

胆固醇酯转运蛋白基因突变患者低密度脂蛋白亚组分颗粒直径增大

汪俊军¹, 陈大宁¹, 强宏娟¹, 张凌², 庄一义¹, 陈琪

(南京医科大学动脉粥样硬化研究中心, 江苏省南京市 210029;

1. 南京军区南京总医院全军医学检验中心; 2. 兰州医学院附属第二医院)

[主题词] 胆固醇酯; 脂蛋白, 低密度; 突变; 冠状动脉疾病; 动脉粥样硬化

[摘要] 为探讨胆固醇酯转运蛋白基因突变对低密度脂蛋白亚组分颗粒大小的影响, 采用聚合酶链反应片段长度多态性技术检测 200 例冠心病患者胆固醇酯转运蛋白基因 15 外显子 D442G 错义突变, 并分析低密度脂蛋白颗粒直径及图形。共检测出 6 例杂合子和 1 例纯合子突变, 冠心病患者该基因突变率为 3.5%。突变患者(7 例) 低密度脂蛋白颗粒直径显著大于非突变患者(40 例) (26.92 ± 0.79 nm 比 25.71 ± 0.66 nm, $P < 0.01$), 突变组低密度脂蛋白亚组分图形均为 A 型; 而非突变组 A 型占 52.5%, B 型占 47.5%。突变组胆固醇酯转运蛋白水平显著降低, 而高密度脂蛋白胆固醇和载脂蛋白 A iv 浓度明显升高。结果提示胆固醇酯转运蛋白基因突变患者低密度脂蛋白亚组分颗粒直径增大。

[中图分类号] Q754

[文献标识码] A

Low Density Lipoprotein Particle Size in Patients with CETP Gene Mutation Increases

WANG Jun- Jun, CHEN Da- Ning, QIANG Hong- Juan, ZHANG Ling, ZHUANG Yi- Yi, and CHEN Qi

(Atherosclerosis Research Center, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

MeSH Cholesterol Ester; Lipoprotein, LDL; Mutation; Coronary Artery Disease; Atherosclerosis

ABSTRACT **Aim** To study the relation between cholesterol ester transfer protein (CETP) gene mutation and size of low density lipoprotein (LDL) particle. **Methods** Exon 15 missense mutation (442D: G) in CETP was determined using PCR - RFLP method in 200 patients with coronary artery disease (CHD). LDL particle size was analyzed by non- denaturing polyacrylamide gradient gels. **Results** 6 heterozygotes and 1 homozygote were found to had the 442D: G mutation among 200 CHD patients. Frequency of this mutation was 3.5%. The patients with gene mutation ($n = 7$) had significantly larger particle diameters than those without the mutation ($n = 40$) (26.92 ± 0.79 nm vs. 25.71 ± 0.66 nm, respectively; $P < 0.01$). LDL subfraction pattern in all the patients with gene mutation is pattern A. The distribution of LDL subfraction pattern was significantly difference between two groups. The patients with gene mutation had decreased plasma CETP level, while elevated level of HDLC and apoA iv compared with control. **Conclusion** LDL particle size in patients with CETP gene mutation increases.

低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)由大小、密度不均一的颗粒组成,可分成大而轻和小而密

的两个亚组分,以小而密为主的 B 型 LDL 因易于氧化被确认为动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)发生的强危险因素^[1,2]。胆固醇酯转运蛋白(cholesterol ester transfer protein, CETP)在体内介导血浆脂蛋白之间中性脂质的转运,影响高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)和 LDL 颗粒大小的分布,在胆固醇逆向转运即胆固醇从外周组织细胞运至肝脏中起关键作用,与动脉粥样硬化的发生和发展相关^[3]。而有关 LDL 颗粒大小的主控基因尚不清楚,文献[4]报道 CETP 基因位点与其相关,本文就此对 CETP 基因 15 外显子 D442G 错义突变的冠心病患者 LDL 颗粒直径进行了分析。

[基金项目] 江苏省应用基础研究课题(BJ97111)

[作者简介] 汪俊军,男,1966 年出生,1988 年毕业于上海医科大学。现为南京军区南京总医院全军医学检验中心主管技师。主要从事脂蛋白与动脉粥样硬化发病的关系研究,在国内外发表有关研究论文 50 多篇,荣获军队科技进步二、三等奖多项。陈琪,男,1958 年出生,江苏省南通市人,博士,病理生理学教授,博士研究生导师,主要从事动脉粥样硬化发病机理研究,现任中国病理生理学学会动脉粥样硬化专业委员会常务委员兼秘书,本刊常务编委,南京医科大学副校长。

1 材料和方法

1.1 研究对象

选择冠心病患者 200 例,均为心肌梗死存活者,年龄 50~75 岁,其中男性 145 例,女性 55 例。取空腹 12 h 静脉血,EDTA (1 g/L) 抗凝。

1.2 胆固醇酯转运蛋白基因 15 外显子 D442G 错义突变的检测^[5]

1.2.1 引物 P1: 5' - AGCAAGGCGTGAGC-CTCTCCG - 3', P2: 5' - GAGGGAGC-CAAGCTGGTAGA- 3'。

1.2.2 PCR 扩增 采用经典碘化钠法提取模板 DNA^[6]。反应体系 500 μ L,其中含 1 \times 扩增缓冲液和 dNTPs 各 200 μ L,引物 P1 和 P2 各 50 pmol,模板 DNA 200 ng。置热循环仪(PE2400 型,Perkin Elmer Cetus)中 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min 后,加入 Taq DNA 聚合酶 2 u,然后按 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,60 $^{\circ}$ C 退火 1 min,74 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,循环 35 次后置 74 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。

1.2.3 扩增产物的限制性酶切 PCR 扩增产物 17 μ L,10 \times 酶切缓冲液 2 μ L,MspI 酶 1 μ L(10 u/ μ L),37 $^{\circ}$ C 消化过夜,反应终止后产物经 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳,溴化乙啶染色 35 min,以 DNA 片段长度标准物为参考,紫外灯下观察结果。

1.3 聚丙烯酰胺电泳

密度梯度超速离心提取 LDL (1.025~1.060 kg/L),透析浓缩,4 $^{\circ}$ C 保存(含 EDTA-Na₂ 1 g/L)^[2]。2%~16% 聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳分离 LDL 亚组分^[7]。电泳缓冲液为 pH 8.3 Tris-甘氨酸。150 V 预电泳 2 h 后,加入 LDL 或系列标准液 15 μ L(含蛋白 0.5 g/L 和蔗糖 200 g/L),依次于 80 V 电泳 2 h、150 V 电泳 12 h 及 220 V 电泳 12 h,电泳温度 4 $^{\circ}$ C。电泳后用考马斯亮兰染色,密度扫描仪扫描(633 nm),测量主峰的泳动距离。

参考标准分别为乳胶颗粒(直径 38.0 nm)、甲状腺球蛋白(直径 17.0 nm)、铁蛋白(直径 12.20 nm)和过氧化氢酶(直径 10.4 nm)。以参考品的泳动距离为横坐标,颗粒直径的对数值为纵坐标绘制标准曲线,计算 LDL 颗粒直径。

1.4 低密度脂蛋白亚组分图形确定

低密度脂蛋白亚组分图形分为 A 型和 B 型,A 型指以颗粒直径大于或等于 25.5 nm 的 LDL 为主峰以及较小颗粒的 LDL 为次峰;B 型指以颗粒直径小于 25.5 nm 的 LDL 为主峰以及较大颗粒的 LDL 为次峰。

1.5 血脂和胆固醇酯转运蛋白测定

酶法测定血浆总胆固醇 (total cholesterol, TC) 和甘油三酯 (triglyceride, TG) 浓度,高密度脂蛋白胆固醇 (HDL cholesterol, HDLC) 水平用自动化分析一步直接测定法。低密度脂蛋白胆固醇 (LDL cholesterol, LDLC) 用 Friedewald 公式计算。载脂蛋白 AI 和 B 用免疫比浊法测定。Lowry 法测定蛋白质含量,标准为牛血清白蛋白。本室建立的 ELISA 法测定 CETP 浓度^[8]。

1.6 统计学方法

数据以均数士标准差表示,数据处理采用方差分析,非正态分布的胆固醇酯转运蛋白经对数转换。

2 结果

2.1 胆固醇酯转运蛋白基因 15 外显子 D442G 突变的频率

根据 MspI 酶切 PCR 产物后的 PAGE 图谱(图 1, Figure 1) 判断:只有 179 bp 一条带者为野生型,有 158 bp 和 179 bp 两条带者为杂合子,只有 158 bp 一条带者为纯合子。200 例冠心病患者中发现 6 例杂合子,1 例纯合子,突变率 3.5%,与我室既往测定的健康人群 4% 的突变率相近^[9]。



图 1 胆固醇酯转运蛋白 Exon 15 D442G 突变 PAGE 图谱
Figure 1 PAGE analysis of Exon 15 missense mutation (442D:G) in CETP. M: PBR322/Hae Φ Makers; lane 1: normal (179 bp); lane 2: heterozygote (179 bp, and 158 bp); lane 3: homozygote (158 bp)

2.2 胆固醇酯转运蛋白基因突变的冠心病患者低密度脂蛋白大小分析

对冠心病患者基因突变个体(7 例)与非突变个体(随机抽取 40 例)进行分析,突变患者 LDL 颗粒直径显著大于非突变患者(26.92 \pm 0.79 nm 比 25.71 \pm 0.66 nm, $P < 0.01$)。突变组 LDL 亚组分图形均为 A 型;而非突变组 A 型 21 例(52.5%),B 型 19 例(47.5%)。两组间血脂水平亦发生变化,突变组胆

固醇酯转运蛋白水平显著降低, 而高密度脂蛋白胆固醇和载脂蛋白 A iv 浓度明显升高(表 1, Table 1)。

表 1 胆固醇酯转运蛋白基因突变患者低密度脂蛋白颗粒大小及血脂变化

Table 1 LDL particle size and plasma lipids level in patients with CETP gene mutation($\bar{x} \pm s$)

Index	CETP deficiency		CETP non- deficiency	
	Pattern A(<i>n</i> = 7)	Pattern A(<i>n</i> = 21)	Pattern B(<i>n</i> = 19)	Pattern A+ B(<i>n</i> = 40)
LDL Diameter (nm) ^d	26.92 ± 0.79	26.20 ± 0.53 ^b	25.19 ± 0.26 ^b	25.71 ± 0.66 ^b
CETP (mg/L) ^c	0.53 ± 0.29	1.79 ± 0.46 ^b	1.51 ± 0.45 ^a	1.65 ± 0.44 ^b
TC (mmol/L)	6.08 ± 2.92	5.24 ± 0.90	5.32 ± 1.01	5.28 ± 0.94
TG (mmol/L)	2.06 ± 1.82	1.62 ± 0.79	2.12 ± 1.16	1.86 ± 1.00
HDLc (mmol/L) ^d	1.76 ± 0.56	1.29 ± 0.24 ^b	1.18 ± 0.22 ^b	1.24 ± 0.24 ^b
LDLc (mmol/L)	3.37 ± 1.64	3.21 ± 0.92	3.16 ± 1.10	3.19 ± 1.00
ApoA iv (g/L) ^d	1.65 ± 0.51	1.30 ± 0.15 ^b	1.25 ± 0.16 ^b	1.28 ± 0.16 ^b
ApoB (g/L)	1.18 ± 0.35	1.07 ± 0.19	1.15 ± 0.27	1.11 ± 0.23

Significant difference between the groups, c: $P < 0.05$, d: $P < 0.01$; Compared with CETP deficiency group, a: $P < 0.05$; b: $P < 0.01$.

3 讨论

众多研究表明 B 型低密度脂蛋白是冠心病的强危险因素, 含有 B 型低密度脂蛋白个体较含有 A 型低密度脂蛋白个体发生心肌梗死的危险性增加 3 倍^[1]。对大批人群随访的前瞻性研究均认为小颗粒低密度脂蛋白与冠心病的发生密切相关^[10]。我们既往的研究也表明冠心病患者低密度脂蛋白分布向致密的低密度脂蛋白亚组分倾斜, 且致密的低密度脂蛋白颗粒易于氧化^[2]。本组冠心病患者低密度脂蛋白颗粒直径和 B 型低密度脂蛋白比例与对照组差别无显著性。

低密度脂蛋白亚组分颗粒大小受遗传控制, 但其他因素起着更重要的调节作用。血浆 TG 水平对小而密的低密度脂蛋白生成有重要的调节作用。血浆脂蛋白之间不断进行脂类交换, 在胆固醇酯转运蛋白作用下, 富含甘油三酯脂蛋白中的甘油三酯与低密度脂蛋白中的胆固醇酯交换; 低密度脂蛋白颗粒内甘油三酯增加至一定程度就被肝脂酶水解, 净的结果是低密度脂蛋白中 TC/ 载脂蛋白 B 比值降低, 颗粒变小, 密度增加^[11]。Rotter 等^[4]对冠心病家族低密度脂蛋白颗粒大小与主要载脂蛋白及参与脂蛋白代谢酶的基因位点进行相关研究, 结果显示胆固醇酯转运蛋白和超氧化物歧化酶基因位点与低密度脂蛋白大小相关。

本文采用聚合酶链反应片段长度多态性技术检测胆固醇酯转运蛋白基因 15 外显子 D442G 突变的方法, 在特定引物中引入一个误配碱基即上游引物 3' 端第 3 个碱基设计为 C 而模板为 T, 用 PCR 技术特异性扩增包含胆固醇酯转运蛋白基因第 1 506 位

碱基的基因序列, 当该位碱基由 A 突变为 G 时, 就形成了 MspI 酶切位点。200 例冠心病患者突变率为 3.5%, 同健康人群的突变率 4% 相近, 这在中国人较常见; 日本人群中该突变率为 4% ~ 7%^[12]。较早的关于胆固醇酯转运蛋白基因缺陷的研究多认为胆固醇酯转运蛋白基因突变患者冠心病发病率降低, 而 Zhong 等^[13]报道的 3 469 名日本男子中胆固醇酯转运蛋白基因突变组冠心病发病率明显高于对照组。

胆固醇酯转运蛋白基因缺陷患者血浆胆固醇酯转运蛋白浓度及活性降低, 引起脂蛋白代谢发生显著变化, 其中胆固醇酯转运蛋白介导的含载脂蛋白 B 的脂蛋白中 TG 与高密度脂蛋白中胆固醇酯的交换降低, 导致高密度脂蛋白中胆固醇酯的堆积, 高密度脂蛋白量和量发生变化, 其最显著的特征是低密度脂蛋白胆固醇和载脂蛋白 A iv 水平的显著升高^[13], 本文资料与之相符。而有关胆固醇酯转运蛋白基因缺陷患者低密度脂蛋白颗粒大小的变化未见报道, 我们发现其颗粒直径显著变大, 且均为 A 型低密度脂蛋白, 可能因胆固醇酯转运蛋白水平下降, 不能充分介导富含 TG 脂蛋白中的 TG 与低密度脂蛋白中的胆固醇酯交换的缘故, 文献[7]亦报道在低胆固醇酯转运蛋白含量的患者血浆中加入胆固醇酯转运蛋白可改变低密度脂蛋白颗粒大小。而另一方面, 低密度脂蛋白中 TG 与高密度脂蛋白中胆固醇酯的交换亦受影响, 使低密度脂蛋白中胆固醇酯含量下降, 导致低密度脂蛋白变小。胆固醇酯转运蛋白基因缺陷患者低密度脂蛋白大小的变化是一个复杂的过程, 有待于进一步研究。

胆固醇酯转运蛋白对动脉粥样硬化作用是复杂的,因胆固醇酯转运蛋白参与胆固醇酯的逆向转运,直接促进胆固醇酯从动脉壁巨噬细胞、血浆间隙组织及动脉平滑肌细胞的清除,具有抗动脉粥样硬化作用。而胆固醇酯转运蛋白缺陷或降低时导致血浆高密度脂蛋白胆固醇升高,低密度脂蛋白颗粒变大,又不易发生动脉粥样硬化;但由于胆固醇酯转运蛋白降低引起大颗粒的高密度脂蛋白_{2a}堆积,新生的pre-高密度脂蛋白降低,从外周细胞摄取胆固醇的能力下降,影响胆固醇酯的逆向转运,具致动脉粥样硬化作用^[14]。

胆固醇酯转运蛋白基因缺陷患者脂蛋白结构、功能和代谢调节有待深入研究,只有从分子生物学基础上才能揭示胆固醇酯转运蛋白与动脉粥样硬化的关系,从而正确评价胆固醇酯转运蛋白的病理、生理和临床意义。

参考文献

- [1] Miller BD, Alderman EL, Haskell WL, et al. Predominance of dense low density lipoprotein particles predicts angiographic benefit therapy in Stanford coronary risk intervention project [J]. *Circulation*, 1996, **24**: 2 146- 153
- [2] 汪俊军, 刘小传, 庄一义. 冠心病患者低密度脂蛋白亚组分的分布及氧化易感性的研究 [J]. *中华医学杂志*, 1998, **78**: 833- 834
- [3] Tall AR. Plasma cholesterol ester transfer protein [J]. *J Lipid Res*, 1993, **34**: 1 225- 274
- [4] Rotter JJ, Bu X, Cantor RM, et al. Multilocus genetic determinants of LDL particle size in coronary artery disease families [J]. *Am J Hum Genet*, 1996, **58**: 585- 594
- [5] Inazu A, Jiang XC, Haraki T, et al. Genetic cholesteryl ester transfer protein deficiency caused by two prevalent mutations as a major determinant of increased levels of high density lipoprotein cholesterol [J]. *J Clin Invest*, 1994, **94**: 1 872- 882
- [6] Loparev VN, Cantas MA, Monken CE, et al. An efficient and simple method of DNA extraction from whole blood and cell line to identify infections agents [J]. *J Virol Methods*, 1990, **34**: 105- 111
- [7] Lagrost L, Gandjini H, Athias A, et al. Influence of plasma cholesteryl ester transfer activity on the LDL and HDL distribution profiles in nonlipidemic subjects [J]. *Arterioscler Thromb*, 1993, **13**(6): 815- 825
- [8] 汪俊军, 庄一义, 刘小传, 等. 抗胆固醇酯转运蛋白单克隆抗体的制备及其应用 [J]. *金陵医院学报*, 1998, **11** (4): 299 - 303
- [9] 强宏娟, 丁庆, 王卫萍, 等. 胆固醇酯转运蛋白基因 15 外显子 D442G 突变的检测 [J]. *临床检验杂志*, 2000, **18**(2): 76 - 78
- [10] Lamarche B, Tchernof A, Moorjani S, et al. Small, dense low-density lipoprotein particles as a predictor of the risk of ischemic heart disease in man- prospective results from the quebec cardiovascular study [J]. *Circulation*, 1997, **95**: 69- 75
- [11] 孙林, 汪俊军, 庄一义. 脂质转运和脂酶水解对低密度脂蛋白的修饰作用 [J]. *基础医学与临床*, 1999, **19**: 58- 62
- [12] Hirano K, Yamashita S, Nakajima N, et al. Genetic cholesteryl ester transfer protein deficiency is extremely frequent in the Omagari area of Japan [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997, **16**: 1 053 - 059
- [13] Zhong S, Sharp DS, Grove JS, et al. Increased coronary heart disease in Japanese- American men with mutation in the cholesteryl ester transfer protein gene despite increased HDL levels [J]. *J Clin Invest*, 1996, **97**: 2 917- 923
- [14] 庄一义. 胆固醇酯转运蛋白与动脉粥样硬化 [J]. *中华医学检验杂志*, 1999, **22** (3): 179- 181

(此文 1999- 11- 24 收到, 2000- 06- 12 修回)

(此文编辑 朱雯霞)