

## 肾素-血管紧张素系统相关基因多态性与老年 2型糖尿病患者外周血管病变的关系

潘晓东, 卞茸文, 姜青林, 顾刘宝, 解雨春, 陈玲, 欧阳晓俊, 俞云

(江苏省老年医学研究所糖尿病防治研究中心, 江苏省南京市 210024)

[关键词] 2型糖尿病; 外周血管病变; 基因多态性

[摘要] 目的 了解 2型糖尿病患者的外周血管病变与肾素-血管紧张素系统基因多态性之间的关系。方法 以踝肱比值为诊断标准, 入选老年 2型糖尿病外周血管病变患者 56例, 非外周血管病变患者 84例。了解患者临床资料, 并检测血管紧张素转化酶 I/D、血管紧张素  $\text{AT1}$  型受体 A1166C、血管紧张素原 M235T 三个基因多态性, 运用 Logistic 回归分析外周血管病变危险因素。结果 两组间的基因型、等位基因频率分布差异无显著性; 但在携带血管紧张素转化酶 I/D 的 D 等位基因人群中, 病例组携带血管紧张素原 M235T 的 T 等位基因比例高于对照组。C 反应蛋白、纤维蛋白原和血管紧张素原 M235T 进入回归方程。结论 肾素-血管紧张素系统不同的基因多态性组合可能对 2型糖尿病患者外周血管病变的发生发展造成影响。纤维蛋白原、C 反应蛋白、血管紧张素原 M235T 是外周血管病变的危险因素。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

### The Relationship Between Renin Angiotensin System Gene Polymorphisms and Peripheral Vascular Disease in Chinese Patients with Type 2 Diabetes

PAN Xiao-Dong, BIAN Rong-Wen, XIE Yu-Chun, LOU Qing-Lin, GU Liu-Bao, XIE Yu-Chun, CHEN Lin, OUYANG Xiao-Jun, and YU Yun

(Diabetes Center of Jiangsu Provincial Geriatrics Research Institute, Nanjing, Jiangsu 210024, China)

[KEY WORDS] Type 2 Diabetes, Peripheral Vascular Disease, Gene Polymorphism

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the contribution of three renin angiotensin system (RAS) gene polymorphisms to the presence of peripheral vascular disease (PVD) in Chinese type 2 diabetes (T2DM) patients. **Methods** Amount to 385 consecutive T2DM patients were examined. Fifty-six of these were determined as PVD patients for their ankle brachial index (ABI) were less than 0.9. 84 non-PVD individuals were enrolled as control group. The clinic parameters and the gene polymorphisms of angiotensin converting enzyme (ACE) I/D, angiotensin  $\text{AT1}$  receptor (AT1R) A1166C and angiotensinogen (AGT) M235T were measured. Logistic analysis were used to study the relationship between the parameters and the risk of PVD. **Results** There were differences in fibrinogen (Fbg), serum creatinine (Scr) and high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) between cases and controls. There were no significant differences in the genotypes and allele frequencies of the three RAS gene polymorphisms between two groups. However, in the T2DM patients with D allele of ACE I/D, the prevalence of PVD significantly increased when they had T allele of AGT M235T at the same time. Logistic regression analysis showed that Fbg, hs-CRP, and AGT M235T were the risk factors of PVD.

**Conclusion** Inflammation factors such as hs-CRP and Fbg are involved in the development of PVD in the T2DM groups. Although the role of single gene polymorphism of RAS is limited, the interaction of the three RAS gene polymorphisms may have significant effect on the risk of PVD in T2DM patients. The individuals with T2DM presenting with D allele of ACE I/D are likely to have higher risk of PVD when they have T allele of AGT M235T at the same time.

2型糖尿病 (T2DM) 外周血管病变 (peripheral vascular disease, PVD) 是 T2DM 残疾的主要原因之一, 它的存在会明显增加死亡率。下肢的动脉粥样

硬化与颈动脉、冠状动脉等部位的动脉粥样硬化都属于全身动脉粥样硬化 (As) 的局部表现。我们既往研究提示, PVD 与颈动脉粥样硬化的发生呈明显正相关<sup>[1]</sup>。有文献证实肾素-血管紧张素系统 (RAS) 的三个常见基因多态性即血管紧张素转化酶 (ACE) I/D、血管紧张素  $\text{AT1}$  型受体 (AT1R) A1166C 和血管紧张素原 (AGT) M235T 与冠心病、中风等 As 疾病有关, 而在 PVD 发生中的作用不明确。本研究旨在探讨 T2DM 患者中这三个基因多态

[收稿日期] 2009-11-12 [修回日期] 2010-01-15

[基金项目] 江苏省卫生厅医学发展重大课题 (H200213)

[作者简介] 潘晓东, 硕士, 主治医师, 主要研究方向为老年人糖尿病并发症机制及治疗, E-mail 为 panxd120@126.com。通讯作者卞茸文, 硕士, 主任医师, E-mail 为 bwrw@jlonline.com。姜青林, 硕士, 主治医师。

性与 PVD 发病之间的关系,并初步探讨临床危险因素和遗传因素在 PVD 发病中的地位。

## 1 对象与方法

### 1.1 研究对象

从 2007 年 9 月至 2008 年 5 月,对在本院住院的江苏省非血缘关系汉族老年 T2DM 患者共 385 例进行连续筛选。经排除 1 型糖尿病 [包括成人隐匿性自身免疫性糖尿病 (LADA)]、处于急性病发作期、使用血管紧张素受体拮抗剂 (ARB) /血管紧张素转化酶抑制剂 (ACEI) 类药物等情况后,共有 140 例患者入选。其中 56 例纳入 PVD 组,非 PVD 患者 84 例,两组资料具有可比性 (表 1)。T2DM 诊断按 1999 年 WHO T2DM 诊断标准。

### 1.2 分组方法

按踝肱比 (ABI) 值分组<sup>[2]</sup>。在室内环境安静的条件下,专人使用 HADECO ES-1000SPM 多普勒血流探测仪分别测得平卧位时双侧足背动脉、胫后动脉和肱动脉血压。用下肢收缩压的最低值除以上肢收缩压最高值即为 ABI。ABI < 0.9 为 PVD 组, ≥ 0.9 者为非 PVD 组。

### 1.3 白细胞分离及基因组 DNA 抽提

抽取静脉血, EDTA 抗凝。2 500 r/min 离心 (SIGMA 3K18) 20 min 后吸取白细胞, Eppendoff 试管中 -80℃ 保存备用。购买基因组 DNA 抽提试剂盒 (博飞公司), 采用磁珠吸附法提取基因组 DNA。

### 1.4 血管紧张素转化酶 I/D 多态性检测

参照文献 [3] 向上海基康公司订购引物。PCR 反应体系共 25 μL ( $Mg^{2+}$  3 mmol/L, dNTP 0.2 mmol/L, 引物各 0.2 μmol/L, DNA 模板 2 μL, Taq 酶  $4 \times 10^4$  U/L)。使用 PTC-100 PCR 反应仪 (MJ Research, Inc) 扩增目的片段。反应条件为 95℃ 预变性 3 min, 95℃ 变性 45 s, 56℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 45 s, 共 40 个循环, 终末 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳 (180 V, 15 min), EB 染色后紫外灯下观察结果。结果判断按文献所述<sup>[3]</sup>。

### 1.5 血管紧张素 ①1 型受体 A1166C 多态性检测

参照文献 [4] 向公司订购引物。PCR 反应体系及条件同 ACE I/D 基因条件。PCR 反应成功后, 取 10 μL 产物与 DdeI3U (TOYOBO 公司) 配成酶切体系, 37℃ 水浴过夜。酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳 (条件同前), EB 染色紫外灯下观察结果。结果判断按文献 [4] 所述。

### 1.6 血管紧张素原 M235T 多态性检测

引物设计参考文献 [5] 并根据 Genbank 略做修改, 向公司订购。上游引物为 5'-agc cgt ttg tgc agg gcc tgg ctc tc-3', 下游引物为 5'-agc cag ggt gct gtc cac act gga ccc c-3'。PCR 反应体系共 25 μL ( $Mg^{2+}$  3.5 mmol/L, 10 × dNTP 1 μL, 20 × P1/P2 各 0.5 μL, DNA 模板 2 μL, Taq 酶 0.2 μL)。反应条件为 94℃ 预变性 3 min, 93℃ 变性 30 s, 68℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 45 s, 共 10 个循环, 接着 90℃ 变性 30 s, 65℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 45 s, 共 35 个循环, 终末 72℃ 延伸 10 min。取 PCR 产物 10 μL 与 ASP I<sup>U</sup> (罗氏诊断公司) 配成酶切体系, 37℃ 水浴过夜。取 10 μL 酶切反应液进行 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (180 V, 60 min), 采用 Cals 法<sup>[6]</sup> 银染观察结果。结果判断按文献 [7] 所述。

### 1.7 统计学处理

计量资料采用 *t* 检验, 非正态分布资料血清肌酐 (Scr) 和高敏 C 反应蛋白 (hs-CRP) 先取自然对数值将其转化为正态分布资料后进入统计。计数资料应用似然比  $\chi^2$  检验。以比值比 (OR 值) 和 95% 可信区间表示 PVD 发生的相对风险率。选择  $P < 0.05$  的变量进入 Logistic 回归模型中进行分析。

## 2 结果

### 2.1 两组间一般资料

PVD 组的 hs-CRP、Scr 水平、血浆纤维蛋白原 (Fbg) 水平均高于非 PVD 组 ( $P < 0.05$ )。PVD 组的中风发生率亦高于非 PVD 组 ( $P < 0.05$ ), 两组糖网患病率差异接近 0.05 (表 1)。

表 1 外周血管病变组和非外周血管病变组一般资料对比

一般资料	PVD 组	非 PVD 组	<i>P</i> 值
男/女 (例)	32/24	50/34	0.779
年龄 (岁)	74.5 ± 7.3	72.9 ± 6.1	0.164
病程 (年)	11.4 ± 8.0	9.8 ± 6.2	0.232
收缩压 (mmHg)	134.7 ± 16.5	131.8 ± 15.0	0.292
舒张压 (mmHg)	73.3 ± 9.4	76.2 ± 8.6	0.066
空腹血糖 (mmol/L)	8.25 ± 3.66	7.84 ± 2.64	0.476
餐后血糖 (mmol/L)	14.75 ± 6.67	14.27 ± 5.11	0.638
糖化血红蛋白	8.42% ± 2.65%	8.20% ± 2.10%	0.590
Scr	4.37 ± 0.31	4.24 ± 0.28	0.010
总胆固醇 (mmol/L)	4.74 ± 1.18	4.75 ± 1.10	0.981
纤维蛋白原 (g/L)	2.83 ± 0.52	2.60 ± 0.43	0.012
hs-CRP	0.56 ± 0.82	0.69 ± 0.82	0.001
糖网 (例)	12 (12/34)	13 (13/71)	0.056
冠心病 (例)	18	17	0.111
中风 (例)	28	19	0.001
高血压 (例)	43	55	0.153

2 2 三个基因多态性及等位基因频率分布

由于 DNA 样本以及材料等问题,最终测定 ACE I/D 基因型共计 104 例, AT1R A 1166C 共计 120 例, AGT M 235T 共计 102 例, 三个基因型分布均符合 Hardy Weinberg 平衡定律。PVD 组和非 PVD 组的 RAS 三个基因多态性基因型和等位基因频率分布情况差异无显著性(表 2~表 4)。其中 AGT M 235T 在两组之间分布  $P$  值为 0.139, 但将 MT 与 TT 合并后, 两组间 T 等位基因的分布  $P$  值接近 0.05 (0.057)。

表 2 血管紧张素转化酶 I/D 多态性分布情况

分 组	基因型 (例)			等位基因频率	
	II	ID	DD	I	D
PVD 组 ( $n=43$ )	22	17	4	70.9%	29.1%
非 PVD 组 ( $n=61$ )	36	18	7	73.8%	26.2%

表 3 血管紧张素  $\text{AT1R}$  受体 A 1166C 多态性分布情况

分 组	基因型 (例)			等位基因频率	
	AA	AC	CC	A	C
PVD 组 ( $n=46$ )	40	5	1	92.4%	7.6%
非 PVD 组 ( $n=74$ )	68	6	0	95.9%	4.1%

表 4 血管紧张素原 M 235T 多态性分布情况

分 组	基因型 (例)			等位基因频率	
	MM	MT	TT	A	C
PVD 组 ( $n=37$ )	3	25	9	39.2%	60.8%
非 PVD 组 ( $n=65$ )	15	34	16	49.2%	50.8%

2 3 三种基因多态性相互作用与外周血管病变的关系

在携带 ACE I/D D 等位基因的 T2DM 人群中, PVD 组携带 AGT M 235T T 等位基因的比例较非 PVD 组增加 ( $P < 0.05$ )。携带 AGT M 235T T 等位基因的人群中, PVD 组携带 ACE I/D D 等位基因的比例较非 PVD 组增加 ( $P = 0.064$ )。具体的两两比较结果见表 5。在 ACE I/D 与 AGT M 235T 的四种基因型组合 (ACE II+ AGT MM; ACE II+ AGT MT/TT; ACE ID/DD+ AGT MM; ACE ID/DD+ AGT MT/TT) 中, PVD 的患病率差异有显著性 ( $P < 0.05$ )。其他的基因型组合未见统计学差异。

2 4 Logistic 回归分析结果

选择表 1 诸多变量中  $P$  值小于 0.2 的变量作为自变量, 最后有年龄、糖网史、中风史、冠心病史、高

血压史、舒张压 (DBP)、Fbg、hs-CRP 的对数值 (lnhs-CRP)、Ser 的对数值 (lnSer)、AGT M 235T 等 10 个变量进入随后的 Logistic 回归模型中。采用前向法选择有主要作用的影响因素, 结果提示, Fbg、hs-CRP、AGT M 235T 是 PVD 的危险因素 (表 6)。

表 5 三种基因多态性相互作用对外周血管病变的影响

基因多态性类型		OR 值	95% 可信区间
ACE II	AGT MM vs AGT MT+TT	0.867	0.178~4.210
	AT1R AA vs AT1R AC+CC	2.667	0.532~13.378
ACE ID+DD	AGT MM vs AGT MT+TT	10.67 <sup>a</sup>	1.171~97.185
	AT1R AA vs AT1R AC+CC	0.525	0.044~6.252
AT1R AA	ACE II vs ACE ID+DD	1.905	0.808~4.490
	AGT MM vs AGT MT+TT	3.702	0.773~17.739
AT1R AC+CC	ACE II vs ACE ID+DD	0.375	0.022~0.3484
	AGT MM vs AGT MT+TT	5.000	0.344~72.767
AGT MM	ACE II vs ACE ID+DD	0.208	0.017~2.600
	AT1R AA vs AT1R AC+CC	2.000	0.133~30.162
AGT MT+TT	ACE II vs ACE ID+DD	2.564	0.939~7.003
	AT1R AA vs AT1R AC+CC	2.701	0.600~12.158

a 为  $P < 0.05$ 。

表 6 外周血管病变危险因素 Logistic 回归分析结果

变量	B	S.E.	P	OR (95% C.I.)
AGT M 235T	1.436	0.591	0.015	4.204
ln hs-CRP	1.452	0.514	0.005	4.271
Fbg	2.058	0.906	0.023	7.827
Constant	-9.846	3.171	0.002	0.000

3 讨论

ABI 是目前公认的 PVD 诊断指标, 国际糖尿病足组推荐将 ABI  $< 0.9$  作为诊断 PVD 的标准, 其敏感性、特异性均可达到 96% 以上, 而且具有安全、方便和经济等优点。因此我们选择 ABI 为分组依据对 T2DM 患者中 PVD 与非 PVD 病人进行研究。

RAS 激活的后果主要由血管紧张素  $\text{Ang}(\text{Ang} \text{II})$  与 AT1R 结合后介导产生, 它们参与了 AS 发生发展过程中的许多重要环节<sup>[8]</sup>。例如, AT1R 与血管内 NADH/NADPH 氧化酶相关联, 而  $\text{Ang}(\text{Ang} \text{II})$  是 NADPH 氧化酶表达的激活物, 可导致该酶在血管平滑肌细胞和成纤维细胞中表达增多。因此当 RAS 激活时, 可以使局部/全身氧化应激水平上调而带来一系列后果: ①内皮细胞功能受损, 一氧化氮产生减少; ②胞内  $\text{Ca}^{2+}$  通道信号传导受影响; ③低密度脂蛋白胆固醇 (LDLC) 被氧化, 氧化型低密度脂蛋白 (ox-LDL) 受体表达增加, 巨噬细胞摄取 ox-LDL 增加而促进泡沫细胞产生。AT1R 的激活还导致非特异免疫的活化, 促进炎症作用在 AS 的发生发展中发挥作

用。RAS各个成分之间也存在相互影响, AGT和ACE的基因多态性可以直接影响Ang<sup>②</sup>的水平,而Ang<sup>②</sup>可以通过激活NADPH氧化酶表达而影响AT1R激活后的作用。RAS激活可以使局部/全身氧化应激水平上调,导致内皮细胞功能受损、LDLC氧化、 $\alpha$ -LDL受体表达增加等,从而促进As发生发展。RAS的激活还导致非特异免疫的活化,促进炎症作用在As发生发展中发挥作用。因此,RAS主要成分的基因多态性与As的关系一直是研究热点。但是目前有关RAS基因多态性与As疾病的研究多是有关心脑血管病,与PVD关系的研究还不多且不一致<sup>[9-14]</sup>。

本研究分析RAS系统相关的三个基因多态性与T2DM患者PVD发病之间的关系。由于ACE I/D的D等位基因、AGT M235T的T等位基因、AT1R A1166C的C等位基因均被认为是风险基因,所以在分析时将ID与DD、AC与CC、MT与TT合并在一起。在单独分析三个基因多态性与PVD关系时,我们发现携带AGT的T等位基因可能影响PVD的发生( $P$ 值接近0.05),而其他基因未见明显影响。将不同基因型两两组合后发现,在T2DM患者携带ACE I/D D等位基因的人群中,同时携带AGT M235T T等位基因时患有PVD的可能性较不携带者增加。有文献报道ACE的D等位基因可以增加ACE的活性,而AGT的T等位基因可以增加血浆AGT水平,两者的组合可能通过Ang<sup>②</sup>途径促进As的发生发展。在香港的研究中<sup>[16]</sup>,ACE D等位基因与AGT TT型相互作用使T2DM患者大脑中动脉狭窄发病增加。我们的研究结果与之相似,证实RAS的基因之间相互作用对T2DM患者大血管病变会造成影响。

大量的临床研究已经证实病程、血糖、血脂水平是动脉粥样硬化性疾病的危险因素,但除它们之外还有哪些因素可能对As造成影响则不明确。本研究在年龄、病程、血糖、血脂水平没有差异的研究对象进行Logistic回归分析后发现,hs-CRP、AGT M235T和Fbg对PVD的发生有显著影响。虽然结果的可靠性有待大样本研究进一步证实,但提示我们RAS基因多态性在T2DM患者PVD的发生发展中可能有重要意义,并可能对临床选择适当方法治疗PVD提供依据。

综上所述,RAS的三个常见基因多态性ACE I/D、AT1R A1166C和AGT M235T单独分析与T2DM

的PVD发病无关。在T2DM患者携带ACE I/D D等位基因的人群中,同时携带AGT M235T T等位基因时患有PVD的可能性较不携带者增大。提示RAS不同基因的多态性组合可能对T2DM患者PVD的发生发展造成影响。PVD组的Fbg、Scr与hs-CRP值和中风发生率明显高于非PVD组。提示除年龄、血糖、血脂等影响因素外,纤维蛋白原、机体炎症水平、肾脏功能和AGT M235T等对PVD的发生也有明显影响。

#### [参考文献]

- [1] 卞茸文, 顾刘宝, 吕利萍, 等. 2型糖尿病患者外周血管病变与颈动脉粥样硬化的关系[J]. 中国糖尿病杂志, 2007, 15(8): 478
- [2] 许樟荣, 敬华, 译. 糖尿病足的流行病学. 国际糖尿病足工作组编写. 糖尿病足国际临床指南[M]. 北京: 人民军医出版社, 2003: 26-29
- [3] Rigat B, Hubert C, Corvol P, et al. PCR detection of the insertion/deletion polymorphism of human angiotensin converting enzyme gene (PCP1, dipeptidyl carboxypeptidase 1) [J]. *Nucleic Acids Research*, 1992, 20(6): 1433
- [4] Tiret L, Bonnardeaux A, Poirier O, et al. Synergistic effects of angiotensin-converting enzyme and angiotensin II type IV gene polymorphism on risk of myocardial infarction [J]. *Lancet*, 1994, 344: 910
- [5] Ishigami T, Umemura S, Iwanoto T, et al. Molecular variant of angiotensinogen gene is associated with coronary atherosclerosis [J]. *Circulation*, 1995, 91: 951
- [6] Carlos JS, Emmanuel DN, Andrew FG. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels [J]. *Biotechniques*, 1994, 17(5): 9141
- [7] 管立学, 张爱娟, 宋保华, 等. 血管紧张素原基因235M et/Thr变异与脑梗塞发病的关系[J]. 中华医学遗传学杂志, 2000, 17(5): 336
- [8] Nickenig G. Central role of the AT1-receptor in atherosclerosis [J]. *J Hum Hypert*, 2002, 16: S26
- [9] Thomas GN, Critchley JA, Tomlinson B, et al. Peripheral vascular disease in type 2 diabetes Chinese patients: associations with metabolic indices, concomitant vascular disease and genetic factors [J]. *Diab Med*, 2003, 20: 988
- [10] Taute BM, Glaser C, Taute R, et al. Progression of atherosclerosis in patients with peripheral arterial disease as a function of angiotensin-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism [J]. *Angiology*, 2002, 53(4): 375
- [11] Niemiec P, Zak I, Wita K. The M235T polymorphism of the AGT gene modifies the risk of coronary artery disease associated with the presence of hypercholesterolemia [J]. *Eur J Epidemiol*, 2008, 23(5): 349
- [12] Nakase T, Mizuno T, Harada S, et al. Angiotensinogen gene polymorphism as a risk factor for ischemic stroke [J]. *J Clin Neurosci*, 2007, 14(10): 943
- [13] Basar Y, Sahayenli N, Aksoy M, et al. ACE gene polymorphism in peripheral vascular disease [J]. *Hum Metab Res*, 2007, 39(7): 534
- [14] Park EY, Ahn HM, Lee JA, Hong YM. Insertion/deletion polymorphism of angiotensin converting enzyme gene in Korean hypertensive adolescents [J]. *Heart Vessels*, 2009, 24(3): 193-198
- [15] 林健雯, Thomas GN, 黄如训, 等. 2型糖尿病患者大脑中动脉狭窄与肾素-血管紧张素系统基因多态性的关系[J]. 中国神经精神疾病杂志, 2003, 29(1): 13

(此文编辑 许雪梅)