

· 临床流行病学 ·

抗原肽处理相关运载体 637 A/G 多态
与代谢综合征的关联性研究

胡晓抒 郭志荣 沈冲 武鸣 喻荣彬 姚才良

【摘要】 目的 探索抗原肽处理相关运载体(TAP1)637 A/G 多态与代谢综合征(MS)的相关性。**方法** 应用病例对照研究设计,以社区基础上的 MS 138 例(男 68 例,女 70 例,年龄 61.31 ± 11.00 岁)和同样来源的 162 例健康对照(男 74 例,女 88 例,年龄 48.73 ± 11.66 岁)进行比较分析,等位基因分型应用限制性片段长度多态性-PCR(RFLP-PCR)方法,多因素调整应用非条件 logistic 回归模型。**结果** 对照组 TAP1 637 A/G 等位基因频率分别为 83.3%、16.7%,符合 Hardy-Weinberg 平衡($\chi^2 = 1.46, P > 0.05$);病例组 TAP1 637 G 等位基因型频率(26.1%)显著高于对照组(16.7%)($P = 0.005$)。以频率较低的等位基因型(G)为突变型,对于隐性模型和相加模型,经年龄调整,病例组的 GG 基因型频率分布均显著高于对照组($P < 0.05$)。隐性模型:OR = 6.62, 95% CI: 1.73~25.31;相加模型:OR = 1.56, 95% CI: 1.01~2.41;而对于显性模型,两者差异无统计学意义(OR = 1.33, 95% CI: 0.78~2.28)。不同基因型之间 MS 临床指标比较结果显示,收缩压和舒张压差异有统计学意义($P < 0.05$),而血糖、体重指数及血脂等其他特征比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** TAP1 637 等位基因 A > G 改变或基因型 AA > GG 与 AG > GG 改变可增加 MS 危险,尤其是增加收缩压和舒张压的水平。

【关键词】 代谢综合征; 抗原肽处理相关运载体; 多态性

Study on the association between polymorphism of TAP1 637 A/G alleles polymorphism and metabolic syndrome HU Xiao-shu*, GUO Zhi-rong, SHEN Chong, WU Ming, YU Rong-bin, YAO Cai-liang.
*Department of Chronic Noninfectious Disease Prevention and Control, Jiangsu Centers for Disease Prevention and Control, Nanjing 210009, China

【Abstract】 Objective To explore the effect of the transporter 1 associated with antigen processing (TAP1) gene 637 A/G polymorphism on the risk of metabolic syndrome(MS). **Methods** A case-control study was conducted on 138 based-community patients (68 males and 70 females, 61.31 ± 11.00 years old) diagnosed as MS with 162 healthy subjects (74 males and 88 females, 48.73 ± 11.66 years old) came from the same origin as cases. The allele polymorphisms TAP1 637 A/G was examined by the specificity restriction fragment length polymorphism-polymerase chain reaction(RFLP-PCR) method with genomic DNA. The effect of TAP1 637 A/G polymorphisms on MS were analyzed by multivariable unconditional logistic regression models. **Results** The TAP1 637 A/G allele genotypes frequencies (83.3%, 16.7%) contribution in control group were consistent with the distribution predicted by Hardy-Weinberg equilibrium ($\chi^2 = 1.46, P > 0.05$). TAP1 637 G allele genotypes frequencies (26.1%) of cases were significantly higher than controls (16.7%) with $P = 0.005$. There were significant differences of AA (58.0%), AG (31.9%) and GG (10.1%) genotypes in cases than controls, AA (68.5%), AG (29.6%) and GG (1.9%) for recessive model and additive model after age was adjusted with P value as 0.006 and 0.044, but no significant differences for dominant model ($P = 0.298$). Results from recessive model with OR = 6.62, 95% CI: 1.73-25.31, Addictive model with OR = 1.56, 95% CI: 1.01-2.41 and one-way ANOVA analysis showed that systolic blood pressure(SBP) and diastolic blood pressure (DBP) levels of GG genotype were significantly higher than AA or AG genotype ($P < 0.05$) whereas no significantly statistical differences for other clinical characteristics. **Conclusion** The TAP1 637 allele A to G alteration or genotype AA to GG and AG to GG alterations could increase the risk of MS significantly, especially for SBP and DBP levels, and this positive association results might be helpful to support the biological role of TAP1 in MS but in need of larger sample size to provide more powerful evidences.

【Key words】 Metabolic syndrome; Transporters associated with antigen processing; Allele polymorphism

基金项目:卫生部科学研究基金(WKJ2004-2-014);江苏省资源生物重点实验室开放基金(Kjs03043)

作者单位:210009 南京,江苏省疾病预防控制中心(胡晓抒、武鸣);苏州大学放射医学与公共卫生学院流行病与卫生统计学系(郭志荣);南京医科大学公共卫生学院流行病与卫生统计学系(沈冲、喻荣彬、姚才良)

代谢综合征(MS)主要临床结果是导致心血管病和 2 型糖尿病的发生。抗原肽处理相关运载体(TAP)参与跨膜转运铁、糖、多糖、氨基酸、多肽分子,涉及多种疾病的不同病理生理过程^[1]。而 TAP1 基因改变,导致机体代谢异常与局部免疫炎症反应,如降低组织胰岛素敏感性等^[2],从而增加成人高血压和 2 型糖尿病等疾病发生风险^[3]。因此,TAP1 基因等位基因变化与 MS 的关系值得深入探讨。本研究运用病例对照研究设计,对 TAP1 基因的 637 A/G(rs1135216)多态性与 MS 的关联性进行分析。

对象与方法

1. 研究对象:应用病例对照研究设计,来自社区基础上符合中华医学会糖尿病学分会(CDS)关于 MS 诊断标准的 MS 136 例(男 68 例,女 70 例,年龄 61.31 ± 11.00 岁)^[4],和同样来源的不具有该诊断标准中任一项指标的 162 例健康对照(男 74 例,女 88 例,年龄 48.73 ± 11.66 岁)为研究对象进行流行病学调查,两组男女比例一致($\chi^2 = 0.387, P = 0.563$)。

2. MS 的诊断:采用 CDS 的建议标准,凡具备以下 4 项组成成分中的 3 项或全部者为 MS 患者:①超重和(或)肥胖: $BMI \geq 25(kg/m^2)$;②高血糖:空腹血糖(FPG) ≥ 611 mmol/L (110 mg/dl) 及(或) 2 hPG ≥ 718 mmol/L (140 mg/dl),及(或)已确诊为糖尿病并治疗者;③高血压:收缩压(SBP)/舒张压(DBP) $\geq 140/90$ mm Hg (1 mm Hg = 0.133 kPa),及(或)已确认为高血压并治疗者;④血脂异常:空腹血甘油三酯(TG) ≥ 1.7 mmol/L (150 mg/dl),及(或)空腹血高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C) < 0.9 mmol/L (35 mg/dl) (男)或 < 1.0 mmol/L (39 mg/dl) (女)。

3. 研究内容及方法:对研究对象进行问卷调查、体格检查和有关生化指标检测。按统一设计的调查表采用统一方式进行问卷调查。调查表内容包括调查对象一般情况、体力活动、吸烟、饮酒、饮食情况、精神因素、糖尿病、高血压家族史等。体格测量包括身高、体重、腰围、臀围和血压等。吸烟指每周吸烟 20 支以上且吸烟 3 个月以上。饮酒指男性每周饮白酒 150 g 以上(或相当量的其他酒类)或女性每周饮酒 100 g (或相当量的其他酒类)以上,且饮酒 3 个月以上。有关生化指标检测:FPG 测定采用葡萄糖氧化酶法;TG 测定用 GPO-PAP 酶法,血清总胆固醇

(TC)测定用 CEH-COD-PAP 酶法,HDL-C 采用磷钨酸镁沉淀法。

4. 等位基因分型:基因组 DNA 采用酚/氯仿方法从获得知情同意者的 EDTA 抗凝血中提取,其纯化应用上海申能博彩生物技术公司的 DNAprep Kit 试剂盒,稀释为 50 ng/ μ l 的 DNA 共 100 μ l,于 -20°C 保存;剩余的 DNA 原液于 -40°C 保存。

应用限制性片段长度多态性-PCR(RFLP-PCR)方法对 TAP1 基因 637 位点多态性进行分析。PCR 引物^[5]:上游引物:5'-CCC TAT CCA GCT ACA ACC-3',下游引物:5'-AAC GCC ACT GCC TGT CGC T-3',由上海申能博彩生物技术公司合成。总反应体积为 15 μ l,组成包括 $1 \times$ PCR buffer, 2 mmol/L $MgCl_2$,每种引物 10 pmol, 0.2 mmol/L dNTP, 0.5 U Taq 聚合酶和 30 ng 的基因组 DNA。

PCR 反应程序: 95°C 5 min; 95°C 50 s,退火温度 52°C 45 s,延伸 72°C 50 s, 32 个循环;最后延伸 5 min。在 PE 公司的 Perkin-Elmer 9600 基因扩增仪上进行 PCR 扩增。PCR 产物(183 bp)用 3% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。取 PCR 产物 10 μ l,在 37°C 用 10 U 限制性内切酶 Xmi I 进行酶切过夜, 65°C 灭活 20 min。1.5 μ l $10 \times$ buffer 反应体积 15 μ l (用去离子双蒸水补足)。TAP1 基因 637 位点如均为突变型 GG 则酶切结果为 132 bp + 51 bp,野生型 AA 不能被识别酶切显示为 183 bp 条带,而杂合子 AG 显示 3 条带,分别为 183 bp、132 bp 和 51 bp。同时随机选择 20 例 PCR 产物进行测序,验证酶切结果正确性选择 100%。

5. 质量控制:①制定科学的调查指南;②调查前对参调人员组织培训考核;③调查现场控制按照发现问题及时纠正、补充完整、签名后经质控员进行审核确认合格方式;④双重录入数据,并进行逻辑核查;⑤实验室检测建立标准曲线并用盲法重复检测核准,基因型分析结果经测序进一步确认。

6. 统计学分析:用 Epi Data 3.0 软件建立数据库,双重录入数据并经逻辑检错无误后转换为 SPSS 数据库文件,用 SPSS 12.0 软件进行数据逻辑核查及统计分析。病例组和对照组比较:对于数值变量分析时采用 t 检验,分类变量采用 χ^2 检验,Hardy-Weinberg 平衡采用 χ^2 检验,不同基因型之间 MS 临床相关特征的比较用单因素方差分析(one-way ANOVA),涉及混杂因素调整的基因型比较应用 logistic 回归模型。双侧概率 < 0.05 被认为差异有

统计学意义。

结 果

1. 一般情况:表 1 为病例和对照两组对象的基本临床特征比较。其中,病例组年龄、SBP、DBP、FPG、TG、TC、HDL-C均显著高于对照组;而两组的性别、吸烟及饮酒分布差异无统计学意义($P < 0.05$),饮酒与吸烟的无差异性可能与患者获知疾病后采取控制措施有关。

表1 病例组与对照组基本特征比较

特征	病例组 (<i>n</i> = 136)	对照组 (<i>n</i> = 136)	<i>P</i> 值 ^a
年龄(岁)	61.31 ± 11.00	48.73 ± 11.66	0.000
女性(%)	50.7	54.3	0.563
SBP(mm Hg)	143.83 ± 17.14	115.77 ± 9.90	0.000
DBP(mm Hg)	89.49 ± 10.14	77.91 ± 7.72	0.000
FPG(mmol/L)	7.65 ± 2.52	4.67 ± 0.83	0.000
BMI(kg/m ²)	25.61 ± 2.83	23.77 ± 2.33	0.000
TG(mmol/L)	1.87 ± 0.72	1.12 ± 0.73	0.000
TC(mmol/L)	5.26 ± 0.97	3.7052 ± 1.62	0.000
HDL-C(mg/dl)	1.21 ± 0.29	1.55 ± 0.61	0.005
LDL-C(mmol/L)	3.47 ± 2.30	3.12 ± 2.57	0.423
吸烟(%)	32.6	26.5	0.250
饮酒(%)	23.0	23.5	0.839

^a 两组连续变量($\bar{x} \pm s$)比较用 *t* 检验,计数资料比较用 χ^2 检验

2. Hardy-Weinberg 平衡检验:对照组 TAP1 637 A/G 等位基因频率分别为83.3%、16.7%,符合 Hardy-Weinberg 平衡($\chi^2 = 1.46, P > 0.05$)。

3. TAP1 637 A/G 基因多态性与 MS 关联性分析:病例组 TAP1 基因 637 A/G 等位基因型频率(73.9%/26.1%)和对照组频率(83.3%/16.7%)差异有统计学意义($\chi^2 = 7.972, P = 0.005$),见表 2。

表2 TAP1 基因 637 A/G 等位基因型(rs1135216)频率分布

分组	等位基因型		<i>P</i> 值	<i>P</i> 值 ^a
	A	G		
病例组(<i>n</i> = 138)	204(73.9)	72(26.1)	0.005	0.044
对照组(<i>n</i> = 162)	270(83.3)	54(16.7)		

注:括号外数据为人数,括号内数据为构成比(%);^a 调整年龄

4. TAP1 637 位点基因型与 MS 关联性分析:应用多因素非条件 logistic 回归模型的向前逐步法(最大似然比法)筛选其他可能影响 MS 结局的变量,包括年龄、性别、受教育程度、吸烟与饮酒,将 TAP1 637 以相加模型直接引入模型。TAP1 637(AA:AG:GG)直接进入模型的第一层,其他变量进入第二层,进入模型概率设为0.05,剔除的概率0.1,最终进入模型的变量是 TAP1 637($P = 0.046$)和年龄($P = 0.000$),其他变量相应概率 *P* 值均大于0.2。

对 TAP1 637 基因型与 MS 关联性的分析,应用 logistic 回归模型对年龄进行调整(表 3)。以频率较低的等位基因型(G)为突变,对于隐性模型和相加模型(按外显形式不同),病例组和对照组的 GG 基因型频率分布差异有统计学意义($P < 0.05$),隐性模型:OR = 6.62,95% CI:1.73~25.31;相加模型:OR = 1.56,95% CI:1.01~2.41;而对于显性模型,两者差异无统计学意义,OR = 1.33,95% CI:0.78~2.28。

表3 TAP1 637 基因型与 MS 的关联性分析

基因突变 类型	基因型频率分布		<i>P</i> 值	<i>P</i> 值 ^a	OR 值 (95% CI)
	基因型	病例组 (<i>n</i> = 138)	对照组 (<i>n</i> = 162)		
显性模型 AA	80(58.0)	111(68.5)	0.058	0.298	1.33(0.78~2.28)
	AG/GG	58(42.0)	51(31.5)		
隐性模型 AA/AG	124(89.9)	159(98.1)	0.002	0.006	6.62(1.73~25.31)
	GG	14(10.1)	3(1.9)		
相加模型 AA	80(58.0)	111(68.5)	0.005	0.044	1.56(1.01~2.41)
	AG	44(31.9)	48(29.6)		
	GG	14(10.1)	3(1.9)		

注:同表 2;^a 调整年龄

5. TAP1 637 基因型与 MS 临床特征的关系:对于已经获知自己罹患高血压或糖尿病并采取药物治疗的研究对象,其临床特征指标有所变化,因此,分析基因型与 MS 相关临床特征的时候将排除这部分对象 81 例,占总病例的58.7%。不同基因型之间的比较应用单因素方差分析,各基因型之间年龄差异无统计学意义($F = 0.48, P = 0.643$)。各组方差齐性检验均显示差异无统计学意义($P > 0.2$)。不同基因型之间 SBP 和 DBP 差异均有统计学意义($P < 0.05$),而其他特征的比较差异均无统计学意义($P > 0.05$),分析结果见表 4。

表4 TAP1 637 基因型与 MS 临床特征的关系

指标	基因型($\bar{x} \pm s$)			<i>P</i> 值
	AA (<i>n</i> = 147)	AG (<i>n</i> = 65)	GG (<i>n</i> = 7)	
年龄(岁)	50.27 ± 10.57	51.66 ± 9.33	52.71 ± 11.32	0.643
SBP(mm Hg)	119.86 ± 13.97	121.02 ± 14.29	135.57 ± 22.60	0.020
DBP(mm Hg)	80.53 ± 9.75	80.86 ± 11.04	91.29 ± 14.99	0.028
FPG(mmol/L)	4.83 ± 0.97	5.08 ± 1.03	5.32 ± 0.35	0.148
BMI(kg/m ²)	24.19 ± 2.63	24.58 ± 3.22	25.65 ± 2.25	0.301
TG(mmol/L)	1.14 ± 0.70	1.13 ± 0.67	1.09 ± 0.97	0.987
TC(mmol/L)	3.87 ± 1.59	3.97 ± 1.53	3.35 ± 1.76	0.605
HDL-C(mg/dl)	1.30 ± 0.42	1.58 ± 0.54	1.30 ± 0.30	0.191
LDL-C(mmol/L)	3.26 ± 2.34	3.32 ± 2.62	3.07 ± 1.64	0.944

讨 论

MS 作为世界范围内常见的一种多病因慢性疾

病^[6], 常见的主要危险因素有不良生活方式如吸烟、饮酒等以及糖尿病与高血压、高血脂家族史等。本研究中, MS 与对照基线资料比较结果显示, 吸烟与饮酒和 MS 无统计学关联(调整年龄)。这可能是因为, 部分已经获知自己罹患高血压或糖尿病的研究对象, 对生活方式进行了适当调整而改变了相关暴露。但两组人群构成 MS 基本特征如血压、血糖、BMI 等指标差异显著(调整年龄), 符合疾病状态分布。

本研究应用多因素非条件 logistic 回归模型的向前逐步法(最大似然比法)筛选年龄、性别、受教育程度、吸烟与饮酒协变量, 结果进入模型的为年龄和 TAP1 637(AA:AG:GG), 其他变量相应概率 P 值均大于 0.2。考虑到年龄会对血压、血脂及血糖等危险因素产生混杂作用, 因此, 在进一步分析 TAP1 637 基因多态性与 MS 关联性时对年龄进行调整。

本次研究对象均为江苏地区(出生居住地)居住人群, 对对照组 TAP1 637 等位基因频率进行 Hardy-Weinberg 平衡检验, A/G 频率结果分别为 83.3%、16.7%, 符合 Hardy-Weinberg 平衡。此等位基因频率分布和日本、韩国人群及其他种族人群相类似^[7,9]。国内其他不同地区人群研究的结果存在差异, 安徽省人群为 G 等位基因的频率为 13.0%^[10], 上海市人群为 21.3%^[11], 沈阳市正常人群为 28.4%, 华北地区人群为 34.2%^[12], 维吾尔族人群为 31.0%^[13], 广州市正常妊娠妇女 39.0% 为最高^[14]。不同地区人群的遗传背景差异以及基因分型方法的不同可能是造成上述差异的重要原因, 同时, 这些研究相对较小的样本也会影响结果的重复性。

关联性分析结果显示, 病例组 TAP1 基因 637 G 等位基因型频率 26.1% 显著高于对照组 (16.7%), 表明该突变型可能与 MS 呈正相关。而应用 logistic 回归模型调整年龄后, 对于隐性模型和相加模型(按外显形式不同), 病例组和对照组的 GG 基因型频率分布差异均有统计学意义。其中, 隐性模型: $OR = 6.62$, 95% $CI: 1.73 \sim 25.31$; 相加模型: $OR = 1.56$, 95% $CI: 1.01 \sim 2.41$ 。此结果进一步证实了该位点 G 突变型可增加 MS 患病的危险。

本研究基因型与 MS 临床特征的关系分析结果表明, 基因型的变化能够影响 SBP 和 DBP 的改变(升高), 是否可能影响血压调节尚需要进一步研究加以证实。而血糖、BMI、血脂等其他特征的比较显

示差异均无统计学意义, 这可能与排除了较多已经获知自己罹患高血压或糖尿病的研究对象有关。进入分析研究对象的上述指标大都处于正常水平, 其基因型之间无差异分布亦支持 MS 这一复杂疾病的发生可能具有多基因作用阈值模型的特点^[15]。

本研究初步获得 TAP1 基因 637 A/G 与 MS 存在关联结果, 但由于研究人群遗传背景异质性和样本含量的局限性, 仍需较大样本及不同人群的相关研究进一步加以证实。

(感谢中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所董小平研究员、韩俊老师的大力支持与帮助)

参 考 文 献

- [1] Higgins CF. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol*, 1992, 8: 67-113.
- [2] Srinivasan KN, Pugalendi KV, Sambandam G, et al. Comparison of glycoprotein components, tryptophan, lipid peroxidation and antioxidants in borderline and severe hypertension and myocardial infarction. *Clin Chim Acta*, 1998, 275: 197-203.
- [3] Agata Kubaszek, Anu Markkanen, Johan GE, et al. The association of the K121Q polymorphism of the plasma cell glycoprotein-1 gene with type 2 diabetes and hypertension depends on size at birth. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004, 89: 2044-2047.
- [4] 中华医学会糖尿病学分会. 中华医学会糖尿病学分会关于代谢综合征的建议. *中华糖尿病杂志*, 2004, 12: 156-161.
- [5] Saeki H, Kuwata S, Nakagawa H, et al. Analysis of disease-associated amino acid epitopes on HLA class II molecules in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*, 1995, 96: 1061-1068.
- [6] Anand SS, Yi QL, Gerstein H, et al. Relationship of metabolic syndrome and fibrinolytic dysfunction to cardiovascular disease. *Circulation*, 2003, 108: 4202-4251.
- [7] Whang DH, Park H, Roh EY, et al. TAP1 and TAP2 gene polymorphisms and HLA-TAP haplotypes in Koreans based on 90 families. *Hum Immunol*, 2005, 66: 998-1007.
- [8] Faucz FR, Probst CM, Petzl-Erler ML. Polymorphism of LMP2, TAP1, LMP7 and TAP2 in Brazilian Amerindians and Caucasoids: implications for the evolution of allelic and haplotypic diversity. *Eur J Immunogenet*, 2000, 27: 5-16.
- [9] Ozbas-Gerceker F, Ozguc M. Frequencies of TAP1 and TAP2 gene polymorphisms in the Anatolian population. *Eur J Immunogenet*, 2003, 30: 97-99.
- [10] 苏虹, 王保龙, 高萍, 等. 皖籍汉族正常人群 TAP 等位基因多态性分析. *中国免疫学杂志*, 2000, 16: 671-672.
- [11] 张勇, 朱晓春, 孙雪青. 上海人群中 TAP、LMP 和 HLA-DM 基因多态性研究. *现代免疫学*, 2006, 26: 31-34.
- [12] 李坤, 戴悦, 阴秀丽, 等. 中国华北地区人群 TAP1 基因多态性与乙肝关联性的研究. *胃肠病学和肝病杂志*, 2005, 14: 66-69.
- [13] 闵伟琪, 施桂英. 维吾尔族人群抗原处理相关转运体(TAP)基因多态性及与类风湿关节炎的相关性. *中国免疫学杂志*, 1999, 15: 317-319.
- [14] 吴爱华, 高眉扬, 温春霞, 等. TAP 基因与妊娠期高血压疾病关系的初步探讨. *广州医学院学报*, 2005, 33: 25-27.
- [15] Morton NM, Densmore V, Wamil M, et al. A polygenic model of the metabolic syndrome with reduced circulating and intra-adipose glucocorticoid action. *Diabetes*, 2005, 54: 3371-3378.

(收稿日期: 2006-06-30)

(本文编辑: 张林东)