

瘦素基因多态性与土家族儿童单纯性肥胖的相关性

向波^{1,2}, 王晓春^{1△}, 符自清², 周明黎² (1. 中南大学湘雅医学院医学检验系, 长沙 410013; 2. 湖南湘西自治州人民医院检验科, 湖南吉首 416000)

【摘要】目的 探讨瘦素(LEP)基因单核苷酸多态性位点 rs3828942 与土家族儿童单纯性肥胖的相关性。**方法** 用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性技术分析 208 例单纯性肥胖儿童和 201 例健康对照儿童的 LEP 基因型及等位基因频率分布状况, 同时测定血脂和血红蛋白(Hb)水平。**结果** 肥胖和健康对照组 LEP 基因突变型(AA)、杂和型(AG)及野生型(GG)基因型频率分别为 57.2%、34.6%、8.2%和 54.2%、36.3%、9.5%, 两组等位基因频率分别为 74.5%、25.5%和 72.4%、27.6%, 两组基因型与等位基因频率差异均无统计学意义($P>0.05$); 肥胖与健康对照组 LEP 基因型频率在性别分层中差异均无统计学意义($P>0.05$)。肥胖组的三酰甘油和 Hb 水平高于健康对照组, 差异有统计学意义($P<0.05$), 肥胖组 AA 型 Hb 高于 GG 型与 AG 型, 差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** LEP 基因 rs3828942 位点多态性与土家族儿童单纯性肥胖及血脂水平无关联, 但对单纯性肥胖儿童 Hb 水平有一定影响。

【关键词】 瘦素; 基因多态性; 单纯性肥胖; 儿童; 土家族

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2011.10.030 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2011)10-1214-03

近 20 年来, 超重和肥胖正逐渐成为严重影响我国居民身体素质的问题之一, 特别是儿童超重和肥胖现象愈发严重。流行病学研究发现, 我国儿童单纯性肥胖率高达 7.2%, 接近欧美发达国家水平^[1]。这种现象得不到充分的认识和改观, 将给我国今后的疾病预防与治疗工作带来极大困难。目前认为瘦素(LEP)在机体脂肪含量和能量平衡的调节中发挥重要作用。LEP 基因突变会影响 LEP mRNA 的表达以及翻译产物的生理活性。国内有关 LEP 基因多态性与单纯性肥胖的相关性鲜有报道。本文针对 LEP 基因 rs3828942 位点多态性与湘西土家族儿童单纯性肥胖进行分析, 旨在从分子生物学角度探讨肥胖的遗传机制。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2009 年 1~9 月来本院儿保科体检的土家族儿童 409 人, 儿童单纯性肥胖诊断标准: 超过同身高同性别参照人群标准体质量的 20% 者定为单纯性肥胖儿童^[2]。肥胖组 208 例, 男 106 例, 女 102 例, 年龄 6~17 岁, 平均(11.5±3.6)岁; 健康对照组 201 例, 男 101 例, 女 100 例, 年龄 6~17 岁, 平均(11.2±3.9)岁。两组均排除继发性肥胖症且未服用激素与影响脂代谢的药物。两组间性别和年龄差异无统计学意义。

1.2 方法

1.2.1 血脂及血常规测定 抽取空腹 12 h 静脉血 3 mL, 分离血清, 用日立公司 7600 全自动生化分析仪测定三酰甘油(TG)、总胆固醇(TC)。血脂试剂由日本第一化学株式会社提供。另抽取 2 mL 静脉血予乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝, 于雅培公司 CELL-DYN3700 全自动五分类血细胞分析仪上测定血常规。同时严格执行室内质控程序。

1.2.2 全血基因组 DNA 提取 取 100 μ L EDTA 抗凝全血, 用 innogent 试剂盒提取全血基因组 DNA, -20 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.3 LEP 基因的扩增 用 Primer Premier5 设计 LEP 基因 rs3828942 多态性位点引物, 并用 Oligo6 验证, 引物序列为: 5'-GTC ACT GGA GAA GGG TTG G-3'; 5'-TTG GAG GAG

ACT GAC TGC TAT G-3'。引物由上海生工技术有限公司合成。聚合酶链反应(PCR)扩增反应体系 50 μ L, 其中 10 \times per buffer 5 μ L, 2 mmol/L dNTP 5 μ L, 25 mmol/L MgCl₂ 3 μ L, 引物各 1 μ L, 5 U/ μ L Taq 酶 0.2 μ L, 模板 2 μ L, 加 ddH₂O 补足 50 μ L。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 sec, 58 $^{\circ}$ C 30 sec, 72 $^{\circ}$ C 50 sec 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。扩增完后, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外透射仪上检测扩增产物。

1.2.4 PCR 扩增产物的基因型鉴定 取 PCR 产物 10 μ L, 用 AclI 内切酶(NEB 公司)5 U, 10 \times buffer 2 μ L, 加 ddH₂O 补足 20 μ L, 37 $^{\circ}$ C 酶解 3 h, 65 $^{\circ}$ C 20 min, 以 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 在凝胶成像系统中分析酶切产物基因型。

1.3 统计学方法 计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 组间差异进行方差分析, 样本间率的比较用 χ^2 检验。采用 SPSS13.0 进行统计学处理, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LEP 基因 rs3828942 位点多态性分布 见表 1。rs3828942 位点的扩增目的片段为 502 bp, 用限制性内切酶 AclI 消化扩增产物后, 突变型(AA 型)个体没有酶切位点, 只有 1 条条带, 即 502 bp 条带; 野生型(GG 型)个体有 1 个酶切位点, 酶切后产生 2 条条带, 即 329、173 bp 条带; 杂和型(AG 型)个体则有 3 条条带, 即 502、329、173 bp 条带。肥胖组与健康对照组基因型的分布均符合 Hardy-Weinberg 平衡定律($\chi^2=1.629, P>0.05$; $\chi^2=1.682, P>0.05$), 所选人群具有代表性。

2.2 肥胖组与健康对照组基因型及等位基因频率比较 见表 2。两组基因型的分布 AA 型均多于非 AA 型, 两组基因型的构成比差异无统计学意义($P>0.05$); 两组等位基因频率差异无统计学意义($P>0.05$), 见表 1。按性别分层后, 肥胖组与健康对照组 LEP 基因型差异均无统计学意义($P>0.05$)。

2.3 肥胖组和健康对照组血脂和血红蛋白(Hb)水平比较 见表 3。肥胖组 TG 和 Hb 水平平均高于对照组, 差异有统计学意义($P<0.05$), 有统计学意义。

2.4 肥胖组各基因型亚组间血脂和 Hb 水平的比较 见表 4。AA 型 Hb 水平高于 AG 型和 GG 型, 差异有统计学意义 ($P <$

0.05)。各基因型间 TG、TC 和红细胞(RBC)水平差异无统计学意义 ($P >$ 0.05)。

表 1 肥胖组和健康对照组 LEP 基因 rs3828942 位点基因型及等位基因频率 [$n(\%)$]

组别	n	基因型			等位基因	
		AA	AG	GG	A	G
肥胖组	208	119(57.2)	72(34.6)	17(8.2)	310(74.5)	106(25.5)
健康对照组	201	109(54.2)	73(36.3)	19(9.5)	291(72.4)	111(27.6)
P	—	0.804			0.490	

注:—表示无数据。

表 2 不同性别儿童 LEP 基因 rs3828942 位点基因型构成频率 [$n(\%)$]

组别	n	AA	AG	GG	χ^2	P
肥胖组(男)	106	54(50.9)	41(38.7)	11(10.4)	0.246	0.884
肥胖组(女)	102	55(53.9)	38(37.3)	9(8.8)		
健康对照组(男)	101	44(43.5)	43(42.6)	14(13.9)	1.436	0.488
健康对照组(女)	100	52(52.0)	36(36.0)	12(12.0)		

表 3 肥胖组和健康对照组血脂和 Hb 水平比较

组别	n	TG (mmol/L)	TC (mmol/L)	RBC ($\times 10^9/L$)	Hb (g/L)
肥胖组	208	1.76 \pm 1.13*	4.13 \pm 1.77	4.46 \pm 0.84	132.52 \pm 12.54*
健康对照组	201	1.35 \pm 0.91	4.06 \pm 1.85	4.51 \pm 0.75	129.59 \pm 11.20

注:与健康对照组比较, * $P <$ 0.05。

表 4 LEP 基因 rs3828942 位点不同基因型亚组血脂及 Hb 水平比较 ($n=208$)

基因型	n	TG (mmol/L)	TC (mmol/L)	RBC ($\times 10^9/L$)	Hb (g/L)
AA 型	119	1.63 \pm 1.31	4.16 \pm 1.63	4.33 \pm 0.82	133.64 \pm 12.66
AG 型	72	1.71 \pm 1.27	4.23 \pm 1.51	4.38 \pm 1.01	132.27 \pm 11.59*
GG 型	17	1.67 \pm 1.29	4.26 \pm 1.79	4.42 \pm 0.97	131.62 \pm 9.71*

注:与 AA 型比较, * $P <$ 0.05。

3 讨论

肥胖及所导致的代谢综合征、糖尿病、心脑血管疾病等严重危害人类的健康^[3]。国外学者认为, 儿童青少年肥胖与代谢综合征以及代谢综合征各组分之间存在联系, 而这些代谢异常是成年期心血管疾病发生的重要危险因素^[4]。Calcaterra 等对 191 名肥胖儿童青少年进行研究发现, 超重与正常体质量者的代谢综合征发生率分别为 12.0% 和 31.1%^[5]。尽管肥胖具有明显的遗传倾向但目前仍未发现明确的单一的致病基因。

LEP 基因位于 7 号染色体(q31.3), 由 3 个外显子和 2 个内含子组成, 共 16 352 bp。rs5932 位于 2 号内含子, 是 G 突变为 A, 并产生 1 个 A1eI 酶切位点。LEP 是一种主要由脂肪细胞合成的肽类激素, 通过与下丘脑受体结合发挥抑制食欲、减少能量摄入、增加能量代谢和降低体质量等生理作用。LEP 基因的缺陷和突变很可能直接或间接造成糖、脂代谢紊乱, 而糖、脂代谢紊乱又是肥胖症发生的主要诱因之一。Weker 发现, 儿童单纯性肥胖组 LEP 水平明显高于非肥胖组, 差异有统

计学意义 ($P <$ 0.01), 且 LEP 与体质量指数(BMI)有明显的相关性 ($r=0.48, P <$ 0.05)^[6]。Gardezi 研究证实, LEP 基因 3' 末端的微卫星遗传多态性影响 LEP 的表达, 在肥胖组 LEP 基因 I/I 型频率明显低于对照组, 差异有统计学意义 (0.4 vs 0.25, $P <$ 0.05), 携带 I/I 型人群患肥胖症可能性是 II/II 型的 1.9 倍^[7]。Mizuta 研究了该基因对机体食欲的影响作用, 发现 LEP A19G 基因多态性与肥胖人群对糖的偏爱有关^[8]。Wang 认为 LEP 基因启动子 -2548 G/G 多态性的非显性遗传与台湾重度肥胖(BMI \geq 35)人群相关^[9]。

本研究发现, 土家族人群 LEP 基因 rs3828942 位点存在多态性, 且 AA 型频率高于非 AA 型, 但未发现, 该多态性位点与土家族儿童单纯性肥胖存在明显相关性。为了探讨该多态性与性别的相关性, 将肥胖组与健康对照组分别按性别分层后, 亦未发现二者存在相关性。可能是由于单个多态性位点的遗传效应微弱, 或者是该位点存在种族异质性。儿童肥胖组的 Hb、TG 水平明显高于对照组, 而 RBC 数量差异无统计学意义。综合分析 Hb、TG 水平和 RBC 数量间的相互关系, 提示儿童肥胖组以上 3 项指标间变化可能是机体在 LEP 作用下营养过剩和脂代谢失衡的结果, 而非造血系统过度增生活跃所致。本研究亦发现, 儿童肥胖组 AA 型的 Hb 水平高于非 AA 型, 由此提示 LEP 与下丘脑中受体结合后, 通过相关信号转导途径发挥其对 Hb 代谢的调节作用, 从而间接影响单纯性肥胖人群 Hb 代谢。因此, 推测 LEP 基因 rs3828942 多态性可能与单纯性肥胖儿童的 Hb 水平存在相关性。

为进一步探明 LEP 基因与单纯性肥胖的相关性, 应进一步做多个遗传标记位点的连锁分析, 同时结合可能导致人群肥胖发生的环境危险因素作 logistic 回归分析。

参考文献

- [1] 全国儿童期单纯性肥胖症研究协作组. 全国 0~6 岁儿童期单纯性肥胖流行病学研究[J]. 中华儿科杂志, 2008, 46(3):179-184.
- [2] 杨锡强, 易著文. 儿科学[M]. 6 版. 北京: 人民卫生出版社, 2004:86.
- [3] 吴红梅, 白怀, 范平, 等. 中国肥胖患者 β_2 肾上腺素受体基因多态性的研究[J]. 四川大学学报: 医学版, 2009, 40(6):1056-1061.
- [4] Gunnell DJ, Frankel SJ, Nanchahal K, et al. Childhood obesity and adult cardiovascular mortality: a 57-y follow-up study based on the Boyd Orr cohort [J]. Am J of Clin Nutr, 1998, 67(6):1111-1118.

[5] Calcaterra V, Klersy C, Muratori T, et al. Prevalence of metabolic syndrome(MS)in children and adolescents with varying degrees of obesity [J]. Clinical Endocrinology, 2008,68(6):868-872.

[6] Weker H, Laskowska-Klita T, Ambroszkiewicz J, et al. Serum leptin level in prepubertal children with simple obesity. Part one[J]. Med Wieku Rozwoj, 2001,5(4):315-320.

[7] Gardezi AZ, Ziaei YZ, Marashi SM. Microsatellite polymorphism of the human leptin gene and risk of obesity [J]. J Crit Care, 2008,23(3):440-444.

[8] Mizuta E, Kokubo Y, Yamanaka I, et al. Leptin gene and leptin receptor gene polymorphisms are associated with sweet preference and obesity [J]. Hypertens Res, 2008,31(6):1069-1077.

[9] Wang TN, Huang MC, Chang WT, et al. G-2548A polymorphism of the leptin gene is correlated with extreme obesity in Taiwanese aborigines[J]. Obesity (Silver Spring), 2006,14(2):183-187.

(收稿日期:2010-12-26)

• 临床研究 •

白细胞计数在急性冠状动脉综合征患者预后中的作用

刘永朱¹, 黄莹¹, 杜景柏²(甘肃省白银市第一人民医院:1. 检验科;2. 心血管科 730900)

【摘要】 目的 探讨白细胞计数与急性冠状动脉综合征(ACS)的近期预后关系。**方法** 回顾分析白银市第一人民医院 2006 年 1 月至 2007 年 12 月心内科住院的 100 例 ACS 患者,分为低白细胞计数($<6.2 \times 10^9/L$)组、中白细胞计数($6.2 \sim 8.5 \times 10^9/L$)组、高白细胞计数($8.5 \sim 16.7 \times 10^9/L$)组。观察白细胞计数与 ACS 的 3 年病死率、年龄、性别、吸烟史、高血压史、糖尿病史、心电图结果、心绞痛、心肌梗死的关系。**结果** (1)高白细胞计数组吸烟者多,与其他两组比较差异有统计学意义($P < 0.01$),其余资料包括年龄、性别、糖尿病、高血压等差异无统计学意义。出院后发生心肌梗死的概率高白细胞计数组与其他两组差异也有统计学意义($P < 0.05$)。(2)中白细胞计数组病死率是低白细胞计数组的 2.89 倍(17.90%和 6.20%),差异有统计学意义($P < 0.05$),发生死亡的相对危险度(RR)是 1.609,95%可信区间(95% CI)为 1.142~2.266;高白细胞计数组病死率是中白细胞计数组的 1.86 倍(33.3%和 17.9%),差异有统计学意义($P < 0.05$),RR 为 1.470,95% CI 为 1.042~2.073,高白细胞计数组病死率是低白细胞计数组的 5.37 倍(33.3%和 6.2%),差异有统计学意义($P < 0.01$),RR 为 2.100,95% CI 为 1.571~2.807。**结论** 白细胞计数升高者多见于吸烟患者,其 3 年内发生心肌梗死、病死的概率明显增高。

【关键词】 白细胞计数; 急性冠状动脉综合征; 预后

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2011.10.031 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2011)10-1216-02

诸多研究认为炎症反应在冠状动脉粥样硬化性心脏病(冠心病)发展过程中起重要作用,和冠状动脉血栓的形成密切相关,是心血管事件的一项重要危险因素,冠心病是一种炎症反应性疾病。白细胞计数是炎症反应的一种简单标记物,其升高和冠心病的进展以及预后有一定关系。本文进行了白细胞计数和急性冠状动脉综合征(ACS)患者近期预后的临床研究,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 回顾性随机选择 2006 年 1 月至 2007 年 12 月白银市第一人民医院心内科住院的 100 例 ACS 患者。排除标准:(1)有急、慢性感染,肝、肾功能异常,恶性肿瘤,近期手术及创伤者;(2)合并充血性心力衰竭;(3)入院接受溶栓治疗者。100 例 ACS 患者中急性心肌梗死 51 例,不稳定性心绞痛 49 例。

1.2 仪器与试剂 使用日本 Sysmex 公司生产的 KX-21N 全自动血液分析仪;试剂为日本 Sysmex 公司生产的原厂配套试剂。

1.3 质量控制 使用日本 Sysmex 公司生产的原厂血液学质控物,每次测定的变异系数均在质控物测定范围之内。

1.4 实验方法 白细胞计数用乙二胺四乙酸二钾抗凝真空采血管(湖南省浏阳市医用仪器厂生产),抽取待测患者静脉血 1

mL,轻轻混匀。所有标本均在抽取后 1~3 h 内测定完毕。

1.5 资料的收集 收集患者的资料(包括年龄、性别、吸烟史、高血压史、糖尿病史、心电图结果等),同时检测入院 24 h 内患者的第 1 次血细胞分析。将患者的白细胞检测结果三分法,分成低白细胞计数($<6.2 \times 10^9/L$)组(30 例)、中白细胞计数 [$(6.2 \sim 8.5) \times 10^9/L$]组(33 例)、高白细胞计数 [$(8.5 \sim 16.7) \times 10^9/L$]组(37 例)。

1.6 研究方法 跟踪确认患者出院后 3 年心血管死亡情况,并分析病死率与白细胞计数之间的关系。ACS 诊断采用美国心脏病学会规定的标准^[1]。

1.7 统计学方法 所有数据应用 SPSS11.5 软件处理,组间数据的比较采用 χ^2 检验,采用多元回归分析处理各因素和预后的关系。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 白细胞计数分组资料 见表 1。白细胞计数增高组吸烟者多,与其他两组比较差异有统计学意义($P < 0.01$),其余资料包括年龄、性别、糖尿病、高血压等差异无统计学意义。出院后发生心肌梗死的概率高白细胞计数组与其他两组差异也有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 各白细胞组预后统计结果 见表 2。中白细胞计数组病死率是低白细胞计数组的 2.89 倍(17.90%和 6.20%),差异