维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2004)01-0018-03

单核苷酸多态性在研究糖尿病微血管病变易感基因中的应用

张玉洪[1], 肖 谦[2]

(1.重庆医科大学临床学院检验科,2.内分泌科,重庆 400016)

【摘 要】目的:检测人醛糖还原酶基因启动区(C-106T)单核苷酸多态性及其基因型在重庆汉族人 2 型糖尿病中的分布,并分析与糖尿病微血管病变易感性的关系。方法:用聚合酶链反应扩增上游启动区,再用限制性内切酶 BfaI 进行多态性分析 2 型糖尿病人的(C-106T)基因型分布频率。结果:2 型糖尿病微血管病变患者较无微血管病变并发症的糖尿病人的 CC 基因型频率显著增加 TT 基因型频率显著减少(χ^2 分别为 6.78 和 4.45,$P<0.01$ 和 $P<0.05$)。结论:AR 基因启动区(C-106T)单核苷酸多态性与中国汉族 2 型糖尿病患者微血管病变的发生有一定的关系,可能是糖尿病微血管病变的功能性多态性和遗传标志之一。

【关键词】2 型糖尿病;微血管病变;醛糖还原酶基因;单核苷酸多态性

【中国图书分类法分类号】R394 【文献标识码】A 【收稿日期】2003-09-04

Application of single nucleotide polymorphism in the study of the susceptible gene of microangiopathy in diabetes mellitus

ZHANG Yuhong, et al

(*Department of Clinical Laboratory, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To detect the distribution of the (C-106T) single nucleotide polymorphism and genotype of promoter region of aldose reductase gene and to study its relation to the susceptibility of microangiopathy in type 2 diabetes mellitus in Chinese Han from Chongqing. *Methods*: The aldose reductase gene in promoter region was amplified by polymerase chain reaction and the frequency of genotype of type 2 diabetes were analyzed by restriction enzyme BfaI. *Results*: The frequencies of genotype CC were significantly higher and the frequencies of genotype TT were much lower in type 2 diabetes patients with microangiopathy than in those without microangiopathy ($\chi^2=6.78$ and 4.45, respectively, $P<0.01$ and $P<0.05$). *Conclusion*: This finding suggests that (C-106T) single nucleotide polymorphism in the aldose reductase gene promoter region may be associated with diabetic microangiopathy of Chinese Han type 2 diabetes. It may be a functional polymorphism and can serve as one of inherited marker for susceptibility of diabetic microangiopathy.

【Key words】Type 2 diabetes mellitus; Diabetic microangiopathy; Aldose reductase gene; Single nucleotide polymorphism

单核苷酸多态性(Single nucleotide polymorphism,SNP)是基因组中存在最广泛的序列多态性,这类多态性对解释个体的表型差异,不同群体和个体对疾病特别是复杂疾病的易感性差异而备受人们的重视[1]。本研究对重庆地区汉族 2 型糖尿病(DM)伴或不伴微血管病变(diabetic microangiopathy,DMAP)患者醛糖还原酶(aldose reductase,AR)基因上游启动区(C-106T)的 SNP 进行检测,对基因型分布频率进行分析,旨在初步探讨该位点 SNP 与本地区汉族人 2 型糖尿病患者 DMAP 的关系。

1 对象与方法

1.1 对象

糖尿病按 1985 年 WHO 诊断标准,选择我院内分泌科住院和糖尿病门诊患者 246 例,均为重庆市汉族人,且相互之间无血缘关系。根据 DM 并发 DMAP 情况将 246 例患者分为两组:无微血管并发症组(NDC)组共 76 例,入选条件眼底荧光造影正常,尿白蛋白肌酐比率(urinary albumin creatinine ratio,UACR)<30μg/mg。微血管并发症组(DMAP):伴肾病和(或)视网膜病变患者:共 170 例,入选条件为 UACR

作者介绍:张玉洪(1963-),男,主管技师。

主要研究方向:免疫学及分子生物学测定。

基金项目:重庆市科学技术委员会攻关项目(981916)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

>30μg/mg 和(或)眼底提示微血管瘤、出血斑或出血点、硬性或软性渗出灶,有的可见新生毛细血管,玻璃体出血等。其临床参数见表 1,NDC 与 DMAP 组间性别构成无统计学差异,年龄、体重指数相匹配,均无显著性差异。

表 1 2 型糖尿病伴及不伴 DMAP 患者的临床参数($\bar{x} \pm s$)

	NDC	DMAP
例数	76	170
性别(男/女)	36/40	77/93
年龄(岁)	53.7±10.12	58.35±8.75
体重指数(kg/m²)	22.89±2.96	23.76±3.55
病程(年)*	4.2±3.8	7.65±5.83

*$P<0.05$ NDC 与 DMAP 病程比较

1.2 标本采集

所有受检对象采集静脉血,一管肝素抗凝,分离白细胞提取 DNA 行基因多态性分析,一管 EDTA 抗凝送检空腹血糖(FBG),糖化血红蛋白(HbA1c),甘油三酯(TG),总胆固醇(TC),尿素(Urea),肌酐(Cr)等生化测定。

1.3 PCR 和酶切、电泳分析

酚/氯仿法从外周静脉全血中提取的基因组 DNA,PCR 扩增 AR 基因上游启动区(nt-222 to +41),引物序列如下:上游引物:5′-CCT TTC TGC CAC GCG GGG CGC GGG-3′,下游引物:5′-CAT GGC TGC TGC GCT CCC AG-3′. PCR 反应条件参照文献[2]方法,首先预变性 94℃ 3min,然后按 94℃ 30s,53℃ 30s,72℃ 45s 共 35 个循环,最后 72℃ 充分延伸 5min。取纯化 PCR 产物 10μl,加 10×NE buffer 2μl,限制性内切酶 BfaI(NEW ENGLAND Biolabs) 10μl,37℃ 2h. 10μl 酶切产物在 30g/L 琼脂糖凝胶中电泳,经溴化乙锭(EB)染色后,在紫外反射仪上观察结果。

1.3 统计学处理

运用 Hardy-Weinberg 检验确认标本群体代表性是符合 Hardy-Weinberg 平衡。基因计数各组基因型频率及等位基因频率,用四格表资料的 χ^2 检验。

2 结 果

2.1 根据在琼脂糖凝胶中出现的条带共发现有 CC、CT、TT 三种基因型

按 Hardy-Weinberg 定律,以 NDC 组和 DMAP 组估算该基因在群体当中的遗传方式是否符合 Hardy-Weinberg 平衡,结果显示 χ^2 值分别为 0.755 和 2.94,两组 P 值均大于 0.05,认为符合 Hardy-Weinberg 平衡[3]。

2.2 各组基因型频率分布情况

野生型仅有一个 BfaI 作用位点(-106),酶切后产生 206bp 和 57bp 两个片断即为 CC 基因型,-106 碱基变异,T 置换 C 后则产生另一个酶切位点,进一步将 206bp 片断酶切为 147bp 和 59bp 片断,如为纯合子变异则为 TT 基因型,如为杂合子则为 CT 基因型,酶切后共出现 57、59、147、206bp4 种片断。由此计数出(C-106T)基因型分布频率,结果显示 DMAP 中 CC 基因型显著增加,$\chi^2=6.78$ $P<0.01$,TT 基因型显著减少 $\chi^2=4.45$,$P<0.05$ 两者差别有显著性(见表 2)。

表 2 2 型糖尿病伴及不伴 DMAP(C-106T)基因型分布频率

基因型	例数(频率,%) NDC ($n=76$)	DMAP ($n=170$)	χ^2	P 值
CC	24(32)	84(49.4)	6.78	<0.01
CT	34(45)	64(37.6)	1.10	>0.05
TT	18(23)	22(13.0)	4.45	<0.05

3 讨 论

DM 除少数以外均属多基因-多因子疾病,其发病受遗传和环境因素的影响。即使对环境因素是否易感仍可受遗传因素的影响。由于多基因疾病表现型的复杂性、相关基因的微效性和人群的遗传异质性,其相关基因定位克隆研究一直是一个很大的挑战,多基因疾病不象单基因疾病那样是由突变基因导致的,而是由多个基因的相互作用以及基因与环境之间的相互作用引起的。因此人们首先在对糖尿病病理生理的基础上挑选候选基因,其次依耐分子生物实验室技术的发展,使相关基因多态位点的快速而准确定位成为可能。近年来的研究表明,多元醇途径的激活,参与了 DM 微血管病变的发生及发展[4]。AR 是多元醇代谢途径的限速酶,该酶基因表达异常或酶活性改变,势必影响 DM 微血管并发症的发生。有些研究见到 DM 视网膜病变、肾病等微血管病变患者血细胞的 AR 活性增高[5]。因此 AR 基因是目前最受重视的与微血管并发症有关的候选基因之一。过去一段时间,AR 基因 5′端的(AC)n 核苷酸重复序列的多态性与 DMAP 相关性的研究比较多[6,7],最近 AR 基因上游启动区(C-106T)SNP 与 DMAP 的相关性开始受到关注[2,8]。

本研究是运用 PCR 扩增 AR 基因启动区上游 5′端 nt-222 to+41 的区域,扩增片断为 263bp,该片断(-165)含有一个限制性内切酶 Bfa1 的位点 CTAG,当-106 碱基变异,T 置换 C 后则产生另一

维普资讯 http://www.cqvip.com

个酶切位点,这样由单一碱基变异形成了 SNP,通过酶切后产生的不同产物计数出相应的基因型。结果显示 246 例 2 型糖尿病的样本中 DMAP 组的 CC 基因型频率显著高于 NDC 组($P<0.01$),提示 AR 基因转录起始点上游 - 106 C→T 置换与 DMAP 关联。CC 基因型可能是 DRP 的风险修饰因子[6]。该区域的 SNP 与以往研究较多的 2.1kb 处(AC)n 二核苷酸微卫星多态性不同的是(C - 106T)紧邻 AR 基因编码区的侧翼调控区内,很可能参与调控基因的表达,对 AR 活性产生了具体的影响。Kao 等[2]在同一样本中分析 AR 基因(C - 106T)SNP 和(AC)n 二核苷酸多态性与糖尿病视网膜病变关系的研究中发现两种多态性之间存在很强的连锁不平衡,也间接支持 AR 基因(C - 106T)SNP 可能是 DRP 的遗传标记。

SNP 是指基因组内特定核苷酸位置上存在两种不同的碱基,其中最少一种在群体中的频率不小于 1%。SNP 是基因组中存在最广泛的序列多态性,平均 300 - 500bp 就有一个 SNP,而且 SNP 只有两种等位基因,所以是进行群体研究和人类学研究的良好标记。其多态性往往与相邻基因的调节和变异有关[1],因此,对其多态性的研究即为基因与疾病之间的相关性提供了线索。SNP 技术是继 80 年代的 Southern/RFLP,90 年代初的微卫星(STR)基因多态标记,STR 基因定位技术之后的第三代遗传标记技术。它的出现为多基因遗传病定位研究带来了新的希望,通过关联分析和联锁不平衡分析寻找复杂疾病的易感基因。

参 考 文 献

[1] 张思仲. 人类基因组的单核苷酸多态性及其医学应用[J]. 中华医学遗传杂志,1999;16(2):119 - 120.

[2] Kao YL, Donaghue K, Chan A, et al. A novel polymorphism in the aldose reductase gene promoter region is strongly associatd with diabetic retinopathy in adolescents with type 1 diabetes[J]. Diabetes, 1999;48(6):1338 - 1340.

[3] 方积乾,陆 盈. 现代医学统计学[M]. 北京:人民卫生出版社,2002;395 - 396.

[4] Hamada Y, Kitoh R, Raskin P. Association of erythrocyte aldose reductase activity with diabetic complications in type 1 diabetes mellitus[J]. Diabet Med, 1993;10(1):33 - 38.

[5] Nishimura C, Saito T, Omori Y, et al. High levels of erythrocyte aldose reductase and diabetic retinopathy in NIDDM patients[J]. Diabetologia, 1994;37(2):328 - 339.

[6] Heesom AE, Hibberd ML, Millward A, et al. Polymorphism in the 5′ end of the aldose reductase gene is strongly associated with development of diabetic nephropathy in type 1 diabetes [J]. Diabetes, 1997;46(2):287 - 291.

[7] 刘丽梅,项坤三,郑泰山. 醛糖还原酶基因多态性与糖尿病微血管并发症的相关性研究[J]. 中华内分泌代谢杂志,1999;15(5):163 - 266.

[8] 肖 谦,张玉洪,汪恕萍. 醛糖还原酶基因启动区(C - 106T)单核苷酸多态性与糖尿病肾病关系的初步研究[J]. 第三军医大学学报,2003;25(14):1281 - 1284.