

Resistin 基因 3' 非翻译区 ATG 序列多态性与 2 型糖尿病的相关性研究

袁重胜 乔虹 孙海明 朱研 傅松滨

【摘要】 目的 研究 *resistin* 基因 3'-非翻译区 ATG 重复序列在 2 型糖尿病 (T2DM) 患者及正常血糖人群中的多态性分布, 探讨此重复序列与 T2DM 的相关性。方法 选取东北地区汉族 T2DM 患者 243 例, 正常对照 110 例, 采用聚合酶链反应-单链构象多态性 (PCR-SSCP) 方法初筛基因后, 进行 DNA 直接测序。结果 在 353 例受试者中, 检测到 *resistin* 基因 3' 非翻译区 ATG 重复序列有 3 种基因型, 表现为 T2DM 患者中 a 型 ATG 序列重复 6 次, 共有 220 例, 频率为 90.5%; b 型 ATG 序列重复 8 次, 共有 10 例, 频率为 4.1%; c 型 ATG 序列重复 7 次, 共有 13 例, 频率为 5.4%。在 110 例正常人中均表现为重复 6 次的 a 型 ATG 序列, 不存在 b 型及 c 型的基因型。结论 *Resistin* 基因 3' 非翻译区 ATG 序列在 T2DM 患者及正常人群中的多态性分布存在差异, 其多态性分布与 T2DM 的易感性相关, 可能是东北地区汉族人群发生 T2DM 的一个重要的相关因素。

【关键词】 2 型糖尿病; *Resistin*; 3'-非翻译区; ATG 序列多态性

Study on the Association of the ATG Repeat in the 3'-Untranslated Region of the Human Resistin Gene and Type 2 Diabetes Mellitus YUAN Chong-sheng¹, QIAO Hong², SUN Hai-ming³, ZHU Yan¹, FU Song-bin^{3,4}. (¹ Postgraduate school, Harbin Medical University, Harbin 150081; ² Department of Endocrine Secretion, The Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150081; ³ Laboratory of Medical Genetics, Harbin Medical University, Harbin 150081; ⁴ Bio-pharmaceutical Key Laboratory of Heilongjiang Province, Harbin 150081, P. R. China)

Corresponding author: FU Song-bin. E-mail: fusb@ems.hrbmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To study the polymorphism distribution of ATG repeats in the resistin gene 3'-UTR in T2DM and normal populations to examine whether the polymorphism are associated with T2DM. **Methods** 243 subjects with T2DM and 110 controls were randomly selected from Han Population in northeast China. Sequence variants of the resistin gene were analyzed with the Single Strand Conformation Polymorphism Analysis of Polymerase Chain Reaction Products (PCR-SSCP) technique as primary screening and then DNA direct sequencing was undertaken. **Results** In the total of 353 subjects, 3 kinds of genotypes of the ATG repeats in *resistin* gene 3'-UTR were identified: ATG repeated 6, 7 and 8 time. In the T2DM group the frequency of 6, 7 and 8 times repeats were 90.5%, 5.4% and 4.1%, respectively. However all of the 110 normal controls the ATG repeated 6 times and no 7 or 8 times repeats were examined. **Conclusion** The polymorphism distribution of ATG repeats in the human *resistin* gene 3'-UTR is different between T2DM patients and normal population. It may be that this difference is associated with the susceptibility of T2DM and plays an important role in the pathogenesis of T2DM in northeast Han Population of China.

【Key Words】 T2DM *Resistin*; 3'-UTR; Polymorphism of ATG repeats

基金项目: 黑龙江省卫生厅医学科研基金 (No. 2003-108)

作者单位: 150081, 哈尔滨医科大学研究生院 (袁重胜、朱研); 150081, 哈尔滨医科大学附属第二临床医学院内分泌科 (乔虹); 150081, 哈尔滨医科大学医学遗传学研究室 (孙海明、傅松滨); 150081, 哈尔滨, 黑龙江省生物医药工程重点实验室 (傅松滨)

通讯作者: 傅松滨 (E-mail: fusb@ems.hrbmu.edu.cn)

胰岛素抵抗和/或胰岛素不足是 2 型糖尿病 (T2DM) 的两个重要环节, T2DM 的发生与遗传因素和环境因素密切相关, 但是其易感基因尚未明确。

抵抗素是一种富含半胱氨酸的蛋白质, 是抵抗素样分子家族成员。它由脂肪细胞分泌, 在血清中可以被检测^[1]。尽管抵抗素的功能还需要进一步的研究, 但是已经有证据表明这种蛋白能够抑制胰岛素的功能, 导致血糖升高^[2]。目前, 抵抗素对人类肥胖的作用并不清楚, 但是在肥胖者以及胰岛素抵抗小鼠体内抵抗素水平显著增高。而且经过过氧化物酶体增生激活受体 γ 活化剂罗格列酮治疗后, 抵抗素水平降低^[3]。这些结果表明, 抵抗素分泌水平增高是肥胖者发生胰岛素抵抗和 2 型糖尿病的一个可能的机制^[4]。

研究者系统地研究了抵抗素基因中的多态位点, 并且认为这些多态位点与 2 型糖尿病无关^[5-8]。最近, Pizzuti 等^[9]报道了抵抗素基因 3'-非翻译区的 ATG 重复序列与欧洲人群的胰岛素抵抗有关。因此, 我们在东北地区汉族 T2DM 患者和正常血糖人群中进行 *resistin* 基因 3'-非翻译区 ATG 序列多态性检测, 以探讨东北地区汉族人群中 *resistin* 基因多态性与 T2DM 的相关性。

1 材料与方法

1.1 研究对象: 我们收集了 2003 年 2 月到 2005 年 12 月期间来哈尔滨医科大学附属第二医院就诊的 2 型糖尿病患者 243 例。2 型糖尿病的诊断符合 1999 年世界卫生组织诊断标准。112 例血糖正常个体作为正常对照, 他们是来医院进行常规健康检查的非选择性群体。血糖正常个体的定义是空腹血糖 < 6.1 mmol/L 及餐后 2 h 血糖 < 7.8 mmol/L, 并且没有糖尿病家族史。所有受试者均排除尿道感染、肾结石以及其他肾脏系统疾病。所有受试者均为东北地区无亲缘关系的汉族个体, 没有其他民族的亲缘关系。这项研究得到了我们医院人类研究伦理委员会的批准并且每个研究对象都知情同意。

所有研究对象均登记年龄、性别, 测量身高、体

重, 计算体重指数 BMI。于清晨空腹测量血压以及血浆生化指标。采用化学发光仪测定血浆胰岛素; 全自动生化仪检测血浆甘油三酯 (TG)、总胆固醇 (TC) 以及高密度脂蛋白-胆固醇 (HDL-C), 血糖采用葡萄糖氧化酶法检测。

1.2 多态性分析: 提取外周血基因组 DNA, 利用聚合酶链反应对抵抗素基因 3'-非翻译区进行选择扩。引物序列为: 上游引物: 5'-GAGACCACATGTCAC-TGCCAGTGC-3'; 下游引物: 5'-GTCCCTCCGGGCTAC-TAAAGAAAC-3' (上海博亚生物技术有限公司合成)。PCR 25 μ L 反应体系为: 10 \times PCR buffer 2.5 μ L; 2.5 mmol/L dNTP 2 μ L; HRes70 0.8 μ L; HRes302 0.8 μ L; Template 2 μ L; H₂O 16.5 μ L; *rTaq* 酶 0.4 μ L。反应条件: 预变性 94 $^{\circ}$ C 3 min; 变性 94 $^{\circ}$ C 20 s, 退火 64 $^{\circ}$ C 30 s, 延伸 72 $^{\circ}$ C 20 s, 30 个循环; 终末延伸 72 $^{\circ}$ C 10 min。4 $^{\circ}$ C 保存备用。

将上述 PCR 产物于变性缓冲液 (90% 甲酰胺, 20 mmol/L EDTA, 10 mmol/L NaOH) 中 94 $^{\circ}$ C 变性 5 min, 然后冰上预冷。室温下在交联比 29:1 的 8% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶中电泳 3 h, 电压为 600 V。根据聚丙烯酰胺凝胶电泳结果进行初步基因分型, 然后进一步做测序分析 (DNA 测序由上海博亚生物技术有限公司进行)。

1.3 统计学分析: 所有资料采用 SAS6.12 软件进行处理。数据资料如符合正态分布, 采用描述, 2 组间差异比较用 *t* 检验; 对于非正态分布资料, 采用中位数描述其平均水平, 2 组间差异比较用 Wilcoxon 非参数检验进行分析。

2 结果

2.1 T2DM 患者、正常对照组临床数据的组间比较见表 1。T2DM 组、对照组之间性别、年龄差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), T2DM 组 BMI、Bp、空腹血糖及空腹胰岛素水平均明显高于正常组 ($P < 0.05$)。与正常组比较, T2DM 组的 TC 水平明显增高 ($P < 0.05$), TG 水平明显增高 ($P < 0.05$), HDL-C 水平显著下降 ($P < 0.05$)。

表 1 东北地区 T2DM 与正常人群临床数据组间比较

Table 1 The comparison of the clinical data between T2DM patients and the controls of Han population in northeast China

| 组别 | 性别 (男性: 女性) | 年龄 (岁) | BMI (kg/m ²) | TC (mmol/L) | Fins (mU/L) | FPG (mmol/L) | TG (mmol/L) | HDL-C (mmol/L) | Bp (mmHg) |
|-------------------|----------------|-------------------|-----------------------------|-----------------|----------------|-----------------|----------------|-------------------|--------------|
| 对照组 (n=110) | 61:49 | 53.86 \pm 9.34 | 22.12 \pm 4.38 | 5.03 \pm 1.12 | 7.3 | 4.9 | 1.12 | 1.89 | 133/81 |
| T2DM 组 (n=243) | 131:112 | 54.08 \pm 11.21 | 26.67 \pm 5.11 | 7.52 \pm 1.71 | 13.5 | 9.1 | 2.08 | 0.56 | 156/92 |

对于符合正态分布的数据采用 $\bar{x} \pm S$ 描述, 对于非正态分布资料采用中位数描述其平均水平。

We used the $\bar{x} \pm S$ to describe the normal distribution data while for the nonnormal distribution data we use the median to describe them.

2.2 PCR-SSCP 初步筛查结果: 在 353 例受试者中, *resistin* 基因 3'-非翻译区 ATG 重复序列共有 3 种基因型, 如图 1 中标记 a 型、b 型和 c 型。在 243 例患者中 a 型 220 例, 频率为 90.5%, b 型 10 例, 频率为 4.0%, c 型 13 例, 频率为 5.5%; 在 110 例正常人中均表现为 a 型, 不存在 b 型与 c 型。

2.3 测序结果: 在 353 例受试者中, *resistin* 基因 3'-非翻译区 ATG 重复序列测序结果如图 2、3、4。参考聚丙烯酰胺凝胶电泳图, a 型基因型 ATG 序列重复 6 次, b 型基因型 ATG 序列重复 8 次, c 型基因型 ATG 序列重复 7 次。

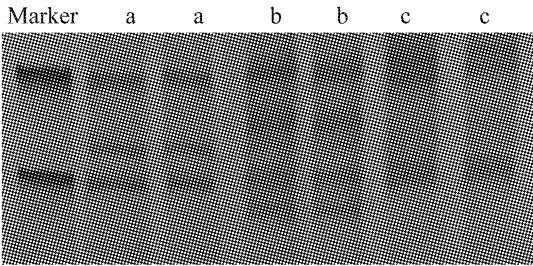


图 1 PCR 产物聚丙烯酰胺凝胶电泳

Fig. 1 PCR-SSCP results of the PCR products

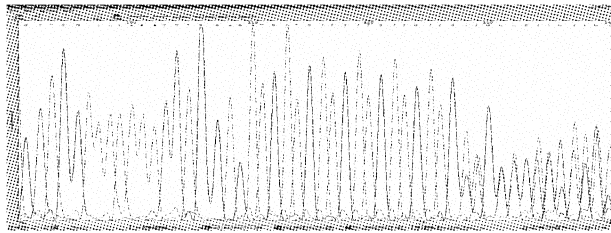


图 2 a 型基因型测序结果

Fig. 2 DNA sequencing results of the a type ATG repeats

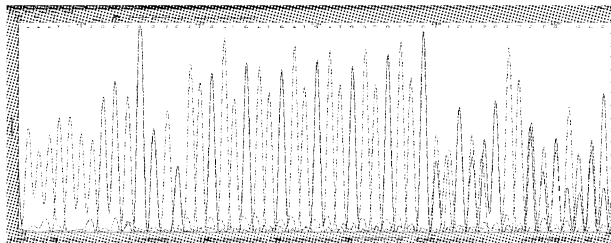


图 3 b 型基因型测序结果

Fig. 3 DNA sequencing results of the b type ATG repeats

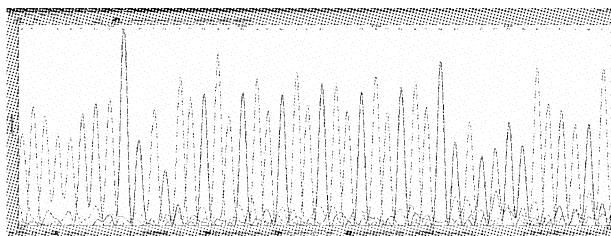


图 4 c 型基因型测序结果

Fig. 4 DNA sequencing results of the c type ATG repeats

3 讨论

Steppan 等^[10]认为 *resistin* 是肥胖与胰岛素抵抗的重要环节, 是具有拮抗胰岛素作用的多肽, 在 ob/ob、db/db 和饮食引起的肥胖糖尿病小鼠中, 血清 *resistin* 水平增高, 而且升高的 *resistin* 与糖耐量降低和胰岛素作用减退有关。此外, 一类抗糖尿病药物噻唑烷二酮类 (thiazolidinedione, TZDs) 可显著降低 *resistin* 基因表达, *resistin* 抗体可改善小鼠的胰岛素敏感性。Savage 等^[3]对人的研究显示, 严重肥胖者脂肪组织中 *resistin* mRNA 高表达, 与 BMI 无关, 与体脂总量正相关。因此, *resistin* 与 T2DM 的相关性引起了越来越多的学者的深入研究。

随着人类基因组计划的深入开展, 人们开始利用基因多态性直接对疾病的候选基因进行突变检测和相关分析。James 等^[11]对加拿大两个地区人群 *resistin* 基因的研究中发现 9 个 SNPs, 5'-侧区的变异与体重指数 (BMI) 相关, 而启动子的变异仅与一个地区人群的 BMI 相关。Sentinelli 等^[6]对意大利人的 *resistin* 基因作了多态性研究, 仅发现 3'-非翻译区 + 1326G/C 位的 1 个 SNP, 而且与意大利人的肥胖、T2DM 无显著相关性。Pizzuti 等^[9]研究发现, 意大利西西里和 Gargano 地区人群中 *resistin* 基因 3'-非翻译区的 ATG 序列重复 7 次者占 94.5%, 重复频率与胰岛素抵抗相关, 其中 ATG 序列重复 6 次的等位基因携带者较 ATG 序列重复 7 次的等位基因携带者对胰岛素敏感性强。

我们检测了东北汉族人群 *resistin* 基因 3'-UTR 的 ATG 序列的多态性, 结果显示在 353 例受试者中, *resistin* 基因 3'-非翻译区 ATG 序列共有 3 种基因型。3 种基因型在 243 例 T2DM 患者中均可见, 其中 a 型 220 例, 频率为 90.5%; b 型 10 例, 频率为 4.0%; c 型 13 例, 频率为 5.5%。110 例正常人中仅表现为 a 型, 不存在 b 型与 c 型。该结果与 Antonio 的研究结果不尽相同, 东北汉族人群中 ATG 序列以重复 6 次者居多, 重复 8 次及重复 7 次者为少数人群, 但是 ATG 序列重复 8 次及重复 7 次与 T2DM 相关。

3'-UTR 可以通过几种机制调节基因表达^[12], 因此, 我们认为 b 型以及 c 型基因型可能通过下调抵抗素基因的表达而使其携带者更容易患 2 型糖尿病。当然这一假说需要通过对不同基因型的脂肪组织中抵抗素基因的表达情况进行研究才能够得到证实。另外, 由于只检测了 3'-UTR 的 ATG 重复序列, 而并没有检测抵抗素基因及其临近区域的其他多态

位点,所以另外一个可能是 3'-UTR 的 ATG 重复本身与 2 型糖尿病并无关联,而是与另外一个调节抵抗素表达的多态位点处于连锁不平衡,从而产生我们所检测到的结果。因此,下一步应对抵抗素基因及其临近区域的其他多态位点进行的研究,以探讨抵抗素基因影响 2 型糖尿病发生的详细机制。

以上的研究表明,*resistin* 基因 3'-非翻译区 ATG 序列多态性与东北汉族人群 T2DM 发生相关,可能是东北汉族人群 T2DM 发病的重要因素之一。

参 考 文 献

- 1 Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, *et al.* The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature*, 2001, 409:307-312.
- 2 Shuldiner AR, Yang R, Gong DW. Resistin, obesity, and insulin resistance: the emerging role of the adipocyte as an endocrine organ. *N Engl J Med*, 2001, 345:1345-1346.
- 3 Savage DB, Sewter CP, Klenk ES, *et al.* Resistin/Fizz3 expression in relation to obesity and peroxisome proliferator-activated receptor-action in humans. *Diabetes*, 2001, 50:2199-2202.
- 4 Pfutzner A, Langenfeld M, Kunt T, *et al.* Evaluation of human Resistin assays with serum from patients with type 2 diabetes and different degrees of insulin resistance. *Clin Lab*, 2003, 49:571-576.
- 5 Osawa H, Onuma H, Murakami A, *et al.* Systemic search for single nucleotide polymorphisms in the resistin gene: the absence of evidence

for the association of three identified single nucleotide polymorphisms with Japanese type 2 diabetes. *Diabetes*, 2002, 51:863-866.

- 6 Sentinelli F, Romeo S, Arca M, *et al.* Human resistin gene, obesity, and type 2 diabetes: mutation analysis and population study. *Diabetes*, 2002, 51:860-862.
- 7 Ma X, Warram JH, Trischitta V, *et al.* Genetic variations at the resistin locus and risk of type 2 diabetes in Caucasians. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, 87: 4407 - 4410.
- 8 Wang H, Chu WS, Hemphill C, *et al.* Human resistin gene: molecular scanning and evaluation of association with insulin sensitivity and type 2 diabetes in Caucasians. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, 87:2520-2524.
- 9 Pizzuti A, Argiolas A, Di Paola R, *et al.* An ATG repeat in the 3'-untranslated region of the human resistin gene is associated with a decreased risk of insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, 87:4403-4406.
- 10 Steppan CM, Lazar MA. Resistin and obesity-associated insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab*, 2002, 13: 18-23.
- 11 James CE, Marie-Claude V, Scott MP, *et al.* 5'Flanking variation of resistin are associated with obesity. *Diabetes*, 2002, 51:1629-1634.
- 12 Conne B, Stutz A, Vassalli JD. The 3'-untranslated region of messenger RNA: a molecular "hotspot" for pathology? *Nat Med*, 2000, 6:637-641.

(收稿日期:2006-08-24)

(本文编辑:高巍)