

PPAR- γ 2 基因 Pro12Ala 多态性与 2 型糖尿病视网膜病变的相关性研究

刘永庆¹, 王丽聪², 董 静², 王晋峰¹, 武圣洁¹

作者单位:¹(030001) 中国山西省太原市, 山西医科大学;
²(030001) 中国山西省太原市, 山西医科大学第一医院眼科
作者简介: 刘永庆, 在读硕士研究生, 研究方向: 眼表疾病、眼底病。

通讯作者: 王丽聪, 教授, 主任, 研究方向: 眼表疾病、眼底病。
mamaheba7@hotmail.com

收稿日期: 2013-01-22 修回日期: 2013-05-27

Association of Pro12Ala polymorphism of PPAR- γ 2 Gene and diabetic retinopathy in type 2 diabetes

Yong-Qing Liu¹, Li-Cong Wang², Jing Dong², Jin-Feng Wang¹, Sheng-Jie Wu¹

¹Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China; ²Department of Ophthalmology, the First Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China

Correspondence to: Li-Cong Wang. Department of Ophthalmology, the First Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China. mamaheba7@hotmail.com

Received: 2013-01-22 Accepted: 2013-05-27

Abstract

• AIM: To observe the relationship between Pro12Ala polymorphism of peroxisome proliferator activated receptor- γ 2 (PPAR- γ 2) gene and diabetic retinopathy (DR) with type 2 diabetic mellitus (T2DM) of the Han nationality in Shanxi province.

• METHODS: Totally 90 patients with T2DM were selected into our research, who were at the age of 40 to 70 years old, diabetic duration from 10 to 20 years, blood pressure <140/90mmHg, and without diabetic nephropathy. Thirty persons were respectively divided into non-DR (NDR) group, nonproliferative-DR (BDR) group and proliferative-DR (PDR) group according to the result of ophthalmology examination. The genotypes of Pro12Ala polymorphism of PPAR- γ 2 gene were determined by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphisms (PCR-RFLP) assay in all the patients.

• RESULTS: PCR results showed that there were 2 alleles and 3 genotypes in the groups. The frequency of genotype PP, PA, AA were 40.0%, 53.3%, 6.7% in NDR group, 70.0%, 30.0%, 0.0% in BDR group, 76.7%, 23.3%, 0% in PDR group, respectively. The allele frequency ($\chi^2 = 10.208$) and gene frequency ($\chi^2 = 10.351$) were statistically significant ($P < 0.05$) in these groups. Logistic regression

analysis showed that Pro12Ala polymorphism was a dangerous factor in the incidence of DR.

• CONCLUSION: The alanine variant of Pro12Ala polymorphism of PPAR- γ 2 gene is associated with DR in type 2 diabetes among the Hans in Shanxi area, and the Ala allele might be a protective factor for the development of diabetic retinopathy.

• KEYWORDS: type 2 diabetes mellitus; diabetic retinopathy; peroxisome proliferator activated receptor; gene polymorphism

Citation: Liu YQ, Wang LC, Dong J, et al. Association of Pro12Ala polymorphism of PPAR- γ 2 Gene and diabetic retinopathy in type 2 diabetes. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2013; 13(6):1108-1111

摘要

目的: 研究过氧化物酶体增殖物激活受体- γ 2 (PPAR- γ 2) 基因 Pro12 Ala 多态性与山西地区汉族人群 2 型糖尿病性视网膜病变 (DR) 的相关性。

方法: 选取年龄 40 ~ 70 岁, 糖尿病病程 10 ~ 20a、血压 <140/90mmHg 且无合并糖尿病肾病的 2 型糖尿病患者 90 例, 其中无 DR 组 (NDR 组)、非增生型 DR 组 (BDR 组) 和增生型 DR 组 (PDR 组) 各 30 例, 采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性 (PCR-RFLP) 分析技术, 对所有患者 PPAR- γ 2 基因 Pro12Ala 多态性位点进行基因分型。

结果: 该研究人群中存在 2 种等位基因和 3 种基因型, 其中 NDR 组中基因型 PP, PA, AA 分别为 40.0%, 53.3% 和 6.7%, BDR 组分别为 70.0%, 30.0% 和 0%, PDR 组分别为 76.7%, 23.3% 和 0%; 三组间比较, 基因型频率 ($\chi^2 = 10.351$) 和等位基因频率 ($\chi^2 = 10.208$) 的差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。Logistic 回归分析结果显示 Pro12 Ala 基因多态性是 DR 发生的危险因素。

结论: PPAR- γ 2 基因 Pro12Ala 多态性与山西地区部分汉族人群 2 型糖尿病视网膜病变有关, 且可能是抑制其发生的保护性因子。

关键词: 2 型糖尿病; 糖尿病视网膜病变; 过氧化物酶体增殖物激活受体; 基因多态性

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2013.06.13

引用: 刘永庆, 王丽聪, 董静, 等. PPAR- γ 2 基因 Pro12Ala 多态性与 2 型糖尿病视网膜病变的相关性研究. 国际眼科杂志 2013; 13(6): 1108-1111

0 引言

糖尿病性视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是糖尿病微血管病变中最常见、最严重的并发症之一,在发达国家已经是成年盲人首要的致盲原因,在我国也日益成为危害中老年患者视力的重要眼病,严重影响患者的生活质量^[1]。目前研究认为 DR 的发生除了与持续高血糖导致的一系列代谢异常有关之外,还与遗传因素密切相关,很多基因的多态性导致了疾病的个体差异。过氧化物酶体增殖物激活受体- γ 2 (peroxisome proliferator activated receptor gamma-2, PPAR- γ 2) 基因 Pro 12Ala 多态性是近年来国内外的研究热点之一,很多学者认为它可能通过其表达产物增加机体对胰岛素的敏感性、促进脂肪细胞的分化、调节体内脂类和糖类代谢,从而降低了 2 型糖尿病的发病风险^[2-4];也有研究发现该多态性与糖尿病性肾病(diabetic nephropathy, DN)的发病率减少密切相关^[5,6];同时有报道称 PPAR- γ 2 在视网膜病变中可能具有抑制白细胞瘀滞和渗漏、参与调控炎症反应、血管增生及细胞凋亡的作用^[7]。而 PPAR- γ 2 基因 Pro12Ala 多态性与 DR 的相关性研究国内外均甚少,且结论不尽一致,故我们通过控制混杂因素(如限定患者年龄及病程,排除 DN 和高血压病的影响等),运用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)分析技术,比较 DR 患者在基因型及分布频率上的差别。

1 对象和方法

1.1 对象 选择 2011-11/2012-10 在山西医科大学第一医院眼科及内分泌科就诊的汉族 2 型糖尿病患者 90 例纳入研究。所有患者均符合 1999 年 WHO 制定的糖尿病诊断标准,年龄在 40~70 岁,糖尿病病程在 10~20a,血压<140/90mmHg,无 DN 及心脑血管疾病,且个体间无血缘关系;经眼科医生进行散瞳间接检眼镜检查及荧光素眼底血管造影(FFA)检查,根据检查结果以及 1985 年中华医学会眼科学会眼底病学组制定的 DR 分期标准将糖尿病患者分为无 DR 组(NDR 组)、非增生型 DR 组(BDR 组)和增生型 DR 组(PDR 组)3 组,每组各 30 例。以上所有患者均签署知情同意书。患者的性别(sex)、年龄(age)、体重指数(BMI)、糖尿病病程(duration),在三组间的差异无统计学意义($P>0.05$,表 1)。

1.2 方法 各组患者均于清晨静脉采血 4mL,分为 2 份,一份做空腹血糖(fasting blood glucose, FBG)、糖化血红蛋白(glycosylated hemoglobin, GHbA1c)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(Triglyceride, TG)测定;另一份加 1/10 体积的 2% 乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝,置于-80℃冻存,最终用饱和酚-氯仿三步法提取外周血白细胞 DNA。根据 GeneBank 中的基因序列用 DNA Star 软件设计 PPAR- γ 2 基因 Pro12Ala 位点上下游引物,上游引物:5'-TCTGGGAGATTCTCTTATTG-3',下游引物:5'-CCCAATAGCCGTATCTGGAAGG-3',由上海生工生物工程公司合成。PCR 反应体系 40 μ L,内含 8 μ L 基因组 DNA、4 μ L 10 \times Buffer、0.8 μ L 三磷酸脱氧核糖核苷(dNTP)、3.2 μ L 25mmol/L MgCl₂、0.06 μ L 上游引物、0.06 μ L 下游引物、0.32 μ L Taq 酶和 24 μ L 去离子水。循

环参数:94℃预变性 5min,94℃变性 45s,52℃退火 45s,72℃延伸 1min,循环 35 次,72℃终末延伸 10min。产物经 20g/L 琼脂糖凝胶电泳,显示目的基因片段长度为 101bp。再用限制性内切酶 HgaI 酶切后,经 6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,在紫外透射仪下观察条带。

统计学分析:实验数据采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析。遗传平衡吻合度检验用 Hardy-Weinberg 平衡法,计数资料间的比较用 χ^2 检验,计量资料间的比较应用单因素方差分析。并以 DR(NDR=0, BDR=1, PDR=2)为因变量,以 sex, age, BMI, duration, FBG, GHbA1c, TG, TC 和基因型(genotype)为自变量,采用 Logistic 多元回归进行分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

PPAR- γ 2 基因 Pro12Ala 多态性位点扩增片段为 101bp,酶切后片段有 101bp,72bp 和 29bp3 种。根据酶切产物进行基因分型:PP 型(101bp1 条带),AA 型(29bp 和 72bp2 条带),PA 杂合型(101bp,72bp 和 29bp3 条带),详见图 1。

在 NDR 组中基因型 PP, PA, AA 的频率分别为 40.0%,53.3% 和 6.7%,BDR 组分别为 70.0%,30.0% 和 0%,PDR 组分别为 76.7%,23.3% 和 0%;三组之间进行比较,基因型频率分布的差异具有统计学意义($\chi^2=10.351, P=0.014$,表 2)。P 和 A 等位基因频率在 NDR 组中分别为 66.7% 和 33.3%,BDR 组分别为 85.0% 和 15.0%,PDR 组分别为 88.3% 和 11.7%;三组间的分布差异具有统计学意义($\chi^2=10.208, P=0.006$)。三组之间进行两两比较后,显示 NDR 组与 BDR 组、PDR 组在基因型频率($\chi^2=5.972, \chi^2=8.527$)和等位基因频率($\chi^2=5.502, \chi^2=8.076$)的分布上均具有统计学意义($P<0.05$);而 BDR 组与 PDR 组的基因型频率($\chi^2=0.341$)和等位基因频率($\chi^2=0.288$)分布无统计学意义($P>0.05$)。

Logistic 回归分析结果显示,Pro12Ala 基因多态性($P=0.007, OR=0.261, 95\% CI:0.098 \sim 0.694$)、糖化血红蛋白($P=0.013, OR=1.459, 95\% CI:1.082 \sim 1.967$)和血清总胆固醇($P=0.013, OR=1.895, 95\% CI:1.147 \sim 3.130$)均属于 DR 发生的独立危险因素。

3 讨论

过氧化物酶体增殖物激活受体(PPAR)是一类由配体激活的核转录因子,属于核内受体超家族成员,能够调节体内多种细胞特异性基因的转录,其中 PPAR γ 基因在脂肪细胞分化、糖脂代谢、胰岛素抵抗和炎症反应中起重要作用。PPAR- γ 2 基因 Pro12Ala 多态性最早是由 Yen 等^[8]通过对 34 位高加索人群研究报道的,有 PA, AA 和 PP 三种基因型;它是 PPAR- γ 2 基因最常见的一种变异,由于外显子 B 的第 12 位密码子 CCA \rightarrow GCA 变异,在表达过程中使脯氨酸转变为丙氨酸,引起了蛋白构象的改变,从而影响 PPAR γ 2 转录激活功能。

近年来,PPAR- γ 2 基因 Pro12Ala 多态性与 2 型糖尿病(T2DM)的研究较为广泛,其中 Gouda 等^[2]对包括中国及日本在内的东亚人进行了二者之间相关性的 Meta 分析,

表1 各组患者一般情况

分组	性别 (男/女)	年龄 (岁)	BMI (kg/m ²)	糖尿病病程 (a)	FBG (mmol/L)	GHbA1c (%)	TG (mmol/L)	TC (mmol/L)
NDR组	14/16	59.23±7.58	23.36±2.58	14.57±2.76	8.42±3.13	8.08±1.87	1.60±0.80	4.54±0.99
BDR组	17/13	58.20±6.70	24.04±2.85	13.87±2.99	9.36±2.49	8.85±2.15	1.89±1.48	4.69±1.16
PDR组	16/14	56.83±7.01	24.49±2.75	14.27±2.72	10.74±4.49	9.55±2.39	2.42±1.29	4.59±0.93

表2 基因型和等位基因频数及频率

分组	n(例)	基因型频率			等位基因频率	
		PP	PA	AA	P	A
NDR组	30	12(40.0)	16(53.3)	2(6.7)	40(66.7)	20(33.3)
BDR组	30	21(70.0)	9(30.0)	0(0)	51(85.0)	9(15.0)
PDR组	30	23(76.7)	7(23.3)	0(0)	53(88.3)	7(11.7)

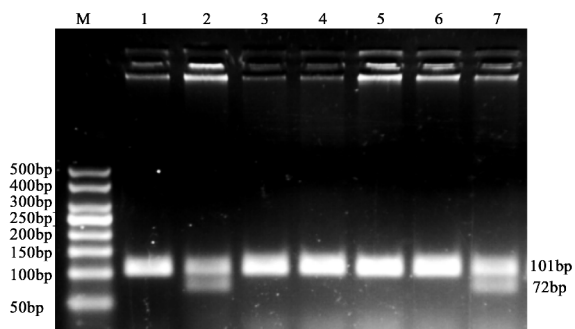


图1 酶切后电泳结果 M为50bp的DNA标准分子量标记;2,7为PA杂合型;1,3,4,5,6为PP型。

结果显示携带A等位基因可以使T2DM发病风险降低20%;Meshkani等^[3]研究证实Pro12Ala多态性可以增加外周组织对胰岛素的敏感性,改善胰岛素抵抗,从而调节糖的代谢;傅健等^[4]对我国汉族2型糖尿病人群的研究也得到了相似的结论,并认为该多态性(Ala等位基因)是抑制T2DM发病的保护性因子。同时在PPAR- γ 2基因Pro12Ala多态性与DN的相关性研究中,柏林糖尿病代谢中心报道^[5]称A等位基因携带者尿蛋白排泄率较不携带者明显降低,认为A等位基因对DN的发生发展有保护作用,并随着病程的延长,这种保护作用越来越明显;我国刘丽梅等对上海地区无血缘关系的汉族T2DM患者进行研究,发现DN组PA基因型及A等位基因频率显著低于无DN组,也认为A等位基因可以减少DN的发生^[6]。

尽管糖尿病视网膜病变与糖尿病肾病同属于糖尿病的微血管并发症,但PPAR- γ 2基因Pro12Ala多态性与DR的相关性研究国内外均甚少,且结论不尽一致。Malecki等^[9]对224例波兰2型糖尿病人群研究,发现A等位基因在NDR患者中的分布频率明显比在DR患者中高,认为该多态性可降低DR的发生,A等位基因有可能是DR的一种保护基因。而Petrovic等^[10]则认为在高加索2型糖尿病人群中,PPAR- γ 2基因Pro12Ala多态性与DR并无明显相关性。Costa等^[11]通过对意大利2型糖尿病人群研究分析,发现PPAR- γ 2基因Pro12Ala多态性与DR也没有明显关联,而PPAR- γ 2基因A2819G多态性可能是DR的易感基因,尤其是在女性PDR患者中更明显。需要指出的是,以上研究均未排除DN或高血压等疾病的影响,

对糖尿病病程的限制也仅在Malecki等^[9]的研究中有所体现,而且不同种族的遗传情况可能存在差异,故得出的结论不尽一致。为了减小混杂因素的影响,我们在排除了DN和高血压等其他疾病的基础上,选择相对单一的2型糖尿病患者作为研究对象,并且将患者年龄限定在40~70岁之间、糖尿病病程在10~20a之间,同时纳入血糖、血脂等可能影响DR发生的生化指标,与基因型一起进行分析研究。

我们的研究结果显示,在山西地区部分汉族2型糖尿病人群中存在PPAR- γ 2基因Pro12Ala多态性的2种等位基因和3种基因型,NDR组、BDR组和PDR组的基因型频率和等位基因频率分布差异均具有统计学意义($P < 0.05$);Logistic回归分析结果显示Pro12Ala基因多态性与DR的发生呈现相关性。由于胰岛素受体能够在视网膜表达,胰岛素敏感性被认为是PDR发生的独立危险因素^[12];而脂肪细胞产生的某些激素、细胞因子和游离脂肪酸也影响着视网膜内皮细胞的结构和功能^[9]。同时有研究发现PPAR- γ 2基因Pro12Ala多态性可以增加机体的胰岛素敏感性、调节体内脂类代谢和促进脂肪细胞的分化^[3],故我们认为Ala等位基因可能减少DR的发生。

通过这次研究,我们初步得出了PPAR- γ 2基因Pro12Ala多态性是DR发生的危险因素,并为今后的研究工作积累了一定的经验。但是由于本文纳入的病例数不多,所得结论尚需进一步验证。因此,我们将继续扩大样本量并深入探讨PPAR- γ 2基因多个位点的多态性与糖尿病视网膜病变的关系,为疾病的预防和诊治提供依据。

参考文献

- 1 张承芬. 眼底病学. 第2版. 北京:人民卫生出版社 2010;260
- 2 Gouda HN, Sagoo GS, Harding AH, et al. The association between the peroxisome proliferator-activated receptor gamma2 (PPARG2) Pro12Ala gene variant and type 2 diabetes mellitus: a HuGE review and meta-analysis. *Am J Epidemiol* 2010;171(6):645-655
- 3 Meshkani R, Taghikhani M, Larijani B, et al. Pro12Ala polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 (PPARG-gamma-2) gene is associated with greater insulin sensitivity and decreased risk of type 2 diabetes in an Iranian population. *Clin Chem Lab Med* 2007;45(4):477-482
- 4 傅健,池上博司,吕远栋,等. 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 2基因Pro12 \rightarrow Ala可能是我国汉族人2型糖尿病的保护性等位基因. 中

华糖尿病杂志 2005;13(5):363-365

5 Herrmann SM, Ringel J, Wang JG, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 polymorphism Pro12Ala is associated with nephropathy in type 2 diabetes: The Berlin Dia-betes Mellitus (BeDiaM) Study. *Diabetes* 2002;51(8):2653-2657

6 李丽芳,刘丽梅,郑泰山,等. PPAR γ 2 基因 P12A 多态性与上海地区汉族人群 2 型糖尿病肾病. *上海交通大学学报(医学版)* 2008;28(4):376-379

7 Costa V, Ciccodicola A. Is PPAR γ the key gene in diabetic retinopathy? *Br J Pharmacol* 2012; 165(1):1-3

8 Yen CJ, Beamer BA, Negri C, et al. Molecular scanning of the human peroxisome proliferator activated receptor gamma (hPPAR gamma) gene in diabetic Caucasians: identification of a Pro12Ala PPAR gamma 2 missense mutation. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;241(2):270-274

9 Malecki MT, Cyganek K, Mirkiewicz-Sieradzka B, et al. Alanine

variant of the Pro12Ala polymorphism of the PPAR gamma gene might be associated with decreased risk of diabetic retinopathy in type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2008;80(1):139-145

10 Petrovic M, Kunej T, Peterlin B, et al. Gly482Ser polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 coactivator-1 gene might be a risk factor for diabetic retinopathy in Slovene population (Caucasians) with type 2 diabetes and the Pro12Ala polymorphism of the PPAR γ gene is not. *Diabetes Metab Res Rev* 2005;21:470-474

11 Costa V, Casamassimi A, Esposito K, et al. Characterization of a novel polymorphism in PPAR γ regulatory region associated with type 2 diabetes and diabetic retinopathy in Italy. *J Biomed Biotechnol* 2009; 2009:126917

12 Parvanova A, Iliev I, Fillipponi M, et al. Insulin resistance and proliferative retinopathy: a cross-sectional, case-control study in 115 patients with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89(9):4371-4376

科技期刊中应停止使用的单位及常见错用的单位符号

常见废弃单位及换算系数

单位名称	符号	换算系数
微(米)	μ	1 μ = 1 μ m
费密	Fermi	1 Fermi = 10^{-15} m = 1 fm
达因	dyn	1 dyn = 10^{-5} N
千克力	kgf	1 kgf = 9.806 65 kN
吨力	tf	1 tf = 9.806 65 MN
标准大气压	atm	1 atm = 101.325 kPa
工程大气压	at	1 at = $9.806 65 \times 10^4$ Pa
托	Torr	1 Torr = 133.322 Pa
毫米汞柱 ¹⁾	mmHg	1 mmHg = 133.322 Pa
毫米水柱	mmH ₂ O	1 mmH ₂ O = 9.806 65 Pa
西西	cc	1 cc = 1 mL
道尔顿	D	1 D = 0.992 1 u
开氏度	$^{\circ}$ K	1 $^{\circ}$ K = 1 K
转每分 ²⁾	rpm	1 rpm = 1 r/min
尔格	erg	1 erg = 10^{-7} J
卡	cal	1 cal = 4.186 8 J
大卡	kcal	1 kcal = 4.186 8 kJ
度(电能)		1 度 = 1 kW · h
[米制]马力		1 马力 = 735.499 W
英马力	hp	1 hp = 745.7 W

常见错用单位符号

量的名称	错用单位符号(方括号中的为正确符号)
长度	M[m]; Cm[cm]; um[μ m]; m μ m[nm]
质量	KG, Kg[kg]; T[t]
压力	pa, Pa, P[Pa]
力	nt[N]
时间	sec, (") , S[s]; m, (') [min]; hr, hs(复数) [h]; day[d]; wk[星期, 周, 无国际符号]; mo[月, 无国际符号]; y, yr[a]
电容	f[F]
电阻率	Ω -m[Ω m]
频率	HZ, H _z [Hz]
功, 能量	ev[eV]; Kev[keV]; Joule[J]
功率	w[W]; KW[kW]
光通量	Lm, lum[lm]
光照度	Lx, lux[lx]
[放射性]活度	bq[Bq]
剂量当量	sv[Sv]

(本刊编辑部)