

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.06.006
文章编号: 1005-8982(2019)06-0026-05

瘦素基因启动子区 G-2548A 多态性与 2 型糖尿病肾病的关系

穆立焕¹, 王颖², 佟俊旺³, 金秀平², 陈茜¹, 徐谦¹, 杨丽婉¹, 江兰¹

(1. 华北理工大学, 河北 唐山 063210; 2. 华北理工大学附属医院 内分泌科, 河北 唐山 063000; 3. 华北理工大学 公共卫生学院, 河北 唐山 063210)

摘要: **目的** 探讨瘦素基因启动子区 G-2548A (rs7799039) 多态性与 2 型糖尿病肾病的关系。**方法** 选取 2016 年 5 月—2017 年 5 月在华北理工大学附属医院内分泌病区住院的 2 型糖尿病患者 416 例。其中, 无糖尿病肾病组 224 例, 男性 102 例, 女性 122 例, 平均年龄 (56.2±11.1) 岁; 2 型糖尿病肾病组 192 例, 男性 96 例, 女性 96 例, 平均年龄 (58.3±11.5) 岁。采用聚合酶链反应及限制性片段长度多态性方法测定 G-2548A 基因型, 比较两组基因型和等位基因多态性的不同。**结果** ① 2 型糖尿病肾病组患者血清瘦素水平、尿素氮、肌酐、糖化血红蛋白、收缩压、舒张压高于无糖尿病肾病组 ($P < 0.05$); 两组尿酸和血脂相关指标比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。② 两组患者 G-2548A 基因型和等位基因分布频率比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** 瘦素基因启动子区 G-2548A 基因型分布、等位基因多态性与 2 型糖尿病肾病有关, 其中 A 等位基因可能是 2 型糖尿病肾病发生、发展的易感基因。

关键词: 糖尿病, 2 型; 糖尿病肾病; 瘦素; G-2548A/ 转录启动子; 多态性, 单核苷酸

中图分类号: R587.2

文献标识码: A

The correlation between polymorphism G-2548A in the promoter of leptin gene and the nephropathy in type 2 diabetes mellitus

Li-huan Mu¹, Ying Wang², Jun-wang Tong³, Xiu-ping Jin², Xi Chen¹,
Qian Xu¹, Li-wan Yang¹, Lan Jiang¹

(1. North China University of Science and Technology, Tangshan, Hebei 063210, China; 2. Department of Endocrinology, North China University of Science and Technology Affiliated Hospital, Tangshan, Hebei 063000, China; 3. School of Public Health, North China University of Science and Technology, Tangshan, Hebei 063210, China)

Abstract: Objective To investigate the relationship between leptin gene promoter G-2548A (rs7799039) polymorphism and type 2 diabetic nephropathy. **Methods** A total of 416 Patients with type 2 diabetes were selected, who were in hospital in the affiliated hospital of North China University of Science and Technology from May 2016 to May 2017. There were 224 cases in no diabetic nephropathy group with 102 males and 122 females, and the average age was (56.2±11.1). The other 192 cases were in type 2 diabetic nephropathy group with 96 females and 96 females, and the average age was (58.3±11.5). The study adopted the method of polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) to determine the genotypes of G-2548A and comparison of differences between genotypes and allelic polymorphisms. **Results** ① There were statistical significance of the differences in serum leptin levels, urea nitrogen, creatinine, glycosylated hemoglobin, systolic blood pressure and diastolic blood pressure among no diabetic nephropathy group and type 2 diabetic nephropathy group ($P < 0.05$), while there was

收稿日期: 2018-09-15

[通信作者] 王颖, E-mail: 13933382591@163.com

no statistical significance of the differences in related index of uric acid and blood lipids ($P > 0.05$). ② The genotype distribution and allele frequency of G-2548A in diabetic nephropathy group and type 2 diabetic nephropathy group were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusions** The distribution of G-2548A genotype in leptin gene promoter region and allele polymorphism have some correlation with type 2 diabetic nephropathy. The A allele may be a susceptible gene for the development of type 2 diabetic nephropathy.

Keywords: diabetes mellitus, type 2; diabetic nephropathies; leptin; G-2548A/ transcription initiation site; polymorphism, single nucleotide

国际糖尿病联盟 2017 年数据表明,全球 4.25 亿成年人患糖尿病,2.12 亿未被确诊,预计 2045 年将达 6.29 亿^[1]。糖尿病肾病是多基因参与的遗传性疾病^[2-3]。高血压、高血脂、高血糖参与糖尿病肾病的发病。近年来多项研究表明,G-2548A 多态性与大血管病变有关,但对微血管病变研究甚少,糖尿病肾病属于微血管病变,或许与大血管病变有相同的发病机制。本研究应用分子生物学技术对 G-2548A 多态性进行研究,旨在探讨该位点多态性与糖尿病肾病的关系,为疾病的早期诊断提供新思路。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取 2016 年 5 月—2017 年 5 月在华北理工大学附属医院内分泌病区住院的 2 型糖尿病肾病和无糖尿病肾病的 2 型糖尿病患者 416 例,均无血缘关系。患者常规降血糖、降血脂、降血压治疗不变。纳入标准:符合 1999 年世界卫生组织糖尿病诊断标准^[4];排除标准:合并糖尿病酮症等急性并发症、泌尿系感染、其他肾脏相关疾病、心功能不全、恶性肿瘤、妊娠、哺乳期及资料不完整等。通过测定尿微量白蛋白将患者分为两组:无糖尿病肾病组男性 102 例,女性 122 例,平均年龄(56.2 ± 11.1)岁;2 型糖尿病肾病组男性 96 例,女性 96 例,平均年龄(58.3 ± 11.5)岁。两组患者年龄、性别方面比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。本研究经华北理工大学伦理委员会批准(批准号:2016113),所有患者签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 检测指标 测量身高、体重并计算体重指数(BMI),测量收缩压(SBP)、舒张压(DBP)。采用乳胶凝集反应法测定糖化血红蛋白(HbA1C)(宁波瑞源生物科技有限公司)。应用 Olympus AU5400 全自动生化分析仪(日本 Olympus 公司)测定相关血清指标:尿素氮(BUN)、肌酐(SCr)、尿酸(UA)、甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白胆固

醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、载脂蛋白 A、载脂蛋白 B。应用酶联免疫法瘦素试剂盒(武汉基因美生物科技有限公司)测定血清瘦素。

1.2.2 分析瘦素基因多态性 抽取空腹静脉血 3 ml,应用北京庄盟国际生物基因科技有限公司 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA,PCR 扩增 DNA。查找 Genebank 中瘦素基因组序列,根据文献[4]并使用引物设计软件 Premier 5.0 优化设计 rs7799039 位点所在序列引物。基因扩增引物由北京睿博兴科生物技术有限公司合成。正向引物:5'GGATGGAGGCCCTAGTGGAA3',反向引物:5'GAGATTAAGCAAAGACAGGCA3'。瘦素基因扩增体系:PCR Taq Master Mix 12.5 μ l,正反向引物各 1.0 μ l,DNA 模板 1.0 μ l,双蒸水 25 μ l。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,57 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 40 s,共 35 个循环,72 $^{\circ}$ C 继续延伸 5 min。取 PCR 产物加样于琼脂糖凝胶孔中进行电泳,在紫外透视镜(安庆昌嘉电子产品贸易有限公司)下观察结果并拍照。最后进行酶切(内切酶 Hha I 由北京睿博兴科生物技术有限公司提供),在紫外透视镜下根据条带位置和数目确定基因型,使用凝胶成像系统照相并保存。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 17.0 统计软件。正态分布的计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,比较用 t 检验;非正态分布的计量资料以中位数和四分位数间距 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示,比较用秩和检验;计数资料以构成比(%)表示,比较用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者临床资料比较

2 型糖尿病肾病组与无糖尿病肾病组患者瘦素、HbA1C、BUN、SCr、收缩压、舒张压比较,经 t 检验,差异有统计学意义($P < 0.05$),2 型糖尿病肾病组患

者瘦素、HbA1C、BUN、SCr、收缩压、舒张压高于无糖尿病肾病组。两组患者 UA、TG、TC、HDL-C、LDL-C、载脂蛋白 A、载脂蛋白 B 比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见表 1、2。

表 1 两组患者临床资料比较

组别	n	瘦素 (ng/ml, $\bar{x} \pm s$)	HbA1C (% , $\bar{x} \pm s$)	BUN (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)	SCr (μ mol/L, $\bar{x} \pm s$)	UA (μ mol/L, $\bar{x} \pm s$)	TG[mmol/L, M (P_{25}, P_{75})]
无糖尿病肾病组	224	8.04 ± 2.64	8.52 ± 1.91	5.55 ± 1.49	63.19 ± 14.33	303.68 ± 90.55	1.58 (1.06, 2.75)
2 型糖尿病肾病组	192	15.79 ± 4.62	8.88 ± 1.79	6.19 ± 2.24	77.27 ± 11.30	296.24 ± 118.18	1.63 (1.13, 2.24)
t/Z 值		-20.546	1.973	-3.371	-11.195	0.712	-0.498
P 值		0.000	0.049	0.000	0.000	0.477	0.418

组别	n	TC (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)	HDL-C (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)	LDL-C (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)	载脂蛋白 A (g/L, $\bar{x} \pm s$)	载脂蛋白 B (g/L, $\bar{x} \pm s$)
无糖尿病肾病组	224	5.25 ± 1.25	1.27 ± 0.35	3.00 ± 0.80	1.29 ± 0.26	1.00 ± 0.43
2 型糖尿病肾病组	192	5.26 ± 1.51	1.24 ± 0.40	3.14 ± 0.94	1.24 ± 0.28	0.99 ± 0.27
t 值		-0.073	0.816	-1.621	1.887	0.288
P 值		0.942	0.415	0.106	0.060	0.773

表 2 两组患者血压比较 (mmHg, $\bar{x} \pm s$)

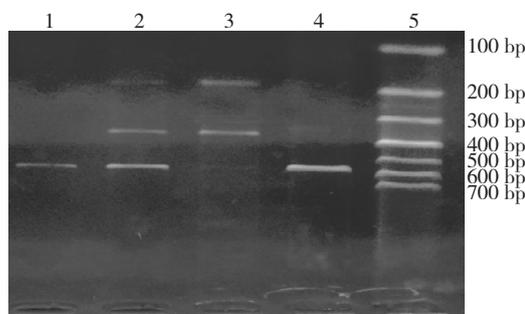
组别	n	收缩压	舒张压
无糖尿病肾病组	224	142.47 ± 19.53	84.04 ± 9.91
2 型糖尿病肾病组	192	150.14 ± 25.91	87.88 ± 13.01
t 值		-3.364	-3.342
P 值		0.000	0.000

2.2 遗传平衡检验结果

将所有研究对象进行 Hardy-Weinberg 遗传平衡检验, AA、AG、GG 基因型频率分别为 68.0%、30.3% 和 1.7%, A 等位基因频率为 83.2%, G 等位基因频率为 16.8%, 经 χ^2 检验, 差异无统计学意义 ($\chi^2=2.802, P=0.094$), 该位点基因型和等位基因频率已达 Hardy-Weinberg 平衡, 来自同一群体, 具有群体代表性。

2.3 瘦素基因启动子区 G-2548A 多态性比较

酶切产物电泳后可分为 3 种基因型, AA、AG 和 GG (见附图)。两组基因型分布频率比较, 经 χ^2 检验, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。两组等位基因分布频率比较, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。见表 3。



1: AA 型 (550 bp); 2: AG 型 (187 bp+363 bp+550 bp); 3: GG 型 (187 bp+363 bp); 4: PCR; 5: DNA Marker

附图 瘦素基因启动子区 G-2548A 多态性电泳图

表 3 两组瘦素基因启动子区 G-2548A 基因型和等位基因的分布频率比较 例 (%)

组别	n	基因型			等位基因	
		AA	AG	GG	A	G
无糖尿病肾病组	224	132 (58.9)	87 (38.8)	5 (2.2)	351 (78.3)	97 (21.7)
2 型糖尿病肾病组	192	151 (78.6)	39 (20.3)	2 (1.0)	341 (88.8)	43 (11.2)
χ^2 值			18.495			16.146
P 值			0.000			0.000

3 讨论

糖尿病肾病是糖尿病慢性并发症之一,也是导致终末期肾衰竭的主要病因之一^[5]。至今,糖尿病肾病的发病机制尚不清楚,可能是多因素相互作用的结果^[6]。其早期表现为肾小球高灌注、高滤过,然后出现蛋白尿,晚期表现为肾衰竭。JARDINE 等^[7]研究表明,糖代谢紊乱、高血压、高血脂、糖尿病病程、性别、年龄等与糖尿病肾病的进展相关。本研究结果表明,2 型糖尿病肾病组收缩压、舒张压、糖化血红蛋白、BUN、SCr 高于无糖尿病肾病组,而两组 UA、TG、TC、HDL-C、LDL-C、载脂蛋白 A、载脂蛋白 B 无差别,与 JARDINE 等^[7]的研究结果不完全相同。有研究表明, HbA1C、BUN、SCr、收缩压、舒张压与对照组相比显著升高^[8-10],与本研究结果一致。李泽宇等^[10]研究指出,糖尿病组血脂水平与糖尿病肾病组有差别,与本研究结论不同,考虑可能与糖尿病肾病组患者服用降脂药物有关。许多研究发现,由脂肪组织产生的细胞因子在糖尿病肾病的发生、发展中起重要作用,瘦素就是其中之一。MOON 等^[11]研究发现,瘦素与糖尿病肾病发病有关。段永强等^[12]研究表明,病例组与对照组的瘦素水平有差别,与本研究结论一致。瘦素是瘦素基因编码的产物,主要由白色脂肪产生,是脂肪细胞分泌的肽类激素,由 167 个氨基酸组成,在调节机体能量平衡、体重及许多生理代谢方面起重要作用。MÜNZHERG 等^[13]研究指出,瘦素促进细胞修复及血管形成。瘦素分泌受多种因素影响,其中基因调控区变异也是影响因素之一。瘦素基因启动子区 G-2548A 是较常见的单核苷酸多态性。有研究者称该单核苷酸多态性或许从转录水平影响瘦素基因的表达及循环瘦素的高低^[14]。王立坤等^[15]研究表明,瘦素在糖尿病微血管病形成过程中起重要作用。瘦素和瘦素受体基因多个位点存在多态性,许多研究证实,该基因多态性参与多种疾病的发生、发展^[14-15]。目前国内外对瘦素基因启动子区 G-2548A 基因多态性相关疾病,如冠状动脉粥样硬化性心脏病(以下简称冠心病)、高血压等都有研究,但对 2 型糖尿病肾病研究甚少。谭艺青等^[16]研究表明,瘦素 rs4731426、rs2167270 基因多态性与我国南方汉族人群冠心病无关联。翟公伟^[17]研究表明,瘦素基因启动子 -2548G/A 存在不同的基

因型,早发冠心病组与正常对照组基因型分布不同,该位点多态性与冠心病发病有关,其中 A 等位基因可能是其发病的遗传易感基因。本研究以瘦素基因启动子区 G-2548A 基因变异作为标记,探讨该基因的变异和 2 型糖尿病肾病易感性的关系。本研究发现无糖尿病肾病患者与 2 型糖尿病肾病组瘦素基因启动子区 G-2548A 基因多态性分布有差异,其中 2 型糖尿病肾病组 AA、AG 基因型频率和 A 等位基因的分布频率较无糖尿病肾病组升高。

综上所述,瘦素基因启动子区 G-2548A 多态性与 2 型糖尿病肾病组患者有一定的相关性,A 等位基因可能是其发病的易感基因。通过检测基因型和等位基因频率可以筛查 2 型糖尿病肾病。由于本研究样本量小,尚需进行大样本研究来证实,同时本研究为病例对照研究,验证因果关联能力弱,尚需前瞻性研究弥补不足。

参考文献:

- [1] International Diabetes Federation. IDF diabetes atlas seventh edition poster update [EB/OL]. [2017-08-13]. <http://www.idf.org/diabetesatlas/update-2017>.
- [2] LIU R, LEE K, HE J C. Genetics and epigenetics of diabetic nephropathy[J]. *Kidney Dis (Basel)*, 2015, 1(1): 42-51.
- [3] 蒋松,刘志红. 糖尿病肾病的防治:任重而道远[J]. *中国实用内科杂志*, 2017, 37(3): 185-188.
- [4] RIBEIRO R, ARAÚJO A P, COELHO A, et al. A functional polymorphism in the promoter region of leptin gene increases susceptibility for non-small cell lung cancer[J]. *European Journal of Cancer*, 2006, 42(8): 1188-1193.
- [5] FORBES J M, COOPER M E. Mechanisms of diabetic complications[J]. *Physiol Rev*, 2013, 93(1): 137-188.
- [6] 黎磊石. 中国肾脏病学[M]. 北京:人民军医出版社, 2008.
- [7] JARDINE M J, HATA J, WOODWARD M, et al. Prediction of kidney-related outcomes in patients with type 2 diabetes[J]. *American Journal of Kidney Diseases the Official Journal of the National Kidney Foundation*, 2012, 60(5): 770-778.
- [8] 黄朝任,黄荣哲,李绍持,等. 2 型糖尿病肾病与血糖、糖化血红蛋白及肾功能的相关性研究[J]. *中国卫生检验杂志*, 2017, 27(8): 1118-1121.
- [9] 肖传宇,侯文华,王宁. 探讨空腹胰岛素、C 肽、HbA1c 在 II 型糖尿病肾病诊断中的临床意义[J]. *中国实验诊断学*, 2015, 19(10): 1679-1682.
- [10] 李泽宇,刘栋,袁文明,等. 糖尿病肾病危险因素及血压控制临界值研究[J]. *中国全科医学*, 2014, 17(20): 2325-2328.

- [11] MOON H S, DALAMAGA M, KIM S Y, et al. Leptin's role in lipodystrophic and nonlipodystrophic insulin-resistant and diabetic individuals[J]. *Endocrine Reviews*, 2013, 34(3): 377-412.
- [12] 段永强, 王佐兵, 余辉. 瘦素及瘦素抵抗在 2 型糖尿病肾病中的作用 [J]. *国际检验医学杂志*, 2011, 32(16): 1824-1825.
- [13] MÜNZBERG H, MORRISON C D. Structure, production and signaling of leptin[J]. *Metabolism Clinical Experimental*, 2015, 64(1): 13-23.
- [14] HOFFSTEDT J, ERIKSSON P, MOTTAGUITABAR S, et al. A polymorphism in the leptin promoter region (-2548 G/A) influences gene expression and adipose tissue secretion of leptin[J]. *Hormone and Metabolic Research*, 2002, 34(7): 355-359.
- [15] 王立坤, 武雪亮, 杨占清, 等. 2 型糖尿病患者血清抵抗素和瘦素及脂联素水平与颈动脉斑块的相关性研究 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2017, 33(4): 297-300.
- [16] 谭艺青, 赵小蕾, 陈业达, 等. 瘦素及瘦素受体基因多态性与中国南方汉族人群冠心病的关联研究 [J]. *现代预防医学*, 2016, 43(4): 601-606.
- [17] 翟公伟. 瘦素基因启动子 -2548G/A 多态性与早发冠心病的关系 [D]. 天津: 天津医科大学, 2013.

(童颖丹 编辑)