

网络出版时间:2016-4-19 11:04:48 网络出版地址: http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20160419.1104.010.html

新疆地区维吾尔族人群 Klotho 基因多态性及血脂成分、电解质与草酸钙肾结石关系的研究

杜广建¹, 阿不都赛买提·艾力¹, 吴冠伟¹, 袁留亚², 木拉提·马合木提¹

摘要 **目的** 探讨 Klotho 基因多态性及血脂、电解质与草酸钙结石的相关性。**方法** 采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性分析(PCR-RFLP)方法检测 128 例草酸钙结石患者(病例组)和 94 例健康志愿者(对照组) Klotho 基因 rs3752472、rs650439 和 rs1207568 位点多态性,并分析病例组与对照组中基因型分布差异以及病例组中不同基因型携带者的电解质、血脂水平差异。**结果** Klotho 基因 SNP rs3752472 多态性,其两组基因型分布差异有统计学意义($OR=3.707, 95\% CI: 1.861 \sim 7.384; \chi^2=14.912, P<0.05$),病例组中 C/C 与 C/T+T/T 基因型携带者相比较,钙磷水平差异有统计学意义($P<0.05$),血镁、血钠水平差异无统计学意义;低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)水平差异有统计学意义;三酰甘油(TG)、总胆固醇(TC)以及高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)水平比较差异无统计学意义;其余两组病例组与对照组相比较基因型分布差异无统计学意义,病例组内不同基因型携带者电解质和血脂比较差异无统计学意义。**结论** Klotho 基因 SNP rs3752472 多态性,是与新疆地区维吾尔族人群草酸钙结石发病风险相关的;在病例组中,C/C 基因型者的血钙、血磷及 LDL-C 均高于 CT+TT 者;Klotho 基因 rs3752472 多态性位点可能通过调节钙磷代谢、LDL-C 水平来影响草酸钙结石的成石。

关键词 Klotho 基因;草酸钙结石;血电解质;血脂**中图分类号** R 691.4**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2016)05-0629-04

研究^[1]表明 Klotho 基因多态性与钙磷及维生素 D 代谢、氧化应激、肾脏缺血再灌注、血脂水平等密切相关。而这些因素是草酸钙成石的机制之一。为了解 Klotho 基因与草酸钙结石形成的相关因素。该实验对 Klotho 基因多态性及血脂及电解质的相关性进行了研究。

2016-02-22 接收

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81460139)

作者单位:¹ 新疆医科大学第二附属医院泌尿外科,乌鲁木齐 830028² 兰州大学第一医院泌尿外科,兰州 730000

作者简介:杜广建,男,硕士研究生;

木拉提·马合木提,男,主任医师,博士生导师,责任作者,

E-mail: mekit@126.com

1 材料与方法

1.1 病例资料 选择 2013 年 3 月~12 月在新疆医科大学第一、二附属医院就诊的新疆地区维吾尔族草酸钙结石患者 128 例(病例组),其中男 91 例,女 37 例;年龄 33~53(43 ± 10)岁,不合并其它疾病(肥胖、糖尿病、高血压等);以及同期的新疆维吾尔族健康体检者 94 例(对照组),其中男 67 例,女 27 例;年龄 37~55(46 ± 9)岁。泌尿系结石经彩超或 X 线片确诊,术后取得结石并经结石成分分析确定为草酸钙结石后选取。

1.2 基因组 DNA 提取 抽取病例组与对照组患者空腹外周静脉血 3 ml,以乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝,采用人类基因组 DNA 提取试剂盒(上海生物工程股份有限公司)从血中提取基因组 DNA,置于 -20℃ 环境下保存。

1.3 引物设计与合成 引物设计根据 GenBank 所收录的全序列,见表 1。

表 1 引物设计

基因	序列(5'-3')	目的片段长度(bp)
rs3752472	F: CCTCCTTTACCTGAAAATCGG	104
	R: GGCCTTGGTGAGACTGCTGATT	
rs650439	F: AGGACGACCAGCTGAGGGTGTAT	104
	R: TCTGGTGACATAACCTTCAGGAGCT	
rs1207568	F: TGGACGCTCAGGTTCAATTCT	243
	R: CCTCTAGGATTTGGGCCACT	

1.4 PCR 扩增及基因型检测 PCR 扩增体系总体积为 15 μ l,上下游引物各 0.2 μ l,双链 DNA 模板 0.5 μ l,dNTP(10 mmol/L),dH₂O 11 μ l,扩增条件:第一步:95℃ 预变性 5 min,第二步:95℃ 变性 30 s,第三步:68℃ 退火 45 s,第四步:72℃ 延伸 60 s;重复第 2~4 步 20 个循环;第五步:95℃ 变性 30 s;第六步:58℃ 退火 30 s;第七步:72℃ 延伸 40 s,重复第 5~7 步 20 个循环;第八步:72℃ 延伸 6 min。采用特异性限制性内切酶 Hae III(rs3752472)、Nhe I(rs650439)和 Hpy188 III(rs1207568)消化(37℃、

12 h), 3% 琼脂糖凝胶电泳并在成像系统中判断酶切结果, 并将 PCR 产物进行测序。

1.5 采集外周静脉血 外周血 1 200 r/min 离心 15 min 后取血清, 生化仪检测血清钙、磷、钠、镁水平; 血三酰甘油(triglyceride, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、血浆低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)及高密度脂蛋白胆固醇(high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C)测定采用日本 CL-7300 全自动生化分析仪。

1.6 统计学处理 应用 SPSS 17.0 软件进行分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。基因型与草酸钙结石的关系采用 χ^2 检验; 基因型与血脂、电解质的关系采用 t 检验(满足正态分布及方差齐性时); 未满足正态分布及方差齐性时, 采用修正 t 检验。

2 结果

2.1 Klotho 基因位点多态性遗传平衡检验

Klotho 基因位点多态性基因型 Hardy-Weinberg 平衡定律检验见表 2。由表 2 可知, $P > 0.05$, 说明 3 个位点的基因型分布均符合 Hardy-Weinberg 平衡, 所选样本具有一定的代表性。

2.2 Klotho 基因单核苷酸多态性基因型的比较

Klotho 基因 rs3752472 位点有野生型 C/C、杂合型 C/T、突变型 T/T 3 种基因型; rs650439 位点有野生型 A/A、杂合型 A/T、突变型 T/T 3 种基因型; rs1207568 位点有野生型 C/C、杂合型 C/T、突变型 T/T 3 种基因型; 分别将其野生型与杂合型、突变型之和进行多态性基因型比较(表 3)。Klotho 基因 rs3752472 位点携带野生型(C/C)的人群结石发病风险明显高于携带有杂合型及突变型(C/T + T/T); 前者发生结石的危险性是后者的 3.707 倍, 差异有统计学意义($\chi^2 = 14.912, P < 0.05$)。其余两位点多态性基因型比较差异无统计学意义。

表 2 Klotho 基因位点多态性
基因型群体遗传学 Hardy-Weinberg 平衡定律检验

项目	病例组	χ^2 值	P 值	对照组	χ^2 值	P 值
rs3752472		0.569	0.451		2.369	0.124
CC	113			63		
CT	14			25		
TT	1			6		
rs650439		0.480	0.488		0.836	0.360
AA	81			56		
AT	40			31		
TT	7			7		
rs1207568		0.056	0.813		2.086	0.149
CC	74			61		
CT	46			23		
TT	8			10		

表 3 Klotho 基因 rs3752472、rs650439、rs1207568 位点
多态性基因型的比较

基因型	病例组 (n = 128 例)	对照组 (n = 94 例)	OR 值	95% CI	P 值
rs3752472					
C/C	113(88.3)	63(67.0)	1.000	-	-
C/T + T/T	15(11.7)	31(33.0)	3.707	1.861 ~ 7.384	0.000 1
rs650439					
A/A	81(63.3)	56(59.6)	1.000	-	-
A/T + T/T	47(36.7)	38(40.4)	1.169	0.677 ~ 2.020	0.575 0
rs1207568					
C/C	74(57.8)	61(64.9)	1.000	-	-
C/T + T/T	54(42.2)	33(35.1)	0.741	0.428 ~ 1.285	0.286 0

2.3 结石患者中 Klotho 基因多态性与电解质、血脂关系 比较病例组中携带野生型基因型与携带杂合型、突变型基因型者血电解质以及血脂水平(表 4)。Klotho 基因 rs3752472 位点比较病例组内携带有 C/C 基因型者与携带有 C/T + T/T 基因型者电解质、血脂水平, 前者血钙($t = 2.372, P = 0.019$)、血磷($t = 2.363, P = 0.02$)水平均高于后者, 而血镁、血钠水平差异无统计学意义; LDL-C($t = 2.226, P = 0.028$), 前者水平明显高于后者, 而 TG、TC、HDL-C

表 4 结石患者中 Klotho 基因多态性与电解质、血脂关系($\bar{x} \pm s$)

指标	rs3752472		rs650439		rs1207568	
	C/C(n = 113)	C/T + T/T(n = 15)	A/A(n = 81)	A/T + T/T(n = 47)	C/C(n = 74)	C/T + T/T(n = 54)
钠	140.900 ± 2.928	139.800 ± 3.177	141.000 ± 3.101	140.400 ± 2.704	140.900 ± 2.664	140.600 ± 3.353
镁	0.845 ± 0.082	0.849 ± 0.062	0.841 ± 0.085	0.854 ± 0.071	0.843 ± 0.080	0.849 ± 0.079
钙	2.363 ± 0.174	2.254 ± 0.106 *	2.354 ± 0.176	2.362 ± 0.160	2.359 ± 0.164	2.353 ± 0.179
磷	1.302 ± 0.319	1.099 ± 0.255 *	1.305 ± 0.336	1.255 ± 0.302	1.310 ± 0.347	1.255 ± 0.289
TG	1.331 ± 0.852	1.336 ± 1.002	1.290 ± 0.783	1.402 ± 0.999	1.248 ± 0.741	1.445 ± 1.010
TC	4.041 ± 1.071	4.152 ± 1.122	3.960 ± 1.102	4.217 ± 1.013	3.851 ± 1.000	4.050 ± 0.906
HDL-C	1.054 ± 0.305	1.050 ± 0.402	1.046 ± 0.293	1.067 ± 0.354	1.066 ± 0.292	1.037 ± 0.347
LDL-C	2.837 ± 0.757	2.387 ± 0.533 *	2.525 ± 0.887	2.721 ± 0.846	2.421 ± 0.845	2.617 ± 0.674

与 C/C 基因型比较; * $P < 0.05$

水平相比较,差异无统计学意义;Klotho 基因 rs650439、rs1207568 位点比较病例组中野生型基因型者与携带有杂合型、突变型基因型者电解质及血脂水平,各项指标差异均无统计学意义。

3 讨论

膜型 klotho 蛋白有调节钙磷代谢等作用,是成纤维生长因子 23 (FGF23) 的一个共同受体;Klotho 蛋白是 FGF23 信号转导通路的关键因子,FGF23 通过 Klotho 蛋白的介导发挥生物学作用^[2-3]。FGF23 能够抑制磷的重吸收和维生素 D 的生物合成,增加尿磷排泄和抑制血清 1,25-(OH)₂D 的水平和甲状旁腺激素合成等调节血磷水平^[4-5]。另外分泌型 Klotho 蛋白还可通过增加肾远曲小管上皮细胞瞬时受体势能离子通道 5 (transient receptor potential vanilloid 5, TRPV5) 的表达,提高钙在肾脏的重吸收;钙离子通过上皮细胞钙通道 TRPV5 蛋白介导,经远端肾小管后段和集合管上皮细胞顶膜入细胞质,与载体蛋白 Calbindin-D28k 结合并扩散至细胞外侧基底膜,通过转运蛋白 NCX1 和 PMCA1b 经基底膜入血液循环^[6]。

Telci et al^[7]用聚合酶链反应法分别对 108 例肾结石患者和 51 例年龄匹配的健康志愿者的 Klotho 基因第 2 外显子 F252V 区域 G395A 基因多态性和第 4 外显子 C1818T 基因多态性进行研究,发现 G395A 位点基因型 G/G 比 G/A 和 A/A 基因型更易患肾结石。研究^[8]显示 Klotho 基因 rs3752472 位点 CC 基因型多态性与杂合子 T/C 和纯合子 T/T 相比肾结石的风险增加了两倍。Klotho 基因多态性是肾结石形成的危险因素之一。Klotho 基因 G395A 多态性与 TRPV5、维生素 D 受体以及钙敏感受体多态性与肾结石形成有关。Klotho 基因通过改变肾脏的离子通道转运和肠道吸收在调节钙磷代谢方面起着重要作用。

据此本研究比较了 Klotho 基因多态性与血清电解质的关系,本研究显示在 Klotho 基因 rs3752472 多态性 C/C 基因型病例组中所占比例 (88.3%) 明显高于对照组 (67%);携带有野生型 (C/C) 基因型者结石发病风险与携带有突变型及杂合型 (T/T + C/T) 发病风险差异有统计学意义;且前者发生结石的风险是后者的 3.707 倍。在病例组中 C/C 基因型的比例明显高于对照组,在病例组中所占比例为 88.3%。

为了解 Klotho 基因 rs3752472 多态性影响草酸

钙结石的因素,本研究比较了病例组中 C/C 基因型与 C/T + T/T 基因型结石患者的血电解质水平,得出 C/C 基因型携带者与 C/T + T/T 基因型携带者相比血钙、血磷水平差异有统计学意义,血镁及血钠差异无统计学意义。而在 Klotho 基因 rs650439、rs1207568 病例组与对照组比较两组基因多态性差异无统计学意义,前者病例组中 A/A 基因型与 A/T + T/T 基因型结石患者的电解质水平比较差异无统计学意义;后者病例组中 C/C 基因型与 C/T + T/T 基因型结石患者的电解质水平比较差异无统计学意义。Klotho 基因 rs3752472 多态性可能通过影响血钙、血磷水平来影响新疆地区维吾尔族人群草酸钙结石的形成。

不同的遗传基因控制和影响着不同个体的脂质代谢过程。不同种族间的血脂水平差异始于儿童阶段,认为可能与遗传因素有关^[9]。Kang et al^[10]认为高 TG 的结石患者尿钙、尿钠、尿酸、尿镁、尿钾的排泄会增多;HDL-C 较低的结石患者尿钠、尿镁以及尿钾的排泄会增多;而 LDL-C 水平较高的结石患者尿钠排泄较低。Soldati et al^[11]认为结石患者与非结石患者比较血清 TG、血糖和谷草转氨酶水平通常较高。然而其并未能够从遗传的角度解释导致结石患者血脂水平高于非结石患者的原因。本研究病例组中 C/C 基因型的比例明显高于对照组,且在病例组中所占比例为 88.3%;本研究比较病例组中 C/C 基因型与 C/T + T/T 基因型结石患者的血脂水平,得出 C/C 基因型携带者与 C/T + T/T 基因型携带者相比 LDL-C 水平差异有统计学意义,而 TG、TC、HDL-C 水平差异无统计学意义。而对于病例组与对照组比较差异无统计学意义的 Klotho 基因 rs650439、rs1207568 位点基因多态性,前者病例组中 A/A 基因型与 A/T + T/T 基因型结石患者的血脂水平比较差异无统计学意义;后者病例组中 C/C 基因型与 C/T + T/T 基因型结石患者的血脂水平比较差异亦无统计学意义。因此 Klotho 基因 rs3752472 多态性可能通过影响 LDL-C 水平来影响草酸钙结石的形成和发展。

推测 Klotho 基因 rs3752472 多态性可能通过某种分子机制调节血钙、血磷、LDL-C 水平来影响新疆地区维吾尔族人群草酸钙结石的成石过程。为进一步的明确上述结论仍需要大样本来进一步研究证实。

参考文献

- [1] 孙 昕,陈 林,董晓慧,等. Klotho 蛋白与疾病的研究进展

- [1]. 中国药理学通报, 2014, 30(2): 153–5.
- [2] Hu M C, Kuro-o M, Moe O W. Klotho and kidney disease[J]. *J Nephrol*, 2010, 23 Suppl 16: S136–44.
- [3] Bernheim J, Benchetrit S. The potential roles of FGF23 and Klotho in the prognosis of renal and cardiovascular diseases[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2011, 26(8): 2433–8.
- [4] Prie D, Urena Torres P, Friedlander G. Latest findings in phosphate homeostasis[J]. *Kidney Int*, 2009, 75(9): 882–9.
- [5] Ramon I, Kleynen P, Body J J, et al. Fibroblast growth factor 23 and its role in phosphate homeostasis[J]. *Eur J Endocrinol*, 2010, 162(1): 1–10.
- [6] 何锦园, 曾国华, 吴文起, 等. 含钙肾结石患者肾组织 TRPV5 的表达及意义[J]. *临床泌尿外科杂志*, 2010, 25(11): 805–8, 811.
- [7] Telci D, Dogan A U, Ozbek E, et al. KLOTHO gene polymorphism of G395A is associated with kidney stones[J]. *Am J Nephrol*, 2011, 33(4): 337–43.
- [8] Xu C, Song R J, Yang J, et al. Klotho gene polymorphism of rs3752472 is associated with the risk of urinary calculi in the population of Han nationality in Eastern China[J]. *Gene*, 2013, 526(2): 494–7.
- [9] 叶任高. 内科学[M]. 5 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 834–7.
- [10] Kang H W, Seo S P, Kim W T, et al. Hypertriglyceridemia is associated with increased risk for stone recurrence in patients with urolithiasis[J]. *Urology*, 2014, 84(4): 766–71.
- [11] Soldati L, Bertoli S, Terranegra A, et al. Relevance of Mediterranean diet and glucose metabolism for nephrolithiasis in obese subjects[J]. *J Transl Med*, 2014, 12: 34.

Effect of Klotho gene polymorphism on the formation of calcium oxalate calculus by regulating lipid and electrolyte Uighur population of Xinjiang region

Du Guangjian, Abudusaimaiti · Aili, Wu Guanwei, et al

(Dept of Urology, The Second Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830028)

Abstract Objective To investigate the effect of Klotho gene polymorphism on the formation of calcium oxalate calculus by regulating the lipid and electrolyte. **Methods** Klotho gene rs3752472, rs650439 and rs1207568 polymorphisms were genotyped by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis (PCR-RFLP) method in 128 patients with calcium oxalate stone patients (case group) and 94 cases of healthy volunteers (control group) and the genotype distribution was compared between the two groups. The electrolytes and blood lipid levels were compared among different genotypes in the case groups. **Results** For Klotho gene rs3752472 polymorphisms, the statistical results of its genotype were odds ratio (OR) = 3.707, 95% confidence interval (CI): 1.861 ~ 7.384, $\chi^2 = 14.912$, $P < 0.05$. In the case group compared C/T with C/T + T/T genotype carriers, blood calcium, phosphorus and low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) levels had significant difference ($P < 0.05$). Serum magnesium, serum sodium, triglyceride (TG), total cholesterol (TC) and high density lipoprotein (HDL-C) levels have no statistical difference. There was no difference in genotype distribution between the case group and the control group in the other two groups and the electrolytes and blood lipid levels had no significant difference among different genotype in the other two cases group. **Conclusion** The rs3752472 polymorphisms of Klotho Gene is associated with the risk of calcium oxalate urolithiasis in Xinjiang region. In addition, in the case group, blood calcium, phosphorus and low density lipoprotein levels with C/C genotype carriers are higher than those with C/T + T/T genotype carriers. The results show that the Klotho gene rs3752472 polymorphism may regulate the metabolism of blood calcium and phosphorus and low density lipoprotein levels to influence the formation of calcium oxalate calculus.

Key words Klotho gene; calcium oxalate calculus; electrolyte; blood lipids