

2 型糖尿病 FOXC2 基因 C-1702T 多态性与血清总胆固醇相关性

念馨, 苏艳丹, 秦琳, 蒋世钊, 李红
(昆明医学院第一附属医院内分泌科, 云南昆明 650032)

[摘要] 目的 探讨叉头框 C2 (FOXC2) 基因 3' 非翻译区 C-1702T 多态性与 2 型糖尿病的相关性. 方法 选择云南省汉族人 280 例, 其中 2 型糖尿病患者 159 例, 无糖尿病家族史的健康对照 121 例. 应用半巢式 PCR 检测 FOXC2 基因 3' 非翻译区 C-1702T 多态性. 结果 在 2 型糖尿病组和对照组中, FOXC2 基因 C-1702T 的基因型和等位基因频率无统计学意义 ($P > 0.05$), 并与性别无关 ($P > 0.05$). 在 2 型糖尿病患者中与 FOXC2 基因 1702 杂合子和突变型 (C/T 和 T/T) 相比, FOXC2 基因 1702C/C 野生型者, 其血清胆固醇的水平明显升高 ($P < 0.05$). 结论 FOXC2 基因 C-1702T 基因多态性与性别及 2 型糖尿病没有相关性. 2 型糖尿病患者 FOXC2 基因 3' 非翻译区 C-1702T 多态性与血清总胆固醇相关.

[关键词] FOXC2; 2 型糖尿病; 多态性

[中图分类号] R587.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003 - 4706 (2012) 02 - 0031 - 04

The Preliminary Analysis of the FOXC2 C-1702T Polymorphism is Associated with Cholesterol

NIAN Xin, SU Yan - dan, QIN Lin, JIANG Shi - zhao, LI Hong
(Dept. of Endocrinology, The First Affiliated Hospital of Kunming Medical University,
Kunming Yunnan 650032, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the association between the forkhead transcription factor C2 (FOXC2) C-1702T transition in the putative promoter region and type 2 diabetes. **Methods** 280 han people in Yunnan province were selected as subjects. A case-control study was performed in 159 type 2 diabetic patients and 121 control subjects. The FOXC2 gene C-1702T polymorphism was detected by heminested PCR. **Results** FOXC2 C-1702T allele and genotype distribution did not differ between patients with type 2 diabetes and control subjects ($P > 0.05$), and had no association with gender. The C/C genotype was associated with higher level of cholesterol ($P < 0.05$) among type 2 diabetic patients. **Conclusions** FOXC2 C-1702T is not associated with gender and type 2 diabetes. FOXC2 C-1702T is associated with serum cholesterol.

[Key words] Forkhead transcription factor; Type 2 diabetes; Polymorphism

FOXC2 (叉头框 C2, forkhead box C2) 是人类 forkhead 家族的一个转录因子, 位于染色体 16q24.3 区域^[1]. Cederberg 等^[2]从人类脂肪 cDNA 文库中找到了 FOXC2 基因, 发现 FOXC2 基因有调控脂肪细胞代谢的作用. Kovacs 等^[3]对 Pima 印第安人群 FOXC2 基因编码区进行了测序, 寻找相应的 SNP 位点, 通过测序发现 4 种变异: 启动子区域 2 个位点: C-512T 和 G-350T; 3' 端: C-1548T 和 C-1702T. Jason^[4]研究发现 FOXC2 基因的过度表达

可以减轻饮食所致的胰岛素抵抗. 目前, 关于中国人 FOXC2 基因多态性与代谢综合征、2 型糖尿病的关系少有报导, 本研究旨在探讨 FOXC2 基因多态性与中国人 2 型糖尿病, 糖脂代谢的关系.

1 对象与方法

1.1 对象

2 型糖尿病组: 抽取 2007 年和 2008 年在昆明

[基金项目] 2005 年云南省教育厅科研基金资助项目 (5y0336)

[作者简介] 念馨 (1975 ~), 女, 云南昆明市人, 医学硕士, 主治医师, 主要从事内分泌科临床工作.

[通讯作者] 李红. E-mail: nianxinkm@hotmail.com

医学院第一附属医院内分泌科住院的2型糖尿病患者159例为2型糖尿病组(T2DM),其中男性81例,女性78例,年龄25~81岁,平均(58.07±12.85)岁。

对照组(NC组):抽取无糖尿病家族史,无糖、脂代谢异常的健康对照者121名,其中男性59名,女性62名,年龄31~72岁,平均(54.15±11.47)岁。

1.2 方法

所有研究对象均禁食12h后清晨测量身高、体重、腰围、臀围,并抽取空腹血生化指标检测及抽取DNA。

空腹血浆血糖、血脂、尿酸检验使用全自动生化分析仪检测,DNA抽取用蛋白酶K法。

半巢式PCR扩增引物:第一次扩增引物:上游引物为5'GCCGACGGATTCTGCGCTC3',下游引物5'CGCTCCTCGCTGGCTCCA3'。内扩引物:上游引物为5'CCAGCCGTCTGTGAAGAAT3'和5'CCAGCCGTCTGTGAAGAAC3',下游引物为5'CACAGCACA-GCCGTCCTGGTAG3',分别构成C和T2个反应体系。引物均由上海英骏生物公司合成。

首先以第一对扩增引物扩增出310bp的片段作为模板,再以半巢式引物(第二扩增引物)扩增出143bp的最终产物。

第一扩增反应体系组成:模板DNA 2.0 μL, 10×Buffer 5.0 μL,上游引物(20mM) 1.0 μL,下游引物(20mM) 1.0 μL, TaqDNA酶(5U/μL) 1.0 μL, H₂O 35.0 μL, MgCl₂ 4.0 μL, dNTP 1.0 μL,构成50.0 μL体系,退火温度为60℃。

半巢式扩增体系组成:以第一扩增产物为模板 2.01 μL, 10×Buffer 5.0 μL,上游引物(20mM)

1.0 μL, P2(20mM) 1.0 μL, TaqDNA酶(5U/μL) 1.0 μL, MgCl₂ 4.0 μL, dNTP 1.0 μL,构成50.0 μL体系,退火温度为60℃。

半巢式PCR循环程序:以上反应体系离心2s后放在PE9600基因扩增仪中,94℃预变性5min,以94℃变性45s,60℃退火45s,72℃延伸45s的条件循环扩增,扩增次数35次,然后72℃终末延伸5min。

半巢式PCR扩增产物分析:制备2%琼脂糖凝胶,加入0.5 μg/mL溴化乙锭。PCR产物10 μL和Marker 2 μL分别加样,在100V电压下电泳40min,电泳结束后用Gel Doc1000紫外图像分析系统观察143bp的产物片段。

1.3 统计学处理

所有数据录入计算机,运用SPSS软件包进行统计分析,计量资料服从正态分布且方差齐者以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,非正态分布计量资料以中位数(M)和25%~75%百分位数表示[M(P₂₅-P₇₅)].统计学方法:基因型和等位基因频率分布组间比较用 χ^2 检验,不同基因型之间生化差异比较用t检验和秩和检验, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 2型糖尿病组和正常对照组临床资料比较

2型糖尿病组159例,正常对照组121例。2组间除年龄、体重、体重指数、血总胆固醇、游离脂肪酸、血尿酸外,其它数值均有统计学意义($P < 0.01$),见表1表2。

表1 2型糖尿病组和正常对照组临床资料 [$\bar{x} \pm s$, M (P₂₅-P₇₅)]

Tab. 1 Comparison of clinical characteristics between normal control and type 2 diabetes mellitus [$\bar{x} \pm s$, M (P₂₅-P₇₅)]

组别	n	性别(男/女)	年龄(岁)	腰臀比	体重(kg)	体重指数(kg/m ²)	BMI FFA (mmol/L)
T2DM组	159	81/78	58.07±12.85	0.93(0.90~1.00)**	63.30±11.25	23.74±3.57	1.26(1.04~1.47)**
NC组	121	59/62	54.15±11.47	0.89(0.80~0.94)	61.21±11.23	22.63±3.22	1.21(1.17~1.62)

与NC比较,** $P < 0.01$ 。

表2 2型糖尿病组和正常对照组临床资料 [$\bar{x} \pm s$, M (P₂₅-P₇₅)]

Tab. 2 Comparison of clinical characteristics between normal control and type 2 diabetes mellitus [$\bar{x} \pm s$, M (P₂₅-P₇₅)]

组别	n	TG (mmol/L)	HDL (mmol/L)	LDL (mmol/L)	UA (μmol/L)	FPG (mmol/L)
T2DM组	159	1.44(1.05~2.10)**	0.97(0.80~1.18)**	2.52±0.89**	294.84±90.79	6.80(5.50~9.40)**
NC组	121	1.15(0.88~1.44)	1.23(1.03~1.40)	2.56±1.44	316.24±88.71	4.80(4.58~5.11)

与NC比较,** $P < 0.01$ 。

2.2 2 型糖尿病组和对照组基因型及等位基因频率分布

用半巢式 PCR 方法, 观察扩增产物, 第一次扩增产物为 310 bp 的产物, 如图 1 所示. 第一次扩增的 C 和 T 反应体系, 出现 143 bp 的产物片断, 如只有 C 反应体系出现, 则为野生型 C/C; 如只有 T 反应体系出现, 则为突变型 T/T; 如 C 和 T 反应体系均出现, 则为杂合子 C/T, 如图 2 示. 计算样本基因型频率, 符合 Hardy-Weinberg 平衡.

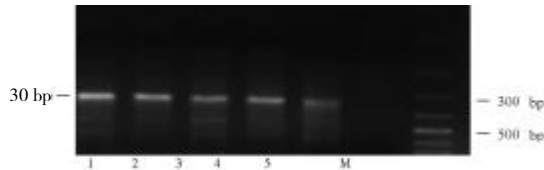


图 1 FOXC2 基因 C-1702T 的第一次扩增产物电泳图
Fig. 1 PCR electropherogram of FOXC2 C-1702T

M:100 bp 的 Marker; 1~5: 为扩增产物.

2 型糖尿病和正常对照组间 FOXC2 基因 C-1702T 多态性基因型和等位基因频率分布情况, 见表 3. 两组比较: 基因型分布比较, $\chi^2 = 1.885$, $P = 0.390$; 等位基因频率分布比较, $\chi^2 = 0.755$, $P = 0.385$, 均无统计学差异.

糖尿病组和正常对照组 C-1702T 不同基因型性别分布情况 (见表 4), 糖尿病组 $\chi^2 = 1.369$, $P = 0.504$, 正常对照组 $\chi^2 = 1.997$, $P = 0.368$. 两组比较在基因型分布上与性别无相关性.

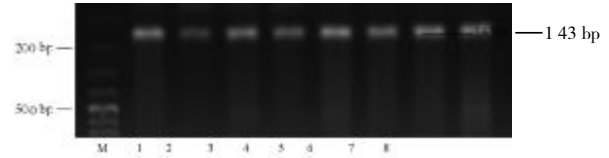


图 2 FOXC2 基因 C-1702T 的第二次扩增产物电泳图
Fig. 2 Heminested PCR electropherogram of FOXC2 C-1702T

M:100bp 的 Marker; 1~8 为扩增产物.

表 3 FOXC2 基因 C-1702T 多态性基因型及等位基因频率分布比较 [n(%)]

Tab. 3 Comparison of distributions FOXC2 C-1702T genotypes and gender between normal control and type 2 diabetes mellitus groups [n(%)]

组 别	基因型 Genotype			等位基因 Allele	
	C/C	C/T	T/T	C	T
NC 组	53(43.8)	50(41.3)	18(14.9)	103(60.2)	68(39.8)
T2DM 组	58(36.5)	70(44.0)	31(19.5)	128(55.9)	101(44.1)

表 4 两组 FOXC2 基因 C-1702T 多态性基因型分布与性别的关系比较 [n(%)]

Tab. 4 Comparison of distributions FOXC2 C-1702T genotypes and sex between normal control and type 2 diabetes mellitus groups [n(%)]

组 别	性别	C/C	C/T	T/T
T2DM 组	男	26(32.1)	38(46.9)	17(21.0)
	女	32(41.0)	32(41.0)	14(18.0)
NC 组	男	22(37.2)	27(45.8)	10(17.0)
	女	31(50.1)	23(37.1)	8(12.8)

2.3 2 型糖尿病不同基因型组间临床和生化特性比较

在 2 型糖尿病患者中与 FOXC2 基因 1702 杂合子和突变型 (C/T 和 T/T) 相比, FOXC2 基因

1702C/C 野生型者具有更高的血清胆固醇水平, $P < 0.05$, 而体重指数、腰臀比、HDL、TG、LDL、空腹血糖、空腹胰岛素, 患脂肪肝的情况在不同基因型者间无明显差异 ($P > 0.05$), 见表 5、表 6.

表 5 2 型糖尿病不同基因型者的临床指标比较 [$\bar{x} \pm s$, M ($P_{25}-P_{75}$)]

Tab. 5 Comparison of clinical characteristics between genotypes of in type 2 diabetes mellitus [$\bar{x} \pm s$, M ($P_{25}-P_{75}$)]

基因型	腰臀比	体重指数 (kg/m ²)	脂肪肝	Chol (mmol/L)	TG (mmol/L)
C/C	0.86 ± 0.11	22.85 ± 3.74	1(0-1)	4.61 ± 0.77*	1.45(1.07 ~ 1.96)
C/Tand T/T	0.89 ± 0.08	22.91 ± 3.66	1(0-1)	4.25 ± 0.98	1.87(1.12 ~ 2.10)

脂肪肝表示: 0 为无脂肪肝, 1 为轻度脂肪肝, 2 为中度脂肪肝 (以 B 超检查为依据). 与 C/Tand T/T 比较, * $P < 0.05$.

表 6 2 型糖尿病不同基因型者的临床指标比较 $[(\bar{x} \pm s, M (P_{25}-P_{75}))]$ Tab. 6 Comparison of clinical characteristics between genotypes of in type 2 diabetes mellitus $[(\bar{x} \pm s, M (P_{25}-P_{75}))]$

基因型	HDL (mmol/L)	LDL (mmol/L)	UA (μ mol/L)	FPG (mmol/L)	空腹 C-肽
C/C	0.97(0.81 ~ 1.20)	2.81 \pm 0.82	254.99 \pm 74.56	9.57 \pm 3.97	1.49 \pm 0.99
C/Tand T/T	0.97(0.80 ~ 1.17)	2.75 \pm 0.89	306.26 \pm 99.38	9.34 \pm 2.67	1.76 \pm 0.78

3 讨论

FOXC2 基因是新近发现的与脂代谢有关的转录因子。FOXC2 可以激活脂肪细胞分化中的转录因子，由此推论 FOXC2 基因可能是脂肪细胞分化的主要效应基因。相关研究证据表明^[2,3]，FOXC2 可调节血脂及胰岛素敏感性，还可减轻高脂饮食诱导的肥胖和胰岛素抵抗。对 FOXC2 基因测序发现其等位基因变异与甘油三酯水平有关^[4]。

目前发现的最常见的 FOXC2 基因变异位于 5' 端非翻译区，其次是 3' 端非翻译区，表现为点突变。5' 端非翻译区常见的基因变异有 C-512T 和 G-350T，3' 端非翻译区常见变异为 C-1548T 和 C-1702T^[5]。Miaklannemark 等^[6]研究发现，对 FOXC2 的编码区和侧链内含子序列进行基因扫描，发现 5' 端非翻译区存在多态性 (C-512T)。65% 体重正常个体的染色体携带 T 等位基因，T 等位基因与胰岛素敏感性增高相关 [HOMA-IR (2.0 \pm 0.1) vs (2.3 \pm 0.2), $P=0.007$]。因此，FOXC2 基因表达增加可减轻胰岛素抵抗，此基因或其附近区域的变异可能影响胰岛素抵抗综合征的表现。Kovacs 等^[7]研究发现，C-512T 突变与 Pima 人群 (男性和女性) 的 BMI ($P=0.03$)、体脂百分率 ($P=0.02$) 相关；此外，还与女性的基础葡萄糖转化率 (Basal glucose turnover) 和空腹血浆甘油三酯值相关。在瑞典、丹麦、及 Pima 印第安人中均发现此变异位点与血浆甘油三酯水平负相关^[7,8]。目前相关人群的研究并未显示出 FOXC2 基因 C-512T 变异与 2 型糖尿病有关。Horra^[9]研究认为对于家族性混合高脂血症，FOXC2 的表达有潜在的作用。而对 FOXC2 基因 C-1702T 的研究甚少。

在本研究中，笔者对 FOXC2 基因的变异位点 3' 非翻译区 1702 位点进行的研究，发现在 2 型糖尿病和正常对照间其基因型和等位基因频率无明显差异，且与性别无相关性。而 2 型糖尿病患者中 C/C 基因型的携带者血清胆固醇的水平明显升高 ($P<0.05$)。说明 FOXC2 基因 C-1702T 与脂代谢有关。

本研究的结果初步表明，2 型糖尿病患者 FOXC2 基因 C-1702T 多态性与血清胆固醇相关。

这些指标与肥胖、代谢综合征相关，FOXC2 基因是否与代谢综合征有关，值得进一步研究，可能为阐明肥胖、胰岛素抵抗及 2 型糖尿病的发病机制提供依据。

[参考文献]

- [1] MANGION J, RAHMAN N, MANSOUR S, et al. A gene for lymphedema-distichiasis maps to 16q24.3 [J]. *Am J Hum Genet*, 1999, 65:427 - 432.
- [2] CERDERBERG A, GRONNING LM, AHREN B, et al. FOXC2 is a winged helix gene that counteracts obesity, hypertriglyceridemia, and diet-induced insulin resistance [J]. *Cell*, 2001, 106:563 - 573.
- [3] KOVACS P, LEHN-STEFAN A, STUMVOLL M, et al. Genetic variation in the human winged helix/forkhead transcription factor gene FOXC2 in Pima Indians [J]. *Diabetes*, 2003, 52(5):1 292 - 1 295.
- [4] JASON K, KIM, HYO-JEONG KIM, et al. Adipocyte-specific overexpression of FOXC2 prevents diet-induced increases in intramuscular fatty acyl coa and insulin resistance [J]. *Diabetes*, 2005, 54:1 657 - 1 663.
- [5] KIM J K, KIM H J, PARK S Y, et al. Transgenic mice overexpressing FOXC2 are protected from high diet-induced insulin resistance in skeletal muscle and liver [J]. *Diabetes*, 2003, 52(1):314.
- [6] PAJUKAMA P, ALLAYEE H, KRASS K L, et al. Combined analysis of genome scans of dutch and finnish families reveals a susceptibility locus for high-density lipoprotein cholesterol on chromosome 16q [J]. *Am J Hum Genet*, 2003, 72:903 - 917.
- [7] OSAWA H, ONUMA H, MURAKAMI A, et al. Systematic search for single nucleotide polymorphisms in the FOXC2 gene: the absence of evidence for the association of three frequent single nucleotide polymorphisms and four common haplotypes with Japanese type 2 diabetes [J]. *Diabetes*, 2003, 52(2):562 - 567.
- [8] KLANNEMARK M, CARLSSON E, CEDERBERG A, et al. FOXC2 is a candidate gene for insulin resistance [R]. *ADA 62 Scientific Sessions*, 2002, 199.
- [9] AHORRA, J SALAZAR. Prox-1 and FOXC2 gene expression in adipose tissue: a potential contributory role of the lymphatic system to familial combined hyperlipidaemia [J]. *Atherosclerosis*, 2009, 206(2):343 - 345.

(2012-01-14 收稿)