基础研究 文章编号:0253-3626(2010)10-1457-06

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

马厚勋,田小春,翟福利,刘晓林,金炯娜,周 平,吴 平
(重庆医科大学附属第一医院老年科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探索中国汉族人群(Klotho,KL)基因 G-395A、F352V 及 C370S 单核苷酸多态性(Single nucleotide polymorphisms,SNP)及其与心动周期信号谱特征的相关关系。方法:随机选择汉族自然人群个体 177 为研究对象[男 96,女 81 例,平均年龄(65.11 ± 10.7)岁],获取其静脉血白细胞基因组 DNA。采用等位基因特异性引物 PCR 技术检测 Klotho 基因 3 个位点的基因型,利用《HPS 谱及其混沌特征分析系统软件》检测人群的卧位心动周期信号谱(Heart period signal,HPS)参数。结果:① KL 基因 G-395A SNP AA 基因型携带者其绝对高频功率(Absolute high frequency power,AHP)及相对高频率(Relative high frequency power,RHP)参数较其 GA 携带者降低,均有显著性差异($P<0.05$);同时携带 AA 基因型者的 RHP 参数也较 GG 携带者降低,亦有显著性差异($P<0.05$)。②KL 基因 F352V SNP VV 突变基因型携带者其相对超低频率(Relative ultra-lower frequency power,RUP)、超低频/高频比值(Ratio of AUP to AHP,RUH)参数值较 FF 野生型纯合子基因型携带者低,差异有显著性($P<0.05$);携带 VV 基因型者绝对低频功率(Absolute low frequency power,ALP)、AHP、RHP 以及总功率(Total power value,TPV)较其 FF 野生型携带者高,也有显著性差异($P<0.05$);汉族人群 KL 基因 F352V 多态性的突变型 VV 基因型纯合子携带者其 RUP、RUH 参数值也较其 FV 杂合子携带者降低;突变型 VV 基因型纯合子携带者其 RHP 参数值则较 FV 杂合子携带者高,亦有显著性差异($P<0.05$)。③KL 基因 C370S 多态性的突变型 SS 基因型纯合子携带者其低频/高频比值(Ratio of absolute low frequency power to AHP,RLH)参数值较 CC 野生型纯合子携带者低有显著性差异,同时也较 CS 杂合子携带者低,其差异亦有显著性($P<0.05$)。结论:KL 基因 G-395A SNP 突变型 AA 与 AHP、RHP 减低有关;F352V SNP 突变型 VV 与 RUP、RUH 减低有关,亦与其 ALP、AHP、RHP 以及总功率(Total power value,TPV)增高有关,这就提示 klotho 基因多态性与心动周期信号谱特征的有明确相关性。

【关键词】Klotho 单核苷酸多态性; 心动周期信号
【中国图书分类法分类号】R153.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-12-22

作者介绍:马厚勋(1966-),男,主任医师,博士,
研究方向:老年心血管疾病基础与临床。

基金项目:国家自然科学基金(编号:30672212);重庆医科大学创新项目(编号:CX0507)。

[7] Stavric B,Nera E A.Use of the uricase-inhibited rat as an animal model in toxicology[J].Clin Toxicol,1978,13(10): 47-74.

[8] Nguyen M T,Awale S,Tezuka Y,et al. Hypouricemic effects of acacetin and 4,5-o-dicaffeoylquinic acid methyl ester on serum uric acid levels in potassium oxonate-pretreated rats[J]. Biol Pharm Bull,2005,28(12): 2231-2234.

[9] Zhao Y S,Zhao L N,Yang G Q,et al. Characterization of a uricase from Bacillus fastidious A.T.C.C.26904 and its application to serum uric acid assay by a patented kinetic uricase method[J].Biotechnol Appl Biochem,2006,45(2):75-80.

[10] 赵利娜,廖 飞,赵运胜. 用积分法考察黄嘌呤对 Candida species 尿酸酶的抑制作用[J].第四军医大学学报,2005,26(19):1729-1731.

[11] Kynclova E,Elsner E,Kopf A,et al. Novel method for coupling of poly (ethylene glycol) to carboxylic acid moieties of proteins [J]. J Mol Recognit,1996,9(5-6):644-651.

[12] Zhao Y S,Yang X L,Li X Y,et al. Reversible inactivation of an intracellular uricase from Bacillus fastidiosus via dissociation of homotetramer into homodimers in solutions of low ionic strength[J].Biosci Biotechnol Biochem,2009,43(9): 2141-2144.

[13] Iwaki K,Yonetani Y. Hyperuricemic effects of cholinergic agents in rats [J]. Jpn J Pharmacol,1982,32(2):343-349.

[14] Liao F,Zhao Y S,Zhao L N,et al. Kinetic method for enzymatic analysis by predicting background with uricase reaction as a model[J].J Med Coll PLA,2005, 20(6):338-344.

[15] Liao F,Zhao Y S,Zhao L N,et al. Evaluation of a kinetic uricase method for serum uric acid assay by predicting background absorbance of uricase reaction solution with an integrated method[J]. J Zhejiang Univ Sci B,2006,7(6):497-502.

[16] Zhao Y S,Yang X Y,Lu W,et al. Uricase based method for determination of uric acid in serum[J]. Michrochim Acta,2009,164(1):1-6.

[17] Meyer-Almes F J,Auer M. Enzyme inhibition assays using fluorescence correlation spectroscopy:a new algorithm for the derivation of k_{cat}/K_M and Ki values at substrate concentrations much lower than the Michaelis constant [J]. Biochem,2000,39(43):13261-13268.

[18] Sundy J S,Ganson N J,Kelly S J,et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of intravenous PEGylated recombinant mammalian urate oxidase in patients with refractory gout[J]. Arthritis Rheum,2007,56(3):1021-1028.

(责任编辑:关蕴良)

Association of klotho gene polymoRHPism with heart period signal spectrum features in the Chinese Han nationality population

MA Hou-xun, et al

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

【Abstract】*Objective*: To search for association of heart period signal spectrum features in the supine posture with single nucleotide polymorphisms of three sites of klotho G-395A, F352V and C370S in Chinese Han nationality population. *Methods*: Genomic DNA of white blood cells from 177 individuals as research objects (female 81 and male 96, age 65.11 ± 10.7 y) selected randomly from Chinese Han nationality population was gotten. The SNPs of klotho G-395A, F352V and C370S were genotyped by allele-specific primer (ASP) PCR technique. We applied the analytical software for spectral features of heart period signal (HPS) to determine the spectral parameters of heart period signal in the supine posture in this group. *Results*: ①The spectral parameters of HPS including absolute high frequency power (AHP) and relative high frequency power (RHP) in the group with AA genotype were significantly low than those in the group with GA genetype of klotho G-395A ($P<0.05$). The spectral parameter of relative high frequency power (RHP) in the group with AA genotype were significantly lower than those in the group with GG genetype of klotho G-395A ($P<0.05$). ②The spectral parameters of HPS including relative ultra-lower frequency power (RUP) and ratio of AUP to AHP (RUH) in the group with VV genotype were significantly lower than those in the group with FF genetype of klotho F352V ($P<0.05$). The spectral parameters of absolute low frequency power (ALP), absolute high frequency power (AHP), relative high frequency power (RHP) and total power value (TPV) in the group carrying VV genetype were significantly higher than those in the group with FF genetype of klotho F352V ($P<0.05$). The spectral parameters of RUP and RUH in the group with VV genotype were obviously lower than those in the group with FV genetype of klotho F352V and the value of RHP in the group with VV genotype were also much higher than that in the group with FV genetype of klotho F352V ($P<0.05$). ③The value of ratio of ALP to AHP (RLH) in the group with SS genotype was significantly lower than that in the group with CC genetype and the group carrying with CS genetype of klotho C370S ($P<0.05$). *Conclusion*: The AA genetype of Klotho G-395A was associated with the decrease of AHP and RHP parameters in Chinese Han Nationality Population. The mutated VV genetype of klotho F352V was not only associated with the decrease of RUP and RUH parameters but also with the increase of ALP, AHP, RHP and TPV parameters in Chinese Han Nationality Population. This suggests that there be an identify relationship between single nucleotide polymorphism of klotho gene and heart period signal spectrum features in Chinese Han Nationality Population.

【Key words】Klotho; Single nucleotide polymorphism; Heart period signal

心率变异性(Heart rate variability, HRV)作为反映心脏自主神经的功能标志,其在研究影响自主神经功能疾病如心肌梗死、充血心力衰竭、糖尿病、高血压与心律失常等疾病中的预后价值已得到肯定[1]。HRV 检测作为一种有效、无创性方法,能提供足够的窦房结自主神经调节信息,亦是一种可提供交感与迷走神经相互作用(即心功能方面)决定指标的间接检测方法[2]。而心动周期信号(Heart period signal, HPS)功率谱分析同样也是一种检测自主神经系统活动的敏感性高的无创性方法,其价值已倍受重视。国内学者殷跃辉等[3]研究阐明:①HPS 谱超低频带反映了交感神经系统活性;②HPS 低频带只是反映交感和副交感神经系统的活动混合带,并无特别的生理意义;③HPS 谱高频带反映胆碱能神经系统的活性。(Klotho, KL)基因是一种由 Kuro 等[4]及其同事最先在小鼠体内发现的能抑制衰老及衰老相关表型(如寿命缩短、动脉硬化和异位钙化、骨质疏松、皮肤萎缩、肺气肿、糖和能量代谢异常等)相关的基因。随后研究证实在人类也有 Klotho 基因表达,主要在肾脏及脑脉络膜。国内学者研究[5]发现在人血液中存在分泌型 Klotho 蛋白,并发现该蛋白随着增龄而有减低的趋势,提示分泌型 Klotho 蛋白与人类衰老有关。Takeshita 等[6]研究还发现在小鼠心脏组织中窦房结是 Klotho 表达的唯一部位,该基因在窦房结的表达对窦房结发挥其起搏功能来说至关重要,进而揭示 Klotho 基因表达缺陷小鼠所发生的早期意外死亡与其心脏窦房结功能障碍有关的根源所在。近年来,人们研究 Klotho 基因及其 SNP 与疾病的关系时,发现 Klotho 基因多态性与早发冠心病、骨质疏松症、脑卒中以及长寿等有关[7-9]。国内学者在研究一氧化氮基因多态性时发现该基因多态性分布特征还存在明显种族差异性[10,11]。为此,本文选择汉族人群作为研究对象,拟通过研究汉族人群 KL 基因 G-395A、F352V 及 C370S 单核苷酸多态性(Single nucleotide polymorphism, SNP)与其心动周期信号谱特征参数的相关性,寻找出影响其心动周期信号谱特征参数的 Klotho 等位基因型。

1 研究对象与方法

1.1 研究对象

随机选择自然汉族人群个体 177 人作为研究对象,男

96,女 81 例,男:女为 1.18:1,年龄为 35～75 岁,平均年龄(65.11±10.7)岁。

1.2.1 DNA 提取 取 EDTA 抗凝外周静脉全血 1 ml,用DNA 提取专业试剂盒法(由中国大连宝生生物技术有限公司提供)抽提白细胞染色体基因组 DNA,按照试剂盒要求的标准进行,并通过凝胶电泳验证染色体基因组 DNA 提取效果。

1.2.2 Klotho 基因 SNP 检测 利用等位基因特异性引物(Allele-specific primer,NASP)PCR 技术[10-12]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。设计引物均由中国大连宝生生物技术有限公司提供,上述设计引物序列均由中国大连宝生生物技术有限公司合成。所设计引物序列如表 1 所示。

1.2.2.3 PCR 体系及其反应条件 检测 Klotho G-395A、Klotho F352V 与 Klotho C370S SNP 的 PCR 反应体系中所用 EX Taq 酶、10×EX Taq 酶缓冲液、$MgCl_2$、dNTP(dATP、dTTP dGTP dCTP)由中国大连宝生物有限公司提供。PCR 体系及其反应条件具体见下表 2、3。

1.2.2.4 Klotho G-395A、Klotho F352V 与 Klotho C370S SNP检测及结果判断方法 本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:通过使用公用上游引物分别与突变型下游引物、野生型下游引物组成引物对分别按上述提供的反应条件及相应的反应体系进行 PCR 扩增。

其扩增产物用 2%琼脂糖凝胶电泳(电泳仪为 DYY-11 电脑三恒多用电泳仪,北京六一仪器厂),琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭(EB)染色(琼脂糖和 EB 皆为大连宝生生物有限公司产品),WD-9403D 型紫外分析仪(北京六一仪器厂)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。

Klotho 基因多态性判断标准: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。

1.2.2.5 HPS 功率谱特征检测方法[3,13] 本研究采用由重庆医科大学生物工程研究室研制设计的《HPS 谱及其混沌特征分析系统》检测所选人群 HPS谱。该分析系统包括电极、ECS 放大器、采样板及计算机系统 4 个部分,以 300 Hz 的采样频率采集 CM5 导联的心电信号(Eeletroc radio signal,ECS)。将从 ECS 提取 512 R-R 间期组成的数字时间序列,称为 HPS。本研究以心动周期信号谱特征来代表自主自主神经系统活性。HPS 功率谱包括总功率(Total power value,TPV),绝对与相对超低频功率(Absolute ultra-low frequency power/relative ultra-lower frequency power,AUP/RUP)、绝对与相对低频功率(Absolute low frequency power/relative lower frequency power,ALP/RLP)、绝对与相对高频功率(Absolute high frequency power/relative high frequency power,AHP/RHP) 及其超低频/高频比值(Ratio of AUP to AHP,RUH)、低频/高频比值(Ratio of absolute low frequency power to AHP,RLH)以及平均心动周期(Mean heart period,MHP)和平均心率(Means heart rate,MHR)。其中上述参数中的绝对与相对超低频功率代表或反映交感神经活性;绝对与相对低频功率为交感神经与副交感神经活动的混合部分;绝对与相对高频功率主要反映副交感神经活性;超低频/高频比值与低频 /高频比值反映交感神经与副交感神经平衡状况指标,总功率为绝对超低功率、低频功率以及高频功率总和。

获得心动周期信号的具体方法[13]:

受试者采集 HPS 前应安静仰卧位休息至少 30 min,在室内温度为 25℃条件下,采集仰卧位时 8 min 的心动周期信号资料,利用《HPS 谱及其混沌特征分析系统》对该体位 HPS 功率谱特征进行分析。

1.3 *资料分析方法*

数据处理和图表绘制主要在 MS-OFFICE2000 的 EXCEL 软件及 SPSS 18 统计软件下完成。采用分类资料相关分析,以 $P<0.05$ 作为统计学差异的判别标准。同类数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用独立样本 t 检验统计分析,以 $P<0.05$ 作为统计学差异的判别标准。

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

SNP 位点	Primer 引物	
Klotho G-395A	P 11	5'-AATTGGCTCCAGCAATGTCCAG-3'
	P 2-1	5'-AGAAAAGGCGCCGACCAACTTTT-3'
	P 2-2	5'-AGAAAAGGCGCCGACCAACTTTC-3'
Klotho F352V	P 1-1	5'-CTTTCATCTATTCTGCCTGATG-3'
	P 1-2	5'-CTTTCATCTATTCTGCCTGATT -3'
	P 22	5'-CCTGAGACAAACCAGCCATT-3'
Klotho C370S	P 11	5'-TACAATACTTCTTTCCGTCCC-3'
	P 2-1	5'- ACTCAAGGAGGGTCCAAAGG-3'
	P 2-2	5'- ACTCAAGGAGGGTCCAAAGC-3'

注:引物序列中加框及有背景的字母代表等位基因特异性位点

2 结 果

2.1 汉族人群 Klotho 基因 G-395A 各等位基因型携带者的心动周期信号谱参数情况

Klotho 基因 G-395A 多态性的 GG、GA 和 AA 等位基因携带者其心动周期信号谱的 AUP、ALP、AHP、RUP、RLP、RHP、RUH、RLH 以及 TPV 等参数比较结果显示：AA 基因型携带者其心动周期信号谱的 AHP 与 RHP 参数较其 GA 携带者低，有显著性差异($P<0.05$)；同时 AA 基因型携带者心动周期信号谱的的 RHP 参数也较 GG 携带者降低($P<0.05$)，各基因型携带者其余参数比较并差异无统计学意久($P>0.05$)，其余结果详见表 4。

2.2 汉族人群 Klotho 基因 F352V 各等位基因型携带者的心动周期信号谱参数情况

Klotho 基因 F352V 多态性的 FF、FV 和 VV 等位基因携带者其心动周期信号谱 AUP、ALP、AHP、RUP、RLP、RHP、RUH、RLH 以及 TPV 等参数比较结果显示：①VV 突变基因型携带者其心动周期信号谱的 RUP、RLH、RUH 参数值较野生型 FF 基因型携带者低，仅有 RUP、RUH 参数差异有显著性($P<0.01$)；同时 VV 突变基因型携带者其 AUP、ALP、AHP、RLP、RHP 以及 TPV 较野生型 FF 基因型携带者高，仅在 ALP、

表 2 PCR 反应条件

基因位点	预变性	变性	退火	延伸	PCR 循环数	最后 72℃延伸
Klotho G-395A						
(P 11 与 P 2-1)	94℃ 4 min	94℃ 30 s	61℃ 30 s	72℃ 30	35	10 min
(P 11 与 P 2-2)	94℃ 4 min	94℃ 30 s	63℃ 30 s	72℃ 30	35	10 min
Klotho F352V						
(P 1-1 与 P 22)	94℃ 4 min	94℃ 30 s	54℃ 30 s	72℃ 30	35	10 min
(P 1-2 与 P 22)	94℃ 4 min	94℃ 30 s	54℃ 30 s	72℃ 30	35	10 min
KlothoC370S						
(P 11 与 P 2-1)	94℃ 4 min	94℃ 30 s	54℃ 30 s	72℃ 30 s	35	10 min
(P 11 与 P 2-2)	94℃ 4 min	94℃ 30 s	54℃ 30 s	72℃ 30 s	35	10 min

表 3 PCR 反应体系

基因多态性位点	双蒸水 (μl)	缓冲液 (μl)	$MgCl_2$ (mmol/L)	dNTP (μmol/L)	P 22 or P 11 (μmol/L)	P-wild (μmol/L)	P-mutated (μmol/L)	Taq 聚合酶 (U)	模板 DNA (ng)
Klotho G-395A									
(P 11 与 P 2-1)	*	2	15	200	0.25			0.5	100
(P 11 与 P 2-2)	*	2	15	200	0.25	0.25	0.25	0.5	100
Klotho F352V									
(P 22 与 P 1-1)	*	2	15	200	0.25			0.5	100
(P 22 与 P 1-2)	*	2	15	200	0.25	0.25	0.25	0.5	100
Klotho C370S									
(P 11 与 P 2-1)	*	2	15	200	0.25			0.5	100
(P 11 与 P 2-2)	*	2	15	200	0.25	0.25	0.25	0.5	100

注：*：加至 20 μl；P11 or P22: 上游引物；P-wild:野生型等位基因特异性引物；P-mutated: 突变型等位基因特异性引物

表 4 Klotho 基因 G-395A、Klotho F352V 与 Klotho C370S 各等位基因型携带者的心动周期信号谱参数对比表

基因型	例数	MHP-S	MHR-S	AUP	ALP	AHP	RUP	RLP	RHP	RUH	RLH	TPV
Klotho G-395G	90	847.09 ± 112.38	71.79 ± 9.23	430.38 ± 340.28	226.44 ± 802.41	239.09 ± 604.31	58.54 ± 15.75	18.38 ± 9.24	23.08 ± 13.27	5.00 ± 8.24	1.19 ± 1.13	895.91 ± 1 491.12
Klotho G-395A	73	837.49 ± 112.56	72.94 ± 9.87	474.78 ± 460.95	162.75 ± 180.05	338.99 ± 592.86	56.98 ± 22.96	18.38 ± 10.97	25.03 ± 21.62	5.26 ± 5.30	1.29 ± 1.17	939.12 ± 879.73
Klotho A-395A	14	840.93 ± 102.68	72.25 ± 8.04	513.99 ± 458.20	174.53 ± 199.85	112.23 ± 99.26	63.10 ± 14.410	20.97 ± 12.05	15.93 ± 7.29	5.64 ± 4.96	1.55 ± 1.06	800.75 ± 667.34
Klotho F352F	51	826.09 ± 103.78	73.74 ± 9.11	389.45 ± 244.97	133.05 ± 134.21	181.78 ± 318.94	60.16 ± 15.96	18.50 ± 8.76	21.34 ± 14.96	5.29 ± 4.94	1.46 ± 1.38	704.27 ± 574.72
Klotho F352V	115	848.55 ± 114.70	71.79 ± 9.53	433.34 ± 427.89	203.13 ± 712.73	257.75 ± 619.18	57.34 ± 20.59	18.86 ± 11.59	23.80 ± 18.74	5.31 ± 7.72	1.3 ± 1.18	901.16 ± 1410.26
Klotho V352V	11	876.78 ± 97.74	69.2 ± 7.60	601.51 ± 349.71	455.32 ± 387.76	965.35 ± 1 561.70	41.17 ± 15.75	23.08 ± 8.97	35.75 ± 17.61	1.59 ± 1.12	0.87 ± 0.68	2022.19 ± 1987.68
Klotho C370C	38	852.45 ± 107.66	71.00 ± 9.09	459.73 ± 425.41	358.38 ± 1 180.77	381.58 ± 919.51	55.77 ± 20.59	20.39 ± 9.73	23.83 ± 16.83	4.48 ± 4.18	1.29 ± 1.07	1217.19 ± 2188.40
Klotho C370S	130	842.79 ± 113.12	72.44 ± 9.48	437.66 ± 388.63	213.61 ± 672.47	316.08 ± 768.00	57.53 ± 20.16	18.61 ± 11.59	23.86 ± 18.38	5.42 ± 7.69	1.32 ± 1.27	941.56 ± 1426.54
Klotho S370S	9	863.18 ± 84.75	70.12 ± 7.02	563.50 ± 465.53	183.94 ± 201.33	470.27 ± 910.80	65.29 ± 14.98	14.61 ± 7.43	20.10 ± 9.44	4.12 ± 2.27	0.76 ± 0.42	826.49 ± 649.78

AHP、RHP 以及 TPV 参数其差异有显著性($P<0.05$)。②突变型 VV 基因型携带者其 RUP、RUH 参数值较其 FV 杂合子携带者低($P<0.05$);同时突变型 VV 基因型携带者其 RHP 参数值则较 FV 杂合子携带者高,亦有显著性差异($P<0.05$)。各基因型携带者其余参数值比较均无显著性差异($P>0.05$),其余结果详见表 4。

2.3 汉族人群 Klotho 基因 C370S 各等位基因型携带者的心动周期信号谱参数情况

Klotho 基因 C370S 多态性的 CC、CS 和 SS 等位基因携带者其心动周期信号谱 AUP、ALP、AHP、RUP、RLP、RHP、RUH、RLH 以及 TPV 等参数比较结果显示:①突变型 SS 基因型携带者其 RLH、RLP 参数值较野生型 CC 基因型携带者低,只有在 RLH 参数方面其差异有显著性($P<0.05$)。②突变型 SS 基因型携带者其 RLH 也较 CS 杂合子携带者低,亦有显著性差异($P<0.05$);各基因型携带者其余参数值比较均无显著性差异($P>0.05$),其余结果详见表 4。

3 讨 论

心率变异功率谱分析是研究自主神经系统活动的重要手段之一。早在 1996 年《欧洲心脏病学会和北美洲起搏与电生理学学会》Task Force 研究组就报道分析了心率变异性的检测标准、生理学上的解释以及临床应用等方面问题,肯定了心率变异性的生理意义及应用价值[14]。随后,1999 年国内学者[3]提出用 HPS 谱特征分析代替心率变异性的观点,以此来研究心脏自主神经系统活动更为恰当,并随接报道 HPS 谱的超低频带及高频带所代表的生理意义,重新评价低频带的生理作用,提出了 HPS 谱混沌特征分析方法[15,16]。

近年来有关 HPS 谱特征(即心率变异性)及参数与遗传变异性的相关性研究取得了初步成果。已有研究证实 HPS 谱特征及参数与基因多态性有着明确的相关性。如国外学者 Shihara 等[17]研究发现解耦联蛋白 -1(Uncoupling protein 1, UCP1)基因多态性单独对自主神经活性并无影响,只有在同时伴有 β3AR 基因多态性突变时对自主神经活动有抑制效应,即说明不同基因多态性在自主神经活性调节方面具有协同效应。国内学者马厚勋等[13]应用 HPS 谱特征分析技术研究报道一氧化合酶(Nitric oxide synthase, NOS)基因多态性与其心动周期信号谱特征的相关性时,发现了影响 HPS 谱特征的 NOS 等位基因型即 NOS2 C-1173T SNP 突变型 TT 与其仰卧位的 RHP 增高有关,NOS3 G894T 突变型 TT 亦与其仰卧位的 AHP 增高有关。该作者随后研究还发现 NOS 基因多态性还与其静息心率有明确相关性[18]。国外学者 Wilk 等[19]研究 β_1、β_2 和 α_2B 肾上腺素受体基因多态性与静息心率关系时也发现 ADR β_1 Ser49Gly 突变基因携带者其静息心率较野生型高,而 ADR β_1 Arg389Gly 突变者其静息心率较野生型低;ADR α_2B C/A 多态性中 A 等位基因携带者其静息心率较野生型高,上述结果表明肾上腺素能受体基因多态性与心率有关。新近 Mitro 等[20]研究发现血管紧张素Ⅱ受体 A1166C SNP AA 等位基因型与其携带者在倾斜实验中易发生体位性低血压有关,也与该基因型携带者在倾斜实验中其交感神经张力减低有关。随后 Neumann 等[21]在研究外观上健康的美籍欧洲中年人的 A 激酶锚定结合蛋白 2(A/G)(A kinase anchoring protein 2,简称为 AKAP10)I646V(异亮氨酸 VS 缬氨酸)基因多态性时,发现 AKAP10 突变型 V 等位基因携带者其静息心率更快而其心率变异性却减低,这提示该基因突变可能影响了心脏起搏细胞对自主神经冲动的敏感性,进而增加心律失常及心脏猝死的风险。上述研究结果表明遗传基因差异性可能就是其心率变异性差异的根源所在。

Klotho 基因作为一种与寿命及其衰老相关的基因,动物实验研究[6]发现该基因缺陷小鼠所发生的早期意外死亡与其心脏窦房结功能障碍有关,而窦房结功能障碍源于该部位 Klotho 基因表达缺陷的结果,也就是说该基因表达异常有可能会影响 Klotho 在窦房结起搏细胞的功能状态。国外学者 Arking 等[22]研究发现 KL V352 突变者其细胞外的分泌 KL 蛋白质较 KL F352 野生者明显降低(6 倍),KL S370 突变者其细胞外的分泌 KL 蛋白质较 KL C370 野生者增高 2.9 倍;KL V352/S370 双突变者则呈现一种居中的表现型(分泌 KL 蛋白质仅增高 1.6 倍),为此,研究该基因多态性及其表达调节在疾病发生中作用机制具有极其重要价值。

目前针对有关 Klotho 基因多态性与心率变异性关系研究的报道甚少,而针对汉族人群研究就更少。本文依据文献研究[3,13]所报导的心动周期信号谱特征作为自主神经系统活性检测指标,采用由重庆医科大学生物工程研究室研制设计的《HPS 谱及其混沌特征分析系统》来检测人群的心动周期信号谱。通过对中国汉族人群 Klotho G-395A、F352V 以及 C370S 3 个位点 SNP 及其等位基因与心动周期信号谱的相关性研究,寻找出可能影响心率变异性的等位基因型,为进一步研究该基因多态性与心血管急性事件(心脏猝死)关系提供线索。

通过对汉族人群 Klotho G-395A GG、GA 和 AA 各等位基因携带者其心动周期信号谱参数比较发现:AA 突变基因型携带者其 AHP 与 RHP 参数较其 GA 杂合子携带者降低有显著性差异;同时携带 AA 突变基因型者的 RHP 参数也较野生型纯合子 GG 携带者降低亦有显著性差异,上述结果提示 KL 基因 G-395A 多态性的 AA 突变基因型与其 AHP 和 RHP(反映副交感神经活性指标)减低有关,究其原因:Klotho 基因 G-395A 位点基因突变有可能通过影响 Klotho 基因表达,进而通过其 Klotho 蛋白影响在窦房结内的起搏细胞功能反应性即心脏起搏细胞对自主神经冲动的敏感性,其结果是绝对与相对高频功率减低,心率变异性减小。

通过对汉族人群 Klotho F352V FF、FV 和 VV 等位基因携带者其心动周期信号谱参数进行比较,发现 VV 突变基因型携带者其心动周期信号谱的 RUP、RUH 参数值较 FF 野生型基因型携带者低,差异有显著性,即提示在 VV 突变基因

型纯合子携带者的 RUP、RUH 参数所代表的交感活性较野生型携带者减低；携带 VV 基因型者其 ALP、AHP、RHP 以及 TPV 则较 FF 野生型携带者高，也有显著性差异，即提示 VV 突变基因型携带者的 AHP、RHP 参数所代表的副交感神经活性以及 TPV 参数所代表的总功率较野生型携带者高，上述两方面指标参数差异说明携带 VV 基因型者心率变异性较野生型携带者大。同时还发现突变型 VV 基因型携带者其 RUP、RUH 参数值(反映交感活性)也较其 FV 杂合子携带者低；突变型 VV 基因型纯合子携带者其 RHP(反映副交感活性)参数值则较 FV 杂合子携带者高，亦有显著性差异，同样说明携带 VV 基因型者心率变异性较 FV 杂合子携带者大，只是程度上不如与野生型差别显著。上述研究结果表明汉族人群 Klotho F352V VV 等位基因携带者其副交感神经活性较强，心率变异性较大，这种突变在对其发生心律失常、心脏猝死等方面可能有保护作用[2]，是否如此尚需进一步研究加以证实。

通过对汉族人群 Klotho C370S 的 CC、CS 和 SS 等位基因携带者其心动周期信号谱参数比较，发现该位点突变型 SS基因型携带者其心动周期信号谱参数中 RLH 参数值较 CC 野生型携带者低有显著性差异，同时也较 CS 杂合子携带者低，其差异亦有显著性；而其余参数无显著性差异。鉴于 RLH 参数所代表的是低频功率与高频功率比值，而以往研究[3]说明 HPS 低频功率带无实际意义，因而虽有 RLH 指标在 KL 基因 C370S 多态性的各等位基因携带者之间有差异性，但不能说明该位点基因多态性与其心动周期信号谱有相关性。基于本文的研究样本不十分大，上述研究结果有待进一步扩大样本加以证实。

参 考 文 献

[1] Bilchick K C, Fetics B, Djoukeng R, et al. Prognostic value of heart rate variability in chronic congestive heart failure (veterans affairs' survival trial of antiarrhythmic therapy in congestive heart failure)[J]. Am. J. Cardiol, 2002, 90: 24-28.

[2] Kowalewski M A, Urban M. Short-and long-term reproducibility of autonomic measures in supine and standing positions[J]. Clinical Science, 2004, 106: 61-66.

[3] 殷跃辉，陈 丽，徐小红，等. 心动周期信号功率谱超低频带的生理意义[J]. 中国心脏起搏与电生理杂志，1999，13(2)：78.

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

[5] 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.

[6] Takeshita K, Fujimori T, Kurotaki Y, et al. Sinoatrial node dysfunction and early unexpected death of mice with a defect of klotho gene expression[J]. Circulation, 2004, 109(14): 1776-1782.

[7] 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.

[8] Arking D E, Becker D M, Yanek L R, et al. Klotho allele status and the risk of early-onset occult coronary artery disease[J]. Am. J. Hum. Genet, 2003, 72(5): 1154-1161.

[9] Arking D E, Atzmon G, Arking A, et al. Association between the functional variant of KLOTHO allele and high-density lipoprotein cholesterol, blood pressure, stroke, and longevity[J]. Circ Res, 2005, 96(4): 412-418.

[10] 马厚勋，谢正祥，牛永红，等. 中国汉族人群 NOS3 基因启动子区 T-786C、A-922G 与第 7 外显子 G894T 多态性等位基因及其组合分布[J]. 中国老年学杂志，2004，24(12)：1137-1140.

[11] 马厚勋，谢正祥，牛永红，等. 汉族人群 NOS3 A-922G、NOS3 T-786C 与 NOS3 G894T SNP 的等位基因及其组合分布与高血压的相关性[J]. 遗传，2006，28(1)：3-10.

[12] 马厚勋，谢正祥，牛永红，等. 等位基因特异性引物 PCR 技术及其应用研究[J]. 生物技术杂志，2005，15(1)：15-18.

[13] 马厚勋，谢正祥，牛永红，等. 一氧化氮合酶基因 5 个位点单核苷酸多态性及其与心动周期信号谱特征的关系[J]. 重医科大学学报，2005，31(3)：343-348，376.

[14] Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation and clinical use [J]. Circulation, 1996, 93: 1043-1065.

[15] 谢正祥，牛永红，殷跃辉，等. 阿托品的心脏自主神经系统效应. [J]. 中国药房，2002，13(5)：265.

[16] 谢正祥，牛永红，殷跃辉，等. 倍他乐克对心脏自主神经系统影响[J]. 中国药房，2002，13(9)：522.

[17] Shihara N, Yasuda K, Moritani T, et al. Synergistic effect of polymorphisms of uncoupling protein 1 and β 3-adrenergic receptor genes on autonomic nervous system activity[J]. International Journal of Obesity, 2001, 25(6): 761-766.

[18] 马厚勋，牛永红，李章勇，等. 汉族人群一氧化氮合酶基因三个位点单核苷酸多态性与静息心率相关性研究[J]. 中华医学遗传医学杂志，2006，23(6)：670-672.

[19] Wilk J B, Myers R H, Pankow J S, et al. Adrenergic receptor polymorhpisms associated with resting heart rate: The hyperGEN study[J]. Annals of Human Genetics, 2006, 70(pt5): 566-573.

[20] Mitro P, Akov K M, Ckov H M, et al. Hemodynamic parameters and heart rate variability during a tilt test in relation to gene polymoRHPism of renin-angiotensin and serotonin system[J]. PACE, 2008, 31(12): 1571-1580.

[21] Neumann S A, Tingley W G, Conklin B R, et al. AKAP10 (I646V) functional polymorhpism predicts heart rate and heart rate variability in apparently healthy, middle-aged European-Americans[J]. Psychophysiology, 2009, 46(3): 466-472.

[22] Arking D E, Krebsova A, Macek M S, et al. Association of human aging with a functional variant of klotho[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99(2): 856-861.

(责任编辑：冉明会)