

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.07.004

Klotho 基因 3 个位点单核苷酸多态性与冠心病相关性研究

尤 宁, 刘晓林, 田小春, 马厚勋

(重庆医科大学附属第一医院老年科, 重庆 400016)

【摘要】目的:通过研究克老素(Klotho, KL)基因 3 个单核苷酸多态性,揭示其与冠心病(Coronary heart disease, CHD)的相关性。方法:随机选取 CHD 患者 317 例为实验组,同期随机选取正常健康人 301 例正常对照组。提取外周血白细胞基因组 DNA,应用单一等位基因特异性引物 PCR 技术检测 KL 基因 3 个 SNP 位点的基因型,分析其各等位基因与 CHD 的相关性。结果:CHD 组 KL G-395A SNP AA 等位基因频率较正常对照组增高,差异有统计学意义($P<0.05$);按性别分层研究发现 CHD 男性亚组 AA 等位基因频率较正常对照组增高($P<0.05$)。KL C370S SNP CC 等位基因频率较对照组增高($P<0.05$),而其 CS 等位基因频率较对照组低($P<0.05$);按性别分层研究发现,CHD 男性亚组 CC 频率较对照组偏高,差异有统计学意义($P<0.05$),而其 CS 频率较对照组降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。未发现 CHD 组 F-352V 基因型多态性 FF、FV 和 VV 频率与对照组比较差异有统计学意义($P>0.05$)。组合分布研究发现:CHD 组 KL G-395A+F352V+C370C、KL A-395A+F352V+C370C 与 KL A-395A+F352V+C370S 组合基因型分布频率较正常对照组明显增高($P<0.05$),而其 KL G-395A+F352V+C370S 组合基因型分布频率较正常对照组低($P<0.05$)。按性别分层研究发现在 CHD 组男性患者中 KL G-395A+F352V+C370C、KL A-395A+F352V+C370C 组合基因型频率亦较正常对照男性亚组明显增高($P<0.05$),而 KL G-395A+F352V+C370S 组合基因型分布频率则较正常对照男性亚组低($P<0.05$);同时还发现在 CHD 女性亚组患者 KL A-395A+F352V+C370S 组合分布基因型分布频率较正常对照女性亚组明显增高($P<0.05$)。结论:研究发现 KL 基因型 G-395A SNP AA 男性携带者易患 CHD,而 KL C370S SNP 突变 CS 杂合子男性携带者则不易患 CHD。组合分布研究还发现 KL G-395A+F352V+C370C、KL A-395A+F352V+C370C 男性携带者与 KL A-395A+F352V+C370S 女性携带者易患 CHD,而 KL G-395A+F352V+C370S 男性携带者则不易患 CHD。

【关键词】克老素;单核苷酸多态性;冠心病;组合基因**【中国图书分类法分类号】**R394.5;R541.4**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2012-01-09

Correlation between single nucleotide polymorphisms at three sites of Klotho gene with coronary heart disease

YOU Ning, LIU Xiaolin, TIAN Xiaochun, MA Houxun

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

【Abstract】Objective: To investigate single nucleotide polymorphisms (SNPS) at three sites of the Klotho (KL) gene and to analyze their correlation with coronary heart disease (CHD). **Methods:** Totally 317 patients were randomly selected as CHD group and 301 healthy people as normal controls. Genomic DNA of leukocytes was extracted from venous blood and the single allele specific primer PCR technique (SASP-PCR) was used to detect allelic genotypes at three SNPS sites of KL gene in order to analyze their relationship with CHD. **Results:** The frequency of allele AA genotype of KL G-395A in CHD group was obviously higher than that in normal control group ($P<0.05$). According to the results of sex stratification analysis, the frequency of allele AA genotype in the CHD male subgroup was higher than that in normal control group ($P<0.05$). The frequency of allele CC genotype of KL C370S was higher than that in normal control group ($P<0.05$), but the frequency of allele CS genotype was lower than that in normal control group ($P<0.05$). According to the results of sex stratification analysis, the frequency of allele CC genotype in CHD male subgroup was higher than that in normal control group ($P<0.05$), but the frequency of allele CS genotype was lower than that in normal control male subgroup ($P<0.05$). There was no significant difference in polymorphic FF, FV and VV frequency in the F-352V gene between CHD group and normal control group ($P>0.05$). According to the results of combination genotype analysis, the allele genotype frequency of KL G-395A+F352V+C370C, KL A-395A+F352V+C370C and KL A-395A+F352V+C370S in CHD group was higher than that in normal control group ($P<0.05$), but the allele genotype frequency of KL G-395A+F352V+C370S was lower than that in normal control group ($P<0.05$). According to the results of sex stratification analysis, the allele genotype frequency of KL G-395A+F352V+C370C, KL A-395A+F352V+C370C was higher than that in normal control male subgroup ($P<0.05$), but the allele genotype frequency of KL G-395A+F352V+C370S was lower than that in normal control male subgroup ($P<0.05$). The allele genotype frequency of KL A-395A+F352V+C370S in CHD female subgroup was obviously higher than that in normal control female subgroup ($P<0.05$). **Conclusion:**

作者介绍:尤 宁(1979-),女,主治医师,硕士,

研究方向:心血管疾病基础与临床。

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)。

sions: This study shows that the male patients who carried with allele genotype KL G-395A SNP AA have higher risk in suffering from CHD. The male patients with allele CS genotype of KL C370S have lower risk in suffering from CHD. This study also finds that the male patients who carried with KL G-395A+F352V+C370C, KL A-395A+F352V+C370C and the female patients who carried with KL A-395A+F352V+C370S have higher risk in suffering from CHD, however, the male patients with KL G-395A+F352V+C370S have lower risk in suffering from CHD.

【Key words】Klotho; single nucleotide polymorphisms; coronary heart disease; combined genotype

冠心病(Coronary heart disease, CHD)是一种临床常见的心血管疾病,常在冠状动脉粥样硬化的基础上,因斑块破裂促使血栓形成,导致心肌梗死、心肌重构、心力衰竭,甚至死亡,严重影响患者的生活质量和寿命,是目前非感染性疾病致死的主要原因之一。然而对 CHD 病因机制的研究至今仍无法准确定论,目前大多数认为其发病机制可能与遗传因素与环境、生活方式等因素密切相关,特别是其遗传易感性已引起广泛关注。已有研究证实至少有超过 400 个基因与 CHD 的发生、发展有关。自 1997 年以来人们研究发现,克老素(Klotho, KL)基因与人类寿命和多种疾病表型密切相关。KL 基因位于人类染色体 13q12 区域,包括 5 个外显子和 4 个内含子,全长约 50 kb。近年来国外学者 Aking 等^[1-3]研究发现在北欧犹太教徒人群 KL 基因单核苷酸多态性与 CHD、脑卒中(如脑梗死)等疾病发生有密切相关性,并发现 KL-VS 等位基因是其早发 CHD 的独立危险因素。而有关该基因多态性与中国人群 CHD 发病关系研究甚少,为此,拟通过对重庆地区汉族人群 KL 基因启动子区 G-395A 与第 2 外显子区 F352V 和 C370S 3 个位点的单核苷酸多态性(Single nucleotide polymorphism, SNP)及其等位基因型分布特征进行研究,探索其与重庆地区汉族人群 CHD 相关关系,以寻找或筛选出与 CHD 相关的等位基因型,为 CHD 的早期干预及防治提供新线索。

1 对象与方法

1.1 研究对象

随机选取 2007 年 3 月至 2009 年 9 月期间在重庆医科大学附属第一医院老年病科门诊体检及住院的,符合 2007 年 CHD 诊断治疗指南标准^[4,5] 317 例 CHD 个体作为研究对象,其中男性 191 例,女性 126 例,年龄 50~91 岁,平均年龄(68.90 ± 7.97)岁;随机选择同期符合正常健康人群标准的 301 例健康个体作为正常对照组,其中男性 184 例,女性 117 例,年龄 50~90 岁,平均年龄(67.69 ± 9.97)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。并详细采集记录包括年龄、性别、血压、身高、体重等相关资料。2 组研究对象均告知本研究目的,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,用于血脂[总胆固醇(Total cholesterol, TC)、甘油三酯(Triglyceride, TG)、低密度脂蛋白(Low density lipoprotein, LDL-C)、高密度脂蛋白(High density lipoprotein, HDL-C)]、空腹血糖检查之用。

1.2.2 DNA 提取 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。

1.2.3 KL G-395A、F352V 与 C370S 基因多态性检测方法

KL 基因的 SNP 信息来自美国国家生物信息中心。使用 Primer 5.0 软件进行引物设计, Blast 2.0 软件对引物特异性进行检测。KL 基因多态性检测方法按照文献^[6-9]所介绍方法进行,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 G-395A SNP 检测: KL G-395A 上游引物为:5'-AATTGGCTCCAGCAATGTC-CAG-3',下游引物:G 等位基因,5'-AGAAAAGGCGCCGACC-CAACTTTC-3';A 等位基因,5'-AGAAAAGGCGCCGACC-AACTTTT-3';其 PCR 产物长度为 147 bp。KL F352V SNP 检测: KL F352V 上游引物为:T 等位基因:5'-CTT TCATCTA-TTCTGCCTGATT-3',G 等位基因,5'-CTTTCATCTATTCTG-CCTGATG-3',下游引物:5'-CCTGAGACAAACCAGCCATT-3';其 PCR 产物长度为 230 bp。KL C370S SNP 检测: KL C370S 上游引物为 5'-TACAATACTTCTTTCCGTCCC-3',下游引物:G 等位基因,5'-ACTCAAGGTGGGTCCAAAGC-3';C 等位基因,5'-ACTCAAGGTGGGTCCAAAGG-3';其 PCR 产物长度为 285 bp。

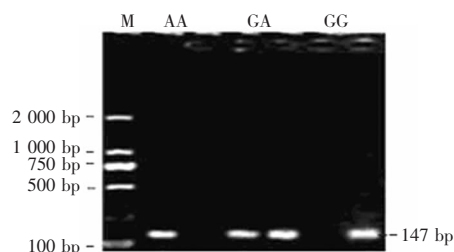
1.2.4 KL G-395A、F352V、C370S SNP 判断方法 取 PCR 产物 5 μl ,使用琼脂糖凝胶-溴化乙锭染色电泳,凝胶成像系统观察结果并判断是否为预期目的片段。判断等位基因型的方法:KL 基因 G-395A 的等位基因有 GG、GA、AA。F352V 基因等位基因有 FF、FV、VV。C370S 的等位基因有 CC、CS、SS。见图 1~3。

1.2.5 生化指标检测 CHD 组和正常对照组均同时检测血清生化指标,包括 TC、TG、HDL-C、LDL-C、空腹血糖等。上述生化指标检查均由重庆医科大学附属第一医院检验科实验室完成,以确保检验结果质量准确可靠。

1.3 统计学分析

所有资料采用 SPSS 16.0 软件进行分析。计量资料结果符合方差齐性者,以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 t 检验;方差不齐者用中位数(Interquartile range, IQR)表示,采用非参数检

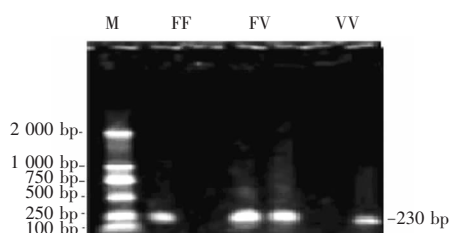
验——Wilcoxon 秩和检验;研究对象基因型分布采用Hardy-Weinberg 检验其标本是否具有群体代表性,各组间基因型及等位基因频率比较采用 χ^2 检验、连续校正 χ^2 检验或 Fisher 确切检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。



注:M 代表 DNA 产物电泳 bp 值的标准品;GG 代表野生型纯合子;GA 代表杂合子;AA 代表突变型纯合子

图 1 KL G-395A SNP 电泳图

Fig.1 Electrophotogram of KL G-395A SNP



注:M 代表 DNA 产物电泳 bp 值的标准品;FF 代表野生型纯合子;FV 代表杂合子;VV 代表突变型纯合子

图 2 KL F352V SNP 电泳图

Fig.2 Electrophotogram of KL F352V SNP

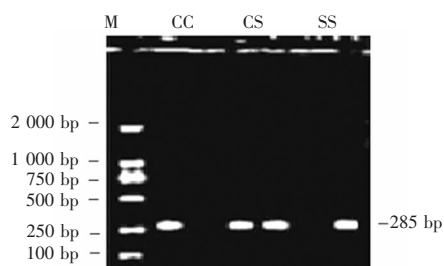


图 3 KL C370S SNP 电泳图

Fig.3 Electrophotogram of KL C370S SNP

2 结果

2.1 CHD 组与正常对照组的基本情况

2 组相比较,CHD 组其收缩压、空腹血糖及 TG 明显较正常对照组高,差异有统计学意义($P < 0.001$),而 CHD 组 TC、LDL-C 与 HDL-C 较正常对照组低($P < 0.01$)。2 组在舒张压及体重指数方面差异无统计学意义($P > 0.05$)。另外,CHD 组中有 72.87% 患者合并高血压,41.01% 患者合并糖尿病,他汀类药物使用率 60%,其余结果见表 1。

表 1 CHD 与正常对照组的基本资料对比表

Tab.1 Comparison of the basic information between CHD group and normal control group

基本资料	CHD 组	正常对照组	P 值
年龄(岁)	68.90 ± 7.97	67.69 ± 9.97	> 0.05
男(%)	60.25	61.13	> 0.05
TC(mmL/L)	4.47 ± 0.96	5.07 ± 0.89	0.00
TG(mmL/L)	1.50 ± 0.86	1.30 ± 0.80	< 0.01
HDL-C*(mmL/L)	1.15(0.96~1.43)	1.55(1.31~1.79)	0.00
LDL-C*(mmL/L)	2.48(1.91~3.03)	2.87(2.43~3.39)	0.00
空腹血糖*(mmL/L)	5.90(5.30~7.07)	4.80(4.60~5.20)	0.00

注:※,2 组方差不齐,采用 Wilcoxon 秩和检验

2.2 CHD 组与对照组 KL 基因 SNP 各等位基因频率分布

所有研究对象 KL G-395A、KL F352V 和 KL C370S 等位基因频率分布经 χ^2 检验 Hardy-Weinberg 平衡,其结果显示 KL G-395A 等位基因型分布满足 Hardy-Weinberg 平衡($P > 0.05$);而 KL F352V 和 KL C370S 2 位点等位基因型分布不符合 Hardy-Weinberg 平衡($P < 0.05$)。

CHD 组 KL 基因 G-395A SNP 中 AA 等位基因频率较正常对照组增高,其差异有统计学意义($P < 0.05$);而按性别分层研究,仅在男性 CHD 亚组其 G-395A AA 等位基因频率较其男性对照亚组增高,其差异有统计学意义($P < 0.05$)。其余结果见表 2。

CHD 组 KL 基因 F352V SNP 中 FF、FV 和 VV 等位基因频率与正常对照组比较差异均无统计学意义($P > 0.05$),而按性别分层研究,发现在女性 CHD 亚组其 F352V SNP 中 VV 等

表 2 CHD 组和正常对照组 KL 基因多态性各等位基因频率比较表

Tab.2 Comparison of the frequencies of allelic genotypes of SNP of KL gene between CHD group and normal control group

基因型	CHD 组			正常对照组			χ^2 值		
	例数(n)	男	女	例数(n)	男	女	总体	男	女
KL G-395G	150	86	64	150	87	63	0.39	0.19	0.23
KL G-395A	124	78	46	129	84	45	0.89	0.89	0.09
KL A-395A	43	27	16	22	13	9	6.42	4.92	1.65
KL F352F	115	66	49	121	74	47	1.01	1.28	0.04
KL F352V	184	111	73	162	102	60	1.12	0.27	1.08
KL V352V	18	14	4	18	8	10	0.03	1.51	3.23
KL C370C	156	99	57	99	56	43	16.97	17.70	1.80
KL C370S	152	83	69	187	116	71	12.53	14.44	0.87
KL S370S	9	9	0	15	12	3	1.90	0.58	1.51*
合计	317	191	126	301	184	117			

注:※,因 $1 \leq T < 5$,采用连续校正 χ^2 检验

位基因频率较其正常对照女性亚组低,但未达到统计学上显著性差异($P=0.073$)。其余结果见表 2。

CHD 组 KL 基因 C370S SNP 中 CC 等位基因频率较正常对照组增高,其差异有统计学意义($P<0.05$);而其 CS 等位基因频率较正常对照组低,其差异也有统计学意义($P<0.05$)。按性别分层研究发现,在 CHD 男性亚组其 KL C370S CC 等位基因频率较其男性对照亚组增高,其差异有统计学意义($P<0.05$);而其 CS 等位基因频率则较正常对照组低($P<0.05$)。其余结果见表 2。

2.3 CHD 组与对照组 KL 基因 SNP 各组合等位基因型分布情况

组合分布研究显示本组资料 CHD 组与正常对照组 KL 基因 G-395A、F352V、C370S 3 个位点基因多态性的组合基因型分别有 22 和 21 种,2 组均未发现 KL G-395G+V352V+S370S、KL A-395A+V352V+C370S 和 KL A-395A+V352V+S370S 组合基因型,其中 KL 各位点组合基因型分布结果如下:

CHD 组 KL G-395A+F352V+C370C、KLA-395A+F352V+C370C 与 KLA-395A+F352V+C370S 组合基因型分布频率较正常对照组明显增高($P<0.05$),而其 KL G-395A+F352V+

C370S 组合基因型分布频率较正常对照组低,其差异有统计学意义($P<0.05$)。

按性别分层研究发现,在 CHD 组男性患者中 KL G-395A+F352V+C370C、KL A-395A+F352V+C370C 组合基因型频率亦较正常对照男性亚组明显增高,差异有统计学意义($P<0.05$);而在 CHD 男性组 KL G-395A+F352V+C370S 组合基因型分布频率较正常对照男性亚组低,其差异也有统计学意义($P<0.05$)。另外发现在女性 CHD 亚组患者 KLA-395A+F352V+C370S 组合分布基因型分布频率较正常对照女性亚组明显增高,差异有统计学意义($P<0.05$)。其余资料详见表 3。

3 讨 论

CHD 是一种世界范围内的常见病、多发病。尽管目前已有较为完善药物治疗方案以及行之有效的介入治疗和手术治疗措施,使 CHD 预后得到显著改善,但其残存风险仍然较高。因此,进一步深入探明 CHD 的发病机理及危险因素,采取更有效干预措

表 3 CHD 组和对照组 KL 基因多态性各组合等位基因频率比较表

Tab.3 Comparison of the frequencies of combined genotypes of SNP of KL gene between CHD group and normal control group

基因型	CHD组			正常对照组			χ^2 值		
	例数(n)	男	女	例数(n)	男	女	总体	男	女
KL G-395G+F352F+C370C	27	14	13	27	19	8	0.840	0.360	0.340
KL G-395G+F352F+C370S	24	16	8	27	12	15	0.610	0.490	0.090
KL G-395G+F352F+S370S	5	5	0	4	4	0	1.000*	0.780*	1.000*
KL G-395G+F352V+C370C	37	21	16	28	16	12	0.340	0.360	0.550
KL G-395G+F352V+C370S	46	21	25	50	30	20	0.470	0.134	0.580
KL G-395G+F352V+S370S	1	1	0	3	2	1	0.580*	0.540*	1.000*
KL G-395G+V352V+C370C	5	4	1	2	0	2	0.490	0.140*	0.950*
KL G-395G+V352V+C370S	5	4	1	9	4	5	0.240	1.000	0.180
KL G-395A+F352F+C370C	23	13	10	17	9	8	0.420	0.420	0.740
KL G-395A+F352F+C370S	21	10	11	25	19	6	0.430	0.070	0.270
KL G-395A+F352F+S370S	1	1	0	3	2	1	0.580*	0.970*	0.480*
KL G-395A+F352V+C370C	38	28	10	17	10	7	0.006	0.003	0.550
KL G-395A+F352V+C370S	35	20	15	57	37	20	0.006	0.009	0.250
KL G-395A+F352V+S370S	1	1	0	3	3	0	0.580*	0.297*	1.000*
KL G-395A+V352V+C370C	5	4	1	1	0	1	0.240*	0.140*	1.000*
KL G-395A+V352V+C370S	2	2	0	5	4	1	0.410*	0.650*	0.480*
KL G-395A+V352V+S370S	0	0	0	1	0	1	0.480*	1.000*	0.480*
KL A-395A+F352F+C370C	9	5	4	7	2	5	0.690	0.480*	0.910*
KL A-395A+F352F+C370S	5	2	3	10	6	4	0.160	0.260*	0.920*
KL A-395A+F352F+S370S	0	0	0	1	1	0	0.490*	0.490*	1.000*
KL A-395A+F352V+C370C	11	10	1	0	0	0	0.001	0.005*	1.000*
KL A-395A+F352V+C370S	16	9	7	4	4	0	0.009	0.180	0.028*
KL A-395A+F352V+S370S	1	1	0	0	0	0	1.000*	1.000*	1.000*
KL A-395A+V352V+C370C	1	0	1	0	0	0	1.000*	1.000*	1.000*
合计	317	191	126	301	184	117			

注:*,因 $1 \leq T < 5$,采用连续校正 χ^2 检验。☆, $T < 1$,采用 Fisher 确切检验(用 P 值表示)

施显得更为重要。现已研究证实 CHD 的发生、发展常与遗传因素、环境因素以及生活方式等因素密切相关,如年龄、性别、高血压、血脂异常、糖尿病以及吸烟、肥胖及活动减少等。特别是人类基因组计划实施以来,人们对基因及其功能研究取得长足进步,先后证实多种基因突变正是某些疾病的发病机制,而有关 CHD 分子生物学机制的研究也不断有新突破,如涉及包括 RAS 系统、肾上腺素能受体以及一氧化氮合酶等基因多态性均与 CHD 发病有关。

KL 基因是由 Kuro 等发现的与人类寿命和多种疾病表型密切相关的基因。近年来人们针对 KL G-395A、F352V 和 C370S SNP 与 CHD 的相关性研究取得初步结果。Imamura 等^[10]研究证实日本人群 KL G-395A 突变 A 等位基因因其 CHD 的独立预测因子,而在韩国人群中 Rhee 等^[11]研究报道 KL G-395A 中 A 等位基因携带者却不易患 CHD。国外学者 Aking 等^[1-3]研究发现在非洲裔美国人、北欧犹太教徒以及波希米亚捷克人群 KL-VS 突变基因与其 CHD、脑卒中(如脑梗死)等疾病有密切相关性,并发现 KL-VS 等位基因是其早发 CHD 的独立危险因素;而有关 KL-VS 多态性与中国人群 CHD 相关关系研究尚未见报导。

本文研究对象 KL G-395A、KL F352V 和 KL C370S SNP 等位基因频率分布经 *Harding-Weinberg* 平衡检验,其结果显示 KL G-395A 等位基因型分布满足 *Harding-Weinberg* 平衡;而 KL F352V 和 KL C370S 2 位点等位基因型分布不符合 *Harding-Weinberg* 平衡($P<0.05$)。究其 KL F352V 和 KL C370S 2 位点等位基因型分布不满足 *Harding-Weinberg* 平衡原因可能与选择人群年龄分布、人群样本量偏小以及所选人群并非来自闭合型社区(即存在自由迁入、迁出以及并非完全自由婚配等情况)有关。此外,还可能与 KL F352V 和 KL C370S SNP 杂合子基因型所占比例较高有关,这与文献报道^[2]KL F352V 和 KL C370S SNP 存在着杂合子优势有关。

本文通过研究发现 CHD 组 KL 基因 G-395A SNP 中 AA 等位基因频率较正常对照组增高;并按性别分层研究,发现在男性 CHD 亚组其 G-395A AA 等位基因频率较其男性对照亚组增高,这就提示 G-395A SNP 与 CHD 的有明确相关性。王虎林等^[12]研究也发现, Klotho 基因 G-395A 多态性的 A 等位基因与其外周动脉硬化有相关性。Jo 等^[13]研究发现在韩国人群 Klotho 基因 G-395A 多态性的 A 等

位基因可能与其 CHD 有关。

本文通过研究发现 CHD 组 KL F352V SNP 中 FF、FV 和 VV 频率较正常对照组差异无统计学意义($P>0.05$), KL C370S SNP 中 CC 等位基因频率较正常对照组增高,差异有统计学意义($P<0.05$),提示 CC 携带者更易患 CHD;而 KL C370S CS 与 SS 频率较对照组低,也就是说 CS 与 SS 等位基因携带者不易患 CHD。若按性别分层,CHD 男性亚组 KL C370S CC 等位基因频率较正常对照组高,即 CC 等位基因男性携带者更易患 CHD;同时 CHD 组男性亚组 CS/SS 基因型频率也较男性对照组低,差异有统计学意义,即 CS/SS 基因型男性携带者不易患 CHD。国内华明娟等^[9]研究也发现 KL 基因 F352V 和 C370S SNP 中 FV 及 CS 杂合子等位基因携带者不易患冠状动脉硬化性心脏病;而国外学者 Tavakkoly-Bazzaz 等^[14]在研究伊朗人 KL 基因 F352V 和 C370S SNP 与 CHD 的关系时,却未能证实 KL 基因 F352V 和 C370S SNP 突变基因与其 CHD 有相关性,这就说明 KL 基因 F352V 和 C370S 单核苷酸多态性在不同种族的作用中具有种族差异性,为此尚需进一步深入研究加以证实。

近年有关 KL 基因单核苷酸多态性及其组合分布与疾病的研究报道甚少。如国内学者刘晓林等^[15]研究 KL 基因 G-395A、C370S、F352V SNP 及其组合基因型与汉族老年人高血压的相关性时,发现在老年男性 KL 基因 G-395A SNP 与高血压病有明确相关性;而组合分布研究则发现 KL G-395A+F352V+C370C、KL A-395A+F352V+C370C 及 KL A-395A+F352V+C370S 组合基因型与老年高血压病有关,并存在性别差异性,这就提示研究基因多态性组合分布比单一位点更有临床价值。

本文通过研究 KL 基因 G-395A、F352V、C370S SNP 组合分布与 CHD 关系时,发现 CHD 组 KL G-395A+F352V+C370C、KL A-395A+F352V+C370C 与 KL A-395A+F352V+C370S 组合基因型分布频率较正常对照组明显增高($P<0.05$),而其 KL G-395A+F352V+C370S 组合基因型分布频率较正常对照组低,其差异有统计学意义($P<0.05$)。按性别分层研究,发现在 CHD 组男性患者中 KL G-395A+F352V+C370C、KL A-395A+F352V+C370C 组合基因型频率亦较正常对照男性亚组明显增高,差异有统计学意义($P<0.05$);而在 CHD 男性组 KL G-395A+F352V+C370S 组合基因型分布频率较正常对照男性亚组

低,其差异也有统计学意义($P<0.05$)。另外发现在女性 CHD 亚组患者 KA-395A+F352V+C370S 组合分布基因型分布频率较正常对照女性亚组明显增高,差异有统计学意义($P<0.05$)。即上述研究结果表明 KL G-395A+F352V+C370C、KL A-395A+F352V+C370C 与 KL A-395A+F352V+C370S 组合基因型携带者可能患冠心病风险高;而 KL G-395A+F352V+C370S 组合基因型携带者则患冠心病风险低,并存在着性别上的差异,这就为开展早期筛选冠心病的高危人群基因研究提供新线索。

综上,本研究发现 KL 基因型 G-395A SNP AA 男性携带者易患 CHD,而 KL C370S SNP CS 男性携带者则不易患 CHD。组合分布研究还发现 KL G-395A+F352V+C370C、KL A-395A+F352V+C370C 男性携带者与 KL A-395A+F352V+C370S 女性携带者易患 CHD,而 KL G-395A+F352V+C370S 男性携带者则不易患 CHD。

参 考 文 献

- [1] Aking D E, Krebsova A, Macek M Sr, et al. Association between a functional variant of Klotho[J]. *Proc Natl ACHD Sci USA*, 2002, 99(2): 856-861.
- [2] Aking D E, Atzmon G, Aring A, et al. Association between a functional variant of Klotho gene and high-density lipoprotein cholesterol, blood pressure, stroke, and longevity[J]. *Circ Res*, 2005, 96(4): 412-458.
- [3] Aking D E, Becker D M, Yanek L R, et al. Klotho gene variants and the risk of early-onset occult coronary artery disease[J]. *Am J Hum Genet*, 2003, 72(5): 1154-1161.
- [4] 高润霖. 慢性稳定性心绞痛诊断和治疗指南[J]. *中华心血管病杂志*, 2007, 35(3): 195-206.
- [5] 胡大一. 慢性稳定性心绞痛和非 ST 段抬高心肌梗死诊断和诊疗指南[J]. *中华心血管病杂志*, 2007, 35(4): 295-304.
- [6] 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.
- [7] 华明娟, 马厚勋, 牛永红, 等. Association of three single nucleotide polymorphism site distribution of Klotho gene with diseases[J]. *China Journal of Modern medicine*, 2008, 18(9): 1174-1178.
- [8] 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.
- [9] 田小春, 马厚勋, 刘晓林, 等. 重庆地区汉族老年人 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.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] 王虎林, 司良毅, 孙兰英, 等. Klotho 基因 G-395A 多态性与动脉硬化的相关性研究[J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2008, 10(2): 96-98.
- [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] Tavakkoly-Bazzaz J, Tabatabaei-Malazy O, Tajmir-Riahi M, et al. Absence of kl-vs variant of klotho gene in Iranian cardiac patients (comparison to the world populations)[J]. *Dis Markers*, 2011, 31(4): 211-244.
- [15] 刘晓林, 马厚勋, 田小春, 等. Klotho 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.
- [16] Liu X L, Ma H X, Tian X C, et al. Association of single nucleotide polymorphism and combination genotype distributions of the KL gene with essential hypertension in the aged[J]. *Journal of Chongqing Medical University*, 2010, 36(4): 389-393.

(责任编辑:冉明会)