

中国汉族人群 *CAVI/CAV2* 基因多态性与 2 型糖尿病的关系

邹丽媛¹, 林 硕², 林可意², 谢莉萍¹, 曾龙驿²

(中山大学附属第三医院 1. 预防保健科, 2. 内分泌科, 广东 广州 510630)

摘要:【目的】研究中国汉族人群微囊蛋白-1/-2(caveolin-1/-2)的编码基因 *CAVI/CAV2* 单核苷酸多态性(SNP)与 2 型糖尿病(T2DM)的相关性。【方法】应用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)方法对 559 例汉族人(T2DM 组 272 例、对照组 287 例) *CAVI/CAV2* 基因座的 14 个 SNPs 位点进行基因分型;同时进行人体测量学及代谢指标的检测,并用稳态模型评估胰岛素抵抗(HOMA-IR)和胰岛 β 细胞功能(HOMA- β)。【结果】*CAVI* 基因 rs926198、*CAV2* 基因 rs2270188、rs1052990 位点的低频等位基因频率(MAF)在 T2DM 组和对照组存在统计学差异($P=0.008, 0.021, 0.045$)。Logistic 回归分析校正年龄、性别、BMI 因素,*CAVI* rs926198 位点 CC/CT 基因型个体 T2DM 患病风险比 TT 型显著增加(OR=2.240, 95%CI=1.415-3.544, $P=0.001$);*CAVI* rs3807986 位点 GG/GA 基因型比 AA 型患 T2DM 风险降低(OR=0.640, 95%CI=0.449-0.913, $P=0.014$);*CAV2* rs2270188 位点 GG/GT 基因型携带者较之 TT 基因型 T2DM 患病风险明显降低(OR=0.616, 95%CI=0.432-0.878, $P=0.007$);*CAV2* rs1052990 位点 GG/GT 基因型比 TT 型患 T2DM 风险亦降低(OR=0.658, 95%CI=0.453-0.956, $P=0.028$)。多元线性回归显示 *CAVI* SNP rs926198 低频等位基因 C 与 HOMA-IR 增高相关($\beta=1.010, P<0.001$);*CAV2* SNP rs2270188 低频等位基因 G 与 HOMA-IR 降低相关($\beta=-0.379, P=0.023$);未发现 SNP 位点与 HOMA- β 存在统计学相关性($P>0.05$)。*CAVI* rs3807986 和 *CAV2* rs2270188 位点低频等位基因 G 与血清 LDL-C 水平降低相关(rs3807986: $P=0.033, \beta=-0.271$; rs2270188: $P=0.030, \beta=-0.299$)。【结论】*CAVI/CAV2* 基因可能是中国汉族人 2 型糖尿病的易感基因,其 SNP rs926198、rs3807986、rs2270188、rs1052990 与 T2DM 患病风险相关,可能通过胰岛素抵抗影响 T2DM 易感性。

关键词:单核苷酸多态性; *CAVI* 基因; *CAV2* 基因; 2 型糖尿病

中图分类号: R587 文献标志码: A 文章编号: 1672-3554(2018)02-0197-10

Association of Polymorphisms in *CAVI/CAV2* Locus with Type 2 Diabetes in Chinese Han Population

ZOU Li-yuan¹, LIN Shuo², LIN Ke-yi², XIE Li-ping¹, ZENG Long-yi²

(1. Department of Prevention and Health Care; 2. Department of Endocrinology, The Third Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China)

Corresponding to: ZENG Long-yi, E-mail: zengly@mail.sysu.edu.cn

Abstract: 【Objective】To study the association of *CAVI/CAV2* gene polymorphisms with type 2 diabetes in Chinese Han population. 【Methods】14 single nucleotide polymorphisms (SNPs) of *CAVI/CAV2* gene were genotyped in 272 patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM group) and 287 subjects with normal glucose tolerance (control group) by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight-mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). Waist circumference, body mass index, plasma glucose, serum insulin and lipid profiles were measured. Homeostatic model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) and β -cell function (HOMA- β) were calculated. 【Results】The minor allele frequency (MAF) distri-

收稿日期: 2017-12-26

基金项目: 国家自然科学基金(81070661/H0713)

作者简介: 邹丽媛, 博士研究生, 主治医师, E-mail: liyuanzou@126.com; 曾龙驿, 通信作者, 教授, 主任医师, 博士生导师, E-mail: zengly@mail.sysu.edu.cn

butions of *CAVI* rs926198, *CAV2* rs2270188, and rs1052990 were significantly different between T2DM group and control group ($P=0.008$, 0.021 , and 0.045 , respectively). After adjusting for age, gender, and BMI, logistic regression analysis showed that minor allele carriers (CC/CT genotype) of *CAVI* rs926198 displayed a particularly increased risk of developing T2DM compared to major allele homozygotes (TT genotype) (OR=2.240, 95% CI=1.415–3.544, $P=0.001$). GG/GA genotype carriers of *CAVI* rs3807986 had lower odds for T2DM than that of AA genotype (OR=0.640, 95% CI=0.449–0.913, $P=0.014$). Compared with TT genotype, GG/GT genotype of *CAV2* rs2270188 was a protective factor for T2DM (OR=0.616, 95% CI=0.432–0.878, $P=0.007$). Significant genotype association with T2DM was also identified in *CAV2* rs1052990 (GG/GT versus TT genotype: OR=0.658, 95% CI=0.453–0.956, $P=0.028$). Multiple linear regression showed that minor allele C of SNP rs926198 was associated with an increased level of HOMA-IR (beta=1.010, $P<0.001$) and minor allele G of SNP rs2270188 was associated with a decreased level of HOMA-IR (beta=-0.379, $P=0.023$). No significant association was identified between any SNP and HOMA- β . Allele G of *CAVI* rs3807986 and *CAV2* rs2270188 were also associated with a decreased level of LDL-C ($P=0.033$ and 0.030 , respectively). 【Conclusion】 *CAVI/CAV2* locus might be the candidate genes for conferring susceptibility to T2DM in the Chinese Han population. SNP rs926198, rs3807986, rs2270188, and rs1052990 in *CAVI/CAV2* locus were associated with T2DM risk perhaps through insulin resistance pathway.

Key words: single nucleotide polymorphism; *CAVI* gene; *CAV2* gene; type 2 diabetes

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2018, 39(2): 197–206; 257]

2型糖尿病(type 2 diabetes, T2DM)是由遗传因素和环境因素共同作用引起的常见疾病,具有明显的家族遗传倾向。作为复杂的多基因遗传性疾病,参与T2DM发生发展的基因及其作用机制目前尚未完全解析,挖掘和鉴定与T2DM遗传相关的易感基因是本领域研究的一个热点。质膜微囊(caveolae)是上世纪50年代发现的细胞膜上直径约50~100 nm的烧瓶状凹陷微区域,微囊蛋白(caveolin)是caveolae的标志性结构蛋白,其家族成员Caveolin-1和Caveolin-2通常共表达于多种组织。以往基础研究表明Caveolin-1/-2在胰岛素信号转导和维持细胞糖脂代谢稳态中发挥重要作用^[1-2],本课题组前期的临床研究也发现T2DM患者外周血单个核细胞Caveolin-1的表达水平较正常人群下降^[3]。Caveolin-1/-2的编码基因*CAVI/CAV2*相邻定位于7q31.1-31.2,近年欧美人群的研究^[4-5]初步表明*CAVI/CAV2*基因单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)与胰岛素抵抗、代谢综合征和T2DM风险相关,不同种族由于遗传背景和生活环境的差异,T2DM的易感基因位点也可能不同。为此,本研究拟在中国汉族人群中研究*CAVI/CAV2*基因多态性与T2DM患病风险的遗传相关性,以及其与胰岛素抵抗、 β 细胞功能等指标的关系,以期发现新的T2DM易感基因和位点,为T2DM高危人群筛查和个体化防治提

供新的思路和靶点。

1 材料与方法

1.1 研究对象

1.1.1 2型糖尿病组 共272例(男性160例,女性112例),平均年龄(51.1 ± 11.9)岁,为2015年10月至2016年10月在中山大学附属第三医院内分泌专科门诊或住院确诊的T2DM患者。纳入标准:①符合1999年WHO糖尿病诊断标准;②三代以内均为汉族;③确诊T2DM时年龄>30岁;④血清胰岛 β 细胞自身抗体检测均阴性;⑤确诊T2DM后2年内无需依赖胰岛素治疗。排除标准:①排除其他类型糖尿病;②排除曾患恶性肿瘤、自身免疫性疾病、青光眼、心房颤动、明确的冠心病或心肌梗死病史者。

1.1.2 对照组 共287例(男性166例,女性121例),平均年龄(50.5 ± 10.4)岁,来源于本院职工体检糖耐量正常者。纳入标准:①既往无糖尿病史;②行口服75g葡萄糖耐量试验(oral glucose tolerance test, OGTT),空腹血糖(fasting plasma glucose, FPG)<5.6 mmol/L且2 h血糖(2-hour plasma glucose, 2 h PG)<7.8 mmol/L;③无糖尿病家族史;④三代以内均为汉族。排除标准:①排除曾患恶性肿瘤、自身免疫性疾病、青光眼、心房颤动、明

确的冠心病或心肌梗死病史者;②排除妊娠者。本研究经我院伦理委员会的批准,所有受试者均在实验前了解本实验的目的并签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 临床资料收集及人体学指标测定 通过问诊及查阅病历资料记录受试对象人口学资料和病史,空腹测量身高、体质量、腰围、血压。

1.2.2 血标本的采集和生化指标的测定 受试者隔夜空腹10~12 h后于早晨采集外周静脉血,用于生化指标测定和提取基因组DNA。血糖测定用葡萄糖氧化酶法,血脂谱测定采用酶法,均使用日立7180A全自动生化仪检测;糖化血红蛋白(HbA1c)采用离子交换高效液相色谱法测定(美国BIO-RAD公司,D-10);血清空腹胰岛素(fasting insulin, FINS)采用直接化学发光法测定,并计算出稳态模型评估胰岛素抵抗指数(homeostatic model assessment of insulin resistance, HOMA-IR)=FPG×FINS/22.5和稳态模型评估β细胞功能指数(homeostatic model assessment of βcell function, HOMA-β)=20×FINS/(FPG-3.5)。

1.2.3 基因组DNA提取 采用人类组织细胞DNA提取试剂盒(德国QIAGEN公司)从全血标本提取基因组DNA,-20℃保存。DNA提取参照试剂盒说明书进行。

1.2.4 SNP位点的选择 本研究采用两种方法选择 *CAVI/CAV2* 基因座的SNPs位点。一是参考文献,选择在其他种族人群中报道过的与糖代谢相关的SNPs位点,二是查询美国国立生物技术信息中心(NCBI)的遗传变异数据库(db SNP)和国际人类基因组单体型图计划(Hap Map)数据库的基因信息,使用Haploview 4.2分析软件,筛选出 *CAVI/CAV2* 基因区的标签SNPs(tagSNPs),筛选条件为:中国汉族人群,低频等位基因频率(minor allele frequency, MAF) > 1%,连锁不平衡参数 $D' = 1, r^2 > 0.8$ 。由此纳入检测的 *CAVI* 基因SNPs为 rs1049337、rs926198、rs3807989、rs36068092、rs3815412、rs3807986、rs3779512、rs975028、rs4730748共9个位点, *CAV2* 基因的SNPs为 rs2270188、rs13226307、rs1052990、rs2191500、rs6466578共5个位点。

1.2.5 SNP位点的基因分型 本研究采用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(matrix-assisted

laser desorption ionization-time of flight-mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)技术进行SNP分型。基因分型由深圳华大基因公司协助完成,通过使用美国Sequenom公司的MassARRAY质谱系统平台进行检测。主要实验步骤:①PCR法对含有SNP位点的DNA片段进行扩增,各SNP位点扩增引物序列见表1;②虾碱性磷酸酶(shrimp alkaline phosphatase, SAP)去磷酸化处理;③单碱基延伸反应,各SNP位点延伸引物见表1;④树脂除盐纯化;⑤用MassARRAY Nanodispenser将检测样品从384孔板点样到SpectroCHIP芯片上;⑥将载有样品的芯片放入质谱仪(Mass Spectrometry)中进行检测,通过MassARRAY TYPER4.0软件分析和输出分型结果,获取SNP分型数据。基因分型检测实施严格的质量控制,按样品总数1%加入阴性对照和阳性对照,以此验证分型结果的准确性;随机抽取5%的DNA样品进行再次分型,与第一次结果进行比对,其一致率为100%(表1)。

1.3 统计学处理和遗传学分析

临床计量资料用均数±标准差表示,非正态分布资料(胰岛素、HOMA-IR和HOMA-β)经log对数转换成正态分布资料后再进行分析,两组间比较采用两独立样本t检验,计数资料率的比较采用 χ^2 检验,上述分析使用SPSS19.0软件进行数据统计, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。应用PLINK1.07软件通过 χ^2 检验判断各SNP位点的基因型频率分布是否符合Hardy-Weinberg遗传平衡(HWE),如在对照组中不符合HWE,则剔除该位点;组间等位基因频率分布的比较采用 χ^2 检验;运用多因素logistic回归法分析基因型与疾病风险的相关性;采用多因素线性回归方法分析基因型与数量性状的相关性;用Permutation法进行多重检验校正。

2 结果

2.1 T2DM组与对照组一般临床资料的比较

本研究采用病例对照研究,两组间一般临床资料的比较见表2。两组间的年龄、性别构成、高血压患病率无统计学差异($P > 0.05$)。T2DM组BMI、腰围、SBP、DBP、FPG、HbA1c、FINS、HOMA-IR、TG均显著高于对照组,HOMA-β、HDL-C明显低于对照组($P < 0.001$;表2)。

表1 *CAVI/CAV2* 基因各 SNP 位点 PCR 扩增和单碱基延伸反应的引物序列
Table 1 Primers of PCR amplification and single-base extension for SNPs in *CAVI/CAV2* locus

Gene/SNP	PCR amplification primers (5'→3')	Single-base extension primers (5'→3')
<i>CAVI</i> rs3815412	F: ACGTTGGATGTTTCTCAACCTCCTCTGCAC R: ACGTTGGATGTTTTAACACGTTGAGCTTCC	F: gACACACAACATTTATTCCAC
<i>CAVI</i> rs3807986	F: CGTTGGATGTGAGCTTCTAGGATCAGACC R: CGTTGGATGTCCACATTCCTTGAAGCCTG	F: cccccGGATCAGACCCTAGATCTT
<i>CAVI</i> rs3779512	F: CGTTGGATGCTGTAACCATGATGATCCC R: ACGTTGGATGGAATGAAGACAATGCGAAG	R: aGCATGTATGTTTCGATCC
<i>CAVI</i> rs975028	F: ACGTTGGATGGCTAAGCTCAAGCTTTATAG R: ACGTTGGATGGTAAAAATTACAGCCCTACC	F: acGCTCAAGCTTTATAGTAAATATTTTC
<i>CAVI</i> rs4730748	F: ACGTTGGATGATTCCCTCCACTAGATTGGC R: ACGTTGGATGGCCAGACTTAGATCTGACTC	R: GGGTCAAAATCTAATAACAATGA
<i>CAVI</i> rs1049337	F: ACGTTGGATGCAGGAGCTTTGGACCTAATC R: ACGTTGGATGTTTATTACTGCCTCCTCCCC	F: TTTGGACCTAATCCAAGCATC
<i>CAVI</i> rs926198	F: ACGTTGGATGCTGAGGATGAGTCAGAATAC R: ACGTTGGATGGGCATTTCCATCCACTGTAG	F: ATACAAGATGGGCATGTTC
<i>CAVI</i> rs3807989	F: ACGTTGGATGGTTCAGTGTCACTGTTTGG R: ACGTTGGATGGTCTCTGGTGTCAATTTGG	F: cctcGGTAACACTCAACATCAAC
<i>CAVI</i> rs36068092	F: ACGTTGGATGTTGAAAGGTAATTTGAGAG R: ACGTTGGATGGCAGTTGAGGTTGTTGGTTC	F: ATATGAAGAACTGAGGAGG
<i>CAV2</i> rs2270188	F: ACGTTGGATGCTGGGATAAGAGGAGAGTAG R: ACGTTGGATGCTGCACATCTGGTGAGACG	R: gacaATGTTTCAGAAAGCCGGT
<i>CAV2</i> rs13226307	F: ACGTTGGATGAGGACTCTTTAGACAACAGC R: ACGTTGGATGACAACAAATCTAGATGGGTC	R: gATTTAAGAAAGGTGTCTCTAAA
<i>CAV2</i> rs1052990	F: ACGTTGGATGCCTTTCAAACAGCTATTGGC R: ACGTTGGATGAGGAAGTCATGTTACTTGAG	F: TACACATAGTTCTGTAATAAAACTGT
<i>CAV2</i> rs2191500	F: ACGTTGGATGGCTGCCTGCAAGATAATCAC R: ACGTTGGATGCCGACCTCCACCTTTAAT	F: CAAGACAGTCTGGTTCA
<i>CAV2</i> rs6466578	F: ACGTTGGATGCCCAAAGAAACAATCTTTTCAG R: ACGTTGGATGCTGGAAACACACTTTCATGC	R: CAAAGTGAGGAATAGAATAGTA

2.2 SNP 位点基因分型结果及 Hardy-Weinberg 平衡分析

采用 MALDI-TOF-MS 法对病例组和对照组共 559 例受试者 *CAVI/CAV2* 基因区的 14 个 SNPs 进行基因型检测,所有 SNPs 位点基因分型成功率均 >99% (99.82% ~ 100%),各 SNP 位点 MAF 值与 1000Genome 和 HapMap 数据库报道的中国汉族人 MAF 值接近。经卡方检验,*CAV2* 基因的 rs2191500 在对照组中的基因型分布不符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡 (HWE; $P < 0.05$),分析前予以剔除。*CAVI* 基因的 rs975028 与 *CAV2* 基因的 rs6466578 两个位点存在完全连锁不平衡 ($r^2 = 1$),故仅需保留 rs975028 纳入关联分析,rs6466578 予以剔除。

CAVI 基因 rs4730748 位点在对照组和 T2DM 组的 MAF 分别为 1.05%、0.18%,因 $MAF < 1%$,故分析前予以剔除。最终 *CAVI* 基因 8 个 SNPs 和 *CAV2* 基因 3 个 SNPs 基因型分布符合 HWE ($P > 0.05$),且 MAF 均大于 1%,纳入后续关联分析。

2.3 *CAVI/CAV2* 基因 SNP 位点等位基因频率分布

各 SNP 位点在 T2DM 和对照组的等位基因频率分布见表 3,*CAVI* 基因 rs926198 位点低频等位基因 C 的频率在 T2DM 组明显高于对照组 ($P = 0.008$),*CAV2* 基因 rs2270188、rs1052990 位点低频等位基因 G 的频率在 T2DM 组明显低于对照组 ($P = 0.021, P = 0.045$; 表 3)。

表2 T2DM组和对照组的一般临床资料比较

Table 2 Comparison of clinical characteristics between T2DM and control group [n(%) or $\bar{x} \pm s$]

Characteristics	T2DM	Control	P
n(M/F)	272(160/112)	287(166/121)	0.776
Age/years	51.1±11.9	50.5±10.4	0.495
BMI/(kg/m ²)	25.0±3.6	23.5±2.9	<0.001
WC/cm	90.2±10.1	83.5±8.6	<0.001
Hypertension	109(40.1%)	109(37.9%)	0.589
SBP/mmHg	134.2±18.4	128.6±15.7	<0.001
DBP/mmHg	83.6±11.3	75.4±10.1	<0.001
FPG/(mmol/L)	9.09±2.24	4.99±0.34	<0.001
HbA1c/%	9.47±2.42	5.31±0.31	<0.001
LgFINS	1.00±0.19	0.89±0.14	<0.001
LgHOMA-IR	0.60±0.13	0.24±0.06	<0.001
LgHOMA-β	1.59±0.21	2.03±0.10	<0.001
TC/(mmol/L)	5.13±1.34	5.24±0.94	0.276
TG/(mmol/L)	2.00±1.77	1.38±0.92	<0.001
LDL-C/(mmol/L)	3.17±1.10	3.26±0.82	0.231
HDL-C/(mmol/L)	1.10±0.28	1.44±0.35	<0.001

BMI:body mass index; WC: waist circumference; SBP: systolic blood pressure; DBP: diastolic blood pressure; FPG: fasting plasma glucose; HbA1c:glycated haemoglobinA1c; lgFINS:logarithm of fasting insulin;lgHOMA-IR:logarithm of homeostatic model assessment of insulin resistance; lgHOMA-β:logarithm of homeostatic model assessment of β-cell function; TC: total cholesterol; TG: triglycerides; LDL-C: low-density lipoprotein cholesterol; HDL-C: high-density lipoprotein cholesterol

表3 T2DM组和对照组 SNP 位点等位基因频率分布比较

Table 3 Distribution of allele frequencies of SNPs in T2DM and control groups [n(%)]

Gene	SNP	Minor/Major Allele	MAF		χ ²	P
			T2DM	Control		
<i>CAVI</i>	rs3815412	C/T	120(22.06)	122(21.25)	0.107	0.744
	rs3807986	G/A	107(19.74)	137(23.87)	2.778	0.096
	rs3779512	T/G	28(5.15)	39(6.79)	1.345	0.246
	rs975028	A/G	26(4.78)	33(5.75)	0.525	0.469
	rs1049337	C/T	232(42.65)	248(43.21)	0.036	0.850
	rs926198	C/T	64(11.76)	41(7.14)	7.011	0.008
	rs3807989	A/G	149(27.39)	160(27.87)	0.033	0.856
	rs36068092	G/del	120(22.06)	120(20.91)	0.221	0.639
<i>CAV2</i>	rs2270188	G/T	104(19.19)	143(24.91)	5.301	0.021
	rs13226307	T/A	78(14.34)	104(18.12)	2.928	0.087
	rs1052990	G/T	79(14.52)	109(18.99)	3.985	0.045

MAF: minor allele frequency

2.4 *CAVI/CAV2*基因各SNP位点基因型频率分布及与T2DM患病风险关联分析

各SNP位点在T2DM和对照组的基因型频率分布见表4,分别在加性(additive, ADD)模型、显性(dominant, DOM)模型、隐性(recessive, REC)

模型三种遗传模式下运用多因素logistic回归分析SNP位点基因型多态性与T2DM遗传易感性的关系,并对年龄、性别、BMI因素进行校正,结果见表4。*CAVI*基因的rs3807986位点在显性遗传模型下与T2DM易感性相关,GG/GA比AA基因型

患 T2DM 风险显著降低 (OR=0.640, 95%CI=0.449~0.913, $P=0.014$)。CAVI 基因的 rs926198 位点在加性和显性遗传模型下均与 T2DM 易感性相关, 与等位基因 T 相比, 等位基因 C 显著增加 T2DM 的患病风险 (OR=2.249, 95%CI=1.429~3.542, $P<0.001$); CC/CT 基因型个体 T2DM 患病风险是 TT 基因型的 2.240 倍 (OR=2.240, 95%CI=1.415~3.544, $P=0.001$)。CAV2 基因的 rs2270188 位点在加性和显性两种遗传模型下均与 T2DM 发病风险相关, 与 T 相比, 等

位基因 G 对 T2DM 发病有保护作用 (OR=0.729, 95%CI=0.544~0.978, $P=0.035$); 校正混杂因素后, 与 TT 基因型相比, GG/GT 基因型患 T2DM 风险明显降低 (OR=0.616, 95%CI=0.432~0.878, $P=0.007$)。CAV2 基因的 rs1052990 位点在显性模型下与 T2DM 易感性相关, GG/GT 基因型比 TT 基因型患 T2DM 风险明显降低 (OR=0.658, 95%CI=0.453~0.956, $P=0.028$; 表 4)。

表 4 各 SNP 位点基因型的频率分布及与 T2DM 风险关联分析

Table 4 Genotype distribution and association with T2DM of the SNPs in CAV1/CAV2 locus

SNP aa/aA/AA ¹⁾	Genotype distribution/n		ADD		DOM		REC	
	T2DM	Control	OR (95%CI)	P_{adj}	OR (95%CI)	P_{adj}	OR (95%CI)	P_{adj}
rs3815412 CC/CT/TT	17/86/169	11/100/176	1.050 (0.785~1.405)	0.743	0.982 (0.691~1.396)	0.919	1.571 (0.706~3.498)	0.268
rs3807986 GG/GA/AA	16/75/180	9/119/159	0.787 (0.584~1.062)	0.117	0.640 (0.449~0.913)	0.014	1.891 (0.795~4.497)	0.150
rs3779512 TT/TG/GG	1/26/245	0/39/248	0.752 (0.444~1.272)	0.288	0.710 (0.414~1.219)	0.215	-	-
rs975028 AA/AG/GG	1/24/247	0/33/254	0.866 (0.499~1.505)	0.611	0.820 (0.464~1.448)	0.494	-	-
rs1049337 CC/CT/TT	48/136/88	54/140/93	0.985 (0.771~1.258)	0.902	1.001 (0.695~1.441)	0.997	0.950 (0.609~1.480)	0.819
rs926198 CC/CT/TT	1/62/209	0/41/246	2.249 (1.429~3.542)	<0.001	2.240 (1.415~3.544)	0.001	-	-
rs3807989 AA/AG/GG	25/99/148	16/128/143	0.974 (0.741~1.280)	0.849	0.830 (0.589~1.169)	0.286	1.718 (0.878~3.363)	0.114
rs36068092 GG/Gd/dd	17/86/169	9/102/176	1.070 (0.797~1.437)	0.652	0.982 (0.691~1.396)	0.919	1.887 (0.808~4.407)	0.142
rs2270188 GG/GT/TT	15/74/182	14/115/158	0.729 (0.544~0.978)	0.035	0.616 (0.432~0.878)	0.007	1.113 (0.512~2.417)	0.787
rs13226307 TT/TA/AA	6/66/200	6/92/189	0.755 (0.540~1.057)	0.102	0.716 (0.493~1.040)	0.080	0.876 (0.265~2.895)	0.829
rs1052990 GG/GT/TT	8/63/201	8/93/186	0.723 (0.521~1.003)	0.052	0.658 (0.453~0.956)	0.028	0.952 (0.338~2.679)	0.926

1) "a" means minor allele and "A" means major allele; ADD: additive model = aa/aA/AA; DOM: dominant model=aa+aA/AA; REC: recessive model=aa/aA+AA; OR: odds ratio; CI: confidence interval; P_{adj} : P value obtained from logistic regression after adjustment for age, gender and BMI.

2.5 CAV1/CAV2 基因 SNPs 与胰岛素抵抗和β细胞功能的相关性

前述结果显示 CAV1 SNP rs3807986、rs926198 及 CAV2 SNP rs2270188、rs1052990 与 T2DM 易感性相关, 为了探索 SNPs 与 T2DM 关联的内在机

制, 采用多元线性回归分析这 4 个 SNPs 与空腹胰岛素 (FINS)、稳态模型评估胰岛素抵抗 (HOMA-IR)、稳态模型评估β细胞功能 (HOMA-β) 的相关性 (表 5)。为了排除药物治疗的影响, 仅将未接受治疗的新诊断 T2DM 者 166 例纳入分析。校正

年龄、性别、BMI因素后, *CAVI* SNP rs926198 低频等位基因 C 与 FINS 和 HOMA-IR 水平增高相关 (FINS: $P < 0.001$, $\beta = 1.380$; HOMA-IR: $P < 0.001$, $\beta = 1.010$), 表明 C 等位基因为胰岛素抵抗的风险基因; *CAV2* SNP rs2270188 低频等位基因 G 与 FINS 和 HOMA-IR 水平降低相关 (FINS: $P = 0.032$, $\beta = -$

0.490; HOMA-IR: $P = 0.023$, $\beta = -0.379$), 与等位基因 T 相比, 等位基因 G 携带者胰岛素抵抗程度减轻; *CAVI* SNP rs3807986 与 FINS 水平相关 ($P = 0.036$), 与 HOMA-IR 无相关性; 未发现各 SNPs 与 HOMA- β 存在统计学相关性 ($P > 0.05$)。

表5 T2DM组 *CAVI/CAV2* SNPs 与 FINS、HOMA-IR、HOMA- β 的相关性
Table 5 Association of *CAVI/CAV2* SNPs with FINS, HOMA-IR and HOMA- β in T2DM group

SNP a/A ¹⁾	FINS		HOMA-IR		HOMA- β	
	β	P_{adj}	β	P_{adj}	β	P_{adj}
rs3807986 G/A	0.475	0.036	0.317	0.057	-0.644	0.785
rs926198 C/T	1.380	<0.001	1.010	<0.001	-3.56	0.319
rs2270188 G/T	-0.490	0.032	-0.379	0.023	-1.253	0.597
rs1052990 G/T	0.278	0.272	0.160	0.389	0.496	0.850

1) "a" means minor allele and "A" means major allele; P_{adj} : P value obtained from multiple linear regression model after adjustment for age, gender and BMI; FINS: fasting insulin; HOMA-IR: homeostatic model assessment of insulin resistance; HOMA- β : homeostatic model assessment of β -cell function

2.6 *CAVI/CAV2* 基因 SNPs 与高血压和肥胖的关联分析

高血压和肥胖均为 T2DM 的相关危险因素, 采用 logistic 回归分析 T2DM 易感性相关的 4 个 SNPs 与高血压和肥胖是否存在关联。根据 2010 年中国高血压防治指南的诊断标准和既往高血压病史对所有研究对象进行高血压诊断评估, 诊断

为高血压者 217 例, 非高血压者 342 例。根据 WHO 肥胖专家顾问组推荐的亚洲人 BMI 划分标准 (BMI ≥ 25 定义为肥胖), 对所有研究对象进行肥胖评估, 划分为肥胖者 216 例, 非肥胖者 343 例。多因素 logistic 回归分析结果见表 6, 未发现 *CAVI/CAV2* 基因各 SNPs 位点与高血压或肥胖存在统计学相关性 ($P > 0.05$)。

表6 *CAVI/CAV2* SNPs 与高血压和肥胖的相关性
Table 6 Association of *CAVI/CAV2* SNPs with hypertension and obesity

SNP a/A ¹⁾	Hypertension		Obesity	
	OR (95%CI)	P_{adj} ²⁾	OR (95%CI)	P_{adj} ³⁾
rs3807986 G/A	1.163 (0.843-1.605)	0.357	0.870 (0.644-1.176)	0.365
rs926198 C/T	2.558 (1.598-4.095)	0.091	0.422 (0.258-0.689)	0.057
rs2270188 G/T	1.118 (0.816-1.531)	0.488	0.890 (0.665-1.193)	0.436
rs1052990 G/T	1.287 (0.908-1.824)	0.156	0.941 (0.680-1.302)	0.713

1) "a" means minor allele and "A" means major allele; 2) P_{adj} : P value obtained from Logistic regression after adjustment for age, gender and BMI. 3) P_{adj} : P value obtained from Logistic regression after adjustment for age and gender

2.7 *CAVI/CAV2* 基因 SNPs 与血脂指标的相关性

血脂紊乱与 T2DM 和胰岛素抵抗关系密切, 为了探索 *CAVI/CAV2* SNPs 与脂代谢的关联, 我们将对照组和 T2DM 组中未服用调脂药物的受试者共 320 例纳入分析, 采用多元线性回归模型,

校正年龄、性别、BMI 因素, 分析 T2DM 相关的 SNPs 位点与血清总胆固醇 (TC)、低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C)、甘油三酯 (TG) 的关联性 (表 7)。*CAVI* rs3807986 位点和 *CAV2* rs2270188 位点的低频等位基因 G 与

表7 CAV1/CAV2 SNPs与血脂指标的相关性
Table 7 Association of CAV1/CAV2 SNPs with serum lipids levels

SNP a/A ¹⁾	TC		LDL-C		HDL-C		TG	
	β	P_{adj}	β	P_{adj}	β	P_{adj}	β	P_{adj}
rs3807986 G/A	0.096	0.336	-0.271	0.033	0.023	0.456	-0.013	0.933
rs926198 C/T	0.027	0.864	0.104	0.610	-0.017	0.769	-0.006	0.967
rs2270188 G/T	0.047	0.627	-0.299	0.030	-0.004	0.900	0.076	0.605
rs1052990 G/T	-0.052	0.615	0.009	0.922	-0.014	0.655	-0.042	0.792

1) “a” means minor allele and “A” means major allele; P_{adj} : P value obtained from multiple linear regression model after adjustment for age, gender and BMI.

血清 LDL-C 水平降低相关(rs3807986: $P=0.033$, $\beta=-0.271$; rs2270188: $P=0.030$, $\beta=-0.299$), 未发现其它 SNPs 位点与血脂指标存在相关性。

3 讨论

本研究首次在中国汉族人群中系统地研究 CAV1、CAV2 基因单核苷酸多态性与 T2DM 易感性的关系。结果显示 CAV1 SNP rs926198、CAV2 SNP rs2270188 等位基因频率分布在 T2DM 组和对照组之间存在统计学差异($P<0.05$); Logistic 回归分析校正年龄、性别、BMI 因素后, CAV1 rs926198 位点与 T2DM 易感性相关, 与 T 相比, C 为 T2DM 风险等位基因(OR=2.249, $P<0.001$), CC/CT 基因型罹患 T2DM 的风险是 TT 型的 2.240 倍(OR=2.240, $P=0.001$); CAV2 rs2270188 (G/T) 位点等位基因 G 对 T2DM 发病有保护作用(OR=0.729, $P=0.035$), GG/GT 基因型相对于 TT 型患 T2DM 风险明显降低(OR=0.616, $P=0.007$)。与本研究结果一致, Baudrand 等^[4]在美国高加索人种进行的研究显示 CAV1 rs926198 低频等位基因 C 携带者(CC/CT 基因型)相对于 TT 型纯合子患代谢综合征风险(OR=2.83)和糖尿病风险(OR=2.38)均显著增加, 并在美国墨西哥裔人种中验证了这一结果。Fisher 等^[5]在德国人群中的研究发现 CAV2 rs2270188 与脂肪摄入量相互作用影响 T2DM 的患病风险, 当膳食脂肪和饱和脂肪酸摄入量增加时, TT 基因型较之 GG/GT 型个体患 T2DM 风险增高。此外 CAV1/CAV2 基因多态性存在种族差异, SNP rs926198 等位基因 C 频率在美国高加索人群为 36%^[6], 而本研究汉族人群为 9.39%, SNP rs2270188

等位基因 G 频率在德国人群为 52.90%^[5], 本研究则为 22.13%, 这也提示在不同人种验证疾病易感基因的必要性。本研究还发现 CAV1 rs3807986、CAV2 rs1052990 位点在显性模型下与 T2DM 易感性相关, 这两位点低频等位基因携带者比高频等位基因纯合子患 T2DM 风险显著降低(rs3807986: OR=0.640, $P=0.014$; rs1052990: OR=0.658, $P=0.028$), 目前尚未见其他种族的研究报道这两个 SNP 与 T2DM 的相关性。

在未接受药物治疗的新诊断 T2DM 者中, 校正年龄、性别、BMI 因素, 多元线性回归结果显示 CAV1 rs926198 等位基因 C 与 FINS 和 HOMA-IR 水平增高相关(FINS: $P<0.001$, $\beta=1.380$; HOMA-IR: $P<0.001$, $\beta=1.010$), 提示 C 为胰岛素抵抗的风险等位基因, 可能通过胰岛素抵抗增加 T2DM 风险; Pojoga 等^[6]在美国高加索人种和墨西哥裔人种的高血压队列中进行研究也发现 rs926198 等位基因 C 的携带者(CC/CT 基因型)较之 TT 型具有更高的 FINS 和 HOMA-IR 水平, 与本研究结果一致。校正混杂因素后, CAV2 rs2270188 等位基因 G 与 FINS 和 HOMA-IR 水平降低相关(FINS: $P=0.032$, $\beta=-0.490$; HOMA-IR: $P=0.023$, $\beta=-0.379$), 提示等位基因 G 携带者胰岛素抵抗程度减轻, 从而患 T2DM 风险降低。本研究未发现 SNP 与 HOMA- β 指标相关, 由此推测 CAV1 rs926198 和 CAV2 rs2270188 可能通过胰岛素抵抗(而非胰岛细胞功能)途径影响 T2DM 发病风险。CAV1 SNP rs3807986 和 CAV2 SNPrs1052990 与 T2DM 疾病易感性相关, 但未发现两者与 HOMA-IR、HOMA- β 存在统计学相关性, 推测其原因为纳入分析的样本量较少(仅 166 例), 检验效能有限, 可能未发现其潜在相

关性。

微囊蛋白(caveolin)家族有三个成员,分别是Caveolin-1, 2和3。Caveolin-1通常与Caveolin-2形成异源寡聚体复合物共表达于多种组织,尤其在脂肪细胞、成纤维细胞、内皮细胞等高表达,Caveolin-3只在肌细胞中特异性地表达,细胞膜上Caveolin作为脚手架蛋白可以组织和聚集信号分子广泛参与信号转导的调节。Caveolin-1对胰岛素信号通路的调节作用主要表现在Caveolin-1与胰岛素受体直接作用维持胰岛素受体稳定性并刺激其酪氨酸激酶活性^[7]、促进葡萄糖转运蛋白4(Glucose transporter 4, GLUT4)转位和内吞^[8-9]等方面。*CAVI*基因敲除(*CAVI-KO*)小鼠出现体型消瘦、葡萄糖摄取率减少、餐后高胰岛素血症和胰岛素抵抗^[10],脂肪细胞上胰岛素受体减少约90%,但在mRNA水平上没有改变,提示胰岛素受体降解加速^[11]。*CAVI*基因第2外显子无义突变112G→T使第38位密码子由谷氨酸变为终止密码子(Glu38X),可导致人类罕见的遗传病Berardinelli-Seip先天性脂肪营养不良,表现为脂肪萎缩、高甘油三酯血症、胰岛素抵抗和早发糖尿病^[12]。本课题组前期的临床研究发现,新诊断的T2DM患者外周血单个核细胞中Caveolin-1的表达水平明显低于正常对照组^[3];肥胖者与正常体重者相比,网膜脂肪组织Caveolin-1 mRNA和蛋白水平均下调^[13]。多数认为Caveolin-2可能是作为一种与Caveolin-1结合在一起的辅助蛋白来起作用的,但有研究显示Caveolin-2的19、27位酪氨酸磷酸化(PY19、PY27)能通过调节信号转导子和转录激活子3(STAT3)的活性影响胰岛素下游的信号转导^[14],并且PY27-Caveolin-2可维持胰岛素受体长时间的酪氨酸激酶活性^[15]。基础和临床研究均有力证实了Caveolin-1/-2在胰岛素信号通路和糖脂代谢稳态中的重要作用。

CAVI、*CAV2*基因相邻定位于7号染色体7q31.1-31.2,*CAV2*基因位于*CAVI*基因的上游,*CAVI*基因全长36.4 ku,*CAV2*基因全长8.94 ku,均含3个外显子。Caveolin基因仅在脊椎动物中表达且高度保守,在此区域内发现的外显子区的突变非常少见,本研究发现的与T2DM易感性相关的变异均位于内含子或两端非编码区,虽然这些SNP不会直接改变所翻译蛋白质的氨基酸序列,但是内含子区域的SNP可以通过与其连锁的其他

功能性多态位点起作用或影响mRNA选择性剪接及mRNA的稳定性等多种途径来影响基因表达水平和蛋白功能。Baudrand等^[4,16]在美国人群的研究显示*CAVI* SNP rs926198等位基因C与淋巴细胞和脂肪组织*CAVI*基因表达下降相关,即CC基因型表达最低,TT型表达最高,故可以推测rs926198位点CC/CT基因型较之TT型Caveolin-1表达降低、胰岛素抵抗水平增高,进而患T2DM风险增加。*CAV2* SNP rs2270188与*CAV1*基因5'端启动子区的数个SNP高度连锁($r^2>0.8$)^[5],而*CAV2* SNP rs1052990位于*CAV2*基因3'端,接近*CAVI*基因的5'端上游区域,故推测SNP rs2270188和rs1052990可能作为*CAVI*基因启动子区多态性的标记,与*CAVI*基因转录和表达调节相关。

高血压、肥胖和血脂异常均为T2DM的危险因素,且与胰岛素抵抗密切相关,故本研究对T2DM相关SNPs与高血压、肥胖和血脂指标进行了关联分析,结果未发现SNPs位点与高血压或肥胖相关,这与Baudrand等^[4]的研究结果一致,提示*CAVI/CAV2*基因SNPs与T2DM和胰岛素抵抗的相关性不依赖于肥胖和高血压因素。血脂分析显示*CAVI* rs3807986和*CAV2* rs2270188位点的低频等位基因G与LDL-C水平降低相关,Chen等^[17]在*CAVI*基因多态性与冠心病的关联研究中也发现*CAVI* SNP与LDL-C水平相关。胞膜caveolae区域含有脂肪酸摄取相关的酶类,Caveolin-1可与胆固醇和长链脂肪酸结合,介导脂质的跨膜转运^[2];在鼠非酒精性脂肪肝模型中,Caveolin-1的表达水平随脂肪变性的程度而上调,表明肝细胞脂质转运增加^[18];Caveolin-1能帮助LDL跨内皮细胞转运,缺乏Caveolin-1会降低细胞对LDL的摄取^[19]。研究发现在3T3-L1脂肪细胞中Caveolin-2的表达水平与胆固醇合成的限速酶HMG-CoA还原酶的活性呈现一致性变化,推断Caveolin-2的表达与胆固醇生物合成途径相关^[20]。*CAVI*基因敲除小鼠出现脂肪营养不良和血脂紊乱的表型,进一步证实了caveolin分子在脂质代谢稳态中的重要作用。因此,我们从功能上推测*CAVI/CAV2* SNPs位点的变异可能通过影响caveolin蛋白表达进而与血脂水平相关。

本研究的局限性:一是样本量有限,可能导致一些有统计学意义的SNP位点未能检出;二是未能直接在中国汉族人中探讨SNP与*CAVI/CAV2*基

因表达水平的关系。后续需要在更大样本量的队列中验证 *CAVI/CAV2* 基因多态性与 T2DM 的关联并研究 SNP 对基因表达水平的影响,进而深入探索其内在机制。

本研究首次在中国汉族人群发现 *CAVI/CAV2* 基因座 SNP rs926198、rs3807986、rs2270188、

rs1052990 与 T2DM 发病风险相关,其机制可能是通过胰岛素抵抗水平改变进而影响 T2DM 易感性。本研究挖掘出新的 T2DM 易感基因位点,为 2 型糖尿病高危人群遗传学筛查和个体化防治提供新的思路和靶点。

参考文献

- [1] Strålfors P. Caveolins and caveolae, roles in insulin signalling and diabetes [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2012, 729(11):111-126.
- [2] Méndez-Giménez L, Rodríguez A, Balaguer I, et al. Role of aquaglyceroporins and caveolins in energy and metabolic homeostasis [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2014, 397(1-2):78-92.
- [3] 江玮, 林硕, 鲁红云, 等. 外周血单个核细胞 Caveolin-1 的表达在新诊断 2 型糖尿病患者中的变化及其与胰岛素抵抗的关系 [J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2012, 33(3):378-382.
Wei J, Shuo L, Hong-yun LU, et al. Decreased Caveolin-1 expression of peripheral blood mononuclear cells in newly diagnosed type 2 diabetic patients and its relationship with insulin resistance [J]. *J Sun Yat-sen Univ (Med Sci)*, 2012, 33(3):378-382.
- [4] Baudrand R, Goodarzi MO, Vaidya A, et al. A prevalent Caveolin-1 gene variant is associated with the metabolic syndrome in Caucasians and Hispanics [J]. *Metabolism*, 2015, 64(12):1674-1681.
- [5] Fisher E, Schreiber S, Joost HG, et al. A two-step association study identifies *CAV2* rs2270188 single nucleotide polymorphism interaction with fat intake in type 2 diabetes risk [J]. *J Nutr*, 2011, 141(2):177-181.
- [6] Pojoga LH, Underwood PC, Goodarzi MO, et al. Variants of the Caveolin-1 gene: a translational investigation linking insulin resistance and hypertension [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2011, 96(8):E1288-1292.
- [7] Sánchez-Wandelmer J, Dávalos A, Herrera E, et al. Inhibition of cholesterol biosynthesis disrupts lipid raft/caveolae and affects insulin receptor activation in 3T3-L1 preadipocytes [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1788(9):1731-1739.
- [8] Yuan T, Hong S, Yao Y, et al. Glut-4 is translocated to both caveolae and non-caveolar lipid rafts, but is partially internalized through caveolae in insulin-stimulated adipocytes [J]. *Cell Res*, 2007, 17(9):772-782.
- [9] González-Muñoz E, López-Iglesias C, Calvo M, et al. Caveolin-1 loss of function accelerates glucose transporter 4 and insulin receptor degradation in 3T3-L1 adipocytes [J]. *Endocrinology*, 2009, 150(8):3493-3502.
- [10] Razani B, Combs TP, Wang XB, et al. Caveolin-1-deficient mice are lean, resistant to diet-induced obesity, and show hypertriglyceridemia with adipocyte abnormalities [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(10):8635-8647.
- [11] Cohen AW, Razani B, Wang XB, et al. Caveolin-1-deficient mice show insulin resistance and defective insulin receptor protein expression in adipose tissue [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2003, 285(1):C222-235.
- [12] Kim CA, Delépine M, Boutet E, et al. Association of a homozygous nonsense Caveolin-1 mutation with Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2008, 93(4):1129-1134.
- [13] 李晓峰, 鲁红云, 江玮, 等. 小凹蛋白 1 在人皮下和网膜脂肪组织的差异表达及与肥胖和胰岛素抵抗的关系 [J]. *中华医学杂志*, 2012, 93(20):1388-1391.
Li XF, Lu HY, Jiang W, et al. Depot-specific expression of Caveolin-1 in human adipose tissue and their relationship with obesity and insulin resistance [J]. *Nat Med J China*, 2012, 93(20):1388-1391.
- [14] Kwon H, Jeong K, Hwang EM, et al. Caveolin-2 regulation of STAT3 transcriptional activation in response to insulin [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1793(7):1325-1333.

(下转第 257 页 to page 257)