

胰岛素受体基因多态性与 2 型糖尿病的相关性^{*}

程孟荣¹ 沈俊² 李擎¹ 金波¹ 楼利高¹ 黄青阳^{1*}
(1 华中师范大学生命科学学院 湖北武汉 430079 2 湖北省宜昌市夷陵医院 湖北宜昌 443100)

摘要 目的: 探讨胰岛素受体基因 (INSR) 的第 8 外显子 NsiI 多态性与湖北汉族人群 2 型糖尿病的相关性; 方法: 采用同胞对(家系内对照) 和随机病例- 对照两种实验设计, 并结合聚合酶链反应- 限制性片段长度多态性 (PCR- RFLP) 技术分析了 224 个样本的 INSR 基因第 8 外显子 NsiI 多态性, 并测定了身高、体重、腰围、臀围、血压和空腹血糖等生理指标; 结果: 两种实验设计中对照组与病例组的基因型和基因频率均无显著差异; 结论: INSR 基因在湖北汉族人群 2 型糖尿病的发生发展中可能不起主要作用。

关键词: 胰岛素受体; 基因多态性; 2 型糖尿病; 相关性

Study on correlation between INSR gene polymorphism and type 2 diabetes mellitus

CHENG Meng-rong¹, SHEN Jun², LI Qing¹, JIN Bo¹, LOULi-gao¹, HUANG Qing-yang^{1*}

1 College of Life sciences, Central China Normal University, Wuhan 430079, Hubei, China

2 Yiling hospital, Yichang 443100, Hubei, China

ABSTRACT Objective: To investigate the correlation between insulin receptor (INSR) gene Nsi I polymorphism of exon 8 and type 2 diabetes mellitus in Hubei Han people. **Methods:** Both sib-pairs and random case-control designs were used. The genotypes in 224 samples were examined using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). Height, weight, blood pressure and fasting blood glucose were measured. **Results:** In two experimental designs, there were no significant differences in the genotype and gene frequency between cases and controls. **Conclusion:** Type 2 diabetes mellitus may be little associated with INSR gene NsiI polymorphism of exon 8 in Hubei Han people.

Key words: Insulin receptor(INSR) gene; Type 2 diabetes mellitus; Polymorphism; Correlation

1 引言

胰岛 β 细胞功能缺陷和胰岛素抵抗是 2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 的基本特征, 研究可能导致这两方面改变的候选基因的变异或表达异常是探讨 2 型糖尿病遗传因素的重要途径。而在胰岛素实现其生物学效应的过程中, 胰岛素受体发挥了相当重要的作用。因此, 胰岛素受体 (insulin receptor, INSR) 基因一直是 2 型糖尿病发生机制研究的热点之一^[1]。1991 年, Hanis 等发现 INSR 基因第 8 外显子具有多态性, 系 6244 位核苷酸由 G 转换为 A, 产生 NsiI 多态性。有研究表明, 该多态性与中国人群的原发性高血压有关^[2], 但它与中国人群 2 型糖尿病的关系国内尚未见有报道。本研究采用同胞对和随机病例- 对照两种实验设计在湖北地区征集样本, 旨在探讨该多态性与湖北汉族人群 2 型糖尿病的相关性。

2 研究对象与方法

2.1 研究对象

我们在湖北地区征集了 224 个汉族人样本, 分为 3 组进行分析: (1) 所有样本, 其中 2 型糖尿病患者 148 例, 符合 1997 年 ADA 公布的新糖尿病诊断标准^[3], 男 75 例, 女 73 例, 平均年龄 54.70 ± 12.33 岁; 对照组 76 例, 空腹血糖 (FPG) 低于 6.1 mmol/L , 餐后 2 小时血糖 (2h PG) 低于 7.8 mmol/L , 男 42 例, 女 34 例, 平均年龄 49.45 ± 11.59 岁。 (2) 同胞对样本, 共 52 个。 (3) 同胞对的对照和随机对照与无血缘关系的 2 型糖尿病患者, 其中 2 型糖尿病患者 96 例, 对照共 74 人。上述调查和取样均征得受试者本人同意并签署了知情同意书。

2.2 方法

2.2.1 基因组 DNA 的提取

常规酚/氯仿/异戊醇法提取基因组 DNA, Eppendorf 紫外分光光度计测定 DNA 浓度并标准化至 $50 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 。

2.2.2 INSR 基因第 8 外显子 NsiI 多态性检测

引物序列参考林从容等^[4], 上游为 $5' \text{CGGTCTGTGTAAGGTAAC} \text{CTG} - 3'$, 下游为 $5' - \text{GAATTCA} \text{CATTC} \text{CAAGACA} - 3'$, 在 $25 \mu\text{L}$ 反应体系中进行 PCR 扩增, 其

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 30340068), 湖北省自然科学基金资助项目

作者简介: 程孟荣 (1981-), 女, 河南夏邑人, 硕士研究生

研究方向: 人类基因组学, 电话: 13476107570 E-mail: chengmengrong@yahoo.com.cn

通讯作者: 黄青阳 (1963-), 男, 湖北孝感人, 教授

研究方向: 分子与统计遗传学, 电话: 027- 67861270 E-mail: qhuang@hotmail.com

(收稿日期: 2006- 03- 18 接受日期: 2006- 03- 30)

中 10× buffer 2.5μL, MgCl₂ 2μL, dNTP Mix 0.5μL, BSA 2.5μL, 上下游引物各 0.5μL、1 个单位的 Taq 酶(北京华大中兴科技发展有限公司)和 100ng 模板 DNA。PCR 扩增在 PCR 扩增仪(MJ Research PTC-200 型)上完成,反应条件为 93℃ 预变性 8min 后,进入循环:93℃ 30sec、55.5℃ 40sec、72℃ 1min,进行 35 个循环后于 72℃ 延伸 10min 终止反应。扩增产物经 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳确认扩增结果后,用限制性内切酶 Nsi I(MBI 公司) 0.6uL(10U/μL) 37℃ 水浴过夜酶切 PCR 产物,酶切产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳,电压 110V,电泳 55min,EB 染色,紫外灯下检测,凝胶成像系统照相。

2.2.3 部分临床生化指标的测定

测定了空腹血糖、餐后 2 小时血糖、收缩压、舒张压、体重、身高、腰围和臀围等生理生化指标,计算体重指数 (body mass index, BMI) 和腰臀比。

2.2.4 统计学处理

采用 SPSS 11.5 统计软件进行数据处理,基因型和等位基因频率采用直接计数法,确认符合 Hardy-Weinberg 平衡。计量资料均用 $\bar{x} \pm s$ (平均数 ± 标准差) 表示。两组间差异比较用 t 检验和 χ^2 检验, $P < 0.05$ 表示差异显著。相关分析采用 Logistic 回归法。

3 结果

3.1 病例组与对照组的临床资料比较

表 1 列出了所有研究对象的临床特征。我们对所有样本的临床特征进行两组独立样本的 t 检验分析,结果发现两组间的性别构成、身高、体重、BMI、腰围和臀围相匹配,差异无显著性,病例组的年龄、腰臀比、血压和空腹血糖显著高于对照组。根据实验设计进行分组分析,发现同胞对中两组间的性别构

成、身高、BMI、臀围相匹配,差异无显著性 ($P > 0.05$),但 2 型糖尿病患者的年龄、体重、腰围、腰臀比、血压和空腹血糖显著高于对照组 (配对 t 检验,资料未显示);同胞对的对照和随机征集的对照与无血缘关系的 2 型糖尿病组比较,发现两组间的性别构成、身高、体重、BMI、腰围和臀围相匹配,差异无显著性 ($P > 0.05$),但 2 型糖尿病组的年龄、腰臀比、血压和空腹血糖显著高于对照组 (两组独立样本的 t 检验,资料未显示)。这与目前公认的 2 型糖尿病危险因素基本一致。

表 1 所有研究对象的临床特征($\bar{x} \pm s$)			
Table 1 Clinical characteristics of total study populations ($\bar{x} \pm s$)			
临床特征	对照组 (n=76)	病例组 (n=148)	P 值
性别(M/F)	M(42)/F(34)	M(75)/F(73)	0.52
年龄 (years)	49.45 ± 11.59	54.70 ± 12.33	< 0.001*
身高 (cm)	164.21 ± 8.07	163.74 ± 7.74	0.67
体重 (kg)	63.35 ± 10.76	65.21 ± 11.16	0.24
BMI (kg/m ²)	23.55 ± 3.19	24.15 ± 3.19	0.19
腰围 (cm)	74.23 ± 20.76	79.83 ± 22.91	0.11
臀围 (cm)	88.07 ± 22.26	88.23 ± 23.79	0.99
腰臀比	0.84 ± 0.11	0.90 ± 0.11	< 0.001*
收缩压 (mmHg)	126.65 ± 20.59	135.32 ± 21.42	0.01*
舒张压 (mmHg)	78.65 ± 11.68	82.75 ± 13.30	0.04*
空腹血糖 (mmol/L)	5.17 ± 0.83	11.20 ± 4.81	< 0.001*
高血压	15(Y)/61(N)	66(Y)/82(N)	< 0.001*

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$ 。Notes: * indicates $P < 0.05$, ** indicates $P < 0.001$ 。
3.2 病例组与对照组的基因型及等位基因频率分布比较

PCR 扩增产物为 322bp,若 6244 位核苷酸存在 G→A 转换,则产生 Nsi I 酶切位点,为 N2 等位基因。经 Nsi I 限制酶消化后产生 238bp 和 84bp 两个片段。若 6244 位核苷酸不存在 G→A 转换,经 Nsi I 限制酶消化后,只有 322bp 一个片段,为 N1 等位基因(图 1)。

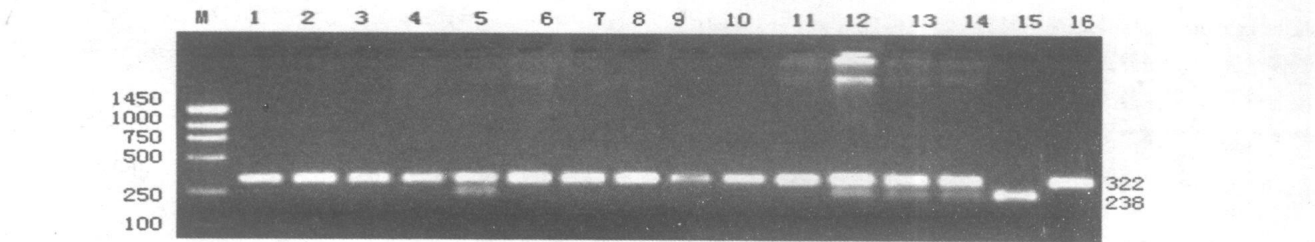


图1. INSR 基因 Nsi I 酶切多态性凝胶电泳图。M: DiamondTM 250bp DNA Marker; 泳道 1、2、3、4、6、7、8、9、10、11 和 16: N1N1 基因型; 泳道 5、12、13 和 14: N1N2 基因型; 泳道 15: N2N2 基因型。
Figure 1. The agarose gel electrophoresis figure shows INSR gene Nsi I polymorphism. M: DiamondTM 250bp DNA Marker; lane 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11 and 16 indicate N1N1 genotype; lane 5, 12, 13 and 14 indicate N1N2 genotype; lane 15 indicates N2N2 genotype.

经 Hardy-Weinberg 平衡定律检验,三组样本中病例组和对照组间 INSR 基因型及等位基因频率分布达到遗传平衡 ($P < 0.05$),具有群体代表性。表 2、表 3 和表 4 分别列出了三组样本的 INSR 基因型和等位基因频率。卡方检验表明,INSR 基因第 8 外显子 Nsi I 多态性的基因型频率在病例组和对照组间差异无显著性 ($P < 0.05$),等位基因频率的分布在两组间差

异亦无显著性 ($P < 0.05$)。Logistic 回归分析表明,无论是单因素还是经年龄、性别、肥胖和高血压等多因素调整,INSR 基因第 8 外显子的 Nsi I 多态性均与 2 型糖尿病无显著相关。本研究结果同时表明高血压是 2 型糖尿病的独立危险因素,三组样本的 OR 值分别为 3.17 (95% CI 1.65– 6.09)、5.51 (95% CI 2.10– 14.46) 和 3.06 (95% CI 1.53– 6.13)。

表2 所有研究对象的 INSR 基因型和等位基因频率分布(%)

Table 2 Genotypic and allelic distribution of INSR polymorphism in all subjects(%)

组别	基因型频率(%)				等位基因频率(%)			
	N1N1	N1N2+	N2N2	X ² (P)	OR	N1	N2	X ² (P)
对照组	55(72.4)	21(27.6)		0.54	0.80	130(85.5)	22(14.5)	0.33
病例组	100(67.6)	48(32.4)		(0.46)		247(83.4)	49(16.6)	(0.57)

注: () 中的值表示该基因型占总数的比例。Note: () indicates that the proportion of any genotype in total.

表3 同胞对样本的 INSR 基因型和等位基因频率分布(%)

Table 3 Genotypic and allelic distribution of INSR polymorphism in sib- pair subjects(%)

组别	基因型频率(%)				等位基因频率(%)			
	N1N1	N1N2+	N2N2	X ² (P)	OR	N1	N2	X ² (P)
对照组	37(71.2)	15(28.8)		0.00	1.00	88(84.6)	16(15.4)	0.00
病例组	37(71.2)	15(28.8)		(1.00)		88(84.6)	16(15.4)	(1.00)

注: () 中的值表示该基因型占总数的比例。Note: () indicates that the proportion of any genotype in total.

表4 同胞对的对照和随机对照与无血缘关系的 2 型糖尿病人的 INSR 基因型和等位基因频率分布(%)

Table 4 Genotypic and allelic distribution of INSR polymorphism in control

of sib- pair subjects and random controls and non- relative type 2 diabetes mellitus (%)

组别	基因型频率(%)				等位基因频率(%)			
	N1N1	N1N2+	N2N2	X ² (P)	OR	N1	N2	X ² (P)
对照组	53(71.6)	21(28.4)		0.69	0.76	126(85.1)	22(14.9)	0.33
病例组	63(65.6)	33(34.4)		(0.41)		159(82.8)	33(17.2)	(0.56)

注: () 中的值表示该基因型占总数的比例。Note: () indicates that the proportion of any genotype in total.

4 讨论

自 1988 年报道第一例胰岛素受体基因突变以来,迄今已发现 60 多种 INSR 基因突变,包括错义突变、无义突变、插入突变和缺失突变等,其中某些突变可导致显著的胰岛素抵抗和糖耐量异常^[4,5],但多数突变和多态性的功能意义仍未明确。Liguori 等^[6]研究发现,2 型糖尿病与胰岛 β 细胞功能受损及靶细胞对胰岛素作用敏感性降低有关。而胰岛素通过结合胰岛素受体并激活相应的底物来起始对血糖的调节。有人估计 2 型糖尿病人群中 INSR 基因突变率在 1% - 5% 左右,因此,多年来 INSR 基因一直是 2 型糖尿病研究中一个非常重要的候选基因^[7]。

本研究结果显示,INSR 基因第 8 外显子 Nsi I 多态性的基因型频率和等位基因频率在 2 型糖尿病组和对照组差异无显著性,说明在湖北地区汉族人群中此基因多态性与 2 型糖尿病无显著相关性,这与国外 Flores- Martinez 等^[8]的研究结果一致。其原因可能在于,虽然密码子由 GCG²⁴→ GCA,但实质上属于同义突变,所编码的氨基酸不变,均为丙氨酸。因此,该突变并非直接参与 2 型糖尿病发病。但我们发现,无论是所有样本一起分析,还是单独分析同胞对样本及同胞对的对照和随机对照与无血缘关系的 2 型糖尿病人,这三组都显示病例组的血压和 WHR 均显著高于对照组,说明高血压和肥胖是 2 型糖尿病的重要危险因素。

本研究的一大优势就是同时采用同胞对(家系内对照)和随机病例-对照两种实验设计征集样本,并分为三组进行分析,同胞对在生活环境、遗传背景等方面较为一致,消除了因病例-对照不匹配而出现的假阴性或假阳性结果,而随机病例-对照研究又可克服同胞对研究的过度匹配问题,两种研究的结果相互补充和验证。但即便如此,我们的研究结果未

发现 INSR 基因第 8 外显子 Nsi I 多态性与 2 型糖尿病有显著的相关性,原因可能是由于本研究的样本量尚少,很大程度上限制了统计的准确性和普遍性。也可能真正在 2 型糖尿病发病中起作用的基因位于 INSR 基因的其他外显子、内含子或调控序列上,亦可能是其他基因。未来我们将进一步扩大样本的数量,增加研究的标记进行基因范围的单体型关联研究以期得出更精确、更可靠的结论。中国人群 2 型糖尿病易感基因的鉴定将为 2 型糖尿病的早期预测、预防、诊断和治疗奠定基础。

参 考 文 献

[1] Sesti G, Federici M, Lauro D, et al. Molecular mechanism of insulin resistance in type 2 diabetes mellitus: role of the insulin receptor variant forms[J]. Diabetes Metab Res Rev, 2001, 17(5):363- 373

[2] 林从容,吴可贵,谢亮地,等. 胰岛素受体基因第 8 外显子 Nsi I 多态性与中国人高血压[J]. 中华医学遗传学杂志, 2000, 17(5): 364 - 365

[3] 许曼音. 糖尿病学[M]. 第一版. 上海: 上海科学技术出版社, 2003: 17

[4] Kusari J, Takata Y, Hatada E, et al. Insulin resistance and diabetes due to different mutations in the tyrosine kinase domain of both insulin receptor gene alleles[J]. J Biol Chem, 1991, 266(8):5260- 5267

[5] Seino S, Seino M, Bell GI. Human insulin- receptor gene. Partial sequence and amplification of exons by polymerase chain reaction[J]. Diabete, 1990, 39(1): 123- 128

[6] Liguori M, Urso R, Fatigante G. Insulin resistance: receptor and post-receptor abnormalities[J]. Minerva Endocrinol, 1998, 23(2): 37- 52

[7] 黄青阳,程孟荣,姬森林. 2 型糖尿病易感基因的连锁和关联研究[J]. 遗传学报, 2006, 33(5)

[8] Flores- Martinez SE, Islas- Andrade S, Machorro- Lazo MV, et al. DNA polymorphism analysis of candidate genes for type 2 diabetes mellitus in a Mexican ethnic group[J]. Ann Genet, 2004, 47(4): 339- 348