·临床研究·

Nrf2基因多态性与糖尿病视网膜病变的相关性研究

李 曼,任勇刚,张 淼

引用:李曼,任勇刚,张淼. Nrf2 基因多态性与糖尿病视网膜病变的相关性研究.国际眼科杂志 2019;19(2):268-271

作者单位:(721000)中国陕西省宝鸡市眼科医院眼底病科
作者简介:李曼,本科,主治医师,研究方向:青光眼。
通讯作者:任勇刚,本科,副主任医师,研究方向:眼底病. 23206537@qq.com
收稿日期: 2018-06-21 修回日期: 2018-12-04

摘要
目的:探讨陕西地区汉族人群中,核因子 E2 相关因子 2(Nrf2)基因多态性与糖尿病视网膜病变(DR)的相关性。
方法:收集 2016-01/2017-01 在我院治疗的 386 例 2 型糖尿病(T2DM)患者分为无视网膜病变(DWR)组 181 例,增生期 DR(PDR)组 62 例和非增生期 DR(NPDR)组 143 例。另外,收集 120 例非糖尿病且无视网膜疾病的患者作为对照组。采用聚合酶链反应(PCR)联合 DNA 直接测序法检测 Nrf2 基因启动子 rs6721961 位点单核苷酸多态性。
结果: DWR 组与对照组比较,rs6721961 位点基因型和等位基因分布频率均无差异($P>0.05$);PDR 组和 NPDR 组分别与对照组和 DWR 组比较,突变纯合子(AA 基因型)和突变基因(A 等位基因)分布频率差异均有统计学意义($P<0.05$)。PDR 组和 NPDR 组比较,基因型和等位基因分布频率均无差异($P>0.05$)。Logistic 多因素回归分析结果显示 rs6721961 位点 A 等位基因与 DR 发生相关($OR=1.532$, $95\%CI$:1.169~2.008, $P=0.014$)。
结论: Nrf2 基因多态性可能与 DR 遗传易感性相关。
关键词:糖尿病视网膜病变;核因子 E2 相关因子 2;基因多态性
DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2019.2.19

Association between Nrf2 gene polymorphism and diabetic retinopathy

Man Li, Yong-Gang Ren, Miao Zhang

Department of Fundus Diseases, Baoji Ophthalmology Hospital, Baoji 721000, Shaanxi Province, China
Correspondence to: Yong - Gang Ren. Department of Fundus Diseases, Baoji Ophthalmology Hospital, Baoji 721000, Shaanxi Province, China.23206537@qq.com
Received:2018-06-21 Accepted:2018-12-04

Abstract
• AIM: To investigate the association between NF-E2-related factor 2 (Nrf2) gene polymorphism and diabetic retinopathy (DR) in the Han descent population of Shaanxi province.
• METHODS: Totally 386 patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM) who hospitalized in our hospital from January 2016 to January 2017 were recruited to participate in the study, they were divided into diabetic without retinopathy (DWR) group (181 cases), proliferative diabetic retinopathy (PDR) group (62 cases) and non-proliferative diabetic retinopathy (NPDR) group (143 cses). Meanwhile, 120 healthy volunteers without DR were recruited to participate in the study as the control group. Genotype was determined by polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism combined with DNA direct sequencing technique for the polymorphism of the Nrf2 gene.
• RESULTS: There was no significant difference of genotype and allele distribution of rs6721961 polymorphism between the DWR group and control group, neither PDR group and NPDR group ($P>0.05$). PDR group and NPDR group were compared with control group and DWR group respectively, the genotype and allele distribution of Nrf2 polymorphism were significantly different ($P<0.05$). Multivariable logistic regression analysis showed that A allele ($OR=1.532$, $95\%CI$ 1.169-2.008, $P=0.014$) distribution of rs6721961 polymorphism were associated with risk of DR.
• CONCLUSION: Polymorphism of the Nrf2 gene may associate with the risk of DR.
• KEYWORDS: diabetic retinopathy; NF-E2-related factor 2; gene polymorphism

Citation: Li M, Ren YG, Zhang M. Association between Nrf2 gene polymorphism and diabetic retinopathy. *Guoji Yanke Zazhi* (*Int Eye Sci*) 2019;19(2):268-271

0 引言

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy,DR)是糖尿病患者最常见的并发症之一,也是成年人致盲最主要的病因之一[1]。研究结果显示严格控制血糖、血压、血脂等危险因素能有效延缓和减轻糖尿病患者 DR 等并发症的发生和发展,但不能彻底阻止其发生,同时还存在部分患者代谢控制不良却不发生 DR,提示 DR 可能是由环境和遗传多因素交互作用所致[2]。近年来相继有研究发现维甲酸 X 受体基因、醛糖还原酶基因、血管紧张素转化酶基因和糖基化终末产物受体基因等与 DR 发生密切相关。越来越多研究证据表明氧化应激可能与 DR 发病及进展均密切相关[3-4],氧化应激可导致细胞膜完整性破坏,通过刺激细胞凋亡,加速微血管损害和血-眼屏障破坏,进而参与 DR 的发生、发展过程。核因子 E2 相关因子 2(NF-E2-related factor 2, Nrf2)是细胞氧化应激损伤的重要保

表1 各组基本临床特征比较

组别	例数	男性(例,%)	年龄($\bar{x}\pm s$,岁)	病程($\bar{x}\pm s$,a)	BMI($\bar{x}\pm s$,kg/m^2)	吸烟(例,%)	高血压(例,%)	使用胰岛素(例,%)
对照组	120	67(55.8)	62.5±10.2	-	24.3±2.9	36(30.0)	28(23.3)	-
DWR组	181	92(50.8)	63.8±8.9	14.5±5.8	23.9±2.7	54(29.8)	40(22.1)	98(54.1)
PDR组	62	38(61.3)	61.5±11.1	15.3±5.2	24.1±3.3	21(33.9)	14(22.6)	35(56.5)
NPDR组	143	87(60.8)	61.8±8.5	14.8±4.8	24.5±3.1	50(35.0)	30(21.0)	80(55.9)
F/χ^2		4.028	1.611	0.545	1.194	1.284	0.218	0.153
P		0.258	0.186	0.582	0.312	0.733	0.975	0.926

组别	空腹血糖($\bar{x}\pm s$,mmol/L)	糖化血红蛋白($\bar{x}\pm s$,%)	TG($\bar{x}\pm s$,mmol/L)	TC($\bar{x}\pm s$,mmol/L)	LDL-C($\bar{x}\pm s$,mmol/L)	HDL-C($\bar{x}\pm s$,mmol/L)
对照组	5.3±1.5	5.5±2.0	1.9±1.5	5.3±2.7	3.2±1.4	1.2±0.3
DWR组	8.3±2.6^a	7.1±2.2^a	2.3±1.6	5.5±2.4	3.4±1.6	1.2±0.3
PDR组	8.8±3.2^a	7.8±2.6^a	2.2±2.2	5.8±3.0	3.5±1.8	1.1±0.4
NPDR组	9.2±2.7^{a,c}	7.3±2.3^a	2.2±1.8	5.2±2.3	3.6±1.5	1.1±0.4
F	60.110	20.864	1.138	0.984	1.108	2.175
P	<0.01	<0.01	0.336	0.402	0.347	0.090

注:对照组:健康志愿者;$^aP<0.05$ *vs* 对照组;$^cP<0.05$ *vs* DWR组。

护性因子,近年来不断有研究发现Nrf2-抗氧化反应元件(antioxidant response element,ARE)通路可能参与DR发病过程[5-6]。Xu等[7]研究发现Nrf2基因多个单核苷酸多态性位点与糖尿病发病无明显关联性,但与并发症发生密切相关。徐晓红[8]也发现Nrf2基因多态性可能与糖尿病血脂异常及并发症相关。然而,两项研究均未就Nrf2基因多态性与DR易感性的相关性进行观察。本研究以我国陕西汉族人群为研究对象,观察Nrf2基因多态性与DR的相关性,为临床工作提供参考。

1 对象和方法

1.1 对象 选择2016-01/2017-01于我科门诊和(或)住院治疗的2型糖尿病(diabetes mellitus type 2,T2DM)患者,T2DM诊断均符合2013年中华医学会糖尿病学分会制定的2型糖尿病诊断标准[9],且排除胰岛细胞抗体,或胰岛素抗体,或谷氨酰胺脱羧酶抗体阳性,以及胰岛素释放试验胰岛素水平低下的患者。参照2014年我国糖尿病视网膜病变临床诊疗指南[10]将T2DM组患者分为无视网膜病变(diabetic without retinopathy,DWR)组,增殖期DR(proliferative diabetic retinopathy,PDR)组和非增殖期DR(non-proliferative diabetic retinopathy,NPDR)组,其中DWR组共181例患者,包括男92例,女89例,平均年龄63.8±8.9岁;PDR组共62例患者,包括男38例,女24例,平均年龄61.5±11.1岁;NPDR组共143例患者,包括男87例,女56例,平均年龄61.8±8.5岁。选取同期在我院健康体检的120例无糖尿病及视网膜疾病的志愿者作为对照组,其中男67例,女53例,平均年龄62.5±10.2岁。所有入组人员均为汉族,彼此无血缘关系。本研究通过本院伦理委员会审核批准,所有入组成员均充分知情同意。

1.2 方法 临床资料收集包括年龄、性别、体质量指数(body mass index,BMI)、吸烟史、血压及糖尿病病史等基本信息,也包括眼科检查及实验室检查结果,眼科检查包括验光、小孔视力及裂隙灯显微镜检查,实验室检查包括血糖、糖化血红蛋白、总胆固醇(total cholesterol,TC)、甘油三酯(triglyceride,TG)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol,LDL-C)及高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol,HDL-C)等。

基因多态性检测:采集清晨空腹时外周静脉血用于实验室检查,部分样本采用DNA提取试剂盒(天根生化科技有限公司,北京)提取全血基因组DNA。采用聚合酶链反应(polymerase chain reaction,PCR)联合DNA直接测序法检测Nrf2基因启动子rs6721961位点单核苷酸多态性。PCR反应体系(25μL)包括:10×Buffer 2.5μL,上、下游引物各1μL(上游:5'-GGGTTCCCGTTTTTCTCCCAGCTCTGGGTG-3';下游:5'-TGTTTGCGAAGGTCGCTGGAGTTCGGACGC-3'),dNTP混合物2μL,TaqDNA聚合酶0.25μL,模板DNA 1μL,不足部分由灭菌蒸馏水补足。反应条件为95℃预变性4min,然后按照变性95℃ 20s、退火65℃ 30s、延长72℃ 50s的顺序循环30周期,最后72℃延长3min。取0.5μL延伸产物,经1%琼脂糖凝胶电泳确定,对PCR产物直接测序。

统计学分析:采用SPSS19.0统计软件分析处理,本研究计量资料均符合正态分布及方差齐性,结果以$\bar{x}\pm s$表示,多组间比较采用方差分析,组间两两比较采用SNK-q检验,计数资料结果以构成百分比(%)表示,组间比较采用χ^2检验。基因型分布采用Hardy-Weinberg平衡定律检验。采用比值比(odd ratio,*OR*)及其95%可信区间(confidence interval,*CI*)表示相对风险度。采用Logistic多因素回归分析法,校正性别、年龄、空腹血糖及糖化血红蛋白等混杂因素,评估rs6721961位点基因多态性与DR的相关性。$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组间基本临床资料比较 四组的性别和年龄差异均无统计学意义,另外在病程,BMI,吸烟,高血压,使用胰岛素情况,TG,TC,LDL-C和HDL-C等指标四组间差异均无统计学意义。DWR组,PDR组和NPDR组分别与对照组比较,空腹血糖及糖化血红蛋白水平差异均具有统计学意义($P<0.05$),见表1。

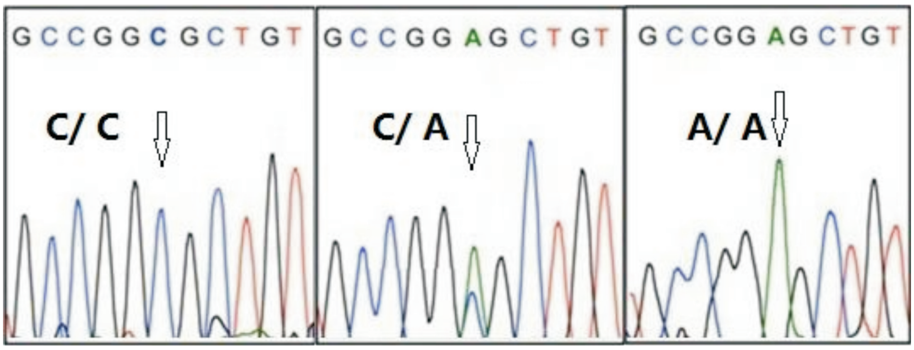

图 1 rs6721961 基因型判读。

表 2 各组 Nrf2 基因型和等位基因分布

分组	例数	C/C	C/A	A/A	C	A
对照组	120	63(52.5)	44(36.7)	13(10.8)	170(70.8)	70(29.2)
DWR 组	181	98(54.1)	65(35.9)	18(9.9)	261(72.1)	101(27.9)
PDR 组	62	24(38.7)	24(38.7)	14(22.6)	72(58.1)	52(41.9)
NPDR 组	143	60(42.0)	55(38.5)	28(19.6)	175(61.2)	111(38.8)

分组	C/C		C/A		A/A		C		A	
	OR(95% *CI*)	*P*	*OR*(95% *CI*)	*P*	*OR*(95% *CI*)	*P*	*OR*(95% *CI*)	*P*	*OR*(95% *CI*)	*P*
对照组 *vs* DWR 组	1.0	-	0.950(0.578~1.560)	0.839	0.890(0.480~1.943)	0.770	1.0	-	0.940(0.655~1.348)	0.736
对照组 *vs* PDR 组	1.0	-	1.432(0.722~2.839)	0.303	2.827(1.162~6.879)	0.019	1.0	-	1.754(1.116~2.757)	0.014
对照组 *vs* NPDR 组	1.0	-	1.313(0.772~2.232)	0.315	2.262(1.072~4.772)	0.030	1.0	-	1.540(1.068~2.221)	0.020
DWR 组 *vs* PDR 组	1.0	-	1.508(0.790~2.879)	0.212	3.176(1.386~7.275)	0.005	1.0	-	1.866(1.221~2.853)	0.004
DWR 组 *vs* NPDR 组	1.0	-	1.382(0.854~2.238)	0.188	2.541(1.295~4.983)	0.006	1.0	-	1.639(1.178~2.281)	0.003
PDR 组 *vs* NPDR 组	1.0	-	0.917(0.467~1.798)	0.800	0.800(0.360~1.776)	0.583	1.0	-	0.878(0.572~1.348)	0.553

注:对照组:健康志愿者。

表 3 Logistic 多因素回归分析

变量	*B*	*S.E*	*Wald*	*OR*	95%*CI*	*P*
性别	1.152	1.140	1.021	3.164	0.339~29.555	0.217
年龄	0.711	0.685	1.077	2.036	0.532~7.796	0.179
空腹血糖	1.136	0.462	6.049	3.115	1.260~7.703	0.004
糖化血红蛋白	1.037	0.463	5.017	2.822	1.138~6.993	0.007
A 等位基因	0.427	0.138	9.555	1.532	1.169~2.008	0.014

2.2 Hardy-Weinberg 遗传平衡检验结果 Nrf2 基因 rs6721961 位点基因型包括 C/C,C/A 和 A/A 三种,本研究各组 rs6721961 位点基因型分布经检验均符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡($P>0.05$),具有群体代表性,见图 1。

2.3 各组 rs6721961 位点基因型和等位基因分布频率及其与 DR 的关系 DWR 组与对照组比较,位点基因型和等位基因分布频率差异均无统计学意义($P>0.05$);PDR 组和 NPDR 组分别与对照组和 DWR 组比较,突变纯合子(AA 基因型)和突变基因(A 等位基因)分布频率差异均有统计学意义($P<0.05$)。PDR 组和 NPDR 组比较,基因型和等位基因分布频率差异均无统计学意义($P>0.05$),见表 2。

2.4 Logistic 多因素回归分析 将 PDR 组和 NPDR 组合并,对照组与 DWR 组合并,采用 Logistic 多因素回归分析,校正性别、年龄、空腹血糖及糖化血红蛋白等混杂因素,rs6721961 位点 A 等位基因与 DR 相关($OR=1.532$, 95%CI: 1.169~2.008, $P=0.014$),见表 3。

3 讨论

高血糖状态下,蛋白激酶 C 途径、多元醇途径及氨基己糖途径等多条途径可被激活,使细胞氧自由基产生增多,同时还原性谷胱甘肽等抗氧化剂被大量消耗,机体氧化/抗氧化平衡被打乱,处于氧化应激状态[3-5]。视网膜作为一种高耗氧组织,较其他组织更容易受到氧化应激损伤。Xu 等[5]研究发现高糖条件下,视网膜 Müller 细胞和血管内皮细胞生成超氧化物明显增多,细胞凋亡增加,加入抗氧化剂后,细胞凋亡可被抑制。还有临床研究结果显示 DR 患者血清中脂质过氧化物水平明显高于 DWR 患者,而 DWR 患者与正常对照组比较,血清脂质过氧化物水平差异无统计学意义[11]。这些研究证据均提示氧化应激在 DR 发生及进展过程中发挥重要作用。

Nrf2 是体内介导抗氧化应激反应最主要的细胞防御机制之一,氧化应激刺激可激活胞浆中的 Nrf2 分子,促使 Nrf2 立即转位至细胞核内,与 ARE 结合,调节下游基因表达,包括多种与机体抗氧化相关基因,发挥稳定抗氧化作用[12]。近年来,不断有研究发现 Nrf2 与 DR 密切相关,Nrf2 表达减少可能是 DR 发病的重要原因之一,激活 Nrf2 表达可能是未来治疗 DR 的重要途径[6]。有研究发现 Nrf2 基因敲除的小鼠视网膜色素上皮细胞存在退行性病理改变[13],还有研究以 Nrf2 基因敲除小鼠构建视网膜缺血-再灌注损伤模型,发现 Nrf2 对视网膜缺血-再灌注损伤具有保护作用[14]。此外,血色素氧化酶-1 作为 Nrf2-ARE 途径下游重要表达产物,也被发现与 DR 病变过程中视网膜神经元损伤相关。

然而,目前关于 Nrf2 基因多态性与 DR 易感性的相关

研究鲜有报道,Xu 等[7-8]学者研究发现 Nrf2 基因多个位点与糖尿病患者并发症发生密切相关,但均未单独就 DR 与 Nrf2 基因多态性进行分析。本研究选择的 Nrf2 基因 rs6721961 C→A 多态性位点位于启动子上游,可通过调控转录的方式来影响 Nrf2 表达和活性,已被证实与动脉粥样硬化、癫痫、帕金森等多种病理改变或疾病易感性相关[15-16]。同时该位点在中国汉族人群中存在广泛变异,适合作为基因多态性研究的位点。本研究结果显示对照组 rs6721961 位点 A 等位基因频率为 29.2%,与既往国人研究结果相符[15-16]。Logistic 多因素回归分析结果显示 rs6721961 位点 A 等位基因均是 T2DM 患者发生 DR 的危险因素,表明 Nrf2 基因 rs6721961 多态性与 DR 易感性密切相关,对于进一步证实 Nrf2-ARE 通路在 DR 发病过程中的作用,同时提示对于存在 rs6721961 位点 A 等位基因,尤其 A/A 基因型的 T2DM 患者,更加需要注意 DR 的预防,加强血糖管理。本研究还发现 PDR 组和 NPDR 组 rs6721961 位点基因型和等位基因分布频率差异均无统计学意义,提示 rs6721961 多态性可能与 DR 进展过程无关,但遗憾本研究未对纳入研究对象血清 Nrf2 水平进行测量,无法评估 Nrf2 本身与 DR 进展是否关联,需要后续研究进一步证实。

综上所述,Nrf2 基因 rs6721961 多态性可能与 DR 易感性密切相关,但本研究纳入对象有限,需要更多相关研究结果验证。而且,Nrf2 基因包括多个 SNP 位点,对于其他位点多态性与 DR 易感性的关系,以及多个位点之间的相互关系尚不明确,也需要后续进一步研究。

参考文献

1 Solomon SD, Chew E, Duh EJ, *et al*. Diabetic Retinopathy: A Position Statement by the American Diabetes Association. *Diabetes Care* 2017; 40(3):412-418
2 Xu J, Xu L, Du KF, *et al*. Subfoveal choroidal thickness in diabetes and diabetic retinopathy. *Ophthalmology* 2013;120(10):2023-2038
3 Giordano CR, Roberts R, Krentz KA, *et al*. Catalase therapy corrects oxidative stress - induced pathophysiology in incipient diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2015; 56(5):3095-3102
4 Yang X, Huo F, Liu B, *et al*. Crocin Inhibits Oxidative Stress and Pro-inflammatory Response of Microglial Cells Associated with Diabetic Retinopathy Through the Activation of PI3K/Akt Signaling Pathway. *J Mol Neurosci* 2017; 61(4):581-589
5 Xu Z, Wei Y, Gong J, *et al*. NRF2 plays a protective role in diabetic retinopathy in mice. *Diabetologia* 2014; 57(1):204-213
6 Zhong Q, Mishra M, Kowluru RA. Transcription factor Nrf2-mediated antioxidant defense system in the development of diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013; 54(6):3941-3948
7 Xu X, Sun J, Chang X, *et al*. Genetic variants of nuclear factor erythroid - derived 2 - like 2 associated with the complications in Han descents with type 2 diabetes mellitus of Northeast China. *J Cell Mol Med* 2016; 20(11):2078-2088
8 徐晓红. NRF2 基因多态性与 2 型糖尿病及其并发症关系的研究. 吉林大学 2013
9 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南(2013 年版). 中华内分泌代谢杂志 2014; 30(10):26-89
10 中华医学会眼科学会眼底病学组. 我国糖尿病视网膜病变临床诊疗指南(2014 年). 中华眼科杂志 2014;50(11):851-865
11 Berkowitz BA, Grady EM, Khetarpal N, *et al*. Oxidative stress and light-evoked responses of the posterior segment in a mouse model of diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2015; 56(1):606-615
12 Ruiz S, Pergola PE, Zager RA, *et al*. Targeting the transcription factor Nrf2 to ameliorate oxidative stress and inflammation in chronic kidney disease. *Kidney Int* 2013; 83(6):1029-1041
13 Zhao Z, Chen Y, Wang J, *et al*. Age-related retinopathy in NRF2-deficient mice. *PloS One* 2011; 6(4):e19456
14 Wei Y, Gong J, Yoshida T, *et al*. Nrf2 has a protective role against neuronal and capillary degeneration in retinal ischemia - reperfusion injury. *Free Radi Biol Med* 2011; 51(1):216-224
15 Figarska SM, Vonk JM, Boezen HM. NFE2L2 polymorphisms, mortality, and metabolism in the general population. *Physiol Genomics* 2014; 46(12):411-417
16 Kunnas T, Määttä K, Nikkari ST. Genetic Polymorphisms of Transcription Factor NRF2 and of its Host Gene Sulfiredoxin (SRXN1) are Associated with Cerebrovascular Disease in a Finnish Cohort, the TAMRISK Study. *Int J Med Sci* 2016; 13(5):325-329