

• 临床检验研究论著 •

环氧化酶-2 基因多态性与 2 型糖尿病的相关性研究

陆天阳

(蚌埠医学院医学检验系,安徽蚌埠 233030)

摘要:**目的** 探讨环氧化酶(COX)基因-765G/C 和-1195G/A 多态性与 2 型糖尿病(T2DM)的相关性。**方法** 采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)和全自动临床生化分析仪法,对 120 例 T2DM 患者和 92 例健康对照者的 COX-2 基因多态性和常用临床指标进行检测,比较分析两组间基因型频率和等位基因频率及其临床资料。**结果** T2DM 组的血糖、餐后 2 h 血糖、TG 均高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);而 HDL-C、载脂蛋白(Apo)A I 均低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);两组-1195G/A 位点基因型的频率比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** COX-2 基因-1195G/A 多态性可能与皖北地区 T2DM 的发病相关。

关键词:糖尿病,2 型; 环氧化酶 2; 基因多态性

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.21.005 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2012)21-2569-03

The relationship between cyclooxygenase-2 gene polymorphism and type 2 diabetes

Lu Tianyang

(Department of Laboratory Medicine, Bengbu Medical College, Bengbu, Anhui 233030, China)

Abstract:**Objective** To investigate the relationship between the polymorphism of cyclooxygenase-2(COX-2) gene -765G/C, 1195G/A and type 2 diabetes. **Methods** Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism(PCR-RFLP) and fully automatic clinical chemistry analyzer were used to detect COX-2 gene polymorphism and common clinical indicators of 120 cases of T2DM patients and 92 healthy controls. Genotype and allele frequencies and clinical data were comparative analysed between the two groups. **Results** The blood glucose,postprandial 2 h plasma glucose,TG of the T2DM group were higher than the control group,the difference was statistically significant($P<0.05$);HDL-C,ApoA I were lower than the control,the difference was statistically significant($P<0.05$);-1195G/A locus genotype frequency between the two groups was statistically significant($P<0.05$). **Conclusion** COX-2 gene -1195G/A polymorphism may be related to the incidence of T2DM in Northern Anhui.

Key words:diabetes mellitus,type2; cyclooxygenase 2; gene polymorphism

糖尿病是因胰岛素分泌和(或)作用缺陷引起的以高血糖为主要特征的全身性代谢性疾病^[1],同时也是一种慢性、低度的炎症性疾病,容易引发和参与一系列的代谢紊乱,导致各种并发症的发生^[2]。环氧化酶(COX)-2 是一种重要的炎症介质,本研究旨在探讨皖北地区汉族人 COX-2 基因-765G/C 和-1195G/A 多态性与 2 型糖尿病(T2DM)的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 T2DM 组共 120 例,男 69 例,女 51 例,平均 56.33 岁,为蚌埠医学院第一附属医院内分泌科住院患者,常住地为蚌埠、淮北、阜阳、宿州等皖北地区。T2DM 诊断依据按 1999 年 WHO 诊断标准。排除原发高血压、脑血管疾病。健康对照组共 92 例,男 56 例,女 36 例,平均 55.72 岁,均为门诊常规健康体检者,并排除心脑血管疾病、肝肾疾病等。以上研究对象均为无血缘关系的个体。

1.2 方法 空腹 8 h 采集外周静脉血 10 mL,分两管分装,一管用 EDTA-K₂ 抗凝,分离白细胞提取基因组 DNA,另一管不抗凝,分离血清,-40 ℃ 备用。血清空腹血糖(FPG)、餐后 2 h 血糖(2h PG)、TC、TG、HDL-C、LDL-C、载脂蛋白(Apo)A I 和 ApoB 测定均在日立 7170 全自动生化分析仪上进行检测。应用改良的碘化钠法提取基因组 DNA,所用的分子生物学试剂均由上海生工生物有限公司提供。引物设计及扩增见表 1。PCR 的扩增程序为:94 ℃ 预变性 5 min,94 ℃ 变性 1 min,57 ℃ (59 ℃)退火 30 s,72 ℃ 延伸 30 s,35 个循环,最后 72 ℃ 延伸 5 min、取 15 μ L 的 PCR 产物用 5 U 限制性内切酶 Bsh1236 I (Pvu II)(均购自上海生工生物技术有限公司)进行酶切,37 ℃ 孵育 12 h,反应终止后,产物经 3% 琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色,通过凝胶成像系统观察结果并照相。根据酶切产生长度的不同,判断 3 种不同的基因型。

表 1 PCR-RFLP 法应用条件

位点	引物序列(5'-3')	退火温度	扩增片段	内切酶
-765G/C	上游:CCG CTT CCT TTG TCC ATC AG	57 ℃	157 bp	Bsh1236 I
	下游:GGC TGT ATA TCT GCT CTA TAT GC			
-1195G/A	上游:TAT CTC ACC CTC ACA TCT C	59 ℃	304 bp	Pvu II
	下游:TGG TTA CTA GCC CTT CAT AG			

1.3 统计学处理 所有数据都在 SPSS17.0 统计软件上进行统计学处理。基因型和等位基因频率采用频数法计算,用

Hardy-Weinberg 平衡检验所选样本的群体代表性。比较各组基因型频率和等位基因频率用 χ^2 检验。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 描

述,组间均数比较 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 T2DM 组和健康对照组的临床资料分析 T2DM 组的 FPG、2hPG、TG 高于健康对照组,差异有统计学意义 (*P* < 0.05),而 HDL-C、ApoAI 低于健康对照组,差异有统计学意义 (*P* < 0.05),其他指标差异无统计学意义 (*P* > 0.05),见表 2。

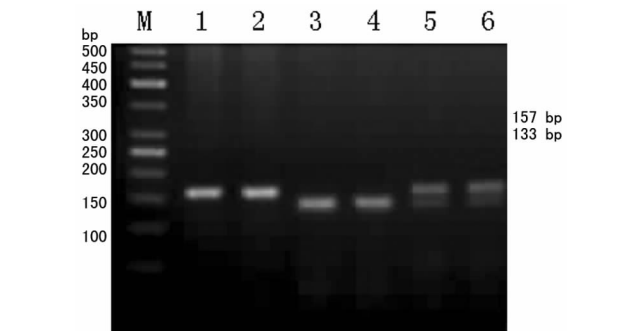
2.2 Hardy-Weinberg 平衡检验 COX-2 基因-765G/C 和-1195G/A 基因型的分布在 T2DM 组和健康对照组中均符合 Hardy-Weinberg 平衡,具有群体代表性。

2.3 PCR-RFLP 法检测 COX-2 基因-765G/C 和-1195G/A 多态性 -765G/C 位点 PCR 扩增片段长度为 157 bp,酶切后的电泳条带:GG 型为 133 bp 1 条片段,CC 型为 157 bp 的 1 条片段,GC 型为 157 bp 和 133 bp 2 条片段,见图 1。-1195G/A 位点 PCR 扩增产物为 304 bp,酶切后的电泳条带:GG 型为 230 bp 和 74 bp 两条片段,AA 型为 304 bp 1 条片段,GA 型为 304 bp、74 bp 和 230 bp 3 条片段,见图 2。

表 2 皖北地区汉族 T2DM 组和健康对照组的临床资料分析($\bar{x} \pm s$)

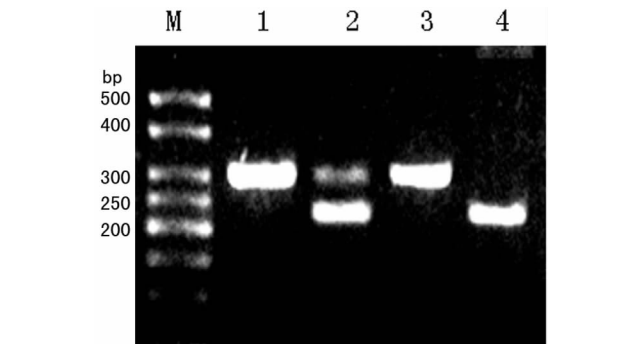
项目	T2DM 组(<i>n</i> = 120)	健康对照组(<i>n</i> = 92)	<i>P</i> 值
年龄(岁)	56.33 ± 11.28	55.72 ± 11.41	0.414
FPG(mmол/L)	6.84 ± 1.12*	4.59 ± 1.02	0.012
2h-PG(mmол/L)	8.52 ± 1.24*	6.93 ± 0.99	0.019
TC(mmол/L)	4.96 ± 1.33	5.02 ± 1.03	0.735
TG(mmол/L)	1.27 ± 0.07	0.90 ± 0.07*	0.006
HDL-C(mmол/L)	1.50 ± 0.47*	1.61 ± 0.38	0.021
LDL-C(mmол/L)	3.15 ± 1.12	3.21 ± 0.85	0.563
ApoA I (mmол/L)	1.47 ± 0.42*	1.56 ± 0.27	0.021
ApoB(mmол/L)	0.89 ± 0.31	0.90 ± 0.23	0.688

*: *P* < 0.05,两组间比较差异具有统计学意义。



1:PCR 产物;2:CC 基因型;3~4:GG 基因型;5~6:GC 基因型;M:DNA 分子标志物。

图 1 PCR-RFLP 法扩增-765G/C 位点凝胶电泳图



1:PCR 产物;2:GA 基因型;3:AA 基因型;4:GG 基因型;M:DNA 分子标志物。

图 2 PCR-RFLP 法扩增-1195G/A 位点凝胶电泳图

2.4 DNA 测序 随机选送不同基因型产物样本和上、下游引物至上海生工生物技术有限公司测序并将测序结果与 COX-2 基因序列进行比对,结果显示一致。

2.5 基因型及等位基因频率比较 -765G/C 位点中,T2DM 组和健康对照组的 GG、GC、CC 基因型的频率比较没有统计学意义 (*P* > 0.05);-1195G/A 位点中,T2DM 组和健康对照组的 GG、GA、AA 基因型的频率比较有统计学意义 (*P* < 0.05),见表 3~4。

表 3 T2DM 组和健康对照组 COX-2 基因多态性的基因频率分布[*n*(%)]

组别	<i>n</i>	-765G/C 位点			-1195G/A 位点		
		GG	GC	CC	GG	GA	AA
T2DM 组	120	99(82.5)	19(15.8)	2(1.7)	15(12.5)	81(67.5)	24(20.0)
对照组	92	78(84.8)	14(15.2)	0(0.0)	35(32.6)	44(42.4)	13(26.1)
χ^2 值		1.59			18.826		
<i>P</i> 值		>0.05			<0.05		

表 4 T2DM 组和健康对照组 COX-2 基因多态性的等位基因频率分布[*n*(%)]

组别	<i>n</i>	-765G/C 位点		-1195G/A 位点	
		G	C	G	A
T2DM 组	120	217(90.4)	23(9.6)	111(46.3)	129(53.8)
对照组	92	170(92.4)	14(7.6)	114(62.0)	70(38.0)
χ^2 值		0.551		10.303	
<i>P</i> 值		>0.05		<0.05	

3 讨 论

慢性低度炎症反应在 T2DM 的发生、发展中的作用越来越受到人们的重视。越来越多的证据表明,炎症在糖尿病和胰岛细胞损伤的发生过程中起着至关重要的作用,当糖尿病前期患者胰岛细胞功能逐渐下降时会发展成 T2DM^[3]。

COX 是二十碳四烯酸合成前列腺素(PG)过程中的一个关键限速酶,目前已知它有两种同工酶:COX-1 和 COX-2。COX-1 广泛分布于各种组织,一般情况下保持相对稳定,以保证细胞的正常活动。COX-2 的主要产物前列腺素具有诱导炎症反应、促进细胞增殖、抑制免疫反应、促进血管生成等多种生物学活性。在人体内 COX-2 局部表达增加与很多疾病状态有关。COX-2 过度表达能增加血管通透性,促进单核细胞黏附,产生炎症细胞因子,诱导巨噬细胞趋化,激活基质金属蛋白酶,活化白细胞和血小板^[4],同时 COX-2 作为炎症反应的介质,能降低人体对胰岛素的敏感性^[5]。既往研究显示,COX-2 的高表达与糖尿病并发症的发生密切相关^[6],糖尿病患者发病早期出现肾小球滤过率增高,而肾小球高滤过是导致糖尿病肾病(DN)发生功能与形态学改变的基础^[7]。

动物实验发现 COX-2 蛋白不仅在糖尿病大鼠视网膜中有表达,且随大鼠糖尿病时间的延长呈表达增高趋势,而在正常大鼠视网膜中则未发现有表达^[8-9]。糖尿病患者的视网膜神经纤维层内皮细胞中有 COX-2 表达,而在非糖尿病患者中则无此现象。COX-2 制剂能明显减低前列腺素 E2 在视网膜星细胞中的水平。Kern 等^[10]研究认为,非类固醇类抗炎剂能阻碍糖尿病性肾病早期血管形态学变化,从而延缓糖尿病性肾病的发展。

本研究运用 PCR-RFLP 方法检测皖北地区 COX-2 基因 -765G/C 和 -1195G/A 多态性,并探寻其与皖北地区 T2DM 人群发病的内在联系。本研究结果显示, -1195G/A 多态性与皖北地区 T2DM 人群发病有关,但尚不能认为 -765G/C 多态性与 T2DM 发病相关,与有关研究结果不同^[11]。COX-2 基因启动子区包含许多重要的顺式作用元件,包括 c-AMP、NF- κ B、IL-6、SP-1 和 TGF- β ,而 -1195G/A 变异并不影响这些转录因子结合位点,而是创造了 1 个 c-MYB 结合位点,这种改变使 COX-2 基因的转录活性增加^[12]。同时, -1195G/A 多态性影响 COX-2 基因的表达, -1195 AA 基因型携带者 COX-2 基因表达增加^[13],可能会诱导炎症出现。COX-2 蛋白表达上调会影响胰岛素分泌,可能在胰岛细胞的病理生理过程中发挥重要作用,但尚未得到相关试验证实。由于标本量所限,尚未排除其他相关因素对试验的影响,本研究得出的结论仍需要进一步研究,以便对 T2DM 的诊断和治疗提供更好的研究依据。

参考文献

[1] 姜振伟,唐红梅.糖化血红蛋白和血清胰抑素 C 联合检测在糖尿病早期肾损伤中的应用价值[J]. 国际检验医学杂志,2012,33(3):759-760.

[2] Wong CK, Ho AWY, Tong PCY, et al. Aberrant activation profile of cytokines and mitogen-activated protein kinases in type 2 diabetic patients with diabetic nephropathy[J]. Clin Exp Immunol, 2007,149(1):123-131.

[3] 李佩霞,许见钗.探讨糖尿病前期患者血浆 IL-18、PAI-1 水平变化与胰岛素抵抗的相关性[J]. 国际检验医学杂志,2012,33(3):305-306.

[4] Sjöholm A, Nyström T. Endothelial inflammation in insulin resist-

ance[J]. Lancet, 2005,365(9459):610-612.

[5] Beloqui O, Paramo JA, Orbe J, et al. Monocyte cyclooxygenase-2 overactivity: a new marker of subclinical atherosclerosis in asymptomatic subjects with cardiovascular risk factors? [J]. Eur Heart J, 2005,26:153-158.

[6] 杜宏,王扬天,赵明.糖尿病大鼠心肌 NF- κ B、iNOS、COX-2 表达的研究[J]. 中国病理生理杂志,2008,24(1):80-83.

[7] 杨珺.地骨皮提取液对 2 型糖尿病大鼠肾脏 COX-2 表达的影响[J]. 浙江中西医结合杂志,2011,21(7):461-463.

[8] 孙国玲,李筱荣,孙靖.环氧化酶-2 在早期糖尿病大鼠视网膜中表达的研究[J]. 天津医科大学学报,2008,14(3):335-338.

[9] 周晰溪,宋滇平.环氧化酶-2 基因启动子区 -765G/C 多态性与糖尿病视网膜病变的相关性研究[J]. 中华临床医师杂志:电子版,2010,4(11):2175-2178.

[10] Kern TSM, Miller CM, Du Y, et al. Topical administration of nepafenac inhibits diabetes-induced retinal microvascular disease and underlying abnormalities of retinal metabolism and physiology[J]. Diabetes, 2007,56(2):373-379.

[11] 周晰溪,宋滇平. COX-2 基因启动子区 -765G/C 多态性与昆明地区汉族人 2 型糖尿病的相关性研究[J]. 中华临床医师杂志:电子版,2011,15(2):512-514.

[12] Zhang X, Miao X, Tan W, et al. Identification of functional genetic variants in cyclooxygenase-2 and the association with risk of esophageal cancer[J]. Gastroenterology, 2005,129(2):565-576.

[13] Liu F, Pan K, Zhang X, et al. Genetic variant in cyclooxygenase-2: expression and risk of gastric cancer and its precursors in a Chinese population[J]. Gastroenterology, 2006,130(7):1975-1984.

(收稿日期:2012-08-01)

(上接第 2568 页)

降非常显著,梗死体积也比野生型的大得多^[11-12]。本研究证实血清 GFAP 浓度与急性脑梗死的不良结局相关,GFAP 浓度上升使再发缺血性脑血管病变和死亡的风险增高 2.11 倍。

本文通过 Logistic 回归分析研究了血清 IL-6、S100B、GFAP、hs-CRP、MBP、血浆 DD 浓度及吸烟、饮酒、体质指数与急性脑梗死不良结局的关系,临床上对于脑梗死急性期血清 IL-6、S100B、GFAP、hs-CRP、MBP 及血浆 DD 浓度较高的患者应加强临床检测及必要的干预治疗,戒除烟酒及控制体质指数可降低脑梗死再发风险。

参考文献

[1] Kiyohara Y, Kato I, Iwamoto H, et al. The impact of alcohol and hypertension on stroke incidence in a general Japanese population: the hisavma study[J]. Stroke, 1995,26(3):368-372.

[2] 田思思,宁宪嘉,涂军,等.天津市农村人群体质指数与脑卒中发病关系的前瞻性队列研究[J]. 中国慢性病预防与控制,2010,18(4):343-346.

[3] Di Napoli M, Schwaninger M, Cappelli R, et al. Evaluation of C-reactive protein measurement for assessing the risk and prognosis in ischemic stroke: a statement for health care professionals from the CRP pooling project members[J]. Stroke, 2005,36(6):1316-1329.

[4] Whiteley W, Chong WL, Sengupta A, et al. Blood markers for the prognosis of ischemic stroke: a systematic review [J]. Stroke, 2009,40:e380-e389.

[5] Whiteley W, Jackson C, Lewis S, et al. Inflammatory markers and

poor outcome after stroke: a prospective cohort study and systematic review of interleukin-6 [J]. Plos medicine, 2009,6(9):e1000145.

[6] Dougu N, Takashima S, Sasahara E, et al. Differential diagnosis of cerebral infarction using an algorithm combining atrial fibrillation and D-dimer level[J]. Eur J Neurol, 2008,15(3):295-300.

[7] Haapaniemi E, Tatlisumak T. Is D-dimer helpful in evaluating stroke patients? A systematic review [J]. Acta Neurol Scand, 2009,119(3):141-150.

[8] Fano G, BioCCA S, Fulle S, et al. The S100B: a protein family in search of function[J]. Prog Neurobiol, 1995,46(1):71-82.

[9] Tiainen M, Roine RO, Pettila V, et al. Serum neuron-specific enolase and S100B protein in cardiac arrest patients treated with hypothermia[J]. Stroke, 2003,34(12):2881-2886.

[10] Jauch EC, Lindsell C, Broderick J, et al. Association of serial biochemical markers with acute ischemic stroke: the national institute of neurological disorders and stroke recombinant tissue plasminogen activator stroke study[J]. Stroke, 2006,37(10):2508-2513.

[11] Herrmann M, Vos P, Wunderlich MT, et al. Release of glial tissue specific proteins after acute stroke: a comparative analysis of serum concentration ratios of protein S100B and glial fibrillary acidic protein[J]. Stroke, 2000,31(11):2670-2677.

[12] Nawashiro H, Huang S, Brenner M, et al. ICP monitoring following bilateral carotid occlusion in GFAP-null mice[J]. Acta Neurochir, 2002,81(Suppl):269-270.

(收稿日期:2012-06-09)