

三磷酸腺苷结合盒转运子 A1 基因多态性 R219K 与脂代谢及冠心病易感性的相关性

孙 屏, 李晓宇, 郭冬平, 陈 琪, 范乐明

(南京医科大学动脉硬化研究中心, 江苏省南京市 210029)

[关键词] 病理学与病理生理学; 三磷酸腺苷结合盒转运子 A1 R219K 与冠心病易感性相关联; 聚合酶链反应—限制片长多态性; 单核苷酸多态性; 脂代谢; 冠心病易感性; 家族性高胆固醇血症

[摘要] 目的 探讨三磷酸腺苷结合盒转运子 A1 基因 R219K 单核苷酸多态性位点与脂代谢和冠状动脉粥样硬化性心脏病易感性的关系。方法 采用聚合酶链反应—限制片长多态性方法检测 133 名正常人和 49 名家族性高胆固醇血症患者三磷酸腺苷结合盒转运子 A1 基因相应片段的多态性。结果 家族性高胆固醇血症患者组三磷酸腺苷结合盒转运子 A1 219K 等位基因频率显著低于正常人群($P=0.0001$)。家族性高胆固醇血症患者组中, K 等位基因携带者组(RK 基因型+ KK 基因型组)与 RR 基因型组比较, 甘油三酯水平明显降低(1.14 ± 0.55 mmol/L 比 1.76 ± 0.58 mmol/L, $P=0.001$), 高密度脂蛋白胆固醇水平有增高趋势(1.39 ± 0.54 mmol/L 比 1.21 ± 0.32 mmol/L, $P=0.061$)。结论 三磷酸腺苷结合盒转运子 A1 基因 R219K 多态性中, 219K 等位基因与家族性高胆固醇血症患者甘油三酯水平降低和高密度脂蛋白胆固醇水平增高相关联, 可能对家族性高胆固醇血症患者不早起冠心病起保护作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The Association of ATP Binding Cassette Transporter 1 Gene R219K Common Variant with Lipid Metabolism And the Risk of Coronary Atherosclerotic Heart Disease

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

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

[KEY WORDS] Single Nucleotide Polymorphism; Lipid Metabolism; Coronary Atherosclerotic Heart Disease Susceptibility; Familial Hypercholesterolemia; ATP Binding Cassette Transporter 1 Gene; Association Study

[ABSTRACT] **Aim** To examine the distribution of R219K polymorphism of ATP binding cassette transporter 1 (ABCA1) gene in Chinese population and to investigate the association of the SNP with lipid metabolism and the susceptibility to coronary atherosclerotic heart disease. **Methods** The target fragments of ATP binding cassette transporter 1 gene was amplified and analyzed by polymerase chain reaction (PCR)-restriction fragment length polymorphism (RFLP) technique in 133 unrelated normal control individuals and 49 familial hypercholesterolemia (FH) patients. The statistical analysis was implemented in statistical package SPSS. **Results** The observed allele frequencies were in accord with Hardy-Weinberg equilibrium. The frequency of ATP binding cassette transporter 1 219K allele was significantly higher in controls than that in FH patients ($P=0.0001$). Compared with the FH patients without 219K, the FH patients with 219K exhibited a significant decrease in plasma triglyceride concentration (1.14 ± 0.55 mmol/L vs 1.76 ± 0.58 mmol/L, $P=0.001$), and a trend of increase in plasma high density lipoprotein cholesterol concentration (1.39 ± 0.54 mmol/L vs 1.21 ± 0.32 mmol/L, $P=0.061$). **Conclusions** 219K polymorphism of ABCA1 gene was associated with higher high density lipoprotein cholesterol level and lower triglyceride level in FH patients and exert protective role for premature CHD in FH patients.

人群流行病学研究发现血浆高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDLC) 水平与冠心病 (coronary heart disease, CHD) 呈高度负相

关, 低血浆 HDLC 水平是早发动脉粥样硬化的一项独立危险因素。血浆 HDLC 水平受多种因素影响, 许多遗传和环境因子参与其中。ATP 结合盒转运子 A1 (ATP binding cassette transporter 1, ABCA1) 是一种整合膜蛋白, 它在胆固醇逆转运 (reverse cholesterol transport, RCT) 和 HDL 形成的起始步骤中起重要作用, 介导胆固醇从外周细胞向肝脏转运使之最终代谢, 被称作 RCT 守门人^[1,2]。ABCA1

[收稿日期] 2004-06-29 [修回日期] 2004-12-31

[基金项目] 江苏省卫生厅科技基金会重大科研课题(H200218)

[作者简介] 孙屏, 医学硕士, 研究方向为动脉粥样硬化。通讯作者范乐明, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化, 联系电话为 025-86862888, E-mail 为 lmfan@njmu.edu.cn。

功能障碍将导致细胞内胆固醇流出受阻,特别是巨噬细胞内大量的胆固醇沉积可形成泡沫细胞,促进动脉粥样硬化的发生。最近国外的一些研究表明,ABCA1 基因常见多态性与血浆脂质水平和 CHD 易感性有着一定的关联性,其中 R219K 多态性在不同人群中表现为与降低的 CHD 危险性相关联^[3,4]。国内尚无对这一多态性的相关研究。本文对江苏汉族健康人群和 CHD 高发人群家族型高胆固醇患者(familial hypercholesterolemia, FH) ABCA1 基因的 R219K 多态性进行检测,并探讨其与血脂水平的关系。

1 对象和方法

1.1 研究对象

正常对照组为无血缘关系的江苏汉族健康个体 133 名,其中男 71 名,女 62 名,平均年龄 26 ± 2 岁,均来自南京医科大学研究生入学体检健康个体,经询问病史、体检、心电图及胸部 X 线摄片等检查排除心血管疾病病史。FH 组为本室保存的 FH 病人基因组 DNA,共 49 份,其中男 29 名,女 20 名,平均年龄 28 ± 2 岁。入选标准是基因水平上确诊的低密度脂蛋白受体(low density lipoprotein receptor, LDLR) 突变杂合子或纯合子个体。

1.2 血脂分析

空腹 12 h 后采外周静脉血,EDTA 抗凝后分离血清。采用胆固醇、甘油三酯和高密度脂蛋白胆固醇测定试剂盒(北京中生生物高科技公司)测定病人外周血总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)和高密度脂蛋白胆固醇水平。低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDLC)的测定按照以下方法进行,即选择性沉淀血清中低密度脂蛋白,其浓度从总胆固醇与沉淀后上清液胆固醇浓度之差求出。每次测定均测复管,取平均值。

1.3 基因组 DNA 提取及聚合酶链反应扩增

空腹静脉血以 EDTA 抗凝,以外周血基因组 DNA 提取试剂盒(CASquick Blood DNA Isolation Kit,上海中科开瑞生物芯片科技股份有限公司)提取 DNA。聚合酶链反应扩增 ABCA1 基因 R219K 位点,引物根据 ABCA1 基因组序列(GeneBank 登录号,Accession Number: NM_005502)并参照文献[3]合成。5'-GCA AGG CTA CCA GTT ACA TTT GAC AAG-3', 5'-GAT TGG CTT CAG GAT GTC CAT GTT GG-3'(由上海申友生物技术有限责任公司合成)。聚合酶链反应扩增反应在 PTC-200 热循环仪上进行,扩增参数为:95℃预变性 4 min → 95℃变性 45~60 s, 56℃~65℃退火

30~45 s, 72℃延伸 30~45 s, 30~35 个循环;最后 72℃延伸 5~7 min。扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测记录。

1.4 聚合酶链反应—限制片长多态性

采用聚合酶链反应—限制片长多态性(polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)方法检测 ABCA1 基因 R219K 位点多态性。上述聚合酶链反应产物用限制性内切酶 XagI(MBI, Fermentas) 37℃酶切过夜。反应液终体积 20 μL: PCR 反应产物 8 μL、XagI 内切酶 10 u。酶切产物用 DNA 长度标准物 2 000 (DNA Marker DL 2 000, TaKaRa 公司产品)在 2% 琼脂糖凝胶中进行同步电泳,溴乙锭染色,在 UVP 凝胶成像系统下观察电泳结果并确定基因型。

1.5 统计学处理

采用 HWE 软件检验基因型的 Hardy-Weinberg 平衡吻合度,正常对照组和家族型高胆固醇患者组间等位基因频率和基因型频率差异的显著性用 SPSS 11.0 软件 χ^2 检验, FH 患者不同基因型组内血脂水平差异的显著性及正常对照组内 BMI 水平差异的显著性用 *t* 检验。

2 结果

2.1 三磷酸腺苷结合盒转运子 A1 基因 R219K (G1051A) 位点多态性分析

R219K 多态性位点的 PCR 扩增产物长 166 bp,经 XagI 酶切后, K 等位基因被切为 101 bp 和 65 bp 两个片段,而 R 等位基因由于无酶切位点仍为一个 166 bp 的片段(图 1, Figure 1)。这样存在 3 种可能的基因型:纯合子 RR(166 bp)、杂合子 RK(166 bp, 101 bp 和 65 bp)、纯合子 KK(101 bp 和 65 bp)。

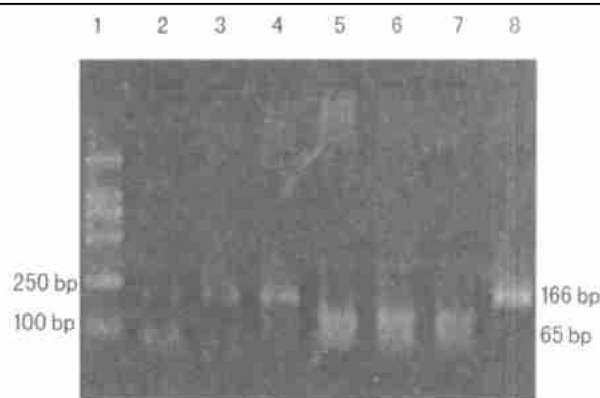


图 1. R219K 多态位点片段聚合酶链反应扩增后酶切结果
1 为 DL 2 000 分子量标准, 2、3 和 4 为 RK 杂合子, 5、6 和 7 为 KK 纯合子, 8 为 RR 纯合子。

Figure 1. Electrophoresis results of PCR-RFLP analysis of R219K locus

2.2 三磷酸腺苷结合盒转运子 A1 基因 R219K (G1051A) 位点基因型频率和等位基因频率分布

在正常对照组中, 两种等位基因片段的频率分别为 56.8% (219R) 和 43.2% (219K), 而在 FH 组中分别为 80.6% (219R) 和 19.4% (219K)。经 HWE 软件进行 Hardy-Weinberg 吻合度检验, R219K 位点基因型个体数的观察值和期望值差异无显著性, 表明等位基因频率分布符合 Hardy-

Weinberg 平衡。R219K 位点等位基因频率以及基因型频率见表 1 (Table 1), 其中等位基因频率分布经 χ^2 检验, 在正常对照组和 FH 组间差异有显著性 ($P=0.001$), 基因型频率 219KK/RR 和 219RK+KK/RR 两组间比较经 χ^2 检验后差异也有显著性 ($P=0.002$, $P=0.00001$), 主要表现在对照组的 219K 基因频率和 219KK 及 219RK+KK 基因型频率显著高于 FH 组。

表 1. 三磷酸腺苷结合盒转运子 A1 基因 R219K 多态位点基因型和等位基因频率分布

Table 1. Allele and genotype frequency distributions of ABCA1 gene R219K polymorphism

分 组	n	基因型				等位基因	
		RR	RK	KK	RK+ KK	R	K
对照组	133	47(34.6%)	57(42.9%) ^a	29(21.8%)	86(65.2%)	151(56.8%)	115(43.2%)
FH 组	49	34(69.4%)	11(22.4%)	4(8.2%)	15(30.6%) ^b	79(80.6%)	19(19.4%)

a: $P=0.002$ (95% CI: 0.06~0.58), b: $P=0.0001$ (95% CI: 0.117~0.478), 与 RR 基因型比较。

2.3 家族性高胆固醇血症组 R219K 位点基因型与脂代谢变化的相关性分析

将 FH 组分等位基因 K 携带者和非 K 携带者两个亚组, 比较两个亚组之间血脂水平的差异 (表 2, Table 2)。t 检验结果表明, 在 FH 患者中, K 等位基因携带者组 TG 水平明显低于非 K 携带者组 ($P=0.001$)。HDLc 水平在等位基因 K 携带者和非 K 携带者组之间趋向差异有显著性 ($P=0.061$), K 携带者组的 HDLC 水平比非 K 携带者组有增高趋势。LDLC 和 TC 水平在各基因型亚组间差异无显著性。

表 2. 血脂水平在家族性高胆固醇血症组中 219K 有与无的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2. Comparison of plasma lipid levels between 219K and non-219K in FH patients

分组	n	TG (mmol/L)	TC (mmol/L)	LDLC (mmol/L)	HDLC (mmol/L)
RR	34	1.76 ± 0.58 ^a	9.52 ± 4.56	7.23 ± 4.66	1.21 ± 0.32 ^b
RK	15	1.14 ± 0.55	8.77 ± 4.67	6.80 ± 4.80	1.39 ± 0.54
KK					

a: $P=0.001$, b: $P=0.061$, 与 RR 基因型比较。

3 讨论

高密度脂蛋白(HDL)在早发性冠心病的发生发展中是个主要的独立危险因素。HDL 的主要抗动脉粥样硬化的功能可能与它促进胆固醇从外周细胞转运到肝脏(即胆固醇的逆向转运)有关。而 AB-

CA1 在胆固醇从外周细胞流出和 HDL 生成的起始步骤中起重要作用^[2]。国外已有不少研究报道了 ABCA1 基因突变常导致 HDL 胆固醇水平降低, TG 增高, 胆固醇流出减少以及增加冠心病危险性^[5,6]。此外, 也有一些研究也表明, ABCA1 基因上的一些单核苷酸多态性影响血浆脂质水平和冠心病的危险性。其中明确的是 R219K 多态性已经被报道与低血浆 TG 水平和降低的冠心病危险性相关^[3], 这与 ABCA1 活性功能增强, 胆固醇逆转运增加相一致。

家族性高胆固醇血症患者是由于其 LDLR 基因缺陷而导致血浆 LDLc 水平明显增高, 成为冠心病的高危人群。本实验室已有多个研究报道了 LDLR 基因突变导致的 FH, 杂合子 FH 病人血脂水平、发生冠心病的年龄、冠心病的严重程度等临床表现与对照组比较差异显著^[7]。显然, 还存在其它的遗传和环境因素在影响 FH 的临床表现^[8,9]。ABCA1 基因 R219K 多态性可能是参与影响其临床表现的遗传因素之一。我们以及已有的一些研究都报道了 ABCA1 基因特别是 R219K 基因多态性与 FH 早发冠心病的风险和 HDL 胆固醇水平相关, 但这一临床表现还存在其他遗传因素的相互作用, 更多遗传或环境因素的进一步深入研究将有助于我们进一步预防或减缓 FH 病人冠心病的发生, 为早期诊断和治疗 FH 病人提供信息。

在 FH 病人中, ABCA1 基因 R219K 这个多态性位点对病人临床表现的影响可能表现为 K 携带者发生动脉粥样硬化的进程延缓, 发生冠心病的年

龄推迟。文献[3]表明,在未早发冠心病的FH患者中,K等位基因的频率显著高于早发冠心病的FH组。我们的研究也表明,K等位基因在正常人群中的频率显著高于FH组,与以上研究结果相一致。可见,R219K多态性中K等位基因对早发冠心病是个保护因子。

在FH患者各基因型亚组间进行血脂比较发现,HDL胆固醇水平在K携带者和非K携带者两亚组间趋向于有显著性差异,可能K等位基因在发挥抗动脉粥样硬化性冠心病易感性的保护作用的同时,对血浆HDL胆固醇水平的影响较小。这提示K等位基因的抗粥样硬化功能不仅仅通过血浆HDL胆固醇水平来体现,还通过HDL的其它机制如抗LDLC氧化修饰和抗血小板黏附等作用来实现。另外,FH组研究样本量比较少,不能排除样本的偏倚和抽样误差,仍需积累更多的病例进行研究证实。

本研究结果发现,FH患者各基因型亚组间TG水平差异存在显著性($P=0.005$),K携带者和非K携带者间TG水平差异也存在显著性($P=0.001$)。K携带者组的TG水平明显低于非K携带者组,其中的机制目前还不清楚。胆固醇酯转运蛋白(cholesterol ester transfer protein, CETP)的功能是使脂蛋白颗粒的核心成分平衡,介导HDL中的胆固醇酯转运到富含TG的脂蛋白,同时转运富含TG脂蛋白中的TG至HDL中。ABCA1活性增强可增加血浆HDL胆固醇水平,促进脂蛋白间胆固醇酯与TG的交换。肝脂肪酶有效水解HDL中的TG,这样增加TG转运到HDL,最终增加了TG的分解代谢,从而降低了血浆TG水平^[10]。另外,也有报道说增加ABCA1活性可以改变细胞内胆固醇和磷脂代谢,导致脂肪酸从TG合成转向磷脂合成,使肝脏合成分泌的TG减少,使血浆TG水平降低^[11]。近

年来越来越认识到TG在冠心病的发生发展中也是主要的独立危险因子,而R219K多态位点还可通过对TG的影响而延缓冠心病的发生。

总之,本研究结果表明,ABCA1基因R219K多态性在FH组和正常对照组中的分布存在显著性差异,R219K多态性可能通过影响血浆HDL胆固醇和TG水平或直接影响胆固醇逆转运速率来影响冠心病的易感性。

[参考文献]

- [1] 许竹梅. ATP结合盒转运子调节细胞内胆固醇流出及对动脉粥样硬化的影响. 中国动脉硬化杂志, 2002, 10(5): 449-457
- [2] Oram JF. Tangier disease and ABCA1. *Biochem Biophys Acta*, 2000, 1529: 321-330
- [3] Cenarro A, Artieda M, Castillol S, Mozas P, Reyes G, Tejedor D, et al. A common variant in the ABCA1 gene is associated with a lower risk for premature coronary heart disease in familial hypercholesterolaemia. *J Med Genet*, 2003, 40: 163-168
- [4] Sath RS, Shengxu L, Wei C, Eric B, Gerald S, Berenson. R219K polymorphism of the ABCA1 gene and its modulation of the variations in serum HDLC and TG related to age and adiposity in white versus black young adults. *Metabolism*, 2003, 52(7): 930-934
- [5] Marciel M, Brooks-Wilson A, Clee SM, Roomp K, Zhang LH, Yu L, et al. Mutations in the ABC1 gene in familial HDL deficiency with defective cholesterol efflux. *Lancet*, 1999, 354: 1341-346
- [6] Clee SM, Kastelein JJ, van Dam M, Marciel M, Roomp K, Zwarts KY, et al. Age and residual cholesterol efflux affect HDL cholesterol levels and coronary artery disease in ABCA1 heterozygotes. *Clin Invest*, 2000, 106: 1263-270
- [7] Ferrieres J, Lambert J, Lussier-Cacan S, Davignon J. Coronary artery disease in heterozygous familial hypercholesterolemia patients with the same LDL receptor gene mutation. *Circulation*, 1995, 92: 290-295
- [8] Nicholls P, Young IS, Graham CA. Genotype/phenotype correlations in familial hypercholesterolemia. *Curr Opin Lipid*, 1998, 9: 313-317
- [9] Sijbrands EJ, Westerdorp RG, Paola L, Havekes LM, Frants RR, Kastelein JJ, et al. Additional risk factors influence excess mortality in heterozygous familial hypercholesterolaemia. *Atherosclerosis*, 2000, 149: 421-425
- [10] 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
- [11] Lawn RM, Wade DP, Garvin MR, Wang X, Schwartz K, Parter JG, et al. The Tangier disease gene product ABC1 controls the cellular apolipoprotein-mediated lipid removal pathway. *J Clin Invest*, 1999, 104: R25-R31

(此文编辑 朱雯霞)

•名词解释•

[文章编号] 1007-3949(2005)13-01-0016-01

[化学趋化因子 chemokine]

化学趋化因子是一类分泌型蛋白,具有刺激白细胞的化学趋化作用,其分子质量大多为8~10 kDa。这类蛋白均含一条多肽链,并含4个保守的半胱氨酸残基。根据最前面两个半胱氨酸的特征性结构,化学趋化因子可进一步分为4类:(1) α 类化学趋化因子具有保守的C-X-C基序(C代表保守的半胱氨酸,X代表任一氨基酸),主要是对中性粒细胞的化学趋化作用,如IL-8、NAP-2、Gro- α 、Gro- γ 、ENA-78和GCP-2;(2) β 类化学趋化因子具有相邻的半胱氨酸(C-C),主要是对单核细胞、嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞的化学趋化作用,如MCP-1-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 、eotaxin和RANTES;(3) γ 类化学趋化因子,C型,缺少第一个半胱氨酸,主要是对淋巴细胞的化学趋化作用,即淋巴细胞趋化蛋白(lymphotactin);(4) δ 类化学趋化因子在结构上为一类不同的膜锚定蛋白,具有C-X-X-X-C的基序,目前只在大脑中发现,即神经细胞趋化蛋白(neurotactin)。

(易光辉 编译)