

ACE 和 eNOS 2 个基因多态性并存与糖尿病肾病的相关性

安新焕¹⁾, 崔文龙²⁾, 宋滇平³⁾, 梁干雄¹⁾, 武会娟⁴⁾, 武彦峰⁴⁾

(1) 中山市人民医院内分泌科, 广东 中山 528400; 2) 昆明医科大学公共卫生学院, 云南 昆明 650500; 3) 昆明医科大学第一附属医院糖尿病科, 云南 昆明 650032; 4) 北京市理化分析测试中心, 北京 100094)

[摘要] **目的** 探讨广东 2 型糖尿病 (T2DM) 患者 eNOS G894T 多态性及 ACE 基因 I/D 多态性共存与糖尿病肾病 (DKD) 的关系. **方法** 选取 T2DM 患者 231 例和健康对照者 (NC 组) 101 例, 用聚合酶链反应限制性片段长度多态性 (PCR-RFLP) 方法检测其 eNOS G894T 多态性及 ACE 基因 I/D 多态性, 其中 2 型糖尿病中正常白蛋白尿即 DKD0 组 145 例, 微量白蛋白尿即 DKD1 组 39 例, 大量白蛋白尿即 DKD2 组 47 例. 比较分析各组间单个基因及两基因多态性共存的基因型频率、等位基因频率以及相关临床资料. **结果** (1) NKD0、DKD1、DKD2 3 组间临床资料比较, 除了收缩压有统计学差异外 ($\chi^2=4.393$, $P=0.036$), 其他临床资料无统计学差异; (2) eNOS 基因基因型及等位基因在各组间均无统计学差异 ($\chi^2=5.054$, $P=0.282$; $\chi^2=5.425$, $P=0.066$); (3) ACE DD 基因型在 DKD2 和 DKD0 组间比较有统计学差异 ($\chi^2=12.608$, $P=0.002$), DKD (DKD1+DKD2) 和 DKD0 比较有统计学差异 ($\chi^2=10.671$, $P=0.005$); D 等位基因在 DKD0/DKD (DKD1+DKD2) 组间比较有统计学意义 ($\chi^2=7.284$, $P=0.007$); (4) eNOS T 等位基因与 ACE D 等位基因共存时, 各组间无统计学差异 ($\chi^2=1.884$, $P=0.296$). **结论** 在中国广东地区汉族人中, eNOS T 和 ACE D 多态性共存可能不是 DKD 的遗传危险因素.

[关键词] 血管紧张素转换酶; 内皮一氧化氮合酶; 基因; 多态性; 糖尿病肾病

[中图分类号] Q75 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X (2015) 11-0012-05

The Association of Concomitant Presence of Endothelial Nitric Oxide Synthase and Angiotensin Converting Enzyme Polymorphism with Diabetic Kidney Disease

AN Xin-huan¹⁾, CUI Wen-long²⁾, Song Dian-ping³⁾, LIANG Gan-xiong¹⁾, WU Hui-juan⁴⁾, WU Yan-feng⁴⁾

(1) Dept. of Diabetes, Zhongshan People's Hospital, Zhongshan Guangdong 528400; 2) School of Public Health, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500; 3) Dept. of Diabetes, The 1st Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650032; 4) Beijing Center for Physical and Chemical Analysis, Beijing 100094, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the association of concomitant presence of endothelial nitric oxide synthase and angiotensin converting enzyme polymorphism with diabetic kidney disease. **Methods** Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) methods were used to detect the gene polymorphism of eNOS G894T and ACE I/D, in 231 unrelated Guangdong Han people with type 2 diabetes and 101 normal controls (NC group). There were 145 cases with normal albuminuria (DKD0 group), 39 cases with microalbuminuria (DKD1 group), 47 cases with macroalbuminuria (DKD2 group) in type 2 diabetes. The relative clinical data and genotype frequency were compared among the groups. **Results** (1) there were no significant differences in the clinical characteristics except for systolic blood pressure among DKD0 DKD1 DKD2

[基金项目] 广东省中山市科技局科研基金资助项目 (K20132A097)

[作者简介] 安新焕 (1969~), 女, 河南禹州市人, 医学硕士, 副主任医师, 主要从事糖尿病及其并发症的相关研究及临床工作.

groups; (2) The frequencies of eNOS genotype and allele frequencies in each groups were not different significantly; (3) There were statistic differences in the frequencies of ACE DD genotype between DKD2 and DKD0 group. The frequencies of ACE DD genotype in DKD group was significantly higher than those in DKD0 group. Allele frequencies of ACE D were of significant difference between DKD and DKD0 group; (4) Allele frequencies of concomitant presence of allele eNOS T and ACE D were not different statistically in each groups.

Conclusion The concomitant presence of allele eNOS T and ACE D may be not a genetic risk factor of DKD development.

[Key words] Angiotensin converting enzyme; Endothelial nitric oxide synthase; Gene; Polymorphisms; Diabetic kidney disease.

糖尿病 (diabetes mellitus, DM) 患者的严重慢性并发症之一是糖尿病肾病 (diabetic kidney disease, DKD)。但血糖控制不佳的患者也并非都发生糖尿病肾病, 而有的糖尿病患者血糖控制良好, 仍发生肾损害^[1]; 目前已明确 DKD 为多基因遗传性疾病, 对于 DKD 遗传易感性方面的研究, 国内外对于 2 个基因多态性并存的研究报道较少, 而对于单个基因变异的研究报道较多。国外报道 ACE 和 eNOS 基因多态性并存与糖尿病肾病相关^[2], 目前国内尚未见报道。笔者检测分析中国广东地区汉族人此种基因多态性, 以明确这两种基因多态性并存与该地区 2 型糖尿病肾病发生发展的关系。

1 对象与方法

1.1 研究对象

糖尿病组 (DM): 选取 231 例 2 型糖尿病患者, 按 WHO 1999 年诊断标准进行糖尿病诊断, 依据中华医学会糖尿病学分会微血管并发症学组制定的《糖尿病肾病防治专家共识 (2014 年版)》^[3] 糖尿病肾病的诊断标准诊断糖尿病肾病, 依尿白蛋白排出率 (UAER) 进行分组, 分为正常白蛋白尿即 DKD0 组 (UAER < 30 mg/24 h)、微量白蛋白

尿即 DKD1 组 (30 mg/24 h ≤ UAER < 300 mg/24 h) 和大量白蛋白尿即 DKD2 组 (UAER ≥ 300 mg/24 h)。其中 DKD0 组 145 例 (男 70 例, 女 75 例), 平均年龄 (56.57 ± 15.13) 岁, DKD1 组 39 例 (男 19 例, 女 20 例), 平均年龄 (64.10 ± 14.00) 岁; DKD2 组 47 例 (男 18 例, 女 29 例), 平均年龄 (62.15 ± 13.05) 岁。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 模板 DNA 用 QIAamp DNA Mini kit 试剂盒提取。

1.2.2 PCR-RFLP 方法检测 eNOS G894T 多态性 上游引物 5′ -AAG GCA GGA GAC AGT GGA TGGA-3′, 下游引物 5′ -CCC AGT CAA TCC CTT TGG TGC TCA-3′ (北京市理化分析测试中心合成), PCR 反应体系、反应条件以及酶切条件依据前期优化过的实验条件进行, PCR 产物经限制性内切酶 BanII 酶切后判断基因型, GG 基因型不含突变位点, 酶切后有 2 个片段 163 bp 和 85 bp; GT 基因型含 G→T 点突变, 酶切后有 3 个片段即 248 bp, 163 bp 和 85 bp; TT 基因型只有 1 个 248 bp 的片段, 对酶切后确认基因型为 TT 型和 GG 型的标本抽样测序 (图 1), 由北京市理化分析测试中心测序, 以证实酶切后确认的基因型是否正确。

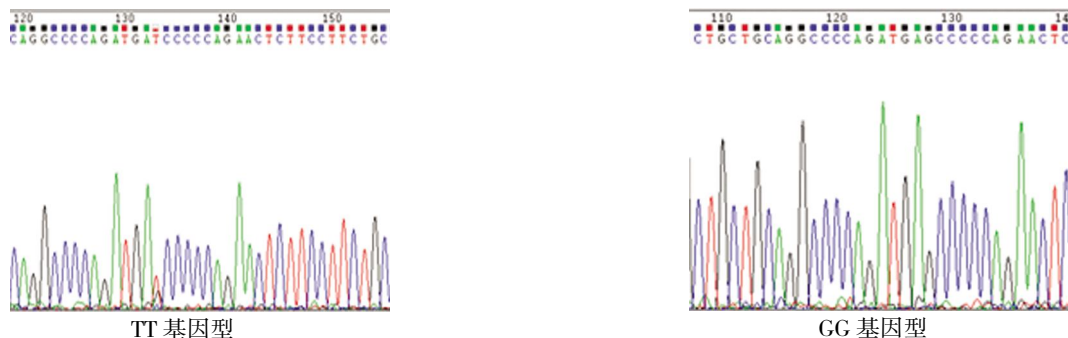


图 1 TT GG 基因型测序图谱

Fig. 1 The sequencing picture of TT and GG genotype of PCR-RFLP

图中箭头所指左为 eNOS 第 7 外显子 894T, 右为 eNOS 第 7 外显子 894G

1.2.3 PCR 方法检测 ACE 基因 I/D 多态性 上游引物 5' -CTG GAG ACC ACTCCC ATC CTT TCT-3' , 下游引物 5' -GAT GTG GCC ATC ACA TTCGTC AGA T-3' (北京市理化分析测试中心合成). PCR 产物经琼脂糖电泳后 II 基因型只有 490 bp 片段; DD 基因型只有 190 bp 片段; ID 型可见到 490 bp 和 190 bp 2 个条带. DD 基因型及 II 基因型抽样测序 (图 2, 3), 由北京市理化分析测试中心测序.

1.2.4 生化指标和临床资料的检测 血糖、血脂

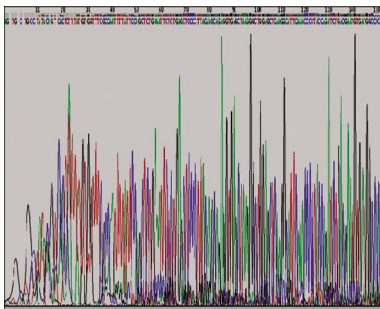


图 2 DD 基因型测序图谱

Fig. 2 The sequencing picture of ACE DD genotype

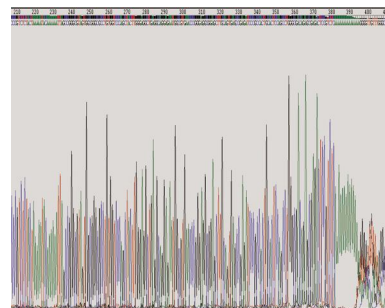
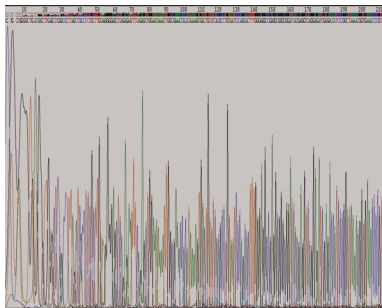


图 3 II 基因型测序图谱

Fig. 3 The sequencing picture of ACE II genotype

由表 3 可见: 基因型在各组间比较差异有统计学意义 ($\chi^2 = 13.459, P = 0.009$). DD 基因型在 DKD2 和 DKD0 间有统计学差异, 在 DKD (DKD1+DKD2) 和 DKD0 组间比较亦有统计学差异; 其他各组间无统计学差异; 各组间等位基因比较有统计学差异 ($\chi^2 = 7.546, P = 0.023$), 其中 D 等位基因在 DKD0/DKD (DKD1+DKD2) 组间有统计学差异, 其它各组间均无统计学差异.

2.4 各组 ACE D 和 eNOS T 共存与否的比较

由表 4 可见: 等位基因 D 和 T 共存与否在各组间无统计学差异.

3 讨论

DKD 是引起 2 型糖尿病患者终末期肾衰的主

要原因. DKD 是多基因遗传性疾病, 内皮型一氧化氮合酶 (endothelial nitric oxide synthase eNOS) 及血管紧张素转换酶 (angiotensin converting enzyme ACE) 基因是 DKD 的候选基因.

1.3 统计学方法

采用单因素方差分析组间资料, χ^2 检验分析组间等位基因频率和基因型频率, 并按 Hardy-weinberg 平衡原理确定样本的群体代表性, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义.

2 结果

2.1 DM 不同组中临床及生化指标的比较

由表 1 可见: DKD0、DKD1、DKD2 3 组间除了收缩压具有统计学差异外 ($P < 0.05$), 其他指标均无统计学差异 ($P > 0.05$).

2.2 各组间 eNOS 基因型频率和等位基因频率比较

由表 2 可见: TT 基因型频率在 DKD1 组及 DKD2 组中较 DKD0 组都有升高趋势, 但无统计学差异 ($P > 0.05$), T 等位基因亦是如此.

2.3 各组间 ACE 基因型频率和等位基因频率比较

笔者的研究显示: eNOS TT 基因型频率在 DKD1 组及 DKD2 组中较 DKD0 组都有升高趋势, 但无统计学差异, T 等位基因亦是如此. eNOS G894T 多态性与 DKD 的发生发展关系不大, 这与 Ka tia G.S 等的研究结果一致^[4], 而与李长贵等^[5]的结果并不一致.

本研究也显示: ACE DD 基因型频率随着 DKD 的进展而逐渐升高, 且 DKD2 和 DKD0 比较有统计学意义, DKD (DKD1+DKD2) 和 DKD0 比较有统计学意义, 而 DKD0 和 DKD1 比较无统计学意义, DKD1 和 DKD2 比较亦无统计学意义, 表明

表 1 DM 不同组间的临床资料 ($\bar{x} \pm s$)Tab. 1 The clinical characteristics in patients with type 2 diabetes ($\bar{x} \pm s$)

指标	DKD0	DKD1	DKD2
性别 (男/女)	70/75	19/20	18/29
年龄 (岁)	56.57 ± 15.13	64.10 ± 14.00	62.15 ± 13.05
病程 (年)	4.98 ± 5.17	6.78 ± 4.64	7.70 ± 3.95
BMI (kg/m ²)	23.39 ± 3.05	24.27 ± 3.52	23.98 ± 3.65
WHR	0.93 ± 0.07	0.97 ± 0.06	0.97 ± 0.64
SBP (mmHg)	137.37 ± 18.11 [#]	149.13 ± 19.85 [#]	159.77 ± 24.09 [#]
DBP (mmHg)	81.70 ± 12.49	84.23 ± 14.16	81.66 ± 12.81
FBG (mmol/L)	8.81 ± 3.29	9.49 ± 3.93	8.70 ± 2.70
2 hBG (mmol/L)	14.86 ± 5.76	15.40 ± 5.34	13.30 ± 4.52
HbA1c (%)	9.87 ± 2.85	9.85 ± 3.16	8.80 ± 2.55
CHOL (mmol/L)	5.02 ± 1.94	4.82 ± 1.60	5.55 ± 1.67
HDL-C (mmol/L)	1.09 ± 0.38	1.00 ± 0.39	1.01 ± 0.30
LDL-C (mmol/L)	2.62 ± 1.06	2.48 ± 0.85	2.86 ± 1.13

BMI: 体重指数 Body mass index; WHR: 腰臀比 Waist hip ratio; SBP: 收缩压 systolic blood pressure; DBP: 舒张压 Diastolic blood pressure; FPG: 空腹血糖 Fasting plasma glucose; 2 hPG: 餐后 2 h 血糖 2 hour postprandial plasma glucose; HbA1c: 糖化血红蛋白 Glycosylated hemoglobin A1c; TC: 总胆固醇; HDL-C: 高密度脂蛋白胆固醇; LDL-C: 低密度脂蛋白胆固醇.

表 2 各组 eNOS 基因频率和等位基因 [n (%)]Tab. 2 eNOS genotype and allele frequencies in each group [n (%)]

组别	例数 (n)	基因型			等位基因	
		GG	GT	TT	G	T
DKD0	145	110 (75.8)	26 (17.9)	9 (6.2)	246 (84.8)	44 (15.2)
DKD1	39	26 (66.7)	7 (17.9)	6 (15.4)	59 (75.6)	19 (24.3)
DKD2	47	32 (68.1)	8 (17.0)	7 (14.9)	72 (76.6)	22 (23.4)
DKD (DKD1+DKD2)	86	58 (67.4)	15 (17.4)	13 (15.1)	131 (76.2)	41 (23.8)

表内显示 例数 (频数)

表 3 各组间 ACE 基因频率和等位基因 [n (%)]Tab. 3 ACE genotype and allele frequencies in each group [n (%)]

组别	例数 (n)	基因型			等位基因	
		II	ID	DD	I	D
DKD0	145	57 (39.3)	73 (50.3)	15 (10.3)	187 (64.5)	103 (35.5)
DKD1	39	11 (28.2)	20 (51.2)	8 (20.5)	42 (53.8)	36 (46.2)
DKD2	47	15 (31.9)	17 (36.2)	15 (31.9) [#]	47 (50.0)	47 (50.0)
DKD (DKD1+DKD2)	86	26 (30.2)	37 (43.0)	23 (26.8) [#]	89 (51.7)	83 (48.3) [#]

表内显示 例数 (频数); 与 DN0 比较, [#] $P < 0.05$.

DD 基因型是 DKD 进展的因素. D 等位基因在 DKD0/DKD (DKD1+DKD2) 组间有统计学意义, 而 DKD0/DKD1 DKD0/DKD2 以及 DKD1/DKD2 组间比较无统计学意义, 初步表明 D 等位基因与

DKD 的发生有关, 与 DKD 的进展恶化关系不大. 这与李慧^[6]、阚瑛^[7]和丁蔷薇^[8]等的研究结果不同, 而与高妍婷^[9]及其他学者研究结果相似.

本研究结果亦显示: eNOS 和 ACE 两基因多态

表 4 各组等位基因 ACE D 和 eNOS T 共存与否 [n (%)]

Tab. 4 Allele frequencies of concomitant presence of eNOS T and ACE D in each group [n (%)]

组别	例数(n)	等位基因 ACE D 和 eNOS T	
		TAllele ACE D and eNOS T	
		D T 共存	D T 不共存
DKD0	145	20(13.8)	125(86.2)
DKD1	39	10(25.6)	29(74.4)
DKD2	47	11(23.4)	36(76.6)

表内显示 例数 (频数)

性联合分析提示 eNOS T 等位基因与 ACE D 等位基因共存时, 各组间无统计学差异。初步提示 eNOS T 和 ACE D 多态性共存可能不是 DKD 的遗传危险因素, 这与 Zohreh R^[2]的结果不尽相同。

近年来, 国内外对 eNOS G894T 多态性和 ACE I/D 基因多态性与 DKD 的易感性的研究报道结论不一, 结果的差异可能与样本选择不同, 还可能与地域、种族不同, 以及其它遗传因素不同有关。

糖尿病微血管并发症之一的糖尿病肾病, 以肾小球硬化症、系膜和基底膜增生为主要表现^[10]。eNOS 是 NO 合成的主要限速因子, NO 对血管舒缩有重要影响, eNOS 基因多态性对血浆 NO 水平有 30 % 的影响, 而肾脏 eNOS 主要存在于肾脏血管内皮细胞, 肾脏微血管病变的发生与 eNOS 的功能障碍有较大关系。eNOS 基因第 7 外显子存在 G894T 多态性, 此多态性可影响 eNOS 蛋白功能, 使血浆 NO 水平下降, 与糖尿病肾病的发生发展有关。

DKD 早期主要表现为肾脏血流动力学的变化, 在 DKD 的发生发展过程中肾脏组织肾素 - 血管紧张素系统 (RAS) 处于激活状态。ACE 是 RAS 的重要组成部分, ACE 基因存在 I/D 多态现象, 而此多态性与血浆 ACE 水平密切相关, 并且携带 DD 基因型的对 ACE 抑制剂治疗 DKD 效果显著。

2 型糖尿病除了与环境因素有关, 亦是多基因遗传性疾病, DKD 也可能是此两种因素相互作用的结果。DKD 是血糖控制不良与多个遗传位点的改变相互作用引起, 但不同地域不同种族会有差异, 所以 Zohreh R 等^[2]研究结果显示同时携带 eNOS T 和 ACE D 等位基因的 2 型糖尿病患者, DKD 发病风险更高, 而我们的结果与之不同, 有待于在更广泛人群中做相关研究, 揭示不同种族不同地域人群的遗传特点, 为临床干预提供依据。

[参考文献]

- [1] DUDEK A Z, PAWLAK W Z, KIRSTEIN M N. Molecular targets in the inhibition of angiogenesis [J]. Expert Opin Ther Targets, 2003, 7(4): 527 - 541.
- [2] ZOHREH R, ASAD V R, ZIBA R, et al. Concomitant presence of endothelial nitric oxide 894T and angiotensin II-converting enzyme D alleles are associated with diabetic nephropathy in a Kurdish population from Western Iran [J]. Nephrology, 2012, 17(2): 175 - 181.
- [3] 中华医学会糖尿病学分会微血管并发症学组. 糖尿病肾病防治专家共识(2014 年版)[J]. 中华糖尿病杂志, 2014, 6(11): 792 - 801.
- [4] KA TIA G S, DAISY C, LUS H C, et al. Association of eNOS gene polymorphisms with renal disease in Caucasians with type 2 diabetes [J]. Diabetes Research and Clinical Practice 91, 2011, 353 - 362.
- [5] 李长贵, 董砚虎, 李文山, 等. 内皮细胞型一氧化氮合酶基因多态性与糖尿病肾病的相关性[J]. 中华内分泌代谢病杂志, 2002, 17(6): 365 - 366.
- [6] 李慧, 刘梦阳, 王清, 等. ACE 基因和 AT1R 基因多态性与 2 型糖尿病早期肾病相关性的研究[J]. 现代预防医学, 2010, 37(9): 1 759 - 1 762.
- [7] 阚瑛, 赵焱, 阚珣, 等. 血管紧张素转化酶基因多态性与 2 型糖尿病肾病的关联性[J]. 吉林大学学报(医学版), 2009, 35(2): 352 - 356.
- [8] 丁蔷薇, 马亚楠, 江新泉. 2 型糖尿病肾病与 ACE 基因多态性的相关性研究 [J]. 泰山医学院学报, 2012, 33(5): 358 - 359.
- [9] 高妍婷, 高妍婷, 李振江, 等. 血管紧张素转换酶基因多态性与 2 型糖尿病肾脏疾病的相关性研究[J]. 陕西医学杂志, 2014, 43(10): 1 283 - 1 286.
- [10] 汤振明, 王忠生. ACEI 联合 ARB 治疗 IV 期糖尿病肾病的临床观察[J]. 中华全科医学, 2012, 10(6): 891 - 892.

(2015 - 07 - 10 收稿)