

武汉地区 85 名汉族人群载脂蛋白(a)基因 5' 侧翼 序列多态性及与脂蛋白(a)水平的关系

何春燕 洪嘉玲 武栋成

(湖北医科大学生物化学教研室, 武汉 430071)

The Sequence Polymorphism in the Apolipoprotein (a) 5' Flanking Frag- ment and Its Relation with Lipoprotein (a) Levels in 85 Individuals of Chinese Han Nationality

HE Chun-Yan, HONG Jia-Ling and WU Dong-Cheng
(Department of Biochemistry, Hubei Medical University,
Wuhan 430071, China)

ABSTRACT

Aim The elevation of the plasma lipoprotein (a) level is an independent genetic risk factor for atherosclerosis and its major manifestations. The wide variation in lipoprotein (a) plasma levels is explained to a large extent by a remarkable size polymorphism of the apolipoprotein (a) isoforms and by unidentified sequence variation in the apo(a) gene. A search was made for sequence variants in the 5' flanking region of the apo(a) gene and its relation with lipoprotein (a) levels in 85 unrelated healthy subjects of Chinese Han Nationality.

Methods The plasma concentrations of lipoprotein (a) were measured within one week using a sandwich enzyme linked immunosorbent assay. Pairs of 25-base oligonucleotides were used to amplify sequences -59 to +325 of the apo(a) gene from genomic DNA using polymerase chain reaction (PCR). The PCR-amplified DNA fragments were screened for single strand DNA conformation polymorphism (SSCP) using a modification of the method of Orita.

Results One single-strand DNA conformation polymorphism in the apo(a) 5' flanking 384 bp frag-

ment was reported. The genotype distribution in 85 healthy unrelated subjects were 0.812 for genotype I, 0.188 for genotype II. The mean lipoprotein (a) level in the subjects with genotype II was higher than that with genotype I, but the difference did not reach statistical significance. The sequence polymorphism was not associated with the differences in the plasma concentrations of lipoprotein (a).

Conclusions Sequence variants exist in the apolipoprotein (a) 5' flanking fragment in individuals of Chinese Han Nationality. Though no association was found between the SSCP genotypes and the plasma concentrations of lipoprotein (a), the sequence variants reported here may significantly alter gene expression *in vitro*.

KEY WORDS Lipoprotein (a); Apolipoprotein (a); Polymerase chain reaction; Single strand DNA conformation polymorphism

摘要 应用多聚酶链反应-单链构象多态性法分析载脂蛋白(a)基因 5' 侧翼 384 bp 范围内的序列多态性。武汉地区 85 名健康汉族人群载脂蛋白(a)基因有二种基因型,其频率分别为:基因型 I 型 0.812, 基因型 II 型 0.188。其中基因型 II 型受检者的脂蛋白(a)均值有升高趋势,但这种差别没有显著性。没有发现此单链构象多态性基因型与血浆脂蛋白(a)浓度间的相关性。

关键词 脂蛋白(a); 载脂蛋白(a); 多聚酶链反应; 单链构象多态性

高血浆脂蛋白(a)水平是心脑血管疾病的独立危险因素,其含量与冠状动脉狭窄程度及动脉粥样斑块中载脂蛋白(a)含量呈显著正相关^[1]。脂蛋白(a)水平个体间差异几乎完全由载脂蛋白(a)基因位点控制。载脂蛋白(a)基因中

Kringle IV 转录重复序列可变数(variable numbers of transcribed kringle 4 repeats, K_4 -VN-TR)决定载脂蛋白(a)异构体大小多态性且与血浆脂蛋白(a)浓度呈负相关,由此可解释个体间脂蛋白(a)水平变异的46%左右^[2]。另外的变异很可能由载脂蛋白(a)基因上 K_4 -VNTR 以外的序列变异所造成;尤其是5'侧翼区存在的序列多态位点有可能通过改变基因表达活性而进一步影响脂蛋白(a)水平^[3]。这种序列多态性与脂蛋白(a)水平的关系,为国外学者近年研究的热点,但国内尚未见相关报道。本文用多聚酶链反应—单链构象多态性法(polymerase chain reaction singlestrand DNA conformation polymorphism, PCR-SSCP)分析健康成人载脂蛋白(a)基因-59~+325 bp 的多态性,并观察其与脂蛋白(a)水平的关系。

1 对象和方法

1.1 对象

确认无心脑血管疾患的武汉地区健康成人85名,其中男48名,女37名,均为汉族。

1.2 血浆脂蛋白(a)浓度测定^[4]

取新鲜 EDTA Na_2 抗凝血,2 h 以内分离血浆,酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测脂蛋白(a)水平(南京军区总医院生物化学科脂蛋白(a)ELISA 试剂盒)。

1.3 全血模板 DNA 提取

按改良 Tritonx-100 法^[5]提取全血模板 DNA。

1.4 多聚酶链反应^[6]

多聚酶链反应(PCR)引物为:

Primer 1. 5'-TGACATTGCACTCTCAAATATTT-TA-3', Primer 2. 5'-CATATACAAGATTTTGT-AATGGGAA-3'。反应总体积 50 μl ,反应体系所含物质终浓度为 Tris HCl pH 8.3, 67 mmol/L; MgCl_2 15 mmol/L; KCl 50 mmol/L; 明胶 0.01%; dNTP 200 $\mu\text{mol/L}$ 。引物各 40 pmol,模板 DNA 约 1.0 μg 。95 $^{\circ}\text{C}$ 下预变性 10 min,加入 Taq DNA 聚合酶 2 u 及液态石蜡 30 μl ,按 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min \rightarrow 58 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 90 s 循环 15 轮;再按 94 $^{\circ}\text{C}$ 45 s \rightarrow 60 $^{\circ}\text{C}$ 45 s \rightarrow 72 $^{\circ}\text{C}$ 105 s 循环 15 轮。最后一轮延伸时间延长为 7 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 终止反应。取 10 μl PCR 产物进行 2% 琼脂糖凝胶(含 0.5 mg/L EB)电泳,余下部分-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.5 扩增产物分子量测定

采用标准 DNA Marker PGEM 3zf(+)/Hae II DNA,以已知的 DNA 片段 bp 数相对应的电泳迁移距离,取对数作图制成标准曲线;再根据扩增产物的电泳迁移距离在标准曲线上求其 bp 数。

1.6 单链构象多态性分析^[7]

1.6.1 PCR 产物变性 (1)碱变性 取 10 μl PCR 产物,加 0.5 mol/L NaOH 及 10 mmol/L EDTA(pH 8.0)各 1 μl ,55 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min,加 3 μl 含 0.5% 溴酚蓝的甲酰胺后立即电泳。(2)热变性 取 25 μl 扩增产物,加 300 μl 无水乙醇,离心沉淀 DNA,室温干燥后加 5 μl TE(10 mmol/L Tris HCl, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0)溶解,再加 20 μl 98% 甲酰胺(含 20 mmol/L EDTA,0.5% 溴酚蓝),95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 min,立即置冰乙醇冰浴 3 min 后电泳。

1.6.2 中性聚丙烯酰胺凝胶电泳 取变性扩增产物迅速加样于 6% 聚丙烯酰胺凝胶中(丙烯酰胺:甲叉双丙烯酰胺为 29:1),电泳缓冲液为 1 \times TBE(89 mmol/L Tris-Boric acid, 10 mmol/L EDTA)电压 8 V/cm,4 $^{\circ}\text{C}$ 电泳 3.5~5 h。电泳完毕后凝胶经溴化乙锭染色 30 min,紫外灯下观察结果并分型。

1.7 统计学处理 实验结果采用 t 检验和 χ^2 检验进行处理,相互关系进行相关回归判别分析。

2 结果

2.1 多聚酶链反应

扩增产物经琼脂糖及聚丙烯酰胺凝胶电泳后均显示一条强荧光带,查 DNA Marker 标准曲线,可知扩增产物的长度相当于 384 bp,其大小与预期结果相符合(图 1 和图 2, Figure 1 and Figure 2)。

2.2 单链构象多态性分析

单链构象多态性分析可见两种基因型,其中一种单链带型由相距较远的两条带组成,命名为基因型(Genotype) I 型,另一种单链带型由相距较近的两条带组成,命名为基因型(Genotype) II 型。同一份扩增产物经碱变性、热变性两种方法分别处理后,在相同条件下进行电泳,可见变性完全,两种方法产生的单链带型未见差异,可以排除残留双链 DNA 带对带型分析的影响,同时也说明两种变性方法均适用于 SSCP 分析(图 3, Figure 3)。

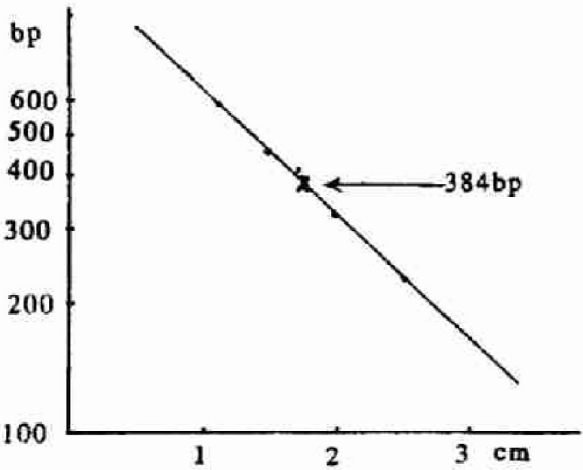


Figure 1. Map of DNA Mark.

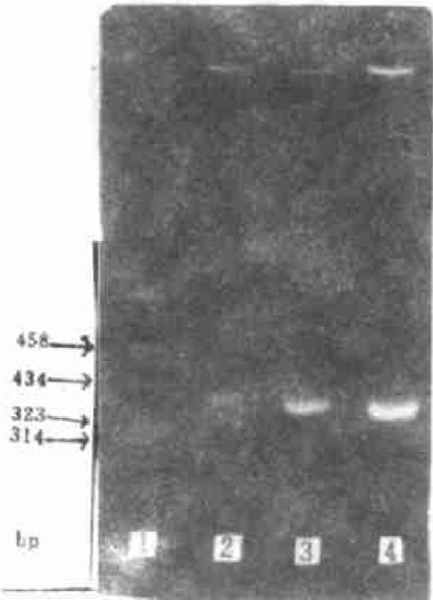


Figure 2. 6% polyacrylamide gel electrophoresis of amplified products of apo(a) gene. Lane 1. PGEM3ZF(+)/Hae III DNA. Lanes 2, 3, 4. the amplified products.

2.3 多态性与脂蛋白(a)浓度的关系

检查 85 名健康成人, 可见 Genotype I 型 69 人, 频率为 0.812; Genotype II 型 16 人, 频

率为 0.188。两组间脂蛋白(a)均值水平未见显著性差异, 但 Genotype II 型受检者的脂蛋白(a)均值有升高趋势(表 1, Table 1)。脂蛋白(a)水平大于总体水平的上四分位数的个体中 Genotype II 型所占比例似有升高, 但这种差异亦无显著性(表 2, Table 2)。故载脂蛋白(a)基因 SSCP 基因型与脂蛋白(a)水平间无相关性 ($r=0.101, P>0.05$)。

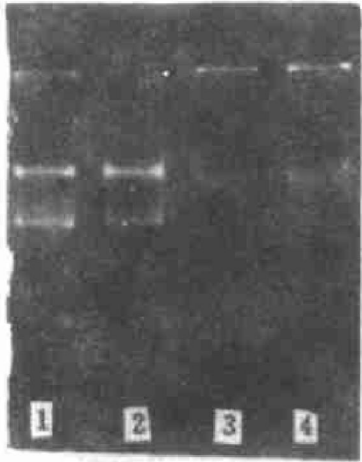


Figure 3. SSCP analysis of the amplified products of apo(a) gene (6% nondenaturing polyacrylamide gel, no glycerol). Lanes 1 and 2, Genotype I, sample 24; Lanes 3 and 4, Genotype II, sample 67; Lanes 1 and 3, Denaturation in high temperature; Lanes 2 and 4, Denaturation in alkaline solution.

Table 1. The distributive frequency (DF) and the plasma lipoprotein(a) levels in the different SSCP genotypes.

Genotypes	n	DF ^①	plasma Lipoprotein(a) level ($\bar{x} \pm s$, mg/L)
I	69	0.812	168 \pm 83
II	16	0.188	206 \pm 132*

① DF: distributive frequency. *: $P>0.05$, compared with Genotype I.

Table 2. Distribution of 85 healthy unrelated subjects with respect to quartile of lipoprotein (a) levels and SSCP genotypes at the apo (a) locus.

Lp(a) percentile	Genotype I		Genotype II		total	
	n	%	n	%	n	%
0~74	56	83.6	11	16.4	67	78.8
75~100	13	72.2	5	27.8	18	21.2
Total	69	81.2	16		85	100

P>0.05

3 讨论

近年的研究表明,脂蛋白(a)水平个体间的高度差异很可能由载脂蛋白(a)基因上包括K_a-VNTR 在内的数个序列多态位点共同控制。由于脂蛋白(a)水平在一定程度上可能取决于载脂蛋白(a)基因5'区的功能状态,许多学者开始研究载脂蛋白(a)基因5'侧翼区的序列多态性及其对基因表达和脂蛋白(a)水平的影响。Trommsdorff 等^[8]新近报道,白种人群中载脂蛋白(a)基因5'侧翼第-1231 位存在的(TTT-TA)_n 五核苷酸重复数目多态性(5'-pentanucleotide repeat polymorphism, 5'-PNRP)与血浆脂蛋白(a)浓度显著负相关,可解释个体间脂蛋白(a)水平差异的 10%~14%。但目前尚未确认哪一种序列多态性能独立解释脂蛋白(a)水平的所有变异。1993 年 Cohen 等^[6]报道载脂蛋白(a)基因5'侧翼-59~+325 bp 范围内有一多态位点,位于+120 bp 处(G→A),基因频率分别为 A 14%,G 86%,杂合率 24%。本文试图调查中国人群中该片段的序列多态性分布情况。结果表明汉族人群载脂蛋白(a)有两种 SSCP 基因型,但尚未发现这一变异与脂蛋白(a)水平有相关性,这点与相关报道一致。本实验中所见 SSCP 多态性只有通过序列分析才能揭示

变异的实质。同时,由于所取样本例数有限,而且该位点的变异对脂蛋白(a)水平的影响可能为 K_a-VNTR 的影响所掩盖,故尚不能排除该 SSCP 多态位点对脂蛋白(a)水平的可能作用。

参考文献

1 Armstrong VW, Cremer P, Eberle E, et al. The association between serum Lp (a) concentrations and angiographically assessed coronary atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 1986, **62**: 249~257.

2 Kraft HG, Kochl S, Menzel HJ, et al. The apolipoprotein(a) gene, a transcribed hypervariable locus controlling plasma lipoprotein(a) concentration. *Hum Genet*, 1992, **90**: 220~230.

3 Wade DP, Clarke JG, Lindahl GE, et al. 5' control regions of the apolipoprotein(a) and members of the related plasminogen gene family. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90**: 1 369~373.

4 汪俊军, 庄一义, 许平, 等. 血清脂蛋白(a)的 ELISA 测定法及参考值. *中华医学检验杂志*, 1991, **14**: 198~202.

5 Kunkel LM, Smith KD, Boyer SM, et al. Analysis of human Y-chromosome specific reiterated DNA in chromosome variants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977, **74**(3): 1 245~249.

6 Cohen JC, Chiesa G, Hobbs HH. Sequence polymorphism in the apolipoprotein (a) gene, evidence for dissociation between apolipoprotein (a) size and plasma lipoprotein(a) levels. *J Clin Invest*, 1993, **91**: 1 630~636.

7 Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, et al. Detection of polymorphism of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, **86**: 2 766~770.

8 Trommsdorff M, Kochl S, Lingenhel A, et al. A pentanucleotide repeat polymorphism in the 5' control region of the apolipoprotein(a) gene is associated with lipoprotein (a) plasma concentrations in caucasians. *J Clin Invest*, 1995, **96**: 150~157.

(1996-11-26 收到, 1997-01-31 修回)