

# 三基因单核苷酸多态性与汉族人群 2 型糖尿病的相关性研究

杨桂<sup>1</sup> 谢意<sup>2</sup>

**[摘要]** 目的: 研究 rs3923113-GRB14, rs1802295-VPS26A, rs7178572-HMG20A 三基因单核苷酸多态性 (SNPs) 与 2 型糖尿病 (T2DM) 及相关代谢指标的相关性。方法: 用高分辨率溶解曲线 (HRM) 小片段基因分型方法检测 300 例 T2DM 患者及 300 例健康体检者 3 SNP 位点基因型及等位基因频率分布。结果: 各 SNP 基因型分布符合遗传平衡定律。rs231362 (KCNQ1) 的风险基因 C 患病风险是 T 等位基因的 1.058 倍 ( $P=0.012$ ,  $OR=1.058$ , 95%  $CI: 1.012 \sim 1.106$ )。rs231362 (KCNQ1) 的 3 种基因型 (TT, CT, CC) 在 T2DM 组与对照组中的分布频率分别为 0.7%、19.9%、75.6% 和 2.7%、25.6%、71.7%, 2 组基因型分布差异有统计学意义 ( $P=0.031$ )。该位点在其隐性模型中 (CC VS CT+TT), 2 组差异有统计学意义 ( $P=0.028$ ,  $OR=1.11$ , 95%  $CI: 1.01 \sim 1.22$ )。rs3923113-GRB14、rs7178572-HMG20A 基因型分布在病例组与对照组中未见显著性差异。我们分析了对照组血糖血脂与各 SNP 位点基因型之间的关系, rs3923113 在显性模型 [(TT+GT)/GG] 下 TT+GT 组总胆固醇 (TC) 值低于 GG 组; TT+GT 组高密度脂蛋白 (HDL-C) 1.07 (0.90~1.19) mmol/L 低于 GG 组 1.21 (1.02~1.41) mmol/L,  $P$  值分别为 0.017 与 0.036。结论: rs231362-KCNQ1 可能与中国人 T2DM 发病有关。rs3923113-GRB14 与 TC 及 HDL-C 升高有关。

**[关键词]** 2 型糖尿病; 基因; 单核苷酸多态性

**[中图分类号]** R587.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1004-2806(2013)12-0833-04

## Association study on three genes' single nucleotide polymorphisms and Type 2 diabetes mellitus

YANG Gui<sup>1</sup> XIE Yi<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan, 430071, China; <sup>2</sup>Wuhan Union Hospital)

Corresponding author: YANG Gui, E-mail: yg24680@sina.com

**Abstract Objective:** To investigate the relationship between single nucleotide polymorphism (SNPs) of rs3923113, rs1802295, rs7178572 and type 2 diabetes (T2DM) and related quantitative traits. **Method:** Three genes' genotypes were detected by high-resolution melting (HRM) in 300 T2DM patients and 300 controls. **Result:** There were no significant difference in genotype distributions of the rs3923113 on GRB14 gene and the rs7178572 on HMG20A gene. The rs231362 on KCNQ1 gene was found to be associated with T2DM. And the triglyceride levels were higher, while the high-density lipoprotein cholesterol was lower in TT and GT carriers than GG carriers of rs3923113. **Conclusion:** The rs231362 may be associated with T2DM in the Chinese population, and the rs3923113 may be associated with lipid metabolism disorders.

**Key words** Type 2 diabetes mellitus; gene; single nucleotide polymorphism

糖尿病 (DM) 是具有明显遗传倾向的多基因疾病, 是由遗传和环境因素共同作用而引起的一组以糖代谢紊乱为主要表现的疾病。2 型糖尿病 (T2DM) 是由于胰岛素抵抗和  $\beta$  细胞分泌缺陷导致高血糖的一种复杂多基因疾病。遗传因素在 T2DM 的发生发展中起着重要的作用。最近有研究报道 rs3923113-GRB14、rs7178572-HMG20A 及 rs231362-KCNQ1 与 T2DM 有关<sup>[1]</sup>。生长因子受体结合蛋白 14 (Grb 14) 是胰岛素信号通路中的一个效应器, 它直接抑制胰岛素受体的催化活性。可能与胰岛素信号下调及胰岛素敏感性有关<sup>[2]</sup>; 高迁

移率族 20A (HMG20A), 激活阻遏蛋白元件 1 沉默性转录因子 (REST) 的易敏基因, 在神经细胞的分化过程中起着关键作用<sup>[3]</sup>。电压门控钾通道亚家族 Q1 (KCNQ1) 基因在心脏中表达水平最高, 在内耳血管和胰腺等器官亦能高度表达与胰岛  $\beta$  细胞功能缺陷有关。因此, 本研究拟采用高分辨率溶解曲线 (high-resolution melting, HRM) 小片段基因分型方法检测这 3 个单核苷酸多态性 (SNP) 位点, 探讨其在中国人中是否与 T2DM 相关性。

### 1 资料与方法

#### 1.1 一般资料

收集 2011-04—2012-05 我院内分泌科确诊为 T2DM 的住院患者组 300 例, 男 200 例, 女 100 例;

<sup>1</sup> 武汉大学中南医院检验科 (武汉, 430071)

<sup>2</sup> 武汉经济技术开发区武汉协和医院 (西区) 检验科

通信作者: 杨桂, E-mail: yg24680@sina.com

平均年龄(55±6)岁。纳入标准为:①符合 1999 年世界卫生组织推荐的 DM 诊断及分型标准;②排除其他类型 DM、排除严重心血管疾病、甲状腺功能紊乱及恶性肿瘤者。收集同期我 3 代以内无 DM 病史并证实者 300 名作为对照组,男 200 例,女 100 例,年龄(53±5)岁。对照组血糖、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)均在正常范围内。个体间无血缘关系。本研究经武汉大学中南医院医学伦理委员会审核通过。所有受试者签署知情同意书。

所有受试者均空腹 12 h,晨起空腹肘静脉采血 2 管,1 管用于自动生化分析仪检测血糖血脂;另 1 管 EDTA 抗凝(1 ml),-80℃冰箱保存用于提取基因组 DNA。并对 T2DM 组行口服 75g 葡萄糖耐量试验(OGTT)。

### 1.2 主要仪器及试剂耗材

美国 ABI PCR 基因扩增仪-9700,高分辨率溶解曲线分析系统 LightScanner 32 +RT-PCR(LightScanner 32 Real Time PCR & HRM)-美国 Idaho 公司,LC Green 饱和荧光染料(美国 Idaho 公司),PCR 毛细管等。

### 1.3 基因组 DNA 提取及检测

用改良碘化钠法提取外周血基因组 DNA,经琼脂糖电泳鉴定,电泳条带均很亮。

### 1.4 引物

基因分型引物参照 Lu 等<sup>[4]</sup>的研究。PCR 产物大小为 52~61 bp。小片段引物详细信息见表 1。测序引物用 Primer 3 软件设计,引物信息见表 2。

### 1.5 高分辨率溶解曲线基因分型

以提取的 DNA 为模板进行小片段 PCR 扩增,反应条件为:DNA 模板 1 μl,25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 0.8 μl,10×Taq buffer with KCl 1 μl,2 mmol/L dNTPs 1 μl,上下游引物(10 μmol/L)各 0.5 μl,Taq DNA Polymerase 500 U 1 μl,LC Green 饱和

荧光染料 1 μl,ddH<sub>2</sub>O 3.2 μl,液体石蜡油 10 μl。PCR 循环参数:95℃预变性 2 min;95℃变性 30 s,Tm(具体见表 2)退火 30 s,72℃延伸 30 s,45 个循环;72℃终末延伸 7 min。将 PCR 产物转入 PCR 毛细管,置于 LightScanner 32 进行高分辨率溶解曲线基因分型<sup>[5]</sup>。程序为 premelting:94℃ 30 s,37℃ 30 s;melting:start from 60℃,peak 90℃,cool to 60℃。5%基因分型结果经测序验证。测序 PCR 扩增体系:MgCl<sub>2</sub> 2 μl,10×PCR Buffer 2.5 μl,2×dNTPs 2.5 μl,ddH<sub>2</sub>O 15 μl,上游引物 0.5 μl,下游引物 0.5 μl,Taq DNA polymerase 1 μl,DNA 模板 1 μl,总体积为 25 μl。扩增条件为 95℃ 5 min;95℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 30 s,共 50 个循环;72℃ 7 min。基因分型成功率在 95%以上。

### 1.6 统计学分析

所有统计计算用 SPSS13.0 进行。用  $\chi^2$  检验检验各 SNP 位点的基因型是否符合 Hardy-Weinberg 平衡,病例组与对照组各基因型和等位基因分布用  $\chi^2$  检验。计量资料进行正态性检验并用  $\bar{x} \pm s$  或中位数和四分位间距表示,两组计量资料用独立样本 *t* 检验或非参(Kruskal-Wallis)检验。每个 SNP 位点各基因型与计量资料之间的关系用非参(Kruskal-Wallis)检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

T2DM 与对照组间年龄、性别、HDL-C,BMI 无统计学差异,详见表 3。TC,TG,LDL-C 有统计学差异;对照组所有位点的基因型分布均符合 Hardy-Weinberg 平衡(*P* > 0.05),说明具有群体代表性,对照组等位基因频率与 HapMap 中国汉族人群数据库的数据近似。

rs231362(KCNQ1)的风险基因 C 患病风险是 T 等位基因的 1.058 倍,见表 4。该位点在其隐性模型中(CC VS CT+TT),2 组差异有统计学意义,

表 1 3 个 SNP 位点的 HRM 分型引物(5'-3')

| SNPs      | 上游引物                         | 下游引物                       | 产物/bp | Tm/℃ |
|-----------|------------------------------|----------------------------|-------|------|
| rs3923113 | TGAGAAAGCAACTGTGA            | CAATGAATGGATTTTATATTT-TAGC | 52    | 58   |
| rs7178572 | GAGAATTAAGAGAGCTGATAT-GATACG | CCTCATACGCAAAAATCTCTTAC-CA | 58    | 63   |
| rs231362  | TTACCATGGTCCTCTACGCTCG       | CTGTGTAGCTCAC-CTGCCTTTG    | 61    | 54   |

注:Tm 为 PCR 扩增过程中的退火温度。

表 2 3 个 SNP 位点测序引物

| SNPs      | 上游引物                 | 下游引物               | 产物/bp |
|-----------|----------------------|--------------------|-------|
| rs3923113 | ATTCTTATTCCAGGTCT    | CTATGTCCCATTTTGTAG | 327   |
| rs7178572 | CCTCCACCATCTAAAGCC   | GATTCTGCCCATCTCAAC | 337   |
| rs231362  | TCAGCCAACAGCAGTATCTC | AAGGCAAGCACCCACATT | 280   |

表 3 样本临床特征  $\bar{x} \pm s$

| 临床特征                           | T2DM 组                             | 对照组                 |
|--------------------------------|------------------------------------|---------------------|
| 性别/(男/女)                       | 300(200/100)                       | 300(200/100)        |
| 年龄/岁                           | 55±6                               | 53±5                |
| BMI/kg·m <sup>-2</sup>         | 24.34±4.09                         | 24.11±3.62          |
| HbA1C/%                        | 7.40<br>(6.40~9.00)                | NA                  |
| 空腹血糖/(mmol·L <sup>-1</sup> )   | 7.68<br>(5.89~11.05) <sup>1)</sup> | 4.77<br>(4.43~5.08) |
| 2 h 血糖/(mmol·L <sup>-1</sup> ) | 14.37<br>(9.94~19.7)               | NA                  |
| TC/(mmol·L <sup>-1</sup> )     | 4.61<br>(3.80~5.22) <sup>1)</sup>  | 4.15<br>(3.81~4.43) |
| TG(mmol·L <sup>-1</sup> )      | 1.37<br>(0.98~2.15) <sup>1)</sup>  | 0.94<br>(0.73~1.23) |
| HDL-C(mmol·L <sup>-1</sup> )   | 1.15<br>(0.92~1.45)                | 1.20<br>(1.02~1.41) |
| LDL-C(mmol·L <sup>-1</sup> )   | 2.48<br>(2.05~2.80)                | 2.40<br>(2.23~2.57) |

注:NA 表示数据不全,与对照组比较,<sup>1)</sup> $P<0.05$ 。

表 4 各位点等位基因频率与 T2DM 的关系

| Gene/SNP  | 等位基因 | 对照组 | T2DM | P     | OR<br>(95%CI)          |
|-----------|------|-----|------|-------|------------------------|
| GRB14     | G    | 107 | 85   |       |                        |
| rs3923113 | T    | 491 | 509  | 0.092 | 1.044<br>(0.997,1.097) |
| HMG20A    | A    | 373 | 386  |       |                        |
| rs7178572 | G    | 227 | 208  | 0.312 | 0.926<br>(0.797,1.075) |
| KCNQ1     | T    | 92  | 63   |       |                        |
| rs231362  | C    | 502 | 531  | 0.012 | 1.058<br>(1.012,1.106) |

见表 5。

因考虑 T2DM 组用药情况,我们只分析了对照组血糖血脂与各 SNP 位点基因型之间的关系,详见表 6。

3 讨论

3.1 rs3923113,rs7178572,rs231362 与 T2DM 的关系

本研究发现在中国人群中 rs231362(KCNQ1)与 T2DM 有关。有关 KCNQ1 基因与 T2DM 的关联研究很多,在南方、北方汉族人群、新加坡人、韩国及日本人中都有报道其与 T2DM 相关联。在以前的研究中,KCNQ1 在中国人中已被确定为 T2DM 危险因素<sup>[6]</sup>,但是 rs231362 这个新的 SNP 未被研究证实。此外周琦等<sup>[7]</sup>的研究认为 KCNQ1 基因的 rs2237896 与妊娠期糖尿病发病风险相关。说明 KCNQ1 在 DM 的发生发展确实中起着重要作用。

这 3 个 SNPs 基因型频率与 NCBI-CHB(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>)相符。但是本研究未得出 rs3923113 (GRB14), rs7178572 (HMG20A)与 T2DM 相关,而 Al-Daghri 等<sup>[8]</sup>在评估 38 个基因位点与沙特阿拉伯人 T2DM 关系研究中,首次报道了 HMG20A、KCNQ1 与沙特阿拉伯人 T2DM 相关。rs1802295(VPS26A)在胰腺及脂肪组织中表达,但是它在 T2DM 发病机制中的作用还未明确。不过 2012 年 Fukuda 等<sup>[9]</sup>在日本人群中,对 8318 例 T2DM 及 3001 例对照组进行了 7 个 SNP 位点的基因分型,其中包括 rs3923113, rs16861329,rs1802295,rs7178572。可能与样本量相对较小、地区及种群有关。

3.2 SNP 位点与相关的计量指标统计分析结果

对照组中 rs3923113 的 TC 及 HDL-C 在显性模式下有差异,可能与 GRB14 在脂肪组织中表达及向心性肥胖有关。在 Ridker 等<sup>[10]</sup>的研究中,GRB14 也与 HDL-C 相关。

综上所述,rs231362-KCNQ1 与中国人群 T2DM 发病有关。rs3923113-GRB14 与 TC 及 HDL-C 升高有关。

参考文献

[1] 黄青阳,程孟荣,姬森林.2 型糖尿病易感基因的连锁

表 5 各位点基因型分布频率及相应的 OR 值

| SNP       | 基因型 | 对照组 | T2DM | P     | 隐性模型  | OR(95%CI)          |
|-----------|-----|-----|------|-------|-------|--------------------|
| rs3923113 | GG  | 11  | 11   | 0.122 | 0.052 | 1.425(0.996,2.038) |
|           | GT  | 85  | 63   |       |       |                    |
|           | TT  | 203 | 223  |       |       |                    |
| rs7178572 | AA  | 111 | 121  | 0.578 | 0.472 | 0.833(0.505,1.373) |
|           | AG  | 151 | 144  |       |       |                    |
|           | GG  | 38  | 32   |       |       |                    |
| rs231362  | TT  | 8   | 2    | 0.031 | 0.028 | 1.11(1.01,1.22)    |
|           | TC  | 76  | 59   |       |       |                    |
|           | CC  | 213 | 236  |       |       |                    |

表 6 rs3923113 对照组显性模型下血糖血脂比较

| SNP       | 基因型   | FPG                 | P     | TC                  | P     | TG                  | P     | HDL-C               | P     | LDL-C               | P     |
|-----------|-------|---------------------|-------|---------------------|-------|---------------------|-------|---------------------|-------|---------------------|-------|
| rs3923113 | GG    | 4.53<br>(4.19,5.40) |       | 3.94<br>(3.41,4.02) |       | 1.15<br>(0.84,1.55) |       | 1.07<br>(0.90,1.19) |       | 2.25<br>(2.10,2.40) |       |
|           | TT+GT | 4.78<br>(4.44,5.08) | 0.325 | 4.16<br>(3.81,4.46) | 0.017 | 0.94<br>(0.73,1.22) | 0.098 | 1.21<br>(1.02,1.41) | 0.036 | 2.41<br>(2.24,2.57) | 0.076 |
| rs7178572 | AA    | 4.70<br>(4.37,5.03) |       | 4.16<br>(3.80,4.44) |       | 0.95<br>(0.73,1.23) |       | 1.17<br>(0.99,1.47) |       | 2.42<br>(2.24,2.56) |       |
|           | AG+GG | 4.78<br>(4.45,5.12) | 0.311 | 4.15<br>(3.82,4.43) | 0.949 | 0.92<br>(0.73,1.23) | 0.931 | 1.22<br>(1.04,1.38) | 0.621 | 2.39<br>(2.23,2.57) | 0.952 |
| rs231362  | TT    | 4.99<br>(4.48,5.22) |       | 4.19<br>(3.73,4.67) |       | 0.82<br>(0.61,1.16) |       | 1.19<br>(1.08,1.37) |       | 2.35<br>(2.23,2.56) |       |
|           | TC+CC | 4.77<br>(4.44,5.07) | 0.486 | 4.15<br>(3.81,4.43) | 0.788 | 0.94<br>(0.73,1.23) | 0.248 | 1.20<br>(1.02,1.41) | 0.993 | 2.40<br>(2.23,2.57) | 0.583 |

和关联研究[J]. 遗传学报, 2006, 7: 573-589.

- [2] 郑骄阳, 陆斌, 刘志民. 应用基因芯片技术对 2 型糖尿病胰岛素抵抗脂肪信号转导相关基因的研究[J]. 上海医学, 2005, 1: 23-26.
- [3] ARTEGIANI B, LABBAYE C, SFERRA A, et al. The interaction with HMG20a/b proteins suggests a potential role for beta-dystrobrevin in neuronal differentiation[J]. J Biol Chem, 2010, 285: 24740-24750.
- [4] LU S, XIE Y, LIN K, et al. Genome-wide association studies-derived susceptibility loci in type 2 diabetes: confirmation in a Chinese population[J]. Clin Invest Med, 2012, 35: 327-328.
- [5] HILL C E, DUNCAN A, WIRTH D, et al. Detection and identification of cytochrome P-450 2C9 alleles \*1, \*2, and \*3 by high-resolution melting curve analysis of PCR amplicons[J]. Am J Clin Pathol, 2006, 125: 584-591.
- [6] HU C, WANG C, ZHANG R, et al. Variations in KCNQ1 are associated with type 2 diabetes and beta cell function in a Chinese population[J]. Diabetologia, 2009, 52: 1322-1325.

[7] 周琦, 李伟, 郑景晨, 等. KCNQ1 基因单核苷酸多态性与妊娠期糖尿病相关性研究[J]. 生殖医学杂志, 2010, 19(1): 40-47.

- [8] AL-DAGHRI N M, ALKHARFY K M, ALOKAIL M S, et al. Assessing the contribution of 38 genetic loci to the risk of type 2 diabetes in the Saudi Arabian Population[J]. Clin Endocrinol (Oxf), 2013: 1111-1113.
- [9] FUKUDA H, IMAMURA M, TANAKA Y, et al. A single nucleotide polymorphism within DUSP9 is associated with susceptibility to type 2 diabetes in a Japanese population[J]. PLoS One, 2012, 7: 46263-46264.
- [10] RIDKER P M, PARE G, PARKER A N, et al. Polymorphism in the CETP gene region, HDL cholesterol, and risk of future myocardial infarction: Genomewide analysis among 18 245 initially healthy women from the Women's Genome Health Study[J]. Circ Cardiovasc Genet, 2009, 2: 26-33.

(收稿日期: 2013-06-18)

## 医学论文中英文摘要的书写规范(二)

### 1.7 用斜体来表示外来语, 特别是动植物名

例: 灯盏细辛对急性冠状动脉血栓形成后溶栓的影响

[误] Influence of Deng Zhan Xi Xin on thrombolytic treatment during acute coronary thrombosis

[正] Influence of *Erigeron breviscapus* on thrombolytic treatment during acute coronary thrombosis

例: 黄芪总皂甙对在体犬心功能的影响

[误] Effects of Astragalus saponins on dog cardiac functions in vivo (in living organism)

[正] Effects of *Astragalus saponins* on dog cardiac functions in vivo