

论著·临床研究

胰高血糖素样肽 1 受体基因 rs3765467 变异与 2 型糖尿病的关联研究

张静静¹, 祝超瑜², 肖元元², 蒋伏松², 高清歌², 方云云², 魏 丽²

1. 上海海洋大学水产与生命学院生物系, 上海 201306; 2. 上海交通大学附属第六人民医院内分泌代谢科, 上海 200233

[摘要] **目的**·探讨胰高血糖素样肽 1 受体 (glucagon-like peptide-1 receptor, *GLP-1R*) 外显子单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphisms, SNPs) 与 2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 的关系。**方法**·选取 318 例 T2DM 患者和 145 例非糖尿病对照者为研究对象 (汉族), 利用多重 PCR 靶向重测序 Hi-Reseq 技术检测 *GLP-1R* 基因外显子的 SNPs 位点, 分析组间基因型、等位基因频率分布及临床特征的差异。**结果**·检测分析发现了 23 个 SNPs 位点, 其中 *GLP-1R* rs3765467 (G/A) 位点多态性与 T2DM 显著相关 ($P=0.005$), 与 GG 基因型携带者相比 GA+AA 基因型者患病风险降低 ($OR=0.502$, 95% CI 0.305~0.829, $P=0.007$), 其中男性人群 GA+AA 基因型者患病风险显著降低 ($OR=0.403$, 95% CI 0.186~0.871, $P=0.021$)。临床特征关联分析表明, GA+AA 基因型携带者糖化白蛋白水平低于 GG 基因型者 ($P=0.048$)。**结论**·*GLP-1R* 基因 rs3765467 位点多态性与上海地区汉族人群 T2DM 相关; 次要等位基因 A 可能有助于维持血糖稳态, 是 T2DM 的保护因素, 这种保护性在男性中尤为显著。

[关键词] 胰高血糖素样肽 1 受体; 单核苷酸多态性; rs3765467; 2 型糖尿病

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2021.09.012 **[中图分类号]** R587.1 **[文献标志码]** A

Association study of variation of glucagon-like peptide-1 receptor gene rs3765467 and type 2 diabetes mellitus

ZHANG Jing-jing¹, ZHU Chao-yu², XIAO Yuan-yuan², JIANG Fu-song², GAO Qing-ge², FANG Yun-yun², WEI Li²

1. Department of Biology, Shanghai Ocean University, College of Fisheries and Life Science, Shanghai 201306, China; 2. Department of Endocrinology and Metabolism, Shanghai Sixth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200233, China

[Abstract] **Objective**·To investigate the association of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the glucagon-like peptide-1 receptor (*GLP-1R*) gene with type 2 diabetes mellitus (T2DM). **Methods**·A total of 318 Han patients with T2DM and 145 non-diabetic controls in Shanghai were enrolled. The polymorphisms of *GLP-1R* gene were detected with multiplex PCR-High throughput resequencing. Differences in frequencies of genotypes and alleles, as well as other clinical variables between the two groups were analyzed. **Results**·Twenty three SNPs were detected. The polymorphism of *GLP-1R* rs3765467 (G/A) was significantly associated with T2DM ($P=0.005$). Compared with GG genotype carriers, GA+AA genotype carriers had a lower risk of T2DM ($OR=0.502$, 95% CI 0.305~0.829, $P=0.007$), while GA+AA genotype carriers had a significantly lower risk of T2DM ($OR=0.403$, 95% CI 0.186~0.871, $P=0.021$) in the male population. Association analysis of clinical feature showed that the glycosylated albumin level of GA+AA genotype carriers was lower than that of GG genotype carriers ($P=0.048$). **Conclusion**·*GLP-1R* rs3765467 polymorphism is associated with T2DM in Shanghai Han population. Minor allele A contributes to maintaining blood glucose homeostasis and is a protective factor for T2DM, especially in men.

[Key words] glucagon-like peptide-1 receptor (GLP-1R); single nucleotide polymorphism (SNP); rs3765467; type 2 diabetes mellitus (T2DM)

2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 是由遗传与环境因素共同作用引起的代谢性疾病^[1], 异常基因的遗传使后代具有糖尿病易感性。胰高血糖素样肽 1 (glucagon-like peptide 1, GLP-1) 是一种能有效调节血糖稳态的肠促胰岛素激素, 可刺激胰岛 β 细胞再生、胰岛素分泌, 减少胰高血糖素释放, 延缓胃排空, 减少肝糖原输出, 促进脂肪组织脂解等^[2-4], 其类似物作为一种新

型降糖药物被广泛应用于临床。GLP-1 主要通过与其受体 GLP-1R (glucagon-like peptide-1 receptor, GLP-1R) 结合发挥生理功能。最近研究发现 *GLP-1R* 基因的遗传变异会影响其结构组成及生理功能^[5], 且 *GLP-1R* 基因多态性与糖尿病易感性相关^[6]。美国健康人群中, *GLP-1R* 单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphisms, SNPs) 位点 rs3765467 GA 基因型个体胰岛素释放量远大于 GG 基因型

[基金项目] 上海市自然科学基金 (20ZR1442500); 浦东新区卫生计生科研联合攻关项目 (PW2018D-14)。

[作者简介] 张静静 (1995—), 女, 硕士生; 电子信箱: 18616829306@163.com。

[通信作者] 魏 丽, 电子信箱: E-mail: 18930173636@189.cn。

[Funding Information] Natural Science Foundation of Shanghai (20ZR1442500); Research Joint Project of Pudong New Area Health and Family Planning (PW2018D-14)。

[Corresponding Author] WEI Li, E-mail: 18930173636@189.cn。



个体^[7]。对韩国人群的研究^[8]发现, rs37675467 (G/A) 突变可降低 T2DM 的风险。目前, *GLP-1R* 基因多态性与中国 T2DM 相关研究尚不完善。迄今为止, 尚无研究发现 rs3765467 多态性与中国人群 T2DM 发病相关。本研究采用多重 PCR 技术, 结合高通量重测序检测 *GLP-1R* 外显子区域 SNPs 位点多态性在我国人群中的分布, 并进一步评估多态性位点与 T2DM 及临床代谢指标的相关性。

1 对象与方法

1.1 研究对象

本研究共纳入 463 例研究对象。其中 T2DM 组 318 例, 均为 2018—2019 年上海交通大学附属第六人民医院(临港院区)内分泌代谢科收治的住院患者。纳入标准: ①符合 1999 年 WHO 的糖尿病诊断标准^[9]: 空腹血糖 ≥ 7.0 mmol/L, 或糖尿病症状+随机血糖 ≥ 11.1 mmol/L, 或口服葡萄糖耐量试验 (oral glucose tolerance test, OGTT) 2 h 血糖 ≥ 11.1 mmol/L。②相互之间无血缘关系。③年龄 >18 周岁。④汉族。排除标准: ①有恶性肿瘤史、急性感染。②有严重的肝肾功能损伤。③患有脑梗死、心肌梗死、冠状动脉粥样硬化性心脏病。④有甲状腺功能亢进症、甲状腺功能减退症等其他内分泌相关疾病。正常对照组 145 例, 为本院体检中心健康体检者, 空腹血糖 <6.0 mmol/L, 且餐后 2 h 血糖 <7.8 mmol/L, 糖化血红蛋白 (glycosylated hemoglobin, HbA1c) $<6.0\%$; 相互之间无血缘关系, 无糖尿病家族史, 无糖尿病史。本研究获上海市第六人民医院(临港院区)伦理委员会批准(审批编号: 2016-004), 所有研究对象均签署知情同意书。

1.2 研究方法

1.2.1 临床资料收集 收集所有入组对象的年龄、性别、体质量、身高、收缩压 (systolic blood pressure, SBP)、舒张压 (diastolic blood pressure, DBP)、家族史、病程等资料, 并计算体质量指数 (body mass index, BMI), 公式为: $BMI (kg/m^2) = \text{体质量} (kg) / \text{身高的平方} (m^2)$ 。

1.2.2 生化指标检测 胰岛功能及血糖指标: 葡萄糖氧化酶法测定空腹血糖 (fasting blood glucose, FBG) 及餐后 2 h 血糖 (2-hour postprandial blood glucose, 2 h PG), 化学发光法测定空腹胰岛素 (fasting insulin, FINS)、餐后 2 h 胰岛素 (2 hours insulin, 2 h INS), 高效液相色谱法检测 HbA1c、糖化白蛋白 (glycated albumin, GA)。血脂谱: 葡萄糖氧化酶法测定血清总胆固醇 (total

cholesterol, TC), 甘油磷酸氧化酶法测定三酰甘油 (triacylglycerol, TAG), 日立 76002020 型生化自动分析仪 (计算法) 测定低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDL-Ch)、高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDL-Ch)。根据 FBG、FINS 检测结果, 计算胰岛素抵抗指数 (homa insulin-resistance, HOMA-IR) $= (FBG \times FINS) / 22.5$ 和胰岛 β 细胞功能指数 (homa islet beta cell function index, HOMA- β) $= 20 \times FINS / (FBG - 3.5)$ 。

1.2.3 DNA 提取及 SNPs 位点检测 收集所有研究对象肘静脉血于 5 mL EDTA 抗凝管中, -80°C 冰箱保存; 使用血液基因组 DNA 提取试剂盒 (上海莱枫生物科技有限公司) 提取基因组 DNA, SpectraMax i3x 酶标仪 (上海迈拓生物科技有限公司) 检测 DNA 样本质量, 保证其浓度 ≥ 50 ng/ μL , 吸光度 A260/A280 值介于 1.8~2.0, 提取的 DNA 于 -80°C 冰箱保存。

据 NCBI 上人类 *GLP-1R* 基因 DNA 参考序列, 设计多重 PCR 特异性引物; 以提取的全基因组 DNA 样本为模板, 进行 PCR 扩增, 不同的样本以相应的 Barcode 引物区分, 而后对扩增子进行二代高通量重测序 [HiSeq X Ten 测序仪 (Illumina, 美国)]。测序结果使用生物信息学方法分析, 最终获得每个位点的变异信息。

1.2.4 变异位点检测 高通量测序过程中会存在一定比例的测序质量较低的数据, 需进行质控以降低 SNPs 假阳性。使用测序数据评估软件 FastQC 0.10.8 将序列文件中的低质量序列过滤掉, 保留的数据测序质量 $Q>30$ ($Q=30$ 指正确率是 99.9%), 此时测序错误率低于 0.1%。序列比对之前, 用 Cutadapt 2.0 软件除去加在特异性引物两侧的接头序列; 运用 BWA 0.7.17 软件将二代测序后的短小片段比对定位到参考基因组 (GRCh37/hg19) 上; 随后使用 Genome Analysis Toolkit 3.x 软件对测序片段中的 SNPs 位点进行统计和分析; 最后以变异处测序深度大于 30、变异在所有样本出现不少于 1 次的标准对突变信息进行过滤, 获得变异位点。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 25.0 软件进行统计学分析。应用 Pearson χ^2 检验进行哈迪-温伯格平衡 (Hardy-Weinberg Equilibrium, HWE) 分析, 以确保研究对象的群体代表性。定量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用独立样本 t 检验进行分析; 偏态分布的定量资料用 $M (Q1, Q3)$ 表示, 采用非参数检验进行分析; 定性资料以频数 (百分率) 表示, 采用 χ^2 检验进行分析。分别采用基因型、等位基因、显性和隐性模型进

行非条件 Logistic 回归分析,修正年龄、性别、BMI、SBP、TAG、HDL-Ch 等混杂因素,计算比值比(odds ratios, *OR*)和95%置信区间(95% confidence interval, 95% *CI*)。为减少非参数检验带来的损失,对偏态分布 HOMA-IR、HOMA- β 数据取自然对数,使其转化为正态分布数据,再进行参数检验。

应用 GAS Power Calculator (http://csg.sph.umich.edu/abecasis/gas_power_calculator/) 在线网站计算统计效能,设置计算条件:显性模型, $OR=1.8$,次等位基因频率(minor allele frequency, MAF)=0.247,人群 T2DM 患病率为10%,T2DM 组318例,正常组145例。本研究统计效能为0.78。

表1 研究人群的临床特征

Tab 1 Clinical characteristics of the study population

Item	T2DM group (<i>n</i> =318)	Control group (<i>n</i> =145)	χ^2/t value	<i>P</i> value
Gender (M/F)/ <i>n</i>	158/160	58/87	3.754	0.053
Age/year	54.53±10.79	53.12±6.56	1.725	0.085
BMI/(kg·m ⁻²)	25.84±3.72	23.73±3.26	5.755	0.000
SBP/mmHg	135.81±19.41	122.62±13.99	8.036	0.000
DBP/mmHg	79.03±12.71	78.11±8.86	0.876	0.381
FBG/(mmol·L ⁻¹)	8.76±2.39	5.28±0.35	17.186	0.000
2h PG/(mmol·L ⁻¹)	12.81±4.78	6.39±1.14	21.640	0.000
HbA1c/%	9.51±2.54	5.60±0.29	25.061	0.000
GA/%	24.96±12.70	13.22±1.14	14.456	0.000
HDL-Ch/(mmol·L ⁻¹)	1.06±0.28	1.27±0.34	-6.767	0.000
LDL-Ch/(mmol·L ⁻¹)	3.26±0.83	3.07±0.71	2.385	0.018
TC/(mmol·L ⁻¹)	5.17±1.40	4.87±0.85	2.744	0.006
TAG/(mmol·L ⁻¹)	1.82 (1.27, 3.03)	1.15 (0.74, 1.77)	7.425	0.000
FINS/(mU·L ⁻¹)	10.20 (6.20, 15.56)	6.55 (4.25, 8.72)	6.919	0.000
2 h INS/(mU·L ⁻¹)	38.46 (20.04, 65.86)	30.66 (18.84, 51.65)	1.824	0.068
HOMA-IR	3.81 (2.33, 6.26)	1.52 (0.99, 2.07)	11.257	0.000
HOMA- β	44.10 (24.96, 76.02)	73.96 (48.61, 101.13)	-6.389	0.000

Note: 1 mmHg=0.133 kPa.

2.2 SNPs 分型及关联分析

GLP-IR 基因外显子多态性检测分析发现23个 SNPs 位点。对位点的基因型和等位基因频率进行病例-对照关联分析,结果显示 rs3765467 位点基因型和等位基因频率在2组间的分布差异存在统计学意义($\chi^2=9.180$, $P=0.010$; $\chi^2=8.056$, $P=0.005$),说明 rs3765467 与 T2DM 发病显著相关;其余位点基因型及等位基因频率在2组间的分布差异均无统计学意义。

HWE 检验表明 rs3765467 等位基因频率分布符合 Hardy-Weinberg 平衡(对照组 $P=0.893$),可代表整体,可进行遗传学分析。

2 结果

2.1 临床特征比较

本研究共收集318例 T2DM 患者,其中男性158例,女性160例;年龄为22~75岁,平均年龄为(54.53±10.79)岁。对照组共145例,其中男性58例,女性87例;年龄为31~66岁,平均年龄为(53.12±6.56)岁。T2DM 组 HDL-Ch、HOMA- β 低于对照组,而 BMI、SBP、FBG、2 h PG、FINS、TC、TAG、LDL-Ch、HbA1c、GA、HOMA-IR 均高于对照组(均 $P<0.05$),2组在性别、年龄、DBP、2 h INS 水平上差异不具有统计学意义(表1)。

2.3 GLP-IR rs3765467 位点多态性与 T2DM 易感性的关系

通过多种模型分析 rs3765467 多态性与 T2DM 易感性的关系,结果(表2)显示:rs3765467 G>A 突变显著降低 T2DM 患病风险(修正后 $OR=0.587$, 95% CI 0.395~0.872, $P=0.008$);与携带野生 GG 基因型个体相比,携带 GA 基因型(修正后 $OR=0.507$, 95% CI 0.298~0.864, $P=0.012$)个体患病风险降低;显性模型中,携带 rs3765467 GA/AA 基因型与携带 GG 基因型的个体相比,T2DM 患病风险较低(修正后 $OR=0.502$, 95% CI 0.305~0.829, $P=0.007$),差异具有统计学意义。隐性模型中,2组间 rs3765467 等位基因及基因型分布差异无统计学意义。

据性别将受试者分为2个亚组, 分别比较亚组内 rs3765467 在 T2DM 组和对照组中的基因型及等位基因频率 (表3)。男性人群中, A 等位基因携带者患病风险显著低于 G 等位基因携带者 (修正后 $OR=0.460$, 95% CI 0.249~0.852, $P=0.013$); 与携带野生 GG 基因型个体相比, 携带 GA 基因型 (修正后 $OR=0.439$, 95% CI 0.195~

0.990, $P=0.047$) 个体患病风险降低; 显性模型中, 与 GG 基因型携带者相比, GA+AA 基因型者患病风险较低 (修正后 $OR=0.403$, 95% CI 0.186~0.871, $P=0.021$), 差异具有统计学意义; 隐性模型中, rs3765467 等位基因及基因型在2组间的分布无显著性差异。而女性人群中, 各种模型下不同基因型携带者患病风险差异均无统计学意义。

表2 GLP-1R rs3765467 位点多态性与 T2DM 易感性的关联

Tab 2 Association between GLP-1R rs3765467 polymorphism and T2DM susceptibility

Model	T2DM group (n=318)	Control group (n=145)	OR (95 % CI)	P value	Adjusted OR (95 % CI) ^①	Adjusted P value ^①
Allele						
G(ref)/n(%)	496 (78)	201 (69)	1	—	1	—
A/n(%)	140 (22)	89 (31)	0.637 (0.467–0.871)	0.005	0.587 (0.395–0.872)	0.008
Genotype						
GG(ref)/n(%)	201 (63)	70 (48)	1	—	1	—
GA/n(%)	94 (30)	61 (42)	0.537 (0.352–0.818)	0.004	0.507 (0.298–0.864)	0.012
AA/n(%)	23 (7)	14 (10)	0.572 (0.279–1.173)	0.127	0.484 (0.197–1.190)	0.114
Dominant model						
GG(ref)/n(%)	201 (63)	70 (48)	1	—	1	—
GA+AA/n(%)	117 (37)	75 (52)	0.543 (0.365–0.808)	0.003	0.502 (0.305–0.829)	0.007
Recessive model						
GG+GA(ref)/n(%)	295 (93)	131 (90)	1	—	1	—
AA/n(%)	23 (7)	14 (10)	0.730 (0.364–1.463)	0.374	0.630 (0.264–1.506)	0.298

Note: ^① Adjusted by age, gender, BMI, SBP, TAG and HDL-Ch.

表3 性别亚组中 GLP-1R rs3765467 位点多态性与 T2DM 易感性的关联

Tab 3 Association between GLP-1R rs3765467 polymorphism and T2DM susceptibility in male and female

Model	Male				Female			
	T2DM group (n=158)	Control group (n=58)	Adjusted OR (95% CI) ^①	Adjusted P value ^①	T2DM group (n=160)	Control group (n=87)	Adjusted OR (95% CI) ^①	Adjusted P value ^①
Allele								
G(ref)/n(%)	254 (80)	77 (66)	1	—	242 (76)	124 (71)	1	—
A/n(%)	62 (20)	39 (34)	0.460 (0.249–0.852)	0.013	78 (24)	50 (29)	0.804 (0.467–1.387)	0.433
Genotype								
GG(ref)/n(%)	105 (67)	27 (47)	1	—	96 (60)	45 (52)	1	—
GA/n(%)	44 (28)	25 (43)	0.439 (0.195–0.990)	0.047	50 (31)	34 (39)	0.677 (0.322–1.422)	0.303
AA/n(%)	9 (6)	6 (10)	0.258 (0.059–1.124)	0.071	14 (9)	8 (9)	0.837 (0.252–2.783)	0.772
Dominant model								
GG(ref)/n(%)	105 (67)	25 (43)	1	—	96 (60)	45 (52)	1	—
GA+AA/n(%)	53 (33)	33 (57)	0.403 (0.186–0.871)	0.021	64 (40)	42 (48)	0.708 (0.354–1.417)	0.330
Recessive model								
GG+GA(ref)/n(%)	149 (94)	52 (90)	1	—	146 (91)	79 (91)	1	—
AA/n(%)	9 (6)	6 (10)	0.360 (0.086–1.502)	0.161	14 (9)	8 (9)	0.981 (0.307–3.316)	0.974

Note: ^① Adjusted by age, BMI, SBP, TAG and HDL-Ch.

2.4 基因分型后临床特征比较

在所有受试者中对 GG 和 GA+AA 基因型携带者的临床特征进行比较, 发现 GA+AA 基因型携带者 GA 水平显

著低于 GG 基因型携带者 ($P=0.048$), 而其他指标在2组间差异均无统计学意义 (表4)。

表4 整体人群不同基因型临床特征比较

Tab 4 Comparison of clinical features of different genotypes

Item	GG (<i>n</i> =271)	GA+AA (<i>n</i> =192)	<i>P</i> value
Gender (M/F)/ <i>n</i>	130/141	86/106	0.499
Age/year	53.80±9.87	54.49±9.41	0.448
BMI/(kg·m ⁻²)	25.08±3.60	25.23±3.87	0.685
SBP/mmHg	131.95±18.34	130.72±19.52	0.506
DBP/mmHg	78.93±11.93	78.44±11.09	0.670
FBG/(mmol·L ⁻¹)	7.65±2.56	7.37±2.54	0.276
2 h PG/(mmol·L ⁻¹)	10.89±4.77	10.42±5.28	0.338
HbA1c/%	8.36±2.85	7.90±2.65	0.094
GA/%	21.69±13.40	19.34±8.51	0.048
HDL-Ch/(mmol·L ⁻¹)	1.11±0.30	1.16±0.34	0.096
LDL-Ch/(mmol·L ⁻¹)	3.20±0.80	3.18±0.79	0.795
TC/(mmol·L ⁻¹)	5.09±1.25	5.05±1.25	0.719
TAG/(mmol·L ⁻¹)	1.54 (1.09, 2.56)	1.49 (0.95, 2.43)	0.570
FINS/(mU·L ⁻¹)	8.25 (5.45, 12.94)	7.03 (5.13, 12.20)	0.387
2 h INS/(mU·L ⁻¹)	36.39 (19.71, 54.47)	32.40 (20.10, 47.80)	0.854
HOMA-IR	2.63 (1.47, 4.78)	2.22 (1.34, 4.10)	0.136
HOMA-β	59.38 (31.46, 89.13)	55.57 (32.83, 85.99)	0.382
HOMA-IR ^①	1.02±0.83	0.88±0.88	0.913
HOMA-β ^①	3.95±0.84	3.95±0.78	0.983

Note: ^①Taking the natural logarithm of the data.

在男性人群中，与 GG 基因型携带者相比 GA+AA 基因型携带者 FBG 水平显著降低 ($P=0.016$)，HbA1c 水平显著降低 ($P=0.037$) (表5)。女性人群中，不同基因型携带者的临床特征无明显差异。

表5 男性人群不同基因型临床特征比较

Tab 5 Comparison of clinical features of different genotypes in the males

Item	GG (<i>n</i> =130)	GA+AA (<i>n</i> =86)	<i>P</i> value
Age/year	50.44±8.93	52.36±8.24	0.112
BMI/(kg·m ⁻²)	25.13±3.08	25.30±3.66	0.724
SBP/mmHg	131.93±17.05	130.91±19.62	0.698
DBP/mmHg	81.55±11.57	81.26±11.96	0.863
FBG/(mmol·L ⁻¹)	8.25±2.55	7.34±2.46	0.016
2 h PG/(mmol·L ⁻¹)	11.53±5.03	10.43±6.00	0.159
HbA1c/%	8.81±3.10	7.89±2.79	0.037
GA/%	22.23±9.02	19.98±9.84	0.116
HDL-Ch/(mmol·L ⁻¹)	1.01±0.28	1.07±0.36	0.230
LDL-Ch/(mmol·L ⁻¹)	3.20±0.81	3.14±0.78	0.637
TC/(mmol·L ⁻¹)	5.08±1.42	4.89±1.16	0.311
TAG/(mmol·L ⁻¹)	1.58 (1.17, 2.59)	1.71 (1.18, 3.39)	0.334
FINS/(mU·L ⁻¹)	8.10 (5.60, 12.51)	8.48 (5.24, 12.35)	0.699
2 h INS/(mU·L ⁻¹)	29.68 (17.53, 45.94)	32.52 (19.72, 47.08)	0.991
HOMA-IR	2.81 (1.56, 4.94)	2.39 (1.48, 3.99)	0.267
HOMA-β	47.62 (24.96, 73.33)	52.38 (31.24, 85.09)	0.151
HOMA-IR ^①	1.05±0.78	0.89±0.75	0.176
HOMA-β ^①	3.71±0.86	3.91±0.81	0.112

Note: ^①Taking the natural logarithm of the data.

3 讨论

GLP-1R 基因定位于 6 号染色体 (6p21.2), 包含 13 个外显子, 全长为 42 500 碱基对。*GLP-1R* 属于 G 蛋白偶联受体, 具有典型的 7 次跨膜 α -螺旋核心结构域和 1 个胞外结构域, 在激素信号接收及受体激活方面发挥重要作用^[10], 是 T2DM 的重要治疗靶点。近年来, 新型降糖药物 GLP-1 受体激动剂以其体重调控和血糖依赖性降糖等优势广受欢迎。多项研究发现, *GLP-1R* 基因的多态性与 GLP-1 受体激动剂敏感性、FBG^[11]、胰岛细胞功能^[12-13]、T2DM 发病机制^[14]、肥胖^[15]、冠状动脉疾病 (coronary artery disease, CAD)^[16] 相关。研究者将糖尿病患者分为 CAD 组和非 CAD 组, 检测 *GLP-1R* 基因的 11 个 SNPs 位点, 发现 rs4714210 位点 GG 基因型患者比其他基因型患者的 CAD 风险低 ($OR=0.442$, $95\% CI=0.258\sim0.757$, $P=0.002$)^[16]。房彬彬等^[17] 发现中国人群中 *GLP-1R*-rs1042044 位点 AC/CC 基因型和 T2DM 发病相关, 其携带者患病风险增加 0.634 倍 ($P=0.045$)。本研究通过多重 PCR 靶向重测序, 共检测到 *GLP-1R* 基因外显子区域的 23 个 SNPs 位点, 通过关联分析发现 rs3765467 位点与 T2DM 发病相关。已有研究^[18] 发现 rs3765467 G 等位基因可显著降低 β 细胞的胰岛素分泌和环磷酸腺苷 (cyclic adenosine monophosphate, cAMP) 浓度, 进而促进细胞凋亡。一项针对日本 T2DM 人群的研究^[13] 发现, 男性中与 rs3765467 GA+AA 基因型携带者相比, 携带 GG 基因型者胰岛素分泌量更低。这些研究提示 *GLP-1R* 基因突变在糖尿病发生发展中扮演重要角色。

本研究发现, T2DM 组 rs3765467 位点 GA+AA 基因型频率显著低于对照组; 与 G 等位基因携带者相比, rs3765467 位点 A 等位基因携带者患 T2DM 风险显著降低; 提示 rs3765467 (G/A) 变异与 T2DM 的发病相关, A 等位基因可能是 T2DM 的保护因素。韩国人群 *GLP-1R* 变异与 T2DM 相关性研究^[8] 发现 rs3765467 (G/A) 突变可降低 T2DM 风险 ($OR=0.84$, $P=3.55\times10^{-8}$), 这与我们的研究结果相似。但也有研究与我们的结果不同。李蕊等^[19] 分析中国山东 137 例 T2DM 患者及 100 例健康人 rs3765467 位点多态性的分布特征, 发现 T2DM 人群 GG 基因型携带者 TAG 水平高于 GG+GA 基因型携带者 ($P=0.03$), 但并未发现 rs3765467 与 T2DM 相关。这可能是由于 2 项研究之间存在样本量的差异, 也可能是因生活环境、遗传背景的差异, 导致 rs3765467 位点对 2 型糖尿病的影响存在

地区异质性。

为阐明 rs3765467 位点多态性对 T2DM 的影响, 本研究对不同基因型下临床特征进行比较。整体人群中, 与 GG 基因型携带者相比, GA+AA 基因型携带者 GA 水平显著降低, HbA1c 水平有下降趋势, 这提示 *GLP-1R* rs3765467 多态性参与血糖水平的调控。二肽基肽酶-4 (dipeptidyl peptidase-4, DPP-4) 抑制剂是一种常用降糖药, 可有效防止 GLP-1 的降解。一项关于韩国 T2DM 患者对 DPP-4 抑制剂的响应的研究^[20] 发现, 与 GG 基因型携带者相比, 携带 GA+AA 基因型的 T2DM 患者对 DPP-4 抑制剂的应答反应更高, HbA1c 降低幅度更大。这与我们的研究结果相似, 表明 rs3765467 位点多态性与血糖水平相关, GA+AA 基因型更利于保持血糖稳态。

按性别分组, 男性人群中 T2DM 组 rs3765467 A 等位基因频率显著低于对照组, A 等位基因携带者患病风险显著降低。临床特征分析显示, 与 GG 基因型携带者相比, GA+AA 基因型携带者 HbA1c、FBG 水平显著降低, 这与整体人群的情况一致。而女性人群中, T2DM 组与对照组的等位基因、基因型频率分布均不存在差异, 不同基因型间临床生化指标也不具有显著性差异。我们推测, rs3765467 A 等位基因可能是防止男性 T2DM 发生的特异性保护因素, A 等位基因有助于维持血糖稳态, 但未来仍需要更大的样本量来验证不同性别人群中 rs3765467 多态性与血糖的相关性。

GLP-1R 基因 rs3765467 变异与 T2DM 相关的机制尚未阐明。已知 GLP-1R 在与其配体互作过程中, 其胞外域先与配体 C 端结合, 从而确保配体的 N 端能够结合到受体核心区域, 进而激活受体; GLP-1R 胞外域中的氨基酸残基在其自身折叠及结构稳定中发挥关键作用^[21]。蛋白序列分析显示, rs3765467 位点 G/A 突变导致 GLP-1R 胞外结构域的 131 位精氨酸 (CGG) 被谷氨酰胺 (CAG) 替代。我们推测, rs3765467 位点 G/A 突变导致氨基酸残基替换可能会影响 GLP-1R 与其配体的结合效率, 影响后期细胞信号传导。

综上, 本研究通过病例-对照研究, 首次发现 *GLP-1R* rs3765467 与上海汉族人群 T2DM 发病风险相关; 次要等位基因 A 可能有助于维持血糖稳态, 是 T2DM 的保护因素, 这种保护性尤其在男性中显著。未来有待采用分子生物学的方法验证位点的功能, 从而为探讨 T2DM 发病机制及基因靶向治疗提供一定的理论依据。

参·考·文·献

- [1] Cho NH, Shaw JE, Karuranga S, et al. IDF diabetes atlas: global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2018, 138: 271-281.
- [2] Blad CC, Tang C, Offermanns S. G protein-coupled receptors for energy metabolites as new therapeutic targets[J]. Nat Rev Drug Discov, 2012, 11(8): 603-619.
- [3] Koliaki C, Doupis J. Incretin-based therapy: a powerful and promising weapon in the treatment of type 2 diabetes mellitus[J]. Diabetes Ther, 2011, 2(2): 101-121.
- [4] Leech CA, Holz GG, Chepurny O, et al. Expression of cAMP-regulated guanine nucleotide exchange factors in pancreatic β -cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 278(1): 44-47.
- [5] Beinborn M, Worrall CI, McBride EW, et al. A human glucagon-like peptide-1 receptor polymorphism results in reduced agonist responsiveness[J]. Regul Pept, 2005, 130(1/2): 1-6.
- [6] Shalaby SM, Zidan HE, Shokry A, et al. Association of incretin receptors genetic polymorphisms with type 2 diabetes mellitus in Egyptian patients[J]. J Gene Med, 2017, 19(9/10): e2973.
- [7] Sathananthan A, Man CD, Micheletto F, et al. Common genetic variation in *GLP1R* and insulin secretion in response to exogenous GLP-1 in nondiabetic subjects: a pilot study[J]. Diabetes Care, 2010, 33(9): 2074-2076.
- [8] Kwak SH, Chae J, Lee S, et al. Nonsynonymous variants in *PAX4* and *GLP1R* are associated with type 2 diabetes in an East Asian population[J]. Diabetes, 2018, 67(9): 1892-1902.
- [9] Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation[J]. Diabet Med, 1998, 15(7): 539-553.
- [10] Parthier C, Reedtz-Runge S, Rudolph R, et al. Passing the baton in class B GPCRs: peptide hormone activation via helix induction? [J]. Trends Biochem Sci, 2009, 34(6): 303-310.
- [11] Scott RA, Freitag DF, Li L, et al. A genomic approach to therapeutic target validation identifies a glucose-lowering *GLP1R* variant protective for coronary heart disease[J]. Sci Transl Med, 2016, 8(341): 341ra76.
- [12] Anderson B, Carlson P, Laurenti M, et al. Association between allelic variants in the glucagon-like peptide 1 and cholecystokinin receptor genes with gastric emptying and glucose tolerance[J]. Neurogastroenterol Motil, 2020, 32(1): e13724.
- [13] Nishiya Y, Daimon M, Mizushiri S, et al. Nutrient consumption-dependent association of a glucagon-like peptide-1 receptor gene polymorphism with insulin secretion[J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 16382.
- [14] Karras SN, Rapti E, Koufakis T, et al. Pharmacogenetics of glucagon-like peptide-1 agonists for the treatment of type 2 diabetes mellitus[J]. Curr Clin Pharmacol, 2017, 12(4): 202-209.
- [15] Jensterle M, Pirš B, Goričar K, et al. Genetic variability in GLP-1 receptor is associated with inter-individual differences in weight lowering potential of liraglutide in obese women with PCOS: a pilot study[J]. Eur J Clin Pharmacol, 2015, 71(7): 817-824.
- [16] Ma X, Lu R, Gu N, et al. Polymorphisms in the glucagon-like peptide 1 receptor (*GLP-1R*) gene are associated with the risk of coronary artery disease in Chinese Han patients with type 2 diabetes mellitus: a case-control study[J]. J Diabetes Res, 2018, 2018: 1054192.
- [17] 房彬彬, 罗俊一, 李艳红, 等. *GLP1R* 基因 rs1042044 多态性与 2 型糖尿病的相关性研究[J]. 新疆医科大学学报, 2021, 44(1): 8-11.
- [18] Li W, Li P, Li R, et al. *GLP1R* single-nucleotide polymorphisms rs3765467 and rs10305492 affect β cell insulin secretory capacity and apoptosis through GLP-1[J]. DNA Cell Biol, 2020, 39(9): 1700-1710.
- [19] 李蕊, 尹影, 徐曰东, 等. 胰升糖素样肽 1 受体基因多态性与 2 型糖尿病代谢指标的相关性研究[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2019, 35(11): 945-949.
- [20] Han E, Park HS, Kwon O, et al. A genetic variant in *GLP1R* is associated with response to DPP-4 inhibitors in patients with type 2 diabetes[J]. Medicine (Baltimore), 2016, 95(44): e5155.
- [21] Dong M, Gao F, Pinon DI, et al. Insights into the structural basis of endogenous agonist activation of family B G protein-coupled receptors[J]. Mol Endocrinol, 2008, 22(6): 1489-1499.

[收稿日期] 2021-04-13

[本文编辑] 张慧俊

