

中国人内源性高甘油三酯血症与载脂蛋白 A5 基因 - 1131T> C 多态性、S19W 多态性的相关性

汤轶波¹, 顾丽萍², 孙屏¹, 郭冬平¹, 李晓宇¹, 陈琪¹, 范乐明¹

(1. 南京医科大学动脉粥样硬化研究中心, 江苏省南京市 210029; 2. 张家港市第一人民医院检验科, 江苏省张家港市 215600)

[关键词] 病理学与病理生理学; 内源性高甘油三酯血症与载脂蛋白 A5 基因多态性相关; 聚合酶链反应-限制片长多态性; 甘油三酯; 单核苷酸多态性; 血脂代谢; 动脉粥样硬化

[摘要] 目的 探讨中国人内源性高甘油三酯血症患者载脂蛋白 A5 基因的 - 1131T> C 多态性及 S19W 多态性与血脂水平的关系。方法 用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性分析, 对 182 名内源性高甘油三酯血症患者及 200 名血脂正常者的载脂蛋白 A5 基因启动子上游 - 1131T> C 单核苷酸多态性、编码区的 S19W(c. 56C> G) 多态性、空腹血脂及载脂蛋白水平进行分析。结果 患者的体质指数、血清总甘油三酯和总胆固醇水平较对照组显著升高, 高密度脂蛋白胆固醇水平则显著降低。- 1131T/C 单核苷酸多态性位点 T 和 C 等位基因频率在病例组和对照组分别为 52.7%、47.3% 和 67.0%、33.0%。等位基因频率和基因型频率分布符合 Hardy-Weinberg 平衡定律。T/C 基因多态性等位基因 T 和 C 频率在两组间的差异有显著性($P < 0.05$); S19W 多态性与内源性高甘油三酯血症发病风险未见明显相关性。结论 载脂蛋白 A5 基因 - 1131C 等位基因与血清甘油三酯的升高相关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Association of Apolipoprotein A5 gene - 1131T> C and S19W Polymorphisms with the Endogenous Hypertriglyceridemia in Chinese

TANG Yi-Bo, GU Li-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] Triglyceride; Single Nucleotide Polymorphism; Lipid Metabolism; Atherosclerosis; Endogenous Hypertriglyceridemia; Association Study; Apolipoprotein A5

[ABSTRACT] Aim To investigate the relationship between apolipoprotein A5 gene - 1131T> C polymorphism, S19W polymorphism and the serum lipid levels in Chinese patients with endogenous hypertriglyceridemia. Methods The restriction fragment length polymorphism (RFLP) of - 1131T> C and S19W was studied using polymerase chain reaction (PCR) in 200 healthy subjects and 182 subjects with endogenous hypertriglyceridemia from a population of Chinese Han nationality in Jiangsu Province. Results The frequencies of T, C alleles of - 1131T> C polymorphism were 52.7%, 47.3% and 67.0%, 33.0% in HTG group and control group, respectively. There were significant differences in allele frequencies between HTG group and control group ($P < 0.05$). The relationship between S19W polymorphism and the disease risk was not found. Conclusion C allele of apolipoprotein A5 - 1131T> C polymorphism is associated with higher serum TG.

近年来的研究发现除了环境因素以外, 遗传因素包括多种基因的变异与内源性高甘油三酯血症 (endogenous hypertriglyceridemia, HTG) 的发病也密切相关。载脂蛋白 A5 (apolipoprotein A5, apoA5) 基因是 Pennacchio 等^[1]发现的一种新的载脂蛋白基因, 位于人类染色体 11q23, 与载脂蛋白 A1/C3/A4 基因

簇相距约 30 kb^[2]。功能研究表明, 载脂蛋白 A5 可使血浆甘油三酯 (triglyceride, TG) 水平降低^[3]。最近对国人载脂蛋白 A5 S19W (c. 56C> G) 多态性和 TG 水平的相关性作过分析, 但未能建立两者间的相关性^[4]。本文对载脂蛋白 A5 基因 - 1131T> C (SNP3) 及 S19W 多态性及其与血脂水平的关系进行了研究。

[收稿日期] 2005-03-07

[修回日期] 2005-10-26

[基金项目] 国家 863 高科技研究发展计划资助项目 (2002BA711A08)

[作者简介] 汤轶波, 硕士研究生, 研究方向为脂代谢的分子机制, 联系电话为 025-86862967, E-mail 为 souptyb@hotmail.com。通讯作者 范乐明, 教授, 博士研究生导师, 主要从事动脉粥样硬化病理生理学分子机制和基因治疗方面的研究, 联系电话为 025-86862888, E-mail 为 lmfan@njmu.edu.cn。陈琪, 教授, 博士研究生导师, 主要从事动脉粥样硬化发生分子机制和信号转导方面的研究。

1 对象与方法

1.1 对象

高甘油三酯组为禁食 12 h 后血 TG ≥ 2.30 mmol/L 人群, 共 182 人, 其中男性 99 人, 女性 83 人, 平均 61 ± 11 岁。正常对照组为禁食 12 h 后血

TG < 2.0 mmol/L 人群, 共 200 人, 其中男性 125 人, 女性 75 人, 平均 63 ± 9 岁。382 名研究对象均为江苏省内无血缘关系个体, 属于继发性高脂蛋白血症的个体, 如高血压、糖尿病和内分泌或代谢系统疾病以及进行降脂治疗的个体被排除在外。通过奥林巴斯 2000 全自动生物化学分析仪测定空腹血清 TG、总胆固醇 (total cholesterol, TC)、高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDLC)、低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDLC)、载脂蛋白 A 和载脂蛋白 B 水平。

1.2 基因组 DNA 提取

抽取空腹外周血 5 mL, 用 1 mL 浓度为 0.5 mmol/L EDTA 抗凝, 摇匀, CAS Quick Blood DNA Isolation KIT 抽提 DNA, -20℃ 冻存备用。

1.3 聚合酶链反应扩增及 SNP 位点分析

用 PCR 扩增载脂蛋白 A5 基因位于启动子上游 SNP3 的 287 bp 片段。引物序列设计 Forward: 5'-CCC CAG GAA CTG GAG CGA AAG TT-3', Reverse: 5'-ATG GGC AGG AGT GTG GTA GAA AG-3'。其中 Forward 序列的倒数第二个碱基由 A 变为 T, 由此构建一个 Mse I 酶切位点^[3]。扩增反应在 PTC200 上进行。反应条件为 96℃ 预变性 5 min → 96℃ 30 s → 56℃ 30 s → 72℃ 30 s, 35 个循环, 终末延伸 72℃ 7 min。10 μL PCR 产物与 5 u 限制性核酸内切酶 Mse I (New England Biolabs) 经 37℃ 温育过夜, 用 3% 琼脂糖凝胶电泳分析, 通过 EB 染色紫外灯显色。酶切产物存在 3 种形式: 287 bp 为 CC 纯合子, 265 bp 者和 287 bp 共存的为 TC 型杂合子, 仅见 265 bp 为 TT 纯合子 (图 1, Figure 1)。

对载脂蛋白 A5 的另一多态位点 S19W, PCR 扩增引物序列设计为 Forward: 5'-GCC TTT CCG

TGC CTG GGT GGT-3', Reverse: 5'-TGC TCA CCT GGG CTC TGG CTC-3'。其中 Forward 序列的最后一个碱基由 C 变为 T, 由此构建一个 Taq I 酶切位点^[5]。反应条件为 96℃ 预变性 5 min → 96℃ 30 s → 63.5℃ 30 s → 72℃ 30 s, 35 个循环, 终末延伸 72℃ 7 min。10 μL PCR 产物与 10 u 限制性核酸内切酶 Taq I (Takara Biotech) 经 65℃ 温育过夜, 电泳鉴定酶切产物 3 种形式: 174 bp 为 WW 纯合子, 154 bp 和 174 bp 共存的为 SW 型杂合子, 仅存 154 bp 者为 SS 纯合子。

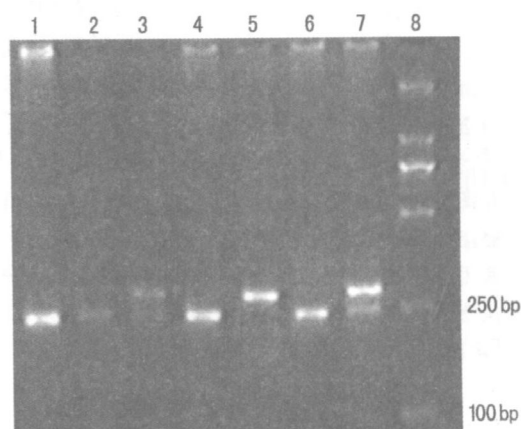


图 1. -1131T> C 多态位点聚合酶链反应扩增后 Mse I 酶切结果 3 和 7 为 TC 杂合子; 5 为 CC 纯合子; 1、2、4 和 6 为 TT 纯合子; 8 为 DL2000 Marker。

Figure 1. RFLP analysis result of apoA5 - 1131T> C locus

1.4 突变序列测定

对 -1131T> C 多态性, 将 TT 型和 CC 型进行 DNA 序列测定。测序图谱 (图 2, Figure 2) 显示 PCR 产物中 (反义链) 箭头所指处, 碱基 A 突变为 G (即互补链中 T 突变为 C), 与酶切结果一致。

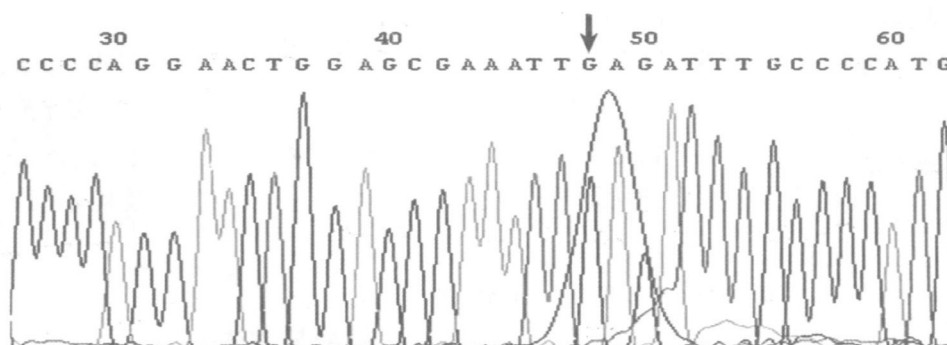


图 2. CC 型纯合子聚合酶链反应产物测序图谱

Figure 2. Result of apoA5 - 1131CC homozygote sequencing

1.5 统计学处理

通过 SPSS12.0 软件包对数据进行分析。对主要数据进行正态性检验,符合正态分布的数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。用 χ^2 检验对基因型频率的 H-W 连锁平衡进行检验。组间血脂及载脂蛋白水平比较用 t 检验。组间等位基因频率用四格表检验。 $P < 0.05$ 为差异有显著性。用 Logistic 回归模型判断基因型对发病危险度的影响,计算出 OR 及 95% CI,以 OR 的 95% CI 不包含 1 为差异具有显著性。

2 结果

2.1 各组一般资料及血脂水平的比较

与对照组比较,HTG 组体质指数较大,血清 TG 水平明显升高($P = 0.000$),TC 水平也有升高($P = 0.002$),而 HDLC 水平则降低($P = 0.000$)。年龄、性别、LDLC、载脂蛋白 A 及载脂蛋白 B 在两组间差异没有显著性(表 1, Table 1)。

表 1. 高甘油三酯组和正常对照组之间一般资料和血脂水平的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1. Baseline characteristics and Serum lipid levels of HTG and control groups

| 指 标 | 正常对照组 | 高甘油三酯组 |
|---------------------------|-----------------|------------------------------|
| 年龄 (岁) | 63 \pm 9 | 61 \pm 11 |
| 性别 (男性个数) | 125 | 99 |
| 体质指数 (kg/m ²) | 24.2 \pm 2.8 | 25.5 \pm 2.9 ^a |
| 甘油三酯 (mmol/L) | 1.36 \pm 0.43 | 3.37 \pm 1.74 ^b |
| 胆固醇 (mmol/L) | 4.59 \pm 1.17 | 4.98 \pm 1.20 ^c |
| 高密度脂蛋白 (mmol/L) | 1.20 \pm 0.24 | 0.99 \pm 0.31 ^d |
| 低密度脂蛋白 (mmol/L) | 2.72 \pm 0.93 | 2.74 \pm 0.92 |
| 载脂蛋白 A (g/L) | 1.32 \pm 0.36 | 1.20 \pm 0.28 |
| 载脂蛋白 B (g/L) | 0.86 \pm 0.25 | 0.93 \pm 0.22 |

a: $P = 0.000$; b: $P = 0.000$; c: $P = 0.002$; d: $P = 0.000$ 。

2.2 各组等位基因频率的比较

- 1131T> C 多态位点在 HTG 组中 T 和 C 等位基因频率分别为 52.7% 和 47.3%,而在对照组中以 T 等位基因为主,T 和 C 等位基因频率分别为 67.0% 和 33.0%;HTG 组中 C 等位基因频率显著高于对照组($P = 0.000$)。S19W 多态位点在 382 例成功扩增的个体中,几乎全部为野生型,仅在 HTG 组发现 1 例 19WW 纯合子,对照组中发现 1 例 19SW 杂合子。由于没有统计学差异,故对此数据不作分析。

2.3 各组- 1131T> C 多态性各基因型频率分布

在 HTG 组中 T/T、T/C 和 C/C 基因型的频率分

别为 49 (26.9%)、94 (51.6%) 和 39 (21.4%)。在正常对照组中,T/T、T/C 和 C/C 基因型的频率分别为 87(43.5%)、94(47.0%) 和 19(9.5%)。经 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律检验,所有基因型在高甘油三酯组及对照组中均符合遗传平衡,具有群体代表性。与携带- 1131TT 基因型个体相比,携带至少 1 个 C 等位基因的个体(TC 和 CC 基因型)其血清 TG 升高的危险性在校正了年龄、性别和体质指数后升高了 2.27 倍(95% CI= 1.37~ 3.77)。

2.4 对照组不同基因型间血脂水平的比较

高甘油三酯组中个体的基础血脂水平较高,比较不同基因型间血脂水平时,未发现达到统计学意义上的差异。如表 2(Table 2)所示,在正常对照组人群中携带了至少 1 个 C 等位基因的个体(TC 和 CC 基因型),其 TG 水平较 TT 基因型个体高($P = 0.002$)。TC、HDLC、LDLC 和载脂蛋白 A 水平在两对照人群之间差异没有显著性($P = 0.219$ 、 $P = 0.554$ 、 $P = 0.345$ 、 $P = 0.650$)。载脂蛋白 B 水平在 TC 和 CC 基因型个体中较 TT 基因型个体低($P = 0.009$)。

表 2. 对照组各基因型间血脂水平的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2. Lipid profiles of control group according to - 1131T > C genotypes

| 指 标 | TT (87) | TC+ CC (113) |
|-----------------|-----------------|------------------------------|
| 胆固醇 (mmol/L) | 4.70 \pm 1.21 | 4.50 \pm 1.14 |
| 甘油三酯 (mmol/L) | 1.26 \pm 0.40 | 1.45 \pm 0.43 ^a |
| 低密度脂蛋白 (mmol/L) | 2.78 \pm 0.99 | 2.66 \pm 0.87 |
| 高密度脂蛋白 (mmol/L) | 1.21 \pm 0.25 | 1.19 \pm 0.22 |
| 载脂蛋白 A (g/L) | 1.30 \pm 0.33 | 1.32 \pm 0.39 |
| 载脂蛋白 B (g/L) | 0.92 \pm 0.27 | 0.82 \pm 0.22 ^b |

a: $P = 0.002$; b: $P = 0.009$ 。

3 讨论

载脂蛋白 A5 基因是应用小鼠和人的比较基因组学和功能基因组学方法发现的,与载脂蛋白 A1、C3 和 A4 紧密相邻成簇位于 11q23。研究表明载脂蛋白 A5 具有降低血浆甘油三酯水平的功能,载脂蛋白 A5 敲除小鼠相对于野生型小鼠血浆 TG 水平提高 4 倍,而转基因小鼠 TG 水平仅有对照水平的 1/3 左右。在大样本人群研究中也发现载脂蛋白 A5 的基因变异极大的影响着血清 TG 的水平^[6,7]。载脂蛋白 A5 降低血清 TG 水平的确切作用机制还不清晰,但研究发现在小鼠部分肝切除后肝脏早期再生的过程中载脂蛋白 A5 水平有上调,提示载脂蛋

白 A5 在调控 TG 分泌方面可能发挥着部分作用^[8]。最新研究也提示载脂蛋白 A5 可能参与了肝细胞对极低密度脂蛋白的合成或分泌^[5,9], 这可能可以对载脂蛋白 A5 的这一功能作出部分解释。

本研究主要分析载脂蛋白 A5 SNP3 (-1131T>C) 多态性与 HTG 的相关性。SNP3 虽然存在于载脂蛋白 A5 基因的启动子部位, 但在载脂蛋白 A5 启动子上游并没有发现确切的转录因子结合位点, 因此可能 SNP3 本身并不直接影响载脂蛋白 A5 基因的表达进而影响血浆 TG 的水平。由于 SNP3 与其它位点存在着连锁不平衡 (Linkage disequilibrium, LD), 例如新近有报告 SNP3 与 SNP1 (c.1259T>C)、SNP2 (IVS3+476G>A)、S19W 以及邻近的载脂蛋白 A1/C3/A4 基因簇的相关位点都存在着强烈的 LD^[6], 因而有认为 SNP3 可作为基因簇上其他功能性变化的标记物^[10], 从而与较高的 TG 水平相关联。我们的研究发现, HTG 组中突变的 C 等位基因频率显著高于正常对照组 ($P = 0.000$)。在正常对照组中也发现携带 C 等位基因的个体较野生型 -1131T/T 个体有更高的血浆 TG 水平 ($P = 0.002$), 表明 SNP3 中的 C 等位基因确实与高 TG 水平相关。此外, 在对研究对象的性别、年龄及体质指数进行校正调整后, 携带 C 等位基因的个体其血清 TG 升高的危险性比不携带 C 等位基因的个体提高了 2.27 倍 (95% CI = 1.37~3.77)。进一步证明载脂蛋白 A5 的 SNP3 是中国人中高甘油三酯血症的遗传性危险因素。

在我们的研究中还发现, 对照组中携带 C 等位基因的个体, 其 HDLC 水平与 T/T 基因型个体相比并没有明显的降低 ($P = 0.554$)。这与 Pennacchio 等^[1]曾报导 T/C 型和 T/T 型个体之间 HDLC 水平没有明显的统计学差异相一致, 在西班牙的大样本研究中^[11]以及对日本成年人的研究中^[13]也得到了相类似的结论。但 Endo 等^[12]在日本学龄儿童中的研究发现 T/C 基因型的个体 HDLC 水平比 T/T 型个体 HDLC 水平低了 5.2%。而 C/C 型个体则比后者低了 6.8%, 差异有显著性。Talmud 等^[6]在正常的英国人群中也发现了 C 等位基因与 HDLC 有临界的统计学关联。由于 HDLC 被认为在胆固醇逆向转运中发挥作用, 是动脉粥样硬化的保护因子, 因此, 是否载脂蛋白 A5 SNPs3 有可能通过降低了血清 HDLC 水平进而影响了血脂谱, 最终导致高脂血症和冠心病的发生, 还需要有更多的研究来验证。

我们也对载脂蛋白 A5 S19W 多态位点也进行了 PCR 扩增及 Taq I 酶切鉴定。该多态位点是由于

编码区第 56 位的碱基发生突变 (C \rightarrow G) 使第 19 位的氨基酸发生错义突变 (丝氨酸 \rightarrow 色氨酸)。在白种人中的研究曾确认 S19W 变异与 TG 水平的变化有明显的关联^[6], 但在我们的研究中仅发现了 1 例 WW 纯合子和 1 例 SW 杂合子, 由于没有统计学差异而无法建立这个位点与血脂水平的相关性。Lai 等^[13]在对 2 711 例新加坡华裔人群中的研究发现该位点的突变频率小于 5%, 而李国平等^[4]在 468 例中国人群的研究中也仅发现了 1 例突变型杂合子, 可见这一多态位点由于遗传背景的差异, 在中国人群中的突变频率确实很低。中国人群中是否还存在其他与 HTG 相关联的载脂蛋白 A5 多态位点以便构成更有价值的单倍型, 是值得进一步探索的课题。

[参考文献]

- [1] 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
- [2] Pennacchio LA, Rubin EM. Apolipoprotein A5, a newly identified gene that affects plasma triglyceride levels in humans and mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, **23** (4): 529-534
- [3] Nabika T, Nasreen S, Kobayashi S, Masuda J. The genetic effect of the apolipoprotein AV gene on the serum triglyceride level in Japanese. *Atherosclerosis*, 2002, **165** (2): 201-204
- [4] 李国平, 王建跃, 鄢盛恺, 张立军, 薛红, 曾威武, 等. 人载脂蛋白 A5 基因多态性 56C>G 与血浆甘油三酯的关系. *中国动脉硬化杂志*, 2004, **12** (5): 574-576
- [5] Beckstead JA, Oda MN, Martin DD, Forte TM, Bielicki JK, Berger T, et al. Structure-function studies of human apolipoprotein A-V: a regulator of serum lipid homeostasis. *Biochemistry*, 2003, **42** (31): 9 416-423
- [6] Talmud PJ, Hawe 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] Evans D, Buchwald A, Beil FU. The single nucleotide polymorphism -1131T>C in the apolipoprotein A5 (APOA5) gene is associated with elevated triglycerides in patients with hyperlipidemia. *J Mol Med*, 2003, **81** (10): 645-654
- [8] Van der Vliet HN, Samuels MG, Leegwater AC, Levels JH, Reitsma PH, Boers W, et al. Apolipoprotein AV: a novel apolipoprotein associated with a nearly phase of liver regeneration. *J Biol Chem*, 2001, **276** (48): 44 512-520
- [9] Weinberg RB, Cook VR, Beckstead JA, Martin DD, Gallagher JW, Shelness GS, et al. Structure and interfacial properties of human apolipoprotein A-V. *J Biol Chem*, 2003, **278** (36): 34 438-444
- [10] Prieur X, Coste H, Rodriguez JC. The human apolipoprotein AV gene is regulated by peroxisome proliferator-activated Receptor and contains a novel farneroid X-activated receptor response element. *J Biol Chem*, 2003, **278** (28): 25 468-480
- [11] Ribalta J, Figuera L, Fernandez-Ballart J, Vilella E, Castro Cabezas M, Masana L, et al. Newly identified apolipoprotein AV gene predisposes to high plasma triglycerides in familial combined hyperlipidemia. *Clin Chem*, 2002, **48** (9): 1 597-600
- [12] Endo K, Yanagi H, Araki J, Hirano C, Yamakawa-Kobayashi K, Tomura S. Association found between the promoter region polymorphism in the apolipoprotein A-V gene and the serum triglyceride level in Japanese schoolchildren. *Hum Genet*, 2002, **111** (1): 570-572
- [13] Lai CQ, Tai ES, Tan CE, Cutter J, Chew SK, Zhu YP, et al. The apolipoprotein A5 locus is a strong determinant of serum triglyceride concentrations across ethnic groups in Singapore. *J Lipid Res*, 2003, **44** (12): 2 365-373

(此文编辑 朱雯霞)