

脂蛋白脂酶基因多态性与 2 型糖尿病的相关性研究^{*}

杜纪坤

(华中师范大学生命科学学院 武汉 430079)

摘要 目的: 探讨脂蛋白脂酶(lipoprotein lipase, LPL) 基因 PvuⅡ酶切多态性与 2 型糖尿病的相关性。方法: 采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP) 方法, 分析了 156 例样本 LPL 基因第 6 内含子 PvuⅡ多态性(病例组 98 人, 对照组 58, 其中 40 个 2 型糖尿病同胞对, 病例组 40 人, 对照组 40 人)。结果: 病例组与对照组的基因型和基因频率均无显著性差异。结论: 湖北汉族人群脂蛋白脂酶基因 PvuⅡ酶切多态性与 2 型糖尿病无明显关联。

关键词: 2 型糖尿病; 脂蛋白脂酶基因; 多态性

中图分类号: R587.1 文献标识码: A

Association research of lipoprotein lipase gene polymorphism and type 2 diabetes mellitus

DU Ji-kun

(College of life science, Central China Normal University, Wuhan 430079, Hubei, China)

ABSTRACT Objective: To study the relationship between the lipoprotein lipase gene PvuⅡ polymorphism and type 2 diabetes mellitus. **Methods:** PCR-RFLP method was used to determine the PvuⅡ polymorphism of intron 6 in LPL gene in 156 samples[compatriot group(n=80): case group(n=40) and control group(n=40); randomly selected group(n=76): case group(n=58) and control group(n=18)]. **Results:** There were no significant differences in the genotype and gene frequency between cases and controls. **Conclusion:** The PvuⅡ polymorphism of LPL gene is not associated with type 2 diabetes mellitus in Hubei Han people.

Key words: Type 2 diabetes mellitus; Lipoprotein lipase gene; Polymorphism

2 型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)是由遗传因素和环境因素共同作用导致的一类代谢异常综合症,已成为影响 4% 世界人口的公共健康问题^[1]。在糖尿病的病理进程中,糖类、脂类及蛋白质代谢均发生了紊乱。有研究表明增高的血浆甘油三酯及脂肪酸通常与增加的胰岛素抵抗有关^[2],提示脂质代谢途径中的基因可能在糖尿病的发生发展中起一定作用。其中脂蛋白脂酶是(lipoprotein lipase, LPL)是脂质代谢的关键酶,主要催化乳糜微粒和极低密度脂蛋白中甘油三酯水解,产生供组织利用的脂肪酸和单酰甘油^[3]。它的缺陷或活性降低可导致血浆乳糜微粒和极低密度脂蛋白降解障碍,导致血浆甘油三酯水平升高、高密度脂蛋白水平降低,引起脂质代谢紊乱。本研究采用同胞对和随机病例-对照两种实验设计,目的是在湖北地区汉族人群中探讨 LPL 基因第 6 内含子 PvuⅡ酶切多态性与 2 型糖尿病的相关性,从而有利于阐明糖尿病的发病机理,早期发现易患人群,并及早进行预防。

1 材料和方法

1.1 研究对象

1.1.1 同胞对设计: 征得 40 个 T2DM 同胞对,其中病例组 40 人,平均年龄 49.40±12.45 岁,符合 1997 年 ADA 公布的新糖尿病诊断标准^[4]: 空腹血糖(FPG) ≥7.0 mmol/L,餐后 2 小时血糖 ≥11.1 mmol/L; 对照组 40 人,平均年龄 47.50±11.02 岁。

FPG<6.1 mmol/L,餐后 2 小时血糖<7.8 mmol/L。

1.1.2 随机病例-对照设计: 征得随机样本 76 例,其中病例组 58 人,平均年龄 55.34±13.56 岁;对照组 18 人,平均年龄 46.50±12.97 岁。T2DM 和对照的入选标准同上。

上述研究对象均来自湖北地区的汉族人群,调查和取样均征得受试者知情同意。

1.2 方法

测定了空腹血糖、餐后 2 小时血糖、收缩压、舒张压、体重、身高、腰围和臀围等临床指标,计算体重指数(body mass index, BMI)和腰臀比(WHR)。血液基因组 DNA 的提取采用酚-氯仿法, LPL 基因 PvuⅡ酶切位点多态性引物参照文献^[5]设计,由上海生工生物工程技术有限公司合成,上游引物序列为: ATGGCACCCTATGCTAAGGTG; 下游引物序列为: GTGAACCTCTGATAACAATCT; PCR 反应体系为 25μL,其中 dNTPs (10mmol/L) 0.5μL, Taq 聚合酶(北京华大中生科技发展有限公司) 1.5U, 上、下游引物(10μmol/L) 各为 0.5μL, 样本 DNA 2μL (约 0.1μg)。PCR 反应条件为: 94℃ 预变性 5min, 94℃ 变性 1min, 60℃ 退火 1min 72℃ 延伸 1min 共 30 个循环, 72℃ 延伸 7min。PCR 产物用 1.5U 限制性内切酶 PvuⅡ(MBI 公司)于 37℃ 水浴消化,过夜。消化产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳及溴化乙锭染色,凝胶成像系统拍照并判读基因型(图 1)。

1.3 统计学分析

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No.30340068), 湖北省自然科学基金资助项目(No.2005ABA132)

作者简介: 杜纪坤(1980-),男,硕士研究生,专业方向: 2 型糖尿病的候选基因研究, E-mail: hsdijk@mails.ccnu.edu.cn

(收稿日期: 2006-05-19 修回日期: 2006-05-20)

所有实验数据和调查资料在 Excel 软件中建立数据库, 运用基因计数法计算各组基因型频率及等位基因频率, 确认符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡, 研究样本有群体代表性。统计在 SPSS11.5 软件中进行, 两组间差异比较用 χ^2 检验和 t 检验, 计量资料均用 $\bar{X} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 T2DM 病例组和对照组一般特征的比较

所有对象经两组独立样本的 t 检验分析, 结果发现两组间的性别构成、身高、WHR、腰围、臀围、收缩压和舒张压相匹配, 无显著性差异 ($p > 0.05$), 病例组的年龄、体重、BMI、空腹血糖显著高于对照组 ($p < 0.05$)。根据实验设计进行分组分析, 发现同胞对两组间的性别构成、身高和舒张压相匹配, 无显著性差异 ($P > 0.05$), 但 T2DM 患者的年龄、体重、BMI、腰围、臀围、WHR、收缩压和空腹血糖显著高于对照组 ($p < 0.05$ 或 $p < 0.01$); 同胞对对照与随机病人相比, 两组间的性别构成、身高、体重、BMI 和腰围相匹配, 无显著性差异 ($P > 0.05$), 但病例组的年龄、WHR、血压和空腹血糖显著高于对照组 ($p < 0.05$ 或 $p < 0.01$)。以上分析表明, 病例组年龄、血压、肥胖和空腹血糖水平显著高于对照组, 提示年龄、血压、肥胖和空腹血糖是 T2DM 独立的危险因素。

2.2 限制性片段多态性琼脂糖凝胶电泳结果

LPL 基因第 6 内含子 PCR 扩增产物长 440bp, 经 PvuII 限制酶水解后可得到 3 种基因型, 即 $P+ P+$, $P+ P-$, $P- P-$ (含 PvuII 酶切位点的等位基因记为“ $P+$ ”, 无酶切位点的记为“ $P-$ ”)(图 1)。

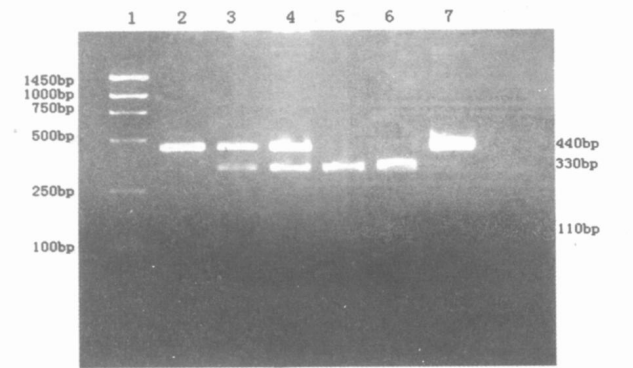


图 1 LPL 基因 PvuII 酶切多态性凝胶电泳图谱
Fig 1 LPL gene PvuII polymorphism analyzed by agarose gel electrophoresis. Lane 1: Diamond™ 250bp DNA marker; Lane 2: $P- P-$ (440bp); Lane 3, 4: $P+ P-$ (440, 330, 110bp); Lane 5, 6: $P+ P+$ (330, 110bp); Lane 7: PCR product

2.3 T2DM 组和对照组 LPL- PvuII 基因型及等位基因频率分布比较

表 1、表 2、表 3 列出了三组样本的 LPL 基因型和等位基因频率。卡方检验显示, 三种基因型及等位基因在糖尿病病例组和对照组间的分布频率无显著性差异 ($P > 0.05$)

表 1 所有样本的 LPL 基因型和基因频率分布 (%)
Table 1 Genotypic and allelic distribution of LPL polymorphism in all subjects (%)

组别	基因型频率 (%)			等位基因频率 (%)	
	$P+ P+$	$P+ P-$	$P- P-$	$P+$	$P-$
对照组	17(28.8)	27(45.8)	15(25.4)	61(51.7)	57(48.3)
病例组	21(21.6)	53(54.6)	23(23.7)	95(49.0)	99(51.0)
	$\chi^2 = 1.381, P = 0.501$			$\chi^2 = 0.218, P = 0.641$	

表 2 同胞对的 LPL 基因型和基因频率分布 (%)
Table 2 Genotypic and allelic distribution of LPL polymorphism in compatriot subjects (%)

组别	基因型频率 (%)			等位基因频率 (%)	
	$P+ P+$	$P+ P-$	$P- P-$	$P+$	$P-$
对照组	12(30.0)	16(40.0)	12(30.0)	40(50.0)	40(50.0)
病例组	9(22.5)	21(52.5)	10(25.0)	39(48.8)	41(51.2)
	$\chi^2 = 1.286, P = 0.526$			$\chi^2 = 0.025, P = 0.874$	

表 3 同胞对对照与非同胞病人的 LPL 基因型和基因频率分布 (%)
Table 3 Genotypic and allelic distribution of LPL polymorphism in control of compatriot subjects and non compatriot patients

组别	基因型频率 (%)			等位基因频率 (%)	
	$P+ P+$	$P+ P-$	$P- P-$	$P+$	$P-$
对照组	12(30.0)	16(40.0)	12(30.0)	40(50.0)	40(50.0)
病例组	13(22.4)	32(55.2)	13(22.4)	58(50.0)	58(50.0)
	$\chi^2 = 2.181, P = 0.336$			$\chi^2 = 0.000, P = 1.000$	

注: () 中的值表示该基因型占总数的比例。

Note: () indicates the proportion of any genotype in total

2.4 LPL 基因 PvuII 酶切多态性与临床变量的关系

表 4 列出了所有样本 LPL 基因 PvuII 位点多态性与临床变量的关系。其中三种基因型 $P+ P+$ 、 $P+ P-$ 、 $P- P-$ 间的年龄、身高、腰围、臀围、收缩压、舒张压、空腹血糖比较, 均无显著性差异 ($P > 0.05$), 但三种基因型间的体重、BMI 比较, 存在显著性差异 ($P < 0.05$), 将所有样本分为病例组和对照组进行分析, 对照组中: 三种基因型间的体重、BMI 等存在显著性差异; 病例组中: 各种临床变量则无显著性差异。

3 结果和讨论

人 LPL 基因位于 8q22, 长约 36bp, 包括 10 个外显子和 9 个内含子。目前, 在 LPL 基因中已检测出 140 多种突变, 其中 PvuII 酶切多态性位于 LPL 基因第 6 内含子, 是由 $C \rightarrow T$ 碱基替换形成。一般认为 $P+$ 等位基因与甘油三酯水平偏高和高密度脂蛋白水平偏低有关。由于 LPL 参与脂质代谢, 而脂质代谢与糖代谢密切相关, 因此许多研究将 LPL 基因作为糖尿病的候选基因进行研究^[6]。Wang 等^[7] 于 1996 年首次报道 LPL PvuII 基因型与糖尿病有关的研究结果, 发现 T2DM 组和对照组 $P+ P+$ 基因型分别占 50.9% 和 26.9%。他们推测 $P+ P+$ 基因型携带者为 T2DM 的高危个体。而国内有研究报道 PvuII 酶切多态性与 2 型糖尿病并无明显关联^[8]。

表 4 所有样本不同基因型间临床特征的比较
Table 4 Comparison of clinical characteristics between the genotypes of all LPL

变量	组别			P
	P+ P+ 型	P+ P- 型	P- P- 型	
年龄(岁)	50.34±13.65	50.94±13.35	50.68±12.26	0.974
身高(cm)	164.71±7.23	163.96±8.35	163.11±7.59	0.676
体重(kg)	68.93±12.43	62.96±10.22	64.05±12.22	0.028
BMI(kg/m ²)	25.35±3.98	23.32±2.60	23.97±3.70	0.008
腰围(cm)	65.38±28.01	73.63±27.97	79.03±22.58	0.137
臀围(cm)	75.63±31.03	83.72±26.43	87.14±23.71	0.245
WHR	0.90±0.07	0.88±0.18	0.90±0.06	0.783
收缩压(mmHg)	132.72±21.12	132.54±21.81	132.03±21.81	0.991
舒张压(mmHg)	80.86±15.78	82.79±17.17	80.09±11.70	0.686
空腹血糖(mmol/L)	9.36±5.65	10.32±4.35	8.78±5.54	0.310

本研究首次采用两种实验设计方法探讨 LPL 基因 Pvu ⑤多态性与湖北汉族人群 T2DM 相关性,即以未受累同胞为对照进行同胞对设计以及随机病例-对照设计。由于同胞对在生活方式、遗传背景等方面相似,进行统计分析时,可避免人群混居和分层产生偏倚,而随机病例-对照设计可克服同胞研究的过度匹配,两种结果互相补充。我们发现 LPL 基因 Pvu ⑤酶切多态性的基因型频率和等位基因频率在 T2DM 病例组和对照组间无显著性差异,推测湖北地区汉族人群 LPL 基因 Pvu ⑤酶切多态性与 T2DM 无明显关联。但 T2DM 患者体重、BMI、血压等显著高于对照组,推测肥胖、高血压是 T2DM 的独立危险因素。

由于研究对象的种族、地域差异,选择标准的不同以及 T2DM 的遗传异质性,许多研究结果并不一致^[7-9]。目前认为,内含子上的突变不会造成 LPL 氨基酸顺序和蛋白质结构的改变。我们所研究的 Pvu ⑤多态性与 T2DM 无显著相关性,可能该位点多态性对 LPL 的功能没有影响,也可能是本研究的样本量太少,限制了统计的准确性。因此,有必要通过大样本量和更多的标记位点进一步研究 LPL 基因多态性的改变对 LPL 功能的影响,阐明 LPL 基因多态性与 T2DM 的关系。

参考文献

[1] King H, Aubert RE, Herman WH. Global burden of diabetes, 1995-2025: Prevalence, numerical estimates, and projections [J]. Diabetes

Care, 1998,21(9): 1414~ 1431

[2] Haffner SM, Miettinen H, Insulin resistance implications for type ⑤diabetes Mellitus and coronary heart disease[J]. Am J Med, 1997, 103(2): 152~ 162

[3] 杨涛,林青云,曾文和,等.中国人 2 型糖尿病合并高甘油三酯血症患者脂蛋白脂酶基因突变及功能分析[J].中国医学科学院学报,2003,25(2): 134~ 141

[4] 许曼音.糖尿病学[M].第一版.上海:上海科学技术出版社,2003: 17

[5] Peacock E, Hansten A, Peter NE, et al. Association between LPLgene polymorphism and plasma correlations of lipids, lipoprotein and lipase activities in young MI survivors and age- matched healthy individuals from Sweden[J]. Atherosclerosis, 1992, 97(2): 171~ 178

[6] Jemma R, Fumeron F, Poirier O, et al. Lipoprotein lipase gene: associations with myocardial infarction and lipoprotein levels, the ECTIM study [J]. J Lipid Res, 1995, 36(12): 2141~ 2146

[7] Wang X L, McGredie R M, Wilcken D E. Common DNA polymorphisms at the lipoprotein lipase gene: association with severity of coronary artery disease and diabetes[J]. Circulation, 1996, 93(7): 1339~ 1345

[8] 沈洪兵,俞顺章,徐耀初,等.2 型糖尿病患者脂蛋白脂酶基因 Pvu ⑤酶切多态性的观察[J].中华医学遗传学杂志,2000, 17(1): 24~ 27

[9] 向光大,王颖群,夏邦顺,等.2 型糖尿病患者脂蛋白脂酶基因多态性与冠心病关系的研究[J].中华内分泌代谢杂志,2001, 17(6): 368~ 369

(上接第 40 页)

本实验通过大体观察、X 线检察、组织学观察、以及生物力学测定得出结论:以硫酸钙为载体的自体颗粒骨比单纯颗粒骨或单纯硫酸钙能更有效地修复骨缺损。硫酸钙作为颗粒骨的载体,解决了颗粒骨自身比较松散,缺少支架固定,容易移位溃散,难于塑形等问题。

参考文献

[1] 夏景君,闫景龙,张志鹏,等.颗粒骨和块状骨对骨髓基质细胞作用的实验研究[J].哈尔滨医科大学学报,2003,36(2): 141~ 143

[2] 张滨.硕士研究生毕业论文.微小颗粒骨在异位成骨过程中 BMP 的表达[D].哈尔滨:哈尔滨医科大学,2003, 5: 51~ 61

[3] Hogset O, Bredberg G. Plaster of paris: Thermal properties and biocompatibility[J]. Acta otolaryngol, 1986, 101: 445~ 52

[4] 刘好源,董星杰,应可满,等.自身骨泥成骨活性的实验研究[J].中

国矫形外科杂志,1999, 6(6): 440~ 443

[5] 侯占江,闫景龙,付海亮,等.微小颗粒骨异位成骨过程中成纤维细胞生长因子的表达[J].中华创伤杂志,2003, 19(12): 734~ 737

[6] 王宏伟,闫景龙,张滨,等.微小颗粒骨在异位成骨过程中 TGF- β1 的表达[J].临床骨科杂志,2004, 7(2): 217~ 221

[7] Coetzee AS. Regeneration of bone in the presense of calcium sulphate[J]. Arch otolaryngol, 1980, 106: 405~ 409

[8] Pelier LF. The use of plaster of paris to fill defects in bone[J]. Clin orthop RelatRes, 1961,21: 27~ 31

[9] Sidqui M, Collin P, Vitte C, et al. Osteoblast adherence and resorption activity of isolated osteoclasts on calcium sulphate hemihydrat[J]. Biomaterials, 1995, 16(17): 1327~ 1332

[10] Bell WH. Resorption characteristics of bone and bone substitutes[J]. Oral Surg O- ral Med.Oral Pathol, 1964, 17: 650~ 57