

早期2型糖尿病肾病与醛糖还原酶基因甲基化水平的临床研究

包利文¹, 尹丽明², 王少波^{1*}

(1. 东莞市厚街医院内分泌科; 2. 东莞市厚街医院检验科, 广东 东莞 523945)

【摘要】目的 探讨醛糖还原酶(AKR1B1)基因甲基化水平和早期2型糖尿病(T2DM)肾病蛋白尿之间的联系。**方法** 选取2020年5月至2022年4月期间东莞市厚街医院收治的40例T2DM合并蛋白尿阳性患者作为糖尿病肾病(DN)组,选择同时期39例诊断T2DM且尿蛋白阴性志愿者作为糖尿病(DM)组,进行前瞻性研究。比较两组患者的临床资料,亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)与AKR1B1基因甲基化水平,并分析AKR1B1基因甲基化水平与临床资料中差异有统计学意义的指标的相关性。**结果** DN组患者糖化血红蛋白(HbA_{1c})、空腹血糖(FBG)、餐后2h血糖(2hPG)、血肌酐(Scr)、尿素氮(BUN)及尿微量白蛋白与肌酐比值(UACR)水平均高于DM组,肾小球滤过率(eGFR)低于DM组(均 $P<0.05$);DN组AKR1B1甲基化水平低于DM组($P<0.05$),两组MTHFR甲基化水平比较,差异无统计学差异($P>0.05$);Pearson相关分析结果表明,AKR1B1甲基化水平与FBG、2hPG、HbA_{1c}、Scr、BUN、UACR呈负相关,而与eGFR水平呈正相关(均 $P<0.05$)。**结论** AKR1B1基因DNA甲基化可能参与了DN的发生、发展过程,且AKR1B1甲基化水平与FBG、2hPG、HbA_{1c}、Scr、BUN、UACR呈负相关,与eGFR水平呈正相关,可预估患者T2DM患者病情。

【关键词】 醛糖还原酶;甲基化;糖尿病肾病;亚甲基四氢叶酸还原酶

【中图分类号】 R587.1

【文献标识码】 A

【文章编号】 2096-3718.2023.20.0087.04

DOI: 10.3969/j.issn.2096-3718.2023.20.029

随着我国经济和社会的发展,人民饮食习惯的改变,糖尿病(diabetes mellitus, DM)发病率日益升高,已成为威胁人类健康的重要因素^[1]。DM可产生多种并发症,糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是其最明显的微血管并发症, DN目前是除肾小球肾炎之外,导致终末期肾病(end stage renal disease, ESRD)的第二大病因,对DM患者的生活质量造成极大的影响, DN的发生发展受遗传和环境因素的影响,而环境因素会改变表观遗传状态,因此表观遗传机制可能在DN的发病机制中起关键作用^[2]。近年来,表观遗传修饰的相关研究越来越受到重视,DM患者的高血糖代谢状态可能存在相关的“代谢记忆效应”,长期的高血糖状态,即使患者血糖水平恢复正常,仍可出现DM的相关并发症。最新研究提示,“代谢记忆”与靶细胞的表观遗传改变的关系密切^[3]。表观遗传修饰是指在不改变DNA序列的情况下影响基因的表达和功能。其中,DNA甲基化是研究最广泛的表观遗传标记。醛糖还原酶(AKR1B1)基因编码一种催化葡萄糖还原为山梨醇的酶,而山梨醇所导致的氧化应激是糖尿病慢性并发症的主要途径之一^[4]。亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)是高同型半胱氨酸(Hcy)代谢过程中重要的酶,通过甲

基化Hcy转化为甲硫氨酸,从而降低血浆Hcy水平,而Hcy具有血管毒性作用,可通过氧化应激损伤血管内皮细胞、刺激血管平滑肌细胞增生等多种途径,导致肾小球滤过率增加,从而参与DN病变进程^[5]。本研究旨在探讨AKR1B1和MTHFR甲基化水平与早期2型糖尿病(diabetes mellitus type 2, T2DM)肾病的关系,为患者病情预估提供参考依据,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取2020年5月至2022年4月期间东莞市厚街医院收治的40例T2DM合并蛋白尿阳性(尿蛋白含量 ≥ 30 mg/24 h或 $20 \mu\text{g}/\text{min}$ ^[7])患者作为DN组,选择同时期39例诊断T2DM且尿蛋白阴性(尿蛋白含量 <30 mg/24 h或 $20 \mu\text{g}/\text{min}$)的研究对象作为DM组,进行前瞻性研究。纳入标准:①所有患者均符合《中国2型糖尿病防治指南(2017年版)》^[6]中T2DM的诊断及分型标准;②DN组患者同时符合《糖尿病肾脏病诊治专家共识》^[7]中的DN的诊断标准,尿微量白蛋白与肌酐比值(UACR) $>30 \mu\text{g}/\text{mg}$;③近期末服用肾毒性药物;无精神疾病或意识障碍。排除标准:①合并慢性肾炎、尿路感染

基金项目: 东莞市社会科技发展重点资助项目(编号:202050715023196)

作者简介: 包利文,硕士研究生,主治医师,研究方向:内分泌。

通信作者: 王少波,博士研究生,主任医师,研究方向:内分泌。E-mail: 13790636601@163.com

等疾病；②半年内有恶性高血压、心脑血管意外等危重病史；③伴凝血功能障碍。本研究获得东莞市厚街医院医学伦理委员会的批准，所有患者均签署知情同意书。

1.2 研究方法

1.2.1 临床资料统计 收集所有患者的一般资料，包括性别、年龄、BMI、病程。嘱其禁食 8 h，次日清晨在患者空腹状态和餐后 2 h 各抽取静脉血 3 mL，同时收集晨尿 3 mL，均以 3 500 r/min 的离心速率离心 10 min 后取得上清液待测。利用全自动生化分析仪 [贝克曼库尔特 (美国) 股份有限公司, 型号: AU5800] 测定血清糖化血红蛋白 (HbA_{1c})、空腹血糖 (FBG)、餐后 2 h 血糖 (2 h PG)、肌酐 (Scr)、尿素氮 (BUN)、丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天冬氨酸转氨酶 (AST)、总胆红素 (TbIL)、直接胆红素 (DbIL)、血红蛋白 (Hb)、总胆固醇 (CHOL)、高密度脂蛋白 (HDL)、低密度脂蛋白 (LDL)、三酰甘油 (TG) 水平, 采用全自动生化分析仪检测尿微量白蛋白与尿肌酐, 并计算肾小球滤过率 (eGFR)、UACR, 采用电子血压计 [松下电气机器 (北京) 有限公司, 京械注准 20162070530, 型号: EW3106] 检测患者收缩压 (SBP) 与舒张压 (DBP)。另取患者空腹静脉血 3 mL, 取一部分抗凝后离心 (离心条件同上), 取血浆待检。采用全自动凝血分析仪 (Instrumentation Laboratory Co., 型号: ACL TOP 700) 检测血浆凝血酶原时间 (PT), 采用酶联免疫吸附法检测血浆纤维蛋白原 (Fib)。利用全自动血液分析仪 (深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司, 型号: 6800PLUS) 检测白细胞计数 (WBC)。

1.2.2 MTHFR、AKR1B1 基因甲基化水平检测 通过基于下一代测序的亚硫酸氢盐测序 (BSP) 评估基因特异性 DNA 甲基化。首先针对目标区域或位点, 完成重亚硫酸盐修饰的基因组 DNA 序列 PCR (BS-PCR) 引物设计和合成, 使用在线 MethPrimer 软件设计 BSP 引物。使用 ZYMO EZ DNA Methylation-Gold™ Kit 转换 1 μg 基因组 DNA, 使用 KAPA HiFi HotStart Uracil+ReadyMix PCR 试剂盒将二十分之一的洗脱产物用作 35 个循环的聚合酶链式反应 (PCR) 扩增模板。对于每个样本, 将多个基因的 BSP 产物平均汇集, 5'-磷酸化, 3'-dA 尾, 并使用 T4 DNA 连接酶 (NEB) 连接到条形码适配器。在 Illumina 平台上对所有样本的条形码库进行测序^[5]。C 位点的甲基化水平 = 支持甲基化的 reads 数 / (支持甲基化的 reads 数 + 支持非甲基化的 reads 数), 引物由上海捷瑞公司设计合成, 引物序列:

MTHFR

上游 5'-TAGATTTAGGTACGTGAAGTAGGGTAGAC-3',
下游 5'-GAAAACTAATAAAAAACCGACGAA-3';

AKR1B1

上游 5'-GGGTTATTTAAAGGTATGTGTT-3',
下游 5'-AACACCATTATTAACAAAAA-3';
U6 (内参)

上游 5'-TTTAGGTATGTGAAGTAGGGTAGATGT-3',
下游 5'-CAAAAACTAATAAAAAAACCAACAAA-3'。

1.3 观察指标 ①比较两组患者的一般资料。②比较两组患者 MTHFR 与 AKR1B1 基因甲基化水平。③分析 DN 组患者 AKR1B1 基因甲基化水平与一般资料中差异有统计学意义的指标的相关性。

1.4 统计学方法 应用 SPSS 23.0 统计学软件分析数据, 计数资料包含临床疗效, 以 [例 (%)] 表示, 组间比较采用 χ^2 检验; 符合正态分布的计量资料采用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 不符合正态分布的计量资料使用中位数 (四分位数间距) [M (P25, P75)] 进行描述, 组间比较采用 Mann-Whitney *U* 检验, 采用 Pearson 法进行相关性分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者临床资料比较 DN 组患者 HbA_{1c} 水平、FBG、2 h PG、Scr、BUN 及 UACR 水平均高于 DM 组, eGFR 低于 DM 组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$); 两组患者性别、年龄、BMI、病程、SBP、DBP、ALT、AST、TbIL、DbIL、PT、WBC、Hb、Fib、CHOL、HDL、LDL、TG 比较, 差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$), 见表 1。

2.2 两组患者基因 AKR1B1 和 MTHFR 甲基化水平比较 DN 组 AKR1B1 甲基化水平低于 DM 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), DN 组 MTHFR 甲基化水平高于 DM 组, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 2。

2.3 DN 组患者 AKR1B1 甲基化水平相关性分析 Pearson 相关分析结果表明, AKR1B1 甲基化水平与 FBG、2 h PG、HbA_{1c}、Scr、BUN、UACR 呈负相关, 而与 eGFR 水平呈正相关, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$), 见表 3。

3 讨论

DN 是 T2DM 的一种严重的微血管并发症, 是导致 ESRD 最常见的原因之一, 预防或减缓 DN 的进展能带来相当的社会经济效益, 且 DN 可以通过早期指标检测来预防或延缓病情进展, 因此, 寻找早期诊断和预后的生物标志物是 DN 临床研究的重点问题。研究表明, 表观遗传对于 DN 的发生发展影响明显, 而表观遗传的改变易受到较多因素的影响, 如长期高血糖所导致的基因甲基化等^[8]。DNA 甲基化改变是表观遗传的主要表现方式, 已被认为参与了 DN 的发病机制, 通过动物实验已证实 DNA 甲基化抑

表1 两组患者临床资料比较

因素	DM组(39例)	DN组(40例)	$\chi^2/t/U$ 值	P值
性别 [例(%)]			0.013	>0.05
男性	20(51.28)	20(50.00)		
女性	19(48.72)	20(50.00)		
年龄(岁, $\bar{x} \pm s$)	53.66 ± 13.32	54.21 ± 14.15	0.178	>0.05
BMI(kg/m ² , $\bar{x} \pm s$)	24.55 ± 4.51	25.05 ± 3.81	0.533	>0.05
病程(年, $\bar{x} \pm s$)	5.67 ± 1.51	6.34 ± 2.01	1.672	>0.05
HbA _{1c} (%, $\bar{x} \pm s$)	7.51 ± 1.23	8.85 ± 2.74	2.792	<0.05
FBG(mmol/L, $\bar{x} \pm s$)	8.52 ± 1.23	9.32 ± 1.61	2.477	<0.05
2h PG(mmol/L, $\bar{x} \pm s$)	12.91 ± 1.73	13.96 ± 2.27	2.308	<0.05
Scr(μ mol/L, $\bar{x} \pm s$)	71.32 ± 10.83	93.48 ± 15.10	7.479	<0.05
eGFR[mL/min · (1.73 m ²) ⁻¹ , $\bar{x} \pm s$]	112.23 ± 11.25	93.56 ± 15.34	6.156	<0.05
BUN(mmol/L, $\bar{x} \pm s$)	4.21 ± 1.10	6.33 ± 1.51	7.117	<0.05
SBP(mmHg, $\bar{x} \pm s$)	117.35 ± 12.08	119.21 ± 12.52	0.672	>0.05
DBP(mmHg, $\bar{x} \pm s$)	68.55 ± 7.17	70.32 ± 8.17	1.022	>0.05
UACR(μ g/mg, $\bar{x} \pm s$)	19.35 ± 4.15	231.22 ± 42.15	31.239	<0.05
ALT[IU/L, M(P25, P75)]	31.06(19.78, 49.21)	32.03(26.13, 61.45)	1.884	>0.05
AST[IU/L, M(P25, P75)]	26.31(20.37, 34.62)	27.64(26.48, 46.22)	2.056	>0.05
TBiL[μ mol/L, M(P25, P75)]	14.72(10.46, 19.29)	14.35(10.28, 19.30)	1.098	>0.05
DBiL[μ mol/L, M(P25, P75)]	5.23(3.91, 7.38)	5.62(4.47, 7.86)	2.864	>0.05
PT(s, $\bar{x} \pm s$)	11.80 ± 3.32	12.13 ± 1.10	0.596	>0.05
WBC($\times 10^9/L$, $\bar{x} \pm s$)	5.24 ± 1.61	5.34 ± 1.72	0.267	>0.05
Hb(g/L, $\bar{x} \pm s$)	147.93 ± 22.45	149.14 ± 22.23	0.241	>0.05
FiB(g/L, $\bar{x} \pm s$)	2.35 ± 0.92	2.25 ± 0.63	0.565	>0.05
CHOL(mmol/L, $\bar{x} \pm s$)	3.76 ± 1.05	3.62 ± 0.81	0.665	>0.05
HDL(mmol/L, $\bar{x} \pm s$)	1.21 ± 0.31	1.26 ± 0.34	0.683	>0.05
LDL(mmol/L, $\bar{x} \pm s$)	2.27 ± 0.72	2.15 ± 0.60	0.806	>0.05
TG[mmol/L, M(P25, P75)]	1.02(0.78, 1.49)	0.93(0.84, 1.39)	1.617	>0.05

注: HbA_{1c}: 糖化血红蛋白; FBG: 空腹血糖; 2h PG: 餐后2h血糖; Scr: 血肌酐; eGFR: 肾小球滤过率; BUN: 尿素氮; SBP: 收缩压; DBP: 舒张压; UACR: 尿微量白蛋白与尿肌酐比值; ALT: 丙氨酸氨基转移酶; AST: 天冬氨酸转氨酶; TBiL: 总胆红素; DBiL: 直接胆红素; PT: 凝血酶原时间; WBC: 白细胞计数; Hb: 血红蛋白; FiB: 纤维蛋白原; CHOL: 胆固醇; HDL: 高密度脂蛋白; LDL: 低密度脂蛋白; TG: 三酰甘油。

表2 两组患者基因 AKR1B1 和 MTHFR 甲基化水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

基因	例数	AKR1B1	MTHFR
DM组	39	0.98 ± 0.21	0.91 ± 0.16
DN组	40	0.60 ± 0.14	0.93 ± 0.17
t值		9.486	0.538
P值		<0.05	>0.05

注: AKR1B1: 醛糖还原酶; MTHFR: 亚甲基四氢叶酸还原酶。

制剂对 DN 有益^[9]。因此, 早期预测 DN 高风险患者从而预防和延迟患者病情显得非常重要, 本研究搜索 Scopus, Pubmed, CochraneCentral 等数据库选择了在糖尿病肾病中具有重要作用的基因 (AKR1B1、MTHFR) 进行研究, 测定早期 DN 患者外周血中靶基因启动子区甲基化水平, 探讨目标基因的 DNA 甲基化水平与蛋白尿及 eGFR 的关系。

本研究结果显示, DN 组患者 HbA_{1c}、FBG 和 2h PG 水

表3 AKR1B1 甲基化水平与生化指标的相关性分析

指标	r值	P值
FBG	-0.489	<0.05
2h PG	-0.473	<0.05
HbA _{1c}	-0.421	<0.05
Scr	-0.377	<0.05
eGFR	0.506	<0.05
BUN	-0.379	<0.05
UACR	-0.488	<0.05

平均高于 DM 组, 提示 DN 患者血糖控制情况较差, 其中 FBG 和 2h PG 是常用的血糖检测指标, 而 HbA_{1c} 是红细胞血红蛋白的 β 链 N 端缬氨酸与葡萄糖非酶化结合的产物, 占血红蛋白总量的 60%~70%, 红细胞寿命是 120 d, 所以 HbA_{1c} 能很好地反映 2~3 个月的血糖水平, 且不受饮食、

运动、血糖忽高忽低影响,因此检测 HbA_{1c} 更能评价患者的血糖情况,已经成为评价糖尿病管理的重要途径^[10]。DN 组患者 Scr、BUN 及 UACR 水平均高于 DM 组, eGFR 低于 DM 组,均提示 DN 患者有明显的肾功能损害。

NAZIR 等^[11]关于 DN 遗传变异的荟萃分析发现,有 11 个基因变异与 DN 显著相关,且证实炎症与 DN 的发生进展有很强的相关性。本研究表明, AKR1B1 基因的甲基化水平在 DN 患者中低于 DM 患者,而 DN 组 MTHFR 甲基化水平高于 DM 组,但差异无统计学意义。刘恺远等^[12]对于 DN 的研究显示, AKR1B1 基因 DNA 甲基化与糖尿病肾病的发生、发展有关, AKR1B1 基因 DNA 甲基化水平越低,血糖及尿蛋白水平越高。而 MTHFR 基因的甲基化水平与 DN 无关,这可能与 MTHFR 通过基因突变而不是甲基化影响血浆 Hcy 浓度,从而损伤血管,最终促进 DN 病变发生有关^[13]。

此外,本研究结果显示, AKR1B1 甲基化水平与 FBG、2 h PG、HbA_{1c}、Scr、BUN、UACR 呈负相关,而与 eGFR 水平呈正相关,提示在 DN 患者中 AKR1B1 基因 DNA 的甲基化水平越低,血糖水平越高,肾功能损伤越严重, AKR1B1 甲基化水平可能是一种新的预测 DN 生物标志物和新的分子靶点,可替代早期的 DN 分子预测靶点,这与 ALDEMIR 等^[14]的研究结果相同。推测这一结果可能与 AKR1B1 基因主要功能是编码 AKR1B1 有关, AKR1B1 是多元醇通路的关键限速酶,能导致山梨醇堆积,从而增加氧化应激,使机体内细胞呈现高渗状态,进而出现细胞水肿、缺氧等,最终导致肾脏、眼底及周围神经的损害^[15]。AKR1B1 基因 DNA 的甲基化水平越低,提示 AKR1B1 越多,肾脏、眼底及周围神经的损害现象越明显。有研究表明, T2DM 患者体内长期高糖环境致使 DNA 甲基化状态发生改变,甲基化水平降低,激活 AKR1B1 基因,导致肾功能组织病变,进而致使 DN 的发生^[16]。

综上, AKR1B1 基因 DNA 甲基化可能参与了 DN 的发生、发展过程,可作为预测 DN 的潜在生物标志物,且 AKR1B1 甲基化水平与 FBG、2 h PG、HbA_{1c}、Scr、BUN、UACR 呈负相关,与 eGFR 水平呈正相关。但本研究样本量较少,后续可以进一步进行大样本甲基化研究,探索早期预测及治疗 DN 高风险患者的新途径。

参考文献

- 高晶晶,高艳虹. 早发 2 型糖尿病流行病学、临床特征及病因机制的研究进展 [J]. 内科理论与实践, 2022, 17(4): 344-348.
- 马晓迎,生玉平,杨星梦,等. 血钾与 2 型糖尿病终末期肾病未透析患者腹主动脉钙化相关性研究 [J]. 创伤与急危重病医学, 2023, 11(2): 110-115.
- 蹇元婕,魏雁涛. 表观遗传修饰参与糖尿病视网膜病变代谢记忆的研究进展 [J]. 国际眼科杂志, 2022, 22(10): 1634-1637.
- 王灵叶,杨晗,葛胜祥,等. DNA 甲基化在 2 型糖尿病治疗中的研究进展 [J]. 生命科学, 2023, 35(7): 925-934.
- 俞刚,陆峰泉,沈静,等. 2 型糖尿病肾病患者血清同型半胱氨酸、叶酸和亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性的关系 [J]. 中华核医学与分子影像杂志, 2021, 41(3): 145-148.
- 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南 (2017 年版) [J]. 中国实用内科杂志, 2018, 38(4): 292-344.
- 北京大学医学系糖尿病肾脏病专家共识协作组. 糖尿病肾脏病诊治专家共识 [J]. 中华医学杂志, 2020, 100(4): 247-260.
- FONTECHA-BARRIUSO M, MARTIN-SANCHEZ D, RUIZ-ANDRES O, et al. Targeting epigenetic Dna and histone modifications to treat kidney disease [J]. Nephrol Dial Transplant, 2018, 33(11): 1875-1886.
- PAN X, GONG D, NGUYEN DN, et al. Early microbial colonization affects DNA methylation of genes related to intestinal immunity and metabolism in preterm pigs [J]. DNA Res, 2018, 25(3): 287-296.
- 邓茹,蔡敏生. 血清胱抑素 C、糖化血红蛋白、hs-CRP 和尿微量清蛋白联合诊断 2 型糖尿病患者早期肾功能损伤的价值 [J]. 国际检验医学杂志, 2017, 38(3): 415-417.
- NAZIR N, SIDDIQUI K, AL-QASIM S, et al. Meta-analysis of diabetic nephropathy associated genetic variants in inflammation and angiogenesis involved in different biochemical pathways [J]. BMC Med Genet, 2014, 15(1): 103.
- 刘恺远,牟新. 糖尿病肾病患者 NTN4、MTHFR、FZD2、AKR1B1 基因 DNA 甲基化水平与危险因素分析 [J]. 浙江医学, 2022, 44(21): 2278-2282.
- 俞刚,郑玉平,沈静. 亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性与 2 型糖尿病肾病相关性的研究 [J]. 标记免疫分析与临床, 2020, 27(12): 2079-2082.
- ALDEMIR O, TURGUTT F, GOKCE C. The association between methylation levels of targeted genes and albuminuria in patients with early diabetic kidney disease [J]. Ren Fail, 2017, 39(1): 597-601.
- DIETER C, LEMOS N E, CORREA N R, et al. The A allele of the rs759853 single nucleotide polymorphism in the AKR1B1 gene confers risk for diabetic kidney disease in patients with type 2 diabetes from a Brazilian population [J]. Arch Endocrinol Metab, 2022, 66(1): 12-18.
- KALLINIKOU D, TSENTIDIS C, KEKOU K, et al. Homozygosity of the Z-2 polymorphic variant in the aldose reductase gene promoter confers increased risk for neuropathy in children and adolescents with type 1 diabetes [J]. Pediatr Diabetes, 2022, 23(1): 104-114.