

征性症状相仿^[10]。Malastrom 等^[12]报道,9%的卵巢颗粒细胞瘤合并子宫内膜癌,33%合并有子宫内膜不典型增生,而本组有1例合并子宫内膜癌,2例有内膜不典型增生(图4B),因此对颗粒细胞瘤者应常规进行诊刮,以明确子宫内膜是否存在病变。

3. 诊断与鉴别诊断:卵巢性索间质肿瘤 CT 均表现为盆腔内边界清晰的类圆形实质性为主肿块,增强肿瘤无强化或轻度强化为其特征性 CT 征象,这也有别其他卵巢肿瘤。但由于此类肿瘤在病理上具有重叠的多向组织学分化特点,因此在各肿瘤的诊断上缺乏足够的特征性,尽管有文献对各肿瘤的影像学表现进行了报道,但相互之间又有共性的表现,因此笔者认为对这一组肿瘤,术前确诊为哪个肿瘤具有相当大的难度,根据笔者的分析及肿瘤的病理特点只能做出倾向性的诊断,对肿块密度均匀、内部无坏死区,则纤维瘤可能性大;肿瘤内坏死区呈多发小囊状、裂隙状的,以颗粒细胞瘤可能性大,而肿瘤内坏死区呈大片状夹杂小囊状的,或增强肿瘤内可见多条纤细血管影,则以卵泡膜细胞瘤可能性大;但最后的诊断仍需依赖病理。

卵巢性索间质肿瘤需与强化轻微又合并内部变性的子宫浆膜下肌瘤或阔韧带肌瘤鉴别,二者平扫表现相仿,但增强后者通常强化略明显,同时肿瘤由子宫动脉供血,无雌激素增高,很少有腹腔积液,可与之鉴别。总之,卵巢性索间质肿瘤表现为盆腔内边界清晰的无强化或轻微强化的实性肿块,同时结合

患者临床表现有助于提高这类肿瘤的诊断准确率,减少误诊。

参考文献

- 1 回允中. 女性生殖道病理学[M]. 北京:北京大学出版社,2005:533;614-621
- 2 范娜娣. 卵巢临床与病理[M]. 天津:天津科学技术出版社,1993:205
- 3 陈本宝,李小红,张善华. 卵巢卵泡膜细胞瘤的 CT 诊断[J]. 放射学实践,2007,22(2):178-180
- 4 李雪丹,王晓枫,谭芳. 卵巢卵泡膜细胞瘤的 CT 诊断[J]. 中华放射学杂志,2005,39(5):535-537
- 5 郑祥武,陈勇春,李剑敏,等. 卵巢卵泡膜细胞瘤的 CT 表现[J]. 中国临床医学影像杂志,2008,19(10):748
- 6 陈忠年,杜心谷,刘伯宁. 妇产科病理学[M]. 上海:上海医科大学出版社,1996:221-223
- 7 Buttin BM, Cohn DE, Herzog TJ, *et al.* Meigs'syndrome with an elevated CA125 from benign Brenner tumor[J]. Obstet Gynecol,2001,98(5):980-982
- 8 Nemeth AJ, Patel SK. Meigs'syndrome revisited[J]. J Thorac Imaging, 2003,18(1):100-103
- 9 齐振红,姜玉新,谭莉,等. 卵巢纤维瘤的超声诊断[J]. 中国医学影像技术,2004,20(9):1410-1412
- 10 杨惠英,包磊,蔡红光,等. 20例卵巢颗粒细胞瘤的临床病理分析[J]. 中国妇幼保健[J]. 2007,22:1470-1471
- 11 刘波,魏光师,陈树良,等. 卵巢颗粒细胞瘤的 MRI 诊断[J]. 临床放射学杂志,2003,22(4):295-297
- 12 Malastrom H, Hogber T, Risberg B, *et al.* Granulosa cell tumors of the ovary: prognostic factors and outcome[J]. Gynecol Oncol,1994,52(1):50

(收稿:2011-07-20)

(修回:2011-08-23)

脂联素基因多态性与 2 型糖尿病肾病的关系

彭春玲 洪郁芝 傅莉萍

摘要 目的 研究脂联素(APN)基因+45位点与+276位点单核苷酸多态性(SNP)与中国浙江地区汉族人群2型糖尿病肾病(DN)的关系。**方法** 根据尿白蛋白排泄率(UAER)将82例2型糖尿病患者分成糖尿病正常白蛋白尿组、微量白蛋白尿组和大量白蛋白尿组;用直接测序法分析SNP+45和+276两位点基因型和等位基因频率,并分析与其他指标的关系。**结果** 脂联素基因SNP+45和+276两多态性位点的基因型和等位基因频率分别在正常白蛋白尿组、微量白蛋白尿组和大量白蛋白尿组3组间无统计学差异($P>0.05$)。**结论** 脂联素基因SNP+45T/G和SNP+276G/T与浙江地区汉族人群中2型糖尿病肾病无相关性。这两位点的基因多态性不能预测2型糖尿病肾病的易感性。

作者单位:315315 浙江省慈溪市第二人民医院内科(彭春玲);310007 杭州,浙江中医药大学附属广兴医院内分泌代谢科(洪郁芝、傅莉萍)

通讯作者:彭春玲,电子信箱:sincery_peng@126.com

关键词 脂联素 单核苷酸多态性 糖尿病肾病

Association of Adiponectin Gene Polymorphism in Type 2 Diabetes with Nephropathy. Peng Chunling, Hong Yuzhi, Fu Liping. The Medical Department of the Second People's Hospital of Cixi, Zhejiang 315315, China

Abstract Objective To investigate the association of single nucleotide polymorphism (SNP) of +45 and +276 loci of adiponectin (APN) gene with type 2 diabetic nephropathy (DN) in Han ethnicity population, Zhejiang province in China. **Methods** Eighty-two type 2 diabetic patients were assigned to normal albuminuria group, micro-albuminuria group, and macro-albuminuria group according to the urine albumin excretion rate (UAER). Direct sequencing was used to analyze allele and genotype frequencies of SNP +45 and +276 loci, and analyzing the relationship with other observed indicators. **Results** The distributions of genotype and allele frequencies of SNP +45 and +276 had no difference among three subgroups ($P > 0.05$). **Conclusion** The T→G polymorphism of SNP +45 and G→T polymorphism of SNP +276 in adiponectin gene are not associated with type 2 diabetic nephropathy in Han ethnicity population, Zhejiang province in China. The gene polymorphisms of these two loci can not predict the susceptibility to type 2 diabetic nephropathy.

Key words Adiponectin; Single nucleotide polymorphisms; Diabetic nephropathy

糖尿病肾病(DN)是糖尿病主要的微血管并发症之一。据文献报道,病程超过 25 年的 1 型及 2 型糖尿病患者中糖尿病肾病的累积患病率高达 25% ~ 40%,已经成为欧美国家终末期肾病的最主要原因。在我国,它是导致终末期肾功能衰竭的第 2 位病因。因此,研究 DN 的发病机制,并在此基础上探索防治 DN 的有效途径已成为我们的迫切任务。人类脂联素基因是单拷贝基因,位于染色体 3q27,此区域存在 2 型糖尿病易感位点,而且有较大频率的基因多态性。本研究旨在通过对脂联素 SNP +45 和 SNP +276 位点上的基因型和等位基因频率的分析,来探讨脂联素参与糖尿病肾病的遗传机制。

资料与方法

1. 研究对象:从 2009 年 4 ~ 12 月在浙江中医药大学附属广兴医院内分泌代谢科和肾病科住院的 2 型糖尿病病史在 5 年以上的患者中筛选 82 例,均为浙江地区汉族人,彼此间无血缘关系。其诊断和分型均符合 2007 年 CDS《中国 2 型糖尿病防治指南》制订的标准,根据尿白蛋白排泄率(UAER)分为 3 组:<30mg/24h 为正常白蛋白尿组(40 例),男性 24 例,女性 16 例;30 ~ 300mg/24h 为微量白蛋白尿组(25 例),男性 15 例,女性 10 例;>300mg/24h 为大量白蛋白尿组(17 例),男性 10 例,女性 7 例。入选患者排除血糖控制不稳定、肾功能不全、心肺功能不全、发热、感染,排除原发性肾脏疾病和其他继发性肾脏疾病,近 2 周内未服用 ACEI 或 ARB 类药物。

2. 研究方法:(1)生化指标及临床资料:所有研究对象在隔夜禁食 10 ~ 12h 后于次日清晨 6:00 抽取静脉血 6ml,3ml 置于普通试管中,送生化室检测各项生化指标。3ml 置于含有 EDTA 抗凝剂的试管中,3000r/min 离心 15min 取血细胞部分,分装冻存于 -70℃ 冰箱中,待标本收齐后统一进行检测。留取 24h 尿液标本,用浓盐酸防腐,取部分尿液测定尿白蛋白排泄率。

(2)脂联素基因多态位点 +45T/G 与 +276G/T 基因型的

检测:取出 -70℃ 冰箱冻存的血细胞,常温解冻,按照人血液基因组 DNA 提取试剂盒(DV811A)(日本 TaKaRa 公司)说明提取外周血 DNA,再行 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测,用 BIO-RAD 凝胶成像系统照相记录,见图 1。以提取出的基因组 DNA 为模板在 50μl 反应体系内进行聚合酶链反应(PCR)。引物设计参考文献,宝生物工程(大连)有限公司合成^[1]。上游引物:5'-GATGGACGGAGTCCTTTGTAGGTC-3',下游引物:5'-CCAAATCACTTCAGGTTGCTTATG-3'。反应体系:10 × Buffer 5μl, MgCl₂ (25mmol/L) 3μl, dNTP (各 2.5mmol/L) 4μl, 上游引物 (10pmol/μl) 2μl, 下游引物 (10pmol/μl) 2μl, 基因组 DNA 4μl, Taq 酶 (5U/μl) 0.6μl, ddH₂O 9.4μl。反应条件:预变性 95℃ 5min, 变性 95℃ 30s, 退火 59.5℃ 30s, 延伸 72℃ 30s, 末端延伸 72℃ 10min, 4℃ 保存,共 35 循环。扩增产物 452bp。PCR 反应结束后,取 10μl 产物与 2μl 的 6 × Loading Buffer 混合,加样于 1% 琼脂糖凝胶电泳中进行检测,用 BIO-RAD 凝胶成像系统照相记录,见图 2。余 PCR 产物送上海美季生物技术公司进行纯化后测序。

3. 统计学方法:采用 SPSS 17.0 医学统计软件分析数据,各组间基因型分布和等位基因频率比较用 χ^2 检验,各基因型观测指标的比较用方差分析, $P < 0.05$ 有统计学意义。

1 2 3 4 5 6 7 DL1000 标志物

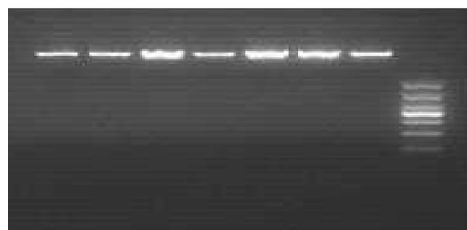


图 1 人血液中提取的基因组 DNA

结 果

1. 各组间的一般临床资料及生化指标比较:各组年龄、性别构成比无明显差异, BMI、DBP、血糖、HbA1c、TG、TC、HDL、LDL 组间比较无统计学意义

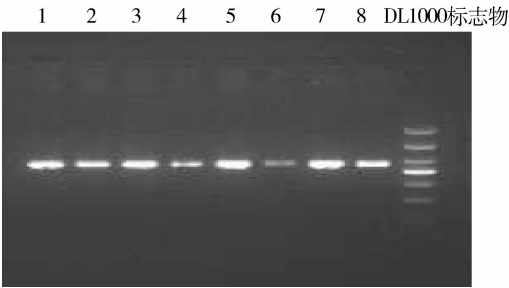


图2 脂联素基因的PCR扩增片段(452bp)

(P 均 >0.05)。SBP在大量白蛋白尿组和微量白蛋白尿组均高于正常白蛋白尿组($P<0.01$, $P<0.05$)。尿白蛋白排泄率在大量白蛋白尿组显著高于微量白蛋白尿组和正常白蛋白尿组($P<0.01$)。Ccr在大量白蛋白尿组和微量白蛋白尿组均显著低于正常白蛋白尿组($P<0.01$)。Scr在大量白蛋白尿组和微量白蛋白尿组均高于正常白蛋白尿组($P<0.05$)，见表1。

表1 各组临床、生化指标的比较($\bar{x} \pm s$)

项目	大量白蛋白尿组	微量白蛋白尿组	正常白蛋白尿组
性别 (男性/女性)	10/7	15/10	24/16
年龄(岁)	63.65 ± 13.67	61.52 ± 11.68	59.70 ± 10.22
BMI(kg/m ²)	23.93 ± 2.79	23.85 ± 4.67	23.24 ± 2.89
SBP(mmHg)	143 ± 13.96 **	137.92 ± 18.60 *	129.55 ± 14.28
DBP(mmHg)	80.12 ± 10.69	75.32 ± 8.82	75.35 ± 9.87
血糖(mmol/L)	8.15 ± 3.42	7.55 ± 2.62	7.25 ± 2.81
HbA1c(%)	8.51 ± 1.77	9.16 ± 2.17	8.79 ± 2.35
TG(mmol/L)	1.43 ± 0.77	1.73 ± 0.74	1.82 ± 1.04
TC(mmol/L)	4.60 ± 0.99	4.87 ± 0.90	4.77 ± 1.15
HDL(mmol/L)	1.07 ± 0.34	1.07 ± 0.31	1.07 ± 0.26
LDL(mmol/L)	2.65 ± 0.82	2.78 ± 0.67	2.64 ± 0.88
尿白蛋白排泄率(mg/24h)	1562.78 ± 1615.15 ** #	86.28 ± 48.04	10.46 ± 5.60
Ccr(ml/min)	76.24 ± 42.92 **	77.95 ± 29.76 **	114.11 ± 53.21
Scr(μmol/L)	91.00 ± 32.07 *	87.2 ± 47.41 *	68.30 ± 19.39

与正常组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与微量蛋白尿组比较, # $P<0.01$

2. 各组基因型和等位基因频率的比较:大量白蛋白尿组、微量白蛋白尿组和正常白蛋白尿组比较, ANP + 45 位点基因型和等位基因频率的差异无统计学意义(P 均 >0.05)。ANP + 276 位点基因型和等位基因频率的差异无统计学意义(P 均 >0.05)。见表2、表3。

表2 脂联素 + 45 位各组基因型和等位基因的比较

组别	基因型			等位基因	
	TT	TG	GG	T	G
大量白蛋白尿组	12	5	0	29	5
微量白蛋白尿组	13	9	3	35	15
正常白蛋白尿组	19	18	3	56	24

各组基因型比较 $\chi^2 = 4.03$, $P = 0.40$; 各组等位基因比较 $\chi^2 = 3.21$, $P = 0.20$

表3 脂联素 + 276 位各组基因型和等位基因的比较

组别	基因型			等位基因	
	TT	TG	GG	T	G
大量白蛋白尿组	0	10	7	10	24
微量白蛋白尿组	3	13	9	19	31
正常白蛋白尿组	0	23	17	23	57

各组基因型比较 $\chi^2 = 7.12$, $P = 0.13$; 各组等位基因比较 $\chi^2 = 1.32$, $P = 0.52$

3. 各脂联素基因型观测指标的比较:(1)所有研究对象中,脂联素各基因型观测指标的比较:脂联素 SNP + 45 位点的 TT、TG、GG 3 组基因型的所有观测指标比较,BMI 具有统计学意义($P<0.05$),TT 型与 TG 型比较有显著差异($P<0.01$),余指标的比较无统计学意义(P 均 >0.05)。脂联素 SNP + 276 位点的 TT、TG、GG 3 组基因型的所有观测指标比较,无统计学意义(P 均 >0.05)。(2)3 组中脂联素基因型观测指标的比较:脂联素 SNP + 45 位点,正常白蛋白尿组中,TT 与 TG 型比较,Scr 的差异有统计学意义($P<0.01$);余组中 3 种基因型的所有指标比较无统计学意义(P 均 >0.05)。脂联素 SNP + 276 位点,大量白蛋白尿组中,TG 与 GG 型比较,DBP 的差异有统计学意义($P<0.05$);微量白蛋白尿组中,TG、GG 与 TT 型比较,尿白蛋白的差异具有统计学意义(P 均 <0.01)。

讨 论

2 型糖尿病肾病是由遗传和环境因素共同作用的一种多基因疾病,其发生有较大的种族差异。糖尿病肾病的发病机制尚未完全明确,近年来国内外学者从各方面进行了大量的研究,遗传因素被认为是其发生的危险因素之一。流行病学资料显示,糖尿病肾病有家族聚集性,此可能与某些基因的突变或多态性变化有关。脂联素作为一种新型的由脂肪细胞特异性分泌的蛋白质,与 2 型糖尿病肾病相关。其基因的多态性调控着脂联素的表达,影响其血清脂联素水平以及向糖尿病肾病的发生发展。

人类脂联素基因 (APM-1) 位于染色体 3q27 区域, 包括 3 个外显子和 2 个内含子, 此区域存在 2 型糖尿病、代谢综合征的易感位点, 而且有较大频率的基因多态性, 通过对人类脂联素基因全序列分析发现, 正常人脂联素基因序列中存在相当数量的等位基因单核苷酸多态性, 但是密码子变化并不改变构成蛋白质的氨基酸序列。目前国内外对定位于染色体 3q27 区域的人脂联素基因的单核苷酸多态性与疾病的关系做了大量研究, 发现不同人群其多态性与疾病的相关性不尽相同, 这说明在不同的人群中, 脂联素基因的 SNPs 可能与遗传和环境等因素有关。

目前已发现 17 个脂联素基因的遗传变异, 如外显子 2 上 45 位点和内含子 2 上 276 位点 T/G 多态性, -11426 位点 G/A 多态性等都是常见的单核苷酸多态性。此外, 还存在许多稀有突变。既往研究表明 SNP + 45T/G 属于同义突变 Gly15Gly, 由于位置靠近外显子和内含子的连接部位, 故这一编码区的静止突变可能是通过影响 mRNA 的剪切机制来影响脂联素基因的表达^[4]。而 SNP + 276G/T 则远离剪切位点, 其调节 RNA 水平的机制尚不清楚, 可能是与不同等位基因造成的不同寡核苷酸转录文本与转录因子的亲和力不同有关。有文献报道 SNP + 45T/G 和 SNP + 276G/T 与脂联素基因启动子区域的 SNP - 11391 和 SNP - 11377 多态性位点呈连锁不平衡, 因此这两个位点的基因多态性可能对基因的启动子区域造成影响而发挥作用^[5]。

多项研究表明, 脂联素基因外显子 2 和内含子 2 的 SNP + 45T/G 及 SNP + 276G/T 多态性与 2 型糖尿病和胰岛素抵抗明显相关。但国内外关于脂联素 SNP + 45T/G 和 + 276 位 G/T 的变异与 2 型糖尿病肾病的相关性研究并不多, 而且研究结果也不尽一致。

本实验研究结果显示, 脂联素 SNP + 45T/G 和 + 276 位 G/T 的变异和等位基因的频率在 2 型糖尿病肾病大量白蛋白尿组、微量白蛋白尿组和正常白蛋白尿组的差异无统计学意义 (P 均 > 0.05), 说明这两个位点的基因型和等位基因频率的变异与 2 型糖尿病肾病无相关性, 与 Yoshioka 等^[6]、郭志新等^[7]的研究结果一致。Bostrom 等^[8]发现瑞典人群中此两位点的变异与 1 型糖尿病肾病不相关。然而, 国内外亦有研

究发现脂联素的 SNPs 与 2 型糖尿病肾病相关。研究结果不一致的原因可能是不同的种族和地域, 以及不同环境因素的影响; 与我们采用的是西方人群 SNPs 数据库也有关。此外, 本研究由于样本例数不多也会对结果造成一定的影响, 因此, 还必须增加样本量, 扩大研究地域的范围, 这样才有助于我们判断脂联素基因是否为中国人 2 型糖尿病肾病的易感基因。

本研究还发现, 脂联素 SNP + 45 位点, TT 与 TG 基因型比较, BMI 具有统计学差异 ($P < 0.05$), 说明此两种基因型可能对 BMI 有影响。脂联素 SNP + 45T/G 和 SNP + 276G/T 与 2 型糖尿病肾病的发生无相关性, 此两位点的多态性并不能预测 2 型糖尿病肾病的易感性。

参考文献

- 1 劳力敏, 向红丁. 脂联素基因多态性与妊娠糖尿病的相关性 [J]. 中国全科医学, 2008, 11 (9B): 1640 - 1642
- 2 Cartegni L, Chew SL, Krainer AR. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing [J]. Nat Rev Genet, 2002, 3 (4): 285 - 298
- 3 Vasseur F, Helbecque N, Dina C, et al. Single - nucleotide polymorphism haplotypes in the both proximal promoter and exon 3 of the APM1 gene modulate adipocyte - secreted adiponectin hormone levels and contribute to the genetic risk for type 2 diabetes in French Caucasians [J]. Hum Mol Genet, 2002, 11: 2607 - 2614
- 4 Yoshioka K, Yoshida T, Umekawa T, et al. Adiponectin gene polymorphism G276T is not associated with incipient diabetic nephropathy in Japanese type 2 diabetic patients [J]. Metabolism, 2004, 53 (9): 1223 - 1226
- 5 郭志新, 吴苏豫. 脂联素基因 276 位点多态性与 2 型糖尿病肾病的关系 [J]. 山西医科大学学报, 2008, 39 (6): 507 - 510
- 6 Ma J, Mollsten A, Falhammar H, et al. Genetic association analysis of the adiponectin polymorphisms in type 1 diabetes with and without diabetic nephropathy [J]. Diabetes Complications, 2007, 21 (1): 28 - 33
- 7 Wu LS, Hsieh CH, Pei D, et al. Association and interaction analyses of genetic variants in ADIPOQ, ENPP1, GHSR, PPAR γ and TCF7L2 genes for diabetic nephropathy in a Taiwanese population with type 2 diabetes [J]. Nephrol Dial Transplant, 2009, 24 (11): 3360 - 3366
- 8 Bostrom MA, Freedman BI, Langefeld CD, et al. Association of adiponectin gene polymorphisms with type 2 diabetes in an African American population enriched for nephropathy [J]. Diabetes, 2009, 58 (2): 499 - 504

(收稿: 2011 - 07 - 13)

(修回: 2011 - 08 - 23)