

[文章编号] 1007-3949(2005)13-02-0195-04

•临床研究•

糖尿病患者同型半胱氨酸及其代谢相关酶基因多态性与颈动脉内膜—中膜厚度的关系

潘琦¹, 郭立新¹, 初明峰¹, 满永², 孙明晓¹, 李铭¹, 刘小萍¹

(卫生部北京医院 1. 内分泌科, 2. 老年医学研究所, 北京市 100730)

[关键词] 内科学; 糖尿病血管病变的分子机制; 聚合酶链反应—限制片长多态性; 同型半胱氨酸; 基因突变; 内膜—中膜厚度

[摘要] 目的 探讨 2 型糖尿病患者同型半胱氨酸水平及其代谢过程的相关酶甲基四氢叶酸还原酶基因 C677T 和胱硫醚缩合酶基因 T833C 位碱基突变与颈动脉内膜—中膜厚度的关系。方法 用酶联免疫吸附法测定同型半胱氨酸水平, 采用聚合酶链反应—限制片长多态性方法检测甲基四氢叶酸还原酶基因 C677T 基因型多态性, 用扩增阻滞突变体系法检测胱硫醚缩合酶基因 T833C 多态性, 用彩色多普勒检查颈动脉内膜—中膜厚度。结果 糖尿病颈动脉内膜—中膜厚度增厚组甲基四氢叶酸还原酶基因和胱硫醚缩合酶基因构成与糖尿病颈动脉内膜—中膜厚度正常组及对照组存在统计学差异 ($P < 0.05$)。三组甲基四氢叶酸还原酶基因和胱硫醚缩合酶基因突变者血浆同型半胱氨酸均高于无基因突变者。糖尿病组甲基四氢叶酸还原酶基因和胱硫醚缩合酶基因突变者颈动脉内膜—中膜厚度明显高于无基因突变者。结论 同型半胱氨酸代谢过程中关键酶基因变异可造成相关酶活性改变, 进而出现高同型半胱氨酸血症促进糖尿病动脉粥样硬化的形成。甲基四氢叶酸还原酶基因 C677T 点突变和胱硫醚缩合酶基因 T833C 点突变可能是糖尿病合并血管病变发病的重要遗传因素。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Relationship between Genetic Polymorphisms of Homocysteine Metabolism Related Enzymes and Carotid Intima-Media Thickness in Type 2 Diabetic Patients

PAN Qi, GUO Li-Xin, CHU Ming-Feng, MAN Yong, SUN Ming-Xiao, LI Ming, and LIU Xiao-Ping

(1. Department of Endocrinology of Beijing Hospital, 2. Beijing Institute of Geriatrics Ministry of Public Health, Beijing 100730, China)

[KEY WORDS] Homocysteinemia; Gene Mutation; Carotid Intima-Media Thickness; Methylenetetrahydrofolate Reductase; Cystathionine β -synthase

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the relationship of plasma homocysteine (Hcy) level and genetic polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T and cystathionine β -synthase (CBS) T833C related to homocysteine metabolism with carotid intima-media thickness (IMT) in type 2 diabetic patients. **Methods** Plasma Hcy level was measured by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). MTHFR genetic C677T polymorphism was determined by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphisms (PCR-RFLP), and CBS T833C polymorphism was determined by amplification refractory mutation system (ARMS) method, carotid intima-media wall thickness was determined by the use of the duplex ultrasonography. **Results** The genotype frequency of diabetics with thickened IMT was different from that of diabetic patients with normal IMT and control groups ($P < 0.05$). Plasma homocysteine levels were markedly higher in patients with MTHFR or CBS genetic mutation than those in patients without mutation in each group. IMT in MTHFR or CBS genetic mutation were thicker than those in patients without mutation in diabetic group. **Conclusion** Mutation of MTHFR or CBS can both cause the elevation of plasma homocysteine level so as to induce the onset of arteriosclerosis in diabetics. Their genetic mutations are possibly the important mechanism of macroangiopathy in diabetics.

近年来,大量研究资料表明高同型半胱氨酸血症是冠心病、脑卒中及外周血管病变的重要危险因素^[1]。甲基四氢叶酸还原酶(methylenetetrahydrofolate

reductase, MTHFR)和胱硫醚缩合酶(cystathionine β -synthase, CBS)是同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)代谢过程中的关键酶,这两种酶活性的改变会造成 Hcy 血浓度的改变。糖尿病患者是动脉硬化的高危人群,大血管并发症是糖尿病的主要致死和致残原因。颈动脉内膜—中膜厚度(intima-media thickness, IMT)作为一个反映全身动脉粥样硬化早期的指标已经逐渐用于临床^[2],有研究显示 IMT 增厚可与糖尿

[收稿日期] 2004-04-30 [修回日期] 2004-11-19

[基金项目] 国家科技部十五攻关课题(2002BA702B01)

[作者简介] 潘琦, 硕士, 主要研究方向糖尿病并发症发病机制及防治研究, E-mail 为 panqi621@163.net。郭立新, 副教授, 硕士研究生导师, 主要研究方向糖尿病并发症研究及临床治疗。初明峰, 硕士研究生, 主要研究方向糖尿病及并发症发病机制研究。

病大血管病变发生密切相关^[3]。本研究旨在通过对2型糖尿病患者上述两个代谢基因多态性的研究,探讨它们与颈动脉IMT的关系。

1 对象与方法

1.1 对象

正常对照组127例来自健康查体者,其中男66例,女61例,年龄 48.7 ± 11.9 岁。糖尿病患者161例,其中男99例,女62例,年龄 49.0 ± 8.7 岁。诊断依据WHO1999年标准,均为病程在1年以内的患者,排除有肝、肾功能异常者,在确诊2型糖尿病时已合并有心、脑、肾及外周血管病者。糖尿病患者根据颈动脉IMT结果分为两组:颈动脉IMT正常组($IMT < 1.0$ mm)和颈动脉IMT增厚组($IMT \geq 1.0$ mm)。

1.2 血液检测

受检对象禁食10h后空腹采肘静脉血5 mL, EDTA抗凝,1h内将标本离心,取血浆-20℃保存备检,Hcy测定用美国Diasyme实验室Hcy微板酶联免疫试剂盒。

1.3 颈动脉超声检查

使用德国ESAOTE-DU6彩超仪,探头频率5~12 MHz。受检者取仰卧位,双肩垫枕充分暴露颈部,头转向被检查的对侧。在双侧颈总动脉、颈内动脉等处沿血管长轴进行测量。当清楚显示动脉壁内膜、中膜、外膜的三层回声后停顿,用游标卡尺测量颈总动脉长轴后壁内膜内表面到中膜外表面之间的垂直距离,在此处及其后1 cm处测3次,取其平均值为受检者的IMT值^[4]。

1.4 聚合酶链反应及凝胶电泳

采用盐酸胍法提取人基因组DNA。以聚合酶链反应—限制片长多态性方法分析MTHFR基因,参照文献[5]设计引物序列,正义5'-CAAAGGCCACCCC-GAAGC-3'反义5'-AGGACGGTGCCGTGAGAGTG-3',反应体系包括10 pmol/L引物1 μL, 2.5 mmol/L dNTP 2 μL, 10× Buffer 3 μL, Taq DNA聚合酶1 u及DNA模板1 μL,总体积为30 μL。反应条件为94℃预变性5 min,再94℃变性1 min、60℃复性30 s、72℃延伸1 min,循环30次后72℃延伸7 min。取PCR产物10 μL,加入Hinf I酶3 u,乙酰化BSA 2 μL, 10× Buffer 2 μL, 37℃消化过夜,2%琼脂糖凝胶电泳观察结果。

采用扩增阻滞突变体系方法检测CBS基因型,参照文献[6]设计引物序列,正义5'-GGAGAAGT-

GTCTTGGATGCA-3',野生反义5'-CCCITCGGGATC-CACCCCAA-3',突变反义5'-CCCITCGGGATC-CACCCAG-3'。反应体系包括10 pmol/L引物1 μL, 2.5 mmol/L dNTP 2 μL, 10× Buffer 2 μL, Taq DNA聚合酶1 u及DNA模板1 μL,总体积为25 μL。反应条件为94℃预变性5 min,再94℃变性1 min、58℃复性90 s、72℃延伸90 s,循环35次后72℃延伸7 min,0.8%琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.5 统计学处理

计数资料用 χ^2 检验,计量资料经过方差齐性检验后使用 t 检验。计量值采用 $\bar{x} \pm s$ 来表示。所有资料经SPSS11.0软件进行统计分析。

2 结果

2.1 甲基四氢叶酸还原酶和胱硫醚缩合酶基因型分析

MTHFR基因扩增目的片段为246 bp,根据Hinf I酶切片段长度的不同分为三种基因型:T/T纯合型、T/C杂合型及C/C野生纯合型(图1, Figure 1)。CBS基因扩增目的片段为870 bp,分为C/C野生型、C/T杂合突变型及T/T纯合突变型(图2, Figure 2)。

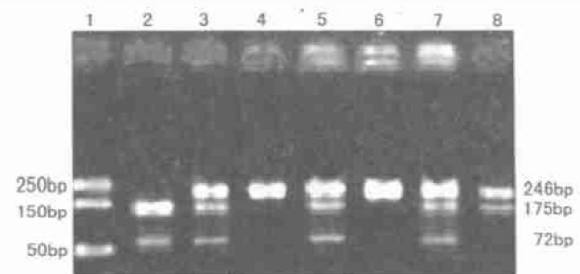


图1. 甲基四氢叶酸还原酶C677T等位基因产物琼脂糖凝胶电泳图 1为DNA分子量标准;2为突变纯合子T/T型;3、5、7、8为突变杂合子C/T型;4、6为野生纯合子C/C型。

Figure 1. Agarose gel result of MTHFR C677T allele polymorphism



图2. 胱硫醚缩合酶T833C等位基因产物琼脂糖凝胶电泳图 1为DNA分子量标准;2、4、5、8、9为野生纯合子T/T型;3为突变纯合子C/C型;6、7为突变杂合子T/C型。

Figure 1. Agarose gel result of CBS T833C allele polymorphism

2.2 甲基四氢叶酸还原酶基因型和等位基因频率分布

对照组 MTHFR 基因型频率分布和 T 等位基因频率与糖尿病 IMT 正常组比较差异无显著性 ($P > 0.05$)。糖尿病 IMT 增厚组 C、T 等位基因分布与正常对照组及糖尿病 IMT 正常组差异有显著意义 ($P < 0.05$)。糖尿病 IMT 增厚组 T/T 纯合型、T/C 杂合型及 C/C 纯合型频率分布与糖尿病 IMT 正常组及正常对照组差异有显著意义 ($P < 0.05$; 表 1, Table 1)。

表 1. 三组甲基四氢叶酸还原酶基因型和等位基因频率比较 [例(%)]

Table 1. Allelic frequencies of MTHFR C677T in three groups

分 组	n	基因型			等位基因	
		C/C	C/T	T/T	C	T
对照组	127	58 (45.7%)	34 (26.8%)	35 (27.6%)	150 (59.0%)	104 (41.0%)
IMT 正常组	100	45 (45.0%)	29 (29.0%)	26 (26.0%)	119 (59.5%)	81(40.5%)
IMT 增厚组	61	15 (24.6%)	22 (36.1%)	24 (39.3%)	52 (43.0%)	70 (57.0%)

表 2. 三组胱硫醚缩合酶基因型和等位基因频率比较 [例(%)]

Table 2. Allelic frequencies of CBS T833C in three groups

分 组	n	基因型			等位基因	
		T/T	T/C	C/C	T	C
对照组	127	86 (67.7%)	35 (27.6%)	6 (4.7%)	207 (81.0%)	47 (19.0%)
IMT 正常组	100	71 (71.0%)	23 (23.0%)	6 (6.0%)	165 (82.5%)	35 (17.5%)
IMT 增厚组	61	19 (31.1%)	40 (65.6%)	2 (3.3%)	78 (64.0%)	44 (36.0%)

2.4 不同基因型血浆同型半胱氨酸水平比较

无论是糖尿病组还是对照组的三种基因型血浆 Hcy 水平的改变存在相同的趋势, 即纯合子突变和杂合基因型血浆 Hcy 水平高于野生基因型 ($P < 0.001$), 纯合子 Hcy 水平高于杂合子 Hcy 水平 ($P < 0.01$), 见表 3 和 4 (Table 3 and 4)。

表 3. 甲基四氢叶酸还原酶不同基因型血浆同型半胱氨酸水平比较

Table 3. Relation between plasma homocysteine concentrations and MTHFR genotypes ($\bar{x} \pm s$, $\mu\text{mol/L}$)

分 组	n	C/C	C/T	T/T
对照组	127	6.3 ± 3.1	9.3 ± 2.7 ^a	13.1 ± 5.9 ^b
IMT 正常组	100	6.4 ± 3.3	10.9 ± 5.0 ^a	15.4 ± 6.2 ^a
IMT 增厚组	61	8.6 ± 3.7	14.0 ± 4.9 ^a	20.1 ± 4.2 ^a

a: $P < 0.01$, b: $P < 0.001$, 同组间比较。

2.3 胱硫醚缩合酶基因型和等位基因频率分布

对照组 CBS 基因型频率分布和 T 等位基因频率与糖尿病 IMT 正常组比较无明显差异 ($P > 0.05$)。糖尿病 IMT 增厚组 C、T 等位基因分布与糖尿病 IMT 正常组及正常对照组差异有显著意义 ($P < 0.01$)。糖尿病 IMT 增厚组基因型 C/C、C/T 及 T/T 频率分布与糖尿病 IMT 正常组及正常对照组差异有显著意义 ($P < 0.001$; 表 2, Table 2)。

表 4. 胱硫醚缩合酶不同基因型血浆同型半胱氨酸水平比较

Table 4. Relation between plasma homocysteine concentrations and CBS genotypes ($\bar{x} \pm s$, $\mu\text{mol/L}$)

分 组	n	C/C	C/T	T/T
对照组	127	7.9 ± 4.0	9.9 ± 3.2 ^a	18.9 ± 10.6 ^c
IMT 正常组	100	8.9 ± 5.41	1.3 ± 4.8 ^a	19.8 ± 7.4 ^b
IMT 增厚组	61	12.3 ± 6.6	15.8 ± 5.3 ^a	27.1 ± 4.5 ^b

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, c: $P < 0.001$, 同组间比较。

2.5 不同基因型内膜—中膜厚度比较

以 MTHFR 基因型为自变量, IMT 为因变量进行方差分析, T/T 和 C/T 基因型的 IMT 值与 C/C 基因型的 IMT 值相比有明显差别 ($P < 0.001$ 及 $P < 0.05$)。以 CBS 基因型为自变量, IMT 为因变量行方差分析, C/C 和 T/C 基因型的 IMT 值与 T/T 基因型的 IMT 值相比有明显差别 ($P < 0.01$ 及 $P < 0.001$),

见表 5(Table 5)。

表 5. 不同基因型内膜—中膜厚度比较

Table 5. Relation genotypes and carotid intima-media thickness

分 组	内膜—中膜厚度 (mm)
甲基四氢叶酸还原酶基因型	
C/C	0.81 ± 0.17
C/T	0.91 ± 0.21
T/T	0.98 ± 0.35
胱硫醚缩合酶基因型	
T/T	0.82 ± 0.20
T/C	0.98 ± 0.21
C/C	1.13 ± 0.77

3 讨论

同型半胱氨酸(Hcy)是蛋氨酸代谢过程的中间产物,许多因素可以引起Hcy水平升高。目前公认的主要影响因素是Hcy代谢关键酶CBS、MTHFR、甲硫氨酸合成酶缺乏或活性降低和膳食中作为辅酶的叶酸、维生素B₆、维生素B₁₂缺乏,而编码酶的基因发生突变是引起代谢酶缺陷或活性下降的主要原因^[7]。

人MTHFR基因定位于染色体1P^{36.3}上,目前已经发现了20余种该基因的突变,其中最常见的是C677T点突变。本研究发现不论是对照组还是糖尿病组发生MTHFR C677T突变者血浆Hcy水平明显高于无基因突变者。MTHFR C677T突变造成碱基T替换了C,其编码的氨基酸也由缬氨酸代替了丙氨酸。Frosst等^[8]研究显示T/T纯合子突变使MTHFR的活性降低51%,杂合子使其降低至正常的75%以下,造成血中Hcy的代谢异常,产生高Hcy血症。

人CBS基因定位于染色体21q^{2.3}上,可编码551个氨基酸。目前已发现64个CBS基因突变位点,其中最常见的是位于278密码子的T833C基因突变。本研究发现发生此种突变者血浆Hcy水平较野生纯合型Hcy水平明显升高。T833C基因突变导致其编码的甘氨酸代替了丝氨酸,可能通过影响CBS亚甲基与血红素与5'-磷酸吡哆醇的相互作用,导致酶活性下降^[9]。

国内外研究已证实高Hcy血症是动脉粥样硬化的一个独立危险因素,可能的机制为高Hcy可促进氧自由基形成,引起血管内皮细胞损伤和毒性作用,以及促进动脉平滑肌细胞增殖,加速低密度脂蛋白氧化,增加泡沫细胞的形成,并可激活血小板的粘附和聚集,导致动脉粥样硬化形成。在糖尿病患者,糖基化终产物和胰岛素抵抗增加了内皮细胞的敏感性,多因素协同作用参与了糖尿病血管病变的发生^[10]。本研究发现,糖尿病IMT增厚组MTHFR和CBS突变率高于对照组,两种基因突变型IMT值均高于无突变者,提示MTHFR和CBS突变通过改变酶的活性,造成血Hcy增高,Hcy升高带来一系列的病理生理改变促进动脉粥样硬化的发生发展,Hcy可能是连接基因突变这个遗传因素与糖尿病血管病变的桥梁,MTHFR C677T、CBS T833C有可能是糖尿病合并动脉粥样硬化的易感基因之一。该研究提示在糖尿病大血管并发症的二级预防中,对于携带易感基因突变的患者给予补充B族维生素有可能会降低血中Hcy水平,进而可能有助于减少糖尿病动脉粥样硬化的发生。

[参考文献]

- [1] McCully KS. Homocysteine and vascular disease. *Nat Med*, 1996, 2: 386-389
- [2] Rots ML, Hofman A, Grobbee DE. Increased common carotid intima-media thickness: adaptive response or a reflection of atherosclerosis? Findings from the Rotterdam Study. *Stroke*, 1997, 28 (12): 2442-447
- [3] Mudrikova T, Szabova E, Tkac I. Carotid intima-media thickness in relation to macrovascular disease in patients with type 2 diabetes mellitus. *Wien Klin Wochenschr*, 2000, 112 (20): 887-891
- [4] 苏琳, 苗懿德, 孙宁玲, 周惠清, 张万蕾. 老年高血压患者颈动脉内膜—中膜厚度及血管内皮依赖性舒张功能. *中国动脉硬化杂志*, 2001, 9(1): 53-56
- [5] 许海燕, 陈在嘉, 汤健, 姜玉新, 张晨辉, 朱大明, 等. 冠心病患者同型半胱氨酸代谢相关酶基因多态性的研究. *中华医学杂志*, 1999, 79: 414-416
- [6] 陈欣, 刘克强, 穆红. 胱硫醚-β-合酶(CBS)基因与冠心病发病机制的研究. *天津医药*, 2003, 31: 158-160
- [7] Motulsky AG. Nutritional ecogenetics: Homocysteine-related arteriosclerotic vascular disease, neural tube defects, and folic acid. *Am J Hum Genet*, 1996, 58: 17-21
- [8] Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet*, 1995, 10: 111-113
- [9] Tsai MY, Bignell M, Schwichtenberg K, Hanson NQ. High prevalence of a mutation in the cystathionine beta-synthase gene. *Am J Hum Genet*, 1996, 59 (6): 1262-267
- [10] Buyschaert M, Dramais AS, Wallenacq PE, Hermans MP. Hyperhomocysteinemia in type 2 diabetes: relationship to macroangiopathy, nephropathy, and insulin resistance. *Diabetes Care*, 2000, 23: 1816-822

(此文编辑 文玉珊)