

2型糖尿病患者锰超氧化物歧化酶 Ala-9Val 基因多态性与颈动脉粥样硬化的相关性研究

何晓一^a, 李春燕^b (中国人民解放军联勤保障部队第九八七医院 a. 内分泌科; b. 消化内科, 陕西宝鸡 721000)

摘要: 目的 探讨2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)患者锰超氧化物歧化酶(manganese-superoxide dismutase, Mn-SOD)Ala-9Val基因多态性与颈动脉粥样硬化(carotid atherosclerosis, CAS)的关系。方法 选取九八七医院2017年1月~2019年1月的310例T2DM患者为T2DM组,根据颈动脉超声检查结果分为无CAS亚组和CAS亚组。另随机选取同期160例健康体检的志愿者作为对照组,采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性法(polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)检测Mn-SOD基因Ala-9Val位点基因型。分别比较各组间Ala-9Val位点基因型和等位基因分布频率。采用Logistic多因素回归分析法探究T2DM患者发生CAS的独立危险因素。结果 对照组和T2DM组的Ala-9Val位点基因型分布频率差异无统计学意义($\chi^2=4.210$, $P=0.122$),两组的等位基因分布频率差异具有统计学意义($\chi^2=4.487$, $P=0.034$)。CAS亚组与无CAS亚组的Ala-9Val位点基因型和等位基因分布频率差异均具有统计学意义($\chi^2=12.283$, $P=0.002$; $\chi^2=10.984$, $P=0.001$)。Logistics多因素回归分析结果显示,Val/Val基因型是T2DM患者发生CAS的独立危险因素($OR=1.865$, 95%CI 1.086~3.200, $P=0.007$)。结论 T2DM患者Mn-SOD基因Ala-9Val位点多态性与CAS存在一定程度的相关性。

关键词: 2型糖尿病(T2DM); 锰超氧化物歧化酶(Mn-SOD); 颈动脉粥样硬化(CAS); Ala-9Val基因多态性
中图分类号: R587.1; R543.5; Q786 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414(2020)05-024-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2020.05.007

Association between Manganese Superoxide Dismutase Gene Ala-9Val Polymorphism and Carotid Atherosclerosis in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus

HE Xiao-yi^a, LI Chun-yan^b

(a. Department of Endocrinologists; b. Department of Gastroenterology, No.987 Hospital of the Joint Service Support force of the Chinese People's Liberation Army, Shaanxi Baoji 721000, China)

Abstract: Objective To investigate the relationship between the Ala-9Val gene polymorphism of manganese superoxide dismutase (Manganese-Superoxide Dismutase, Mn-SOD) and carotid atherosclerosis (CAS) in patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM). **Methods** A total of 310 cases of T2DM patients in No.987 Hospital from January 2017 to January 2019 were assigned to the T2DM group. According to the results of carotid ultrasound, the subjects were divided into no CAS subgroup and CAS subgroup. Besides, 160 healthy volunteers during the same period were randomly assigned to the control group. PCR-RFLP was used to detect the Ala-9 Val locus genotype of MN-SOD gene. Allele frequency and genotype of Ala-9Val locus were compared among groups. Logistic multivariate regression analysis was used to explore the independent risk factors for CAS in T2DM patients. **Results** There was no significant difference in Ala-9Val genotype distribution frequency between the control group and the T2DM group ($\chi^2=4.210$, $P=0.122$), and the allele frequency difference between the two groups was statistically significant ($\chi^2=4.487$, $P=0.034$). There were statistically significant differences in Ala-9Val genotype and allele distribution frequency between the CAS subgroup and the non-CAS subgroup ($\chi^2=12.283$, $P=0.002$; $\chi^2=10.984$, $P=0.001$). Logistic multi-factor regression analysis results showed that Val/Val genotype was an independent risk factor for CAS in T2DM patients ($OR=1.865$, 95%CI 1.086~3.200, $P=0.007$). **Conclusion** There was a certain degree of correlation between the polymorphism of Mn-SOD gene ALA-9Val and CAS in T2DM patients.

Keywords: type 2 diabetes mellitus (T2DM); manganese-superoxide dismutase (Mn-SOD); carotid atherosclerosis (CAS); Ala-9 Val gene polymorphism

颈动脉粥样硬化(carotid atherosclerosis, CAS)是 2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)患者最

作者简介: 何晓一(1980-), 女, 本科, 主治医师, 研究方向: 内分泌糖尿病代谢, E-mail: baojihexiaoyi@163.com。

通讯作者: 李春燕(1980-), 女, 本科, 主治医师, 研究方向: 消化道内镜, E-mail: 242980283@qq.com。

常见的大血管并发症,亦是导致T2DM患者死亡的主要原因,因此有效控制颈动脉粥样硬化(Carotid atherosclerosis CAS)对改善T2DM患者的预后和生活质量具有积极的作用。研究表明氧化应激水平的异常在糖尿病发生和发展过程中发挥着重要的作用^[1-3]。锰超氧化物歧化酶(manganese-superoxide dismutase, Mn-SOD)是超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)的同工酶,其是机体重要的抗氧化酶之一,近年来有研究指出Ala-9Val是Mn-SOD基因多态性位点,该位点基因型差异可直接影响Mn-SOD构象及生物学活性。目前已有大量关于Ala-9Val位点单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)与糖尿病、糖尿病视网膜病变、糖尿病肾病等相关性分析的文献报道^[4-6],但是鲜有其SNP与CAS相关性的研究报道,基于此本研究通过比较不同患者Mn-SOD基因Ala-9Val位点基因型和等位基因分布频率的差异,旨在探讨Mn-SOD基因多态性与T2DM及CAS的相关性,为临床提供参考。

1 材料与方法

1.1 研究对象 选取我院2017年1月~2019年1月310例T2DM患者为T2DM组,其中男性181例,女性129例;平均年龄 56.09 ± 9.81 岁,根据颈动脉超声检查结果又分为无CAS亚组和CAS亚组。另选取同期我院体检健康的160例志愿者作为对照组,其中男性94例,女性66例;平均年龄 55.74 ± 9.90 岁。本研究经我院伦理委员会审核批准,所有受试者均自愿参加且签署知情同意书。

收集受试者的一般资料,主要包括体重指数(body mass index, BMI)、高血压病史、空腹血糖(fasting plasma glucose, FPG)、糖化血红蛋白(glycated hemoglobin, GHb)、三酰甘油(triacylglycerol, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)和高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDL-C)等。

T2DM组纳入标准:①年龄 ≥ 18 岁;②严格参照中华医学会糖尿病学分会指定的《中国2型糖尿病防治指南》(2013年)诊断为T2DM者^[7];③糖尿病病程大于5年者。

T2DM组排除标准:①1型糖尿病患者;②并发严重肝肾疾病、恶性肿瘤和风湿免疫系统疾病者;③妊娠期女性。

1.2 仪器与试剂 DNA提取试剂盒购自北京天根生化科技有限公司,PCR引物由上海生工生物工程有限公司合成,PCR仪购自德国Eppendorf公司。采用日本东芝公司智能彩色多普勒超声仪(Aplio

500型)测定颈动脉内中膜厚度值(carotid intima-media thickness, CIMT)。

1.3 方法 颈动脉超声检查:受试者取仰卧位,采用智能彩色多普勒超声仪检测颈总动脉分叉处及分叉处远端和近端各1~1.5cm处的CIMT值,取左右两侧较大值作为该受试者CIMT结果。本研究定义CIMT ≥ 1 mm或颈动脉斑块形成为CAS,并以此标准将T2DM组患者分为无CAS亚组和CAS亚组。

基因多态性检测:①基因组DNA提取:清晨采集受试者空腹外周静脉血3ml,采用DNA提取试剂盒严格按照说明书上的操作步骤提取全血基因组DNA。

②PCR扩增:严格按照PCR操作流程,上、下游引物分别为5'-CAGCCCAGCCTGCGTAGACG-3';

5'-GCGTTGATGTGAGGTTCCAG-3'。③酶切和电泳:取延伸产物采用限制性内切酶BsaW I进行酶切,再取酶切产物进行电泳,凝胶成像系统判定结果。

1.4 统计学分析 采用SPSS 19.0统计学软件进行数据分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,计数资料以 $n(\%)$ 表示。基因型分布采用Hardy-Weinberg平衡定律检验。多因素分析采用Logistic回归分析法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组间一般资料的比较 见表1。相较于对照组,T2DM组患者的CIMT, FPG和LDL-C值均显著升高,其差异具有统计学意义($P < 0.05$),两组的BMI,吸烟、高血压、GHb, TG, TC和HDL-C差异无统计学意义($P > 0.05$)。另外,相较于无CAS亚组,CAS亚组患者的CIMT, GHb, TG和TC均显著升高,其差异具有统计学意义($P < 0.05$),两组的BMI,吸烟、高血压、FPG, LDL-C和HDL-C差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 各组Mn-SOD基因Ala-9Val位点基因型和等位基因分布频率的比较 见表2。研究发现在Mn-SOD基因Ala-9Val位点共有3种基因型,分别为Val/Val, Ala/Val和Ala/Ala基因型。对照组和T2DM组的Ala-9Val位点基因型差异无统计学意义($\chi^2=4.210$, $P=0.122$),两组的等位基因分布频率差异具有统计学意义($\chi^2=4.487$, $P=0.034$)。CAS亚组与无CAS亚组的Ala-9Val位点基因型和等位基因分布频率差异均具有统计学意义($\chi^2=12.283$, $P=0.002$; $\chi^2=10.984$, $P=0.001$)。

2.3 T2DM患者发生CAS的危险因素分析 见表3。结合上述实验结果,以GHb, TG, TC和Ala-9Val位点Val/Val基因型为自变量,采用Logistic多因素回归分析法,结果显示Ala-9Val位点Val/Val基因型是T2DM患者发生CAS的独立危险因素

(OR=1.865, 95%CI 1.086~3.200, $P=0.007$)。

表 1

各组间一般资料的比较 [$\bar{x} \pm s, M(P_{25}, P_{75})$]

项目	对照组 ($n=160$)	T2DM 组 ($n=310$)	χ^2	P	T2DM 组		χ^2	P
					CAS 亚组 ($n=186$)	无 CAS 亚组 ($n=124$)		
BMI(kg/m ²)	23.85 ± 3.16	24.22 ± 3.11	0.118	0.908	24.35 ± 3.04	24.01 ± 3.26	0.130	0.718
吸烟 [$n(\%)$]	70(43.75)	147(47.42)	0.326	0.754	90(48.39)	57(45.97)	0.325	0.569
高血压 [$n(\%)$]	68(42.50)	155(50.00)	0.375	0.707	100(53.76)	55(44.35)	0.139	0.933
CIMT(mm)	0.70(0.50,0.80)	1.40(0.90,2.20)	10.984	0.001	2.00(1.70,2.70)	0.80(0.60,0.90)	7.869	0.005
FPG(mmol/L)	5.53 ± 1.86	9.26 ± 2.10	12.283	0.002	9.40 ± 2.02	9.06 ± 2.21	3.037	0.219
GHb(%)	5.14(4.86,5.82)	6.02(6.35,9.02)	0.406	0.687	9.24 ± 1.94	6.34 ± 2.05	4.063	0.044
TG(mmol/L)	2.20 ± 0.64	2.27 ± 0.59	0.125	0.903	5.33 ± 0.58	2.18 ± 0.62	8.644	0.003
TC(mmol/L)	4.66 ± 1.05	4.84 ± 0.98	4.210	0.122	5.93 ± 0.94	4.39 ± 1.03	4.487	0.034
LDL-C(mmol/L)	3.05 ± 0.95	5.45 ± 0.98	7.865	0.005	3.47 ± 0.85	3.42 ± 0.92	0.406	0.687
HDL-C(mmol/L)	1.14 ± 0.36	1.09 ± 0.35	4.487	0.034	1.06 ± 0.33	1.13 ± 0.38	4.210	0.122

表 2

各组 Mn-SOD 基因 Ala-9Val 位点基因型和等位基因分布频率比较

组别	n	基因型			等位基因	
		Val/Val	Ala/Val	Ala/Ala	Val	Ala
对照组	160	122(76.25)	34(21.25)	4(2.50)	278(86.88)	42(13.13)
T2DM 组	310	260(83.87)	46(14.84)	4(1.29)	566(91.29)	54(8.71)
CAS 亚组	186	167(89.78)	17(9.14)	2(1.08)	351(94.35)	21(5.65)
无 CAS 亚组	124	93(75.00)	29(23.39)	2(1.61)	215(86.69)	33(13.31)

表 3

T2DM 患者发生 CAS 的危险因素分析

变量	B	SE	Wals	OR	95%CI	P
HbA1c	0.504	0.304	2.743	1.655	0.911~3.004	0.093
TG	0.462	0.298	2.397	1.587	0.884~2.847	0.208
TC	0.401	0.317	1.604	1.493	0.803~2.777	0.339
Ala-9Val 位点 Val/Val 基因型	0.623	0.276	5.109	1.865	1.086~3.200	0.007

3 讨论

已有大量研究表明机体氧化还原水平失衡与 T2DM 的发生、发展密切相关^[8-10], SOD 是一类广泛存在于生物体内的金属酶, 是机体重要的抗氧化物质, 与过氧化氢酶 (catalase, CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GPx) 相互作用共同维持机体的超氧离子处于较低水平。SOD 主要是以 Fe-SOD, Mn-SOD 和 Cu/Zn-SOD 等形式存在于细胞质、叶绿体、线粒体和过氧化物酶体内。Mn-SOD 主要分布于细胞线粒体基质内, 其是机体主要的自由基清除剂之一, 对维持机体细胞氧化还原平衡具有重要作用。有研究指出 T2DM 患者血清 Mn-SOD 活性显著低于正常对照组, 且并发糖尿病视网膜病变 / 糖尿病肾病患者血清 Mn-SOD 活性水平较单纯糖尿病患者下降地更为显著^[11-12], 由此可提示 Mn-SOD 与多种疾病密切相关。

目前, Ala-9Val 是 Mn-SOD 基因单核苷酸多态性位点, 例如 GCT → GTT 点突变可将 Mn-SOD 线粒体靶序列第 9 位的氨基酸由丙氨酸替换为丝氨酸,

进而导致信号肽构象由亲水的 α -螺旋结构转变为疏水的 β -折叠层结构, 阻碍 Mn-SOD 在线粒体膜上的转运, 显著降低 Mn-SOD 活性。大量研究结果显示 Ala-9Val 位点多态性与糖尿病、糖尿病视网膜病变、糖尿病肾病、冠心病、精神分裂症等的临床易感性密切相关, 充分证实该位点基因多态性具有实际生物学功能^[13]。然而, 该位点基因多态性与 CAS 的相关性鲜有报道。

本研究选取我院 310 例 T2DM 患者和 160 例健康体检志愿者为研究对象, 分别检测和比较其 Mn-SOD 基因 Ala-9Val 位点基因型和等位基因分布频率, 结果显示对照组和 T2DM 组等位基因分布频率的差异具有统计学意义, 两组的 Ala-9Val 位点基因型分布频率差异无统计学意义。该结果与相关文献报道不同, 究其原因可能与本研究纳入样本量相对较少和纳入排除标准不同有关。本研究进一步探讨了 T2DM 患者 CAS 亚组和无 CAS 亚组 Ala-9Val 位点基因型和等位基因的分布频率, 结果显示两组 Ala-9Val 位点基因型和等位基因分布频率差异均具

有统计学意义。由于 Val/Val 基因型是各组中分布频率较高的 Ala-9Val 位点基因型,最后采用多因素 Logistic 回归分析法分析 T2DM 患者发生 CAS 的危险因素,结果显示携带 Val/Val 基因型是 T2DM 患者发生 CAS 的独立危险因素。

国内外研究结果表明不同地区、不同种族人群 Ala-9Val 位点基因型和等位基因分布频率存在显著差异,亚洲人群中 Ala 等位基因分布频率显著低于欧洲人群^[14-16]。接下来本课题组计划扩充纳入样本的数量、区域以更全面和科学地反映 Ala 等位基因分布频率与各种疾病发生发展的关联性。

综上所述, Mn-SOD 基因 Ala-9Val 多态性与 T2DM 患者 CAS 相关,携带 Val/Val 基因型可能成为预测 T2DM 患者出现 CAS 的新指标。

参考文献:

- [1] NEWSHOLME P, CRUZAT V F, KEANE K N, et al. Molecular mechanisms of ROS production and oxidative stress in diabetes[J]. The Biochemical Journal, 2016, 473(24): 4527-4550.
- [2] KAHYA M C, NAZIROĞLU M, ÖVEY İ S. Modulation of diabetes-induced oxidative stress, apoptosis, and Ca²⁺ entry through TRPM2 and TRPV1 channels in dorsal root ganglion and hippocampus of diabetic rats by melatonin and selenium [J]. Molecular neurobiology, 2017, 54(3): 2345-2360.
- [3] D'SOUZA J M P, D'SOUZA R P, VIJIN V F, et al. High predictive ability of glycated hemoglobin on comparison with oxidative stress markers in assessment of chronic vascular complications in type 2 diabetes mellitus[J]. Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation, 2016, 76(1): 51-57.
- [4] 周玉,王伶俐,黄杨,等. 糖尿病大鼠的 SOD 活性与抗氧化剂治疗对机体抗氧化状态的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2016, 24(4): 422-426.
ZHOU Yu, WANG Lingli, HUANG Yang, et al. Effect of antioxidant treatment on the expression and activity of SOD in diabetic rats[J]. Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica, 2016, 24(4): 422-426.
- [5] 李俊燕,陶枫,吴新星,等. 锰超氧化物歧化酶基因多态性与 2 型糖尿病的相关性 [J]. 中国老年学杂志, 2016, 36(4): 832-833.
LI Junyan, TAO Feng, WU Xinxing, et al. The association between Manganese superoxide dismutase gene polymorphism and type 2 diabetes mellitus [J]. Chinese Journal of Gerontology, 2016, 36(4): 832-833.
- [6] TIWARI A K, PRASAD P, THELMA B K, et al. Oxidative stress pathway genes and chronic renal insufficiency in Asian Indians with type 2 diabetes[J]. Journal of Diabetes and Its Complications, 2009, 23(2): 102-111.
- [7] 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南 (2013 年版) [J]. 中华糖尿病杂志, 2014, 22(8): 447-498.
Chinese Diabetes Society Chinese guidelines for the prevention and treatment of type 2 diabetes(2013 edition)[J]. Chinese Journal of Diabetes, 2014, 22(8): 447-498.
- [8] HAN C Y. Roles of reactive oxygen species on insulin resistance in adipose tissue[J]. Diabetes Metab J, 2016, 40 (4) :272-279.
- [9] ANDERSON C, MAJESTE A, HANUS J, et al. E-Cigarette aerosol exposure induces reactive Oxygen species, DNA damage, and cell death in vascular endothelial cells[J]. Toxicological Sciences, 2016, 154(2): 332-340.
- [10] TOGLIATTO G, DENTELLI P, ROSSO A, et al. PDGF-BB carried by endothelial cell-derived extracellular vesicles reduces vascular smooth muscle cell apoptosis in diabetes[J]. Diabetes, 2018, 67(4): 704-716.
- [11] 张瑞. 血清超氧化物歧化酶检测在糖尿病肾病中的应用价值 [J]. 延安大学学报 (医学科学版), 2014, 12(4): 47-49.
ZHANG Rui. Application value of detection of serum superoxide dismutase in diabetes mellitus[J]. Journal of Yanan University(Medical Sciences), 2014, 12(4): 47-49.
- [12] 季雄娟,邵静,陆胜. 糖化血红蛋白及糖化清蛋白水平对糖尿病视网膜病变的诊断价值分析 [J]. 现代检验医学杂志, 2018, 33(5): 77-81.
JI Xiongjuan, SHAO Jing, LU Sheng. Diagnostic value of glycosylated hemoglobin A1c and glycated albumin levels in diabetic retinopathy[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2018, 33(5): 77-81.
- [13] 姚创利,赵佳,鲁旭娟,等. 冠心病患者血清脂蛋白相关磷脂酶 A2 水平与锰超氧化物歧化酶 9 Ala / Val 基因多态性关系探讨 [J]. 现代检验医学杂志, 2017, 32(1): 26-29.
YAO Chuangli, ZHAO Jia, LU Xujuan, et al. Study on the relationship between lipoprotein associated phospholipase A2 level and manganese superoxide dismutase 9 Ala/Val genetic polymorphism in patients with coronary heart disease [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2017, 32(1): 26-29.
- [14] KALKAN G, SEÇKIN HY, BENLİ İ, et al. Relationship between Manganese superoxide dismutase(MnSODAla-9Val)and glutathione peroxidase(GPx1 Pro 197 Leu)gene polymorphisms and alopecia areata[J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(11): 21533-21540.
- [15] JEROTIC D, MATIC M, SUVAKOV S, et al. Association of Nrf2, SOD2 and GPX1 polymorphisms with biomarkers of oxidative distress and survival in End-Stage renal disease patients[J]. Toxins, 2019, 11(7): 431.
- [16] DRAGICEVIC B, SUVAKOV S, JEROTIC D, et al. Association of SOD2 (rs4880) and GPX1 (rs1050450) gene polymorphisms with risk of balkan endemic nephropathy and its related tumors[J]. Medicina, 2019, 55(8): E435.

收稿日期: 2020-06-01

修回日期: 2020-06-29