

[文章编号] 1007-3949(2003)11-06-0549-04

•临床研究•

## 胆固醇酯转运蛋白及其基因多态性与 2 型糖尿病大血管病变的关系

刘宽芝<sup>1</sup>, 王晓英<sup>1</sup>, 张进贵<sup>2</sup>

(河北医科大学附属第三医院 1. 内分泌科, 2. 实验中心, 河北省石家庄市 050051)

[关键词] 内科学; 胆固醇酯转运蛋白在 2 型糖尿病大血管病变发生中的作用; 聚合酶链反应—限制性片断长度多态性技术; 动脉粥样硬化; 基因多态性; 酶联免疫吸附测定

[摘要] 探讨胆固醇酯转运蛋白在 2 型糖尿病大血管病变发生中所起的作用及胆固醇酯转运蛋白 Taq ivB 基因多态性与大血管病变的关系。对 96 例正常对照者及 226 例 2 型糖尿病患者的血清胆固醇酯转运蛋白水平及胆固醇酯转运蛋白 Taq ivB 基因型进行研究。结果发现: 2 型糖尿病组胆固醇酯转运蛋白水平较正常对照组明显升高, 大血管病变组升高更显著; ④糖尿病大血管病变组 B1B1 基因型频率 (37.3%) 显著高于无大血管病变组 (16.4%), B1B1 基因型大血管病变发生率 (68.3%) 明显高于 B1B2 (46.6%) 和 B2B2 (29.1%) 型; ④多元回归分析显示, 高胆固醇酯转运蛋白水平和 B1 等位基因是 2 型糖尿病大血管病变的危险因素。提示: 2 型糖尿病患者血清胆固醇酯转运蛋白水平升高, 后者是 2 型糖尿病大血管病变的危险因素; ④胆固醇酯转运蛋白 Taq ivB 基因多态性与 2 型糖尿病大血管病变发生有关, B1 等位基因是 2 型糖尿病大血管病变的易感基因。

[中图分类号] R58

[文献标识码] A

### The Relationship between Cholesteryl Ester Transfer Protein and Type 2 Diabetic Macroangiopathy in Chinese

LIU Kuan Zhi<sup>1</sup>, WANG Xiao Ying<sup>1</sup>, and ZHANG Jin Gui<sup>2</sup>

(1. Department of Endocrinology, 2. Experimental Center, the Third Affiliated Hospital, Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei 050051, China)

[KEY WORDS] Atherosclerosis; Gene Polymorphism; Enzyme-linked Immunosorbent Assay; Type 2 Diabetes Mellitus; Cholesteryl Ester Transfer Protein

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the association of cholesteryl ester transfer protein (CETP) and CETP Taq ivB polymorphism with type 2 diabetic macroangiopathy in Chinese. **Methods** The level of serum CETP was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and CETP genotype was determined by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) in 96 healthy controls and 226 patients with type 2 diabetes mellitus. **Results** The serum level of CETP in type 2 diabetes groups was significantly higher than that in controls, and its level in patients with macroangiopathy was higher than that in patients without macroangiopathy. ④The frequency of genotype B1B1 (37.3%) in type 2 diabetes with macroangiopathy significantly higher than that in patients without macroangiopathy (16.4%). Compared with genotype B2B2 (29.1%) class, the morbidity of macroangiopathy in genotype B1B1 (68.3%) or B1B2 (46.6%) class was significantly increased. ④Multiple logistic analysis showed that the serum CETP and its B1 allele were the important risk factors of type 2 diabetic macroangiopathy. **Conclusions** Serum CETP level rises in diabetic patients and high CETP level may be an important risk factor for type 2 diabetic macroangiopathy. ④CETP Taq ivB polymorphism is associated with the development and progression of type 2 diabetic macroangiopathy. B1 allele may be a susceptible gene of type 2 diabetic macroangiopathy.

大血管病变是 2 型糖尿病常见的慢性并发症, 也是导致其死亡的首要原因, 其突出的病理变化是动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As), 2 型糖尿病发生 As 部分是由于与胰岛素抵抗相关的脂代谢紊乱所

致。胆固醇酯转运蛋白 (cholesteryl ester transfer protein, CETP) 促进体内甘油三酯 (triglyceride, TG) 和胆固醇酯 (cholesteryl ester, CE) 在脂质间的转运, 是血脂代谢的重要调节因子, 其变化可能改变血管发生 As 的易感性。因此, 本研究拟通过对 2 型糖尿病患者血清 CETP 水平及其 Taq ivB 基因多态性的测定, 以明确 CETP 及其基因多态性在 2 型糖尿病大血管病变中的作用。

[收稿日期] 2003-05-27 [修回日期] 2003-10-13

[作者简介] 刘宽芝, 女, 1963 年出生, 河北省文安县人, 内分泌科副主任, 副主任医师, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向为糖尿病慢性并发症; 电话: 0311-7027951-3136。王小英, 女, 1975 年出生, 河北省唐山市人, 硕士, 现工作单位为北京市中国人民解放军 306 医院。张进贵, 男, 1955 年出生, 河北省石家庄市人, 实验中心主任, 副主任检验师。

### 1 对象与方法

### 1.1 研究对象

2型糖尿病组:2002年1月至2002年10月我院内分泌科门诊及住院的2型糖尿病患者共226例,其中男114例,女112例,年龄 $61.7 \pm 6.3$ 岁,病程 $9.0 \pm 5.7$ 年。根据有无大血管病变分为无大血管病变组116例和有血管病变组110例。诊断标准:2型糖尿病的诊断符合1997年美国糖尿病协会提出的糖尿病诊断及分型标准。④糖尿病大血管病变的诊断依据:冠状动脉粥样硬化性心脏病:以前有心肌梗死或心绞痛史,心电图呈缺血性改变或有心肌酶学改变;周围血管病:有间歇性跛行,或经超声证实动脉粥样硬化斑块形成或血管闭塞;脑血管疾病:有脑血管病史,或CT扫描或核磁共振成像显示缺血或出血性病灶。正常对照组:选择同期在我院体检的健康个体96名,其中男49名,女47名,年龄 $61.4 \pm 6.3$ 岁;空腹血糖、血脂和血压正常,无心、脑、肝、肾疾病。所有研究对象均为河北地区汉族人群,之间无血缘关系;无自身免疫性疾病、恶性肿瘤及其他内分泌疾患,近3个月未服用调脂药物。

### 1.2 研究方法

受试者经过夜禁食10~12h后,均于晨起空腹抽取静脉血6mL,其中1mL用2%乙二胺四乙酸(ethylenediamine tetraacetic acid, EDTA)抗凝,用于抽提基因组DNA,余5mL常规分离血清,用于血清CETP等生物化学指标的测定。用碘化钾法提取基因组DNA,采用聚合酶链反应—限制性片段长度多态性(polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)方法检测胆固醇酯转运蛋白基因第1内含子Taq ivB基因多态性。聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)引物序列为5'-CACTAGCCCAGAGAGAGGAGTGCC-3', 5'-CTGAGCCCAGCCGCACACTAAC-3'<sup>[1]</sup>。反应在2400型热循环仪(Perkin-Elmer公司)上进行:95℃预变性5min,继之30个循环(每个循环中变性94℃30s→退火65℃30s→延伸74℃45s),最后74℃延伸5min。取PCR产物10μL,加入限制性内切酶Taq ivB

(Takaka公司产品)5u,于65℃孵育2h。取酶切产物进行5%聚丙烯酰胺凝胶电泳,溴化乙锭染色后于紫外灯下观测基因型(B1B1型:361、174bp;B1B2型:361、174、535bp;B2B2型:535bp),摄片。

### 1.3 统计学分析

所有数据均输入计算机,用统计软件SPSS10.0处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,并进行正态检验。以Hardy Weinberg平衡法检验各组基因频率的群体代表性,计量资料的组间比较用方差分析或秩和检验,计数资料的组间比较用 $\chi^2$ 检验。2型糖尿病大血管病变发生的危险性用Logistic回归分析。

## 2 结果

### 2.1 2型糖尿病组与正常对照组之间胆固醇酯转运蛋白的比较

两组的年龄、性别构成比无显著差别,具有可比性。2型糖尿病组胆固醇酯转运蛋白水平为 $2.12 \pm 1.00$  mg/L,较正常对照组的 $1.79 \pm 1.04$  mg/L明显升高;大血管病变组胆固醇酯转运蛋白为 $2.39 \pm 1.14$  mg/L,较非大血管病变组升高更显著( $P < 0.05$ )。

### 2.2 胆固醇酯转运蛋白Taq ivB基因在各组中分布

正常对照组及2型糖尿病组的胆固醇酯转运蛋白Taq ivB基因型分布符合Hardy-Weinberg平衡(正常对照组 $\chi^2 = 0.031, P = 0.985$ ;2型糖尿病组 $\chi^2 = 0.276, P = 0.871$ ),因而该研究对象具有群体代表性。比较各组间B1等位基因和B1B1基因型的频率,2型糖尿病组与正常对照组间无显著性差异(分别为 $\chi^2 = 0.095, P = 0.758$ 和 $\chi^2 = 0.084, P = 0.772$ )。糖尿病大血管病变组中的B1等位基因和B1B1基因型更为常见(分别为 $\chi^2 = 15.904, P < 0.001$ 和 $\chi^2 = 12.639, P < 0.001$ ),其相对危险性以比值比(odds ratio, OR)表示: B1等位基因OR=2.141(95%可信限1.469~3.119); B1B1基因型OR=3.034(95%可信限1.623~5.670)(表1, Table 1)。

表1. 各组胆固醇酯转运蛋白基因型及其等位基因频率

Table 1. Distribution of CETP genotype and allele frequencies of the subjects in various subgroups

分 组	例数	基因型(例数, %)			等位基因(例数, %)	
		B1B1	B1B2	B2B2	B1	B2
正常对照组	96	24(25.0)	49(51.0)	23(24.0)	97(50.5)	95(49.5)
2型糖尿病组	226	60(26.5)	118(52.2)	48(21.3)	238(52.7)	214(47.3)
无大血管病变组	116	19(16.4)	63(54.3)	34(29.3)	101(43.5)	131(56.5)
合并大血管病变组	110	41(37.3)	55(50.0)	14(12.7)	137(62.3)	83(37.7)

### 2.3 不同基因型组间大血管病变发生率的比较

在 2 型糖尿病病人中, B1B1 型大血管病变发生率为 68.3%, 显著高于 B1B2 (46.6%) 和 B2B2 (29.1%) ( $\chi^2 = 16.80, P < 0.001$ )。B1B1 型和 B2B2 型相比, 大血管病变发病率 OR = 5.263 (95% 可信限 4.392~6.369)。

### 2.4 胆固醇酯转运蛋白 Taq ivB 基因多态性与胆固醇酯转运蛋白的关系

无论在正常对照组还是 2 型糖尿病组中, 胆固醇酯转运蛋白水平都与胆固醇酯转运蛋白 Taq ivB 基因多态性有关 ( $r = 0.228, P = 0.001$ ): B1B1 型胆固醇酯转运蛋白水平为  $2.43 \pm 1.24$  mg/L, 高于 B1B2 型的  $2.11 \pm 0.97$  mg/L 和 B2B2 型的  $1.80 \pm 0.93$  mg/L, 三者比较差异具有显著性 ( $F = 4.833, P = 0.009$ )。

### 2.5 2 型糖尿病大血管病变的危险因素分析

多元 Logistic 回归分析显示, 升高的胆固醇酯转运蛋白 (回归系数 2.957,  $P = 0.012$ ) 和 B1 等位基因 (回归系数 0.657,  $P = 0.012$ ) 是大血管病变的危险因素。

## 3 讨论

人类胆固醇酯转运蛋白基因位于第 16 号染色体长臂 (16q12-21), 长约 25 kb, 包含 16 个外显子与 15 个内含子<sup>[1]</sup>。CETP 的功能主要表现在以下两方面: 一方面, CETP 参与胆固醇逆向转运, 具有抗 As 的作用; 另一方面, 胆固醇酯转运蛋白在转运胆固醇酯的过程中形成富含胆固醇酯的产物极低密度脂蛋白和极低密度脂蛋白, 后者与肝极低密度脂蛋白受体的结合力较低, 因此高水平胆固醇酯转运蛋白致大量富含胆固醇酯的极低密度脂蛋白和极低密度脂蛋白流至周围细胞, 具有致 As 作用<sup>[2]</sup>。

早在 1995 年 Bagdade 等就研究发现慢性自发性糖尿病猕猴胆固醇酯转运蛋白浓度明显升高<sup>[3]</sup>, 由此引起人们对糖尿病患者胆固醇酯转运蛋白浓度或活性改变的关注, 然而所得到的结论不尽相同, 其机制也尚未明了, 对此目前国内尚无报道, 国外罕见报道。本研究发现, 2 型糖尿病组胆固醇酯转运蛋白水平较正常对照组明显升高, 猜测糖尿病时血糖升高、胰岛素抵抗是血清胆固醇酯转运蛋白水平的重要影响因素。另外, 本研究中大血管病变组胆固醇酯转运蛋白升高更显著。国外有关使用胆固醇酯转运蛋白拮抗剂的研究表明, 分别通过给兔注射反义寡核苷酸<sup>[4]</sup>和含有胆固醇酯转运蛋白片段的疫苗<sup>[5]</sup>

来抑制胆固醇酯转运蛋白, 可使 As 损害面积明显减少; 健康人服用一种胆固醇酯转运蛋白抑制剂 JTT-705<sup>[6]</sup>, 仅 4 周可使糖尿病胆固醇酯转运蛋白活性下降 37%, 高密度脂蛋白水平升高 34%, 低密度脂蛋白降低 7%, 从而减少冠状动脉 As 的危险性, 支持 CETP 具有致 As 作用的观点。Guerin 等也发现<sup>[7]</sup>, 2 型糖尿病患者胆固醇酯转运蛋白作用下胆固醇酯优先从高密度脂蛋白转移到极低密度脂蛋白 1, 促进小而密低密度脂蛋白的形成, 而此颗粒已被证实可促进 As 形成。由此可见, 糖尿病时升高的胆固醇酯转运蛋白是糖尿病大血管病变的危险因素, 本研究通过 Logistic 回归分析也支持这一观点。

胆固醇酯转运蛋白基因在多个位点上有多态性, 目前研究较多的是胆固醇酯转运蛋白基因第一内含子限制性片段长度多态性, 胆固醇酯转运蛋白 Taq ivB 基因多态性普遍存在于各种族人群中。本研究将 2 型糖尿病组分组, 发现 B1 等位基因和 B1B1 基因型在大血管病变组更为常见, 且 B1B1 型大血管病变发生率高于 B2B2 型, OR = 5.263; 结合多元回归分析认为, B1 等位基因是 2 型糖尿病大血管病变发生的易感基因。其机制尚不明了, 但可能与胆固醇酯转运蛋白 Taq ivB 多态性决定胆固醇酯转运蛋白水平有关。本研究结果与 Kawasaki<sup>[8]</sup> 和 Meguro 等<sup>[9]</sup> 在 2 型糖尿病中的研究结果相一致。Kuivenhoven 在非糖尿病人群的研究也得到类似结论<sup>[10]</sup>, 而鄢盛恺等研究发现血清胆固醇酯转运蛋白不是中国北方地区汉族人冠心病发生的主要危险因素<sup>[11]</sup>。另外, 法国 Durlach 等在 406 例 2 型糖尿病病人中发现, 胆固醇酯转运蛋白 TaqIB 基因多态性与大血管病变的关系仅在男性有差异<sup>[12]</sup>; 意大利 Arca 等得出无显著性差异的结论<sup>[13]</sup>。本研究结果与国外结果不完全一致, 原因可能为 As 受多因素、多基因遗传的影响, 而且不同的种族、地区及同一地区选择病例的标准、所用试验方法的不同也会得出不同的结论。

综上所述, 2 型糖尿病患者血清胆固醇酯转运蛋白升高, 后者是糖尿病大血管病变发生的重要危险因素; 胆固醇酯转运蛋白 Taq ivB 基因多态性与胆固醇酯转运蛋白水平相关, B1 等位基因表现为高胆固醇酯转运蛋白和大血管病变高发生率, B1 等位基因是 2 型糖尿病大血管病变的易感基因。上述结论为筛查危险人群、及早诊治病人提供了有力依据。但由于 2 型糖尿病属于多基因遗传性疾病, 所以还需设计更严密和采用多中心、大样本、包括更多基因标志的临床试验, 以进一步证实本研究的结论。

## [参考文献]

- [1] 李虎, 赵水平. 胆固醇酯转运蛋白限制片长多态性与冠心病. 中国动脉硬化杂志, 2001, **9** (5): 447-449
- [2] Rothblat GH, Lleras-Moya M, Atger V, Weibel GK, Williams DL, Phillips MC. Cell cholesterol efflux; integration of old and new observations provides new insight. *J Lipid Res*, 1999, **40** (4): 781-796
- [3] Bagdade JD, Wagner JD, Rudel LL, Clarkson TB. Accelerated cholesteryl ester transfer and altered lipoprotein composition in diabetic cynomolgus monkeys. *J Lipid Res*, 1995, **36** (4): 759-766
- [4] Sugano M, Makino N, Sawada S, Otsuka S, Watanabe M, Okamoto H, et al. Effect of antisense oligonucleotides against cholesteryl ester transfer protein on development of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *J Biol Chem*, 1998, **273**: 5 033-036
- [5] Rittershaus CW, Miller DP, Thomas LJ, Picard MD, Honan CM, Emmett CD. Vaccine induced antibodies inhibit CETP activity in vivo and reduce aortic lesions in a rabbit model of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, **20**: 2 106-112
- [6] Grooth GJ, Kuivenhoven JA, Stalenhoef AF, Graaf J, Zwinderman AH, Posma JL. Efficacy and safety of a novel cholesteryl ester transfer protein inhibitor, JTT-705, in humans: a randomized phase II dose response study. *Circulation*, 2002, **105** (18): 2 159-165
- [7] Guerin M, Le Goff W, Lassel TS, Van Tol A, Steiner G, Chapman MJ. Atherogenic role of elevated CE transfer from HDL to VLDL1 and dense LDL in type 2 diabetes: impact of the degree of triglyceridemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, **21** (2): 282-288
- [8] Kawasaki I, Tahara H, Emoto M, Shoji T, Nishizawa YK. Relationship between Taq IVB cholesteryl ester transfer protein gene polymorphism and macrovascular complications in Japanese patients with type 2 diabetes. *Diabetes*, 2002, **51** (3): 871-874
- [9] Meguro S, Takei I, Murata M, Hirose H, Takei N, Mitsuyoshi Y. Cholesteryl ester transfer protein polymorphism associated with macroangiopathy in Japanese patients with type 2 diabetes. *Atherosclerosis*, 2001, **156** (1): 151-156
- [10] Kuivenhoven JA, Jukema JW, Zwinderman AH, De Knijff P, McPherson R, Bruschke AV. The role of a common variant of the cholesteryl ester transfer protein gene in the progression of coronary atherosclerosis. *N Engl J Med*, 1998, **338** (2): 86-93
- [11] 鄂盛恺, 朱燕林, 程澍, 宋耀虹, 严晓伟, 朱文玲. 中国北方汉族人冠心病患者血清胆固醇酯转运蛋白的水平. 中国动脉硬化杂志, 2002, **10** (5): 442-444
- [12] Durlach A, Clavel C, Girard-Globa A, Durlach V. Sex-dependent association of a genetic polymorphism of cholesteryl ester transfer protein with high density lipoprotein cholesterol and macrovascular pathology in type II diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab*, 1999, **84** (10): 3 656-659
- [13] Arca M, Montali A, Ombres D, Battiloro E, Campagna F, Ricci G. Lack of association of the common Taq IVB polymorphism in the cholesteryl ester transfer protein gene with angiographically assessed coronary atherosclerosis. *Clin Genet*, 2001, **60** (5): 374-380

(此文编辑 曾学清)