

## • 文献综述 •

## 人载脂蛋白 E 基因限制性片段长度多态性

张国兵 江智文

(上海市第一人民医院心脏内科, 上海 200080)

**摘要** 载脂蛋白的基因变异与血脂代谢、动脉粥样硬化密切相关,测定这些变异对其研究具有重要意义。载脂蛋白 E 是参与血脂转运和代谢的重要载脂蛋白。载脂蛋白 E 基因编码第 112 位和第 158 位氨基酸的密码子存在着变异,分别构成了 E2、E3 和 E4 等位基因。以基因的限制性片段长度多态性来测定载脂蛋白 E 的基因变异,具有准确、简便等优点,已越来越多地被用来研究载脂蛋白 E 不同等位基因的生物活性以及与异常脂蛋白血症和动脉粥样硬化的关系。本文就此作一综述。

**关键词** 载脂蛋白 E; 限制性片段长度多态性

载脂蛋白 E 是富含精氨酸的载脂蛋白,它作为乳糜微粒(chylomicron)、极低密度脂蛋白(very low density lipoprotein, VLDL)和高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)的组成成分维持这些脂蛋白的稳定性,在血脂转运中起重要作用;同时作为低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)受体和乳糜微粒残粒受体的配基调节细胞对脂蛋白的摄取和降解,影响血脂的代谢<sup>[1]</sup>。载脂蛋白 E 存在着多态现象<sup>[2]</sup>,其多态性与其功能状态密切相关,是异常脂蛋白血症和动脉粥样硬化的发病因素之一。载脂蛋白 E 的多态性还与神经细胞的生长和损伤修复<sup>[3]</sup>以及 Alzheimer's 病<sup>[4]</sup>有关,因而其测定日益受到重视。早期以等电聚焦(isoelectric focusing, IEF)电泳法测定载脂蛋白 E 在蛋白质水平上的多态性,随着分子生物学的发展,近年来开始在基因水平上研究载脂蛋白 E 的多态性。本文着重讨论人载脂蛋白 E 基因的限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)及其临床意义。

## 1 载脂蛋白 E 基因

载脂蛋白 E 基因位于人类染色体 19 p13~q13 区,与载脂蛋白 C I 及 C II 基因构成紧密连锁的载脂蛋白基因簇。该基因长 3 597 bp,包括 4 个外显子和 3 个内含子。第一内含子位于 5'端非翻译区,第二内含子切断

编码载脂蛋白 E 前肽第 4 位氨基酸的密码子,第三内含子切断编码成熟蛋白质第 61 位氨基酸的密码子。mRNA 转录起始点位于第一内含子上游 44 bp 处, TATAATT 序列在转录起始点上游 33 bp 处。基因中的 Alu 重复顺序 2 个位于第二内含子内,一个位于 5'端,还有一个位于 3'端。载脂蛋白 E 成熟蛋白含 299 个氨基酸,主要由第 4 个外显子编码。

## 2 载脂蛋白 E 多态性

### 2.1 载脂蛋白 E 蛋白质的多态性

载脂蛋白 E 的多态性在蛋白质水平上最早由 Utermann 等<sup>[2]</sup>对脱脂的 VLDL 进行 IEF 电泳时发现,3 种主要异构体 E2、E3 和 E4 在人群中组合成 6 种表型,即纯合子 E2/2、E3/3、E4/4 和杂合子 E4/2、E3/2、E4/3。载脂蛋白 E 氨基酸序列分析表明 E2、E3 和 E4 的差别源于 112 位和 158 位氨基酸的替换。E3 在 112 位是中性的半胱氨酸(Cysteine, Cys), 158 位是碱性的精氨酸(Arginine, Arg); E2 均为 Cys,故比 E3 少一个正电荷;E4 则均为 Arg,比 E3 多一个正电荷。三者所带电荷不同,在 IEF 时便呈现等电点互不相同的区带。

Zannis 等<sup>[3]</sup>提出 E2、E3 和 E4 分别是由位于同一基因位点的 3 个等位基因 E2、E3、E4 所控制。因而,可由 IEF 电泳法测出载脂蛋白 E 的表型,再由表型推测相应的基因型。这种推测对于占人群总基因频率绝大部分的 E2、E3 和 E4 是正确而适用的,但对一些罕见异构体,其氨基酸替换未引起电荷变化,或虽引起电荷变化但发生于 112 位和 158 位以外的部位时,IEF 电泳法就不能发现或将其误认为电荷变化发生于 112 位或 158 位的某种常见异构体。此外 IEF 电泳法还受翻译后唾液酸化作用的影响<sup>[5]</sup>。

### 2.2 载脂蛋白 E 基因的多态性

分子生物学的发展为载脂蛋白 E 基因型的直接测定提供了方法。根据已知的载脂蛋白 E 基因碱基顺序合成的等位基因特异性寡核苷酸(allele-specific oligonucleotide, ASO)探针,与通过多聚酶链反应

(polymerase chain reaction, PCR)扩增的待测目的基因作 DNA 杂交,既能测定常见异构体的基因型,还能发现其它罕见异构体<sup>[6]</sup>。该方法所需血样少、直接、准确,但技术要求高、费时、需同位素标记,难以在普通实验室开展。另一种在基因水平上反映载脂蛋白 E 多态性的方法是 RFLP 法。

### 3 载脂蛋白 E 基因限制性片段长度多态性

#### 3.1 载脂蛋白 E 限制性片段长度多态性分析步骤

限制性片段长度多态性分析是指用限制性核酸内切酶切割染色体 DNA 上的特异性位点所形成的不同大小的片段。当 DNA 发生点突变、碱基缺失或重排导致酶切位点改变时,酶切后便形成了不同长度的异常片段。其步骤包括:提取外周血白细胞 DNA→PCR 扩增目的基因→内切酶切割→聚丙烯酰胺凝胶电泳→溴化乙锭染色显影。

#### 3.2 载脂蛋白 E 限制性片段长度多态性的分子基础

目前常用于分析载脂蛋白 E 基因 RFLP 的内切酶为 Hha I,它切割的碱基顺序为 GGCC。载脂蛋白 E 的多态性来自于基因突变,这些突变同时也改变了 Hha I 酶切位点,因而可以通过 RFLP 法来识别<sup>[7]</sup>。所扩增目的基因中产生片段长度差异的片段为 174 bp,包含了编码第 112 位和 158 位氨基酸的密码子。对于 E4,112 位和 158 位均为 Arg,其密码子 CGC 在局部形成了 GCGC 酶切位点,酶切后形成长度为 19、72、48 和 35 bp 的片段;E2 的 112 位和 158 位均为 Cys,其密码子 TGC 在局部均不能形成 GCGC,不能被 Hha I 切割,故形成长度为 91 和 83 bp 的片段;而对于 E3,编码 112 位 Cys 的密码子 TGC 在局部不能形成 GCGC 顺序,故形成长度为 91、48 和 35 bp 的片段。不同长度的片段电泳后与已知长度的标准片段相比较,即可被识别。

#### 3.3 载脂蛋白 E 多态性等电聚焦电泳和限制性片段长度多态性分析结果的比较

3.3.1 常见异构体 限制性片段长度多态性依赖于基因结构的差异,而 IEF 电泳依赖于电荷的差异,但对于常见异构体 E2、E3 和 E4,两者的结果是一致的,因为它们有共同的分子基础:编码 112 位和 158 位氨基酸的碱基发生了突变。Kontula 等<sup>[8]</sup>对 40 名随机个体同时作 IEF 电泳和 RFLP 分析,其中有 39 人两种方法的结果一致;Walden 等<sup>[9]</sup>对 22 名患有 III 型高脂蛋白血症(hyperlipoproteinemia, HLP)患者同时作 IEF 电泳和 RFLP 分析,其中 21 人结果一致,这两项研究中各自都有因一罕见异构体的出现而使二者结果不一致。Tsukamoto 等<sup>[10]</sup>对日本 104 例随机个体作 IEF 电泳和

RFLP 分析时两者结果完全一致,其中包括去唾液酸处理的 5 例。

3.3.2 罕见异构体 对于一些罕见异构体,其碱基变化只引起表达产物发生电荷变化而未引起酶切位点改变,或只引起酶切位点改变而未引起电荷变化时,则 IEF 电泳和 RFLP 分析结果便会不一致。而二者的不一致往往提示某种罕见异构体的出现。Kontula<sup>[8]</sup>的实验中发现罕见异构体 E1,该 E1 来自于 E2:甘氨酸 127→天冬氨酸,比 E2 少一个正电荷,但却未引起 Hha I 酶切位点的变化,故 IEF 电泳显示为 E1,而 RFLP 分析仍显示为 E2。Moriyamak 等<sup>[11]</sup>对 5 名 III 型 HLP 患者作载脂蛋白 E 多态性分析时发现另一罕见异构体 E1,该 E1 来自于 E3:赖氨酸 146→谷氨酸,比 E3 少两个正电荷但未影响酶切位点,故 IEF 电泳显示为 E1,而 RFLP 分析仍显示为 E3。Walden<sup>[9]</sup>的实验中检出一新异构体 E3:Arg136→Cys,比 E3 少一个正电荷,IEF 电泳时出现于 E2 带,但该替换使原来该部位的 Hha I 酶切位点丢失。RFLP 分析显示一条长 109 bp 的异常片段。其他罕见异构体为 E3:Arg142→Cys<sup>[12]</sup>亦可因酶切位点发生异常改变而电荷变化同于某一常见异构体,而使 IEF 电泳和 RFLP 分析结果不一致。

与 IEF 电泳法和 ASO 法相比,RFLP 法准确、直接、所需血样少,不受唾液酸化作用影响;不需放射性同位素标记、快速价廉、简单易行,已被越来越多地应用于载脂蛋白 E 多态性的研究。

## 4 载脂蛋白 E 多态性与临床

### 4.1 载脂蛋白 E 的多态性与血脂

载脂蛋白 E 分子的羧基端系脂质结合部位,氨基端则与受体结合有关。载脂蛋白 E 的多态性与血脂水平有关,血浆胆固醇浓度变化的 7%~9%由载脂蛋白 E 多态性决定<sup>[1]</sup>。研究表明 E2 与受体结合活性明显低于 E3<sup>[1]</sup>,使得肝脏 LDL 受体上调,胆固醇清除增加,呈现降低效应;而 E4 在体内与受体结合活性高于 E3,故血浆胆固醇有升高趋势。具体而言,与 E3 相比,E2 对血浆总胆固醇、LDL 胆固醇有降低作用<sup>[13,14]</sup>;而 E4 的作用正好相反。载脂蛋白 E 多态性对胆固醇的这些作用在正常血脂个体或异常脂蛋白血症个体均存在<sup>[13]</sup>,且不受种族差异<sup>[15,16]</sup>、环境因素<sup>[17]</sup>、性别<sup>[18]</sup>以及年龄<sup>[19]</sup>的影响。与 E3 相比,E2、E4 均有升甘油三酯作用<sup>[13,20~22]</sup>,但亦有研究认为载脂蛋白 E 多态性与甘油三酯和 HDL 胆固醇之间无相关性<sup>[15,23]</sup>。III 型 HLP 患者 90%为 E2/2 纯合子,但人群中 E2/2 纯合子只有 5%发病,提示 E2/2 为 III 型 HLP 的必要而非充分条

件<sup>[1]</sup>。

载脂蛋白 E 多态性还对血浆其它载脂蛋白产生一定影响。E2 对血浆载脂蛋白 A1<sup>[24,25]</sup>、B<sup>[17,21,23,24]</sup>、E<sup>[14,24]</sup>以及脂蛋白(a)水平<sup>[23,24]</sup>均有降低作用,而 E4 有升高作用。此外,载脂蛋白 E 多态性还与肠道胆固醇吸收有关,含 E4 个体更易于出现饮食相关性 LDL 胆固醇升高,对降脂饮食的反应性也最好<sup>[25]</sup>。

#### 4.2 载脂蛋白 E 多态性与动脉粥样硬化

人群中载脂蛋白 E 的等位基因频率分布几乎均为 E3>E4>E2(中国和日本为 E3>E2>E4),但在不同人群中其分布存在着种族差异<sup>[1,16,21]</sup>。高加索人群中 E3 频率明显低于其它人群,而中国和日本人群中 E3 频率明显高于其它人群。在心肌梗塞发病率高的芬兰人群中 E4 频率明显高于其他人群,E2 频率低于其它人群;而在低冠心病发病率的日本人群中 E4 和 E2 的频率分布正好相反。因此推测 E4 为冠心病的易患因子,而 E2 为其保护因子(除非同时患有 III 型 HLP)。

直接以冠心病病人为对象的一些研究结果尚不一致<sup>[1]</sup>。近年来有研究表明冠状动脉造影证实的冠心病病人中 E4 频率明显增高<sup>[18,20]</sup>,在急性心肌梗塞病人中亦见 E4 频率升高<sup>[19,21,26]</sup>,E2 频率减低。作定量分析表明根据冠状动脉造影确定的冠心病的严重程度与 E4 显著正相关<sup>[18,22]</sup>,而与 E2 负相关。对年轻冠心病病人的研究显示 E4 为早发冠心病的危险因素<sup>[23,27]</sup>,早发心肌梗塞的危险性随 E2/2、E3/2、E4/2、E4/3、E4/4 而逐步增加<sup>[23]</sup>。另有研究表明 E4 是冠心病死亡的重要预报因子<sup>[26]</sup>。一般认为载脂蛋白 E 多态性是通过对其血脂的影响而成为冠心病的危险因素,但有研究显示在去除血脂的影响后 E4 仍与冠心病显著相关<sup>[20,27]</sup>,提示尚存在血脂以外目前尚不清楚的机制。但亦有研究显示载脂蛋白 E 多态性与冠心病及缺血性脑血管疾病之间无相关性<sup>[28]</sup>。另外,已有研究表明 E4 是经皮腔内冠状动脉成形术后再狭窄的危险因子,并可能与 At 转化酶的 D 等位基因有协同作用<sup>[29]</sup>。

总之,由于载脂蛋白 E 的多态性与临床关系十分密切,其测定日益受到重视,RFLP 法以其准确、简便、价廉等优点,临床应用将日益广泛。

#### 参考文献

- 1 Davignon J, Gregg RE, Sing CF. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 1988, **8**: 1~21.
- 2 Utermann G, Hees M, Steinmetz A. Polymorphism of apolipoprotein E and occurrence of dysbetalipoproteinemia

in man. *Nature*, 1997, **269**: 604~607.

- 3 Nathan BP, Bellosta S, Sanan DA, et al. Differential effects of apolipoprotein E3 and E4 on neuronal growth in vitro. *Science*, 1994, **264**: 850~852.
- 4 Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, et al. Apolipoprotein E: high avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90**: 1977~981.
- 5 Zannis VI, Breslow JL. Human very low density lipoprotein apolipoprotein E isoprotein polymorphism is explained by genetic variation and posttranslation. *Biochemistry*, 1981, **20**: 1033~41.
- 6 Main BF, Jones PJH, Maccillivray RTA, et al. Apolipoprotein E genotyping using the polymerase chain reaction and allele-specific oligonucleotide primers. *J Lipid Res*, 1991, **32**: 183~187.
- 7 Hixon JE, Vernier DT. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with Hha I. *J Lipid Res*, 1990, **31**: 545~548.
- 8 Kontula K, Aalto-Setälä K, Kuusi T, et al. Apolipoprotein E polymorphism determined by restriction enzyme analysis of DNA amplified by polymerase chain reaction: convenient alternative to phenotyping by isoelectric focusing. *Clin Chem*, 1990, **36**: 2087~092.
- 9 Walden CC, Huff MW, Leiter LA, et al. Detection of a new apolipoprotein E mutation in type III hyperlipidemia using deoxyribonucleic acid restriction isotyping. *J Clin Endocrinol Metab*, 1994, **78**: 699~704.
- 10 Tsukamoto K, Watanabe T, Matsushima T, et al. Determination by PCR-RFLP of apo E genotype in a Japanese population. *J Lab Clin Med*, 1993, **121**: 598~602.
- 11 Moriyama K, Sasaki J, Matsunaga A, et al. Apolipoprotein E1 Lys-146-Glu with type III hyperlipoproteinemia. *Biochim Biophys Acta*, 1992, **1128**: 58~64.
- 12 Horie Y, Fazio S, Westerlund JR, et al. Functional characteristics of a human apolipoprotein E variant (cysteine at residue142) may explain its association with dominant expression of type III hyperlipoproteinemia. *J Biochem*, 1992, **267**: 1962~968.
- 13 Dallongeville J, Lussier-Cacan S, Davignon J. Modulation of plasma triglyceride levels by apoE phenotype: a meta-analysis. *J Lipid Res*, 1992, **33**: 447~454.
- 14 Braeckman L, De-Bacquer D, Rossen M, et al. Apolipoprotein E polymorphism in middle-aged Belgian: phenotype distribution and relation to serum lipids

- and lipoproteins. *Atherosclerosis*, 1996, **120**: 67~73.
- 15 Kao JT, Tsai KS, Chang CJ, et al. The effects of apolipoprotein E polymorphism on the distribution of lipids and lipoproteins in the Chinese population. *Atherosclerosis*, 1995, **114**: 55~59.
- 16 Hallman DM, Boerwinkle E, Saha N, et al. The apolipoprotein E polymorphism: a comparison of allele frequencies and effects in nine population. *Am J Hum Genet*, 1991, **49**: 338~349.
- 17 De-Kniff P, Boomsma D, De-Wit E, et al. The effects of apolipoprotein E phenotype on plasma lipids is not influenced by environmental variability; results of a dutch twin study. *Hum Gene*, 1993, **9**: 268~272.
- 18 Lehtinen S, Lehtimäki T, Sisto T, et al. Apolipoprotein E polymorphism, serum lipids, myocardial infarction and severity of angiographically verified coronary artery disease in men and women. *Atherosclerosis*, 1995, **114**: 83~91.
- 19 Yamamura T, Dong LM, Yamamoto A. Apolipoprotein E polymorphism and coronary heart disease. *Chin Med J*, 1992, **105**: 738~741.
- 20 Winson PWF, Myers RH, Larson MG, et al. Apolipoprotein alleles, dyslipidemia and coronary heart disease. The framingham offspring study. *JAMA*, 1994, **272**: 1666~671.
- 21 Luc G, Bard JM, Arveiler D, et al. Impact of apolipoprotein E polymorphism on lipoproteins and risk of myocardial infarction. The CCTIM study. *Arterioscler Thromb*, 1994, **14**: 1412~419.
- 22 Wang XL, McCredie RM, Wilcken DE. Polymorphisms of the apolipoprotein E gene and severity of coronary artery disease defined by angiography. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995, **15**: 1303~304.
- 23 Tiert L, De-knijff P, Menzel HJ, et al. Apo E polymorphism and predisposition to coronary heart disease in youths of different European populations. The EARS study. *Arterioscler Thromb*, 1994, **14**: 1617~624.
- 24 Kamboh MI, Evans RW, Aston CE. Genetic effect of apolipoprotein(a) and apolipoprotein E polymorphism on plasma quantitative risk factors for coronary heart disease in American black women. *Atherosclerosis*, 1995, **117**: 73~81.
- 25 Lopez-Miranda J, Ordovas JM, Mata P, et al. Effect of apolipoprotein E phenotype on diet-induced lowering of plasma low density lipoprotein cholesterol. *J Lipid Res*, 1994, **35**: 1659~675.
- 26 Eichner JE, Kuller JF, Orchard TJ, et al. Relation of apolipoprotein E phenotype to myocardial infarction and mortality from coronary artery disease. *Am J Cardiol*, 1993, **71**: 160~163.
- 27 Van-Bockxmeer FM, Mamotte CD. Apolipoprotein epsilon homozygosity in young man with coronary heart disease. *Lancet*, 1992, **340**(8824): 879~880.
- 28 Kuusisto J, Mykkanen L, Kervinen K, et al. Apolipoprotein E4 phenotype is not an important risk factor for coronary heart disease or stroke in elderly subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995, **15**: 1280~286.
- 29 Van-Bockxmeer FM, Mamotte CDS, Gibbons FA, et al. Angiotensin-converting enzyme and apolipoprotein E genotypes and restenosis after coronary angioplasty. *Circulation*, 1995, **92**: 2066~071.

(1997-01-06 收到, 1997-05-21 修回)