

中国人内源性高甘油三酯血症与脂蛋白脂酶基因 Hind Ⅳ多态性的关系

张 蓉, 刘秉文, 白 怀

(华西医科大学载脂蛋白研究室, 四川省成都市 610041)

[主题词] 高甘油三酯血症, 内源性; 脂蛋白脂酶; Hind Ⅳ 多态性, 限制片段长; 流行病学; 中国人

[摘要] 为了解中国人内源性高甘油三酯血症与脂蛋白脂酶基因多态性是否相关, 用聚合酶链反应—限制片段长多态性方法对成都地区 200 例内源性高甘油三酯血症患者及 202 例血脂正常者脂蛋白脂酶基因 Hind Ⅳ酶切位点的多态性及其血脂、载脂蛋白水平进行了研究。结果发现, 内源性高甘油三酯血症患者和正常人均以 H2H2 纯合子基因型为主, 内源性高甘油三酯血症组 H2 等位基因频率较对照组增加(0.855 比 0.745, $P < 0.01$); 而 H1 等位基因频率内源性高甘油三酯血症组则明显低于对照组(0.145 比 0.255, $P < 0.01$)。H2H2 基因型者血浆甘油三酯、载脂蛋白 C Ⅲ、C Ⅳ水平、甘油三酯与高密度脂蛋白的比值均显著高于 H1H1 基因型者($P < 0.01$), 比 H1H2 基因型者也明显增加($P < 0.05$)。此结果提示, 脂蛋白脂酶基因内含子 8Hind Ⅳ酶切位点的多态性与中国人内源性高甘油三酯血症有一定的相关性。

[中图分类号] R181.32

[文献标识码] A

A Study of Lipoprotein Lipase Gene Hind ⅣPolymorphism Associated with Chinese Endogenous Hypertriglyceridemics

ZHANG Rong, LIU Bing- Wen, and BAI Huai

(Apolipoprotein Research Unit, West China University of Medical Sciences, Chengdu 610041, China)

MeSH Hypertriglyceridemia, Endogenous; Lipoprotein Lipase; Genes, Hind Ⅳ Polymorphism, Restriction Fragment Length; Epidemiology; Chinese

ABSTRACT **Aim** To investigate the lipoprotein lipase gene Hind Ⅳpolymorphism associated with Chinese endogenous hypertriglyceridemics (HTG). **Methods** Lipoprotein lipase gene Hind Ⅳpolymorphism was studied using polymerase chain reaction (PCR) and restriction fragment length polymorphisms (RFLP) in 200 endogenous hypertriglyceridemics and 202 healthy subjects from a population of Chinese Han nationality in Chengdu area. **Results** The results showed that both in HTG group and control group, the H2H2 homozygous was the major alleles. H2 allelic frequencies in HTG group were higher than that of control group (0.855 vs 0.745, $P < 0.01$). but H1 allelic frequencies in HTG group was significantly lower than that of control group (0.145 vs 0.255, $P < 0.01$). the plasma triglycerides (TG) level, apo C Ⅲ and apo C Ⅳ levels, TG/HDL ratio in H2H2 genotypes were significantly higher than that of H1H1 genotypes ($P < 0.01$), also higher than that of H1H2 genotypes ($P < 0.05$). **Conclusions** Therefore, it is suggest that the Hind ⅣRFLP at intron 8 of LPL gene is associated with endogenous hypertriglyceridemics to some extent in Chinese population.

内源性高甘油三酯血症(endogenous hypertriglyceridemics, HTG)是我国常见的一类高脂血症,与冠心病、脑动脉硬化及糖尿病等关系密切,在血浆甘油三酯(triglyceride, TG)及极低密度脂蛋白(very low density lipoprotein, VLDL)显著升高、高密度脂蛋白胆

固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDLC)明显降低的同时,常伴有载脂蛋白水平异常^[1]。最近大量流行病学的研究表明,血浆甘油三酯水平升高是冠心病发病的独立危险因素之一^[2]。HTG 的发病有环境因素也有遗传因素。我们曾从我国人民膳食以糖高脂低的特点出发,在膳食、血脂、脂蛋白、载脂蛋白(apolipoprotein, apo)、肝脏脂蛋白受体及载脂蛋白 A iv、C Ⅲ及 C Ⅳ基因表达的水平上探讨了中国人 HTG 的发病机理^[1]。为从遗传角度探讨中国人 HTG 的发病机理,我们对 200 例 HTG 患者及 202 例

[基金项目] 国家自然科学基金(39770322)资助

[作者简介] 张 蓉,女,1952 年 3 月出生,四川省安县人,临床医学本科毕业,副教授,主要从事血脂、脂蛋白和载脂蛋白的研究工作。刘秉文,男,1930 年 12 月出生,四川省梓潼县人,生物化学与分子生物学教授,博士研究生导师。

血脂正常者脂蛋白脂酶(lipoprotein lipase, LPL)基因内含子8 Hind Ⅲ位点多态性作进一步研究。

1 对象与方法

1.1 对象

高甘油三酯血症(HTG)组:选择空腹血浆TG ≥ 2.3 mmol/L、总胆固醇(total cholesterol, TC) ≤ 6.6 mmol/L,年龄为35~65岁,排除肝、肾及甲状腺疾病的HTG患者200例。

正常对照组:选择空腹血浆TG < 2.0 mmol/L、TC < 6.6 mmol/L,年龄为35~65岁的健康成人202例,排除肝、肾及甲状腺疾病。

受试者选自成都地区华西医科大学、四川大学及红光电子管厂的教师、职员及干部,均为汉族。

1.2 血基因组DNA的分离

取空腹12~14 h的静脉血,EDTA抗凝,用常规方法直接从全血抽提DNA, -20°C 保存备用。

1.3 聚合酶链反应

1.3.1 聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)引物 PCR引物按张秋萍等^[3]的方法设计。LPL基因内含子8 Hind Ⅲ限制生长多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)引物上游:5'-GATGTCACCTGGATAATCAAAG;下游:5'-CTTCAGCTAGACATTGCTAGTGT-3' (由北京赛百盛生物技术有限公司合成)。其扩增产物长365 bp。

1.3.2 聚合酶链反应(PCR)过程 以抽提的血基因组DNA为模板,用PCR引物进行常规扩增反应。25 μL 反应液中含10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3)、50 mmol/L KCl、0.01% 明胶、200 $\mu\text{mol/L}$ dNTP、20 mmol/L MgCl₂、50 $\mu\text{mol/L}$ 引物、0.6 μg 模板DNA、1.5 u Taq聚合酶,加石蜡油复盖后94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min \rightarrow 56 $^{\circ}\text{C}$ 1 min \rightarrow 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,进行35个循环后,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸10 min结束PCR反应。

1.4 限制片长多态性(RFLP)分析

1.4.1 酶解 取PCR产物10 μL ,加限制内切酶Hind Ⅲ2 u,酶解反应缓冲液2 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 消化过夜。

1.4.2 电泳 取消消化液在2%琼脂糖凝胶板上1 \times TAE缓冲液150 V电泳2 h,溴乙锭染色后在紫外灯下显示DNA带并拍照。

1.5 血脂及载脂蛋白测定

抽取空腹12~14 h静脉血,血清TG及TC的测定按酶法(北京中生公司),HDLc用磷钨酸沉淀一酶法测定,载脂蛋白AI、AⅡ、B100、CⅡ、CⅢ及E用本室研制的免疫扩散试剂盒^[7]测定。

1.6 统计分析

用Windows SPSS统计软件,在Windows软件中建立数据库,HTG组与正常对照组间基因型频率及等位基因频率的差异用 χ^2 检验,组间血脂及载脂蛋白水平比较用 t 检验,不同基因型亚型间的差异用协方差分析。

2 结果

2.1 限制片长多态性琼脂糖凝胶电泳结果

脂蛋白脂酶(LPL)基因内含子8聚合酶链反应(PCR)扩增产物长365 bp,经Hind Ⅲ限制酶水解后出现三种多态性:H1H1为365 bp一条带(无Hind Ⅲ限制性酶切位点);H2H2被酶切为205 bp和160 bp两条带;杂合子H1H2则有365 bp、205 bp及160 bp三条带(图1, Figure 1)。

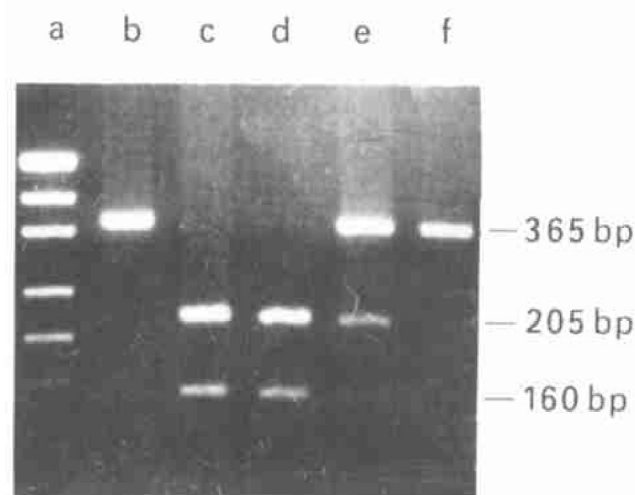


图1 脂蛋白脂酶基因内含子8 Hind Ⅲ限制生长多态性的凝胶电泳图谱

Figure 1 LPL gene Hind Ⅲ RFLP were analyzed by agarose electrophoresis. a: pUC19DNA/Msp IV; b: PCR product; c and d: H2H2; e: H1H2; f: H1H1.

2.2 高甘油三酯血症组与对照组血脂及载脂蛋白水平的比较

由表1 (Table 1)可见,HTG组血清TG水平及血TG/HDLc比值显著高于对照组($P < 0.001$);载脂蛋白AI及HDLc则比对照组有明显降低($P < 0.001$),而载脂蛋白B100、CⅡ、CⅢ及E均显著高于对照组($P < 0.001$),与本室以往的报道相符^[6]。

2.3 脂蛋白脂酶基因Hind Ⅲ基因型分布

脂蛋白脂酶基因Hind Ⅲ的基因型分布见表2 (Table 2)。可见两组均以H2H2纯合子基因型为主,但HTG组H2H2明显高于对照组,而H1H2杂合

子和 H1H1 纯合子基因型频率则明显低于对照组。

表 1 高甘油三酯血症组及对照组血脂及载脂蛋白水平的比较

Table 1 Comparison of serum lipid and apolipoprotein level in the HTG group and the control group

Index	HTG (n= 200)	Control (n= 202)
Age (years)	54. 49 ±15. 37 ^a	51. 08 ±1. 31
Sex (M/ F) (%)	137+ 63 (68. 5% + 31. 5%) ^a	120+ 82 (59. 4% + 40. 6%)
BMI (kg/ m2)	24. 85 ±3. 22 ^b	22. 83 ±3. 53
BS (mmol/ L)	5. 213 ±2. 956 ^b	4. 027 ±2. 253
TG (mmol/ L)	3. 591 ±1. 830 ^c	1. 162 ±0. 348
TC (mmol/ L)	5. 629 ±1. 195 ^c	5. 037 ±0. 699
HDL C (mmol/ L)	1. 020 ±0. 286 ^c	1. 388 ±0. 404
Apo AI (g/ L)	1. 195 ±0. 302 ^c	1. 316 ±0. 231
Apo A Ⅲ (g/ L)	0. 283 ±0. 049	0. 284 ±0. 061
Apo B100 (g/ L)	0. 986 ±0. 195 ^c	0. 779 ±0. 139
Apo C Ⅲ (g/ L)	0. 089 ±0. 036 ^c	0. 045 ±0. 016
Apo C Ⅳ (g/ L)	0. 200 ±0. 076 ^c	0. 111 ±0. 030
Apo E (g/ L)	0. 064 ±0. 026 ^c	0. 042 ±0. 011
TG/ HDLC	3. 783 ±2. 198 ^c	0. 914 ±0. 410

BS is the abbreviation of the blood sugar. a: $P < 0. 05$, b: $P < 0. 01$, c: $P < 0. 001$, compared with control group.

表 2 脂蛋白脂酶(LPL) 基因 Hind Ⅲ 基因型分布

Table 2 Distribution of LPL gene Hind Ⅲ genotypes (n, %)

Groups	n	H2H2	H1H2	H1H1
Control	202	118(58. 4)	65(32. 2)	19(9. 4)
HTG	200	148(74. 0)	46(23. 0)	6(3. 0)

χ^2 inspection, $P < 0. 01$, Compared with control group.

2.4 中国人与日本人和欧洲白种人脂蛋白脂酶基因 Hind Ⅲ 等位基因频率比较

由表 3 (Table 3) 可见, 中国人 LPL 基因内含子 8 Hind Ⅲ H2 等位基因频率显著高于欧洲白种人(0. 745 比 0. 586, $P < 0. 01$)。中国人、日本人及欧洲白种人 HTG 组及对照组均以 H2 等位基因为主, 少见 H1 等位基因。不同人种 HTG 组 H1 等位基因频率均低于对照组(0. 145 比 0. 255, $P < 0. 01$; 0. 121 比 0. 342, $P < 0. 01$; 0. 211 比 0. 414, $P < 0. 01$)。H2 等位基因频率均高于对照组(0. 855 比 0. 745, $P < 0. 01$; 0. 879 比 0. 658, $P < 0. 01$; 0. 789 比 0. 586, $P < 0. 01$)。

2.5 脂蛋白脂酶基因 Hind Ⅲ 位点不同基因型亚组

与血脂及载脂蛋白水平比较

由表 4 (Table 4) 可见, H2H2 基因型组血浆 TG、载脂蛋白 C Ⅲ、C Ⅳ水平及 TG/ HDLC 比值均显著高于 H1H1 基因型组($P < 0. 01$); 比 H1H2 基因型组有所增加($P < 0. 05$)。

表 3 中国人与日本人^[8]和欧洲白种人^[8]脂蛋白脂酶基因 Hind Ⅲ 等位基因频率比较

Table 3 Comparison of LPL gene Hind Ⅲ allele frequencies between Chinese, Japanese and Caucasian

Groups	n	H1	H2
Chinese			
HTG	200	0. 145	0. 855
Control	202	0. 255	0. 745
Japanese			
HTG	53	0. 121	0. 879
Control	76	0. 342	0. 658
Caucasian			
HTG	90	0. 211	0. 789
Control	186	0. 414	0. 586

$P < 0. 01$, Compared HTG with control group.

表 4 脂蛋白脂酶(LPL) 基因 Hind Ⅲ 位点不同基因型亚组与血脂及载脂蛋白水平比较

Table 4 Fasting plasma lipids and apolipoprotein levels for Chinese in Chengdu area with different LPL gene Hind Ⅲ genotypes

	H2H2 n= 266	H1H2 n= 11	H1H1 n= 25
TG(mmol/ L)	2. 544 ±1. 915 ^a	2. 188 ±1. 432 ^b	1. 582 ±0. 699
TC(mmol/ L)	5. 419 ±1. 036	5. 235 ±0. 951	5. 186 ±0. 986
HDL C(mmol/ L)	1. 186 ±0. 402	1. 223 ±0. 383	1. 203 ±0. 244
Apo AI(g/ L)	1. 241 ±0. 288	1. 289 ±0. 229	1. 318 ±0. 289
Apo A Ⅲ(g/ L)	0. 284 ±0. 057	0. 281 ±0. 049	0. 289 ±0. 048
Apo B100(g/ L)	0. 897 ±0. 199	0. 878 ±0. 203	0. 837 ±0. 137
Apo C Ⅲ(g/ L)	0. 071 ±0. 037 ^a	0. 067 ±0. 032 ^b	0. 052 ±0. 021
Apo C Ⅳ(g/ L)	0. 164 ±0. 077 ^a	0. 146 ±0. 061 ^b	0. 121 ±0. 043
Apo E(g/ L)	0. 051 ±0. 038	0. 052 ±0. 021	0. 045 ±0. 012
TG/ HDLC	2. 548 ±2. 282 ^a	2. 112 ±1. 731 ^b	1. 405 ±0. 762

p- values were analysed by analysis of covariances genotypes. a: $P < 0. 01$, compared H2H2 with H1H1; b: $P < 0. 05$, compared H2H2 with H1H2

3 讨论

脂蛋白脂酶是血浆脂蛋白代谢的关键酶, 在乳糜微粒(chylomicron, CM) 和极低密度脂蛋白的代谢

中发挥重要作用,其活性降低可导致血浆CM、极低密度脂蛋白降解障碍,引起血浆TG、极低密度脂蛋白水平明显升高。人脂蛋白脂酶基因位于第8号染色体,由10个外显子和9个内含子组成,全长约30 kb。外显子1~9编码由475个氨基酸构成的分子量约为60 kDa的蛋白质,外显子10编码3'端非翻译区。近年来国外陆续报导了在欧美白种人发现一些脂蛋白脂酶基因外显子4和5以外的基因突变,其发生频率较高,且与高甘油三酯血症及动脉硬化化的发生有一定关系^[4~6]。

Chamberlain等^[8]报道欧洲白种人和日本人H2H2纯合子基因型在高甘油三酯血症组的频率比正常对照组显著升高,与高甘油三酯血症的发生密切相关,因此日本人将H2等位基因作为高甘油三酯血症发病的特征性易感基因。随后Thorh等^[9]和Peacock等^[10]也有类似报道。本室张秋萍等^[6]报道脂蛋白脂酶基因HindⅢ酶切位点多态性与中国人高甘油三酯血症的发生无关,但该研究例数较少(HGT组69例,对照组74例)。本研究在扩大样本例数至200例及202例后发现中国人H2H2基因型高甘油三酯血症组明显高于正常对照组($P < 0.01$),同时发现具有H2H2等位基因型组其血浆TG、载脂蛋白CⅢ、CⅣE水平及TG/HDL-C比值均明显高于H1H1基因型组($P < 0.01$),与Chamberlain等^[8]报道的结果一致,但存在种族差异。因此我们认为,中国人脂蛋白脂酶基因HindⅢ酶切位点H2等位基因与高甘油三酯血症的发生有一定关联。脂蛋白脂酶脂蛋白脂酶基因HindⅢ酶切位点多态性发生于内含了8区,并不直接影响脂蛋白脂酶的结构与功能。Chamberlain等^[8]、Heizmann等^[11]认为H2等位基因可能是由于发生连锁不平衡导致脂蛋白脂酶基因的一个外显子的突变而影响这个基因产物的结构与功能;或者是引起基因侧翼序列的核苷酸的改变而影响基因表达的调节,间接使邻近基因发生突变而导致脂蛋白脂酶活性降低而使血脂及载脂蛋白水

平改变。但其详细机制有待进一步研究。

参考文献

- [1] 刘秉文. 内源性高甘油三酯血症发病机制探讨[J]. 中国动脉硬化杂志, 1993, 1(1): 67-70
- [2] 刘秉文. 血浆甘油三酯与动脉粥样硬化[J]. 心血管病学进展, 1999, 20(1): 3-6
- [3] 张秋萍, 刘秉文, 刘宇, 等. 中国人内源性高甘油三酯血症患者脂蛋白脂酶及肝脂酶常见基因变异的研究[J]. 中华医学遗传学杂志, 1997, 14(5): 289-293
- [4] Galton DJ, Mattu RK, Cavanna J. Polymorphism of the lipoprotein lipase gene and premature atherosclerosis[J]. J Inter Med, 1994, 236(Suppl 736): 63-68
- [5] Mailly F, Olivecrona G, Turgrul Y, et al. A common variant in the gene for lipoprotein lipase (Asp-Asn): Functions and prevalence in normal and hyperlipidaemic subjects[J]. Arterioscler Thromb, 1995, 15(4): 468-478
- [6] Hoffer MJV, Bredie SIH, Boomsma DI, et al. The lipoprotein lipase (Asn 291 Ser) mutation is associated with elevated lipid levels in families with familial combined hyperlipidaemia[J]. Atherosclerosis, 1996, 119(2): 159-167
- [7] 刘秉文. 血浆载脂蛋白的免疫测定及临床应用[M]. 见: 王克勤主编. 脂蛋白与动脉粥样硬化. 北京: 人民卫生出版社, 1995: 359-360
- [8] Chamberlain JC, Thorn JA, Oka K, et al. DNA polymorphisms at lipoprotein lipase gene: Associations in normal and hypertriglyceridaemia subjects[J]. Atherosclerosis, 1989, 79(1): 85-91
- [9] Thorn JA, Chamberlain JC, Alcolado JC, et al. Lipoprotein and hepatic gene variants in coronary atherosclerosis[J]. Atherosclerosis, 1990, 85(1): 55-60
- [10] Peacock RE, Hamsten A, Nilsson EP, et al. Associations between lipoprotein lipase gene polymorphisms and plasma correlations of lipids, lipoprotein and lipase activities in young myocardial infarction survivors and age-matched healthy individuals from Sweden[J]. Atherosclerosis, 1992, 97(2): 171-185
- [11] Heizmann C, Kirchgesner T, Kwiterovich PO, et al. DNA polymorphism haplotypes of the lipoprotein lipase gene: possible association with high density lipoprotein levels[J]. Human Genetics, 1991, 86: 578-584

(此文2000-05-22收到, 2000-12-13修回)

(此文编辑 文玉珊, 胡必利)