

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.23.012

老年汉族人群 KL 基因 G-395A 多态性与冠状动脉粥样硬化性心脏病及胱抑素 C 水平的相关性分析*

刘 玮,张韶英[△],徐慧敏,管斯斯
(湖北省武汉市中心医院老年科 430014)

[摘要] **目的** 研究华中地区老年汉族人群 Klotho(KL) 基因的 G-395A 位点多态性与冠状动脉粥样硬化性心脏病(以下简称冠心病)及胱抑素 C(Cys-C)水平的相关性。**方法** 选取该院老年科(年龄大于或等于 60 岁)汉族冠心病患者 138 例(冠心病组),无冠心病老年人 140 例(对照组)作为研究对象,用 TaqMan 基因探针法分别检测两组 KL 基因 G-395A 位点的基因型,并分析该位点基因多态性与冠心病及血清 Cys-C 水平的相关性。**结果** 与对照组相比,冠心病组 KL 基因的 G-395A 位点 GG 基因型频率明显增高($P < 0.05$),AA 基因型和 AG 基因型的频率差异无统计学意义($P > 0.05$)。无论在对照组还是冠心病组,GG 基因型的人 Cys-C 水平均高于 AA 和 AG 基因型。**结论** 在华中地区老年汉族人群中,KL 基因的 G-395A 位点为 GG 基因型的人患冠心病的风险较高。KL 基因 G-395A 位点的基因突变可能通过影响血 Cys-C 水平,抑制动脉粥样硬化的发生发展。

[关键词] Klotho 基因;多态性,单核苷酸;半胱氨酸蛋白酶抑制剂;冠心病;老年人

[中图分类号] R543.3

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2017)23-3206-03

Association of KL gene G-395A polymorphisms with coronary heart disease and serum cystatin C level in the elderly Chinese Han population in central China*

Liu Wei, Zhang Shaoying[△], Xu Huimin, Guan Sisi

(Department of Geriatrics, the Central Hospital of Wuhan city, Wuhan, Hubei 430014, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the single nucleotide polymorphism at G-395A site of the Klotho (KL) gene and to analyze its correlation with the coronary heart disease (CHD) and serum Cystatin C (Cys-C) level in the elderly Chinese Han population in central China. **Methods** A case-control study was conducted in 278 elderly Chinese Han population in this department, who were divided into CHD group (138 cases) and control group (140 cases) according to bear angiography coronary or not. G-395A polymorphism of KL gene was determined by TaqMan Gene probe method, and the relationship between G-395A polymorphism and coronary heart disease and serum Cys-C level was analyzed. **Results** Compared with the control group, the frequency of GG genotype of G-395A in CHD group was significantly higher, and the frequency of AA genotype and AG genotype was not statistically significant. The levels of Cys-C in the GG genotype were higher than those in the AA and AG genotypes both in the control group and coronary heart disease group. **Conclusion** In the elderly Han population in central China, the risk of suffering coronary heart disease is higher among the GG genotype of the G-395A locus of the KL gene. KL gene G-395A site gene mutation may affect the development of atherosclerosis by affecting blood Cys-C levels.

[Key words] Klotho gene; polymorphism, single nucleotide; cysteine proteinase inhibitors; Atherosclerosis; aged

KL 基因是于 1997 年在小鼠体内被发现的能抑制衰老及各种衰老相关表现(如寿命缩短、骨质疏松、动脉硬化、软组织钙化、皮肤萎缩、肺气肿等)的基因^[1]。研究表明,KL 基因敲除(KL^{-/-})的小鼠在出生不久后就开始出现动脉粥样硬化的征象(如内膜增厚、主动脉钙化等),并随着增龄逐渐加重^[1]。而把外源性的 KL cDNA 转入 KL^{-/-}的小鼠体内后,其动脉粥样硬化的程度能够得到显著的改善^[2]。上述研究成果表明,KL 基因与动脉粥样硬化密切相关。然而,KL 基因参与动脉粥样硬化发生发展机制尚不明确。近年来大量研究发现,血清胱抑素 C(cystaint, Cys-C)参与了炎症反应及动脉粥样硬化的进程,与冠状动脉粥样硬化性心脏病(以下简称冠心病)的发生、发展有十分密切的关系^[3-4]。本研究拟通过对 KL 基因 G-395A 多态性位点进行基因型分析,探讨 KL 基因的 G-395A 位点多态性与华中地区老年汉族人群冠心病发病的相关性,同时通过对血清 Cys-C 水平的检测,探讨 KL 基因多态性参与冠

心病发生发展的相关机制。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2012 年 3—11 月在本院老年科病房住院的患者,随机选取老年(≥ 60 岁)住院患者 278 例(其中男 136 例,女 142 例,年龄 60~97 岁)。研究纳入标准:年龄大于或等于 60 岁,无血缘相关关系的、愿意参加项目研究者。本研究符合人体试验伦理学标准,并得到伦理委员会的批准。所有参加的研究对象均签署知情同意书。病例分组:根据冠状动脉造影和(或)冠状动脉非创伤性血管成像技术(CTA)结果将入选对象分为冠心病组(138 例)和对照组(无冠心病)。冠心病诊断标准按照 Judkin's 法:根据 1975 年美国心脏病学会分段分类法的标准将冠状动脉进行分段,至少在两个以上的 X 线片投影位置能看到冠状动脉的分支段狭窄大于或等于 50% 的可以诊断为冠心病。

1.2 方法

* 基金项目:湖北省武汉市科技局资助课题(201260523187-4);湖北省武汉市卫生和计划生育委员会科研计划资助项目(WX12C04)。作者简介:刘玮(1981—),副主任医师,博士,主要从事衰老及动脉粥样硬化机制研究。△ 通信作者,E-mail:5622788@qq.com。

1.2.1 DNA 提取 所有对象于清晨空腹抽取肘正中静脉血 5 mL,乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝,用 DNA 抽提试剂盒提取 DNA(中国大连宝生物工程技术有限公司)。

1.2.2 KL 基因 G-395A 位点单核苷酸多态性(SNP)检测 通过美国国家生物信息中心的 Gene-Bank 获取 KL 基因序列及 G-395A 位点的 SNP 信息(rs1207568)。由美国 ABI 公司合成 TaqMan 引物和探针,采用 2×TaqMan Universal PCR Master Mix 试剂盒(ABI 公司,货号 4351379,批号 P130715-008E09)进行试验,在荧光定量 PCR 仪(ABI Stepone plus 型)上进行扩增。探针 1:(VIC)-AGT CGG GAA AAG T-(MGB);探针 2:(FAM)-CAA GTC GGG GAA AG-(MGB);上游引物:5'-TAG GGC CCG GCA GGA T-3';下游引物:5'-CCT GGA GCG GCT TCG TC-3';反应体系为:40×引物和 TaqMan 探针混合物 0.5 μL,2×TaqMan Universal PCR Master Mix 10 μL,模板 DNA 2.0 μL,ddH₂O 7.5 μL,共 20 μL 反应体系。PCR 反应条件如下:95℃预变性 10 min;95℃变性 15 s,60℃退火和延伸各 1 min,共 40 个循环。

1.2.3 血清 Cys-C 水平检测 对所有入选的病例进行清晨空腹肘正中静脉采血,使用北京利德曼生化股份有限公司提供的血清测定试剂盒,由专人使用北京利德曼生化分析仪采用颗粒增强散射免疫比浊法测定血清中 Cys-C 水平。血清中 Cys-C 水平参考范围为 0.63~1.25 mg/L。

1.2.4 一般资料及生化指标录入 记录入选病例的年龄,吸烟史、体质指数(BMI)、血压、清晨空腹血糖、总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)。(1)每天吸烟超过 1 支,吸烟时间超过 1 年的记录为有吸烟史;(2)已经接受降压药物治疗,或者非同日两次以上测量收缩压(SBP)≥140 mm Hg 或舒张压(DBP)≥90 mm Hg 记录为高血压;(3)已经接受降糖药物治疗或者空腹血糖大于或等于 7.0 mmol/L,或者餐后血糖大于或等于 11.1 mmol/L 记录为糖尿病;(4)已经接受降脂药物治疗或 TC>5.7 mmol/L 或 TG>2.3 mmol/L 或 LDL>3.7 mmol/L 均记录为高血脂。

1.3 统计学处理 采用 SPSS18.0 软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验研究对象基因型与 Hardy-Weinberg 平衡定律的符合程度、组间基因型及等位基因频率比较采用 χ^2 检验,Cys-C 水平与基因型的关系应用单因素方差分析(ANVOA),以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 冠心病组与对照组的临床资料分析 冠心病组和对照组的年龄、DBP、TC、TG、BMI 差异无统计学意义(*P*>0.05);冠心病组血糖、SBP、LDL、HDL 水平、男性比例及吸烟比例明显高于对照组,而 HDL 水平明显低于对照组,差异均有统计学意义(*P*<0.05),见表 1。

2.2 冠心病组与对照组的 KL 基因 G-395A 位点多态性分布 KL 基因型的分布经 χ^2 检验符合 Hardy-Weinberg 平衡定律,具有群体代表性。与对照组比较,冠心病组 GG 基因型明显升高,AA 基因型及 AG 基因型与对照组比较差异无统计学意义(*P*>0.05);G 等位基因频率明显升高,A 等位基因频率明显降低。见表 2。

2.3 KL 基因 G-395A 位点 GG 基因型与老年冠心病的相关性 在调整年龄、性别、吸烟史、高血压、高血脂和高血糖等因素并经多元 Logistic 回归分析后,GG 基因型与老年冠心病存在相关性,GG 基因型为老年冠心病的独立危险因素,见表 3。

2.4 KL 基因 G-395A 位点多态性与血清 Cys-C 的关系 无

论在对照组还是冠心病组,GG 基因型的 Cys-C 水平均高于 AA 基因型和 AG 基因型。AA 基因型和 AG 基因型的 Cys-C 水平差异无统计学意义(*P*>0.05),见表 4。

表 1 两组基本资料比较($\bar{x} \pm s$)

项目	对照组(n=140)	冠心病组(n=138)	<i>P</i>
男性(%)	63.56	72.38	0.039
吸烟史(%)	36.35	52.46	0.023
年龄(岁)	78.43±7.31	75.47±6.45	0.486
BMI	24.48±2.26	25.14±3.02	0.672
空腹血糖(mmol/L)	5.17±0.76	6.88±0.63	0.035
SBP(mm Hg)	112.58±7.21	137.71±8.45	0.033
DBP(mm Hg)	63.65±7.47	62.57±5.18	0.567
TC(mmol/L)	4.56±0.47	4.67±0.58	0.427
TG(mmol/L)	1.58±0.35	1.78±0.26	0.467
LDL(mmol/L)	2.04±0.32	2.88±0.41	0.031
HDL(mmol/L)	1.58±0.29	1.11±0.18	0.033

表 2 KL 基因 G-395A 的多态性分布[n(%)]

基因型	冠心病组(n=138)	对照组(n=140)	<i>P</i>
G-395A 基因型频率			
GG	71(51.4)	57(40.7)	0.037
AG	36(26.1)	44(31.4)	0.314
AA	31(22.5)	39(27.9)	0.239
等位基因频率			
G	178(64.5)	158(56.4)	0.038
A	98(35.5)	122(43.6)	0.042

表 3 多元 Logistic 回归分析 KL 基因 G-395A 位点 GG 基因型与老年冠心病的关系

变量	OR	95%CI	<i>P</i>
GG 基因型	1.653	1.047~2.535	0.037
年龄	1.044	1.021~1.096	0.025
性别	2.154	1.376~2.963	0.054
吸烟史	1.386	0.897~2.143	0.257
高血压	1.396	1.213~2.254	0.179
高血糖	1.569	1.058~2.439	0.047
高血脂	1.638	1.125~2.786	0.031

表 4 KL 基因 G-395A 多态性与 Cys-C 水平的相关性($\bar{x} \pm s$,mg/L)

组别	GG	AG	AA
冠心病组	1.17±0.08	0.96±0.07 ^a	0.93±0.06 ^a
对照组	0.97±0.07	0.84±0.08 ^a	0.83±0.05 ^a

^a:*P*<0.05,与同组 GG 基因型比较比较

3 讨 论

研究证实,人类 KL 基因 G-395A 位点的多态性与心源性

脑卒中、冠心病、原发性高血压等心血管系统疾病关系密切^[5-7]。然而,国内外研究对 KL 基因 G-395A 位点的多态性与冠心病的相关性有不同的结论。Rhee 等^[7]发现在韩国 60 岁以上的人群中, KL 基因 G-395A 位点 A 等位基因对冠心病具有保护作用。而在 Imamura 等^[5]对日本人群 KL 基因 G-395A 位点多态性的研究中发现, A 等位基因携带者其冠心病患病率较高。国内在对重庆地区的汉族人群 G-395A 位点多态性的研究中发现, A 等位基因携带频率与动脉硬化呈负相关^[8]。因此推测上述不同的研究结论产生的可能原因为 KL 基因 G-395A 位点多态性与冠心病的关系可能存在着某些种族、地域和年龄效应,且与样本量的大小有关。在本研究中发现,在华中地区 60 岁以上的老年汉族人群中, A 等位基因携带者其冠心病患病率较低,这与韩国和重庆地区的相关研究结果相符^[9]。在调整年龄、性别、吸烟史、高血压、高血脂和高血糖等传统的冠心病危险因素并经多元 Logistic 回归分析后发现, GG 基因型与老年冠心病存在相关性, GG 基因型为老年冠心病的独立危险因素。本研究为探讨 KL 基因多态性与冠心病的相关性补充了一部分华中地区老年人群的数据库信息。然而,本研究仅限于单位点、单种族、单年龄段且样本量有限, KL 基因多态性与冠心病的关系有待于多位点突变的发现和多地域、多民族广泛深入的协同研究。

目前认为冠状动脉粥样斑块的形成和发展过程与细胞外基质(ECM)的重构及冠状动脉血管壁重塑有密切联系^[10-11]。Cys-C 是半胱氨酸蛋白酶抑制剂超家族 2 中的成员之一, Cys-C 通过调节半胱氨酸蛋白酶活性,参与 ECM 产生和降解的动态平衡,还可能通过影响粒细胞的吞噬与趋化功能,参与炎症过程,促进动脉粥样硬化的发生发展^[12-14],是预测冠心病患者发生心脏事件的独立危险因素。本研究发现,在华中地区 60 岁以上的老年人群中, KL 基因 G-395A 位点野生型携带者(GG 基因型)血清 Cys-C 水平无论在对照组和冠心病组均明显高于突变型携带者(GA 基因型和 AA 基因型)。基因发生突变可能导致转录决定蛋白质合成的氨基酸序列的改变,引起 Cys-C 合成和分泌量的降低,对半胱氨酸蛋白酶活性的抑制也可能减弱,减轻 ECM 的沉积及炎症反应,从而延缓冠状动脉粥样硬化的发生发展。KL 基因 G-395A 位点的 G-A 突变可能通过降低血 Cys-C 水平,减轻 ECM 的重构及冠状动脉血管壁重塑,从而抑制冠心病的发生发展。

综上所述,笔者认为在华中地区老年汉族人群中, KL 基因 G-395A 位点多态性与冠心病的发病相关, A 等位基因携带者其冠心病患病率较低, GG 基因型为老年冠心病的独立危险因素。KL 基因 G-395A 位点的基因突变可能通过影响血 Cys-C 水平,抑制冠状动脉粥样硬化的发生、发展。

参考文献

[1] Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, et al. Mutation of the mouse KL gene leads to a syndrome resembling aging [J]. *Nature*, 1997, 390(6655): 45-51.

[2] Masuda H, Chikuda H, Suga T, et al. Regulation of multiple ageing-like phenotypes by inducible klotho gene expression in klotho mutant mice [J]. *Mech Ageing Dev*, 2005, 126(12): 1274-1283.

[3] 葛长江,任芳,吕树铮,等. 血浆胱抑素 C 对冠心病的临床预测价值[J]. *中华急诊医学杂志*, 2010, 19(3): 273-276.

[4] 李庆,王聪霞,董新,等. 血清胱抑素 C、高敏 C 反应蛋白与冠状动脉粥样硬化斑块负荷的关系[J]. *西安交通大学学报(医学版)*, 2012, 33(1): 43-47.

[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] Wang HL, 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.

[7] Rhee EJ, Oh KW, Lee WY, 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.

[8] 王虎林,司良毅,孙兰英,等. KL 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.

[9] Chatzizisis YS, Coskun AU, Jonas M, et al. Role of endothelial shear stress in the natural history of coronary atherosclerosis and vascular remodeling: molecular, cellular, and vascular behavior [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2007, 49(25): 2379-2393.

[10] White AJ, Duffy SJ, Walton AS, et al. Matrix metalloproteinase-3 and coronary remodelling: implications for unstable coronary disease [J]. *Cardiovasc Res*, 2007, 75(4): 813-820.

[11] Vieira C, Nabais S, Ramos V, et al. Multimarker approach with cystatin C, N-terminal pro-brain natriuretic peptide, C-reactive protein and red blood cell distribution width in risk stratification of patients with acute coronary syndromes [J]. *Rev Port Cardiol*, 2014, 33(3): 127-136.

[12] Choe JY, Park SH, Kim SK. Serum cystatin C is a potential endogenous marker for the estimation of renal function in male gout patients with renal impairment [J]. *J Korean Med Sci*, 2010, 25(1): 42-48.

[13] Lee M, Saver JL, Huang WH, et al. Impact of elevated cystatin C level on cardiovascular disease risk in predominantly high cardiovascular risk populations: a meta-analysis [J]. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes*, 2010, 3(6): 675-683.

[14] Akgul O, Uyarel H, Ergelen M, et al. Predictive value of elevated cystatin C in patients undergoing primary angioplasty for ST-elevation myocardial infarction [J]. *J Crit Care*, 2013, 28(5): 13-20.