

肥胖儿童血清脂蛋白(a)水平及载脂蛋白(a)的遗传表型研究

刘德文 侯泽^① 张悦红 陈红杰 吕华^② 谢瑞王^③

王美德^④ 赵吉娥^③ 武纯^④ 李瑞琦^③ 强梅

(山西医科大学生物化学教研室, 太原 030001)

Studies on Sera Lipoprotein (a) Levels and Genetic Phenotypes of Apolipoprotein(a) in Obese Children

LIU De-Wen, HOU Ze, ZHANG Yue-Hong, CHEN Hong-Jie, LIU Hua, XIE Ri-Huang, WANG Mei-De, ZHAO Ji-E, WU Chun, LI Ri-Qi and QIANG Mei

(Department of Biochemistry, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)

ABSTRACT This report presents the studies of sera levels of lipoprotein(a) [Lp(a)] and genetic polymorphism of apolipoprotein(a) [apo(a)] in obese children. The aims of this study were to explore the relationship between obese children and high sera levels of Lp(a) and the distributive characteristics of genetic phenotypes of apo(a). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to measure sera levels of Lp(a) in 57 obese children and their parents. The genetic phenotypes of apo(a) were determined by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Western blot analysis. Of 75% subjects of obese children with high Lp(a) level, one side of their parents had high concentration of sera Lp(a). A total of 7 different phenotypes of apo(a) were determined from 41 obese children, including 5 different phenotypes of single-isoform and 2 different phenotypes of two-isoform. Obese children mostly had S1 and S2 phenotypes, but the controls generally had S4 phenotype. The similar reports have not been found in the recent

5-year references. The study of genetic phenotypes of apo(a) in obese children can be of great importance to protection and treatment of the cardiovascular and cerebrovascular disease induced by obesity.

KEY WORDS Obese; Child; Lipoprotein(a); Apolipoprotein(a); Polymorphism; Genetic phenotype

摘要 本文对肥胖儿童血清脂蛋白(a)水平及血清载脂蛋白(a)多态性进行分析,以探讨肥胖儿童与高脂蛋白(a)血症的关系及其血清载脂蛋白(a)遗传表型的分布特点。用酶联免疫吸附法测定57名肥胖儿童及其双亲血清脂蛋白(a)的含量,用十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳和Western blot免疫印迹技术测定载脂蛋白(a)遗传表型。结果发现高脂蛋白(a)血症的肥胖儿童中约有75%的患儿其父母中有一方伴发高脂蛋白(a)血症;在41名肥胖儿童中共检出7种载脂蛋白(a)遗传表型(其中5种单异构体表型,2种双异构体表型)。肥胖儿童中以低分子量的S1和S2表型为主;非肥胖儿童以高分子量的S4表型为主,在近5年文献中尚未见类似报道。

关键词 肥胖; 儿童; 脂蛋白(a); 载脂蛋白(a); 多态性; 遗传表型

近10年来国内儿童肥胖症的发病率虽呈上升趋势,但因其病理体征及近期危害不明显,而其潜在的远期危害性追踪研究较少,故未被研究者重视。近5年来国外一些研究发现^[1,2],肥胖儿童多伴有脂质代谢紊乱,且其诱发动脉粥样硬化的发生与脂质紊乱类型有关。近年来的研究资料证实,血清脂蛋白(a)含量升高是导致冠状动脉粥样硬化性心脏病与血栓形成的一个独立的危险因素^[3]。脂蛋白(a)是一种不受饮食、性别和种族影响,与遗传有关的血清脂蛋

山西省科委资助项目 (952075)

① 研究生,现在大同医学专科学校生物化学教研室

② 山西省卫生厅

③ 太原钢铁公司总医院儿科

④ 太原西山矿务局总医院

白。1993年 Wilcken^[4]的研究指出:血清高脂蛋白(a)含量的儿童其父母双亲患冠状血管疾病明显增高。这一结论促使我们设想,高脂蛋白(a)血症的儿童其父母是否也有高脂蛋白(a)血症?且有资料证明脂蛋白(a)颗粒内的特异载脂蛋白—载脂蛋白(a)多态性表型中,以 S1、S2 表型常伴有高脂蛋白(a)血症与诱发心脑血管疾病有正相关关系^[5]。那么,肥胖儿是否也高发遗传性高脂蛋白(a)血症?以哪一种载脂蛋白(a)遗传表型为主?这就是本文的研究宗旨,即为进一步探讨肥胖儿诱发心脑血管疾病关系的前瞻性研究提供资料。此外,本文尚对一名肥胖儿家族三代成员的脂蛋白(a)水平进行分析。

1 对象与方法

1.1 研究对象

1.1.1 肥胖儿组 在 1400 名学龄儿童体检中筛选 57 名肥胖儿童(男 31,女 26),年龄 7~12 岁(平均 10.5 \pm 1.86 岁)。肥胖儿判断标准,按姚家兴^[6]推荐方法进行。其中重度肥胖者 50 名,中度 6 名,轻度 1 名。临床检查排除内分泌、中枢神经系统疾患引起的肥胖症。心电图、丙氨酸转氨酶皆正常。肥胖儿父母亲各 39 名,其中父亲肥胖者 6 名,母亲超重肥胖者 1 名,均为躯体型肥胖。

1.1.2 非肥胖儿组 非肥胖儿童自愿受检查 19 名(男 11 名,女 8 名),年龄 7~11 岁(平均 9.6 \pm 0.5 岁)其身高、体重、皮脂厚度皆在正常范围。心、肝功能及神经系统皆正常,作为对照组。非肥胖儿的父母亲各 10 名,其中一名母亲超重肥胖亦为躯体型肥胖。

1.2 实验方法

1.2.1 血清脂质、脂蛋白及载脂蛋白测定方法 取空腹 10~12 h 静脉展血,1 h 内分离血清(2 500 r/min,离心 25 min)。为了进行肥胖儿高脂蛋白血症分型(按 WHO 1970 改进法)以本室建立的常规方法(酶法)测定血清总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDLC)、极低密度脂蛋白胆固醇(very LDLC, VLDLC)、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDLC)及其亚组分 HDL₂C 和 HDL₃C 的含量;血清载脂蛋白 A 及 B100 的含量用免疫浊度法,血清脂蛋白(a)含量用酶联免疫吸附(enzyme linked immunosorbent assay,

ELISA)法测定,采用非配对 *t* 检验做显著性检验。因血清脂蛋白(a)含量呈现偏态分布,故作对数转换以 XG \pm SG 表示,再进行 *t* 检验。高脂蛋白(a)血症的判断标准:血清 TC、TG、VLDLC、LDLC 等皆正常,仅单项血清脂蛋白(a)含量 >300 mg/L 者。

1.2.2 载脂蛋白(a)遗传表型测定 取肥胖儿血清 20 μ l 按常规方法进行垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳缓冲液为 pH 8.6,电压 100 V,电泳 6.5 h。

1.2.3 Western blot 免疫印迹分析 从垂直板中取出凝胶置于转移电泳槽(Bio-RAO 产,硝酸纤维素膜为 Amersham 产品),8 $^{\circ}$ C, 150 mA 电泳 5 h 后,用 0.01% 氨基黑 10B 染色,进行肥胖儿血清载脂蛋白(a)遗传表型测定,如 Figure 1 所示。采用 Utermann 推荐的方法^[7],按照载脂蛋白(a)与载脂蛋白 B100 在凝胶中迁移率快慢分为:F(载脂蛋白 B100 迁移块),B(与载脂蛋白 B100 位置相似)。用 Sigma 产载脂蛋白 B100 纯品作为电泳标记物鉴定载脂蛋白 B100 的位置,试剂编号 113H9492),S1、S2、S3 及 S4(依次较 B 移动慢),共分为 6 种载脂蛋白(a)异构体(即多态性)。

2 结果

2.1 高脂蛋白血症分型

57 例肥胖儿童高脂蛋白血症分型中发现,血脂正常者 11 例(占 19.3%);N 型高脂蛋白血症 15 例(占 26.3%);高脂蛋白(a)血症 20 例(占 35.1%);I a I b 型二者共 11 例(占 19.3%)。对上述 20 例伴发高脂蛋白(a)血症的肥胖儿的父母的血清脂蛋白(a)含量进行分析发现,有 3 例为父母双方都患有高脂蛋白(a)血症;有 13 例父母双方有一方患有高脂蛋白(a)血症;有 4 例父母双方血清脂蛋白(a)含量皆正常,即约有 80% 的患者其父母中有一方伴发高脂蛋白(a)血症。

2.2 肥胖儿童血清载脂蛋白(a)遗传表型分布

研究结果如 Table 1 所示。在 41 名肥胖儿童中共检出 7 种载脂蛋白(a)表型,其中 5 种单载脂蛋白(a)异构体表型,2 种双载脂蛋白(a)异构体表型,与 16 名非肥胖儿童的载脂蛋白(a)表型比较可见;肥胖儿组 S1、S2 表型多见(共占 37%),其血清脂蛋白(a)含量达到 257.0 \pm 2.9 mg/L($\bar{x}\pm s$),因为 41 例中仅有 5 例 B 型且未发现 F 表型故未做统计。但在 14 例未

检出载脂蛋白(a)多态性的肥胖儿中及5例载脂蛋白(a)表型为S4的非肥胖儿中,其血清脂蛋白(a)含量都低于50 mg/L。在Figure 1中有S1/S2及S3/S4双载脂蛋白(a)异构体的图谱,但在资料整理中发为I型糖尿病可疑合并者,故删除。此外,在实验中记录到一例S2/S3表型,照像时凝胶板破裂,故Figure 1中未能显像。实验中未发现F、S1/S3、S1/S4及S2/S4双异构体表型。

2.3 血脂测定结果

肥胖儿及其父母双亲的血清TG及VLDLC含量都高于非肥胖儿及其父母双亲,差异有显著性意义(P分别<0.001和<0.05)。但是,肥胖儿及其父母双亲与非肥胖儿及其父母双亲之间血清TC、LDLC及载脂蛋白

AI、载脂蛋白B100的含量无显著性差异(Table 2)。

Table 1. Phenotypic distribution of sera apo(a) in obese children.

	obese children(n=41)		Non obese children(n=16)	
	n	%	n	%
Null	14	34.1	6	37.5
B	5	12.2	—	—
S1	9	22.0	1	6.3
S2	6	14.6	1	6.3
S3	3	7.3	3	18.8
S4	1	2.4	5	31.3
B/S1	2	4.9	—	—
S2/S3	1	2.4	—	—



B/S4 S1/S4 S4 S4 S1 S1 S3 S1/S2

Figure 1. Phenotypes of apo(a) in obese children.

Table 2. Sera levels of lipoprotein cholesterol apoprotein and Lp(a) in obese children and their parents(mmol/L, $\bar{x} \pm s$)

	obese children		Non-obese children	
	children(n=57)	parents(n=78)	children(n=19)	parents(n=32)
age(years)	10.5±1.86	36.2±2.83	9.60±1.51	33.4±2.70
TG	1.15±0.65 ^a	1.23±0.46 ^a	0.68±0.23	1.03±0.36
TC	4.81±0.85	5.58±1.23	5.13±0.48	4.74±1.30
HDLc	1.65±0.17	1.56±0.15	1.67±0.15	1.57±0.11
HDL ₂ C	0.76±0.12	0.71±0.13	0.78±0.09	0.69±0.11
HDL ₃ C	0.88±0.11	0.85±0.08	0.91±0.08	0.88±0.05
HDL ₂ C/HDL ₃ C	1.18±0.26	1.25±0.27	1.21±0.15	1.28±0.20
HDLc/TC	35.2±7.11	29.2±6.56	32.7±2.30	35.2±9.10
LDLC	2.93±0.89	3.78±1.20	3.21±0.52	2.99±1.33
VLDLC	0.23±0.13 ^c	0.25±0.09 ^a	0.14±0.04	0.19±0.06
apo A I	1.14±0.26	1.54±0.34	0.92±0.40	0.98±0.23
apo B100	0.92±0.20	0.95±0.24	0.88±0.29	0.99±0.33
Lp(a) ^a	204.2±2.59 ^c	142.07±0.34 ^a	137.7±2.92	137.1±0.33

^a: P<0.05, ^c: P<0.001; compared with non-obese children. $\bar{x} \pm s$ (geometric mean ± geometric standard deviation, mg/L)

2.4 家族调查

对一个肥胖症家族的血清脂蛋白(a)含量及高脂蛋白血症调查中发现(Figure 2)。祖孙三代都患有肥胖症,其父是高脂蛋白(a)血症合并Ⅰa型高脂蛋白血症,其母(非肥胖症)为高脂蛋白(a)血症,其祖母为高脂蛋白(a)血症,其祖父为重度肥胖症合并Ⅰa型高脂蛋白血症,其祖母为高脂蛋白(a)血症。

蛋白(a)血症合并Ⅰa型高脂蛋白血症,患儿姑姑为肥胖症合并Ⅰa型高脂蛋白血症及高脂蛋白(a)血症,其祖父为重度肥胖症合并Ⅰa型高脂蛋白血症,其祖母为高脂蛋白(a)血症。

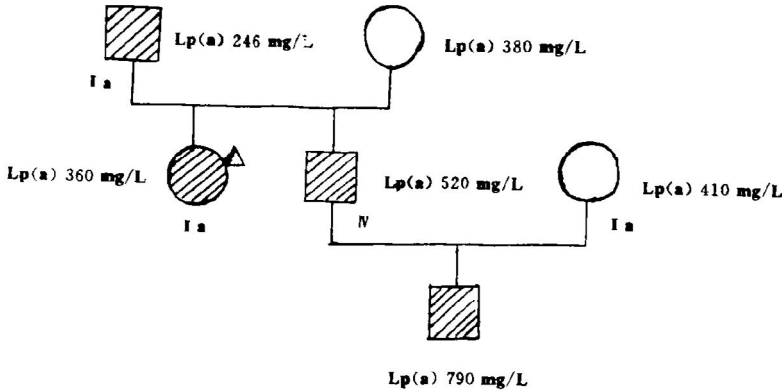


Figure 2. Family tree of one obese children.

3 讨论

近年来国内外的研究都证明了高脂蛋白(a)血症是诱发动脉粥样硬化、冠心病及血栓形成的独立的危险因素^[3,4]。Wilcken等^[4]最近对2010名8~12岁儿童的研究提示,儿童血清脂蛋白(a)及载脂蛋白B水平升高者,其父母及祖父母中患冠心病的危险性增加,虽然文中未提及其父母及祖父母是否也并发高脂蛋白(a)血症,但从另一方面说明即使高脂蛋白(a)血症的儿童目前尚未出现冠状血管疾患,也提示早期筛检出高脂蛋白(a)血症的儿童,有助于早期预测诱发心脑血管疾患的危险因素并给予早期预防措施。

现已证实脂蛋白(a)分子内蛋白质部分由载脂蛋白B100和特异的载脂蛋白(a)组成,二者以二硫键相连。载脂蛋白(a)是一个结构复杂的糖蛋白。因其分子中三环结构4(Kringle 4)的拷贝数目不同而呈现分子量大小不等(300 000~700 000)的多态性,载脂蛋白(a)的遗传表型受第6号染色体长臂上的等位基因(*LpF*、*LpB*、*LpS1*、*LpS2*、*LpS3*、*LpS4*、*Lp0*)控制,载

脂蛋白(a)的结构基因控制血清脂蛋白(a)的含量,通常血清载脂蛋白(a)的F及B表型常伴有高脂蛋白(a)含量,S1及S2表型伴有中等度血清脂蛋白(a)含量,而S3和S4表型者血清脂蛋白(a)含量处于低水平^[8]。国内文献中尚未见到关于肥胖儿童血清脂蛋白(a)含量分析及血清载脂蛋白(a)遗传表型的报道。近5年国外文献中也未查到关于肥胖儿童血清载脂蛋白(a)遗传表型的研究报告。但已发现肥胖症患者的肥胖基因^[9]。血清载脂蛋白(a)多态性的分析及载脂蛋白(a)遗传表型的研究,为进一步从分子水平探讨肥胖儿童的DNA变异开辟一个新的途径。

上述从血清脂蛋白(a)的含量及血清载脂蛋白(a)遗传表型及一个肥胖儿家族的高脂蛋白(a)血症探讨肥胖儿童的遗传因素,但也不能完全排除饮食、锻炼、环境等因素的影响。从本文对肥胖儿童高脂蛋白血症分型中可见,N型高脂蛋白血症是肥胖儿的主发型。众所周知,N型患者以血清TG及VLDL含量增高为主要特征。VLDL是在肝脏合成的,是内源性甘油

三酯的载体,是由于摄取过多的糖类在肝脏转化成甘油三酯所致。已证实成年人驱体性肥胖症患者,体内脂蛋白脂肪酶活性降低,而肝脂肪酶活性增高,使血中富含 TG 的脂蛋白(乳糜微粒及 VLDL)中脂肪分解减少,使血清 TG、VLDL 含量升高^[10]。但在肥胖儿体内酶活性改变的资料尚未见到,有待今后进一步探讨。

参考文献

- 1 Bellu R (孔梅译). 米兰地区学龄期肥胖儿童 apo A I 和 apoB 的研究. 国外医学儿科分册, 1984, 21: 220.
- 2 Ruowei LI, Connorio, Buckley, et al. Relation of activity levels to body fat in infants 6 to 12 months of age. *J Pediatrics*, 1995, 126: 353.
- 3 Jauhainen M, Koskinen P, Ehnholm C, et al. Lipoprotein(a) and coronary heart disease risk; a nested case-control study of Helsinki heart study participants. *Atherosclerosis*, 1991, 89: 59.
- 4 Wilcken DEL, Wang X-L, Greenwood J, et al. Lipoprotein(a) and apolipoproteins B and A I in children and coronary vascular events in their grandparents. *J Pediatrics*, 1993, 123: 519.
- 5 Sandholzer CH, Boerwinkle K, Saha N, et al. Apolipoprotein(a) phenotypes, Lp(a) concentration and plasma lipid levels in relation to coronary heart disease in a Chinese population; Evidence for the role of the apo(a) gene in coronary heart disease. *J Clin Invest*, 1992, 89: 1 040.
- 6 姚家兴, 刘春荣, 陈争, 等. 7~12 岁儿童体脂肪含量研究. 中华预防医学杂志, 1994, 28: 213.
- 7 Utermann G, Menzel HJ, Kraft HG, et al. Lp(a) glycoprotein phenotypes; inheritance and relation to Lp(a)-lipoprotein concentrations in plasma. *J Clin Invest*, 1987, 80: 458.
- 8 Utermann G, Kraft HG, Menzel HJ, et al. Genetics of the quantitative Lp(a) lipoprotein trait I; relation of Lp(a) glycoprotein phenotypes to Lp(a) lipoprotein concentration in plasma. *Hum Genet*, 1988, 18: 41.
- 9 Fredman JM (李满译). 科学家首次找到肥胖基因. 生命化学, 1995, 15: 39.
- 10 Despres JP, Ferland M, Moorjanis, et al. Role of hepatic triglyceride lipase activity in the association between intra-abdominal fat and plasma HDL-cholesterol in obese women. *Arteriosclerosis*, 1989, 9: 485.

(1996-10-14 收到)

· 书 讯 ·

《急诊学》出版发行

由北京、上海、南京、同济医科大学及泰山医学院等 40 余所高等医学院校和医疗科研单位近百位知名专家、教授执笔撰写的《急诊学》一书,于 1997 年 1 月由中国医药科技出版社出版发行。著名急诊医学专家、北京协和医院邵孝铨教授主审,中华医学会急诊医学学会主任委员王一钟教授作序。全书共 16 章,分别介绍了急诊医学的发展历史、现场急救与护送、重症监护病房的实施、心肺脑复苏、危重病监测、各种危急重症、灾难医学、急诊影像学、抗生素和糖皮质激素在急诊病人中的应用及常用急救技术等,书末收录了急诊常用药物和检验正常值等。该书理论联系实际,具有很高的学识水平,又极富实用价值。适用于从事急诊工作的内、外、妇、儿和眼耳鼻喉等各科医护人员学习与参考,可作为医学院校教材,同时也适合于基层医务人员学习与查阅之用。全书 100 余万字,16 开本,定价 29.80 元。欲订购者,请按下列地址汇款订购,款到发书。

汇款地址: 山东省泰安市泰山医学院附属医院 史继学收。

邮编: 271000

电话: (0538)8415581 或 8417152 转 2325、2230