

胆固醇酯转运蛋白基因 373 Ala[→]Pro 和 451 Arg[→]Gln 的突变频率及其对脂质代谢的影响

陆付耳 黄光英 Heiko Wiebusch Harald Funke Gerd Assmann

(同济医科大学附属同济医院, 武汉 430030)

主题词 胆固醇酯; 转运; 蛋白; 基因频率; 突变; 373 Ala; 451 Arg; 脂蛋白, 高密度; 甘油三酯

摘要 为了进一步探讨胆固醇酯转运蛋白基因突变 373 Ala[→]Pro 和 451 Arg[→]Gln 的频率及其对血脂代谢的影响, 采用致突变分离聚合酶链反应技术, 检测了 91 例健康德国大学生和 409 例冠心病患者在胆固醇酯转运蛋白基因第 373 和第 451 位密码子的基因型, 并对照测定其血脂参数。结果表明, 373 Ala[→]Pro 和 451 Arg[→]Gln 等位基因频率为 3%~5%, 在绝大多数受检者中联合出现, 但尚存二者的不完全连锁性; 在健康志愿者和冠心病患者中两个突变的杂合子与野生型比较均呈现血清高密度脂蛋白胆固醇水平的降低 ($P < 0.05$), 健康志愿者的杂合子还显示出甘油三酯的升高 ($P < 0.05$)。从而提示 373 Ala[→]Pro 和 451 Arg[→]Gln 为频发误义突变, 其在健康志愿者和冠心病患者中的携带者可表现为血清高密度脂蛋白胆固醇水平的降低和甘油三酯水平的升高。

Allele Frequencies of Mutations 373 Ala[→]Pro and 451 Arg[→]Gln in Cholesterol Ester Transfer Protein Gene and Their Influences on Lipid Metabolism

LU Fu- Er, HUANG Guang- Ying, WIEBUSCH Heiko, FUNKE Harald and ASSMANN Gerd

(Institute of Integrated Traditional and Western Medicine, Affiliated Tongji Hospital, Tongji Medical University, Wuhan 430030, China)

MeSH Cholesterol Esters; Transfer; Proteins; Gene Frequency; Mutation; 373 Ala; 451 Arg; Lipoprotein, HDL; Triglyceride

ABSTRACT **Aim** To determine the allele frequencies of genetic variants 373 Ala[→]Pro and 451 Arg[→]Gln of cholesteryl ester transfer protein (CETP) and to explore their potential impacts on serum lipid metabolism. **Methods** The genotypes in CETP codon 373 and 451 in 91 German healthy students and 409 angiographically confirmed coronary heart disease (CHD) patients were respectively analyzed using the allele specific technique of mutagenically separated polymerase chain reaction (MS-PCR) and their serum lipid parameters were determined. **Results** It is demonstrated that genetic variants 373 Ala[→]Pro and 451 Arg[→]Gln are frequent mutations with allele frequencies around 3% to 5% presented in the healthy individuals as well as in the CHD patients. The high density lipoprotein cholesterol (HDL) level was significantly decreased in the 373- Pro and 451- Gln alleles heterozygotic carriers in both examined cohorts compared with those in the wild type individuals. The increasing of serum triglyceride (TG) in the mutant alleles carriers was only observed in the healthy volunteers. It was also found that these two genetic variants do not always emerge in the linkage form. **Conclusion** It is suggested that these two mutations together would possess the phenotype of decreasing HDL and increasing TG levels.

胆固醇酯转运蛋白 (cholesterol ester transfer protein, CETP) 是机体参与脂质代谢的重要酶系之一, 其主要功能是介导胆固醇酯从高密度脂蛋白 (high density lipoprotein, HDL) 向低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 和极低密度脂蛋白 (very low density lipoprotein, VLDL) 转移, 而甘油三酯 (triglyceride, TG) 则由 LDL 和 VLDL 向 HDL 转移。研究表明胆固醇酯转运蛋白活性与血清高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDL) 水平密切相关^[1], 胆固醇酯转运蛋白的遗传性缺陷可引起显著的高高密

度脂蛋白血症^[2]。我们曾报道一女性同时携带胆固醇酯转运蛋白基因的 373 Ala[→]Pro 和 451 Arg[→]Gln 两个变异体, 且位于同一条染色体上^[3]。本研究将进一步探讨它们在人群中的等位基因频率及其对血清脂蛋白代谢的影响。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选择自 1996 年 9 月至 1996 年 12 月, 来自明斯特的健康大学生健康志愿者 91 人, 其中男 68 例, 女 23 例, 年龄 25~38 岁。选择经冠状动脉造影确诊为冠心病的患者 409 人, 其中男 314 例, 女 95 例, 年龄 45

~ 72 岁。收集这些受检者全血标本备用。

1.2 DNA 的分离

按改良 Higuchi^[4] 方法, 全血 0.5 mL 经 EDTA 抗凝, 加等量 Lysis 缓冲液 (Sucrose 0.32 mol/L, Tris-HCl 10 mmol/L, MgCl₂ 5 mmol/L, 1% Triton X-100, pH 7.5), 在 Eppendorf 管内混匀, 以 10 000 g 离心 3 min, 去上清液, 沉淀以 Lysis 缓冲液反复洗涤直至获得浅黄色沉淀为止。后者以 0.5 mL 非离子去垢剂缓冲液 (KCl 50 mmol/L, Tris-HCl 10 mmol/L, MgCl₂ 2.5 mmol/L, 0.01% Gelatin, 0.45% NP40, 0.45% Tween 20, pH 8.3) 加 30 μg 蛋白酶 K 混匀, 于 55℃ 水浴 2 h, 继而煮沸 10 min, 最后贮存于 -20℃ 备用。

1.3 血清脂质的测定

血清 TG、总胆固醇 (total cholesterol, TC) 和 HDLC 的定量测定均按常规酶学方法进行; 低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDLC) 按 Friedewald 公式计算获得。

1.4 致突变分离聚合酶链反应

采用具有等位基因 (allele) 特异性的致突变分离聚合酶链反应 (mutagenically separated polymerase chain reaction, MS-PCR) 技术^[5], 分别检测 CETP 基因第 373 和第 451 位密码子的基因型 (genotype)。检测 373-Ala-Allele 的特异性引物 MS₅ 的寡核苷酸组成为: 5'-AGAAGAGCTTTTCTTAGAATAGGACGC-3'; 检测 373-Pro-Allele 的特异性引物 MS₆ 为: 5'-ACATACTGGAAATCCAAGAGGCTTATCTAGAGCTTTTCTTAGAATAGGAGTG-3'; 检测 373 Ala→Pro 位点 MS-PCR 的对应链引物为: 5'-CCAGTCCCTCAGTG-

GAAAGAATCAGG-3'。检测 451-Arg-Allele 的引物 MS₇ 为: 5'-TCTCCCCAGGAACAGGGGCTCCAGAGGGGGCTTTGTACTCGCATGTC-3'; 检测 451-Gln-Allele 的引物 MS₈ 为: 5'-GGTGAGGGGGGCTTTGTACTCCCATCAT-3'; 检测 451 Arg→Gln 位点 MS-PCR 的引物为: 5'-CAGCATCTCCCACTACCCAGGGTG-3'。采用 Perkin Elmer 公司 9600 基因扩增仪, 自编 Touch-Down 程序体外扩增相应的等位基因片段。

聚合酶链反应条件为: Tris-HCl (pH 9.5) 10 mmol/L, KCl 50 mmol/L, MgCl₂ 1.5 mmol/L, Gelatin 0.01%, Triton X-100 0.1%, dNTP 各为 20 μmol/L, MS₅ 或 MS₈ 引物 0.1 μmol, MS₆ 或 MS₇ 引物 0.05 μmol, 对应链引物 0.1 μmol, 基因组 DNA 1 μg, SuperTaq DNA 聚合酶 0.25 u, 反应体积为 40 μL。上述反应溶液置于基因扩增仪, 变性 94℃ 30 s, 延伸 72℃ 45 s, 而火温度则随着循环次数的增加从 68℃ 逐渐降至 64℃, 总循环次数为 42。

2 结果

2.1 373 Ala→Pro 和 451 Arg→Gln 对健康志愿者血脂的影响

从表 1 (Table 1) 可知, 健康大学生志愿者的血脂成份平均水平在正常范围内。虽然受检者样本例数不多, 但是 373 Ala→Pro 和 451 Arg→Gln 对血脂成份的影响则显而易见: 与野生型比较, 373 Ala→Pro 和 451 Arg→Gln 两突变的杂合子 HDLC 水平均降低 ($P < 0.05$), 而其 TG 水平则升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

表 1. 胆固醇酯转运蛋白基因突变 373 Ala→Pro 和 451 Arg→Gln 对德国健康志愿者血脂代谢的影响 (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)

Table 1. Influence of CETP variants 373 Ala→Pro and 451 Arg→Gln on serum lipids in german students (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)

Genotypes	n	TG	TC	HDLC	LDLC
373, Ala/Ala	82	0.99 ± 0.3	4.86 ± 1.0	1.57 ± 0.5	2.83 ± 0.9
373, Ala/Pro	9	1.22 ± 0.5 ^a	4.85 ± 0.8	1.36 ± 0.3 ^a	2.92 ± 0.8
451, Arg/Arg	84	0.99 ± 0.3	4.87 ± 1.0	1.56 ± 0.5	2.85 ± 0.9
451, Arg/Gln	7	1.46 ± 0.6 ^a	4.75 ± 0.5	1.34 ± 0.3 ^b	2.74 ± 0.7

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, compared with the corresponding wildtypes. 373-Pro and 451-Gln allele frequencies: 4.95% and 3.85% respectively

2.2 373 Ala→Pro 和 451 Arg→Gln 对冠心病患者血脂的影响

表 2 (Table 2) 表明, 冠心病患者 HDLC 平均水平显著较正常人低, 其余血脂参数基本正常。由于采用了较多观察例数的大样本分析, 在平均 HDLC 水

平较低的冠心病患者中, 仍然可见 373 Ala→Pro 和 451 Arg→Gln 两突变的杂合子 HDLC 水平较野生型更为降低 ($P < 0.05$); TG 水平在野生型和杂合子间无明显差别。

表 2. 胆固醇酯转运蛋白基因突变 373 Ala \rightarrow Pro 和 451 Arg \rightarrow Gln 对德国冠心病患者血脂代谢的影响 (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)Table 2. Influence of CETP variants 373 Ala \rightarrow Pro and 451 Arg \rightarrow Gln on serum lipids in CHD atients (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)

Genotypes	n	TG	TC	HDLc	LDLc
373, Ala/Ala	373	1.67 \pm 0.8	5.57 \pm 1.2	0.91 \pm 0.3	3.87 \pm 1.1
373, Ala/Pro	36	1.69 \pm 0.8	5.30 \pm 1.0	0.79 \pm 0.2 ^a	3.74 \pm 1.0
451, Arg/Arg	380	1.67 \pm 0.8	2.43 \pm 1.2	0.90 \pm 0.3	3.87 \pm 1.1
451, Arg/Gln	29	1.76 \pm 0.9	5.36 \pm 1.1	0.79 \pm 0.3 ^a	3.76 \pm 1.1

a: $P < 0.05$, compared with the corresponding wildtypes. 373-Pro and 451-Gln allele frequencies: 4.40% and 3.55% respectively

2.3 373 Ala \rightarrow Pro 和 451 Arg \rightarrow Gln 基因的不完全连锁性

通过对相同样本对照进行 373 Ala \rightarrow Pro 和 451 Arg \rightarrow Gln 两个突变点的检测,发现突变的 373-Pro-Allele 与 451-Gln-Allele 在绝大多数情况下联合同时出现,但并非总是连锁在一起,亦可偶尔单独出现。

3 讨论

我们曾报道一女性先驱者同时携带 373 Ala \rightarrow Pro 和 451 Arg \rightarrow Gln 两个突变点(分别位于 CETP 基因第 12 和 15 外显子),其血脂参数仅 HDLc 高于平均水平(HDLc 为 1.97 mmol/L),其余血脂成分基本正常;通过对该先驱者两个突变点的座位关系的探讨,证明 373-Pro 基因与 451-Gln 基因位于同一染色体上^[3]。参照 Inazu 等^[6]报道的 CETP 基因内含子 14 第+1 位 G \rightarrow A 突变(CETP Int14, +1, G \rightarrow A)导致 CETP mRNA 转录拼接障碍的表型,373 Ala \rightarrow Pro 和 451 Arg \rightarrow Gln 两个突变点位于同一染色体的基因型与血清 HDLc 中度升高的表型是吻合的,即仅调控 CETP 合成的一条等位基因缺陷。由于该先驱者及其家属拒绝进一步的合作,不能检测其血浆 CETP 活性和含量以及确定这两个突变点的单倍体遗传方式,因而对 373 Ala \rightarrow Pro 和 451 Arg \rightarrow Gln 两个突变点的性质还知之甚少。

我们采用具有等位基因特异性的 MS-PCR 技术分别对健康的德国大学生 CETP 基因第 373 和 451 位进行基因型检定,同时对照测定其血脂。MS-PCR 技术通过在特定位置故意错配碱基设计引物,以提高分别检测两个等位基因的特异性,避免其交叉反应;以不同长度设计两个特异性引物(通常相差约 20 寡核苷酸),就可以通过对 MS-PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳将其分离开,从而显示出相应的基因型,因而该技术尤其适用于调查人群中某一基因型出现的频率以及基因型与表型的相关性。

本实验结果表明,突变的 373-Pro 和 451-Gln

出现频率并不低(分别为 4.95% 和 3.85%)。人们通常定义突变的等位基因频率超过 1% 者即称为频发突变,因此 373 Ala \rightarrow Pro 和 451 Arg \rightarrow Gln 均为频发突变。引人注目的是,通过仅 91 例正常人的检测,我们即发现了两点与原来的设想完全不同的结果:其一,虽然突变的 373-Pro 和 451-Gln 在绝大多数情况下联合同时出现,但并非总是连锁在一起的,二者均可单独出现,亦即 373-Pro 和 451-Gln 连锁不完全。其二,373 Ala \rightarrow Pro 和 451 Arg \rightarrow Gln 的杂合子与野生型比较,其 HDLc 水平均呈现有显著统计学意义的降低,而 TG 则有一定程度的升高。为了尽可能减少偶然因素对这一相关性研究的影响,我们又对 409 例经冠状动脉造影证实的冠心病患者进行 CETP 基因第 373 和 451 位的基因型与表型的对比研究,373 Ala \rightarrow Pro 和 451 Arg \rightarrow Gln 的杂合子亦呈现明显降低的 HDLc 水平($P < 0.05$),除 TG 水平在杂合子与野生型间无甚差别外,其等位基因频率(373-Pro 和 451-Gln 分别为 4.40% 和 3.55%)及其它血脂参数大致与在正常人中检测的结果类同。

迄今为止,被发现并报道的 CETP 基因突变均与 HDLc 升高有关^[7, 8],因为 CETP 基因遗传性变异致使 CETP 合成减少(或活性降低)或缺陷,HDL 内胆固醇酯向含载脂蛋白 B 的血浆脂蛋白(如 LDL 和 VLDL)转移受阻,使胆固醇酯在 HDL 内不断积累,HDL 膨大,HDL 半衰期延长,因而 HDLc 水平升高^[7]。通常,基因突变导致基因产物的合成障碍,但是亦发现某些基因多态性或突变与基因产物活性增强密切相关。参与 HDL 的构成载脂蛋白和参与 HDL 代谢的酶的基因多态性或突变,分别与血清 HDL 水平的升高和减低密切相关。如载脂蛋白 E 多态性就与 HDLc 的水平和某些疾病的易感性有关, E_2 等位基因携带者 HDLc 水平较野生型 E_3 略高或相近,而 E_4 携带者则 HDLc 水平降低^[9];再如,脂蛋白脂酶 Asn-291 \rightarrow Ser 和 Ser-447 \rightarrow Stop 突变对 HDLc 水平的影响更是截然不同,前者 HDLc 水平较野生型为低^[10],后者 HDLc 水平则升高^[11]。我们曾

报道一频发 CETP 变异体 Ile⁻ 405[→] Val, 并证实其携带者 HDLC 水平明显升高^[8]; 而本研究对正常人和冠心病患者的分析检测则均提示 CETP 基因变异体 373 Ala[→] Pro 和 451 Arg[→] Gln 可能与 HDLC 水平降低密切相关。根据 CETP 的生理学特性和功能, 推测 373 Ala[→] Pro 和 451 Arg[→] Gln 变异体可能在某种程度上增强了 CETP 的酶促反应活性。为何我们曾发现的 373 Ala[→] Pro 和 451 Arg[→] Gln 先驱者血清 HDLC 水平非但不降低反而增高? 因为 HDL 水平受遗传和环境等多方面因素的影响, 可能该先驱者的其它促使 HDL 水平升高的因素不仅抵消了 373 Ala[→] Pro 和 451 Arg[→] Gln 变异体的负面影响, 而且还使 HDL 水平中度升高。

此外, 在首次发现的先驱者中证实这两个突变点位于同一染色体, 因而曾认为这两个突变点连锁在同一条等位基因。但是, 本研究分别对两个突变点的基因型在正常人和冠心病患者中进行较大样本的对照检测, 结果显示其不完全连锁性。由于没有足够数量的单独出现的 373- Pro 和 451- Gln, 所以不能鉴定出它们各自相应的表型。但是 373- Pro 和 451- Gln 连锁同时出现的概率在 95% 以上, 因此可以认为 373 Ala[→] Pro 和 451 Arg[→] Gln 连锁的基因型与一定程度的 HDLC 水平降低的表型密切相关, 其分子机制尚待进一步研究。

参考文献

- 1 Tato F, Vega GL, Tall AR, et al. Relation between cholesterol ester transferprotein activities and lipoprotein cholesterol in patients with hypercholesterolemia and combined hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995, **15**: 112~ 120
- 2 Koizumi J, Mabuchi H, Yoshimura A, et al. Deficiency of serum cholesterol ester transfer activity in patients with familial hyperalphalipoproteinemia. *Atherosclerosis*, 1985, **58**: 175~ 186
- 3 陆付耳, 黄光英, 李鸣真, 等. CETP 新突变点 373 AlaPro 和 451 ArgGln 及其座位关系. *中国心血管杂志*, 1998, **3** (6): 431~ 435
- 4 Higuchi R. Simple and rapid preparation of samples for PCR. In: Ehrlich HA (ed.), *PCR - Technology, principles and applications for DNA amplification*. New York Stockton Press: 1989; 31~ 38
- 5 Rust S, Funke H, Assmann G. Mutagenically separated PCR (MS-PCR): a highly specific one step procedure for easy mutation detection. *Nucl Acids Res*, 1993, **21**: 3 623~ 629
- 6 Inazu A, Brown ML, Hersler CB, et al. Increased high density lipoprotein levels caused by a common cholesteryl ester transfer protein gene mutation. *N Engl J Med*, 1990, **323**: 1 234~ 238
- 7 Tall AR. Plasma cholesteryl ester transfer protein and high-density lipoproteins: new insights from molecular genetic studies. *J Intern Med*, 1995, **237**: 5~ 12
- 8 陆付耳, 黄光英, 李鸣真, 等. 胆固醇酯转运蛋白变异体 Ile405Val 及其对 HDL 代谢的影响. *同济医科大学学报*, 1999, **28** (2): 143~ 146
- 9 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
- 10 Reymer PWA, Gagne E, Groenemeyer BE, et al. A lipoprotein lipase mutation (Asn 291Ser) is associated with reduced HDL cholesterol levels in premature atherosclerosis. *Nature Genet*, 1995, **10**: 28~ 33
- 11 Kuivenhoven JA, Groenemeyer BE, Boer JM, et al. Ser447Stop mutation in lipoprotein lipase is associated with elevated HDL cholesterol levels in normolipidemic males. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997, **17** (3): 595~ 599

(1999- 01- 03 收到, 1999- 07- 20 修回)

(此文编辑 朱雯霞)