

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.31.007

叉头盒转录因子 O1 基因多态性与中国重庆汉族人 2 型糖尿病相关性研究*

龚莉琳¹, 李蓉¹, 任伟¹, 王增产^{2,3}, 白晓苏^{1,4}, 张闻宇^{1,5}, 汪志红¹, 秧茂盛^{2,6}, 张素华¹

(1. 重庆医科大学附属第一医院内分泌科 400016; 2. 重庆医科大学公共卫生学院疾病基因研究室 400016;
3. 重庆医科大学感染性疾病分子生物学教育部重点实验室 400016; 4. 广东省深圳市龙华新区
人民医院内分泌科 518000; 5. 河南省郑州市人民医院内分泌科 450003;
6. 吉首大学医学院药理教研室与疾病基因研究室, 湖南吉首 416000)

[摘要] **目的** 探讨叉头盒转录因子 O1(FOXO1)基因单核苷酸多态性(SNPs)与中国重庆汉族人 2 型糖尿病(T2DM)的相关性。**方法** (1)在无血缘关系的 105 名中国重庆汉族人中,采用 PCR-RFLP 和基因测序法,对 FOXO1 基因编码区和非编码区的 15 个 SNPs 进行筛查,连锁不平衡(LD)分析,构建单倍型。(2)选择重庆地区 704 名汉族人(414 名 T2DM 患者,290 名健康人)进行病例对照研究,对位于同一单倍域的 5 个 SNPs 进行基因型鉴定,分析 SNPs 及单倍型与 T2DM 的关联。**结果** (1)共筛查到 12 个 SNPs;外显子 Thr488Asn 在该人群中未发现多态现象。LD 分析提示 rs17592236、rs9577066、rs7986407、rs4581585 和 rs4325426 位于同一单倍域内($D' > 0.7$)。(2)rs7986407、rs4581585 与 T2DM 发病相关:rs7986407 位点 AA 基因型个体 T2DM 患病风险是 GG 基因型的 1.42 倍(additive 模式 $OR = 1.420, 95\%CI: 0.783 \sim 2.577, P = 0.011$);rs4581585 位点 CC 基因型个体 T2DM 患病风险是 TT 基因型的 2.57 倍(additive 模式 $OR = 2.571, 95\%CI: 1.404 \sim 4.695, P = 0.002$)。年龄、体质量指数、血糖、血脂、胰岛素、Homa-IR 和 Homa- β 等在不同基因型间差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** FOXO1 基因可能是中国重庆汉族人 T2DM 的易感基因。

[关键词] 2 型糖尿病;叉头盒转录因子 O1;单核苷酸多态性;关联分析

[中图分类号] R587.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2016)31-4340-05

Correlation between FOXO1 genetic polymorphisms with type 2 diabetes in Chinese Han population from Chongqing*

Gong Lilin¹, Li Rong¹, Ren Wei¹, Wang Zengchan^{2,3}, Bai Xiaosu^{1,4},
Zhang Wenyu^{1,5}, Wang Zhihong¹, Yang Maosheng^{2,6}, Zhang Suhua¹

(1. Department of Endocrinology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China;
2. Laboratory of Disorders Genes, College of Public Health and Management, Chongqing Medical University,
Chongqing 400016, China; 3. Key Laboratory of Molecular Biology for Infectious Diseases of Ministry of Education,
Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 4. Department of Endocrinology, People's Hospital of Longhua New
District, Shenzhen, Guangdong 518000, China; 5. Department of Endocrinology, Zhengzhou
Municipal People's Hospital, Zhengzhou, Henan 450003, China; 6. Laboratory of Disorders Genes and
Department of Pharmacology, Medicine School of Jishou University, Jishou, Hunan 416000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the correlation between the polymorphisms of forkhead box O1 (FOXO1) gene and type 2 diabetes (T2DM) in Chinese Han people from Chongqing. **Methods** (1) Among 105 unrelated Chinese Chongqing Han people, the PCR-RFLP and gene sequencing method were adopted to conducting the screening of 15 SNPs at FOXO1 gene coding region and non-coding region, linkage disequilibrium (LD) analysis and haplotype construction. (2) Seven hundreds and four Han people in Chongqing area (414 cases of T2DM and 290 healthy people) were performed the case control study. Five SNPs at the same haplotype block were performed the genotype identification. The association between SNPs and haplotype with T2DM was analyzed. **Results** (1) Twelve SNPs were screened out; the polymorphism phenomenon of Thr488Asn in exon was not found in this population. The LD analysis suggested that rs17592236, rs9577066, rs7986407, rs4581585 and rs4325426 belonged to the same haplotype block ($D' > 0.7$). (2) rs7986407 and rs4581585 were associated with T2DM onset. The risk of T2DM in the subjects with AA genotype of rs7986407 was 1.42 times of those with GG genotype (additive mode $OR = 1.420, 95\%CI: 0.783 - 2.577, P = 0.01$). And the subjects with CC genotype of rs4581585 had the 2.57 times risk suffering from T2DM of those with TT genotype ($OR = 2.571, 95\%CI: 1.404 - 4.695, P = 0.002$). However, there was no statistically significant difference of age, body mass index, plasma glucose, lipid profile, serum insulin, Homa-IR and Homa- β between different genotypes ($P > 0.05$). **Conclusion** FOXO1 gene may be the susceptibility gene of T2DM in Chinese Han population from Chongqing.

[Key words] type 2 diabetes mellitus; forkhead box O1; single nuclear polymorphism; association analysis

* 基金项目: 国家临床重点专科建设项目([2011]170); 重庆市卫生局中医药科技课题(2010-2-134)。 作者简介: 龚莉琳(1979-), 博士, 主治医师, 主要从事 2 型糖尿病分子遗传学研究。

2 型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)是严重危害人类健康的常见病和多发病,它属于多基因遗传病,有明显的遗传易感性。寻找 T2DM 易感基因有助于尽早发现易感人群,积极干预可延缓或防止 T2DM 的发生^[1]。

胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)和胰岛 β 细胞功能障碍是 T2DM 的两大发病机制。研究表明叉头转录因子 O1 (forkhead box O1, FOXO1)与 T2DM 的两大发病机制密切相关:(1)细胞水平实验发现,FOXO1 活化后可通过调节靶基因的转录,使肝脏糖原生增加、肝糖输出增多,脂肪细胞分化成熟障碍,肌肉细胞脂质沉积,导致 IR;同时还使胰岛 β 细胞增殖减少、对 IR 的代偿能力下降,导致 β 细胞功能障碍^[2-4]。(2)动物研究显示,IR 或 β 细胞功能紊乱小鼠模型(InsR +/− 或 IRS2 +/− 小鼠)若同时杂合敲除 FOXO1,可改善胰岛素敏感性和 β 细胞功能,防止糖尿病发生;而 FOXO1 表达增加的小鼠表现为空腹血糖升高,IR 和 β 细胞功能障碍^[4-5]。由此可见,FOXO1 同时参与 T2DM 两大发病机制,其基因变异可能影响 T2DM 易感风险。

既往 FOXO1 基因多态性与 T2DM 相关性的研究不多,结果不一致^[6-8]。其原因可能与种族差异及单核苷酸多态性(single-nucleotide polymorphisms, SNPs)位点的选择方式有关。因此,本研究首先选取 FOXO1 基因启动子、外显子、内含子及 3′-非编码区的 15 个 SNPs 在中国重庆汉族人中进行筛查,连锁不平衡(linkage disequilibrium, LD)分析,构建单倍型;再选择位于同一单倍域的 5 个 SNPs 进行病例对照研究,分析 FOXO1 基因 SNPs 及其单倍型与中国重庆汉族人 T2DM 的关联。

1 资料与方法

1.1 研究对象 收集无血缘关系的中国重庆汉族人共 704 名(414 名 T2DM 患者,290 名健康对照)用于病例对照研究。从

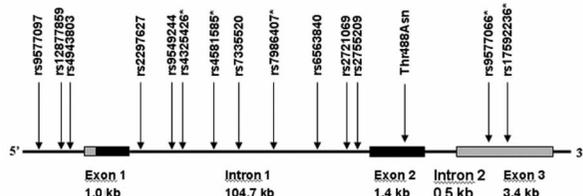
中选取 105 例(57 名 T2DM 患者,48 名健康人)进行 FOXO1 基因 SNPs 筛查,糖尿病诊断采用 1999 年 WHO 标准。

1.2 方法

1.2.1 病史询问和生化指标测定 研究方案经重庆医科大学附属第一医院伦理委员会批准,受试者签署书面知情同意书。按统一表格进行病史询问,测量人体学指标和血压。研究对象行 75 g 口服葡萄糖耐量试验(oral glucose tolerance test, OGTT),留取空腹和服糖后 2 h 血样用于提取基因组 DNA 及生化指标测定。采用葡萄糖氧化酶法测定血糖,放射免疫法测定胰岛素,自动生化分析仪检测血脂。

1.2.2 SNPs 位点选择 根据 NCBI 公共 SNP 数据库,选择 FOXO1 基因外显子错义突变以及启动子、内含子和 3′-非编码区杂合度高(杂合度大于 0.1)的 SNPs 共 15 个。SNPs 位点分布见图 1。

1.2.3 SNPs 基因型鉴定 采用酚-氯仿法提取基因组 DNA,根据 SNP 数据库或相关文献,设计合成引物。采用聚合酶链反应-限制性酶切长度多态性分析(polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)法对 SNPs 基因型进行鉴定。每种酶切基因型选取 1 个 PCR 产物进行基因测序。各个 SNPs 位点的 PCR 引物、反应条件及限制性内切酶等见表 1。



Exon:外显子;Intron:内含子;* :构建单倍型的 SNPs 位点。

图 1 FOXO1 基因 SNPs 筛查位点分布示意图

表 1 PCR 引物、反应条件和限制性内切酶

| SNPs | PCR 引物 | PCR 退火温度(℃) | PCR 产物(bp) | 限制性内切酶 | 限制性内切酶片段长度(bp) |
|------------|--|-------------|------------|--------|----------------|
| rs9577097 | 5′-AAGTCTGTAGGAAGACTCCTTTA-3′ 5′-ACCTTTCCAATTACTCTGC-3′ | 55.5 | 175 | Mbo II | 175,117,58,16 |
| rs12877859 | 5′-GGAAGATGGACAGTAGGGTTT 3 5′-CATGCCCTAGTATCAGCAAGAA-3′ | 55.5 | 323 | Ssp I | 323,240,83 |
| rs4943803 | 5′-GGGAGATAGGACCAAAGCC-3′ 5′-CTTGTAAGAAAGAAAGGGAT-3′ | 49.0 | 372 | Dra I | 372,310,62 |
| rs2297627 | 5′-CTATACAAAAATGGATGAAAAGAAAA-3′ 5′-CTTTATTCATTAGCATCCCAGTTTACTGTA-3′ | 56.5 | 163 | Csp6 I | 163,133,30 |
| rs9549244 | 5′-GGGGAGCCAAGTAGGCAAAGC-3′ 5′-GACCAATCAAACCGGAATT-3′ | 56.5 | 315 | Msp I | 315,209,106,15 |
| rs4325426 | 5′-TGCTAGGATATGTAGCAGATGCAACCAGGC-3′ 5′-TGGTGACAGGCATGAGAG ATACCTTTTGG-3′ | 61.0 | 170 | BsuR I | 170,140,30 |
| rs4581585 | 5′-TTTGAGCATCATGTTGCCACTCAAGAAGTT-3′ 5′-CGAAGCCACAACCCACT GAGCATTT3′ | 62.5 | 151 | Dra I | 151,125,26 |
| rs7335520 | 5′-GTGCAAACAATTCTTTGGATT-3′ | | | | |

续表 1 PCR 引物、反应条件和限制性内切酶

| SNPs | PCR 引物 | PCR 退火 温度(°C) | PCR 产物 (bp) | 限制性 内切酶 | 限制性内切酶 片段长度(bp) |
|------------|--------------------------------|------------------|----------------|------------|--------------------|
| rs7986407 | 5'-TAAAGGTTTTTGTTCATTG-3' | 54.0 | 136 | Ssp I | 136、110、26、25 |
| | 5'-CTACTCGATAGCTCCCTACTCT-3' | | | | |
| rs6563840 | 5'-ACGTAAGTCTGGCAACTGACT-3' | 54.0 | 325 | Hin6 I | 325、223、102 |
| | 5'-TGCTGTTTGATAGCATTCTACT-3' | | | | |
| rs2721069 | 5'-AGATGCAGATGTGGTGAAC-3' | 54.0 | 299 | Taa I | 299、195、104 |
| | 5'-CTCAGGCTTATTTCCAATGTC-3' | | | | |
| rs2755209 | 5'-ATAGGTCACCTCAAAACCGA-3' | 59.0 | 144 | Dde I | 144、116、28、2 |
| | 5'-CGAGACACGCTGTGAGGAG-3' | | | | |
| Thr488Asn | 5'-ACAAGGCTGTGGCTCTGTG-3' | 57.0 | 168 | Mly I | 168、130、38 |
| | 5'-CTGAGCATGTCCAGGTTGGTATGG-3' | | | | |
| rs9577066 | 5'-AGTTGATCCTGGGTAGCCAGTCA-3' | 64.5 | 151 | Sal I | 151、125、26 |
| | 5'-GTACGCATAGTTCAGTAGAAG-3' | | | | |
| rs17592236 | 5'-TATACATGCTTAAGTGGTTG-3' | 56.5 | 229 | Mva I | 229、121、108 |
| | 5'-GGGAGAATGAGATGAAGTAT-3' | | | | |
| | 5'-GACCTCTGTAGTCTGGGAG-3' | 49.0 | 238 | Eco47 I | 238、164、74 |

1.3 统计学处理 利用 SPSS 11.5 进行统计分析,计数资料用率(%)表示,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。等位基因、基因型及单倍型频率的比较采用 χ^2 检验。SNPs 位点基因型患 T2DM 的相对风险度用非条件 Logistic 回归分析,并以比值比(odds ratio, OR)及 95%可信区间(confidence interval, CI)表示,计算相对风险 OR 时校正年龄和性别。计量资料两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用方差分析。

2 结果

2.1 FOXO1 基因 SNPs 位点筛查及单倍型构建

2.1.1 FOXO1 基因 SNPs 筛查 共筛查到 12 个 SNPs,启动子 1 个(rs9577097), 3'-非编码区 2 个(rs9577066、rs17592236), 内含子 9 个(rs2297627、rs9549244、rs4325426、rs4581585、rs7335520、rs7986407、rs6563840、rs2721069、rs2755209)。SNP 数据库中报道位于启动子的 rs4943803、rs12877859 和外显子 Thr488Asn 在本人群中未发现多态现象。进一步在 259 个样本中(146 名 T2DM 患者,113 名健康人)对外显子 Thr488Asn 进行筛查,仍未发现多态现象。

2.1.2 LD 分析和单倍型构建 12 个 SNPs 基因型分布均符合 Hardy-Weinberg 平衡($P > 0.05$)。LD 分析显示绝大多数位点间 $D' > 0.7$,提示 FOXO1 基因内存在 LD,可构建单倍型。rs9577066 与 rs9577097、rs7986407 与 rs9549244 及 rs7986407 与 rs2297627 之间 $r^2 = 1$,提示两两间完全关联,可相互指示。于是进一步选取 3'-非编码区 rs17592236、rs9577066 和内含子 rs7986407、rs4581585、rs4325426 共 5 个 SNPs,对所有研究对象(704 人)进行基因型鉴定。再次 LD 分析提示 5 个 SNPs 位于同一单倍域(表 2)。共可构成 21 种单倍型,其中 H1、H3、H6 和 H16 常见,频率分别为 4.2%、29.9%、21.1%和 31.4%,共可解释 86.6%的单倍型。

2.2 FOXO1 基因与 T2DM 的关联分析

2.2.1 研究对象一般情况 对上述位于同一单倍域的 5 个

SNPs 进行病例对照研究,研究人群临床资料见表 3。校正年龄和体质指数(body mass index, BMI)后,与健康对照组比较,T2DM 组的血糖、血压、三酰甘油、低密度脂蛋白和胰岛素水平明显增高($P < 0.01$),且具有胰岛素抵抗和 β 细胞功能减退。

表 2 FOXO1 基因 5 个 SNPs 的 LD 分析(D')

| r^2 | rs17592236 | rs9577066 | rs7986407 | rs4581585 | rs4325426 |
|------------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| rs17592236 | — | 1.000 0 | 0.889 8 | 0.702 7 | 0.851 4 |
| rs9577066 | 0.010 4 | — | 0.701 0 | 0.834 5 | 0.763 9 |
| rs7986407 | 0.162 4 | 0.025 0 | — | 0.850 0 | 0.904 9 |
| rs4581585 | 0.143 5 | 0.025 0 | 0.509 9 | — | 0.796 3 |
| rs4325426 | 0.179 3 | 0.024 6 | 0.678 8 | 0.539 8 | — |

表 3 研究对象的一般资料比较

| 项目 | 健康对照 | T2DM |
|-------------------------|--------------|---------------|
| n(男/女) | 290(174/116) | 414(223/191) |
| 年龄(岁) | 50.27±10.30 | 55.11±12.10* |
| BMI(kg/m ²) | 23.37±2.88 | 24.84±3.23* |
| 腰臀比 | 0.85±0.07 | 0.91±0.07* |
| 腰围(cm) | 79.88±9.55 | 85.57±9.24* |
| 收缩压(mm Hg) | 122.94±17.85 | 128.06±20.06* |
| 舒张压(mm Hg) | 76.51±9.60 | 77.21±11.42 |
| 三酰甘油(mmol/L) | 1.52±0.95 | 2.10±1.62* |
| 总胆固醇(mmol/L) | 4.87±0.91 | 4.82±1.03 |
| 高密度脂蛋白(mmol/L) | 1.34±0.33 | 1.24±0.35* |
| 低密度脂蛋白(mmol/L) | 2.85±0.81 | 2.57±0.87* |
| 空腹血糖(mmol/L) | 4.92±0.41 | 8.63±3.55* |
| 服糖后 2 h 血糖(mmol/L) | 5.81±1.03 | 18.07±6.73* |

续表 3 研究对象的一般资料比较

| 项目 | 健康对照 | T2DM |
|-------------------|--------------|----------------|
| 空腹胰岛素(mU/L) | 10.85±5.14 | 14.15±10.32* |
| 服糖后 2 h 胰岛素(mU/L) | 46.38±28.51 | 50.43±40.69 |
| Homa-IR | 2.41±1.21 | 5.21±4.21* |
| Homa-β | 161.03±90.36 | 101.80±252.42* |

*: $P < 0.01$, 与健康对照组比较。稳态模型胰岛素抵抗指数(Homa-IR) = [空腹血糖(FPG) × 空腹胰岛素(FINS)] / 22.5; 胰岛 β 细胞功能评估: $Homa-β = 20 \times FINS / (FPG - 3.5)$ 。

2.2.2 FOXO1 基因 SNPs 与 T2DM 的关联 rs17592236、rs9577066、rs7986407、rs4581585 和 rs4325426 位点的少见等位基因分别为 T、A、A、C 和 C, 频率分别为 37.3%、1.4%、28.3%、34.2% 和 27.6%。T2DM 患者 rs7986407 位点的 A 等位基因频率明显高于健康人(31.2% vs. 24.2%, $\chi^2 = 7.798$,

$P = 0.005$)。其余位点等位基因频率在两组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。rs7986407 和 rs4581585 基因型分布在两组差异有统计学意义。T2DM 组 rs7986407 位点 AA 基因型频率(12.0% vs. 7.4%, $\chi^2 = 7.070, P = 0.029$)、rs4581585 位点 CC 基因型频率(14.1% vs. 6.5%, $\chi^2 = 9.679, P = 0.008$)均明显高于对照组。其余位点基因型分布在两组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。非条件 Logistic 回归分析显示 rs7986407、rs4581585 与 T2DM 显著相关(表 4)。rs7986407 位点 AG 或 AA 基因型个体对 T2DM 的易感性明显增加, AA 基因型个体的患病风险是 GG 基因型的 1.42 倍。rs4581585 位点 CT 或 CC 基因型个体对 T2DM 的易感性显著增加, CC 基因型个体的患病风险是 TT 基因型的 2.57 倍。其余位点与 T2DM 无关联($P > 0.05$)。

表 4 FOXO1 基因 SNPs 与 T2DM 的关联分析

| SNPs | 基因型 | 健康对照 [n=290, n(%)] | T2DM [n=414, n(%)] | 共显性模式 | | 显性模式 | | 隐性模式 | |
|------------|-----|-----------------------|-----------------------|--------------------|-------|--------------------|-------|--------------------|-------|
| | | | | OR(95%CI) | P | OR(95%CI) | P | OR(95%CI) | P |
| rs17592236 | TT | 39(14.9) | 59(15.1) | | | | | | |
| | CT | 121(46.2) | 170(43.5) | 1.088(0.676~1.759) | 0.729 | 1.085(0.654~1.600) | 0.922 | 0.896(0.647~1.241) | 0.508 |
| | CC | 102(38.9) | 162(41.4) | | | | | | |
| rs9577066 | AA | 0 | 0 | — | — | — | — | 0.811(0.312~2.110) | 0.668 |
| | AC | 8(3.1) | 10(2.7) | | | | | | |
| | CC | 252(96.9) | 364(97.3) | | | | | | |
| rs7986407 | AA | 20(7.4) | 47(12.0) | | | | | | |
| | AG | 91(33.6) | 150(38.4) | 1.420(0.783~2.577) | 0.011 | 1.789(1.024~3.125) | 0.041 | 1.585(1.149~2.188) | 0.005 |
| | GG | 160(59.0) | 194(49.6) | | | | | | |
| rs4581585 | CC | 17(6.5) | 51(14.1) | | | | | | |
| | CT | 132(50.6) | 157(43.5) | 2.571(1.404~4.695) | 0.002 | 2.457(1.374~4.405) | 0.002 | 1.071(0.770~1.488) | 0.686 |
| | TT | 112(42.9) | 153(42.4) | | | | | | |
| rs4325426 | CC | 16(6.2) | 25(6.7) | | | | | | |
| | AC | 121(46.5) | 147(39.2) | 1.272(0.642~2.519) | 0.491 | 1.075(0.556~2.083) | 0.828 | 0.758(0.549~1.046) | 0.092 |
| | AA | 123(47.3) | 203(54.1) | | | | | | |

2.2.3 FOXO1 基因单倍型与 T2DM 关联 分析 4 个常见单倍型 H1、H3、H6、H16 与 T2DM 的关联(表 5)。T2DM 组 H6 单倍型频率显著高于对照组($P < 0.05$), 其余 3 个单倍型与 T2DM 无关联($P > 0.05$)。

表 5 FOXO1 基因常见单倍型与 T2DM 的关联分析[n/n(%)]

| 单位型 | 健康对照 | T2DM | χ^2 | P |
|-----|---------------|---------------|----------|-------|
| H1 | 21/452(4.6) | 39/628(6.2) | 1.226 | 0.268 |
| H3 | 128/452(28.3) | 175/628(27.9) | 0.027 | 0.870 |
| H6 | 82/452(18.1) | 146/628(23.2) | 4.116 | 0.042 |
| H16 | 153/452(33.8) | 198/628(31.5) | 0.645 | 0.422 |

2.2.4 FOXO1 基因 SNPs 不同基因型间临床指标比较 健

康对照组和 T2DM 组, 年龄、BMI、血压、血脂、血糖、胰岛素水平、Homa-IR 和 Homa-β 等临床指标在 rs7986407 和 rs4581585 位点的不同基因型间差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

3 讨 论

本研究在 105 名中国重庆汉族人中, 对 SNP 库中报道的 FOXO1 基因编码区和非编码区 15 个 SNPs 进行筛查。结果在启动子、3'-非编码区和内含子共发现了 12 个 SNPs。而位于启动子的 rs4943803、rs12877859 和外显子 Thr488Asn 未发现多态现象。尽管扩大样本量, 共对 364 名受试者进行了 Thr488Asn 位点筛查, 仍未发现多态现象。提示中国重庆汉族人 rs4943803、rs12877859 和 Thr488Asn 位点不存在多态性。

LD 分析提示 FOXO1 基因 12 个 SNPs 存在 LD, 可能位于同一单倍型域内。rs9577066 与 rs9577097 间、rs7986407、

rs9549244 与 rs2297627 间完全关联,可以相互指示。因此,本研究从中选取 rs9577066 和 rs7986407,还同时选取了位于对基因表达可能有调控作用的 3'-非编码区^[9]的 rs17592236 及位于内含子的 rs4581585 和 rs4325426 共 5 个 SNPs,在大样本中构建单倍型并进行关联分析。

5 个 SNPs 两两间呈高度 LD,可构成 21 个单倍型。比较 4 个常见单倍型在健康对照组和 T2DM 组的分布频率,可见 T2DM 组 H6 单倍型频率显著高于对照组,提示 FOXO1 基因 H6 单倍型与 T2DM 相关。

5 个 SNPs 与 T2DM 的关联分析结果显示,T2DM 患者 rs7986407 的 A 等位基因频率和 AA 基因型频率、rs4581585 的 CC 基因型频率均明显高于健康人,提示 rs7986407 位点 AA 或 rs4581585 位点 CC 基因型者可能易感 T2DM。进一步非条件 Logistic 回归分析也表明 rs7986407 位点 AA 基因型和 rs4581585 位点 CC 基因型个体 T2DM 患病风险显著增加。提示 FOXO1 基因变异与中国重庆汉族人群 T2DM 相关。既往在高加索人和非裔美国人中未发现 FOXO1 基因变异与 T2DM 相关^[6],而在德国和芬兰人中的研究提示该基因变异与 T2DM 患病风险增加有关^[7]。这些研究结论的不一致可能与入种差异有关。然而,Li 等^[8]研究提示 FOXO1 基因多态性与中国汉族人 T2DM 不相关。本研究所选择基本覆盖整个 FOXO1 基因的 SNPs 中,除 rs17592236 外,其余 SNPs 与 Li 等^[8]所选不同,所得结论不一致可能与 SNPs 的选择有关。此外,本研究人群与 Li 等^[8]的研究对象来自中国不同地域,且样本量都较小,也可能是造成彼此结论不一致的原因。因此,FOXO1 基因变异与中国汉族人 T2DM 的关系尚需进一步多中心、大样本的研究来验证。

本研究提示 FOXO1 基因 SNPs 与 T2DM 患病相关,然而,这些基因变异是否可引起其功能改变从而导致 T2DM 呢?通常导致疾病的是外显子或启动子 SNPs 变异,它们可通过改变蛋白的表达和结构进而影响其功能,导致疾病发生^[10]。由于本课题未在研究人群中筛查到 FOXO1 基因外显子 Thr488Asn 多态性,故未对其外显子进行研究。而本结果提示与 T2DM 阳性关联的 2 个 SNPs 位于内含子的中间区域。目前认为内含子也可自我剪切及调控基因表达,位于中间区域的变异可通过激活隐性剪切位点影响 mRNA 剪切而导致疾病^[11]。因此,推测 rs7986407 和 rs4581585 可能通过激活隐性剪切位点,使 FOXO1 基因剪切发生改变,从而影响其功能。但这尚需进一步功能基因组学研究来证实。

尽管基础研究表明 FOXO1 可能通过参与胰岛素抵抗和 β 细胞功能减退从而促使 T2DM 发生。但本研究分别在 T2DM 阳性关联位点 rs7986407 和 rs4581585 的不同基因型间,对年龄、BMI、血压、血脂、血糖、胰岛素水平、Homa-IR 和 Homa- β 等临床指标进行比较,结果未找到 FOXO1 基因与胰岛素抵抗或 β 细胞功能减退相关联的证据。

综上所述,本研究表明 FOXO1 基因 rs7986407、rs4581585 位点基因型分布和 H6 单倍型频率,在中国重庆汉族健康人和

T2DM 患者中存在明显差异;FX1A+60936 位点 AA 基因型和 FX1A+36829 位点 CC 基因型可能增加 T2DM 患病风险。提示 FOXO1 基因与中国重庆汉族人 T2DM 相关,可能是其易感基因。

参考文献

- [1] Brunetti A,Chiefari E,Foti D. Recent advances in the molecular genetics of type 2 diabetes mellitus[J]. World J Diabetes,2014,5(2):128-140.
- [2] Haeusler RA,Hartil K,Vaitheesvaran B,et al. Integrated control of hepatic lipogenesis versus glucose production requires FoxO transcription factors[J]. Nat Commun,2014(5):5190.
- [3] Kitamura T. The role of FOXO1 in beta-cell failure and type 2 diabetes mellitus[J]. Nat Rev Endocrinol,2013,9(10):615-623.
- [4] Nakae J,Biggs WH,Kitamura T,et al. Regulation of insulin action and pancreatic beta-cell function by mutated alleles of the gene encoding forkhead transcription factor Foxo1[J]. Nat Genet,2002,32(2):245-253.
- [5] Kitamura T,Nakae J,Kitamura Y,et al. The forkhead transcription factor FoxO1 links insulin signaling to Pdx1 regulation of pancreatic beta cell growth[J]. J Clin Invest,2002,110(12):1839-1847.
- [6] Karim M,Craig RL,Wang X,et al. Analysis of FOXO1A as a candidate gene for type 2 diabetes[J]. Mol Genet Metab,2006,88(2):171-177.
- [7] Mussig K,Staiger H,Machicao F,et al. Association of common genetic variation in the FOXO1 gene with beta-Cell dysfunction,impaired glucose tolerance,and type 2 diabetes[J]. J Clin Endocrinol Meta,2009,94(4):1353-1360.
- [8] Li TJ,Wu XP,Zhu XL,et al. Association analyses between the genetic polymorphisms of HNF4A and FOXO1 genes and Chinese Han patients with type 2 diabetes[J]. Mol Cell Biochem,2011,353(1/2):259-265.
- [9] Newbury SF. Control of mRNA stability in eukaryotes[J]. Biochem Soc Trans,2006,34(1):30-34.
- [10] Brunham LR,Hayden MR. Hunting human disease genes:lessons from the past,challenges for the future[J]. Hum Genet,2013,132(6):603-617.
- [11] Jian XE,Boerwinkle E,Liu XM. In silico tools for splicing defect prediction;a survey from the viewpoint of end users[J]. Gene Med,2014,16(7):497-503.

(收稿日期:2016-03-13 修回日期:2016-04-27)