

基于人2型糖尿病易感 SNP 位点筛查 食蟹猴2型糖尿病易感 SNP 标记

柳明玉, 孙 飞, 蒙裕欢, 田 帅, 陈军辉, 杜红丽

(华南理工大学生物科学与工程学院, 广州 510006)

【摘要】 目的 2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)及其并发症的迅速蔓延已经成为严重威胁人类健康的世界性难题。食蟹猴 T2DM 模型可以模拟人类 T2DM 发病进程,这对 T2DM 的预防,治疗和新药开发具有重要意义。本研究以 37 个与人密切关联的 T2DM 易感位点为基础,探讨对应食蟹猴同源区域的这些位点与 83 个食蟹猴个体之间的关联性。方法 先采用 DNA 池法初筛,然后对食蟹猴个体进行直接聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增测序,并利用 DNASTar 软件分析碱基之间的差异性,最后采用方差分析和 F 检验计算等位基因间的频率,并采用 SAS 的 GLM 模型进行基因型与空腹血糖值和糖化血红蛋白值之间的关联分析。结果 在自发性 T2DM 组和对照组中,单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNP)位点 SNPmf-66A、SNPmf-66B、SNPmf-34A、SNPmf-34B、SNPmf-34C、SNPmf-56A、SNPmf-56B 和 SNPmf-56C 的等位基因频率存在差异显著性($P < 0.05$),同时 SNPmf-66A、SNPmf-66B、SNPmf-34A、SNPmf-34B 和 SNPmf-34C 与空腹血糖之间也存在显著性关联性($P < 0.05$)。结论 SNPmf-66A、SNPmf-66B、SNPmf-34A、SNPmf-34B、SNPmf-34C 可能对食蟹猴 T2DM 动物模型构建具有重要意义。

【关键词】 2型糖尿病;食蟹猴;易感基因位点;模型;动物

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014) 10-0018-09

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2014.010.004

Screening of genetic markers based on human type 2 diabetes mellitus (T2DM) susceptibility loci in a *Cynomolgus* T2DM model

LIU Ming-yu, SUN Fei, MENG Yu-huan, TIAN Shuai, CHEN Jun-hui, DU Hong-li

(School of Bioscience & Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

【Abstract】 Objective Type 2 diabetes mellitus (T2DM) as a common disease around the world becomes a great threat to the health of human beings. The *cynomolgus* T2DM model, which preferably simulates human T2DM onset and progress, can be beneficial to the drug development and clinical treatment. In the present study, 37 of T2DM-susceptibility SNPs and the extended genome sequences were used to obtain corresponding SNPs in the T2DM *cynomolgus* monkeys. **Methods** Firstly, DNA pool screening was conducted. Then, using polymerase chain reaction to amplify and to sequence the *cynomolgus* homologous sequences. Using DNASTar software to analyze the differences between bases. Finally, we used analysis of variance and *F* test to calculate the frequency of alleles. We also used the GLM models of SAS software to analyze the association of genotype with fasting plasma glucose and glycosylated hemoglobin. **Results** SNP661A,

【基金项目】 国家自然科学基金(编号:31340045);国家科技支撑项目(编号:2014BAI03B01);广州市科学技术计划项目(编号:2012B060300006);华工-华大创新基金(编号:SW20130802)。

【作者简介】 柳明玉(1988-),女,硕士研究生,专业方向:生物化学与分子生物学。E-mail: 13798020438@163.com。

【通讯作者】 杜红丽(1975-),女,博士,研究方向:遗传与功能基因组学。E-mail: hldu@scut.edu.cn。

SNP661B, SNP343A, SNP343B, SNP343C, SNP565A, SNP565B and SNP565C were found to have a significant difference of allele frequencies between spontaneous cases and controls. **Conclusions** The findings of this study suggest that SNP661A, SNP661B, SNP343A, SNP343B and SNP343C may play an important role in the establishment of *cynomolgus* T2DM models.

【Key words】 Type 2 diabetes mellitus; *Cynomolgus*; Susceptibility Loci; Model, animal

2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 是人类最常见的内分泌紊乱性疾病,由遗传和环境因素综合作用的结果,以胰岛素抵抗和胰岛 β 细胞功能衰竭为主要特征,其发病机制至今尚未完全阐明^[1]。在过去的二十年里,T2DM 的人数正在迅速增加,其发病率接近 6%^[2]。随着人口老龄化及肥胖人数的增多,到 2025 年,全球 T2DM 患者人数将增至 3 亿^[3]。T2DM 迅速成为 21 世纪全球性最大的健康问题之一,同时这一疾病也引起了与其相关的并发症的迅速蔓延,如缺血性心脏疾病、中风、神经病变、视网膜病变、肾病变等^[4]。近年来,随着候选基因技术的不断完善,尤其是全基因组相关性分析 (GWAS) 及 SNP 技术的发展,已鉴定出多种糖尿病易感基因及与 T2DM 密切相关的 SNP 位点^[5-15],这些位点的鉴定为揭示 T2DM 的发病机制提供大量信息,以便更好的预防,诊断和治疗该疾病^[16]。但由于缺少理想 T2DM 的动物模型,该病的分子机制仍未被完全阐明。因此,构建与人类 T2DM 发病进程相似的 T2DM 动物模型对于新药开发、发病机理的研究具有极大的应用价值^[16]。食蟹猴的遗传背景与人的高度相似,其 T2DM 模型能较好地模拟人 T2DM 发病进程,但自发性的食蟹猴 T2DM 发病比率很低^[17],远远不能满足研究需求。因此,本研究以人 37 个 T2DM 易感 SNP 位点为基础,分析食蟹猴对应基因组区域 SNP 与食蟹猴 T2DM 的关联性,以筛查食蟹猴 T2DM 易感 SNP 标记,筛出的这些标记可能对于食蟹猴 T2DM 模型的构建具有重要的意义。

1 材料和方法

1.1 血液样品

83 只食蟹猴血样分别由广东蓝岛生物科技有限公司(中国广东),广东高要市康达实验动物科技有限公司(中国广东)和云南金杰康生物科技有限公司(中国云南)提供。所有食蟹猴样本(许可证号 SCXK(粤)2014-0010)在直系三代内均无亲缘关系,并单独饲养于 70 cm × 70 cm × 80 cm 大小的笼内,环境温度为 25°C 左右,相对空气湿度为 50% ~

80%,每天 12 h 光照,12 h 黑暗。每只食蟹猴喂食苹果 100 g/d(饲料研究所,广东省广州市),每天两次,并允许自由饮水。从上述三个公司采集的样品数目分别为 83(包括 35 个自发和 48 个诱导个体)。所有样品被分为 4 个大组(两个自发组和两个诱导组),根据空腹血糖和糖化血红蛋白值,每个大组分为 T2DM 组和对照组(正常的个体),其中同时满足空腹血糖 ≥ 108 mg/dL 和糖化血红蛋白 $\geq 6\%$ 定义为 T2DM 个体,同时满足空腹血糖 ≤ 90 mg/dL 和糖化血红蛋白 $\leq 5\%$ 定义为正常个体。所有实验食蟹猴样本均获得隶属广东蓝岛生物科技有限公司的机构动物管理及使用委员会审批,并受到该机构的监督。

1.2 实验仪器与试剂

1.2.1 实验仪器:基因扩增仪:Bio-Rad Tetrad 2;紫外可见光成像系统:美国 UVP 公司 3UV Transilluminator;凝胶成像系统:Bio-Rad;恒温水浴锅:宏华仪器 HH-4

1.2.2 实验试剂:PCR Taq Mix,购自广州东盛生物科技有限公司;DL2000 marker,购自广州东盛生物科技有限公司;琼脂糖干粉,购自 Biowest;溴化乙锭 (EB),购自广州普博欣生物试剂公司;Proteinase K,购自宝生物工程(大连)有限公司;无水乙醇,购自天津大茂化学仪器厂;1.5 mL 离心管(RNA-free),购自广州普博欣生物试剂公司;EDTA-2K 抗凝管,购自湖南浏阳市医用器具厂;枪头(RNA-free)和一次性注射器(5 mL),均购自广州普博欣生物试剂公司。

1.3 方法

1.3.1 基因组 DNA 的提取和 DNA 池的准备:基因组 DNA 采用北京普博生物科技有限公司的试剂盒进行抽提,提取的 DNA 基因组使用分光光度计测其浓度,然后统一稀释至 10 ng/ μ L,分别取等体积等浓度的 30 个样品,组成 A 池(T2DM 的个体混合基因组)和 B 池(正常个体混合基因组)。

1.3.2 SNP 选择和序列下载:本研究分别以人类已报道的 37 个 T2DM 易感突变位点为中心,在人类基因组上下游截取 1 000 bp,并用这些序列同源比对下载食蟹猴基因组对应区域的序列(表 1)。

表 1 37 个对应食蟹猴同源序列信息表
 Tab. 1 37 corresponding orthologous sequences of the *cynomolgus* genome

Human SNP name	CE-SNP-Chr	Upstream pos	Downstream pos	Length
rs1470579	chr2	102030470	102032449	1980
rs4402960	chr2	102049000	102050986	1987
rs6769511	chr2	102029290	102031299	2010
rs849134	chr3	99202838	99204817	1980
rs864745	chr3	99218492	99220465	1974
rs972283	chr3	170875224	170877273	2050
rs1531343	chr3	94325060	94327055	1996
rs4712523	chr4	20844833	20846830	1998
rs4712524	chr4	20845143	20847130	1988
rs6931514	chr4	20893791	20895792	2002
rs7754840	chr4	20848558	20850541	1984
rs7756992	chr4	20869213	20871171	1959
rs10440833	chr4	20877696	20879713	2018
rs10946398	chr4	20848321	20850326	2006
rs4457053	chr6	73913548	73915543	1996
rs8042680	chr7	67375033	67377009	1977
rs896854	chr8	99911399	99913371	1973
rs4506565	chr9	112612963	112614982	2020
rs7901695	chr9	112610989	112612908	1920
rs7903146	chr9	112615277	112617240	1964
rs243021	chr13	59495737	59497670	1934
rs5215	ch14	54738484	54740488	2005
rs5219	ch14	54737542	54739542	2001
rs231362	ch14	2563591	2565580	1990
rs1387153	ch14	91763645	91765638	1994
rs1552224	ch14	70694887	70697179	2293
rs2237892	ch14	2754302	2756316	2015
rs2237895	ch14	2772299	2774273	1975
rs2237897	ch14	2773624	2775699	2076
rs2383208	chr15	56737112	56738827	1716
rs10811661	chr15	56735381	56737372	1992
rs10965250	chr15	56736182	56737979	1798
rs7578326	scaffold3972	55599	57621	2023
rs1111875	scaffold5482	206224	208229	2006
rs5015480	scaffold5482	208946	210920	1975
rs11634397	scaffold8196	35269	37271	2003
rs5945326	C129171422	1	2279	2279

1.3.3 PCR 扩增及测序:根据已下载的食蟹猴序列,设计 37 对引物,引物序列见表 2。引物由上海生工生物工程公司合成。以上述的 A 池和 B 池为模板,通过 PCR 扩增目的片段,PCR 产物送华大基因测序。筛选出 A 池和 B 池测序存在显著性差异 SNP 的引物,以 83 个体基因组为模板进行 PCR,扩

增 DNA 片段(表 3)。

1.3.4 基因分型和等位基因频率:以 83 个个体基因组为模板,五对引物分别进行 PCR 扩增和测序,利用 DNASTar 软件分析碱基之间的差异性,同时计算等位基因间的频率。

1.3.5 关联分析:基因频率差异采用方差分析和 F

检验^[18], 基因型与空腹血糖值和糖化血红蛋白值之间的关联分析采用 SAS 的 GLM 模型, 基因型为固定效应, 两种分析都规定 $P < 0.05$ 表示差异显著性, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

表 2 PCR 扩增引物序列
Tab. 2 Primers used for PCR amplification in the present study

No.	SNP	Primer name	Primer sequence (forward/reverse)	T _m ^a (°C)	Expected length(bp)
1	rs4402960	rs960-F,R	ATGAAACCTCAGGGGACAGA/CCAGCCTTGCAATGTAGTG	60	644
2	rs1470579	rs579-F,R ^b	GAAACCTGCTCCTCCAATGGGCCAGTGTCCCAAAT		534
3	rs6769511	rs511-F,R	GTTCTCAATGAAATGAAATGGGTC/GGGAAATCCTGGCTTCTTATC	59.5	509
4	rs4712523	rs523-F,R	GGTCACCATTCGCTAACA/GAAAGACAGTAAATCCCT	53.1	620
5	rs4712524	rs524-F,R	CAGCACCATCCTTCCCTTG/GGGCTTCTAGCGATTCTTT	56.5	674
6	rs10946398	rs398-F,R ^b	TCTTGIGCTCCTCACTATCCCTGTTCATCAGGCACTATTC		612
7	rs7754840	rs840-F,R	GGTTGTAGTGTAGTCCCTTGA/ATTACCTGCCACTCCTATCC	59	640
8	rs7756992	rs992-F,R	TGTTGCCAAGGCCAGTCTCA/CCAAGGCCACTAGGCATAAA	60.2	674
9	rs10440833	rs833-F,R ^b	GACTGTAGGCACTACCAACATGCCACATACCAATCAA		630
10	rs6931514	rs514-F,R ^b	GGCTCACAAAATCTAAAGTAGAATGAAATCCACAGCACAG		689
11	rs864745	rs745-F,R	GATTTTACTGTCCGGTCCCC/TGTCAAGCTTTCCATGTAGG	58.8	665
12	rs849134	rs134-F,R	TTTACTTTGGACAGGCATCA/TTCTCGGATCTGAAATTACG	56.4	642
13	rs2383208	rs208-F,R	CTATTACTGGCTGGGAACT/ATTTTCTCATGGGGTGGTC	58	582
14	rs10965250	rs250-F,R	TGAGTACATAATGGACGACAAGAGTAGCCAGAATAGACAC	56.4	596
15	rs10811661	rs661-F,R	GTTCTACCAATCTTCAGCCACC/ACCGCCACGCCACCTATTT	62.7	563
16	rs1111875	rs875-F,R	TGACACTATTTGGGATGGTGCATAAAATCCCTGGTC	53	531
17	rs5015480	rs480-F,R	TAAACTTCAGTGGCTATGTG/CCAGGATGGAAAATGAGGAGA	58	649
18	rs7901695	rs695-F,R	TGCAGTCATCCACGTCACT/ACCCAGCAACTTCACTCATA	59	421
19	rs4506565	rs565-F,R	AATTTCCAGTGAAGTGTAGGG/GTGGCTTCCATCAAAGGTC	56.5	650
20	rs7903146	rs146-F,R	TGCTTAGTCACTTTCTGTT/GAGCCTCAAATCCATCCA	54	694
21	rs2237892	rs892-F,R	CGTCCCAGATACGGCTAA/CTGTCTCCTGGCAGTTGTG	59	486
22	rs2237895	rs895-F,R	TGCTGGGAGGACCCTGGAA/CACCCGCCTTGAATCTGG	60.2	530
23	rs2237897	rs897-F,R	GGCAGGTGAGACAGGGATAGGGGCTGGTGTGCTGTCT	52	694
24	rs5215	rs5215-F,R	CCTTGTAACACCCTGGATGAGC/CATTGATGCCAACAGCCCA	62	529
25	rs5219	rs5219-F,R ^b	ETCAGCAGTGCCTCGTTGCCTCAGCCTCCCAAAGTA		585
26	rs243021	rs021-F,R	ACATTACCCAAGTGTAGTCCA/AGGCATTGATGAGTAGGAG	58	630
27	rs4457053	rs0534-F,R	AGGTTTACTTCTACTTGTCT/GATTTGTATGGTGGGACT	56.5	685
28	rs972283	rs283-F,R	TGAAAGCAGTCTGAAGGGAT/AATAAAGGCACTGACAAGCA	57.7	699
29	rs896854	rs854-F,R	CGAGTAGGTAGGACCAAGG/TAGGAATCAGCAGATAAACC	56.5	633
30	rs231362	rs362-F,R	GAATGCTCTTGCACTCT/GAAAGAAGAAACCCCATC	55	568
31	rs1552224	rs224-F,R	GCCCTATCAGGAAACTTCAA/GAGAACCTTACCTCCTTTA	57.8	610
32	rs1531343	rs343-F,R	AAAGGTCTGGCTACTCTGGC/GAGAAATCCCACTCCACTACA	59	561
33	rs11634397	rs397-F,R	AGGAATCACCCGCCAAAGT/AAGCTGGCACCTCCCTCATC	57.8	609
34	rs8042680	rs680-F,R ^b	GTGGGCGTATCACTGATCCTTCTCCCAAATCAG		644
35	rs5945326	rs5326-F,R	GGCTTAGTTTGGGAGGAC/AGCTGAGCATTCTGGGTAC	57.4	537
36	rs1387153	rs1533-F,R	AGCCATACTGTAAACCT/ATGGGATTGGAGAAAGAT	57.7	640
37	rs7578326	rs8326-F,R	CATGGGATGAGGCAACAAGT/CACAAGCAATAAACAATCA	57.4	562

注: ^a退火温度^b在对照组和疾病组样本中未成功扩增出目的片段的引物序列

Note^a Annealing temperature, ^bPrimers can't amplified the expected DNA fragments between case and control individuals.

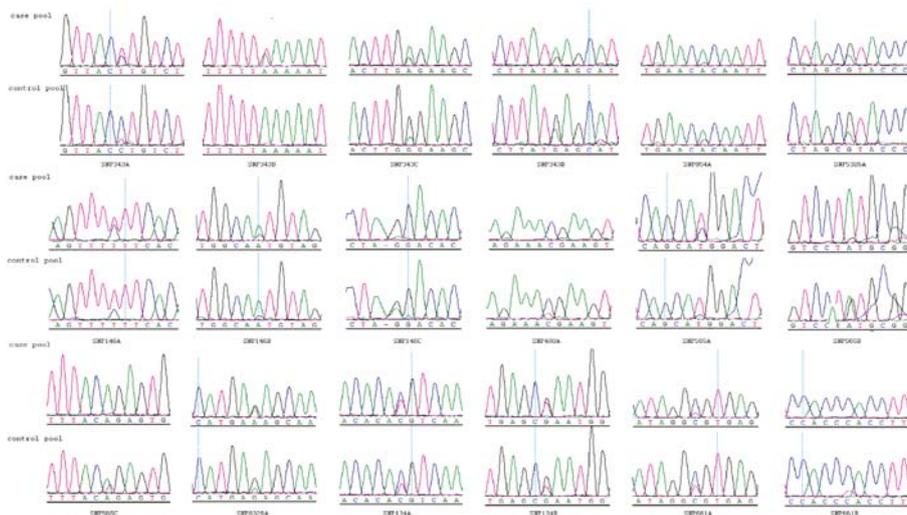
表 3 PCR 反应体系

Tab. 3 PCR reactions in a final volume of 50 μL

成分	体积 Volume	终浓度 Final concentration
ddH ₂ O	16 μL	
Perimer 1	2 μL	0.4 $\mu\text{mol/L}$
Perimer 2	2 μL	0.4 $\mu\text{mol/L}$
模板 Template	5 μL	40 ng/50 μL
Taq Mix	25 μL	2 U/50 μL
Total	50 μL	

反应条件为:94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min 预变性;94 $^{\circ}\text{C}$ 30s 变性,退火温度 57 $^{\circ}\text{C}$ 30s,72 $^{\circ}\text{C}$ 40s 延伸,35 个循环;循环结束后保持 72 $^{\circ}\text{C}$ 7 min,然后取出样品放入 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

Note. The reaction conditions: Predenaturation at 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; denaturation at 94 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; Annealing at 57 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; Elongation at 72 $^{\circ}\text{C}$, 40 s, 35 cycles; after cycling they were kept at 72 $^{\circ}\text{C}$ 7 min, and samples were taken out and kept in the refrigerator at 4 $^{\circ}\text{C}$.



A: T2DM 个体混合基因组, B: 正常个体混合基因组

图 1 两个池中位基因有明显差异的测序图

A: T2DM individual mixed genome, B: Normal individual mixed genome

Fig. 1 SNPs from the two DNA pools with obvious peak differences screened by sequencing of PCR products

2.2 基因分型和等位基因频率

每个 SNP 等位基因在 T2DM 组和对照组之间的分布差异以及与 T2DM 的关联性分析结果表明,在金杰康自发群体中,SNPmf-66A 和 SNPmf-66B 在 T2DM 组和对照组之间的等位基因频率差异显著 ($P < 0.05$),同时这两个位点的基因型与空腹血糖值之间也存在显著关联性 (type III $P < 0.05$), (表 4)。在蓝岛自发群体中,SNPmf-34A、SNPmf-34B、SNPmf-34C、SNPmf-56A、SNPmf-56B 和 SNPmf-56C 在 T2DM 组和对照组之间等位基因频率也存在差异显著性 ($P < 0.05$),其中 SNPmf-34A、SNPmf-34B、SNPmf-34C 位点的基因型与空腹血糖值之间存在极显著关联性 (type III $P < 0.01$), (表 5)。在云南金杰康和广东蓝岛所有自发群体中,SNPmf-66B、SNPmf-34A、SNPmf-34B 在 T2DM 组和对照组之间的

2 结果

2.1 PCR 和测序

本研究共设计了 37 对引物,其中有 5 对引物扩增的片段在自发的 T2DM 组和对照组中存在很大差异,见图 1。这 5 对引物分别命名为 mf-56 (3 个 SNP),mf-66 (2 个 SNP),mf-14 (3 个 SNP),mf-34 (4 个 SNP),mf-32 (1 个 SNP),采用上述 5 对引物,以 83 个个体基因组为模板,进行 PCR 扩增并测序,分析 13 个 SNP 在四个大组中的差异。

等位基因频率存在显著性差异 ($P < 0.05$),SNPmf-34A、SNPmf-34B、SNPmf-34C 位点的基因型与空腹血糖之间存在显著性关联 (type III $P < 0.05$), (表 6)。并且,这 13 个 SNP 位点与糖化血红蛋白之间无显著性关联性。此外,在诱导群体中,这 13 个 SNP 位点的等位基因频率在 T2DM 组和对照组之间均无显著性差异,且与空腹血糖和糖化血红蛋白也无显著性关联 ($P > 0.05$)。

在自发性 T2DM 群体中,我们筛查出与人的 T2DM 易感基因 rs10811661 和 rs1531343 对应的食蟹猴基因组上同源区域内有 5 个 SNP 位点即 SNPmf-66A、SNPmf-66B、SNPmf-34A、SNPmf-34B、SNPmf-34C 有可能是食蟹猴 2 型糖尿病模型制备的遗传标记。

表 4 SNP 位点等位基因频率在金杰康自发组中的分布及其基因型与空腹血糖的关联性
Tab. 4 Genotype and allele frequencies of polymorphic sites in spontaneous individuals from Jinjiekang spontaneous group, and the association between genotype and fasting blood glucose

SNP 命名	组别 (n) Groups	等位基因频率 Allele frequency		P 值 P value	基因型 (LSM ± SEM) Genotypes			P 值 P value
		A	G		AA(6)	AG(6)	GG(3)	
SNP565A	T2DM(8)	0.56	0.44	0.6540	4.62 ± 0.83	6.03 ± 0.83	3.33 ± 1.17	0.1935
	#对照(7)	0.64	0.36					
SNP565B	T2DM(8)	0.56	0.44	0.6540	4.62 ± 0.83	6.03 ± 0.83	3.33 ± 1.17	0.1935
	#对照(7)	0.64	0.36					
SNP565C	T2DM(8)	0.56	0.44	0.3890	4.62 ± 0.91	5.51 ± 0.84	3.80 ± 1.57	0.5859
	#对照(7)	0.71	0.29					
SNP661A	T2DM(8)	0	1	0.0140 *	2.70 ± 1.79	2.73 ± 1.03	5.73 ± 0.54	0.0433 *
	#对照(7)	0.36	0.64					
SNP661B	T2DM(8)	0	1	0.0140 *	2.70 ± 1.79	2.73 ± 1.03	5.73 ± 0.54	0.0433 *
	#对照(7)	0.36	0.64					
SNP146A	T2DM(8)	0.19	0.81	0.4174	2.70 ± 2.21	4.77 ± 0.90	5.33 ± 0.78	0.5374
	#对照(7)	0.36	0.64					
SNP146B	T2DM(8)	0.81	0.19	0.4174	5.33 ± 0.78	4.77 ± 0.90	2.70 ± 2.21	0.5374
	#对照(7)	0.64	0.36					
SNP146C	T2DM(8)	0.19	0.81	0.6051	0	6.25 ± 1.03	4.45 ± 0.62	0.1580
	#对照(7)	0.07	0.93					
SNP343A	T2DM(8)	0.44	0.56	0.4640	5.08 ± 1.09	4.23 ± 0.82	6.00 ± 1.09	0.4490
	#对照(7)	0.57	0.43					
SNP343B	T2DM(8)	0.5	0.5	0.2320	4.23 ± 0.90	5.65 ± 0.90	4.87 ± 1.28	0.5568
	#对照(7)	0.71	0.29					
SNP343C	T2DM(8)	0.56	0.44	0.7320	6.00 ± 1.07	4.19 ± 0.76	5.47 ± 1.24	0.3722
	#对照(7)	0.5	0.5					
SNP343D	T2DM(8)	0.56	0.44	0.7320	6.00 ± 1.07	4.19 ± 0.76	5.47 ± 1.24	0.3722
	#对照(7)	0.5	0.5					
SNP8326A	T2DM(8)	0.06	0.94	0.1571	3.20 ± 2.18	3.97 ± 1.26	5.35 ± 0.66	0.4699
	#对照(7)	0.29	0.71					

注: * P < 0.05 为差异显著

Note. * P < 0.05 is considered as a significant difference. # Control (7).

表 5 SNP 位点等位基因频率在蓝岛自发组中的分布及其基因型与空腹血糖的关联性
Tab. 5 Genotype and allele frequencies according to the polymorphic sites in spontaneous individuals from Landao spontaneous group and the association between genotype and fasting blood glucose

SNP 命名	组别 (n) Groups	等位基因频率 Allele frequency		P 值 P value	基因型 (LSM ± SEM) Genotypes			P 值 P value
		A	G		AA(12)	AG(7)	GG(1)	
SNP565A	T2DM(10)	0.95	0.05	0.0197 *	8.48 ± 0.78	5.78 ± 1.02	4.90 ± 2.69	0.1000
	#对照(10)	0.6	0.4					
SNP565B	T2DM(10)	0.95	0.05	0.0197 *	8.48 ± 0.78	5.78 ± 1.02	4.90 ± 2.69	0.1000
	#对照(10)	0.6	0.4					
SNP565C	T2DM(10)	0.95	0.05	0.0436 *	8.28 ± 0.77	5.77 ± 1.13	4.90 ± 2.76	0.1509
	#对照(10)	0.65	0.35					
SNP661A	T2DM(10)	0.2	0.8	0.7050	0	7.25 ± 1.00	7.44 ± 0.90	0.8877
	#对照(10)	0.25	0.75					
SNP661B	T2DM(10)	0.1	0.9	0.6330	0	7.03 ± 1.34	7.46 ± 0.77	0.7809
	#对照(10)	0.15	0.85					
SNP146A	T2DM(10)	0.25	0.75	0.6948	8.69 ± 2.12	6.16 ± 1.50	7.51 ± 0.80	0.5937
	#对照(10)	0.15	0.85					
SNP146B	T2DM(10)	0.75	0.25	0.6948	7.51 ± 0.80	6.16 ± 1.50	8.69 ± 2.12	0.5937
	#对照(10)	0.85	0.15					
SNP146C	T2DM(10)	0.15	0.85	0.6948	6.65 ± 2.96	6.19 ± 1.21	7.95 ± 0.82	0.4870
	#对照(10)	0.25	0.75					
SNP343A	T2DM(10)	0.55	0.45	0.0380 *	5.91 ± 0.69	8.00 ± 0.93	11.37 ± 1.31	0.0055 **
	#对照(10)	0.85	0.15					
SNP343B	T2DM(10)	0.6	0.4	0.0280 *	5.84 ± 0.67	9.48 ± 0.95	10.09 ± 1.65	0.0084 **
	#对照(10)	0.9	0.1					
SNP343C	T2DM(10)	0.45	0.55	0.0380 *	11.37 ± 1.31	8.00 ± 0.93	5.91 ± 0.69	0.0055 **
	#对照(10)	0.15	0.85					
SNP343D	T2DM(10)	0.55	0.45	0.2040	7.76 ± 1.42	8.21 ± 0.90	5.65 ± 1.16	0.2339
	#对照(10)	0.35	0.65					
SNP8326A	T2DM(10)	0.25	0.75	0.6948	4.90 ± 3.02	7.71 ± 1.23	7.38 ± 0.84	0.6947
	#对照(10)	0.15	0.85					

注: * $P < 0.05$ 为差异显著; ** $P < 0.01$ 为差异极显著

Note. * $P < 0.05$ is considered as a significant difference. # Control (10).

表 6 SNP 位点等位基因频率在所有自发个体中的分布及其基因型与空腹血糖的关联性
Tab. 6 Genotype and allele frequencies of the polymorphic sites in all spontaneous individuals from Jinjiekang and Landao spontaneous individuals and the association between genotype and fasting blood glucose

SNP 命名	组别 (n) Groups	等位基因频率 Allele frequency		P 值 P value	基因型 (LSM ± SEM) Genotypes			P 值 P value
		A	G		AA	AG	GG	
SNP565A	T2DM(18)	0.78	0.22	0.1440	AA(18)	AG(13)	GG(4)	0.0681
	#对照(17)	0.62	0.38		AA(18)	AT(13)	TT(4)	
SNP565B	T2DM(18)	0.78	0.22	0.1440	AA(18)	AG(13)	GG(4)	0.0681
	#对照(17)	0.62	0.38		AA(18)	AT(13)	TT(4)	
SNP565C	T2DM(18)	0.78	0.22	0.3410	CC(19)	CT(13)	TT(3)	0.1377
	#对照(17)	0.68	0.32		CC(19)	CT(13)	TT(3)	
SNP661A	T2DM(18)	0.11	0.89	0.0560	AA(1) ^e	AG(12)	GG(22)	0.3695
	#对照(17)	0.29	0.71		AA(1)	AG(8)	GG(26)	
SNP661B	T2DM(18)	0.11	0.89	0.0426 *	AA(1)	AG(8)	GG(26)	0.2839
	#对照(17)	0.24	0.76		AA(1)	AG(8)	GG(26)	
SNP146A	T2DM(18)	0.22	0.78	0.8960	CC(3)	CT(10)	TT(22)	0.4428
	#对照(17)	0.24	0.76		CC(3)	CT(10)	TT(22)	
SNP146B	T2DM(18)	0.78	0.22	0.8960	AA(22)	AG(10)	GG(3)	0.4428
	#对照(17)	0.76	0.24		AA(22)	AG(10)	GG(3)	
SNP146C	T2DM(18)	0.17	0.83	0.9130	AA(1)	AG(10)	GG(24)	0.9870
	#对照(17)	0.18	0.82		AA(1)	AG(10)	GG(24)	
SNP343A	T2DM(18)	0.5	0.5	0.0430 *	CC(15)	CT(13)	TT(7)	0.0115 *
	#对照(17)	0.74	0.26		CC(15)	CT(13)	TT(7)	
SNP343B	T2DM(18)	0.56	0.44	0.0160 *	AA(18)	AT(12)	TT(5)	0.0087 **
	#对照(17)	0.82	0.18		AA(18)	AT(12)	TT(5)	
SNP343C	T2DM(18)	0.5	0.5	0.0790	AA(7)	AG(14)	GG(14)	0.0117 *
	#对照(17)	0.29	0.71		AA(7)	AG(14)	GG(14)	
SNP343D	T2DM(18)	0.56	0.44	0.2290	AA(8)	AG(18)	GG(9)	0.6453
	#对照(17)	0.41	0.59		AA(8)	AG(18)	GG(9)	
SNP8326A	T2DM(18)	0.17	0.83	0.6730	AA(2)	AG(9)	GG(24)	0.5270
	#对照(17)	0.21	0.79		AA(2)	AG(9)	GG(24)	

注: * $P < 0.05$ 为差异显著; ** $P < 0.01$ 为差异极显著

Note. * $P < 0.05$ is considered as a significant difference.

3 讨论

由于 T2DM 及其并发症的迅速蔓延已经成为严重威胁人类健康的世界性难题,为了找到能有效防治糖尿病及其并发症的药物或方法,相关动物模型则是必不可少的重要工具^[19]。研究发现食蟹猴 T2DM 在发病前也经过类似人类 T2DM 的胰岛素抵抗、糖代谢异常、高胰岛素血症等阶段。在所有的实验动物中非人灵长类的血糖值最符合人的血糖值范围^[16]。另外,人类 T2DM 患者中 90% 都发生了胰岛淀粉化,非人灵长类动物与人类 T2DM 临床病理特征最相似的地方就是胰岛淀粉样沉积,多种非人灵长类动物(恒河猴、黑猴、食蟹猴以及豚尾猴等)自发 T2DM 都具有这一特征,又因食蟹猴来源广泛,并且具有繁殖周期短,性格温顺,用药量少等优势,因此,食蟹猴 T2DM 模型成为 T2DM 病因、病理研究比较理想的动物模型之一^[17]。

相对于其他动物,食蟹猴的遗传背景与人的更接近^[20],已测的食蟹猴的基因组的数据显示,它的基因组与人的同源性达约 94%。因此从理论上来说,食蟹猴与人之间具有更多共同的 T2DM 相关基因,本项目基于人类已有的 T2DM 易感突变位点,采用基因关联分析等方法在食蟹猴基因组对应区域筛查与食蟹猴 T2DM 相关的遗传标记是可行的。

Rs10811661 位于易感基因 CDKN2A/CDKN2B 上游 124 kb 左右,在法国人群^[21]和中国汉族人群^[22]中都证实了 rs10811661 位点与 2 型糖尿病具有很强的关联性,同时 rs10811661 中 T 等位基因在韩国人群中也证实了与 2 型糖尿病的紧密相关性(OR = 1.47, 95% CI = 1.23 - 1.75, $p = 2.1 \times 10^{-5}$)^[23]。CDKN2A 和 CDKN2B 是细胞周期蛋白依赖性激酶抑制基因,位于 9 号染色体短臂上。CDKN2A 抑制细胞周期素依赖激酶 4(CDK4),而 CDK4 是胰腺 β 细胞增殖的关键调节因子。Rs10811661 有 T 和 C 两种等位基因,当 C 突变成 T 时,CDKN2A/CDKN2B 基因表达增多,对 CDK4 抑制作用增强,造成 β 细胞功能受损。易感基因 HMGA2 rs1531343 在日本人群中证实是与 2 型糖尿病相关的多态性位点^[24]。该位点主要影响胰岛素分泌^[25],且与空腹血糖之间有较强的关联性。

本实验筛查出的 SNPmf-66A、SNPmf-66B 和 SNPmf-34A、SNPmf-34B、SNPmf-34C 这些位点分别位于与人的 T2DM 易感基因 rs10811661 和

rs1531343 对应的食蟹猴基因组上同源区域内,因此,我们推测这些位点有可能是食蟹猴 T2DM 模型制备的遗传标记。而在诱导群体中,13 个 SNP 的基因频率在 T2DM 组和对照组之间没有显著性差异,分析其可能的原因是与自发性个体相比,诱导的 T2DM 个体具有不同的分子遗传学机制。这些遗传标记对揭示 T2DM 的发病机制和开发食蟹猴 T2DM 模型提供一种新的策略。

参考文献:

- [1] Kahn SE. The relative contribution of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of type 2 diabetes [J]. *Diabetologia*, 2003, 46 (76):3 - 19.
- [2] King H, Aubert RE, Herman WH. Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections [J]. *Diabetes Care*, 1998, 21(35):1414 - 1431.
- [3] Zimmet P, Alberti KG, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic [J]. *Nature*, 2001, 414 (953):782 - 787.
- [4] Saini V. Molecular mechanisms of insulin resistance in type 2 diabetes mellitus [J]. *World J Diabetes*, 2010, 1 (3):68 - 75.
- [5] Sladek R, Rocheleau G, Rung J, et al. A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes [J]. *Nature*, 2007, 445(59):881 - 884.
- [6] Chauhan G, Spurgeon CJ, Tabassum R, et al. Impact of common variants of PPARG, KCNJ11, TCF7L2, SLC30A8, HHEX, CDKN2A, IGF2BP2, and CDKAL1 on the risk of type 2 diabetes in 5,164 Indians [J]. *Diabetes*, 2010, 59(651):2068 - 2074.
- [7] Scott LJ, Mohike KL, Bonnycastle L, et al. A genome-wide association study of type 2 diabetes in Finns detects multiple susceptibility variants [J]. *Science*, 2007, 316 (4):1341 - 1345.
- [8] Voight BF, Scott LJ, Steinthorsdottir V, et al. Twelve type 2 diabetes susceptibility loci identified through large-scale association analysis [J]. *Nat Genet*, 2010, 42(23):579 - 589.
- [9] Wan YL, Zhang YC, Peng BL, et al. Screening of spontaneous diabetes mellitus in middle-old-aged cynomolgus monkey [J]. *Zool Res*, 2010, 32(9):307 - 310.
- [10] Kong A, Steinthorsdottir V, Masson G, et al. Parental origin of sequence variants associated with complex diseases [J]. *Nature*, 2009, 462(153):868 - 874.
- [11] Villareal DT, Robertson H, Bell GI, et al. Parental origin of sequence variants associated with complex diseases [J]. *Nature*, 2009, 462(753):868 - 874.
- [12] Zeggini E, Scott LJ, Saxena R, et al. Meta-analysis of genome-wide association data and large-scale replication identifies additional susceptibility loci for type 2 diabetes [J]. *Nat Genet*, 2008, 40(334):638 - 645.

(下转第 31 页)

- resuscitation, and aggressive fluid resuscitation therapy approaches in an experimental uncontrolled hemorrhagic shock model [J]. *Turkish J Trauma Emerg Surg*, 2010, 16(3): 191.
- [9] Meybohm P, Cavus E, Bein B, et al. Small volume resuscitation: a randomized controlled trial with either norepinephrine or vasopressin during severe hemorrhage [J]. *J Trauma*, 2007, 62(3): 640–646.
- [10] 王海霞, 李永明, 周华成. 低压复苏对非控制出血性休克抢救效果的探讨 [J]. *中国比较医学杂志*, 2008, 18(4): 14–17.
- [11] Zhang YM, Gao B, Wang JJ, et al. Effect of hypotensive resuscitation with a novel combination of fluids in a rabbit model of uncontrolled hemorrhagic shock [J]. *Plos ONE*, 2013, 8(6): 1–10.
- [12] 杜鹏飞, 朱海彬, 赵会民. 不同补液强度对重度失血性休克早期血清乳酸及钾的影响 [J]. *中国急救医学*, 2013, 3(5): 462–464.
- [13] 陈唐葶, 周翔, 王立群, 等. 急性心肌缺血大鼠心肌 α 辅肌动蛋白含量变化及其与心功能的关系 [J]. *南方医科大学学报*, 2011, 31(6): 970–974.
- [14] 李荣国, 王剑, 王小欧, 等. 7.5% 高渗盐水用于创伤性失血性休克早期复苏的观察 [J]. *现代临床医学*, 2012, 38(3): 182–184.
- [15] 尹文. 创伤失血性休克早期复苏的几个关键问题 [J]. *创伤外科杂志*, 2013, 15(6): 485–488.

[修回日期]2014-09-01

(上接第 26 页)

- [13] Unoki H, Takahashi A, Kawaguchi T, et al. SNPs in *KCNQ1* are associated with susceptibility to type 2 diabetes in East Asian and European populations [J]. *Nature Genet*, 2008, 40(924): 1098–1102.
- [14] Yasuda K, Miyake K, Horikawa Y, et al. Variants in *KCNQ1* are associated with susceptibility to type 2 diabetes mellitus [J]. *Nature Gene*, 2008, 40(328): 1092–1097.
- [15] Sladek R, Rocheleau G, Rung J, et al. A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes [J]. *Nature*, 2007, 445(553): 881–885.
- [16] 牟道华, 谭正怀. II 型糖尿病动物模型研究进展 [J]. *四川生理科学杂志*, 2010, 32(4): 172–174.
- [17] 万玉玲, 刘晓明. 自发性 II 型糖尿病动物模型 [J]. *医学综述*, 2008, 14(14): 2175–2177.
- [18] 汪志红, 张素华, 王增产. 中国汉族人群 *TCF7L2* 基因多态性与 2 型糖尿病的关联分析 [J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2009, 25(2): 139–143.
- [19] Prokopenko I, Langenberg C, Florez JC, et al. Variants in *MTNR1B* influence fasting glucose levels [J]. *Nat Genet*, 2009, 41(5): 77–81.
- [20] Saxena R, Voight BF, Lyssenko V, et al. Genome-wide association analysis identifies loci for type 2 diabetes and triglyceride levels [J]. *Science*, 2007, 316(475): 1331–1336.
- [21] Rane SG, Dubus P, Mettus RV. Loss of *Cdk4* expression causes insulin-deficient diabetes and *Cdk4* activation results in beta-islet cell hyperplasia [J]. *Nat Genet*, 1999, 22: 44–52.
- [22] Wen J, Tina R, Anders O. Investigation of type 2 diabetes risk alleles support *CDKN2A/B*, *CDKAL1*, and *TCF7L2* as susceptibility genes in a Han Chinese cohort [J]. *Nat Genet*, 2010, 5: 354–362.
- [23] Marzo N, Mora C, Fabregat ME. Pancreatic islets from cyclin-dependent kinase 4/R24C knock-in mice have significantly increased beta cell mass and are physiologically functional, indicating that *Cdk4* is a potential target for pancreatic beta cell mass regeneration in type 1 diabetes [J]. *Diabetologia*, 2004, 47: 686–694.
- [24] Toshihiko O, Minoru I, Shiro M. Association of new loci identified in European Genome-Wide Association Studies with susceptibility to type 2 diabetes in the Japanese [J]. *Nat Genet*, 2004, 24: 218–225.
- [25] Wan YL. Screening of spontaneous diabetes mellitus in middle-old-aged cynomolgus monkey [J]. *Zool Res*, 2010, 32: 307–310.

[修回日期]2014-07-23