

· 论 著 ·

PVT1 基因多态性与糖尿病肾病易感相关性研究^{*}庄 严¹, 粟俊杰¹, 陈传琦², 王黎敏³

(深圳市南山区蛇口人民医院:1. 中心实验室;2. 内分泌科;3. 肾内科, 广东深圳 518067)

摘要:目的 分析探讨人浆细胞瘤转化迁移(PVT1)基因的学校苷酸的多态性(SNP)与糖尿病肾病易感相关性。方法 利用 MassARRAY 质谱分析对糖尿病及糖尿病肾病患者进行 PVT1 基因的 5 个 SNP 位点(rs10808565, rs13447075, rs2648862, rs2720709, rs2648875)多态性检测, 通过统计学分析各位点多态性在糖尿病肾病及糖尿病组中的差异, 探讨 PVT1 基因的 SNP 位点与糖尿病肾病易感性的相关性。**结果** 两组样本 PVT1 各基因(rs10808565, rs13447075, rs2648862, rs2720709, rs2648875)符合 Hard-Weinberg 遗传平衡分布, rs2648875 多态性在糖尿病肾病及糖尿病组比较, 差异具有统计学意义($P < 0.05$); rs10808565, rs13447075, rs2648862, rs2720709 在糖尿病肾病及糖尿病组比较, 差异均无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 在中国人中 PVT1 rs2648875 多态性与糖尿病肾病存在易感相关性; rs10808565, rs13447075, rs2648862, rs2720709 与糖尿病肾病易感性无关。

关键词:人浆细胞瘤转化迁移基因; 单核苷酸多态性; 糖尿病肾病**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2017.16.007**文献标识码:**A**文章编号:**1673-4130(2017)16-2193-04**The correlation of plasmacytomas variant translocation gene polymorphisms and diabetes nephropathy^{*}**ZHAUGN Yan¹, LI Junjie¹, CHEN Chuanqi², WANG Limin³

(1. Central laboratory; 2. Department of endocrinology; 3. Department of nephrology,

SheKou people's Hospital, Shenzhen, Guangdong 518067, China)

Abstract: Objective To research the correlation of single nucleotide polymorphisms(SNPs) of Plasmacytomas Variant Translocation Gene(PVT1) and diabetes nephropathy. **Methods** To assay PVT1 SNPs (rs10808565, rs13447075, rs2648862, rs2720709, rs2648875) in two groups individuals with diabetes nephropathy and diabetes by MassARRAY system. Then analysis the results by statistical methods to evaluate the relationship between PVT1 SNPs and diabetes nephropathy. **Results** The distributions of SNPs of PVT1 (rs10808565, rs13447075, rs2648862, rs2720709, rs2648875) were all under the Hard-Weinberg equilibrium in two groups. Difference in PVT1 rs2648875 between two groups was statistically significant($P < 0.05$); and there were no significant differences in the others SNPs (rs10808565, rs13447075, rs2648862, rs2720709) between two groups. **Conclusion** PVT1 rs2648875 may contribute to the susceptibility of DN in chinese people and the others PVT1 SNPs (rs10808565, rs13447075, rs2648862, rs2720709) may not be Chinese susceptibility gene in DN.

Key words:plasmacytomas variant translocation Gene; single nucleotide polymorphism; diabetes nephropathy

人浆细胞瘤转化迁移基因(PVT1)位于人染色体 8q24, 是长链非编码 RNA(1.9 kb), 该基因因在 20% 的 Burkitt's 淋巴瘤中参与该区位以及 2 号、22 号染色体间循环易位为人们所熟悉^[1-2]。最新国外研究发现 PVT1 基因突变是 I 型和 II 型糖尿病引起终末期肾脏病(ESRD)的危险因素^[3-4]。这些位点突变在中国地区人群中与糖尿病肾病易感的相关性还未见有确凿的文献报告。本研究充分利用 MassARRAY Assay 高通量技术的优势, 探讨 PVT1 基因的 5 个 SNP 位点(rs10808565, rs13447075, rs2648862, rs2720709, rs2648875)多态性与糖尿病肾病易感相关性。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取本院住院糖尿病肾病患者 75 例为病例组, 男 40 例, 女 35 例, 年龄(59.8±13.4)岁; 单一糖尿病患者 70 例为疾病对照组, 男 36 例, 女 34 例, 年龄(59.5±9.8)岁。纳入标准: 疾病对照组要求糖尿病病史 10 年以上无糖尿病肾脏疾病; 糖尿病肾脏疾病组纳入要求按糖尿病肾损害分期在 III 期或以上病例。

1.2 仪器与试剂 主要设备: 美国 AgenaBioscience 公司的

MassARRAY 质谱系统: 质谱仪 MassARRAY Analyzer 4 System, 点样仪(MassARRAY Nanodispenser), 384 孔双头 PCR 仪(GeneAmp PCRSysytem 9700 Dual 384-Well Sample Block Module); 生化仪(雅培 c16000 型)、血红蛋白分析仪(Bio-Rad 公司)、尿液分析仪(贝克曼库尔特 1000 型)。主要试剂: QIA-GEN QIAamp R RNA Blood Mini Kit Complete iPLEXR Gold Reagent Set。

1.3 方法

1.3.1 标本采集 采集空腹外周血干燥管 3 mL, 用于生化肝功、肾功、血糖等检测; 枸橼酸抗凝管 2 mL 2 管, 用于糖化血红蛋白检测, 同时全血及提取核酸于 -20 °C 保存用于质谱分析; 采集晨起中段尿液标本 10 mL 用于尿常规、尿微量清蛋白及尿肌酐等检测。

1.3.2 检测方法

1.3.2.1 生化及尿液指标检测 肝功、肾功、血糖、血脂在雅培 c16000 机上完成, 糖化血红蛋白检测应用 Bio-Rad 血红蛋白分析仪、尿液检测应用贝克曼库尔特 1000 型尿液分析仪, 以上检测均在取得标本的当天上机完成。

^{*} 基金项目: 深圳市科技计划项目(JCYJ20150403093555014)。

作者简介: 庄严, 女, 副主任技师, 主要从事临床检验诊断学研究。

1.3.2.2 外周血核酸提取 柚橼酸抗凝管抗凝全血,严格按照 QIAGEN QIAamp R RNA Blood Mini Kit 试剂盒说明进行外周血核酸提取,并对每个样品进行质检,要求核酸的浓度不低于 10 ng/μL,纯度在 OD 1.7~2.1 之间。全血及提取核酸

于-20 ℃保存用于质谱分析。

1.3.2.3 引物设计 引物采用 Agena Bioscience 公司的 ADS2.0 软件进行设计,引物是由北京六合华大基因科技有限公司合成的。各位点引物序列见表 1。

表 1 PVT1 基因 5 种不同 SNP 位点引物序列

SNP_ID	正向引物	反向引物	延伸引物序列
rs13447075	ACGTTGGATGCAAATAAACCTGCAAGTC	ACGTTGGATGGCTAGAGGATCTACATGAAC	CTGCAAGTCCATGCT
rs2648875	ACGTTGGATGACCATACTAGTGATGAC	ACGTTGGATGCTCATCGTCAGCCATAGG	TTTCCTGCCTCACAAAT
rs2720709	ACGTTGGATGCTGAAAGGTGAGCAGCTATG	ACGTTGGATGTTAGATGTAGTCCAGGCC	GCAAGAGTGAGAAGGTT
rs10808565	ACGTTGGATGACCAGGCTGGTTGATTGAC	ACGTTGGATGGCTGTGAAGGATCAAAGGG	CCTTGAGTGGTGAAGCCC
rs2648862	ACGTTGGATGGAGAAGCAAGGAGTGGAC	ACGTTGGATGAAGGGCACTGGAGACCTAC	TAAGGAGTGGACCTGGAG

1.3.2.4 MassARRAY 质谱分析 借助华大基因公司 MassARRAY 质谱分析平台,选取相关基因的 SNP 位点为研究靶点,经多重 PCR 扩增,即通过设计 PCR 引物实现对含有待检测位点靶序列的扩增,采用多重 PCR 技术,同时在一个反应孔扩增出高达 30 个的靶序列;单碱基延伸,用 SAP 酶去除多重 PCR 产物中残留的 dNTP,加入 ddNTP,在紧邻待检测位点处设计一条延伸引物,在酶的催化下,只延伸待检测位点处的碱基;高能激光能使延伸的寡核苷酸产物带上单电荷,在电磁场的作用下,寡核苷酸的飞行时间与其分子量相关,由于四种碱基的分子量不同,通过质谱检测的延伸产物峰数据即可判断相应位点的基因型。

1.4 统计学处理 使用 Haplovview 软件经 Hardy-Weinberg 平衡检验 SNP 基因型和等位基因频率分布。使用 SPSS13.0 软件,计算不同基因型在疾病发病中相应的风险值(95%置信区间下)和 P 值。所有检验均为双侧概率检验,检验水准为 P=0.05。

2 结 果

2.1 两组样本 PVT1 各基因型 Hard-Weinberg 遗传平衡检验 糖尿病肾病组、糖尿病组,经 Hardy-Weinberg 遗传平衡检验,PVT1 的 5 个 SNP 位点(rs10808565、rs13447075、rs2648862、rs2720709、rs2648875)在 2 组中 P 均大于 0.05,表明各组样本分布都达到了 H-W 遗传平衡,见表 2。

2.2 PVT1 5 种 SNPs 多态性在糖尿病肾病及单一糖尿病 2 组样本中分布比较 PVT1 5 种 SNPs rs10808565、rs13447075、rs2648862、rs2720709、rs2648875 位点多态性在糖尿病肾病及单一糖尿病 2 组样本中分布比较显示,rs2648875 位点多态性在 2 组中有显著性差异;其余 4 种 SNPs 多态性在 2 组样本中无显著性差异,见表 3。

表 2 Hardy-Weinberg 遗传平衡检验

突变位点	基因型	实际例数		H-W 理论例数	
		糖尿病肾病	糖尿病	糖尿病肾病	糖尿病
rs10808565	CC	32	43	32.67	40.13
	CT	35	20	33.66	25.74
	TT	8	7	8.67	4.13
	χ^2	0.12	3.48	—	—
	P	0.94	0.18	—	—
rs13447075	CC	59	51	58.96	52.29
	CA	15	19	15.07	16.42
	AA	1	0	0.96	1.29
	χ^2	0.00	1.73	—	—
	P	1.00	0.42	—	—
rs2648862	CC	48	48	50.43	48.89
	CA	27	21	22.14	19.22
	AA	0	1	2.43	1.89
	χ^2	3.61	0.60	—	—
	P	0.16	0.74	—	—
rs2720709	AA	22	23	19.76	25.20
	GA	33	38	37.47	33.60
	GG	20	9	17.76	11.20
	χ^2	1.07	1.20	—	—
	P	0.59	0.55	—	—
rs2648875	AA	29	36	24.65	37.16
	GA	28	30	36.69	27.69
	GG	18	4	13.65	5.16
	χ^2	4.21	0.49	—	—
	P	0.12	0.78	—	—

注: χ^2 与 P 值均为与相应突变位点的 H-W 理论例数比较得出;— 表示该项无数据。

表 3 PVT1 5 种 SNPs 多态性在 2 组样本中比较

SNP 位点	位置(Mb)	基因型	糖尿病肾病组[n(%)]	糖尿病组[n(%)]	OR(95%CI)	P
rs10808565	129.076594	CC	32(42.7)	43(61.4)		
		CT	35(46.7)	20(28.6)		
		TT	8(10.6)	7(10.0)	0.62(0.37~1.04)	0.0694
rs13447075	129.079772	CC	59(72.9)	51(72.9)		
		CA	15(27.1)	19(27.1)		
		AA	1(1.0)	1(1.0)	1.36(0.69~2.69)	0.3804
rs2648862	129.130967	CC	48(64.0)	48(68.6)		
		CA	27(36.0)	21(30.0)		

续表 3 PVT1 5 种 SNPs 多态性在 2 组样本中比较

SNP 位点	位置(Mb)	基因型	糖尿病肾病组[n(%)]	糖尿病组[n(%)]	OR(95%CI)	P
rs2720709	129.127538	AA	0(0.0)	1(1.4)	0.82(0.44~1.53)	0.5267
		GA	22(29.3)	23(15.8)		
		GG	33(44.0)	38(47.4)		
rs2648875	129.141343	AA	20(26.7)	9(36.8)	0.70(0.44~1.12)	0.1378
		GA	29(38.7)	36(51.4)		
		GG	28(37.3)	30(42.9)		
			18(24.0)	4(5.7)	0.50(0.31~0.82)	0.0057

3 讨 论

糖尿病肾病是糖尿病严重的微血管慢性并发症之一,是终末期肾病(ESRD)的主要原因,也是导致透析和肾移植的常见原因之一^[5-6]。在我国这一比例在逐年上升。糖尿病肾病在 I 型糖尿病中的患病率为 33%~40%,II 型糖尿病中的患病率为 20%~25%^[7-8]。糖尿病肾病表现为高血压、蛋白尿、水肿及肾功能不全等,这主要是由于糖尿病代谢异常引发肾小球硬化,从而导致肾功能障碍和损害。病理学上 糖尿病肾病 表现为肾小球肥大,肾小球基底膜增厚,系膜基质增宽,最后导致肾小球纤维化、硬化^[9]。遗传因素不仅与 糖尿病肾病 的发生和发展密切相关,而且还决定了 糖尿病肾病 的易感性。糖尿病肾病 具有很明显的家族聚集性及种族差异,且不是所有的糖尿病患者都会并发 糖尿病肾病。PVT1 是作为肾衰竭或 ESRD 候选基因而在先前确定的,PVT1 可能降低肾脏过滤血液的能力,从而导致肾脏疾病、肾功能衰竭和死亡,该研究小组发现,在高血糖(常伴有糖尿病)的情况下,PVT1 的表达水平增高至 5 倍平均值^[10-11]。美国明尼苏达大学的研究人员发现,PVT1 的过度表达因 8q24.21 的放大而促成高水平的 MYC,同时也促成由 MYC 驱动的肿瘤发生。MYC 和 PVT1 水平在人类肿瘤中也是相互关联的,说明二者之间存在类似的相关性^[12]。Hanson 等^[3] 和 Millis MP 等^[4] 的研究发现 PVT1 (rs2720709A > G)与 I 型和 II 型糖尿病引起 ESRD 有关联,此外 Millis MP 等^[4] 的研究发现 rs13447075、rs2648862、rs10808565、rs134470751 型糖尿病引起 ESRD 有一定关联性。Maisaa Alwohaib 等^[13] 的研究也表明 G 等位基因的高频改变可能与 II 型糖尿病有或没有肾病的发展相关。Robert L. Hanson 等^[14] 对 PVT1 所有外显子、外显子内含子边界进行测序,确定了 47 个变异,发现 PVT1 rs2720709 与 rs2648875 位点与 II 型糖尿病引起 ESRD 有强烈的相关性。

本研究利用已有的文献资料^[3-4] 及其相应的生物信息数据库(如 dbSNP, HapMap 等)初步筛选比较适合的易感性 SNPs 位点 (rs10808565、rs13447075、rs2648862、rs2720709、rs2648875), 使用 Haplovie 软件经 Hardy-Weinberg 平衡检验 SNP 基因型和等位基因频率分布, 使用 SPSS13.0 软件进行分析, rs2648875 位点多态性在两组中有显著性差异, 表明此位点与糖尿病肾病的发病存在相关性; 其他位点 rs10808565、rs13447075、rs2648862、rs2720709 基因多态性与糖尿病肾病易感性无关。与国内唯一的关于 PVT1 基因多态性与糖尿病肾病相关性的研究报道,郑萍等^[15] 对连云港市汉族 II 型糖尿病患者的 PVT1 (rs2720709A > G) 基因多态性与该地区汉族人的糖尿病肾病易感性无关,结果呼应。

由于人种及地域之间的遗传差异,很多在国外其他人群中报道的易感基因以及 SNPs 在中国人群中的相关性仍然有待

进一步验证,国内外研究发现的位点也非常少,本研究中涉及标本量的因素,PVT1 基因与糖尿病肾病相关性的研究还有待大样本深入研究。

参考文献

- Graham M, Adams JM. Chromosome 8 breakpoint far 3' of the c-myc oncogene in a Burkitt's lymphoma 2;8 variant translocation is equivalent to the murine pvt-1 locus [J]. EMBO J, 1986, 5(11):2845-2851.
- Mengle-Gaw L, Rabbitts TH. A human chromosome 8 region with abnormalities in B cell, HTLV-1+T cell and c-myc amplified tumours[J]. EMBO J, 1987, 6(17):1959-1965.
- Hanson RL, Bogardus C, Duggan D, et al. A search for variants associated with young-onset type 2 diabetes in American Indians in a 100 K genotyping array[J]. Diabetes 2007, 56(30):3045-3052.
- Millis MP, Bowen D, Kingsley C, et al. Variants in the plasmacytoma variant translocation gene (PVT1) are associated with end-stage renal disease attributed to type 1 diabetes[J]. Diabetes, 2007, 56(12):3027-3032.
- 卢伟波,李舒敏.糖尿病肾病早期诊断的研究进展[J].中国当代医药,2014,21(2):191-193.
- Tang SC, Yiu WH, Lin M, et al. Diabetic Nephropathy and Proximal Tubular Damage[J]. J Ren Nutr, 2015, 25(2):230-233.
- 李敏州,高彦彬,马鸣飞,等.糖尿病肾病发病机制研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(2):344-348.
- 李俊燕,谭英姿,冯国鄞,等.糖尿病肾病遗传学研究进展[J].遗传学,2012,12,34(12):1537-1544.
- 李娜,孙汇,王拓,等.糖尿病肾病发病机制研究进展[J].北华大学学报(自然科学版),2012,2,13(1):68-72.
- Alvarez ML, Distefano JK. Functional characterization of the plasmacytoma variant translocation 1 gene (PVT1) in diabetic nephropathy[J]. PLoS One, 2011, 6(4):e18671.
- Alvarez ML, Khosroheidari M, Eddy E, et al. Role of microRNA 1207-5P and its host gene, the long non-coding RNA pvt1, as mediators of extracellular matrix accumulation in the kidney: implications for diabetic nephropathy [J]. PLoS One, 2013, 8(10):e77468.
- Tseng YY, Moriarity BS, Gong W, et al. PVT1 dependence in cancer with MYC copy-number increase[J]. Nature, 2014, 512(1):82-86.

(下转第 2198 页)

体会自动开启纤溶激活系统,促使血栓溶解,纤溶系统激活后形成纤溶酶,降解后形成纤维蛋白,逐渐形成碎片,大量的碎片形成后就形成D-D^[3]。研究指出,D-D是纤维蛋白特异性降解产物,是反映机体高凝状态和继发纤溶增高的特异性指标^[4]。结果显示,D-D是DVT形成的独立危险因素,可见其升高说明血液处于高凝状态,血管内微小颗粒聚集,堵塞血管。

FIB是血浆中浓度最高的凝血因子,在凝血酶作用下转变为纤维蛋白单体,沉积在血管壁中形成血栓^[5]。结果显示,术后创伤性骨折患者FIB水平均显著高于对照组,且DVT患者FIB水平显著升高,分析原因可能是手术应激造成凝血系统紊乱,促使血液处于高凝状态,另外和血浆凝血因子部分消耗也有关,影响因素较多。故其可作为判断创伤性骨折患者DVT形成的参考指标,非特异性指标。

TAT是凝血酶形成和抗凝血酶Ⅲ形成的复合物,代表凝血酶生成和活性增高,对血液高凝状态敏感性高、特异性良好^[6]。研究指出,TAT中的t-PA是血管内控制纤溶系统关键,在血管损伤和血栓形成下会释放入血,对纤维蛋白高度亲和,当纤维蛋白形成后,其表面会出现很强的酶活性,促使纤溶酶生成,促使蛋白纤维溶解^[7]。当TAT显著升高,说明血液处于高凝状态,是形成DVT的危险因素,而这点在本次结论中得到了证实。

研究指出,纤维蛋白溶解系统中最基本、最核心的PIg,在内外激活酶作用下会激活纤溶酶,清除血管内形成和沉积的纤维蛋白,防止血栓形成^[8]。另外,纤溶系统中一些活化剂能灭活纤溶酶,从而起到调节作用。PAgT是反映血小板聚集的敏感指标,创伤性骨折后,血小板黏附、激活和聚集,形成血小板血栓,初步止血形成,后在凝血瀑布反应下血小板表面释放出血小板第四因子,造成血液处于高凝状态^[9]。

结果显示,创伤性骨折后DVT患者的FIB、PAgT、D-D、TAT、PIg含量显著发生变化,以升高为主,且阳性率偏高。但经Logistic回归分析后,发现仅有D-D、TAT是DVT形成独立危险因素,这点与文献[10-11]结论一致。针对此,在围术期要适当应用阿司匹林、低分子肝素钙等药物进行抗凝治疗,以防止DVT发生。本研究中PT、APTT水平在各组中均无明显变化,与文献[12]结果不一致,可能与纳入样本量小、研究时间短和着重点不同有关,但PT、APTT是临幊上最常用的凝血功能指标,其是否和DVT形成有相关性仍值得继续探讨。

参考文献

- [1] 范文,周慧,刘燕捷.外伤骨折凝血功能等常规实验检测的改变及其临床意义[J].血栓与止血学,2013,19(3):129-131.
- [2] 肖欢,高洁,金艳荣,等.妊娠期血栓前状态孕妇凝血功能的变化分析[J].首都医科大学学报,2016,37(3):382-384.
- [3] Fatih A, Bahadir K, Serkan S, et al. Association between inherited thrombophilia and impaired right ventricular function in deep vein thrombosis without symptomatic pulmonary embolism [J]. Clin Appl Thromb Hemost, 2014, 20(3):270-277.
- [4] Singh TA, Devi KR, Ahmed G, et al. Microbial and endogenous origin of fibrinolytic activity in traditional fermented foods of Northeast India [J]. Food Res Int, 2014, 55(7):356-362.
- [5] Bi QQ, Chu JX, Feng YL, et al. Purification and characterization of a new serine protease with fibrinolytic activity from the Marine invertebrate, Urechis unicinctus [J]. Appl Biochem Biotechnol, 2013, 170(3):525-540.
- [6] Salar O, Holley J, Baker B, et al. Omitting pre-operative coagulation screening tests in hip fracture patients: stopping the financial cascade? [J]. Injury, 2014, 45(12):1938-1941.
- [7] Wolfgang T, Peter D, Bernhard I, et al. Stress ulcer prophylaxis, thromboprophylaxis and coagulation management in patients with hip fractures [J]. Wien Med Wochenschr, 2013, 163(19/20):442-447.
- [8] 谢乃潺,钟志强,陈尊荣,等.56例骨折患者围术期凝血及纤溶系统变化研究[J].中国当代医药,2011,18(1):13-14.
- [9] Ali SM, Ling TC, Muniandy S, et al. Recovery and partial purification of fibrinolytic enzymes of Auricularia polytricha(Mont.)Sacc by an aqueous two-phase system [J]. Separa Purif Technol, 2014, 1(3):359-366.
- [10] 梁春玲,王沂峰.妇科手术对患者凝血和纤溶系统的短期影响[J].广东医学,2015,5(10):1576-1579.
- [11] 欧阳秀莲,秦翠萍,闭雄杰.妇科恶性肿瘤术后下肢深静脉血栓形成及手术前后凝血和纤溶系统的变化[J].中国厂矿医学,2007,20(1):9-11.
- [12] 高阳,芦琳,张甦颖,等.深静脉血栓形成患者凝血、抗凝、纤溶系统功能改变及临床意义[J].中国交通医学杂志,2016,20(2):184-185.

(收稿日期:2017-02-09 修回日期:2017-04-09)

(上接第2195页)

- [13] Alwolhaib M, Alwaheeb S, Alyatama N, et al. Single nucleotide polymorphisms at erythropoietin, superoxide dismutase 1, splicing factor, arginine/serin-rich 15 and plasmacytoma variant translocation genes association with diabetic nephropathy[J]. Saudi J Kidney Dis Transpl, 2014, 25(3):577-581.
- [14] Hanson RL, Craig DW, Millis MP, et al. Identification of PVT1 as a candidate gene for end-stage renal disease in

type 2 diabetes using a pooling-based genome-wide single nucleotide polymorphism association study[J]. Diabetes, 2007, 56(4):975-983.

- [15] 郑萍,田小平,徐宁,等.PVT1基因rs2720709多态性与2型糖尿病肾病的相关性[J].江苏医药,2014,40(6):663-665.

(收稿日期:2017-02-15 修回日期:2017-04-22)