

β_2 -肾上腺素能受体基因 Arg16/Gly 多态性与新疆哈萨克族男性甘油三酯水平的关系

骆 秦 李南方* 周 玲 李 涛 王新玲 祖菲亚 张德莲 常桂娟 周克明 洪 静

(新疆维吾尔自治区人民医院高血压科,新疆维吾尔自治区高血压评估治疗中心,乌鲁木齐 830001)

摘 要 探讨 β_2 -肾上腺素能受体 (β_2 -adrenergic receptor, β_2 -AR) 基因 Arg16/Gly 多态性与新疆哈萨克族男性血清甘油三酯 (TG) 水平的关系。采集新疆阿勒泰地区 265 例 30 岁 ~ 60 岁之间哈萨克族男性牧民的遗传标本,采用聚合酶链反应-限制性酶切片段多态性 (PCR-RFLP) 技术分析 β_2 -AR 基因 Arg16/Gly 多态性,观察各基因型和等位基因与 TC 水平的关系。(1) 在扣除收缩压、舒张压、BMI 和年龄等影响因素后,血清 TG 水平在 β_2 -AR 基因 Arg16/Gly 多态位点三种基因型间无统计学差异 ($P > 0.05$)。(2) 将人群按血清 TG 水平 < 1.7 mmol/L、 $(1.7 \sim 2.25)$ mmol/L、 ≥ 2.26 mmol/L 划分为正常组、边缘升高组及升高组 3 组, β_2 -AR 基因 Arg16/Gly 多态位点三种基因型频率在 TG 正常、边缘升高及升高组 3 组中的分布无统计学差异 ($P > 0.05$)。 β_2 -AR 基因 Arg16/Gly 多态性与哈萨克族男性牧民的 TG 水平升高无关。

关键词 β_2 -肾上腺素受体 (β_2 -AR) Arg16/Gly 多态性 甘油三酯 哈萨克族男性

中图分类号 R335.4; **文献标志码** A

β 肾上腺素能受体 (β AR) 是交感神经系统的重要组成部分,在儿茶酚胺的介导下对机体脂肪代谢的调节发挥重要作用。 β_2 -AR 主要调节皮下脂肪的沉积,同时骨骼肌的脂肪分解作用几乎完全由 β_2 -AR 调控^[1,2]。因此, β_2 -AR 基因多态性一直是近年来代谢综合征遗传学机制的研究热点。人类 β_2 -AR 基因 Arg16/Gly 多态性最为常见,近年的研究显示该位点与特定人群和性别的血脂异常、肥胖、高血压等心血管疾病相关^[3-5]。研究发现 β_2 -AR 基因 Arg16/Gly 多态性与哈萨克人群尤其是女性的低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 水平相关,并发现哈萨克族男性的甘油三酯 (TG) 水平明显高于女性^[6],而 β_2 -AR 基因 Arg16/Gly 多态性与哈萨克男性人群 TG 关系的研究目前尚属空白。因此以哈萨克族男性人群作为研究对象,研究该人群 β_2 -AR 基因

Arg16/Gly 多态性与甘油三酯水平之间的关系。

1 资料与方法

1.1 研究对象

随机选取新疆阿勒泰地区 30 岁 ~ 60 岁的哈萨克族男性牧民 265 例,平均年龄 (47.9 ± 10.6) 岁,体重指数 (BMI) $(17 \sim 43)$ kg/m²,平均 (26.0 ± 4.2) kg/m²。无血缘关系及异族通婚史。同时排除继发性血脂异常:糖尿病、过度饮酒、服用避孕药史、心肌梗塞、肝肾疾病及甲状腺疾病等。

1.2 研究方法

1.2.1 一般测量及抽血

用标准方法测量受试者血压、身高、体重;在受试者知情并同意下,自肘前静脉抽取空腹静脉血 10 mL,抗凝管离心分离出血浆和血细胞,采用日立 7600 生化分析系统,测定血清 TG。

1.2.2 DNA 提取

取肝素抗凝管外周静脉血 5 mL,低渗溶血法破裂红细胞,采用经典的蛋白酶 K 消化,饱和酚/氯仿

2010 年 7 月 12 日收到 新疆维吾尔自治区科技基础条件平台
建设项目 (编号:PT0903) 资助

第一作者简介:骆 秦,女,硕士,主治医师。

* 通讯作者简介:李南方, E-mail: lnafang@yahoo.com.cn。

抽提法提取白细胞 DNA, DNA 溶于 TE 溶液中备用。

1.2.3 β_2 -AR 基因 Arg16/Gly 多态性基因型检测

采用 PCR 技术扩增目的片段。引物 1 (FP-Arg16): 5'-CGC CTT CTT GCT GGC ACG CAAT-3' (引入错配碱基 G, 从而创造一个 BseMI 内切酶的酶切位点); 引物 2 (RP-Gly16): 5'-CCA GTG AAG TGA TGA AGT AGT-3' (由上海生工生物工程技术服务有限公司合成)。用 PE-9700 扩增仪进行扩增反应。50 μ L PCR 反应体系: DNA 模板约 0.2 μ g, 引物 1、2 各为 0.16 pmol/L, Tris-HCl (pH8.3) 10 mmol/L, KCl 50 mmol/L, dNTP 100 μ mol/L, Taq 酶 4 U, MgCl₂ 1.5 mmol/L。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min 后, 进入 35 个循环: 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 60 $^{\circ}$ C 复性 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 循环结束后, 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。PCR 产物用含 EB 的 2% 琼脂糖凝胶, 在电压 100 V、1 $\times$ TAE 缓冲液中电泳 20 min, 应用凝胶成像分析系统观察扩增结果。(dNTP、MgCl₂、10 $\times$ Buffer、TaqDNA 聚合酶均来自华美生物工程公司)。PCR 产物片段长度为 203 bp, 4 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.4 基因型的判断

采用限制性内切酶法: 每管反应体积 20 μ L, 取 8 μ L PCR 产物, BseMI 内切酶 (上海生工生物工程技术服务有限公司) 4 U, 10 $\times$ buffer 2 μ L, 剩余体积以灭菌去离子超纯水补足, 置于 55 $^{\circ}$ C 水浴箱中 5 h。酶切产物用含 EB 的 3% 进口琼脂糖凝胶电泳, 在 70 V 电压、1 $\times$ TAE 缓冲液中电泳 30 min, 应用凝胶成像分析系统观察酶切结果。因在 PCR 产物下游 147 bp 处存在一个 BseMI 内切酶的固定酶切位点 (3'-CGTTAC $\uparrow$ NN-5'), 故在酶切反应后所有 PCR 产物片段均被切去 56 bp 成为 147 bp 的片段。Gly16 型等位基因者存在 BseMI 内切酶酶切位点 (5'-GCAATGNN $\downarrow$ -3'), 酶切后产生 125 bp、22 bp 两个片段; 而 Arg16 型等位基因不存在酶切位点故酶切反应后仍为 147 bp。因此, Arg16/Arg 为一个片段 (147 bp), Arg16/Gly 杂合型有 3 个片段 (147 bp、125 bp、22 bp), Gly16/Gly 纯合型有 2 个片段 (125 bp、22 bp) (图 1)。

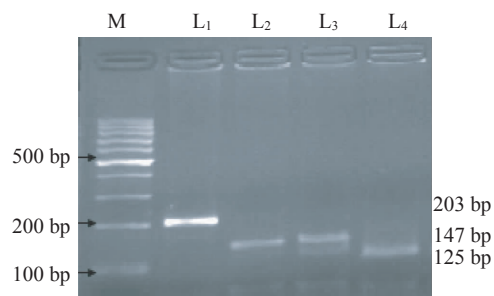


图 1 β_2 -AR 基因 +46 位多态性电泳图谱

M—泳道为 DNA Marker DL 1000, L1—泳道为 PCR 产物。由于 22 bp 片段太小, 在电泳过程中因扩散而难以辨认, 故主要通过观察 147 bp 及 125 bp 2 个片段来确定基因型, L2—泳道为 Arg16 纯合型 (147 bp), L3—泳道为 Arg16/Gly 杂合型 (147 bp、125 bp), L4 泳道为 Gly16 纯合型 (125 bp)

1.2.5 统计学处理

用直接计数法计算各组病例和对照组的基因型及等位基因频率, 用 SPSS13.0 软件作统计学分析, 计量资料用 (均数 $\pm$ 标准差) 表示, 多组计量资料的比较用协方差分析, Hardy-Weinberg 检验和构成比的比较用 χ^2 检验。所有结果在 $P < 0.05$ 时被认为有统计学意义。

2 结果

2.1 哈萨克族人群 β_2 -AR 基因 Arg16/Gly 多态位点 3 种基因型间血清 TG 水平的比较

各基因型间甘油三酯水平的比较采用协方差分析法: 以 TG 作为应变量, 基因型作为分组变量, 以收缩压、舒张压、BMI 和年龄等可能影响 TG 水平的因素作为协变量, 讨论各基因型与 TG 的关系。结果: 在扣除上述影响因素后, 血清 TG 水平在 3 种基因型间无统计学差异 ($P > 0.05$) (见表 1)。

2.2 β_2 -AR 基因

Arg16/Gly 多态性各基因型和等位基因在血清 TG 正常、边缘升高及升高组 3 组中的分布比较: 参照我国血脂异常防治建议 (1997), 将人群按血清 TG 水平 < 1.7 mmol/L、(1.7 ~ 2.25) mmol/L、 ≥ 2.26 mmol/L 划分为正常组、边缘升高组及升高组 3

组,比较该位点各基因型和等位基因在 3 组间的分布频率。

表 1 β₂-AR 基因 Arg16/Gly 三种基因型与 TG 的协方差分析结果

基因型	例数	TG/mmol · L ⁻²	F	P
Arg16/Arg	85	1.26 ± 0.08	0.373	0.689
Arg16/Gly	115	1.41 ± 0.06		
Gly16 /Gly	65	1.23 ± 0.09		

各基因型频率及等位基因频率在 TG 正常、边缘升高及升高组 3 组间无统计学差异 ($P > 0.05$) (见表 2)。

表 2 不同基因型和等位基因频率在 TG 正常、边缘增高及升高组 3 组中的比较

TG 水平	正常	边缘升高	升高	合计	χ ² 值	P 值
基因型						
Arg16/Arg	58(0.36) *	10(0.22)	17(0.28)	85	6.341	>0.05
Arg16/Gly	60(0.38)	24(0.52)	31(0.52)	115		
Gly16/Gly	41(0.26)	12(0.26)	12(0.20)	65		
合计	159	46	60	265		
等位基因						
Arg16	176(0.55)	44(048)	65(054)	285	1.633	>0.05
Gly16	142(0.45)	482(052)	55(0.46)	245		
合计	318	92	120	530		

* 括号内的数值为相对值

2.2 讨论

β₂-AR 是人体重要的脂肪代谢调节受体,与儿茶酚胺结合后激活腺苷酸环化酶通过使 cAMP 生成增多,激活蛋白激酶 A,促进甘油三酯分解。以往的多项研究显示 β₂-AR 基因 Arg16/Gly 多态性与血脂异常相关,且存在种族和性别差异。例如来自我国汉族人群的研究提示 Arg/Arg 基因型携带者血清 TG 水平显著高于 Arg/Gly 基因型携带者^[7]。来自日本的研究也显示,在超重与肥胖人群中 Arg/Arg 基因型与其他 2 种基因型相比, TG 水平显著升高^[8]。

以往我们的研究发现新疆哈萨克族 β₂-AR 基因 Arg16/Gly 多态性与哈萨克族女性的 LDL-C 水平

有关,而男性的 TG 水平明显高于女性,但未进一步探讨与该基因的相关性。为进一步探讨哈萨克族男性的 TG 水平升高的遗传学机制,本研究进一步扩大样本量,以 30 岁 ~ 60 岁的新疆哈萨克族牧区男性人群作为研究对象(这部分人群因常年在外放牧,因此遗传标本不易获得),研究 β₂-AR 基因 Arg16/Gly 多态性与该人群 TG 水平之间的关系。结果显示在扣除年龄、BMI、血压等影响因素后, TG 水平在 3 种基因型间无统计学差异。比较各基因型频率在 TG 正常、边缘升及升高组 3 组间也无统计学差异 ($P < 0.05$)。提示 β₂-AR 基因 Arg16/Gly 多态性与哈萨克族男性 TG 水平增高无关。由于外源性甘油三酯水平受饮食结构和生活习惯的影响较大,而哈萨克族男性的饮食结构与女性相比,男性肉类的摄入多于女性,而且喜好饮酒,这可能是哈萨克族男性甘油三酯高于女性的主要原因。

参 考 文 献

1 Barbe P, Millet L, Galitzky J. In situ assessment of the role of the β₁-, β₂-, β₃-adrenoceptors in the control of lipolysis and nutritive blood flow in human subcutaneous adipose tissue. Br J Pharmacol, 1996;117:907—913

2 Hagstrom-Toft E, Enoksson S, Moberg E. β-adrenergic regulation of lipolysis and blood flow in human skeletal muscle in vivo. Am J Physiol, 1998;275:909—916

3 Hallman D M, Srinivasan S R, Chen W, et al. The β₂-adrenergic receptor Arg16-gly polymorphism and interactions involving β₂- and β₃-adrenergic receptor polymorphisms are associated with variations in longitudinal serum lipid profiles: The Bogalusa Heart Study. Metabolism, 2004;53(9):1010—1016

4 Rosmond R, Ukkola O, Chagnon M, et al. Polymorphisms of the β₂-adrenergic receptor gene (ADRB2) in relation to cardiovascular risk factors in men. J Intern Med, 2000;248(3):239—244

5 Dallongeville J, Helbecque N, Cottel D, et al. The Gly¹⁶→Arg¹⁶ and Gln²⁷→Glu²⁷ polymorphisms of β₂-adrenergic receptor are associated with metabolic syndrome in men. J Clin Endocrinol Metab, 2003;88(10):4862—4866

6 李南方, 骆 秦, 周 玲. β₂ 肾上腺素能受体基因 +46 位 Arg16/Gly 多态性与新疆哈萨克族人群低密度脂蛋白胆固醇水平的关系. 中华心血管病杂志, 2005;33(12):1071—1074

7 吴红梅, 白 怀, 范 平, 等. 中国人内源性高甘油三酯血症患者 β₂ 肾上腺素受体基因 Arg16Gly 多态性的研究. 中华医学遗传学

杂志,2008;(25)1:50—54

8 Petrone A,Zavarella S,Iacobellis G. Association of beta2 adrenergic

receptor polymorphisms and related haplotypes with triglyceride and

LDL-cholesterol levels. Eur J Hum Genet,2006;14(1):94—100

Association of Beta2 Adrenergic Receptor Arg16/Gly Polymorphism with Triglyceride in Male Kazakans of Xinjiang

LUO Qin,LI Nan-fang*,ZHOU Ling,WANG Xin-ling,

ZU Fei-ya,ZHANG De-lian,CHANG Gui-juan,ZHOU Ke-ming,HONG Jing

(Hypertension Institute of Xinjiang,Hypertension Unit of the People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region,Urumuqi 830001,P. R. China)

[Abstract] To investigate the relationship between β_2 -AR gene Arg16/Gly polymorphism and serum triglyceride in male Kazakans of Xinjiang. To detect the genotypes of β_2 -AR gene Arg16/Gly polymorphism by the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) technique in 265 kazakans with age from 30 to 60, and analyse association of the three genotypes with triglyceride. (1) After deduct factors of blood pressure, age and body mass index, *et al*, no significant difference were found in level of serum triglyceride between the three genotypes. (2) To divide the subjects into three groups with normal, marginally high and high level of TG according to its level < 1.7 mmol/l, $(1.7 \sim 2.25)$ mmol/l, ≥ 2.26 mmol. The frequency of both genotypes and alleles in the three groups were not found significant difference. No association were found between β_2 -AR gene Arg16/Gly polymorphism and serum triglyceride in male kazakans of Xinjiang.

[Key words] β_2 -adrenergic receptor gene Arg16/Gly polymorphism triglyceride kazakans male

(上接第 6966 页)

Physica D,2004;196:172—192

7 Smoller J. Shock waves and reaction-diffusion equations, (Second Edition). New York:Springer-Verlag,1994

8 Henry D. Geometric theory of semilinear parabolic equations. Lecture Notes in Mathematics. Berlin, New York:Springer-Verlag,1993;840

9 钟承奎,等. 非线性泛函分析引论. 兰州:兰州大学出版社,2004:104—105

10 Rabinowitz P H. Some global result for nonlinear eigenvalue problems. J Funct Anal,1971;487—513

The Existence of Non-constant Positive Solution of the Predator-prey Model

QUAN Li-na^{1,2}, LI Yan-ling^{2*}

(College of Mathematics and Information Science¹, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, P. R. China;

Shaanxi Institute of Education², Xi'an 710061, P. R. China)

[Abstract] The existence of non-constant positive solution of the predator-prey model with homogeneous Neumann boundary is discussed by the methods of bifurcation theory and degree theory. Some existence conditions for non-constant positive solution are given.

[Key words] predator-prey model non-constant positive solution existence