

论著·临床研究

脂联素基因多态性变化与儿童单纯性肥胖的关系

吴静¹ 颜伟建^{1,4} 莫娟¹ 杨浩波² 王昭昭¹ 雷闽湘¹ 彭烈武³

(1. 中南大学湘雅医院内分泌科, 湖南 长沙 410008; 2. 中南大学湘雅医院麻醉科, 湖南 长沙 410008;
3. 长沙市开福区教育科研培训中心, 湖南 长沙 410005; 4. 邵阳医专附属医院, 湖南 邵阳 422000)

[摘要] 目的 分析长沙市区儿童脂联素基因 +45 位点单核苷酸多态性(SNP)基因型的分布频率, 探讨其与儿童肥胖症的相关性。方法 随机抽取 147 例肥胖儿童及 118 例健康儿童, 采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)方法检测脂联素基因 SNP +45 多态性位点、双抗体夹心 ELISA 测定血清脂联素。同时进行腰围(WC)、腰臀比(WHR)、体脂百分比(%BF)、收缩压(SBP)、舒张压(DBP)、空腹血糖(FPG)、血清甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、空腹胰岛素水平(FINS)、稳态模型胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)的测定。结果 肥胖组和正常组的 SNP +45 多态性发生频率分别为 40.5% 和 25.4%, 两组间基因型分布与等位基因频率差异均有统计学意义($P < 0.05$)。肥胖儿童中, TT 基因型与 TG、GG 型相比, 其脂联素水平高, 而 %BF、HOMA-IR、TC 和 LDL-C 水平低, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 脂联素基因 SNP +45 变异可能与儿童单纯性肥胖相关, T→G 突变可增加儿童肥胖症的发生, 同时使脂联素水平下降。
[中国当代儿科杂志, 2011, 13(7): 539-542]

[关键词] 脂联素; 单核苷酸多态性; 肥胖症; 儿童

[中图分类号] R723.14 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2011)07-0539-04

Association of adiponectin gene polymorphism with obesity in children

WU Jing, YAN Wei-Jian, MO Juan, YANG Hao-Bo, WANG Zhao-Zhao, LEI Min-Xiang, PENG Lie-Wu. Department of Endocrinology, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410008, China (Email: wujing0731@hotmail.com)

Abstract: Objective To study the distribution characteristics of adiponectin gene +45 single nucleotide polymorphisms (SNP) in Chinese children, and to determine the role of adiponectin gene +45 polymorphisms in the pathogenesis of childhood obesity. **Methods** A total of 147 Chinese obese and 118 healthy children were randomly selected and enrolled to identify adiponectin gene SNP +45 polymorphism by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) assay. Plasma adiponectin levels were determined using ELISA. Waist circumference (WC), waist to hip ratio (WHR), percentage of body fat (%BF), systolic blood pressure (SBP), diastolic blood pressure (DBP), fasting plasma glucose (FPG), serum triglycerides (TG), total cholesterol (TC), high density lipoprotein-cholesterol (HDL-C), low density lipoprotein-cholesterol (LDL-C), plasma fasting insulin (FINS), and homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) were measured. **Results** The allelic frequency of adiponectin gene SNP +45 in children with obesity and healthy controls were 40.5% and 25.4%, respectively. There were significant differences in the distribution of genotypes and the allelic frequency between the two groups ($P < 0.05$). The plasma adiponectin levels were significantly higher, in contrast, %BF, HOMA-IR, TC and LDL-C levels were significantly lower in obese children with TT genotype than those in obese children with TG or GG genotype. **Conclusions** The adiponectin gene SNP +45 polymorphism may be associated with pathogenesis of obesity in children. T→G variance may be associated an increased risk of childhood obesity and result in a decreased level of adiponectin.

[Chin J Contemp Pediatr, 2011, 13(7): 539-542]

Key words: Adiponectin; Single nucleotide polymorphisms; Obesity; Child

我国儿童单纯性肥胖症的发生率逐年上升, 不仅成为严重危害青少年健康的疾病, 也是成人代谢

综合征、动脉粥样硬化、2型糖尿病的重要危险因素^[1]。报道显示, 肥胖儿童脂联素水平低于正常儿

[收稿日期] 2010-09-28; [修回日期] 2010-11-15

[基金项目] 湖南省教育科学规划课题(XJK03AJ006); 湖南省自然科学基金(09jj5018)。

[作者简介] 吴静, 女, 博士, 主任医师。

童^[2]。人类脂联素基因位于染色体3q27,全基因组扫描显示染色体3q27是2型糖尿病、代谢综合征、冠心病和肥胖的易感基因位点^[3,4]。目前对脂联素基因序列分析发现存在相当数量等位基因的单核苷酸多态性(SNP),脂联素基因的SNP还可影响血浆脂联素水平的变化^[5]。本研究从候选基因角度出发,采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)方法分析长沙市肥胖儿童脂联素基因SNP+45基因型分布,探讨其多态性与肥胖儿童各项临床指标和脂联素水平变化的关系,为了解儿童肥胖症的发病机制和发展提供新的证据。

1 资料与方法

1.1 研究对象

2007年1月至2008年12月从长沙市5所小学6~13岁的儿童中按年龄分层随机抽取肥胖儿童147名(男81例,女66例)。肥胖判断标准参照国际生命科学学会中国肥胖组颁布的“中国学龄儿童青少年超重、肥胖体重指数分类标准”^[6],同时在同一群体中选择同年龄(相差<6个月)、同身高(相差<3cm)、同性别、体重正常的健康儿童118人(男65例,女53例)为正常组。所有入选对象均排除甲状腺功能低下、库欣综合征、下丘脑综合征及肾病综合征等引起的继发性肥胖。研究方案获得中南大学湘雅医院医学伦理委员会批准及家属书面知情同意。

1.2 研究方法

1.2.1 临床指标检测 由经过专业培训的人员按照统一的方法测量收缩压(SBP)、舒张压(DBP)、身高、体重、腰围(WC)和臀围(HC),分别计算体重指数(BMI)[BMI=体重(kg)/身高(m)²]、腰臀比(WHR)[WHR=WC/HC];采用美国Lunar公司的DPX-IQ型双能X线骨密度仪(DEXA)测量体脂百分比(percentage of body fat, %BF);测定血清甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、空腹血糖(FPG)、空腹胰岛素(FINS),计算稳态模型胰岛素抵抗指数(homeostasis model assessment of insulin resistance, HOMA-IR)=FPG×FINS/22.5。

1.2.2 脂联素测定 采用双抗体夹心ABC-ELISA测定,试剂盒为R&D.US公司提供,板内变异系数<10%,板间变异系数<15%。

1.2.3 PCR-RFLP检测脂联素基因SNP+45多态性位点 ①DNA提取:取静脉血5mL,EDTA抗

凝,采用酚氯提取-乙醇沉淀法提取基因组DNA。②PCR扩增:上游引物5'-GTGCTTGGTCCTGTGCTCA-3',下游引物5'-TGTAGGAGGTCTGTGATGAA-3';PCR反应体系(25μL)含有:ddH₂O 19.3μL,10×PCR缓冲液(Mg²⁺) 2.5μL,dNTPs 0.5μL(10mM each),引物0.7μL(10mM),基因组DNA 1.5μL,Taq DNA聚合酶0.5μL(2U/μL)。PCR反应条件:预变性94℃ 5min后进入主循环;变性94℃ 30s,退火57℃ 30s,延伸72℃ 30s,35个循环;终末延伸72℃ 7min。PCR产物经2%琼脂糖凝胶电泳,于凝胶成像分析仪中观察扩增结果,PCR扩增产物长度为571bp的DNA片断进一步酶切。③PCR-RFLP分析:取扩增良好的PCR产物10μL,10×Tango buffer 2μL,SamI(10U/μg) 0.5μL,消毒双蒸水7.5μL,混匀后30℃水浴6h,用2%的琼脂糖凝胶进行电泳分离,溴化乙锭染色后紫外光下观察结果。④随机选择部分样品应用直接测序法验证PCR-RFLP结果。

1.3 统计学分析

采用SPSS 13.0软件进行统计学处理。计数资料用卡方检验,分析基因型的分布是否符合Hardy-Weinberg平衡用卡方检验。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间均数比较用t检验或方差分析。HOMA-IR为非正态分布资料,用自然对数转换为正态分布后再行统计学处理。P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组体质量指标比较

肥胖组儿童BMI、WC、WHR、%BF均高于正常组,差异有统计学意义(P<0.01)。见表1。

表1 两组体质量指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	BMI(kg/m ²)	WC(cm)	WHR(cm)	%BF(%)
正常组	118	17.1±1.7	58±7	0.79±0.05	20±5
肥胖组	147	24.3±2.4	82±9	0.89±0.05	38±5
t值		27.380	23.245	16.119	29.111
P值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

2.2 两组血糖及血脂代谢指标比较

肥胖组儿童FINS、HOMA-IR、TG、LDL-C均高于正常组,HDL-C低于正常组,差异有统计学意义(P<0.01);两组FPG与TC比较差异无统计学意义。见表2。

表2 两组血糖、血脂代谢指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	FPG (mmol/L)	FINS (mU/L)	HOMA-IR	TG (mmol/L)	TC (mmol/L)	HDL-C (mmol/L)	LDL-C (mmol/L)
正常组	118	4.9 ± 0.4	8.5 ± 2.7	0.8 ± 0.3	0.9 ± 0.4	3.9 ± 0.5	1.52 ± 0.30	1.9 ± 0.4
肥胖组	147	5.0 ± 0.3	15.7 ± 6.1	1.5 ± 0.4	1.2 ± 0.5	4.0 ± 0.5	1.27 ± 0.25	2.2 ± 0.5
<i>t</i> 值		1.840	11.998	15.374	5.976	1.879	-7.291	4.680
<i>P</i> 值		0.067	<0.01	<0.01	<0.01	0.061	<0.01	<0.01

2.3 两组血清脂联素及血压比较

肥胖组儿童血清脂联素水平低于正常组 ($P < 0.05$), SBP 高于正常组 ($P < 0.01$), 两组 DBP 比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 3。

表3 两组血清脂联素及血压比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	脂联素 (mg/L)	SBP (mm Hg)	DBP (mm Hg)
正常组	118	12.2 ± 4.7	90 ± 9	65 ± 6
肥胖组	147	8.1 ± 2.5	102 ± 10	66 ± 7
<i>t</i> 值		-3.453	10.173	1.932
<i>P</i> 值		0.002	<0.01	0.054

2.4 脂联素基因 SNP + 45 多态性位点基因型及等位基因频率分布

SNP + 45 等位基因 G 的扩增片段有 *SamI* 限制性酶切位点, 而等位基因 T 的扩增片段则无 *SamI* 限制性酶切位点, 基因型为 GG, TT, TG。随机抽取部分样本进行 PCR 产物直接测序, 其结果与 PCR-RFLP 检测结果一致。经 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律检验, 所研究的 SNP + 45 位点上观察值与期望值相吻合, 各基因频率达到遗传平衡, 提示本研究资料具有群体代表性。肥胖儿童组和正常组的 SNP + 45 单核

苷酸多态性发生频率分别为 40.5% 和 25.4%, 两组间等位基因频率差异有统计学意义 ($\chi^2 = 13.261$, $P < 0.01$), 肥胖组携带等位基因 G 频率高于正常组 ($OR = 2.00$, 95% *CI* 为 1.37 ~ 2.90), 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 14.834$, $P < 0.01$)。见表 4。

表4 两组 SNP + 45 的基因型频率和等位基因频率的比较 [例(%)]

组别	例数	SNP + 45 基因型			SNP + 45 等位基因	
		TT	TG	GG	T	G
正常组	118	63 (53.4)	50 (42.4)	5 (4.2)	176 (74.6)	60 (25.4)
肥胖组	147	47 (32.0)	81 (55.1)	19 (12.9)	175 (59.5)	119 (40.5)
χ^2 值			14.834			13.261
<i>P</i> 值			0.001			<0.001

2.5 肥胖儿童组脂联素基因 SNP + 45 多态性位点各基因型中参数的比较

各基因型组间血清脂联素、%BF、HOMA-IR、TC、LDL-C 和 SBP 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), TT 型血清脂联素水平高于 TG 和 GG 型 ($P < 0.01$), TT 型 %BF、HOMA-IR、TC 和 LDL-C 低于 TG、GG 型 ($P < 0.05$), TT 型 SBP 高于 TG 和 GG 型 ($P < 0.05$)。见表 5, 6。

表5 肥胖组脂联素基因 SNP + 45 多态性位点各基因型中体质量指标、血糖及胰岛素比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	%BF	BMI (kg/m ²)	WHR	SBP (mm Hg)	FPG (mmol/L)	FINS (mU/L)	HOMA-IR
TT	47	35 ± 4	23.4 ± 2.3	0.81 ± 0.04	107 ± 8	4.9 ± 0.4	15 ± 5	1.1 ± 0.5
TG	81	39 ± 4 ^a	24.5 ± 2.5	0.90 ± 0.04	99 ± 8 ^a	5.1 ± 0.4	16 ± 6	1.6 ± 0.7 ^a
GG	19	40 ± 4 ^a	25.4 ± 2.6	1.01 ± 0.06	99 ± 8 ^a	5.1 ± 0.4	16 ± 8	1.7 ± 0.8 ^a
<i>F</i> 值		-2.102	-1.293	-1.586	2.221	-1.492	-0.531	-2.672
<i>P</i> 值		0.043	0.402	0.122	0.034	0.330	0.772	0.012

a: 与 TT 基因型组比较, $P < 0.05$

表6 肥胖组脂联素基因 SNP + 45 多态性位点各基因型中血脂及血清脂联素比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	脂联素 (mg/L)	TG (mmol/L)	TC (mmol/L)	HDL-C (mmol/L)	LDL-C (mmol/L)
TT	47	10.0 ± 2.8	1.4 ± 0.6	3.7 ± 0.5	1.32 ± 0.43	1.96 ± 0.36
TG	81	7.3 ± 1.7 ^b	1.1 ± 0.3	4.1 ± 0.5 ^a	1.26 ± 0.23	2.25 ± 0.41 ^a
GG	19	6.9 ± 1.2 ^b	1.2 ± 0.3	4.2 ± 0.6 ^a	1.15 ± 0.19	2.41 ± 0.47 ^a
<i>F</i> 值		3.162	1.381	-3.161	0.612	-2.341
<i>P</i> 值		0.009	0.399	0.009	0.710	0.018

a: 与 TT 基因型组比较, $P < 0.05$; b: 与 TT 基因型组比较, $P < 0.01$

3 讨论

肥胖是由多个遗传易感基因及环境因素共同参与且相互作用而导致的慢性疾病。有报道某些易感基因可能与我国儿童单纯性肥胖相关^[7]。全基因组扫描发现代谢综合征、2型糖尿病和肥胖症的易感基因位点定位于染色体3q27上,而脂联素基因也正好定位于此,而且有较大频率基因多态性。因此,脂联素基因的SNPs与疾病的关系成为研究热点。Petronne等^[8]对270名肥胖儿童的脂联素基因的多态性研究,四个位点上分别显示-11391G>A, -11377C>G, +45T>G, +276G>T。在-11391G>A位点上,基因型GG与GA+AA型相比,伴随高空腹胰岛素水平、高HOMA-IR指数及低脂联素水平。在11377C>G位点上,与纯合子基因CC比较,GG与CG型表现出高空腹血糖、高空腹胰岛素水平、高HOMA-IR指数和甘油三酯水平,也表达低脂联素水平。在+45T>G上,基因型GG、TG与TT型相比较,表现出空腹和餐后2h血糖增高及低脂联素水平。从上述3个位点发现,携带等位基因G的儿童都表达低脂联素水平,高血糖或高胰岛素水平,说明此3个位点等位基因G可能是肥胖和代谢综合征发生的遗传危险因子。此研究在+276G>T未得出与脂联素有统计学意义相关性。但在Bouatia-Naji等^[9]的研究中,在+276G>T发现基因型TT、TG比GG型表达高的血浆脂联素水平,而在-11391G>A与-11377C>G上,与Petronne等^[8]研究结果相似,说明脂联素基因调节脂联素水平还有环境等因素的影响。在魏颖丽等^[10]研究中发现我国宁夏汉族成年人群脂联素基因+45位核苷酸T/G多态性,2型糖尿病组GG基因型频率和G等位基因频率明显高于对照组,+45位点多态性与肥胖、胰岛素抵抗及2型糖尿病的相关。

本研究结果表明,肥胖儿童组和正常儿童组的脂联素基因SNP+45发生频率分别为40.5%和25.4%,肥胖组等位基因G频率明显高于正常组,两组间基因型频率差异也具有统计学意义,与Bouatia-Naji等^[9]的研究不一致,这说明该位点存在一定的种族和环境等差异性。在肥胖组中,SNP+45中TG、GG基因型表达脂联素水平低于TT型,TG、GG型中%BF、HOMA-IR、TC和LDL-C高于TT

型,与Petronne等^[8]报道一致,说明SNP+45与儿童肥胖相关,诱发生胰岛素抵抗,高脂血症,且可影响肥胖儿童血浆脂联素水平的表达。

综上所述,脂联素基因SNP+45多态性位点与儿童肥胖症的发病相关,T→G突变可增加儿童肥胖症的发生率,同时使脂联素水平下降。更大样本研究和对脂联素更多SNPs位点的筛选,有利于了解此基因多态性对儿童肥胖症的发病机制和发展的影响。

[参 考 文 献]

- [1] 郑云郎. 儿童肥胖的危害及应对措施[J]. 中国健康教育, 2004, 20(11): 1054-1056.
- [2] 颜伟健, 吴静, 莫娟, 黄超文, 彭烈武, 徐丽. 肥胖儿童血浆脂联素与肿瘤坏死因子-α的变化及意义[J]. 中国当代儿科杂志, 2009, 11(1): 47-50.
- [3] Vionnet N, Hani EH, Dupont S, Gallina S, Francke S, Dotte S, et al. Genomewide search for type 2 diabetes-susceptibility genes in French whites: evidence for a novel susceptibility locus for early-onset diabetes on chromosome 3q27-qter and independent replication of a type 2-diabetes locus on chromosome 1q21-q24[J]. Am J Hum Genet, 2000, 67(6): 1470-1480.
- [4] Francke S, Manraj M, Lacquemant C, Lecoœur C, Leprêtre F, Passa P, et al. A genome-wide scan for coronary heart disease suggests in Indo-Mauritians a susceptibility locus on chromosome 16p13 and replicates linkage with the metabolic syndrome on 3q27[J]. Hum Mol Genet, 2001, 10(24): 2751-2765.
- [5] Chung HK, Chae JS, Hyun YJ, Paik JK, Kim JY, Jang Y, et al. Influence of adiponectin gene polymorphisms on adiponectin level and insulin resistance index in response to dietary intervention in overweight-obese patients with impaired fasting glucose or newly diagnosed type 2 diabetes[J]. Diabetes Care, 2009, 32(4): 552-558.
- [6] 中国肥胖问题工作组. 中国学龄儿童青少年超重、肥胖筛查体质指数值分类标准[J]. 中华流行病学杂志, 2004, 25(2): 97-102.
- [7] 莫娟, 吴静, 孙志香, 杨浩波, 雷闽湘, 刘玮芳. PTP1B基因多态性与儿童单纯性肥胖的关系(英文)[J]. 中南大学学报(医学版), 2010, 14(9): 1498-1504.
- [8] Petronne A, Zavarella S, Caiazza A, Leto G, Spoleitini M, Potenzianni S, et al. The promoter region of the adiponectin gene is a determinant in modulating insulin sensitivity in childhood obesity[J]. Obesity (Silver Spring), 2006, 14(9): 1498-1504.
- [9] Bouatia-Naji N, Meyre D, Lobbens S, Séron K, Fumeron F, Balkau B, et al. ACDC/adiponectin polymorphisms are associated with severe childhood and adult obesity[J]. Diabetes, 2006, 55(2): 545-550.
- [10] 魏颖丽, 霍正浩, 赵巍. 我国西部人群脂联素基因+45位点多态性与肥胖、胰岛素抵抗及2型糖尿病的相关性[J]. 中国糖尿病杂志, 2007(10): 583-585.

(本文编辑:俞 燕)