临床研究 文章编号:0253-3626(2010)07-1067-03

Preproghrelin 基因 Leu72Met 多态性与广州地区汉族人群 2 型糖尿病的相关性研究

崔炳权,何震宇,林元藻
(广东药学院生物化学与分子生物学系,广州 510006)

【摘 要】目的:探讨 Preproghrelin 基因 Leu72Met 多态性与广州地区汉族人群 2 型糖尿病(Type 2 diabetes mellitus,T2DM)的相关性。方法:以广州地区汉族人群中的 95 位非糖尿病的正常人(对照组)和 102 位 2 型糖尿病人(T2DM 组)为研究对象,采用 PCR 扩增目的片段、限制性内切酶 *BseN* Ⅰ酶切,Native-PAGE 分离和银染分析,确定各组 Preproghrelin 基因 Leu72Met 多态基因型,比较分析各组间基因型、等位基因频率分布的差异。结果:对照组和 T2DM 组的基因型频率分布符合 Hardy-Weinberg 平衡。在对照组 95 例样本中,CC 68 例、AC 27 例, AA 0 例;基因型频率分别为:0.716、0.284、0;在 T2DM 组 102 例样本中,CC 71 例、AC 25 例、AA 6 例,基因型频率分别为:0.696、0.245、0.059。组间基因型和等位基因频率差异无统计学意义。结论:Preproghrelin 基因 Leu72Met 多态性与 T2DM 之间无显著的相关性。但在 T2DM 组中检测到 AA 基因型而对照组中未发现,提示等位基因 A 在 T2DM 发生中有某种作用,将进一步研究。

【关键词】Preproghrelin 基因;Leu72Met 多态性;2 型糖尿病(T2DM)
【中国图书分类法分类号】R587.1;Q754 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-05-20

Relationships between Leu72Met polymorphism of preproghrelin gene and type 2 diabetes mellitus in Han ethnics of Guangzhou

CUI Bing-quan, et al
(*Department of Biochemistry and Molecular Biology, Guangdong Pharmaceutical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the relationships between Leu72Met polymorphism of preproghrelin gene and type 2 diabetes mellitus (T2DM) in Han ethnics of Guangzhou. *Methods*: We conducted a case-control study using 95 non-T2DM healthy individuals as controls (the control group) and 102 individuals diagnosed with T2DM as patients (the T2DM group) from populations of Han ethnics in Guangzhou, in order to detect genotypes of Leu72Met polymorphism of preproghrelin gene within each group, and to compare the differences of genotypic and allelic frequencies between the two groups. Various molecular biology techniques were employed in the study including target gene segments amplification using the polymerase chain reaction (PCR). After amplification, digestions of PCR products were carried out using restriction enzyme *BseN* Ⅰ and fragments obtained were detected using Native-PAGE in conjunction with a highly sensitive silver stain method. *Results*: In the healthy control group, the genotypes CC and AC were detected in 68 and 27 individuals, respectively, while no genotype AA was detected in this group. Their corresponding genotypic frequencies were 0.716, 0.284, and 0, respectively. In the T2DM group, the genotypes CC, AC, and AA were detected in 71, 25, and 6 cases, respectively. Their corresponding genotypic frequencies were 0.696, 0.245, and 0.059, respectively. Allele frequencies detected were in equilibrium with the Hardy-Weinberg equation. However, there were no significant differences between the control group and the T2DM group in terms of genotypic and allelic frequencies. *Conclusion*: There are no significant relationships between Leu72Met polymorphism of preproghrelin gene and T2DM in Han ethnics of Guangzhou. However, genotype AA was detected in the T2DM group but not in control, which suggested that allele A may play certain roles in T2DM development. Further investigations certainly would be worth pursuing.

【Key words】Preproghrelin gene; Leu72Met polymorphism; Type 2 diabetes mellitus(T2DM)

作者介绍:崔炳权(1966-)男,讲师,硕士,
研究方向:医学生物化学与分子生物学。

基金项目:广东省医学科学技术研究基金立项项目(编号:A2009312)。

2 型糖尿病（Type 2 diabetes mellitus，T2DM）是由于胰岛素抵抗和 β 细胞分泌缺陷导致的一种以高血糖为特征的代谢紊乱伴有蛋白质、脂肪代谢异常、可引起多系统损害性疾病[1]，是遗传因素和环境因素共同作用所致的一种多基因复杂疾病。遗传因素在 T2DM 的发生发展中起着重要的作用，而遗传因素在 T2DM 发生发展中起作用的机制阐明有赖于 T2DM 易感基因的鉴定。候选基因研究是易感基因鉴定的主要方法之一[2,3]。候选基因法通常利用病例对照设计进行关联分析。糖尿病候选基因是指参与糖尿病病理生理过程有关的基因，亦即可能参与胰岛 β 细胞胰岛素分泌不足及参与周围组织如骨骼肌、肝及脂肪组织胰岛素作用不足发生的生物学过程的基因。

Preproghrelin 基因是 T2DM 的候选基因之一。国外有研究认为：Preproghrelin 基因 Leu72Met 多态性对胰岛素抵抗起到保护作用[4]，与 T2DM 关系未有定论。国内最近有报道：Preproghrelin 基因 Leu72Met 多态性与上海地区汉族人 T2DM 未见显著相关性，但可能具有延缓 T2DM 微量蛋白尿继续进展的作用[5]。

由于遗传因素、气候、饮食习惯的差异，广州地区是T2DM 的高发区，已成为本地区人群的一个重要的健康问题。广州地区汉族人群中 Preproghrelin 基因 Leu72Met 多态性与 T2DM 相关性的研究未见报道，因此本研究旨在探讨 Preproghrelin 基因 Leu72Met 多态性与广州地区汉族人群 T2DM 的相关性及在 T2DM 发展中的作用，为阐明 T2DM 的遗传特征和发病机制及早期预测、预防和进一步基因治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

全血基因组 DNA 制备试剂盒（杭州维特洁公司）；HS Taq mix（广州东盛生物科技有限公司）；限制性内切酶 *BseN* Ⅰ（加拿大 Fermentas 公司）；DNA Marker-DL2000（TaKaRa 产品，宝生物工程（大连）有限公司提供）。

1.2 主要仪器

5804R 型低温高速离心机（德国 Eppendorf 公司）；DDY-6c 型电泳仪（北京市六一仪器厂）；G:Box 系列凝胶成像分析仪（英国 Syngene 公司）；2720 型 PCR 仪（美国 ABI 公司）。

1.3 研究对象和分组

95 例健康正常人和 102 例 T2DM 外周血来自近几年广东药学院门诊部采集收集的广州地区无血缘关系的汉族人群的血样。健康正常人（对照组）指临床体检无糖尿病和其它疾病的个体；T2DM 个体（T2DM 组）依据通用的 T2DM 诊断标准进行诊断并确诊。

1.4 基因组 DNA 制备

本实验所用的基因组 DNA 均采用 DNA 制备试剂盒从研究对象的外周血中提取而来，并贮存于 -20℃备用。

1.5 引物设计

以 NCBI 中的参考序列 NC 000003.11 为依据通过primer premier5.0 软件设计引物并委托上海生工生物工程科技服务有限公司合成。引物序列如下：上游引物 5'-CACTTAGCAACCAGCTCTGTGA-3'，下游引物 5'-TGTAGTTGGGACCCTGTTCACT-3'。引物及多态位点的具体位置见图 1。3 175 位的 M（C/A）代表多态位点碱基，当 M 为 C 时，CTG 对应肽链 72Leu，当 M 为 A 时，ATG 对应肽链 72Met，此即Leu72Met 多态性。

1.6 PCR 反应条件和扩增片段检测

PCR 体系组成：25 μl，HS Taq mix 12.5 μl；上下游引物各 1 μl（10 *pmol*）；DNA 模板 1 μl（100 *ng* DNA）；三蒸水 9.5 μl。PCR 反应条件：94℃预变性 3 min；94℃30 s；58℃30 s；72℃1 min；30 个循环；72℃延伸 7 min。扩增产物检测：PCR 产物用 2%琼脂糖凝胶电泳检测，以确认获得目标片段。

1.7 PCR 产物限制性内切酶酶切分型

酶切体系为 20 μl，其中 PCR 产物 10 μl；10 × buffer B 2 μl；*BseN* Ⅰ 1 μl（10 U）；三蒸水 7 μl，65℃水浴 4 h，后 80℃水浴 20 min 终止反应。酶切产物用 8%Native-PAGE 分离，银染分析，以确定基因型。PCR 产物理论大小为 370 bp，从图 1 可看出，当 M 为 C 时，其周边序列 ACTTGA 能被 *BseN* Ⅰ（ACTGGN▼）识别切割，酶切后可得到 260、110 bp 2 个片段。相反，当 M 为 A 时，PCR 产物不能被 *BseN* Ⅰ 切割，因此，CC 纯合子基因型个体，其 PCR 产物酶切后将会产生 110、260 bp 2 条带；而杂合子 CA 基因型个体，其 PCR 产物酶切后将产生 110、260、370 bp 3 条带；AA 纯合子基因型个体，其 PCR 产物完全不能被 *BseN* Ⅰ 切割，酶切后仍保留其 370 bp 1 条带。

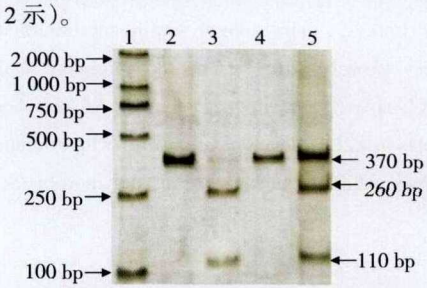
1.8 统计学方法

采用 SPSS13 软件分析，用 χ^2 检验确定基因型频率分布是否符合 Hardy-Weinberg 平衡以及组间基因型和等位基因频率分布差异是否具有统计学意义（$P \leq 0.05$ 表明差异具有统计学意义）。

2 结 果

2.1 PCR-RFLP 鉴定

Preproghrelin 基因 Leu72Met 多态位点基因型有 3 种，分别是 CC（260、110 bp）、AC（370、260、110 bp）、AA（370 bp）（如图 2 示）。



1. DNA marker-DL2000；2. PCR 产物；3. CC 基因型；4. AA 基因型；5. AC 基因型

图 1 PCR-RFLP 鉴定 preproghrelin 基因 Leu72Met 多态位点基因型

2.2 Preproghrelin 基因 Leu72Met 位点基因型和等位基因分布频率

对照组 95 例中，检测到基因型 CC 68 例；AC 27 例；AA 0 例，基因型频率分别为：0.716、0.284、0；等位基因 C、A 频率为 0.858 和 0.142。T2DM 组 102 例中 CC 71 例；AC 25 例；AA 6 例，基因型频率分别为：0.696、0.245、0.059；等位基因 C、A 频率 0.819 和 0.181(见表 1)。

2.3 Hardy-Weinberg 平衡分析

(上游引物)

2919 CACTTAGCAACCAGCTCTGTGACCTGGAGCAGCA 2952
2953 GCGCCATCTCTGGGCTTCAGTCTTCTCCCAGAGC 2986
2987 ACAAAGGACTCTGGGTCTGACCTCACTGTTTCTG 3020
3021 GAAGGACATGGGGGCTTAGAGTCCTAAACAGACT 3054
3055 GTTTCCCCCTTCCAGCAGAGAAAGGAGTCGAAGA 3088
3089 AGCCACCAGCCAAGCTGCAGCCCCGAGCTCTAGC 3122
3123 AGGCTGGCTCCGCCCGGAAGATGGAGGTCAAGCA 3156
3157 GAAGGGGCAGAGGATGAAMTGGAAGTCCGGGTCG 3190
3191 GTACCTCTGCAGTTTTATGCTTCTGTGGCAGCGA 3224
3225 GGAGGGTGGGGTCAGGGGAGAGGGAGGGCAGGGA 3258
3259 GAGGTGGCAGTGAACAGGGTCCCAACTACA 3288

3'TCACTTGTCCCAGGGTTGATGT 5'(下游引物)

根据对照组和 T2DM 组 3 种基因型的实际频数和理论频数，计算得出：对照组 $\chi^2=2.61<\chi^2_{0.05(1)}=3.84$，即 $P>0.05$；T2DM 组 $\chi^2=3.10<\chi^2_{0.05(1)}=3.84$(见表 2)，即 $P>0.05$，表明对照组和 T2DM 组 Preproghrelin 基因 3 种基因型频率分布均符合 Hardy-Weinberg 平衡定律，说明 2 组样本都具有群体代表性。

2.4 Preproghrelin 基因 Leu72Met 位点基因型和等位基因频率分布差异性分析

运用 χ^2 检验比较 T2DM 组和对照组之间 3 种基因型频率分布的差异，计算可得 $\chi^2=5.90<\chi^2_{0.05(2)}=5.99$，即 $P>0.05$，表明 3 种基因型在 2 组间的频率分布差异无统计学意义；分析 T2DM 组和对照组之间等位基因频率分布的差异，计算可得 $\chi^2=1.11<\chi^2_{0.05(1)}=3.84$，即 $P>0.05$，表明 C、A 等位基因在 2 组间频率分布无统计学意义。T2DM 组和对照组之间在 CC、AC 频率分布方面非常接近，但 T2DM 组(102 例)中出现 6 例 AA 纯合体，而对照组(95 例)中则 1 例都没有(见表 1)。

表 1 Preproghrelin 基因 Leu72Met 多态基因型和等位基因分布频率

组别	样本数量	基因型			等位基因	
		CC	AC	AA	C	A
对照组	95	68 (0.716)	27 (0.284)	0 (0.00)	163 (0.858)	27 (0.142)
T2DM 组	102	71 (0.696)	25 (0.245)	6 (0.059)	167 (0.819)	37 (0.181)

表 2 Preproghrelin 基因 3 种基因型频率分布的 Hardy-Weinberg 平衡分析

组别	项目	基因型			合计
		CC	AC	AA	
对照组	实际频数(O)*	68	27	0	95
	理论频数(E)△	69.92	23.16	1.92	95
	$(O-E)^2/E$	0.05	0.64	1.92	$\chi^2=2.61$
T2DM 组	实际频数(O)*	71	25	6	102
	理论频数(E)△	68.36	30.29	3.36	102
	$(O-E)^2/E$	0.10	0.92	2.08	$\chi^2=3.10$

注：*代表实际检测到的样本数；△代表理论频数。基因型 CC 理论频数 =P2(C) 总样本数；基因型 AC 理论频数 =P(C) P(A) 2 总样本数；基因型 AA 理论频数 =P^2(A) 总样本数。$\chi^2=(O-E)^2/E$。

3 讨 论

Preproghrelin 是前促生长激素释放多肽原基因，位于染色体 3p25-26，含有 5 个外显子和 3 个内含子，编码由 117 个氨基酸的组成的蛋白原，该蛋白原是 Ghrelin 和 Obestatin 的多肽前体，Ghrelin 即促生长激素释放多肽，由 28 个氨基酸残基组成[6]，是 G 蛋白偶联受体的天然配体。Ghrelin 能促进腺垂体释放生长激素，促进摄食，脂肪蓄积，在消化系统功能及能量代谢调节方面均起重要作用。有研究发现[7]：低水平 Ghrelin 与胰岛素抵抗、高血压及 T2DM 的发病相关，提示 Ghrelin 具有降低胰岛素抵抗的作用。Obestatin 即肥胖抑制素，是由 23 个氨基酸残基组成的多肽[8]，由胃部产生，与 G 蛋白共轭受体 39 结合。ghrelin 能够刺激机体增加对食物的摄入，使体质量增加，而 obestatin 可以抑制 ghrelin 对食欲增加和空肠收缩的刺激作用，obestatin 被认为是 ghrelin 的生物学拮抗肽[6,8]。

目前，关于 preproghrelin 基因 Leu72Met 多态性的研究并不鲜见，但结论很不一致。Zavarella 等通过对 1420 名意大利人的研究发现：Leu72Met 多态性对胰岛素抵抗起保护作用[4]。Lee DY 等报道在韩国人群中 Preproghrelin 基因 Leu72Met 多态性与 T2DM 之间没有显著相关性，但 Leu72Met 多态性与低水平 SCr 相关，并能够降低 T2DM 肾病肾功能衰竭的发病率，提示 Preproghrelin 基因 Leu72Met 多态性可能与延缓T2DM

临床研究 文章编号:0253-3626(2010)07-1070-04

儿童复杂先天性心脏病并冠状动脉畸形造影分析

李 谧,陈 勇,易岂建,白永虹,田 杰,吴 春,蒲晓芳
(重庆医科大学儿童医院心脏中心,重庆 400014)

【摘 要】目的:分析儿童复杂先天性心脏病并发冠状动脉畸形的发生率,探讨冠状动脉造影的诊断价值。方法:2006 年 1 月~2009 年 6 月在重庆医科大学儿童医院心脏中心行心导管检查心血管造影的患儿 229 例,对患儿复杂先心病的病种构成、冠状动脉畸形发生率、冠脉畸形类型及其发生率、异常冠状动脉跨过右心室流出道的病种、跨过右心室流出道的异常冠状动脉类型,以及患儿预后进行回顾性分析。结果:229 例患儿共检出 27 例冠状动脉先天性变异,检出率为 11.8%;其中左单支冠状动脉 15 例,发生率 6.55%,占发生冠脉畸形中的 55.56%。27 例冠状动脉先天性变异中 16 例异常冠状动脉跨过右心室流出道,占儿童复杂先天性心脏病的 6.99%,异常冠状动脉跨过右心室流出道的先心病类型分别为法乐氏四联症 7 例、右室双出口 3 例、肺动脉闭锁/室间隔缺损 3 例、完全性大动脉转位 1 例、完全性房室间隔缺损 1 例、单心室/大动脉移位 1 例。229 例患儿照影死亡 1 例,占复杂先天性心脏病并冠状动脉畸形造影总数的 3.70%,占复杂先天性心脏病造影总数的 0.44%,手术死亡 3 例,占复杂先天性心脏病并冠状动脉畸形手术患儿的 16.67%。结论:儿童复杂先心病冠脉畸形的发生率高于正常人群;冠状动脉造影是确诊各种冠状动脉先天性变异的重要手段。

【关键词】冠状动脉畸形;先天性心脏病;心血管造影术
【中国图书分类法分类号】R725.4 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-01-21

Angiocardiography analysis of complex congenital heart diseases with congenital coronary artery anomalies

LI Mi, et al
(Heart Center, Children's Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】*Objective*: Analysis of complex congenital heart disease of children and the incidence of coronary abnormalities to explore the diagnostic value of coronary angiography. *Methods*: Angiocardiography cardiac catheterization of 229 children in Heart Center of

作者介绍:李 谧(1973-),男,硕士,
研究方向:小儿心脏介入。

肾病的发生和进展有关[9]。国内姜家梅等报道[5]:Preproghrelin 基因 Leu72Met 多态性与上海地区汉族人 T2DM 没有显著相关性,但可能具有延缓 T2DM 微量蛋白尿继续进展的作用。以上的研究中均发现 3 种基因型,即 CC、CA 及 AA,且以 CC 型居多,等位基因则以 C 为主,3 种基因型频率分布无显著差异。

本试验研究发现:Preproghrelin 基因 Leu72Met 多态性与广州地区汉族人 T2DM 的发生没有显著相关性,CC、AC 基因型频率分布在正常人对照组和 T2DM 组之间非常接近,但 AA 基因型分布在两者之间存在着令人费解的差异,102 例 T2DM 患者中有 6 例为 AA 基因型,而正常对照组 95 例个体中竟无 1 例 AA 基因型个体,这可能是等位基因 A 在 T2DM 发生中确有某种作用,并且只有在纯合状态和其它因素的综合作用下才得以表现出来,值得进一步深究。

参 考 文 献

[1] 陈雪香,刘 合.PPARα 基因多态性与 2 型糖尿病关系研究[J].医学综述,2008,14(6):897-899.

[2] 项坤三.糖尿病的病因异质性及分型[J].中华内分泌代谢杂志,2005,21(4):453-457.

[3] 黄青阳,彭妹彬,杜纪坤,等.2 型糖尿病候选基因的研究进展[J].国际遗传学杂志,2006,29(6):446-452.

[4] Zavarella S, Petrone A, Zampetti S, et al. A new variation in the promoter region, the -604 C>T, and the Leu72Met polymorphism of the ghrelin gene are associated with protection to insulin resistance[J]. Int J Obes(Lond), 2008, 32(4):663-668.

[5] 姜家梅,孙永宁,刘丽梅,等.Preproghrelin 基因 Leu72Met 多态性与 T2DM 和 DN 的关系[J].上海交通大学学报(医学版),2008,28(7):863-866.

[6] 唐胜球,江青艳,张永亮,等.脑肠肽 obestatin 与 ghrelin 的研究进展[J].世界华人消化杂志,2007,15(31):3324-3331.

[7] Poykko S M, Kellokoski E, Horkko S, et al. Low plasma ghrelin is associated with insulin resistance, hypertension, and the prevalence of Type 2 diabetes[J]. Diabetes, 2003, 52(10):2546-2553.

[8] Zhang J V, Ren P G, Avsian-Kretchmer O, et al. obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin's effects on food intake[J]. Science, 2005, 310:996-999.

[9] Lee D Y, Kim S Y, Jo D S, et al. Preproghrelin Leu72Met polymor-phism predicts a lower rate of developing renal dysfunction in type 2 diabetic nephropathy[J]. Eur J Endocrinol, 2006, 155(1):187-190.

(责任编辑:关蕴良)