

[文章编号] 1007-3949(2001)-04-0337-03

·流行病学研究·

## 121 例新生儿载脂蛋白 E 基因型的分布

刘欣, 曹海燕, 陈涛, 钟媛, 解用虹

(天津医科大学生物化学教研室, 天津 300070)

[关键词] 新生儿; 载脂蛋白 E; 等位基因; 多态性, 限制片长

[摘要] 为了建立能较好反映国人载脂蛋白 E 等位基因分布的基本数据, 利用聚合酶链反应-限制片长多态性技术测定 121 例天津市新生儿载脂蛋白 E 基因型并计算其等位基因频率。结果发现, 新生儿载脂蛋白 E 的六种基因型分布分别为: E3/3(74.38%)、E2/3(13.22%)、E3/4(8.27%)、E2/4(2.48%)、E2/2(1.65%) 及 E4/4(0), 推算等位基因 E3、E2 和 E4 频率分别为 85.13%、9.50% 和 5.37%。121 例新生儿的数据与多数以前所报成年人和老年人的结果十分相近, 提示虽然携带不同载脂蛋白 E 等位基因可能影响机体的血脂水平及冠心病等的发病率, 但尚未对人群的预期寿命产生明显的影响。

[中图分类号] R181.36

[文献标识码] A

### Distribution of Apolipoprotein E Genotypes in 121 Chinese Newborn

LIU Xin, CAO Hai-Yan, CHEN Tao, ZHONG Yuan, and XIE Yong-Hong

(Department of Biochemistry, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

MeSH Newborn; Apolipoproteins E; Alleles; Polymorphism, Restriction Fragment Length

**ABSTRACT** Aim To determine the distribution of apolipoprotein E genotype that can veritably reflect the actual apolipoprotein E genotypic frequency of Chinese population. **Methods** The blood samples were randomly collected from 121 newborn's umbilical cords. The apolipoprotein E genotypes were examined by polymerase chain reaction (PCR) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) techniques. **Results** The allelic frequencies of apolipoprotein E are E2 9.50%, E3 85.13% and E4 5.37% respectively. **Conclusions** Although there were some certain differences between the results and those of other research groups', the Apo E allelic frequencies were quite similar to that of the aged and the adults reported previously by the major laboratories in China. Based on the unremarkable difference of the allelic and genotypic frequencies of Apo E among different generations, although the Apo E allele may affect the lipid level and the morbidity of coronary heart disease, it has no obvious impact on the life expectancy.

载脂蛋白 E (apolipoprotein E, Apo E) 是人血浆中最主要的载脂蛋白成份之一, 由位于第 19 染色体的基因编码, 299 个氨基酸残基组成, 分子质量为 34145 Da。载脂蛋白 E 有明显的多态性, 不同异构体的受体结合生理活性差异明显。载脂蛋白 E 广泛地参与机体的代谢, 它不仅可结合和运转脂质, 同时也是多种相关受体的配基。此外, 它还参与机体的免疫调节、细胞的增殖与分化以及损伤神经的修复等多种生理病理过程。国内外的研究显示, 载脂蛋白 E 的基因型是影响机体血脂水平、冠心病 (coro-

nary heart disease, CHD) 易患危险的主要因素之一。近几年有关载脂蛋白 E 基因型与早老性痴呆和帕金森病密切相关的报告再一次使载脂蛋白 E 基因型的研究成为热点<sup>[1~5]</sup>。基于早期防治的原则和基因诊断治疗的趋势, 在研究 Apo E 基因型与各种疾病内在联系的同时, 测定青少年甚至婴幼儿的载脂蛋白 E 基因型已是势在必行的工作, 它将为科学客观地评估我国人群与载脂蛋白 E 相关的遗传易患疾病的发病率提供了基础数据, 同时为相关疾病筛选方法的选择和防止策略的制定具有一定的参考价值。鉴于新生儿的测定结果较少受主客观因素的干扰, 因此有可能作为与载脂蛋白 E 相关疾病统计学研究的公用对照组。

[基金项目] 天津市科学基金(973608611)资助

[作者简介] 刘欣, 女, 1969 年 12 月出生, 天津人, 硕士, 助理研究员, 生物化学与分子生物学专业。曹海燕, 女, 1972 年 4 月出生, 硕士研究生, 讲师, 研究方向为脂代谢。解用虹, 男, 1943 年 3 月出生, 硕士研究生, 教授, 硕士研究生导师, 国务院特聘专家, 研究方向为分子脂代谢。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

121例汉族新生儿脐带血从天津市河北产院随机收集。脐带经处理无污物,脐带血用EDTA抗凝(0.5 mol/L)。Taq DNA聚合酶、DNA片段长度标准物(pBR322/Msp I marker)为华美生物公司产品,引物由上海生物工程有限公司合成,dNTP、Hha I酶为Promega产品,其余试剂均为分析纯。

## 1.2 基因型分析

载脂蛋白E的基因型测定依据改进的Hixson方法<sup>[6]</sup>进行。首先用TKM法<sup>[7]</sup>提取人基因组DNA,再利用设计的上游引物5'-TAAGCITGGCAGGCTGTCCAAGGA-3'和下游引物5'-ACA-GAATTCGCCCGGCCTGTACAC-3'特异性扩增载脂蛋白E基因中含有多态性位点的DNA片段,片段长度为244 bp。反应体系25 μL,首先在95°C预变

性10 min,其后按95°C变性→62°C退火→72°C延伸各1 min,循环30次,最后72°C延伸7 min。扩增产物与Hha I限制性内切酶5 u(2 μL)于37°C保温5~6 h。酶切产物进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,电泳凝胶用银染方法显色。依据染色凝胶图谱中DNA片段91 bp、81 bp、72 bp和48 bp的有无和组合,确定载脂蛋白E基因型。

## 2 结果

### 2.1 载脂蛋白E基因型

通过聚合酶链反应-限制片长多态性方法检测121例新生儿脐带血载脂蛋白E基因型,共得到5种不同基因型,未检出E4/4基因型(图1, Figure 1)。

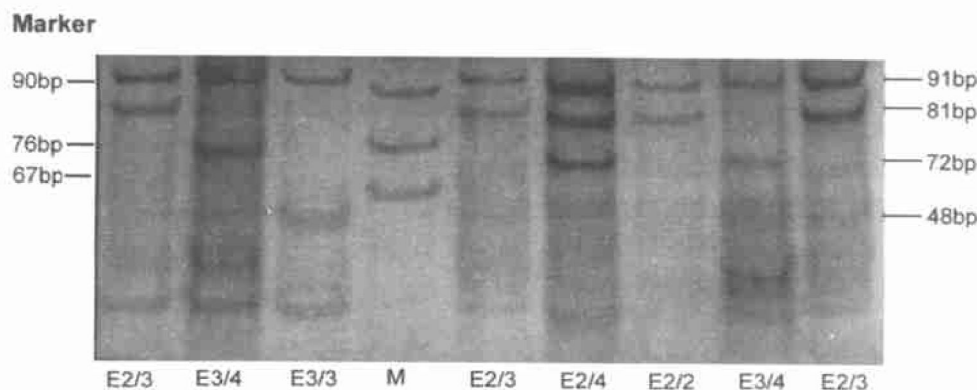


图1. 载脂蛋白E基因型的测定

Figure 1. Determination of apolipoprotein E genotypes by PCR-RFLP. Left: PBR 322/Msp I Marker; Right: Sample fragment length (bp).

### 2.2 载脂蛋白E基因型分布及等位基因频率

由表1(Table 1)可知,新生儿载脂蛋白E基因型的测定结果与国内大多数成人测定结果<sup>[8~10]</sup>趋势相同。即E3/3频率最高,E2/3和E3/4次之,E2/2、E2/4和E4/4最低。表现在等位基因上,ε3最高,ε2和ε4较低。但与国内的一些测定结果相比也存在一些差异,如本组ε4等位基因频率仅为5.37%,远低于张晓琴等<sup>[11]</sup>的10.00%和顾牛范等<sup>[12]</sup>的12.90%。而ε2等位基因频率为9.50%,明显高于张晓琴等<sup>[11]</sup>的5.00%和顾牛范等<sup>[12]</sup>的4.00%。

## 3 讨论

我们利用聚合酶链反应-限制片长多态性方法测定了121例中国汉族新生儿载脂蛋白E的基因型分布。比较疾病组与对照组载脂蛋白E等位基因分布的差异是研究载脂蛋白E与相关疾病内在联

表1. 121例新生儿载脂蛋白E基因型和等位基因频率

Table 1. The genotypic and allelic frequencies of Apo E in 121 Chinese newborn

Index	n	%
Genotypes		
E2/2	2	1.65
E3/3	90	74.38
E4/4	0	0
E2/3	16	13.22
E2/4	3	2.48
E3/4	10	8.27
Alleles		
ε2	12	9.50
ε3	103	85.13
ε4	6	5.37

系的常用手段之一。我们注意到多数对照组载脂蛋白 E 基因型的分布结果相近,但也有些对照组间的结果存在相当的差别。国内的一些测定结果相比也显示了相当的差别<sup>[4~6,8~12]</sup>。以  $\epsilon 4$  等位基因为例,文献报告其是高胆固醇血症、冠心病和早老性痴呆的遗传易患因子,对照组低的为 5.66%<sup>[6]</sup>,高的达 12.90%<sup>[12]</sup>,相差悬殊。产生这些差别的原因无疑是多方面的,其中对照组所选对象和样本大小可能是重要原因之一。对照组入选条件的限定是必要的但可能使“样本”偏离“总体”,由于每个研究课题受客观条件限制导致的对照组样本量偏小,有可能使其结果不能真实地反应“总体”的等位基因频率。

由于载脂蛋白 E 生理功能的广泛和多样,使其与多种疾病的发生机制密切相关,在研究一个疾病与载脂蛋白 E 基因型关系时不仅要测定疾病组载脂蛋白 E 基因型分布,同时也要测定所选的相应对照组的基因型分布,这很可能是一种人力、物力、财力的浪费。测定相对较大数量新生儿载脂蛋白 E 的基因型分布可能是建立“总体”基因型分布的可取途径。它受人为限定条件的影响较少,其结果能较好地代表国人至少某一地区人群“总体”载脂蛋白 E 的基因型分布。

早年的载脂蛋白 E 基因型分布多是根据蛋白表型的分布推测的。蛋白表型测定不仅需要超速离心机等大型设备,而且需要较多的血样。借助分子生物学的迅猛发展和技术进步我们直接测定载脂蛋白 E 的基因型。该方法不仅简便快速,特别是用血量少,使较大范围内测定婴幼儿甚至新生儿载脂蛋白 E 的基因型成为可能。而这又为建立较可靠的国人载脂蛋白 E 基因型分布资料提供了基础和条件。

通过对新生儿、成年人和老年人载脂蛋白 E 等位基因分布结果的比较,使我们能从纵的方向探讨载脂蛋白 E 等位基因对人们健康的影响。虽然 Davignon 等<sup>[13]</sup>曾报告 236 名 80 岁以上加拿大长寿老人与 102 名对照组相比有较低的  $\epsilon 4$  等位基因频率(0.087/0.152,  $P < 0.025$ ),表明载脂蛋白 E 等位

基因可能影响人们的预期寿命。但国人的资料显示不同年龄段载脂蛋白 E 等位基因分布十分接近,提示虽然它们可能影响机体的血脂水平及冠心病等的发病率,但在 80 岁以下人群尚未对人的预期寿命产生明显的影响。进一步的深入探讨尚需范围更广和数目更多人群资料的分析。

#### 参考文献

- 1 Utemann G. Apolipoprotein E polymorphism in health and disease [J]. *Am Heart J*, 1987, **113**: 433-440
- 2 解用虹, 郭善一, 吴茹莲, 等. 高胆固醇血症的遗传易患因子 - $\epsilon 4$  [J]. *中华医学杂志*, 1989, **69**: 585-587
- 3 Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, et al. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families [J]. *Science*, 1993, **261**: 921-923
- 4 Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, et al. Apolipoprotein E: High-avidity binding to  $\beta$ -amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90**: 1977
- 5 黎锦如, 潘勇辉, 卢锡林, 等. 帕金森病和载脂蛋白 E 基因多态性的相关研究 [J]. *中国神经精神疾病杂志*, 1998, **24**: 275-276
- 6 郭刚, 郭善一, 杨洁, 等. 106 例天津老年人载脂蛋白 E 基因型的测定 [J]. *天津医药*, 1999, **27**: 390-392
- 7 Lahiri DK, Schnabel B. DNA isolation by a rapid method from human blood samples [J]. *Biochemical Genetics*, 1993, **31**: 321-328
- 8 Wang KQ, He JL, Xie YH. Studies on human apolipoprotein E genetic isoform and their phenotypes among the Chinese population [J]. *Proc CAMS PUMC*, 1987, **2**: 133-139
- 9 曾武威, 吕新跃, 陈保生. 载脂蛋白 E 基因多态性与高脂血症的相关性研究 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 1996, **4**: 185-189
- 10 鄢盛恺, 周新, 哈黛文. 聚合酶链反应限制性片段长度多态性检测载脂蛋白 E 基因型 [J]. *中华医学检验杂志*, 1997, **20**: 28-31
- 11 张晓琴, 肖劲松, 黄朝云. 载脂蛋白 E 基因多态性与血管性痴呆关系的研究 [J]. *中华医学遗传学杂志*, 1997, **14**: 31-34
- 12 顾牛范, 冯国鄞, 江三多, 等. 中国汉族人群 Apo E 等位基因频率的初步研究 [J]. *中华医学遗传学杂志*, 1996, **13**: 8-10
- 13 Davignon L, Gregg RE, Sing CF. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis [J]. *Arteriosclerosis*, 1986, **8**: 1-21

(此文 2001-04-05 收到, 2001-09-17 修回)

(此文编辑 文玉珊)