

Apelin 基因 rs2235306 多态性与 2 型糖尿病早期肾损害的关系

贾少丹, 李靖, 刘伟, 纪霞

(山东青岛市市立医院干部保健科, 青岛 266071)

[摘要] **目的** 探讨 Apelin 基因 rs2235306 多态性与 2 型糖尿病早期肾损害的关系。**方法** 选取 121 例 2 型糖尿病患者, 根据尿清蛋白与肌酐的比值分为正常清蛋白尿组 (NA 组, 58 例) 和微量清蛋白尿组 (MA 组, 63 例); 选择健康志愿者 60 名为健康对照组 (NC 组)。应用四引物扩增受阻突变体系聚合酶链反应 (ARMS-PCR) 技术, 测定上述三组人群 Apelin 基因 rs2235306 多态性, 同时测定血清 Apelin 水平及生化指标。**结果** (1) NC 组三种基因型频率分别为 TT 43%、TC 45%、CC 12%, 等位基因频率为 T 66%、C 34%; NA 组相应为 TT 40%、TC 45%、CC 15%, T 62%、C 38%; MA 组相应为 TT 33%、TC 40%、CC 27%, T 53%、C 47%。MA 组 CC 基因型频率及 C 等位基因频率明显高于 NC 组 (χ^2 分别为 4.591、4.082, P 值为 0.032、0.043); NA 组 CC 基因型频率及 C 等位基因频率与 NC 组比较, 差异无统计学意义。(2) 糖尿病人群 TC + CC 基因型组与 TT 基因型组比较, 空腹胰岛素 (FIns)、胰岛素抵抗指数 (HOMA-IR) 和 Apelin 水平明显升高 (均 $P < 0.05$)。 (3) 多因素回归分析结果显示, Apelin 与 HOMA-IR 和 BMI 正相关 ($t = 4.078$ 和 2.071 , 均 $P < 0.05$)。**结论** Apelin 基因 rs2235306 位点 C 等位基因携带可能与 2 型糖尿病早期肾损害有关。

[关键词] 糖尿病, 2 型; 基因表达调控; 肾功能不全; 白蛋白尿

中图分类号: R587.1 文献标识码: A DOI: 10.3969/J.issn.1672-6790.2018.05.009

Association between polymorphism of Apelin Gene rs2235306 and early renal damage in type 2 diabetes mellitus

Jia Shaodan, Li Jing, Liu Wei, Ji Xia (Cadre Health Care Department, Qingdao Municipal Hospital, Qingdao 266071, China)

Corresponding author: Liu Wei, Email: Liuwei701021@sohu.com

[Abstract] **Objective** To investigate the relationship between polymorphism of Apelin gene rs2235306 and early renal damage in type 2 diabetes mellitus. **Methods** 121 patients with type 2 diabetes were divided into normal albuminuria group (58 cases in the NA group) and micro-albuminuria group (63 cases in the MA group) according to the urinary micro-albumin to creatinine ratio, with 60 healthy subjects included as controls (NC group). The genotypes of Apelin gene rs2235306 were analyzed by tetra-primer amplification refractory mutation system PCR (Tetra-primer ARMS PCR, T-ARMS-PCR) in 121 patients with type 2 diabetes and 60 healthy volunteers. At the same time, serum levels of Apelin and the other biochemical indexes were tested. **Results** (1) The frequencies of genotypes in NC group were TT 43%, TC 45%, CC 12%. the frequencies of alleles in NC group were T 66% and C 34%, the frequencies of genotypes in NA group were TT 40%, TC 45% and CC 15%, . the frequencies of alleles in NA group were T 62% and C 38%, the frequencies of genotypes in MA group were TT 33%, TC 40% and CC 27%, and the frequencies of alleles in MA group were T 53% and C 47%. The CC genotype and allele C frequency in the MA group were higher than those in the NC group ($\chi^2 = 4.591, 4.082; P = 0.032, 0.043$). For the NA group and the NC group, the CC genotype and allele C frequency had no statistical significance. (2) In the group of patients with type 2 diabetes, serum FIns, HOMA-IR and Apelin were significant higher in genotypes TC + CC group compared with the genotype TT group ($P < 0.05$). (3) Further multivariate regression analysis revealed that Apelin had positive correlation with HOMA-IR and BMI ($t = 4.078, 2.071. P < 0.05$). **Conclusion** The allele C carriers of Apelin gene promoter rs2235306 may be correlated with early

基金项目: 山东省医药卫生科技发展计划项目 (2015BJYB34)

作者简介: 贾少丹, 主任医师, Email: jiashaodan1965@126.com

通信作者: 刘伟, 副主任医师, Email: Liuwei701021@sohu.com

renal damage in type 2 diabetes mellitus.

[**Keywords**] Diabetes mellitus, type 2; Gene expression regulation; Renal insufficiency; Albuminuria

Apelin 是一种新发现的脂肪因子,是由同一基因编码的具有不同分子结构的一组内源性活性肽,它是血管紧张素 II 1 型受体相关蛋白(APJ)的内源性配体,该类肽通过作用于 APJ 参与胰岛素敏感性、心血管功能、氧化应激及炎症等病理生理过程,与糖尿病多种微血管并发症关系密切。本研究应用四引物扩增受阻突变体系聚合酶链反应(ARMS-PCR)技术,测定 2 型糖尿病患者 Apelin 基因 rs2235306 位点多态性,探讨 Apelin 在糖尿病肾病发病机制中的作用。

1 对象和方法

1.1 研究对象 选择 2016 年 6 月至 2017 年 5 月在我院门诊就诊和住院的 2 型糖尿病患者 121 例为研究组,诊断符合 1999 年世界卫生组织糖尿病诊断标准,并根据尿清蛋白与肌酐(UACR)的比值是否 ≥ 30 mg/gCr,分为正常蛋白尿组(NA 组:UACR < 30 mg/gCr)和微量清蛋白尿组(MA 组:UACR $30 \sim 300$ mg/gCr)。其中 NA 组 58 例,男 27 例,女 31 例;年龄范围 28 ~ 65 岁,年龄 (48.3 ± 14.7) 岁;MA 组 63 例,男 30 例,女 33 例,年龄范围 29 ~ 62 岁,年龄 (46.6 ± 11.5) 岁。选择同期健康体检者 60 例为健康对照组,男 28 例,女 32 例;年龄范围 27 ~ 62 岁,年龄 (47.2 ± 13.7) 岁。并经葡萄糖耐量试验排除糖尿病。

所有研究对象肝功能、尿素氮和血肌酐均正常,排除尿路感染和其他肾脏疾病患者。所有参加本研究者均签署知情同意书。

1.2 研究方法

1.2.1 一般临床指标和生化指标检测 所有研究对象由专人测量身高、体质量、腰围、血压,计算体质指数(BMI)。各受试者于采血前夜 22:00 后禁食,次晨抽取肘静脉血 5 mL,其中 3 mL 送检生化指标如空腹血糖(FPG)、空腹胰岛素(FIns)、总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)及;余 2 mL 在 -80 °C 冰箱保存,用于 DNA 提取和酶联免疫吸附法检测 Apelin 水平。胰岛素抵抗指数(HOMA-IR) = $(FPG \times FIns) / 22.5$ 。

1.2.2 基因组 DNA 提取 应用美国 Promega 公司 DNA 提取试剂盒,严格按照试剂盒操作说明提取全

血基因组 DNA,提取后的 DNA 应用微量核酸蛋白测定仪(NanoVue 超微量分光光度计,英国)进行定性、定量分析, -80 °C 冰箱保存备用。

1.2.3 引物合成 根据 Genebank 中提供的基因组序列由上海生工生物技术有限公司设计 T-ARMS-PCR 引物,其中(1)内引物-上游引物 5'-CCCCCTG-CACCATCTGCTT-3',下游引物 5'-GGGACAGG-GATCTAGTAGCAGGAAG-3';(2)外引物-上游引物 5'-AAGTGGTGCAGGGTATCCTTGGGT-3',下游引物 5'-AAGGAGCCAAGGAGGAAC AGAGC-3'。

1.2.4 DNA 扩增条件 PCR 反应体系总体积 25 μ L,包括模板 DNA 100 ng,四引物各 1 μ L(10 mmol/L), $10 \times$ 缓冲液 2.5 μ L,dNTPs 0.5 μ L(10 mmol/L),MgCl₂ 1.5 μ L(25 mmol/L),TaqDNA 聚合酶为 0.15 μ L(5 u/ μ L),加双蒸水至 25 μ L。所有试剂均由 Fermentas 公司提供。PCR 反应条件:① 95 °C 预变性 5 min,② 95 °C 变性 30 s,③ 61 °C 退火 30 s,④ 72 °C 延伸 60 s,进行 35 个循环,最后 72 °C 终末延伸 10 min。

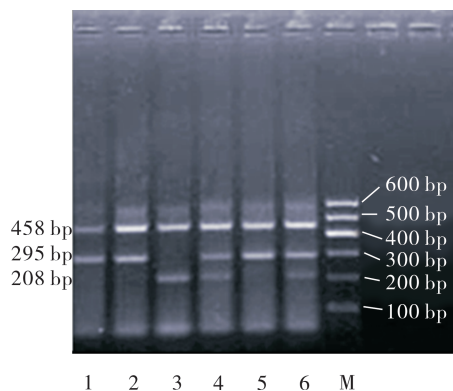
1.2.5 扩增产物验证 应用 2% 琼脂糖制胶,取扩增产物 10 μ L 进行凝胶电泳,EB 染色,以 DL-600DNA 片段长度为参考标准,使用培清 JS-780A 全自动凝胶成像分析仪观察电泳结果并拍照保存。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行数据分析,使用 χ^2 检验分析各组 Apelin 基因 rs 2235306 位点基因型及等位基因频率是否符合 Hardy Weinberg 平衡。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验。计数资料比较采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Apelin 基因 rs2235306 位点多态性结果 PCR 产物电泳后于 208 bp 和 458 bp 处出现两条带者为野生纯合型 TT;于 295 bp 和 458 bp 处出现两条带者为突变纯合型 CC;于 208 bp、295 bp 和 458 bp 处出现三条带者为突变杂合型 TC。见图 1。

2.2 三组研究对象 Apelin 基因 rs2235306 位点多态性比较 三组研究对象 Apelin 基因 rs2235306 位点的基因型和等位基因频率均符合 Hardy-Weinberg 平衡($P > 0.05$)。MA 组 CC 基因型频率及 C 等位基因频率明显高于 NC 组(χ^2 值分别为 4.591、



注: M 为 DL-600maker; 1、2、5 为 CC 基因型; 3 为 TT 基因型; 4、6 为 TC 基因型

图 1 Apelin 基因 rs2235306 位点多态性

4.082, P 值为 0.032, 0.043); 与 NA 组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。NA 组 CC 基因型频率及 C 等位基因频率与 NC 组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

2.3 糖尿病组 Apelin 基因 rs2235306 位点多态性与其他临床指标的关系 由于人群 CC 型基因分布频率少, 因此采用 TC + CC 与 TT 比较。糖尿病组 TC + CC 基因型与 TT 基因型比较, FIns、HOMA-IR

和 Apelin 水平明显升高 (均 $P < 0.05$)。见表 2。

2.4 Apelin 的影响因素分析 以 Apelin 为因变量, 年龄、腰围 (WC)、BMI、收缩压 (SBP)、舒张压 (DBP)、TC、TG、HDL-C、LDL-C、FPG、FIns、HOMA-IR 为自变量的多元逐步回归分析显示 Apelin 与 HOMA-IR 和 BMI 正相关 ($t = 4.078, 2.071$, 均 $P < 0.05$), 因此, HOMA-IR 和 BMI 是 Apelin 的独立相关因素 (r^2 分别为 0.148 和 0.171, 均 $P < 0.05$)。见表 3。

表 3 Apelin 与其他指标的多元逐步回归分析

指标	β	Std. Error	β'	t 值	P 值
HOMA-IR	14.725	3.611	0.350	4.078	<0.001
BMI	6.653	3.213	0.178	2.071	0.041

3 讨论

糖尿病肾病是糖尿病的主要微血管并发症之一, 起病隐匿, 以微量清蛋白尿为早期表现, 其确切的发病机制目前尚未完全阐明。许多研究显示细胞因子和炎症反应参与了糖尿病肾病的发生和发展^[1-2]。Apelin 是 1998 年被发现的一种脂肪因子, 与血管紧张素 II (Ang II) 同源, 具有降血压、增强心肌收缩力、促进胰岛素分泌及垂体激素的释放等多

表 1 糖尿病亚组和健康对照组 Apelin 基因 rs2235306 位点多态性分布比较 [例 (%)]

组别	例数	基因型频率分布			等位基因频率分布	
		TT	TC	CC	T	C
NC 组	60	26 (0.43)	27 (0.45)	7 (0.12)	79 (0.66)	41 (0.34)
NA 组	58	23 (0.40)	26 (0.45)	9 (0.15)	72 (0.62)	44 (0.38)
MA 组	63	21 (0.33)	25 (0.40)	17 (0.27) ^a	67 (0.53)	59 (0.47) ^b

注: 与 NC 组比较, ^a $\chi^2 = 4.591, P < 0.05$; ^b $\chi^2 = 4.082, P < 0.05$

表 2 糖尿病组 Apelin 基因 rs2235306 位点多态性与其他临床指标的关系 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	年龄 (岁)	BMI (kg/m ²)	WC (cm)	SBP (mm Hg)	DBP (mm Hg)	TC (mmol/L)	TG (mmol/L)
TC + CC	77	47.1 ± 11.9	26.0 ± 2.4	91.3 ± 7.7	132.8 ± 15.2	81.9 ± 13.7	5.37 ± 1.20	1.91 ± 1.11
TT	44	47.7 ± 12.4	25.3 ± 1.9	89.7 ± 8.5	129.4 ± 12.7	77.9 ± 11.8	4.96 ± 1.86	1.80 ± 1.37
t 值		0.241	1.587	1.043	1.258	1.628	1.804	0.488
P 值		0.810	0.115	0.299	0.211	0.106	0.074	0.626

组别	例数	HDL-C (mmol/L)	LDL-C (mmol/L)	FPG (mmol/L)	FIns (mU/L)	HOMA-IR	Apelin (ng/L)
TC + CC	77	1.49 ± 0.56	3.57 ± 0.80	7.87 ± 1.03	15.16 ± 4.66	5.38 ± 2.06	375.58 ± 81.48
TT	44	1.45 ± 0.51	3.50 ± 1.07	7.73 ± 0.96	13.15 ± 4.07	4.57 ± 1.69	324.62 ± 75.85
t 值		0.384	0.355	0.752	2.376	2.236	3.393
P 值		0.702	0.724	0.453	0.019	0.027	0.001

注: BMI 为体质指数, WC 为腰围, SBP 为收缩压, DBP 为舒张压, TC 为总胆固醇, TG 为三酰甘油, HDL-C 为高密度脂蛋白胆固醇, LDL-C 为低密度脂蛋白胆固醇, FPG 为空腹血糖, HOMA-IR 为胰岛素抵抗指数, 下表同

种生物学效应^[3-5]。研究发现 Apelin 不仅参与了众多心血管疾病的发生发展,而且在肥胖相关疾病——2 型糖尿病中起重要作用。此外,Apelin 还与肾脏疾病也有一定的关系。

Apelin 表达分布广泛,在肾脏组织和血管内皮细胞都有表达。体外研究表明 Apelin-APJ 系统以自分泌或旁分泌的方式诱导内皮细胞增殖,促进新生血管形成^[6]。Zhang 等^[7]研究发现 Apelin 通过促进肾小球上皮细胞增殖和增加肾小球毛细血管的通透性两方面在糖尿病肾病发生中发挥作用。曾翔俊等^[8]的研究也表明 Apelin/APJ 在 2 型糖尿病小鼠及 2 型糖尿病患者肾脏组织中表达上调,上调表达的 Apelin/APJ 系统促进肾小球微血管内皮细胞形成血管样结构并促进 2 型糖尿病小鼠肾小球毛细血管增生,从而参与糖尿病肾病的发生发展。人类 Apelin 基因位于 X 染色体 q25-26.1 段,含有 3 个外显子和 2 个内含子, mRNA 长度是 2673 bp。rs2235306 位点存在于 Apelin 基因启动子区,存在 T-C 的变异,本研究发现 MA 组 CC 基因型及 C 等位基因频率高于 NC 组($P < 0.05$),NA 组 CC 基因型频率及 C 等位基因频率与 NC 组比较差异无统计学意义,因此推测 Apelin 基因 rs2235306 位点 C 等位基因携带可能与 2 型糖尿病早期肾损害有关。

胰岛素抵抗是早期糖尿病肾病的独立危险因素,而 Apelin/APJ 系统与肥胖、胰岛素抵抗密切相关。Krist 等^[9]研究发现肥胖、胰岛素抵抗患者的血清 Apelin 水平明显升高,而且减少脂肪组织 Apelin 的表达有助于提高胰岛素敏感性。国内黎英荣等^[10]研究发现血清 Apelin 浓度与血清胰岛素水平和 HOMA-IR 呈正相关。本研究结果显示糖尿病组人群 TC + CC 基因型组与 TT 基因型组比较,FIIns、HOMA-IR 和 Apelin 水平明显升高,多元逐步回归分析显示 HOMA-IR 和 BMI 是 Apelin 的独立相关因素,提示 Apelin 与胰岛素抵抗密切相关。因此,推测 Apelin 可能在糖尿病肾病的发生、发展中发挥作用。

Apelin 是一种新发现的调节肽,目前关于 Apelin

和 APJ 在基因水平与疾病的相关性研究尚未普遍开展,因此,Apelin 基因多态性与糖尿病肾病的相关性机制还需进行大样本的深入研究和探索。

参考文献

- [1] WADA J, MAKINO H. Inflammation and the pathogenesis of diabetic nephropathy [J]. Clin Sci, 2013, 124(3): 139-152.
- [2] CAI Y, ZENG T, CHEN L. Association of adiponectin polymorphisms with the risk of diabetic nephropathy in type 2 diabetes; a meta analysis [J]. Diabetes, 2015, 7(1): 31-40.
- [3] DUPARC T, COLOM A, CANI P D, et al. Central Apelin controls glucose homeostasis via a nitric oxide-dependent pathway in mice [J]. Antioxid Redox Signal, 2011, 15(6): 1477-1496.
- [4] ZHU P, HUANG F, LIN F, et al. Plasma apelin levels, blood pressure and cardiovascular risk factors in coastal Chinese population [J]. Ann Med, 2013, 45(7): 494-498.
- [5] PITKIN S L, MAGUIRE J J, KUC R E, et al. Modulation of the Apelin/APJ system in heart failure and atherosclerosis in man [J]. Br J Pharmacol, 2010, 160(7): 1785-1795.
- [6] SAWANE M, KAJIYA K, KIDOYA H, et al. Apelin inhibits diet-induced obesity by enhancing lymphatic and blood vessel integrity [J]. Diabetes, 2013, 62(6): 1970-1980.
- [7] ZHANG B H, WANG W, WANG H, et al. Promoting effects of the Adipokine, Apelin on diabetic nephropathy [J]. PLOS One, 2013, 8(4): e60457.
- [8] 曾翔俊, 张宝海, 张冬梅, 等. Apelin/APJ 系统促进糖尿病肾病发生的研究 [J]. 中国病理生理杂志, 2010, 26(10): 2060.
- [9] KRIST J, WIEDER K, KLOTING N, et al. Effects of weight loss and exercise on apelin serum concentrations and adipose tissue expression in human obesity [J]. Obes Facts, 2013, 6(1): 57-69.
- [10] 黎英荣, 连连, 苏宏业, 等. 2 型糖尿病和肥胖患者血清 Apelin 与胰岛素抵抗的关系研 [J]. 重庆医学, 2010, 39(5): 1322-1323.

(收稿日期:2018-06-22)