

基础研究

DOI:10.3969/j.issn.0253-3626.2012.05.001

老年人群 Klotho 基因多态性与其代谢综合征相关性研究

胡兴文¹, 马厚勋², 田小春², 刘晓林², 吴平², 周平²

(1. 四川省广安市武胜县人民医院内科, 广安 638450; 2. 重庆医科大学附属第一医院老年病科, 重庆 400016)

【摘要】目的: 研究老年汉族人群 Klotho (KL) G-395A、F352V 和 C370S 基因多态性与老年人群代谢综合征 (Metabolic syndrome, MS) 的相关性。方法: 同期选择老年 (年龄 ≥ 60 岁) MS 病人 329 例, 正常健康老年人 321 例作为研究对象。采用等位基因特异性引物 PCR 技术 (SASP-PCR) 检测 Klotho (KL, 克老素) 基因多态性, 并分析其等位基因频率分布与 MS 的相关性。结果: 老年人群 MS 病组 KL 基因 G-395A SNP AA 等位基因频率较正常对照组增高, 但无显著性差异 ($P > 0.05$), 而按性别分层研究, MS 组无论男、女性患者其 AA 等位基因型频率虽较正常对照组明显增高也无显著性差异 ($P > 0.05$); MS 组 KL 基因 F352V SNP VV 等位基因型频率较正常对照组低 ($P = 0.053$), 但性别分层研究, 其差异未达到统计学意义; MS 组 KL 基因 C370S SNP CS 基因型频率较正常对照组低 ($P < 0.05$), 若按性别分层研究, MS 组男性患者 KL 基因 C370S SNP CS 杂合子及 SS 纯合子基因型频率较正常对照组低 ($P < 0.05$)。结论: 本文研究发现在老年人群 KL 基因 F352V SNP VV 突变基因型可能与 MS 有相关性, 同时 KL 基因 C370S SNP 突变基因型男性携带者不易患 MS。

【关键词】Klotho; 代谢综合征; 老年; 基因型; 单核苷酸多态性**【中国图书分类法分类号】**R394.2**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2011-10-28

Correlation between single nucleotide polymorphisms of Klotho gene and metabolic syndrome in the aged

HU Xingwen¹, MA Houxun², TIAN Xiaochun², LIU Xiaolin², WU Ping², ZHOU Ping²

(1. Department of Internal Medicine, the People's Hospital of Wusheng County in Sichuan Province;

2. Department of Geriatrics, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the correlation between the distribution of three single nucleotide polymorphisms (SNPs) of Klotho (KL) G-395A, F352V and C370S in the Klotho (KL) gene and metabolic syndrome (MS) in the elderly Han population. **Methods:** Totally 329 patients (aged ≥ 60) with MS and 321 healthy people were enrolled. The single allele specific prime PCR (SASP-PCR) technique was used to detect three sites of SNPs and the distribution frequencies of allelic genotypes of the KL gene in order to analyze their relationship with MS in the aged. **Results:** The frequency of allele AA genotype of KL G-395A in MS group was higher than that in the control group but without any significant difference ($P > 0.05$). According to sex stratification analysis, no significant difference in the frequency of allele AA was found either in the female subgroup or the male subgroup between the MS group and the control subgroup ($P > 0.05$). The frequency of allele VV genotype of KL F352V in MS group was higher than that in the control group ($P = 0.053$), but no significant difference of the frequency of allele VV of KL F352V was found either in the female or male subgroup between MS group and the control group according to sex stratification analysis. The frequency of allele CS genotype of KL C370S SNP in MS group was lower than that in the control group ($P < 0.05$). According to sex stratification analysis, the frequency of allele CS and SS in the MS male subgroup was obviously lower than that in the control subgroup ($P < 0.05$). **Conclusion:** Correlation between VV mutant genotype of KL F352V SNP and metabolic syndrome in the elderly people may be existed and the males who carried mutant genotypes of KL C370S SNP have a low risk in suffering from MS.

【Key words】Klotho; metabolic syndrome; the aged; genotype; single nucleotide polymorphism

作者介绍: 胡兴文 (1964-), 男, 副主任医师,

研究方向: 心血管疾病。

通信作者: 马厚勋, 男, 教授, Email: mahouxun1966@yahoo.com.cn。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (编号: 30672212)。

代谢综合征 (Metabolic syndrome, MS) 是以中心性肥胖、糖尿病或糖调节受损、高血压、血脂异常以及胰岛素抵抗 (Insulin resistance, IR) 为共同病理生理基础, 以多种代谢性疾病合并出现为临床特征的

一组临床症候群。已有研究表明 MS 是缺血性心脏病的主要危险因素之一。克老素 (Klotho, KL) 基因是 Kuro 等^[1]发现的与衰老相关的新基因,动物实验研究表明该基因表达缺陷的小鼠可表现出包括动脉硬化、骨质疏松、肺气肿、皮肤萎缩等多种类似于人类衰老的相关临床表型。分子遗传学研究早已证实人类疾病发生的个体差异性与其遗传差异有关,其中基因多态性是最为常见的因素。近年来人们针对 KL 基因多态性的研究时发现 KL 基因 G-395A、F352V、C370S 多态性与其冠心病、高血压、脑卒中等有一定的相关性^[2~6],提示该基因多态性与心血管疾病有关;而 MS 亦是老年病人血管疾病独立危险因素。为此,故本文拟通过对老年汉族人群 KL 基因 G-395A、F352V、C370S 3 个位点的基因多态性与 MS 相关关系进行研究,揭示该基因多态性及其与老年 MS 的相关性,进而为心血管疾病的早期干预提供新的线索。

1 对象与方法

1.1 研究对象

均来源于 2007 年 11 月-2009 年 10 月期间四川省武胜县人民医院内科门诊及重庆医科大学附属第一医院老年科门诊、住院病人。随机选择符合 MS 标准的老年患者 329 例 (年龄 ≥ 60 岁)作为研究对象,男性 198 例,女性 131 例,平均年龄为 (68.16 ± 7.31) 岁。所有 MS 符合 2004 年中华医学会糖尿病学会 (Chinese diabetes society, CDS) 提出中国人的 MS 诊断标准:①空腹血糖 ≥ 6.1 mmol/L,或餐后血糖 ≥ 7.8 mmol/L,或已确诊糖尿病并治疗者;②高密度脂蛋白胆固醇 (High density lipoprotein cholesterol, HDL-C) < 0.9 mmol/L (男), < 1.0 mmol/L (女);甘油三酯 (Triglycerides, TG) ≥ 1.7 mmol/L;③体重指数 (Body mass index, BMI) ≥ 25 kg/m²;血压 $\geq 140/90$ mmHg 或已治疗者;上述 3 条或 3 条以上符合者即诊断 MS。同时随机选择体检后确诊的老年健康人群 321 例作为老年正常对照组 (年龄 ≥ 60 岁),男性 196 例,女性 125 例,平均年龄 (67.76 ± 7.83) 岁;正常对照组入选标准:血压 $< 140/90$ mmHg,无心、脑、肾、肝胆、糖尿病及肿瘤等病史,且心电图、尿常规、肝、肾功能及血糖、血脂正常者。上述两组人群选择基于年龄 ≥ 60 岁,采取简单随机抽样方法获得上述人群资料;并详细采集记录包括年龄、性别、血压、身高、体重、腹围在内的相关资料。两组研究对象均为老年汉族人群,均告知本研究目的,并签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 标本采集方法 所有研究对象均采集早晨空腹抗凝血液标本 6 ml,其中取 2 ml 静脉全血,离心后分离外周白细胞后置于 -20 °C 冰箱备用,用于 KL 基因多态性检测。另留取 4 ml 上述血液标本,用于总胆固醇 (Total cholesterol, TC)、

TG、低密度脂蛋白 (Low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、HDL-C、空腹血糖检查之用。

另外,餐后 2 h 血糖标本则通过以下方式获得,即禁食 8 ~ 12 h 空腹早晨留取血液标本,再口服 75 g 葡萄糖行简易糖耐量试验,待餐后 2 h 留取血液标本用于血糖检测。上述生化指标检查均由专业人员按照试剂盒要求说明完成,以确保检验结果质量可靠准确。

1.2.2 DNA 提取及 KL G-395A、F352V 与 C370S 基因多态性检测方法 本文研究所需血液基因组 DNA 提取,按照上海华舜生物工程有限公司抽提试剂盒的操作方法规程进行。KL 基因多态性检测方法则按照文献[3,6~8]介绍方法进行,引物设计亦参照该文献提供的方式设计,由中国大连宝生物技术有限公司 (TaKaRa) 合成。

KL 基因的序列及相应位点的 SNP 信息均参照 NCBI,利用 Primer5.0 软件参照文献[3,6~8]设计等位基因特异性引物,设计 1 条等位基因特异性上游引物,以此作为参照,同时设计 1 条 3' 末端碱基与检测 SNP 位点的突变型或野生型等位基因碱基互补的特异性下游引物。KL G-395A 上游引物为:5'-AATCGGCTCCAGCAATGTCCAG-3',下游引物:G 等位基因者 5'-AGAAAAGTCGCCGACCAACTTT \square -3',A 等位基因者 5'-AGAAAAGTCGCCG CCAACTTT \square -3'。KL F352V 上游引物:F 等位基因 5'-CTTTCATCTATTCTGCCTGA T \square -3',V 等位基因者 5'-CTTTCATCTATTCTGCCTGAT \square -3';下游引物:5'-CCTGAGA CAAACCA GCCAT T-3'。KL C370S 上游引物为:5'-TACAATTACTTCTTTCCGTCCTCC-3';下游引物:C 等位基因者为 5'-ACTCAAGGAGGGTCCAA AG \square -3',S 为等位基因者为 5'-ACTCAAGGAGGGTCCAAAG \square -3'。

上述 PCR 实验结束后,取其 PCR 产物 5 μ l,2 % 的琼脂糖凝胶-溴化乙锭染色法电泳,凝胶成像系统观测记录结果。其中 KL 基因 G-395A 多态性的等位基因型为 GG、GA、AA 3 种形式,其 PCR 扩增产物片段长度为 147 bp;KL 基因 F-352V 多态性的等位基因型为 FF、FV、VV 3 种;其 PCR 扩增产物片段长度为 230 bp;KL 基因 C370S 多态性的等位基因型为 CC、CS、SS 3 种,其 PCR 扩增产物片段长度为 285 bp。所有 DNA 提取及基因多态性检测研究实验工作均在重庆医科大学眼科实验室及重庆医科大学基础医学院分子生物学实验中心完成。

1.3 统计分析

采用 SPSS16.0 软件分析,分类资料采用各组中所占的百分数表示,采用 χ^2 检验;计量资料采用 t 检验,各项指标以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 老年 MS 组与正常对照组临床资料情况

2 组基本资料显示 MS 组除性别、TC、LDL-C 外,其 TG、空腹血糖及餐后 2 h 血糖、收缩压、舒张压水平及其 BMI 较对照组高 ($P < 0.01$),而 HDL-C 水平较对照组低 ($P < 0.01$)。其余详见表 1。

表 1 老年 MS 组与正常对照组临床资料情况
Tab.1 Clinical data of metabolism syndrome group
and healthy control group

临床资料	正常对照组	MS 组	P 值
年龄 (岁)	67. 76 ± 7. 83	68. 16 ± 7. 31	>0. 05
M%	61. 06	60. 18	>0. 05
冠心病%	0	41. 34	<0. 01
糖尿病%	0	32. 83	<0. 01
TC (mmol/L)	5. 06 ± 0. 89	5. 15 ± 1. 18	>0. 05
TG (mmol/L)	1. 36 ± 1. 21	2. 28 ± 1. 59	<0. 01
HDL-C (mmol/L)	1. 57 ± 0. 35	1. 17 ± 0. 33	<0. 01
LDL-C (mmol/L)	2. 91 ± 0. 75	2. 99 ± 0. 88	>0. 05
餐前血糖 (mmol/L)	4. 93 ± 0. 46	6. 48 ± 2. 42	<0. 01
餐后 2 h 血糖 (mmol/L)	6. 05 ± 1. 70	10. 42 ± 3. 96	<0. 01
SHP (mmHg)	118. 47 ± 11. 58	143. 28 ± 18. 60	<0. 01
DHP (mmHg)	73. 62 ± 8. 03	79. 74 ± 11. 53	<0. 01
脉压 (mmHg)	40. 38 ± 16. 46	62. 74 ± 17. 52	<0. 01
体重指数 (kg/m ²)	22. 53 ± 3. 06	25. 86 ± 3. 03	<0. 01
总数	321	329	

2.2 老年 MS 组与正常对照组 KL 基因 G-395A、F352V 与 C370S SNP 各等位基因频率分布情况

老年 MS KL 基因 G-395A SNP AA 等位基因频率较正常对照组增高,但差异无统计学意义 ($P>0.05$);若按性别分层研究,老年 MS 女性亚组患者其 AA 等位基因型频率较对照组明显增高 ($P=0.114$),差异也无统计学意义;其余详见表 2。

老年 MS 组 KL 基因 F352V SNP VV 等位基因型频率较正常对照组低 ($P=0.053$),而按性别分层研究发现无论男性还是女性亚组上述各等位基因在两组人群中分布频率差异均没有统计学意义 ($P>0.05$);其余详见表 2。

老年 MS 组 KL 基因 C370S SNP CC 等位基因型频率较正常对照组高 ($P<0.05$),而 CS 等位基因型频率较正常对照组低 ($P<0.05$);按性别分层研究发现老年男性亚组 MS 患者其 KL 基因 C370S SNP CC 等位基因型频率较正常对照组高 ($P<0.05$),而在男性亚组 MS 患者其 CS、SS 等位基因

分布频率亦较男性亚组正常对照人群低 ($P<0.05$);其余详见表 2。

3 讨 论

研究证实 MS 属于一组由遗传因素与环境因素共同决定的包括葡萄糖与胰岛素代谢异常、肥胖 (特别是腹型肥胖)、高脂血症与高血压等在内的临床症候群,已成为心血管事件发生的独立危险因素。KL 基因是一种由 Kuro 等^[1]研究发现的与衰老密切相关的基因,研究已证实 KL 基因表达缺陷的小鼠会出现与人类衰老相关疾病表型,如动脉硬化、骨质疏松、糖及能量代谢异常等,即提示 KL 基因表达调节有可能在人类 MS 的发生、发展中起作用。

近年研究表明 KL 基因多态性与冠心病、脑卒中及高血压病有关,如 Akiko 等^[4]在研究日本人群中 KL G-395A 多态性时发现 CAD 患者中 G-395A 的杂合子较对照组更为常见,由此推测-395A 突变型可能是 CAD 发病的遗传因素; Joe 等^[9]在韩国人群中也发现 KL G-395A 多态性 A 突变型与冠心病有关。Kuro 等^[10]的报道中阐述 KL-VS 这种突变体的纯合子可能是 CAD 和中风的独立危险因素。Vijaya 等^[11]也发现 KL-VS 突变体的纯合子与其早发缺血性脑卒中有关系。Rhee 等^[12]研究发现 KL 基因 SNP (G-395A)A 等位基因携带者其收缩压明显高于非 A 等位基因携带者。刘晓林等^[6,13]、王虎林等^[14]研究也发现 KL G-395A 多态性与原发性高血压有密切的相关性,并发现 AA 等位基因型可能是老年男性高血压的易感基因。但就目前有关 KL 基因多态性与 MS 的相关性研究报道甚少,为此,本文通过研究 KL 基因 SNP 与 MS 的关系,以揭示 KL 基因多态性在 MS 发生中的作用机制。

表 2 老年 MS 组与正常对照组 KL 基因多态性各等位基因频率比较
Tab.2 Frequencies of allelic genotypes of KL gene in metabolism syndrome group and healthy control group

基因型	MS 组						正常对照组						χ^2 值		
	例数 (n)	频率 (%)	男 (n)	频率 (%)	女 (n)	频率 (%)	例数 (n)	频率 (%)	男 (n)	频率 (%)	女 (n)	频率 (%)	总体	男	女
KL G-395G	150	45.59	91	45.96	59	45.04	160	49.84	92	46.94	68	54.4	1.177	0.038	3.388
KL G-395A	143	43.46	89	44.95	54	41.22	136	42.37	89	45.41	47	37.6	0.080	0.008	0.110
KL A-395A	36	10.95	18	9.09	18	13.74	25	7.79	15	7.65	10	8.0	1.900	0.265	2.164
KL F352F	128	38.91	83	41.92	45	34.35	133	41.43	83	42.35	50	40.0	0.432	0.007	0.209
KL F352V	191	58.05	111	56.06	80	61.07	168	52.34	105	53.57	63	50.4	2.149	0.246	2.953
KL V352V	10	3.04	4	2.02	6	4.58	20	6.23	8	4.08	12	9.6	3.758	1.417	2.466
KL C370C	145	44.07	93	46.97	52	39.69	104	32.40	60	30.61	44	35.2	9.370	11.095	0.551
KL C370S	174	52.89	100	50.51	74	56.49	198	61.68	121	61.73	77	61.6	5.134	5.043	0.691
KL S370S	10	3.04	5	2.52	5	3.82	19	5.92	15	7.66	4	3.2	3.160	5.375	0.072

通过对汉族老年 MS 组及正常健康人群组 KL G-395A SNP GG、GA、AA 等位基因型分布研究,发现 MS 组其 KL 基因 G-395A SNP AA 等位基因分布频率高于对照组,但未达到显著性差异;进一步按性别分层研究虽在老年女性 MS 组患者其 KL 基因 G-395A SNP AA 等位基因分布频率较对照组增高,接近显著性差异,即提示老年女性 AA 等位基因型携带者是否易患 MS 组,尚需进一步扩大样本人群加以验证。

通过研究发现汉族老年 MS 组及正常健康人群组老年 MS 组 KL 基因 F352V SNP VV 等位基因型频率较正常对照组低,接近显著性差异,而按性别分层研究发现无论男性还是女性亚组上述各等位基因在两组人群中分布频率差异却无显著性差异;同时研究还发现老年 MS 组 KL 基因 C370S SNP CC 等位基因型频率较正常对照组高,而 CS 等位基因型频率较正常对照组低;按性别分层研究发现老年男性亚组 MS 患者其 KL 基因 C370S SNP CC 等位基因型频率较正常对照组高,而在男性亚组 MS 患者其 CS、SS 等位基因分布频率亦较男性亚组正常对照人群低 ($P < 0.05$),上述结果提示 KL 基因 C370S SNP 突变基因型男性携带者不易患 MS。这与新近国外学者 Vijaya 等^[15]研究报道的在亚洲印度人群中“KL-VS 突变基因型可能是 MS 与胰岛素抵抗的预测风险因子”的结论不一致,究其原因可能与人群种族、样本大小差异有关。

本文研究发现 KL F352V SNP VV 等位基因型可能与老年 MS 有相关性,同时还发现 KL 基因 C370S SNP 突变基因型还与男性携带者不易患 MS 有关。但鉴于样本量并不十分大,且与国外研究报道不一致,尚需深入研究加以证实。

参 考 文 献

- [1] Kuro M, Matsumura Y, Aizawa H, et al. Mutation of the mouse KL gene leads to a syndrome resembling aging[J]. *Nature*, 1997, 3(90): 45-51.
- [2] Arking D E, Atzmon G, Arking A, et al. Association between a functional variant of the Klotho gene and high-density lipoprotein cholesterol, blood pressure, stroke and longevity[J]. *Circ Res*, 2005, 96(4): 412-418.
- [3] 华明娟, 马厚勋, 牛永红, 等. KLOTHO 的 3 个 SNP 位点分布与几种疾病相关性的研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2008, 18(9): 1174-1178.
- [4] Hua M J, Ma H X, Niu Y H, et al. Association of three single nucleotide polymorphism site distribution of Klotho gene with diseases[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2008, 18(9): 1174-1178.
- [5] Imamura A, Okumura K, Ogawa Y, et al. Klotho gene polymorphism may be a genetic risk factor for atherosclerotic coronary artery disease but not for vasospastic angina in Japanese[J]. *Clin Chim Acta*, 2006, 371(1-2): 66-70.
- [6] Rhee E J, Oh K W, Lee W Y, et al. The differential effects of age on the association of Klotho gene polymorphisms with coronary artery disease[J]. *Metabolism*, 2006, 55(10): 1344-1351.
- [7] 刘晓林, 马厚勋, 田小春, 等. Klotho 基因 3 个 SNP 位点与老年高血压及脂代谢的相关性[J]. *中国老年学杂志*, 2010, 30(23): 3429-3432.
- [8] Liu X L, Ma H X, Tian X C, et al. Association of single nucleotide polymorphism of three sites of Klotho gene with aging hypertension and lipid metabolism[J]. *Chinese Journal of Gerontology*, 2010, 30(23): 3429-3432.
- [9] 马厚勋, 田小春, 翟福利, 等. 汉族人群 Klotho 基因多态性及其与心动周期信号谱特征的相关性研究[J]. *重庆医科大学学报*, 2010, 35(10): 1457-1462.
- [10] Ma H X, Tian X C, Zhai F L, et al. Association of klotho gene polymorphism with heart period signal spectrum features in the Chinese Han nationality population[J]. *Journal of Chongqing Medical University*, 2010, 35(10): 1457-1462.
- [11] 田小春, 马厚勋, 刘晓林, 等. 重庆地区汉族老年人群 klotho G-395A、F352V 与 C370S 基因多态性及其组合分布[J]. *中国老年学杂志*, 2011, 31(1): 1-4.
- [12] Tian X C, Ma H X, Liu X L, et al. Genotype combination distribution and frequency distribution of single nucleotide polymorphism of G-395A, F352V and C370S of klotho gene in elderly people of the Chinese Han nationality population[J]. *Chinese Journal of Gerontology*, 2011, 31(1): 1-4.
- [13] Jo S H, Kim S G, Choi Y J, et al. Klotho gene polymorphism is associated with coronary artery stenosis but not with coronary calcification in a Korean population[J]. *Int Heart J*, 2009, 50(1): 23-32.
- [14] Kuro-o M. Klotho and aging[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1790(10): 1049-1058.
- [15] Vijaya M, Dindagur N, Rita C. Association of the functional KL-VS variant of Klotho gene with early-onset ischemic stroke[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2010, 403(3-4): 412-416.
- [16] Rhee E J, Oh K W, Yun E J, et al. Relationship between polymorphisms G-395A in promoter and C1818T in exon 4 of the Klotho gene with glucose metabolism and cardiovascular risk factors in Korean women[J]. *J Endocrinol Invest*, 2006, 29(7): 613-618.
- [17] 刘晓林, 马厚勋, 田小春, 等. KL 基因单核苷酸多态性及其组合与老年高血压的相关性研究[J]. *重庆医科大学学报*, 2011, 36(4): 389-393.
- [18] Liu X L, Ma H X, Tian X C, et al. Association of single nucleotide polymorphism and combined genotypes of Klotho gene with aging hypertension[J]. *Journal of Chongqing Medical University*, 2011, 36(4): 389-393.
- [19] Wang H L, Xu Q, Wang Z, et al. A potential regulatory single nucleotide polymorphism in the promoter of the Klotho gene may be associated with essential hypertension in the Chinese Han population[J]. *Clin Chim Acta*, 2010, 411(5-6): 386-390.
- [20] Vijaya M, Rita C. Association of exonic variants of Klotho with metabolic syndrome in Asian Indians[J]. *Clin Chim Acta*, 2011, 412(11-12): 1116-1121.

(责任编辑:关蕴良)