

孕妇 FTO 基因的表达与胰岛素水平相关性的研究*

肖鸽飞, 李桦, 孟小军, 赵艳玲, 洪琳凤, 胡玲玲
(珠海市妇幼保健院检验科, 广东珠海 519001)

摘要:目的 探讨孕妇脂肪量和肥胖相关基因(FTO)的表达与妊娠期胰岛素水平的相关性。方法 分别选取2016年3~8月于珠海市妇幼保健院就诊的60例妊娠期糖尿病(GDM)孕妇和60例血糖正常孕妇作为研究对象,各空腹抽取2管静脉血。其中1管抗凝全血分离淋巴细胞提取RNA,并以RT-PCR法研究其淋巴细胞中FTO mRNA的表达水平;另1管非抗凝血离心取其血清,以酶联免疫法检测血清中FTO蛋白,化学发光法检测空腹胰岛素,自动生化分析仪检测血清GLU,CHO,TG,HDL-C和LDL-C等指标的浓度,并分析其相关性。结果 病例组FTO mRNA,FTO蛋白水平、空腹血糖、OGTT 1 h和2 h血糖的结果分别为 $0.17\% \pm 0.10\%$, 61.32 ± 25.23 pg/ml, 4.71 ± 0.54 mmol/L, 10.70 ± 1.36 mmol/L和 8.97 ± 1.60 mmol/L,与对照组的 $0.11\% \pm 0.07\%$, 51.47 ± 22.97 pg/ml, 4.41 ± 0.28 mmol/L, 8.05 ± 1.04 mmol/L和 6.56 ± 0.75 mmol/L相比,差异均有统计学意义($t=3.876, 2.236, 3.817, 11.964$ 和 $10.578, P$ 均 <0.05)。病例组的胰岛素水平为 6.83 ± 9.76 mU/L,与对照组的 13.15 ± 13.99 mU/L相比,差异有统计学意义($t=-2.869, P<0.05$)。另外,FTO mRNA与FTO蛋白,OGTT 1 h,2 h血糖水平呈正相关,与胰岛素水平呈负相关(均 $r=0.232, 0.292, 0.242, -0.185, P<0.05$),与空腹血糖和血脂水平无相关性($P>0.05$)。结论 GDM孕妇的FTO表达高于正常孕妇,FTO mRNA相对表达量与胰岛素呈负相关,其对血糖代谢的调节可能是通过影响胰岛素来实现。

关键词:妊娠期糖尿病;脂肪量和肥胖相关基因;胰岛素

中图分类号:Q786;R714.256 **文献标志码:**A **文章编号:**1671-7414(2017)05-044-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2017.05.012

Correlation Study on FTO Expression and Insulin Secretion Level in Pregnant Women

XIAO Ge-fei, LI Hua, MENG Xiao-jun, ZHAO Yan-ling, HONG Lin-feng, HU Ling-ling
(Department of Clinical Laboratory,

Zhuhai Municipal Maternal and Child Healthcare Hospital, Guangdong Zhuhai 519001, China)

Abstract: Objective To evaluate the correlation of maternal FTO expression and insulin secretion levels in pregnant women.

Methods In outpatient of Zhuhai Municipal Maternal and Child Healthcare Hospital, 60 cases of pregnant women with gestational diabetes mellitus (GDM) and 60 cases of healthy pregnant women were recruited in this study from March 2016 to August 2016. Each pregnant woman was taken two tubes of venous blood. Lymphocytes was isolated from one tube of anti-coagulated whole blood. The expression of FTO mRNA in lymphocytes was investigated using RT-PCR. Serum was isolated from another tube of non-anticoagulant whole blood. Its FTO protein was investigated using ELISA, insulin was investigated using chemiluminescence method, and GLU, CHO, TG, HDL-C and LDL-C were investigated by automatic biochemical analyzer. The correlation of the biochemical indicators were analyzed. **Results** The expression level of FTO mRNA, FTO protein, fasting glucose data, OGTT at 1h and 2h glucose levels in the case group were $0.17\% \pm 0.10\%$, 61.32 ± 25.23 pg/ml, 4.71 ± 0.54 mmol/L, 10.70 ± 1.36 mmol/L and 8.97 ± 1.60 mmol/L respectively. The values of these biochemical indicators in control group were $0.11\% \pm 0.07\%$, 51.47 ± 22.97 pg/ml, 4.41 ± 0.28 mmol/L, 8.05 ± 1.04 mmol/L and 6.56 ± 0.75 mmol/L respectively. The differences were statistically significant ($t=3.876, 2.236, 3.817, 11.964$ and $10.578, P<0.05$). The insulin levels were 6.83 ± 9.76 mU/L in the case group, and 13.15 ± 13.99 mU/L in control group. The differences was statistically significant too ($t=-2.869, P<0.05$). FTO expression level was positively correlated with FTO protein, OGTT 1h glucose and OGTT 2h glucose levels ($r=0.232, 0.292, 0.242$, all $P<0.05$), and it was negatively correlated with insulin levels ($r=-0.185, P<0.05$). There was no correlation between FTO and fasting glucose expression levels ($P>0.05$). **Conclusion** The expression of FTO level in pregnant women with GDM was higher than that in healthy pregnant women. The relative expression of FTO mRNA was negatively correlated with insulin. And the regulation of glucose metabolism might be effected by insulin.

Keywords: gestational diabetes mellitus; fat mass and obesity associated gene; insulin

* 基金项目:珠海市医学科研基金项目(项目编号:2015J018)。

作者简介:肖鸽飞(1974—),女,硕士,主任技师,主要研究方向为遗传病的实验室诊断,E-mail: xgf8111_cn@hotmail.com。

中国成人糖尿病患病率为11.6%^[1],其中妊娠并发糖尿病患者也在不断增多,已成为我国重大的公共卫生问题之一。妊娠并发糖尿病包括孕前糖尿病(pre-gestational diabetes mellitus, PGDM)和妊娠期糖尿病(gestational diabetes mellitus, GDM),控制不好可导致严重的母体和胎儿并发症,如妊娠高血压疾病、早产、糖尿病性巨大胎儿和低血糖等症状,遗传、年龄和肥胖是其重要的影响因素。有研究显示,脂肪量和肥胖相关基因(fat mass and obesity associated gene, FTO)参与体重调节并与胰岛素抵抗、糖脂代谢明显相关^[2]。本研究通过对GDM孕妇淋巴细胞FTO mRNA的表达与诸多血清生化指标的关联分析,旨在探讨孕妇FTO表达与胰岛素水平的相关性。

1 材料与方法

1.1 研究对象 病例组选择2016年3~8月于珠海市妇幼保健院就诊的60例GDM孕妇(孕24.0±3.6周),诊断标准参考《妊娠合并糖尿病诊治指南(2014)》^[3],即服糖前、服糖后1 h, 2 h的血糖值应分别低于5.1, 10.0, 8.5 mmol/L,任何一项血糖值达到或超过上述标准即诊断为GDM。排除孕前糖尿病史、并发其他可能影响血糖水平的基础疾病、并发甲状腺功能异常等其他内分泌疾病、或肾上腺功能异常等激素相关疾病者,且抽血前未使用过影响糖代谢的药物。对照组为同期就诊、无糖尿病史的血糖正常孕妇60例(孕22.9±4.6周)。

1.2 试剂和仪器

1.2.1 淋巴细胞分析:分离全血中淋巴细胞使用挪威产淋巴细胞分离液, RNA的提取及逆转录均使用的是北京全式金公司的试剂盒。cDNA的引物合成和PCR扩增反应体系均使用大连宝生物公司的Takara产品,其中FTO产物长度为191 bp,内参GAPDH产物长度为454 bp。PCR使用美国ABI公司的9700型基因扩增仪,产物分析采用凝胶电泳法,使用珠海黑马公司的GSG-2000核酸/蛋白凝胶图像分析及相应的分析软件。

1.2.2 血清各生化指标的检测:FTO蛋白检测使用美国RD生物制品公司的ELISA试剂盒检测,仪器采用瑞士HAMILTON FAME 24/20全自动酶免仪。胰岛素测定采用美国罗氏COBAS E601全自动化学发光免疫分析仪及配套试剂。血糖、总胆固醇和三酰甘油检测使用上海科华的试剂盒,高密度脂蛋白胆固醇及低密度脂蛋白胆固醇使用日本和光的检测试剂盒,仪器均采用日立7180全自动生化分析仪。

1.3 方法

1.3.1 样本收集:对所研究的孕妇分别抽取2管

空腹静脉血,其中1管EDTA-K₃抗凝全血2 ml,采用密度梯度离心法分离提取淋巴细胞后置-80℃冻存;另1管非抗凝血离心取血清检测空腹胰岛素(FINS)、空腹葡萄糖(FPG)、总胆固醇(CHO)、三酰甘油(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)及低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)水平,同时行75 g葡萄糖耐量试验(OGTT)分别检测服糖水后1 h和2 h血糖(GLU)水平。

1.3.2 FTO mRNA检测:先采用层析柱法提取淋巴细胞中的RNA,再用逆转录法合成cDNA,应用RT-PCR技术以cDNA为模板扩增FTO和GAPDH片段,产物用1.5 g/dl的琼脂糖凝胶进行电泳分析,以检测血液淋巴细胞中的mRNA相对表达量。FTO mRNA相对表达量=FTO的DNA条带灰度值/内参GAPDH的DNA条带灰度值。

1.3.3 生化指标测定:FTO蛋白检测应用酶联免疫法,FINS测定使用电化学发光法,其他生化指标的检测均采用化学比色法。

1.4 统计学分析 运用SPSS10.0,对病例组和对照组各生化指标间的比较采用 t 检验分析,FTO mRNA相对表达量与各生化指标间的关联作Pearson相关性分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 病例组与对照组基本信息比较 病例组与对照组孕妇的年龄、BMI和体重分别为31.95±4.83岁, 21.4±2.64 kg/m²和54.7±6.8 kg; 29.22±3.93岁, 20.1±2.47 kg/m²和51.7±6.0 kg,比较差异均有统计学意义($t=3.399, 2.256, 2.221, P=0.001, 0.027, 0.029$)。两组孕妇的身高分别为1.60±0.04 m和1.60±0.05 m,两者间差异无统计学意义($t=-0.266, P=0.791$)。

2.2 RT-PCR电泳结果 淋巴细胞cDNA进行RT-PCR扩增后行凝胶电泳分析,产物见图1。

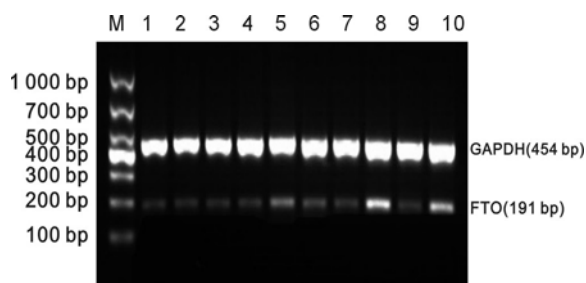
2.3 病例组与对照组各生化指标间的关系 见表1。对两研究组的各生化指标行 t 检验分析,病例组FTO mRNA相对表达量、FTO蛋白水平, FPG, OGTT 1 h和2 h GLU的结果均高于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。病例组的FINS水平低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。两组间CHO, TG, HDL-C和LDL-C结果的差异均无统计学意义($P>0.05$)。

2.4 FTO mRNA相对表达量与各生化指标的相关性分析 经Pearson相关性分析,FTO mRNA相对表达量与FTO蛋白、OGTT 1 h和2 h GLU水平呈正相关性($r=0.232, 0.292, 0.242, P=0.011, 0.001, 0.008$),与FINS水平呈负相关($r=$

-0.185, $P=0.043$), 与 FPG 水平无相关性 ($r=0.067$, $P=0.465$)。

表 1 病例组与对照组各分析指标的统计学结果

项 目	病例组	对照组	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
FTO mRNA 相对表达量(%)	0.17±0.10	0.11±0.07	3.876	0.000
FTO 蛋白水平(pg/ml)	61.32±25.23	51.47±22.97	2.236	0.027
FINS(mU/L)	6.83±9.76	13.15±13.99	-2.869	0.005
FPG(mmol/L)	4.71±0.54	4.41±0.28	3.817	0.000
OGTT 1h GLU(mmol/L)	10.70±1.36	8.05±1.04	11.964	0.000
OGTT 2h GLU(mmol/L)	8.97±1.60	6.56±0.75	10.578	0.000
CHO(mmol/L)	5.70±1.29	5.36±1.12	1.518	0.132
TG(mmol/L)	2.19±1.00	2.18±0.82	0.086	0.932
LDL-C(mmol/L)	3.09±0.97	2.80±0.94	1.640	0.104
HDL-C(mmol/L)	1.83±0.39	1.75±0.36	1.239	0.218



注: M 为 Marker, 1~5 为正常对照样本, 6~10 为病例组样本。

图 1 FTO mRNA 的 RT-PCR 电泳结果

3 讨论 FTO 是 Frayling 等^[4]通过全基因组关联分析发现的与肥胖密切相关的一个基因, 该基因表达的蛋白质是一类脱氧核糖核酸去甲基化酶^[5], 这种甲基化修饰在维持人类能量动态平衡中发挥关键性的作用^[6]。Russell 等^[7]通过使用在 INS-1 细胞中开发的条件表达系统来研究 FTO 蛋白在胰腺 β-细胞中的作用发现, 适度增加 FTO-血凝素的表达可选择性地增强第一时相的胰岛素分泌, 而第二时相阶段保持不变, 从而认为 FTO 蛋白可能在胰腺 β-细胞中的第一时相胰岛素分泌的控制中发挥作用。

GDM 是由于胰岛素抵抗与胰岛 β 细胞功能不良所致。在妊娠期母体分泌的激素和胎盘分泌的生物活性物质中, 仅胰岛素具有降糖作用, 而胰高血糖素、胎盘分泌的泌乳素、甾类激素、甲状腺激素、肾上腺皮质激素等均有拮抗胰岛素的作用。另外胎盘胰岛素酶还可以加速胰岛素降解, 更加削弱了降糖机制的能力。Henri 等^[8]研究认为, FTO 突变与增加身体脂肪和腰围、降低外周胰岛素的敏感性有关。本研究结果显示 FTO mRNA 相对表达量虽与孕妇的空腹血糖水平无相关性, 但与 OGTT 1 h, 2 h GLU 水平呈正相关, 与胰岛素水平呈负相关, 可能就是受胰岛素的敏感性和抵抗因素影响所致。也有研究认为, GDM 患者的红细胞分布

宽度升高与胰岛素抵抗呈正相关^[9]。虽然分娩后随着诸多影响因素的消失, 大多数 GDM 患者的血糖水平会逐渐恢复正常, 但多项对 GDM 产后糖代谢转归的研究结果显示, GDM 患者产后空腹血糖受损和患 2 型糖尿病的风险均显著增加^[10,11]。

Do 等^[12]研究也发现 FTO 基因 rs17817449 和 rs1421085 两个位点的 SNP 与肥胖相关表形有显著性关联, 其中 rs17817449 不仅与 BMI、体重和腰围相关, 而且还影响空腹胰岛素水平、胰岛素抵抗和胰岛素敏感指数, 调整 BMI 会使其与胰岛素敏感性等指标的关联消失, 该位点的 GG 基因型组的空腹胰岛素水平明显高于另外两种基因型, 但空腹血糖无显著性差异。而本研究中, 病例组 FPG 水平也与对照组无显著性差异, 与之相符; 但 FINS 水平显著低于对照组, 结果与之相反, 是否与 FTO 基因的多态性位点有关, 有待进一步的研究。

综上所述, GDM 孕妇的 FTO 表达高于正常孕妇, FTO mRNA 相对表达量与胰岛素呈负相关, 其对血糖代谢的调节可能是通过影响胰岛素来实现。

参考文献:

- [1] 徐 瑜, 毕宇芳, 王卫庆, 等. 中国成人糖尿病流行与控制现状-2010 年中国慢性病监测暨糖尿病专题调查报告解读[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2014, 30(3): 184-186.
Xu Y, Bi YF, Wang WQ, et al. Prevalence and control of diabetes in Chinese adults-the interpretation of a 2010 China Noncommunicable Disease Surveillance report[J]. Chin J Endocrinol Metab, 2014, 30(3): 184-186.
- [2] 周东浩, 刘洪军, 张京玲, 等. 中国北方汉族人群 FTO rs9940128 基因多态性与 2 型糖尿病的关联性研究[J]. 中国糖尿病杂志, 2012, 20(10): 725-727.
Zhou DH, Liu HJ, Zhang JL, et al. Association between FTO rs9940128 gene polymorphism and T2DM in people of northern China[J]. Chin J Diabetes,

- 2012,20(10):725-727.
- [3] 中华医学会妇产科学分会产科学组,中华医学会围产医学分会妊娠合并糖尿病协作组.妊娠合并糖尿病诊治指南(2014)[J].中华妇产科杂志,2014,49(8):561-569.
- Chinese Medical Association Obstetrics and Gynecology Branch, Chinese Medical Association Perinatal Medicine Branch Pregnancy with Diabetes Collaboration. Guidelines for diagnosis and treatment of pregnancy with diabetes mellitus(2014)[J]. Chin J Obstet Gynecol, 2014, 49(8): 561-569.
- [4] Frayling TM, Timpson NJ, Weedon MN, et al. A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity[J]. Science, 2007, 316(5826): 889-894.
- [5] Han ZF, Niu TH, Chang JB, et al. Crystal structure of the FTO protein reveals basis for its substrate specificity[J]. Nature, 2010, 464(7292): 1205-1209.
- [6] Jia GF, Fu Y, Zhao X, et al. N6-methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO[J]. Nature Chemical Biology, 2012, 7(12): 885-887.
- [7] Russell MA, Morgan NG. Conditional expression of the FTO gene product in rat INS-1 cells reveals its rapid turnover and a role in the profile of glucose-induced insulin secretion[J]. Clin Sci (Lond), 2011, 120(9): 403-413.
- [8] Heni M, Kullmann S, Ahlqvist E, et al. Interaction between the obesity-risk gene FTO and the dopamine D2 receptor gene ANKK1/TaqIA on insulinsensitivity[J]. Diabetologia, 2016, 59(12): 2622-2631.
- [9] 高飞, 杨红玲, 王洁琳, 等. 妊娠期糖尿病患者红细胞分布宽度与胰岛素抵抗的相关性研究[J]. 现代检验医学杂志, 2017, 32(1): 66-68.
- Gao F, Yang HL, Wang JL, et al. Relationship between the red cell volume distribution width in patients with gestational diabetes and insulin resistance[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2017, 32(1): 66-68.
- [10] 张杨子, 吴红花. 妊娠期糖尿病产后糖代谢转归的研究进展[J]. 中华糖尿病杂志, 2016, 8(5): 304-306.
- Zhang YZ, Wu HH. Advances in postpartum glucose metabolism in gestational diabetes mellitus[J]. Chin J Diabetes Mellitus, 2016, 8(5): 304-306.
- [11] Liu H, Zhang C, Zhang S, et al. Prepregnancy body mass index and weight change on postpartum diabetes risk among gestational diabetes women[J]. Obesity (Silver Spring), 2014, 22(6): 1560-1567.
- [12] Do R, Bailey SD, Desbiens K, et al. Genetic variants of FTO influence adiposity, insulin sensitivity, leptin levels, and resting metabolic rate in the Quebec Family Study[J]. Diabetes, 2008, 57(4): 1147-1150.

收稿日期: 2017-06-03

修回日期: 2017-07-06

(上接 43 页)实验中发现糖尿病小鼠应用 pro3(GIP)后,其血清的瘦素水平明显降低,由此可以说明,pro3(GIP)改善糖尿病小鼠的代谢作用可能与影响瘦素表达相关。

综上所述,本实验研究了 GIP 受体抑制剂对诱导的糖尿病小鼠的代谢尤其是糖代谢具有一定改善作用,与国外现有研究相同的是,GIP 受体抑制剂可以明显降低血糖及胰岛素分泌水平。我们进一步发现了其可以减轻脂肪组织的炎症浸润,作用机制可能与影响瘦素表达相关,这为进一步阐明糖尿病的发病机制,开发糖尿病新药治疗奠定了基础。

参考文献:

- [1] Chan JC, Zhang Y, Ning G. Diabetes in China: a societal solution for a personal challenge[J]. Lancet Diabetes Endocrinol, 2014, 2(12): 969-979.
- [2] Gault VA, O'Harte FP, Harriott P, et al. Characterization of the cellular and metabolic effects of a novel enzyme-resistant antagonist of glucose-dependent insulinotropic polypeptide [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 290(5): 1420-1426.
- [3] Irwin N, McClean PL, O'Harte FP, et al. Early administration of the glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor antagonist pro3(GIP) prevents the development of diabetes and related metabolic abnormalities associated with genetically inherited obesity in ob/ob mice[J]. Diabetologia, 2007, 50(7): 1532-1540.
- [4] Mentis N, Vardarli I, Kothe LD, et al. GIP does not potentiate the antidiabetic effects of GLP-1 in hyperglycemic patients with type 2 diabetes[J]. Diabetes, 2011, 60(4): 1270-1276.
- [5] Goedecke JH, Micklesfield LK. The effect of exercise on obesity, body fat distribution and risk for type 2 diabetes[J]. Med Sport Sci, 2014(60): 82-93.
- [6] Lau E, Carvalho D, Pina-Vaz C, et al. Beyond gut microbiota: understanding obesity and type 2 diabetes[J]. Hormones (Athens), 2015, 14(3): 358-369.
- [7] van Greevenbroek MM, Schalkwijk CG, Stehouwer CD. Obesity-associated low-grade inflammation in type 2 diabetes mellitus: causes and consequences[J]. Neth J Med, 2013, 71(4): 174-187.
- [8] Miyawaki K, Yamada Y, Ban N, et al. Inhibition of gastric inhibitory polypeptide signaling prevents obesity[J]. Nat Med, 2002, 8(7): 738-742.
- [9] Nie Y, Ma RC, Chan JC, et al. Glucose-dependent insulinotropic peptide impairs insulin signaling via inducing adipocyte inflammation in glucose-dependent insulinotropic peptide receptor-overexpressing adipocytes[J]. FASEB J, 2012, 26(6): 2383-2393.
- [10] Ranganath LR, Beety JM, Morgan LM, et al. Attenuated GLP-1 secretion in obesity: cause or consequence[J]. Gut, 1996, 38(6): 916-919.

收稿日期: 2016-01-05

修回日期: 2017-02-15