

[文章编号] 1007-3949(2005)14-01-0067-03

• 流行病学研究 •

## 胆固醇酯转运蛋白 D<sup>442</sup>→G 突变对 高密度脂蛋白胆固醇水平的影响

曹海燕<sup>1</sup>, 刘欣<sup>2</sup>, 薛春兰<sup>1</sup>, 解用虹<sup>2</sup>

(天津医科大学 1. 化学教研室, 2. 生物化学教研室, 天津市 300070)

[关键词] 分子生物学; 胆固醇酯转运蛋白基因突变; 聚合酶链反应限制片段多态性; 胆固醇酯转运蛋白; 基因突变; 高密度脂蛋白胆固醇; 等位基因频率

[摘要] 目的 探讨胆固醇酯转运蛋白 D<sup>442</sup>→G 变异对国人血脂水平的影响。方法 收集天津地区 189 例健康人群, 检测其血脂水平, 并应用聚合酶链反应限制片段多态性分析方法对胆固醇酯转运蛋白 D<sup>442</sup>→G 突变进行检测。结果 高密度脂蛋白胆固醇水平较高组与对照组 D<sup>442</sup>→G 等位基因频率分别为 6.03% 和 1.53%, 具有统计学差异 ( $P < 0.05$ )。D<sup>442</sup>→G 基因变异携带组高密度脂蛋白胆固醇水平显著高于对照组 ( $P < 0.01$ ), 其它血脂水平无显著性差异。结论 胆固醇酯转运蛋白第 15 外显子 D<sup>442</sup>→G 突变与高密度脂蛋白胆固醇水平升高密切相关。

[中图分类号] Q7

[文献标识码] A

### Effect of the Mutation D<sup>442</sup>→G in Cholesteryl Ester Transfer Protein Gene on the Level of Serum High Density Lipoprotein Cholesterol

CAO Hai-Yan<sup>1</sup>, LIU Xin<sup>2</sup>, XUE Chun-Lan<sup>1</sup>, and XIE Yong-Hong<sup>2</sup>

(1. Department of Chemistry, 2. Department of Biochemistry, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

[KEY WORDS] Cholesteryl Ester Transfer Protein; Gene Mutation; High Density Lipoprotein Cholesterol; Allelic Frequencies; Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism

[ABSTRACT] **Aim** To study the effect of the mutation D<sup>442</sup>→G in cholesteryl ester transfer protein gene on the level of serum high density lipoprotein cholesterol. **Methods** 189 normal subjects were randomly collected, cholesteryl ester transfer protein gene D<sup>442</sup>→G mutation were examined by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP), and the serum lipids of the subjects were determined. **Results** The allelic frequencies of the cholesteryl ester transfer protein 15 D<sup>442</sup>→G in the group (58 subjects) with high density lipoprotein cholesterol  $\geq 1.7$  mmol/L and the control (131 subjects) were 6.03% and 1.53% respectively ( $P < 0.05$ ), the results showed that there was statistical difference between the two groups. The level of high density lipoprotein cholesterol in the group with the cholesteryl ester transfer protein gene exon 15 D<sup>442</sup>→G was higher than the control group ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** Exon 15 D<sup>442</sup>→G mutation in cholesteryl ester transfer protein is related to the elevated level of serum high density lipoprotein cholesterol.

冠心病是目前威胁人类健康的一种常见慢性病, 流行病学研究已充分显示血清高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDLC) 水平与动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 呈显著负相关, 因而对高密度脂蛋白代谢调控因素的研究一直是脂蛋白领域的一个重要内容。人群 HDLC 水平是一受遗传、环境等多因素影响的脂质代谢参数。近年研究显示, 胆固醇酯转运蛋白 (cholesteryl ester transfer protein, CETP) 多种基因异常可引起血浆 CETP 活性下降, 显著影响机体 HDLC 水平<sup>[1,2]</sup>。本研究应用聚合酶链反应限制片段多态性分析方法对 189 例人群 CETP 第 15 外显子 D<sup>442</sup>→G 突变进行检测, 并分析

CETP 基因变异对 HDLC 水平的影响, 以期从分子生物学水平说明 CETP 在 As 发生发展中的作用提供基础数据和参考资料。

### 1 对象与方法

#### 1.1 研究对象

189 例人群由随机收集的一般健康体检人群组成, 彼此无亲缘关系, 以 HDLC  $\geq 1.7$  mmol/L 为界, 分成高 HDLC 组 (HDLC 为  $1.94 \pm 0.12$  mmol/L) 58 例和正常对照组 (HDLC 为  $1.27 \pm 0.24$  mmol/L) 131 例, 两组的年龄、性别构成比无明显差别。

#### 1.2 标本的采集和处理

取空腹肘静脉血 5 mL, 血清用于全自动生物化学仪测定血脂水平; EDTA 抗凝血 (0.5 mol/L) 用 TKM 法提取基因组 DNA。

[收稿日期] 2004-12-27

[修回日期] 2005-11-15

[作者简介] 曹海燕, 硕士, 讲师, 研究方向为分子脂代谢, E-mail 为 caohy@tjmu.edu.cn。刘欣, 硕士, 讲师, 研究方向为分子脂代谢。薛春兰, 硕士, 副教授。

### 1.3 胆固醇酯转运蛋白基因第 15 外显子 D<sup>442</sup>→G 突变检测

采用聚合酶链反应限制片长多态性方法,引物序列和扩增实验步骤参见文献[3];限制片长多态性分析取 PCR 产物 20 μL,加入 MspI 10 u, 10 × buffer 2.5 μL,其余用重蒸水补齐至 25 μL, 37 °C 过夜。酶切产物进行聚丙烯酰胺凝胶(8%)电泳,电压 100 V,待示踪指示剂二甲苯蓝至底部时停止电泳,电泳凝胶用银染方法显色。依据染色凝胶图谱中 DNA 片段 180 bp、150 bp 和 30 bp 的有无和组合,确定 CETP 第 15 外显子 D<sup>442</sup>→G 突变。

### 1.4 统计学方法

计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示,用 Student's *t* 检验比较组间均数的差异, $\chi^2$  比较组间构成的差异。

## 2 结果

### 2.1 胆固醇酯转运蛋白基因第 15 外显子 D<sup>442</sup>→G 突变

电泳图谱中显示 180 bp 一条带者为正常人(D/D),显示 180 bp 和 150 bp 两条带者为突变型杂合子(D/G),显示 150 bp 一条带者为突变型纯合子(G/G),30 bp 条带电泳时未泳出(图 1)。

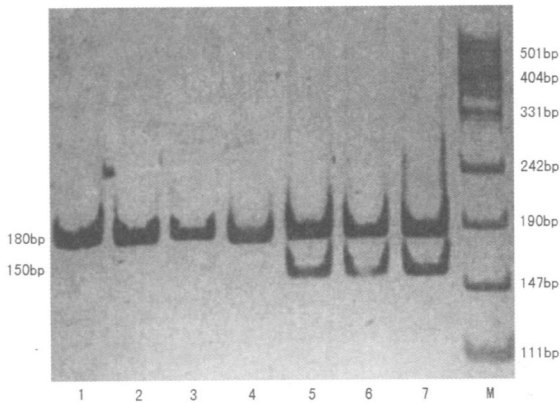


图 1. 胆固醇酯转运蛋白第 15 外显子聚合酶链反应限制片长多态性分析电泳图 1~4 泳道为正常,5~7 泳道为杂合子, M 泳道为 pUC19DNA/MspI 分子量参考标准。

### 2.2 胆固醇酯转运蛋白 D<sup>442</sup>→G 突变基因型分布和等位基因频率

在 58 例高 HDLC 组中发现 7 例(12.07%)杂合子突变,未发现纯合子突变;在 131 例对照组中仅发现 4 例(3.05%)杂合子突变。高 HDLC 人群突变发生率明显高于一般人群( $P < 0.05$ ),见表 1。

### 2.3 胆固醇酯转运蛋白突变基因型与血脂水平

CETP D<sup>442</sup>→G 突变组总胆固醇(total cholesterol,

TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)和低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDLC)水平虽低于非突变组,但无统计学差异;而突变组 HDLC 水平明显高于非突变组( $P < 0.01$ ),见表 2。

表 1. 胆固醇酯转运蛋白 D<sup>442</sup>→G 突变基因型分布和等位基因频率

分 组	例数	纯合子	杂合子	突变频率	突变等位基因频率
对照组	131	0	4	3.05%	1.53%
高 HDLC 组	58	0	7	12.07% <sup>a</sup>	6.03%

a 为  $P < 0.05$ , 与对照组比较。

表 2. 胆固醇酯转运蛋白 D<sup>442</sup>→G 突变组与非突变组血脂水平比较

指 标	突变组 (n= 11)	非突变组 (n= 178)
TC (mmol/L)	4.91 ± 1.29	4.97 ± 1.10
TG (mmol/L)	1.10 ± 0.49	1.30 ± 0.48
HDLC (mmol/L)	1.67 ± 0.24 <sup>a</sup>	1.42 ± 0.32
LDLC (mmol/L)	2.95 ± 0.94	3.28 ± 0.86

a 为  $P < 0.01$ , 与非突变组比较。

## 3 讨论

胆固醇酯转运蛋白(CETP)参与胆固醇逆向转运,调节体内胆固醇酯(cholesteryl ester, CE)和 TG 在脂蛋白间的交换,因此 CETP 是参与高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)代谢和决定血浆 HDLC 水平的重要因素。最新流行病学研究表明,血浆 HDLC 每升高 0.03 mmol/L,患冠心病的危险性即降低 2%~3%<sup>[4]</sup>,故 CETP 功能变化与 As 的关系引起人们的广泛关注<sup>[5]</sup>。

胆固醇酯转运蛋白(CETP)功能主要表现在以下两方面:一方面介导 HDL 中的 CE 由外周组织向肝脏转运,防止外周组织细胞内胆固醇的积蓄,具有抗 As 的作用;另一方面 CETP 在此过程中又引起脂质再分布,即促进胆固醇酯由 HDL 转运到含载脂蛋白 B 族脂蛋白,由此又流入周围细胞,具有致 As 作用,提示 CETP 与 As 的关系十分复杂。CETP 缺陷时,胆固醇逆向转运减弱,CE 主要经 HDL 路径直接回流入肝清除,故 CETP 基因缺陷对减少 As 的发生是有益的。迄今为止已鉴定出 10 多种 CETP 基因变异,家族性遗传变异引起血中 CETP 完全缺乏或极端缺乏可致 HDLC 显著升高,日本的高 α 脂蛋白血症和 CETP 突变异常密切,其作用可高达 61.7%<sup>[6]</sup>,但在人群中二者并不是简单的“负相关”关系。

Kinoshita 等<sup>[7]</sup>的研究表明在健康日本人群中 CETP 与 HDLC 无关。

胆固醇酯转运蛋白(CETP)第 15 外显子 D<sup>442</sup>→G 为 cDNA 第 1506 位碱基 A→G 转换突变,导致第 442 位天冬氨酸(Asp)被甘氨酸(Gly)替代,由于突变位点靠近脂质转运活性中心,故对血浆 CETP 活性和 HDLC 水平影响较大。该突变在亚洲人群中较为常见,中国台湾人群突变等位基因频率可达 4.46%<sup>[8]</sup>,但未见与血脂关系的报道,欧美白人未见此突变报道。本研究以 189 例中国天津人群 CETP 第 15 外显子 D<sup>442</sup>→G 突变与血脂水平的资料探讨和分析了 D<sup>442</sup>→G 突变对 HDLC 水平的影响,首先分析了高 HDLC 组与对照组 D<sup>442</sup>→G 突变的频率分布,继而又比较了 D<sup>442</sup>→G 突变者与非突变者 HDLC 水平的差异,两方面的分析和比较均显示 D<sup>442</sup>→G 突变可能是导致 HDLC 水平升高的重要因素之一。另一方面高 HDL 组 D<sup>442</sup>→G 突变率为 12.07%,比日本高 HDL 人群 18.27% 的突变率<sup>[9]</sup>低,可能和所选择的人群、地域、样本大小等因素有关。综合上述分析,该突变可能减少 As 的发生,但是近来有关较大数量 CETP 基因缺陷调查资料显示<sup>[10]</sup>: CETP 基因缺陷组 HDLC 水平显著高于对照组,冠心病发病率却明显高于对照组。提示 CETP 与 As 的关系十分微妙,呈现双向作用<sup>[5]</sup>, CETP 对其形成和发展的影响可能是通过影响脂代谢的诸多环节而起的作用。

人群 HDLC 水平是受遗传和环境等各种因素协同影响的脂质代谢参数,众多因素<sup>[11]</sup>显示早年人们较多关注的环境因素对 HDLC 水平的影响,至少部分是通过 CETP 的作用实现的。那么如何通过影响 CETP 活性来提高 HDLC 水平(如环境因素、药物研

制),以及进一步加大自然人群、患病人群检测样本,深入分析 CETP 基因缺陷患者脂蛋白结构和功能的变化,对从分子生物学水平揭示 CETP 与 As 的关系有重要意义。

#### [参考文献]

- [1] Maruyama T, Sakai N, Ishigami M, Hirano K, Arai T, Okada S, et al. Prevalence and phenotypic spectrum of cholesteryl ester transfer protein gene in Japanese hyperalphalipoproteinemia[J]. *Atherosclerosis*, 2003, **166** (1): 177-185
- [2] Gudnason V, Kakkola S, Nicaud V, Savolainen MJ, Kesäniemi YA, Tahvanainen E, et al. Cholesteryl ester transfer protein gene effect on CETP activity and plasma high density lipoprotein in European populations[J]. *Eur J Clin Invest*, 1999, **29** (2): 116-128
- [3] 曹海燕, 陈涛, 刘欣, 解用虹. 天津地区国人 CETP 第 15 外显子突变(Asp442-Gly)频率[J]. *天津医科大学学报*, 2000, **6** (3): 268-271
- [4] Ishikawa Y, Ito K, Akasaka Y, Ishii T, Masuda T, Zhang L, et al. The distribution and production of cholesteryl ester transfer protein in the human aortic wall[J]. *Atherosclerosis*, 2001, **156** (1): 29-37
- [5] 曾武威, 陈保生. 胆固醇酯转运蛋白与动脉粥样硬化的关系[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2002, **10** (3): 262-264
- [6] Nagano M, Yamashita S, Hirano K, Ito M, Maruyama T, Ishihara M, et al. Two novel missense mutations in the CETP gene in Japanese hyperalphalipoproteinemic subjects: high-throughput assay by Invader assay[J]. *J Lipid Res*, 2002, **43** (7): 1 011-1018
- [7] Kinoshita M, Teramoto T, Shimazu N, Kaneko K, Ohta M, Koike T, et al. CETP is a determinant of serum LDL-cholesterol but not HDL-cholesterol in healthy Japanese[J]. *Atherosclerosis*, 1996, **120** (1-2): 75-82
- [8] Jap TS, Wu YC, Tso YC, Chiu CY. A novel mutation in the intron1 splice donor site of the cholesteryl ester transfer protein (CETP) gene as a cause of hyperalphalipoproteinemia[J]. *Metabolism*, 2002, **51** (3): 394-397
- [9] Inazu A, Jiang XC, Haraki T, Yagi K, Kamon N, Koizumi J, et al. Genetic cholesteryl ester transfer protein deficiency caused by two prevalent mutations as a major determinant of increased levels of high density lipoprotein cholesterol[J]. *J Clin Invest*, 1994, **94** (5): 1 872-882
- [10] Nagano M, Yamashita S, Hirano K, Takano M, Maruyama T, Ishihara M, et al. Molecular mechanisms of cholesteryl ester transfer protein deficiency in Japanese[J]. *J Atheroscler Thromb*, 2004, **11** (3): 110-121
- [11] Fumeron F, Betoulle D, Luc G, Behague I, Ricard S, Poirier O, et al. Alcohol intake modulates the effect of polymorphism of the cholesteryl ester transfer protein gene on plasma high density lipoprotein and the risk of myocardial infarction[J]. *J Clin Invest*, 1995, **96** (3): 1 664-671

(此文编辑 文玉珊)

• 国家标准选登 •

## 《GB/T 7714-2005 文后参考文献著录规则》附录 B

表 B.1 文献类型和标志代码

文献类型	标志代码	文献类型	标志代码
普通图书	M	报告	R
会议录	C	标准	S
汇编	G	专利	P
报纸	N	数据库	DB
期刊	J	计算机程序	CP
学位论文	D	电子公告	EB