

• 论 著 •

HSL 基因启动子-60C>G 多态性与 2 型糖尿病高脂血症的相关性研究

刘环宇¹, 刘博洋², 宁乐平³

(1. 湖北省黄石二中, 湖北黄石 435003; 2. 华中师范大学第一附属中学, 武汉 430223;

3. 武汉大学中南医院基因诊断中心, 武汉 430071)

摘要:目的 探讨激素敏感性脂肪酶(HSL)基因启动子-60C>G 多态性与 2 型糖尿病(T2DM)高脂血症患者血浆脂质水平的相关性。方法 采用限制性片段长度多态性聚合酶链反应(PCR-RFLP)和 DNA 测序法对 94 例健康对照者、77 例 T2DM 高脂血症患者的 HSL 基因启动子-60C>G 多态性进行分析,并检测空腹血糖和血脂水平。结果 试验组空腹血糖和 TC、TG、LDL-C 水平均显著高于健康对照组, HDL-C 水平明显低于健康对照组($P<0.05$);两组均未发现 HSL 基因-60GG 纯合型,试验组 CG 杂合型频率较健康对照组高, G 等位基因频率也较健康对照组高,但两组间的基因型频率和等位基因频率差异均无统计学意义($P>0.05$);试验组 CC 型血浆 TC、TG、LDL-C 水平均明显高于健康对照组 CC 型、CG 型($P<0.05$), HDL-C 水平明显低于健康对照组 CC 型($P<0.05$);试验组和健康对照组组内 CC 型和 CG 型血脂水平差异均无统计学意义($P>0.05$)。结论 HSL 基因启动子-60C>G 多态性与湖北地区汉族人群中 T2DM 高脂血症的血脂水平无明显关联。

关键词: 糖尿病, 2 型; 高脂血症; 血脂; 激素敏感性脂肪酶; 多态性

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.14.013

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)14-1558-03

Study of the association of the hormone-sensitive lipase gene promoter -60C>G polymorphism with type 2 diabetes mellitus with hyperlipidemia

Liu Huanyu¹, Liu Boyang², Ning Leping³

(1. Huangshi Second Middle School, Huangshi Hubei 435003, China; 2. NO. 1 Middle School Attached to Central China Normal University, Wuhan 430223; 3. Center for Gene Diagnosis, Zhongnan Hospital, Wuhan University, Wuhan 430071)

Abstract: **Objective** To investigate the association of the hormone-sensitive lipase(HSL) gene promoter -60C>G polymorphism with plasma lipids level in type 2 diabetes mellitus(T2DM) with hyperlipidemia. **Methods** HSL -60C>G polymorphism was detected in 77 cases of T2DM with hyperlipidemia and 94 normal controls by PCR-RFLP and DNA sequencing. Fasting plasma lipids and glucose were assayed on Abbott automatic biochemical analyzer. **Results** Compared with normal controls, plasma glucose, TC, TG and LDL-C levels were significantly higher, and HDL-C level was significantly lower in T2DM with hyperlipidemia ($P<0.05$). No -60GG homozygote were found in both groups. The distributions of -60CG heterozygote and -60G allele were higher in T2DM with hyperlipidemia, with 14.3% and 11.7%, 7.1% and 5.9%, respectively, but the differences did not reach statistical significance($P>0.05$). In T2DM with hyperlipidemia group, individuals with -60CC were with increased plasma TC, TG, LDL-C levels, compared with CC or CG healthy individuals($P<0.05$), and decreased HDL-C levels compared with CC healthy individuals($P<0.05$). No significant differences were found between CC and CG individuals for plasma lipids levels within normal controls or T2DM with hyperlipidemia group($P>0.05$). **Conclusion** It could be suggested that there was no strong association between -60C>G polymorphism and plasma lipids levels in T2DM with hyperlipidemia in Hubei population of Chinese Han.

Key words: diabetes mellitus, type 2; hyperlipidemis; plasma lipids; hormone-sensitive lipase; polymorphism

胰岛素抵抗(IR)是 2 型糖尿病(T2DM)的主要特征之一,是 T2DM 发生、发展的中心环节^[1-3]。研究发现血浆游离脂肪酸(FFA)浓度的升高可促进 IR 的发生与发展^[4-6]。位于人类染色体 19q13.3 的激素敏感性脂肪酶(HSL)是人体内三酰甘油水解的限速酶,是调节体内 FFA 释放的关键酶,在血 FFA 浓度的调节方面起决定性作用^[5-7]。HSL 编码基因的-86~-57 之间的序列对于 HSL 的表达是必需的^[8],位于启动子区的-60C>G 多态性与体脂和血浆脂质水平有关^[6-10]。本研究旨在探讨 HSL 基因启动子区-60C>G 多态性与 T2DM 高脂血症患者血浆脂质水平的相关性。

1 资料与方法

1.1 一般资料 健康对照组为武汉大学中南医院 2009 年的健康体检人员 94 例,其中男 57 例,女 37 例,平均年龄 54 岁,血糖、血脂等生化指标正常,无肝肾功能异常,无糖尿病家族史,无其他代谢性疾病。试验组 77 例为武汉大学中南医院内

分泌科确诊为 T2DM 合并高脂血症的住院患者^[11],其中男 49 例,女 28 例,平均年龄 59 岁。所有研究对象均为湖北地区汉族人,无亲缘关系。

1.2 仪器与试剂 Veriti TM 基因扩增仪(ABI,美国),全自动凝胶成像系统(Syngene,英国),DU530 分光光度计(Beckman,美国),全自动生化分析仪(Abbott,美国);全血基因组 DNA 提取试剂盒(TIANGEN,中国),Taq 酶(MBI,美国),dNTP(Roche,德国),RsaI 内切酶(New England Biolab,美国)。

1.3 方法

1.3.1 标本收集 在知情同意情况下抽取受试对象空腹静脉血 3 mL, EDTA 抗凝,1 200 g 离心 5 min,分离新鲜血浆,全自动生化分析仪检测空腹血糖和血脂(TG、TC、LDL-C、HDL-C)。提取新鲜全血细胞基因组 DNA,-20℃保存备用。

1.3.2 引物设计与合成 采用 primer3 软件设计引物 1 对,

并经 Blast 软件比对分析其特异性,由上海英骏公司合成。上游引物:5'-GAG GGA GGA GGG GCT ATG GGT-3';下游引物:5'-TCC CTG GGC TGG GAC TAC TGG-3'。目的片段 PCR 产物长度为 271 bp。

1.3.3 HSL 启动子区 C-60G 基因多态性分析 (1)PCR 扩增:25 μ L PCR 体系中含 100 ng DNA,200 μ M dNTP,1.5 mM MgCl₂,1 $\times$ 缓冲液,10 pmol 的上、下游引物和 1 U Taq 酶。扩增条件:94 $^{\circ}$ C 变性 5 min,94 $^{\circ}$ C 变性 45 s,60 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,35 个循环,72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。每次 PCR 过程中均设阴性质控。(2)限制性内切酶片段长度多态性(RFLP)分析:目的片段经 1.5%的琼脂糖鉴定后,经 RsaI 内切酶 37 $^{\circ}$ C 孵育

16 h 后,聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)电泳鉴定酶切结果。(3)DNA 测序:随机选取不同基因型标本送 Invitrogen 公司测序验证。

1.4 统计学处理 所有数据均使用 SPSS16.0 软件进行统计分析,计数资料采用 χ^2 检验,计量资料采用两样本独立 t 检验或单因素方差分析。检验水平为双侧 0.05。

2 结 果

2.1 两组间空腹血糖和血脂水平比较分析结果 见表 1,试验组空腹血糖和血脂水平均高于健康对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。

表 1 两组间空腹血糖与血脂水平比较($\bar{x}\pm s$,mmol/L)

组别	<i>n</i>	血糖	TC	TG	HDL-C	LDL-C
健康对照组	94	5.39 $\pm$ 0.35	4.02 $\pm$ 0.46	0.96 $\pm$ 0.03	1.28 $\pm$ 0.22	2.39 $\pm$ 0.38
试验组	77	7.12 $\pm$ 2.90	5.12 $\pm$ 1.00	2.12 $\pm$ 0.11	1.11 $\pm$ 0.44	3.24 $\pm$ 0.89

2.2 PCR-RFLP 分析结果 HSL 基因启动子-60 位不同基因型 RsaI 酶切 PAGE 电泳图谱,见图 1。CC 型因不存在 RsaI 内切酶识别位点,只有 1 条带(271 bp),电泳结果如同 PCR 产物;CG 型电泳后可见 3 条带(271、182、89 bp)。两组间 HSL 基因-60C>G 多态性频率分布见表 2。试验组和健康对照组基因频率分布经检验均符合 Hardy-Weinberg 平衡($P>0.05$),具有群体代表性。两组均未发现 HSL 基因-60GG 纯合型,试验组 CG 杂合型频率(14.3%)较健康对照组(11.7%)高,C 等位基因频率(7.1%)也高于健康对照组(5.9%),但是两组间 HSL 基因-60 位的基因型频率($\chi^2=0.252,P=0.616$)和等位基因频率($\chi^2=0.235,P=0.628$)差异均无统计

学意义。

2.3 DNA 测序结果 为进一步验证 PCR-RFLP 分析结果,随机选取 2 种基因型标本进行 DNA 测序,结果与 PCR-RFLP 分析结果一致。

表 2 两组间 HSL 基因启动子-60C>G 多态性分布比较[$n(\%)$]

组别	<i>n</i>	基因型频率		等位基因频率	
		CC 型	CG 型	C	G
试验组	77	66(85.7)	11(14.3)	143(92.9)	11(7.1)
健康对照组	94	83(88.3)	11(11.7)	177(94.1)	11(5.9)

表 3 HSL 基因启动子-60 位不同基因型与血脂水平比较分析($\bar{x}\pm s$,mmol/L)

组别	基因型	TC	TG	HDL-C	LDL-C
试验组	CC 型($n=66$)	5.16 $\pm$ 1.04	2.13 $\pm$ 0.11	1.11 $\pm$ 0.46	3.25 $\pm$ 0.92
	CG 型($n=11$)	4.78 $\pm$ 0.51	2.00 $\pm$ 0.12	1.06 $\pm$ 0.22	3.11 $\pm$ 0.59
健康对照组	CC 型($n=83$)	4.02 $\pm$ 0.44	0.96 $\pm$ 0.03	1.29 $\pm$ 0.23	2.37 $\pm$ 0.38
	CG 型($n=11$)	4.16 $\pm$ 0.52	0.98 $\pm$ 0.01	1.19 $\pm$ 0.22	2.61 $\pm$ 0.38
<i>F</i>		27.82	44.19	3.54	21.08

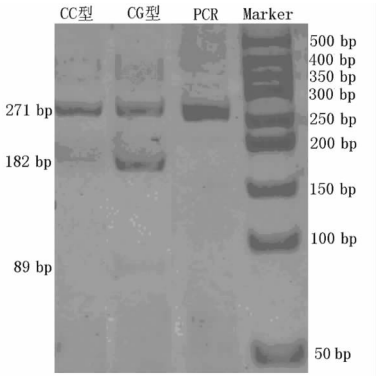


图 1 HSL 基因启动子-60 位不同基因型 RsaI 酶切 PAGE 电泳结果

2.4 HSL 基因启动子区-60C>G 多态性对血脂的影响 试验组和健康对照组不同基因型的血脂水平比较结果见表 3。试验组 CC 型、CG 型,健康对照组 CC 型、CG 型 4 组间空腹血浆 TC($F=27.82,P=0.00$)、TG($F=44.19,P=0.00$)、HDL-C($F=3.54,P=0.02$)、LDL-C($F=21.08,P=0.00$)水平差异均有统计学意义。事后检验(LSD)结果显示:试验组 CC 型血浆 TC、TG、LDL-C 水平均明显高于健康对照组 CC 型、CG 型,HDL-C 水平明显低于健康对照组 CC 型,差异均有统计学意义($P<0.05$);试验组和健康对照组组内 CC 型和 CG 型血脂水平差异均无统计学意义($P>0.05$)。

3 讨 论

HSL 主要存在于脂肪组织,能水解 TG、甘油二酯(PG)、甘油一酯、胆固醇酯和其他脂质及水溶性底物,产生甘油和 FFA,是脂肪分解的限速酶,在人体脂代谢、尤其是 FFA 代谢

中起着非常重要的作用^[7]。

本研究以 T2DM 高脂血症患者为研究对象,首次在国内对 HSL 基因启动子-60C>G 多态性与血脂水平的相关性进行了研究。结果发现 HSL -60 位基因型和等位基因频率分布虽然在试验组较高,但两组间差异无统计学意义,分析其一方面可能与研究对象的种族和地区有关,另一方面可能与样本量有关。本组研究中健康对照组 C/G 等位基因频率与英格兰^[8]和加拿大^[12]的报道相似。两组间不同基因型血脂水平存在差异,然而组内 CC 型和 CG 型血脂水平的差异无统计意义,因此这种差异是来源于试验组对象的高脂血症,还是由于 G 等位基因型的脂代谢保护作用,还有待于加大样本和更深入的研究进一步证实。

参考文献

[1] Mikhail N. The metabolic syndrome; insulin resistance[J]. Curr Hypertens Rep, 2009, 11(2):156-158.

[2] Delarue J, Magnan C. Free fatty acids and insulin resistance[J]. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2007, 10(2):142-148.

[3] 陈瑜, 李玲, 杨刚毅. 游离脂肪酸在 2 型糖尿病发病机制中的作用[J]. 国际检验医学杂志, 2007, 28(10):915-917.

[4] Duncan BB, Schmidt MI, Ballantyne CM, et al. Fasting plasma free fatty acids and risk of type 2 diabetes: the atherosclerosis risk in communities study[J]. Diabetes Care, 2004, 27(1):77-82.

[5] 张婷婷, 徐冲, 俎鲁霞, 等. 高浓度葡萄糖刺激脂肪细胞脂肪分解的效应及其机制[J]. 北京大学学报(医学版), 2008, 40(3):273-

279.

[6] 李学英, 葛斌, 路健, 等. 遵义地区人群激素敏感性脂肪酶基因第 6 内含子多态性与 2 型糖尿病的关系[J]. 中国糖尿病杂志, 2008, 16(12):721-722.

[7] Yeaman SJ. Hormone-sensitive lipase——new roles for an old enzyme[J]. Biochem J, 2004, 379(Pt 1):11-22.

[8] Talmud PJ, Palmen J, Wolf AM, et al. Investigation into the role of the hormone sensitive lipase -60C>G promoter variant in morbid obesity[J]. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2005, 15(1):31-35.

[9] Garenc C, Vohl MC, Bouchard C, et al. LIPE C-60G influences the effects of physical activity on body fat and plasma lipid concentrations; the Quebec family study[J]. Hum Genomics, 2009, 3(2):157-168.

[10] Talmud PJ, Palmen J, Luan J, et al. Variation in the promoter of the human hormone sensitive lipase gene shows gender specific effects on insulin and lipid levels: results from the Ely study[J]. Biochim Biophys Acta, 2001, 1537(3):239-244.

[11] 中国成人血脂异常防治指南制订联合委员会. 中国成人血脂异常防治指南[J]. 中华心血管病杂志, 2007, 35(5):390-420.

[12] Garenc C, Pérusse L, Chagnon YC, et al. The hormone-sensitive lipase gene and body composition: the heritage family study[J]. Int J Obes Relat Metab Disord, 2002, 26(2):220-227.

(收稿日期:2010-07-29)

(上接第 1557 页)

留白血病骨髓细胞的凋亡,减少复发的概率。

参考文献

[1] Yoshizawa A, Fukuoka J, Shimizu S, et al. Overexpression of phosphor-eIF4E is associated with survival through AKT pathway in non-small cell lung cancer[J]. Clin Cancer Res, 2010, 16(1):240-248.

[2] Wang X, Yue P, Kiml YA, et al. Enhancing mTOR-targeted cancer therapy by preventing mTOR/raptor inhibition-initiated, mTOR/rector-independent Akt activation[J]. Cancer Res, 2008, 68(18):7409-7418.

[3] Guertin DA, Sabatini DM. An expanding role for mTOR in cancer[J]. Trends Mol Med, 2005, 11(18):353-361.

[4] Hon JC, Kahan BD. Rapamycin and transplantation[J]. Transplantation, 1999, 68(5):701-704.

[5] 黄玲, 陈雪梅, 何俊琳, 等. 雷帕霉素对绒癌 JEG-3 细胞株的影响[J]. 激光杂志, 2010, 31(2):93-94.

[6] Recher C, Beyne-Ranzoy O, Demur C, et al. Antileukemic of activit of rapamycin in acute myeloid leukemia[J]. Blood, 2005, 105(6):2527-2534.

[7] Fingar DC, Blenis J. Target of rapamycin(TOR): an integrator of

nutrient and growth factor signals and coordinator of cell and cell cycle progression[J]. Oncogene, 2004, 23(18):3151.

[8] Gao N, Flynn DC, Zhang Z, et al. G1 cell cycle progression and the expression of G1 cyclins are regulated by PI3K/AKT/mTOR/p70S6K1 signaling in human ovarian cancer cells[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2004, 287(2):C281-291.

[9] Gao N, Zhang Z, Jiang BH, et al. Role of PI3K/AKT/mTOR signaling in the cell cycle progression of human prostate cancer[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 310(4):1124-1132.

[10] West KA, Castillo SS, Dennis PA. Activation of the PI3K/Akt pathway and chemotherapeutic resistance[J]. Drug Resist Updat, 2002, 5(6):234-248.

[11] Martelli AM, Tabellini G, Bortul R, et al. Involvement of the phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway in the resistance to therapeutic treatments of human leukemias[J]. Histol Histopathol, 2005, 20(1):239-252.

[12] Fingar DC, Richardson CJ, Tee AR, et al. mTOR controls cell cycle progression through its cell growth effectors S6K1 and 4E-BP1/eukaryotic translation initiation factor 4E[J]. Mol Cell Biol, 2004, 24(1):200-216.

(收稿日期:2011-04-15)

参数与统计量

描述总体特征的数值为参数,通常是未知的,一般用希腊字母表示,如 μ 、 σ 、 π 等。描述样本特征的数值为统计量,是已知的或可计算获得的,用英文字母表述,如 S 、 P 等。从总体中随机抽样可获得样本,以样本为基础、通过统计推断(参数估计、假设检验)可获得对总体的认识。