

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.15.010

CIDE B/C 基因多态性与高三酰甘油血症相关性研究*

刘莉¹, 平智广^{2△}, 詹芳芳², 戚敏杰², 黄忻¹

(郑州大学:1. 基础医学院组织学与胚胎学教研室; 2. 公共卫生学院流行病学与卫生统计学教研室, 郑州 450001)

[摘要] **目的** 通过分析 CIDE B/C 基因多态性的人群分布特征, 探明 CIDE B/C 基因多态性与中国河南汉族人群血三酰甘油(TG)水平的关系。**方法** 选取 528 例无亲缘关系研究对象, 男 198 例, 女 330 例, 平均年龄(52.23 ± 13.41)岁, 以 1.70 mmol/L 为 TG 界值, 将研究对象分为高三酰甘油血症(HTG)组(181 例)和正常三酰甘油组(NTG 组, 347 例)。检测 CIDE B/C 基因的 7 个 SNP, 采用 SHEsis 进行基因单倍型研究, 分析两种基因的单倍型与 TG 的关系。**结果** 分析显示 rs2144492、rs2281472、rs2144493 位点与 TG 有关, 其中 rs2144492 的 A 等位基因、rs2281472 和 rs2144493 的 C 等位基因具有保护作用, 携带上述等位基因的个体 TG 水平相对较低。CIDE B 基因的 ATCC 单倍型在 NTG 组比例较高, 具有保护作用, OR 及其 95% CI 为 0.698 (0.490~0.992)。**结论** CIDE B/C 基因多态性及 CIDE B 基因的 ATCC 单倍型对 HTG 的发生风险存在一定作用。

[关键词] 甘油三酯类; CIDE; 基因多态性; 单倍型**[中图分类号]** R589.2**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2016)15-2061-04

The relation between gene polymorphisms of CIDE B/C and hypertriglyceridemia*

Liu Li¹, Ping Zhiguang^{2△}, Zhan Fangfang², Qi Minjie², Huang Xin¹

(1. Teaching and Research Section of Histology and Embryology, Basic Medical College; 2. Teaching and Research Section of Epidemiology and Health Statistics, College of Public Health, Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450001, China)

[Abstract] **Objective** To determine the possible effect of CIDE B/C gene polymorphism and haplotypes on hypertriglyceridemia (HTG) in Han group. **Methods** 528 unrelated subjects were selected (198 males, 330 females) with the mean age of 52.23 ± 13.41 years old. According to the criteria of triglyceride (TG) ≥ 1.70 mmol/L (150 mg/dl), 181 persons were arranged into HTG (hypertriglyceridemia) group and 347 persons were in NTG (normal triglyceride) group. A total of 7 SNPs in CIDE B and CIDE C genes were detected. The relationship between these ten SNPs and TG were analyzed under additive inheritance pattern by logistic regression. SHEsis online were used to get the haplotypes and their effects on TG. **Results** rs2144492, rs2281472 and rs2144493 were associated with TG. The frequency of ATCC, haplotype of CIDE B, was higher in NTG group. OR and its 95% confidence interval was 0.698 [0.490~0.992]. **Conclusion** ATCC of CIDE B/C gene polymorphism may be related to the occurrence of HTG.

[Key words] triglycerides; CIDE; gene polymorphism; haplotype

慢性代谢性疾病已成为影响生命质量和增加各国财政负担的全球性重要公共卫生问题^[1]。高三酰甘油血症(hypertriglyceridemia, HTG)作为患病率很高的代谢异常, 已成为冠心病、高血压、2 型糖尿病、非酒精性肝病等的主要危险因素之一^[2]。大量研究证实, 遗传因素在 HTG 的发生、发展中确实起着重要作用^[3-5], 虽有单位点突变导致的少数病例, 但大多数研究显示 HTG 是由多个基因共同作用的结果。

CIDE (cell death-inducing DNA fragmentation factor 45-like effector) 家族包括 CIDE A、CIDE B 和 CIDE C [小鼠中 CIDE C 被称为脂肪特异性蛋白 27 (fat special protein 27, FSP27)]^[6] 主要分布于棕色脂肪组织 (brown adipose tissue, BAT), 肝脏和白色脂肪组织 (white adipose tissue, WAT)^[7]。该家族最初被认为与哺乳动物的细胞凋亡有关^[6,8]。近来研究发现 CIDE 蛋白在脂质贮存、脂滴形成、脂质分解等脂质代谢过程中发挥重要作用, 并与肥胖、糖尿病、脂肪肝等疾病的发生、发展有关^[9-11]。然而, 迄今为止, 关于 CIDE 家族与血三酰甘油 (triglyceride, TG) 的研究主要集中在动物实验和细胞水

平, 而人群中 CIDE 基因多态性与 TG 的关系仍未被揭示。

由于 HTG 是多基因遗传的复杂性疾病, 发病往往为多个微效基因共同作用所致, 而且单倍型致病研究是探索基因多态性与疾病关系的一个重要途径^[12]。因此, 本研究将对人群 CIDE B 和 CIDE C 基因的 7 个多态性位点及单倍型与 TG 水平的关系进行了分析。

1 资料与方法

1.1 一般资料 通过现场横断面调查获得 528 例无亲缘关系汉族个体, 其中男 198 例, 女 330 例, 平均年龄(52.23 ± 13.41)岁。根据 TG 水平将研究对象分为 HTG 组 (TG ≥ 1.70 mmol/L) 和正常 TG 组 (NTG 组, TG < 1.70 mmol/L)^[13]。HTG 组 181 例, 男 62 例, 女 119 例, 平均年龄(53.41 ± 11.22)岁; NTG 组 347 例, 男 136 例, 女 211 例, 平均年龄(51.62 ± 14.39)岁。两组间性别、年龄比较, 差异无统计学意义 (P > 0.05), 具有可比性。

1.2 方法

1.2.1 单核苷酸多态性 (SNP) 检测 所有调查对象抽取肘静

表 1 CIDE B 和 CIDE C 基因 7 个 SNP 位点信息

基因	SNP 位点	染色体	位置	W>M*	突变引起的功能变化	MAF
CIDE B	rs2144492	14	24308205	A>C	内含子变异	A=0.0950
CIDE B	rs2332320	14	24307013	T>C	内含子变异	C=0.2158
CIDE B	rs2281472	14	24306640	C>T	内含子变异	C=0.2516
CIDE B	rs2144493	14	24305411	C>T	下游变异	C=0.0849
CIDE C	rs17222536	3	9867251	G>A	His213/His200/His210	A=0.0523
CIDE C	rs391709	3	9873902	C>A	内含子变异	C=0.2424
CIDE C	rs462378	3	9875970	G>A	内含子变异	G=0.2782

* W:野生型等位基因;M:突变型等位基因。

表 2 CIDE B 和 CIDE C 基因 7 个 SNP 位点引物信息

基因	SNP 位点	分型方法	上游引物(3'-5')	下游引物(3'-5')
CIDE B	rs2144492	snapshot	CTTATGGCTTCTCCAGTAGGT	GTATGTGTGTCTTTGGTGATGA
CIDE B	rs2332320	LDR	CTCTGTGCCAGGTATGAGGAC	GCAGGAGATAGGGAGAGTTCCG
CIDE B	rs2281472	LDR	AAAACCTGAAGAACACGGAGAGC	CCATTCAGCAGTAGGGTCTCC
CIDE B	rs2144493	LDR	TCAGCATAACGCCTCACATCC	GGGGAGTTTATAGGGACAGGAGG
CIDE C	rs17222536	LDR	CTGCAGTATCTTCAGACAGGT	ACCTACTTCGTGGTTTTGACT
CIDE C	rs391709	snapshot	CTCAGGACATTTACAACCACA	GTATTCAGAAACCGAGACCAG
CIDE C	rs462378	LDR	AGCACCAAGTCCAGGTTAGAG	TTCTAAGTTTCCCTCCCTATTTC

表 3 两组 CIDE B 和 CIDE C 基因 SNP 位点等位基因、基因型分布

SNP	NTG 组					HTG 组				
	WW	WM	MM	HWE χ^2	HWE <i>P</i>	WW	WM	MM	HWE χ^2	HWE <i>P</i>
rs2144492	225	111	11	0.365	0.546	133	45	3	0.132	0.716
rs2332320	88	169	90	0.233	0.629	39	92	50	0.075	0.784
rs2281472	12	118	217	0.695	0.404	4	47	130	0.011	0.918
rs2144493	12	115	220	0.414	0.520	4	46	131	0.000	0.987
rs17222536	343	4	0	0.012	0.914	181	0	0	0.000	1.000
rs391709	15	112	220	0.024	0.876	6	76	99	3.599	0.058
rs462378	16	110	221	0.236	0.627	7	74	100	2.229	0.135

脉血 2 mL,血清用于测量 TG 水平,白细胞用于提取 DNA 并检测 SNP。

1.2.2 SNP 的选择 在 CIDE B 和 CIDE C 基因上分别选择了 4 个和 3 个 SNP,筛选依据为满足下列条件之一:(1)已报道与 TG 或代谢异常有关;(2)具有杂合性且最小等位基因频率(minor allele frequency,MAF) >0.05 ;(3)所在基因片段能够引起功能性改变。所选 SNP 位点的详细信息见表 1。

1.2.3 基因分型 采用 Promega 公司的基因组 DNA 提取试剂盒按说明书操作提取 DNA,并采用琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量。采用 snapshot 或连接酶技术(ligase detection reaction,LDR)进行 SNP 分型。引物信息见表 2。

1.3 统计学处理 利用 Microsoft Excel 2003 进行哈温平衡检验。采用 SHEsis^[14] 在线软件(<http://analysis.bio-x.cn/myAnalysis.php>)分析 CIDE B/C 基因的单倍型及其与 TG 水平的关系。采用 SPSS21.0 进行 Logistic 回归,分析 CIDE B/C 基因多态性与 TG 水平的关系。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t'* 检验。性别采用频数描述,组间比较采用 χ^2 检验。

检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组 SNP 分布特征 CIDE B 和 CIDE C 基因分型在 NTG 组和 HTG 组的分布见表 3。各位点均满足哈温平衡(Hardy-Weinberg equilibrium, HWE),差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 4 SNP 单位点与 TG 水平的 Logistic 回归结果

SNP	<i>B</i>	<i>S.E</i>	<i>Wals</i>	<i>df</i>	<i>P</i>	<i>OR</i> (95% <i>CI</i>)
rs2144492	-0.380	0.182	4.332	1	0.037	0.684 (0.478,0.978)
rs2332320	-0.109	0.129	0.712	1	0.399	0.897 (0.696,1.155)
rs2281472	-0.374	0.177	4.439	1	0.035	0.688 (0.486,0.974)
rs2144493	-0.365	0.178	4.209	1	0.040	0.694 (0.490,0.984)
rs17222536	20.564	20.096.224	0.000	1	0.999	
rs391709	0.233	0.159	2.156	1	0.142	1.262 (0.925,1.723)
rs462378	0.228	0.157	2.107	1	0.147	1.256 (0.923,1.708)

2.2 SNPs 单位点与 TG 水平的关系 采用 Logistic 回归按

加性遗传模式对各位点与高 TG 的关系进行分析,结果见表 4。rs2144492、rs2281472、rs2144493 位点与 TG 水平的关系差异有统计学意义($P < 0.05$),其中 rs2144492 的 A 等位基因、rs2281472 和 rs2144493 的 C 等位基因具有保护作用,携带上述等位基因的个体 TG 水平相对较低。rs17222536 位点因 A 等位基因频率较低,估计误差较大,故其 OR 值及其 95%CI 未列出。

2.3 单倍型与 TG 的关系 采用 SHEsis 在线软件分别估算 CIDE B、CIDE C 基因 SNP 的连锁不平衡系数(表 5、6),根据 D' 和 r^2 可知 CIDE B、CIDE C 基因的 SNPs 位点存在连锁不平衡,进而估计各基因的单倍型及其频率,计算相应的频数,整理结果见表 7。CID E/B 基因常见单倍型为 CCTT(50.38%)、CTTT(30.78%)和 ATCC(17.23%),CIDE C 基因常见单倍型为 GAA(77.94%)和 GCG(21.12%)。结果显示,CIDE B 基因的 ATCC 单倍型在组间存在差异,其在 HTG 组的比例较低,具有保护作用,OR 及 95%CI 为 0.698(0.490~0.992)。

表 5 CIDE B 各 SNP 的连锁不平衡参数

SNP	rs2144492	rs2144493	rs2281472	rs2332320
rs2144492		0.987(D')	0.986(D')	0.984(D')
rs2144493	0.918(r^2)		1.000(D')	0.913(D')
rs2281472	0.895(r^2)	0.975(r^2)		0.915(D')
rs2332320	0.215(r^2)	0.196(r^2)	0.202(r^2)	

表 6 CIDE C 各 SNP 的连锁不平衡参数

SNP	rs17222536	rs391709	rs462378
rs17222536		1.000(D')	1.000(D')
rs391709	0.014(r^2)		0.983(D')
rs462378	0.014(r^2)	0.967(r^2)	

表 7 CIDE B、CIDE C 单倍型组间分布频率[n(%)]

基因	单倍型类型	HTG 组	NTG 组	χ^2	P	OR(95% CI)
CIDE B	CCTT	189(52.21)	343(49.42)	0.498	0.480	1.097 (0.849~1.417)
CIDE B	CTTT	118(32.60)	207(29.83)	0.789	0.375	1.132 (0.861~1.490)
CIDE B	ATCC	51(14.09)	131(18.88)	4.041	0.044	0.698 (0.490~0.992)
CIDE B	其他	4(1.10)	13(1.87)			
CIDE C	GAA	273(75.41)	550(79.25)	2.653	0.103	0.776 (0.572~1.053)
CIDE C	GCG	87(24.03)	136(19.60)	2.653	0.103	1.289 (0.949~1.750)
CIDE C	其他	2(0.55)	8(1.15)			
合计		362(100)	694(100)			

3 讨 论

本研究检测了 CIDE B/C 基因的多态性,并分析了基因多态性、单倍型与 TG 水平的关系。研究发现,rs2144492、rs2281472、rs2144493 位点与 TG 水平具有统计学关联,其中 rs2144492 的 A 等位基因、rs2281472 和 rs2144493 的 C 等位基因具有保护作用,那么,rs2144492 的 G 等位基因、rs2281472 和 rs2144493 的 T 等位基因则是危险等位基因。此前虽未见有关多态性与 HTG 风险之间的相关报道,但本研究的结果依然得到了有关 CIDE B/C 的功能研究的支持。

CIDE 家族包括 3 种蛋白:CIDE A、CIDE B 和 CIDE C(或称 Fsp27),其在哺乳动物中,分别主要表达于棕色脂肪、肝脏和白色脂肪^[15]。考虑到成人体内棕色脂肪较少,因此本研究重点研究了 CIDE B 和 CIDE C 基因。近年研究表明,CIDE 蛋白与脂质代谢调节密切相关^[16]。CIDE 家族所有成员都在脂滴的聚集、融合中发挥重要作用^[17-20]。研究表明 CIDE B 在能量储存和消耗中发挥重要作用,CIDE B 缺失小鼠表现出能耗升高,血浆 TG 水平降低,胰岛素敏感性和血游离脂肪酸增加^[21]。其原因是 VLDL 包裹 TG 是在 CIDE B 的介导下完成的,CIDE B 可调控 TG 和胆固醇水平^[22]。CIDE C 属脂滴相关蛋白,可抑制脂肪分解,从而导致 TG 在脂肪细胞中的积累^[23]。即使在非脂肪细胞中,CIDE C 依然可以在诱导小脂滴融合为大脂滴的过程中发挥至关重要的作用,其分泌不足可导致小鼠脂滴分散、脂肪分解率升高^[24]。而纯合子无义突变可导致人体部分性脂肪代谢障碍,以及含多个小脂滴的脂肪细胞的出现^[25]。这些结果均表明,CIDE C 在脂质代谢、能量贮存及

血 TG 水平调节中发挥重要作用。遗憾的是,之前的研究多为动物实验或细胞水平的研究,尚少见 CIDE B/C 人群基因多态性与血 TG 水平之间关系的研究。因此,本研究的结果将为明确 CIDE B、CIDE C 基因与 TG 水平的关系并将相应的遗传因素作为防治脂质代谢紊乱疾病的分子靶点提供理论依据。

虽然目前少见这 7 个多态性位点与 HTG 关系的研究供对比。但已有报道:PGC-1、PPAR 和 PLIN 等重要的脂滴相关蛋白,其基因多态性均与 HTG 相关,而与细胞内脂质代谢关系密切的 CIDE B/C,其与 PGC-1、PPAR 和 PLIN 等蛋白极其密切的关系亦渐渐被揭示,这些研究间接支持了本研究结果。PGC-1 在将细胞质中的 TG 装配入 VLDL 分泌小室并促进 VLDL 分泌中起着重要的作用,而该功能是通过诱导 CIDE B 行使的^[26]。Kim 等^[23]研究发现在调节脂肪细胞中脂质代谢及脂质贮存方面举足轻重的 PPAR γ 2 是通过诱导 CIDE C 而发挥作用的。FSP27 与 PLIN 在调节脂肪细胞中脂滴的大小方面发挥协同作用^[27]。目前,已有多项研究表明 PGC-1^[28]、PPAR^[2]、PLIN^[29]等的基因多态性与脂代谢有关。本研究亦证实与 PGC-1、PPAR、PLIN 关系密切的 CIDE B/C 基因多态性也与 TG 相关。

综上所述,本研究通过检测中国河南汉族人群 CIDE B/C 多态性并通过单位点和单倍型分析证实了 CIDE B/C 多态性与 TG 水平有关。另外,CIDE B/C 与其他脂代谢相关基因的交互作用也值得进一步研究。

参考文献

[1] Shah A, Rader DJ, Millar JS. The effect of PPAR-alpha

- agonism on apolipoprotein metabolism in humans [J]. *Atherosclerosis*, 2010, 210(1): 35-40.
- [2] Gu SJ, Liu MM, Guo ZR, et al. Gene-gene interactions among PPAR α / δ / γ polymorphisms for hypertriglyceridemia in Chinese Han population[J]. *Gene*, 2013, 515(2): 272-276.
- [3] Aguilar-Salinas CA, Tusie-Luna T, Pajukanta P. genetic and environmental determinants of the susceptibility of amerindian derived populations for having hypertriglyceridemia[J]. *Metabolism*, 2014, 63(7): 887-894.
- [4] Rosenthal EA, Ranchalis J, Crosslin DR, et al. Joint linkage and association analysis with exome sequence data implicates SLC25A40 in hypertriglyceridemia [J]. *Am J Hum Genet*, 2013, 93(6): 1035-1045.
- [5] Behar DM, Adler L, Basel-Vanagaite L. Severe hypertriglyceridemia in an infant of Arab descent[J]. *Isr Med Assoc J*, 2013, 15(1): 53-54.
- [6] Ito M, Nagasawa M, Omae N, et al. Differential regulation of CIDEA and CIDEc expression by insulin via Akt1/2- and JNK2-dependent pathways in human adipocytes[J]. *J Lipid Res*, 2011, 52(8): 1450-1460.
- [7] Gong J, Sun Z, Li P. CIDE proteins and metabolic disorders[J]. *Curr Opin Lipidol*, 2009, 20(2): 121-126.
- [8] Liang L, Zhao M, Xu Z, et al. Molecular cloning and characterization of CIDE-3, a novel member of the cell-death-inducing DNA-fragmentation-factor (DFF45)-like effector family[J]. *Biochem J*, 2003, 370(Pt 1): 195-203.
- [9] Li JZ, Ye J, Xue B, et al. Cideb regulates diet-induced obesity, liver steatosis, and insulin sensitivity by controlling lipogenesis and fatty acid oxidation[J]. *Diabetes*, 2007, 56(10): 2523-2532.
- [10] Kim JY, Liu K, Zhou S, et al. Assessment of fat-specific protein 27 in the adipocyte lineage suggests a dual role for FSP27 in adipocyte metabolism and cell death[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2008, 294(4): E654-667.
- [11] Li YH, Lei T, Chen XD, et al. Molecular cloning, chromosomal location and expression pattern of porcine CIDEa and CIDEc[J]. *Mol Biol Rep*, 2009, 36(3): 575-582.
- [12] Crawford DC, Nickerson DA. Definition and clinical importance of haplotypes[J]. *Annu Rev Med*, 2005, 56: 303-320.
- [13] 中国成人血脂异常防治指南制订联合委员会. 中国成人血脂异常防治指南[J]. *中华心血管病杂志*, 2007, 35(5): 390-419.
- [14] Li ZQ, Zhang Z, He ZD, et al. A partition-ligation-combination-subdivision EM algorithm for haplotype inference with multiallelic markers: update of the SHEsis [J]. *Cell Res*, 2009, 19(4): 519-523.
- [15] Wu C, Zhang Y, Sun Z, et al. Molecular evolution of Cide family proteins: novel domain formation in early vertebrates and the subsequent divergence[J]. *BMC Evol Biol*, 2008, 8: 159.
- [16] Barneda D, Frontini A, Cinti S, et al. Dynamic changes in lipid droplet-associated proteins in the "browning" of white adipose tissues [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1831(5): 924-933.
- [17] Xu L, Zhou L, Li P. CIDE proteins and lipid metabolism [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012, 32(5): 1094-1098.
- [18] Christianson JL, Boutet E, Puri V, et al. Identification of the lipid droplet targeting domain of the Cidea protein [J]. *J Lipid Res*, 2010, 51(12): 3455-3462.
- [19] Singaravelu R, Lyn RK, Srinivasan P, et al. Human serum activates CIDEb-mediated lipid droplet enlargement in hepatoma cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 441(2): 447-452.
- [20] Gong J, Sun Z, Wu L, et al. Fsp27 promotes lipid droplet growth by lipid exchange and transfer at lipid droplet contact sites[J]. *J Cell Biol*, 2011, 195(6): 953-963.
- [21] Li JZ, Lei Y, Wang Y, et al. Control of cholesterol biosynthesis, uptake and storage in hepatocytes by Cideb [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1801(5): 577-586.
- [22] Zhang LJ, Wang C, Yuan Y, et al. Cideb facilitates the lipidation of chylomicrons in the small intestine[J]. *J Lipid Res*, 2014, 55(7): 1279-1287.
- [23] Kim YJ, Cho SY, Yun CH, et al. Transcriptional activation of Cidec by PPAR γ 2 in adipocyte [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 377(1): 297-302.
- [24] Jambunathan S, Yin J, Khan W, et al. FSP27 promotes lipid droplet clustering and then fusion to regulate triglyceride accumulation [J]. *PLoS One*, 2011, 6(12): e28614.
- [25] Rubio-Cabezas O, Puri V, Murano I, et al. Partial lipodystrophy and insulin resistant diabetes in a patient with a homozygous nonsense mutation in CIDEc [J]. *EMBO Mol Med*, 2009, 1(5): 280-287.
- [26] Chen Z, Norris JY, Finck BN. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α (PGC-1 α) stimulates VLDL assembly through activation of cell death-inducing DFFA-like effector B (CideB) [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(34): 25996-26004.
- [27] Grahn TH, Zhang Y, Lee MJ, et al. FSP27 and PLIN1 interaction promotes the formation of large lipid droplets in human adipocytes [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 432(2): 296-301.
- [28] Ambye L, Rasmussen S, Fenger M, et al. Studies of the Gly482Ser polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 α (PGC-1 α) gene in Danish subjects with the metabolic syndrome [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2005, 67(2): 175-179.
- [29] 王姣锋. PLIN 14995(A/T)多态性与肥胖、血脂、血糖及血压水平的关系[D]. 郑州: 郑州大学, 2007.