

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.01.007

老年人群 klotho G-395A、F352V 与 C370S 基因多态性及组合与其血清 klotho 蛋白水平的相关性研究

周 平,田小春,马厚勋,刘晓林,翟福利,吴 平,李法琦

(重庆医科大学附属第一医院老年病科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨重庆市汉族老年人 Klotho G-395A、F352V 与 C370S 3 个位点的单核苷酸多态性(Single nucleotide polymorphism, SNP)及其组合与血清 klotho 蛋白水平的相关性。方法:随机选择汉族老年人 390 例,采用等位基因特异性引物 PCR 技术检测 Klotho G-395A、F352V 与 C370S SNP,酶联免疫吸附试验(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测其血清 klotho 蛋白水平。结果:Klotho G-395A、F352V 与 C370S SNP 各等位基因型携带者其血清 klotho 蛋白水平均无显著性差异($P>0.05$)。基因组合分析研究发现 Klotho G-395A、F352V 与 C370S SNP 各组合等位基因型携带者其血清 klotho 蛋白水平差异性较大,其中 Klotho G-395G+F352F+C370S 携带者较 Klotho G-395G+F352F+C370C 携带者其血清 klotho 蛋白水平明显增高($P=0.056$)。结论:Klotho G-395A、F352V 与 C370S SNP 各等位基因型携带者其血清 klotho 蛋白水平无显著性差异,而组合等位基因型研究发现 Klotho G-395G+F352F+C370S 携带者较 Klotho G-395G+F352F+C370C 组合等位基因型携带者血清 klotho 蛋白水平增高有显著性趋势。

【关键词】Klotho 基因;单核苷酸多态性;组合基因型;老年人

【中国图书分类法分类号】R394.2

【文献标志码】A

【收稿日期】2011-08-19

Association of single nucleotide polymorphisms and combined genotypes of klotho G-395A, F352V and C370S with serum klotho protein levels in elderly people of Chinese Han population in Chongqing

ZHOU Ping, TIAN Xiaochun, MA Houxun, LIU Xiaolin, ZHAI Fuli, WU Ping, LI Faqi

(Department of Gerontology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the association between serum klotho protein level and single nucleotide polymorphisms (SNPs) and combined genotypes of Klotho G-395A, F352V and C370S in elderly people of Han nationality in Chongqing. Methods: Unrelated 390 elderly individuals from Chinese Han population (in Chongqing) were selected. Single nucleotide polymorphisms of Klotho gene in the G-395A, F352V and C370S were tested by allele-specific primer (ASP) PCR, and serum klotho protein level was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Results: No significant difference was found in serum klotho protein level in the aged carrying allelic genotypes of Klotho G-395A, F352V and C370S SNP ($P>0.05$). According to combined genotype analysis, the klotho protein level in the elderly individuals carrying Klotho G-395G+F352F+C370S was higher than that in the elderly individuals with Klotho G-395G+F352F+C370C ($P=0.056$). Conclusion: No association of allelic genotypes of Klotho G-395A, F352V and C370S SNP with serum klotho protein levels is found. But a trend is found that serum klotho protein level in those with Klotho G-395G+F352F+C370S is higher than that in the elderly individuals with Klotho G-395G+F352F+C370C.

【Key words】klotho gene; single nucleotide polymorphism; combined genotype; elderly people

Klotho 基因是由 Kuro-o 等^[1]在 1997 年研究发现的与寿命和衰老密切相关的基因,该基因表达缺陷的小鼠出现了一系列与人类衰老相关的表型。研究发现人类 Klotho 基因定位

于染色体 13q12 上,该基因为含有 5 个外显子大约 50 kb 的基因组 DNA^[2]。由于该基因 hnRNA 剪接方式的不同,形成不同的两个转录体,分别编码含 1 012 个氨基酸的膜结合型和含 549 个氨基酸的分泌型 klotho 蛋白。Xiao 等^[3]研究发现在人类血液中存在分泌型 klotho 蛋白。Arking 等^[4]研究报道在体外实验中 klotho V352 突变者其细胞外的分泌型 klotho 蛋白较 Klotho F352 野生者明显降低,而 Klotho S370 突变者其

作者介绍:周 平(1971-),女,副主任医师,硕士,

研究方向:老年心血管疾病研究。

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

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:30672212)。

细胞外的分泌型 klotho 蛋白较 Klotho C370 野生者增高 2.9 倍;Klotho V352/S370 双突变者则呈现一种居中的表现型(分泌型 klotho 蛋白仅增高 1.6 倍),这就提示人类血清 klotho 蛋白水平个体差异性有可能与其基因多态性差异有关。为此,本研究选择重庆汉族老年人群作为研究对象,研究该人群 Klotho 基因启动子区 G-395A 及其第 2 外显子区(Exon2) F352V(苯丙氨酸替代缬氨酸)与 C370S(半胱氨酸替代为丝氨酸)3 个位点单核苷酸多态性(Single nucleotide polymorphism, SNP)及组合与血清 klotho 蛋白水平的相关关系,以探寻其基因多态性是否影响其血清 klotho 蛋白水平及可能机制。

1 材料与方法

1.1 研究对象

本文资料自 2007 年 1 月-2009 年 9 月期间在重庆医科大学附属第一医院门诊及住院年龄 ≥ 60 岁的老年人群中,随机选择 390 例老年人[男 215 例,女 175 例,年龄 60~97 岁,平均年龄(76.20 ± 4.67)岁]作为研究对象。研究纳入标准:年龄 ≥ 60 岁,无亲属相关关系的、愿意接受项目研究者即可。所有参加研究对象均告知并签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 血标本收集 全部对象留取早晨空腹血标本,其中留 EDTA 抗凝外周静脉全血 2 ml,以备 DNA 提取之用;另留 4 ml 未抗凝全血,分离血清,以备检测血清 klotho 蛋白之用。上述所有标本置于 -20°C 保存备用。

1.2.2 DNA 提取 取 EDTA 抗凝外周静脉全血 1 ml,用 DNA 提取专业试剂盒(由上海华舜生物工程有限公司提供)抽提白细胞染色体基因组 DNA。

1.2.3 引物序列选取与设计 利用等位基因特异性引物(AI-allele-specific primer, ASP)PCR 技术^[5,6]检测 klotho G 395A、klotho F352V 与 klotho C370S SNP 的等位基因型。根据研究需要通过美国 NCBI(美国国家生物信息中心)的 GenBank 获取 klotho 基因序列(klotho 基因序列来自 GenBank NO.AB009667.Homo sapiens Klot...[gi:60391381])及其相应位点的 SNP 信息。利用 Primer5.0 软件设计符合研究需要的引物,并用 Blast2.0 软件检测引物的特异性。本研究自行设计的引物序列均由中国大连宝生物工程有限公司合成。所设计引物序列方法,见表 1。

1.2.4 PCR 反应体系及其反应条件 检测 klotho G-395A、F352V 与 C370S SNP 的 PCR 反应体系中所用 EX Taq 酶,10 $\times$ EX Taq 酶缓冲液、MgCl₂、dNTP(dATP、dTTP、dGTP、dCTP)均由中国大连宝生物工程有限公司提供。PCR 反应体系及其反应条件,参见文献[7]所介绍的方法操作。

1.2.5 Klotho 基因多态性检测及结果判断 研究采用单一等位基因特异性引物 PCR 技术检测 klotho 基因多态性,具体方法参见文献[6,7]介绍方法进行单核苷酸多态性检测。

扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色,WD-

表 1 Klotho G-395A、F352V 与 C370S 所设计的引物序列

Tab.1 The primer sequences of Klotho G-395A,F352V and C370S

基因多态性位点	引物
Klotho G-395A	P 11 5' - aattggctccagcaatgtccag-3'
	P 2-1 5' - agaaaaggcgccgaccaacttt t -3'
	P 2-2 5' - agaaaaggcgccgaccaacttt c -3'
Klotho F352V	P 1-1 5' - ctttcattctattctgctgat g -3'
	P 1-2 5' - ctttcattctattctgctgat t -3'
	P 22 5' - cctgagacaaaccagccatt-3'
Klotho C370S	P 11 5' - tacaatacttcttttcggtccc-3'
	P 2-1 5' - actcaaggagggtccaaag g -3'
	P 2-2 5' - actcaaggagggtccaaag c -3'

注:引物序列中加框及有背景阴影者代表特异性等位基因位点所在

9403D 型紫外分析仪检测证实 PCR 结果,并用电脑控制的紫外线凝胶成像系统摄像分析。

Klotho 基因多态性判断标准,参见文献[7,8]:如果 2 次 PCR 反应产物电泳结果均有目标条带出现即判断为杂合子基因型;只有其中 1 次 PCR 产物电泳结果阳性,即为野生型或突变型纯合子基因型。

采用基因测序分析技术针对 klotho G-395A 位点 SNP 进行基因测序分析研究,其研究结果证实单一等位基因特异性引物 PCR 技术的准确性与基因测序分析结果相同。

1.2.6 酶联免疫吸附试验(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测血清 klotho 蛋白水平 采用 ELISA 检测血清 klotho 蛋白含量,其具体方法:取 EDTA 抗凝外周静脉血清 0.05 ml,用人 klotho 蛋白 ELISA 检测试剂盒(由上海锐聪科技发展有限公司提供)检测 Klotho 蛋白水平。标准品稀释到 200、100、50、25、0 pg/ml;吸取稀释好的标准品或样品到聚苯乙烯板的反应孔中,每孔 0.05 ml;然后立即在反应孔中加 0.05 ml 生物素标记的抗体,37 $^{\circ}\text{C}$ 温浴 1 h,洗脱;每孔加入 0.06 ml 亲和链酶素-辣根过氧化物酶,37 $^{\circ}\text{C}$ 温浴 30 min,洗脱;加入临时配制的 TMB 底物溶液 0.05 ml,37 $^{\circ}\text{C}$ 温浴 10 min 后加入 0.05 ml 终止液,混匀,在酶标仪(美国,MD,Spectra-Max M2^e)上于 450 nm 处,以空白对照孔调零后测 OD 值。并以标准品浓度为横坐标,其测得的 OD₄₅₀ 值为纵坐标,制作其实验标准曲线;而待测血液样品的 klotho 蛋白水平则根据其 OD₄₅₀ 值由标准曲线换算出相应的浓度。

1.3 统计学分析

采用分类资料关联分析,采用卡方检验,以 $\alpha=0.05$ 作为统计学差异的判别标准。同类计量数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用独立样本 t 检验分析,以 $P<0.05$ 作为统计学差异的判别标准。 χ^2 检验分析 Klotho 各等位基因频率分布是否符合 Hardy-Weinberg 定律及 Klotho 基因多态性与血清 klotho 蛋白的关系。数据处理和图表绘制主要在 MS-OFFICE 2003 的 EXCEL 软件;采用 SPSS 18.0 统计软件对上述资料进行统计分析。

2 结 果

2.1 Klotho G-395A、F352V 与 C370S SNP 及其与血清 klotho 蛋白水平的关系

研究结果显示:(1)本组汉族老年人群 Klotho G-395A、F352V 与 C370S SNP各等位基因型频率分布符合 Hardy-Weinberg 定律($P>0.05$)。(2)本组汉族老年人群 Klotho G-395A SNP 等位基因中,AA 携带者其血清 klotho 蛋白水平较 GG 等携带者降低,但未达到显著性差异($P>0.05$);Klotho F352V SNP 等位基因中,FF、FV、VV 携带者之间其血清klotho 蛋白水平差异也无显著性($P>0.05$);Klotho C370S SNP CS 等位基因携带者其血清 klotho 蛋白水平较 SS 等位基因携带者增高,但未达到显著性差异($P>0.05$),其结果详见表 2。

表 2 Klotho G-395A、F352V 与 C370S SNP 各等位基因型携带者血清 klotho 蛋白水平表 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Serum klotho protein level in the carriers with each alleleotype of Klotho G-395A, F352V and C370S SNP ($\bar{x} \pm s$)

Klotho 基因型	例数 (n)	频率 (%)	klotho蛋白 (pg/ml)
Klotho G-395G	187	47.95	73.47 ± 71.64
Klotho G-395A	152	38.97	70.58 ± 75.13
Klotho A-395A	51	13.08	67.78 ± 69.45
Klotho F352F	150	38.46	69.89 ± 73.37
Klotho F352V	224	57.44	70.21 ± 72.07
Klotho V352V	16	4.10	74.41 ± 44.99
Klotho C370C	181	46.41	66.42 ± 61.67
Klotho C370S	195	50.00	76.01 ± 80.74
Klotho S370S	14	3.59	53.11 ± 57.45

2.2 Klotho G-395A、F352V 与 C370S SNP 组合等位基因与其血清 klotho 蛋白水平的关系

本文研究结果显示 Klotho G-395A、F352V 与 C370S SNP 组合等位基因型仅发现有 20 种,其中排序在前 10 位分别为:Klotho G-395G +F352V +C370S、Klotho G-395A +F352V +C370C、Klotho G-395A +F352V +C370S、Klotho G-395G +F352V +C370C、Klotho G-395G +F352F +C370C、Klotho G-395G +F352F +C370S、Klotho G-395A +F352F +C370C、Klotho G-395A +F352F +C370S、Klotho A-395A +F352V +C370S、Klotho A-395A +F352F +C370C、Klotho A-395A +F352F +C370S。本文等位基因组合分析研究发现上述各组合等位基因携带者之间其血清 klotho 蛋白水平差异较大,其中 Klotho G-395G +F352F +C370S 携带者血清 klotho 蛋白水平较 Klotho G-395G +F352F +C370C、Klotho A-395A +F352F +C370S 携带者增高,但仅有 Klotho G-395G +F352F +C370S 携带者其血清klotho 蛋白水平较 Klotho G-395G +F352F +C370C 携带者增高,接近显著性差异($P=0.056$),其余各组合等位基因型携带者之间差异均未达到统计学上显著性差异($P>0.05$)。其结果详见表 3。

表 3 Klotho G-395A、F352V 与 C370S SNP 组合基因携带者血清 Klotho 蛋白水平比较表 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.3 Serum klotho protein level of carrier with combined alleleotypes of Klotho G-395A, F352V and C370S SNP ($\bar{x} \pm s$)

Klotho 组合等位基因型	例数 (n)	频率 (%)	klotho蛋白 (pg/ml)
Klotho G-395G+F352V+C370S	59	15.13	67.26 ± 69.54
Klotho G-395A+F352V+C370C	45	12.82	63.61 ± 52.22
Klotho G-395A+F352V+C370S	44	11.28	82.98 ± 99.60
Klotho G-395G+F352V+C370C	42	10.77	74.43 ± 67.10
Klotho G-395G+F352F+C370C	42	10.77	61.29 ± 58.70
Klotho G-395G+F352F+C370S	30	7.69	97.93 ± 106.13
Klotho G-395A+F352F+C370C	26	6.67	69.10 ± 76.12
Klotho G-395A+F352F+C370S	21	5.38	70.87 ± 72.37
Klotho A-395A+F352V+C370S	20	5.13	85.10 ± 87.48
Klotho A-395A+F352F+C370C	14	3.59	66.38 ± 65.80
Klotho A-395A+F352F+C370S	10	2.56	52.89 ± 39.03
Klotho A-395A+F352V+C370C	7	1.79	55.59 ± 37.68
Klotho G-395A+V352V+C370S	6	1.54	88.76 ± 67.90
Klotho G-395G+V352V+C370S	5	1.28	73.06 ± 43.02
Klotho G-395A+F353F+S370S	4	1.03	21.87 ± 4.36
Klotho G-395A+F352V+S370S	4	1.03	57.34 ± 21.81
Klotho G-395G+V352V+C370C	3	0.77	76.59 ± 14.25
Klotho G-395G+F352V+S370S	3	0.77	48.24 ± 34.91
Klotho G-395G+F352F+S370S	3	0.77	112.15 ± 121.67
Klotho G-395A+V352V+C370C	2	0.51	70.69 ± 8.87

3 讨 论

Klotho 基因作为一种新近发现的与衰老相关的基因,其编码的 klotho 蛋白具有多种生物学功能。研究证实 klotho 蛋白属于单次跨膜蛋白,其细胞外区由两个同源序列组成,该序列与植物和细菌的 β 葡萄糖苷酶享有同源序列,具有 β 葡萄糖苷酶活性^[9]。随后研究发现膜结合型 klotho 蛋白的细胞外区可被锚定在细胞膜上的 ADAM10 和 ADAM17 等金属蛋白酶水解脱落而产生一种分泌型 klotho 蛋白^[10],这种分泌型 klotho 蛋白在血液、尿液及脑脊液中均能被检测到,这就提示分泌型 klotho 蛋白具有激素功能,即通过抑制细胞内胰岛素/胰岛素样生长因子-1(Insulin/IGF-1)信号级联放大效应、调节离子通道活性,抑制氧化应激、抑制 Wnt 信号转导以及增加一氧化氮合成等多种作用发挥其全身调节功能^[11,12]。

人们早期研究^[9]发现人类血清 klotho 有随着增龄而降低趋势,且存在着明显的个体差异性,推测其差异性可能与其基因多态性有关。新近研究发现 Klotho 基因启动区 G-395A 位点基因突变有可能就是该基因表达的一种潜在的调节靶点^[13]。现有研究发现 Klotho 基因中 F352V 位点在真核细胞生物同源蛋白质中相当保守的,其编码区包含 F352V(苯丙氨酸替代缬氨酸)和 C370S(半胱氨酸替代为丝氨酸)2 个位点

的突变,有可能改变其 klotho 蛋白的代谢功能,即影响其分泌型蛋白水平,进而影响其生物学功能^[4]。

鉴于目前有关该基因多态性与其蛋白表达水平关系研究报道甚少,为此,该研究选择重庆老年汉族人群作为研究对象,探索 Klotho 基因多态性与其血液 klotho 蛋白水平的相关性。本文研究结果显示:(1)Klotho G-395A 与 F352V SNP 各等位基因型携带者之间其血清 klotho 蛋白水平无显著性差异;而在 Klotho C370S SNP 中,发现 CS 杂合子基因型携带者其血清 klotho 蛋白水平较 Klotho C370S SNP CC(野生型)纯合子基因型携带者有增高趋势,也较 SS(突变型)纯合子基因型携带者增高,但其差异均未达到显著性。(2)通过组合基因型研究发现 Klotho G-395A、F352V 与 C370S 各组合等位基因型携带者之间其血清 klotho 蛋白水平差异较大,其中 Klotho G-395G+F352F+C370S 携带者其血清 klotho 蛋白水平较 Klotho G-395G+F352F+C370C 携带者(野生型)明显增高($P=0.056$),即提示在 Klotho 基因启动子区 G-395A 与外显子区 F352V 两个位点无突变的背景下,Klotho C370S 杂合子携带者其血液中分泌型 klotho 水平较 Klotho C370C 野生型高,这说明该位点杂合子突变可有促进 klotho 蛋白分泌或表达作用,与文献^[4]体外实验研究一致。本文通过基因组合研究发现 Klotho G-395G+F352F+C370S(杂合子)携带者其血清 klotho 蛋白水平较 Klotho G-395G+F352F+C370C 携带者(野生型)有明显增高趋势,接近显著性差异,这就提示研究 Klotho 基因多个位点多态性的组合等位基因综合生物学效应比研究其单一一位点的等位基因在生物学效应方面显得更具有实际意义。

本研究还发现 Klotho G-395G+F352F+C370S 携带者其血清 klotho 蛋白水平较 Klotho A-395A+F352F+C370S 增高,也未达到统计学显著性差异水平,究其缘由这可能与本组研究人群样本偏小有关,再加之从 Klotho 基因多态性的差异到其基因表达为蛋白质之间有较多环节因素(如基因转录、mRNA 修饰、klotho 蛋白的翻译调节以及其释放到细胞外成为血清 klotho 蛋白和该蛋白的代谢情况等)均可影响其血清 klotho 蛋白水平,这将是下一步研究的方向,也为进一步探讨 Klotho 基因多态性差异与其基因表达翻译为蛋白质的中间环节因素等研究提供了新的线索。

参 考 文 献

- [1] Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, et al. Mutation of the mouse Klotho gene leads to a syndrome resembling aging[J]. *Nature*, 1997, 390(6655):45-51.
- [2] Matsumura Y, Aizawa H, Shiraki-Iida T, et al. Identification of the human klotho gene and its two transcripts encoding membrane and secreted klotho protein[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 242(3): 626-630.
- [3] Xiao N M, Zhang Y M, Zheng Q, et al. Klotho is a serum factor related to human aging[J]. *Chin Med J*, 2004, 117(5):742-747.
- [4] Arking D E, Krebsova A, Macek M Sr, et al. Association of human aging with a functional variant of klotho[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(2):856-861.
- [5] 马厚勋, 牛永红, 李章勇, 等. 等位基因特异性引物 PCR 技术及其应用研究[J]. *生物技术*, 2005, 15(1):15-18.
- Ma H X, Niu Y H, Li Z Y, et al. Application of allele-specific primer PCR technique[J]. *Biotechnology*, 2005, 15(1):15-18.
- [6] 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.
- 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.
- [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.
- 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.
- [8] 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.
- 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.
- [9] Tohyama O, Imura A, Iwano A, et al. Klotho is a novel beta-glucuronidase capable of hydrolyzing steroid beta-glucuronides[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(11):9777-9784.
- [10] Chen C D, Podvin S, Gillespie E, et al. Insulin stimulates the cleavage and release of the extracellular domain of Klotho by ADAM10 and ADAM17[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(50):19796-19801.
- [11] Torres PU, Prié D, Molina-Blétry V, et al. Klotho; an antiaging protein involved in mineral and vitamin D metabolism[J]. *Kidney Int*, 2007, 71(8):730-737.
- [12] Liu H, Fergusson M.M, Castilho R.M, et al. Augmented Wnt signaling in a mammalian model of accelerated aging[J]. *Science*, 2007, 317: 803-806.
- [13] 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.
- [14] Kuro-o M. Klotho and aging[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1790(10):1049-1058.

(责任编辑:关蕴良)