

# 中国人 VEGF 基因多态性与 DR 的关系

李东豪<sup>1</sup>, 胡利<sup>1</sup>, 何文智<sup>2</sup>, 丘红红<sup>1</sup>, 闻毅颀<sup>1</sup>, 杨倩<sup>1</sup>

**基金项目:**广州市荔湾区科技计划项目(No. 20111213068)  
**作者单位:**(510150)中国广东省广州市,广州医学院第三附属医院<sup>1</sup>眼科;<sup>2</sup>妇研所实验室  
**作者简介:**李东豪,医学硕士,主任医师,眼科主任兼党支部书记,硕士研究生导师,广东省医学会眼科学分会委员,广东省科技厅和广州市科技局科技项目评审专家库成员,广东省卫生系列高级职称评审专家,研究方向:眼底病。  
**通讯作者:**李东豪. ldh71@163.com  
**收稿日期:**2013-02-17 **修回日期:**2013-05-27

## The association study of gene polymorphism of vascular endothelial growth factor with diabetic retinopathy

Dong-Hao Li<sup>1</sup>, Li Hu<sup>1</sup>, Wen-Zhi He<sup>2</sup>, Hong-Hong Qiu<sup>1</sup>, Yi-Yi Wen<sup>1</sup>, Qian Yang<sup>1</sup>

**Foundation item:** Scientific Research Project of Guangzhou Liwan District, China( No. 20111213068)

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology; <sup>2</sup>Laboratory of Women's Studies Institute, the Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College, Guangzhou 510150, Guangdong Province, China

**Correspondence to:** Dong-Hao Li. Department of Ophthalmology, the Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College, Guangzhou 510150, Guangdong Province, China. ldh71@163.com  
**Received:**2013-02-17 **Accepted:**2013-05-27

### Abstract

• **AIM:** To investigate the correlation of vascular endothelial factor (VEGF) I/D gene polymorphism with diabetic retinopathy (DR) in type 2 diabetes mellitus.  
• **METHODS:** The 91 patients with diabetes and 30 control cases which VEGF I/D genotypes and VEGF level were determined by polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP).  
• **RESULTS:** The DD genotype frequencies were significantly higher in NPDR and PDR groups than in groups of NDR and control ( $P < 0.01$ ); The VEGF level were significantly higher in NPDR and PDR groups than in groups of NDR and normal control ( $P < 0.01$ ).  
• **CONCLUSION:** VEGF I/D gene polymorphism is associated with the development of diabetic retinopathy; D allele is probably a susceptible gene of diabetic retinopathy.  
• **KEYWORDS:** vascular endothelial; growth factor; gene polymorphism; diabetic retinopathy

**Citation:** Li DH, Hu L, He WZ, et al. The association study of gene polymorphism of vascular endothelial growth factor with diabetic retinopathy. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2013; 13(6):1106-1107

### 摘要

**目的:**探讨血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF) I/D 基因多态性与糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)的关系。

**方法:**应用 PCR-RFLP 方法检测 91 例 2 型糖尿病患者和 30 例对照者的 VEGF I/D 基因和 VEGF 水平。

**结果:**NPDR 组和 PDR 组 DD 基因型频率显著高于 NDR 组和对照组 ( $P < 0.01$ ); NPDR 组和 PDR 组血清 VEGF 水平显著高于 NDR 组和对照组 ( $P < 0.01$ )。

**结论:**VEGF I/D 基因多态性很可能与 DR 的发生发展有关, D 等位基因可能是 DR 的易感基因。

**关键词:**血管内皮; 生长因子; 基因多态性; 糖尿病视网膜病变

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2013.06.12

**引用:**李东豪, 胡利, 何文智, 等. 中国人 VEGF 基因多态性与 DR 的关系. *国际眼科杂志* 2013; 13(6):1106-1107

### 0 引言

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是糖尿病的最严重的微血管并发症,也是一种世界性的主要致盲眼病。中国糖尿病的发病率为 6.7%,成为全球糖尿病第一大国,大约有 1.5 亿人患有糖尿病。探讨防治 DR 的机制和方法,对于防盲治盲有极其重要的意义。目前研究发现,血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是 DR 新生血管形成的最强刺激因子, VEGF 基因与 DR 发展也存在一定关系。因此,从基因水平探讨 DR 的发生、发展,成为目前国内外的研究焦点<sup>[1,2]</sup>。本课题应用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)方法检测 VEGF 水平及其 I/D 基因多态性,旨在探讨 VEGF 及其基因多态性在 DR 发生、发展中的作用,为预防和治疗 DR 提供新的方法和理论依据。

### 1 对象和方法

**1.1 对象** 选取我院 2011-07/2012-10 眼科住院患者 121 例进行分组,其中对照组 30 例,糖尿病组 91 例。对照组:随机选择同期在我院眼科住院的老年性白内障患者 30 例,其中男 14 例,女 16 例,年龄 57~75(平均 66±9)岁,无糖尿病史。糖尿病组(T<sub>2</sub>DM):按照 1999 年 WHO 糖尿病诊断标准,病程超过 10a 的 T<sub>2</sub>DM 患者 91 例。根据眼底照相检查分为三个亚组:(1)无糖尿病视网膜病变组(non-diabetic retinopathy, NDR):31 例,其中男 14 例,女 17 例,年龄 52~71(平均 62±9.3)岁,病程 8~16(平均 12±4.2)a,眼底没有 DR。(2)非增殖性糖尿病视网膜病变组(nonproliferative diabetic retinopathy, NPDR):30 例,其中男 13 例,女 17 例,年龄 51~73(平均 63±9.6)岁,病程 8~18(平均 13±5.1)a,眼底病变 I~III 期。(3)增殖性糖尿病视网膜病变组(proliferative diabetic retinopathy, PDR):30 例,其中男 14 例,女 16 例,年龄 56~75

表1 NDR和NPDR及PDR三个亚组间临床特点比较

组别	例数	年龄(岁)	病程(a)	收缩压SBP(mmHg)	舒张压DBP(mmHg)	血糖(mmol/L)	HbA1c(%)
NDR组	31	62±9.3	12±4.2	141±18.5	86±10.5	8±3.8	8±2.5
NPDR组	30	63±9.6	13±5.1	142±19.3	85±12.2	9±3.4	9±2.7
PDR组	30	65±9.2	15±5.6	142±21.5	87±9.6	11.2±3.6	10.5±2.2

 $\bar{x} \pm s$ 

(平均65±9.2)岁,病程10~20(平均15±5.6)a,眼底病变IV~VI期。所有研究对象为中国汉族人群,彼此间无血缘关系,部分患者有高血压病史。

**1.2 方法** 采集受试者2mL EDTA抗凝的外周血用于基因型检测,同时用干管采集2mL全血,4℃静止凝集后离心收集血清。DNA及血清样本均保存于-80℃。基因组DNA提取:外周血基因组DNA提取采用Qiagen公司Qiagen DNeasy Tissue试剂盒。NanoDrop100进行紫外分光纯度测定, $A_{260/280}$ 介于1.8至2.0之间, $A_{260/230}$ 大于1.5。基因型检测:rs35569394位点(即-2549位点)(I/D)基因型检测采用PCR产物多态性分析。PCR引物序列为:上游5'-ATTTATTTTGTCTTCCATT-3',下游5'-GTCTGTCTGTCTGCCGTCA-3',其中上游引物在5'端标记FAM基因。PCR反应体系为:基因组DNA 100ng,  $Mg^{2+}$ 终浓度2.0mmol/L, dNTP 0.1mmol/L,上下游引物各1μmol/L。PCR反应条件预变性94℃ 5min,扩增25个循环:94℃ 30s,65℃ 30s,72℃ 30s,最后72℃延伸10min。PCR完成后取1μL采用ABI 3100型遗传分析仪检测,214bp产物峰为D型,230bp产物峰为I型。随机取20例样本,采用前述非标记上游引物对片段进行基因序列测定,以验证基因型。外周血VEGF浓度测定:采用CUSABIO公司人VEGF ELISA Kit进行检测,操作方法见试剂盒说明书。

统计学分析:所有数据均采用SPSS 10.0软件处理。各组基因频率的群体代表性检验采用Hardy-Weinberg均衡法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 糖尿病组三个亚组间临床指标比较** NDR组和NPDR组的例数、血压、HbA1c无统计学差异( $P > 0.05$ );PDR组的年龄、病程和血糖明显高于NDR组和NPDR组( $P < 0.05$ ,表1)。

**2.2 各组患者血清VEGF水平比较** NDR组患者血清VEGF水平 $115 \pm 12$ pg/mL高于NC组 $81 \pm 11$ pg/mL( $P < 0.05$ ),NPDR组和PDR组患者血清VEGF水平 $208 \pm 13$ , $286 \pm 15$ pg/mL明显高于NC和NDR组( $P < 0.01$ )。

**2.3 各组VEGF I/D基因型分布频率比较** 正常对照组和糖尿病患者三个亚组的VEGF基因均存在II, ID, DD 3个基因型。NPDR组及PDR组的II基因型频率显著低于NDR组和NC组( $P < 0.01$ ),DD基因型频率显著高于NDR组和NC组( $P < 0.01$ );NDR组DD等位基因频率略高于NC组( $P < 0.05$ )。II, ID和DD基因频率在NPDR和PDR组间的分布无明显差异( $P > 0.05$ ,表2)。

## 3 讨论

DR是糖尿病最严重的微血管并发症之一,也是一种世界性的主要致盲眼病。2000年,全世界约有1.51亿患者,预计到2025年患病人数将达3亿。糖尿病病程超过20a的患者几乎100%会出现DR。在毛细血管丢失所致的缺氧或/和微动脉瘤形成的情况下,VEGF可由视网膜色素上皮细胞、周细胞及内皮细胞产生,能促进上皮细胞

表2 各组VEGF基因型分布频率比较

组别	例数	II	ID	DD
NC组	30	7(23)	12(40)	11(37)
NDR组	31	8(26)	11(35)	12(39)
NPDR组	30	3(10)	11(37)	16(53)
PDR组	30	3(10)	10(33)	17(57)

例(%)

有丝分裂及增加微血管渗透性。VEGF,特别是VEGF亚型164/165,是视网膜缺血导致视网膜屏障破坏和新生血管形成的一个关键性介质,另外,VEGF可通过诱导ICAM-1表达和白细胞粘附来促进炎症反应从而促进DR发生发展。迄今为止,VEGF被认为是DR新生血管形成的最强刺激因子。同时大量研究显示VEGF基因与DR发展也存在一定的关系:Monika Buraczynska, Piotr Ksiazek等发现VEGF基因I/D多态性的D等位基因是DR的独立危险因素<sup>[2]</sup>,Awata等<sup>[3]</sup>发现VEGF的5'UTR C(634)G多态性是DR及DME的基因危险因素;另外,VEGF-460基因型能预测视网膜病变的发展<sup>[4]</sup>;VEGF在正常生理状态下在体内呈低表达状态,如果VEGF在眼内表达水平增高,可导致视网膜血管渗透性增高,刺激新生血管形成<sup>[4]</sup>。有些学者认为<sup>[5]</sup>,VEGF基因多态性与DR的相关性受不同民族遗传背景和环境因素影响,这使不同群体研究结果之间存在差异。因种族不同,这些基因与我国种族DR发生发展有无关联,将是国内人们关注的热点问题。

本研究结果显示:没有发生视网膜病变的糖尿病患者,其血清VEGF水平高于正常对照组( $P < 0.05$ );非增殖性和增殖性糖尿病视网膜病变患者血清VEGF水平明显高于NDR组和NC组( $P < 0.01$ );说明糖尿病越严重,血清中VEGF水平越高,更进一步证实VEGF与DR发生、发展呈正相关性。本研究还发现,中国汉族人糖尿病视网膜病变患者血清中VEGF I/D基因型中,DD基因型频率明显高于没有并发视网膜病变的糖尿病患者和正常对照组。进一步说明,VEGF I/D基因多态性中的D等位基因是DR发生、发展的危险因素。

### 参考文献

- Buraczynska M, Ksiazek P, Baranowicz-Gaszczyk I, et al. Association of the VEGF gene polymorphism with diabetic retinopathy in type 2 diabetes patients. *Nephrol Dial Transplant* 2007; 22(6): 827-832
- Ray D, Mishra M, Ralph S, et al. Association of the VEGF gene with proliferative diabetic retinopathy but not proteinuria in diabetes. *Diabetes* 2004; 53(3): 861-864
- Awata T, Inoue K, Kurihara S, et al. A common polymorphism in the 5'-untranslated region of the VEGF gene is associated with diabetic retinopathy in type 2 diabetes. *Diabetes* 2002; 51(4): 1635-1639
- 王晓梅,金成吉,张骏,等.血管内皮生长因子基因多态性与糖尿病视网膜病变的相关性. *中国糖尿病杂志* 2008; 16(8): 462-464
- Witmer AN, Vrensen GF, Van Noorden CS, et al. Vascular endothelial growth factor angiogenesis in eye disease. *Prog Eye Res* 2003; 22(2): 1-29