

维生素 D 受体基因多态性与 2 型糖尿病患者视网膜病变的相关性分析

严 凯¹, 刘 意², 田慧丽³

引用:严凯,刘意,田慧丽. 维生素 D 受体基因多态性与 2 型糖尿病患者视网膜病变的相关性分析. 国际眼科杂志 2020; 20(8):1405-1408

作者单位:¹(467000)中国河南省平顶山市,平顶山工业职业技术学院;²(451460)中国河南省郑州市,郑州铁路职业技术学院;³(467000)中国河南省平顶山市残疾人联合会低视力康复中心眼科

作者简介:严凯,男,硕士,讲师,主治医师,研究方向:眼视光学。

通讯作者:田慧丽,女,本科,副主任医师,研究方向:眼视光、儿童斜视弱视。zeyang27262377@126.com

收稿日期:2019-12-02 修回日期:2020-07-09

摘要

目的:探讨维生素 D 受体基因多态性与 2 型糖尿病(T2DM)患者视网膜病变的相关性。

方法:筛选 2018-02/2019-01 我院收治的 T2DM 患者 198 例作为研究对象,分为糖尿病性视网膜病变(DR)组($n=108$)和非 DR 组($n=90$)。应用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性对 rs1544410、rs2228570 位点多态性进行检测。非条件 Logistic 回归分析 rs1544410、rs2228570 基因多态性与 2 型糖尿病患者视网膜病变的关系。

结果:DR 组 VDR 基因 rs1544410 位点 T 等位基因频率、rs2228570 位点 A 等位基因频率均显著高于非 DR 组($P<0.05$);CC 基因型 130 例,CT 基因型 52 例,TT 基因型 16 例,CC 基因型与 CT+TT 基因型相关指标比较有差异($P<0.05$);GG 基因型 121 例,GA 基因型 59 例,AA 基因型 18 例,GG 基因型与 GA+AA 基因型相关指标比较有差异($P<0.05$);BsmI 基因 CT+TT 基因型、FokI 基因 GA+AA 基因型是 DR 的危险因素($P<0.05$)。

结论:VDR 基因 BsmI、FokI 多态性与 2 型糖尿病视网膜病变显著相关,可能是 2 型糖尿病视网膜病变的易感基因位点。

关键词:维生素 D 受体;基因多态性;2 型糖尿病;视网膜病变

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2020.8.23

The relationship between vitamin D receptor gene polymorphism and retinopathy in type 2 diabetic patients

Kai Yan¹, Yi Liu², Hui-Li Tian³

¹Pingdingshan Polytechnic College, Pingdingshan 467000, Henan Province, China; ²Zhengzhou Railway Vocational & Technical College, Zhengzhou 451460, Henan Province, China; ³Department

of Ophthalmology, Pingdingshan Disabled Persons' Federation Low Vision Rehabilitation Center, Pingdingshan 467000, Henan Province, China

Correspondence to: Hui-Li Tian. Department of Ophthalmology, Pingdingshan Disabled Persons' Federation Low Vision Rehabilitation Center, Pingdingshan 467000, Henan Province, China. zeyang27262377@126.com

Received:2019-12-02 Accepted:2020-07-09

Abstract

• **AIM:** To investigate the relationship between vitamin D receptor gene polymorphism and retinopathy in patients with type 2 diabetes mellitus.

• **METHODS:** Totally 198 T2DM patients admitted to our hospital from February 2018 to January 2019 were selected as the study objects and divided into DR group ($n=108$) and non DR group ($n=90$). The polymorphisms of rs1544410 and rs2228570 were detected by PCR restriction fragment length polymorphism. The relationship between rs1544410, rs2228570 gene polymorphism and retinopathy in type 2 diabetic patients was analyzed by unconditional Logistic regression.

• **RESULTS:** The frequencies of T allele at rs1544410 and A allele at rs2228570 in DR group were significantly higher than those in non DR group ($P<0.05$). There were 130 cases of CC genotype, 52 cases of CT genotype, 16 cases of TT genotype, and there were statistical differences between CC genotype and CT+TT genotype ($P<0.05$); 121 cases of GG genotype, 59 cases of GA genotype, 18 cases of AA genotype, and there were statistical differences between GG genotype and GA+AA genotype ($P<0.05$); CT+TT genotype of BSMI gene and GA+AA genotype of FokI gene were risk factors of DR ($P<0.05$).

• **CONCLUSION:** The polymorphism of VDR gene BSMI and FokI is significantly related to type 2 diabetic retinopathy, which may be the susceptible gene locus of type 2 diabetic retinopathy.

• **KEYWORDS:** vitamin D receptor; gene polymorphism; type 2 diabetes; retinopathy

Citation: Yan K, Liu Y, Tian HL. The relationship between vitamin D receptor gene polymorphism and retinopathy in type 2 diabetic patients. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2020; 20(8): 1405-1408

0 引言

糖尿病性视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是临床最常见的糖尿病微血管并发症,DR是成人致盲的重要

原因,据相关报道,超过一半的2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)患者会患视网膜病变,其中近1/3的患者会因DR而失明^[1]。可见,DR严重威胁T2DM患者的生活质量,同时给患者家庭和社会带来沉重的负担。2型糖尿病视网膜病变的具体发病机制仍未阐明,目前维生素D与T2DR的相关性是国内外研究的热点^[2]。维生素D是一组内分泌激素,在肝脏及肾脏内羟化成为活性1,25-二羟维生素D₃[1,25(OH)₂D₃],具有抗氧化、抑制血管平滑肌增生以及抗血管增殖的作用,在视网膜组织中广泛表达^[3]。维生素D与维生素D受体(VDR)结合,通过激活及调节多条细胞通路来发挥其生物学作用^[4]。近年来,出现少数关于VDR基因多态性与DR相关性的相关报道,但结果差异较大甚至截然相反。因此,本研究通过多重高温连接酶检测反应(improved multiple ligase detection reaction, iMLDR)技术进行单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)分型,检测并分析DR患者rs1544410、rs2228570的VDR SNPs位点基因多态性,旨在探讨VDR基因多态性与DR的相关性,为DR的临床预防及个性化治疗提供理论依据,现报道如下。

1 对象和方法

1.1 对象 筛选2018-02/2019-01我院收治的T2DM患者作为研究对象。纳入标准:(1)符合《中国2型糖尿病防治指南(2017版)》^[5]相关诊断标准;(2)同意取血样行DNA检测;(3)个人资料完整;(4)患者自愿参与本研究,并签署知情同意书。排除标准:(1)合并其他恶性肿瘤;(2)与已纳入对象有血缘关系;(3)肾功能衰退;(4)急性或者慢性炎症者;(5)其他原因导致的视网膜病变。最终纳入研究的T2DM患者共198例。本研究遵循《世界医学协会赫尔辛基宣言》,并经我院伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 分组方法 采用免散瞳数码眼底成像方法对198例患者进行眼底检查。患者先在暗室内适应视觉,后由眼科医师使用佳能EOS 40D免散瞳数码眼底相机获取45°后极部视网膜彩色图像。由眼科医师根据美国眼科协会出台的2018年糖尿病视网膜病变临床指南^[6]阅片诊断,并将198例患者分为DR组($n=108$)和非DR组($n=90$)。

1.2.2 检测方法

1.2.2.1 相关指标检测 使用EDTA管取患者入院次日清晨空腹静脉血约5mL,提取DNA,-80℃储存备用。检测空腹血糖(FBG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、甘油三酯(TG)、糖化血红蛋白(HbA1c)和血管内皮生长因子(VEGF)。

1.2.2.2 PCR扩增 主要试剂:Taq DNA聚合酶(赛默飞世尔科技有限公司,中国),引物(上海生工生物工程公司),PCR反应缓冲液(TaKaRa公司),PCR Marker(南京赛泓瑞生物科技有限公司),琼脂糖(上海源叶生物科技有限公司)等。PCR条件:反应体系10μL包括1×HotStarTap缓冲液、0.30mmol/L dNTP、3.0mmol/L Mg²⁺、1U HotStarTap聚合酶、1μL DNA样本及1μL多重PCR引物,引物序列见表1。反应热循环:95℃预变120s;94℃20s、65℃40s、72℃90s,循环11次;94℃20s、59℃30s、72℃90s,循环24次;72℃延伸120s,4℃保存。

1.2.2.3 PCR产物纯化 5U SAP酶、2U Exonuclease I酶加入10μL PCR产物中,温浴(37℃,60min),然后灭活

表1 各SNP的引物序列

SNPs	基因	引物序列
rs1544410	BsmI	5'-TCACTGCACATTGCCTCAAAA-3'
		5'-TTCGTAGGGGGATTCTGAGGA-3'
rs2228570	FokI	5'-CGGTCAAAGTCTCCAGGCTCAG-3'
		5'-CCTGGCACTGACTCTGGCTC-3'

(75℃,15min)。连接引物反应体系:10×连接缓冲液(1.0μL)、0.25μL高温连接酶、0.4μL 5'连接引物混合液(1.0μmol/L)、0.4μL 3'连接引物混合液(2.0μmol/L)、2.0μL纯化后多重PCR产物、6.0μL ddH₂O,混匀。将稀释后的连接产物(0.5μL)、Liz 500SIZ STANDARD(0.5μL)、hi-Di(9.0μL)混匀,变性(95℃,5min)后上ABI 3730XL基因测序仪,所得原始数据应用GeneMap-per4.1(ABI)进行分析。

统计学分析:本研究应用统计学软件SPSS21.0进行数据处理。定量资料使用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用独立样本 t 检验;定性资料用频率或百分比表示,组间比较采用卡方检验。rs1544410、rs2228570位点基因型分布采用Hardy-Weinberg平衡检验。采用Logistic回归分析rs1544410、rs2228570与2型糖尿病患者视网膜病变的关系。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组一般资料比较 两组患者年龄、性别、T2DM病程、体质指数及HDL-C比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$);DR组的HbA1c、FBG、LDL-C、TG、VEGF显著高于非DR组,差异均有统计学意义($P < 0.001$),见表2。

2.2 VDR基因位点Hardy-Weinberg平衡检验 rs1544410、rs2228570位点基因型分布符合Hardy-Weinberg平衡($P > 0.05$),提示2个位点选择的样本具有群体代表性,见表3。

2.3 非DR组与DR组VDR基因位点的基因型和等位基因频率分布比较 DR组VDR基因rs1544410位点T等位基因频率、rs2228570位点A等位基因频率均显著高于非DR组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表4。

2.4 VDR基因BsmI基因型间相关指标比较 CC基因型130例,CT基因型52例,TT基因型16例。CC基因型与CT+TT基因型相关指标比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$),见表5。

2.5 VDR基因FokI基因型间相关指标比较 GG基因型121例,GA基因型59例,AA基因型18例。GG基因型与GA+AA基因型相关指标比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$),见表6。

2.6 Logistic回归分析rs1544410、rs2228570与2型糖尿病患者视网膜病变的关系 以是否发生DR作为因变量(1代表发生,0代表不发生),选择以上比较有统计学意义的因素(HbA1c、FBG、LDL-C、TG、VEGF)及BsmI基因显性模型、FokI基因显性模型作为自变量,进行非条件Logistic回归分析,结果显示BsmI基因CT+TT基因型、FokI基因GA+AA基因型是DR的危险因素($P < 0.05$,表7)。

3 讨论

目前,DR发生普遍被认为与患者的高血糖有关,高血糖会促使白细胞对微血管上皮细胞的黏附,引起细胞损

表2 两组一般资料比较

组别	例数	性别 (男/女,例)	年龄 (岁)	T2DM 病程(a)	体质量指数 (kg/m ²)	HbA1c (%)	FBG (mmol/L)	HDL-C (mmol/L)	LDL-C (mmol/L)	TG (mmol/L)	VEGF (pg/mL)
DR组	108	60/48	52.10±6.50	8.02±2.06	25.18±2.10	8.40±2.03	7.88±2.04	1.27±0.30	3.34±0.88	1.98±0.44	188.60±42.10
非DR组	90	52/38	51.80±7.10	7.88±2.04	25.02±2.05	6.88±1.56	6.62±1.90	1.30±0.28	2.50±0.74	1.65±0.40	140.08±30.05
<i>t</i>		0.099	0.310	0.478	0.540	5.815	4.464	0.722	7.183	5.475	9.159
<i>P</i>		0.753	0.757	0.633	0.590	<0.001	<0.001	0.471	<0.001	<0.001	<0.001

表3 两组 VDR 基因位点 Hardy-Weinberg 平衡检验

组别	例数	rs1544410 基因型频数					rs2228570 基因型频数				
		CC	CT	TT	χ^2	<i>P</i>	GG	GA	AA	χ^2	<i>P</i>
DR组											
实际值	108	57	38	13	2.291	0.304	54	40	14	1.777	0.425
理论值	108	53	45	10			51	46	11		
非DR组											
实际值	90	73	14	3	4.945	0.088	67	19	4	2.758	0.250
理论值	90	71	18	1			65	23	2		

表4 非DR组与DR组 VDR 基因位点的基因型和等位基因频率分布比较

组别	例数	rs1544410					rs2228570				
		CC	CT	TT	C	T	GG	GA	AA	G	A
非DR组	90	73(81.1)	14(15.6)	3(3.3)	160(88.9)	20(11.1)	67(74.5)	19(21.1)	4(4.4)	153(85.0)	27(15.0)
DR组	108	57(52.8)	38(35.2)	13(12.0)	152(70.4)	64(29.6)	54(50.0)	40(37.0)	14(13.0)	148(68.5)	68(31.5)
χ^2		17.807			20.147		12.897			14.626	
<i>P</i>		<0.001			<0.001		0.002			<0.001	

表5 VDR 基因 BsmI 基因型间相关指标比较

分型	例数	HbA1c(%)	FBG(mmol/L)	LDL-C(mmol/L)	TG(mmol/L)	VEGF(pg/mL)
CC	130	6.49±1.96	6.33±2.01	2.46±0.75	1.70±0.54	145.23±35.20
CT+TT	68	8.28±2.70	7.82±2.22	3.54±0.80	1.90±0.60	180.20±39.55
<i>t</i>		5.338	4.777	9.403	2.381	6.359
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001	0.018	<0.001

表6 VDR 基因 FokI 基因型间相关指标比较

分型	例数	HbA1c(%)	FBG(mmol/L)	LDL-C(mmol/L)	TG(mmol/L)	VEGF(pg/mL)
GG	121	6.16±1.88	6.08±1.84	2.20±0.66	1.68±0.50	148.50±38.02
GA+AA	77	8.34±2.60	7.96±2.30	3.71±0.94	1.94±0.63	182.11±40.14
<i>t</i>		6.836	6.350	13.270	3.219	5.934
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001	0.002	<0.001

表7 Logistic 回归分析 rs1544410、rs2228570 与 2 型糖尿病患者视网膜病变的关系

变量	<i>B</i>	<i>Wald</i>	<i>P</i>	<i>OR</i>	95% <i>CI</i>
BsmI 基因 CT+TT 基因型	0.951	7.780	0.024	2.588	1.108~6.450
FokI 基因 GA+AA 基因型	0.688	5.505	0.038	1.990	1.404~8.220

伤、血液流变学变化,导致视网膜破坏^[7]。有研究显示,血清维生素 D 水平不足或缺乏会增加胰岛素抵抗作用、降低胰岛 β 细胞功能^[8-9]。许多研究证实,T2DM 患者血清 25(OH)D 与 HbA1c、FPG 呈负相关,25(OH)D 水平下降可能是 T2DM 发生的机制之一,且 25(OH)D 水平下降可增加 T2DM 合并周围血管病变的风险^[10-11]。李俊等^[12]的研究阐述了 T2DR 的发生与患者血清维生素 D 的关系,发现 25(OH)D 水平与 T2DR 的发生呈负

相关,认为维生素 D 在 DR 的发病过程中对视网膜具有保护的作用,而维生素 D 缺乏则会增加 DR 发生风险。关于维生素 D 对 DR 的发病机制不明确,可能为血清 25-OH-VD3 抑制视网膜组织中的 VEGF 和转化生长因子-1(TGF-1)的表达,减少因 VEGF 的过度表达导致的血管内皮细胞凋亡,VEGF 的升高可增强血糖对神经元的毒性,加重微血管并发症,加速对玻璃体的侵袭,促进 DR 的发生发展^[13-14]。

1,25(OH)₂D₃是维生素D₃的主要活性形式,与VDR结合在体内发挥多种生物学效应,近几年VDR与DR的相关性已成为国内外研究的热点,其中维生素D与VDR结合,通过激活及调节多条细胞通路来发挥其生物学作用,因此,有学者认为VDR基因在DR发病过程中起到决定性作用^[15]。VDR是DR候选基因之一,属于亲核蛋白,具有单核苷酸多态性。Zhong等^[16]发现DR发病率与患者VDR rs2228570位点基因多态性显著相关,认为VDR的rs2228570基因位点可作为T2DR的良好生物标志物。Hong等发现韩国人VDR基因中的BsmI多态性可作为预测T2DM并发症发生的易感性标记物^[17]。侯丽君等^[18]研究结果显示,中国山东泰安及周边地区汉族人VDR基因FokI多态性与T2DR发病显著相关。同时,本研究发现,非DR组BsmI等位基因频率T 11.1%,C 88.9%,DR组BsmI等位基因频率T 29.6%,C 70.4%;非DR组FokI等位基因频率A 15.0%,G 85.0%,DR组FokI等位基因频率A 31.5%,G 68.5%;DR组VDR基因rs1544410位点T等位基因频率、rs2228570位点A等位基因频率均显著高于非DR组,差异有统计学意义($P<0.05$)。同时,本研究分析了VDR基因BsmI、FokI基因型间DR相关生化指标的比较,发现BsmI、FokI的不同基因型之间的FBG、LDL-C、TG、HbA1c和VEGF水平差异明显($P<0.05$),进一步Logistic分析中显示BsmI基因CT+TT基因型、FokI基因GA+AA基因型是DR的危险因素($P<0.05$)。这些提示VDR基因BsmI、FokI多态性与DR显著相关。本研究与上述研究结果相似,但其中相关机制尚不明确,考虑可能VDR BsmI和FokI多态性导致VDR无法介导1,25(OH)₂D₃发挥生物学效应,无法有效发挥抑制视网膜血管增生的作用,有待进一步机制研究。但是,在李丽等^[19]的研究中,VDR基因BsmI、FokI多态性与新疆汉族T2DR并无明显相关性,与本研究及其他研究结果差异较大,考虑原因可能是VDR基因多态性具有区域及种族分布差异性,与人的生活习惯及地理环境有关,或与研究的纳入标准、排除标准及试验方法的不同有关。因此,仍需更大样本量更深入的研究予以进一步证实。

综上所述,VDR基因BsmI、FokI多态性与2型糖尿病视网膜病变显著相关,但其机制尚未明确,可能是2型糖尿病视网膜病变的易感基因位点。

参考文献

- 1 刘婷婷. 25羟维生素D₃与2型糖尿病视网膜病变的相关研究. 河南大学 2019
- 2 Martina Z, Vaclav V, Josef R, et al. Effects of Glucan and Vitamin D Supplementation on Obesity and Lipid Metabolism in Diabetic Retinopathy. *Open Biochem J* 2018;12(12):36-45

- 3 龚莉华, 张爱华, 周黎纹. 血清维生素D水平与2型糖尿病视网膜病变程度的相关性研究. *眼科* 2016;25(4):270-271
- 4 Cong L, Xia YP, Zhao GQ, et al. Expression of vitamin D receptor and cathelicidin in human corneal epithelium cells during fusarium solani infection. *Int J Ophthalmol* 2015;8(5):866-871
- 5 中华医学会糖尿病学分会. 中国2型糖尿病防治指南(2017年版). *中国实用内科杂志* 2018;38(4):292-344
- 6 邵毅, 周琼. 糖尿病视网膜病变诊治规范——2018年美国眼科学会临床指南解读. *眼科新进展* 2019;39(6):501-506
- 7 Satinsky AL. A key to preventing diabetic retinopathy: the link between nutrition and blood sugar. *J Ophthalmic Nurs Technol* 1994;13(6):263-266
- 8 Millen Amy E, Sahli Michelle W, Nie J, et al. Adequate vitamin D status is associated with the reduced odds of prevalent diabetic retinopathy in African Americans and Caucasians. *Cardiovasc Diabetol* 2016;15(1):128
- 9 Adem G, Orhan A, Habib B, et al. Retinal Nerve Fiber Layer Thickness in Early - Stage Diabetic Retinopathy With Vitamin D Deficiency. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2015;56(11):6433-6437
- 10 包煜芝, 周煜炜, 杨方列, 等. 糖尿病性视网膜病变术后CRT、SFCT、mALB、MBG、HbA1c水平的变化及相关性. *基因组学与应用生物学* 2019;38(2):865-870
- 11 Rosa LCGFD, Zajdenverg L, Souto DL, et al. HbA1c variability and long-term glycemic control are linked to diabetic retinopathy and glomerular filtration rate in patients with type 1 diabetes and multiethnic background. *J Diabetes Complications* 2019;33(9):610-615
- 12 李俊, 严玉洁, 姚保栋, 等. 血清维生素D与2型糖尿病视网膜病变关系的研究. *复旦学报(医学版)* 2017;44(5):580-584, 601
- 13 刘朝辉, 高晓虹, 栗改云, 等. 雷珠单抗对增生性糖尿病视网膜病变眼部VEGF-A、VEGF-B、PIGF及玻璃体切除术的影响. *眼科* 2018;27(4):258-263
- 14 刘贝贝, 阳琰, 李琪, 等. 2型糖尿病视网膜病变患者血清25羟维生素D、血清趋化素、血管内皮细胞生长因子及缺血性修饰蛋白水平的变化及其意义. *中国糖尿病杂志* 2018;26(3):197-200
- 15 李媛, 谭薇. 2型糖尿病性视网膜病变易感基因多态性的研究进展. *遵义医学院学报* 2018;41(2):233-238
- 16 Zhong X, Du YJ, Lei Y, et al. Effects of vitamin D receptor gene polymorphism and clinical characteristics on risk of diabetic retinopathy in Han Chinese type 2 diabetes patients. *Gene* 2015;566(2):212-216
- 17 Joo HY, Seok KE, Jin JM, et al. Association between BsmI Polymorphism in Vitamin D Receptor Gene and Diabetic Retinopathy of Type 2 Diabetes in Korean Population. *Endocrinol Metab (Seoul)* 2015;30(4):469-474
- 18 侯丽君, 黄东辉, 韩静静. 维生素D受体基因FokI多态性与糖尿病视网膜病变的相关性研究. *泰山医学院学报* 2015;36(5):490-493
- 19 李丽, 易湘龙, 钱一, 等. 维生素D受体SNPs基因多态性与新疆汉族2型糖尿病视网膜病变相关性研究. *新疆医科大学学报* 2016;39(9):1081-1085