

脂蛋白脂肪酶内含子 3C[→]T 突变

杨宇虹, 葛林, 赵郁, 解用虹

(天津医科大学生物化学教研室, 天津市 300070)

[关键词] 生物化学; 脂蛋白脂肪酶内含子基因突变; 聚合酶链反应—单链构象多态性分析; 脂蛋白脂肪酶; 高甘油三酯血症; 内含子突变

[摘要] 为筛查中国人群脂蛋白脂肪酶基因的突变情况, 并探讨这些突变对脂蛋白代谢可能产生的影响, 研究者利用聚合酶链反应—单链构象多态性分析技术, 对 140 例人群(高甘油三酯血症组 51 例, 正常对照组 89 例)的脂蛋白脂肪酶基因进行了突变筛查, 对可疑突变的扩增样品进行 DNA 序列测定。结果在外显子 4 扩增片段(包括内含子—外显子交界区)有 2 例可疑突变被检出, 经测序证实均为内含子 3 受位剪接位点上游 6 bp 的 C[→]T 转换突变杂合子。由于该突变仅见于重度高甘油三酯血症患者, 结合国内外相关文献, 研究者认为我国人群存在脂蛋白脂肪酶基因内含子 3 受位剪接位点的 C[→]T 突变, 该突变可能是我国人群高甘油三酯血症的遗传易患因子。

[中图分类号] Q54

[文献标识码] A

A Splice Site Mutation in Intron 3 of the Lipoprotein Lipase Gene Resulting in Hypertriglyceridemia

YANG Yur-Hong, GE Lin, ZHAO Yu, and XIE Yong-Hong

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

[KEY WORDS] Lipoprotein Lipase; Hyperglyceridemia; Intron Mutation; Polymerase Chain Reaction; Single Strand Conformation Polymorphism

[ABSTRACT] **Aim** To screen the lipoprotein lipase gene for mutations in Chinese population and to study the possible effects of the mutations on the lipoprotein metabolism. **Methods** The lipoprotein lipase gene was examined by polymerase chain reaction—single strand conformation polymorphism analysis, and the polymerase chain reaction products showing abnormal pattern on single strand conformation polymorphism were sequenced using dideoxy-mediated chain-termination method. **Re-**

sults Two mutations were found in 140 Chinese people and both were heterozygous C[→]T transitions at 6 bp upstream from acceptor splicing site of intron 3. **Conclusion** The mutation in intron 3 of the lipoprotein lipase gene may be the genetic risk of hyperglyceridemia in Chinese population.

脂蛋白脂肪酶(lipoprotein lipase, LPL; EC 3. 1. 1. 34)是机体脂蛋白代谢的关键酶之一, 其作用是将血浆乳糜微粒和极低密度脂蛋白中的甘油三酯水解为甘油和游离脂肪酸。许多研究显示, LPL 的结构和功能异常是高脂血症特别是高甘油三酯血症(hypertriglyceridemia, HTG)的重要原因之一^[1]。近年的研究表明, LPL 基因突变不仅影响血脂水平, 还可影响早发性痴呆、高血压和先兆子痫等多种疾病的发生和发展^[2]。为了解中国人群 LPL 基因突变情况及其

可能产生的影响, 我们利用聚合酶链反应—单链构象多态性(polymerase chain reaction—single strand conformation polymorphism, PCR-SSCP)分析技术对 140 例人群的 LPL 基因(包括转录起始位点上游 140 bp 以内的调节区, 外显子 1~9 和内含子—外显子交界区)进行了突变筛查, 结果检出 2 例 LPL 基因内含子 3 受位剪接位点上游 6 bp 的 C[→]T 转换突变杂合子, 现报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料

140 例人群由随机收集的 HTG 患者和健康体检人群组成, 彼此无亲缘关系, 以血浆甘油三酯(triglyceride, TG) > 1.7 mmol/L 为界, 分成 HTG 组 51 例和正常 TG 组 89 例, 其中重度 HTG 患者(TG > 3.95 mmol/L) 45 例。

1.2 基因组 DNA 的提取

[收稿日期] 2003-05-26 [修回日期] 2003-09-30

[基金项目] 天津市自然科学基金(033607311)资助

[作者简介] 杨宇虹, 女, 1972 年出生, 内蒙古乌兰浩特市人, 汉族, 助理研究员, 硕士研究生, 从事分子生物学和脂代谢研究; 电话: 022-23542521, E-mail: joieyang@hotmail.com。葛林, 女, 1974 年出生, 辽宁省沈阳市人, 汉族, 助教, 在读硕士研究生, 从事分子生物学和脂代谢研究。解用虹, 男, 1943 年出生, 天津市人, 汉族, 教授, 硕士研究生导师, 享受国务院特殊津贴专家, 中国生物化学学会脂蛋白专业组委员兼秘书; 课题负责人, 本文通讯作者, 电话: 022-23542521, E-mail: tjxieyh@sina.com。

取空腹静脉血,以乙二胺四乙酸(1/10 体积的 0.5 mol/L 乙二胺四乙酸)抗凝,应用 TKM 法^[3]提取基因组 DNA。

1.3 目的基因的扩增

脂蛋白脂肪酶目的基因的引物设计参照文献[4],由上海生工生物工程有限公司负责合成,其中外显子 4 扩增片段的上游引物为 5'-TTG-GCAGAACTGTAAGCACCT-3',下游引物为 5'-AGTCCTTTTCACCTCTTATGATA-3'。由此扩增出的外显子 4 片段长 201 bp,包括内含子 3 的 3' 端 43 bp、外显子 4 全长 112 bp 和内含子 4 的 5' 端 46 bp。聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)反应体系 25 μ L,扩增条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min $\rightarrow$ 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min $\rightarrow$ 57 $^{\circ}$ C 退火 1 min $\rightarrow$ 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,共进行 30 次循环,最后 72 $^{\circ}$ C 额外延伸 7 min。

1.4 单链构象多态性分析

取 13 μ L PCR 产物,与 6 μ L 单链构象多态性(single strand conformation polymorphism, SSCP)上样缓冲液(由 9.6 mL 甲酰胺、5 mg 溴酚蓝和 400 μ L 0.5 mol/L 乙二胺四乙酸配制而成)混合。95 $^{\circ}$ C 热变性 10 min 后立即置于冰浴中。取 15 μ L 变性产物上样,采用浓度为 10%、交联度为 2% 的聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳(20 cm $\times$ 16 cm),4 $^{\circ}$ C 恒温。先以 150 V 10 min 使样品进胶,继以恒功率 5 W 电泳 5 h。电泳后将凝胶进行银染法染色。

1.5 测序

对于 SSCP 显示异常带型的可疑突变样品采用双脱氧 DNA 链合成终止法进行 PCR 产物直接测序,测序工作由上海生工生物工程有限公司负责完成。

2 结果

140 例样品基因组 DNA 提取物完整性良好,目的基因扩增片段产量和纯度均适合 SSCP 分析(图 1, Figure 1)。外显子 4 扩增片段的 SSCP 电泳图有 2

例显示出异常带型(图 2, Figure 2)。分别将该样品的 PCR 产物进行 DNA 测序,证实均为内含子 3 受位剪接位点上游 6 bp 的 C $\rightarrow$ T 转换突变杂合子(图 3, Figure 3)。这 2 例内含子 3 突变杂合子血浆 TG 分别为 5.90 mmol/L 和 6.62 mmol/L,正常 TG 组中未检出该突变。

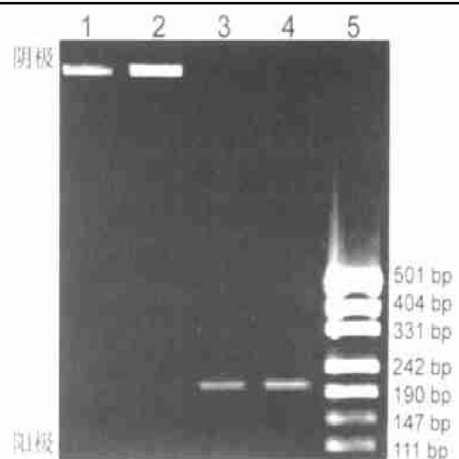


图 1. 基因组 DNA 和外显子 4 扩增片段的琼脂糖凝胶电泳图 泳道 1、2: TKM 法提取的基因组 DNA; 泳道 3、4: 外显子 4 扩增片段; 泳道 5: pUC19 DNA/Msp IV 分子量标准, 显示 501、404、331、242、190、147 和 111 bp 7 条带。外显子 4 扩增片段为 201 bp, 介于 190 bp 和 242 bp 之间。

Figure 1. Schematic illustration of the genomic DNA and the PCR products of exon 4

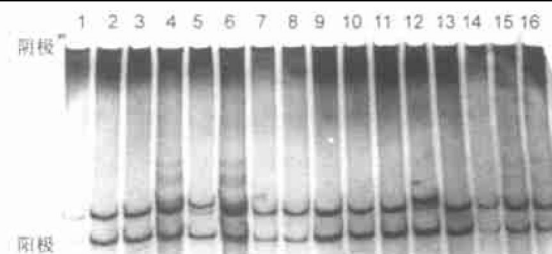


图 2. 外显子 4 扩增片段的单链构象多态性电泳图 泳道 5、12 出现异常单链, 为内含子 3 突变杂合子; 其余各道均为两条正常单链, 未见突变。

Figure 2. SSCP analysis of the exon 4 PCR products

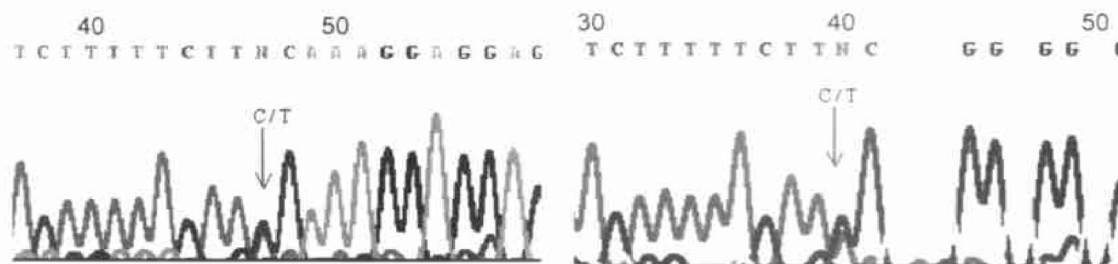


图 3. 内含子 3 突变杂合子的 DNA 测序结果 箭头标记处可见双峰 C/T, 为内含子 3 的 C $\rightarrow$ T 转换突变杂合子。

Figure 3. Sequence of the heterozygous mutation in intron 3

3 讨论

人脂蛋白脂肪酶是基因突变最为丰富的蛋白质之一,目前文献报道的基因突变已达 110 种之多。虽然在这些突变中主要为外显子突变,但内含子突变也并不罕见,9 个内含子中已发现 5 个内含子的 8 种剪接点突变,这些突变的携带者均显示血脂水平的异常^[2]。

在正常机体,内含子本为非编码表达的序列,经过复杂的转录后加工,内含子被完整地剪除而外显子被正确地拼接,从而形成成熟的 mRNA。在这复杂的剪接作用中,内含子的 3 个保守位点,即 5'-给位剪接位点(5'-donor splice site, 5'-dss)的“GT”和 3'-受位剪接位点(3'-acceptor splice site, 3'-ass)的“AG”以及分支部位的“A”发挥着相当重要的作用。剪接过程首先由分支部位 A 的 2'-OH 攻击 5'-dss 形成套索结构,继而由游离的前外显子的 3'-OH 攻击 3'-ass,使内含子套索被剪下,同时完成前后外显子的连接。

文献报道的内含子突变多发生在这些保守部位,从而影响正常的剪接作用。Ikeda 等^[5,6]发现, LPL 内含子 8/5'-dss/T(+2)→C 突变使原有 5'-dss 剪接点(GT→GC)失活,并激活位于外显子 8(-133)的 GT 潜在剪接点,成为替代的 5'-dss 剪接点,造成部分外显子的丢失,使得肝素后血浆 LPL 活性和质量均明显降低。研究者普遍认为,内含子剪接点突变的结果是广泛而多样的,这是因为潜在剪接位点的选择与多种因素有关,存在众多的可能性,而且多种遗传和环境因素也往往与之共同作用^[5-7]。另外突变引起 mRNA 编码作用、稳定性和多样性的改变,可导致表达产物酶活性的不同;但即使引起一级结构改变,其效果也是多样的,有的几乎不产生什么效应,有的则可改变酶的催化效率或改变酶与变构剂的结合能力^[8]。

脂蛋白脂肪酶基因内含子 3/3'-ass/C(-6)→T 转换突变由日本学者 Nakamura 等首次报道^[9],研究者应用 PCR-SSCP、聚合酶链反应—限制片段长度多态性分析和 DNA 序列分析,在 106 例 HTG 患者(TG > 3.4 mmol/L)中检出并确认了 6 例杂合子突变,而在 105 例血脂正常组未能检出该种变异。同时利用酶联免疫吸附分析技术对 6 例突变携带者中的 3 例进行了 LPL 质量测定,其中 2 例测定结果在正常值范围内,1 例低于正常参考值。由于该突变在 HTG 组(6/106)与正常血脂组(0/105)中的发生频率有显著差异, Nakamura 等认为它可能与 HTG 的发病相

关。其后 Li 等^[10]应用终端用户计算系统(end user computing, EUC),在 50 例日本 HTG 患者(TG > 3.95 mmol/L)中检出了 4 例内含子 3 的 C→T 杂合子突变, LPL 质量测定有 2 例低于正常参考值。基于该突变较高的发生频率(4/50),且仅发生于 HTG 人群,研究者认为该突变可造成 HTG,并可能是造成日本人群 HTG 的主要遗传因素。本文报告的 2 例突变杂合子(TG 分别为 5.90 mmol/L 和 6.62 mmol/L)在重度 HTG 患者(TG > 3.95 mmol/L)中发生的频率为 4.4%(2/45),而在 89 例血脂正常人群中未发现 1 例,也显示出该突变在不同血脂水平人群中分布的显著差异。

目前该突变仅发现于日本和中国,尚未读到其他国家的相关报告。在日本的 2 篇报告中,突变发生的频率在重度 HTG 患者中分别为 5.7%(6/106)和 8.0%(4/50)。本文有限的资料显示,其在中国重度 HTG 患者的发生频率为 4.4%(2/45),显示出很大的相似性。尽管因实验条件的限制,我们未能进行 mRNA 分析和 LPL 活性及质量的测定,但根据上述分子流行病学调查,我们有理由相信,内含子 3/3'-ass/C(-6)→T 转换突变与 HTG 具有一定的相关性,可能是中国人 HTG 的遗传易患因素之一,其作用机制有待进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] Merkel M, Eckel RH, Goldberg IJ. Lipoprotein lipase: genetics, lipid uptake and regulation. *J Lipid Res*, 2002, **43** (12): 1 997-2 006
- [2] 穆云翔,解用虹. 脂蛋白脂肪酶基因突变研究进展. *中国动脉硬化杂志*, 2002, **10** (4): 358-362
- [3] 刘欣,曹海燕,陈涛,钟媛,解用虹. 121 例新生儿载脂蛋白 E 基因型的分布. *中国动脉硬化杂志*, 2001, **9** (4): 337-340
- [4] Oka K, Tkalecic GT, Nakano T, Tucker H, Ishimura Oka K, Brown WV. Structure and polymorphic map of human lipoprotein lipase gene. *Biochim Biophys Acta*. 1990, **1 049** (1): 21-26
- [5] Ikeda Y, Takagi A, Nakata Y, Sera Y, Hyoudou S, Hamamoto K, et al. Novel compound heterozygous mutations for lipoprotein lipase deficiency: A G→T transversion at the first position of exon 5 causing G154V missense mutation and a 5' splice site mutation of intron 8. *J Lipid Res*, 2001, **42** (7): 1 072-081
- [6] Ikeda Y, Takagi A, Nakata Y, Sera Y, Hyoudou S, Hamamoto K, et al. A family-based study of hyperinsulinemia and hypertriglyceridemia in heterozygous lipoprotein lipase deficiency. *Clin Chim Acta*, 2002, **316** (1): 179-185
- [7] Holz B, Kraft HG, Wiebusch H, Sandhofer A, Patsch J, Sandhofer F, et al. Two novel mutations in the lipoprotein lipase gene in a family with marked hypertriglyceridemia in heterozygous carriers. Potential interaction with the polymorphic marker DIS104 on chromosome 1q21-q23. *J Lipid Res*, 2000, **41** (5): 734-741
- [8] Rodwell VW. Catabolism of the carbon skeletons of amino acids. In: Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW eds. *Harper's Biochemistry*. 25th ed. Stanford: Appleton & Lange, 2000; 323-346
- [9] Nakamura T, Suehiro T, Yasuoka N, Yamamoto M, Ito H, Yamano T, et al. A novel nonsense mutation in exon 1 and a transition in intron 3 of the lipoprotein lipase gene. *J Arterioscler Thromb*, 1996, **3** (1): 17-24
- [10] Li J, Kobori K, Kondo A, Yonekawa O, Kanno T. The application of end user computing (EUC) for detection of lipoprotein lipase gene abnormality. *Rinsho Byori*, 1999, **47** (8): 737-743 (此文编辑 曾学清)