

钙蛋白酶 10 基因多态性与贵阳地区人群 2 型糖尿病的相关性研究

鲍丽雅¹, 谢 渊^{2△}, 单可人², 张 婷², 肖 雁² (贵阳医学院: 1. 附属医院感染科实验室; 2. 分子生物学实验室, 贵阳 550004)

【摘要】 目的 探讨钙蛋白酶 10 (Calpain10) 基因第 3 内含子 SNP19 多态性与贵阳地区人群 2 型糖尿病 (T2DM) 遗传易感性的关系。**方法** 采用病例-对照研究设计, 对 74 例 T2DM 患者和 72 例健康对照应用聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性 (PCR-RFLP) 技术检测 Calpain10 基因 SNP19 位点多态性, 并与不同人群进行比较分析。**结果** 与对照组相比病例组 SNP19 基因型频率、等位基因频率均无显著差异, 与其他研究人群的结果相近。**结论** Calpain10 基因 SNP19 位点多态性可能与贵阳地区人群 T2DM 的发生无关。

【关键词】 2 型糖尿病; 钙蛋白酶 10 基因; 基因多态性; 贵阳

DIO: 10.3969/j.issn.1672-9455.2010.16.013

中图分类号: R587.1; R446.61

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2010)16-1691-02

Study on correlation between calpain 10 genetic polymorphism and type 2 diabetes mellitus in Guiyang area population
BAO Li-ya¹, XIE Yuan^{2△}, SHAN Ke-ren², ZHANG Ting², XIAO Yan². 1. Laboratory of Infectious Diseases Department; 2. Molecular Biologic Laboratory, Affiliated Hospital, Guiyang Medical College, Guiyang, Guizhou 550004, China

【Abstract】 Objective To investigate the relation of SNP19 polymorphism of intron 3 of calpain 10 gene with the genetic susceptibility to type 2 diabetes mellitus in Guiyang area population. **Methods** The case-control design was adopted. PCR-RFLP method was used to determine the distribution of allele and genotype frequencies of SNP 19 polymorphism (1/2) in intron 3 of calpain 10 gene in 74 patients with type 2 diabetes and 72 normal control subjects. The comparative analysis of the results in different populations was conducted. **Results** In two experiment design, the genotype and gene frequency between cases and controls had no significant difference ($P > 0.05$). The result was similar to that of other research groups. **Conclusion** The occurrence of type 2 diabetes mellitus may be little associated with the SNP19 polymorphism of calpain 10 gene in Guiyang area population.

【Key words】 type 2 diabetes mellitus; calpain 10; gene polymorphism; Guiyang

糖尿病是严重危害人类健康的常见病、多发病, 2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 是最常见的类型, 它是一种由遗传因素和环境因素交互作用的多因素复杂性代谢性疾病, 由于其遗传表型具有很大的异质性, 不同国家、不同种族其患病率明显不同。钙蛋白酶 10 (Calpain10) 基因是 Horikawa 等^[1]通过定位克隆技术确定的第 1 个 T2DM 易感基因, 能增加墨西哥裔美国人 T2DM 的发病风险, 随后的研究表明其作用有种族和人群的异质性。该基因变异导致糖尿病的机制目前尚不清楚, 为了探讨贵阳地区人群 Calpain10 基因与 T2DM 发病的关系, 作者选择新诊断的 T2DM 患者和非糖尿病的健康查体者为研究对象, 对 Calpain10 基因中 SNP19 多态性位点进行了研究。

1 对象与方法

1.1 对象 74 例 2 型糖尿病病例组选择近期在贵阳医学院附属医院内科住院的患者, 年龄 (58.2 ± 9.5) 岁, 符合 1999 年 WHO 诊断标准。健康对照组为贵阳医学院附属医院健康体检人群 72 例, 平均年龄 (55.9 ± 8.6) 岁, 均无心、肺、肝、肾及 2 型糖尿病家族史。

1.2 方法

1.2.1 DNA 的提取 采用酚/氯仿抽提法由外周血有核细胞

中提取基因组 DNA。

1.2.2 聚合酶链反应 (PCR) 采用 PCR 方法扩增 Calpain10 基因内含子 3 中含有 SNP19 多态位点的 DNA 片段, 上游引物: GTT TGG TTC TCT TCG CGT GGA G; 下游引物: CAT GAA CCC TGC AGG GTC TAA G, PCR 扩增体系为 25 μ L: 含 2.5 μ L 10 $\times$ PCR 缓冲液 (50 mmol/L KCl; 10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.3; 1.5 mmol/L MgCl₂; 0.1% 明胶), 1 μ L DNA 样品, 上、下游引物 (10 μ mol/L) 各 0.5 μ L, 2.0 μ L MgCl₂ (25 mmol/L), 1.5 μ L dNTP (2.5 mmol/L), 0.5 μ L Taq DNA 酶 (2.5 U/ μ L), 加双蒸水至 25 μ L。反应条件为 95 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 40 s, 58 $^{\circ}$ C 50 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s, 共 30 个循环, 最后于 72 $^{\circ}$ C 下延伸 7 min。

1.2.3 电泳及多态性检测 将扩增产物与溴酚蓝以 5:1 混合, 3% 含 EB 琼脂糖凝胶电泳, 约 200 V 30 min 后紫外分析仪下观察并拍照记录结果, 读取基因型。

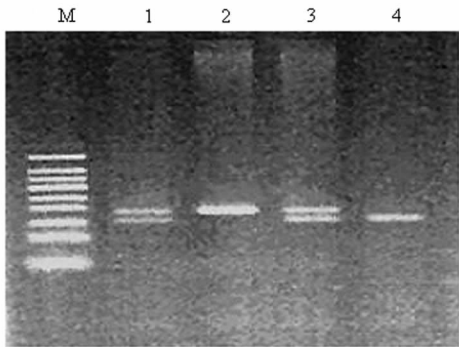
1.3 统计学方法 应用 SPSS11.5 软件进行数据分析。

2 结 果

2.1 电泳结果 Calpain10 基因 SNP19 多态性的 PCR 产物具有长度多态性, 等位基因 1 是 32 bp 的两次重复, 序列长度为 155 bp, 等位基因 2 是 32 bp 的 3 次重复, 序列长度为 187

[△] 通讯作者, E-mail: xieyuan1974@163.com。

bp, PCR 产物可直接电泳分为 3 个基因型: 11 纯合子 (155 bp)、22 纯合子 (187 bp)、12 杂合子 (155、187 bp), 结果见图 1。



注: M 表示标准分子量参照 (50/100/150/200/250/300/350/400/450); 1、3 泳道分别代表 12 杂合子 (155、187 bp); 2 泳道代表 22 纯合子 (187 bp); 4 泳道代表 11 纯合子 (155 bp)。

图 1 Calpain10 基因 SNP19 凝胶电泳结果

2.2 糖尿病组与对照组 SNP19 多态位点的基因型和基因频率分布及比较 SNP19 多态位点的基因型频率经遗传平衡定律检验均符合 Hardy-Weinberg 平衡法则, 表明各基因频率已达遗传平衡 ($P>0.05$), 所选择群体具有群体代表性。利用等位基因直接计数法, 根据基因型分别计算等位基因频率, 基因型和基因频率经 χ^2 检验后发现, 病例组与健康对照组之间差异无统计学意义, 结果见表 1。

表 1 Calpain 10 基因 SNP19 位点 1~2 多态性等位基因及基因型频率分布及比较

组别	n	基因型 (%)			等位基因 (%)	
		11	12	22	1	2
病例组	74	13(17.6)	32(43.2)	29(39.2)	58(39.2)	90(60.8)
健康对照组	72	10(13.9)	30(41.7)	32(44.4)	50(34.7)	94(65.3)
χ^2			0.576		0.625	
P			0.750		0.429	

2.3 不同人群中 Calpain 10 基因 SNP19 多态性的频率分布 不同人群中 Calpain 10 基因 SNP19 多态性等位基因频率资料统计见表 2。发现在贵阳地区人群中该多态性位点频率分布, 除低于墨西哥裔美国人的频率外, 与其他研究人群的研究结果相接近, 1/2 等位基因频率在病例组和健康对照组间分布无差异。而在安徽人群中 SNP19 的 1/2 等位基因频率在病例组和健康对照组间分布差异有统计学意义。

表 2 不同人群 Calpain 10 基因 SNP19 多态性等位基因频率

人群	健康对照组		病例组		P
	1	2	1	2	
中国北方汉族 ^[2]	0.34	0.66	0.33	0.37	0.35
中国南方汉族 ^[3]	0.45	0.55	0.41	0.59	0.32
湖北汉族 ^[4]	0.38	0.62	0.36	0.64	0.64
江苏 ^[5]	0.36	0.64	0.29	0.71	0.17
安徽 ^[6]	0.26	0.74	0.36	0.64	0.048
日本 ^[7]	0.37	0.63	0.41	0.59	0.56
美国 ^[8]	0.37	0.63	0.33	0.37	0.36
墨西哥 ^[1]	0.57	0.43	0.58	0.42	0.89
贵阳	0.35	0.65	0.39	0.61	0.43

3 讨论

Calpain 10 基因位于人类 2 号染色体长臂 NIDDM1 区内, 编码半胱氨酸蛋白酶 Calpain 10。Calpain 10 广泛分布于多种组织中, 参与细胞凋亡、增殖、分化等过程, 调节细胞内信号传导, 脂肪细胞分化以及胰岛素诱导的胰岛素受体 21(IRS21) 下调。最初由日本学者 Horikawa 等指出 Calpain10 基因的单核苷酸多态性位点与 T2DM 发病有关, 但此相关性存在明显的种群差异。SNP19 是一种类似于小卫星多态性的长度多态性, 位于 Calpain 10 基因内含子 6nt7919, 是 32 bp 的 2 次或 3 次重复多态, 在墨西哥裔美国人和欧洲白人中与 SNP43 多态性呈紧密的连锁不平衡, 与 T2DM 的遗传易感性密切相关。

在本研究中, 病例组和对照组均 SNP19 以 12 和 22 两种基因型为主, 而 11 基因型较少, 等位基因以“2”为主, “1”较“2”低。等位基因“1”在健康对照中为 34.7%, 病例组为 39.2%, 经检验两组之间无显著性差异, 表明在贵阳地区 Calpain 10 基因 SNP19 多态性与 2 型糖尿病的发生无关。通过对已报道的资料统计发现本研究结果与中国其他人群研究结果较为一致, 与日本、美国人群的 SNP19 多态性也类似, SNP19 多态性与 T2DM 并无关联, 这与墨西哥裔美国人有一定的差异。但邓香梅等^[5]报道, Calpain10 基因的 SNP19 与江苏地区人群 2 型糖尿病患者的高胰岛素和胰岛素抵抗相关。T2DM 其发病机制极其复杂, 牵涉到基因之间相互作用及基因与环境的作用, 具有遗传异质性和表型异质性, 在未来的研究中应进一步征集更多的样本, 对更多位点及单体型进行研究, 以期获得更加准确的结论。

参考文献

[1] Horikawa Y, Naohisa O, Cox NJ, et al. Genetic variation in the gene encoding Calpain10 is associated with type 2 diabetes mellitus[J]. Nat Genet, 2000, 26: 163-175.

[2] 纪立农, 陈陵霞, 韩学尧, 等. Calpain 10 基因多态性与中国人 2 型糖尿病遗传易感性的相关性研究[J]. 中国糖尿病杂志, 2002, 10(1): 7-10.

[3] Wu B, Takahashi J, Fu M, et al. Variants of calpain-10 gene and its association with type 2 diabetes in Chinese. Diabetes[J]. Res Clin Prac, 2005, 68(2): 155-161.

[4] 苏燕, 熊国梅, 彭妹彬. Calpain10 基因多态性与 2 型糖尿病的相关性研究[J]. 现代生物医学进展, 2006, 6(11): 41-43.

[5] 邓梅香, 陈军建, 俞力, 等. 钙蛋白酶 10 基因 Indel-19 与 2 型糖尿病及胰岛素抵抗的关系[J]. 四川医学, 2008, 29(7): 832-834.

[6] 周青. 钙蛋白酶 10 基因多态性与汉族人 2 型糖尿病遗传易感性的相关性研究[J]. 皖南医学院学报, 2008, 27(4): 246-249.

[7] Iwasaki N, Horikawa Y, Tsuchiya T, et al. Genetic variations in calpain-10 gene and the development of type 2 diabetes in Japanese[J]. J Hum Genet, 2005, 50(2): 92-98.

[8] Tsai HJ, Sun G, Weeks DE, et al. Type 2 diabetes and three calpain 10 gene polymorphisms in Samoans: 110 evidence of association[J]. Am J Hun Genet, 2001, 69(3): 1236-1244.