

• 证的研究 •

早期糖尿病肾病患者亚甲基四氢叶酸还原酶 C676T 突变的相关因素及中医证型分析

林 兰¹ 郭小舟¹ 倪 青¹ 龚燕冰¹ 王 斌¹ 石世华²

(1. 中国中医科学院广安门医院内分泌科, 北京市宣武区北线阁 5 号, 100053; 2. 北京王府中西医结合医院)

[摘 要] **目的** 探讨早期糖尿病肾病(DN)患者基因突变与中医证型的关系。**方法** 应用聚合酶链反应限制性片段长度多态性的方法,检测63例早期DN患者亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)基因的677碱基多态性情况,测定患者血浆同型半胱氨酸(Hcy)、叶酸浓度、空腹血糖、餐后血糖、糖化血红蛋白(HbA_{1c})、尿白蛋白排泄率(UAER)及血脂,并记录患者的中医证型。**结果** 63例早期DN患者中CC型19例,TT型17例,CT型27例,TT、TC、CC的基因型频率分别为27.00%、42.85%、30.15%;T等位基因频率为48.41%,C等位基因频率51.59%。MTHFR基因的C676T突变与Hcy水平相关($P<0.01$);与甘油三酯(TG)水平相关($P<0.05$)。中医证型与基因型具有相关性($P<0.01$),CC型基因多辨证为阴虚热盛,杂合子基因型CT多辨证为气阴两虚,纯合子基因型TT多辨证为阴阳两虚。**结论** 早期糖尿病肾病患者MTHFR基因的677碱基多态性与Hcy、TG、中医证候相关。

[关键词] 糖尿病肾病;中医证候;亚甲基四氢叶酸还原酶;同型半胱氨酸

Analysis on the Correlated Factors of Methylene Tetrahydrofolate Reductase C676T Mutation and the Different TCM Syndromes in Early Diabetic Nephropathy

LIN Lan¹, GUO Xiaozhou¹, NI Qing¹, GONG Yanbing¹, WANG Bin¹, SHI Shihua²

(1. Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053; 2. Beijing Royal Integrative Medicine Hospital)

ABSTRACT **Objective** To explore the relationship between gene mutation and different syndromes of TCM in the early stage of diabetic nephropathy (DN). **Methods** Sixty-three patients with diabetic nephropathy in the early stage were observed. The methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) C676T polymorphism was determined by polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) assay. The levels of homocysteine (Hcy), acidum folicum, fasting glucose, postprandial glucose, glycosylated hemoglobin (HbA_{1c}), urinary albumin excretion rate (UAER), and blood lipid were measured respectively, and the TCM syndromes were recorded. **Results** Of the 63 patients, 19 were genotype CC, 17 were genotype TT, and 27 were genotype CT. The genotypic frequency of TT was 27.00%, that of CT was 42.85%, and that of CC was 30.15%. The T allele frequency was 48.41% and C allele frequency 51.59%. The MTHFR C676T mutation was related with plasma Hcy level ($P<0.01$) and triglyceride (TG) level ($P<0.05$). TCM syndromes were related with genotypes ($P<0.01$). The genotype CC was mostly in the syndrome of yin deficiency with heat, the genotype CT was mostly in the syndrome of both qi and yin deficiency, and the genotype TT was mostly in the syndrome of both yin and yang deficiency. **Conclusion** The MTHFR C677 base alkali polymorphism in patient of early DN was related with plasma Hcy and TG levels and TCM syndromes.

Key Words Diabetic nephropathy; TCM syndrome; Methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR); Homocysteine (Hcy)

糖尿病肾病(DN)是糖尿病的主要并发症之一,在糖尿病人群中的发生率约为20%~40%^[1]。此病涉及肾脏小血管和肾小球病变,造成蛋白尿排泄和滤过的异常。糖尿病的自然过程是从正常蛋白尿、亚临床蛋白尿排泄,也称微量蛋白尿发展为临床蛋白尿,至终末期肾功能衰竭。然而DN可以被阻止或延缓于任何一个阶段,早期甚至是可逆的。研究表明,遗传因素在DN的发生发展中起关键作用,亚甲基四氢叶酸还原酶

(MTHFR)基因C676T突变的基因型增加了DN的发生^[2-3],下面就早期DN患者MTHFR基因C676T突变的基因型与中医证型及相关因素作一探讨。

1 资料和方法

1.1 一般资料

病例选自2007年1月~2009年5月中国中医科学院广安门医院门诊和住院患者。共收集63例早期DN患者,其中男42例,女21例;年龄39~72岁,平均55.5岁;糖尿病病程10~22年,平均13.1年;早期DN病程2个月~9年,平均2.4年;合并脂代谢紊乱37例,合并

高血压 26 例, 合并冠心病 10 例, 合并脑血管病 7 例。

1.2 诊断标准

西医诊断标准: 参照《肾脏病学》^[4] 符合以下条件诊断为早期 DN: ①确切的 2 型糖尿病病史; ②半年内连续两次尿蛋白排泄率(UAER) 为 20~200 $\mu\text{g}/\text{min}$, 或 24h 尿蛋白定量为 30~300mg。分期标准: 根据国际通用的 Mogensen 分期标准^[4], 早期 DN 属于 III 期, 主要表现为微量蛋白尿, 血压轻度升高。

1.3 中医辨证标准

根据《中药新药临床研究指导原则》^[5] 辨证分为 3 型: ①阴虚热盛证: 症见口渴引饮, 小便频数, 口干舌燥, 消谷善饥, 形体消瘦, 大便秘结, 舌红苔黄, 脉数。②气阴两虚证: 症见神疲乏力, 汗出气短, 心悸失眠, 怔忡健忘, 五心烦热, 咽干舌燥, 舌红苔薄, 脉濡细。③阴阳两虚证: 症见畏寒倦卧, 手足心热, 口干喜热饮, 小便清长, 大便溏薄, 舌淡苔白, 脉沉细。

1.4 纳入及排除标准

纳入标准: 凡符合早期 DN 诊断, 可纳入本研究。
排除标准: 原发性肾脏疾病; 严重的心血管与肝脏疾病; 18 岁以下或者孕妇及哺乳期的妇女; 合并感染或发热的患者; 肿瘤患者。

1.5 观察指标和方法

1.5.1 各基因型相关因素的检测 测定空腹及餐后血糖、糖化血红蛋白(HbA_{1c})、尿白蛋白排泄率(UAER) 及血脂(包括甘油三酯、总胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇及低密度脂蛋白胆固醇)。血浆同型半胱氨酸(Hcy) 浓度采用酶联免疫吸附法检测; 血浆叶酸浓度采用放射免疫法测定。

1.5.2 MTHFR 基因 C677T 位点突变检测 采用聚合酶链反应-限制性内切酶片段长度多态性技术检测。MTHFR 引物序列按参考文献^[6] 设计, 由上海生物工程公司合成, 引物 1: 5'-

TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA-3', 引物 2: 5'-AGGACGGTGCGGTGAGAGTG-3'。扩增片段长度为 198bp, 用 2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。酶切产物基因型判定: CC 型为缺乏相应酶切位点(198, 单带); CT 型为存在酶切位点的杂合子基因型(198, 175 双带), TT 型为存在酶切位点的纯合子基因型(175, 单带)。

1.6 统计学方法

利用 SPSS 12.0 软件进行统计分析, 计量资料采用单因素方差分析, 采用均数±标准差表示; 计数资料采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 MTHFR 基因的 677 碱基多态性情况

63 例早期 DN 患者中 CC 型 19 例, TT 型 17 例, CT 型 27 例, TT、TC、CC 的基因型频率分别为 27.00%、42.85%、30.15%; T 等位基因频率为 48.41%, C 等位基因频率 51.59%。

2.2 中医证型与基因型的相关性分析

表 1 中医证候与基因型的相关性				
中医证型	例数	CC 基因型	CT 基因型	TT 基因型
阴虚热盛证	17	11	5	1
气阴两虚证	24	4	14	6
阴阳两虚证	22	4	8	10

表 1 示, 中医证型与基因型具有相关性($\chi^2 = 19.778_{\text{a}}$, $P < 0.01$), CC 型基因多辨证为阴虚热盛, 杂合子基因型 CT 多辨证为气阴两虚, 纯合子基因型 TT 多辨证为阴阳两虚。

2.3 基因型的相关因素分析

表 2 示, MTHFR 的 C676T 突变与 Hcy 及甘油三酯水平具有相关性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 与其他因素无统计学意义。不同基因组间两两比较显示, TT 基因型与 CC、CT 两基因型相比较, 甘油三酯水平更高($P < 0.05$)。

表 2 各基因型的相关因素分析

相关因素	CC 基因型	CT 基因型	TT 基因型	F	P
Hcy($\mu\text{mol}/\text{L}$)	22.98±9.39	30.27±9.03	31.33±8.24	5.065	$P < 0.01$
叶酸($\mu\text{g}/\text{L}$)	10.58±4.62	9.94±3.25	11.59±4.19	0.795	$P > 0.05$
HbA _{1c} (%)	7.24±1.75	8.10±1.65	7.62±1.78	1.142	$P > 0.05$
空腹血糖(mmol/L)	8.40±2.91	8.70±7.73	9.33±2.91	0.479	$P > 0.05$
餐后血糖(mmol/L)	11.83±6.35	11.93±4.45	11.29±4.30	0.089	$P > 0.05$
UAER($\mu\text{g}/24\text{h}$)	59.12±37.17	64.68±42.31	45.41±21.77	1.489	$P > 0.05$
甘油三酯(mmol/L)	1.62±0.60	1.90±0.85	2.33±1.06	3.120	$P < 0.05$
胆固醇(mmol/L)	5.28±1.35	5.36±1.19	5.17±1.21	0.122	$P > 0.05$
高密度脂蛋白胆固醇(mmol/L)	1.36±0.32	1.32±0.32	1.37±0.22	0.165	$P > 0.05$
低密度脂蛋白胆固醇(mmol/L)	2.81±1.11	3.26±0.76	3.32±0.55	2.098	$P > 0.05$

3 讨论

DN 即糖尿病性肾小球硬化症, 是糖尿病最主要

的微血管并发症之一。关于早期 DN 的中医辨证参照了“三型辨证”理论体系,20 世纪 80 年代初,本课题组总结出糖尿病“三型辨证”理论体系,具体为阴虚热盛型、气阴两虚型、阴阳两虚型 3 型。“三型辨证”理论体系自 1990 年以来被卫生部制定《中药新药临床研究指导原则》所采用至今,故为中医药或中西医结合防治糖尿病的临床研究提供了重要的辨证依据^[7]。本研究显示,早期 DN 中医证型与基因型具有相关性($P < 0.01$),CC 型基因多辨证为阴虚热盛,杂合子基因型 CT 多辨证为气阴两虚,纯合子基因型 TT 多辨证为阴阳两虚。故 MTHFR 基因的 677 碱基多态性的不同基因型可能成为指导中医辨证用药的有用指标之一。

MTHFR 基因 C667T 突变是最常见的突变,C667T 的等位基因突变位点位于第 667 个核苷酸,胸腺嘧啶(T)取代胞嘧啶(C),导致一个高度保守的丙氨酸(Ala)被缬氨酸(Val)代替,同时产生了一个 Hinf I 和 T_{ap}I 限制性酶切位点。根据 C 突变为 T 后产生的 Hinf I 限制性内切酶切位点,可将其分成 3 种基因型:CC 型(野生型)最多见,其次是 CT 型(杂合子型),TT 型(突变的纯合子型)最少。C667T 位于 MTHFR 催化区域,其突变直接导致 MTHFR 的活性和耐热性降低。研究发现 TT 型突变对酶的活性影响最大。37℃ 时,TT 型突变酶的活性在为 CC 型酶的活性的 40%~50%,46℃ 时仅为 35%;杂合子突变酶活性亦有下降,居于 CC 型与 TT 型之间^[8]。由基因突变引起的 MTHFR 活性下降会导致 Hcy 的转硫基和甲基化过程出现障碍,引起血中 Hcy 水平升高。本研究结果表明,MTHFR 的 C667T 突变与 Hcy 水平具有相关性($P < 0.01$)。Hcy 是一种血管损伤性氨基酸,高 Hcy 血症是促进糖尿病大、小血管并发症的因素之一。研究认为,高 Hcy 血症与尿蛋白排泄率和 DN 有关^[9]。我们将进一步探讨中药复方制剂对 Hcy 水平及 MTHFR 基因 C667T 突变的影响,为中医药治疗 DN 提供理论依据。

血脂异常可能是 DN 的重要危险因素之一^[10],2 型糖尿病患者中伴肾病比无肾病患者存在更明显脂代谢异常,且以甘油三酯增高为显著特点。本研究结果显示,MTHFR 基因的 C667T 突变与甘油三酯水平具有相关性($P < 0.05$)。进一步分组研究 MTHFR 基因 677C→T 与血脂的关系发现,3 组中仅 MTHFR T/T 组有更高的甘油三酯水平,而其他血脂水平差异无统计学意义。提示脂代谢紊乱与糖尿病肾病关系密切,有效的治疗脂代谢紊乱,特别是降低高甘油三酯,是否可以逆转基因突变,需待进一步研究。

参考文献

[1]廖二元,莫朝晖.内分泌学[M].2 版.北京:人民卫生出版社,2007:1448-1449.

[2]曹宏,黄德芳,毛莉,等.血清同型半胱氨酸水平、亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性与糖尿病肾病相关性研究[J].南京医科大学学报(自然科学版),2005,25(4):249-251.

[3]王龙清,汪吉仪,薛耀明,等.甲基四氢叶酸还原酶基因多态性与糖尿病肾病关系的研究[J].中华医学遗传学杂志,2001,18(4):276-278.

[4]王海燕.肾脏病学[M].3 版.北京:人民卫生出版社,1996:949-967.

[5]郑筱萸.中药新药临床研究指导原则[M].北京:中国医药科技出版社,2002:233-237.

[6]Neugebauer S, Baba T, Watanabe T, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism as a risk factor for diabetic nephropathy in NIDDM patients [J]. Lancet, 1998, 352(9126):454.

[7]闫秀峰,倪青,孟凤仙.“三型辨证”的应用现状及其对中医药治疗糖尿病的影响[J].中国中医药信息杂志,2005,12(6):95-98.

[8]徐倍,张军.亚甲基四氢叶酸还原酶基因(C667T)多态性与糖尿病血管病变[J].国外医学分子生物学分册,2003,25(6):375-377.

[9]Stabler SP, Estacio R, Jeffers BW, et al. Total homocysteine is associated with nephropathy in non-insulin-dependent diabetes mellitus [J]. Metabolism, 1999, 48(9):1096-1101.

[10]王惠芳,白晓宁,何华,等.血脂异常对 2 型糖尿病肾病的影响[J].西安医科大学学报,2002,23(3):280-283.

(收稿日期:2009-08-24;修回日期:2009-11-30)
[编辑:叶晨]

2010 中澳中医药学术研讨会的通知

为弘扬中医药学,与澳洲中医界学者、专家交流探索中、西医诊疗的发展道路,为中澳中医界搭建一个高效的交流平台,世界针灸学会联合会与澳洲中医药学会于 2010 年 9 月 10~18 日在悉尼举办“中澳中医药学术研讨会”,欢迎广大学者、专家踊跃报名,前往交流。1. 活动内容:交流使用传统医药疗法和非药物疗法的特色与优势,与当地中医专家会面并研讨有关中医药科研和商业合作项目,访问悉尼科技大学和西悉尼大学的中医学院等活动。2. 主要征文范围:中医药临床研究成果和经验;非药物疗法临床经验;中医药在国际市场的管理和运作。3. 论文要求:论文字数 2000~5000 字,同时撰写 150~200 字左右的中、英文摘要;论文及摘要请用 Word 格式电子版发送至:info@wfas-acu.org;入选论文将颁发论文证书;截稿日期:2010 年 7 月 10 日。

投稿地址:北京广渠门内夕照寺大街东玖大厦世界针灸学会联合会世针针灸交流中心,邮编:100061,联系人:张跃琴,电话:(010)87196318 传真:(010)87196320