

• 临床检验研究论著 •

2 型糖尿病并发血管疾病男性患者雄激素受体基因(CAG)*n* 多态性研究

毛达勇, 赵娟, 张吉才[△]

(湖北医药学院附属太和医院检验科, 湖北十堰 442000)

摘要:目的 研究雄激素受体(AR)基因(CAG)*n* 多态性分布及其与 2 型糖尿病并发血管疾病的相关性。方法 采用序列特异性引物 PCR(SSP-PCR)和 DNA 测序技术检测 48 例 2 型糖尿病并发血管疾病的男性患者(A 组)的 AR 基因 CAG 串联重复序列(CAG-STR)长度,并与 60 例无血管并发症的 2 型糖尿病男性患者(B 组)和 46 例健康对照组比较。结果 154 例研究对象的 CAG 重复次数介于 13~36 次,平均 22.2 次。A、B、健康对照组 CAG 重复次数分别为(23.4±3.85)、(22.3±3.57)、(21.9±3.45)次,A 组与 B 组、健康对照组之间的差异均有统计学意义($P<0.05$)。CAG 重复次数与 HDL-C 水平呈正相关($r=0.289$, $P=0.003$)。结论 CAG 重复序列的长度可能是 2 型糖尿病并发血管疾病的危险因素,CAG 重复序列越长,2 型糖尿病患者并发血管疾病的可能性越大。

关键词:糖尿病,2 型; 血管并发症; 雄激素受体; 基因多态性

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.12.009

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)12-1430-02

The polymorphism of (CAG)*n* within androgen receptor gene among male patients of type 2 diabetes mellitus complicated by vascular disease

Mao Dayong, Zhao Juan, Zhang Jicai[△]

(Department of Clinical Laboratory, Hubei Medical University Affiliated Taihe Hospital, Shiyan, Hubei 442000, China)

Abstract: Objective To study the relationship of androgen receptor (AR) gene (CAG)*n* polymorphism frequency and angiopathy in male patients of type 2 diabetes mellitus. **Methods** PCR and DNA sequence methods were used to detect androgen receptor gene CAG short tandem repeat (CAG-STR) repeats' length in 48 cases of type 2 diabetes patients with vascular complications (group A), 60 type 2 diabetes patients without vascular complications (group B), and 46 cases of normal controls (normal control group). **Results** The numbers of CAG repeats ranged from 13 to 36, with mean value 22.2. The numbers of CAG repeats of group A, group B, and normal control group were 23.4 ± 3.85 , 22.3 ± 3.57 , and 21.9 ± 3.45 , respectively. CAG-STR repeats' length of group A was significantly higher than that of group B and normal control group ($P<0.01$). The numbers of CAG repeats were positively correlated with HDL-C levels. **Conclusion** Diabetic vascular complications might be associated with androgen receptor CAG gene polymorphism. The number of CAG repeats is likely to be a risk factor of diabetic vascular disease.

Key words: diabetes, type 2; vascular complications; androgen receptor; gene polymorphism

有研究报道,66.8%的男性糖尿病患者有勃起功能障碍(ED),72.6%的女性糖尿病患者有性功能障碍(FSD)^[1-2]。雄激素是糖尿病及其并发症患者中变化最为显著的性激素^[3-4],其主要通过雄激素受体(AR)发挥效应。已证实 AR 基因 CAG 的重复序列多态性与 AR 表达和转录活性有关,随着 CAG 重复序列的延长,其所编码的多聚谷氨酰胺〔(Gln)*n*〕重复增多,AR 功能下降。近年研究表明,CAG 重复序列长度多态性与冠心病、动脉粥样硬化等心血管疾病和乳腺癌等多种疾病发生相关^[5-9],但与糖尿病及其并发症的关系尚未见报道。笔者研究了 AR 基因 CAG 串联重复序列(CAG-STR)的重复次数 *n* 与糖尿病并发血管疾病的相关性,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2 型糖尿病(T2DM)组 108 例,为本院 2011 年 1~7 月收住患者,均符合 WHO 1999 年推荐的糖尿病诊断标准,年龄 28~59 岁,平均 46.5 岁,病程(4.1±1.8)年,患者均未采用饮食、口服降糖药物或胰岛素治疗。按有无血管并发症分为:有并发症组(A 组,48 例);无并发症组(B 组,60 例)。

健康对照组 46 例,年龄为(52.2±11.6)岁,均为无心、脑、肝、肾等器质性疾病的健康体检者。

1.2 仪器与试剂 日本 Olympus 公司 5400 自动生化分析仪及配套试剂;美国 Bio-Rad 公司 M-10 糖化血红蛋白分析仪及配套试剂;德国西门子公司 Immune 2000 免疫发光分析仪及配套试剂;美国 Bio-Rad 公司 Bio-Rad 2400 扩增仪;美国 ABI 公司 Abi-3100 基因测序仪。

1.3 方法

1.3.1 生化指标检测 各组研究对象均于清晨静脉采血 4 mL,取全血检测糖化血红蛋白(GHb),在 M-10 糖化血红蛋白分析仪上进行;分离血浆用于检测血糖(Glu)、三酰甘油(TG)、总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、胰岛素(Ins)水平,所有检测均在 3 h 内完成。

1.3.2 AR 基因型检测 采用碘化钠法提取外周血白细胞基因组 DNA,AR 基因型检测采用序列特异性引物 PCR(SSP-PCR),引物序列为^[4]:正义引物(F)5'-TCC AGA ATC TGT TCC AGA GCG TGC-3';反义引物(R)5'-GCT GTG AAG

[△] 通讯作者,E-mail:jicaizhang@hotmail.com。

GTT GCT GTT CCT CAT-3'。PCR 反应体系 20 μ L, 其中 10 \times Buffer 2 μ L(含 Mg^{2+}), 引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, TaqDNA 聚合酶 2 U, dNTP(200 μ mol/L)0.4 μ L, DNA 模板 10 ng, 补水至 20 μ L。扩增条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min 后进入循环(95 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 40 s), 循环 35 次后 72 $^{\circ}$ C 再延伸 5 min, 保存于 4 $^{\circ}$ C。采用 Abi-3100 型基因测序仪测 PCR 产物长度;加入 PCR 反应液 2 μ L、标准的 Beckman D1 labeled DNA size standard 400 0.5 μ L 及 Beckman Sample Loading Solution 40 μ L 进行电泳。系统设置条件:毛细管温度 50 $^{\circ}$ C、90 $^{\circ}$ C 变性 90 s、2.0 kV, 注射 60 s、4.8 kV 电泳 60 min。以上材料均由美国 ABI 公司提供。

1.4 统计学处理 计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验, 相关性分析采用多元回归分析, SPSS13.0 统计软件包上进行分析。

2 结 果

2.1 各组生化指标检测结果 与健康对照组比较, A 组 Ins 水平显著升高, GHb 水平显著降低, 差异均有统计学意义($P<0.01$), 但与 B 组比较差异无统计学意义($P>0.05$), TG、TC、HDL-C、LDL-C 水平在三组间差异均无统计学意义($P>0.05$), 见表 1。

表 1 各组间生化指标检测结果比较			
指标	健康对照组 (<i>n</i> =46)	A 组 (<i>n</i> =48)	B 组 (<i>n</i> =60)
Glu(mmol/L)	4.63 \pm 1.23	10.10 \pm 3.92*	9.82 \pm 3.65*
TG(mmol/L)	0.92 \pm 0.11	2.34 \pm 0.33	2.21 \pm 0.27
TC(mmol/L)	5.13 \pm 0.65	5.99 \pm 0.92	5.78 \pm 0.69
HDL-C(mmol/L)	1.53 \pm 0.11	1.23 \pm 0.09	1.24 \pm 0.08
LDL-C(mmol/L)	2.63 \pm 0.31	2.66 \pm 0.29	2.64 \pm 0.38
Ins(U/L)	18.36 \pm 7.32	11.14 \pm 6.11*	11.55 \pm 5.44*
GHb(mmol/L)	4.15 \pm 1.09	8.71 \pm 2.64*	8.59 \pm 2.15*

*: $P<0.01$, 与健康对照组比较。

2.2 AR 基因 CAG 重复序列长度 3 组对象共 154 例 CAG 重复次数为 13~36 次, 平均 22.2 次, 中位数为 22.0 次, CAG 重复序列长度分布情况见图 1。按 CAG 重复次数将 154 例研究对象分为两组: CAG 重复次数大于或等于 22 次为长 AR 基因组, 小于 22 次为短 AR 基因组。

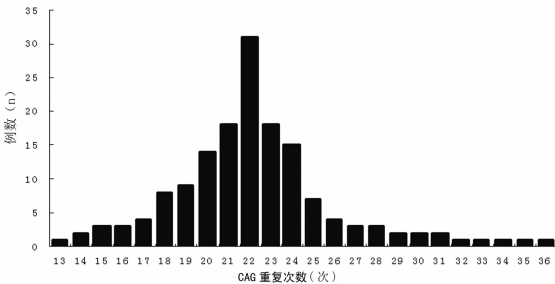


图 1 AR 基因 CAG 重复序列长度分布图

2.3 CAG 重复次数与 T2DM 并发血管病变的相关性 A、B、健康对照组 CAG 重复次数分别为(23.4 \pm 3.85)、(22.3 \pm 3.57)、(21.9 \pm 3.45)次, A 组显著高于健康对照组, 差异有统计学意义($P<0.05$), 但与 B 组差异无统计学意义($P>0.05$),

B 组与健康对照组比较, 差异也无统计学意义($P>0.05$)。

2.4 CAG 重复次数与各生化指标的相关性 长 AR 基因组具有较高的 HDL-C 水平, 虽然与短 AR 基因组比较差异无统计学意义($P>0.05$), 但相关分析表明, CAG 重复次数和 HDL-C 水平呈正相关($r=0.289, P=0.003$), 而与 Ins、GHb、TG、TC、LDL-C 水平无相关性。

3 讨 论

AR 广泛存在于心血管系统内, 在胰岛 β 细胞表面尚未发现。循环系统中的雄激素通过与 AR 结合作用于靶组织和靶器官。AR 是核受体家族的一员, 其编码基因位于 X 染色体的 q11~12 区, 由 8 个外显子和 7 个内含子组成。AR 的一级结构可分为 3 个功能区: 具有转录激活功能的 N-端区(NTD)、与靶基因上雄激素反应元件(ARE)特异性结合的 DNA 结合域(DBD)、C 末端的配体结合区(LBD)。由第一外显子编码的 NTD 含有正常受体活性所需的转录激活单位, 其活性可能与该区域内几个多态性结构有关, 其中最为明显的是位于第一外显子的 CAG-STR, 它编码了 NTD 中的 (Gln)*n* 片段。目前的研究普遍认为, AR 的转录活性与 AR 基因 CAG-STR 的重复次数呈负相关, 重复次数越小, AR 的转录活性越强。

本研究结果显示, 3 组对象共 154 例 CAG 重复次数介于 13~36 次, 平均 22.2 次, 中位数为 22.0 次, 与文献报道一致^[5-7]。A 组 CAG-STR 的重复次数显著高于健康对照组($P<0.05$), 但与 B 组间差异无统计学意义($P>0.05$), B 组与健康对照组比较, 差异无统计学意义($P>0.05$)。说明 CAG 重复次数是 T2DM 并发血管病变的危险因素, CAG 重复序列越长, T2DM 并发血管病变的可能性越大。CAG-STR 重复次数增多会降低 AR 基因的转录活性, 使 AR 活性减弱, 雄激素的作用不能很好发挥, 加之糖尿病患者睾酮水平显著降低, 最终导致糖尿病患者性功能减低, 并增加血管病变的可能性^[8]。

CAG 重复次数与 HDL-C 水平呈正相关($r=0.289, P=0.003$), 提示参与 HDL-C 代谢的关键基因的转录可能受 AR 调控, 这些关键基因主要是指在肝脏转移 HDL-C 过程中发挥重要作用的肝脂肪酶和清道夫受体 B1 基因^[9]。此外, 有资料显示胆甾烯基酯转移蛋白、肝脂肪酶、脂蛋白脂肪酶的基因多态性引起 HDL-C 水平个体差异的程度与 AR 基因 CAG 重复次数多态性的程度相似。CAG 重复次数与 Ins、GHb、TG、TC、LDL-C 无相关性, 说明其与胰岛素敏感性及血糖控制无关。

AR 基因多态性可能为 T2DM 并发血管病变的遗传危险因素, 但其是否受遗传背景的影响、是否与其他因素共同作用及如何作用等, 均有待多种族、大样本量人群研究来进一步阐明。

参考文献

[1] 程飞, 郭宏. 男性 2 型糖尿病患者性功能调查与相关因素分析[J]. 北京医学, 2005, 27(10): 580-582.
[2] 姜道新, 宁波. 糖尿病对女性性功能的影响及相关因素分析[J]. 中国基层医药, 2010, 17(1): 36-37.
[3] 毛达勇, 吕军, 郭毅飞. 2 型糖尿病及其慢性并发症患者性激素水平的变化与意义[J]. 鄞阳医学院学报, 2009, 28(3): 247-249.
[4] Jääskeläinen J, Korhonen S, Kuulasmaa T, et al. (下转第 1433 页)

表 2 ACS 患者胸痛发作后不同时间检测阳性结果比较 (n)

时间 (h)	H-FABP		cTnI		CK-MB	
	心绞痛组	心肌梗死组	心绞痛组	心肌梗死组	心绞痛组	心肌梗死组
3	28	36	9	23	5	16
6	35	39	37	40	11	25
12	1	3	20	38	17	30

在胸痛发作后 3 h, H-FABP 的阳性率为 70.3% (64/91), 而 cTnI 和 CK-MB 阳性率分别为 35.2% (32/91) 和 23.1% (21/91), 差异有统计学意义 ($P<0.05$); 在胸痛发作后 6 h, H-FABP 和 cTnI 的阳性率分别为 81.3% (74/91) 和 84.6% (77/91), 差异无统计学意义 ($P>0.05$); 但心肌梗死组 H-FABP 阳性率 [95.1% (39/41)] 在胸痛发作 6 h 后仍明显高于心绞痛组 [70.0% (35/50)], 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 见表 2。

3 讨 论

心肌损伤是由炎症、缺血、缺氧等因素导致心肌细胞发生病理改变, 进而引起一系列心功能异常的病理过程。临床上有 1/3 以上的 ACS 患者在缺乏典型临床症状时就已经发生了心肌损伤的病理变化, cTnI、CK-MB 等心肌生化标志物的血清浓度只有在心肌坏死后才会升高, 而在心肌缺血时无明显变化, 近年文献报道, H-FABP 在急性心肌缺血时具有敏感性高和检测时间早等优点, 有助于 ACS 的早期诊断^[1]。

脂肪酸结合蛋白是 1971 年美国研究者在肠黏膜中发现的, 是一组多源性小分子、酸性可溶性蛋白, 广泛存在于哺乳动物的心、肝、脂肪、骨骼肌等脂肪酸代谢活跃的组织细胞中^[2]。目前已发现的了 9 种脂肪酸结合蛋白, 包括脂肪细胞型、肝型肠型、上皮细胞型、脑型、心型等。其中 H-FABP 在心肌细胞质中含量丰富, 约占心脏可溶性蛋白质的 4%~8%。H-FABP 在心肌缺血时从心肌细胞中迅速释放入血, 于发病后 1~3 h 开始升高, 在 12~24 h 恢复到正常^[3]。H-FABP 在骨骼肌中的含量比心肌中低 10 倍, 提示 H-FABP 可作为诊断早期急性心肌受损的生化标志物^[4]。本研究对 91 例 ACS 患者的 H-FABP、cTnI 和 CK-MB 水平进行了对比观察, 发现在 ACS 患者胸痛发作后 3 h 内 H-FABP 水平明显增高, 12 h 后降到正常范围。而 CK-MB、cTnI 水平在胸痛发作后 3 h 开始逐渐增高, 6 h 才明显增高。本研究结果发现, H-FABP 在 ACS 患者胸痛发作后 3 h 内监测意义最大。在胸痛发作后 3 h, H-FABP 阳性率与 cTnI 和 CK-MB 的阳性率比较, 差异均有统计学意义

($P<0.05$)。在胸痛发作后 6 h, H-FABP 和 cTnI 阳性率差异无统计学意义 ($P>0.05$), 表明 H-FABP 在早期诊断 ACS 方面明显优于 CK-MB 和 cTnI。本研究还发现, 心肌梗死组 H-FABP 的阳性率在胸痛发作后 6 h 仍明显高于心绞痛组 ($P<0.05$), 表明 H-FABP 对于心肌梗死早期诊断具有较高的灵敏度。Glatz 等^[5]认为, 在急性心肌梗死的早期监测方面, H-FABP 比肌红蛋白 (MYO) 更有临床价值, 是一种较 MYO 更为敏感和特异的早期急性心肌梗死诊断标志物。综上所述, 在 ACS 诊断中, H-FABP 与 cTnI 和 CK-MB 相比较, 在检测时间上具有优势, 但特异性及敏感性无明显差别, 说明 H-FABP 是 ACS 早期诊断的生化标志物, 尤其对急性心肌梗死早期诊断非常有意义。

参考文献

[1] Valle HA, Riesgo LG, Bel MS, et al. Clinical assessment of heart type fatty acid-binding protein in the early diagnosis of acute coronary syndromal[J]. Eur J Emerg Med J, 2008, 15(3): 140-144.
[2] Wu AHB. Cardiac markers[M]. 2nd edition. Totowa NJ USA: Humana Press, 2003: 319-338.
[3] Chen LL, Xie HY, Yang F, et al. The role of heart-type fatty acid-binding protein in the diagnosis of acute myocardial in farction within early stage[J]. J Clin Cardiol, 2005, 21(7): 400-404.
[4] Tambara K, Fujita M, Miyamoto S, et al. Pericardial fluid level of heart-type cytoplasmic fatty acid-binding protein(H-FABP) is an indicator of severe myocardial ischemia[J]. Int J Cardiol, 2004, 93(2/3): 281-284.
[5] Glatz JF, Van Der Putten RF, Hermens WT. Plasma markers of activated hemostasis in the early diagnosis of acute coronary syndromes[J]. Clin Chim Acta, 2006, 371(1/2): 37-54.

(收稿日期: 2012-03-09)

(上接第 1431 页)

Androgen receptor gene CAG repeat length in women with metabolic syndrome[J]. Gynecol Endocrinol, 2008, 24(7): 411-416.
[5] 楚新梅, 李小鹰. 雄激素受体基因 (CAG)*n* 多态性与男性心血管病危险因素[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2007, 9(5): 352-353.
[6] 王钢, 陈光椿, 王晓慧, 等. 中国男性雄激素受体基因 (CAG)*n* 重复多态性的初步研究[J]. 中华医学遗传学杂志, 2001, 18(6): 415-417.
[7] Skjaerpe PA, Giwercman YL, Giwercman A, et al. Androgen receptor gene polymorphism and the metabolic syndrome in 60-80

years old Norwegian men[J]. Int J Androl, 2010, 33(3): 500-506.
[8] Saltiki K, Cimponeriu A, Garofalaki M, et al. Severity of coronary artery disease in postmenopausal women: association with the androgen receptor gene (CAG)*n* repeat polymorphism[J]. Menopause, 2011, 45(24): 1266-1301.
[9] 洗琳辉, 崔斌, 赵咏桔, 等. 老年男性雄激素受体基因 CAG 重复序列长度多态性与代谢综合征的关系[J]. 诊断学理论与实践, 2007, 6(5): 412-416.

(收稿日期: 2012-04-25)