

• 临床检验研究论著 •

江苏地区 2 型糖尿病易感基因单核苷酸多态性 与妊娠期糖尿病关系的研究*

胡晓菡, 郑 洁, 张 葵[△]

(南京大学医学院附属鼓楼医院检验科, 江苏南京 210008)

摘要:目的 探讨江苏地区 2 型糖尿病易感基因 *CDKAL1*、*CDKN2A-CDKN2B*、*TCF7L2* 及 *HHEX-IDE* 的单核苷酸多态性(SNP)与妊娠期糖尿病(GDM)的关系。方法 采用病例对照法及多重 SNaPshot SNP 分型技术检测 185 例无 GDM 倾向的健康孕妇(对照组)及 176 例 GDM 孕妇(GDM 组)*CDKAL1*、*CDKN2A-CDKN2B*、*TCF7L2* 及 *HHEX-IDE* 的 SNP 位点基因分型,并对所有 SNP 位点进行连续不平衡分析。结果 比较 GDM 组和对照组孕妇的等位基因频率,*CDKAL1*(rs7754840)的等位基因 C 为 GDM 的一个危险因素。CC 型携带者患 GDM 的风险是未携带者的 1.73 倍[$P < 0.01$, $OR = 1.73$, 95% CI : 1.28 ~ 2.33]。*CDKN2A-CDKN2B*(rs10811661)、*TCF7L2*(rs7903146)及 *HHEX-IDE*(rs1111875)检测位点的基因分布差异无统计学差异($P > 0.05$)。*CDKAL1*(rs7754840)、*CDKN2A-CDKN2B*(rs10811661)、*TCF7L2*(rs7903146)及 *HHEX-IDE*(rs1111875)的基因型频率均符合遗传平衡法则。结论 *CDKAL1*(rs7754840)与江苏地区 GDM 易感密切相关。

关键词:多态性,单核苷酸; 糖尿病,妊娠; 易感基因

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.10.006

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)10-1245-03

A research on relationship between single nucleotide polymorphism of susceptibility genes of type 2 diabetes mellitus and gestational diabetes mellitus*

Hu Xiaohan, Zheng Jie, Zhang Kui[△]

(Department of Clinical Laboratory, Nanjing Drum Tower Hospital Affiliated to Medical
School of Nanjing University, Nanjing, Jiangsu 210008, China)

Abstract: **Objective** To investigate the relationship between single nucleotide polymorphism(SNP) of susceptibility genes *CDKAL1*, *CDKN2A-CDKN2B*, *TCF7L2* and *HHEX-IDE* of type 2 diabetes mellitus and gestational diabetes mellitus(GDM) in Jiangsu region. **Methods** 185 healthy pregnant women without GDM tendency(control group) and 176 pregnant women with GDM(GDM group) were enrolled. Case-control method and Multiplex SNaPshot SNP genotyping technology were utilized to detect genotypes at SNP loci of *CDKAL1*, *CDKN2A-CDKN2B*, *TCF7L2* and *HHEX-IDE* of pregnant women both in the two groups, and all SNP loci were subject to continuous disequilibrium analysis. **Results** Compared the allele frequencies of pregnant women in GDM group and the control group, C allele of *CDKAL1*(rs7754840) was a risk factor for GDM. The risk of suffering GDM of CC genotype carriers was 1.73 times the non-CC genotype carriers[$P < 0.01$, $OR = 1.73$, 95% CI : 1.28 ~ 2.33]. No statistical difference was found in gene distribution of detection loci of *CDKN2A-CDKN2B*(rs10811661), *TCF7L2*(rs7903146) and *HHEX-IDE*(rs1111875). The genotype frequencies of *CDKAL1*(rs7754840), *CDKN2A-CDKN2B*(rs10811661), *TCF7L2*(rs7903146) and *HHEX-IDE*(rs1111875) were all accordance with the law of genetic equilibrium. **Conclusion** *CDKAL1*(rs7754840) is closely related to GDM susceptibility in Jiangsu region.

Key words: polymorphism, single nucleotide; diabetes, gestational; susceptibility genes

妊娠期糖尿病(gestational diabetes mellitus, GDM)是指妊娠期间首次发生或发现的糖代谢异常^[1]。GDM 对孕妇、胎儿、新生儿有诸多不良影响。国内、外多项研究表明 GDM 患者将来发生 2 型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)的危险率明显增加。研究数据显示,产后 15 年内约 40% GDM 孕妇成为糖尿病患者,50% 在第 2 次妊娠时再次发生 GDM^[2]。而有糖尿病家族史者, GDM 患病率将明显增加。这些数据表明 GDM 患者是 T2DM 发病高风险的女性人群,也是 T2DM 的早期阶段^[3]。近年来多个研究小组运用全基因组关联研究(genome-wide association studies, GWAS)验证并发现了转录因子 7 样 2(transcription factor 7-like 2, TCF7L2)、周期素依赖性激酶抑制因子 2A(cyclin dependent kinase inhibitor 2A,

CDKN2A)-CDKN2B、造血表达同源异形盒(Hematopoietically expressed homeobox, HHEX)-胰岛素降解酶(insulin-degrading enzyme, IDE)、CDK5 调控相关蛋白 1 样 1(CDK5 regulatory subunit associated protein 1-like 1, CDKAL1)等多个与 T2DM 密切相关的基因区域^[4-5]。Shaat 等^[6]发现斯堪的那维亚人群中 GDM 患者 *TCF7L2* 基因 rs7903146 位点多态性与健康者的差异有统计学意义。同样在 Watanabe 等^[7]对墨西哥裔美国人的研究中也发现, *TCF7L2* 基因变异与 GDM 相关。同时遗传学和流行病学的研究均表明, GDM 与 T2DM 具有一定的相关性,二者均是多基因、多因素所致的疾病,以胰岛素抵抗和胰岛素分泌功能受损为特征。因此,笔者拟探讨汉族妊娠人群中与 T2DM 密切相关的基因区域是否与 GDM 也存在着

* 基金项目:南京市医学科技发展项目(YKK11097)。 作者简介:胡晓菡,女,硕士,技师,主要从事糖尿病及相关疾病研究。 [△] 通讯作者, E-mail: zhangkui@yahoo.com.cn。

一定的相关性,为 GDM 病因学研究提供一定的理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2010 年 8 月至 2012 年 8 月于本院产科分娩的孕妇 361 例,根据身体情况分为 GDM 组($n=176$)及对照组($n=185$)。GDM 组孕妇年龄(29.5 ± 4.2)岁,均符合美国国家糖尿病数据组(National Diabetes Data Group, NDDG)修订的 GDM 诊断标准^[8];对照组孕妇年龄(28.3 ± 3.9)岁,为同期入院年龄相当的健康孕妇,50 g 葡萄糖筛查试验显示无 GDM 倾向。2 组孕妇年龄、孕次、孕周的差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。所有入选病例均为江苏地区汉族人,排除严重心、肺、肝、肾及内分泌系统疾病。研究方案得到医院临床医学实验伦理委员会批准。

1.2 主要试剂与仪器 主要试剂为 DNA 提取试剂盒(美国 QIAGEN 公司);主要仪器为梯度聚合酶链反应(polymerase

chain reaction,PCR)仪(美国 ABI 公司)、ABI3730XL 全自动 DNA 测序仪(美国 ABI 公司)。

1.3 基因组 DNA 的提取 受试者空腹 8 h 后,于次日清晨抽取静脉血 2 mL 于乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)抗凝管,采用 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA,紫外分光光度法测定 DNA 的纯度和浓度,样本保存于一 20 ℃ 冰箱备用。

1.4 引物及 PCR 引物由南京海普乐生物科技中心设计合成,见表 1。PCR 体系:模板 DNA 1 μL, 10×buffer 1.5 μL, 25 mmol/L MgCl₂ 1.5 μL, 10 mmol/L 三磷酸脱氧核糖核苷(deoxy-ribonucleoside triphosphate, dNTP) 0.3 μL, 10 pmol/L 引物各 0.3 μL, 5 U TaqDNA 聚合酶 0.3 μL,用水补充体系至 15 μL。延伸反应体系包括 PCR 产物 2 μL, Snapshot Mix 1 μL,延伸引物混合 2 μL,水补充体系至 6 μL。

表 1 引物序列及其片段长度

基因	引物	片段大小(bp)
<i>TCF7L2</i> (rs7903146)	F:5'-GTC AGA TGG TAA TGC AGA TGT G-3' R:5'-TAC TTG CCT TCC CTG TAA CTG-3'	227
<i>CDKN2A-CDKN2B</i> (rs10811661)	F:5'-GTC TAA TGA AGA CAT TAG AAC-3' R:5'-TCC CAA AAT TTG TTC TGA GAA-3'	206
<i>HHEX-IDE</i> (rs1111875)	F:5'-ATG AGA TCA GGT AAT TGC TTG-3' R:5'-ATT GTA GAT TAG ACC AGA CTA-3'	194
<i>CDKAL1</i> (rs7754840)	F:5'-ACT GCT TGC TGT TGG GGA AGA-3' R:5'-ATC TTT CAA TTC AAT TCA GTG-3'	189

1.5 基因分型 采用多重单碱基延伸单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)分型技术(Multiplex SNaP-shot)确定样本的基因型及其对应的 SNP 位点,分型结果经过 DNA 测序确认和验证。

1.6 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析,以 Hardy-Weinberg 遗传平衡检验检测各位点基因频率在群体中的代表性;直接计数法计算各个基因位点的基因型、等位基因频率;组间基因型和等位基因的分布差异采用 χ^2 检验;计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验,以 $\alpha=0.05$ 为检验水准,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 SNP 基因型和等位基因频率分析 比较 GDM 组和对照组孕妇的等位基因频率,结果显示,*CDKAL1*(rs7754840)的等位基因 C 为 GDM 的一个危险因素。对照组孕妇 G/G、G/C、C/C 基因型频率分别为 54.6%、22.7%、22.7%,危险等位基因 C 的频率为 34.1%。GDM 组孕妇 G/G、G/C、C/C 基因型频率分别为 34.5%、36.8%、28.7%,危险等位基因 C 的频率为 47.1%,CC 型携带者患 GDM 的风险是未携带者的 1.73 倍 [$P<0.01$, $OR=1.73$, 95% $CI:1.28\sim2.33$]。而 *CDKN2A-CDKN2B*(rs10811661)、*TCF7L2*(rs7903146)及 *HHEX-IDE*(rs1111875)检测位点的基因分布差异无统计学差异($P>0.05$)。

2.2 Hardy-Weinberg 遗传平衡检验 *CDKAL1*(rs7754840)、*CDKN2A-CDKN2B*(rs10811661)、*TCF7L2*(rs7903146)及 *HHEX-IDE*(rs1111875)的基因型频率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。

3 讨 论

GDM 对孕妇、胎儿、新生儿有诸多不良影响,受到国内、外

医学领域的高度重视。从分子遗传学水平探讨 GDM 的病因一直是医学研究的热点之一,但由于多基因疾病病因的复杂性以及技术水平限制,对疾病易感基因的筛选一直进展缓慢。

近年来,随着 GWAS 的推出,很多研究者把目光投向 SNP 的研究。运用 GWAS 技术,很多研究小组发现 *CDKAL1*、*CDKN2A-CDKN2B*、*TCF7L2* 及 *HHEX-IDE* 等多个与 T2DM 密切相关的基因区域。有研究表明,T2DM 易感基因与 GDM 存在一定的相关性^[9],但关于 GDM 遗传易感性相关基因的探讨却报道较少。Multiplex SNaPshot 是一种以多重引物延伸为基础、可同时对多个已知 SNP 位点进行遗传分型的自动化方法。分型准确度高,可多位点同时检测,且不受 SNP 位点多态特性及样品个数的限制^[10]。很多调查研究显示,种族和地域差异对基因具有影响,因此,笔者采用 Multiplex SNaPshot 检测了 361 例江苏地区汉族妊娠妇女与 T2DM 密切相关的基因区域 *CDKAL1*、*CDKN2A-CDKN2B*、*TCF7L2* 及 *HHEX-IDE* 的遗传多态性,结果提示 *CDKAL1*(rs7754840)的 C 等位基因是 GDM 的一个危险因素,CC 型携带者患 GDM 的风险较未携带者明显增高。

CDKAL1 基因定位于 6 号染色体(6p22.3),高表达于人类胰岛、大脑和骨骼肌组织中。研究发现 *CDKAL1* 基因 rs7756992 变异型等位基因 GG 纯合子患者的胰岛素分泌较其他基因型低,提示 *CDKAL1* 基因变异,并通过降低胰岛素的分泌增加个体对糖尿病的易感性。本研究 SNP 基因型和等位基因频率分析结果与 Cho 等^[10]对韩国妊娠人群的易感基因调查基本一致。

TCF7L2 基因位于 10 号染色体(10q25.3),广泛表达于包括成熟胰岛细胞在内的各种人体组织中,其变异可影响 Wnt 信号转导通路,最终破坏体内血糖的稳定。此外,*TCF7L2* 基因变异还能导致三酰甘油在外周组织的沉积,由此产生胰岛素

抵抗。HHEX-IDE 基因区域是一个跨度为 295 kb 的基因组区域,包含多个 T2DM 相关 SNP,涉及 *HHEX*、*KIF11*、*IDE* 基因。其中,HHEX 基因编码含同源框的转录因子,高表达于胚胎及成熟的胰腺中,其转录受 Wnt 信号通路调控;*HHEX* 基因敲除小鼠还可出现胰腺发育缺陷;而 *IDE* 基因则编码一种细胞间金属肽酶,其降解产物包括胰岛素和多种淀粉样蛋白等。*CDKN2A* 和 *CDKN2B* 基因位于 9 号染色体(9q21),分别编码 P16INK4a 和 P15INK4b 蛋白,这 2 种蛋白均高表达于胰岛细胞中。动物模型研究显示,P16INK4a 蛋白的过度表达将导致胰岛细胞分裂能力的降低;同样,P15INK4b 异常高表达也可引起小鼠胰岛发育不全并出现糖尿病症状。本研究发现,*CDKN2A-CDKN2B*(rs10811661)、*TCF7L2*(rs7903146)及 *HHEX-IDE*(rs1111875)这 3 个 SNP 检测位点的基因分布差异无统计学意义,与 Shaat 等^[6]及 Cho 等^[10]的研究结果并不一致,也许与样本数量及地域差异有关,另外,在 *TCF7L2*(rs7903146)的基因分型中,T 的等位基因携带率极小,检验效能无法保证,也可能与结果差异有一定关系。因此,接下来的研究应尽可能增大样本量及样本分布地区,进一步完善数据,为 GDM 的易感基因调查提供更全面、可靠的分析。

糖尿病是威胁人类健康的重要疾病之一,其持续增长的流行病趋势构成严重的全球性公共卫生问题。因此,通过对基因多态性与 GDM 易感性关系的研究,阐明基因型和表型之间的联系,对认识 GDM 的发生机制,进一步阐明其发病的分子遗传学机制,预测转归具有重要意义,并为个性化治疗奠定坚实的理论基础,可有效改善妊娠结局,减少产科合并症的发生,避免或延缓 GDM 发展为 T2DM。

参考文献

[1] Hummel S,Much D,Rossbauer M,et al. Postpartum outcomes in women with gestational diabetes and their offspring:POGO study design and first-year results[J]. Rev Diabet Stud,2013,10(1):49-

(上接第 1244 页)

表达水平明显低于正常大鼠,提示内源性硫化氢在延髓组织局部产生减少,可能与高血压发病有一定的关联。

综上所述,本实验研究表明,正常大鼠及 SHR 脑组织中均有 *CBS* mRNA 表达,且 SHR 脑组织中 *CBS* mRNA 的表达均下调,提示脑组织内源性硫化氢生成减少可能通过延髓等中枢机制参与高血压的发病。

参考文献

[1] Burnett WW,King EG,Grace M,et al. Hydrogen sulfide poisoning:review of 5 years' experience[J]. Can Med Assoc J,1977,117(11):1277-1280.
[2] Łowicka E,Bettowski J. Hydrogen sulfide (H₂S)-the third gas of interest for pharmacologists[J]. Pharmacol Rep,2007,59(1):4-24.
[3] Kimura H. Hydrogen sulfide as a biological mediator[J]. Antioxid Redox Signal,2005,7(5/6):778-780.
[4] Zhao W,Zhang J,Lu Y,et al. The vasorelaxant effect of H(2)S as a novel endogenous gaseous K(ATP) Channel opener[J]. EMBO J,2001,20(21):6008-6016.
[5] Kimura Y,Goto Y,Kimura H. Hydrogen sulfide increases glutathione production and suppresses oxidative stress in mitochondria [J]. Antioxid Redox Signal,2010,12(1):1-13.

57.
[2] Reece EA,Assimakopoulos E,Hagay Z,et al. Assessment of carbohydrate tolerance in pregnancy[J],Obstet Gynecol Surv,1991,46(1):1-14.
[3] Ryan AS,Mclenithan JC,Zietowski GM. Accelerated metabolic susceptibility to type 2 diabetes in older women with a history of gestational diabetes[J]. Endocr Connect,2013,2(2):79-86.
[4] Steinthorsdottir V,Thorleifsson G,Reynisdottir I,et al. A variant in CDKAL1 influences insulin response and risk of type 2 diabetes [J]. Nat Genet,2007,39(6):770-775.
[5] Wellcome Trust Case Control Consortium. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls[J]. Nature,2007,447(7145):661-678.
[6] Shaat N,Lernmark A,Karlsson E,et al. A variant in the transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene is associated with an increased risk of gestational diabetes mellitus[J]. Diabetologia,2007,50(5):972-979.
[7] Watanabe RM,Allayee H,Xiang AH,et al. Transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) is associated with gestational diabetes mellitus and interacts with adiposity to alter insulin secretion in Mexican Americans[J]. Diabetes,2007,56(5):1481-1485.
[8] National Diabetes Data Group. Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance[J]. Diabetes,1979,28(12):1039-1057.
[9] Fu W,Wang Y,Wang Y,et al. Missing call bias in high-throughput genotyping[J]. BMC Genomics,2009,10:106.
[10] Cho YM,Kim TH,Lim S,et al. Type 2 diabetes-associated genetic variants discovered in the recent genome-wide association studies are related to gestational diabetes mellitus in the Korean population[J]. Diabetologia,2009,52(2):253-261.

(收稿日期:2013-12-09)

[6] 刘文庆,柴琛,曹农,等. 内源性硫化氢的中枢心血管效应与 KATP 通道开放机制有关[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2009,13(33):6527-6530.
[7] Liu WQ,Chai C,Li XY,et al. The cardiovascular effects of central Hydrogen sulfide are related to K(ATP) channels activation[J]. Physiol Res,2011,60(5):729-738.
[8] Qiao W,Yang L,Li XY,et al. The cardiovascular inhibition functions of Hydrogen sulfide within the nucleus tractus solitarii are mediated by the activation of KATP channels and glutamate receptors mechanisms[J]. Pharmazie,2011,66(4):287-292.
[9] Guyenet PG. The sympathetic control of blood pressure[J]. Nat Rev Neurosci,2006,7(5):335-346.
[10] Michelini LC. The NTS and integration of cardiovascular control during exercise in normotensive and hypertensive individuals[J]. Curr Hypertens Rep,2007,9(3):214-221.
[11] 于海云,马红,曹银祥,等. 硫化氢对 SHR 大鼠的中枢心血管效应及其机制探讨[J]. 中国分子心脏病学杂志,2011,11(4):235-240.
[12] Hui Y,Du J,Tang C,et al. Changes in arterial hydrogen sulfide (H(2)S) content during septic shock and endotoxin shock in rats [J]. J Infect,2003,47(2):155-160.

(收稿日期:2013-12-09)