

2 型糖尿病遗传易感性与 CAPN-10 基因多态性的相关性研究*

周 龙¹, 谭玉洁^{2△}, 王 焰², 马 莉² (1. 重庆三峡中心医院生化科 404000; 2. 贵阳医学院附属医院中心实验室, 贵阳 550001)

【摘要】 目的 探讨 2 型糖尿病(T2DM)遗传易感性与 CAPN-10 基因多态性的关系。方法 采用限制性片段长度多态性聚合酶链反应(PCR-RFLP)技术对 100 例 T2DM 患者(病例组)和 100 例健康者(对照组)CAPN-10 基因 SNP19(rs3842570)、SNP43(rs3792267)和 SNP63(rs5030952)多态性位点进行基因分型。结果 病例组 CAPN-10 基因 43 位点的 GG 基因型频率和 G 等位基因频率显著高于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 19 位点和 63 位点的基因型频率、等位基因频率在病例组与对照组分布差异均无统计学意义($P > 0.05$)。结论 CAPN-10 基因 SNP43(rs3842570)位点与 T2DM 的发生有相关性, 而 SNP19(rs3842570)和 SNP63(rs5030952)位点则与 T2DM 的发生无相关性。

【关键词】 2 型糖尿病; 遗传易感性; CAPN-10; 基因多态性

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2013.15.002 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2013)15-1923-03

Relationship between the genetic susceptibility and polymorphisms of CAPN-10 gene in type 2 diabetes mellitus ZHOU Long¹, TAN Yu-jie^{2△}, WANG Yan², MA Li² (1. Department of Biochemistry, Chongqing Three Gorges Central Hospital, Chongqing 404000, China; 2. Central Laboratory, Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang, Guizhou 550001, China)

【Abstract】 **Objective** To observe relationship between the genetic susceptibility and polymorphisms of CAPN-10 gene in type 2 diabetes mellitus (T2DM). **Methods** Restriction fragment length polymorphism polymerase chain reaction (PCR-RFLP) method was used to determine the distribution of allele and genotype frequencies of SNP19 (rs3842570), SNP43 (rs3792267) and SNP63 (rs5030952) polymorphism in CAPN-10 gene in 100 T2DM patients (case group) and 100 normal control subjects (control group). **Results** The frequencies of GG genotype and G allele of SNP43 in case group was significantly higher than that in control group ($P < 0.05$). There was no significant difference in genotypic frequencies and allele frequencies of SNP19 and SNP63 between case group and control group ($P > 0.05$). **Conclusion** The polymorphism of SNP43 in CAPN-10 gene may contribute to the genetic susceptibility to T2DM, but SNP19 and SNP63 in CAPN-10 gene may be not related to T2DM susceptibility possibly.

【Key words】 type 2 diabetes mellitus; genetic susceptibility; CAPN-10; gene polymorphism

据有关统计, 中国糖尿病患者人数已超过 9 000 万人, 居世界第一^[1]。其中, 2 型糖尿病 (T2DM) 占整个糖尿病人群 90% 以上, 是最主要和增长最快的糖尿病类型^[2]。T2DM 是一种由遗传因素和环境因素引起的复杂疾病, 其病因和发病机制尚不十分清楚。CAPN-10 基因是首次发现的 T2DM 易感基因, 国内外学者对该基因的部分位点展开了研究, 但研究结果尚存在争议。本文就 CAPN-10 基因 19、43 及 63 位点单核苷酸多态性 (SNP) 与 T2DM 遗传易感性是否相关进行了探讨。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2009 年 10 月至 2010 年 9 月于贵阳医学院附属医院内分泌科就诊、彼此间无亲缘的 T2DM 患者 100 例, 汉族, 年龄 (58.5 ± 8.6) 岁, 均符合 T2DM 诊断标准^[2]。另选 100 例体检健康且排除糖尿病及其他自身免疫性疾病和遗传性疾病、各项临床和实验室检查指标均无异常者纳入对照组。研究对象均符合伦理学要求, 经患者或体检者本人知情同意。抽取研究对象的静脉血 2 mL, 乙二胺四乙酸二钾抗凝, 采用酚-氯仿法提取基因组 DNA, -20 °C 保存备用。

1.2 方法

1.2.1 筛查程序及诊断标准 具糖尿病症状且任意时间血浆葡萄糖水平大于或等于 11.1 mmol/L (200 mg/dL); 或空腹血浆葡萄糖水平大于或等于 7.0 mmol/L (126 mg/dL); 或口服葡萄糖耐量试验中, 2 h 血糖水平大于或等于 11.1 mmol/L (200 mg/dL)。以上 3 种方法都可单独用于糖尿病诊断, 其中任何 1 种出现阳性结果, 必须用另 2 种方法中的任意 1 种进行复查以确诊。

1.2.2 聚合酶链反应 (PCR) 扩增 (1) PCR 引物序列: CAPN-10 基因 19、43 和 63 位点的引物由北京赛百盛公司合成 (引物序列见表 1)。(2) PCR 扩增反应体系: 9700 型 PCR 仪 (美国 ABI) 进行 PCR 反应, PCR 扩增体系 25 μL, 其中 Taq DNA 聚合酶 2.5 U, 4 种三磷酸脱氧核苷酸各 2 mmol/L, PCR 染料 2.5 μL, 10×PCR 缓冲液 (含 Mg²⁺) 2.5 μL, 上下游引物各 10 pmol 及模板 DNA 100 ng, 用超纯水将反应体积补足至 25 μL。(3) PCR 反应条件: 见表 1。

1.2.3 基因多态性分析 取上述 PCR 产物 5 μL, 点样于

* 基金项目: 贵州省贵阳市科技局资助项目 [筑科农字 (2008-9-2) 号]。△ 通讯作者, Tel: 13985189340。

2.5%琼脂糖凝胶点样孔中,120 V电压电泳 40 min 后在 DNA 扩增条带(即目的条带)。相应的 PCR 产物经特异性限制性内切酶酶切,电泳后根据电泳条带的位置判定基因型,见表 1。

表 1 CAPN-10 基因 3 种 SNP 位点分析方法

SNP 位点	引物序列	PCR 参数	内切酶反应	基因型判定
SNP19	F:5'-CTCTGCCTGCCGAAGTGA-3' R:5'-GGGAAAGCCGCTGTGTGTT-3'	94 °C 预变性 5 min;94 °C 30 s,58 °C 复性 30 s,72 °C 延伸 30 s,30 个循环后 72 °C 7 min	无需内切酶	11:372 bp;12:372 bp,404 bp; 22:404 bp
SNP43	F:5'-CACGCTTGCTGTGAAGTAATGC-3' R:5'-CTCTGATTCCTATGCTCTGTAG-3'	94 °C 预变性 5 min;94 °C 30 s,59 °C 复性 30 s,72 °C 延伸 30 s,30 个循环后 72 °C 7 min	NisI, 37 °C 水浴,6 h	GG:144 bp;GA:144 bp,121 bp,23 bp;AA:121 bp,23 bp
SNP63	F:5'-AAGGGGGCCAGGGCCTGACGGGGGT- GGCG-3, R:5'-AGCACTCCAGCTCCTGATC-3'	94 °C 预变性 5 min;94 °C 30 s,65 °C 复性 30 s,72 °C 延伸 30 s,30 个循环后 72 °C 7 min	HhaI, 37 °C 水浴,6 h	TT:192 bp;CT:192 bp,162 bp,30 bp;CC:162 bp,30 bp

注:SNP19 等位基因 1 为 2 个 32 bp 序列重复,等位基因 2 为 3 个 32 bp 序列重复。

1.3 统计学处理 使用 SPSS 11.5 软件进行数据分析。以 Hardy-Weinberg 平衡检验方法检验每组各位点基因频率在群体中的代表性;统计每组的各个基因位点的基因型、等位基因频率;各组之间基因型和等位基因的分布差异分析采用 χ^2 检验,计量资料的两组间比较采用 *t* 检验,以 ($\bar{x} \pm s$) 表示,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 遗传平衡定律检验 CAPN-10 基因 19、43、63 位点的基因型频率经 Hardy-Weinberg 定律检验,均符合遗传平衡法则,表明各基因频率满足遗传平衡($P > 0.05$),等位基因的分布具群体代表性,见表 2~4。

2.2 CAPN-10 基因 19、43、63 位点基因型、等位基因频率分布

2.2.1 病例组 CAPN-10 基因 19 位点基因型、等位基因频率分布 与对照组相比,差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 2。

2.2.2 病例组 CAPN-10 基因 43 位点基因型、等位基因频率分布 与对照组相比,病例组的 GG 基因型频率显著升高(90% vs 75%),差异有统计学意义($P < 0.05$);G 等位基因频率也显著升高(95% vs 87.5%),差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 3。

2.2.3 病例组 CAPN-10 基因 63 位点基因型、等位基因频率分布 与对照组相比,差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 4。

表 2 CAPN-10 基因 19 位点基因型、等位基因频率分布

组别	n	基因型频率(%)			χ^2	P	等位基因频率(%)		χ^2	P	Hardy-Weinberg 平衡检验(χ^2 值)
		11 型	12 型	22 型			1	2			
对照组	95	10	47	38	0.24	0.89	67	123	0.01	0.92	0.41
病例组	100	9	48	43			66	134			0.58

表 3 CAPN-10 基因 43 位点基因型、等位基因频率分布

组别	n	基因型频率(%)			χ^2	P	等位基因频率(%)		χ^2	P	Hardy-Weinberg 平衡检验(χ^2 值)
		GG 型	GA 型	AA 型			G	A			
对照组	100	75	25	0	4.68	0.031	175	25	0.008	7.05	2.21
病例组	100	90	10	0			190	10			0.01

表 4 CAPN-10 基因 63 位点基因型、等位基因频率分布

组别	n	基因型频率(%)			χ^2	P	等位基因频率(%)		χ^2	P	Hardy-Weinberg 平衡检验(χ^2 值)
		CC 型	CT 型	TT 型			C	T			
对照组	100	58	39	3	1.36	0.98	155	45	0.98	0.32	0.75
病例组	100	66	31	3			163	37			0.01

3 讨 论

CAPN-10 是钙蛋白酶家族的一员,为细胞内钙依赖的半胱氨酸蛋白酶,其活性受 Ca^{2+} 浓度调节,它存在于包括骨骼肌、肝脏、胰腺的许多组织中,并在这些组织中广泛表达,参与

多种细胞过程,包括细胞凋亡、增殖和分化等,调节细胞内信号转导、脂肪细胞代谢和糖代谢等过程^[3]。

有研究发现在人类、大鼠等许多哺乳动物体内的组织器官中均能检测到 CAPN-10 基因的 mRNA,并具有重要的生理作

用,该基因 mRNA 在胰、肌肉和肝脏中表达,可能与胰岛素分泌、胰岛素作用和肝脏中葡萄糖的产生有关^[4-5]。

近年来各国学者在不同种族中就 CAPN-10 基因与 T2DM 的关系进行研究,发现两者的关系有正相关也有负相关,研究结果存在差异^[6-8]。

国外学者在对突尼斯人群 CAPN-10 基因(SNP43、19、63)与 T2DM 相关性研究中发现,仅 SNP43 位点的等位基因 A ($OR=1.86$)和单倍体组合 121/221($OR=2.38$)增加了该地区人群患 T2DM 的风险,而 SNP19 和 SNP63 与 T2DM 则无关^[6]。此后又有学者对该人群进行大样本研究发现,CAPN-10 基因仅 SNP19 位点的变异和 111 单倍体组合增加了该地区人群患 T2DM 的风险,而未发现 SNP43 和 SNP63 与 T2DM 有相关性^[7]。

国内学者许青松等^[8]研究发现,韩国人群 CAPN-10 基因 SNP 分布与白人、美籍墨西哥人^[9]及美籍印第安人等种族间存在较大差异,与中国^[10-11]和日本^[12]人群较为相近,其 112/121 单倍体组合频率显著高于美籍墨西哥人。王丹等^[13]对大连地区汉族人群及陈小盼等^[14]对海南黎族人群的 T2DM 研究中均发现,CAPN-10 基因 SNP43 位点多态性与 T2DM 遗传易感性无关,提示 T2DM 的发生受环境、种族等诸多因素影响,并具有地域差异。

本研究课题同时对 CAPN-10 基因 SNP19、SNP43 和 SNP63 位点的多态性进行了观察,结果显示,病例组 SNP43 位点的 GG 基因型频率和 G 等位基因频率均明显高于对照组($P<0.05$),这与孙红霞等^[11]的研究结果较一致;而 SNP19、SNP63 位点的基因型频率、等位基因频率分布差异均无统计学意义($P>0.05$),这提示 CAPN-10 基因 SNP43 位点多态性与 T2DM 遗传易感性有关,而 SNP19、SNP63 位点则与 T2DM 的发生无关。19 位点等位基因 1、2 在 T2DM 病例组的频率分布与鲍丽雅等^[15]的研究结果基本一致,显示了在样本量足够的前提下,相同的基因位点在同一地区、相同种群的研究具有较好的重复性。从国内外对 CAPN-10 基因相关研究报道来看,研究结论大多显示 CAPN-10 基因 43 位点多态性与 T2DM 遗传易感性有关,而 19、63 位点多态性与 T2DM 的遗传易感性无关。

通过上述研究报道及本文研究不难证实,T2DM 受环境、种族、人群等诸多因素影响,并具有显著的地域和种族差异^[2]。究其原因,首先种族、地域、人群差异的影响较大;其次,遗传背景、环境、多基因对 CAPN-10 基因的影响较大,在同一个研究中,病例和对照可能选自不同遗传背景的人群,这种遗传背景的差异可能导致研究结果的差异;再次,研究对象的样本数量也可能导致差异的产生,研究对象的样本数量越大,群体代表性就越大,同时大样本研究会减少研究过程中出现的偶然误差,而采用小样本研究,这种偶然误差可能会对实验数据产生较大影响;最后,不同的实验方法也可能对研究结果产生一定的影响,这在小样本研究中表现得尤为明显。

以上对 CAPN-10 基因的研究,表明 CAPN-10 基因与不同种族 T2DM 遗传易感性相关,说明该基因在 T2DM 的发病中可能具有重要的作用,但不同种族人群中存在的影响 T2DM 遗传易感性的机制尚不清楚,有待进一步更深入的研究。

参考文献

- [1] 李枝萍,刘军,徐婷婷,等.我国 2 型糖尿病的流行病学及危险因素研究现状[J].西南军医,2010,20(4):754-756.
- [2] 中华医学会糖尿病学分会.中国 2 型糖尿病防治指南[M].北京:北京大学医学出版社,2007:9.
- [3] Horikawa Y. Calpain-10 (NIDDM1) as a susceptibility gene for common type 2 diabetes[J]. Endocr J, 2006, 53(5):567-576.
- [4] Seshiah V, Balaji V, Balaji MS, et al. Gestational diabetes mellitus manifests in all trimesters of pregnancy[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2007, 77(3):482-484.
- [5] 黄青阳,彭姝彬,杜纪坤,等.2 型糖尿病候选基因的研究进展[J].国际遗传学杂志,2006,29(6):446-453.
- [6] Kifagi C, Makni K, Mnif F, et al. Association of calpain-10 polymorphisms with type 2 diabetes in the Tunisian population[J]. Diabetes Metab, 2008, 34(3):273-278.
- [7] Ezzidi I, Turki A, Messaoudi S, et al. Common polymorphisms of calpain-10 and the risk of type 2 diabetes in a tunisian Arab population: a case-control study[J]. BMC Med Genetics, 2010, 11(11):75.
- [8] 许青松,许松姬,洪润哲,等.韩国人 calpain-10 基因单核苷酸多态性及其组合型的分析[J].中华医学遗传学杂志,2006,23(1):100-102.
- [9] Horikawa Y, Oda N, Cox NJ, et al. Genetic variation in the gene encoding calpain-10 is associated with type 2 diabetes mellitus[J]. Nat Genet, 2000, 26(2):163-175.
- [10] 陈陵霞,纪立农,韩学尧,等.2 型糖尿病家系 Calpain-10 基因多态性的研究[J].中华医学杂志,2003,83(21):1856-1859.
- [11] 孙红霞,张奎星,杜玮南,等.中国人 CAPN10 基因单核苷酸多态性的分布及其在北方汉族 2 型糖尿病患者中的关联分析[J].中国医学科学院学报,2002,24(3):228-233.
- [12] Horikawa Y, Oda N, Yu L, et al. Genetic variations in calpain-10 gene are not a major factor in the occurrence of type 2 diabetes in Japanese[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2003, 88(1):244-247.
- [13] 王丹,苏本利,李昌臣,等. Calpain-10 基因 43 位点单核苷酸多态性与 2 型糖尿病及胰岛素抵抗相关性的研究[J].中华糖尿病杂志,2005,3(13):190-191.
- [14] 陈小盼,宋钦华,陈志斌,等.海南黎族 2 型糖尿病患者 Calpain-10 基因多态性的实验研究[J].临床荟萃,2006,14(21):1000-1002.
- [15] 鲍丽雅,谢渊,单可人,等.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[J].检验医学与临床,2010,7(16):1691-1692.