

## 2 型糖尿病患者 rs4987318 基因多态性和生化指标分析

张阳东, 楚瑞雪, 翁代慧, 时磊, 陈珂

**【摘要】 目的** 观察 L-选择素(L-selectin, SELL)基因 rs4987318 单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)与 2 型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)的相关性和生化指标的变化。**方法** 应用荧光标记单碱基延伸及寡核苷酸微阵列芯片杂交技术检测 SELL 基因 rs4987318 多态性;采用全自动生化分析仪检测血脂及 C-反应蛋白(C-reactive protein, CRP)水平。**结果** T2DM 组 CC 基因型频率明显高于健康对照组( $P < 0.05$ )。T2DM 组的甘油三酯(triglyceride, TG)、载脂蛋白 B(apolipoprotein B, Apo B)和 CRP 水平显著高于对照组( $P < 0.05$ ),高密度脂蛋白胆固醇(high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C)和载脂蛋白 A1(apolipoprotein A1, Apo A1)水平显著低于对照组( $P < 0.05$ )。T2DM 组 TG 的 AA、CA、CC 型, Apo B 的 CC 型和 CRP 的 CA、CC 型的水平显著高于对照组的相同基因型( $P < 0.05$ );HDL-C 的 AA、CA、CC 型和 Apo A1 的 AA、CA 型水平显著低于对照组的相同基因型( $P < 0.05$ )。**结论** SELL 基因 rs4987318 多态性可能与 T2DM 的易感性、患者血脂代谢紊乱和血管炎症的发生有关。

**【关键词】** 2 型糖尿病; L-选择素; 单核苷酸多态性

**【中图分类号】** R 587.1

**【文献标识码】** A

### Rs4987318 Polymorphism and Clinical Biochemical Values in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus

ZHANG Yang-dong, CHU Rui-xue, WENG Dai-hui, SHI Lei, CHEN Ke. Department of Clinical Laboratory, the Second Artillery General Hospital of the People's Liberation Army, Beijing 100088, China

**【Abstract】 Objective** To investigate the association between rs4987318 single nucleotide polymorphism (SNP) in L-selectin (SELL) gene and type 2 diabetes mellitus (T2DM) and the clinical biochemical indexes. **Methods** The rs4987318 mutations in the SELL gene were analyzed with allele-specific fluorogenic oligonucleotide probes in an assay combining extension and hybridization. The levels of lipid and C-reactive protein (CRP) were detected by automatic biochemical modular system. **Results** The frequencies of CC genotype of T2DM group was significantly higher than that of the control group ( $P < 0.05$ ). In T2DM group, the serum levels of triglyceride (TG), apolipoprotein B (Apo B) and CRP were higher, and the high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) and apolipoprotein A1 (Apo A1) were lower than that in the control group ( $P < 0.05$ ). TG levels of AA, CA and CC genotype, Apo B level of CC genotype, CRP levels of CA and CC genotypes were significantly higher in T2DM group than that of the same genotypes in the control group ( $P < 0.05$ ). HDL-C levels of AA, CA and CC genotypes, Apo A1 levels of AA and CA were significantly lower in T2DM group than that of the same genotypes in the control group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Rs4987318 polymorphism in SELL may be associated with T2DM susceptibility, lipid metabolism disorder and vessel inflammation of T2DM patients.

**【Key words】** Type 2 diabetes mellitus; L-selectin; Single nucleotide polymorphism

2 型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)是一种与遗传相关、由多种病因引起的内分泌代谢疾病。单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)位点是生物多样性的物质基础,是一种最普遍的遗传变异类型。L-选择素(L-selectin, SELL)作为一种细胞黏附分子,有研究显示其 rs2229569 多态性与 T2DM 的发病有关。本研究通过探讨 SELL 基因 rs4987318 多态性的等位基因在 T2DM 患者和健康对照人群中的分布及检

测部分生化指标,研究汉族人群 rs4987318 多态性与 T2DM 的易感性及部分生化指标的关系。

### 1 对象与方法

#### 1.1 研究对象

T2DM 和对照组的纳入标准见文献[1]。T2DM 组 186 例,年龄 36~77( $59.4 \pm 9.8$ )岁,其中男 110 例,女 76 例。对照组 185 例,年龄 45~78( $61.7 \pm 5.9$ )岁,其中男 110 例,女 75 例。两组均为汉族,无血缘关系,性别、年龄无统计学差异。

1.2 引物设计和合成

PCR 引物:5'-AATCAGACCCTCTGCCAATAT -3'和5'-AGCCTCTATTTGAAAATACTGGTATAAA-3', 延伸引物: 5'-CCGCCAGTAAGACCTAGACGAAAAAAGTAGATTTCCTTCAAATGTT-3'。引物由北京赛百盛基因技术有限公司合成。

1.3 研究方法

采集受检者外周血 2 ml,EDTA-2K 抗凝,外周血白细胞 DNA 的提取、SNP 的基因分型方法参见文献[1]。用分离胶管采集受检者外周血 3 ml,分离血清,胆固醇(cholesterol,CHO)、甘油三酯(triglyceride,TG)、高密度脂蛋白胆固醇(high-density lipoprotein cholesterol,HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol,LDL-C)、载脂蛋白 A1(apolipoprotein A1, Apo A1)及载脂蛋白 B(apolipoprotein B, Apo B)应用酶法,试剂购自美国 Roche 公司;C-反应蛋白(C-reactive protein,CRP)应用高灵敏度的免疫比浊法,试剂购自芬兰 Orion 公司;美国 Roche 7600 全自动生化分析仪进行检测。

1.4 统计学处理

用中华高智 CHISS 2005 统计软件进行分析。各组数据进行正态性检验,正态分布数据组间比较采用  $t$  检验;非正态分布数据组间比较采用  $t'$  检验。基因型和等位基因频率的 Hardy-Weinberg 平衡符合程度采用美国 Beckman Coulter 公司的 GetGenos 软件分析,频率比较采用  $\chi^2$  检验,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 基因型频率分析

SELL 基因 rs4987318 基因型和等位基因在两组人群中的分布频率符合 Hardy-Weinberg 平衡,具有群体代表性。T2DM 组 CC 基因型频率明显高于健康对照组( $\chi^2=5.77,P=0.016$ )。其余各基因型和等位基因频

率 2 组间比较无统计学差异( $P>0.05$ ),见表 1。

表 1 SELL 基因 rs4987318 基因型和等位基因频率分布 [n(%)]

Table 1 Frequencies of the genotypes of rs4987318 in SELL gene [n(%)]

组别	例数	基因型			等位基因	
		AA	CA	CC	A	C
健康对照组	185	33(17.8)	91(49.2)	61(33.0)	157(42.4)	213(57.6)
T2DM 组	186	26(14.0)	75(40.3)	85(45.7)	*127(34.1)	245(65.9)

注:组间比较,\* $P<0.05$

2.2 两组生化指标比较

T2DM 组的 TG、ApoB 和 CRP 水平显著高于对照组( $t$  值依次为 3.79,2.46,3.01, $P<0.05$ ),HDL-C 和 ApoA1 水平显著低于对照组( $t$  值依次为 5.62,2.23, $P<0.05$ ),见表 2。

表 2 T2DM 组和健康对照组生化指标的比较 ( $\bar{x}\pm s$ )

Table 2 Comparison of the biochemical indexes between T2DM and control groups ( $\bar{x}\pm s$ )

变量	健康对照组	T2DM 组
CRP(mg/L)	2.39±3.89	5.64±10.46*
TCH(mmol/L)	4.51±0.98	4.50±1.06
TG(mmol/L)	1.33±0.97	1.75±1.13*
HDL-C(mmol/L)	1.33±0.45	1.11±0.29*
LDL-C(mmol/L)	2.85±0.79	2.82±0.84
ApoA1(g/L)	1.30±0.28	1.19±0.65*
ApoB(g/L)	0.88±0.22	0.95±0.27*

注:组间比较,\* $P<0.05$

2.3 各基因型间生化指标的比较

T2DM 组 TG 的 AA、CA、CC 型,ApoB 的 CC 型和 CRP 的 CA、CC 型的水平显著高于对照组的相同基因型( $t$  值依次为 3.23,2.07,2.43,3.64,2.29,2.03, $P<0.05$ );HDL-C 的 AA、CA、CC 型和 ApoA1 的 AA、CA 型水平显著低于对照组的相同基因型( $t$  值依次为 3.75,3.69,2.70,2.90,4.63, $P<0.05$ )。其余各基因型生化指标 2 组间比较无统计学差异( $P>0.05$ ),见表 3。

表 3 T2DM 组和健康对照组各基因型间生化指标的比较 ( $\bar{x}\pm s$ )

Table 3 Comparison of the biochemical indexes among different genotypes of T2DM and control groups ( $\bar{x}\pm s$ )

变量	健康对照组			T2DM 组		
	AA	CA	CC	AA	CA	CC
CRP(mg/L)	2.40±3.92	3.33±9.30	2.37±3.90	3.26±4.36	7.25±12.79*	4.94±9.30*
TCH(mmol/L)	4.59±1.01	4.57±0.96	4.36±1.00	4.28±1.00	4.43±1.06	4.63±1.08
TG(mmol/L)	1.03±0.47	1.47±1.03	1.29±1.05	1.47±0.59*	1.82±1.13*	1.77±1.26*
HDL-C(mmol/L)	1.39±0.34	1.33±0.54	1.29±0.35	1.06±0.33*	1.08±0.26*	1.15±0.30*
LDL-C(mmol/L)	2.86±0.70	2.97±0.81	2.67±0.78	2.75±0.85	2.74±0.87	2.90±0.80
ApoA1(g/L)	1.33±0.26	1.30±0.29	1.28±0.28	1.14±0.25*	1.10±0.26*	1.27±0.92
ApoB(g/L)	0.88±0.17	0.92±0.24	0.83±0.21	0.90±0.25	0.92±0.27	0.99±0.28*

注:和对照组相同基因型比较,\* $P<0.05$

### 3 讨论

SELL 作为一种高度糖基化的膜蛋白,主要表达于中性粒细胞、单核细胞和某些淋巴细胞亚群表面,与表达于活化内皮细胞表面的 E-选择素和表达于活化血小板、内皮细胞表面的 P-选择素共同构成选择素家族。SELL 参与了白细胞的活化、炎症和创伤等过程,使白细胞沿内皮细胞表面滚动、迁移和黏附,并通过与  $\beta_2$  整合素的黏附加强作用,使白细胞活化、变形、穿越血管内皮细胞,释放炎症介质介导炎症反应,是主要的炎症因子。同时 SELL 与 P-选择素相互识别,可触发白细胞与血小板结合,血流动力学改变,血流瘀滞,容易形成血栓。

胰岛素抵抗和胰岛  $\beta$  细胞受损是 T2DM 发病机制的基本环节和重要特征。SELL 与其单克隆抗体及其配体的结合,能引起肿瘤坏死因子  $\alpha$  (tumor necrosis factor alpha, TNF- $\alpha$ ) 基因的表达上调。而 TNF- $\alpha$  是导致胰岛素抵抗的主要因素之一,说明 SELL 在胰岛素抵抗的发生过程中起了一定的作用。同时 TNF- $\alpha$  也可调节肝脏 CRP 的合成。单个核苷酸碱基的突变可导致氨基酸的替换、基因表达水平和生物活性的改变。国外的研究结果显示,SELL 的 rs2229569 多态性与 T2DM 的危险因素低体重出生儿有关<sup>[2-4]</sup>,但与 T2DM 的患病率无关<sup>[5]</sup>。国内学者的研究结果显示,该多态性与东乡族人群的 T2DM 发病密切相关<sup>[6]</sup>。本研究利用荧光标记单碱基延伸及寡核苷酸微阵列芯片杂交技术对 SELL 基因的 rs4987318 多态性进行分型,结果显示 T2DM 组 CC 基因型频率明显高于健康对照组的 CC 基因型,说明 SELL 基因 rs4987318 多态性可能与 T2DM 的易患性有关,CC 基因型可能是 T2DM 的危险遗传因素之一。

T2DM 患者的高血糖可损伤内皮细胞、血小板,使 SELL 高度表达,介导大量单核细胞与内皮细胞黏附。单核细胞穿过内皮滞留于内皮下层,通过其细胞膜上的清道夫受体,大量摄入脂质形成泡沫细胞,从而诱导动脉粥样硬化的形成。SELL 介导的活化血小板与内皮细胞、白细胞的黏附、相互作用,释放活性物质,促进血管平滑肌增生、结缔组织生成,最终导致动脉粥样硬化的形成。因此 T2DM 是动脉粥样硬化的重要致病因子。硬化斑块的形成不是简单的脂质沉积,而是全身动脉的一种慢性炎症反应结果。T2DM 大血管病变以迅速发展、多部位、严重动脉粥样硬化为特点,是患者致死的主要原因。CRP 是 T2DM 患者全身动脉的一种慢性炎症反应结果。研究结果显示,

T2DM 患者血清 SELL 水平明显升高,血清 SELL 水平与 T2DM 患者的大血管病变密切相关<sup>[7]</sup>。本研究结果显示,T2DM 组的 TG、Apo B 和 CRP 水平显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ),HDL-C 和 Apo A1 水平显著低于对照组 ( $P < 0.05$ )。通过对上述 5 项生化指标不同基因型两组间比较发现,T2DM 组 TG 的 AA、CA、CC 型,Apo B 的 CC 型和 CRP 的 CA、CC 型的水平显著高于对照组的相同基因型 ( $P < 0.05$ );HDL-C 的 AA、CA、CC 型和 Apo A1 的 AA、CA 型水平显著低于对照组的相同基因型 ( $P < 0.05$ )。结果表明 T2DM 患者的血脂代谢紊乱以 TG、HDL-C、ApoA1 和 ApoB 水平异常为主。血脂代谢紊乱导致脂质沉积诱导动脉粥样硬化的形成及高血糖损伤血管内皮细胞可引起全身动脉的慢性炎症反应和 CRP 的升高,SELL 的 rs4987318 多态性与 T2DM 的血脂代谢紊乱及 CRP 水平升高相关,提示 rs4987318 多态性可能通过影响 SELL 基因表达和活性而与 T2DM 的易患性相关,进而影响 T2DM 的血脂代谢和血管炎症等并发症的发生。

检测 SELL 基因的 rs4987318 多态性对 T2DM 高危人群进行筛查,对 T2DM 患者发生血脂代谢紊乱和动脉粥样硬化等并发症进行评估具有重要的指导意义。

### 参 考 文 献

- [1] 张阳东,时磊,于敏,等.中国汉族人群亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性与 2 型糖尿病的相关性研究[J].现代检验医学杂志,2010,25(1):14-16
- [2] Derzbach L, Bokodi G, Treszl A, *et al.* Selectin polymorphisms and perinatal morbidity in low-birthweight infants[J]. Acta Paediatr, 2006, 95(10): 1213-1217
- [3] Nissen PM, Nebel C, Oksbjerg N, *et al.* Metabolomics reveals relationship between plasma inositols and birth weight: possible marker for fetal programming of type 2 diabetes[J/OL]. J Biomed Biotechnol, 2010-10-01[2011-11-11]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/med/20814537/>
- [4] Kajantie E, Osmond C, Barker DJ, *et al.* Preterm birth a risk factor for type 2 diabetes? The Helsinki birth cohort study[J]. Diabetes Care, 2010, 33(12): 2623-2625
- [5] Stavarachi M, Panduru NM, Serafinceanu C, *et al.* Investigation of P213S SELL gene polymorphism in type 2 diabetes mellitus and related end stage renal disease. A case-control study[J]. Rom J Morphol Embryol, 2011, 52(3 Suppl): 995-998
- [6] 徐三妮,刘静,郭茜,等.甘肃东乡族 L 选择素 P213S 基因多态性与 2 型糖尿病的相关性研究[J].临床荟萃, 2009, 24(16): 1384-1387
- [7] 王芳,王培娜. 2 型糖尿病患者血清 L-选择素与大血管病变的相关性研究[J]. 山东医药, 2007, 47(34): 11-12

(2011-12-23 收稿 2012-01-09 修回)