论 著 文章编号:0253-3626(2008)12-1475-04

CAPN10 基因单核苷酸多态性与西南地区人群 2 型糖尿病的相关性研究

董 靖,彭惠民

(重庆医科大学基础医学院细胞生物学及遗传学教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨 calpain10 基因单核苷酸多态性(Single nucleotide polymorphism,SNP)与西南地区汉族人群 2 型糖尿病(Type 2 diabetes mellitus,T2DM)遗传易感性的关系。方法:采用病例 - 对照研究设计,对 144 例 T2DM 患者和 98 例正常对照者采用双向等位特异性 PCR 技术(Bi-PASA),检测 calpain10 基因 SNP43A/G 位点、SNP44C/T 位点和 SNP56A/G 位点的基因型,并进行关联分析。结果:与对照组相比,病例组 SNP43 的 G/G 等位基因型频率、SNP44 的 C/T 等位基因型频率和 SNP56 的 A/A 等位基因型频率显著升高(分别为 86.11%,73.5%;36.8%,19.36%;38.0%,9.8%)。SNP43 的 G 等位基因频率、SNP44 的 C 等位基因频率和 SNP56 的 A 等位基因频率在西南地区 T2DM 人群中显著升高 (分别为 93.06%,86.22;19.1%,9.69%;60.07%,44.96%);单体型 ATG、GCA、GTG 频率在病例组与对照组的分布具有显著差异。结论:calpain10 基因可能为西南地区汉族人群 T2DM 的易感基因。

【关键词】calpain10;2 型糖尿病;遗传易感性;单核苷酸多态性

【中国图书分类法分类号】R394.3 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-03-05

A case-control study on the role of calpainl0 gene single nucleotide polymorphism in the genetic susceptibility to type 2 diabetes mellitus in southern Chinese Han population

DONG Jing,et al

【Abstract】*Objective*: To test the hypothesis that calpain10 gene could contribute to the genetic susceptibility to type 2 diabetes mellitus(T2DM) in southern Chinese Han population. *Methods*: In this case-control study,Bi-PASA method was used to determine the distribution of allele and genotype frequencies of SNP43 polymorphism(A/G),SNP44 polymorphism(C/T)and SNP56 polymorphism(A/G)in Calpainl0 in 144 type2 diabetes patients and 98 normal control subjects. *Results*: The genotypes frequencies of SNP43 G/G,SNP44 C/T and SNP56 A/A were significant increased in case group,as compared with the control group(86.11% vs 73.5%;36.8% vs 19.36 %;38.0% vs 9.8%,respectively).The frequencies of SNP43 G-allele,SNP44 C-allele and SNP56 A-allele in T2DM patients were significantly increased as compared with that in the control subjects (93.06% vs 86.22;19.1% vs 9.69% ;60.07% ,44.96% respectively);The haplotype frequencies of ATG、GCA and GGT were significanty different between T2DM patients and control subjects. *Conclusion*: The study suggested that Calpainl0 gene might contribute to the genetic susceptibility to T2DM in southern Chinese Han population。

【Key words】Calpain10 gene;Type 2 diabetes mellitus;Genetic susceptibility;Single nucleotide polymorphism(SNP)

糖尿病(Diabetes mellitus,DM)是目前世界上普遍危害人类健康的慢性疾病之一。作为 DM 的主要类型,2 型糖尿病(Type 2 diabetes mellitus,T2DM)是一种具明显异质性的多因素、多基因遗传病,其遗传方式和发病机制十分复杂,许多微效基因的变异都会增加其发病率。CAPN10 基因是 T2DM 候选致病基因之一,但到目前为止,尚无该基因与西南地区汉族人群 T2DM 相关性研究报道。本文通过研究 CAPN10 基因的 3 个 SNP 位点与西南地区汉族人群 T2DM 的关系,并分析其与 T2DM 的关系,以评

作者简介:董 靖(1981-)女,硕士,研究方向:遗传学。

通讯作者:彭惠民,男,教授,E-mail:penghuimin6@sohu.com。

基金项目:重庆医科大学创新基金(基金编号:CX200302)。

价该基因是否为西南地区汉族人群 T2DM 的易感基因。

1 对象与方法

1.1 对象

病例组 144 例，均为中国西南地区汉族人，2003 年 2 月至 2005 年 12 月在重庆医科大学附属第一医院经 OGTT 试验确诊，2 型糖尿病的诊断遵循 WHO 诊断标准[1]。对照组 98 例，为相同地区年龄和性别频数匹配，无高血糖、T2DM 家族史、高血压及代谢相关疾病。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 每个研究对象抽取外周血 4~5 ml，采用 EDTA 抗凝，用 Biospin 全血基因组 DNA 提取试剂盒提取 DNA，于 -20℃保存。

1.2.2 基因多态性检测 以 Bi-PASA PCR 检测 CAPN10 基因 SNP43 位点、SNP44 位点和 SNP56 位点基因型，并进行关联分析[2]。

Bi-PASA PCR 技术是在等位特异 PCR 法的基础上发展而来的分型原理见图 1。

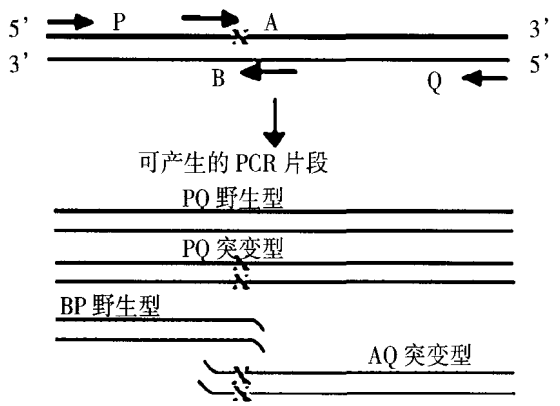


图 1 Bi-PASA PCR 分型原理

在 Bi-PASA 法中，共有 4 条引物（如图 1 所示），外侧引物 P 和 Q 分别位于待测等位基因的上、下游；引物 A 位于 X（X 代表 SNP 突变位点）序列的中上游，其 3' 末端碱基与突变位点碱基互补；引物 B 位于待测等位基因序列的中下游，其 3' 末端碱基与野生型 SNP 位点互补。对于杂合子，可扩增出两条包含有野生型 SNP 位点及两条包含有突变型 SNP 位点的寡核苷酸序列，共扩增出 3 条片段，即 PQ（PQ 野生型与 PQ 突变型长度相同）、AQ、PB；AQ 代表 X 突变型片段，BP 代表野生型片段，而 PQ 为共有片段。PQ、PB、AQ 片段长度有明显差异利用 1%的琼脂糖溶胶电泳而容易识别。对于纯合野生型和纯合突变型只产生 2 条片段，即 AQ 和 PQ 片段或 PB 和 PQ 片段该反应只需 1 个退火温度。其优点为操作简单，实验成本低。两条内侧引物是 PCR 反应扩增产量高低的关键。

1.2.3 引物设计 根据 Bi-PASA 原理，利用 Primer Premier 5.0 软件设计各 SNPs 位点引物，用 NCBI 的 Blast 2.0 软件检验其特异性。引物由重庆升博科技有限公司合成。3 个 SNPs 位点引物如表 1 所示。

表 1 CAPN10 基因 3 个 SNPs 位点引物

SNPs 位点	引物序列：5'端→3'端
SNP43	P CCATC CCAAG GGCTG TT
	Q TGCTA CGCCC TTCAG GTT
	A TGCTG CGAAG TAAGG
	B GCTTA GCCTC ACCTT CAAAT
SNP44	P CAC AAA CTG AGG ACA CCA CC
	Q CCC CAG CAT ACC AAC ACT T
	A CTT CAA ACG CCT TAC TTC G
	B CGC TCA CGC TTG CTG T
SNP56	P GATTG AGGCA GCGGT TGG
	Q TGGGC TCCAG GCGGT TGG
	A CTCAG TTGTG ACCTT CCCTA
	B TCCCT CTGGA AGAGG ACAGC

1.2.4 扩增产物分析 扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳分离，以 150 bp DNA Ladder Marker 为标准对照，用 goldview 染色检测等位基因。

1.3 统计学分析

对各 SNPs 的基因型分布进行 Hardy-Weinberg（H-W）遗传平衡检验，估测样本的群体代表性。以 Pearson χ^2 检验比较 CAPN10 基因 SNPs 各基因型、等位基因在病人组与对照组之间分布的差异。统计分析采用 SPSS12.0 统计软件进行处理，$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。等位基因、单体型比较亦采用比值比（odd ratio）。利用 SHEsis 软件分析 CAPN10 基因 3 个 SNPs 单体型频率在病人组与对照组之间的分布差异。

2 结 果

2.1 病例与对照的均衡性

病例和对照的选择均严格按照设计要求进行，都为相同地区年龄和性别频数匹配，无高血糖、T2DM 家族史、高血压及代谢相关疾病。

2.2 判读样本基因型

SNP 基因型的确立（见表 2）。

CAPN10 基因 3 个 SNPs 的 PCR 反应产物（见图 2）。

2.3 统计学分析

2.3.1 CAPN10 基因 3 个 SNPs 等位基因频率的分布 SNP43、SNP44 和 SNP56 的优势等位基因分别

为 G、C 和 A，其频率在病人组及对照组分别为 93.06%，86.22%，P=0.013；19.1%，9.69%，P=0.005；60.07%，44.96%，P=0.001。P 值均小于 0.05。

2.3.2 CAPN10 基因 3 个 SNPs 等位基因型频率的分布 3 个 SNPs 的等位基因型频率在病人组及对照组分别为：SNP43 G/G 型为 0.861 1/0.735，A/A 型为 0.000/0.011 2，A/G 型为 0.138 9/0.254 1，P=0.000；SNP44T/T 型为 0.625/0.806，C/C 型为 0.006 9/0.000，C/T 型为 0.368 0/0.193 9，P=0.004；SNP56A/G 型为 0.537/0.520，A/A 型为 0.380/0.098，G/G 型为 0.083/0.382，P=0.004。P 值均小于 0.05。

2.3.3 CAPN10 基因 3 个 SNPs 单体型频率的分布 3个 SNPs 位点可以组成八种单体型，详见表 3。

表 2 CAPN10 基因反应产物片断长度 SNPs 位点

SNPs 位点	扩增片断长度(bp)		
	杂合子	纯合子	
		野生型	突变型
SNP43	AG	AA	GG
	PQ 451	PQ 451	PQ 451
	AQ 192	PB 294	AQ 192
	PB 294		
SNP44	CT	CC	TT
	PQ 924	PQ 924	PQ 924
	AQ 379	PB 563	AQ 379
	PB 563		
SNP56	AG	AA	GG
	PQ773	PQ 773	PQ 773
	AQ 300	PB 593	AQ 300
	PB 593		

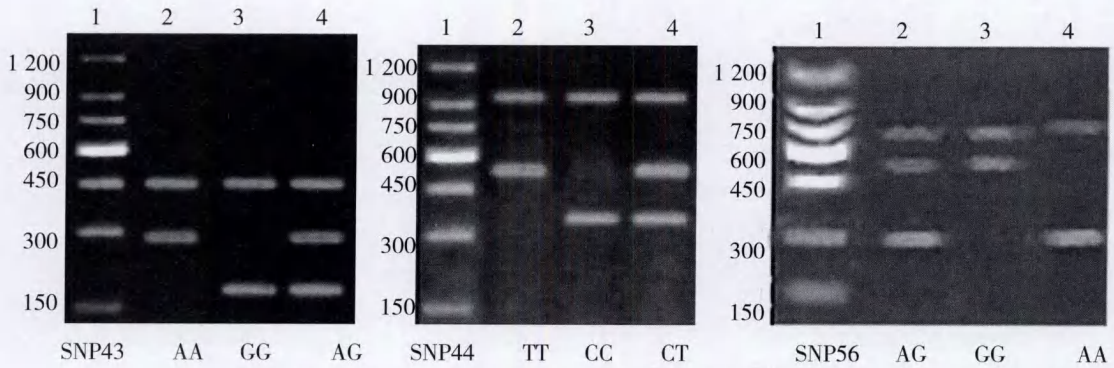


图 2 CAPN10 基因 3 个 SNPs 的 PCR 反应产物电泳图

表 3 病人组和对照组单体型频率的分布

Haplotype	Case(freq)	Control(freq)	Chi2	Fisher's P	OR	95%CI
ACA	0.82(0.003)	0.00(0.000)	–	–	–	–
ACG	0.01(0.000)	0.23(0.001)	–	–	–	–
ATA	12.41(0.043)	7.61(0.039)	0.055 2	0.815 012 0	1.116	0.444~2.804
ATG*	6.77(0.024)	19.17(0.098)	12.662	.0.000 377	0.222	0.091~0.545
GCA*	31.59(0.110)	7.31(0.037)	8.299 7	0.003 984	3.186	1.395~7.277
GCG	21.59(0.075)	11.47(0.059)	0.501 10	0.478 974	1.306	0.623~2.738
GTA	129.18(0.449)	74.07(0.378)	2.441 6	0.118 232 0	1.343	0.927~1.947
GTG*	85.64(0.297)	76.14(0.388)	0.250 00	0.038 156	0.668	0.455~0.979

3 讨 论

目前，对 T2DM、心血管疾病等复杂疾病的遗传学研究方法主要有两种：定点克隆和候选基因的关联分析。候选基因的关联分析即直接研究疾病候选基因的变异与疾病表型之间的关系，该法主要基于对家系或人群的病例—对照关联分析，较直接、快捷，为多基因遗传病研究所普遍采用。

CAPNl0 基因是通过现代基因分析技术，在墨西

哥裔美国人群中发现的增加 T2DM 遗传易感性的易感基因，是钙依赖性中性蛋白酶，其活性中心富含半胱氨酸，位于 2 号染色体长臂 NIDDM1 区内，含 15 个外显子和 14 个内含子，SNP43 及 SNP44 位点位于其第 3 个内含子内，SNP56 位点则位于第 4 内含子内。该基因与组织胰岛素敏感性、血糖水平等相关，其选择性剪切可产生至少 8 种不同类型的蛋白酶(a～h)，可能有多种细胞功能。

近年来人们对 T2DM 相关基因进行了广泛的研究。但是不同地区、不同种族、不同人群之间存在着遗传变异，因此有关的研究结果并不一致。就 CAPN10 基因而言，本研究认为：这 3 个 SNPs 位点均与西南地区汉族人群 T2DM 相关。其中，SNP43 位点与西南地区汉族人群 T2DM 相关，这与文献对韩国人群 2 型糖尿病的 G 等位基因和 GG 基因型在糖尿病中的分布频率显著高于对照组的研究结果相似[3]，也与对高加索人 T2DM 的研究相符[4]，对芬兰人群而言，SNP43 在 T2DM 高危人群中可能通过调节脂肪异常分布而与糖尿病发生有关[5]。同样对于芝加哥人，SNP44 也是其易感位点之一[6]。但是，对丹麦人的研究发现 SNP43 和 SNP44 都与 T2DM 无关[7]，SNP43 和 SNP56 两者者的任何单体型都和西非人 T2DM 数量性状关系不是很密切[8]，在日本人中进行的研究也发现，CAPN10 基因多态性只是增加了血清胆固醇水平而不与 T2DM 相关[9]。文献报道的不同种群中的分布存在明显差异，反映了人种的异质性，也说明了该基因在不同种群中对糖尿病发生的参与程度可能不同。

既往 CAPN10 基因 SNPs 均是通过传统的 PCR-SSCP、RFLP 等方法检测 SNP，本实验首次应用 Bi-PASA 技术检测了 CAPN10 基因的 3 个 SNPs，也是首次揭示了 CAPN10 基因 3 个位点 SNP 基因频率、基因型频率及单体型频率在中国西南地区汉族人群中的分布特征。本研究认为：CAPN10 基因 SNP43 位点 G 等位基因、SNP44 位点 c 等位基因和 SNP56 位点 A 等位基因可能与西南地区人群 T2DM 的发病相关。SNP43 的 G/G 等位基因型频率、SNP44 的 C/T 等位基因型频率和 SNP56 的 A/A 等位基因型频率显著升高，增加了罹患 T2DM 的风险。其中，SNP43 的 G/G 型降低了 CAPN10 mRNA 的表达，提示出现胰岛素抵抗，说明 G/G 型增加了糖尿病的易感性；SNP44 在 CAPN10 转录调节上起作用，该多态性与氨基酸多态性 T504A 存在连锁不平衡，提示突变蛋白质的合成和(或)转录调节的改变可能促进 T2DM 的发生。单体型 ATG、GCA、GTG 频率在病历组与对照组的分布具有显著差异，携带 GCA、GTG 单体型的人群罹患 T2DM 的风险较高，携带 ATG 单体型的人群罹患 T2DM 的风险较低。

综上所述，本研究认为，CAPN10 的 SNP43、SNP44 和 SNP56 位点与西南地区汉族人群 T2DM 相关，CAPN10 基因可能为西南地区汉族人群 T2DM 易感基因。

参 考 文 献

[1] 中华医学会糖尿病学分会代谢综合征研究协作组. 中华医学会糖尿病学分会关于代谢综合征的建议[J]. 中华糖尿病杂志，2004，12(3)：156-157.

[2] 周晨慧，彭惠民.双向等位特异 PCR 技术及其在单核苷酸多态性研究中的应用[J]. 重庆医科大学学报，2006，31(5)：658-661.

[3] Harris F，Biswas S，Singh J，et al. Calpains and their multiple roles in diabetes mellitus[J]. Ann N Y Acad Sc，November 1，2006，1084：452-480.

[4] Jensen D，Urhammer S A，Eiberg H，et al. Variation in CAPN10 in relation to type 2 diabetes，obesity and quantitative metabolic traits：studies in 6018 whites[J]. Mol Genet Meta，2006，89(4)：360-367.

[5] Pihlajamaki J，Salmenniemi U，Vanttinen M，et al. Common Poly-morphisms of calpain-10 are associated with abdominal obesity insubjects at high risk of type 2 diabetes[J]. Diabetoloqia，2006，49(7)：1560-1566.

[6] Vander Molen J，Frisse L M，Fullerton S M，et al. Population genetics of CAPN10 and GPR35：implications for the evolution of type 2 diabetes variants[J]. Am J Hum Genet，2005，76(4)：548-560.

[7] Chen Y，Kittles R，Zhou J，et al. Cal pain-10 gene polymorphisms and type 2 diabetes in West Africans：the africa america diabetes mellitus(AADM) study[J]. Ann Epidemiol，2005，15(2)：153-159.

[8] Elbein S C，Chu W，Ren Q，et al. Role of calpain-10 gene variants in familial type 2 diabetes in Caucasians[J]. J Clin Endocrinol Meta，2002，87(2)：650-654.

[9] Shima Y，Nakanishi K，Odawara M，et al. Association of the SNP-19 genotype 22 in the calpain-10 gene with elevated body mass index and hemoglobin A1c levels in Japanese[J]. Clin Chim Acta，2003，336(1-2)：89-96.

(责任编辑：冉明会)