

载脂蛋白 C3 基因多态性- 482C> T 与血浆脂质的关系

李国平, 陈保生, 薛红, 曾武威, 吴刚

(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
生物化学系医学分子生物学国家重点实验室脂蛋白组, 北京市 100005)

[关键词] 分子生物学; 载脂蛋白 C3 基因多态性研究; 聚合酶链反应-限制片段多态性; 载脂蛋白 C3; 基因多态性; 甘油三酯

[摘要] 目的 研究载脂蛋白 C3 基因上游调控区内- 482C> T 多态性位点与血浆脂质以及载脂蛋白水平的关系。方法 应用聚合酶链反应-限制片段多态性方法逐个鉴定每个个体的基因型, 并测定其血浆脂质和载脂蛋白水平。结果 - 482T 等位基因携带者具有较高的甘油三酯水平($P=0.044$); 同时该等位基因的携带者也具有较高的载脂蛋白 C2 水平($P=0.017$)。结论 载脂蛋白 C3 基因- 482C> T 位点和血浆甘油三酯以及其它几种脂蛋白密切相关。

[中图分类号] Q7

[文献标识码] A

Relationship Between the Polymorphism of Apolipoprotein C3 Gene - 482C> T and the Levels of Serum Lipids and Lipoproteins

LI Guo-Ping, CHEN Bao-Sheng, XUE Hong, ZENG Wu-Wei, and WU Gang

(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 C3; Gene Polymorphism; Triglyceride; Polymerase chain reaction-restriction fragments length polymorphisms

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the relationship between the polymorphism of apolipoprotein C3 gene - 482C> T and the levels of serum lipids as well as lipoproteins. **Methods** The genotypes of the subjects were determined by using polymerase chain reaction-restriction fragments length polymorphisms (PCR-RFLP), and the serum lipids and apolipoproteins were determined. **Results** The carrier with minor allele of - 482C> T have higher levels of serum triglycerides. At the same time the carrier with minor allele of - 482C> T have higher levels of serum apolipoprotein C3 and higher apolipoprotein C2. **Conclusions** The results strongly support that the single nucleotide polymorphisms, - 482C> T in apolipoprotein C3 gene, is related to the levels of serum triglyceride (TG) and high density lipoprotein cholesterol (HDL) and those of other several lipoproteins in the Chinese population.

载脂蛋白 C3 是由 79 个氨基酸残基组成单一的多肽链, 主要在肝脏中合成, 小肠中也有少量表达。转基因小鼠研究表明, 在小鼠中过度表达人载脂蛋白 C3 基因会使小鼠患有高甘油三酯(triglyceride, TG)血症, 如果小鼠中载脂蛋白 C3 基因被敲除则血浆 TG 水平只有正常小鼠的 70%^[1,2]。载脂蛋白 C3 主要存在于富含 TG 的极低密度脂蛋白(very low density lipoprotein, VLDL)和乳糜微粒(chylomicrons, CM)中, 载脂蛋白 C3 占此两类脂蛋白中的蛋白含量分别为 40% 和 36%。载脂蛋白 C3 通过抑制血管内皮细胞表面的脂蛋白脂肪酶(lipoprotein li-

pase, LPL) 以及肝脂酶(hepatic lipase, HL) 等酶和受体的活性来影响血浆富含 TG 脂蛋白的代谢^[1,2]。如果载脂蛋白 C3 表达失控就会累及脂蛋白脂肪酶等, 从而使 CM 和 VLDL 脂解的速度改变, 影响血浆 TG 的水平。

长期以来不少研究者均关注载脂蛋白基因与血浆血脂水平的关系^[3-5], 特别是载脂蛋白 C3 基因多态性与之的关系^[6,12]。- 482C> T 位点是位于载脂蛋白 C3 基因上游调控区胰岛素应答调控元件(insulin response element, IRE) 中的一个位点, 它的多态性变化与部分血浆脂质及载脂蛋白的水平密切相关, 然而不同实验室的研究结果又有差别^[6,7,9,11,12]。本课题组以中国汉族人群为对象, 分析了载脂蛋白 C3 基因- 482C> T 多态性位点与血浆脂质以及载脂蛋白的关系。

[收稿日期] 2004-05-17 [修回日期] 2004-11-25

[基金项目] 国家重大基础研究项目 973 项目(G-20000569-02)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。通讯作者陈保生, 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 市级科技成果奖, E-mail 为 capogene@yahoo.com。

1 对象与方法

1.1 研究对象

随机选自健康体检者 293 人, 男 146 名, 女 147 名, 年龄 45 ± 20 岁, 以上均为无血缘关系的浙江舟山地区汉族人。

1.2 试剂和主要仪器

限制性内切酶 *Msp* *iv* 购自深圳晶美生物工程有限公司(MBI 公司生产, 立陶宛); 玻璃奶纯化回收试剂盒购自北京博大泰克生物基因技术有限责任公司; *pftaq* 高保真 DNA 聚合酶(自产), dNTP、 Φ X174DNA/*Hae*III Markers 购自大连宝生物工程有限公司; 其它均为国产分析纯。DNA 扩增仪(PE9600 型, 美国珀金埃尔默公司), AU2700 全自动生化分析仪(奥林巴斯公司, 日本)。

1.3 引物设计与合成

载脂蛋白 C3 上游引物 5' GGATTGAAACCCA-GAGATGGAGGTG 3', 下游引物 5' TTCACACTG-GAATTCAGGCC3', 由上海生物工程技术服务有限公司合成。

1.4 模板 DNA 的提取

采用改良的碘化钠法^[13], 参照 Loparev 等法加以改良。取全血 100 μ L 加无菌双蒸水 100 μ L 混匀, 加 6 mol/L NaI 200 μ L 涡旋震荡 30 s, 加等体积氯仿/异戊醇(24:1), 涡旋震荡 30 s, 离心后取上清加 0.6 体积异丙醇混匀, 室温(或 4 $^{\circ}$ C)静置 15 min, 离心后沉淀以 37% 异丙醇洗 1 次, 晾干后溶于 TE 中。以上两法提取 DNA 经紫外分光光度计定量后, 置 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.5 聚合酶链反应—限制片长多态性方法

反应总体系 20 μ L, 10 \times buffer 2 μ L, dNTP 200 μ mol/L, 正向引物、反向引物各 0.5 μ mol/L, 50 ng 基因组 DNA, *pftaq* 高保真 DNA 聚合酶 0.5 u。将反应物置 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min。按 94 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 62 $^{\circ}$ C 退火 20 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 20 s, 循环 30 次。末次循环后延伸 3 min。20 μ L PCR 扩增产物, 加入 10 单位限制性内切酶 *Msp* *iv*, 37 $^{\circ}$ C 消化过夜。酶切产物用 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离鉴定。

1.6 聚合酶链反应产物测序

随机挑选部分 PCR 产物, 经 3% 琼脂糖凝胶电泳后切胶回收, 送上海博亚生物技术有限公司测序。

1.7 血脂及载脂蛋白的测定

酶法测定总胆固醇和 TG; 选择遮蔽直接测定法测定高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDLC); 直接测定法测定低密度脂蛋白胆

固醇(low density lipoprotein, LDLC); 双波长免疫透射比浊法测定载脂蛋白 A1、载脂蛋白 A2、载脂蛋白 B、载脂蛋白 C2、载脂蛋白 C3、载脂蛋白 E 及脂蛋白(a); 体质指数(body mass index, BMI) 等于体重(kg)除以身高(m)的平方。

1.8 统计学处理

研究对象与 Hardy-Weinberg 平衡符合程度, 组间基因型及等位基因频率比较采用 χ^2 检验; 组间血脂水平比较采用 ANOVA 和 ANCOVA 检验; 多元线性回归分析检测载脂蛋白 C3 - 482C> T 多态性位点对不同血脂参数及载脂蛋白是否有显著性影响。

2 结果

2.1 载脂蛋白 C3 基因- 482C> T 多态性

样品基因型的分布符合 Hardy-Weinberg 平衡。载脂蛋白 C3 基因- 482C> T 多态性扩增片段为 230 bp, 酶切后片段应有 4 种, 为 162 bp、146 bp、68 bp 和 16 bp。若为 - 482C/C, 有 *Msp* *iv* 酶切位点, 可见 146 bp、68 bp 和 16 bp 三条带; 若为 - 482T/T, 无 *Msp* *iv* 酶切位点, 可见 162 bp 和 68 bp 两条带; 若为 - 482C/T 杂合, 则可见 162 bp、146 bp、68 bp 和 16 bp 四条带(图 1, Figure 1)。然而由于 16 bp 的核酸序列太短, 电泳之后, 很可能已经泳出凝胶进入到电泳液或者经溴化乙锭染色以后肉眼难以分辨出来, 但这并不影响结果的判定。

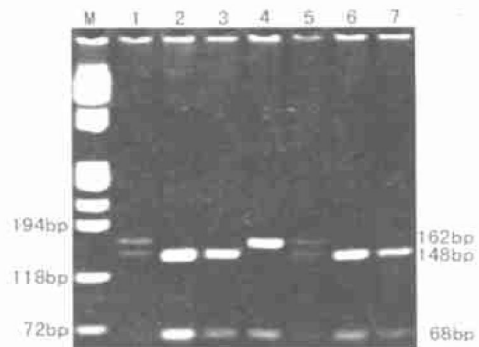


图 1. 载脂蛋白 C3 基因- 482C> T 多态性分析 M 为 Φ X174DNA/*Hae*III Markers; 1、5 为酶切产物 *Msp* *iv*(+/-) 杂合子; 2、3、6、7 为酶切产物 *Msp* *iv*(+/+) 纯合子; 4 为酶切产物 *Msp* *iv*(-/-) 纯合子。

Figure 1. - 482C> T polymorphism of apolipoprotein C3 gene determined by PCR-RFLP analysis

图 2、3、4 (Figure 2, 3 and 4) 分别显示了载脂蛋白 C3-482C/T 纯合野生型序列、纯合突变型序列及异源杂合型序列。

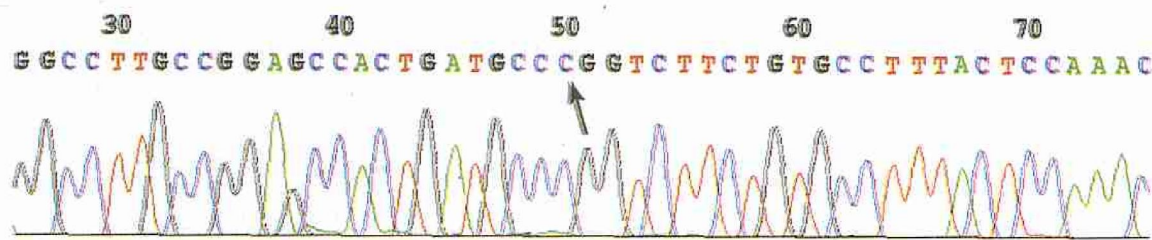


图 2. Msp iv(+ / +) 纯合基因型序列

Figure 2. Homozygous Msp iv(+ / +) genotype sequence

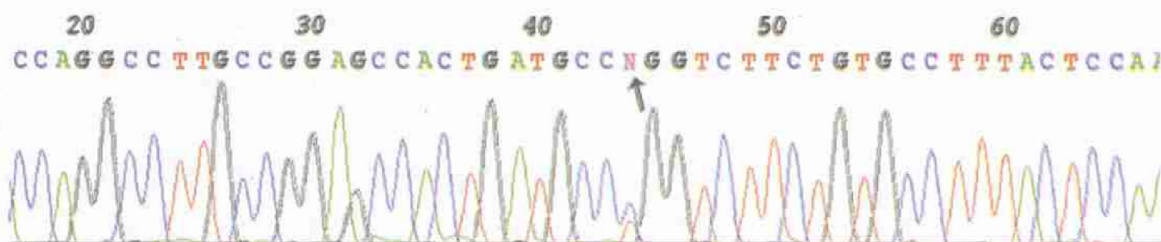


图 3. Msp iv(+ / -) 杂合基因型序列 N 表示该位点是 C/T 杂合。箭头指示-482C>T 多态性位点所在位置。

Figure 3. Heterozygous Msp iv(+ / -) genotype sequence

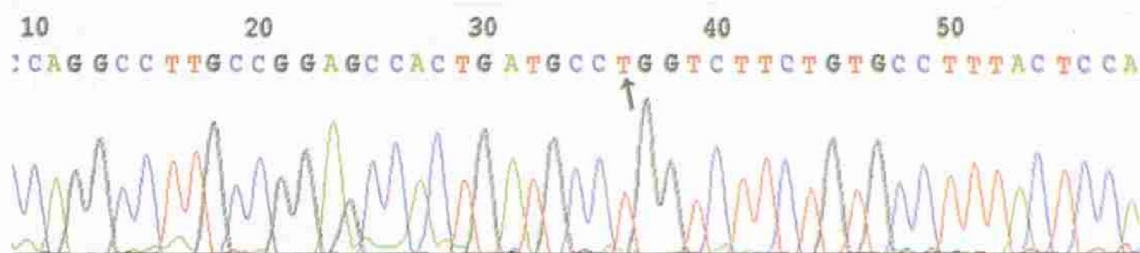


图 4. Msp iv(- / -) 纯合基因型序列

Figure 4. Homozygous Msp iv(- / -) genotype sequence

2.2 载脂蛋白 C3 基因多态性与血浆脂质的关系

该人群中-482C>T 多态性位点的基因频率符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡规律, 具有群体代表性。根据-482C>T 多态性位点的基因型进行分组, 在三组之间进行方差分析和协方差分析, 结果发现-482C/T、-482T/T 组比野生型-482C/C 组具有较高的 TG 水平 ($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$), -482T/T 组比野生型-482C/C 组具有较高的载脂蛋白 C2 水平 ($P < 0.05$)。HDLc 和载脂蛋白 C3 在野生型-482C/C 组与突变型-482T/T 组之间的差异接近显著性水平 ($P = 0.053$ 和 $P = 0.073$), 而其它血脂水平在这三组基因型之间无显著性差异 (表 1, Table 1)。

以 TG 为因变量, 以年龄、性别、BMI、-482C>T

多态性位点、总胆固醇、HDLc 和 LDLc 为自变量, 以强迫引入法建立多元回归方程, 方程决定系数 (R^2) 等于 0.69, 对方程检验 $F = 87.662$, $P = 0.000$, 有统计学意义。提示-482C>T 位点明显与 TG 水平密切相关 (表 2, Table 2), 也与载脂蛋白 C3、载脂蛋白 C2 及 HDLc 密切相关 (具体数据没有列出)。

3 讨论

载脂蛋白 C3 通过抑制血管内皮细胞表面的脂蛋白脂肪酶以及肝脂酶等酶和受体的活性来影响血浆富含 TG 脂蛋白的代谢^[1,2]。如果载脂蛋白 C3 表达失控就会累及脂蛋白脂肪酶等, 从而使得 CM 和 VLDL 脂解的速度改变, 影响血浆 TG 的水平。-482T 等位基因的携带者会具有较高的 TG 水平,

表 1. 载脂蛋白 C3- 482C> T 基因多态性与血浆脂质的关系
Table 1. Relationship between the polymorphism of apolipoprotein C3 gene - 482C> T and the levels of serum lipids ($\bar{x} \pm s$)

指标	CC (n= 86)	CT (n= 145)	TT (n= 62)
年龄 (岁)	44 ±20	45 ±20	45 ±19
总胆固醇 (mg/dL)	180 ±41	175 ±41	188 ±50
TG (mg/dL)	141 ±107	152 ±108 ^a	208 ±222 ^b
HDLc (mg/dL)	55 ±15	50 ±18	49 ±13
LDLc (mg/dL)	99 ±33	98 ±33	106 ±36
载脂蛋白 A1 (mg/dL)	132 ±19	127 ±23	128 ±120
载脂蛋白 A2 (mg/dL)	26 ±9	29 ±11	29 ±10
载脂蛋白 B (mg/dL)	82 ±24	85 ±25	88 ±23
载脂蛋白 C2 (mg/dL)	3.2 ±2.2	3.7 ±2.5	4.5 ±2.7 ^a
载脂蛋白 C3 (mg/dL)	8 ±3	8 ±3	9 ±3
载脂蛋白 E (mg/dL)	4.0 ±1.2	4.1 ±1.3	4.5 ±1.7
脂蛋白(a) (mg/dL)	11 ±12	13 ±12	14 ±31
体质指数 (kg/m ²)	23 ±4	23 ±6	24 ±4

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与 CC 基因型比较。

表 2. 多元回归分析

Table 2. Multiple regression analysis

影响因素	标准化系数
年龄	- 0.06 ^a
1= 男性, 2= 女性	0.014 ^a
- 482C/T	0.07 ^b
BMI	0.10 ^b
总胆固醇	1.39 ^c
HDLc	- 0.56 ^c
LDLc	- 1.10 ^c

a: $P > 0.05$; b: $P < 0.05$; c: $P < 0.001$

- 482C> T 位点是位于载脂蛋白 C3 基因上游调控区 IRE 中的一个位点, 该位点突变常常使得餐后血糖、胰岛素、TG 和载脂蛋白 C3 升高。载脂蛋白 C3 过表达后进而抑制脂蛋白脂肪酶活性及肝细胞膜载脂蛋白 E 受体, 最终使 VLDL 及 CM 等富含 TG 的颗粒分解代谢减慢, 血浆 TG 水平明显升高。有人报道患有重度高 TG 血症的患者常伴有载脂蛋白 C3 含量的明显升高^[14]。在我们的研究中 - 482T 等位基因的携带者同时具有较高的载脂蛋白 C3 水平和较高的血浆 TG 水平。

在一些研究当中载脂蛋白 C3 基因 - 482C> T 多态性位点与血脂之间的关系和我们的研究结果一致。Talmud 等^[6] 的研究中载脂蛋白 C3 基因

- 482C> T 多态性位点与血浆 TG 的关系非常密切, 他们认为在载脂蛋白 C3/A4/A5 这个基因簇中载脂蛋白 C3 基因 - 482T 是主要的升高 TG 的等位基因之一; Waterworth 等^[7] 的研究不仅证实载脂蛋白 C3 基因 - 482C> T 多态性位点与血浆 TG 的关系非常密切, 而且进一步指出该多态性位点与吸烟相互作用, 该位点不能独立影响血浆 TG 水平, 只有考虑上与吸烟的相互作用该位点影响 TG 的作用才能体现。Jaroslav 等^[9] 在研究捷克人群时发现不同性别人群中 - 482C> T 位点对 TG 的影响也不一样, 男性人群中 - 482T 纯合子携带者会具有最高的血浆 TG 水平。

而在一些研究当中载脂蛋白 C3 基因 - 482C> T 多态性位点和 TG 之间的关系, 和我们的结果不一致。Groenendijk 等^[11] 在研究一组来自荷兰的家族性混合高 TG 血症家系时得到的确是载脂蛋白 C3 基因 - 482C> T 多态性位点与血脂的各种参数之间并没有明显关系。并且 Shoulders 等^[12] 在研究意大利的 11~ 13 岁的学生时也证实载脂蛋白 C3 基因 - 482C> T 多态性位点与血浆 TG 及载脂蛋白 C3 的水平没有明显关系。

为什么会有这些差异呢? 我们考虑主要有这样几方面的原因, 一是在不同的人群中, 遗传背景差异很大, 载脂蛋白 C3 基因 - 482C> T 多态性位点与血浆脂质的关系可能在不同的人群中作用强度不同; 二是可能受饮食习惯以及居住环境等因素的影响, 削弱或者加强了该位点的作用; 三是取样大小、年龄结构、性别组成以及统计方法的选择也会对结果造成很大的影响。基于以上因素的综合考虑, 不同研究课题组的这些相似甚至相反的结论都是有可能的, 要想进一步证实载脂蛋白 C3 基因 - 482C> T 多态性位点与血浆脂质的关系, 需要大人群、多种族、不同的统计方法再加以证实, 总之揭开谜底仍有待于日后的不懈努力。

传统的聚合酶链反应 - 限制片段多态性检测方法已经得到了广泛应用, 它和近年发展起来的 PCR 产物直接测序的手段遥相呼应, 这两种检测手段的结合使用使多态性检测的可靠性大大提高。本研究为确保检测结果的真实性、客观性与可靠性, 我们结合使用了这两种方法, 同时为进一步提高结果的客观性, 电泳结果与测序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。

我们在阅读近几年与载脂蛋白 C3 基因 - 482C> T 多态性位点有关的文献时发现了一些小问题, 提出来仅供大家参考, 在文献^[11, 15, 16] 中在引

物的设计上或者引物方向搞错抑或出现引物碱基与美国国立生物技术信息中心提供的序列不配对的情况。到底是人种的遗传背景差异还是当初提供序列的研究人员的疏忽,抑或者文章在编排时的丢落,我们不得而知。但不管是哪种情况我们都提醒大家注意在引用参考文献时请认真鉴别、多方比较,以免给您的后续研究造成不便。

[参考文献]

- [1] Jong MC, Hofker MH, Havekes LM. Role of ApoCs in lipoprotein metabolism: functional differences between ApoC1, ApoC2, and ApoC3. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999, **19** (3): 472-484
- [2] 王琳芳, 杨克恭 (主编). 医学分子生物学原理. 北京: 高等教育出版社, 2001; 7
- [3] 曾武威, 陈保生. 载脂蛋白 E 基因多态性与高血脂症的相关性研究. *中国动脉硬化杂志*, 1996, **4** (3): 185-189
- [4] 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*, 2004, **12** (2): 229-232
- [5] 李国平, 王建跃, 鄢盛恺, 张立军, 薛红, 曾武威, 等. 载脂蛋白 A5 基因多态性位点 S19W 与人血浆甘油三酯的关系. *中国动脉硬化杂志*, 待发表
- [6] Talmud PJ, Have E, Martin S, Olivier M, Miller GJ, 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] Waterworth DM, Talmud PJ, Bujac SR, Fisher RM, Miller GJ, Humphries SE. The contribution of apoC3 gene variants to the determination of triglyceride levels and interaction with smoking in middle-aged men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, **20**: 2 663-669
- [8] Hegele RA, Connelly PW, Hanley AJ, Sun F, Harris SB, Zinman B. Common genomic variation in the APOC3 promoter associated with variation in plasma lipoproteins. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 1997, **17**: 2 753-758
- [9] Hubacek JA, Waterworth DM, Poledne R, Pitha J, Skodova Z, Humphries SE, et al. Genetic determination of plasma lipids and insulin in the Czech population. *Clinical Biochemistry*, 2001, **34** (2): 113-118
- [10] Miller M, Rhyne J, Khatta M, Parekh H, Zeller K. Prevalence of the APOC3 promoter polymorphisms T-455C and C-482T in Asiatr Indians. *The American Journal of Cardiology*, 2001, **87** (2): 220-221
- [11] Groenendijk M, Cantor RM, Blom NH, Rotter JL, de Bruin TW, Dallinger-Thie GM. Association of plasma lipids and apolipoproteins with the insulin response element in the apoC-III promoter region in familial combined hyperlipidemia. *J Lipid Res*, 1999, **40**: 1 036-044
- [12] Shoulders CC, Grantham TT, North JD, Gaspardone A, Tomai F, de Fazio A, et al. Hypertriglyceridemia and the apolipoprotein C3 gene locus: lack of association with the variant insulin response element in Italian school children. *Hum Genet*, 1996, **98** (5): 557-566
- [13] 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
- [14] Shoulders CC, Harry PJ, Lagrost L, White SE, Shah NF, North JD, et al. Variation at the apo AI/CIII/AIV gene complex is associated with elevated plasma levels of apo CIII. *Atherosclerosis*, 1991, **87**: 239-247
- [15] Waterworth DM, Hubacek JA, Pitha J, Kovar J, Poledne R, Humphries SE, et al. Plasma levels of remnant particles are determined in part by variation in the APOC3 gene insulin response element and the APOCF/APOE cluster. *J Lipid Res*, 2000, **41**: 1 103-109
- [16] Waterworth DM, Ribalta J, Nicaud V, Dallongeville J, Humphries SE, Talmud P. ApoCIII gene variants modulate postprandial response to both glucose and fat tolerance tests. *Circulation*, 1999, **99**: 1 872-877

(此文编辑 文玉珊)

读者·作者·编者·

作者申明

刊发在《中国动脉硬化杂志》第 13 卷第 2 期第 203~ 206 页的文章中,通讯作者刘芳的工作单位更改为病毒学国家重点实验室 武汉大学生命科学学院,湖北省武汉市 430072,第四作者胡汉林应为胡汉宁。

以上为原稿所提供,非编排错误。特此申明。