

SLC30A8 基因 rs13266634 多态性与内蒙古地区汉族人群 2 型糖尿病的相关性研究 *

李晓晶¹ 苏 燕^{1△} 闫朝丽^{2△} 张晶晶¹ 顾 丽¹ 秦文斌¹ 李彩萍² 李爱珍² 赵 静³

(1 包头医学院生物化学与分子生物学教研室 内蒙古 包头 014060 ;

2 内蒙古医学院第一附院内分泌科 内蒙古 呼和浩特 010050 3 包头医学院 2007 级卫生检验本科班 内蒙古 包头 014060)

摘要 目的:研究内蒙古地区汉族人群 SLC30A8 (solute carrier family 30, member 8) 基因 rs13266634 单核苷酸多态性(Single nucleotide polymorphism, SNP)的等位基因和基因型频率分布与 2 型糖尿病(Type 2 diabetes, T₂DM)的相关性。方法:采用等位基因特异性聚合酶链式反应(AS-PCR)对 222 例内蒙古地区汉族人(其中 T₂DM 组 125 例,正常对照 NC 组 97 例)rs13266634 进行基因分型。结果:T₂DM 组中 rs13266634 的 C 等位基因频率、CC 基因型频率分别为 61.2%和 28.4%,均显著高于 NC 组的 53.1%和 24.7%(P 值均 <0.05),而 T₂DM 组的 TT 基因型频率为 6.4%,显著低于 NC 组的 18.6%(P<0.05)。C 等位基因携带者患 T₂DM 的风险是 T 等位基因的 1.64 倍(OR=1.64, 95%CI=1.125-2.402)。结论:SLC30A8 基因 rs13266634 多态性位点的 C 等位基因可能是 T₂DM 的风险等位基因,该位点 C/T 多态性与内蒙古地区汉族人群 T₂DM 具有相关性,可能是内蒙古地区汉族人 T₂DM 的易感基因之一。

关键词:单核苷酸多态性;SLC30A8 基因;2 型糖尿病

中图分类号:R587.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2011)12-2221-03

Association of rs13266634 Polymorphism in SLC30A8 Gene with Type 2 Diabetes in Han Population of Inner Mongolia*

LI Xiao-jing¹, SU Yan¹, YAN Zhao-li², ZHANG Jing-jing¹, GU Li¹, QIN Wen-bin¹, LI Cai-ping², LI Ai-zhen², ZHAO Jing³

(1 Department of Biochemistry and Molecular Biology, Baotou Medical College, Baotou 014060, China;

2 Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical College, Hohhot 010050, China0

3 Health inspection 2007, Baotou Medical College, 014060, China)

ABSTRACT Objective: To study association of alleles and genotype frequencies of rs13266634 single nucleotide polymorphism in SLC30A8 (solute carrier family 30, member 8) gene with type 2 diabetes mellitus in Han population of Inner Mongolia. **Methods:** Using allele-specific polymerase chain reaction, the rs13266634 polymorphism of SLC30A8 gene was genotyped in 222 Han population of Inner Mongolia, including 125 patients with type 2 diabetes (T₂DM group) and 97 normal controls (NC group). **Results:** In T₂DM group, the frequencies of C allele and CC genotype of rs13266634 were 61.2% and 28.4% respectively, they were significantly higher than those (53.1% and 24.7%) in the NC group (P<0.05); The TT genotype was significantly lower than that of the NC group (P<0.05). The risk of T₂DM was significantly increased by C allele with T allelic odd ratio(OR) of 1.64 (OR=1.64, 95% CI=1.125-2.402). **Conclusion:** C allele of rs13266634 polymorphism site in SLC30A8 gene might be a risk factor of T₂DM, the site C/T polymorphism is associated with Type 2 diabetes and SLC30A8 gene might be a susceptible gene of T₂DM in Han population of Inner Mongolia.

Key words: Single Nucleotide Polymorphism; SLC30A8 gene; Type 2 Diabetes

Chinese Library Classification (CLC): R587.1 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2011)12-2221-03

前言

2007 年全基因组研究发现了人类 2 型糖尿病新的易感基因 SLC30A8。SLC30A8 基因位于人 8q24.11 编码含 369 个氨基酸的锌转运蛋白 8 (ZnT-8)。ZnT-8 位于胰岛 β 细胞中含有胰岛素颗粒的囊泡膜上,是参与胰岛素合成、储存和分泌的重要成分,在锌离子介导的胰岛素成熟和分泌过程中发挥着重要的作用^[1]。近年研究发现,SLC30A8 基因 rs13266634 单核苷酸多态性 (Single nucleotide polymorphism, SNP) 与 2 型糖尿病 (Type 2 diabetes, T₂DM)发病显著相关^[2-8]。由于种族遗传背景及

生存环境的不同,在不同种族中印证已报道的疾病相关基因或位点对人类复杂性疾病病理机制的研究具有重要意义。本研究采用等位基因特异性聚合酶链式反应(AS-PCR)方法,选取内蒙古地区汉族人群探讨 SLC30A8 基因 rs13266634 多态性是否与 T₂DM 相关。

1 材料与方法

1.1 研究对象

T₂DM 组和正常对照(NC)组抗凝血分别取自内蒙古医学院第一附属医院内分泌科住院和体检的内蒙古地区无血缘关

* 基金项目:内蒙古自治区科技计划项目(20090501)、内蒙古自然科学基金面上项目(2009MS1120)

和秦文斌科技助研基金项目(200911)的资助

作者简介:李晓晶(1978-),女,硕士研究生,讲师,主要研究方向:基因多态性。电话:15561269899 E-mail:jjl51@163.com。

△通讯作者:苏燕 E-mail:synmg@126.com 闫朝丽 E-mail:aliceyzl@126.com

(收稿日期:2011-02-06 接受日期:2011-02-28)

系的汉族人群。T₂DM 组 125 例(男 68 例,女 57 例,平均年龄 57.90± 10.37 岁,BMI 25.72± 3.23),NC 组 97 例(男 54 例,女 43 例,平均年龄 52.55± 8.98 岁,BMI 23.99± 3.33)。T₂DM 患者依据通用的 T₂DM 诊断标准进行诊断并确诊,排除 T₁DM、母系遗传糖尿病、继发性糖尿病和其他代谢性疾病。血样 50μL/管分装后,-40℃保存备用。

1.2 仪器

PCR 扩增仪(杭州博日科技有限公司),高速离心机(长沙湘仪有限公司),电泳仪,紫外分析仪(北京六一仪器厂)。

1.3 试剂

DNA 提取裂解液由包头医学院基因诊断研究所秦文斌教授惠赠,rs13266634C/T PCR 引物(sense: 5'-GTCTCCCTTC-CATAGT-3', anti-sense1: 5'-CGAACCACCTTGGCTGTCCCG-3' anti-Sense2: 5'-CGAACCACCTTGGCTGTCCCA-3')由北京奥科生物科技有限公司合成,2× Taq Mix (内含 10× PCR buffer、Mg²⁺、dNTP、Taq 酶等)购自北京博迈德科技发展有限公司,琼脂糖(西班牙进口),DL2000 DNA Marker、T 载体、DNA 凝胶回收试剂盒和质粒小量提取试剂盒均购自宝生物工程(大连)有限公司,其它化学试剂均为 Amersisco 进口分装。

1.4 研究方法

1.4.1 基因组 DNA 的提取 取冻存的抗凝血 50μL,室温融化。加双蒸水 1mL,混匀,室温静置 15min,3000rpm 3min,弃上清;加生理盐水至 1mL,混匀,3000rpm 3min,弃上清,加双蒸水至 1mL,混匀,3000rpm 3min,弃净上清。加裂解液 50μL,漩涡振荡 1min。沸水煮 10min,冷却,再漩涡振荡 1min,

12000rpm 5min。上清液中含有模板 DNA,-20℃保存备用。
1.4.2 SLC30A8 基因 rs13266634 多态性检测 采用等位基因特异性聚合酶连锁反应 (allele specific polymerase chain reaction, AS-PCR)扩增目的基因片段。

PCR 反应体系:总体积 10μL,其中 DNA 模板 1.5μL,2xTaq Mix 5μL,上、下游引物(10μmol/L)各 0.5μL,灭菌水 2.5μL。PCR 循环参数 94℃预变性 2min 后,94℃变性 30s,54℃退火延伸 30s,72℃延伸 45s,共 35 个循环,72℃终延伸 5min。扩增产物为 312 bp。

扩增产物检测:反应结束后,取 PCR 产物 10μL,加入 2μL 6× 载样缓冲液,进行 1%琼脂糖凝胶电泳,电压 100V,时间 30min,溴乙锭染色,紫外透射仪下观察扩增结果,判读不同的基因型。每种基因型产物均通过切胶回收连接 T 载体后,送北京博迈德科技发展有限公司进行测序。此外,抽取 10%的样本重复进行基因分型。

1.5 数据处理

应用 SPSS13.0 统计学软件。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,率的比较采用 χ^2 检验。通过 χ^2 检验判断多态性位点的基因型频率分布是否符合 Hardy-Weinberg 平衡,计算组间各基因型频率及等位基因频率,P<0.05 表示有统计学意义。

2 结果

2.1 临床参数的比较

T₂DM 与正常对照组的年龄、性别及 BMI 之间的差别无统计学意义(P>0.05)。

表 1 T₂DM 组和正常对照组的一般临床指标($\bar{x} \pm s$)
Table 1 General clinical indices of T₂DM group and NC group($\bar{x} \pm s$)

Index	T ₂ DM	NC
Sex(m/F)	68/57	54/43
Age(year)	57.90± 10.37	52.55± 8.98
BMI(kg/m ²)	25.72± 3.23	23.99± 3.33

注:与 NC 组比较 P>0.05
Note: Compared with NC group P>0.05

2.2 Hardy-Weinberg 平衡的结果

SLC30A8 基因 rs13266634 多态性位点的基因型频率分布在 NC 组($\chi^2=2.69$, P=0.10)和 T₂DM 组($\chi^2=0.07$, P=0.79)均符合 Hardy-Weinberg 平衡。说明样本具有群体代表性,能够反映内蒙古地区汉族人群的总体情况。

2.3 SLC30A8 基因 rs13266634 多态性电泳及测序结果

rs13266634C/T 位点 PCR 扩增产物长度为 312bp,得到 CC、CT 和 TT 三种基因型。三种基因型产物的测序结果表明扩增产物完全正确。此外,对 10%的样本重复进行基因分型,其一致率为 100%。

2.4 SLC30A8 基因 rs13266634 多态性位点等位基因和基因型频率分布

T₂DM 组的 rs13266634C/T 的 C 等位基因频率明显高于 NC 组 (61.2%vs53.1%, $\chi^2=6.63$, P=0.01),基因型频率分布在两

组中也有显著性差异 ($\chi^2=7.809$, P=0.02),其中 T₂DM 组的 CC 基因型频率(28.8%VS.24.7%)明显增加,而 TT 型频率显著减少(6.4%vs18.6%)。C 等位基因携带者患 T₂DM 的风险是 T 等位基因的 1.64 倍(OR=1.64, 95%CI=1.125-2.402)。

3 讨论

入选本实验的两组人群在性别、年龄和 BMI 上均互相匹配,用 AS-PCR 对 rs13266634 C/T 基因进行基因分型,操作简便、经济、重复性好。本研究对内蒙古地区汉族人群 222 例样本进行检测,结果显示 SLC30A8 基因 rs13266634 的 3 种基因型 C/C,C/T,T/T 在 T₂DM 组与 NC 组中的分布差异有统计学意义($\chi^2=7.809$, P=0.02),这与相关文献报道的欧洲、亚洲人群^[9-16]结果基本一致。T₂DM 组与 NC 组之间 C 等位基因频率的差异均有统计学意义 ($\chi^2=6.63$, P=0.01),C 等位基因携带者患 T₂DM 的风险约为 T 等位基因携带者的 1.64 倍。这提示 C 等位基因

表2 T₂DM组与NC组SLC30A8基因rs13266634位点基因型分布和等位基因频率
Table 2 Genotype distribution and allele frequencies of rs13266634 site in SLC30A8 between T₂DM group and NC group

Group	Case	Genotype(n[%])			Allele (%)	
		CC	CT	TT	C	T
T ₂ DM	125	36(28.8)	81(64.8)	8(6.4)	61.2	38.8
NC	97	24(24.7)	55(56.7)	18(18.6)	53.1	46.9
X ²		7.809			6.63	
P		0.02			0.01	

可能是T₂DM的风险等位基因,与相关文献报道的结果一致^[10,12,17]。因为SLC30A8基因编码产物ZnT-8是仅在胰腺β细胞表达的胰腺特异性的锌转运蛋白,而锌参与胰岛素的合成、贮存和分泌,SLC30A8基因变异可能导致ZnT-8的结构和/或功能异常,进而影响胰岛素的分泌导致T2DM的发病风险增加,但引起胰岛素分泌改变的机制尚不清楚,有待深入研究。此外,也有与本研究不同的结果报道^[18-19],这可能是由于地区及种族差异所致,也可能与检测人群的例数较少有关。

参考文献(References)

[1] Sladek R, Rocheleau G, Rung J, et al. Genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes [J]. Nature,2007,445: 881-885

[2] Zeggini E, Weedon M N, Lindgren C M, et al. Replication of genome-wide association signals in UK samples reveals risk loci for type 2 diabetes[J]. Science.2007, 316:1336-1341

[3] Palmer ND, Goodarzi MO, Langefeld CD, et al. Quantitative trait analysis of type 2 diabetes susceptibility loci identified from whole genome association studies in the insulin resistance atherosclerosis family study[J]. Diabetes.2008, 57 (4) : 1093-1100

[4] Hertel JK, Johansson S, Raeder H, et al. Genetic analysis of recently identified type 2 diabetes loci in 1, 638 unselected patients with type 2 diabetes and 1, 858 control participants from a Norwegian population based cohort (the HUNT study) [J]. Diabetologia.2008, 51 (6): 971-977

[5] Omori S, Tanaka Y, Takahashi A, et al. Association of CDKAL1, IGF2BP2, CDKN2A/B, HHEX, SLC30A8, and KCNJ11 with susceptibility to type 2 diabetes in a Japanese population [J]. Diabetes.2008, 57 (3): 791-795

[6] Scott LJ, Mohlke KL, Bonnycastle LL, et al. A genome wide association study of type 2 diabetes in Finns detects multiple susceptibility variants[J]. Science.2007,316:1341-1345

[7] Tabara Y, Osawa H, Kawamoto R, Onuma H, Shimizu I, et al. Replication study of candidate genes associated with type 2 diabetes based on genome-wide screening. Diabetes.2009, 58:493-498

[8] Takeuchi F, Serizawa M, Yamamoto K, Fujisawa T, Nakashima E, et al. Confirmation of multiple risk Loci and genetic impacts by a genome-wide association study of type 2 diabetes in the Japanese population [J]. Diabetes.2009, 58:1690-1699

[9] Horikawa Y, Miyake K, Yasuda K, et al. Replication of genome wide association Studies of Type 2 diabetes susceptibility in Japan[J]. Clin Endocrinol Metab.2008,93(8):3136-3141

[10] Ng M.C, Park K.S, Oh B, et al. Implication of genetic variants near TCF7L2,SLC30A8, HHEX,CDKAL1, CDKN2A/B, IGF2BP2 and FTO in Type2 Diabetes and obesity in 6719 Asians [J]. Diabetes. 2008,57(8):2226-2233

[11] Tabara Y, Osawa H, Kawamoto R, et al. Replication study of candidate genes associated with type2 diabetes based on genome-wide screening[J]. Diabetes,2009,58(2):493-498

[12] Xiang J, Li XY, Xu M, Hong J, Huang Y, et al. Zinc transporter-8 gene (SLC30A8) is associated with type 2 diabetes in Chinese[J]. Clin Endocrinol Metab, 2008,93:4107-4112

[13] Nicolson TJ, Bellomo EA, Wijesekara N, Loder MK, Baldwin JM, et al. Insulin storage and glucose homeostasis in mice null for the granule zinc transporter ZnT8 and studies of the type 2 diabetes-associated variants[J]. Diabetes, 2009,58:2070-2083

[14] Lee YH, Kang ES, Kim SH, Han SJ, Kim CH, et al. Association between polymorphisms in SLC30A8, HHEX, CDKN2A/B, IGF2BP2, FTO, WFS1, CDKAL1, KCNQ1 and type 2 diabetes in the Korean population[J]. Hum Genet, 2008,53:991-998

[15] Tan JT, Ng DP, Nurbaya S, Ye S, Lim XL, et al. Polymorphisms identified through genome-wide association studies and their associations with type 2 diabetes in Chinese, Malays, and Asian-Indians in Singapore[J].Clin Endocrinol Metab, 2010,95:390-397

[16] Wu Y, Li H, Loos RJ, Yu Z, Ye X, et al. Common variants in CDKAL1, CDKN2A/B, IGF2BP2, SLC30A8, and HHEX/IDE genes are associated with type 2 diabetes and impaired fasting glucose in a Chinese Han population [J].Diabetes. 2008,57:2834-2842

[17] 汪志红, 张素华, 王增产, 等. 中国汉族人群 SLC30A8 基因 rs13266634 多态性与 2 型糖尿病的关联 [J]. 上海医学,2008(31): 323-327

Wang Zhi-hong, Zhang Su-hua, Wang Zeng-chan, et al. Relationship of rs13266634 polymorphism in SLC30A8 (solute carrier family 30, member 8) gene with type 2 diabetes in Chinese Han population[J]. Shanghai Med J, 2008(31):323-327 (In Chinese)

[18] Lewis JP, Palmer ND, Hicks PJ, et al. Association analysis in african americans of European-derived Type2 diabetes single nucleotide polymorphisms from Whole-genome association studies[J]. Diabetes, 2008, 57(8):2220-2225

[19] Rong R, Hanson RL, Ortiz D, et al. Association analysis of variation in /Near FTO, CDKAL1, SLC30A8, HHEX,EXT2, IGF2BP2, LOC387761, and CDKN2B with type 2 diabetes and related quantitative traits in Pima Indians[J]. Diabetes, 2009, 58 (2) : 4782488