

# 脑源性神经营养因子 Val66Met 基因多态性和 2 型糖尿病认知障碍的关联

周东浩,刘桂娟,单晓阳,王领章,陈淑红,刘红艳,田 涛\*

(临沂市人民医院内分泌科,山东 临沂 276002)

**[摘要]** 目的:探讨脑源性神经营养因子基因多态性和 2 型糖尿病认知障碍的关联性。方法:重复性成套心理状态测验测试认知功能,聚合酶链式反应-限制性内切酶片段长度多态性法检测脑源性神经营养因子基因 Val66Met 等位基因,应用 SPSS15.0 及 SHEsis 软件进行统计分析。结果:在女性样本中,Val66Met 的等位基因和基因型在病例组和对照组中的分布差异有统计学意义(分别是  $\chi^2 = 8.333, P = 0.004; \chi^2 = 7.589, P = 0.022$ ),在总体样本和男性样本中未观察到 Val66Met 等位基因和基因型在病例组和对照组中分布的统计学差异( $P > 0.05$ )。结论:脑源性神经营养因子 Val66Met 基因与 2 型糖尿病认知障碍的关联存在性别差异。

**[关键词]** 脑源性神经营养因子;2 型糖尿病;认知障碍;单核苷酸多态性

**[中图分类号]** R587.1

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2014)03-330-04

**doi:**10.7655/NYDXBNS20140310

关于孪生子的研究表明,超过 60%的成年和老年个体认知表现差异是由遗传引起的<sup>[1]</sup>。横断面和前瞻性流行病学研究证据都显示,2 型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)是认知功能障碍的独立危险因素<sup>[2-3]</sup>,而脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)是至今为止已经发现的与认知密切相关的候选基因之一<sup>[4]</sup>。尤其是 G/A 单核苷酸多态性(NCBI SNP 数据库编号:rs6265),可对 BDNF 基因的蛋白表达产生影响(缬氨酸 Val 替代蛋氨酸 Met),并影响 BDNF 的活动依赖性分泌<sup>[5]</sup>。本课题组既往的研究也发现,T2DM 合并认知损伤,并且这种认知损伤和血清 BDNF 水平下降有关<sup>[6]</sup>,后续研究进一步证明了这个结果<sup>[7-8]</sup>。本研究拟通过聚合酶链式反应-限制性内切酶片段长度多态性(polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)方法,从分子水平进一步研究 BDNF 单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNP)与 2 型糖尿病认知障碍(type 2 diabetes patients complicated with cognitive impairment, T2DM-CI)之间的关联。

## 1 对象和方法

### 1.1 对象

临沂市人民医院门诊及住院的 T2DM 患者,均为汉族居民,愿意配合本研究,接受问卷调查、认知功能测评及相应的实验室检查,提供完整的调查资料。T2DM 的诊断依据 1999 年 WHO 糖尿病诊断标准。

病例的纳入及排除标准:①无能够引起认知功能改变的其他疾病;②无影响认知功能测试的严重视力、听力障碍及肢体活动障碍;③经认知功能测评,符合下述病例诊断标准者:主诉或家庭成员证实存在记忆力减退;重复性成套心理状态测验(repeatable battery for the assessment of neuropsychological status, RBANS)标准总分或至少两个子神经心理状态评分低于同年龄组同等教育水平正常人均值 1.5 个标准差以上者。

对照组的纳入及排除标准:①无 T2DM 以外的能够引起认知功能改变的其他中枢神经损伤的疾病;②无影响认知功能测试的严重视力、听力障碍。

本次调查共纳入符合条件的 T2DM-CI 病例 93 例,平均年龄( $53.30 \pm 11.81$ )岁,其中男 38 例,女 55 例。对照组来自年龄、性别、受教育程度与病例组相匹配的无明显认知功能损害的 T2DM 患者,共 192 例,平均年龄( $52.39 \pm 12.74$ )岁,其中男 80 例,女

**[基金项目]** 山东省自然科学基金项目(ZR2012HL26)

\*通信作者 (Corresponding author), E-mail: Tiantao@medmail.com.cn

112 例。两组空腹血糖、血脂、血压、体质指数、糖化血红蛋白水平均无统计学差异( $P > 0.05$ , 表 1)。

表 1 2 型糖尿病认知障碍组和对照组生化指标、体质指数比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

观察指标	T2DM-CI 组	对照组	$t$ 或 $\chi^2$ 值	$P$ 值
性别(男/女)	38/55	80/112	0.017	0.897
年龄(岁)	53.30 ± 11.81	52.39 ± 12.74	0.792	0.429
受教育程度(年)	9.84 ± 3.63	10.09 ± 2.93	1.178	0.270
体质指数	25.98 ± 3.44	24.62 ± 3.77	1.913	0.059
收缩压(mmHg)	136.6 ± 20.28	137.6 ± 20.05	0.234	0.815
舒张压(mmHg)	72.96 ± 10.52	74.07 ± 11.24	0.517	0.606
空腹血糖(mmol/L)	8.59 ± 3.70	8.04 ± 3.78	0.440	0.382
糖化血红蛋白(%)	9.57 ± 2.47	9.54 ± 2.54	0.602	0.508
总胆固醇(mmol/L)	5.24 ± 1.25	5.04 ± 1.30	0.661	0.510
高密度脂蛋白胆固醇(mmol/L)	1.77 ± 1.06	1.87 ± 1.29	0.046	0.963
低密度脂蛋白胆固醇(mmol/L)	2.70 ± 0.86	2.58 ± 0.89	0.774	0.441

## 1.2 方法

### 1.2.1 资料收集

自编的一般情况调查表,收集 T2DM 患者年龄、性别、文化程度等人口学资料和疾病相关资料, RBANS 测试受试者认知功能。

### 1.2.2 PCR-RFLP 检测 BDNF 基因 rs6265 多态性

采集研究对象外周静脉血(2% EDTA 抗凝) 3 ml,充分混匀,应用美国 proigma 公司 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA,上游引物为 5'-CAAACATC-CGAGGACAAGGT-3', 下游引物为 5'-AGAAGAG-GAGGCTCCAAAGG-3' (北京博迈德生物公司合成),扩增片断长度 250 bp。反应总体积为 10  $\mu$ l, 反应体系混匀后在 PCR 仪中进行扩增:95 $^{\circ}$ C 变性 5 min;95 $^{\circ}$ C 变性 30 s,60 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 共 30 个循环;最后延伸 5 min。所得产物用 *Pml* I (美国 MBI 提供) 酶切,10  $\mu$ l 产物体系加内切酶 4 U,三蒸水 3.1  $\mu$ l,10 $\times$ buffer 1.5  $\mu$ l, 反应温度为 37 $^{\circ}$ C,在孵育箱中恒温过夜 16 h。酶切后产物用 2.0% 的琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色 20 min 后,在紫外线凝胶成像系统中观察结果。如 rs6265 两条等位基因酶切后片段长度均为 250 bp 时,表示 2 条等位基因均未切开,判断该个体的基因型为 AA;如 2 条等位基因酶切后片段长度分别为 125 bp 和 250 bp 时,说明只有 1 条等位基因被切开,判断该个体的基因型为 AG;如 2 条等位基因酶切后片段长度为 125 bp 时,表示 2 条等位基因均切开,判断该个体的基因型为 GG(图 1)。

### 1.3 统计学方法

统计分析应用 SPSS15.0 及在线多功能遗传学软件 SHEsis。Hardy-Weinberg 平衡使用 SHEsis 检验,计数资料使用  $\chi^2$  检验,计量资料的数据分析使

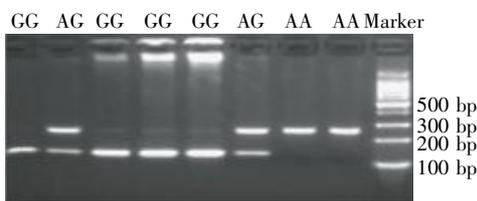


图 1 *Pml* I 酶切后 BDNF-rs6265 电泳图谱

用独立样本  $t$  检验,多元 Logistic 回归分析控制混杂因素, $P \leq 0.05$  认为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 Hardy-Weinberg 平衡检验结果

对 T2DM-CI 组和对照组 SNP 基因型进行拟和优度  $\chi^2$  检验,结果表明它们的基因型频率分布都没有偏离 Hardy-Weinberg 平衡( $P > 0.05$ ),样品来自随机婚配的自然群体。

### 2.2 BDNF-rs6265 与 T2DM-CI 的关联性分析

表 2 所示,在总体样本中,T2DM-CI 组 BDNF-rs6265 等位基因 G 的频率为 48.35%,与对照组的 52.36%相比,差异无统计学意义( $\chi^2 = 0.791, P = 0.374$ )。病例组携带 AA、AG 及 GG 基因型的频率分别为 27.47%、48.35% 和 24.18%,与对照组的 26.18%、42.93% 和 30.89% 相比,差异无统计学意义( $\chi^2 = 1.411, P = 0.494$ )。进一步性别分层,在女性样本中,T2DM-CI 组 rs6265 的 A 等位基因频率为 66.2%,明显多于对照组 46.9% ( $\chi^2 = 8.333, P = 0.004$ ),基因型频率分布在病例组和对照组中也有显著性差异 ( $\chi^2 = 7.589, P = 0.022$ ),AA 基因型在 T2DM-CI 组分布相对过多。而在男性样本中,rs6265 的等位基因和基因型在 T2DM-CI 组和对照组中的分布均无差异,说明该位点可能与女性对 T2DM-CI 的易感性有关。

表2 2型糖尿病认知障碍组和对照组 BDNF rs6265 基因型、等位基因分布频率

组别	基因型			等位基因型					
	AA	AG	GG	$\chi^2$ 值	<i>P</i> 值	A	G	$\chi^2$ 值	<i>P</i> 值
总体				1.411	0.494			0.791	0.374
T2DM-CI 组	25	44	22			94	88		
对照组	50	82	59			182	200		
男				1.807	0.405			1.291	0.252
T2DM-CI 组	9	27	18			45	63		
对照组	21	35	23			77	81		
女				7.589	0.022			8.333	0.004
T2DM-CI 组	16	17	4			49	25		
对照组	29	47	36			105	119		

### 3 讨论

目前,对认知功能障碍的诊断,美国神经学会质量标准分会在痴呆早期筛查指南中推荐使用以记忆力测试为主的成套神经心理测试方法或简易智力状态检查量表作为轻度认知障碍和早期痴呆的筛查措施<sup>[9]</sup>。RBANS 测验以记忆力测试为主,具有快速、有效、敏感、易操作等优点,经在汉族人群中试用,结果证明具有良好的信度和效度,是认知功能评估的敏感工具<sup>[10]</sup>。

BDNF 基因位于 11p13 染色体,由超过 5 个以上的外显子组成。大量研究表明,BDNF 基因多态性和认知功能障碍有关,其中受关注程度最高的就是 rs6265,这个 SNP 在前 BDNF 序列 66 密码子产生了一个从 Val(缬氨酸)到 Met(蛋氨酸)的置换突变,所以又称做 Val66Met 等位基因。

Egan 等<sup>[5]</sup>2003 年报道 Val66Met 基因变异可以影响海马功能和记忆。在精神分裂症和正常对照的病例对照研究中,Egan 等<sup>[5]</sup>发现 Met 等位基因携带者的即时记忆和长期记忆受损,功能性核磁共振显示海马工作记忆模式异常,神经元功能细胞内标志物 N-乙酰基天冬氨酸水平低下,提示 Met 等位基因变异和情节记忆功能损伤有关。与此类似,Hariri 等<sup>[11]</sup>在一项健康受试者情节记忆的研究中发现与 Val/Val 野生纯合型者相比,MetBDNF 等位基因携带者都显示海马衔接减少,认知错误增多。引人注意的是,Val66Met 基因变异和海马编码反应的相互作用可以解释 25%的认知改变。Gong 等<sup>[12]</sup>在年龄、受教育程度相匹配的中国年轻健康汉族人群中的研究发现,BDNF Val66Met 基因多态性与数字工作记忆( $P = 0.02$ )和空间定位功能( $P = 0.03$ )有关,Val 等位基因携带者较 Met 等位基因携带者数字工作记忆和空间定位功能测试得分高,提示 Val 等位基因

对记忆过程的正常发挥有积极的保护作用。不过 BDNF Val66Met 基因多态性是否也与 T2DM 并发的认知障碍有关,目前尚未见到相关报道。

本研究以中国汉族人群为研究对象,PCR-RFLP 检测 T2DM-CI 组和对照组 BDNF Val66Met 位点的基因型和等位基因的不同分布,结果发现在女性样本中,T2DM-CI 组 rs6265 的 A 等位基因频率明显多于认知正常对照组,且 AA 基因型在 T2DM-CI 组分布相对过多。而在总体样本和男性样本中,rs6265 的等位基因和基因型在病例组和对照组中的分布均无显著性差异,说明该位点可能与女性对 T2DM-CI 的易感性有关。

Val66Met 基因变异影响认知功能的机制,可能有下列几点。首先,临床研究证实,记忆主要依赖于海马和相关的中颞叶瓣状结构。既往研究发现,Val66Met 基因多态性可以影响海马早期和晚期长期时程增强效应的形成<sup>[5,11]</sup>。其次,大量研究已经证实 Met 基因变异和海马以及大脑皮质的萎缩有关<sup>[13-14]</sup>,如 Pezawa 等<sup>[14]</sup>研究发现 Met BDNF 等位基因携带者显示与年龄和性别无关的背外侧前额叶皮质灰质体积减少,这种皮质形态学变化至少部分是由于长期 BDNF 调节神经发育过程的结果。因此,本文推测 Met 基因变异与 T2DM-CI 的关联有可能与 Met 基因变异对大脑结构的影响有关。

本研究观察到:BDNF 基因与 T2DM-CI 的关联存在明显的性别差异,rs6265 (Val66Met) 主要与女性 T2DM-CI 发病相关,这种性别关联差异的基础目前还不清楚,推测可能与性激素和 BDNF 基因的相互作用有关。既往研究发现 BDNF 基因上含有特定的功能性雌激素应答元件<sup>[15]</sup>,雌激素可促进 BDNF mRNA 和蛋白的表达<sup>[16]</sup>,雌激素和 BDNF 还可以在大脑海马区活化包括细胞外信号调节激酶以及 N-甲基-D-天冬氨酸受体在内的相同信号通路<sup>[17]</sup>,因

此两者很可能存在着复杂的相互作用。有趣的是, Fukumoto 等<sup>[18]</sup>关于日本阿兹海默病患者和对照者的研究,也发现在女性样本中 Val66Met 等位基因与阿兹海默病存在关联( $P = 0.017$ )。为了证实这个结论,研究者们还荟萃了世界范围的16个类似研究进行 Meta 分析,进一步验证了这个结论( $P = 0.002$ )。Val66Met 基因多态性与认知功能关联的性别差异是否与雌激素作用相关,值得进一步研究。

#### [参考文献]

- [1] Plomin R, Kosslyn SM. Genes, brain and cognition [J]. *Nat Neurosci*, 2001, 4(12):1153-1154
- [2] 卢正红, 唐伟, 方小正. 高血糖与2型糖尿病认知功能关系研究[J]. *南京医科大学学报:自然科学版*, 2010, 30(2):226-230
- [3] Cukierman T, Gerstein HC, Williamson JD. Cognitive decline and dementia in diabetes--systematic overview of prospective observational studies [J]. *Diabetologia*, 2005, 48(12):2460-2469
- [4] Bekinschtein P, Cammarota M, Izquierdo I, et al. BDNF and memory formation and storage [J]. *Neuroscientist*, 2008, 14(2):147-156
- [5] Egan MF, Kojima M, Callicott JH, et al. The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function [J]. *Cell*, 2003, 112(2):257-269
- [6] 周东浩, 房辉, 秦静, 等. 2型糖尿病患者认知功能受损与血清脑源性神经营养因子的相关性 [J]. *中国康复医学杂志*, 2010, 25(4):315-318
- [7] Zhen YF, Zhang J, Liu XY, et al. Low BDNF is associated with cognitive deficits in patients with type 2 diabetes [J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 2013, 227(1):93-100
- [8] 陈英姿, 孟信龙, 马向华. 2型糖尿病患者认知功能状况及血清脑源性神经营养因子与胰岛素样生长因子的临床研究 [J]. *南京医科大学学报:自然科学版*, 2011, 31(2):235-237
- [9] Petersen RC, Stevens JC, Ganguli M, et al. Practice parameter: early detection of dementia; mild cognitive impairment (an evidence-based review) report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology [J]. *Neurology*, 2001, 56(9):1133-1142
- [10] 张保华, 谭云龙, 张五芳, 等. 重复性成套性神经心理状态测验的信度、效度分析 [J]. *中国心理卫生杂志*, 2008, 22(11):787-791
- [11] Hariri AR, Goldberg TE, Mattay VS, et al. Brain-derived neurotrophic factor val66met polymorphism affects human memory-related hippocampal activity and predicts memory performance [J]. *J Neurosci*, 2003, 23(17):6690-6694
- [12] Gong P, Zheng A, Chen D, et al. Effect of BDNF Val66Met polymorphism on digital working memory and spatial localization in a healthy Chinese Han population [J]. *J Mol Neurosci*, 2009, 38(3):250-256
- [13] Manschot SM, Brands AM, van der Grond J, et al. Brain magnetic resonance imaging correlates of impaired cognition in patients with type 2 diabetes [J]. *Diabetes*, 2006, 55(4):1106-1113
- [14] Pezawas L, Verchinski BA, Mattay VS, et al. The brain-derived neurotrophic factor val66met polymorphism and variation in human cortical morphology [J]. *J Neurosci*, 2004, 24(45):10099-10102
- [15] Sohrabji F, Miranda RC, Toran-Allerand CD. Identification of a putative estrogen response element in the gene encoding brain-derived neurotrophic factor [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, 92(24):11110-11114
- [16] Sohrabji F, Lewis DK. Estrogen-BDNF interactions: implications for neurodegenerative diseases [J]. *Front Neuroendocrinol*, 2006, 27(4):404-414
- [17] Scharfman HE, MacLusky NJ. Estrogen and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in hippocampus; complexity of steroid hormone-growth factor interactions in the adult CNS [J]. *Front Neuroendocrinol*, 2006, 27(4):415-435
- [18] Fukumoto N, Fujii T, Combarros O, et al. Sexually dimorphic effect of the Val66Met polymorphism of BDNF on susceptibility to Alzheimer's disease: New data and meta-analysis [J]. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 2009, 153B(1):235-242

[收稿日期] 2013-04-02