

p53 基因 72 位密码子多态性与高脂血症的相关性

王晓燕¹, 万 沁², 张琰山³, 左唯义³, 胡传飞³, 罗永鸿³, 陈 庄¹, 陈 枫¹

(泸州医学院 1. 附属医院医学实验中心, 2. 附属医院内分泌科, 3. 临床医学系, 四川省泸州市 646000)

[关键词] p53; 单核苷酸多态性; 高脂血症

[摘要] 目的 探讨 p53 基因 72 位密码子多态性与高脂血症的相关性。方法 采用 PCR-RFLP 技术和 PCR 方法检测高脂血症组 202 例(均为胆固醇和低密度脂蛋白水平升高)和正常对照组 194 例 p53 基因 72 位密码子多态性的分布情况。结果 p53 基因 72 位密码子多态性位点基因型为 ArgArg/ArgPro/ProPro, 高脂血症组三种基因型频率分别为 39.1%、45.0% 和 15.8%, 正常对照组三种基因型频率分别为 28.4%、55.7% 和 16.0%, 两组差异无显著性($P>0.05$); 两组中女性的 3 种基因型频率分别为 42.8%、42.1%、15.1% 和 27.3%、58.0%、14.7%, 差异有统计学意义($P=0.012$); 男性中三种基因型分布差异无显著性($P>0.05$)。等位基因频率在两组中及男性、女性中的分布差异均没有统计学意义。结论 p53 基因 72 位密码子多态性与高脂血症存在相关性, 携带 Arg/Arg 基因型的女性高脂血症发病风险增高。基因型 Arg/Arg 可能是高胆固醇、高低密度脂蛋白血症发生的一个危险因素。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

The Relevant Analysis of p53 Gene Codon 72 Polymorphism and Hyperlipemia

WANG Xiao-Yan¹, WAN Qin², ZHANG Long-Shan³, ZUO Wei-Yi³, HU Chuan-Fei³, LUO Yong-Hong³, CHEN Zhuang¹, and CHEN Feng¹

(1. Experimental Medicine Center, Affiliated Hospital of Luzhou Medical College; 2. Department of Endocrinology, Affiliated Hospital of Luzhou Medical College; 3. Department of Clinical Medicine of Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China)

[KEY WORDS] p53; Single Nucleotide Polymorphism; Hyperlipemia

[ABSTRACT] Aim To investigate the correlation between the p53 gene codon 72 polymorphism and hyperlipidemia. Methods Blood samples were collected from 202 people in hyperlipidemia group(both the level of total cholesterol and low-density lipoproteins increased) and 194 people in control group. PCR-RFLP and PCR method was used to detect the genotypes of p53 codon 72 polymorphism. Results The genotype of the p53 gene codon 72 was ArgArg/ArgPro/ProPro, and the frequencies of genotype in hyperlipidemia group were 39.1%, 45.0% and 15.8%, respectively. The frequencies of genotype in control group were 28.4%, 55.7% and 16.0%, and the difference of distribution of genotype was not significant($P>0.05$). The frequencies of genotype of women in two groups were 42.8%, 42.1%, 15.1% and 27.3%, 58.0%, 14.7%, respectively, and the difference was statistically significant($P=0.012$). The genotype distribution of men in two groups was not significantly different. The differences of allele frequency distributions in the two groups and in men or in woman were not significant($P>0.05$). Conclusion There was a correlation between the genotype distribution of p53 gene codon 72 and hyperlipidemia. The risk of hyperlipidemia was increased in women who carried the Arg/Arg genotype. The genotype Arg/Arg may be a risk factor of hyperlipidemia.

近年来,随着人们生活水平的提高,生活方式的改变,高糖、高蛋白饮食摄入的增加,高脂血症的患病率在逐年提高,现已成为当今一种常见的疾病。高脂血症是指血浆中总胆固醇(total cholester-

ol, TC)和/或甘油三酯(triglyceride, TG)水平及低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoproteins cholesterol, LDLC)升高;临床上常分为高胆固醇血症、高甘油三酯血症、混合型高脂血症和低高密度脂蛋白血症四

[收稿日期] 2013-07-16

[基金项目] 四川省卫生厅科研项目(120348)

[作者简介] 王晓燕,检验技师,研究方向为免疫学,E-mail 为 wxyank@sohu.com。万沁,硕士,教授,研究方向为内分泌疾病的诊治。通讯作者陈枫,教授,研究方向为免疫学,E-mail 为 chen6305@foxmail.com。

类。高脂血症是一种隐匿性、渐进性和全身性的疾病,可引起严重的并发症,可导致动脉粥样硬化,诱发心血管疾病、高血压、高血糖、脂肪肝和胰腺炎等^[1]。p53 基因是重要的抑癌基因之一,参与调节细胞周期、细胞死亡与凋亡。最近的研究发现,p53 基因与脂代谢有关,p53 参与调控脂代谢过程中相关基因的表达^[2]。p53 可增强羧基酯脂酶(carboxylic ester of lipase, CEL)或 NPC1L1 蛋白(Niemann-Pick type C 1 like 1)的表达促进肠道对外源性脂质的吸收^[3]。p53 还可介导载脂蛋白 B48(apolipoprotein B48, ApoB48)、载脂蛋白 B 编辑复合体 1(apolipoprotein B editing complex 1, ApoBEC1)和载脂蛋白 M(apolipoprotein M, ApoM)、磷脂转化蛋白(phospholipid transfer protein, PLTP)和 CEL 的表达,影响乳糜微粒、极低密度脂蛋白(very low-density lipoproteins, VLDL)、低密度脂蛋白(low-density lipoproteins, LDL)的生成及高密度脂蛋白(high-density lipoproteins, HDL)的转化生成^[4-7]。对 p53 基因多态性研究得较多的是其第 4 外显子的 72 位密码子,已发现该位点多态性与多种肿瘤的发生相关^[8],还与瘢痕形成、子宫腺肌病等有关^[9,10]。随着对 p53 及其多态性研究的深入,其研究领域也在不断扩展。本研究试通过比较四川泸州地区汉族人群中高脂血症患者与正常对照人群 p53 基因 72 位密码子等位基因频率和基因型频率分布的差异,初步探讨 p53 基因 72 位密码子多态性与高脂血症的相关性。

1 对象和方法

1.1 研究对象

研究对象为 2010 年四川泸州地区体检人群,汉族,年龄 40 周岁以上。收集受试者一般资料(包括性别、年龄、疾病史、家族史等)及血液生化检查(包括血糖、血脂、肝肾功能等)资料。根据资料将受试者分为高脂血症组和正常对照组两组。(1)高脂血症组:参照《中国成人血脂异常防治指南》及当地检验科参考值,选取高脂血症患者 202 例。其血脂水平为:TC 和 LDL 水平均升高(TC > 5.2 mmol/L, LDL > 3.15 mmol/L),而 TG 和 HDL 均在正常范围(0.4 mmol/L < TG < 1.7 mmol/L, HDL > 1.04 mmol/L)。其中,男性 50 例,女性 152 例,年龄 56.00 ± 8.08 岁。(2)正常对照组:选取体检结果均正常的健康对照者 194 例。其中男性 51 例,女性 143 例,年龄 55.79 ± 9.93 岁。两组人群均已排除使用降脂药物、肝肾功能异常、高血糖、高血压、恶

性肿瘤、心肌梗死、脑卒中、冠心病、脂肪肝及遗传病家族史等。

1.2 基因组 DNA 的提取

收集患者和健康对照者空腹静脉血血凝块标本,采用北京庄盟血凝块 DNA 提取试剂盒,按照相应操作说明提取 DNA 样本;采用 Nanodrop1000(美国 Thermo 公司)检测 DNA 的纯度和浓度,260 nm/280 nm 吸光度比值在 1.8 ~ 2.0 之间。

1.3 引物的合成

p53 基因多态性引物由上海生物工程技术有限公司合成。引物序列为上游 5'-TCCCCCTTGCCGTC-CCAA-3';下游 5'-CGTGCAAGTCACAGACTT-3'。

1.4 p53 基因 72 位密码子多态性(rs:1042522)的检测

采用 PCR-RFLP 方法检测 p53 基因 72 位密码子基因型。PCR 采用天津天根生化科技公司 PCR 预混试剂盒,反应条件为 94℃ 5 min, 94℃ 1 min, 60℃ 45 s, 72℃ 1 min, 35 个循环; 72℃ 10 min。以灭菌水代替 DNA 模板作为阴性对照。PCR 产物大小为 279 bp。PCR 产物用限制性内切酶 BstU I(英国 NEB 公司)酶切。酶切总体积为 20 μL, 酶切 Buffer 2 μL, p53 PCR 产物 4 μL, 酶 0.5 μL, 无酶水 13.5 μL; 60℃ 水浴酶切过夜。酶切片段为 119 bp 和 160 bp。酶切产物 10 μL 经 2% 琼脂糖电泳 40 min, 用美国百乐凝胶成像系统观察结果, 如图 1 所示。

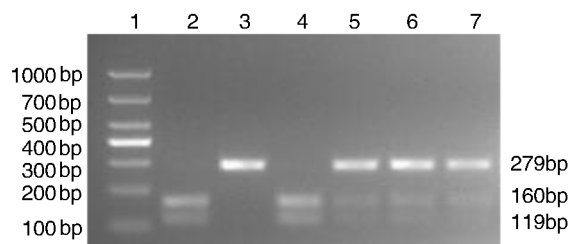


图 1. p53 基因 72 位密码子多态性检测酶切电泳图 1 为标准 DNA Marker, 2 和 4 为 Arg 纯合子, 3 为 Pro 纯合子, 5、6 和 7 为 Arg/Pro 杂合子。

Figure 1. The electrophoresis of digestion of p53 codon 72 site PCR product

1.5 测序

随机选取部分样本 PCR 产物送上海生物工程技术有限公司测序,以确定酶切实验的准确性,结果如图 2 所示。

1.6 统计学处理

应用 IBM SPSS 软件包进行统计学分析。所有数据以率来表示。基因型分布作 Hardy-Weinberg 平

衡检验;两组等位基因频率和基因型频率比较及计数资料采用 χ^2 检验,计算OR值及其95%可信区间(95% CI)。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

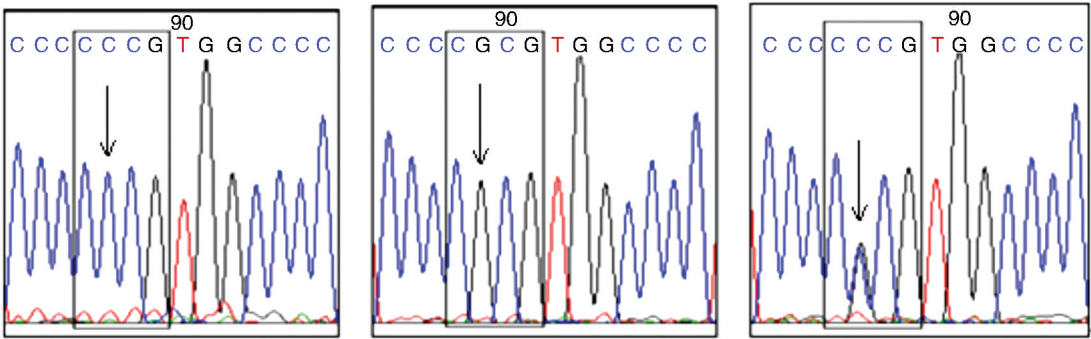


图 2. 三种基因型 PCR 产物测序图 从左至右依次为 Pro 纯合子、Arg 纯合子和 Arg/Pro 杂合子。
Figure 2. Sequencing of PCR products of three types of genotype

2 结 果

2.1 p53 基因 72 位密码子多态性位点基因型分布和等位基因频率

高脂血症组与正常对照组 p53 基因 72 位密码子位点的基因型分布均符合 Hardy-Weinberg 平衡 ($P>0.05$),具有群体代表性。两组基因型分布(χ^2

$=5.607, P=0.061$)及等位基因频率($\chi^2=2.428, P=0.119$)差异均无显著性(表 1);但进行性别分层后,发现两组女性基因型分布差异有显著性($\chi^2=8.780, P=0.012$),而男性基因型分布($\chi^2=0.253, P=0.881$)差异仍无显著性,等位基因频率在男性($\chi^2=0.016, P=0.900$)和女性($\chi^2=3.479, P=0.062$)中差异均无显著性($P>0.05$;表 2)。

表 1. 高脂血症组和正常对照组 p53 基因 72 位密码子基因型分布和等位基因频率

Table 1. Comparison of allele and genotype frequencies of p53 codon 72 polymorphism between hyperlipidemia and control groups

分 组	n	基因型(例)			等位基因(例)	
		Arg/Arg	Arg/Pro	Pro/Pro	Arg	Pro
高脂血症组	202	79(39.1%)	91(45.0%)	32(15.8%)	249(61.6%)	155(38.4%)
正常对照组	194	55(28.4%)	108(55.7%)	31(16.0%)	218(56.2%)	170(43.8%)

表 2. 两组男性和女性 p53 基因 72 位密码子基因型分布和等位基因频率

Table 2. Comparison of allele and genotype frequencies of p53 codon 72 polymorphism in man and woman between hyperlipidemia and control groups

性 别	n	基因型(例)			等位基因(例)	
		Arg/Arg	Arg/Pro	Pro/Pro	Arg	Pro
女性 高脂血症组	152	65(42.8%)	64(42.1%)	23(15.1%)	194(63.8%)	110(36.2%)
正常对照组	143	39(27.3%)	83(58.0%)	21(14.7%)	161(56.3%)	125(43.7%)
男性 高脂血症组	50	14(28.0%)	27(54.0%)	9(18.0%)	55(55.0%)	45(45.0%)
正常对照组	51	16(31.4%)	25(49.0%)	10(19.6%)	57(55.9%)	45(44.1%)

2.2 p53 基因 72 位密码子多态性位点基因型分布与高脂血症发病风险的相关性分析

高脂血症组与正常对照组中携带 Arg/Arg 基因型与携带 Arg/Pro + Pro/Pro 基因型的人群相比,其

高脂血症的患病风险增加;在女性人群中该风险更高,差异有统计学意义;而在男性人群中,高脂血症的患病风险差异无显著性(表 3)。

表 3. 高脂血症组与正常对照组基因型分布与高脂血症发病风险的关系

Table 3. Relationship of the risk of hyperlipidemia and frequencies of genotype in hyperlipidemia and control groups

基因型	高脂血症组 (n = 202)	正常对照组 (n = 194)	OR (95% CI)	P 值
总体: Arg/Pro + Pro/Pro	123 (60.9%)	139 (71.6%)	1.00	0.024
Arg/Arg	79 (39.1%)	55 (28.4%)	1.623 (1.065 ~ 2.473)	
女性: Arg/Pro + Pro/Pro	87 (57.2%)	104 (72.7%)	1.00	0.005
Arg/Arg	65 (42.8%)	39 (27.3%)	1.992 (1.222 ~ 3.247)	
男性: Arg/Pro + Pro/Pro	36 (72.0%)	35 (68.6%)	1.00	0.711
Arg/Arg	14 (28.0%)	16 (31.4%)	0.851 (0.362 ~ 2.000)	

3 讨 论

p53 基因是一种抑癌基因,是迄今为止发现的与人类肿瘤最密切相关的基因。人类 p53 基因位于 17 号染色体 p13,全长约 16 ~ 20 kb,由 11 个外显子和 10 个内含子组成,编码 393 个氨基酸、相对分子量为 53 kDa 的核内磷酸化蛋白。以往对 p53 的研究主要集中在细胞周期的调控、细胞分化、细胞凋亡、与肿瘤发生发展的关系等。随着研究的深入, p53 的研究方向在改变,其方向涉及免疫系统、代谢功能、生殖、长寿、干细胞生成等等^[11]。p53 基因 72 位密码子多态编码的氨基酸为精氨酸(Arg) 和脯氨酸(Pro),含 Arg 和 Pro 的两种 p53 均为野生型,但分子生物学行为和功能不完全相同^[12]。

本研究以中国四川泸州地区 202 例高脂血症患者和 194 例正常对照者为对象,分析了 p53 基因 72 位密码子多态的基因型及基因频率的分布。结果显示两组间基因型及基因频率的分布均无显著性差异($P>0.05$)。但两组中女性之间的基因型分布具有显著性差异($P=0.012$);基因型与疾病发生风险的分析显示,携带 Arg/Arg 基因型女性人群较携带 Arg/Pro 和 Pro/Pro 基因型的人群高脂血症的患病风险增加了 99.2% ($r=1.992$, 95% CI 1.222 ~ 3.247),而男性中基因型及基因频率分布并不存在差异。本研究中高脂血症组人群血脂水平为总胆固醇和低密度脂蛋白均增高,提示 Arg/Arg 基因型可能是女性高胆固醇、高低密度脂蛋白血症发生的危险因子。与我们研究结果相似的是,Smith 等人^[13]研究巴西 383 例年龄在 66 至 97 岁老年人群 p53 基因 72 位密码子多态性与心血管疾病发生风险的关系显示,相比 Pro 等位基因,携带 Arg 等位基因的人群高密度脂蛋白水平偏低,且易发生心血管疾病。其 Arg/Pro 等位基因频率分别为 69% 和 31%。而另一项针对科威特人群 158 例冠状动脉疾

病患者和 142 例糖尿病患者发病率与 p53 基因 72 位密码子多态性关系的研究显示,Arg 和 Pro 基因型和基因频率与冠状动脉疾病和糖尿病的发生均无相关性^[14]。

本研究中,p53 基因 72 位密码子多态性在女性人群中存在差异,其可能的解释是 p53 蛋白功能的发挥与激素有关系。Noma 等^[15]人研究日本妇女 p53 72 位密码子多态性与雌激素受体阳性乳腺癌的风险显示,携带 p53 Pro/Pro 基因型和雌激素受体阳性的绝经后妇女,患乳腺癌风险增加。本研究中,研究对象为 40 岁以上人群,女性多已进入绝经期,p53 的功能可能会因 Arg/Pro 多态的不同而不同。Feng 等^[16]研究人 p53 基因 72 位密码子 Arg/Pro 敲入小鼠体外受精的实验显示 p53 和雌激素受体 α 可通过调节子宫白血病抑制因子(LIF) 的转录而影响小鼠的繁殖率。携带 Arg 基因型的雌鼠比携带 Pro 基因型的雌鼠表达更高的 LIF,繁殖率更高。另外,在进行试管婴儿手术的患者中,其多数携带 Pro 基因型,Pro 基因型是体外受精胚胎移植失败的一个危险因素^[17]。LIF 除可调节细胞的增殖、分化和表型外,还可抑制脂蛋白脂酶(lipoprotein lipase, LPL) 的活性^[18]。LPL 是血浆中清除 TG 的限速酶,可催化 CM 和 VLDL 核心的 TG 水解,使机体能利用经食物摄取和肝脏合成的脂肪;LPL 还参与 VLDL 和 HDL 之间的载脂蛋白和磷脂的转换,在 HDL 成熟过程中发挥重要作用^[19]。另外,性激素也可能参与糖、脂代谢,有研究表明性激素在高于或低于生理范围时可促进胰岛素抵抗^[20],在高性激素状态下,可能影响新型脂肪细胞因子 Visfatin 的功能而参与高性激素导致的糖、脂代谢紊乱^[21]。但对于不同性别个体,p53 是如何影响脂代谢的过程还有待进一步的研究证实。

不同的研究对象得出的结果有较大差异,其原因可能与研究的地区、种群、环境与其他因素的相

互作用及研究人群的统计样本量等有关。本研究对象中,女性为 295 例,男性为 101 例,男性研究例数相对较少,要研究清楚 p53 功能在性别中的差异,还应进一步扩大样本量,结合年龄段、女性绝经情况等逐一分层分析。

[参考文献]

[1] 严 励, 万 川. 糖尿病血脂异常研究新进展[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2012, 28(9): 704-709.

[2] Goldstein I, Rotter V. Regulation of lipid metabolism by p53-fighting two villains with one sword[J]. Trends Endocrinol Metab, 2012, 23(11): 567-575.

[3] Goldstein I, Ezra O, Rivlin N, et al. p53, a novel regulator of lipid metabolism pathways[J]. J Hepatol, 2012, 56(3): 656-662.

[4] Ashur-Fabian O, Har-Zahav A, Shaish A, et al. ApoB and apobec1, two genes key to lipid metabolism, are transcriptionally regulated by p53[J]. Cell Cycle, 2010, 9(18): 3761-770.

[5] Yazdanyar A, Yeang C, Jiang XC. Role of phospholipid transfer protein in high-density lipoprotein-mediated reverse cholesterol transport[J]. Curr Atheroscler Rep, 2011, 13(3): 242-248.

[6] Camarota LM, Chapman JM, Hui DY, et al. Carboxyl ester lipase cofractionates with scavenger receptor BI in hepatocyte lipid rafts and enhances selective uptake and hydrolysis of cholesteryl esters from HDL3[J]. J Biol Chem, 2004, 279(26): 27 599-606.

[7] Hu YW, Zheng L, Wang Q. Characteristics of apolipoprotein M and its relation to atherosclerosis and diabetes[J]. Biochim Biophys Acta, 2010, 1801(2): 100-105.

[8] 管立学, 杜欣莹, 王守讯. p53 基因 CD72Arg/Pro 多态性与肿瘤易感性研究进展[J]. 国外医学遗传学分册[J]. 2005, 28(6): 354-357.

[9] 卓 阳, 高建华, 罗深秋, 等. 瘢痕疙瘩发病风险与 p53 基因第 72 位密码子多态性的关系[J]. 中华整形外科杂志, 2005, 21(3): 201-203.

[10] Hsieh YY, Lin CS. P53 codon 11, 72, and 248 gene pol-

ymorphisms in endometriosis[J]. Int J Biol Sci, 2006, 2(4): 188-193.

[11] Levine AJ. Introduction: the changing directions of p53 research[J]. Genes Cancer, 2011, 2(4): 382-384.

[12] Zhang W, Hu GY, Deisseroth A. Polymorphism at codon 72 of the p53 gene in human acute myelogenous leukemia[J]. Gene, 1992, 117(2): 271-275.

[13] Smith MA, Sliva MD, Cendoroglo MS, et al. TP53 codon 72 polymorphism as a risk factor for cardiovascular disease in a Brazilian population[J]. Braz J Med Biol Res, 2007, 40(11): 1 465-472.

[14] Alkhalaf M, Al-Bustan S, Hamoda H, et al. Polymorphism of p53 gene codon 72 in Kuwaiti with coronary artery disease and diabetes[J]. Int J Cardiol, 2007, 115(1): 1-6.

[15] Noma C, Miyoshi Y, Taguchi T, et al. Association of p53 genetic polymorphism (Arg72Pro) with estrogen receptor positive breast cancer risk in Japanese women[J]. Cancer Lett, 2004, 210(2): 197-203.

[16] Feng Z, Zhang C, Kang HJ, et al. Regulation of female reproduction by p53 and its family members[J]. FASEB J, 2011, 25(7): 2 245-255.

[17] Kang HJ, Feng Z, Sun Y, et al. Single-nucleotide polymorphism in the p53 pathway regulate fertility in humans[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106(24): 9 761-766.

[18] Marshall MK, Doerrler W, Feingold KR, et al. Leukemia inhibitory factor induces changes in lipid metabolism in cultured adipocytes[J]. Endocrinology, 1994, 135(1): 141-147.

[19] 杜纪坤, 黄青阳. 脂蛋白脂酶基因的研究进展[J]. 中华医学遗传学杂志, 2007, 29(1): 8-16.

[20] Livingston C, Collison M. Sex steroids and insulin resistance[J]. Clin Sci, 2002, 102(2): 151-166.

[21] 温 宇, 杨姗姗, 刘 婧, 等. 性激素对 3T3-L1 脂肪细胞 Visfatin 表达的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2012, 20(10): 871-875.

(此文编辑 许雪梅)