

## 2 型糖尿病危险因素的多因素 logistic 回归分析

鲁一兵 缪珩 王华 何戎华 金卫新 华子春

**【摘要】** 目的 探讨多种因素与 2 型糖尿病发生的关系。方法 对南京地区汉族 106 例 2 型糖尿病患者和 102 例正常对照者解偶联蛋白 3 (UCP<sub>3</sub>)、激素敏感脂酶 (HSL) 和蛋白酪氨酸磷酸化酶 1B (PTP-1B) 基因的微卫星标记多态性进行分析,并结合临床参数进行多因素非条件 logistic 回归分析。结果 单因素非条件 logistic 回归分析结果有显著意义的变量为年龄、收缩压、空腹胰岛素、胆固醇、甘油三酯、高密度脂蛋白、低密度脂蛋白、载脂蛋白 B、脂蛋白(α)、UCP<sub>3</sub> 等位基因 1、3、6 和 7、HSL 等位基因 5 和 9。多因素非条件 logistic 回归分析发现 2 型糖尿病的发病与 UCP<sub>3</sub> 等位基因 6 和 7、收缩压、载脂蛋白 B、脂蛋白(α)呈正相关,与 HSL 等位基因 5、高密度脂蛋白呈负相关,均具有统计学意义。结论 UCP<sub>3</sub> 基因等位基因 6 和 7、收缩压、载脂蛋白 B、脂蛋白(α)在南京地区汉族人群 2 型糖尿病的发病中可能起一定的作用,而 HSL 基因等位基因 5、高密度脂蛋白可能起一定的保护作用。

**【关键词】** 2 型糖尿病;基因;危险因素;非条件 logistic 回归分析

**Multivariate logistic regression analysis on the risk factors of type 2 diabetes mellitus** LU Yibing\*, MIAO Heng, WANG Hua, et al. \*Department of Endocrinology, The Second Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210011, China

**【Abstract】 Objective** To explore the relationship between multivariate factors and type 2 diabetes mellitus. **Methods** Polymorphisms of microsatellite markers in uncoupling protein 3 (UCP<sub>3</sub>) gene, hormone-sensitive lipase (HSL) gene and protein tyrosine phosphatase-1B (PTP-1B) gene were tested in 106 patients with type 2 diabetes and 102 control subjects by performing polymerase chain reaction (PCR), polyacrylamide gel electrophoresis and silver staining. Multivariate logistic regression analysis was performed by all factors. **Results** Through univariate analysis, type 2 diabetes had significantly positive associations with age, systolic blood pressure (SBP), fasting insulin (FINS) level, cholesterol, triglyceride, low-density lipoprotein, apolipoprotein B (ApoB), α lipoprotein, UCP<sub>3</sub> gene allele 6, UCP<sub>3</sub> gene allele 7, HSL gene allele 9, and negative associations with UCP<sub>3</sub> gene allele 1 and 3, HSL gene allele 5, high-density lipoprotein. The results of multivariate logistic analysis showed that UCP<sub>3</sub> gene allele 6, UCP<sub>3</sub> gene allele 7, SBP, ApoB, α lipoprotein were still positively related to type 2 diabetes, while HSL gene allele 5, high-density lipoprotein were still negatively related to type 2 diabetes. **Conclusion** Our data showed that UCP<sub>3</sub> gene allele 6, UCP<sub>3</sub> gene allele 7, SBP, abnormality of plasma ApoB and α lipoprotein might play a role in the development of type 2 diabetes. HSL gene allele 5, high-density lipoprotein might play some protective role in the development of type 2 diabetes.

**【Key words】** Type 2 diabetes mellitus; Gene; Risk factors; Multivariate logistic regression analysis

流行病学研究显示 2 型糖尿病具有强烈的遗传基础,由于牵涉到多个基因及环境因素的多重影响,使得糖尿病的发病机理异常复杂,至今病因仍然不

明。以前的流行病学调查已发现一些因素与 2 型糖尿病发生有关<sup>[1]</sup>,但研究中较少与 2 型糖尿病发病可能相关的基因等一些遗传因素进行综合分析。因此,我们对南京地区汉族 106 例 2 型糖尿病患者和 102 例正常对照者解偶联蛋白 3 (uncoupling protein 3, UCP<sub>3</sub>) 基因、激素敏感脂酶 (hormone-sensitive lipase, HSL) 基因和蛋白酪氨酸磷酸化酶 1B (protein tyrosine phosphatase-1B, PTP-1B) 基因各等位基因及其临床参数进行多因素非条件 logistic

基金项目 国家自然科学基金资助项目(39500072) 江苏省教委科研基金资助项目(99KJB320002)

作者单位 210011 南京医科大学第二附属医院内分泌科(鲁一兵、缪珩),南京医科大学第一附属医院内分泌科(王华、何戎华),南京大学医药生物技术国家重点实验室(金卫新、华子春)

回归分析 ,从分子流行病学角度初步探讨它们在 2 型糖尿病病因中所占的地位。

### 材料和方法

#### 一、研究对象

根据 1985 年 WHO 糖尿病诊断标准 ,选择门诊 2 型糖尿病患者 106 例 (2 型糖尿病组) ,男 45 例 ,女 61 例 ,平均年龄 (58.06 ± 10.21) 岁。同时期健康体检者 102 例 (对照组) ,男 42 例 ,女 60 例 ,平均年龄 (62.20 ± 10.74) 岁。经 75 g 葡萄糖耐量试验排除糖尿病。以上研究对象均为南京地区汉族 ,无血缘关系和糖尿病家族史 ,分别进行流行病学问卷调查 ,测量身高、体重、腰围、臀围。

#### 二、方法

1. 临床检测 :所有研究对象分别测定空腹血糖 (FBG) ,餐后 2 h 血糖 (PBG) ,空腹胰岛素 (FINS) ,餐后 2 h 胰岛素 (PINS) ,空腹 C 肽 (FCP) ,餐后 2 h C 肽 (PCP) ,血浆胆固醇 (TC) ,甘油三酯 (TG) ,高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-c) ,低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-c) ,载脂蛋白 A<sub>1</sub> (ApoA<sub>1</sub>) ,载脂蛋白 B (ApoB) ,脂蛋白 α [Lp(α)]

2. 微卫星标记多态性检测 :取外周血白细胞 ,酚-氯仿抽提 DNA。PCR 引物由上海生物工程公司合成。引物设计来源于 PC-GDB (genome database) (<http://gdbwww.gdb.org>)。UCP<sub>3</sub> :上游引物 5'-CAGACTATTCTCATTGCTGC-3' ,下游引物 5'-GGACTTCTAAGCCTCCATAA-3'。HSL :上游引物 5'-CTCAGCAGGGAAACAGGACTG-3' ,下游引物 5'-GTTTGAGCCACTGCACTCAGC-3'。PTP-1B :上游引物 5'-GCATATACATGGAGGGGAA-3' ,下游引物 5'-GATTTTCAGGTGGATAAGATTAGC-3'。PCR 反应体积 25 μl ,基因组 DNA 100 ng ,引物 0.375 μmol/L , MgCl<sub>2</sub> 1.5 mmol/L , dNTP 200 μmol/L , Taq 酶 1 U (Shanghai Promega 公司生产) ,PCR 条件 :94℃ 预变性 5 min ,继之 35 个循环 ,每个循环中变性 94℃ 45 s ,退火 58℃ 45 s ,延伸 72℃ 45 s ,最后 72℃ 再延伸 5 min。PCR 仪采用 Perkin Elmer 公司 480 型。4% 变性聚丙烯酰胺凝胶 60W 电泳 1 k (电泳仪为 ECPS3000/150 ,Pharmacia) 后银染 ,参照分子量标记 pBR322DNA/MSPI Marker ,读取等位基因的编码。

#### 三、数据处理与统计学分析

体重指数 (BMI) = 体重 (kg) / 身高<sup>2</sup> (m<sup>2</sup>) ,腰臀

比值 (WHR) = 腰围 / 臀围。基因型分布作 Hardy-Weinberg 平衡吻合度检验。以 2 型糖尿病发病与否为因变量 (y = 0 ,1) ,以所选择的研究因素为自变量 ,按表 1 的规格量化。采用 SPSS 8.0 for windows 统计软件进行单因素非条件 logistic 回归分析 ,在此基础上选择有意义的变量 ,进行多因素非条件 logistic 回归分析。

表 1 主要研究因素及赋值方法

自变量	赋值方法
性别	男 = 0 ,女 = 1
年龄 (岁)	< 40 = 0 ; 40 ~ 60 = 1 ; > 60 = 2
BMI	< 24 = 0 ; 24 ~ 27 = 1 ; > 27 = 2
WHR	< 0.9 = 0 ; 0.9 ~ 1.0 = 1 ; > 1.0 = 2
收缩压 (SBP)*	< 18.67 = 0 ; 18.67 ~ 21.33 = 1 ; > 21.33 = 2
舒张压 (DBP)*	< 12 = 0 ; 12 ~ 12.67 = 1 ; > 12.67 = 2
FINS (mIU/L)	< 5 = 0 ; 5 ~ 25 = 1 ; > 25 = 2
PINS (mIU/L)	< 25 = 0 ; 25 ~ 75 = 1 ; > 75 = 2
FCP (pmol/L)	< 200 = 0 ; 200 ~ 400 = 1 ; > 400 = 2
PCP (pmol/L)	< 300 = 0 ; 300 ~ 1 500 = 1 ; > 1 500 = 2
TC (mmol/L)	< 4.2 = 0 ; 4.2 ~ 6.0 = 1 ; > 6.0 = 2
TG (mmol/L)	< 1.2 = 0 ; 1.2 ~ 1.8 = 1 ; > 1.8 = 2
HDL-c (mmol/L)	< 0.8 = 0 ; 0.8 ~ 1.6 = 1 ; > 1.6 = 2
LDL-c (mmol/L)	< 1.5 = 0 ; 1.5 ~ 3.0 = 1 ; > 3.0 = 2
ApoA <sub>1</sub> (g/L)	< 1.0 = 0 ; 1.0 ~ 2.0 = 1 ; > 2.0 = 2
ApoB (g/L)	< 0.8 = 0 ; 0.8 ~ 1.2 = 1 ; > 1.2 = 2
Lp(α) (mg/L)	< 200 = 0 ; 200 ~ 300 = 1 ; > 300 = 2
UCP <sub>3</sub> 各等位基因	不含该等位基因者 = 0 ,含该等位基因者 = 1
HSL 各等位基因	不含该等位基因者 = 0 ,含该等位基因者 = 1
PTP-1B 各等位基因	不含该等位基因者 = 0 ,含该等位基因者 = 1

\* 计量单位为 kPa

### 结 果

1. 基因型分布 :106 例 2 型糖尿病患者和 102 例正常对照中分别检出 UCP<sub>3</sub> 基因 8 种等位基因片段 :1 (135 bp) ,2 (137 bp) ,3 (139 bp) ,4 (141 bp) ,5 (143 bp) ,6 (145 bp) ,7 (147 bp) ,8 (149 bp) ,共 18 种基因型。HSL 基因 7 种等位基因片段 :3 (232 bp) ,4 (234 bp) ,5 (236 bp) ,6 (238 bp) ,7 (240 bp) ,8 (242 bp) ,9 (244 bp) ,共 15 种基因型。PTP-1B 基因 8 种等位基因片段 :1 (177 bp) ,2 (179 bp) ,3 (181 bp) ,4 (183 bp) ,5 (185 bp) ,6 (187 bp) ,7 (189 bp) ,8 (191 bp) ,共 19 种基因型。3 个基因的基因型分布均符合 Hardy-Weinberg 平衡定律。

2 型糖尿病组和正常对照组 UCP<sub>3</sub>、HSL、PTP-1B 基因各等位基因频率分布的比较发现 UCP<sub>3</sub> 等位基因 6、7 与 2 型糖尿病的发生呈显著性正相关 ,HSL 等位基因 5 与 2 型糖尿病的发生呈显著性负

相关。并分别在两组中对有该等位基因与没有该等位基因者的临床参数进行比较 结果差异无显著性。

2. 单因素非条件 logistic 回归分析 :在所选择的 41 个变量中,与 2 型糖尿病发病呈显著性正相关的变量有:年龄 ( $OR = 1.6784$ )、SBP ( $OR = 1.9090$ )、FINS ( $OR = 1.9112$ )、TC ( $OR = 1.9930$ )、TG ( $OR = 1.6324$ )、LDL-c ( $OR = 2.1326$ )、ApoB ( $OR = 2.9848$ )、Lp( $\alpha$ ) ( $OR = 1.9167$ )、UCP<sub>3</sub> 等位基因 6 ( $OR = 7.2014$ )、UCP<sub>3</sub> 等位基因 7 ( $OR = 9.1246$ )、HSL 等位基因 9 ( $OR = 7.1318$ )。与 2 型糖尿病发病呈显著性负相关的变量有 HDL-c ( $OR = 0.6461$ )、UCP<sub>3</sub> 等位基因 1 ( $OR = 0.3121$ )、UCP<sub>3</sub> 等位基因 3 ( $OR = 0.5123$ )、HSL 等位基因 5 ( $OR = 0.4149$ )。

3. 多因素非条件 logistic 回归分析 :将单因素分析  $P$  值  $< 0.05$  或  $P$  值在 0.05 左右的变量引入 logistic 回归方程,进行多因素非条件 logistic 回归分析,有显著性意义的结果见表 2。

表 2 多因素非条件 logistic 回归分析结果

自变量	$\beta$	$s_x(\beta)$	$P$ 值	$OR$ 值	$OR95\% CI$
SBP	0.550	0.279	0.048	1.733	1.004 ~ 2.994
HDL-c	-1.051	0.348	0.003	0.350	0.177 ~ 0.692
ApoB	0.755	0.293	0.010	2.218	1.199 ~ 3.778
Lp( $\alpha$ )	0.465	0.228	0.042	1.592	1.018 ~ 2.491
UCP <sub>3</sub> 6	1.631	0.738	0.027	5.111	1.203 ~ 21.710
UCP <sub>3</sub> 7	1.820	0.778	0.019	6.170	1.343 ~ 28.351
HSL5	-1.025	0.522	0.050	0.359	0.129 ~ 0.999

多因素非条件 logistic 回归分析表明,最终进入主效应模型的因素即影响 2 型糖尿病发生的独立因素为 SBP、ApoB、Lp( $\alpha$ )、UCP<sub>3</sub> 基因等位基因 6 和 7、HSL 等位基因 5、HDL-c。从  $OR$  值来看,UCP<sub>3</sub> 等位基因 6、UCP<sub>3</sub> 等位基因 7 意义较大( $OR$  值分别为 5.111 和 6.170),而 HDL-c ( $OR$  值为 0.350)起保护作用。

## 讨 论

据国内外流行病学研究报道,2 型糖尿病的危险因素包括:糖尿病家族史、肥胖、种族、年龄、糖耐量降低、高血压、HDL-c  $< 0.9$  mmol/L、TG  $> 2.82$  mmol/L、体力活动下降以及女性巨大婴儿 ( $> 4$  kg) 生育史和妊娠糖尿病<sup>[1]</sup>。随着分子流行病学的发展,人们对 2 型糖尿病流行病学的研究也不仅仅局限在是否有糖尿病家族史这一方面上,而是深入到研究糖尿病的易感基因以及其他致病因素如何对易

感基因的表达产生影响。微卫星标记的应用使人们认识到糖尿病与不同等位基因间的关系<sup>[2]</sup>。

2 型糖尿病是多基因遗传病,牵涉到多个基因及其他致病因素的多重影响以及它们之间的相互作用。通过多因素 logistic 回归分析方法可以寻找影响 2 型糖尿病发病的独立危险因素。在单因素回归分析中发现 2 型糖尿病的发病与年龄、SBP、FINS、TC、TG、LDL-c、ApoB、Lp( $\alpha$ )、UCP<sub>3</sub> 等位基因 6 和 7、HSL 等位基因 9 呈显著性正相关,疾病的发生与 UCP<sub>3</sub> 等位基因 1 和 3、HSL 等位基因 5、HDL-c 呈显著性负相关。为了控制混杂因素的影响,比较客观地评价各因素所起的作用及相互关系,在单因素分析的基础上建立了多因素非条件 logistic 回归模型。

在多因素非条件 logistic 回归模型中,经其他因素校正后,疾病的发生仍然与 UCP<sub>3</sub> 等位基因 6 和 7 及 SBP、ApoB、Lp( $\alpha$ ) 呈正相关,与 HSL 等位基因 5、HDL-c 呈负相关,均具有统计学意义。表明 UCP<sub>3</sub> 等位基因 6 和 7 及 SBP、ApoB、Lp( $\alpha$ ) 是 2 型糖尿病发病独立的危险因素。而 HSL 等位基因 5、HDL-c 可能起一定的保护作用。

UCP<sub>3</sub> 基因变异与 2 型糖尿病发病间的分子机制目前还不清楚。Krook 等<sup>[3]</sup>发现 2 型糖尿病患者骨骼肌中 UCP<sub>3</sub> mRNA 水平特异性降低了 41%。Otabe 等<sup>[4]</sup>认为 UCP<sub>3</sub> 基因内含子 4C  $\rightarrow$  T 突变、5 号外显子 Tyr210Tyr 突变与肥胖患者 2 型糖尿病发生明显相关。Argyropoulos 等<sup>[5]</sup>发现 UCP<sub>3</sub> 基因外显子 6 号连接区突变的 African-American 糖尿病患者中基础脂肪氧化率下降了 50% 和高呼吸商,这些因素将会促进脂肪贮存和体重增加,引起肥胖和胰岛素抵抗,最终可能发生糖尿病。

本研究结果提示了 SBP、ApoB、Lp( $\alpha$ ) 与 2 型糖尿病发病间的关系,美国糖尿病协会(ADA)报告,高血压 ( $> 18.7/12.0$  kPa) 是 2 型糖尿病的高危因子<sup>[6]</sup>,而脂质代谢异常是高胰岛素血症、胰岛素抵抗及未控制糖尿病的一种标志<sup>[7]</sup>。

HSL 是脂肪组织中 TG 分解的限速酶,HSL 等位基因 5 如何对 2 型糖尿病的发生起保护作用机制还不清楚,目前的研究未能发现具有 HSL 等位基因 5 者与不具有 HSL 等位基因 5 者的临床参数之间的差异<sup>[8]</sup>。HDL-c 对 2 型糖尿病的发生起保护作用与文献报道相一致<sup>[1]</sup>。

目前的研究还不能将所有的基因和环境因素放

在一起综合分析,随着人类基因组计划的研究进展,单核苷酸多态性(SNPs)遗传标记的应用和 DNA 芯片技术的发展,理论上可以找到与 2 型糖尿病发病有关的所有的易感基因和环境影响因素<sup>[9]</sup>。2 型糖尿病分子流行病学研究的意义在于,可以通过筛查 2 型糖尿病的易感基因发现易感人群,同时改变环境中的影响因素可早期预防或延缓糖尿病的发展。

### 参 考 文 献

- 1 American Diabetes Association. Standards of medical care for patients with diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 1997, 20 (suppl 1):5-13.
- 2 Philippe Djian. Evolution of simple repeats in DNA and their relation to human disease. *Cell*, 1998, 94:155-160.
- 3 Krook A, Digby J, O'Rahilly S, et al. Uncoupling protein 3 is reduced in skeletal muscle of NIDDM patients. *Diabetes*, 1998, 47:1528-1531.
- 4 Otabe S, Clement K, Dubois S, et al. Mutation screening and

association studies of the human uncoupling protein-3 gene in normoglycemic and diabetic morbidly obese patients. *Diabetes*, 1999, 48:206.

- 5 Argyropoulos G, Brown AM, Willi SM, et al. Effects of mutations in the human uncoupling protein 3 gene on the respiratory quotient and fat oxidation in severe obesity and type 2 diabetes. *J Clin Invest*, 1998, 102:1345-1351.
- 6 American Diabetes Association. Screening for diabetes. *Diabetes Care*, 1997, 20 (suppl 1):22-23.
- 7 Man ZW, Zhu M, Noma Y, et al. Impaired beta-cell function and deposition of fat droplets in the pancreas as a consequence of hypertriglyceridemia in OLETF rat, a model of spontaneous NIDDM. *Diabetes*, 1997, 46:1718-1724.
- 8 Magre J, Laurell H, Fizames C, et al. Human hormone-sensitive lipase: genetic mapping, identification of a new dinucleotide repeat, and association with obesity and NIDDM. *Diabetes*, 1998, 47:284-286.
- 9 Marshall E. The hunting of the SNP. *Science*, 1997, 278:2046.

(收稿日期:2000-11-02)

(本文编辑:段江娟)