

中国人内源性高甘油三酯血症患者胰岛素受体底物1基因的多态性

刘瑞¹, 白怀², 刘宇², 黄明慧¹, 李献¹, 刘秉文²

(四川大学 1. 华西医院内科实验室, 成都 610041; 2. 华西医学中心载脂蛋白研究室)

[主题词] 底物, 胰岛素受体; 高甘油三酯血症, 内源性; 基因多态性; 中国人

[摘要] 为探讨胰岛素受体底物1基因多态性是否与内源性高甘油三酯血症患者有关联, 应用多聚酶链反应对成都地区汉族117例高甘油三酯血症患者及194例正常对照者胰岛素受体底物1基因酶切位点的限制性片段长度多态性进行研究。血脂用酶法测定, 血清载脂蛋白A_{IV}、A_I、B₁₀₀、C_I、C_{II}及E用RID试剂盒测定。结果发现, 高甘油三酯血症组和正常对照组胰岛素受体底物1基因均以GG基因型为主, 其频率分别为0.995和0.985($P>0.05$)。高甘油三酯血症组中具有GR基因型者血清载脂蛋白C_{II}水平较具有GG基因型者降低($P>0.05$)。以上结果提示胰岛素受体底物1基因G⁹⁷²R位点多态性与中国人高甘油三酯血症无关联。

[中图分类号] R589.2

[文献标识码] A

The Insulin Receptor Substrate-1 Gene Polymorphism in Patients with Endogenous Hypertriglyceridemia in Chinese Population

LIU Rui, BAI Huai, LIU Yu, HUANG Ming-Hui, LI Xian, and LIU Bing-Wen

(Laboratory of Internal Medicine, the West China Hospital of Sichuan University, Chengdu 610041, China)

[MeSH] Substrate, Insulin Receptor; Hypertriglyceridemia, Endogenous; Gene Polymorphism; Chinese

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the insulin receptor substrate-1 (IRS-1) gene polymorphism and its relationship with serum lipids and apolipoproteins (Apo) levels in patients with endogenous hypertriglyceridemia (HTG) in Chinese population.

Methods The genotype and allele frequency of IRS-1 gene polymorphism was assayed by polymerase chain reaction (PCR)-restriction fragment length polymorphism (RFLP). Serum lipids were measured by enzymatic kits and apolipoproteins A_{IV}, A_I, B₁₀₀, C_I, C_{II} and E by RID kits developed by Apolipoprotein Research Unit of WCUMS in 117 HTG patients whose fasting serum TG levels were ≥ 2.26 mmol/L and 194 healthy subjects whose fasting serum TG levels were < 1.82 mmol/L and TC levels < 6.2 mmol/L from a population of Chinese Han nationality in Chengdu area.

Results Both in HTG group and control group, the GG genotype of IRS-1 gene was the major one, and its frequency was 0.995 and 0.985 respectively. In the HTG group, subjects with the genotype GR had a lower serum ApoC_{II} levels than those with the genotype GG ($P>0.05$).

Conclusion These results suggest that the IRS-1 gene G⁹⁷²R polymorphism was not associated with endogenous hypertriglyceridemia in Chinese population.

胰岛素抵抗增加了动脉硬化性心血管疾病的危险性^[1]。胰岛素受体底物1(insulin receptor substrate-1, IRS-1)基因与胰岛素抵抗有关, 其基因表达产物——IRS-1蛋白存在于胰岛素敏感组织胞浆中, 并在胰岛素受体信号传递中起重要作用^[2]。研究表明, IRS-1基因的异常, 如第3494位上的G被A所取代, 使第972位甘氨酸(Gly)被精氨酸(Arg)替代而导致胰岛素抵抗^[3]。内源性高甘油三酯血症(hypertriglyceridemia, HTG)即Ⅴ型高脂血症, 是我国最常

见的高脂血症。刘秉文等^[4]调查显示, 国人Ⅴ型高脂蛋白血症在WHO分型的6型高脂蛋白血症中最多, 占65%。范萍等^[5]研究表明, Ⅴ型高脂蛋白血症患者存在胰岛素抵抗。有研究表明, IRS-1基因变异与脂代谢紊乱有关^[6-8], Baroni等^[9]研究结果显示, IRS-1基因G⁹⁷²R突变携带者血甘油三酯(triglyceride, TG)水平显著升高, 进一步提示IRS-1基因变异可能与内源性高甘油三酯血症的发生有关联。为此, 我们进行了内源性高甘油三酯血症与胰岛素受体底物1基因多态性关联的研究, 现报道如下。

[收稿日期] 2002-04-28 [修回日期] 2002-09-20

[基金项目] 国家自然科学基金(39770322)资助。

[作者简介] 刘瑞, 女, 1963年出生, 博士, 副研究员, 医学生物化学与分子生物专业。白怀, 男, 1960年出生, 博士, 教授, 硕士研究生导师。刘秉文, 男, 教授, 博士研究生导师, 国务院特殊津贴专家, 本文通讯联系人。

1 对象与方法

1.1 对象

高甘油三酯血症组选择空腹12~14h血清TG

≥2.26 mmol/L、总胆固醇<6.21 mmol/L 的高脂蛋白血症患者 117 例,其中男性 75 例,女性 42 例,平均年龄 54 ± 11 岁,体重 66.8 ± 10.3 kg。正常对照组选择空腹 12~14 h 血清 TG<1.82 mmol/L、TC<6.21 mmol/L 及血糖正常者 194 例,其中男性 106 例,女性 88 例,平均年龄 52 ± 11 岁,体重 60.1 ± 10.3 kg。以上 2 组经询问病史和体检,排除心、肺、肝、肾及内分泌疾病,主要选自成都地区华西医科大学、四川大学和四川师范大学的教职员,少部分为体检者,均为汉族。

1.2 血液基因组 DNA 的分离及聚合酶链反应扩增

参考文献[10]分离 DNA,于-20℃保存备用。聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)引物序列为上游 5'-CIT CTG TCA GGT GTC CAT CC-3',下游 5'-TGG CGA GGT GTC CAC GTA GC-3'。PCR 反应系统总体积为 50 μL,含 0.5 μmol/L 引物、1.5 mmol/L MgCl₂、200 μmol/L dNTP、0.2 μg DNA 模板和 2.0 u Taq DNA 聚合酶,加矿物油复盖后,95℃变性 5 min 后,94℃1 min,55℃1 min,72℃1.5 min,进行 35 个循环,72℃保温 10 min 结束反应。以 2% 琼脂糖凝胶电泳检查聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增产物。

1.3 聚合酶链反应扩增产物的消化及电泳

取 10 μL PCR 扩增产物,加 10 u 限制性内切酶 Mva I (MBI 或 Takara 产品),37℃消化 3 h 或过夜,取消化产物加入 3%~4% 低熔点琼脂糖凝胶板,在 TBE 缓冲液中电泳 40 min。溴乙锭染色 20 min,紫外光下拍照。

1.4 血脂测定

血清总胆固醇总胆固醇、TG 和高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDLC)按酶法测定(北京中生生物技术公司试剂盒)。血清载脂蛋白 A_{iv}、A_⊕、B100、C_⊕、C_⊗及 E 按本校载脂蛋白研究室研制的单向免疫扩散试剂盒测定^[11]。低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDLC) (TG<4.52 mmol/L)按以下公式计算。

$$\text{LDLC}(\text{mmol/L}) = (\text{TC} - \text{HDLC}) - \text{TG}/2.19,$$

$$\text{nHDLC} = \text{TC} - \text{HDLC}^{[12]}.$$

1.5 统计学方法

高甘油三酯血症组与正常对照组间基因型频率及等位基因频率的差异用 χ^2 检验。组间血脂及载脂蛋白水平比较用 t 检验,不同基因型亚组之间血脂及载脂蛋白的比较用协方差分析(ANOVA)。IRS-1 基因的基因型进行 Hardy-Weinberg 平衡检验。 $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

2 结果

2.1 高甘油三酯血症组及正常对照组血脂及载脂蛋白水平的比较

从表 1(Table 1)可见,高甘油三酯血症患者血清 TG 为 2.94 mmol/L,较对照组 1.21 mmol/L 升高 143% ($P < 0.001$), HDLC 较对照组降低 41% ($P < 0.001$), TG/HDLC 比值较对照组升高 3.4 倍 ($P < 0.001$); nHDLC 升高 12.3% ($P < 0.001$)。载脂蛋白 A_I 为 1.15 g/L,较对照组 1.33 g/L 降低 16% ($P < 0.001$)。载脂蛋白 B100、载脂蛋白 C_⊕、载脂蛋白 C_⊗及载脂蛋白 E 与对照组相比分别升高 19%、60%、64% 和 50% ($P < 0.001$)。血清 TC 及载脂蛋白 A_⊕含量则无明显改变。

表 1. 高甘油三酯血症组及正常对照组血脂及载脂蛋白水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)。

Table 1. Serum lipids and Apolipoproteins levels in HTG and control groups.

Index	Control(<i>n</i> = 194)	HTG(<i>n</i> = 117)
Age (years)	52.0 ± 11.3	54.0 ± 10.6
BMI (kg/m ²)	23.0 ± 3.3	25.0 ± 2.7 ^a
TG (mmol/L)	1.21 ± 0.40	2.94 ± 0.52 ^a
TC (mmol/L)	5.16 ± 1.48	5.14 ± 0.92
HDLC (mmol/L)	1.41 ± 0.39	1.00 ± 0.29 ^a
nHDLC (mmol/L)	3.65 ± 0.79	4.16 ± 0.94 ^a
LDLC (mmol/L)	3.08 ± 0.71	2.83 ± 0.61 ^b
Apolipoprotein A _{iv} (g/L)	1.33 ± 0.22	1.15 ± 0.21 ^a
Apolipoprotein A _⊕ (g/L)	0.29 ± 0.06	0.28 ± 0.05
Apolipoprotein B100 (g/L)	0.78 ± 0.13	0.93 ± 0.17 ^a
Apolipoprotein C _⊕ (g/L)	0.05 ± 0.02	0.08 ± 0.03 ^a
Apolipoprotein C _⊗ (g/L)	0.11 ± 0.03	0.18 ± 0.05 ^a
Apolipoprotein E (g/L)	0.04 ± 0.01	0.06 ± 0.02 ^a
TG/HDLC	2.15 ± 0.99	7.37 ± 3.21 ^a

BMI: body mass index. a: $P < 0.001$, b: $P < 0.01$, compared with control group.

2.2 限制性内切酶 Mva I 消化聚合酶链反应扩增产物电泳结果

聚合酶链反应扩增产物经限制性内切酶 Mva I 消化后, Gly972 纯合子 GG 显示 158 bp、81 bp 和 23 bp 3 条带,而 Gly972Arg972 杂合子 GR 则显示 158 bp、107 bp、81 bp、51 bp 和 23 bp 5 条带(图 1, Figure 1)。电泳谱上 23 bp 带未显示。

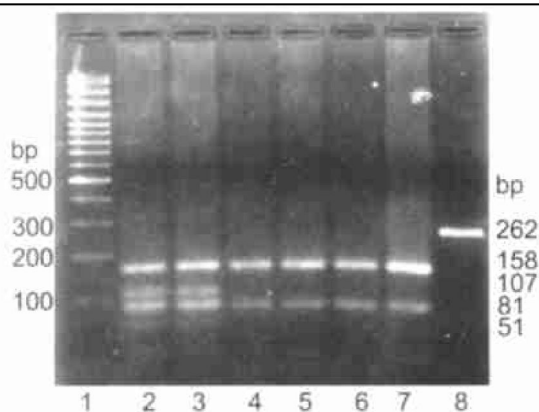


图 1. 限制性内切酶 Mva I 消化聚合酶链反应扩增产物琼脂糖电泳图谱。

Figure 1. Mva I restriction enzyme cutting result on agarose gel electrophoresis. 1: marker; 2 and 3: genotype GR (158 bp, 107 bp, 81 bp, 51 bp and 23 bp); 4~ 7: genotype GG (158 bp, 81 bp, and 23 bp); 8: PCR product.

2.3 正常对照组胰岛素受体底物 1 基因的基因型 Hardy-Weinberg 平衡检验

188 例 GG 基因型、6 例 GR 基因型和 0 例 RR 基因型频率分布为: GG、GR 和 RR 基因型频率分布观察值分别为 97%、3% 和 0, 期望值分别为 97%、3% 和 0, 该分布符合 Hardy-Weinberg 平衡遗传定律, 说明这一基因位点已达到遗传平衡, 具有群体代表性。

2.4 高甘油三酯血症组与正常对照组胰岛素受体底物 1 基因基因型及等位基因频率的比较

正常对照组和 HTG 组均以 GG 基因型为主, 其频率分别为 0.969 和 0.983, GR 基因型的频率在两组分别为 0.031 和 0.017。而 RR 纯合子基因型在两组中未检测出。两组间 R 等位基因频率差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 2 (Table 2)。

表 2. 高甘油三酯血症组与对照组胰岛素受体底物 1 基因基因型及等位基因频率的比较。

Table 2. Genotype and allele frequencies of IRS-1 gene in HTG and control groups.

	Control (n= 194)	HTG (n= 117)
Genotype		
GG	0.969 (188)	0.983 (115)
GR	0.031 (6)	0.017 (2)
RR	0	0
Allele		
G	0.985 (382)	0.995 (232)
R	0.015 (6)	0.005 (2)

Numbers in parentheses indicate the number of subjects with each genotype or number of alleles of each type. Chi-square analysis: $P > 0.05$, compared with control group.

2.5 胰岛素受体底物 1 基因多态性不同基因型亚组之间血脂及载脂蛋白水平的比较

IRS-1 基因多态性不同基因型亚组间血脂及载脂蛋白水平没有显著差异 ($P > 0.05$)。见表 3 (Table 3)。

表 3. 胰岛素受体底物 1 基因多态性不同基因型亚组间血脂及载脂蛋白水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)。

Table 3. Mean values of serum lipids and apolipoprotein levels for IRS-1 gene polymorphism in different genotypes.

Index	Control		HTG	
	GG (n= 188)	GR (n= 6)	GG (n= 115)	GR (n= 2)
BMI (kg/m^2)	23.0 $\pm$ 3.3	22.0 $\pm$ 2.9	25.0 $\pm$ 2.7	27.0 $\pm$ 1.1
TG (mmol/L)	1.22 $\pm$ 0.40	0.97 $\pm$ 0.43	2.95 $\pm$ 0.52	2.66 $\pm$ 0.10
TC (mmol/L)	5.17 $\pm$ 0.65	4.94 $\pm$ 0.83	5.15 $\pm$ 0.92	4.64 $\pm$ 0.49
HDLc (mmol/L)	1.41 $\pm$ 0.39	1.51 $\pm$ 0.43	1.00 $\pm$ 0.29	1.03 $\pm$ 0.22
nHDLc (mmol/L)	3.66 $\pm$ 0.78	3.43 $\pm$ 0.96	4.16 $\pm$ 0.95	4.11 $\pm$ 0.00
LDLC (mmol/L)	3.08 $\pm$ 0.71	3.11 $\pm$ 1.07	2.83 $\pm$ 0.61	2.92 $\pm$ 0.00
Apolipoprotein A iv (g/L)	1.33 $\pm$ 0.23	1.35 $\pm$ 0.21	1.15 $\pm$ 0.21	1.21 $\pm$ 0.05
Apolipoprotein A $\text{\textcircled{I}}$ (g/L)	0.29 $\pm$ 0.06	0.30 $\pm$ 0.04	0.28 $\pm$ 0.05	0.28 $\pm$ 0.05
Apolipoprotein B100 (g/L)	0.78 $\pm$ 0.13	0.76 $\pm$ 0.10	0.93 $\pm$ 0.17	0.89 $\pm$ 0.04
Apolipoprotein C $\text{\textcircled{II}}$ (g/L)	0.05 $\pm$ 0.02	0.04 $\pm$ 0.02	0.08 $\pm$ 0.03	0.06 $\pm$ 0.01
Apolipoprotein C $\text{\textcircled{III}}$ (g/L)	0.11 $\pm$ 0.03	0.11 $\pm$ 0.02	0.18 $\pm$ 0.05	0.11 $\pm$ 0.00
Apolipoprotein E (g/L)	0.04 $\pm$ 0.01	0.05 $\pm$ 0.01	0.06 $\pm$ 0.02	0.04 $\pm$ 0.01
TG/HDLc	2.17 $\pm$ 0.99	1.58 $\pm$ 0.84	7.39 $\pm$ 3.23	6.01 $\pm$ 1.06

3 讨论

胰岛素受体底物 1 (IRS-1) 是一种信号传导蛋白, 广泛分布于胰岛素敏感组织细胞浆内^[13]。IRS-1 N 末端具有 PH (pleckstrin homology, PH) 结构域, 后者能特异结合磷脂及细胞内其它信号蛋白如 Sos、PKB 和 β -ark 等。IRS-1 还含有与磷酸酪氨酸残基结合 (PTB) 的结构域, 后者可与酪氨酸磷酸化的胰岛素受体结合, 从而传递胰岛素的信号。IRS-1 至少含有 20 个酪氨酸残基可被磷酸化, 其中 6 个在 YMXM 模体中, 3 个在 YXXM 模体中。IRS-1 还含有 30 个以上的丝氨酸/苏氨酸残基可被丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶磷酸化^[12]。当胰岛素与受体结合, 使其 β 亚基酪氨酸蛋白激酶活化, 后者使 IRS-1 的酪氨酸残基磷酸化, 即转变为与 SH2 结合的锚蛋白, 可通过其磷酸化酪氨酸残基与 SH2 蛋白结合, 从而激活 SH2 蛋白的活性, 并将胰岛素信号传递到胞内 SH2 蛋白。胞浆 SH2 蛋白包括磷脂酰肌醇 3-激酶的 P85 亚基、生长因子结合蛋白 2 及酪氨酸磷酸酶 SHP2 等。IRS-1 的 Y⁹³⁹ MNM 和 Y⁹⁸⁷ MTM 酪氨酸残基经磷酸化后均是磷脂酰肌醇 3-激酶 p85 亚基的结合位点, Gly972 位于这两个结合位点之间。精氨酸取代 972 位甘氨酸能引起这些结合位点的构象改变, 并影响 IRS-1 与磷脂酰肌醇 3-激酶 p85 亚基的结合。

胰岛素受体底物 1 (IRS-1) 基因的 G⁹⁷²R 位点基因型分布符合 Hardy-Weinberg 平衡遗传定律, 说明这一基因位点已达到遗传平衡, 具有群体代表性。本研究中国人 IRS-1 基因 GR 基因型频率为 0.031, 较美国白种人 0.067、英国白种人 0.097、意大利白种人 0.068、法国白种人 0.069 和芬兰白种人 0.087 显著为低^[9, 14, 15], 与日本人 0.020 相近^[16]。由此可见, IRS-1 基因 G⁹⁷²R 基因多态性存在明显的种族差异。

Almind 等^[17]报道, 在 32D-IR 细胞中 IRS-1 G⁹⁷²R 变异引起 DNA 合成减少。Baroni 等^[9]研究结果表明, IRS-1 基因 G⁹⁷²R 变异是冠状动脉疾病的危险因素, GR 基因型携带者血浆 TG 水平比 GG 基因型携带者升高 60%。Abe 等^[18]报道, IRS-1 完全缺乏小鼠伴有高甘油三酯血症。本研究表明, HTG 患者 IRS-1 基因 R 等位基因的频率为 0.005, 正常对照组为 0.015, 正常对照组 G⁹⁷²R 变异的频率比 HTG 组高, 但差异不显著 ($P > 0.05$), 未发现 G⁹⁷²R 变异与高甘油三酯血症有关联。本研究对 IRS-1 基因多态位点 GG、GR 基因型与血脂及载脂蛋白含量进行了分析, HTG 组及正常对照组均未发现有影响。但

HTG 组中具有 GR 基因型者血清载脂蛋白 C Ⅲ水平较具有 GG 基因型者有降低趋势 ($P = 0.07$)。这些结果表明胰岛素受体底物 1 基因 G⁹⁷²R 位点多态性与中国人 HTG 无关联。这说明中国人 HTG 患者存在的胰岛素抵抗可能与 IRS-1 基因 G⁹⁷²R 位点多态性无关。

[参考文献]

- [1] DeFronzo RA, Ferrannini E. Insulin resistance: a multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care*, 1991, **14** (3): 173-194
- [2] 刘瑞, 白怀, 刘秉文. 胰岛素受体信号传递. *生理科学进展*, 2001, **32** (3): 254-256
- [3] Almind K, Bjorbaek C, Vestergaard H, et al. Amino acid polymorphism of insulin receptor substrate-1 in non-insulin dependent diabetes mellitus. *Lancet*, 1993, **342** (8875): 828-833
- [4] 刘秉文. 血浆甘油三酯与动脉粥样硬化. *心血管病学进展*, 1999, **20** (1): 3
- [5] 范萍, 刘秉文, 方定志, 等. 内源性高甘油三酯血症存在胰岛素抵抗. *中国动脉硬化杂志*, 1996, **4** (2): 104-107
- [6] Clausen JO, Hansen T, Bjorbaek C, et al. Insulin resistance: interactions between obesity and a common variant of insulin receptor substrate-1. *Lancet*, 1995, **346** (8972): 397-402
- [7] Campagna F, D'Andrea MP, Baroni MG, et al. Genetic determinants of dyslipidemia associated with the insulin resistance syndrome (IRS). *Atherosclerosis*, 1997, **135** (suppl 1): S7
- [8] Zhang Y, Wat N, Stratton IM, et al. UKPDS 19: heterogeneity in NIDDM: separate contributions of IRS-1 and beta 3-adrenergic-receptor mutations to insulin resistance and obesity respectively with no evidence for glycogen synthase gene mutations. UK Prospective Diabetes Study. *Diabetologia*, 1996, **39** (12): 1505-511
- [9] Baroni MG, D'Andrea MP, Montali A, et al. A common mutation of the insulin receptor substrate-1 gene is a risk factor for coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999, **19** (12): 2975-980
- [10] 刘瑞, 白怀, 刘宇, 等. 中国人内源性高甘油三酯血症患者载脂蛋白 C Ⅲ基因 SstI 酶切位点多态性的研究. *华西医科大学学报*, 2001, **32** (2): 175-178
- [11] 刘秉文. 血浆载脂蛋白的免疫测定及应用. 见: 王克勤主编. 脂蛋白与动脉粥样硬化. 北京: 人民卫生出版社, 1995: 359-360
- [12] Frost PH, Havel RJ. Rational for use of non-high-density lipoprotein cholesterol rather than low-density lipoprotein cholesterol as a tool for lipoprotein cholesterol screening and assessment of risk and therapy. *Am J Cardio*, 1998, **81** (1): 26B
- [13] Sun XJ, Rothenberg P, Khan CR, et al. Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature*, 1991, **352** (6330): 73-77
- [14] Sigal RJ, Doria A, Warram JH, et al. Codon 972 polymorphism in the insulin receptor substrate-1 gene, obesity, and risk of noninsulin dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*, 1996, **81** (4): 1657-659
- [15] Laakso M, Malkki M, Kekalainen P, et al. Insulin receptor substrate-1 variants in non-insulin dependent diabetes. *J Clin Invest*, 1994, **94** (3): 1141-146
- [16] Yamada K, Yuan X, Ishiyama S, et al. Codon 972 polymorphism of the insulin receptor substrate-1 gene in impaired glucose tolerance and late-onset NIDDM. *Diabetes Care*, 1998, **21** (5): 753-756
- [17] Almind K, Inoue G, Pedersen O, et al. A common amino acid polymorphism in insulin receptor substrate-1 causes impaired insulin signaling. Evidence from transfection studies. *J Clin Invest*, 1996, **97** (11): 2569-575
- [18] Abe H, Yamada N, Kamata K, et al. Hypertension, hypertriglyceridemia and impaired endothelium-dependent vascular relaxation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *J Clin Invest*, 1998, **101** (8): 1784-788

(此文编辑 朱雯霞)