

[文章编号] 1007- 3949(2001)- 03- 0231- 04

•临床研究•

脑梗死患者载脂蛋白(a) 基因 TTTTA 五核苷酸重复序列多态性

胡波¹, 周新², 李玺³, 梁敏坚¹(中山大学附属第三医院 1. 检验科, 3. 外科, 广东省广州市 510630;
2. 武汉大学中南医院检验科, 湖北省武汉市 430071)

[主题词] 载脂蛋白(a); 脑梗死; 克隆; 测序; 聚合酶链反应

[摘要] 载脂蛋白(a) 5' 端侧翼存在一个 TTTTA 五核苷酸重复序列, 为探讨中国汉族人群中载脂蛋白(a) TTTTA 五核苷酸重复序列多态性与动脉硬化性脑梗死的关系, 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 82 例脑梗死患者和 153 例正常汉人 TTTTA 五核苷酸重复序列, 同时采用 T 载体快速克隆载脂蛋白(a) (TTTTA)₅ 等位基因并对其测序。共检出 TTTTA 串联重复次数为 4、5、7、8、9、10 和 11 共 7 种等位基因和 4/8、4/9、5/8、5/9、7/8、8/8、8/9、8/10、8/11、9/9 和 9/10 等 11 种基因型, 脑梗死组载脂蛋白(a) TTTTA 重复序列为 5 的等位基因频率明显高于正常对照组 ($P < 0.05$), 重复序列为 9 的等位基因频率明显低于正常对照组 ($P < 0.01$), 测序结果表明 (TTTTA)₅ 等位基因未发现其有基因变异。结果提示极有可能是 (TTTTA) 的重复数目与脑梗死发生关联。

[中图分类号] R743

[文献标识码] A

A TTTTA Pentanucleotide Repeat Polymorphism of Apolipoprotein(a) Gene in Patient with Cerebral Infarction

HU Bo, ZHOU Xin, LI Xi, and LIANG Min-Jian

(Laboratory Department, the Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510630, China)

MeSH Apolipoprotein(a); Cerebral Infarction; Clone; Sequencing; Polymerase Chain Reaction

ABSTRACT **Aim** To explore the correlation between TTTTA Pentanucleotide repeats (PNR) polymorphism of the apolipoprotein(a) [apo(a)] gene and atherosclerosis cerebral infarction (ACI) in Chinese Han nationality, 235 subjects with no blood links in Hubei region, including 82 patients with ACI and 153 healthy controls were studied. **Methods** Polymerase chain reaction (PCR)-denature polyacrylamide gel electrophoresis-silver stain technique was employed to determine the TTTTA PNR polymorphism of apo(a) gene. And (TTTTA)₅ allele of the apo(a) PNR was cloned into a plasmid T-vector. The recombinant PGEM-apo(a) was sequenced. **Results** The Chinese Han nationality in Hubei region has apo(a) gene polymorphism, 7 alleles with 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11 TTTTA PNR and 11 genotypes with 4/8, 4/9, 5/8, 5/9, 7/8, 8/8, 8/9, 8/10, 8/11, 9/9 and 9/10 was detected; the allele frequency in ACI with 5 repeats was remarkably higher than that in controls ($P < 0.05$), the frequency in ACI with 9 repeats was remarkably lower than that in controls ($P < 0.01$); sequence mutation of the apo(a) PNR (TTTTA)₅ was not found. **Conclusions** It was possible that the copy number of the apo(a) PNR (TTTTA) was associated with the susceptibility to ACI.

脑梗死是严重危害人类健康的疾病, 其发病有众多复杂的遗传和环境因素, 其病理基础是动脉粥样硬化斑块的形成, 而基因变异是脑梗死的重要发

病因素之一^[1]。载脂蛋白(a) [apolipoprotein(a), Apo(a)] 是仅存在于脂蛋白(a) [lipoprotein(a), Lp(a)] 的一种高分子量的糖蛋白, 其基因位点调控着脂蛋白(a) 的浓度。在其 5' 端侧翼 1.5 kb 内存在一个五核苷酸重复序列 (pentanucleotide repeats, PNR) 显示多态性即 (TTTTA)_n 串联重复。国外大量研究表明, 载脂蛋白(a) PNR 基因多态性与脂蛋白(a) 水平升高和动脉硬化性疾病有关联^[2,3], 并对研究遗传和预测动脉硬化性脑梗死的危险性具有一定的价值。

[作者简介] 胡波, 男, 1970 年出生, 湖北武汉人, 临床检验诊断学专业硕士研究生, 研究方向为脂蛋白与动脉粥样硬化, 现从事脂蛋白的分子生物学研究。周新, 男, 教授, 博士生导师, 武汉大学医学院检验系, 武汉大学附属中南医院检验科主任及基因诊断中心主任, 研究方向为血脂、脂蛋白及载脂蛋白与动脉粥样硬化及相关疾病的生物化学研究。

为了探索在中国汉族人中载脂蛋白(a) PNR 等位基因是否发生基因变异影响载脂蛋白(a) 蛋白功能, 及其与脑梗死发病风险的关系, 本研究应用聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR) 检测了 82 例动脉硬化性脑梗死(atherosclerosis cerebral infarction, ACI) 患者与 153 例正常中国湖北地区汉族人载脂蛋白(a) PNR 基因型, 分析了载脂蛋白(a) PNR 基因遗传变异是否与 ACI 发生关联。并对脑梗死患者中发现的特异性基因 (TTTTA)₅ 进行克隆和序列分析, 以期进一步阐明载脂蛋白(a) PNR 与脑梗死的关系。

1 材料与方法

1.1 研究对象

选取在我院住院的动脉硬化性脑梗死患者 82 例, 其中男性 54 例, 女性 28 例, 平均年龄 68 ± 9.2 岁, 符合 1981 年第二届全国脑血管疾病会议制定的脑血管诊断标准及 1990 年 WHO 脑梗死诊断标准, 经临床检查(病史、体征、生化检查) 及头颅 CT 或 MRI 扫描确诊。对照组 153 例, 其中含与 ACI 患者性别、年龄相匹配的人群, 平均年龄 62 ± 10.5 岁, 为无心血管及其它疾病的体检健康者。所有受试者均随机选自湖北地区汉族人群, 无肝、肾及内分泌等影响脂质代谢的疾病。

1.2 聚合酶链反应扩增

取 EDTA-Na 抗凝血 100 μ L, 采用改良的碘化钠法, 从人静脉血有核细胞中提取基因组 DNA, 引物参照 Malgaretti 等^[4] 设计, 由加拿大 Sangon 公司合成。序列为 P1: 5'-GAATTCATTTGCGGAAAGATTG-3'; P2: 5'-CTTCAACCGGGGTGAGAGTCTC-3'。特异性扩增载脂蛋白(a) 5' 端调控区起始密码子上游 1 373 bp 处的 (TTTTA)_n 五核苷酸串联重复基因序列, 扩增方法参见参考文献[4], 产物片段为 76 bp~111 bp。

1.3 扩增产物的检测

按丙烯酰胺: N, N'-甲叉双丙烯酰胺 38: 2 的比例配制 6% 的变性胶板, 胶板中含 4 mol/L 的尿素。取 1.5 μ L 聚合酶链反应产物、2 μ L 载样缓冲液、2.5 μ L Tris-EDTA 液混合, 点样于相应的上样孔。在电泳仪 (Sequar GenR GT, BIO-RAD 公司) 上进行电泳, 用银染法染色并照相记录。载脂蛋白(a) DNA 片段分子量的估算参照 PBR322/Hae III 和 PBR322/Msp I 的 DNA 片段标记, 用回归法计算出 DNA 片段大小。

1.4 重组质粒的构建和 DNA 序列测定

挑选等位基因为 (TTTTA)₅ 的脑梗死患者对其基因进行克隆和测序。以 6% 变性 PAGE 电泳分离目的 DNA, 溴化乙锭染色后紫外灯下切下 (TTTTA)₅ 目的条带。将产物经酚、氯仿、无水乙醇沉淀纯化, 采用 T 载体构建重组质粒(取 2 μ L DNA 纯化产物, 2 \times Buffer 5 μ L, PGEM-T 载体 1 μ L, T4 DNA 连接酶 1 μ L, 加无菌双蒸水至 10 μ L, 室温孵育 1 h), 将重组质粒转化 JM109 感受态细胞, 在 LB 固体培养基上取氨苄抗性菌落培养扩增, 采用碱裂解法提取质粒, 重组质粒采用聚合酶链反应扩增, 聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定。由本实验室采用 Perkin-Elmer 公司 ABI PRISMTM 310 型全自动测序仪用公用引物 M13 进行测序, 具体操作参照 ABI PRISMTM 310 型全自动测序仪说明书。

1.5 统计学分析

统计分析用 SAS (statistical analysis system) 软件, 载脂蛋白(a) PNR 基因型与等位基因频率采用基因计数法计算, 研究对象与 Hardy-Weinberg 平衡的符合程度及组间基因型与等位基因频率比较采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 载脂蛋白(a) PNR 基因型与等位基因频率的分布

两组人群载脂蛋白(a) PNR 共检出 11 种基因型和 7 种等位基因, 7 种等位基因所含 TTTTA 重复次数分别为 4、5、7、8、9、10 和 11 次, 其扩增产物分别为 76 bp、81 bp、91 bp、96 bp、101 bp、106 bp 和 111 bp, 11 种基因型分别为 4/8、4/9、5/8、5/9、7/8、8/8、8/9、8/10、8/11、9/9 和 9/10 (图 1, Figure 1), 基因型频率分布均符合 Hardy-Weinberg 平衡(均为 $P > 0.05$), 具有群体代表性。但两组人群间载脂蛋白(a) PNR 基因型与等位基因频率差异有显著性意义。ACI 组基因型 (TTTTA)_{5/8} 和等位基因 (TTTTA)₅ 频率均显著高于正常对照组, 基因型 (TTTTA)_{8/9} 和等位基因 (TTTTA)₉ 频率均显著低于正常对照组(表 1, Table1, 表 2, Table2)。

2.2 DNA 序列克隆和测定

以 T 载体构建重组质粒。PGEM- 载脂蛋白(a) PNR 序列测定结果与国外报道一致, (TTTTA) 串联重复序列拷贝数为 5, 未发现其它变异。

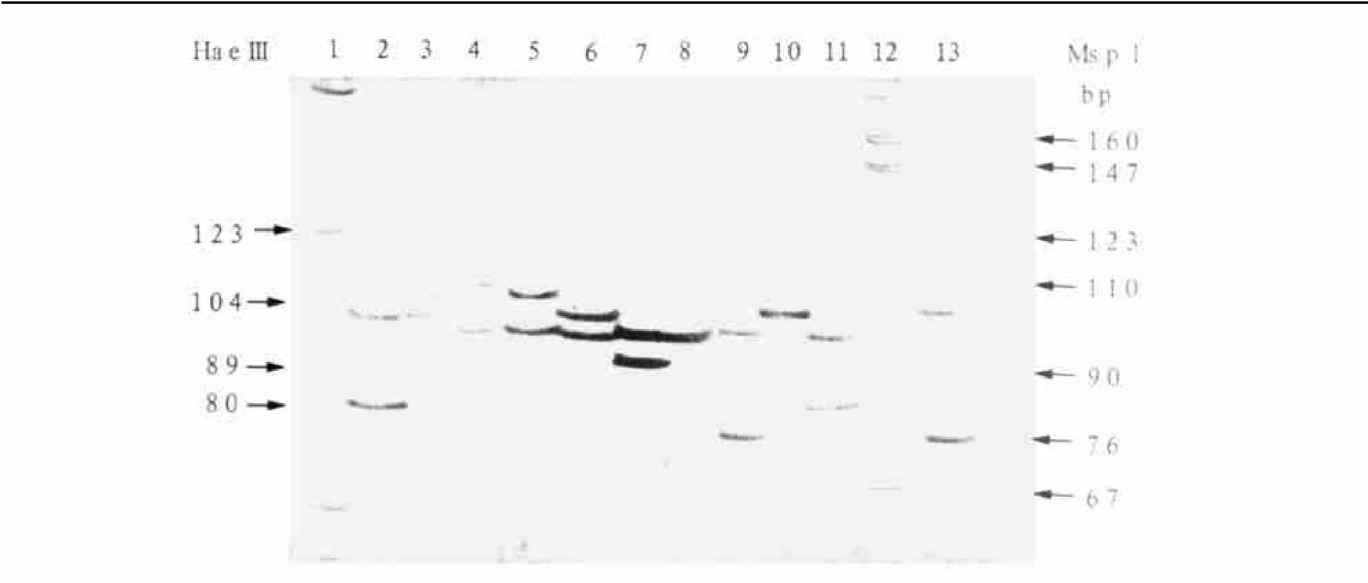


图 1. 载脂蛋白(a) 五核苷酸重复序列基因聚合酶链反应产物图谱。 1. PBR322/HaeIII 标志物, 2. 5/9, 3. 9/10, 4. 8/11, 5. 8/10, 6. 8/9, 7. 7/8, 8. 8/8, 9. 4/8, 10. 9/9, 11. 5/8, 12. PBR322/MspI 标志物, 13. 4/9

Figure 1. Patterns of apo(a) PNR gene PCR products. Lane 1: PBR322/HaeIII Marker; Lane 2~ 11, 13: correspond to 5/9, 9/10, 8/11, 8/10, 8/9, 7/8, 8/8, 4/8, 9/9, 5/8, 4/9; Lane12: PBR322/ MspI Marker

表 1. 脑梗死组和对照组载脂蛋白(a) 五核苷酸重复序列等位基因频率分布比较(%)

Table 1. Allele frequencies of the apolipoprotein(a) pentanucleotide repeat gene in ACI and control groups

Groups	Allele 4	Allele 5	Allele 7	Allele 8	Allele 9	Allele 10	Allele 11
Control	0.7	2.6	0.6	74.0	21.3	0.7	0.3
ACI	0	9.8 ^a	0	82.9	7.3 ^b	0	0

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, compared with control group.

表 2. 脑梗死组和对照组载脂蛋白(a) 五核苷酸重复序列基因型频率分布比较(%)

Table 2. Genotype frequencies of the apolipoprotein(a) pentanucleotide repeat gene in ACI and control groups

Groups	4/8	4/9	5/8	5/9	7/8	8/8	8/9	8/10	8/11	9/9	9/10
Control	0.7	0.7	3.9	1.3	1.3	55.7	29.4	0.7	0.7	5.2	0.7
ACI	0	0	17.1 ^a	2.4	0	68.3	12.2 ^a	0	0	0	0

a: $P < 0.01$, compared with control group.

3 讨 论

脑梗死的发生与年龄、吸烟、高血压和糖尿病等多种危险因素有关,属复杂病范畴(complex disease),常与冠心病、高血压、糖尿病在个体中集结存在,遗传因素在脑梗死发病中具有重要的作用,但目前关于脑梗死的遗传学特征知之甚少。国外大量研究表明,载脂蛋白(a) PNR 基因多态性与脂蛋白(a)水平升高和动脉硬化性疾病有关联,但对高加索人和黑人的研究只发现重复序列拷贝数为 6~ 11 的等位基因,未发现串联重复序列拷贝数为 5[(TTTTA)₅] 的等位基因出现^[5]。本文检测了 153 例健康汉族人,检出 7 种等位基因,11 种基因型,与国外学者所报导的高加索

人、黑人比较,发现这个位点的等位基因频率在不同的人种中有显著性差异^[6]。(TTTTA)₆ 等位基因多见于黑人,(TTTTA)₅ 等位基因仅见于中国汉族人和日本人,高加索人(TTTTA)₁₀等位基因频率(18.2%)明显高于中国人(0.7%)和黑人(4.0%),而又未见拷贝数为 4、5、6 低重复序列数等位基因的检出,这可能是由于人种的遗传漂变(genetic drift)、突变和迁移引起,与中国人和黑人比较高加索人更为古老有关。Amemiya 等^[7]对日本人载脂蛋白(a) PNR 基因型的研究表明,(TTTTA)_{8/8}纯合子基因型与高脂蛋白(a)水平和动脉粥样硬化的严重程度有关,未发现(TTTTA)₅ 等位基因在动脉粥样硬化患者中频率分布有何异常。本文结果表明,ACI 组重复序列数为

5/8 的基因型和 5 的等位基因相对频率显著高于对照组, 重复序列数为 8/9 的基因型和 9 的等位基因相对频率则显著低于对照组。关联分析显示, 重复序列数为 5 的等位基因与 ACI 发生密切正关联, 而重复序列数为 9 的等位基因则与 ACI 发生密切负关联, 提示这些等位基因与 ACI 的有关临床表现型有一定联系。

为了探索(TTTTA)₅ 等位基因是否发生基因变异, 影响载脂蛋白(a) 蛋白功能及载脂蛋白(a) 与脑梗死发病风险的关系, 我们克隆该等位基因进行序列分析, 期望能证实串联重复序列拷贝数为 5 的等位基因与脑梗死存在关联。DNA 测序是基因诊断的金标准, 但 PCR 产物本身较难以克隆, 其原因是 Taq DNA 聚合酶能在扩增产物的 3' 端加上一个非配对的碱基, 且 90% 以上为 dAMP^[8]。一般常用的克隆方法有粘性末端连接克隆法、平末端连接克隆法和 T-A 互补克隆法等。粘性末端连接法需事先在 5' 端设计酶切位点和保护碱基, 这样会增加费用, 费时费力。平末端连接法克隆效率低, 筛选也较费时。我们使用的 PGEM-T 载体, 利用 T-A 互补法克隆, 效率明显高于平末端连接法, 与经典粘性末端连接法克隆效率相近, 且可以直接与产物连接进行克隆, 简便易行。

测序结果表明, 中国人脑梗死患者的载脂蛋白(a) PNR 串联重复序列拷贝数为 5 的等位基因确实含有 5 个(TTTTA) 重复数目, 其余序列与国外所报道的高加索人一致, 并未发现有其它基因变异, 证明极有可能是载脂蛋白(a) PNR 的(TTTTA) 重复数目不同与脑梗死发生关联。

载脂蛋白(a) PNR(TTTTA)₅ 基因的检出为进一步揭示载脂蛋白(a) 基因在脑梗死发病中的作用提供了良好的遗传标记, 但载脂蛋白(a) PNR 本身并不

表达, 至于它是如何影响载脂蛋白(a) 的表达水平, 而导致脂蛋白(a) 水平的升高, 而与动脉粥样硬化性脑梗死发生关联, 这有待于进一步研究。

参考文献

- [1] Kariok, Kanai N, Saito K, et al. Ischemic stroke and the gene for angiotension converting enzyme in Japanese hypertensive [J]. *Circulation*, 1996, **93**: 1 630- 633
- [2] Hong SH, Min WK, Cheon SI, et al. Association between apolipoprotein(a) polymorphism and Lp(a) levels in Koreans [J]. *Mol Cells*, 1998, **8**(5): 544- 549
- [3] Volkova MV, Vasina VI, Fomicheva EV, et al. Comparative analysis of Apo(a) gene alleles: distribution of pentanucleotide repeats in position 1373 and C/T transition in position + 93 among patients with myocardial infarction and a control group in St. Petersburg, Russia [J]. *Biochem Mol Med*, 1997, **61**(2): 208- 213
- [4] Magaretti N, Acquati F, Magnaghi P, et al. Characterization by yeast artificial chromosome cloning of the linked apolipoprotein(a) and plasminogen genes and identification of the apolipoprotein(a) 5' flanking region [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89**: 11 584- 588
- [5] Trommsdorff M, Kochl S, Lingenhel A, et al. A pentanucleotide repeat polymorphism in the 5' control region of the Apolipoprotein(a) gene is associated with lipoprotein(a) plasma concentrations in caucasians [J]. *J Clin Invest*, 1995, **96**: 150- 157
- [6] 胡波, 周新, 邵华. 载脂蛋白(a) 五核苷酸重复序列基因型的检测 [J]. *中华检验医学杂志*, 2000, **23**(2): 83- 86
- [7] Amemiya H, Arinami T, Kikuchi S, et al. Apolipoprotein(a) size and pentanucleotide repeat polymorphisms are associated with the degree of atherosclerosis in coronary heart disease [J]. *Atherosclerosis*, 1996, **123**: 181- 191
- [8] White BA. *PCR Cloning Protocols [M]*. New Jersey: Humana Press, 1997; 61- 101

(此文 2000- 12- 08 收到, 2001- 05- 01 修回)

(此文编辑 朱雯霞)