

PGC-1 α 基因 Gly482Ser 多态性与 2 型糖尿病的相关性研究

邓德耀¹⁾, 袁文丽¹⁾, 金鑫鑫¹⁾, 刘春林¹⁾, 赵东岩¹⁾, 侯霞¹⁾, 张瑛²⁾

(1) 云南省第二人民医院检验科; 2) 内分泌科, 云南昆明 650021)

[摘要] **目的** 了解云南省昆明地区 PGC-1 α 基因 Gly482Ser 多态性与 2 型糖尿病的相关性. **方法** 采集 430 例 2 型糖尿病患者 (T2DM) 和 431 例 OGTT 正常的健康志愿者 (NGT) 的血样, 提取基因组 DNA. 应用高分辨率熔解曲线方法 (HRM) 分析 PGC-1 α 基因 Gly482Ser 基因型, 观察 T2DM 人群中基因型和等位基因的分布情况. **结果** PGC-1 α 基因 Gly482Ser AA 基因型及 G 等位基因在 T2DM 组中的频率分别为 0.209 和 0.587, 在 NGT 组中为 0.139 和 0.651, 2 组之间差异有统计学意义 ($P < 0.05$). **结论** PGC-1 α 基因 Gly482Ser 多态性与云南省昆明地区 2 型糖尿病相关.

[关键词] PGC-1 α 基因; 多态性; 2 型糖尿病; 高分辨率熔解曲线

[中图分类号] R587.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095 - 610X (2014) 03 - 0028 - 04

Association of PGC-1 α Gene Polymorphism with Type 2 Diabetes Mellitus

DENG De-yao¹⁾, YUAN Wen-li¹⁾, JIN Xin-xin¹⁾, LIU Chun-lin¹⁾, ZHAO Dong-yan¹⁾, HOU Xia¹⁾, ZHANG Ying²⁾

(1) Dept. of Laboratory Medicine; 2) Dept. of Endocrinology, The Second People's Hospital of Yunnan Province, Kunming Yunnan 650021, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the association of PGC-1 α gene Gly482Ser single nucleotide polymorphism with type 2 diabetes mellitus (T2DM) in Kunming, Yunnan province. **Methods** Four hundred and thirty patients with type 2 diabetes mellitus and 431 normal volunteers (NGT) were recruited in the study. Their blood specimens were collected to extract the genomic DNA. PGC-1 α gene Gly482Ser (G>A) types were identified by HRM and DNA direct sequencing. The distribution of genotype and allele in T2DM group were investigated. **Results** AA genotype and G allele frequencies of PGC-1 α gene Gly482Ser variant were 0.209 and 0.587 in T2DM group, and were 0.139 and 0.651 in NGT group, respectively. There were significant differences for the frequencies between the two groups ($P < 0.05$). **Conclusion** PGC-1 α gene Gly482Ser single nucleotide polymorphism was associated with type 2 diabetes mellitus in Kunming, Yunnan province.

[Key words] PGC-1 α gene; Polymorphism; Type 2 diabetes mellitus; High resolution melting

过氧化物增殖激活受体协同激活子 (PPAR- γ coactivator 1 α , PGC-1 α) 是近年来发现的一种转录协同激活子, 在多种糖尿病研究模型及部分人群中可见其多态性与 2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 相关, 认为 PGC-1 α 基因可能参与了糖尿病发病^[1-3]. 本研究探讨应用 HRM 方法, 对云南省昆明地区 430 例 2 型糖尿病人群 PGC-

1 α 基因 Gly482Ser 多态性位点 (rs8192678) 进行分析, 在基因水平为糖尿病的早期诊断提供一定的客观依据.

1 对象与方法

1.1 研究对象

[基金项目] 云南省教育厅重点科研课题基金资助项目 (09C0306)

[作者简介] 邓德耀 (1964~), 女, 云南大理市人, 医学学士, 主任医师, 主要从事检验医学临床、科研和教学工作.

本研究选择了云南省昆明地区的具有医疗记录的 430 例 2 型糖尿病患者 (T2DM) 和 431 例性别和年龄相匹配的 OGTT 正常的健康志愿者 (NGT)。糖尿病诊断标准采用 WHO1999 年诊断标准。正常对照系进行糖尿病普查和筛选的随机人群中确定的非糖尿病个体。

1.2 实验方法

1.2.1 主要试剂和仪器 紫外分光光度计 (Becman 公司), PCR 扩增仪 (Perkin-Elmer 公司), DYY-10C 型电泳仪 (北京市六一仪器厂), 凝胶成像系统 (美国 BIO-RED 公司), LightCycler 480 荧光定量分析仪 (德国罗氏诊断有限公司), 即用 PCR 扩增试剂盒 (上海生工生物工程有限公司), LightCycler 480 高分辨率熔解扩增试剂盒 (德国罗氏诊断有限公司)。

1.2.2 基因组 DNA 制备 用 2% EDTA+K2 抗凝真空管采集外周静脉血 2 mL, 经典酚-氯仿-异戊醇法提取基因组 DNA, 紫外分光光度计对 DNA 浓度进行测定, 每个样本测定两次, 取其平均值。如果两次误差超过 10%, 则进行第 3 次测定, 然后取两个相近数值的平均值, 最后将所有 DNA 样品稀释至终浓度 20 ng/ μ L。

1.2.3 引物的合成 根据 Primer3.0 软件设计 PGC-1 α 基因的引物。上游引物序列: 5'-CAGTCAA-GCTGTTTTTGACGAC-3'; 下游引物序列: 5'-TCACTTTCATCTTCGCTGTCAT-3'。引物由上海生工生物工程有限公司合成, 用 HPLC 纯化。

1.2.4 PCR 扩增 在 PCR 扩增仪上进行普通 PCR 反应。PCR 体系包括 20 ng 的基因组 DNA、1 \times PCR Master mix (已含 MgCl₂)、500 nmol 的正反向引物, 并用 PCR 级别的水补足至 20 μ L。反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 55 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 再延伸 7 min, 并于 4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳, 然后用凝胶成像系统观察。

1.2.5 高分辨率熔解曲线 (high resolution melting, HRM) 分析方法检测 PGC-1 α 基因 Gly482Ser G>A 基因型: 普通 PCR 反应扩增特异性条带成功后, 在 Light Cycler 480 荧光定量分析仪上采用 HRM 方法进行 PGC-1 基因 Gly482Ser G>A 多态性分析。PCR 和 HRM 分析均在 Light Cycler 480 上进行。PCR 体系包括 10 ng 的基因组 DNA、1 \times PCR Master mix、2 mmol/L MgCl₂、200 nmol 的正反向引物, 并用 PCR 级别的水补足至 20 μ L。PCR 条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min 后行触底 PCR, 即 95 $^{\circ}$ C

10 s, 65 $^{\circ}$ C ~ 55 $^{\circ}$ C 退火 15 s, 72 $^{\circ}$ C 10 s, 55 个循环, 其中前 10 个循环 65 $^{\circ}$ C ~ 55 $^{\circ}$ C, 每个循环退火温度降一度, 后 45 个循环退火温度维持 55 $^{\circ}$ C。HRM 分析条件: 95 $^{\circ}$ C 1 min, 40 $^{\circ}$ C 1 min, 熔解曲线数据收集从 65 $^{\circ}$ C 到 95 $^{\circ}$ C, 温度上升率为 1 $^{\circ}$ C/s, 且每升高 1 $^{\circ}$ C 进行 15 次数据采集。最后 40 $^{\circ}$ C 冷却 10 s。应用 gene scanning 软件进行实时数据检测和分析。随机选取不同熔解曲线的产物共 20 例测序验证基因型结果。以测序得到的野生纯合子 GG、突变杂合子 GA 和突变纯合子 AA 分别作为标准品, 分析其它 DNA 样本基因型。

1.3 统计学分析

基因型等计数资料的比较以及 Hardy-Weinberg 平衡检验均使用 χ^2 检验。所有数据均用 SPSS 软件处理, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

根据熔解曲线荧光和峰值的差异来有效区分不同标本 PGC-1 α 基因 482 位点多态性, 结果由 Light Cycler 480 gene scanning 软件输出, 该位点的基因型分为 GG、GA、AA 三型, 且与测序结果一致 (图 1、图 2)。

PGC-1 α 基因 482 位点多态性的基因型经遗传平衡定律检验符合 Hardy-Weinberg 平衡法则, 提示研究对象具有群体代表性。AA 纯合子在 T2DM 组中的频率 0.209, 在 NGT 组中为 0.139, 前者频率高于后者, 且差异有统计学意义 ($P < 0.05$); G 等位基因和 A 等位基因频率在两组间比较, NGT 组人群拥有较低的 A 等位基因频率, 且差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 1。

3 讨论

T2DM 是多基因遗传病, 至今尚未从基因角度完全阐明其发病机制。随着疾病基因组学研究的深入, 作为第 3 代遗传标记的单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphisms, SNP) 筛查及其与疾病相关性分析近年倍受关注。SNP 是指在基因组水平上, 因单个核苷酸的转换、颠换、插入或缺失而形成的一种与疾病群体易感性和个体表型差异相关, 甚至参与某些疾病发病过程的 DNA 序列改变。PGC-1 α 是 PGC-1 家族的第一个成员。PGC-1 α 可辅助激活核受体 PPAR- α 和 PPAR- γ 及肌肉增强因子 2C (muscle enhance factor 2C, MEF2C) 等一系列与糖脂代谢有关的基因转录, 是

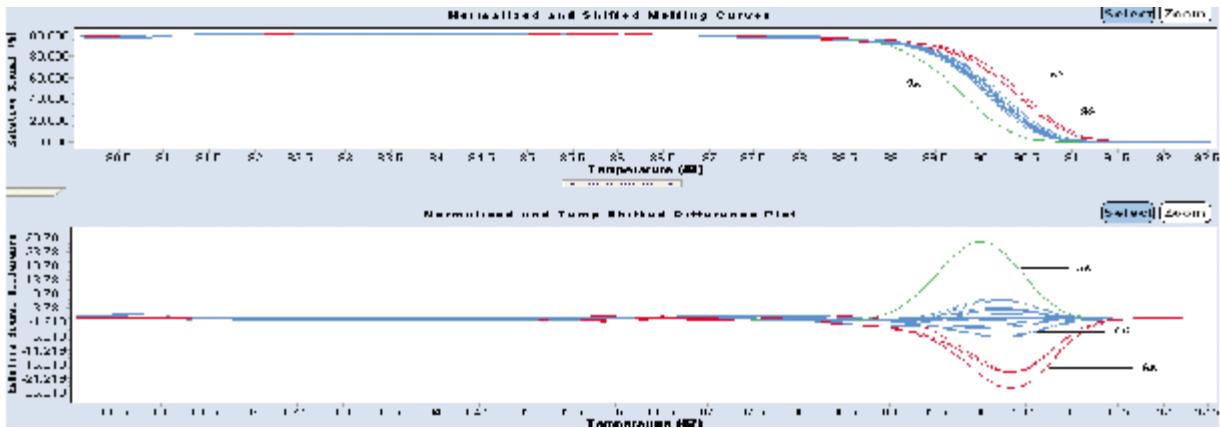


图 1 PGC-1 α 基因 482 位点多态性不同基因型的高分辨率熔解曲线

Fig. 1 The high resolution melting of different genotypes of PGC-1 α Gly482Ser polymorphism

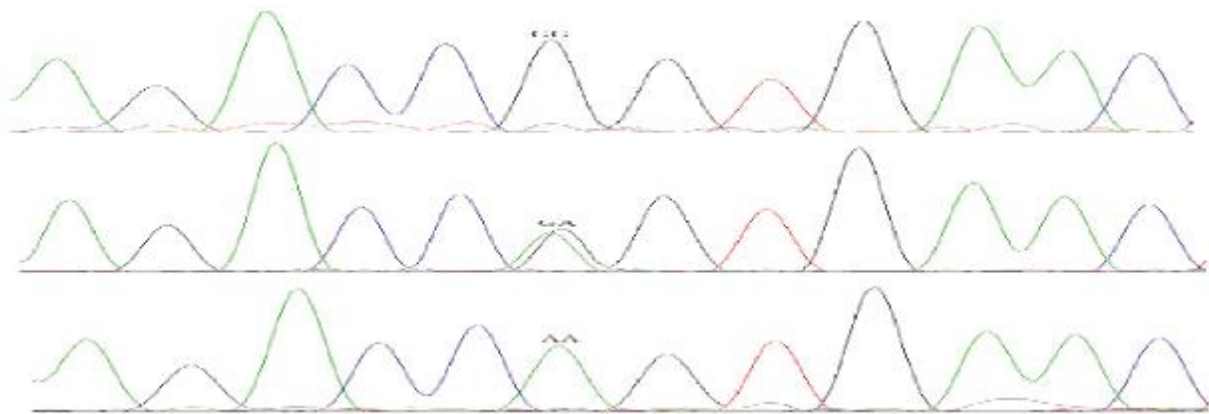


图 2 PGC-1 α 基因 482 位点多态性不同基因型的测序

Fig. 2 Sequencing of different genotypes of PGC-1 α Gly482Ser polymorphism

表 1 T2DM 组和 NGT 组和 PGC-1 α 基因型与等位基因分布频率 [n(%)]

Tab. 1 The distribution frequencies of genotype and allele of PGC-1 α of T2DM group and normal group [n(%)]

组 别	n	基因型			等位基因	
		GG	GA	AA	G	A
T2DM	430	165(38.4)	175(40.7)	90(20.9)	505(58.7)	355(41.3)
NGT	431	190(44.1)	181(42.0)	60(13.9)	561(65.1)	301(34.9)

机体能量代谢的重要调控者。MEF2C 是骨骼肌葡萄糖转运子 (glucose transporter, GLUT4) 的上游调控子, 经 PGC-1 α 辅助激活后调节骨骼肌对葡萄糖的摄取过程^[4-6]。PGC-1 α 基因中部 403-570 区域 (称为“MEF2C 结构域”) 可以与 MEF2C 多肽链的第 93-174aa 区域特异结合, 482 位点恰好位于该结构域的中心, 此位点的错义突变有可能影响 PGC-1 α 与 MEF2C 的结合, 进而影响 MEF2C 对下游基因 GLUT4 表达的调控^[7,8]。国内也有学者研究发现, PGC-1 α 基因 Gly482Ser 多态性与 T2DM 相关, 他们认为 PGC-1 α 基因可能参与了糖尿病发病^[9,10]。但是在不同国家、甚至是同一

国家的不同地区, 基因多态性位点及同一多态性位点等位基因的分布频率也不尽相同, 这种多态性分布的差异性对 2 型糖尿病的发病也存在着不同的影响, 因此本次研究仅针对 PGC-1 α 基因 Gly482-Ser 多态性与云南省昆明地区 2 型糖尿病的相关性进行分析。

本实验通过 HRM 方法对 PGC-1 α 基因 Gly482Ser 多态性进行检测, 其结果与直接测序一致, 为今后 HRM 检测方法的广泛应用提供一定的参考依据。笔者测定 861 例受试者, 结果显示, rs8192678 位点 AA 纯合子在云南省昆明地区 430 例 T2DM 中的频率为 0.209, 在 431 例正常人群中

为 0.139, 两组间具有显著性差异 ($P=0.02$); G 等位基因和 A 等位基因频率在两组间比较, NGT 组人群拥有较低的 A 等位基因频率, 且差异具有显著性意义 ($P=0.007$)。本研究观察到 PGC-1 α 基因 482 位点 A 等位基因 (包括 GA 和 AA 型) 更易出现在 2 型糖尿病人群, 且 A 等位基因频率与 2 型糖尿病的发生呈正相关。可以推测, PGC-1 α 基因 Gly482Ser 多态性与云南省昆明地区 2 型糖尿病相关, PGC-1 α 基因 482 位点 A 等位基因可能是 T2DM 的一个分子标记。

随着生活方式的改变, T2DM 发病率逐年升高, 作为一个多基因遗传性疾病, 基因在其发病中的作用至关重要。鉴于因此, 迫切需要寻找一些分子标记, 以期达到早期诊断的目的。本课题只是在应用 HRM 方法的基础上对一定量样本糖尿病人群 PGC-1 α 基因 Gly482Ser 进行了多态性分析, 观察到 PGC-1 α 基因 Gly482Ser 多态性与云南省昆明地区 2 型糖尿病相关, 并推测 A 等位基因可能是 T2DM 的一个分子标记, 下一步需要扩大样本量进行更加深入的研究。

[参考文献]

- [1] 马慧娟. PGC-1 α 与胰岛素抵抗 [J]. 心血管病学进展, 2011, 32(5):731-733.
- [2] 郭凯锋, 陈海冰. PGC-1 α 与 2 型糖尿病线粒体功能和形态结构的关系 [J]. 中华医学杂志, 2012, 92(26): 1868-1870.
- [3] MACIEJEWSKA A, SAWCZUK M, CIESZCZYK P, et al. The PPARGC1A gene Gly482Ser in Polish and Russian athletes [J]. J Sports Sci, 2012, 30(1):101-113.
- [4] 伍一鸣, 陈程, 张俊清. 过氧化物酶体增殖物激活受体- γ 辅助激活因子 1 mRNA 在 OLETF 大鼠组织表达的变化 [J]. 首都医科大学学报, 2010, 31(5):623-627.
- [5] 郝利霞, 毕力夫, 苏秀兰. PPAR- γ 及 PGC-1 基因单核苷酸多态性与 2 型糖尿病相关性研究进展 [J]. 内蒙古医学院学报, 2007, 29(2):144-148, 152.
- [6] 黄忠, 钟政, 黄群. 中国汉族人群 PGC-1 α 基因 Thr394Thr 和 Gly482Ser 变异在 2 型糖尿病家系中传递的不平衡分析 [J]. 中国临床新医学, 2012, 5(9):807-811.
- [7] CASTILLO-QUAN J I. From white to brown fat through the PGC-1 α -dependent myokine irisin: implications for diabetes and obesity [J]. Dis Model Mech, 2012, 5(3): 293-295.
- [8] 唐芸. 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 协同刺激因子 1 α 与糖脂代谢 [J]. 安徽医科大学学报, 2012, 47(9):1117-1119.
- [9] 陈燕铭, 何圣清, 梁华, 等. 过氧化物酶体增殖物辅助激活因子 1 α 基因多态性对糖异生基因转录的影响 [J]. 中华糖尿病杂志, 2011, 3(4):333-338.
- [10] 回圆嫩, 关玉峰, 李政, 等. PGC-1 α 基因 Gly482Ser 多态性与 2 型糖尿病发病的相关性研究 [J]. 大连医科大学学报, 2009, 31(3):295-298.

(2014-01-02 收稿)