

文章编号 1006-8147(2018)02-0135-03

论 著

## 腰臀比性状的全基因组通路关联分析研究

张苗苗<sup>1</sup>, Struan Grant<sup>2</sup>, Hakon Hakonarson<sup>2</sup>, R. Arlen Price<sup>3</sup>, 张 愿<sup>1</sup>, 李卫东<sup>1</sup>, 焦红肖<sup>4</sup>

(1.天津医科大学遗传学系,天津 300070;2.美国费城儿童医院应用基因组学中心,费城 PA 19104;3.美国宾夕法尼亚大学医学院精神医学系,费城 PA 19104;4.天津医科大学基础医学研究中心,天津 300070)

**摘要** 目的:通过对欧洲裔美国人群腰臀比性状进行全基因组通路关联分析研究,以期寻找与腰臀比性状相关的信号通路。方法:以700例腹型肥胖患者(病例组)和358例正常人群(对照组)为研究对象,利用改良的基因富集分析法(GenGen软件)在全基因组大约550 000个SNP位点,1 347条通路/基因集中对腰臀比性状进行全基因组通路关联分析。结果:腰臀比二分类变量(病例/对照)分析结果显示,65条通路/基因集达到显著水平(empirical  $P < 0.05$ ),其中rasPathway(empirical  $P = 0.003$ , FDR=0.238)最为显著,该通路相关基因也包含于ceramidePathway(empirical  $P = 0.004$ , FDR=0.196)和hcmvPathway(empirical  $P = 0.005$ , FDR=0.203)信号通路中。结论:Ras信号通路可能与欧洲裔美国人群的腰臀比性状相关。

**关键词** 腰臀比;全基因组关联分析;通路关联分析;腹型肥胖;欧洲裔

中图分类号 R394.5

文献标志码 A

### A genome wide pathway association study of waist-to-hip ratio

ZHANG Miao-miao<sup>1</sup>, Struan Grant<sup>2</sup>, Hakon Hakonarson<sup>2</sup>, R. Arlen Price<sup>3</sup>, ZHANG Yuan<sup>1</sup>, LI Wei-dong<sup>1</sup>, JIAO Hong-xiao<sup>4</sup>

(1.Department of Genetics, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2.Center for Applied Genomics, Children's Hospital of Philadelphia, Philadelphia PA 19104, USA; 3.Department of Psychiatry, University of Pennsylvania Perelman School of Medicine, Philadelphia PA 19104, USA; 4.Research Center of Basic Medical Sciences, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

**Abstract Objective:** To explore the signaling pathways associated with WHR (waist to hip ratio), and to conduct case/control pathway-based genome wide association study in a European American cohort. **Methods:** Comprising 700 patients with abdominal obesity and 358 matched healthy controls, pathway-based genome wide association study in WHR was carried out by the modified Gene Set Enrichment Algorithm (GenGen software) in 550 000 single nucleotide polymorphisms (SNPs) and a total of 1 347 pathways. **Results:** Sixty-five pathways manifested a significant level of empirical  $P < 0.05$ , and the most significant pathway was rasPathway (empirical  $P = 0.003$ , FDR=0.238). Genes in the rasPathway were also identified by ceramidePathway (empirical  $P = 0.004$ , FDR=0.196) and hcmvPathway (empirical  $P = 0.005$ , FDR=0.203). **Conclusion:** The results indicate that the rasPathway may affect the WHR of European ancestry Americans.

**Key words** waist to hip ratio; genome wide association study; pathway associations analysis; abdominal obesity; European ancestry

腰臀比(waist to hip ratio, WHR)反映人体腹部皮下脂肪及内脏脂肪的聚集程度,是判断中心性肥胖的重要测量标准。最近研究表明,人体脂肪分布是一种重要的代谢健康量度,不同的脂肪分布与不同的代谢风险相关<sup>[1]</sup>。腰围(waist circumference, WC)与腰臀比作为判定中心性肥胖的测量指标是高度遗传的<sup>[2]</sup>。多个影响腰臀比的常见遗传变异位点已经通过全基因组关联分析研究(Genome-wide association study, GWAS)确认。Lindgren等<sup>[3]</sup>确认2个与WC相关的基因位点(*TFAP2B*和*MSRA*)及1个在女性中与WHR相关的基因位点(*LYPLAL1*)。

基金项目 国家重点研发计划基金资助项目(2017YFC1001900);天津医科大学科研基金(2016KYZQ08)

作者简介 张苗苗(1993-),女,硕士在读,研究方向:病理学与病理生理学;通信作者:李卫东, E-mail: liweidong98@tjmu.edu.cn;焦红肖, E-mail: jiaohongxiao@163.com。

Heid等<sup>[4]</sup>在欧洲人群中确认了14个基因位点与脂肪分布相关,其中包括已经确认的*LYPLAL1*基因。WHR作为复杂性状,由多种基因控制。传统的GWAS由于其有限的检测效能,一些与WHR相关的微效基因在多重检验校正后变得不显著,同时也忽略了基因之间的交互作用,致使一些利用GWAS筛选出来的基因不足以解释WHR性状的较高遗传度<sup>[4]</sup>。为了弥补传统GWAS的不足,许多新的分析方法应运而生,Wang等<sup>[5]</sup>在基因集合富集分析GSEA(Gene Set Enrichment Analysis)算法的基础上开发出应用于GWAS数据进行全基因组通路关联分析的方法GenGen<sup>[6]</sup>。本研究采用GenGen软件检测与WHR相关的基因集合/通路,通过已有的生物学通路知识确定与WHR相关的基因集合/通路,为挖掘WHR候选基因提供一定的科学依据。

## 1 资料与方法

**1.1 研究对象** 本研究收集 1 071 名无血缘关系的欧洲裔美国人作为研究对象,其中 526 名极度肥胖者 ( $BMI > 35 \text{ kg/m}^2$ ), 545 名体质量正常者 ( $BMI < 25 \text{ kg/m}^2$  且一生中未超过  $25 \text{ kg/m}^2$ )。极度肥胖者全部选自肥胖三联体和肥胖家系中的先证者。肥胖三联体要求父母双方至少有一个正常;肥胖家系要求同时具备肥胖同胞对和正常-肥胖同胞对。选取正常体质量者与极度肥胖者间无血缘关系,且匹配性别、年龄和地理分布。研究对象中,1 058 例样本含有腰围/臀围资料,其中女性 1 017 例,男性 41 例。调查取样均已征得本人同意并签署知情同意书,该研究获得美国宾夕法尼亚大学人类研究委员会批准。

**1.2 腰臀比分组** 腰臀比病例/对照分析时,根据 1999 年世界卫生组织 WHO 对中心性肥胖的诊断定义,将 WHR:男  $> 0.90$ ,女  $> 0.85$  样本作为病例组, WHR:男  $\leq 0.90$ ,女  $\leq 0.85$  样本作为对照组。

### 1.3 方法

**1.3.1 提取全基因组 DNA** 采用高盐法获取人外周血全基因组 DNA,紫外分光光度计测定 DNA 浓度及纯度确保质量, DNA 样本于  $-80^\circ\text{C}$  保存。

**1.3.2 基因分型及质量控制** 采用 Illumina 公司 Illumina HumanHap 550 SNP array 对大约 55 万个 SNP 位点进行基因分型,其中剔除次等位基因频率 (MAF) 小于 0.01 或哈迪-温伯格平衡 (HWE) 检测值小于 0.001 的 SNP 位点,共计约 518 230 个 SNPs, 17 437 个基因,基因分型结果保存于 Illumina BeadStudio 3.0 进行整理。

**1.4 统计学分析** 应用 SPSS17.0 软件对样本表型资料进行统计学描述。运用 GenGen 软件对全基因组约 55 万个 SNP 位点进行腰臀比二分类变量 (病例/对照) 全基因组通路关联分析,运算方法如下: (1) 经  $\chi^2$  检验确定病例/对照试验中每一个 SNP 位点对应  $\chi^2$  值,选取每个基因内 SNP 位点最大  $\chi^2$  值作为该基因的统计值; (2) 利用 GSEA 运算法则计算基因集/通路 S 富集值 ES(S); (3) 为了调整不同基因的大小和同一基因内不同 SNP 位点之间的连锁不平衡,进行以下校正: ① 随机对样本进行 1 000 次表型重排 (每次重排后病例/对照组样本量不变), 计算每次重排后相应富集值  $ES(S, \pi)$ , ② 根据 1 000 次表型重排富集值计算标准化富集值 NES,  $NES = [ES(S) - \text{mean}(ES(S, \pi))] / SD[ES(S, \pi)]$ , 从而不同基因集/通路 S 间可进行比较; (4) 计算实验 P 值 (empirical P), 重排后  $ES(S, \pi)$  值大于实际 ES(S) 值的次数的百分比即为实验 P 值; (5) 对所得结果进行

多重假设检验,其中假阳性发现率 (false-discovery rate, FDR) 用来控制预期的假阳性发现比例小于一定阈值,参照 Aravind 等<sup>[7]</sup>的 GSEA 法分析研究,本次研究 FDR 显著性标准设定为  $FDR \leq 0.25$ 。

## 2 结果

**2.1 WHR 基本特征描述** 本研究共纳入研究对象 1 058 例,其中病例组 700 例,对照组 358 例,对照组与病例组间 WHR 水平差异显著 ( $P < 0.000 1$ ),见表 1。

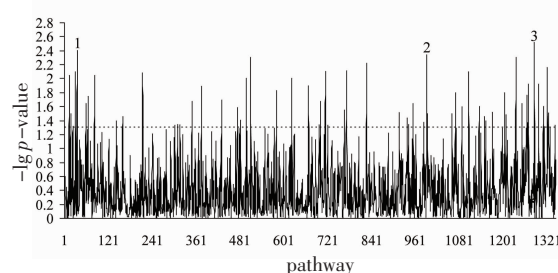
表 1 病例/对照组 WHR 特征描述

Tab 1 Traits distributions of WHR in cases and controls

	样本量/n(%)	性别(女/男)	年龄( $\bar{x} \pm s$ )	WHR( $\bar{x} \pm s$ )
总体	1058(100)	1017/41	42.1 $\pm$ 9.1	0.84 $\pm$ 0.01
病例组	700(66.20)	685/15	42.5 $\pm$ 8.7	0.87 $\pm$ 0.07*
对照组	358(33.80)	332/26	41.3 $\pm$ 9.8	0.77 $\pm$ 0.05

\*  $P < 0.000 1$ , vs. 对照组

**2.2 统计结果分析** 通过对腰臀比性状在约 55 万个 SNP 位点、1 347 条通路/基因集合中全基因组通路关联分析研究发现: 65 条通路/集合达到显著水平 ( $P < 0.05$ ), 其中 3 条通路经多重检验校正后  $FDR \leq 0.25$ 。如图 1、表 2 所示。在 65 条通路/集合中, rasPathway (Ras 信号通路) 最为显著 (empirical  $P = 0.003$ ,  $FDR = 0.238$ )。另外, ceramidePathway (神经酰胺信号通路) 和 hcmvPathway (人巨细胞病毒与 MAPK 通路) 是另外两条结果显著的通路 (分别为 empirical  $P = 0.004$ ,  $FDR = 0.196$ ; empirical  $P = 0.005$ ,  $FDR = 0.203$ )。如表 3 所示, Ras 信号通路包含 23 个基因, 其下游分支 PI3K/AKT 途径相关基因 BAD、AKT1、PIK3CA、PIK3CG、PIK3R1; MAPK/ERK 途径相关基因 RAF1、MAP3K1、MAPK1、MAPK3、MAP2K1 和 IKK $\beta$ /NF- $\kappa$ B 途径相关基因 NFKB1 和 RELA 等均广泛分布于与 WHR 性状相关的 ceramidePathway 和 hcmvPathway 中, 提示 rasPathway 基因集合与 WHR 性状可能存在一定的关联性。



图中虚线为  $-\lg 0.05$ , 1 表示 ceramidePathway, 2 表示 hcmvPathway, 3 表示 rasPathway, 3 条通路具有较高的显著性, 其中 rasPathway 最为显著; 1 347 条通路/基因集合分别选自 BioCarc, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) 和 Gene Ontology (GO) 公共通路数据库

图 1 WHR(case/control)通路分析 empirical P 值分布图

Fig 1 Distribution of empirical P value of WHR related pathways in cases and controls

表 2 WHR(case/control)显著相关通路

Tab 2 Significant pathways of WHR in cases and controls

通路 ID	基因数	empirical <i>P</i>	FDR	数据库	注释
rasPathway	23	0.003	0.238	BioCara	Ras 信号通路
ceramidePathway	22	0.004	0.196	BioCara	神经酰胺信号通路
hcmvPathway	17	0.005	0.203	BioCara	人巨细胞病毒与 MAPK 通路

表 3 信号通路基因集合

Tab 3 Gene set of pathways

通路 ID	基因
rasPathway	AKT1 BAD BCL2L1 CASP9 CDC42 CHUK ELK1 FOXO4 HRAS MAP2K1 MAPK3 NFKB1 PIK3CA PIK3CG PIK3R1 PLD1 RAC1 RAF1 RALA RALBP1 RALGDS RELA RHOA
ceramidePathway	AIFM1 BAD BAX BCL2 CASP8 CYCS FADD MAP2K1 MAP2K4 MAP3K1 MAPK1 MAPK3 MAPK8 NFKB1 NSMAF RAF1 RELA RIPK1 SMPD1 TNFRSF1A TRADD TRAF2
hcmvPathway	AKT1 CREB1 MAP2K1 MAP2K2 MAP2K3 MAP2K6 MAP3K1 MAPK1 MAPK14 MAPK3 NFKB1 PIK3CA PIK3CG PIK3R1 RB1 RELA SPI

3 讨论

脂肪中心性积累与一系列的疾病如糖尿病、高血压和心脏病等相关<sup>[8-10]</sup>,其关联性甚至超出了广义肥胖<sup>[11]</sup>。研究发现<sup>[12]</sup>,腹部肥胖者脂肪在腹腔内脏分布,内脏脂肪的聚集及分泌代谢多种细胞因子进入循环系统,包括 IL-6、TNF- $\alpha$ 、脂联素、瘦素等,导致一系列代谢异常,如胰岛素抵抗、血脂代谢异常、糖调节受损、慢性炎症反应等。1999 年 WHO 将中心性肥胖(WHR:男>0.90,女>0.85 和(或)BMI>30 kg/m<sup>2</sup>)作为代谢综合征 MS 的诊断标准之一。2005 年,国际糖尿病联盟工作组 IDF 将中心性肥胖作为 MS 的必要诊断条件。作为一项重要的临床指标,复杂性状 WHR 群体水平的遗传学研究具有深刻的意义。本研究中,利用改良后的基因集合富集分析法对复杂性状 WHR 进行全基因组通路关联分析,研究发现 Ras 信号通路与 WHR 显著相关,其下游分支 PI3K/AKT 途径、MAPK/ERK 途径和 NF- $\kappa$ B 途径位于多条与 WHR 相关的通路中,如神经酰胺信号通路和人巨细胞病毒与 MAPK 通路,提示 Ras 信号通路基因集合与 WHR 性状存在一定的关联性。

PI3K/AKT 途径和 MAPK/ERK 途径及其它们的下游途径 NF- $\kappa$ B 途径影响细胞内多种生物学功能,如细胞增殖、凋亡、细胞迁徙、细胞周期、免疫炎症等。PI3K/AKT 途径是胰岛素信号通路中的经典途径,胰岛素主要通过 PI3K 途径介导胰岛素对葡萄糖、蛋白质及脂肪代谢的调控作用。最近的研究发现胰岛素和瘦素信号可通过 PI3K/AKT、Foxo1、MAPK 和 mTOR 通路相互作用共同调节能量代谢。MAPK/ERK 途径同样与细胞的增殖、分化和凋亡相关,并参与炎症、肿瘤等疾病的发生。NF- $\kappa$ B 途径作

为 PI3K/AKT 途径和 MAPK/ERK 途径的下游分支,可调控多种炎症因子的表达,在细胞凋亡、免疫、炎症等生物学进程中发挥作用。Zhang 等<sup>[13]</sup>证实下丘脑内侧基底部的 IKK $\beta$ /NF- $\kappa$ B 途径激活可导致中央胰岛素和瘦素抵抗。Yuan 等<sup>[14]</sup>研究发现炎症反应和 IKK $\beta$ /I $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B 途径激活是造成肥胖和饮食诱导的胰岛素抵抗的主要原因。整体、器官和组织对胰岛素作用的反应性降低,可促进肌肉、脂肪等外周组织摄取和利用葡萄糖,抑制肝糖输出,促进糖原与脂肪的合成,造成一系列代谢紊乱。越来越多的证据表明外周组织的脂肪累积与肥胖和 2 型糖尿病中发现的胰岛素抵抗相关。在之前的通路关联研究中,我们已经证实 Ras 信号通路与欧洲裔美国人群中血浆脂联素水平相关<sup>[15]</sup>。人体脂联素水平与糖尿病、肥胖呈负相关,在人体内具有广泛的调节功能,可促进脂肪酸氧化、增强葡萄糖摄取和改善胰岛素抵抗等,提示 Ras 信号通路中 PI3K/AKT 途径和 MAPK/ERK 途径及其它们的下游途径 NF- $\kappa$ B 途径可能借助脂联素、胰岛素等信号进行一系列代谢调控,造成糖代谢紊乱,脂肪合成增加与代谢减少,造成腹部脂肪累积,进而影响腰臀比。

总之,本研究利用全基因组通路关联分析全面展示了与复杂性状 WHR 相关的通路网络,提示 Ras 信号通路可能与欧洲裔美国人群中复杂性状腰臀比具有关联。我们准备扩大样本量进一步验证,并进行相关的功能性研究。

参考文献:

[1] Booth A, Magnuson A, Foster M. Detrimental and protective fat: body fat distribution and its relation to metabolic disease[J]. Horm Mol Biol Clin Investig, 2014, 17(1): 13

(下转第 141 页)



- number, the size of metastatic foci, and the presence of desmoplasia[J]. *Surgery*, 2015,157(1):111
- [4] Zhao Q, Ming J, Liu C, et al. Multifocality and total tumor diameter predict central neck lymph node metastases in papillary thyroid microcarcinoma[J]. *Ann Surg Oncol*, 2013,20(3):746
- [5] Lee J S Y, Soh E Y. Central lymph node metastasis is an important prognostic factor in patients with papillary thyroid microcarcinoma[J]. *J Korean Med Sci*, 2014,29(1):48
- [6] Mazzaferri E L, Jhiang S M. Long-term impact of initial surgical and medical therapy on papillary and follicular thyroid cancer[J]. *Am J Med*, 1994,97(5):418
- [7] 于洋,高明. 甲状腺微小乳头状癌外科治疗进展[J]. *中国肿瘤临床*, 2015, 53 (9): 487
- [8] 苗蔚. 第十五个世界癌症日到来及《世界癌症报告》发表[J]. *中华医学杂志*, 2014,94(12):888
- [9] Zhou Y L, Gao E L, Zhang W, et al. Factors predictive of papillary thyroid micro-carcinoma with bilateral involvement and central lymph node metastasis: a retrospective study[J]. *World J Surg Oncol*, 2012,10:67
- [10] Park J P, Roh J L, Lee J H, et al. Risk factors for central neck lymph node metastasis of clinically noninvasive, node-negative papillary thyroid microcarcinoma[J]. *Am J Surg*, 2014,208(3):412
- [11] Mao L N, Wang P, Li Z Y, et al. Risk factor analysis for central nodal metastasis in papillary thyroid carcinoma[J]. *Oncol Lett*, 2015,9(1):103
- [12] Xiang D, Xie L, Xu Y, et al. Papillary thyroid microcarcinomas located at the middle part of the middle third of the thyroid gland correlates with the presence of neck metastasis[J]. *Surgery*, 2015, 157(3):526
- [13] Hunt J P, Buchmann L O, Wang L, et al. An analysis of factors predicting lateral cervical nodal metastases in papillary carcinoma of the thyroid[J]. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 2011,137(11):1141
- [14] Yang Y, Chen C, Chen Z, et al. Prediction of central compartment lymph node metastasis in papillary thyroid microcarcinoma[J]. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2014,81(2):282
- [15] So Y K, Son Y I, Hong S D, et al. Subclinical lymph node metastasis in papillary thyroid microcarcinoma: a study of 551 resections[J]. *Surgery*, 2010,148(3):526
- [16] Kim W Y, Kim H Y, Son G S, et al. Clinicopathological, immunohistochemical factors and recurrence associated with extrathyroidal extension in papillary thyroid microcarcinoma[J]. *J Cancer Res Ther*, 2014,10(1):50
- [17] Pisanu A, Saba A, Podda M, et al. Nodal metastasis and recurrence in papillary thyroid microcarcinoma[J]. *Endocrine*, 2015,48(2):575
- [18] Kim E Y, Kim W G, Kim W B, et al. Coexistence of chronic lymphocytic thyroiditis is associated with lower recurrence rates in patients with papillary thyroid carcinoma[J]. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2009, 71(4):581

(2017-08-31 收稿)

+++++

(上接第 137 页)

- [2] Schleinitz D, Böttcher Y, Blüher M, et al. The genetics of fat distribution[J]. *Diabetologia*, 2014, 57(7): 1276
- [3] Lindgren C M, Heid I M, Randall J C, et al. Genome-wide association scan meta-analysis identifies three Loci influencing adiposity and fat distribution[J]. *PLoS Genet*, 2009, 5(6): e1000508
- [4] Heid I M, Jackson A U, Randall J C, et al. Meta-analysis identifies 13 new loci associated with waist-hip ratio and reveals sexual dimorphism in the genetic basis of fat distribution[J]. *Nat Genet*, 2010, 42(11): 949
- [5] Lai Y, Zhang F, Nayak T K, et al. Concordant integrative gene set enrichment analysis of multiple large-scale two-sample expression data sets[J]. *BMC Genomics*, 2014, 15(Suppl 1): S6
- [6] Wang K, Li M, Bucan M. Pathway-based approaches for analysis of genomewide association studies[J]. *Am J Hum Genet*, 2007, 81(6): 1278
- [7] Subramanian A, Tamayo P, Mootha V K, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102 (43): 15545
- [8] Khan A, Faheem M, Shah S T, et al. Frequency of abdominal obesity and its association with diabetes mellitus among people of peshawar[J]. *J Ayub Med Coll Abbottabad*, 2015, 27(3): 617
- [9] De Oliveira C M, Ulbrich A Z, Neves F S, et al. Association between anthropometric indicators of adiposity and hypertension in a Brazilian population: Baependi Heart Study[J]. *PLoS One*, 2017, 12(10): e0185225
- [10] Keihani S, Hosseinpahan F, Barzin M, et al. Abdominal obesity phenotypes and risk of cardiovascular disease in a decade of follow-up: the Tehran Lipid and Glucose Study[J]. *Atherosclerosis*, 2015, 238(2): 256
- [11] Myint P K, Kwok C S, Luben R N, et al. Body fat percentage, body mass index and waist-to-hip ratio as predictors of mortality and cardiovascular disease[J]. *Heart*, 2014, 100(20): 1613
- [12] Reilly M P, Rader D J. The metabolic syndrome: more than the sum of its parts[J]. *Circulation*, 2003, 108(13): 1546
- [13] Zhang X Q, Zhang G, Zhang H, et al. Hypothalamic IKK beta/NF-kappa B and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity[J]. *Cell*, 2008, 135(1): 61
- [14] Yuan M, Konstantopoulos N, Lee J, et al. Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta[J]. *Science*, 2001, 293(5535): 1673
- [15] Li W D, Jiao H, Wang K, et al. Pathway-Based genome-wide association studies reveal that the Rac1 pathway is associated with plasma adiponectin levels[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 13422

(2017-10-12 收稿)