

PPP1R3 基因 Asp905Tyr 多态性与安徽省汉族人群 2 型糖尿病相关性研究

陈明卫 杨明功 王长江 王佑民 徐希平 刘树琴 章秋 孙海燕

【摘要】 目的 研究 1 型蛋白磷酸酶的骨骼肌特异糖原靶向调节亚单位基因(PPP1R3) Asp905Tyr 多态性与安徽省汉族人群 2 型糖尿病相关性。方法 选取安徽省合肥地区汉族 2 型糖尿病患者 262 例,健康成人 104 名,运用聚合酶链反应限制性片段长度多态性技术(PCR-RFLP)进行基因型测定。以体重指数(BMI) $\geq 25 \text{ kg/m}^2$ 为分割点,将病例组和对照组进行分层分析。结果 PPP1R3 基因 Asp905Tyr 多态性与安徽省汉族人群 2 型糖尿病没有明显的相关性;以 BMI $< 25 \text{ kg/m}^2$ 基因型 Tyr/Tyr 组为参照组, BMI $\geq 25 \text{ kg/m}^2$ 携带 Asp 905 等位基因个体的糖尿病发病风险明显增加(OR = 3.69, 95% CI :1.38~8.89, $P=0.006$)。结论 PPP1R3 基因 Asp 905Tyr 多态性可能不是安徽省汉族人群 2 型糖尿病主要的致病因素。肥胖与 Asp 905 等位基因间的交互作用可增加糖尿病的发病风险。

【关键词】 糖尿病 2 型;蛋白磷酸酶 1 型;基因,骨骼肌特异糖原靶向调节亚单位;多态性

Study on the association of PPP1R3 gene polymorphism with type 2 diabetes in Han population of Anhui province CHEN Ming-wei*, YANG Ming-gong, WANG Chang-jiang, WANG You-min, XU Xi-ping, LIU Shu-qin, ZHANG Qiu, SUN Hai-yan. *Department of Endocrinology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022, China

【Abstract】 Objective To study the association of muscle-specific glycogen-targeting regulatory subunit of the glucogen-bound protein phosphatase 1(PPP1R3) gene codon 905 Asp/Tyr polymorphism with type 2 diabetes in Chinese Han population in Hefei region of Anhui province. **Methods** PPP1R3 gene Asp905Tyr polymorphism was detected by polymerase chain reaction and appropriate restriction enzyme (PCR-RFLP) in 262 type 2 diabetic cases and 104 normal controls. Case and control groups were divided into subgroups by body mass index (BMI) $\geq 25 \text{ kg/m}^2$. **Results** When PPP1R3 gene Asp905Tyr polymorphism was not associated with type 2 diabetes mellitus. When subjects with BMI $< 25 \text{ kg/m}^2$ and Tyr/Tyr genotypes were used as reference. Subjects with Asp905 and BMI $\geq 25 \text{ kg/m}^2$ had a 3.69-fold increase of risk suffering from type 2 diabetes(OR = 3.69, 95% CI :1.38-8.89, $P=0.006$). **Conclusions** PPP1R3 gene Asp905Tyr polymorphism did not seem to play a critical role in the development of type 2 diabetes mellitus in Han population of Chinese in Anhui province but interaction between the Asp 905 and BMI cause the increase of risk of type 2 diabetes.

【Key words】 Diabetes, type 2; Protein phosphatase, type 1; Gene, PPP1R3; Polymorphism

人体内骨骼肌特异性糖原结合的 1 型蛋白磷酸酶(glycogen-bound protein phosphatase 1, PP1G)是胰岛素激活糖原合成酶途径中的主要磷酸酶,在调节糖原合成以及葡萄糖的非氧化代谢途径中起关键作用^[1]。其调节亚单位与骨骼肌糖原有高度亲和力,又称为骨骼肌特异糖原靶向调节亚单位,由 PPP1R3 基因编码。研究发现 PPP1R3 基因

Asp905Tyr 多态性与部分人群的胰岛素抵抗或 2 型糖尿病相关^[2,3]。本研究采用病例对照设计原则,研究安徽省合肥地区汉族人群中 PPP1R3 基因 Asp905Tyr 多态性与 2 型糖尿病的相关性。

对象与方法

1. 研究对象:全部研究对象均来自安徽省合肥地区的汉族人群。2 型糖尿病组 262 例,男 128 例,女 134 例,正常对照组 104 人,男 46 人,女 58 人。以上两组均再按体重指数(BMI)分为两个亚组,分割点设于 BMI 25, BMI $\geq 25 \text{ kg/m}^2$ 相当于超重或肥

基金项目 安徽省教委自然科学基金资助(96JL0068)

作者单位 230022 合肥 安徽医科大学第一附属医院内分泌科(陈明卫、杨明功、王长江、王佑民、刘树琴、章秋、孙海燕);美国哈佛大学公共卫生学院(徐希平)

胖, BMI < 25 kg/m² 亚组相当于体重正常或低于理想体重。2 型糖尿病的诊断, 依据 1999 年 WHO 的诊断标准^[4]。所有受试者早晨 8 时空腹状态(禁食至少 10 h)取空腹静脉血 10 ml, 用于空腹血糖、胰岛素、血脂及肾功能等生化指标的测定和 DNA 的提取。并作 75 g 口服葡萄糖耐量试验(OGTT)已确诊为糖尿病者, 作 100 g 馒头餐试验测定餐后 2 h 血糖和胰岛素。同时测量所有入选者的身高、体重、腰围、臀围、血压等指标, 并对其职业、饮食和运动等生活习惯进行流行病学问卷调查。糖尿病组中吸烟、饮酒、BMI、甜食习惯、高糖摄入、高热量摄入和体育锻炼、常吃蔬菜和水果取患病前的数值, 其他各值均为调查当时的测定值。吸烟指每天至少吸 1 支并持续 1 年。饮酒指平均每周饮酒 2 次或 2 次以上并持续 1 年以上。甜食习惯指每周至少食用甜食 2 次以上, 每次超过 50 g。高食糖摄入指每周食糖摄入超过 50 g。高热量饮食习惯指每日每公斤体重摄入量超过 35 kcal。规律锻炼指每周至少参加体育锻炼 1 h。常吃蔬菜指每天至少 250 g。常吃水果指每周至少 3 次。上述取样和调查均征得本人同意, 自愿进行。

2. 实验方法:

(1) PPP1R3 基因 Asp905Tyr 多态性测定: 采用高盐沉淀法提取外周血白细胞基因组 DNA。用聚合酶链反应-限制性内切酶片段长度多态性(PCR-RFLP)的方法检测。正义链 5'-CCTCATGGGTCATTACAGAAT-3', 反义链 5'-AGTTACTACATGGCTAGCCA-3'。PCR 循环体系含有 DNA 模板 200 ng, 5 μl; PCR buffer 10 mmol/L, 1 μl; dNTP 2.5 mmol/L, 0.8 μl; MgCl₂ 25 μmol/L, 0.2 μl, 正反向引物各 20 μmol/L, 0.15 μl; Taq 酶 5 U/μl, 0.045 μl(由 Bio-Rad Laboratories 公司生产); ddH₂O 2.655 μl, 总反应体积为 10 μl。PCR 反应条件为: 预变性 95℃ 2 min, 变性 94℃ 35 s, 退火 52℃ 30 s, 逐步降至 45℃(每个循环降 0.5℃), 延伸 72℃ 40 s, 共 14 个循环, 再 94℃ 变性 30 s, 52℃ 退火 20 s, 72℃ 延伸 40 s, 共 25 个循环; 72℃ 终末延伸 7 min。PCR 反应产物用限制性内切酶 Dde I 于 37℃ 恒温消化 15 h, 将限制性酶切产物 5 μl 以 3% 琼脂糖凝胶于 200 V 电泳 1.5 h 后, 溴化乙锭(EB)染色, 在紫外线下检测摄影, 判读基因型。可以看到三种基因型结果: Asp/Asp 型为 167 bp、103 bp 2 条带; Asp/Tyr 型为 187 bp、167 bp、103 bp 3 条带片

段, Tyr/Tyr 型为 187 bp、103 bp 2 条带。

(2) 生化指标的测定: 采用酶化学法(日本岛津公司生产的 CL-7300 全自动生化分析仪)测定血糖、血脂、尿素氮和肌酐。采用放射免疫法(中国原子能科学研究院试剂盒)测定胰岛素。根据文献的方法^[5], 计算胰岛素敏感指数(ISI)并取自然对数值。

3. 统计学分析: 组间差异分析采用 *t* 检验、卡方检验和方差分析。采用 logistic 回归分析方法分析 Asp905Tyr 多态性与 2 型糖尿病的相关性。使用多元回归模型以控制其他混杂因素的作用。

结 果

1. 病例组与对照组的临床资料: 病例组和对照组在年龄性别上得到了很好的匹配。病例组的空腹胰岛素、血脂、血压和 BMI 等显著高于对照组, 且喜甜食者多, 进食蔬菜、水果以及锻炼者少, 这与目前公认的 2 型糖尿病危险因素基本一致。病例组 ISI 显著低于对照组, 与 2 型糖尿病病理生理特点一致(表 1)。

表1 病例组与对照组一般情况比较

临床资料	对照组 (n = 104)	病例组 (n = 262)
年龄(岁)	57.2 ± 9.5	58.9 ± 10.6
性别 男	48	56
女	134	139
空腹胰岛素(mIU/L)	13 ± 7	18 ± 8*
2 h 胰岛素(mIU/L)	58 ± 20	64 ± 22
收缩压(mm Hg)	124 ± 14	136 ± 16**
舒张压(mm Hg)	79 ± 9	83 ± 8
总胆固醇(mmol/L)	5.1 ± 0.8	5.4 ± 1.1*
甘油三酯(mmol/L)	1.4 ± 0.9	1.9 ± 1.3*
ISI(mIU × mmol/L ⁻²)	-3.8 ± 0.6	-4.5 ± 0.4*
BMI(kg/m ²)	24.6 ± 2.1	26.8 ± 4.5**
腰臀比	0.85 ± 0.06	0.89 ± 0.05*
吸烟(%)	42.5	56.5*
饮酒(%)	42.2	46.3
甜食习惯(%)	43.7	66.2*
高食糖摄入(%)	22.9	56.7**
高热量饮食(%)	51.2	73.9*
规律体育锻炼(%)	55.1	8.9**
水果(%)	51.3	24.2*
蔬菜(%)	59.7	22.3*

注: 1 mm Hg = 0.133 kPa, 与对照组相比, * *P* < 0.05, ** *P* < 0.01

2. PPP1R3 基因 Asp905Tyr 多态性与 2 型糖尿病相关性: 见表 2。Asp/Asp 纯合子基因型组患 2 型糖尿病的危险性较 Tyr/Tyr 纯合子组高, 差异无显著性(Asp/Asp vs Tyr/Tyr, 调整 OR = 1.62, 95% CI 0.72 ~ 2.64, *P* = 0.46)。主要对年龄、性别、饮

酒、吸烟、高热量摄入、甜食和蔬菜、水果习惯以及 BMI 等混淆因子进行控制。

表2 PPP1R3 基因 Asp905Tyr 多态性与 2 型糖尿病相关性

基因型	病例组	对照组	未调整		调整后	
			OR 值(95%CI)	P 值	OR 值(95%CI)	P 值
Tyr/Tyr	139	56	1.00	-	1.00	-
Asp/Tyr	96	42	1.04(0.54~1.96)	0.81	1.12(0.61~2.93)	0.76
Asp/Asp	27	6	1.56(0.69~2.25)	0.52	1.62(0.72~2.64)	0.46

3. 将基因型 Asp/Tyr 和 Asp/Asp 合并进行分析,以 BMI₂₅ 为分割点,将病例组和对照组进行分层。以 BMI < 25 kg/m² 的 Tyr/Tyr 基因型为参照组,肥胖(BMI ≥ 25 kg/m²)可增加 Tyr/Tyr 基因型糖尿病发病的风险(调整后 OR = 2.52, 95% CI: 1.16~5.97, P = 0.043),并明显增加携带 Asp905 等位基因个体的糖尿病发病风险(调整后 OR = 3.69, 95% CI: 1.38~8.89, P = 0.006)。

讨 论

PPP1R3 基因定位于染色体 7q 31.1-31.2,含有 4 个外显子和 3 个内含子。第 905 位密码子 AGG → AGT 多态性存在于外显子 4 中,造成天冬氨酸 → 丙氨酸的替换(Asp905Tyr)^[3]。对丹麦高加索人研究发现 PPP1R3 基因 Asp905Tyr 多态性与胰岛素抵抗

相关^[2]。Pima 印第安人的研究资料表明,此多态性与胰岛素敏感性、空腹胰岛素水平以及 2 型糖尿病发病率有关^[3]。其可能的机理为氨基酸的替换导致 PP1G 功能的改变,影响胰岛素作用效应和糖原代谢调节^[6]。本组资料显示 Asp/Asp 基因型组患糖尿病的危险性有增高的趋势(OR = 1.62),但无统计学意义(P = 0.46),表明 Asp905Tyr 多态性与安徽省汉族人群 2 型糖尿病没有明显的相关性,与最近 Hansen 等^[7]对高加索男性的 20 年随访资料进行的分析结果相似。上述研究结果的不同可能与 2 型糖尿病的遗传异质性以及种族间遗传差异有关。

以 BMI 进行分层研究,采用了 logistic 回归分析方法,在排除年龄、性别、饮酒、吸烟、高热量摄入、甜食和蔬菜、水果习惯等糖尿病常见的可能危险因素后,我们发现携带 Asp 905 等位基因的肥胖个体,其糖尿病发病风险明显增加(OR = 3.69, P = 0.006),表明 Asp905Tyr 多态性与肥胖之间的交互作用会增加安徽省汉族人群糖尿病的发病风险性。原因可能为 Asp905 等位基因与肥胖之间的交互作用导致胰岛素的敏感性下降^[8]。

总之,本研究发现在安徽省汉族人群中肥胖与 Asp905 等位基因间的交互作用可增加糖尿病的发病风险,PPP1R3 基因 Asp905Tyr 多态性对 2 型糖尿病的发生可能有所影响,但不是主要的致病基因。

表3 以 BMI 分层的 PPP1R3 基因 Asp905Tyr 多态性与 2 型糖尿病相关性

基因型	BMI	例 数		未 调 整		调 整 后	
		病例组	对照组	OR 值(95%CI)	P 值	OR 值(95%CI)	P 值
Tyr/Tyr	<25	40	30	1.00	-	1.00	-
Asp/Tyr + Asp/Asp	<25	31	26	1.06(0.38~1.97)	0.760	1.02(0.36~2.13)	0.810
Tyr/Tyr	≥25	99	26	2.83(1.35~6.24)	0.026	2.52(1.16~5.97)	0.043
Asp/Tyr + Asp/Asp	≥25	92	22	3.97(1.59~9.17)	0.001	3.69(1.38~8.89)	0.006

注:调整因素包括年龄、性别、饮酒、吸烟、高热量摄入、甜食和蔬菜、水果习惯

参 考 文 献

- Mott DM, Kida Y, Nyomba BL. Human skeletal muscle, type-1 protein phosphatase and insulin resistance. *Adv Prot Phosph*, 1993, 7:413-427.
- Hansen L, Hansen T, Vestergaard H, et al. Widespread amino acid polymorphism at codon 905 of the glycogen-associated regulatory subunit of protein phosphatase-1 is associated with insulin resistance and hypersecretion of insulin. *Hum Mol Genet*, 1995, 4:1313-1320.
- Xia J, Scherer SW, Cohen PT, et al. A common variant in PPP1R3 associated with insulin resistance and type 2 diabetes. *Diabetes*, 1998, 47:1519-1524.
- 钱荣立,译. 关于糖尿病的新诊断标准与分型. *中国糖尿病杂志*, 2000, 8:5-6.

- 李光伟,潘孝仁, Lillioja S, 等. 检测人群胰岛素敏感性的一项新指数. *中华内科杂志*, 1993, 32:656-660.
- Hbbard MJ, Cohen P. Ontarget with a new mechanism for the regulation of protein phosphatase. *TIBS*, 1993, 18:172-177.
- Hansen L, Reneland R, Berglund L, et al. Polymorphism in the glycogen-associated regulatory subunit of type 1 protein phosphatase (PPP1R3) gene and insulin sensitivity. *Diabetes*, 2000, 49:298-301.
- Hasen L, Reneland R, Hasen T, et al. Increased insulin stimulated glucose disposal rate in 1161 Caucasian males: interaction between obesity and the Asp905Tyr variant of the glycogen associated subunit of type 1 protein phosphatase (Abstract). *Diabetologia*, 1997, 40 (suppl 1):A173.

(收稿日期:2003-06-05)

(本文编辑:张林东)