

# 一氧化氮和一氧化氮合酶基因多态性与糖尿病视网膜病变

董娟,郎平,吴昌凡

作者单位:(241000)中国安徽省芜湖市,皖南医学院弋矶山医院眼科

作者简介:董娟,女,在读硕士研究生,研究方向:临床眼科学。

通讯作者:郎平,女,主任医师,副教授,硕士研究生导师,研究方向:眼底病. ximmengxiaotong@126.com

收稿日期:2010-09-15 修回日期:2010-10-15

## NO and NOS on genetic polymorphisms of diabetic retinopathy

Juan Dong, Ping Lang, Chang-Fan Wu

Department of Ophthalmology, Yijishan Hospital of Wannan Medical College, Wuhu 241000, Anhui Province, China

**Correspondence to:** Ping Lang, Department of Ophthalmology, Yijishan Hospital of Wannan Medical College, Wuhu 241000, Anhui Province, China. ximmengxiaotong@126.com

Received:2010-09-15 Accepted:2010-10-15

### Abstract

• Diabetic retinopathy (DR) is one of important eye diseases that may cause blindness. Its occurrence and development is related to blood glucose level, duration of diabetes, environment and genetics. Nitric oxide (NO) is an important vasoactive substance which correlate with capillary occlusion, microcirculation disturbance, endothelial cell proliferation in DR. Nitric oxide synthase (NOS) is now accepted as a key enzyme of NO synthesis. The functions of NO and NOS on genetic polymorphism to DR are summarized in this review.

• **KEYWORDS:** diabetic retinopathy; nitric oxide; nitric oxide synthase; genetic polymorphism

Dong J, Lang P, Wu CF. NO and NOS on genetic polymorphisms of diabetic retinopathy. *Int J Ophthalmol (Guoji Yanke Zazhi)* 2010;10(11):2144-2146

### 摘要

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是重要致盲性眼病之一,其发生和进展与血糖水平、疾病病程、环境及遗传等多种因素有关。一氧化氮(NO)作为一种重要的血管活性物质,与DR中毛细血管闭塞、微循环障碍、内皮细胞增殖相关。一氧化氮合酶(NOS)是NO合成过程中的关键酶,我们就NO和NOS基因多态性与DR的关系进行综述。

**关键词:**糖尿病视网膜病变;一氧化氮;一氧化氮合酶;基因多态性

DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2010.11.032

董娟,郎平,吴昌凡.一氧化氮和一氧化氮合酶基因多态性与糖尿病视网膜病变.国际眼科杂志2010;10(11):2144-2146

### 0 引言

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是糖尿病微血管病变中的重要表现,属于糖尿病的严重并发症之一,是世界范围内致盲的主要疾病。目前大量的研究资料表明,DR的发生和发展除与疾病的病程、血糖控制的情况有关,还受一定的遗传因素影响,很多基因的多态性导致了疾病的个体差异。DR遗传易感性的决定基因目前尚不清楚,近来研究显示<sup>[1]</sup>,一氧化氮(nitric oxide, NO)与DR的发生发展密切相关。但由于NO半衰期极短,且体内NO是L-精氨酸在一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)的催化下产生的,故常依赖于对NOS的研究来探讨NO在DR中的作用机制。我们就NO和NOS基因多态性与DR的关系作一综述。

### 1 NO与NOS

**1.1 NO与NOS的关系** NO是一种脂溶性、具有高反应活性的自由基和生物信使分子,具有广泛的生物活性。在生理状态下,机体分泌一定浓度的NO,保持基础状态下血管舒张,抑制血管平滑肌细胞增生和血小板及单核细胞的黏附。基础NO释放减少使人发生高血压和动脉粥样硬化,恢复NO活性可使先前的损伤恢复正常。但当NO生成过多,就会因细胞毒性作用而对细胞和组织造成损害。NO由L-精氨酸转化而来,NOS是其合成的限速酶,NOS的活性及含量直接影响NO合成。人类共有三种NOS,即内皮型NOS(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)、神经型NOS(neural nitric oxide synthase, nNOS)和诱导型NOS(inducible nitric oxide synthase, iNOS)。nNOS和eNOS合称结构型NOS(constitutive NOS, cNOS),其激活依赖于Ca<sup>2+</sup>/CaM的作用,不受内毒素等诱导,在生理状态下随着胞内Ca<sup>2+</sup>浓度的变化,催化生成NO,参与细胞的信号传导和血管张力的调节,但催化反应迅速短暂,NO生成较少。而iNOS不依赖于Ca<sup>2+</sup>/CaM,在生理状态下一般不表达,在病理状态下可由内毒素、细菌脂多糖、IL-1等介质的刺激下产生大量的NO<sup>[2]</sup>,破坏DNA双螺旋结构,诱导DNA损伤、突变和发挥细胞毒效应<sup>[3]</sup>。

**1.2 NOS在眼部的分布** cNOS存在于脉络膜、视网膜、睫状体及小梁网,以脉络膜和视网膜的NOS活性最强。而iNOS在正常视网膜组织中几乎无表达,而在内毒素等介质刺激下可表达于视网膜内皮细胞、周细胞、视网膜神经节细胞、视网膜色素上皮细胞等细胞胞质之中<sup>[4]</sup>。其活性持续时间远远超过eNOS和nNOS,而且在病理状态下,iNOS的表达不受限制<sup>[5]</sup>。

### 2 NO与DR

视网膜血管病变是DR的病理特征之一,而视网膜微循环障碍则是导致DR的重要发病因素。NO作为一种重

要的血管活性物质,在保持视网膜血管的基础张力、血流的基本供给以及微血管的循环调节等方面所起的作用已得到大多数学者的共识。目前多数学者认为 DR 与血管内皮功能受损密切相关,NO 在其中起十分重要的作用。不少学者发现糖尿病时大鼠血管内皮细胞合成 NO 的能力下降。另外,一些研究认为糖尿病时 NO 合成减少可能与底物不足、NOS 辅因子缺乏及醛糖还原酶活性增加等有关。还有不少学者认为糖尿病动物或糖尿病患者的血管内皮合成 NO 并不减少,在某一阶段或某一器官反而增加,而糖尿病时生成的某些物质如氧自由基、糖基化终产物对 NO 的灭活,则是 NO 依赖的血管舒张障碍的主要原因。据实验观察<sup>[6]</sup>,2 型糖尿病患者外周血中 NO 水平 NDR 组明显高于对照组,以后又呈下降趋势,提示血中 NO 含量变化与 DR 有关。研究表明,糖尿病视网膜血管血流早期加快及通透性增高与 NO 增多有关,高糖对 NOS 同功酶具有不同作用,蛋白激酶 C 活化能诱导 iNOS 表达上调,而抑制 eNOS 表达,其结果为产生过多的 NO<sup>[7]</sup>。过量生成 NO 超氧化,表现出细胞毒性和组织损伤作用,损伤视网膜血管周细胞。这也许与 DR 早期病理改变视网膜毛细血管周细胞的丧失有关。

### 3 NOS 与 DR

**3.1 NOS 基因的定位及其作用** nNOS 基因位于第 12 号染色体(12q24.2),由 28 个外显子组成,约有 100kb,除了在中枢和周围神经元表达外,还在骨骼肌、胃、子宫、支气管上皮细胞和  $\beta$  细胞中表达。eNOS 基因位于第 7 号染色体(7q35-36),含 26 个外显子,约有 21kb,主要存在于内皮细胞,它产生的 NO 主要作用是调节血流,尤其是冠脉血流。因 eNOS 基因是第一个被测定的 NOS 基因,故已有数项研究涉及 eNOS 基因多态性与 DR 的关系。iNOS 基因位于染色体 17cen-q11.2,约有 37kb,含 26 个外显子。在外显子 2 上有转录起始点,外显子 26 上有终止密码。在纯合子小鼠中敲除该基因不引起高血压,而敲除 eNOS 基因则引起高血压。

**3.2 NOS 在视网膜中的表达** 糖尿病大鼠模型研究显示<sup>[8]</sup>,iNOS 在大鼠视网膜中免疫组化结果显示 iNOS 在视网膜中弱阳性表达,且表达部位主要位于 INL(内核层)的细胞胞体以及 IPL(内丛状层)、OPL(外丛状层)中。但在糖尿病组大鼠的视网膜中,iNOS 在上述部位的表达则呈强阳性,较对照组明显增强。由于视网膜的血管主要位于 INL 层,提示 iNOS 表达的增强可能与糖尿病视网膜血流减少有关。研究结果还显示 eNOS,nNOS 在大鼠的视网膜组织中均有表达,因此含有此二型 NOS 的细胞均有可能释放 NO、参与视网膜微循环的调节。目前关于 eNOS,nNOS 在糖尿病视网膜中的表达调节尚未定论。此研究认为在 DR 前期,视网膜的血流开始减少之时,iNOS 的表达上调与血流灌注不良、血液循环障碍有密切关系,而 eNOS 与 nNOS 的表达未见显著增强,提示此时如采用针对 iNOS 表达的抑制剂可能有助于预防 DR 的发生。但是,Clermont 等<sup>[9]</sup>1999 年通过转 eNOS 基因糖尿病鼠发现,转入 eNOS 基因的糖尿病鼠其血管病变减轻,推测糖尿病早期可能存在 eNOS 的缺陷或活性改变。

### 3.3 NOS 基因多态性与 DR

**3.3.1 iNOS 基因多态性与 DR** iNOS 基因变异主要发生在启动子区域。有以下几种:(1)(CCTTT)<sub>n</sub>,5' 端启动子区域内 5 个核苷酸(CCTTT)重复序列的多态性。(2)启动子区 G<sup>954</sup>→C。(3)启动子区 G<sup>969</sup>→C。Warpeha 等<sup>[10]</sup>

发现,携带不同数目 CCTTT 碱基重复序列的 iNOS 基因转录活性不同。其中,携带 14 个重复序列等位基因者与 DR 明显相关,该等位基因携带者与非携带者相比,患 DR 的相对危险度仅为 0.21,并且他们患肾病和心脏并发症的几率明显减少。Warpeha 等还发现,(CCTTT)<sub>14</sub> 等位基因可增强启动子活性,上调 iNOS 的表达,促进 NO 的产生,参与舒张血管、松弛血管平滑肌和抑制内皮细胞增殖,可能在抵御 DR 的发生中发挥一定的作用,具体机制有待于进一步的研究。有报道(CCTTT)<sub>n</sub> 多态性影响 iNOS 启动子活性,且(CCTTT)<sub>n</sub> 与(AAAT)<sub>5</sub> 有连锁不平衡关系,两者均与 DR 和 DN 有关<sup>[11]</sup>。Kumaramanicavel 等<sup>[12]</sup>对 199 例 2 型糖尿病患者的研究表明,iNOS 的 210bp 等位基因是 DR 的危险因子(OR = 2.03, 95% CI: 96 ~ 4.35),而 200bp 及 220bp 等位基因是 DR 的保护性基因。

**3.3.2 nNOS 基因多态性与 DR** 在糖尿病的各种并发症中,对 nNOS 基因的研究较少。已报道发现的与糖尿病相关的 nNOS 基因多态性有第 7 和第 9 号等位基因<sup>[13]</sup>。

**3.3.3 eNOS 基因多态性与 DR** eNOS 基因变异主要有以下几种:(1)第 4 内含子处 27 个碱基(GAAGTCTAGACCTGCTGCAPGGGGTGAG)4 或 5 次的重复。大多数人在此处的等位基因为 5 个重复序列(eNOS4b),前 3 个重复序列第 19 位核苷酸是 A,而后 2 个是 G;少数人为 4 个重复序列(eNOS4a),前 2 个重复序列第 19 位核苷酸是 A,后 2 个是 G,据此将 eNOS 基因分为 3 种基因型(4b/4b,4b/4a,4a/4a)和两类等位基因(4b,4a)。(2)第 7 外显子处 G894→T(Glu298Asp)。(3)启动子区 T<sup>786</sup>→C,即上游区域第 786 位核苷酸 T→C 突变。(4)第 13 内含子处(CA)<sub>n</sub> 的多态重复。(5)启动子区 A<sup>922</sup>→G。(6)启动子区 T<sup>1468</sup>→A。(7)第 18 内含子 A→C 替代。(8)第 23 内含子处的 G→T 替代。其中对前 3 种变异的研究较为广泛。eNOS 基因多态性与 eNOS 功能减低有关,而 eNOS 是决定血管壁 NO 基础水平的关键酶。de Syllós 等<sup>[14]</sup>在 2006 年对巴西人群及 Uthra 等<sup>[15]</sup>在 2007 年对南印度人群的研究发现,eNOS 基因多态性与 DR 无关。Awata 等<sup>[16]</sup>在 2004 年报道日本人群中 eNOS4a/b 基因型频率与 DR 的发生与发展程度无关,但可能与黄斑水肿相关。Neugebauer 等<sup>[17]</sup>在研究 DN 的同时发现 eNOS 基因多态性与 DR 易感性不相关。Warpeha 等<sup>[18]</sup>调查 1 型和 2 型 DM 患者后发现,eNOS 基因多态性与严重的 DR 也不相关。而 Taverna 等<sup>[19]</sup>在 2002 年发现高加索人种中 1 型糖尿病患者 eNOS4a/b 与严重 DR 相关;2007 年 Ezzidi 等<sup>[20]</sup>报道突尼斯人群及 Chen 等<sup>[21]</sup>报道西非人群中非胰岛素依赖型糖尿病(NIDDM)患者 DR 的发生与 eNOS 基因型有关。Frost 等<sup>[22]</sup>发现 b/b 基因型的 1 型糖尿病患者 DR 的发生率比 a/a 和 b/a 基因型患者显著增高(OR = 2.4 95% CI: 1 ~ 5.3)。Taverna 等<sup>[23]</sup>也发现 1 型糖尿病严重 DR 患者的 eNOS a/a 基因型数量明显少于对照组(P = 0.02)。而其 eNOS b/b 基因型数量明显多于对照组(P = 0.032)。李明武等<sup>[24]</sup>在研究了汉族人群中 166 例 2 型糖尿病患者 eNOS 基因第四内含子存在 27 个 bp 重复的多态性,但可能与 DR 的发生发展无相关性。另有研究结果显示 eNOS 基因 786T→C 多态性与 774C→T 多态性与严重 DR 的发生有关,并且 786T→C 多态性是严重 DR 发病的独立危险因子之一<sup>[25]</sup>。出现上述分歧的原因可能与入选患者的种族、病程、血糖控制情况不同以及 DR 的分组情况不同有关。

#### 4 小结

根据文献报道,DR 的发生可能与多个基因有关,对于 DR 基因多态性,多数欧美人研究了 1 型糖尿病,日本人大多研究了 2 型糖尿病,尽管在机制上认为 NOS 与 DR 有关,目前也有很多动物及临床研究已显示:eNOS 和 iNOS 基因在 DR 的发生和发展过程中扮演重要角色,但 DR 的发生发展受多种因素的影响及研究方法的局限性,对于在汉族人群中 NOS 基因与 DR 的关系,还有待于进一步的研究。

#### 参考文献

- 1 Bitar MS, Wahid S, Mustafa S, et al. Nitric oxide dynamics and endothelial dysfunction in type II model of genetic diabetes. *Eur J Pharmacol* 2005;511(1): 53-64
- 2 Bohme GA, Bon C, Stutzmann JM, et al. Possible involvement of nitric oxide in long term potentiation. *Eur J Pharmacol* 1991;199(3):379-381
- 3 Liu RH, Hotchkiss TH. Potential genotoxicity of chronically elevated nitric oxide: a review. *Mutat Res* 1995;339(2):73-89
- 4 Chakravarthy U, Stitt AW, Mcnally J, et al. Nitric oxide synthase activity and expression in retinal capillary endothelial cells and pericytes. *Curr Eye Res* 1995;14(2):285-294
- 5 Bogdan C. Nitric oxide and the regulation of gene expression. *Trends Cell Biol* 2001;11(2):66-75
- 6 杜红阳,付海燕. 血浆 ET-1、NO 和 vWF 与 2 型糖尿病视网膜病变相关关系. *眼科新进展* 2006;26(9):685-687
- 7 罗大卫,许迅. 氨基胍与糖尿病视网膜病变. *眼科新进展* 2002;22(3):206-207
- 8 王梅,文艳玲,李海刚,等. 糖尿病视网膜病变前期 NOS 亚型的蛋白表达及其在血流变化中作用的实验研究. *中山大学学报(医学科学版)* 2004;25(4):342-346
- 9 Clermont AC, Takahara H, Kagokawa H, et al. In vivo transduction of epithelial nitric oxide synthase (eNOS) via adenovirus infection in diabetic rats enhances retinal hemodynamics. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40:680
- 10 Warpeha KM, Xu W, Liu IG, et al. Genotype and functional analysis of a polymorphic (CCTTT) n repeat of NOS2A in diabetic retinopathy. *FASEB J* 1999;13:1825-1832
- 11 Ng DP, Warram JH, Krolewski AS, et al. Nitric oxide synthase gene polymorphisms and diabetic nephropathy. *Diabetologia* 2003;46(13):1706-1707
- 12 Kumaramanickavel G, Sriprya S, Vellanki RN, et al. Inducible nitric oxide synthase gene and diabetic retinopathy in Asian Indian patients.

*Clin Genet* 2002;61(5):344-348

- 13 Freedman BI, Yu H, Anderson PJ, et al. Genetic analysis of nitric oxide and endothelin in end-stage renal disease. *Nephrol Dial Transplant* 2000;15(11):1794-1800
- 14 de Syllos RW, Sandrim VC, Lisboa HR, et al. Endothelial nitric oxide synthase genotype and haplotype are not associated with diabetic retinopathy in diabetes type 2 patients. *Nitric Oxide* 2006;15:417-422
- 15 Uthra S, Raman R, Mukesh BN, et al. Intron 4 VNTR of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) gene and diabetic retinopathy in type 2 patients in southern India. *Ophthalmic Genet* 2007;28:77-81
- 16 Awata T, Neda T, Iizuka H, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene is associated with diabetic macular edema in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2004;27:2184-2190
- 17 Neugebauer S, Baba T, Watanabe T, et al. Association of the nitric oxide synthase gene polymorphism with an increased risk for progression to diabetic nephropathy in type 2 diabetes. *Diabetes* 2000;49:500-503
- 18 Warpeha KM, Ah-Fat F, Harding S, et al. Dinucleotide repeat polymorphisms in EDN1 and NOS3 are not associated with severe diabetic retinopathy in type 1 or type 2 diabetes. *Eye* 1999;13:174-178
- 19 Taverna MJ, Sola A, Guyot-Argenton C, et al. eNOS4 polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase predicts risk for severe diabetic retinopathy. *Diabet Med* 2002;19:240-245
- 20 Ezzidi I, Mtiraoui N, Mohamed MB, et al. Endothelial nitric oxide synthase Glu298Asp, 4b/a, and T-786C polymorphisms in type 2 diabetic retinopathy. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2008;68:542-546
- 21 Chen Y, Huang H, Zhou J, et al. Polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with diabetic retinopathy in a cohort West Africans. *Mol Vis* 2007;13:2142-2147
- 22 Frost D, Chitu J, Meyer M, et al. Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) 4a/b gene polymorphism and carotid artery intima-media thickness in type-1 diabetic patients. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2003;111:12-15
- 23 Taverna MJ, Sola A, Guyot-Argenton C, et al. eNOS4 polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase predicts risk for severe diabetic retinopathy. *Diabet Med* 2002;19:240-245
- 24 李明武,黎晓新,赵明威,等. 一氧化氮合酶基因多态性与糖尿病视网膜病变相关性研究. *中华眼底病杂志* 2010;26(2):135-138
- 25 Taverna MJ, Elgrably F, Selmi H, et al. The T-786C and C774T endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms independently affect the onset pattern of severe diabetic retinopathy. *Nitric Oxide* 2005;13(1):88-92