

达水平,进一步可能通过调控PI3K/AKT/mTOR信号通路,调节下游自噬/凋亡等信号的改变,从而保护肝细胞的生理结构和功能。而左归降糖清脂方对高脂饲养MKR鼠在自噬和凋亡方面的具体干预机制,有待于进一步的研究和探讨。

致谢: 贵州中医药大学基础医学院实验教学中心。

#### 参 考 文 献

- [1] 程莉娟,成细华,喻嵘,等.滋阴益气活血解毒法治疗32例2型糖尿病合并非酒精性脂肪肝的临床观察.中华中医药杂志,2013,28(9):2807-2810
- [2] 喻嵘,成细华,胡伟,等.骨骼肌特异性胰岛素样生长因子1及胰岛素双受体功能缺失所致小鼠2型糖尿病.中国糖尿病杂志,2008,16(7):438-440
- [3] 程莉娟,成细华,喻嵘,等.内质网应激相关基因在2型糖尿病合并脂肪肝小鼠肝脏中的表达变化.中国老年学杂志,2015,35(2):415-418
- [4] 魏冠德.左归降糖清脂方调控PPAR- $\alpha$ 、CYP2E1表达改善MKR转基因鼠2型糖尿病合并脂肪肝的作用研究.长沙:湖南中医药大学,2012
- [5] 成细华,喻嵘,明霞,等.2型糖尿病合并非酒精性脂肪肝动物模型的建立.胃肠病学和肝病学杂志,2011,20(1):77-80
- [6] Xingjun Huang, Guihua Liu, Jiao Guo, et al. The PI3K/AKT pathway in obesity and type 2 diabetes. Int J Biol Sci, 2018, 14(11):1483-1496
- [7] 许帅,廖华君,钟玉梅,等.中医药通过PTEN/PI3K/Akt信号通路防治糖尿病肾病的研究进展.中华中医药杂志,2019,34(9):4190-4192
- [8] 师林,杨玉彬,黄颖娟,等.健脾化湿方对脾虚痰湿型肥胖2型糖尿病胰岛素抵抗大鼠骨骼肌PI3K/Akt通路的影响.中华中医药杂志,2018,33(2):530-534
- [9] 于森,朴春丽,南征,等.2型糖尿病胰岛素抵抗的肝内炎症发病机制与毒损肝络病机理论的相关性探讨.中国中西医结合杂志,2006,26(11):1132-1134

(收稿日期: 2019年8月7日)

· 论 著 ·

## Megsin基因C2093T基因多态性与广西汉族人群IgA肾病中医证型关系的研究

龙春莉<sup>1</sup>, 谢永祥<sup>2</sup>, 史伟<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>广西中医药大学, 南宁 530000; <sup>2</sup>广西中医药大学第一附属医院, 南宁 530023)

**摘要:** 目的: 探讨Megsin基因C2093T基因多态性与广西汉族人群IgA肾病(IgAN)患者中医证型的关系。方法: 中医将IgAN病例辨证分为脾肾气虚证、肝肾阴虚证、气阴两虚证、风湿热毒证4型。采用PCR-RFLP检测86例IgAN组和59名正常组Megsin基因C2093T位点基因多态性; 分析其基因型及等位基因在IgAN病不同中医证型中的分布规律。结果: ①Hardy-Weinberg平衡检验: Megsin基因C2093T存在3种突变基因型, 即CC型、CT型、TT型及C、T两种等位基因, IgAN组和正常对照组Megsin基因C2093T基因型及等位基因频率均具有群体代表性; ②IgAN组和正常组3种突变基因型之间频率比较无显著差异, 两组C、T两种等位基因频率分布差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ); ③IgAN组中医证型分布规律: 脾肾气虚证>气阴两虚证>肝肾阴虚证>风湿热毒证; ④IgAN脾肾气虚证组基因型中CC型占比例最大, 脾肾气虚证组Megsin基因C2093T基因型与正常对照组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); ⑤IgAN各中医证型之间基因型及等位基因频率比较均无明显差异。结论: IgAN患者中医证型以虚证为多, 脾肾气虚证及气阴两虚证为其主要证型。Megsin基因C2093T位点基因型CC型可能是IgA肾病脾肾气虚证发病的易感基因。

**关键词:** IgA肾病; Megsin; 多态性; 中医证型

**基金资助:** 国家自然科学基金地区科学基金项目(No.81460719), 广西自然科学基金项目(No.2017JJA140492Z), 广西名中医史伟传承工作室

## Relationship between Megsin gene C2093T polymorphism and TCM syndromes of IgA nephropathy in the Guangxi Han population

LONG Chun-li<sup>1</sup>, XIE Yong-xiang<sup>2</sup>, SHI Wei<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530000, China; <sup>2</sup>The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530023, China)

**Abstract:** Objective: To investigate the relationship between the polymorphism of the Megsin gene C2093T and the expression of TCM syndromes in IgA nephropathy patients in Guangxi Han population. Methods: According to TCM syndrome differentiation, IgA nephropathy cases were divided into four types: syndrome of qi deficiency of spleen and kidney, syndrome of yin deficiency of liver and kidney, syndrome of deficiency of both qi and yin and syndrome of wind-damp and toxic heat. The polymorphism of C2093T locus of Megsin gene in 86 cases of IgA nephropathy group and 59 cases of normal group was detected by PCR-RFLP and the distribution of its genotype and allele in different TCM syndromes of IgA nephropathy was analyzed. Results: ①Hardy-Weinberg balance test showed that there were three mutant genotypes of Megsin gene C2093T of Megsin gene, namely CC, CT, TT and C, T alleles. The C2093T genotype and allele frequencies of Megsin gene in IgA nephropathy group and normal group were all representative of population. ②There was no significant difference in the frequencies of the three mutant genotypes between IgA nephropathy group and normal group, but the frequency distribution of C and T alleles in two groups had statistical significance ( $P<0.05$ ). ③Distribution regularity of TCM syndromes in IgA nephropathy group: syndrome of qi deficiency of spleen and kidney>syndrome of deficiency of both qi and yin>syndrome of yin deficiency of liver and kidney>syndrome of wind-damp and toxic heat. ④The proportion of CC genotype in IgA nephropathy with syndrome of qi deficiency of spleen and kidney group was the largest. The C2093T genotype of Megsin gene in syndrome of qi deficiency of spleen and kidney group was significantly different from that in normal group ( $P<0.05$ ). ⑤There was no significant difference in genotype and allele frequencies of IgA nephropathy among TCM syndromes. Conclusion: The syndromes of TCM in IgA nephropathy patients are characterized by deficiency syndromes, which the syndrome of qi deficiency of spleen and kidney and the syndrome of deficiency of both qi and yin are the main syndromes. CC genotype of C2093T of Megsin gene may be a susceptible gene for the pathogenesis of IgA nephropathy with syndrome of qi deficiency of spleen and kidney.

**Key words:** IgA nephropathy; Megsin; Polymorphism; TCM syndromes

**Funding:** Fund for Less Developed Regions of National Natural Science Foundation of China (No.81460719), Natural Science Foundation of Guangxi Province (No.2017JJA140492Z), Heritage Studio of Guangxi Famous TCM Expert SHI Wei

IgA肾病(IgA nephropathy, IgAN)是世界上尤其亚洲地区最常见的原发性肾小球疾病,通过20年随访发现,20%~40%的IgAN进展为终末期肾病<sup>[1]</sup>。IgAN的发病机制与免疫、基因及遗传因素等因素有关。易感基因与IgAN的关联愈来愈受到学者关注。Megsin是一种在肾脏系膜细胞特异表达的基因,涉及到肾脏系膜细胞增殖和系膜区扩张<sup>[2]</sup>,C2093T位点是报道最多的位点之一,其与IgAN易感性及进展关系如何,是否受种族的影响目前不完全清楚。目前国内鲜见IgAN中医证型与Megsin基因多态性关系的文献报告。基于此,本研究通过PCR-RFLP法鉴定广西汉族人群IgAN患者中Megsin基因C2093T位点基因的突变及其在IgAN不同中医证型组的表达分布规律。以期阐明IgAN及其各中医证型与Megsin基因C2093T基因多态性的关系。

### 资料

1. 研究对象 IgAN患者来自2011年1月1日至2015年12月31日广西中医药大学第一附属医院肾病科经肾

活检病理检查确诊为IgAN的86例住院患者,均为广西汉族人群,其中男40例,女46例,年龄18~58岁,平均(34.90±11.24)岁。所有病例均已排除过敏性紫癜、系统性红斑狼疮、肝炎、肿瘤等继发性IgAN。正常对照组来自同期广西汉族人群健康体检者59名,其中男35名,女24名,年龄23~60岁,平均(37.63±10.83)岁。既往健康,无肾脏疾病及其他重大疾病史。两组间在年龄、性别之间的比较差异均无统计学意义。本研究遵守本院人体实验伦理规范及原则。

2. 诊断标准 凡肾穿刺活检病理提示肾小球系膜区有大量IgA沉积,并排除过敏性紫癜、肝炎及系统性红斑狼疮等系统性疾病所致的IgA沉积。

3. 纳入标准 ①经肾活检确诊为IgA肾病;②年龄18~60岁;③签署知情同意书。

4. 排除标准 继发性IgA肾病。

### 方法

1. 证型 参照2007年中华中医药学会肾病分会

发布的《IgA肾病的诊断、辨证分型和疗效评定(试行方案)》<sup>[3]</sup>,根据临床症状进行中医辨证,将IgAN病例分为4型:脾肾气虚证、气阴两虚证、肝肾阴虚证及风湿热毒证。

2. 检测方法 空腹抽取两组受试者外周静脉血加入含EDTA抗凝剂的真空管,编号保存于-80℃冰箱,用于后续提取基因组DNA。血液基因组DNA抽取采用QIAamp DNA kit,所得DNA编号置于-20℃保存备用。根据megin基因序列数据库资料设计引物,由广州英俊生物科技有限公司合成。引物序列分别为:上游:5'-TTG TTG ACC TAT GAA GAT TTT AGA G-3';下游:5'-AAA CTT ATA AAC TAC ACA GCA TAT GA-3',扩增片段长度为256bp。采用聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性分析法(PCR-RFLP)进行基因型鉴定,分别检测IgAN组和正常对照组Megin基因C2093T位点引物。应用限制性内切酶HaeⅢ对PCR扩增产物进行酶切,确定其基因型及等位基因分布规律。

3. 统计学方法 应用Hardy-Weinberg遗传平衡检验法检验各组基因型频率是否具有群体代表性。所有数据均使用SPSS 17.0统计软件进行统计分析。计数资料采用卡方检验。以P<0.05为差异有统计学意义。

### 结果

1. PCR扩增产物电泳结果 Megin基因C2093T位点的PCR扩增片段全长为256bp,见图1。2093C等位基因含有HaeⅢ酶切位点,可以被HaeⅢ酶切为114bp、142bp的2条片断;2093T等位基因不含该酶切位点,不能被酶切。所以酶切产物仅1条长为256bp条带的为TT基因型,有114bp、142bp 2条条带的为CC基因型,有114bp、142bp、256bp 3条条带的为CT基因型,见图2。

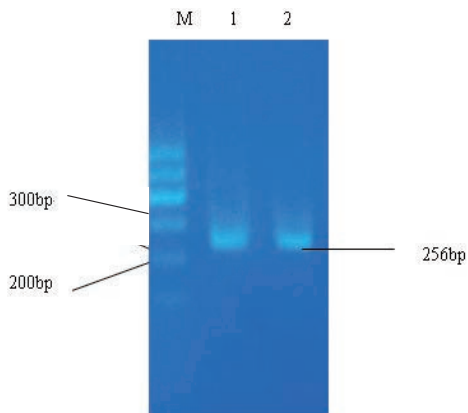


图1 Megin PCR反应电泳图  
注:泳道M为DNA Maker;泳道1-2为酶切前PCR产物。

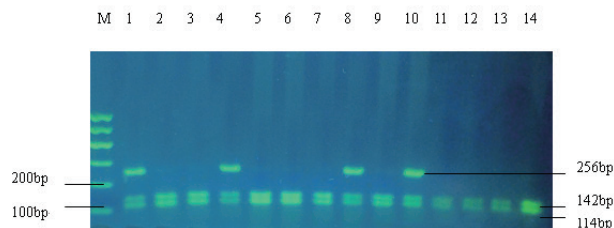


图2 Megin基因C2093T酶切电泳图  
注:泳道M为DNA Marker;泳道1、8、10为CT基因型;泳道4为TT基因型;泳道2、3、5、6、7、9、11、12、13、14为CC基因型。

2. 各基因型Hardy-Weinberg平衡检验结果 本研究对健康人群、IgAN人群研究对象进行了Megin基因C2093T多态性检测,各组人群的Megin基因C2093T均有C、T两种等位基因及CC、CT、TT 3种基因型。各基因型分布频率均符合Hardy-Weinberg平衡,表明正常对照组和IgAN组基因型频率具有群体代表性。

3. 两组Megin基因C2093T位点基因型及等位基因的分布 见表1。经过 $\chi^2$ 检验,两组间的Megin基因的C2093T各基因型分布差异无统计学意义。

表1 两组Megin基因C2093T基因型和等位基因频率的比较 [例(%)]

组别	例数	基因型			等位基因	
		CC型	CT型	TT型	C型	T型
IgAN组	86	49 (57.0)	27 (31.4)	10 (11.6)	125 (72.7)	47 (27.3)
正常对照组	59	37 (62.7)	20 (33.9)	2 (3.4)	94 (79.7)	24 (20.3)
$\chi^2$ 值			3.131		15.007	
P值			0.076		0.001	

正常对照组的等位基因C和T频率分别为79.7%、20.3%, IgAN组的等位基因C和T频率分别为72.7%、27.3%, 经过 $\chi^2$ 检验,两组间的等位基因分布差异有统计学意义(P<0.01)。

4. IgAN组不同中医证型与正常对照组Megin基因C2093T基因型及等位基因频率分布 IgAN组按中医证型分布规律分为:脾肾气虚证38例、气阴两虚证26例、肝肾阴虚证12例、风湿热毒证4例。IgAN组MeginC2093T基因型在IgAN各中医证型和正常对照组之间比较差异无统计学意义。因为样本例数较小,考虑MeginC2093T基因的突变可能在各个证型组与正常对照组以及各个证型之间有可能存在差异。见表2。

5. IgAN组不同中医证型与正常对照组、不同中医证型之间Megin基因C2093T基因型及等位基因频率两两比较 见表3-表4。正常对照组除与IgAN组

表2 IgAN各中医证型与正常对照组Megin基因C2093T基因型及等位基因频率分布 [例(%)]

组别	例数	基因型			等位基因	
		CC型	CT型	TT型	C型	T型
正常对照组	59	37 (62.7)	20 (33.9)	2 (3.4)	94 (79.7)	24 (20.3)
脾肾气虚组	38	17 (44.7)	13 (34.2)	8 (21.1)	47 (61.8)	29 (38.2)
气阴两虚组	26	16 (61.5)	9 (34.6)	1 (3.8)	41 (78.8)	11 (21.2)
肝肾阴虚组	18	12 (66.7)	5 (27.8)	1 (5.6)	29 (80.6)	7 (19.4)
风湿热毒组	4	4 (100.0)	0	0	8 (100.0)	0
$\chi^2$ 值			14.617			12.183
P值			0.067			0.016

表3 正常对照组与IgAN组不同中医证型Megin基因C2093T基因型之间的两两比较

组别	基因型(例)			$\chi^2$ 值(P值)	$\chi^2$ 值(P值)	$\chi^2$ 值(P值)	$\chi^2$ 值(P值)
	CC	CT	TT				
正常对照组	37	20	2	-	-	-	-
脾肾气虚组	17	13	8	8.337 (0.015)	-	-	-
气阴两虚组	16	9	1	0.017 (0.991)	8.412 (0.129)	-	-
肝肾阴虚组	12	5	1	0.360 (0.836)	4.862 (0.087)	0.269 (0.874)	-
风湿热毒组	4	0	0	2.292 (0.318)	2.395 (0.302)	2.308 (0.315)	1.933 (0.400)

表4 正常对照组与IgAN组不同中医证型Megin基因C2093T等位基因之间的两两比较

组别	等位基因(例)		$\chi^2$ 值(P值)	$\chi^2$ 值(P值)	$\chi^2$ 值(P值)	$\chi^2$ 值(P值)
	CC	CT				
正常对照组	94	24	-	-	-	-
脾肾气虚组	47	29	1.380 (0.240)	-	-	-
气阴两虚组	41	11	0.027 (0.867)	1.187 (0.276)	-	-
肝肾阴虚组	29	7	0.060 (0.807)	0.373 (0.542)	0.117 (0.732)	-
风湿热毒组	8	0	2.010 (0.156)	2.947 (0.086)	1.846 (0.174)	2.173 (0.140)

脾肾气虚证Megin基因C2093T基因型频率比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),与其它证型间比较差异均无统计学意义; IgAN组不同中医证型Megin基因C2093T基因型频率比较差异均无统计学意义。

正常对照组与IgAN组不同中医证型Megin基因C2093T等位基因频率比较差异均无统计学意义; IgAN组不同中医证型Megin基因C2093T等位基因频率比较差异均无统计学意义。

### 讨论

随着分子生物学研究方法的成熟与发展,大量研究表明IgAN可能是一种多基因病,其发生、发展存在地域、种族差异,且有家族聚集倾向<sup>[4]</sup>。Megin在肾脏系膜细胞增生及系膜基质增多中发挥作用<sup>[2]</sup>,是研究IgAN遗传因素中的相关候选基因之一。本研究结果表明:从正常对照组3种基因型的构成来看,

CC基因型占比例最大,CT型其次,TT型所占比例最低。在IgAN组患者中,检测到3种基因型的分布与正常人相似。正常组及IgAN组各基因型分布频率均符合Hardy-Weinberg平衡,具有群体代表性,可对该基因与IgAN的关联性做进一步研究。经过比较,3种基因型在正常对照组及IgAN组中的分布差异无统计学意义,基于此,本研究提示Megin基因C2093T位点基因型多态性可能与广西汉族人群IgA肾病遗传易感性无关。进一步比较T、C等位基因中,正常对照组及IgAN组,C型较T型多,两组间的等位基因分布比较差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。复习文献显示:基因频率与文献报道的我国汉族人种和匈牙利人种<sup>[5]</sup>中各基因型频率均接近。基于正常组与IgAN组间T、C等位基因比较,碱基T在IgAN组中的分布高于正常对照组,且两组间的比较等位基因分布差异有统计学

意义,因此,提示携带T碱基比携带C碱基具有更高的IgAN发病风险。这与C S Lim等<sup>[6]</sup>研究260例IgA肾病患者和315例健康对照者后发现Megin基因C2093T及C2180T多态性在IgAN与健康对照人群中无显著性差异结果是一致的,但是此结果与YOU-JI LI等<sup>[7]</sup>对423例中国汉族人群Megin基因C2093T及C2180T多态性与IgAN的易感性进行研究,发现Megin基因多态性与IgAN的易感性有相关性的结果不完全一致。这个结果可能与研究对象的种族不同、抽样误差等多方面因素影响导致基因多态性位点不同有关。

本研究结果显示, Megin基因C2093T位点基因多态性CT、TT、CC基因型在IgAN中医证型组中的分布与正常对照组比较无显著差异,因为样本例数较小,考虑MeginC2093T基因的突变可能在各个中医证型组与正常对照组以及各个证型之间有可能存在差异,进一步探讨IgA肾病Megin基因C2093T位点多态性在不同中医证型中的分布。IgA肾病虚证多,实证少,脾肾气虚证及气阴两虚证为其主要证型。实验结果显示, IgA肾病脾肾气虚证Megin基因C2093T的CC基因型频率高于风湿热毒证、气阴两虚证及肝肾阴虚证,正常对照组除与IgAN组脾肾气虚证Megin基因C2093T基因型频率比较差异有统计学意义( $P<0.05$ ),与其它证型间比较差异均无统计学意义; IgAN组不同中医证型Megin基因C2093T基因型及等位基因频率相互比较差异均无统计学意义。正常组与IgAN组不同中医证型Megin基因C2093T等位基因频率比较差异均无统计学意义。说明Megin基因2093T位点型CC型是广西汉族人群IgA肾病脾肾气虚证发病的易感基因,即在病理条件下,携带Megin 2093T基因型CC型的个体可增加IgA肾病脾肾气虚证的发病风险。考虑样本量少,此结论仍需进一步扩大样本量以论证。另外,本研究发现正常对照组及IgAN中医各证型的3种基因分布,均以CC基因型占比例最大,与杜勇等<sup>[8]</sup>发现在我国正常人群中Megin基因C2093T基因以CC型分布最多(42.3%)实验结果一致。

笔者研究显示, Megin基因C2093T基因多态性可能和广西汉族人群IgAN遗传易感性不相关。IgAN患者中医证型以虚证为多, Megin基因C2093T位点基因型CC型可能是IgA肾病脾肾气虚证发病的易感基因。考虑到本实验样本量较小,亦可能导致易感基因研究结果不一致。因此,还需扩大样本数,设计更加合理的实验方法,并对种族、地域和民族进一步研究加以论证以上推论。

#### 参 考 文 献

- [1] Zhang Y,Zhou X,Zhang H.What genetics tells us about the pathogenesis of IgA nephropathy:The role of immune factors and infection.Kidney International Reports,2017,2(3):318-331
- [2] Miyata T,Strihou C V Y D.Diabetic nephropathy:A disorder of oxygen metabolism?.Nature Reviews Nephrology,2010,6(2):83
- [3] 中华中医药学会肾病分会.IgA肾病的诊断、辨证分型和疗效评定(试行方案).上海中医药杂志,2007,41(5):9-10
- [4] Magistroni R,D Agati V D,Appel G B,et al.New developments in genetics,pathogenesis,and therapy of IgA nephropathy.Kidney Int,2015,88(5):974-989
- [4] Hsu S I,Ramirez S B,Winn M P,et al.Evidence for genetic factors in the development and progression of IgA nephropathy.Kidney Int, 2000,57(5):1818-1835
- [5] Barratt J,Smith A C,Feehally J.The pathogenic role of IgA1 linked glycosylation in the pathogenesis of IgA nephropathy.Nephrology (Carlton),2007,12(3):275-284
- [6] C S Lim,S M Lim,Y K Oh,et al.megin 2093T-2180C haplotype at 3' untranslated region is associated with poor renal survival in Korean IgA nephropathy patients.Clinical Nephrology,2008,2: 101-109
- [7] YOU-JI LI,YONG DU,CAI-XIA LI,et al.Family-based association study showing that immunoglobulin A nephropathy is associated with the polymorphisms 2093C and 2180T in the 3' untranslated region of the Megin gene.J Am Soc Nephrol,2004,15(7):1739-1743
- [8] 杜勇,李幼姬,李彩霞,等.我国汉族人群Megin基因C2093T、Uteroglobin基因G38A多态性分布特征的研究.中山大学学报(医学科学版),2004,25(3):1-3

(收稿日期:2019年8月6日)