

佤族人群 CCR5 基因 59029G/A 多态性与糖尿病前期和糖尿病的相关性研究

李会芳¹⁾, 宋滇平¹⁾, 王玉明²⁾, 张 娴³⁾

(1) 昆明医学院第一附属医院糖尿病科, 2) 检验科, 云南昆明 650032; 3) 昆明市第一人民医院内分泌科, 云南昆明 650011)

[摘要] **目的** 探讨 CC 类趋化因子受体 5 (CCR5) 基因启动子区 59029G/A 多态性与云南省临沧市沧源佤族人群糖尿病前期 (PD) 及糖尿病 (DM) 的相关性. **方法** 运用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性 (PCR-RFLP) 技术检测 73 例 PD, 36 例 DM 患者和 60 例健康对照者 (NC) 的 CCR5 基因 59029G/A 多态性. 比较分析各组间基因型和等位基因频率以及相关临床资料. **结果** (1) 佤族 PD 组、DM 组和 NC 组间的基因型和等位基因频率无统计学意义 ($P > 0.05$); (2) 腹型肥胖和年龄可能是 PD 和 DM 发生的危险因素, 高血压和血胆固醇 (TC) 可能是 PD 发生的危险因素 ($P < 0.05$). **结论** CCR5 基因 59029G/A 多态性可能不是佤族人群 PD 及 DM 发生的遗传危险因素; 改善生活方式, 减少高血压和腹型肥胖的发生可能会减少 PD 和 DM 的发生.

[关键词] 佤族; 糖尿病前期; 糖尿病; CCR5; 多态性

[中图分类号] R587.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-4706 (2012) 04-0051-06

Association of the 59029G/A Polymorphism of CCR5 Gene and Pre-diabetes, Diabetes Mellitus in Wa People

LI Hui-fang¹⁾, SONG Dian-ping¹⁾, WANG Yu-ming²⁾, ZHANG xian³⁾

(1) Dept. of Diabetes; 2) Dept. of Clinical Laboratory, The 1st Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650032; 3) Dept. of Endocrinology, The First People's Hospital of Kunming, Kunming Yunnan 650032, China)

[Abstract] **Objective** To explore the association of the 59029G/A polymorphism of CCR5 gene with Pre-diabetes and Diabetes mellitus in Wa People. **Methods** The genotype was detected by PCR-RFLP in 73 Wa people with pre-diabetes (PD), 36 Wa people with Diabetes mellitus (DM) and 60 healthy Wa people as normal controls (NC). The genotype and allele frequencies and relative clinic data were compared among groups, then recruit in the survey by questionnaire. **Results** (1) There was no statistically significant differences in genotypes and allele frequencies distributions among the three groups ($P > 0.05$). (2) Abdominal obesity and age were risk factors of PD and DM development, hypertension and total cholesterol (TC) were risk factors of PD development in Wa people. **Conclusions** The 59029G/A polymorphism of CCR5 may not be genetic risk factors for PD and DM in Wa People. To improve lifestyle, reduce high blood pressure and abdominal obesity may reduce the occurrence of PD and DM.

[Key words] Wa people; Pre-diabetes; Diabetes mellitus; CCR5; Polymorphism

2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 以慢性低度炎症状态为特征^[1], 且早于 T2DM 发生的数年前已有炎症因子相关免疫紊乱的存在^[2]. Bogdanski 等^[3]的研究发现 T2DM 患者胰岛素治疗前

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (30760087,81160104)

[作者简介] 李会芳 (1975~), 女, 山西昔阳县人, 医学硕士, 主治医师, 主要从事内分泌代谢病诊疗工作.

[通讯作者] 张娴. E-mail:zhangxliuhf729@163.com

末梢血单核巨噬细胞表面 CCR5 浓度和血清正常 T 细胞表达和分泌的活性调节蛋白 RANTES (Regulated on activation normal T-cell expressed and secreted) 的水平明显高于对照组, 而且 CCR5 及其配体 RANTES 介导的炎症反应在 T2DM 发病过程中起重要作用. Mokubo 等^[4]研究发现 CCR5 启动子区 59029A 阳性基因携带者末梢血单核细胞 CCR5 的表达是增加的, 因此, 笔者旨在探讨 CCR5 基因 59029G/A 多态性与云南佤族糖代谢异常的相关性.

1 对象与方法

1.1 研究对象

所有研究对象选自 2009 年 4 月至 5 月期间在云南省临沧市沧源佤族自治县筛查的 20 岁以上, 居住满 20 a, 3 代无族外通婚的佤族居民.

将空腹血糖调节受损 (impaired fasting glucose, IFG) 和 / 或糖耐量异常 (impaired glucose tolerance, IGT) 者作为糖尿病前期 (PD) 组, 共 73 例, 男 19 例, 女 54 例, 年龄 (45.42 ± 12.10) 岁. 糖尿病 (DM) 组: 共 36 例, 男 6 例, 女 30 例, 年龄 (49.39 ± 13.53) 岁. 排除既往明确甲状腺功能亢进症、心血管疾病、恶性肿瘤等个体. 参见 1999 年 WHO 糖尿病毛细血管全血诊断标准.

正常对照组 (NC): 共 60 例, 男 22 例、女 38 例, 年龄 (39.47 ± 13.33) 岁. 无糖尿病、高血压病史, 血糖筛查正常的健康个体.

1.2 研究方法

1.2.1 研究对象分组采集血标本 禁食 8 ~ 12 h 后, 采外周静脉血 3 mL 及手指端毛细血管全血 5 μ L, 按仪器说明使用血糖仪分析血糖值, 按诊断标准分组采集血标本于 -20°C 条件保存, 所有研究对象均签署知情同意书.

1.2.2 问卷及体格检查 采用自行编制的调查表, 由经过培训的调查员现场或入户进行问卷调查, 主要包括一般情况 (性别、年龄、职业、文化程度等)、吸烟、饮酒、饮食习惯、糖尿病、高血压既往患病史等. 测量血压、身高、体重, 计算体重指数 (BMI).

1.2.3 临床及生化指标检测 AU5400 全自动生化分析仪检测相关生化指标; 用放免法检测空腹胰岛素和 C 肽水平; 用乳胶凝集实验法测定糖化血红蛋白 (HbA1c).

1.2.4 CCR5 基因 59029G/A 多态性检测 用小量全血基因组 DNA 快速提取试剂盒 (北京博迈德科

技公司) 分次抽提静脉血白细胞 DNA 作为模板. 以寡核苷酸 5'-CCCGTGAGCCCATAGTTAAACT-C-3' 为上游序列, 5'-GATTCAGCTAAGACTCAT-CTCTCTGC-3' 为下游序列 (大连宝生物工程公司) 进行 PCR, 选用限制性内切酶 Bsp1286 I^[5] (MBI Fermentas 公司) 对 PCR 产物进行酶切定型. AA 基因型有 780 bp 和 199 bp 2 条条带; GA 基因型有 780 bp、199 bp、643 bp 和 137 bp 4 条片段 (由于 137 bp 片段是经历了 2 次酶切的产物, 故浓度较淡, 电泳图显示不清晰); GG 基因型有 643 bp、137 bp 和 199 bp 3 条条带. 以上酶切结果抽样给予测序证实 (见图 1).

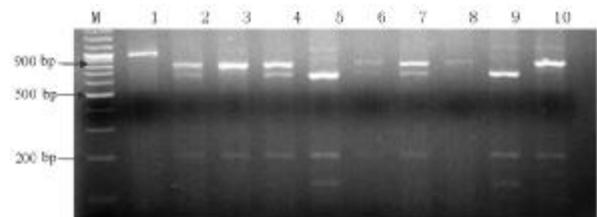


图 1 CCR5 基因扩增产物酶切电泳图

Fig. 1 Electropherogram of the enzyme Bsp1286 I products of CCR5

M:Marker; 3、8、10:AA; 2、4、6、7:GA; 5、9:GG; 1:PCR 产物.

1.3 统计方法

基因型和等位基因频率用基因计数法计数, 研究对象符合 Hardy-Weinberg 平衡. 组间基因型频率和等位基因频率比较用 χ^2 检验. 临床变量和生化指标符合正态分布以 ($\bar{x} \pm s$) 描述, 组间均数比较用方差分析或 t 检验 (方差不齐用 t' 检验); 计量资料不符合正态分布, 则以中位数 \pm 四分位数间距进行描述, 组间采用秩和检验进行统计分析. 以二分类 Logistic 回归分析 PD 及 DM 的相关危险因素, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

佤族 NC 组、PD 和 DM 组间该位点基因型和等位基因频率比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 1.

2.1 临床特征的比较

佤族 NC 组、PD 和 DM 组间临床及生化指标的比较, DM 和 PD 组的女性例数、年龄、SBP、DBP 和 WHR 大于 NC 组; PD 组 TC 低于 NC 组;

差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 2~4.

无论是在 NC 组还是在 PD 和 / 或 DM 组中, 携带 CCR5 基因 59029G/A 多态性不同基因型个体间各项临床指标比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$).

2.2 佤族 PD 及 DM 相关危险因素的 Logistic 回归分析

将所有样本入选为分析对象, 以是否处于 PD 为因变量, 年龄、性别、文化、是否有高血压、BMI、TC、TG、HDL、LDL、是否腹型肥胖[据

2003 年《中国成人超重和肥胖症预防控制指南》进行分层]、是否听说过糖尿病、是否喜欢吃甜食、吃油的情况、吃蔬菜的情况、是否抽烟、是否饮酒作为自变量, 做二分类 Logistic 回归分析, 结果显示佤族 PD 发生的危险因素有: 高血压、年龄、TC 和腹型肥胖 (见表 5). 以是否处于 DM 为因变量, 与 PD 发生与否取相同自变量进行 Logistic 回归分析, 结果显示佤族 DM 发生的危险因素有: 年龄和腹型肥胖 (见表 6).

表 1 3 组间该位点基因型和等位基因频率比较 [n(%)]

Tab. 1 Comparison of genotype and allele frequencies among three groups [n(%)]

组别	n	基因型			等位基因	
		GG	GA	AA	G	A
NC 组	60	19(31.7)	22(36.7)	19(31.7)	60(50.0)	60(50.0)
PD 组	73	20(27.4)	37(50.7)	16(21.9)	77(52.7)	69(47.3)
DM 组	36	11(30.6)	14(38.9)	11(30.6)	36(50.0)	36(50.0)
总数	169	50(29.6)	73(43.2)	46(27.2)	173(51.2)	165(48.8)

表 2 3 组间各临床及生化指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Comparison of clinical data among three groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	男/女	年龄 (岁)	SBP (mmHg)	DBP (mmHg)
NC 组	22/38 ^{▲△}	39.47 ± 13.33 ^{▲△}	111.25 ± 16.20 ^{▲△}	70.00 ± 20.00 ^{▲△}
PD 组	19/54	45.42 ± 12.10	120.00 ± 27.00	80.00 ± 20.00
DM 组	6/30	49.39 ± 13.53	121.14 ± 16.43	78.72 ± 10.69

与 DM 组比较, [▲] $P < 0.05$; 与 PD 组比较, [△] $P < 0.05$.

表 3 3 组间各临床及生化指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 3 Comparison of clinical data among three groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	TC (mmol/L)	TG (mmol/L)	HDL (mmol/L)	LDL (mmol/L)
NC 组	4.40 ± 1.03 [△]	0.93 ± 0.64	1.21 ± 0.36	1.21 ± 0.36
PD 组	3.97 ± 1.03	1.12 ± 0.51	1.31 ± 0.29	1.31 ± 0.29
DM 组	4.12 ± 1.01	1.19 ± 0.48	1.28 ± 0.25	1.28 ± 0.24

与 PD 组比较, [△] $P < 0.05$.

表 4 3 组间各临床及生化指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 4 Comparison of clinical data among three groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	BMI (kg/m ²)	WHR	FINS (μ IU/mL)	FCP (ng/mL)	HbA1C (%)
NC 组	21.89 ± 2.72	0.90 ± 0.52 ^{▲△}	-	-	-
PD 组	21.86 ± 3.41	0.94 ± 0.45	6.60 ± 4.24	1.01 ± 0.71	7.16 ± 0.70
DM 组	22.40 ± 4.79	0.95 ± 0.47	7.52 ± 3.81	1.02 ± 0.53	7.27 ± 0.83

与 DM 组比较, [▲] $P < 0.05$; 与 PD 组比较, [△] $P < 0.05$.

表 5 佤族 PD 相关危险因素的 Logistic 回归分析

Tab. 5 Logistic regression analysis of the risk factors of PD in Wa People

因素	B	S.E	Wald	df	P	OR	95% CI
高血压	1.441	0.542	7.075	1	0.008	4.226	1.461 ~ 12.222
年龄	0.037	0.016	5.224	1	0.022	1.037	1.005 ~ 1.071
TC	-0.411	0.199	4.247	1	0.039	0.663	0.449 ~ 0.980
腹型肥胖	1.678	0.544	9.542	1	0.002	5.354	1.845 ~ 15.542

表 6 佤族 DM 相关危险因素的 Logistic 回归分析

Tab. 6 Logistic regression analysis of the risk factors of DM in Wa People

因素	B	S.E	Wald	df	P	OR	95% CI
年龄	0.052	0.018	8.290	1	0.004	1.054	1.017 ~ 1.092
腹型肥胖	2.084	0.807	6.659	1	0.010	8.034	1.651 ~ 39.103

3 讨论

T2DM 以胰岛素抵抗和胰岛素分泌相对不足为主要发病机制。肥胖、胰岛素抵抗和 T2DM 以慢性低度炎症状态为特征, DM 状态下机体炎性免疫细胞增加, 这些细胞可加剧炎性细胞因子的生成, 这一过程有潜在增加胰岛素抵抗的作用, 而且可使 DM 患者的血糖控制更加困难^[6]。Tolppanen 等^[1]的研究发现 CCR5 及其配体 RANTES 在肥胖者的脂肪组织中是上调的, 且肥胖者脂肪组织中巨噬细胞的浸润增加, 这样可使多种炎性介质分泌增加, 另外也发现内脏脂肪增加与前炎症状态的脂肪因子正常平衡紊乱有关, 高度提示炎性因子及其受体可能通过影响机体的胰岛素抵抗而与糖尿病的发生有关, 与 Venza 等^[9]的结论基本一致。代谢紊乱发生和发展过程中内在炎症和免疫反应由趋化因子及其受体控制^[3]。

CCR5 属趋化因子受体的一种, 是 G 蛋白偶联受体的亚家族成员, 存在于外周 T 淋巴细胞、单核和巨噬细胞, 它的自然配体有 RANTES, CCR5 及 RANTES 介导作用与炎性因子表达及其在炎症部位的集聚密切相关。越来越多的证据表明 T2DM 患者末梢血单核和巨噬细胞表面 CCR5 浓度增高^[7], Bogdanski 等^[8]发现新诊断 T2DM 患者末梢血单核和巨噬细胞表面 CCR5 浓度和血清 RANTES 水平明显增高, 胰岛素治疗 5 周后, 这些细胞表面 CCR5 表达和血清 RANTES 水平明显下降, 不仅提示 T2DM 炎性反应是增加的, 而且胰岛素治疗可阻止这一过程的早期阶段, 进一步肯定了 T2DM 与炎症过程的激活有关。尽管有许多研究探讨了 T2DM 与急性期蛋白和前炎症细胞因子的关系, 但不同炎性介质在

发病机制中的作用仍然不是很清楚。

Mokubo 等^[4]对 CCR5 基因 59029G/A 多态性与 DM 肾病的相关研究表明 CCR5 基因 59029A 阳性基因型携带者末梢血单核细胞 CCR5 的表达是增加的, 而 CCR5 又与 T2DM 相关的炎症反应密切相关, 因此, 笔者着重研究 CCR5 基因 59029G/A 多态性是否通过影响自身表达而与佤族人群 PD 和 DM 发生有关, 结果显示各组间基因型和等位基因频率无统计学差异, Logistic 回归分析表明这一多态性可能不是佤族人群 PD 和 DM 发生的遗传危险因素, 也可能与佤族人群生活水平极低, 以从事体力劳动为生, 而且体重指数均值在 21.0 kg/m² 左右, 后天因素不足以使这一可能的遗传危险因素发挥显性作用。另外本研究还发现年龄和腹型肥胖是 PD 和 DM 发生的危险因素, 与多数研究结论一致。高血压和高胆固醇 (TC) 水平是 PD 发生的危险因素, 这与糖代谢紊乱与动脉功能障碍和多种细胞类型功能变化有关相一致^[3]。佤族人群以食用动物油为主, 也是 TC 升高的原因之一, 因此改善生活方式减少高血压及腹型肥胖的发生对不同程度糖代谢异常有一定的预防作用。

本研究涉及经济文化相对落后的少数民族, 开展研究工作困难较大, 仍有待于扩大样本量进一步深入研究, 为少数民族糖尿病的防治提供更多的依据。

[参考文献]

- [1] TOLPPANEN A M, PULKKINEN L, HERDER C, et al. The genetic variation of the tenomodulin gene (TNMD) is associated with serum levels of systemic immune mediators the

- finnish diabetes prevention study [J]. Genet Med, 2008, 10(7):536-544.
- [2] HERDER C, HAASTERT B, MULLER-SCHLZE S, et al. Association of systemic chemokine concentrations with impaired glucose tolerance and type diabetes: results from the cooperative health research in the region of Augsburg survey S4 (KORA S4) [J]. Diabetes, 2005, 54(suppl2):S11-17.
- [3] BOGDANSKI P, PUPEK M D, DYTFFELD J, et al. Influence of insulin therapy on expression of chemokine receptor CCR5 and selected inflammatory markers in patients with type 2 diabetes mellitus [J]. Int J Clin Pharmacol Ther, 2007, 45(10):563-567.
- [4] MOKUBO A, TANAKA Y, NAKAJIMA K, et al. Chemotactic cytokine receptor 5 (CCR5) gene promoter polymorphism (59029A/G) is associated with diabetic nephropathy in Japanese patients with type 2 diabetes: A 10-year longitudinal study [J]. Diabetes Research and Clinical Practice, 2006, 73:89-94.
- [5] NAKAJIMA K, TANAKA Y, NOMIYAMA T, et al. Chemokine receptor genotype is associated with diabetic nephropathy in Japanese with type 2 diabetes [J]. Diabetes, 2002, 51(1):238-242.
- [6] VENZA I, VISALLI M, CUCINOTTA M, et al. Proinflammatory gene expression at chronic periodontitis and peri-implantitis sites in patients with or without type 2 diabetes [J]. J Periodontol, 2010, 81:99-108.
- [7] DYTFFELD J, BOGDANSKI P, PUPEK-MUSIALIK D, et al. Expression of chemokine receptor CCR5 in patients with type 2 diabetes [J]. Merkuriz Lekarski, 2006, 20:195-198.
- (2012-03-02 收稿)

(上接第 50 页)

3.3 学生对指导老师的满意度

九成以上的学生对指导老师的态度是满意或比较满意,这说明学生对指导老师的满意度非常高。这可能与大部分学生在参与大学生创新性实验计划项目之前并没有接触过科研,对这块领域比较陌生,缺乏相关的基础知识,同学们开展项目的难度大,而指导老师在整个项目的申报、实施、评估、结题中都起到了重要的引导作用有关。

学生对指导老师也提出了很好的建议,如提高学生参与度,让学生多参与,以学生做为主,老师指导为辅,让学生真正学到知识。

[参考文献]

- [1] 陈曦,冯希平. 对国家大学生创新实验计划实践的思考 [J]. 西北医学教育, 2009, 17(1):13.
- [2] 王祖源,毛骏健,吴於人. 实施“国家大学生创新实验计划”的体会 [J]. 中国大学教育, 2007, (9):26.
- [3] 雷恩骏,赵为禄. 国家大学生创新实验计划 促进医学实验教学的研究 [J]. 中国高等医学教育, 2010, (11):10.
- [4] 姚文轩,滕召胜. 运用大学生创新性实验计划培养创新能力的实践与思考 [J]. 高等教育研究学报, 2010, 33(2):96.

(2012-02-07 收稿)