

半胱氨酸蛋白酶 8 基因-652 6N I/D 多态性与高脂血症的相关性

何雪梅¹, 李娟², 曹勇¹, 胡传飞², 何永萍², 邓宇³, 陈庄¹

(四川医科大学 1.附属第一医院医学实验中心, 2.临床医学系, 四川省泸州市 646000; 3.重庆医科大学, 重庆市 400016)

[关键词] 半胱氨酸蛋白酶 8; 高脂血症; 基因多态性

[摘要] **目的** 分析半胱氨酸蛋白酶 8(CASP8) 基因-652 6N I/D 多态性与高脂血症的相关性。**方法** 采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性技术结合 DNA 测序的方法对四川地区 350 例正常人和 357 例高脂血症患者进行 CASP8 基因-652 6N I/D 基因型检测。**结果** 正常对照组和高脂血症组 I/I、I/D 和 D/D 的基因频率分别为 54.3%、41.4%、4.3% 和 55.2%、36.1%、8.7%, 两组基因型频率差异有统计学意义 ($P=0.038$); 但两组等位基因 I 和 D 的频率差异无统计学意义。与 I/I 基因型或合并 I/I 与 I/D 基因型相比, D/D 基因型发生高脂血症的风险增加, OR 值分别为 1.993 (95%CI 为 1.043~3.810, $P=0.034$) 和 2.124 (95%CI 为 1.125~4.008, $P=0.018$), 且高脂血症患者中 D/D 基因型者血清甘油三酯水平高于 I/D 和 I/I 基因型者。**结论** CASP8 基因-652 6N I/D 多态性与四川地区高脂血症的发生相关。

[中图分类号] R589

[文献标识码] A

The Correlation of CASP8 -652 6N I/D Polymorphism and Risk of Hyperlipidemia

HE Xue-Mei¹, LI Juan², CAO Yong¹, HU Chuan-Fei², HE Yong-Ping², DENG Yu³, and CHEN Zhuang¹

(1. Experimental Medicine Center of the First Affiliated Hospital, 2. Department of Clinical Medicine, Sichuan Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China; 3. Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

[KEY WORDS] Cysteine Aspartic Acid Specific Protease 8; Hyperlipidemia; Gene Polymorphism

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the correlation of cysteine aspartic acid specific protease 8 (CASP8) gene -652 6N insertion/deletion (I/D) polymorphisms with hyperlipidemia. **Methods** CASP8 gene -652 6N I/D polymorphisms were detected by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) and DNA sequencing in 350 controls and 357 patients with hyperlipidemia in Sichuan area. **Results** The I/I, I/D and D/D genotype frequencies were 54.3%, 41.4%, 4.3% in control group and 55.2%, 36.1%, 8.7% in hyperlipidemia group, respectively. The genotype frequency distribution between the two groups showed significant differences ($P=0.038$). However, no significant difference of I and D allelic frequency was found between the two groups. Compared with the CASP8 gene -652 6N I/I or the combined I/I+I/D genotype, a significant increased risk of hyperlipidemia was found for the D/D genotype people (OR=1.993, 95%CI was 1.043~3.810, $P=0.034$ and OR=2.124, 95%CI was 1.125~4.008, $P=0.018$, respectively). What's more, the triglyceride in serum of D/D genotype people was strikingly higher than that in I/D and I/I genotype people. **Conclusion** These findings indicate that CASP8 gene -652 6N I/D polymorphisms are associated with hyperlipidemia in Sichuan area, and D/D genotype could increase the risk of hyperlipidemia.

高脂血症是各种原因导致的血浆中总胆固醇 (total cholesterol, TC) 和/或甘油三酯 (triglyceride, TG) 及低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein

cholesterol, LDLC) 水平升高的一类疾病, 常诱发产生动脉粥样硬化、脑血栓等心脑血管疾病。高脂血症的发生与饮食和生活方式等相关外, 也与遗传基

[收稿日期] 2015-09-28

[修回日期] 2016-01-23

[基金项目] 中华医学会临床医学科研专项资金-施贵宝内分泌糖尿病研究项目 (12020160276); 四川省科学技术厅与泸州市人民政府、泸州医学院联合科研专项资金计划项目 (14JC01283-LH11)

[作者简介] 何雪梅, 硕士, 研究实习员, 研究方向为心血管疾病, E-mail 为 hexuemei1116@aliyun.com。李娟, 硕士, 研究方向为免疫学, E-mail 为 43658152@qq.com。通讯作者陈庄, 教授, 研究方向为免疫学, E-mail 为 zhuangchen@hotmail.com。

因相关。基因多态性也会影响其发病风险,研究发现 P53 基因 72 位密码子为 Arg/Arg 的女性发生高脂血症的风险增加^[1]。半胱氨酸蛋白酶 8 (cysteine aspartic acid specific protease 8, CASP8) 是凋亡起始因子,也参与炎症的调控^[2-3]。Sun 等^[4]发现 CASP8 基因启动子区六核苷酸插入/缺失多态性(-652 6N I/D,rs3834129)会影响 CASP8 基因与转录因子 Sp1 的结合,影响多种肿瘤的患病风险。随着对 CASP8 多态性研究的深入,其研究领域已从肿瘤延伸至其他疾病,但其与高脂血症的患病风险尚无报道。本研究分析了 CASP8 基因-652 6N I/D 多态性与四川地区高脂血症的关系,为高脂血症的发病机制提供新的依据。

1 对象和方法

1.1 研究对象

选取 40 岁以上四川省泸州地区汉族体检人群共 707 例,在取得受试者同意并签署知情同意后,收集体格检查和常规血液生化检查结果。根据资料将受试者分为正常对照组和高脂血症组。高脂血症诊断标准:空腹血清 TC>6 mmol/L 或 TG>2.30 mmol/L 或 LDLC>3.36 mmol/L 或高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDLC) < 0.82 mmol/L。两组人群均排除近期有感染体征和症状、肝肾功能衰竭、糖尿病、恶性疾病或具有遗传病家族史者。

1.2 基因组 DNA 的提取

收集受试人群的外周静脉血血凝块标本,取 300 μL 血凝块按照试剂盒说明书(庄盟,北京)提取基因组 DNA,采用 Nanodrop 1000 (Thermofisher, 美国)测定 DNA 浓度和纯度, A_{260/280} = 1.8 ~ 2.0, DNA 于-20℃ 保存。

1.3 CASP8 基因-652 6N I/D 多态性检测

采用 PCR-RFLP 技术检测 CASP8 基因-652 6N I/D 多态性,根据文献^[4]设计 PCR 引物,由上海生工生物工程技术有限公司合成,上游引物为 5'-GCC ATA GTA ATT CTT GCT CTG C-3',下游引物为 5'-CTG CAT GCC AGG AGC TAA GT-3',扩增片段为 171 bp 或 177 bp。PCR 反应体系:模板 DNA 1 μL,上下游引物各 1 μL, Mix 12.5 μL,加 ddH₂O 至 25 μL。PCR 反应条件:95℃ 预变性 10 min,然后 94℃ 变性 30 s,58℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,共 30 个循环,最后 72℃ 延伸 10 min。以 XspI 酶切 PCR 产物,酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳。用 Gel.Doc XR+型

凝胶成像系统 (Bio-Rad, 美国) 观察酶切产物,判定基因型。

1.4 统计学方法

使用 SPSS 19.0 软件分析实验数据,Hardy-Weinberg 平衡检验所选样本的群体代表性。组间临床数据比较采用 *t* 检验,组间基因型频率和等位基因频率比较采用 χ^2 检验, *P*<0.05 表示差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 临床资料比较

正常对照组和高脂血症组 TC、TG、LDLC 差异有统计学意义,而性别、年龄、血糖和 HDLC 差异无统计学意义(表 1)。

表 1. 研究对象的临床资料比较

Table 1. Comparison of clinical data of study subjects		
项 目	正常对照组 (<i>n</i> = 350)	高脂血症组 (<i>n</i> = 357)
年龄 (岁)	55.67±9.84	55.93±8.17
男/女 (例)	100/250	101/256
餐前血糖 (mmol/L)	5.18±0.37	5.21±0.35
2 h 血糖 (mmol/L)	6.19±1.03	6.29±1.00
TC (mmol/L)	4.25±0.58	5.30±1.42 ^a
TG (mmol/L)	0.96±0.30	1.79±1.53 ^a
HDLC (mmol/L)	1.38±0.23	1.33±0.45
LDLC (mmol/L)	2.26±0.49	3.09±1.01 ^a

a 为 *P*<0.01,与正常对照组比较。

2.2 CASP8 基因-652 6N 基因型的确定

XspI 内切酶将有 CTTACT 插入的片段切开为 146 bp 和 31 bp 两个片段,即 I/I 基因型为 146 bp 和 31 bp 两个片段,I/D 基因型为 171 bp、146 bp 和 31 bp 三个片段,D/D 基因为 171 bp 一个片段(图 1)。随机选取不同基因型 PCR 产物进行测序鉴定以确定酶切结果的准确性,测序结果与酶切结果吻合(图 2)。

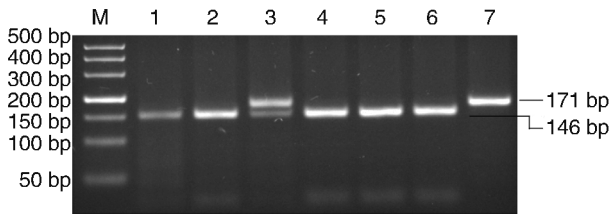


图 1. CASP8 基因-652 6N I/D 位点酶切电泳图 M 为 DNA 标准分子量 Marker,1、2、4、5 和 6 为 I/I 基因型,3 为 I/D 基因型,7 为 D/D 基因型。
Figure 1. Enzyme electrophoresis of CASP8 gene -652 6N I/D site

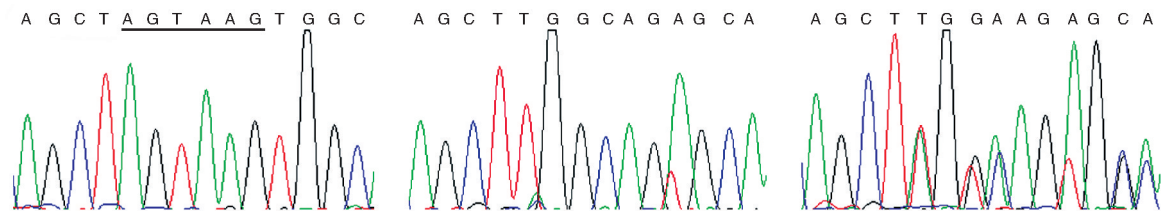


图 2. CASP8 基因-652 6N I/D 位点测序图 从左至右分别为 I/I 基因型、D/D 基因型和 I/D 基因型。

Figure 2. Sequence diagram of CASP8 gene -652 6N I/D site

2.3 CASP8 基因-652 6N 基因型分布与高脂血症的关系

正常对照组和高血脂症组-652 6N I/D 多态性基因型频率均符合 Hardy-Weinberg 平衡($P>0.05$),说明研究人群具有人群代表性。两组基因型频率差异有统计学意义($P=0.038$),组间等位基因频率差异无统计学意义。与 I/I 基因型或合并 I/I 与 I/D 基因型相比,D/D 基因型发生高脂血症的风险均增加(表 2)。研究发现绝经后女性血脂水平增加,将正常对照组和高血脂症组中女性按是否绝经分组进行 CASP8 基因-652 6N 基因型分布检测,发现未绝经女性和绝经女性-652 6N 基因型分布在正常对照组和高血脂症组中无显著差异(表 3)。

表 2. CASP8 基因-652 6N I/D 多态性基因型分布与高脂血症发病风险

Table 2. Evaluation of genotype distribution of CASP8 -652 6N I/D polymorphism and risk of hyperlipemia

项目 (例)	正常对照组	高血脂症组	OR(95%CI)
I/I	190(54.3%)	197(55.2%)	1
I/D	145(41.4%)	129(36.1%)	0.858(0.629~1.170)
D/D	15(4.3%)	31(8.7%)	1.993(1.043~3.810) ^b
I/I+I/D	335(95.7%)	326(91.3%)	1
D/D	15(4.3%)	31(8.7%)	2.124(1.125~4.008) ^a
I	525(76.0%)	523(74.5%)	1
D	175(24.0%)	191(25.5%)	1.096(0.863~1.390)

a 为 $P<0.01$,与 I/I+I/D 基因型比较;b 为 $P<0.05$,与 I/I 基因型比较。

表 3. 两组女性 CASP8 基因-652 6N I/D 多态性基因型分布(例)

Table 3. Genotype distribution of CASP8 -652 6N I/D polymorphism in women between the two groups(Case)

项 目	正常对照组			高血脂症组		
	I/I	I/D	D/D	I/I	I/D	D/D
未绝经女性	47(51.6%)	40(44.0%)	4(4.4%)	33(55.9%)	21(35.6%)	5(8.5%)
已绝经女性	85(53.5%)	67(42.1%)	7(4.4%)	110(55.8%)	71(36.0%)	16(8.1%)

2.4 CASP8 基因-652 6N 基因型与血脂的关系

高血脂症组 D/D 基因型者血清 TG 水平高于 I/D+I/I 基因型者($P<0.01$),其他指标差异无统计学意义;正常对照组中 D/D 基因型者血脂水平与 I/D+I/I 基因型者差异无统计学意义(表 4)。

表 4. CASP8 基因-652 6N 基因型与血脂的关系(mmol/L)

Table 4. Relationship of CASP8 gene -652 6N genotypes and blood lipids(mmol/L)

分 组	TC	TG	HDL C	LDLC
正常对照组				
D/D	4.34±0.53	0.96±0.31	1.36±0.23	2.33±0.50
I/I+I/D	4.25±0.58	0.96±0.30	1.38±0.24	2.25±0.49
高血脂症组				
D/D	5.57±1.25	2.48±2.67 ^a	1.34±0.39	3.12±0.90
I/I+I/D	5.27±1.44	1.72±1.36	1.34±0.45	3.08±1.03

a 为 $P<0.01$,与同组 I/D+I/I 基因型比较。

3 讨 论

高脂血症是一种由饮食、肥胖、药物等多种因素引起运输胆固醇和 TG 的脂蛋白合成增加,而分解减少,引起脂质转运紊乱的代谢障碍性疾病。近期研究发现高脂血症的发生与遗传背景相关,母亲高脂血症也会增加后代疾患动脉粥样硬化^[5]。

CASP8 基因组为 30 kb,共 11 个外显子,位于染色体 2q33-34,其编码的蛋白以无活性的酶原 pro-

Caspase-8 存在于胞浆中,活化后的 Caspase-8 可通过细胞内途径和细胞外途径启动细胞凋亡^[6]。研究发现 CASP8 基因-652 6N D/D 基因型频率在汉族人群中为 3.3%~7.0%^[4,7],本研究结果与之相似,但比欧洲人群和美国人群的 20%~25%低^[8],说明 CASP8 基因-652 6N D/D 基因型分布在不同种族中差异较大,可能与人类种族进化过程中遗传漂变或自然选择有关。本研究表明高脂血症组 CASP8-652 6N D/D 基因型频率增加,与 I/I 基因型或 I/I+I/D 基因型相比,D/D 基因型均会使高脂血症的患病风险增加。有报道女性绝经后血脂水平增加,我们将研究人群中的女性按绝经与否进行分层分析,结果发现女性是否绝经 CASP8 基因-652 6N I/D 多态性对高脂血症的患病风险无关。同时,高脂血症组中 D/D 基因型人群血清 TG 水平高于 I/I+I/D 基因型人群,说明 CASP8 基因-652 6N I/D 多态性与高脂血症相关,并可能与 TG 代谢紊乱相关。Zhang 等^[9]报道 CASP8 基因-652 6N I/D 多态性与多种肿瘤的患病风险相关,D/D 基因型使 CASP8 蛋白含量下降,降低肺癌、食管癌、胃癌、乳腺癌等多种肿瘤的患病风险。前期我们发现 D/D 基因型会使 2 型糖尿病的患病风险增加^[10],这种不一致的结果可能是 CASP8 基因多态性在不同疾病中的生物学效应不同引起的。越来越多的研究表明高脂饮食会刺激炎症的发生,而炎症因子在高脂血症的发病过程中也起着重要作用,高脂血症患者体内炎症因子的增加导致预后水平较差^[11-12]。炎症小体的激活会刺激肝脏内胆固醇结晶的发生^[13],许多炎症因子如 IL-1 β 水平与血脂水平相关,IL-1 会减弱脂肪酶活性,增加脂肪细胞内脂肪的分解^[14]。近期研究发现 Caspase-8 参与了经典与非经典炎症通路,能够调控 IL-1 β 的表达^[15-17]。Caspase-8 的抑制剂或表达下调使 pro-IL-1 β 切割成 IL-1 β 的量降低^[16]。因此,CASP8 基因-652 6N I/D 多态性使高脂血症患者体内 Caspase-8 蛋白水平发生改变,体内炎症水平受到影响,从而影响了其发病风险。但其具体机制仍需进一步研究。

综上,CASP8 基因-652 6N I/D 多态性与四川地区高脂血症的发生有一定关系,D/D 基因型是高脂血症的危险因素。当然,还需要扩大样本量对高脂血症的类型进行分层研究,以探讨各种类型血脂异常与 CASP8 基因-652 6N I/D 多态性的关系,并检测不同基因型中炎症因子的表达水平,进一步明确 CASP8 基因-652 6N I/D 多态性影响高脂血症的具体机制,为个体化诊断和治疗提供理论基础。

[参考文献]

- [1] 王晓燕, 万沁, 张琰山, 等. P53 基因 72 位密码子多态性与高脂血症的相关性[J]. 中国动脉硬化杂志, 2014, 22 (1): 50-54.
- [2] Fulda S. Caspase-8 in cancer biology and therapy[J]. Cancer Lett, 2009, 281 (2): 128-133.
- [3] Bossaller L, Chiang PI, Schmidt-Lauber C, et al. Cutting edge: FAS (CD95) mediates noncanonical IL-1 β and IL-18 maturation via Caspase-8 in an RIP3-independent manner [J]. J Immunol, 2012, 189 (12): 5508-5512.
- [4] Sun T, Gao Y, Tan W, et al. A six-nucleotide insertion-deletion polymorphism in the CASP8 promoter is associated with susceptibility to multiple cancers[J]. Nat Genet, 2007, 39 (5): 605-613.
- [5] 高胜利, 高淑红, 赵成瑞. 母亲高脂血症增加后代疾患动脉粥样硬化的机制[J]. 中国动脉硬化杂志, 2014, 22 (6): 633-636.
- [6] Ghavami S, Hashemi M, Ande SR, et al. Apoptosis and cancer: mutations within caspase genes[J]. J Med Genet, 2009, 46 (8): 497-510.
- [7] Wang M, Zhang Z, Tian Y, et al. A six-nucleotide insertion-deletion polymorphism in the CASP8 promoter associated with risk and progression of bladder cancer[J]. Clin Cancer Res, 2009, 15 (7): 2567-572.
- [8] Li C, Lu J, Liu Z, et al. The six-nucleotide deletion/insertion variant in the CASP8 promoter region is inversely associated with risk of squamous cell carcinoma of the head and neck [J]. Cancer Prev Res, 2010, 3 (2): 246-253.
- [9] Zhang F, Yang Y, Guo C, et al. CASP8 -652 6N del polymorphism and cancer risk: a meta-analysis of 30 case-control studies in 50112 subjects[J]. Mutagenesis, 2012, 27 (5): 559-566.
- [10] 何雪梅, 李娟, 唐小平, 等. CASP8 基因-652N I/D 多态性与 2 型糖尿病易感性的关系[J]. 实用医学杂志, 2014, 30 (19): 3073-075.
- [11] 张艳艳, 赵蕾, 谢云霞, 等. FAT/CD36 在高脂喂养小鼠脂肪组织炎症中的作用[J]. 中国病理生理杂志, 2015, 31 (3): 463-467.
- [12] 闫美玲, 夏丽莎, 胡长平. 代谢炎症与肥胖相关研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2015, 23 (6): 634-638.
- [13] Hendriks T, Bieghs V, Walenbergh SM, et al. Macrophage specific Caspase-1/11 deficiency protects against cholesterol crystallization and hepatic inflammation in hyperlipidemic mice [J]. PLoS One, 2013, 8 (12): e78792.
- [14] Feingold KR, Grunfeld C. Role of cytokines in inducing hyperlipidemia[J]. Diabetes, 1992, 41 (Suppl 2): 97-101.
- [15] Antonopoulos C, Russo HM, El Sanadi C, et al. Caspase-8 as an effector and regulator of NLRP3 inflammasome signaling[J]. J Biol Chem, 2015, 290 (33): 20167-184.
- [16] Monie TP, Bryant CE. Caspase-8 functions as a key mediator of inflammation and pro-IL-1 β processing via both canonical and non-canonical pathways[J]. Immunol Rev, 2015, 265 (1): 181-193.
- [17] Shenderov K, Riteau N, Yip R, et al. Cutting edge: Endoplasmic reticulum stress licenses macrophages to produce mature IL-1 β in response to TLR4 stimulation through a Caspase-8 and TRIF-dependent pathway[J]. J Immunol, 2014, 192 (5): 2029-033.

(此文编辑 文玉珊)