

脂联素基因 SNP-11377 和 SNP-4522 单倍型与代谢综合征相关

李奕平¹, 杨 曼¹, 熊煜欣¹, 李显丽¹, 徐 波¹, 姚宇峰², 张 瑛^{1*}

(1. 云南省第二人民医院 内分泌代谢科, 云南 昆明 650021; 2. 中国医学科学院 北京协和医学院
医学生物学研究所, 云南 昆明 650118)

摘要:目的 探讨昆明地区汉族脂联素基因单核苷酸多态性(SNP)与代谢综合征的相关性。方法 采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性方法检测脂联素基因 SNP-11391、SNP-11377、SNP-4522、SNP + 45 和 SNP + 331 的基因型,分析以上5个多态性位点与代谢综合征的相关性。结果 (1)脂联素基因 SNP-11391 和 SNP + 331 不是昆明地区汉族的多态性位点;(2)在代谢综合征组中,SNP-11377G-SNP-4522T 单倍型频率低于对照组($P < 0.05$),而 SNP-11377C-SNP-4522T 和 SNP-11377G-SNP-4522C 单倍型频率高于对照组($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$)。结论 在昆明地区汉族群体中,SNP-11377G-SNP-4522T 单倍型可能降低患代谢综合征风险,而 SNP-11377C-SNP-4522T 和 SNP-11377G-SNP-4522C 单倍型可能增高患代谢综合征风险。

关键词: 脂联素基因; 单核苷酸多态性; 代谢综合征; 单倍型

中图分类号: R 589.9 文献标志码: A

Adiponectin gene SNP-11377 and SNP-4522 haplotypes are related to metabolic syndrome

LI Yi-ping¹, YANG Man¹, XIONG Yu-xin¹, LI Xian-li¹, XU Bo¹, YAO Yu-feng², ZHANG Ying^{1*}

(1. Dept. of Endocrinology and Metabolism, the Second People Hospital of Yunnan Province, Kunming 650021; 2. Institute of Medical Biology, CAMS & PUMC, Kunming 650118, China)

Abstract: Objective To investigate whether the adiponectin gene single nucleotide polymorphism(SNP) is associated with the metabolic syndrome. **Methods** Using polymerase chain reaction-based restriction fragment-length polymorphism (PCR-RFLP) we genotyped SNP-11391, SNP-11377, SNP-4522, SNP + 45 and SNP + 331 of adiponectin gene and estimated the association of the five SNPs with metabolic syndrome(MS). **Results** (1) Adiponectin gene SNP-11391 and SNP + 331 are not polymorphisms in Han population of Kunming City. (2) In MS group, SNP-11377G-SNP-4522T haplotype frequency is lower than control group ($P < 0.05$), SNP-11377C-SNP-4522T and SNP-11377G-SNP-4522C haplotype frequencies are higher than control group ($P < 0.05$ and $P < 0.01$). **Conclusion** In Han population of Kunming City, SNP-11377G-SNP-4522T haplotype may be related to lower risk of MS, and SNP-11377C-SNP-4522T and SNP-11377G-SNP-4522C haplotypes may be associated with higher risk of MS.

Key words: adiponectin gene(APM1); single nucleotide polymorphism(SNP); metabolic syndrome(MS); haplotype

收稿日期: 2010-03-19 修回日期: 2010-06-07

基金项目: 云南省教育厅科学研究基金(09C0296)

* 通信作者(corresponding author): lypyyf@yahoo.com.cn

代谢综合征(metabolic syndrome, MS)以中心性肥胖、糖调节受损、血脂异常和高血压为特征。流行病学和临床研究表明,MS的每一成分都是发生心血管病变的危险因素;同时合并多种代谢紊乱时发生心血管病的危险性更大。

MS的发生是复杂的遗传和环境因素相互作用的结果。全基因组扫描发现MS的易感位点位于3q27,编码脂联素的脂联素基因(adiponectin gene, *APM1*)位于其附近^[1],从而提示脂联素基因与MS可能相关。大量研究已报道脂联素基因单核苷酸多态性位点与MS和2型糖尿病相关^[2-4],但不同群体、不同地区的研究结果并不一致。

在以前我们对脂联素基因与MS的研究中,未发现脂联素基因SNP-11377、SNP+45和SNP+276与MS的相关性^[5]。本研究中,我们扩大样本量,并增加了SNP位点数,期望获得脂联素基因SNP-11391、SNP-11377、SNP-4522、SNP+45和SNP+331在昆明地区汉族中的分布情况及与MS的相关性。

1 材料与方法

1.1 研究对象

2006年10月至2009年2月云南省第二人民医院内分泌科住院的137名MS患者(男70,女67)为病例组。入选标准根据国际糖尿病联盟(International Diabetes Federation, IDF, 2006年)中国人诊断标准。中心性肥胖(男性腰围 ≥ 90 cm,女性腰围 ≥ 80 cm)及以下4项中的任意两项:(1)三酰甘油: ≥ 150 mg/dL(1.7 mmol/L),或正在接受调脂治疗;(2)高密度脂蛋白胆固醇:男性 < 40 mg/dL(1.03 mmol/L),女性 < 50 mg/dL(1.29 mmol/L),或正在接受调脂治疗;(3)血压:收缩压 ≥ 130 或舒张压 ≥ 85 mmHg(1 mmHg = 0.133 kPa),或既往诊断过高血压,正在接受治疗;(4)空腹血糖(fasting plasma glucose, FPG) ≥ 100 mg/dL(5.6 mmol/L),或既往诊断过糖尿病。131名健康对照为云南省第二人民医院体检的随机人群(男55,女76),行口服葡萄糖耐量实验糖代谢正常者,排除患高血压病及糖尿病家族史阳性的个体。所有参加者均是昆明地区汉族,实验前均签署知情同意书,相互之间无血缘关系。

1.2 人体测量

身高、体质量、腰围和臀围均由专业人员测量2次,取平均值。测量时被测者取站立位,测量腰围时两腿分开20~30 cm,测量位置在水平位髂前上棘和第12肋下缘连线中点;测量臀围时位置在环绕臀部的骨盆最突出点的周径。体质指数(body mass index, BMI) = 体质量(kg)/[身高(m)]²。腰臀比(waist to hip ratio, WHR) = 腰围/臀围。

1.3 实验室检查

空腹12 h清晨抽静脉血。HITACHI Automatic Analyzer 7600-020测定空腹血浆血糖(葡萄糖氧化酶法)。酶法测定总胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇、三酰甘油。Friedewald formula计算低密度脂蛋白胆固醇。免疫比浊法测定糖化血红蛋白。放射免疫法测定空腹血清胰岛素。稳态模型评价(homeostasis model assessment, HOMA)评估胰岛素抵抗程度。胰岛素抵抗指数(homeostasis model assessment, HOMA-IR) = [空腹血糖(mmol/L) × 空腹胰岛素(mU/L)]/22.5。

1.4 基因型测定

采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(polymerase chain reaction-based restriction fragment-length polymorphism, PCR-RFLP)方法检测脂联素基因SNP-11391、SNP-11377、SNP-4522、SNP+45和SNP+331的基因型。常规酚/氯仿法抽提外周淋巴细胞中DNA。PCR扩增产物以限制性核酸内切酶酶切,产物进行3%琼脂糖电泳,溴乙锭染色后紫外线检测。

1.4.1 脂联素基因启动子区SNP-11391A/G和SNP-11377C/G的基因型测定:扩增SNP-11391和SNP-11377的引物序列:上游引物:5'-TG GTG GACTT GACTTTACTGGTAG-3',下游引物:5'-TAGAAGCA GCCTGGAGA ACTG-3',扩增片段335 bp。PCR扩增产物分别以限制性核酸内切酶 *Alu* I (SNP-11391)和 *Hha* I (SNP-11377)于37℃酶切10 h。对于SNP-11391,PCR产物酶切后出现335 bp/200 bp/135 bp 3条片段者为SNP-11391A/G基因型,出现200 bp/135 bp 2条片段者为SNP-11391A/A基因型,出现335 bp 1条片段为G/G基因型。对于SNP-11377,PCR产物酶切后出现335 bp/213 bp/122 bp 3条片段者为SNP-11377C/G基因型,出现213 bp/122 bp 2条片段,为SNP-11377G/G基因型,出现335 bp 1

条片段者为 C/C 基因型。

1.4.2 脂联素基因靠近 5'端内含子 1 区域 SNP-4522C/T 基因型测定:扩增 SNP-4522 的引物序列^[6]:5'-GTTCTGACTTCCAAATCGGTG-3' 和 5'-CAT TAGAGTCAAAAGCAGGGC-3', 扩增片段 226 bp。PCR 扩增产物以限制性核酸内切酶 *Hinf* I 于 37 ℃ 酶切 10 h。PCR 产物酶切后出现 217 bp/144 bp/73 bp/9 bp 者为 C/T 基因型,出现 3 条片段 144 bp/73 bp/9 bp 为 C/C 基因型,出现 2 条片段 217 bp/9 bp 为 T/T 基因型。

1.4.3 脂联素基因外显子 2 区域 SNP + 45T/G 基因型测定:扩增 SNP + 45 的引物序列:5'-CTTGGTG AGGAAAGGAGAC-3' 和 5'-GAGGAATCAGAATATG AATG-3',扩增片段 745 bp。PCR 扩增产物分别以限制性核酸内切酶 *Sma* I (SNP + 45) 于 30 ℃ 酶切 10 h。对于 SNP + 45,酶切后出现 3 条片段 745 bp/456 bp/289 bp 为 G/T 基因型,出现 2 条片段 456 bp/289 bp 为 G/G 基因型,出现 1 条片段 745 bp 为 T/T 基因型。

1.4.4 脂联素基因外显子 3 区域 SNP + 331C/T 基因型测定:扩增 SNP + 331 的引物:5'-GGTTGTGAG TGGGAGCCACAGGGATG-3' 和 5'-GCTCCCCAGGAC TGGGAACATAGC-3'^[7],扩增片段 813 bp。PCR 扩增产物以限制性核酸内切酶 *Bst*-1107- I 于 37 ℃ 酶切 10 h。PCR 产物酶切后出现 3 条片段 813 bp/215 bp/598 bp 为 T/C 基因型,出现 2 条片段 15 bp/598 bp 为 T/T 基因型,出现 1 条片段 813 bp 为 C/C 基因型。

为验证所检测 SNP 位点的准确性,抽取部分样本直接测序,其结果与 PCR-RFLP 方法检测结果相同。

1.5 统计学分析

临床实验数据用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。用 SPSS12.0 软件进行统计学分析。 χ^2 检验检测 MS 组和对照组基因型、等位基因频率及其单倍型频率的差异。用 SHEsis 软件程序计算 5 个 SNP 位点的连锁不平衡及构建单倍型 ([http://analysis. bio-x. cn/myAnalysis. php](http://analysis.bio-x.cn/myAnalysis.php))。

2 结果

2.1 入选本研究的个体临床特征

MS 组个体的体质指数、腰围和臀围高于对照组

(表 1)。MS 组的胰岛素抵抗指数也显著高于对照组(表 1)。

表 1 入选本研究个体的临床数据
Table 1 Clinical characteristics of the control and MS group ($\bar{x} \pm s$)

item	control	MS
<i>n</i>	131	137
sex(male/female)	55/76	70/67
age(years)	35. 7 ± 13. 8	51. 1 ± 11. 7
body mass index(kg/m ²)	21. 0 ± 2. 7	25. 6 ± 3. 1 *
waist circumference(cm)	75. 2 ± 9. 3	92. 6 ± 8. 3 *
hip circumference (cm)	87. 6 ± 7. 3	98. 4 ± 7. 0 *
waist to hip ratio	0. 9 ± 0. 1	0. 9 ± 0. 1 *
total cholesterol (mmol/L)	4. 2 ± 0. 7	5. 0 ± 1. 0 *
triglycerides (mmol/L)	1. 17 ± 0. 6	3. 0 ± 2. 0 *
high-density lipoprotein-cholesterol (mmol/L)	1. 4 ± 0. 3	1. 2 ± 0. 3 *
low-density lipoprotein-cholesterol (mmol/L)	2. 3 ± 0. 5	2. 6 ± 0. 8 *
fasting plasma glucose (mmol/L)	4. 2 ± 0. 6	7. 9 ± 2. 2 *
HbA1c (%)	4. 3 ± 0. 8	9. 0 ± 2. 6 *
fasting insulin (mU/L)	12. 2 ± 6. 6	13. 3 ± 7. 6
HOMA	2. 3 ± 1. 3	4. 7 ± 3. 3 *

**P* < 0. 05 compared with control

2.2 MS 组和对照组的脂联素基因多态性比较

在昆明地区汉族中,SNP-11391 和 SNP + 331 位点不存在多态性。SNP-11377、SNP-4522 和 SNP + 45 的基因型和等位基因频率在 MS 组和对照组中无差异(表 2)。

由于脂联素基因 SNP-11377 和 SNP-4522 相连锁(*D'* = 0. 802),构建 SNP-11377 和 SNP-4522 位点单倍型,结果显示,SNP-11377C-SNP-4522T 和 SNP-11377G-SNP-4522C 单倍型在 MS 组的频率高于对照组(*P* < 0. 05, *OR* = 1. 615, 95% *CI*: 1. 050 ~ 2. 485 和 *P* < 0. 01, *OR* = 5. 804, 95% *CI*: 1. 480 ~ 22. 767) (表 3)。SNP-11377G-SNP-4522T 单倍型在 MS 组的频率低于对照组(*P* < 0. 05, *OR* = 0. 639, 95% *CI*: 0. 426 ~ 0. 959) (表 3)。

3 讨论

本研究对脂联素基因 SNP-11391、SNP-11377、

表 2 代谢综合征组 and 对照组脂联素基因单核苷酸多态性位点基因型和等位基因频率比较

Table 2 Comparison of genotypic and allelic distribution of five SNPs between MS and control

SNP	genotype(%)			allele(%)		odds ratio[95% CI]
	AA	AG	GG	A	G	
-11391						
MS	0. 0	0. 0	100. 0	0. 0	100. 0	
control	0. 0	0. 0	100. 0	0. 0	100. 0	
-11377						
MS	8. 3	34. 6	57. 1	25. 6	74. 4	1. 19[0. 81 - 1. 75]
control	6. 1	45. 8	48. 1	29. 0	71. 0	
-4522						
MS	20. 0	48. 1	31. 9	44. 1	55. 9	1. 02[0. 73 - 1. 44]
control	18. 3	52. 7	29. 0	44. 7	55. 3	
+45						
MS	50. 4	39. 3	10. 3	70. 1	29. 9	0. 82[0. 56 - 1. 21]
control	43. 1	45. 5	11. 4	65. 9	34. 1	
+331						
MS	100. 0	0. 0	0. 0	100. 0	0. 0	
control	100. 0	0. 0	0. 0	100. 0	0. 0	

表 3 代谢综合征组 and 对照组脂联素基因单核苷酸多态性位点单倍型频率比较

Table 3 The haplotype frequencies comparison between MS and control

		control	MS	odds ratio [95% CI]
-11377	-4522	frequency (%)	frequency (%)	
C	C	54. 4	50. 5	0. 86 [0. 61 - 1. 21]
C	T	16. 6	24. 3 *	1. 62 [1. 05 - 2. 49]
G	C	00. 9	5. 20 * *	5. 80 [1. 48 - 22. 77]
G	T	28. 1	20. 0 *	0. 65 [0. 43 - 0. 96]

**P* < 0. 05, * **P* < 0. 01 compared with control

SNP-4522、SNP + 45 和 SNP + 331 位点进行基因分型, 研究结果发现, 在昆明地区汉族中, SNP-11391

和 SNP + 331 不存在多态性。这一结果与其他中国汉族群体研究结果一致^[8-9], 但与其他白种人的结果存在差异^[10-11], 这可能是不同的遗传背景所造成的。在以前我们对脂联素基因与 MS 的研究中, 未发现脂联素基因 SNP-11377、SNP + 45 与 MS 的相关性^[5]。在本研究中, 尽管我们扩大了样本量, 但仍未发现 SNP-11377、SNP + 45 位点与 MS 相关。同时, 本研究也未发现 SNP-4522 与 MS 相关。

单倍型是倾向于以整体遗传给后代的 SNP 组合, 它可以提供比单个 SNP 更大的信息量。我们在基于连锁不平衡的基础上, 构建 SNP-11377 和 SNP-4522 单倍型, 结果显示, SNP-11377G-SNP-4522T 单倍型可能降低患 MS 的风险, 而 SNP-11377C-SNP-4522T 和 SNP-11377G-SNP-4522C 单倍型可能增高患 MS 风险。Vasseur 等^[12-13]对法国高加索人群的研究显示, 位于启动子区域的 SNP-11391G-SNP-11377G 单倍型与 2 型糖尿病相关。而对德国人群的研究提示, SNP-11391A-SNP-11377C 单倍型与增加的 2 型糖尿病风险相关^[10]。根据以上结果, 我们推测, 脂联素基因的 5' 非翻译区的 SNP 变异可能通过影响转录来影响脂联素的血清浓度, 从而增加或降低患 MS 和 2 型糖尿病的风险。

我们认为, 单个 SNP 位点和单倍型结果差异的原因可能是由于脂联素基因单个 SNP 位点具有的信息量和检验效能有限, 同时, 这些位点在 MS 及其表型上起到的作用很微弱, 从而未观察到显著性差异。与之相比, 单倍型分析可提供比单个 SNP 更大的信息量和检验效能, 从而更容易找到与 MS 相关的易感位点。

为全面探讨脂联素基因多态性位点与 MS 的相关性, 我们将在以后的研究中扩大样本量, 对脂联素基因其他多态性位点作进一步的研究, 并研究与脂联素相互作用的基因。

参考文献:

[1] Vionnet N, Hani EH, Dupont S, *et al.* Genomewide search for type 2 diabetes-susceptibility genes in French whites: evidence for a novel susceptibility locus for early-onset diabetes on chromosome 3q27-qter and independent replication of a type 2-diabetes locus on chromosome 1q21-q24 [J]. *Am J Hum Genet*, 2000, 67: 1470 - 1480.

- [2] 魏颖丽, 何兰杰, 霍正浩, 等. 脂联素基因 +45 位 T/G 多态性与 2 型糖尿病遗传易感性的相关性[J]. 基础医学与临床, 2008, 28: 940-943.
- [3] 王淑芳, 赵家军, 姜强, 等. 脂联素基因多态性与 2 型糖尿病相关性研究[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2007, 23: 51-52.
- [4] 宋现让, 王淑芳, 迟伟玲. 等位基因 3' 末端碱基特异性引物定量 PCR 检测人脂联素基因单核苷酸多态性[J]. 基础医学与临床, 2007, 27: 1026-1028.
- [5] 李奕平, 张瑛, 李显丽, 等. 脂联素基因 SNP-11377、SNP +45 和 SNP +276 与代谢综合征的相关性[J]. 临床荟萃, 2009, 24: 786-788.
- [6] Liu Hekun, Chen Suyun, Zhang Sizhong, *et al.* Adiponectin gene variation -4522C/T is associated with type 2 diabetic obesity and insulin resistance in Chinese[J]. J Genet Genomics, 2007, 34: 877-884.
- [7] Zietz B, Barth N, Scholmerich J, *et al.* Gly15Gly polymorphism within the human adipocyte-specific apM-I gene but not Tyr11His polymorphism is associated with higher levels of cholesterol and LDL-cholesterol in caucasian patients with type 2 diabetes[J]. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2001, 109: 320-325.
- [8] 王遂军, 贾伟平, 包玉倩, 等. 脂联素基因多态性与肥胖、血清脂联素水平的相关性[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12: 1295-1299.
- [9] 叶枫, 何岚, 李建宁, 等. 脂联素基因启动子区多态性与肥胖、2 型糖尿病的相关性[J]. 西安交通大学学报: 医学版, 2008, 29: 74-76, 83.
- [10] Schwarz PE, Govindarajulu S, Towers W, *et al.* Haplotypes in the promoter region of the ADIPOQ gene are associated with increased diabetes risk in a German Caucasian population[J]. Horm Metab Res, 2006, 38: 447-451.
- [11] Gu HF, Abulaiti A, Ostenson CG, *et al.* Single nucleotide polymorphisms in the proximal promoter region of the adiponectin (APM1) gene are associated with type 2 diabetes in Swedish caucasians[J]. Diabetes, 2004, 53 Suppl 1: S31-35.
- [12] Vasseur F, Helbecque N, Lobbens S, *et al.* Hypoadiponectinaemia and high risk of type 2 diabetes are associated with adiponectin-encoding (ACDC) gene promoter variants in morbid obesity: evidence for a role of ACDC in diabetes[J]. Diabetologia, 2005, 48: 892-899.
- [13] Vasseur F, Helbecque N, Dina C, *et al.* Single-nucleotide polymorphism haplotypes in the both proximal promoter and exon 3 of the APM1 gene modulate adipocyte-secreted adiponectin hormone levels and contribute to the genetic risk for type 2 diabetes in French Caucasians[J]. Hum Mol Genet, 2002, 11: 2607-2614.

孕妇多吃煎培根蛋可促进胎儿智力

据英国《BBC 新闻》(BBC NEWS)2010 年 1 月 11 日报道, 孕妇的饮食对胎儿的发育有直接影响早已被证实。科学研究发现, 吃猪肉制品和鸡蛋有助于胎儿的大脑发育。这项研究成果发表在 FASEB 杂志上。

科学家发现, 传统的西方早餐培根和蛋 (Bacon and eggs) 不只对健康有益, 其中的一种化学物质对大脑的生长有促进作用。对多种动物的多个研究结果也证明吃煎培根和蛋的效果。

科学家最新研究显示, 一种叫 choline (胆碱/维生素 B 复合体之一) 的矿物质微量营养元素对子宫中胎儿的与记忆相关的那部分大脑的发育至关重要。

美国北卡罗来纳大学 (University of North Carolina) 的科学家 Mihai G Mehedint 博士领导的团队在对大鼠的研究中发现, 低 choline 饮食的母鼠与高 choline 饮食的母鼠相比, 其幼鼠的大脑细胞出现了基因差异。

但是也有专家表示, 这只是让人们知道 choline 的作用, 而每个人的体质不同, 并且这一实验也未测试下一代的智力。专家建议, 研究并未证明孕妇也有相同效果, 均衡饮食重于有足够的 choline。

英国多家媒体报道, 煎培根蛋有益于孕妇这个复杂的实验只用在大鼠身上, 并没有人类的临床证明; 而且这项实验也未对大鼠智力或记忆做测试。

Choline 是一种营养素, 可在多种食物中找到, 而鸡蛋、小麦胚芽、培根和肝脏中含有大量的 choline; 另外, 牛奶、鸡肉和坚果也含有较高的 choline。

Choline 为美国的国家科学院食品委员会推荐的“必需营养素”, 是脑神经传递化学物质乙酰 choline 以及许多重要的化学信息物质的前体。Choline 与学习和记忆力有关, 而在大脑发育期, choline 也担负了刺激脑细胞分裂的重要使命, 怀孕与新生儿早期的足量 choline 补充对于脑细胞的发育以及学习力和记忆力有长久的影响, 甚至对于日后脑神经细胞的寿命延长都有帮助。