·老年人认知功能障碍专栏·

胱抑素C基因多态性与2型糖尿病患者轻度认知功能障碍的相关性研究

罗 镧[1]，孙 诚[2]，拓西平[3*]

（[1]南通大学附属医院老年医学科，[2]江苏省神经再生重点实验室，南通 226001；[3]第二军医大学附属长海医院老年病科，上海 200433）

【摘 要】目的 研究老年2型糖尿病（T2DM）患者的胱抑素C基因（CST3）多态性与其发生轻度认知功能障碍（MCI）的关系，探讨发生MCI的相关危险因素。**方法** 选取156例老年T2DM患者，分为MCI组和认知功能正常组（NC），均使用简易智力状态量表、蒙特利尔认知评估量表、焦虑自评量表、流行病学调查用抑郁自评量表、帕金森病筛查量表、日常生活能力量表、全面衰退量表等进行测验，聚合酶链反应-限制性片段长度多态性分析（PCR-RFLP）CST3基因多态性。**结果** A等位基因频率在MCI组与NC组分别为80.4%和90.9%，B等位基因频率在MCI组与NC组分别为19.6%和9.1%，两组比较$\chi^2 = 7.005$，$P = 0.008$，差异均有统计学意义。在0.05检验水准下，携带B等位基因（OR：2.279，95% CI：1.064～4.882，$P = 0.034$）与T2DM发生MCI危险性的关联差异有统计学意义。**结论** 携带B等位基因是老年T2DM患者发生MCI的危险因素。检测CST3多态性有利于老年T2DM患者认知障碍的早期诊断。

【关键词】糖尿病，2型；轻度认知功能障碍；胱抑素C基因；危险因素

【中图分类号】 R587.1; R741.041 **【文献标识码】** A **【DOI】** 10.3724/SP.J.1264.2014.00076

Relationship of polymorphism in cystatin C gene with risk for mild cognitive impairment in type 2 diabetes mellitus patients

LUO Lan[1], SUN Cheng[2], TUO Xi-Ping[3*]

([1]Department of Geriatrics, Affiliated Hospital, [2]Jiangsu Key Laboratory of Neuroregeneration, Nantong University, Nantong 226001, China; [3]Department of Geriatrics, Affiliated Changhai the Hospital, the Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

【Abstract】 Objective To investigate the correlation of polymorphism in cystatin C gene (CST3) with mild cognitive impairment (MCI) in the elderly with type 2 diabetes mellitus (T2DM) and to analyze the risk factors for MCI. **Methods** A total of 156 retired veteran cadres with identified T2DM living in Shanghai were recruited and divided into 2 groups: MCI group and normal cognition (NC) group based on Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders-Fourth Edition (DSM-Ⅳ). All subjects were evaluated with cognition scores of Mini-Mental State Examination (MMSE), Montreal Cognitive Assessment (MoCA), Self-Rating Anxiety Scale (SAS), Center for Epidemiogical Studies Depression Scale (CES-D), Screening Scale for Parkinson's disease (SSPD), Activity of Daily Living (ADL), and Global Deterioration Scale (GDS). Polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) was used to detect the polymorphism of CST3. **Results** The allele A frequency was 80.4% and 90.9% respectively in T2DM-MCI group and T2DM-NC group, and that of allele B were 19.6% and 9.1% respectively. There were significant differences between the 2 groups (Chi-square = 7.005, $P = 0.008$). CST3 B allele carrying was a risk factor for MCI in the T2DM elderly (OR = 2.279, 95% CI = 1.064 to 4.882, $P = 0.034$). **Conclusion** CST3 B allele carrying is one of the risk factors for MCI in the T2DM elderly. Detection of CST3 polymorphism is helpful in the early diagnosis of MCI for the elderly people with T2DM.

【Key words】 diabetes mellitus, type 2; mild cognitive impairment; cystatin C gene; risk factors

This work was supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (31271260), *the Project of "Six Kinds of Talents Summit" of Jiangsu Province* (2013-WSN-071), *the Project of Social Scientific and Technological Innovation and Demonstration of Nantong City* (HS2013024) *and the Project of Teaching Research of Nantong University* (Tfj1211).

Corresponding author: TUO Xi-Ping, E-mail: xptuo_01@126.com

收稿日期： 2014−02−12; **修回日期：** 2014−03−31

基金项目： 国家自然科学基金面上项目（31271260）；江苏省"六大人才高峰"资助项目（2013-WSN-071）；南通市社会事业科技创新与示范项目（HS2013024）；南通大学教学研究课题（Tfj1211）

通信作者： 拓西平, E-mail: xptuo_01@126.com

认知功能损害是2型糖尿病（type 2 diabetes mellitus，T2DM）重要且常见的慢性并发症之一[1]，其早期表现为轻度认知功能障碍（mild cognitive impairment，MCI），但并不是所有患者均发生，并且发生的轻重、缓急、早晚均不同[2]。既往研究发现血清胱抑素水平升高可能是T2DM发生MCI的危险因素之一[3]，但是这是否与患者本身的遗传素质相关，胱抑素基因（cystatin C gene，CST3）多态性是否参与调节，未见文献报道。本研究选择老年T2DM患者，这是MCI发生比例相对更高的人群，通过分子流行病学的方法，旨在探讨CST3多态性与老年T2DM患者发生MCI危险的相关性。

1 对象与方法

1.1 研究对象

上海地区军队干休所的离退休老干部156人，均符合1999年WHO的T2DM诊断标准，对病史、体检和影像学资料进行筛查，参照2004年MCI国际工作组MCI诊断标准[4]，以及美国精神障碍诊断与统计手册第4版（Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders-Fourth Edition，DSM-Ⅳ）进行分组[5]：T2DM-MCI组：79人有认知功能减退的主诉或有知情人提供的具有明显的认知功能减退的临床表现，症状持续≥6个月；总体认知功能基本正常，简易智力状态量表（Mini-Mental State Examination，MMSE）总分在正常范围；蒙特利尔认知评估量表（Montreal Cognitive Assessment，MoCA）19～25分；认知功能量表检查至少有一个认知领域损伤，且均为轻度异常（即≤各分检验分界值1.5SD）；日常生活能力（Activity of Daily Living，ADL）量表评分＜26分；全面衰退量表（Global Deterioration Scale，GDS）评分为2～3级。T2DM-normal cognition（NC）组：77人所有认知功能检测项目均在正常范围；无社会适应能力受损，ADL＜26分；GDS为1级。

1.2 方法

1.2.1 问卷与检查 调查性别、年龄、民族、教育年限、通讯方式、既往病史、家族史。测量血压、身高和体质量。检查心电图、肝肾彩超、头颅计算机断层扫描（computed tomography，CT）等。分别检测血常规、肝功能、血肌酐、血胱抑素C（cystatin C，Cys C）、空腹血糖、糖化血红蛋白、甘油三酯、总胆固醇，留取晨尿做尿常规分析。要求汉族、无低血糖及酮症酸中毒昏迷史、无其他内分泌系统及代谢障碍性疾病史、无风湿免疫性病史、无脑血管病史，无引起中枢神经损伤的其他病史、无中枢神经系统局灶性体征、无影响认知功能测试的严重视听力障碍及肢体活动障碍；不筛除头颅CT表现为轻度脑萎缩和腔隙性脑梗死患者。血常规、尿常规和肝功能基本正常，血肌酐＜132.6μmol/L。并且保证T2DM-MCI组与T2DM-NC组的年龄、性别和受教育程度等项目构成匹配。

1.2.2 神经心理学量表测试 要求MMSE得分：文盲≥20分，小学≥23分，中学及以上≥27分，以排除痴呆；MoCA总分≥19分，保证入组对象仅包括NC和MCI；流行病学研究中心抑郁量表（Center for Epidemiogical Studies Depression Scale，CES-D）≤15分，以排除抑郁症状；焦虑自评量表（Self-rating Anxiety Scale，SAS）＜50分，以排除焦虑症状；帕金森病筛查量表（Screening Scale for Parkinson's Disease，SSPD）≤1分，以排除帕金森病症状；ADL＜26分。以排除日常生活能力下降；GDS：1～3级，保证入组对象仅包括NC（1级）和MCI（2～3级）。并严格控制信息偏倚。

1.2.3 基因组DNA提取、聚合酶链反应扩增及限制性片段长度多态性分析（polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism，PCR-RFLP）空腹抗凝外周静脉血2ml，上海生工试剂盒提取基因组DNA作为模板，PCR扩增引物序列：CST3-正义（sense）：5'-TGGGAGGGACGAGGCGTTCC-3'；CST3-反义（antisense）：5'-TGCTGGCTTTGTTGTACTCG-3'预计扩增片段长度389bp。50μl PCR反应体系于Marstercycler gradient扩增仪中经95℃预变性5min，95℃变性60s，56℃退火30s，72℃延伸60s，共30个循环后72℃充分延伸5min后，4℃保存。过量SacⅡ酶消化过夜酶切，找出一个能被完全切开的野生纯合子AA。然后在反应体系中缓冲液和BSA2不变的情况下，按一定梯度设定酶切所用扩增产物量、内切酶的浓度、酶切时间，总共20μl反应体系，混匀并短暂离心后，置37℃水浴酶切4h。酶切产物分别做琼脂糖凝胶电泳，在Ge1Doc2000紫外检测系统中观察酶切产物的片段图谱，根据片段条带判断基因型，英韦创津生物科技有限公司进行双向测序，验证基因型的正确性。

1.3 统计学处理

应用SPSS17.0统计软件包进行统计学分析。研究对象与Hardy-Weinberg平衡的符合程度及组间基因型与等位基因频率比较用χ^2检验；采用单因素logistic回归模型分析CST3基因型与T2DM-MCI的相关性，并计算比值比（odds ratio，OR）及其95%可信区间（confidence interval，CI）。

2 结 果

2.1 CST3 AA/BB/AB基因多态性结果

测序结果与GeneBank比对，RFLP分型结果与测序结果完全一致。AA纯合子为−157G、−72A、+73G（图1）；BB纯合子为−157C、−72C、+73A（图2）；AB杂合子为−157G/C（S）、−72A/C（M）、+73G/A（R；图3）。

2.2 研究对象与Hardy-Weinberg平衡的符合程度

基因型分布为：AA = 118例、BB = 7例、AB = 31例。等位基因分布为：A = 267；B = 45。计算A的频率 p = 267/312 = 85.6%；B的频率q = 45/312 = 14.4%；进一步计算出各预期频率为：p^2 = 85.6% × 85.6% = 73.3%（AA）；2pq = 2 × 85.6% × 14.4% = 24.6%（AB）；q^2 = 14.4% × 14.4% = 2.1%（BB）。而实际频率为AA = 118/156 = 75.6%；AB = 31/156 = 19.9%；BB = 7/156 = 4.5%。实际频率与预期频率比较，结果为χ^2 = 1.897，P = 0.387。同样计算T2DM-MCI组和T2DM-NC组，均为P > 0.05，说明该研究人群的CST3基因型分布均符合Hardy-Weinberg遗传平衡，故具有群体代表性。

2.3 两组等位基因频率分布

比较T2DM-MCI组与T2DM-NC组的A等位基因频率B等位基因频率，χ^2 = 7.005，P = 0.008，差异均有统计学意义（表1）。

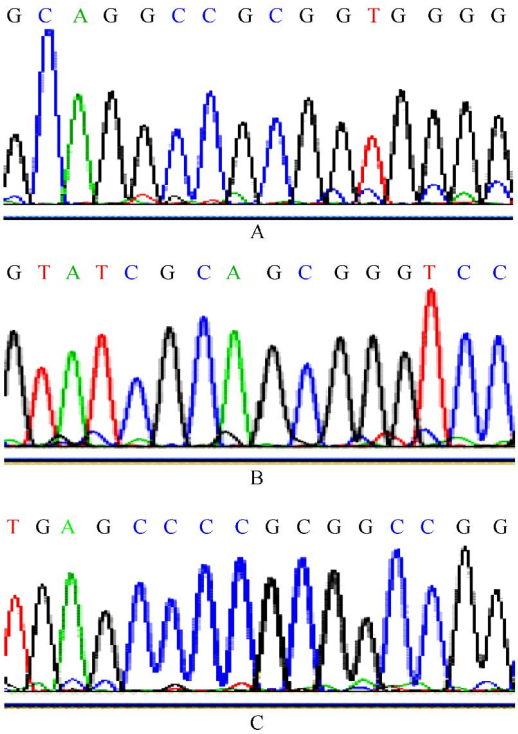


图1 CST3 AA基因多态性
Figure 1 Polymorphism of CST3 AA
A: −157G; B: −72A; C: +73G; CST3: cystatin C gene

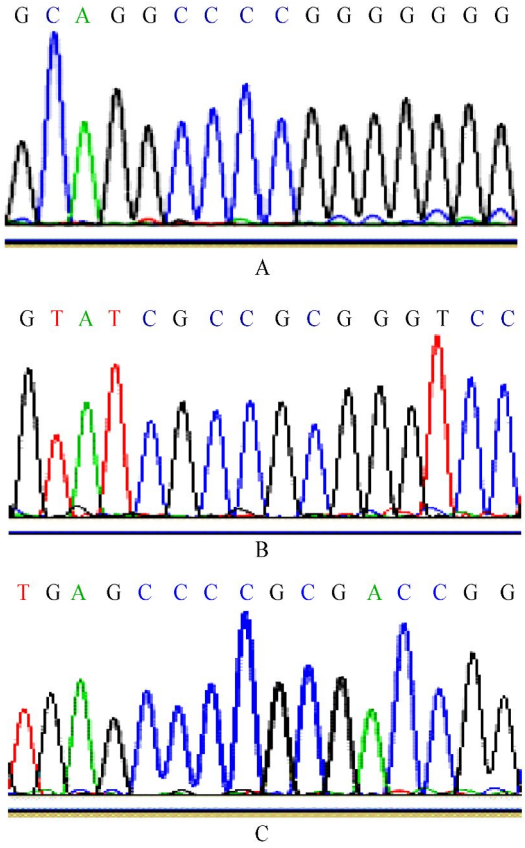


图2 CST3 BB基因多态性
Figure 2 Polymorphism of CST3 BB
A: −157C; B: −72C; C: +73A; CST3: cystatin C gene

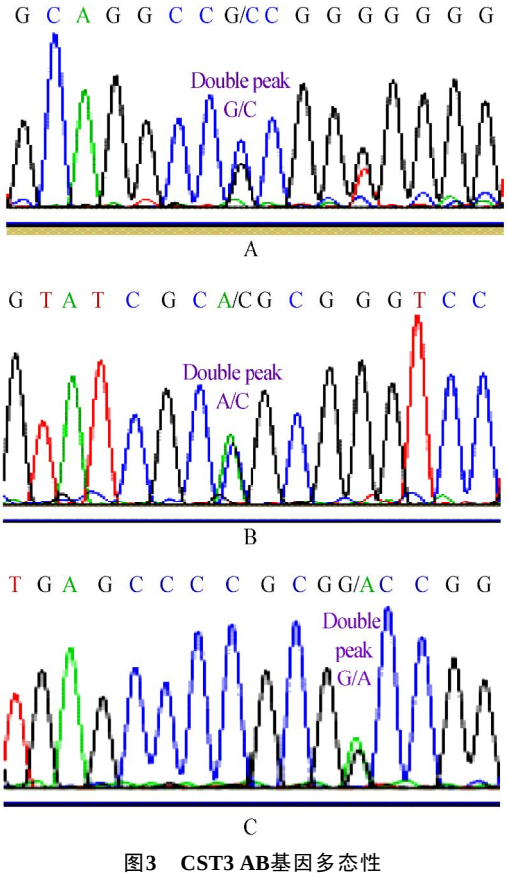


图3 CST3 AB基因多态性
Figure 3 Polymorphism of CST3 AB
A: −157G/C (S); B: −72A/C (M); C: +73G/A (R); CST3: cystatin C gene

表1 两组CST3等位基因频率分布
Table 1 CST3 allele frequencies in two groups [*n*(%)]

Group	*n*	Allele frequency	
		A	B
T2DM-MCI	79	127 (80.4)	31 (19.6)
T2DM-NC	77	140 (90.9)	14 (9.1)
χ^2		7.005	
P		0.008	

CST3: cystatin C gene; T2DM: type 2 diabetes mellitus; MCI: mild cognitive impairment; NC: normal cognition

2.4 3种基因型认知功能量表检查结果

比较CST3 AA基因型组、CST3 BB基因型组与CST3 AB基因型组的MMSE总分，差异无统计学意义（$F = 1.441$，$P = 0.240$），而MoCA总分的差异有统计学意义（$F = 6.802$，$P = 0.001$），以CST3 BB基因型组的MoCA得分最低，CST3 AA基因型MoCA得分最高（表2）。

表2 不同基因型认知功能量表检查结果比较
Table 2 Comparison of cognitive function scores in different genotypes ($\bar{x} \pm s$)

Genotype	*n*	MMSE	MoCA
CST3 AA	118	28.19 ± 1.18	26.04 ± 2.59
CST3 BB	7	27.43 ± 2.29	23.14 ± 2.19
CST3 AB	31	28.06 ± 0.85	24.65 ± 2.81
F		1.441	6.802
P		0.240	0.001

CST3: cystatin C gene; MMSE: Mini-Mental State Examination; MoCA: Montreal Cognitive Assessment

2.5 CST3基因型与MCI相关性的单因素logistic回归分析

以是否携带BB基因型赋值为协变量，是否T2DM-MCI赋值为因变量，并按血清Cys C水平分层，进行单因素logistic回归分析。结果显示，BB基因型发生T2DM-MCI的危险性增加，OR：6.247（0.734～53.158），但是BB基因型与T2DM-MCI的关联差异无统计学意义（$P > 0.05$）；同理，以是否携带B等位基因赋值为协变量的结果显示，携带B等位基因发生T2DM-MCI的危险性增加，OR：2.279（1.064～4.882），且携带B等位基因与T2DM-MCI的关联差异存在统计学意义（$P = 0.034$；表3）。

3 讨 论

T2DM和认知功能损害都是老年人易患疾病，其患病人数迅速增加已成为全球面临的严重问题。流行病学调查显示T2DM增加MCI的发生，MCI是介于正常衰老和痴呆的中间状态，通过早期筛查鉴别MCI人群，采取干预措施可预防或延缓痴呆，但是目前尚无很好的筛查措施[6]。

Cys C是一种半胱氨酸蛋白酶抑制剂，可以通过调节动脉粥样硬化的发生发展，与糖尿病并发症密切相关[7]，还可以通过影响β样淀粉蛋白[8]、神经元的再生与变性[9]、细胞凋亡[10]、氧化应激等机制[11]，与神经变性性疾病相关，前期研究已发现血清Cys C水平升高可能是老年T2DM发生MCI的危险因素[3]。Cys C编码基因是CST3，多数研究认为CST3 B是AD的风险等位基因，CST3 BB基因型与系统分泌的Cys C减少有关。CST3在5’上游有3个ksp Ⅰ限制性多态位点（CCGCGG），其中两个位于5’侧翼启动子区，另外一个位于外显子1的信号肽区，由于连锁的不平衡性，3个CST3的多态位点只产生了两个通常所见的单倍型：CST3 A（−157，−72，+73位点核苷酸分别为G，A，G）和CST3 B（C，C，A）。有研究发现+73位点的G/A突变，导致了信号肽倒数第2位的丙氨酸被苏氨酸替换。而这一替换通过改变Cys C向内质网和高尔基复合体的输运，或通过中断信号肽与成熟蛋白的断裂来修饰Cys C的分泌加工途径，从而导致了Cys C分泌减少或活性降低[12]。

本研究发现，3种基因型MMSE总分的比较差异无统计学意义，而MoCA总分的差异有统计学意义，以CST3 BB基因型组的MoCA得分最低，CST3 AA基因型MoCA得分最高，从侧面说明了MoCA比MMSE在认知功能筛查方面的优越性。CST3等位基因频率在T2DM-MCI组与T2DM-NC组之间的分布存在统计学差异，特别是本研究还发现携带B等位基因的个体出现MCI的危险性为不携带者的2倍以上，说明B等位基因可能是认知功能下降的风险基因，提示CST3 B等位基因是T2DM-MCI的危险因素之一。由于CST3 B等位基因常与低水平的Cys C表达相联系，而前期研究结果发现血清高Cys C水平是T2DM-MCI的危险因素之一[3]，提示血清和组织细

表3 T2DM-MCI危险性的单因素logistic回归分析
Table 3 Univariate logistic regression analysis of risk factors for MCI in T2DM patients

Risk factor	B	SE	Wald	*P*	OR	95%CI
BB genotype	1.832	1.092	2.812	0.094	6.247	0.734−53.158
B allele carrying	0.824	0.389	4.493	0.034	2.279	1.064−4.882

MCI: mild cognitive impairment; T2DM: type 2 diabetes mellitus

胞中的胱抑素水平可能不一致。本研究者认为Cys C浓度的增加反映了其蛋白酶抑制作用的增加[13]，而CST3 B所提示的细胞内Cys C水平下降，可能导致其抑制基质降解的作用下降，促进动脉粥样硬化的形成，而系统或者局部炎症作为动脉粥样硬化的机制[14]，可能是Cys C代谢发生紊乱，从而引起细胞内外Cys C水平不同的原因之一。其次由于Cys C与Aβ共同聚集于脑微动脉管壁形成淀粉样沉积物，血管平滑肌细胞随着沉积物积聚程度加深而出现进行性减少，从而导致微血管变性和脑出血等脑血管病变，以及中枢神经系统Cys C释放入血，从而引起组织中与血中Cys C浓度不平行也是可能原因之一。另外血清Cys C作为反映肾功能的敏感指标[15]，其浓度还受血脑屏障、血管内皮细胞功能等的影响，CST3多态性是否与此有关，还有待于进一步研究。总之检测CST3多态性或可有利于老年T2DM患者认知障碍的早期诊断。

【参考文献】

[1] Williamson JD, Launer LJ, Bryan RN, *et al*. Cognitive function and brain structure in persons with type 2 diabetes mellitus after intensive lowering of blood pressure and lipid levels: a randomized clinical trial[J]. JAMA Intern Med, 2014, 174(3): 324−333.

[2] Zhang Y, Zhang X, Zhang J, *et al*. Gray matter volume abnormalities in type 2 diabetes mellitus with and without mild cognitive impairment[J]. Neurosci Lett, 2014, 562: 1−6.

[3] Luo L, Hu YH, Tuo XP. Association of serum cystatin C and risk of mild cognitive impairment in elderly patients with type 2 diabetes mellitus[J]. Acad J Second Mil Med Univ, 2011, 10(32): 1122−1125. [罗 镧, 胡毓洪, 拓西平. 老年2型糖尿病患者血清胱抑素C水平与轻度认知损害的相关性[J]. 第二军医大学学报, 2011, 10(32): 1122−1125.]

[4] Gauthier S, Reisberg B, Zaudig M, *et al*. Mild cognitive impairment[J]. Lancet, 2006, 367(9518): 1262−1270.

[5] American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition(DSM−Ⅳ)[M]. Washington DC: American Psychiatric Association, 1994: 143−147.

[6] Alagiakrishnan K, Zhao N, Mereu L, *et al*. Montreal Cognitive Assessment is superior to Standardized Mini-Mental Status Exam in detecting mild cognitive impairment in the middle-aged and elderly patients with type 2 diabetes mellitus[J]. Biomed Res Int, 2013, 2013: 186106.

[7] Zang L, Fu P, Liu F, *et al*. The correlation of serum cystatin C level with the severity of carotid atherosclerosis in patients with type 2 diabetes mellitus[J]. J Sichuan Univ (Med Sci Edi), 2012, 43(6): 882−887. [臧 丽, 付 平, 刘 芳, 等. 胱抑素C在评价2型糖尿病患者颈动脉粥样硬化中的作用[J]. 四川大学学报(医学版), 2012, 43(6): 882−887.]

[8] Tizon B, Ribe EM, Mi W, *et al*. Cystatin C protects neuronal cells from amyloid-beta-induced toxicity[J].J Alzheimer's Dis, 2010, 19(3): 885−894.

[9] Ghidoni R, Paterlini A, Albertini V, *et al*. Cystatin C is released in association with exosomes: a new tool of neuronal communication which is unbalanced in Alzheimer's disease[J]. Neurobiol Aging, 2011, 32(8): 1435−1442.

[10] Liang X, Nagai A, Terashima M, *et al*. Cystatin C induces apoptosis and tyrosine hydroxylase gene expression through JNK-dependent pathway in neuronal cells[J]. Neurosci Lett, 2011, 496(2): 100−105.

[11] Tizon B, Sahoo S, Yu H, *et al*. Induction of autophagy by cystatin C: a mechanism that protects murine primary cortical neurons and neuronal cell lines[J]. PLoS One, 2010, 5(3): e9819.

[12] Hua Y, Zhao H, Lu X, *et al*. Meta-analysis of the cystatin C (CST3) gene G73A polymorphism and susceptibility to Alzheimer's disease[J]. Int J Neurosci, 2012, 122(8): 431−438.

[13] Strålberg F, Henning P, Gjertsson I, *et al*. Cysteine proteinase inhibitors regulate human and mouse osteoclastogenesis by interfering with RANK signaling[J]. FASEB J, 2013, 27(7): 2687−2701.

[14] Cozlea DL, Farcas DM, Nagy A, *et al*. The impact of C reactive protein on global cardiovascular risk on patients with coronary artery disease[J]. Curr Health Sci J, 2013, 39(4): 225−331.

[15] Ayub S, Zafar MN, Aziz T, *et al*. Evaluation of renal function by cystatin C in renal transplant recipients[J]. Exp Clin Transplant, 2014, 12(1): 37−40.

（编辑：李菁竹）