DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.14.025
第25卷第14期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 14
2003年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2003

文章编号:1000-5404(2003)14-1281-04

论著

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

肖 谦,张玉洪,汪恕萍 (重庆医科大学附属第一医院内分泌科,重庆 400016)

提 要:目的 探讨重庆地区汉族人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的关系。方法 用聚合酶链反应,琼脂糖凝胶电泳和限制性内切酶 *Bfa*Ⅰ对192例重庆地区汉族2型糖尿病人的(C-106T)等位基因和基因型频率进行分析。结果 2型糖尿病伴白蛋白尿患者C等位基因和CC基因型频率较正常白蛋白尿糖尿病患者显著增加。Logistic回归分析显示,C等位基因和CC基因型在2型糖尿病中与糖尿病肾病有关,*P* 值分别为0.032和0.046。结论 AR基因启动区(C-106T)单核苷酸多态性与中国汉族2型糖尿病患者糖尿病肾病的发生有一定关联,可能是糖尿病肾病的功能性多态性和遗传标志之一。

关键词:2型糖尿病;单核苷酸多态性;糖尿病肾病;醛糖还原酶基因
中图法分类号:R394.3;R587.102 文献标识码:A

A preliminary study of the relationship between the (C-106T) single nucleotide polymorphism in the aldose reductase gene promoter region and diabetic nephropathy

XIAO Qian, ZHANG Yu-hong, WANG Shu-ping (Department of Endocrinology, the First Afiliated Hospital, Chongqing University of Medical Science, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To study the relationship between the (C-106T) single nucleotide polymorphsim of promoter region of aldose reductase gene and type 2 diabetes mellitus with nephropathy in Chinese Han from Chongqing. Methods The (C-106T) allele and genotype of 192 patients of type 2 diabetes were examined by polymerase chain reaction agarose gel electrophoresis and restriction enzyme *Bfa*Ⅰ. Results The frequencies of both allele C and genotype CC were significantly higher in type 2 diabetes patients with albuminuria than in those without albuminuria. Logistic regression analysis showed that allele C and genotype CC were associated with diabetic nephropathy in type 2 diabetes mellitus patients($P=0.032$ and 0.046, respectively). Conclusion This finding suggests that (C-106T) single nucleotide polymorphism in the aldose reductase gene promoter region may be associated with diabetic nephropathy of Chinese Han type 2 diabetes. It may be a functional polymorphism and can serve as an inherited marker for susceptibility of diabetic nephropathy.

Key words: type 2 diabetes; single nucleotide polymorphism; diabetic nephropathy; aldose reductase gene

糖尿病肾病(Diabetic nephropathy, DN)是常见的糖尿病微血管并发症之一。已有的临床研究表明DN发生并不总与血糖水平和病程有关,部分病人尽管血糖控制良好,也早早发生DN,而另一方面,有些糖尿病人却终身不发生DN。因此目前认为高血糖是DN发生的必备因素,但不是惟一因素。流行病学调查也显示在1型和2型糖尿病中,DN的发生均有家族集聚现象[1,2],不同种族DN发病率差异悬殊[3],这些都强烈提示遗传因素对DN发生发展的影响。多元醇途径(Polyol pathway, PP)是组织细胞葡萄糖代谢途径之一,由醛糖还原酶(Aldose reductase, AR)和山梨醇脱氢酶(Sorbitol dehydrogenase, SDH)共同组成,其中AR是PP的限速酶,因PP激活在DN发生机制中的意义已得到广泛认同,AR基因是目前最受重视的与DN有关的候选基因之一。最近的研究提示AR基因上游启动区(C-106T)单核苷酸多态性(Single nucleotide polymorphism, SNP)与1型糖尿病视网膜病变关联[4]。本研究对192例重庆地区汉族2型糖尿病患者进行了AR基因上游启动区(C-106T)等位基因和基因型分布频率分析,旨在初步探讨该位点SNP与重庆地区汉族人2型糖尿病患者DN的关系。

基金项目:重庆市科学技术委员会攻关项目(981916)
作者简介:肖 谦(1956-),男,四川省成都市人,博士,副教授,主要从事糖尿病慢性并发症防治方面的研究,发表论文10余篇。电话:(023)69012523
收稿日期:2002-07-08;修回日期:2002-11-20

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1 资料与方法

1.1 对象

2 型糖尿病病人 192 例(男 90 例, 女 102), 根据 1985 年 WHO 诊断标准确诊, 均为我院内分泌科住院和糖尿病门诊患者, 按尿白蛋白肌酐比率(Urinary albumin creatinine ratio, UACR)将2 型糖尿病人分为 3 个亚组: ①正常白蛋白尿组(UACR< 30 μg/mg); ②微量白蛋白尿组(30~300 μg/mg); ③大量白蛋白尿组(UACR> 300 μg/mg)。

所有研究对象均为重庆地区汉族人, 受检者之间无血缘关系, 经询问病史和必要化验除外泌尿系感染。

1.2 标本采集

所有受检对象空腹 12 h 以上于上午 8:00~8:30 采集肘静脉血, 一管肝素抗凝, 分离白细胞提取 DNA 行基因多态性分析, 一管用 EDTA 抗凝, 送检空腹血糖(FBG), 糖基化血红蛋白(HbA1c), 甘油三酯(TG), 总胆固醇(TC), 高密度脂蛋白胆固醇(HDL-c)和低密度脂蛋白胆固醇(LDL-c)。留取随机尿样, -20 ℃ 冰箱保存待测尿白蛋白、肌酐, 初诊病人作 75 g 葡萄糖耐量试验。

所有研究对象均行身高、体质量、血压测量, 平均血压(Mean arterial pressure, MBP)为 1/3 脉压差与舒张压之和。

1.3 聚合酶链反应(PCR)和酶切、电泳分析

酚/氯仿法从外周静脉全血中提取基因组 DNA, PCR 扩增 AR 基因上游启动区 263 对碱基(nt-222 ~ +41), 引物序列如下: 上游引物: 5′-CCTTTCTGCCACGCGGGGCGCGG-3′, 下游引物: 5′-CATGGCTGCTGCGCTCCCCAG-3′。PCR 反应条件参照文献[4]方法, 预变性 94 ℃ 3 min, 变性94 ℃ 30 s, 退火 53 ℃ 30 s, 延伸72 ℃ 45 s, 共 35 个循环, 最后 72 ℃延伸 5 min。取纯化 PCR 产物 10 μl, 加 10× NE Buffer 2 μl, 限制性内切酶 *Bfa* Ⅰ (NEW ENGLAND Biolabs) 10 μl, 37 ℃孵育 2 h。10 μl 酶切 PCR 产物, 加 2 μl 上样缓冲液混匀, 设置 PUC 19 DNA/*Msp* Ⅰ 分子质量标准作对照, 100 V 恒压电泳 60 min, 0.5% 溴化乙锭染色 10 min, 紫外透射仪观察并摄片。

1.4 血生化及尿白蛋白、肌酐检测

血浆葡萄糖测定用氧化酶法, HbA1c 测定用亲和柱层析法, TG、TC、HDL、LDL 测定用 CHOD-PAP 法, 尿白蛋白检测用放免法, 尿肌酐测定用苦味酸法。

1.5 统计学处理

两组间比较用 Student *t* 检验, 多组间用方差分析。运用 Hardy-Weinberg 检验确认标本的群体代表性, 基因计数法计算各组基因型频率及等位基因频率。用 Logistic regression 分析白蛋白尿与(C-106T)等位基因及基因型分布频率的关系(微量白蛋白尿和大量白蛋白尿组作合并处理), 所有数据用 SAS 6.12 统计软件处理。

2 结果

2.1 患者一般临床及实验室资料

各组间性别构成无统计学差异, 年龄、体重指数、MBP 相匹配, 均无显著性差异, 各组间临床生化资料差异均无显著性($P>0.05$), 而大量白蛋白组病程显著长于正常白蛋白尿和微量白蛋白尿组($P<0.05$), 见表 1。

表 1 2 型糖尿病伴及不伴 DN 患者临床和实验室资料($\bar{x}\pm s$)

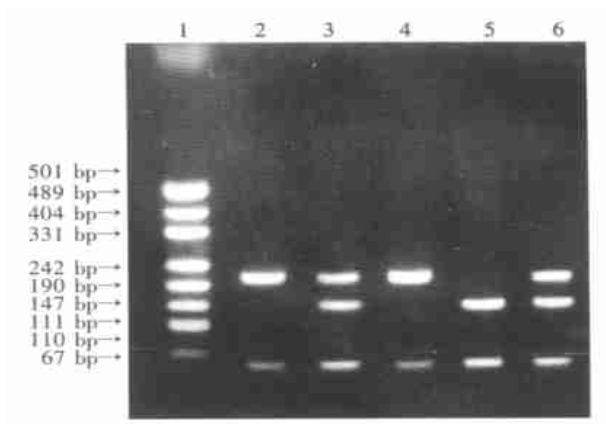
Tab 1 General clinical and laboratory data of type 2 diabetic patients with or without nephropathy($\bar{x}\pm s$)

	Normal buminuria	Microalbuminuria	Macroalbuminuria
Case	76	64	52
Gender(M/F)	36/40	32/32	22/30
Age(year)	53.700±10.12	56.840±8.44	58.550±8.30
BMI(kg/m²)	22.890±2.96	24.120±3.12	23.140±3.52
Duration(year)	4.200±3.8 *	6.800±4.3 *	9.200±5.9
MBP(mmHg)	103.400±7.60	105.350±6.95	107.650±5.48
FBG(mmol/L)	8.960±3.02	9.120±3.45	9.660±3.65
HbA1c(%)	9.230±1.72	10.220±2.21	10.380±1.78
TC(mmol/L)	5.310±1.26	5.146±0.99	5.330±1.14
TG(mmol/L)	1.811±0.69	1.658±0.71	1.770±0.98
HDL-C(mmol/L)	0.961±0.38	1.152±0.43	1.103±0.46
LDL-C(mmol/L)	2.210±0.48	2.468±0.67	2.290±0.59
UACR(μg/mg)	8.060±4.86	38.560±13.42	365.200±97.34

*: $P<0.05$ *vs* macroalbumiauria group

2.2 各组等位基因频率和基因型频率分布情况

PCR 产物酶切结果见图 1, 共检测出 57、59、147、206 bp 4 种片段, 由此计数出(C-106T)等位基因和基因型分布频率, 见表 2、3。



1: Puc 19 DNA/*Msp* Ⅰ marker; 2, 4: Genotype C/C; 3, 6: Genotype C/T; 5: Genotype T/T

图 1 AR 基因启动子上游 nt-222~+41 扩增产物 *Bfa* Ⅰ 酶切分析

Fig 1 The analysis of AR gene promoter region nt-222 to +41 PCR product digested by *Bfa* Ⅰ

表 2 192 例 2 型糖尿病伴及不伴 DN(C-106T)等位基因分布频率

Tab 2 Distribution of frequencies of (C-106T) allele in type 2 diabetes mellitus patients with or without nephropathy

	Normal buminuria (n=152)	Microalbuminuria (n=128)	Macroalbuminuria (n=104)
C	80(53%)	88(69%)	70(67%)
T	72(47%)	40(31%)	34(33%)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 3　192 例 2 型糖尿病伴及不伴 DN(C-106T)基因型分布频率

Tab 3　Distribution of frequencies of genotypes containing (C-106T) in type 2 diabetes mellitus patients with or without nephropathy

	Normal buminuria (n=76)	Microalbuminuria (n=64)	Macroalbuminuria (n=52)
C/C	24(32%)	32(50%)	24(46%)
C/T	34(45%)	25(39%)	22(42%)
T/T	18(23%)	7(11%)	6(12%)

本研究所检测群体 AR 基因上游启动区(C-106T)位点基因型频率的观察值与预期值差异无显著性, 符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律。

Logistic 回归分析, 与正常白蛋白尿组相比, 白蛋白尿组 C 等位基因分布频率显著升高(χ^2=4.614 1, P=0.032), 比数比(OR)=1.922, 95%可信区间为 1.061~3.502; CC 基因型出现频率也显著升高(χ^2=3.973 4, P=0.046), OR 值=1.826, 95%可信区间为 1.020~3.365。

3　讨论

已有研究显示, DN 时 AR 基因表达增加[5], 红细胞 AR 活性较不伴 DN 的糖尿病患者显著升高[6]。转基因鼠实验发现 AR 基因过度表达导致细胞内山梨醇含量增加, 并出现与之相关的 DN 改变[7]。由于 AR 基因蛋白编码区的高度保守性, 目前尚无 AR 基因外显子结构改变导致表达上调、活性增加的报道[4], 但多项不同种族的研究表明, AR 基因转录起始点上游非编码区多态性与 AR 活性以及糖尿病视网膜病变和 DN 有关[4,8~10]。

本研究涉及 AR 基因启动子上游 5′端 263 对碱基(nt−222~+41), 具体序列如下:

−240　TACAGCAGCT CACCAACTCC TTTCTGCCAC GCGGGGCGCG
−200　GGCGAGCGTT GGGGGCGGAA AGAATCCGCT GCCACTAGGA
−160　CCAGGCGGAA GAAGCATCCC CGCCGACCCT TGGGGAAGGC
−120　CGCCGCGGCA CCCCCAGCGC AACCAATCAG AAGGCTCCTT
−80　CGCGCAGCGG CGCGCCAACC GCAGGCGCCC TTTCTGCCGA
−40　CCTCACGGGC TATTTAAAGG TACGCGCCGC GGCCAAGGCC
+1　GCACCGTACT GGGCGGGGGT CTGGGGAGCG CAGCAGCCAT G

该片段含 CCAAT 盒, 富含 GA 区等启动活性区域, 限制性内切酶 *Bfa* Ⅰ酶切位点为 C┆TAG, 野生型仅有一个 *Bfa* Ⅰ作用位点(−165), 酶切后产生 206 bp 和 57 bp 两条片段。−106 碱基变异, T 置换 C 后则产生另一个酶切位点, 进一步将 206 bp 片段酶切为 59、147 bp 片段, 如为纯合子变异, *Bfa* Ⅰ酶切产物为 57、59 bp 和 147 bp, 杂合子则为 57、59、147 bp 和 206 bp。这种由单一碱基变异形成的多态性即为 SNP, 由于该 SNP 位于 AR 基因的表达调控区域, 因此有可能为功能性多态性(Functional polymorphism), 在一定程度上参与 AR 基因表达的调控。

SNP 被认为是继限制性长度片段多态性(Restriction fragment length polymorphism, RFLP)和简短串联重复(Short tandem repeat, STR)之后新一代的遗传标志, 是基因变异中最多的一种, 其最低的等位基因频率大于或等于 1%, 因而不同于其他罕见变异。尽管就单个 SNP 而言只含有二种变异体, 变异程度不如微卫星或小卫星 DNA, 但 SNP 在基因组中数量大、分布广, 平均每 721~1 001 bp 就有一个 SNP, 据此推算人类 30 亿碱基中有约 3×10^6 个 SNP 位点, 大约占整个 DNA 多态性的 90%[11]。在任何已知或未知疾病基因附近都能找到众多的 SNP, 因此就整体而言, SNP 的多态性要高得多[12]。现已成为研究基因组多态性和识别、定位疾病相关基因的一种重要工具。SNP 中单核苷酸变异最常见于 CG 序列, 而且多为 C→T, 原因是胞嘧啶(C)容易甲基化, 然后自发地脱氨基后转变为胸腺嘧啶(T)。本研究中 SNP 也属此变异类型。

本研究显示, 在 192 例 2 型糖尿病样本中, 白蛋白尿组(包括微量和大量白蛋白尿)C 等位基因和 CC 基因型分布频率均显著高于正常白蛋白尿组(P<0.05), OR 值分别为 1.922 和 1.826。提示 AR 基因转录起始点上游−106 C→T 置换与 DN 关联, C 等位基因和 CC 基因型可能是 DN 的风险修饰因子。微量白蛋白尿和大量白蛋白尿组 C、T 等位基因频率和 CC、CT 基因型分布差异无显著性(P>0.05), 而两组间病程长短差异显著, 显示除遗传因素外, 病程也与 DN 发生和发展有密切关系。另外, 本组资料各组间体重指数、平均动脉压等糖尿病或 DN 的危险因素差异无显著性, 表明以上危险因素与(C-106T)SNP 无直接关系。

本研究结果提示, 与某些 DNA 编码区中碱基突变的直接致病效应不同, AR 基因启动区(C-106T)SNP 虽然还不能算是致病基因, 但很可能是 DN 的遗传标记之一。Kao 等[4] 在同一样本中分析 AR 基因(C-106T)SNP 和$(AC)_n$二核苷酸微卫星多态性与糖尿病视网膜病变的关系, 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 可能为 DN 的遗传标记。与以往研究较多的 2.1 kb 处$(AC)_n$二核苷酸微卫星多态性仅能作为遗传标记不同的是(C-106T)SNP 位于紧邻 AR 基因编码区的侧翼调控区内, 很可能参与调控 AR 基因的表达, 对 AR 活性产生具体影响, 但其基因型和表型的真正关系, 有待于今后研究工作的进一步深入。另外, (C-106T)SNP 较$(AC)_n$二核苷酸微卫星多态性研究方法简便可靠, 扩增后不像重复变异有假带产生, 而且 SNP 通常属于二等位基因(Biallelic)的遗传变异, 等位基因的频率很容易被估

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

计。在临床应用中有更好的可操作性，有望为筛查、干预DN易感人群提供新的方法和手段，并通过关联分析和联锁不平衡分析寻找DN的易感基因。

参考文献：

[1] Seaquist E R, Goetz F C, Rich S, *et al*. Familial clustering of diabetic kidney disease. Evidence for genetic susceptibility of diabetic nephropathy [J]. N Engl J Med, 1989, 320(18): 1161—1165.

[2] Freedman B I, Tuttle A B, Spray B J. Familial predisposition to nephropathy in African-Americans with non-insulin-dependent diabetes mellitus[J]. Am J Kidney Dis, 1995, 25(5): 710—713.

[3] Nelson R G, Knowler W C, Pettitt D J, *et al*. Diabetic kidney disease in Pima Indians[J]. Diabetes Care, 1993, 16(1): 335—341.

[4] Kao Y L, Donaghue K, Chan A, *et al*. A novel polymorphism in the aldose reductase gene promoter region is strongly associated with diabetic retinopathy in adolescents with type Ⅰ diabetes[J]. Diabetes, 1999, 48(6): 1338—1340.

[5] Shah V O, Dorin R I, Sun Y, *et al*. Aldose reductase gene expression is increased in diabetic nephropathy[J]. J Clin Endocrinol Metab, 1997, 82(7): 2294—2298.

[6] Hamada Y, Kitoh R, Raskin P. Increased activity of erythrocyte aldose reductase in insulin-dependent diabetes with severe diabetic complications [J]. Diabetes, 1991, 40(Suppl 1): 9A.

[7] Yamoka T, Nishimura C, Yamashita K, *et al*. Acute onset of diabetic pathological changes in transgenic mice with human aldose reductase cDNA [J]. Diabetologia, 1995, 38(3): 255—261.

[8] Ko B, Lam K, Wat N M, *et al*. An (A-C)n dinucleotide repeat polymorphic marker at the 5′ end of the aldose reductase gene is associated with early-onset diabetic retinopathy in NIDDM patients[J]. Diabetes, 1995, 44(7): 727—734.

[9] Sun Y, Shah V, Nikolic J, *et al*. Variability in the structure and expression of the aldose reductase gene modulates the risk for DN[J]. J Am Soc Nephrol, 1996, 7(9): 1366.

[10] Heesom A E, Hibberd M L, Millward A, *et al*. Polymorphism in the 5′-end of the aldose reductase gene is strongly associated with the development of diabetic nephropathy in type I diabetes[J]. Diabetes, 1997, 46(2): 287—291.

[11] Collins F S, Brooks L D, Chakravartic A. A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation[J]. Genome Res, 1998, 8(12): 1229—1231.

[12] 张思仲. 人类基因组的单核苷酸多态性及其医学应用[J]. 中华医学遗传学杂志, 1999, 16(2): 119—122.

（编辑 栗 嘉）

（上接1280页）

剂。在主城区使用较少，而广大农村仍有非法销售市场，中毒事件屡有发生。它可经消化道或呼吸道粘膜吸收入血，并迅速分布于各组织器官内。毒鼠强致惊厥作用为拮抗γ氨基丁酸(GABA)导致中枢神经系统呈现过度兴奋而引起惊厥。人急性中毒症状主要为四肢抽搐，如不及时治疗，中毒者可因剧烈的强直性抽搐导致呼吸衰竭而死亡。

3.1 洗胃

本组病例除1例4 d后就诊外，其余入院后均立即插胃管洗胃，经清水反复洗胃，有效的减少了胃内粘膜毒物浓度，防止中毒进一步加深；尸检证实[1]，中毒后8 h胃肠道粘膜毒物浓度最高，故洗胃应尽早在此时期内完成。

3.2 抗惊厥

因全身肌肉反复而持久地抽搐和痉挛导致呼吸肌痉挛性麻痹或窒息是病人死亡的主要原因；同时还可导致骨骼肌损害，加重脑水肿及其他器官的损害。苯巴比妥钠、安定能有效的控制惊厥。针对每个病例对止惊药物的用后反应，可采用快速静脉滴注或维持缓滴交替，时间3~7 d；儿童抽搐频繁的采用硫喷妥钠快速止惊，再用苯巴比妥钠或安定维持，效果更好。对抽搐昏迷病例，防止脑水肿要尽早使用脱水剂，减轻脑损害；同时对心肌酶谱升高的病例作保护性处理，应用1，6-二磷酸果糖静脉滴注，神志清醒后改口服，有利减轻心脑损害[2]。

3.3 血液净化治疗

可用血液透析或血液灌注治疗。目前公认最有效的毒鼠强中毒抢救措施，也有较多成功病例报告[3~5]。血液净化能快速清除血液中毒鼠强浓度，减轻毒物对人体的损害，减少中毒患者多器官衰竭的发生。本组对集体中毒的7例病员采用血透，抽搐终止快，意识恢复早，均取得满意疗效。有条件的医院对每1例中毒病例应在洗胃、止惊的基础上，尽快进行血液净化治疗。

3.4 二巯基丙磺酸钠的应用

目前中国疾病预防控制中心最新资料仍认为毒鼠强中毒无特效解毒剂。临床也有应用二巯基丙磺酸钠救治急性毒鼠强中毒的报道[6,7]，其解毒疗效各家结果不尽相同，有待今后有更多的实验室与临床资料证实。

关键词：毒鼠强中毒；血液净化

中图法分类号：R595.405 文献标识码：B

参考文献：

[1] 孟新科，邓跃林，严虹英. 血液净化救治毒鼠强患者的临床研究[J]. 中国危重病急救医学, 2001, 13(4): 240—242.

[2] 龚仁义. 急性毒鼠强中毒血清酶谱检测及临床意义[J]. 急诊医学, 2002, 9(4): 245—246.

[3] 蔡会玲. 血液灌流治疗急性毒鼠强中毒临床疗效分析[J]. 临床急诊杂志, 2002, 3(3): 146.

[4] 郑 鹏，孟新科. 血液净化治疗四亚甲基二砜四胺中毒的临床研究[J]. 内科急危重症杂志, 2002, 8(1): 20—22.

[5] 孟新科. 毒鼠强中毒的研究进展[J]. 中国急救医学, 2002, 22(4): 245—246.

[6] 陈应斌，宇振洲，陈智康. 二巯基丙磺酸钠解救四亚甲基二砜四胺中毒的观察[J]. 中华内科杂志, 2000, 30(1): 3—4.

[7] 宋桐君，张春颖，陈醒言. 巯基化合物对毒鼠强急性中毒小鼠保护作用[J]. 温州医学院学报, 2000, 13(1): 3—4.

（编辑 陈聪连）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net