临床研究 DOI:10.3969/j.issn.0253-3626.2011.11.025

CAPN-10基因 Indel-19 与非糖尿病血液透析患者的关系研究

路 萍,夏春英,邵维斌,李 忻
(江苏大学附属人民医院肾内科,镇江 212002)

【摘 要】目的:研究 CAPN-10 基因 Indel-19 与非糖尿病血液透析患者的关系。方法:用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(Polymerase chain reaction-restrictive fragment length polymorphism,PCR-RFLP)法检测 30 个健康人(A 组),60 个稳定的非糖尿病血液透析患者(B 组)CAPN-10 基因 Indel-19 插入多态性基因型,生化技术测定空腹血糖(Fasting blood glucose,FBG),甘油三脂(Three acids glyceride,TG),高密度脂蛋白胆固醇(High-density lipoprotein cholesterol,HDL-C)水平。结果:B 组患者收缩压、舒张压及甘油三酯水平较 A 组高($P<0.05$)。A、B 两组比较 Indel-19 基因型分布无明显差异($P=0.742$)。B 组基因型为 2/2 的患者较基因型为 1/1,1/2 患者有较高的腰围及 TG 水平(P 值分别为 0.033,0.002)。同时合并存在"代谢综合征"的 B 组患者出现 CAPN-10 基因 Indel-19 基因型 2/2 的频率较 B 组其余患者高($P=0.001$)。结论:非糖尿病血液透析患者多同时存在脂质代谢紊乱及高血压。CAPN-10 基因 Indel-19 可能与同时存在"代谢综合征"的终末期肾脏病有关,其可能机制是影响肾病患者脂质代谢,加重患者动脉硬化等的程度,但其具体作用机制尚有待于进一步研究。

【关键词】CAPN-10 基因 Indel-19;血液透析;代谢综合征
【中国图书分类法分类号】R692.5 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-05-08

Relation between Indel-19 polymorphisms of CALPAIN-10 gene and hemodialysis patients

LU Ping, XIA Chun-ying, SHAO Wei-bin, LI Xin
(*Department of Nephrology, the Affiliated People's Hospital of Jiangsu University*)

【Abstract】*Objective*: To explore the relation between Indel-19 polymorphisms of Calpain-10 gene and hemodialysis patients. *Methods*: Polymerase chain reaction-restrictive fragment length polymorphism(PCR-RFLP) was used to test the genetype of Indel-19 of Calpain-10 gene. The people being tested included 30 normal people and 60 hemodialysis patients. The relationship between FBG, TG and HDL-C was also tested. *Results*: The frequency of different genetypes was the same in 2 groups($P=0.742$). The frequency of genetype 2/2 in hemolysis patients with the syndrome of MS was higher than that in other hemodialysis patients ($P=0.001$). *Conclusion*: Indel-19 of Calpain-10 gene maybe one of the genetic factors contributing to the occurence of hemodialysis patients with the syndrome of MS. The disorder of lipid metabolism maybe the possible cause for the end-stage renal disease, but the specific mechanisms need to be further studied.

【Key words】CAPN-10 gene Indel-19; hemodialysis; metabolic syndrome(MS)

基因多态性与疾病相关性的研究涉及疾病的发生,发展和预后。随着研究的不断深入,基因治疗无疑会对肾脏疾病的治疗带来新的希望。目前报道可能与肾脏疾病相关的基因多态性较少,主要有血管紧张素转化酶基因,白细胞介素-1 受体拮抗基因,葡萄糖转运蛋白基因多态性等。钙蛋白酶-10(CALPAIN-10,CAPN-10)基因是第一个被定位克隆的糖尿病易感基因,作者通过查阅大量中外文献除发现 CAPN-10基因 SNP 多态性与糖尿病的易感性有关外,还与心血管疾病、肥胖、脂质代谢等相关,这些因素多属于"代谢综合征"的组成元素,而终末期肾脏病患者尤其血液透析患者常表现为这些多种代谢因素异常聚集的现象,故本实验对 CAPN-10 基因 Indel-19 多态性在正常人群及非糖尿病血液透析患者中进行检测,以探讨该基因与终末期肾脏病的关系。

1 对象与方法

1.1 研究对象

选用江苏大学附属人民医院 2009 年 6 月门诊体检的个体 30 人(男/女,17/13,1.3:1)为正常对照组(A 组),另选用该

作者介绍:路 萍(1980-),女,主治医师,硕士,研究方向:血液净化学基础与临床。
基金项目:江苏大学临床医学科技发展资助项目(编号:JLY20080056)。

院人工肾病情稳定的常规门诊非糖尿病血液透析的患者(B组)60人(男/女 35/25,1.4:1)。所有入选对象排除糖尿病肾病、移植肾肾脏疾病、囊肿性肾脏疾病(多囊肾)。

1.2 研究方法

1.2.1 CALPAIN10 基因 Indel-19(CAPN10-g.7920 indel 132 bp) 多态性检测 EDTA-2K 抗凝管采患者外周血 3 ml,4℃保存,24 h 内离心,提取基因组 DNA(上海生工 UNIQ-10 柱式血液基因组抽提试剂盒)。PCR 扩增 CAPN-10 基因,引物 5'-GTTTGGTTCTCTTCAGCGTGGAG 和 5'-CATGAACCCTG-GCAGGGTCTAAG。25 μl 反应体系中,15.6 μmol/L 引物 1 μl,2 mmol/L dNTPs 2.5 μl,5 U/μl Taq 酶 2.5 μl,1.5 mmol/L $MgCl_2$ 1.5 μl 。PCR 扩增条件:预变性 94℃,5 min;变性 94℃,30 s;退火 59.5℃,30 s;延伸 72℃,30 s;最后延伸 72℃,10 min。(PCR 仪为 P×2 Thermal Cycler,美国),扩增产物 8%聚丙烯酰胺电泳。紫外灯下观察,等位基因 1 为 155 个碱基片断,等位基因 2 为 187 个碱基片断。

1.2.2 血糖、TG、HDL-C 测定 采用日立 750 型自动生化分析仪。

1.2.3 血压测定 调查对象先静坐放松 10 min,然后用汞柱式血压计测定血压 3 次,每次间隔 1 min;以 Korotkoff 第一音为收缩压,第五音为舒张压(缺乏此音时按第四音记录)。取 3 次测量水平的平均值作为其血压值。

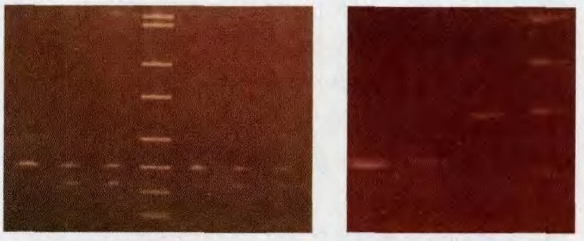
1.3 统计分析

数据采用 SPSS13.0 软件进行统计学处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验。分类计数资料比较用卡方检验或 *Fisher's* 检验,多重 *Logistic* 回归分析基因型与临床各指标关系。

2 结 果

2.1 非糖尿病血液透析患者与正常受试对象基因型分布及一般资料比较

2组受试对象基因型分布差异无统计学意义(χ^2=0.108,P=0.742)。2 组受试对象的年龄、腰围、FBG 及 HDL-C 均无显著差异($P>0.05$),血液透析患者收缩压、舒张压及甘油三酯水平高于正常对照组($P<0.01$)(见表 1、2)。



注:Indel-19 的 3 种基因型电泳图谱(2/2 为 187 bp 的片断的纯合子,1/1 为 155 个 bp 的片断的纯合子,1/2 为 1 个 187 bp 和 1 个 155 bp 的杂合子)

图 1 CAPN-10 基因 Indel-19 的 3 种基因型电泳图谱

2.2 非糖尿病血液透析患者与正常受试对象不同基因型分布的一般资料比较

非糖尿病血液透析患者基因型为 2/2 的个体较基因型为 1/1、1/2 的个体有较高的腰围及 TG 水平(P 值分别为 0.033、

表 1 非糖尿病血液透析患者与正常受试对象一般资料比较

组别	年龄(岁)	腰围(cm)	收缩压(mmHg)	舒张压(mmHg)	TG(mmol/L)	HDL-C(mmol/L)	FBG(mmol/L)
A组 30 例	50.70±6.35	81.73±7.82	119.33±14.78	73.67±7.42	1.48±0.48	1.18±0.25	5.31±0.34
B 组 60 例	49.30±11.67^{NS}	80.47±8.48^{NS}	140.92±16.86**	84.73±10.50**	1.71±0.27**	1.10±0.18^{NS}	5.23±0.34^{NS}

注:NS,差异无统计学意义,$P>0.05$;与阴性对照组相比 *,$P<0.05$, **,$P<0.01$

表 2 2 组受试对象基因型分布比较(χ^2=0.108,P=0.742)

项目	Indel-19基因型 2/2	Indel-19基因型 1/2	Indel-1基因型 1/1	合计
正常对照组(A 组)	8(26.67%)	17(56.67%)	5(16.66%)	30
非糖尿病血透组(B 组)	18(30.00%)	32(53.33%)	10(16.67%)	60
合计	26(28.89%)	49(54.44%)	15(16.67%)	90

表 3 2 组受试对象不同基因型分布的临床定量指标

组别	年龄(岁)	腰围(cm)	收缩压(mmHg)	舒张压(mmHg)	TG(mmol/L)	HDL-C(mmol/L)	FBG(mmol/L)
A组							
2/2	50.75±33.92	78.62±8.70	117.50±12.25	75.00±5.34	1.40±0.23	1.07±0.22	5.18±0.36
1/1,1/2	50.59±7.10	82.86±8.80	120.0±15.81	73.18±8.10	1.51±0.16	1.23±0.25	5.37±0.33
P	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
B 组							
2/2	50.61±9.85	84.00±7.05	142.5±17.43	85.72±8.43	1.88±0.32	1.13±0.16	5.26±0.30
1/1,1/2	48.71±12.48	78.95±8.66	140.24±16.78	84.31±17.43	1.64±0.22	1.04±0.21	5.21±0.36
P	NS	0.033*	NS	NS	0.002**	NS	NS

注:NS,差异无统计学意义,$P>0.05$;与阴性对照组相比,*,$P<0.05$, **,$P<0.01$

0.002，见表 3），正常对照组中不同基因型患者，各一般资料比较差异无统计学意义（$P>0.05$）。

2.3 非糖尿血液透析患者根据“代谢综合征”存在与否分组后基因型分布

代谢综合征（Metabolic syndrome，MS）是指在个体中多种代谢异常情况集结存在的现象，2007 年中国根据《中国成人血脂异常防治指南》对代谢综合征的量化指标修订如下：①腹型肥胖：腰围男性>90 cm，女性>85 cm。②TG 升高>1.70 mmol/L（150 mg/dl）。③血 HDL-C<1.04 mmol/L（40 mg/dl）。③血压≥130/85 mmHg。④空腹血糖升高≥6.1 mmol/L（110 mg/dl），或糖负荷后 2 h 血糖≥7.8 mmol/L（140 mg/dl）或有糖尿病病史，具有 3 种或 3 种以上者可诊断为代谢综合征。非糖尿病血液透析患者表现为多种代谢因素异常聚集现象，故根据是否存在“代谢综合征”对 B 组患者重新进行分组，并对基因分布进行计数统计，发现同时存在“代谢综合征”的非糖尿病血透患者基因型为 2/2 的个体较多，差异有统计学意义（$\chi^2=12.804$，$P=0.001$，见表 4）。

2.4 多重 *Logistic* 回归分析

以 B 组患者 CAPN-10 基因 Indel-19 基因型为因变量（因为 Indel-19 基因型 1/1 的个体例数较少，故与基因型 1/2 合并与基因型 2/2 进行比较，分别赋值为 0、1），年龄，FBG，TG，HDL-C，代谢综合征存在与否为自变量（其中代谢综合征存在与否为二分类变量，分别进行赋值，存在为 0，不存在为 1，其余自变量为定量变量），强迫回归法将所有变量全部引入方程进行 *Logistic* 回归分析（结果见表 5）初步了解各自变量与因变量关系，后经 Forward：Conditional 法，筛选出 TG [$P=0.023$；OR（95% CI）=5.14（1.15-9.24）]及是否同时存在“代谢综合征”[$P=0.01$；OR（95% CI）=6.602（1.47-31.31）]是 Indel-19 基因型 2/2 的主要影响因素。

3 讨 论

据 K/DOQI 统计 60%的透析患者存在需要治疗的脂质代谢异常。80%以上 ESRD（终末期肾脏疾病）患者在开始透析时已经存在高血压[1]。上海市的 1 项[2]11 家透析中心的 1 382 例维持性血透患者的横断面调查发现受访患者高血压患病率为 86.3%，治疗率为 96.8%。李全瑞、郭增玉等[3]研究表明，尿毒症患者在透析前即存在脂质代谢异常，透析不能消除高脂血症，且加重脂质代谢紊乱。曾瑜、代碧珍等[4]对 86 例非糖尿病肾病维持性血液透析患者研究提示受试患者虽然血糖、胰岛素变化并不明显，但出现胰岛素抵抗指数明显增高。本研究并未发现正常对照组与非糖尿病血透患者比较，在所测 CALPAIN-10 基因 Indel-19 基因型分布上的明显差异，但单独对血液透析患者进行研究，同时合并存在代谢综合征的血液透析患者，基因型为 2/2 的个体较多，差异有统计学意义（$\chi^2=12.804$，$P=0.001$），且对 CAPN-10 基因的基因型 2/2 与临床各指标的回归分析亦显示，该基因型与甘油三脂水平及是否存在“代谢综合征”有关（$P=0.023$；$P=0.01$）。出现上述结果考虑原因如下：（1）CALPAIN-10 基因[5]是第一个被定位克隆的糖尿病易感基因。Ezzidi I，Mtiraoui N 等[6]对 917 个患有 2 型糖尿病及 748 个作为正常对照组的突尼斯人群的研究发现，UCSNP-19 基因型 2/2 与肥胖[$P=0.003$；OR（95% CI）=2.07（1.28-3.33）]及超重[$P=0.021$；OR（95% CI）=1.83（1.10-3.07）]的患者有关，UCSNP-43 与空腹血糖升高有关，UCSNP-63 与 HDL 升高有关。Perez-Martinez P，Delgado-Lista J 等[7]对西班牙 452 例具有代谢综合征的个体研究发现，CAPN-10 基因

表 4 非糖尿血液透析患者根据“代谢综合征”存在与否分组后基因型分布

非糖尿病血透患者（B 组）	Indel-19基因型 2/2	Indel-19基因型 1/2	Indel-19基因型 1/1	合计
有代谢综合征组	10（66.67%）	5（33.33%）	0（0）	15
无代谢综合征组	8（17.78%）	27（60%）	10（22.22%）	45
合计	18（30%）	32（53.33%）	10（16.67%）	60

表 5 非糖尿血液透析患者基因型分布与各临床指标 *Logistic*（enter）回归分析结果

	B	*S.E*	*Wals*	*df*	*Sig.*	*Exp*（*B*）	*EXP*（*B*）的 95% *CI*	
							下限	上限
年龄	-0.017	0.033	0.272	1	0.602	0.983	0.922	1.048
腰围	-0.016	0.054	0.093	1	0.761	0.984	0.885	1.093
SBP	0.000	0.035	0.000	1	0.990	1.000	0.934	1.070
DBP	-0.015	0.057	0.071	1	0.790	0.985	0.881	1.102
GLU	-1.538	1.270	1.466	1	0.226	0.215	0.018	2.590
TG	1.775	1.347	1.737	1	0.029	5.900	0.421	82.624
HDL-C	-1.528	2.396	0.406	1	0.524	0.217	0.002	23.778
MS	2.263	1.062	4.541	1	0.033	9.616	1.199	77.103
常量	2.540	8.654	0.086	1	0.769	12.680		

注：OR 值 >1 提示为因变量的影响因素，OR<1 为保护因素，OR=1 表示与该变量无关

(rs2953171)可能主要通过血浆脂肪酸浓度升高,进而影响胰岛素抵抗有关。中国上海瑞金医院 1 项[8]对 961 个具有/不具有空腹血糖或糖耐量异常的原发性高血压患者 CALPAIN-10 基因 UCSNP-43 及 UCSNP-63 的研究发现该基因可能与同时存在空腹血糖升高/糖耐量异常的原发性高血压患者有关。李金娥、刘德敏等[9]在对天津地区汉族 255 例 2 型糖尿病患者及125例正常人的研究发现,钙蛋白酶10基因UCSNP43的变异与 2 型糖尿病无关,但与胰岛素抵抗相关的一些代谢因素体重指数(BMI),甘油三脂有关。以上文献提示 CAPN10 基因与超重/肥胖、高血脂、糖耐量异常、高血压等密切相关。非糖尿病血透患者本身多合并存在高血压、高血脂、糖耐量异常等中的一项或几项,且部分患者可以定义为同时合并存在"代谢综合征",该基因可能与非糖尿病血液透析患者的脂质代谢异常有关。(2)关于 CALPAIN-10 基因研究结果,在不同种族,不同地域,不同受试人群中有一定差异。Ouederni TB,Sanchez-Corona J 等[10]对 CAPN-10 基因 Indel-19 与突尼斯人群不同亚群 2 型糖尿病患者研究发现,调整性别、年龄因素后只有杰尔巴岛阿拉伯亚群与 2 型糖尿病易感性、胰岛素分泌等因素有关。Takeuchi M,Okamoto K 等[11]在以往对东亚人群研究基础上重新对糖尿病易感性与CAPN-10 基因多态性及行为、环境因素等变化关系的研究发现,习惯及环境变化疾病影响较基因多态性更明显。张汝阳、柏建岭等[12]根据系统评价原理及规范,检索 PUBMED 及中文期刊数据库得出钙蛋白酶-10 基因 SNP43 位点 G 等位基因、G/G 基因型、111/221 单倍型组合是蒙古人种的危险因素;SNP44 位点 C 等位基因、111/111 单倍型组合是高加索人种的危险因素;SNP44 位点 C 等位基因是混血人种的危险因素。陈淑凤、严卫丽等[13]对我国北方地区 493 例汉族 2 型糖尿病合并高血压的患者及 547 例性别、年龄、地域相匹配的汉族健康个体的研究并未发现 CAPN-10 基因 SNP-43,63,44,19 多态性及其组合变异与血脂水平关系。更大样本及在我国不同地区、不同民族个体中该基因的研究,可能更有意义。(3)本试验仅对 CAPN10 基因 Indel-19 进行测定,有一定局限性,Indel-19 与其它易感位点(如-43,63,44 等)的组合测定可能更有助于我们对 CAPN-10 基因与终末期肾脏病患者关系的综合判断。(4)目前有关肾脏病的基因有定论的较少,CAPN-10 基因可能只是这众多基因中的一个,可疑基因位点可能本身后天存在一定的变异性,所研究个体虽暂时未表现出易感基因型,但随着糖、脂质代谢紊乱、血压控制不佳等因素加重,这一易感性可能会逐渐表现出来,肾脏病还有很长的路要走,该假设亦有待于临床上大样本的随访观察。

综上所述,CAPN-10 基因 Indel-19 基因型 2/2 可能与同时存在"代谢综合征"的终末期肾脏病有关,其可能机制是影响肾病患者脂质代谢,但具体机制尚有待于进一步探讨。

参 考 文 献

[1] 梅长林,叶朝阳,戎 殳.实用透析手册[M].第 2 版.北京:人民卫生出版社,2008.349,336.

[2] 林 静,丁小强,林 攀,等.上海市维持性血液透析患者高血压现状的多中心调查[J].中华内科杂志,2010,49(7):563.

[3] 李全瑞,郭增玉,陈秉良,等.维持性血液透析对尿毒症患者血脂水平影响及相关分析[J].中国血液净化,2004,3(7):358-360.

[4] 曾 瑜,代碧珍,温向琼,等.非糖尿病肾病维持性血液透析患者胰岛素抵抗、微炎症状态与脂质代谢紊乱的相互关系研究[J].现代预防医学,2009,36(18):3529-3531.

[5] Horikawa Y,Oda N,Cox N J,et al.Genetic variation in the gene encoding calpain10 is associated with type2 diabetes mellitus[J].Nat Genet,2000,26(2):163-175.

[6] Ezzidi I,Mtiraoui N,Nemr R,et al.Variants within the calpain-10 gene and relationships with type 2 diabetes (T2DM) and T2DM-related traits among Tunisian Arabs[J].Diabetes Metab,2010,36(5):357-362.

[7] Perez-Martinez P,Delgado-Lista J,Garcia-Rios A,et al.Calpain-10 interacts with plasma saturated fatty acid concentrations to influence insulin resistance in individuals with the metabolic syndrome[J].Am J Clin Nutr,2011,93(5):1136-1141.

[8] Zhou X,Wang Y,Zhang Y,et al.Association of CAPN10 gene with insulin sensitivity,glucose tolerance and renal function in essential hypertensive patients[J].Clin Chim Acta,2010,411(15-16):1126-1131.

[9] 李金娥,刘德敏,张 喆.钙蛋白酶 10 基因多态性与 2 型糖尿病患者胰岛素抵抗的研究[J].天津医药,2008,36(2):95-98.

[10] Ouederni T B,Sanchez-Corona J,Skhiri H A,et al.Study of association of the SNP19 polymorphism of calpain 10 gene with type 2 diabetes in ethnic sub-groups of the Tunisian population:gene-environment interaction[J].Ann Biol Clin (Paris),2009,67(2):171-176.

[11] Takeuchi M,Okamoto K,Takagi T,et al.Ethnic difference in patients with type 2 diabetes mellitus in inter-East Asian populations:a systematic review and meta-analysis focusing on gene polymorphism[J].J Diabetes,2009,1(4):255-262.

[12] 张汝阳,柏建岭,易洪刚,等.钙蛋白酶 10 基因多态性与 2 型糖尿病的关联研究:Meta 分析[J].中华流行病学杂志,2009,30(8):850-856.

[13] 陈淑凤,严卫丽,王来元,等.CAPN-10 基因变异与中国北方汉族人群血脂水平的关联研究[J].中国分子心脏病学杂志,2009,9(3):129-133.

（责任编辑:冉明会）