

[文章编号] 1007-3949(2004)12-05-0577-04

•临床研究•

# 一家族性高胆固醇血症家系低密度脂蛋白受体基因突变分析

孙 屏, 郭冬平, 李晓宇, 陈 琪, 范乐明

(南京医科大学动脉粥样硬化研究中心, 江苏省南京市 210029)

[关键词] 分子生物学; 低密度脂蛋白受体外显子基因突变; 聚合酶链反应—单链构象多态性分析; 低密度脂蛋白受体; 家族性高胆固醇血症; 基因突变

[摘要] 为分析一家族性高胆固醇血症家系低密度脂蛋白受体的基因突变, 提取患儿及其父母外周血基因组 DNA, 用聚合酶链反应扩增低密度脂蛋白受体基因的 18 个外显子。用单链构象多态性分析检测聚合酶链反应产物, 对单链构象多态性分析电泳结果异常者进行 DNA 序列分析。结果发现, 单链构象多态性分析发现患者及其母亲第 10 外显子存在一异常条带。DNA 测序结果证实患者第 10 外显子的 471 位密码子由 AGA 同义突变为 AGG, 483 位密码子由 TGG 突变为 TAG, 导致在 483 位提前出现终止密码子。本研究利用聚合酶链反应—单链构象多态性分析方法报道了一个新的低密度脂蛋白受体突变位点。

[中图分类号] Q7

[文献标识码] A

## Analysis of Gene Mutation in the Low Density Lipoprotein Receptor Genes of one Familial Hypercholesterolemia Genealogy

SUN Ping, GUO Dong-Ping, LI Xiao-Yu, CHEN Qi, and FAN Le-Ming

(Atherosclerosis Research Center of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

[KEY WORDS] Low Density Lipoprotein Receptor; Familial Hypercholesterolemia; Gene Mutation; Polymerase Chain Reaction; DNA Sequencing

[ABSTRACT] **Aim** To analyse the mutation site in low density lipoprotein receptor (LDLR) gene of a familial hypercholesterolemia (FH) family. **Methods** The patients' serum lipids were analysed by enzymatic method. The peripheral whole blood was used to isolate the genomic DNA. The genomic DNAs were used as templates to amplify 18 exons of LDLR gene by polymerase chain reaction (PCR). The PCR products were analysed using polymerase chain reaction—single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) method and the exons showing abnormal band on PCR-SSCP were underwent DNA sequencing.

**Results** A synonymous mutation (AGA471AGG) and a nonsense mutation (TGG483TAG) were identified by PCR-SSCP combined with DNA sequencing. The nonsense mutation (TGG483TAG) introduced a beforehand stop codon in codon 483.

**Conclusion** A novel mutation of LDLC gene was detected by the PCR-SSCP methods.

流行病学和临床研究资料表明, 胆固醇在动脉粥样硬化和冠心病的发生发展过程中扮演着重要而直接的角色<sup>[1]</sup>。家族性高胆固醇血症 (familial hypercholesterolemia, FH) 是一种较为常见的常染色体显性遗传病, 其发病机制主要是由于低密度脂蛋白受体 (low density lipoprotein receptor, LDLR) 基因发生突变, 纯合子 FH 患者 LDLR 功能完全缺乏, 杂合子 FH 患者的 LDLR 功能减半, 致使体内低密度脂蛋白不能正常代谢, 导致血浆胆固醇浓度升高并在组织内过度积聚<sup>[2]</sup>。目前最大的 FH 数据库已显示世界

各地陆续发现 LDLR 基因突变的种类已有 700 余种, 包括各种点突变、小片段或大片段缺失、插入或重排<sup>[3]</sup>。本研究对一例临床诊断为 FH 的患者及其父母进行了研究。为了明确诊断, 应用聚合酶链反应—单链构象多态性分析 (polymerase chain reaction—single strand conformation polymorphism, PCR-SSCP) 结合 DNA 序列测定从基因水平对患儿及其父母的 LDLR 基因进行了检测。

## 1 对象和方法

### 1.1 研究对象

先证者女, 18 岁, 汉族, 安徽籍。出生后不久发现臀部有绿豆大小黄色丘疹, 固定, 不活动, 无压痛等不适, 未予注意, 增长缓慢。后继续在身体其它部位长出多个黄色丘疹, 分布于肘关节、指关节、膝关

[收稿日期] 2003-12-25 [修回日期] 2004-05-24

[基金项目] 国家自然科学基金 (39970310) 资助

[作者简介] 孙屏, 硕士研究生, 研究方向为脂代谢的分子机制。范乐明, 教授, 博士研究生导师, 主要从事动脉粥样硬化的病理生理学分子机制和基因治疗方面的研究, E-mail 为 lmfan@njmu.edu.cn。陈琪, 奥地利 Graz 大学生物化学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事动脉粥样硬化发生的分子机制和信号转导方面的研究。

节、两臀部,呈对称性分布,生长缓慢,无自觉不适症状。曾就诊于当地皮肤科,先后以冰冻、激光等方法治疗过。但近2~3年发现丘疹数目增多,增大,尤以臀部的丘疹明显增大。两眼睑、颈部皮肤处也陆续长出绿豆大小的黄色丘疹。平时时常有头晕、眼花,运动后胸闷。查体:精神佳,智力及体格发育正常。无角膜环。眼睑、颈后皮肤、双肘关节、腕关节、掌指关节、指指关节、膝关节等多处有散在分布的约1 cm×1 cm大小的黄色丘疹,边缘清,固定无活动,质韧,无触痛,关节活动正常。臀部有对称性分布的约15 cm×15 cm大小的肿块,稍隆起于皮肤表面,无触痛。其余无异常。患者父母无常规体检,是表兄妹结婚。

## 1.2 血脂分析

空腹12 h后于清晨采集患者及其父母的静脉血,血浆总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDLC)的测定采用标准酶法,北京中生生物高科技公司试剂盒测定。LDLC由上述数据按Friedewald公式计算<sup>[4]</sup>。

## 1.3 基因组DNA的制备

采用 wizard genomic DNA Purification Kit (Promega 产品)按说明书操作步骤提取患者外周血基因组DNA。

## 1.4 聚合酶链反应

选取外显子与内含子相邻的序列,按参考文献[5]设计LDLR基因的18个外显子的引物,引物由上海生工生物技术有限公司合成。PCR扩增条件为94℃预变性5 min→94℃变性30 s→50℃~57℃退火30 s→72℃延伸30 s,共进行30个循环,末次72℃延伸5 min,最后4℃保存。PCR扩增产物用1.5%琼脂糖凝胶电泳分析鉴定。

## 1.5 单链构象多态性分析

通过PCR扩增所期望的SSCP模板后,其产物(10 μL)与相同体积的SSCP上样缓冲液(95%甲酰胺、20% EDTA、0.05%溴酚蓝)混和。然后,样品于100℃变性10 min并直接置冰浴上。电泳常规分别在两个条件下进行<sup>[6]</sup>。第1个凝胶由10%丙烯酰胺(丙烯酰胺:双丙烯酰胺G=49:1)、2.5%~10%甘油、1×TBE、TEMED和10%过硫酸胺组成。该凝胶上的样品在室温下,电压100 V、用1×TBE电泳缓冲液电泳10 h以上。应用冷却扇维持恒温。第2个凝胶成分与第1个凝胶相同,但它不含甘油而且电泳在4℃下进行。电泳结束后作硝酸银染色。拍照保存并重复三次。

## 1.6 聚合酶链反应产物T/A克隆

对SSCP分析出现异常单链构象带的外显子,先用PCR产物纯化试剂盒(Promega公司)对其PCR产物进行纯化。再用pGEM-T Easy (Promega产品)对纯化的PCR产物进行连接反应,4℃过夜转入JM109感受态细胞。10 μL菌液均匀涂布于含氨苄青霉素的LB平板上,37℃孵育12 h后挑取单个阳性菌落种在5 mL含氨苄青霉素的LB培养基中,200 r/min,37℃摇菌过夜。

## 1.7 测序分析

将PCR鉴定的阳性克隆菌液送上海博亚生物技术有限公司对第10外显子进行DNA序列分析。

# 2 结果

## 2.1 血脂水平

患者及其母亲的血浆TC和LDLC明显高于正常水平,HDLC低于正常水平(表1, Table 1),临床诊断为“家族性高胆固醇血症”。患儿母亲时常出现头晕、胸闷等症状,无黄色瘤等病变。患儿父亲无明显症状和体征。

表1. 家族性高胆固醇血症家系成员表型分析 (mmol/L)

Table 1. Phenotype of individuals in the FH family

成员	年龄	TC	TG	LDLC	HDLC	黄色瘤	冠心病
父	46	4.14	0.56	3.70	1.05	-	-
母	39	9.50	1.42	8.70	0.66	-	-
女	18	9.18	0.96	8.60	0.66	+	?

## 2.2 琼脂糖凝胶电泳

该家系及正常对照的第10外显子PCR反应产物长度符合已知序列大小(图1, Figure 1)。

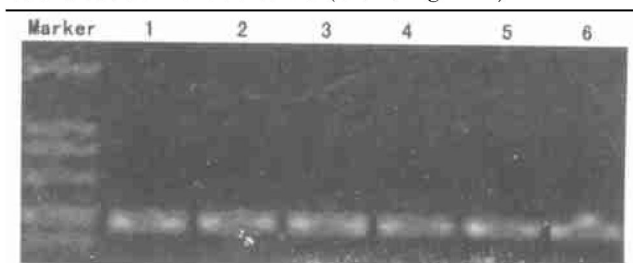


图1. 低密度脂蛋白受体基因外显子10的琼脂糖凝胶电泳图谱 1、2和3为正常对照,4、5和6分别为女、母和父;M为DL2000分子量标准,显示2000、1000、750、500、250及100 bp 6条带。外显子10扩增片段为228 bp。

Figure 1. Schematic illustration of exon 10 of LDLR gene

### 2.3 低密度脂蛋白受体基因的突变

患者及其母亲第 10 外显子有一异常多余条带 (图 2, Figure 2)。患者第 10 外显子存在两个点突变: 471 位密码子发生 AGA-AGG 碱基替换, 对照氨基酸密码子表属同义突变, 483 位密码子发生 TGG-

TAG 碱基替换, 对照氨基酸密码子表属无义突变, 导致提前出现终止密码子 (图 3, Figure 3)。由此突变基因生成的 LDLR 将缺乏部分 EGF 相似区、O-糖链区、跨膜区和胞质区, 成为截短的 LDLR。

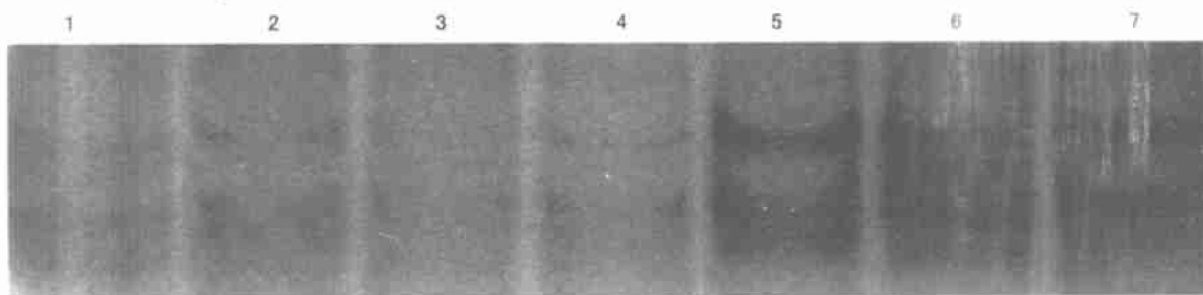


图 2. 低密度脂蛋白受体基因外显子 10 的单链构象多态性电泳图

1、3 为女; 6 为母, 均出现异常条带; 2 为父; 其余各泳道为正常对照。

Figure 2. SSCP pattern of exon 10 of LDLR gene

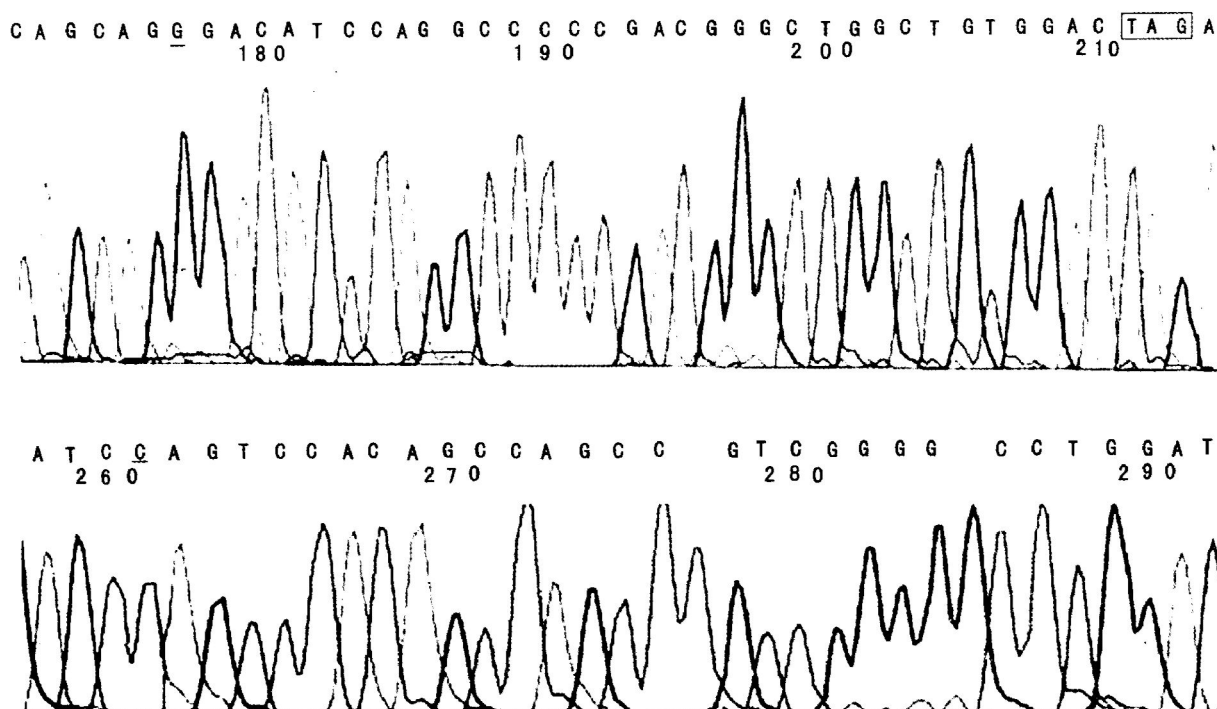


图 3. 低密度脂蛋白受体基因第 10 外显子部分测序结果

上图为患儿及母 212 位 G 突变为 A, 177 位 A/G 置换; 下图为父的反向测序, 261 位为 C, 正向为 G, 对应图 3 中 212 位 G

Figure 3. Sequence analysis of exon 10 of LDLR gene

### 3 讨论

低密度脂蛋白受体(LDLR)基因位于第 19 号染色体的短臂上, 含有 18 个外显子和 17 个内含子, 外显子编码 860 氨基酸。LDLR 在结构上可分 5 个区域: 1 为配体结合域, 由第 2~6 号外显子编码; 2 为表皮生长因子前体同源域, 由第 7~14 号外显子编码, 为受体与配基在胞浆内吞体中的酸依赖性解离所必需, 同时该域还为配体结合域处于适当的位置

提供了方便, 使之能在细胞膜上结合 LDL; 3 为 O-连接糖域, 由外显子 15 编码; 4 为跨膜域, 由第 16 外显子和第 17 外显子的 5' 端编码; 5 为胞浆域, 由第 17 外显子的其余部位和第 18 外显子 5' 端编码。根据结构和功能的关系, 发生在以上不同的结构域的基因突变会导致受体表现不同类型的功能障碍。有人将 LDLR 突变分 5 种类型: 不表达等位基因、转运缺陷型等位基因、结合缺陷型等位基因、内移缺陷型等位基因和再循环缺陷型等位基因<sup>[5]</sup>。因此, 可以根

据受体功能的障碍类型大致判断突变在受体对应的结构域。

该家系的患儿根据临床症状及血脂检查结果可诊断为纯合子 FH。PCR-SSCP 结合 DNA 测序结果发现患者及其母亲的第 10 外显子的第 553 个密码子(TAC)上的 C 替换为 G, 导致第 553 位提前出现了终止密码子 TAG, 从而不能表达正常的 LDLR, 即没有正常的表皮生长因子前体同源域, 缺失含糖域、跨膜域和胞浆域, 可能导致 LDL 不能正常结合和转运等, 使体内胆固醇的代谢发生障碍。目前最大的 FH 数据库([www. ucl. ac. uk. /fh](http://www.ucl.ac.uk/fh))显示世界各地陆续发现 LDLR 基因突变的种类已有 700 余种, 包括各种点突变、小片段或大片段缺失、插入或重排。突变遍布启动子、内含子、外显子区域, 但主要发生在配体结合区(42%)和表皮生长因子前体同源区(47%)。经查询对比, 该数据库未包括本文报告的突变类型。本方法可以筛选出外显子区域的各种突变, 具有明显的实用价值。当然也不能完全排除还有某些对 LDLR 功能有影响的突变存在于非外显子区域, 如大片段的缺失和重排, 这些可考虑采用 Southern blotting 等方法检测<sup>[7]</sup>。

流行病学调查表明, 中国 FH 杂合子的临床表现要比西方 FH 杂合子轻得多, 这可能与传统的低脂饮食及一些“降脂”基因有关<sup>[7]</sup>。在本家系患者中, 其血浆 TC 明显低于西方国家 FH 杂合子患者的水平。因此, 探讨中国 FH 杂合子体内是否具有对抗动脉硬化的机理将是一项非常有意义的研究。在本家系血脂检查结果中, 患者及其母的 HDLC 水平都低于正常水平, 且在本实验室收集的多个家系血

脂水平可以看到, HDLC 水平变化范围较大, 可见这一临床表现是由多基因如 ABCA1、LCAT、CETP 等和环境因素如饮食、生活习惯等共同作用的结果<sup>[8]</sup>。随着人类基因组序列图的最终完成, 大量基因组多态性的发掘, 利用常见多态性与复杂临床表型关联性的原理, 可以对这些相关基因中的常见多态性进行关联分析, 寻找与疾病易感性相关联的遗传标记<sup>[9]</sup>, 可以用于早期的人群普查。在相关基因中来寻找遗传标记, 运用关联分析来分析这些基因水平的遗传标记是否与临床表现有着关联性。

#### [参考文献]

- [1] 史若飞, 陈运贞. 降低血清胆固醇防治冠心病的现代概念. 中国动脉硬化杂志, 2000, 8 (1): 87-90
- [2] Goldstein JL, Hobbs H, Brown MS. Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Hum Mutat*, 1992, 1 (6): 445-66
- [3] Heath KE, Gahan M, Whittall RA, Humphries SE. Low density lipoprotein receptor gene (LDLR) world-wide website in familial hypercholesterolemia; update, new features and mutation analysis. *Atherosclerosis*, 2001, 154: 243-246
- [4] Friedewald WT, Levy RL, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem*, 1972, 18 (6): 499-502
- [5] Leitersdorf E, Tobin EJ, Hobbs HH, Davignon J. Common low density lipoprotein receptor mutations in the French Canadian population. *J Clin Invest*, 1990, 85 (4): 1 014-023
- [6] Orita M, Iwahara H, Kanazawa H. Detection of poly-morphisms of human DNA by gel electrophoresis as single strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989, 86: 2 766
- [7] Bertolini S, Cassanelli S, Garuti R, Ghisellini M, Simone ML, Rollerli M. Analysis of LDL receptor mutations in Italian Patients with homozygous familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999, 19: 408-418
- [8] 曾武威, 陈保生. 胆固醇脂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
- [9] Doris Peter A. Hypertension Genetics, Single Nucleotide Polymorphisms, and the Common Disease: Common Variant Hypothesis. *Hypertension*, 2002, 39: 323-331

(此文编辑 文玉珊)