

妊娠期糖尿病患者外周血 NOX5 基因甲基化检测

吴越¹ 杨宗军² 徐瑛蕾³ 张璐³ 潘月帅¹ 魏丽丽¹

(1 青岛大学附属医院护理部,山东 青岛 266003; 2 青岛市妇女儿童医院检验科; 3 青岛大学附属医院产前诊断中心)

[摘要] **目的** 检测妊娠期糖尿病(gestational diabetes mellitus,GDM)患者外周血 NOX5 基因甲基化状态,并分析其与 GDM 的相关性。**方法** 以 2020—2021 年我院产科门诊确诊为 GDM 的孕妇 67 例为病例组,同期门诊口服糖耐量正常的健康孕妇 87 例为对照组,采用甲基化特异性 PCR 方法检测两组孕妇 NOX5 基因甲基化状态,并根据 NOX5 基因甲基化状态将病例组孕妇分为阳性亚组 44 例和阴性亚组 23 例,根据是否胎儿窘迫、是否巨大儿将 154 例新生儿分为窘迫组(6 例)和非窘迫组(148 例)、巨大儿组(11 例)和非巨大儿组(143 例),分析 NOX5 基因甲基化状态与 GDM 孕妇一般资料及妊娠结局的相关性。**结果** 病例组和对照组 NOX5 基因甲基化阳性构成比分别为 65.67%、40.23%,两组比较差异有显著性($\chi^2=9.807, P<0.05$),阳性亚组和阴性亚组比较孕妇年龄、孕前体质量指数(BMI)、收缩压、舒张压、空腹血糖差异无显著性($P>0.05$)。胎儿窘迫组与非窘迫组、巨大儿组与非巨大儿组 NOX5 基因甲基化阳性构成比比较差异无显著性($P>0.05$)。**结论** GDM 患者 NOX5 基因易发生甲基化,但 NOX5 基因甲基化状态与 GDM 孕妇年龄、孕前 BMI、血压、空腹血糖无明显相关,与胎儿窘迫、巨大儿也无明显相关。

[关键词] 糖尿病,妊娠;DNA 甲基化;NADPH 氧化酶 5;胎儿窘迫;巨大胎儿

[中图分类号] R714.7 **[文献标志码]** A

DETECTION OF NOX5 GENE METHYLATION IN PERIPHERAL BLOOD OF PATIENTS WITH GESTATIONAL DIABETES MELLITUS WU Yue, YANG Zongjun, XU Yinglei, ZHANG Lu, PAN Yueshuai, WEI Lili (Nursing Department, The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266003, China)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the methylation status of the NOX5 gene in peripheral blood of patients with gestational diabetes mellitus (GDM) and its association with GDM. **Methods** A total of 67 pregnant women who were diagnosed with GDM at the outpatient service of Department of Obstetrics in our hospital from 2020 to 2021 were enrolled as case group, and 87 healthy pregnant women with normal oral glucose tolerance test results during the same period of time were enrolled as control group. Methylation-specific PCR was used to determine the methylation status of the NOX5 gene, and according to the methylation status of the NOX5 gene, the pregnant women in the case group were further divided into positive subgroup with 44 women and negative subgroup with 23 women. According to the presence or absence of fetal distress or fetal macrosomia, 154 neonates were divided into distress group with 6 neonates and non-distress group with 148 neonates, as well as fetal macrosomia group with 11 neonates and non-fetal macrosomia group with 143 neonates. The methylation status of the NOX5 gene was analyzed in terms of its association with the general information and pregnancy outcome of the pregnant women with GDM. **Results** There was a significant difference in the constituent ratio of positive NOX5 gene methylation between the case group and the control group (65.67% vs 40.23%, $\chi^2=9.807, P<0.05$), and there were no significant differences between the positive subgroup and the negative subgroup in age, pre-pregnancy body mass index (BMI), systolic blood pressure, diastolic blood pressure, and fasting blood glucose ($P>0.05$). There was no significant difference in the constituent ratio of positive NOX5 gene methylation between the distress group and the non-distress group and between the fetal macrosomia group and the non-fetal macrosomia group ($P>0.05$). **Conclusion** NOX5 gene methylation is often observed in pregnant women with GDM, but the methylation status of the NOX5 gene is not associated with the age, pre-pregnancy BMI, blood pressure, and fasting blood glucose of pregnant women with GDM, and it is also not associated with fetal distress and fetal macrosomia.

[KEY WORDS] Diabetes, gestational; DNA methylation; NADPH oxidase 5; Fetal distress; Fetal macrosomia

妊娠期糖尿病(gestational diabetes mellitus, GDM)是指孕妇妊娠期首次发生和发现的不同程度的糖代谢异常^[1],不仅会增加巨大儿、先天畸形的发生率,还会增加孕妇患子痫等疾病的风险,对母婴及后代的健康影响极大^[2]。GDM 与 2 型糖尿病(dia-

betes mellitus type 2, T2DM)的病理特征均为胰岛 β 细胞凋亡、胰岛素抵抗,并且 GDM 孕妇后期发生 T2DM 的风险亦显著增加,因此 GDM 也被认为是 T2DM 的早期阶段,两者可能存在着相似的遗传基础^[3]。DNA 甲基化是表观遗传的重要方式,在各种疾病的发生发展中起着关键作用^[4]。近年来的研究表明 DNA 甲基化与 T2DM 等代谢疾病密切相关,其主要作用是抑制调控胰岛素分泌基因的表达,造

[收稿日期] 2022-10-19; **[修订日期]** 2022-11-18

[基金项目] 山东省自然科学基金(ZR2014HP017)

[通讯作者] 魏丽丽, Email:13573828157@163.com

成胰岛素分泌减少,最终形成 T2DM。既往研究显示,T2DM 患者外周血中存在基因的甲基化^[5],而 T2DM 与 GDM 存在相似的遗传基础,因此 GDM 患者外周血中也可能存在控制胰岛素分泌基因的甲基化。NADPH 氧化酶(NOX)5 是 NOX 家族的 7 个成员之一,目前研究已经了解到 NOX5 的同源物 NOX2、NOX4 可以导致胰岛 β 细胞凋亡及胰岛素抵抗^[6-7],但由于 NOX5 发现的时间较短,且不存在于大鼠和小鼠中,所以目前尚没有关于 NOX5 基因与糖尿病相关性的研究。本研究通过甲基化特异性 PCR 方法,分析 NOX5 基因甲基化状态与 GDM 的相关性。现将结果报告如下。

1 对象与方法

1.1 研究对象

以 2020—2021 年我院产科门诊就诊最终诊断为 GDM 的 67 例患者为病例组,患者平均年龄为 (33.76 ± 4.56) 岁,孕前体质量指数(BMI) (21.89 ± 2.28) kg/m^2 ,收缩压 (16.01 ± 2.11) kPa,舒张压 (10.06 ± 0.97) kPa,胎儿窘迫 6 例,巨大儿 11 例。另选取同期在同一产科门诊就诊口服糖耐量正常的健康孕妇 87 例为对照组,孕妇平均年龄 (33.86 ± 3.70) 岁,孕前 BMI (21.19 ± 2.11) kg/m^2 ,收缩压 (15.71 ± 1.43) kPa,舒张压 (10.02 ± 1.01) kPa,无胎儿窘迫和巨大儿情况。GDM 的诊断标准采用美国糖尿病协会 2019 年标准^[8];胎儿窘迫、巨大儿的诊断参照《妇产科学》第 7 版中的标准。两组孕妇年龄、孕前 BMI、收缩压、舒张压比较差异均无显著性 ($P > 0.05$),而胎儿窘迫、巨大儿情况比较差异有显著性 ($P < 0.05$)。两组均排除存在输血史、免疫治疗史及其他并发症的孕妇。

1.2 样品采集与处理

采集每一位孕妇的静脉血 5 mL 于抗凝管中, -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冻存。使用血液基因组 DNA 提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司)提取基因组 DNA。使用基因甲基化检测试剂盒(ZYMO 生物科技公司,美国)进行亚硫酸盐转化。使用甲基化特异性 PCR 试剂盒(北京天根生化科技有限公司)对制备好的 DNA 进行扩增,采用 Meth Premier 5.0 软件设计引物,引物名称及序列详见表 1。反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;然后 4 $^{\circ}\text{C}$ 变性 20 s, 50 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 20 s,总共进行 35 个循环;最后以 72 $^{\circ}\text{C}$ 中止 5 min。PCR 总反应体系为 20 μL ,内含 DNA 500 ng,上下游引物各 1 μL ,dNTPs 1.6 μL ,

Taq 酶 0.4 μL , Buffer 溶液 2 μL ,加蒸馏水补足至 20 μL 。取 PCR 产物 10 μL 置于 15 g/L 琼脂糖凝胶中电泳,紫外线检测仪检测。基因甲基化判断标准:①甲基化:仅存在甲基化条带,或甲基化、非甲基化条带同时存在的样品;②非甲基化:仅存在非甲基化条带的样品。

表 1 引物名称及其序列

引物名称	序列	长度 (bp)
甲基化引物	F:5'-AGGGATCGCGTTTAAATTAC-3' R:5'-TCCTAATACGCATACTCGCT-3'	20
非甲基化引物	F:5'-TATAGGGATTGTGTTTAAATTAT-3' R:5'-CCTTCCTAATACACATACTCACT-3'	23

1.3 NOX5 基因甲基化状态与 GDM 孕妇一般资料及妊娠结局的相关性

根据 NOX5 基因甲基化状态将病例组孕妇分为阳性亚组(44 例)和阴性亚组(23 例)。另外根据是否胎儿窘迫将 154 例新生儿分为窘迫组(6 例)和非窘迫组(148 例),根据是否巨大儿将 154 例新生儿分为巨大儿组(11 例)和非巨大儿组(143 例),分析 NOX5 基因甲基化状态与 GDM 孕妇一般资料及妊娠结局的相关性。

1.4 统计学处理

使用 SPSS 23.0 软件进行统计学处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验。计数资料以例(率)表示,组间比较采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结 果

2.1 两组孕妇 NOX5 基因甲基化状态比较

病例组与对照组孕妇 NOX5 基因甲基化阳性构成比分别为 65.67%、40.23%,差异具有显著意义 ($\chi^2 = 9.807, P < 0.05$)。

2.2 NOX5 基因甲基化状态与 GDM 孕妇一般资料的关系

阳性亚组与阴性亚组相比较,孕妇年龄、孕前 BMI、收缩压、舒张压、空腹血糖差异无显著性 ($P > 0.05$)。见表 2。

2.3 NOX5 基因甲基化状态与妊娠结局的关系

窘迫组、非窘迫组 NOX5 基因甲基化阳性构成比分别为 83.33%、50.00%,两组比较差异无显著性 ($P > 0.05$);巨大儿组、非巨大儿组 NOX5 基因甲基化阳性构成比分别为 72.73%、49.65%,两组比较差异无显著性 ($P > 0.05$)。

表 2 NOX5 基因甲基化状态与 GDM 孕妇一般资料的关系($\bar{x} \pm s$)

分组	n	年龄(岁)	孕前 BMI(kg/m ²)	收缩压(p/kPa)	舒张压(p/kPa)	空腹血糖(c/mmol·L ⁻¹)
阴性亚组	23	33.17±4.66	21.66±1.86	15.93±2.09	9.75±0.90	5.44±1.00
阳性亚组	44	34.07±4.53	22.01±2.49	16.05±2.14	10.23±0.97	5.36±0.93

3 讨 论

GDM 是孕期常见的并发症^[9],随着孕妇肥胖人群比例的增加,GDM 的发病率也逐年增高^[10]。流行病学调查发现,GDM 存在显著的种族差异,遗传因素在 GDM 孕妇的发病中发挥着非常重要的作用^[11-12]。GDM 与 T2DM 具有相似的代谢特征和遗传背景,被认为是 T2DM 的早期阶段,所以通常借鉴 T2DM 的遗传学研究方法来探讨 GDM 发生的病因及机制^[13]。DNA 甲基化是表观遗传的重要方式,在遗传调控中起着重要作用^[14],可以解释糖尿病等多种慢性疾病的发生机制。当调控胰岛素分泌的基因发生异常甲基化时,会抑制胰岛素信号通路的传导,造成胰岛素分泌减少,这可能是 T2DM 形成的一个重要因素^[15]。由于 T2DM 与 GDM 有着相似遗传背景,所以 DNA 甲基化也可能是 GDM 发生的重要原因。

NOX 家族是活性氧(ROS)的主要来源,是细胞内生成 ROS 的主要物质,在正常情况下 ROS 可以调节胰岛素分泌,维持正常的生理过程,但是当 ROS 在体内大量积聚时,会对糖酵解和三羧酸循环进行抑制,抑制胰岛 β 细胞的功能,使胰岛素分泌减少,最终参与糖尿病的发生^[16-19]。NOX5 基因是 NOX 家族的一员,位于 15 号染色体 q22.31 处,可以生成 ROS。目前还没有关于 NOX5 与 GDM 的相关性研究,但是 NOX5 基因可以促进糖尿病并发症的发生和发展,动物实验表明 NOX5 基因的过表达可以使 ROS 生成增加,加速肾小球硬化,促进糖尿病肾病的发展^[20]。同时,NOX5 基因甲基化对子痫前期的发生也有明显的促进作用^[21]。糖尿病肾病、子痫都是 GDM 孕妇产后常见的并发症,并且两者在 GDM 孕妇当中的发病风险均明显高于正常孕妇^[22-23],由此可以推断 NOX5 基因可能与 GDM 孕妇的发病有关。

本研究采用甲基化特异性 PCR 方法检测 GDM 孕妇外周血 NOX5 基因甲基化状态,结果显示,病例组孕妇 NOX5 基因甲基化阳性构成比显著高于对照组,同时 NOX5 基因甲基化状态与 GDM 孕妇年龄、孕前 BMI、收缩压、舒张压、空腹血糖无明显

相关,与胎儿窘迫、巨大儿也无明显相关。本研究结果说明 NOX5 基因甲基化可能参与了 GDM 的发生,但是与 GDM 孕妇的一般资料及妊娠结局无相关,原因可能是 GDM 是一种发病机制十分复杂的疾病^[24-25],NOX 家族促进胰岛 β 细胞凋亡及胰岛素抵抗只是其中一方面原因,NOX5 基因甲基化如何参与血糖的代谢有待下一步研究;此外本研究属于单中心研究,后期可纳入多中心样本,以便深入探究 NOX5 基因甲基化与 GDM 孕妇一般资料及妊娠结局的关系。

总之,本研究结果表明 GDM 孕妇的 NOX5 基因易发生甲基化,但是 NOX5 基因甲基化状态与 GDM 孕妇年龄、孕前 BMI、血压、空腹血糖无明显相关关系,与胎儿窘迫、巨大儿也无明显相关关系。NOX5 基因与 GDM 的相关性仍需后续实验进一步研究验证。

伦理批准和知情同意:本研究涉及的所有试验均已通过青岛大学附属医院医学伦理委员会的审核批准(文件号 QYFYWZLL27449)。所有试验过程均遵照《人体医学研究的伦理准则》的条例进行。受试对象或其亲属已经签署知情同意书。

作者声明:吴越、杨宗军、魏丽丽参与了研究设计;吴越、徐瑞蕾、张璐、潘月帅参与了论文的写作和修改。所有作者均阅读并同意发表该论文。所有作者均声明不存在利益冲突。

[参考文献]

- [1] AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. 14. management of diabetes in pregnancy: Standards of medical care in diabetes-2021[J]. Diabetes Care, 2021,44(Suppl 1):S200-S210.
- [2] BAYOUMI M A A, MASRI R M, MATANI N Y S, et al. Maternal and neonatal outcomes in mothers with diabetes mellitus in Qatari population [J]. BMC Pregnancy Childbirth, 2021,21(1):651.
- [3] LITHGOW G E, ROSSI J, GRIFFIN S J, et al. Barriers to postpartum diabetes screening: A qualitative synthesis of clinicians' views[J]. Br J Gen Pract, 2021,71(707):e473-e482.
- [4] MANO T, SATO K, IKEUCHI T, et al. Peripheral blood BRCA1 methylation positively correlates with major Alzheimer's disease risk factors[J]. J Prev Alzheimers Dis, 2021,8(4):477-482.
- [5] LIN C H, LEE Y S, HUANG Y Y, et al. Methylation status of vault RNA 2-1 promoter is a predictor of glycemic response to glucagon-like peptide-1 analog therapy in type 2 diabetes

- mellitus [J]. *BMJ Open Diabetes Res Care*, 2021, 9(1): e001416.
- [6] SUCCURRO E, ANDREOZZI F, CARNEVALE R, et al. Nox2 up-regulation and hypoalbuminemia in patients with type 2 diabetes mellitus[J]. *Free Radic Biol Med*, 2021, 168:1-5.
- [7] BOUABOUT G, AYME-DIETRICH E, JACOB H, et al. Nox4 genetic inhibition in experimental hypertension and metabolic syndrome[J]. *Arch Cardiovasc Dis*, 2018, 111(1):41-52.
- [8] AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. 2. Classification and diagnosis of diabetes: Standards of medical care in diabetes-2019[J]. *Diabetes Care*, 2019, 42(Suppl 1):S13-S28.
- [9] DOMANSKI G, LANGE A E, ITTERMANN T, et al. Evaluation of neonatal and maternal morbidity in mothers with gestational diabetes: A population-based study[J]. *BMC Pregnancy Childbirth*, 2018, 18(1):367.
- [10] PIRAS C, NERI I, PINTUS R, et al. First trimester metabolomics 1H-NMR study of the urinary profile predicts gestational diabetes mellitus development in obese women[J]. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2022, 35(25):8275-8283.
- [11] WANG Q Y, YOU L H, XIANG L L, et al. Current progress in metabolomics of gestational diabetes mellitus[J]. *World J Diabetes*, 2021, 12(8):1164-1186.
- [12] WEI W W, HE Y J, WANG X, et al. Gestational diabetes mellitus: The genetic susceptibility behind the disease [J]. *Horm Metab*, 2021, 53(8):489-498.
- [13] 韦春莲, 陈颖, 徐瑛蕾, 等. TGF- β 1 基因多态性与妊娠期糖尿病遗传易感性关系[J]. *青岛大学学报(医学版)*, 2018, 54(2): 176-179.
- [14] 熊静, 王梓炫, 陈飞宇, 等. Abl 相互作用蛋白 3 的生物学功能及与疾病关系的研究进展[J]. *精准医学杂志*, 2019, 34(4): 357-361.
- [15] 季慧慧, 郑中华, 邬博逸, 等. 女性 2 型糖尿病患者外周血全基因组 DNA 甲基化的研究[J]. *中国糖尿病杂志*, 2020, 28(8): 568-575.
- [16] AGIDIGBI T S, KIM C. Reactive oxygen species in osteoclast differentiation and possible pharmaceutical targets of ROS-mediated osteoclast diseases[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(14): 3576.
- [17] 郑莉芳, 陈佩杰, 肖卫华. 活性氧对骨骼肌胰岛素抵抗的调控及其机制[J]. *中国糖尿病杂志*, 2020, 28(2):153-157.
- [18] BROWN O I, BRIDGE K I, KEARNEY M T. Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidases in glucose homeostasis and diabetes-related endothelial cell dysfunction [J]. *Cells*, 2021, 10(9):2315.
- [19] JOO E H, KIM Y R, KIM N, et al. Effect of endogenous and exogenous oxidative stress triggers on adverse pregnancy outcomes; Preeclampsia, fetal growth restriction, gestational diabetes mellitus and preterm birth[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(18):10122.
- [20] JHA J C, DAI A Z, HOLTERMAN C E, et al. Endothelial or vascular smooth muscle cell-specific expression of human NOX5 exacerbates renal inflammation, fibrosis and albuminuria in the Akita mouse[J]. *Diabetologia*, 2019, 62(9):1712-1726.
- [21] YEUNG K R, CHIU C L, PIDSLEY R, et al. DNA methylation profiles in preeclampsia and healthy control placentas[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2016, 310(10): H1295-H1303.
- [22] 郭占荣, 刘晓莉. 血清 Hcy、Cys-C、SOD 及尿 NAG 对妊娠期糖尿病患者早期肾损伤的诊断价值[J]. *包头医学院学报*, 2021, 37(3):46-49.
- [23] ZHENG W, HUANG W Y, LIU C, et al. Weight gain after diagnosis of gestational diabetes mellitus and its association with adverse pregnancy outcomes: A cohort study[J]. *BMC Pregnancy Childbirth*, 2021, 21(1):216.
- [24] GUO F, LONG W, ZHOU W B, et al. FTO, GCKR, CDKAL1 and CDKN2A/B gene polymorphisms and the risk of gestational diabetes mellitus: A meta-analysis[J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2018, 298(4):705-715.
- [25] XU Y H, SHI L, BAO Y P, et al. Association between sleep duration during pregnancy and gestational diabetes mellitus: A meta-analysis[J]. *Sleep Med*, 2018, 52:67-74.
- (本文编辑 耿波 厉建强)
-
- (上接第 76 页)
- [22] LYLE C L, BELGHASEM M, CHITALIA V C. C-cbl: An important regulator and a target in angiogenesis and tumorigenesis[J]. *Cells*, 2019, 8(5):498.
- [23] SINGH D, ATTRI B K, GILL R K, et al. Review on EGFR inhibitors: Critical updates[J]. *Mini Rev Med Chem*, 2016, 16(14):1134-1166.
- [24] SIGISMUND S, AVANZATO D, LANZETTI L. Emerging functions of the EGFR in cancer[J]. *Mol Oncol*, 2018, 12(1): 3-20.
- [25] URSINI-SIEGEL J, MULLER WJ. The ShcA adaptor protein is a critical regulator of breast cancer progression[J]. *Cell Cycle*, 2008, 7(13):1936-43.
- [26] BHAT S S, ANAND D, KHANDAY F A. p66Shc as a switch in bringing about contrasting responses in cell growth: Implications on cell proliferation and apoptosis[J]. *Mol Cancer*, 2015, 14(1):1-12.
- (本文编辑 耿波 厉建强)