

妊娠糖尿病患者的维生素 D 受体基因单核苷酸多态性研究

祁娟, 许 烨(江苏省南京市妇幼保健院检验科 210004)

【摘要】 目的 探讨维生素 D 受体基因单核苷酸多态性与妊娠糖尿病(GDM)发病的关系。**方法** 按病例-对照设计的方法,选取 GDM 患者和健康妊娠对照各 80 例作为受试对象,采用全自动生化分析仪检测受试者体内血糖和肝功能等指标;应用聚合酶链反应-基因测序法对所有受试者维生素 D 受体基因上的 rs1544410 位点进行多态性分析。使用 SPSS13.0 进行 t 检验和 χ^2 检验分析。**结果** 两组人群的维生素 D 受体基因 rs1544410 的 G/A 等位基因频率比较差异有统计学意义($P<0.05$)。Bb 型基因型的空腹血糖水平高于 bb 型($P<0.05$),两组的肝功能指标相比差异无统计学意义。**结论** 维生素 D 受体基因 rs1544410 多态性位点与南京地区汉族妊娠糖尿病具有相关性。

【关键词】 维生素 D 受体基因; 妊娠糖尿病; 基因多态性

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2013.20.012 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2013)20-2663-03

Single nucleotide polymorphism of vitamin D receptor gene in patient with gestational diabetes mellitus QI Juan, XU Ye (Department of Laboratory Medicine, Nanjing Maternal and Child Health Care Hospital, Nanjing, Jiangsu 210004, China)

【Abstract】 Objective To investigate the association between single nucleotide polymorphism(SNP) in vitamin D receptor(VDR) gene and gestational diabetes mellitus(GDM). **Methods** According to the case-control design method, 80 GDM patients and 80 controls were enrolled and detected for blood glucose, liver function indicators and polymorphisms of rs1544410 site in VDR gene. The allele distributions of SNP were evaluated by student t test and χ^2 test. **Results** The G/A allele frequency of VDR gene SNP loci rs1544410 in the two groups were statistically different($P<0.05$). Fasting plasma glucose levels of patients with Bb genotype were higher than those with bb genotype($P<0.05$), while the liver function indicators showed no significant difference. **Conclusion** VDR gene polymorphism(SNP loci rs1544410) could be significantly associated with GDM in people of Han nationality in Nanjing region.

【Key words】 vitamin D receptor gene; gestational diabetes mellitus; gene polymorphism

妊娠期糖尿病(GDM)被认为对母胎的健康有不良影响,且与不良妊娠结局和新生儿代谢障碍的发生有关^[1]。但目前有关 GDM 的具体发病机制的研究相对较少,相关的全基因组关联分析也少见报道。近年来发现维生素 D 是维持正常胰岛素分泌和糖耐量所必需的物质^[5]。国外也有研究表明维生素 D 受体基因多态性和 1、2 型糖尿病有关联^[6];但国内至今仍少有维生素 D 受体基因和 GDM 之间的关联研究。因此,本文选取文献报道结果较一致的维生素 D 受体基因多态性位点 rs1544410,探讨其与 GDM 及相关临床特征之间的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 遵循知情自愿的原则,本文于 2011 年 11 月至 2012 年 6 月,在本院共选取 160 例孕 32 周入院孕检的孕妇作为研究对象,其中 GDM 组 80 例;同期入院的健康孕妇,经口服葡萄糖耐量试验(OGTT)证明无 GDM 并排除双胎、甲状腺功能亢进、妊娠高血压及其他慢性疾病者 80 例作为对照组。所有孕妇均做 OGTT 以确诊,OGTT 诊断按美国糖尿病协会 2011 年推荐的标准:空腹血糖大于或等于 5.1 mmol/L,餐后 1 h 血糖大于或等于 10.0 mmol/L,餐后 2 h 血糖大于或等于 8.5 mmol/L,满足以上任意一项即可诊断为 GDM。

1.2 试验方法

1.2.1 检测指标 记录孕妇年龄,取孕妇空腹静脉血 5 mL,检测血生化各指标,所有研究对象进行 OGTT,测量空腹血

糖、餐后 1 h 血糖,餐后 2 h 血糖。

1.2.2 DNA 提取及目的片段扩增 取静脉血 2 mL,离心后取其白细胞,采用 tiangen 血液基因组 DNA 提取试剂盒提取 DNA,基因测序检测基因多态性。rs1544410 位点目的片段的引物设计是首先从 PubMed 数据库中检索目标 SNP 位点两侧碱基序列,利用 NCBI Primer-Blast 在线设计和验证引物。引物由 Invitrogen 公司合成,VDR-474-F: 5'-GCA TCG TCT CCC CAG GTA TG-3',VDR-474-R: 5'-AAC CAG CGG AAG AGG TCA AG-3'。PCR 产物全长 474 bp。PCR 扩增体系 100 μ L,其中包括模板 DNA 4 μ L,10 $\times$ 扩增缓冲液 10 μ L,双蒸水 65 μ L,上下游引物各 2 μ L,MgCl₂ 8 μ L,2.5 mmol/L dNTP 8 μ L,Taq 酶 1 μ L。PCR 反应条件:预变性 94 $^{\circ}$ C 5 min,变性 95 $^{\circ}$ C 30 s,退火 60 $^{\circ}$ C 50 s,延伸 72 $^{\circ}$ C 60 s,总延伸 72 $^{\circ}$ C 10 min,共 35 个循环,延伸产物于-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.3 测序反应 上述 PCR 的扩增产物用 tiangen 通用型核酸纯化试剂盒纯化后,采用 ABI 3130 测序仪进行测序。具体方法是取纯化后的 PCR 产物 30 ng(约 1 μ L),2.5 $\times$ mix 0.5 μ L,5 $\times$ buffer 3.7 μ L,上游引物 0.3 μ L,去离子水 14.5 μ L,混合后进行反应,条件如下:96 $^{\circ}$ C 1 min;96 $^{\circ}$ C 10 s,50 $^{\circ}$ C 5 s,60 $^{\circ}$ C 4 min 共 25 个循环;用乙醇进行纯化,产物溶于 10 μ L 去离子甲酰胺后上机检测。

1.3 统计学处理 根据惯例,当 rs1544410 多态性位点的核

苷酸为 GG 时被定义为 bb 基因型,为 GA 时被定义为 Bb 基因型,为 AA 时被定义为 BB 基因型。所有试验结果使用 SPSS13.0 进行分析,两组受试人群的遗传平衡性使用 Hardy-Weinberg 平衡检验;数值变量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验;分类变量资料直接计数后用 χ^2 检验。 $P<0.05$ 为

差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组临床特点比较 两组之间年龄、肝功能等差异无统计学意义,受试者中无高血压患者。GDM 组的空腹血糖、餐后 1 h 血糖、餐后 2 h 血糖均高于对照组,见表 1。

表 1 GDM 组与对照组临床特点比较($n=80,\bar{x}\pm s$)

组别	年龄(岁)	空腹血糖 (mmol/L)	OGTT 1 h 血糖(mmol/L)	OGTT 2 h 血糖(mmol/L)	ALT(U/L)	AST(U/L)	总胆红素 (μ mol/L)	直接胆红素 (μ mol/L)	总蛋白 (g/L)
GDM 组	28.26 $\pm$ 3.15	4.69 $\pm$ 0.62	9.78 $\pm$ 1.52	8.37 $\pm$ 1.44	21.62 $\pm$ 15.22	19.73 $\pm$ 8.28	7.34 $\pm$ 2.62	1.54 $\pm$ 0.78	67.28 $\pm$ 4.23
对照组	27.52 $\pm$ 2.21	4.31 $\pm$ 0.28	6.85 $\pm$ 1.37	5.71 $\pm$ 1.05	18.18 $\pm$ 8.48	17.61 $\pm$ 4.21	6.85 $\pm$ 1.58	1.60 $\pm$ 1.20	66.20 $\pm$ 3.55
P	0.160	0.000	0.000	0.000	0.150	0.097	0.242	0.740	0.153

2.2 基因型鉴定 VDR-rs1544410 位点 PCR 扩增产物经纯化后直接测序鉴定。GG 纯合型(即 bb 基因型)测序结果见图 1,GA 杂合型(即 Bb 基因型)测序结果见图 2。

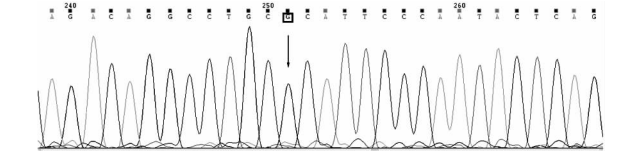


图 1 rs1544410 GG 纯合型(黑框标记的位点)

2.3 对照组和 GDM 组基因多态性分布比较 计数两组受试者各基因型的频率,按 Hardy-Weinberg 遗传定律进行群体平衡检验,两组受试者均符合遗传平衡定律(GDM 组的 χ^2 值

2.033, P 值 0.154;对照组的 χ^2 值 0.355, P 值 0.551),两组中的 B、b 等位基因频率分布差异有统计学意义,见表 2。

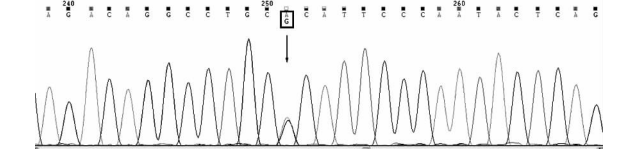


图 2 rs1544410 GA 杂合型双峰图(黑框标记的位点)

2.4 rs1544410 遗传多态性与临床指标间的关系 FPG 水平差异在 3 种基因型之间差异有统计学意义,未发现其他各指标差异有统计学意义,见表 3。

表 2 两组受试者 B/b 等位基因频数分布比较

分组	基因型(n)			合计 ($n=80$)	χ^2	P	等位基因(n)		χ^2	P
	bb	Bb	BB				b	B		
GDM 组	58	22	0	80	5.625	0.018	138	22	5.000	0.025
对照组	70	10	0	80			140	10		

表 3 不同基因型临床指标的比较($\bar{x}\pm s$)

基因型	n	年龄 (岁)	空腹血糖 (mmol/L)	OGTT 1 h 血糖(mmol/L)	OGTT 2 h 血糖(mmol/L)	ALT(U/L)	AST(U/L)	总胆红素 (μ mol/L)	直接胆红素 (μ mol/L)	总蛋白(g/L)
bb	128	28.34 $\pm$ 2.32	4.44 $\pm$ 0.37	8.12 $\pm$ 2.12	7.18 $\pm$ 1.85	20.11 $\pm$ 14.34	19.21 $\pm$ 7.92	7.40 $\pm$ 2.05	1.42 $\pm$ 0.50	66.68 $\pm$ 4.19
Bb	32	29.14 $\pm$ 2.19	4.76 $\pm$ 0.26	8.99 $\pm$ 1.32	8.25 $\pm$ 1.34	17.77 $\pm$ 8.59	16.44 $\pm$ 6.02	7.32 $\pm$ 4.79	1.38 $\pm$ 1.16	65.89 $\pm$ 1.91
P		0.407	0.037	0.307	0.155	0.680	0.389	0.997	0.898	0.626

3 讨 论

在本研究中,作者选取了 80 例 GDM 患者和 80 例健康孕妇进行对照,分析她们的维生素 D 受体上的 rs1544410 位点的多态性,发现 GDM 组中的 Bb 遗传多态性的患者多于对照组,并且 bb 型与 Bb 型患者的空腹血糖差异存在统计学意义。

近些年来,研究人员发现,维生素 D 对胰腺中的胰岛具有保护作用,是维持正常糖代谢和胰岛素分泌所必需的物质。因此,VDR 基因被认为是 2 型糖尿病的候选基因。国外研究人员也发现在匈牙利和德国人群中,VDR 基因的 rs1544410 位点的多态性与 2 型糖尿病的发生有关。

在中国台湾人群中,研究者发现 VDR 基因的多态性与 1 型糖尿病的发病有关^[7];而北京汉族人群中的 1 型糖尿病的易感性也与 rs1544410 位点相关^[8]。也有研究报道,携带(BB+Bb)基因型的人群比其他基因型人群的 1 型糖尿病的易感性更高,且亚洲地区高于欧洲和拉丁美洲^[9]。

在本次研究中两组均未检测出 BB 型,这可能与作者选取的样本例数不多有关,但根据文献,BB 型的基因频率在人群中很低,只占总数的 0%~1.4%^[10],本次试验的数据与之接近,但同时也提示临床工作者今后有待于进一步扩大样本量再观测。

目前国内关于 rs1544410 多态性因与 GDM 关联研究的报道还少见,作者对南京地区汉族人进行病例-对照研究发现 rs1544410 中 B 等位基因的频率在 GDM 组和对照组中差异具有统计学意义;同时本次研究也发现 Bb 型受试者空腹血糖水平要高于 bb 基因型。本次研究提示 rs1544410 位点中 B 等位基因与南京地区汉族人群 GDM 的发生有关。

参考文献

[1] Yang H, Wei Y, Gao X, et al. Risk factors for gestational diabetes mellitus in Chinese women: a prospective study of 16, 286 pregnant women in China[J]. Diabet Med, 2009, 26(11):1099-1104.

[2] Zhang F, Dong L, Zhang CP, et al. Increasing prevalence of gestational diabetes mellitus in Chinese women from 1999 to 2008[J]. Diabet Med, 2011, 28(6):652-657.

[3] 邓耀, 韦永琼. 四川省成都市妊娠期糖尿病筛查的研究[J]. 内蒙古中医药, 2011, 30(11):113-114.

[4] 单秀娟, 王丽萍, 赵淑玲, 等. 长春市妊娠糖尿病的调查研究[J]. 中国实用医药, 2011, 6(35):255-256.

[5] Borissova AM, Tankova T, Kirilov G, et al. The effect of vitamin D3 on insulin secretion and peripheral insulin sensitivity in type 2 diabetic patients[J]. Int J Clin Pract,

2003, 57(4):258-261.

[6] Valdivielso JM, Fernandez E. Vitamin D receptor polymorphisms and diseases[J]. Clin Chim Acta, 2006, 371(1):1-12.

[7] Chang TJ, Lei HH, Yeh JJ, et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms influence susceptibility to type 1 diabetes mellitus in the Taiwanese population[J]. Clin Endocrinol (Oxf), 2000, 52(5):575-580.

[8] Xiao XH, Liu ZL, Wang H, et al. Effects of vitamin D receptor gene polymorphisms on susceptibility to type 1 diabetes mellitus[J]. Chin Med Sci J, 2006, 21(2):95-98.

[9] Zhang J, Li W, Liu J, et al. Polymorphisms in the vitamin D receptor gene and type 1 diabetes mellitus risk: an update by meta-analysis[J]. Mol Cell Endocrinol, 2012, 355(1):135-142.

[10] Zhang H, Wang J, Yi B, et al. BsmI polymorphisms in vitamin D receptor gene are associated with diabetic nephropathy in type 2 diabetes in the Han Chinese population[J]. Gene, 2012, 495(2):183-188.

(收稿日期:2013-01-21 修回日期:2013-06-12)

(上接第 2662 页)

度。随访 6 个月至 1 年,成功 83 例,占 97.5%,失败 2 例,占 2.5%,其中桩冠脱落 1 例,桩核松动 1 例。而对照组成功 30 例,占 83.3%,失败 6 例,占 20.0%,根折 4 例,桩核松动 1 例,桩冠脱落 1 例。纤维桩桩冠修复和金属桩桩冠修复成功率比较差异有统计学意义($P<0.05$),纤维桩核冠修复有更好的临床效果。

3 讨论

众多学者和临床医生对后牙大面积牙体缺损采用了纤维桩树脂核全冠修复,取得了很好的临床效果。与金属成品桩和铸造桩相比,纤维桩系统主要优点有:(1)抗疲劳;(2)美观、耐腐蚀;(3)机械性能与牙体组织更匹配,折裂方式有利于再修复,几乎无不可逆性根折^[1];(4)易于取出以便于二次修复;(5)生物相容性好,毒性小;(6)与 Bis-GMA 树脂型黏接剂产生强的化学作用;(7)可用于核磁共振成像技术(MRI),使用纤维桩修复患者可以安全的进行 MRI 检查,不会影响射频场造成图像的扭曲和变形^[2]。李广亚等^[2]实验证实,用碳纤维桩加树脂核修复的牙齿在高载荷下,桩核界面先出现折裂,牙体折断现象是很少见的。段静娟^[3]实验也证明,碳纤维桩修复的牙齿在循环加载状态下,比采用金属桩修复或锥形金属铸造桩修复的牙齿明显具有更高的抗折断性。另外有研究表明,纤维桩的使用能有效地防止根折,在咬合力作用下有利于残根、残冠的保存^[4]。因此,纤维桩加树脂核在临床上正逐渐取代成品桩和铸造桩,开始广泛应用于牙冠严重缺损牙齿的修复。用预存的根管纤维桩系统进行磨牙残根残冠的修复,具有操作简单、方便、快捷,缩短就诊次数,扩大应用范围的优点。克服了当牙根根

管较细时铸造桩核不易制作及因材料强度不够、铸造缺陷等原因引起的桩变形、折断等不足。纤维桩不受共同就位道的限制,可制备到一定的深度,同时又避免了为取得共同就位道而切割过多的牙体组织。桩之间可以互成角度,产生制锁作用,使其固位力增强。玻璃纤维桩的弹性模量与牙本质相近,作用力可以沿整个桩均匀分布,减少应力集中,降低发生根折的危险^[5]。即使发生牙体折裂也多位于牙槽嵴顶上,称为可修复性破坏,再次修复仍有可能。本研究采用纤维桩核冠修复磨牙牙体大面积缺损,获得了很好的临床效果,较好地恢复牙齿的形态和功能,是可以在临床上广泛推广的修复残留方法。

参考文献

[1] 王鹏. 纤维桩核冠修复牙体严重缺损的临床疗效分析[J]. 医药前沿, 2012, 2(16):15-16.

[2] 李广亚, 杨怀勇, 田斌. 纤维桩修复技术治疗牙体缺损体会[J]. 宁夏医学杂志, 2008, 30(9):854-855.

[3] 段静娟. 纤维桩在牙体修复中的应用[J]. 中国社区医师:医学专业, 2010, 12(36):55-56.

[4] 裴延平, 林松杉. 纤维桩的临床应用[J]. 北京口腔医学, 2010, 18(6):349-351.

[5] 王贯新, 白保晶, 魏永杰. 纤维桩核冠修复牙体严重缺损的临床效果观察[J]. 北京口腔医学, 2011, 19(4):225-227.

(收稿日期:2013-05-30)