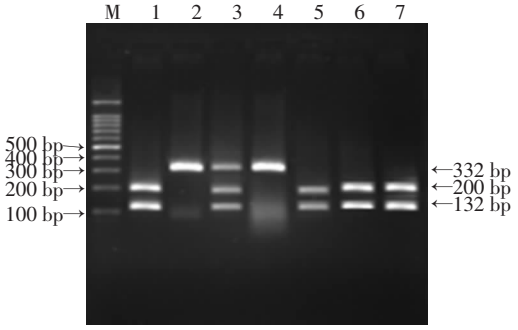
M:标准;1 ~ 5:PCR 扩增产物;6、7:扩增失败

图 1 AMPK-rs1124900 PCR 扩增产物

2.2 不同基因型间代谢指标的比较

将病例组与对照组按照 G/G、G/T、T/T 基因型分别分组,比较各组间代谢指标,结果如表 2 所示。各组间 BMI、收缩压(SBP)、舒张压(DBP)、空腹 C 肽水平(F-CP)、总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白(HDL)、糖化血红蛋白(GHbA1C)水平均无明显差异($P > 0.05$),但在病例组及对照组中,T/T 脂联素水平明显

较 G/G、G/T 低($P<0.05$),T/T 甘油三酯、低密度脂蛋白、颈动脉内膜中层厚度及粥样斑块发生率明显高于 G/G、G/T($P<0.05$)。相关分析表明,CIMT 及斑块发生率与血清 TG($r=0.3496$, $P<0.01$)、LDL-C($r=0.4167$, $P<0.01$)正相关,与 APN 水平负相关($r=-0.2623$, $P<0.05$)。



M:标准;1、5、6、7:GG;2、4:TT;3:GT

图2 AMPK-rs1124900 *Nsp* Ⅰ酶切产物

表1 AMPKα2-rs1124900 G/T 基因型及等位基因频率[例(%)]

组别	n	基因型			等位基因	
		GG	GT	TT	G	T
T2DM 组	178	53(29.8)	77(43.2)	48(26.9)	183(51.4)	173(48.6)
对照组	160	52(32.5)	68(42.5)	40(25.0)	172(53.7)	148(46.3)

3 讨论

AMPK 的活性受细胞质中 AMP/ATP 比值变化和 5-氨基咪唑-4 甲酰胺核苷酸(AICAR)的直接调节。AMPK 上游的激酶能磷酸化 AMPK 亚基 Thr172 来激活 AMPK,包括 LKB1、钙调蛋白激酶(CaMKKβ)、转化生长因子-β 激活的激酶 1(TAK1)[5]和毛细血管扩张性共济失调突变蛋白(ATM)[6]。此外,AMPK 的活性还与脂联素、抵抗素、瘦素、ghrelin 和大麻素,以及一些细胞因子如胰高血糖素样肽 1(GLP-1)、白细胞介素-6(IL-6)、睫状神经营养因子(CNTF)、巨噬细胞抑制因子(MIF)、肿瘤坏死因子(TNF)等密切相关,这些激素和细胞因子对 AMPK 活性的影响具有组织特异性[7]。激活的 AMPK 能增加糖激酶 2 表达,并通过提高葡萄糖转运体 4(GLUT4)转移到细胞膜和 GLUT4 基因表达上调葡萄糖摄取。AMPK 对肝脏糖异生的调控通过抑制磷酸烯醇式丙酮酸激酶(PEPCK)和葡萄糖-6 磷酸酶的转录[8]。活化的 AMPK 在骨骼肌磷酸化和抑制糖原合酶,从而导致在糖原合成减少。激活的 AMPK 磷酸化和抑制 ACC1 和 HMG-CoA 还原酶,减少脂肪酸合成酶(FAS)的表达并激活丙二酰辅酶 A 羧化酶,从而导致在脂肪酸和胆固醇的合成减少。此外,活化的 AMPK 通过抑制 ACC2 降低丙二酰辅酶 A 水平以刺激脂肪酸氧化。AMPK 已被认为可以抑制儿茶酚胺在脂肪细胞中刺激脂肪分解,从而降低血浆脂肪酸水平。AMPK 能识别并磷酸化内皮源性一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS),并可增加 eNOS 转录因子 KLF2 的表达,增加内皮源性一氧化氮(NO)的产生,起到保护血管内皮功能的作用[9]。

脂联素是由脂肪细胞分泌的一种糖蛋白,能增加 CD36、脂酰辅酶 A 氧化酶的表达,并抑制肿瘤坏死因子的促脂解作用,降低循环血液中的脂肪酸浓度[10]。动物实验发现,机械损伤脂联素缺乏小鼠的主动脉,其新生内膜厚度为正常小鼠的 2 倍,并有血管平滑肌细胞的增殖,补充脂联素后病理改变明显减轻。脂联素能减少由氧化型低密度脂蛋白 ox-LDL 诱导产生的超氧化物的产生,抑制 ox-LDL 在血管壁的沉积,抑制内皮细胞的增殖[11]。体外培养发现脂联素能抑制巨噬细胞向泡沫细胞的转化,抑制细胞黏附因子的表达,能阻止肿瘤坏死因子介导的单核细胞与主动脉内皮细胞的黏附而对抗动脉粥样硬化[12]。

血脂代谢紊乱是动脉粥样硬化的重要危险因素,其中最主要的就是低密度脂蛋白,LDL 侵入动脉壁后,易与氨基葡聚糖结合,启动胆固醇在动脉壁的沉积[13]。ox-LDL 易被巨噬细胞吞噬形成泡沫细胞,并抵抗溶酶体酶及组织蛋白酶对其的降解,导致脂质在泡沫细胞内的沉积,在动脉壁形成纤维斑块。ox-LDL 能促进单核细胞及中性粒细胞的黏附,促进平滑肌细胞及肌源性泡沫细胞的产生,并促进内皮细胞释放释放血小板源生长因子(PDGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)及转化生长因子-β(TGF-β),正向调控血

表2 AMPKα2-rs1124900 位点不同基因型间代谢指标的比较($\bar{x}\pm s$)

组别	基因型	n	年龄(岁)	BMI(kg/m^2)	收缩压(mmHg)	舒张压(mmHg)	TC(mmol/L)	TG(mmol/L)	HDL(mmol/L)	LDL(mmol/L)	GHbA1C(%)	F-CP(ng/ml)	APN(mg/L)	CIMT(mm)
对照组	GG	52	52.8±10.3	22.7±2.8	118.7±17.3	73.4±9.1	4.91±1.04	1.48±0.36[a]	1.39±0.31	2.57±0.34[a]	5.32±0.58	2.89±0.23	18.52±3.11[a]	0.73±0.12[a]
	GT	68	51.6±9.8	23.6±2.3	122.4±17.1	76.5±9.4	4.76±0.95	1.53±0.27[a]	1.35±0.33	2.61±0.37[a]	5.13±0.57	2.76±0.31	18.33±3.06[a]	0.77±0.13[a]
	TT	40	51.3±9.5	23.1±2.5	122.7±15.6	75.7±8.9	4.86±1.33	1.99±0.35	1.30±0.29	3.03±0.31	5.22±0.62	2.81±0.27	13.24±2.87	1.05±0.13
T2DM 组	GG	53	54.5±9.6	25.1±2.3	139.6±17.3	87.6±10.3	4.88±1.28	2.13±0.36[a]	1.26±0.37	2.86±0.35[a]	8.67±0.41	4.15±0.34	13.38±3.15[a]	1.07±0.11[a]
	GT	77	55.3±10.4	24.7±2.1	137.4±18.6	86.4±10.9	4.93±1.07	2.12±0.23[a]	1.27±0.34	2.99±0.37[a]	8.46±0.50	3.99±0.17	13.22±3.09[a]	1.01±0.09[a]
	TT	48	54.1±8.7	24.9±2.4	138.3±17.2	89.5±9.6	4.91±1.04	2.57±0.39	1.23±0.36	3.42±0.36	8.44±0.56	4.06±0.29	9.42±3.87	1.31±0.14

a: $P<0.05$,与 TT 比较

管平滑肌细胞的增殖[14],刺激组织因子(TF)、促凝血因子-1(PAI-1)的表达,促使血小板黏附、聚集、血栓形成[15]。并通过参与氧化应激及通过细胞毒性作用损伤内皮细胞。

本实验结果显示,在 2 型糖尿病和非糖尿病对照组均存在 AMPKα2 rs1124900 位点 G→T 的单碱基突变,但 AMPKα2 rs1124900 基因多态性在糖尿病组 G/G、G/T、T/T 基因型频率分别为 29.8%、43.2%、26.9%。T 等位基因频率为 48.6%,正常对照组 AMPKα2 rs1124900 G/G、G/T、T/T 基因型频率为 32.5%、42.5%、25.0%,T 等位基因频率为 46.3%,2 组间差异无显著性($P>0.05$),表明 AMPKα2 rs1124900 基因多态性与 2 型糖尿病发病无关。将病例组与对照组按照 G/G、G/T、T/T 基因型分别分组,比较各组间血糖、血脂、C 肽、糖化血红蛋白、脂联素、抵抗素、颈动脉内膜厚度及斑块,发现在糖尿病组和对照组 TT 型者的血清 TC、LDL-C 水平明显高于 GG 型者,血清脂联素水平明显低于 GG 型者($P<0.05$)。

编码 AMPKα2 的基因 PRKAA2 位于 1p31,Spencer-Jones 等[16]通过对 2 777 例正常高加索女性 PRKAA2 基因的研究发现,5 个 SNPs(rs1124900、rs2796516、rs2746342、rs2796498、rs1418442)和总胆固醇、LDL-C 有关($P<0.001\sim0.034$)。其中,rs1124900 与 ApoB 显著相关,rs2796498 与 HDL-C 相关,rs2796516 与 TG、ApoB 及中心性肥胖显著相关。本实验结果显示 rs1124900 基因多态性与 LDL 相关,与上述实验结果基本符合。但本实验示 rs1124900 基因多态性与 TC 无相关性,但与 TG 明显相关,考虑与样本量及人种有关。

在糖尿病组和对照组 TT 基因型者颈动脉内膜中层厚度显著高于 GG 基因型者($P<0.05$)。颈动脉粥样斑块的发生率在对照组分别为:GG 基因型 6 例,占 11.5%,GT 基因型 9 例,占 13.2%,TT 基因型 13 例,占 32.5%。2 型糖尿病组分别为:GG 基因型 14 例,占 26.4%,GT 基因型 19 例,占 24.7%,TT 基因型 25 例,占 52.1%。TT 基因型颈动脉内膜斑块发生率明显高于 GT、GG 基因型。相关分析表明,CIMT 及斑块发生率与血清 TG、LDL-C 正相关,与 APN 水平负相关。推测 rs1124900 基因多态性可能影响 APN 水平及 TG、LDL 的代谢,间接参与动脉粥样硬化的发生发展过程。

综上所述,AMPKα2 rs1124900 基因频率和等位基因频率与 2 型糖尿病发病无相关性,但与血清脂联素水平、血脂代谢紊乱及颈动脉粥样硬化相关,但迄今为止对 AMPK 的认识还有限,需进一步研究以确定 AMPKα2 rs1124900 是否为颈动脉粥样硬化的易感基因。

参考文献:

[1] Simon A, Megnien J L, Chironi G. The value of carotid intima-media thickness for predicting cardiovascular risk[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010, 30(2): 182-185.

[2] 肖华, 迟路湘. 颈动脉内中膜厚度及尿微量白蛋白在多动脉粥样硬化患者心血管危险评估中的作用[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(9): 944-947.

[3] 杨缙, 邓华聪, 廖璞. 老年 2 型糖尿病患者血清脂联素和早期动脉粥样硬化的关系[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(4): 372-375.

[4] 肖蓉, 殷军. 彩色多普勒超声在糖尿病颈动脉硬化中的应用[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(11): 1232-1234.

[5] Momcilovic M, Hong S P, Carlson M. Mammalian TAK1 activates Snf1 protein kinase in yeast and phosphorylates AMP-activated protein kinase in vitro[J]. J Biol Chem, 2006, 281(35): 25336-25343.

[6] Fu X, Wan S, Lyu Y L, *et al*. Etoposide induces ATM-dependent mitochondrial biogenesis through AMPK activation[J]. PLoS One, 2008, 3(4): e2009.

[7] Lim C T, Kola B, Korbonits M. AMPK as a mediator of hormonal signalling[J]. J Mol Endocrinol, 2010, 44(2): 87-97.

[8] Inoue E, Yamauchi J. AMP-activated protein kinase regulates PEPCK gene expression by direct phosphorylation of a novel zinc finger transcription factor[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 351(4): 793-799.

[9] Young A, Wu W, Sun W, *et al*. Flow activation of AMP-activated protein kinase in vascular endothelium leads to Kruppel-like factor 2 expression[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009, 29(11): 1902-1908.

[10] Kawano J, Arora R. The role of adiponectin in obesity, diabetes, and cardiovascular disease[J]. J Cardiometab Syndr, 2009, 4(1): 44-49.

[11] Ekmekci H, Ekmekci O B. The role of adiponectin in atherosclerosis and thrombosis[J]. Clin Appl Thromb Hemost, 2006, 12(2): 163-168.

[12] Broedl U C, Lebherz C, Lehrke M, *et al*. Low adiponectin levels are an independent predictor of mixed and non-calcified coronary atherosclerotic plaques[J]. PLoS One, 2009, 4(3): e4733.

[13] Ishigaki Y, Katagiri H, Gao J, *et al*. Impact of plasma oxidized low-density lipoprotein removal on atherosclerosis[J]. Circulation, 2008, 118(1): 75-83.

[14] Kona S, Chellamuthu P, Xu H, *et al*. Effects of cyclic strain and growth factors on vascular smooth muscle cell responses[J]. Open Biomed Eng J, 2009, 3: 28-38.

[15] 李洁琪, 赵水平, 方颖, 等. 氧化低密度脂蛋白对培养兔脂肪细胞凝血和纤溶因子表达的影响[J]. 贵州医药, 2007, 31(2): 103-106.

[16] Spencer-Jones N J, Ge D, Snieder H, *et al*. AMP-kinase alpha2 subunit gene PRKAA2 variants are associated with total cholesterol, low-density lipoprotein-cholesterol and high-density lipoprotein-cholesterol in normal women[J]. J Med Genet, 2006, 43(12): 936-942.

(**收稿**:2011-09-10;**修回**:2011-11-21)

(编辑 栾 嘉)