

深圳汉族人中上游刺激因子 1 基因单核苷酸多态性与 2 型糖尿病之间的关系

陈 莉, 栗俊杰(广东省深圳市南山区蛇口人民医院检验科 518067)

【摘要】 目的 分析深圳汉族人中上游刺激因子 1(USF1)基因单核苷酸多态性(SNP)及其与 2 型糖尿病之间的相关性。方法 采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性分析(PCR-RFLP)结合琼脂糖凝胶电泳技术检测 137 例健康者及 64 例 2 型糖尿病患者 SNP(rs3737787) 基因型及等位基因频率分布,同时采用生化方法测定所有研究对象的血脂、血糖、胰岛素和 C-肽水平。结果 糖尿病组 SNP(rs3737787)等位基因频率显著高于对照组($P=0.006$)。CC 纯合子患糖尿病的风险是 TT 纯合子的 3.74 倍($OR=3.74, 95\%CI:1.56\sim 8.93$),且经 Logistic 回归分析,校正年龄、体质量指数和血浆高密度脂蛋白(HDL-C)、低密度脂蛋白(LDL-C)、血脂及糖化血红蛋白水平等其他混杂因素影响后,差异有统计学意义($OR=2.69, 95\%CI:1.25\sim 5.87$)。结论 在深圳汉族人群中以 USF1 中的 rs3737787 作为主要等位基因,与 2 型糖尿病发病风险高度相关。

【关键词】 上游刺激因子 1; 单核苷酸多态性; 2 型糖尿病

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2012.04.012 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2012)04-0408-03

Association of upstream transcription factor 1 (USF1) single-nucleotide polymorphism with type II diabetes mellitus in Han Chinese in Shenzhen CHEN Li, LI Jun-jie (Department of Laboratory, Shekou People's Hospital of Nanshan District, Shenzhen, Guangdong 518067, China)

【Abstract】 Objective To analyze the rs3737787 single nucleotide polymorphisms (SNPs) and its association with essential type II diabetes mellitus (DM). **Methods** The genotypes of rs3737787 polymorphism were determined in 137 healthy individuals and 64 patients with type II DM by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). Serum levels of lipids, glucose, insulin and C-peptide in these subjects were also estimated by biochemical methods. **Results** The frequency of the rs3737787 allele in DM patients was significantly higher than that of the control group (0.440 vs. 0.295, $P=0.006$). When compared with the TT genotype, CC homozygotes significantly increased DM risk ($OR=3.74, 95\%CI:1.56\sim 8.93$). By Logistic regression analysis, after adjusting the influence of confounding factors, the difference showed statistical significance ($OR=2.69, 95\%CI:1.25\sim 5.87$). **Conclusion** The major allele of rs3737787 in USF1 gene is highly associated with the occurrence risk of type II diabetes in Shenzhen area.

【Key words】 upstream transcription factor 1; single-nucleotide polymorphism; type II diabetes

人类家族性高脂蛋白血症染色体上 1q21-23 是上游刺激因子 1(upstream transcription factor 1, USF1)的识别区域,它是负责血脂血糖自身平衡的转录基因^[1]。自从有文献报道了墨西哥人与高加索人中高脂蛋白血症与 USF1 的相关性^[2],接下来发现了以色列人标本 USF1 与高脂蛋白血症,代谢综合症及相关并发症显著相关^[3]。在近来有前瞻性报告研究中,USF1 等位基因被证明与心血管疾病相关,并有一定的病死率^[4]。

在高脂蛋白血症,2 型糖尿病和低脂蛋白血症基因型和表现型之间存在的重叠性在 2 型糖尿病患者中是一个普遍存在的现象。家族性混合性高脂血症(FCHL)和 2 型糖尿病同时发生于胰岛素抵抗,倾向于早期心血管疾病。定位于染色体 1q21-23 的 USF1 不仅贡献于 FCHL^[1,5],而且最能代表 2 型糖尿病的基因区域。然而,USF1 对 2 型糖尿病贡献的敏感性均不及 FCHL^[6]。本文的研究报道了 SNP(rs3737787)与 2 型糖尿病显著相关。近年的研究没有提供统计学数据的支持^[7-8]。为了足够要评价 USF1 与 2 型糖尿病特定人群的相关性,笔者提供了全面的评价内容。本文主要通过研究深圳汉族人中 2 型糖尿病与健康人群中 USF1 基因 SNP rs3737787 的遗传多态性,来探讨深圳汉族人中 USF1 基因的遗传多态性与 2 型糖

尿病的发病风险是否相关。

1 资料与方法

1.1 一般资料

1.1.1 糖尿病组 2009 年 1 月至 2010 年 12 月在本院内内分泌科住院的无血缘关系的 2 型糖尿病患者,共 64 例,其中男 29 例,女 35 例,平均年龄(56.7 ± 15.5)岁。所有患者均按国际糖尿病-亚洲太平洋地区诊断标准进行确诊(随机血浆葡萄糖浓度大于 11.1 mmol/L),均采用口服降糖药治疗。

1.1.2 对照组 自 2009 年 1 月到 2010 年 12 月在本院门诊健康体检者,排除各种急性应激状态(如急性心肌梗死、脑梗死、感染、外伤、手术等),肝肾功异常,甲状腺功能异常以及血常规 $WBC\geq 10.0\times 10^9/L$ 和空腹血糖(FPG) ≥ 6.11 mmol/L 者。共入选对象 137 例,其中男 52 例,女 85 例,平均年龄(53.9 ± 13.6)岁。以上所有研究对象均来自无血缘关系的汉族人群。

1.2 方法

1.2.1 生化指标检测 研究对象均禁食 12 h 后取外周血分离血浆测定血脂水平。采用酶法测定血浆总胆固醇(TC)和三酰甘油(TG)水平(Beckman 试剂);直接测定法测定血浆高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)和低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)水平

(日本第一化学株式会社试剂);已糖激酶法测定 FPG 水平(Beckman 试剂),以上所有项目均在 BeckmanLs20 全自动生化分析仪上进行测定;BIORAD 免疫比浊法测定糖化血红蛋白 HbA1c;空腹胰岛素、空腹 C-肽在 i2000 化学发光仪上检测。

1.2.2 基因多态性检测 以改良碘化钠法提取基因组 DNA。引物设计参考文献[1],并委托大连宝生物技术有限公司合成。上游引物:5'-GATAGTCTCAAGATGCATTTAGGAC-3',下游引物:5'-CCACAGGAAGTGGAGGGACATT-3'。扩增反应在 DNA 扩增仪 MyCyclerThermal Cycler(Bio-Rad, USA)上进行。循环参数:95 °C 预变性 4 min,然后 95 °C 变性 30 s,58 °C 复性 30 s,72 °C 延伸 30 s,共 35 个循环,最后 72 °C 延伸 7 min。PCR 产物用限制性内切酶 Mse I (Fermentas 公司)消化过夜,酶切产物经 4% 琼脂糖凝胶电泳,EB 染色后经凝胶成像系统(GelDoc XR, Bio-Rad 公司)及配套软件分析记录。

1.3 统计学方法 应用 SPSS13.0 软件包进行统计分析^[7]。基因型和等位基因频率用基因计数法统计。基因型的 Hardy-Weinberg 平衡符合程度,基因型及组间等位基因频率比较采用 χ^2 检验,并以比值比(OR)和 95% 可信区间(CI)表示相对风险度。计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验,两组以上比较经方差齐性检验后进行单因素方差分析(One-way-ANOVA)。所有的统计检验均为双侧概率检验,以 $P < 0.05$

为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 USF1 SNP(rs3737787) 基因型及基因频率分布情况 见表 1。作者扩增了 rs3737787,基因扩增成功率大于 98%,SNP 符合 H-W 平衡,与以前研究相符合。SNP 存在完全连锁不平衡。USF1 SNP(rs3737787)基因在糖尿病组及对照组中的等位基因与基因型频率见表 1。经 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律检验($\chi^2 = 1.04, 0.25 < P < 0.50$ 与 $\chi^2 = 0.43, P > 0.50$),所有基因型在患者组及对照组中均符合遗传平衡,具有群体代表性。两组间基因型频率和等位基因频率存在明显差异,等位基因 C 的频率在糖尿病组显著高于对照组($P = 0.006$)。

2.2 USF1 SNP(rs3737787) 基因型与糖尿病的相关性 基因型频率的相对风险分析显示,CC 纯合子患糖尿病的风险是 TT 纯合子的 3.74 倍($OR = 3.74, 95\% CI: 1.56 \sim 8.93$),C 等位基因携带者患糖尿病的风险较非 C 等位基因携带者升高 3.25 倍($OR = 3.25, 95\% CI: 1.45 \sim 7.49$);经 Logistic 回归分析,校正年龄、BMI 和血浆 HDL-C、LDL-C、TG、TC 及 HbA1c 水平等其他混杂因素影响后,这种差异仍具有统计学意义($OR = 2.69, 95\% CI: 1.25 \sim 5.87$ 和 $OR = 2.57, 95\% CI: 1.22 \sim 5.38$) (表 2)。

表 1 糖尿病组与对照组 SNPrs3737787 基因型和等位基因分布频率[n(%)]

组别	n	基因型频率			等位基因频率	
		TT	TC	CC	T	C
糖尿病组	64	19(0.296)	35(0.550)	10(0.154)	73(0.560)	55(0.440)
对照组	137	69(0.508)	54(0.396)	14(0.099)	193(0.705)	81(0.295)
χ^2	—	8.82	—	—	7.72	—
P	—	0.012	—	—	0.006	—

注:—表示无数据。

表 2 SNPrs3737787 基因型与糖尿病风险性的关系

基因型	未校正模型			校正模型		
	OR	95%CI	P	OR	95%CI	P
TT	1	—	—	1	—	—
TC	2.07	0.65~6.94	0.231	2.06	0.68~6.43	0.202
CC	3.74	1.56~8.93	0.005	2.69	1.25~5.87	0.013
TC+CC	3.25	1.45~7.49	0.003	2.57	1.22~5.38	0.014

注:—表示无数据。

3 讨 论

USF1 是 2 型糖尿病位置和功能代表基因。本研究主要发现是 USF1 单核苷酸多态性尤其是 rs3737787 在深圳汉族人群中与 2 型糖尿病发病风险高度相关。近年的研究没有提供统计学数据的支持^[8-9]。

USF1 是双螺旋亮氨酸家族中普遍存在的转录信使。它调节 40 多个基因的表达,其中包括血脂、血糖的代谢。USF1 通过连接带有一致序列 CACGTG 的靶基因区域中的 E-box 调控转录调节,或者作为同源二聚体,但更多是作为与 USF2 相关的异二聚体。

在 USF1 中没有发现一种氨基酸能功能性解释观察到的相关性,然而连接细胞核蛋白位于 1q21-23 的 rs3737787 是转录调节的代表元素。在所有研究中,rs3737787 和 rs2073658 是相关变异中作用最大的,它提示了这些 SNP 是否是病原学

变异的真正原因。

本研究分析了在 USF1 中 SNPrs3737787 单核苷酸多态性与 2 型糖尿病的关系。本次研究发现,中国汉族人群 USF1 基因型频率和等位基因频率明显不同于国外报道。2 型糖尿病患者合并许多代谢异常如:肥胖、血脂异常和高血压等。在香港家庭糖尿病研究(HKFDS)中发现染色体 1q21-25 基因座子与 2 型糖尿病、代谢综合征和腹围明显相关。在其他人群中发现该染色体区域与 2 型糖尿病、糖耐量受损、代谢综合征、肥胖、血脂异常或者家族性混合性高脂血症(FCHL)相关^[10]。Pajukanta 等发现在芬兰人中染色体 1q22-23 区域的 USF1 SNPs 与家族性混合性高脂血症明显相关。迄今为止很少研究强调 USF1 基因的变异与糖代谢的关系。Putt 等在欧洲动脉粥样硬化调查研究中检测了 800 例年青男子 3 个 USF1 SNPs(其中一个 rs2073655,完全连锁不平衡 SNPs,在芬兰人中与家族性混合性高脂血症明显相关),发现通过口服葡萄糖耐量试验检测的血糖与之无明显相关性。最近在香港中国人中用单病例对照(家庭病例表现为 1q 连锁)分析报道了 USF1 SNPs (包括 rs3737787) 与 2 型糖尿病和(或)代谢综合征存在相关性,但是在大陆中国人中未重复过此实验。161 475 例法国患者的病例对照研究发现 8 个 USF1 SNPs (包括 rs3737787,rs2073658)与 2 型糖尿病无关。2006 年牛津大学调查了 1q 连锁的 3 726 例病例,1 215 例欧洲血统的病例和 832 例以家庭为基础的美洲印第安人的相关性研究,均排除了

USF1 的多态性影响 2 型糖尿病的遗传易感性。2008 年在 2000 例荷兰高加索人的 USF1 和 2 型糖尿病的相关性研究中发现二者存在正相关。

本项目进行中国汉族人中 USF1 基因的遗传多态性与 2 型糖尿病和(或)代谢综合征的研究,拟通过该实验来探讨深圳汉族人种的 USF1 基因的遗传多态性与 2 型糖尿病的发病风险是否相关。结果显示,SNPrs3737787 基因型频率和等位基因频率糖尿病组明显高于健康对照组($P < 0.025$),相对风险分析显示,C 等位基因携带者(TC+CC)患糖尿病的风险是 TT 纯合子的 3.25 倍($OR = 3.25, 95\% CI: 1.44 \sim 7.48$),提示 SNPrs3737787 等位基因可能与我国深圳汉族人 2 型糖尿病高度相关。

尽管 USF1 等位基因在现今的研究有少量风险性,但它对这个特定的人群有重要的影响。国外有研究报道在芬兰人中 USF1 SNPs rs2073655,75% 的标本携带 A 等位基因,它将对该人群中的 14% 有患病风险性。这就意味着这个种群没有这种基因的 SNP,2 型糖尿病发生率将降低 14%。

综上所述,通过本次的研究初步显示在深圳汉族人群中在 USF1 中 rs3737787 作为主要等位基因,与糖尿病发病风险高度相关。SNPrs3737787 基因多态性的检测有助于更好地了解糖尿病的发病机制,对糖尿病的早期干预具有积极的意义。

参考文献

[1] Pajukanta P, Lilja HE, Sinsheimer JS, et al. Familial combined hyperlipidemia is associated with upstream transcription factor1 (USF1) [J]. Nat Genet, 2003, 88(1): 371-376.
 [2] Coon P, Xin Y, Hopkins PN, et al. Hunt, Upstream stimulatory Factor 1 associated with familial combined hyperlipidemia, LDL cholesterol, and triglycerides [J]. Hum Genet, 2005, 117(5): 444-451.

[3] Ng MC, Miyake K, So WY, et al. The linkage and association of the gene encoding upstream stimulatory factor 1 with type 2 diabetes and metabolic syndrome in the Chinese population [J]. Diabetologia, 2005, 48(10): 2018-2024.
 [4] Komulainen K, Alanne M, Auro K, et al. Risk alleles of USF1 gene predict cardiovascular disease of women in two prospective studies [J]. PLoS Genet, 2006, 2(5): e69-e74.
 [5] Huertas-Vazquez A, Aguilar-Salinas C, Lasis AJ, et al. Familial combined hyperlipidemia in Mexicans: association with upstream transcription factor1 and linkage on chromosome 16q24.1, Arterioscler [J]. Thromb Vasc Biol, 2005, 25(9): 1985-1991.
 [6] Dickson ME, Tian X, Liu X, et al. Upstream stimulatory factor is required for human angiotensinogen expression and differential regulation by the A-20C polymorphism [J]. Circ Res, 2008, 103(9): 940-947.
 [7] 赵静, 周初. 单核苷酸多态性及其数据库的应用 [J]. 国际病理科学临床杂志, 2006, 26(2): 152-155.
 [8] Kato M, Wang L, Putta S, et al. Post-transcriptional up-regulation of Tsc-22 by Ybx1, a target of miR-216a, mediates TGF-beta-induced collagen expression in kidney cells [J]. J Biol Chem, 2010, 285(44): 34004-34015.
 [9] RamachandraRao SP, Zhu Y, Ravasi T, et al. Pirfenidone is renoprotective in diabetic kidney disease [J]. J Am Soc Nephrol, 2009, 20(8): 1765-1775.
 [10] 李晓品, 苏燕. 2 型糖尿病和易感基因研究的进展 [J]. 现代生物医学进展, 2009, 9(8): 1580-1581.

(收稿日期: 2011-08-06)

(上接第 407 页)

1 min 内可报告结果,尤其是糖尿病患者可随身携带自我监测血糖浓度。目前已普遍用于临床。血糖仪的准确性应与已经建立的实验室方法比较^[3]。

本实验中按方法来分,罗氏血糖分析仪采用的是干化学法,血气分析仪和全自动生化仪虽然都是湿化学法,但是前者采用的是电极法,后者采用的是氧化酶法;按照标本的不同来分,罗氏血糖仪和血气分析仪都是使用全血标本,而全自动生化分析仪使用的是血浆标本。虽然从方法和标本类型上有差别,但是从本实验的表 1 中可以看到罗氏血糖分析仪与日立 7080 型全自动生化分析仪所测血糖结果经 t 检验提示差异无统计学意义($P > 0.05$),说明这两种仪器测定血糖结果较一致,差异无统计学意义。从表 1 中可看到血气分析仪所测血糖结果与罗氏血糖分析仪及日立 7080 型全自动生化分析仪所测结果差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

血糖测定的方法和仪器的种类繁多,有学者表示,除做好各仪器的室内质量控制外,应建立参考实验方法,将其他仪器测定的结果与参考方法的结果进行比较,使各仪器间的结果有可比性,更准确、可靠^[4-5]。尤其应该注意的是便携式血糖仪应照有关规定严格管理,才能保证其检测结果的可靠性^[6]。因此,临床上应用不同的检测系统对其进行测定,找出其差异性,以比较测定结果是否具有可比性,从而为临床判断检验结果的

可接受度提供依据,以便更好地为临床服务。

参考文献

[1] The National Committee for Clinical Laboratory Standards. Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples [S]. Approved Guideline, Second Edition, EP9-A2, 2002.
 [2] 罗春燕. 中国加快糖尿病防控步伐——2009 糖尿病国际论坛探讨降低医疗负担的长期策略 [J]. 糖尿病新世界, 2009, 12(12): 66-68.
 [3] 邓济甦, 张菊萍. 3 款 POCT 血糖仪的性能分析 [J]. 检验医学与临床, 2011, 8(4): 430-431.
 [4] 冯泽霞, 揭素铭, 李志平, 等. 血清与肝素抗凝的全血标本血糖、葡萄糖测定结果比较 [J]. 广东医学, 1999, 20(2): 109-110.
 [5] 曾素根, 余霆, 庄利芳, 等. 6 种仪器测定血糖葡萄糖结果的相关性比较 [J]. 华西医学 2000, 15(4): 485-486.
 [6] 张有为, 曹美芳, 邓开萍. 几种快速血糖仪的性能分析 [J]. 临床和实验医学杂志, 2011, 10(11): 839-840.

(收稿日期: 2011-08-22)