遗传 HEREDITAS (Beijing) 2008 年 3 月, 30(3): 304－308
ISSN 0253-9772 www.chinagene.cn

研究报告

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2008.00304

PPARGC1A 基因 Thr394Thr/Gly482Ser 多态性与 2 型糖尿病的关联研究

苏燕[1], 彭姝彬[1], 李智琼[2], 黄青阳[1*]

1. 华中师范大学生命科学学院, 武汉 430079;
2. 宜昌市夷陵医院, 宜昌 443100

摘要: 对 344 例 2 型糖尿病患者和 307 名正常人的 *PPARGC1A* 基因单核苷酸多态性 rs2970847(Thr394Thr)和 rs8192678(Gly482Ser)与 2 型糖尿病的关系进行了单标记和单体型关联分析以及 Logistic 回归分析。在单标记分析中,对照组与病例组 Thr394Thr 的基因型和等位基因频率有显著差异(基因型, P =0.006; 等位基因, P < 0.001); Logistic 回归和单体型分析表明, Thr394Thr 的 *AA* 基因型及 Thr394(ACA)-Ser482 单体型增加患 2 型糖尿病的风险。Gly482Ser 的基因型和等位基因频率在对照组与病例组间无显著差异。*PPARGC1A* 基因是湖北汉人的一个 2 型糖尿病易感基因。

关键词: 2 型糖尿病; 过氧化物酶体增殖活化受体γ协同激活因子; 多态性; 单体型; 关联

Association study between *PPARGC1A* Thr394Thr/Gly482Ser polymorphisms and type 2 diabetes

SU Yan[1], PENG Shu-Bin[1], LI Zhi-Qiong[2], HUANG Qing-Yang[1]

1. *College of life sciences*, *Central China Normal University*, *Wuhan* 430079,. *China*;
2. *Yiling hospital of Yichang*, *Yichang* 443100, *China*

Abstract: To investigate the association between single nucleotide polymorphisms rs2970847(Thr394Thr) and rs8192678 (Gly482Ser) of peroxisome proliferators activated receptor gamma coactivator-1(*PPARGC1A*) gene and type 2 diabetes in Chinese Han population in Hubei, Thr394Thr and Gly482Ser polymorphisms of the *PPARGC1A* gene were genotyped in 307 controls and 344 type 2 diabetes patients. Height, weight, blood pressure and fasting blood glucose were measured. Single marker/haplotype association and logistic regression analysis were performed. Significant differences in genotypic and allelic frequencies were observed between cases and controls for Thr394Thr (genotype, P=0.006; allele, P<0.001). The genotype *AA* of Thr394Thr and the haplotype Thr394 (ACA)- Ser482 were significantly associated with type 2 diabetes. No differences in genotypic and allelic frequencies between cases and controls were found for Gly482Ser. *PPARGC1A* is a susceptibility gene for type 2 diabetes in Chinese Han population in Hubei.

Keywords: type 2 diabetes; *PPARGC1A* gene; polymorphism; haplotype; association

2 型糖尿病(type 2 diabetes, T2DM)是由遗传因素和环境因素共同作用导致的一类多基因复杂疾病[1]。

收稿日期: 2007–09–28; 修回日期: 2007–11–01
基金项目: 国家自然科学基金(编号：30340068)和湖北省自然科学基金(编号：2005ABA132)资助[Supported by National Natural Science Foundation of China (No.30340068) and Hubei Natural Science Foundation (No.2005ABA132)]
作者简介: 苏燕(1983–), 女, 江西人, 硕士研究生, 专业方向：2 型糖尿病的候选基因研究。Tel: 027-87150887; E-mail: suyan_1105@yahoo.com.cn
通讯作者: 黄青阳(1963–), 男, 湖北人, 教授, 博士生导师, 研究方向：分子与统计遗传学。E-mail: huangqy@mail.ccnu.edu.cn

过氧化物酶体增殖活化受体γ协同激活因子(peroxisome proliferators activated receptor gamma coactivator-1, PPARGC1A)是近年发现的一种转录协同激活因子, 在人的肝、心、肾、骨骼肌有高水平的表达, 通过与过氧化物酶体增殖活化受体γ(PPARγ)、α(PPARα)、类维生素AX受体(RXR)、甲状腺激素受体(TR)、糖皮质激素受体(GR)和雌激素受体α(ERα)等各种转录因子结合, 调节基因的转录。PPARGC1A在调节体内能量代谢的各方面均扮演着重要的角色, 它参与体内调节性生热作用、线粒体的生物形成及脂肪酸的β氧化[2,3]。*PPARGC1A*基因位于人染色体 4p15.1, 该区域在美国印第安人中与空腹胰岛素水平相连锁[4]。因此*PPARGC1A*基因是T2DM的一个重要的功能和图位候选基因。本研究旨在探讨*PPARGC1A*基因在湖北地区汉族人群T2DM易感性中的作用。

1 对象和方法

1.1 研究对象

总共征集了 651 个湖北地区的汉族人。其中病例组 344 人, 男 183 人, 女 161 人, 平均年龄 56.2±14.2 岁; 对照组 307 人, 男 173 人, 女 134 人, 平均年龄 56.0±14.3 岁。正常对照组空腹血糖(FPG)<6.1 mmol/L (110mg/dl)。2 型糖尿病的入选标准按照 1997 年 ADA 公布的新糖尿病诊断标准: 空腹血糖(FPG)≥7.0mmol/L(126mg/dl), 餐后 2 小时血糖≥11.1 mmol/L(200 mg/dl)为糖尿病。上述调查和取样均征得受试者本人同意并签署了知情同意书。

1.2 生理指标测定及 DNA 提取

对所有研究对象进行流行病学调查,测量身高、体重、腰围、臀围、收缩压(SBP)、舒张压(DBP)、FPG 等临床指标, 计算体重指数(body mass index, BMI)和腰臀比(waist hip ratio, WHR)。抽取研究对象空腹静脉血 4ml, 采用酚-氯仿法提取基因组 DNA。

1.3 基因型分析

用PCR-RFLP方法分析了*PPARGC1A*基因第 8 外显子rs2970847(Thr394Thr)和rs8192678 (Gly482- Ser)两个单核苷酸多态性位点。引物参照文献[5]设计(上海生物工程技术服务公司合成), Gly482Ser(GGT→AGT)位点上游引物: 5′-TTTGGAGGCAAGCAAGCAG-3′; 下游引物: 5′-TATTTAGGGTTTTGCCAAGG-3′; Thr394Thr (ACG→ACA)位点上游引物: 5′-GCCAGTCAATTAATTCCAAACC- 3′; 下游引物: 5′-TTGGAGCTGTTTTCTTGTGC-3′。其中Thr394Thr位点的上游引物下划线碱基为错配碱基, 可产生一*Msp* Ⅰ限制性内切酶酶切位点。PCR反应体系如下: 10×buffer 2.5 μl、10 mmol/l dNTP 0.5 μl、上下游引物 10 μmol/l各 0.5 μl、25 mmol/l $MgCl_2$ 2.5 μl、*Taq*酶 1U、模板DNA100ng, 总体积 25 μl。PCR反应条件: 95℃预变性 5mins, 95℃变性 60 s, 55℃复性 45 s, 72℃延伸 45 s, 共 35 个循环, 72℃延伸 10 min。PCR扩增产物用限制性内切酶*Msp* Ⅰ酶切, 37℃消化过夜, 消化片段经 2.5%琼脂糖凝胶电泳、EB染色后, 用Bio-Rad凝胶成像系统拍照并判断基因型。Thr394Thr位点PCR扩增产物为 163bp, 经*Msp* Ⅰ酶切后基因型为: *AA*(163bp)、*GG*(142bp、21bp)和*GA*(163bp、142bp、21bp) (图 1)。Gly482Ser位点PCR扩增产物为 508bp, 经*Msp* Ⅰ酶切后基因型为:*GG*(508bp)、*SS*(376bp、132bp)和*GS*(508bp、376bp、132bp) (图 2)。

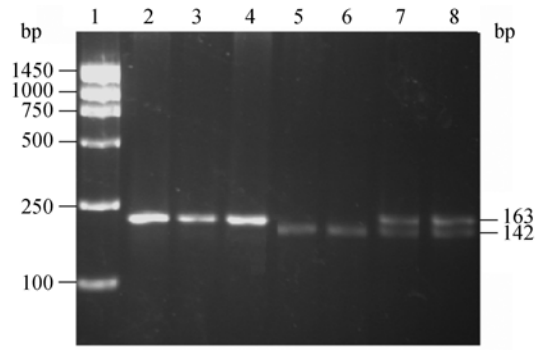

图 1 ***PPARGC1A*** 基因 **Thr394Thr** 多态
1: Diamond™ 250 bp DNA 标记; 2~4: *AA*基因型; 5、6: *GG*基因型; 7、8: *GA*基因型。

Fig. 1 The Thr394Thr polymorphism of *PPARGC1A* gene
1: Diamond™ 250 bp DNA marker; 2–4: *AA*; 5、6; *GG*; 7、8: *GA*.

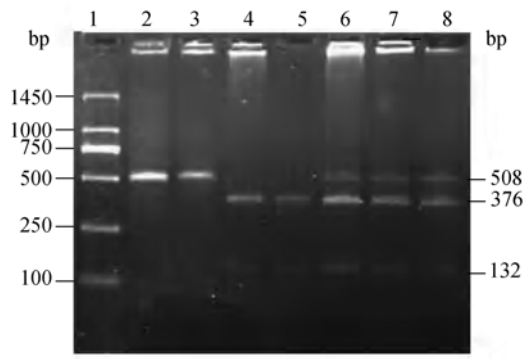

图 2 ***PPARGC1A*** 基因 **Gly482Ser** 多态
1: Diamond™ 250 bp DNA 标记; 2、3; *GG*基因型; 4、5; *SS*基因型; 6、7、8; *GS*基因型。

Fig. 2 The Gly482Ser polymorphism of *PPARGC1A* gene
1: Diamond™ 250 bp DNA marker; 2、3: *GG*; 4、5: *SS*; 6–8: *GS*

1.4 统计学分析

基因型和等位基因频率采用直接计数法统计, 以Hardy-Weinberg平衡检验确认研究样本的群体代表性。计量资料用Mean ±s表示, 组间比较采用*t*检验和单因素方差分析, 关联分析用χ^2检验和Logistic回归。以上分析均用SPSS11.5 统计软件完成。单体型分析用Estimation Haplotype-frequencies (EH)软件进行; 以$P<0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 T2DM 组和对照组的临床特点

所有样本经两组独立样本 *t* 检验分析, 病例组的 BMI、WHR 和空腹血糖显著高于对照组, 其它临床指标差异不显著,表明肥胖是 T2DM 的风险因子。

2.2 单标记分析

经Hardy-Weinberg平衡检验, *PPARGC1A*基因Thr394Thr和Gly482Ser多态位点各基因型频率已达到遗传平衡, 具有群体代表性。经χ^2检验, Thr394Thr位点基因型及等位基因频率在病例组和对照组的差异有显著性, T2DM组A等位基因频率显著高于对照组($P<0.001$)。但Gly482Ser位点基因型及等位基因频率在病例组和对照组差异不显著 (表 1)。

2.3 Logistic 回归分析

在所有受试对象中, 单因素 Logistic 回归分析显示 Thr394Thr 位点基因型 *AA* 与 T2DM 具有显著相关性(OR=1.945, 95%CI 1.288~2.937, $P=0.002$),是 T2DM 的风险因子。经年龄、性别、高血压和肥胖等多因素调整后亦存在显著相关性(OR=1.854, 95%CI 1.327~3.035, $P=0.004$)。Gly482Ser 与 T2DM 相关不显著(表 2)。

2.4 单体型分析

在所有对象中, Thr394Thr/Gly482Ser单体型频率在对照组与T2DM组中的分布有显著性差异($P=0.027$, $\chi^2=9.173$), Thr394(ACA)-Ser482 单体型与T2DM的发病风险相关联($P=0.03$) (表 3)。

表 1　病例组和对照组 ***PPARGC1A*** 基因型及等位基因频率

Table 1　Genotype and allele frequency of *PPARGC1A* gene in T2DM and control groups

组 别 Groups	基因型频率 Genotype frequencies(%)			等位基因频率 Allele frequencies(%)	
Thr394Thr	GG	*GA*	*AA*	G	A
对照组 Controls	82(26.7)	114(37.1)	111(36.2)	278(45.3)	336(54.7)
病例组 T2DM	60(17.4)	126(36.6)	158(45.9)	246(35.8)	442(64.2)
		$\chi^2=10.15$, $P=$ **0.006**		$\chi^2=12.23$, $P<$**0.001**	
Gly482Ser	*GG*	*GS*	*SS*	G	S
对照组 Controls	74(24.0)	202(65.6)	32(10.4)	350(56.8)	266(43.2)
病例组 T2DM	87(25.4)	219(63.8)	37(10.8)	393(57.3)	293(42.7)
		$\chi^2=0.217$, $P=0.897$		$\chi^2=0.029$, $P=0.864$	

表 2　***PPARGC1A*** Thr394Thr/Gly482Ser 多态与 T2DM 的 Logistic 回归分析

Table 2　Logistic regression analysis of the *PPARGC1A* Thr394Thr/Gly482Ser and T2DM in all subjects

位点 Loci	基因型 Genotypes	组别 Groups		未调整 Unadjusted			调整后* Adjusted*		
		病例组 T2DM	对照组 Controls	OR	95%CI	*P*	OR	95%CI	*P*
Thr394Thr	*GG*	60	82	1.000	–	–	1.000	–	–
	GA	126	114	1.288	0.917~1.829	0.158	1.176	0.905~1.919	0.16
	AA	158	111	1.945	1.288~2.937	**0.002**	1.854	1.327~3.035	**0.004**
Gly482Ser	*GG*	87	74	1.000	–	–	1.000	–	–
	GS	219	202	1.084	0.753–1.561	0.663	0.981	0.664–1.449	0.922
	SS	37	32	1.017	0.578–1.790	0.954	0.926	0.504–1.700	0.804

*: 调整因素包括年龄、性别、血压和肥胖(BMI≥25 kg/m^2)。

*: Adjusting factors: age、sex、hypertension and obesity(BMI≥25 kg/m^2).

表 3 *PPARGC1A* 基因与 T2DM 的单体型关联分析
Table 3 Haplotype association analysis of *PPARGC1A* gene with T2DM in all subjects

单体型 Haplotypes	病例组(%) T2DM	对照组(%) Controls	*P*
Thr394(ACG)-Gly482	143(0.272)	159(0.232)	0.104
Thr394(ACG)-Ser482	106(0.154)	114(0.185)	0.132
Thr394(ACA)-Gly482	252(0.366)	199(0.324)	0.068
Thr394(ACA)-Ser482	187(0.208)	143(0.258)	**0.03**
$P(\chi^2)$	P=**0.027**, χ^2=9.173		

3 讨 论

为了探讨 *PPARGC1A* 基因在湖北汉人 T2DM 中的作用，我们分析了 *PPARGC1A* 基因的两个常见多态性 Gly482Ser 和 Thr394Thr。在所有受试对象中，*PPARGC1A*基因第 8 外显子Thr394Thr位点基因型频率和等位基因频率在T2DM患者与对照组间差异有统计学意义(基因型, P=0.006; 等位基因, P< 0.001)。Logistic回归分析显示无论是单因素分析还是在调整了性别、年龄、血压和肥胖等因素后，Thr394Thr多态性均与T2DM存在显著相关性(OR=1.945, 95%CI 1.288~2.937, P=0.002)。这些结果表明Thr394Thr变异是T2DM的遗传风险因子。在印度人中，Thr394Thr的*GA*基因型(P=0.0004)和A等位基因(P=0.002)增加患T2DM的风险[6]，在我们的研究中，A等位基因也与T2DM的发病风险相关联，*AA*基因型增加湖北汉人患T2DM的风险，OR为 1.9。另外，在日本人中，Thr394Thr与T2DM不相关[7]，而在丹麦人*G*等位基因增加患T2DM的风险(P= 0.002)[5]，这些结果表明这个同义突变可能不是真正的原因变异，而是和一个真正的原因变异相连锁。

Gly482Ser位点基因型和等位基因频率在我们的病例组和对照组间差异不显著。在丹麦人[5]、白人[8] 、印度北部人[9]中Gly482Ser多态与T2DM相关联，但在印度南部人[6]、英国人[10]、日本人[7]、pima印第安人[11]、法国白人[12]和欧洲白人[13]中Gly482Ser与T2DM不相关。在本研究中,单标记分析和Logistic回归分析也未发现*PPARGC1A*基因Gly482Ser多态与T2DM相关。在中国北方人中，研究结果与我们相似，482Ser等位基因频率在病例组和对照组间差异不显著,分别为 42.9%vs42.8%[14]。而在广东人中 482Ser等位基因频率在两组间有显著差异(P=0.04)，为41%vs32.1%[15]。在上海人中*GS*基因型携带者患T2DM的风险增加[16]。按照HAPMAP中的资料，rs2970847和rs8192678在45个中国人中连锁不平衡程度很低，r^2仅 0.185。这些结果的差异可能反映了中国不同地区人群这个位点连锁不平衡程度的变异，因此需要在不同地区进行大范围的研究，以阐明该位点在中国人T2DM中的作用及其区域差异。

PPARGC1A广泛调节能量生成与利用，在糖异生过程中的作用尤为重要，可在转录水平上激活糖异生的关键酶，包括磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶、葡萄糖-6-磷酸酶，从而影响血糖代谢[17]。Ser/Ser基因型携带者具有较高的空腹胰岛素浓度(P=0.018)和IR指数(P=0.027)[7]，较高的胰岛素分泌和脂肪酸氧化代谢率[11]。对肌肉特异转运子(GLUT4)敲除的小鼠研究表明，*PPARGC1A*基因通过协同激活肌细胞增强因子能高效诱导GLUT4 基因的表达以提高肌细胞转运葡萄糖的能力，从而降低血糖[18]。*PPARGC1A*基因 403–570 区域氨基酸是此基因与肌细胞增强因子相互作用的关键区域，因而可能是*PPARGC1A*基因提高GLUT4 的胰岛素敏感性的功能区, Gly482Ser和Thr394Thr多态正位于这个区域。最近的研究发现，AKt/PKB对PPARGC1A的磷酸化会抑制脂肪酸氧化和肝细胞糖异生[19]。

总之，我们的结果显示 *PPARGC1A* 基因第 8 外显子 Thr394Thr 多态和 Thr394(ACA)-Ser482 单体型与湖北汉人 2 型糖尿病的发生相关联，*AA* 基因型是 T2DM 的遗传风险因子，*PPARGC1A* 基因是湖北汉族人的一个 T2DM 易感基因。

参考文献(References):

[1] Huang QY, Cheng MR, Ji SL. Linkage and association studies of the susceptibility genes for type 2 diabetes. *Acta Genetica Sinica*, 2006, 33(7): 573–589. [DOI]

[2] Wu Zhidan, Puigserver P, Andersson U, Adelmant G, Mootha V, Troy A, Cinti S, Lowell B, Scarpulla RC, Spiegelman BM. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1.*Cell*, 1999, 98(1): 115–124. [DOI]

[3] Puigserver P, Wu Z, Dark CW, Graves R, Wright M, Spiegelman BM. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell*, 1998, 92(6): 829–839. [DOI]

[4] Perusse L, Rice T, Chagnon YC, Després JP, Lemieux S, Roy S, Lacaille M, Ho-Kim MA, Chagnon M, Province MA, Rao DC, Bouchard C. A genomewide scan for abdominal fat assessed by computed tomography in the Quebec family study. *Diabetes*, 2001, 50(3): 614–621. [DOI]

[5] EK J, Andersen G, Urhammer SA, Gade PH, Drivsholm T,

Borch-Johnsen K, Hansen T, Pedersen O. Mutation analysis of peroxisome proliferators activated receptor gamma coactivator-1(PGC-1) and relationships of identified amino acid polymorphisms to type Ⅱ diabetes mellitus. *Diabetologia*, 2001, 44(2): 2220–2226. [DOI]

[6] Vimaleswaran KS, Radha V, Ghosh S, Majumder PP, Deepa R, Babut HNS, Rao MRS, Mohan V. Peroxisome proliferators activated receptor gamma coactivator-1 α gene polymorphisms and their relationship to type 2 diabetes in Asian Indians. *Diabeice medcine*, 2005, 22(11): 1516–1521. [DOI]

[7] Hara K, Tobe K, Okada T, Kadowaki H, Akanuma Y, Ito C, Kimura S, Kadowaki T. A genetic variation in the *PGC-1* gene could confer insulin resistance and susceptibility to type Ⅱ diabetes. *Diabetologia*, 2002, 45(5): 740–743. [DOI]

[8] Kuneji T, Petrovic MG, Dov P, Peterlin B, Petrovic D. A Gly482Ser polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor-γ coactivator-1(PGC-1) gene is associated with type 2 diabetes in Caucasians. *Folia Biologica*, 2004, 50(5): 157–158.

[9] Rai E, Sharma S, Koul A, Bhat AK, Bhanwer AJS, Bamezai RNK. Interaction between the UCP2–866G/A, mtDNA 10398G/A and PGC1α p.Thr394Thr and p.Gly482Ser polymorphisms in type 2 diabetes susceptibility in North Indian population. *Human Genetics*, 122(5):535-40. [DOI]

[10] Barroso I, Luan J, Middelberg RP, Harding AH, Franks PW, Jakes RW, Clayton D, Schafer AJ,O ́ Rahilly S, Wareham NJ. Candidate gene association study in type 2 diabetes indicates a role for genes involved in beta-cell function as well as insulin action. *PLoS Biol*, 2003, 1(1): 041–055. [DOI]

[11] Muller YL, Bogardus C, Pedersen O, Baier L. A Gly482Ser missense mutation in the peroxisome proliferators activated receptor gamma coactivator-1(PGC-1) is associated with altered lipid oxidation and early insulin secretion in pima Indians.*Diabetes*, 2003, 52(3): 895–898. [DOI]

[12] Lacquemant C, Chikri M, Boutin P, Samson C, Froguel P. No association between the G482S polymorphism of the peroxisome proliferators activated receptor gamma coactivator-1(*PGC-1*)gene and type Ⅱ diabetes in French Caucasias. *Diabetologia*, 2002, 45(4): 602–603. [DOI]

[13] Esterbauer H, Oberkofler H, Linnemayr V, Iglseder B, Hedegger M, Wolfsgruber P, Paulweber B, Fastner G, Krempler F, Patsch W. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 gene locus: associations with obesity indices in middle-aged women. *Diabetes*, 2002, 51(4): 1281–1286. [DOI]

[14] Chen SF, Yan WL, Huang JF, Yang WJ, Gu DF. Peroxisome proliferators activated receptor gamma coactivator-1 α gene polymorphisms is not associated with essential hypertension and type 2 diabetes mellitus in Chinese population. *Hypertens Res*, 2004, 27(11): 813–820. [DOI]

[15] Lu WS, Chen CG, Liang WW, Li F, Qi YQ, Yan L, Cheng H.Association between *PGC-1* gene Thr394Thr/Gly482Ser combined mutation and type 2 diabetes. *Clinical Focus*, 2005, 20(24): 1385–1387.
路文盛, 陈超刚, 梁尉文, 黎锋, 戚以勤, 严励, 程桦. PGC-1α基因 Thr394Thr/Gly482Ser 联合变异与 2 型糖尿病相关关系. 临床荟萃, 2005, 20(24): 1385–1387.

[16] Wang YB, Yu YC, Li Z, Wang C, Wang JY, Wu GT. Study on the relationship between polymorphisms of peroxisome proliferators activated receptor gamma coactivator-1 α gene and type 2 diabetes mellitus in Shanghai Hans in China. *Chin J Med Genet*, 2005, 22(4): 453–456.
王艳波,于永春, 李智, 汪纯, 王吉影, 吴国亭. 中国上海地区汉族人 PGC-1α基因多态性与 2 型糖尿病相关性研究. 中华医学遗传学杂志, 2005, 22(4): 453–456.

[17] Yoon JC, Puigeserver P, Chen G, Donovan J, Wu Z, Rhee J, Adelmant G, Stafford J, Kahn CR, Granner DK, Newgard CB, Spiegelman BM. Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. *Nature*, 2001, 413(6852): 131–138. [DOI]

[18] Michael LF, Wu Z, Cheatham RB, Puigserver P, Adelmant G, Lehman JJ, Kelly DP, Spiegelman BM. Reatoration of insulin-sensitive glucose transporter (GLUT4) gene expression in muscle cells by the transcriptional coactivator PGC-1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(7): 3820–3825. [DOI]

[19] Li X, Monks B, Ge Q, Morris J, Birnbaum. AKt/PKB regulates hepatic metabolism by directly inhibiting PGC-1 transcription coactivatior. *Nature*, 2007, 426(7165): 1012–1016. [DOI]