

SLC30A8 和 PTPRD 基因多态性与南京地区中老年人 2 型糖尿病的相关性研究

赵丽娟 徐宽枫 杨涛 戴皓 马冰沁 季荔 陈阳 施云 郑帅 胡晴芳
张青青 杨帆 蒋琳

【摘要】 目的 探讨溶质载体家族 30/ 锌转运体, 成员 8 (SLC30A8) 基因 (rs13266634 和 rs3802177) 和蛋白酪氨酸磷酸酶受体 D (PTPRD) 基因 (rs17584499) 单核苷酸多态性与南京地区中老年人 2 型糖尿病的相关性。方法 对南京地区 40 岁以上人群行 75 g 口服葡萄糖耐量试验及问卷调查, 选取 2 型糖尿病 1 758 例 (糖尿病组), 正常对照 1 970 名 (对照组), 提取外周血基因组 DNA, 对其 SLC30A8 和 PTPRD 基因 3 个目标位点的基因型进行检测, 分析与 2 型糖尿病的关系。结果 SLC30A8 基因位点 rs13266634 在糖尿病组的基因型频率 (CC、CT 和 TT) 分别为 35.9%、48.2% 和 15.9%, 对照组为 33.3%、48.8% 和 17.9%, 糖尿病组 C 等位基因频率高于对照组 ($\chi^2=3.986, P=0.046$), C 等位基因携带者患 2 型糖尿病的风险是 T 等位基因的 1.158 倍 [优势比 (OR)=1.158, $P=0.005$]。位点 rs3802177 在糖尿病组的基因型频率 (CC、CT 和 TT) 分别为 35.3%、48.2% 和 16.5%, 对照组为 32.1%、49.9% 和 18.0%, 糖尿病组 C 等位基因频率高于对照组 ($\chi^2=4.085, P=0.043$), C 等位基因携带者患 2 型糖尿病的风险是 T 等位基因的 1.162 倍 (OR=1.162, $P=0.004$)。PTPRD 基因位点 rs17584499 在糖尿病组的基因型频率 (CC、CT 和 TT) 分别为 81.9%、16.9% 和 1.2%, 对照组为 82.4%、16.5% 和 1.1%, 两组基因频率分布无统计学差异 ($\chi^2=0.274, P=0.600$)。结论 SLC30A8 基因位点 rs13266634 和 rs3802177 的 C 等位基因可能是 2 型糖尿病的风险基因, 与南京地区中老年人 2 型糖尿病相关, 未发现 PTPRD 基因 (rs17584499) 与本地区 2 型糖尿病相关。

【关键词】 溶质载体家族 30/ 锌转运体, 成员 8; 蛋白酪氨酸磷酸酶受体 D; 2 型糖尿病; 单核苷酸多态性

Relationship between SLC30A8 and PTPRD gene polymorphisms and type 2 diabetes in middle aged and elderly people in Nanjing area Zhao Lijuan*, Xu Kuanfeng, Yang Tao, Dai Hao, Ma Bingqin, Ji Li, Chen Yang, Shi Yun, Zheng Shuai, Hu Qingfang, Zhang Qingqing, Yang Fan, Jiang Lin. *Department of Endocrinology, The First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

Corresponding author: Jiang Lin, Email: jlinna0000@163.com

【Abstract】 Objective To explore the relationship between solute carrier family 30/zinc transporter, member 8 (SLC30A8) gene (rs13266634 and rs3802177) and protein tyrosine phosphatase receptor type D (PTPRD) gene (rs17584499) single nucleotide polymorphisms (SNPs) and type 2 diabetes in middle aged and elderly people in Nanjing area. **Methods** Genomic DNA were extracted from peripheral blood of 1 758 type 2 diabetic patients (diabetes group) and 1 970 healthy controls (control group) who had received 75 g oral glucose tolerance test and questionnaire survey. All patients were all over 40 years old and came from Nanjing area. Genotypes of three target loci of gene SLC30A8 and PTPRD were detected. Relation between type 2 diabetes and genotype distribution were analyzed. **Results** The frequencies of the three genotypes CC, CT and TT of SLC30A8 rs13266634 were 35.9%, 48.2% and 15.9% in diabetes group and 33.3%, 48.8% and 17.9% in control group, respectively. The C allele frequency in diabetes group was higher than that in control group ($\chi^2=3.986, P=0.046$). The risk of type 2 diabetes for C allele carriers was 1.158 times that of T allele [odds ratio (OR)=1.158, $P=0.005$]. The frequencies of three genotypes CC, CT and TT of rs3802177 were 35.3%, 48.2% and 16.5% in diabetes group and 32.1%, 49.9% and 18.0% in control group, respectively. The C allele frequency in diabetes group was higher than that in control group ($\chi^2=4.085, P=0.043$). The risk of type 2 diabetes for C allele carriers was 1.162 times that of T allele (OR=1.162, $P=0.004$). The distribution of CC, CT and TT of PTPRD rs17584499 in control group (81.9%, 16.9% and 1.2%) and diabetes group (82.4%, 16.5% and 1.1%) was not different ($\chi^2=0.274, P=0.600$). **Conclusions** The polymorphisms of rs13266634

DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-4157.2015.03.001

作者单位: 210029 南京医科大学第一附属医院内分泌科 (赵丽娟, 徐宽枫, 杨涛, 戴皓, 马冰沁, 季荔, 陈阳, 施云, 郑帅, 蒋琳); 215004 苏州大学附属第二医院内分泌科 (胡晴芳); 225499 泰州市人民医院内分泌科 (张青青); 214002 无锡市第二人民医院内分泌科 (杨帆)

通信作者: 蒋琳, Email: jlinna0000@163.com

and rs3802177 in SLC30A8 are associated with type 2 diabetes in middle aged and elderly people in Nanjing area. The C allele might be a risk allele of type 2 diabetes. There is no relationship between rs17584499 in PTPRD and type 2 diabetes in this area.

【Key words】 Solute carrier family 30/zinc transporter, member 8; Protein tyrosine phosphatase receptor type D; Type 2 diabetes mellitus; Single nucleotide polymorphism

(Int J Endocrinol Metab, 2015, 35: 145-148)

2 型糖尿病是一种常见的慢性内分泌代谢性疾病,其发病受遗传及环境等多种因素共同影响。自 2007 年以来,全基因组关联分析(GWAS)及荟萃分析发现了众多与 2 型糖尿病相关的易感基因,如 TCF7L2、CDKAL1、HHEX 和 KCNJ11 等^[1]。胰岛分泌颗粒对 Zn 的摄入主要靠锌离子转运蛋白 8(ZnT8)来调节,而 ZnT8 是溶质载体家族 30/ 锌转运体,成员 8 (SLC30A8)基因的表达产物^[2]。近年来研究发现,SLC30A8 基因的多个单核苷酸多态性(SNP)位点与 2 型糖尿病有关,但不同研究结果尚存在差异^[3]。且在中国人群中的大样本研究为数不多。蛋白酪氨酸磷酸酶受体 D(PTPRD)基因(rs17584499)是 2010 年首先在汉族人群(中国台湾居民)中发现与 2 型糖尿病相关的^[4]。但 2013 年对日本人群的研究得出了阴性结果^[5]。目前,此基因位点与中国大陆人群 2 型糖尿病发病的关系研究甚少。本研究对南京地区人群 SLC30A8 基因(rs13266634、rs3802177)和 PTPRD 基因(rs17584499)进行了 SNP 检测和分析,旨在探讨其与 2 型糖尿病的相关性。

1 对象与方法

1.1 研究对象 选取 2010 年中国非传染性疾病流行病学调查中南京地区人群,均进行过 75 g 口服葡萄糖耐量试验(OGTT)、HbA1c、血脂水平检测及问卷调查,共 1 758 例 2 型糖尿病患者入选作为糖尿病组,其中男性 753 例,女性 1 005 例,同时,选择 1 970 名正常者作为对照组,其中男性 622 名,女性 1 348 名。

糖尿病组入选标准:(1)年龄在 40 周岁以上。(2)OGTT 结果符合世界卫生组织(1999 年)制定的诊断标准:空腹血糖 ≥ 7.0 mmol/L 或餐后 2 h 血糖 ≥ 11.1 mmol/L,并结合病史及家族史排除 1 型糖尿病、继发性糖尿病及其他原因所致糖尿病。(3)既往已确诊为 2 型糖尿病的患者。**对照组入选标准:**(1)年龄在 40 周岁以上。(2)OGTT 检测结果血糖正常。(3)既往无任何糖尿病及血糖异常病史。所有使用胰岛素治疗、既往肿瘤病史、肝脏疾病病史(慢性病毒性肝炎、肝硬化、自身免疫性肝病、其他肝脏疾病)、急慢性胰腺炎病史患者均未纳入本研究中。经入选人群均知情同意并经南京医科大学第一附属医院伦理委员会批准。

1.2 研究方法

1.2.1 提取外周血基因组 DNA 取外周血 2 ml,使用 DNA 提取试剂盒(TIANGEN 公司),按照说明书的步骤提取基因组 DNA:取冻存的抗凝血 2 ml,加入蛋白酶 K 混匀,加入缓冲液 GE,混匀后置于 65℃ 水浴,简短离心(3 000 r/min, r =160 mm)并室温冷却,加入无水乙醇,混匀后转移一半上述溶液至吸附柱,离心(5 000 r/min, r =160 mm)后丢弃滤液,将另一半溶液以同样方法过滤,向吸附柱中加入缓冲液 GD,离心(5 000 r/min, r =160 mm)后向吸附柱中加入缓冲液 PW,离心(5 000 r/min, r =160 mm)后再次向吸附柱中加入缓冲液 PW,离心(5 000 r/min, r =160 mm)后将吸附柱放入新的离心管中,加入 250 μ l 洗脱液 TB,室温静置 5 min,离心(5 000 r/min, r =160 mm)后将洗脱出滤液的吸至吸附柱中,再次静置后离心(5 000 r/min, r =160 mm),将所得溶液转移至干净的 EP 管中,于 -80℃ 保存备用。

1.2.2 PCR 扩增目的基因和基因分型检测 确定 SNP 位点后,使用 Sequenom 实验平台进行实验操作,以所选 SNP 位点为中心截取长度大于 100 bp 的基因序列,结合文献并采用 Assay Designer 3.1 软件进行引物设计,继而合成引物。对目的基因区域进行 PCR 扩增,经过 SAP 纯化、单碱基延伸反应后去盐、导入 Assay 中,并完成样本表格输入、建板和点样后进行 Mass ARRAY 分析,得出基因分型检测结果(北京六合华大基因科技有限公司)。每个 SNP 位点的基因型检出率 98%以上。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 18.0 软件进行统计分析,通过 χ^2 检验判断各位点的基因型频率分布是否符合 Hardy-Weinberg 平衡。连续变量的组间比较采用 *t* 检验,分类变量的组间比较采用 χ^2 检验,关联性分析采用二元 Logistic 回归,用优势比(OR)及其 95%可信区间(95% CI)表示相对危险度,同时进行性别、年龄及体重指数的校正。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Hardy-Weinberg 平衡与临床特征 入选的糖尿病组基本临床特征如表 1~3 所示。糖尿病组和对照组 SLC30A8 基因(rs13266634、rs3802177)和 PTPRD

基因(rs17584499)的基因分布频率均符合 Hardy-Weinberg 平衡。各基因位点糖尿病组与对照组之间的性别、年龄及体重指数存在差异,糖尿病组男性比例、年龄及体重指数均高于对照组。

2.2 各基因位点与 2 型糖尿病的相关性 SLC30A8 基因 rs13266634 位点检测结果得到 CC、CT 和 TT 3 种基因型。对照组 3 种基因型(CC、CT 和 TT)的频率分别为 33.3%、48.8%和 17.9%,糖尿病组分别为 35.9%、48.2%和 15.9%,糖尿病组 C 等位基因频率高于对照组($\chi^2=3.986, P=0.046$),见表 4。经年龄、性别及体重指数校正后,C 等位基因携带者患 2 型糖尿病的风险是 T 等位基因的 1.158 倍($OR=1.158, 95\%CI:1.046 \sim 1.283, P=0.005$)。在显性模型和隐性模型中,两组差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 5。

SLC30A8 基因 rs3802177 位点检测得到 CC、CT 和 TT 3 种基因型。对照组 3 种基因型(CC、CT 和 TT)频率分别为 32.1%、49.9%和 18.0%,糖尿病组分别为 35.3%、48.2%和 16.5%,糖尿病组 C 等位基因频率高于对照组($\chi^2=4.085, P=0.043$),见表 6。经校正年龄、性别及体重指数后,C 等位基因携带者患 2 型糖尿病的风险是 T 等位基因的 1.162 倍($OR=1.162, 95\%CI:1.049 \sim 1.288, P=0.004$)。在显性模型中,经年龄、性别、体重指数校正后两组差异未及统计学意义($P=0.053$),在隐性模型中,两组比较有显著性差

表 1 SLC30A8 基因 rs13266634 位点的有效例数及基本临床特征($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	性别 (男/女)	年龄 (岁)	体重指数 (kg/m ²)
糖尿病组	1 737	746/991	64.31 ± 8.57	25.2 ± 3.46
对照组	1 950	611/1 339	57.69 ± 8.98	23.59 ± 3.16
χ^2 值 / <i>t</i> 值		53.28	23.01	5.63
<i>P</i> 值		<0.05	<0.05	<0.05

表 2 SLC30A8 基因 rs3802177 位点的有效例数及基本临床特征($\bar{x} \pm s$)

rs3802177 组别	例数	性别 (男/女)	年龄 (岁)	体重指数 (kg/m ²)
糖尿病组	1 740	745/995	64.34 ± 8.56	25.19 ± 3.47
对照组	1 939	605/1 334	57.68 ± 9.00	23.58 ± 3.15
χ^2 值 / <i>t</i> 值		52.84	23.05	5.65
<i>P</i> 值		<0.05	<0.05	<0.05

表 3 PTPRD 基因 rs17584499 位点的有效例数及基本临床特征($\bar{x} \pm s$)

rs17584499 组别	例数	性别 (男/女)	年龄 (岁)	体重指数 (kg/m ²)
糖尿病组	1 744	752/992	64.32 ± 8.60	25.17 ± 3.34
对照组	1 954	613/1 341	57.65 ± 8.97	23.57 ± 2.96
χ^2 值 / <i>t</i> 值		54.45	23.27	5.67
<i>P</i> 值		<0.05	<0.05	<0.05

异($P < 0.01$),见表 7。

PTPRD 基因 rs17584499 位点检测结果得到 CC、CT 和 TT 3 种基因型。糖尿病组 3 种基因型(CC、CT 和 TT)频率分别为 81.9%、16.9%和 1.2%,对照组分别为 82.4%、16.5%和 1.1%,两组等位基因频率无统计学差异($\chi^2=0.274, P=0.600$),见表 8。经校正

表 4 SLC30A8 基因位点 rs13266634 基因型分布

组别	例数	基因型[n(%)]			等位基因 (%)	
		CC	CT	TT	C	T
糖尿病组	1 737	623(35.9)	837(48.2)	277(15.9)	60.0	40.0
对照组	1 950	649(33.3)	951(48.8)	350(17.9)	57.7	42.3
χ^2 值			4.007			3.986
<i>P</i> 值			0.135			0.046

注:SLC30A8:溶质载体家族 30/ 锌转运体,成员 8

表 5 SLC30A8 基因位点 rs13266634 与 T2DM 的相关性

rs13266634	β 值	SE 值	Wald χ^2 值	<i>P</i> 值 ^a	OR(95%CI) ^a
Additive ^a	0.147	0.052	7.960	0.005	1.158(1.046~1.283)
Dominant ^b	0.236	0.097	5.923	0.015	1.266(1.047~1.530)
Recessive ^c	0.168	0.076	4.878	0.027	1.183(1.019~1.373)

注:^a对年龄、性别及体重指数进行校正;^a附加模型:RR vs. RW vs. WW;^b显性模型:(RR+RW) vs. WW;^c隐性模型:(WW+RW) vs. RR; T2DM:2 型糖尿病;SLC30A8:溶质载体家族 30/ 锌转运体,成员 8

表 6 SLC30A8 基因位点 rs3802177 基因型分布

组别	例数	基因型[n(%)]			等位基因 (%)	
		CC	CT	TT	C	T
糖尿病组	1 740	614(35.3)	838(48.2)	288(16.5)	59.4	40.6
对照组	1 939	622(32.1)	968(49.9)	349(18.0)	57.0	43.0
χ^2 值			4.500			4.085
<i>P</i> 值			0.105			0.043

注:SLC30A8:溶质载体家族 30/ 锌转运体,成员 8

表 7 SLC30A8 基因位点 rs3802177 与 T2DM 的相关性

rs3802177	β 值	SE 值	Wald χ^2 值	<i>P</i> 值 ^a	OR(95%CI) ^a
Additive ^a	0.150	0.052	8.242	0.004	1.162(1.049~1.288)
Dominant ^b	0.186	0.096	0.096	0.053	1.204(0.998~1.454)
Recessive ^c	0.205	0.077	0.077	0.007	1.228(1.056~1.427)

注:^a对年龄、性别及体重指数进行校正;^a附加模型:RR vs. RW vs. WW;^b显性模型:(RR+RW) vs. WW;^c隐性模型:(WW+RW) vs. RR; T2DM:2 型糖尿病;SLC30A8:溶质载体家族 30/ 锌转运体,成员 8

表 8 PTPRD 基因位点 rs17584499 基因型分布

组别	例数	基因型[n(%)]			等位基因 (%)	
		CC	CT	TT	C	T
糖尿病组	1 744	1429(81.9)	294(16.9)	21(1.2)	90.35	9.65
对照组	1 954	1611(82.4)	322(16.5)	21(1.1)	90.70	9.30
χ^2 值			0.317			0.274
<i>P</i> 值			0.853			0.600

注:PTPRD:蛋白酪氨酸磷酸酶受体 D

年龄、性别及体重指数后,两组基因型分布差异无统计学意义($P > 0.05$),在显性模型和隐性模型中,两组比较差异仍无统计学意义($P > 0.05$),见表 9。

表 9 PTPRD 基因位点 rs17584499 与 T2DM 的相关性

rs17584499	β 值	SE 值	Wald χ^2 值	P 值*	OR(95%CI)*
Additive ^a	-0.016	0.086	0.037	0.848	0.984(0.831~1.164)
Dominant ^b	-0.033	0.094	0.122	0.727	0.968(0.805~1.164)
Recessive ^c	0.174	0.343	0.259	0.611	1.190(0.608~2.330)

注:*对年龄、性别及体重指数进行校正;^a附加模型:RR vs. RW vs. WW;^b显性模型:(RR+RW) vs. WW;^c隐性模型:(WW+RW) vs. RR;T2DM:2 型糖尿病;PTPRD:蛋白酪氨酸磷酸酶受体 D

3 讨论

SLC30A8 基因位于 8 号染色体,主要在胰岛 β 细胞中表达,其表达产物为 ZnT8,可向胰岛素分泌颗粒中摄取锌,锌离子与胰岛素和钙离子结合形成稳定的胰岛素晶体,然后被分泌入血,后晶体稳定性受到破坏,释放出胰岛素单体、游离锌离子和钙离子,锌离子可被 ZnT8 再摄取入胰岛 β 细胞浆中进一步利用,故该基因的表达产物 ZnT8 与胰岛素分泌颗粒的合成及分泌有关^[1-2]。自 SLC30A8 基因被发现与 2 型糖尿病相关后,其在不同种族及地区人群中的进一步研究结果存在差异^[3]。本研究结果表明,SLC30A8 基因 rs13266634 和 rs3802177 与南京地区 2 型糖尿病发病存在相关性,其 C 等位基因可能增加 2 型糖尿病的发病风险。

SLC30A8 基因的编码序列外显子 13 可编码 ZnT8 的最后 52 个氨基酸,rs13266634 和 rs3802177 为该外显子内的 SNP 位点,其中 rs13266634 的次要等位基因 T 可使 325 位的精氨酸转换为色氨酸^[2]。GWAS 研究数据和本研究结果显示,SLC30A8 基因 rs13266634 的主要等位基因与人群 2 型糖尿病风险增加有关,故有假设认为其编码的改变可能直接影响 ZnT8 对锌的转运。Nicolson 等^[6]研究证实,ZnT8 色氨酸突变的小鼠 MIN6 细胞质中锌浓度高于精氨酸突变的细胞,故认为色氨酸突变可能使 ZnT8 的转运活性增加,但这种变化是如何影响 β 细胞功能的,目前尚不清楚,因为 Cauchi 等^[7]发现色氨酸突变与基础胰岛素和葡萄糖刺激的胰岛素分泌的改善均不相关。另外,Maruthur 等^[8]研究表明,给健康人群补充外源性锌剂(醋酸锌)后,可观察到葡萄糖刺激的早相胰岛素分泌增加,且其增加幅度因 SLC30A8 基因 rs13266634 基因型的不同而存在差异,可能与 ZnT8 的表达差异有关。

PTPRD 基因位于 9 号染色体上,其编码产物为蛋白酪氨酸磷酸酶家族成员之一,此种酶包括细胞外区域、跨膜片段和胞质内的催化片段,由此组成

受体结构,参与调节一系列细胞活动,包括细胞生长、分化、有丝分裂等。2010 年关于中国台湾汉族人群的首个 GWAS 研究发现,PTPRD 基因 rs17584499 的 T 等位基因与 2 型糖尿病发病风险增加有关,可能为 2 型糖尿病的风险基因^[4]。后有研究报道,在随访 5.43 年后,携带 PTPRD 基因 rs17584499 基因型 TT 的人群发展为 2 型糖尿病的风险增加,且可能与胰岛素抵抗增加有关^[9]。而 2013 年对日本人群的研究未发现 PTPRD 基因 rs17584499 与 2 型糖尿病相关^[5]。本研究亦未发现 PTPRD 基因 rs17584499 与 2 型糖尿病有关,其中 T 等位基因在病例组的基因频率为 0.097,低于日本人群的结果。

本研究糖尿病组与对照组之间基本临床特征存在差异,可能与 2 型糖尿病发病的危险因素(性别、年龄和肥胖)有关,结果分析中对两组之间上述差异进行了校正。本研究表明,SLC30A8 基因 rs13266634 和 rs3802177 的 C 等位基因与南京地区中老年人群 2 型糖尿病发病存在相关性,可能为 2 型糖尿病的风险基因,未发现 PTPRD 基因(rs17584499)与 2 型糖尿病发病有关。有关 SLC30A8 基因多态性影响 2 型糖尿病发病的具体机制,目前尚不十分清楚,仍需进一步探索。

参 考 文 献

- [1] Sladek R, Rocheleau G, Rung J, et al. A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes [J]. Nature, 2007, 445(7130): 881-885.
- [2] Davidson HW, Wenzlau JM, O'Brien RM. Zinc transporter 8 (ZnT8) and β cell function [J]. Trends Endocrinol Metab, 2014, 25(8): 415-424.
- [3] Faghhi H, Khatami SR, Azarpira N, et al. SLC30A8 gene polymorphism (rs13266634 C/T) and type 2 diabetes mellitus in south Iranian population [J]. Mol Biol Rep, 2014, 41(5): 2709-2715.
- [4] Tsai FJ, Yang CF, Chen CC, et al. A genome-wide association study identifies susceptibility variants for type 2 diabetes in Han Chinese [J]. PLoS Genet, 2010, 6(2): e1000847.
- [5] Imamura M, Iwata M, Maegawa H, et al. Replication study for the association of rs391300 in SRR and rs17584499 in PTPRD with susceptibility to type 2 diabetes in a Japanese population [J]. J Diabetes Investig, 2013, 4(2): 168-173.
- [6] Nicolson TJ, Bellomo EA, Wijesekera N, et al. Insulin storage and glucose homeostasis in mice null for the granule zinc transporter ZnT8 and studies of the type 2 diabetes-associated variants [J]. Diabetes, 2009, 58(9): 2070-2083.
- [7] Cauchi S, Del Guerra S, Choquet H, et al. Meta-analysis and functional effects of the SLC30A8 rs13266634 polymorphism on isolated human pancreatic islets [J]. Mol Genet Metab, 2010, 100(1): 77-82.
- [8] Maruthur NM, Clark JM, Fu M, et al. Effect of zinc supplementation on insulin secretion: interaction between zinc and SLC30A8 genotype in Old Order Amish [J]. Diabetologia, 2015, 58(2): 295-303.
- [9] Chang YC, Chiu YF, Liu PH, et al. Replication of genome-wide association signals of type 2 diabetes in Han Chinese in a prospective cohort [J]. Clin Endocrinol (Oxf), 2012, 76(3): 365-372.

(收稿日期:2014-12-30)