

· 临床研究 ·

# 全外显子组测序联合 SnaPshot 技术分析华南地区汉族人增生性糖尿病视网膜病变的遗传易感性

谢洁 蒋正轩 张良 崔颖 王军 张爱平 孟倩丽

510080 广州, 华南理工大学附属广东省人民医院眼科(谢洁, 孟倩丽); 510080 广州, 广东省人民医院眼科 广东省眼病防治研究所 广东省医学科学院(张良、崔颖、王军、张爱平); 230022 合肥, 安徽医科大学第二附属医院眼科(蒋正轩)

通信作者: 孟倩丽, Email: mengqly@163.com

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2018.10.008

**【摘要】** **目的** 研究增生性糖尿病视网膜病变(PDR)的遗传易感性。**方法** 采用横断面研究设计, 纳入 2011 年 9 月至 2012 年 2 月在东莞眼病研究中确诊的 2 型糖尿病患者和 2017 年 7 月至 2018 年 3 月在广东省人民医院眼科诊治的相关患者共 220 例, 其中 100 例糖尿病患者和 120 例 PDR 患者。采用全外显子组测序技术对 22 例不伴视网膜病变的 2 型糖尿病患者(糖尿病组)和 23 例 PDR 患者(PDR 组)的外周血样本 DNA 进行单核苷酸多态性(SNP)、InDel 等鉴定, 筛选出其中具有显著差异的 9 个外显子区域位点, 采用 SnaPshot 技术对 78 例不伴视网膜病变的 2 型糖尿病患者和 97 例 PDR 患者进行 9 个位点的 SNP 分型, 并分析其单倍型和连锁不平衡性。**结果** 全外显子组测序检出 75 个位点 SNP 与 PDR 相关联( $P < 0.01$ ), 涉及 53 个基因, 其中 11 个位点位于外显子区, 7 个突变属于非同义突变。SnaPshot SNP 分型技术验证其中 9 个显著差异的位点, 发现其等位基因及基因型频率在 PDR 组和糖尿病组中差异无统计学意义( $P > 0.05$ ), 但 7 种单倍型分布频率差异有统计学意义( $P < 0.01$ ), 其中 Hap1 和 Hap4 可能会降低 PDR 的患病风险[均比值比(OR) < 1,  $P < 0.05$ ], Hap2 可能会增加 PDR 的患病风险(OR > 1,  $P < 0.05$ )。**结论** 华南地区汉族 2 型糖尿病患者 PDR 的发生存在遗传易感性。

**【关键词】** 增生性糖尿病视网膜病变; 汉族; 遗传易感性; 外显子组测序; SnaPshot

**基金项目:** 国家自然科学基金项目(81371031); 广东省自然科学基金项目(2017A030313609); 广东省医学科学技术研究基金项目(A2018401)

**Analysis of genetic susceptibility to proliferative diabetic retinopathy in Han patients with type 2 diabetes from Southern China by whole exome sequencing and SnaPshot** Xie Jie, Jiang Zhengxuan, Zhang Liang, Cui Ying, Wang Jun, Zhang Aiping, Meng Qianli

Department of Ophthalmology, Guangdong General Hospital, School of Medicine, South China University of Technology, Guangzhou 510080 (Xie J, Meng QL); Guangdong General Hospital, Guangdong Eye Institute, Guangdong Academy of Medical Sciences, Guangzhou 510080, China (Zhang L, Cui Y, Wang J, Zhang AP); Department of Ophthalmology, the Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022, China (Jiang ZX)

Corresponding author: Meng Qianli, Email: mengqly@163.com

**【Abstract】** **Objective** To research the genetic susceptibility of proliferative diabetic retinopathy (PDR) in Han patients with type 2 diabetes from Southern China. **Methods** A cross-sectional study was performed under the informed consent of the patients. Patients with type 2 diabetes in the Dongguan Eye Study from September 2011 to February 2012 and relative patients treated in Guangdong General Hospital from July 2017 to March 2018 were included in this study, including 100 patients with diabetes mellitus (DM) and 120 patients with PDR. Whole exome sequencing was used to identify DNA mutation in peripheral blood samples from 22 type 2 diabetic patients without retinopathy (DM group) and 23 diabetic patients with PDR (PDR group). Genotype and allele of the nine selected single-nucleotide polymorphisms (SNPs) were tested and analyzed by SnaPshot technology in another 78 DM patients without retinopathy and 97 PDR patients. **Results** A total of 75 SNPs were associated with PDR ( $P < 0.01$ ),

involving 53 genes. Eleven gene loci were in the exon region and 7 were non-synonymous mutations. Nine exon loci of 8 genes with significant differences were screened out for the verification. SnaPshot SNP genotyping technique found that there were no significant differences in allele and genotype frequency in the nine selected SNPs between PDR group and DM group (all at  $P > 0.05$ ). However, 7 haplotypes distribution frequencies were significantly different between PDR group and DM group (all at  $P < 0.01$ ). Hap1 and Hap4 might reduce the risk of PDR (both at  $OR < 1$ ,  $P < 0.05$ ), and Hap2 might increase the risk of PDR ( $OR > 1$ ,  $P < 0.05$ ). **Conclusions** The occurrence of PDR probably has a genetic susceptibility in type 2 DM patients of Han nationality in Southern China.

[**Key words**] Proliferative diabetic retinopathy; Han nationality; Genetic susceptibility; Whole exome sequencing; SnaPshot

**Fund program:** National Natural Science Foundation of China (81371031); Natural Science Foundation of Guangdong (2017A030313609); Medical Scientific Research Foundation of Guangdong (A2018401)

糖尿病是当前威胁全球人类健康的重要的非传染性疾 病<sup>[1]</sup>。糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR) 作为糖尿病高度特异的微血管并发症,已成为工作年龄人群首位不可逆盲眼病,被世界卫生组织界定为现阶段继白内障之后的第二大防盲重点眼病。在中国 2 型糖尿病成人患者中,20% ~ 40% 出现视网膜病变,8% 视力丧失<sup>[2]</sup>,其中增生性糖尿病视网膜病变 (proliferative diabetic retinopathy, PDR) 是导致严重视功能损害的主要类型。DR 病因错综复杂,DR 发生及发展与血糖水平、糖尿病病程、血压等密切相关<sup>[3]</sup>。不是所有血糖控制欠佳、长病程、伴有高血压的糖尿病患者都发生 DR,而一些严格控制血糖等危险因素的患者同样可以出现视网膜病变<sup>[4]</sup>。流行病学调查研究发现,DR 具有显著的种族差异和家族聚居现象<sup>[5]</sup>,提示遗传因素在 DR 易感性中发挥着重要作用。鉴于此,本研究以华南地区汉族 2 型糖尿病成年患者为研究对象,以 PDR 患者为病例组,以不伴有视网膜病变的 2 型糖尿病患者为对照组,采用全外显子组测序技术联合 SnaPshot SNP 分型技术筛选与 PDR 发生可能相关的单核苷酸多态性 (single-nucleotide polymorphisms, SNPs) 及相关的易感基因。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

采用横断面研究设计。纳入 2011 年 9 月至 2012 年 2 月在东莞眼病研究<sup>[6]</sup>中确诊的 2 型糖尿病患者和 2017 年 7 月至 2018 年 3 月在广东省人民医院眼科诊治的相关患者共 220 例,其中糖尿病患者 100 例,PDR 患者 120 例。纳入标准:(1) 年龄  $\geq 40$  岁;(2) 根据美国糖尿病学会 2010 年糖尿病诊断标准<sup>[7]</sup> 确诊为 2 型糖尿病;(3) 根据糖尿病视网膜病变国际临床分级标准 (2002)<sup>[8]</sup> 诊断为无明显视网膜病变且糖尿病病程  $\geq 5$  年 (糖尿病组) 或 PDR (PDR 组) 的患者。排除

标准:(1) 屈光间质明显混浊,影响 DR 的诊断者;(2) 同时患有全身 (恶性肿瘤、血液病、免疫性疾病) 或眼部 (青光眼、除 DR 外的其他眼底疾病) 其他疾病,可能对检测指标造成影响者;(3) 不能配合完成所有眼科及全身相关检查者。

所有患者均进行标准化评估,以明确诊断,排除其他全身疾病的影响,主要包括病史问诊、体格检查、眼科专科检查以及实验室检查。病史问诊包括患者的基本信息 (年龄、性别、民族、籍贯)、既往史 (如糖尿病、高血压、高脂血症) 和家族史。体格检查包括体质量、身高、腰围、臀围和血压。眼科检查主要包括矫正视力、眼压、眼前节裂隙灯显微镜检查、扩瞳前置镜下间接检眼镜检查及眼底照相,部分患者行光相断层扫描和荧光素眼底血管造影。实验室检查包括空腹血糖、糖化血红蛋白、血脂四项和肾功能等,同时抽取静脉血 2 ~ 4 ml 保存于  $-80$  °C 超低温冰箱。该研究方案经广东省人民医院伦理委员会批准 (批文号:GDREC2013026H),并遵循赫尔辛基宣言,所有患者均签署知情同意书。

### 1.2 方法

**1.2.1 全外显子组测序** 选取糖尿病组患者 22 例和 PDR 组患者 23 例外周血样本,使用基因组 DNA 提取和纯化试剂盒 (QIAamp blood min kit; QIAGEN) 从静脉全血中提取基因组 DNA。使用外显子测序技术 (Illumina HiSeq 2000 等测序平台) 对全基因组外显子区域 DNA 进行 SNP、InDel 等鉴定 (北京华诺时代科技有限公司)。对下机的原始数据进行数据质量评估,保证每个样本测序量均在 9G 以上,Q30 达 85%,并评估覆盖效率及测序深度。使用短序列比对软件 bwa v. 0.7.9,采用 mem-T30-h5-M 命令,将测序 reads 比对到参考基因组上;参考基因组下载自 UCSC,人类基因组版本为 hg38。随后采用 GATK v3.5 程序检测 SNP 及短序列插入缺失突变 (Insertions and Deletions, Indel)

根据 22 例糖尿病患者和 23 例 PDR 患者样本 SNP 检测结果,采用 logistic 回归模型,使用关联分析软件 plink (v1.9) 分析病例组与对照组中 SNP 的基因型间的联系。

**1.2.2 候选基因筛选** 根据全外显子组测序结果中 PDR 组与糖尿病组差异位点的所处功能位置 (exonic/intronic/intergenic/UTR5/UTR3/ncRNA\_exonic/ncRNA\_intronic/upstream/downstream/), 结合突变性质 (同义突变/非同义突变)、突变频率、KEGG 分析结果,以及 Pubmed 查阅位点相关研究,挑选出 9 个位于外显子区

的位点进行验证(表 1)。

**1.2.3 候选位点 SNP 分型、单倍型和连锁不平衡分析** 选取 78 例糖尿病组患者和 97 例 PDR 组患者外周血样本,提取基因组 DNA。采用多重单碱基延伸反应 (SnaPshot SNP 分型技术) 检测各样本 9 个位点的 SNP 分型(武汉天一辉远生物科技有限公司)(表 1)。采用 genemarker 软件分析得到的 fsa 结果,统计出每个样品的 SNP 突变型。根据卡方检验比较 2 个组单倍型频率差异,并分析候选基因连锁不平衡性。

表 1 筛选出的 9 个 SNP 位点及其多重 PCR 引物的核苷酸序列

基因	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')	单碱基延伸引物
rs11604671	GAGATCACAACAGTCCACAC	AAGGTGTCCTGCAAGCTGTC	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTACACACTCACCTCCC
rs2734849	ACTTTGAGAATGTGGCACGG	TAACATGGCCAAAGTAGGGC	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGCTGACCCCAACCTGC
rs28699256	TGAGGAGCCCGATCTAGAC	AAGGTCCCAGTACCCCTC	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGACCCCC CCACCACACAGCC
rs3745790	ATGTCCAAGGACACTAACGG	AAGGTGGAATGCACTCCCG	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGGAGGTGGACGCCGTG
rs3749930	GATGAACTCAGTTGACGAGG	GAACACAACCACTGAATTGC	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCGGTGACGCCTGCTATT
rs396912	AGGCTTGCTGTGTGCCTGT	AGGAAGCCCCAGAGCAGAT	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGTGGGTGCTGCAA GCCTGTC
rs62619939	AGAAAGGGTAGCAGCAAGAC	GCTGTCCATTTGAACAGCC	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGCAGCAAGACCTACCAC
rs71395334	TAACCAGCTGTGCAGATACG	ACGCTGCGAATTCGTTGTC	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGATCCGGCTAC GTCACCAA
rs79541588	TTTCCTGGAAGGTTTCCCCC	GTAAGCAGTCCAGTAGAGTC	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAGATTGTCCTGT GAGTT

注:SNP:单核苷酸多态性

**1.3 统计学方法**

采用 SPSS 20.0 统计学软件 (Inc., Chicago, IL, USA) 进行统计分析。2 个组患者的基线特征比较采用独立样本 t 检验和  $\chi^2$  检验。2 个组患者基因的基因型频率、基因型和等位基因分布使用卡方检验。利用 SHEsis 在线软件分析各多态位点间的连锁不平衡状态,构建单倍型并计算各单倍型在对照组和病例组间的分布差异。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

个基因,其中 11 个位点位于外显子区,7 个突变属于非同义突变。根据全外显子组测序结果中 PDR 组与糖尿病组差异位点的所处功能位置、突变频率、KEGG 分析结果,以及 Pubmed 查阅位点相关研究,挑选出处于外显子区域的 rs11604671、rs2734849、rs28699256、rs3745790、rs3749930、rs396912、rs62619939、rs71395334 和 rs79541588 共 9 个位点进行验证,共涉及 8 个基因(表 3)。

**2 结果**

**2.1 患者一般情况**

糖尿病组患者男 43 例,女 57 例,平均年龄 62 岁; PDR 组患者男 64 例,女 56 例,平均年龄 56 岁。与 PDR 组比较,糖尿病组患者年龄较大,可能与所选择的糖尿病组患者糖尿病病程要求较长( $\geq 5$  年)有关。2 个组患者间性别比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ) (表 2)。

**2.2 全外显子组关联性**

75 个位点 SNP 与 PDR 相关联( $P < 0.01$ ),涉及 53

表 2 纳入患者的基线特征

组别	外显子测序样本			SNP 分型验证样本		
	例数	性别构成比 (男/女,例数) <sup>a</sup>	年龄 ( $\bar{x} \pm s$ ,岁) <sup>b</sup>	例数	性别构成比 (男/女,例数) <sup>a</sup>	年龄 ( $\bar{x} \pm s$ ,岁) <sup>b</sup>
PDR 组	23	10/13	56.0 $\pm$ 8.4	97	54/43	55.0 $\pm$ 10.0
糖尿病组	22	8/14	62.0 $\pm$ 12.0	78	35/43	65.0 $\pm$ 11.0
$\chi^2/t^2$ 值		0.237	-2.283		2.017	67.01
P 值		0.626	0.022		0.155	<0.001

注:PDR:增生性糖尿病视网膜病变;SNP:单核苷酸多态性(a: $\chi^2$  检验;b:独立样本 t 检验)

表 3 所筛选出的候选基因及 SNP 位点

染色体	位置	参考碱基	突变碱基	功能位置	SNP	基因名称	基因功能
chr11	113397337	G	A	外显子	rs11604671	ANKK1	属于 Ser/Thr 蛋白激酶家族,参与信号转导通路及神经精神疾病相关 <sup>[9]</sup>
chr11	113399438	A	G	外显子	rs2734849	ANKK1	同上
chr15	78766609	T	C	外显子	rs28699256	ADAMTS7	可调节血管平滑肌细胞迁移。该基因突变可能与冠心病的易感性有关 <sup>[10]</sup>
chr19	46494265	C	T	外显子	rs3745790	PNMAL2	功能不明确
chr6	155440112	G	T	外显子	rs3749930	NOX3	NADPH 氧化酶的 NOX 家族成员,参与氧化应激 <sup>[11]</sup>
chr21	44574611	T	G	外显子	rs396912	KRTAP10-4	功能不明确
chr10	16925587	C	G	外显子	rs62619939	CUBN	内因子-维生素 B12 复合物的受体 <sup>[12]</sup>
chr16	88859681	C	T	外显子	rs71395334	TRAPPC2L	参与囊泡介导的蛋白质和脂质的转运 <sup>[13]</sup>
chr16	57051553	C	T	外显子	rs79541588	NLRCS	在细胞因子应答和抗病毒免疫中起作用 <sup>[14]</sup>

注:SNP:单核苷酸多态性

### 2.3 候选位点 SNP 类与 PDR 的关联性型

续表 4

采用 SnaPshot SNP 分型技术测得 9 个位点 SNP 分型结果显示,该 9 个位点的基因型及等位基因频率在 PDR 组和糖尿病组中总体分布差异均无统计学意义(表 4),提示这 9 个 SNP 位点与 PDR 的发生可能无显著关联。

表 4 SNP 基因型与等位基因分布频率

位点	基因型/等位基因	PDR 组 (n=97) (例数/百分比)	糖尿病组 (n=78) (例数/百分比)	OR 值	$\chi^2$ 值	P 值
rs11604671	CC	83(85.6%)	71(91.0%)	0.584	1.219	0.269
	CT	14(14.4%)	7(9.0%)			
	C	180(92.8%)	149(95.5%)			
	T	14(7.2%)	7(4.5%)			
rs2734849	AA	83(85.6%)	72(92.3%)	0.494	1.940	0.163
	AG	14(14.4%)	6(7.7%)			
	A	180(92.8%)	150(96.2%)			
	G	14(7.2%)	6(3.8%)			
rs28699256	AA	77(79.4%)	63(80.8%)	0.635	0.728	0.728
	AG	17(17.5%)	14(17.9%)			
	GG	3(3.1%)	1(1.3%)			
	A	171(88.1%)	140(89.7%)			
rs3745790	AA	11(11.3%)	5(6.4%)	1.5657	3.383	0.065
	AG	40(41.2%)	26(33.3%)			
	GG	46(47.4%)	47(60.3%)			
	G	132(68.0%)	120(76.9%)			
rs749930	GG	22(22.7%)	19(24.4%)	0.959	0.036	0.847
	GT	51(52.6%)	40(51.3%)			
	TT	24(24.7%)	19(24.4%)			
	T	99(51.0%)	78(50.0%)			
rs396912	GG	46(47.4%)	48(61.5%)	0.613	3.825	0.051
	GT	43(44.3%)	27(34.6%)			
	TT	8(8.2%)	3(3.8%)			
	G	135(69.6%)	123(78.8%)			
rs79541588	CC	53(54.6%)	44(56.4%)	2.079	0.353	0.353
	CT	38(39.2%)	25(32.1%)			
	TT	6(6.2%)	9(11.5%)			
	C	144(74.2%)	113(72.4%)			
rs62619939	CC	80(82.5%)	71(91.0%)	0.463	2.671	0.102
	CG	17(17.5%)	7(9.0%)			
	C	177(91.2%)	149(95.5%)			
	G	17(8.8%)	7(4.5%)			
rs71395334	CC	84(86.6%)	73(93.6%)	0.556	1.372	0.241
	CT	13(13.4%)	4(5.1%)			
	TT	0(100.0%)	1(1.3%)			
	T	13(6.7%)	6(3.8%)			

注:SNP:单核苷酸多态性;PDR:增生性糖尿病视网膜病变;OR:比值比

### 2.4 候选位点中具有显著差异的单倍型及分布频率

单倍型分析结果显示,有 7 个单倍型在 PDR 组和糖尿病组中有显著差异(表 5),其中 Hap1 在 PDR 组中占 10.6%,在糖尿病组中占 23.5% [ $P=0.004, OR=0.424, 95\%$  置信区间(confidence interval, CI):0.234~0.767];Hap4 在 PDR 组中未出现,在糖尿病组中占 3.9% ( $P=0.013, OR=0.001, 95\%$  CI:0.000~0.013),提示该 2 种单倍型可能会降低 PDR 的发生风险。Hap2 在 PDR 组中占 10.1%,在糖尿病组中占 2.7% ( $P=0.003, OR=4.579, 95\%$  CI:1.554~13.593),提示其可能会增加 PDR 的发生风险。

### 2.5 候选基因连锁不平衡分析结果

8 个候选基因之间重组系数  $D'$  值均  $<0.7, r^2$  值均  $<0.3$ ,说明这 8 个基因间的连锁不平衡性较弱,提示可能不存在连锁遗传。图 1 显示 rs11604671 与 rs2734849

具有较强的连锁不平衡性,但由于这 2 个 SNP 为同一基因的不同位点,因此其连锁不平衡性可能没有意义(表 6,7,图 1)。

表 5 单倍型及分布频率

单倍型编号	单倍型*	PDR 组	糖尿病组	$\chi^2$ 值	P 值	OR 值 [95% CI]
Hap1	CAACGGCCC	10.6%	23.5%	8.315	0.004	0.424[0.234-0.767]
Hap2	CAACGTCCC	10.1%	2.7%	8.935	0.003	4.597[1.554-13.593]
Hap3	CAACTGCCT	0.0%	8.0%	14.794	<0.001	
Hap4	CAACTTCCC	0.0%	3.9%	6.163	0.013	0.001[0.000-0.013]
Hap5	CAACTTGCC	0.0%	2.6%	4.762	0.029	
Hap6	CAATTCCT	2.5%	0.0%	4.381	0.036	
Hap7	CAGCTGCC	3.3%	0.0%	5.742	0.017	

注:从左至右碱基依次代表 rs11604671、rs2734849、rs28699256、rs3745790、rs3749930、rs396912、rs62619939、rs71395334 和 rs79541588。PDR:增生性糖尿病视网膜病变;OR:比值比;CI:置信区间

表 6 9 个位点连锁不平衡检验 D' 值

D'	rs2734849	rs28699256	rs3745790	rs3749930	rs396912	rs62619939	rs71395334	rs79541588
rs11604671	1.000	0.087	0.113	0.192	0.108	0.125	0.109	0.102
rs2734849	-	0.106	0.150	0.190	0.146	0.139	0.115	0.075
rs28699256	-	-	0.145	0.109	0.124	0.211	0.217	0.143
rs3745790	-	-	-	0.136	0.095	0.064	0.393	0.011
rs3749930	-	-	-	-	0.070	0.044	0.113	0.288
rs396912	-	-	-	-	-	0.327	0.118	0.077
rs62619939	-	-	-	-	-	-	0.025	0.120
rs71395334	-	-	-	-	-	-	-	0.527

注:D'值>0.7 提示有较强的连锁不平衡性

表 7 9 个位点连锁不平衡检验 r<sup>2</sup> 值

r <sup>2</sup>	rs2734849	rs28699256	rs3745790	rs3749930	rs396912	rs62619939	rs71395334	rs79541588
rs11604671	0.949	0.004	0.002	0.002	0.002	0.013	0.011	0.002
rs2734849	-	0.005	0.004	0.002	0.004	0.016	0.013	0.001
rs28699256	-	-	0.007	0.002	0.005	0.026	0.022	0.001
rs3745790	-	-	-	0.007	0.008	0.000	0.023	0.000
rs3749930	-	-	-	-	0.002	0.000	0.001	0.031
rs396912	-	-	-	-	-	0.022	0.002	0.006
rs62619939	-	-	-	-	-	-	0.000	0.003
rs71395334	-	-	-	-	-	-	-	0.006

注:r<sup>2</sup>值>0.3 提示有较强的连锁不平衡性

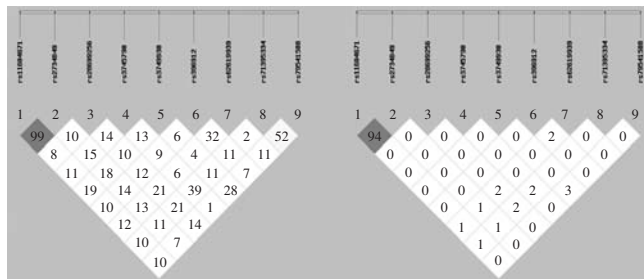


图 1 根据 D' 值、r<sup>2</sup> 值所制的 9 个位点连锁不平衡分析图 LD 图中任何 2 个 SNP 交叉处,代表二者之间的关系,用从白到黑之间的颜色变化表示,黑色越深表示连锁不平衡性越强

### 3 讨论

DR 作为一种典型的多基因、多阶段疾病已引起广泛的关注。PDR 作为 DR 中导致不可逆性视功能损害的主要类型已被证实具有明显的遗传易感性<sup>[9-14]</sup>。一项针对美国印第安人、美国黑人、欧裔美国人和墨西哥裔美国人的研究发现,PDR 的遗传率高达 25%<sup>[15]</sup>。流行病学研究显示,亚洲人群的 2 型糖尿病患者多集中于 40 ~ 59 岁年龄段<sup>[16]</sup>,因此 DR 的发病年龄也以 40 岁以上人群居多。中国基于人群流行病学的研究报道显示,不同地区的 DR 患病率有所不同<sup>[17-18]</sup>。因此,本研究中选取 40 岁以上华南地区汉族 2 型糖尿病患者为研究对象,通过外显子组测序和 SNP 验证的方法筛选与该人群 PDR 发生可能相关的易感基因。

诸多研究已证实,DR 具有显著的种族差异和家族聚居现象。DR 患病率在美国黑人、美籍西班牙人、美国白人和美籍华人中的患病率分别为 36.7%、37.4%、24.8% 和 25.7%;糖尿病患者的家庭成员出现 DR 的风险是正常人的 3 倍,其平均患病率约为 52%<sup>[19-20]</sup>。种族差异、家庭聚居性、对治疗结果的不同反应等这些特性,提示了遗传因素在 DR 易感性中发挥着重要作用。因此,人们通过连锁分析、定位克隆、关联分析等多种方法试图寻找 DR 的可能致病基因。虽然近年开展的几项全基因组关联研究确定了 DR 的多个易感基因位点,但是这些基因座均未达到全基因组的显著水平,也无法在其他研究中被复制<sup>[21]</sup>。与全基因组关联分析相比,较多的遗传学研究集中在与糖尿病微血管并发症相关的重要通路和分子上(逻辑候选基因)。但迄今为止,除了血管内皮生长因子和醛糖还原酶外,其他候选基因并不能较好地与 DR 严重程度联系起来<sup>[22-24]</sup>。众所周知,外显子是真核细胞的基因在表达过程中能编码蛋白质的核苷酸序列,是基因中重要的组成部分。外显子组测序是指利用序列捕获技术将全基因组外显子区域 DNA 捕捉并富集后进行高通量测序的基因组分析方法。与全基因组重测序相比,外显子组测序具有成本低、针对性强、准确性高等优势。因此本研究采用外显子组测序技术探寻汉族 2 型糖尿病并发症 PDR 发生的易感基因。

本研究中共发现 75 个 SNP 位点与 PDR 相关联,涉及 53 个基因,其中 11 个位点位于外显子区,7 个突变属于非同义突变。位于外显子区的 NLRC5 基因所编码的蛋白是 NLR 家族成员,该蛋白在炎症反应和免疫应答中起作用<sup>[14]</sup>,这与 Ung 等<sup>[25]</sup>所进行的一项 PDR 全外显子组测序结果显示同属于 NLR 家族的

NLRP12 基因在 PDR 患者中存在突变相似,该结果提示 NLR 家族在 PDR 的发生和发展中可能起着至关重要的作用,但其作用机制有待进一步研究。

本研究发现,位于外显子区域的 rs11604671、rs2734849、rs62619939、rs3749930、rs3745790、rs79541588、rs71395334、rs28699256 和 rs396912SNP 分型在 PDR 患者与糖尿病患者中的差异有统计学意义。除 rs2734849<sup>[10]</sup>外,其余 8 个位点均未检索到相关报道。虽然 SNP 分型结果显示这 9 个位点的基因型及等位基因频率在 PDR 组和糖尿病组之间差异无统计学意义,但发现 7 个单倍型存在显著性差异,其中 Hap1 和 Hap4 可能对 PDR 有保护性作用,而 Hap2 可能是 PDR 的致病因素,再次证实了 DR 可能是多基因遗传性疾病。由于本研究样本的局限性,后续仍然需要进一步扩大样本量进行验证。

本研究中通过外显子组测序技术发现了多个与 PDR 发生可能相关的候选基因,并通过 SnpShot 技术验证了其中 9 个候选 SNP 位点。这种分析模式让我们对 PDR 复杂的基因组学有了初步的了解,有助于未来进一步明确特定人群 PDR 发生和发展的遗传易感性,探索与疾病严重程度相关的特定基因,从而研发新的治疗方法,以实现个体化治疗。

## 参考文献

- [1] Cho NH, Shaw JE, Karuranga S, et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045 [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2018, 138 : 271 - 281. DOI: 10. 1016/j. diabres. 2018. 02. 023.
- [2] 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) [J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2014, 30(10) : 893-942. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 1000-6699. 2014. 10. 020.
- [3] Yau JW, Rogers SL, Kawasaki R, et al. Global prevalence and major risk factors of diabetic retinopathy [J]. *Diabetes Care*, 2012, 35(3) : 556-564. DOI: 10. 2337/dc11-1909.
- [4] Sobrin L, Green T, Sim X, et al. Candidate gene association study for diabetic retinopathy in persons with type 2 diabetes: the candidate gene association resource (CARE) [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011, 52(10) : 7593-7602. DOI: 10. 1167/iov. 11-7510.
- [5] Zhang X, Saaddine JB, Chou C, et al. Prevalence of diabetic retinopathy in the United States, 2005-2008 [J]. *JAMA*, 2010, 304(6) : 649-656. DOI: 10. 1001/jama. 2010. 1111.
- [6] Cui Y, Zhang L, Zhang M, et al. Prevalence and causes of low vision and blindness in a Chinese population with type 2 diabetes: the Dongguan Eye Study [J/OL]. *Sci Rep*, 2017, 7(1) : 11195 [2018-01-15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28894238>. DOI: 10. 1038/s41598-017-11365-z.
- [7] American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes-2011 [J]. *Diabetes Care*, 2011, 34 (Suppl 1) : S11-S61. DOI: 10. 2337/dc11-S011.
- [8] Wilkinson CP, Ferris FL, Klein RE, et al. Proposed international clinical diabetic retinopathy and diabetic macular edema disease severity scales [J]. *Ophthalmology*, 2003, 110(9) : 1677-1682. DOI: 10. 1016/S0161-6420(03) 00475-5.
- [9] Huang W, Payne TJ, Ma JZ, et al. Significant association of ANKK1 and detection of a functional polymorphism with nicotine dependence in an African-American sample [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2009, 34(2) : 319-330. DOI: 10. 1038/npp. 2008. 37.
- [10] Chan K, Pu X, Sandesara P, et al. Genetic variation at the ADAMTS7 locus is associated with reduced severity of coronary artery disease [J/OL]. *J Am Heart Assoc*, 2017, 6(11) : e006928 [2018-3-02]. <http://jaha. ahajournals.org/cgi/pmidlookup?view=long&pmid=29089340>. DOI: 10. 1161/JAHA. 117. 006928.
- [11] Zhang Y, Shan P, Srivastava A, et al. An endothelial Hsp70-TLR4 axis limits Nox3 expression and protects against oxidant injury in lungs [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2016, 24(17) : 991-1012. DOI: 10. 1089/ars. 2015. 6505.
- [12] Tanner SM, Li Z, Perko JD, et al. Hereditary juvenile cobalamin deficiency caused by mutations in the intrinsic factor gene [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(11) : 4130-4133. DOI: 10. 1073/pnas. 0500517102.
- [13] Scrivens PJ, Shahrzad N, Moores A, et al. TRAPPC2L is a novel, highly conserved TRAPP-interacting protein [J]. *Traffic*, 2009, 10(6) : 724-736. DOI: 10. 1111/j. 1600-0854. 2009. 00906. x.
- [14] Cui J, Zhu L, Xia X, et al. NLRC5 negatively regulates the NF-kappaB and type I interferon signaling pathways [J]. *Cell*, 2010, 141(3) : 483-496. DOI: 10. 1016/j. cell. 2010. 03. 040.
- [15] Hietala K, Forsblom C, Summanen P, et al. Heritability of proliferative diabetic retinopathy [J]. *Diabetes*, 2008, 57(8) : 2176-2180. DOI: 10. 2337/db07-1495.
- [16] Das A. Diabetic retinopathy: battling the global epidemic [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2016, 57(15) : 6669-6682. DOI: 10. 1167/iov. 16-21031.
- [17] Du ZD, Hu LT, Zhao GQ, et al. Epidemiological characteristics and risk factors of diabetic retinopathy in type 2 diabetes mellitus in Shandong Peninsula of China [J]. *Int J Ophthalmol*, 2011, 4(2) : 202-206. DOI: 10. 3980/j. issn. 2222-3959. 2011. 02. 20.
- [18] 张敏, 崔颖, 孟倩丽, 等. 广东省东莞市糖尿病视网膜病变流行病学调查 [J]. *眼科新进展*, 2014, 34(3) : 260-263. DOI: 10. 13389/j. cnki. rao. 2014. 0070.
- [19] Zhang M, Cui Y, Meng QL, et al. Prevalence of diabetic retinopathy in Dongguan city, Guangdong Province, China [J]. *Rec Adv Ophthalmol*, 2014, 34(3) : 260-263. DOI: 10. 13389/j. cnki. rao. 2014. 0070.
- [20] Liew G, Klein R, Wong TY. The role of genetics in susceptibility to diabetic retinopathy [J]. *Int Ophthalmol Clin*, 2009, 49(2) : 35-52. DOI: 10. 1097/IIO. 0b013e31819fd5d7.
- [21] Uhlmann K, Kovacs P, Boettcher Y, et al. Genetics of diabetic retinopathy [J]. *Exp Clin Endocrinol Diabet*, 2006, 114(6) : 275-94. DOI: 10. 1055/s-2006-924260.
- [22] Kuo JZ, Wong TY, Rotter JL. Challenges in elucidating the genetics of diabetic retinopathy [J]. *JAMA Ophthalmol*, 2014, 132(1) : 96-107. DOI: 10. 1001/jamao. phthalmol. 2013. 5024.
- [23] Qiu M, Xiong W, Liao H, et al. VEGF -634G>C polymorphism and diabetic retinopathy risk: a meta-analysis [J]. *Gene*, 2013, 518(2) : 310-315. DOI: 10. 1016/j. gene. 2013. 01. 018.
- [24] Ko BC, Lam KS, Wat NM, et al. An (A-C)n dinucleotide repeat polymorphic marker at the 5' end of the aldose reductase gene is associated with early-onset diabetic retinopathy in NIDDM patients [J]. *Diabetes*, 1995, 44(7) : 727-732.
- [25] Warpeha KM, Chakravarthy U. Molecular genetics of microvascular disease in diabetic retinopathy [J]. *Eye (Lond)*, 2003, 17(3) : 305-311. DOI: 10. 1038/sj. eye. 6700348.
- [26] Ung C, Sanchez AV, Shen L, et al. Whole exome sequencing identification of novel candidate genes in patients with proliferative diabetic retinopathy [J]. *Vision Res*, 2017, 139 : 168-176. DOI: 10. 1016/j. visres. 2017. 03. 007.

(收稿日期:2018-03-31 修回日期:2018-09-20)

(本文编辑:杜娟)