

## •临床研究•

[文章编号] 1007-3949(2004)12-05-0574-03

人载脂蛋白 A5 基因多态性 56C<sup>→</sup>G 与血浆甘油三酯的关系李国平<sup>1</sup>, 王建跃<sup>2</sup>, 鄢盛恺<sup>3</sup>, 张立军<sup>2</sup>, 薛红<sup>1</sup>, 曾武威<sup>1</sup>, 吴刚<sup>1</sup>, 陈保生<sup>1</sup>

(1. 中国医学科学院基础医学研究所 中国协和医科大学基础医学院医学分子生物学国家重点实验室, 北京市 100005;

2. 舟山市疾病预防控制中心, 浙江舟山市 316000;

3. 中国医学科学院中国协和医科大学北京协和医院检验科, 北京市 100730)

[关键词] 生物化学; 载脂蛋白 A5 基因多态性与血浆甘油三酯的关系; 聚合酶链反应限制片段多态性; 载脂蛋白 A5; 基因多态性; 甘油三酯

[摘要] 为研究载脂蛋白 A5 基因编码区 56C<sup>→</sup>G 这一多态性位点与血浆脂质以及载脂蛋白水平的关系, 选择 468 个健康汉族人, 应用聚合酶链反应限制片段多态性的原理, 逐个鉴定每个个体的基因型。结果发现, 56C<sup>→</sup>G 这一位点在中国汉族人群中突变频率小于 1%, 提示它在中国汉族人群中不是一个多态性位点, 因此也就无法建立这一位点与血脂之间的关系。

[中图分类号] Q5

[文献标识码] A

The Relationship between the Polymorphism of Apolipoprotein A5 Gene 56C<sup>→</sup>G and the Levels of Serum Triglyceride

LI Guo-Ping, WANG Jian-Yue, YAN Sheng-Kai, ZHANG Li-Jun, XUE Hong, ZENG Wu-Wei, WU Gang, and CHEN Bao-Sheng

(National Laboratory of Medical Molecular Biology, Department of Biochemistry, Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences and School of Basic Medicine, Peking Union Medical College, Beijing 100005, China)

[KEY WORDS] Apolipoprotein A5; Gene Polymorphism; Triglyceride; Genotype

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the relationship between the polymorphism of apolipoprotein A5 gene 56C<sup>→</sup>G and the levels of serum lipids and lipoproteins. **Methods** 486 subjects were collected to determine the genotypes by using polymerase reaction-restriction fragments length polymorphisms (PCR-RFLP). **Results** There is only one carrier with minor allele of 56C<sup>→</sup>G, in another word, only one heterozygous was found in the group ( $n=468$ ). **Conclusion** The relationship between the site of apolipoprotein A5 gene 56C<sup>→</sup>G and the levels of serum lipids and lipoproteins can not be established.

载脂蛋白 A5 (apolipoprotein A5, apo A5) 是由两个独立的课题组在 2001 年同期发现并证实的一个载脂蛋白基因<sup>[1,2]</sup>, 该基因对血浆甘油三酯 (triglyceride, TG) 水平有重要影响。血浆 TG 代谢与心血管疾病的关系十分密切, 代谢异常引起多种心血管疾病, 如高血压、心脏病等<sup>[3-5]</sup>, 因此探明载脂蛋白 A5 的调控机制及其代谢机理具有重要意义。到目前为止, 在美国国家生物技术信息中心单核苷酸多态性数据库中收录了载脂蛋白 A5 基因内及附近区域 14 个多态性位点, 其中 56C<sup>→</sup>G 多态性位点颇受关注<sup>[6-8]</sup>。近期不同的课题组采用不同的实验设计研究不同种族载脂蛋白 A5 多态性与 TG 的关系时得出的结论相似, 即在绝大多数种族人群中 56C<sup>→</sup>G

多态性的改变都会极大地影响人血浆 TG 水平, 而对胆固醇的影响互不相同。本研究以中国汉族人群为对象, 分析载脂蛋白 A5 基因 56C<sup>→</sup>G 多态性与血清脂质的关系。

## 1 对象和方法

## 1.1 研究对象

随机选自体检健康者, 男 236 名, 女 232 名, 年龄  $43.39 \pm 20.19$  岁, 均为无血缘关系的汉族人。

## 1.2 试剂和主要仪器

限制性内切酶 Taq iv (MBI 公司)。4 种 dNTP、pftaq 高保真 DNA 聚合酶 (北京天为时代科技有限公司),  $\Phi$ X174DNA/Hae III Markers (大连宝生物技术有限公司)。DNA 扩增仪 (PE9600 型, Perkin Elmer 公司), 岛津 CL-7200 全自动生化分析仪。

## 1.3 引物设计与合成

参照文献 [6] 设计引物。正向引物 5' GGCTCTCTTTCAGGTGGGTCTCCG 3', 反向引物 5'

[收稿日期] 2003-10-13 [修回日期] 2004-06-02

[基金项目] 国家自然科学基金 (39770168) 和国家重大基础研究项目 973 (G2000056902) 资助

[作者简介] 李国平, 博士研究生, E-mail 为 guoping.li@yahoo.com。曾武威, 助理研究员。陈保生, 教授, 博士研究生导师, 主要从事血浆脂蛋白研究, 曾获得 2 项国家科技进步奖, 5 项卫生部 and 市部级科技成果奖, E-mail 为 capogene@yahoo.com, 本文通讯作者。

GCCITTCCTGCCTGGG TGGT 3', 特异性扩增载脂蛋白 A5 基因编码区第三外显子内第 7 bp 处 C> G 多态性位点, 产物长度为 157 bp。

#### 1.4 模板 DNA 的提取

采用改良的碘化钠法<sup>[9]</sup>。取 EDTA 抗凝血 100  $\mu$ L, 加无菌双蒸水 100  $\mu$ L, 混匀, 加入 6 mol/L NaI 200  $\mu$ L, 反复混匀 20 s, 再加入氯仿: 异丙醇 (24: 1) 400  $\mu$ L, 振荡 20 s, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 加 0.6 倍体积异丙醇, 室温静置 15 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 加入 70% 乙醇 1 mL, 然后 12 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 室温干燥后溶于 30  $\mu$ L TE 溶液 (pH 8.0), 置 -20  $^{\circ}$ C 储存。

#### 1.5 聚合酶链反应—限制片段多态性

反应总体系 20  $\mu$ L, 10  $\times$  buffer 5  $\mu$ L, dNTP 200  $\mu$ mol/L, 正向引物、反向引物各 0.5  $\mu$ mol/L, 50 ng 基因组 DNA, pftaq 高保真 DNA 聚合酶 0.5 u。将反应物置 96  $^{\circ}$ C 预变性 5 min。按 96  $^{\circ}$ C 变性 15 s, 67  $^{\circ}$ C 退火 20 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 20 s, 循环 30 次。末次循环后延伸 5 min。取 PCR 扩增产物 20  $\mu$ L, 加入限制性内切酶 Taq iv 10 u, 65  $^{\circ}$ C 消化 4 h。酶切产物用 15% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离鉴定。

#### 1.6 血脂及载脂蛋白的测定

采用酶法测定血浆总胆固醇 (total cholesterol, TC) 和甘油三酯 (triglyceride, TG) 水平; 选择遮蔽直接测定法测定血浆高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDLC) 和低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDLC) 水平; 双波长免疫透射比浊法测定血浆载脂蛋白 A1、载脂蛋白 B 及脂蛋白 (a) 水平。

#### 1.7 统计学处理

研究对象符合 Hardy-Weinberg 平衡, 组间基因型及等位基因频率比较采用  $\chi^2$  检验; 组间血脂水平比较采用 ANOVA 检验。

## 2 结果

#### 2.1 限制片段多态性分析

载脂蛋白 A5 基因 56C $\rightarrow$ G 多态性扩增片段为 157 bp, 酶切后片段有 3 种, 为 157 bp、134 bp 和 23 bp。若为 56C/C, Taq iv 酶切位点可见 134 bp 和 23 bp 的带; 若无 Taq iv 酶切位点, 即 56G/G, 只见一条 157 bp 的带; 若是 56C/G 杂和, 则见 157 bp、134 bp 和 23 bp 三条带 (图 1, Figure 1)。

#### 2.2 载脂蛋白 A5 基因多态性与血浆脂质的关系

468 例个体中只有一个 56C/G 个体, 无法进行

统计分析。

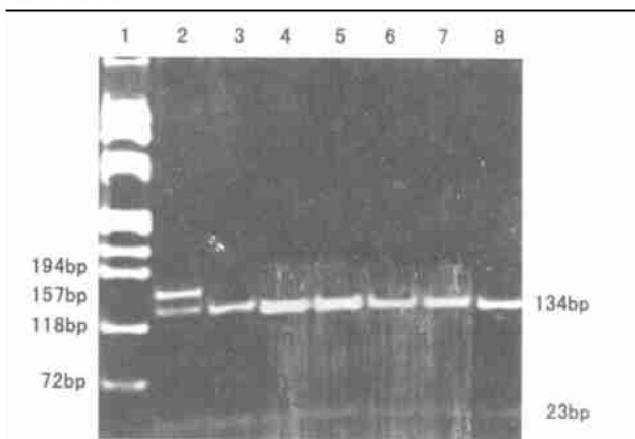


图 1. 载脂蛋白 A5 基因 56C $\rightarrow$ G 多态性扩增片段限制片段多态性分析 1 为  $\Phi$ X174DNA/Hae III Markers, 2 为 PCR 酶切产物 Taq iv (+/-) 杂合子, 3~8 为 Taq iv (+/+) 纯合子。

Figure 1. 56C $\rightarrow$ G polymorphism of apolipoprotein A5 gene determined by PCR-RFLP analysis

表 1. 载脂蛋白 A5 基因多态性与血浆脂质的关系

Table 1. Clinical characteristics and serum lipid levels according to the C/G genotype of the apo A5 gene ( $\bar{x} \pm s$ , mg/dL)

指标	CC (n= 467)	CG (n= 1)
总胆固醇	174.1 $\pm$ 42.1	168.0
甘油三酯	146.4 $\pm$ 125.1	236.0
高密度脂蛋白胆固醇	52.5 $\pm$ 15.1	28.9
低密度脂蛋白胆固醇	95.4 $\pm$ 32.4	105.0
载脂蛋白 A1	129.0 $\pm$ 19.5	104.6
载脂蛋白 B	82.6 $\pm$ 23.2	81.2
脂蛋白 (a)	12.7 $\pm$ 16.1	9.1

## 3 讨论

本研究采用传统的聚合酶链反应限制片段多态性检测方法, 该方法具有成功率高、灵敏、花费低、操作简单等优点已经得到了广泛应用。为确保检测结果的真实性、客观性与可靠性, 电泳结果分别由两个研究人员独立判定, 然后把两个人的判定结果比较得出。本研究结果发现, 在所选择的 468 例人群中, 仅有一个载脂蛋白 A5 基因多态性位点 (56C $\rightarrow$ G) 的杂合个体, 所以在这个中国汉族人群中无法建立血脂水平与这个位点之间的关系。根据 Brookes 等<sup>[10]</sup>的观点这个位点在中国人群中更应该被视为一个突变位点, 因为它的突变频率小于 1%。在近期的研究中, 如 Lai 等<sup>[11]</sup> 在一个 2 711 例新加坡汉族人群中证实该位点在中国汉族人群中突变频率至少小于

5%; 台湾学者 Kao 等<sup>[12]</sup> 在对一个 290 例台湾汉族人群进行载脂蛋白 A5 基因 DNA 测序时也没有检测到这一多态性位点的存在, 这也说明根据我们的实验结果得出的结论是比较合理的。

在分析其它两个位点(载脂蛋白 A5 -1131T $\rightarrow$ C 和载脂蛋白 C3-482C $\rightarrow$ T) 时, 发现这两个位点的多态性变化极大地影响血浆 TG 水平(另文发表)。载脂蛋白 A5 基因多态性位点(56C $\rightarrow$ G) 对中国汉族人群血脂的影响不像对白种人影响那么明显, 原因可能有二, 一是由于遗传背景的差异使中国人血脂水平的变化对 56C $\rightarrow$ G 不敏感; 二是样本数量可能不够大, 应该存在的差异没有显露出来。

在 Talmud 等<sup>[6]</sup> 以 2 808 个白人为研究对象, 发现这一位点稀有位点纯合携带者比野生型位点纯合携带者的 TG 水平高出 40%, 在 Martin 等<sup>[13]</sup> 的研究中也证实稀有位点携带者比野生型位点携带者的 TG 水平高。他们的解释是编码区第 56 位的 C 碱基变成 G 碱基之后, 使第 19 位的氨基酸发生了错义突变, 由原来的亲水性丝氨酸变成了疏水性的色氨酸, 而这个氨基酸正好在载脂蛋白 A5 的疏水性的信号肽区域, 这就影响了该基因编码的载脂蛋白 A5 在内质网的转位, 即成熟的载脂蛋白 A5 的数量减少, 使它滞留在内质网中不能正常参与脂质颗粒的组装, 如极低密度脂蛋白的组装和分泌, 从而使得极低密度脂蛋白的产生速度加快, 血浆 TG 水平升高。

不仅如此, 在 Hubacek 等<sup>[14]</sup> 的研究中, 以 1 191 个男性和 1 368 个女性捷克人为研究对象, 发现这一位点的突变不仅使 TG 水平升高, 还升高了患急性心肌梗死的风险。这说明在不同人种之间遗传背景的差异很大, 这种遗传背景本身固有的差异很大程度上决定了个体的表型特征。深入研究不同民族

之间的 SNP 的差异有助于解释在个体的表型差异、不同群体和个体对疾病的易感性, 特别是对复杂疾病的易感性, 对各种药物的耐受性等。

#### [参考文献]

- [1] Van der Vliet HN, Samuels MG, Leegwater AC, Levels JH, Reitsma PH, Boers W, et al. Apolipoprotein AV: a novel apolipoprotein associated with an early phase of liver regeneration. *J Biol Chem*, 2001, **276** (48): 44 512-520
- [2] Pennacchio LA, Olivier M, Hubacek JA, Cohen JC, Cox DR, Fruchart JC, et al. An apolipoprotein influencing triglycerides in humans and mice revealed by comparative sequencing. *Science*, 2001, **294** (5540): 169-173
- [3] 曾武威, 陈保生. 载脂蛋白 E 基因多态性与高脂血症的相关性研究. *中国动脉硬化杂志*, 1996, **4** (3): 185-189
- [4] 曾武威, 陈保生. 胆固醇酯转运蛋白与动脉粥样硬化的关系. *中国动脉硬化杂志*, 2002, **10** (3): 262-264
- [5] 李国平, 陈保生. 载脂蛋白家族新成员—载脂蛋白 A5 基因研究进展. *中国动脉硬化杂志*, 刊印中
- [6] Talmud PJ, Hawe E, Martin S, Olivier M, Miller CJ, Rubin EM, et al. Relative contribution of variation within the APOC3/A4/A5 gene cluster in determining plasma triglycerides. *Hum Mol Genet*, 2002, **11** (24): 3 039-046
- [7] Pennacchio LA, Olivier M, Hubacek JA, Krauss RM, Rubin EM, Cohen JC. Two independent apolipoprotein A5 haplotypes influence human plasma triglyceride levels. *Hum Mol Genet*, 2002, **11** (24): 3 031-038
- [8] Hubacek JA, Skodova Z, Adamkova V, Lanska V, Poledne R. The influence of APOAV polymorphisms (T-1131> C and S19> W) on plasma triglyceride levels and risk of myocardial infarction. *Clin Genet*, 2004, **65** (2): 126-130
- [9] Loparev VN, Cartas MA, Monken CE, Velpandi A, Srinivasan A. An efficient and simple method of DNA extraction from whole blood and cell lines to identify infectious agents. *J Virol Methods*, 1991, **34** (1): 105-112
- [10] Brookes AJ. The essence of SNPs. *Gene*, 1999, **234** (2): 177-186
- [11] Lai CQ, Tai ES, Tan CE, Cutter J, Chew SK, Zhu YP, et al. The APO A5 locus is a strong determinant of plasma triglyceride concentrations across ethnic groups in Singapore. *J Lipid Res*, 2003, **44** (12): 2365-373
- [12] Kao JT, Wen HC, Chien KL, Hsu HC, Lin SW. A novel genetic variant in the apolipoprotein A5 gene is associated with hypertriglyceridemia. *Hum Mol Genet*, 2003, **12** (19): 2 533-539
- [13] Martin S, Nicaud V, Humphries SE, Talmud PJ (EARS group). Contribution of APO A5 gene variants to plasma triglyceride determination and to the response to both fat and glucose tolerance challenges. *Biochim Biophys Acta*, 2003, **1 637** (3): 217-225
- [14] Hubacek JA, Skodova Z, Adamkova V, Lanska V, Poledne R. The influence of APO AV polymorphisms (T-1131> C and S19> W) on plasma triglyceride levels and risk of myocardial infarction. *Clin Genet*, 2004, **65** (2): 126-130

(此文编辑 文玉珊)