

BDNF rs12273539 基因多态性与 2 型糖尿病 认知障碍的关联存在性别差异

周东浩¹, 张建丽², 刘红艳¹, 陈淑红¹, 刘桂娟¹, 单晓阳¹, 周爱金¹, 彭焱¹, 房辉³, 张向阳⁴

摘要 目的 探讨脑源性神经营养因子(BDNF) rs12273539 基因多态性和 2 型糖尿病认知障碍(T2DM-CI) 之间的关联。方法 选择 T2DM-CI 患者 92 例, 无认知障碍的 T2DM (T2DM-NCI) 患者 191 例, 聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP) 法检测 BDNF rs12273539 基因多态性, SPSS 15.0 及在线遗传软件 SHEsis 进行统计分析。结果 在总体样本和男性样本中, BDNF rs12273539 TT 基因型在认知障碍病例组分布相对过多, 可能是 T2DM-CI 的易感基因型。在女性样本中 BDNF rs12273539 等位基因和基因型分布在 T2DM-CI 组和 T2DM-NCI 组的差异无统计学意义。结论 BDNF rs12273539 可能是 T2DM-CI 的易感基因; BDNF rs12273539 基因多态性与 T2DM-CI 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 R 587.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)01-0103-04

认知功能是一种复杂的大脑神经运动过程。关于孪生子的研究^[1]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。横断面和前瞻性流行病学研究^[2-3] 证据显示, 2 型糖尿病(type 2 diabetes, T2DM) 是认知功能障碍的独立危险因素, 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^[4-5]。课题组既往的研究^[6] 显示 2 型糖尿病认知障碍(type 2 diabetes cognitive impairment, T2DM-CI) 和血清 BDNF 水平下降有关。后续的研究^[7] 进一步证明了这个结果。该研究拟从分子水平进一步研究 BDNF 基因多态性与 T2DM-CI 之间的关联。

2013-07-31 接收

基金项目: 山东省自然科学基金(编号: ZR2012HL26)

作者单位: ¹临沂市人民医院内分泌科, 临沂 276002

²临沂市交通医院内科, 临沂 276002

³唐山工人医院内分泌科, 唐山 063000

⁴北京回龙观医院实验中心, 北京 100700

作者简介: 周东浩, 男, 副主任医师, 责任作者, E-mail: zdh759@126.com

Microanatomical study of the upper neurovascular complex via extreme lateral supracerebellar infratentorial keyhole approach

Chen Wei, Cheng Hongwei, Feng Chunguo, et al

(Dept of Neurosurgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To study the microanatomy of the upper neurovascular complex via extreme lateral supracerebellar infratentorial keyhole approach. **Methods** The extreme lateral supracerebellar infratentorial keyhole approach was imitated in ten vascular perfusion adult cadaveric heads fixed in formalin, the upper neurovascular complex was dissected and observed by microscopy and neuroendoscopy. **Results** The extreme lateral supracerebellar infratentorial keyhole approach could fully expose the anatomical relationship of superior petrosal vein, superior cerebellar artery and trigeminal nerve; the trigeminal nerve was mainly compressed by superior cerebellar artery. The application of neuroendoscopy made up for the shortcoming when exposing the superinterior of trigeminal nerve and the ventralis of brainstem. **Conclusion** The extreme lateral supracerebellar infratentorial keyhole approach can fully expose the upper neurovascular complex and adjacent regions, which can be apply to the operation in upper cerebellopontine angle area.

Key words extreme lateral supracerebellar infratentorial approach; the upper neurovascular complex; neuroendoscopy; microanatomy

1 材料与方法

1.1 研究对象 收集 2012 年 3 月~8 月于临沂市人民医院就诊的 T2DM 患者 均为汉族 且愿意配合本研究 并接受问卷调查、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。

1.1.1 T2DM-CI 组 T2DM-CI 组纳入及排除标准如下: 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; 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且同等教育水平正常人均值 1.5 个标准差(SD) 以上者。

1.1.2 T2DM-NCI 组 T2DM-NCI 组的纳入及排除标准如下: T2DM-NCI 为经认知功能测定 不符合上述病例诊断标准的无明显认知功能损害的 T2DM 患者。此外 尚需符合下列纳入标准: ① 无 T2DM 以外的能够引起认知功能改变的其它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。

1.2 主要试剂及仪器 DNA 提取试剂盒购自美国 Omega 公司 上下游引物由博迈德生物公司合成, TGRADIENT 型 PCR 扩增仪为德国 BIOMETRA 公司产品, Jel Doc2001 型凝胶成像系统为美国 BIO-RAD 公司产品。

1.3 方法

1.3.1 资料收集 自编一般情况调查表, 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 重复性成套心理状态测验(RBANS) 测试受试者认知功能。

1.3.2 BDNF-rs12273539 多态性的检测 采集研究对象外周静脉血(2% EDTA 抗凝) 3 ml, 充分混匀, 提取基因组 DNA, 上游引物: 5'-CTGGGTAAC-CACCCTAATAC-3'; 下游引物: 5'-GGAAGGAAG-GCAGTGTATGC-3' 扩增片断长度 250 bp, 反应总体积为 10 μl, 反应体系混匀后在 PCR 仪中进行扩增: 5 °C 变性 5 min, 再 95 °C 变性 30 s, 53.5 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 30 个循环 最后延伸 5 min。所得产物用 Bcl I(MBI 提供) 酶切, 10 μl 产物体系加内切酶 4 U, 蒸馏水 3.1 μl, 10 × buffer 1.5 μl, 反应温度为 50 °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, EB 染色 20 min 后,

在紫外线凝胶成像系统中观察结果。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 15.0 及在线多功能遗传学软件 SHEsis 进行分析, 数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间等位基因频率和基因型频率分布比较采用 χ^2 检验 独立样本采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 两组的一般临床资料比较 共纳入符合条件且资料完整的 T2DM-CI 患者 92 例, 年龄(53.30 ± 11.81) 岁, 其中男 38 例, 女 54 例。T2DM-NCI 组共 191 例, 年龄(52.39 ± 12.74) 岁, 其中男 80 例, 女 111 例。两组年龄、性别、受教育年限和空腹血糖(FPG)、体重指数(BMI)、收缩压(SBP)、舒张压(DBP)、糖化血红蛋白(HbA1c)、总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C) 水平比较差异均无统计学意义, 见表 1。

表 1 两组的一般临床资料比较($\bar{x} \pm s$)

项目	T2DM-CI 组	T2DM-NCI 组	<i>t</i> 或 χ^2 值	<i>P</i> 值
性别(男/女)	38/54	80/111	0.017	0.897
年龄(岁)	53.30 ± 11.81	52.39 ± 12.74	0.792	0.429
受教育年限(年)	9.84 ± 3.63	10.09 ± 2.93	1.178	0.27
BMI(kg/m ²)	25.98 ± 3.44	24.62 ± 3.77	1.913	0.059
SBP(kPa)	18.21 ± 2.70	18.35 ± 2.67	0.234	0.815
DBP(kPa)	9.73 ± 1.40	9.87 ± 1.50	0.517	0.606
FPG(mmol/L)	8.59 ± 3.70	8.04 ± 3.78	0.44	0.382
HbA1c(%)	9.57 ± 2.47	9.54 ± 2.54	0.602	0.508
TC(mmol/L)	5.24 ± 1.25	5.04 ± 1.30	0.661	0.510
HDL-C(mmol/L)	1.77 ± 1.06	1.87 ± 1.29	0.046	0.963
LDL-C(mmol/L)	2.70 ± 0.86	2.58 ± 0.89	0.774	0.441

2.2 EB 染色 rs12273539 位点为 C/T 二态 SNP, 经 PCR 扩增片段长度为 357 bp。当 rs12273539 为 T 等位基因时, 形成 Bcl I 酶切位点, 酶切后产生 171 bp 和 186 bp 的两条片段, 在群体中组成 CC、CT 和 TT 3 种不同基因型, 见图 1。

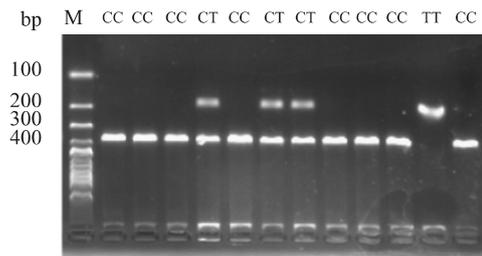


图 1 Bcl I 酶切后 BDNF-rs12273539 电泳图谱 M: Marker; CC: CC 基因型; CT: CT 基因型; TT: TT 基因型

表2 两组 BDNF-rs12273539 基因型、等位基因分布频率[n(%)]

组别		基因型			χ^2 值	P 值	等位基因			
		CC	CT	TT			C	T	χ^2 值	P 值
总	T2DM-CI	66(71.74)	21(22.83)	5(5.53)	7.639 4	0.021 9	153(83.15)	31(16.85)	0.578 4	0.446 9
	T2DM-NCI	137(71.73)	53(27.75)	1(0.52)			327(85.60)	55(14.40)		
男	T2DM-CI	38(70.37)	12(22.22)	4(7.41)	6.643 0	0.036 1	88(81.48)	20(18.52)	0.514 9	0.473 1
	T2DM-NCI	55(69.62)	24(30.38)	0(0)			134(84.81)	24(15.19)		
女	T2DM-CI	28(73.68)	9(23.68)	1(2.63)	0.698 8	0.705 1	65(85.53)	11(14.47)	0.019 0	0.890 4
	T2DM-NCI	82(73.21)	29(25.89)	1(0.89)			193(86.16)	31(13.84)		

2.3 Hardy-Weinberg 平衡检验结果 对两组 SNP 基因型进行拟和优度 χ^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,样品来自随机婚配的自然群体。

2.4 BDNF-rs12273539 与 T2DM-CI 的关联性分析 在总体样本中,T2DM-CI 组 BDNF-rs12273539 等位基因 C 的频率为 83.15%,与 T2DM-NCI 组的 85.60% 相比差异无统计学意义,T2DM-CI 组携带 CC、CT 及 TT 基因型的频率分别为 71.74%、22.83% 和 5.43%,与 T2DM-NCI 组的 71.73%、27.75% 和 0.52% 相比,差异有统计学意义($\chi^2 = 7.639 4, P = 0.021 9$),TT 基因型在 T2DM-CI 组中分布相对过多,可能是 T2DM-CI 的易感基因型。进一步性别分层,在男性样本中,rs12273539 的基因型在 T2DM-CI 组和 T2DM-NCI 组中的分布差异有统计学意义($\chi^2 = 6.643 0, P = 0.036 1$);而在女性样本中,rs12273539 的等位基因和基因型在 T2DM-CI 组和 T2DM-NCI 组中的分布均无差异,说明该位点的多态性可能与 T2DM-CI 特别是男性人群 T2DM-CI 的易感性相关,见表 2。

3 讨论

大量研究表明 T2DM 患者存在认知损伤。Okereke et al^[2] 在两个大型的社区老年人群的队列研究中发现,糖尿病患者存在记忆等各种认知缺陷,而且病程越长,认知评分越低。Kodl et al^[3] 研究显示,T2DM 可以伴发精神性运动速度、前额叶执行功能、言语记忆、处理速度、即刻记忆、延迟记忆、视觉保持、注意功能等一种或多种认知域的损伤。糖尿病患者的认知功能障碍严重影响了患者的生活质量和治疗方案的实施,增加了患者和社会的负担。

BDNF 是一种分子量为 13 ku 的成熟碱性蛋白,主要分布在中枢神经系统,尤其在海马部位表达最多。海马是记忆的中枢,近年来越来越多的证据^[4-5] 表明,BDNF 和学习、记忆等认知过程密切相关。Hwang et al^[8] 研究表明 BDNF 可以调节突触数

目和活动依赖性轴突生长,在学习和年龄相关性记忆衰退过程中发挥关键作用,临床研究^[9] 也发现 BDNF 可以明显影响长期记忆、言语识别记忆、推理等认知功能。此外,BDNF 还可以调节突触可塑性,增强海马区的长时程增强效应(long term potentiation, LTP),在 BDNF 突变体小鼠中,LTP 明显受损,给予外源性 BDNF 后,这种损伤可以修复^[10]。突触可塑性是记忆痕迹的基础,LTP 是突触可塑性的重要表现形式,因而 BDNF 在记忆的形成、提取等多种认知过程中都发挥了重要作用。Egan et al^[5] 发现 BDNF 基因变异可以影响海马功能和记忆,BDNF 变异基因携带者的即时记忆和长期记忆功能受损,N-乙酰基天冬氨酸水平低下,提示 BDNF 等位基因变异和情节记忆功能损伤有关。但是,BDNF 等位基因变异是否与 2 型糖尿病所致的认知损伤相关,目前尚未见报道。

本研究以中国汉族 T2DM-CI 和 T2DM-NCI 者作为研究对象,关联分析发现在总体样本中,T2DM-CI 组 BDNF-rs12273539 TT 基因型在 T2DM-CI 组中分布相对过多,可能是 T2DM-CI 的易感基因型。进一步性别分层,在男性样本中,rs12273539 的基因型在 T2DM-CI 组和 T2DM-NCI 组中的分布比较差异有统计学意义;而在女性样本中,rs12273539 的等位基因和基因型在 T2DM-CI 组和 T2DM-NCI 组中的分布无明显差异,说明该位点的多态性可能与 T2DM-CI 特别是男性人群 T2DM-CI 的易感性相关。

BDNF 基因变异影响认知功能的机制,推测可能有下列两点。首先,记忆过程和 LTP 密切相关,BDNF 基因多态性可以影响海马早期和晚期 LTP 的形成^[5]。其次,MRI 研究^[11] 发现 T2DM-CI 者海马和皮层体积减少,而 BDNF 基因变异和海马以及大脑皮质的萎缩有关,例如 Pezawas et al^[12] 研究发现 BDNF 变异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。

本研究显示 BDNF 基因与 T2DM-CI 的关联存在明显的性别差异,rs12273539 主要与男性 T2DM-

CI 关联, 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^[13]显示 BDNF 基因上含有特定的功能性雌激素应答元件, 雌激素可以促进 BDNF mRNA 和蛋白的表达^[14], 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的信号通路^[15], 因此两者很可能存在着复杂的相互作用。BDNF 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 S M. Genes, brain and cognition[J]. *Nat Neurosci*, 2001, 4(12): 1153-4.
- [2] Okereke O I, Kang J H, Cook N R, et al. Type 2 diabetes mellitus and cognitive decline in two large cohorts of community-dwelling older adults[J]. *J Am Geriatr Soc*, 2008, 56(6): 1028-36.
- [3] Kodl C T, Seaquist E R. Cognitive dysfunction and diabetes mellitus[J]. *Endocr Rev*, 2008, 29(4): 494-511.
- [4] Bekinschtein P, Cammarota M, Izquierdo I, et al. BDNF and memory formation and storage[J]. *Neuroscientist*, 2008, 14(2): 147-56.
- [5] Egan M F, Kojima M, Callicott J H, et al. The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function[J]. *Cell*, 2003, 112(2): 257-69.
- [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): 315-8.
- [7] Zhen Y F, Zhang J, Liu X Y, et al. Low BDNF is associated with cognitive deficits in patients with type 2 diabetes[J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 2013, 227(1): 93-100.
- [8] Hwang I K, Yoo K Y, Jung B K, et al. Correlations between neuronal loss, decrease of memory, and decrease expression of brain-derived neurotrophic factor in the gerbil hippocampus during normal aging[J]. *Exp Neurol*, 2006, 201(1): 75-83.
- [9] Harris S E, Fox H, Wright A F, et al. The brain-derived neurotrophic factor Val66 Met polymorphism is associated with age-related change in reasoning skills[J]. *Mol Psychiatry*, 2006, 11(5): 505-13.
- [10] Patterson S L, Abel T, Deuel T A, et al. Recombinant BDNF rescues deficits in basal synaptic transmission and hippocampal LTP in BDNF knockout mice[J]. *Neuron*, 1996, 16(6): 1137-45.
- [11] Manschot S M, Brands A M, 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): 1106-13.
- [12] Pezawas L, Verchinski B A, Mattay V S, et al. The brain-derived neurotrophic factor val66met polymorphism and variation in human cortical morphology[J]. *J Neurosci*, 2004, 24(45): 10099-102.
- [13] Sohrabji F, Miranda R C, Toran-Allerand C D. 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): 11110-4.
- [14] Sohrabji F, Lewis D K. Estrogen-BDNF interactions: implications for neurodegenerative diseases[J]. *Front Neuroendocrinol*, 2006, 27(4): 404-14.
- [15] Scharfman H E, MacLusky N J. 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): 415-35.

Gender differences between polymorphisms of BDNF-rs12273539 and cognitive impairment in T2DM patients

Zhou Donghao¹, Zhang Jianli², Liu Hongyan¹, et al

(¹Dept of Endocrinology, Linyi People's Hospital, Linyi 276002; ²Dept of Internal Medicine, Traffic Hospital of Linyi City, Linyi 276002)

Abstract Objective To investigate the genetic associations between polymorphisms of BDNF-rs12273539 and cognitive impairment in type 2 diabetes (T2DM) patients. **Methods** Participants were divided into two groups: T2DM patients complicated with cognitive impairment (T2DM-CI) group ($n = 92$) and type 2 diabetes patients without cognitive impairment (T2DM-NCI) group ($n = 191$). Polymorphic SNPs of rs12273539 in the BDNF gene were genotyped using PCR-RFLP technology. The description of data, case-control analysis and association analysis between SNPs were performed with the SPSS 15.0 program and online SHEsis program. **Results** In the total samples and male samples, there was also a significant difference in BDNF rs12273539 genotype distribution between the patients and control groups ($\chi^2 = 7.6394$, $P = 0.0219$; $\chi^2 = 6.6430$, $P = 0.0361$, respectively). In the female samples, no significant association with T2DM-CI was observed between two groups ($P > 0.05$). **Conclusion**

According to the present results, it can be concluded that: ① the genetic polymorphisms of BDNF gene are likely to confer susceptibility to T2DM-CI; ② there are BDNF gene sex-specific genetic components involved in the pathology of T2DM-CI.

Key words brain-derived neurotrophic factor; type 2 diabetes; cognitive impairment; SNP