

雌激素受体  $\beta$  基因 AluI、RsaI 位点多态性与妊娠期糖尿病易感性研究\*马丽媛<sup>1</sup>, 李超<sup>2△</sup>, 王伟伟<sup>3</sup>

(1. 青岛大学医学部, 山东青岛 266003; 2. 青岛大学附属医院产科, 山东青岛 266003;

3. 临沂市中心医院产科, 山东临沂 276400)

**摘要:**目的 探讨雌激素受体  $\beta$ (ER $\beta$ )基因 AluI、RsaI 酶切位点基因多态性与妊娠期糖尿病(GDM)易感性关系。方法 选择青岛大学附属医院首诊的 GDM 患者 115 例为研究对象作为 GDM 组,并配对选择同期健康孕妇 115 例作为健康对照组,采用 PCR-限制性片段长度多态性技术(PCR-RFLP)对 ER $\beta$  基因 AluI、RsaI 位点单核苷酸多态性进行检测,分析其与 GDM 易感性关系并进行统计学分析。结果 AluI 位点多态性在 GDM 组、健康对照组中表达差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),携带 AA(OR:1.973,95%CI:1.306~2.391, $P = 0.012$ )、Aa(OR:1.426,95%CI:1.112~1.685, $P = 0.023$ )基因型会显著增加 GDM 发病风险,合并分析显示携带 A 等位基因较 a 等位基因 GDM 发病风险可增加 1.755 倍(95%CI:1.287~2.061, $P = 0.019$ );RsaI 位点多态性在 GDM 组、健康对照组中表达差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),与 GDM 易感性无显著关联( $P > 0.05$ )。携带 AluI 位点 AA、Aa 基因型患者产前体质量指数、空腹血糖浓度及稳态模式评估法(HOMA-IR)显著高于 aa 型患者,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),空腹胰岛素显著低于 aa 型患者,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论 ER $\beta$  基因 AluI 位点多态性可能与 GDM 易感性相关,A 等位基因是 GDM 危险因素,可能加重妊娠期糖代谢紊乱。

**关键词:**雌激素受体  $\beta$ ; AluI; RsaI; 妊娠期糖尿病; 易感性

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2019.09.010

中图法分类号:R714.256

文章编号:1673-4130(2019)09-1062-04

文献标识码:A

The relationship between polymorphisms of AluI and RsaI of estrogen receptor  $\beta$  and susceptibility to gestational diabetes mellitus\*MA Liyuan<sup>1</sup>, LI Chao<sup>2△</sup>, WANG Weiwei<sup>3</sup>

(1. Department of Medicine, Qingdao University, Qingdao, Shandong, 266003 China;

2. Department of Obstetrics, the Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao, Shandong 266003, China;

3. Department of Obstetrics, the Central Hospital of Linyi, Linyi, Shandong 276400, China)

**Abstract: Objective** To investigate the relationship between polymorphisms of AluI and RsaI of estrogen receptor  $\beta$  (ER $\beta$ ) and susceptibility to gestational diabetes mellitus (GDM). **Methods** A total of 115 patients with GDM who were first diagnosed in the Affiliated Hospital of Qingdao University were selected as subjects (GDM group), and 115 healthy pregnant women were selected as control group. Polymorphisms at AluI and RsaI loci of ER $\beta$  gene were detected by PCR-RFLP, and their susceptibility to GDM was analyzed. **Results** AluI polymorphisms were significantly different between GDM group and control group ( $P < 0.05$ ), carriers of AA (OR:1.973,95%CI:1.306-2.391, $P = 0.012$ ) and Aa (OR:1.426,95%CI:1.112-1.685, $P = 0.023$ ) genotypes significantly increased the risk of GDM, the combined analysis showed that the risk of GDM in patients carrying A allele was 1.755 times higher than that in patients carrying a allele (95%CI:1.287-2.061, $P = 0.019$ ). There was no significant difference in RsaI polymorphism between GDM group and control group ( $P > 0.05$ ), and no significant correlation with GDM susceptibility ( $P > 0.05$ ). The prenatal BMI, fasting blood glucose and homeostatic model assessment for insulin resistance (HOMA-IR) were significantly higher in patients with AA and Aa than those with aa, and the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ), and fasting insulin was significantly lower than those in patients with aa, and the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The AluI polymorphism of ER $\beta$  may be associated with GDM susceptibility, and

\* 基金项目:山东省医药卫生科技发展计划基金资助项目(2016WS0274)。

作者简介:马丽媛,青岛大学医学部,硕士在读,住院医师,主要从事妊娠相关疾病临床与基础方面的研究。△ 通信作者,E-mail:lichaoqy@126.com。

本文引用格式:马丽媛,李超,王伟伟.雌激素受体  $\beta$  基因 AluI、RsaI 位点多态性与妊娠期糖尿病易感性研究[J].国际检验医学杂志,2019,40(9):1062-1065.

A allele is a risk factor for GDM and may aggravate the disorder of glucose metabolism during pregnancy.

**Key words:** estrogen receptor  $\beta$ ; AluI; RsaI; gestational diabetes mellitus; susceptibility

妊娠期糖尿病(GDM)是孕妇妊娠期常见代谢异常疾病,我国 GDM 患病率为 3%~8%,高于同期国际水平<sup>[1]</sup>。GDM 多发生于妊娠中后期,患者不仅妊娠期高血压、子痫前期、远期糖尿病患病风险升高,且易出现早产、巨大儿、新生儿呼吸窘迫症等新生儿疾病<sup>[2]</sup>,严重威胁母婴健康。GDM 发病机制复杂,涉及炎症应答、代谢紊乱及免疫异常等机体内系统失衡,由于 GDM 与 2 型糖尿病具有遗传相似性,故遗传易感性也被认为是 GDM 发病的关键因素之一,并且得到诸多研究证实<sup>[3]</sup>。雌激素通过雌激素受体(ER)发挥多种生物学效应,可在妊娠中晚期对抗孕激素作用,从而降低脂肪、肌肉组织胰岛素敏感性,导致 GDM 发生<sup>[4]</sup>。本研究通过对雌激素受体  $\beta$ (ER $\beta$ ) 基因 AluI、RsaI 酶切位点基因多态性进行分析,探讨 ER $\beta$  基因与 GDM 遗传易感性关系,以期对 GDM 早期预防、干预提供理论依据。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选择青岛大学附属医院(下称本院)2017 年 1—12 月首诊 GDM 患者 115 例作为 GDM 组,GDM 诊断标准:孕妇空腹血糖 $\geq 5.1$  mmol/L,口服 75 g 葡萄糖 1 h $\geq 10.0$  mmol/L、2 h $\geq 8.5$  mmol/L,3 项检测结果满足其中 1 项或以上则诊断为 GDM<sup>[5]</sup>。平均(31.2 $\pm$ 4.7)岁,平均孕周(38.3 $\pm$ 1.2)周,产前体质量指数(BMI)为(24.7 $\pm$ 3.1)kg/m<sup>2</sup>。另配对选取同期本院健康孕妇 115 例作为健康对照组,平均(31.9 $\pm$ 4.2)岁,平均孕周(38.6 $\pm$ 1.1)周,BMI(24.3 $\pm$ 2.8)kg/m<sup>2</sup>。排除标准:(1)具有吸烟史、饮酒史;(2)孕前患有高血压、2 型糖尿病,或甲状腺功能亢进或减退等疾病;(3)辅助生殖技术受孕;(4)孕前 3 个月内或孕期使用皮质类固醇类药物史。两组孕妇均为汉族人群,在年龄、孕周等一般资料比较中差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),具有可比性。本研究医院伦理委员会支持,所有入组者均知晓本研究目的、过程及意义,签署知情同意书。

## 1.2 方法

**1.2.1 标本采集** 孕妇空腹 12 h 于次日清晨取乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K<sub>2</sub>)抗凝管、肝素抗凝管静脉血各 5 mL,肝素抗凝血 3 500 r/min 离心 5 min 后用于空腹血糖(FBG)、空腹胰岛素(FIN)测定,EDTA-K<sub>2</sub>抗凝于-80℃冰箱保存待测。

**1.2.2 生化指标测定** FBG 于本院检验科采用日立 7600 全自动生化分析仪测定,FIN 采用罗氏 Cobas E602 全自动电化学发光分析仪测定,均购买成品试剂盒,严格按照试剂盒说明书进行检测,实验室湿度、温度均符合检测要求。稳态模式评估(HOMA-IR)指数=空腹血糖 $\times$ 空腹血胰岛素/22.5。

**1.2.3 待测基因位点 PCR 扩增** 采用北京天根生化科技公司提供的全血 DNA 提取试剂盒进行总 DNA 提取,严格按照试剂盒说明书进行操作,分光光度仪 260/280 吸光度值在 1.6~2.0 之间为合格 DNA 标本。引物由上海生工生物工程技术有限公司设计并合成,参考相关文献序列如下<sup>[5]</sup>:RsaI 上游 5'-TCT TGC TTT CCC CAG GCT TT-3',下游 5'-ACC TGT CCA GAA CAA GAT CT-3',AluI 上游 5'-GAC CTG CTG CTG GAG ATG CT-3',下游 5'-AAT GAG GGA CCA CAG CA-3'。以提取 DNA 为模板进行 PCR 扩增,PCR 反应体系:DNA 1.0  $\mu$ L(0.15  $\mu$ g/ $\mu$ L)、上游及下游引物各 5.0  $\mu$ L、10 $\times$ PCR 反应缓冲液 2.5  $\mu$ L、dNTP 0.5  $\mu$ L(10 mmol/L)、Taq-DNA 聚合酶 0.5  $\mu$ L(5 U/ $\mu$ L),余以双蒸水补足 25  $\mu$ L。循环参数设置:94℃预变性 4 min,95℃30 s,62℃退火 40 s,72℃延伸 40 s,共 35 个循环。扩增产物于-4℃保存。

**1.2.4 RFLP 分析** 取 PCR 扩增 DNA 产物 10  $\mu$ L、限制性内切酶各缓冲液 1  $\mu$ L 在 37℃水浴箱内酶切 3 h。终止反应后以 2%琼脂糖凝胶电泳分离 30 min,溴化乙锭染色(0.5  $\mu$ g/mL),将酶切凝胶置于紫外凝胶成像仪成像判断基因型。RsaI 酶切区分 RR 基因型(片段长度为 125、31 bp)、rr 基因型(片段长度为 156 bp)、Rr 基因型(片段长度为 156、125、31 bp),AluI 酶切区分 AA 基因型(片段长度为 240、67 bp)、aa 基因型(片段长度为 307 bp)、Aa 基因型(片段长度为 307、240、67 bp)。

**1.3 统计学处理** 所有数据均采用 SPSS17.0 软件统计包进行分析。计数资料采用  $\chi^2$  检验,计量资料采用  $t$  检验;采用拟合优度皮尔森  $\chi^2$  检验对 GDM 组、对照组 AluI、RsaI 基因型分布是否符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡进行检测;非条件 Logistic 回归分析基因多态性与 GDM 易感性关系,以比值比(OR)及 95%可信区间(CI)进行描述风险度,并经民族、年龄、家族史、妊娠次数等变量校正。所有检测结果均以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 基因型分布** GDM 组与对照组 AluI 位点 AA 基因型、Aa 基因型、aa 基因型分布符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡规律, $P > 0.05$ 。GDM 组与对照组 RsaI 位点 RR 基因型、Rr 基因型、rr 基因型分布符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡规律, $P > 0.05$ 。表明本研究选择对象基因型具有群体代表性。

**2.2 AluI、RsaI 位点基因型易感性分析** GDM 组 AluI 位点 AA 型基因、Aa 基因型比例显著高于健康对照组,aa 型基因显著低于健康对照组,差异有统计

学意义( $P < 0.05$ );基因易感性分析显示,AA、Aa 基因型孕妇会增加 GDM 患病相对风险度( $OR: 1.973, 95\%CI: 1.306 \sim 2.391, P = 0.012; OR: 1.426, 95\%CI: 1.112 \sim 1.685, P = 0.023$ ),合并分析显示 A 等位基因 GDM 患病风险高于 a 等位基因( $OR: 1.755,$

$95\%CI: 1.287 \sim 2.061, P = 0.019$ )。见表 1。RsaI 位点 RR、Rr、rr 基因型在 GDM 组、健康对照组表达差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),基因易感性分析显示该位点基因型与 GDM 患病无显著关系( $P > 0.05$ )。见表 2。

表 1 AluI 位点基因型易感性分析[n(%)]

基因型	GDM 组(115 例)	对照组(115 例)	$\chi^2/P$	OR(95%CI)	P
AA	22(19.2)	15(13.0)	7.752/0.021	1.973(1.306~2.391)	0.012
Aa	51(44.3)	37(32.2)		1.426(1.112~1.685)	0.023
aa	42(36.5)	63(54.8)		1	
A	95(41.3)	67(29.1)	7.470/0.006	1.755(1.287~2.061)	0.019
a	135(58.7)	163(70.9)		1	

表 2 RsaI 位点基因型易感性分析[n(%)]

基因型	GDM 组(115 例)	对照组(115 例)	$\chi^2/P$	OR(95%CI)	P
RR	42(36.5)	46(40.0)	0.897/0.639	1.115(0.892~1.306)	0.237
Rr	57(49.6)	50(43.5)		0.953(0.857~1.228)	0.184
rr	16(13.9)	19(16.5)		1	
R	141(61.3)	142(61.7)	0.009/0.924	1.089(0.866~1.279)	0.191
r	89(38.7)	88(38.3)		1	

**2.3 不同基因型 GDM 患者生化指标比较** 将 GDM 患者按照 AluI 位点不同基因型进行分组生化指标比较,AA+Aa 基因型患者产前 BMI、0 h 血糖及 HOMA-IR 指数显著高于 aa 基因型患者,0 h 胰岛素显著低于 aa 基因型患者,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表 3。RsaI 位点与 GDM 无易感性,未做分析。

表 3 不同基因型 GDM 患者生化指标比较( $\bar{x} \pm s$ )

指标	基因型		t	P
	AA+Aa(73 例)	aa(42 例)		
孕周	38.2±1.2	38.5±1.4	1.213	0.113
产前 BMI(kg/m <sup>2</sup> )	25.4±3.52	24.3±2.8	1.848	0.033
OGTT-血糖(mmol/L)				
0 h	6.5±0.9	5.8±0.6	4.996	0.001
1 h	12.5±1.6	12.1±1.3	1.378	0.085
2 h	8.6±1.2	8.9±1.2	1.290	0.099
OGTT-胰岛素(mU/L)				
0 h	14.2±2.8	15.3±2.7	2.054	0.021
1 h	87.6±9.6	85.3±9.9	1.223	0.111
2 h	96.1±15.7	92.4±14.2	1.259	0.105
HOMA-IR 指数	4.5±0.7	4.0±0.5	4.067	0.001

### 3 讨论

GDM 是一种妊娠期女性首次被检测出糖耐量或糖代谢异常疾病,多发于妊娠中晚期,虽然多数 GDM 患者在产后可恢复正常糖代谢,但是在妊娠过程中其

仍然是孕妇、新生儿相关疾病主要危险因素之一。GDM 不仅会增加孕妇妊娠意外概率,还可因为长期高浓度血糖导致抗感染能力下降而发生生殖系统感染,此外 GDM 还可导致分娩结果改变、早产、巨大婴儿及孕妇远期糖尿病等,危及产妇及新生儿安全<sup>[1-2]</sup>。雌激素是女性内分泌系统中重要激素之一,在妊娠早期生理浓度的雌激素可通过上调胰岛素受体表达来增加脂肪、肌肉组织胰岛素敏感度<sup>[6]</sup>,但是当孕周增加至中晚期妊娠时体内雌激素浓度增加,相对高浓度雌激素会通过影响胰岛素受体表达及对抗孕激素作用,导致机体血糖利用能力下降,出现妊娠期糖尿病<sup>[7]</sup>。介导雌激素生物学效应的主要是 ER $\alpha$  和 ER $\beta$ ,有研究显示控制这两种受体表达的基因会由于等位基因多态性而影响其表达及生物学功能,导致多种疾病发生<sup>[5,8]</sup>。基因多态性是一种较为常见的生理现象,随着分子生物学技术的发展,这一领域也得到更为深入的研究,目前认为其与多种疾病遗传易感性相关<sup>[9]</sup>。本课题组前期研究发现 ER $\alpha$  基因 Pvu II、Xba I 酶切位点多态性与 GDM 相关<sup>[10]</sup>,但是 ER $\beta$  基因多态性与 GDM 有无遗传易感性目前还尚未见报道。

ER $\beta$  基因位于染色体 14q23.2,有两种常见基因多态性位点,RsaI 位点:在 ER $\beta$  基因 5 号外显子配体结合区的 1 082 号核苷酸由于点突变会出现 RsaI 内切酶特异性识别位点;AluI 位点:ER $\beta$  基因 8 号外显子 3,端非编码区的 1 730 号核苷酸发生点突变出现 AluI 内切酶特异性识别位点<sup>[11]</sup>。ER $\beta$  基因 RsaI 位点、AluI 位点多态性被证实与多种临床疾病相关。

SHOUKRY 等<sup>[12]</sup>对 200 例绝经后女性骨质疏松患者 RsaI 位点进行多态性分析,发现 R 基因可能与绝经后女性骨质疏松症易感性相关,而另一等位基因 r 则是该病的保护因素。基于雌激素及雌激素受体在孕期中动态变化,ER $\beta$  基因多态性也是妊娠相关疾病研究热点。DOMÍNGUEZ 等<sup>[13]</sup>在围生期抑郁发病危险因素研究中发现 AluI 位点 A 等位基因呈差异性,风险分析显示 A 等位基因是围生期抑郁高危因素。殷艳等<sup>[14]</sup>的一项流行病学调查发现,AluI 位点 A 基因是维吾尔族妇女妊娠期胆汁淤积症危险因素,而 RsaI 位点 R 等位基因是其保护因素。

本研究对 GDM 患者 ER $\beta$  基因多态性进行分析,GDM 组与对照组基因型分布均符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡规律,提示选择对象具有群体代表性。研究结果显示 GDM 组 AluI 位点基因型与对照组相比差异有统计学意义,AA、Aa 基因型孕妇会增加 GDM 患病风险,A 等位基因可能是 GDM 易感性基因。RsaI 位点各基因型在 GDM 组、对照组差异无统计学意义,亦与 GDM 无易感相关性。GDM 主要表现为血糖、胰岛素异常及胰岛素抵抗现象,且雌激素受体在孕期中与糖代谢密切相关,本研究选择与 GDM 具有易感相关性的 AluI 位点基因进行相关指标分析,结果显示,AA+Aa 基因型患者血糖、胰岛素抵抗高于 aa 基因型,而胰岛素低于 aa 基因型,与该位点基因型在 GDM、健康人群中分布结果相符。本研究推测 a 等位基因调控的相关蛋白可能在雌激素信号传递过程中发挥关键作用,通过影响信号传导来调控终端胰岛素敏感性<sup>[15]</sup>,该基因型可能具有更高效胰岛素利用功能。

#### 4 结 论

通过本次研究发现,ER $\beta$  基因 AluI 位点多态性可能与 GDM 易感性相关,A 等位基因具有高 GDM 患病风险,且 A 等位基因患者糖代谢异常更为严重。本研究成果丰富了 GDM 的遗传因素相关理论,为 GDM 预防和后期干预提供新的依据。但是本研究还存在一定局限性,如样本例数较少、非多中心研究等,还需加强后续研究,以期进一步明晰 GDM 遗传易感性机制。

#### 参考文献

[1] LIU W Y, ZHANG B, HUANG Z, et al. Cadmium body burden and gestational diabetes mellitus: a prospective study[J]. *Environ Health Perspect*, 2018, 126(2): 027006.  
 [2] CHEN H Q, ZOU S H, YANG J B, et al. Maternal and neonatal outcomes of pregnancy at 39 weeks and beyond with mild gestational diabetes mellitus[J]. *Ginekol Pol*, 2017, 88(7): 366-371.  
 [3] TARNOWSKI M, MALINOWSKI D, PAWLAK K, et al.

GCK, GCKR, FADS1, DGKB/TMEM195 and CDKAL1 gene polymorphisms in women with gestational diabetes[J]. *Can J Diabetes*, 2017, 41(4): 372-379.  
 [4] VILLARROEL C, SALINAS A, LÓPEZ P, et al. Pregestational type 2 diabetes and gestational diabetes exhibit different sexual steroid profiles during pregnancy[J]. *Gynecol Endocrinol*, 2017, 33(3): 212-217.  
 [5] 吴芹, 马桂芳, 孙金霞, 等. ER $\alpha$  基因 Pvu II, Xba I 和 ER $\beta$  基因 Rsa I, Alu I 酶切多态性与冠心病的相关性研究[J]. *国际检验医学杂志*, 2017, 38(22): 3116-3119.  
 [6] TREBOTIC L K, KLIMEK P, THOMAS A, et al. Circulating betatrophin is strongly increased in pregnancy and gestational diabetes mellitus[J]. *PLoS One*, 2015, 10(9): e0136701.  
 [7] SHI Z H, ZHAO C, GUO X R, et al. Differential expression of microRNAs in omental adipose tissue from gestational diabetes mellitus subjects reveals miR-222 as a regulator of ER $\alpha$  expression in estrogen-induced insulin resistance[J]. *Endocrinology*, 2014, 155(5): 1982-1990.  
 [8] SHEN CHUNYU, CHEN Z L, MAHMOODURRAHMAN M, et al. Single nucleotide polymorphisms of ER $\beta$  and coronary atherosclerotic disease in Chinese Han women[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(2): 2044-2050.  
 [9] GULUBOVA M, ALEKSANDROVA E, VLAYKOVA T. Promoter polymorphisms in TGFB1 and IL10 genes influence tumor dendritic cells infiltration, development and prognosis of colorectal cancer[J]. *J Gene Med*, 2018, 20(2/3): e3005.  
 [10] 周玉彬, 李超, 詹瑛, 等. ER $\alpha$  基因多态性与妊娠期糖尿病发病的关系[J]. *中华妇产科杂志*, 2017, 51(10): 773-776.  
 [11] LE A W, WANG Z H, YUAN R, et al. Association of the estrogen receptor- $\beta$  gene RsaI and AluI polymorphisms with human idiopathic thin endometrium[J]. *Genet Mol Res*, 2013, 12(4): 5978-5985.  
 [12] SHOUKRY A, SHALABY S M, ETEWA R L, et al. Association of estrogen receptor  $\beta$  and estrogen-related receptor  $\alpha$  gene polymorphisms with bone mineral density in postmenopausal women[J]. *Mol Cell Biochem*, 2015, 405(1/2): 23-31.  
 [13] DOMÍNGUEZ-ORDÓÑEZ R, GARCÍA-JUÁREZ M, LIMA-HERNÁNDEZ F J, et al. Estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  are involved in the activation of lordosis behavior in estradiol-primed rats[J]. *Horm Behav*, 2016, 86(1): 1-7.  
 [14] 殷艳, 李芳, 王冬梅. 维吾尔族雌激素  $\rho$  受体基因多态性与妊娠期肝内胆汁淤积症的相关性分析[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2012, 29(3): 319-322.  
 [15] PARK Y M, PEREIRA R I, ERICKSON C B, et al. Estradiol-mediated improvements in adipose tissue insulin sensitivity are related to the balance of adipose tissue estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  in postmenopausal women[J]. *PLoS One*, 2017, 12(5): e0176446.