

海南黎族 2 型糖尿病患者 VEGF 基因多态性与糖尿病视网膜病变关系

吴清静¹, 吴佩佩¹, 鲁晓¹, 彭立^{1,2}, 邢球¹, 谢青¹

引用: 吴清静, 吴佩佩, 鲁晓, 等. 海南黎族 2 型糖尿病患者 VEGF 基因多态性与糖尿病视网膜病变关系. 国际眼科杂志 2022;22(2):322-326

基金项目: 海南省卫生厅科研项目课题 (No.1601032037A2003)
作者单位: ¹(570208) 中国海南省海口市人民医院 中南大学湘雅医学院附属海口医院; ²(410000) 中国湖南省长沙市, 中南大学湘雅二医院眼科
作者简介: 吴清静, 女, 本科, 副主任医师, 研究方向: 眼视光及眼底疾病。
通讯作者: 谢青, 女, 博士, 主任医师, 眼科主任, 研究方向: 白内障、眼底疾病的诊治. oph_xq@163.com
收稿日期: 2021-05-07 修回日期: 2022-01-06

摘要

目的: 探讨海南黎族 2 型糖尿病患者血管内皮细胞生长因子 (VEGF) 基因 rs2010963 和 rs3025039 的单核苷酸多态性与糖尿病视网膜病变 (DR) 的相关性。

方法: 前瞻性研究。随机收集 2016-09/2019-10 海南黎族 2 型糖尿病患者 89 例, 其中非增殖期 DR (NPDR) 患者 30 例、增殖期 DR (PDR) 患者 33 例, 2 型糖尿病无视网膜病变 (DWR) 患者 26 例作为对照。运用聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性技术测序法, 进行 VEGF 基因相应位点的多态性分析, 比较基因型和等位基因频率的差别。

结果: 在 rs2010963 位点上, 与 DWR 组比较, PDR 组 CC 基因型显著升高 ($P < 0.016667$), PDR 组 CG 基因型显著降低 ($P < 0.016667$), 三组患者的 GG 基因型和 C、G 等位基因分布比较均无差异 ($P > 0.05$)。在 rs3025039 位点上, DWR 组, NPDR 和 PDR 组三组的 CC、CT 基因型及 C、T 等位基因分布均无差异 (均 $P > 0.05$)。海南黎族 PDR 患者尿素、肌酐水平较 DWR 和 NPDR 组均显著升高 (均 $P < 0.05$)。

结论: 海南黎族 2 型糖尿病患者 VEGF 基因 rs2010963 基因多态性与 DR 发生有关, CC 基因型可能是 DR 发生的遗传危险因素, 增加 PDR 的易感性。rs2010963 基因多态性对于 PDR 具有协同作用。

关键词: 血管内皮细胞生长因子 (VEGF); 基因多态性; 糖尿病视网膜病变; 黎族; 海南

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2022.2.29

Relationship between VEGF gene polymorphism and diabetic retinopathy in Li nationality type 2 diabetic patients in Hainan

Qing-Jing Wu¹, Pei-Pei Wu¹, Xiao Lu¹, Li Peng^{1,2}, Qiu Xing¹, Qing Xie¹

Foundation item: Scientific Research Project of Hainan Provincial

Health and Family Planning Industry (No.1601032037A2003)

¹Central South University Xiangya School of Medicine Affiliated Haikou Hospital; Haikou People's Hospital, Haikou 570208, Hainan Province, China; ²Department of Ophthalmology, the Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410000, Hunan Province, China

Correspondence to: Qing Xie. Central South University Xiangya School of Medicine Affiliated Haikou Hospital; Haikou People's Hospital, Haikou 570208, Hainan Province, China. oph_xq@163.com

Received: 2021-05-07 Accepted: 2022-01-06

Abstract

• **AIM:** To assess the association of vascular endothelial growth factor (VEGF) gene polymorphisms (rs2010963 and rs3025039) with diabetic retinopathy (DR) in Li nationality type 2 diabetic (T2DM) patients in Hainan.

• **METHODS:** Prospective study. A total of 89 patients with T2DM in the Li nationality in Hainan were randomly categorized (between 09/2016 to 10/2019) into three groups, 30 patients in nonproliferative diabetic retinopathy (NPDR) group, 33 patients in proliferative diabetic retinopathy (PDR) group, and 26 patients in T2DM without retinopathy (DWR) group as control. Polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism method was used to determine the polymorphism in the VEGF gene. Differences in allele frequencies and genotype frequencies between cases and controls were compared.

• **RESULTS:** Compared with the DWR group, the CC genotype of rs2010963 polymorphic site was significantly increased ($P < 0.016667$), and CG genotype was significantly decreased in PDR group ($P < 0.016667$). No significant differences were detected in the frequencies of genotype GG and C, G allele distribution among the three groups ($P > 0.05$). Meanwhile, no significant differences were detected in the frequencies of genotype CC, CT, C, and T in rs3025039 among the three groups (all $P > 0.05$). Plasma levels of serum urea and creatinine were significantly increased in PDR group compared to DWR and NPDR groups in Li nationality group in Hainan (all $P < 0.05$).

• **CONCLUSION:** The polymorphism of the VEGF gene (rs2010963) is associated with DR. CC genotype may be a genetic risk factor for the development of DR, increasing susceptibility to PDR. The rs2010963 related genotype is conferred risk and associated with higher susceptibilities of PDR.

• **KEYWORDS:** vascular endothelial growth factor (VEGF); gene polymorphisms; diabetic retinopathy; the Li nationality; Hainan

Citation: Wu QJ, Wu PP, Lu X, *et al.* Relationship between VEGF gene polymorphism and diabetic retinopathy in Li nationality type 2 diabetic patients in Hainan. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2022;22(2):322-326

0 引言

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是一种常见的致盲眼病,是最严重和最常见的糖尿病微血管并发症之一,已在中老年人群中成为最常见的导致视力损害和不可逆性失明的原因之一^[1-2],DR在糖尿病人群中的患病率大约为三分之一,其中十分之一的人有视力下降,如糖尿病性黄斑水肿(diabetic macular edema, DME)或增殖性DR(proliferative diabetic retinopathy, PDR)。DR发病机制复杂,目前尚无明确一致的发病机制可以解释该疾病的发生发展。DR的发生发展与糖尿病本身以及患者的血糖控制情况密切相关,此外DR的发生亦具有显著的个体差异和家庭聚集性。有文献报道DR的发生有27%的遗传可能性,PDR患者的遗传性更高,可达52%^[3],DR的发生、发展与遗传因素有着密切的关系。

DR患者的视功能和生存质量随着DR的发展受到严重的影响^[4-5],早期发现高风险的DR患者,早期提供最佳的预防和治疗措施,将极大地改善DR患者的视功能预后与生活质量。临床上DR损害患者视功能的主要原因为视网膜新生血管的生成和黄斑水肿的发生,血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)在DR新生血管的生成中扮演者重要角色,有着密切的关系^[6]。

近几年分子生物学研究得到快速发展,识别早期诊断的生物标志物、预后预测和DR的靶向治疗是非常重要的^[7],关于DR在基因层面的科学研究逐渐增多,不断引起学者的重视,生长因子基因多态性与DR发生发展的关系研究是当前国内外研究热点,对评价DR的严重程度以及探索新疗法的研究中起着重要的作用,为研究DR新的治疗靶点提供重要的依据和支持。黎族属于少数民族,中国有125万黎族人口,其中111万来自海南^[8],而海南作为中国唯一的热带地区,本地区的人群的基因多态性与DR相关性的研究鲜有报道,我们旨在探索海南黎族2型糖尿病患者VEGF基因多态性与DR的关系,为早期糖尿病患者的预防、诊断提供有力的依据。

1 对象和方法

1.1 对象 前瞻性研究。随机收集2016-09/2019-10海口市人民医院眼科和内分泌科住院的海南黎族2型糖尿病患者89例,其中男49例,女40例。依据世界卫生组织(WHO)推荐的糖尿病诊断和糖代谢状态分类标准实施。纳入标准:同时满足以下要求:(1)2型糖尿病;(2)祖籍为海南黎族,3代以上父母双方均为海南黎族人;(3)糖尿病病程 ≥ 8 a;(4)所有患者均接受眼科检查(最佳矫正视力、裂隙灯显微镜+90D非接触镜、眼底照相、OCT、FFA)。排除标准:(1)患有酮症酸中毒、心力衰竭、高血糖高渗性昏迷、脑梗塞急性期、尿毒症(肌酐 $\geq 707 \mu\text{mol/L}$)、妊娠期

糖尿病、1型糖尿病患者;(2)既往有高血压性视网膜病变、视网膜静脉阻塞、眼底血管样条纹、中心性浆液性视网膜病变、中心性渗出性脉络膜视网膜病变、息肉状脉络膜血管病变、年龄相关性黄斑变性、视网膜静脉周围炎、脉络膜新生血管病史者。本研究遵循《赫尔辛基宣言》,通过海口市人民医院伦理委员会批准,所有患者均知情同意。

1.2 方法

1.2.1 一般资料收集 通过问卷咨询调查、查阅相关病例、进行相关体格检查和实验室检查进行临床各项指标的收集。所有患者禁食12~14h,晨起空腹抽取肘静脉血,应用全自动生化仪测肌酐、尿素、总胆固醇、甘油三酯;低压液相层析柱法(EDTA抗凝全血,EDTA:血量=1.5mg/mL)测糖化血红蛋白(HbA1c)。

1.2.2 提取基因组DNA 采集纳入研究对象的EDTA抗凝血3mL,按照实验步骤提取研究对象的基因组DNA。

1.2.3 检测基因多态性 应用聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性检测分析法对研究对象提取的样本进行基因多态性检测。引物的设计根据基因序列和相关文献。VEGF基因rs2010963位点PCR扩增全长度为224bp,上游引物为5'-GGATTTTGGAAACCAGCAGA-3',下游引物为5'-CTGTCTGTCTGTCGTCAGC-3'。VEGF基因rs3025039位点PCR扩增全长度为317bp,上游引物为5'-GGGAACCAGATCTCTCACCA-3',下游引物为5'-TGTATGTGGGTGGGTGTGTC-3'。PCR反应体系中含2X Goldstar Buffer Mix 10 μL , H₂O 6 μL , DNA 100ng($\approx 1 \mu\text{L}$), Primer Mix 3 μL 。将配置好的PCR反应体系液置入PCR检测仪里,按照实验步骤进行下一步的PCR检测。按照实验步骤进行样品的基因测序,随后进行上机电泳,应用ABI 3130/ABI 3130XL测序仪实施样品的测序,对样品的rs2010963、rs3025039位点进行相关检测。

统计学分析:采用SPSS22.0统计软件包和GraphPad Prism 7软件处理数据。使用Hardy-Weinberg平衡法对基因型频率的群体代表性进行检验。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)描述,两组之间的比较采用独立样本 t 检验,三组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用Bonferroni检验(检验水准为 $P < 0.016667$)。计数资料的比较选用 χ^2 检验,列表单元格频数小于5时使用Fisher确切概率法,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 三组患者临床资料比较 参照中华医学会眼底病学组的标准对DR进行分组:非增殖期DR(non-proliferative diabetic retinopathy, NPDR)患者30例和增殖期DR(proliferative diabetic retinopathy, PDR)患者33例。将2型糖尿病无视网膜病变(diabetic without retinopathy, DWR)患者26例作为对照。三组患者平均年龄、糖尿病病程、收缩压、舒张压、总胆固醇、甘油三酯、糖化血红蛋白比较差异均无统计学意义($P > 0.05$);PDR患者尿素、肌酐水平较DWR和NPDR组显著升高,差异均有统计学意义($P < 0.016667$),见表1。

2.2 三组患者VEGF基因rs2010963检测结果 三组患者均存在CC、CG及GG三种基因型和C、G两种等位基因,见图1。该位点的基因型分布频率与Hardy-Weinberg平衡定律一致。三组患者各基因分布情况见表2。Fisher

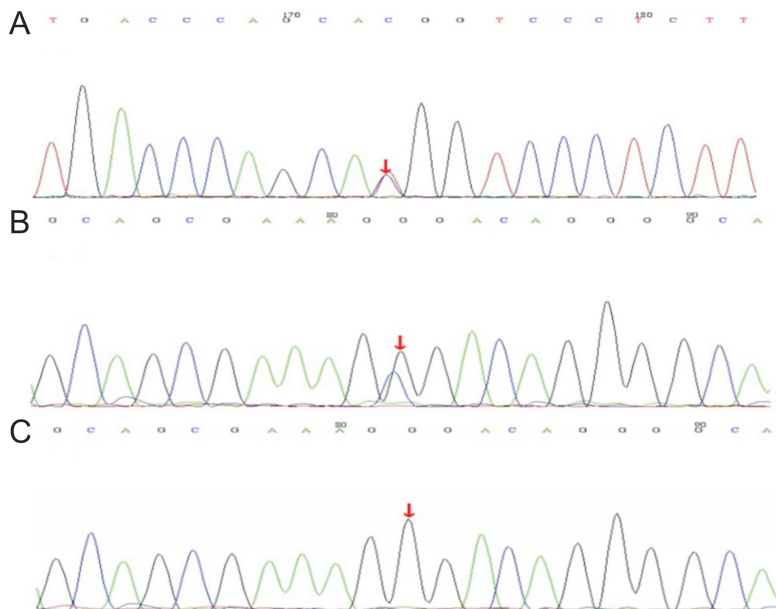


图1 海南黎族2型糖尿病患者 VEGF 基因 rs2010963 位点各基因型测序图 A:CC 基因型;B:CG 基因型;C:GG 基因型。

表1 三组患者临床资料比较

分组	例数	男/女 (例)	年龄 ($\bar{x} \pm s$, 岁)	病程 ($\bar{x} \pm s$, a)	收缩压 ($\bar{x} \pm s$, mmHg)	舒张压 ($\bar{x} \pm s$, mmHg)	糖化 血红蛋白 ($\bar{x} \pm s$, %)	总胆固醇 ($\bar{x} \pm s$, mmol/L)	甘油三酯 ($\bar{x} \pm s$, mmol/L)	尿素 ($\bar{x} \pm s$, mmol/L)	肌酐 ($\bar{x} \pm s$, $\mu\text{mol/L}$)
DWR 组	26	14/12	61.42 \pm 9.74	8.85 \pm 5.55	135.56 \pm 17.97	78.79 \pm 9.75	8.27 \pm 1.58	5.39 \pm 1.09	1.94 \pm 0.86	4.23 \pm 1.85	78.19 \pm 23.18
NPDR 组	30	12/18	66.55 \pm 9.25	10.58 \pm 5.26	141.29 \pm 18.49	82.49 \pm 8.77	9.12 \pm 2.23	4.82 \pm 1.21	1.89 \pm 0.86	5.59 \pm 1.72	100.36 \pm 28.99
PDR 组	33	16/17	66.54 \pm 8.45	11.56 \pm 6.76	145.64 \pm 22.82	81.79 \pm 11.57	9.39 \pm 2.45	5.41 \pm 1.18	1.78 \pm 0.64	6.95 \pm 3.99	170.21 \pm 150.72
F/χ^2		1.107	2.912	1.526	1.834	1.026	2.075	2.477	0.3269	6.828	7.884
P		0.575	0.06	0.22	0.17	0.36	0.13	0.09	0.72	<0.001	<0.001

表2 三组患者 VEGF 基因 rs2010963 基因型及等位基因分布比较 $n(\%)$

分组	例数	基因型			等位基因	
		CC	CG	GG	C	G
DWR 组	26	1(4)	15(58)	10(38)	17(33)	35(67)
NPDR 组	30	9(30)	10(33)	11(37)	28(47)	32(53)
PDR 组	33	13(39)	6(18)	14(42)	32(48)	34(52)

精确检验结果显示三组患者 CC 基因型比较差异有统计学意义 ($P=0.003$), 进一步两两比较显示: DWR 和 NPDR 组差异有统计学意义 ($P=0.014$), NPDR 组和 PDR 组差异无统计学意义 ($P=0.435$), DWR 和 PDR 组差异有统计学意义 ($P=0.002$)。三组患者 CG 基因型比较差异有统计学意义 ($\chi^2=10.046, P=0.006$), 进一步两两比较显示: DWR 和 NPDR 组差异无统计学意义 ($P=0.067$), NPDR 组和 PDR 组差异无统计学意义 ($P=0.168$), DWR 和 PDR 组差异有统计学意义 ($P=0.002$)。三组患者 GG 基因型比较差异无统计学意义 ($\chi^2=0.230, P=0.893$)。三组患者 C 和 G 等位基因分布比较差异均无统计学意义 ($\chi^2=3.384, P=0.184; \chi^2=3.384, P=0.184$), 见表 2。结果提示 CC 基因型增加 PDR 的易感性。

2.3 三组患者 VEGF 基因 rs3025039 位点检测结果

三组患者均存在 C、T 两种等位基因和 CC、CT 两种基因型, NPDR 和 PDR 组还存在 TT 基因型, 见图 2。三组患者 VEGF 基因 rs3025039 基因型及等位基因分布比较见表 3。

表3 三组患者 VEGF 基因 rs3025039 基因型及等位基因分布比较 $n(\%)$

分组	眼数	基因型			等位基因	
		CC	CT	TT	C	T
DWR 组	26	20(77)	6(23)	0	46(88)	6(12)
NPDR 组	30	21(70)	8(27)	1(3)	50(83)	10(17)
PDR 组	33	23(70)	8(24)	2(6)	54(82)	12(18)

Fisher 精确检验结果显示, 三组患者 CC、CT、TT 基因型比较差异均无统计学意义 ($P=0.835, 0.950, 0.773$)。三组患者 C 和 T 等位基因分布比较差异均无统计学意义 ($\chi^2=1.028, P=0.598; \chi^2=1.028, P=0.598$)。

2.4 三组患者不同基因型与 PDR 发生率的比较 与基因型为 TT 的研究对象相比, 等位基因 C 携带者患 PDR 的危险性较高 [82% (54/66) vs 6% (2/33)]。

3 讨论

本研究采用 PCR 结合 DNA 测序法方法首次对中国海南黎族 2 型糖尿病患者 VEGF 基因 rs2010963 和 rs3025039 的单核苷酸多态性进行研究。以上两个单核苷酸位点在 VEGF 的转录及翻译过程中起着不容忽视的重要作用, 但因种族、地区及生活方式的不同, 它们与 DR 的相关性存在较大差异。海南岛地理位置特殊, 有独特的海洋气候, 黎族是海南的土著居民, 历代多居住于山地及丘陵地带, 缺乏与外界交流, 再加上相对封闭保守的婚恋原则, 与外族人通婚较少, 导致黎族基因具有其保守性和独

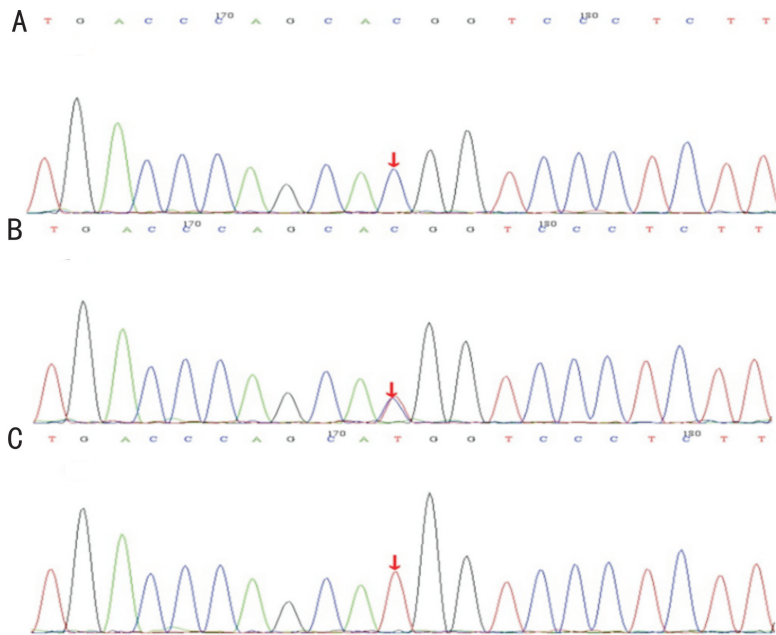


图2 海南黎族 2 型糖尿病患者 VEGF 基因 rs3025039 位点各基因型测序图 A:CC 基因型;B:CT 基因型;C:TT 基因型。

特性,目前鲜有黎族人群的相关报道。单核苷酸多态性的研究较多^[9],是人类最常见的遗传变异形式,估计占人类遗传变异的 90% 以上,是当基因组序列中的单个核苷酸发生改变时所发生的 DNA 序列变异,在多种人类疾病的发生发展中起着重要作用^[10]。VEGF 是一种有效的血管生成和血管通透性因子,其多态性与 DR 的发生发展相关^[11]。

Watson 等^[12]对英国健康人群进行研究发现 VEGF 基因单核苷酸多态性与 VEGF 蛋白表达有关,其中 rs2010963 位点携带 G 等位基因可使 VEGF 基因转录增强,从而使 VEGF 蛋白浓度增加。且携带 GG 基因型的个体血浆 VEGF 含量最高,CG 基因型次之,CC 基因型的含量最低。rs2010963 中的 CC 基因与 VEGFA 分泌减少有关^[13]。我们的研究结果显示,DWR 组、NPDR 组与 PDR 组中均存在 CC、CG 及 GG 三种基因型和 C、G 两种等位基因。三组中 CC 基因型分布频率分别约为 4%、30% 和 39%,CG 基因型频率分别为 58%、33%、和 18%,GG 基因型分布频率依次是 38%、37% 和 42%。与 DWR 相比,PDR 组 CC 基因型频率显著增高,CG 基因型明显降低,NPDR 组 CG 基因型略降低。在海南黎族 2 型糖尿病患者中,rs2010963 位点的 CC 基因型增加 PDR 的易感性。我国学者 Yuan 等^[10]对河北石家庄地区的汉族 2 型糖尿病患者进行基因位点研究发现 NPDR 组、PDR 组与无 DR 组在 rs2010963 位点的基因型和等位基因分布频率上无显著差异。文献报道对中国台湾地区糖尿病患者进行基因检测发现携带 CC 或 CG 基因型的患者的 DR 患病率明显高于携带 GG 基因型患者,且 C 等位基因患者中 VEGF 的表达水平增高^[14]。伊朗学者 Fegghi 等^[15]研究发现在 rs2010963 位点 GG 基因型是 PDR 患者的独立危险因素,携带 GG 基因型患 PDR 的概率为携带 CC 基因型的 1.87 倍。韩国的一项研究显示,韩国 2 型糖尿病人群中 PDR、NPDR、DWR 在 rs2010963 位点上各基因型及等位基因上无明显差异^[16]。文献报道 CC 基因型在 DWR 组中比例最高,而 GG 基因型则在 PDR 组中比例最高,差异具有统计

学意义^[17]。rs2010963 在其他疾病中也被报道过,如冠状动脉疾病发生风险相关^[18],与先兆子痫发生风险有显著的相关性^[19]。rs2010963 位点与 VEGF 基因的激活蛋白-1 紧密连接,参与 VEGF 蛋白产物的表达^[20],且还有研究发现它可以改变 VEGF 基因启动子的反应活性^[21-22]。不同地区的人群,不同的民族群体间在 rs2010963 存在多态性。VEGF 的增加导致 PDR 的发生,视网膜缺血是 VEGF 分泌的主要刺激因子,导致 PDR^[23]。

rs3025039 位点可通过激活蛋白-4 发挥作用,调节血浆 VEGF 水平^[24-25]。这些位点的多态性都可能影响 VEGF 的转录水平或表达水平,与 DR 的发生、发展密切相关。一项 Meta 分析显示在等位基因模型中发现 rs3025039 (C>T) 多态性与 DR 风险增加显著相关^[26]。我们的研究显示三组之间 rs3025039 在等位基因分布方面差异无统计学意义,但是 NPDR 和 PDR 组还存在 TT 基因型,黎族 2 型糖尿病患者患者在 rs3025039 位点单核苷酸多态性与 DR 的发生相关性不显著,可能与我们的人群特性有关。此外,不同的 DME 患者个体对抗 VEGF 治疗的反应并不相同,DME 抗 VEGF 治疗反应的个体间差异可能部分是由于 VEGF 基因的多态性和/或 VEGF 基因表达的差异所致^[27]。因此,VEGF 的单核苷酸多态性可能在 DR 的发生与发展中起着重要作用,VEGF 基因的多态性可能在抗 VEGF 的治疗反应中起到决定性作用。

在国内海南黎族的人群中,rs2010963 和 rs3025039 尚未被报道过。本研究也存在局限性,首先我们的研究样本量有限,可能不能完全评估基因的多态性情况,其次虽然我们首次对海南黎族人群进行了研究,但是缺少大样本的和汉族人群的对比较研究。

综上所述,海南黎族 2 型糖尿病患者 VEGF 基因 rs2010963 位点的 CC 基因型较 CG 基因型增加糖尿病患者 DR 的易感性,海南黎族 DR 患者主要为 CC 基因型。而在 rs3025039 位点上,黎族 NPDR 和 PDR 组还存在 TT 基因型,在 rs3025039 位点单核苷酸多态性与 DR 的发展相关不显著。本研究运用 PCR-RFLP 技术测定 VEGF 基

因型,探索海南黎族2型糖尿病患者 VEGF 基因多态性与 DR 的相关性,探寻 DR 发生的遗传学证据,为早期预防、诊断提供有力的依据,期望能为 DR 提供更有效的治疗手段。

参考文献

1 Wu JH, Li YN, Chen AQ, *et al.* Inhibition of Sema4D/PlexinB1 signaling alleviates vascular dysfunction in diabetic retinopathy. *EMBO Mol Med* 2020; 12(2):e10154

2 Simo-Servat O, Hernandez C, Simo R. Diabetic Retinopathy in the Context of Patients with Diabetes. *Ophthalmic Res* 2019;62(4):211-217

3 Mao XB, Cheng YH, Xu YY. miR - 204 - 5p promotes diabetic retinopathy development via downregulation of microtubule - associated protein 1 light chain 3. *Exp Ther Med* 2019;17(4):2945-2952

4 Sun JK, Glassman AR, Beaulieu WT, *et al.* Rationale and Application of the Protocol S Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Algorithm for Proliferative Diabetic Retinopathy. *Ophthalmology* 2019;126(1):87-95

5 Mora N, Kempen JH, Sobrin L. Diabetic Retinopathy in Hispanics: A Perspective on Disease Burden. *Am J Ophthalmol* 2018; 196:xviii-xxiv

6 Pongrac BD, Harjutsalo V, Gordin D, *et al.* The Association of Severe Diabetic Retinopathy With Cardiovascular Outcomes in Long-standing Type 1 Diabetes: A Longitudinal Follow-up. *Diabetes Care* 2018; 41(12):2487-2494

7 Zhang SJ, Chen X, Li CP, *et al.* Identification and Characterization of Circular RNAs as a New Class of Putative Biomarkers in Diabetes Retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2017;58(14):6500-6509

8 Zhang Y, Fang W, Fan L, *et al.* Hepatitis B surface antigen prevalence among 12,393 rural women of child bearing age in Hainan Province, China: a cross-sectional study. *Virol J* 2013; 10:25

9 Neal-Mc Kinney JM, Liu KC, Lock CM, *et al.* Comparison of MiSeq, MinION, and hybrid genome sequencing for analysis of *Campylobacter jejuni*. *Sci Rep* 2021;11(1):5676

10 Yuan Y, Wen Z, Guan Y, *et al.* The relationships between type 2 diabetic retinopathy and VEGF - 634G/C and VEGF - 460C/T polymorphisms in Han Chinese subjects. *J Diabetes Complications* 2014; 28(6):785-790

11 Hu L, Gong C, Chen X, *et al.* Associations between Vascular Endothelial Growth Factor Gene Polymorphisms and Different Types of Diabetic Retinopathy Susceptibility: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Diabetes Res* 2021;2021:7059139

12 Watson CJ, Webb NJ, Bottomley MJ, *et al.* Identification of polymorphisms within the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene: correlation with variation in VEGF protein production. *Cytokine* 2000;12(8):1232-1235

13 Khan N, Paterson AD, Roshandel D, *et al.* Association of IGF1 and VEGFA polymorphisms with diabetic retinopathy in Pakistani population. *Acta Diabetol* 2020; 57(2):237-245

14 Chen CF, Liou SW, Wu HH, *et al.* Regulatory SNPs Alter the Gene Expression of Diabetic Retinopathy Associated Secretary Factors. *Int J Med Sci* 2016; 13(9):717-723

15 Feghhi M, Nikzamir A, Esteghamati A, *et al.* Relationship of vascular endothelial growth factor (VEGF) + 405 G/C polymorphism and proliferative retinopathy in patients with type 2 diabetes. *Transl Res* 2011; 158(2):85-91

16 Chun MY, Hwang HS, Cho HY, *et al.* Association of vascular endothelial growth factor polymorphisms with nonproliferative and proliferative diabetic retinopathy. *Horm Metab Res* 2010; 95(7):3547-3551

17 El-Shazly SF, El-Bradey MH, Tameesh MK. Vascular endothelial growth factor gene polymorphism prevalence in patients with diabetic macular oedema and its correlation with anti-vascular endothelial growth factor treatment outcomes. *Clin Exp Ophthalmol* 2014;42(4):369-378

18 Ma WQ, Wang Y, Han XQ, *et al.* Association of genetic polymorphisms in vascular endothelial growth factor with susceptibility to coronary artery disease: a meta-analysis. *BMC Med Genet* 2018; 19(1):108

19 Duan W, Xia C, Wang K, *et al.* A meta-analysis of the vascular endothelial growth factor polymorphisms associated with the risk of pre-eclampsia. *Biosci Rep* 2020;40(5):BSR20190209

20 Bozduman T, Ersoy ES, Karahan S, *et al.* Genetic Risk Factors for Psoriasis in Turkish Population: -1540 C/A, -1512 Ins18, and +405 C/G Polymorphisms within the Vascular Endothelial Growth Factor Gene. *Ann Dermatol* 2016;28(1):30-39

21 Kazemi E, Zargooshi J, Kaboudi M, *et al.* A genome-wide association study to identify candidate genes for erectile dysfunction. *Brief Bioinform* 2021; 22(4):bbaa338

22 Qin C, Cao Q, Li P, *et al.* The influence of genetic variants of sorafenib on clinical outcomes and toxic effects in patients with advanced renal cell carcinoma. *Sci Rep* 2016;6:20089

23 Altaf QA, Dodson P, Ali A, *et al.* Obstructive Sleep Apnea and Retinopathy in Patients with Type 2 Diabetes. A Longitudinal Study. *Am J Respir Crit Care Med* 2017;196(7):892-900

24 Guo Z, Cui W, Que L, *et al.* Pharmacogenetics of medication-related osteonecrosis of the jaw: a systematic review and meta-analysis. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2020; 49(3):298-309

25 Arredondo-Garcia VK, Cepeda-Nieto AC, Batallar-Gomez T, *et al.* Association of the Vascular Endothelial Growth Factor Gene Polymorphism +936 C/T with Diabetic Neuropathy in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *Arch Med Res* 2019;50(4):181-186

26 Xie XJ, Yang YM, Jiang JK, *et al.* Association between the vascular endothelial growth factor single nucleotide polymorphisms and diabetic retinopathy risk: A meta-analysis. *J Diabetes* 2017;9(8):738-753

27 Gonzalez VH, Campbell J, Holekamp NM, *et al.* Early and Long-Term Responses to Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Therapy in Diabetic Macular Edema: Analysis of Protocol I Data. *Am J Ophthalmol* 2016; 172:72-79