

极低密度脂蛋白受体基因 CGG 串联重复序列 多态性与冠心病的关系

邵 华¹, 周 新², 李 艳¹, 胡 波³

(湖北医科大学 1. 附属第一医院检验科, 湖北省武汉市 430060; 2. 附属第二医院
检验科, 湖北省武汉市 430071; 3. 中山医科大学附属第三医院检验科, 广东省广州市 510120)

[主题词] 受体, 脂蛋白; 脂蛋白, 极低密度; 基因; 多态性; 等位基因; 冠状动脉疾病; 聚合酶链反应

[摘要] 极低密度脂蛋白受体基因 5' 非编码区起始密码子上游 19 bp 处存在 CGG 三核苷酸串联重复序列, 为探讨中国汉族人群极低密度脂蛋白受体基因 CGG 串联重复序列多态性与冠心病的相关性, 采用聚合酶链反应、变性聚丙烯酰胺凝胶电泳和银染等技术分析湖北地区 75 例冠心病患者和 160 例正常汉族人 CGG 串联重复序列。共检出 CGG 串联重复次数为 5、8、9、11 的四种等位基因及 5/5、5/8、8/8、8/9、9/9、5/9、8/11 和 5/11 等八种基因型, 冠心病组和对照组极低密度脂蛋白受体等位基因频率和基因型频率分布无统计学差异 ($P > 0.05$), 结果提示, 极低密度脂蛋白受体基因 CGG 串联重复序列多态性与冠心病没有关联。

[中图分类号] R363.25

[文献标识码] A

The Correlation between CGG Triplet Repeat Polymorphism of Very Low Density Lipoprotein Receptor Gene and Coronary Heart Disease

SHAO Hua, ZHOU Xin, LI Yan, and HU Bo

(Medical Laboratory Science, the First College of Clinical Medicine, Hubei Medical University, Wuhan 430060, China)

MeSH Receptor, LDL; Genes; Polymorphisms; Gene Alleles; Coronary Disease; Polymerase Chain Reaction

ABSTRACT **Aim** To explore the correlation between CGG triplet repeat polymorphism on the 5' non-coding region of very low density lipoprotein receptor (VLDLR) gene and coronary heart disease (CHD) in Chinese Han nationality, 235 subjects with no blood links in Hubei region, including 75 cases with CHD and 160 healthy controls were studied. **Methods** Polymerase chain reaction (PCR) - denature polyacrylamide gel electrophoresis - silver stain technique was employed to determine the CGG triplet repeat polymorphism of VLDLR gene. **Results** The Chinese Han nationality in Hubei region has VLDLR gene polymorphism, 4 alleles with 5, 8, 9, 11 CGG triplet repeats and 8 genotypes with 5/5, 5/8, 8/8, 8/9, 9/9, 5/9, 8/11 and 5/11 were detected. There were no statistically significant differences in VLDLR gene allele and genotype frequencies between CHD and normal controls ($P > 0.05$). **Conclusions** There is VLDLR gene polymorphism in the Han Chinese in Hubei region and such polymorphism has ethnic difference. CGG triplet repeat polymorphism of VLDLR gene has no correlation with CHD. It is not an independent risk factor.

极低密度脂蛋白受体 (very low density lipoprotein receptor, VLDLR) 是低密度脂蛋白受体 (low density lipoprotein receptor, LDLR) 基因家族的新成员, 其分子在结构上与 LDLR 关系最近^[1]。人 VLDLR 基因定位于 9p24, 含 19 个外显子, 18 个内含子, 长约 40 kb。VLDLR 和 LDLR 基因来自共同的原始基因, 结构和组成几乎完全相同。值得注意的是, VLDLR 基因 5' 非编码区 (5' - untranslated region, 5' - UTR) 起始密码子上游 19 bp 处存在 CGG 三核苷酸重复序列^[2]。人们推测这一结构可能与某些疾病有关。国外的统

计资料表明, 该 CGG 重复序列在正常人群中的分布呈高度多态性, 且有民族差异。本文采用常规聚合酶链反应、变性聚丙烯酰胺凝胶电泳和银染等技术, 对湖北地区 75 例冠心病 (coronary heart disease, CHD) 患者和 160 例正常人 CGG 重复序列进行了分析, 旨在探讨中国汉族人群 VLDLR 基因 CGG 重复序列多态性与冠心病的相关性。

1 材料和方法

1.1 研究对象

选取在我院住院的冠心病患者 75 例, 其中男性

45 例, 女性 30 例, 平均年龄 65.2 ± 9.5 岁。健康体检者 160 例, 其中男性 86 例, 女性 74 例, 平均年龄 55.7 ± 14.6 岁。两组研究对象的性别、年龄均无显著性差异。冠心病的诊断依据 1981 年全国冠心病、高血压普查预防座谈会修订标准, 排除家族性高胆固醇血症、脂肪肝、糖尿病和甲状腺疾病等影响脂质代谢疾病^[3]。

1.2 聚合酶链反应扩增

取 EDTA- Na_2 抗凝血 100 μL , 采用改良碘化钠法^[4]提取正常人白细胞基因组 DNA。参照文献[5, 6]合成一对引物, 其序列为 P1: 5' - GCAGC-CAGAGCGCCAGAGCG - 3' (sense); P2: 5' - AGGGCTGGTAACCTGTGTGCGGAG - 3' (antisense) (由加拿大 Sangon 公司合成)。引物位于 CGG 重复序列的两侧, 扩增片段大小为 82 bp+ (CGG) n 。PCR 扩增按常规方法在 PE2400 热循环仪上进行。反应总体积 50 μL , 其中包括: 0.5 μg 模板 DNA、引物 P1 和 P2 各 30 pmol、dNTPs 各 200 $\mu\text{mol/L}$ 、 $10 \times$ buffer 5 μL 、2.0 mmol/L MgCl_2 及 10% 二甲基亚砜。95 $^\circ\text{C}$ 预变性 5 min 后, 取出置冰浴中, 加 Taq DNA 聚合酶 1.5 u, 进行扩增。循环条件为: 94 $^\circ\text{C}$ 1 min, 65 $^\circ\text{C}$ 1 min, 72 $^\circ\text{C}$ 1 min, 共循环 30 次。以灭菌超纯水代替模板 DNA 作为反应系统的阴性对照。

1.3 聚合酶链反应产物分子量及 CGG 重复次数的确定

聚合酶链反应 (PCR) 产物用 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定, 在 BIO-RAD 手工测序仪上进行。将 PCR 产物 2 μL 点样于含 7 mol/L 尿素的 T=6%、C=5% 的聚丙烯酰胺凝胶中, $1 \times$ TBE, 10 W 恒功率, 电泳 4 h 后进行银染。同时参照两个分子量大小标记 (pBR 322 DNA/Hae III Markers 和 pBR 322 DNA/Msp I Markers) 确定扩增片段的大小, 从而推算出 CGG 三核苷酸重复序列的重复次数。

1.4 统计学处理

等位基因频率采用基因计数法计算; 研究对象结果与 Hardy-Weinberg 平衡符合程度及组间基因

型和等位基因频率比较采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 基因型频率分布

共检出 4 个等位基因, 扩增产物的分子量分别为: 97 bp、106 bp、109 bp 和 115 bp, 其 CGG 重复次数分别相当于 5、8、9 和 11 次; 检出的 8 种基因型分别是: 5/5、5/8、8/8、8/9、9/9、5/9、8/11 及 5/11 (图 1, Figure 1)。

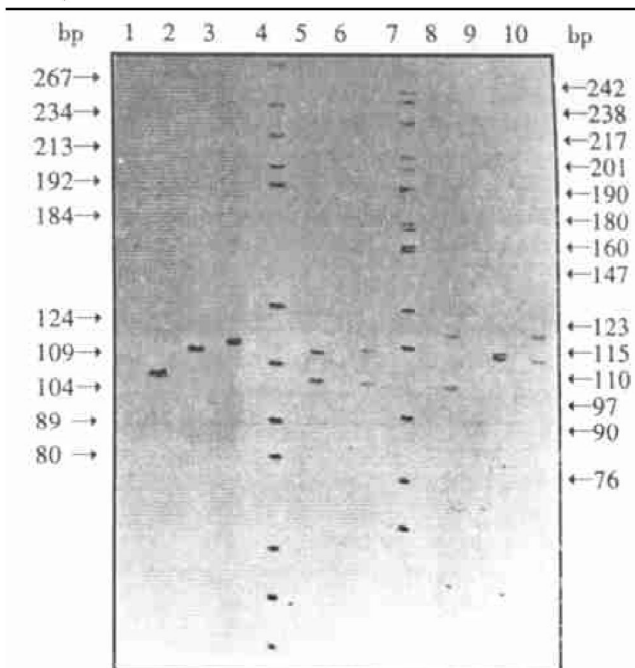


图 1. 极低密度脂蛋白受体基因聚合酶链反应产物图谱。

Figure 1. Patterns of VLDLR gene PCR products. Lane 1~3, 5, 6, 8~10: correspond to 5/5, 5/8, 8/8, 8/9, 9/9, 5/9, 5/11, 8/9, 8/11; Lane 4: pBR 322 DNA/Hae III Markers; Lane 7: pBR 322 DNA/Msp I Markers.

从表 1 (Table 1) 可知, 对照组 VLDLR 基因 CGG 重复序列检出了 8 种基因型, 冠心病组中检出了 6 种基因型, 未发现 9/9 和 8/11 基因型。对照组和冠心病组 5/8 基因型最常见, 其次为 8/8 和 5/5, 而 8/9、9/9、5/9、8/11 和 5/11 均为少见型。两组间各基因型频率分布总体趋势一致, 无显著性差异 ($P > 0.05$)。

表 1. 冠心病组与对照组极低密度脂蛋白受体基因 CGG 重复序列基因型频率分布。

Table 1. Genotype frequencies of CGG triplet repeat in VLDLR gene in CHD and control groups.

Groups	n	Genotype frequency (%)							
		5/5	5/8	8/8	5/9	8/9	9/9	8/11	5/11
Control	160	13.1	41.9	26.9	6.9	8.8	0.6	1.2	0.6
CHD	75	14.7	44.0	24.0	8.0	5.3	0.0	0.0	4.0

2.2 等位基因频率分布

根据 VLDLR 基因型频率分布结果和 VLDLR 复序列等位基因共显性的特点, 按 Hardy-Weinberg 平衡定律计算两组 VLDLR 的 4 种等位基因频率。从表 2 (Table 2) 可以看出, 在两组中 CGG 重复数为 8 的等位基因出现频率最高, 分别是 53.3% 和 48.7%。两组间各等位基因频率分布无统计学差异 ($P > 0.05$)。

表 2. 冠心病组与对照组低密度脂蛋白受体基因 CGG 重复等位基因频率分布。

Table 2. Allele frequencies of CGG triplet repeat in VLDLR gene in CHD and control groups.

Groups	n	Allele frequency (%)			
		5	8	9	11
Control	160	38.3	53.3	7.8	0.6
CHD	75	42.6	48.7	6.7	2.0

3 讨论

众所周知, 冠心病是一类严重危害人类健康的疾病, 其病理基础为动脉粥样硬化。一些研究表明, 动脉粥样硬化与载脂蛋白 E 基因多态性的关系十分密切^[7]。而载脂蛋白 E 是 VLDLR 的主要配体, VLDLR 通过识别载脂蛋白 E 而摄取含载脂蛋白 E 的脂蛋白颗粒, 两者在生物化学上有密切关联^[2]。因此, 有人提出 VLDLR 与冠心病之间是否也有一定的联系。1994 年, Sakai 首次报导 VLDLR 基因 5' - UTR 起始密码子上游 19 bp 处存在 CGG 三核苷酸重复序列后, 立即引起各国学者的关注。本文就 VLDLR 基因 CGG 三核苷酸重复序列与冠心病的关系作了初步探讨, 共检出 CGG 重复次数为 5、8、9、11 的四种等位基因及 5/5、5/8、8/8、8/9、9/9、5/9、8/11 和 5/11 等八种基因型。与国外已有的文献[8, 9] 比较, 中国人群(湖北地区) VLDLR 基因 CGG 重复序列等位基因频率分布与日本人及中国香港人群基本一致。冠心病组与对照组比较, 基因型和等位基因频率分布均无显著性差异, 提示 VLDLR 基因 CGG 重复序列多态性与冠心病没有关联, 这与 Helbecque 等^[5]的研究结果一致。该 CGG 重复序列存在于 VLDLR 的非编码区, 它可能与 VLDLR 基因的编码区连锁不平衡, 目前还不能否定 VLDLR 基因的编码区不是冠心病的危险因子。关于 VLDLR 基因 5' -

UTR 的 CGG 三核苷酸重复序列多态性的研究尚处于起步阶段, 还有待于在汉族和其它民族中进行大样本的调查研究工作。研究简单重复序列的传统方法主要有 DNA 指纹图谱法、限制性片段长度多态性分析法、寡核苷酸探针分析法及扩增片段长度多态性分析法^[10]。本研究采用了 PCR、变性聚丙烯酰胺凝胶电泳及银染技术分析 VLDLR 基因 5' - UTR 的 CGG 重复序列扩增片段长度多态性。该技术简便迅速, 操作时间短, 分辨率、灵敏度明显高于普通凝胶电泳, 结果准确可靠, 重复性好, 无同位素污染, 克服了其它技术方法中存在的缺点。因此, 该法适合实验室开展, 在遗传病诊断、基因定位和法医学上有着广阔的应用前景。

参考文献

- [1] 周 新. 极低密度脂蛋白受体 [M]. 见: 周新(主编). 动脉粥样硬化与生物化学检验. 武汉: 湖北科技出版社, 第一版, 1997: 71- 81
- [2] Sakai J, Hoshino A, Takahashi S, et al. Structure, chromosome location, and expression of the very low density lipoprotein (VLDL) receptor gene [J]. *J Biol Chem*, 1994, **269**: 2 173- 182
- [3] 元柏民. 心血管病诊断标准 [M]. 北京: 学苑出版社, 第一版, 1992: 178- 181
- [4] Loparev VN, Cantas MA, Monken CE, et al. An efficient and simple method of DNA extraction from whole blood and cell line to identify infectious agents [J]. *J Virol Methods*, 1990, **34**: 105- 111
- [5] Helbecque N, Dallongeville J, Codron V, et al. The role of a triplet repeat sequence of the very low density lipoprotein receptor gene in plasma lipid and lipoprotein level variability in humans [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997, **17** (11): 2 759- 764
- [6] Jokinen E, Sakai J, Yamamoto T, et al. CGG triplet repeat polymorphism in VLDL receptor (VLDLR) gene [J]. *Hum Mol Genet*, 1994, **3**: 521- 528
- [7] 鄢盛恺, 周 新, 李秀玲, 等. 动脉硬化性脑梗塞患者载脂蛋白 E 基因多态性的研究 [J]. *临床检验杂志*, 1994, **11** (4): 318- 320
- [8] Chen L, Baum L, Ng HK, et al. No association detected between verylowdensity lipoprotein receptor (VLDLR) and late-onset Alzheimer's disease in Hong Kong Chinese [J]. *Neurosci Lett*, 1998, **241**: 33- 36
- [9] Okuizumi K, Onodera O, Seki K, et al. Lack of association of very low density lipoprotein receptor gene polymorphism with caucasian Alzheimer's disease [J]. *Ann Neurol*, 1996, **40**: 251- 254
- [10] 颜 真, 苏成芝. 简单重复序列——一类新的 DNA 多态标志 [J]. *中华医学遗传学杂志*, 1994, **11** (4): 223- 226

(此文 1999- 09- 09 收到, 2000- 01- 08 修回)

(此文编辑 文玉珊)