

· 临床研究 ·

eNOS 基因第 7 外显子 894G→T 多态与糖尿病肾病合并高血压的相关性研究

吕淑云 邢强强 李长贵

【摘要】 目的 探讨内皮细胞型一氧化氮合酶(eNOS)基因第 7 外显子 894 位点多态性与糖尿病肾病合并高血压的相关性。方法 随机选择研究对象为单纯糖尿病(DM)患者 52 例,平均年龄(66.3±7.9)岁,单纯糖尿病肾病(DN)患者 45 例,平均年龄(65.9±6.7)岁,糖尿病肾病合并高血压(DN+HP)患者 50 例,平均年龄(65.9±6.8)岁。运用聚合酶链反应限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)技术扩增 eNOS 基因第 7 外显子的 DNA 片段(248 bp),以限制性内切酶 *Ban* II 进行酶切消化,2%的琼脂糖电泳分离 PCR 产物。各组间等位基因频率及基因型频率的比较用 χ^2 检验,危险因素分析用 Logistic 回归分析。结果 DN 组 T 等位基因和 TG 基因型频率显著高于单纯 DM 组($\chi^2=7.20, P<0.05$; $\chi^2=9.17, P<0.05$), DN 合并高血压组 T 等位基因及 TG 基因型频率高于 DN 组,但差异无显著性($\chi^2=0.44, P>0.05$; $\chi^2=0.61, P>0.05$)。多因素 Logistic 回归分析发现:收缩压(SBP)、糖化血红蛋白(HbA_{1c})、甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、eNOS 基因第 7 外显子 894G→T 突变是 DN 的独立危险因素。结论 eNOS 基因第 7 外显子 894G→T 多态与糖尿病肾病有关。T 等位基因可能是中国人 2 型糖尿病患者易患 DN 的独立危险因素。eNOS 基因第 7 外显子 894G→T 多态与糖尿病肾病合并高血压的关系有待进一步研究。

【关键词】 内皮细胞型一氧化氮合酶;基因多态性;糖尿病肾病;高血压

Association between 894G→T polymorphism at exon 7 of endothelial nitric oxide synthase gene and diabetic nephropathy with or without hypertension

LÜ Shuyun¹, XING Qiangqiang¹, LI Changgui²

1. Department of Endocrinology, Ren Min Hospital of Jimo City, Jimo 266200, China

2. Department of Endocrinology, Affiliated Hospital, Qingdao University, Qingdao 266011, China

【Abstract】 Objective To investigate the association between 894G→T polymorphism at exon 7 of eNOS gene and diabetic nephropathy with or without hypertension. Methods A case-control study in 147 Chinese subjects (including 52 patients with type-2 diabetes mellitus(DM), 45 patients with diabetic nephropathy(DN) and 50 patients with diabetic nephropathy and hypertension) was performed. The allele frequency and genotype distribution of 894G→T polymorphism at exon 7 of eNOS gene were determined by polymerase chain reaction combined with restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) methods. Results The frequency of T allele and TG genotype at exon 7 were significantly higher in DN group than in DM one; but there was no significant difference between DN with hypertension and DN without hypertension. Multivariate logistic regression analysis showed that the systolic blood pressure, TG, TC, HbA_{1c} and the 894G→T polymorphism at exon 7 of eNOS gene were risk factors for diabetic nephropathy. Conclusion T allele of the 894G→T polymorphism at exon 7 of eNOS gene is related to diabetic nephropathy in type-2 diabetes mellitus, but it is not related to hypertension in diabetic nephropathy.

【Key words】 endothelial nitric oxide synthase; gene; polymorphism; diabetic nephropathy; hypertension

临床研究发现,糖尿病患者易伴发高血压病,糖

尿病患者一旦出现高血压病,单纯糖尿病肾病(DN)的发生、发展加速。DN 和高血压病皆为多基因遗传性疾病,其发生、发展都是遗传因素和环境因素共同作用的结果。一氧化氮合酶(eNOS)基因的表达产物 NOS 是一氧化氮(NO)合成中的主要限速因

作者单位:266200 即墨市,山东省即墨市人民医院(吕淑云、邢强强);266011 青岛市,青岛大学医学院附属医院内分泌科(李长贵)

作者简介:吕淑云,大学本科,在读医学硕士

通讯作者:吕淑云,电话:0532-8558170

子,NO是体内重要的舒血管物质,在维持血压和肾小球内压的平衡中起重要作用,此外,NO还可通过抑制平滑肌增殖和抑制血小板聚集,拮抗肾小球硬化的发生发展。NOS的功能异常通过影响血管壁NO基础水平,进而影响血管壁平滑肌的舒缓。临床研究还发现,早期糖尿病肾病患者中,有的患者出现高血压,而有的患者则不出现高血压,出现上述现象的原因除环境因素外,遗传因素可能在其中起一定的作用。我们对eNOS基因第7外显子处894G→T多态与糖尿病肾病合并高血压的关系进行了研究。

1 对象与方法

1.1 研究对象 所有入选的患者均为2型糖尿病(T₂DM)患者,糖尿病病史均≥8年,伴或不伴高血压,伴高血压者,高血压在糖尿病之后出现。糖尿病诊断参照1999年WHO制定的标准:症状+随机血糖≥11.1 mmol/L,或空腹血糖≥7.0 mmol/L,或OGTT中2 h血糖≥11.1 mmol/L。高血压诊断参照WHO的诊断标准:收缩压≥140 mmHg和(或)舒张压≥90 mmHg。糖尿病肾病诊断:6个月内连续两次尿微量白蛋白排泄率(UAER)20~200 μg/min,肌酐<132 μmol/L,并排除其他原因引起蛋白尿者。

根据UAER和血压分为:(1)DM组:糖尿病诊断明确,无糖尿病肾病和高血压病,共52例,男/女=20/32,年龄(66.3±7.9)岁,糖尿病病程(10.21±2.09)年。(2)DN:有糖尿病且合并糖尿病肾病但无高血压病,共45例,男/女=18/27,年龄(65.9±6.7)岁;糖尿病病程(11.69±3.32)年。(3)DN+HP组:有糖尿病且合并糖尿病肾病和高血压,共50例,男/女=19/31,年龄(65.9±6.8)岁,糖尿病病程(12.31±5.31)年,高血压病程(5.61±2.86)年。

1.2 实验方法 (1)血糖、血脂、肌酐用全自动生化仪测定,糖化血红蛋白采用HPLC法。C肽和24 h尿白蛋白排泄率用酶联免疫吸附法。(2)DNA的提取应用Promega公司试剂,-20℃保存。(3)PCR扩增:上游及下游引物分别为:5'-AAGGCAGGA-GACAGTGGATGGA-3',5'-CCCAGTCAATCCCTT TGGTGCTCA-3'。反应总体积为25 μl,含DDW 11.8 μl,10×缓冲液2.5 μl,MgCl₂ 1.5 μl,dNTPs 2.0 μl,上游引物2.5 μl,下游引物2.5 μl,Taq DNA聚合酶0.2 μl,模板DNA 2.0 μl。反应条件为94℃预变性5 min,94℃变性30 s,60℃退火30 s,72℃延伸45 s,循环35周后,于72℃终延伸5 min。(4)eNOS基因第7外显子894位点多态性分析:反应

体积共20 μl,含DDW 10.3 μl,10×缓冲液2 μl,BSA 0.2 μl,PCR产物7 μl,Ban II内切酶0.5 μl,70℃水浴酶切3 h,冷却。(5)基因型确定:取酶切产物于2%琼脂糖凝胶分离,经溴化乙锭染色,于紫外投射仪下观察结果。

1.3 统计学分析 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用方差分析,计数资料用 χ^2 检验,危险性分析用Logistic回归。所有统计用SPSS10.0软件完成。

2 结果

2.1 2型糖尿病患者eNOS第7外显子894G→T多态检测结果 不含894G→T多态的等位基因经Ban II内切酶酶切后得到大小为163 bp和85 bp的两个片段,基因型为GG;酶切得到248 bp,又得到163 bp和85 bp的片段者,基因型为TG(图1)。

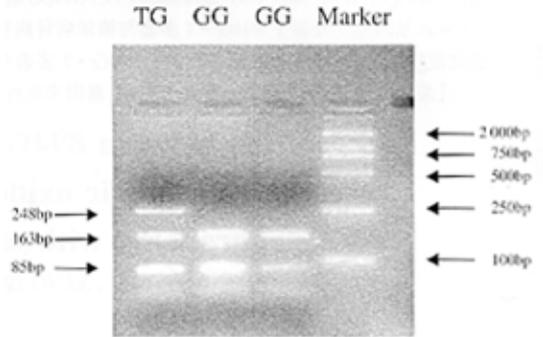


图1 eNOS第7外显子894G→T多态位点 Ban II 酶切后电泳

2.2 DM组、DN组和DN合并高血压组临床资料和生化特征 DM组和DN组除UAER的差异有显著性(P<0.05),其他如年龄、病程、体重指数、血压、糖化血红蛋白、甘油三酯、总胆固醇等差异均无显著性(P>0.05)。DN组和DN合并高血压组除收缩压和舒张压差异有显著性(P<0.05)外,其他如年龄、病程、体重指数、尿白蛋白排泄率、糖化血红蛋白、甘油三酯、总胆固醇等差异均无显著性(P>0.05;表1)。

2.3 eNOS第7外显子894G→T多态不同基因型的临床和生化特征 所有病例依据基因型分为二组:GG基因型95例(男36,女59),GT基因型52例(男20,女32)。两组患者除UAER比较有显著性差异(P<0.05)外,其余指标如年龄、病程、性别、血压、体重指数、血糖、血脂、总胆固醇、糖化血红蛋白差异均无显著性(P>0.05;表2)。

2.4 eNOS第7外显子894G→T多态各组中基因型及基因频率分布 eNOS基因多态产生三种基因

型:GG(野生型纯合子),TT(突变型纯合子),GT(杂合子)。本实验中未发现TT基因型。DN组的GT基因型频率明显高于DM组($P<0.05$),T等位基因频率也明显高于DN组($P<0.05$;表3)。DN合并高血压组GT基因型频率和T等位基因频

率高于单纯DN组,但差异无显著性($P>0.05$;表4)。相对风险分析发现GT基因型者发生糖尿病肾病的概率是非GT基因型者的2.29倍($P<0.05$;表5)。

表1 各组患者临床资料及生化特征比较

临床资料	DM组	DN组	DN+HP组	F值	P值
例数(例)	52	45	50	—	—
性别(男/女)	20/32	18/27	19/31	—	—
年龄(岁)	66.3±7.9	65.9±6.7	65.9±6.8	0.482	0.619
糖尿病病程(年)	10.21±2.09	11.69±3.32	12.31±5.31	2.511	0.085
高血压病程(年)	—	—	5.61±2.86	—	—
体重指数(kg/m ²)	24.05±2.53	24.39±2.30	26.45±3.02	0.784	0.458
收缩压(mmHg)	126.08±8.23	125.67±9.27	161.43±15.75	148.526	<0.001
舒张压(mmHg)	76.92±6.87	77.71±6.27	90.92±7.12	63.33	<0.001
空腹血糖(mmol/L)	9.48±2.27	9.57±1.99	9.53±2.92	0.017	0.983
甘油三酯(mmol/L)	1.70±0.54	1.92±0.54	2.36±0.56	2.316	0.102
总胆固醇(mmol/L)	5.46±1.34	5.99±1.13	6.62±1.14	2.694	0.071
糖化血红蛋白(%)	7.22±0.76	7.79±1.03	7.96±1.64	1.430	0.243
血肌酐(μmol/L)	91.48±14.78	89.84±14.81	88.20±15.46	0.629	0.535
24 h尿微量白蛋白排泄率(μg/min)	4.83±2.07	156.56±83.34	157.43±93.40	13.275	<0.001

表2 所有患者eNOS基因第7外显子G→T多态不同基因型临床资料特征

项目	G/G	G/T	F值	P值
例数(例)	95	52	—	—
性别(男/女)	36/59	20/32	—	—
年龄(岁)	65.8±7.4	65.8±6.8	0.000	0.994
病程(年)	10.25±2.74	10.92±3.31	1.733	0.190
体重指数(kg/m ²)	24.96±2.63	25.01±3.09	2.013	0.158
收缩压(mmHg)	134.84±22.35	140.59±19.20	1.107	0.294
舒张压(mmHg)	80.47±9.48	85.33±19.20	0.790	0.376
空腹血糖(mmol/L)	9.73±2.34	9.15±2.52	2.676	0.104
甘油三酯(mmol/L)	2.02±0.60	1.92±0.63	0.871	0.352
总胆固醇(mmol/L)	6.07±1.25	5.86±1.32	0.815	0.368
糖化血红蛋白(%)	7.55±0.91	7.76±0.86	1.801	0.182
24 h尿微量白蛋白排泄率(μg/min)	75.36±78.13	146.64±77.95	4.451	0.037*

注:*两组比较 $P<0.05$

表3 DM组和DN组及单纯DN组和DN+HP组基因频率及基因型分布

组别	例数	基因型频率(%)		等位基因频率(%)	
		GG	GT	G	T
DM组	52	42(80.8)	10(19.2)	94(90.4)	10(9.6)
DN组	95	53(55.8)	42(44.2)	148(77.9)	42(22.1)
单纯DN组	45	27(60)	18(40)	72(80)	18(20)
DN+HP组	50	26(52)	24(48)	76(76)	24(24)

注:DN组与DM组比较, $P<0.05$;DN+HP组与单纯DN组比较, $P>0.05$

表4 eNOS基因894G→T多态与糖尿病肾病相对风险分析

基因多态	OR	P值
G/T	2.29	<0.05
G/G	0.70	<0.05

表5 糖尿病肾病各危险因素的 Logistic 回归分析结果

选入变量	β	SE(β)	Exp(B)	P值
收缩压	0.53	0.019	1.054	0.005
糖化血红蛋白	0.475	0.235	1.608	0.043
甘油三酯	0.911	0.455	2.487	0.045
胆固醇	0.827	0.274	2.286	0.003
基因型	1.145	0.517	3.143	0.027

2.5 糖尿病肾病各危险因素的 Logistic 回归分析

以收缩压、BMI、HbA_{1c}、TC、TG、病程和 eNOS 基因第7外显子基因型为自变量,UAER为因变量,进行多因素 Logistic 回归分析,结果显示,收缩压、HbA_{1c}、TC、TG和第7外显子基因型进入回归方程。

2.6 基因适合度检测 对三组患者的基因型频率经 χ^2 检验进行适合度检测,符合 Hardy-Weinberg 平衡。

3 讨论

NO是以L-Arg为原料合成的一种血管舒缓物质,生理条件下,NO通过激活鸟苷酸环化酶,促进cGMP的合成,使平滑肌松弛和血管舒张、降低血小板聚集、抑制脂质过氧化、抑制内皮细胞增殖^[1]。NO生成减少可导致血管收缩、内皮细胞增殖。

DM患者体内NO含量的变化是一个双相过程,表现为早期NO代偿性合成增加而晚期则减少^[2]。Tolins等^[3]研究链脲佐菌素(STZ)诱导的糖尿病大鼠发现,6周病程时肾小球滤过率、肾滤过压、肾血浆流量等均明显升高,且尿NO₂、NO₃排泄量也增加。给予NOS抑制剂L-NAME后上述指标均下降,提示DN早期NO合成增加可能是导致肾小球高滤过的重要原因。倪连松等^[4]发现单肾切除8周后,糖尿病大鼠NO含量明显下降,而细胞基质蛋白的积聚及尿白蛋白的排泄却显著增加。提示DN晚期NO含量的降低可能与肾小球硬化有关。

NO水平与高血压病的发生发展有关。国内外学者研究发现原发性高血压患者NO水平明显降低^[5-7]。吴秀香等^[8]研究还发现肾性高血压大鼠不仅基础NO生成与释放减少,内皮素(ET)的含量也明显增加。

NOS是NO合成中的主要限速因子,NOS的功能障碍将影响血管壁NO基础水平。Wang等^[9]发现血浆NO水平的变化30%是由于eNOS基因多态

性所致。近年来eNOS基因第7外显子894G→T多态与DN和高血压关系成为国内外研究的热点,但研究结果各家报道不一。Suzuki等^[10]研究发现,各种原因引起的ESRD中GT和TT基因型明显升高,提示Glu298Asp突变是ESRD的一个危险因素。国内学者研究发现,T等位基因与DN的发生有关^[11]。Miyamoto等^[12-14]发现,eNOS基因894G→T多态性与高血压明显相关。而Benjafield等^[15-17]却得出相反的结论。以上研究表明eNOS基因第7外显子894G→T多态与糖尿病肾病有关,与糖尿病肾病合并高血压的关系尚不明确。

糖尿病肾病高血压可能是多种因素作用的结果,其中包括容量负荷增加,血管活性张力增高,内源性血管扩张物质的减少及遗传易感性等。临床研究发现,早期糖尿病肾病患者中部分患者出现高血压,有的则不出现,导致该现象的原因目前尚不清楚。eNOS基因第7外显子894G→T多态与DN和高血压病均有关,推测其在早期糖尿病肾病高血压患者中发生率应较高,但目前国内外均未见有关的报道。本研究发现,DN合并高血压组的T等位基因和GT基因型频率均明显高于DM组,高于DN组但差异无显著性。出现上述情况可能与本研究样本数偏少有关,因此eNOS基因894G→T突变与DN合并高血压的相关性研究有待于大样本研究证实。把所有DN患者与DM组比较发现DN组的T等位基因和GT基因型频率均明显高于DM组,进一步证实eNOS基因894G→T多态与DN的发生有关。本研究发现,DN除与eNOS基因第7外显子894G→T突变有关外,还与收缩期血压、HbA_{1c}、TC、TG呈正相关。

eNOS基因第7外显子894G→T多态导致NO合成减少的原因目前尚不清楚。有人发现eNOS基因298位的Glu为 α 螺旋,894G→T突变使298Glu变为Asp可使其结构变得更为紧密,从而影响酶的一级和二级结构,导致酶的活性降低。提示eNOS基因894G→T多态可影响eNOS的蛋白功能,使NO生成减少^[18]。

综上所述,我们的研究显示eNOS基因第7外显子894G→T突变与DN的发生有关,而与DN合并高血压的关系尚需多中心大样本的研究加以证实。

参考文献

- Zanetti M, Katusic ZS, Obrien T. Expression and function of recombinant endothelial nitric oxide synthase in human endothelial cells. *J Vasc Res*, 2000, 37:449-456.

(下转第311页)

- nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature*, 2000, 405:458-462.
- 9 Bernik TR, Friedman SG, Ochani M, et al. Cholinergic anti-inflammatory pathway inhibition of tumor necrosis factor during ischemia reperfusion. *J Vasc Surg*, 2002, 36: 1231-1236.
 - 10 Catania A, Cutuli M, Garofalo L, et al. Plasma concentrations and anti-L-cytokine effects of alpha-melanocyte stimulating hormone in septic patients. *Crit Care Med*, 2000, 28: 1403-1407.
 - 11 Martinez C, Abad C, Delgado M, et al. Anti-inflammatory role in septic shock of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 1053-1058.
 - 12 Beishuizen A, Thijs LG. Endotoxin and the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. *J Endotoxin Res*, 2003, 9: 3-24.
 - 13 Chadda K, Annane D. The use of corticosteroids in severe sepsis and acute respiratory distress syndrome. *Ann Med*, 2002, 34: 582-589.
 - 14 Law WR, Valli VE, Conlon BA, et al. Therapeutic potential for transient inhibition of adenosine deaminase in systemic inflammatory response syndrome. *Crit Care Med*, 2003, 31: 1475-1481.

(收稿日期 2003-09-08)

(本文编辑 张和起)

(上接第 278 页)

- 2 Wascher TC, Graier WF, Bahadori B. Time course of endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circulation*, 1994, 90: 1109-1110.
- 3 Tolins JP, Shultz PJ, Raji L, et al. Abnormal renal hemodynamic response to reduced renal perfusion pressure in diabetic rats: role of NO. *Am J Physiol*, 1993, 265(6 Pt 2): F886-F895.
- 4 倪连松, 郑景晨, 汪大望, 等. 糖尿病大鼠肾脏一氧化氮合酶异构体 mRNA 表达初步研究. *中国现代医学杂志*, 2003, 13: 34-36.
- 5 Forte P, Copland M, Smith L, et al. Basal nitric oxide synthesis in essential hypertension. *Lancet*, 1997, 349: 837-842.
- 6 周希江, 柳元宗, 吴军, 等. 2 型糖尿病伴高血压患者尿一氧化氮排量测定及其意义. *临床内科杂志*, 2001, 18: 181-183.
- 7 路影, 蓝红林, 张志刚, 等. 2 型糖尿病患者血清一氧化氮与高血压的关系. *广西医科大学学报*, 2002, 19: 64-65.
- 8 吴秀香, 董建文, 贾月霞, 等. 肾性高血压大鼠血浆及血管组织中内皮素及基础 NO 的动态变化. *高血压杂志*, 1999, 7: 366-367.
- 9 Wang XL, Mahaney MC, Sim AS, et al. Genetic contribution of the endothelial constitutive nitric oxide synthase gene to plasma nitric oxide levels. *Arterioscl Thromb Vasc Biol*, 1997, 17: 3147-3153.
- 10 Suzuki H, Nagase S, Kikuchi S, et al. Association of a missense Glu298Asp mutation of the endothelial nitric oxide synthase gene with end stage renal disease. *Clin Chem*, 2000, 46: 1858-1860.
- 11 李长贵, 董砚虎, 吕文山, 等. 内皮型一氧化氮合酶基因多态性与糖尿病肾病的相关性. *中华内分泌代谢杂志*, 2001, 17: 365-366.
- 12 Miyamoto Y, Saito Y, Kajiyama N, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension. *Hypertension*, 1998, 32: 3-8.
- 13 Yasujima M, Tsutaya S, Shoji M. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and hypertense. *Rinsho Byori*, 1998, 46: 1199-1204.
- 14 Jachymova M, Horvay K, Bultas J, et al. Association of the Glu298Asp polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene with essential hypertension resistant to conventional therapy. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 284: 426-430.
- 15 Benjafield AV, Morris BJ. Association analyses of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism in essential hypertension. *Am J Hypertens*, 2000, 13: 994-998.
- 16 Tsujita Y, Babas S, Yamauchi R, et al. Association analyses between genetic polymorphisms of endothelial nitric oxide synthase gene and hypertension in Japanese: The Suita Study. *J Hypertens*, 2001, 19: 1941-1948.
- 17 Kato N, Sugiyama T, Morita H, et al. Lack of evidence for association between the endothelial nitric oxide synthase gene and hypertension. *Hypertension*, 1999, 33: 933-936.
- 18 Shimasaki Y, Yasue HY, Yoshimura M, et al. Association of the missense Glu298Asp variant of the endothelial nitric oxide synthase gene with myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*, 1998, 31: 1506-1510.

(收稿日期: 2003-08-25)

(本文编辑 张和起)