

•临床研究•

[文章编号] 1007-3949(2001)-04-0306-04

脑梗死患者载脂蛋白 B 基因 3' 端小卫星区 多态性与血脂水平的关系

张 镛¹, 秦 震²

(1. 山东省立医院神经内科, 山东省济南市 250021; 2. 复旦大学华山医院神经内科, 上海市 200040)

[主题词] 载脂蛋白 B; 基因表达; 动脉粥样硬化; 血脂; 脑梗死

[摘要] 为探讨载脂蛋白 B 基因 3' 端小卫星区多态性与动脉粥样硬化性脑梗死的相关性。应用聚合酶链反应技术分析 84 名动脉粥样硬化性脑梗死患者及 107 名正常对照者。用特异寡核苷酸引物 5'-ATG GAA ACG GAG AAA TTG-3' 和 5'-CCT TCT CAC TTG GCA AAT AG-3' 对外周血白细胞 DNA 基因组 MSR 扩增; 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离等位基因。结果发现, 两组载脂蛋白 B 基因 3' 端等位基因的分布频率均以 MSR37 和 MSR39 最高, 其中动脉粥样硬化性脑梗死组分别为 0.48 和 0.19; 对照组分别为 0.50 和 0.17。且动脉粥样硬化性脑梗死组的大拷贝等位基因分布频率增高。④组内及组间分析发现, 大拷贝等位基因与血清胆固醇、载脂蛋白 B 和低密度脂蛋白胆固醇具有相关性。载脂蛋白 B 基因的第二转录终止信号的 3' 端存在具有长度多态性的随机重复核苷酸序列, 其核心序列的长度为 14~16 bp, 由富含 AT 结构组成。这些片段随机重复量的差异而非核苷酸序列的不同构成了不同的等位基因。这种串联重复单位具有高信息特征。3'-端小卫星区等位基因是已知载脂蛋白 B 基因小等位基因的有用标记。此结果提示, 大拷贝片段 MSR 等位基因与动脉粥样硬化性脑梗死有相关性, 位于载脂蛋白 B 基因 3'-端小卫星区等位基因多态性及病理过程中胶原暴露和内皮损伤共同参与动脉粥样硬化性脑梗死的发病机制。

[中图分类号] R743

[文献标识码] A

The Study of Minisatellite Region Polymorphisms at 3' End of Apolipoprotein B Gene in Atherosclerotic Cerebral Infarction

ZHANG Yong, and QIN Zen

(Department of Neurology, Shandong Provincial Hospital, Jinan 250021, China)

MeSH Apolipoproteins B; Gene Expression; Atherosclerosis; Lipids/blood; Cerebral Infarction

ABSTRACT **Aim** Atherosclerotic cerebral infarction (ACI) as a gradually progressive atherosclerotic disorder has been thought to be a heterogeneous and multifactorial of environment. There are in different epidemiologic state. The relationship of minisatellite region (MSR) polymorphisms at 3'-end of apolipoprotein B gene in Chinese ACI and healthy controls was observed.

Methods The 3' hypervariable minisatellite region polymorphism of apolipoprotein B gene was examined by polymerase chain reaction technique in 84 patients with ACI and 107 age-matched Chinese healthy controls. The targeted minisatellite region were amplified rapidly and accurately, and then identified oligonucleotide primer 5'-ATG GAA ACG GAG AAA TTG-3', 5'-CCT TCT CAC TTG GCA AAT AG-3' was used to the amplification of DNA genome which in peripheral leucocyte, number repeat unit (MSR) alleles detected by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE).

Results The frequency distribution of apolipoprotein B 3' minisatellite region alleles was in monomodal peaks at 37, 39 repeat units in both groups (from MSR29 to MSR53), and the big number repeat unit (MSR39 is 18.5%, and < MSR39 is 12.5%) was higher in ACI than in healthy controls (difference for 18.2% and 7.9%). The allele frequency of MSR45 and above all is 11.9% in patients with ACI, but 3.7% in controls ($\chi^2 = 5.62, P < 0.02$). ④The homozygote genotype of the big number repeat units alleles was related to the high level of apolipoprotein and LDL. The blood lipid parameters in different zygote genotype of the small number repeat unit (MSR, \leq MSR37) and big number repeat unit (MSRB, \geq MSR39) was compared (table 2), the homozygote big copied alleles (MSRB/MSRB) related to the increase of apo B and LDL. There were same tendency in ACI and controls.

Conclusions Our investigation results suggested the possibility that apolipoprotein B 3' gene minisatellite region alleles polymorphism increase the susceptibility to atherosclerosis by means other than by altering lipoprotein levels deserves further consideration.

[基金项目] 卫生部科研基金资助项目

[作者简介] 张镛,男,1962年出生,山东省宁阳县人,副主任,医学博士。秦震,男,1931年出生,主任医师,终身教授,博士研究生导师。

近年来,载脂蛋白 B 基因在动脉粥样硬化发生发展中的作用受到重视,动脉粥样硬化和动脉狭窄是动脉硬化性疾病的主要病理过程。脂代谢异常在其中起重要作用。载脂蛋白 B 作为低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 的主要蛋白成分,是 LDL 受体的专一配基,直接影响 LDL 清除,LDL 颗粒表面的载脂蛋白 B 对肝素和血管内皮的酸性蛋白多糖的高亲合力可致前者在动脉粥样硬化斑内沉积。不少作者对载脂蛋白 B 基因多态性进行研究,并试图发现作为评估这类疾病危险性的遗传学标志^[1-4]。我们应用聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 技术检测动脉粥样硬化性脑梗死 (atherosclerotic cerebral infarction, ACI) 患者的载脂蛋白 B 基因 3' 端小卫星区 (minisatellite region, MSR) 等位基因多态性与血脂参数的关系。

1 对象与方法

1.1 对象

动脉粥样硬化性脑梗死患者 84 例,符合全国第二届脑血管病学术会议第三次修订方案的诊断标准,经临床 CT (或 MR) 确诊,其中男 48 例,女 36 例,年龄 51~75 岁,平均 68.5 岁。另选健康无血缘关系的成人 107 例作为正常对照,无高血压、冠心病、脑血管病、过度肥胖、大量饮酒等病史。其中男 76 例,女 31 例,年龄 45~77 岁,平均 65.8 岁。全部研究对象均为汉族。

1.2 白细胞基因组 DNA 提取

取肝素或 Na₂EDTA 抗凝静脉全血,用 0.8% NH₄Cl 破坏红细胞,加白细胞核裂解液、蛋白酶 K 和 RNA 过夜,经饱和酚、氯仿和异戊醇抽提,乙醇沉淀等多步骤提取基因组 DNA。

1.3 载脂蛋白 B 基因分析

1.3.1 聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 扩增引物序列为 5' ATG GAA ACG GAG AAA TTA TG-3', 5'-CCCTCT CAC TTG GCA AAT AC-3'。50 μL PCR 总反应物体积中含有 200~600 ng 基因组 DNA 样本,引物各 0.2 μmol/L。脱氧三磷酸腺苷 (dATP)、脱氧三磷酸胞苷 (dCTP)、脱氧三磷酸鸟苷 (dGTP) 和脱氧三磷酸胸苷 (dTTP) 这四种底物各 0.2 mmol/L, Taq 酶 1.2 u (华美工程公司), 10% DMSO 2 μL, 10×PCR 缓冲液 3 μL, 其余以去离子水补充。混合后短暂离心,石蜡油 50 μL 覆盖。应用自动热循

环仪 (P-E cetus 公司生产, TC-1 型) 进行扩增,条件为预变性 97℃ 7 min, 80℃ 时加入 Taq 酶,反应循环为: 95℃ 60 s 变性 → 55℃ 60 s 退火 → 72℃ 120 s 延伸,循环 30 次。最后 72℃ 延伸 7 min, 反应结束后即以 4℃ 贮存。

1.3.2 聚丙烯酰胺凝胶电泳

应用 30% 丙烯酰胺、5×TBE、10% 过硫酸铵、TEMED 制成垂直电泳凝胶。PCR 产物 10 μL 和 6×凝胶加样缓冲液 2 μL 置入梳孔。用 0.5×TBE 作电泳缓冲液。恒压电泳分离不同 DNA 片段,显色与标准分子量 ΦX174/Hae Ⅲ 比较并摄片。

1.4 血脂和脂蛋白检测

常规方法检测静脉空腹血 TC、TG、HDL-C、LDL-C、载脂蛋白 A 和载脂蛋白 B 浓度。

2 结果

2.1 等位基因命名与分布特点

载脂蛋白 B MSR 扩增产物在聚丙烯酰胺凝胶上的潜泳速度与 MSR 片段碱基数或等位基因的大小呈反比关系。等位基因按照重复单位数命名,即每两个相邻的等位基因长度有两个 15 bp 的重复单位长的奇数为等位基因名^[1,2]。等位基因自 MSR29 至 MSR53, 两组等位基因分布频率均呈明显的单峰模式 (表 1, Table 1)。

2.2 小卫星区 ACI 与正常对照的载脂蛋白 B 基因 3'-端小卫星区等位基因分布

对表 1 的分析可知,在所检测的 84 例 ACI 样本, MSR39 及以上的等位基因分别为 18.5%、12.5%, 其中 ACI 组 MSR45 及以上等位基因占 11.9%, 而对照组占 3.7%, 统计学处理后差异显著 ($\chi^2 = 5.62, P < 0.02$)。

2.3 载脂蛋白 B 基因 3' MSR 等位基因与血清脂质、脂蛋白及载脂蛋白的关系

将 ACI 和对照组的 MSR37 及以下小拷贝等位基因 (small number repeat unit, MSRS) 与 MSR39 以上大拷贝等位基因 (big number repeat unit, MSRB) 的合子基因型血脂参数比较 (表 2, Table 2) 发现, 纯合子型大拷贝等位基因 (MSRB/MSRB) 组的血清载脂蛋白 B 和 LDL-C 增高有关, 尽管某些变化未达到有显著意义的统计学变化, 病人组与正常对照组的不同基因型与血脂参数呈现相同的变化趋势。

表 1. 动脉粥样硬化性脑梗死组 and 对照组小卫星区等位基因频率

Table 1. The frequency distribution of apo B 3'-minisatellite region alleles in ACI patients and controls

Genotype		Alleles sum	ACI group			Control group		
			Alleles	Freguency(%)	Cumulated ratio(%)	Alleles	Freguency(%)	Cumulated ratio(%)
MSR	29	3	2	1.2	1.2	1	0.5	0.5
MSR	31	10	5	2.9	4.1	5	0.5	2.8
MSR	33	21	20	4.8	8.9	13	6.1	8.9
MSR	35	50	20	11.9	20.8	30	14	22.9
MSR	37	190	81	48.2	69.0	109	50.9	73.8
MSR	39	70	31	19.0	87.5	39	17.3	92.1
MSR	41	9	0	0	87.5	9	4.2	96.3
MSR	43	1	1	0.5	88.0	0	0	96.3
MSR	45	7	5	2.9	91.0	2	0.9	97.2
MSR	47	10	9	5.3	96.4	1	0.5	97.7
MSR	49	8	4	2.3	98.8	4	1.9	99.5
MSR	51	1	0	0	98.8	1	0.5	100
MSR	53	2	2	1.1	100	0	0	100

表 2. 载脂蛋白 B 基因 3' MSR 不同基因型的血脂参数

Table 2. The blood lipid parameters in different genotypes at 3' MSR end of apolipoprotein B gene ($\bar{x} \pm s$)

Index	ACI group	Control group
BMI (kg/m ²)	25.4 ± 2.5	24.6 ± 3.1
TC (mmol/L)	4.73 ± 0.97	4.34 ± 0.74
TG (mmol/L)	1.49 ± 0.67	1.34 ± 0.80
HDL-C (mmol/L)	1.40 ± 0.36	1.65 ± 0.52
LDL-C (mmol/L)	2.98 ± 0.69	2.48 ± 0.55
ApoB (g/L)	0.92 ± 0.11	0.74 ± 0.14
TC		
MSR/MSR	4.70 ± 0.98 (n = 40)	4.20 ± 0.63 (n = 57)
MSR/MSRB	4.36 ± 0.72 (n = 44)	4.69 ± 0.75 (n = 36)
MSRB/MSRB	5.02 ± 1.25 (n = 6)	5.07 ± 1.02 (n = 8)
TG		
MSR/MSR	1.39 ± 0.75	1.31 ± 0.79
MSR/MSRB	1.47 ± 0.78	1.36 ± 0.82
MSRB/MSRB	2.04 ± 0.94	1.97 ± 1.03
HDL-C		
MSR/MSR	1.46 ± 0.52	1.66 ± 0.32
MSR/MSRB	1.39 ± 0.69	1.63 ± 0.47
MSRB/MSRB	1.17 ± 0.71	1.29 ± 0.64
LDL-C		
MSR/MSR	2.77 ± 0.61	2.34 ± 0.43
MSR/MSRB	2.92 ± 0.66	2.45 ± 0.63
MSRB/MSRB	4.26 ± 0.83 F = 3.12	4.18 ± 0.84
Apo B		
MSR/MSR	0.89 ± 0.10	0.72 ± 0.14
MSR/MSRB	0.94 ± 0.12	0.74 ± 0.17
MSRB/MSRB	1.03 ± 0.18 F = 3.46	0.93 ± 0.21 F = 3.51

F-test, compare of the blood lipid parameters in different genotypes at 3' MSR end of apo B gene, $P < 0.05$

3 讨论

人类定位于不同染色体上的各种载脂蛋白基因,目前认为是由一种寡核苷酸重复结构组成的祖先载脂蛋白基因在自然选择力的不断作用下趋异形成的^[5]。某些载脂蛋白 B 基因多态性与脂代谢的相关性已有较多报道^[4,6-8],其中对载脂蛋白 B 基因 RFLP 的研究较多。本研究结果显示,载脂蛋白 B 基因 3' 端高度变区不同拷贝等位基因与 ACI 可能存在某种联系,即在脑梗死患者 MSRB 等位基因比例增高。据研究认为,载脂蛋白 B3' 端小卫星区中富含 AT 的重复序列也见之于人类胶原 Ⅲ 型基因的 3' 端,而动脉内皮损伤的内膜下胶原暴露是动脉粥样硬化始发和关键性的病理过程。载脂蛋白 B3' 端小卫星区 MSRB 多态性与卒中的相关性可能是一种单独或协同机制作用,尽管致 ACI 环境负荷对其基因的表现型可影响甚至改变后者,突变所产生的表型累加的程度及其与环境因素协同对动脉粥样硬化及 ACI 产生的作用尚待深化认识。

载脂蛋白 B 基因 3' 端 MSR 由中间的核心区和侧翼区组成^[3,9]。前者以含有多个“重复单位”的短序列为特征,这些碱基对数目几乎不变,而串联在一起的重复单位数目是随机改变的。由于每个非 MSR 位点的 DAN 限制片段多态性(RFLP)仅能检测到一个或几个等位基因,可以推论 MSR 位点的侧翼区变数目也只有几个。故而人群中特定 MSR 位点等位基因差异(MSR 多态)主要是不同数目的串联重复单位差异使然。MSR 与 RFLP 的不同在于其等位基因较多,人群中杂合子比例在半数以上,最高可达 90%,呈经典孟德尔遗传方式,可作为良好的遗传学标记系统^[10]。而 RFLP 位点杂合程度较

低,当等位基因频率为 0.5 时,人群中的杂合子比例一般不超过 50%,故 MSR 较 RFLP 更具有价值。

载脂蛋白 B 基因的 3' 端存在的长度多态性重复核苷酸序列(即小卫星区,MSR)随机重复量的差异构成了不同的等位基因,其所具有的高信息特征是已知载脂蛋白 B 基因小等位基因的有用标记,利用载脂蛋白 B 3' 端小卫星区多态的高信息特征,已有不少不同种族等位基因研究的报道^[1,3]。本研究显示 MSRB 与血脂异常有关,这提示大片段 MSR 等位基因与 ACI 有相关性,本研究结果支持不同拷贝数目的基因多态性对血脂水平代谢的影响。

参考文献

- [1] Wu JH, Destro-Bisol, Silvano Presciuttini, et al. Apo B 3' hypervariable repeat genotype: association with plasma lipid concentration, coronary artery disease and other restriction fragment polymorphisms [J]. *Clin Chem*, 1996, **42** (6): 927-932
- [2] Deka R, Chakraborty R, DeCruz S, et al. Characteristics of polymorphism at a VNTR locus 3' to apolipoprotein B gene in five human populations [J]. *Am J Hum Genet*, 1992, **51**: 325
- [3] Renges H H, Peacock R, Duning AM, et al. Genetic relationships between the 3'-VNTR and dialetic apolipoprotein B gene polymorphisms. haplotype analysis in individuals of European and South Asian origin [J]. *Ann Hum Genet*, 1992, **56**: 11
- [4] 闫卫利,董晖,曲荣美. TG、Apo B、HDL-C 预示 NIDDM 发生脑梗死的可能性探讨 [J]. *中国慢性病预防与控制*, 1999, **7** (3): 113-115
- [5] Buresi C, Sherry ST, Rogers AR, et al. Polymorphism wVNTR locus 3 to the apolipoprotein B gene in a Tunisian population: difference from other ethnic groups [J]. *Genet Epidemiol*, 1998, **12** (4): 381-389
- [6] Boerwinkle E, Lee SS, Rutler R, et al. Rapid typing of apolipoprotein B DNA polymorphisms by DNA amplification [J]. *Atherosclerosis*, 1989, **81**: 225
- [7] Ye P, Chen BS, Wang SW. Polymorphism of apo B in relation to coronary heart disease in Chinese Han nationalities [J]. *Clin Med J Engl*, 1994, **107**: 30
- [8] Friedle W, Ludwig EH, Paulweber B, et al. Hypervariability in a minisatellite 3' end of the apolipoprotein B gene in patients with coronary heart disease compared with normal controls [J]. *J Lipid*, 1990, **31**: 659
- [9] Hison JE, Powers PK, McMahon CA. The human apolipoprotein B 3' hypervariable region detection of tight new alleles and comparisons of allele frequencies in blacks and whites [J]. *Hum Genet*, 1993, **91**: 475
- [10] John SW, Fourny RM. Identification of complex DNA polymorphisms based variable number of tandem repeats (VNTR) and restriction site polymorphism [J]. *Hum Genet*, 1990, **84**: 223

(此文 2000-08-21 收到, 2001-04-19 修回)

(此文编辑 胡必利)

• 书讯 •

新书《循证医学: 临床证据的产生、评价与利用》征订启事

由《实用医学杂志》编辑部主任常务副主编李强主编、中国科学院科学出版社出版的《循证医学: 临床证据的产生、评价与利用》已于 2001 年 7 月出版, 约 52 万字, 350 页, 16 开, 每本邮购价 45 元。共分以下 14 章: 第 1 章 循证医学, 第 2 章 如何正确开展临床诊断性研究, 第 3 章 如何正确开展临床疗效研究, 第 4 章 如何正确开展临床病因学研究, 第 5 章 如何正确开展疾病的预后研究, 第 6 章 临床经济分析, 第 7 章 临床科研数据的统计分析, 第 8 章 临床医学科研选题, 第 9 章 临床科研成果的申报, 第 10 章 医学文献查找的方法, 第 11 章 如何利用网络获得最新医学文献, 第 12 章 如何撰写医学论文, 第 13 章 如何选择医学期刊投稿, 第 14 章 医学专业临床医生投稿指南。有意购买者请通过邮局汇款至: 广州市惠福西路进步里 2 号之 4《实用医学杂志》编辑部李强收, 邮编: 510180, 联系电话: 020-81872080。