

• 短篇论著 •

β_3 肾上腺素能受体基因多态性与糖尿病足的相关性研究

惠宗光 周学伟 李文通 孙金红 侯宁宁 孙红喜

【摘要】目的 探讨中国人群 β_3 肾上腺素能受体(β_3 -AR)基因 Trp64Arg 突变与糖尿病足的关系。**方法** 应用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)方法检测 110 例 2 型糖尿病患者(T2DM 组)[其中糖尿病足患者 58 例(DFU 组),单纯 2 型糖尿病患者 52 例(N-DFU 组)]和 42 例正常人(正常对照组) β_3 -AR 基因的 Trp64Arg 突变,比较各组的基因型(TT 型,TA 型或 AA 型)和基因频率(T 或 A);并进行人体测量学和代谢指标的检测。**结果** (1) β_3 -AR 基因 Trp64Arg 基因型频率符合 Hardy-Weinberg 平衡定律,T2DM 组 β_3 -AR 基因 64 位 Arg 突变患者,其体重指数和稳态模型评估-胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)显著高于无突变组($P=0.007\ 2$, $P=0.038\ 6$)。(2)在 T2DM 组,Arg64 携带者血高密度脂蛋白-胆固醇水平明显低于非携带者($P=0.047\ 5$)。(3)DFU 组 Arg64 等位基因频率明显高于 N-DFU 组($\chi^2=5.147$, $P<0.05$),而 T2DM 组与正常对照组 β_3 -AR 基因型及等位基因频率无统计学意义($\chi^2=0.067$, $P>0.05$)。**结论** β_3 -AR 基因多态性与糖尿病足存在相关性,Arg64 等位基因可能是糖尿病足的危险因素之一。

【关键词】 β_3 肾上腺素能受体;基因多态性;糖尿病足;胰岛素抵抗

Relationship between gene polymorphism of beta 3-adrenergic receptor and diabetic foot
Hui Zongguang*, Zhou Xuewei, Li Wentong, Sun Jinhong, Hou Ningning, Sun Hongxi. *Department of Endocrinology, Affiliated Hospital of Weifang Medical University, Weifang 261041, China

【Abstract】Objective To explore the relationship between Trp64Arg polymorphism of the β_3 -adrenergic receptor (β_3 -AR) gene and diabetic foot in Chinese subjects. **Methods** The mutational genotype of Trp64Arg in β_3 -AR gene was measured by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) in 110 patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM group) [(58 with diabetic foot ulcer (DFU group) and 52 without (N-DFU group)] and 42 normal healthy subjects (normal control group). The genotype (TT, TA or AA) and allele frequencies (T or A) were compared among groups. The anthropometry and metabolic indices were also compared between groups. **Results** (1) No significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium was found in the β_3 -AR Trp64Arg genotype frequency. In T2DM group, body mass index and homeostasis model assessment for insulin resistance index (HOMA-IR) in Arg allele were significantly higher than those without mutations allele ($P=0.007\ 2$, $P=0.038\ 6$). (2) In T2DM group, Arg64 carriers had lower level of high density lipoprotein-cholesterol than those without this mutation ($P=0.047\ 5$). (3) The frequency of Arg64 allele in DFU group was greatly higher than that of N-DFU group ($\chi^2=5.147$, $P<0.05$), while no difference in β_3 -AR gene genotype and allele frequency was observed between T2DM group and normal control group ($\chi^2=0.067$, $P>0.05$). **Conclusion** β_3 -AR gene polymorphism is associated with diabetic foot. The Arg64 allele may be one of the risk factors of diabetic foot.

【Key words】 Beta-3 adrenergic receptor; Gene polymorphism; Diabetic foot; Insulin resistance

(Int J Endocrinol Metab, 2014, 34: 138-140)

糖尿病足是糖尿病一种常见且严重的慢性并发症,是糖尿病患者长期住院、截肢、致残的主要原因,早期防治糖尿病足意义重大,但关于糖尿病足损害的遗传因素研究较少。有研究显示, β_3 -肾上腺素能受体

(β_3 -AR)基因多态性与糖尿病心血管终点事件有关^[1]。关于该基因是否参与糖尿病足的发生、发展,目前国内、外尚未见相关报道。本研究旨在探讨 β_3 -AR 基因多态性与糖尿病足发生的相关性。

1 对象与方法

1.1 研究对象 收集 2009 年 3 月至 2011 年 9 月在潍坊医学院附属医院内分泌科住院的 2 型糖尿病患者 110 例,设为 2 型糖尿病组(T2DM 组),进一步分为 2 个亚组,其中糖尿病足组(DFU 组)58 例、

DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-4157.2014.02.019

基金项目:山东省高等学校科技计划基金项目(J12LK05)

作者单位:261041 潍坊医学院附属医院内分泌科(惠宗光,孙金红,侯宁宁,孙红喜),药剂科(周学伟);261042 潍坊医学院病理学教研室(李文通)

单纯糖尿病组(N-DFU 组)52 例。另选取 42 名体检健康者作为正常对照组。纳入标准:符合《糖尿病足(肢端坏疽)检查方法及诊断标准(草案)》中糖尿病的诊断标准;2 型糖尿病的诊断依据世界卫生组织(1999 年)糖尿病诊断标准。排除标准:合并有严重的心、脑、肝、肾疾病者。研究对象均已签署本研究的知情同意书。

1.2 研究方法

1.2.1 生化指标的测定 采集各组研究对象的空腹静脉血,检测空腹血糖、空腹胰岛素(FINS)、HbA1c、总胆固醇、甘油三酯、高密度脂蛋白-胆固醇(HDL-C),计算稳态模型评估-胰岛素抵抗指数(HOMA-IR),同时留取 3 ml 空腹静脉血,加 EDTA 防凝,−20℃保存,用于基因组 DNA 的提取。

1.2.2 基因多态性的分析 (1)采用常规酚/氯仿方法提取外周血粒细胞基因组 DNA。(2) β_3 -AR 基因 Trp64Arg 多态性测定与基因分型:采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)方法进行基因型检测,PCR 引物序列为:上游引物为 5'-CCACCA GGAGTCCCATCACC-3',下游引物为 5'-CGCCCAAT-ACCGCCAACAC-3'。PCR 反应体系为 50 μ l,其中包括 10 \times buffer 5 μ l,dNTPs (2.5 mmol/L) 4 μ l,引物各 0.5 μ l,Taq 酶(5 U/ μ l) 0.4 μ l,模板基因组 DNA 5 μ l,三蒸水 29.6 μ l,混匀后用 PCR 扩增仪进行反应。PCR 反应条件:预变性 94℃ 5 min,变性 94℃ 30 s,退火 61℃ 30 s,延伸 72℃ 40 s,共 35 个循环,最后 72℃延伸 5 min。将 PCR 扩增产物用限制性内切酶(BstN I)进行酶切,在 61℃条件下酶切 3~4 h,酶切产物用 3%琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色,紫外灯下观察酶切产物进行基因分型。根据限制性内切酶酶切产生片段长度的不同,判定 3 种不同的基因型:TT 型(99 bp、62 bp 两条带),TA 型(161 bp、99 bp、62 bp 三条带),AA 型(161 bp 一条带)。

1.3 统计学处理 应用 SPSS17.0 统计软件进行处理。基因型分布和等位基因频率的组间比较采用 χ^2 检验。计量资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组均数间比较

采用 t 检验。多组间均数比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 PCR 扩增产物基因型的鉴定 β_3 -AR 基因扩增目的片段大小为 210 bp, BstN I 酶切后可产生 2 个等位基因(Trp、Arg)及 3 种基因型:突变纯合子 AA 产物为 161 bp 1 条带;正常纯合子 TT 产物为 99 bp 和 62 bp 2 条带,突变杂合子 TA 产物为 161 bp、99 bp、62 bp 3 条带。

2.2 Hardy-Weinberg 平衡检验 对 T2DM 组和正常对照组单核苷酸多态性(SNP)基因型进行平衡检验,结果表明它们的基因型频率分布没有偏移 Hardy-Weinberg 平衡($P > 0.05$),表明所选择的研究人群基因频率能够代表群体的基因分布。

2.3 不同基因型组间的临床指标 T2DM 组各基因型亚组间年龄、血压、空腹血糖、HbA1c、总胆固醇、甘油三酯水平均无统计学差异($P > 0.05$),携带等位基因 Arg64 TA 组体重指数、FINS 和 HOMA-IR 显著高于携带 Arg64 TT 组($P < 0.01$),而 HDL-C 水平明显低于非携带者($P < 0.05$),提示等位基因 Arg 与体重指数、胰岛素抵抗、脂代谢异常可能相关,见表 1。

2.4 Trp64Arg 基因型和等位基因频率在 T2DM 组和正常对照组的比较 两组基因型和等位基因频率分布差异无显著意义($\chi^2 = 0.067, P > 0.05$)。其中,DFU 组 β_3 -AR Arg64 等位基因及基因型频率明显高于 NDFU 组($\chi^2 = 5.147, P = 0.027; \chi^2 = 4.245, P = 0.036$)及正常对照组($\chi^2 = 4.346, P = 0.032; \chi^2 = 4.520, P = 0.034$),差异具有统计学意义,见表 2。

3 讨论

β_3 -AR 主要存在于人体棕色脂肪组织,介导脂肪分解和产热,对于能量利用和储存以及葡萄糖的内环境稳态起重要作用。 β_3 -AR 基因位于 8q11-q12,包括 2 个外显子和 1 个内含子。该基因变异主要发生在细胞内侧 3 个氨基酸环中的第一环,位于外显子 190 位核苷酸的胸腺嘧啶(T)被胞嘧啶(C)取代,引起 64 位密码子色氨酸被精氨酸置换,形成 Trp64Arg 等位基因,

表 1 T2DM 组不同基因型间临床特征的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	年龄 (岁)	体重指数 (kg/m ²)	收缩压 (mmHg)	舒张压 (mmHg)	空腹血糖 (mmol/L)	总胆固醇 (mmol/L)
TT($n=77$)	59.75 \pm 6.46	20.58 \pm 2.33	132.24 \pm 20.88	78.26 \pm 9.72	9.14 \pm 2.90	5.27 \pm 1.22
TA($n=32$)	58.33 \pm 6.81	25.97 \pm 2.38 ^a	133.84 \pm 19.22	77.67 \pm 8.56	9.45 \pm 2.39	5.32 \pm 0.72
组别	甘油三酯 (mmol/L)	HDL-C (mmol/L)	LDL-C (mmol/L)	空腹胰岛素 (μ IU/ml)	HbA1c (%)	HOMA-IR
TT($n=77$)	1.88 \pm 0.73	1.13 \pm 0.23	3.14 \pm 0.88	7.95 \pm 4.39	8.50 \pm 1.12	3.21 \pm 2.27
TA($n=32$)	2.09 \pm 1.12	0.93 \pm 0.22 ^b	3.25 \pm 0.76	10.58 \pm 4.76 ^a	8.22 \pm 2.43	4.43 \pm 2.13 ^b

注:与 TT 组相比,^a $P < 0.01$,^b $P < 0.05$;HDL-C:高密度脂蛋白-胆固醇;LDL-C:低密度脂蛋白-胆固醇;HOMA-IR:稳态模型评估-胰岛素抵抗指数;1 mmHg=0.133 kPa

表 2 各组 β_3 -AR 等位基因和基因型频率的比较

组别	例数	基因型(%)			等位基因(%)	
		TT	TA	AA	T	A
正常对照组	42	30(71.4)	12(28.6)	0(0.00)	72(85.7)	12(14.3)
T2DM 组	110	77(70.0)	32(0.29)	1(0.01)	186(84.5)	34(15.5)
N-DFU 组	52	42(80.8)	10(19.2)	0(0.000)	94(90.4)	10(9.6)
DFU 组	58	35(60.3)	22(37.9) ^{ab}	1(1.7)	92(79.3)	24(20.7) ^{ab}

注: β_3 -AR: β_3 -肾上腺素能受体; T2DM 组: 2 型糖尿病组; N-DFU 组: 单纯糖尿病组; DFU: 糖尿病足组; 与 N-DFU 组相比, * $P < 0.05$; 与正常对照组相比, ^b $P < 0.05$

导致 β_3 -AR 活性下降, 从而降低内脏脂肪分解和能量产生。许多研究证实, β_3 -AR 基因变异与心血管疾病的危险因素如肥胖及胰岛素抵抗相关^[26]。另有对印度克什米尔人群的研究显示, Arg64 等位基因是 2 型糖尿病的危险因素之一, 而 Trp64 纯合子具有保护效应, 提示 β_3 -AR 基因变异与 2 型糖尿病的发生存在相关性^[7]。本研究发现在 T2DM 组携带 Arg64 TA 者的体重指数、FINS 和 HOMA-IR 显著高于携带 Arg64 TT 者, 且 HDL-C 水平明显低于非携带者, 与国外研究结论一致^[8]。提示 β_3 -AR 基因变异不仅与肥胖、胰岛素抵抗相关, 还可能影响脂代谢, 从而影响糖尿病血管并发症的发生、发展。但本研究未发现该基因与 T2DM 存在相关性, 导致结果不一致的原因, 可能与不同的种族人群、年龄及环境因素的影响有关。

糖尿病足不仅是糖尿病常见的慢性并发症, 也是糖尿病患者致死、致残的重要原因。目前认为病程、代谢控制、吸烟等因素参与了糖尿病足的发生。笔者在临床上发现, 有些糖尿病患者尽管血糖控制良好却发生糖尿病足, 而另一些患者尽管血糖控制不佳, 却无糖尿病足发生, 提示糖尿病足的发生可能存在重要的遗传学基础。有研究发现 β_3 -AR 基因与糖尿病血管并发症存在相关性, β_3 -AR 基因变异可导致冠心病发病风险增加^[9-10]。然而, 关于中国人群中 β_3 -AR 基因 Trp64Arg 多态性与糖尿病足的相关性尚未有报道。本研究选择汉族人群作为研究对象, 对 β_3 -AR 基因 Trp64Arg 多态性进行分析。探讨 β_3 -AR 基因上潜在的功能性多态性位点 Trp64Arg 与糖尿病足的关系, 发现 DFU 组 β_3 -AR Arg64 等位基因及基因型频率明显高于 N-DFU 组, 提示 Arg64 等位基因分布频率的升高与糖尿病足的发生有关, β_3 -AR 基因可能是糖尿病足的风险基因之一。 β_3 -AR 基因与糖尿病足的相关机制目前尚不清楚, β_3 -AR 可增加微循环血流、血管生成及调节内皮依赖性血管舒张功能, 推测 β_3 -AR 基因突变可能通过减少下肢及足部的微循环血流及内皮依赖性血管舒张功能降低而导致糖尿病足的发生、发展^[10]。此外, β_3 -AR 基因变异还可能通过影响脂代谢、肥胖和胰岛素抵抗导致糖尿病大血管

病变, 共同参与糖尿病足的发生、发展。

总之, 本研究不但发现 β_3 -AR 基因多态性与肥胖、胰岛素抵抗及脂代谢紊乱相关, 更重要的是发现了该基因多态性与糖尿病足存在显著相关性, 提示 β_3 -AR 基因的 Arg64 等位基因可能是中国人群糖尿病足的风险基因。本研究病例样本量不足, 且只对 β_3 -AR 基因的单一功能多态位点进行研究。因此, 有必要开展大样本、多基因、多位点的研究, 以进一步揭示该基因在糖尿病足发生、发展中的作用。

参 考 文 献

- [1] Wang Y, Luk AO, Ma RC, et al. Independent predictive roles of eotaxin Ala23Thr, Paraoxonase 2 Ser311Cys and beta-adrenergic receptor Trp64Arg polymorphisms on cardiac disease in Type 2 Diabetes-an 8-year prospective cohort analysis of 1297 patients[J]. Diabet Med, 2010, 27(4): 376-383.
- [2] Takeuchi S, Katoh T, Yamauchi T, et al. ADRB3 polymorphism associated with BMI gain in Japanese men[J]. Exp Diabetes Res, 2012, 2012: 973561.
- [3] Sasayama D, Hori H, Teraishi T, et al. Possible impact of ADRB3 Trp64Arg polymorphism on BMI in patients with schizophrenia[J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2012, 38(2): 341-344.
- [4] Baturin AK, Pogozheva AV, Sorokina Elu, et al. The Trp64Arg polymorphism of the beta3-adrenoreceptor gene study in persons with overweight and obesity[J]. Vopr Pitan, 2012, 81(2): 23-27.
- [5] de Luis DA, Aller R, Izaola O, et al. Interaction of -55CT polymorphism of UCP3 gene with Trp64Arg polymorphism of the beta3 adrenoreceptor gene on insulin resistance in obese patients[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2012, 16(5): 610-616.
- [6] de Luis DA, Ballesteros M, Ruiz E, et al. Polymorphism Trp64Arg of beta3 adrenoreceptor gene: allelic frequencies and influence on insulin resistance in a multicenter study of Castilla-León[J]. Nutr Hosp, 2010, 25(2): 299-303.
- [7] Hameed I, Masoodi SR, Afroze D, et al. Trp homozygotes at codon 64 of ADRB3 gene are protected against the risk of type 2 diabetes in the Kashmiri population [J]. Genet Test Mol Biomarkers, 2013, 17(10): 775-779.
- [8] Mirakniov AE, Kerimkulova AS, Lunegova OS, et al. An association between TRP64ARG polymorphism of the β_3 adrenoreceptor gene and some metabolic disturbances [J]. Cardiovasc Diabetol, 2011, 10: 89.
- [9] Iwamoto Y, Ohishi M, Yuan et al. β -Adrenergic receptor gene polymorphism is a genetic risk factor for cardiovascular disease: a cohort study with hypertensive patients[J]. Hypertens Res, 2011, 34(5): 573-577.
- [10] Kumar S, Mishra A, Srivastava A, et al. Significant role of ADRB3 rs4994 towards the development of coronary artery disease[J]. Coron Artery Dis, 2014, 25(1): 29-34.

(收稿日期: 2013-09-29)