

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.30.015

血管内皮生长因子及对氧磷酶 1 基因多态性与糖尿病视网膜病变的相关性*

卫钦锋¹, 李先加²

(1. 西宁市第二人民医院眼科 810003; 2. 青海大学医学院藏医学院藏医系, 西宁 810003)

[摘要] **目的** 探讨血管内皮生长因子(VEGF)、对氧磷酶 1(PON1)基因多态性与糖尿病视网膜病变(DR)的相关性。**方法** 选取 2013 年 1 月至 2015 年 12 月西宁市第二人民医院收治的糖尿病(DM)患者 168 例,将其分为 DM 组(48 例)、增殖性 DR(PDR)组(66 例)和非增殖性 DR(NPDR)组(54 例);另选取同期体检健康者 104 例作为对照组(NC 组)。通过聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)测定血管内皮生长因子(VEGF)和对氧磷酶 1(PON1)基因多态性,采用紫外分光光度计检测所有受试者超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)水平。**结果** 与 NC 组比较,DM 组、NPDR 组及 PDR 组收缩压、糖化血红蛋白水平明显升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$);而舒张压、胆固醇、三酰甘油、高密度脂蛋白水平比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。PDR 组和 NPDR 组收缩压比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),而舒张压、胆固醇、三酰甘油、高密度脂蛋白、糖化血红蛋白水平比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。CC、CT、TT 基因型患者 DR 发生率分别为 71.05%、56.27%、38.64%,CC 基因型患者 DR 发生率明显高于 CT 和 TT 基因型患者,差异有统计学意义($P < 0.05$)。PON1 192 位点不同基因型健康体检者 SOD、MDA 水平比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$),QQ 基因型 DR 患者体内 SOD 水平低于 QR、RR 基因型患者,MDA 水平高于 QR、RR 基因型患者,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** VEGF、PON1 基因的表达影响 DR 的发生和进展,PON1 基因可能通过影响 DR 患者体内氧化应激酶的表达控制疾病的发展。

[关键词] 血管内皮生长因子;对氧磷酶 1;多态性,单核苷酸;糖尿病视网膜病变**[中图分类号]** R774.1**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2017)30-4223-03

Correlation between vascular endothelial growth factor and paraoxonase 1 gene polymorphism with diabetic retinopathy*

Wei Qin Feng¹, Li Xian Jia²

(1. Department of Ophthalmology, Second People's Hospital of Xining City, Xining, Qinghai 810003, China;

2. Department of Tibetan Medicine, Medical College of Qinghai University, Xining, Qinghai 810003, China)

[Abstract] **Objective** To explore the correlations of vascular endothelial growth factor (VEGF) and paraoxonase 1 (PON1) gene polymorphism with diabetic retinopathy. **Methods** A total of 168 patients with diabetes mellitus(DM) in the Second People's Hospital of Xining City were selected from January 2013 to December 2015, and were divided into the DM group (48 cases), proliferative diabetic retinopathy (PDR) group (66 cases) and non-proliferative diabetic retinopathy (NPDR) group (54 cases). A total of 104 healthy subjects were selected as the control group (NC group). The VEGF and PON1 gene polymorphisms were detected by using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP), and levels of superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) of all subjects were detected by using UV spectrophotometer. **Results** Compared with the NC group, the systolic blood pressures and glycated hemoglobin levels in the DM group, NPDR group and PDR group were significantly increased, there were statistically significant differences ($P < 0.05$). No statistically significant difference was found in diastolic blood pressure and levels of cholesterol, triglyceride, high density lipoprotein among these groups ($P > 0.05$). There was statistically significant difference in systolic blood pressure between PDR group and NPDR group ($P < 0.05$), while no statistically significant difference was found in diastolic blood pressure and levels of cholesterol, triglyceride, high density lipoprotein and glycated hemoglobin between the two groups ($P > 0.05$). The incidence rate of DR in the patients with CC, CT and TT genotype was 71.05%, 56.27% and 38.64%, respectively. The incidence rate of DR in the patients with CC genotype was significantly higher than that in the patients with CT or TT genotype ($P < 0.05$). No statistically significant difference was found in SOD and MDA levels of healthy subjects with different PON1 192 genotypes ($P > 0.05$). The SOD level of DR patients with QQ genotype was lower than that of patients with QR or RR genotype, and the MDA level of DR patients with QQ genotype was higher than that of patients with QR or RR genotype, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** The expression of VEGF and PON1 genes could affect the development and progression of DR. PON1 gene might control the progression of DR by affecting the expression of oxidative kinase in DR patients.

[Key words] vascular endothelial growth factor; paraoxonase 1; polymorphism, single nucleotide; diabetic retinopathy

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是一种具有特异性的糖尿病(DM)微血管病变,是 DM 的并发症之一^[1-2]。

临床上将 DR 分为非增殖性 DR(NPDR)和增殖性 DR(PDR),前者无视网膜新生血管增生,而后者有视网膜新生血管增生,

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81560806)。 作者简介:卫钦锋(1970—),副主任医师,本科,主要从事眼科临床研究。

表 1 各组血压及生化指标水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	收缩压 (mm Hg)	舒张压 (mm Hg)	胆固醇 (mmol/L)	三酰甘油 (mmol/L)	高密度脂蛋白 (mmol/L)	糖化血红蛋白 (%)
NC 组	104	124.16±9.12	56.89±11.32	5.15±2.01	2.00±1.00	1.30±0.63	8.35±1.63
DM 组	48	151.14±17.11 ^a	70.21±14.15	4.28±1.46	1.98±0.01	1.34±0.29	9.21±2.67 ^a
NPDR 组	54	145.97±19.09 ^a	80.25±14.11	4.69±1.26	2.22±1.45	1.28±0.91	9.26±1.99 ^a
PDR 组	66	150.08±26.14 ^{ab}	77.44±15.86	4.91±1.02	2.04±1.67	1.27±0.83	9.14±2.18 ^a

^a: $P<0.05$,与 NC 组比较;^b: $P<0.05$,与 NPDR 组比较

医学上认为 NPDR 是 PDR 的前期^[3-5]。DR 的致盲概率大,据统计约 10% 的 DR 患者会丧失视力。我国 DM 患病率逐年升高,因此,研究 DR 的发病机制与治疗方法具有重要意义。目前研究表明,DR 的发生与血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)及对氧磷酶 1(paraoxonase 1, PON1)的基因多态性有关^[6]。VEGF 能增强毛细血管的细胞通透性,促进血管增生,造成 DM 患者视网膜病变,而 VEGF 基因在转录过程中形成多种同分异构体,如 VEGF121、VEGF165 和 VEGF206,其表达活性受游离 mRNA 控制^[7-9]。人体内存在抗氧化和氧化机制,DM 患者高血糖水平会促进机体的氧化作用,打破机体抗氧化/氧化平衡,产生氧化应激反应,生成更多的氧化剂破坏机体细胞、组织和器官,引起病变。而 PON1 蛋白表达产物能抑制氧化应激作用,当机体 PON1 基因表达抑制,细胞过氧化加剧,细胞的代谢作用受到影响,引起病变,并且氧化应激的正反馈作用会进一步加剧病变^[10-11]。本研究以 DM 患者和体检健康者为研究对象,探讨 VEGF、PON1 基因多态性和 DR 的相关性,现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2013 年 1 月至 2015 年 12 月于西宁市第二人民医院治疗的 DM 患者 168 例,男 97 例,女 71 例。入选者相互无血缘关系,且符合 DM 判定标准:空腹状态下血糖水平,静脉血浆大于 7.5 mmol/L,静脉全血大于 6.4 mmol/L,毛细血管全血大于 6.3 mmol/L;服糖后 2 h 血糖水平,静脉血浆大于 12.1 mmol/L,静脉全血大于 10.9 mmol/L,毛细血管全血大于 11.8 mmol/L。排除心脏病、肾衰竭、肝癌等疾病患者。将患者分为 3 组:单独 DM 组(DM 组)48 例,男 28 例,女 20 例,平均(62.51±9.31)岁;PDR 组 66 例,男 34 例,女 32 例,平均(61.73±8.75)岁;NPDR 组 54 例,男 30 例,女 24 例,平均(63.28±9.65)岁。另选取同期体检健康者 104 例纳入健康组(NC 组),男 55 例,女 49 例,平均(60.91±9.81)岁。本研究获西宁市第二人民医院伦理委员会批准,患者或近亲属签署知情同意书。

1.2 方法 测量并记录所有受试者血压、血脂及糖化血红蛋白水平。采集受试者空腹静脉血,提取基因组 DNA 后加入抗凝血清低温保存待用,采用黄嘌呤氧化酶法检测超氧化物歧化酶(SOD)水平,采用硫代巴比妥酸法测定丙二醛(MDA)水平。PCR 引物序列: PON1 Q192R,引物 1:5'-TAT TGT TGC TGT GGG ACC TGA G-3',引物 2:5'-CAC GCT AAA CCC AAA TAC ATC TC-3'; PON1 L 55M,引物 1:5'-GAA GAG TGA TGT ATA GCC CCA G-3',引物 2:5'-TTT ATT CCA GAG CTA ATG AAA GCC-3'。PCR 反应条件:先 94 °C 预变性 3 min,94 °C 变性 30 s,61 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,进行 35 个循环,最后 72 °C 延伸 7 min。

1.3 统计学处理 采用 SPSS20.0 统计软件进行统计分析。

正态分布计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用独立样本 t 检验;计数资料以百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验。取双侧检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组血压及生化指标水平比较 与 NC 组比较,DM 组、NPDR 组及 PDR 组收缩压、糖化血红蛋白水平明显升高,差异均有统计学意义($P<0.05$);其他各项指标比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。PDR 组和 NPDR 组收缩压比较,差异有统计学意义($P<0.05$),其余各项指标比较,差异无统计学意义($P>0.05$),见表 1。

2.2 VEGF 等位基因检测结果 未发生基因突变时,C 等位基因是纯合型因子(CC),电泳结果呈现一条荧光带(208 bp);纯合突变型等位基因(TT)电泳时产生 122、86 bp 两条片段;杂合型(CT)电泳出现 208、122、86 bp 3 条片段。VEGF 等位基因基因型检测结果见图 1。

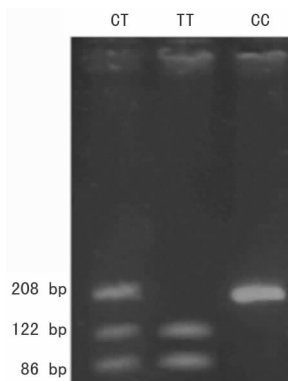


图 1 VEGF 等位基因基因型检测结果

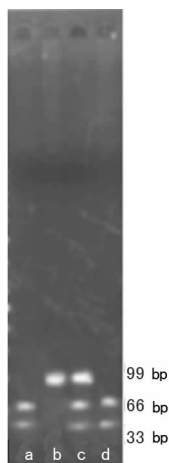
2.3 不同基因型患者 DR 发生率 CC 基因型 DR 发生率 71.05%,CT 基因型发生率为 56.27%,TT 基因型发生率仅 38.64%。CC 基因型患者 DR 发生率明显高于 CT 和 TT 基因型患者,差异有统计学意义($P<0.05$);而 CT 基因型患者 DR 发生率与 TT 基因型患者比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.4 PON1 等位基因检测结果 PON1 基因型 PCR 实验扩增产物有 3 种,分别为 99、66、33 bp 3 种片段。QQ 基因型患者仅有 99 bp 片段,RR 基因型有 66、33 bp 片段,QR 基因型有 99、66、33 bp 片段。PON1 192 位点基因型检测电泳结果见图 2。

2.5 不同 PON1 192 位点基因型受试者体内 SOD 和 MDA 水平比较 PON1 192 位点不同基因型体检健康者 SOD 和 MDA 水平比较,差异无统计学意义($P>0.05$);PON1 192 位点不同基因型 DR 患者 SOD 和 MDA 水平比较,差异有统计学意义($P<0.05$),QQ 基因型患者体内 SOD 水平低于其他两种基因型患者,MDA 水平高于其他两种基因型患者,见表 2。

表 2 不同 PON1 192 位点基因型受试者体内 SOD 和 MDA 水平比较($\bar{x}\pm s$)

基因型	体检健康者			DR 患者		
	n	SOD(μ /mL)	MDA(nmol/mL)	n	SOD(μ /mL)	MDA(nmol/mL)
QQ	34	114.65±16.58	9.14±3.12	46	52.37±21.03	13.21±9.12
QR	51	106.45±32.12	7.56±3.21	50	69.01±18.24	9.84±3.09
RR	19	104.36±27.32	6.09±3.42	14	84.77±19.20	9.02±3.24



a:RR 基因;b:QQ 基因;c:QR 基因;d:对比基因

图 2 PON1 192 位点基因型检测结果

3 讨 论

DM 是一种由于胰岛素分泌不足或胰岛功能缺陷导致血糖过高的代谢性疾病,长期高血糖会破坏各组织器官,眼、肾、血管的损伤尤为严重。DM 对眼部损伤很大,可改变眼组织神经和血管循环,损伤眼部功能和视力^[12]。微血管是一类介于微小动脉和微小静脉的毛细血管网,为血液提供物质交换和代谢的场所,而 DM 患者过高的血糖水平引起代谢紊乱,使血管内皮细胞损伤,从而破坏视网膜上皮细胞的联合,研究表明 DR 是致盲的主要原因之一^[13]。出血斑点、黄斑水肿、视网膜微血管异常和棉绒斑等症状都是视网膜血管病变的临床表现,由视网膜微血管渗漏引起的缺血会使视网膜出血,严重时还会脱落,严重损伤视力^[14-15]。

DM 患者体内的高血糖环境会使蛋白激酶 C 的转录因子表达增多,这些转录因子作为分子信号促进 VEGF 基因的转录和翻译,使 VEGF 蛋白水平提升。另一方面,高血糖状态会破坏毛细血管红细胞的细胞膜组织成分从而使物质交换速率变缓,细胞供氧不足而发生缺氧,发生正反馈作用,促进 VEGF 蛋白表达。VEGF 基因有 3 种基因型(CC、CT、TT),不同人体不同基因型的表达水平存在差异,基因突变对 VEGF 的表达产生影响。本研究表明,CC 基因型患者 DR 发生率明显高于 CT 和 TT 基因型患者,差异有统计学意义($P<0.05$),但 CT 基因型患者 DR 发生率与 TT 基因型患者比较无明显差异($P>0.05$)。DR 的发病率可能与 CC 和 C 等位基因频率升高及 VEGF 基因的高水平呈正相关。研究发现,PON1 基因多态性与 DR 关系密切,PON1 基因有 3 种基因型(QQ、QR、RR)。PON1 192 位点基因促进 DR 发生但不影响 DR 的发展,PON1 基因先通过控制 PON1 酶活性从而控制体内的氧化应激反应,氧化应激是机体摄取氧分子进行氧化反应的过程,如视网膜中的不饱和脂肪酸参与氧化应激。MDA 水平可反映机体脂质氧化程度,SOD 可反映机体氧自由基水平。本研究通过

SOD 和 MDA 水平衡量氧化应激水平,结果显示,QQ 基因型患者体内 SOD 水平高于 QR、RR 基因型患者,MDA 水平低于 QR、RR 基因型患者,说明 QQ 型患者体内氧化应激水平高。DR 患者氧化应激水平明显高于健康体检者。

参考文献

- [1] Sutendra G, Michelakis E. The metabolic basis of pulmonary arterial hypertension[J]. Cell Metabolism, 2014, 19(4):558-573.
- [2] 周杨琳,陈雪燕,陈雪艺,等.糖尿病视网膜病变患者相关生化指标测定及其预测意义[J].中国全科医学,2014,17(15):1715-1718.
- [3] Tai WT, Shiau CW, Chen PJ, et al. Discovery of novel Src homology region 2 domain-containing phosphatase 1 agonists from sorafenib for the treatment of hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 2014, 59(1):190-201.
- [4] Doyle J, Aiello LC, Shapiro SC, et al. Principles of knowledge representation and reasoning: proceedings of the fifth International Conference; (KR'96) [J]. Semin Immunopathol, 1996, 26(12):1-18.
- [5] Su X, Zhan P, Gavine PR, et al. FGFR2 amplification has prognostic significance in gastric cancer: results from a large international multicentrestudy [J]. Br J Cancer, 2014, 110(4):967-975.
- [6] Sahara M, Hansson EM, Wernet O, et al. Manipulation of a VEGF-Notch signaling circuit drives formation of functional vascular endothelial progenitors from human pluripotent stem cells[J]. Cell Res, 2015, 25(1):148.
- [7] Widemann BC, Acosta MT, Ammoun S, et al. CTF meeting 2012: Translation of the basic understanding of the biology and genetics of NF1, NF2, and schwannomatosis toward the development of effective therapies[J]. Am J Med Genet A, 2014, 164A(3):563-578.
- [8] Vottonen P, Pääkkönen A, Tarkka IM, et al. Best-corrected visual acuity and retinal thickness are associated with improved cortical visual processing in treated wet AMD patients[J]. Acta Ophthalmol, 2015, 92(7):621-625.
- [9] Allum WH, Bonavina L, Cassivi SD, et al. Surgical treatments for esophageal cancers [J]. Ann N Y Acad Sci, 2014, 1325:242-268.
- [10] 郭露,吕红彬.亚洲及欧洲人群血管内皮生长因子基因多态性与糖尿病视网膜病变的相关性 meta 分析[J].中华眼底病杂志, 2015, 31(2):173-178.
- [11] López-Mejías R, Genre F, Corrales A, et al. Investigation of a PON1 gene polymorphism (rs662 polymorphism) as predictor of subclinical atherosclerosis in patients with rheumatoid arthritis[J]. Ann Rheum Dis, (下转第 4228 页)

而非感情或经济问题。因此,高校需加大对大学生学习或就业工作的关注,采取相应干预措施,从而提高学生的环境适应能力,促进社会功能的健全。

本次研究表明,在过去 1 年中,随着大学生经历的负性生活事件数目的增多,近期自杀意念产生的危险性增加。青少年由高中生成为大学生的过程中,生理及心理上需要一定的适应过程。而对于个体而言适应能力存在一定的差异,随着危险因素的累积,势必会导致一部分人在经历较多的负性生活事件时可能会产生逃避的心理。因此,选择过激的解决方式——自杀,而自杀之前的一段时间内往往会向周围的同学或朋友等表露出自杀的想法及意念,这时就需要及时发现存在潜在风险的个体,阻断悲剧的发生。对于经受负性事件的学生进行早期识别和重塑个人人格特质,减低多重负性生活事件对心理造成的累积效应非常必要。

多因素逻辑回归分析显示,与家庭其他成员之间的矛盾,遭受虐待是大学生自杀意念的主要危险因素。Marczyńska-Wdowik 等^[14]研究也显示,有自杀意念的青少年往往缺乏来自父母的支持。大学生属于半社会人,面临问题时,大多数仍需要在父母或亲属的帮助或协助下解决。而与家人之间的矛盾,意味着支持系统的减弱,学生往往会恐慌不安,甚至产生无助、绝望感,而导致自杀意念的产生。因此,和谐家庭环境对大学生的心理健康非常重要,可在一定程度上降低大学生自杀意念的产生。另外,Eskin 等^[15]研究表明,遭受虐待是自杀意念产生的危险因素。遭受虐待的大学生容易产生悲观绝望等负性情绪,这种“消极”的认知结构,特别强调对未来的消极预期,对自杀有着深远影响,更易产生自杀意念,增加自杀风险。

该课题为横断面研究,在一定程度上可能会降低自杀意念与负性生活事件之间的时间先后顺序、变量之间的因果关系,若研究对象的选择均为近 1 个月内出现的自杀意念,则可避免上述缺陷。

参考文献

- [1] 北京回龙观医院临床流行病学研究室. 2000 年 3 月 22—24 日举办的“卫生部/WHO 预防自杀讲习班”的会议报告[J]. 中国心理卫生杂志, 2000, 14(5): 295-298.
- [2] Bridge JA, Goldstein TR, Brent DA. Adolescent suicide and suicidal behavior[J]. J Child Psychol Psych, 2006, 47(3-4): 372-394.
- [3] Grunbaum JA, Kann L, Kinchen SA, et al. Youth risk behavior surveillance—United States, 2001 [J]. J School Health, 2002, 72(8): 313-328.

- [4] Nath Y, Paris J, Thombs B, et al. Prevalence and social determinants of suicidal behaviours among college youth in India[J]. Int J Soc Psychiatry, 2012, 58(4): 393-399.
- [5] 范引光, 肖琴, 王茜, 等. 安徽省大学生自杀意念及其影响因素研究[J]. 中华流行病学杂志, 2008, 29(3): 241-244.
- [6] 徐慧兰, 肖水源, 冯姗姗, 等. 中南大学大学生自杀意念及其危险因素研究[J]. 中华流行病学杂志, 2004, 25(4): 288-291.
- [7] Li ZZ, Li YM, Lei XY, et al. Prevalence of suicidal ideation in Chinese college students: a meta-analysis[J]. PLoS One, 2014, 9(10): 104-368.
- [8] van Leeuwen N, Rodgers R, Régner I, et al. The role of acculturation in suicidal ideation among second-generation immigrant adolescents in France[J]. Transcul Psychiatry, 2010, 47(5): 812-832.
- [9] Finkelhor D, Turner HA, Shattuck A, et al. Violence, crime, and abuse exposure in a national sample of children and youth: an update[J]. JAMA pediatrics, 2013, 167(7): 614-621.
- [10] Turner HA, Finkelhor D, Shattuck A, et al. Recent victimization exposure and suicidal ideation in adolescents [J]. Arch Pediatr Adolesc Med, 2012, 166(12): 1149-1154.
- [11] Jiang M, Hu Z, Cao Y. Suicide deaths concentrated in Beijing Universities [J]. Am J Psychiatry, 2007, 164(11): 1758-1758.
- [12] 黄乔蓉, 刘博, 冯铁蕾. 生活事件与大学生自杀意念的相关研究[J]. 中国健康心理学杂志, 2007, 15(3): 210-213.
- [13] Kubiak M, Musikowska B, Sein A J. Recent life events preceding suicide attempt by drug overdose[J]. Przegląd lekarski, 2012, 70(8): 551-554.
- [14] Marczyńska-Wdowik AM. Selected coping resources and critical situations as the risk factors of adolescent's suicide attempts[J]. Wiad Lek, 2002, 55(Pt 2): 791-795.
- [15] Eskin M, Kaynak-Demir H, Demir S. Same-sex sexual orientation, childhood sexual abuse, and suicidal behavior in university students in Turkey[J]. Arch Sex Behav, 2005, 34(2): 185-195.

(收稿日期: 2017-03-22 修回日期: 2017-06-16)

(上接第 4225 页)

2014, 73(9): 1749-1794.

- [12] 饶玉萍, 徐玲娟, 肖紫云, 等. 增生型糖尿病视网膜病变患者血浆和玻璃体中 VEGF 和低密度脂蛋白受体相关蛋白 6 的表达及其相关性[J]. 眼科新进展, 2016, 36(3): 278-280.
- [13] Laird BD, Goncharov AB, Ayotte P, et al. Relationship between the esterase paraoxonase-1 (PON1) and metal concentrations in the whole blood of Inuit in Canada[J]. Chemosphere, 2015, 120(4): 479-485.
- [14] Kita T, Clermont AC, Murugesan N, et al. Plasma Kal-

likrein-Kinin System as a VEGF-independent mediator of diabetic macular edema[J]. Diabetes, 2015, 64(10): 88-99.

- [15] Redha NA, Mahdi N, Al-Habboubi HH, et al. Impact of VEGFA -583C>T polymorphism on serum VEGF levels and the susceptibility to acute chest syndrome in pediatric patients with sickle cell disease[J]. Pediat Blood Cancer, 2014, 61(12): 2310-2312.

(收稿日期: 2017-04-18 修回日期: 2017-06-26)