

低密度脂蛋白受体基因突变的研究进展

张春妮, 李克, 季晶

(南京军区南京总医院全军医学检验中心, 南京 210002)

[主题词] 脂蛋白, 低密度; 受体; 基因突变; 高胆固醇血症, 家族性

[摘要] 低密度脂蛋白受体基因突变是引发家族性高胆固醇血症的主要原因。近年的研究主要集中于快速发现新突变及对突变的大规模筛选上, 建立了多种新检测方法, 发现了许多新突变以及人种或地区常见突变类型, 为预防、诊断和治疗家族性高胆固醇血症提供了便利。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

低密度脂蛋白受体(low density lipoprotein receptor, LDLR)是一种细胞表面糖蛋白, 负责结合和降解循环系统中的低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL), 在胆固醇代谢过程中发挥极其重要的作用。低密度脂蛋白受体基因位于第19号染色体(p13.1~p13.3), 约45 kb, 含有18个外显子和17个内含子, 编码由839个氨基酸组成的成熟蛋白。低密度脂蛋白受体基因突变会削弱载脂蛋白B和载脂蛋白E从循环系统的清除, 引发家族性高胆固醇血症(familial hypercholesterolemia, FH)。本文将着重介绍近几年来低密度脂蛋白受体基因突变的研究进展。

1 低密度脂蛋白受体基因突变新的检测方法

最初使用的低密度脂蛋白受体基因突变的快速诊断方

法有Southern印迹法、电磁脉冲凝胶电泳法(pulse field gel electrophoresis)、原位荧光杂交法(fluorescence in situ hybridization)和逆转录-多聚酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)等, 但这些技术有一定的局限性^[1]。近几年新的检测方法层出不穷, 利用这些方法检测到了许多低密度脂蛋白受体基因新突变, 已被广泛应用于研究和临床。

1.1 单链构象多态性(single strand conformational polymorphism, SSCP)

单链构象多态性是一种DNA单链凝胶电泳技术。扩增产物变性后, 单链产物经中性聚丙烯酰胺电泳, 靶DNA中会因含碱基置换、碱基插入或缺失等改变, 造成迁移率变化而出现泳动变化。据报道单链构象多态性可以检测出低密度脂蛋白受体基因80%~90%的点突变, 此外单链构象多态性还可以检测出单链DNA中绝大多数序列的变化, 尤其是150~250核苷长度的片段^[2], 并可用于排除病变^[3]。Jensen等^[4]用单链构象多态性对家族性高胆固醇血症杂合子检测时, 发现了丹麦的5个最常见的低密度脂蛋白受体基因点突变, 分别为W23X、W66G、W556S、313+1G→A和1846-1G→A, 而在

[作者简介] 张春妮, 女, 1963年出生, 山东人, 副主任技师, 硕士研究生导师, 从事临床生物化学工作, 研究方向为脂蛋白与动脉粥样硬化, 发表论文30余篇。

南非的欧洲人、德国人和英国人杂合子家族性高胆固醇血症中 95% 由 3 种突变引起。Mozas 等^[5]利用单链构象多态性对 36 个无相关的西班牙家族性高胆固醇血症患者的低密度脂蛋白受体基因启动子序列、18 个外显子和侧翼的内含子序列分析时,发现 19 个异常区域,共 20 个突变,其中 3 个为新突变,另有 7 个病人被发现在相同的等位基因上携带两种突变。Callis 等^[6]利用异源双链单链构象多态性(heteroduplex SSCP, HEX-SSCP)发现了 3 个新突变。最近又发展了一种毛细管电泳(capillary electrophoresis)荧光单链构象多态性(fluorescence-based SSCP)法,该技术以其高精度和自动化程度使其非常适用于临床的快速诊断^[7]。

1.2 变性梯度凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)

变性梯度凝胶电泳是双链 DNA 片段通过含有浓度递增的变性剂(如尿素、甲醛或二者并用)进行的聚丙烯酰胺凝胶电泳法。由于不同片段在梯度的不同部位发生变性,因此两个相同大小的片段可以彼此分开。如果变性剂的梯度平缓,这一技术的灵敏度足以将相差一个碱基的 DNA 片段分开。变性梯度凝胶电泳可更大比例地发现突变,但在检测点突变时常须在引物处引入一个 5' GC 发夹结构,因此现在常用 GC 锁状变性梯度凝胶电泳检测突变。变性梯度凝胶电泳并不能直接观察到序列的变化,它只是帮助确定需要进行进一步序列分析的区域。已有大量家族性高胆固醇血症病人的低密度脂蛋白受体基因用这种方法检测,并且发现了许多新突变。Nissen 等^[8]认为变性梯度凝胶电泳可以发现家族性高胆固醇血症家系中的常见突变,他们建议在家族性高胆固醇血症家系中应将基因的咨询列入日常应用中。Ekstrom 等^[9]使用变性梯度凝胶电泳发现了 2 个突变: E256K 和 I402T,所检测的每个家族性高胆固醇血症病人均携带这两种突变。Lombardi 等^[10]使用变性梯度凝胶电泳对 141 个患病儿检测时,发现有一种突变存在于 111 个病儿中。Day 等对变性梯度凝胶电泳方法进行了改良,称为微板阵列凝胶电泳(microplate array diagonal gel electrophoresis, MADGE),作为半自动多聚酶链反应分析过程的一种,提高了突变的发现率。

1.3 长距离多聚酶链反应(long-distance PCR)

长距离多聚酶链反应可以用来发现较大的重排,而且可以用来发现一些特殊的或在某些国家或地区常见的突变类型^[11]。

1.4 通用引物定量荧光多重多聚酶链反应(universal primer quantitative fluorescent multiplex-PCR, UPQFM-PCR)

通用引物定量荧光多重多聚酶链反应包括两步多聚酶链反应反应,第一步(P1)对由特定引物选择出的外显子进行扩增;第二步(P2)用通用的引物对 P1 扩增的序列扩增,通用引物的一个被荧光染色标记,然后在 ABI DNA 测序仪上测定。UPQFM-PCR 无须经过进一步的分析即可确定哪个外显子丢失或复制,能检测出已报道的 86% 的重排,并且对非常小的重排(甚至只有 1 bp 大小)检测具有独到之处^[1]。

1.5 突变体等位基因特异扩增技术(mutant allele-specific amplification, MASA)

Hopkins 等^[12]1999 年对一个家系的低密度脂蛋白受体基因进行筛选,发现一种新的突变,然后利用此技术对该家族的 12 个相关成员诊断,明确诊断了 7 个杂合子患者,同时排除了 5 个曾被怀疑患有家族性高胆固醇血症的成员。2000 年时,他们又发现了一种新的突变,并且证明了该突变和升高的脂蛋白水平同时出现^[13]。Cantafora 等^[14]利用该法在低密度脂蛋白受体基因外显子 11 上发现一个点突变,而用外显子扩增或酶解反应均未曾发现这一点突变。

此外,还有一些其他新的检测方法。Xenophontos 等^[15]利用微卫星和基因内单倍体型(microsatellite and intragenic haplotype)研究低密度脂蛋白受体基因的突变,显示出带有同样低密度脂蛋白受体基因突变的家庭有共同的起源,这同时也被他们相对的地域分布所证明。Yamaki 等^[16]用错位匹配 PCR-RFLP(mismatched PCR-RFLP)法检测单个碱基的缺失,并将其用于家族性高胆固醇血症的分子诊断。Pak-cheung Chan 利用 Epstein Barr virus transformed lymphocytes(EBV-L)与低密度脂蛋白受体具有高亲和力,研究低密度脂蛋白受体的基因突变或多态性,并且用于观察节食或治疗的疗效。Raunaard 等^[17]用结合有 EBV-L 的荧光流式细胞分析仪(fluorescence flow cytometry assay)研究突变。Hirata 等^[18]在比较两种逆转录多聚酶链反应(RT-PCR)方法在低密度脂蛋白受体基因表达的差异时,发现竞争性逆转录-多聚酶链反应(competitive RT-PCR)相对于非竞争性逆转录-多聚酶链反应(noncompetitive RT-PCR)简化了分析过程,并且在一次分析过程中需要更少的 cDNA、时间和花费。

2 低密度脂蛋白受体基因突变位点分布

利用以上方法和技术,近年来人们发现了大量低密度脂蛋白受体基因的新突变。至 2000 年 9 月,所报道的突变已达到 692 种。突变广泛分布于基因的各个位点。迄今为止,启动子外显子共报道了 551 种突变(占 79.6%),内含子 46 种(占 6.65%),内含子外显子交界区 86 种(占 12.43%)。在不同的外显子上突变发生的频率也不尽相同。有 125 种突变(占 18.06%)发生于外显子 4 上,仅在第 152 位密码子就发现 6 种突变,可谓突变的好发部位^[19]。在外显子 15 上只发现 6 种突变,为突变的罕发部位。

突变广泛存在于不同的民族和国家。在不同的民族和国家中,突变的好发率有别,即使在同一个人族,突变的好发位点也有差异。例如 E80K 10% 发生在英国的曼彻斯特城, D147H 10% 发生在以色列。生活在南非的欧洲人家族性高胆固醇血症患者中有 65%~70% 的低密度脂蛋白受体基因突变是 D206E, 5%~10% 为 D154N。在中国内地,现已发现 18 种突变,其中 7.1% 为 L393K, 4.8% 为 C308Y。

3 低密度脂蛋白受体基因突变的分类

低密度脂蛋白受体基因突变有多种分类方法,其中两种常用的是按突变对低密度脂蛋白受体结构和功能的影响和根据低密度脂蛋白受体基因突变对临床症状的影响分类。

按突变对低密度脂蛋白受体结构和功能的影响可以将突变分为5种类型:受体蛋白合成表达受阻,④受体转运受阻(包括受体转运完全受阻和受体转运速度降低两种),④受体与配体结合受损,受体配体复合物内化受阻,受体循环存在缺陷。根据低密度脂蛋白受体基因突变对临床症状的影响,可将突变分为2种:受体缺陷型(receptor defective)和受体缺失型(receptor negative)^[20]。这2种突变在年龄、性别、体重、动脉高血压及吸烟史上均有相似之处。受体缺失型的病人,LDL胆固醇水平比受体缺陷型高18%,HDL胆固醇水平低5%,并且腱黄瘤及冠状动脉疾病(coronary artery disease, CAD)的发病率增高20%。受体缺陷型的病人,以下3种因素均独立地发挥作用:男性、动脉高血压及LDL胆固醇水平;而在受体缺失型的病人中,前两个因素较强烈地预示着CAD,LDL胆固醇的影响较小,故其患CAD的机率只有受体缺失型的26%。

4 低密度脂蛋白受体基因分析的临床价值

知道特定的低密度脂蛋白受体基因突变未必有助于家族性高胆固醇血症病人的治疗,但对于寻找患病的亲属、携带这些突变的儿童及排除可能患病的群体具有较高的临床价值。现阶段家族性高胆固醇血症的诊断主要依靠家族史、血浆脂蛋白水平以及腱黄瘤的发生和早发心血管疾病。利用这些诊断标准,约15%的病人尤其是儿童被误诊。在中国人群中,由于缺少明显的临床表现,诊断多数依赖脂蛋白水平或亲属的表现,这可能与中国人传统的低脂肪进食有关^[21]。

Nobe等^[22]在明确诊断家族性高胆固醇血症的同时,排除了3个6~12岁的儿童患家族性高胆固醇血症的可能。Shin等^[23]发现了4个新突变,并且这4个突变只存在于有临床症状的家族性高胆固醇血症中,而不存在于正常血脂个体。Kotze等^[24]发现D154N、D206E和V408M在近90%的生活在南非的欧洲人中引发家族性高胆固醇血症。他们对85个患者家庭的221个孩子检查发现,60个男孩和56个女孩是D154N、D206E或V408M杂合子突变,这116个孩子的总胆固醇水平和LDL胆固醇水平相似,但均显著高于其余的孩子。这表明生活方式也是导致家族性高胆固醇血症的一个重要因素。因此在儿童期对一些潜在的突变进行分子诊断,在环境因素还未发挥作用时调整儿童的饮食习惯及运动习惯,可以大大降低影响程度,使其成年时发病率降低。

但是有些低密度脂蛋白受体基因突变并不导致家族性高胆固醇血症或仅引起较轻的家族性高胆固醇血症。有时低密度脂蛋白受体基因突变存在于正常血脂的个体中,这种变化属蛋白质多态性的变化而非功能性的改变。Loux等曾在一些杂合子家族性高胆固醇血症法国患者中发现T705I,但最近在正常血脂人群中也发现。一般说来,如果一个等位基因包含2个或2个以上基因序列的变化,那么其中单独一个突变不会造成功能性的改变。N543H和2593del9同时出现在受到影响的杂合子家系中,会导致75%受体功能的损伤,但其中单独一个突变并不影响受体的功能。此外,E256K和

I402T2种突变只有一起发生时,I402T才会导致受体功能性的改变,而单独的E256K并不影响低密度脂蛋白受体的功能。在一组不严重的高胆固醇血症病人中发现P84S,但在某些家系中并无家族性高胆固醇血症,它是否会引起高胆固醇血症尚不得知,有可能其它遗传因素和环境因素的影响在其中起一些作用。

5 低密度脂蛋白受体基因突变研究的焦点

最近对低密度脂蛋白受体基因突变的研究很多,主要集中在以下几个方面:研究突变的分布位置,在核苷水平上确定优先突变的位点,用表格或图画表示突变的种类、在相关家系的分布以及多发的突变;④研究不同的外显子突变的分布,这能在已观察的突变和预期将有的突变之间发现具有统计意义的区别;④研究突变在不同蛋白质区域上的分布;

寻找在突变周围和可能卷入突变机制中的重复序列,寻找能修饰各种突变的限制性酶,为家族性高胆固醇血症在分子水平进行诊断及治疗提供便利;双相比较:比较两组突变,每组用分子、临床以及性别等指标作为尺度,结果可用几组图解表示其氨基酸、外显子或蛋白质功能区。另外,突变也可以累积或详细方式表达(如插入、缺失、错义和无义)。

综上所述,低密度脂蛋白受体基因突变已从单独的实验室检查逐步走向临床,相信随着新技术的不断应用,低密度脂蛋白受体基因突变的临床诊断和治疗将造福于生活在家族性高胆固醇血症边缘的人们。

参考文献

- [1] Karen EH, Ian NMD, Steve EH. Universal primer quantitative fluorescent multiplex (UPQFM) PCR: a method to detect major and minor rearrangements of the low density lipoprotein receptor gene [J]. *J Med Genet*, 2000, **37**: 272-280
- [2] Hunphries SE, Gudnason V, Whittall R, et al. Single strand conformation polymorphism analysis with high throughput modifications, and its use in mutation detection in familial hypercholesterolemia [J]. *Clin Chem*, 1997, **43**: 427-435
- [3] Katsumata H, Emi M, Nobe Y, et al. Familial hypercholesterolemia in Utah kindred with novel R103W mutations in exon 4 of the LDL receptor gene [J]. *Jpn Heart J*, 1999, **40**: 443-449
- [4] Jensen HK, Jensen LG, Meinertz H, et al. Spectrum of LDL receptor gene mutations in Denmark: implications for molecular diagnostic strategy in heterozygous familial hypercholesterolemia [J]. *Atherosclerosis*, 1999, **146**: 337-344
- [5] Mozas P, Cenarro A, Civeira F, et al. Mutation analysis in 36 unrelated Spanish subjects with familial hypercholesterolemia: identification of 3 novel mutations in the LDL receptor gene [J]. *Hum Mutat*, 2000, **15**: 483-484
- [6] Callis M, Jansen S, Thiaert R, et al. Mutation analysis in familial hypercholesterolemia patients of different ancestries: identification of three novel LDLR gene mutations [J]. *Mol Cell Probes*, 1998, **12**: 149-152
- [7] Walz T, Geisel J, Bodis M, et al. Fluorescence-based single strand

- conformation polymorphism analysis of mutations by capillary electrophoresis [J]. *Electrophoresis*, 2000, **21**: 375-379
- [8] Nissen H, Hansen AB, Guldberg P, et al. Evaluation of a clinically applicable mutation screening technique for genetic diagnosis of familial hypercholesterolemia and familial defective apolipoprotein [J]. *Clin Genet*, 1998, **53**: 433-439
- [9] Ekstrom U, Abrahamson M, Sveger T, et al. Expression of an LDL receptor allele with two different mutations (E256K and I402T) [J]. *Mol Pathol*, 2000, **53**: 31-36
- [10] Lombardi MP, Redeker EJ, Defesche JC, et al. Molecular genetic testing for familial hypercholesterolemia: spectrum of LDL receptor gene mutations in the Netherlands [J]. *Clin Genet*, 2000, **57**: 116-124
- [11] Gorski B, Kubalska J, Naruszewicz M, et al. LDL-R and ApoB-100 gene mutations in Polish familial hypercholesterolemia [J]. *Hum Genet*, 1998, **102**: 562-565
- [12] Hopkins PN, Wu LL, Stephenson SH, et al. A novel LDLR mutation. H190Y, in a Utah kindred with familial hypercholesterolemia [J]. *J Hum Genet*, 1999, **44**: 364-367
- [13] Wu LL, Hopkins PN, Xin Y, et al. Co-segregation of elevated LDL with a novel mutation (D92K) of the LDL receptor in a kindred with multiple lipoprotein abnormalities [J]. *J Hum Genet*, 2000, **45**: 154-158
- [14] Cantafora A, Blotta I, Mercuri E, et al. Simple detection of a point mutation in LDL receptor gene causing familial hypercholesterolemia [J]. *J Lipid Res*, 1998, **39**: 1 101-105
- [15] Xenophontos SL, Pierides A, Demetriou K, et al. Geographical clustering of low density lipoprotein receptor gene mutations (C292X, Q363X, D365E&C660X) in Cyprus [J]. *Hum Mutat*, 2000, **15**: 380-386
- [16] Yamaki E, Hirayama T, Wu LL, et al. Molecular genetic diagnosis of a family with hypercholesterolemia by a mismatched PCR-RFLP method for genotyping single base substitution of the LDL receptor gene [J]. *Jpn Heart J*, 1998, **39**: 681-686
- [17] Raungaard B, Heath F, Hansen PS, et al. Flow cytometric assessment of LDL ligand function for detection of heterozygous familial defective apolipoprotein B-100 [J]. *Clin Chem*, 2000, **46**: 224-233
- [18] Hirata RDC, Salazar LA, Hinuy HM, et al. Low-density lipoprotein receptor gene expression of two RT-PCR assay [J]. *Clin Chem*, 2000, **46**(s6): A104
- [19] Vallve JC, Alonso V, Ribalta J, et al. Extron 4, and in particular codon 152 of the LDL receptor gene, is a hot spot for point mutations [J]. *Atherosclerosis*, 1998, **140**: 191-192
- [20] Bertolini S, Gantafora A, Averna M, et al. Clinical expression of familial hypercholesterolemia in clusters of mutations of the LDL receptor gene that cause a receptor-defective or receptor-negative phenotype [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, **20**: E41-52
- [21] Ying TM, Chi PP, Brian T, et al. Mutations in the low density lipoprotein receptor gene in the Chinese familial hypercholesterolemia patients [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998, **18**: 1 600-605
- [22] Nobe Y, Emi M, Katsumata H, et al. Familial hypercholesterolemia in Utah kindred with novel 2412-6 ins G mutations in exon 17 of the LDL receptor gene [J]. *Jpn Heart J*, 1999, **40**: 435-441
- [23] Shin JA, Kim Sh, Kim UK, et al. Identification of four novel mutations of the low density lipoprotein receptor gene in Korean patients with familial hypercholesterolemia [J]. *Clin Genet*, 2000, **57**: 225-229
- [24] Kotze MJ, Peeters AV, Loubser O, et al. Familial hypercholesterolemia: potential diagnostic value of mutation screening in a pediatric population of South Africa [J]. *Clin Genet*, 1998, **54**: 74-78
- (此文 2001-02-10 收到, 2001-07-30 修回)
- (此文编辑 朱雯霞)

•读者•作者•编者•

作者申明

本刊于 2001 年第 9 卷第 3 期发表张黎的“溶血磷脂酰胆碱诱导内皮细胞表达血管内皮生长因子及丹酚酸 B 的抑制作用”一文系国家自然科学基金资助课题, 项目编号为 39870870, 特此申明。