

[文章编号] 1671-587X(2012)05-0985-05

## 宁夏汉族人群 VDR 基因 4 个 SNPs 位点基因多态性与 2 型糖尿病的关联性分析

徐金瑞, 纳小菲, 杨 易

(宁夏大学 西部特色生物资源保护与利用教育部重点实验室, 宁夏 银川 750021)

[摘 要] 目的: 探讨在宁夏地区汉族人群中维生素 D 受体(VDR)基因 4 个 SNPs 位点基因多态性与 2 型糖尿病(T2DM)的关联性, 旨在为 T2DM 的早期预防提供理论依据。方法: 采用聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)方法对宁夏汉族 201 例 T2DM 患者及 210 例健康对照个体 VDR 基因 rs1544410(G>A)、rs757343(G>A)、rs731236(T>C)和 rs739837(G>T)共 4 个 SNPs 位点的多态性进行检测, 病例-对照组间基因型和等位基因频数的差异比较采用  $\chi^2$  检验, 单倍型分析采用 SHEsis 在线分析软件。结果: T2DM 组和对照组间, rs1544410、rs757343 位点基因型频数分布差异具有统计学意义( $P<0.05$ ); rs1544410 位点等位基因频数分布差异有统计学意义( $P<0.05$ ), 等位基因 G 在 T2DM 组的频数(93.5%)高于对照组(89.3%), OR [95%CI]为 1.738 [1.055~2.865]; 4 个位点共检出 16 种单倍型, 单倍型 GGCT 在宁夏汉族 T2DM 患者中的频数(10.0%)高于对照组(6.1%), 组间比较差异有统计学意义( $P<0.05$ ), 且 OR [95%CI]为 1.723 [1.03~2.883]。结论: 在宁夏汉族人群中, VDR 基因 rs1544410 位点等位基因 G 及单倍型 GGCT 可增加患 T2DM 的风险。

[关键词] VDR 基因; 糖尿病, 2 型; 宁夏汉族; 单核苷酸多态性

[中图分类号] R587.1 [文献标志码] A

## Relevance analysis on polymorphisms of four SNPs of VDR gene and type 2 diabetes mellitus in Ningxia Han population

XU Jin-rui, NA Xiao-fei, YANG Yi

(Key Laboratory of Protection and Utilization of Special Biological Resources in Western China, Ministry of Education, Ningxia University, Yinchuan 750021, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the correlation between 4 single nucleotide polymorphisms(SNPs) of vitamin D receptor (VDR) gene and type 2 diabetes mellitus (T2DM) in Ningxia Han population and to provide theoretical basis for T2DM prevention. **Methods** Polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method was carried out to examine the SNPs at rs1544410 (G>A), rs757343 (G>A), rs731236 (T>C) and rs739837 (G>T) sites of VDR gene in 201 T2DM patients (T2DM group) and 210 healthy individuals (control group) in Ningxia Han population. The  $\chi^2$  test was used to compare the allelic frequencies and genotypic frequencies between two groups. The SHEsis online haplotype analysis software was applied. **Results** The genotypic frequencies of rs1544410 and rs757343 had significant differences between T2DM group and control group ( $P<0.05$ ). The frequency of allele G was higher in T2DM group (93.5%) than that in control group (89.3%), and the difference between two groups had statistically significant difference ( $P<0.05$ ). The OR [95%CI] value was 1.738 [1.055-2.865]. There were 16 haplotypes in 4 SNPs in all and the frequency of haplotype GGCT had

[收稿日期] 2012-04-17

[基金项目] 宁夏回族自治区科技厅自然科学基金资助课题 (NZ1145)

[作者简介] 徐金瑞 (1975-), 男, 宁夏回族自治区永宁县人, 副教授, 遗传学硕士, 主要从事遗传学的研究。

[通信作者] 徐金瑞 (Tel: 0951-2062813, E-mail: xjr975@163.com)

significant difference between T2DM group (10.0%) and control group (6.1%) ( $P < 0.05$ ), with OR [95%CI] = 1.723 [1.03–2.883]. **Conclusion** The allele G of rs1544410 and the haplotype GGCT of VDR gene may be associated with T2DM susceptibility in Ningxia Han population.

**Key words:** vitamin D receptor gene; diabetes mellitus, type 2; Ningxia Han nationality; single nucleotide polymorphisms

2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)是由遗传和环境因素共同作用的复杂性疾病。目前认为胰岛素抵抗和胰岛素分泌缺陷是T2DM发病的两个要素<sup>[1]</sup>。维生素D受体(vitamin D receptor, VDR)是一种细胞核内受体,属于类固醇/甲状腺激素受体超家族的一员,可与维生素D活性形式 $1, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 结合后影响胰岛 $\beta$ 细胞功能,从而预防T2DM的发生。人的VDR基因位于第12号染色体(12q13-14),长约75 000 bp<sup>[2]</sup>,由9个外显子和8个内含子组成。研究<sup>[3]</sup>表明:VDR基因多态性与T2DM的发生有关,并且具有一定的种族特异性。目前,尚未见VDR基因多态性与宁夏汉族人群T2DM相关性的研究报道。本研究对宁夏汉族T2DM患者与健康对照个体rs1544410(G>A)、rs757343(G>A)、rs731236(T>C)和rs739837(G>T)共4个SNPs位点基因多态性及单倍型进行检测,探讨这些位点的变异与宁夏汉族人群T2DM易感性的关联性。

## 1 资料与方法

1.1 一般资料 收集宁夏不同地区汉族体检健康人群及T2DM患者的外周静脉血样本,其中T2DM组201例(男性123例,女性78例),DM诊断标准参照WHO标准(1999年)。健康对照组210例(男性88例,女性122例)。以上个体间均无血缘关系,追溯3代均为汉族,且在宁夏地区居住3代以上。根据知情同意原则,采取外周静脉血样本提取基因组DNA。

1.2 基因组DNA提取 采用常规酚/氯仿提取法提取基因组DNA。

1.3 SNP位点选择 对文献报道较多的rs1544410、rs757343、rs731236和rs739837共4个SNPs位点进行检测<sup>[4-7]</sup>。

1.4 引物设计 根据GenBank中VDR基因序列设计引物,扩增各位点所在目的片段,引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。对相近(160 bp)的rs1544410、rs757343位点采用相同引物扩增目的片段: F, 5'-ATAAGGAAATAC-

CTACTTTGCTGGTTT-3'; R, 5'-TAGGTGCT-CAATAAATTGTTGCTAAG-3', 扩增片段大小为580 bp,退火温度58℃。rs731236位点引物序列为: F, 5'-CAGAGCATGGACAGGGAGCAA-3', R, 5'-GCAACTCCTCATGGCTGAGGTCTC-3'; 扩增片段大小为745 bp,退火温度65℃。rs739837位点引物序列: F, 5'-GCAGGGCCTT-GCCCA-3'; R, 5'-CACTAGGCGCTGGACAAG-C-3', 扩增片段大小为149 bp,退火温度64.5℃。

1.5 PCR反应 反应体系15  $\mu\text{L}$ ,其中DNA模板( $40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )0.6  $\mu\text{L}$ ,上下游引物各0.3  $\mu\text{L}$ , 2 $\times$ Reaction Mix 7.5  $\mu\text{L}$ , Golden DNA Polymerase( $2.5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )0.12  $\mu\text{L}$ ,灭菌三蒸水6.18  $\mu\text{L}$ 。PCR反应条件为:94℃预变性5 min;94℃变性30 s,58℃/65℃/64.5℃退火30 s,72℃延伸1 min,30个循环;最后72℃延伸10 min,4℃保存。扩增完成后,取PCR产物3  $\mu\text{L}$ ,用1%的琼脂糖凝胶电泳进行检测。

1.6 酶切反应 限制性内切酶Taq I, Tru9 I、Bgl I和Bsm I购自美国Fermentas公司。分别用各位点相应的内切酶对PCR产物进行酶切。酶切体系均为10  $\mu\text{L}$ 。包括PCR产物4  $\mu\text{L}$ ,10 $\times$ 酶切缓冲液1  $\mu\text{L}$ ,限制性内切酶3 U,加灭菌三蒸水补充至10  $\mu\text{L}$ 。Taq I、Bsm I及Tru9 I的酶切温度为65℃,Bgl I酶切温度为37℃,反应时间均为3 h;反应结束后,取酶切产物6  $\mu\text{L}$ 用1.5%的琼脂糖凝胶电泳进行检测。

1.7 基因型记录与分析 各位点酶切产物及所对应的基因型见表1。

1.8 统计学分析 采用SPSS 17.0软件进行统计学分析。应用拟合优度 $\chi^2$ 检验检测对照组和T2DM组各SNPs位点是否符合Hardy-Weinberg平衡定律。组间基因型频数、等位基因频数的差异比较采用 $\chi^2$ 检验。单倍型分析采用SHEsis在线分析软件进行(<http://analysis.bio-x.cn/myAnalysis.php>);统计效力(statistical power)的计算采用Stata 10.0软件进行。

## 2 结果

2.1 PCR 扩增结果 各位点的扩增结果见图 1~3。由图可见, 扩增片段与预期大小一致, 且条带清晰, 可满足后续实验要求。

2.2 酶切结果 各位点均检出 3 种基因型。rs731236 位点为: CC、TC 和 TT; rs1544410 位点为: AA、GA 和 GG; rs757343 位点为: GG、GA 和 AA; rs739837 位点为: TT、TG 和 GG。见图 4~7 和表 1。

2.3 基因型及等位基因频数分布 各 SNP 位点基因型频数在对照组及患者组中的分布均符合 Hardy-Weinberg 平衡, 具有群体代表性。T2DM 组与对照组间基因型与等位基因频数的比较结果见表 2 和 3。rs1544410、rs757343 位点基因型频数在 T2DM 组与对照组的分布比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 在 T2DM 组与对照组间, 除 rs1544410 位点基因频数的分布有统计学意义外 ( $P < 0.05$ ), 其余位点等位基因频数在 2 组间比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

表 1 各位点不同基因型产生的酶切片段

Tab.1 The digested fragments of 4 sites of different genotypes

SNPs	Restricted enzyme	Genotype	Digested fragment(bp)
rs731236 (T>C)	Taq I	TC	494,293,251,201
		TT	293,251,201
		CC	494,251
rs1544410 (G>A)	Bsm I	GA	580,414,166
		GG	414,166
		AA	580
rs757343 (G>A)	Tru9 I	GA	580,322,258
		AA	322,258
		GG	580
rs739837 (G>T)	Bgl I	GT	149,110,39
		GG	110,39
		TT	149

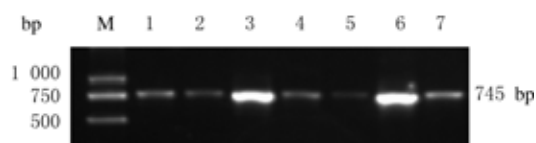


图 1 rs731236 位点 PCR 产物电泳图

Fig.1 Electrophoregram of PCR products of rs731236 site  
M:DL 2 000 marker; Lane 1-7: PCR products.

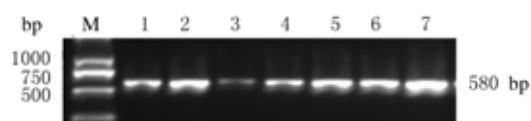


图 2 rs1544410 位点和 rs757343 位点 PCR 产物电泳图

Fig.2 Electrophoregram of PCR products of rs1544410 and rs757343 sites

M:DL 2 000 marker; Lane 1-7: PCR products.

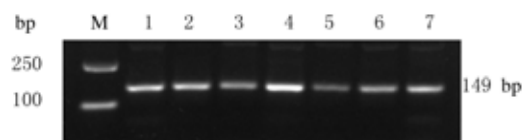


图 3 rs739837 位点 PCR 产物电泳图

Fig.3 Electrophoregram of PCR products of rs739837 site

M:DL 2 000 marker; Lane 1-7: PCR products.

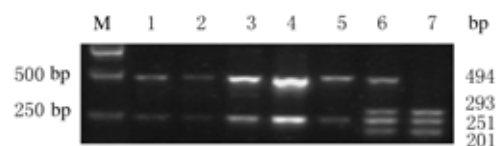


图 4 rs731236 位点 Taq I 酶切产物电泳图

Fig.4 Electrophoregram of products digested by Taq I of rs731236 site

M:DL 2 000 marker; Lane 1-5: Genotype CC; Lane 6: Genotype TC; Lane 7: Genotype TT.

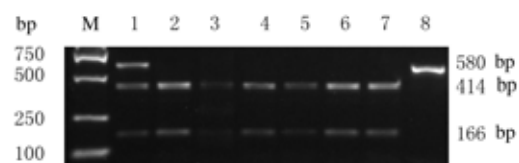


图 5 rs1544410 位点 Bsm I 酶切产物电泳图

Fig.5 Electrophoregram of products digested by Bsm I of rs154410 site

M:DL 2 000 marker; Lane 1: Genotype GA; Lane 2-7: Genotype GG; Lane 8: Genotype AA.

rs1544410 位点等位基因 A 在 T2DM 组中的频数 (6.5%) 低于对照组 (10.7%), 且 OR [95%CI] 为 0.575 [0.349~0.948], 而等位基因 G 在 T2DM 组的频数 (93.5%) 高于对照组 (89.3%), 且 OR [95%CI] 为 1.738 [1.055~2.865], 组间比较差异具有统计学意义 ( $\chi^2 = 4.8$ ,  $P < 0.05$ ); power=0.269 5。

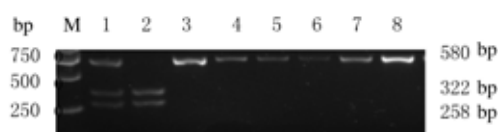
图6 rs757343位点 *TruI* 酶切产物电泳图

Fig. 6 Electrophoregram of products digested by *TruI* I of rs757343 site

M: DL 2 000 marker; Lane 1: Genotype GA; Lane 2: Genotype AA; Lane 3-8: Genotype GG.

2.4 单倍型分析 4个位点共检出16种单倍型,其中单倍型GGCT在对照组及T2DM组中的频数分别6.1%和10.0%,组间比较差异有统计学意义

( $\chi^2 = 4.378$ ,  $P < 0.05$ ), 且 OR [95% CI] 为 1.723 [1.03 ~ 2.883], 提示该单倍型会增加 T2DM 的患病风险。见表 4。

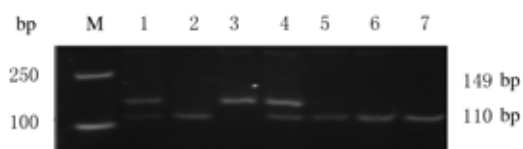
图7 rs739837位点 *BglI* 酶切产物电泳图

Fig. 7 Electrophoregram of products digested by *BglI* I of rs739837 site

M: DL 2 000 marker; Lane 1, 4: Genotype GT; Lane 2, 5-7: Genotype GG; Lane 3: Genotype TT.

表2 T2DM组与对照组VDR基因SNPs位点基因型频数的分布

Tab. 2 Distribution of genotypic frequencies of SNPs of VDR gene in T2DM group and control group [n(η/%)]

Group	rs1544410			rs757343			rs731236			rs739837		
	AA	GA	GG	GG	GA	AA	CC	TC	TT	TT	GT	GG
T2DM	1(0.5)	24(11.9)	176(87.6)	124(61.7)	72(35.8)	5(2.5)	182(90.5)	19(9.5)	0(0.0)	35(17.4)	73(36.3)	93(46.3)
Control	0(0.0)	47(21.5)	172(78.5)	145(66.2)	60(27.4)	14(6.4)	188(87.9)	25(11.7)	1(0.5)	23(15.5)	55(37.2)	70(47.3)
$\chi^2$		7.739			6.233			1.510			0.216	
P		0.021			0.044			0.470			0.898	

表3 T2DM组与对照组VDR基因SNPs位点等位基因频数的分布

Tab. 3 Distribution of allelic frequencies of SNPs of VDR gene in T2DM group and control group [n(η/%)]

Group	rs1544410		rs757343		rs731236		rs739837	
	A	G	G	A	C	T	T	G
T2DM	26(6.5)	376(93.5)	320(79.6)	82(20.4)	383(95.3)	19(4.7)	143(35.6)	259(64.4)
Control	47(10.7)	391(89.3)	350(79.9)	88(20.1)	401(93.7)	27(6.3)	101(34.1)	195(65.9)
$\chi^2$		4.800		0.012		0.991		0.158
P		0.028		0.912		0.319		0.691
OR	0.575	1.738	0.981	1.019	1.357	0.737	1.066	0.938
[95%CI]	0.349-0.948	1.055-2.865	0.701-1.374	0.728-1.427	0.742-2.481	0.403-1.347	0.778-1.461	0.684-1.286

### 3 讨论

T2DM 表现为胰岛素抵抗与胰岛素相对缺乏的特征,因此也被称为非胰岛素依赖性糖尿病。目前对 VDR 基因多态性与 T2DM 关联性的研究逐渐成为 T2DM 发病机制研究中的热点。本研究所涉及的 4 个 SNPs 位点中,仅 rs1544410 位点与宁夏汉族 T2DM 的发生具有关联性,等位基因 G 是宁夏汉族人群易患 T2DM 的风险因子,而 rs757343、rs731236 和 rs739837 位点多态性与 T2DM 的发生不存在关联性。

徐家蓉等<sup>[8]</sup>研究发现:VDR 基因 rs1544410 位点等位基因 G 可能是南京汉族人群 T2DM 的风险因素;蓝小春等<sup>[9]</sup>对浙江汉族人群、张鹏等<sup>[10]</sup>对天津汉族人群的研究表明:VDR 基因 rs1544410 位点 A 等位基因是 T2DM 发病的易感因素;而石艳军<sup>[11]</sup>等的研究结果显示:rs1544410 位点多态性与湖北汉族人群 T2DM 的发生无关。Malecki 等<sup>[12]</sup>的研究结果显示:rs1544410 和 rs731236 位点的多态性与波兰人 T2DM 的发生无关联性。

表 4 T2DM 组与对照组 VDR 基因单倍型频数的分布

Tab. 4 Distribution of haplotypic frequencies of VDR gene in T2DM group and control group [n(η/%)]

Group	AATT	AATG	AACT	AACG	AGTT	AGTG	AGCT	AGCG
T2DM	0 (0)	0 (0)	0.16(0)	0 (0)	8.63(2.1)	0 (0)	10.79(2.7)	6.42(1.6)
Control	0.85(0.2)	1.05(0.2)	0.29(0.1)	3.31(0.8)	17.82(4.2)	3.04(0.7)	6.99(1.6)	13.64(3.2)
$\chi^2$	—	—	—	—	2.756	—	—	2.237
P	—	—	—	—	0.09	—	—	0.134
OR	—	—	—	—	0.503	—	—	0.492
[95%CI]					0.220—1.149			0.190—1.270
Group	GACT	GACG	GGTT	GGCT	GGCG	GATT	GATG	GGTG
T2DM	75.71(18.8)	4.76(1.2)	7.23(1.8)	40.26(10.0)	244.91(60.9)	0.23(0.1)	1.14(0.3)	1.77(0.4)
Control	74.81(17.6)	4.69(1.1)	4.24(1.0)	26.00(6.1)	267.26(63.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
$\chi^2$	0.247	—	—	4.378	0.263	—	—	—
P	0.618	—	—	0.036	0.608	—	—	—
OR	1.095	—	—	1.723	0.925	—	—	—
[95%CI]	0.767—1.563		1.030—2.883		0.687—1.246			

The order of SNP sites in haplotypes: rs1544410, rs757343, rs731236 and rs739837.

Fuat 等<sup>[13]</sup>的研究结果显示: VDR 基因 rs731236 位点多态性与土耳其人群 T2DM 的发生无相关性。而 rs757343、rs739837 位点多态性与 T2DM 的相关性研究国内外尚未见报道。

综上所述, 对不同人群的研究结果存在不一致性, 可能的原因包括: T2DM 为多基因遗传病, 由多个微效基因作用, 每个微效基因的表型效应很小; 表现型是遗传因素和环境因素共同作用的结果, 还需结合环境因素综合分析; 由于不同种族间基因型分配不同、地域差异、饮食不同。此外, 对于复杂的多基因疾病, 仅对某基因单个位点的多态性分析往往不能得出基因与疾病的真实关联性, 而应对多个位点组成的单倍型进行分析, 才能准确地找出与疾病相关联的遗传标记。

本研究对 4 个 SNP 位点的单倍型分析结果表明: 单倍型 GGCT 可增加宁夏汉族患 T2DM 的风险。这一结果提示: 携带 VDR 基因 rs1544410 位点等位基因 A 及单倍型 GGCT 的人群应作为宁夏汉族 T2DM 一级预防的重点人群。

#### [参考文献]

- [1] 唐朝泽, 吴志香. 2 型糖尿病发生机制的研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2009, 6 (11): 69-70.
- [2] Song YQ, Manson JE. Vitamin D, insulin resistance, and type 2 diabetes [J]. Curr Cardio Risk Rep, 2010, 4 (1): 40-47.
- [3] 翟木绪, 刘芬, 陈希平, 等. 维生素 D 受体基因多态性与糖耐量异常、2 型糖尿病相关性研究 [J]. 潍坊医学院学报, 2008, 30 (1): 47-49.
- [4] Velayoudom-Céphise FL, Larifla L, Donnet JP, et al. Amin

D deficiency, vitamin D receptor gene polymorphisms and cardiovascular risk factors in Caribbean patients with type 2 diabetes [J]. Diabetes Metab, 2011, 37 (6): 540-545.

- [5] Kocaba A, Karagüzel G, Imir N, et al. Effects of vitamin D receptor gene polymorphisms on susceptibility to disease and bone mineral density in Turkish patients with type 1 diabetes mellitus [J]. J Pediatr Endocrinol Metab, 2010, 23 (12): 1289-1297.
- [6] Gogas Yavuz D, Keskin L, Kiyici S, et al. Vitamin D receptor gene BsmI, FokI, ApaI, TaqI polymorphisms and bone mineral density in a group of Turkish type 1 diabetic patients [J]. Acta Diabetol, 2011, 48 (4): 329-336.
- [7] Young KA, Snell-Bergeon JK, Naik RG, et al. Vitamin D deficiency and coronary artery calcification in subjects with type 1 diabetes [J]. Diabetes Care, 2011, 34 (2): 454-458.
- [8] 徐家蓉, 鲁一兵, 耿厚法, 等. 维生素 D 受体基因多态性与 2 型糖尿病发病的关联 [J]. 中国组织过程研究与临床康复, 2007, 11 (30): 5881-6018.
- [9] 蓝小春, 霍晓静. 维生素 D 受体基因 BsmI 多态性与 2 型糖尿病关系研究 [J]. 海峡药学, 2009, 21 (5): 141-142.
- [10] 张鹏, 苏文凌, 沈保爽, 等. 天津地区汉族人 2 型糖尿病与维生素 D 受体基因多态性的研究 [J]. 天津医药, 2008, 36 (4): 255-259.
- [11] 石艳军, 沈轶, 蔡立清, 等. 维生素 D 受体基因多态性与糖尿病的相关性 [J]. 中国糖尿病杂志, 2007, 15 (4): 219-221.
- [12] Malecki MT, Frey J, Moczulski D, et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms and association with type 2 diabetes mellitus in a Polish population [J]. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2003, 111 (8): 505-509.
- [13] Dilmec F, Uzer E, Akkafa F, et al. Detection of VDR gene ApaI and TaqI polymorphism in patients with type 2 diabetes mellitus using PCR-RFLP method in a Turkish population [J]. Diabetes, 2010, 24 (3): 186-191.