

云南汉族人群 CD40 基因多态性与 2 型糖尿病的相关性*

张新文¹, 陶文玉², 赵 淦³, 杨 曼², 陈 珺¹, 王晓苓², 周紫云¹, 赵雨笛¹,
刘楠楠¹, 史 荔¹, 李奕平^{2**}

(1. 中国医学科学院 & 北京协和医学院 医学生物学研究所, 云南 昆明 650118; 2. 云南省第二人民医院 & 云南大学第一医院 & 昆明医科大学第四附属医院, 内分泌代谢科, 云南 昆明 650021; 3. 云南大学 生命科学学院, 云南 昆明 650500)

[摘 要] 目的: 研究 CD40 基因单核苷酸多态性(SNPs)位点 rs1883832 和 rs4810485 与云南汉人群 2 型糖尿病(T2DM)的相关性。方法: 选取云南地区汉族人群 T2DM 患者 343 例作为病例组, 健康体检者 325 例作为对照组, 采用 Taqman 探针法对 CD40 基因 SNPs 位点 rs1883832 和 rs4810485 进行基因分型, 分析其等位基因和基因型在病例组和对照组中的分布特征; 构建 2 个 SNPs 位点的单倍型, 分析各单倍型在 2 组中的分布差异。结果: rs4810485 等位基因 G 在病例组中的分布频率显著高于对照组($P=0.014$), 该位点等位基因 G 可能是云南汉族人群 T2DM 发生的风险因素($OR=1.323$, 95% CI 为 $1.057 \sim 1.655$, $P<0.05$); rs1883832 等位基因和基因型在两组中分布频率比较, 差异无统计学意义($P>0.05$); 单倍型分析结果显示 rs1883832C-rs4810485G 单倍型可能会增加 T2DM 发生风险的因素($OR=1.43$, 95% CI 为 $1.15 \sim 1.78$, $P<0.05$)。结论: CD40 基因 SNPs 位点 rs4810485 等位基因 G 和 rs1883832C-rs4810485G 单倍型可能是云南汉族人群 T2DM 发生的风险因素。

[关键词] 2 型糖尿病; CD40 基因; 炎症反应; 基因多态性; 汉族; 相关性分析; 云南

[中图分类号] R587.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2018)05-0508-05

DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2018.05.003

Polymorphisms in CD40 Gene were Associated with T2DM in A Chinese Han population from Yunnan Province

ZHANG Xinwen¹, TAO Wenyu², ZHAO Gan³, YANG Man², CHEN Jun¹, WANG Xiaoling²,
ZHOU Ziyun¹, ZHAO Yudi¹, LIU Nannan¹, SHI Li¹, LI Yiping²

(1. Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Kunming 650118, Yunnan, China; 2. Department of Endocrinology and Metabolism, The Second People's Hospital of Yunnan Province & The First Hospital of Yunnan University & The Fourth Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650021, Yunnan, China; 3. School of Life Science, Yunnan University, Kunming 650500, Yunnan, China)

[Abstract] Objective: To investigate the association of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in CD40 gene (rs1883832 and rs4810485) with type 2 diabetes mellitus (T2DM) in a Yunnan Han population. **Methods:** Taqman assay was used to genotype rs1883832 and rs4810485 in 343 T2DM patients and 325 healthy individuals. And the allelic and genotypic distribution of the SNPs in T2DM patients and healthy controls were analyzed. Additionally, the haplotypes were constructed and the association of the haplotypes with T2DM was analyzed. **Results:** The results showed that the allelic frequency of rs4810485 G was significantly higher in T2DM patients than healthy controls ($P=0.014$),

*[基金项目] 国家自然科学基金项目(31660313、30960148); 云南省科技厅-昆明医科大学应用基础研究联合专项(2013FB181)

**通信作者 E-mail: yyflyp@aliyun.com

网络出版时间: 2018-05-17 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20180517.1756.026.html>

and rs4810485 G may be a risk factor for T2DM in Yunnan Han population ($OR = 1.323$, $95\% CI: 1.057 \sim 1.655$, $P < 0.05$). However, there was no significant difference of the allelic and genotypic frequencies of rs1883832 between T2DM and control groups ($P > 0.05$). In addition, the haplotype frequency of rs1883832C-rs4810485G was significantly higher in T2DM group ($P < 0.05$, $OR = 1.43$; $95\% CI: 1.15 \sim 1.78$). **Conclusion:** Our results showed that the G allele of rs4810485 and the rs1883832C-rs4810485G haplotype might be associated with high risk of T2DM in a Yunnan Han population.

[**Key words**] type 2 diabetes mellitus; CD40; inflammatory reaction; polymorphisms; Han population; association; Yunnan

国际糖尿病联合会的最新报告显示,糖尿病成人发病率高达 9.1%,中国糖尿病患者约 1 亿人,患者人数位居全球第 1 位^[1]。2 型糖尿病(Type 2 diabetes mellitus, T2DM)是糖尿病的主要类型,占糖尿病的 85% ~ 95%^[2]。研究发现,遗传因素和环境因素(包括肥胖、老龄化、饮食等)均在糖尿病的发病过程中发挥重要作用^[3]。CD40 蛋白是一种 I 型跨膜糖蛋白,是肿瘤坏死因子家族受体超家族成员,CD40 和其配体 CD40L 相互作用参与体液和细胞免疫各阶段的调节,CD40 等免疫共刺激分子在炎症引起的肥胖相关的代谢性紊乱中发挥重要作用^[4]。近年来的研究表明,T2DM 可能是一种固有免疫系统疾病,在这一过程中一些炎症相关的细胞因子起到重要的促进作用。因此,CD40 蛋白及其配体作为炎症免疫反应的调节分子,可能在 T2DM 的发生过程发挥重要的调节作用。Chatzigeorgiou 等^[4]研究发现 CD40 分子缺失会加重胰岛素抵抗的症状,而胰岛素抵抗是 T2DM 的发病基础^[5],因此推测 CD40 可能与糖尿病存在一定相关性,目前关于 CD40 基因多态性与 T2DM 的相关性研究较少。因此本研究选取了 CD40 基因中的 2 个单核苷酸多态性位点(single Nucleotide polymorphisms, SNPs),探讨其在云南汉族人群 T2DM 患者及健康个体中的分布差异,分析其与云南汉族人群 T2DM 易感性的相关性。

1 对象与方法

1.1 对象

根据知情同意原则,选取 343 例 2011 年 12 月 ~ 2014 年 11 月在云南省第二人民医院被诊断为 T2DM 的患者作为病例组,并选取同期 325 例在云南省第二人民医院进行健康体检者作为对照组。T2DM 诊断依据参考 1999 年世界卫生组织糖尿病

诊断标准,排除患有糖尿病、有糖尿病家族史、葡萄糖耐受较差者以及高血压或冠心病患者,所有研究对象均为居住于云南地区的彼此无血缘关系的汉族人群。

1.2 方法

采集受试者空腹静脉血 5 mL,用抗凝剂(肝素钠)抗凝,使用 QIAamp 全血基因组 DNA 提取试剂盒(货号 51106,购于 QIAGEN 公司)提取 DNA,CD40 基因中 SNPs 位点 rs1883832 及 rs4810485 的基因分型采用 Taqman 探针荧光定量 PCR 法进行。Taqman 探针、引物及分型试剂(Taqman Genotyping Master Mix)购于 ABI 公司,rs1883832 和 rs4810485 探针及引物货号分别为 C__11655919_20 和 C__1260190_10。Taqman 探针分型实验使用罗氏 LightCycler 480 实时荧光定量 PCR 仪,PCR 反应体系为 20 μ L,反应条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min,92 $^{\circ}$ C 变性 15 s,60 $^{\circ}$ C 退火 1 min,共 40 个循环,40 $^{\circ}$ C 最后延伸 5 min。分型实验设阴性对照(以水代替样本 DNA 模板)。实验数据采用 LCS480 1.5.1.62 软件进行分析,分型完成后对部分 Taqman 分型结果进行测序验证。

1.3 统计学分析

应用 t 检验分析对照组和病例组年龄差异, χ^2 分析病例组和对照组人群性别差异,使用 Hardy-Weinberg 平衡检验分析 CD40 基因 SNPs 位点基因型在 2 组人群中的分布是否具有代表性。CD40 基因中 SNPs 位点 rs1883832 和 rs4810485 等位基因及基因型频率在 2 组人群中的分布差异采用 χ^2 检验, SHEsis 软件计算 2 个 SNPs 位点间的连锁不平衡状态^[6]。根据连锁不平衡结果构建单倍型,并分析各单倍型频率在病例组和对照组间的差异,并使用 Bonferroni 进行校正^[6]。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 研究对象基本特征

本研究纳入健康对照样本 325 例,病例组样本 343 例,病例组和对照组年龄和性别比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。病例组和对照组间糖脂代谢指标(总胆固醇、甘油三酯、高密度脂蛋白、低密度脂蛋白、空腹血糖及糖化血红蛋白)比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

表 1 两组被检者一般资料及糖脂代谢指标比较
Tab.1 The characteristics of the subjects enrolled in the current study

指标	病例组	对照组	<i>P</i>
例数(<i>n</i>)	343	325	
年龄(岁)	50.59 ± 11.85	49.93 ± 11.26	0.295
性别(男/女)	217/126	190/135	0.206
总胆固醇(mmol/L)	4.898 ± 1.099	4.429 ± 0.868	<0.001
甘油三酯(mmol/L)	2.645 ± 2.062	1.675 ± 1.118	<0.001
高密度脂蛋白(mmol/L)	1.084 ± 0.278	1.286 ± 0.288	<0.001
低密度脂蛋白(mmol/L)	2.672 ± 0.985	2.090 ± 0.617	<0.001
空腹血糖(mmol/L)	7.950 ± 2.466	4.959 ± 0.627	<0.001
糖化血红蛋白(%)	8.910 ± 2.691	5.200 ± 0.502	<0.001

2.2 CD40 基因 SNPs 位点 rs1883832 和 rs4810485 与云南汉族人群 T2DM 的相关性

CD40 基因 SNPs 位点 rs1883832 和 rs4810485 基因型在对照组和病例组中的分布符合 Hardy-

Weinberg 平衡定律($P > 0.05$),说明本研究选取样本是具有群体代表性的随机样本。对位点 rs1883832 和 rs4810485 等位基因和基因型在对照组和病例组中的分布差异分析的结果显示,rs4810485 位点等位基因 G 在病例组的分布频率显著高于对照组($OR = 1.323$,95% *CI* 为 1.057 ~ 1.655, $P = 0.014$),提示该位点可能是云南汉族 T2DM 的风险因素,且该位点基因型 G/G、G/T 和 T/T 在病例组和对照组中的分布频率的差异具有统计学意义($P = 0.029$);而 rs1883832 位点等位基因和基因型在 2 组间的分布比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),提示该位点可能与云南汉族人群 T2DM 的易感性无关,见表 2。

2.3 CD40 基因 SNPs 位点连锁不平衡及单倍型分析

CD40 基因 SNPs 位点连锁不平衡结果显示,在病例组和对照组中 rs1883832 和 rs4810485 之间存在连锁不平衡, $D' = 0.895$ 。根据连锁不平衡结果构建 rs1883832 和 rs4810485 位点的单倍型,并对频率 >3% 的单倍型在病例组和对照组中的分布进行分析,结果显示经过校正后 rs1883832C - rs4810485G 单倍型在病例组和对照组中分布频率的差异具有统计学意义($OR = 1.43$,95% *CI* 为 1.15 - 1.78, $P < 0.05$),提示 rs1883832C - rs4810485G 单倍型可能是云南汉族 T2DM 的风险因素。见表 3。

表 2 两个 CD40 基因 SNPs 位点等位基因和基因型在 2 组被检者中的分布
Tab.2 Comparison of the allelic and genotypic distribution of the SNPs in CD40 gene between T2DM and control groups

SNPs 位点	等位基因/基因型	病例组(<i>n</i> ,%)	对照组(<i>n</i> ,%)	等位基因		基因型
				<i>P</i>	<i>OR</i> [95% <i>CI</i>]	<i>P</i>
rs1883832	C	482(70.3)	426(65.5)	0.064	1.24[0.99 ~ 1.56]	0.207
	T	204(29.7)	224(34.5)			
	C/C	176(51.3)	146(44.9)			
	C/T	130(37.9)	134(41.2)			
	T/T	37(10.8)	45(13.8)			
rs4810485	G	461(67.2)	395(60.8)	0.014	1.32[1.06 ~ 1.65]	0.029
	T	225(32.8)	255(39.2)			
	G/G	153(44.6)	125(38.5)			
	G/T	155(45.2)	145(44.6)			
	T/T	35(10.2)	55(16.9)			

表 3 两个 CD40 基因 SNPs 位点构建的单倍型在 2 组被检者中的分布
Tab.3 The distribution of haplotypes constructed by rs1883832 and rs4810485
between T2DM and control groups

rs1883832	rs4810485	病例组 (n,%)	对照组 (n,%)	P	Bonferroni 校正 P	OR [95% CI]
C	G	431. 74(62. 9)	353. 10(54. 3)	0. 001	<0. 05	1. 43[1. 15 ~ 1. 78]
C	T	50. 26 (7. 3)	72. 90(11. 2)	0. 014	>0. 05	0. 63[0. 43 ~ 0. 91]
T	G	29. 26 (4. 3)	41. 90 (6. 4)	0. 076	>0. 05	0. 647[0. 40 ~ 1. 05]
T	T	174. 74(25. 5)	182. 10(28. 0)	0. 294	>0. 05	0. 878[0. 69 ~ 1. 12]

3 讨论

T2DM 是目前最常见的非传染性疾病之一,研究显示,与欧洲人群相比中国汉族人群更易患 T2DM^[4,7],全基因组关联分析(GWAS)结果也显示遗传因素在 T2DM 的发生过程中发挥重要作用^[8-10]。肥胖、胰岛素抵抗等均是 T2DM 发病的关键因素,而 CD40 及其相关的信号通路可能参与了这一过程。已有大量研究显示 CD40 基因 SNPs 位点与多种人类疾病相关^[11-13]。2015 年,Chen 等^[14]的研究显示 CD40 基因 SNPs 位点可能与 CD40 血清水平相关,这可能是 CD40 基因中多态性与人类疾病相关的机制之一。但 CD40 基因 SNPs 位点与 T2DM 相关性的研究较少,因此本研究选取了 CD40 基因的 2 个 SNPs 位点 rs1883832 和 rs4810485,分析其在云南汉族人群 T2DM 患者以及健康对照中的分布特征。

本研究结果显示,CD40 基因 SNPs 位点 rs4810485 等位基因 G 在病例组中分布频率显著高于健康对照组($P=0.014$),该结果提示 CD40 基因 SNPs 位点 rs4810485 可能是云南汉族人群 T2DM 的风险性因素。有学者在白塞氏疾病中的研究发现 rs4810485 基因型 GT 与疾病的风险显著相关,同样有学者在欧洲人群风湿性关节炎及系统性红斑狼疮中的研究显示该位点等位基因 G 与疾病风险显著相关^[15]。Vazgiourakis 等^[16]的研究表明 rs4810485 可能与 CD40 的表达水平具有相关性。因此本研究推测 CD40 基因 SNPs 位点 rs4810485 与云南汉族人群 T2DM 具有相关性的机制可能是由于该位点影响了体内 CD40 的表达水平,但这仍需要进一步的功能研究来证实。

2011 年,Wang 等^[17]的研究显示 rs1883832SNPs

位点可能与中国人群急性冠脉综合征的发生相关,并可能与 CD40 表达水平具有相关性。同样 Yun 等^[18]的研究证实该位点与中国人群动脉粥样硬化的发生具有相关性。而本研究结果显示 rs1883832 等位基因和基因型在病例组和健康对照组中的分布差异无统计学意义($P>0.05$)。虽然这些研究选择的人群都是中国人群,但研究的疾病不同,这可能是造成结果不一致的原因之一,当然这些结果都需要进一步在更大人群中进行验证。

本研究对 CD40 基因的 2 个 SNPs 位点进行了连锁不平衡分析,构建了单倍型,并对构建的单倍型在病例组和对照组中的分布频率进行了分析。结果显示单倍型 rs1883832C - rs4810485G 单倍型在病例组和对照组中分布频率的差异具有统计学意义($P<0.05$, $OR=1.43$,95% CI 为 1.15 ~ 1.78),提示该单倍型可能是云南汉族人群 T2DM 发生的风险因素,这也与 rs4810485 等位基因 G 是云南汉族人群 T2DM 发生的风险因素相一致。

综上所述,本研究结果显示 CD40 基因中的 SNPs 位点 rs4810485 等位基因 G 和 rs1883832C - rs4810485G 单倍型可能是云南汉族人群 T2DM 发生的风险因素。鉴于 CD40 在炎症免疫及胰岛素抵抗中发挥的作用,rs4810485 可能是通过影响 CD40 基因的表达而与 T2DM 的发生具有相关性,但这仍需要进一步的功能研究来证实。

4 参考文献

[1] HU C, JIA W. Diabetes in China: Epidemiology and genetic risk factors and their clinical utility in personalized medication [J]. 2018, 67(1): 3 - 11.
[2] LI W, HUANG E. An update on type 2 diabetes mellitus as a risk factor for dementia [J]. Journal of Alzheimer's disease;JAD, 2016, 53(2): 393 - 402.

- [3] CHAN J C N, MALIK V, JIA W, et al. Diabetes in Asia [J]. *Journal of the American Medical Association*, 2009, 301(20): 2129–2140.
- [4] CHATZIGEORGIOU A, SEIJKENS T, ZARZYCKA B, et al. Blocking CD40-TRAF6 signaling is a therapeutic target in obesity-associated insulin resistance [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(7): 2686–2691.
- [5] UMEGAKI H. Type 2 diabetes as a risk factor for cognitive impairment: current insights [J]. *Clinical interventions in aging*, 2014, 9(10): 11–19.
- [6] SHI Y Y, HE L. SHEsis, a powerful software platform for analyses of linkage disequilibrium, haplotype construction, and genetic association at polymorphism loci [J]. *Cell research*, 2005, 15(2): 97–98.
- [7] YOON K H, LEE J H, KIM J W, et al. Epidemic obesity and type 2 diabetes in Asia [J]. *Lancet*, 2006, 368(9548): 1681–1688.
- [8] ALMAWI W Y, NEMR R, KELESHIAN S H, et al. A replication study of 19 GWAS-validated type 2 diabetes at-risk variants in the Lebanese population [J]. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 2013, 102(2): 117–122.
- [9] CHANG Y C, LIU P H, YU Y H, et al. Validation of type 2 diabetes risk variants identified by genome-wide association studies in Han Chinese population: a replication study and meta-analysis [J]. *PloS one*, 2014, 9(4): e95045.
- [10] PALMER N D, MCDONOUGH C W, HICKS P J, et al. A genome-wide association search for type 2 diabetes genes in African Americans [J]. *PloS one*, 2012, 7(1): e29202.
- [11] CHEN X, HU Z, LI W, et al. Synergistic combined effect between CD40 – 1C > T and CTLA-4 + 6230G > A polymorphisms in Graves' disease [J]. *Gene*, 2015, 567(2): 154–158.
- [12] ZHOU G, WANG Y, FANG Z, et al. CD40 – 1C > T polymorphism and the risk of lung cancer in a Chinese population [J]. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 2015, 8(11): 15163–15169.
- [13] 王小娜, 张禹, 王培智, 等. 云南汉族人群 CD40 基因多态性与肺癌发生发展的相关性 [J]. *贵州医科大学学报*, 2017, 42(4): 383–388.
- [14] CHEN J M, GUO J, WEI C D, et al. The association of CD40 polymorphisms with CD40 serum levels and risk of systemic lupus erythematosus [J]. *BMC genetics*, 2015, 16(1): 21.
- [15] LEE Y H, BAE S C, CHOI S J, et al. Associations between the functional CD40 rs4810485 G/T polymorphism and susceptibility to rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus: a meta-analysis [J]. *Lupus*, 2015, 24(11): 1177–1183.
- [16] VAZGIOURAKIS V M, ZERVOU M I, CHOULAKI C, et al. A common SNP in the CD40 region is associated with systemic lupus erythematosus and correlates with altered CD40 expression: implications for the pathogenesis [J]. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2011, 70(12): 2184–2190.
- [17] WANG M, LI Y, LI W, et al. The CD40 gene polymorphism rs1883832 is associated with risk of acute coronary syndrome in a Chinese case-control study [J]. *DNA and cell biology*, 2011, 30(3): 173–178.
- [18] YUN Y, MA C, MA X. The SNP rs1883832 in CD40 gene and risk of atherosclerosis in Chinese population: a meta-analysis [J]. *PloS one*, 2014, 9(5): e97289.

(2018-02-05 收稿, 2018-05-02 修回)

中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 周 凌