

葡萄糖激酶调节蛋白基因 rs780094 多态性与儿童青少年血脂关系的研究

尚晓瑞 宋洁云 刘芳宏 马军 王海俊

【摘要】 目的 探讨葡萄糖激酶调节蛋白(GCKR)基因 rs780094 的多态性与儿童青少年血脂水平的关系。方法 选取1 026名7~18岁中小学生对为研究对象。由专职人员记录学生一般情况和既往病史,检测身高、体重,并采集清晨空腹肘静脉血,测定血清TC、TG、HDL-C和LDL-C水平。利用基质支持的激光释放/电离飞行时间质谱分析(MALDI-TOF MS)进行GCKR基因 rs780094位点的基因型检测。采用多元线性回归和多元logistic回归分析基因多态性与血脂水平的关系。结果 调整年龄、年龄的平方和性别,GCKR基因 rs780094多态性A等位基因与TC、TG和LDL-C的水平增加存在相关性($b=0.06$ mmol/L, $P=0.037$; $b=0.09$ mmol/L, $P<0.001$; $b=0.05$ mmol/L, $P=0.040$); rs780094多态性与TG、LDL-C异常也存在相关性($OR=1.60$, 95%CI: 1.30~1.97, $P<0.001$; $OR=1.35$, 95%CI: 1.02~1.80, $P=0.036$)。结论 GCKR基因 rs780094位点的多态性与儿童青少年血脂水平有关,A等位基因可能是血脂增高的遗传因素。

【关键词】 血脂; 葡萄糖激酶调节蛋白; 基因多态性; 儿童

Association between rs780094 polymorphism in GCKR and plasma lipid levels in children and adolescents Shang Xiaorui, Song Jieyun, Liu Fanghong, Ma Jun, Wang Haijun. Institute of Child and Adolescent Health, School of Public Health, Peking University, Beijing 100191, China

Corresponding authors: Ma Jun, Email: majunt@bjmu.edu.cn; Wang Haijun, Email: whjun1@bjmu.edu.cn

The work was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (No. 81172683) and the Major State Basic Research and Development Program of China (973 Program) (No. 2012CB517501).

【Abstract】 Objective To investigate the association between rs780094 polymorphism in glucokinase regulatory protein (GCKR) and plasma lipid levels in children and adolescents. **Methods** 1 026 Chinese children aged 7 to 18 years were recruited, with anthropometric measurements, detection of plasma lipid levels and genotyping of rs780094 performed. Relationships between polymorphism and plasma lipid levels were tested, using multivariate linear regression and logistic regression. **Results** A-allele of rs780094 in GCKR was associated with increased TC, TG and LDL-C levels ($b=0.06$ mmol/L, $P=0.037$; $b=0.09$ mmol/L, $P<0.001$; $b=0.05$ mmol/L, $P=0.040$) under the additive model adjusted for age, age square and gender. The rs780094 in GCKR was also associated with abnormal levels of TG and LDL-C ($OR=1.60$, 95%CI: 1.30-1.97, $P<0.001$; $OR=1.35$, 95%CI: 1.02-1.80, $P=0.036$). **Conclusion** The rs780094 in GCKR was associated with plasma lipid levels in children and adolescents while A-allele of rs780094 might serve as genetic factor for the increased plasma lipid levels.

【Key words】 Plasma lipid; Glucokinase regulatory protein; Gene polymorphism; Child

葡萄糖激酶调节蛋白(GCKR)基因位于染色体2p23区域,包含19个外显子,共编码625个氨基

酸。其编码的GCKR是糖异构酶家族成员,主要存在于肝脏和胰岛细胞中^[1],通过非共价键与葡萄糖激酶(GCK)结合形成一种不活泼的复合物抑制其活性,参与调节肝脏糖脂代谢^[2]。该基因被认为是青少年的成年人发病型糖尿病(MODY)^[3]和痛风^[4]的候选基因。近年来研究发现,GCKR基因 rs780094多态性与非酒精性脂肪肝^[5]和高三酰甘油血症^[6]密切相关;国内已有相关研究报道,但研究结果不一

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2014.06.003

基金项目:国家自然科学基金(81172683);国家重点基础研究发展计划(973)项目(2012CB517501)

作者单位:100191 北京大学公共卫生学院/儿童青少年卫生研究所

通信作者:马军,Email: majunt@bjmu.edu.cn;王海俊,Email: whjun1@bjmu.edu.cn

致^[7,8],尚需大样本验证。为此本研究探讨rs780094多态性对汉族儿童青少年血脂的影响,为血脂异常的发病机制研究提供线索。

对象与方法

1. 研究对象:在北京市海淀区3所中学和2所小学7~18岁全体在校学生中,选取所有超重/肥胖学生,并在每个年级随机选择2个班的体重正常学生。根据病史和体检资料,排除心、肺、肝、肾等重要脏器疾病史,其他原因(如饮酒、药物、病毒、自身免疫等)引起的肝病,身体发育异常(如侏儒症、巨人症)和身体残缺、畸形者(如严重脊柱侧弯、鸡胸、明显的O型腿和X型腿)及其他原因(如内分泌疾病、药物副作用等)引起的肥胖,最终共选取1 026人。本研究已获得所有研究对象的知情同意,并通过北京大学生物医学研究伦理委员会审批。

2. 判定标准:采用美国国家胆固醇教育计划(NCEP)推荐的儿童青少年血脂谱水平异常标准^[9],即TG \geq 1.1 mmol/L、TC \geq 4.4 mmol/L、HDL-C $<$ 1.3 mmol/L(其中 \geq 15岁男生HDL-C $<$ 1.17 mmol/L)、LDL-C \geq 2.9 mmol/L为异常。采用中国肥胖工作组制定的“中国学龄儿童青少年超重、肥胖筛查体重指数分类标准”判定超重/肥胖^[10]。

3. 研究方法:

(1)一般情况及体格检查:采用自行设计的体检表,由专职人员填写学生姓名、性别、年龄,询问既往病史,并检测身高、体重等。

(2)问卷调查:问卷内容包括一般情况,过去7 d内鱼肉豆蛋奶类、蔬菜、水果、淀粉等食物摄入频率和西式快餐饮食行为的发生频率,及每天体育锻炼和静态生活行为(包括看电视和/或DVD、玩电脑、玩电子游戏)的平均时间。

(3)血生化指标测定:采集每名研究对象的空腹静脉血3 ml,3 000 r/min离心,分离血清和血凝块(-20 °C保存用于提取DNA)。使用RA-1000型全自动生化分析仪(美国泰尔康公司)测定血清TC、TG(均采用酶法)、HDL-C和LDL-C(均采用清除法)。

(4)血凝块DNA提取:用常规酚/氯仿方法提取外周血白细胞基因组DNA。

(5)分子生物学实验:采用Sequenom MassArray Assay DesignSuite软件设计特定PCR扩增及延伸引物,利用基质支持的激光释放/电离飞行时间质谱分析(MALDI-TOF MS)进行基因分型:①

多重PCR反应扩增DNA样本;②虾碱性磷酸酶(SAP)反应去除未反应完的dNTP;③进行单碱基延伸反应;④所得产物除去盐份并转移至384孔芯片上,用Sequenom MassArray质谱仪检测;⑤应用MassArray Typer软件分析质谱图。

4. 统计学分析:采用描述性统计方法分析研究对象的一般情况以及基因型和等位基因频率,进行Hardy-Weinberg(H-W)遗传平衡检验;调整年龄、年龄的平方、性别、BMI后,采用多元线性回归和多元logistic回归分析基因多态性与血脂水平的关系。因相关文献发现年龄对rs780094基因多态性与血脂关系的作用为非线性^[6],故选用年龄和年龄的平方调整年龄的作用。为了控制膳食和体力活动的混杂作用,进一步分析调整过去7 d食物摄入频率、西式快餐饮食行为发生频率、每天体育锻炼平均时间和静态生活行为平均时间之后基因多态性与血脂水平的关联。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。采用SPSS 18.0软件进行统计分析,使用QUANTO软件计算基因多态性与血脂水平和血脂异常关联分析的power值。

结 果

1. 基本情况和基因型分布:1 026名儿童青少年中男生574人(55.9%),女生452人(44.1%);体重正常组429人(41.8%),超重组301人(29.3%),肥胖组296人(28.8%);平均年龄(11.50 \pm 2.88)岁,平均BMI(21.68 \pm 4.26) kg/m²,平均TG、TC、LDL-C、HDL-C分别为(0.92 \pm 0.41) mmol/L、(4.11 \pm 0.69) mmol/L、(2.22 \pm 0.56) mmol/L、(1.51 \pm 0.31) mmol/L,异常比例分别为25.6%、28.7%、11.1%、23.1%。rs780094有AA、AG和GG三种基因型,频率分别为29.0%(298人)、49.9%(512人)、21.1%(216人)。经检验,研究样本符合H-W遗传平衡定律($P>0.05$)。

2. rs780094基因多态性与血脂水平的关系:采用多元线性回归的方法,调整年龄、年龄的平方和性别,分析得出GCKR基因rs780094多态性A等位基因与TC、TG和LDL-C的水平增加存在相关性($b=0.06$, $P=0.037$; $b=0.09$, $P<0.001$; $b=0.05$, $P=0.040$);调整BMI后,关联存在($b=0.06$, $P=0.036$; $b=0.09$, $P<0.001$; $b=0.05$, $P=0.031$),见表1。调整肥胖程度,关联仍然存在($b=0.06$, $P=0.038$; $b=0.09$, $P<0.001$; $b=0.05$, $P=0.040$)。进一步调整过去7 d食物摄入频率、西式快餐饮食行为发生频率、

每天体育锻炼平均时间和静态生活行为平均时间后,关联仍然存在($P < 0.05$)。

表 1 GSKR 基因 rs780094 多态性与血脂水平的关系 (调整均数)

血脂(mmol/L)	模型	AA	AG	GG	b 值	P 值
TC	一	4.104	4.042	3.980	0.06	0.037
	二	4.165	4.103	4.041	0.06	0.036
TG	一	1.041	0.954	0.867	0.09	<0.001
	二	1.001	0.914	0.827	0.09	<0.001
LDL-C	一	2.292	2.241	2.190	0.05	0.040
	二	2.249	2.197	2.145	0.05	0.031
HDL-C	一	1.519	1.531	1.543	-0.01	0.373
	二	1.558	1.570	1.582	-0.01	0.319

注:在加性模型下,采用多元线性回归分析基因多态性与血脂水平的关系;模型一的协变量为年龄、年龄的平方和性别,模型二的协变量为年龄、年龄的平方、性别和 BMI

3. rs780094 基因多态性与血脂异常的关系:采用多元 logistic 回归方法,调整年龄、年龄的平方和性别,分析得出 rs780094 多态性和 TG、LDL-C 异常存在相关性 ($OR = 1.60, 95\% CI: 1.30 \sim 1.97, P < 0.001; OR = 1.35, 95\% CI: 1.02 \sim 1.80, P = 0.036$); 调整 BMI 后关联稍变强 ($OR = 1.69, 95\% CI: 1.35 \sim 2.10, P < 0.001; OR = 1.38, 95\% CI: 1.04 \sim 1.85, P = 0.028$), 见表 2。调整肥胖程度,关联仍然存在 ($OR = 1.66, 95\% CI: 1.34 \sim 2.07, P < 0.001; OR = 1.36, 95\% CI: 1.02 \sim 1.81, P = 0.036$)。进一步调整过去 7 d 食物摄入频率、西式快餐饮食行为发生频率、每天体育锻炼平均时间和静态生活行为平均时间后,该基因多态性与血脂水平的关联仍然存在($P < 0.05$)。

讨 论

全基因组扫描显示 GSKR 基因定位于染色体 2p23.2-3, 且该区域存在 MS 的易感位点^[11]。GSKR 基因单核苷酸多态性 rs780094 位于第 16 号内含子, 未改变 GSKR 蛋白的氨基酸序列, 但是可能因与其他致病多态性位点存在紧密的连锁不平衡或者是处于转录因子结合部位或 RNA 剪接位置, 从而影响 GSKR 基因的表达。

目前已有多个关于 GSKR 基因 rs780094 位点与

血脂的关联研究。2008 年一项 GWAS 研究, 在芬兰和瑞典人群中发现 rs780094 多态性的 A 等位基因与高三酰甘油血症密切相关^[6], 此研究结果在欧美和亚洲成年人中得到验证^[12-18]。该多态性与脂代谢异常的关系在中国人群中也有报道。Tam 等^[8]对中国香港地区 600 名健康成年人及 986 名健康青少年的研究发现该多态性与 TG 水平升高密切相关。Sparso 等^[19]对 16 853 名丹麦人的研究发现, rs780094 除与 TG 水平升高有关外, 还与 TC 和 LDL-C 水平升高有关, 此结果在日本人群中得到验证^[20]。本研究在调整年龄、年龄的平方、性别和 BMI 后, rs780094 多态性 A 等位基因与 TC、TG 和 LDL-C 的水平升高存在相关性, 和 TG、LDL-C 异常也存在相关性。其中 rs780094 多态性与增加的 TG 水平有关, 这与 Tam 等^[8]研究结果相符, 而 rs780094 多态性与 TC、LDL-C 的相关性则是第一次在中国汉族人群中发现, 与之前国外的研究结果一致^[19, 20]。

GSKR 是葡萄糖代谢途径中的第一个关键酶, 在调节肝细胞糖脂代谢和胰岛 B 细胞葡萄糖刺激的胰岛素分泌过程中发挥重要作用。主要存在于肝脏和胰岛细胞中的 GSKR, 通过非共价键与 GSK 结合形成一种不活泼的复合物来抑制其活性, 从而参与调节肝脏糖脂代谢^[2]。研究 GSKR 基因敲除的大鼠, 发现由于 GSKR 对 GSK 调控的缺陷, 而表现出 GSK 活性降低及血糖水平升高^[21]; 而通过重组腺病毒介导过度表达 GSKR 基因的糖尿病大鼠, 可发现大鼠胰岛素敏感性和 TG 水平增加^[22]。目前国内外已开展对 GSKR 基因变异导致血脂异常的机制研究, 但其确切结果仍有待阐明^[23-25]。

本研究存在局限性。根据现有样本量和相关文献提供的基因频率^[8], 按 $\alpha = 0.05$ 水准, 得出当 GSKR 基因 rs780094 多态性与某血脂指标水平的关联强度 $b \geq 0.05$ 时, 有 80% 以上的把握度发现位点与某血脂指标水平的关联; 当 rs780094 多态性与 TC、HDL-C 异常的 $OR \geq 1.32$ 时, 有 80% 以上的把握度发现位点与某血脂指标的关联。本研究阳性结果的把握度均大于 80%, 但 rs780094 多态性与 HDL-C 的关联强

表 2 GSKR 基因 rs780094 多态性与血脂异常的关系

模型	TC 异常		TG 异常		LDL-C 异常		HDL-C 异常	
	OR 值(95%CI)	P 值	OR 值(95%CI)	P 值	OR 值(95%CI)	P 值	OR 值(95%CI)	P 值
一	1.15(0.95 ~ 1.40)	0.156	1.60(1.30 ~ 1.97)	<0.001	1.35(1.02 ~ 1.80)	0.036	1.11(0.90 ~ 1.37)	0.347
二	1.15(0.95 ~ 1.41)	0.150	1.69(1.35 ~ 2.10)	<0.001	1.38(1.04 ~ 1.85)	0.028	1.12(0.90 ~ 1.40)	0.298

注:在加性模型下,采用多元 logistic 回归分析基因多态性与血脂谱异常的关系;模型一的协变量为年龄、年龄的平方和性别,模型二的协变量为年龄、年龄的平方、性别和 BMI; TG ≥ 1.1 mmol/L、TC ≥ 4.4 mmol/L、HDL-C < 1.3 mmol/L (其中 ≥ 15 岁男生 HDL-C < 1.17 mmol/L)、LDL-C ≥ 2.9 mmol/L 为异常

度、rs780094多态性与TC、HDL-C异常的OR值均小于检验效能计算时设定的参数,其关联分析的把握度小于80%,这些阴性结果需要今后扩大样本进一步研究。

总之,本研究发现GCKR基因rs780094多态性与汉族儿童青少年的血脂存在密切关系,可能是儿童脂质代谢异常及其相关疾病的遗传学基础,但该多态性对脂质代谢异常的作用机制还需进一步深入研究。

参 考 文 献

- [1] Van Schaftingen E. A protein from rat liver confers to glucokinase the property of being antagonistically regulated by fructose 6-phosphate and fructose 1-phosphate[J]. Eur J Biochem, 1989, 179(1):179-184.
- [2] Fang YB, Zou DJ. Research progress on glucokinase regulatory protein[J]. Acta Medicinæ Sinica, 2003, 16(3): 422-423. (in Chinese)
方亦斌,邹大进. 葡萄糖激酶调节蛋白的研究进展[J]. 华夏医学, 2003, 16(3):422-423.
- [3] Vionnet N, Stoffel M, Takeda J, et al. Nonsense mutation in the glucokinase gene causes early-onset non-insulindependent-diabetes mellitus[J]. Nature, 1992, 356(6371):721-722.
- [4] Wang J, Liu S, Wang B, et al. Association between gout and polymorphisms in GCKR in male Han Chinese[J]. Hum Genet, 2012, 131(7):1261-1265.
- [5] Speliotes EK, Yerges-Armstrong LM, Wu J, et al. Genome-wide association analysis identifies variants associated with nonalcoholic fatty liver disease that have distinct effects on metabolic traits[J]. PLoS Genet, 2011, 7(3):e1001324.
- [6] Saxena R, Voight BF, Lyssenko V, et al. Genome-wide association analysis identifies loci for type 2 diabetes and triglyceride levels [J]. Science, 2007, 316(5829):1331-1336.
- [7] Ling Y, Li X, Gu Q, et al. Associations of common polymorphisms in GCKR with type 2 diabetes and related traits in a Han Chinese population: a case-control study[J]. BMC Med Genet, 2011, 12: 66.
- [8] Tam CH, Ma RC, So WY, et al. Interaction effect of genetic polymorphisms in glucokinase (GCK) and glucokinase regulatory protein (GCKR) on metabolic traits in healthy Chinese adults and adolescents[J]. Diabetes, 2009, 58(3):765-769.
- [9] National Cholesterol Education Program (NCEP): highlights of the report of the Expert Panel on Blood Cholesterol Levels in Children and Adolescents[J]. Pediatrics, 1992, 89(3):495-501.
- [10] Group of China Obesity Task Force. Body mass index reference norm for screening overweight and obesity in Chinese children and adolescents[J]. Chin J Epidemiol, 2004, 25(2): 97-102. (in Chinese)
中国肥胖问题工作组. 中国学龄儿童青少年超重、肥胖筛查体重指数值分类标准[J]. 中华流行病学杂志, 2004, 25(2): 97-102.
- [11] Comuzzie AG, Hixson JE, Almasy L, et al. A major quantitative trait locus determining serum leptin levels and fat mass is located on human chromosome 2[J]. Nat Genet, 1997, 15(3):273-276.
- [12] Sparso T, Andersen G, Nielsen T, et al. The GCKR rs780094 polymorphism is associated with elevated fasting serum triacylglycerol, reduced fasting and OGTT-related insulinaemia, and reduced risk of type 2 diabetes [J]. Diabetologia, 2008, 51(1):70-75.
- [13] Takeuchi F, Katsuya T, Chakravarthy S, et al. Common variants at the GCK, GCKR, G6PC2-ABCB11 and MTNR1B loci are associated with fasting glucose in two Asian populations [J]. Diabetologia, 2010, 53(2):299-308.
- [14] Perez-Martinez P, Corella D, Shen J, et al. Association between glucokinase regulatory protein (GCKR) and apolipoprotein A5 (APOA5) gene polymorphisms and triacylglycerol concentrations in fasting, postprandial, and fenofibrate-treated states[J]. Am J Clin Nutr, 2009, 89(1):391-399.
- [15] Bi M, Kao WH, Boerwinkle E, et al. Association of rs780094 in GCKR with metabolic traits and incident diabetes and cardiovascular disease: the ARIC Study [J]. PLoS One, 2010, 5(7):e11690.
- [16] Kozian DH, Barthel A, Cousin E, et al. Glucokinase-activating GCKR polymorphisms increase plasma levels of triglycerides and free fatty acids, but do not elevate cardiovascular risk in the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health Study [J]. Horm Metab Res, 2010, 42(7):502-506.
- [17] Mohas M, Kisfali P, Jaromi L, et al. GCKR gene functional variants in type 2 diabetes and metabolic syndrome: do the rare variants associate with increased carotid intima-media thickness?[J]. Cardiovasc Diabetol, 2010, 9:79.
- [18] Rafiq S, Venkata KK, Gupta V, et al. Evaluation of seven common lipid associated loci in a large Indian sib pair study[J]. Lipids Health Dis, 2012, 11:155.
- [19] Sparso T, Andersen G, Nielsen T, et al. The GCKR rs780094 polymorphism is associated with elevated fasting serum triacylglycerol, reduced fasting and OGTT-related insulinaemia, and reduced risk of type 2 diabetes [J]. Diabetologia, 2008, 51(1):70-75.
- [20] Onuma H, Tabara Y, Kawamoto R, et al. The GCKR rs780094 polymorphism is associated with susceptibility of type 2 diabetes, reduced fasting plasma glucose levels, increased triglycerides levels and lower HOMA-IR in Japanese population [J]. J Hum Genet, 2010, 55(9):600-604.
- [21] Farrelly D, Brown KS, Tieman A, et al. Mice mutant for glucokinase regulatory protein exhibit decreased liver glucokinase: a sequestration mechanism in metabolic regulation [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96(25):14511-14516.
- [22] Slosberg ED, Desai UJ, Fanelli B, et al. Treatment of type 2 diabetes by adenoviral-mediated over expression of the glucokinase regulatory protein[J]. Diabetes, 2001, 50(8):1813-1820.
- [23] Beer NL, Tribble ND, McCulloch LJ, et al. The P446L variant in GCKR associated with fasting plasma glucose and triglyceride levels exerts its effect through increased glucokinase activity in liver[J]. Hum Mol Genet, 2009, 18(21):4081-4088.
- [24] Saxena R, Voight BF, Lyssenko V, et al. Genome-wide association analysis identifies loci for type 2 diabetes and triglyceride levels [J]. Science, 2007, 316(5829):1331-1336.
- [25] Qi Q, Wu Y, Li H, et al. Association of GCKR rs780094, alone or in combination with GCK rs1799884, with type 2 diabetes and related traits in a Han Chinese population [J]. Diabetologia, 2009, 52(5):834-843.

(收稿日期:2013-12-13)

(本文编辑:张林东)