

河南省某地区人群肥胖易感性与神经肽 Y 及其受体基因多态性的关系

刘卫刚^{1,2}, 陆云³, 李琳琳⁴, 李筠青¹, 盛学文¹, 尹磊², 张功员⁴, 赵景志²

(1. 河北工程大学附属医院病案统计室, 河北 邯郸 056002; 2. 河南省军区直属医院办公室, 河南 郑州 450003; 3. 河北工程大学附属医院肾内科, 河北 邯郸 056002; 4. 郑州大学公共卫生学院卫生统计学教研室, 河南 郑州 450001)

摘要:目的 探讨河南省某地区人群肥胖易感性与神经肽 Y 及其受体基因多态性的关系。方法 随机整群抽取 510 例河南省某地区 18 岁以上常住居民, 进行不同程度 BMI 与基因易感性分析。结果 rs2880412、rs2880416 2 个位点基因分布差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 基因突变率与基因型分布呈整体升高趋势 ($P < 0.05$); 3 个位点基因型的不同与肥胖发生之间存在关联 ($P < 0.05$), CA、GA、GC 3 种单体型在肥胖组和非肥胖组中的分布差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 以 CA 作为对照单体型, GA、GC 单体型与肥胖的易感性有关联 ($P < 0.05$)。结论 rs2880412、rs2880416 位点的基因多态性与肥胖易感性有统计学关联, 并且 2 个位点对应的等位基因 C、C 是肥胖发生的危险因素, 单体型分析表明 3 个位点存在交互作用。

关键词: 基因多态性; 肥胖; 易感性; 单体型

中图分类号: R181.2 **文献标志码:** A

Relationships between obese population-susceptibility and gene polymorphisms of neuropeptide Y and its receptor in a region of Henan Province, China

LIU Weigang^{1,2}, LU Yun³, LI Linlin⁴, LI Yunqing¹, SHENG Xuewen¹,
YIN Lei², ZHANG Gongyuan⁴, ZHAO Jingzhi²

(1. Medical Record Statistics Office, Affiliated Hospital of Hebei University of Engineering, Handan 056002, Hebei, China;
2. Hospital Office, Affiliated Hospital of Henan Province Military Region, Zhengzhou 450003, Henan, China;
3. Department of Renal Medicine, Affiliated Hospital of Hebei University of Engineering, Handan 056002, Hebei, China;
4. Department of Health Statistics, College of Public Health, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, Henan, China)

Abstract: Objective To investigate the relationships between obese population-susceptibility and gene polymorphisms of neuropeptide Y and its receptors in a region of Henan Province, China. **Methods** We selected 510 inhabitants aged over 18 in a region of Henan Province by the method of random cluster sampling, and analyzed the relationships of obesity degree with genetic susceptibilities. **Results** The genic distributions of rs2880412 and rs2880416 had statistical differences ($P < 0.05$). The rates of genic mutation and the distributions of genotypes showed the overall increasing trend ($P < 0.05$). Three sites of different genotypes had relevance to the occurrence of disease. The distributions in three kinds of haplotypes, including CA, GA and GC, had statistical differences between obese and non-obese groups ($P < 0.05$). When haplotype CA was as a control, haplotypes GA and GC were relevant to obese susceptibility ($P < 0.05$). **Conclusion** Gene polymorphisms of rs2880412 and rs2880416 sites are statistically relevant to obese susceptibilities. The corresponding allele C and C of them are risk factors of obesity. Haplotype-analysis showed that there are interactions in the three sites.

Key words: Gene polymorphisms; Obesity; Susceptibility; Haplotype

肥胖及超重已成为全球性公共卫生问题,常与多种慢性疾病相关^[1]。神经肽 Y 是神经元合成、释放的一种神经递质,广泛参与摄食、运动等多种生理功能的控制。神经肽 Y 及其受体与肥胖、代谢综合征有最为密切的关系^[2],神经肽 Y 及其受体基因多态性与肥胖的关联研究在国外仅有个别报道。本研究探讨了河南某地区不同肥胖程度的人群与神经肽 Y 及其受体基因多态性的关系。

1 资料与方法

1.1 研究对象 采用随机整群抽样的方法抽取河南省某地区 18 岁以上常住居民 510 例。

1.2 方法

1.2.1 资料收集和样本采集 自行设计调查问卷,

表 1 rs2880412、rs2880416、rs1047214 位点的引物序列设计

SNP 位点	引物	退火温度(°C)	片段长度(bp)
rs2880412	上游 5'-ATTCAATGACGTAAACCAGAA-3'	59	21
	下游 5'-AGAGAGCCAACATAGAAAAAC-3'		21
rs2880416	上游 5'-GAGGAGAAGGAGCAGAAGGA-3'	59	20
	下游 5'-CGTTTTACTTTGAATGACTACTTGC-3'		25
rs1047214	上游 5'-CTTCCTGATTATTGGCTTGGC-3'	60	21
	下游 5'-CTGATGGTAGTGGTCATTTGC-3'		21

1.2.4 PCR 反应体系 rs2880412、rs2880416 位点的 PCR 总反应体系 20 μ L,其中基因组 DNA 1.0 μ L、上下游引物各 1.5 μ L、2 \times Taq PCR Plus Master Mix 10 μ L,加离子水 6 μ L;受体基因 rs1047214 位点的 PCR 总反应体系 15 μ L,其中基因组 DNA 1.0 μ L、上下游引物各 0.25 μ L、2 \times Taq PCR Plus Master Mix 7.5 μ L,加离子水 6 μ L。

1.2.5 PCR 反应条件 rs2880412、rs2880416 位点:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,95 $^{\circ}$ C 变性 30 s,60 $^{\circ}$ C 退火 40 s,73 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,32 个循环,72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min,4 $^{\circ}$ C 保存;受体基因 rs1047214 位点:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,60 $^{\circ}$ C 退火 40 s,72 $^{\circ}$ C 延伸

在调查对象知情同意的情况下,由统一培训的调查员入户调查并填写调查表,且对问卷进行信度、效度检验。调查内容包括一般情况(性别、年龄)、体格检查(身高、体质量)等;抽取每例研究对象 10 mL 血液,并且分装保存,保存温度 -80 $^{\circ}$ C,运送过程保证血液的质量。

1.2.2 诊断标准 肥胖标准^[3]:体质量指数(BMI) < 18.5 为体质量过低,18.5 ~ 23.9 为体质量正常,24.0 ~ 27.9 为超重, \geq 28 为肥胖。

1.2.3 引物设计 根据 Genebank 中 PYY 基因位点 rs2880412、rs2880416 及其受体 rs1047214 位点的基因序列,采用 PPrimer 5.0 软件进行 3 个位点的引物设计,EpiData 3.1 软件双遍录入数据并进行一致性检查;采用 Haploview 4.2 软件进行 3 个位点的连锁不平衡检验。见表 1。

30 s,30 个循环,72 $^{\circ}$ C 延伸 8 min,4 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.6 酶切反应体系及条件 rs2880412、rs2880416 2 个位点的反应体系 20 μ L,包括 15 μ L PCR 产物,然后在 PCR 产物中加入 0.5 μ L 酶和 1 μ L 10 \times Buffer 的混合产物,最后加脱离子水 4.5 μ L,置于 37 $^{\circ}$ C 水浴 8 ~ 16 h。受体基因 rs1047214 位点的反应体系 15 μ L,包括 10 μ L PCR 产物,然后在 PCR 产物中加入 0.5 μ L 酶和 1 μ L 10 \times Buffer 的混合产物,最后加脱离子水 4.5 μ L,37 $^{\circ}$ C 水浴 8 ~ 16 h。序列识别采用《Fermentas 分子生物学产品应用指南》2010-2011 版用书提供的酶切序列。见表 2。

表 2 rs2880412、rs2880416、rs1047214 位点的 PCR-RFLP 检测

SNP 位点	PCR 产物长度(bp)	内切酶	识别序列	基因多态性类型	基因多态性条带(bp)
rs2880412	196	eco81I	5'-CC \downarrow TAAGG-3'	纯合基因型 A/A	1 条带:196
			3'-GGAAT \uparrow CC-5'	杂合基因型 A/C	3 条带:196,149,47
				纯合基因型 C/C	2 条带:149,47
rs2880416	354	fspbi (bfal)	5'-C \downarrow TAG-3'	纯合基因型 G/G	2 条带:135,219
			3'-GAT \uparrow C-5'	杂合基因型 C/G	4 条带:135,219,158,61
				纯合基因型 C/C	3 条带:135,158,61
rs1047214	289	nci1 (bcn1)	5'-TTCC \downarrow GG-3'	纯合基因型 T/T	1 条带:223
			3'-GGTT \uparrow CC-5'	杂合基因型 T/C	3 条带:196,223,27
				纯合基因型 C/C	2 条带:196,27

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件,对资料进行 χ^2 检验及趋势 χ^2 检验,通过调用 SAS 9.1 程序 HAPLOTYPE 过程分析 3 个位点与肥胖的关联性,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 不同程度 BMI 3 个位点基因分布 体质量过低、体质量正常、超重、肥胖分别为 13、271、126、100 人。rs2880412、rs2880416 2 个位点的基因分布差异有统计学意义 ($P < 0.05$),且 2 个位点突变率随

BMI 的增大呈升高趋势 ($P < 0.05$),见表 3。

2.2 3 个位点基因型与疾病关联分析 设肥胖 = 1,非肥胖 = 0,3 个位点基因型的不同与肥胖的发生存在一定关联 ($\chi^2 = 13.75, P < 0.05$),提示不同人群中 3 个位点基因型频率的改变可能会致病。rs2880416 位点的基因型分布差异有统计学意义 ($P < 0.01$);rs2880412、rs2880416 2 个位点基因型的分布随着 BMI 程度的增大呈升高趋势 ($P < 0.05$)。见表 4。

表 3 不同程度 BMI 3 个位点基因的分布 [$n(\%)$]

分类	rs2880412(A > C)		rs2880416(G > C)		rs1047214(T > C)	
	A	C	G	C	T	C
体质量过低	18(69.23)	8(30.77)	23(80.77)	3(11.54)	24(92.31)	2(7.69)
体质量正常	315(58.11)	227(41.89)	458(84.50)	84(15.50)	455(83.95)	87(16.05)
超重	132(52.38)	120(47.62)	200(79.37)	52(20.63)	210(83.37)	42(16.67)
肥胖	98(49.00)	102(51.00)	128(64.00)	72(36.00)	161(80.50)	39(19.50)
合计	564(55.29)	456(44.71)	809(79.02)	211(20.98)	850(83.33)	170(16.67)
χ^2	7.86		38.81		2.81	
P	<0.05		<0.01		>0.05	
χ^{2*}	7.35		35.92		1.94	
P^*	<0.05		<0.01		>0.05	

注: χ^2 、 P 为整体比较, χ^{2*} 、 P^* 为趋势检验。

表 4 不同程度 BMI 各个位点基因型的分布 [$n(\%)$]

分类	rs2880412(A > C)			rs2880416(G > C)			rs1047214(T > C)		
	AA	AC	CC	GG	GC	CC	TT	TC	CC
体质量过低	7(53.85)	4(30.77)	2(15.38)	11(84.62)	1(7.69)	1(7.69)	11(84.62)	2(15.38)	0
体质量正常	102(37.64)	107(39.48)	60(22.14)	196(72.32)	66(24.35)	9(3.32)	189(69.74)	77(28.41)	5(1.85)
超重	35(27.78)	62(49.21)	29(23.01)	83(65.87)	34(26.98)	9(7.12)	86(68.25)	38(30.16)	2(1.59)
肥胖	29(29.00)	40(40.00)	31(31.00)	42(42.00)	44(44.00)	14(14.00)	63(63.00)	35(35.00)	2(2.00)
合计	135(26.47)	251(49.22)	124(24.31)	321(62.94)	155(30.39)	34(6.67)	349(68.43)	152(29.80)	9(1.76)
χ^2	10.06			36.35			3.64		
P	>0.05			<0.01			>0.05		
χ^{2*}	5.99			31.19			2.09		
P^*	<0.05			<0.01			>0.05		

注: χ^2 、 P 为整体比较, χ^{2*} 、 P^* 为趋势检验。

2.3 rs2880412、rs2880416、rs1047214 位点单体型分析 3 个位点进行连锁不平衡检验(linkage disequilibrium, LD),发现仅 rs2880412 位点和 rs2880416 位点存在连锁不平衡性 ($LD > 0.5$)。由于 rs2880412 位点和 rs2880416 位点均属于单核苷酸多态性位点,且位于同一条染色体上,进行单体型预测,可构建 4 种单体型:CA、CC、GA、GC,其中

CA、GA、GC 3 种单体型在肥胖组和非肥胖组中的分布差异有统计学意义 ($P < 0.05$);以 CA 作为对照单体型,GA、GC 与肥胖的易感性有统计学关联 ($P < 0.05$),其基因型的 OR 值及其 95% CI 分别为 2.61(1.71 ~ 3.98) 和 2.44(1.63 ~ 3.65)。见表 5、6。

表5 rs2880412、rs2880416、rs1047214 位点连锁分析

位点	rs2880412	rs2880416	rs1047214
rs2880412	1.00	0.70	0.05
rs2880416	0.70	1.00	0.01
rs1047214	0.05	0.01	1.00

表6 rs2880412、rs2880416 2 个位点的多态性单体型分析

单体型	肥胖组[n(%)]	非肥胖组[n(%)]	χ^2	OR(95% CI)	P	P*
CA	58(29.0)	117(14.3)	参照	1.00		<0.01
CC	10(5.0)	34(4.1)	1.78	1.69(0.78 ~ 3.65)	0.21	0.22
GA	58(29.0)	305(37.2)	20.57	2.61(1.71 ~ 3.98)	<0.01	<0.01
GC	74(37.0)	364(44.4)	19.54	2.44(1.63 ~ 3.65)	<0.01	<0.01

注:P*为单体型肥胖组和非肥胖组中的分布检验P值。

3 讨论

本研究发现,rs2880412、rs2880416 和 rs1047214 位点的突变率分别为 44.71% (A > C)、20.98% (G > C) 和 16.67% (T > C)。rs1047214 突变率略低于张俊等^[2]研究的北京中小學生 rs1047214 的突变率。rs2880412、rs2880416 2 个位点在不同程度 BMI 的基因分布差异有统计学意义,且该 2 个基因位点突变率随着 BMI 的增大呈升高趋势,提示肥胖人群机体进食后胃肠道神经肽 Y 分泌量明显低于正常体质量人群,抑制促进食欲的神经元 NPY 的分泌不明显,从而使饥饿感增强,食欲增加,导致肥胖^[4-6]。rs1047214 位点基因分布以及突变率趋势差异均无统计学意义^[7-9]。

本研究的 3 个位点基因型的不同与肥胖的发生存在一定关联,提示不同人群中 3 个位点基因型频率的改变可能会致病。rs2880416 位点基因型的分布差异有统计学意义。rs2880412、rs2880416 2 个位点基因型的分布随着 BMI 程度的增大呈升高趋势。rs1047214 位点基因型分布和趋势差异均无统计学意义,这与 Siddiq 等^[10]、McGowan 等^[11]研究的法国成年白种人群结果一致^[10-11],与 Hung 等^[12]研究的结果不同。但本研究的等位基因突变率为 16.67%,而在白种人中等位基因突变率为 40% ~ 50%^[13],提示神经肽受体基因多态性的基因型和等位基因频率存在种族差异。

本研究进行 3 个位点的连锁不平衡检验,发现 rs2880412 位点和 rs2880416 位点存在连锁不平衡性(LD > 0.5)。单体型预测^[14]可以构建 4 种单体型,其中 CA、GA、GC 3 种单体型在肥胖组和非肥胖组中的分布差异有统计学意义,CC 分布无统计学意义,得出 rs2880412 与 rs2880416 位点的 C、C 等

位基因可能是肥胖发生的危险因素。以 CA 作为对照单体型,CC 与肥胖的易感性没有统计学关联,GA、GC 与肥胖的易感性有统计学关联,因此 3 个位点存在交互作用。

参考文献:

- [1] 李鹏飞,姜能俊,刘云海,等.用危险因素评分法分析超重及肥胖对糖尿病的影响[J].山东大学学报:医学版,2010,48(9):5-8.
- [2] 张俊,王海俊,马军,等.儿童青少年肥胖与神经肽 Y 第二受体基因多态性[J].中华流行病学杂志,2009,30(7):695-698.
- [3] 李国强.基于医学指标与体质量指数关系评价肥胖标准的方法[J].中国组织工程研究与临床康复,2007,11(43):8745-8748.
- [4] Ma L, Tataranni P A, Hanson R L, et al. Variations in peptide YY and Y2 receptor genes are associated with severe obesity in Pima Indian men[J]. Diabetes, 2005, 54(5):1598-1602.
- [5] Batterham R L, Cowley M A, Small C J, et al. Gut hormone PYY (3-36) physiologically inhibits food intake[J]. Nature, 2002, 418(6898):650-654.
- [6] Clarke G M, Morris A P. A comparison of sample size and power in case-only association studies of gene-environment interaction[J]. Am J Epidemiol, 2010, 171(4):498-505.
- [7] Conaway L, Green J. Metabolic syndrome in Native Americans[J]. Adv Nurse Pract, 2009, 17(4):4-8.
- [8] Wang H J, Wermter A K, Nguyen T T, et al. No association of sequence variants in the neuropeptide Y2 receptor (NPY2R) gene with early onset obesity in Germans[J]. Horm Metab Res, 2007, 39(11):840-844.
- [9] Torekov S, Larsen L, Andersen G, et al. Variants in the 5' region of the neuropeptide Y receptor Y2 gene (NPY2R) are associated with obesity in 5971 white subjects[J]. Diabetologia, 2006, 49(11):2653-2658.

(下转第 107 页)

- 卫生研究, 2001, 30(4): 221-225.
- [10] 翟凤英, 王惠君, 杜树发, 等. 中国居民膳食结构与营养状况变迁追踪[J]. 医学研究杂志, 2006, 35(4): 3-6.
- [11] 张继国, 张兵, 王惠君, 等. 中国9省区成年居民膳食模式研究[J]. 中华流行病学杂志, 2013, 34(1): 37-40.
- [12] van Dam R M, Rimm E B, Willett W C, et al. Dietary patterns and risk for type 2 diabetes mellitus in U. S. men[J]. *Ann Intern Med*, 2002, 136(3): 201-209.
- [13] Forman D, Bulwer B E. Cardiovascular disease: optimal approaches to risk factor modification of diet and lifestyle [J]. *Curr Treat Options Cardiovasc Med*, 2006, 8(1): 47-57.
- [14] Chen Y, Mc Clintock T R, Segers S, et al. Prospective investigation of major dietary patterns and risk of cardiovascular mortality in Bangladesh [J]. *Int J Cardiol*, 2013, 167(4): 1495-1501.
- [15] Newby P K, Muller D, Hallfrisch J, et al. Food patterns measured by factor analysis and anthropometric changes in adults[J]. *Am J Clin Nutr*, 2004, 80(2): 504-513.
- [16] Murtaugh M A, Herrick J S, Sweeney C, et al. Diet composition and risk of overweight and obesity in women living in the southwestern United States[J]. *J Am Diet Assoc*, 2007, 107(8): 1311-1321.
- [17] Lichtenstein A H, Schwab U S. Relationship of dietary fat to glucose metabolism[J]. *Atherosclerosis*, 2000, 150(2): 227-243.
- [18] Vessby B, Uusitupa M, Hermansen K, et al. Substituting dietary saturated for monounsaturated fat impairs insulin sensitivity in healthy men and women: The KANWU Study[J]. *Diabetologia*, 2001, 44(3): 312-319.
- [19] 张文斌, 季爱玲, 曹瑞, 等. 共轭亚油酸对肥胖大鼠脂肪组织瘦素的影响[J]. *中国公共卫生*, 2005, 21(4): 447-448.
- [20] Larsson S C, Virtamo J, Wolk A. Fish consumption and risk of stroke in Swedish women[J]. *Am J Clin Nutr*, 2011, 93(3): 487-493.

(编辑: 周英智)

(上接第 101 页)

- [10] Siddiq A, Gueorguiev M, Samson C, et al. Single nucleotide polymorphisms in the neuropeptide Y2 receptor (NPY2R) gene and association with severe obesity in French white subjects[J]. *Diabetologia*, 2007, 50(3): 574-584.
- [11] McGowan B, Bloom S. Peptide YY and appetite control [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2004, 4(6): 583-588.
- [12] Hung C C, Pirie F, Luan J, et al. Studies of the peptide YY and neuropeptide Y2 receptor genes in relation to human obesity and obesity-related traits [J]. *Diabetes*, 2004, 53(9): 2461-2466.
- [13] Lavebratt C, Alpman A, Persson B, et al. Common neuropeptide Y2 receptor gene variant is protective against obesity among Swedish men [J]. *Int J Obes (Lond)*, 2006, 30(3): 453-459.
- [14] 王起山, 潘玉春, 胡艳玲. 单体型关联分析方法研究进展[J]. *上海交通大学学报: 农业科学版*, 2008, 26(3): 254-257.

(编辑: 周英智)