

中国汉、蒙古、回、东乡、维吾尔、傣族六个民族居民 胆固醇酯转运蛋白 D442G 和 I14A 基因突变调查

强宏娟¹, 庄一义¹, 汪俊军¹, 黄承荣¹, 徐丕模², 路西春³, 赵明学⁴

(1. 南京军区南京总医院全军医学检验中心生物化学室, 南京 210002; 2. 云南省西双版纳州人民医院检验科;

3. 新疆乌鲁木齐军区总医院检验科; 4. 甘肃省临夏市第七医院检验科)

[主题词] 胆固醇酯; 突变; 脂类; 基因; 环境

[摘要] 研究中国不同民族健康人群胆固醇酯转运蛋白两种主要基因突变 D442G 和 I14A 的发生率、血清胆固醇酯转运蛋白水平及其与其他血脂的关系, 应用聚合酶链反应—限制片段长度多态性分析方法检测胆固醇酯转运蛋白基因两种主要突变的发生率, 采用 ELISA 法测定蒙古族、维族、回族、东乡族、傣族和汉族 6 个民族共 600 例健康成人血清胆固醇酯转运蛋白水平, 同时测定血清总胆固醇、甘油三酯、高密度脂蛋白胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇、载脂蛋白 AI 和载脂蛋白 B 水平。结果发现, 蒙古族、回族、东乡族、傣族和维吾尔族居民血清胆固醇酯转运蛋白水平与汉族居民无显著差异, 胆固醇酯转运蛋白基因 D442G 和 I14A 两种主要突变频率也无明显差异; 与汉族居民相比, 其它 5 个民族居民总胆固醇水平均显著降低 ($P < 0.05$); 回族居民甘油三酯水平显著高于汉族居民 ($P < 0.05$); 蒙古族、回族和东乡族居民高密度脂蛋白胆固醇水平明显低于汉族居民 ($P < 0.05$); 维吾尔族、回族和东乡族居民低密度脂蛋白胆固醇水平显著低于汉族居民 ($P < 0.05$)。结果提示, 胆固醇酯转运蛋白基因两种主要突变的频率在不同民族之间无明显差异, 6 个民族居民中地理和膳食等环境因素对胆固醇酯转运蛋白水平影响较小。

[中图分类号] Q754

[文献标识码] A

Frequency of Exon 15 Missense Mutation (D442G) and Intron 14 Splice Donor Site Mutation (I14A) in Cholesterol Ester Transfer Protein Gene in Chinese Han, Menggu, Hui, Weiwuer, Dai and Dongxiang

QIANG Hong Juan, ZHUANG Yi Yi, WANG Jun Jun, HUANG Cheng Rong, XU Pei Mo, LU Xi Chun, and ZHAO Ming Xue
(Biochemistry Laboratory, Nanjing General Hospital of PLA, Nanjing 210002, China)

MeSH Cholesterol Esters; Mutation; Lipids; Gene; Environment

ABSTRACT **Aim** To explore the relationship among serum cholesterol ester transfer protein (CETP) and serum lipid in 600 healthy Chinese subjects which belonged to six different Chinese peoples including Chinese Han, Menggu, Hui, Weiwuer, Dai and Dongxiang, the levels of CETP and the frequency of exon 15 missense mutation (D442G) and intron 14 splice defect (I14A) in CETP gene were examined. **Methods** A simple and practical method for detecting two prevalent mutations in CETP gene using PCR-RFLP was developed to scan 600 healthy Chinese subjects. Using ELISA established by our own laboratory to detect the level of serum CETP, and at same time serum lipids and apolipoprotein determination was carried out. **Results** Frequency of CETP gene D442G and I14A mutation was similar among Chinese Han, Menggu, Hui, Weiwuer, Dai and Dongxiang. There was no significant difference in the level of CETP among six different Chinese peoples. Serum total cholesterol (TC) level of Chinese Han was higher than other five Chinese peoples in the study ($P < 0.05$). Serum triglyceride (TG) level of Chinese Hui was significantly higher than that of Chinese Han ($P < 0.05$). Serum high density lipoprotein cholesterol (HDL) level in Chinese Menggu, Hui and Dongxiang was lower than that in Chinese Han ($P < 0.05$). Serum low density lipoprotein cholesterol (LDL) level in Chinese Weiwuer, Hui and Dongxiang was lower than that in Chinese Han ($P < 0.05$). **Conclusion** There was no significant difference in frequency of CETP gene D442G and I14A mutation in six different Chinese peoples and environment factors including zone and meal had little influence on CETP level in six different Chinese peoples.

[基金项目] 中国人民解放军总后勤部九五科研基金(96D025)资助。

[作者简介] 强宏娟, 女, 1972 年出生, 1994 年毕业于南京大学生物化学专业, 技师。庄一义, 男, 1940 年出生, 上海人, 教授。汪俊军, 男, 1966 年出生, 安徽省怀宁人, 主管技师。均从事脂蛋白与动脉粥样硬化发病的关系研究。

胆固醇酯转运蛋白(cholesterol ester transfer protein, CETP)作为载体促进高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)核心的胆固醇酯(cholesterol ester, CE)转运至极低密度脂蛋白(very low density lipoprotein, vLDL)、低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL),同时与之发生甘油三酯(triglyceride, TG)的交换^[1],是决定血浆高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDLC)水平的最重要因素之一,关系到各种脂蛋白颗粒大小、脂质组成。CETP 基因突变引起血浆 CETP 水平下降和其他血脂的改变,从而影响动脉硬化性心脑血管疾病的发生和发展。中国汉族居民中存在 CETP 基因突变^[2],而关于中国其他民族居民 CETP 的研究尚未见报道,由此本文调查研究了汉族、蒙古族、维吾尔族和傣族等 6 个民族居民的 CETP 基因 D442G 和 I14A 突变频率、CETP 水平和血脂状况。

1 对象与方法

1.1 研究对象

选择 6 个民族居民,蒙古族和维吾尔族居民选自乌鲁木齐市,东乡族和回族居民选自甘肃省临夏市,傣族居民选自云南省西双版纳州,汉族居民选自南京市,均为在当地居住 5 年以上的 15 岁以上健康居民,体检和实验室检查排除高血压、糖尿病等与血脂代谢有关的疾病,其中蒙古族居民 102 人,男性 67 人,女性 35 人;维吾尔族居民 85 人,男性 44 人,女性 41 人;回族居民 110 人,男性 61 人,女性 49 人;东乡族居民 102 人,男性 63 人,女性 39 人;傣族居民 101 人,男性 55 人,女性 46 人;汉族居民 100 人,男性 52 人,女性 48 人。禁食 12 h 以上采血。抽提 DNA 的全血用 EDTA-K₂ 抗凝。

1.2 胆固醇酯转运蛋白基因突变的检测

1.2.1 模板 DNA 提取 碘化钠法,参照 Loparev 等^[3]法。

1.2.2 引物设计 检测 CETP 基因 14 内含子 I14A 突变的引物设计参考文献[4],序列 P1: 5'-AG-CAGCTCCGAGTCCATCCAG-3', P2: 5'-TCCCCTC-CAGCCCAGACATA-3'。下游引物 P2 设计的时候故意插入一个误配碱基,即下游引物从 3' 端第 3 个碱基设计为 A,而模板为 G,当 CETP 基因 14 内含子+1 位碱基由 G 突变为 A 时,就形成了 NdeI 酶切位点,聚合酶链反应(polymer chain reaction, PCR)产物长度为 94 bp;检测 15 外显子 D442G 突变的引物设计参考文献[6],序列 P3: 5'-AGCAAGCGTGAGC-

CTCTCCG-3', P4: 5'-AGGAGGGAGCCAAGCTGGTAGA-3',上游引物 P3 设计时将其 3' 端第 3 个碱基设计为 C,而模板为 T,当 CETP 基因第 1 506 位碱基由 A 突变为 G 时就形成了 MspI 酶切位点,PCR 产物长度为 179 bp。两对引物均由中科院上海细胞所合成。

1.2.3 聚合酶链反应扩增及其产物的限制性酶切

PCR 扩增条件为 95℃预变性 5 min 后,加入 Taq DNA 聚合酶,然后 94℃变性 1 min, 60℃退火 1 min, 74℃延伸 1 min,循环 35 次后置 74℃延伸 7 min (PE2400 热循环仪)。取扩增产物 17 μL, 10×酶切缓冲液 2 μL,相应的内切酶 10 u(MspI 为 Promega 产品, NdeI 为 MBI 产品), 37℃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(marker PBR322HaeIII)为参考,紫外灯下观察结果。

1.3 血清胆固醇酯转运蛋白测定

自制 CETP 单抗建立 ELISA 法测定 CETP,参考血清采用法国 Bocage 医院脂蛋白实验室 Dr. Lagrost 赠送 CETP 定值血清,经 ELISA 多次标定,见参考文献[7]。

1.4 血脂测定

总胆固醇(total cholesterol, TC)、TG 用日本第一化学药品株式会社试剂盒, HDLC 用 BM 公司试剂盒, Cfas 校准物。LDLC 用 Friedewald 公式计算。载脂蛋白 AI(apolipoprotein, apo AI)、载脂蛋白 B(apolipoprotein, apo B)免疫比浊试剂用上海明华公司试剂盒,载脂蛋白 AI、载脂蛋白 B 校准血清用本室 WHO-IFCC 国际参考材料靶值转移后的定值血清标定。测定仪器用日立 7600 生化自动分析仪。

1.5 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据处理采用 *t* 检验、 χ^2 检验,相关性分析用 Statistics 软件。CETP 为偏态分布,经对数转换后进行相关性分析。

2 结果

2.1 聚合酶链反应-限制片长多态性分析

根据酶切 PCR 产物后的 PAGE 图谱(图 1, Figure 1)判断。CETP 基因 14 内含子 I14A 突变:只有 94 bp 一条带者为野生型,有 74 bp 和 94 bp 两条带者为杂合子; CETP 基因 15 外显子 D442G 突变: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。

2.2 胆固醇酯转运蛋白基因突变频率的比较

从表 1(Table 1)可见,与汉族居民相比,蒙古族、

维吾尔族、回族、东乡族和傣族 5 个民族居民 CETP 基因 D442G 和 I14A 两种主要突变频率无明显差异 ($P > 0.05$)。

2.3 胆固醇酯转运蛋白及血脂水平比较

由表 2(Table 2) 可见, 蒙古族、维吾尔族、回族、东乡族和傣族 5 个民族居民 CETP 水平与汉族居民均无显著性差异($P > 0.05$); 与汉族居民相比, 其它 5 个民族居民 TC 水平均显著降低($P < 0.05$); 回族居民 TG 水平显著高于汉族居民($P < 0.05$); 蒙古族、回族和东乡族居民 HDLC 水平明显低于汉族居民($P < 0.05$)。

2.4 胆固醇酯转运蛋白水平与血脂的相关性

6 个民族共 600 例健康人血清 CETP 水平与 TC 和载脂蛋白 B 有很弱的相关性($r = 0.17$ 和 0.12 ; $P < 0.05$), 而与 TG、HDLC 和载脂蛋白 AI 无相关性($r = 0.041$ 、 -0.045 和 -0.035 , $P > 0.05$)。

表 1. 6 个民族居民胆固醇酯转运蛋白基因突变频率的比较

Table 1. Frequencies of two prevalent mutations in CETP gene in six Chinese peoples.

Index	Weiwuer (n = 85)	Menggu (n = 102)	Hui (n = 110)	Dongxiang (n = 102)	Dai (n = 101)	Han (n = 100)
D442G heterozygotes	4	4	5	5	5	4
D442G homozygotes	0	0	1	0	0	1
Frequency of D442G (%)	4.7	3.9	5.5	4.9	4.9	5.0
I14A heterozygotes	0	1	1	0	0	1
I14A homozygotes	0	0	0	0	0	0
Frequency of I14A (%)	0	0.98	0.9	0	0	1

表 2. 6 个民族居民胆固醇酯转运蛋白及血脂水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2. Comparison of CETP and sorum lipids level in six deferent Chinese peoples

Index	Weiwuer	Menggu	Hui	Dongxiang	Dai	Han
Number	85	102	110	102	101	100
Age	24.0 ± 10.4 ^a	31.7 ± 16.8	36.8 ± 11.1	37.0 ± 15.0	29.0 ± 12.0 ^a	35.0 ± 10.0
TC (mmol/L)	3.85 ± 0.73 ^a	4.00 ± 1.00 ^a	3.78 ± 1.00 ^a	3.60 ± 1.24 ^a	4.09 ± 0.96 ^a	4.81 ± 0.89
TG (mmol/L)	1.34 ± 0.96	1.51 ± 1.15	1.68 ± 0.56 ^a	1.38 ± 0.56	1.36 ± 0.94	1.44 ± 0.55
HDLC (mmol/L)	1.34 ± 0.28	1.04 ± 0.31 ^a	1.09 ± 0.29 ^a	1.08 ± 0.37 ^a	1.30 ± 0.33	1.35 ± 0.25
Apo AI (g/L)	1.18 ± 0.19 ^a	1.05 ± 0.28 ^a	1.25 ± 0.29 ^a	1.07 ± 0.40 ^a	1.29 ± 0.28	1.32 ± 0.22
Apo B (g/L)	0.67 ± 0.21 ^a	0.82 ± 0.30	0.88 ± 0.29	0.78 ± 0.38 ^a	0.82 ± 0.29	0.88 ± 0.23
CETP (mg/L)	1.79 ± 0.74	1.76 ± 1.06	1.90 ± 0.77	1.85 ± 0.73	1.94 ± 0.67	1.84 ± 1.55

a: $P < 0.05$, compared with Chinese Han

3 讨论

以西方人群为研究对象的大量研究资料显示, 基因变异对血脂水平的影响大于环境因素, 认为血

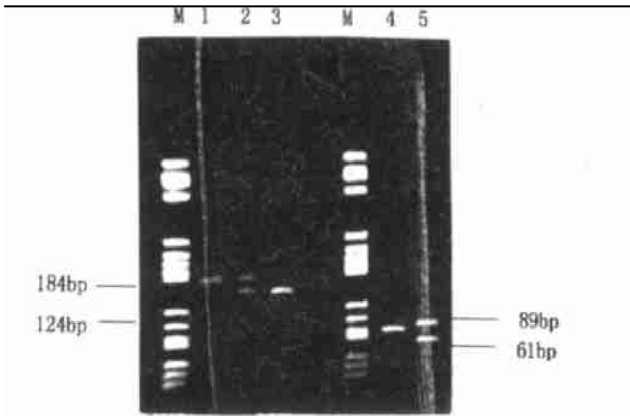


图 1. PCR 产物酶切后的 PAGE 图谱

Figure 1. Gel electrophoresis of PCR-amplified DNA after digestion. M: PBR322/Hae ⅢMakers; lane 1: D442G normal (179 bp); lane 2: D442G heterozygote (179 bp, 158 bp); lane 3: D442G homozygote (158 bp); lane 4: I14A normal (94 bp); lane 5: I14A heterozygote (94 bp, 74 bp)

脂紊乱和动脉粥样硬化(atherosclerosis, As) 属于多基因遗传病^[5]。CETP 基因突变主要有 15 外显子 D442G 突变和 14 内含子 I14A 突变两种类型, 日本

为这两种突变最频发的国家, 突变率分别为 6% 和 1%^[6]。CETP 基因缺陷可引起脂蛋白的显著变化, 最显著的特征是 CETP 基因突变者 HDLC 水平升高, 血清 CETP 浓度和活性降低。Hui 等^[9] 检测中国北京居民 379 人 D442G 的突变频率为 4.2%, 但基因突变者并无 HDLC 水平升高; Hirano 等^[4] 发现日本 Omagari 地区 I14A 极度频发, 104 505 人 CETP 缺陷频率高于日本其它地区 20 倍, I14A 突变者冠心病发生率显著高于非突变者。而我们以前的调查^[2] 发现心肌梗死和脑梗死患者 CETP 基因突变频率不高于健康人, 与大多数日本较大人群的调查结果不一致, 推测中国人 CETP 基因突变者的脂蛋白异常特征和对心脑血管疾病的影响与日本人有所差别。CETP 对 As 的影响可能随机体代谢状况不同而有不同, 若胆固醇逆向转运环节中其它关键成分, 如 LCAT、HDL 等功能均正常, 则 CETP 主要可能具有抗 As 作用。

我国汉族居民 CETP 基因 D442G 和 I14A 这两种基因突变的频率与日本人相近已有报道^[2], 从本研究结果可看到所选 6 个民族间两种突变频率并无明显差异, 而这 6 个民族居住地却相距甚远。由此认为不同民族不同地区的突变发生率须经大量的人群调查, 不能以偏概全。

已证实血脂数量表型的变化受环境和遗传两个方面的影响。环境因素主要包括膳食、吸烟、饮酒、性别、年龄、体重、体育锻炼、药物、高血压、糖尿病等, 其中膳食因素最为重要^[8]。长期吸烟、酗酒的人 CETP 基因表达增加, 血浆 CETP 含量升高; 运动和少量饮酒可使血浆 HDL 升高, CETP 下降; 胆固醇、高饱和脂酸及内源性胆固醇均可诱导肝脏及外周组织 CETP mRNA 的表达增加及血浆 CETP 含量增加, 皮质类固醇、脂多糖可使 CETP 表达减少, 妊娠期雌激素可诱导 CETP 表达增加^[10]。我们所选的 6 个民族居民生活和饮食习惯相差较大, 而 CETP 水平无明显差异, 提示膳食等环境因素对 CETP 水平影响较小。本研究中, 蒙古族、维吾尔族、回族、东乡族和傣族这 5 个民族居民血清 TC 水平均显著低于汉族居民 ($P < 0.05$); 回族居民 TG 显著高于汉族居民

($P < 0.05$), 而蒙古族、维吾尔族、东乡族和傣族居民与汉族居民无明显差异, 这些可能均与饮食习惯差别有关。

As 受环境和遗传两种因素的综合影响, 探讨 CETP 以及 CETP 基因缺陷与 As 的关系需要更多的临床和更深的基础研究。

参考文献

- [1] Tall AR. Metabolic and genetic control of HDL cholesterol levels [J]. *J Intern Med*, 1992, **231**: 551
- [2] 强宏娟, 庄一义, 陈光辉. 动脉粥样硬化患者 CETP 基因两种主要突变型的检测 [J]. *医学研究生学报*, 2000, **13**: 165-167
- [3] Loparev VN, Cantas MA, Monken CE, et al. An efficient and simple method of DNA abstraction from whole blood and cell line to identify infectious agents [J]. *J Virol Methods*, 1990, **34**: 105
- [4] Hirano K, Yamashita S, Funahashi T, et al. Frequency of intron 14 splicing defect of cholesterol ester transfer protein gene in the Japanese general population: relation between the mutation and hyperalphalipoproteinemia [J]. *Atherosclerosis*, 1993, **100**: 85
- [5] Kuusi T, Kesaniemi YA, Vuoristo M, et al. Inheritance of high density lipoprotein lipase and hepatic lipase activity [J]. *Atherosclerosis*, 1987, **4**: 421-425
- [6] Inazu A, Jiang XC, Haraki T, et al. Genetic cholesterol 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
- [7] 庄一义, 汪俊军, 李勇. 胆固醇酯转运蛋白的提纯和鉴定 [J]. *中华医学检验杂志*, 1999, **22**: 101-103
- [8] Connor WE, Connor SL. Dietary cholesterol benefits of nutritional changes [M]. In: *Diet and prevention of heart diseases and cancer*. Raven Press, NY, 1986, 133-147
- [9] Hui SP. Frequency and effect on plasma lipoprotein metabolism of a mutation in the cholesterol ester protein gene in the Chinese [J]. *Hokkaido Iqaku Zasshi*, 1997, **73**: 319-327
- [10] Masucci Magoulas L, Moulin P, Jiang XC, et al. Decreased cholesterol ester transfer protein (CETP) mRNA and protein and increased high density lipoprotein following lipopolysaccharide administration in human CETP transgenic mice [J]. *J Clin Invest*, 1995, **95**: 1 587-594

(此文 2001-04-11 收到, 2001-10-08 修回)

(此文编辑 文玉珊)