

广东汉族人群JAK2 rs7849191位点单核苷酸多态性与2型糖尿病遗传易感性研究

于海兵, 何小艺, 梁碧玉, 巫 舫, 孔丹莉, 潘海燕, 丁元林 (广东医科大学公共卫生学院, 广东东莞 523808)

摘要: 目的 了解JAK2 rs7849191位点单核苷酸多态性(SNP)与2型糖尿病遗传易感性关系。方法 采用SNPscanTM分型技术检测广东地区汉族人群中1 092例2型糖尿病患者和1 092名正常对照JAK2 rs7849191位点基因型, 比较两组中基因型及等位基因频率分布。结果 糖尿病患者和正常对照中JAK2 rs7849191位点的等位基因频率和基因型频率分布差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 广东地区汉族人群中2型糖尿病患者遗传易感性可能与JAK2 rs7849191位点SNP无关。

关键词: 2型糖尿病; 单核苷酸多态性; JAK2基因

中图分类号: R 587.1

文献标识码: A

文章编号: 2096-3610(2017)04-0329-04

Relationship between JAK2 rs7849191 single nucleotide polymorphism and genetic susceptibility in Guangdong Han population with type 2 diabetes mellitus

YU Hai-bing, HE Xiao-yi, LIANG Bi-yu, WU Shan, KONG Dan-li, PAN Hai-yan, DING Yuan-lin (School of Public Health, Guangdong Medical University, Dongguan 523808, China)

Abstract: **Objective** To investigate the relationship between JAK2 rs7849191 single nucleotide polymorphisms (SNP) and genetic susceptibility in type 2 diabetes mellitus (T2DM). **Methods** The genotypes of JAK2 rs7849191 locus in 1 092 patients with T2DM and 1 092 normal controls in Guangdong Han population were detected by SNPscanTM typing technique. Genotype and allele frequencies were analyzed in both groups. **Results** There were no significant differences in allele and genotype frequencies of JAK2 rs7849191 locus between T2DM and control groups ($P>0.05$). **Conclusion** Genetic susceptibility to type 2 diabetes mellitus may be unrelated to JAK2 rs7849191 SNP in Guangdong Han population.

Key words: type 2 diabetes mellitus; single nucleotide polymorphism; JAK2 gene

我国糖尿病患者已达1.139亿, 人均年医疗费用为3 000~5 000元, 并以近15%的比例递增, 其中2型糖尿病(T2DM)患病现状尤为严峻, T2DM及糖尿病相关并发症已成为威胁全球的健康问题, 其患病率逐渐增长给社会造成严重负担^[1-3]。2011年, T2DM成为世界十大死亡的主要原因, 预计病例数将继续增加^[4]。到2035年, 全球T2DM的患病率可能达到5.92亿^[5]。T2DM患病率的上升固然与过量饮食、运动量减少等因素有关, 而遗传因素是不容忽视的重要内因。瘦素可以通过多种途径导致胰岛素抵抗、高胰岛素血症, 而高胰岛素血症、胰岛素抵

抗又能引起瘦素的过度分泌, 如此形成恶性循环, 导致糖脂代谢异常^[6]。血浆瘦素水平受多种因素影响, 比如进食、性别、年龄、体脂分布、游离脂肪酸、糖皮质激素、细胞因子、胰岛素等, 其中胰岛素水平起着非常重要的作用。瘦素与胰岛素互为负反馈关系, 共同构成了“脂肪-胰岛素轴”。瘦素抵抗和胰岛素抵抗与“脂肪-胰岛素”轴发生紊乱有关, 二者在产生机制上可能互为因果, 并且相互作用, 共同参与了多种疾病的发生发展^[7]。现就广东汉族人群瘦素信号通路JAK2 rs7849191位点的单核苷酸多态性与T2DM遗传易感性是否存在相关性进

基金项目: 国家自然科学基金面上基金(No.81273166), 东莞市国际科技合作(含港澳台)项目(No.20135081520017), 广东高校省级重点平台和重大科研项目(No.2015KTSCX048), 东莞市医疗卫生科技计划一般项目(No.201605101290)

收稿日期: 2017-04-12; **修订日期:** 2017-06-10

作者简介: 于海兵(1981-), 男, 博士, 讲师。

通信作者: 丁元林(1967-), 男, 教授, 博士生导师, E-mail: gdmcsbd@163.com。

行研究。

1 资料和方法

1.1 病例与分组

本研究为病例对照研究, 病例为确诊的T2DM患者, 来自广东医学院附属医院、茂名市人民医院、韶关市人民医院、东莞市石龙博爱医院、东莞厚街人民医院、深圳龙华人民医院、深圳市南山人民医院、深圳市观澜人民医院、深圳市西乡人民医院、深圳市福田人民医院等10所医院的内分泌科, 共1 092例, T2DM诊断标准采用WHO(1999年)糖尿病诊断。纳入标准: (1)年龄20~70岁; (2)有糖尿病症状(高血糖所导致的多饮、多食、多尿、体重下降、皮肤瘙痒、视力模糊等急性代谢紊乱表现)随机血糖 ≥ 11.1 mmol/L; 无糖尿病症状, 空腹血糖 ≥ 7.0 mmol/L, 或葡萄糖负荷后2 h血糖 ≥ 11.1 mmol/L; (3)无其它严重疾病如心脑血管疾病、恶性肿瘤、慢性肝肾疾病等。选取同时期在同一家医院体检的健康人群为对照组, 共1 092例, 纳入标准: (1)年龄20~70岁; (2)无糖尿病家族遗传史; (3)经询问病史、体检、血糖检查及其它生化检查结果无异常。本研究经伦理委员会批准, 全部调查和取样均征得受试者同意并签署知情同意书。所有参与者均为汉族且无亲缘关系。

1.2 方法

1.2.1 现场调查 由统一培训的调查员对符合纳入标准的研究对象进行标准化的问卷调查, 内容包括年龄、性别、籍贯、职业、疾病史、病程、吸烟史、家族史、并发症、饮食及运动情况等。调查结束后, 使用身高体重秤测量受试者的身高与体重, 采用台式汞柱血压计测量坐位右臂血压, 连续测量2次, 取平均值。由内分泌科护士于清晨采集受试者外周血约5 mL, 用于临床生化指标空腹血糖(FPG)、总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白(HDL-C)、低密度脂蛋白(LDL-C)和糖化血红蛋白(HBA1C)的检测。FPG水平测定采用己糖激酶法, 血浆TC、TG、HDL-C和LDL-C的测定采用酶法。HBA1C测定采用高效液相色谱法(BIO-RADD-10TM糖化血红蛋白检测系统), 其余生化指标的检测在全自动生化分析仪上完成。

1.2.2 基因组DNA提取 所有研究对象采集外周静脉血4 mL(每管2 mL), 使用EDTA·k2充分抗凝处理, 蛋白酶K消化, 盐析法提取DNA, -80 °C保存。

1.2.3 SNP筛选与分型 利用HapMap公共数据库

(<http://www.hapmap.org>)和Haploview (ver.4.2)从基因及其上下游5 kb区域内选择tagSNP(MAF >0.05 , $r^2 \geq 0.8$), 并应用FastSNP对tagSNP的潜在功能进行预测, 选择预测分值较高的tagSNP, 本文选取JAK2基因的rs7849191。采用SNPscan™单核苷酸多态性分型技术检测对rs7849191进行分型。该技术基本原理是应用连接酶连接反应的高特异性实现对SNP位点等位基因的识别, 然后通过连接探针末端引入不同长度的非特异序列以及通过连接酶加接反应获得位点对应的不同长度连接产物, 利用标记荧光的通用引物对连接产物进行PCR扩增, 通过荧光毛细管电泳对扩增产物进行电泳分离, 最后通过对电泳图谱的分析获取SNP位点的基因型。具体实验操作步骤如下: (1)取1 μ L DNA样本, 通过1% agarose电泳检查样本质量并估计DNA质量浓度, 由于大部分样本DNA质量浓度在30~50 μ g/L, DNA不做稀释; (2)样本裂解。取4 μ L样本, 分别加入2.5 μ L 4 \times DNA lysis Buffer, 用水补足至10 μ L, 盖好膜震荡混匀离心, 在PCR仪上98 °C 5 min, 立即冰置; (3)配制连接反应预混合液。按下表配制预混合液, 考虑到分装时枪头的吸附造成损失等因素, 96个样本按100个进行配制; (4)连接反应。在冰置的降解DNA样本中, 加入10 μ L连接反应预混合液, 盖上盖膜, 轻微震荡混匀后3 000 r/min离心30 s后立即将离心后96孔板放置PCR仪上, 去除盖膜, 然后盖上96孔橡胶盖垫, 盖好PCR仪热盖, 按以下程序运行: 4 Cycles \times (94 °C 1 min, 58 °C for 4 h), 94 °C 2 min, 72 °C forever。反应产物在72 °C温浴时, 如果需要立即进行下一步实验, 则取下冰置待用, 否则, 立即 -20 °C保存, 在进行下一步实验时, 先4 °C解冻10 min, 然后冰置待用; (5)多重荧光PCR反应。按下表配制PCR预混合液, 考虑到分装时枪头的吸附造成损失等因素96个样本按100个进行配制。然后取新96孔板放置于冰上, 每孔分装19 μ L PCR预混合液, 然后将上述连接产物每孔取1 μ L加入该96孔板的对应位置, 盖上盖膜, 轻微震荡混匀后3 000 r/min离心30 s, 然后立即(越快越好)将离心后96孔板放置PCR仪上, 去除盖膜, 然后盖上96孔橡胶盖垫, 盖好PCR仪热盖, 按以下程序运行: 95 °C for 2 min, 9 \times (94 °C 20 s, 62 °C -0.5 °C/cycle 40 s, 72 °C 1.5 min), 25 \times (94 °C 20 s, 57 °C 40 s, 72 °C 1.5 min), 60 °C 1 h, 4 °C forever; (6) PCR产物上ABI3130XL测序仪: PCR产物稀释10倍后, 取1 μ L与0.5 μ L Liz500 SIZE STANDARD, 8.5 μ L Hi-Di 混匀, 95 °C变性5 min后

上ABI3130XL测序仪; (7) ABI3130XL测序仪上收集的原始数据用GeneMapper4.1(Applied Biosystems, USA)分析, 得到PCR产物的荧光标记和长度以及对应的SNP位点/等位基因信息。

1.3 统计学处理

采用SPSS 20.0软件进行数据处理, 两组的一般资料和基因型及等位基因频率比较用 χ^2 检验、Student-t检验, 多因素 Logistic 回归分析计算调整年龄和性别后的OR及95%CI, 拟合优度 χ^2 检验用于基因型分布的 Hardy-Weinberg平衡检验。计量数据

用均数±标准差表示。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

本研究共纳入病例组1 092例, 对照组1 092例, 剔除SNP分型缺失率 $>20\%$ 的个体, 最终以病例组为1 067例, 对照组1 054例进入统计学分析。病例组的平均年龄、体质量指数、空腹血糖水平和甘油三酯水平均高于对照组($P<0.01$), 详见表1。

表1 两组基线资料比较

参数	病例组(n=1 067)	对照组(n=1 054)	P值
男性/%	532(49.86)	532(50.47)	>0.05
平均年龄/岁	59.71±11.87	57.23±10.41	<0.001
身体质量指数/(kg/m ²)	24.60±3.24	23.58±3.33	<0.001
空腹血糖/(mmol/L)	10.46±4.50	5.60±1.60	<0.001
总胆固醇/(mmol/L)	5.31±1.59	5.43±1.27	0.056
甘油三酯/(mmol/L)	2.24±1.03	1.31±0.96	<0.001
高密度脂蛋白/(mmol/L)	1.35±0.54	1.37±0.42	0.398
低密度脂蛋白/(mmol/L)	2.73±1.04	3.03±0.65	<0.001
高血压/%	396(37.11)	380(36.05)	>0.05
心率/(次/min)	76.40±15.26	76.20±10.92	>0.05

2.2 JAK2 rs7849191多态性基因型和等位基因频率比较

基因型频率分布符合 Hardy-Weinberg平衡($P=0.351$)。JAK2 rs7849191位点C和T等位基因频率

在两组之间比较, 差异无统计学意义($P>0.05$); CC、CT和TT基因型频率在两组比较分布差异亦无统计学意义($P>0.05$), 见表2。

表2 病例组和对照组基因型与等位基因分布频率比较 例(%)

组别	n	基因型			等位基因	
		CC	CT	TT	C	T
病例组	1067	420(39.4)	509(47.7)	138(12.9)	674(63.2)	785(36.8)
对照组	1054	412(39.1)	506(48.0)	136(12.9)	665(63.1)	778(36.9)

2.3 两组遗传模型比较

调整协变量之前后, 两组位点rs7849191的共显性、显性、隐性及超显性遗传模型间差异均无统计学意义($P>0.05$), 见表3。

3 讨论

T2DM是一种进展性疾病, 其患病率不断上升, 现已成为一种严重威胁到人类健康的疾病, 糖尿病不仅给患病个体带来了肉体和精神上的损害并导致寿命的缩短, 还给个人、国家带来了沉重的经

济负担, 我国T2DM短期患病率的增加, 原因有可能是由于城市化、老龄化、生活方式改变、肥胖和超重的比例增加、筛查方法、易感性、糖尿病患者生存期增加等^[8]。病因学上T2DM是由于遗传因素和环境因素共同参与和相互作用导致的复杂疾病, 且有明显的家族遗传倾向, 约有40%的T2DM患者存在糖尿病相关的家族史^[9]。

瘦素是一种由脂肪组织分泌的激素, 可通过抑制神经肽Y(NPY)基因的表达和分泌, 使得交感神经抑制、交感神经兴奋, 从而减少胰岛素的分泌。瘦

表3 两组遗传模型的四种模型关联分析结果

组别	共显性			显性		隐性		超显性	
	C/C	C/G	G/G	C/C	C/G+G/G	C/C+C/G	GG	C/C+G/G	C/G
对照组	412	506	136	412	642	918	136	548	506
病例组	420	509	138	420	647	929	138	558	509
OR(95%CI)	1	0.99(0.82~1.19)	1.00(0.76~1.31)	1	1.12(0.83~1.18)	1	1.00(0.78~1.29)	1	0.99(0.83~1.17)
P值		0.990	0.952		0.901		0.982		0.893
AdOR(95%CI)	1	0.98(0.81~1.18)	1.01(0.76~1.33)	1	0.98(0.82~1.18)	1	1.02(0.79~1.32)	1	0.97(0.82~1.16)
AdP		0.963	0.910		0.852		0.882		0.774

素是一种由肥胖基因编码的由白色脂肪分泌合成的蛋白质类激素,在机体能量维持正常的代谢平衡中起着关键的作用。瘦素是一种蛋白质类激素,与肥胖、糖尿病等多种以胰岛素抵抗为基础的疾病有密切相关的联系^[10]。瘦素主要是能够控制食欲、减少体内脂肪积累,从而维持正常的机体脂肪沉积作用。

JAK是一类非受体酪氨酸激酶家族,包括4个成员,JAK1、JAK2、JAK3及TYK1。JAK2是JAK家族的一个重要作用的成员。JAK2是一种细胞质蛋白酪氨酸激酶,可引发多种信号通路^[11]。

本研究就广东汉族人群瘦素信号通路中的JAK2 rs7849191位点的单核苷酸多态性与T2DM遗传易感性进行研究。国内外关于两者的相关性研究仍较少,Wang等^[12]研究者研究未发现JAK2 rs7849191位点与血脂跟血糖水平之间存在关系,但尚未进一步说明是否也与T2DM易感性无关。本研究对广东地区1 092名汉族T2DM患者和1 092名汉族健康对照者的JAK2 rs7849191位点基因型分析结果显示,病例组和对照组rs7849191位点A、C等位基因频率分别63.2%、36.8%和63.1%、36.9%;两位点基因型频率和等位基因频率经调整协变量前后在两组之间的分布差异均无统计学意义($P>0.05$),提示在广东地区汉族人群中JAK2 rs7849191位点与T2DM间可能没有直接关联。这提示广东地区汉族人群T2DM患者遗传易感性可能与JAK2 rs7849191位点单核苷酸多态性无关。

综上所述,本研究虽未发现广东地区汉族人群中JAK2 rs7849191位点单核苷酸多态性与广东地区汉族人群T2DM患者遗传易感性有关,很有可能是以下原因造成:(1)本研究的群体只是广东省汉族人群,人员具有一定的局限性;(2)本实验研究位点没有涵盖该基因所有的SNP位点。下一步的研究将考虑进一步增加JAK2基因SNP位点的实验并加以认证,为T2DM提供新的治疗靶点。

参考文献:

- [1] Yang S H, Dou K F, Song W J. Prevalence of diabetes among men and women in China[J]. N Engl J Med, 2010, 362(12): 1090-1101.
- [2] Prawitt J, Caron S, Staels B. Bile acid metabolism and the pathogenesis of type 2 diabetes[J]. Curr Diab Rep, 2011, 11(3): 160-166.
- [3] 朱小蔚, 黄方, 方放, 等. 法尼酯衍生物X受体基因多态性与2型糖尿病的相关性研究[J]. 医学研究生学报, 2016, 29(8): 832-835.
- [4] Luna G I, Da Silva I C, Sanchez M N. Association between-308G/A TNFA Polymorphism and Susceptibility to Type 2 Diabetes Mellitus: A Systematic Review[J]. J Diab Rep, 2016,2016(1): 1-6.
- [5] Farooq R, Amin S, Hayat Bhat M, et al. Type 2 diabetes and metabolic syndrome-adipokine levels and effect of drugs[J]. Gynecol Endocrinol, 2017, 33(1): 75-78.
- [6] Yadav A, Kataria M A, Saini V, et al. Role of leptin and adiponectin in insulin resistance[J]. Clin Chim Acta, 2013, 417: 80-84.
- [7] 赵荷瑀, 李兴. 瘦素与胰岛素抵抗的研究进展[J]. 医学综述, 2010, 16(11): 1684-1687.
- [8] 中华医学会糖尿病学分会. 中国2型糖尿病防治指南(2013年版)[J]. 中国医学前沿杂志(电子版), 2015, 7(03): 26-89.
- [9] Cornelis M C, Zaitlen N, Hu F B, et al. Genetic and environmental components of family history in type 2 diabetes[J]. Hum Genet, 2015, 134(2): 259-267.
- [10] Dragano N R, Haddadtovolli R, Velloso L A. Leptin, Neuroinflammation and Obesity[J]. Endocrine Immunology, 2017, 48:84-96.
- [11] Ge D, Gooljar S B, Kyriakou T, et al. Association of common JAK2 variants with body fat, insulin sensitivity and lipid profile[J]. Obesity (Silver Spring), 2008, 16(2): 492-496.
- [12] Wang Y C, McPherson K, Marsh T, et al. Health and economic burden of the projected obesity trends in the USA and the UK[J]. Lancet, 2011, 378(9793): 815-825.