

MCP-1 基因 -2518A/G 位点多态性与 2 型糖尿病视网膜病变的关系研究

程怡 薛诚 吴金友 林海洋 赵佳佳 毛小洁

【摘要】 目的 探讨单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)基因 -2518A/G 位点多态性与 2 型糖尿病视网膜病变的关系。方法 采用聚合酶链反应-限制性酶切片长度多态性分析技术检测 192 例 2 型糖尿病患者[其中糖尿病视网膜病变组 93 例(包括增殖性视网膜病变亚组 45 例和非增殖性视网膜病变亚组 48 例),糖尿病非视网膜病变组 99 例]和 109 例健康体检者(对照组)的 MCP-1 基因 -2518A/G 位点多态性。结果 糖尿病视网膜病变组患者 AA 基因型频率高于糖尿病非视网膜病变组,差异有统计学意义($P < 0.05$),A 等位基因频率亦高于糖尿病非视网膜病变组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。增殖性视网膜病变亚组患者与非增殖性视网膜病变亚组患者的基因型频率和等位基因频率比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。logistic 回归分析显示,MCP-1 基因 -2518A/G 位点多态性及糖尿病病程与糖尿病视网膜病变的发生有关,AA 基因型及糖尿病病程长是糖尿病视网膜病变发生的危险因素。结论 MCP-1 基因 -2518A/G 位点多态性与 2 型糖尿病患者视网膜病变发生有关,其中 AA 基因型可能是 2 型糖尿病患者发生视网膜病变的危险因素,A 等位基因可能增加该人群视网膜病变的发生风险。

【关键词】 单核细胞趋化蛋白-1 基因多态性 糖尿病视网膜病变

Association of MCP-1 gene 2518A/G polymorphism with diabetic retinopathy in type 2 diabetes mellitus patients CHENG Yi, XUE Cheng, WU Jinyou, et al. Department of Endocrinology, Wenling First People's Hospital, Taizhou 317500, China

【Abstract】 Objective To Investigate the polymorphism of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) gene 2518A/G with the susceptibility to diabetic retinopathy (DR) in type 2 diabetes mellitus (T2DM) patients. Methods One hundred and ninety two T2DM patients were enrolled in the study, including 99 cases without DR (Non-DR group), 45 cases with proliferative DR (PDR group) and 48 cases with non-proliferative DR (NPDR group); 109 healthy individuals served as control group. The genotypes of MCP-1 2518A/G were determined by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). The blood glucose, glycosylated hemoglobin A1c (HbA_{1c}), C-peptide, lipid profiles were also measured. Results The AA genotype frequencies and A allele frequencies in DR group (PDR+NPDR) were significantly higher than those in Non-DR group ($P < 0.05$). There were no significant differences in genotype frequencies or allele frequencies between PDR and NPDR group. Logistic regression analysis showed that AA genotype and DM course were the independent risk factors for a development of diabetic retinopathy. Conclusion The AA genotype and A allele of MCP-1 2518A/G is associated with diabetic retinopathy in type 2 diabetic patients.

【Key words】 Monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1) Gene polymorphism Diabetic retinopathy

随着 2 型糖尿病患病人数的增多,疾病本身及其慢性并发症已成为严重的社会负担。糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是 2 型糖尿病常见的慢性并发症之一,是发达国家成人致盲的主要原因^[1]。多种

途径的炎症反应损伤血管内皮,是 DR 的重要发病机制之一^[2]。单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)属于趋化因子家族成员,是一种对单核细胞有趋化作用的炎症细胞因子^[3]。有证据表明,MCP-1 参与介导感光细胞凋亡和视网膜血管再生^[4]。位于 MCP-1 基因启动子区的-2518A/G 位点多态性会影响 MCP-1 的表达^[5]。基于此,本研究通过聚合酶链反应-限制性酶切片长度多态性分析(PCR-RFLP)技术检测基因多态性,旨在探讨 MCP-1 基因-

DOI:10.12056/j.issn.1006-2785.2019.41.15.2018-1600

基金项目:温岭市科技项目(2015C311034)

作者单位:317500 台州,温岭市第一人民医院内分泌科

通信作者:程怡,E-mail:chengyi1013@163.com

2518A/G 位点多态性与 DR 的关系,现报道如下。

1 对象和方法

1.1 对象 选取 2014 至 2017 年本院收治的 2 型糖尿病患者 192 例(DM 组),其中男 91 例,女 101 例;年龄 50~81 岁。DM 组患者均为中国浙江地区汉族人,相互之间无血缘关系,排除 1 型糖尿病、伴有急慢性感染性疾病、严重心脑血管病变、妊娠、自身免疫性疾病、恶性肿瘤以及因青光眼、白内障和其他眼底血管性疾病等原因导致眼底无法分级者。DM 组患者住院期间由专业眼科医师行眼底检查及眼底照相。根据 2013 年中华医学会眼科学分会眼底病学组的分期方法^[6],将 DM 组患者分为 DR 组(93 例)和非 DR 组(99 例);DR 组又分为 2 个亚组,增殖性视网膜病变亚组(PDR 亚组,45 例)和非增殖性视网膜病变亚组(NPDR 亚组,48 例)。另择同期在本院行健康体检者 109 例作为对照组,其中男 50 例,女 59 例;年龄 45~76 岁。对照组受检者均为汉族人,实验室检查证实无糖尿病,无高血压、心脏病、肝脏和肾脏疾病史,且无糖尿病、眼底疾病家族史。本研究获医院医学伦理委员会批准,研究对象均知情同意并签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 资料收集 收集并记录 DM 组患者与对照组受检者年龄、性别、糖尿病病史及治疗史、其他重大疾病史、家族史等,测身高、体重、收缩压、舒张压及腰围,计算 BMI;留取血标本,测定空腹血糖(FPG)、餐后 2h 血糖(2hPG)、糖化血红蛋白(HbA_{1c})、C 肽、TC、TG、HDL-C、LDL-C 等生化指标。

1.2.2 MCP-1 基因-2518A/G 位点多态性检测 采用 PCR-RFLP 技术检测基因多态性。采用德国 QIAGEN 公司的 DNA 提取试剂盒(50T, 51104)提取的 DM 组患者与对照组受检者外周血白细胞 DNA 作为模板,聚合链式反应上游引物序列 5'-CCGAGATGTTCCCAGCACAG-3',下游引物序列 5'-CTGCTTTGCTTGTGCCTCTT-3',扩增产物大小为 930bp。反应条件:94℃预变性 10min,94℃变性 30s,64℃退火 30s,72℃延伸 30s,上述循环 40 次,最后 72℃延伸 10min。PCR 扩增产物以 Pvu II 内切酶(New England Biolabs,US,25 000units,R0151)进行酶切反应,酶切产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳,溴乙锭染色后于紫外线成像仪中观察。由于 MCP-1 基因-2518A/G 位点有 Pvu II 酶切位点,所以 AA 基因型酶切片段为 930bp,AG 基因型为 930、708 和 222bp,GG 基因型为 708 和 222bp。选取经酶切鉴定携带不同基因型的 PCR 产物样本各 1 份委托英潍捷基(上海)贸易有限公司测

序,与酶切结果进行对比。

1.3 观察指标 (1)比较 DR 组、非 DR 组和对照组一般情况及生化指标;(2)比较 DM 组患者与对照组受检者 MCP-1 基因-2518A/G 位点基因型和等位基因频率分布情况;(3)分析 DR 相关危险因素。

1.4 统计学处理 应用 SPSS 24.0 统计软件。计算各组的基因型和等位基因频率分布情况,采用 Hardy-Weinberg 平衡公式检验各组基因型是否达到遗传平衡。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验,两组比较采用两独立样本 *t* 检验;计数资料以频数和构成比表示,组间比较采用 χ^2 检验。DR 相关危险因素分析采用 logistic 回归。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DR 组、非 DR 组和对照组一般情况及生化指标比较 DR 组与非 DR 组患者年龄、收缩压、舒张压、腰围、BMI、FPG、2hFPG、HbA_{1c}、TG、LDL-C 比较差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。DR、非 DR 组患者年龄、收缩压、舒张压、腰围、BMI、FPG、2hFPG、HbA_{1c}、TG、LDL-C 均高于对照组受检者(均 $P < 0.05$)。DR 组患者年龄、糖尿病病程均大于非 DR 组患者(均 $P < 0.05$),而非 DR 组患者与非 DR 组患者收缩压、舒张压、腰围、BMI、FPG、2hPG、HbA_{1c}、C 肽、TC、TG、HDL-c、LDL-c 比较差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$),见表 1。

表 1 DR 组、非 DR 组和对照组一般情况及生化指标比较

指标	DR 组 (n=93)	非 DR 组 (n=99)	对照组 (n=109)	P 值
性别(n,男/女)	44/49	47/52	50/59	>0.05
年龄(岁)	63.83 ± 8.13 [△]	60.42 ± 9.90 [*]	57.84 ± 10.27	<0.05
糖尿病病程(年)	12.41 ± 6.99 [△]	9.81 ± 6.96	-	<0.05
收缩压(mmHg)	140.34 ± 21.60 [*]	138.76 ± 15.84 [*]	118.52 ± 18.47	<0.05
舒张压(mmHg)	81.05 ± 15.92 [*]	80.68 ± 13.86 [*]	75.84 ± 8.83	<0.05
腰围(cm)	89.55 ± 8.74 [*]	88.10 ± 7.32 [*]	80.94 ± 8.06	<0.05
BMI	23.97 ± 3.37 [*]	24.55 ± 3.46 [*]	23.05 ± 3.68	<0.05
FPG(mmol/L)	10.33 ± 4.54 [*]	10.21 ± 3.74 [*]	4.92 ± 0.75	<0.05
2hPG(mmol/L)	16.51 ± 6.45 [*]	15.55 ± 5.63 [*]	5.75 ± 2.07	<0.05
HbA _{1c} (%)	9.88 ± 2.34 [*]	9.47 ± 2.22 [*]	5.66 ± 0.76	<0.05
C 肽(ng/mL)	1.63 ± 0.89	1.74 ± 0.97	-	>0.05
TC(mmol/L)	5.31 ± 1.47	5.15 ± 1.26	5.08 ± 1.27	>0.05
TG(mmol/L)	1.87 ± 1.26 [*]	1.78 ± 1.24 [*]	1.26 ± 0.95	<0.05
HDL-C(mmol/L)	1.31 ± 0.38	1.31 ± 0.42	1.39 ± 0.58	>0.05
LDL-C(mmol/L)	3.32 ± 1.25 [*]	3.11 ± 1.12 [*]	2.74 ± 0.72	<0.05

注:与对照组比较,^{*} $P < 0.05$;与非 DR 组比较,[△] $P < 0.05$

2.2 DM 组患者与对照组受检者 MCP-1 基因-2518A/G 位点基因型和等位基因频率分布情况比较 DM 组患者 AA 基因型频率为 29.2%, 高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); DM 组患者 A 等位基因频率为 51.8%, 高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。DR、非 DR、对照组 AA 基因型频率分别为 37.6%、21.2%、14.7%, A 等位基因频率为 57.0%、47.0% 和 39.4%, DR 组 AA 基因型频率高于非 DR 组和对照组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$), DR 组 A 等位基因频率高于非 DR 组和对照组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。PDR 亚组与 NPDR 亚组 MCP-1 基因-2518A/G 位点基因型频率和等位基因频率比较均无统计学差异 (均 $P > 0.05$), 见表 2。

表 2 DM 组患者与对照组受检者 MCP-1 基因 -2518A/G 位点基因型和等位基因频率分布情况比较 [例 (%)]

组别	n	基因型			等位基因	
		AA	AG	GG	A	G
DM 组	192	56(29.2)	87(45.3)	49(25.5)	199(51.8)	185(48.2)
DR 组	93	35(37.6)	36(38.7)	22(23.7)	106(57.0)	80(43.0)
PDR 亚组	45	18(40.0)	16(35.6)	11(24.4)	52(57.8)	38(42.2)
NPDR 亚组	48	17(35.4)	20(41.7)	11(22.9)	54(56.3)	42(43.7)
非 DR 组	99	21(21.2)	51(51.5)	27(27.3)	93(47.0)	105(53.0)
对照组	109	16(14.7)	54(49.5)	39(35.8)	86(39.4)	132(60.6)

注: MCP-1 基因 -2518A/G 位点基因型频率实际观察值与期望值进行 χ^2 检验, $\chi^2=1.10$, $P > 0.05$, 符合 Hardy-Weinberg 平衡, 表示样本来自遗传平衡的总体, 具有群体代表性

2.3 DR 相关危险因素分析 以 DR 的发生与否为因变量, 选择 MCP-1 基因-2518A/G 位点基因型、年龄、糖尿病病程、收缩压、舒张压、腰围、BMI、FPG、2hPG、HbA_{1c}、TC、TG、HDL-C 和 LDL-C 为自变量, 作 logistic 回归分析, 结果显示, MCP-1 基因-2518A/G 位点多态性及糖尿病病程与 DR 的发生有关, AA 基因型及糖尿病病程长是 DR 发生的危险因素, 见表 3。

表 3 DR 相关危险因素的 logistic 分析

变量	B	SE	Sig	Exp	95%CI
AA 基因型	1.532	0.476	0.015	1.907	0.790~5.263
糖尿病病程	0.115	0.053	0.030	0.891	0.803~0.989

3 讨论

DR 是糖尿病微血管并发症之一, 其发病是由多种因素共同参与、相互作用导致, 具体机制尚不十分明确。研究发现, 多种炎症细胞因子和趋化因子参与 DR 的发病过程, 包括血管内皮生长因子、细胞间黏附分子-1 和

MCP-1 等^[7-9]。

MCP-1 是一种炎症细胞趋化因子, 参与多种在单核细胞及巨噬细胞内发生的反应, 包括诱导超氧化阴离子、细胞因子产生和黏附分子表达^[9]。在动物试验中发现, 糖尿病大鼠玻璃体、视网膜血管壁和视网膜神经细胞内的 MCP-1 水平升高, 激活视网膜小胶质细胞, 释放炎症因子, 参与 DR 相关的炎症反应^[10]。葡萄糖和糖化血清白蛋白刺激 MCP-1 在视网膜色素上皮细胞内的信号表达^[11]。此外, 还有研究发现眼内的 MCP-1 水平在 DR 患者中较高, 为对照组的 2.2 倍^[12]。

关于 MCP-1 基因多态性与 DR 的相关性研究目前报道不多, 且结论并不一致。Jeon 等^[13]在对 590 例 2 型糖尿病患者的研究中发现, MCP-1 基因-2518A/G 位点 AA 基因型与 PDR 的发生有关, 而 Katakami 等^[14]及 Dong 等^[15]研究却认为-2518A/G 位点 GG 基因型及 G 等位基因增加 DR 包括 PDR 的患病风险。本研究以中国浙江地区汉族人为研究对象, 比较了 DM 组和对照组 MCP-1 基因-2518A/G 位点多态性的分布差异。结果表明, DM 组 AA 基因型频率和 A 等位基因频率高于对照组, 提示 AA 基因型及 A 等位基因与 2 型糖尿病易感性有关。该结果与马江波等^[16]研究结果相符。本研究还发现, DR 组 AA 基因型频率和 A 等位基因频率高于非 DR 组, logistic 回归分析发现 2 型糖尿病患者 MCP-1 基因-2518A/G 位点多态性及糖尿病病程与 DR 的发生有关。

本研究结果反映了浙江地区汉族人 MCP-1 基因-2518A/G 位点多态性与 DR 的关系, 该位点的多态性可能通过影响 MCP-1 基因的转录、翻译影响视网膜血管表达 MCP-1, 趋化吸引单核细胞的聚集而引起毛细血管的阻塞, 同时诱导多种途径的炎症反应损伤血管内皮, 最终导致 DR 的发生。本研究结果与目前已知的国内外研究结果并非完全一致的原因可能有: 首先, 该基因位点突变存在种族差异性, 基因型及等位基因的频率在各项研究中并不一致; 其次, 部分其他研究样本的糖尿病病程较短, 各组间血糖水平存在差异, 本研究中 DR 组和非 DR 组糖尿病病程均较长 (平均病程 > 10 年), 而两组间血糖水平无统计学差异; 但是本研究样本量不够大 (301 例) 可能也是造成结果偏差的原因。

综上所述, 本研究结果显示 MCP-1 基因-2518A/G 位点多态性与 2 型糖尿病患者 DR 发生有关, 其中 AA 基因型可能是浙江局部地区汉族人群中 2 型糖尿病患者发生 DR 的危险因素, A 等位基因可能增加该人群 DR 的发生风险。但由于 DR 的发生、发展是多种遗传和环境因素共同作用的结果, 进一步研究 MCP-1 基因与

其它基因以及环境因素等的相互影响有助于深入揭示 DR 发生的病理生理机制。

4 参考文献

- [1] Solomon SD, Chew E, Duh EJ, et al. Diabetic Retinopathy: A Position Statement by the American Diabetes Association[J]. *Diabetes Care*, 2017, 40 (9):412–418. DOI: 10.2337/dc17-er09.
- [2] Hameed I, Masoodi SR, Mir SA, et al. Type 2 diabetes mellitus: From a metabolic disorder to an inflammatory condition[J]. *World J Diabetes*, 2015, 6 (4):598–612. DOI: 10.4239/wjd.v6.i4.598.
- [3] Melgarejo E, Medina MA, Sanchez-Jimenez F, et al. Monocyte chemoattractant protein-1: a key mediator in inflammatory processes[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2009, 41 (5):998–1001. DOI: 10.1016/j.biocel.2008.07.018.
- [4] Feng C, Wang X, Liu T, et al. Expression of CCL2 and its receptor in activation and migration of microglia and monocytes induced by photoreceptor apoptosis[J]. *Mol Vis*, 2017, 23:765–777.
- [5] Rovin BH, Lu L, Saxena R. A novel polymorphism in the MCP-1 gene regulatory region that influences MCP-1 expression. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 259(2):344–348. DOI: 10.1006/bbrc.1999.0796.
- [6] 中华医学会眼科学分会眼底病学组. 我国糖尿病视网膜病变临床诊疗指南(2014 年)[J]. *中华眼科杂志*, 2014, 50(11):851–865. DOI:10.3760/cma.j.issn.0412-4081.2014.11.014.
- [7] Crawford TN, Alfaro DV 3rd, Kerrison JB, et al. Diabetic retinopathy and angiogenesis[J]. *Curr Diabetes Rev*, 2009, 5(1):8–13. DOI: 10.2174/157339909787314149.
- [8] Sassa Y, Yoshida S, Ishikawa K, et al. The kinetics of VEGF and MCP-1 in the second vitrectomy cases with proliferative diabetic retinopathy[J]. *Eye(Lond)*, 2016, 30(5):746–753. DOI:10.1038/eye.2016.20.
- [9] Kolattukudy PE, Niu J. Inflammation, endoplasmic reticulum stress, autophagy, and the monocyte chemoattractant protein-1/ CCR2 pathway[J]. *Circ Res*, 2012, 110(1):174–189. DOI: 10.1161/CIR-CRESAHA.111.243212
- [10] Dong N, Li X, Xiao L, et al. Upregulation of retinal neuronal MCP-1 in the rodent model of diabetic retinopathy and its function in vitro[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012, 53(12):7567–7575. DOI: 10.1167/iovs.12-9446.
- [11] Nawaz MI, Van Raemdonck K, Mohammad G, et al. Autocrine CCL2, CXCL4, CXCL9 and CXCL10 signal in retinal endothelial cells and are enhanced in diabetic retinopathy[J]. *Exp Eye Res*, 2013, 109:67–76. DOI: 10.1016/j.exer.2013.01.008.
- [12] Chernykh VV, Varvarinsky EV, Smirnov EV, et al. Proliferative and inflammatory factors in the vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy[J]. *Indian J Ophthalmol*, 2015, 63(1): 33–36. DOI: 10.4103/0301-4738.151464.
- [13] Jeon HJ, Choi HJ, Park BH, et al. Association on monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) 2518A/G with proliferative diabetic retinopathy in Korean type 2 diabetes[J]. *Yonsei Med J*, 2013, 54(3):621–625. DOI: 10.3349/ymj.2013.54.3.621.
- [14] Katakami N, Matsuhisa M, Kaneto H, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) gene polymorphism as a potential risk factor for diabetic retinopathy in Japanese patients with type 2 diabetes[J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2010, 89(1):e9–e12. DOI: 10.1016/j.diabres.2010.04.006.
- [15] Dong L, Lv XY, Wang BJ, et al. Association of monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1) 2518A/G polymorphism with proliferative diabetic retinopathy in northern Chinese type 2 diabetes [J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2014, 252 (12): 1921–1926. DOI: 10.1007/s00417-014-2651-1.
- [16] 马江波, 许鑫, 马改改, 等. 单核细胞趋化蛋白-1 基因多态性与浙江局部地区汉族人群 2 型糖尿病的相关性研究[J]. *浙江医学*, 2016, 38 (20): 1646–1649.
- (收稿日期: 2018-06-27)
(本文编辑: 李媚)
-
- (上接第 1605 页)
- cell-specific FoxO1 knockout mice[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2012, 302(5):E603–613. DOI:10.1152/ajpendo.00469.2011.
- [7] Kitamura T. The role of FOXO1 in beta-cell failure and type 2 diabetes mellitus[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2013, 9(10):615–623. DOI:10.1038/nrendo.2013.157.
- [8] Miyazaki S, Minamida R, Furuyama T, et al. Analysis of FoxO1-regulated genes using Foxo1-deficient pancreatic beta cells[J]. *Genes Cells*, 2012, 17(9):758–767. DOI:10.1111/j.1365-2443.2012.01625.x.
- [9] Jiang Z, Tian J, Zhang W, et al. Forkhead Protein FoxO1 Acts as a Repressor to Inhibit Cell Differentiation in Human Fetal Pancreatic Progenitor Cells[J]. *Journal of Diabetes Research*, 2017, 2017: 6726901. DOI:10.1155/2017/6726901.
- [10] van der Horst A, Burgering BM. Stressing the role of FoxO proteins in lifespan and disease[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8 (6):440–450. DOI:10.1038/nrm2190.
- [11] 崔旻, 赵勇. FoxO 转录因子[J]. *中国生物工程杂志*, 2004, 24(3):40–43. DOI:10.3969/j.issn.1671-8135.2004.03.009.
- [12] Wang Y, Zhou Y. FOXO Transcription Factors: Their Clinical Significance and Regulation[J]. *BioMed Research International*, 2014, 2014. DOI:10.1155/2014/925350.
- [13] Webb AE, Brunet A. FOXO transcription factors: key regulators of cellular quality control[J]. *Trends in biochemical sciences*, 2014, 39(4):159–169. DOI:10.1016/j.tibs.2014.02.003.
- [14] Rena G, Woods YL, Prescott AR, et al. Two novel phosphorylation sites on FKHR that are critical for its nuclear exclusion[J]. *The EMBO Journal*, 2002, 21(9):2263–2271. DOI:10.1093/emboj/21.9.2263.
- (收稿日期: 2019-05-09)
(本文编辑: 李媚)